

刘玥, 艾克拜尔·努尔买买提, 叶建荣. 利多卡因调节 Hippo-YAP 信号通路对原位肝移植大鼠缺血再灌注损伤的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 1-8.

Liu Y, Akbar N, Ye JR. Effect of lidocaine regulating the Hippo-YAP signaling pathway on ischemia-reperfusion injury in orthotopic liver transplantation rats [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 1-8.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.001

利多卡因调节 Hippo-YAP 信号通路对原位肝移植大鼠缺血再灌注损伤的影响

刘 玥, 艾克拜尔·努尔买买提, 叶建荣*

(新疆医科大学第一附属医院麻醉科 新疆围术期器官保护重点实验室, 乌鲁木齐 830054)

【摘要】 目的 探究利多卡因(LID)对原位肝移植(OLT)大鼠缺血再灌注损伤的影响,并分析其作用机制。**方法** 随机将 60 只大鼠平均分为维替泊芬(Verteporfin)组、LID 高剂量组、LID 中剂量组、LID 低剂量组、模型组和对照组,除对照组大鼠外的其余大鼠构建 OLT 模型。苏木素-伊红(HE)染色观察肝组织的病理变化,检测血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肝组织炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素(IL)-6、IL-1 β 和 IL-10 水平,荧光探针法检测活性氧(ROS),硫代巴比妥酸显色法检测丙二醛(MDA),氮蓝四唑显色法检测超氧化物歧化酶(SOD),分光光度计法检测谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),原位末端标记法(TUNEL)检测肝组织细胞凋亡,蛋白印迹法(Western blot)检测 Hippo-YAP 信号通路相关蛋白哺乳动物 STE20 样蛋白激酶(MST1)、磷酸化(p)-MST1、大肿瘤抑制因子 1(LATS1)、p-LATS1、Yes 相关蛋白(YAP)、p-YAP 以及凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)表达。**结果** 与对照组相比,模型组大鼠肝组织出现损伤,肝细胞坏死且大量炎性细胞浸润,细胞凋亡率、血清 AST、ALT、TBIL、LDH 活性、肝组织 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MDA、ROS、Bax 水平显著升高,肝组织 IL-10、SOD、GSH-Px 及 Bcl-2、p-MST1/MST1、p-LATS1/LATS1、p-YAP/YAP 蛋白表达降低($P<0.05$);与模型组相比,LID 低、中、高剂量组的肝组织损伤减轻,细胞凋亡率、血清 AST、ALT、TBIL、LDH 活性、肝组织 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MDA、ROS、Bax 水平显著降低,肝组织 IL-10、SOD、GSH-Px 及 Bcl-2、p-MST1/MST1、p-LATS1/LATS1、p-YAP/YAP 蛋白表达的水平显著升高($P<0.05$);Hippo-YAP 信号通路抑制剂 Verteporfin 逆转了 LID 对 OLT 大鼠缺血再灌注损伤的改善作用($P<0.05$)。**结论** LID 可能通过激活 Hippo-YAP 通路,减少炎症反应、氧化应激和肝细胞凋亡,对 OLT 大鼠肝缺血再灌注损伤发挥改善作用。

【关键词】 利多卡因;原位肝移植;缺血再灌注损伤;Hippo-YAP 信号通路;炎症反应;氧化应激;凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0001-08

Effect of lidocaine regulating the Hippo-YAP signaling pathway on ischemia-reperfusion injury in orthotopic liver transplantation rats

LIU Yue, AKBAR Nurmainaiti, YE Jianrong*

(Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University/Xinjiang Key Laboratory of Perioperative Organ Protection, Urumqi 830054, China)

【基金项目】 国家自然科学基金(82060581)。

【作者简介】 刘玥(1986—),女,本科,主治医师,研究方向:麻醉学。E-mail:liuyue1025520@163.com

【通信作者】 叶建荣(1978—),女,博士,主任医师,研究方向:麻醉学。E-mail:616227972@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of lidocaine (LID) on ischemia-reperfusion injury in orthotopic liver transplantation (OLT) rats and to analyze its mechanism of action. **Methods** Sixty rats were randomly divided into Verteporfin group, high-dose LID(High LID), medium-dose LID(Medium LID), low-dose LID(Low LID), Model and Control groups, on average. The rest of the rats except the control rats were used to establish OLT models. Observe the pathological changes in liver tissue were with hematoxylin-eosin staining. Serum aspartate transaminase (AST), total bilirubin (TBIL), lactate dehydrogenase (LDH) activities and alanine transaminase (ALT) were detected. Measure liver tissue levels of proinflammatory factors tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6, IL-1 β , and IL-10 with enzyme-linked immunosorbent assays. Reactive oxygen species (ROS) was detected by a fluorescence probe. Malondialdehyde (MDA) was detected by the thiobarbituric acid colorimetric method. Superoxide dismutase (SOD) was detected by nitrogen blue tetrazole colorimetry. Glutathione peroxidase (GSH-Px) was detected by a spectrophotometry method. Apoptosis of liver histiocytes was detected by in situ end labeling. Detect the expression of mammalian STE20 like protein kinase (MST1), phosphorylation (p)-MST1, large tumor suppressor factor 1 (LATS1), p-LATS1, Yes associated protein (YAP), p-YAP, and apoptosis-related proteins B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) and Bcl-2 related X protein (Bax) with Western blot. **Results** Compared with the Control group, liver tissue in Model group rats showed injury, liver cell necrosis, and a large degree of inflammatory cell infiltration. Moreover, the cell apoptosis rate; serum AST, ALT, TBIL, and LDH activities; and liver tissue levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , MDA, ROS, and Bax were significantly increased. Furthermore, liver tissue levels of IL-10, SOD, GSH-Px, Bcl-2, p-MST1/MST1, p-LATS1/LATS1, and p-YAP/YAP proteins were significantly reduced ($P<0.05$). Compared with the Model group, liver tissue injury was reduced in Low LID, Medium LID, and High LID groups. The cell apoptosis rate; serum AST, ALT, TBIL, and LDH activities; and liver tissue levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , MDA, ROS, and Bax were significantly reduced. Moreover, liver tissue levels of IL-10, SOD, GSH-Px, Bcl-2, p-MST1/MST1, p-LATS1/LATS1, and p-YAP/YAP proteins were significantly increased ($P<0.05$). Hippo-YAP signaling pathway inhibitor verteporfin reversed the improving effect of LID on ischemia-reperfusion injury in OLT rats ($P<0.05$). **Conclusions** LID may activate the Hippo-YAP pathway, which reduces the inflammatory response, oxidative stress, and liver cell apoptosis, and improves liver ischemia-reperfusion injury in OLT rats.

【Keywords】 lidocaine; orthotopic liver transplantation; ischemia-reperfusion injury; Hippo-YAP signaling pathway; inflammatory response; oxidative stress; apoptosis

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

原位肝移植(orthotopic liver transplantation, OLT)被认为是肝癌和终末期肝病的主要治疗方法,由于器官切除、冷保存和缺血再灌注损伤可导致急性 and 慢性排斥反应,进而使移植物功能受损^[1]。缺血再灌注损伤是 OLT 中常见的问题之一,也是影响肝移植成功的关键因素^[2]。因此,探索介导 OLT 患者缺血再灌注损伤的分子机制,对改善 OLT 预后非常重要。利多卡因(lidocaine, LID)是一种酰胺衍生的局部麻醉剂,常用于预防小手术期间的疼痛或缓解损伤后的疼痛,临床上用于治疗心律失常,具有抗炎抗菌特性,已有研究表明 LID 能减轻肺移植术中缺血再灌注损伤引发的炎症和凋亡反应^[3]。Hippo 通路及其下游效应分子 Yes 相关蛋白(Yes associated protein, YAP)通过调节细胞增殖和凋亡,控制器官生长。在哺乳动物肝中, YAP 决定细胞命运和维持内稳态, YAP 的缺失可导致肝细胞凋亡^[4]。已有研究发现,在肝缺血再灌注损伤中通过激活 Hippo-YAP 信号通路可减少肝炎症和肝细胞

死亡^[5],但是 LID 能否通过调节 Hippo-YAP 信号通路发挥对 OLT 大鼠缺血再灌注损伤的保护作用,目前尚不清楚。本研究通过构建 OLT 大鼠模型,探究 LID 的改善作用,并探讨其分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

60 只雄性 SPF 级 SD 大鼠,购买单位为上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2022-0004],饲养单位为新疆医科大学动物实验室[SYXK(新)2023-0004],体重 209~228 g,平均(220.74 $\pm$ 5.17)g,6~8 周龄,适应性饲养大鼠 1 周时间,12 h/12 h 光暗循环,不禁水食,湿度 55%左右,温度 22℃左右。本研究在实验研究过程中遵循了 3R 原则并通过新疆医科大学动物伦理委员会批准(IACUC-2022-238)。

1.2 主要试剂与仪器

盐酸 LID 注射液(四川国瑞药业有限责任公

司,国药准字 H20055048,规格:10 mL:0.2 g);维替泊芬 (Verteporfin,上海源叶生物科技有限公司);苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒 (翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司);原位末端标记法 (*In situ* end labeling, TUNEL) 染色液 (翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司);炎症因子 ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司);氧化应激指标试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司、北京百奥莱博科技有限公司);荧光二抗 (美国 Abcam 公司);一抗哺乳动物 STE20 样蛋白激酶 1 (mammalian STE20 like protein kinase1, MST1)、磷酸化 (phosphorylation, p)-MST1、大肿瘤抑制因子 1 (large tumor suppressor factor 1, LATS1)、p-LATS1、p-YAP、YAP、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 related X protein, Bax)、B 淋巴细胞瘤 2 (apoptosis-related proteins B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 和 β -actin (美国 Abcam 公司);辣根酶标记山羊抗兔二抗 (上海信裕生物科技有限公司)。酶标仪 (奥地利 TECAN 公司);显微镜 (日本尼康公司);全自动生化分析仪 (德国罗氏公司);紫外分光光度计 (上海仪电分析仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型构建、分组和干预

将大鼠随机分为对照组、模型组、LID 低剂量组、LID 中剂量组、LID 高剂量组和 Verteporfin 组 (Hippo-YAP 信号通路抑制剂), 每组 10 只。除对照组外, 其余构建大鼠 OLT 模型^[6], 麻醉大鼠, 腹部切口, 分离肝韧带、门静脉、肝下腔静脉、肝固有动脉, 阻断上述肝血管后, 进入无肝期。通过门静脉向肝注射林格液, 冷灌注 30 min, 肝变为土黄色后去掉血管夹。复通肝血管, 肝转为鲜红色, 预热生理盐水冲洗并关闭腹腔。对照组大鼠只进行腹部切口, 暴露肝后关闭, 不做其他操作。

对各组大鼠造模前 24 h 和造模前 1 h 分别进行药物干预, 其中 LID 低、中、高剂量组腹腔注射 1.25、2.50、5.0 mg/kg LID, Verteporfin 组在 LID 5.0 mg/kg 基础上加 0.8 pmol/kg Verteporfin 注射^[7]。对照组和模型组注射相同剂量生理盐水。

1.3.2 样本采集

各组大鼠造模 24 h 后, 下腔静脉取血, 离心取上清, -80 °C 冰箱中保存; 麻醉处死大鼠, 分离肝组织, 一部分固定于 4% 多聚甲醛中, 其余肝组织在 -80 °C 冰箱中保存。

1.3.3 HE 染色观察肝组织病理变化

采用 4% 多聚甲醛行肝组织固定并进行石蜡包

埋, 准备肝切片, 分离石蜡后行 HE 染色, 用电子显微镜观察肝组织病理学变化并留取图像资料。

1.3.4 生化指标检测

取-80 °C 冰箱中保存的血清, 用生化分析仪检测天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、总胆红素 (TBIL)、乳酸脱氢酶 (LDH) 活性。

1.3.5 炎症因子检测

取-80 °C 冰箱中保存的肝组织, 按照 ELISA 试剂盒说明书, 检测炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素 (IL)-6、IL-1 β 和 IL-10 的水平。

1.3.6 氧化应激指标检测

取-80 °C 冰箱中保存的肝组织, 按照试剂盒说明书, 分别采用荧光探针法检测活性氧 (ROS), 硫代巴比妥酸显色法检测丙二醛 (MDA), 氮蓝四唑显色法检测超氧化物歧化酶 (SOD), 分光光度计法检测谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)。

1.3.7 TUNEL 法检测肝组织细胞凋亡

取大鼠肝组织石蜡切片, 按照 TUNEL 试剂盒说明书染色, 4 °C 孵育过夜, 洗涤后与荧光二抗在 37 °C 下孵育 1 h, 显微镜下观察拍照。

1.3.8 蛋白印迹法 (Western blot) 检测蛋白表达

取-80 °C 冰箱中保存的大鼠肝组织, 浓度定量等步骤后, 进行蛋白 SDS-PAGE 电泳、转膜, 封闭 2 h 后在适宜温度下分别加入一抗 Hippo-YAP 信号通路相关蛋白 MST1 (1 : 1000)、p-MST1 (1 : 1000)、LATS1 (1 : 1000)、p-LATS1 (1 : 1000)、p-YAP (1 : 1000)、YAP (1 : 1000) 以及凋亡蛋白 Bax (1 : 1000)、Bcl-2 (1 : 1000) 和 β -actin (1 : 2000) 孵育, 加二抗山羊抗兔 IgG (1 : 2000) 孵育 2 h。用 Image J 软件分析各条带灰度值。

1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 采用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK-*q* 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LID 对肝组织病理变化的影响

对照组肝组织完整, 未见炎性细胞浸润、肝组织空泡、坏死等; 模型组大鼠出现肝细胞融合坏死、空泡、炎性细胞浸润等现象; LID 治疗后肝组织损伤得到缓解, 肝水肿、液泡化、细胞坏死比例下降, 炎

性细胞减少,且有剂量依赖性;Verteporfin 可逆转 LID 对肝细胞损伤的改善。见图 1。

2.2 LID 对生化指标的影响

与模型组相比,LID 低、中、高剂量组血清 AST、ALT、TBIL、LDH 活性显著下降,且 LID 各组间呈剂量依赖性 ($P<0.05$);模型组比对照组、Verteporfin 组比 LID 高剂量组血清 AST、ALT、TBIL、LDH 活性更高($P<0.05$)。见图 2。

2.3 LID 对炎症因子的影响

与模型组大鼠相比,LID 低、中、高剂量组大鼠肝组织中炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著降低,IL-10 水平显著升高,且 LID 各组间呈剂量依赖性 ($P<0.05$);模型组比对照组、Verteporfin 组比 LID 高剂量组肝组织中炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平更高,IL-10 水平更低 ($P<0.05$)。见图 3。

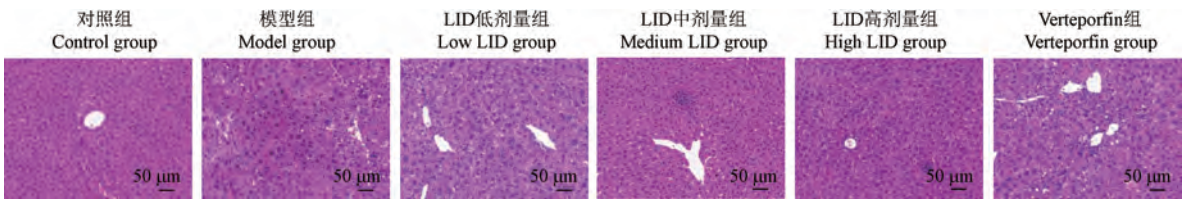
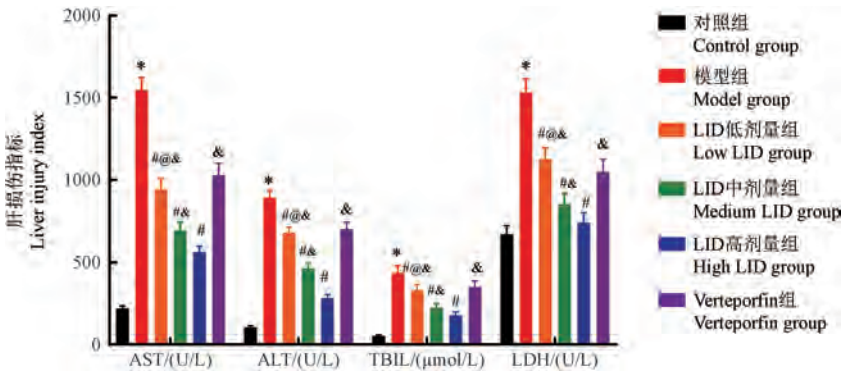


图 1 大鼠肝组织病理变化
Figure 1 Pathological changes of rat liver tissue

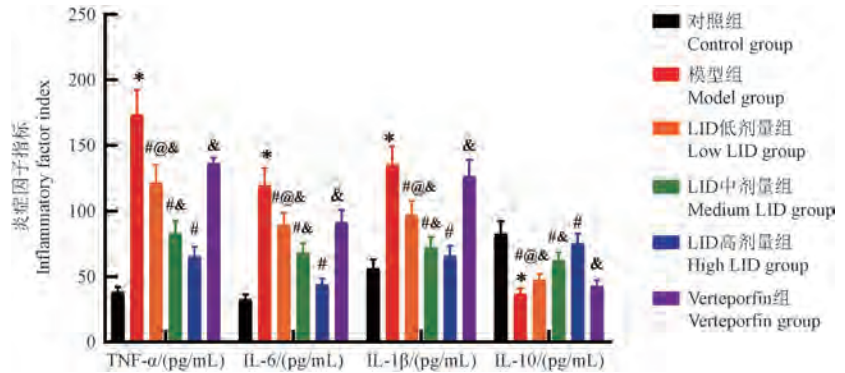


注:与对照组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$;与 LID 中剂量组比较, @ $P<0.05$;与 LID 高剂量组比较, & $P<0.05$ 。

图 2 各组大鼠生化指标比较($n=10$)

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Model group, # $P<0.05$. Compared with Medium LID group, @ $P<0.05$. Compared with High LID group, & $P<0.05$.

Figure 2 Comparison of biochemical indexes of rats in each group



注:与对照组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$;与 LID 中剂量组比较, @ $P<0.05$;与 LID 高剂量组比较, & $P<0.05$ 。

图 3 各组大鼠炎症因子比较($n=10$)

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Model group, # $P<0.05$. Compared with Medium LID group, @ $P<0.05$. Compared with High LID group, & $P<0.05$.

Figure 3 Comparison of inflammatory factors in rats of each group

2.4 LID 对氧化应激指标的影响

与模型组相比,LID 低、中、高剂量组的肝组织 MDA、ROS 水平显著降低,SOD、GSH-Px 显著升高,且 LID 各组间呈剂量依赖性($P<0.05$);模型组比对照组、Verteporfin 组比 LID 高剂量组的肝组织 MDA、ROS 水平更高,SOD、GSH-Px 水平更低($P<0.05$)。见图 4。

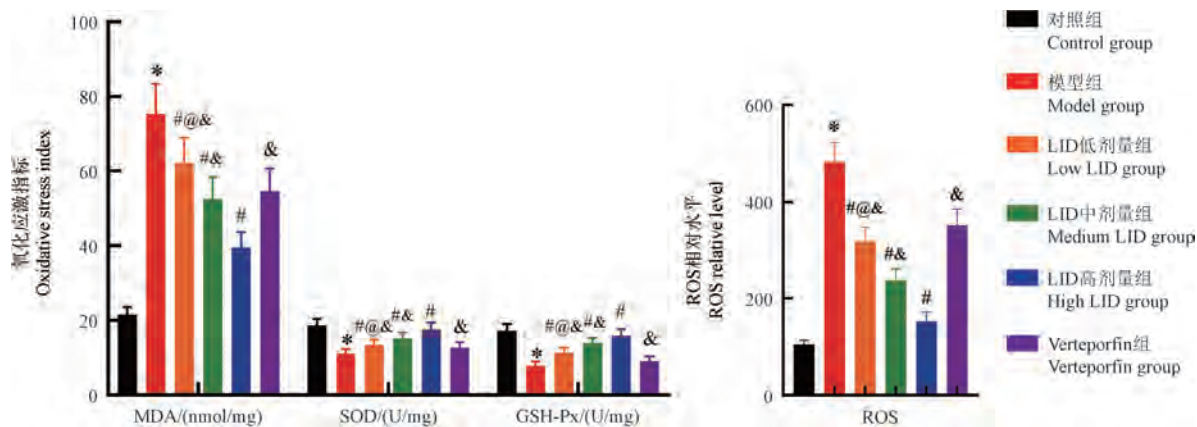
2.5 LID 对肝组织细胞凋亡的影响

与模型组相比,LID 低、中、高剂量组大鼠肝细胞凋亡减少,凋亡率显著降低,且 LID 各组间呈剂量依赖性($P<0.05$);模型组比对照组、Verteporfin 组

比 LID 高剂量组的肝细胞凋亡增加,凋亡率显著升高($P<0.05$)。见图 5。

2.6 LID 对肝组织凋亡蛋白及 Hippo-YAP 通路蛋白表达的影响

与模型组相比,LID 低、中、高剂量组肝组织 p-MST1/MST1、p-LATS1/LATS1、p-YAP/YAP、Bcl-2 蛋白表达水平升高,Bax 表达降低,且 LID 各组间呈剂量依赖性($P<0.05$);模型组比对照组、Verteporfin 组比 LID 高剂量组的肝组织 p-MST1/MST1、p-LATS1/LATS1、p-YAP/YAP、Bcl-2 表达更低,Bax 表达更高($P<0.05$)。见图 6、图 7。

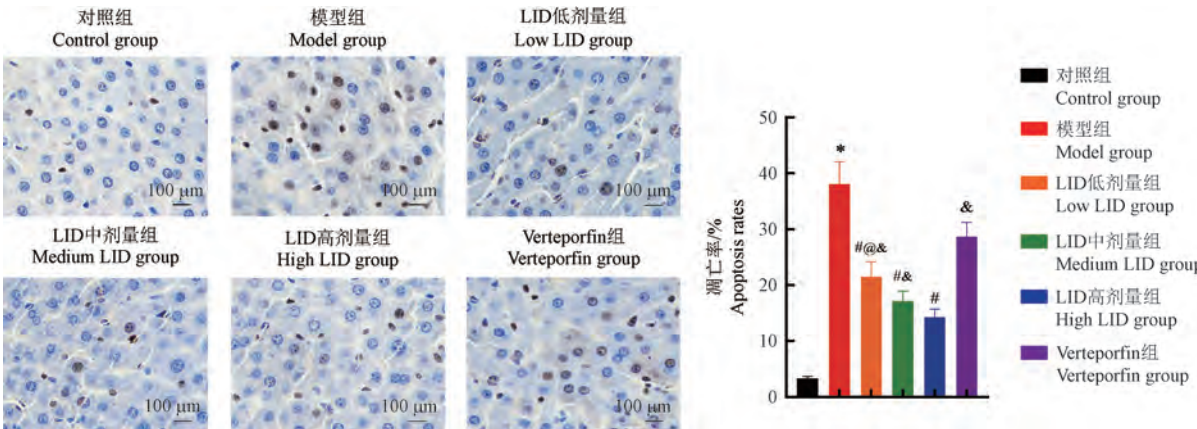


注:与对照组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$;与 LID 中剂量组比较, @ $P<0.05$;与 LID 高剂量组比较, & $P<0.05$ 。

图 4 各组大鼠氧化应激指标比较($n=10$)

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Model group, # $P<0.05$. Compared with Medium LID group, @ $P<0.05$. Compared with High LID group, & $P<0.05$.

Figure 4 Comparison of oxidative stress indexes in rats of each group



注:与对照组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$;与 LID 中剂量组比较, @ $P<0.05$;与 LID 高剂量组比较, & $P<0.05$ 。

图 5 大鼠肝组织凋亡情况

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Model group, # $P<0.05$. Compared with Medium LID group, @ $P<0.05$. Compared with High LID group, & $P<0.05$.

Figure 5 Apoptosis of rat liver tissue

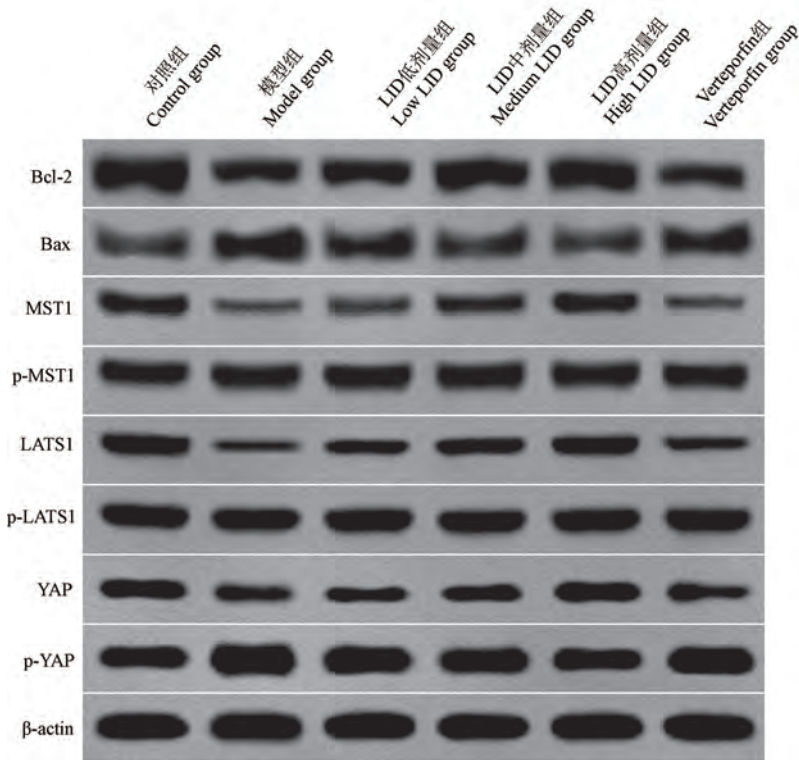
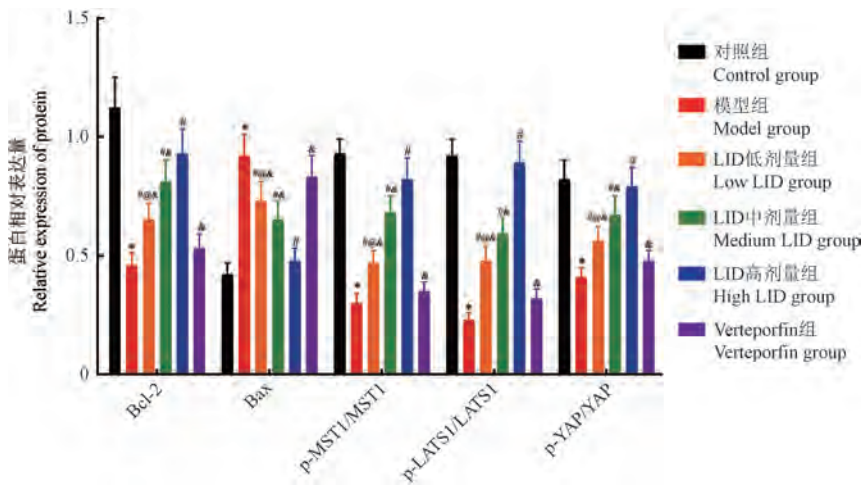


图 6 各组大鼠肝组织相关蛋白 Western blot 检测图

Figure 6 Western blot detection of related protein in liver tissue of rats in each group



注:与对照组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$;与 LID 中剂量组比较, @ $P<0.05$;与 LID 高剂量组比较, & $P<0.05$ 。

图 7 各组大鼠肝组织相关蛋白表达情况 ($n=10$)

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Model group, # $P<0.05$. Compared with Medium LID group, @ $P<0.05$. Compared with High LID group, & $P<0.05$.

Figure 7 Expression of related protein in liver tissue of rats in each group

3 讨论

OLT 引发的缺血再灌注损伤,显著降低了肝移植的存活率^[8]。目前尚无有效的治疗方法缓解 OLT 中肝缺血再灌注损伤的发生,因此,探索有效

降低 OLT 中发生缺血再灌注损伤的方法,对减少 OLT 肝损伤,提高移植率,具有重要意义。在肝缺血再灌注损伤过程中,ALT、AST、TBIL、LDH 从肝细胞释放到血液中,导致血清 ALT、AST、TBIL、LDH 活性升高,是主要的肝损伤标志物^[9]。本研究通过构

建 OLT 模型,发现移植过程中出现肝缺血再灌注损伤,肝细胞坏死,大量炎性细胞浸润,且血清 AST、ALT、TBIL、LDH 活性显著升高,表明 OLT 大鼠缺血再灌注损伤模型构建成功。

肝缺血再灌注诱导的组织损伤包括一系列病理过程,其中炎症反应和氧化应激反应的出现,会导致肝细胞损伤和凋亡,进而导致移植失败^[10]。肝缺血再灌注发生炎症细胞如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的异常激活,抗炎细胞因子 IL-10 异常下降,导致继发性肝损伤的发生^[11]。缺血再灌注可能通过导致 ROS 和脂质过氧化物 MDA 过量产生,而保护细胞免受氧自由基诱导损伤的抗氧化酶 SOD、GSH-Px 活性降低,引起强烈的氧化反应和肝损伤发生^[12]。凋亡蛋白 Bax 与抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达失衡引起的细胞凋亡也是肝缺血再灌注损伤的机制之一^[13]。本研究发现,模型组大鼠肝组织 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、ROS、MDA 及 Bax 蛋白水平显著升高,肝组织 IL-10、SOD、GSH-Px、Bcl-2 水平显著下降,表明 OLT 大鼠发生炎症反应、氧化应激和肝细胞凋亡,进而导致肝缺血再灌注损伤的发生。

尽管手术技术的进步、器官移植的标准护理和新型免疫疗法显著改善了肝移植结果,但目前尚无药物治疗被批准用于预防与移植相关的缺血再灌注损伤^[14]。越来越多的研究表明麻醉药物在肝缺血再灌注损伤的实验和临床环境中具有保护作用,包括丙泊酚、七氟醚、右美托咪定等多种麻醉药物,然而存在治疗周期长、用药剂量无法确定、副作用大等缺点,影响以上药物在临床上的使用^[15]。LID 属于局部酰胺类麻醉剂,耐受性好、过敏反应少,还对多种疾病的 IR 损伤发挥保护作用,如脑^[16]、肺^[3]、心肌^[17]、脊髓^[18]等缺血再灌注损伤。LID 还具有稳定肝细胞膜,增长肝细胞体外培养时间,减少肝细胞凋亡^[19]。因此,LID 可能改善 OLT 大鼠肝缺血再灌注损伤。本研究发现,LID 能减轻肝组织损伤,降低血清 AST、ALT、TBIL、LDH 活性和肝组织 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、ROS、MDA、Bax 水平,提高肝组织 IL-10、SOD、GSH-Px、Bcl-2 表达水平。因此,LID 因其具有抗炎、抗氧化药理学活性,可以减少 OLT 大鼠肝细胞凋亡,进而改善肝缺血再灌注损伤,与上述研究结果相似^[19-20],但 LID 改善 OLT 大鼠肝缺血再灌注损伤的具体分子机制尚不清楚,本研究进一步进行探讨。

Hippo 信号通路具有调节细胞生长、免疫反应、

肝再生和修复的作用,主要包含 MST1/2 和 LATS1/2^[20]。Hippo 通路激活时,MST1/2、LATS1/2 作为上游激酶,可磷酸化激活 YAP,抑制 YAP 核转位,最终导致其在胞质降解^[21]。未磷酸化的 YAP 通过进入细胞核,与多种转录因子相互作用,调节细胞增殖、分化和存活的基因表达,且 YAP 磷酸化激活对肝修复和再生至关重要^[22]。Hippo 信号通路在肝生成和肝缺血再灌注损伤中发挥重要作用,Lee 等^[23]发现激活 Hippo/YAP 信号通路,可抑制肝中的氧化应激,减少肝损伤。此外在肝缺血再灌注损伤中,激活 MST 介导的 Hippo/YAP 通路可缓解肝损伤^[24]。对 OLT 诱导的肝缺血再灌注损伤,Zhou 等^[5]和 Liu 等^[7]均发现,Hippo-YAP 激活可保护 OLT 大鼠肝免受缺血再灌注介导的损伤。本研究发现,模型组大鼠肝组织 p-MST1/MST1、p-LATS1/LATS1、p-YAP/YAP 蛋白表达水平降低,表明肝缺血再灌注可能抑制 Hippo/YAP 信号通路的激活。而 LID 干预后 p-MST1/MST1、p-LATS1/LATS1、p-YAP/YAP 蛋白表达升高,表明 LID 可能具有激活 Hippo/YAP 信号通路的作用。为进一步验证 LID 对 Hippo/YAP 信号通路的干预作用,本研究在 LID 高剂量组的基础上加上 Hippo-YAP 信号通路抑制剂 Verteporfin,实验结果发现 LID 对 OLT 大鼠肝缺血再灌注损伤的改善作用受到抑制,因此,猜测 LID 可能通过激活 Hippo-YAP 通路,参与对 OLT 大鼠肝缺血再灌注损伤的调节。

综上所述,LID 可能通过激活 Hippo-YAP 通路,减少炎症反应、氧化应激和肝细胞凋亡,对 OLT 大鼠肝缺血再灌注损伤具有改善作用。本研究为改善 OLT 大鼠肝缺血再灌注损伤提供了一定的思路,但 LID 对肝缺血再灌注损伤的其他分子机制仍有待阐明。

参考文献:

- [1] ZHANG X, LV L, WU Z, et al. Orthotopic liver transplantation improves postoperative quality of life, survival rate and reduces recurrence rate in patients with liver cancer [J]. Am J Transl Res, 2022, 14(2): 990-1000.
- [2] 沈钦海,张盟辉,秦召敏,等. 槲皮素预处理调节 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬途径改善大鼠肝缺血再灌注损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 16-22.
- SHEN Q H, ZHANG M H, QIN Z M, et al. Quercetin pretreatment modulates the autophagy pathway mediated by the AMPK/mTOR signaling pathway and improves liver ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32

- (3): 16–22.
- [3] ROMERA A, CEBOLLERO M, ROMERO-GÓMEZ B, et al. Effect of intravenous lidocaine on inflammatory and apoptotic response of ischemia-reperfusion injury in pigs undergoing lung resection surgery [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 6630232.
 - [4] NISHINA H. Physiological and pathological roles of the Hippo-YAP/TAZ signaling pathway in liver formation, homeostasis, and tumorigenesis [J]. Cancer Sci, 2022, 113(6): 1900–1908.
 - [5] ZHOU J, HU M, HE M, et al. TNFAIP3 interacting protein 3 is an activator of hippo-YAP signaling protecting against hepatic ischemia/reperfusion injury [J]. Hepatology, 2021, 74(4): 2133–2153.
 - [6] CAO Z R, ZHENG W X, JIANG Y X, et al. MiR-449a ameliorates acute rejection after liver transplantation via targeting procollagen-lysine1, 2-oxoglutarate5-dioxygenase 1 in macrophages [J]. Am J Transplant, 2023, 23(3): 336–352.
 - [7] LIU Y, LU T, ZHANG C, et al. Activation of YAP attenuates hepatic damage and fibrosis in liver ischemia-reperfusion injury [J]. J Hepatol, 2019, 71(4): 719–730.
 - [8] 李小娟, 梁红萍. 传统生化指标动态监测在原位肝移植缺血再灌注损伤评价中的意义 [J]. 河北医药, 2021, 43(19): 2904–2907, 2912.
LI X J, LIANG H P. The significance of dynamic monitoring of traditional biochemical indexes in the evaluation of ischemia-reperfusion injury in orthotopic liver transplantation [J]. Hebei Med J, 2021, 43(19): 2904–2907, 2912.
 - [9] DOU X, YAN D, LIU S, et al. Thymol alleviates LPS-induced liver inflammation and apoptosis by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and the AMPK-mTOR-autophagy pathway [J]. Nutrients, 2022, 14(14): 2809.
 - [10] CHOI E K, LIM D G. Hepatic ischemia-reperfusion injury with respect to oxidative stress and inflammatory response; a narrative review [J]. J Yeungnam Med Sci, 2023, 40(2): 115–122.
 - [11] LUO Y, HUANG Z, MOU T, et al. SET8 mitigates hepatic ischemia/reperfusion injury in mice by suppressing MARK4/NLRP3 inflammasome pathway [J]. Life Sci, 2021, 273: 119286.
 - [12] G BARDALLO R, PANISELLO-ROSELLÓ A, SANCHEZ-NUNO S, et al. Nrf2 and oxidative stress in liver ischemia/reperfusion injury [J]. FEBS J, 2022, 289(18): 5463–5479.
 - [13] 游茂春, 刘广益, 程俊, 等. 脂肪干细胞及其外泌体减轻肝细胞凋亡改善大鼠肝纤维化 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(7): 30–37.
YOU M C, LIU G Y, CHENG J, et al. Adipose stem cells and their derived exosomes alleviate liver fibrosis in rats by reducing apoptosis [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(7): 30–37.
 - [14] ALMAZROO O A, MIAH M K, PILLAI V C, et al. An evaluation of the safety and preliminary efficacy of peri- and post-operative treprostinil in preventing ischemia and reperfusion injury in adult orthotopic liver transplant recipients [J]. Clin Transplant, 2021, 35(6): e14298.
 - [15] SENONER T, VELIK-SALCHNER C, LUCKNER G, et al. Anesthesia-induced oxidative stress: are there differences between intravenous and inhaled anesthetics? [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 8782387.
 - [16] JIANG R, LIAO J, YANG M C, et al. Lidocaine mediates the progression of cerebral ischemia/reperfusion injury in rats via inhibiting the activation of NF- κ B p65 and p38 MAPK [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(8): 548.
 - [17] 郑琢, 吴沁娟, 温虎成, 等. 利多卡因缓解心肌缺血再灌注大鼠心功能和免疫紊乱并抑制 NF- κ B p38MAPK 的活化 [J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(13): 1547–1552.
ZHENG Z, WU Q J, WEN H C, et al. Lidocaine alleviating cardiac function and immune disorders, and inhibiting activation of NF- κ B p38MAPK in rats with myocardial ischemia-reperfusion [J]. Chin J Immunol, 2021, 37(13): 1547–1552.
 - [18] LIU L, XU Y, ZHOU Y, et al. Regionally infused lidocaine can dose-dependently protect the ischemic spinal cord in rabbits and may be associated with the EAA changes [J]. Neurosci Lett, 2020, 725: 134889.
 - [19] XU Y, YE M, HONG Y, et al. Efficacy of perioperative continuous intravenous lidocaine infusion for 72 hours on postoperative pain and recovery in patients undergoing hepatectomy: study protocol for a prospective randomized controlled trial [J]. J Pain Res, 2021, 14: 3665–3674.
 - [20] MA S, MENG Z, CHEN R, et al. The hippo pathway: biology and pathophysiology [J]. Annu Rev Biochem, 2019, 88: 577–604.
 - [21] 徐纪伟, 孙丹华, 陈旭东, 等. MST1/2 抑制剂促进大鼠脊髓损伤修复的实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 942–948.
XU J W, SUN D H, CHEN X D, et al. MST1/2 inhibitor for spinal cord injury repair in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 942–948.
 - [22] WU B K, MEI S C, CHEN E H, et al. YAP induces an oncogenic transcriptional program through TET1-mediated epigenetic remodeling in liver growth and tumorigenesis [J]. Nat Genet, 2022, 54(8): 1202–1213.
 - [23] LEE E H, BAEK S Y, PARK J Y, et al. Emodin in *Rheum undulatum* inhibits oxidative stress in the liver via AMPK with Hippo/Yap signalling pathway [J]. Pharm Biol, 2020, 58(1): 333–341.
 - [24] RAO J, CHENG F, ZHOU H, et al. Nogo-B is a key mediator of hepatic ischemia and reperfusion injury [J]. Redox Biol, 2020, 37: 101745.

[收稿日期] 2023–07–05

邓林林,安日问,赵方新,等. 骨桥蛋白通过 LGALS3BP 调控 PI3K/AKT 通路促进肝癌细胞迁移 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 9-15.

Deng LL, An RW, Zhao FX, et al. Osteopontin activates the PI3K/AKT pathway by upregulating LGALS3BP in promotion of hepatoma cell migration [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 9-15.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.002

骨桥蛋白通过 LGALS3BP 调控 PI3K/AKT 通路促进肝癌细胞迁移

邓林林,安日问,赵方新,林 婷,刘翠华,红 梅,武建强,张 烜*

(内蒙古医科大学 基础医学院,呼和浩特 010059)

【摘要】 目的 探讨骨桥蛋白(OPN)通过半乳糖凝集素 3 结合蛋白(LGALS3BP)促进肝癌细胞迁移的作用及机制。**方法** 体外培养人肝癌细胞系 SMMC-7721、稳定转染空真核表达载体的人肝癌细胞系 SMMC-P 及稳定转染 OPN 基因的人肝癌细胞系 SMMC-OPN。RT-qPCR 检测细胞中 OPN 及 LGALS3BP mRNA 表达情况,Western blot 检测细胞中 OPN、LGALS3BP 和 PI3K/AKT 通路蛋白表达水平,细胞划痕实验检测细胞迁移能力。SMMC-OPN 细胞中分别转染靶向 LGALS3BP 的小干扰 RNA (si-LGALS3BP) 及阴性对照 (si-NC) 后,检测细胞迁移能力变化和 PI3K/AKT 通路蛋白相对表达水平变化。**结果** 相较于亲本细胞 SMMC-7721 和转染空载体的细胞 SMMC-P,高表达 OPN 的细胞 SMMC-OPN 迁移能力明显增强,而且细胞中 LGALS3BP mRNA 及蛋白表达水平显著上调,同时 p-PI3K/PI3K 及 p-AKT/AKT 蛋白相对表达量均显著升高。沉默 LGALS3BP 表达后,SMMC-OPN 细胞的迁移能力受到明显抑制,同时 p-PI3K/PI3K 及 p-AKT/AKT 蛋白相对表达水平均显著降低。**结论** OPN 可以通过上调 LGALS3BP 的表达激活 PI3K/AKT 通路,从而促进肝癌细胞迁移。

【关键词】 骨桥蛋白;LGALS3BP;PI3K/AKT 通路;肝癌;细胞迁移

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0009-07

Osteopontin activates the PI3K/AKT pathway by upregulating LGALS3BP in promotion of hepatoma cell migration

DENG Linlin, AN Riwen, ZHAO Fangxin, LIN Ting, LIU Cuihua, HONG Mei, WU Jianqiang, ZHANG Xuan*

(School of Basic Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of osteopontin (OPN) in hepatoma cell migration through galectin-3 binding protein (LGALS3BP). **Methods** Human hepatoma cell lines SMMC-7721, SMMC-P (stably transfected with empty eukaryotic expression vectors), and SMMC-OPN (stably transfected with the OPN gene) were cultured. mRNA expression levels of OPN and LGALS3BP were measured by RT-qPCR. Western blot assays were used to analyze the relative protein expression of OPN and LGALS3BP and PI3K/AKT pathway. Wound healing assays were performed to explore the cell migration ability. After transfection with LGALS3BP-targeting small interfering RNA (si-LGALS3BP) or negative control small RNA (si-NC) into SMMC-OPN cells, cell migration and relative expression of

【基金项目】 国家自然科学基金 (81660482); 内蒙古自治区自然科学基金 (2022MS08009); 内蒙古自治区卫生健康科技计划项目 (202202128)。

【作者简介】 邓林林 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤免疫。E-mail: 13593760778@163.com

【通信作者】 张烜 (1975—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 肿瘤免疫。E-mail: zhxuan024@163.com

PI3K/AKT pathway-related proteins were assessed. **Results** Compared with SMMC-7721 and SMMC-P, the migratory ability of SMMC-OPN cells was significantly reinforced, and expression of LGALS3BP was obviously upregulated at both mRNA and protein levels. Moreover, relative expression of p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT proteins was significantly increased. Wound healing assays showed that the si-LGALS3BP obviously suppressed the migratory ability of SMMC-OPN cells. Furthermore, relative expression of p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT proteins in SMMC-OPN cells was significantly decreased after transfection of si-LGALS3BP. **Conclusions** OPN activates the PI3K/AKT pathway by upregulating LGALS3BP expression to promote hepatoma cell migration.

[Keywords] osteopontin; LGALS3BP; PI3K/AKT pathway; liver cancer; cell migration

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

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 在全球常见的恶性肿瘤中位居第六^[1], 死亡率居第三位, 而在我国死亡率位居第二位, 仅次于肺癌^[2]。2020 年中国占全球肝癌病例的 45.3% 和肝癌死亡人数的 47.1%^[3], 患者死亡的主要原因是肿瘤的转移复发。骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 是一种磷酸化糖蛋白, 参与机体多种生理及病理过程, 是一种多功能蛋白^[4], 可与细胞膜上受体 CD44 及整合素结合, 影响肿瘤生长、浸润及转移过程。研究表明, 肿瘤患者血清 OPN 水平升高常伴随预后不良, 在肝癌转移组织中 OPN 表达显著升高, 并且与低生存率和高复发率相关^[5-6]。HCC 患者的血清 OPN 升高, 提示其可作为 HCC 的生物学标志物^[7], 在 HCC 中的诊断和预后中具有重要临床意义^[8-9]。半乳糖凝集素 3 结合蛋白 (galectin-3 binding protein, LGALS3BP) 是一种分泌型、高糖基化蛋白^[10], 属于富半胱氨酸清道夫受体 (scavenger receptor cysteine-rich, SRCR) 超家族^[11-12]。研究发现, LGALS3BP 基因在肝细胞癌、口腔鳞状细胞癌、胃癌等多种肿瘤组织中和血清中表达增多, 可以通过多种方式参与肿瘤的生长与转移, 并引起细胞黏附、免疫反应以及免疫逃逸^[13-14]。LGALS3BP 与肝癌的预后密切相关, 在 HCC 患者中, 总生存期高的患者血清 LGALS3BP 表达较正常范围低^[14], 其高表达可能与 HCC 患者的不良预后相关^[15], 表明 LGALS3BP 可以作为肝癌的血清生物学标志物和治疗靶点^[16-17]。但其对肝癌细胞的迁移及侵袭的影响研究很少。而且 OPN 与 LGALS3BP 之间是否存在调控关系从而影响肝癌细胞的迁移尚不明确。本研究从 LGALS3BP 在 OPN 对肝癌细胞迁移的调控作用及机制出发, 检测出高表达 OPN 的肝癌细胞中 LGALS3BP 的表达情况, 发现 OPN 可以通过上调 LGALS3BP 活化 PI3K/AKT 通路, 进而促进肝癌细胞迁移。

1 材料和方法

1.1 细胞

人肝癌细胞系 SMMC-7721 购自上海细胞库, 稳定转染空真核表达载体的人肝癌细胞系 SMMC-P 及稳定转染 OPN 基因的人肝癌细胞系 SMMC-OPN 均由内蒙古医科大学微生物与免疫学研究室构建。

1.2 主要试剂与仪器

RPMI 1640 培养基、PBS、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、0.25% 胰蛋白酶、青霉素和链霉素均为美国 GIBCO 公司产品; 遗传霉素 G418 为美国 Sigma 公司产品; 总 RNA 抽提纯化试剂盒为北京天根生化科技有限公司产品; cDNA 特异性反转录试剂盒为北京全式金公司产品; SYBR Green qPCR Super Mix 为南京诺唯赞公司产品; RIPA 蛋白质裂解液及蛋白酶抑制剂为北京索莱宝公司产品; BCA 蛋白定量试剂盒为北京 CWBIO 公司产品; NC 膜为武汉博士德公司产品; 脱脂奶粉为美国 BD 公司产品; 兔抗人 LGALS3BP 抗体为 abcam 公司产品; 兔抗人 AKT、p-AKT、PI3K、p-PI3K、 β -actin 抗体、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔 IgG 均为美国 CST 公司产品; ECL 发光液为大连 meilunbio® 公司产品; 小 RNA 转染试剂盒 riboFECT™ CP Reagent 为广州锐博生物科技有限公司产品; RT-qPCR 引物由北京擎科公司合成; 小 RNA 干扰片段由广州锐博生物科技有限公司合成。光学显微镜为德国 Leica Microsystems CMS GmbH; 实时荧光定量 PCR 仪为美国 applied biosystems。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

SMMC-7721、SMMC-P、SMMC-OPN 细胞均使用含有 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基, 其中 SMMC-P 及 SMMC-OPN 细胞培养基中需加入 300 μ g/mL G418, 在 5%

CO₂、37℃恒温培养箱中培养。

1.3.2 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测肝癌细胞中 OPN 和 LGALS3BP mRNA 表达

用胰酶消化生长状态良好的肝癌细胞,培养基重悬,以 4×10^5 /孔接种于 6 孔板中,在 5% CO₂、37℃恒温培养箱培养 24 h 后,用总 RNA 抽提纯化试剂盒提取细胞中总 RNA,用反转录试剂盒合成 cDNA。参照 SYBR Green qPCR SuperMix 试剂盒说明书,使用 RT-qPCR 法检测 OPN 及 LGALS3BP 基因 mRNA 的相对表达量。GAPDH 作为内参,每组设置 3 个复孔,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达量。引物序列为: GAPDH 的上游为 5'-ACAACCTTGGTATCGTGAAGG-3',下游为 5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'; OPN 的上游为 5'-ATCTCCTAGCCCCACAGAAT-3',下游为 5'-CATCAGACTGGTGAGAATCATC-3'; LGALS3BP 的上游为 5'-AGGAACCCAAGGCCTGAAC-3',下游为 5'-TAGAAGATCTCCACGCGGC-3'。

1.3.3 细胞划痕实验检测细胞迁移

用胰酶消化生长状态良好的肝癌细胞,培养基重悬,以 4×10^5 /孔接种到 6 孔板中,当细胞汇合度达到 80%~90%时,各孔分别用 200 μL 消毒枪头与板底所作横线垂直进行划线,用 PBS 冲洗两遍,再加入无血清培养基,于细胞培养箱中继续培养,分别在划痕后 0 h、24 h、48 h、72 h 于显微镜下拍照,Image J 分析划痕面积,计算细胞愈合率。细胞愈合率/% = (24 h/48 h/72 h 划痕面积 - 0 h 划痕面积)/0 h 划痕面积 × 100%。

1.3.4 Western blot 检测细胞中 OPN、LGALS3BP、AKT、p-AKT、PI3K 和 p-PI3K 蛋白表达

用胰酶消化对数生长期细胞,培养基重悬,以 4×10^5 /孔接种到 6 孔板中,5% CO₂、37℃培养 48~72 h 后提取总蛋白,根据 BCA 蛋白定量试剂盒说明书测定蛋白浓度。以 30 μg 蛋白上样后进行电泳,运用湿转法将蛋白转到 NC 膜上,5%脱脂牛奶室温摇床封闭 1 h 后,分别加入兔抗人 β-actin 抗体(1:1000)、兔抗人 LGALS3BP 抗体(1:1000)、兔抗人 AKT 抗体(1:1000)、兔抗人 p-AKT 抗体(1:1000)、兔抗人 PI3K 抗体(1:1000)和兔抗人 p-PI3K 抗体(1:1000),4℃冰箱孵育 12~18 h,加入二抗即 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:1000),室温摇床孵育 1~2 h 后,参照 ECL 试剂盒说明书进行电化学发光测定,以 β-actin 为内参,通过 Image J 软件进

行定量分析。

1.3.5 RNA 干扰

用胰酶消化 SMMC-OPN 细胞,培养基重悬,以 4×10^5 /孔接种在 6 孔板中,细胞汇合度达到 50%~70%,参照 riboFECT™ CP Reagent 试剂盒说明书操作,用无血清培养基将靶向 LGALS3BP 的小干扰 RNA (si-LGALS3BP) 及阴性对照无关序列 (si-NC) 分别转染至细胞。转染 4~6 h 后换用完全培养基,24 h 后进行 RT-qPCR 实验及细胞划痕实验。24 h 后提取总蛋白进行 Western blot 实验。靶向 LGALS3BP 的小 RNA 干扰片段序列为 5'-GGA CCUGUAUGCCUAUGCA dTdT-3' (si-NC) 和 3'-dTdT CCUGGACAUACGGAUACGU-5' (si-LGALS3BP)。

1.3.6 实验分组

SMMC-7721 细胞经稳定转染空真核表达载体的人肝癌细胞系 SMMC-P 及稳定转染 OPN 基因的人肝癌细胞系 SMMC-OPN,即分为 SMMC-7721 组 (SMMC-7721 group)、空载组 (SMMC-P group)、过表达 OPN 组 (SMMC-OPN group)。SMMC-OPN 细胞转染后分为对照组 (Control group)、无关序列组 (si-NC group)、干扰组 (si-LGALS3BP group)。

1.4 统计学方法

采用 GraphPadPrism 8 软件进行作图及统计分析,多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),两组间比较采用独立样本 *t* 检验进行分析,计量资料以平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,以 $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

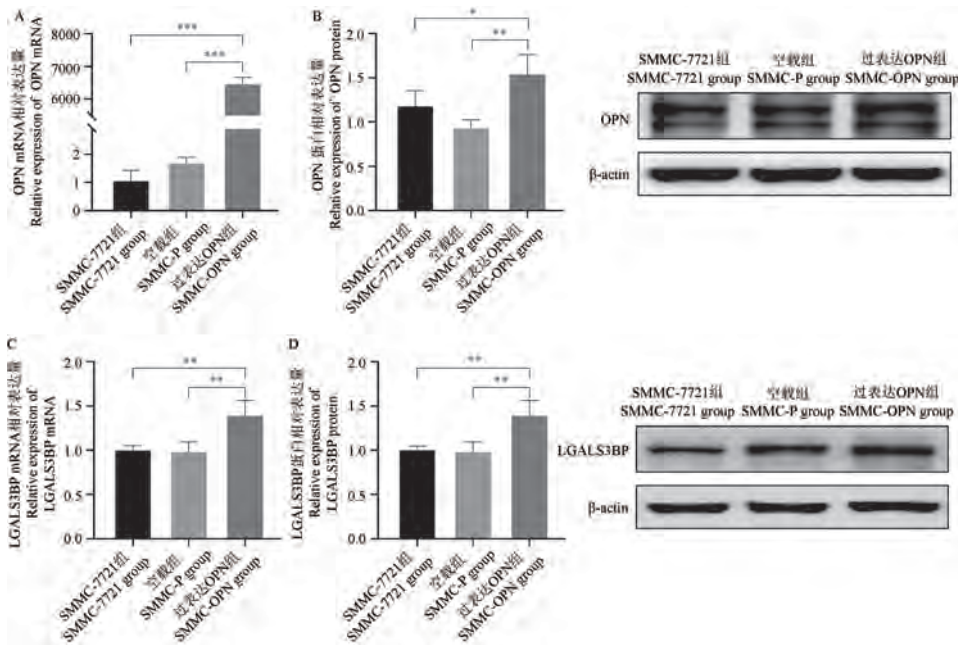
2 结果

2.1 OPN 上调肝癌细胞中 LGALS3BP 的表达

SMMC-7721 细胞中稳定转染 OPN 后得到高表达 OPN 的细胞 SMMC-OPN,RT-qPCR 与 Western blot 结果显示,与亲本细胞 SMMC-7721 和转染空载体的细胞 SMMC-P 相比,SMMC-OPN 细胞中 OPN 基因的 mRNA ($P < 0.001$,图 1A) 及蛋白 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图 1B) 表达显著升高。同时, LGALS3BP 基因的 mRNA ($P < 0.01$,图 1C) 及蛋白 ($P < 0.05$,图 1D) 表达水平均显著增加,说明 OPN 可以上调肝癌细胞中 LGALS3BP 的表达。

2.2 OPN 通过上调 LGALS3BP 激活 PI3K/AKT 通路

如图 2 所示,采用 Western blot 检测了 SMMC-7721、SMMC-P 和 SMMC-OPN 细胞以及 SMMC-OPN

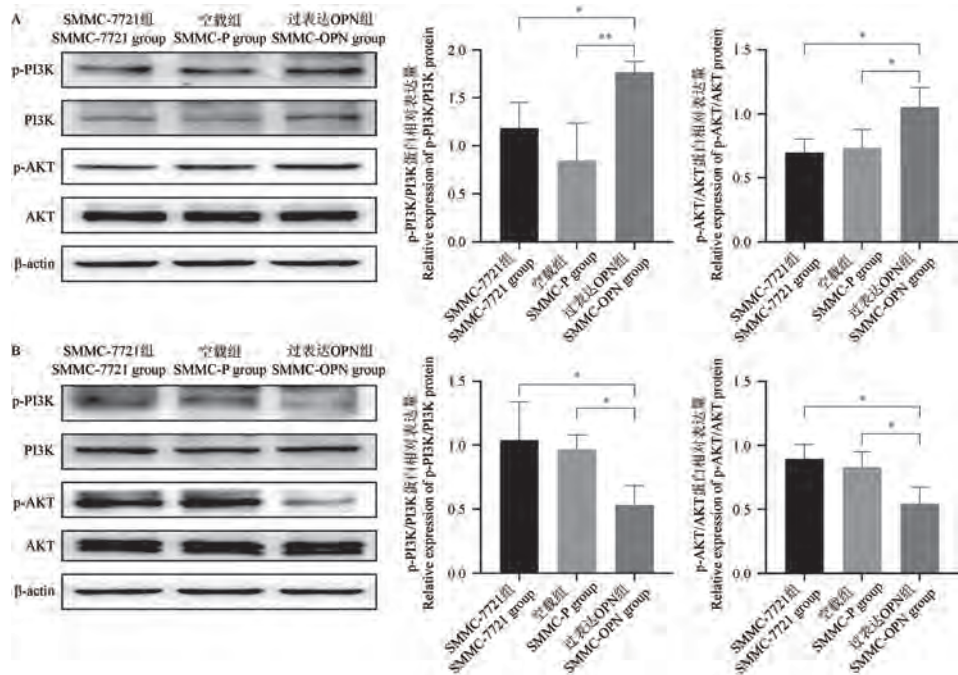


注:A:RT-qPCR 检测细胞中 OPN mRNA 表达;B:Western blot 检测细胞中 OPN 蛋白表达;C:RT-qPCR 检测细胞中 LGALS3BP mRNA 表达;D:Western blot 检测细胞中 LGALS3BP 蛋白表达。与 SMMC-7721 及空载组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 1 OPN 上调肝癌细胞中 LGALS3BP 的表达

Note. A, OPN mRNA expression was assayed by RT-qPCR. B, OPN protein expression was detected by Western blot. C, LGALS3BP mRNA expression was assayed by RT-qPCR. D, Protein expression of LGALS3BP was analyzed using Western blot. Compared with SMMC-7721 and SMMC-P group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 1 OPN upregulates LGALS3BP expression in HCC cells



注:A:Western blot 检测 OPN 对 PI3K/AKT 通路的影响;B:Western blot 检测 LGALS3BP 对 PI3K/AKT 通路的影响。与 SMMC-7721 及空载组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 2 Western blot 检测 OPN 及 LGALS3BP 对 PI3K/AKT 通路的影响

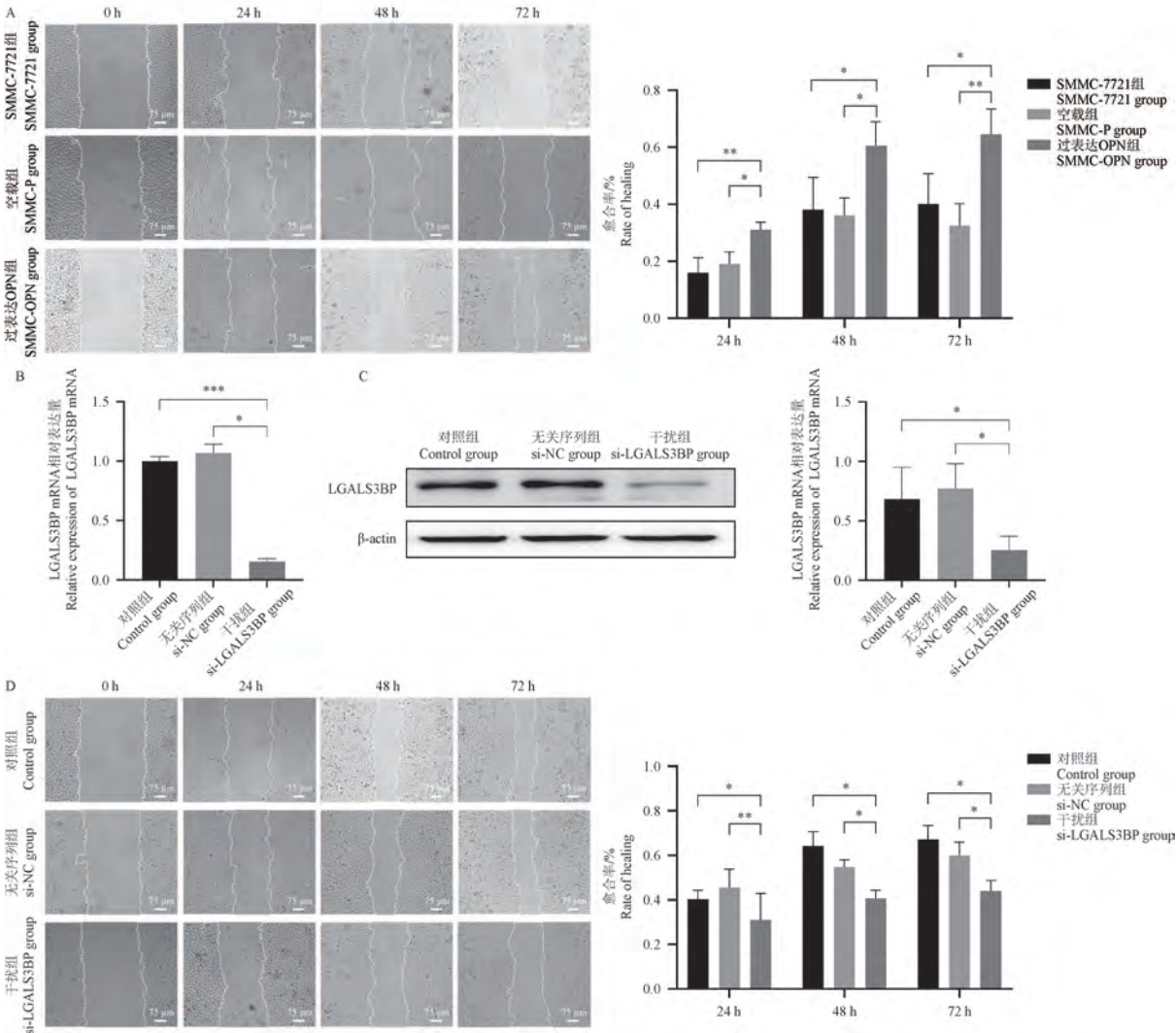
Note. A, Western blot was used to detect the effect of OPN on PI3K/AKT pathway. B, Western blot analysis of the effect of LGALS3BP on the PI3K/AKT pathway. Compared with SMMC-7721 and SMMC-P group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 2 Effects of OPN and LGALS3BP on PI3K/AKT pathway detected by Western blot

干扰 LGALS3BP 后的 PI3K/AKT 通路相关基因表达变化。结果表明,与 SMMC-7721 和 SMMC-P 细胞相比,SMMC-OPN 细胞的 p-PI3K/PI3K($P<0.05$ 或 $P<0.01$,图 2A) 及 p-AKT/AKT($P<0.05$,图 2A) 蛋白相对表达水平均显著上调。用 si-LGALS3BP 干扰 LGALS3BP 表达后,与 Control 组及 si-NC 组相比,si-LGALS3BP 组的 p-PI3K/PI3K($P<0.05$,图 2B) 及 p-AKT/AKT($P<0.05$,图 2B) 蛋白相对表达量均显著下调,表明 OPN 可以通过上调 LGALS3BP 表达激活

PI3K/AKT 通路。
2.3 OPN 通过上调 LGALS3BP 促进肝癌细胞迁移

如图 3 所示,通过细胞划痕实验检测了 SMMC-7721、SMMC-P 和 SMMC-OPN 细胞的迁移能力,以及 SMMC-OPN 细胞敲低 LGALS3BP 后的细胞迁移能力变化。结果显示,与亲本细胞 SMMC-7721 和转染空载体的细胞 SMMC-P 相比,SMMC-OPN 细胞的迁移能力显著增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$,图 3A),表



注:A:OPN 影响 SMMC-7721 细胞迁移能力;B:RT-qPCR 检测细胞中 OPN mRNA 表达;C:Western blot 检测细胞中 LGALS3BP 蛋白表达;D:LGALS3BP 影响 SMMC-OPN 细胞迁移能力。与 SMMC-7721 及空载组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 3 OPN 及 LGALS3BP 影响肝癌细胞迁移能力

Note. A, OPN affected SMMC-7721 cells migration ability using wound-healing assays. B, OPN mRNA expression was assayed by RT-qPCR. C, Protein expression of LGALS3BP was analyzed using Western blot. D, LGALS3BP affected SMMC-OPN cells migration ability using wound-healing assays. Compared with SMMC-7721 and SMMC-P group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 3 OPN and LGALS3BP affect the migration ability of hepatocellular carcinoma cells

明 OPN 可以促进 SMMC-7721 细胞的迁移。用 si-LGALS3BP 干扰 LGALS3BP 表达后 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$, 图 3B、3C), 与对照组及无关序列组相比, 干扰组的细胞迁移能力明显受到抑制 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 3D), 表明 OPN 通过上调 LGALS3BP 表达促进肝癌细胞迁移。

3 讨论

癌细胞转移是肝癌患者预后不良和死亡的主要原因。骨桥蛋白 OPN 是一种分泌型的磷酸化糖蛋白, 在许多肿瘤以及转移组织中表达较高, 与肿瘤转移密切相关。在肿瘤细胞中, LGALS3BP 的表达可以刺激血管生成及影响肿瘤相关巨噬细胞极化, 通过调节肿瘤微环境来促进肿瘤的生长和转移^[18-19]。前期研究采用 UALCAN 网站在线对 TCGA 库中数据进行分析, 发现肝癌细胞组织中 LGALS3BP 表达较正常组织高, 可能参与肝细胞癌恶性进展^[20], 但是 LGALS3BP 在肝癌细胞迁移中的作用及机制研究很少, 而且在肝癌细胞迁移中 OPN 与 LGALS3BP 之间的调控关系尚不清楚。

本研究以高表达 OPN 的肝癌细胞为模型, 研究了 OPN 对肝癌细胞迁移的调控作用及其分子机制, 发现肝癌细胞中过表达 OPN 后迁移能力增强, 同时细胞中 LGALS3BP 的表达水平升高。而在用小干扰 RNA 敲低细胞中 LGALS3BP 后, 肝癌细胞迁移能力明显受到抑制, 表明 OPN 可以通过上调 LGALS3BP 的表达从而促进肝癌细胞的迁移。

有资料证实, LGALS3BP 可以触发 PI3K/AKT 信号通路, 导致肿瘤细胞的生长与转移^[21], 以及血管生成等^[22]。PI3K/AKT 信号通路是细胞发育、生长、分化、细胞凋亡以及血管生成等的关键信号通路, 在癌症细胞中可受到各种致癌基因和生长因子受体通路的作用而异常激活, 与癌症的生长与发展密切相关^[23]。PI3K/AKT 信号通路在 HCC 中高度激活, 是对肝癌细胞生长、增殖、迁移、代谢、血管生成及细胞基质重塑影响极其重要的信号通路之一^[24-25]。因此, 为进一步探讨 LGALS3BP 在 OPN 促肝癌细胞迁移中的详细作用机制, 采用 Western blot 检测了 SMMC-OPN 细胞中 PI3K/AKT 通路蛋白的表达情况, 发现 OPN 可以活化肝癌细胞中 PI3K/AKT 通路。而在干扰 LGALS3BP 后, PI3K/AKT 通路受到抑制, 与文献报道一致^[21], 表明 OPN 可通过调控 LGALS3BP 表达影响 PI3K/AKT 通路活化。

综上所述, 肝癌细胞系 SMMC-7721 高表达 OPN 后通过上调 LGALS3BP 的表达从而触发 PI3K/AKT 信号通路, 进而促进肝癌细胞迁移, 也表明 LGALS3BP 通过调控 PI3K/AKT 信号通路在 OPN 促迁移中发挥重要作用。多种基因及分子水平的改变参与了原发性肝癌的发生发展, 本研究发现 OPN 与 LGALS3BP 在促进肝癌细胞迁移中存在调控关系, 丰富了肝癌细胞迁移的分子机制, 对后续深入探讨 OPN 对肿瘤转移相关生物学行为的影响及其作为肝癌生物标志物开发提供实验依据, 对研究肝癌转移具有重要的意义, 可为肝癌的临床预防和诊疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(7): 783-791.
- [3] RUMGAY H, ARNOLD M, FERLAY J, et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040 [J]. J Hepatol, 2022, 77(6): 1598-1606.
- [4] ICER MA, GEZMEN-KARADAG M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin [J]. Clin Biochem, 2018, 59: 17-24.
- [5] MOORMAN H R, POSCHEL D, KLEMENT J D, et al. Osteopontin: a key regulator of tumor progression and immunomodulation [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(11): 3379.
- [6] ZHU Y, GAO X M, YANG J, et al. C-C chemokine receptor type 1 mediates osteopontin-promoted metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Sci, 2018, 109(3): 710-723.
- [7] ZHU Y, YANG J, XU D, et al. Disruption of tumour-associated macrophage trafficking by the osteopontin-induced colony-stimulating factor-1 signalling sensitises hepatocellular carcinoma to anti-PD-L1 blockade [J]. Gut, 2019, 68(9): 1653-1666.
- [8] SUN T, LI P, SUN D, et al. Prognostic value of osteopontin in patients with hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(43): e12954.
- [9] WANG H, GUO D, LI J, et al. Increased expression of osteopontin indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11(12): 5916-5922.
- [10] TRAINI S, PICCOLO E, TINARI N, et al. Inhibition of tumor growth and angiogenesis by SP-2, an anti-lectin, galactoside-binding soluble 3 binding protein (LGALS3BP) antibody [J].

Mol Cancer Ther, 2014, 13(4): 916-925.

[11] LOIMARANTA V, HEPOJOKI J, LAAKSOAHO O, et al. Galectin-3-binding protein: a multitask glycoprotein with innate immunity functions in viral and bacterial infections [J]. J Leukoc Biol, 2018, 104(4): 777-786.

[12] 刘翠华, 邓林林, 赵方新, 等. LGALS3BP 3' UTR 荧光素酶报告基因载体构建及鉴定 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(5): 8-14.

LIU C H, DENG L L, ZHAO F X, et al. Construction of a luciferase reporter gene vector for the LGALS3BP 3' UTR [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(5): 8-14.

[13] PARK S Y, YOON S, SUN E G, et al. Glycoprotein 90K promotes E-cadherin degradation in a cell density-dependent manner via dissociation of E-cadherin-p120-catenin complex [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(12): 2601.

[14] CAPONE E, IACOBELLI S, SALA G. Role of galectin 3 binding protein in cancer progression: a potential novel therapeutic target [J]. J Transl Med, 2021, 19(1): 405.

[15] IACOVAZZI P A, GUERRA V, ELBA S, et al. Are 90K/MAC-2BP serum levels correlated with poor prognosis in HCC patients? Preliminary results [J]. Int J Biol Markers, 2003, 18(3): 222-226.

[16] BAUDI I, INOUE T, TANAKA Y. Novel biomarkers of hepatitis B and hepatocellular carcinoma: clinical significance of HBcrAg and M2BPGi [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(3): 949.

[17] SONG Y, WANG M, TONG H, et al. Plasma exosomes from endometrial cancer patients contain LGALS3BP to promote endometrial cancer progression [J]. Oncogene, 2021, 40(3): 633-646.

[18] WU S, YU L, CHENG Z, et al. Expression of maspin in non-small cell lung cancer and its relationship to vasculogenic mimicry [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2012, 32(3): 346-352.

[19] JIANG S S, WENG D S, WANG Q J, et al. Galectin-3 is associated with a poor prognosis in primary hepatocellular carcinoma [J]. J Transl Med, 2014, 12: 273.

[20] 刘翠华, 邓林林, 赵方新, 等. miR-4660 对肝癌细胞迁移和侵袭的影响及其机制 [J]. 山西医科大学学报, 2023, 54(1): 1-8.

LIU C H, DENG L L, ZHAO F X, et al. Effect and mechanism of miR-4660 on migration and invasion of hepatic carcinoma cells [J]. J Shanxi Med Univ, 2023, 54(1): 1-8.

[21] ZHANG X, DING H, LU Z, et al. Increased LGALS3BP promotes proliferation and migration of oral squamous cell carcinoma via PI3K/AKT pathway [J]. Cell Signal, 2019, 63: 109359.

[22] ZHAO C, LIU Y, MENG J, et al. LGALS3BP in microglia promotes retinal angiogenesis through PI3K/AKT pathway during hypoxia [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2022, 63(8): 25.

[23] NOOROLYAI S, SHAJARI N, BAGHBANI E, et al. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer [J]. Gene, 2019, 698: 120-128.

[24] WU Y, ZHANG Y, QIN X, et al. PI3K/AKT/mTOR pathway-related long non-coding RNAs: roles and mechanisms in hepatocellular carcinoma [J]. Pharmacol Res, 2020, 160: 105195.

[25] PASKEH M D A, GHADYANI F, HASHEMI M, et al. Biological impact and therapeutic perspective of targeting PI3K/Akt signaling in hepatocellular carcinoma: promises and Challenges [J]. Pharmacol Res, 2023, 187: 106553.

[收稿日期]2023-04-28

陈乾,王帝,张定一,等. 炎调方调控 Rho/ROCK 信号通路对脓毒症急性胃肠损伤小鼠肠上皮细胞凋亡的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 16-24.

Chen Q, Wang D, Zhang DY, et al. Mechanism of Yantiao Fang regulating the Rho/ROCK signaling pathway in apoptosis of intestinal epithelial cells in mice with acute gastrointestinal injury caused by sepsis [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 16-24.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.003

炎调方调控 Rho/ROCK 信号通路对脓毒症急性胃肠损伤小鼠肠上皮细胞凋亡的研究

陈 乾^{1,2}, 王 帝¹, 张定一¹, 贾赛蕾¹, 王丽辉¹, 曹玉净¹, 李 鲜¹, 李燕红^{2*}

(1.河南省中医院/河南中医药大学第二附属医院,郑州 450002;2.黄河科技学院,郑州 450000)

【摘要】 目的 探讨炎调方调控 Rho/ROCK 信号通路对脓毒症急性胃肠损伤小鼠肠上皮细胞凋亡的影响。**方法** 取 70 只 BALB/c 小鼠随机分为空白组、假手术组和造模小鼠。除空白组、假手术组外,各组小鼠均采用盲肠结扎穿孔术(cecum ligation and puncture, CLP)构建脓毒症急性胃肠损伤小鼠模型,将造模成功的小鼠随机分为模型组、炎调方低、中、高剂量组和 ROCK 抑制剂组。采用 HE 染色观察小鼠回肠组织病理学改变;ELISA 法检测各组小鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-10 水平;免疫组织化学检测观察 PCNA、Ki-67 的表达;蛋白印迹法检测回肠组织凋亡指标 cleaved caspase3 蛋白、Bax 蛋白表达;RT-qPCR 检测小鼠回肠组织 ROCK mRNA、MLC mRNA 表达。**结果** 较空白组和假手术组相比,模型组小鼠的 Chiu's 病理评分、促炎介质(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)水平、cleaved caspase3 蛋白、Bax 蛋白、ROCK mRNA、MLC mRNA 水平升高($P<0.05$),而抑炎介质(IL-10)水平和回肠组织中 PCNA、Ki-67 表达降低($P<0.05$)。与模型组比较,炎调方各组随着剂量增加,回肠组织病理学改变均得到不同程度改善,其 Chiu's 病理评分、血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平、cleaved caspase3 蛋白、Bax 蛋白、ROCK mRNA、MLC mRNA 的表达降低($P<0.05$),而 IL-10 水平、回肠组织中 PCNA、Ki-67 表达升高($P<0.05$)。**结论** 炎调方可能通过调控 Rho/ROCK 信号通路抑制脓毒症急性胃肠损伤小鼠的肠上皮细胞凋亡,从而具有减轻肠道组织炎症反应,最终达到防止肠黏膜组织损伤的作用。

【关键词】 脓毒症急性胃肠损伤;肠上皮细胞凋亡;Rho/ROCK 信号通路;炎调方

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0016-09

Mechanism of Yantiao Fang regulating the Rho/ROCK signaling pathway in apoptosis of intestinal epithelial cells in mice with acute gastrointestinal injury caused by sepsis

CHEN Qian^{1,2}, WANG Di¹, ZHANG Dingyi¹, JIA Sailei¹, WANG Lihui¹, CAO Yujing¹, LI Xian¹, LI Yanhong^{2*}

(1. Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine/Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China. 2. Yellow River Institute of Science and Technology, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Yantiao Fang on apoptosis of intestinal epithelial cells in mice with acute gastrointestinal injury caused by sepsis by regulating the Rho/ROCK signaling pathway. **Methods** Seventy BALB/c mice were randomly divided into normal, sham, and model groups. Except for normal and sham groups, mice

【基金项目】国家自然科学基金青年项目(82104833);全国名老中医药专家传承工作室(国中医药人教函【2022】75号);河南省中医药科学研究专项课题(2024ZY2084, 20-21ZY2114, 2022ZY1086);河南省科技攻关项目(212102310339)。

【作者简介】陈乾(1990—),男,主治医师,博士,研究方向:中西医治疗危重症。E-mail:568220084@qq.com

【通信作者】李燕红(1985—),女,主治医师,研究方向:中西医结合治疗危重症。E-mail:www17009833@126.com

were subjected to cecal ligation and perforation to establish a mouse model of acute gastrointestinal injury caused by sepsis. The mouse models were randomly divided into model, Low, Medium, and High dose of Yantiao Fang, and ROCK inhibitor groups. Histopathological changes of the ileum were observed by HE staining. Serum levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IL-10 were measured by ELISA. PCNA and Ki-67 expression was detected by immunohistochemistry. Cleaved caspase3 and Bax expression was detected by Western blot. ROCK and MLC mRNA expression in the ileum was measured by RT-qPCR. **Results** Compared with normal and sham groups, Chiu's pathological score, proinflammatory factor (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) levels, cleaved caspase3 and Bax protein expression, and ROCK and MLC mRNA levels were increased in the model group ($P<0.05$). Moreover, anti-inflammatory mediator IL-10 and expression of PCNA and Ki-67 in the ileum were decreased in the model group ($P<0.05$). Compared with the model group, histopathological changes of the ileum in all Yantiao Fang groups were improved by various degrees with the increase in dose. Chiu's pathological score, IL-1 β , IL-6, and TNF- α serum levels, cleaved caspase3 and Bax protein expression, and ROCK and MLC mRNA levels were decreased in Yantiao Fang groups ($P<0.05$). The IL-10 level and expression of PCNA and Ki-67 in the ileum were increased in Yantiao Fang groups ($P<0.05$). **Conclusions** Yantiao Fang may inhibit apoptosis of intestinal epithelial cells in mice with acute gastrointestinal injury due to sepsis by regulating the Rho/ROCK signaling pathway, thereby alleviating intestinal tissue inflammation and ultimately preventing intestinal mucosal tissue injury.

[Keywords] acute gastrointestinal injury caused by sepsis; apoptosis of intestinal epithelial cells; Rho/ROCK signaling pathway; Yantiao Fang

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

根据最新脓毒症指南,脓毒症被定义为由于机体对感染的反应不足或失调而引起的严重器质性疾病,是 ICU 重症患者的重要死亡原因之一^[1]。相关研究表明,脓毒症患者在我国重症监护病房患者中占五分之一的比例,其 90 d 的死亡率高达 35.5%,而导致脓毒症出现死亡最为常见的因素则是急性胃肠道损伤 (acute gastrointestinal injury, AGI) 所导致的多脏器功能衰竭 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS)^[2-3]。AGI 被认为是脓毒症发生免疫炎症失调的“激活器”,是 MODS 启动的重要环节^[4]。然而,当前临床上脓毒症所导致的 AGI 尚无特效疗法,仍以对症治疗为主,效果不尽人意^[5]。因此,亟需研发针对性治疗药物以及相应疗法,避免出现 MODS 和其他不良预后^[6]。脓毒症致 AGI 早期临床症状主要以腹胀、腹痛、便秘、舌红、脉滑数为主要特征,其病因主要为外感热毒邪气侵袭机体,此时,营热聚而为毒,热毒壅滞于肠腑,烧灼肠腑津液,气血瘀滞不畅,以致热毒瘀陷于肠腑。因此,热结肠腑证乃脓毒症致 AGI 的核心病机。本课题组前期自拟经验方 (炎调方, Yantiao Fang, YTF),方中君药为芒硝、大黄、桃仁,具有荡涤肠腑热毒之效;臣药玄参、赤芍可助君药以清热凉血养阴;佐药银花、连翘、麦冬、当归,不仅能助臣药加速热毒外解,而且还可滋润通便。全方配伍具有通腑泄热、养阴清营之功效,正切脓毒症致 AGI 病机。前期研究显示,炎调方能够降低脓毒症致 AGI

的炎症反应,有效保护肠黏膜组织损伤程度,以及促进患者的临床症状、体征恢复等疗效^[7-8]。然而,其具体机制仍不明确。因而,本研究旨在探讨炎调方治疗脓毒症胃肠损伤的作用机制,为其进一步深入研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6~8 周龄健康雄性 BALB/c 小鼠,70 只,SPF 级,体重 18~22 g,购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司 [SCXK (京) 2019-0010],于河南中医药大学中心实验室动物房饲养 [SYXK (豫) 2021-0018],小鼠均适应性饲养 1 周,自由进食和饮水,实验室环境温度 22~28℃,湿度维持在 40%~60%,昼夜明暗交替 12 h/12 h。本研究已得到河南省中医院实验动物伦理委员会批准 (PZ-HNSZYY-2022-026),在实验过程中均按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

炎调方颗粒剂组成:芒硝 10 g、金银花 15 g、赤芍 15 g、当归 15 g、生大黄 10 g、桃仁 10 g、玄参 15 g、连翘 15 g、麦冬 10 g,均由河南中医药大学第二附属医院提供 (批号:2107004W、2107001W、7409316、2110011W、2106004W、2202003C、2207001C、0000786-180、2103005W),并加工制备成含生药 2.5 g/mL 的药液,4℃冰箱保存备用。法舒地尔 (天津红

日药业股份有限公司,规格:2 mL:30 mg)购自河南省中医院(批号:2108181);ELISA 试剂盒购自武汉碧云天生物科技有限公司(批号:L220916464、L220920650、L220810379、L221125648);PCNA 抗体、Ki67 抗体、caspase3 抗体、Bax 抗体购自 abcam 公司(批号:ab92552、ab16667、ab184787、ab32503);反转录试剂盒、qPCR 试剂盒购自 NovoproteinScientific. Inc 公司(批号 E047-01B、E096-01A);总 RNA 提取试剂购自于 EpiZyme 公司(批号 YY101)。石蜡切片机(Leica RM2016);正置显微镜(Nikon Eclipse ci);成像系统(Nikon DS-U3);4℃离心机(SCIOGEX CF1524R);超低温冰箱(MEILING BIOLOGY&MEDLGAL);核酸定量仪(Thermo NANODROP 2000);qPCR 仪(Roche LightCycler480);多功能酶标仪(Thermo MULTISKANFC);电泳系统(Mini Vertical Electrophoresis YY-Mini PRO);转膜系统(Mini Tank Transfer System YY-TransBLOT);摇床(Orbital Shaker TS-1);恒温箱(blue pard DHP-9031);化学发光成像系统(AI600)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组与造模

将小鼠随机分为 7 组:空白(normal)组、假手术(sham)组、模型(model)组、炎调方低、中、高剂量(Low, Medium and High dose of YTF)组和 ROCK 抑制剂(inhibitor)组(法舒地尔组),小鼠每组 10 只。禁食 12 h 不禁水,采用盲肠结扎穿孔术(cecum ligation and puncture,CLP)制备脓毒症致 AGI 小鼠模型:20%乌拉坦麻醉后,于小鼠中下腹正中做一约 1.0 cm 长的切口,找到盲肠,然后在其根部 2/3 处进行结扎,用 23 号针管穿通盲肠 2 次,过程中要避免损害肠壁血管,轻挤出少量肠内容物,回纳盲肠于腹腔,逐层缝合腹壁切口,手术完毕后皮下注射 0.9% NaCl 抗休克。假手术组:小鼠经麻醉后开腹,轻翻肠道后关腹。

1.3.2 干预方法

造模前 3 d 及造模后炎调方低、中、高剂量组予炎调方灌胃(7.4 g/kg、14.8 g/kg、29.6 g/kg),抑制剂组予法舒地尔腹腔注射(15 mg/kg),每天 1 次。空白组、假手术组及模型组同时灌服并注射等量生理盐水。

1.3.3 标本采集与检测

各组小鼠术后 24 h 麻醉并腹主动脉采血后行回肠组织采集及检测。

(1) ELISA 法检测血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 IL-10 水平

血液标本 3000 r/min,4℃离心 10 min,然后吸取血清。严格按照 ELISA 试剂盒说明书方法进行血 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-10 指标检测。

(2) HE 染色回肠组织

PBS 缓冲液冲洗回肠表面,4%多聚甲醛中固定 24 h,梯度酒精脱水,石蜡包埋、切片 3 μ m,观察回肠组织的病理变化。

(3) 免疫组化测定 PCNA 和 Ki67

将石蜡组织切成 5 μ m 厚进行染色后,细胞核内可见大小不等的黄色或深棕色颗粒为 PCNA、Ki67b 阳性。染色完成后,应用 Image J 测算其累积光密度值(IOD 值),随机选取 5 个视野进行测定,所得 IOD 值的平均值为最终值。

(4) Western blot 方法检测 cleaved caspase3、Bax 蛋白表达情况

提取各组回肠组织总蛋白,测定蛋白浓度。经电泳、转膜、封闭后 4℃避光孵育 cleaved caspase3、Bax 抗体过夜,予以二抗,采用凝胶成像系统测定蛋白条带灰度值。

(5) RT-qRCR 检测 ROCK、MLC mRNA 水平

将冻存的回肠组织样本 100 mg 研磨制成匀浆,加入裂解液裂解,提取总 RNA,测定其浓度,反转录得到对应的 cDNA,反转录条件为 50℃ 15 min,75℃ 5 min,-20℃保存。以 GAPDH 为内参进行 Real-time PCR 检测 ROCK、MLC 表达,各组重复 3 次,取平均值。PCR 扩增条件为 95℃ 10 s、60℃ 10 s、72℃ 10 s,40 个循环。结果处理采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 循环阈值法获取 Ct 值(表 1)。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 26.0 统计软件对数据进行统计学分析。计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示;两组间比较采用独立样本 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,两两之间采用 LSD-*t* 检验多重比较,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

表 1 用于 RT-qRCR 的引物

Table 1 Primers for RT-qRCR

名称 Name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
ROCK	F:GCATGTATGAAGCCGCTGTG
	R:GTCTGCAGCTGGAGGCTTTT
MLC	F:TACCATGCCTGTTTCCAGCG
	R:GAGCGAAAACCCAGAGGTCA
GAPDH	F:GGTATAGAGACAGACAAGTAGA
	R:TCTTACAGCACAAGCCATT

2 结果

2.1 炎调方对脓毒症急性胃肠损伤小鼠回肠组织病理学的影响

空白组、假手术组的肠黏膜结构完整,绒毛排列整齐紧密,未见炎性细胞浸润。模型组肠黏膜萎缩明显,绒毛排列杂乱,可见断裂、脱落,上皮细胞坏死脱落,炎症细胞浸润明显。炎调方随着剂量的增加,肠黏膜肠萎缩情况好转,肠绒毛排列整齐,炎性细胞浸润减少,炎性细胞减少,其中高剂量组肠黏膜损伤改善最为明显。抑制剂组的肠黏膜较模型组明显改善,绒毛排列整齐,肠黏膜损伤减轻,炎性细胞浸润减少,但与炎调方高剂量并无差异。见图 1。

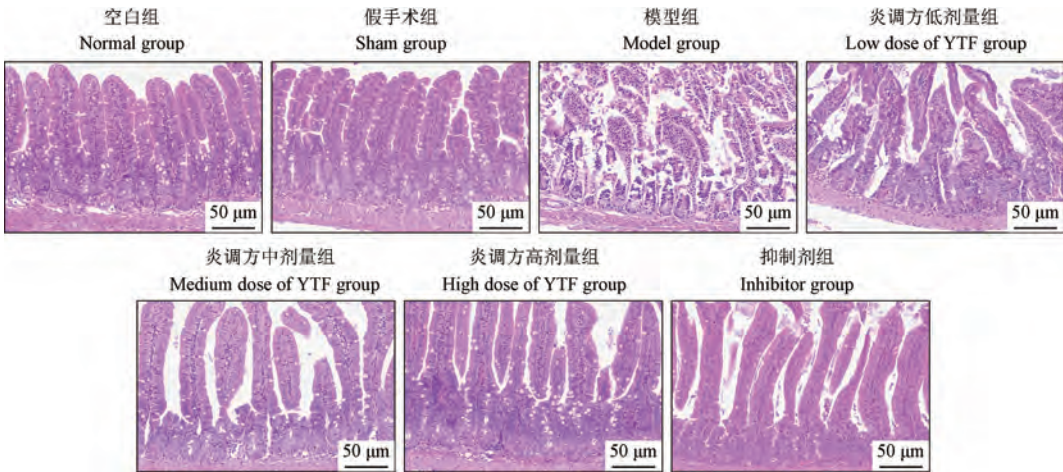


图 1 各组小鼠肠组织病理变化 (HE)

Figure 1 Pathological changes of intestinal mucosa in each group (HE)

2.2 炎调方对脓毒症急性胃肠损伤小鼠回肠组织 Chiu's 评分的影响

较空白组、假手术组相比,模型组 Chiu's 病理评分显著升高($P<0.05$)。随着炎调方药物剂量增加,炎调方高剂量组的 Chiu's 病理评分呈逐渐下降趋势($P<0.05$)。抑制剂组的 Chiu's 病理评分较炎调方低剂量组和中剂量组低($P<0.05$),但与炎调方高剂量组的 Chiu's 病理评分无显著差异($P>0.05$)。见图 2。

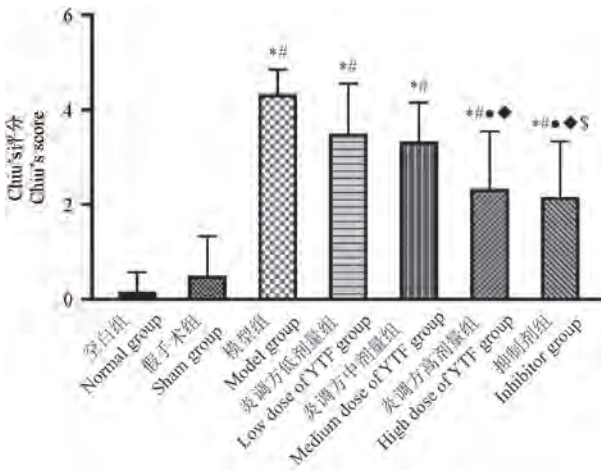
2.3 炎调方对脓毒症急性胃肠损伤小鼠炎症反应的影响

较空白组和假手术组相比,模型组小鼠的血清促炎因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平均显著升高($P<0.05$),而 IL-10 水平显著下降($P<0.05$)。与模型组相比,抑制剂组的血清促炎因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平均显著下降($P<0.05$),而 IL-10 水平显著升高($P<0.05$)。与模型组相比,随着炎调方剂量增加,小鼠的血清促炎因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平均呈逐渐下降趋势($P<0.05$),IL-10 水平呈上升趋势($P<0.05$)。见图 3。

2.4 炎调方对脓毒症急性胃肠损伤小鼠回肠组织增殖指标 PCNA 和 Ki-67 的影响

免疫组化染色后,PCNA 阳性呈棕黄色,且定位

落,炎症细胞浸润明显。炎调方随着剂量的增加,肠黏膜肠萎缩情况好转,肠绒毛排列整齐,炎性细胞浸润减少,炎性细胞减少,其中高剂量组肠黏膜损伤改善最为明显。抑制剂组的肠黏膜较模型组明显改善,绒毛排列整齐,肠黏膜损伤减轻,炎性细胞浸润减少,但与炎调方高剂量并无差异。见图 1。



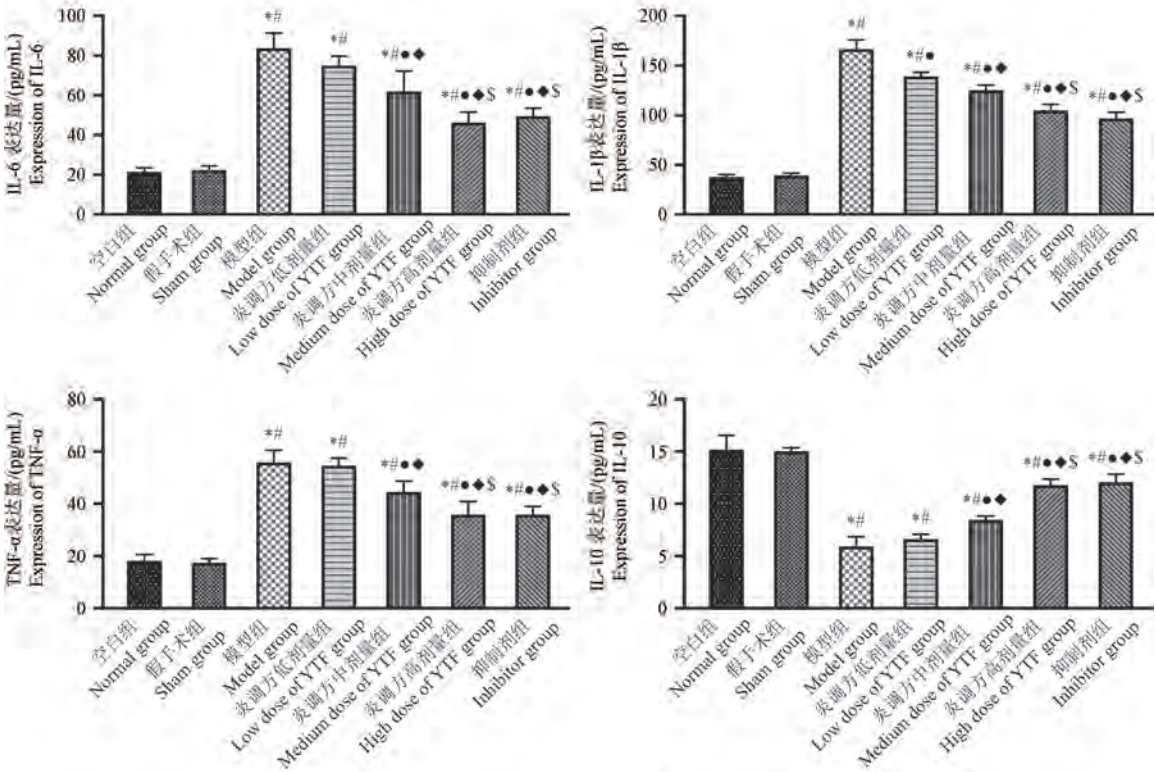
注:与空白组相比, * $P<0.05$;与假手术组相比, # $P<0.05$;与模型组相比, • $P<0.05$,与炎调方低剂量组相比, ♦ $P<0.05$;与炎调方中剂量组相比, § $P<0.05$ 。

图 2 各组小鼠肠黏膜组织病理评分比较
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the sham group, # $P<0.05$. Compared with the model group, • $P<0.05$. Compared with the Low dose of YTF group, ♦ $P<0.05$. Compared with the Medium dose of YTF group, § $P<0.05$.

Figure 2 Comparison of pathological scores of intestinal mucosa in each group of mice

于细胞核,而位于细胞胞浆阳性反应主要为非特异性染色所致(图 4);Ki-67 阳性也呈棕黄色,且定位于细胞核。PCNA 阳性细胞和 Ki-67 阳性细胞主要分布在肠腺隐窝区。与空白组和假手术组相比,模型组小鼠 PCNA 和 Ki-67 表达水平显著降低(P

0.05)。与模型组比较,炎调方低、中、高剂量组和抑制剂组小鼠的 PCNA 和 Ki-67 表达显著升高(P <0.05),其中,炎调方高剂量组小鼠的 PCNA 和 Ki-67 表达较低、中剂量组显著升高(P <0.05)。见图 5、图 6。



注:与空白组相比, * P <0.05;与假手术组相比, # P <0.05;与模型组相比, ● P <0.05;与炎调方低剂量组相比, ◆ P <0.05;与炎调方中剂量组相比, \$ P <0.05。

图 3 各组小鼠血清炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 和 IL-10 的表达

Note. Compared with the control group, * P <0.05. Compared with the sham group, # P <0.05. Compared with the model group, ● P <0.05. Compared with the Low dose of YTF group, ◆ P <0.05. Compared with the Medium dose of YTF group, \$ P <0.05.

Figure 3 Expression of serum inflammatory cytokines IL-1β, IL-6, TNF-α and IL-10 in each group of mice

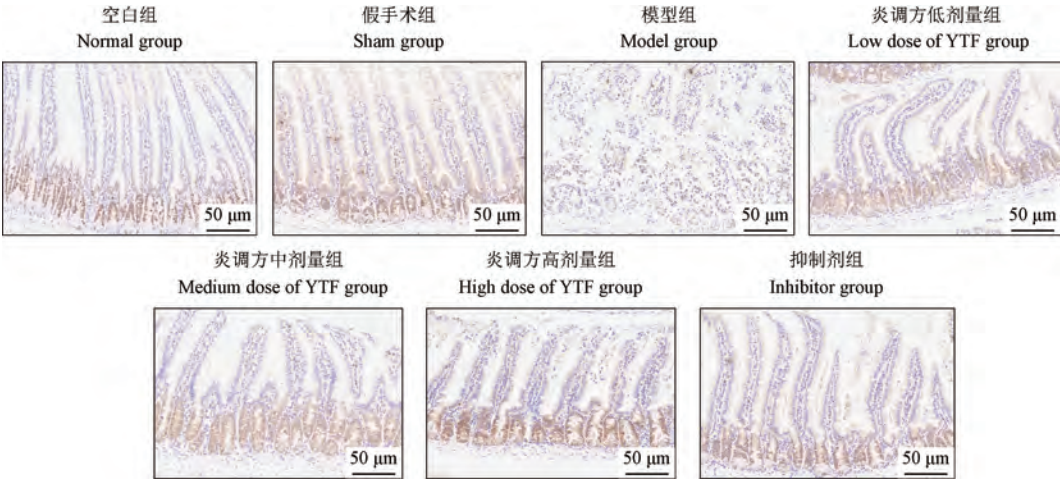


图 4 各组小鼠肠组织 PCNA 的表达(IHC)

Figure 4 Expression of PCNA in intestinal tissue of mice in each group (IHC)

2.5 炎调方对脓毒症急性胃肠损伤小鼠回肠组织凋亡蛋白的影响

与空白组和假手术组比较,模型组小鼠 cleaved caspase3、Bax 蛋白表达水平显著增加 ($P<0.05$)。与模型组比较,炎调方低、中、高剂量组和抑制剂组小鼠的 cleaved caspase3、Bax 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$),随着炎调方药物剂量增加,炎调方高剂量组小鼠的 cleaved caspase3、Bax 蛋白较低剂量组表达降低 ($P<0.05$)。抑制剂组小鼠的 cleaved caspase3、Bax 蛋白表达水平较炎调方低剂量组显著降低 ($P<0.05$),但与炎调方高剂量组相比无显著差异 ($P>0.05$)。见图 7。

2.6 炎调方对脓毒症急性胃肠损伤小鼠回肠组织 Rho/ROCK 信号通路的影响

与空白组和假手术组比较,模型组小鼠的 ROCK mRNA、MLC mRNA 相对表达量显著增加 ($P<0.05$,图 8)。与模型组比较,炎调方低、中、高剂量组和抑制剂组小鼠的 ROCK mRNA、MLC mRNA 相对表达量显著降低 ($P<0.05$),且随着炎调方药物剂量增加,炎调方中、高剂量组小鼠的 ROCK mRNA、MLC mRNA 相对表达量较低剂量组显著降低 ($P<0.05$)。抑制剂组小鼠的 ROCK mRNA、MLC mRNA 相对表达量较炎调方低剂量组和中剂量组显著降低 ($P<0.05$),但与炎调方高剂量组无显著差异 ($P>0.05$)。

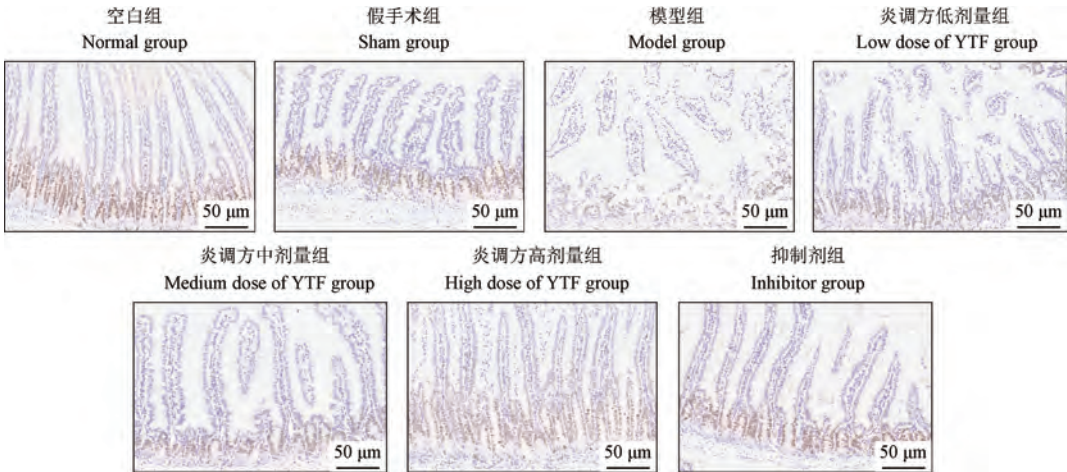
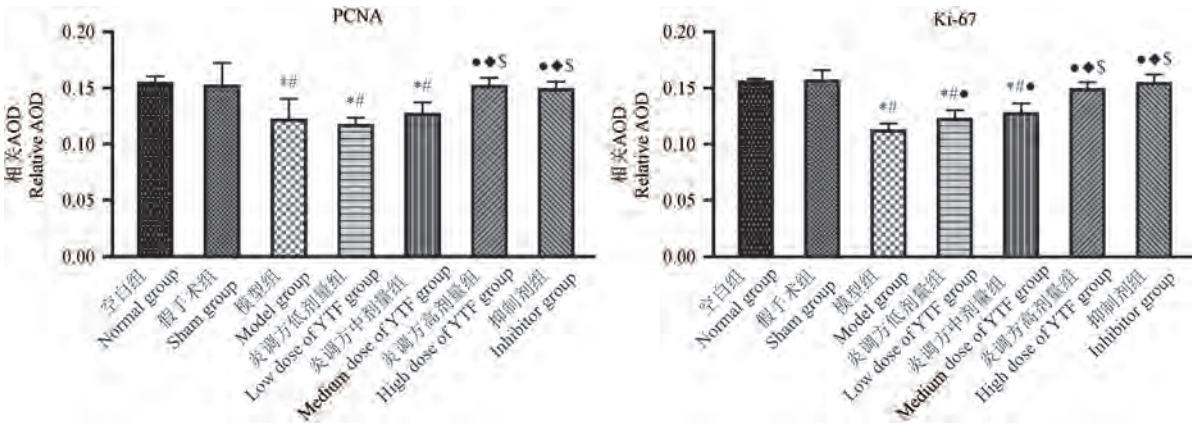


图 5 各组小鼠肠组织 Ki-67 的表达 (IHC)
Figure 5 Expression of Ki-67 in intestinal tissue of mice in each group (IHC)

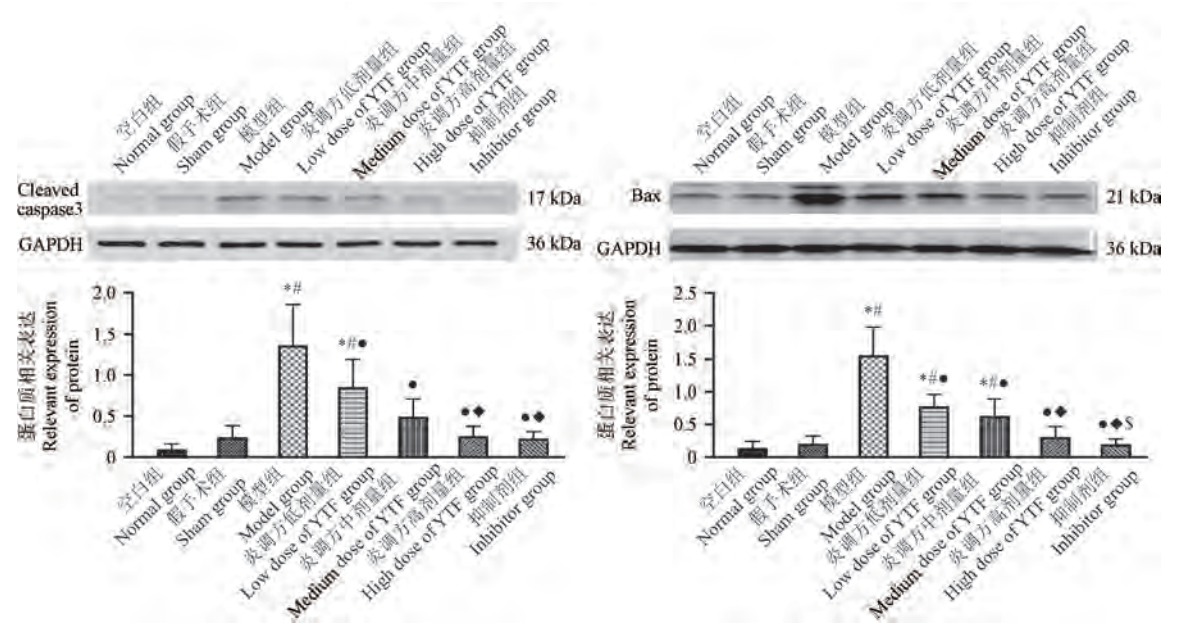


注:与空白组相比, * $P<0.05$;与假手术组相比, # $P<0.05$;与模型组相比, • $P<0.05$;与炎调方低剂量组相比, ♦ $P<0.05$;与炎调方中剂量组相比, § $P<0.05$ 。

图 6 各组小鼠肠组织 PCNA 和 Ki-67 的表达

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the sham group, # $P<0.05$. Compared with the model group, • $P<0.05$. Compared with the Low dose of YTF group, ♦ $P<0.05$. Compared with the Medium dose of YTF group, § $P<0.05$.

Figure 6 Expression of PCNA and Ki-67 in intestinal tissue of mice in each group

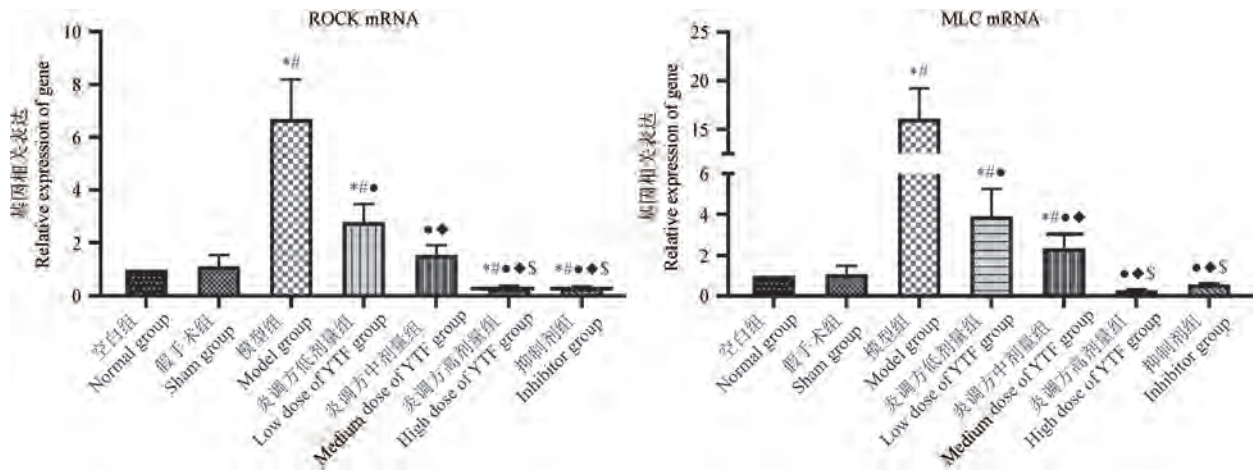


注:与空白组相比, * $P<0.05$;与假手术组相比, # $P<0.05$;与模型组相比, • $P<0.05$;与炎调方低剂量组相比, ♦ $P<0.05$;与炎调方中剂量组相比, § $P<0.05$ 。

图7 各组小鼠肠黏膜组织中 caspase3 和 Bax 的表达比较

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the sham group, # $P<0.05$. Compared with the model group, • $P<0.05$. Compared with the Low dose of YTF group, ♦ $P<0.05$. Compared with the Medium dose of YTF group, § $P<0.05$.

Figure 7 Comparison of cleaved caspase3 and Bax expression in intestinal mucosa of mice in each group



注:与空白组相比, * $P<0.05$;与假手术组相比, # $P<0.05$;与模型组相比, • $P<0.05$;与炎调方低剂量组相比, ♦ $P<0.05$;与炎调方中剂量组相比, § $P<0.05$ 。

图8 各组小鼠肠黏膜组织中 ROCK mRNA 和 MLC mRNA 的表达比较

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the sham group, # $P<0.05$. Compared with the model group, • $P<0.05$. Compared with the Low dose of YTF group, ♦ $P<0.05$. Compared with the Medium dose of YTF group, § $P<0.05$.

Figure 8 Comparison of ROCK mRNA and MLC mRNA expression in intestinal mucosa of mice in each group

3 讨论

AGI 是脓毒症最易出现的并发症之一,目前我国医学并没有相关记载,但根据其症状及疾病进展

归属于中医“便秘”“痞满”“腹胀”等范畴^[9]。脓毒症是由于外感毒热邪气侵犯机体所致,胃为多气多血之腑-传化物而不藏,但此时,外感毒热壅具成毒,气血津液输布失常,内生痰浊、瘀血,热毒、瘀

血、痰浊共同蕴结于肠腑,热灼津液,最终引起腑气不通、热结肠腑。故而,脓毒症致 AGI 的主要病机为热结肠腑、腑气不通^[10-11]。于是,本课题组自拟经验方—炎调方,应用于临床治疗脓毒症致 AGI 患者。前期动物研究显示,炎调方能够降低脓毒症致 AGI 大鼠炎症反应,有效保护肠黏膜组织损伤程度及减少细菌易位率^[7];此外,临床研究也同样显示,炎调方能够有效降低脓毒症致 AGI 患者炎症反应及改善患者的临床症状及体征^[8],但其具体机制尚不明确。

脓毒症 AGI 发生发展与炎症介质失控密切相关^[12-13]:当脓毒症时,由于大量活性、炎性细胞因子的刺激,肠上皮细胞会大量凋亡,加剧肠道机械屏障的破坏,从而导致组织器官损伤加重以促使肠腔内细菌及其毒素移位入血,最终引发脓毒症 AGI^[14]。其中炎性细胞因子,例如 IL-10、IL-6、TNF- α 等,它们既是脓毒症发生发展的重要促炎/抑炎因子,也是直接促进肠上皮细胞凋亡从而导致肠黏膜组织受损的原因^[15-16]。故而,如能有效调控炎性细胞因子的水平,将对脓毒症 AGI 患者的治疗具有重要意义。本研究显示,与模型组相比,炎调方组的肠黏膜组织损伤程度得到改善,为探究炎调方组的小鼠肠黏膜损伤减轻是否与炎症反应调控相关,本研究检测脓毒症 AGI 小鼠外周血相关炎性细胞因子发现,与既往研究一样^[17],炎调方组的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平较模型组低,而 IL-10 水平较模型组高,说明炎调方能够有效改善脓毒症 AGI 小鼠肠黏膜组织损伤程度,确实与炎症反应相关。

肠道机械屏障作为肠腔内第一道物理屏障,不仅仅具有抵挡肠道内潜在病原体的作用,还是导致脓毒症致 AGI 的炎症反应失控的核心结构,其结构完整性主要在于肠道上皮细胞增殖和凋亡动态平衡^[16]。肠上皮细胞增殖如果被抑制则会导致隐窝细胞坏死、数量减少,凋亡细胞增加,肠道机械屏障结构的完整性就会被破坏^[18]。细胞凋亡的过程主要依赖于凋亡相关蛋白酶 caspase 活化,caspase3 作为细胞凋亡过程中最主要的凋亡因子之一,与促凋亡基因 Bax 相互影响,共同参与并调控细胞凋亡进程^[19]。为进一步探究炎调方减轻炎症反应的作用机制,本研究遂对肠黏膜组织细胞增殖指标(Ki-67 和 PCNA)和凋亡指标(cleaved caspase3、Bax 蛋白)进行观察,研究显示,脓毒症 AGI 模型组小鼠肠上皮细胞增殖减少而凋亡增加,而炎调方组的 Ki-67、

PCNA 表达较模型组显著增高,cleaved caspase3、Bax 蛋白较模型组下降,表明炎调方具有促进脓毒症 AGI 小鼠的肠上皮细胞增殖以及抑制肠上皮细胞凋亡的作用。

Rho/ROCK 信号通路主要由 Rho、ROCK 和 MLC 等组成,参与细胞骨架调节、细胞的增殖、迁移和转录过程^[20]。已有研究证实,Rho/ROCK 能够直接引起 MLCK 和 MLC 的磷酸化,通过肌动蛋白的收缩等,参与细胞间连接的破坏,从而介导肠道上皮细胞凋亡^[21]。研究显示 Rho/ROCK 信号通路可通过介导炎症细胞因子的产生,激活 caspase3 活性而发生细胞凋亡^[22],而应用 Rho 抑制剂(法舒地尔)能够抑制细胞凋亡,从而对胃肠道起到有效保护作用^[23-24]。此外,激活的 caspase3 同样能够独自将 ROCK1 进行切割,并促进 MLC 磷酸化,诱导动态膜起泡,促进细胞凋亡,从而引起组织损伤,进一步加重炎症反应,形成恶性循环^[25]。为了进一步探明炎调方具体作用靶点,我们遂观察炎调方对脓毒症 AGI 小鼠回肠黏膜组织 ROCK、MLC mRNA 的影响,研究表明,炎调方可明显降低脓毒症 AGI 小鼠回肠黏膜组织的 ROCK mRNA 和 MLC mRNA 的表达水平。综上,炎调方可能通过介导调控 Rho/ROCK 信号通路,从而达到抑制肠道上皮细胞凋亡的作用。综上,炎调方可能通过调控 Rho/ROCK 信号通路抑制脓毒症 AGI 小鼠的肠上皮细胞凋亡,从而具有减轻肠道组织炎症反应,最终达到防止肠黏膜组织损伤的作用。

参考文献:

- [1] SALOMÃO R, FERREIRA B L, SALOMÃO M C, et al. Sepsis: evolving concepts and challenges [J]. Braz J Med Biol Res, 2019, 52(4): e8595.
- [2] XIE J, WANG H, KANG Y, et al. The epidemiology of sepsis in Chinese ICUs: a national cross-sectional survey [J]. Crit Care Med, 2020, 48(3): e209-e218.
- [3] CECI M, DELPECH G, SPARO M, et al. Clinical and microbiological features of bacteremia caused by *Enterococcus faecalis* [J]. J Infect Dev Ctries, 2015, 9(11): 1195-1203.
- [4] BERGER M M, HURNI C A. Management of gastrointestinal failure in the adult critical care setting [J]. Curr Opin Crit Care, 2022, 28(2): 190-197.
- [5] 孙啸宇, 陆宗庆, 张金, 等.《拯救脓毒症运动: 脓毒症与脓毒性休克治疗国际指南(2021)》摘译与解读 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2021, 28(6): 645-652.

SUN X Y, LU Z Q, ZHANG J, et al. Interpretation of Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of

- sepsis and septic shock 2021 [J]. Chin J Integr Tradit West Med Intensive Crit Care, 2021, 28(6): 645-652.
- [6] 杨泽, 王可洲, 于杨. 脂多糖结合蛋白和杀菌/通透性增加蛋白: 脓毒症的潜在治疗靶点 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 86-94.
- YANG Z, WANG K Z, YU Y. Lipopolysaccharide-binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein: potential therapeutic targets in sepsis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 86-94.
- [7] 金源源, 施荣, 凌琪华, 等. 炎调方治疗脓毒症致急性胃肠损伤(腑实营热证)的临床研究 [J]. 中国中医急症, 2021, 30(9): 1586-1589.
- JIN Y Y, SHI R, LING Q H, et al. Clinical efficacy observation of yantiao decoction for acute gastrointestinal injury caused by sepsis [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2021, 30(9): 1586-1589.
- [8] 韩丹, 陈乾, 施荣, 等. 炎调方对脓毒症大鼠肠黏膜屏障及 TLR9 信号通路影响的实验研究 [J]. 中国中医急症, 2019, 28(11): 1881-1884, 1892.
- HAN D, CHEN Q, SHI R, et al. Effects of yantiao decoction on intestinal mucosal barrier and TLR9 signaling pathway in sepsis rats [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2019, 28(11): 1881-1884, 1892.
- [9] 李志军, 王博超. 运用“四证四法”辨治感染性休克 [J]. 实用休克杂志(中英文), 2017, 1(2): 73-75.
- LI Z J, WANG B C. Applying “four patterns and four methods” for the differentiation and treatment of Septic Shock [J]. J Pract Shock, 2017, 1(2): 73-75.
- [10] 赵红芳, 江其敏, 刘清泉. 刘清泉教授应用中医药治疗脓毒症的临床经验 [J]. 中国中医急症, 2017, 26(9): 1563-1565.
- ZHAO H F, JIANG Q M, LIU Q Q. Professor Liu qingquan's clinical experience in treating sepsis with traditional Chinese medicine [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2017, 26(9): 1563-1565.
- [11] 高天野, 刘杰, 黄丽英. 中西医治疗脓毒症急性胃肠损伤研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(20): 146-148.
- GAO T Y, LIU J, HUANG L Y. Research progress on traditional Chinese medicine and western medicine in the treatment of acute gastrointestinal injury in sepsis [J]. Chin Med Mod Distance Educ China, 2020, 18(20): 146-148.
- [12] HUANG M, CAI S, SU J. The pathogenesis of sepsis and potential therapeutic targets [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(21): 5376.
- [13] TANG A L, SHEN M J, ZHANG G Q. Intestinal microcirculation dysfunction in sepsis: pathophysiology, clinical monitoring, and therapeutic interventions [J]. World J Emerg Med, 2022, 13(5): 343-348.
- [14] IVANOV A I. Structure and regulation of intestinal epithelial tight junctions: current concepts and unanswered questions [J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 763: 132-148.
- [15] LI Z, QI X, ZHANG X, et al. TRDMT1 exhibited protective effects against LPS-induced inflammation in rats through TLR4-NF- κ B/MAPK-TNF- α pathway [J]. Animal Model Exp Med, 2022, 5(2): 172-182.
- [16] ZHOU Q, VERNE G N. Intestinal hyperpermeability: a gateway to multi-organ failure? [J]. J Clin Invest, 2018, 128(11): 4764-4766.
- [17] 费丽萍, 陈志冬, 陈金锦, 等. $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体调控线粒体自噬在脓毒症急性胃肠损伤中的作用机制研究 [J]. 现代实用医学, 2023, 35(4): 453-455, 561.
- FEI L P, CHEN Z D, CHEN J J, et al. Study on the mechanism of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor regulating mitochondrial autophagy in septic acute gastrointestinal injury [J]. Mod Pract Med, 2023, 35(4): 453-455, 561.
- [18] DONG Y, ZHANG Y, WANG X, et al. The protective effects of Xuebijing injection on intestinal injuries of mice exposed to irradiation [J]. Animal Model Exp Med, 2022, 5(6): 565-574.
- [19] XIANG C, YAN Y, ZHANG D. Alleviation of the doxorubicin-induced nephrotoxicity by fasudil *in vivo* and *in vitro* [J]. J Pharmacol Sci, 2021, 145(1): 6-15.
- [20] PATEL K M, MEARS S C, BARNES C L, et al. Sepsis and total joint arthroplasty [J]. Orthop Clin North Am, 2022, 53(1): 13-24.
- [21] OUCHI T, MORIMURA S, DOW L E, et al. EpCAM (CD326) regulates intestinal epithelial integrity and stem cells via rho-associated kinase [J]. Cells, 2021, 10(2): 256.
- [22] MIÑAMBRES R, GUASCH R M, PEREZ-ARACÓ A, et al. The RhoA/ROCK-1/MLC pathway is involved in the ethanol-induced apoptosis by anoikis in astrocytes [J]. J Cell Sci, 2006, 119(Pt 2): 271-282.
- [23] EISA-BEYGI S, WEN X Y. Could pharmacological curtailment of the RhoA/Rho-kinase pathway reverse the endothelial barrier dysfunction associated with Ebola virus infection? [J]. Antiviral Res, 2015, 114: 53-56.
- [24] GROTHAUS J S, ARES G, YUAN C, et al. Rho kinase inhibition maintains intestinal and vascular barrier function by upregulation of occludin in experimental necrotizing enterocolitis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2018, 315(4): G514-G528.
- [25] SEBBAGH M, RENVOIZÉ C, HAMELIN J, et al. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing [J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(4): 346-352.

孙文婷, 万盈盈, 杨家熙, 等. 性别差异对牛 II 型胶原诱导的类风湿关节炎模型的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 25-34.

Sun WT, Wan YY, Yang JX, et al. Effect of gender difference on the model of rheumatoid arthritis induced by bovine type II collagen [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 25-34.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.004

性别差异对牛 II 型胶原诱导的类风湿关节炎模型的影响

孙文婷¹, 万盈盈¹, 杨家熙², 王文乾², 王皓男¹, 叶婉婷², 寇秋爱^{1*}

(1. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

【摘要】 目的 构建雌性及雄性牛 II 型胶原诱导的关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 模型, 比较性别差异对 CIA 模型关节及关节外表现的影响。**方法** 选用雌性及雄性 SD 大鼠并注射牛 II 型胶原和弗氏完全佐剂诱导 CIA 模型, 评估各组大鼠的一般情况、关节炎指数、足肿胀度、血清炎症因子及纤溶酶原激活物抑制剂水平、脾指数、膝关节及踝关节病理、右后足爪骨破坏情况、肺间质病变情况。**结果** 雌性 CIA 大鼠的关节炎指数在初次免疫后第 21 天较雄性 CIA 大鼠显著升高 ($P < 0.05$), 但两组足肿胀度在观察的任一时间点均无显著差异 ($P > 0.05$); 雌性 CIA 大鼠血清肿瘤坏死因子 α 、白介素 1 β 和脾指数均较雄性 CIA 大鼠显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.001$), 纤溶酶原激活物抑制剂水平无显著差异 ($P > 0.05$); 雌性 CIA 大鼠膝关节和踝关节病理的炎症细胞浸润及滑膜增生评分较雄性 CIA 大鼠显著升高 ($P < 0.05$), 雌性 CIA 大鼠膝关节软骨损伤及右后足爪骨破坏程度均较雄性显著升高 ($P < 0.05$); 雌性和雄性 CIA 大鼠均出现了肺间质炎症细胞浸润及轻度纤维化, 但雌性比雄性的肺间质病变更重。**结论** 使用 SD 大鼠构建的雌性及雄性 CIA 模型均能兼具关节炎及肺间质病变, 但雌性 CIA 大鼠的病变程度更重, 在使用 CIA 模型进行 RA 相关研究时应关注性别差异带来的影响。

【关键词】 类风湿关节炎; 性别差异; 牛 II 型胶原诱导的关节炎模型; 间质性肺病

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0025-10

Effect of gender difference on the model of rheumatoid arthritis induced by bovine type II collagen

SUN Wenting¹, WAN Yingying¹, YANG Jiayi², WANG Wenqian², WANG Haonan¹, YE Wanting², KOU Qiulai^{1*}

(1. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China.

2. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029)

【Abstract】 Objective To establish female and male bovine collagen-induced arthritis (CIA) models and compare the effects of gender differences on joint and extra-articular manifestations of the CIA model. **Methods** The CIA model was induced by injection of bovine type II collagen and Freund's complete adjuvant into female and male SD rats. The general condition, arthritis index, foot swelling, serum proinflammatory factors and plasminogen activator inhibitor levels, spleen index, knee and ankle joint pathologies, right rear paw bone destruction, and pulmonary interstitial lesions were

【基金项目】 中国中医科学院优势病种医院制剂新药研发专项 (ZZ15-XY-PT-07)。

【作者简介】 孙文婷 (1996—), 女, 博士研究生, 研究方向: 中医风湿病的临床与基础研究。E-mail: cherrysunwt@163.com

【通信作者】 寇秋爱 (1964—), 女, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 中医风湿病的临床与基础研究。E-mail: kouqiulai@126.com

evaluated. **Results** The arthritis index of female CIA rats was significantly higher than that of male CIA rats on day 21 after initial immunization ($P<0.05$), but no significant difference was found in the degree of foot swelling between the two groups at any time point ($P>0.05$). Serum tumor necrosis factor α , interleukin- 1β , and the spleen index of female CIA rats were significantly higher than those of male CIA rats ($P<0.05$, $P<0.001$). No significant difference was found in plasminogen activator inhibitor levels ($P>0.05$). The scores of inflammatory cell infiltration and synovial hyperplasia in the knee and ankle pathologies of female CIA rats were significantly higher than those of male CIA rats ($P<0.05$), and cartilage damage of the knee joint and bone damage of the right rear paw of female CIA rats were significantly higher than that of male rats ($P<0.05$). Both male and female CIA rats showed pulmonary interstitial inflammatory cell infiltration and mild fibrosis, but the pulmonary interstitial lesions in females were more severe than those in males. **Conclusions** Female and male CIA models established in SD rats have arthritis and pulmonary interstitial lesions, but the lesion degree in female CIA rats is more serious. When using CIA models for RA-related research, attention should be focused on the effect of gender differences.

【Keywords】 rheumatoid arthritis; gender difference; arthritis induced by bovine type II collagen; interstitial lung disease

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

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以侵蚀性、对称性关节炎为主要临床表现的自身免疫性疾病^[1]。RA 的病理特征复杂,常表现为滑膜的增殖、炎症细胞浸润、血管翳形成、软骨和骨侵蚀等。作为多系统损伤性疾病,RA 还会出现多种关节外病变,包括肺间质炎症、肺纤维化、心血管损伤等,严重影响患者的生活质量^[2]。该病在不同性别之间存在显著的不平衡,女性与男性发病比例为 3 : 1 左右,且女性患者疾病活动度更高、关节破坏更严重,这提示性别因素与 RA 的发生及预后密切相关^[3]。

胶原诱导的关节炎模型(collagen-induced arthritis, CIA)与人类 RA 具有相似的病理和免疫学特征,是目前公认的 RA 动物模型^[4-5]。其中 II 型胶原诱导的 CIA 模型使用最为广泛,II 型胶原的诱导会引起 T 细胞和 B 细胞与胶原发生免疫反应,抗 II 型胶原抗体沉积在关节中,激活补体途径并引发炎症反应,出现关节炎、骨骼破坏等表现^[6]。尽管 CIA 大鼠广泛应用于 RA 的病理生理及药物治疗的研究中,但目前 CIA 大鼠的症状是否存在性别差异以及该模型是否兼具肺间质病变尚不清楚。因此,本研究选用雄性和雌性 SD 大鼠构建牛 II 胶原诱导的 CIA 大鼠模型,探索性别差异对 CIA 大鼠关节及关节外病变的影响,为 RA 动物实验中大鼠性别的选择以及 RA 性别差异的相关研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

4~5 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只、雌性 SD

大鼠 20 只,体重(200±20)g,由中国中医科学院西苑医院实验动物中心购于斯贝福(北京)生物技术有限公司[SYXK(京)2019-0010],饲养于中国中医科学院西苑医院实验动物中心 SPF 级小动物饲养室[SYXK(京)2023-0053]。本实验已通过中国中医科学院西苑医院动物伦理审查委员会审查(2021XLA014-4),并遵守 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

牛 II 型胶原(美国 Chondrex 公司,批号:210571);完全弗氏佐剂(美国 Sigma 公司,批号:2003150981);冰醋酸溶液(上海麦克林生化科技有限公司,批号:01295);戊巴比妥钠(北京化学试剂公司,批号:020402);快速脱钙液(北京中邦万科生物科技有限公司,批号:20220701);苏木素-伊红(HE)染色液(北京中科万邦生物科技有限公司,批号:RY-0002);Masson 染色试剂盒(北京中科万邦生物科技有限公司,批号:RY-0003)。动物体质量秤(上海奥豪斯仪器有限公司);足容积测量仪(上海欣软信息科技有限公司);包埋机(武汉俊杰电子有限公司);切片机(上海徕卡仪器有限公司);酶标仪(美国 Beckman);光学显微镜(德国 Leica);X 线机(荷兰 PHILIPS)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及牛 II 型胶原溶液的配制

适应性喂养 7 d 后,分别将雌、雄性 SD 大鼠随机分为雌性对照组、雌性 CIA 组、雄性对照组、雄性 CIA 组,每组 10 只,共 4 组。依据文献^[7],在初次免疫前 1 d,将 50 mg 牛 II 型胶原溶于 25 mL 0.01 mol/L pH = 3.2 的冰醋酸溶液中,放于 4℃ 冰箱过夜备用。

1.3.2 CIA 大鼠模型的制备

使用匀浆机将制备好的牛Ⅱ型胶原溶液与 25 mL 完全弗氏佐剂反复乳化,制成含牛Ⅱ型胶原 1.0 mg/mL 的乳化液。除雌性 & 雄性对照组大鼠外,其余大鼠使用 5% 的戊巴比妥 (5.0 mL/kg) 麻醉后进行初次免疫,每只大鼠分 5 个点 (背部 3 个点、尾根部及右后足掌) 皮内注射胶原乳剂各 0.1 mL。如图 1 所示,初次免疫动物 7 d 后进行二次免疫,在大鼠尾根部皮内注射含有牛Ⅱ型胶原 1.0 mg/mL 的胶原乳液每只 0.2 mL^[8]。对照组大鼠在相同的时间点、相同的部位注射等量的生理盐水。初次免疫后第 14 天,对大鼠进行关节炎指数 (arthritis index, AI) 评分,AI 评分 ≥ 4 分为造模成功^[9]。

1.3.3 观测指标

(1) 一般情况

实验期间,每日观察大鼠的精神状态、进食情况、毛发色泽、活动灵活程度及关节的变化;初次免疫后,每 7 d 拍照记录大鼠的前后足爪关节;初次免疫前及初次免疫后每 7 d 称量 1 次大鼠体重。

(2) 关节炎指数 (arthritis index, AI)

初次免疫后第 7、14、21、28、35、42 天对雌性 & 雄性 CIA 组大鼠进行 AI 评分。依据 4 级评分法对 4 组大鼠的四肢关节进行 AI 评分,每只大鼠的 AI 评分最高为 16 分^[10]。

(3) 足肿胀度

在初次免疫前及初次免疫后第 0、7、14、21、28、35、42 天使用足容积测量仪测量大鼠右后侧足容积。测量前在大鼠右后足踝关节上 1 cm 处标记,将大鼠足爪浸入左侧注射器的水中,抽取右侧注射器上升的水至标注处,读取抽取的水体积读数即为大鼠的足容积,足肿胀度 = 造模后足容积 - 造模前足容积^[11]。

(4) X 线观察右后足爪变化

初次免疫后第 42 天,将大鼠进行麻醉。对大鼠行右后足爪 X 线检查,并由 1 名有经验的放射科医生及 1 名风湿科专家共同根据 Larsen 评分标准进

行评分,以评估右后足爪的骨破坏程度^[12]。
(5) ELISA 法检测血清炎症因子及纤溶酶原激活物抑制剂 1 (plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1) 水平

初次免疫后第 42 天,将各组大鼠麻醉后腹主动脉取血,离心后取上清,使用 ELISA 试剂盒检测血清肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素 1β (interleukin-1β, IL-1β) 以及 PAI-1 的水平。

(6) 脾指数

初次免疫后第 42 天,大鼠麻醉处死后,取各组大鼠脾称重 (图 1),并计算脾指数,脾指数 / (mg/g) = 脾质量 / 体重^[13]。

(7) HE 染色观察膝关节组织病理变化

取材后,将大鼠的右膝关节浸泡于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,使用快速脱钙液脱钙 7 d,组织梯度乙醇脱水、透明、浸蜡。将蜡块至冻台预冷 20 min 后,上切片机,切 4 mm 厚切片,将切下的蜡片至摊片机内恒温水域中展平,附于载玻片上。将粘附组织的蜡片使用 HE 染液染色后使用中性树脂封片,在光学显微镜下根据大鼠膝关节滑膜增生、炎症浸润、血管翳形成情况,进行病理损伤的半定量分析^[14]。

(8) 番红 O 固绿染色观察膝关节软骨变化

使用二甲苯将包埋有膝关节的石蜡切片脱蜡,梯度乙醇溶液脱水,使用 Weigert 苏木素滴染 5 min,洗去多余染液,分别使用固绿染液及番红染液滴染,使用体积分数 95% 乙醇分化数秒并风干,二甲苯透明,中性树胶封固后,在光学显微镜下观察大鼠膝关节软骨变化,并按照 Mankin 评分标准对软骨损伤程度进行评分^[14]。

(9) 肺组织病理学变化

取材后,将大鼠的肺组织浸泡于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,常规脱水、石蜡包埋后,切片 5 μm。将切下的蜡片放置于摊片机内恒温水域中展平,附于载玻片上。分别使用 HE 染液试剂盒进行 HE 染

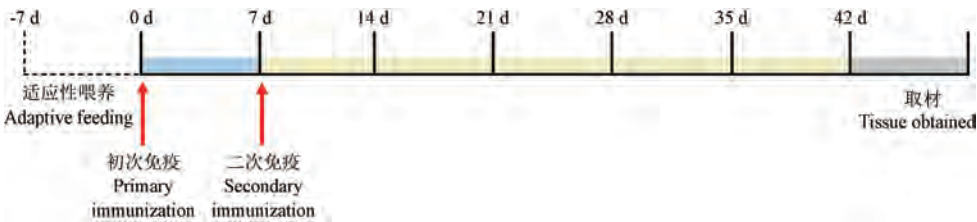


图 1 CIA 大鼠免疫及取材时间点示意图
Figure 1 Schematic diagram of immunization and sampling time points of CIA rats

色,使用 Masson 染色复合液进行 Masson 染色,在光学显微镜下观察大鼠肺组织病理形态变化^[15]。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 对数据进行统计分析,使用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示计量资料,使用单因素方差分析进行多组间的比较,两组间的比较采用 SNK-*q* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。使用 Graphpad prism 9.5.0 绘制统计图。

2 结果

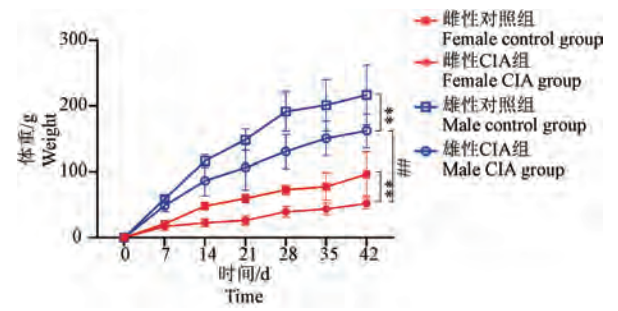
2.1 一般情况

初次免疫后第 14 天,雌性及雄性 CIA 组大鼠均造模成功。雄性及雌性对照组大鼠一般状态良好,饮食正常,活动敏捷。相比雄性 CIA 大鼠,雌性 CIA 大鼠活动受限、食量减少更明显。CIA 大鼠体重增长显著低于同性别对照组大鼠($P<0.01$),雌性 CIA 大鼠体重增长显著低于雄性 CIA 大鼠($P<0.01$,图 2)。雌性 CIA 大鼠出现关节红肿的时间点均较雄性 CIA 大鼠提前 2 d;雌性 CIA 大鼠在初次免疫第 12 天已出现明显的后足爪关节红肿,初次免疫第 19 天前足爪关节、腕关节均可观察到红肿;雄性 CIA 大鼠在初次免疫第 14 天出现明显的后足爪关节红

肿,初次免疫第 21 天前足爪关节、腕关节可观察到红肿。初次免疫第 21~28 天,雌性及雄性 CIA 大鼠各关节红肿均达到高峰,活动受限明显,甚至足爪拖行。初次免疫第 28 天后,关节红肿逐渐减轻,尤其以后足爪关节红肿减轻明显,部分大鼠出现关节畸形(图 3)。

2.2 关节炎指数及足肿胀度

初次免疫后,雌性及雄性 CIA 大鼠均逐渐出现

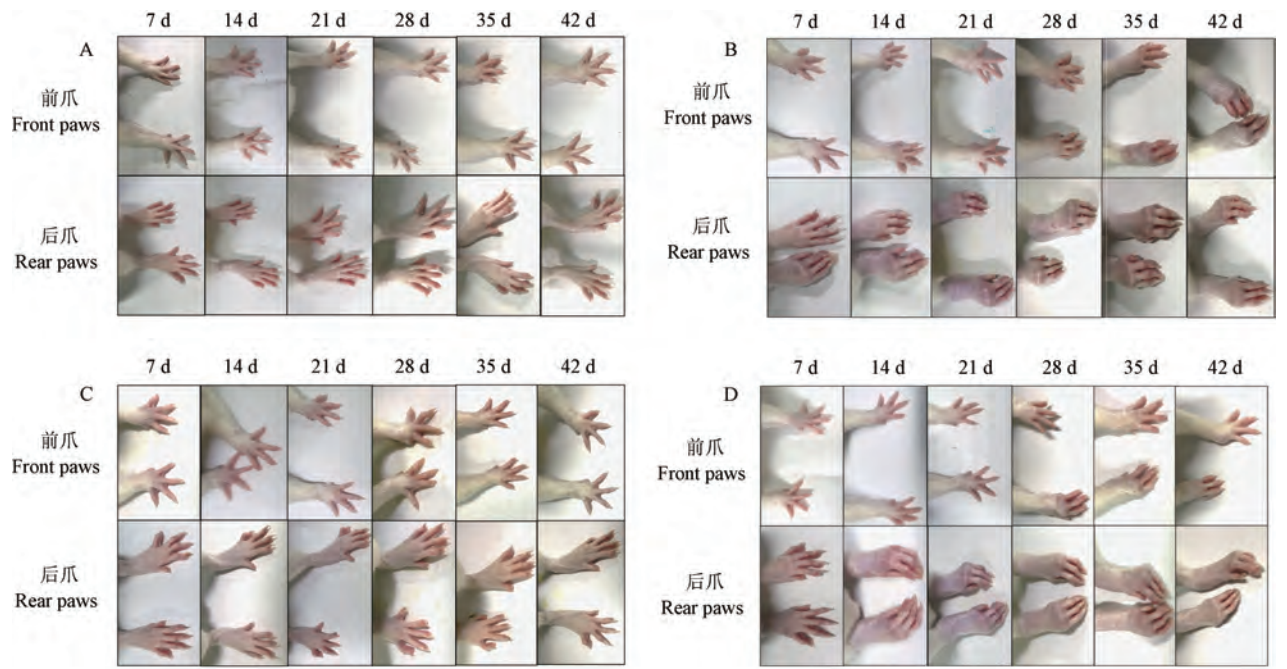


注:与同性别的对照组相比, ** $P<0.01$;与雄性 CIA 组相比, ## $P<0.01$ 。

图 2 雌性及雄性大鼠体重增长趋势图

Note. Compared with control group of the same sex, ** $P<0.01$. Compared with the male CIA group, ## $P<0.01$.

Figure 2 Weight growth trend of female and male rats



注:A:雌性对照组;B:雌性 CIA 组;C:雄性对照组;D:雄性 CIA 组。

图 3 雌性及雄性大鼠前后足爪图像

Note. A, Female control group. B, Female CIA group. C, Male control group. D, Male CIA group.

Figure 3 Images of front and rear paws of female and male rats

关节炎,初次免疫后第 21~28 天,关节炎指数逐渐达到峰值。初次免疫后第 21 天,相比雄性大鼠,雌性大鼠的 AI 评分显著升高($P<0.05$),其余时间点均无显著差异(图 4A)。

初次免疫后,雄性及雌性 CIA 大鼠逐渐出现后肢足肿胀,初次免疫后第 21~28 天,足肿胀度逐渐达到峰值,后逐渐呈下降趋势。雄性及雌性大鼠足肿胀度在各时间点均无显著差异($P>0.05$,图 4B)。

2.3 血清炎症因子及 PAI-1 水平

与同性别对照组比较,雌性及雄性 CIA 大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、PAI-1 水平均显著升高($P<0.05$, $P<0.001$);与雄性 CIA 大鼠相比,雌性 CIA 大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平均显著升高($P<0.05$, $P<0.05$),但 PAI-1 水平无显著差异($P>0.05$,表 1)。

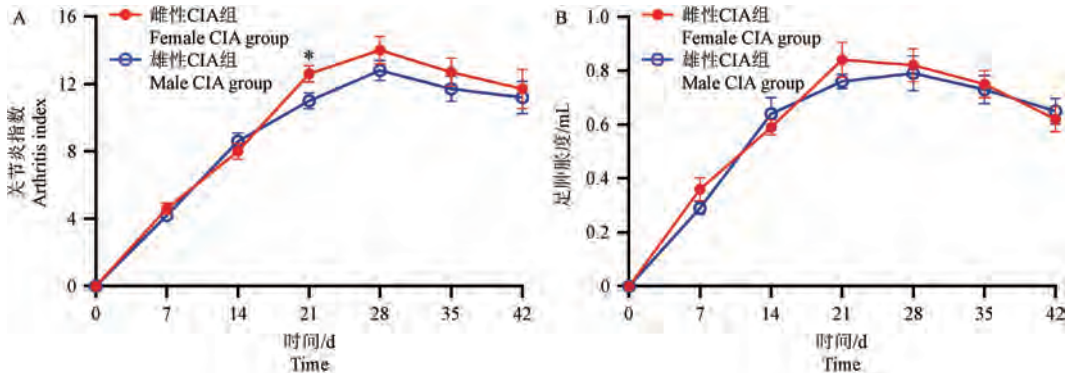
2.4 脾指数

与同性别对照组比较,雌性及雄性 CIA 组大鼠脾指数均显著升高($P<0.01$, $P<0.001$);相比雄性 CIA 大鼠,雌性 CIA 大鼠的脾指数显著升高($P<0.001$,图 5)。

2.5 膝关节的病理学观察

膝关节 HE 染色结果显示,雄性及雌性对照组大鼠膝关节结构清晰完整,关节面光滑,无炎症细胞浸润及滑膜血管翳的侵袭。雄性及雌性 CIA 大鼠均可见膝关节结构破坏,关节间隙变窄或消失,滑膜内可见大量的炎症细胞浸润,关节面被大量的滑膜血管翳侵蚀,关节面不连续。膝关节病理评分结果显示,雌性 CIA 大鼠在滑膜增生、炎症浸润方面均较雄性 CIA 大鼠严重($P<0.05$),但在血管翳方面未见显著差异($P>0.05$,图 6A、6B)。

在番红 O 固绿染色中,软骨基质中蛋白多糖会呈现红染,胶原纤维及软骨下骨小梁会呈绿色。右膝关节的番红 O 固绿染色结果显示,雌性及雄性对照组大鼠关节软骨基质表面完整、软骨细胞排列规则紧密,无明显软骨损伤;雌性及雄性 CIA 大鼠番红染色部分丢失,潮线不完整,提示软骨表面破坏严重,软骨面被大量的纤维组织侵蚀,软骨面断裂、不连续,甚至消失。Mankin 评分结果显示,相比雄性 CIA 大鼠,雌性 CIA 大鼠膝关节软骨损伤更严重



注:A:关节炎指数趋势图;B:足肿胀度趋势图。与雄性 CIA 组相比, * $P<0.05$ 。

图 4 CIA 大鼠关节炎指数及足肿胀度趋势图

Note. A. Arthritis index trend chart. B. Trend chart of foot swelling. Compared with the male CIA group, * $P<0.05$.

Figure 4 Trend chart of arthritis index and foot swelling degree of CIA rats

表 1 雌性及雄性大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 和 PAI-1 的水平比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 1 Serum level of rats in each group TNF- α , IL-1 β and PAI-1 levels

组别 Groups	TNF- α / (pg/mL)	IL-1 β / (pg/mL)	PAI-1/ (pg/mL)
雌性对照组 Female control group	18.26 $\pm$ 1.62	68.32 $\pm$ 5.04	198.76 $\pm$ 8.07
雌性 CIA 组 Female CIA group	42.47 $\pm$ 4.53***	106.43 $\pm$ 4.75***	209.12 $\pm$ 6.58*
雄性对照组 Male control group	17.25 $\pm$ 2.29	70.42 $\pm$ 3.55	188.87 $\pm$ 6.08
雄性 CIA 组 Male CIA group	38.37 $\pm$ 1.34***#	100.45 $\pm$ 3.16***#	207.07 $\pm$ 8.93*

注:与同性别对照组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$;与雄性 CIA 组相比, # $P<0.05$ 。

Note. Compared with control group of the same sex, * $P<0.05$, *** $P<0.001$. Compared with the male CIA group, # $P<0.05$.

($P<0.05$,图 6C、6D)。

2.6 踝关节的病理学观察

踝关节 HE 染色结果所示,雄性及雌性对照组大鼠踝关节结构清晰完整,关节面光滑,无炎症细胞浸润及滑膜血管翳的侵蚀。雄性及雌性 CIA 大鼠踝关节均可见关节结构破坏,关节间隙狭窄甚至消失,滑膜血管翳中有大量炎症细胞浸润,部分关

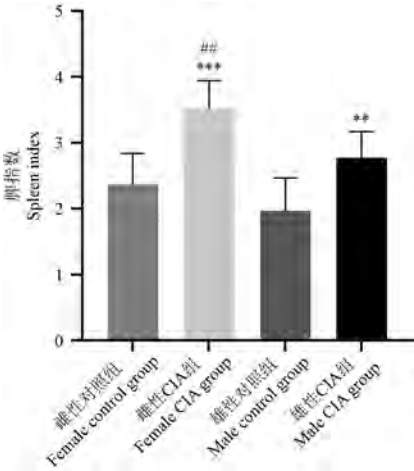
节面均被严重侵蚀。踝关节病理评分结果显示,雌性 CIA 大鼠在滑膜增生、炎症浸润方面均较雄性 CIA 大鼠严重($P<0.05$),但在血管翳方面无显著差异($P>0.05$,图 7)。

2.7 足爪 X 线观察

右后足爪 X 线显示,雌性及雄性对照组大鼠关节面平整,雌性及雄性 CIA 组大鼠可见明显的关节破坏,关节间隙狭窄,甚至出现足趾关节融合,且雌性比雄性大鼠关节破坏更明显;Larsen 评分显示,雌性 CIA 组大鼠骨破坏较雄性 CIA 组大鼠严重($P<0.05$,图 8)。

2.8 肺组织的病理学观察

肺组织 HE 染色结果显示,雌性及雄性对照组大鼠肺组织 HE 染色可见清晰完整的肺泡结构,未见明显的炎症细胞浸润。在雌性及雄性 CIA 组大鼠肺组织中,尤其是胸膜下区域,均可见大量的炎症细胞浸润,肺泡结构紊乱,肺泡壁破坏、肺间隔有增宽增粗,局部有毛细血管扩张、充血;雌性 CIA 大鼠比雄性 CIA 大鼠的病变程度和范围更重(图 9A)。肺组织 Masson 染色结果显示,雌性及雄性对照组大鼠肺组织结构正常,无明显肺纤维化;雌性及雄性 CIA 组大鼠的胸膜下区域肺间质及血管周围均可见轻度的肺纤维化,雌性较雄性 CIA 组大鼠肺纤维化程度重(图 9B)。

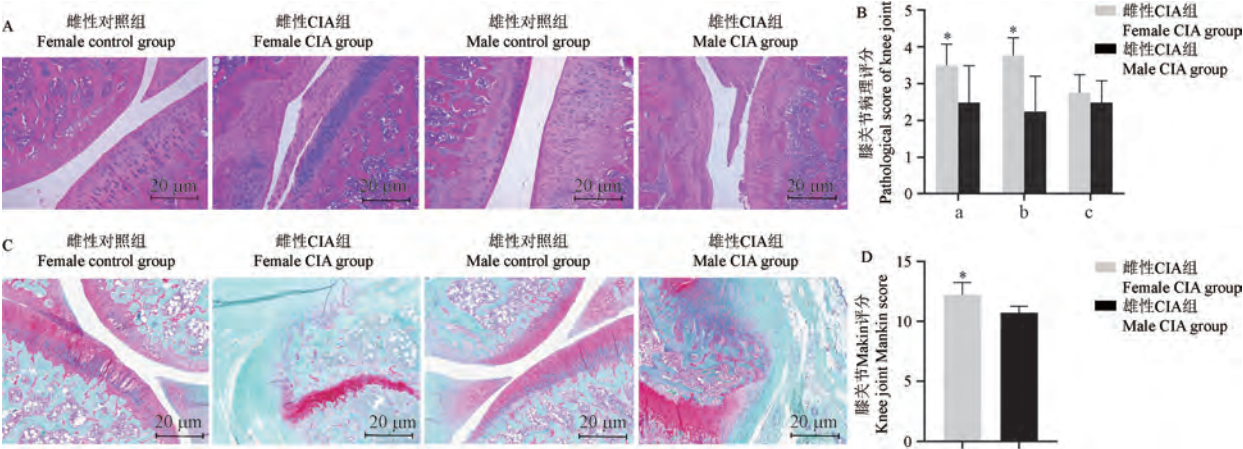


注:与同性别对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与雄性 CIA 组相比, ## $P<0.01$ 。

图 5 雌性大鼠脾指数

Note. Compared with control group of the same sex, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with the male CIA group, ## $P<0.01$.

Figure 5 Statistics of spleen index in female and male rats

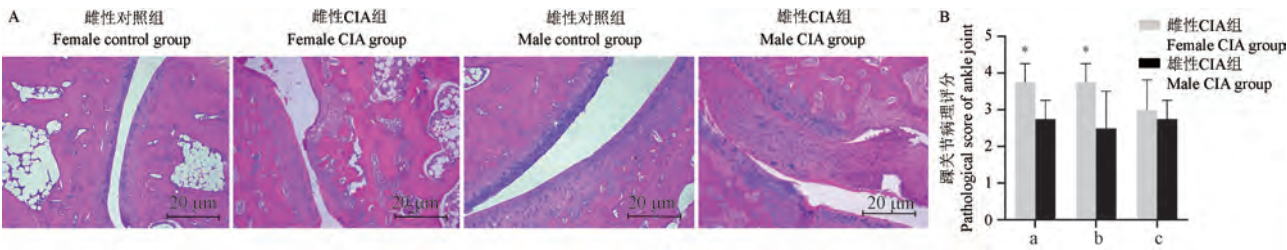


注:A:膝关节 HE 染色;B:膝关节病理评分柱状图;C:膝关节番红 O 固绿染色;D:膝关节软骨损伤 Mankin 评分。a:滑膜增生;b:炎症浸润;c:血管翳形成。与雄性 CIA 组相比, * $P<0.05$ 。

图 6 雌性大鼠膝关节 HE 染色及番红 O 固绿染色

Note. A, HE staining of knee joint. B, Histogram of pathological score of knee joint. C, Cronin O solid green staining of knee joint. D, Mankin score of knee joint cartilage injury. a, Synovial hyperplasia. b, Inflammatory infiltration. c, Pannus formation. Compared with the male CIA group, * $P<0.05$.

Figure 6 HE staining and safranin O fast green staining of knee joint in female and male rats

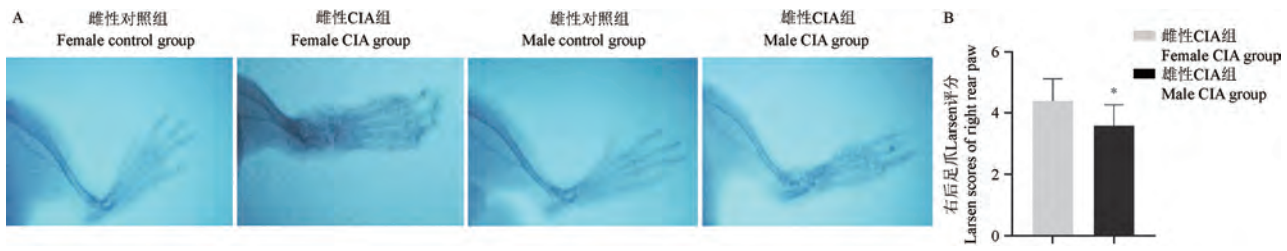


注:A:踝关节 HE 染色;B:踝关节病理评分。a:滑膜增生;b:炎症浸润;c:血管翳形成。与雄性 CIA 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 7 雌性及雄性大鼠踝关节 HE 染色

Note. A, HE staining of ankle joint. B, Pathological score of ankle joint. a, Synovial hyperplasia. b, Inflammatory infiltration. c, Pannus formation. Compared with the male CIA group, * $P < 0.05$.

Figure 7 HE staining of ankle joint in female and male rats

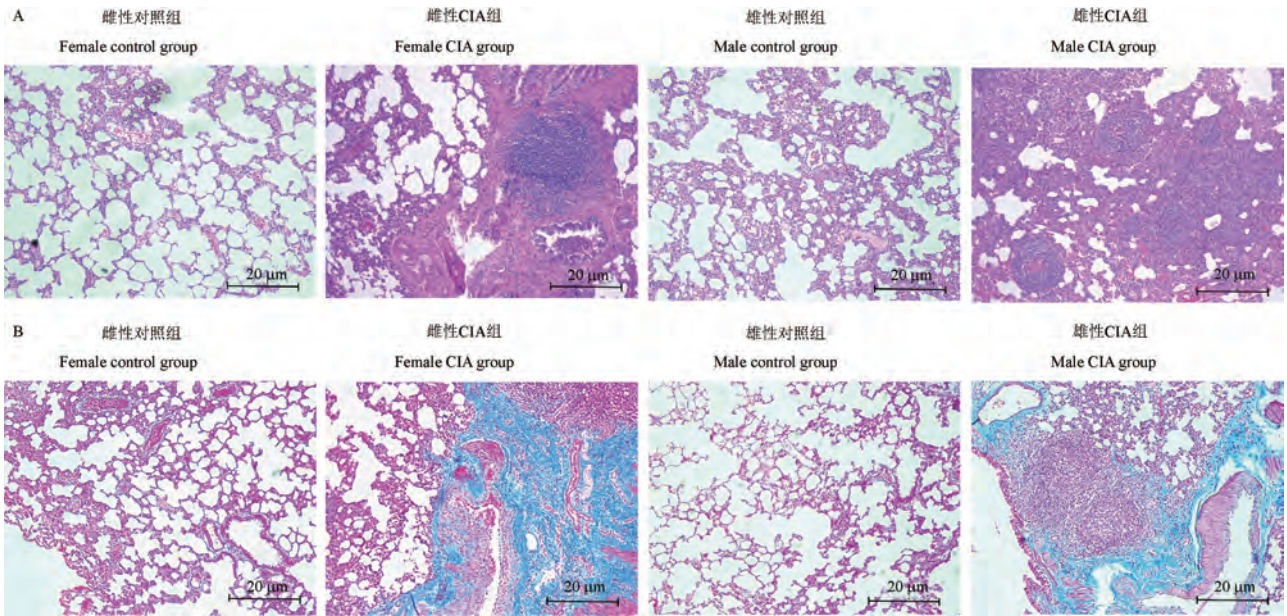


注:A:右后足爪 X 线;B:右后足爪 Larsen 评分。与雄性 CIA 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 8 雌性及雄性大鼠右后足爪 X 线

Note. A, Right rear paw X-ray. B, Larsen scores of right rear paw. Compared with the male CIA group, * $P < 0.05$.

Figure 8 Right rear paw X-ray of female and male rats



注:A:肺组织 HE 染色;B:肺组织 Masson 染色。

图 9 肺组织 HE 染色及 Masson 染色

Note. A, HE staining of lung tissue. B, Masson staining of lung tissue.

Figure 9 HE staining and Masson staining of lung tissue

3 讨论

RA 是一种病因不明的自身免疫性疾病,病变主要位于四肢小关节,随着疾病的进展,可累及全身各个系统,严重影响患者的生活质量。RA 的发病存在着性别不平衡,女性与男性的发病比例通常为 3:1 左右。根据一项全球 RA 的调查结果,女性 RA 的患病率约为 0.35%,而男性患病率约为 0.13%^[16]。相比男性,女性患者发病更早、疾病活动度更高、病程更长、致残率更高^[17]。有研究认为,这种差异可能与遗传、生活方式、性激素等多种因素有关^[3,18]。选择合适的动物模型是深入探究 RA 性别差异及其相关病理生理机制的关键环节,CIA 模型是最常用的 RA 动物模型,也是 RA 体内研究的标准动物模型。目前雌性及雄性 CIA 大鼠在 RA 的动物实验研究中均有应用,但这些研究多集中在关节炎的发病机制及关节炎治疗领域^[9,19];针对 CIA 大鼠性别差异的研究集中在关节炎及关节病理损伤的比较,但在不同的研究中结论并不一致,且尚未探究关节外病变的差异^[20-22]。本研究通过构建雄性及雌性 CIA 大鼠,从关节炎症、软骨损伤、骨破坏、心血管风险相关的血清 PAI-1 的表达情况等多个方面比较了雄性及雌性 CIA 大鼠的病变差异;同时也首次探索了 CIA 大鼠肺组织的病理变化,初步提示了雌性及雄性 CIA 大鼠均能兼备关节炎和肺间质病变,但雌性较雄性病变程度更重。

目前报道的制作 CIA 模型的大鼠包括 DA 大鼠、Lewis 大鼠、Wister 大鼠、SD 大鼠,DA 大鼠对新环境适应力差、免疫力低,且多需国外引进、价格昂贵,Lewis 大鼠、Wister 大鼠、SD 大鼠均为国内 CIA 研究常用的大鼠,结合课题组既往的造模经验,本研究选择了 SD 大鼠进行造模^[9]。在本研究中发现,雌性 CIA 大鼠足爪关节症状比雄性大鼠早 2 d 出现,雌性 CIA 大鼠的 AI 评分在第 21 天较雄性大鼠高;雌性 CIA 大鼠脾指数较雄性 CIA 大鼠升高,雌性 CIA 大鼠膝关节、踝关节在炎症细胞浸润、滑膜细胞增殖等方面的病变程度均较雄性大鼠严重。与本研究结果相似,Dimitrijević 等^[22]在使用 DA 大鼠诱导的 CIA 模型中也发现雌性大鼠关节炎评分在第 17~39 天高于雄性大鼠,并且雌性大鼠较雄性大鼠发病提早 3 d。研究认为,这一现象的发生可能与 Th17/Treg 轴有关,与雄性大鼠相比,雌性大鼠发炎的足爪组织中 GM-CSF、TNF- α 和 IL-6、IL-1 β 水

平较高,这些炎症因子能够驱动 Th17 细胞分化,促进 IL-17 的分泌,导致雌性 CIA 大鼠关节症状更严重^[22]。此外,与雄性大鼠相比,雌性 CIA 大鼠血清中的促氧化剂/抗氧化剂比率升高,脾中单核细胞/巨噬细胞的生成增强,且单核细胞 CD11b⁺ 细胞表现出更强的吞噬、粘附和迁移能力,这种不同性别之间单核细胞系所带来差异可能也是导致雌性 CIA 大鼠症状更严重的原因^[23]。与本次研究使用的 SD 大鼠不同,在 DA 大鼠制作的 CIA 模型中雄性大鼠仅有后足显示关节炎的迹象,未出现前爪的关节炎,考虑可能与造模动物本身的基因易感性有关。值得注意的是,在药物相关的研究中已证实,不同性别 CIA 模型所表现出的差异会对药物的治疗作用产生影响,比如,一项关于蔡普生对 CIA 大鼠的治疗作用的研究发现,蔡普生在雄性 CIA 大鼠中的作用强于雌性 CIA 大鼠,尤其是对足爪肿胀方面^[24]。这也提示我们,在药物治疗的试验研究中应当关注性别差异引起的疗效差异。

尽管 CIA 模型是目前常用的 RA 动物模型,但对于该模型的关节外病变目前研究较少。类风湿关节炎间质性肺疾病(rheumatoid arthritis-interstitial lung disease,RA-ILD)是 RA 最常见的关节外表现,约有 2%~10% 的 RA 患者会发展为该病,也是 RA 患者死亡的主要原因之一^[25]。该病主要表现为肺部的炎症及纤维化,其常见的病理类型报告普通间质性肺病和非特异性间质性肺病,其中以非特异性间质性肺病最为多见,然而 RA-ILD 的发病机制尚不清楚。合适的动物模型是深入探索 RA-ILD 的关键,既往研究 RA-ILD 多采用博来霉素诱导的肺纤维化动物模型,尽管这种模型造模周期短,形成的间质性肺病相对稳定,但是这与 RA-ILD 不可逆、进展缓慢的特点以及病理变化差异较大,并且该模型无法兼备关节炎和肺间质病变两种疾病状态,存在诸多不足^[26-27]。因此,我们探索了 CIA 大鼠是否存在肺间质性病变。本研究发现,雌性及雄性 CIA 大鼠肺组织病理中均可以观察到大量的炎症细胞浸润,肺泡结构紊乱,肺泡壁破坏,尤其是胸膜下区更为明显,这与人类 RA-ILD 是相似的。尽管雌性及雄性 CIA 大鼠的胸膜下区域肺间质及血管周围均可见轻度的肺纤维化,但相比雄性 CIA 大鼠,雌性的炎症细胞浸润程度、纤维化程度更重。在 CIA 小鼠的研究中有文献报道,初次免疫 49 d 后,肺组织周围可见片状间质浸润,尤其在胸膜下区域,其中

以 M2 表型的 CD11b 巨噬细胞增多为主,该表型的巨噬细胞可以促进纤维化发生,但研究者未观察到 CIA 小鼠的肺纤维化,此外,CIA 小鼠模型的肺组织还存在 IgG 和补体 C3 的沉积,以及抗瓜氨酸纤维蛋白抗体的产生。遗憾的是,这项研究仅针对雄性 CIA 小鼠进行了探索,雌性 CIA 小鼠中是否也存在相似的表现尚不清楚^[28]。

除间质性肺疾病外,RA 患者的动脉粥样硬化和继发的心血管事件发生率也高于一般人群^[29]。既往有研究证实,CIA 大鼠模型存在血管内皮损伤等早期动脉粥样硬化改变^[30]。PAI-1 是调节纤溶活性的一种单链糖蛋白,它能减少纤维蛋白的清除,使血液处于高凝状态,导致动脉粥样斑块形成、粥样斑块破裂、血栓形成等,是心血管事件的危险因素^[31]。在 RA 中 PAI-1 的表达较正常人显著升高^[32]。在本研究中,我们发现 CIA 大鼠的 PAI-1 表达较同性别对照组大鼠均显著升高,但未观察到雌性与雄性 CIA 大鼠的 PAI-1 表达具有显著差异。类似的,Kwieciński 等^[33]在雄性 DBA/1 小鼠诱导的 CIA 小鼠模型中也观察到血清 PAI-1 表达较正常雄性小鼠显著升高,并认为 CIA 小鼠能够模拟人类 RA 纤溶系统的变化,但该研究同样未观察雌性小鼠。

在本研究中,我们对比了不同性别的 CIA 模型之间关节及关节外病变的差异,并首次探索了 SD 大鼠诱导的 CIA 模型是否合并有间质性肺炎。该研究提示,使用 SD 大鼠构建的雄性及雌性 CIA 模型均能兼备关节炎和肺间质病变两种疾病状态,相比雄性 CIA 大鼠,雌性 CIA 大鼠发病时间更早,AI 评分、血清炎症因子及脾指数均更高,膝关节及踝关节病理损伤、右后足爪骨破坏程度均更重。这些差异也反映了不同性别的 CIA 大鼠对免疫损伤的反应是不同的,在 CIA 大鼠相关的试验研究中,尤其在药物治疗领域,应当考虑到性别差异带来的影响。本研究尚存在一些不足,尽管我们在雄性及雌性 CIA 大鼠初次免疫后的第 42 天观察到了肺间质性病变,但这种病变是否稳定存在尚不清楚,仍需在未来的研究通过更大的样本量和更长的实验周期进行验证。

参考文献:

[1] RADU A F, BUNGAU S G. Management of rheumatoid arthritis: an overview [J]. Cells, 2021, 10(11): 2857.
[2] 徐洪琳, 张蜀澜. 类风湿关节炎相关肺间质病变生物标志物

[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2021, 15(4): 448-453.
XU H L, ZHANG S L. Biomarkers for rheumatoid arthritis-related interstitial lung disease [J]. Chin J Allergy Clin Immunol, 2021, 15(4): 448-453.
[3] FAVALLI E G, BIGGIOGGERO M, CROTTI C, et al. Sex and management of rheumatoid arthritis [J]. Clinic Rev Allerg Immunol, 2019, 56(3): 333-345.
[4] ROSLONIEC E F, CREMER M, KANG A H, et al. Collagen-induced arthritis [J]. Curr Protoc Immunol, 2001, Chapter 15: 15.5.1-15.5.25.
[5] WANG S, ZHOU Y, HUANG J, et al. Advances in experimental models of rheumatoid arthritis [J]. Eur J Immunol, 2023, 53(1): e2249962.
[6] CHOUDHARY N, BHATT L K, PRABHAVALKAR K S. Experimental animal models for rheumatoid arthritis [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2018, 40(3): 193-200.
[7] GAO Q, QIN H, ZHU L, et al. Celastrol attenuates collagen-induced arthritis via inhibiting oxidative stress in rats [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 84: 106527.
[8] MIYOSHI M, LIU S. Collagen-induced arthritis models [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1868: 3-7.
[9] 马天越, 方宜梅, 郭甘霖, 等. 二四汤对牛Ⅱ型胶原诱导大鼠类风湿关节炎的干预机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(5): 38-45.
MA T Y, FANG Y M, GUO G L, et al. Mechanisms of ersi decoction on rheumatoid arthritis rats induced by bovine type II collagen-solution [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(5): 38-45.
[10] POUTOGLIDOU F, POURZITAKI C, MANTHOU M E, et al. Infliximab prevents systemic bone loss and suppresses tendon inflammation in a collagen-induced arthritis rat model [J]. Inflammopharmacology, 2021, 29(3): 661-672.
[11] 南丽红, 刘玉凤, 黄枚, 等. 雷公藤炮制前后对胶原诱导型关节炎大鼠的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(11): 5795-5799.
NAN L H, LIU Y F, HUANG M, et al. Effects of *Tripterygium wilfordii* Hook. F. before and after processing on CIA model rats [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(11): 5795-5799.
[12] LI X, ZHANG L, XU Y, et al. Therapeutic effect of matrine on collagen-induced arthritis rats and its regulatory effect on RANKL and OPG expression [J]. J Immunol Res, 2021, 2021: 4186102.
[13] 富雨萍, 李佳钰, 陆麒麟, 等. 从炎症、凋亡与自噬评价 Mtb 诱导类风湿关节炎风湿热痹动物模型 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(23): 44-52.
FU L P, LI J Y, LU Q J, et al. Evaluation of animal model of rheumatoid arthritis induced by *Mycobacterium tuberculosis* from inflammation, apoptosis and autophagy [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(23): 44-52.
[14] MU Y R, CAI L, ZHOU M Y, et al. Acetazolamide ameliorates

- the severity of collagen-induced arthritis in rats; Involvement of inducing synovial apoptosis and inhibiting Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 90: 107214.
- [15] 景菲, 胡旭东, 彭渊, 等. 结合网络药理学探讨扶正化癆方对肺纤维化小鼠 PI3K-Akt 信号通路的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2022, 29(2): 28-33.
- JING F, HU X D, PENG Y, et al. Exploring the effects of fuzheng Huayu recipe on PI3K-akt signaling pathway in mice with pulmonary fibrosis based on network pharmacology [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2022, 29(2): 28-33.
- [16] CROSS M, SMITH E, HOY D, et al. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(7): 1316-1322.
- [17] SHIN S, PARK E H, KANG E H, et al. Sex differences in clinical characteristics and their influence on clinical outcomes in an observational cohort of patients with rheumatoid arthritis [J]. *Joint Bone Spine*, 2021, 88(3): 105124.
- [18] NGO S T, STEYN F J, MCCOMBE P A. Gender differences in autoimmune disease [J]. *Front Neuroendocrinol*, 2014, 35(3): 347-369.
- [19] 张冬梅, 李宝丽. 痹祺胶囊对胶原诱导性关节炎大鼠骨桥蛋白表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(3): 1359-1362.
- ZHANG D M, LI B L. Effects of Biqi Capsule on the expression of osteopontin in collagen-induced arthritis rats [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2017, 32(3): 1359-1362.
- [20] 赵宏艳, 王燕, 肖诚, 等. 不同品系、不同性别对大鼠 CIA 发病情况的比较研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2010, 16(9): 761-764.
- ZHAO H Y, WANG Y, XIAO C, et al. Comparative study of the incidence in collagen-induced arthritis rats of different gender and species [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*, 2010, 16(9): 761-764.
- [21] 秦苏萍, 李慧, 李向阳, 等. 性别差异对类风湿性关节炎大鼠模型的影响[J]. *徐州医学院学报*, 2014, 34(12): 865-867.
- QIN S P, LI H, LI X Y, et al. Effects of gender on rats with rheumatoid arthritis [J]. *Acta Acad Med Xuzhou*, 2014, 34(12): 865-867.
- [22] DIMITRIJEVIĆ M, ARSENOVIĆ-RANIN N, KOSEC D, et al. Sexual dimorphism in Th17/Treg axis in lymph nodes draining inflamed joints in rats with collagen-induced arthritis [J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 76: 198-214.
- [23] DIMITRIJEVIĆ M, ARSENOVIĆ-RANIN N, BUFAN B, et al. Sex-based differences in monocytic lineage cells contribute to more severe collagen-induced arthritis in female rats compared with male rats [J]. *Inflammation*, 2020, 43(6): 2312-2331.
- [24] LI X, DUBOIS D C, ALMON R R, et al. Modeling sex differences in pharmacokinetics, pharmacodynamics, and disease progression effects of naproxen in rats with collagen-induced arthritis [J]. *Drug Metab Dispos*, 2017, 45(5): 484-491.
- [25] KAWANO-DOURADO L, DOYLE T J, BONFIGLIOLI K, et al. Baseline characteristics and progression of a spectrum of interstitial lung abnormalities and disease in rheumatoid arthritis [J]. *Chest*, 2020, 158(4): 1546-1554.
- [26] 李燕飞, 胡长平, 李峰. 肺纤维化动物模型研究进展[J]. *中南医学科学杂志*, 2016, 44(2): 211-215.
- LI Y F, HU C P, LI F. Research progress of animal models of pulmonary fibrosis [J]. *J Med Sci Cent South China*, 2016, 44(2): 211-215.
- [27] 姚璐莎, 王雁芳, 范伏元. 通痹颗粒对类风湿关节炎继发肺间质病变模型大鼠的保护作用[J]. *世界中医药*, 2020, 15(12): 1743-1746.
- YAO L S, WANG Y F, FAN F Y. Protective effect of Tongbi Granule on rats with pulmonary interstitial disease secondary to rheumatoid arthritis [J]. *World Chin Med*, 2020, 15(12): 1743-1746.
- [28] SATO T, SATOOKA H, ICHIOKA S, et al. Citrullinated fibrinogen is a target of auto-antibodies in interstitial lung disease in mice with collagen-induced arthritis [J]. *Int Immunol*, 2020, 32(8): 533-545.
- [29] 杨洋, 张晓红, 黄鹤. 类风湿关节炎与心血管疾病相关性的研究进展[J]. *中国心血管杂志*, 2019, 24(6): 571-574.
- YANG Y, ZHANG X H, HUANG H. Research advances on the correlation between rheumatoid arthritis and cardiovascular disease [J]. *Chin J Cardiovasc Med*, 2019, 24(6): 571-574.
- [30] 李振彬, 焦爱军, 刘文萍, 等. 三七总皂苷配伍雷公藤多苷对胶原诱导性关节炎大鼠心血管损伤的保护作用[J]. *解放军医药杂志*, 2015, 27(1): 52-55.
- LI Z B, JIAO A J, LIU W P, et al. Protective effect of *Panax notoginsenosidum* combined with *Tripterygium* glycosides on the cardiovascular injury in rats with collagen induced arthritis [J]. *Med Pharm J Chin People's Liberation Army*, 2015, 27(1): 52-55.
- [31] TORRES-CARRILLO N, TORRES-CARRILLO N M, MARTÍNEZ-BONILLA G E, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 C/G polymorphism in relation to plasma levels in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Exp Med*, 2009, 9(3): 223-228.
- [32] MCENTEGART A, CAPELL H A, CRERAN D, et al. Cardiovascular risk factors, including thrombotic variables, in a population with rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2001, 40(6): 640-644.
- [33] KWIECIŃSKI J, JOSEFSSON E, JIN T. Fibrinolysis is down-regulated in mouse collagen-induced arthritis, but its normalization does not alleviate the course of disease [J]. *Inflamm Res*, 2011, 60(11): 1021-1029.

马林纳,马堃,范晓迪,等. 雷公藤多苷致小鼠早发性卵巢功能不全模型的不同时间点进展研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 35-44, 153.

Ma LN, Ma K, Fan XD, et al. Progression of *Tripterygium wilfordii* polyglycoside in mice with premature ovarian insufficiency at various time points [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 35-44, 153.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.005

雷公藤多苷致小鼠早发性卵巢功能不全模型的不同时间点进展研究

马林纳¹, 马堃^{2*}, 范晓迪^{3*}, 罗洁², 高山凤², 李佳妮², 张涵¹

(1.天津中医药大学,天津 301617;2.中国中医科学院西苑医院,北京 100091;

3.中国中医科学院西苑医院基础医学研究所,北京 100091)

【摘要】 目的 探讨雷公藤多苷致早发性卵巢功能不全(POI)小鼠模型相关指标的变化,确定采取干预措施的最佳时间点。**方法** 将 40 只 ICR 雌性小鼠随机分为对照组、A、B、C、D 模型组,每组 8 只。对照组灌胃纯水 14 d (0.01 mL/10 g),其余各组给予雷公藤多苷混悬液(80 mg/kg,0.01 mL/10 g)分别连续灌胃 1 d(A 模型组)、3 d(B 模型组)、7 d(C 模型组)、14 d(D 模型组),并分批次取材。称量各组小鼠体重、湿重子宫和双侧卵巢;酶联免疫法检测各组小鼠血清 FSH、LH、E₂、P、AMH、INH-B、T 含量;HE 染色观察各组小鼠各级卵泡、黄体的数量及发育状态;TUNEL 荧光染色法检测各组小鼠卵巢内凋亡面积;IHC 法检测各组小鼠卵巢中 VEGFA、CD34、EPO 蛋白阳性表达;PCR 法检测各组小鼠 HIF-1 α 、SDF-1、CXCR4 的 mRNA 表达量。**结果** 与对照组比较,A 模型组各指标变化不符合 POI 成模标准;B 模型组小鼠卵巢指数、子宫指数、体重显著降低($P<0.01$),C 模型组体重显著下降($P<0.01$),D 模型组卵巢指数明显下降($P<0.05$);B、C、D 模型组血清指标 FSH、LH 含量升高($P<0.05$, $P<0.01$),E₂、PROG、AMH、INH-B、T 含量下降($P<0.01$);B、C、D 模型组始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡、排卵前卵泡及黄体数量明显减少($P<0.05$, $P<0.01$),闭锁卵泡数量显著增多($P<0.01$);A、B、C、D 模型组 TUNEL 荧光染色凋亡面积明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);B、C、D 模型组 CD34、VEGFA、EPO 阳性表达明显下降($P<0.05$, $P<0.01$);A、B 模型组 HIF-1 α 、SDF-1、CXCR4 的 mRNA 表达量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与 B 模型组相比,C、D 模型组相关指标发生明显变化,提示 C、D 模型较严重,趋向 POF 发展。**结论** B 模型组是卵巢功能从受损状态 POI 发展到不可逆卵巢早衰(POF)的转折点,提示雷公藤多苷给药 3 d 是诱导 POI 疾病模型及药物有效干预的最佳时间。

【关键词】 早发性卵巢功能不全;雷公藤多苷;颗粒细胞;血管新生;病理性缺氧

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0035-10

Progression of *Tripterygium wilfordii* polyglycoside in mice with premature ovarian insufficiency at various time points

MA Linna¹, MA Kun^{2*}, FAN Xiaodi^{3*}, LUO Jie², GAO Shanfeng², LI Jiani², ZHANG Han¹

(1. Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin 301617, China. 2. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091. 3. Institute of Basic Medical Sciences, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091)

【基金项目】 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A02406);北京市自然科学基金(7212193);北京市科技计划(Z171100001017104)。

【作者简介】 马林纳(1995—),女,博士研究生,研究方向:中医妇科学。E-mail:malinna18703626180@163.com

【通信作者】 马堃(1962—),女,医学博士,研究员,研究方向:中医妇科学。E-mail:mkun1230@163.com

范晓迪(1985—),女,医学博士,副研究员,研究方向:中药学。E-mail:xiaodi.1018@163.com

* 共同通信作者

[Abstract] Objective Changes in relevant indexes in the mouse model of early-onset ovarian insufficiency caused by *Tripterygium wilfordii* polyglycoside were analyzed, and the optimal time point for intervention was determined. **Methods** Forty female ICR mice were randomly divided into control and A, B, C, and D model groups with eight mice in each group. The control group was gavaged with purified water for 14 days (0.01 mL/10 g), and the remaining groups were administered a *Tripterygium wilfordii* polyglycoside suspension (80 mg/kg, 0.01 mL/10 g) for 1 day (A model group), 3 days (B model group), 7 days (C model group), or 14 days (D model group), and samples were collected. Body weight and wet weights of the uterus and bilateral ovaries of mice were determined in each group. Serum FSH, LH, E2, P, AMH, INH-B, and T contents were measured using enzyme-linked immunoassays. HE staining was used to observe the number and developmental status of follicles and corpus luteum at all levels in mice of each group. TUNEL staining was used to detect the apoptosis in the ovaries of mice in each group. IHC detected expression of VEGFA, CD34, and EPO proteins in the ovaries of mice in each group. mRNA expression of HIF-1 α , SDF-1, and CXCR4 in each group of mice was detected by PCR. **Results** Compared with the control group, changes in indicators in model A mice did not meet the POI modeling standard. The ovarian index, uterine index, and body weight of mice in the B model group were decreased significantly ($P<0.01$), the weight of the C model group was decreased significantly ($P<0.01$), and the ovarian index of the D model group was decreased significantly ($P<0.05$). Serum contents of FSH and LH in B, C, and D model groups were increased ($P<0.05$, $P<0.01$), the E2, PROG, AMH, INH-B, and T contents were decreased ($P<0.01$). The numbers of basal follicles, pre-sinus follicles, sinusoidal follicles, antral follicles, preovulatory follicles, and corpus luteum were decreased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$) and the number of atresia follicles was increased significantly ($P<0.01$) in B, C, and D model groups. The apoptotic area of TUNEL staining in A, B, C, and D model groups was increased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$). Expression of CD34, VEGFA, and EPO in B, C, and D model groups was decreased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$). mRNA expression of HIF-1 α , SDF-1, and CXCR4 in A and B model groups was significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the B model group, the relevant indexes of C and D model groups were changed significantly, indicating that C and D models were more serious and tended to develop POF. **Conclusions** The B model group is the turning point of ovarian function from impaired POI to irreversible POF, suggesting that 3 days of administrating *Tripterygium wilfordii* polyglycoside is optimal to induce a POI disease model for effective drug intervention.

[Keywords] premature ovarian insufficiency; *Tripterygium wilfordii* polyglycoside; granule cells; angiogenesis; pathological hypoxia

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

早发性卵巢功能不全 (premature ovarian insufficiency, POI) 是指由于卵巢功能异常或卵泡过度损耗所引起的女性 (<40 岁) 性腺激素功能减退疾病^[1], 美国生殖协会按照促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 水平、生育能力和月经情况将 POI 疾病进程分为隐性性-生化异常-临床异常 3 个阶段^[2], 其中隐性性仅表现为生育力下降; 生化异常阶段是间隔 4 周的 2 次 FSH 血清检查结果显示 >25 IU/L 伴生育力下降, 但月经规律; 临床异常阶段是生化异常的基础上月经紊乱甚至闭经。中医学中虽无早发性卵巢功能不全这一疾病的记载, 但可归于“不孕”这一疾病, 结合《上古天真论》对女子生殖能力变化的描述“二七而天癸至, 任脉通, 太冲脉盛, 月事以时下, 故有子”, 到“七七, 任脉虚, 太冲脉衰少, 天癸竭, 地道不通, 故形坏而无子也”, 可以认识到中西医均认为 POI 是一种卵巢功

能渐进型衰退的疾病, 若不及时医治则发展为卵巢功能不可逆衰竭的卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF), 最终引发更年期提前所致的心脑血管、神经退行性病变等一系列疾病^[3]。目前对于女性生殖疾病的研究因受限于临床伦理、患者配合度等因素, 多采用动物模型进行机制探索, 其中啮齿类动物如小鼠因价格低廉、易饲养、与人体遗传学相似度较高^[4] 而在 POI 动物模型中广泛应用。国内较为主流的 POI 小鼠模型以化疗药物如雷公藤多苷 (*Tripterygium wilfordii* polyglycoside, TWP) 灌胃造模为主, 但通过观察发现, 其与 POF 等卵巢功能受损的小鼠动物模型存在造模药、评价指标相同^[5-6], 且不同模型界限判定模糊等情况。此外, 应用此模型进行药效学、机制学研究的实验中, 治疗药物的干预时间点多样, 其中以造模和治疗同时进行^[7]、模型成功后再治疗^[8] 这

两种形式为主。由此引发模型进展程度的评价标准模糊、给药节点无证据支持等系列问题,对界定 POI 疾病模型及寻找治疗 POI 疾病有效治疗药物十分不利。本课题组经过前期实验研究建立 TWP 致小鼠 POI 模型^[9],其造模周期、成模标准均已具有相关基础,基于此对造模过程中不同时间点小鼠的卵巢功能进行检测,以期通过对卵巢衰退过程的生物指标变化监测,探寻到小鼠卵巢“早期”功能衰退且尚有恢复能力的转折点,确定治疗药物对 POI 小鼠模型干预的最佳治疗时间点,为丰富 POI 动物模型的实验方法研究提供可靠的数据支持。

1 材料和方法

1.1 实验动物

ICR 小鼠 50 只,雌性,6 周龄,体重 18~20 g, SPF 级,均购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010]。饲养于中国中医科学院西苑医院动物实验中心[SYXK(京)2023-0053]。饲养条件为恒温 24℃ 左右,湿度(45±5)%,光照和黑暗各 12 h 交替进行,饮水不限,自由进食标准颗粒饲料。实验遵循实验动物“3R”原则,实验方案经过中国中医科学院西苑医院医学伦理委员会审批通过(2021XLC055-2)。

1.2 主要试剂与仪器

雷公藤多苷片(远大医药黄石飞云制药有限公司,批号 Z42021212);小鼠 ELISA 检测试剂盒:促卵泡素(批号 INS-20239)、促黄体激素(批号 INS-21468)、雌二醇(批号 INS-J20231)、孕酮(批号 INS-J20231)、睾酮(批号 INS-J20320)、抗缪勒管激素(批号 INS-20514)、抑制素 B(批号 INS-20808)均购自黄石市艾恩斯生物科技有限公司;瑞氏吉姆萨复合染色液(北京索莱宝生物科技有限公司,批号 G1020);RNA 提取液(批号 G3013)、无酶水(G4700)均购于武汉赛维尔生物科技有限公司;一抗鼠抗 VEGF(批号 GB13034)、CD34(批号 GB13584)、EPO(批号 GB11323)、HRP(批号 GB23303)均购于武汉赛维尔生物科技有限公司;三氯甲烷(批号 10006818)、异丙醇(批号 80109218)、无水乙醇(批号 10009218)均购于国药集团化学试剂有限公司。

酶标仪(美国 Bio-rad 公司,BIO-RAD680);台式高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技有限公司,Heraeus MultifugeX3R);显微镜(尼康仪器有限公

司,E100);显微镜载玻片(江苏世泰实验器材有限公司,批号 80302-2101);电子天平(上海精密科学仪器有限公司,FA2204B);荧光定量 PCR 仪(Bio-rad,CFX Connect)。

1.3 实验方法

1.3.1 药品制备

造模药配置:40 mL 纯水中添加 0.1 g 羧甲基纤维素钠、0.125 mL 吐温 80,随后加入 1600 mg 雷公藤多苷片并定容至 50 mL,超声装置中震荡均匀为 4 mg/mL TWP 混悬液,置于-4℃ 冰箱避光保存备用。

1.3.2 实验动物分组

将 50 只 6 周龄,18~20 g ICR 雌性小鼠适应性喂养 3 d 后每日早上 9:00 行阴道涂片,监测动情周期,以 5 d 为 1 个周期循环。10 d 后剔除动情周期紊乱小鼠 10 只,将余下 40 只小鼠采用随机分组法分为对照组、A 模型组、B 模型组、C 模型组、D 模型组,每组 8 只。

1.3.3 动物模型制备和取材

参照前期实验基础制定模型制备方法,于上午 9:00 称重后进行模型制备给药。对照组:每日灌胃纯水 0.01 mL/10 g;A、B、C、D 模型组:每日以 80 mg/kg 灌胃 TWP 混悬液。各组小鼠在最后 1 d 灌胃造模后禁食不禁水,并于第 2 日上午 8:00 行眼眶后静脉丛采血,离心后将血清置于-80℃ 冰箱冻存。精密天平称取脏器质量后,将小鼠两个卵巢分别随机放入 10% 甲醛液固定和-80℃ 冰箱冷冻保存,具体安排如表 1。

1.3.4 检测指标

(1)称重:小鼠体重/g;子宫系数=子宫湿量/mg×100/体重/g;卵巢系数=双侧卵巢湿重/mg×100/体重/g;

(2)血清指标检测:按照试剂盒说明书以酶联免疫法检测各组小鼠血清中促卵泡激素(follicle-stimulating hormone,FSH)、促黄体生成素(luteinizing hormone,LH)、雌二醇(estradiol,E₂)、孕酮(progesterone,PROG)、抗缪勒管激素(anti-Müllerian hormone,AMH)、抑制素 B(inhibin B,INH-B)、睾酮(testosterone,T)浓度水平;

(3)卵巢病理学观察:将小鼠卵巢放入甲醛溶液固定,组织脱水后行石蜡包埋切片,并用苏木精对其染色。每组选取 6 张切片,在×200 倍光学显微镜对每张切片任选 5 个视野,并对始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡、排卵前卵泡、排卵后囊腔、黄体 and 闭

锁卵泡进行数目统计。正常小鼠卵巢皮质、髓质结构清晰;颗粒细胞层清晰且排列整齐;各级卵泡形态正常,卵母细胞无萎缩、核无固缩;闭锁卵泡少或无。以上描述若有一项不符则视为异常卵泡。

(4)TUNEL 染色:将卵巢制成蜡块后进行脱蜡;经 PBS 漂洗和蛋白酶打孔后加入 Nasel 反应液,漂洗后避光滴入 DAPI、甘油混合液,封盖后 48 h 内在荧光显微镜下以激发波长 450~500 nm,发射波长 515~565 nm 进行观察拍照。每组选取 6 个卵巢制片,每张切片在×200 高倍镜下随机拍摄 5 个视野,分析累计光密度(integrated optical density, IOD)及染色区域的面积(Area),计算出平均光密度(average optical density, AOD)=IOD/Area。

(5)免疫组化检测:将卵巢制成石蜡切片并进行脱蜡水洗和抗原修复,之后进行内源性过氧化物

酶阻断;添加一抗进行孵育过夜,PBS 洗涤后加二抗进行室温孵育;在玻片洗涤后滴加 DAB 显色液、自来水冲洗后进行复染;流水冲洗后,将切片依次放入酒精、无水乙醇、正丁醇、二甲苯中脱水,晾干后封片。每组选取 6 个卵巢制片,每张 CD34、EPO 免疫组化切片在×400 高倍镜下随机拍摄 3 个视野,每张 VEGF 免疫组化切片在×200 高倍镜下随机拍摄 3 个视野,检测各蛋白阳性表达。

(6)荧光定量 PCR 检测:抽提卵巢总 RNA 后使用 Nanodrop 2000 检测 RNA 浓度及纯度,定容至 20 μL,最终浓度为 200 ng/μL;混匀离心后在 PCR 仪上完成逆转录;取 0.1 mL PCR 反应板,每个反转录产物配制 3 管;点样后完成封膜,于荧光定量 PCR 仪上进行扩增(表 2),记录 HIF-1α、SDF-1、CXCR4 的 mRNA 表达量,采用 2^{-ΔΔCt} 法进行差异性检验。

表 1 雷公藤多苷致早发性卵巢功能不全小鼠模型取材时间点

Table 1 Time points when the mice model of premature ovarian insufficiency induced by Tripterygium wilfordii polyglycosides was collected			
组别 Groups	灌胃类型及剂量 Type and dose of gavage	灌胃频次 Frequency of gavage	取材 Material acquisition
A 模型组 A model group	雷公藤多苷 80 mg/(kg·d) TWP 80 mg/(kg·d)	1 次 1 time	造模期第 2 天 Day 2 of the model making period
B 模型组 B model group	雷公藤多苷 80 mg/(kg·d) TWP 80 mg/(kg·d)	3 次 3 times	造模期第 4 天 Day 4 of the model making period
C 模型组 C model group	雷公藤多苷 80 mg/(kg·d) TWP 80 mg/(kg·d)	7 次 7 times	造模期第 8 天 Day 8 of the model making period
D 模型组 D model group	雷公藤多苷 80 mg/(kg·d) TWP 80 mg/(kg·d)	14 次 14 times	造模期第 15 天 Day 15 of the model making period
对照组 Control group	纯水 0.01 mL·20 g/d Water 0.01 mL·20 g/d	14 次 14 times	造模期第 15 天 Day 15 of the model making period

表 2 qRT-PCR 引物序列
Table 2 qRT-PCR primer sequences

基因 Gene	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	产物长度/bp Product length/bp
GAPDH-正向 GAPDH-positive	CCTCGTCCCCTAGACAAAATG	133
GAPDH-反向 GAPDH-reverse	TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	
CXCR4(RZ)-正向 CXCR4(RZ)-positive	GCTAAGGAGCATGACGGACAA	232
CXCR4(RZ)-反向 CXCR4(RZ)-reverse	CTGACTGTTGCTGGCGTGGA	
HiF1α-正向 HiF1α-positive	TTGCTTTGATGTGGATACCGATA	223
HiF1α-反向 HiF1α-reverse	CATACTTGGAGGGCTTGGAGAAT	
CXCL12-正向 CXCL12-positive	AGTGACGGTAAACCACTCAGCC	116
CXCL12-反向 CXCL12-reverse	AGGGCACAGTTTGGAGTGTGA	

1.4 统计学方法

运用 ImageJ 6.0 软件计算 TUNEL 图片凋亡区域和免疫组化图片平均光密度值;运用 SPSS 22.0 软件进行统计分析;单因素方差分析进行组间比较和 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义;以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $n\geq 3$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠性腺指数以及体重比较

如表 3 所示,与对照组相比,B 模型组卵巢指数、子宫指数和体重显著降低($P<0.01$),A、C 模型组体重显著降低($P<0.01$),D 模型组卵巢指数明显下降($P<0.05$),其余无统计学差异($P>0.05$)。与 B 模型组相比,C 模型组体重和 D 模型组子宫指数、体重上升($P<0.05,P<0.01$),其余无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 各组小鼠血清生化指标比较

如表 4 所示,与对照组相比,A 模型组各指标无

显著变化($P>0.05$),B、C、D 模型组血清中 FSH、LH 浓度显著升高($P<0.05,P<0.01$), E_2 、PROG 浓度显著降低($P<0.01$)。与 B 模型组相比,C 模型组血清中 FSH 浓度升高($P<0.01$), E_2 、PROG 浓度降低($P<0.01$),D 模型组血清中 FSH、LH 浓度升高($P<0.05,P<0.01$), E_2 、PROG 浓度降低($P<0.01$)。

如表 5 所示,与对照组相比,A 模型组血清中 AMH 浓度显著降低($P<0.01$);B、C、D 模型组血清中 AMH、INH-B、T 浓度降低($P<0.05,P<0.01$),其余无统计学意义($P>0.05$)。与 B 模型组相比,C 模型组血清 AMH、T 浓度下降($P<0.05,P<0.01$);D 模型组血清 AMH、INH-B、T 浓度降低($P<0.05,P<0.01$),其余无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 各组小鼠卵巢 HE 染色观察

如图 1 所示,与对照组相比,B、C、D 模型组小鼠卵巢中始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡、排卵前卵泡、黄体减少($P<0.05,P<0.01$),闭锁卵泡增多($P<0.01$),其余无统计学意义($P>0.05$)。与 B 模型组

表 3 各组小鼠性腺指数以及体重比较($n=8$)
Table 3 Comparison of gonadal index and body weight of mice in each group

组别 Groups	卵巢指数/(mg/g) Ovarian index	子宫指数/(mg/g) Uterine index	体重/g Weight
对照组 Control group	1.21 $\pm$ 0.13	7.69 $\pm$ 1.31	29.27 $\pm$ 0.92
A 模型组 A model group	1.05 $\pm$ 0.19	6.52 $\pm$ 1.59	27.20 $\pm$ 0.98**
B 模型组 B model group	0.98 $\pm$ 0.09**	5.22 $\pm$ 0.73**	26.78 $\pm$ 1.22**
C 模型组 C model group	1.04 $\pm$ 0.24	6.18 $\pm$ 2.36	28.46 $\pm$ 1.12** Δ
D 模型组 D model group	1.00 $\pm$ 0.19*	7.51 $\pm$ 2.83 Δ	29.34 $\pm$ 1.74 $\Delta\Delta$

注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 B 模型组相比, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。
Note. Compared with the control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$. Compared with the B model group, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$.

表 4 各组小鼠血清 FSH、LH、 E_2 和 PROG 浓度比较($n=6$)
Table 4 Comparison of serum FSH, LH, E_2 and PROG concentrations in each group

组别 Groups	FSH/(mIU/mL)	LH/(mIU/mL)	E_2 /(pg/mL)	PROG/(ng/mL)
对照组 Control group	32.4 $\pm$ 6.32	35.59 $\pm$ 3.01	4119.31 $\pm$ 284.12	33.82 $\pm$ 2.14
A 模型组 A model group	40.12 $\pm$ 8.31	33.78 $\pm$ 3.28	3833.09 $\pm$ 306.9	31.52 $\pm$ 2.2
B 模型组 B model group	43.77 $\pm$ 6.44*	41.41 $\pm$ 3.51*	3439.95 $\pm$ 193.53**	29.65 $\pm$ 1.3**
C 模型组 C model group	59.02 $\pm$ 7** $\Delta\Delta$	43.12 $\pm$ 4.25**	2697.01 $\pm$ 226.08** $\Delta\Delta$	22.49 $\pm$ 1.82** $\Delta\Delta$
D 模型组 D model group	60.72 $\pm$ 12.11** Δ	48.62 $\pm$ 4.04** $\Delta\Delta$	2187.03 $\pm$ 244.76** $\Delta\Delta$	20.7 $\pm$ 1.74** $\Delta\Delta$

注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 B 模型组相比, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。
Note. Compared with the control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$. Compared with the B model group, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$.

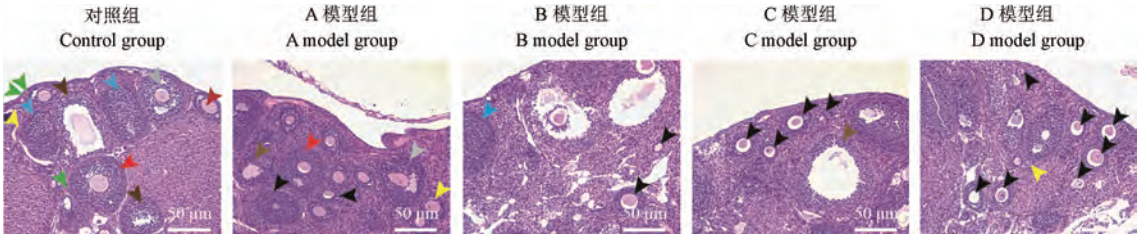
相比,C 模型组始基卵泡、黄体减少 ($P<0.05$, $P<0.01$),闭锁卵泡显著增多 ($P<0.01$);D 模型组始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡、黄体减少 ($P<0.05$, $P<0.01$),闭锁卵泡显著增加 ($P<0.01$),其余无统计

学意义 ($P>0.05$),见图 2。
2.4 TUNEL 法检测各组小鼠卵巢颗粒细胞凋亡
如图 3 所示,在卵巢髓质部的各级卵泡内绿色荧光增强,在卵巢皮质部未见绿色荧光表达。与对

表 5 各组小鼠血清 AMH、INH-B、T 浓度比较 ($n=6$)
Table 5 Comparison of serum AMH, INH-B and T concentrations in each group

组别 Groups	AMH/(pg/mL)	INH-B/(pg/mL)	T/(ng/mL)
对照组	3809.36±391.48	40.86±5.59	21.60±1.76
Control group			
A 模型组	3044.5±378.23**	36.28±3.76	20.17±1.87
A model group			
B 模型组	2400.88±102.05**	30.19±5.06**	16.05±1.42**
B model group			
C 模型组	2056.9±261.93**△△	27.42±1.96**	14.45±1.02**△
C model group			
D 模型组	1595.6±501.19**△△	23.59±3.05**△	11.93±2.3**△△
D model group			

注:与对照组相比, ** $P<0.01$;与 B 模型组相比, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$ 。
Note. Compared with the control group, ** $P<0.01$. Compared with the B model group, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$.

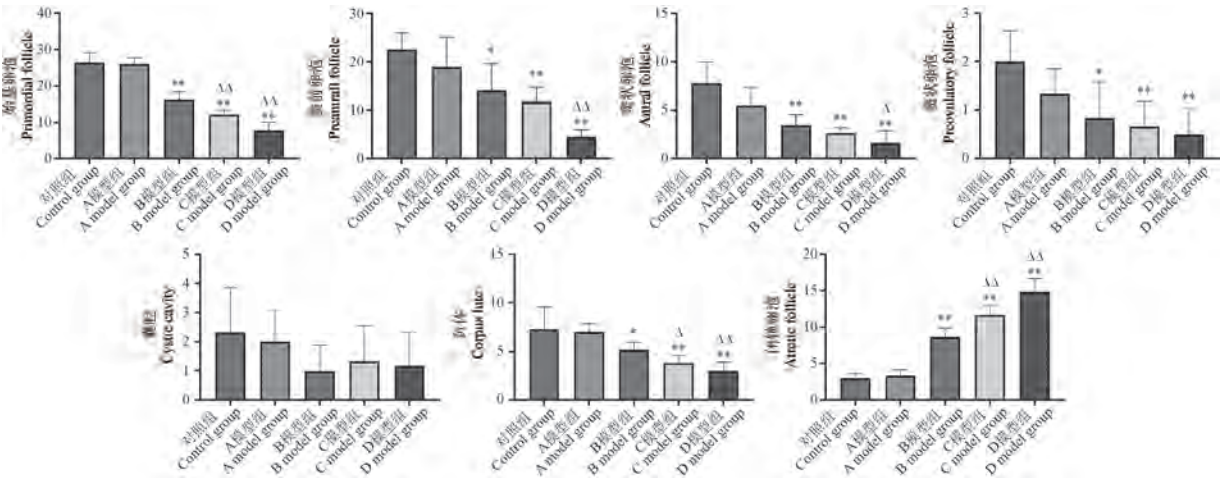


注:绿色三角标示始基卵泡;黄色三角标示窦前卵泡;红色三角表示窦状卵泡;灰色标示排卵前卵泡;棕色标示排卵后囊腔;蓝色三角标示黄体;黑色三角标示闭锁卵泡。

图 1 各组小鼠卵巢 HE 染色病理图

Note. Green triangle marks the primordial follicles. Yellow triangle marking preantral follicles. Red triangles indicate antral follicles. Gray marks preovulatory follicles. Brown marks the postovulatory cystic cavity. Blue triangles indicate the corpus luteum. Black triangles indicate atretic follicles.

Figure 1 Pathological diagram of ovary HE staining in mice in each group



注:与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 B 模型组相比, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$ 。

图 2 各组小鼠卵泡计数

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

Figure 2 Follicle count of mice in each group

照组相比,A、B、C、D 模型组小鼠卵巢组织 TUNEL 荧光强度增强($P<0.05,P<0.01$)。与 B 模型组相比,D 模型组小鼠卵巢组织 TUNEL 荧光强度增强($P<0.01$),其余无统计学意义($P>0.05$),见表 6。

2.5 各组小鼠卵巢免疫组化指标 CD34、VEGFA 及 EPO 蛋白表达比较

如图 4 所示,与对照组相比,B、C、D 模型组 CD34、VEGFA、EPO 蛋白的表达降低且具有统计学意义($P<0.05,P<0.01$),其余无统计学意义($P>0.05$)。与 B 模型组相比,C 模型组 EPO 蛋白的表达降低($P<0.01$),D 模型组 CD34、VEGFA、EPO 蛋白的表达降低($P<0.05$),其余无统计学意义($P>$

0.05),见表 7。

2.6 各组小鼠卵巢 HIF-1 α /SDF-1/CXCR4 通路相关基因 mRNA 表达比较

如表 8 所示,与对照组相比,A、B 模型组 HIF-1 α 、SDF-1 和 CXCR4 的 mRNA 表达升高($P<0.05,P<0.01$);C 模型组 HIF-1 α 的 mRNA 表达显著升高($P<0.01$);D 模型组 HIF-1 α 和 SDF-1 的 mRNA 表达均升高($P<0.05,P<0.01$),其余均无统计学意义($P>0.05$)。与 B 模型组相比,C 模型组 SDF-1、CXCR4 的 mRNA 表达明显降低($P<0.05$);D 模型组 HIF-1 α 、SDF-1、CXCR4 的 mRNA 表达降低($P<0.05,P<0.01$),其余无统计学意义($P>0.05$)。

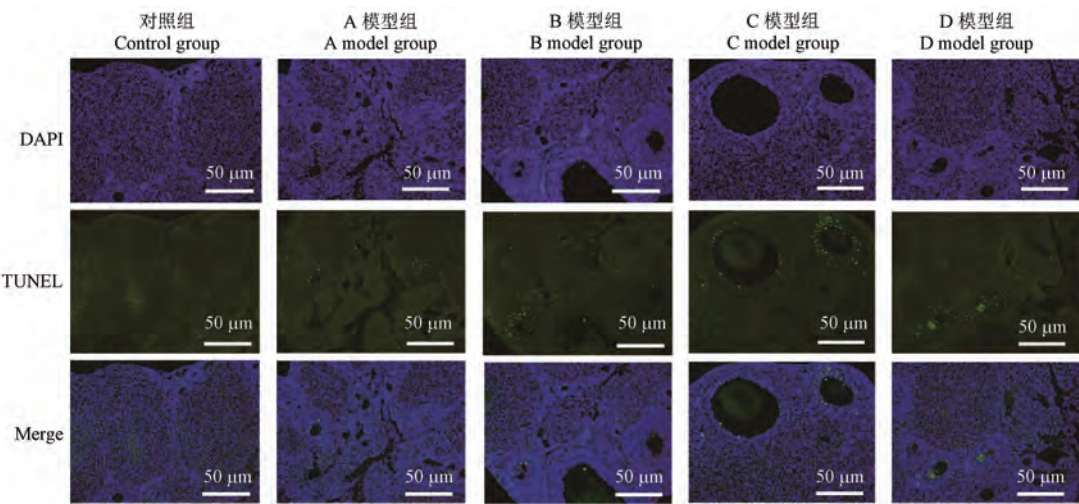


图 3 卵巢颗粒细胞凋亡图

Figure 3 Pathological diagram of ovary HE staining in mice in each group

表 6 各组小鼠卵巢颗粒细胞凋亡平均光密度($n=6,\bar{x}\pm s$)

Table 6 Average optical density of apoptosis in ovarian granulosa cells of mice in each group

组别 Groups	AOD
对照组 Control group	24.46±3.48
A 模型组 A model group	30.33±4.86 [*]
B 模型组 B model group	33.58±6.15 [*]
C 模型组 C model group	38.64±10.12 ^{**}
D 模型组 D model group	44.82±7.83 ^{**△}

注:与对照组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与 B 模型组相比,[△] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$. Compared with the B model group, [△] $P<0.05$.

表 7 各组小鼠卵巢免疫组化指标比较($n=6,\bar{x}\pm s$)

Table 7 Comparison of ovarian immunohistochemistry indexes in each group

组别 Groups	CD34	VEGFA	EPO
对照组 Control group	0.49±0.1	0.6±0.07	0.6±0.1
A 模型组 A model group	0.48±0.09	0.55±0.08	0.55±0.07
B 模型组 B model group	0.35±0.09 [*]	0.38±0.07 ^{**}	0.51±0.01 [*]
C 模型组 C model group	0.29±0.1 ^{**}	0.32±0.06 ^{**}	0.47±0.02 ^{*△△}
D 模型组 D model group	0.24±0.05 ^{**△}	0.3±0.05 ^{**△}	0.42±0.07 ^{**△}

注:与对照组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与 B 模型组相比,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。

Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$. Compared with the B model group, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$.

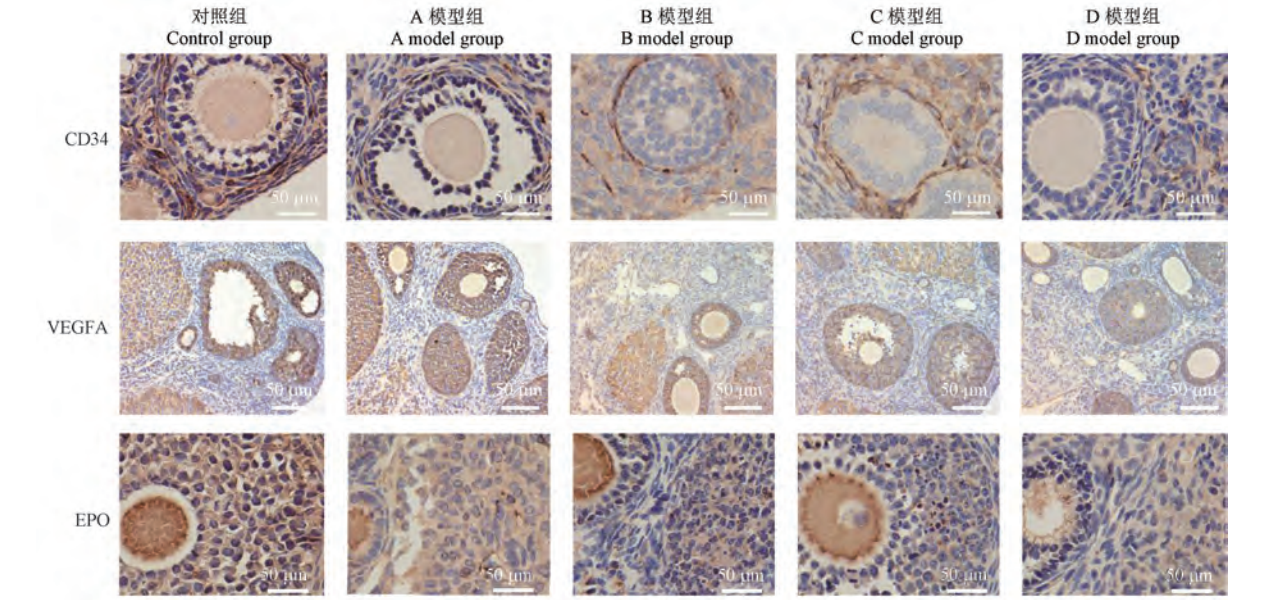


图 4 各组小鼠卵巢 CD34、VEGFA 和 EPO 蛋白染色结果(免疫组化染色)

Figure 4 Results of ovarian CD34, VEGFA and EPO protein staining in mice (immunohistochemical staining)

表 8 各组小鼠卵巢 HIF-1α、SDF-1 和 CXCR4mRNA 表达比较 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Table 8 Comparison of ovarian HIF-1α, SDF-1 and CXCR4mRNA expression in each group

组别 Groups	HIF-1α	SDF-1	CXCR4
对照组 Control group	0.44±0.02	0.58±0.08	0.31±0.03
A 模型组 A model group	0.96±0.05**	1.34±0.31*	0.39±0.04*
B 模型组 B model group	1.02±0.05**	1.94±0.26**	0.39±0.02*
C 模型组 C model group	1.08±0.02**	1.02±0.37 Δ	0.34±0.01 Δ
D 模型组 D model group	0.92±0.03** Δ	0.88±0.14* $\Delta\Delta$	0.32±0.03 Δ

注:与对照组相比, * P<0.05, ** P<0.01;与 B 模型组相比, Δ P<0.05, $\Delta\Delta$ P<0.01。
Note. Compared with the control group, * P<0.05, ** P<0.01. Compared with the B model group, Δ P<0.05, $\Delta\Delta$ P<0.01.

3 讨论

研究发现 TWP 可通过发挥细胞功能毒性,诱导靶器官发生特异性自身免疫,产生促炎效应,破坏卵巢功能,进而影响子宫发育和小鼠生长^[10]。目前临床 POI 病人主要致病原因之一是服用具有生殖毒性药物所致的医源性伤害,而 TWP 所诱导的小鼠 POI 模型是比较符合此发病机制的实验模型。

3.1 评价小鼠 POI 模型不同时间点的相关生物学指标

既往研究证明 FSH 诱导颗粒细胞增殖、分泌 E₂,联合 T 激素促进卵泡发育^[11],LH 作用于成熟卵

泡启动排卵^[12],排卵后囊腔内颗粒细胞分化为黄体并分泌 PROG 维持黄体功能^[13],因此在临床诊断中常根据患者内分泌激素水平来判断卵巢功能状态。本实验以 80 mg/kg TWP 分别灌胃 1 d(A 模型组)、3 d(B 模型组)、7 d(C 模型组)、14 d(D 模型组)监测模型小鼠卵巢功能的发展进程,通过血清激素检测发现 TWP 灌胃 3 d 后 ICR 小鼠血液中 E₂、PROG、T 水平显著下降,FSH、LH 水平显著上升,卵巢和子宫指数下降,这一现象与临床生化异常阶段 POI 患者的血清生化指标趋势和影像学特征相吻合^[14]。此外,始基卵泡、窦前卵泡中颗粒细胞分泌的 AMH,以及窦前卵泡、窦卵泡中颗粒细胞分泌的 INH-B 均呈下降趋势,表明 TWP 对于卵巢的生殖毒性可能与各级卵泡中颗粒细胞的功能状态及凋亡密切相关^[15]。

大量研究已证实 TWP 可以导致小鼠卵巢细胞凋亡水平升高^[16],但缺少 TWP 对小鼠卵巢功能损伤动态监测的相关性研究。本实验采用 TUNEL 荧光检测技术,通过对各组小鼠卵巢凋亡情况进行观察,发现与对照组相比,各模型组卵巢荧光凋亡强度增加,证明了 TWP 诱导了卵巢内细胞凋亡。结合 HE 染色病理结果发现,与对照组相比,B 模型组出现卵巢损伤,颗粒细胞层排列疏松、始基卵泡减少、闭锁卵泡增多,证明了 TWP 通过损伤颗粒细胞,使其凋亡率升高,导致卵泡发育异常、闭锁。C、D 模型组相较于 B 模型组,荧光凋亡强度明显升高,颗

粒细胞层更加稀薄、卵母细胞萎缩和核固缩严重,始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡和黄体数量明显减少,闭锁卵泡数量增加,表明 TWP 对小鼠卵巢损伤程度与作用时长呈正相关,且 TWP 灌胃 3 d 时病理指标符合“POI”动物模型标准且具有统计学意义。

本实验通过免疫组化检测发现,与对照组相比,B 模型组 VEGFA、CD34 蛋白表达明显下降,CD34 作为血管内皮细胞标志物,在卵巢组织中常锚定卵泡膜微血管,其蛋白表达降低抑制卵泡血管新生,影响卵泡成熟^[17]。VEGFA 基因表达下降会降低排卵期卵泡膜血管通透性^[18]、抑制卵泡成熟以及破坏黄体功能^[19],从而导致卵子排出障碍。实验结果表明,TWP 通过抑制卵泡膜血管新生,降低卵泡成熟率,诱导 POI 的发生。与对照组小鼠卵巢 EPO 蛋白阳性表达相比,自 B 模型组起二者在各级卵泡、黄体中的表达量明显下降,且随着造模时间的延长其阳性面积明显减少,EPO 是促进血管新生的主要表达因子之一,其分泌量的减少,使内皮细胞增殖、迁移行为被抑制,造成受损血管修复失败、无法维持血管形态,导致血管新生不足^[20]。由此可以得出 TWP 通过营造卵巢病理性缺氧环境,抑制卵泡血管新生、提高闭锁卵泡率、破坏黄体功能,建立了小鼠 POI 模型。通过检测各组小鼠卵巢中 HIF-1 α 、SDF-1/CXCR4 的 mRNA 表达发现,与对照组比较,A、B、C、D 模型组 HIF-1 α 、SDF-1/CXCR4 mRNA 呈高表达状态,当卵巢组织在受到损伤后试图通过激活 HIF-1 α /SDF-1/CXCR4 通路,影响间充质干细胞归巢于卵巢,以达到修复卵巢组织和内分泌功能,这与已有研究的实验趋势相一致^[21]。与 B 模型组相比,C、D 模型组 SDF-1/CXCR4 的 mRNA 表达量呈明显降低趋势,在 TWP 灌胃第 3 天小鼠通过促进 SDF-1/CXCR4 的 mRNA 表达导致卵巢自我修复能力处于“高位点”,诱导卵巢组织分泌血管生成因子、抑制卵泡凋亡。若此时不采取干预措施,卵巢组织持续受损会造成自我调节和修复能力降低,导致 SDF-1/CXCR4 信号通路表达强度下降^[22],由此可见 B 模型组即 TWP 造模 3 d 不仅是采取药物干预措施的关键点,更是决定是否进展为 POF 的节点。

3.2 POI 动物模型建立的意义与应用

POI 是 POF 的“前哨”,POF 是卵巢功能衰退的“终端”。将对卵巢功能诊断的关口前移,其目的是通过及时治疗,阻止卵巢功能不可逆衰退的到

来^[23]。目前常采用激素替代疗法对 POI 进行干预,但效果仍不理想。流行病学调查显示,POI 发病人群中 30 岁以下女性占比逐年升高^[24],且约有 69.2%继发性闭经女性从月经异常发展到 POI 的过程用时不到 1 年^[25],这提示 POI 发病人群低龄化且病程进展迅速。因此,制作 POI 动物模型时要注意实验动物的生殖寿命,避免造模周期过长^[26]使实验动物在取材时已处在生理性初老阶段^[27],而对实验结果造成干扰。此外,目前临床、动物研究中对于 POI 到 POF 的进展时长均未有明确定义。因此,在建立 POI 动物模型时,既需要符合临床发病规律,也要注意与 POF 动物模型进行区分。既往研究中出现 POI^[28]和 POF^[29]模型动物、造模药、剂量、造模时长均相同的情况,说明 TWP 虽可以造成卵巢功能衰退,但存在长时间损伤而未及时给予干预治疗,进展为 POF 动物模型的可能性;同时引发了因实验动物卵巢功能过度损伤,与临床 POI 患者实际情况存在偏差,导致评估 POI 治疗药物出现遗漏或错误的结果。因此,寻找模型成立及药物干预的最佳时间点对 POI 疾病的治疗具有重要意义。

针对 TWP 灌胃致小鼠 POI 模型实验研究中,发现在 B 模型组时期(造模 3 d)小鼠血清指标、卵巢病理、免疫组化和免疫荧光结果均符合 POI 动物模型标准^[30],同时也是小鼠卵巢丧失自我修复能力的“转折点”,更是药物干预治疗的最佳时间点,此实验方法回答了既往实验模型存在的问题和争议,最大程度体现了 POI 的发病本质(卵巢功能早期的病理状态)和干预原则(早发现、早治疗),同时为 POI 小鼠动物模型药效学研究的干预时间点提供数据支持,也为临床针对 POI 患者在不同时间节点的疾病进程采取更加优质、细化的治疗方案提供理论基础和思考方向。

参考文献:

- [1] CHRISTIN-MAITRE S, GIVONY M, ALBAREL F, et al. Position statement on the diagnosis and management of premature/primary ovarian insufficiency (except Turner Syndrome) [J]. Ann Endocrinol (Paris), 2021, 82(6): 555–571.
- [2] HOMER H A. Senataxin: a new guardian of the female germline important for delaying ovarian aging [J]. Front Genet, 2021, 12: 647996.
- [3] 陈水风, 王婷婷. 卵巢早衰不良健康后果及其干预的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(61): 84–85.
CHEN S F, WANG T T. Research progress on the adverse health

- effects of premature ovarian failure and its intervention [J]. World Latest Med Inf, 2019, 19(61): 84-85.
- [4] 王艳辉, 唐丽, 雷磊. 基于数据挖掘的早发性卵巢功能不全动物模型分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(9): 225-233.
- WANG Y H, TANG L, LEI L. Animal model of premature ovarian insufficiency based on data mining [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(9): 225-233.
- [5] 潘正美, 刘洋. 卵巢早衰小鼠模型综述 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(12): 97-102.
- PAN Z M, LIU Y. Summary of mouse models of premature ovarian failure [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 97-102.
- [6] 黄长盛, 贺守第, 管雁丞, 等. 菟丝子黄酮和槲皮素对雷公藤多苷致卵巢早衰大鼠卵巢功能的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(6): 667-670.
- HUANG C S, HE S D, GUAN Y C, et al. Effects of dodder flavonoids and quercetin on the ovarian function in rat model of premature ovarian failure induced by tripterygium glycosides [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2020, 36(6): 667-670.
- [7] 王维贵, 郭路, 刘晓程, 等. 二甲双胍通过抑制 NLRP1 等炎症小体改善小鼠卵巢储备的作用 [J]. 老年医学与保健, 2022, 28(2): 390-397.
- WANG W G, GUO L, LIU X C, et al. Metformin improves ovarian reserve in mice by inhibiting NLRP1 and other inflammasomes [J]. Geriatr Health Care, 2022, 28(2): 390-397.
- [8] 张芳, 师伟, 刘震, 等. 基于 Rho/ROCK 信号通路探讨补肾养精颗粒改善早发性卵巢功能不全模型大鼠卵巢功能的机制 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(5): 2678-2683.
- ZHANG F, SHI W, LIU Z, et al. Mechanism of Bushen Yangjing Granules in improving ovarian fibrosis in POI model rats based on Rho/ROCK signaling pathway [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(5): 2678-2683.
- [9] 袁苑, 陈燕霞, 马堃, 等. 探索建立雷公藤多苷致早发性卵巢功能不全肾虚血瘀证的小鼠模型 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(9): 1895-1903.
- YUAN Y, CHEN Y X, MA K, et al. Establishment of premature ovarian insufficiency kidney deficiency and blood stasis pattern mouse model with *Tripterygium wilfordii* polyglycoside for Bushen Culuan Decoction therapy [J]. China J Chin Mater Med, 2019, 44(9): 1895-1903.
- [10] 吴静静, 任献青, 苏杭, 等. 基于 CiteSpace 对雷公藤多苷研究趋势及热点的可视化分析 [J]. 中国药事, 2022, 36(2): 170-178.
- WU J J, REN X Q, SU H, et al. Visualized analysis of research trends and hotspots of *Tripterygium wilfordii* glycosides based on CiteSpace [J]. Chin Pharm Aff, 2022, 36(2): 170-178.
- [11] JIN J, HU Q Y, XU W W, et al. Tanshinone IIA attenuates estradiol-induced polycystic ovarian syndrome in mice by ameliorating FSHR expression in the ovary [J]. Exp Ther Med, 2019, 17(5): 3501-3508.
- [12] ODUWOLE O O, HUHTANIEMI I T, MISRAHI M. The roles of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and testosterone in spermatogenesis and folliculogenesis revisited [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(23): 12735.
- [13] European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI, WEBBER L, DAVIES M, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency [J]. Hum Reprod, 2016, 31(5): 926-937.
- [14] 姬霞, 傅金英, 王冰玉, 等. 补肾养血方对卵巢早衰大鼠中抗苗勒氏管激素的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(1): 49-53.
- Ji X, Fu J Y, Wang B Y, et al. Effect of bushen yangxue prescription on the levels of anti-mullerian hormone in rat with premature ovarian failure [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(1): 49-53.
- [15] CONDE P, MORADO S, ALVAREZ G, et al. Effect of the hematopoietic growth factors erythropoietin and kit ligand on bovine oocyte *in vitro* maturation and developmental competence [J]. Theriogenology, 2019, 123: 37-44.
- [16] 肖潇, 刘艳霞, 危一飞, 等. 益肾疏肝汤含药血清对雷公藤多苷干预的大鼠颗粒细胞凋亡的影响 [J]. 世界中医药, 2022, 17(22): 3148-3153.
- XIAO X, LIU Y X, WEI Y F, et al. Effect of yishen Shugan Decoction-containing serum on apoptosis of granulosa cells in rats treated with *Tripterygium wilfordii* glycosides [J]. World Chin Med, 2022, 17(22): 3148-3153.
- [17] HSIAO Y H, SIDDIQUI S, MAN Y G. Dual use of a single Wilms' tumor 1 immunohistochemistry in evaluation of ovarian tumors: a preliminary study of 20 cases [J]. J Cancer, 2010, 1: 93-97.
- [18] DUNCAN W, VAN DEN DRIESCHE S, FRASER H M. Inhibition of vascular endothelial growth factor in the primate ovary up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α in the follicle and corpus luteum [J]. Endocrinology, 2008, 149(7): 3313-3320.
- [19] SHIMIZU T, IJIMA K, MIYABAYASHI K, et al. Effect of direct ovarian injection of vascular endothelial growth factor gene fragments on follicular development in immature female rats [J]. Reproduction, 2007, 134(5): 677-682.
- [20] WANG Y, YANG C, ELSHEIKH N A H, et al. HO-1 reduces heat stress-induced apoptosis in bovine granulosa cells by suppressing oxidative stress [J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(15): 5535-5547.
- [21] 徐基杰, 戴健, 朱彦华, 等. 鹿红方对缺血缺氧心肌细胞 SDF-1/CXCR4 信号通路的影响 [J]. 中国中医急症, 2022, 31(10): 1717-1721.
- XU J J, DAI J, ZHU Y H, et al. Effects of luhong decoction on SDF-1/CXCR4 signaling pathway in ischemic and hypoxic cardiomyocytes [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2022, 31(10): 1717-1721.

董一蕾,刘悦,李珺媛,等. 急性缺血性脑卒中瘀毒互结证大鼠模型“脑-脾炎症耦联”机制探讨[J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 45-54.

Dong YL, Liu Y, Li JY, et al. Mechanism of brain-spleen inflammation coupling in a rat model of acute ischemic stroke stasis toxin syndrome [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 45-54.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.006

急性缺血性脑卒中瘀毒互结证大鼠模型“脑-脾炎症耦联”机制探讨

董一蕾¹, 刘悦^{1,2}, 李珺媛¹, 付建华^{1,2}, 张允岭², 姚明江^{1*}

(1.中国中医科学院西苑医院基础医学研究所,中药药理北京市重点实验室,北京 100091;

2.中国中医科学院西苑医院,北京 100091)

【摘要】 目的 探讨急性缺血性脑卒中瘀毒互结证大鼠模型脑损伤与脾损害的相关性,分析对 MCP-1/CCR2 趋化因子信号轴的影响。**方法** 40 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组(sham)、角叉菜胶联合干酵母菌瘀毒互结证(Carrageenan/Yeast, CA/Y)组(单纯证候组)、大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)组(单纯疾病组)、大脑中动脉阻塞瘀毒互结证(MCAO+CA/Y)组(病证结合组),每组 10 只。CA/Y 组与 MCAO+CA/Y 组于造模首日经腹腔注射角叉菜胶 10 mg/kg、第 2 日背部皮下注射干酵母悬液 2 mg/kg, MCAO 组及 MCAO+CA/Y 组于第 2 日采用线栓法建立大脑中动脉阻塞模型。脑梗死模型术后 24 h,对各组大鼠进行神经功能缺损评分,采用 TTC 染色法观察脑梗死面积百分比,取脾测定脾重量,采用 Spearman 相关系数分析脑梗死面积百分比与脾重量的相关性,苏木素-伊红(HE)染色法观察脑组织及脾组织病理形态,酶联免疫吸附实验(ELISA)检测大鼠血浆中单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)含量,Western blot 法检测缺血侧脑组织趋化因子 C-C-基元受体 2(chemokine C-C-motif receptor 2, CCR2)蛋白表达。**结果** 与 sham 组比较, MCAO 组和 MCAO+CA/Y 组的神经功能缺损评分、脑梗死面积、血浆中 MCP-1 与 IFN- γ 含量均显著升高($P<0.01$),脾重量显著下降($P<0.01$),脑组织中 CCR2 蛋白表达明显上调($P<0.05$);与 CA/Y 组比较, MCAO 组和 MCAO+CA/Y 组的神经功能缺损评分、脑梗死面积显著升高($P<0.01$),脾重量显著下降($P<0.01$),脑组织和脾组织中 CCR2 蛋白表达均明显上调($P<0.05$);与 MCAO 组比较, MCAO+CA/Y 组的脑梗死面积显著升高($P<0.01$),脾重量明显下降($P<0.05$)。Spearman 相关分析显示,脾重量与脑梗死面积百分比呈负相关($P<0.01, r=-0.9711$)。病理形态学观察结果显示, MCAO+CA/Y 组病理改变最为严重,脑组织皮层中可见大脑液化坏死灶,病灶中神经元细胞排列稀疏、紊乱,体积萎缩,少部分空泡化和核固缩,大部分神经元细胞红色变性、坏死,小胶质细胞增生明显,小血管明显增多,间质脂质变性;脾组织部分动脉周围淋巴鞘细胞密度减低,边缘区增宽。**结论** 急性缺血性脑卒中瘀毒互结证大鼠模型脑损伤与脾损害存在相关性,可能与 MCP-1/CCR2 趋化因子信号轴参与“脑-脾炎症耦联”机制有关。

【关键词】 急性缺血性脑卒中;瘀毒互结证;脑-脾炎症耦联;趋化因子

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0045-10

Mechanism of brain-spleen inflammation coupling in a rat model of acute ischemic stroke stasis toxin syndrome

【基金项目】北京市自然科学基金面上项目(7232317);中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(CI2021A01305);国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目(ZYYCXTD-C-202007);中国中医科学院创新团队项目(CI2021B006)。

【作者简介】董一蕾(1996—),女,硕士研究生,研究方向:脑血管病中药药理学研究。E-mail:458654651@qq.com

【通信作者】姚明江(1982—),男,研究员,研究方向:脑血管病中药药理学研究。E-mail:ymj_ren@163.com

DONG Yilei¹, LIU Yue^{1,2}, LI Junyuan¹, FU Jianhua^{1,2}, ZHANG Yunling², YAO Mingjiang^{1*}

(1. Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Beijing, 100091, China.
2. Xiyuan Hospital, Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100091)

[Abstract] Objective To investigate the correlation between brain injury and spleen damage in a rat model of acute ischemic stroke and stasis interaction, and its effect on the MCP-1/CCR2 axis, and to provide an experimental basis for the mechanism of brain-spleen inflammatory coupling in spleen lesions caused by acute ischemic stroke. **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into a sham group, carrageenan/yeast stasis syndrome group (carrageenan/yeast, CA/Y), middle cerebral artery occlusion group (MCAO), and middle cerebral artery stasis syndrome group (MCAO CA/Y) with 10 rats in each group. CA/Y and MCAO CA/Y groups were injected with 10 mg/kg carrageenan and 10 mg/kg intraperitoneally on the first day of modeling. 2 mg/kg of dry yeast suspension were injected subcutaneously on the second day. MCAO and MCAO CA/Y groups were established by wire embolism on the second day. At 24 h after cerebral infarction modeling, the neurological deficit score was calculated in each group, the percentage of the cerebral infarction area was determined by TTC staining, the spleen weight was measured, and the correlation between the percentage of the cerebral infarction area and spleen weight was analyzed by the Spearman correlation coefficient. Furthermore, the pathological morphology of brain and spleen tissues was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and chemotactic protein 1 (MCP-1) and interferon- γ (IFN- γ) contents were measured in rat plasma by enzyme-linked immunosorbent assays. Western blot was used to detect chemokine C-C-motif receptor 2 (CCR2) protein expression in the ischemic side of brain tissue. **Results** Compared with the sham group, the neurological deficit score, cerebral infarction area, and MCP-1 and IFN- γ contents in plasma were significantly increased ($P<0.01$), spleen weight was decreased significantly ($P<0.01$), and CCR2 protein expression in brain tissue was significantly upregulated ($P<0.05$) in MCAO and MCAO CA/Y groups. Moreover, the area of cerebral infarction was increased significantly ($P<0.01$), the spleen weight was decreased significantly ($P<0.01$), and CCR2 protein expression in brain and spleen tissues was significantly upregulated ($P<0.05$) Compared with the MCAO group, the area of cerebral infarction in the MCAO CA/Y group was significantly increased ($P<0.01$) and the spleen weight was decreased significantly ($P<0.05$). Spearman correlation analysis showed that the spleen weight was negatively correlated to the percentage of the cerebral infarction area ($P<0.01$, $r=-0.9711$). Pathological morphology observation revealed that the pathological changes in the MCAO CA/Y group were the most serious, cerebral liquefaction necrosis foci were seen in the brain tissue cortex, arrangement of neuronal cells in the lesions was sparse and disordered with volume atrophy and a small number of vacuoles and nuclear solidification, most neuronal cells were degenerated and necrotic, microglia hyperplasia was obvious, small blood vessels were significantly increased, and interstitial lipid degeneration was severe. The density of periarterial lymph sheath cells in some of the spleen tissue was reduced and the marginal area is widened. **Conclusions** A correlation between brain and spleen injury was found after acute ischemic stroke with stasis and toxin syndrome, and the chemokine signaling axis of MCP-1/CCR2 might be involved in the mechanism of brain-spleen inflammation coupling.

[Keywords] acute ischemic stroke; stasis toxin syndrome; brain-spleen inflammatory coupling; chemokines

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

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS) 占有所有脑卒中的 80% 以上,是最常见的卒中类型,具有高发病率、高致死率、高致残率、高复发率、高经济负担等特点^[1]。在中医理论中,缺血性脑卒中属于“中风病”范畴,历代医家对缺血性中风病因病机理论认识不断完善与深化。20 世纪 90 年代以来,王永炎院士提出“毒损脑络”病机学说,明确了脑病治疗中重视毒邪、络病的重要意义,并逐渐成为现代中医药认识和研究中风病的重要病理机制之一^[2-3]。西

苑医院心脑血管病研究团队在长期的临床实践中发现,急性缺血性脑卒中患者发病后,除突然昏倒、不省人事、口眼歪斜、舌强失语、肢体偏枯不遂等主症外,还会出现狂躁善忘、口气臭秽、舌紫绛而黯伴有瘀斑或紫黑、苔厚腻或垢腻、脉涩或结代等瘀毒互结的临床特征^[4-6],认为“瘀”“毒”互结互化、犯脑损络是缺血性脑血管病发生和恶化的关键病机,活血通络解毒应是缺血性脑卒中急性期的核心治法^[7]。

随着研究的逐渐深入,目前已经证实急性缺血性脑卒中发生,伴随着外周器官与组织的系统性炎症免疫改变^[8]。脾属次级淋巴器官,同时也是机体内最大的免疫器官,脑与脾之间通过被称为“脑-脾炎症偶联(brain-spleen inflammatory coupling)”在中枢和外周炎症免疫之间相互作用,相互影响^[9]。卒中的发生可引起脾体积的改变,脾中免疫细胞释放并被招募到脑组织,加重中枢神经系统的损害^[9-11],进一步明确缺血性脑卒中后脑-脾之间的信号传递机制具有重要的意义。

本实验在课题组前期采用大脑中动脉阻塞(MCAO)复合角叉菜胶/干酵母菌(CA/Y)方法建立急性缺血性脑卒中瘀毒互结病证结合大鼠模型的基础上,以炎症因子及 MCP-1/CCR2 趋化因子信号轴为切入点探讨“脑-脾炎症偶联”机制,并为进一步开发缺血性脑卒中瘀毒互结证的治疗药物提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,体重 200~220 g,购自北京维通利华有限公司[SCXK(京)2021-0011]。大鼠饲养于中国中医科学院西苑医院 SPF 级实验动物中心[SYXK(京)2023-0053],室温 20~25℃,相对湿度 40%~70%。本研究经中国中医科学院西苑医院实验动物伦理委员会审批通过(2022XLC045-2)。实验过程中严格遵守 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

角叉菜胶(上海麦克林生化科技有限公司,批号:C12774049),实验前用生理盐水配成 1 g/L 溶液;活性干酵母菌(安琪酵母股份有限公司,批号:10046518637257),实验前采用灭菌蒸馏水配置成 200 g/L;MCAO 栓线(北京西浓科技有限公司,批号:A1-243250);生理盐水(华润双鹤药业股份有限公司,批号:Y1606233W);通用型组织固定液(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号:XS191501);2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC, 中国医药上海化学试剂公司,批号:20031212);苏木素-伊红(Hematoxylin and Eosin, HE)染色液(北京益利精细化学品有限公司,批号:20211223);大鼠 MCP-1 酶联免疫检测试剂盒(cohesion,批号:CEK1626);大鼠 IFN- γ 酶联免疫检测试剂盒(cohesion,批号:CEK1602);CCR-2 兔多克

隆一抗(proteintech 公司,批号:16153-1-AP); β -actin 兔多克隆一抗(proteintech 公司,批号:66009-1-Ig);HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L)(北京华兴博创基因技术有限公司,货号:HX2031)。尼康 D90 数码单镜反光相机(日本尼康公司);奥林巴斯 BX53 正置显微镜(奥林巴斯有限公司);IEC 低温冷冻离心机(美国 Thermo 公司);Synergy 4 型酶标仪(美国 Bio Tek 公司);AR2130 型豪斯电子天平(美国 Ohaus 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

40 只大鼠随机分为 4 组,即假手术组(sham)、角叉菜胶联合干酵母菌瘀毒互结证(Carrageenan/Yeast, CA/Y)组(单纯证候组)、大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)组(单纯疾病组)、大脑中动脉阻塞瘀毒互结证(MCAO+CA/Y)组(病证结合组),每组 10 只。

1.3.2 模型制备及评价

MCAO 及瘀毒互结证模型制备参照文献^[12-14]。造模首日,CA/Y 组和 MCAO+CA/Y 组大鼠腹腔注射角叉菜胶 10 mg/kg,假手术组腹腔注射等体积生理盐水。次日,MCAO 组和 MCAO+CA/Y 组进行大脑中动脉栓塞法(MCAO)手术,颈部正中切口,分离右侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)和颈外动脉(ECA),结扎 CCA 近心端和 ECA 远心端,于 CCA 作一小切口,插入线栓至大脑前动脉。MCAO+CA/Y 组在接受 MCAO 术后立刻背部皮下注射干酵母悬液 2 mg/kg。自线栓插入颈内动脉阻塞大脑中动脉造成局灶性缺血开始计时,待缺血时间达到 90 min,将线栓向外抽出 1 cm,剪去多余部分,放回笼中饲养。CA/Y 组同样背部皮下注射干酵母悬液 2 mg/kg。

CA 和 MCAO 线栓法导致大鼠“血瘀”证,酵母导致大鼠“热毒”证。CA 注射后第 2 天,在相同角度和光线下拍摄大鼠尾部,观察各组大鼠黑尾情况,发现大鼠出现黑尾现象,说明大鼠血流不畅、循环出现障碍;MCAO 造模后 24 h 大鼠出现神经功能缺损现象,说明大鼠受毒邪侵袭,凶猛急躁(图 1)。

1.3.3 神经功能缺损评分

再灌注后 24 h,各组大鼠取材麻醉前评估神经功能缺损程度,评分参考 Zea Longa 评分标准^[14]。0 分:无神经功能缺损,大鼠正常活动;1 分:将大鼠尾端提起后,不能完全伸展左前肢;2 分:将大鼠置于

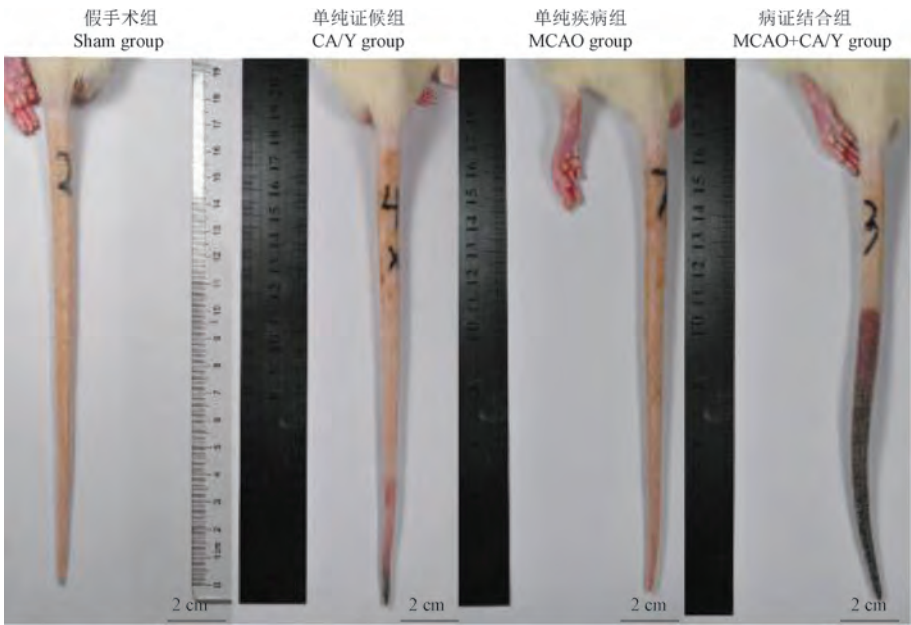


图 1 各组大鼠尾部征象
Figure 1 Signs of tails in rats

平地上,向左绕圈行走;3 分:将大鼠置于平地上,向左侧倾倒;4 分:大鼠左侧偏瘫,不能自发行走且意识水平低下。分值越高,提示大鼠神经功能缺损越严重。得分 1~3 分为造模成功。

1.3.4 脑梗死面积百分比测定

全部动物进行神经功能缺损评分后,经手术麻醉后,在冰盒上快速断头取脑,放置于脑槽位 2 mm 的冠状脑切片模具内,从视交叉处额极到枕极处连续切 6 片,厚度均为 2 mm,将其置于锡箔纸覆盖的 1.2% TTC 溶液中染色,染色后梗死区变为白色,非梗死区呈现红色,之后转移到通用型组织固定液中进行固定,24 h 后脑片按脑的前后顺序整齐排列,使用病理图文采集分析系统,统一角度、高度对脑片正反两面进行拍照,并使用 Image Pro Plus 软件分析计算脑梗死面积百分比。

1.3.5 脾重量测定

大鼠取脑后,迅速摘取脾,立即进行称量并记录脾重量。

1.3.6 HE 染色观察脑、脾组织病理形态

分别取 TTC 染色后的第 3 片脑片和记录重量后的脾组织用于 HE 染色。脑、脾组织分别在通用型组织固定液中固定 24~48 h,随后脱水、透明、石蜡包埋、切片(4 μm),进行常规 HE 染色,在光学显微镜下观察大鼠脑、脾组织病理形态。

1.3.7 ELISA 检测血浆中的炎症因子含量

麻醉大鼠后,腹主动脉采血 2 mL,置于 3.8%枸

橐酸钠抗凝管,离心后取上层血浆,采用 ELISA 法检测血浆中 MCP-1 和 IFN-γ 含量,实验操作按相应 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.3.8 Western blot 法检测脑、脾组织 CCR2 蛋白表达水平

随机选取 6 只大鼠,麻醉后,在冰盒上快速断头取脑,从视交叉处额极到枕极处连续切 6 片,厚度均为 2 mm,取第 4 片脑片,于梗死灶外缘 1 mm 处取材,提取总蛋白后进行 Western blot 检测;同时取出脾组织,提取总蛋白后进行 Western blot 检测。

1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析,各组实验数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间两两比较采用 Dunnett C 法,指标相关性分析采用 Spearman 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能缺损评分比较

与 sham 组比较,MCAO 组与 MCAO+CA/Y 组大鼠的神经功能缺损评分显著增高($P < 0.01$);与 CA/Y 组比较,MCAO 组和 MCAO+CA/Y 组大鼠的神经功能缺损评分显著增高($P < 0.01$),MCAO 组和 MCAO+CA/Y 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠脑梗死面积百分比比较

与 sham 组和 CA/Y 组比较,MCAO 组与 MCAO +CA/Y 组大鼠脑梗死面积百分比显著增加 ($P<0.01$);与 MCAO 组比较,MCAO+CA/Y 组大鼠脑梗死面积百分比进一步增加($P<0.01$)。见图 2、图 3。

2.3 各组大鼠脾重量比较

与 sham 组和 CA/Y 组比较,MCAO 组与 MCAO +CA/Y 组大鼠脾重量均显著减轻 ($P<0.01$);与 MCAO 组比较,MCAO+CA/Y 组大鼠脾重量明显减轻($P<0.05$)。进一步对脾重量与脑梗死面积百分比进行相关性分析,二者呈显著负相关($P<0.01$, $r=-0.9711$)。结果见图 4。

2.4 各组大鼠脑组织与脾组织 HE 染色形态观察

sham 组与 CA/Y 组大鼠脑组织皮层中神经元排列整齐,未见大脑液化坏死灶和小胶质细胞增生,可见散在个别红色变形的神经元。MCAO 组大鼠脑组织皮层中可见大脑液化坏死灶,病灶中神经元细胞排列稀疏、紊乱,体积萎缩,空泡化和核固缩,小胶质细胞增生,小血管增生,间质脂质变性。MCAO+CA/Y 组大鼠脑组织皮层中可见大脑液化坏死灶,病灶中神经元细胞排列稀疏、紊乱,体积萎缩,少部分空泡化和核固缩,大部分神经元细胞红色变性、坏死,小胶质细胞增生明显,小血管明显增多,间质脂质变性(图 5A)。

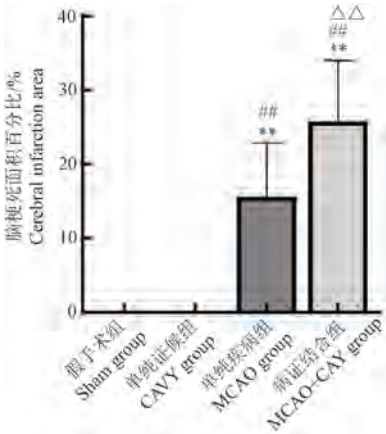
sham 组大鼠脾红髓、白髓分界清晰,动脉周围淋巴鞘细胞密度正常,动脉周围淋巴鞘一侧淋巴结轻度增生,可见生发中心,边缘区无增生,红髓充血,包膜附近有血液挤压的淋巴组织。CA/Y 组、MCAO 组中,动脉周围淋巴鞘细胞密度不同程度减低,边缘区增宽,CA/Y 组略重于 MCAO 组,同时

CA/Y 组红髓充血减少。MCAO+CA/Y 组部分动脉周围淋巴鞘细胞密度减低,边缘区增宽,较 MCAO 组明显(图 5B)。

表 1 各组大鼠神经功能缺损评分比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Neurological deficit scores in rats	
组别 Groups	神经功能缺损评分 Neurological deficit score
假手术组 Sham group	0.00±0.00
单纯证候组 CA/Y group	0.00±0.00
单纯疾病组 MCAO group	2.10±0.74 ** ##
病证结合组 MCAO+CA/Y group	2.40±0.70 ** ##

注:与假手术组比较, ** $P<0.01$;与单纯证候组比较, ## $P<0.01$ 。
Note. Compared with sham group, ** $P<0.01$. Compared with CA/Y group, ## $P<0.01$.



注:与假手术组比较, ** $P<0.01$;与单纯证候组比较, ## $P<0.01$;与单纯疾病组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图 2 各组大鼠脑梗死面积百分比比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Note. Compared with sham group, ** $P<0.01$. Compared with CA/Y group, ## $P<0.01$. Compared with the MCAO group, $\Delta\Delta P<0.01$.

Figure 2 Percentage of cerebral infarction area in rats

单纯疾病组 MCAO group 病证结合组 MCAO+CA/Y group

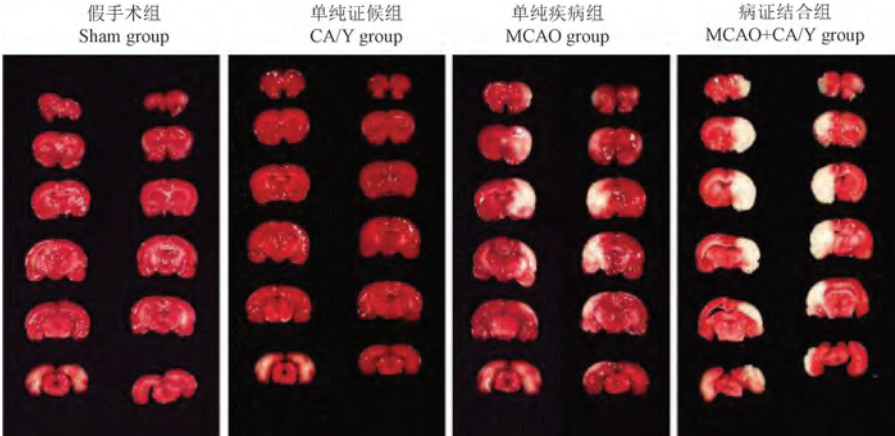
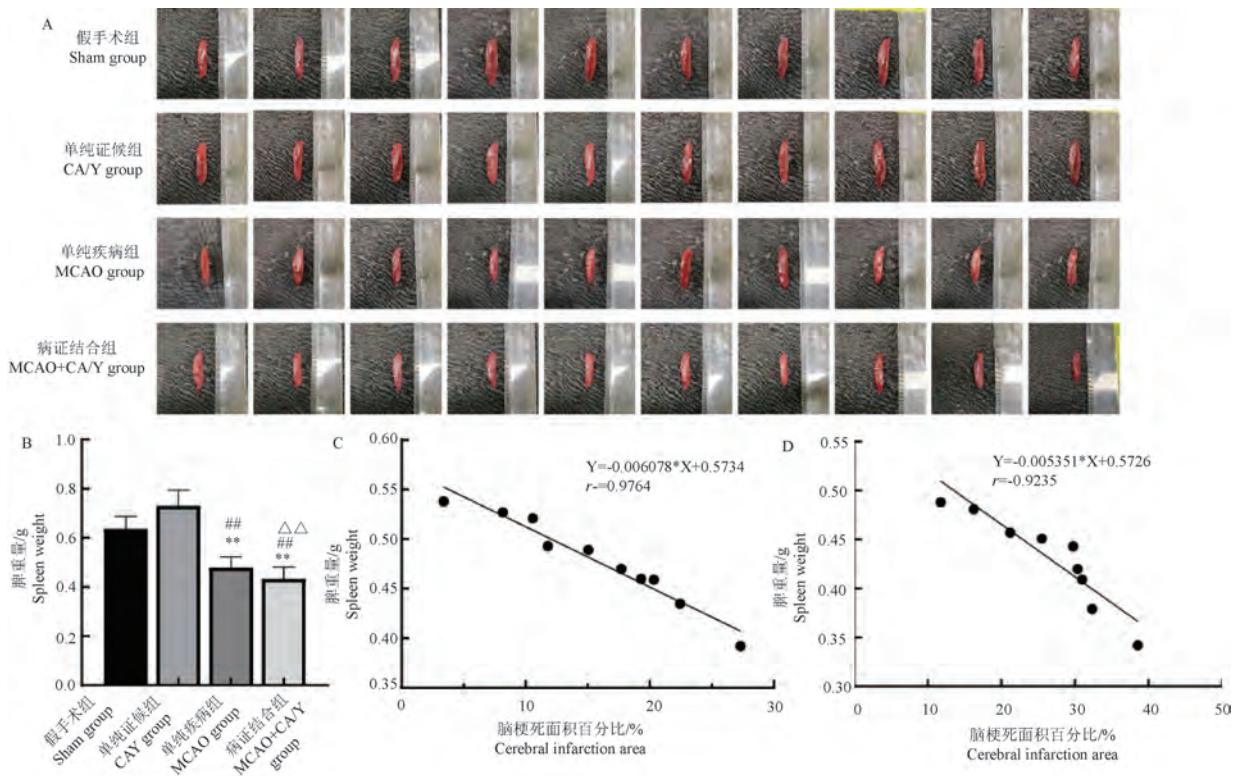


图 3 各组大鼠脑片 TTC 染色图

Figure 3 TTC staining of brain slices in rats

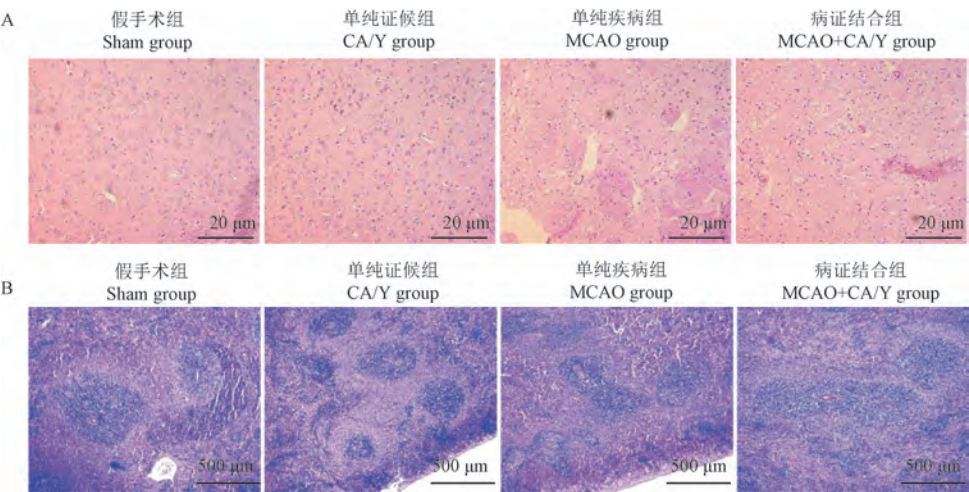


注:A:各组大鼠脾照片;B:各组大鼠脾重量比较($\bar{x}\pm s, n=10$),与假手术组比较, ** $P<0.01$;与单纯证候组比较, ## $P<0.01$;与单纯疾病组比较, $\Delta\Delta P<0.05$;C:单纯疾病组脾重量与脑梗死面积百分比相关性分析($P<0.01, r=-0.9764, n=10$);D:病证结合组脾重量与脑梗死面积百分比相关性分析($P<0.01, r=-0.9235, n=10$)。

图4 各组大鼠脾重量比较及脑脾相关性分析

Note. A, Picture of rat spleen. B, Spleen weights in rats ($\bar{x}\pm s, n=10$). Compared with sham group, ** $P<0.01$. Compared with CA/Y group, ## $P<0.01$. Compared with the MCAO group, $\Delta\Delta P<0.01$. C, Correlation analysis between spleen weights and percentage of cerebral infarction area in MCAO group ($P<0.01, r=-0.9764, n=10$). D, Correlation analysis between spleen weights and percentage of cerebral infarction area in MCAO+CA/Y group ($P<0.01, r=-0.9235, n=10$).

Figure 4 Comparison of spleen weight and correlation analysis of brain-spleen in rats in each group



注:A:大鼠脑皮层病理组织 HE 染色;B:大鼠脾病理组织 HE 染色。

图5 各组大鼠脑组织与脾组织 HE 染色结果

Note. A, HE staining of pathological tissues in the cerebral cortex of rats. B, HE staining of spleen pathological tissues in rats.

Figure 5 HE staining results of brain tissue and spleen tissue of rats in each group

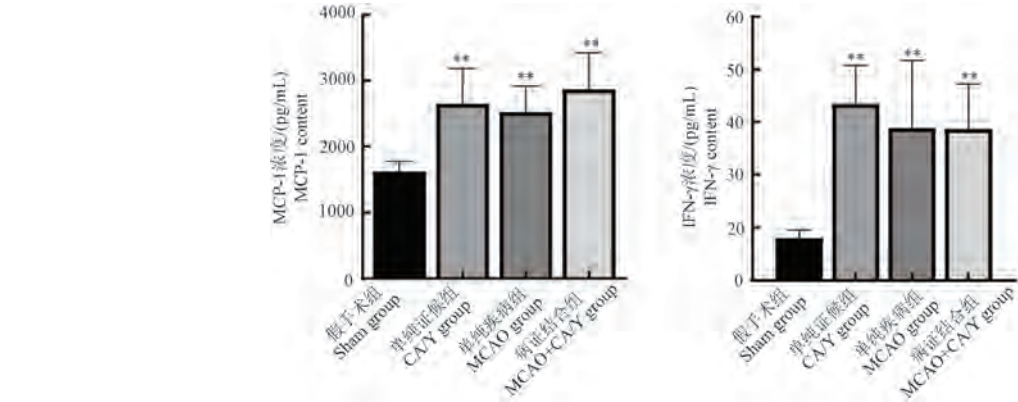
2.5 各组大鼠血浆中 MCP-1 和 IFN-γ 水平比较

与 sham 组比较,CA/Y 组、MCAO 组和 MCAO+CA/Y 组大鼠血浆中 MCP-1 和 IFN-γ 水平均显著上升($P<0.01$),但 CA/Y 组、MCAO 组和 MCAO+CA/Y

Y 组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 6。

2.6 各组大鼠脑组织和脾组织中 CCR2 蛋白表达比较

如图 7 所示,与 sham 组比较,MCAO 组与

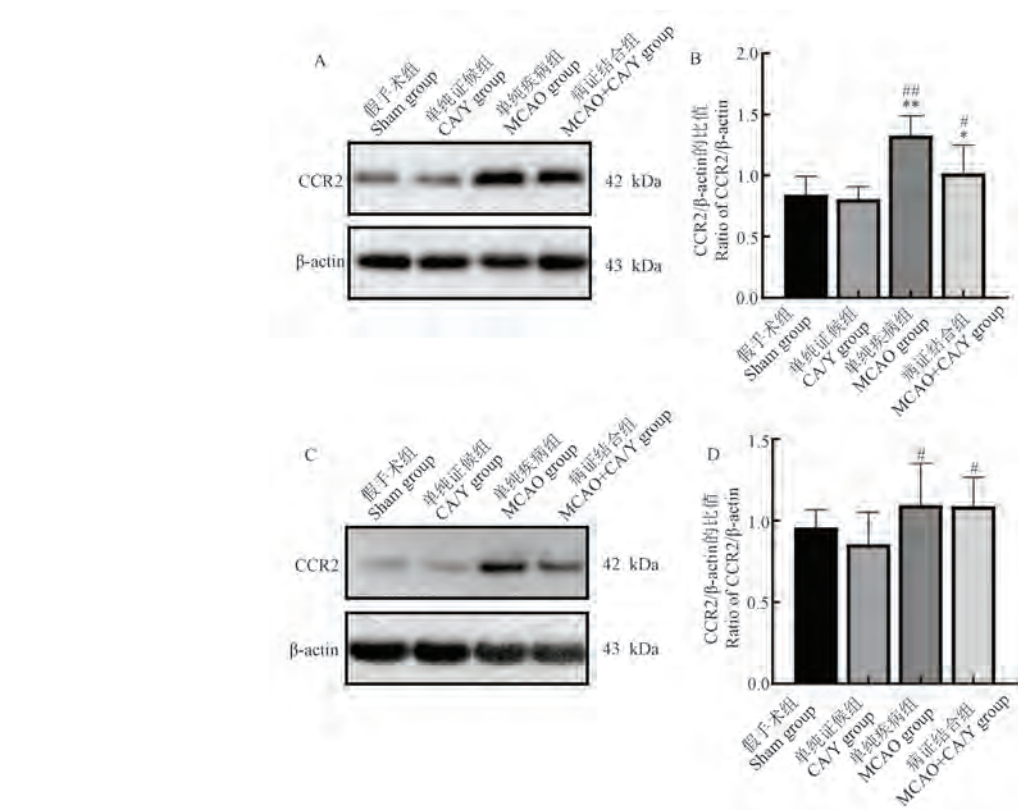


注:A:大鼠血浆中 MCP-1 含量比较;B:大鼠血浆中 IFN-γ 含量比较。与假手术组比较, ** $P<0.01$ 。

图 6 大鼠血浆中 MCP-1 和 IFN-γ 含量比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

Note. A, Comparison of MCP-1 content of plasma in rats. B, Comparison of IFN-γ content of plasma in rats. Compared with sham group, ** $P<0.01$.

Figure 6 Comparison of MCP-1 and IFN-γ content of plasma in rats



注:A:大鼠脑组织 CCR2、β-actin 蛋白表达;B:大鼠脑组织 CCR2/β-actin 比值比较;C:大鼠脾组织 CCR2、β-actin 蛋白表达;D:大鼠脾组织 CCR2/β-actin 比值比较。与假手术组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与单纯证候组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 7 大鼠脑组织 CCR2 和 β-actin 蛋白表达($\bar{x}\pm s, n=6$)

Note. A, Expression of CCR2 and β-actin proteins in rat brain tissue. B, Comparison of CCR2/β-actin ratios in rat brain tissue. C, Expression of CCR2 and β-actin proteins in rat spleen tissue. D, Comparison of CCR2/β-actin ratios in rat brain tissue. Compared with sham group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with CA/Y group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 7 Expression of CCR2 and β-actin protein in rats brain tissues

MCAO+CA/Y 组大鼠脑组织 CCR2 蛋白表达显著上调($P<0.01$, $P<0.05$), 与 CA/Y 组比较, MCAO 组与 MCAO+CA/Y 组大鼠脑组织 CCR2 蛋白表达显著上调($P<0.01$, $P<0.05$), 但 MCAO 组与 MCAO+CA/Y 组之间差异无统计学意义($P>0.05$); 与 CA/Y 组比较, MCAO 组与 MCAO+CA/Y 组大鼠脾组织 CCR2 蛋白表达显著上调($P<0.05$), 而 MCAO 与 MCAO+CA/Y 组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

缺血性脑卒中属我国医学“中风病”范畴, 瘀毒互结证是缺血性中风急性期最常见证候。血瘀是中风病重要的始动病机之一, 瘀血在脉内结滞日久, 蕴而化热, 热灼血脉, 久酿生毒; 毒邪又可炼血成瘀, 血瘀、热毒相互搏结, 耗气伤阴, 壅堵脑络, 发为中风^[15], 常具有酷烈性、暴戾性、正损性等特点^[16]。课题组前期通过腹腔注射角叉菜胶和皮下注射干酵母悬液建立了瘀毒互结证模型^[12,17], 并在此基础上开展了缺血性脑卒中病证结合机制的相关研究^[9,13], CA 和 MCAO 线栓法主要用于致“血瘀”证, 干酵母悬液引起炎症反应, 主要体现“热毒”证^[18]。CA 注射后第 2 天大鼠尾端远心端开始出现颜色变黑变暗的表现, 提示此时大鼠出现血瘀相关症状。线栓法 MCAO 造模后 24 h, 大鼠短时间内明显症状加重, 体现了“瘀毒互结”证来势凶猛、发病急骤的特点^[16,19]。本研究结果显示, MCAO+CA/Y 病证结合模型组大鼠相较于 sham 组、CA/Y 组、MCAO 组, 表现出更严重的黑尾现象以及神经功能缺损的症状, TTC 染色和 HE 染色结果也显示了 MCAO+CA/Y 组脑组织在缺血后损伤更严重, 符合瘀毒互结证的证型特点, 与课题组前期研究结果一致^[12-13]。

近年来, 免疫炎症反应参与缺血性脑血管病的发病机制受到越来越多的关注。作为重要的外周免疫器官, 啮齿类动物的脾和胸腺体积在缺血性脑卒中发生后明显缩小^[20-21], 脾重量的减少主要是由交感神经系统激活引起的脾被膜收缩所致, 脾红髓中的造血成分减少, 脾细胞数量急剧减少, 采用羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 标记脾细胞, 可观察到缺血性脑卒中后脾细胞向大脑的迁移^[22], 在 MCAO 后 48 h, 可在血液中检测到标记的淋巴细胞、单核细胞和中性粒细胞, 提示脑缺血后免疫反应由急性期向亚急性期发展, 产生免疫抑制

作用, 表现为淋巴器官萎缩、脾淋巴细胞减少及活化受损^[23], 脾切除术可减少出血性和缺血性中风啮齿动物模型中的神经损伤^[24-25]。临床研究显示, 急性脑梗死病人发病后脾体积同样表现为先缩小后增大^[26-27], 积累的证据表明局灶性脑缺血会改变脾中的细胞因子、趋化因子和免疫细胞谱^[28], 因此, 脾已成为介导外周免疫反应的新靶点和治疗途径。本研究结果显示, MCAO+CA/Y 病证结合组脾重量相较于 sham 组、CA/Y 组、MCAO 组, 脾重量显著减少, 且脾重量与脑梗死面积百分比呈负相关, 即脑梗死面积越大, 脾重量越轻; MCAO+CA/Y 组病理形态观察提示, 脾边缘区增宽, 动脉周围淋巴鞘细胞密度降低, 较 MCAO 组明显。说明 MCAO+CA/Y 病证结合组的脾病理变化符合缺血性脑卒中后的病理变化规律, 且表现更加严重。CA/Y 组脾重量相较于 sham 组有所增加, 但无统计学意义, HE 染色观察, CA/Y 组红髓充血减少, 可能是提前注射角叉菜胶使大鼠产生类似脂多糖预处理 (LPS-PC) 的神经保护作用, 但具体调节机制尚不清楚^[29]。

已有研究结果证实, 小鼠缺血性脑卒中后 22 h, 活化的脾细胞分泌的 IFN- γ 、MCP-1 水平显著升高, IFN- γ 早期在脾中增加, 24 h 时 MCP-1 和 IFN- γ 在血液中表达增加, 然后在脑中增加^[30], 且 24 h 内, IFN- γ 与脾体积呈负相关, 脾可通过释放炎症因子加剧缺血性脑损伤, 阻断 IFN- γ 信号传导可减少缺血性脑卒中引起的神经变性^[31]。本研究 ELISA 实验结果显示, 与 sham 组相比, CA/Y 组、MCAO 组、MCAO+CA/Y 组血浆中的 MCP-1 和 IFN- γ 浓度均显著上升, 说明急性缺血性脑卒中瘀毒互结模型中的脾也可释放炎症因子加剧缺血性脑损伤, 提前注射角叉菜胶的单纯证候组血浆中的 MCP-1、IFN- γ 含量也显著增加, 表明角叉菜胶联合干酵母菌可以引起血浆中炎症因子含量增加, 对急性缺血性瘀毒互结模型造成炎症损伤。

缺血性脑卒中后, 受损的中枢神经系统分泌多种趋化因子, 包括趋化因子 (C-C 基序) 配体 2 (CCL2)、CCL3、CCL5、CX3CL1、CXCL8、CXCL12 等^[30], 招募炎症细胞到受伤大脑, 在此过程中, 脾中相应的趋化因子受体表达也增加^[20]。CCL2 是缺血性脑卒中后单核细胞/巨噬细胞浸润的有效介质^[21,32], CCL2-CCR2 相互作用对于脾单核细胞的部署及其向损伤大脑的运动具有重要意义^[32-33]。Western blot 结果显示, MCAO+CA/Y 组大鼠脑组织

的 CCR2 蛋白表达较 sham 组明显上调 ($P<0.05$), 脾组织的 CCR2 蛋白表达有所上调, 但无统计学意义, 相较于 MCAO 组, 脑组织和脾组织的 CCR2 蛋白表达均有所下调, 可能是提前注射角叉菜胶使大鼠产生预处理的调节作用, 降低了脑组织和脾组织中的 CCR2 蛋白表达。

综上所述, MCP-1/CCR2 信号轴可能参与急性缺血性脑卒中瘀毒互结证“脑-脾炎症耦联”机制。脾通过 MCP-1/CCR2 信号轴向血中释放 MCP-1、IFN- γ 等炎性因子, 加剧急性缺血性脑卒中瘀毒互结证的脑损伤, 角叉菜胶联合干酵母菌对炎性因子的水平影响占主导, 单纯证候组血浆中的炎性因子表达有所增加。本研究为进一步探讨化瘀解毒中药对急性缺血性脑梗死的治疗作用提供了理论基础和实验依据, 也对急性缺血性脑卒中瘀毒互结证“脑-脾炎症耦联”现象进行了实验探究, 为针对脾的缺血性脑卒中治疗方法提供了实验依据。

参考文献:

[1] ZHANG T, ZHAO J, LI X, et al. Chinese Stroke Association guidelines for clinical management of cerebrovascular disorders; executive summary and 2019 update of clinical management of stroke rehabilitation [J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2020, 5(3): 250–259.

[2] 王永炎. 关于提高脑血管疾病疗效难点的思考 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1997, 17(4): 195–196.
WANG Y Y. Reflections on the difficulties in improving the efficacy of cerebrovascular diseases [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 1997, 17(4): 195–196.

[3] 李澎涛, 王永炎, 黄启福. “毒损脑络”病机假说的形成及其理论与实践意义 [J]. *北京中医药大学学报*, 2001, 24(1): 1–6, 16.
LI P T, WANG Y Y, HUANG Q F. The hypothesis of the injury of brain collaterals by toxins and its theoretical and practical significance [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*, 2001, 24(1): 1–6, 16.

[4] 仲爱芹, 徐士欣, 张军平. 从瘀毒论治缺血性中风的理论探讨 [J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(3): 573–575.
ZHONG A Q, XU S X, ZHANG J P. Theory analysis of treatment of ischemia stroke from blood-stasis and toxin [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2015, 33(3): 573–575.

[5] 何丽丽, 马苏苏, 王秋月, 等. 中风发病前出现“毒损脑络”病情变化人群临床特点研究 [J]. *广州中医药大学学报*, 2023, 40(4): 787–795.
HE L L, MA S S, WANG Q Y, et al. A study on the clinical features of patients with illness progression of toxin damaging brain collaterals before the onset of stroke [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med*, 2023, 40(4): 787–795.

[6] 刘悦, 梁晓, 魏竞竞, 等. 心脑血管疾病瘀毒互结证的研究现状与展望 [J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(3): 937–941.
LIU Y, LIANG X, WEI J J, et al. Research status and prospect of blood stasis and toxin syndrome in cardiovascular and cerebrovascular diseases [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2023, 38(3): 937–941.

[7] 鞠建庆, 梁晓, 高洁, 等. 缺血性心脑血管病瘀毒互结证诊断标准的研究 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2023, 21(4): 577–580.
JU J Q, LIANG X, GAO J, et al. Study on diagnostic criteria of blood stasis and toxin accumulation syndrome in ischemic cardiovascular and cerebrovascular diseases [J]. *Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis*, 2023, 21(4): 577–580.

[8] KAMEL H, IADECOLA C. Brain-immune interactions and ischemic stroke: clinical implications [J]. *Arch Neurol*, 2012, 69(5): 576–581.

[9] HAN D, LIU H, GAO Y, et al. Targeting brain-spleen crosstalk after stroke: new insights into stroke pathology and treatment [J]. *Curr Neuroparmacol*, 2021, 19(9): 1590–1605.

[10] LIU Z J, CHEN C, LI F W, et al. Splenic responses in ischemic stroke: new insights into stroke pathology [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2015, 21(4): 320–326.

[11] PENNYPACKER K R, OFFNER H. The role of the spleen in ischemic stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35(2): 186–187.

[12] 刘悦, 姚明江, 梁晓, 等. 瘀毒互结证动物模型的建立与评价 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(13): 72–78.
LIU Y, YAO M J, LIANG X, et al. Establishment and evaluation of animal models of combined stasis and toxin syndrome [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2023, 29(13): 72–78.

[13] 姚明江, 李珺媛, 刘悦, 等. 急性脑梗死瘀毒互结证大鼠模型并发脑心综合征的比较探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(1): 112–119.
YAO M J, LI J Y, LIU Y, et al. Comparison on rat models of acute cerebral infarction due to stasis combined with toxin complicated with cerebral-cardiac syndrome [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2024, 30(1): 112–119.

[14] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84–91.

[15] 彭珣, 李定祥, 马若梦, 等. 化瘀解毒方对缺血性中风瘀毒互结证模型大鼠脑细胞自噬及血脑屏障通透性的影响 [J]. *中医杂志*, 2022, 63(9): 862–868.
PENG X, LI D X, MA R M, et al. Effects of Huayu Jiedu formula on brain cell autophagy and blood brain barrier permeability in ischemic stroke model rats with binding of stasis and toxin syndrome [J]. *J Tradit Chin Med*, 2022, 63(9): 862–868.

[16] 张允岭, 郭蓉娟, 王嘉麟, 等. 基于专家问卷的中医“毒”的特性分析 [J]. *中医杂志*, 2010, 51(1): 27–29.
ZHANG Y L, GUO R J, WANG J L, et al. Analysis on the

- characteristics of “du-pathogen” in TCM; based on expert questionnaire [J]. *J Tradit Chin Med*, 2010, 51(1): 27–29.
- [17] 秦文秀, 杜健强, 许军峰, 等. 缺血性脑卒中病证结合实验动物模型构建研究进展 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2023, 30(10): 191–196.
- QIN W X, DU J Q, XU J F, et al. Research progress in the construction of experimental animal model of ischemic stroke with combination of disease and syndrome [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2023, 30(10): 191–196.
- [18] 邓家刚, 郝二伟, 杜正彩, 等. 中医瘀热互结证大鼠模型的建立及评价 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(3): 402–405.
- DENG J G, HAO E W, DU Z C, et al. The establishment and evaluation of the model rats of blood stasis and heat accumulation syndrome [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2012, 32(3): 402–405.
- [19] 蒋成婷, 葛金文, 聂慧芳, 等. 缺血性中风瘀毒互结证病证结合动物模型研究 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2020, 27(9): 69–74.
- JIANG C T, GE J W, NIE H F, et al. Study on disease-syndrome combination animal model of ischemic stroke stasis toxin syndrome [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2020, 27(9): 69–74.
- [20] OFFNER H, SUBRAMANIAN S, PARKER S M, et al. Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages [J]. *J Immunol*, 2006, 176(11): 6523–6531.
- [21] KIM E, YANG J, BELTRAN C D, et al. Role of spleen-derived monocytes/macrophages in acute ischemic brain injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2014, 34(8): 1411–1419.
- [22] SEIFERT H A, HALL A A, CHAPMAN C B, et al. A transient decrease in spleen size following stroke corresponds to splenocyte release into systemic circulation [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2012, 7(4): 1017–1024.
- [23] 邹莹香, 李世春, 王志菲. 黄芪甲苷对脑缺血小鼠外周免疫抑制作用的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2021, 28(5): 55–59.
- ZOU Y X, LI S C, WANG Z F. Effects of astragaloside IV on cerebral ischemia-induced peripheral immunosuppression in mice [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2021, 28(5): 55–59.
- [24] SEIFERT H A, OFFNER H. The splenic response to stroke: from rodents to stroke subjects [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 195.
- [25] PENNYPACKER K R. Targeting the peripheral inflammatory response to stroke: role of the spleen [J]. *Transl Stroke Res*, 2014, 5(6): 635–637.
- [26] 潘晶晶. 急性脑梗死病人发病后脾体积变化及与血清炎症因子、T 淋巴细胞的相关性分析 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2020, 18(12): 1983–1987.
- PAN J J. Changes of spleen volume after acute cerebral infarction and its correlation with serum inflammatory factors and T lymphocytes [J]. *Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis*, 2020, 18(12): 1983–1987.
- [27] 赵丹鹏, 杨硕, 刘喜灿, 等. 急性脑梗死后脾体积变化及与炎症因子、淋巴细胞水平的相关性 [J]. *河南医学研究*, 2022, 31(1): 28–31.
- ZHAO D P, YANG S, LIU X C, et al. Changes of spleen volume after acute cerebral infarction and its correlation with inflammatory factors and lymphocyte levels [J]. *Henan Med Res*, 2022, 31(1): 28–31.
- [28] LEONARDO C C, PENNYPACKER K R. The splenic response to ischemic stroke: what have we learned from rodent models? [J]. *Transl Stroke Res*, 2011, 2(3): 328–338.
- [29] GARCIA-BONILLA L, BREA D, BENAKIS C, et al. Endogenous protection from ischemic brain injury by preconditioned monocytes [J]. *J Neurosci*, 2018, 38(30): 6722–6736.
- [30] OFFNER H, SUBRAMANIAN S, PARKER S M, et al. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26(5): 654–665.
- [31] SEIFERT H A, LEONARDO C C, HALL A A, et al. The spleen contributes to stroke induced neurodegeneration through interferon gamma signaling [J]. *Metab Brain Dis*, 2012, 27(2): 131–141.
- [32] DIMITRIJEVIC O B, STAMATOVIC S M, KEEP R F, et al. Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice [J]. *Stroke*, 2007, 38(4): 1345–1353.
- [33] BAO Y, KIM E, BHOSLE S, et al. A role for spleen monocytes in post-ischemic brain inflammation and injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2010, 7: 92.

[收稿日期] 2023–07–17

陈琳,谭洪兴,郝丽萍,等. 维生素 D 对自发性糖尿病大鼠肠道菌群结构和多样性的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34 (2): 55-62.

Chen L, Tan HX, Hao LP, et al. Effect of vitamin D on the structure and diversity of intestinal flora in spontaneously diabetic rats [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 55-62.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.007

维生素 D 对自发性糖尿病大鼠肠道菌群结构和多样性的影响

陈琳¹, 谭洪兴¹, 郝丽萍², 李艳艳^{1*}

(1. 深圳市慢性病防治中心, 广东 深圳 518020; 2. 华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生学系, 武汉 430030)

【摘要】目的 探讨维生素 D (VD) 对自发性糖尿病大鼠肠道菌群的影响。**方法** 自发性肥胖型 2 型糖尿病 (ZDF) 大鼠随机分为正常对照 (Con) 组、VD 对照 (VD) 组、模型 (T2DM) 组和 VD 干预 (VD+T2DM) 组。检测各组大鼠空腹血糖情况和口服糖耐量水平。采用 16S rDNA 测序技术检测大鼠肠道菌群变化, 进行 OTU 分析 (韦恩图)、 α 多样性分析 (chao1、observed species、PD whole tree、shannon 和 simpson)、 β 多样性分析 (主坐标分析 (PCoA))、菌群结构及菌群物种差异性分析 (线性判别分析及影响因子 (LEfSe) 分析)。**结果** VD 干预显著改善了 T2DM 大鼠的空腹血糖水平和胰岛素抵抗情况 ($P < 0.05$)。 α 多样性结果表明 T2DM 组和 VD+T2DM 组的 chao1、observed species、PD whole tree、shannon 和 simpson 指数无显著差异 ($P > 0.05$); β 多样性分析结果显示, 与 T2DM 组相比, VD+T2DM 组与 Con 组的物种相似度更高。各组大鼠肠道菌群的优势菌具有显著差异; 相较于 T2DM 组, VD+T2DM 组的 *Bacteroidetes* 丰度下降、*Firmicutes* 和 *Clostridium XIVa* 丰度增加。**结论** VD 可改善 T2DM 大鼠的空腹血糖升高和胰岛素抵抗情况; VD 可改善 T2DM 大鼠的肠道菌群结构, 降低 *Bacteroidetes* 丰度, 升高 *Firmicutes* 和 *Clostridium XIVa* 丰度。

【关键词】 维生素 D; 糖尿病; 肠道菌群; 16S rDNA 测序; 血糖; 胰岛素抵抗

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0055-08

Effect of vitamin D on the structure and diversity of intestinal flora in spontaneously diabetic rats

CHEN Lin¹, TAN Hongxing¹, HAO Liping², LI Yanyan^{1*}

(1. Shenzhen Center for Chronic Disease Control, Shenzhen 518020, China. 2. Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030)

【Abstract】Objective To investigate the effect of vitamin D (VD) on intestinal flora in spontaneously diabetic rats. **Methods** Zucker diabetic fatty rats (ZDF rats) were randomised to control (Con) group, VD control (VD) group, model (T2DM) group, and VD intervention (VD+T2DM) group. Fasting blood glucose profiles and oral glucose tolerance levels were determined in rats of each group. 16S rDNA sequencing was used to assess changes in rat intestinal flora. OTU analysis (Venn diagram), α diversity analysis (chao1, observed species, PD whole tree, and shannon and simpson), β diversity analysis (principal coordinate analysis (PCoA)), flora structure, and colony species variability analysis (linear discriminant analysis and influence factor (LEfSe) analysis) were also performed. **Results** VD intervention significantly

【基金项目】 深圳医学重点学科建设经费资助 (SZXK065); 国家自然科学基金 (81703226)。

【作者简介】 陈琳 (1995—), 女, 硕士, 研究方向: 营养与慢性病。E-mail: 1207391520@qq.com

【通信作者】 李艳艳 (1987—), 女, 博士, 研究方向: 营养与慢性病。E-mail: lyhust@126.com

improved fasting blood glucose levels and insulin resistance in T2DM rats ($P<0.05$). α diversity showed no significant differences in chao1, observed species, PD whole tree, and shannon and simpson indices between T2DM and VD+T2DM groups ($P>0.05$). β diversity analysis showed that the VD+T2DM group had more species similarity to the Con group than the T2DM group. The dominant bacteria of rat intestinal flora in each group were significantly different. In comparison to the T2DM group, the VD+T2DM group showed a decrease in abundance of *Bacteroidetes* and increases in abundances of *Firmicutes* and *Clostridium XIVa*. **Conclusions** VD improves fasting glucose elevation and insulin resistance in T2DM rats. VD improves the structure of intestinal flora, decreases *Bacteroidetes*, and elevates *Firmicutes* and *Clostridium XIVa* abundances in T2DM rats.

[Keywords] vitamin D; diabetes; intestinal flora; 16S rDNA sequencing; blood glucose; insulin resistance

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

糖尿病是当前严重威胁人类健康的世界性公共卫生问题^[1-3]; 预计到 2045 年全球 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 患者总数将增加至 7 亿^[4]。我国糖尿病监测数据显示, 糖尿病患病率从 2013 年的 10.9% 增加到 2018 年的 12.4%^[1]。T2DM 发病率高, 治愈率低, 常伴有并发症, 严重影响患者健康, 给社会带来了沉重的卫生与经济负担。T2DM 的机制十分复杂, 糖脂代谢紊乱在 T2DM 的发生发展中起重要作用, 但具体靶点尚不明确。最近的研究认为其与肠道菌群及其代谢物密切相关^[5]。维生素 D (vitamin D, VD) 是一种脂溶性维生素, 活性形式是 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, VD 在基因转录、炎症反应、葡萄糖代谢等方面起着重要作用^[6-7]。既往研究表明, 在糖尿病前期患者中, 补充 VD 可降低 T2DM 的风险^[8]。现有研究发现, 在肥胖或 VD 缺乏的患者中补充 VD 可以改善患者的肠道菌群^[9]。肠道菌群是人体最大的微生态系统, 菌群在肠道可发挥消化、抵御病原体肠道定植等多种功能^[10]。本研究继续探讨 VD 补充对自发性肥胖型 2 型糖尿病大鼠 (Zucker diabetic fatty, ZDF) 血糖和胰岛素抵抗的改善效应, 以及对肠道菌群结构和多样性的影响, 将为补充 VD 防治 T2DM 提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 ZDF 大鼠 20 只, 体重 (125.8 ± 11.7) g, 5 ~ 6 周龄。SPF 级雄性 Zucker 瘦型 (Zucker lean, ZL) 大鼠 20 只, 体重 (113.9 ± 6.6) g, 5 ~ 6 周龄。大鼠购自维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2021-0006]。在华中科技大学实验动物中心饲养 [SYXK (鄂) 2021-0057]。本研究通过华中科技大学同济医学院实验动物医学伦理委员会审批 (432), 遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

Zucker 大鼠专用饲料 Purina#5008 (Beijing Keao Xieli Feed Co., Ltd.); $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ (Cayman); 葡萄糖测定试剂盒 (Biosino Biotechnology and Science inc)。血糖仪 (Roche); 血糖试纸 (Roche); 紫外微量分光光度计 (Thermo NanoDrop 2000); 测序仪 (Illumina NovaSeq PE250)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

健康雄性 5 周龄 ZDF 大鼠经适应性喂养 1 周后根据体重随机分 4 组 (10 只/组): (1) 正常对照组 (Con): ZDF 对照鼠 (ZDF/Gmi fa/+); (2) VD 对照组 (VD): ZDF/Gmi fa/+ + $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对照组 ($5 \mu\text{g/kg}$); (3) 模型组 (T2DM): ZDF 胖型鼠 (ZDF/Gmi fa/fa); (4) VD 干预组 (VD+T2DM): ZDF/Gmi fa/fa + $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ ($5 \mu\text{g/kg}$)。

使用 Purina#5008 作为大鼠饲料, 在原饲料配方基础上去除添加的 VD。VD 和 VD+T2DM 组, 用 $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 溶于玉米油中根据体重每 2 d 灌胃 1 次, 剂量为 $5 \mu\text{g/kg}$ 。Con 和 T2DM 组大鼠灌胃等量玉米油。喂养期间, 每周测量 1 次体重, 每 3 周取尾血并分离血清。根据空腹血糖 ($\geq 16.7 \text{ mmol/L}$) 确定终止时间。

1.3.2 空腹血糖、口服糖耐量试验

大鼠喂养期间, 每 3 周进行尾静脉采血, 检测大鼠的空腹血糖。口服糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT): 造模结束前 1 周, 大鼠禁食 12 h 后使用 40% 葡萄糖溶液灌胃 (1 g/kg)。在 0、15、30、60 和 120 min 时进行尾静脉采血, 测量血糖。将血糖值绘制曲线, 计算曲线下面积表示葡萄糖耐量。

1.3.3 肠道菌群 16S rDNA 测序

抽提各组大鼠的粪便样本 DNA, 进行总 DNA 质检。16S rDNA 扩增的通用引物为 F341 和 R806。

F(5'-3') : ACTCCTACGGGRSGCAGCAG (F341) , R (5'-3') : GGACTACVVGGGTATCTAATC (R806) 。构建测序文库,并进行文库质检。上机测序。随机抽平,提取操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU) 序列。使用 Qiime 软件,做 α 多样性指数的稀释曲线,并确定抽平参数。抽平后进行分析。物种分类后,根据 OTU 序列条数,获得 OTU 丰度表。根据该丰度表进行后续生物信息学分析。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 22.0 进行统计分析,数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。多组间均数比较使用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 VD 干预可以改善 T2DM 大鼠空腹血糖

如表 1 所示,造模初始 Con、VD 组大鼠的空腹血糖比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$); T2DM 组

和 VD+T2DM 组大鼠的空腹血糖较 Con、VD 组均升高 ($P<0.05$)。3 周后, Con、VD 组大鼠的空腹血糖比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$); T2DM 组大鼠的空腹血糖较 Con、VD 组均升高 ($P<0.05$)。6 周后, T2DM 组大鼠的空腹血糖较 Con、VD、VD+T2DM 组均升高 ($P<0.05$)。

2.2 VD 干预可以改善 T2DM 大鼠 OGTT 水平

各组大鼠 OGTT 结果及曲线下面积可视化图像如图 1 所示,大鼠在葡萄糖灌胃后 30 min 时,血糖达到最大值。VD+T2DM 组的在血糖达到最高后下降的速度慢于 T2DM 组, T2DM 组的下降速度慢于 Con、VD 组; Con、VD 组的下降速度相差不显著。在 60 min 和 120 min 时, T2DM 组的血糖水平高于 VD +T2DM 组, VD+T2DM 组高于 Con、VD 两组。

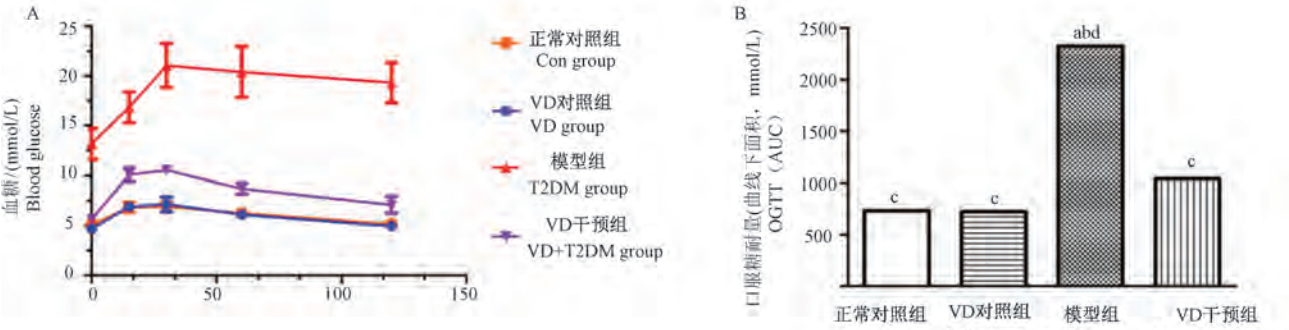
2.3 各组大鼠的肠道菌群 OTU 水平不一

OTU 聚类分析显示,四组大鼠共计 641 个 OTU。其中 Con 组独有 56 个 OTU、VD 组独有 23 个 OTU、T2DM 组独有 21 个 OTU、VD+T2DM 组独有 25

表 1 各组大鼠造模初始、3 周和 6 周后的空腹血糖比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别 Groups	空腹血糖/(mmol/L) Fasting blood glucose		
	造模初始 Initial modeling	3 周后 After 3 weeks	6 周后 After 6 weeks
<i>P</i>	0.002	<0.0001	<0.0001
正常对照组 Con group	4.34 $\pm$ 0.82	5.04 $\pm$ 0.51	5.47 $\pm$ 0.38
VD 对照组 VD group	4.25 $\pm$ 0.57	5.00 $\pm$ 0.63	4.77 $\pm$ 1.03
模型组 T2DM group	5.23 $\pm$ 0.76 ^{ab}	6.03 $\pm$ 0.46 ^{ab}	11.85 $\pm$ 5.61 ^{ab}
VD 干预组 VD+T2DM group	5.14 $\pm$ 0.51 ^{ab}	6.41 $\pm$ 0.60 ^{ab}	7.41 $\pm$ 2.05 ^c

注:与正常对照组相比, ^a $P<0.05$;与 VD 对照组相比, ^b $P<0.05$;与模型组相比, ^c $P<0.05$ 。
Note. Compared with the Con group, ^a $P<0.05$. Compared with the VD group, ^b $P<0.05$. Compared with the T2DM group, ^c $P<0.05$.



注:A:各组大鼠 OGTT 实验血糖变化;B:各组大鼠 OGTT 实验血糖变化曲线下面积。与正常对照组相比, ^a $P<0.05$;与 VD 对照组相比, ^b $P<0.05$;与模型组相比, ^c $P<0.05$;与 VD 干预组相比, ^d $P<0.05$ 。

图 1 OGTT 实验血糖变化和曲线下面积

Note. A, OGTT blood glucose changes in each group of rats. B, Area under the curve of OGTT blood glucose changes in each group of rats. Compared with the Con group, ^a $P<0.05$. Compared with the VD group, ^b $P<0.05$. Compared with the T2DM group, ^c $P<0.05$. Compared with the VD+T2DM group, ^d $P<0.05$.

Figure 1 Changes of blood glucose and area under the curve of OGTT

个 OTU, 各组之间 OTU 交集情况详见韦恩图(图 2)。

2.4 α多样性指数分析显示各组大鼠肠道菌群的物种丰富度和多样性不同

α多样性分析物种丰富度和多样性。T2DM 组和 VD+T2DM 组的 chao1、observed species、PD whole tree、shannon 和 simpson 指数无显著差异 ($P > 0.05$)。T2DM 组的 observed species、PD whole tree、shannon 和 simpson 指数均低于 Con 组 ($P < 0.05$)。各指数的组间比较详见表 2。

2.5 各组大鼠的肠道菌群 β多样性分析显示菌群结构存在差异

如图 3 所示,主坐标分析(principal coordinate

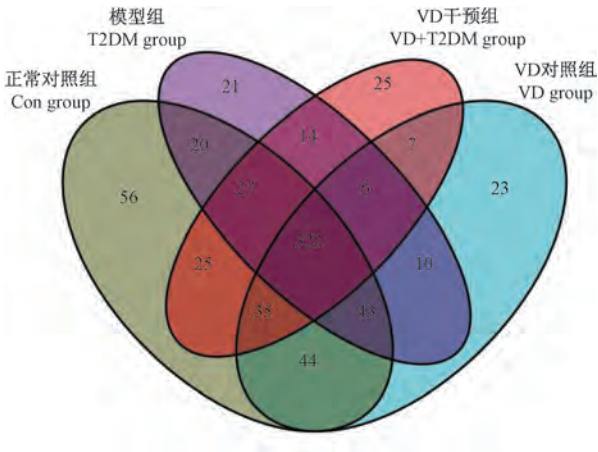


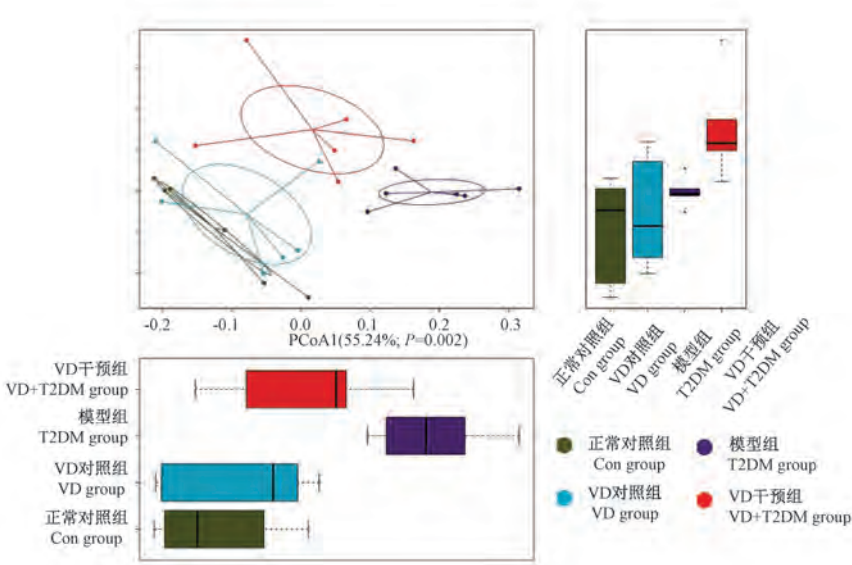
图 2 各组大鼠 OTU 的韦恩图

Figure 2 Venn of OTU in each group of rats

表 2 各组肠道菌群 α多样性指数比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of α diversity index in different groups

组别 Groups	α多样性指数 α diversity index				
	chao1 指数 chao1 index	物种丰富度指数 Observed species	PD 整树 PD whole tree	香农指数 Shannon index	辛普森多样性指数 Simpson index
<i>P</i>	<0.0001	<0.0001	0.003	0.021	0.040
正常对照组 Con group	431.04±35.30	336.67±27.65	22.14±1.84	5.10±0.63	0.93±0.03
VD 对照组 VD group	356.30±23.93 ^a	288.67±19.05 ^a	19.45±0.86 ^a	5.03±0.23	0.94±0.02
模型组 T2DM group	331.24±33.09 ^a	265.00±17.33 ^a	18.72±1.89 ^a	4.53±0.3 ^{ab}	0.89±0.03 ^{ab}
VD 干预组 VD+T2DM group	329.21±32.83 ^a	246.67±31.85 ^{ab}	17.44±2.64 ^a	4.56±0.13 ^{ab}	0.91±0.01

注:与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$;与 VD 对照组相比, ^b $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the Con group, ^a $P < 0.05$. Compared with the VD group, ^b $P < 0.05$.



注:Weighted UniFrac 结果。横、纵坐标分别表示第一、第二主坐标,百分比表示相应主坐标对样品差异的贡献率。横向、纵向的箱型图分别是不同分组在第一、第二主坐标上值的分布。

图 3 各组肠道菌群 PCoA 分析图

Note. Weighted UniFrac results. The first and second principal coordinates are represented by the horizontal and vertical coordinates, respectively. The percentages indicate the contribution of the corresponding principal coordinates to the sample differences. The distribution of values on the first and second principal coordinates for different subgroups is shown in the horizontal and vertical box plots, respectively.

Figure 3 PCoA analyses showed the structural characteristics of different groups

analysis, PCoA) 对肠道微生物群落结构的变化进行分析, 结果发现所有样本被分为 3 个聚类: T2DM 组与其余 3 组的距离远; VD+T2DM 组与 Con 组的距离相较于 T2DM 组与 Con 组的距离更近; Con 组与 VD 组的距离较近 ($P < 0.005$)。

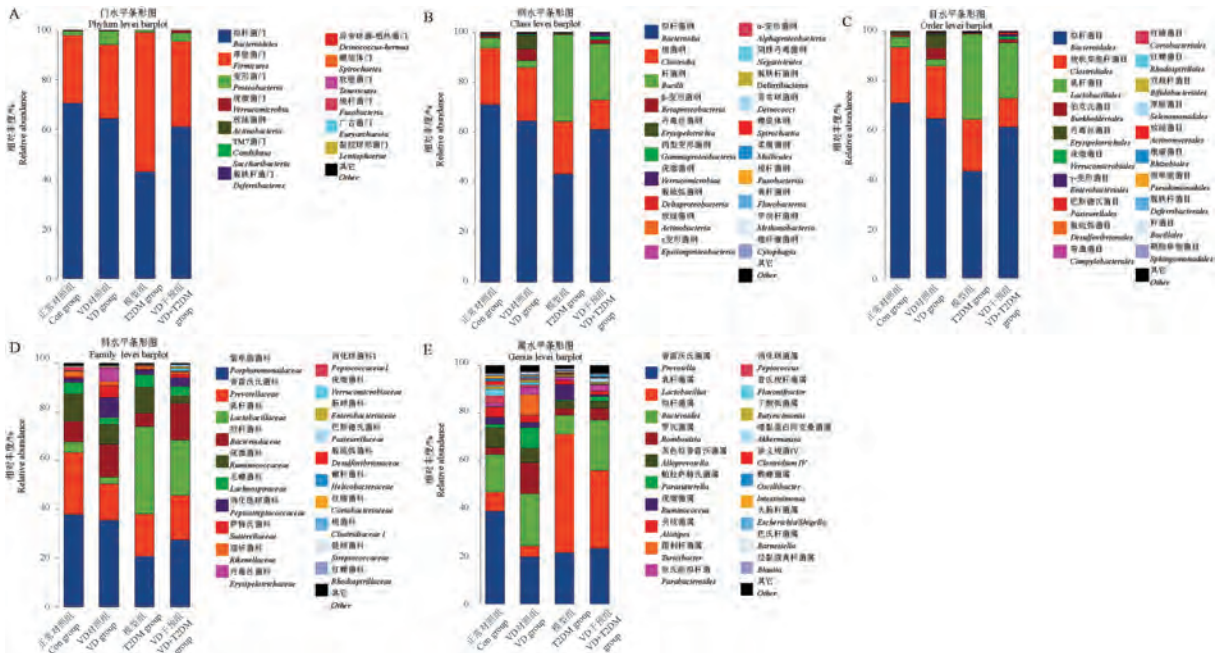
2.6 各组大鼠的肠道菌群门、纲、目、科和属水平的物种丰度存在差异

各组大鼠肠道菌群在门、纲、目、科和属水平上, 各组的优势菌 (丰度排名 top 10) 存在比较大的差异 (图 4)。在门水平上, 以 *Bacteroidetes*、*Firmicutes* 为主, 其余菌门的丰度较低; T2DM 组的 *Firmicutes* 丰度高于 VD+T2DM 组和 Con 组, VD+T2DM 组 *Bacteroidetes* 丰度高于 T2DM 组, 但低于 Con 组。在纲水平上, 以 *Bacteroidia*、*Closteridia* 和 *Bacilli* 为主, 其余菌纲的丰度较低; T2DM 组 *Bacteroidia* 丰度低于其余 3 组, VD+T2DM 组 *Closteridia* 和 *Bacilli* 丰度低于 T2DM 组。在目水平上, 以 *Bacteroidales*、*Closteridiales* 和 *Lactoacilliales* 为主, 其余菌目的丰度较低; T2DM 组的 *Bacteroidales* 丰度低于其余 3 组, VD+T2DM 组 *Closteridiales* 和

Lactoacilliales 丰度低于 T2DM 组 (图 4C)。在科水平上, 以 *Porphyromonadaceae*、*Prevotellaceae*、*Lactoaciliaceae*、*Bacteroidaceae* 和 *Ruminococcaceae* 为主, 其余菌科的物种丰度较低; T2DM 组的 *Lactoaciliaceae* 丰度高于其余 3 组, VD+T2DM 组的 *Porphyromonadaceae* 和 *Bacteroidaceae* 丰度高于 T2DM 组。在属水平上, 以 *Prevotella*、*Lactococcus*、*Bacteroides* 和 *Romboutsia* 为主, T2DM 组的 *Lactococcus* 高于其余 3 组, VD+T2DM 组的 *Bacteroides* 和 *Romboutsia* 高于 T2DM 组。

2.7 各组大鼠肠道菌群的物种 LEfSe 显著性差异分析

柱状图和聚类树结果显示 4 组肠道菌群丰度具有显著差异 ($P < 0.05$) (图 5)。其中 Con 组的 *Bacteroidia*、*Bacteroidales*、*Bacteroidetes* 等丰度较高; VD 组的 *Proteobacteria*、*Sutterellaceae*、*Betaproteobacteria* 等丰度较高; T2DM 组的 *Bacilli*、*Lactobacillales*、*Lactobacillaceae* 等丰度较高; VD+T2DM 组的 *Bacteroides*、*Bacteroidaceae*、*Clostridium* XIVa 等丰度较高。

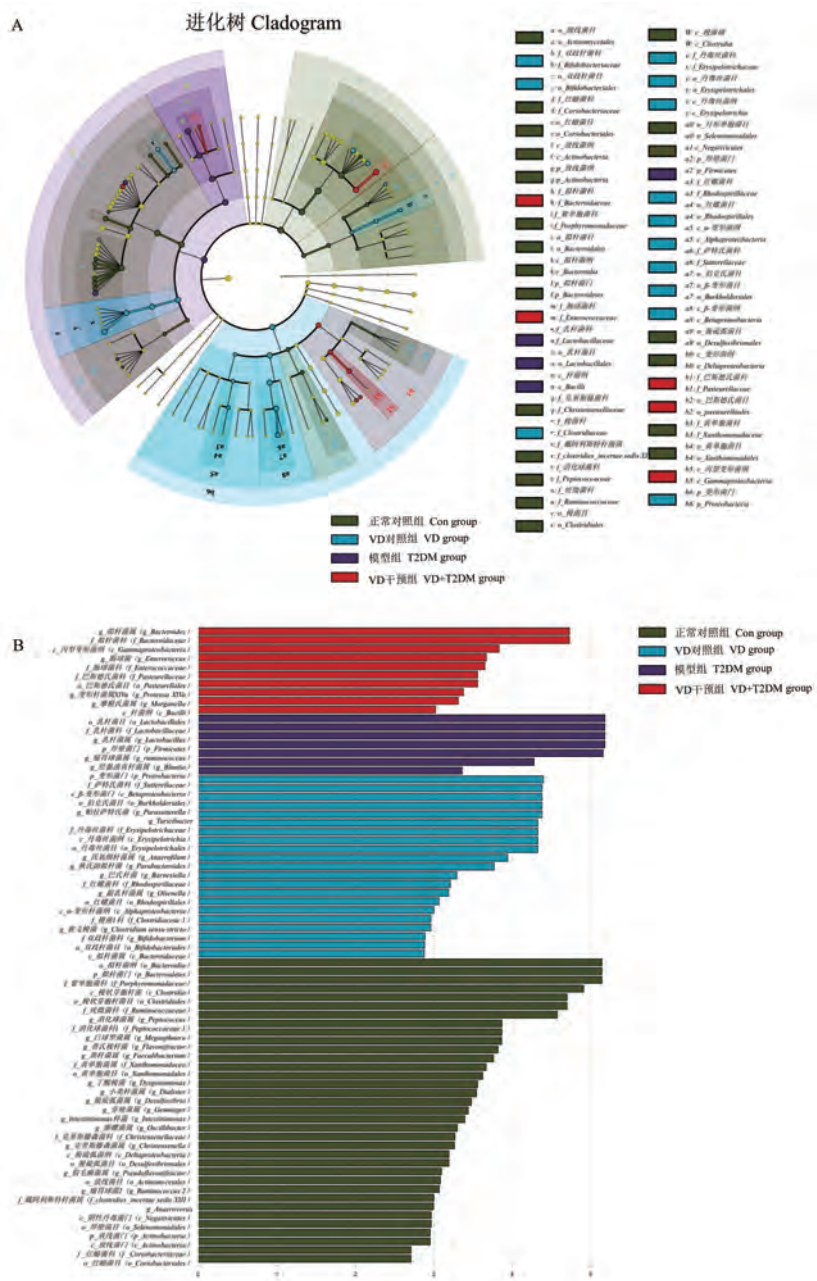


注: A: 在门水平上各样本丰度前 10 的菌群; B: 在纲水平上各样本丰度前 10 的菌群; C: 在目水平上各样本丰度前 10 的菌群; D: 在科水平上各样本丰度前 10 的菌群; E: 在属水平上各样本丰度前 10 的菌群。不同颜色代表不同物种, 色块长度代表物种相对丰度。

图 4 在门、纲、目、科和属水平上各样本丰度前 10 位的肠道菌群

Note. A, Top 10 microbial taxon with abundance in each sample at the phylum level. B, Top 10 microbial taxon with high abundance in each sample at the class level. C, Top 10 microbial taxon with high abundance in each sample at the order level. D, Top 10 microbial taxon with high abundance in each sample at the family level. E, Top 10 microbial taxon with high abundance in each sample at the genus level. Different colors represent different species, and the length of color blocks represents the relative abundance of species.

Figure 4 At phylum, class, order, family and genus level top 10 taxon with high abundance in different samples



注:A:聚类树,显示差异富集的属。黄色节点表示在不同分组中未起到重要作用的微生物群。B;LDA 评分的直方图,表示差异富集属。柱状图的长短代表的是不同组间显著差异物种的影响程度。LDA 阈值为 2。

图 5 LEfSe 分析四组差异菌群

Note. A, Cluster tree, shows differentially enriched genera. Microbial taxa that did not play a significant role in the different groupings are indicated by yellow nodes. B, Histogram of LDA scores, indicates differentially enriched genera. Histogram's length indicates the degree of influence of significantly different species across groups, with an LDA threshold of 2.

Figure 5 LEfSe analysis of four groups of differential flora

3 讨论

ZDF 大鼠的瘦素受体突变,对食欲控制及产热作用受损,导致其多食、肥胖,表现为糖耐量异常、高脂血症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗等特点;ZDF

大鼠疾病表型变化过程与人类 T2DM 的进程相似,是理想的 T2DM 动物模型^[11-12]。因此本研究选用 ZDF 大鼠作为研究对象。既往研究报道,VD 对 T2DM 具有保护作用,VD 补充剂可能有助于控制糖尿病前期和 T2DM 进展,并对 T2DM 及其并发症治

疗有积极作用^[13-14]。胰岛素抵抗持续增加和 β 细胞功能的下降,会导致血液中的葡萄糖水平失调,导致糖尿病前期发展成 T2DM^[15]。此外,机体的高血糖状态可以使炎症指标和活性氧水平异常增加,从而导致机体胰岛素抵抗和胰岛素分泌受损^[16]。本研究使用 5~6 周龄 ZDF 大鼠作为研究对象,在研究初始阶段 T2DM 组大鼠的血糖水平虽然高于 Con 组大鼠,但是尚未到达 16.7 mmol/L。本研究发现 VD 干预可以改善 T2DM 大鼠空腹血糖升高情况,同时 OGTT 实验证实 VD 干预可以改善 T2DM 大鼠的胰岛素抵抗情况。这一结果与既往研究结果相符合^[17-18]。一项研究发现,VD 缺乏小鼠可以产生胰岛素抵抗,补充 VD 可以显著改善小鼠的胰岛素敏感性、肝炎症和氧化情况^[17]。另一项研究则在临床水平和动物水平上探究了 VD 与 T2DM 患者胰岛素抵抗的关系,结果发现,VD 缺乏可通过提高 T2DM 患者的炎症指标表达,从而增强胰岛素抵抗^[18]。但是上述研究主要针对血液和组织的生物标志物,未涉及微生物水平的验证。

本研究的 OTU 聚类分析结果发现,VD 组和 T2DM 组的独有 OTU 数量均少于对照组、VD+T2DM 组独有 OTU 数量高于上述两组但是仍然低于 Con 组。 α 多样性分析表明,T2DM 组和 VD+T2DM 组的物种多样性无显著差异,T2DM 组的物种多样性低于对照组。 β 多样性分析结果显示,T2DM 组与其余 3 组的距离较远,菌群结构明显不同;VD+T2DM 组与 Con 组的距离相较于 T2DM 组与 Con 组的距离更近,说明 VD 干预可以改善 T2DM 所致的菌群结构异常。既往研究发现,T2DM 患者的肠道菌群的丰度和多样性存在异常^[19];而对 T2DM 患者进行药物治疗(如二甲双胍)后,可以明显改善其菌群情况^[20]。例如 Gu 等^[20] 研究发现二甲双胍治疗可以部分缓解 T2DM 引起的唾液微生物群的变化。由此推测,VD 可以改善 T2DM 所致的大鼠菌群结构异常。

本研究发现 VD 干预可以影响 T2DM 大鼠肠道菌群改变,4 组大鼠的肠道菌群结构在门、纲、目、科和属的水平上有所不同、优势菌的比例不一、肠道菌群结构发生改变。其中 VD+T2DM 组大鼠的 *Bacteroidetes* 的丰度水平较 T2DM 组升高,而 *Firmicutes* 的丰度水平较 T2DM 组下降。研究显示,高脂高糖饮食可导致 *Bacteroidetes* 的比例失衡,从而导致肠道屏障功能失调、低度炎症和机体代谢异常

的风险更高^[21]。非酒精性脂肪肝患者往往伴随胰岛素抵抗。有研究发现,非酒精性脂肪肝患者肠道炎症与肠道微生物群失调相关,相较于健康对照组,非酒精性脂肪肝患者的 *Bacteroidetes* 丰度显著下降^[22]。丁酸盐在机体肠道稳态中具有重要作用,*Firmicutes* 等可以产生丁酸盐的肠道微生物丰度下降会影响肠道稳态^[23]。但是也有研究发现 *Firmicutes* 丰度升高可能会导致肠道屏障功能障碍^[24]。既往研究发现 VD 缺乏小鼠的 *Bacteroidetes* 丰度升高,*Firmicutes* 和 *Gammaproteobacteria* 等的丰度下降,从而促进上皮屏障功能障碍和肠道炎症^[25]。因此,我们推测 VD 可能通过 *Bacteroidetes* 的丰度升高,*Firmicutes* 的丰度下降改善 T2DM 的炎症水平和胰岛素抵抗,但是具体的调控机制还需要深入探究。*Clostridium* 可以产生有助于肠道屏障完整性的丁酸盐等,减弱机体慢性炎症水平^[26]。其中,*Clostridium XIVa* 具有很强的抗炎特性,可以产生短链脂肪酸,是 Treg 细胞的有效诱导剂和激活剂,可增加对全身免疫球蛋白 E 反应的抵抗力^[27-28]。本研究发现 VD+T2DM 组的 *Clostridium XIVa* 显著富集,推测 VD 可能通过该肠道益生菌减弱 T2DM 的炎症水平进而改善血糖和胰岛素抵抗情况从而调节机体肠道菌群。

综上所述,VD 的干预可以改善 T2DM 大鼠的血糖水平和胰岛素抵抗,影响肠道菌群物种丰度和多样性,例如 VD 干预可以使 T2DM 大鼠的 *Bacteroidetes* 丰度下降、*Firmicutes* 和 *Clostridium XIVa* 增加等。但是 VD 影响 T2DM 大鼠的肠道菌群结果改变的具体机制以及这些菌群改变与血糖和胰岛素改善之间的关系还需要进一步的研究。本研究结果为以 VD 为成分的 T2DM 新疗法开发提供理论基础。在未来的 VD 与 T2DM 的机制研究中,可通过代谢组学等先进的技术方法,从代谢产物等角度继续深入探究。

参考文献:

- [1] WANG L, PENG W, ZHAO Z, et al. Prevalence and treatment of diabetes in China, 2013-2018 [J]. JAMA, 2021, 326(24): 2498-2506.
- [2] MAGLIANO D J, ISLAM R M, BARR E L M, et al. Trends in incidence of total or type 2 diabetes: systematic review [J]. BMJ, 2019, 366: l5003.
- [3] WANG L, LI X, WANG Z, et al. Trends in prevalence of diabetes and control of risk factors in diabetes among US adults, 1999-2018 [J]. JAMA, 2021, 326(8): 1-13.

- [4] PETRONI M L, BRODOSI L, MARCHIGNOLI F, et al. Nutrition in patients with type 2 diabetes: present knowledge and remaining challenges [J]. *Nutrients*, 2021, 13(8): 2748.
- [5] WU H, TREMAROLI V, SCHMIDT C, et al. The gut microbiota in prediabetes and diabetes: a population-based cross-sectional study [J]. *Cell Metab*, 2020, 32(3): 379–390, e3.
- [6] KRUL-POEL Y H, TER WEE M M, LIPS P, et al. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: the effect of vitamin D supplementation on glycaemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Endocrinol*, 2017, 176(1): R1–R14.
- [7] LEWGOOD J, OLIVEIRA B, KORZEPA M, et al. Efficacy of dietary and supplementation interventions for individuals with type 2 diabetes [J]. *Nutrients*, 2021, 13(7): 2378.
- [8] ZHANG Y, TAN H, TANG J, et al. Effects of vitamin D supplementation on prevention of type 2 diabetes in patients with prediabetes: a systematic review and meta-analysis [J]. *Diabetes Care*, 2020, 43(7): 1650–1658.
- [9] NADERPOOR N, MOUSA A, FERNANDA GOMEZ ARANGO L, et al. Effect of vitamin D supplementation on faecal microbiota: a randomised clinical trial [J]. *Nutrients*, 2019, 11(12): 2888.
- [10] 厉颖, 李灿委, 范孟然, 等. 中药调控肠道菌群干预酒精性肝病的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(6): 107–115.
- LI Y, LI C W, FAN M R, et al. Progress in research of traditional Chinese medicine for regulation of gut microbiota in patients with alcoholic liver disease [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(6): 107–115.
- [11] 宋丹, 冉丽媛, 姜如娇, 等. 糖尿病研究中的动物模型进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(9): 83–87.
- SONG D, RAN L Y, JIANG R J, et al. Animal models in diabetes mellitus research [J]. *Chin J Comp Med*, 2016, 26(9): 83–87.
- [12] 李艳艳, 王宁, 刘妍妍, 等. 维生素 D 缺乏对自发性糖尿病大鼠发病的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(2): 20–25.
- LI Y Y, WANG N, LIU Y Y, et al. Effect of vitamin D deficiency on pathogenesis of Zucker diabetic fatty rat [J]. *Chin J Comp Med*, 2018, 28(2): 20–25.
- [13] BARENGOLTS E. Vitamin D and prebiotics may benefit the intestinal microbacteria and improve glucose homeostasis in prediabetes and type 2 diabetes [J]. *Endocr Pract*, 2013, 19(3): 497–510.
- [14] TABATABAEI-MALAZY O, PEIMANI M, MOHSENI S, et al. Therapeutic effects of dietary antioxidative supplements on the management of type 2 diabetes and its complications; umbrella review of observational/trials meta-analysis studies [J]. *J Diabetes Metab Disord*, 2022, 21(2): 1833–1859.
- [15] KHAN R M M, CHUA Z J Y, TAN J C, et al. From pre-diabetes to diabetes: diagnosis, treatments and translational research [J]. *Medicina*, 2019, 55(9): 546.
- [16] LUC K, SCHRAMM-LUC A, GUZIK T J, et al. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2019, 70(6): 809–824.
- [17] MUTT S J, RAZA G S, MÄKINEN M J, et al. Vitamin D deficiency induces insulin resistance and re-supplementation attenuates hepatic glucose output via the PI3K-AKT-FOXO1 mediated pathway [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2020, 64(1): e1900728.
- [18] WANG W, ZHANG J, WANG H, et al. Vitamin D deficiency enhances insulin resistance by promoting inflammation in type 2 diabetes [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(5): 1859–1867.
- [19] YANG H T, LIU J K, XIU W J, et al. Gut microbiome-based diagnostic model to predict diabetes mellitus [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 12521–12534.
- [20] GU M, WANG P, XIANG S, et al. Effects of type 2 diabetes and metformin on salivary microbiota in patients with chronic periodontitis [J]. *Microb Pathog*, 2021, 161(Pt B): 105277.
- [21] HUSSEIN H M, ELYAMANY M F, RASHED L A, et al. Vitamin D mitigates diabetes-associated metabolic and cognitive dysfunction by modulating gut microbiota and colonic cannabinoid receptor 1 [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2022, 170: 106105.
- [22] JIANG W, WU N, WANG X, et al. Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8096.
- [23] THOMAS R L, JIANG L, ADAMS J S, et al. Vitamin D metabolites and the gut microbiome in older men [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5997.
- [24] DE FILIPPO C, CAVALIERI D, DI PAOLA M, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(33): 14691–14696.
- [25] ASSA A, VONG L, PINNELL L J, et al. Vitamin D deficiency promotes epithelial barrier dysfunction and intestinal inflammation [J]. *J Infect Dis*, 2014, 210(8): 1296–1305.
- [26] KWAN S Y, SABOTTA C M, JOON A, et al. Gut microbiome alterations associated with diabetes in Mexican Americans in south texas [J]. *mSystems*, 2022, 7(3): e0003322.
- [27] KOWALCZYK P, STRZĘPA A, SZCZEPANIK M. Perinatal treatment of parents with the broad-spectrum antibiotic enrofloxacin aggravates contact sensitivity in adult offspring mice [J]. *Pharmacol Rep*, 2021, 73(2): 664–671.
- [28] WANG S, WEI Y, LIU L, et al. Association between breastmilk microbiota and food allergy in infants [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 770913.

李雨芬,姜爽,宋伍,等.回毒银花散中各药及药物不同配比对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的作用研究[J].中国比较医学杂志,2024,34(2):63-71.

Li YF, Jiang S, Song W, et al. Effects of the various herbs and different proportions of the herbs in Huidu Yinhua powder on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 63-71.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.008

回毒银花散中各药及药物不同配比对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的作用研究

李雨芬,姜爽,宋伍,姜涛,刘畅,周豪芳,唐亚婷,魏琳*,苏鑫*

(长春中医药大学,长春 130117)

【摘要】 目的 研究《外科正宗》中回毒银花散对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的抑菌能力以及毒力因子 α -溶血素(α -hemolysin, Hla)活性和生物被膜形成的抑制作用,同时探究回毒银花散最佳配比为古方新用提供实验支撑。**方法** 通过最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)、最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)、纸片扩散法(K-B法)分析回毒银花散及组方中各味药对MRSA菌株USA300的抑制效果,溶血实验、Hla中和实验、Hla寡聚实验、免疫印记(Western blot)实验验证药物以何种形式抑制毒力因子Hla的活性,生物被膜形成实验评价回毒银花散对生物被膜的抑制效果,最后正交实验探究回毒银花散的最佳配比。**结果** 回毒银花散抑制MRSA菌株, MIC₉₀为64 mg/mL, MBC为256 mg/mL, 抑菌圈直径为(7.50±0.50)mm。回毒银花散还通过抑制Hla的释放抑制Hla的活性,最小有效浓度(minimum effective concentration, MEC)为16 mg/mL,抑制生物被膜形成的MEC为8 mg/mL。回毒银花散中金银花、黄芪只影响MRSA溶血活性以及生物被膜形成但不抑制细菌的生长,两药溶血活性MEC以及生物被膜形成MEC均为32 mg/mL;甘草抑菌能力较强, MIC₉₀为8 mg/mL,生物被膜MEC为1 mg/mL,在亚抑菌浓度下未表现出抑制溶血活性。最后正交实验显示,当回毒银花散中金银花、黄芪、甘草比例为1:2:4时, MIC₉₀为16 mg/mL,溶血活性MEC为8 mg/mL,生物膜形成MEC为4 mg/mL,均为9组中最低。**结论** 回毒银花散在亚抑菌浓度下可影响MRSA的溶血活性以及生物被膜形成,其中金银花、黄芪、甘草的最佳比例为1:2:4。

【关键词】 金黄色葡萄球菌;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;回毒银花散; α -溶血素;生物被膜

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)02-0063-09

Effects of the various herbs and different proportions of the herbs in Huidu Yinhua powder on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

LI Yufen, JIANG Shuang, SONG Wu, JIANG Tao, LIU Chang, ZHOU Haofang, TANG Yating, WEI Lin*, SU Xin*
(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

【Abstract】 Objective To study the inhibitory effect of Huidu Yinhua powder from the Orthodox Manual of External Medicine on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), virulence factor α -hemolysin (Hla) activity, and biofilm formation, and to explore the optimal ratios of Huidu Yinhua powder and provide experimental support for its

【基金项目】 吉林省教育厅科学技术研究项目(JJKH20230985KJ)。

【作者简介】 李雨芬(1999—),女,硕士研究生,研究方向:方剂文献及配伍规律研究。E-mail:chengyuan56@outlook.com

【通信作者】 魏琳(1984—),女,硕士,实验师,研究方向:方剂文献及配伍规律研究。E-mail:lynnw2013@sina.com

苏鑫(1975—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:方剂文献及配伍规律研究。E-mail:suxin2307@126.com

* 共同通信作者

use. **Methods** The inhibitory effects of Huidu Yinhua powder and the herbs in the formula on USA300 were analyzed by the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and disk diffusion assay (K-B method). Hemolysis, neutralization, oligomerization, and Western blot assays were used to verify in which form the drug inhibits the activity of virulence factor α -hemolysin (Hla). A biofilm assay was performed to evaluate the inhibitory effect of Huidu Yinhua powder on biofilm. Orthogonal experiments were performed to explore the optimal ratio of Huidu Yinhua powder. **Results** Huidu Yinhua powder inhibited the MRSA strain with a MIC₉₀ of 64 mg/mL and an MBC of 256 mg/mL with antibacterial circle diameter of (7.50±0.50) mm. Huidu Yinhua powder inhibited Hla activity by inhibiting Hla secretion. The minimum effective concentration (MEC) was 16 mg/mL, and the MEC of biofilm was 8 mg/mL. In Huidu Yinhua powder, honeysuckle and astragalus only affected the hemolytic activity of MRSA and biofilm formation without inhibiting bacterial growth. The hemolytic activity and biofilm of MEC were both 32 mg/mL. Glycyrrhiza had a strong bacterial inhibitory capacity with a MIC₉₀ of 8 mg/mL and biofilm MEC of 1 mg/mL without showing inhibitory hemolytic activity at subinhibitory concentrations. The orthogonal experiment showed that, at a ratio of honeysuckle, astragalus, and glycyrrhiza in Huidu Yinhua powder of 1 : 2 : 4, the MIC₉₀ was 16 mg/mL, MEC of hemolytic activity was 8 mg/mL and that of biofilm was 4 mg/mL, both of which were the lowest among the nine groups. **Conclusions** Huidu Yinhua powder affects the hemolytic activity and biofilm formation of MRSA at subinhibitory concentrations with the optimal ratio of honeysuckle, astragalus, and glycyrrhiza being 1 : 2 : 4.

[Keywords] *Staphylococcus aureus*; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; Huidu Yinhua powder; α -hemolysin; biofilm

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

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 是常见的人体共生菌,同时可引起多种疾病,如皮肤软组织感染 (skin and soft tissue infections, SSTI)、肺炎、菌血症等,其中 SSTI 是社区和医院环境中最常见的感染之一^[1-3]。SSTI 多由化脓性病原体感染所致,*S. aureus* 是主要病原体,单纯性的皮肤软组织感染包含痈疖、毛囊炎、脓疱病、浅表性蜂窝织炎、丹毒等,复杂性 SSTI 可能会出现危及生命的坏死性筋膜炎以及严重的全身表现^[4-5]。抗生素的滥用使各种耐药菌株的出现更加频繁,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 使 *S. aureus* 引起的感染变得更加凶险,同时管理复杂性 SSTI 患者的抗菌治疗也成为一项日益严峻的挑战,对医疗保健系统也造成重大负担^[6]。

S. aureus 为了能更好地在宿主细胞内生存及扩散,会释放各种毒力因子达到目的,Hla 就是其中的主力军^[7]。在 *S. aureus* 感染过程中,角质形成细胞的细胞膜上去整合素金属蛋白酶 10 (a disintegrin and metalloproteinase 10, ADAM10) 能快速聚集并识别 Hla,破坏上皮细胞之间的细胞骨架,使组织变得松散,帮助 *S. aureus* 向更深层组织进行扩散^[8]。同时 Hla 快速组装为七聚体的桶状结构,在细胞膜上完成穿孔,为 *S. aureus* 进入细胞提供条件^[9]。进入细胞内的 *S. aureus* 产生的 Hla 在线粒体表面穿孔,

线粒体应激导致活性氧大量释放,通过坏死、凋亡或焦亡等多种途径引起细胞死亡^[10-11]。除此之外,生物膜在感染过程中也起到非常重要的作用,相当于在细菌表面覆盖一层厚防护层,增加了细菌对抗生素药物的耐药性,并且致密的生物膜可以有效阻挡抗生素向深层渗透,增加感染后复发概率^[12-13]。

回毒银花散源自《外科正宗·卷二》,由金银花、黄芪、甘草三味药以 2 : 4 : 1 的比例组合而成,主治为“治脑疽及诸发阴疮不起”^[14]。脑疽是发于脑后项部的有头疽,阴疮为阴性溃疡,主要表现为患处漫肿无头,皮色不变,皮温不高。根据临床表现,脑疽和阴疮都属于化脓性病原体引起的感染。研究回毒银花散的最佳药物配比,及其对 MRSA 毒力因子 Hla 和生物膜的抑制作用,为新药开发提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 菌株

MRSA 菌株 USA300 (ATCC BAA 1717) 购自美国模式培养物集存库。

1.2 主要试剂与仪器

中药免煎颗粒金银花 (2201416101)、黄芪 (231087101)、甘草 (2208135101) 购自江阴天江药业有限公司,将中药免煎颗粒用二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解为 1 g/mL 溶液,随

后按原方比例将金银花、黄芪、甘草以 2 : 4 : 1 混合配制回毒银花散溶液,置于 4 ℃ 保存。除正交实验,其余回毒银花散中金银花、黄芪、甘草的比例均为 2 : 4 : 1。万古霉素(V871983,250 mg)购自上海麦克林科技有限公司;胰蛋白胨大豆肉汤(tryptic soy broth,TSB,HB4114)、阳离子调节肉汤(ationadjusted mueller-hinton broth,CAMHB,HB6231-1)及胰蛋白胨大豆琼脂(tryptose soya agar,TSA,HB0177)购自青岛海博生物技术有限公司;无菌抗凝兔血(20230610)购自北京平睿生物科技有限公司;山羊抗兔(A0208)、结晶紫染色剂(C0121)、DMSO(ST038)、脱氧胆酸钠(ST2049)购自上海碧云天生物技术有限公司。

紫外可见分光光度计(T6,北京普析通用仪器有限责任公司);酶标仪(A51119700C,Thermo Scientific);振荡培养箱(KT-2,常州市中贝仪器有限公司);低温离心机(75002554,Thermo Scientific);生化培养箱(LC-SPX-70BE,上海力辰仪器科技有限公司);GraphPad Prism 8.0 统计软件(GraphPad Software San Diego,CA,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration,MIC)、最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration,MBC)

过夜培养的 USA300 以 1 : 100 的比例传代至 CAMHB 肉汤中培养,当 A_{600} 为 0.8 时,稀释菌液至最终浓度为 10^6 CFU/mL。在 96 孔板中加入 100 μ L 菌液以及 1~512 mg/mL 浓度梯度中药颗粒溶液,置于恒温培养箱中(37 ℃,24 h),然后酶标仪测量 A_{600} 值。最后将加药培养的菌液均匀铺在 TSA 琼脂板中,恒温培养(37 ℃,24 h)观察是否有菌落生成。

1.3.2 时间-生长曲线

USA300 菌液以 1 : 100 传代至 TSB 培养基,当 A_{600} 为 0.3 时,转移至新试管后加入中药颗粒溶液,取出 100 μ L 点入 96 孔板中,用酶标仪测量 600 nm 吸光度值,记录 0 h 的数据。此后每 1 h 取 100 μ L 测量 1 次,直至 6 h 后,改为每 2 h 1 次。

1.3.3 K-B 法

用棉签将 USA300 菌液均匀平铺在 TSA 琼脂板中,取中药颗粒溶液(1 g/mL)和万古霉素(2 mg/mL)20 μ L 完全浸润 6 mm 直径的纸片后,贴入含菌的 TSA 培养板中,置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 16

h,用直尺测量抑菌圈直径。

1.3.4 溶血实验

将含有中药颗粒溶液的 USA300 菌液,培养至 A_{600} 为 2.5 时,离心(5000 r/min,5 min)取 100 μ L 上清液,加入装有 850 μ L 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline,PBS)的 1.5 mL EP 管中,取 940 μ L PBS 缓冲液和 10 μ L 的 Triton-X 100 为阳性对照组,最后取 50 μ L 无菌新鲜兔血混匀后,放置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 30 min,低温离心(4 ℃,5000 r/min,3 min),用酶标仪测量 A_{543} 值。

1.3.5 Hla 中和实验

将 A_{600} 为 2.5 的 USA300 菌液离心(5000 r/min,5 min),取 100 μ L 上清,加至含有 PBS 缓冲液与中药颗粒溶液的混合液中,保持体积为 950 μ L。最后加入 50 μ L 无菌新鲜兔血,剩余步骤与溶血试验一致。

1.3.6 Western blot 实验

将蛋白电转至聚偏二氟乙烯膜后,用 2.5% 脱脂奶粉封闭 2 h,转移至 Hla 一抗(1 : 5000)中 4 ℃ 过夜孵育,TBS/T 清洗 5 次(130 r/min,5 min),加入含有辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG 的二抗(1 : 1000)孵育 2 h,显影结果用 Image J 软件分析。

1.3.7 Hla 蛋白寡聚实验

在 500 μ L 的 Ep 管中加入 5 mmol 脱氧胆酸盐溶液 100 μ L,加入 Hla 蛋白至最终浓度为 0.5 mg/mL,最后加入中药颗粒溶液混匀,22 ℃ 孵育 25 min。与 5 $\times$ 非还原性蛋白上样缓冲液以 4 : 1 的比例混合后金属浴(55 ℃,10 min)。电泳结束后,倒入考马斯亮蓝染色剂中,最后结果用 Image J 分析 Hla 七聚体与单体的比值。

1.3.8 生物被膜形成实验

向酶标板中点入 A_{600} 为 0.3 的 USA300 菌液 100 μ L,再加中药颗粒溶液,放入 37 ℃ 恒温箱中培养 24 h。用 PBS 缓冲液清洗浮游细菌,结晶紫染色 20 min,再次使用 PBS 缓冲液洗脱未结合结晶紫,最后无水乙醇溶解结晶紫,酶标仪测量 595 nm 处吸光度值。

1.3.9 正交实验

将回毒银花散中金银花、黄芪、甘草作为影响回毒银花散效果的 3 个因素,以原方比例 2 : 4 : 1 为基础,每个因素安排 1、2、4 三个比例水平。用 SPSS 13.0(SPSS Chicago,IL,美国)进行随机分组,

产生 9 组数据进行分析。

1.4 统计学方法

数据采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件和 SPSS 进行统计学分析。每组实验均重复 3 次,用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)展示实验数据,呈现正态分布的独立样本采用 *t* 检验,多组均数采用单因素方差分析,当 $P<0.05$ 时认为有显著性差异。

2 结果

2.1 回毒银花散对 MRSA 的抑菌检测

为了探究回毒银花散对 MRSA 菌株的影响,用微孔板法测量 MIC 和 MBC,结果显示回毒银花散的 MIC₉₀ 为 64 mg/mL, MBC 为 256 mg/mL。K-B 法测试回毒银花散抑菌能力,用万古霉素作为对照组,显示回毒银花散的抑菌圈为(7.50±0.50)mm。

2.2 回毒银花散对 MRSA 溶血活性的影响

用无菌新鲜兔血以 MIC₉₀ 为最大浓度进行梯度溶血实验,共设置 5 个梯度,测试回毒银花散抑制溶血的能力,结果显示回毒银花散在亚抑菌浓度 16 mg/mL 的情况下依旧抑制 MRSA 的溶血活性。见表 1。

2.3 回毒银花散对 MRSA 生物被膜形成的影响

通过结晶紫染色剂对生物被膜进行染色,能明显观察到回毒银花散以剂量依赖性的方式抑制 MRSA 生物被膜的形成,64 mg/mL 时几乎没有生物被膜的覆盖,随药物浓度降低,吸光度值逐渐增高呈剂量依赖性,8 mg/mL 时仍能抑制生物被膜的形成,4 mg/mL 吸光度值与空白组相差不大。见表 2。

2.4 亚抑菌浓度的回毒银花散的时间-生长曲线

从 MIC 结果可知,在 16 mg/mL 浓度下回毒银花散并不抑制细菌的生长,但其仍然可以抑制 MRSA 的溶血活性以及生物被膜的形成。为了进一步确定在 16 mg/mL 浓度下回毒银花散是否有抑菌效果,测定了回毒银花散的时间-生长曲线,结果显示加入 16 mg/mL 浓度的回毒银花散对 MRSA 菌株的生长没有明显影响。见图 1。

2.5 回毒银花散对 Hla 蛋白的影响

Hla 中和实验显示回毒银花散在 64 mg/mL 以及 32 mg/mL 浓度对 Hla 的溶血活性有影响,提示在一定浓度下回毒银花散直接中和 Hla 的溶血活性。随后 Hla 蛋白寡聚实验,利用脱氧胆酸盐促使纯化的 Hla 蛋白低聚成具有活性的七聚体形态,分析结果显示 64 mg/mL 以下浓度不影响 Hla 七聚体

的形成。最后测试回毒银花散是否抑制 Hla 的分泌,取含有不同浓度药物的 MRSA 菌液上清,制作成蛋白样品进行 Western blot 实验,结果显示回毒银花散在 4 mg/mL 浓度下显著减少 *S. aureus* 中 Hla 释放量。见表 3。

2.6 回毒银花散中各药对 MRSA 的抑菌检测

为了探究回毒银花散中各味药物对 MRSA 菌株的抑制效果,首先分别对金银花、黄芪、甘草三味药进行了 MIC、MBC 测定,结果可知金银花的 MIC₉₀ 为 256 mg/mL, MBC>512 mg/mL;黄芪的 MIC₉₀ 为

表 1 不同浓度回毒银花散对 MRSA 溶血活性影响($n=3$)
Table 1 Effect of different concentrations of Huidu Yinhua powder on the hemolytic activity of MRSA

药物浓度/(mg/mL)	溶血活性/%
Herb concentration	Hemolytic activity
0	100.00±11.41
4	105.75±11.33
8	91.88±13.08
16	4.04±0.81***
32	3.11±0.53***
64	3.43±0.80***

注:与 0 mg/mL 组比较, *** $P<0.001$ 。
Note. Compared with the 0 mg/mL group, *** $P<0.001$.

表 2 不同浓度回毒银花散对 MRSA 生物被膜形成影响($n=3$)
Table 2 Effect of Huidu Yinhua powder with different concentration on MRSA biofilm formation

药物浓度/(mg/mL)	生物被膜形成(A_{595})
Herb concentration	Biofilm formation(A_{595})
0	2.03±0.17
4	1.78±0.12
8	1.49±0.23*
16	1.45±0.14**
32	1.07±0.12***
64	0.67±0.13***

注:与 0 mg/mL 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。
Note. Compared with the 0 mg/mL group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

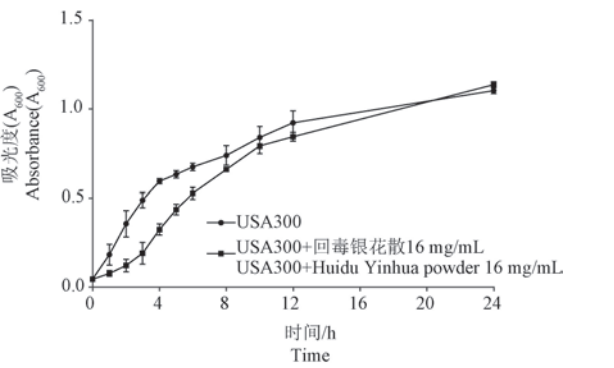


图 1 回毒银花散时间-生长曲线
Figure 1 Time-growth curves for Huidu Yinhua powder

512 mg/mL, MBC>512 mg/mL; 两者抑菌能力较弱。甘草的 MIC₉₀ 为 8 mg/mL, MBC 为 64 mg/mL, 显示强抑菌作用。随后用 K-B 法进一步测量各味药物对 MRSA 的敏感程度, 结果显示金银花和黄芪对 USA300 均不敏感, 甘草抑菌圈大小为 (11.83 ± 0.29) mm, 属于中度敏感。根据上述 MIC 结果, 我们选用不影响细菌生长的适宜药物浓度为最高梯度进行溶血及生物被膜实验。为进一步验证药物在设定的最高梯度不影响细菌的生长, 又测定了 3 味药物的时间-生长曲线, 结果显示金银花、黄芪在 64 mg/mL, 甘草在 2 mg/mL 浓度下均不影响 MRSA

的生长。见图 2, 表 4。

2.7 回毒银花散中各药对 MRSA 溶血活性及 Hla 蛋白的影响

溶血结果显示金银花和黄芪均在 32 mg/mL 以上浓度显著抑制 USA300 的溶血活性, 甘草在亚抑菌浓度下未表现出明显对溶血活性的抑制效果。与 2.5 思路一致, 首先针对金银花和黄芪进行 Hla 中和实验, 观察两味药是否中和 Hla 毒性的形式抑制 Hla 的穿孔活性, 结果显示金银花在 8 mg/mL 即表现出对 Hla 蛋白的抑制作用, 同时黄芪在 64 mg/mL 及 32 mg/mL 也有相应作用。随后又进行 Hla

表 3 不同浓度的回毒银花散对 Hla 蛋白影响 (n=3)

Table 3 Effects of different concentrations of Huidu Yinhua powder on Hla proteins

药物浓度/(mg/mL) Herb concentration	Hla 中和实验/% Hla neutralization assay	Hla 寡聚实验 (七聚体/Hla)	Hla 蛋白免疫印记实验/% Hla Western blot
		Hla oligomerization assay (Heptamer/Hla)	
回毒银花散 Huidu Yinhua powder	0	1.21±0.12	100.00±6.13
	4	1.10±0.27	65.47±13.75**
	8	1.00±0.05	25.68±7.04***
	16	0.89±0.05	10.60±3.11***
	32	1.01±0.13	6.02±0.83***
	64	1.18±0.21	6.00±0.77***

注: 与 0 mg/mL 组比较, ** P<0.01, *** P<0.001。
Note. Compared with the 0 mg/mL group, ** P<0.01, *** P<0.001.

表 4 回毒银花散中各味药 MIC、MBC 和抑菌能力

Table 4 MIC, MBC and bacteriostatic ability of each flavor of the herbs in Huidu Yinhua powder

组别 Groups	MIC/(mg/mL)	MBC/(mg/mL)	抑菌圈/mm Sphere of inhibition	敏感程度 Sensitivity level
金银花 Honeysuckle	256	>512	/	不敏感 Insensitive
黄芪 Astragalus	512	>512	/	不敏感 Insensitive
甘草 Glycyrrhiza	8	64	11.83±0.29	中度敏感 Moderately sensitive

注: 敏感度标准: 抑菌圈直径>20 mm 为极度敏感, 15.1~20 mm 为高度敏感, 10~15 mm 为中度敏感, <10 mm 为不敏感。
Note. Sensitivity criteria, Inhibition circle diameter >20 mm is extremely sensitive, 15.1~20 mm is highly sensitive, 10~15 mm is moderately sensitive, <10 mm is insensitive.

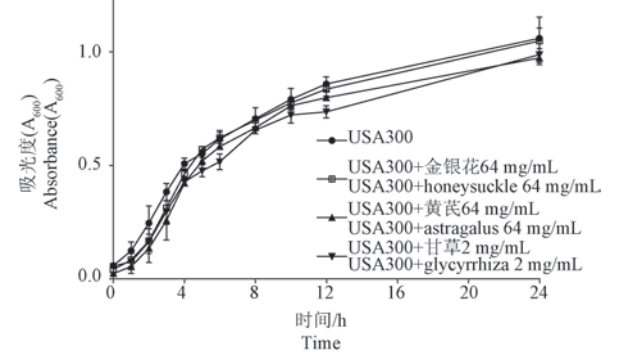


图 2 回毒银花散中各味药的时间-生长曲线

Figure 2 Time-growth curves of the individual herbs in Huidu Yinhua powder

寡聚实验, 结果显示黄芪和金银花则未表现对 Hla 七聚体形成的抑制作用。最后 Western blot 实验再一次验证金银花和黄芪也主要通过抑制 Hla 的分泌来降低 MRSA 的溶血活性, 据统计结果可观察到 4 mg/mL 浓度的金银花和黄芪均能使培养基中由 USA300 释放的 Hla 蛋白大幅度减少。见表 5, 图 3。

2.8 回毒银花散中各药对生物被膜形成的影响

生物被膜实验观察回毒银花散中单味药物对生物被膜形成的抑制作用, 结果显示金银花对生物膜的最小抑制浓度为 32 mg/mL, 黄芪为 16 mg/mL, 甘草则能在更小的浓度 1 mg/mL 显示出对生物膜形成的抑制作用。见图 4。

2.9 回毒银花散中各药的最佳配比

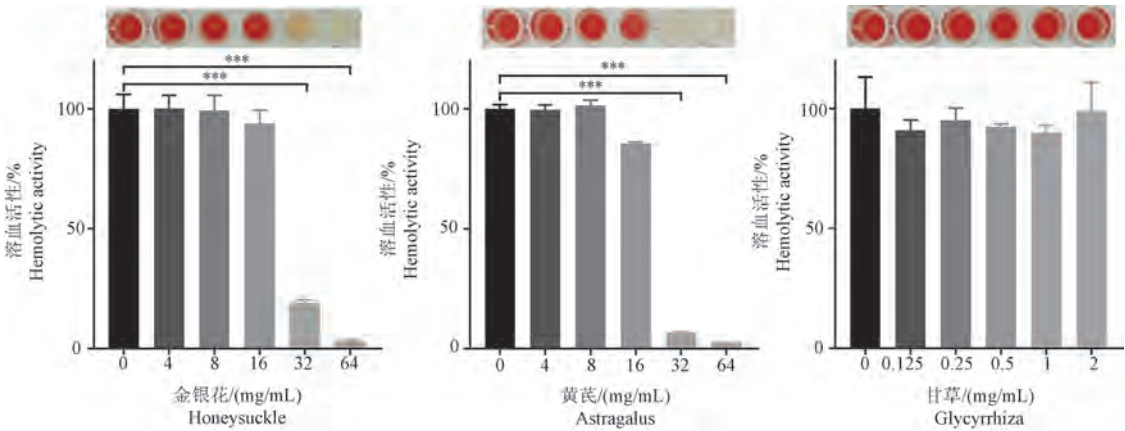
由上述的所有实验,我们可以明显观察到甘草在回毒银花散中显示出强抑菌能力,三味药合用使

在亚抑菌浓度下回毒银花散对 MRSA 菌株还表现出较强的抑制溶血以及生物膜形成的能力。如表 6 所示,原方中金银花、黄芪、甘草为 2 : 4 : 1,为了测

表 5 金银花、黄芪对 Hla 蛋白的影响 (n=3)
Table 5 Effect of honeysuckle and astragalus on Hla proteins

药物浓度/(mg/mL) Herb concentration	Hla 中和实验/% Hla neutralization assay		Hla 寡聚实验(七聚体/Hla 单体) Hla oligomerization assay (Heptamer/Hla monomer)		Hla 蛋白免疫印记实验/% Hla Western blot	
	金银花 Honeysuckle	黄芪 Astragalus	金银花 Honeysuckle	黄芪 Astragalus	金银花 Honeysuckle	黄芪 Astragalus
0	100.00±9.64	100.00±1.44	0.99±0.28	1.43±0.85	100.00±3.59	100.00±1.31
4	88.09±3.62	98.80±1.44	0.94±0.21	1.44±0.49	43.46±8.50***	20.55±0.73***
8	81.33±9.38*	98.13±4.66	0.83±0.07	1.05±0.13	27.00±9.62***	15.74±0.18***
16	65.68±2.37***	98.28±1.43	0.79±0.11	0.74±0.05	10.59±3.01***	9.38±0.95***
32	61.30±3.10***	76.80±3.74***	0.90±0.09	0.64±0.06	5.82±0.93***	8.10±1.27***
64	20.56±1.42***	59.39±3.81***	0.94±0.20	0.84±0.05	6.19±1.23***	7.25±0.46***

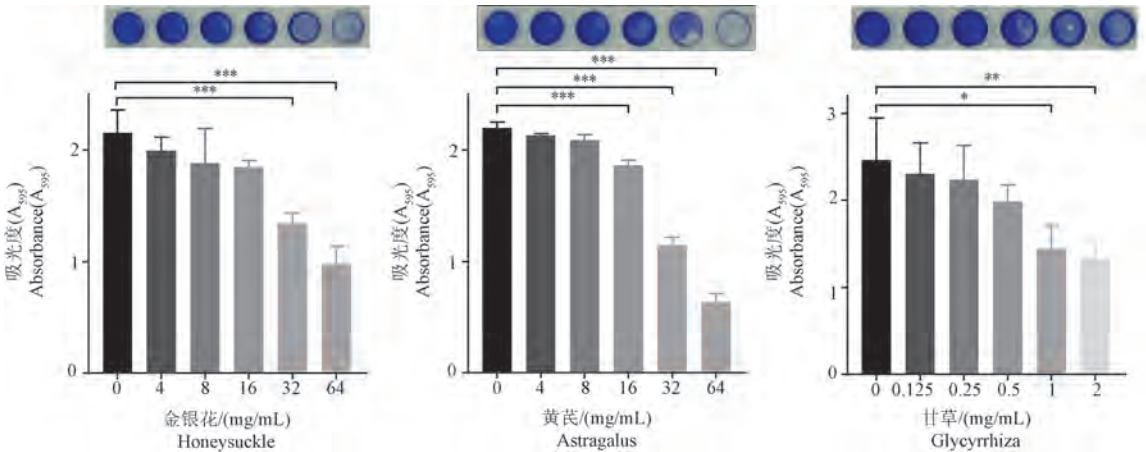
注:与 0 mg/mL 组比较, *P<0.05, ***P<0.001。
Note. Compared with the 0 mg/mL group, *P<0.05, ***P<0.001.



注:与 0 mg/mL 组比较, ***P<0.001。
图 3 回毒银花散中各味药对 MRSA 溶血活性影响 (n=3)

Note. Compared with the 0 mg/mL group, ***P<0.001.

Figure 3 Effects of various flavors of herbs on the hemolytic activity of MRSA in Huidu Yinhua powder



注:与 0 mg/mL 组比较, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。
图 4 回毒银花散中各药对生物被膜形成的影响 (n=3)

Note. Compared with the 0 mg/mL group, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Figure 4 Effects of the flavors in Huidu Yinhua powder on the formation of MRSA biofilms

表 6 回毒银花散正交实验结果 (n=3)
Table 6 Results of orthogonal assay on Huidu Yinhua powder

序号 Serial number	药物比例 (金银花:黄芪:甘草) Herb ratio (honeysuckle : astragalus :glycyrrhiza)	抑菌圈/mm Sphere of inhibition	MIC ₉₀ /(mg/mL)	溶血 MEC/(mg/mL) Hemolysis MEC	生物被膜 MEC/(mg/mL) Biofilm MEC
1	4:4:1	6.33±0.47	256	32	16
2	1:2:4	10.17±0.26***	16	8	4
3	4:1:4	9.33±0.26***	32	16	8
4	2:4:4	9.33±0.47***	32	16	4
5	4:2:2	8.00±0.82	64	32	8
6	2:2:1	7.33±0.47	64	32	4
7	2:1:2	9.67±0.47***	32	16	8
8	1:1:1	8.33±0.62	32	16	4
9	2:4:1	7.00±0.00	64	16	8

注:与第 9 组比较, *** P<0.001。敏感度标准:抑菌圈直径>20 mm 为极度敏感,15.1~20 mm 为高度敏感,10~15 mm 为中度敏感,<10 mm 为不敏感。
Note. Compared with the group 9, *** P<0.001. Sensitivity criteria, Inhibition circle diameter >20 mm is extremely sensitive, 15.1~20 mm is highly sensitive, 10~15 mm is moderately sensitive, <10 mm is insensitive.

试方中药物最佳比例,设计产生了 9 种组合形式的正交表。分别对 9 组药物组合进行 MIC 和抑菌圈测量,结果显示有 5 组数据的 MIC₉₀ 较原方 64 mg/mL 不同程度下降,4 组抑菌圈大小较原方显著性增大。分析 9 组数据可知当甘草在方中占比越高则回毒银花散的抑菌能力越强,其中金银花、黄芪、甘草的比例为 1:2:4 时,MIC₉₀ 值在 9 组中最小,为 16 mg/mL,并且抑菌圈尺寸达到 (10.17±0.26) mm,较原方有显著升高,在 9 组药物配比中显示出抑菌能力最强。在此比例下,药物浓度为 8 mg/mL 即显示出对 *S. aureus* 溶血活性的良好抑制作用,4 mg/mL 时仍对生物被膜的形成有抑制效果,均能在亚抑菌浓度下展现对 *S. aureus* 毒力的抑制作用,并且较原方所需药物浓度更低,是目前最佳药物配比。

3 讨论

随着耐药菌株的不断发展,SSTI 患者的抗菌治疗也是临床治疗的棘手问题。针对浅表性的 SSTI 如痈疖、毛囊炎等,直接进行引流,大多治愈后复发频率较高,在治疗后仍需要口服抗生素防止复发;较为严重的 SSTI 则不仅需要引流,还需要配合内服、外用抗生素,防止进一步感染以及并发症的出现,目前较为推荐万古霉素为首选药物,其他还有克林霉素、利奈唑胺、达托霉素、替考拉宁等^[15-17]。抗生素的大量使用,为细菌的耐药性的发展提供了良好的温床,同时也破坏了身体的共生菌群^[17-19]。共生微生物群的存在,可以与病原菌争夺营养物和粘附位点,在这种竞争中,共生细菌能干扰潜在病原体的粘附和发病机制,从而保护宿主^[20-22]。

本研究结果表明,高浓度的回毒银花散对 MRSA 有显著抑制作用,亚抑菌浓度的回毒银花散可以通过抑制毒力因子 Hla 以及生物被膜的形成减弱 MRSA 毒性。根据 MIC、时间-生长曲线数据可知亚抑菌浓度的回毒银花散对 MRSA 菌株生长产生的抑制作用微乎其微,在一定程度上减缓 *S. aureus* 的生存压力,同时溶血与生物被膜形成实验的结果显示,在不抑制细菌生长情况下,回毒银花散依旧能抑制 MRSA 的溶血活性以及生物被膜的生成,达到减毒的目的。Hla 活性被抑制时 *S. aureus* 难以穿过细胞膜进入到宿主细胞体内进行免疫逃避;同时减少细胞死亡,炎症因子水平大量减轻;减少细胞骨架的破坏,使 *S. aureus* 感染停留在表皮层,减少向下渗透。此外,阻碍生物被膜的形成,使药物能向更深层渗透,深层细菌无处可逃,减少清除不彻底导致的疾病复发。

对回毒银花散进行拆解处理后,发现方中甘草的抑菌能力最强,在亚抑菌浓度下虽未表现出对溶血活性的抑制作用,但对生物被膜的形成有抑制作用。金银花和黄芪均对 *S. aureus* 不敏感,但是在亚抑菌浓度下无论是对 *S. aureus* 的溶血活性还是生物被膜的形成都有明显的抑制效果。三药配合使用,金银花和黄芪缓和甘草的抑菌能力,使整方在亚抑菌浓度下依旧通过抑制 *S. aureus* 毒力因子的释放以及破坏毒力因子的活性结构等多种形式减轻 *S. aureus* 侵袭能力。在治疗有效的前提下,达到降低 *S. aureus* 的生存压力的目的,减缓其形成耐药的进程。最后正交实验对全方比例进行调整后发现,甘草在方中的占比越高会显著增加整方对 *S.*

aureus 的敏感性,但单独使用甘草很难在亚抑菌浓度下有所突破。因此适当调整金银花、黄芪、甘草在整方中的比例,扩大甘草用量,将三者比例调整为 1 : 2 : 4,在大幅度降低整方抑菌浓度的基础上,还能保留在亚抑菌浓度下对 *S. aureus* 溶血活性以及生物被膜形成的抑制作用。并且无论是抑菌浓度或是对 *S. aureus* 溶血活性以及阻碍生物被膜形成的 MEC 均为 9 组中最低,是目前较为理想的药物比例。

回毒银花散既可治疗火热毒邪所引起的脑疽,也可治疗正气不足,邪毒内陷所导致的阴疮。方中金银花性味甘寒,有清热解毒,消炎退肿之用,《本草求真》言:“能治恶疮、痈疽,为外科治毒通行要剂”,近代研究也证明金银花的提取物可以治疗脓毒症^[23-24]。黄芪性甘温,托毒排脓,敛疮生肌,目前黄芪为主药的方剂也广泛用于糖尿病足的治疗中,效果甚佳^[25-27]。甘草性甘平,可清热解毒,缓急止痛,现代研究甘草中的有效成分对 *S. aureus* 有很强的抑制作用^[28-29]。三药配合使用,共奏清热解毒,托毒生肌之功,但三药占比不同则功效偏向不同,探寻不同比例在体内达到的最佳治疗效果将是进一步研究重点。

目前 *S. aureus* 引起 SSTI 的治疗方式仍然是引流加抗生素的组合,但抗生素引起的细菌耐药是临床难题。近年来,抗毒力策略又一次被重视,因其一方面可以抑制细菌毒力,使杀伤力大大降低;另一方面药物不直接杀死细菌,缓解细菌的生存压力,减少耐药菌株的产生。本实验在体外测试回毒银花散在亚抑菌浓度下对 MRSA 毒力靶点 Hla 和生物被膜形成的抑制作用,探究方中各药的具体功效以及药物最佳配比,为回毒银花散投入临床使用提供进一步实验支撑。

参考文献:

[1] STRYJEWSKI M E, CHAMBERS H F. Skin and soft-tissue infections caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Clin Infect Dis, 2008, 46 (Suppl 5): S368-S377.

[2] SELB R, ALBERT-BRAUN S, WELTZIEN A, et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from children at hospital admission: experiences from a hospital in a German metropolitan area [J]. Pediatr Infect Dis J, 2022, 41(9): 720-727.

[3] ZHONG J, WEI M, YANG C, et al. Molecular epidemiology of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

and clinical characteristics of different sites of infection [J]. Infect Drug Resist, 2023, 16: 1485-1497.

[4] ESPOSITO S, NOVIELLO S, LEONE S. Epidemiology and microbiology of skin and soft tissue infections [J]. Curr Opin Infect Dis, 2016, 29(2): 109-115.

[5] MILLER L G, PERDREAU-REMINGTON F, RIEG G, et al. Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles [J]. N Engl J Med, 2005, 352(14): 1445-1453.

[6] LIVORSI D J, NAIR R, LUND B C, et al. MRSA prevalence and hospital-level antibiotic use: a retrospective study across 122 acute-care hospitals [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2021, 42(3): 353-355.

[7] PULIA M S, ANDERSON J, YE Z, et al. Expression of staphylococcal virulence genes *in situ* in human skin and soft tissue infections [J]. Antibiotics, 2022, 11(4): 527.

[8] MARETZKY T, REISS K, LUDWIG A, et al. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(26): 9182-9187.

[9] WILKE G A, BUBECK WARDENBURG J. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* α -hemolysin-mediated cellular injury [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(30): 13473-13478.

[10] ESSMANN F, BANTEL H, TOTZKE G, et al. *Staphylococcus aureus* α -toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation [J]. Cell Death Differ, 2003, 10 (11): 1260-1272.

[11] COHEN T S, BOLAND M L, BOLAND B B, et al. *S. aureus* evades macrophage killing through NLRP3-dependent effects on mitochondrial trafficking [J]. Cell Rep, 2018, 22(9): 2431-2441.

[12] SCHILCHER K, HORSWILL A R. Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2020, 84(3): e00026-e00019.

[13] RÖMLING U, BALSALOBRE C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies [J]. J Intern Med, 2012, 272(6): 541-561.

[14] (明)陈实功. 外科正宗 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989.

CHEN S G. Surgical authenticity [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1989.

[15] SARTELLI M, GUIRAO X, HARDCASTLE T C, et al. 2018 WSES/SIS-E consensus conference: recommendations for the management of skin and soft-tissue infections [J]. World J Emerg Surg, 2018, 13: 58.

[16] UHLEMANN A C, DORDEL J, KNOX J R, et al. Molecular tracing of the emergence, diversification, and transmission of *S. aureus* sequence type 8 in a New York community [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(18): 6738-6743.

[17] TACCONELLI E. Antimicrobial use: risk driver of multidrug resistant microorganisms in healthcare settings [J]. Curr Opin

- Infect Dis, 2009, 22(4): 352-358.
- [18] NAKASE K, KOIZUMI J, FUKUMOTO S, et al. Increased prevalence of minocycline-resistant *Staphylococcus epidermidis* with *tet*(M) by tetracycline use for acne treatment [J]. Microb Drug Resist, 2022, 28(8): 861-866.
- [19] FRITZ S A, WYLIE T N, GULA H, et al. Longitudinal dynamics of skin bacterial communities in the context of *Staphylococcus aureus* decolonization [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(2): e0267221.
- [20] CREECH C B, AL-ZUBEIDI D N, FRITZ S A. Prevention of recurrent staphylococcal skin infections [J]. Infect Dis Clin North Am, 2015, 29(3): 429-464.
- [21] CELLA M A, COULSON T, MACEACHERN S, et al. Probiotic disruption of quorum sensing reduces virulence and increases cefoxitin sensitivity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 4373.
- [22] SALGAONKAR N, KADAMKODE V, KUMARAN S, et al. Glycerol fermentation by skin bacteria generates lactic acid and upregulates the expression levels of genes associated with the skin barrier function [J]. Exp Dermatol, 2022, 31(9): 1364-1372.
- [23] (清)黄宫绣. 本草求真 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987. HUANG G X. Materia medica [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1987.
- [24] 李文举, 罗福龙, 王凤忠, 等. 金银花水提取物改善脓毒血症的物质基础研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 79-89. LI W J, LUO F L, WANG F Z, et al. Exploring the mechanism of *Lonicerae japonicae* flos water extract in the treatment of sepsis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(8): 79-89.
- [25] 张臻, 阙华发. 黄芪多糖对糖尿病溃疡大鼠炎症期相关因素的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(5): 616-623. ZHANG Z, QUE H F. Effect of *Astragalus* polysaccharides on the factors related to inflammation stage in diabetic ulcer rats [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2022, 33(5): 616-623.
- [26] 余玲, 董瑞鸿, 宋秋艳, 等. 黄芪桂枝汤治疗糖尿病足疗效及对患者周围神经感觉阈值、微炎症状态的影响 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2019, 33(1): 82-87. YU L, DONG R H, SONG Q Y, et al. The clinical efficacy of *huangqiguizhi* decoction and effect on peripheral nerve sensory threshold value and inflammatory state in patients with diabetic foot [J]. Chin J Dermatovenereol, 2019, 33(1): 82-87.
- [27] 刁元元, 李玉梅, 李晓文, 等. 黄芪抗糖尿病并发症的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 123-128. DIAO Y Y, LI Y M, LI X W, et al. Review of *Astragali radix* for treating diabetic complications [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 123-128.
- [28] XU Z, XU Z, GU J, et al. *In situ* formation of ferrous sulfide in glycyrrhizic acid hydrogels to promote healing of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*-infected diabetic wounds [J]. J Colloid Interface Sci, 2023, 650(Pt B): 1918-1929.
- [29] 张鹰, 熊鑫, 马浩然, 等. 甘草油的 HPLC-MS/MS 法分析及抑菌作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(4): 861-864. ZHANG Y, XIONG X, MA H R, et al. Analysis of *Glycyrrhiza uralensis* fisch oil by HPLC-MS/MS and study on its bacteriostasis [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(4): 861-864.

[收稿日期] 2023-09-04

杨加辉,罗小泉,林萌,等. 抑郁症动物模型的研究现状与趋势分析—基于 CiteSpace 的文献计量分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 72-78.

Yang JH, Luo XQ, Lin M, et al. Research status and trend of depression models in animals: a bibliometric analysis based on CiteSpace [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 72-78.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.009

抑郁症动物模型的研究现状与趋势分析—基于 CiteSpace 的文献计量分析

杨加辉^{1#}, 罗小泉^{1#}, 林萌¹, 罗涛², 龚美富^{3*}

(1.江西中医药大学,南昌 330004;2.南昌大学第一附属医院,南昌 330006;
3.江西中医药大学附属医院,南昌 330006)

【摘要】 目的 借助文献计量学对抑郁症动物模型相关文献进行分析,从而更好地了解该领域的研究现状与热点。**方法** 本文作者从 WoSCC 数据库选取了近十年抑郁症动物模型的相关文献,并使用分析软件 CiteSpace 6.1 R1(64-bit) Basic 对相关的年度出版量、国家、机构、作者等进行分析。**结果** 通过分析本次研究纳入的文献可得知,近十年论文发表量呈现逐步增加并趋于稳定的趋势;美国发表的文章最多(256 篇);Wegener Gregers 是该领域中影响力最高的作者。**结论** 目前,该领域较多侧重于信号通路与治疗方法的研究,以确定抑郁症的发病机制并探求更好的治疗方法。本研究揭示了抑郁症动物模型相关的研究趋势与热点,以期帮助研究人员更好的了解最新情况。

【关键词】 动物模型;抑郁症;文献计量分析

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0072-07

Research status and trend of depression models in animals: a bibliometric analysis based on CiteSpace

YANG Jiahui^{1#}, LUO Xiaoquan^{1#}, LIN Meng¹, LUO Tao², GONG Meifu^{3*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China. 2. the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006. 3. the Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine Hospital, Nanchang 330006)

【Abstract】 Objective Using literature metrology, scientific literature in the field of depression models in animals was analyzed to better understand the development trends and hot topics in this field. **Methods** We obtained publications on depression and animal models from 2013 to 2022 from the Web of Science core set database. CiteSpace 6.1 R1(64-bit) Basic was used to analyze annual publications, countries, institutions, authors, and keywords related to this field. **Results** A total of 1000 articles were included in this study. From 2013 to 2022, the number of articles published increased gradually and then stabilized. In terms of the number of articles, the United States had the most published articles (256). Wegener Gregers was the most influential author in the field with 23 published articles. **Conclusions** The field focuses on

【基金项目】 江西省科技基础条件平台(20212BCD46005);江西省卫生健康委科技项目(202310474);江西省中医药管理局科技计划项目(2022B1069)。

【作者简介】 杨加辉(1999—),男,硕士研究生,研究方向:实验动物学及动物模型研究。E-mail:1549284536@qq.com

罗小泉(1966—),男,教授,硕士生导师,研究方向:实验动物与教学工作。E-mail:lxqdl@126.com

[#]共同第一作者

【通信作者】 龚美富(1979—),女,硕士生导师,研究方向:实验动物模型研究。E-mail:466023562@qq.com

signaling pathways and therapeutic approaches to determine the pathogenesis of depression and better treatments. This study provides a visual analysis of trends in depression research to help researchers keep up with the latest developments.

【Keywords】 animal models; depression; bibliometric analysis

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

抑郁症是一种常见的精神疾病,其主要症状包括情绪低落、失眠、食欲改变、自我否定等^[1]。抑郁症的患病率约为 4.4%,发病年龄多在成年初期,且女性发病率远高于男性^[2]。抑郁症作为最严重的神经系统疾病之一,给社会带来了巨大的经济与医疗负担^[3]。动物模型是基于动物与人类在生物学和生理上的相似性^[4],将人类疾病或生理过程复制到动物身上的一种研究方法,并通过研究探讨疾病的发生、发展、治疗等相关问题^[5]。文献计量学是一种利用计量学方法对文献进行分析的方法^[6],而 CiteSpace 则是基于它的可视化分析工具。它使人们更直观地了解某一学科领域的研究现状和趋势^[7]。抑郁症是一种复杂的精神疾病,给患者和社会带来巨大负担,因此,了解抑郁症的发病机制、病理过程和治疗非常重要,而动物模型是研究抑郁症常用的方法。而文献计量分析可以对研究文献进行定性、定量和可视化分析,从而帮助研究人员在大量复杂的文献中更好地了解抑郁症动物研究的最新进展。

1 实验方法

1.1 数据源和搜索策略

本研究中的所有数据均来自 Wed of Science

(WOS) Core Collection 的在线数据库 Science Citation Index Extension (SCI-E)。我们将收录库中的文章发表时间限制在 2013 年~2022 年,按照 WOS 检索后的相关性排序选取前 1000 篇文章,剔除重复和不完整的数据,并在 2023 年 3 月 26 日完成检索后导出所有数据。英文检索式设定为 TS = (animal model) AND TS = (“depress ion” OR “depressive disorder”) 采用主题词与自由词相结合的方式检索,文章语言限制为英文,出版国家和研究类型不限。具体检索公式及结果如图 1 所示。

1.2 分析工具

本研究应用可视化软件 Citespace 6.1 R1 (Basic) 结合 Excel 提取数据并进行可视化分析。(1)基础统计和描述性分析:如年度发表和趋势、国家、机构、作者、共被引作者、期刊、共被引期刊等;(2)协同网络分析:主要针对国家(地区)、机构和作者 3 个维度进行分析;(3)共被引分析:作者、期刊。文献计量学分析的具体参数设置如下:“每篇文章中被引或出现次数最多的前 10%”为入选标准;时间跨度为 2013 年 1 月~2022 年 2 月,使用 CiteSpace 进行的所有分析的时间切片设置为“每切片 1 年”;使用对数似然比(log-likelihood ratio, LLR)算法提

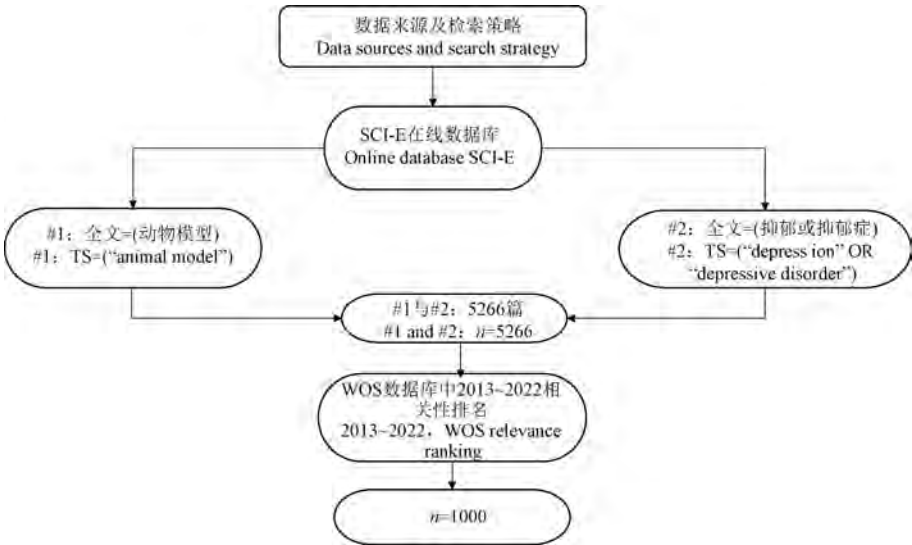


图 1 抑郁症动物模型研究的数据来源和搜索策略

Figure 1 Data sources and search strategies for animal models of depression.

取聚类标签;可视化地图以节点和链接为主;每个节点代表一个因素,如作者、机构、国家,这些节点之间的每一个链接都表明了一种合作或共现关系;这些线条或聚类表现出冷暖色调的不同色彩,可用于分析共现的时间或重要性。

2 结果

2.1 年度刊物及趋势

将检索后筛选出来的文章建立数据库并导入 EXCEL,以此生成一个折线图(图 2)来显示每年发表的文章数量和趋势。从数据来看,近十年来论文发表量总体呈波动上升趋势。2013 年~2016 年发表论文数略有波动。2017 年~2019 年发表论文数量快速增长,分别达到 120 篇和 112 篇。2020 年发表论文数下降至 86 篇,2021 年将再次上升至 121 篇,2022 年回落至 87 篇。

2.2 国家地区分析

将文章数据导入 CiteSpace 软件,并使用它生成所有相关国家/地区的协作网络地图(图 3)。可以看到抑郁症动物模型领域的文章来自 66 个不同的国家和地区,合作线 36 条,密度为 0.0159。分析结果显示频率排名前五名分别是美国(F=256)、中国(F=198)、日本(F=73)、巴西(F=64)和德国(F=62)。度数排名前五的分别是西班牙(D=4)、中国(D=3)、英国(D=3)、摩洛哥(D=3)和法国(D=2)。

2.3 机构分析

根据图 4 可见,抑郁症的动物模型研究领域中有 278 家机构,合作线有 95 条,密度为 0.0025。文章列出了频率和程度排名前十的国家。由此可以看出频率最高的五个机构分别是波兰科学院(F=50)、奥胡斯大学(F=38)、德克萨斯大学系统(F=31)、南非西北大学(F=25)和国立卫生与医学研究所(F=21)。度数最高的五个机构分别是国家科学研究中心(D=5)、乌拉尔联邦大学(D=5)、波兰科学院(D=4)、卡罗林斯卡医学院(D=4)、贝勒医学院(D=4)。

2.4 作者分析

从图 5 可以看出,抑郁症动物模型研究领域共有 361 位不同作者和 61 条合作线,密度为 0.0015。Wegener Gregers(F=23)、Quevedo Joao(F=13)、



图 2 抑郁症动物模型相关研究的年度出版数量及趋势
Figure 2 Annual publication number and trends of studies related to animal models of depression

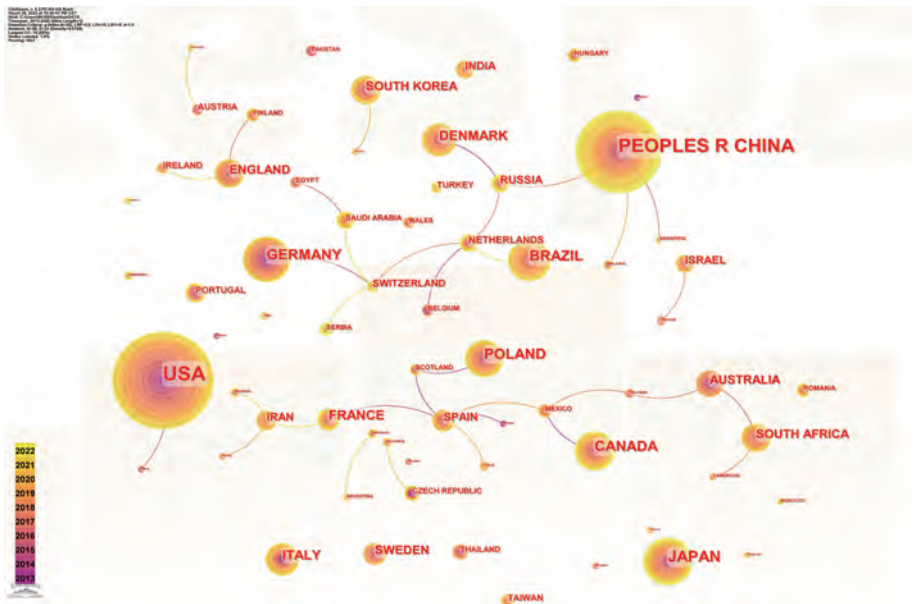


图 3 抑郁症动物模型研究相关的国家/地区合作网络图
Figure 3 Depression animal model research relevant national/regional cooperation network map

Abelaira Helena M (F = 12)、Reus Gislaïne Z (F = 11) 和 Budziszewska Boguslawa (F = 8) 是发表频率最高的五位作者。度数排名前五的作者是 Wegener Gregers (D = 4)、Slusarczyk Joanna (D = 4)、Roche Michelle (D = 4)、Roche Michelle (D = 4) 和 Rastegar Mojgan (D = 4)。

2.5 关键词共现分析

使用 CiteSpace 软件制作关键词共现图(图 6), 可以看出关键词节点有 381 个, 连接线有 841 条。根据频率和程度, 文章列出了频率和度数排名前十

名的关键词, 频率排名前 5 位的词是 animal models (F = 476), major depression (F = 146), brain (F = 141), major depressive disorder (F = 126), stress (F = 119)。度数排名前 5 位的词分别是 antidepressants (D = 18)、disorders (D = 17)、gene (D = 17)、dentate gyrus (D = 16)、neurogenesis (D = 14)。根据聚类图(图 6), 还可以看出, 抑郁症动物模型领域主要集中在“深部脑刺激”“嗅球切除术”“抑郁症动物模型”“炎症”和“白质”。



图 4 抑郁症动物模型研究相关的机构图
Figure 4 Institutional map of animal model studies of depression



图 5 抑郁症动物模型研究相关的作者图谱
Figure 5 Author maps related to animal models of depression

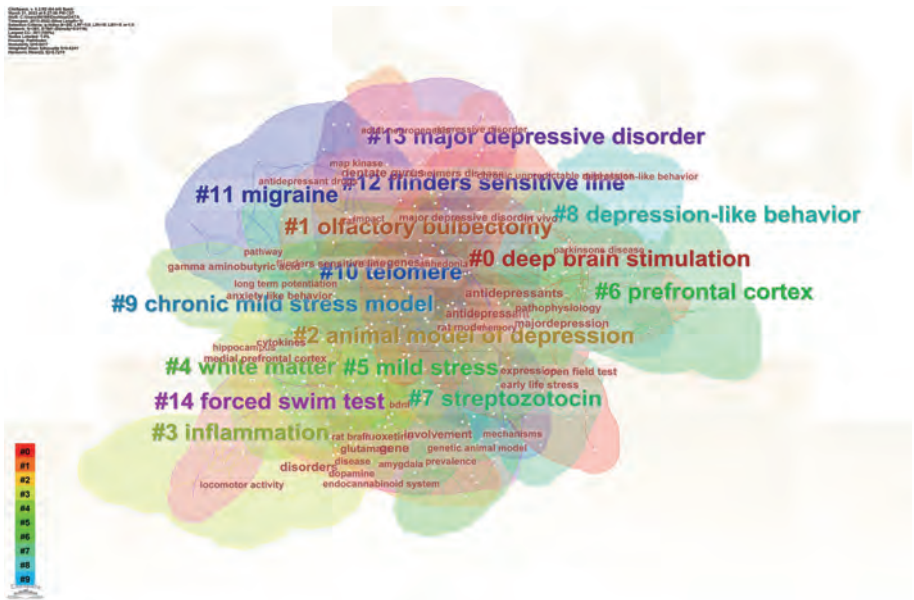


图 6 抑郁症动物模型研究相关的关键词共现图

Figure 6 Co-occurrence map of keywords related to animal models of depression

3 讨论

3.1 一般信息讨论

从抑郁症动物研究领域近 10 年的发表量和趋势可以看出,该领域每年的发表量都在波动和上升,这说明世界对该领域的关注度越来越高。同时,随着该领域研究的深入,未来有望在抑郁症动物模型领域发现更多新的成果与突破。

从研究国家来看,有 66 个不同的国家和地区发表了抑郁症动物模型的文章,其中美国、中国和日本在频数上排名最高,是这个领域贡献最多的 3 个国家。西班牙的出版物数量不多,但在中心程度上排名第一,可见其与其他国家的交流密切,占有重要地位。然而从图中也可以看出,各个国家之间的合作并不密切,应加强国际合作,推动该领域的发展。

从研究机构来看,目前多以综合性大学为主,少部分为科研机构。波兰科学院、奥胡斯大学和德克萨斯大学在这方面的贡献最大。频率和度数排名前五的机构分布在不同的国家/地区,这也说明抑郁症动物模型研究领域的研究热度并不局限于某个国家或地区。排名最高的法国国家科学研究中心 (centre national de la recherche scientifique, CNRS) 和乌拉尔联邦大学有机会与更多机构合作,可能与它们的研究领域广泛,地理位置优越相关。

从作者的角度来看,作者之间合作的线性密度

仅为 0.0015。一般来说,密度越高,合作关系越密切,领域合作越频繁。由此也可以看出,该研究领域作者之间的合作关系比较薄弱,合作关系有待进一步加强。在该领域贡献最大的作者是 Wegener Gregers。他是丹麦奥胡斯大学教授,抑郁症研究领域知名学者。其研究成果在抑郁症领域具有广泛影响,尤其是在动物模型研究方面^[8],他认为钾通道的异常可能是 FSL 大鼠抑郁样行为的基础^[8],益生菌治疗可以减轻 SD 大鼠的抑郁^[9]。

3.2 研究热点与前沿

研究热点是专家在一定时期内通过对某一特定研究领域的大量文献进行讨论而达成的共识。这可以帮助研究者了解某一领域的研究趋势,把握研究方向和前沿,从而更好地规划研究计划,探索未来研究更多的可能性。

在出现频率最高的关键词中,可以看到“重度抑郁症”这个词,这说明重度抑郁症是抑郁症动物模型中常见的研究方向。“压力”出现的频率高,说明压力是导致抑郁症的重要因素。研究表明,压力(尤其是慢性压力),是导致人类抑郁的一个因素,而抑郁与压力反应的改变有关^[10]。“大脑”一词的频繁出现表明抑郁症与大脑的结构和功能异常密切相关。在抑郁症中,大脑区域的默认模式网络 (default mode network, DMN) 经常被发现与抑郁症中过度激活和过度连接^[11]。

从共现词聚类分析,我们可以看到聚类“深部

脑刺激(deep brain stimulation, DBS)”,这是目前抑郁症研究性治疗的主要方法^[12]。簇状“嗅球切除术”^[13]是一种被广泛应用于抑郁症研究领域的动物模型,因为抑郁症患者的嗅觉功能往往受到影响。“炎症”与大量抑郁症患者有关,并且可能是其发病机制的潜在机制,研究表明 1/4 的抑郁症患者表现出低浓度炎症^[14]。

根据标题包含的关键词聚类分析(图 7)可以看出,抑郁症动物模型研究领域的热点主要分布在“神经化学证据”“电休克”“运动功能”“小胶质细胞作用”和“奖赏导向行为”。这表明该领域的研究热点更多地集中在其发病机制和治疗方法上。神

经化学证据相关研究通常涉及抑郁症的病理生理学研究,重点关注神经递质的变化、神经激素和脑区代谢活动,如胺能、 γ -氨基丁酸能等^[15]。电休克疗法(electroconvulsive therapy, ECT)^[16]是治疗重度抑郁症的一种方法,其基本原理是通过电刺激刺激大脑中的神经递质和神经回路,从而减轻或消除抑郁症的症状。研究表明,ECT 对具有精神病特征的抑郁症患者和患有抑郁症的老年人尤其有效^[17]。运动功能主要关注抑郁症患者的运动能力及其与抑郁症状的关系。动机和运动缺陷在抑郁症和其他精神疾病患者中很常见,这可能与中脑边缘和中纹状体多巴胺(dopamine, DA)有关^[18]。

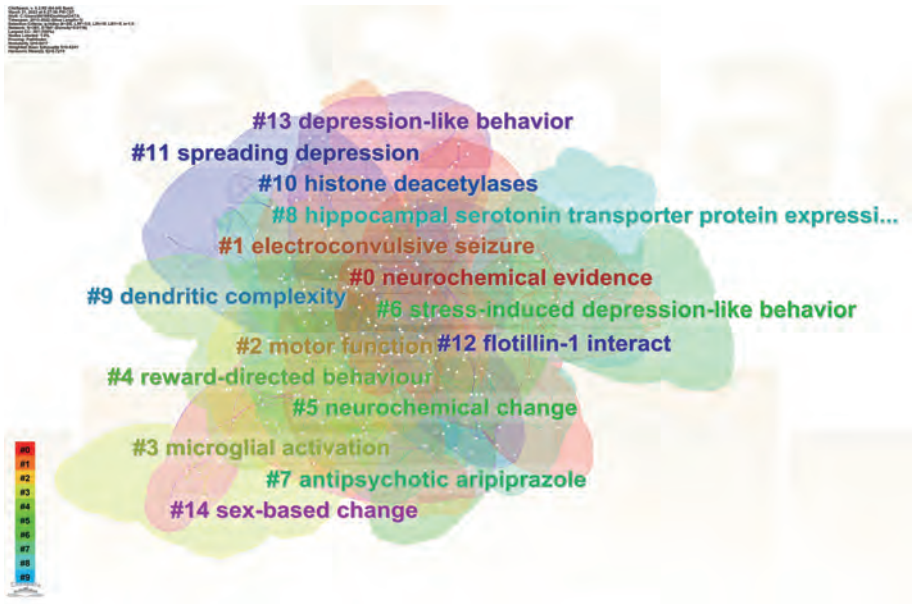


图 7 抑郁症动物模型标题关键词聚类分析图

Figure 7 Keyword cluster analysis of animal model of depression

突变词是一定时间内某些关键性词语引用次数的突然增加,可以用来反映一定时间内的研究趋势。研究者运用 CiteSpace 软件以查找引用次数最多的关键字(图 8)。抑郁症动物模型是研究抑郁症发病机制和治疗的重要手段。2013 年~2014 年期间,研究者主要采用悬尾试验(Strength = 4.19)评价抑郁症小鼠模型的信度和效度,同时探索皮质酮(Strength = 3.29)对抑郁症发作的影响。2013 年~2016 年,社交失败(Strength = 3.47)作为一种新型抑郁模型逐渐受到关注,强迫游泳试验(Strength = 4.55)和嗅球切除术(Strength = 4.42)也成为研究热点。2014 年~2016 年,下丘脑-肾上腺轴(Strength = 3.45)的作用逐渐成为研究重点之一,而 2016 年~2017 年,大鼠(Strength = 3.5)成为主要研究对象。

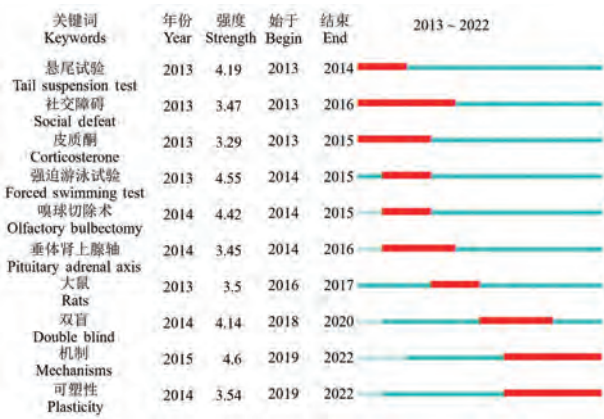


图 8 抑郁症动物模型研究中排名前 10 的突变词

Figure 8 Top 10 strongest citation bursts word in studies of animal models of depression

2018 年~2020 年,双盲试(Strength=4.14)开始广泛应用于抑郁症药物研究,2019~2022 年,研究者将更加关注揭示抑郁症的机制(Strength=4.6)和可塑性(Strength=3.54),以期为抑郁症的诊治提供更多的科学依据。总的来说,这些研究课题是抑郁症动物模型研究领域的重要热点,对探索抑郁症的发病机制和治疗方法具有重要意义。

4 结论

本文利用 CiteSpace 软件对 WOS 数据库中收集的 1000 个抑郁症动物模型研究的相关基础信息进行分析,展现动物模型在抑郁症领域的重要研究动向和研究热点。通过分析图谱可得知,虽然美国、中国及日本作为 3 个科研大国在该领域中做出了重大贡献,但是抑郁症动物模型的研究普遍存在于机构和团体内部,国际合作并不密切,缺乏大规模的深入合作。此外,抑郁症动物模型的相关研究主要集中在探索不同的信号通路及相关发病机制上,但这也揭示了动物实验的一个弊端,即每次只能针对单一通路进行研究而很难做到同时在单一模型上进行多通路或多种机制的全面研究,未来仍需要对动物造模方法展开进一步的相关探索。本研究旨在通过对抑郁症动物模型相关文献的可视化分析,帮助研究者更准确、更具体地了解该领域,并及时追踪其研究动向。

同时本研究也存在一些不足,首先,我们只分析了来自 WOS 数据库的文章,因为 CiteSpace 软件目前无法同时分析来自多个数据库的内容。此外,所有分析的文章都没有列出详细信息,因为该软件主要是通过提取文献信息来判断研究趋势和热点,并不能对具体的内容进行研究。

参考文献:

[1] JORM A F. Using the Delphi expert consensus method in mental health research [J]. Aust N Z J Psychiatry, 2015, 49(10): 887-897.

[2] KESSLER R C, BROMET E J. The epidemiology of depression across cultures [J]. Annu Rev Public Health, 2013, 34: 119-138.

[3] ALONSO J, VILAGUT G, CHATTERJI S, et al. Including information about co-morbidity in estimates of disease burden: results from the World Health Organization World Mental Health Surveys [J]. Psychol Med, 2011, 41(4): 873-886.

[4] CAMPOS A C, FOGAÇA M V, AGUIAR D C, et al. Animal models of anxiety disorders and stress [J]. Braz J Psychiatry,

2013, 35 Suppl 2: S101-S111.

[5] MCGRATH J C, DRUMMOND G B, MCLACHLAN E M, et al. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines [J]. Br J Pharmacol, 2010, 160(7): 1573-1576.

[6] ELLEGAARD O, WALLIN J A. The bibliometric analysis of scholarly production: how great is the impact? [J]. Scientometrics, 2015, 105(3): 1809-1831.

[7] CHEN C, SONG M. Visualizing a field of research: a methodology of systematic scientometric reviews [J]. PLoS One, 2019, 14(10): e0223994.

[8] BONEFELD B, ELFVING B, WEGENER G. Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue [J]. Synapse, 2008, 62(4): 302-309.

[9] ABILDGAARD A, ELFVING B, HOKLAND M, et al. Probiotic treatment reduces depressive-like behaviour in rats independently of diet [J]. Psychoneuroendocrinology, 2017, 79: 40-48.

[10] COMMONS K G, CHOLANIAN A B, BABB J A, et al. The rodent forced swim test measures stress-coping strategy, not depression-like behavior [J]. ACS Chem Neurosci, 2017, 8(5): 955-960.

[11] WHITFIELD-GABRIELI S, FORD J. Default mode network activity and connectivity in psychopathology [J]. Annu Rev Clin Psychol, 2012, 8: 49-76.

[12] SCHLAEPFER T E, BEWERNICK B H, KAYSER S, et al. Rapid effects of deep brain stimulation for treatment-resistant major depression [J]. Biol Psychiatry, 2013, 73(12): 1204-1212.

[13] CZÉH B, FUCHS E, WIBORG O, et al. Animal models of major depression and their clinical implications [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2016, 64: 293-310.

[14] OSIMO E F, BAXTER L J, LEWIS G, et al. Prevalence of low-grade inflammation in depression: a systematic review and meta-analysis of CRP levels [J]. Psychol Med, 2019, 49(12): 1958-1970.

[15] LENER M S, NICIU M J, BALLARD E D, et al. Glutamate and γ -aminobutyric acid systems in the pathophysiology of major depression and antidepressant response to ketamine [J]. Biol Psychiatry, 2017, 81(10): 886-897.

[16] KELLNER C H, KNAPP R G, PETRIDES G, et al. Continuation electroconvulsive therapy vs pharmacotherapy for relapse prevention in major depression: a multisite study from the Consortium for Research in Electroconvulsive Therapy (CORE) [J]. Arch Gen Psychiatry, 2006, 63(12): 1337-1344.

[17] VAN DIEMEN L, VAN DEN AMEELE S, KAMPERMAN A M, et al. Prediction of electroconvulsive therapy response and remission in major depression: meta-analysis [J]. Br J Psychiatry, 2018, 212(2): 71-80.

[18] FELGER J C, TREADWAY M T. Inflammation effects on motivation and motor activity: role of dopamine [J]. Neuropsychopharmacology, 2017, 42(1): 216-241.

马秋婷,徐磊,朱钰晨,等.江香薷炮制前后多糖含量及消炎、止血和抗氧化活性的影响[J].中国比较医学杂志,2024,34(2):79-88.

Ma QT, Xu L, Zhu YC, et al. Effects of polysaccharide content and anti-inflammatory, hemostatic, and antioxidant activities before and after preparation of Mosla chinensis-Jiangxiangru [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 79-88.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.010

江香薷炮制前后多糖含量及消炎、止血和抗氧化活性的影响

马秋婷,徐磊,朱钰晨,徐梦婷,张文凯,刘志勇*

(江西中医药大学,南昌 330004)

【摘要】目的 探究生姜汁炮制前后江香薷多糖含量变化,以及对炮制前后多糖消炎止血抗氧化活性评价。**方法** 利用苯酚-硫酸法测定炮制前后江香薷多糖(JXRP)和姜制江香薷多糖(JZJXRP)的含量;体内通过构建大鼠足肿胀模型和体外内毒素(LPS)诱导小鼠巨噬细胞RAW264.7炎症模型,采用细胞增殖法(MTT)选取最佳给药浓度,酶联免疫吸附试验(ELISA)测定细胞上清液中白介素-6(IL-6)、白介素-12(IL-12)、一氧化氮(NO)、白介素-4(IL-4)和白介素-10(IL-10)的表达来评价炮制前后多糖的抗炎作用;通过剪尾法观察小鼠的出血时间来评价其止血效果;最后,利用清除1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH)和2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS)的能力来评价其体外抗氧化活性能力。**结果** 生姜汁炮制前后江香薷多糖的含量分别为13%、22%;大鼠足肿胀结果显示,在注射角叉菜胶4h后,与模型组相比,江香薷多糖在给药剂量为200 mg/kg出现显著性差异($P<0.05$),而姜制江香薷多糖在给药剂量为100 mg/kg时就可明显减轻大鼠足肿胀($P<0.05$);体外抗炎结果显示,炮制前后的多糖均能显著抑制细胞分泌IL-6、IL-12和NO($P<0.01$),促进细胞分泌IL-4和IL-10($P<0.01$),且炮制后作用更强。小鼠断尾止血实验结果表明,与正常组相比,江香薷多糖组可以加快止血效果但无显著性差异,而姜制江香薷多糖在中剂量时有显著性差异($P<0.05$),而高剂量有加快趋势但并无显著性差异;体外抗氧化活性结果显示炮制前后的江香薷多糖对DPPH和ABTS皆有不同程度的清除能力,其中江香薷多糖的 IC_{50} 值分别为0.2215 mg/mL和0.2110 mg/mL,姜制江香薷多糖的 IC_{50} 值分别为0.1651 mg/mL和0.1884 mg/mL。**结论** 江香薷经生姜汁炮制后可促进多糖的溶出,增加多糖含量;炮制后江香薷多糖消炎止血及抗氧化能力均比江香薷多糖强,可为江香薷多糖后续研究及临床应用奠定基础。

【关键词】 江香薷;炮制;多糖;消炎止血;抗氧化活性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)02-0079-10

Effects of polysaccharide content and anti-inflammatory, hemostatic, and antioxidant activities before and after preparation of Mosla chinensis-Jiangxiangru

MA Qiuting, XU Lei, ZHU Yuchen, XU Mengting, ZHANG Wenkai, LIU Zhiyong*

(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

【Abstract】Objective Explore changes in polysaccharides in Jiangxiangru before and after ginger juice preparation, and evaluate polysaccharide anti-inflammatory and antioxidant activities before and after processing. **Methods** The contents of Jiangxiangru polysaccharide (JXRP) and Ginger juice processed of Jiangxiangru polysaccharide

【基金项目】 江西中医药大学校级科技创新团队发展计划(CXTD-22004);江西中医药大学省级创新创业训练计划(S202310412055)。

【作者简介】 马秋婷(1997—),女,硕士研究生,研究方向:中药药理与毒理。E-mail:928372868@qq.com

【通信作者】 刘志勇(1969—),男,博士,硕士生导师,教授,研究员,研究方向:中药药理与毒理。E-mail:liuzhiyong0791@163.com

(JZJXRPs) before and after processing were determined by phenol-sulfuric acid method. We used the swelling model in rats and endotoxin (LPS) to establish the RAW264.7 mouse macrophage inflammation model. The optimal administration concentration was determined using a cell proliferation (MTT) assay. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to measure Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-12 (IL-12), Nitric oxide (NO), Interleukin-4 (IL-4), and Interleukin-10 (IL-10). Bleeding time of mice by tail cutting was observed to evaluate the hemostatic effect. The ability to remove 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical (DPPH) and 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS) was used to evaluate *in vitro* antioxidant activity. **Results** The contents of JXRPs and JZJXRPs were 13% and 22%, respectively. In swollen rats at 4 h after injection, compared with the model group, 200 mg/kg JXRPs and 100 mg/kg JZJXRPs significantly reduced rat swelling ($P < 0.05$). *In vitro* anti-inflammation assessment showed that the polysaccharides before and after processing significantly inhibited secretion of IL-6, IL-12, and NO ($P < 0.01$) and promoted secretion of IL-4 and IL-10 ($P < 0.01$), and also that processing post-effects were stronger. The hemostatic experiment show that, compared with the control group, JXRPs increased hemostasis, but without a significant difference, and no significant difference was found using JZJXRPs, although high doses showed a trend to increase hemostasis. *In vitro* antioxidant activity showed that JXRPs and JZJXRPs had different scavenging abilities for DPPH and ABTS with IC_{50} values of JXRPs of 0.2215 and 0.2110 mg/ml, respectively, and IC_{50} values of JZJXRPs of 0.1651 and 0.1884 mg/mL, respectively. **Conclusions** After Jiangxiangru is produced in ginger juice, it promotes dissolution of polysaccharides and increases polysaccharide content. Anti-inflammatory, hemostasis, and antioxidant capacities are stronger in JZJXRPS than JXRPS, which lays the foundation for follow-up research and clinical applications of JXRPS.

【Keywords】 Mosla chinensis-Jiangxiangru; processing; polysaccharide; anti-inflammatory and hemostatic; antioxidant activity

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

中药多糖是由 10 个以上单糖通过糖苷键连接成的天然高分子聚合物,广泛存在于中药材中。研究发现中药多糖具有显著的抗肿瘤^[1]、抗病毒、抗氧化^[2]、调节免疫^[3]等多种药理作用,因具有良好的生物活性和低毒副作用,在临床中有着十分广阔的应用^[4-5]。多糖免疫调节作用是目研究最活跃的,主要分为免疫增强或免疫刺激等,而抗肿瘤也是多糖活性的另一个主要方面,二者紧密相关,免疫功能的提高是机体抗肿瘤能力主要机制之一,如香菇多糖、虫草多糖、刺五加多糖、灵芝多糖等均表现出不同程度的免疫调节、抗肿瘤等生物活性。

江香薷 (Mosla chinensis-Jiangxiangru) 是江西省“赣十味”中药材之一,江西道地药材,主产于江西省新余市等地,具有发汗解表,化湿和中,利水消肿之功,临床多用来治疗暑湿感冒、恶寒发热、头痛腹痛、小便不利等疾病^[6]。同时作为药食两用的中药材^[7],还具有消暑湿、健脾胃、增食欲等功用^[8]。近年来研究发现,江香薷含有多种营养物质与活性成分,如挥发油^[9]、黄酮^[10]、多糖^[11]和矿质元素^[12]等。其中,多糖类化合物作为江香薷的主要有效成分之一,现有关研究大部分集中在多糖提取分离及结构表征等方面,而有关药理活性研究鲜有报道。

现代研究关于江香薷的炮制主要以产地、加工

一体化与净制、切制等传统炮制工艺为主,而加辅料炮制的相关研究较少^[13]。明代李梴在《医学入门》一书中首次提出江香需用辅料炮制—“去梗姜汁炒”^[14],研究发现,生姜汁炮制江香薷后挥发油含量及挥发性成分的数目均高于生品^[15]。课题组前期研究也发现江香薷经姜汁炮制后多糖得率和含量均高于生品,因此,文章以江香薷炮制前后的多糖为研究对象,探讨炮制前后多糖的消炎止血效果及抗氧化能力,旨在探究江香薷多糖的基础药理活性,为后续江香薷多糖炮制和进一步开发研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

雄性 SPF 级 KM 小鼠 80 只,体重 18~22 g。雄性 SPF 级 SD 大鼠 72 只,体重 200~220 g,由江西中医药大学实验动物科技中心提供[SCXK(赣)2023-0001],饲养在江西中医药大学实验动物科技中心 SPF 级屏障系统内[SYXK(赣)2022-0002],本项目全程注意实验动物福利伦理,遵循 3R 原则,项目得到江西中医药大学实验动物伦理委员会的批准(JZLLSC20230665)。

1.1.2 细胞

RAW264.7 (小鼠巨噬细胞白血病细胞, RAW264.7)购自上海富衡生物科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

江香薷饮片(购自江西江中中药饮片有限公司),生姜(购自江西九山生姜),由江西中医药大学附属医院药剂科陈浩副主任医师鉴定为江香薷和生姜;江香薷多糖(Jiangxiangru polysaccharide, JXRPs)和姜制江香薷多糖(Ginger juice processed of Jiangxiangru polysaccharide, JZJXRPs)由实验室自提。95%乙醇(西陇化工股份有限公司);氯仿、硫酸(成都市科隆化学制品有限公司);正丁醇(C13080161,上海麦克林生化科技有限公司);无水葡萄糖(SG8510,北京索莱宝科技有限公司);1,1-二苯基-2-苦基肼(MB3206,上海源叶生物科技有限公司);2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(A800764,上海麦克林生化科技有限公司);抗坏血酸(A8100,北京索莱宝科技有限公司);角叉菜胶(CHB180929,北京索莱宝科技有限公司);苯酚(20210902,国药集团化学试剂有限公司);以上试剂纯度均为AR。胎牛血清(200236,上海聚顶生物科技有限公司);DMEM 高糖培养基(12100,北京索莱宝科技有限公司);内毒素(L8880,北京索莱宝科技有限公司);NO 检测试剂盒(S0021S,上海碧云天生物技术股份有限公司)。离心机(Cence 湘仪);旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);冷冻干燥机(美国 LABCONCO 公司);多功能酶标仪(Thermo 公司);足趾容积测量仪(安徽正华生物仪器设备有限公司);紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 江香薷多糖的提取

称取江香薷饮片,先超声辅助提取,超声时间 10 min,超声功率 80 w,料液比 1:20 提取多糖,再热水浸提,浸提温度 90 ℃,浸提 1 h,抽滤得滤液,减压浓缩至体积 1/4,以 Sevag 试剂(氯仿:正丁醇=4:1)除蛋白 3 次,除蛋白后的粗多糖溶液放置 4 ℃ 冰箱,95%醇沉过夜,沉淀物以 4800 r/min,10 min 离心,得多糖沉淀,冷冻干燥,即得江香薷粗多糖。

1.3.2 姜制江香薷多糖的提取

根据张依欣^[15]的方法进行生姜汁的制备以及生姜汁炮制江香薷,将炮制好的江香薷采用超声波辅助提取多糖,以超声时间 10 min、超声功率 80 w、料液比 1:20 提取多糖,同江香薷多糖的提取,并计算粗多糖得率。见图 1。

1.3.3 总糖含量的测定

(1) 葡萄糖标准曲线的绘制

精密称定无水葡萄糖 0.002 g,制备浓度 0.2 mg/mL 的葡萄糖标准溶液。分别精密吸取 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.9 mL 葡萄糖标准溶液于 20 mL 具塞试管中,体积不足 1 mL 加水补足至 1 mL,再加入 2 mL 的 5% 苯酚溶液,再分别加入向每个试管中迅速加入 7 mL 的浓硫酸,缓慢摇匀,置于 100 ℃ 水浴加热 15 min,取出后放入冷水中冷却至室温,于 490 nm 波长处测定吸光度。

(2) 江香薷多糖和姜制江香薷多糖中总糖含量的测定

配制质量浓度为 1 mg/mL 的多糖样品,吸取 0.5 mL 至 20 mL 具塞试管中,加水补足至 1 mL,按 2.2.1 中苯酚-硫酸法操作,测定样品在 490 nm 处

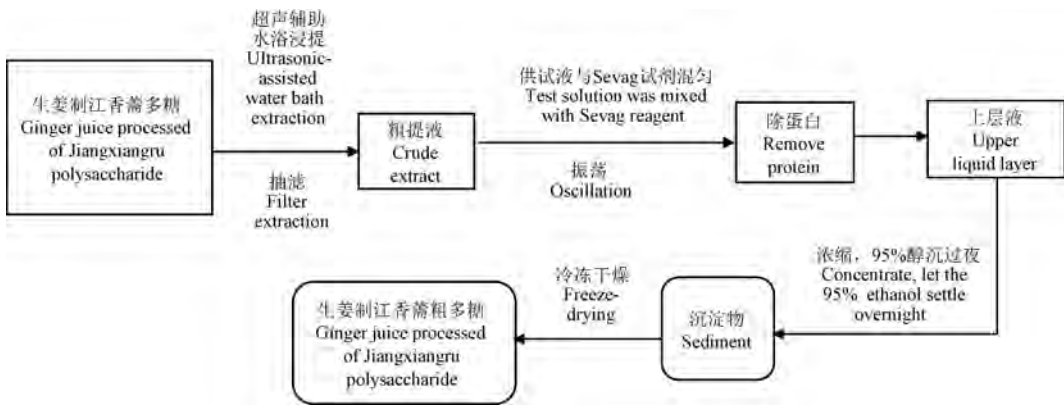


图 1 多糖的提取流程

Figure 1 Extraction process of polysaccharides

的吸光度值,将测定的吸光度值带入标准曲线,计算多糖样品中的多糖的浓度,按照下列公式计算。

多糖含量%=(C * N * Vt)/M 公式(1)

其中 C 为样品溶液中多糖的质量浓度/(mg/mL);N 为稀释倍数;Vt 为提取液总体积/mL;M 为样品称取的质量/mg。

1.3.4 体内外抗炎效果研究

(1)大鼠足肿胀实验分组、给药及测定

将大鼠分为 9 组,每组 8 只,分别分为正常组、模型组、阳性组(阿司匹林组)、给药组(江香薷多糖、姜制江香薷多糖低、中、高剂量组)。正常组和模型组灌胃同体积的生理盐水;阳性组给药剂量为 50 mg/kg;给药组的低、中、高剂量分别为 50、100、200 mg/kg,每天灌胃 1 次,给药 6 d。给药结束后,测量足趾容积,分别在注射角叉菜胶 0、1、2、4 h 测量足趾容积。具体操作步骤参考课题组前期草珊瑚多糖大鼠足肿胀测定方法^[16]。

(2)RAW264.7 细胞培养及传代

RAW264.7 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 中培养,37℃、5% CO₂ 空气环境中生长,待细胞密度长到至 90% 时进行传代,用 PBS 洗 3 遍,加入细胞培养基轻柔地吹下细胞,收集细胞至 15 mL 离心管,1000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,加入新鲜培养基重悬细胞,1:3 进行传代。

(3)江香薷多糖和姜制江香薷多糖对 RAW264.7 细胞毒性的影响

用含 10% 胎牛血清的高糖培养基培养 RAW264.7 细胞,当细胞生长至对数期时,调整细胞浓度为 1×10⁵/mL,接种于 96 孔板中,每孔 200 μL,于 37℃、5% CO₂ 浓度的培养箱中培养 24 h 后,更换含有不同浓度的江香薷多糖和姜制江香薷多糖的培养基,使最终浓度为 2、5、10、20、40、60、80、100 μg/mL,在每个浓度下设置 6 个复孔,作为药物组;同时用不含药物 1% 的培养基饥饿培养基培养,作为正常组;不含细胞的饥饿培养基培养,作为空白组。培养 24 h 后,弃去培养液,每孔加入含 10% MTT 的培养基,继续培育 4 h 后,终止培养,小心吸去孔内培养基,每孔加入 150 μL 的二甲基亚砷(DMSO),置摇床上轻微振摇 10 min,在酶标仪上检测各孔在 490 nm 处的吸光度。

(4)MTT 法检测内毒素诱导 RAW264.7 细胞对细胞毒性的作用

按 1.3.4 的方法(3)接种细胞,每孔 200 μL,于

37℃、CO₂ 浓度为 5% 的培养箱中培养 24 h 后,更换含有不同浓度的内毒素(LPS)培养基,使最终浓度为 0、0.06、0.2、0.5、1、2 μg/mL,在每个浓度下设置 6 个复孔,作为给药组;同时把不含药物的培养基设置成正常组;不含细胞的培养基作为空白组。培育 24 h 后,在显微镜下观察细胞形态,再通过 MTT 法检测内毒素对 RAW264.7 细胞的毒性作用。

(5)LPS 对 RAW264.7 细胞 NO 含量的影响

按 1.3.4 方法(4)浓度给药培育 24 h 后,收集细胞上清液,按 NO 试剂盒操作测定 NO 含量。稀释标准品,分别稀释成浓度为 0、1、2、5、10、20、40、60、100 μmol,制作标准曲线。每孔分别加入 50 μL 样品,然后分别加入 Griess1 和 Griess2 试剂,在酶标仪上检测 450 nm 处的吸光度并计算 NO 含量。

(6)多糖对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症因子的检测

按 1.3.4 方法(3)接种细胞,培育 24 h 后,分别给药不同浓度的多糖溶液(2、5、10 μg/mL),给药 1 h 后,除正常组外,再分别给药 1 μg/mL 的 LPS。同时设置 LPS 组和正常组,每组设 3 个复孔。培育 24 h 后,收集细胞上清液,按 ELISA 试剂盒检测。

1.3.5 止血实验检测止血能力

(1)分组及给药

将小鼠随机分为 8 组,每组 10 只,分别为正常组,阳性组(云南白药组,50 mg/kg),江香薷多糖低、中、高剂量组(35、70、140 mg/kg),姜制江香薷多糖低、中、高剂量组(35、70、140 mg/kg)。正常组灌胃同等体积的生理盐水,给药组分别灌胃不同浓度的多糖溶液,每天灌胃 1 次,连续 6 d。

(2)小鼠出血时间的测定

末次给药 30 min 后,测定出血时间。用小鼠固定器固定小鼠,距小鼠尾尖 0.3 cm 处剪断,待出血时立即用秒表计时,每隔 15 s 用滤纸吸去血滴,至不出血为止,即是出血时间。

1.3.6 抗氧化能力的检测

(1)DPPH 清除能力

将江香薷多糖和姜制江香薷多糖分别制成浓度为 1 mg/mL 的多糖溶液,然后配成不同质量浓度为 0.08、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mg/mL 的待测多糖品溶液。参考前期草珊瑚多糖抗氧化的研究方法进行测定^[16]。于 517 nm 处测定吸光度,平行测定 3 次,按照下列公式计算 DPPH 自由基清除率。

清除率(%)=(1- $\frac{\text{样品组}-\text{空白组}}{\text{对照组}}$)×100%

公式(2)

其中样品组:100 μL 样品液+100 μL DPPH 混合液;空白组:100 μL 样品液+100 μL 蒸馏水;对照组:100 μL 蒸馏水+100 μL DPPH 混合液。

(2) ABTS 清除能力

按 1.3.6 的方法(1)进行不同浓度江香薷多糖和姜制江香薷多糖的制备,参考前期草珊瑚多糖抗氧化研究方法进行测定^[16],于 734 nm 处测定吸光度,平行测定 3 次,按照下列公式计算 ABTS 清除率。

$$\text{清除率}(\%) = (1 - \frac{\text{样品组} - \text{空白组}}{\text{对照组}}) \times 100\%$$

公式(3)

其中样品组:50 μL 样品液+150 μL ABTS 混合液;空白组:50 μL 样品液+150 μL 蒸馏水;对照组:50 μL 蒸馏水+150 μL ABTS 混合液。

1.4 统计学方法

试验数据用 SPSS 26.0 统计软件进行统计分析,各项指标采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。本实验所用图谱均采用 GraphPad Prism9.5 软件作图。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 多糖的含量测定

以葡萄糖浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。标准曲线为 $y = 7.5456x - 0.0107$ ($R^2 = 0.9992$),试验结果表明在质量浓度为 0~0.18 mg/mL 范围内对照品线性关系良好。根据 1.3.3 的方法(2)计算得出江香薷多糖的含量为 13%,姜制江

香薷多糖的含量为 22%。姜汁炮制前后江香薷多糖提取率分别为 8.57%、9.77%。

2.2 大鼠足肿胀结果

大鼠注射角叉菜胶后,分别在 0、1、2、4 h 后测量足趾容积。其中在 0、1 和 2 h 时,给药组的大鼠足趾容积均有不同程度的增高,但在 4 h 时,与模型组相比,阳性组有显著性差异($P < 0.01$);江香薷多糖在高剂量时有显著性差异($P < 0.05$),而姜制江香薷多糖在中剂量时就有显著性差异($P < 0.05$),与江香薷多糖相比,炮制后多糖的足肿胀度虽无显著性差异,但在相同剂量下,姜制江香薷降低大鼠足肿胀度效果更好。结果见表 1。

2.3 细胞实验结果

2.3.1 江香薷多糖和姜制江香薷多糖对 RAW264.7 细胞活性的影响

如图 2 所示,用不同浓度的江香薷多糖和姜制江香薷多糖干预 RAW264.7 细胞,筛选干预浓度,MTT 法检测不同浓度江香薷多糖和姜制江香薷多糖对细胞增殖率的影响。结果发现,与正常组相比,当两个多糖均在 10 μg/mL 浓度以下时,对细胞不存在毒性作用,进一步提高多糖的浓度后,显著抑制细胞增殖($P < 0.05$)。

2.3.2 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症模型

(1) 细胞形态观察

如图 3 所示,在光学显微镜 20 倍镜下观察不同浓度的 LPS 刺激 RAW264.7 细胞形态。正常组的细胞形态呈椭圆形,圆润透亮,无触角。当用不同形态的 LPS 刺激后,细胞形态发生不同程度的变化,当 LPS 浓度达到 1 μg/mL 时,细胞形态有一部

表 1 各组大鼠致炎后不同时间足肿胀度的测量结果($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Measurement results of foot swelling at different times after inflammation in each group

组别 Groups	剂量/(mg/kg) Dosage	足肿胀 Foot swelling			
		0 h	1 h	2 h	4 h
正常组 Control group	/	-0.02±0.02	-0.01±0.02	-0.03±0.05	-0.03±0.04**
模型组 Model group	/	0.37±0.13	0.42±0.15	0.41±0.21	0.40±0.23
阳性组 Positive group	50	0.36±0.06	0.30±0.04	0.28±0.06	0.20±0.09**
	50	0.25±0.08	0.29±0.11	0.35±0.11	0.33±0.10
江香薷多糖组 JXRPs group	100	0.25±0.07	0.34±0.08	0.36±0.08	0.31±0.06
	200	0.19±0.04	0.27±0.14	0.28±0.11	0.24±0.10*
	50	0.25±0.10	0.32±0.08	0.34±0.05	0.31±0.06
姜制江香薷多糖组 JZXRPs group	100	0.24±0.05	0.32±0.04	0.32±0.05	0.25±0.07*
	200	0.20±0.04	0.26±0.11*	0.26±0.12	0.22±0.08*

注:与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

分呈长条形并有触角,当为 2 $\mu\text{g/mL}$ 时,大部分都已分化呈梭形并有触角,只有一小部分细胞形态为椭圆形。结果表明,0 ~ 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 对 RAW264. 7 细胞的形态及生长情况无明显影响。

(2) LPS 对 RAW264. 7 细胞活性作用

如图 4 所示,用不同浓度 LPS 处理细胞后,利用 MTT 法检测 LPS 对 RAW264. 7 细胞的细胞活性,与正常组相比,当浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 时有显著性差异 ($P<0.05$),对细胞的活性有影响。结果表明,LPS 的浓度为 0 ~ 1 $\mu\text{g/mL}$ 时,对细胞活性无影响,可为 LPS 浓度的选择提供参考。

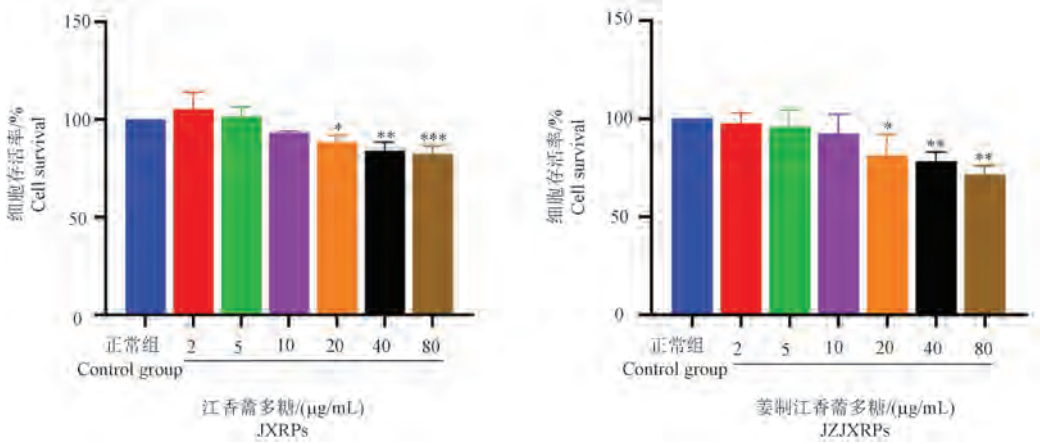
(3) LPS 对 RAW264. 7 细胞 NO 释放量的影响

NO 是 LPS 诱导细胞炎症反应过程中重要的炎症介质,随着炎症反应的增强,细胞产生的 NO 量不

断增加。如图 5 所示,利用 NO 试剂盒检测不同浓度的 LPS 诱导 RAW264. 7 巨噬细胞后对 NO 释放量的影响,随着 LPS 浓度的增加,NO 的含量与 LPS 的浓度呈正相关,与正常组相比,0.06 ~ 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 都具有显著性差异 ($P<0.01$)。这表明 LPS 在 0.06 ~ 2 $\mu\text{g/mL}$ 时就能诱导炎症。结合光学显微镜观察和细胞活性实验,LPS 的浓度选择为 1 $\mu\text{g/mL}$,可用于后续 的细胞炎症造模。

2. 3. 3 多糖对 LPS 诱导 RAW264. 7 细胞促炎因子 IL-6、IL-12、NO 和抑炎因子 IL-4、IL-10 表达的影响

巨噬细胞经 LPS 刺激后,可产生多种炎症介质,包括促炎细胞因子、前列腺素、NO 等。如表 2、表 3 所示,与正常组相比,模型组 NO、IL-6 与 IL-12 含量显著升高,IL-4 和 IL-10 含量显著降低 ($P<0.05$,



注:与正常组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。
图 2 多糖对 RAW264. 7 细胞活力的影响
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 2 Effect of polysaccharides on RAW264. 7 cell viability

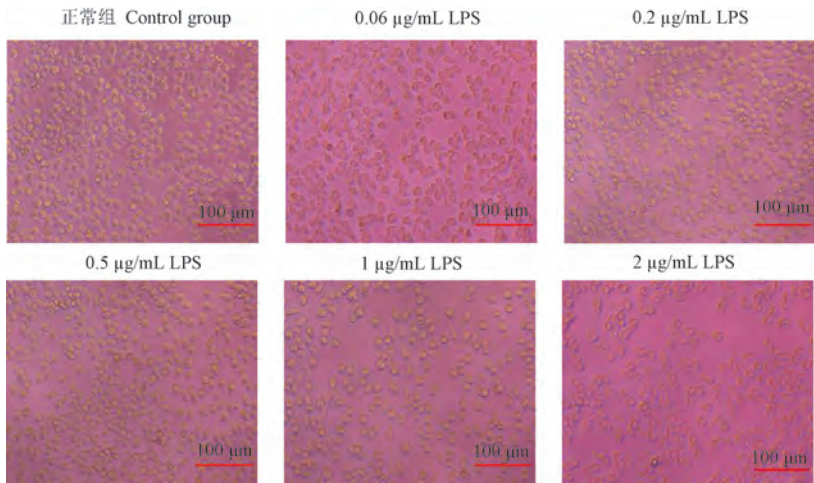


图 3 不同浓度 LPS 诱导 RAW264. 7 细胞形态图
Figure 3 Morphology of RAW264. 7 cells induced by different concentrations of LPS

$P<0.01$),与模型组比,江香薷多糖和姜制江香薷多糖在中高剂量时,NO、IL-6 与 IL-12 含量均有不同程度降低,IL-4 和 IL-10 含量显著升高($P<0.05$, $P<0.01$),其中,与江香薷多糖组比,姜制江香薷多糖组虽无显著差异,但在高剂量组时,促炎因子 NO、IL-6 与 IL-12 含量均比江香薷多糖低,抑炎因子则相反,这表明生姜炮制后的江香薷多糖抗炎效果更好。

2.4 止血实验结果

分别灌胃给药不同浓度的江香薷多糖和姜制江香薷多糖后,小鼠的出血时间随着给药浓度的增加呈不同程度的降低,其中,与正常组相比,江香薷多糖组无显著性差异,姜制江香薷多糖在中剂量组有显著性差异($P<0.05$)。这表明生姜炮制后的江香薷多糖优于江香薷多糖,说明姜制江香薷多糖具

有一定的止血效果(表 4)。

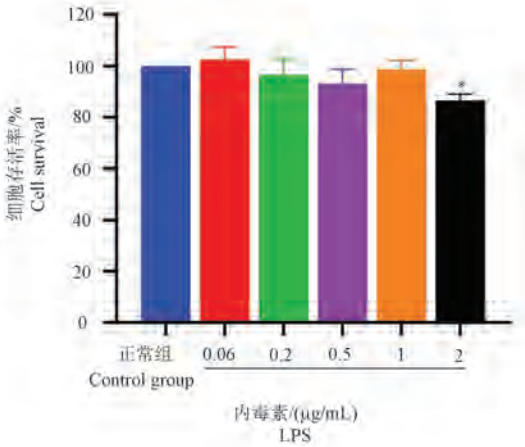
2.5 多糖抗氧化能力

2.5.1 DPPH 抗氧化能力

由图 6 可知,当质量浓度在 0.08~0.8 mg/mL 内,江香薷多糖和姜制江香薷多糖对 DPPH 的清除能力随着多糖浓度的增加而增强。当浓度为 0.6 mg/mL 时两者曲线开始呈现平缓的趋势,其中江香薷多糖的最大清除率可达 67.98%, IC_{50} 值为 0.2215 mg/mL;姜制江香薷多糖的最大清除率可达 71.60%, IC_{50} 值为 0.1651 mg/mL。说明炮制后的多糖对 DPPH 的清除能力较强。

2.5.2 ABTS 抗氧化能力

由图 7 可知,在质量浓度为 0.08~0.8 mg/mL 范围内,随着两者浓度的增加对 ABTS 的清除能力

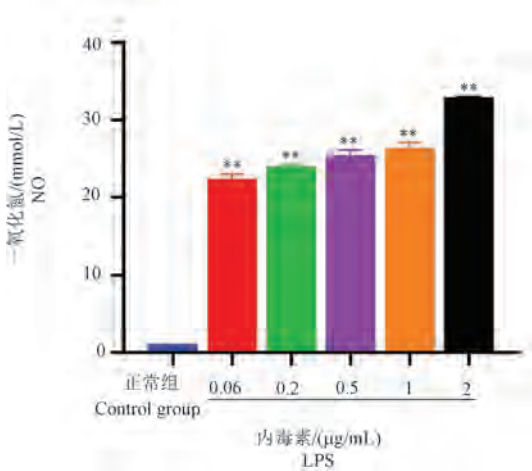


注:与正常组相比, * $P<0.05$ 。

图 4 LPS 对 RAW264.7 细胞活性的影响

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

Figure 4 Effect of LPS on RAW264.7 cell activity



注:与正常组相比, ** $P<0.01$ 。

图 5 LPS 对 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响

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

Figure 5 Effect of LPS on NO release in RAW264.7

表 2 炮制前后多糖对促炎因子表达量的影响($\bar{x}\pm s$)				
Table 2 Effects of polysaccharides on the expression of pro-inflammatory factors before and after preparation				
组别 Groups	浓度/($\mu\text{g/mL}$) Concentration	一氧化氮/(mmol/L) NO	白细胞介素-6/(pg/mL) IL-6	白细胞介素-12/(pg/mL) IL-12
正常组 Control group	/	1.11 $\pm$ 0.01	97.18 $\pm$ 4.63	133.66 $\pm$ 0.13
模型组 Model group	1	25.65 $\pm$ 0.27**	164.11 $\pm$ 0.49*	199.20 $\pm$ 0.64*
江香薷多糖组 JXRPs group	2	24.30 $\pm$ 0.58	161.63 $\pm$ 1.03	200.95 $\pm$ 1.34
	5	22.06 $\pm$ 0.1	153.55 $\pm$ 1.9 [#]	191.07 $\pm$ 0.25
	10	20.14 $\pm$ 0.22 ^{##}	146.94 $\pm$ 1.28 ^{##}	108.37 $\pm$ 0.54 ^{##}
姜制江香薷多糖组 JZJXRPs group	2	24.48 $\pm$ 2.04	171.49 $\pm$ 1.31	246.11 $\pm$ 0.2
	5	21.25 $\pm$ 0.38 [#]	161.90 $\pm$ 2.68	173.22 $\pm$ 0.76 ^{##}
	10	19.27 $\pm$ 0.38 ^{##}	140.52 $\pm$ 2.09 ^{##}	73.10 $\pm$ 0.92 ^{##}

注:与正常组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组相比, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ 。

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

均呈现增大的趋势。其中,在浓度 0.08~0.4 mg/mL 时,对 ABTS 的清除能力呈增长趋势;0.6~0.8 mg/mL 时趋于平缓。江香薷多糖和姜制江香薷多糖在浓度为 0.8 mg/mL 时,清除率分别为 89.63%

和 92.5%,IC₅₀ 值分别为 0.2110 mg/mL 和 0.1884 mg/mL。其中姜制江香薷多糖的清除率达到 92.5%,接近于 VC 抗氧化能力,这表明姜制江香薷对 ABTS 的清除能力较强。

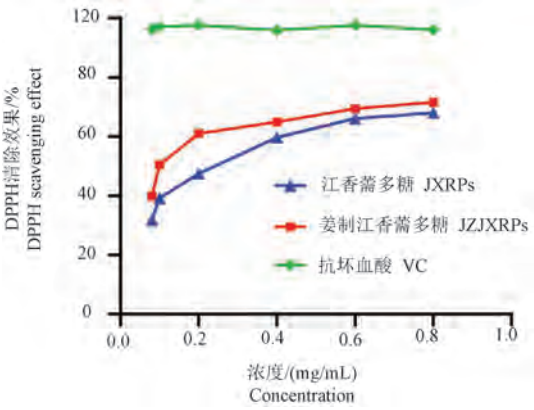


图 6 DPPH 自由基清除能力

Figure 6 DPPH radical scavenging capacity

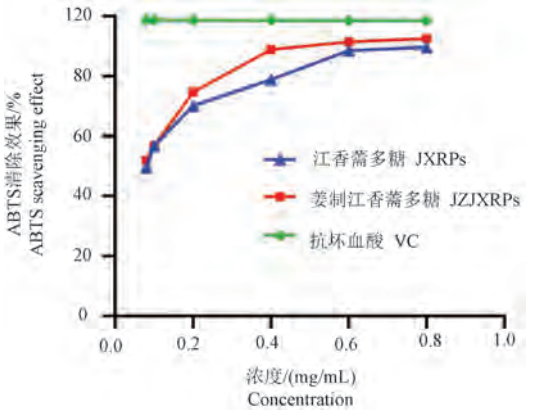


图 7 ABTS 自由基清除能力

Figure 7 ABTS free radical scavenging ability

表 3 炮制前后多糖对抑炎因子表达量的影响(̄x±s)

Table 3 Effect of polysaccharides on the expression of inflammatory factors before and after processing

组别 Groups	浓度/(μg/mL) Concentration	白细胞介素-4/(pg/mL) IL-4	白细胞介素-10/(pg/mL) IL-10
正常组 Control group	/	75.34±0.97	68.68±6.33
模型组 Model group	1	48.97±0.48**	50.00±8.19*
江香薷多糖组 JXRPs group	2	50.34±1.45	49.74±6.32
	5	57.88±5.33	59.21±4.09
	10	64.73±13.08##	65.00±1.12 [#]
姜制江香薷多糖组 JZXRPs group	2	52.74±11.62	45.79±8.19
	5	60.62±4.36	53.68±6.7
	10	77.05±0.48 ^{##}	69.74±3.35 ^{##}

注:与正常组相比,**P*<0.05,***P*<0.01;与模型组相比,[#]*P*<0.05,^{##}*P*<0.01。
Note. Compared with the control group,**P*<0.05,***P*<0.01. Compared with the model group,[#]*P*<0.05,^{##}*P*<0.01.

表 4 炮制前后多糖对出血时间的影响(̄x±s)

Table 4 Effects of polysaccharides on bleeding time before and after processing

组别 Groups	剂量/(mg/kg) Dosage	出血时间/min Bleeding time
正常组 Control group	/	7.75±1.07
阳性组 Positive group	50	4.28±0.76**
江香薷多糖组 JXRPs group	35	7.47±2.36
	70	7.37±1.73
	140	7.31±0.94
姜制江香薷多糖组 JZXRPs group	35	8.03±2.73
	70	5.16±0.79*
	140	5.37±1.1

注:与正常组相比,**P*<0.05,***P*<0.01。
Note. Compared with the control group,**P*<0.05,***P*<0.01.

3 讨论

目前,关于江香薷多糖的研究大多在分离纯化方面,对其药效的研究鲜有报道,尤其对炮制前后多糖含量以及药理作用,至今尚未见国内外相关报道。因此,本实验采用生姜汁炮制江香薷探讨炮制前后多糖的含量,并在消炎止血及抗氧化能力上进行初步探讨。

研究发现,炮制后江香薷多糖的含量增加,推测可能是生姜汁中的某种成分促进多糖的溶出,或者江香薷全草经闷润后有利于多糖在水中的溶出。辅料和炒制温度是影响多糖含量的主要因素^[17],据相关文献报道,通常炒制之后多糖含量降低,主要原因可能是温度过高使多糖发生美拉德等反应,导

致部分糖类成分碳化损伤^[18]。如炒制后黄芪多糖的含量降低,米炒党参后多糖含量随着炒制时间的延长呈先增加后降低的趋势。由此可分析炮制之后江香薷多糖的含量升高,推测可能是炒制温度低,炒制时间短,多糖未碳化损伤。

本文进一步探讨了炮制前后江香薷多糖在消炎止血及抗氧化方面的效果。本实验采用体外角叉菜胶致大鼠足肿胀模型和体内利用 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症模型来观察生姜汁炮制江香薷后多糖对其抗炎作用的影响,结果显示江香薷多糖和姜制江香薷多糖均能明显抑制大鼠足趾肿胀,其中,江香薷多糖在高剂量时有显著性差异($P < 0.05$),而姜制江香薷多糖在中剂量时就有显著性差异($P < 0.05$);细胞实验结果显示,炮制前后的多糖在高剂量时均能降低 IL-6、IL-12 和 NO 的表达,促进 IL-4 和 IL-10 的表达,其中,姜制江香薷在中剂量就能显著降低 NO 和 IL-12 的表达。结果显示炮制前后的多糖均能抑制大鼠足肿胀、降低促炎因子和升高抑炎因子的表达,但炮制后的抗炎效果更好一些。另外,本实验用小鼠断尾实验来观察炮制前后多糖的止血效果,结果显示,与正常对照组相比,江香薷组无显著性差异,姜制江香薷多糖在中剂量有显著性差异($P < 0.05$),而高剂量组并无此差异。表明炮制后的多糖能显著抑制小鼠的出血时间。最后,本实验采用 DPPH 和 ABTS 清除法来观察炮制前后多糖的抗氧化能力,结果显示,炮制前后的多糖随着浓度的增加,对 DPPH 和 ABTS 的清除率呈剂量依赖关系,当浓度为 0.8 mg/mL 时,江香薷多糖和姜制江香薷多糖对 DPPH 的清除能力分别为 67.9%、71.6%;对 ABTS 的清除能力分别为 89.6%、92.5%。说明炮制后的江香薷多糖抗氧化能力稍强。

研究表明,单糖组成和相对分子量是影响多糖药理活性的重要因素。多糖的单糖组成不同,可能导致生物活性不同,从香菇子实体中提取得到的香菇多糖是由葡萄糖组成葡聚糖,具有显著的抗肿瘤活性^[19]。阿拉伯半乳聚糖具有一定的免疫调节功能,可以增强巨噬细胞和自然杀伤细胞的免疫作用^[20]。多糖相对分子量也是影响多糖药理活性的重要因素之一,多糖相对分子质量较低无法形成活性聚合结构,而分子量太大则不利于穿过细胞膜进入体内发挥生物活性^[21]。王莹等^[22]发现分子量大的枸杞多糖表现出更强的免疫调节作用。王瑞^[23]

从蒸附子多糖中分离纯化得到 4 个多糖,其抗氧化作用随分子量从小到大呈现先升后降的变化趋势。

综上所述,炮制后多糖含量增加,推测可能是生姜汁中的某种成分促进多糖的溶出,或者是姜汁闷润后有利于多糖在水中的溶出;其次,可能是炒制温度低,炒制时间短,多糖未碳化损伤。江香薷多糖和炮制后的多糖均有良好的抗炎和抗氧化作用,而且经生姜汁炮制后多糖抗炎抗氧化作用增强,且经炮制后江香薷多糖止血效果显著。因此,本研究初步验证了炮制前后江香薷多糖的消炎止血及抗氧化能力,但具体是何种原因发挥作用,需进一步对炮制前后的多糖从结构上进行分析。

参考文献:

- [1] YU J, JI H, LIU A. Preliminary structural characteristics of polysaccharides from pomelo peels and their antitumor mechanism on S180 tumor-bearing mice [J]. Polymers, 2018, 10 (4): 419.
- [2] WU Q, LUO M, YAO X, et al. Purification, structural characterization, and antioxidant activity of the COP-W1 polysaccharide from *Codonopsis tangshen* Oliv [J]. Carbohydr Polym, 2020, 236: 116020.
- [3] FENG H, FAN J, LIN L, et al. Immunomodulatory effects of phosphorylated *Radix cyathulae officinalis* polysaccharides in immunosuppressed mice [J]. Molecules, 2019, 24(22): 4150.
- [4] ZHAN Y, AN X, WANG S, et al. Basil polysaccharides: a review on extraction, bioactivities and pharmacological applications [J]. Bioorg Med Chem, 2020, 28(1): 115179.
- [5] WANG J, JIA J, SONG L, et al. Extraction, structure, and pharmacological activities of *Astragalus* polysaccharides [J]. Appl Sci, 2019, 9(1): 122.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 年版 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2020 Edition [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- [7] 卫计委公布最新食药两用中药名单 [J]. 中医临床研究, 2017, 9(24): 11-14.
The Health and Family Planning Commission announced the latest list of Chinese medicines for both food and medicine [J]. Clin J Chin Med, 2017, 9(24): 11-14.
- [8] 李松梅. 认识身边的中药——香薷 [J]. 中医健康养生, 2021, 7(6): 32-33.
LI S M. Get to know the Chinese medicine around you—Elsholtzia [J]. TCM Healthy Life-Nurturing, 2021, 7(6): 32-33.
- [9] 罗光明, 杨光义, 刘红宁, 等. 香薷类药材挥发油化学成分比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14): 1483-1485.
LUO G M, YANG G Y, LIU H N, et al. Comparative study on

chemical constituents of volatile oil from *Elsholtzia* species [J]. China J Chin Mater Med, 2007, 32(14): 1483-1485.

[10] 胡浩武, 谢晓鸣, 张普照, 等. 江香薷黄酮类化学成分研究 [J]. 中药材, 2010, 33(2): 218-219.

HU H W, XIE X M, ZHANG P Z, et al. Study on the flavonoids from *Mosla chinensis* ‘jiangxiangru’ [J]. J Chin Med Mater, 2010, 33(2): 218-219.

[11] 李景恩. 江香薷多糖和两种阿拉伯胶的结构解析及功能特性 [D]. 南昌: 南昌大学, 2014.

LI J E. Structure analysis and functional properties of polysaccharides from *Mosla chinensis* Maxim. cv. jiangxiangru and two Arabic gums [D]. Nanchang: Nanchang University, 2014.

[12] 易永, 刘华, 陈钟文, 等. ICP-MS 法测定江香薷不同部位矿物质元素的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 106-108.

YI Y, LIU H, CHEN Z W, et al. Determination of mineral elements in different part of *Mosla chinensis* with ICP-MS [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2012, 18(12): 106-108.

[13] 孙冬月, 王晓婷, 王馨雅, 等. 香薷传统切制与产地加工炮制一体化比较研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(12): 72-76.

SUN D Y, WANG X T, WANG X Y, et al. Comparative study on traditional cutting processing and integration processing of origin of moslae herba [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2017, 24(12): 72-76.

[14] 王孝涛. 历代中药炮制法汇典: 古代部分 [M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1998.

WANG X T. Compendium of Chinese Medicine processing methods of the past dynasties: ancient parts [M]. Nanchang: Jiangxi Science and Technology Press, 1998.

[15] 张依欣. 姜汁制香薷特色炮制机理研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2020.

ZHANG Y X. Study on the processing mechanism Moslae Herba produced by ginger juice [D]. Nanchang: Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2020.

[16] 马秋婷, 朱钰晨, 万小光, 等. 草珊瑚多糖消炎止血和抗氧化活性研究初探 [J]. 江西中医药, 2023, 54(10): 74-77.

MA Q T, ZHU Y C, WAN X G, et al. Preliminary study on anti-inflammatory, hemostatic and antioxidant activities of caoshanhu polysaccharide [J]. Jiangxi J Tradit Chin Med, 2023, 54(10): 74-77.

[17] 李春晓, 张兵, 李红艳. 炮制对药食同源植物功能成分和活性的影响 [J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(24): 7867-7874.

LI C X, ZHANG B, LI H Y. Effects of processing on functional components and activities of medicinal and edible homologous plants [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(24): 7867-7874.

[18] LIU Z, CHAO Z, LIU Y, et al. Maillard reaction involved in the steaming process of the root of *Polygonum multiflorum* [J]. Planta Med, 2009, 75(1): 84-88.

[19] 张玉, 张琪琳, 王静林, 等. 香菇多糖构效关系、抗肿瘤作用机制及药代动力学研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(7): 804-812.

ZHANG Y, ZHANG Q L, WANG J L, et al. Advances in structure-activity relationship, anti-tumor mechanism and pharmacokinetics of lentinan [J]. Chin J Hosp Pharm, 2023, 43(7): 804-812.

[20] WANG P, ZHANG L, YAO J, et al. An Arabinogalactan from flowers of *Panax notoginseng* inhibits angiogenesis by BMP2/Smad/Id1 signaling [J]. Carbohydr Polym, 2015, 121: 328-335.

[21] 边亮, 陈华国, 周欣. 植物多糖的抗肿瘤活性研究进展 [J]. 食品科学, 2020, 41(7): 275-282.

BIAN L, CHEN H G, ZHOU X. Recent advances in understanding the antitumor activity of polysaccharides from plants [J]. Food Sci, 2020, 41(7): 275-282.

[22] 王莹, 金红宇, 李耀磊, 等. 不同分子量枸杞多糖对 RAW_{264.7} 巨噬细胞的免疫调节作用 [J]. 中国新药杂志, 2021, 30(12): 1079-1086.

WANG Y, JIN H Y, LI Y L, et al. Immunomodulatory effect of *Lycium barbarum* polysaccharide of different molecular weights on macrophage RAW_{264.7} [J]. Chin J New Drugs, 2021, 30(12): 1079-1086.

[23] 王瑞. 蒸附子多糖的化学表征及其抗炎抗氧化作用研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2021.

WANG R. Study on chemical characterization and anti-inflammatory and antioxidant effects of steamed monkshood polysaccharide [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine, 2021.

[收稿日期] 2023-07-15

胡毅龙,赵怡楠,张双丽,等. 基于数据挖掘的急性肝损伤动物模型应用分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 89-100.
Hu YL, Zhao YN, Zhang SL, et al. Analysis of the application characteristics of the acute liver injury animal model based on data mining [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 89-100.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.011

基于数据挖掘的急性肝损伤动物模型应用分析

胡毅龙^{1,2}, 赵怡楠^{1,2}, 张双丽¹, 邱广楠¹, 冯艺凡^{1,2}, 苗明三^{1,2*}, 苗晋鑫^{1,2*}

(1.河南中医药大学,郑州 450046;2.豫药全产业链研发河南省协同创新中心,郑州 450046)

【摘要】 目的 探究各类急性肝损伤动物模型的造模要素,为急性肝损伤动物模型的建立和评价提供参考和建议。**方法** 在中国知网(CNKI)、万方(WanFang)、重庆维普(VIP)、中华医学期刊全文数据库(Yiigle)、PubMed等数据库检索2002~2022年急性肝损伤动物实验文献,归纳总结文献中涉及到的急性肝损伤动物模型的动物种类、阳性对照药、造模方法、造模药及给药剂量、给药时间和检测指标,应用Excel、SPSS Modeler18.0、Cytoscape3.8.2对结果进行分析。**结果** 数据库共纳入896篇文献,急性肝损伤动物模型中应用最多的是雄性KM小鼠;造模方法以化学性肝损伤、酒精性肝损伤、药物性肝损伤和免疫性肝损伤四大类为主,分别对应的主要造模方式为:①实验前24 h腹腔注射10.0 mL/kg 0.1% CCl₄ 植物油;②实验前16 h灌胃12.0 mL/kg 50.0%~56.0%乙醇;③实验前24 h腹腔注射APAP 300 mg/kg;④实验前8 h尾静脉注射Con A 20 mg/kg。模型的评价以肝病理指标为金标准,结合生化指标血清ALT、AST,肝组织匀浆SOD、MDA含量及活性为直接指标。**结论** 临床上急性肝损伤发病原因各异,在制备急性肝损伤动物模型时应根据特定的研究内容、研究特点选择对应的造模方法。

【关键词】 数据挖掘;急性肝损伤;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0089-12

Analysis of the application characteristics of the acute liver injury animal model based on data mining

HU Yilong^{1,2}, ZHAO Yinan^{1,2}, ZHANG Shuangli¹, QIU Guangnan¹, FENG Yifan^{1,2}, MIAO Mingsan^{1,2*}, MIAO Jinxin^{1,2*}

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.

2. Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry Chain of Yu-Yao, Henan Province, Zhengzhou 450046)

【Abstract】 Objective To investigate the modeling elements of various types of animal models for acute liver injury, and to provide references and suggestions to establish and evaluate animal models of acute liver injury (ALI).

Methods The animal experimental literature of ALI from 2002 to 2022 was searched in the databases of the China Knowledge Network, WanFang, Chongqing Vip (VIP), Chinese Medical Journal Full Text Data (Yiigle), and PubMed. The animal species, positive control drugs, modeling method, modeling drugs, and drug administration of the animal models of ALI in the literature were summarized. The result were analyzed using Excel, SPSS Modeler 18.0, and Cytoscape 3.8.2. **Results** A total of 896 articles were included in the databases. The most used animal models for ALI

【基金项目】岐黄学者(国中医药人教函2022-6);河南省重大公益专项(201300310100)。

【作者简介】胡毅龙(2000—),男,硕士研究生,研究方向:中药学。E-mail:huyilong20001003@163.com

【通信作者】苗明三(1965—),男,教授,博士生导师,研究方向:中药学。E-mail:miaomingsan@163.com

苗晋鑫(1986—),博士,副研究员,硕士生导师,研究方向:动物模型及肿瘤防治。E-mail:miaojinxin2022@163.com

* 共同通信作者

were male KM mice. The modeling method were mainly chemical liver injury, alcoholic liver injury, drug-related liver injury, and immune liver injury. ①The corresponding main modeling method were intraperitoneal injection of 10 mL/kg of 0. 1% CCl₄ in vegetable oil at 24 h before experiments, ②gavage of 12. 0 mL/kg of 50. 0% ~ 56. 0% ethanol at 16 h before experiments, ③intraperitoneal injection of 300 mg/kg APAP at 24 h before experiments, ④tail vein injection of 20 mg/kg Con A at 8 h before experiments. Evaluation of the models was based on liver pathological indexes as the gold standard combined with biochemical indexes of serum ALT, AST, and SOD and MDA contents and activities in liver tissue homogenate as direct indicators. **Conclusions** Because the causes of ALI vary in clinical practice, the preparation of animal models of ALI should be based on the specific study content and characteristics, and the corresponding modeling method should be selected.

【Keywords】 data mining; acute liver injury; animal model
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

急性肝损伤(acute liver injury, ALI)是指肝在无慢性病的情况下短期突发异常疾病^[1], 机体发生氧化应激、炎症、肝细胞坏死和凋亡等多种病理改变, 严重的 ALI 还会转变为急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)、肝硬化和肝癌, 其致病因素有药物中毒、酒精摄入过多、病毒感染、化学毒性等。ALI 的发病率呈逐年上升的趋势^[2-4], 特别是新型冠状病毒肆虐以来, 对乙酰氨基酚等解热镇痛药的使用量大大增加, 过量错误地服用药品, 会极大地损害肝组织, 造成肝损伤。良好的动物模型是开发新药和研究疾病治疗方式的基础, 国内外学者针对 ALI 的临床发病因素已研究出了各种造模方式, 根据不同的造模方式, 实验性 ALI 动物模型可分为化学性肝损伤模型、酒精性肝损伤模型、药物性肝损伤模型、免疫性肝损伤模型和其他类肝损伤模型^[5-6], 分别对应临床上由各种病因引起的肝损伤。前四类 ALI 动物模型应用广泛, 广泛应用于药效学研究^[7-8], 但各类 ALI 模型造模方法均无统一标准, 例如该模型的关键因素造模药物剂量差异较大, 无法为后续研究提供更明确的指导。因此, 为进一步明确 ALI 动物模型的应用特点, 确定更合适的 ALI 造模方法, 本研究通过数据挖掘方式归纳整理 ALI 动物模型相关文献, 并通过“分类讨论”的方式分析总结各造模要素, 探究现有 ALI 动物模型的研究现状及不足之处, 为提高 ALI 动物模型造模成功率以及 ALI 的发病机制和治疗方法研究提供理论参考。

1 资料和方法

1.1 数据来源

以“急性肝损伤”和“动物模型”为主题词, 在中国知网(CNKI)、万方数据知识服务平台(WanFang)、重庆维普中文期刊服务平台(VIP)、中

华医学期刊全文数据库(Yiigle)进行检索; 以“acute liver injury” AND “animals model”为主题词, 在 PubMed 数据库进行检索。检索时间范围均设置为 2002 年 12 月~2022 年 12 月, 建立数据库。

1.2 文献筛选标准

纳入标准: 使用 ALI 动物模型进行研究的实验性文献。排除标准: ①排除综述类、理论研究类文献、硕博学位论文、会议性文献; ②排除未明确记录实验动物种类和造模方式的文献; ③排除造模剂量不明确的文献; ④排除资料缺失文献, 数据库之间重复文献。最终有 896 篇 ALI 动物模型文献符合筛选标准。

1.3 数据处理

将符合纳入标准的 896 篇文献, 根据造模方式和研究目的分为化学性肝损伤、免疫性肝损伤、药物性肝损伤和酒精性肝损伤四类, 其余类型归为其他。录入 Excel 2021, 建立数据库, 分析造模特点。参照《常用医药研究动物模型》^[9]对实验动物名称、种类等进行统一规范处理。

1.4 统计学方法

统计录入的全部数据, 使用 Excel 2021、SPSS Modeler 18. 0、Cytoscape 3. 8. 2 进行统计学处理。

2 结果

2.1 实验动物选择

将录入的 896 篇实验文献中的全部实验动物种类进行归类统计, 共分为 20 种。动物种类最多的为 KM 小鼠(333 篇, 37. 17%), 其次为 SD 大鼠(154 篇, 17. 19%)和 C57BL/6 小鼠(150 篇, 16. 74%), 详见表 1。在实验动物性别的选择上, 排除 6 篇未对动物性别作出标注的文献, 其余的 890 篇中, 雄性(659 篇, 74. 04%), 雌雄各半(194 篇, 21. 80%), 雌性(37 篇, 4. 16%)。

2.2 阳性干预药使用情况

将 896 篇实验文献中的阳性干预药进行规范分类,有 317 篇设置阳性干预对照组。阳性干预药种

类主要包括西药和中成药。阳性干预药以联苯双酯(171 篇,56.62%)和水飞蓟素(66 篇,21.85%)为主。阳性干预药分布情况见表 2。统计过程中发现,有部分文献使用甘草饮片^[10]等作为阳性干预药,由于频次较低,忽略不计。

2.3 造模概况

在纳入数据库的 896 篇文献中,各类 ALI 模型的分布情况为化学性肝损伤模型 473 篇,酒精性肝损伤 146 篇,药物性肝损伤 103 篇,免疫性肝损伤 160 篇。其他类肝损伤主要通过手术切除 70%~80% 肝等方式制备 ALI,但因操作难度较大,动物存活率较低^[11-12]等因素,出现频次较低,详见表 3。

2.3.1 化学性肝损伤

在 473 篇化学性肝损伤动物模型文献中,主要通过四氯化碳(CCl₄)(389 篇,82.24%)诱导 ALI 动物模型。对 389 篇 CCl₄ 诱导 ALI 模型文献进行归纳,发现其给药方式主要为腹腔注射(338 篇,86.89%),给药时间集中在实验前 24 h(205 篇,52.84%),CCl₄ 给药剂量主要为 10.0 mL/kg 0.10% CCl₄ 植物油溶液(64 篇,37.65%)。详见图 1、表 4。

2.3.2 酒精性肝损伤

在 146 篇乙醇诱导 ALI 文献中,乙醇的给药方式均为灌胃,灌胃时间集中在实验前 16 h(44 篇,47.31%),灌胃剂量主要为 12.0 mL/kg 50%~56% 乙醇(39 篇,50.00%),详见图 2、表 5。

表 1 ALI 动物模型实验动物种类分布情况

Table 1 Distribution of experimental animals in ALI animal model

动物种类 Animal species	品系 Strain	频次/ <i>n</i> Frequency	占比/% Proportion
小鼠 Mice	KM	333	37.17%
	C57BL/6	150	16.74%
	ICR	96	10.72%
	BALB/C	55	6.14%
	WT	5	0.56%
	NIH	4	0.45%
	Swiss	4	0.45%
	SD	3	0.33%
	FVB	2	0.22%
	CBA	1	0.11%
	WT	1	0.11%
	Sabra	1	0.11%
	SD	154	17.19%
	Wistar	78	8.71%
大鼠 Rats	KM	2	0.22%
	实验犬 Experimental dog	3	0.33%
	白羽肉鸡 White feather broiler	1	0.11%
其他 Other	草鱼 Grass carp	1	0.11%
	建鲤 Jianli	1	0.11%
	食蟹猴 Cynomolgus macaques	1	0.11%

表 2 ALI 动物模型实验阳性干预药使用分布情况

Table 2 Distribution of positive drugs used in ALI animal model experiments

阳性药干预类型 Positive intervention drug type	阳性干预药 Positive intervention drug	频次/ <i>n</i> Frequency	占比/% Proportion
西药 Western medicine	联苯双酯 Biphenyl diester	171	56.62%
	水飞蓟素 Silymarin	66	21.85%
	甘利欣注射 Diammonium glycyrrhizinate injection	11	3.64%
	双环醇 Bicyclol	6	1.99%
	凯西莱 Tiopronin	6	1.99%
	还原性谷胱甘肽 Reduced glutathione	5	1.66%
	N-乙酰半胱氨酸 N-acetylcysteine	4	1.32%
	东宝肝泰 Dongbao Gantai	4	1.32%
	地塞米松 Dexamethasone	3	0.99%
	异甘草酸镁 Magnesium isoglycyrrhetate	3	0.99%
	维生素 E Vitamin E	2	0.67%
	护肝片 Liver-protecting tablet	14	4.64%
	茵栀黄颗粒 Yinzhihuang Granules	3	0.99%
	复方鳖甲软肝片	2	0.66%
	Fufang biejia ruangan tablet	2	0.66%
	苦参素胶囊 Marine capsules	2	0.66%

表 3 ALI 动物模型分类情况
Table 3 Classification of ALI animal models

动物模型类型 Animal model type	造模药物 Modeling drugs	频次/n Frequency	占比/% Proportion
化学性肝损伤动物模型(473) Animal model of chemical liver injury (473)	四氯化碳 CCl ₄	389	82.24%
	D-氨基半乳糖 D-GalN	47	9.95%
	硫代乙酰胺 Thioacetamide	21	4.44%
	α-萘异硫氰酸酯 α-Naphthalene isothiocyanate	10	2.11%
	二甲基甲酰胺 Dimethylformamide	3	0.63%
	黄曲霉素 B1 Aflatoxin B1	2	0.42%
	D-氨基半乳糖联合肿瘤坏死因子 α D-GalN combined with TNF-α	1	0.21%
酒精性肝损伤动物模型(146) Animal model of alcoholic liver injury (146)	乙醇 Alcohol	146	100.00%
药物性肝损伤动物模型(103) Animal model of drug-induced liver injury (103)	对乙酰氨基酚 Acetaminophen	92	89.32%
	雷公藤 Tripterygium wilfordii	4	3.89%
	衣霉素 Chlamycin	2	1.94%
	双氯芬酸钠 Diclofenac sodium	2	1.94%
	紫杉醇 Paclitaxel	1	0.97%
	四环素 Tetracycline	1	0.97%
	恩诺沙星 Enrofloxacin	1	0.97%
	伴刀豆球蛋白 A Concanavalin A	62	38.75%
	D-氨基半乳糖联合脂多糖 D-GalN combined with LPS	58	36.25%
	脂多糖 Lipopolysaccharide	29	18.13%
免疫性肝损伤动物模型(160) Animal model of immune liver injury (160)	卡介苗联合脂多糖 BCG combined with LPS	11	6.87%
	手术 Surgical operation	7	50.00%
	氯化铬 CrCl ₂	4	28.57%
	可卡因 Cocaine	2	14.29%
其他类肝损伤动物模型(14) Other animal models of liver injury (14)	亚硝酸钠 Sodium nitrite	1	7.14%

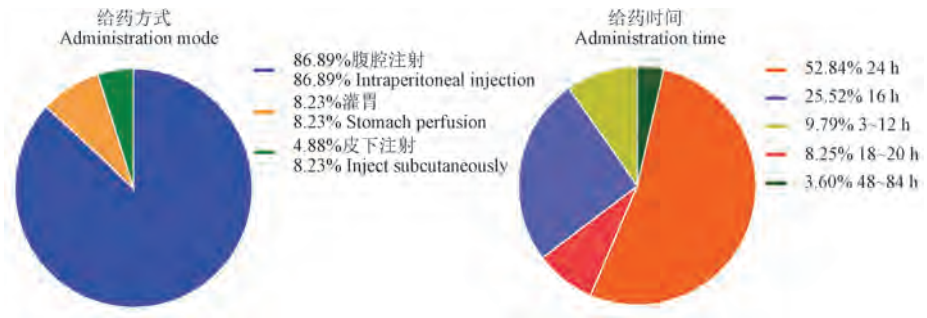


图 1 CCl₄ 诱导 ALI 给药方式及给药时间分布情况

Figure 1 Administration mode and time distribution of CCl₄ induced ALI

表 4 CCl₄ 诱导 ALI 给药体积分数及剂量分布情况(频次≥10)
Table 4 Volume fraction and dose distribution of CCl₄-induced ALI administration(frequency≥10)

体积分数/% Volume fraction	剂量 (mL/kg) Dosage	频次/n Frequency	占比/% Proportion
0.10%	10	64	37.65%
	20	12	7.06%
0.20%	10	42	24.71%
1.00%	5	11	6.47%
	10	11	6.47%
50.00%	1	12	7.06%
100.00%	1	18	10.59%

2.3.3 药物性肝损伤

在 103 篇药物性肝损伤动物模型文献中,主要通过乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) (92 篇, 89.32%) 诱导 ALI 动物模型。对 92 篇 APAP 诱导 ALI 动物模型的文献归纳发现,给药方式主要为腹腔注射 (70 篇, 76.09%), 给药时间主要为实验前 24 h (56 篇, 60.87%), 给药剂量主要为 300 mg/kg (31 篇, 33.70%)。详见图 3。

2.3.4 免疫性肝损伤

在 160 篇免疫性肝损伤动物模型文献中,主要通过伴刀豆球蛋白 A (concanavalin A, Con A) (62 篇, 38.75%) 诱导 ALI 物模型。如图 4 所示,对 62

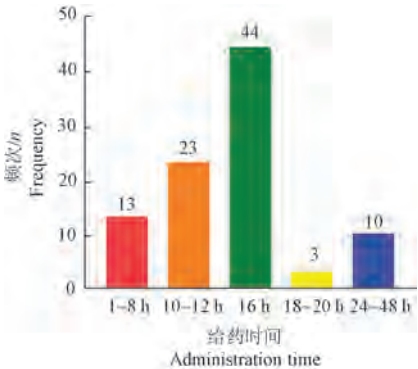


图 2 乙醇诱导 ALI 灌胃时间分布情况
Figure 2 Distribution of ethanol-induced ALI gavage times

表 5 乙醇诱导 ALI 灌胃体积分数及剂量分布情况 (频次≥5)

Table 5 Ethanol-induced ALI volume fraction and dose distribution (frequency≥5)

体积分数/% Volume fraction	剂量 (mL/kg) Dosage	频次/n Frequency	占比/% Proportion
50%~56%	12.0	39	50.00%
	14.0	13	16.67%
	3.0~10.0	13	16.67%
	15.0	7	8.97%
100%	6.0~8.0	6	7.69%

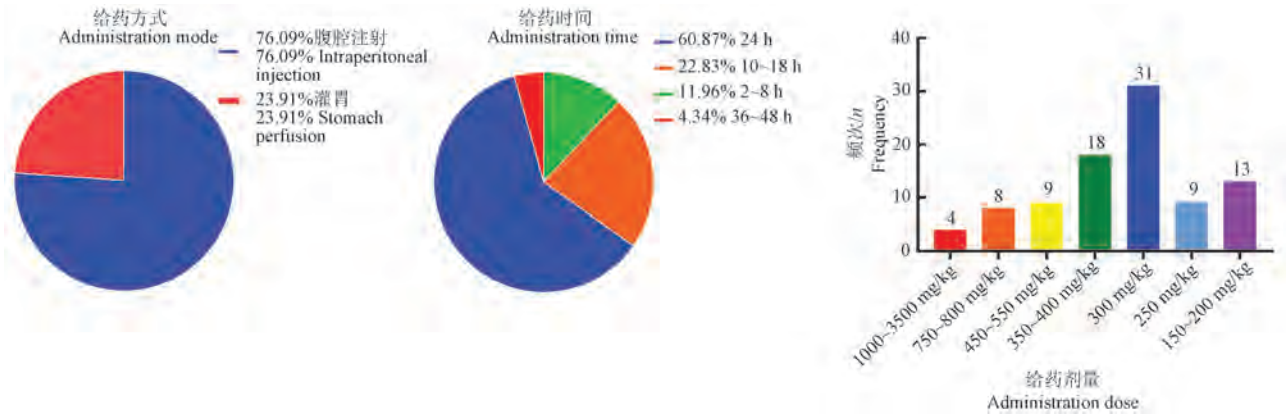


图 3 APAP 诱导 ALI 给药方式、给药时间及给药时间分布情况
Figure 3 Administration mode, administration time and administration time distribution of ALI induced by APAP

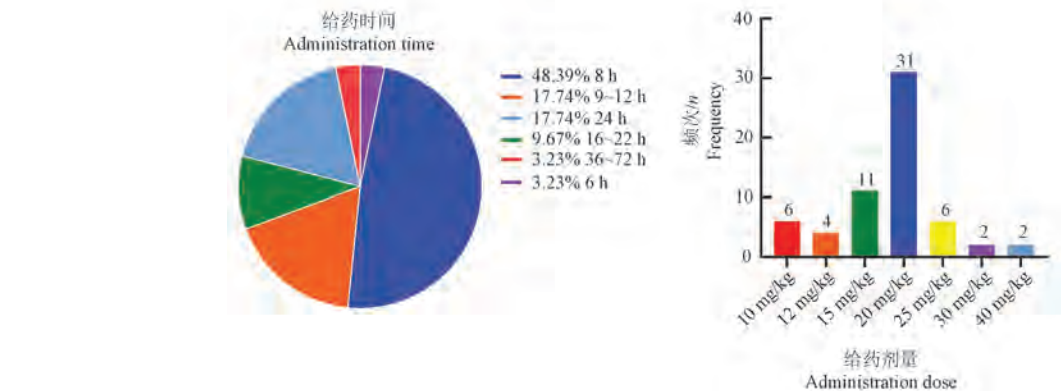


图 4 Con A 诱导 ALI 给药时间及给药剂量分布情况
Figure 4 Administration time and dose distribution of ALI induced by Con A

篇 Con A 诱导 ALI 动物模型的文献进行归纳统计, 给药方式主要为尾静脉注射($n=61$), 仅 1 篇为内眦静脉注射; 给药时间集中在实验前 8 h (30 篇, 48.39%), 给药剂量主要为 20 mg/kg (31 篇, 50.00%)。

2.4 检测指标

如表 6 所示, 对 896 篇 ALI 动物模型文献的实验相关指标进行归纳统计, 文献主要对表观指标、病理指标、生化指标、分子生物学相关指标进行了检测。

表 6 ALI 动物模型指标检测情况
Table 6 Detection of indexes in ALI animal models

指标 Target	临床表现 Clinical manifestation
表观指标 Apparent indicators	① 体重降低 ① Weight loss
	② 毛发渐干枯无光泽 ② Dry and lusterless hairs
	③ 活动频次明显下降, 饮食、饮水量减少, 精神萎靡不振 ^[13-14] ③ Frequency of activity decreases significantly, the amount of food and water intake decreases, and the spirit is depressed
	④ 尿失禁、步态不稳、动作迟缓、昏睡等 ^[15-16] ④ Urinary incontinence, unsteady gait, slow movement, lethargy, etc
组织病理指标 Histopathological indicators	① 肝组织出现多处融合坏死, 有纤维化组织出现 ① Liver tissue showed multiple fused necrosis with fibrotic tissue
	② 肝细胞肿胀、变性、排列紊乱 ② Hepatocyte swelling, degeneration and disorder of arrangement
	③ 有大量炎性细胞浸润 ^[17-19] ③ Massive inflammatory cell infiltration
生化指标 Biochemical indicators	血清 Serum
	谷丙转氨酶 ↑ ALT ↑ 谷草转氨酶 ↑ AST ↑ 碱性磷酸酶 ↑ ALP ↑ 肿瘤坏死因子-α ↑ TNF-α ↑ 白介素-1β ↑ IL-1β ↑ 谷胱甘肽过氧化物酶 ↓ GSH-Px ↓
	肝组织 Hepatic tissue
	超氧化物歧化酶 ↓ SOD ↓ 丙二醛 ↑ MDA ↑ 过氧化氢酶 ↓ CAT ↓ 非酶抗氧化剂 ↓ GSH ↓ 白介素-6 ↑ IL-6 ↑
通路相关蛋白 Pathway related proteins	炎症相关蛋白 Inflammation related proteins
	核因子-κB 蛋白 ↑ NF-κB protein ↑ 肿瘤坏死因子-α 蛋白 ↑ TNF-α protein ↑ NLRP3 蛋白 ↑ NLRP3 protein ↑ 白介素-6 蛋白 ↑ IL-6 protein ↑ TLR4 蛋白 ↑ TLR4 protein ↑ 一氧化氮合酶蛋白 ↑ INOS protein ↑ 磷酸化细胞外调节蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶 ↑ p-ERK/ERK ↑
	凋亡相关蛋白 Apoptosis related proteins
	Bax 蛋白 ↑ Bax protein ↑ B 淋巴细胞瘤-2 蛋白 ↓ Bcl-2 protein ↓ 人内质网应激相关蛋白 ↑ CHOP protein ↑ Caspase-3 蛋白 ↑ Caspase-3 protein ↑ Caspase-12 蛋白 ↑ Caspase-12 protein ↑ Grp78 蛋白 ↑ Grp78 protein ↑
通路相关 mRNA Pathway related mRNA	氧化应激相关蛋白 Oxidative stress related proteins
	CYP2E1 蛋白 ↑ CYP2E1 protein ↑ 血红素氧合酶-1 ↑ HO-1 ↑ Nrf2 蛋白 ↑ Nrf2 protein ↑ 磷酸化氨基末端蛋白激酶/氨基末端蛋白激酶 ↑ p-JNK/JNK ↑
	炎症相关 mRNA Inflammation related mRNA
	肿瘤坏死因子-α mRNA ↑ TNF-α mRNA ↑ 白介素-6 mRNA ↑ IL-6 mRNA ↑ 一氧化氮合酶 mRNA ↑ INOS mRNA ↑ 白介素-1β mRNA ↑ IL-1β mRNA ↑
	凋亡相关 mRNA Apoptosis related mRNA
	Caspase 3 mRNA ↑ Caspase 12 mRNA ↑
	氧化应激相关 mRNA Oxidative stress related mRNA
	血红素氧合酶 1 ↑ mRNA HO-1 mRNA ↑ 细胞色素同功酶 mRNA ↑ CYP2E1 mRNA ↑ P38 MAPK mRNA ↑ Nrf2 mRNA ↓ Keap 1 mRNA ↓

2.5 生化指标关联规则分析

如图 5 所示,将频数≥10 的生化指标导入 SPSS Modeler 18.0 进行关联规则分析,链接显示最小值设置为 10,运行得到生化指标关联规则网络图。将数据进一步导入 Cytoscape 3.8.2 对关联规则网络图进行可视化升级,从关联规则图中可得出关联较强的生化指标组合为 ALT-AST-SOD-MDA。

3 讨论

ALI 是临床常见的危重急症之一^[20],构建 ALI 动物模型是研究 ALI 发病机制及筛选有效药物的重要方式。临床上 ALI 患者病因各异,遵循“辨证施治”原则,应依据病因开发不同的治疗药物,在开展实验研究时,也应依据不同的研究内容制备不同的 ALI 模型。本研究依据不同的造模方式,将 ALI 动物模型分为化学性肝损伤、酒精性肝损伤、药物性肝损伤和免疫性肝损伤四类,详见表 7。

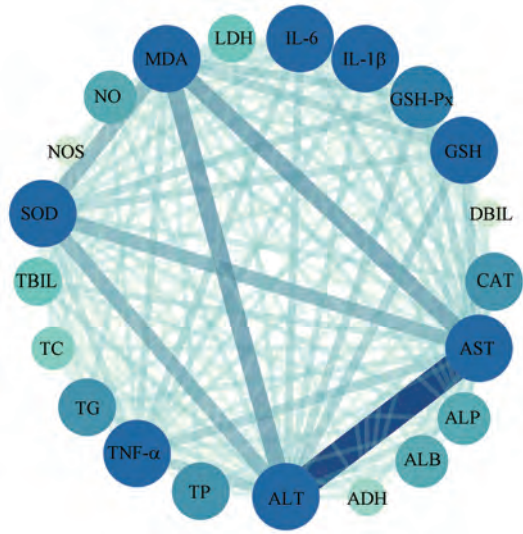


图 5 生化指标关联规则图
Figure 5 Neteork association diagram of Biochemical indicators

表 7 ALI 动物模型
Table 7 ALI animal models

模型类型 Model type	制备方法 Preparation method	优点 Advantage	缺点 Disadvantage	应用范围 Applicable scope
化学性肝损伤 ^[5,21-22] Chemical liver injury	实验前 24 h 腹腔注射 10.0 mL/kg 0.1% CCl ₄ 植物油 Intraperitoneal injection of 10.0 mL/kg of 0.1% CCl ₄ vegetable oil, 24 h before the experiment	成本低;操作简单;症状与人相似,稳定性强 Low cost; simple operation; symptoms are similar to those of people, and the stability is strong	CCl ₄ 毒性较大;特异性较低,对其他脏器也会造成损伤 CCl ₄ is toxic; the specificity is low, and it will also cause damage to other organs	研究急性肝损伤病理生理学机制;研究化学品及代谢产物对肝的毒害 To study the pathophysiological mechanism of acute liver injury and the toxicity of chemicals and metabolites to liver
酒精性肝损伤 ^[23] Alcoholic liver injury	实验前 16 h 灌胃 12.0 mL/kg 50.0% ~ 56.0% 乙醇 Gavage of 12.0 mL/kg 50.0% ~ 56.0% ethanol, 16 h before the experiment	操作简单;易成模;与人类发病流程较为一致 Simple operation; easy to become a model; it is more consistent with the human pathogenesis process	酒精造模存在品系和性别差异 There are strains and gender differences in alcohol modeling	研究酒精性脂肪肝、酒精性肝炎机制;开发治疗酒精性肝损伤药物 To study the mechanism of alcoholic fatty liver and alcoholic hepatitis; development of drugs for treating alcoholic liver injury
药物性肝损伤 ^[24-25] Drug-induced liver injury	实验前 24 h 腹腔注射 APAP 300 mg/kg Intraperitoneal injection of APAP 300 mg/kg, 24 h before the experiment	成本低;与人类临床表现及组织病理相似 Low cost; similar to human clinical manifestations and histopathology	药物溶解度低;死亡率高 Low drug solubility; high mortality rate	临床固有型、非特异型肝损伤研究 Study on clinical intrinsic and atypical liver injury
免疫性肝损伤 ^[6] Immune liver injury	实验前 8 h 尾静脉注射 Con A 20 mg/kg Tail vein injection of Con A 20 mg/kg, 8 h before the experiment	周期短;不需要提前致敏;对肝的损害具有特异性;与临床匹配性较好 Short cycle; no need to be sensitized in advance; damage to the liver is specific; good matching with clinic	操作具有一定难度;无法持续损伤肝细胞 Operation is difficult; unable to sustain liver cell damage	急性肝损伤的细胞免疫学机制研究 Study on cellular immunological mechanism of acute liver injury

在动物品系的选择上,ALI 动物模型的种类涉及鼠、犬、鸡、鱼、猴等^[26-29]。考虑到经济成本、操作便捷性,一般选用鼠类作为造模动物;同时研究发现,不同种属的动物对 APAP 的敏感性不同,其中小鼠的敏感性最高^[25,30],因此,小鼠更适合作为模型动物。雄鼠体内 CYP450 酶含量较雌鼠高 10%~30%^[31],而 CCl₄ 诱导肝损伤是经 CYP450 依赖性混合功能氧化酶的代谢而发生细胞膜过氧化反应引起的,因此雄鼠更适用于制备 ALI 模型。再综合动物的生理周期,选取雄性小鼠作为造模动物比较合适。

在各类 ALI 模型中,化学性肝损伤应用最广,其中使用 CCl₄ 制备化学性肝损伤的最多。在造模剂量的选择上,文献多选用腹腔注射 10.0 mL/kg 0.1% 的 CCl₄ 植物油溶液。黎旻等^[32] 针对 CCl₄ 制备化学性肝损伤的剂量进行了考察,结果发现当 CCl₄ 的浓度为 0.1% 时,既能体现肝损伤的程度,又能保证模型动物存活。CCl₄ 诱导肝损伤的机制为通过氧化应激反应引起炎症反应造成肝细胞损伤^[6],CCl₄ 经细胞色素酶 P450 代谢生成的产物一方面可诱导肝细胞膜脂质过氧化发生氧化应激,另一方面可直接攻击肝细胞线粒体,影响肝细胞代谢。同时 CCl₄ 代谢产物可通过一系列反应激活 NF- κ B 通路关键蛋白 NF- κ B p65 与肝细胞内特定 DNA 的结合,诱导肝细胞炎症^[21]。CCl₄ 制备的肝损伤与临床较为相似,且 CCl₄ 成本低,造模方式操作简单,能在较短时间内建立 ALI 模型。但 CCl₄ 毒性较大,特异性较低,对其他脏器也会造成损伤^[21],因此不适用于免疫机制等方面的研究^[5]。

酒精性肝损伤模型的建立是通过直接灌胃或腹腔注射乙醇完成的,在造模剂量的选择上,文献多选用灌服 12.0 mL/kg 50.0%~56.0% 的乙醇,在该剂量下,小鼠出现明显的醉酒反应,血清 ALT、AST 含量明显升高,HE 染色情况也提示造模成功^[15]。亦有文献通过腹腔注射的方式进行造模,但相较于腹腔注射,灌胃能更好模拟酒精性肝损伤的发病过程。在临床上,酗酒引起的疾病约占 5%^[33],肝是乙醇代谢的主要场所,乙醇代谢产物乙醛能诱导肝氧化应激,使线粒体和微管系统受损,线粒体功能损伤、内质网应激和免疫或炎症反应等引起肝损伤^[34]。乙醇诱导急性肝损伤的标志为肝细胞凋亡,乙醇通过 MAPK-p53 信号通路诱发细胞凋亡,造成肝细胞坏死。同时可以促进活性氧簇 ROS 的升

高,诱发氧化反应,促进炎症因子释放,最终损伤肝细胞^[5]。乙醇诱导急性肝损伤操作简单,易成模,且与临床发病过程较为一致。

药物性肝损伤主要通过对乙酰氨基酚(APAP)进行造模,文献统计结果显示,APAP 剂量使用最多的为 300 mg/kg。APAP 是临床上广泛应用的解热镇痛药,其过量使用也是急性肝损伤的最常见诱因^[35],Imani 等^[36] 对会造成药物性肝损伤的药品进行 meta 分析发现,APAP 这一类非甾体抗炎药即使是在正常使用剂量下,亦有 10% 的患者会产生不同程度的肝损伤。机体摄入过量 APAP 后,CYP2E1 将过量 APAP 氧化,代谢产生过量的 N-乙酰对苯醌亚胺与细胞蛋白中的巯基结合,同时耗尽供应的谷胱甘肽,致使线粒体功能障碍,最终导致肝细胞损伤^[6]。韩艳珍等^[25] 对制备药物性肝损伤的药物进行比较发现,APAP 制备的药物性肝损伤模型与临床吻合度最高。APAP 诱导的急性肝损伤与人类临床表现及组织病理相似,但该模型死亡率高、肝细胞坏死严重,因此在使用该模型进行抗肝损伤药物研究时,建议使用预防性给药方式。

免疫性肝损伤模型的建立主要通过静脉注射伴刀豆球蛋白(Con A)进行制备。文献分析结果显示,造模剂量选用最多的为尾静脉注射 20 mg/kg 的 Con A。单莹莹等^[37]、张炜等^[38]、刘悦晖等^[39] 对 Con A 诱导小鼠急性肝损伤的影响因素进行研究,均发现 20 mg/kg 的 Con A 给药组小鼠肝组织病理发生明显坏死,血清 ALT、AST 含量显著升高,且无小鼠死亡,是诱导急性肝损伤较为合适的剂量。Con A 对肝静脉窦具有较高的亲和力,可导致肝组织中 CD4⁺T 细胞、自然杀伤 T 细胞、库普弗细胞和中性粒细胞同时激活并浸润肝组织,产生大量炎症细胞因子和趋化因子^[40],造成急性肝损伤。Con A 诱导免疫性肝损伤操作简便、周期短,不需要提前致敏,对肝的损害具有特异性,能够较好的模拟临床病毒性肝炎所致的免疫性肝损伤。

检测指标方面,通过表观指标、肝组织病理、血清和肝组织生化、分子生物学等指标的检测,可有效评价 ALI 动物模型的成模情况。ALI 的表观指标仅对小鼠的日常活动情况和外观精神状态等进行了简单的观察。若能对其表观指标进行半定量分析^[41],可使表观指标成为更合理的成模依据。肝组织病理是判断 ALI 模型成功与否的重要标准,通过病理指标可看出肝组织纤维化、肝细胞坏死等病

变。关联最强的生化指标为 ALT-AST-SOD-MDA, 同时也是出现频次前四位的检测指标, 当肝细胞受到破坏, ALT 和 AST 将会被释放入血, 引起转氨酶升高, 因此, 在判定肝损伤时, 建议选用 ALT 和 AST 作为标志物^[42-43]。另外氧化应激产物 MDA、氧化酶 CAT、SOD、GSH-Px 及 GSH 等, 可以有效反应肝的氧化应激状态^[44-45]。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子可以评价肝的炎症情况^[46]。这些指标主要通过酶联免疫法(ELISA)测定, 操作简便, 可行性强, 可以有效评价急性肝损伤的程度。分子生物学指标主要检测了急性肝损伤相关通路蛋白和 mRNA 的表达, 目前急性肝损伤的发病机制研究多围绕氧化应激、炎症反应、细胞凋亡展开, 因此文献多选择与之相关的 NF- κ B、Nrf2、Keap、Caspase-1、MAPK、TLR4、NLRP3、ARE 通路进行研究^[17,46-47]。

综上, 本研究归纳整理了 ALI 动物模型的造模动物品系、造模方式、造模剂量、检测指标, 对各类 ALI 动物模型的造模方式进行了分类讨论。同时, 在归纳过程中也发现了部分问题: ①ALI 是指临床上病毒性肝炎、酒精性肝炎、免疫性肝炎、药物性肝炎等肝病所造成的肝损伤, 各类肝病发病因素有一定差异, 但在归纳文献时发现, 部分研究未对 ALI 进行具体的分类, 造成了几种类型肝损伤的界限模糊不清, 建议后续研究注重几种类型肝损伤的区分, 进一步体现精准医学, 开发具有针对性的药物。②ALI 与急性肝衰竭(ALF)的造模方法相同, 区别在于造模剂量^[48-50]。因此在造模时, 一定要谨防剂量过大, 避免 ALI 恶化为 ALF。然而目前 ALI 造模剂量的针对性研究较少, 建议后续加强该方面研究。③APAP 作为解热镇痛药诱导药物性肝损伤与临床上肝损伤相似度较高^[24], 但 APAP 溶解度较差^[51], 该特性对模型的制备造成了一定影响, 建议后续加强研究, 探索更良好的造模方式。④当前的 ALI 动物模型各方面均较为符合西医学的标准, 在制备中西医结合的动物模型方面稍有欠缺。仅有一篇文献制备了病证结合的急性肝损伤动物模型^[52]。其以乙醇引发小鼠肝胆湿热; 以高脂饲料灌胃小鼠引发血瘀; 又以猪血清激起小鼠免疫反应, 造成小鼠“本虚”, 形成肝郁脾虚证的急性肝损伤, 对体现中医证候的 ALI 模型的建立提供了思路。建议后续进一步开发类似模型, 为开发治疗 ALI 的中药、中成药等提供理论依据和参考。本研究针对现有各种造模方式的优、缺点进行了评价和比较, 并提出了

一些 ALI 模型现有问题和未来的研究思路, 以期对后续 ALI 机制的研究与新药的开发等提供参考。

参考文献:

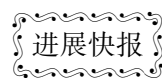
- [1] 杨毅, 陈德昌. 重症医学病理生理紊乱: 诊断与治疗临床思路 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2018.
YANG Y, CHEN D C. Pathophysiology in critical care, Perspective of diagnosis and treatment [M]. Shanghai: Shanghai Science & Technology Publishers, 2018.
- [2] FAN H, TU T, ZHANG X, et al. Sinomenine attenuates alcohol-induced acute liver injury via inhibiting oxidative stress, inflammation and apoptosis in mice [J]. Food Chem Toxicol, 2022, 159: 112759.
- [3] CHALASANI N P, HAYASHI P H, BONKOVSKY H L, et al. ACG Clinical Guideline: the diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury [J]. Am J Gastroenterol, 2014, 109(7): 950-966, quiz 967.
- [4] 李晓芸, 唐洁婷. 药物性肝损伤的流行病学 [J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(11): 2510-2514.
LI X Y, TANG J T. Epidemiology of drug-induced liver injury [J]. J Clin Hepatol, 2021, 37(11): 2510-2514.
- [5] 吕超, 石清兰, 覃倩, 等. 小鼠实验性肝损伤模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1): 107-113.
LYU C, SHI Q L, QIN Q, et al. A review of experimental liver injury models in mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(1): 107-113.
- [6] 方春秋, 张文军, 张景洲, 等. 常见肝损伤动物模型构建和应用的研究状况 [J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(3): 276-280.
FANG C Q, ZHANG W J, ZHANG J Z, et al. Research status of the construction and application of common liver injury animal models [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2022, 38(3): 276-280.
- [7] AL HUMAYED S, AL-HASHEM F, HAIDARA M A, et al. Resveratrol pretreatment ameliorates p53-bax axis and augments the survival biomarker B-cell lymphoma 2 modulated by paracetamol overdose in a rat model of acute liver injury [J]. Pharmacology, 2020, 105(1/2): 39-46.
- [8] YUAN R, TAO X, LIANG S, et al. Protective effect of acidic polysaccharide from *Schisandra chinensis* on acute ethanol-induced liver injury through reducing CYP2E1-dependent oxidative stress [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 99: 537-542.
- [9] 苗明三, 朱飞鹏. 常用医药研究动物模型 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
MAO M S, ZHU F P. Commonly used animal models for medical research [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007.
- [10] 谢丽琼, 李海芳, 迪里努尔. 小鼠中甘草毛状根、甘草切片总抗氧化能力和对 CCl₄ 致肝损伤保护的比较研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(23): 432-435.
XIE L Q, LI H F, DI L. Total antioxidant capacity and

- protective effect of extract from hairy roots of *Glycyrrhiza uralensis* fish on CCl₄-induced acute liver injury in mice [J]. Food Sci, 2009, 30(23): 432-435.
- [11] ZHENG Y, CUI B, SUN W, et al. Potential crosstalk between liver and extra-liver organs in mouse models of acute liver injury [J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(7): 1166-1179.
- [12] 唐波, 乔海泉, 孙学英, 等. 内毒素血症对部分肝切除大鼠的肝损伤机制探讨 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2008, 14(2): 108-111.
- TANG B, QIAO H Q, SUN X Y, et al. Acute liver injury induced by endotoxemia after partial hepatectomy in rats [J]. Chin J Hepatobiliary Surg, 2008, 14(2): 108-111.
- [13] 肖会敏, 何悦, 常琰, 等. 芎龙胶囊对伴刀豆蛋白致小鼠急性肝损伤的保护与机制研究 [J]. 西北药学杂志, 2020, 35(2): 220-223.
- XIAO H M, HE Y, CHANG Y, et al. Protective effect of Jiaolong Capsules on acute liver injury induced by concanavalin in mice and its mechanism [J]. Northwest Pharm J, 2020, 35(2): 220-223.
- [14] LU K, SHEN S, LUO O Y, et al. Manipulating PP2A α -ASK-JNK signaling to favor apoptotic over necroptotic hepatocyte fate reduces the extent of necrosis and fibrosis upon acute liver injury [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(11): 985.
- [15] 贾岚, 孟智睿, 魏益谦, 等. 金昭胶囊对急性酒精性肝损伤小鼠的保护作用 [J]. 世界中医药, 2022, 17(11): 1578-1583.
- JIA L, MENG Z R, WEI Y Q, et al. Protective effect of Jinzhao capsules on acute alcoholic liver injury in mice [J]. World Chin Med, 2022, 17(11): 1578-1583.
- [16] CHAO X, WANG S, ZHAO K, et al. Impaired TFEB-mediated lysosome biogenesis and autophagy promote chronic ethanol-induced liver injury and steatosis in mice [J]. Gastroenterology, 2018, 155(3): 865-879. e12.
- [17] 鲁荣华, 杨群, 赵玲. 金银花提取物通过激活 Nrf2 通路对急性肝损伤模型大鼠肝功能的保护作用 [J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(19): 4811-4815.
- LU R H, YANG Q, ZHAO L. Protective effect of honeysuckle extract on liver function in rats with acute liver injury by activating Nrf2 pathway [J]. Chin J Gerontol, 2022, 42(19): 4811-4815.
- [18] 白阳秋, 罗晓英, 李修岭, 等. 雷帕霉素介导 P53 选择性自噬对急性肝损伤和肝纤维化大鼠的干预作用 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2022, 36(10): 1006-1011.
- BAI Y Q, LUO X Y, LI X L, et al. Intervention of rapamycin in acute liver injury and fibrosis rats by mediating P53 selective autophagy [J]. J Chin Pract Diagn Ther, 2022, 36(10): 1006-1011.
- [19] LI Y, YU P, FU W, et al. Ginsenoside rd inhibited ferroptosis to alleviate CCl₄-induced acute liver injury in mice via cGAS/STING pathway [J]. Am J Chin Med, 2023, 51(1): 91-105.
- [20] 廖月, 何毅怀, 罗亚文. 氧化应激在急性肝损伤中的作用 [J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(10): 2402-2407.
- LIAO Y, HE Y H, LUO Y W. Role of oxidative stress in acute liver injury [J]. J Clin Hepatol, 2022, 38(10): 2402-2407.
- [21] 王雨欣, 王倩, 田颖. 不同化学物质建立肝损伤动物模型的作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 109-114.
- WANG Y X, WANG Q, TIAN Y. Mechanisms of chemicals in establishing animal models of liver injury [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 109-114.
- [22] HAYASHI P H, ROCKEY D C, FONTANA R J, et al. Death and liver transplantation within 2 years of onset of drug-induced liver injury [J]. Hepatology, 2017, 66(4): 1275-1285.
- [23] 储兰兰, 许猛, 王妍, 等. 小鼠急性酒精性肝损伤模型氧化损伤指标的动态监测 [J]. 现代预防医学, 2017, 44(14): 2605-2608, 2622.
- CHU L L, XU M, WANG Y, et al. Dynamic monitoring of alcohol-induced acute liver injury model in male mice [J]. Mod Prev Med, 2017, 44(14): 2605-2608, 2622.
- [24] 王雁, 汤纳平, 富欣, 等. 对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤大鼠血浆 miR-122 表达的变化 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(5): 854-859.
- WANG Y, TANG N P, FU X, et al. Changes in miR-122 expression in plasma of rats with acute liver injury induced by acetaminophen [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2013, 27(5): 854-859.
- [25] 韩艳珍, 白明, 邱广楠, 等. 基于中、西医临床病症特点的药物性肝损伤动物模型分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(12): 1833-1838.
- HAN Y Z, BAI M, QIU G N, et al. Animal model analysis of drug-induced liver injury based on the characteristics of clinical diseases in traditional Chinese and western medicine [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2021, 32(12): 1833-1838.
- [26] 张文涛, 吴尚文, 黄卫宣, 等. 食蟹猴 CCl₄ 急性肝损伤模型建立及藤茶总黄酮对其保护作用研究 [J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(5): 861-865.
- ZHANG W T, WU S W, HUANG W X, et al. Establishment of acute liver injury model induced by CCl₄ in *Macaca fascicularis* and study the protective effect of total flavone of *Ampelopsis Grossedentata* on this model [J]. J Guangxi Med Univ, 2020, 37(5): 861-865.
- [27] 李紫元, 莫蓝, 肖洁怡, 等. 恩诺沙星诱导鸡急性肝损伤模型的建立 [J]. 动物医学进展, 2019, 40(11): 73-76.
- LI Z Y, MO L, XIAO J Y, et al. Establishment of enrofloxacin induced acute liver injury model in chickens [J]. Prog Vet Med, 2019, 40(11): 73-76.
- [28] 喻运珍, 余少梅, 熊文静, 等. 姜黄素对草鱼急性肝损伤的保护作用研究 [J]. 湖北农业科学, 2016, 55(6): 1514-1517.
- YU Y Z, YU S M, XIONG W J, et al. The protective effect of curcumin in acute hepatic injured *Ctenopharyngodon idellus* [J]. Hubei Agric Sci, 2016, 55(6): 1514-1517.
- [29] 徐伟, 宋倩倩, 苗双, 等. 青蒿素对 CCl₄ 致犬急性肝损伤模型抗氧化指标的时效影响 [J]. 兽药与饲料添加剂, 2009,

- 14(4): 1-3.
- XU W, SONG Q Q, MIAO S, et al. Time-effect of artemisinin on antioxidant indexes of acute liver injury model induced by CCl₄ in dogs [J]. Vet Pharm Feed Addit, 2009, 14(4): 1-3.
- [30] DAVIS D C, POTTER W Z, JOLLOW D J, et al. Species differences in hepatic glutathione depletion, covalent binding and hepatic necrosis after acetaminophen [J]. Life Sci, 1974, 14(11): 2099-2109.
- [31] 邹文, 周文. 药物代谢的种属和性别差异研究 [J]. 齐鲁药事, 2007, 26(12): 735-737.
- ZOU W, ZHOU W. Research progress on species and gender differences of drug metabolism [J]. Qilu Pharm Aff, 2007, 26(12): 735-737.
- [32] 黎晓, 李瑾翡, 蒋忠军, 等. CCl₄ 致小鼠急性肝损伤模型的研究 [J]. 热带医学杂志, 2010, 10(6): 657-659.
- LI Y, LI J F, JIANG Z J, et al. Acute hepatic injury caused by carbon tetrachloride [J]. J Trop Med, 2010, 10(6): 657-659.
- [33] NAMACHIVAYAM A, VALSALA GOPALAKRISHNAN A. A review on molecular mechanism of alcoholic liver disease [J]. Life Sci, 2021, 274: 119328.
- [34] 王奎淞, 赵鲲鹏, 张秋菊. 常用肝纤维化实验动物模型研究进展 [J]. 解放军医药杂志, 2021, 33(11): 113-116.
- WANG K S, ZHAO K P, ZHANG Q J. Research progress of common experimental animal models of liver fibrosis [J]. Med Pharm J Chin People's Liberation Army, 2021, 33(11): 113-116.
- [35] CHAO X, WANG H, JAESCHKE H, et al. Role and mechanisms of autophagy in acetaminophen-induced liver injury [J]. Liver Int, 2018, 38(8): 1363-1374.
- [36] IMANI F, MOTAVAF M, SAFARI S, et al. The therapeutic use of analgesics in patients with liver cirrhosis: a literature review and evidence-based recommendations [J]. Hepat Mon, 2014, 14(10): e23539.
- [37] 单莹莹, 王佳烨, 王晓丽, 等. Con A 建立小鼠急性免疫性肝损伤模型研究 [J]. 北华大学学报(自然科学版), 2019, 20(1): 55-58.
- SHAN Y Y, WANG J Y, WANG X L, et al. Con A on establishing acute immunological liver injury model in mice [J]. J Beihua Univ Nat Sci, 2019, 20(1): 55-58.
- [38] 张伟, 陈明, 傅涓涓. 不同剂量刀豆蛋白 A 诱导 Balb/c 小鼠肝纤维化的量效关系 [J]. 徐州医学院学报, 2007, 27(6): 375-378.
- ZHANG W, CHEN M, FU J J. A study on the dose-effect relationship between the dosage of concanavalin A and hepatic fibrosis in Balb/c mice [J]. Acta Acad Med Xuzhou, 2007, 27(6): 375-378.
- [39] 刘悦晖, 范学工, 李宁, 等. 刀豆球蛋白 A 所致实验性肝损伤模型的构建 [J]. 中国感染控制杂志, 2008, 7(5): 297-301.
- LIU Y H, FAN X G, LI N, et al. Development of the model about concanavalin A-induced experimental liver injury in mice [J]. Chin J Infect Contr, 2008, 7(5): 297-301.
- [40] 郝健亨, 李振城, 刘莹, 等. 差异表达 microRNA 参与刀豆蛋白 A 诱导的自身免疫性肝炎小鼠模型肝损伤的功能分析 [J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(6): 1360-1367.
- HAO J H, LI Z C, LIU Y, et al. A functional analysis of differentially expressed microRNAs involved in liver injury in mice with autoimmune hepatitis induced by concanavalin A [J]. J Clin Hepatol, 2021, 37(6): 1360-1367.
- [41] 梁雪丹, 林传权, 曾信平, 等. 基于体征半定量指标评价的利血平致脾气虚大鼠模型的研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(1): 26-32.
- LIANG X D, LIN C Q, ZENG X P, et al. Evaluation of spleen-qi-deficiency rat model induced by reserpine based on semiquantification of physical signs [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2019, 30(1): 26-32.
- [42] 付双楠, 高达, 郭佳佳, 等. 四氯化碳致小鼠急性肝损伤模型建立与考察 [J]. 肝脏, 2022, 27(9): 1036-1040.
- FU S N, GAO D, GUO J J, et al. Establishment and investigation of carbon tetrachloride-induced acute liver injury model in mice [J]. Chin Hepatol, 2022, 27(9): 1036-1040.
- [43] THANEBAL S A P, VUN-SANG S, IQBAL M. Hepatoprotective effects of *Pandanus amaryllifolius* against carbon tetrachloride (CCl₄) induced toxicity: a biochemical and histopathological study [J]. Arab J Chem, 2021, 14(10): 103390.
- [44] RUA R M, OJEDA M L, NOGALES F, et al. Serum selenium levels and oxidative balance as differential markers in hepatic damage caused by alcohol [J]. Life Sci, 2014, 94(2): 158-163.
- [45] 杨柳, 王文地, 马允, 等. 急性酒精性肝损伤模型的考察及验证 [J]. 西北药学杂志, 2020, 35(3): 391-396.
- YANG L, WANG W D, MA Y, et al. Investigation and verification of acute alcoholic liver injury model [J]. Northwest Pharm J, 2020, 35(3): 391-396.
- [46] 刘雨冬, 刘俊泽, 冀国鑫, 等. 基于 NF-κB/NLRP3 信号通路探讨栀子豉汤对酒精性肝损伤的保护作用 [J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(22): 7446-7453.
- LIU Y D, LIU J Z, JI G X, et al. Protective effect of Zhi-zi-Chi Decoction on alcoholic liver injury based on NF-κB/NLRP3 signaling pathway [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(22): 7446-7453.
- [47] 赵若玮, 张庆, 朱铭星, 等. 八宝丹通过抑制 NLRP3/Caspase-1 通路减轻对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5): 122-128.
- ZHAO R W, ZHANG Q, ZHU M X, et al. Babaodan alleviates APAP-induced acute liver injury in mice by inhibiting NLRP3/caspase-1 pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(5): 122-128.
- [48] 王欢, 乌恩其. 蒙药祛“热”凉性方剂给旺-9 对四氯化碳诱导大鼠急性肝衰竭的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 238-241.
- WANG H, WU E Q. Effect of Mongolian medicine GEI Wang-9 with cool nature and removing heat on acute liver failure induced by carbon tetrachloride [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae,

- 2013, 19(8): 238-241.
- [49] 张荣臻, 吕超, 石清兰, 等. 急性肝衰竭大鼠模型构建实验研究 [J]. 陕西医学杂志, 2021, 50(3): 268-271.
- ZHANG R Z, LYU C, SHI Q L, et al. Construction of rat model of acute liver failure [J]. Shaanxi Med J, 2021, 50(3): 268-271.
- [50] 龙富立, 林镛, 彭子明, 等. 急性肝衰竭动物模型的研究进展 [J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(1): 204-208.
- LONG F L, LIN Y, PENG Z M, et al. Research advances in animal models of acute liver failure [J]. J Clin Hepatol, 2021, 37(1): 204-208.
- [51] QIAN H, BAI Q, YANG X, et al. Dual roles of p62/SQSTM1 in the injury and recovery phases of acetaminophen-induced liver injury in mice [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(12): 3791-3805.
- [52] 黄娜娜, 孙晓倩, 杨倩, 等. 大鼠急性肝损伤(肝郁脾虚证)病证结合模型的研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(23): 4400-4407.
- HUANG N N, SUN X Q, YANG Q, et al. Research on rat models of acute liver injury with syndrome of liver depression and spleen deficiency [J]. China J Chin Mater Med, 2016, 41(23): 4400-4407.

[收稿日期]2023-04-21



图像引导放射治疗小鼠原位肝癌模型的建立

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上第七大常见癌症,占原发性肝癌病例的 75%~85%。目前,由于最近的技术发展,放射疗法被认为是 HCC 有效的治疗选择。然而,对于 HCC 的分次方法、分次剂量、放射疗法与其他疗法的组合或治疗时间表,尚未达成一致,HCC 放疗也没有标准方案。因此,需要一个稳定的临床前模型来促进相关的临床研究。本研究在小动物治疗前和治疗期间,采用 X-RADSmART 小动物图像引导放射治疗系统。该系统能够根据器官位置的变化修改治疗条件,使照射区域与目标区域非常相似,从而提高治疗的准确性。其益处在于可以使用三维 CT 成像精确评估体内肿瘤的位置、形状和大小。使用这些信息,可以创建精确的放射治疗计划,允许 X 射线靶向肿瘤的位置并从各个角度进行照射。总的来说,这项研究为基于放射治疗的 HCC 综合治疗领域提供了可靠的建模技术。通过注射建立了原位 HCC 小鼠模型,利用 MRI 技术模拟 HCC 的临床诊断,进行精确放射治疗以确定肿瘤的位置,然后用小动物精密 X 射线机结合 CT 勾画和治疗靶区,并通过治疗后分析肿瘤大小和肿瘤组织内的凋亡来证实治疗的有效性。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2023, 6(5): 419-426. <https://doi.org/10.1002/ame2.12335>)。

何洋,章秀林,张秋宇,等. 实验用鹌鹑遗传检测方法的初步建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 101-107.

He Y, Zhang XL, Zhang QY, et al. Establishment of a genetic monitoring method for laboratory quails [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 101-107.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.012

实验用鹌鹑遗传检测方法的初步建立

何 洋^{1,2}, 章秀林^{2,3}, 张秋宇², 张晓璐², 傅 博², 王文栋², 杜小燕²,
陈振文², 李长龙^{2*}

(1.大连医科大学护理学院,辽宁 大连 116044;2.首都医科大学基础医学院,北京 100069;
3.中国医学科学院阜外医院,北京 100037)

【摘要】 目的 建立封闭群实验用鹌鹑微卫星 DNA 遗传检测方法。**方法** 通过文献检索,筛选鹌鹑微卫星位点,利用种间转移法,在鹌鹑近缘物种—鸡和鸭筛选适合鹌鹑的微卫星 DNA 位点。提取鹌鹑肝组织 DNA 作为模板,并通过 PCR 扩增以及琼脂糖凝胶电泳技术,对相应的位点进行筛选。最后根据所选微卫星位点扩增情况、等位基因数目和多态性等,筛选出适用于鹌鹑遗传质量检测的微卫星位点组合并建立检测方法。**结果** 初步确定适用于封闭群实验用鹌鹑遗传检测的 23 个微卫星位点组合。**结论** 初步建立了实验用鹌鹑的遗传质量检测方法。

【关键词】 实验用鹌鹑;遗传检测方法;微卫星;封闭群

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0101-07

Establishment of a genetic monitoring method for laboratory quails

HE Yang^{1,2}, ZHANG Xiulin^{2,3}, ZHANG Qiuyu², ZHANG Xiaolu², FU Bo², WANG Wendong², DU Xiaoyan²,
CHEN Zhenwen², LI Changlong^{2*}

(1. School of Nursing, Dalian Medical University, Dalian 116044, China. 2. Capital Medical University School of Basic Medical Sciences, Beijing 100069. 3. Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037)

【Abstract】 Objective To establish a genetic monitoring method for laboratory quails. **Methods** Quail microsatellite loci were searched in the literature, and microsatellite DNA loci suitable for quails were screened by an interspecific transfer method in closely related species, namely chickens and ducks. Quail liver DNA was extracted as a template, and the corresponding loci were screened by PCR amplification and agarose gel electrophoresis. On the basis of amplification of the selected microsatellite loci, the number of alleles, polymorphisms, and microsatellite loci combinations for quail genetic quality detection were selected and detection method were developed. **Results** We preliminary determined 23 microsatellite loci for genetic monitoring of closed-colony laboratory quails. **Conclusions** A genetic monitoring method for laboratory quails was preliminary developed.

【Keywords】 laboratory quails; genetic monitoring method; microsatellite; closed colony

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

实验动物是生命科学研究和生物医药产业重要的实验材料。随着科学水平的升高及科研的发展,科研人员提高了对于实验动物的质量要求。实

验动物质量包括微生物质量和遗传质量,实验动物遗传质量作为保证实验结果均一性和准确性的重要因素^[1],其检测可作为有效手段以评价实验动物

【基金项目】 国家重点研发计划(2022YFF0711005,2021YFF0703200);国家自然科学基金(32070537);北京市自然科学基金-北京市教育委员会重点项目(KZ20210025037)。

【作者简介】 何洋(1993—),女,博士,讲师,研究方向:医学遗传学。E-mail:595272181@qq.com

【通信作者】 李长龙(1976—),男,博士,副教授,副研究员,研究方向:实验动物资源开发及遗传与发育研究。E-mail:licl@ccmu.edu.cn

遗传质量。遗传质量检测的方法有多种,微卫星标记技术是一项可靠且便于应用的技术。

近年来,鹌鹑作为一种实验用动物,被广泛应用于生命科学和生物医学等领域的科学研究中^[2-5],并且实验动物学价值较高且极具潜力。尽管如此,国内还没有实验用鹌鹑相关质量控制标准,给实验动物法制化、规范化和标准化管理造成重要的影响。遗传质量是实验动物质量控制的重要内容。但是由于遗传因素对试验结果的影响具有隐蔽性和滞后性,在实验前和实验中很难发现,对实验结果影响更为严重。目前,实验用鹌鹑的遗传分析方法尚不成熟,缺少遗传标准和遗传检测方法的研究,使得实验用鹌鹑的遗传质量没有统一的控制标准,影响了实验用鹌鹑在医学研究及实验中结果的准确性和稳定性^[2]。

微卫星 DNA (microsatellite DNA) 具有丰富的多态性,等位基因代间传递符合孟德尔遗传规律,呈共显性遗传,并且具有重复性好、简便、快速的特点^[6]。微卫星 DNA 遗传标记检测法已经在大小鼠^[7-8]、长爪沙鼠^[9-10]、鸡^[11]、猪^[12]、山羊^[13]等实验动物质量控制方面有良好的应用。

在微卫星 DNA 位点的选择方面,由于研究报道较少,没有相关的鹌鹑的微卫星位点可供参考。因此,我们利用种间转移法,从亲缘关系较近的物种筛选用于鹌鹑微卫星位点^[14],通过检索相关文献的已知鸡、鸭的微卫星位点,对鹌鹑的基因组 DNA 进行 PCR 扩增、琼脂糖电泳和测序技术筛选位点,并根据位点的扩增情况、等位基因数目及基因的多态性等方面挑选出适用于建立鹌鹑遗传检测的微卫星位点组合,建立实验用鹌鹑的遗传质量检测技术,为实验用鹌鹑的遗传质量标准和法制化管理奠定技术基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验选用朝鲜龙城和迪法克 2 个封闭群鹌鹑群体,购自北京德岭鹌鹑养殖场。朝鲜龙城和迪法克在 1994 年引种自北京种禽公司,群体内采用全随机交配方式繁殖。随机抽取 2 个封闭群内 3 代内非近亲的个体各 40 只,45 日龄,雌雄各半,朝鲜龙城鹌鹑样本体重 (150±10) g,迪法克鹌鹑样本体重 (240±10) g。动物由养殖场屠宰加工,实验所取肝样本于 -20 ℃ 低温保存。本课题动物实验经首都医科大

学动物实验及实验动物福利委员会批准 (AEEI-2023-162),所有实验做到实验动物 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

6×Loading Buffer (9156, Takara, 大连宝生物工程有限公司); 50 bp DNA marker (3590A, Takara, 大连宝生物工程有限公司); Tris-饱和酚 (T0250, 北京索莱宝科技有限公司); 蛋白酶 K (P9460, 北京索莱宝科技有限公司); 细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。微量分光光度计 (Nanodrop, 美国); 核酸凝胶成像系统 (Gel Doc™ XR+, 美国 Bio-rad 公司); PCR-30 型核酸电泳仪 (美国 Bio-rad 公司); PCR 扩增仪 (ALS1296 型, 美国 Bio-rad 公司); DreamTaq Green PCR Master Mix (K1081, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 微卫星及荧光标记微卫星引物、STR 扫描由北京天一辉远生物科技有限公司完成。

1.3 实验方法

1.3.1 鹌鹑微卫星位点的检索

本研究利用前期筛选和本实验室获得的已知鸡、鸭的微卫星位点^[11,14],随机挑选出 100 个位点以供筛选。

1.3.2 鹌鹑肝组织样本 DNA 的提取

鹌鹑肝组织样本 DNA 的提取采用细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒进行,基因组 DNA 浓度和纯度的监测通过微量分光光度计和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行,使用双蒸水 (ddH₂O) 稀释所有 DNA 样本至浓度为 50 ng/μL,然后置于 -20 ℃ 冰箱保存。

1.3.3 用 PCR 技术和琼脂糖凝胶电泳进行位点的初筛

本实验所选位点的 PCR 扩增采用 20 μL 反应体系,包括 1 μL 的基因组 DNA 样品 (50 ng/μL),各 1 μL 的上游引物 (10 μmol/μL) 和下游引物 (10 μmol/μL), 10 μL Mix, 补充 7 μL ddH₂O。PCR 反应程序设定为 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 30 s, 退火 30 s (扩增时采用梯度退火温度), 72 ℃ 延伸 30 s, 循环 30 次, 72 ℃ 继续延伸 7 min; 扩增后,将产物于 4 ℃ 冰箱保存。所筛选的微卫星位点 PCR 扩增的引物序列及退火温度,参考已知鸡、鸭的微卫星位点的引物序列及退火温度。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,每孔加样 5 μL,调节电压为 130 V,时间为 70 min,拍照成像。根据电泳结果,筛选出能够成功扩增且条带较为清晰、无非特异性扩增的位点 34 个。

1.3.4 基因组池法筛选微卫星位点并凝练位点组合

将每个鹌鹑样品基因组 DNA 样品分别稀释到 50~100 ng/ μ L 后,将 2 个种群各 40 个个体样本的基因组 DNA 样品混合为 DNA 池。

琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,配制 2% 琼脂糖凝胶,取扩增产物加样,设定电泳条件为电压 5 V/cm,时间 30 min,并用凝胶成像仪器进行图像采集和分析。2 个封闭群中筛选出 23 个扩增效率高、特异性较好的微卫星位点保留。

1.3.5 荧光引物扩增与 STR 扫描

将筛选出的扩增效率高、特异性较好的 23 个微卫星位点重新合成荧光标记引物,分别标记为 FAM、HEX、TAMRA,荧光标记位于上游引物 5' 端。

荧光引物扩增采用 20 μ L 反应体系,PCR 反应条件遵循最终确定的优化条件,将 PCR 扩增产物用 STR 扫描仪进行扫描,3 个微卫星位点可同时一次扫描,且 3 个位点分别用 FAM、HEX、TAMRA 进行标记,每组 3 个位点片段大小间差异度应尽量大于 50 bp。为进行 STR 扫描,将每个样品 3 种荧光标记扩增产物各抽取 1 μ L 混合,再吸取每个混合样品 1 μ L。

1.3.6 STR 扫描结果的统计分析

在 Gene Marker 软件导入最终的扫描,读出并记录扫描波峰扩增产物的大小及数值。每个微卫星位点的等位基因按片段长度大小排列并分别记录为 A、B、C、D、E、F 等,之后每个样品的基因型分别用 AA、BB、CC、AB、BC 等字母组合来记录。分析出现的波形:只有一个主波,说明样本为纯合基因型,若有两个或两个以上主波,说明样本为杂和基因型。

1.4 统计学方法

将从 STR 扫描得到的信息转换为 popgene 3.2、PIC_CALC 软件所需格式并进一步计算观测等位基因数、有效等位基因数、香农指数、有效杂合度和多态性信息含量等信息。

2 结果

2.1 鹌鹑微卫星位点的 PCR 初筛

将从鸡和鸭的微卫星位点中筛选的 100 个微卫星位点,使用鹌鹑肝样品的基因组 DNA 进行 PCR 扩增后,经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,根据扩增结果初步筛选出微卫星位点 34 个。电泳结果如图 1A~1G 所示。

然后使用 2 个封闭群鹌鹑的 DNA 池进行 PCR 扩增,根据扩增结果,选择多态性较高的微卫星位点(即电泳条带较宽,或者电泳结果显示有 2 条或以上主要条带的位点,如图 1H~1K 所示),最终挑选出 23 个微卫星位点。

2.2 鹌鹑 23 个微卫星位点 STR 扫描分析

采用 STR 扫描分析琼脂糖凝胶电泳筛选获得的 23 个微卫星位点,并在 Gene Marker 软件中导入最终扫描结果,读出波峰处的扩增产物长度并记录。每个微卫星位点分析结果详见表 1。将波峰形状异常或等位基因较少的位点排除,最终确定 23 个位点用于封闭群遗传检测。

以 CAUD010 位点为例(图 2),在朝鲜龙城群体 1 号 DNA 样本表现为 243 bp 片段,为纯合子;在迪法克群体 2 号 DNA 样本中表现为 241 bp 片段和 243 bp 片段,为杂合子。

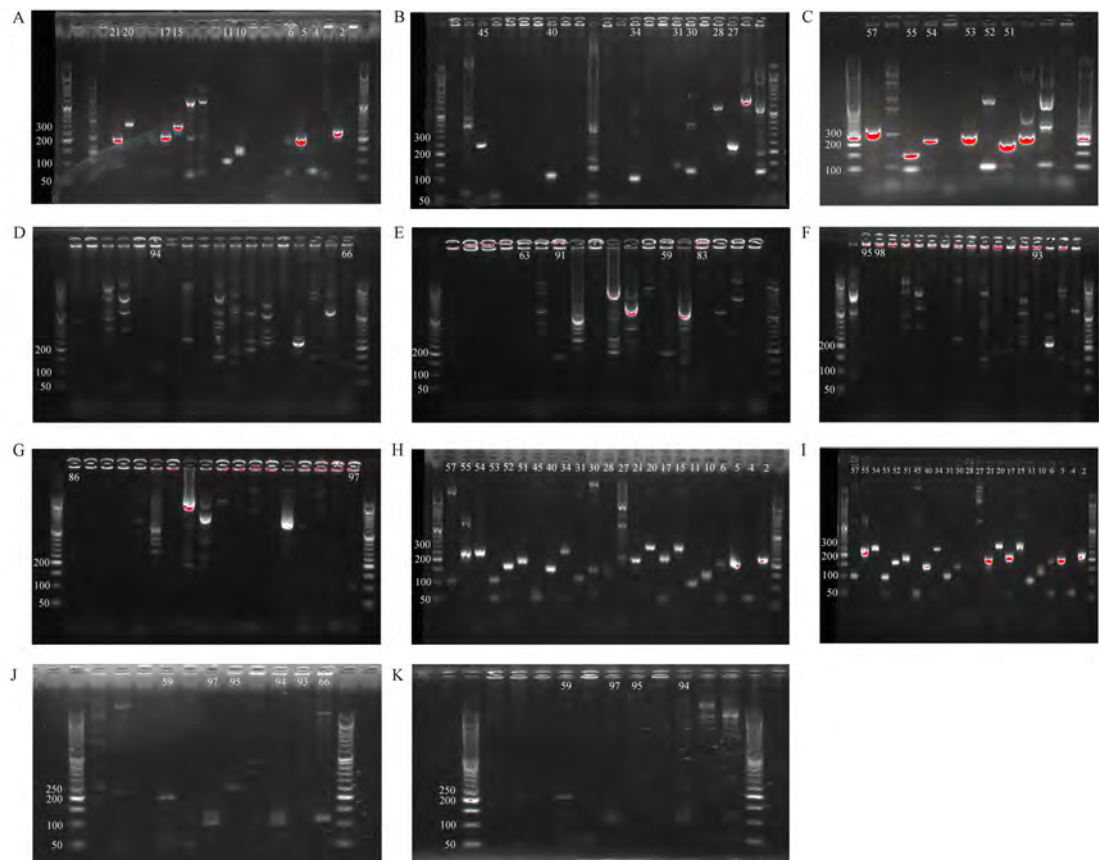
2.3 群体遗传分析

2.3.1 群体位点分析

在 popgene 3.2 软件中导入经 STR 扫描分析确定的实验用鹌鹑的位点信息,分析实验用鹌鹑样品在所筛选的 23 个位点上的观测等位基因数、有效等位基因数、香农指数及有效杂合度。在朝鲜龙城和迪法克鹌鹑 2 个种群中,23 个微卫星位点平均观测等位基因数为 9.87 个,均表现出高度多态性,其中观测等位基因数最高的位点是 APH09,为 20 个,观测等位基因数最低的位点是 AY314、ADL298 和 GGVITC,均为 6 个;平均有效等位基因数为 6.26 个,其中有效等位基因数最高的位点是 APH09,为 9.96 个,有效等位基因数最低的位点为 AY314,为 3.09 个;平均香农指数为 1.97,其中香农指数最高的位点是 APH09,为 2.59,香农指数最低的位点是 AY314,为 1.36,表明在封闭群中,所筛选的 23 个位点的遗传多样性差别均较大,遗传多样性较好;平均有效杂合度为 0.83,有效杂合度最高的位点是 APH09,为 0.91,有效杂合度最低的位点是 ADL298,为 0.71,表明群体中杂合度差异较大。具体信息详见表 2。

2.3.2 群体遗传结构分析

群体分析结果显示,朝鲜龙城和迪法克鹌鹑群体的平均观测等位基因数分别为 8.04 和 9.83;平均有效等位基因数分别为 5.49 和 5.95;平均香农指数分别为 1.79 和 1.96;平均有效杂合度分别为 0.81 和 0.83。

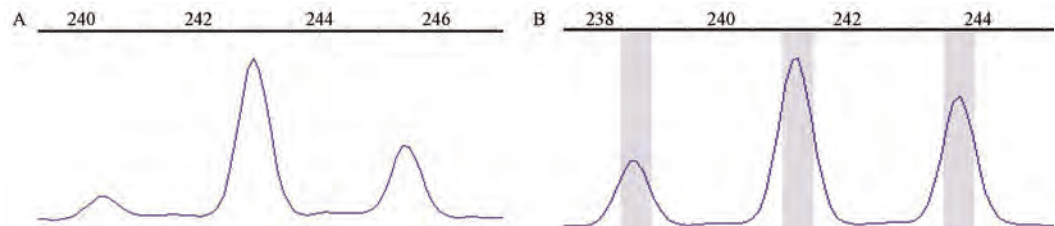


注:A~C:鹌鹑的鸡亲缘微卫星位点 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果;D~E:鹌鹑的鸭亲缘微卫星位点第 1 次 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果;F~G:鹌鹑的鸭亲缘微卫星位点第 2 次 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果;H:利用鸡微卫星位点,以朝鲜龙城鹌鹑 DNA 池为模板进行 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果;I:利用鸡微卫星位点,以迪法克鹌鹑 DNA 池为模板进行 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果;J:利用鸭微卫星位点,以朝鲜龙城鹌鹑 DNA 池为模板进行 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果;K:利用鸭微卫星位点,以迪法克鹌鹑 DNA 池为模板进行 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果。

图 1 鹌鹑微卫星位点的 PCR 初筛结果

Note. A~C, PCR amplification products' agarose gel electrophoresis results of microsatellite loci of chicken relatives of quail. D~E, First PCR amplification products' agarose gel electrophoresis results of microsatellite loci of duck relatives of quail. F~G, Second PCR amplification products' agarose gel electrophoresis results of microsatellite loci of duck relatives of quail. H, Agarose gel electrophoresis results of PCR amplification products using the DNA pool of Korean quail on microsatellite sites of chickens. I, Agarose gel electrophoresis results of PCR amplification products using the DNA pool of Difak quail on microsatellite sites of chickens. J, Agarose gel electrophoresis results of PCR amplification products using the DNA pool of Korean quail on microsatellite sites of ducks. K, Agarose gel electrophoresis results of PCR amplification products using the DNA pool of Difak quail on microsatellite sites of ducks.

Figure 1 PCR screening results of quail microsatellite loci



注:A:CAUD010 位点在朝鲜龙城群体 1 号 DNA 样本中表现为 243 片段,纯合子;B:CAUD010 位点在迪法克群体 2 号 DNA 样本中表现为 241 bp 片段和 243 bp 片段,杂合子。

图 2 CAUD010 位点 STR 检测结果示例

Note. A, CAUD010 locus appears as a 243 bp fragment, homozygous, in the DNA sample of Korea quail-1. B, CAUD010 locus is expressed as a 241 bp fragment and a 243 bp fragment, heterozygous, in the DNA sample of Difak quail-2.

Figure 2 Result of loci CAUD010 in STR scanning

表 1 23 个鹌鹑微卫星位点 STR 扫描结果统计

Table 1 Statistics of STR scanning results of 23 quail microsatellite loci

序号 No.	位点 Loci	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	等位基因数目/ <i>n</i> Allele number	等位基因范围/bp Allele range
2	MCW0330	TGGACCTCATCACTCTGACAG AATGTTCTCATAGAGTTCCTGC	9	330~348
4	ADL166	TGCCAGCCCGTAATCATAGG AAGCACACGACCCAATCTA	7	211~223
5	LEI0094	CAGGATGGCTGTTATGCTTCCA CACAGTGCAGAGTGGTGCCA	16	318~446
6	MCW0014	AAAATATTGGCTCTAGGAACGTGC ACCGGAAATGAAGGTAAGACTAGC	15	283~331
10	ADL0292	CCAAATCAGGCAAACTTCT AAATGGCCTAAGGATGAGGA	13	151~243
11	ADL0293	GTAATCTAGAAACCCCATCT ACATACCGCAGCTTTTGTTT	12	427~449
15	LEI0074	GACCTGCTCCTGACATGGGTG GTTTGCTGATTAGCCATCGCG	10	359~383
17	LEI0141	CGCATTTGATGCATAACACATG AAGGCAAACCTACGCTGGAACG	7	151~163
20	MCW0087	ATTTCTGCAGCCAACCTGGAG CTCAGGCAGTTCTCAAGAACA	10	336~354
28	MCW0402	ACTGTGCCTAGGACTAGCTG CCTAAGTCTGGGCTCTTCTG	10	289~329
30	ADL298	CAAGGCTGGGATTGATGAAA TGGCGTGTGGGTTTACAAAA	7	104~120
34	ADL328	CACCCATAGCTGTGACTTTG AAAACCGGAATGTGTAACGT	11	220~240
45	STMSGGHU2-1A	CTTAATATGTGTGAGGTGGC GTTCTCACAATTGCATTAGC	12	399~421
52	GGMYC *	GAGCTACGGACGCTCCTTTG GAGTACTGCGAGCCGGAGCT	12	318~340
53	GGMYC	CGAGGCGCTCTGCGAGTTTA TGGGGACCTCTGGCTCTGAC	15	174~246
54	GGVTHIG	GGCAGGTTTCTAATGCCTGA CCCATCGTTTCAACTGTATG	9	277~293
55	GGVITC	AGCCATCATTCAGGGCATCT GATGTCCTGAGTGATGCTCA	6	92~102
59	CAUD002	CTTCGGTGCCTGTCTTAGC AGCTGCCTGGAGAAGGTCT	11	236~256
66	CAUD010	GGATGTGTTTTTCATTATTGAT AGAGGCATAAACTACTCAGTG	8	237~251
93	AY314	CTCATTCCAATTCCTCTGTA CAGCATTATTATTTCAGAAGG	6	106~116
94	CMO211	GGATGTTGCCCCACATATTT TTGCCTTGTTTATGAGCCATT	7	158~170
95	CMO212	CTCCACTAGAACACAGACATT CATCTTTGGCATTTTGAAG	13	374~398
97	APH09	GGATGTTGCCCCACATATTT TTGCCTTGTTTATGAGCCATT	20	303~389

表 2 实验用鹌鹑样品的遗传参数

Table 2 Genetic parameters of experimental quail samples

序号 No.	位点 Loci	等位基因数目 Allele number	有效等位基因数目 Effective number of alleles	平均杂合度 Average heterozygosity	香农指数 Shannon's index	多态性信息含量 PIC
1	CAUD002	9	5.9410	0.8370	1.9415	0.7979
2	CAUD010	10	5.3024	0.8165	1.7997	0.7590
3	AY314	6	3.0918	0.6766	1.3560	0.5538
4	CMO211	7	4.1783	0.7656	1.6268	0.6886
5	CMO212	10	7.3209	0.8693	2.1259	0.8419
6	APH09	20	9.9560	0.9056	2.5948	0.8478
7	MCW0330	8	5.7280	0.8310	1.8842	0.7936
8	ADL166	7	4.5134	0.7835	1.6989	0.6967
9	LEI0094	15	9.2169	0.8915	2.4109	0.8517
10	MCW0014	14	7.3858	0.8701	2.2995	0.8513

续表2

序号 No.	位点 Loci	等位基因数目 Allele number	有效等位基因数目 Effective number of alleles	平均杂合度 Average heterozygosity	香农指数 Shannon's index	多态性信息含量 PIC
11	ADL0292	10	7. 1185	0. 8665	2. 1139	0. 8295
12	ADL0293	12	7. 6179	0. 8748	2. 2310	0. 8355
13	LEI0074	11	6. 8854	0. 8548	2. 1018	0. 8207
14	LEI0141	7	5. 1114	0. 8044	1. 7466	0. 6759
15	MCW0087	9	5. 5377	0. 8246	1. 8913	0. 7836
16	MCW0402	9	5. 7876	0. 8331	1. 9442	0. 8023
17	ADL298	6	3. 4348	0. 7134	1. 4725	0. 6459
18	ADL328	10	5. 8824	0. 8352	1. 9811	0. 7719
19	STMSGGHU2-1A	11	7. 7145	0. 8759	2. 1725	0. 8314
20	GGMYC *	9	6. 9264	0. 8610	2. 0529	0. 8215
21	GGMYC	14	9. 1839	0. 8981	2. 3938	0. 8541
22	GGVITIIG	9	5. 8608	0. 8294	1. 9015	0. 7708
23	GGVITC	6	4. 2485	0. 7646	1. 5701	0. 6314
	Mean	9. 87	6. 2584	0. 8312	1. 9701	0. 7720

3 讨论

实验动物是科学研究的重要实验材料,并在众多领域得到广泛的应用。实验用鹌鹑在药物实验及生物实验中被广泛应用,但目前由于缺乏实验用鹌鹑的遗传标准及遗传检测方法,各实验室及科研机构采用的实验用鹌鹑的遗传质量并不明确,难以保证实验用鹌鹑的遗传质量,从而易造成应用实验用鹌鹑其实验结果的准确性及可重复性较差。因此,本研究旨在研究和建立实验用鹌鹑的群体遗传质量控制遗传检测技术方法,为实验用鹌鹑的质量标准以及法制化管理奠定技术基础。

目前常用的实验动物遗传检测方法主要包括形态学、细胞学及 DNA 分子标记检测方法。而这些传统的遗传检测方法缺点明显,如可检测位点少、耗时长、检测数目受限等。而微卫星 DNA 分子标记可以直接从 DNA 分子水平上反应遗传变异,检测生物间差异。微卫星 DNA 有丰富的多态性,等位基因世代传递符合孟德尔遗传规律,且呈共显性遗传,具有重复性好、简便、快速的特点。本课题组已经利用微卫星遗传检测技术建立了实验用鸡和鸽的遗传检测方法^[15-16],为本实验研究奠定了基础。

群体的基因杂合度表示位点上某等位基因的频率,可以反映出检测基因的丰富度。平均有效杂合度反映群体的遗传变异程度,是其遗传多样性的重要指标^[17]。一般认为,当群体的平均有效杂合度<0. 5 时,表明该群体内个体的遗传多样性较低^[18],可能存在近交衰退风险,不符合封闭群实验动物的要求;当平均有效杂合度为 0. 5~0. 7 时,表明该群体具有较为丰富的遗传多样性^[19];当平均有效杂合度>0. 7 时,表明该群体具有较高的遗传多样性,在

经过必须的系统选育后,才能够推广使用^[20]。本实验中朝鲜龙城和迪法克鹌鹑群体的平均有效杂合度分别为 0. 81 和 0. 83,表明 2 个鹌鹑群体的基因杂合度较高,遗传多样性高,具有较好的选育潜力。

平均香农指数是衡量群体多态性的指数,本实验中朝鲜龙城和迪法克鹌鹑群体分别为 1. 79 和 1. 96,表明其生物多样性较高。微卫星 DNA 位点的多态性可用多态性信息含量(PIC)作为指标来衡量。当 PIC 为 0. 25~0. 5 时,表明该位点为中度多态,当 PIC<0. 25 时,表明该位点为低度多态,当 PIC>0. 5 时,表明该位点为高度多态^[21]。本实验中所筛选的 23 个微卫星位点均 PIC>0. 5,表明这些位点均高度多态,遗传信息丰富^[22],可以作为遗传标记用于实验用鹌鹑群体的遗传多样性分析。

本研究通过多次筛选,优化出了 23 个微卫星位点用于实验用鹌鹑的遗传检测,初步建立了实验用封闭群鹌鹑的遗传质量检测技术,为实现实验用封闭群鹌鹑遗传质量控制标准的建立提供支持。

参考文献:

[1] 刘艳,王珑. 浅述实验动物质量控制 [J]. 中国公共卫生管理, 2011, 27(1): 25-27.
LIU Y, WANG L. Discussion on quality control of experimental animals [J]. Chin J Public Health Manag, 2011, 27(1): 25-27.
[2] 王丽莎,庞有志. 鹌鹑的实验动物学价值 [J]. 生物学通报, 2013, 48(5): 8-11.
WANG L S, PANG Y Z. Laboratory animal science value of quail [J]. Bull Biol, 2013, 48(5): 8-11.
[3] 李昌文,于海波,都成,等. 鹌鹑实验动物化简史及相关研究进展 [J]. 中国家禽, 2023, 45(5): 85-91.
LI C W, YU H B, DU C, et al. Brief history and recent advances of quail breeding as laboratory animal [J]. China

- Poult, 2023, 45(5): 85-91.
- [4] WU H, WANG Y, HUANG J, et al. Rutin ameliorates gout via reducing XOD activity, inhibiting ROS production and NLRP3 inflammasome activation in quail [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 158: 114175.
- [5] META M, BILČÍK B, ČAVARGA I, et al. The potential effect of leptin co-administration on photodynamic damage using quail chorioallantoic membrane model [J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2023, 43: 103711.
- [6] 刘先菊, 王艳蓉, 魏强. 常用实验动物遗传质量检测方法概述 [J]. 医学动物防制, 2013, 29(8): 864-869.
LIU X J, WANG Y R, WEI Q. Overview of genetic quality monitoring method on laboratory animals [J]. J Med Pest Contr, 2013, 29(8): 864-869.
- [7] 左琴, 魏杰, 付瑞, 等. 应用微卫星技术对 KM 小鼠种子群体遗传质量进行比较分析 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 819-823.
ZUO Q, WEI J, FU R, et al. Population genetic quality analysis of a closed KM mouse colony by microsatellites [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 819-823.
- [8] 魏杰, 左琴, 王洪, 等. 基于团体标准 T/CALAS21—2017 的 Wistar 大鼠微卫星 DNA 群体遗传质量分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(6): 528-534.
WEI J, ZUO Q, WANG H, et al. Population genetic quality analysis of microsatellite DNA in wistar rats based on T/CALAS 21—2017 [J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(6): 528-534.
- [9] 李薇, 江其辉, 杜小燕, 等. 封闭群长爪沙鼠遗传标准的建立 [J]. 实验动物科学, 2011, 28(2): 31-36.
LI W, JIANG Q H, DU X Y, et al. Establishment of genetic standards of closed colony gerbil [J]. Lab Anim Sci, 2011, 28(2): 31-36.
- [10] 冯丹丹, 陈沫, 杜小燕, 等. 利用基因组数据对长爪沙鼠微卫星位点的筛选与优化 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(7): 1-7, 16.
FENG D D, CHEN M, DU X Y, et al. Screening and optimization of microsatellite loci in Mongolian gerbils using genomic data [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(7): 1-7, 16.
- [11] 朱庆, 李亮. 四川地方乌骨鸡种群遗传变异的微卫星 DNA 分析 [J]. 四川畜牧兽医, 2002, 29(8): 26-27, 29.
ZHU Q, LI L. Genetic diversity in Sichuan black-bone chicken lines as revealed by microsatellite DNA markers [J]. Sichuan Anim Vet Sci, 2002, 29(8): 26-27, 29.
- [12] 樊斌, 李奎, 彭中镇, 等. 湖北省三品种猪 27 个微卫星座位的遗传变异 [J]. 生物多样性, 1999, 7(2): 91-96.
FAN B, LI K, PENG Z Z, et al. Genetic variation of 27 microsatellite loci in three Hubei indigenous pig breeds [J]. Biodiversity Sci, 1999, 7(2): 91-96.
- [13] 杨澜. 利用微卫星标记分析五个中国地方山羊品种的遗传多样性 [D]. 武汉: 华中农业大学, 1999.
YANG L. Analysis of genetic diversity of five China local goat breeds by microsatellite markers [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 1999.
- [14] SUN H S, KIRKPATRICK B W. Exploiting dinucleotide microsatellites conserved among mammalian species [J]. Mamm Genome, 1996, 7(2): 128-132.
- [15] 王艺宁, 刘新梦, 章秀林, 等. 封闭群实验用鸽微卫星 DNA 遗传检测方法的初步建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 17-22.
WANG Y N, LIU X M, ZHANG X L, et al. Establishment of a genetic monitoring method for a closed colony of laboratory pigeons based on microsatellite DNA [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(8): 17-22.
- [16] 崔爱缺, 宫映岷, 章秀林, 等. 实验用鸡的遗传检测方法的初步建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 23-30.
CUI A Q, GONG (D/Y) D, ZHANG X L, et al. Preliminary establishment of genetic detection method for experimental chickens [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(8): 23-30.
- [17] 衣帅, 谢珊珊, 刘继峰, 等. 微卫星 DNA 标记技术对试验用虎皮猫群体遗传结构的分析 [J]. 中国兽医学报, 2013, 33(1): 137-141.
YI S, XIE S S, LIU J F, et al. Analysis of genetic structure of experimental tiger skin cat population by microsatellite DNA marker technology [J]. Chin J Vet Sci, 2013, 33(1): 137-141.
- [18] CHAKRABORTY R, ZHONG Y, DE ANDRADE M, et al. Linkage disequilibria among (CA)_n polymorphisms in the human dystrophin gene and their implications in carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophies [J]. Genomics, 1994, 21(3): 567-570.
- [19] 曲鲁江, 李显耀, 徐桂芳, 等. 利用微卫星标记分析中国地方鸡种的遗传多样性 [J]. 中国科学: 生命科学, 2006, 36(1): 17-26.
QU L J, LI X Y, XU G F, et al. Analysis of genetic diversity of China local chicken breeds by microsatellite markers [J]. Sci Sin Vitae, 2006, 36(1): 17-26.
- [20] 伍革民, 张继, 唐继高. 4 个贵州乌骨鸡群体遗传关系的微卫星标记分析 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(21): 169-171.
WU G M, ZHANG J, TANG J G. Microsatellite marker analysis of genetic relationships among four Guizhou black-bone chicken populations [J]. Jiangsu Agric Sci, 2018, 46(21): 169-171.
- [21] VANHALA T, TUISKULA-HAAVISTO M, ELO K, et al. Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers [J]. Poult Sci, 1998, 77(6): 783-790.
- [22] 包文斌, 束婧婷, 许盛海, 等. 样本量和性比对微卫星分析中群体遗传多样性指标的影响 [J]. 中国畜牧杂志, 2007, 43(1): 6-9.
BAO W B, SHU J T, XU S H, et al. Influence of sample size and sex ratio on population genetic diversity index in microsatellite analysis [J]. Chin J Anim Sci, 2007, 43(1): 6-9.

杨子豪,孟寒,张兆南,等. 基于智慧教学环境下实验动物学教学的创新与探索 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 108-113.

Yang ZH, Meng H, Zhang ZN, et al. Innovation and exploration of medical laboratory animal science teaching on the basis of a smart teaching environment [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 108-113.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.013

基于智慧教学环境下实验动物学教学的创新与探索

杨子豪¹, 孟寒², 张兆南¹, 张平¹, 师长宏^{2*}, 葛煦^{1*}

(1.空军军医大学教研保障中心, 西安 710032; 2.空军军医大学实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 目的 在传统的实验动物学授课环境中, 存在师生互动较少, 学生兴趣不足、学习投入度不高等现象。为进一步提升实验动物学的教学质量, 本教研室基于多媒体教室与智慧教室的不同教学环境, 以《医学实验动物学》的理论课程教学为研究对象, 对课程授课形式、教学模式、教学手段等方面进行创新与探索。**方法** 研究通过问卷调查了解学生学习投入度变化和智慧教室使用偏好情况, 采用 NVivo 质性分析软件编码分析师生课堂行为。**结果** 相对于传统教学, 智慧教学环境下, 学生的兴趣更高, 课堂师生互动频次更多。同时, 学生学习投入度显著高于传统教学, 学生课内、后习题有更高的正确率, 对实验动物学相关概念的把握程度更好。**结论** 智慧教学环境能给学生带来更好的感受和体验, 提高学生对实验动物学的兴趣, 增加课堂学习投入度, 取得了良好的教学效果。

【关键词】 医学实验动物学; 智慧教室; 学习投入

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0108-06

Innovation and exploration of medical laboratory animal science teaching on the basis of a smart teaching environment

YANG Zihao¹, MENG Han², ZHANG Zhaonan¹, ZHANG Ping¹, SHI Changhong^{2*}, GE Xu^{1*}

(1. Teaching and Research Support Center, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China.

2. Laboratory Animal Center, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032)

【Abstract】 Objective In the traditional laboratory zoology lecture environment, there is less teacher-student interaction, less student interest, and less engagement in learning. To improve the teaching quality of laboratory animal science, this teaching and research department was based on different teaching environments of multimedia and intelligent classrooms, theoretical course teaching of Medical Laboratory Animal Science as the research object, the course lecture format, teaching mode, teaching method, and other aspects of innovation and exploration. **Methods** This study used questionnaires to understand changes in student engagement in learning and preferences for smart classroom use, and NVivo qualitative analysis software was used to code student classroom behavior. **Results** The smart teaching environment resulted in higher student interest and more frequent teacher-student interaction in the classroom. Students were significantly more engaged in learning than in traditional teaching with higher correct rates on in-class and post-lesson exercises and a better grasp of concepts related to laboratory animal science. **Conclusions** A smart teaching environment brings students a better feeling and experience, improves their interest in laboratory animal science, increases classroom learning engagement, and achieves good teaching result.

【Keywords】 medical laboratory animal science; smart classrooms; learning engagement

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

[作者简介] 杨子豪 (1995—), 男, 硕士, 助理员, 研究方向: 教学管理。E-mail: 843256298@qq.com

[通信作者] 师长宏 (1973—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 人类疾病动物模型制作。E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

葛煦 (1973—), 男, 副教授, 研究方向: 教学管理。E-mail: gexu@fmmu.edu.cn * 共同通信作者

实验动物学是以实验动物资源研究、质量控制和利用实验动物进行科学实验的一门综合性课程,是医学、生命科学、动物学等学科研究的基础和重要支撑条件^[1]。随着现代生物技术的发展,基因编辑技术不断进步,必要的动物实验技术已经成为医学、医学生物技术等各专业学生必须掌握的一项基本技能^[2]。空军军医大学在临床、口腔、空医等学科的本科课程中均开设了实验动物学课程,取得了一定的教学成效,对于普及实验动物学知识,提高学生的科研能力和综合素质起到了重要作用。

空军军医大学教研保障中心实验动物室在长期的实验动物学教学探索和交流学习中,我们发现实际教学中存在不少问题,导致学生积极性和课堂学习投入度不高^[3-5]。主要包括实验动物学一般开设在学生课程早期阶段,学生缺乏基础知识和相关实践经验,对课程理解较为困难,导致课上积极性不高;教学方式单一,目前多以教师讲授为核心,师生互动较少,“灌输性”的知识输入容易导致教学枯燥无味,学生疲于记忆很难投入到课堂中等。

近年来,随着互联网、大数据等技术的发展,智慧环境与教学的融合更为紧密。教师思维模式和学生的学习习惯呈现出新的态势,新的教学需求不断涌现^[6]。在政策和技术的推动下,各级院校纷纷开展了智慧教学环境的建设,同时在此基础上,开创了如“翻转课堂”“互动教学”等新兴教学方法。空军军医大学于 2021 年建成了系列智慧教室并在全校推广使用。为提高学生对实验动物学的学习兴趣 and 课堂学习投入度,改善实验动物学的教学效果。本教研室依托空军军医大学智慧教学环境,在 2021~2022 学年春季学期的实验动物学的课程教学中开展智慧模式,从授课形式、教学模式等方面进行创新与探索,并通过问卷调查及数据分析评价其教学效果。

1 实验方法

1.1 智慧教室基本情况

本次教学探索的智慧环境为多屏分组互动教室。该教室包含智能绿板、可用于学生自主交互的六块分屏、自由组合与拼接的桌椅,支持多屏互动、一键广播、智能终端无线显示投屏等功能。课前,教师可通过云平台进行备课,上传预习视频,学生在移动端同步完成预习任务;课中,教师可将主屏展示的教学视频画面以广播的形式同步推送至各

小组分屏,也可将课间习题由主屏推送至各分屏。同时,学生能够依托分屏进行 PPT 演示和习题作答,通过电子书包、手机等移动设备参与课堂互动。课后,学生可以通过移动终端设备进行课程的回看、课后习题的作答及交流反馈等。该教室具有优化教学内容呈现、便利学习资源获取、促进课堂交互开展、情境感知和环境管理功能,主要用于多组研讨、交互式教学,至多可容纳 36 名学生同步学习。

1.2 研究设计

课程准备阶段:本研究对空军军医大学智慧教学环境开展了宣讲和使用培训,同时对参会学生开展问卷调查。问卷内容主要包括,学生对智慧教室的了解和使用情况等。

课程开始阶段:本研究将课程分为两个部分,第一部分(A1~A6)在常规多媒体教室进行,采用以往的教材,在传统多媒体教学模式下开展教学,并对课程进行录制,在课程结束后发放学习投入度问卷。第二部分在智慧教室开展(B1~B6),使用智慧教学模式,并进行课程的录制,课程结束后发放智慧教室偏好问卷以及学习投入度问卷。

课程结束阶段:利用 Excel 工具统计问卷结果后,导入 SPSS 软件进行分析;将录制的 12 次实验动物课程导入 NVivo 软件,每 15 s 进行 1 次编码,采用质性分析的方法,定性与定量相结合地对授课视频进行分析。

1.3 调查对象

本研究调查以在 2021~2022 学年春季学期完成“医学实验动物学”课程学习的空军军医大学无军籍本科学生为研究对象,共计 30 人;此外对前期参与智慧教室宣讲培训的 286 名学生进行了基本情况调查,有效问卷回收率均为 100%。

1.4 研究工具

本研究采用问卷调查法,问卷为基本情况调查表、智慧教室环境偏好问卷和智慧教室学习投入度问卷。其中智慧教室环境偏好问卷、智慧教室学习投入度问卷采用里克特量表五点计分法,Cronbach's α 值分别为 0.975 和 0.947, Bartlett 球形度检验效果均显著,表明两个量表信度和效度较高。本研究采用 Harman 单一因子检验法检验问卷共同方法偏差问题,对所有变量进行探索性因子分析结果发现未旋转情况下共有 19 个因子的特征值 >1 ,并且第一公因子的方差解释百分比为 19.43%, $<40\%$ 的临界标准,所以本研究不存在严重的共同

方法偏差。

本研究采用质性分析的方法,利用智慧云平台软件实时录制课程视频,记录课堂行为,如课前观看预习视频情况,课中、课后完成习题情况等,并对课堂录制视频进行分析,分析软件选取 NVivo 质性分析软件。该软件是目前最具代表性的可视化视频分析工具,能对文本、音频、视频、网页等资源进行导入和可视化分析。在进行课堂视频分析的过程中,该软件可以直接对课堂实录视频进行教学行为的编码分析,也可以将课堂实录视频的言语行为转录成逐字稿后,利用节点编码功能对课堂教学行为进行编码分析^[7]。

2 研究结果

2.1 基本情况调查

基本情况调查问卷显示,在实验动物学认知方面,86%的学生对实验动物学课程内容并不了解,在智慧教室使用情况方面,98%的学生没有在智慧教室进行过学习,但是 91%的学生非常愿意使用智慧教室。详见图 1A。

对实验动物学选修课近 5 年开班人数进行统计,往年选修课报名人数平均为 18 人,选取智慧教

学后,报名实验动物学选修课的人数达到 30 人,在报名人数上有很大提高。详见图 1B。

智慧教学云平台为我校基于互联网平台的信息化教学管理平台,通过云平台教师可实现在线备课、上传预习视频、师生实时互动等,同时可以在后台查看互动数据。智慧教学中,需要学生在课前有一定的知识储备,课前,教师通过上传视频帮助学生预习。根据云平台后台数据显示,平均 92.4%的学生通过观看教师上传的视频进行预习,尤其在 B3 分组讨论节次中,观看预习视频的人数达到了 100%。参考问卷调查“您在课前是否会进行预习”选项中,87.2%的学生没有进行过课前预习,原因是没有预习的习惯或课业压力较大没有预习的时间。

2.2 学习投入度的差异性检验

对学生传统教学环境下学习投入度以及智慧教学环境下的学习投入度进行配对样本 *t* 检验,结果显示相关系数为 0.643, *P*=0.000,表明二者有显著的差异,即学生在智慧教学环境下学习投入度要显著地高于传统教学环境下学习投入度(表 1)。

2.3 学习投入度的相关性检验

智慧教学环境偏好问卷的结果显示,学生对智慧教室平均偏好程度为 175.5,处于很高的水平。



注:A:学生基本情况 B:实验动物学选修课报名人数。
Note. A, Basic information of students. B, Enrollment of laboratory animal science elective course.

图 1 课前调研相关情况

Figure 1 Pre-class investigation

表 1 智慧教学前后学习投入差异性检验
Table 1 Difference test of learning input before and after wisdom teaching

项目 Project	均值 Mean value	相关系数 Correlation coefficient	标准误 Standard error	t	P
前学习投入度 Pre-learning engagement	64.2	0.643 ***	1.76	-0.96	0.000
后学习投入度 Post-learning engagement	81.07	/	/	/	/

注:与后学习投入度相比, *** *P*<0.001。
Note. Compared with post-learning engagement, *** *P*<0.001.

为进一步了解学生智慧教学下学习投入度和学生对智慧教室使用偏好之间的关系,对学生智慧教室使用偏好程度与智慧教学下学习投入度进行相关性检测,结果显示相关系数为 0.415, $P=0.023$ 。表明学生对智慧教室的使用偏好程度与智慧教学后学生的学习投入度呈正相关。详见表 2。

2.4 智慧教室使用偏好与智慧教学后学习投入度的回归分析检验

为进一步了解智慧教室使用偏好对学习投入度的影响方向和程度,我们对二者进行回归分析。可得 $P=0.000$,学生对智慧教室的使用偏好显著的正向预测了智慧教学的学习投入度,学生偏好智慧教学环境的程度越高,则学生的学习投入程度越高。详见表 3。

2.5 课堂录制视频的 NVivo 质性分析

2021~2022 学年春季学期的实验动物学课程共计 12 次,24 个学时,将 12 次课程的录制视频导入 NVivo 软件中,传统授课模式编号为 A1~A6,智慧

教学模式编号为 B1~B6。以每 15 s 为 1 次对视频进行编码,分别对教师行为、师生交互行为以及课间、后测验的正确率进行记录。结果发现,传统教学模式下,教师讲解行为以及技术展示行为是授课的主体,平均分别占比为 85.07% 和 10.63%,而教师提问、学生应答、学生讨论等师生、生生交互行为平均占课程的 2.67%。学生课间问答平均正确率为 68%,课后测验正确率为 83.67%(表 4)。

智慧教学模式下,除 B3 采用小组互动讨论教学法外,其余课程仍是以教师讲解为主,平均占课程的 45.85%,而师生交互行为占比提高,平均为 28.02%。学生课间问答的平均正确率为 95.5%,课后测验的正确率为 97.67%。详见表 4。

3 讨论与分析

3.1 学生对智慧教学环境的使用偏好

根据调查结果显示,本校学生对智慧教学环境缺乏了解和认识,缺少参与智慧教学的经历和机

表 2 智慧教室使用偏好与智慧教学后学习投入度的相关性检验

Table 2 Correlation test between smart classroom use preference and learning engagement after smart teaching				
项目 Project	均值 Mean value	标准误 Standard error	相关系数 Correlation coefficient	P
智慧教室使用偏好 Preference for smart classroom use	175.5	14.76	0.415 *	0.023
后学习投入度 Post-learning engagement	64.2	10.32	/	/

注:与后学习投入度相比, * $P<0.05$ 。
Note. Compared with post-learning engagement, * $P<0.05$.

表 3 智慧教室使用偏好对学习投入度的影响

Table 3 Influence of smart classroom use preference on learning engagement				
项目 Project	回归系数 β Regression coefficient β	标准误 Standard error	t	P
使用偏好 Usage preference	0.7	0.08	0.59	0.000
F	3.72 **	/	/	/
R ²	0.725	/	/	/

注:与后学习投入度相比, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with post-learning engagement, ** $P<0.01$.

表 4 实验动物学课堂教学行为编码结果

Table 4 Coding results of classroom teaching behavior in laboratory animal science

项目 Project	教师讲解 Teacher's explanation	技术展示 Technology display	师生交互行为 Teacher-student interaction behavior	沉寂 Silence	课间问答正确率 Correct rate of question and answer between classes	课后题目正确率 Correct rate of questions after class
A1	80.76%	10.36%	6.12%	2.76%	65.00%	83.00%
A2	86.45%	12.13%	1.42%	0.00%	62.00%	79.00%
A3	91.45%	8.55%	0.00%	0.00%	68.00%	86.00%
A4	84.36%	12.64%	3.00%	0.00%	71.00%	83.00%
A5	77.76%	9.75%	5.46%	7.03%	67.00%	85.00%
A6	89.64%	10.36%	0.00%	0.00%	75.00%	86.00%
B1	50.42%	14.50%	24.34%	9.74%	92.00%	95.00%
B2	45.63%	17.60%	29.46%	7.31%	94.00%	97.00%
B3	9.70%	48.32%	39.58%	2.40%	100.00%	100.00%
B4	59.00%	13.60%	25.70%	1.70%	96.00%	98.00%
B5	53.62%	17.80%	26.28%	2.30%	95.00%	97.00%
B6	56.73%	19.31%	22.76%	1.20%	96.00%	99.00%

会,但对于实验动物学全新的教学模式和教学场景尝试中,大多数学生愿意去尝试和配合。但也有少部分学生表示不能接受智慧教学,实验动物学科具有体系庞杂、内容抽象、逻辑性强等特点,学生需要识记,理解的内容多,学业压力较大。智慧教学模式需要学生有一定的知识储备,课前需要花费一定时间进行准备,增加了学生的课业压力。

学习环境偏好程度反映了学生在拥有该环境下的学习经历后,对在该环境中的学习活动、学习资源、设备等诸多要素的态度或喜爱程度^[8]。相关研究表明,学习者对环境良好的偏好能够提高学习者的学习效果,尤其是对概念的学习,探索式教学和强交互的环境更能产生积极影响^[9-11]。对参与智慧教学的 30 名学生进行智慧教室偏好程度测试,结果发现,学生对智慧教室使用偏好程度很高,平均每个条目的得分为 4.39,尤其在“我能够有舒适的学习氛围”“通过个人研究、小组讨论和课堂讲授的形式呈现学习主题”“提供学习参与和交互的机会”等条目得分平均达到 4.82。

总体来说,智慧教学环境能够提供更舒适的学习环境,提供更多交互手段,大多数学生是愿意去尝试,并在过程中产生更多的使用偏好。一方面,要拓展智慧教室的宣传和使用途径,加强智慧教学的探索。另一方面,也要把握好课前和课上的任务分配,平衡学生课业压力,同时,对于一些知识点大、概念多的课程,建议还是采取以往的授课模式。

3.2 影响实验动物学教学效果的智慧教学环境因素

为明确智慧教学环境与实验动物学效果提升之间的关系,我们对学生在智慧教学环境下的偏好和学生的学习投入度进行了相关性分析,结果显示,学生的偏好程度和学习投入度存在显著的正相关($P<0.01$),同时,学生对智慧教学环境的偏好程度正向预测了学生的学习投入度。即智慧教学环境提供的各类智能设备、线上和线下资源以及我们开展的一系列活动,都增强了学生的偏好程度,提高了学生对实验动物学的学习投入度,进而提高了教学效果。原因分析包括教学内容、教学方式两个方面。

教学内容方面,传统教学因为知识点繁多,课堂时间有限往往只能介绍实验动物学的基本概念和解剖、注射、取血、处死等操作方法,而最新学科发展和知识拓展无法充分展示。而在智慧教学探

索中,通过翻转课堂的形式,教师通过录制视频等方式让学生在课前对相关知识进行学习,为课堂展示热点问题和最新技术发展情况留出充足的时间;教学方式方面,采用交互讨论的方式,学生可以依托分屏进行交流答辩,同时,借助电子书包丰富的线上资源让课堂的边界无限拓展。

3.3 智慧教学环境下实验动物学的教学效果

教学效果是一节课是否成功的关键要素,包含老师“教”的效果和学生“学”的效果。学习成绩可以较为直观地反映一节课或某一阶段,学生对知识点和概念的把握情况,根据 12 次课间问答和课后测验的结果,传统教学模式中学生课间问答的平均正确率为 68%,课后测验的平均正确率为 83.67%,而智慧教学模式中学生课间问答的平均正确率为 95.5%,课后测验的平均正确率为 97.67%。这表明智慧教学环境下学生对于知识点和概念的把握要优于传统模式,尤其是课程 B3 采用交互讨论式教学法,课间、课后的正确率均为 100%,原因是课前学生充分预习了课程所学内容,对课程的基本知识和概念已经有了掌握,B3 课程上更多的是对知识点的拓展和观点的讨论与分享。

学习成绩能够反映学生对知识点和概念的把握,但对于课程教学效果的反映并不全面。在课堂教学中,学习投入度是对学生的学习过程进行有效的观察重要指标之一,它是一种与学习相关的积极、充实的精神状态,是学生在教育活动中所付出的时间和精力^[12]。我们分别对传统和智慧教学环境下学生的学习投入度进行了测量,并对其进行了配对样本 T 检验,发现智慧教学环境下学生的学习投入度要显著地高于传统教学,即在智慧教学环境下,学生投入了更多的精力,更大程度地参与到课程之中。进一步对课程录制视频进行质性分析后,可以发现,智慧教学课程中师生平均交互行为占比为 28.02%,远高于传统授课的水平。这表明,在智慧教学环境下,实验动物学有着更好的教学效果。

4 总结与展望

4.1 研究结论

基于研究结果,本研究得出如下的结论:①智慧教学环境下的实验动物学教学更能吸引学生,学生在使用中对智慧教学环境产生较高的偏好度;②智慧教学环境下的实验动物学教学效果更好,学生的课堂学习投入度更高;③学生对智慧教学环境的

使用偏好度能够提升学生的课堂学习投入度。

4.2 展望

实验动物学理论知识的学习和讲授可采用交互学习的智慧教学手法,结合实验案例和科学研究前沿热点,以学生为中心,借助问题导向,将实验动物学基本理论知识转化为问题,学生自学结合课堂讨论,依托多屏分组互动智慧教室的强交互环境,通过学生之间团队合作来解决问题,以此培养学生积极主动学习能力。同时,提高学生课堂参与程度,从而提升学生学习投入度,继而改善学习效果。

在课程设计方面应融入有效的教学交互策略。教师可充分利用多屏分组智慧教室的优势,结合实验动物学课程设置问题,指导学生使用智慧教室相关功能,并引导学生参与讨论。在课程内容上,要合理安排课前预习内容,既要让学生对理论概念知识有感性的认识,为课上交流讨论留出充足的时间,同时不能占用学生大量的课余时间,降低学生的积极性。

在课程安排上应统筹规划。实验动物学本身具有知识点多、概念性强的特点,对于不同的授课内容需精心设计互动内容。比如,实验动物福利伦理具有较强的讨论和延展性。师生可以借助多屏分组互动教室强交互性的特质进行交流讨论,如各小组可利用分屏灵活的演示 PPT,成员也可使用电子书包查阅资源并提供讨论佐证。

总之,智慧教学环境下的实验动物学教学能够改善实验动物学的教学效果,提高学生的学习兴趣和学习投入,提升实验动物学教学质量。本研究为实验动物学全面智慧教学提供了一定的参考,但是还需要进一步尝试和完善,探索多元化的教学方式,促进理论和实践相融合,不断提升实验动物学的教学效果。

参考文献:

[1] 肖春兰, 盛雅洁, 王禹斌, 等. 医学院校实验动物学课程改革的几点建议 [J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(6): 496-498, 504.
XIAO C L, SHENG Y J, WANG Y B, et al. Some suggestions on the curriculum reform of laboratory animal science in medical colleges [J]. Lab Anim Comp Med, 2019, 39(6): 496-498, 504.

[2] 赵善民, 李煜, 冯延, 等. 医科院校开展实验动物学第二课堂教学探讨 [J]. 基础医学教育, 2022, 24(2): 113-117.
ZHAO S M, LI Y, FENG Y, et al. Exploration on the second

classroom teaching in the course of laboratory animal science [J]. Basic Med Educ, 2022, 24(2): 113-117.

[3] 刘念, 赵微, 韩喜彬. 医学院校实验动物学实验选修课的探索与实践 [J]. 中国继续医学教育, 2021, 13(34): 135-139.
LIU N, ZHAO W, HAN X B. Exploration and practice of offering an experimental elective course of laboratory animal science in medical university [J]. China Continuing Med Educ, 2021, 13(34): 135-139.

[4] 陈尹. 扎根理论: 方法误区与正本清源 [J]. 广西师范大学学报(哲学社会科学版), 2022, 58(6): 79-93.
CHEN Y. Grounded theory: its misuse and clarification [J]. J Guangxi Norm Univ (Philos Soc Sci Ed), 2022, 58(6): 79-93.

[5] 张小吉, 王心辉. “互联网+教育”下智慧教学环境的建设探究 [J]. 大学, 2022, 17(16): 34-37.
ZHANG X J, WANG X H. Research on the construction of smart teaching environment under “Internet + education” [J]. University, 2022, 17(16): 34-37.

[6] 王利巧, 杨鹏. 高校智慧教学环境建设与应用面临的问题及对策——以 H 大学为例 [J]. 中国信息技术教育, 2022, 21(14): 106-109.
WANG L Q, YANG P. Problems and countermeasures in the construction and application of intelligent teaching environment in colleges and universities—taking H university as an example [J]. China Inf Technol Educ, 2022, 21(14): 106-109.

[7] 吴树峰. 基于 NVivo 的高中生物学课堂师生互动行为研究 [D]. 桂林: 广西师范大学, 2021.
WU S F. Research on interaction behavior between teacher-student in senior high school biology classroom by NVivo [D]. Guilin: Guangxi Normal University, 2021.

[8] 张雪. 智慧教室中大学生学习环境偏好与学习策略研究 [D]. 武汉: 华中师范大学, 2018.
ZHANG X. The study on college students' preference toward the smart classroom and learning strategies [D]. Wuhan: Central China Normal University, 2018.

[9] CHU R J C, TSAI C C. Self-directed learning readiness, Internet self-efficacy and preferences towards constructivist Internet-based learning environments among higher-aged adults [J]. J Comput Assist Learn, 2009, 25(5): 489-501.

[10] BALASUBRAMANIAN K, JAYKUMAR V, FUKEY L N. A study on “student preference towards the use of edmodo as a learning platform to create responsible learning environment” [J]. Procedia Soc Behav Sci, 2014, 144: 416-422.

[11] YANG F Y, CHANG C C. Examining high-school students' preferences toward learning environments, personal beliefs and concept learning in web-based contexts [J]. Comput Educ, 2009, 52(4): 848-857.

[12] SCHAUFELI W B, MARTÍNEZ I M, MARQUES P A, et al. Burnout and engagement in university students: a cross-national study [J]. J Cross Cult Psychol, 2002, 33(5): 464-481.

张树威,程浩,王浩伟,等.非编码 RNA 在甲基苯丙胺诱导成瘾及神经毒性作用的研究进展 [J].中国比较医学杂志,2024,34(2):114-121.

Zhang SW, Cheng H, Wang HW, et al. Research progress of non-coding RNA in methamphetamine-induced addiction and neurotoxicity [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 114-121.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.014

非编码 RNA 在甲基苯丙胺诱导成瘾及神经毒性作用的研究进展

张树威,程浩,王浩伟,苗霖,李怡,官莉娜*,曾晓锋*

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

【摘要】 甲基苯丙胺(methamphetamine, METH)具有高度成瘾性和神经毒性,可导致滥用者的认知和记忆功能障碍。METH 的危害不仅在于其本身的毒性,更在于吸毒者身心的高度依赖性,常造成精神障碍并引发暴力行为,给社会带来极大的安全隐患。非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)不编码蛋白质,是在转录后水平调控基因表达的重要因子。研究表明,ncRNA 在甲基苯丙胺诱导的成瘾及神经毒性中发挥了重要的调控作用,但其具体机制尚不清楚。本文就目前 ncRNA 调控 METH 诱导成瘾及神经毒性的研究进展进行综述,以期 ncRNA 作为 METH 滥用者的法医学鉴定指标和潜在的药物干预靶点提供参考。

【关键词】 甲基苯丙胺;非编码 RNA;成瘾;神经毒性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0114-08

Research progress of non-coding RNA in methamphetamine-induced addiction and neurotoxicity

ZHANG Shuwei, CHENG Hao, WANG Haowei, MIAO Lin, LI Yi, GUAN Lina*, ZENG Xiaofeng*

(Key Laboratory of Drug Dependence and Treatment, National Health Commission, School of Forensic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

【Abstract】 Methamphetamine (METH) is highly addictive and neurotoxic, which causes cognitive and memory dysfunction in abusers. The harm of METH lies not only in its own toxicity, but also in the high physical and mental dependence of drug addicts, often causing mental disorders and violent behavior, bringing great safety risks to society. Non-coding RNA (ncRNA) does not encode proteins and is an important factor in regulating gene expression at the post-transcriptional level. Studies have shown that ncRNA plays an important regulatory role in methamphetamine-induced addiction and neurotoxicity, but the specific mechanism is unclear. This article reviews the current research progress of ncRNA in regulating METH-induced addiction and neurotoxicity to provide a reference for ncRNA as a forensic identification index and potential therapeutic target for METH abusers.

【Keywords】 methamphetamine; non-coding RNA; addiction; neurotoxicity

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

【基金项目】 国家自然科学基金(82160325, 82060382); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项(202001AY070001-177, 202101AY070001-062); 昆明医科大学研究生创新基金项目(2022S015)。

【作者简介】 张树威(1996—),男,硕士研究生,研究方向:毒品成瘾与干预的分子机制。E-mail:1564384322@qq.com

【通信作者】 官莉娜(1979—),女,讲师,研究方向:毒品成瘾与干预的分子机制。E-mail:1554956167@qq.com

曾晓锋(1977—),男,博士,教授,研究方向:毒品成瘾与干预的分子机制。E-mail:zxf2004033@163.com * 共同通信作者

毒品滥用已成为世界性的公害,给社会经济和人们身心健康带来严重危害。甲基苯丙胺(methamphetamine, METH)是一种广泛流行的新型合成毒品,因其见效快、药效维持时间长,已成为我国滥用“头号毒品”。与传统毒品相比, METH 对人体中枢神经系统(central nervous system, CNS)的刺激和毒性损伤更强,过量吸食可导致急性中毒甚至死亡,长期少量滥用可导致慢性中毒和认知功能障碍。研究表明, METH 诱导的 CNS 损伤涉及多种复杂的调控机制,包括氧化应激、神经炎症和细胞凋亡^[1]。METH 的危害不仅在于其本身的毒性,更在于其高度成瘾性。研究表明, METH 成瘾行为的发展受多巴胺能系统的调节,与大脑奖赏回路密切相关^[2]。METH 滥用会触发大脑奖赏回路突触可塑性改变,导致成瘾及其相关的认知功能障碍,造成精神障碍并引发暴力行为,给社会带来极大的安全隐患^[3]。因此,探寻 METH 诱导成瘾和神经毒性的作用机制对减少 METH 依赖和复吸具有重要意义。

目前 METH 诱导成瘾和神经毒性的作用机制尚未阐明,且没有客观的诊断指标和有效的治疗药物。近年来,随着转录组测序等高通量基因检测技术的广泛应用,越来越多的研究者对 ncRNA 调控的基因差异表达进行研究^[4]。ncRNA 主要包括短链非编码 RNA(microRNA, miRNA)、长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)以及环状 RNA(circular RNA, circRNA)等 RNA 转录物。研究表明, ncRNA 在甲基苯丙胺诱导的成瘾及神经毒性中发挥了重要的调控作用。在中枢神经系统中, miRNA 作为关键的调控因子,在转录后水平调控与 METH 成瘾和毒性相关基因的表达^[5]。lncRNA 也会通过影响神经元可塑性、学习和记忆相关的基因表达,调控 METH 诱导的成瘾^[6]。circRNA 可以直接调节靶 mRNA 的翻译,或作为 miRNA 海绵调节 METH 成瘾或毒性相关基因的表达^[7]。此外, miRNA 也显示出作为法医生物检材分子标记的重要潜力。miRNA 因其高稳定性和强大的组织特异性,可被用于鉴定法医生物检材的组织属性来源^[8]。在毒品滥用领域,也有研究报道 miRNAs 可作为 METH 使用障碍(methamphetamine use disorder, MUD)患者的分子标志物,例如 miR-181a、miR-15b 和 miR-let-7d 等 miRNA 分子可能在 MUD 的病理中作为潜在的外周生物标志物^[9]。本文综述了目前 ncRNA 调控 METH 诱导成瘾及神经毒性

的研究进展,旨在为补充 METH 成瘾及神经毒性的神经生物学机制提供参考。

1 ncRNA 调控 METH 诱导的成瘾

1.1 ncRNA 调控大脑奖赏回路

METH 诱导的成瘾与大脑奖赏回路密切相关。大脑奖赏通路是由内侧前额皮质、基底前脑以及伏隔核等部位共同组成的神经网络,通过接受中脑腹侧被盖区的多巴胺能传入神经,传递与“奖赏”有关的刺激^[10]。多巴胺(dopamine, DA)是一种儿茶酚胺神经递质,调节大脑认知、运动和奖赏在内的许多功能,在成瘾中发挥重要作用^[11]。DA 在神经元的细胞质中合成,在神经末梢被释放,被突触前膜中的多巴胺转运体(dopamine transporter, DAT)捕获。其中 DAT 通常负责 DA 的再摄取,而 METH 主要通过 DAT 的相互作用而引起成瘾效应^[12]。METH 滥用会增加中枢神经系统中 DA 的细胞外浓度,导致中枢神经系统兴奋性增加,长期使用会导致毒品耐受性的产生^[13-14]。研究表明, ncRNA 是调控基因表达的重要因子,在 METH 诱导的成瘾中具有广泛的调节作用。

miRNA 是一类由内源基因编码的小非编码 RNA,在人体的多种组织细胞中广泛表达。miRNA 通过与目标信使 RNA(mRNA)的 3'-非翻译区(UTR)或编码区结合,诱导靶 mRNA 降解或者抑制其翻译,在转录后水平对基因的表达发挥调控作用^[15]。在非编码 RNA 中, miRNA 在转录后水平作为基因表达的强调节因子,调控 METH 成瘾相关基因的表达^[5]。Gu 等^[16]在 METH 成瘾受试者的血清中发现 miR-9-3p 的表达显著升高。Zhang 等^[17]研究发现, miR-181a/GRIA2 通路在 MUD 中起关键作用。Sim 等^[18]测定了 METH 成瘾大鼠的 NAc 中的 miRNA 表达谱,发现大量的 METH 成瘾相关 miRNAs 在 MAPK、CREB 和 GnRH 等信号通路中发挥重要作用。在体外细胞研究中, Sim 等^[18]发现 miR-496-3p、miR-194-5p、miR-200b-3p 和 miR-181a-5p 等 miRNA 与 METH 成瘾显著相关。Liu 等^[19]表明 miR-124-3p、miR-212-3p 和 miR-29b-3p 通过调控生物合成在 METH 成瘾的发生中发挥作用。

lncRNA 是一类长链非编码 RNA,包含 200 多个核苷酸,通过募集转录因子或通过海绵作用抑制 miRNA 与 mRNA 的结合进而参与靶基因的调节^[13]。lncRNA 具有庞大的家族,包括增强子

lncRNAs、启动子 lncRNAs、反义 lncRNAs 和基因间 lncRNAs 等多种类型,参与 mRNA 的运输、稳定性和翻译,以及蛋白质的稳定性、翻译后修饰和功能的调节^[14]。lncRNA 也会通过影响神经元可塑性、学习和记忆相关的基因表达,调控 METH 诱导的成瘾。Ip 等^[20]通过构建 *Gomafu* 基因的小鼠敲除 (KO) 模型,证实 lncRNA *Gomafu* 可能通过调节基因表达或选择性剪接靶基因来改变小鼠行为。Zhu 等^[6]发现 METH 可以引起致敏小鼠 NAc 中 lncRNA 表达的整体变化,这些变化可能参与了 METH 诱导的行为敏化和成瘾。

circRNA 是一类特殊的非编码 RNA 分子,最初在植物类病毒中鉴定,被认为是剪接错误的副产品而不受重视。与线性 RNA 不同, circRNA 具有独特的共价环结构,由 mRNA 前体通过可变剪接或反向剪接加工而成,可以直接调节靶 mRNA 的翻译,或作为 miRNA 海绵发挥调节作用^[21]。目前, circRNA 已经成为 RNA 领域的一个研究热点,但鲜有人对 METH 诱导的 circRNA 表达变化进行研究。Li 等^[7]对 METH 处理的小鼠原代皮质神经元进行高通量 RNA 测序,发现 circRNA *Homer1* 和 *Ttk1* 与成瘾高度相关。

1.2 ncRNA 调控突触可塑性

突触可塑性与药物成瘾和记忆形成相关。METH 滥用会触发大脑奖赏回路突触可塑性改变和突触相关蛋白的异常表达,导致大脑奖赏神经回路的重塑,进而引起成瘾及其相关认知功能障碍^[22]。有研究发现, miRNA 可通过调节神经元可塑性相关基因的表达,促进 METH 成瘾。Qian 等^[23]证实 miR-313 通过靶向突触可塑性相关蛋白 *RhoA*, 调节 METH 诱导的小鼠成瘾行为。Zhu 等^[24]对 METH 处理的小鼠伏隔核 RNA 进行转录组测序,发现 miR-212-3p 和 miR-138-5p 可能靶向 *Arc* 和 *Ntrk1* 等突触可塑性相关基因,调节 METH 成瘾和神经元可塑性(表 1)。

2 ncRNA 调控 METH 诱导的神经毒性

2.1 ncRNA 调控 METH 诱导的神经炎症

细胞因子和趋化因子是大脑正常免疫功能的基础,调节神经发育、神经炎症和突触传递^[33]。然而,过度的神经炎症会加重现有的 CNS 损伤。研究表明, METH 可引起脑器官内的胶质细胞增生和神经炎症,诱导 TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 和 IL-6 等多种细胞

因子释放,加重其诱导的中枢神经系统内神经毒性^[34]。此外, METH 可诱导动物模型中小胶质细胞以及 NLRP3 炎性小体的激活,导致小胶质细胞介导的神经炎症和多巴胺能神经元变性^[35]。NLRP3 炎性小体通过 miR-143/PUMA 轴参与 METH 诱导的小胶质细胞活化^[35]。Yu 等^[36]发现 METH 可通过 miR-142a-3p/miR-155-5p-Peli1 轴参与神经炎性的调节,促进促炎细胞因子分泌和相应的通路激活。黄荣荣等^[37]研究发现, METH 通过 circHIPK2/miR-124/ σ -1R 轴调控星形胶质细胞活化,参与神经炎症的调节。

2.2 ncRNA 调控 METH 诱导的细胞凋亡和自噬

细胞凋亡 (apoptosis) 是多基因控制的细胞自主的有序的死亡,在 METH 诱导的神经元损伤中发挥着重要作用。METH 诱导的凋亡涉及到内在和外在死亡途径的激活,包括 Caspase-3 裂解启动的死亡受体途径、BCL-2 家族介导的线粒体途径、内质网应激和 p53 诱导的凋亡通路^[38]。ncRNA 可在转录后水平影响相关基因的表达,调控 METH 诱导的凋亡。Du 等^[39]发现 METH 给药的大鼠 miR-127、miR-186 和 miR-222 表达上调, miR-329 表达下调,其预测靶点参与了神经元凋亡。Shen 等^[40]研究表明, METH 治疗可抑制 miR-181c 的表达,调控 TNF- α 诱导的 IEC-6 细胞凋亡。

lncRNA 与 circRNA 也参与调控 METH 诱导的凋亡。Xiong 等^[41]研究表明, lncRNA *GAS5* 可有效调节涉及 p53 介导的神经元凋亡的下游分子调控 METH 诱导的凋亡; lncRNA *NR_110713* 和 *NR_027943* 通过靶向调控 *Ddit3* 的表达,影响内质网应激依赖性凋亡。Li 等^[42]发现 circ*Homer1* 通过靶向 *Bbc3* 调控 METH 诱导的凋亡,抑制 circ*Homer1* 降低了 Caspase-3 蛋白水平,降低了细胞凋亡率。Deng 等^[43]研究表明, circ_0015891 可作为 miR-129-1-3p 的海绵,调节 METH 诱导的多巴胺能细胞凋亡。

自噬通常被认为是一种生存机制,维持蛋白质合成、细胞器生物发生及其清除之间的平衡^[44]。研究表明, METH 可通过调节 mTOR、Beclin-1 和 LC3-II 等基因的表达,诱导多巴胺能神经元自噬^[45]。最近的研究表明, METH 可通过调节相关的 miRNA 来诱导自噬。Zhu 等^[46]认为 METH 通过调节相关 miRNA 影响细胞自噬、细胞代谢和免疫应答相关的通路。Zhang 等^[47]发现 miR-143 通过调节细胞凋亡和自噬之间的相互作用来介导小胶质细胞的存活。

表 1 ncRNA 在 METH 调控成瘾中的表达和功能
Table 1 Expression and function of ncRNA in METH regulation of addiction

ncRNA	表达水平 Expression level	样本类型 Sample type	调控轴 Regulatory axis	功能 Function
miR-9-3p ^[16]	上调 Upregulation	人血清 Human serum	本研究未提及 Not mentioned in this study	METH 滥用 METH abuse
miR-29c ^[25]	下调 Downregulation	小鼠伏隔核 Nucleus accumbens of mice	miR-29c/Dnmt3a, Dnmt3b, Meg3	METH 敏化 METH sensitization
miR-31-3p ^[23]	上调 Upregulation	小鼠背侧海马区 Dorsal hippocampus of mice	miR-31-3p/RhoA	METH 成瘾 METH abuse
miR-124 ^[26]	下调 Downregulation	小鼠前额叶皮层 Prefrontal cortex of mice	miR-124/Drd2	METH 诱导的多动症和社交缺陷 METH-induced hyperactivity and social deficits
miR-128 ^[27]	上调 Upregulation	小鼠伏隔核 Nucleus accumbens of mice	miR-128/Arf6, Cpeb3, Nlgn1	METH 敏化 METH sensitization
miR-133a-5p ^[28]	下调 Downregulation	大鼠心脏组织 Rat heart tissue	miR-133a-5p/ROCK2	METH 依赖 METH dependency
miR-134 ^[29]	上调 Upregulation	大鼠背外侧纹状体 Dorsolateral striatum in rats	miR-134/LIMK1	METH 滥用 METH abuse
miR-181a ^[18]	下调 Downregulation	人血清; SH-SY5Y 细胞 Human serum, SH-SY5Y cells	miR-181a/GRIA2	METH 滥用 METH abuse
miR-204-3p ^[30]	上调 Upregulation	小鼠伏隔核 Nucleus accumbens of mice	miR-204-3p/Sema4A, Plxna204	METH 敏化 METH sensitization
miR-222-3p ^[31]	下调 Downregulation	小鼠伏隔核 Nucleus accumbens of mice	miR-222-3p/Ppp3r1, Cdkn1c, Fmr1, PPARGC1A	METH 滥用 METH abuse
miR-313 ^[23]	上调 Upregulation	小鼠 Mice	RhoA	突触可塑性 Synaptic plasticity
miR-212-3p ^[24]	下调 Downregulation	小鼠伏隔核 Nucleus accumbens of mice	Arc, Ntrk1	突触可塑性 Synaptic plasticity
miR-138-5p ^[24]	下调 Downregulation	小鼠伏隔核 Nucleus accumbens of mice	Arc, Ntrk1	突触可塑性 Synaptic plasticity
novel-m009C ^[32]	下调 Downregulation	小鼠伏隔核 Nucleus accumbens of mice	novel-m009C/Grin1	METH 成瘾 METH abuse
LncGomafu ^[20]	本研究未提及 Not mentioned in this study	Gomafu 基因敲除小鼠 Gomafu gene knockout mice	本研究未提及 Not mentioned in this study	METH 敏化 METH sensitization
circHomer1 ^[7]	上调 Upregulation	伏隔核、腹侧被盖区、前额叶皮层和海马体 Nucleus accumbens, ventral tegmental area, prefrontal cortex and hippocampus	本研究未提及 Not mentioned in this study	METH 成瘾 METH abuse
circTlk1 ^[7]	下调 Downregulation	腹侧被盖区 Ventral tegmental area	本研究未提及 Not mentioned in this study	METH 成瘾 METH abuse

2.3 ncRNA 调控 METH 诱导的血脑屏障损伤

血脑屏障(blood brain barrier, BBB)是脑毛细血管壁和神经胶质细胞之间形成的天然屏障,可限制或调节毒性分子与 CNS 的交换,从而维持 CNS 的正常生理状态^[48]。研究表明,滥用 METH 会上调 α-syn 的表达,诱发星形胶质细胞相关的 BBB 炎症损

害^[49],或增加大鼠皮质中的血浆氨和活性 MMP-2 的水平,导致 BBB 的结构破坏^[50]。最近的研究表明,ncRNA 通过调节相关基因的表达,参与了 METH 诱导的 BBB 损伤。Bai 等^[51]研究表明,miR-143 通过靶向抑制 PUMA 的表达,调控 METH 诱导的人内皮细胞通透性改变和小鼠皮层和海马中 TJP 蛋白的

表达。Yang 等^[52]研究发现, circHECW2 通过与 miR-30 d 的结合调节内皮-间充质转化,在 METH 诱导的 BBB 损伤中具有潜在作用(表 2)。

3 ncRNA 作为 MUD 分子标志物的应用

除了作为 METH 成瘾和毒性作用的调控分子, miRNA 作为分子标记也逐渐应用到法医学鉴定中。由于现场检材的特殊性,很多情况下需要对生物检材做种属鉴定和组织属性鉴定,miRNA 具有种属遗传稳定性及种间差异性,适合用于鉴定多种类型法医检材的种属来源。此外,miRNA 具有强大的组织特异性,也可被用于鉴定法医生物检材的组织属性来源^[8]。Burgos 等^[54]对来自 5 个不同受试者的血

清和脑脊液中 miRNA 进行测序,发现不同受试者的血清和脑脊液中 miRNA 的表达具有差异性。

在毒品滥用领域,也有研究报道 miRNAs 可作为 MUD 患者的分子标志物。Chand 等^[55]研究表明,miR-29a 在 METH 诱导的炎症和突触树突损伤中发挥关键作用,表明 EV-miR-29a 可能作为 MUD 患者神经元损伤的生物标志物。Kim 等^[56]研究表明,循环细胞外囊泡中的 miR-137 可作为 METH 戒断综合征的诊断指标。Zhao 等^[9]研究表明,miR-181a 和 miR-15b 等 miRNA 分子可能作为 MUD 的潜在外周生物标志物。因此,通过对 miRNA 在不同组织中的差异表达及其在 METH 相关疾病中的特异性表达进行研究,能够为法医病理毒理学鉴定分

表 2 ncRNA 在 METH 调控神经毒性中的表达和功能
Table 2 Expression and function of ncRNA in METH regulated neurotoxicity

ncRNA	表达水平 Expression level	样本类型 Sample type	调控轴 Regulatory axis	功能 Function
miR-129-1-3p ^[43]	上调 Upregulation	SH-SY5Y 细胞系 SH-SY5Y cell line	miR-129-1-3p/MAP2K4, PRKCE, PAWR, MAPK3	细胞凋亡 Apoptosis
miR-143 ^[47]	早期下调,后期上调 Early downregulation, later upregulation	BV2 小胶质细胞,小鼠海马体 BV2 microglia, mouse hippocampus	miR-143/BBC3	细胞凋亡 Apoptosis
miR-181c ^[40]	下调 Downregulation	人血清 Human serum	miR-181c/TNF-α	细胞凋亡 Apoptosis
miR-142a-3p ^[36]	下调 Downregulation	BV2 小胶质细胞,小鼠前额叶皮层 BV2 microglia, mouse prefrontal cortex	miR-142a-3p/Peli1	炎症反应 Inflammatory reaction
miR-155-5p ^[36]	下调 Downregulation	BV2 小胶质细胞,小鼠前额叶皮层 BV2 microglia, mouse prefrontal cortex	miR-155-5p/Peli1	炎症反应 Inflammatory reaction
miR-143 ^[35]	下调 Downregulation	小胶质细胞 Microglia	miR-143/PUMA	炎症反应 Inflammatory reaction
miR-143 ^[51]	上调 Upregulation	人血清,小鼠,人脑内皮细胞 Human serum, mice, human brain endothelial cells	miR-143/PUMA/p53, NF-κB	血脑屏障 Blood-brain barrier
circHIPK2 ^[37]	上调 Upregulation	小鼠海马脑区星形胶质细胞,星形胶质细胞 Astrocyte in mouse hippocampus, astrocyte	circHIPK2/miR-124/σ-1R	炎症反应 Inflammatory reaction
circHomer1 ^[42]	上调 Upregulation	HT-1 细胞 HT-1 cells	circHomer1/Bbc3	细胞凋亡 Apoptosis
circ_0015891 ^[43]	下调 Downregulation	SH-SY5Y 细胞系 SH-SY5Y cell line	circ_0015891/miR-129-1-3p	细胞凋亡 Apoptosis
circHIPK2 ^[53]	上调 Upregulation	原代小鼠星形胶质细胞 Primary mouse astrocyte	circHIPK2/miR-124/2HG	自噬 Autophagy
circHECW2 ^[52]	上调 Upregulation	小鼠海马,人脑微血管内皮细胞 Mouse hippocampus, human brain microvascular endothelial cells	circHECW2/miR-30d/ATG5	血脑屏障 Blood-brain barrier

析提供有力的帮助。

4 展望

ncRNA 在 METH 诱导的成瘾及神经毒性损伤中发挥着重要作用。作为转录后水平基因表达的强调节因子,靶向干预 miRNA 的相关药物研发具有重要的应用前景。目前以 ncRNA 作为药物干预靶点的体内实验研究较少,且不同种属的实验动物之间 miRNA 的给药剂量和给药方式没有明确的标准,开展大量的体内动物实验,对靶向 miRNA 的药物特异性进行验证可作为进一步的研究方向。此外,目前的研究主要集中在 ncRNA 的非编码功能,但近年来,许多 circRNA 的蛋白质编码能力已被不断鉴定^[57]。围绕 circRNA 蛋白质编码功能的进一步研究,可能启发我们这些生物分子在 METH 滥用成瘾相关机制中的新思路。综上所述,对 METH 在 RNA 水平对靶基因的调控机制进行研究,可以丰富 METH 滥用成瘾的神经毒理学作用机制,为 METH 中毒死亡的法医学鉴定提供参考,为非编码 RNA 分子作为潜在的干预靶点补充新的理论依据。

参考文献:

- [1] WU M, SU H, ZHAO M. The role of α -synuclein in methamphetamine-induced neurotoxicity [J]. Neurotox Res, 2021, 39(3): 1007-1021.
- [2] TIEN L T, HO I K. Involvement of μ -opioid receptor in methamphetamine-induced behavioral sensitization [J]. Curr Neuropharmacol, 2011, 9(1): 215-218.
- [3] LIANG M, ZHU L, WANG R, et al. Methamphetamine exposure in adolescent impairs memory of mice in adulthood accompanied by changes in neuroplasticity in the dorsal hippocampus [J]. Front Cell Neurosci, 2022, 16: 892757.
- [4] DESHPANDE D, CHHUGANI K, CHANG Y, et al. RNA-seq data science: from raw data to effective interpretation [J]. Front Genet, 2023, 14: 997383.
- [5] ZHAO Y, QIN F, HAN S, et al. MicroRNAs in drug addiction: current status and future perspectives [J]. Pharmacol Ther, 2022, 236: 108215.
- [6] ZHU L, ZHU J, LIU Y, et al. Methamphetamine induces alterations in the long non-coding RNAs expression profile in the nucleus accumbens of the mouse [J]. BMC Neurosci, 2015, 16: 18.
- [7] LI J, SHI Q, WANG Q, et al. Profiling circular RNA in methamphetamine-treated primary cortical neurons identified novel circRNAs related to methamphetamine addiction [J]. Neurosci Lett, 2019, 701: 146-153.
- [8] 胡荣, 方晨, 刘旭, 等. 法医物证学 miRNA 分析的研究进展 [J]. 中国法医学杂志, 2016, 31(5): 456-458, 462.

- HU R, FANG C, LIU X, et al. Progress and perspectives of microRNA research in forensic biological evidence [J]. Chin J Forensic Med, 2016, 31(5): 456-458, 462.
- [9] ZHAO Y, ZHANG K, JIANG H, et al. Decreased expression of plasma microRNA in patients with methamphetamine (MA) use disorder [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2016, 11(3): 542-548.
- [10] GOLDEN S A, RUSSO S J. Mechanisms of psychostimulant-induced structural plasticity [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012, 2(10): a011957.
- [11] SOLINAS M, BELUJON P, FERNAGUT P O, et al. Dopamine and addiction: what have we learned from 40 years of research [J]. J Neural Transm, 2019, 126(4): 481-516.
- [12] RUDNICK G. Cytoplasmic permeation pathway of neurotransmitter transporters [J]. Biochemistry, 2011, 50(35): 7462-7475.
- [13] HU W, ALVAREZ-DOMINGUEZ J R, LODISH H F. Regulation of mammalian cell differentiation by long non-coding RNAs [J]. EMBO Rep, 2012, 13(11): 971-983.
- [14] BRIDGES M C, DAULAGALA A C, KOURTIDIS A. LNCcation: lncRNA localization and function [J]. J Cell Biol, 2021, 220(2): e202009045.
- [15] TREIBER T, TREIBER N, PLESSMANN U, et al. A compendium of RNA-binding proteins that regulate microRNA biogenesis [J]. Mol Cell, 2017, 66(2): 270-284, e13.
- [16] GU W J, ZHANG C, ZHONG Y, et al. Altered serum microRNA expression profile in subjects with heroin and methamphetamine use disorder [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 109918.
- [17] ZHANG K, WANG Q, JING X, et al. MiR-181a is a negative regulator of GRIA2 in methamphetamine-use disorder [J]. Sci Rep, 2016, 6: 35691.
- [18] SIM M S, SOGA T, PANDY V, et al. MicroRNA expression signature of methamphetamine use and addiction in the rat nucleus accumbens [J]. Metab Brain Dis, 2017, 32(6): 1767-1783.
- [19] LIU D, ZHU L, NI T, et al. Ago2 and Dicer1 are involved in METH-induced locomotor sensitization in mice via biogenesis of miRNA [J]. Addiction Biology, 2019, 24(3): 498-508.
- [20] IP J Y, SONE M, NASHIKI C, et al. Gomafu lncRNA knockout mice exhibit mild hyperactivity with enhanced responsiveness to the psychostimulant methamphetamine [J]. Sci Rep, 2016, 6: 27204.
- [21] CHEN L L, YANG L. Regulation of circRNA biogenesis [J]. RNA Biol, 2015, 12(4): 381-388.
- [22] HAGENSTON A M, BADING H, BAS-ORTH C. Functional consequences of calcium-dependent synapse-to-nucleus communication: focus on transcription-dependent metabolic plasticity [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2020, 12(4): a035287.
- [23] QIAN H, SHANG Q, LIANG M, et al. MicroRNA-31-3p/RhoA signaling in the dorsal hippocampus modulates methamphetamine-

- induced conditioned place preference in mice [J]. *Psychopharmacology*, 2021, 238(11): 3207–3219.
- [24] ZHU L, LI J, DONG N, et al. mRNA changes in nucleus accumbens related to methamphetamine addiction in mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36993.
- [25] SU H, ZHU L, LI J, et al. Regulation of microRNA-29c in the nucleus accumbens modulates methamphetamine-induced locomotor sensitization in mice [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 148: 160–168.
- [26] KOZUKA T, OMORI Y, WATANABE S, et al. MiR-124 dosage regulates prefrontal cortex function by dopaminergic modulation [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 3445.
- [27] LI J, ZHU L, SU H, et al. Regulation of miR-128 in the nucleus accumbens affects methamphetamine-induced behavioral sensitization by modulating proteins involved in neuroplasticity [J]. *Addict Biol*, 2021, 26(1): e12881.
- [28] ZHOU Y, LIN Y, CHEN Z, et al. Expression of miR-133a-5p and ROCK2 in heart in methamphetamine-induced rats and intervention of rhynchophylline [J]. *Pharmacology*, 2020, 105(5/6): 300–310.
- [29] SHI J J, CAO D N, LIU H F, et al. Dorsolateral striatal miR-134 modulates excessive methamphetamine intake in self-administering rats [J]. *Metab Brain Dis*, 2019, 34(4): 1029–1041.
- [30] NI T, LI Y, WANG R, et al. The potential involvement of miR-204-3p-axon guidance network in methamphetamine-induced locomotor sensitization of mice [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 707: 134303.
- [31] SHANG Q, WANG J, XI Z, et al. Mechanisms underlying microRNA-222-3p modulation of methamphetamine-induced conditioned place preference in the nucleus accumbens in mice [J]. *Psychopharmacology*, 2022, 239(9): 2997–3008.
- [32] ZHU L, WU F, YAN Z, et al. A novel microRNA, novel-m009C, regulates methamphetamine rewarding effects [J]. *Mol Psychiatry*, 2022, 27(9): 3885–3897.
- [33] CHUI R, DOROVINI-ZIS K. Regulation of CCL2 and CCL3 expression in human brain endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide [J]. *J Neuroinflammation*, 2010, 7: 1.
- [34] GONÇALVES J, MARTINS T, FERREIRA R, et al. Methamphetamine-induced early increase of IL-6 and TNF- α mRNA expression in the mouse brain [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1139: 103–111.
- [35] DU L, SHEN K, BAI Y, et al. Involvement of NLRP3 inflammasome in methamphetamine-induced microglial activation through miR-143/PUMA axis [J]. *Toxicol Lett*, 2019, 301: 53–63.
- [36] YU G, SONG Y, XIE C, et al. MiR-142a-3p and miR-155-5p reduce methamphetamine-induced inflammation; role of the target protein Peli1 [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 370: 145–153.
- [37] 黄荣荣, 张媛, 韩冰, 等. CircHIPK2/miR-124/ σ -1R 轴在星形胶质细胞活化中的作用机制 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2018, 32(9): 693.
- HUANG R R, ZHANG Y, HAN B, et al. Role of circHIPK2/miR-124/ σ -1R axis in astrocyte activation [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2018, 32(9): 693.
- [38] HAFNER A, BULYK M L, JAMBHEKAR A, et al. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(4): 199–210.
- [39] DU H Y, CAO D N, CHEN Y, et al. Alterations of prefrontal cortical microRNAs in methamphetamine self-administering rats: from controlled drug intake to escalated drug intake [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 611: 21–27.
- [40] SHEN S, ZHAO J, DAI Y, et al. Methamphetamine-induced alterations in intestinal mucosal barrier function occur via the microRNA-181c/TNF- α /tight junction axis [J]. *Toxicol Lett*, 2020, 321: 73–82.
- [41] XIONG K, LONG L, ZHANG X, et al. Overview of long non-coding RNA and mRNA expression in response to methamphetamine treatment *in vitro* [J]. *Toxicol In Vitro*, 2017, 44: 1–10.
- [42] LI J, SUN Q, ZHU S, et al. Knockdown of circHomer1 ameliorates METH-induced neuronal injury through inhibiting Bbc3 expression [J]. *Neurosci Lett*, 2020, 732: 135050.
- [43] DENG B, TANG X, WANG Y. Regulation and bioinformatic analysis of circ_0015891/miR-129-1-3p axis in methamphetamine-induced dopaminergic apoptosis [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 999211.
- [44] TSUJIMOTO Y, SHIMIZU S. Another way to die: autophagic programmed cell death [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(Suppl 2): 1528–1534.
- [45] YANG G, ZENG X, LI J, et al. Protective effect of gastrodin against methamphetamine-induced autophagy in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells via the AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 707: 134287.
- [46] ZHU L, ZHU J, LIU Y, et al. Chronic methamphetamine regulates the expression of microRNAs and putative target genes in the nucleus accumbens of mice [J]. *J Neurosci Res*, 2015, 93(10): 1600–1610.
- [47] ZHANG Y, SHEN K, BAI Y, et al. Mir143-BBC3 cascade reduces microglial survival via interplay between apoptosis and autophagy: implications for methamphetamine-mediated neurotoxicity [J]. *Autophagy*, 2016, 12(9): 1538–1559.
- [48] PANG L, WANG Y. Overview of blood-brain barrier dysfunction in methamphetamine abuse [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 161: 114478.
- [49] HUANG J, DING J, WANG X, et al. Transfer of neuron-derived α -synuclein to astrocytes induces neuroinflammation and blood-brain barrier damage after methamphetamine exposure: involving the regulation of nuclear receptor-associated protein 1 [J]. *Brain Behav Immun*, 2022, 106: 247–261.
- [50] NORTHROP N A, HALPIN L E, YAMAMOTO B K. Peripheral ammonia and blood brain barrier structure and function after methamphetamine [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 107: 18

-26.

[51]

BAI Y, ZHANG Y, HUA J, et al. Silencing microRNA-143 protects the integrity of the blood-brain barrier: implications for methamphetamine abuse [J]. Sci Rep, 2016, 6: 35642.

[52]

YANG L, HAN B, ZHANG Y, et al. Engagement of circular RNA HECW2 in the nonautophagic role of ATG5 implicated in the endothelial-mesenchymal transition [J]. Autophagy, 2018, 14(3): 404-418.

[53]

HUANG R, ZHANG Y, HAN B, et al. Circular RNA HIPK2 regulates astrocyte activation via cooperation of autophagy and ER stress by targeting MIR124-2HG [J]. Autophagy, 2017, 13(10): 1722-1741.

[54]

BURGOS K L, JAVAHERIAN A, BOMPRESZI R, et al. Identification of extracellular miRNA in human cerebrospinal fluid by next-generation sequencing [J]. RNA, 2013, 19(5): 712-722.

[55]

CHAND S, GOWEN A, SAVINE M, et al. A comprehensive study to delineate the role of an extracellular vesicle-associated microRNA-29a in chronic methamphetamine use disorder [J]. J Extracell Vesicles, 2021, 10(14): e12177.

[56]

KIM B, TAG S H, KIM Y S, et al. Circulating microRNA miR-137 as a stable biomarker for methamphetamine abstinence [J]. Psychopharmacology, 2022, 239(3): 831-840.

[57]

PRATS A C, DAVID F, DIALLO L H, et al. Circular RNA, the key for translation [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(22): 8591.

[收稿日期] 2023-04-24

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://zgsgydw.cnjournals.com>

期待您的来稿!

刘沿, 胡小垒, 许可洪, 等. 经皮给药系统皮肤模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 122-128.

Liu Y, Hu XL, Xu KH, et al. Overview of *in vitro* skin models of transdermal drug delivery systems [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 122-128.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.015

经皮给药系统皮肤模型的研究进展

刘 沿^{1,2,3}, 胡小垒^{1,2,3}, 许可洪^{1,2,3}, 赵海荣^{1,2,3}, 巫秀美^{2,3,4}, 杨自忠^{1,2,3},
张成桂^{1,2,3}, 赵 昱^{1,2,3}, 高鹏飞^{1,2,3*}

(1.大理大学药学院, 云南 大理 671000; 2.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;
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】 经皮给药系统(transdermal drug delivery system, TDDS)的皮肤模型是指构建能够模拟人体皮肤结构和功能, 并用于研究和评估药物在经皮给药过程中的吸收、渗透及药效等方面的实验模型。该模型可代替传统人体皮肤实验, 减少药物开发过程中对人体皮肤的使用, 为经皮制剂的研发提供一种便捷、可控且经济高效的方法。针对经皮给药系统的皮肤模型, 本文从药物经皮吸收途径出发, 对目前常用的动物皮肤模型、人工皮肤模型、重组人体皮肤模型进行介绍, 并对其优缺点及应用进行了分析, 为经皮制剂的研发提供参考。

【关键词】 经皮给药系统; 皮肤模型; 应用特点

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0122-07

Overview of *in vitro* skin models of transdermal drug delivery systems

LIU Yan^{1,2,3}, HU Xiaolei^{1,2,3}, XU Kehong^{1,2,3}, ZHAO Hairong^{1,2,3}, WU Xiumei^{2,3,4}, YANG Zizhong^{1,2,3},
ZHANG Chenggui^{1,2,3}, ZHAO Yu^{1,2,3}, GAO Pengfei^{1,2,3*}

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

【Abstract】 Skin modeling of transdermal drug delivery system refers to experimental models that mimic the structure and function of human skin to explore and evaluate absorption, penetration, and efficacy of medicines in transdermal drug delivery. It provides an alternative to traditional human skin experiments and reduces the use of human skin in medical research, which is convenient, controllable, and cost effective. For skin models of transdermal drug delivery systems, this article introduces commonly used animal skin models, artificial skin models, and recombinant human skin models from the perspective of the transdermal absorption pathway of medicines, and analyzes their advantages, disadvantages, and applications so provide references the research and development of transdermal formulations and topical therapies.

【Keywords】 transdermal drug delivery system; skin model; application characteristics

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

【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】 刘沿 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药学。E-mail: liuyan2022666@163.com

【通信作者】 高鹏飞 (1971—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 代谢组学, 肠道菌群。E-mail: gaodaluan@126.com

经皮给药系统 (transdermal drug delivery system, TDDS) 是指药物经皮肤吸收进入体循环,从而达到全身或局部治疗作用,实现预防或治疗疾病的新型给药剂剂系统^[1]。与传统给药方式相比, TDDS 具有提高患者依从性、减少副作用、避免肝首过效应、安全性高等诸多优势^[2]。

随着 TDDS 的发展,皮肤作为一种给药途径被广泛使用。然而,皮肤的角质层 (stratum corneum, SC) 屏障特性以及多层结构严重限制了药物的运输和生物利用度^[3]。此外,人体皮肤由于存在伦理性问题使用受限,影响了 TDDS 的研究^[4]。因此,旨在开发出模拟人体皮肤的体外皮肤模型。目前,已报道了多种替代人体皮肤的皮肤模型应用于 TDDS 研究,其可以通过模拟人体皮肤特性评估 TDDS 的药物经皮吸收及渗透等性能,为 TDDS 制剂的研发提供关键的技术支持。

本文总结了目前 TDDS 研究中常用的动物皮肤模型、人工皮肤模型和重组皮肤模型的研究进展,

阐述这 3 种模型的应用特点,比较各自的优势及不足,为 TDDS 研究提供参考。

1 动物皮肤模型

动物皮肤模型是国内较为常用的皮肤模型,其优点在于物种选择性较多、与人体皮肤结构相似、具有较高的利用价值等^[5]。目前研究该模型所涉及的动物主要有:猪、啮齿类动物 (小鼠、豚鼠、大鼠)、家兔、蛇、灵长类动物等^[6-8]。这些动物皮肤模型在体外经皮渗透研究中各具应用特点 (表 1)。

1.1 猪

体外经皮渗透研究中,猪皮在组成、渗透、体内代谢等方面与人体皮肤高度相似,特别是具有人体皮肤相似的多余毛被和分化良好的厚表皮及真皮层,广泛用来代替人体皮肤进行经皮渗透实验^[11-13]。目前,已利用猪皮肤模型评估了乳膏、软膏、洗剂、乳剂、微粒、胶体等多种经皮药物剂型^[14]。

经皮渗透研究应用中,猪腹部及猪耳皮应用范

表 1 动物皮肤模型应用特点
Table 1 Characteristics of animal skin model applications

动物模型 ^[9-10] Animal model	优点 Advantages	不足 Disadvantages
猪 Pigs	①生理及解剖结构与人类皮肤相似性 ①Physiological and anatomical structure are similar to human skin	①不同解剖部位存在个体差异 ①There are individual differences in different anatomical parts
	②猪皮体外渗透研究效果较佳 ②Effect of porcine skin penetration in vitro is better	②年龄影响皮肤厚度 ②Age affects skin thickness
	③易获取,可冷冻贮藏 ③Easy to obtain, can be frozen and stored	
啮齿类动物 Rodents	①皮肤结构与人类皮肤相似 ①Skin anatomy is similar to human skin	①比人类皮肤渗透性大 ①Higher permeability than human skin
	②易获取、价格便宜、操作简单 ②Easy to obtain, inexpensive and simple to operate	②有毛啮齿类,毛囊较多,影响药物经皮吸收 ②Hairy rodents with more hair follicles, affecting transdermal absorption of drugs
灵长类动物 Primates	①生理及解剖结构与人体皮肤相似 ①Physiological and anatomical structure are similar to human skin	①使用受限、价格昂贵 ①Limited use and expensive
	②经皮吸收效果好 ②Effect of transdermal absorption is great	②皮肤覆盖浓密毛皮与人类皮肤结构略有差异 ②Skin covered with dense fur has a slightly different structure from human skin
家兔 Rabbits	①常用于皮肤毒性实验 ①It is often used in skin toxicity tests	①皮肤渗透性高于类皮肤 ①Permeability of skin is higher than that of similar skin
	②易获取 ②Easy to obtain	②毛囊密度较高 ②Higher hair follicle density
蛇 Snakes	②脱毛皮肤易损伤 ②Hair removal skin is prone to damage	
	①单个动物可提供多次蛇蜕 ①A snake can provide multiple molts	①皮肤渗透性高于类皮肤 ①Permeability of skin is higher than that of similar skin
	②不存在个体间差异 ②There are no individual differences	②毛囊缺乏影响药物的渗透性 ②Lack of hair follicles affects drug permeability
	③结构、组成、脂质含量和透水性等方面于人类 SC 具有相似性 ③Structure, composition, lipid content and water permeability of human SC are similar	

围较广,尤其猪耳皮,该部位的 SC 厚度为 10 μm ,与人体前臂的 17 μm SC 接近,且表皮层和真皮层的厚度十分相似^[15-16]。研究表明,猪耳皮常用于测定不同配方化合物的透皮功效以及确定化合物外用配方应用对皮肤的影响效果^[17]。此外,有研究成功利用带状剥离的猪耳皮作为体外 TDDS 皮肤模型来验证、评估对早产儿经皮给药的可行性^[18]。并且新鲜的猪皮可用于预测化合物在皮肤中的显著生物转化和进行皮肤药代动力学研究^[19]。

1.2 啮齿类动物

啮齿类动物在 TDDS 体外皮肤模型中也有所应用,其中具有代表性的有大鼠、小鼠和豚鼠。其具有体积小、操作方便、来源丰富、成本低、易获取等优点^[20]。啮齿类动物中,大鼠的皮肤结构与人体皮肤最为相似,可用于体外经皮吸收实验,及透皮吸收的体内评价,但其皮肤渗透性通常高于人体皮肤,是人体皮肤的 3~5 倍^[17,21]。研究应用中,为了不影响药物经皮吸收和渗透效果,多选用无毛大鼠皮肤模型,且其腹部和背部皮肤常作为经皮渗透试验选取部位^[22]。

与大鼠及人体皮肤相比,小鼠皮肤厚度及角质层较薄,且皮肤渗透性远大于人体皮肤,因此小鼠皮肤具有更高的渗透性和较低的 SC 屏障作用^[23]。小鼠腹部毛发较少与人体皮肤结构相似,且毛孔密度接近,常用于药物经皮渗透研究,尤其是早期处方筛选中的应用^[9,24]。豚鼠皮肤厚度在经皮吸收可接受范围内,但因真皮中无汗腺与人皮有差异,渗透性大于人体皮肤,在体外经皮渗透研究中受限,但对毒物有较强的刺激反应,可用于局部皮肤毒性作用试验。

1.3 其他动物皮肤模型

灵长类动物在系统发育上最接近人类,且与人类的皮肤相似,手臂内侧、腿部、躯干等区域都相对无毛,且经皮吸收的区域差异较小,是经皮吸收理

想的动物模型^[20]。但由于涉及实验伦理及价格昂贵不易获取等原因导致其使用受到限制。

家兔、蛇等在药物经皮吸收的研究中有所报道。在体外皮肤渗透研究中,家兔的药物吸收速率较快,常用于考察药物的皮肤毒性^[25]。药物经兔皮进入血液循环效果虽较好,但其渗透性过大,作为经皮吸收的理想预测模型的应用受到限制^[6]。

此外,蛇蜕也常被作为替代皮肤模型,其特点在于蛇蜕不存在个体差异^[14];获取便捷无需伤害动物;在结构、组成、脂质含量和透水性方面证实了与人类角质层相似。但由于缺乏毛囊等原因,蛇蜕会影响药物的渗透性,因此,该模型不适合研究通过毛囊途径进行经皮药物的真皮吸收^[14]。

2 人工皮肤模型

人工皮肤模型,是一种简化人工模型膜,主要由各种类型的扩散细胞及磷脂混合物制备而成,亦称人工膜^[26]。该模型可用于测试和评估各种药物及制剂范围,提高优化局部制剂的效率。目前,国内外研发出多种人工皮肤模型,广泛应用于 TDDS 的研究。常见的人工皮肤模型有皮肤平行人工膜渗透模型 (parallel artificial membrane permeation assay, PAMPA)、磷脂囊泡基质渗透模型 (phospholipid veside-based permeation assay, PVPA) 及 Strat-MTM 人工膜,3 种人工皮肤模型应用见表 2。

2.1 PAMPA 模型

早期,PAMPA 模型是由 Kansy 等^[26]以人工磷脂作为生物膜基于 96 微孔微量滴定板分析技术为基础方法制成的人工膜。具有高通量的分析效率^[1,27],模拟皮肤角质层屏障、血脑屏障等特性^[25,28]。研究表明,PAMPA 模型已广泛用于活性成分的经皮扩散及屏障渗透性研究^[29-30],其效果与人体皮肤具有较高相关性。目前,PAMPA 模型已在镇痛药、局部麻醉药、抗氧化剂、解热镇痛药抗炎

表 2 人工皮肤模型的优缺点
Table 2 Advantages and disadvantages of artificial skin models

人工皮肤模型 ^[21] Artificial skin model	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
PAMPA	高通量,渗透相关性良好 High throughput, good permeability correlation	稳定性较差,渗透途径简单 Stability is poor, the penetration path is simple
PVPA	中通量,易处理 Medium flux, easy to handle	渗透途径简单 Simple penetration path
Strat-M TM	商业化,相关性良好 Commercial, good relevance	成本较高 High cost

药、胆碱酯酶抑制剂、维生素类、天然产物活性成分等类型的众多 TDDS 药物的渗透性筛选研究中广泛应用^[31]。

PAMPA 模型不仅可用于高通量筛选单体化合物、天然产物,还可用于测试 TDDS 药物透皮制剂的整体渗透性能^[32]。Vizserálek 等^[10]通过不同的透皮和局部治疗贴片中含有的 4 种不同的活性成分(尼古丁、芬太尼、利瓦斯替明和酮洛芬)对 PAMPA 模型进行体外渗透研究,结果证实了 PAMPA 模型是评估和分类透皮贴剂性能的有效工具^[10]。

综上,PAMPA 模型在一定程度能够模拟人体角质层的屏障特性,可作为预测人体皮肤渗透系数的一种快速、经济的研究工具,然而由于缺乏皮肤生物复杂性,如蛋白质、附属物、脂质和表皮的分层结构,适用范围受限,主要作为局部和经皮给药制剂的潜在预筛工具^[32]。

2.2 PVPA 模型

PVPA 模型是由 Flaten 等^[27]开发的一种以磷脂囊泡为屏障层的渗透模型,该模型可用于预测药物渗透性的中通量筛选,且在特定条件下可用于高通量筛选。其结构组成与 PAMPA 模型不同之处在于 PVPA 模型屏障由支撑膜和膜上堆积的脂质体层组成,固定在磷脂囊泡基质中,其通透性稳定不因外界干扰而增加^[1,27]。另外,PVPA 模型模拟体内吸收条件优于单层的 PAMPA 模型^[28]。

实验研究中,PVPA 模型在测试新活性物质以及各种配方的药物的渗透实验中有所应用。Engesland 等^[22]开发出不同的 PVPA 模型进行测试,验证了该模型能够穿透和区分不同亲脂性的药物,且该模型可重复生产,用于候选药物、外用配方药物及药妆品的渗透皮肤模型。

2.3 Strat-M™ 人工膜

Strat-M™ 人工膜由两层含有人造合成脂类的聚酯砜和一层聚烯烃支撑层组成,为一种模拟皮肤组织的人造膜,厚度约为 300 μm,呈现与人类皮肤相似的形态^[33]。该合成膜含有脂质(神经酰胺、胆固醇、游离脂肪酸和其他成分)的组合,其特定比例类似于人类 SC 中发现的比例^[34]。有利于 Start-M™ 充分模拟皮肤屏障性能,可作为多种药物的透皮扩散模型^[28]。

在体外渗透实验中,Haq 等^[34]利用 Strat-M™ 膜与人体皮肤进行对比,研究了不同促进剂对尼古丁透皮影响,验证了 Strat-M™ 膜与人体皮肤具有较好

的相关性,可有效代替人体皮肤。Milanowski 等^[35]也通过预测评估 5 种非甾体抗炎药(双氯芬酸、乙酯、布洛芬、酮洛芬和萘普生)透过 Strat-M™ 人工膜的体外渗透率,来优化体外渗透测试条件,表明 Strat-M™ 人工膜作为皮肤渗透模型具有一定可行性。然而 Start-M™ 人工膜也存在成本较高、不易大量使用等缺点,有待进一步改善。

3 重组人体皮肤模型

重组人体皮肤模型又称重组人体皮肤等效物,为 3D 皮肤模型,该模型由组织培养物生长的人类细胞和存在于皮肤中的基质等效物组成^[36],通常分为重组人体表皮模型(reconstructed human epidermis models, RHE)和全层皮肤模型(full-thickness humanskin models, LSE)。目前,已开发出多种重组人体皮肤模型用于测量经皮吸收^[37](表 3)。

3.1 RHE 模型

RHE 模型由角质层和活表皮组成,模拟人类表皮的重建表皮模型^[40]。目前,已上市的 RHE 模型有 EpiSin™、SkinEthic™、EpiDerm™ 等产品。这些模型的形态、脂质组成和生化标志物方面与天然人体组织具有较高相似性^[38]。且经过欧洲替代方法验证中心(ECVAM)认证,具有较高的标准化程度^[41-42]。这些模型主要用于皮肤刺激、皮肤腐蚀、光毒性、表皮遗传毒性、透皮给药、代谢等研究^[42]。

目前,有研究利用 EpiSkin™ 模型评估 87 种化学品的预测能力,研究结果证实了 EpiSkin™ 模型在评估皮肤刺激性、腐蚀性方面的可行性^[43]。Alépée 等^[44]利用 SkinEthic™ 模型进行了体外皮肤腐蚀和刺激性评估,结果较为理想。RHE 模型也具有一定局限性,如皮肤屏障功能较弱、复杂度低、测试周期短等缺点^[38]。并且与天然人体皮肤相比,这些模型具有较高的皮肤渗透性,极大地限制了在药物运输研究中的价值,并可能导致毒性研究中的一些假阳性现象。

3.2 LSE 模型

LSE 模型由角质层、活表皮、真皮或皮肤等效物组成,其形态和组织功能相较于 RHE 模型更加丰富,更接近人体皮肤特征^[16]。目前,市面上广泛应用的 LSE 模型包括 EpidermFT®、StarataTest®、Graftskin®、Phenion® FT 等,这些模型具有较高标准化,广泛用于经皮吸收测试、伤口愈合及细菌粘附等研究^[42]。但成本较高,且无法长期维持细胞培养。

表 3 重建皮肤模型应用
Table 3 Reconstructed skin model applications

模型名称 ^[38-39] Model name	公司 Corporation	应用 Applications
重建人体表皮模型 RHE Reconstructed human epidermis		
SkinEthic®	SkinEthic	皮肤腐蚀性、皮肤刺激、紫外线照射、渗透性 Skin corrosion, skin irritation, UV exposure, permeability
EpiSkin®	SkinEthic	皮肤腐蚀性、皮肤刺激性、紫外线照射、渗透性 Skin corrosion, skin irritation, UV exposure, permeability
EpiDerm®	MatTek	皮肤腐蚀性、皮肤刺激性、水合作用、基因毒性、皮肤给药、光毒性 Skin corrosion, skin irritation, hydration, genotoxicity, skin administration, phototoxicity
全层皮肤模型 LSE Full-thickness skin models LSE		
EpiDermFT®	MatTek	抗衰老、伤口愈合、皮肤补水、防紫外线 Anti-aging, wound healing, skin hydration, UV protection
StrataTest®	Strate Tech	毒理学、化学、物理组织损伤 Toxicological, chemical, physical tissue damage
Graftskin®	OrganogenesisInc	伤口修复、慢性溃疡、静脉曲张 Wound repair, chronic ulcers, varicose veins

在经皮吸收研究中, Ackermann 等^[45] 将 Phenion® FT 模型用于猪皮平行研究,使用 franz 型扩散细胞量化苯甲酸、尼古丁、睾酮和咖啡因的渗透。结果表明 Phenion® FT 模型可有效代替人体皮肤,进一步验证后可用于经皮吸收研究。此外, Groeber 等^[41] 报道,真皮成纤维细胞可以增强角质形成细胞对有毒化学物质的抵抗力,因此,使用 FT 模型可从体外毒理学研究中获得更有说服力的数据。

4 展望

随着 TDDS 的广泛应用和研究,促进了体外皮肤模型的发展。然而,目前研究使用的体外皮肤模型存在一定局限性,例如,动物皮肤模型是药物经皮吸收研究的传统方法,但存在物种差异、伦理性、无法重复利用及标准化等问题^[46-47]。

人工皮肤模型大多是以脂质成分为基质,通过模仿皮肤的脂质组成或结构从而模拟皮肤屏障功能的模型,作为处方快速筛选的工具,具有高重现性、高通量、制备简单、可修饰性强等优点^[1],但目前仅模拟人体皮肤部分生理功能,尚无法完全还原皮肤的复杂结构。

重组人体皮肤模型相较以上两种皮肤模型能够更好的还原人体真实皮肤微环境,提供更准确的药物经皮吸收数据,但该模型仍无法完全模拟真实人体皮肤结构及功能,其生物相容性和安全性还需进一步考察,且该模型的构建和维护较为复杂和昂

贵。总之,动物皮肤模型、人工皮肤模型和重组人体皮肤模型三者之间各有其优势及不足,需根据实验成本、可行性及研究目的等综合考虑选择合适的皮肤模型。未来,经皮给药的皮肤模型有望在以下方面得到进一步发展:(1)进一步更精准模拟人体皮肤的结构与功能,通过更精确的细胞组织模型和生物力学特性的考虑,更准确地预测药物的透皮性能和皮肤吸收的效果^[48]; (2)随着个体化医疗的兴起,皮肤模型有望发展成可以根据个体特征进行定制的工具。通过结合个体的基因信息、生理参数和皮肤特性,可以创建个体化的皮肤模型,更精确地评估不同药物在不同个体上的透皮表现,为经皮给药系统的研发提供新的途径。(3)随着纳米技术、生物打印和微流控技术等领域的不断进展,这些新技术可以被应用于皮肤模型的制备和改进。例如,利用纳米粒子进行药物传递,利用 3D 打印技术制备复杂的皮肤结构以及利用微流控技术实现更精确的模拟等^[49-50]。

总而言之,皮肤模型未来的进展将伴随经皮给药系统的研究,建立起更精准、个体化、功能更加完善的皮肤模型,为经皮给药系统的研究和应用提供更大的帮助,推动药物传递技术的进步以及为皮肤病治疗领域带来更多突破。

参考文献:

[1] 张会, 陈军, 蒋秋冬, 等. 脂质人工皮肤膜的研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2016, 51(10): 780-785.

- ZHANG H, CHEN J, JIANG Q D, et al. Advances in research on lipid artificial skin membrane [J]. Chin Pharm J, 2016, 51(10): 780-785.
- [2] 余晨曦, 高会乐. 经皮给药技术用于脑靶向药物递送 [J]. 药理学学报, 2023, 58(8): 2334-2340.
- YU C X, GAO H L. Transdermal drug delivery technology for brain-targeted drug delivery [J]. Acta Pharm Sin, 2023, 58(8): 2334-2340.
- [3] VILELA DE SOUSA I, FERREIRA M J S, BEBIANO L B, et al. Skin models of cutaneous toxicity, transdermal transport and wound repair [J]. Burns Trauma, 2023, 11: tkad014.
- [4] SHAKEL Z, NUNES C, COSTA LIMA S A, et al. Development of a novel human stratum corneum model, as a tool in the optimization of drug formulations [J]. Int J Pharm, 2019, 569: 118571.
- [5] 吴玥, 王珏, 冯婷婷, 等. 基于动物模型的药物筛选数据库的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(6): 778-786.
- WU Y, WANG J, FENG T T, et al. Construction of a drug screening database based on animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(6): 778-786.
- [6] 朱慧勇, 武余波, 卢望丁, 等. 用于经皮给药系统研究的皮肤模型与关键质量控制 [J]. 中国医药工业杂志, 2022, 53(5): 591-600.
- ZHU H Y, WU Y B, LU W D, et al. Skin models and critical quality control for the studies of transdermal drug delivery systems [J]. Chin J Pharm, 2022, 53(5): 591-600.
- [7] 李子祥, 邱华明, 吴延军, 等. 小型猪在中医动物模型中的应用研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(9): 1186-1193.
- LI Z X, QIU H M, WU Y J, et al. Progress in the application of minipigs as animal models of Chinese medicine [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(9): 1186-1193.
- [8] 吴玥, 薛婧, 魏强, 等. 国家动物模型资源共享信息平台的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1080-1086.
- WU Y, XUE J, WEI Q, et al. Establishment of national infrastructure for an animal model resource platform [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1080-1086.
- [9] SUPE S, TAKUDAGE P. Methods for evaluating penetration of drug into the skin: a review [J]. Skin Res Technol, 2021, 27(3): 299-308.
- [10] VIZSERÁLEK G, BERKÓ S, TÓTH G, et al. Permeability test for transdermal and local therapeutic patches using Skin PAMPA method [J]. Eur J Pharm Sci, 2015, 76: 165-172.
- [11] 罗世英, 陈华萍. 透皮吸收常用的几种实验动物 [J]. 中国药业, 2004, 13(4): 74-75.
- LUO S Y, CHEN H P. Several experimental animals commonly used for transdermal absorption [J]. China Pharm, 2004, 13(4): 74-75.
- [12] RANAMUKHAARACHCHI S A, LEHNERT S, RANAMUKHAARACHCHI S L, et al. A micromechanical comparison of human and porcine skin before and after preservation by freezing for medical device development [J]. Sci Rep, 2016, 6: 32074.
- [13] 石兴勇, 王吉, 陈斌. 我国实验小型猪的发展现状及展望 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 104-109.
- SHI X Y, WANG J, CHEN B. Current status and prospect of research of experimental miniature swine in China [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(1): 104-109.
- [14] FLATEN G E, PALAC Z, ENGESLAND A, et al. *In vitro* skin models as a tool in optimization of drug formulation [J]. Eur J Pharm Sci, 2015, 75: 10-24.
- [15] GODIN B, TOUITOU E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2007, 59(11): 1152-1161.
- [16] NEVES L M G, WILGUS T A, BAYAT A. *In vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* approaches for investigation of skin scarring: human and animal models [J]. Adv Wound Care, 2023, 12(2): 97-116.
- [17] SUMMERFIELD A, MEURENS F, RICKLIN M E. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin [J]. Mol Immunol, 2015, 66(1): 14-21.
- [18] SEKKAT N, KALIA Y N, GUY R H. Porcine ear skin as a model for the assessment of transdermal drug delivery to premature neonates [J]. Pharm Res, 2004, 21(8): 1390-1397.
- [19] SINTOV A C. Cumulative evidence of the low reliability of frozen/thawed pig skin as a model for *in vitro* percutaneous permeation testing [J]. Eur J Pharm Sci, 2017, 102: 261-263.
- [20] JUNG E C, MAIBACH H I. Animal models for percutaneous absorption [J]. J Appl Toxicol, 2015, 35(1): 1-10.
- [21] BARBERO A M, FRASCH H F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: a quantitative review [J]. Toxicol In Vitro, 2009, 23(1): 1-13.
- [22] ENGESLAND A, SKAR M, HANSEN T, et al. New applications of phospholipid vesicle-based permeation assay: permeation model mimicking skin barrier [J]. J Pharm Sci, 2013, 102(5): 1588-1600.
- [23] DELLAMBRA E, ODORISIO T, D'ARCANGELO D, et al. Non-animal models in dermatological research [J]. ALTEX, 2019, 36(2): 177-202.
- [24] GROEBER F, HOLEITER M, HAMPEL M, et al. Skin tissue engineering—*in vivo* and *in vitro* applications [J]. Clin Plast Surg, 2012, 39(1): 33-58.
- [25] NICOLI S, PADULA C, AVERSA V, et al. Characterization of rabbit ear skin as a skin model for *in vitro* transdermal permeation experiments: histology, lipid composition and permeability [J]. Skin Pharmacol Physiol, 2008, 21(4): 218-226.
- [26] KANSY M, SENNER F, GUBERNATOR K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. J Med Chem. 1998, 41(7): 1007-1010.
- [27] FLATEN G E, BUNJES H, LUTHMAN K, et al. Drug permeability across a phospholipid vesicle-based barrier 2. Characterization of barrier structure, storage stability and stability

- towards pH changes [J]. Eur J Pharm Sci, 2006, 28(4): 336–343.
- [28] FALAVIGNA M, KLITGAARD M, BRASE C, et al. Mucus-PVPA (mucus Phospholipid Vesicle-based Permeation Assay): an artificial permeability tool for drug screening and formulation development [J]. Int J Pharm, 2018, 537(1/2): 213–222.
- [29] 马敏, 瞿叶清, 戈叶婷, 等. 应用复合磷脂脂质体人工皮肤膜表征香附四物汤活性部位生物药剂学性质 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1048–1055.
- MA M, QU Y Q, SHU Y T, et al. Study on biopharmaceutical properties of active fraction from Xiangfu Siwu Decoction by composite phospholipid liposome-based artificial skin membrane [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2018, 49(5): 1048–1055.
- [30] BOUWSTRA J A, HELDER R W J, EL GHALBZOURI A. Human skin equivalents: impaired barrier function in relation to the lipid and protein properties of the stratum corneum [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 175: 113802.
- [31] 宋三孔, 白银亮, 梁建娣. 平行人工膜渗透模型在经皮给药系统药物渗透性筛选中的应用进展 [J]. 中国药房, 2023, 34(4): 502–507.
- SONG S K, BAI Y L, LIANG J D. Application progress of parallel artificial membrane permeation assay model in drug permeability screening of transdermal drug delivery system [J]. China Pharm, 2023, 34(4): 502–507.
- [32] NEUPANE R, BODDU S H S, RENUKUNTLA J, et al. Alternatives to biological skin in permeation studies: current trends and possibilities [J]. Pharmaceutics, 2020, 12(2): 152.
- [33] KUNITA R, NISHIJIMA T, TODO H, et al. A mathematical approach using Strat-M[®] to predict the percutaneous absorption of chemicals under finite dose conditions [J]. Pharmaceutics, 2022, 14(7): 1370.
- [34] HAQ A, GOODYEAR B, AMEEN D, et al. Strat-M[®] synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin [J]. Int J Pharm, 2018, 547(1–2): 432–437.
- [35] MILANOWSKI B, WOSICKA-FRĄCKOWIAK H, GŁÓWKA E, et al. Optimization and evaluation of the *in vitro* permeation parameters of topical products with non-steroidal anti-inflammatory drugs through Strat-M[®] membrane [J]. Pharmaceutics, 2021, 13(8): 1305.
- [36] ZHANG Y, LANE M E, HADGRAFT J, et al. A comparison of the *in vitro* permeation of niacinamide in mammalian skin and in the Parallel Artificial Membrane Permeation Assay (PAMPA) model [J]. Int J Pharm, 2019, 556: 142–149.
- [37] VAN GELE M, GEUSENS B, BROCHEZ L, et al. Three-dimensional skin models as tools for transdermal drug delivery: challenges and limitations [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2011, 8(6): 705–720.
- [38] PLAZA C, MEYRIGNAC C, BOTTO J M, et al. Characterization of a new full-thickness *in vitro* skin model [J]. Tissue Eng Part C Methods, 2021, 27(7): 411–420.
- [39] VARGA-MEDVECKZY Z, KOCSIS D, NASZLADY M B, et al. Skin-on-a-chip technology for testing transdermal drug delivery-starting points and recent developments [J]. Pharmaceutics, 2021, 13(11): 1852.
- [40] GARCIA M T J, DE VASCONCELLOS F L L, RAFFIER C P, et al. Alternative methods to animal studies for the evaluation of topical/transdermal drug delivery systems [J]. Curr Top Med Chem, 2018, 18(4): 287–299.
- [41] GROEBER F, HOLEITER M, HAMPEL M, et al. Skin tissue engineering—*in vivo* and *in vitro* applications [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2011, 63(4–5): 352–366.
- [42] SUHAIL S, SARDASHTI N, JAISWAL D, et al. Engineered skin tissue equivalents for product evaluation and therapeutic applications [J]. Biotechnol J, 2019, 14(7): e1900022.
- [43] ALÉPÉE N, GRANDIDIER M H, COTOVIO J. Usefulness of the EpiSkinTM reconstructed human epidermis model within Integrated Approaches on Testing and Assessment (IATA) for skin corrosion and irritation [J]. Toxicol In Vitro, 2019, 54: 147–167.
- [44] ALÉPÉE N, GRANDIDIER M H, TORNIER C, et al. An integrated testing strategy for *in vitro* skin corrosion and irritation assessment using SkinEthicTM Reconstructed Human Epidermis [J]. Toxicol In Vitro, 2015, 29(7): 1779–1792.
- [45] ACKERMANN K, BORGIA S L, KORTING H C, et al. The Phenion full-thickness skin model for percutaneous absorption testing [J]. Skin Pharmacol Physiol, 2010, 23(2): 105–112.
- [46] 张道涵, 邵红霞. 实验动物非麻醉安乐死技术的伦理学探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(3): 82–89.
- ZHANG D H, SHAO H X. Ethical analysis of non-anesthetic euthanasia for experimental animals [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(3): 82–89.
- [47] 杜冠华. 药物临床前研究与转化医学——实验动物的应用与动物实验 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(10): 24–26.
- DU G H. The application of experimental animal in the drug preclinical research and translational medicine [J]. Chin J Comp Med, 2011, 21(10): 24–26.
- [48] 金荣华. 三维生物打印脱细胞真皮基质及甲基丙烯酸化明胶构建全层皮肤的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
- JIN R H. Three-dimensional bioprinting of a full-thickness functional skin model using acellular dermal matrix and gelatine methacrylamide bioink [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021.
- [49] 李欢. 基于深度学习图像分割算法的生物 3D 打印皮肤组织修复研究 [D]. 杭州: 杭州电子科技大学, 2021.
- LI H. Research on skin tissue repair of biological 3D printing based on deep learning image segmentation algorithm [D]. Hangzhou: Hangzhou Dianzi University, 2021.
- [50] 解雨馨, 彭慧玲, 先德海, 等. 体外银屑病样三维皮肤模型的构建 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2023, 37(3): 284–290.
- XIE Y X, PENG H L, XIAN D H, et al. Study on establishment of psoriasis-like three-dimensional skin model *in vitro* [J]. Chin J Dermatovenereol, 2023, 37(3): 284–290.

李泓宇, 兰瑞, 王漫漫, 等. 小檗碱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, 2024, 34(2): 129-136.
Li HY, Lan R, Wang MM, et al. Research progress of berberine in the field of neuroprotection in ischemic stroke [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 129-136.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.016

小檗碱在缺血性脑卒中神经保护领域的研究进展

李泓宇^{1,2}, 兰瑞^{1*}, 王漫漫^{1,2}, 王玮玮^{1,2}, 张勇³, 唐琛^{1,2}, 刘双^{1,2}

(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. 郑州大学第三附属医院, 郑州 450000)

【摘要】 小檗碱是一种天然的异喹啉生物碱, 最初可作为广谱抗菌药应用于临床治疗肠炎、消化性溃疡、慢性胃炎、肺炎等疾病。近年来随着对小檗碱药理作用的深入研究, 越来越多证据证明, 小檗碱对缺血性脑卒中具有神经保护作用。在本综述中, 我们介绍了小檗碱对缺血性脑卒中危险因素的干预, 还详细论述了小檗碱在缺血性脑卒中不同机制的神经保护作用, 旨在对本领域的临床和基础研究提供一定的参考。

【关键词】 缺血性脑卒中; 小檗碱; 危险因素; 神经保护; 脑损伤机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0129-08

Research progress of berberine in the field of neuroprotection in ischemic stroke

LI Hongyu^{1,2}, LAN Rui^{1*}, WANG Manman^{1,2}, WANG Weiwei^{1,2}, ZHANG Yong³, TANG Chen^{1,2}, LIU Shuang^{1,2}

(1. Encephalopathy Center, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China. 2 the First Clinical Medical College of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000.
3. the Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Berberine is a natural isoquinoline alkaloid that was initially used as a broad-spectrum antibacterial agent in clinical treatment of enteritis, peptic ulcers, chronic gastritis, pneumonia, and other diseases. In recent years, in-depth study of the pharmacological effects of berberine has provided increasing evidence that berberine has neuroprotective effects on ischemic stroke. In this review, we introduce the effect of berberine on risk factors of ischemic stroke and discuss the neuroprotective effects of berberine on various mechanisms of ischemic stroke in detail to provide a reference for clinical and basic research in this field.

【Keywords】 ischemic stroke; berberine; risk factors; neuroprotection; mechanisms of brain injury

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

缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 是一种残疾率、复发率和死亡率都很高的脑血管疾病, 它主要是由于脑血管阻塞, 导致局部脑供血功能障碍^[1]。

它的发病率占有所有脑卒中患者的 87%^[2]。目前 IS 的治疗多选用溶栓治疗, 然而, 组织纤溶酶原激活剂有非常窄的治疗时间窗口 (<4.5 h)、选择性疗

【基金项目】 国家自然科学基金 (81973618, 81503422); 河南省中医药科学研究专项课题 (2022JDZX090); 河南省自然科学基金资助项目 (2023000410399)。

【作者简介】 李泓宇 (1999—), 女, 硕士, 研究方向: 中西医结合脑病方向的基础研究。E-mail: lihongyu03042022@163.com

【通信作者】 兰瑞 (1984—), 女, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 中西医结合神经病学相关临床及实验研究。

E-mail: lanrui0312@163.com

效、出血性并发症等缺点。因此,我们迫切需要探索并开发有效治疗 IS 的相关药物。而中草药在治疗 IS 及其后遗症方面有着悠久的历史。小檗碱是一种存在于多种中草药根茎中的异喹啉生物碱,可以治疗包括 IS 在内的多种疾病并在神经保护中发挥着至关重要的作用。本文综述了小檗碱在缺血性脑卒中神经保护领域的现有证据,从而指出其在神经保护方面的潜力。

1 小檗碱的概述

小檗碱是一种黄色结晶粉末状的异喹啉生物碱,它广泛存在于多种草药的根、根茎、茎或树皮中,化学式为 $C_{20}H_{18}NO_4^+$ (图 1),易溶于沸水,微溶于冷水,几乎不溶于乙醇、氯仿和乙醚,2000 多年来,小檗碱一直被中国传统医学用于治疗各种疾病^[3]。最常见的是用作抗菌药,它对痢疾杆菌、大肠杆菌、肺炎双球菌、金黄葡萄球菌、链球菌、伤寒杆菌及阿米巴原虫均有抑制作用,临床主要用于肠道感染及菌痢等。然而,随着研究的不断进展,越来越多证据表明,小檗碱很容易穿透血脑屏障(blood brain barrier, BBB),对帕金森、阿尔茨海默病和蛛网膜下腔出血损伤等多种神经系统疾病具有强大的神经保护作用^[4]。但小檗碱在 IS 的神经保护机制尚不明确,有研究认为,小檗碱对 IS 的神经保护机制和调控自噬反应、抗炎、抑制氧化应激、抑制细胞凋亡、促进血管新生、保护血脑屏障等机制有关。

2 小檗碱对 IS 危险因素的干预

IS 的可干预危险因素包括动脉粥样硬化、高血压、糖尿病、肥胖、血脂异常等,这些危险因素极易引起脑血管持续损伤,诱导神经退行性病变,加重 IS 的发生发展。

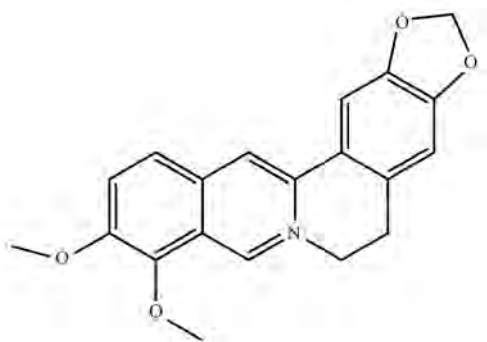


图 1 小檗碱化学式

Figure 1 Chemical formula of berberine

2.1 动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是多种心脑血管疾病发病的主要原因之一^[5],也是 IS 发生最常见的诱因。动脉粥样硬化的发病机制很复杂。有研究发现,它与低密度脂蛋白胆固醇氧化、炎症机制、内皮细胞损伤等多种因素有关^[6]。小檗碱可以通过抗炎、抗氧化应激反应、减少内皮细胞损伤等机制来发挥抗动脉粥样硬化的作用。最近研究发现,小檗碱减少了主动脉中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,降低了血浆丙二醛(malondialdehyde, MDA)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)水平,从而预防了动脉粥样硬化的发生^[7]。而且它还可以通过降低肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 和血清中 IL-6 的表达,来抑制动脉粥样硬化的形成^[8]。除此之外,小檗碱对内皮细胞损伤也具有保护作用。它可以通过激活腺苷 5'-单磷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)信号通路来改善内皮损伤,增强内皮血管舒张^[9]。因此,小檗碱可以有效地改善动脉粥样硬化,从而干预 IS 的发生发展。

2.2 高血压

高血压是所有 IS 患者中最常见的危险因素。它通常被认为是脑血管疾病最重要且可改变的危险因素^[10]。小檗碱的降压作用是通过抑制血管紧张素转换酶活性和调节信号通路来实现的。动物实验证实,小檗碱显著缓解了血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)诱导的高血压小鼠血压的升高、血管功能障碍和病理重塑,从而达到血管保护的作用^[11]。同样,小檗碱还可以通过 ROS/Erk1/2/iNOS 通路降低大鼠的高血压,激活交感系统,达到保护神经的作用^[12]。此外,在临床试验中,小檗碱可以通过增加 CXC 趋化因子受体 4(CXC chemokine receptor 4, CXCR4)信号的传导来增加高血压患者早期内皮祖细胞的内皮修复能力,从而降低血压和预防心脑血管疾病^[13]。

2.3 糖尿病

糖尿病是 IS 的危险因素之一,有糖尿病的患者患 IS 的风险是无糖尿病患者的两倍^[14]。大多数 II 型糖尿病患者都会出现胰岛素抵抗(insulin resistance, IR),这种情况会导致 IS 疾病加重和发展^[15]。而小檗碱可以通过糖酵解、抑制炎症、调节信号通路等途径来改善糖尿病患者的胰岛素抵抗。有研究表明,小檗碱通过增加葡萄糖激酶的活性来

刺激糖酵解,抑制了肝中的糖异生和脂肪生成,从而改善胰岛素抵抗^[16]。同样,小檗碱可以降低白三烯 B4(leukotriene B4,LTB4)诱导的胰岛素抵抗和肝细胞炎症,以及巨噬细胞的趋化性,来达到抗炎和抗糖尿病的功能^[17]。此外,调控信号通路也是改善胰岛素抵抗的重要途径,有丝分裂原/细胞外信号调节激酶激酶 1 (MEK kinase-1, MEKK1) 被认为是小檗碱的靶标,而小檗碱可以通过靶向 MEKK1 途径来改善 TNF- α 诱导的肝胰岛素抵抗^[18]。因此,小檗碱可以通过不同途径改善糖尿病的胰岛素抵抗,从而控制 IS 疾病的加重和发展。

2.4 肥胖

肥胖会诱发多种疾病,特别是心脑血管疾病。有研究表明,小檗碱是一种有效的降胆固醇药物,它可以降低血清胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇,而不影响血清高密度脂蛋白胆固醇水平^[19]。动物实验证实,小檗碱可明显降低小鼠脂肪细胞脂滴的数量和大小,抑制脂肪的生成,从而预防肥胖的发生^[20]。小檗碱预防肥胖的途径还与 AMPK 途径有关,如小檗碱可通过激活脂肪组织和肌肉中的 AMPK 活性,调节代谢基因的表达,抑制脂肪生成,诱导能量消耗,从而使体重减轻^[21];也可以通过增强 AMPK 依赖性脂肪组织甘油三酯脂肪酶的表达,达到预防肥胖的作用^[22]。此外,小檗碱还可以增强脂肪细胞中的基础甘油三酯脂肪分解,并通过过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ , PPAR γ) 和 CCAAT/增强子结合蛋白 α (CCAAT/enhancer binding protein α , CEBP α) 途径抑制前脂肪细胞和脂肪细胞的分离,从而达到减肥作用^[23]。总之,小檗碱可以有效抑制肥胖的发生,从而达到预防 IS 的作用。

2.5 血脂异常

血脂异常是冠状动脉粥样硬化疾病和 IS 的重要危险因素^[24]。已有研究表明,小檗碱可以有效治疗血脂异常。在临床实验中,口服小檗碱 3 个月就可以调节肠道菌群,降低血清甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇的水平^[25],并可以通过促进细胞内胆固醇外排和降低肠细胞对胆固醇的摄取显著缓解血脂异常^[26]。小檗碱还可以通过激活 AMPK 途径来增强脂肪酸氧化和缓解脂质沉积,从而在脂质代谢紊乱的调节中发挥作用。因此,小檗碱被证实可以通过不同机制和途径调控血脂异常,从而达到预防 IS 的作用。

3 小檗碱在 IS 中神经保护的作用机制

3.1 小檗碱参与自噬反应

自噬是溶酶体内重要的分解代谢过程,是 IS 中必不可少的促生存途径^[27]。自噬的作用是双向的,它通常有益于脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI),但是被过度激活后则会加剧 CIRI^[28]。研究发现,小檗碱对 IS 后自噬反应的调节是双向的。LC3 和 p62 是自噬中的重要蛋白质,自噬发生时,细胞质型 LC3-I 会转化为自噬体膜 LC3-II,LC3-II/LC3-I 比值增大^[29]。而自噬相关基因 Beclin-1 与 Bcl-2 家族蛋白持续结合会抑制自噬发生^[30]。用小檗碱治疗后,Bcl-2 与 Beclin-1 持续性结合,过度的自噬反应被降低,随后产生了对大鼠脑神经的保护作用^[31]。相反,小檗碱也可通过促进自噬反应达到神经保护的作用。在动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 大鼠模型大脑中,小檗碱通过激活蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路,增加 LC3-II/LC3-I、Beclin-1 以及降低 p62 的表达来抑制雷帕霉素靶蛋白 (mechanistic target of rapamycin, mTOR) 磷酸化,从而促进自噬并有利于 MCAO 大鼠神经元的恢复^[27]。基于上述研究,小檗碱对自噬的作用比较复杂,一方面抑制自噬,另一方面却促进自噬发挥神经保护作用。虽然近年来关于小檗碱在自噬调控方面具体机制还有待阐明,但无论促进自噬或者抑制自噬,均有利于改善疾病发生发展并有良好的预后。

3.2 小檗碱抑制炎症反应

炎症反应是细胞死亡的主要原因之一,它会导致脑缺血再灌注损伤和继发性损伤^[32]。高迁移率组 1 (high mobility group box 1, HMGB1)、肺腺癌转录本 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, Malat1) 和 NF- κ B 等促炎介质的表达,直接或间接地促进神经炎症,并使脑梗死和脑水肿面积增加,加重神经功能的损伤^[33]。小檗碱可通过下调 Malat1 和 HMGB1 的表达,减弱神经炎症反应,保护神经元细胞免受脑缺血再灌注损伤^[34]。除此之外,小檗碱的神经保护作用还与靶向信号通路有关。研究发现,小檗碱可以通过靶向丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 途径和 AMPK 非依赖性方式下调促炎细胞因子 iNOS、COX-2、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的水平,并上调抗炎细胞因子 IL-10 的表达,减轻大鼠缺血再灌注

所致的炎症反应,进而发挥脑神经保护作用^[16]。有趣的是,外泌体 miR-182-5p 也参与小檗碱的神经保护作用。它的作用机制可能是小檗碱携带 miR-182-5p 到受伤的神经元,通过抑制神经炎症并改善缺血性脑卒中后的脑损伤,发挥神经保护作用^[35]。由此可见,小檗碱有望成为 IS 的神经保护剂并且有广阔的治疗空间。

3.3 小檗碱调控氧化应激反应

氧化应激反应与 IS 的发病机制密切相关,它是由于 ROS 过度积累导致氧化剂和抗氧化剂失衡,最终导致多种神经系统疾病发生^[36]。有研究表明,ROS 的生成与谷胱甘肽、超氧化物歧化酶、叔丁基过氧化氢等化学物质有关^[36-37]。而小檗碱具有降低 ROS 生成和保护神经细胞免受氧化损伤的潜能,并且在 50 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下可以显著降低 ROS 生成和脂质过氧化,同时改善谷胱甘肽含量和细胞中的超氧化物歧化酶的活性,并通过抗氧化机制对谷氨酸诱导的 N2a 和 PC12 细胞发挥神经保护作用^[37]。同样,叔丁基过氧化氢 (tert-butyl hydroperoxide, t-BHP) 也会使 ROS 过量产生,随后导致氧化应激,线粒体和溶酶体功能障碍,并激活 PC12 细胞产生凋亡级联反应。小檗碱给药后,过量 ROS 诱导的氧化应激和线粒体自噬反应受到明显抑制,从而恢复部分中枢神经系统的神经功能^[38]。除此之外,小檗碱抗氧化应激的作用还与转录因子 PPAR 有关。PPAR 是配体诱导的转录因子,PPARs 激活会发挥抗氧化作用,而小檗碱可以激活 PPAR δ 来清除 ROS,减轻 CIRI 小鼠的氧化损伤,从而赋予神经保护作用^[39]。综上所述,小檗碱可以通过不同机制使 ROS 的产生和清除间保持平衡,而小檗碱很有可能为 IS 的神经保护提供新的研究方向。

3.4 小檗碱抑制细胞凋亡反应

CIRI 诱导的细胞凋亡是神经细胞死亡的重要途径,它明显加剧了 IS 患者的神经功能缺损^[40]。因此,细胞凋亡在 CIRI 的病理过程中起着至关重要的作用。近几年的研究表明,内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 介导的细胞凋亡途径在 IS 的发病机制中是比较经典的,小檗碱可以通过调控 ERS 途径来抑制细胞凋亡,从而达到神经保护的作用^[41-43]。国内学者研究发现,在 MCAO 大鼠模型中,内质网分子伴侣蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulation protein 78, GRP78) 和冠层成纤维细胞生长因子信号调节器 2 (Canopy 2, CNPY2) 的

表达水平可以反映 ERS 细胞凋亡途径的激活程度^[44]。小檗碱处理后,GRP78 和 CNPY2 的表达水平显著降低,ERS 细胞凋亡途径被抑制,随后促进 CIRI 大鼠神经功能恢复。同样,小檗碱还可以通过抑制 ERS 途径来逆转 PC12 细胞中氧-葡萄糖剥夺/再灌注 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 诱导的细胞凋亡,促进 OGD 后的神经恢复^[45]。这表明小檗碱可以通过 ERS 介导的细胞途径抑制细胞凋亡反应,从而促进神经元修复,达到神经保护的作用。

3.5 小檗碱促进血管新生

血管新生是通过刺激血管的生长来实现的,血管的生成可使脑灌注趋于稳定,继而促进神经元的生存,提高大脑可塑性及恢复神经功能^[46]。小檗碱可激活 AMPK 信号通路并在促进血管新生过程中发挥着至关重要的作用。有研究证实,AMPK 信号通路被激活后可介导小胶质细胞从 M1 表型转变为 M2 表型随后促进血管新生。在体内,用小檗碱治疗大脑动脉闭塞小鼠 14 d 后,AMPK 信号通路被激活,促进了 M2 极化并抑制了 M1 极化^[47]。在体外,被小檗碱处理后的脂多糖会诱导小胶质细胞激活 AMPK 信号通路,随后小胶质细胞极化为 M2 表型并促进血管生成^[48]。另外,小檗碱通过激活 HIF-1 α /VEGF 信号转导途径,可增加微血管密度、内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、缺氧诱导生长因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 的表达,促进脑缺血再灌注损伤大鼠的血管生成,从而达到神经保护的作用^[49]。

3.6 其他

小檗碱可以减轻兴奋性毒性和保护血脑屏障,并对 IS 发挥神经保护作用。兴奋性毒性会诱导 Ca^{2+} 内流,受损细胞中的 Ca^{2+} 穿过质膜后会导致细胞内 Ca^{2+} 积累,触发各种有害过程,从而导致不可逆的细胞损伤,最终导致细胞凋亡和死亡^[50]。小檗碱具有抑制 Ca^{2+} 内流的作用,可以直接保护 OLN-93 少突胶质细胞免受脑缺血再灌注损伤。在此过程中,细胞内 Ca^{2+} 过载的衰减,使 OLN-93 少突胶质细胞免于兴奋性毒性损伤^[51]。

BBB 是一种极度复杂的结构,它主要是由脑微血管内皮细胞、周细胞、星形胶质细胞和基底膜组成^[52]。它在维持中枢神经系统稳态中起重要作用^[53],IS 后,BBB 紧密连接结构的完整性被破坏,导致细胞通透性增加,继而导致脑水肿、出血和死

亡率增加^[54]。而小檗碱通过调节闭锁小带蛋白 1 (zonula occludens protein 1,ZO-1) 很容易穿过血脑屏障,并对保护血脑屏障的完整性有一定的作用。据报道,小檗碱可以显著性上调 ZO-1、紧密连接蛋白 occludin 的表达量,抑制 NF-κB 的产生,降低炎症因子的释放量,从而发挥对 BBB 的保护作用^[55]。

小檗碱也可以通过调节 SH-SY5Y 细胞表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)激活 JNK/c-Jun 信号通路,促进 JNK/c-Jun 的磷酸化,从而调节 ZO-1 的再分布和闭塞,最终降低 BBB 的通透性,减轻缺血性再灌注损伤达到神经保护的作用^[4](表 1)。

表 1 小檗碱在缺血性脑卒中神经保护领域的意义
Table 1 Significance of berberine in neuroprotection of ischemic stroke

机制 Mechanism	实验对象 Experimental subject	实验结果 Experimental result
抑制自噬 ^[31] Inhibition of autophagy	雄性 SD 大鼠 Male Sprague-Dawley rats	用小檗碱治疗后大鼠脑组织自噬相关因子 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 比值、Beclin-1 蛋白表达水平降低,抑制自噬,从而发挥神经保护作用。 Berberine treatment can reduce the ratio of autophagy-related factor LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ and the expression level of Beclin-1 protein in rat brain tissue, which inhibits autophagy and plays a neuroprotective role.
促进自噬 ^[27] Autophagy promotion	雄性 SD 大鼠 Male Sprague-Dawley rats	小檗碱治疗后可以促进自噬并有益于神经元的恢复。 Berberine treatment can promote autophagy and benefit the recovery of neurons.
抑制炎症 ^[33] Suppression of inflammation	雄性 C57BL/6J 小鼠 Male C57BL/6J mice	小檗碱可以减少 HMGB1 分泌和 NF-κB 的核易位,直接或间接地通过减少神经炎症。 Berberine can reduce HMGB1 secretion and nuclear translocation of NF-κB, directly or indirectly by reducing neuroinflammation.
抑制炎症 ^[34] Suppression of inflammation	雄性 C57BL/6J 小鼠 Male C57BL/6J mice	小檗碱可以下调 Malat1 和 HMGB1 表达,然后减弱炎症反应,保护神经元细胞免受 CIRI 损伤。 Berberine can down-regulate the expression of Malat1 and HMGB1, then attenuate the inflammatory response and protect neuronal cells from CIRI injury.
抑制炎症 ^[35] Suppression of inflammation	SD 大鼠 Sprague-Dawley rats	小檗碱还可以通过靶向丝裂原激活的蛋白激酶途径和 AMPK 非依赖性方式下调促炎细胞因子来减少炎症,从而抑制促炎细胞因子的表达。 Berberine can also reduce inflammation by targeting the mitogen-activated protein kinase pathway and down-regulating proinflammatory cytokines in an AMPK-independent manner, thereby inhibiting the expression of proinflammatory cytokines.
抑制炎症 ^[36] Suppression of inflammation	雄性 C57BL/6 小鼠 Male C57BL/6J mice	小檗碱可以携带 miR-182-5p 到受伤的神经元,从而抑制神经炎症并改善缺血性脑卒中后的脑损伤。 Berberine can carry miR-182-5p to injured neurons, thereby inhibiting neuroinflammation and improving brain damage after ischemic stroke.
抗氧化应激 ^[37] Anti-oxidative stress	N2a 和 PC12 细胞 N2a and PC12 cells	小檗碱可以通过抗氧化机制对谷氨酸诱导的 N2a 和 PC12 细胞发挥神经保护作用。 Berberine can exert a neuroprotective effect on glutamate-induced N2a and PC12 cells through an antioxidant mechanism.
抗氧化应激 ^[38] Anti-oxidative stress	PC12 细胞 PC12 cells	小檗碱给药后,过量 ROS 诱导的氧化应激和线粒体自噬反应会受到明显抑制,从而恢复部分中枢神经系统的神经功能。 After berberine administration, excessive ROS-induced oxidative stress and mitophagy can be significantly inhibited, thereby restoring part of the neurological function of the central nervous system.
抗氧化应激 ^[39] Anti-oxidative stress	雄性 C57BL/6 小鼠 Male C57BL/6J mice	小檗碱可以激活 PPARδ 来清除 ROS,减轻大脑氧化损伤反应,从而赋予神经保护作用。 Berberine can activate PPARδ to scavenge ROS and reduce the oxidative damage response in the brain, thus conferring neuroprotection.
抗细胞凋亡 ^[44] Antiapoptosis	SD 大鼠 Sprague-Dawley rats	小檗碱处理后,GRP78 和 CNPY2 的表达水平显著降低,随后 ERS 细胞凋亡途径被抑制。 After berberine treatment, the expression levels of GRP78 and CNPY2 were significantly decreased, followed by inhibition of the apoptotic pathway in ERS cells.

续表1

机制 Mechanism	实验对象 Experimental subject	实验结果 Experimental result
抗细胞凋亡 ^[45] Antiapoptosis	PC12 细胞 PC12 cells	小檗碱可以抑制 ERS 途径来逆转 PC12 细胞中 OGD/R 诱导的细胞凋亡,促进 OGD 后的神经恢复。 Berberine can inhibit ERS pathway to reverse OGD/R-induced apoptosis in PC12 cells and promote neurological recovery after OGD.
促进血管新生 ^[47-48] Promote angiogenesis	雄性 C57BL/6 小鼠 和小胶质细胞 Male C57BL/6 mice and microglia	小檗碱可以通过 AMPK 信号通路激活促进小胶质细胞 M2 极化并抑制 M1 极化来促进血管新生,从而减少 CIRI 达到神经保护的作用。 Berberine can promote the M2 polarization of microglia and inhibit the M1 polarization through the activation of AMPK signaling pathway to promote angiogenesis, thereby reducing CIRI to achieve neuroprotection.
促进血管新生 ^[49] Promote angiogenesis	SD 大鼠 Sprague-Dawley rats	小檗碱通过激活 HIF-1 α / VEGF 信号转导途径,可促进脑缺血再灌注损伤大鼠的血管生成。 Berberine can promote angiogenesis in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury by activating HIF-1 α / VEGF signal transduction pathway.
抑制兴奋性毒性 ^[51] Inhibition of excitotoxicity	OLN-93 少突胶质 细胞 OLN-93 oligodendrocytes	小檗碱保护 OLN-93 少突胶质细胞免受缺血诱导的兴奋性毒性损伤,其机制可能是细胞内 Ca ²⁺ 过载的衰减使 OLN-93 免于兴奋性毒性损伤。 Berberine protects OLN-93 oligodendrocytes from ischemia-induced excitotoxic injury, and the mechanism may be that the attenuation of intracellular Ca ²⁺ overload protects OLN-93 from excitotoxic injury.
保护血脑屏障 ^[55] Protect the blood-brain barrier	大鼠脑微血管内皮 细胞 Rat brain microvascular endothelial cells	小檗碱可以显著性上调 ZO-1、occludin 表达量,抑制 NF- κ B 产生、降低炎性因子释放量,从而发挥对 BBB 的保护作用。 Berberine can significantly up-regulate the expression of ZO-1 and occludin, inhibit the production of NF- κ B, and reduce the release of inflammatory factors, so as to play a protective role in BBB.
保护血脑屏障 ^[4] Protect the blood-brain barrier	人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞 Human neuroblastoma SH-SY5Y cells	小檗碱可以调节 ZO-1 的再分布和闭塞降低 BBB 的通透性,减轻缺血性再灌注损伤达到神经保护的作用。 Berberine can regulate the redistribution of ZO-1 and reduce the permeability of BBB after occlusion, thus reducing ischemic reperfusion injury and achieving neuroprotection.

4 总结与展望

小檗碱广泛存在于多种传统草药的根、根茎、茎或树皮中,具有广泛的生理活性,特别在神经保护方面作用独特,深入研究小檗碱的药理作用机制,从细胞水平、分子水平或基因水平来揭示小檗碱的药理作用机制,将为小檗碱作为神经保护剂的进一步开发利用提供重要科学依据。已有研究发现,小檗碱作为廉价的传统药物,可通过多种机制对缺血性脑卒中发挥神经保护作用,包括参与自噬、抗细胞凋亡、抗炎、抗氧化应激、促进血管新生、保护血脑屏障等。然而,以前的研究有几个局限性。首先,现有关于小檗碱潜在神经保护机制的实验研究并不全面,实验涉及的观察指标和通路都比较单一。而且参与自噬和血管生成的重要信号通路很少被研究。此外,小檗碱对兴奋性毒性几乎没有研究,为了更客观地评估小檗碱对 IS 的影响,应在未来的研究中应用基因组学、转录组学、蛋白质

组学、代谢组学、影像组学等综合组学技术,去探索参与小檗碱神经保护作用的基因、蛋白质、代谢物和信号通路,从而有助于对小檗碱及其生物活性成分的潜在机制的理解。总之,小檗碱对于治疗缺血性脑卒中极具潜力,其在缺血性脑卒中的神经保护作用值得我们进一步探索和研究,下一步应以临床与基础相结合为导向,通过更严谨的临床和基础实验,探索小檗碱能否成为治疗缺血性脑卒中的突破点。

参考文献:

[1] POUSTCHI F, AMANI H, AHMADIAN Z, et al. Combination therapy of killing diseases by injectable hydrogels: from concept to medical applications [J]. Adv Healthc Mater, 2021, 10(3): e2001571.

[2] BUI T A, JICKLING G C, WINSHIP I R. Neutrophil dynamics and inflammaging in acute ischemic stroke: a transcriptomic review [J]. Front Aging Neurosci, 2022, 14: 1041333.

[3] FAN D, LIU L, WU Z, et al. Combating neurodegenerative

- diseases with the plant alkaloid berberine; molecular mechanisms and therapeutic potential [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2019, 17 (6): 563–579.
- [4] SONG K, SUN Y, LIU H, et al. Network pharmacology and bioinformatics methods reveal the mechanism of berberine in the treatment of ischaemic stroke [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 5160329.
- [5] CAI Y, XIN Q, LU J, et al. A new therapeutic candidate for cardiovascular diseases: berberine [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 631100.
- [6] ZHAO H, XING C, ZHANG J, et al. Comparative efficacy of oral insulin sensitizers metformin, thiazolidinediones, inositol, and berberine in improving endocrine and metabolic profiles in women with PCOS: a network meta-analysis [J]. *Reprod Health*, 2021, 18(1): 171.
- [7] TAN W, WANG Y, WANG K, et al. Improvement of endothelial dysfunction of berberine in atherosclerotic mice and mechanism exploring through TMT-based proteomics [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 8683404.
- [8] WAN Q, LIU Z, YANG Y, et al. Suppressive effects of berberine on atherosclerosis via downregulating visfatin expression and attenuating visfatin-induced endothelial dysfunction [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(4): 1939–1948.
- [9] SONG D, HAO J, FAN D. Biological properties and clinical applications of berberine [J]. *Front Med*, 2020, 14(5): 564–582.
- [10] OPARIL S, ACELAJADO M C, BAKRIS G L, et al. Hypertension [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4: 18014.
- [11] WANG Z, WU F, ZHOU Q, et al. Berberine improves vascular dysfunction by inhibiting trimethylamine-N-oxide *via* regulating the gut microbiota in angiotensin II-induced hypertensive mice [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 814855.
- [12] TIAN H, KANG Y M, GAO H L, et al. Chronic infusion of berberine into the hypothalamic paraventricular nucleus attenuates hypertension and sympathoexcitation via the ROS/Erk1/2/iNOS pathway [J]. *Phytomedicine*, 2019, 52: 216–224.
- [13] SHAO Y J, TAO J, YU B B, et al. Berberine-promoted CXCR4 expression accelerates endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in persons with prehypertension [J]. *Chin J Integr Med*, 2018, 24(12): 897–904.
- [14] CASTILLA-GUERRA L, FERNANDEZ-MORENO M D C, LEON-JIMENEZ D, et al. Antidiabetic drugs and stroke risk. Current evidence [J]. *Eur J Intern Med*, 2018, 48: 1–5.
- [15] DING P F, ZHANG H S, WANG J, et al. Insulin resistance in ischemic stroke: mechanisms and therapeutic approaches [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 1092431.
- [16] OCH A, OCH M, NOWAK R, et al. Berberine, a herbal metabolite in the metabolic syndrome: the risk factors, course, and consequences of the disease [J]. *Molecules*, 2022, 27(4): 1351.
- [17] GONG M, DUAN H, WU F, et al. Berberine alleviates insulin resistance and inflammation *via* inhibiting the LTB4-BLT1 axis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 722360.
- [18] LI Y, CHEN X, CHEN Y, et al. Berberine improves TNF- α -induced hepatic insulin resistance by targeting MEKK1/MEK pathway [J]. *Inflammation*, 2022, 45(5): 2016–2026.
- [19] YI J, WU S, TAN S, et al. Berberine alleviates liver fibrosis through inducing ferrous redox to activate ROS-mediated hepatic stellate cells ferroptosis [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7 (1): 374.
- [20] LI C, GUAN X M, WANG R Y, et al. Berberine mitigates high glucose-induced podocyte apoptosis by modulating autophagy via the mTOR/P70S6K/4EBP1 pathway [J]. *Life Sci*, 2020, 243: 117277.
- [21] PARK H J, JUNG E, SHIM I. Berberine for appetite suppressant and prevention of obesity [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 3891806.
- [22] WANG M, XU R, LIU X, et al. A co-crystal berberine-ibuprofen improves obesity by inhibiting the protein kinases TBK1 and IKK? [J]. *Commun Biol*, 2022, 5(1): 807.
- [23] MIRHADI E, REZAEE M, MALAEKEH-NIKOUEI B. Nano strategies for berberine delivery, a natural alkaloid of Berberis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104: 465–473.
- [24] ABDUL-RAHMAN T, BUKHARI S M A, HERRERA E C, et al. Lipid lowering therapy: an era beyond statins [J]. *Curr Probl Cardiol*, 2022, 47(12): 101342.
- [25] WU C, ZHAO Y, ZHANG Y, et al. Gut microbiota specifically mediates the anti-hypercholesterolemic effect of berberine (BBR) and facilitates to predict BBR's cholesterol-decreasing efficacy in patients [J]. *J Adv Res*, 2022, 37: 197–208.
- [26] XING L, ZHOU X, LI A H, et al. Atheroprotective effects and molecular mechanism of berberine [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 762673.
- [27] ZHANG Q, FU X, WANG J, et al. Treatment effects of ischemic stroke by berberine, baicalin, and jasminoidin from Huang-Lian-Jie-du-decoction (HLJDD) explored by an integrated metabolomics approach [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 9848594.
- [28] ONORATI A V, DYCCZYNSKI M, OJHA R, et al. Targeting autophagy in cancer [J]. *Cancer*, 2018, 124 (16): 3307–3318.
- [29] LEVINE B, KROEMER G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective [J]. *Cell*, 2019, 176(1/2): 11–42.
- [30] KLIONSKY D J, PETRONI G, AMARAVADI R K, et al. Autophagy in major human diseases [J]. *EMBO J*, 2021, 40 (19): e108863.
- [31] 丁实, 赵学荣, 赵亮, 等. 黄连素通过 B 细胞淋巴瘤-2/自噬相关基因复合体抑制自噬减轻脑缺血再灌注损伤的研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(9): 1094–1097.
- DING S, ZHAO X R, ZHAO L, et al. Study of berberine on reducing cerebral ischemia reperfusion injury by inhibiting autophagy through B cell lymphoma 2/Beclin-1 complex [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2021, 37(9): 1094–1097.

- [32] JURCAU A, SIMION A. Neuroinflammation in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injuries: from pathophysiology to therapeutic strategies [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 14.
- [33] ZHU J R, LU H D, GUO C, et al. Berberine attenuates ischemia-reperfusion injury through inhibiting HMGB1 release and NF- κ B nuclear translocation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(11): 1706–1715.
- [34] CAO D W, LIU M M, DUAN R, et al. The lncRNA Malat1 functions as a ceRNA to contribute to berberine-mediated inhibition of HMGB1 by sponging miR-181c-5p in poststroke inflammation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(1): 22–33.
- [35] DING W, GU Q, LIU M, et al. Astrocytes-derived exosomes pre-treated by berberine inhibit neuroinflammation after stroke via miR-182-5p/Rac1 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 118: 110047.
- [36] JIANG W, LI S, CHEN X, et al. Berberine protects immortalized line of human melanocytes from H₂O₂-induced oxidative stress via activation of Nrf2 and Mitf signaling pathway [J]. *J Dermatol Sci*, 2019, 94(1): 236–243.
- [37] SADEGHNIA H R, KOLANGIKHAH M, ASADPOUR E, et al. Berberine protects against glutamate-induced oxidative stress and apoptosis in PC12 and N2a cells [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2017, 20(5): 594–603.
- [38] LI Z, JIANG T, LU Q, et al. Berberine attenuated the cytotoxicity induced by t-BHP via inhibiting oxidative stress and mitochondria dysfunction in PC-12 cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40(4): 587–602.
- [39] SHOU J W, LI X X, TANG Y S, et al. Novel mechanistic insight on the neuroprotective effect of berberine: the role of PPAR δ for antioxidant action [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 181: 62–71.
- [40] UZDENSKY A B. Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro-and antiapoptotic proteins [J]. *Apoptosis*, 2019, 24(9–10): 687–702.
- [41] VAN OPDENBOSCH N, LAMKANFI M. Caspases in cell death, inflammation, and disease [J]. *Immunity*, 2019, 50(6): 1352–1364.
- [42] ZHU Q, ZHENG M, BALAKRISHNAN A, et al. Gasdermin D promotes AIM2 inflammasome activation and is required for host protection against *Francisella novicida* [J]. *J Immunol*, 2018, 201(12): 3662–3668.
- [43] VAN GORP H, VAN OPDENBOSCH N, LAMKANFI M. Inflammasome-dependent cytokines at the crossroads of health and autoinflammatory disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11(1): a028563.
- [44] ZHAO L, LI H, GAO Q, et al. Berberine attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury induced neuronal apoptosis by down-regulating the CNPY2 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 609693.
- [45] XIE P, REN Z K, L V J, et al. Berberine ameliorates oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced apoptosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress and autophagy in PC12 cells [J]. *Curr Med Sci*, 2020, 40(6): 1047–1056.
- [46] YANG Y, TORBEY M T. Angiogenesis and blood-brain barrier permeability in vascular remodeling after stroke [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2020, 18(12): 1250–1265.
- [47] ZHU J, CAO D, GUO C, et al. Berberine facilitates angiogenesis against ischemic stroke through modulating microglial polarization via AMPK signaling [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2019, 39(6): 751–768.
- [48] CHEN G, LIU S, PAN R, et al. Curcumin attenuates gp120-induced microglial inflammation by inhibiting autophagy via the PI3K pathway [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38(8): 1465–1477.
- [49] LIU H, REN X, MA C. Effect of berberine on angiogenesis and HIF-1 α /VEGF signal transduction pathway in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2018, 28(10): 753–757.
- [50] VERMA M, LIZAMA B N, CHU C T. Excitotoxicity, calcium and mitochondria: a triad in synaptic neurodegeneration [J]. *Transl Neurodegener*, 2022, 11(1): 3.
- [51] NADJAFI S, EBRAHIMI S A, RAHBAR-ROSHANDEL N. Protective effects of berberine on oxygen-glucose deprivation/reperfusion on oligodendrocyte cell line (OLN-93) [J]. *Int J Prev Med*, 2014, 5(9): 1153–1160.
- [52] XU L, NIRWANE A, YAO Y. Basement membrane and blood-brain barrier [J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2019, 4(2): 78–82.
- [53] PROFACI C P, MUNJI R N, PULIDO R S, et al. The blood-brain barrier in health and disease: important unanswered questions [J]. *J Exp Med*, 2020, 217(4): e20190062.
- [54] JIANG X, ANDJELKOVIC A V, ZHU L, et al. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke [J]. *Prog Neurobiol*, 2018, 163/164: 144–171.
- [55] 王美华, 王甲, 韩丹, 等. 小檗碱对氧糖剥夺/复氧诱导的大鼠体外血脑屏障损伤的保护作用 [J]. *中国医药导报*, 2020, 17(9): 16–20.
- WANG M H, WANG J, HAN D, et al. Protective effect of berberine on *in vitro* blood-brain barrier injury induced by oxygen glucose deprivation/reoxygenation in rats [J]. *China Med Her*, 2020, 17(9): 16–20.

章美玲, 崔亚茹, 陈抒鹏, 等. 中医药干预白血病干细胞免疫逃逸研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 137-143.
Zhang ML, Cui YR, Chen SP, et al. Mechanism of leukemia stem cells immune escape by Traditional Chinese Medicine intervention [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 137-143.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.017

中医药干预白血病干细胞免疫逃逸研究进展

章美玲¹, 崔亚茹¹, 陈抒鹏¹, 罗钧允¹, 曾英坚^{1,2*}

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

【摘要】 白血病是目前临床上高发的急危重症, 病死率极高, 其中白血病干细胞(leukemia stem cells, LSC)发生免疫逃逸是白血病诱导缓解后复发及进展的主要因素。中医药(Traditional Chinese Medicine, TCM)临床诊疗具有鲜明的辨证论治优势, 基于“以平为期”的诊治目的, 中医药辨治白血病强调恢复人体机能的“阴阳和谐”, 有助于提高机体自身免疫力, 符合干预肿瘤细胞免疫逃逸的机制。本文从文献研究及中医理论探讨中医药干预 LSC 免疫逃逸的机制及其研究进展。

【关键词】 中医药; 白血病细胞; 免疫逃逸; 干预机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0137-07

Mechanism of leukemia stem cells immune escape by Traditional Chinese Medicine intervention

ZHANG Meiling¹, CUI Yaru¹, CHEN Shupeng¹, LUO Junyun¹, ZENG Yingjian^{1,2*}

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

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

【Abstract】 Leukemia is a critical disease with a high incidence and extremely high fatality rate. Immune escape by leukemia stem cells (LSC) is the main factor for recurrence and progression after remission. Clinical diagnosis and treatment by Traditional Chinese Medicine (TCM) have distinct advantages of syndrome differentiation and treatment. Based on the purpose of diagnosis and treatment, leukemia treatment by TCM emphasizes the harmony of yin and yang to restore human functions, which is conducive to improve autoimmunity and conforms to the mechanism of intervention for tumor cell immune escape. This article discusses the mechanism and research progress of TCM interventions in LSC immune escape based on literature and TCM theory.

【Keywords】 Traditional Chinese Medicine; leukemic cells; immune escape; intervention mechanism

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

白血病作为一种血液系统恶性克隆性肿瘤疾病, 临床治疗难度大、预后差, 具有较高的发病率和病死率^[1]。据统计, 2022 年我国白血病患者新增病例占

所有新增癌症病例比例超 18%, 死亡病例占所有癌症死亡病例的 20% 左右, 其 5 年相对生存率不到 28%^[2-3]。其发病机制主要是造血干细胞癌变后不

【基金项目】 国家自然科学基金(82260914); 江西省自然科学基金面上项目(20192BAB205100); 江西省中医药管理局临床研究基地(第二批)建设项目(赣中医药科教字[2021]3号)。

【作者简介】 章美玲(1990—), 女, 讲师, 博士研究生, 研究方向: 血液病的中医药防治。E-mail: 1006028230@qq.com

【通信作者】 曾英坚(1975—), 男, 主任中医师, 博士生导师, 研究方向: 中医药防治血液系统疾病。E-mail: 13431762390@163.com

受机体控制,生长增殖、分化及凋亡存在障碍^[4],导致白细胞恶性增殖,骨髓及其他非造血组织中可发现大量处于不同发育阶段的病变白细胞浸润,临床主要表现为淋巴结肿大、贫血、出血、乏力、发热、多汗等^[5-6]。虽然随着医疗技术的不断进步,白血病诱导完全缓解率也不断提高,但大多数患者的疾病复发仍是其治疗的最主要难点,降低或避免白血病缓解后的复发是目前临床迫切需要解决的问题。

1 白血病干细胞 (leukemia stem cells, LSC) 免疫逃逸及其临床风险

1.1 诱导 LSC 衰老、凋亡并清除是治疗白血病的关键环节

目前研究认为 LSC 是白血病起始和维持细胞, LSC 具有自我更新和多向分化的潜能,参与白血病的发病及传变^[7]。研究表明, LSC 的免疫表型为 CD34⁺CD38⁻,并经实验证实 CD34⁺CD38⁻表型的 LSC 可克隆形成白血病^[8]。白血病的治疗方式主要包括化疗、放疗、异基因造血干细胞移植及免疫疗法等,其中化疗仍是目前临床上用以治疗白血病的最有效手段之一^[1]。这些治疗方式的机制都是基于破坏异常 LSC,诱导 LSC 衰老、凋亡并清除,促进正常细胞的再生和生长^[6]。

1.2 干预 LSC 免疫逃逸是抑制白血病复发及进展的有效手段

LSC 的自我更新能力可维持白血病细胞的恶性克隆,故 LSC 是能否治愈白血病的决定因素,但 LSC 对化疗及免疫疗法具有一定抵抗特性,同时对机体免疫杀伤具有一定逃逸性,从而导致白血病的复发与进展^[8],基于“阴平阳秘,精神乃至”“正气存内,邪不可干”中医理论,如果白血病患者机体免疫系统功能恢复正常,则能在白血病获得诱导缓解后通过免疫监视和杀伤清除残留的 LSC,最终治愈白血病。因而通过干预 LSC 免疫逃逸,促进 LSC 凋亡及清除,是抑制白血病缓解后复发及进展的有效手段。

2 中医临床辨治白血病特色及现状概况

2.1 中医临证强调辨病辨证相结合,突出辨证个体化、阶段性特色

中医临证突出辨证论治,但强调辨病辨证相结合;如《伤寒论》中强调首辨六经病,再辨寒证热证、实证虚证;《金匱要略》开创病证结合辨治杂病的先河;《温病学》强调风温病与春温病的发病特点不同,证候演变亦不同。可见病证结合,先辨病再辨

证一直以来是中医临证特色。究其原由乃辨病辨证,虽都揭示疾病本质,但辨病侧重于体现疾病全程全貌中的基本矛盾点;辨证侧重于体现疾病不同阶段中个体的主要矛盾。辨病可以提示辨证的常规范围,简化辨证过程;辨证能更深入了解疾病全程各阶段、全貌各分支的具体病理类型及演变情况,丰富对疾病本质及其传变规律的认识^[9]。所以病证合参,先辨病再辨证是中医临证论治的特点及优势。

2.2 中医经典古籍对白血病的认识

白血病作为病种概念,属于现代疾病范畴,中医古籍中并无“白血病”病名。联系其临床表现及实际,符合中医“伏气温病”“虚劳”“髓癆”“血积”“癥瘕”“热劳”“痰核”等病证^[6]。由于该病的进展迅速、控制难、病情较重、易反复、预后凶险等特征,又称为“急劳”^[10]。中医学认为白血病是正虚邪实夹杂病证,在正气虚损的基础上又伴有邪实,临床多表现为气血亏虚或气阴亏虚,并夹杂温热邪毒或痰瘀邪毒等^[11-12]。在中医整体观、动态观等哲学观念指导下,治疗强调辨病辨证相结合,突出辨证,随证治之,全程固护正气,重视人体正气与毒邪之间的较量,以平为期为最终治疗目的。

2.3 现代中医各家对白血病诊疗的现状概括

现代医家们运用中医药治疗白血病均有自己独到的经验,老一辈中医名家,学验丰富,如周永明教授、周郁鸿教授、杨文华教授等提出辨证要突出疾病证候阶段性、个体化特点,分期论治、标本兼治,选方用药强调扶正祛毒,攻补兼施^[13-15]。如杨文华教授根据 AML 临床治疗阶段差异,分期辨治,并创立急性白血病的“四期单元疗法”,全程重视扶正益气,培本固元^[15]。顾振东教授团队基于《理虚元鉴》对虚劳病的论述,提出气阴两虚为本,邪毒内伏为标,本虚标实乃白血病关键病机,并创制益气养阴方,方中重用黄芪、生地^[16]。王新梅等^[17]研究发现,以“祛邪解毒,扶正固本”为法,方药为黄连解毒汤合当归补血汤加减治疗 AML,能显著改善患者中医证候,提升机体免疫调节功能,进而提高缓解率。赵修诚^[18]结合自己近 50 年的临床经验,认为急性白血病的病机是伤寒邪陷少阴,证属外邪内陷少阴亡阳亡血证,治法当以回阳救逆以托邪外出,方选四逆加人参汤加减。张瑞丹等^[19]研究发现,老年 AML 在西化疗基础上,辨证予“抗白延年汤”等中药以清热解毒兼益气扶正,可获较佳疗效。曾

英坚等^[20]结合疾病特点,根据患者证候特点,辨证论治,在化疗前采用和枢机化药毒、调气机和脏腑、交阴阳安睡眠、扶正气强体能的治法,调患者阴阳,改善不适症状。

3 LSC 免疫逃逸机制及中医药干预研究

3.1 LSC 免疫逃逸机制研究

现代研究统一认为白血病患者体内存在严重的免疫功能紊乱。LSC 免疫逃逸是指 LSC 通过各种机制逃避免疫系统的攻击和清除,从而导致 LSC 无法被免疫系统有效地清除。这种现象可能会导致白血病患者在体内不断增殖,最终导致疾病的恶化和复发。LSC 免疫逃逸机制主要包括抑制免疫细胞的功能、改变细胞表面分子的表达、产生免疫抑制因子等^[21]。

3.1.1 T 淋巴细胞免疫异常

肿瘤诱导的 T 淋巴细胞无能及 T 淋巴细胞耗竭为肿瘤患者的免疫逃逸机制之一^[21]。在肿瘤发生发展过程中,肿瘤细胞表面过表达的 PD-L1 与 T 细胞表面的 PD-1 分子结合后通过 PD-1 抑制 T 细胞的活化,导致 T 细胞功能耗竭,从而实现肿瘤的免疫逃逸^[22]。吴璨等^[23]通过实验研究发现,B7-H1 可通过增加肿瘤中抑制性 T 细胞、减少效应 T 细胞的数量和降低细胞免疫因子的水平来促进 AML 进展和 LSC 免疫逃逸。翟志敏教授团队研究发现 Tregs 是诱导 AML 患者 LSC 免疫逃逸的关键因素^[24]。IL-35 可以通过抑制 Tregs、促进 Tregs 和 iTregs 的表达以及直接促进 AML 细胞增殖、抑制 AML 细胞凋亡来诱导 LSC 免疫逃逸;同时 Tregs 及其分泌的 IL-35 还是影响 CIK 细胞杀伤 AML 细胞活性的重要因素。

3.1.2 吞噬功能异常

巨噬细胞同时具有效应细胞和抗原递呈细胞的功能,参与体内免疫应答过程。CD47(整联蛋白相关蛋白 IAP)是一种广泛表达于细胞膜表面的免疫球蛋白样蛋白质,几乎所有癌种均有 CD47 高表达现象,包括白血病^[25]。揭晓亮等^[26]通过综述发现 CD47 与信号调节蛋白 α 形成的信号复合物,是促使 LSC 从巨噬细胞介导吞噬作用中逃逸的关键因素。也有研究表明,肿瘤细胞自噬途径可作为肿瘤细胞逃避免疫杀伤的保守介质^[27],且自噬会促进肿瘤细胞 MHC-I 类分子降解,使抗原呈递减少,免疫细胞识别受阻,导致肿瘤细胞发生免疫逃逸^[28]。

3.1.3 抑制性肿瘤微环境(TME)形成

肿瘤形成抑制性 TME 是对抗抗肿瘤免疫反应的重要途径,肿瘤微环境中的乳酸通过与免疫效应细胞相互作用促进了肿瘤的免疫逃逸^[29-30]。国医大师周仲瑛提出 TME 与癌毒病机密切相关,肿瘤炎性微环境是癌毒病机热毒表现,所呈现的炎热、升腾等特性,与肿瘤炎性微环境中存在的炎性细胞及因子等特征相似^[31]。有研究报道肿瘤微环境中 IFN- γ 活化 JAK1、JAK2 信号通路,进而上调 PD-L1,PD-L1 与 NK 细胞的 PD-1 结合,减弱 NK 细胞的抗肿瘤活性^[32]。崔雯瑄等^[33]提出高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)和吡啶胺-2,3-双加氧酶(IDO)协同作用,可以促进细胞增殖、侵袭和迁移,稳定 TME,介导肿瘤细胞免疫逃逸。也有研究发现异常的骨髓微环境,尤其是成骨细胞龛,可通过 IL-1 参与的炎症信号反应,介导 CD34 的高表达,促进 LSC 的增殖和自我更新能力,介导 LSC 的免疫逃逸^[34]。

3.1.4 NK 细胞失能

NK 细胞失能也是引起肿瘤细胞免疫逃逸的关键因素之一^[35]。相关研究发现 NKG2D 及其配体(NKG2D-L)的相互作用,对白血病细胞的免疫清除起重要作用。同时,研究也发现 NKG2D-L 的可溶性表达或低表达甚至不表达,是介导 LSC 免疫逃逸的关键因素^[36]。也有研究认为 LSC 表面表达的 MICA/B 脱落,导致血清中 sMICA 和 sMICB 异常升高,损伤了基于 NKG2D-MIC 的抗肿瘤效应,导致 LSC 的免疫逃逸^[37]。另外,Stringaris 等^[38]发现 AML 患者的 LSC 能分泌 IL-10,对 NK 细胞具有免疫抑制作用,从而降低 NK 细胞对 LSC 的杀伤力,介导 LSC 免疫逃逸。贾祝霞等^[39]研究发现 STAT3 磷酸化可降低肿瘤细胞表面 NKG2DL 分子(MICA)的表达水平,介导耐药 LSC 抗凋亡,降低其对 NK 细胞的杀伤敏感,从而介导 LSC 免疫逃逸。

3.2 中医药干预 LSC 免疫逃逸研究

随着研究的不断深入,越来越多的中药及其复方被证实,可通过多个途径实现 LSC 免疫逃逸状态的调控,这为未来白血病的治愈提供了希望。

3.2.1 诱导白血病细胞凋亡

研究发现,LSC 通过上调多个免疫检查点蛋白(PD-L1、TIM-3、CD24)发挥特有的免疫抗性。中药可通过抑制 Akt 激活的 β -catenin 降低 LSC 免疫抗性,抑制 LSC 免疫逃逸^[40]。如三氧化二砷(ATO)是砒霜的主要活性成分,早在 20 世纪 70 年代,砒霜已

被陈竺院士最先用于急性早幼粒细胞白血病(APL) 的治疗,临床效果较好,并成为治疗 APL 的一种有效常用中药^[41]。研究发现,ATO 能通过抑制 Akt,调控 NF- κ B 通路、Caspase-3 和 Caspase-7 通路,进而增强自身的免疫功能^[42]。姜黄素是中药姜黄的活性成分,能够抑制 Akt/mTOR 通路和 Raf/ERK/MAPK 通路,激活 Caspase 依赖性凋亡,降低白血病细胞免疫抗性,增强西医化疗药物的药效^[43]。有研究发现 ATO 联合姜黄素可通过下调 JAK2、STAT3 和 Bcl-2 蛋白的表达,上调 P53 和 P27 的表达,调控细胞自噬,抑制 LSC 免疫逃逸^[44]。丹参酮是中药丹参的主要活性成分,研究表明,丹参酮 II A 对 BCR/ABL 引起的下游信号通路如 JAK/STAT3/5 通路、MPK/mTOR 通路、Raf/ERK 通路等具有调节作用,抑制白血病细胞增殖及 PD-L1 表达,增加白血病细胞凋亡,并能干预白血病患者免疫抗性^[45]。

3.2.2 增强机体免疫力

中药及其复方可提高免疫细胞的数量及功能,增强机体的免疫力,促使机体清除白血病细胞,进而达到治疗效果。如中药黄芪的主要活性成分是黄芪总苷与黄芪多糖。其中黄芪多糖通过上调 MICA 表达增强其对 NK 细胞杀伤敏感性^[46],进而增强自身的免疫功能。段丽芳等^[47]发现黄芪多糖可双向免疫调节白血病,既能增加机体抗癌作用,又能调控肿瘤细胞分泌抑制因子,干预 LSC 免疫逃逸。刘清池等^[48]研究发现,凌丹康复方可以增强免疫系统对 LSC 的识别及杀伤功能,干预 LSC 的免疫逃逸,延长白血病患者中位生存期。在临床试验中,将含有黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷和汉黄芩素的黄芩提取物用于治疗儿童白血病患者,发现其具有免疫扶正作用^[49]。也有研究发现黄芩素可以干扰 PD-L1 表达,促进白血病细胞凋亡。药理研究表明白术能促进脾淋巴细胞转化,使机体免疫力提高;并调节体液及细胞免疫的紊乱,发挥抗 LSC 免疫逃逸的作用^[50]。

3.2.3 抑制 LSC 分化

LSC 遵循不对称分裂,分裂产生的两个子代细胞中,一个仍然保留 LSC 的特征,另一个子代细胞相对成熟,进入细胞周期活跃状态,通过系定向分化产生白血病细胞群体^[51]。诱导 LSC 进入细胞周期,清除的是 LSC 分裂出来的子代白血病细胞,相反,抑制 LSC 进入细胞周期却可抑制 LSC 免疫抗性,避免白血病诱导缓解后复发,抑制白血病进展。

近年来多项研究表明,作为中药苦参的主要活性成分苦参碱,可以调控细胞周期蛋白和细胞周期抑制因子的表达,调节 ERK/MAPK 通路、IL-6/JAK/STAT3 等信号通路,阻滞细胞 G1/S 期进程,抑制 LSC 的增殖,干预 LSC 的免疫逃逸^[52-53]。相关动物实验表明以雄黄、青黛和丹参为主的复方可增强 APL 的 G1/G0 阻滞,并可诱导体内、外 APL 细胞终末分化^[54]。

4 中医药辨治白血病未来展望

中医临证强调辨证论治,整体调整,使阴阳重归平和。现代越来越多的研究证明中医整体调整、因势利导的治疗原则,对机体抗病的免疫力具有促进和增强作用。白血病细胞免疫逃逸是目前导致白血病诱导缓解后复发及进展的关键因素。因此,对于重大难治性疾病的临床诊治,要发挥中西医结合优势,更好地贯彻落实“健康中国”的战略目标。对白血病的诊断,强调西医辨病的重要,突出中医辨证的优势,病证合参,动态认识白血病的发生发展规律。治疗方面,在西医放化疗或骨髓移植等治疗方案基础上,遵循中医整体观,辨证施以中医复方或中药单体扶正祛邪,调整机体免疫,抑制肿瘤细胞免疫逃逸,符合中医亢害承制理论,有望实现有效抑制白血病经西医化疗等诱导缓解后的复发及进展。

参考文献:

- [1] LOSONCZY H, NAGY Á, KOSZTOLÁNYI S, et al. Correlations between secondary hypogammaglobulinaemia, infections and mortality and the need for preventive immunoglobulin replacement in patients with chronic lymphoid leukaemia [J]. Orv Hetil, 2019, 160(38): 1487-1494.
- [2] NEWELL L F, COOK R J. Advances in acute myeloid leukemia [J]. BMJ, 2021, 375: n2026.
- [3] XIA C, DONG X, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants [J]. Chin Med J, 2022, 135(5): 584-590.
- [4] 万才水. 白血病患者血清 IL-6、MCP-1、IL-22 水平变化及临床意义 [J]. 中国医学创新, 2022, 19(36): 155-159.
WAN C S. Changes and clinical significance of serum IL-6, MCP-1 and IL-22 levels in patients with leukemia [J]. Med Innovation China, 2022, 19(36): 155-159.
- [5] 葛均波, 徐永健, 王辰. 内科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
GE J B, XU Y J, WANG C. Internal medicine [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2018.
- [6] 胡晓梅, 吴德沛. 中西医结合血液病学 [M]. 北京: 人民卫

- 生出版社, 2023.
- HU X M, WU D P. Integrative medicine hematology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2023.
- [7] VETRIE D, HELGASON G V, COPLAND M. The leukaemia stem cell; similarities, differences and clinical prospects in CML and AML [J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(3): 158-173.
- [8] ZEIJLEMAKER W, GROB T, MEIJER R, et al. CD34⁺CD38⁻ leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia [J]. Leukemia, 2019, 33(5): 1102-1112.
- [9] 刘英锋. 中医思维方法与实训 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2020.
- LIU Y F. TCM Thinking Methods and Practical Training [M]. Beijing: China Publishing House of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [10] 庄海峰. 急性白血病中医病机探讨 [J]. 江西中医药, 2019, 50(2): 15-16.
- ZHUANG H F. Discussion on the pathogenesis of acute leukemia in traditional Chinese medicine [J]. Jiangxi J Tradit Chin Med, 2019, 50(2): 15-16.
- [11] 郎海燕, 刘雅峰, 高宠, 等. 血液肿瘤疾病中医理论创新与发展 [J]. 现代中医临床, 2019, 26(3): 55-58.
- LANG H Y, LIU Y F, GAO C, et al. Innovation and development of traditional Chinese medical theory on hematological malignancies [J]. Mod Chin Clin Med, 2019, 26(3): 55-58.
- [12] 郑丹丹, 孙明令, 周永明. 中医药治疗急性髓系白血病的研究进展 [J]. 中医药信息, 2018, 35(4): 118-121.
- ZHENG D D, SUN M L, ZHOU Y M. Research progress on treatment of acute myeloid leukemia with traditional Chinese medicine [J]. Inf Tradit Chin Med, 2018, 35(4): 118-121.
- [13] 李昌桂, 周永明. 周永明治疗老年急性白血病临床经验 [J]. 上海中医药大学学报, 2017, 31(2): 1-3.
- LI C G, ZHOU Y M. Clinical experience of professor Zhou yongming in the treatment of acute leukemia in elderly [J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai, 2017, 31(2): 1-3.
- [14] 周丽媛, 蔡文亮, 吴迪炯, 等. 周郁鸿教授治疗老年急性白血病临床经验 [J]. 黑龙江中医药, 2015, 44(4): 30-31.
- ZHOU L Y, CAI W L, WU D J, et al. Professor Zhou Yuhong's clinical experience in treating elderly acute leukemia [J]. Heilongjiang J Tradit Chin Med, 2015, 44(4): 30-31.
- [15] 王兴丽, 杨文华, 史哲新, 等. 益气养阴解毒祛邪法治疗老年急性白血病经验 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(8): 3121-3123.
- WANG X L, YANG W H, SHI Z X, et al. Experience in treating aged acute leukemia with therapy of tonifying qi and Yin and removing toxic substance and pathogen [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2016, 31(8): 3121-3123.
- [16] 焦宁, 张登山, 徐瑞荣. 《理虚元鉴》对现代白血病中医治疗的启示 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(10): 2563-2564.
- JIAO N, ZHANG D S, XU R R. Inspiration from Chinese medical literature "lixu Yuanjian" in treating leukemia with traditional Chinese medicine [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2012, 23(10): 2563-2564.
- [17] 王新梅, 罗静, 田林涛, 等. 中药联合化疗治疗急性髓细胞白血病 [J]. 中医学报, 2018, 33(11): 2069-2071.
- WANG X M, LUO J, TIAN L T, et al. Chinese medicine combined with chemotherapy for acute myeloid leukemia [J]. Acta Chin Med, 2018, 33(11): 2069-2071.
- [18] 赵修诚. 回阳托邪法根治急性白血病的体会 [J]. 现代临床医学, 2021, 47(5): 350-351.
- ZHAO X C. Experience in radical treatment of acute leukemia by replenishing Yang and entrusting pathogens [J]. J Mod Clin Med, 2021, 47(5): 350-351.
- [19] 张瑞丹, 王博, 沈一平. 沈一平中西医结合治疗老年急性髓系白血病经验拾萃 [J]. 浙江中医药大学学报, 2018, 42(9): 723-726, 734.
- ZHANG R D, WANG B, SHEN Y P. The clinical experience of integrated traditional Chinese and western medicine in treating elderly acute myeloid leukemia of SHEN yiping [J]. J Zhejiang Chin Med Univ, 2018, 42(9): 723-726, 734.
- [20] 曾英坚, 彭国蕊, 刘凡, 等. 中医药在老年急性髓系白血病去甲基化化疗前干预应用优势探讨 [J]. 中国中医急症, 2020, 29(5): 913-915.
- ZENG Y J, PENG G R, LIU F, et al. Discussion on the advantages of traditional Chinese medicine intervention before demethylation chemotherapy in elderly acute myeloid leukemia [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2020, 29(5): 913-915.
- [21] 李倩, 文飞球. 白血病异基因造血干细胞移植后免疫逃逸机制的研究进展 [J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2020, 25(5): 302-305.
- LI Q, WEN F Q. Research progress on immune escape mechanism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in leukemia [J]. J China Pediatr Blood Cancer, 2020, 25(5): 302-305.
- [22] KAMPHORST A O, WIELAND A, NASTI T, et al. Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent [J]. Science, 2017, 355(6332): 1423-1427.
- [23] 吴璨, 翟志敏, 吴凡, 等. B7-H1 通过调节肿瘤免疫微环境促进 AML 肿瘤细胞免疫逃逸的实验研究 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2020, 25(6): 494-499.
- WU C, ZHAI Z M, WU F, et al. B7-H1 promotes immune escape of AML tumor cells by regulating tumor immune microenvironment [J]. Chin Clin Oncol, 2020, 25(6): 494-499.
- [24] 陶千山. IL-35 诱导急性髓细胞白血病细胞免疫逃逸的作用及机制 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2014.
- TAO Q S. Effect and mechanism of IL-35 on immune escape of acute myeloid leukemia cells [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2014.
- [25] YANG K, XU J, LIU Q, et al. Expression and significance of CD47, PD1 and PDL1 in T-cell acute lymphoblastic lymphoma/leukemia [J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(2): 265-271.
- [26] 揭晓亮, 孔阳阳, 周光彪. CD47 在肿瘤免疫逃逸中的作用及靶向治疗策略研究进展 [J]. 四川大学学报(医学版),

- 2023, 54(3): 455–461.
- JIE X L, KONG Y Y, ZHOU G B. Latest findings on the role of CD47 in tumor immune evasion and related targeted therapies [J]. J Sichuan Univ Med Sci, 2023, 54(3): 455–461.
- [27] LAWSON K A, SOUSA C M, ZHANG X, et al. Functional genomic landscape of cancer-intrinsic evasion of killing by T cells [J]. Nature, 2020, 586(7827): 120–126.
- [28] YAMAMOTO K, VENIDA A, YANO J, et al. Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I [J]. Nature, 2020, 581(7806): 100–105.
- [29] KLINK M. 肿瘤细胞免疫—免疫细胞和肿瘤细胞的相互作用 [M]. 北京: 化学工业出版社; 2016.
- KLINK M. Tumor cell immunity—Interaction immune and cancer cells [M]. Beijing: Chemical Industry Press; 2016.
- [30] HIRSCHHAEUSER F, SATTLER U G A, MUELLER-KLIESER W. Lactate: a metabolic key player in cancer [J]. Cancer Res, 2011, 71(22): 6921–6925.
- [31] 程海波, 沈卫星, 吴勉华, 等. 基于肿瘤微环境的癌毒病机理论研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(2): 105–107.
- CHENG H B, SHEN W X, WU M H, et al. Pathogenesis theory of cancerous toxin in tumor microenvironment [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2014, 30(2): 105–107.
- [32] BELLUCCI R, MARTIN A, BOMMARITO D, et al. Interferon- γ -induced activation of JAK1 and JAK2 suppresses tumor cell susceptibility to NK cells through upregulation of PD-L1 expression [J]. Oncoimmunology, 2015, 4(6): e1008824.
- [33] 崔雯瑄, 马鸣. HMGB1 和 IDO 在肿瘤免疫逃逸中的作用研究进展 [J]. 河北医科大学学报, 2023, 44(5): 612–616.
- CUI W X, MA M. Research progress on the role of HMGB1 and IDO in tumor immune escape [J]. J Hebei Med Univ, 2023, 44(5): 612–616.
- [34] 曹志杰, 李怡爽, 王慧君, 等. 成骨细胞通过上调白血病细胞 IL-1 的表达促进白血病干细胞增殖的研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2022, 30(5): 1348–1353.
- CAO Z J, LI Y S, WANG H J, et al. Osteoblast niche promotes the proliferation of leukemia stem cells by up-regulating the expression of IL-1 in leukemia cells [J]. J Exp Hematol, 2022, 30(5): 1348–1353.
- [35] 魏姗姗, 余妙容, 彭琪, 等. 自然杀伤细胞在白血病免疫逃逸中的研究进展 [J]. 广东医学, 2013, 34(22): 3502–3505.
- WEI S S, SHE M R, PENG Q, et al. Research progress of natural killer cells in immune escape of leukemia [J]. Guangdong Med J, 2013, 34(22): 3502–3505.
- [36] LIU M, DU M, YU J, et al. CEBPA mutants down-regulate AML cell susceptibility to NK-mediated lysis by disruption of the expression of NKG2D ligands, which can be restored by LSD1 inhibition [J]. Oncoimmunology, 2022, 11(1): 2016158.
- [37] 吴振添, 刘会兰, 耿良权, 等. NK 细胞活化性受体 NKG2D 及其配体 MICA/B 在急性白血病免疫逃逸机制中的初步研究 [J]. 中国实用内科杂志, 2007, 27(S1): 93.
- WU Z T, LIU H L, GENG L Q, et al. Preliminary study on the immune escape mechanism of NK cell activated receptor NKG2D and its ligand MICA/B in acute leukemia [J]. Chin J Pract Intern Med, 2007, 27(S1): 93.
- [38] STRINGARIS K, SEKINE T, KHODER A, et al. Leukemia-induced phenotypic and functional defects in natural killer cells predict failure to achieve remission in acute myeloid leukemia [J]. Haematologica, 2014, 99(5): 836–847.
- [39] 贾祝霞, 卢绪章, 何金媛, 等. STAT3 介导耐药白血病细胞抗凋亡和免疫逃逸机制的研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2020, 28(6): 1796–1803.
- JIA Z X, LU X Z, HE J Y, et al. Mechanism of anti apoptosis and immune evasion in drug-resistant leukemia cells mediated by STAT3 [J]. J Exp Hematol, 2020, 28(6): 1796–1803.
- [40] PERRY J M, TAO F, ROY A, et al. Overcoming Wnt- β -catenin dependent anticancer therapy resistance in leukaemia stem cells [J]. Nat Cell Biol, 2020, 22(6): 689–700.
- [41] ZHU H, HU J, CHEN L, et al. The 12-year follow-up of survival, chronic adverse effects, and retention of arsenic in patients with acute promyelocytic leukemia [J]. Blood, 2016, 128(11): 1525–1528.
- [42] 王欣, 谭译敏, 王梅竹, 等. 中药砷剂治疗 BCR-ABL 阳性慢性髓系白血病研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(6): 136–140.
- WANG X, TAN X M, WANG M Z, et al. Research progress in TCM arsenic for treatment of BCR-ABL positive chronic myeloid leukemia [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2020, 27(6): 136–140.
- [43] GUO Y, SHAN Q, GONG Y, et al. Curcumin induces apoptosis via simultaneously targeting AKT/mTOR and RAF/MEK/ERK survival signaling pathways in human leukemia THP-1 cells [J]. Pharmazie, 2014, 69(3): 229–233.
- [44] CHEN S, WU J L, LIANG Y, et al. Arsenic trioxide rescues structural p53 mutations through a cryptic allosteric site [J]. Cancer Cell, 2021, 39(2): 225–239, e8.
- [45] YUN S M, JUNG J H, JEONG S J, et al. Tanshinone IIA induces autophagic cell death via activation of AMPK and ERK and inhibition of mTOR and p70 S6K in KBM-5 leukemia cells [J]. Phytother Res, 2014, 28(3): 458–464.
- [46] 邓黎黎. 黄芪多糖对白血病细胞 MICA 表达及 NK 细胞杀伤敏感性的影响 [D]. 兰州: 兰州大学, 2012.
- DENG L L. The effects of *Astragalus* polysaccharide on the expression of MICA in leukemia cell lines and its impact on NK cytotoxicity [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2012.
- [47] 段丽芳, 张晓芹. 黄芪多糖抗白血病免疫治疗研究进展 [J]. 中医药导报, 2017, 23(6): 74–76.
- DUAN L F, ZHANG X Q. Progress on *Astragalus* polysaccharides in immunotherapy of anti-leukemia [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 23(6): 74–76.
- [48] 刘清池, 吴维海, 李刚荣, 等. 凌丹康复方配合 DC-CIK 治疗白血病临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(4): 347–350.

LIU Q C, WU W H, LI G R, et al. Effect of lingdankang composite combined dendritic cell-cytokine induced killer cells in treating leukemia [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2009, 29 (4) : 347-350.

[49] ORZECZOWSKA B, CHABER R, WISNIEWSKA A, et al. Baicalin from the extract of *Scutellaria baicalensis* affects the innate immunity and apoptosis in leukocytes of children with acute lymphocytic leukemia [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 23(2) : 558-567.

[50] 柳威, 邓林华, 赵英强. 白术及其有效成分药理作用概述 [J]. 中医学报, 2021, 49(10) : 116-118.

LIU W, DENG L H, ZHAO Y Q. Summary of pharmacological effects of *Atractylodes macrocephala* and its active ingredients [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2021, 49(10) : 116-118.

[51] 杨向东, 杨文华, 史哲新, 等. 从白血病干细胞探讨中医中药治疗白血病的思路方法 [J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19 (6) : 1250-1252.

YANG X D, YANG W H, SHI Z X, et al. Primary investigation on treatment method and new research direction for leukemia therapy with Traditional Chinese Medicine and materia medica based on leukemia stem cells [J]. J Mod Oncol, 2011, 19(6) :

1250-1252.

[52] 王金侠, 张立, 矫增金, 等. 苦参碱及氧化苦参碱诱导肿瘤细胞自噬作用机制研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(2) : 155-159.

WANG J X, ZHANG L, JIAO Z J, et al. Advances in the mechanism by which matrine and oxymatrine induce autophagy in tumor cells [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2021, 23 (2) : 155-159.

[53] 晁荣, 胡晓燕, 朱生东, 等. 苦参碱联合化疗药物对人急性髓系白血病 HL-60 细胞增殖及侵袭力的影响 [J]. 世界中医药, 2019, 14(11) : 2910-2913.

CHAO R, HU X Y, ZHU S D, et al. Effects of matrine combined with chemotherapeutic drugs on proliferation and invasion of human acute myeloid leukemia HL-60 cells [J]. World Chin Med, 2019, 14(11) : 2910-2913.

[54] WANG L, ZHOU G B, LIU P, et al. Dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Realgar-Indigo naturalis as an effective treatment for promyelocytic leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(12) : 4826-4831.

[收稿日期] 2023-06-14

编者·读者·作者

《中国比较医学杂志》2024 年征订启事

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

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

汇款方式:银行转帐:中国农业银行股份有限公司北京潘家园支行
帐号:11220201040003764
单位抬头全称:中国实验动物学会

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

陈梦琪,刘婷婷,孙芳玲,等. 新生鼠心肌再生相关调节机制的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 144-153.
Chen MQ, Liu TT, Sun FL, et al. Advances in research on mechanisms related to myocardial regeneration in neonatal murine [J].
Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 144-153.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.018

新生鼠心肌再生相关调节机制的研究进展

陈梦琪^{1,2}, 刘婷婷^{1,2}, 孙芳玲^{1,2}, 田欣^{1,2}, 郑文荣^{1,2}, 祝自新^{1,2}, 王宇峰^{1,2},
马连素^{3*}, 王文^{1,2,4*}

(1.首都医科大学宣武医院实验动物室,北京 100053;2.北京市老年病医疗研究中心,北京 100053;
3.北京医药健康科技发展中心,北京 100101;4.北京市脑重大疾病研究院,北京 100069)

【摘要】 心血管疾病是一种危害人类健康的疾病,心肌梗死导致的收缩性心力衰竭是造成死亡的主要原因。既往观点认为,成年哺乳动物心脏中心肌细胞自我增殖更新能力有限,而近年来大量报道指出,哺乳动物在出生早期具备心肌再生的能力,并且其强度足以修复受损的心脏组织。新生鼠心肌再生现象的发现,为探讨影响心肌再生的相关机制提供了理想的动物模型,继而许多能够逆转心肌细胞周期阻滞和促进心肌再生的调控机制得以揭示。本文基于近几年开展的有关新生鼠心肌再生的研究,综述了影响心肌再生基因表达的因素(ncRNAs、转录因子等)、心肌再生相关信号通路和非心肌细胞(细胞外基质、免疫反应、心外膜等)对心肌再生的调节作用,以期为实现成年哺乳动物心肌损伤后心肌再生提供方向。

【关键词】 心肌再生;心血管疾病;细胞增殖;新生心脏;分子机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0144-10

Advances in research on mechanisms related to myocardial regeneration in neonatal murine

CHEN Mengqi^{1,2}, LIU Tingting^{1,2}, SUN Fangling^{1,2}, TIAN Xin^{1,2}, ZHENG Wenrong^{1,2}, ZHU Zixin^{1,2}, WANG Yufeng^{1,2},
MA Liansu^{3*}, WANG Wen^{1,2,4*}

(1. Department of Experimental Animal Laboratory, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China.
2. Beijing Geriatric Medical Research Center, Beijing 100053. 3. Beijing Medical Health Technology Development Center,
Beijing 100101. 4. Beijing Institute for Brain Disorders, Beijing 100069)

【Abstract】 Cardiovascular disease is a health hazard to humans and systolic heart failure due to myocardial infarction is a major cause of death. It was previously thought that myocardial cells of the adult mammalian heart possess a limited ability to proliferate and self-renew. However, it has been widely reported that mammals have the ability to regenerate the myocardium, which is restricted to early postnatal life, and that it is strong enough to repair damaged heart tissue. The discovery of myocardial regeneration in neonatal hearts has provided an ideal animal model to investigate the mechanisms that affect myocardial regeneration, and many mechanisms that reverse myocardial cell cycle arrest and promote

【基金项目】 国家自然科学基金(82173795)。

【作者简介】 陈梦琪(2000—),女,硕士,研究方向:心血管药理基础研究。E-mail:1531812315@qq.com

【通信作者】 马连素(1989—),女,博士,助理研究员,研究方向:生物医药,生命科学前沿关键技术,医药健康产业集群研究。

E-mail:maliansu@kw.beijing.gov.cn

王文(1968—),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:心脑血管再生修复治疗。E-mail:lzwang@163.com

* 共同通信作者

myocardial regeneration have been revealed. In this article, we review the factors affecting gene expression for myocardial regeneration (e. g., ncRNAs and transcription factors), myocardial regeneration-related signaling pathways, and the regulation of myocardial regeneration by non-myocardial cells (e. g., extracellular matrix, immune response, and epicardium) to provide directions for achieving myocardial regeneration after myocardial injury in adult mammals.

[Keywords] myocardial regeneration; cardiovascular disease; cell proliferation; neonatal heart; molecular mechanism

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

随心血管疾病危险因素的流行,全球心血管疾病(cardiovascular diseases, CVD)患病率持续上升,其中,由心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)导致的收缩性心力衰竭一直是造成死亡的重要原因之一。由于人类心肌再生能力十分有限,一旦心脏发生缺血损伤,心肌细胞则会迅速凋亡或坏死,最终被无收缩性的瘢痕组织取代,目前的医疗手段仅能在心脏受损后改善心脏功能,无法修复受损的心肌,这也是冠状动脉疾病高死亡率的重要原因^[1]。随着心肌再生现象在斑马鱼、蝾螈及新生哺乳动物中的发现,大量研究表明,非心肌细胞、生长因子、ncRNAs 以及小分子等均可通过调控心肌细胞的有丝分裂、心肌纤维化、血管生成等,影响心肌再生,这些发现及临床前结果为开发治疗人类心力衰竭的方法提供了新的方向^[2]。目前在针对心脏内源性机制的再生策略研究中,由于新生鼠心脏在出生后的短期内保有强大的再生能力,成为研究心肌再生现象和机制的理想模型。为了实现心肌再生现象向临床治疗转化,深入并系统研究心肌再生机制,了解心脏中不同细胞群及信号分子之间的相互关联就显得十分迫切。

1 新生鼠心肌再生相关基因表达的调控

1.1 非编码 RNA (non-coding RNAs, ncRNAs) 与心肌再生

ncRNAs 是新生鼠心肌细胞增殖、分化和修复中的关键调节因子^[3],目前研究较多的主要包括微小 RNA (microRNA, miRNA)、长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 和环状 RNA (circular RNA, circRNA)。miRNA 中如 miRlet-7i-5p、miR-26a、miR-128 等在出生后上调,乳鼠心肌再生能力也随之消失。其中,miRlet-7i-5p 通过与 E2f2 和 Ccnd2 的 mRNA 3' UTR 末端结合,抑制 E2f2 和 Ccnd2 的表达,影响心肌细胞周期进程,抑制心肌损伤后的再生^[4];miR-26a 能够抑制 Ezh2 的表达,而 Ezh2 是多梳蛋白抑制复合物 2 (polycomb repressive

complex 2, PRC2) (能够抑制细胞周期负调控因子)的组成成分,进而使心肌细胞增殖受到抑制^[5];miR-128 通过抑制 Suz12 的表达,上调 p27 (上调下游靶标 Cyclin E 和 CDK2 的表达)的转录,抑制心肌细胞增殖^[6]。除了抑制再生,miR-31a-5p、miR-106b-25、miR-199a、miR-302/367 等则促进再生相关基因的表达,促进心肌再生的发生。其中,miR-31a-5p 通过与 RhoBTB1 (心脏中功能尚不明确的肿瘤抑制基因)的 mRNA 3' UTR 末端结合抑制其表达,进而促进心肌细胞增殖^[7];miR-106b-25 通过调控多种细胞周期基因以及一些关键的细胞周期负调控因子(E2f5、Cdkn1c、Ccne1 和 Wee1),发挥促进心肌细胞增殖的作用^[8];miR-199a 通过抑制 Cd151 的表达进而抑制 p38 (心肌细胞增殖的负调节因子)的表达促进心肌再生^[9];miR-302-367 通过抑制 Mst1、Lsts2 和 Mob1b 的表达,抑制 Hippo-Yap 信号通路,促进新生鼠心肌细胞的增殖和再生^[10]。下文总结了近年来有关 miRNA 在心肌再生中的作用及相关机制的研究(表 1)。

lncRNA 也影响着心肌细胞增殖能力,虽然通常细胞中 lncRNA 的丰度低于 miRNA,但其往往具有更强的组织特异性。在新生鼠中,反义 lncRNA Sirt1 能够与 Sirt1 的 mRNA 结合并提高其稳定性和表达水平,促进心肌细胞增殖^[27];lncRNA Snhg1 可与 PTEN 结合诱导其降解,激活 PI3K/Akt 信号通路,诱导新生鼠心脏损伤后心肌细胞细胞质的分裂,同时 c-Myc 作为 PI3K/Akt 信号通路的下游靶点,又可作为 Snhg1 的转录因子促进其转录,实现对 PI3K/Akt 信号通路的持续激活,促进心肌细胞增殖和再生,改善心功能^[28]。在新生鼠中, lncRNA NPPA-AS1 和 lncDACH1 抑制心肌细胞的增殖,其中, lncRNA NPPA-AS1 的缺失不会影响心脏发育,但可以延长新生鼠心尖切除(apex resection, AR)后的心肌再生窗口,这是由于 NPPA-AS1 可与 SFPQ 蛋白竞争性结合,抑制了 SFPQ-NONO 异构体(能够促进 DNA 双链修复)的形成, DNA 损伤增加,进而

表 1 miRNA 对新生鼠心肌再生的影响及机制总结

Table 1 A summary of the miRNAs on neonatal murine cardiomyocyte proliferation and mechanism

ncRNA	物种 Species		靶点 Targets	影响 (+/-) Effect (+/-)	作者 Authors
	体内 <i>In vitro</i>	体外 <i>In vivo</i>			
miR-302-367	NMCMs	小鼠 Mouse	Mst1-, Lsts2-, Mob1b-	+	TIAN Y, et al. [10]
miR-1825	/	小鼠 Mouse	p16-, Rb1-, Meis2-	+	PANDEY R, et al. [11]
miR-128	NMCMs	小鼠 Mouse	SUZ12-, Cyclin E -, CDK2-	-	HUANG W, et al. [6]
miR-34a	NRCMs	小鼠 Mouse	Bcl2-, CyclinD1-, Sirt1-	-	YANG Y, et al. [12]
miR-31a-5p	NRCMs	大鼠 Mouse	RhoBTB1+	+	XIAO J, et al. [7]
miR-7i-5p	NMCMs	小鼠 Mouse	E2F2-, CCND2-	-	HU Y, et al. [4]
miR-222	NRCMs	/	p27-, HIPK1-, Hmbox-1-	+	VUJIC A, et al. [13]
miR-19a/19b	NRCMs	/	PTEN-, BIM-	+	GAO F, et al. [14]
miR-204	NRCMs	/	Jarid2-	+	LIANG D, et al. [15]
miR-294	NRCMs	/	Wee1/CDK1-, CyclinB1 axis-	+	BORDEN A, et al. [16]
miR-410, miR-495	NRCMs	/	Cited2-	+	CLARK A L, et al. [17]
miR-708	NMCMs NRCMs	/	MAPK14-	+	DENG S, et al. [18]
miR-106b-25	NRCMs	/	E2f5-, Cdkn1c-, Ccne1-, Wee1-, Hand2-, Mef2d-	+	RASO A, et al. [8]
miR-486	/	小鼠 Mouse	GATA4+, FoxO1-, TGFβ/Smad-	+	LANGE S, et al. [19]
miR-26a	NRCMs	小鼠 Mouse	Ezh2-	+	CRIPPA S, et al. [5]
miR-1180	NRCMs	/	NKIRAS2-	+	DING Y, et al. [20]
miR-152	NMCMs	小鼠 Mouse	YAP1-, P27kip1-, DNMT1-	+	WANG X, et al. [21]
miR-199a-3p	NRCMs	/	CD151-, P38-	+	TAO Y, et al. [9]
miR-24	NRCM	/	CDKN1B-	+	GAO J, et al. [22]
miR-301a	NRCMs	/	PTEN-	+	ZHEN J, et al. [23]
miR-143-3p	NMCMs	/	YAP-, Ctnd1-	-	MA W Y, et al. [24]
miR-411	NMCMs	/	YAP+	+	NUGROHO A B, et al. [25]
miR-378a-3p	NRCMs	/	ATg12-, LC3-, P62+	-	ZHAO J. et al. [26]

注: +表示对心肌再生具有促进作用或促进基因表达; -表示对心肌再生具有抑制作用或抑制基因表达; NMCMs: 新生小鼠心肌细胞; NRCMs: 新生大鼠心肌细胞。

Note. + indicates the facilitation to myocardial regeneration or promoting gene expression. - indicates the inhibition to myocardial regeneration or inhibition of gene expression. NMCMs, Neonatal mouse cardiomyocytes. NRCMs, Neonatal rat cardiomyocytes.

导致细胞周期停滞的发生^[29]。lncDACH1 的表达在小鼠出生后逐渐上调, 研究发现, lncDACH1 能够通过 与蛋白磷酸酶 1 催化亚基 α (protein phosphatase 1 catalytic subunit alpha, PP1A) 结合, 抑制其去磷酸化活性, 进而促进 YAP1 的磷酸化并使其核转运受到抑制, 最终导致新生鼠 AMI 后的心肌再生障碍^[30]。

除 miRNA 和 lncRNA 外, 近期研究发现, 具有突出稳定性和组织特异性的 circRNA 在心脏生长发育和疾病进程中也发挥重要作用^[31]。如 circHipk3 通过促进 Notch1 的乙酰化激活 Notch1 信号, 促进

AMI 后心肌细胞的增殖, 同时通过抑制 miR-133a 促进结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 的表达, 通过促进 AMI 后血管生成促进心肌再生^[32]; circCDYL 通过与 miR-4793-5p 结合, 调控 APP 的表达, 促进 AMI 后心肌细胞增殖^[33]; circSamd4 通过诱导 VCP 蛋白的线粒体易位减少氧化应激反应的发生, 进而下调 Vdac1 的表达并抑制线粒体通透性转换孔的打开^[34], 促进心肌细胞增殖并阻止心肌细胞凋亡; cirMdc1 通过与 PABP 结合抑制 Mdc1 的翻译, 引发心肌细胞的 DNA 损伤

和染色体稳定性的下降,进而影响受损心脏的再生和修复能力^[31]。

1.2 转录因子 (transcription factor, TF) 与心肌再生

转录因子能够通过调控再生相关基因的表达,如转录因子 Nr1、GATA4、Meis1 等,在新生鼠心脏发育和再生中发挥关键作用^[35]。其中,Nr1 是实现新生鼠 AMI 后心脏再生的关键因素,其通过调控蛋白酶体和抗氧化反应通路相关基因的表达介导新生鼠心肌再生反应的发生,并且在成年鼠中 Nr1 也可以为心脏提供保护作用^[36]。在心脏发育过程中,转录因子 GATA 家族可在彼此之间及与其他 TF 或信号分子产生相互作用,激活特定的下游靶标基因,影响心脏再生能力^[37]。其中,从小鼠出生后 1~7 d,心脏中 GATA4 蛋白含量不断降低,这与心肌细胞周期退出时间一致,心脏冷冻损伤新生小鼠在特异性敲除 GATA4 之后无法再生,而提高其在 7 日龄心脏冷冻损伤小鼠心脏中的水平可显著促进心脏再生^[38]。研究表明,GATA4 可调控成纤维细胞生长因子 16(fibroblast growth factors 16,FGF-16)的表达,诱导心肌再生^[39]。Meis1 可调节新生鼠心肌细胞周期和心肌再生能力,缺失 Meis1 的新生鼠心肌再生窗口可延长至 14 d^[40]。在成年鼠中的研究发现,Meis1 可以上调多种细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂基因(包括 p16、p19、p15、p21)的表达,诱导心肌细胞周期再入及心肌再生^[41]。还有研究通过分析再生小鼠和非再生小鼠的转录组,发现具有再生能力的心肌亚群在受损后转录因子 NFYA 和 NFE2L1 显著高表达,进一步研究发现,NFYA 可提高心肌细胞的分裂能力,NFE2L1 则对心肌细胞有明显保护作用^[42]。

1.3 表观遗传学与心肌再生

在心脏成熟过程中,新生鼠心肌细胞中的染色质结构会在特定区域发生剧烈变化,对特定基因的表达造成影响。研究人员比较了具备再生能力的 1 日龄小鼠和几乎丧失再生能力的 14 日龄及 56 日龄小鼠心肌细胞染色质构象,发现在心肌细胞成熟过程中,与增殖相关的基因关闭,而与肌肉发育相关的基因开放^[43]。这一变化的发生与组蛋白修饰、先锋转录因子、ATP 依赖性染色质重塑以及 DNA 甲基化有关^[44],所以通过调控以上因素,将对心肌细胞的增殖能力造成影响。

在分析对比了 1 日龄小鼠和 8 日龄小鼠心脏

H3K27ac 组蛋白修饰情况后,研究人员发现具备再生能力的 1 日龄小鼠与非再生 8 日龄小鼠在组蛋白修饰层面的明显区别及其与心脏再生能力的直接联系。1 日龄 AMI 小鼠在 1.5 d 后上调的 H3K27ac 峰优先富集于 FOXH1、NF- κ B 和 STAT5 等转录因子,这些转录因子在再生中均发挥重要作用^[45]。抑制参与染色质构象调节的转录因子激活蛋白 1(activator protein 1, AP-1)的功能将降低 Fbxl22 和 Ilk 位点(调节肌节分解和心肌细胞向受损区域的增殖)的染色质可及性,使心肌细胞无法增殖,而其过表达则能够促进心脏损伤区域心肌细胞的去分化和增殖^[46]。研究人员将 Hippo 通路的效应器 YAP 重编程为 YAP5SA(抵抗磷酸化的 YAP 突变体,心肌细胞中所有 YAP 的 LATS1/2 磷酸化位点从丝氨酸 S 突变为丙氨酸 A),这避开了 Hippo 信号通路对 YAP 活性的负调节,实现了部分成年鼠心肌细胞增殖状态的胎儿化,基因组研究结果显示,这与 YAP5SA 增加了心肌细胞染色质胚胎基因的表达有关^[47]。

1.4 其他

RHAU 是具有 G4 溶解酶活性的 RNA 结合蛋白,研究发现,RHAU 的缺失将使新生鼠心肌细胞丧失再生能力,最终导致心力衰竭^[48]。这是由于 RHAU 能够与 Yap1 和 Hexim1 基因的 5' 和 3' UTR 相偶联,使 mRNA 稳定性降低,提高翻译水平,这是新生鼠心脏受损后再生的必要条件。研究表明,具有强大再生能力的新生鼠心肌细胞几乎全部为单核二倍体,在成熟过程中,二倍体心肌细胞逐渐向多倍体转化,心脏再生能力也逐渐消失^[48]。针对这一现象,有研究发现,核纤层蛋白 B2(lamin B2, Lmnb2)可以促进核膜破裂,促进哺乳动物心肌细胞从单倍体向多倍体转化^[49],缺失 Lmnb2 的新生小鼠多倍体心肌细胞百分比增加,同时心肌再生能力降低。与 Lmnb2 类似,E2f 通路也与心肌细胞的多核化有关^[50],但研究表明,虽然缺失 E2f7/8 的小鼠心脏中心肌细胞单核二倍体增加,但发生 AMI 的小鼠心肌细胞的增殖并未受到刺激^[51]。所以心肌细胞染色体倍性与再生的联系还需要进一步深入研究。

2 新生鼠心肌再生的分子机制

2.1 Hippo/YAP 信号通路

Hippo/YAP 信号通路在器官大小和组织生长

的调节中发挥着重要作用,其在心肌再生领域的作用已经进行了广泛的研究,抑制 Hippo 通路中的调节因子,可以促进心肌细胞重新进入细胞周期进行细胞增殖,促进心肌再生^[52-53],其中,Hippo 的下游靶标 YAP 是心肌再生过程中的重要调节因子^[54]。YAP 也可独立于 Hippo 信号通路在其他信号的刺激下影响心肌细胞增殖和再生,如 GP130、TLR3 等均可通过作用于 YAP 促进心肌细胞增殖^[21,55]。其中,通过构建新生小鼠的 AR 心脏再生模型,研究人员发现了 GP130-YAP-Notch 通路在心肌再生中的重要作用,GP130 通过磷酸化 SRC 蛋白激活 YAP,这并不依赖于经典的 Hippo 信号通路^[55]。TLR3 能够诱导糖酵解依赖性的 YAP1 的激活,促进 miR-152 的表达,进而抑制 P27kip1、细胞周期抑制蛋白及 DNA 甲基转移酶 (DNA Methyltransferase 1, DNMT1) 的表达,促进新生鼠心脏受损后的再生及修复^[21]。

2.2 Wnt 信号通路

Wnt 信号的下调是细胞周期停滞的诱因之一^[56-57],抑制该信号通路可促进受损心肌中心肌细胞增殖并减少纤维化^[58]。该信号通路可分成两个亚类:经典的 β -catenin 依赖性和非经典的非 β -catenin 依赖性信号通路。近期研究发现,Wnt 配体的共受体 LRP6 通过 ING5/P21 信号通路激活新生和成年小鼠的心肌细胞周期活性,促进心脏的再生修复^[59],而下调共受体 LRP5 可促进 AKT 的降解,提高 p21 的表达水平,促进再生^[60]。Wnt 信号通路还可被 RNA 结合蛋白 CUGBP1 激活,通过 CUGBP1-Wnt/ β -catenin-GATA4 调控轴促进新生鼠心肌损伤后心肌细胞的增殖^[61]。此外,Wnt 信号通路还可与 Hippo 通路共同协调心肌细胞和成纤维细胞之间的相互作用,调控新生鼠心肌再生过程。在新生鼠的心肌细胞中,YAP 活性高时,Wnt 转运蛋白(wntless,WLs)被激活,介导心肌细胞与成纤维细胞之间非经典的 Wnt 信号通路交流,进而抑制心脏成纤维细胞的激活和转分化,抑制心脏受损后的纤维化,促进心肌再生^[62]。

2.3 其他

除了以上研究外,在新生鼠的心肌再生中发挥重要作用的还有 Notch 信号通路,通过该信号通路不仅可以减少氧化应激和细胞凋亡,还可以控制心肌损伤后的心肌细胞纤维化并促进血运重建,促进心肌细胞增殖和再生^[63]。

PI3K/p-AKT 信号通路在生理和病理条件下调节着细胞的增殖、分化、凋亡和自噬,在心肌再生中,通过该信号通路能够促进心肌细胞分裂增殖、降低 Bad 和 Bax 表达水平抑制细胞凋亡以及增加 Bcl-2 和 Vegf 的表达水平诱导梗死心肌的血管新生^[64]。近期研究发现,血小板衍生生长因子受体 β (platelet-derived growth factor receptor β , PDGFR- β) 可通过靶向 PI3K/p-AKT 信号通路控制心肌细胞中 Ezh2 的表达,促进心肌细胞增殖^[65]。在 AKT 的介导下,由内皮细胞分泌的髓源性生长因子(myeloid-derived growth factor, Mydgif)能够通过 c-Myc/FoxM1 通路,诱导新生 AR 小鼠心脏的心肌细胞增殖,促进心肌再生,并且在受损的成年小鼠心脏中,Mydgif 对再生同样有促进作用^[66]。

由 L-色氨酸(L-Tryptophan, Trp)在吲哚胺 2,3-双加氧酶 1 (Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1, IDO1) 催化下产生的犬尿氨酸(kynurenine, Kyn),在细胞中以烟酰胺嘌呤二核苷酸的形式参与细胞供能。研究表明,Trp-Kyn 代谢在新生鼠心肌再生和血管生成中发挥着双重作用,一方面,Kyn 可以通过与 AHR 结合激活 Src-YAP/ERK 通路促进 AR 新生鼠心脏的心肌细胞增殖,另一方面,Kyn 还可通过促进内皮细胞中 AHR 的核易位提高 VEGFA 的转录水平,进而促进血管新生^[67]。这一研究证明,IDO1-Kyn-AHR-Yap/ERK 轴是心肌再生中内皮细胞和心肌细胞之间相互作用的重要途径。

3 影响新生鼠心肌再生能力的非心肌细胞因素

3.1 细胞外基质

ECM(extracellular matrix, ECM)是一个复杂的蛋白质网络,含有多种细胞合成的酶、生长因子、结构蛋白(如胶原蛋白)和多糖,影响着细胞的生物学特性并赋予组织特定的理化和机械特性,越来越多的研究表明,ECM 影响着心脏的再生能力^[68-69]。ECM 组成不是一成不变的,在生长发育过程中不断发生着动态变化,1 日龄新生鼠心脏中分离的 ECM 与 7 日龄相比,能更显著地促进心肌细胞增殖。针对这种现象,研究人员比较了不同生长发育阶段心脏 ECM 组成,发现多种存在显著差异的成分,尤其是其中的 ECM 蛋白 Agrin 含量变化与小鼠心脏再生能力的大小高度相关,研究表明 Agrin 能够促进 AMI 后的心肌细胞的增殖和再生,缺失 Agrin 基因则会造成心脏提前成熟并在损伤后发生显著纤维

化^[70]。对于 Agrin 的作用机制,研究人员提出了 Agrin-DGC-YAP 调控轴模型。ECM 中的骨膜蛋白也是新生鼠心肌再生中的关键蛋白,敲除骨膜蛋白基因的小鼠在 AMI 后无法实现心肌的完全再生,并会出现显著的纤维化和血管生成减少现象^[71]。此外,有研究比较了胚胎期和出生后小鼠 ECM 的组成,发现两种在胚胎期富集的 ECM 蛋白 Sli2 和肾连蛋白(nephronectin, NPNT)在体外和体内均能够发挥刺激心肌细胞增殖的作用^[72]。

上述 ECM 成分都是通过直接促进心肌细胞增殖发挥促进心肌再生的作用,除此之外,有效的血运重建也是心肌再生的必要条件,而在血运重建时,ECM 不仅是血管新生的物理支撑,也是这一过程中调节血管生成的细胞因子和生长因子的重要来源^[73]。新生鼠中的相关研究比较有限,但在成年小鼠中的研究表明,ECM 中大量存在的蛋白多糖家族 HSPG,抑制其在梗死小鼠心脏中的硫酸化可以促进其与血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 的结合,进而促进 VEGFA 的释放,诱导血管生成,使梗死后的心脏功能改善^[74]。在斑马鱼中的研究也充分证实了 ECM 蛋白(如胶原蛋白)的血管支架和信号传导作用^[75-77]。虽然新生鼠中的研究尚未涉及 ECM 中的具体成分,但已有研究证实,在心肌再生过程中,内皮细胞向损伤区域的迁移先于心肌细胞的增殖过程^[78]。

除了组成外,ECM 的机械性能也影响着心脏再生能力。在新生小鼠及大鼠心肌细胞体外培养过程中,ECM 硬度的增加将导致细胞周期停滞的发生^[79],而在使用赖氨酰氧化酶(lysyl oxidases, LOX)降低 ECM 的硬度后,小鼠能够在出生后的 3 d 内保持心脏的再生能力,这表明 ECM 的硬度是新生鼠心肌再生的影响因素之一^[80]。

3.2 心外膜

心外膜是心脏的最外层,是各种心脏间质细胞(如成纤维细胞、血管壁细胞、内皮细胞)的起源,而且在胚胎发育阶段,心外膜和心外膜衍生细胞(epicardial and epicardium-derived cells, EPDCs)能够通过分泌生长因子(FGF9、IGF2、TGF- β 、PDGF),调控心外膜衍生细胞的发育方向,进而影响心脏纤维化、血管成熟、心肌细胞增殖和心脏发育进程^[81]。虽然心外膜在出生后即进入休眠状态,但在新生鼠中,其中许多旁分泌信号通路在心脏修复或再生期

间又可重新启动^[82]。其中,胰岛素生长因子 2 (insulin-like growth factor 2, IGF-2)是心脏发育过程中重要的有丝分裂原,是新生鼠心脏再生所必须的,IGF2 缺失的新生小鼠心肌细胞几乎无法进入细胞周期^[83]。细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)作为细胞间通讯和信号传导的重要媒介,是心外膜作用发挥所必须的物质。近期有研究人员通过向新生鼠心脏受损区域注射从永生化小鼠胚胎中分离的外源心外膜 EVs,促进了 1 日龄 AMI 心脏再生模型小鼠的心肌细胞增殖,并且诱导了 7 日龄小鼠心肌细胞周期再入和增殖,这种促再生作用的发挥是由囊泡中的 miR-30a、miR-100 等保守的促再生 miRNA 介导的^[84]。

3.3 免疫反应

研究表明,AMI 后新生鼠和成年鼠心脏的免疫反应和巨噬细胞亚群存在显著差异,在心脏损伤的新生鼠中,这些免疫反应能够刺激心肌再生^[85]。研究人员把从新生小鼠心脏中分离得到的巨噬细胞移植到成年小鼠 AMI 部位,促进了心肌细胞的增殖,受损的心肌显著修复,心脏功能改善,这证实新生小鼠受损心脏中巨噬细胞在心肌再生中发挥的重要作用^[86]。此外,对新生鼠来说,心脏受损后的急性炎症反应是心肌再生的必要条件,急性炎症反应被抑制或 IL-13 缺陷的新生小鼠在 AR 后无法实现完全的心肌再生,相反,外源 IL-13 可激活 ERK1/2 和 AKT,进而促进心肌细胞的增殖,促进心肌再生^[87]。

4 细胞代谢与心肌再生

在出生后,心肌细胞的代谢方式逐渐从糖酵解过渡到脂肪酸氧化或有氧呼吸^[88],这种转变的发生将造成心肌细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量的增加,引发 DNA 的氧化损伤,导致细胞周期停滞的发生^[89]。使用 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)^[90]、H₂S^[91]等清除 ROS 能够延长新生鼠心肌再生窗口,上调抗氧化基因如 Pitx2 的表达水平,同时避免了 ROS 对心肌细胞的影响,维持心肌的再生能力^[92-93]。由于脂肪酸是氧化代谢的主要原料,研究人员通过控制食物中脂肪酸含量,促进葡萄糖氧化并抑制脂肪酸氧化,成功减少了 ROS 的产生,显著降低了心肌细胞 DNA 的氧化损伤^[52]。除了控制代谢的原料,还有研究通过控制代谢反应的关键酶如丙酮酸激酶的 M2 (pyruvate

kinase M2, pkm2)^[94]、丙酮酸脱氢酶激酶 4 (pyruvate dehydrogenase kinases 4, PDK-4)^[52] 的表达,证实代谢模式可通过影响氧化应激反应影响心脏损伤后的心肌再生能力。

5 新生鼠心肌再生研究的展望与总结

新生鼠心肌再生现象的发现为心肌再生机制的研究和相关疗法的开发提供了有力工具。当前在相关研究中,还有诸多亟待解决的问题,如心肌细胞的倍性是如何影响心肌再生能力的;心肌细胞代谢方式从脂肪酸氧化到糖酵解的转变具体是如何促进心肌再生的;心脏中是否存在一个对有丝分裂刺激更敏感心肌细胞亚群等。虽然目前凭借新生鼠心肌再生模型已经发现了诸多心肌再生相关的调节机制,但新生鼠与成年鼠或其他哺乳动物在心肌细胞的细胞核成倍性、端粒长度、能量利用形式等方面存在显著差异,通过任何一种单一途径对心肌再生的促进作用都十分有限,这表明从新生鼠心肌再生向其他哺乳动物心肌再生的过渡还需要厘清多种影响因素的相互作用关系,综合考虑各种因素从整体上实现更有效的心肌再生。未来,要想在人类心脏治疗中开发出心肌再生疗法,还需要对心肌再生机制进一步深入研究。

参考文献:

[1] ROTH G A, MENSAH G A, JOHNSON C O, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990-2019: update from the GBD 2019 study [J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(25): 2982-3021.

[2] CHEN C H, POSS K D. Regeneration genetics [J]. Annu Rev Genet, 2017, 51: 63-82.

[3] HUNKLER H J, GROB S, THUM T, et al. Non-coding RNAs: key regulators of reprogramming, pluripotency, and cardiac cell specification with therapeutic perspective for heart regeneration [J]. Cardiovasc Res, 2022, 118(15): 3071-3084.

[4] HU Y, JIN G, LI B, et al. Suppression of miRNA let-7i-5p promotes cardiomyocyte proliferation and repairs heart function post injury by targeting CCND2 and E2F2 [J]. Clin Sci, 2019, 133(3): 425-441.

[5] CRIPPA S, NEMIR M, OUNZAIN S, et al. Comparative transcriptome profiling of the injured zebrafish and mouse hearts identifies miRNA-dependent repair pathways [J]. Cardiovasc Res, 2016, 110(1): 73-84.

[6] HUANG W, FENG Y, LIANG J, et al. Loss of microRNA-128 promotes cardiomyocyte proliferation and heart regeneration [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 700.

[7] XIAO J, LIU H, CRETOIU D, et al. MiR-31a-5p promotes

postnatal cardiomyocyte proliferation by targeting RhoBTB1 [J]. Exp Mol Med, 2017, 49(10): e386.

[8] RASO A, DIRKX E, SAMPAIO-PINTO V, et al. A microRNA program regulates the balance between cardiomyocyte hyperplasia and hypertrophy and stimulates cardiac regeneration [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 4808.

[9] TAO Y, ZHANG H, HUANG S, et al. MiR-199a-3p promotes cardiomyocyte proliferation by inhibiting Cd151 expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 516(1): 28-36.

[10] TIAN Y, LIU Y, WANG T, et al. A microRNA-Hippo pathway that promotes cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration in mice [J]. Sci Transl Med, 2015, 7(279): 279ra38.

[11] PANDEY R, VELASQUEZ S, DURRANI S, et al. MicroRNA-1825 induces proliferation of adult cardiomyocytes and promotes cardiac regeneration post ischemic injury [J]. Am J Transl Res, 2017, 9(6): 3120-3137.

[12] YANG Y, CHENG H W, QIU Y, et al. MicroRNA-34a plays a key role in cardiac repair and regeneration following myocardial infarction [J]. Circ Res, 2015, 117(5): 450-459.

[13] VUJIC A, LERCHENMÜLLER C, WU T D, et al. Exercise induces new cardiomyocyte generation in the adult mammalian heart [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 1659.

[14] GAO F, KATAOKA M, LIU N, et al. Therapeutic role of miR-19a/19b in cardiac regeneration and protection from myocardial infarction [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1802.

[15] LIANG D, LI J, WU Y, et al. miRNA-204 drives cardiomyocyte proliferation via targeting Jarid2 [J]. Int J Cardiol, 2015, 201: 38-48.

[16] BORDEN A, KURIAN J, NICKOLOFF E, et al. Transient introduction of miR-294 in the heart promotes cardiomyocyte cell cycle reentry after injury [J]. Circ Res, 2019, 125(1): 14-25.

[17] CLARK A L, NAYA F J. MicroRNAs in the myocyte enhancer factor 2 (MEF2)-regulated Gtl2-Dio3 noncoding RNA locus promote cardiomyocyte proliferation by targeting the transcriptional coactivator Cited2 [J]. J Biol Chem, 2015, 290(38): 23162-23172.

[18] DENG S, ZHAO Q, ZHEN L, et al. Neonatal heart-enriched miR-708 promotes proliferation and stress resistance of cardiomyocytes in rodents [J]. Theranostics, 2017, 7(7): 1953-1965.

[19] LANGE S, BANERJEE I, CARRION K, et al. MiR-486 is modulated by stretch and increases ventricular growth [J]. JCI Insight, 2019, 4(19): e125507.

[20] DING Y, BI L, WANG J. MiR-1180 promotes cardiomyocyte cell cycle re-entry after injury through the NKIRAS2-NFkB pathway [J]. Biochem Cell Biol, 2020, 98(4): 449-457.

[21] WANG X, HA T, LIU L, et al. TLR3 mediates repair and regeneration of damaged neonatal heart through glycolysis dependent YAP1 regulated miR-152 expression [J]. Cell Death Differ, 2018, 25(5): 966-982.

[22] GAO J, ZHU M, LIU R F, et al. Cardiac hypertrophy is

- positively regulated by microRNA-24 in rats [J]. *Chin Med J*, 2018, 131(11): 1333-1341.
- [23] ZHEN L, ZHAO Q, LÜ J, et al. MiR-301a-PTEN-AKT signaling induces cardiomyocyte proliferation and promotes cardiac repair post-MI [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 22: 251-262.
- [24] MA W Y, SONG R J, XU B B, et al. Melatonin promotes cardiomyocyte proliferation and heart repair in mice with myocardial infarction via miR-143-3p/Yap/Ctnnd1 signaling pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(6): 921-931.
- [25] NUGROHO A B, STAFFORD N, ZI M, et al. Micro RNA-411 expression improves cardiac phenotype following myocardial infarction in mice [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2022, 7(9): 859-875.
- [26] ZHAO J, CHEN F, MA W, et al. Suppression of long noncoding RNA NEAT1 attenuates hypoxia-induced cardiomyocytes injury by targeting miR-378a-3p [J]. *Gene*, 2020, 731: 144324.
- [27] LI B, HU Y, LI X, et al. Sirt1 antisense long noncoding RNA promotes cardiomyocyte proliferation by enhancing the stability of Sirt1 [J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(21): e009700.
- [28] LI M, ZHENG H, HAN Y, et al. LncRNA Snhg1-driven self-reinforcing regulatory network promoted cardiac regeneration and repair after myocardial infarction [J]. *Theranostics*, 2021, 11(19): 9397-9414.
- [29] FU W, REN H, SHOU J, et al. Loss of NPPA-AS1 promotes heart regeneration by stabilizing SFPQ-NONO heteromer-induced DNA repair [J]. *Basic Res Cardiol*, 2022, 117(1): 10.
- [30] CAI B, MA W, WANG X, et al. Targeting LncDACH1 promotes cardiac repair and regeneration after myocardium infarction [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(7): 2158-2175.
- [31] MA W, WANG X, SUN H, et al. Oxidant stress-sensitive circRNA Mdc1 controls cardiomyocyte chromosome stability and cell cycle re-entry during heart regeneration [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 184: 106422.
- [32] SI X, ZHENG H, WEI G, et al. circRNA Hipk3 induces cardiac regeneration after myocardial infarction in mice by binding to Notch1 and miR-133a [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 21: 636-655.
- [33] ZHANG M, WANG Z, CHENG Q, et al. Circular RNA (circRNA) CDYL induces myocardial regeneration by ceRNA after myocardial infarction [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e923188.
- [34] ZHENG H, HUANG S, WEI G, et al. CircRNA Samd4 induces cardiac repair after myocardial infarction by blocking mitochondria-derived ROS output [J]. *Mol Ther*, 2022, 30(11): 3477-3498.
- [35] WANG M, HU S, NIE Y, et al. Proteomic profiling of key transcription factors in the process of neonatal mouse cardiac regeneration capacity loss [J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(12): 1435-1442.
- [36] CUI M, ATMANLI A, MORALES M G, et al. Nrf1 promotes heart regeneration and repair by regulating proteostasis and redox balance [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5270.
- [37] WHITCOMB J, GHARIBEH L, NEMER M. From embryogenesis to adulthood: critical role for GATA factors in heart development and function [J]. *IUBMB Life*, 2020, 72(1): 53-67.
- [38] MALEK MOHAMMADI M, KATTIH B, GRUND A, et al. The transcription factor GATA4 promotes myocardial regeneration in neonatal mice [J]. *EMBO Mol Med*, 2019, 11(6): e10678.
- [39] YU W, HUANG X, TIAN X, et al. GATA4 regulates Fgf16 to promote heart repair after injury [J]. *Development*, 2016, 143(6): 936-949.
- [40] MAHMOUD A I, KOCABAS F, MURALIDHAR S A, et al. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest [J]. *Nature*, 2013, 497(7448): 249-253.
- [41] MURALIDHAR S A, SADEK H A. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest [J]. 2016: 93-101.
- [42] CUI M, WANG Z, CHEN K, et al. Dynamic transcriptional responses to injury of regenerative and non-regenerative cardiomyocytes revealed by single-nucleus RNA sequencing [J]. *Dev Cell*, 2020, 55(5): 665-667.
- [43] QUAIFE-RYAN G A, SIM C B, ZIEMANN M, et al. Multicellular transcriptional analysis of mammalian heart regeneration [J]. *Circulation*, 2017, 136(12): 1123-1139.
- [44] CHIARELLA A M, LU D, HATHAWAY N A. Epigenetic control of a local chromatin landscape [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 943.
- [45] WANG Z, CUI M, SHAH A M, et al. Mechanistic basis of neonatal heart regeneration revealed by transcriptome and histone modification profiling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(37): 18455-18465.
- [46] BEISAW A, KUENNE C, GUENTHER S, et al. AP-1 contributes to chromatin accessibility to promote sarcomere disassembly and cardiomyocyte protrusion during zebrafish heart regeneration [J]. *Circ Res*, 2020, 126(12): 1760-1778.
- [47] MONROE T O, HILL M C, MORIKAWA Y, et al. YAP partially reprograms chromatin accessibility to directly induce adult cardiogenesis *in vivo* [J]. *Dev Cell*, 2019, 48(6): 765-779, e7.
- [48] JIANG M, HU H, ZHAO K, et al. The G4 resolvase RHAU modulates mRNA translation and stability to sustain postnatal heart function and regeneration [J]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100080.
- [49] HAN L, CHOUDHURY S, MICH-BASSO J D, et al. Lamin B2 levels regulate polyploidization of cardiomyocyte nuclei and myocardial regeneration [J]. *Dev Cell*, 2020, 53(1): 42-59, e11.
- [50] WINDMUELLER R, LEACH J P, BABU A, et al. Direct comparison of mononucleated and binucleated cardiomyocytes reveals molecular mechanisms underlying distinct proliferative competencies [J]. *Cell Rep*, 2020, 30(9): 3105-3116, e4.
- [51] YU Z, ZHANG L, CATTANEO P, et al. Increasing mononuclear diploid cardiomyocytes by loss of E2F transcription

- factor 7/8 fails to improve cardiac regeneration after infarct [J]. *Circulation*, 2023, 147(2): 183–186.
- [52] CARDOSO A C, LAM N T, SAVLA J J, et al. Mitochondrial substrate utilization regulates cardiomyocyte cell cycle progression [J]. *Nat Metab*, 2020, 2(2): 167–178.
 - [53] XIE J, WANG Y, AI D, et al. The role of the Hippo pathway in heart disease [J]. *FEBS J*, 2022, 289(19): 5819–5833.
 - [54] XIN M, KIM Y, SUTHERLAND L B, et al. Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(34): 13839–13844.
 - [55] LI Y, FENG J, SONG S, et al. gp130 controls cardiomyocyte proliferation and heart regeneration [J]. *Circulation*, 2020, 142(10): 967–982.
 - [56] MAJIDINIA M, AGHAZADEH J, JAHANBAN-ESFAHLANI R, et al. The roles of Wnt/ β -catenin pathway in tissue development and regenerative medicine [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(8): 5598–5612.
 - [57] QUAIFE-RYAN G A, MILLS R J, LAVERS G, et al. β -Catenin drives distinct transcriptional networks in proliferative and nonproliferative cardiomyocytes [J]. *Development*, 2020, 147(22): dev193417.
 - [58] BERTOZZI A, WU C C, HANS S, et al. Wnt/ β -catenin signaling acts cell-autonomously to promote cardiomyocyte regeneration in the zebrafish heart [J]. *Dev Biol*, 2022, 481: 226–237.
 - [59] WU Y, ZHOU L, LIU H, et al. LRP6 downregulation promotes cardiomyocyte proliferation and heart regeneration [J]. *Cell Res*, 2021, 31(4): 450–462.
 - [60] ZHOU H, ZHANG F, WU Y, et al. LRP5 regulates cardiomyocyte proliferation and neonatal heart regeneration by the AKT/P21 pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(10): 2981–2994.
 - [61] LIU Y, WANG H, ZHANG H, et al. CUGBP1, a crucial factor for heart regeneration in mice [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(2): 120.
 - [62] LIU S, TANG L, ZHAO X, et al. Yap promotes noncanonical Wnt signals from cardiomyocytes for heart regeneration [J]. *Circ Res*, 2021, 129(8): 782–797.
 - [63] KACHANOVA O, LOBOV A, MALASHICHEVA A. The role of the Notch signaling pathway in recovery of cardiac function after myocardial infarction [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12509.
 - [64] VALIZADEH A, ASGHARI S, MANSOURI P, et al. The roles of signaling pathways in cardiac regeneration [J]. *Curr Med Chem*, 2022, 29(12): 2142–2166.
 - [65] YUE Z, CHEN J, LIAN H, et al. PDGFR- β signaling regulates cardiomyocyte proliferation and myocardial regeneration [J]. *Cell Rep*, 2019, 28(4): 966–978, e4.
 - [66] WANG Y, LI Y, FENG J, et al. Mydgd promotes Cardiomyocyte proliferation and Neonatal Heart regeneration [J]. *Theranostics*, 2020, 10(20): 9100–9112.
 - [67] ZHANG D, NING J, RAMPRASATH T, et al. Kynurenine promotes neonatal heart regeneration by stimulating cardiomyocyte proliferation and cardiac angiogenesis [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 6371.
 - [68] HORTELLS L, JOHANSEN A K Z, YUTZEY K E. Cardiac fibroblasts and the extracellular matrix in regenerative and nonregenerative hearts [J]. *J Cardiovasc Dev Dis*, 2019, 6(3): 29.
 - [69] LI H, BAO M, NIE Y. Extracellular matrix-based biomaterials for cardiac regeneration and repair [J]. *Heart Fail Rev*, 2021, 26(5): 1231–1248.
 - [70] BASSAT E, MUTLAK Y E, GENZELINAKH A, et al. The extracellular matrix protein agrin promotes heart regeneration in mice [J]. *Nature*, 2017, 547(7662): 179–184.
 - [71] CHEN Z, XIE J, HAO H, et al. Ablation of periostin inhibits post-infarction myocardial regeneration in neonatal mice mediated by the phosphatidylinositol 3 kinase/glycogen synthase kinase 3 β /cyclin D1 signalling pathway [J]. *Cardiovasc Res*, 2017, 113(6): 620–632.
 - [72] WU C C, JERATSCH S, GRAUMANN J, et al. Modulation of mammalian cardiomyocyte cytokinesis by the extracellular matrix [J]. *Circ Res*, 2020, 127(7): 896–907.
 - [73] DEL MONTE-NIETO G, FISCHER J W, GORSKI D J, et al. Basic biology of extracellular matrix in the cardiovascular system, part 1/4: JACC focus seminar [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 75(17): 2169–2188.
 - [74] KORF-KLINGEBIEL M, REBOLL M R, GROTE K, et al. Heparan sulfate-editing extracellular sulfatases enhance VEGF bioavailability for ischemic heart repair [J]. *Circ Res*, 2019, 125(9): 787–801.
 - [75] MARÍN-JUEZ R, EL-SAMMAK H, HELKER C S M, et al. Coronary revascularization during heart regeneration is regulated by epicardial and endocardial cues and forms a scaffold for cardiomyocyte repopulation [J]. *Dev Cell*, 2019, 51(4): 503–515, e4.
 - [76] MUKHERJEE D, WAGH G, MOKALLED M H, et al. Ccn2a is an injury-induced matricellular factor that promotes cardiac regeneration in zebrafish [J]. *Development*, 2021, 148(2): dev193219.
 - [77] EL-SAMMAK H, YANG B, GUENTHER S, et al. A vegfc-Emilin2a-Cxcl8a signaling axis required for zebrafish cardiac regeneration [J]. *Circ Res*, 2022, 130(7): 1014–1029.
 - [78] INGASON A B, GOLDSTONE A B, PAULSEN M J, et al. Angiogenesis precedes cardiomyocyte migration in regenerating mammalian hearts [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2018, 155(3): 1118–1127, e1.
 - [79] YAHALOM-RONEN Y, RAJCHMAN D, SARIG R, et al. Reduced matrix rigidity promotes neonatal cardiomyocyte dedifferentiation, proliferation and clonal expansion [J]. *Elife*, 2015, 4: e07455.
 - [80] NOTARI M, VENTURA-RUBIO A, BEDFORD-GUAUS S J, et al. The local microenvironment limits the regenerative potential of the mouse neonatal heart [J]. *Sci Adv*, 2018, 4(5):

eaao5553.

[81] CAO J, POSS K D. The epicardium as a hub for heart regeneration [J]. Nat Rev Cardiol, 2018, 15(10): 631–647.

[82] QUIJADA P, TREMBLEY M A, SMALL E M. The role of the epicardium during heart development and repair [J]. Circ Res, 2020, 126(3): 377–394.

[83] SHEN H, GAN P, WANG K, et al. Mononuclear diploid cardiomyocytes support neonatal mouse heart regeneration in response to paracrine IGF2 signaling [J]. Elife, 2020, 9: e53071.

[84] DEL CAMPO C V, LIAW N Y, GUNADASA-ROHLING M, et al. Regenerative potential of epicardium-derived extracellular vesicles mediated by conserved miRNA transfer [J]. Cardiovasc Res, 2022, 118(2): 597–611.

[85] HAN C, NIE Y, LIAN H, et al. Acute inflammation stimulates a regenerative response in the neonatal mouse heart [J]. Cell Res, 2015, 25(10): 1137–1151.

[86] LI Y, LI H, PEI J, et al. Transplantation of murine neonatal cardiac macrophage improves adult cardiac repair [J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(2): 492–494.

[87] WODESDALEK D J, PADDOCK S J, WAN T C, et al. IL-13 promotes *in vivo* neonatal cardiomyocyte cell cycle activity and heart regeneration [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2019, 316(1): H24–H34.

[88] BO B, LI S, ZHOU K, et al. The regulatory role of oxygen metabolism in exercise-induced cardiomyocyte regeneration [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 664527.

[89] MOHAMED T M A, ABOULEISA R, HILL B G. Metabolic determinants of cardiomyocyte proliferation [J]. Stem Cells, 2022, 40(5): 458–467.

[90] PUENTE B N, KIMURA W, MURALIDHAR S A, et al. The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response [J]. Cell, 2014, 157(3): 565–579.

[91] EGHBALI A, DUKES A, TOISCHER K, et al. Cell cycle-mediated cardiac regeneration in the mouse heart [J]. Curr Cardiol Rep, 2019, 21(10): 131.

[92] LIU S, MARTIN J F. The regulation and function of the Hippo pathway in heart regeneration [J]. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2019, 8(1): e335.

[93] TAO G, KAHR P C, MORIKAWA Y, et al. Ptx2 promotes heart repair by activating the antioxidant response after cardiac injury [J]. Nature, 2016, 534(7605): 119–123.

[94] MAGADUM A, SINGH N, KURIAN A A, et al. Pkm2 regulates cardiomyocyte cell cycle and promotes cardiac regeneration [J]. Circulation, 2020, 141(15): 1249–1265.

[收稿日期]2023-06-06

(上接第 44 页)

[22] KUCIA M, JANKOWSKI K, RECA R, et al. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion [J]. J Mol Histol, 2004, 35(3): 233–245.

[23] 李德保, 周莉, 孙祖越. 早发性卵巢功能不全相关信号通路研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(2): 121–127.

LI D B, ZHOU L, SUN Z Y. Research advances of premature ovarian insufficiency-related signaling pathways [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(2): 121–127.

[24] CHON S J, UMAIR Z, YOON M S. Premature ovarian insufficiency: past, present, and future [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 672890.

[25] 陈子江, 田秦杰, 乔杰, 等. 早发性卵巢功能不全的临床诊疗中国专家共识 [J]. 中华妇产科杂志, 2017, 52(9): 577–581.

CHEN Z J, TIAN Q J, QIAO J, et al. China expert consensus on clinical diagnosis and treatment of early-onset ovarian insufficiency [J]. Chin J Obstet Gynecol, 2017, 52(9): 577–581.

[26] 许万枫, 苏洁, 翁路安, 等. 孕康口服液对早发性卵巢功能不全小鼠的影响 [J]. 中成药, 2020, 42(5): 1180–1186.

XU W F, SU J, WENG L A, et al. Effects of Yunkang Oral Liquid on mice with premature ovarian insufficiency [J]. Chin Tradit Pat Med, 2020, 42(5): 1180–1186.

[27] DUTTA S, SENGUPTA P. Men and mice: relating their ages [J]. Life Sci, 2016, 152: 244–248.

[28] 张芳, 丁怡, 于潇, 等. 补肾养精颗粒调控早发性卵巢功能不全模型大鼠卵巢颗粒细胞凋亡机制研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2022, 46(3): 365–372, 378.

ZHANG F, DING Y, YU X, et al. Mechanism of Bushen Yangjing Granule in regulating apoptosis of ovarian granulosa cell in model rats with premature ovarian insufficiency [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med, 2022, 46(3): 365–372, 378.

[29] 陈峰荣, 周彤, 尚坤. 二至丸对卵巢早衰大鼠治疗作用及机制的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(7): 145–149, 271–273.

CHEN F R, ZHOU T, SHANG K. Experimental study on therapeutic effect and mechanism of erzhi pill on rats with premature ovarian failure [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2022, 40(7): 145–149, 271–273.

[30] 中华中医药学会, 中药实验药理专业委员会. 雌性不孕症动物模型制备规范(草案) [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(19): 25–30.

Traditional Chinese Medicine Experimental Pharmacology Professional Committee, Medicine CAOC. Specifications for preparation of female infertility animal models (draft) [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2018, 24(19): 25–30.

[收稿日期]2023-04-28

唐鑫,谭洁. 激光散斑衬比成像技术在慢性脑缺血动物模型中的应用研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 154-160.
Tang X, Tan J. Advances in the application of laser speckle contrast imaging in animal models of chronic cerebral hypoperfusion [J].
Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 154-160.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.019

激光散斑衬比成像技术在慢性脑缺血动物模型中的应用研究进展

唐鑫,谭洁*

(湖南中医药大学针灸推拿与康复学院,长沙 410208)

【摘要】 激光散斑衬比成像技术采用可视化、可量化的方法实时动态测量组织或器官的微循环血流量。因其活体检测、实时成像及操作简单等优点,已在微循环检测的多个领域中应用。慢性脑缺血动物模型主要通过减少双侧颈总动脉向大脑输送血流量的方法造模,可造成脑供血长期不足。激光散斑衬比成像技术可通过对慢性脑缺血动物模型皮层脑血流量、侧支循环开放、神经血管耦合反应等进行观察分析,从而判断动物模型造模是否成功及干预方法对其的治疗效果。本文就激光散斑衬比成像技术在慢性脑缺血动物模型中的应用及其优缺点进行总结,以期为临床治疗和科研提供新思路。

【关键词】 激光散斑衬比成像;慢性脑缺血;动物模型;综述

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856 (2024) 02-0154-07

Advances in the application of laser speckle contrast imaging in animal models of chronic cerebral hypoperfusion

TANG Xin, TAN Jie*

(College of Acupuncture & Tuina and Rehabilitation, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

【Abstract】 A visual and quantitative method of dynamically measuring microcirculatory blood flow in a tissue or organ in real time was developed using laser speckle contrast imaging technology. It has been used in numerous microcirculation detection domains because of its benefits of *in vivo* detection, real-time imaging, and ease of operation. Most animal models of chronic cerebral hypoperfusion involve decreasing blood flow to the brain from bilateral common carotid arteries, which can lead to a protracted deficit in cerebral blood supply. By monitoring and analyzing cortical cerebral blood flow, collateral circulation opening, and neurovascular coupling responses, laser speckle contrast imaging technology assesses the efficacy of modeling and the therapeutic effect of interventions in animal models of chronic cerebral hypoperfusion. This article summarizes the benefits and drawbacks of laser speckle contrast imaging in an animal model of chronic cerebral hypoperfusion to promote novel approaches to clinical care and academic study.

【Keywords】 laser speckle contrast imaging; chronic cerebral hypoperfusion; animal model; review

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

【基金项目】湖南省教育厅科学研究重点项目(22A0253);湖南省中医药科研计划项目(2021233)。

【作者简介】唐鑫(1998—),女,硕士,研究方向:神经系统疾病的中西医结合康复的机理与临床研究。

E-mail:20213712@stu.hnucm.edu.cn

【通信作者】谭洁(1980—),女,博士,教授,硕士生导师,研究方向:神经系统疾病的中西医结合康复的机理与临床研究。

E-mail:86869454@qq.com

慢性脑缺血 (chronic cerebral hypoperfusion, CCH), 又名慢性脑低灌注, 是指由一系列脑血管和循环系统疾病造成脑血流量 (cerebral blood flow, CBF) 病理性慢性减少而导致的脑功能障碍临床综合征^[1]。CCH 在血管认知障碍疾病的发作及进展中起关键作用, 而认知功能受损将严重影响患者的生活质量, 且临床上尚未有十分有效的治疗方法^[2-3]。CCH 患者数量庞大, 在 65 岁以上人群中 CCH 患者占 2/3, 50~65 岁人群中有 50% 是 CCH 患者, 45~50 岁人群中 CCH 患者占总人数的 25%^[4]。大脑血流供应的失代偿状态是 CCH 发病的主要原因, 因此改善失代偿状态可能是治疗 CCH 发病的有效策略。激光散斑衬比成像 (laser speckle contrast imaging, LSCI) 技术可以实时成像观察 CCH 动物模型 CBF 变化情况, 有效判断动物模型 CBF 的改变及干预方法对 CBF 的影响, 对探索 CCH 动物模型的造模方法及该病的治疗方法具有重要贡献。本文就 LSCI 技术在 CCH 动物模型中的应用及其优缺点进行综述, 以期临床治疗和科研提供思路。

1 激光散斑衬比成像技术

LSCI 技术自 20 世纪 90 年代推出以来, 已广泛应用于神经科学、皮肤病学和眼科等领域, 是测量血流量的有用工具^[5]。激光散斑衬比成像系统主要由 HeNe 激光器、扩束镜、反光镜、光学镜筒、CCD 相机及计算机组成, 是一种快速、实时、非侵入性和非接触式的成像技术, 以高时间和空间分辨率使组织中的体积积分血流图可视化^[6-7]。其利用激光具有相干性的特点, 当激光照射血管组织时, 血管中的红细胞持续流动, 反射回来的光线在成像上的强度不一, 从而形成相差^[8]。在图像上反映的是红细胞的流速越快, 成像就越模糊。因此, 流动的红细胞是移动散射体的主要来源, 而血流则充当着虚拟造影剂的角色, 从而勾勒出血管的轮廓^[9]。系统成像后, 可利用计算机通过量化观察到的斑点对比度 K 中的空间模糊量来测量相对于基线的血流变化, 其中 K 为给定相机曝光时间 T 下窗口像素强度的标准偏差与平均值的比率^[6]。尽管 LSCI 技术在微循环血流量观察方面是有前途的工具, 但其也存在一定的局限性。为了促进 LSCI 技术的广泛应用并改善其局限性, 许多研究对该技术进行了优化。多重曝光激光散斑对比成像量化了散斑对比度如何随着曝光时间的增加而降低, 并在估计灌注时展现

出更真实的光组织相互作用和散斑去相关模型, 因此相较于单曝光 LSCI 其提高了灌注的线性响应, 受组织特性的影响较小且主观上成像质量更高^[10]。而同步多尺度激光散斑成像可通过大视野和小视野的同时成像获得关键信息, 前者为感兴趣的组织提供全局血流动力学信息, 而后者则提供局部高分辨率血流信息^[11]。线扫描激光散斑对比成像相比于传统表面照明的散斑成像能够检测和量化更小、更深血管中的血流, 此外其还能够生成基于深度分辨吸收的组织形态学图像, 增强基于血流的功能成像^[5]。且随着对激光散斑衬比成像关键技术的进一步研究, 一系列新型 LSCI 系统也应运而生, 主要包括便携式 LSCI、内窥式 LSCI、头戴式 LSCI、多模态 LSCI 等, 这些新型系统拓宽了该技术的应用场景^[12]。LSCI 技术在观察血流量方面有其优缺点 (具体见表 1), 但随着该技术的进一步研究, 其缺点也在逐渐优化中。

2 激光散斑衬比成像技术在慢性脑缺血模型中的应用

2.1 监测脑皮层血流量

LSCI 技术在脑科学中应用最广泛的就是监测皮层脑血流量, 通过对大脑皮层 CBF 的活体监测, 提供客观的图像, 在脑缺血疾病模型的研究中发挥着重要作用。目前对 CCH 模型评价的方法主要有行为学、神经电生理及 CBF 监测, 其中 CBF 监测是评价 CCH 模型动物状态的金标准^[17]。CCH 动物模型主要的模式动物为大、小鼠, 且存在多种造模方法, 不同的造模方法造成的损伤部位及程度不同^[3]。尽管造模方法不同, 但模型的成模标准大多相同, 通过分析计算动物造模前后 CBF 的下降比率常作为其成模的标准之一。目前研究多认为其成模标准为 CBF 在术后 3 d 内下降至基线水平的 30%~50% 或以上^[18-22]。有研究通过长期观察利用双侧颈总动脉狭窄法制备的 CCH 小鼠模型 CBF 变化, 发现在术后 2 h 脑皮层血流量下降最明显, 后逐渐恢复, 在术后 28 d 仍较基线水平下降约 30%^[23]。而利用改良双侧颈总动脉永久性闭塞法 (先闭塞一侧颈总动脉间隔 1 周再闭塞另一侧) 制备的 CCH 大鼠模型 CBF 在闭塞一侧颈总动脉时下降至基线水平的 12.5%, 而后 CBF 逐渐恢复至基线水平, 两侧血管都闭塞后 CBF 急剧下降, 并在术后 8 周 CBF 恢复至基线水平^[24]。有研究探索更年期是否会加剧雌性小鼠慢性脑缺血所致的认知障碍, 利用 LSCI 技

表 1 激光散斑衬比成像技术的优缺点分析

Table 1 Analysis of advantages and disadvantages of laser speckle contrast imaging technology

技术 Technology	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
激光散斑衬比成像技术 Laser speckle contrast imaging technology	1. 非接触式活体成像 1. Non-contact living imaging	1. 穿透性有限,适用于皮层血管血流量观察 1. Limited penetration, suitable for observation of blood flow in cortical vessels
	2. 实时全场成像 2. Real-time full-field imaging	2. 观察对象最轻微的移动都会导致高振幅伪影 ^[13] 2. Slightest movement of the observed object will result in high-amplitude artifacts
	3. 高空间和时间分辨率 3. High spatial and temporal resolution	3. 基线值的测量无法得到彻底评估 ^[14] 3. Measurements of baseline values cannot be thoroughly evaluated
	4. 结果可视化、可量化 4. Visual and quantifiable results	4. 静态散射成分会影响结果的准确性 ^[15] 4. Static scattering components will affect the accuracy of the results
	5. 可重复性好 ^[16] 5. Good repeatability	5. 对血流灌注的非线性响应 ^[10] 5. Nonlinear response to blood perfusion
	6. 成像视野的可扩展性 ^[11] 6. Scalability of imaging field of view	6. 在噪声存在下的高可变性 ^[10] 6. High variability in the presence of noise
	7. 仪器廉价且操作简单 7. Instrument is cheap and easy to operate	7. 不能提供绝对血流灌注值 ^[16] 7. Absolute perfusion values cannot be provided

术观察更年期 CCH 模型与对照 CCH 模型小鼠脑血流量变化,发现二者无明显差异,但证明 CBF 减少可导致小鼠日常生活能力受损^[25]。综上,LSCI 技术可作为评价 CCH 动物模型成模的重要工具,并可对模型造模前后的 CBF 进行长期观察,判断不同造模方法对动物模型 CBF 的影响,从而更深入地了解动物模型 CBF 的变化过程,改进更符合 CCH 发病过程的造模方法。此外,其还可用于探讨不同干预因素对该疾病动物模型脑血流量的影响,为临床治疗该病提供便利。

LSCI 技术在观察大小鼠动物模型时有所不同。小鼠因其颅骨骨质较薄,其皮层血管清晰可见,因此打开其头皮即可成像,是激光散斑衬比成像常用的模式动物。与小鼠不同,大鼠的颅骨较厚需利用小动物颅钻将其磨薄才能观察到清晰的血流图(图 1)。因此在观察大鼠模型时,人工磨薄程度的差异,也会在一定程度影响 CBF 的观察。若要长期观察大鼠模型的 CBF 变化,还须时刻注意磨薄颅窗的愈合情况,在颅骨愈合增厚时要及时磨薄。此外,在保持硬脑膜的完整情况下也可手术去除大鼠颅骨,再利用盖玻片建立人工颅窗以避免颅骨愈合影响对脑血流的观察,但手术操作难度大且动物死亡率会增加。LSCI 技术可实时、非接触式的活体成像,但颅骨等静态散射成分也会影响脑血流量的监测,且因其穿透深度约为 300 μm 只能检测脑皮层血流量,所以对于受缺血影响更大的白质及海马供

血情况尚无法检测。而皮层表浅血管容易受自身及外界因素影响,自身因素包括动物自身的应激情况、血压、血气等,而外界因素则包括温度、麻醉的种类及麻醉的程度等^[26]。值得一提的是,呼吸麻醉剂异氟醚的使用会改善 CBF 并增加局灶性缺血区 O₂ 的供应和消耗^[27]。因此在利用 LSCI 技术观察动物模型 CBF 变化时要严格控制麻醉的种类统一。

2.2 评价神经血管耦合功能

神经血管耦合将大脑的高能量需求与血液中的能量底物供应相匹配,是健康大脑的基本功能,其可靠性也是临床和科研使用非侵入性脑成像技术的基础^[28]。而神经血管耦合调节 CBF 在维持健康的认知功能方面也起着至关重要的作用^[29]。目前已有许多技术应用于神经血管耦合的观察中,包括功能磁共振成像、功能近红外光谱技术、正电子发射计算机断层成像和功能超声等。而 LSCI 技术是评价神经血管耦合功能的新兴技术,其可通过散斑成像及脑血流量分析,呈现更直观、客观的结果。有研究通过 LSCI 技术发现老年小鼠的神经血管耦合反应受损明显,而利用聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶抑制剂 PJ-34 治疗 2 周后可通过增加内皮 NO (nitric oxide) 介导的血管舒张来改善该反应,从而显著改善其空间工作记忆^[30]。类似于上述研究,目前 LSCI 技术对神经血管耦合反应的观察多集中于老年小鼠,通过该技术判断不同干预因素对老年小鼠神经血管耦合反应及认知功能的影响^[29,31-35]。

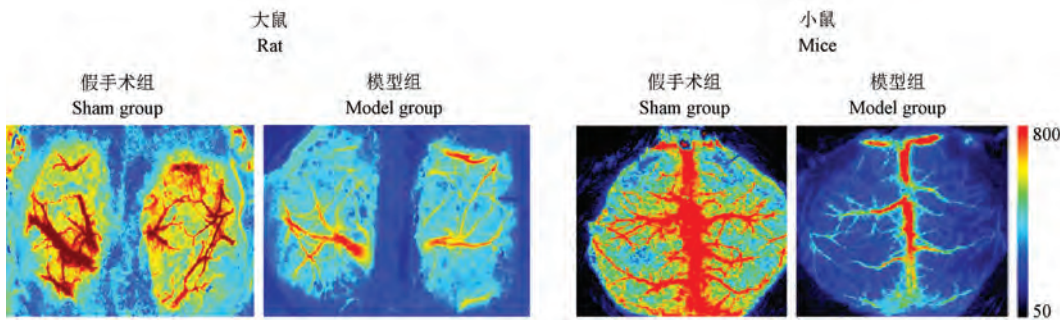


图 1 大鼠、小鼠激光散斑衬比成像脑血流图^[22]

Figure 1 Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow in rats and mice

神经血管耦合是正常大脑功能的基础,脑组织缺血后,神经血管耦合不可避免的会受到影响。因此通过对 CCH 动物模型神经血管耦合功能的评价可以判断模型造模是否成功及干预方法对该疾病的改善效果。

对于神经血管耦合反应的观察需要 3 个关键要素:(1)有效的神经刺激的方法;(2)测量 CBF 或可视化脑血管反应性的实时技术;(3)可靠的数据分析方法。而 LSCI 技术对 CBF 动力学的高度敏感性促进了其在神经血管耦合和疾病模型表征中的应用,可很好地满足以上要求^[36-37]。此外,同步多尺度激光散斑衬比成像可以大视野(低分辨率)观察整个脑血流量,以评估血流情况,同时还可以小视野(高分辨率)精确捕获局部血管动力情况,从而更好地评价神经血管耦合反应^[11]。目前常用的神经刺激方法为晶须刺激,而对应的观察部位为晶须刺激对侧的晶须桶皮层(位于前囟的 1 mm 喙侧及 3 mm 外侧)。晶须刺激的方法为使用棉签小心轻柔地从一侧到另一侧触摸大鼠胡须 5 s,频率为 30 Hz,同时记录晶须桶状皮层血流的变化,并捕获大脑表面的血流差分灌注图^[35]。对神经血管耦合功能的评价一般要进行 6 次实验,每次间隔 5~10 min,以获得准确可靠的数据分析。

2.3 观察脑侧支循环的开放

脑侧支循环为血液到达缺血组织提供了另一种血管通路,并已被证实与缺血性疾病更好的临床结局有关^[38]。脑侧支循环一般分为三级,初级侧支为连接大脑前后循环的颅底动脉环;次级侧支为软脑膜侧支即大脑中动脉与大脑前动脉及大脑后动脉远端节段之间形成的侧支吻合;三级侧支是指新生血管构成的侧支循环^[39]。其中软脑膜侧支供应被认为是狭窄闭塞性血管病变预防慢性缺血脑组

织损伤的关键^[40]。侧支循环开放后,其直径及弯曲度会增加,且软脑膜侧支的开放可出现在皮质的所有区域^[41]。有研究通过 LSCI 技术及双光子激光扫描显微镜观察缺血区域脑血流量、血管直径和单个侧支的血流方向及速度发现远端缺血预处理可改善老年缺血性卒中大鼠侧支衰竭,从而提高缺血区域脑灌注,减少脑组织损伤^[42]。LSCI 技术已被应用于观察缺血性卒中脑侧支循环的建立,对于同样是脑缺血疾病的 CCH 来说,利用其观察 CCH 中侧支循环的建立及评价不同干预方法对脑侧支循环开放的影响可能是研究 CCH 治疗方法的有效策略。然而相较于缺血性卒中模型单侧大脑中动脉的闭塞而言,CCH 模型侧支循环观察的范围要更广,实验耗时要更长。且 LSCI 技术只能观察到皮层的侧支开放,对于颅底及大脑深部的侧支无法观察。

对小鼠脑皮层侧支循环开放的观察可通过造模前后的激光散斑衬比成像图对比,从而观察皮层侧支循环的开放,并可对侧支循环的开放支数进行统计分析,从而判断干预方法对侧支循环的影响。不同于小鼠,大鼠侧支循环的观察则更为复杂。相较于 CBF 的监测,侧支循环的观察需要更清晰的视野,故通常行开颅手术去除颅骨同时保持硬脑膜完好无损,将一层薄薄的 1.3% 低熔点琼脂糖(溶解于人工脑脊液中)放在暴露的硬脑膜上用盖玻片密封,并用牙科水泥固定周边再进行激光散斑衬比成像^[43]。在对啮齿动物皮层侧支循环观察时,LSCI 技术常与双光子激光扫描显微镜结合研究,一方面激光散斑衬比成像可直观的呈现侧支循环的开放,并分析侧支循环的相对血流量,另一方面双光子激光扫描显微镜可以通过测量血管直径,红细胞速度及红细胞通量对侧支循环进行分析,二者结合可以更全面地评价皮层侧支循环的开放^[42,44]。

3 总结与展望

激光散斑衬比成像技术在脑科学中的应用越来越广泛,并发展出越来越广泛的用途。尽管其具有一定的局限性,但随着对 LSCI 技术深入研究,这些局限性也在逐渐攻克中。目前尚未有公认的 CCH 动物模型造模方法,因此更符合人类发病过程的 CCH 动物模型仍在探索中。且 CCH 模型动物多为雄性,但 CCH 的患病人群中也有女性,所以探索一个符合人类发病过程的 CCH 雌性动物模型也是十分有必要的。激光散斑衬比成像技术可以检测脑血流的变化、评价神经血管耦合功能和观察侧支循环的开放,且其操作相对来说也较简单,对 CCH 动物模型造模方法的改进、模型成模的判断及其治疗的探索是一个有前途的工具,在研究该疾病的发生发展中发挥重要作用。但目前激光散斑衬比成像技术多应用于缺血性卒中动物模型研究,相较于该模型,CCH 动物模型的发病时间更长,需观察的范围更广。因此 LSCI 技术在 CCH 动物模型的应用研究相对较少,未来 LSCI 技术在该动模型中的应用可能是研究治疗该疾病的新方向。另有研究发现激光散斑衬比成像技术可用于监测活体啮齿动物血脑屏障的完整性,但具体应用的研究报导较少^[45]。笔者相信未来激光散斑衬比成像技术可在 CCH 动物模型研究中得到广泛应用,同时为证明不同干预方法治疗该病的效果发挥一定作用,从而以更直观、更客观的角度研究该病的发生发展,为临床治疗该病提供思路。

参考文献:

[1] MA X, JI C. Remote ischemic conditioning: a potential treatment for chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Eur Neurol*, 2022, 85(4): 253-259.

[2] YAN N, XU Z, QU C, et al. Dimethyl fumarate improves cognitive deficits in chronic cerebral hypoperfusion rats by alleviating inflammation, oxidative stress, and ferroptosis via NRF2/ARE/NF- κ B signal pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 98: 107844.

[3] 侯外方, 张茂森, 张琳, 等. 血管性认知障碍动物模型的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(4): 542-552.

HOU W F, ZHANG M S, ZHANG L, et al. Research progress using animal models of vascular cognitive impairment [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(4): 542-552.

[4] 北京中西医结合学会卒中专业委员会. 慢性脑缺血中西医结合诊疗专家共识 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(10): 1161-1167.

Stroke professional committee of Beijing association of integrative medicine. Expert consensus on the diagnosis and treatment of chronic cerebral ischemia with integrated traditional Chinese and Western medicine [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2018, 38(10): 1161-1167.

[5] DU E, SHEN S, CHONG S P, et al. Multifunctional laser speckle imaging [J]. *Biomed Opt Express*, 2020, 11(4): 2007-2016.

[6] JAFARI C Z, SULLENDER C T, MILLER D R, et al. Effect of vascular structure on laser speckle contrast imaging [J]. *Biomed Opt Express*, 2020, 11(10): 5826-5841.

[7] 张雅檬, 宁雪, 李赳赳, 等. 联合光谱和激光散斑成像的小鼠脑损伤模型在体研究 [J]. *数据采集与处理*, 2021, 36(4): 697-704.

ZHANG Y M, NING X, LI W T, et al. *In vivo* research of brain injury model in mice by combined spectroscopy and laser speckle imaging [J]. *J Data Acquis Process*, 2021, 36(4): 697-704.

[8] 李宜璋, 杨晖, 李然, 等. 激光散斑血流成像系统中的光源相干性 [J]. *光学精密工程*, 2019, 27(10): 2127-2135.

LI Y Z, YANG H, LI R, et al. Source coherence in laser speckle blood imaging system [J]. *Opt Precis Eng*, 2019, 27(10): 2127-2135.

[9] SENARATHNA J, REGE A, LI N, et al. Laser Speckle Contrast Imaging: theory, instrumentation and applications [J]. *IEEE Rev Biomed Eng*, 2013, 6: 99-110.

[10] HULTMAN M, LARSSON M, STRÖMBERG T, et al. Speed-resolved perfusion imaging using multi-exposure laser speckle contrast imaging and machine learning [J]. *J Biomed Opt*, 2023, 28(3): 036007.

[11] LEE B, SOSNOVTSOVA O, SØRENSEN C M, et al. Multi-scale laser speckle contrast imaging of microcirculatory vasoreactivity [J]. *Biomed Opt Express*, 2022, 13(4): 2312-2322.

[12] 翟林君, 傅玉青, 杜永兆. 激光散斑衬比血流成像关键技术及应用研究进展 [J]. *中国激光*, 2023, 50(9): 52-79.

ZHAI L J, FU Y Q, DU Y Z. Advances in laser speckle contrast imaging: key techniques and applications [J]. *Chin J Lasers*, 2023, 50(9): 52-79.

[13] OMARJEE L, SIGNOLET I, HUMEAU-HEUTIER A, et al. Optimisation of movement detection and artifact removal during laser speckle contrast imaging [J]. *Microvasc Res*, 2015, 97: 75-80.

[14] DAVIS M A, GAGNON L, BOAS D A, et al. Sensitivity of laser speckle contrast imaging to flow perturbations in the cortex [J]. *Biomed Opt Express*, 2016, 7(3): 759-775.

[15] PARTHASARATHY A B, KAZMI S M, DUNN A K. Quantitative imaging of ischemic stroke through thinned skull in mice with Multi Exposure Speckle Imaging [J]. *Biomed Opt Express*, 2010, 1(1): 246-259.

[16] BIOSE I J, DEWAR D, MACRAE I M, et al. Impact of stroke co-morbidities on cortical collateral flow following ischaemic stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2020, 40(5): 978

- 990.
- [17] 王丽晔, 陈志刚, 罗玉敏. 动物慢性脑缺血模型的研究现状 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(4): 67-73.
WANG L Y, CHEN Z G, LUO Y M. Current research status on animal models of chronic cerebral ischemia [J]. Chin J Comp Med, 2014, 24(4): 67-73.
- [18] WASHIDA K, HATTORI Y, IHARA M. Animal models of chronic cerebral hypoperfusion: from mouse to primate [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(24): 6176.
- [19] LIU Q, BHUIYAN M I H, LIU R, et al. Attenuating vascular stenosis-induced astrogliosis preserves white matter integrity and cognitive function [J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 187.
- [20] 张嘉泳. 基于 Neurogranin 调控海马突触可塑性探讨游泳运动改善慢性低灌注脑缺血致空间记忆障碍的机制 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2020.
ZHANG J Y. The mechanism of swimming improving spatial memory after with chronic hypoperfusion cerebral ischemia based on Neurogranin regulation of hippocampal synaptic plasticity. [D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [21] 郭小肃. 垂体腺苷酸环化酶激活多肽对慢性低灌注引起的认知障碍的保护作用 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2021.
GUO X S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects against cognitive impairment caused by chronic cerebral hypoperfusion. [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2021.
- [22] ZHANG Z, GUO Z, TU Z, et al. Cortex-specific transcriptome profiling reveals upregulation of interferon-regulated genes after deeper cerebral hypoperfusion in mice [J]. Front Physiol, 2023, 14: 1056354.
- [23] LIN H, ZHANG J, DAI Y, et al. Neurogranin as an important regulator in swimming training to improve the spatial memory dysfunction of mice with chronic cerebral hypoperfusion [J]. J Sport Health Sci, 2023, 12(1): 116-129.
- [24] ZOU W, SONG Y, LI Y, et al. The role of autophagy in the correlation between neuron damage and cognitive impairment in rat chronic cerebral hypoperfusion [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(1): 776-791.
- [25] GANNON O J, NAIK J S, RICCIO D, et al. Menopause causes metabolic and cognitive impairments in a chronic cerebral hypoperfusion model of vascular contributions to cognitive impairment and dementia [J]. Biol Sex Differ, 2023, 14(1): 34.
- [26] 闵喆, 李昌盛, 方瑜, 等. 激光散斑成像技术在大鼠大脑中动脉栓塞模型侧枝循环观测中的应用 [J]. 神经损伤与功能重建, 2014, 9(3): 191-194.
MIN Z, LI C S, FANG Y, et al. Laser speckle contrast imaging of collateral blood flow during cerebral infarction in rats [J]. Neural Inj Funct Reconstr, 2014, 9(3): 191-194.
- [27] CHI O Z, HUNTER C, LIU X, et al. The effects of isoflurane pretreatment on cerebral blood flow, capillary permeability, and oxygen consumption in focal cerebral ischemia in rats [J]. Anesth Analg, 2010, 110(5): 1412-1418.
- [28] STACKHOUSE T L, MISHRA A. Neurovascular coupling in development and disease: focus on astrocytes [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 702832.
- [29] TARANTINI S, VALCARCEL-ARES N M, YABLUCHANSKIY A, et al. Treatment with the mitochondrial-targeted antioxidant peptide SS-31 rescues neurovascular coupling responses and cerebrovascular endothelial function and improves cognition in aged mice [J]. Aging Cell, 2018, 17(2): e12731.
- [30] TARANTINI S, YABLUCHANSKIY A, CSIPO T, et al. Treatment with the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor PJ-34 improves cerebrovascular endothelial function, neurovascular coupling responses and cognitive performance in aged mice, supporting the NAD⁺ depletion hypothesis of neurovascular aging [J]. Geroscience, 2019, 41(5): 533-542.
- [31] OWENS C D, MUKLI P, CSIPO T, et al. Microvascular dysfunction and neurovascular uncoupling are exacerbated in peripheral artery disease, increasing the risk of cognitive decline in older adults [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2022, 322(6): H924-H935.
- [32] CSISZAR A, YABLUCHANSKIY A, UNGVARI A, et al. Overexpression of catalase targeted to mitochondria improves neurovascular coupling responses in aged mice [J]. Geroscience, 2019, 41(5): 609-617.
- [33] YABLUCHANSKIY A, TARANTINI S, BALASUBRAMANIAN P, et al. Pharmacological or genetic depletion of senescent astrocytes prevents whole brain irradiation-induced impairment of neurovascular coupling responses protecting cognitive function in mice [J]. Geroscience, 2020, 42(2): 409-428.
- [34] TARANTINI S, BALASUBRAMANIAN P, DELFAVERO J, et al. Treatment with the BCL-2/BCL-xL inhibitor senolytic drug ABT263/Navitoclax improves functional hyperemia in aged mice [J]. Geroscience, 2021, 43(5): 2427-2440.
- [35] TARANTINI S, NYÜL-TÓTH Á, YABLUCHANSKIY A, et al. Endothelial deficiency of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) impairs neurovascular coupling responses in mice, mimicking aspects of the brain aging phenotype [J]. Geroscience, 2021, 43(5): 2387-2394.
- [36] SEKER F B, FAN Z, GESIERICH B, et al. Neurovascular reactivity in the aging mouse brain assessed by laser speckle contrast imaging and 2-photon microscopy: quantification by an investigator-independent analysis tool [J]. Front Neurol, 2021, 12: 745770.
- [37] KAZMI S M, RICHARDS L M, SCHRANDT C J, et al. Expanding applications, accuracy, and interpretation of laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2015, 35(7): 1076-1084.
- [38] WEI B, WANG Z, WU S, et al. Improving collateral circulation: a potential adjunctive strategy to prevent or slow the progression of vascular dementia [J]. Neuropsychiatr Dis Treat,

2021, 17: 3061–3067.

[39] HUNG SH, KRAMER S, WERDEN E, et al. Pre-stroke physical activity and cerebral collateral circulation in ischemic stroke: a potential therapeutic relationship? [J]. Front Neurol, 2022, 13: 804187.

[40] SEILER A, BRANDHOFE A, GRACIEN R M, et al. DSC perfusion-based collateral imaging and quantitative T2 mapping to assess regional recruitment of leptomeningeal collaterals and microstructural cortical tissue damage in unilateral steno-occlusive vasculopathy [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2021, 41(1): 67–81.

[41] 杨国源, 金坤林, 张志君. 实验卒中模型方法学 [M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2019.

YANG G Y, GIN K L, ZHANG Z J. Methodology of experimental stroke model [M]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University Press, 2019.

[42] MA J, MA Y, SHUAIB A, et al. Improved collateral flow and reduced damage after remote ischemic preconditioning during distal middle cerebral artery occlusion in aged rats [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 12392.

[43] ARMITAGE G A, TODD K G, SHUAIB A, et al. Laser speckle contrast imaging of collateral blood flow during acute ischemic stroke [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(8): 1432–1436.

[44] LUO C, LIANG F, REN H, et al. Collateral blood flow in different cerebrovascular hierarchy provides endogenous protection in cerebral ischemia [J]. Brain Pathol, 2017, 27(6): 809–821.

[45] DUFOUR S, ATCHIA Y, GAD R, et al. Evaluation of laser speckle contrast imaging as an intrinsic method to monitor blood brain barrier integrity [J]. Biomed Opt Express, 2013, 4(10): 1856–1875.

[收稿日期]2023-06-28

编者·读者·作者

《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》2023 年版(即第 10 版)动物学/人类学类的核心期刊!

《中文核心期刊要目总览》采用定量评价和定性评的学术水平和学术影响进行综合评价,受到学术界的广泛认同。

目前,本刊为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。

感谢编委、专家们的帮助与支持,感谢广大作者和读者朋友们的厚爱与信任。本刊编辑部将始终坚守办刊宗旨,不忘初心,严谨办刊,开拓进取,不断创新,向世界一流期刊看齐。



刘娟,李彦杰,秦合伟,等. 环状 RNA 在帕金森病中作用机制研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 161-166.
Liu J, Li YJ, Qin HW, et al. Advances in the mechanism-of-action of circRNA in Parkinson's disease [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 161-166.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.020

环状 RNA 在帕金森病中作用机制研究进展

刘娟¹, 李彦杰^{1,2*}, 秦合伟^{1,2}, 马璐瑶¹, 赵楠楠¹, 徐振华¹

(1.河南中医药大学康复医学院,郑州 450046;2.河南省中医院康复科,郑州 450046)

【摘要】 帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种以黑质中多巴胺能神经元退行性死亡为特征的神经退行性疾病,表现出一系列运动症状和非运动症状,对患者的生存质量产生严重影响。circRNA 是一种共价闭环非编码 RNA,在 PD 病程进展中发挥重要作用。本文就 circRNA 参与氧化应激、调节转录水平、神经炎症、自噬和 α -synuclein 方面进行综述。

【关键词】 帕金森病;circRNA;氧化应激;神经炎症;生物标志物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0161-06

Advances in the mechanism-of-action of circRNA in Parkinson's disease

LIU Juan¹, LI Yanjie^{1,2*}, QIN Hewei^{1,2}, MA Luyao¹, ZHAO Nannan¹, XU Zhenhua¹

(1. Faculty of Rehabilitation Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.

2. Department of Rehabilitation, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

【Abstract】 PD is a neurodegenerative disease characterized by degenerative death of dopaminergic neurons in the substantia nigra, exhibiting a range of motor and non-motor symptoms with serious effects on quality of life. circRNA is a covalently closed-loop non-coding RNA that plays a major role in PD progression. This article reviews the involvement of circRNA in oxidative stress, regulation of transcription, neuroinflammation, autophagy, and α -synuclein.

【Keywords】 Parkinson's disease; circRNA; oxidative stress; neuroinflammation; biomarkers

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

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见而复杂的神经系统疾病,其发病率随着年龄的增长而增加,每年的发病率为每 10 万人中约 15 例^[1]。帕金森病典型的运动症状包括静止性震颤、运动迟缓、僵硬和姿势不稳^[2]。主要的病理特征为黑质致密部多巴胺能神经元的缺失,导致基底节区多巴胺水平下降和含有纤维 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)的路易体形成^[3]。神经元的退行性病变引起运动皮质区和基底神经节的神经元回路异常,从而

导致运动功能异常,影响个体的生活质量^[4]。目前,PD 的主要治疗方法是抗帕金森药物,如左旋多巴能减轻症状、延缓病情,但无法根治。运动训练作为一种辅助和补充治疗,可以提高皮层纹状体的可塑性,增加多巴胺的释放。大多数 PD 的病因、病机、作用机理和有效的治疗靶点尚不明确,因此需探索更加灵敏可靠的早期筛查与诊断的生物标志物和有效治疗靶点,为 PD 的诊断和治疗提供有价值的资源。研究发现环状 RNA(circRNA)可以通过

【基金项目】 河南省中医药拔尖人才培养项目(豫中医科教[2018]35 号);中原英才计划中原青年拔尖人才项目(豫科[2021]1 号);河南省高等学校重点科研项目(19A360024)。

【作者简介】 刘娟(1999—),女,硕士研究生,研究方向:神经系统疾病引起功能障碍的康复。E-mail:1319651329@qq.com

【通信作者】 李彦杰(1969—),女,教授,硕士生导师,研究方向:神经系统疾病引起功能障碍的康复。E-mail:yanjieli2008@qq.com

参与氧化应激、神经炎症、自噬等调节 PD, 且 circRNA 有作为 PD 生物标志物的潜力^[5-7]。故本文从 circRNA 参与氧化应激、调节转录水平、神经炎症、自噬等方面进行综述。

circRNA 是一类特殊的非编码 RNA, 是由 mRNA 反向剪接形成的共价闭合 RNA 分子, 具有独特的结构特征, 缺乏 5' 帽和 3' 尾^[8]。circRNA 是真核生物中共价封闭的内源性生物分子, 具有组织特异性和细胞特异性的表达模式, 其生物生成受特定的顺式作用元件和反式作用因子调控^[9]。circRNA 在真核生物中含量很高, 其中许多在进化上是保守的^[10]。最近的研究发现, circRNA 可以作为 miRNA 海绵, 抑制 miRNA 功能, 并参与靶基因的剪接, 可通过吸附 RNA 结合蛋白和 microRNAs 影响转录、mRNA 转换和翻译等过程, 从而调控基因表达, 具有重要的生物学功能和应用前景^[11-12]。近年来, circRNA 是非编码 RNA 领域的研究热点。与线性 RNA 相比, circRNA 对 RNA 外切酶的抗性更强, 在细胞中异常稳定^[13-14], 本文将总结研究 circRNA 及其在帕金森病中的作用以及作为生物标志物和治疗靶点的潜力, 以提供有关 circRNA 在帕金森病中作用的新见解。

1 circRNA 与 PD

circRNA 是一种具有封闭结构的组织特异性非编码 RNA, 随着大脑年龄的增长而积累, 并且越来越多的研究发现其可以调节神经元及神经胶质发育和功能的各个方面^[15]。最近已证明 circRNA 参与 PD 的致病过程, 这些 RNA 分子可以上调或下调 α -syn 的表达^[16]。circRNA 在帕金森病患者的大脑中有不同的表达, 越来越多的证据表明它们介导着帕金森病的发病机制。以下本文就 circRNA 参与氧化应激、调节转录水平、神经炎症、自噬、 α -突触核蛋白等方面进行综述(图 1)。

1.1 circRNA 参与氧化应激

氧化应激(oxidative stress, OS)是由活性氧的产生和细胞抗氧化能力失衡所导致的一种病理现象, 与机体的各种疾病密切相关^[17]。氧化应激是 PD 发病的重要因素, 在 PD 发病过程中, 氧活性物质的产生通过脂质过氧化、蛋白质氧化和 DNA 氧化破坏黑质(substantia nigra, SN)^[18]。在散发性和家族性 PD 中都观察到 SN 的氧化应激水平升高, PD 的发展过程中有许多与氧化应激相关的分子途径参与,

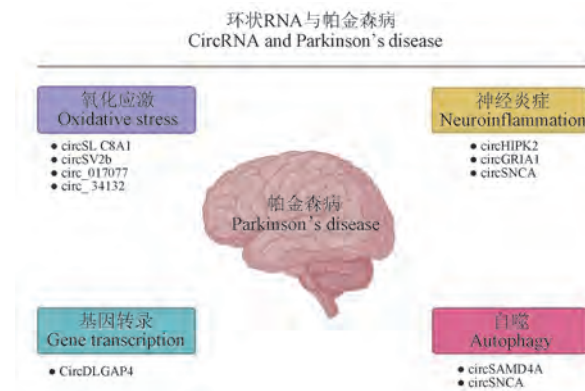


图 1 环状 RNA 调节帕金森病机制

Figure 1 CircRNA regulates Parkinson's disease mechanisms

主要有铁水平增加、谷胱甘肽水平下降、线粒体复合物 I 功能受损和 26S 蛋白酶体活性降低 4 种现象^[19]。研究发现, circRNA 与帕金森病的氧化应激有关, 在家族性和散发性 PD 中, 氧化应激在导致多巴胺细胞退化的级联反应中起着至关重要的作用^[20]。有研究表明 circSLC8A1 在氧化应激的产生中发挥作用, 暴露于百草枯诱导的氧化应激下的 SH-SY 细胞表现出 circSLC8A1 表达增加^[21]。然而用神经保护抗氧化剂改性剂辛伐他汀处理的细胞, 其特征是 circSLC8A1 的表达降低^[22]。氧化本身可能导致神经元中 circSLC8A1 环化的增加或 circRNA 降解的减少。因此, 我们可以推测 circSLC8A1 是帕金森病的重要分子^[5]。另一项研究, 在甲基-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 小鼠模型中, circSV2b 在黑质致密部(substantia nigra pars compacta, SNpc)、短串联重复序列(short tandem repeat, STR)和血清外泌体中的表达显著降低, 此外, circSV2b 过表达可以防止多巴胺能神经元的丢失, 维持黑质纹状体功能, 减轻氧化应激损伤^[23]。Nrf2 是一种调节细胞氧化还原状态的转录因子, Yang 等^[24]对 Nrf2 敲除小鼠和野生型小鼠的 SN 和纹状体进行芯片分析, 分别发现 65 和 150 个差异表达 circRNA。根据 circRNA-miRNA-mRNA 相互作用网络分析显示, circ-34132(来源于 D430041D05Rik 基因)、circ-017077(来源于 MAX 基因相关蛋白基因)和 circ-015216(来源于 YES 原癌基因)可能参与 Nrf2 介导的抗氧化应激神经保护。

1.2 circRNA 调控基因转录水平

在真核生物基因表达调控中, 转录调控属于一个非常重要的环节, 真核细胞 RNA 聚合酶本身对启

动子缺乏特异的亲和力,不能独立进行转录,因此转录过程中,需要一个由众多转录因子和辅助转录因子组成的复杂转录机制参与。circRNA 在细胞核和细胞质中以多种水平调控基因表达,他们诱导转录和选择性剪接,中和 miRNAs 和 RNA 结合蛋白(RNA binding protein, RBP),充当信号支架,并能成功被翻译成蛋白。circRNA、长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA) 和 microRNA(miRNA) 作为竞争内源性 RNA(competing endogenous RNA, ceRNA) 相互作用^[25], 这有助于我们进一步探讨其参与转录调控网络的机制。一项研究结果表明, circDLGAP4 在 MPTP 诱导的 PD 小鼠模型和活性代谢物 1-甲基-4-苯基吡啶(1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP+) PD 细胞模型中表达降低, 参与 PD 的病理生理^[5], cAMP-响应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB) 是 miR-134-5p 的靶标, 是神经元中的促生存转录因子, 可被 Ser133 位点磷酸化激活^[26]。激活的 CREB 一般通过转录来激活下游的靶基因, 如 Bcl2 凋亡调节因子^[27]、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 以及过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1- α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 α , PGC-1 α)^[28]。因此, circDLGAP4 可能通过调控 miR-134-5p/CREB 通路参与 PD 的发病机制^[6]。

1.3 circRNA 参与神经炎症

神经炎症是一种可以保护神经元免受伤害和弥补神经元损害的基本免疫反应, 神经炎症反应受到免疫细胞如小胶质细胞、星形胶质细胞和外周免疫细胞以及细胞因子和趋化因子的调控。PD 病理生理学的标志之一是慢性炎症。在 PD 患者的受影响区域发现 T 淋巴细胞、活化的小胶质细胞和星形胶质细胞, 同时促炎介质的表达增加^[29]。circRNA 是参与神经细胞行为和神经系统发育的一种 ncRNAs^[30]。敲除 circHIPK2 可增强中枢神经系统向神经元分化, 促进神经元可塑性^[31]。Xu 等^[32] 证明 circGRIA1 缺失有助于突触发生和突触可塑性的改善。尚未在帕金森病的确切背景下, 在皮质撞击控制性引起的创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI) 的动物模型中证实一些 circRNA 已涉及神经炎症, 发现 circ-010705 表达上调, 而其靶蛋白 miR-27a-3p 下调, 因此, 在体内, circLrp1b 或 miR-27a-3p 过表达的下调抑制了 TBI 诱导的自噬和炎症^[33]。

circSNCA 作为 miR-7 的 ceRNA 在 PD 中上调 SNCA^[34], 综上所述, circRNA 对于小胶质细胞和星形胶质细胞的激活是不可或缺的, 即将进行的研究将确定这些 circRNA 是否对 PD 的发病机制有显著影响。

1.4 circRNA 参与自噬

自噬是指细胞有选择性或无选择性地清除受损的蛋白质及细胞器^[35]。自噬是机体内最重要的分解代谢机制, 作为一种可将错误折叠的蛋白质和损伤的细胞器转运至溶酶体进行降解的关键方式^[36], 主要途径包括巨自噬、伴侣介导的自噬和微自噬。越来越多的研究表明, 自噬在 PD 的发病机制中发挥关键的作用, 在 PD 患者 SN 和外周血细胞中自噬相关蛋白的表达出现异常^[37], 此外, 在多种 PD 动物模型中也可以检测到异常的自噬, 包括毒素诱导的 PD 动物模型、 α -syn 转基因细胞、小鼠、果蝇等^[38]。circRNA 被报道通过影响关键自噬蛋白的表达或影响调节自噬的信号通路的抑制或激活, 在自噬调控中发挥关键作用^[39]。研究报告了 PD 患者大脑中 circRNA 的表达发生变化, 越来越多的证据强调他们在 PD 发展中可能的致病作用^[5-6]。在一项研究中, Sang 等^[34] 发现抑制 circSNCA 和 SNCA 可以减少细胞凋亡, 促进自噬, 从而减缓 PD 的进展。circRNA 在疾病进展中的关键机制之一是通过其与疾病相关的 miRNA 相互作用来影响疾病进程^[40]。在 PD 中, circRNA 的 zip2 敲除通过海绵 miR-60 导致 SNCA 蛋白聚集减少, 从而使 PD 患者的生存结果更好^[7]。Huang 等^[41] 发现抑制 circHIPK2 的表达, 通过靶向 MIR124-2HG 和 SIGMAR 调节自噬和内质网应激, 能够显著减轻星形胶质细胞的活化。Wang 等^[42] 发现 circSAMD4A 在 MPP+处理的 SH-SY5Y 细胞中显著过表达, 这是 circSAMD4A 在 PD 发病机制中可能发挥作用的一个指标。Zhang 等^[43] 发现 miR-29c-3p 靶向并抑制 circSAMD4A 的表达, 通过调节 AMPK/mTOR 级联参与多巴胺能神经元的凋亡和自噬。上述数据强调自噬相关 circRNA 作为帕金森病潜在治疗靶点的重要性。关于 circRNA 在 PD 过程中如何调节自噬的研究仍然很少, 需要更多的发现。

1.5 α -突触核蛋白异常聚集

α -突触核蛋白(α -syn) 是一种广泛分布于神经元中的蛋白质, 主要集中在突触前神经末梢, 当 α -syn 被错误折叠时, 他会形成特殊的聚合体, 称为

Lewy 体。这些聚集物的存在被认为是 PD 大脑的一个组织病理学标志。越来越多的研究表明, α -syn 在 PD 的发生和发展中都起着关键作用。Devi 等^[44]在一项人类大脑线粒体 α -syn 的研究中发现, PD 患者的 SN 和纹状体中 α -syn 大量积累。 α -syn 过表达导致 PD 患者的进行性运动功能障碍。Sang 等^[34]发现, 通过抑制 circSNCA, 可以下调 α -syn 表达水平, 从而改善 PD 患者运动功能。circSNCA 可以增加 α -syn 的表达, 导致 SH-SY5Y 细胞系的自噬通量受到抑制, 并通过海绵化 miR-7 诱导细胞凋亡。Kumar 等^[7]发现在 PD 的转基因秀丽隐杆线虫 NL5901 模型中 circip2 的表达显著下调, 在检测到的 11 个分子中, miR-60-3p 是唯一一个确认有 mRNA 靶标的 miRNA, 结果表明 circip-2、miR60-3p 和 α -syn 之间可能存在联系。进一步的分析显示, circip-2 可能作为 miR-60-3p 的海绵, 抑制 FOXO 通路的 mRNA, 进而对 PD 和衰老的发展具有保护作用。circ-Pank1 是源于 Pank1 基因的 circRNA, 在鱼藤酮处理的 PD 模型小鼠的 SN 和多巴胺能神经元的 MN9D 细胞模型中均有高表达。Liu 等^[45]发现, circ-Pank1 是一个有效的 miR-7a-5p 海绵, miR-7a-5p 靶向 α -syn 表达, 敲除 circ-Pank1 可以降低 α -syn 蛋白和 α -syn mRNA 的表达水平, 研究表明 circ-Pank1 通过靶向调控 miR-7a-5p/ α -syn 轴调控多巴胺能神经元损伤。

2 circRNA 可作为 PD 的生物标志物

PD 是一种复杂的综合征, 具有不同的临床亚型和广泛的病程变异性, 对其临床、遗传、生化及影像学的生物标志物要求各不相同。目前 PD 的诊断是基于临床标准和神经影像学, 并使用与运动和非运动体征相关的评分量表进行监测, 但评分量表通常是主观的, 神经成像技术提供了疾病进展的可量化措施, 但在实用性和成本方面受到限制^[46-47]。最近的研究发现, circRNA 与各种神经系统疾病相关^[48]。circRNA 是一种很有前景的生物标志物, 因其在大脑中高度稳定和丰富多样, 而且能显示细胞与组织的特异性表达; 与蛋白质不同的是, 它们是未经过处理的, 其表达水平与活性有直接关系。但值得注意的是, 这一领域的研究还处于起步阶段, CiRS-7 是第一个被报道为 PD 诊断的潜在生物标志物的 circRNA。到目前为止, 已有研究表明, 在 PD 患者的外周血中发现差异表达 circRNA。Ravanidis

等^[49]使用来自特发性 PD 患者和健康对照的 60 对外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)进行 RT-qPCR 分析, 在最终检测的 48 个 circRNA 中, 有 6 个 circRNA 在 PD 患者中显著下调。Kong 等^[50]使用来自 PD 患者和对照组的 4 对总血进行 RNA-seq 分析, PD 患者中有 129 个上调的 circRNA 和 282 个下调的 circRNA。Zhong 等^[51]使用了来自 PD 患者(1 期~4-5 期)和对照组的 3 对血浆进行微阵列分析, PD 患者中有 6 种 circRNA 表达上调。目前, 可用的 PD 生物标志物不够敏感或不具备特异性。circRNA 在非侵入性生物体液中的稳定性、多样性、组织特异性和表达等特性标志着 circRNA 是一个潜在的、有前途的生物标志物, 可以用于 PD 的临床诊断和预后。

3 总结与展望

PD 是一种具有复杂发病机制的神经退行性疾病, circRNA 在 PD 的发生发展中起到关键的调控作用, 并可通过调控 PD 的发生发展, 进而影响与 PD 相关的多个进程, 如 α -syn 的表达、神经炎症、细胞凋亡和自噬。相对于编码 RNA, circRNA 的研究相对较少, 目前关于 circRNA 在 PD 中作用机制的研究多为体外研究, 对 circRNA 功能的研究仅限于其 miRNA 海绵效应和与 RBP 的结合。在此基础上, 通过基因测序技术的进步, 我们将会筛选出更多与 PD 相关的 circRNA, 并对其与涉及的编码 RNA 和蛋白质相互作用网络进行研究分析, 将有助于理解 PD 发病机制, 从而加深对 PD 发病机制的认识, 为 PD 的诊断、预防、治疗以及预后的评估等提供新的理论见解。

参考文献:

- [1] SIMON D K, TANNER C M, BRUNDIN P. Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology [J]. Clin Geriatr Med, 2020, 36(1): 1-12.
- [2] COSTA H N, ESTEVES A R, EMPADINHAS N, et al. Parkinson's disease: a multisystem disorder [J]. Neurosci Bull, 2023, 39(1): 113-124.
- [3] AHMAD M H, RIZVI M A, ALI M, et al. Neurobiology of depression in Parkinson's disease: insights into epidemiology, molecular mechanisms and treatment strategies [J]. Ageing Res Rev, 2023, 85: 101840.
- [4] SARAVANAMUTTU J, RADHU N, UDUPA K, et al. Impaired motor cortical facilitatory-inhibitory circuit interaction in Parkinson's disease [J]. Clin Neurophysiol, 2021, 132(10): 2685-2692.

- [5] FENG Z, ZHANG L, WANG S, et al. Circular RNA circDLGAP4 exerts neuroprotective effects via modulating miR-134-5p/CREB pathway in Parkinson's disease [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 522(2): 388-394.
- [6] XIAO Y, CHEN H, LIAO J, et al. The potential circular RNAs biomarker panel and regulatory networks of Parkinson's disease [J]. *Front Neurosci*, 2022, 16: 893713.
- [7] KUMAR L, SHAMSUZZAMA, JADIYA P, et al. Functional Characterization of Novel Circular RNA Molecule, circzip-2 and Its Synthesizing Gene zip-2 in *C. elegans* Model of Parkinson's Disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(8): 6914-6926.
- [8] SHI Y, JIA X, XU J. The new function of circRNA: translation [J]. *Clin Transl Oncol*, 2020, 22(12): 2162-2169.
- [9] YANG L, WILUSZ J E, CHEN L L. Biogenesis and regulatory roles of circular RNAs [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2022, 38: 263-289.
- [10] PATOP I L, WÜST S, KADENER S. Past, present, and future of circRNAs [J]. *EMBO J*, 2019, 38(16): e100836.
- [11] HUANG A, ZHENG H, WU Z, et al. Circular RNA-protein interactions: functions, mechanisms, and identification [J]. *Theranostics*, 2020, 10(8): 3503-3517.
- [12] ZANG J, LU D, XU A. The interaction of circRNAs and RNA binding proteins: an important part of circRNA maintenance and function [J]. *J Neurosci Res*, 2020, 98(1): 87-97.
- [13] MISIR S, WU N, YANG B B. Specific expression and functions of circular RNAs [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(3): 481-491.
- [14] HOQUE P, ROMERO B, AKINS R E, et al. Exploring the multifaceted biologically relevant roles of circRNAs: from regulation, translation to biomarkers [J]. *Cells*, 2023, 12(24): 2813.
- [15] DOXAKIS E. Insights into the multifaceted role of circular RNAs: implications for Parkinson's disease pathogenesis and diagnosis [J]. *NPJ Parkinsons Dis*, 2022, 8(1): 7.
- [16] DOROSTGOU Z, YADEGAR N, DOROSTGOU Z, et al. Novel insights into the role of circular RNAs in Parkinson disease: an emerging renaissance in the management of neurodegenerative diseases [J]. *J Neurosci Res*, 2022, 100(9): 1775-1790.
- [17] GÁMEZ-VALERO A, GUIADO-CORCOLL A, HERRERO-LORENZO M, et al. Non-coding RNAs as sensors of oxidative stress in neurodegenerative diseases [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(11): 1095.
- [18] PERCÁRIO S, DA SILVA BARBOSA A, VARELA E L P, et al. Oxidative stress in Parkinson's disease: potential benefits of antioxidant supplementation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 2360872.
- [19] CHAKRABARTI S, BISAGLIA M. Oxidative stress and neuroinflammation in Parkinson's disease: the role of dopamine oxidation products [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(4): 955.
- [20] LIAO J, ZHANG Q, HUANG J, et al. The emerging role of circular RNAs in Parkinson's disease [J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1137363.
- [21] HANAN M, SIMCHOVITZ A, YAYON N, et al. A Parkinson's disease CircRNAs Resource reveals a link between circSLC8A1 and oxidative stress [J]. *EMBO Mol Med*, 2020, 12(11): e13551.
- [22] YAN J, QIAO L, WU J, et al. Simvastatin protects dopaminergic neurons against MPP+-induced oxidative stress and regulates the endogenous anti-oxidant system through ERK [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(4): 1957-1968.
- [23] CHENG Q, WANG J, LI M, et al. CircSV2b participates in oxidative stress regulation through miR-5107-5p-Foxk1-Akt1 axis in Parkinson's disease [J]. *Redox Biol*, 2022, 56: 102430.
- [24] YANG J H, ZHANG R J, LIN J J, et al. The differentially expressed circular RNAs in the substantia nigra and corpus Striatum of Nrf2-knockout mice [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(3): 936-951.
- [25] YANG Y, WANG Y, WANG F, et al. The roles of miRNA, lncRNA and circRNA in the development of osteoporosis [J]. *Biol Res*, 2020, 53(1): 40.
- [26] XU X Y, HE X, ZHANG Z Y, et al. CREB inactivation by HDAC1/PP1 γ contributes to dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease [J]. *J Neurosci*, 2022, 42(22): 4594-4604.
- [27] YE D, SHI Y, XU Y, et al. PACAP attenuates optic nerve crush-induced retinal ganglion cell apoptosis via activation of the CREB-bcl-2 pathway [J]. *J Mol Neurosci*, 2019, 68(3): 475-484.
- [28] ZHAO Z, PU Y. Lixisenatide enhances mitochondrial biogenesis and function through regulating the CREB/PGC-1 α pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(4): 1120-1125.
- [29] LIU T W, CHEN C M, CHANG K H. Biomarker of neuroinflammation in Parkinson's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8): 4148.
- [30] CHEN M, LAI X, WANG X, et al. Long non-coding RNAs and circular RNAs: insights into microglia and astrocyte mediated neurological diseases [J]. *Front Mol Neurosci*, 2021, 14: 745066.
- [31] WANG G, HAN B, SHEN L, et al. Silencing of circular RNA HIPK2 in neural stem cells enhances functional recovery following ischaemic stroke [J]. *EBioMedicine*, 2020, 52: 102660.
- [32] XU K, ZHANG Y, XIONG W, et al. CircGRIA1 shows an age-related increase in male macaque brain and regulates synaptic plasticity and synaptogenesis [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3594.
- [33] LI H, LU C, YAO W, et al. Dexmedetomidine inhibits inflammatory response and autophagy through the circLrp1b/miR-27a-3p/Dram2 pathway in a rat model of traumatic brain injury [J]. *Aging*, 2020, 12(21): 21687-21705.
- [34] 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.

[35] LIZAMA B N, CHU C T. Neuronal autophagy and mitophagy in Parkinson ’ s disease [J]. Mol Aspects Med, 2021, 82: 100972.

[36] THEMISTOKLEOUS C, BAGNOLI E, PARULEKAR R, et al. Role of autophagy pathway in Parkinson ’ s disease and related genetic neurological disorders [J]. J Mol Biol, 2023, 435(12): 168144.

[37] ELDEEB M A, THOMAS R A, RAGHEB M A, et al. Mitochondrial quality control in health and in Parkinson ’ s disease [J]. Physiol Rev, 2022, 102(4): 1721–1755.

[38] LU J, WU M, YUE Z. Autophagy and Parkinson ’ s disease [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1207: 21–51.

[39] WANG Y, MO Y, PENG M, et al. The influence of circular RNAs on autophagy and disease progression [J]. Autophagy, 2022, 18(2): 240–253.

[40] ZHAO X, ZHONG Y, WANG X, et al. Advances in circular RNA and its applications [J]. Int J Med Sci, 2022, 19(6): 975–985.

[41] HUANG R, ZHANG Y, HAN B, et al. Circular RNA HIPK2 regulates astrocyte activation via cooperation of autophagy and ER stress by targeting MIR124-2HG [J]. Autophagy, 2017, 13(10): 1722–1741.

[42] WANG W, LV R, ZHANG J, et al. circSAMD4A participates in the apoptosis and autophagy of dopaminergic neurons via the miR-29c-3p-mediated AMPK/mTOR pathway in Parkinson ’ s disease [J]. Mol Med Rep, 2021, 24(1): 540.

[43] ZHANG H, YAO L, ZHENG Z, et al. The role of non-coding RNAs in the pathogenesis of Parkinson ’ s disease: recent advancement [J]. Pharmaceuticals, 2022, 15(7): 811.

[44] DEVI L, RAGHAVENDRAN V, PRABHU B M, et al. Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain [J]. J Biol Chem, 2008, 283(14): 9089–9100.

[45] LIU Q, LI Q, ZHANG R, et al. Circ-Pank1 promotes dopaminergic neuron neurodegeneration through modulating miR-7a-5p/α-syn pathway in Parkinson ’ s disease [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(5): 477.

[46] BHIDAYASIRI R, MARTINEZ-MARTIN P. Clinical assessments in Parkinson ’ s disease: scales and monitoring [J]. Int Rev Neurobiol, 2017, 132: 129–182.

[47] VIRAMETEEKUL S, REVESZ T, JAUNMUKTANE Z, et al. Clinical diagnostic accuracy of Parkinson ’ s disease: where do we stand? [J]. Mov Disord, 2023, 38(4): 558–566.

[48] MA Y, LIU Y, JIANG Z. CircRNAs: a new perspective of biomarkers in the nervous system [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 128: 110251.

[49] RAVANIDIS S, BOUGEA A, KARAMPATSI D, et al. Differentially expressed circular RNAs in peripheral blood mononuclear cells of patients with Parkinson ’ s disease [J]. Mov Disord, 2021, 36(5): 1170–1179.

[50] KONG F, LV Z, WANG L, et al. RNA-sequencing of peripheral blood circular RNAs in Parkinson disease [J]. Medicine, 2021, 100(23): e25888.

[51] ZHONG L, JU K, CHEN A, et al. Circulating CircRNAs panel acts as a biomarker for the early diagnosis and severity of Parkinson ’ s disease [J]. Front Aging Neurosci, 2021, 13: 684289.

[收稿日期] 2023–04–24

宁静华,张鑫,张钰哲. AMPK:多样性调控机制与疾病治疗新视角 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 167-178.
Ning JH, Zhang X, Zhang YZ. AMPK: Diverse regulatory mechanisms and new perspectives for disease treatment [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 167-178.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.021

AMPK:多样性调控机制与疾病治疗新视角

宁静华¹,张鑫¹,张钰哲^{1,2,3*}

(1.大理大学基础医学院,云南 大理 671000;2.云南抗病原药用植物筛选重点实验室,云南 大理 671000;
3.云南省昆虫生物医药重点实验室,云南 大理 671000)

【摘要】 单磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase,AMPK)是一种保守的细胞能量感受器,在调控细胞生长、增殖、分化、自噬、磷酸化、串扰以及葡萄糖和脂质代谢等方面起着重要作用,当机体能量匮乏或某些极端情况时 AMPK 被激活,而在营养过剩时被抑制,以维持能量平衡。此外,AMPK 信号通路介导铁死亡发生的调控机制也体现了其独特作用,AMPK 在不同细胞器里发挥特殊调控功能为疾病治疗提供了新的方向。这也是预防疾病的治疗靶标,如生殖系统疾病、衰老、癌症、炎症和心脏功能障碍等。该文综述了细胞能量不平衡对机体微环境造成的损害,AMPK 通过多样性信号调控机制激发了其在疾病和药物中的潜在治疗潜力,为不同系统疾病提供了治疗新思路。通过综述 AMPK 信号通路的多样性调节机制,为靶向 AMPK 的癌症治疗和其他疾病的治疗提供理论参考。

【关键词】 单磷酸腺苷激活的蛋白激酶;能量代谢;铁死亡;信号传导;治疗靶标

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0167-12

AMPK: Diverse regulatory mechanisms and new perspectives for disease treatment

NING Jinghua¹, ZHANG Xin¹, ZHANG Yuzhe^{1,2,3*}

(1. Basic Medicine Science College of Dali University, Dali 671000, China. 2. Yunnan Key Laboratory for Screening of Pathogen Resistant Medicinal Plants, Dali 671000. 3. Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical, Dali 671000)

【Abstract】 AMP-activated protein kinase (AMPK) is a conserved cellular energy receptor that plays an important role in regulating cell growth, proliferation, differentiation, autophagy, phosphorylation, crosstalk, and glucose and lipid metabolism. AMPK is activated during low-energy or other extreme conditions, and it is suppressed by an excess of nutrients to maintain the energy balance. Additionally, the regulatory mechanism of the AMPK signaling pathway mediating ferroptosis reflects its unique role. AMPK plays a specialized regulatory function in various organelles, which provides a new direction for disease therapy. It is also a therapeutic target to prevent diseases such as reproductive system diseases, aging, cancer, inflammation and cardiac dysfunction. This article reviews cellular energy imbalance. AMPK stimulates its potential therapeutic potential in diseases and drugs through diverse signal regulatory mechanisms. It provides a new

【基金项目】 云南省地方高校联合专项面上项目(202001BA070001-064,202101BA070001-102);云南省教育厅科学研究基金项目(2023Y0950,2022Y80);云南省滇西抗病原植物资源筛选研究重点实验室开放项目(APKL2101);大理大学博士科研启动基金项目(KYBS2018012)。

【作者简介】 宁静华(2001—),女,硕士研究生,研究方向:病理学与病理生理学。E-mail:15334447389@163.com

【通信作者】 张钰哲(1980—),男,副教授,硕士生导师,研究方向:癌症表观遗传学。E-mail:lzuyz1568@hotmail.com

treatment for different system diseases. This review summarizes the diverse regulatory mechanisms of the AMPK signaling pathway and provides a theoretical reference for cancer therapy and other disease therapies targeting AMPK.

【Keywords】 AMP-activated protein kinase; energy metabolism; ferroptosis; signal transduction; therapeutic targets
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

代谢是生物体生长繁殖、保持结构、对外界环境做出反应以及维持生命活动的有序化学反应的总称。单磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是一个在进化上保守、广泛表达的一类丝氨酸-苏氨酸激酶,这是一个感知细胞内低 ATP 浓度水平的复杂系统,当机体处于低能量水平时,由 AMP/ATP 和 ADP/ATP 比率的增加发出信号,AMPK 通过促进产生 ATP 的分解代谢途径同时抑制能量消耗过程来恢复能量稳态^[1]。AMPK 参与了细胞增殖、线粒体生物合成、自噬、与铁死亡共同调控疾病以及在细胞器等中发挥新光彩,还参与了能量和氧化还原平衡等过程。此外,由炎症、缺氧和衰老引起的肿瘤微环境的改变也与 AMPK 密切相关,且其发挥的作用机理是双面性的,这也为癌症提供了可能的治疗新靶标。AMPK 参与了多种多样的调控机制,在不同的信号机制和通路中发挥了独特作用^[2]。因此,深入认识 AMPK 的激活状态及调节途径对某些疾病和癌症的治疗至关重要。该文梳理了 AMPK 在多种疾病发生发展中的功能机制,尤其是在能量代谢调节和癌症调控中的作用,这对未来从基于 AMPK 的相关疾病中挖掘出其作为疾病诊断的生物标记物或者治疗靶标提供参考。

1 AMPK 的复合体结构、功能与机制

1.1 AMPK 的异构体

AMPK 几乎存在于所有真核细胞中,它是含有

催化亚基 α 和调节亚基 β 、 γ 的异源三聚体蛋白, α 亚基有 2 种异构体,分别为 $\alpha 1$ (PRKAA1) 和 $\alpha 2$ (PRKAA2); β 亚基也有 2 种异构体分别为 $\beta 1$ (PRKAB1) 和 $\beta 2$ (PRKAB2); γ 亚基有 3 种异构体为 $\gamma 1$ (PRKAG1)、 $\gamma 2$ (PRKAG2) 和 $\gamma 3$ (PRKAG3)。 α 、 β 和 γ 亚单位可组合多达 12 种亚型^[3](图 1)。AMPK 在组织分布、调节和功能方面有所差异。AMPK $\alpha 1$ 、AMPK $\beta 1$ 和 AMPK $\gamma 1$ 广泛表达,而其他异构体表达有限。AMPK $\alpha 2$ 在心肌、骨骼肌中表达量高,在肝亦有表达,但在其他组织中表达较低;AMPK $\beta 2$ 在骨骼肌和心肌中是主导的 β 亚单位,在其他组织中表达较少;AMPK $\gamma 2$ 和 AMPK $\gamma 3$ 的表达似乎仅限于骨骼和心脏组织^[4]。

1.2 AMPK 的功能与机制

1.2.1 AMPK 的磷酸化、泛素化及串扰

磷酸化在生命活动中调控着许多细胞功能,当磷酸化途径改变时会导致疾病的发生^[5]。AMPK 的磷酸化在维持能量平衡上发挥极大作用,AMPK 在 Thr-172 位点处被磷酸化会使得其活性得到极大提高,这也使其在多种细胞功能中发挥重要调控作用^[6]。转录因子 E3 (transcription factor E3, TFEB) 和与 IGHM 增强子 3 结合的转录因子(transcription factor binding to IGHM enhancer 3, TFE3) 是自噬和溶酶体活性的重要转录调节因子,其中 TFEB 的丝氨酸簇中依赖 AMPK 的磷酸化位点对转录活性是必需的,AMPK 磷酸化是增强 TFEB 和 TFE3 转录活

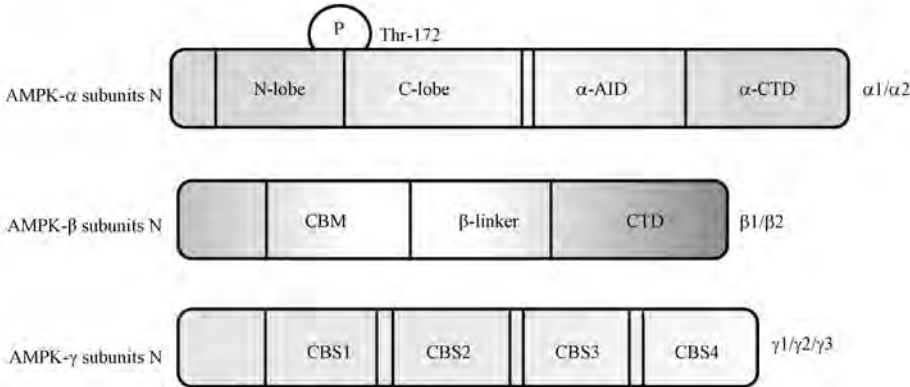


图 1 AMPK 结构示意图
Figure 1 Schematic diagram of the structure of AMPK

性的必要条件^[7]。核因子- κ B 激酶亚基 β (inhibitor of nuclear factor κ B kinase subunit β , IKK β) 是磷酸化 AMPK 的上游激酶, IKK β 通过竞争性磷酸化 AMPK 和 I κ B 介导炎症中的稳态功能^[8]。

溶酶体损伤激活了 AMPK, 能引起强烈的泛素化反应^[9]。AMPK 促进受损溶酶体中 K63 和 TAK1 的泛素化, 从而触发自噬^[10]。Cereblon (CRBN) 是 Cullin 环 E3 泛素连接酶的底物受体, CRBN 通过 AMPK γ 的泛素依赖性蛋白酶降解来调节 AMPK^[11]。高糖可通过 MG53 (也称 TRIM72) E3-泛素-连接酶介导的 AMPK α 降解和失活抑制 AMPK 信号转导^[12]。

肠道是吸收、代谢营养物质的重要器官, 肠道 AMPK α 1 与棕色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT) 相互影响能增强产热, 肠道 AMPK α 1 激活与调节肠道微生物群和代谢物调节 BAT 产热之间存在联系^[13]。研究发现若对仔猪使用谷氨酰胺 (Gln) 调节 AMPK 激活和线粒体功能之间的串扰, 能减少肠道内的炎症反应^[14]。泛素化和磷酸化是常见的蛋白质修饰, 磷酸化是调节和控制蛋白质功能的基本机制, 泛素化也参与了多种生理过程, 能通过级联反应放大信号, 相继或同时发生改善蛋白质的生物学功能, 在细胞信号传导过程中起着重要作用。大多数抗癌药物通过改变蛋白质翻译后修饰来调节细胞通路的活动^[15]。AMPK 在肿瘤发生、发展中扮演重要角色, 因此, 研究 AMPK 的信号转导过程是很有意义的。

1.2.2 AMPK 参与细胞自噬和增殖

自噬是一种在细胞内以蛋白质、细胞器、生物大分子等为主要物质进行降解的一种分解代谢途径, 通过自我降解过程被引导到溶酶体, 以维持细胞环境的平衡。AMPK 对调节自噬有重要作用, 营养缺乏下诱导自噬, 加上自噬活动出现的积极意义, 表明自噬对 AMPK 激活的一些积极作用有利于未来进一步的研究 AMPK 的潜在机制^[16]。例如, AMPK 是内皮细胞血管内皮生长因子 (VEGF) 的有效调节剂, 并且可以被 VEGF 激活, 自噬诱导通过 VEGF/AMPK 途径可能有助于血管生成^[17]。研究表明三氧化二砷 (arsenic trioxide, ATO) 促进 ROS 诱导, 导致 TFEB 的核转位并抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路, 这些作用促进巨噬细胞自噬, 降低了早期动脉粥样硬化病变程度, 也将为临床治疗提供新思路^[18]。细胞自噬和凋亡都是生命基本现象, 保证了

新、旧细胞器的更迭, 深入研究和了解后能提供新的疾病治疗切入点。

2 AMPK 与铁死亡

铁是一种重要的生命元素。人体中的铁含量是被严格控制的, 过高或过低的铁含量都会导致很多临床症状^[19]。铁死亡是指由脂质过氧化作用介导的铁依赖性、特化和调节性坏死, 与包括癌症在内的多种疾病密切相关^[20]。铁死亡是需要能量的非凋亡性细胞死亡过程, 能量应激介导 AMPK 的激活可抑制铁死亡。从机制上讲, AMPK 通过乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC) 和多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFA) 生物合成来调节铁死亡^[21]。AMPK 与铁死亡之间的交互调控在疾病治疗中逐渐引起关注。有研究表明肾小管损伤在糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD) 的发病机制中起着关键作用, 与糖尿病小鼠 DKD 相关的主要病理过程之一是铁死亡, empagliflozin 可通过促进 AMPK 介导的抗氧化转录因子 NFE2 相关因子 2 (antioxidant transcription factor NFE2-related factor 2, NRF2) 激活途径来预防铁死亡的发展治疗肾损伤, 为 DKD 可能的新治疗方法提供重要见解^[22]。此外, 铁死亡与神经退行性疾病和糖尿病相关的器官损伤有关, 用 2 型糖尿病小鼠模型研究发现 AMPK 激活可以减少海马体铁死亡, 从而改善糖尿病小鼠的认知能力^[23]。对于 2 型糖尿病性骨质疏松症 (type 2 diabetic osteoporosis, T2DOP), 维生素 K2 可以通过激活 AMPK/SIRT1 信号通路抑制铁死亡来改善 T2DOP^[24]。还有研究发现, 当诱导铁中毒后, AMPK 被上游激酶 LKB1 激活, LKB1-AMPK 轴通过抑制脂肪酸合成负向调节铁死亡, 以铁蛋白酶为诱饵的肿瘤治疗, 有机会克服肿瘤对现有药物的耐药性^[25]。AMPK 与铁死亡在癌症中的调控作用也不容忽视。乳酸摄取可以促进肝癌细胞中 ATP 的产生并使 AMPK 失活, 以增强抗铁死亡单不饱和脂肪酸的产生, 富含乳酸的肝癌细胞对常见的铁死亡诱导剂介导的铁死亡损伤表现出更强的抵抗力, 突出了其作为基于铁死亡的肿瘤治疗靶点的转化潜力^[26]。结直肠癌组织中的 TP53 诱导的糖酵解和凋亡调控蛋白 (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator, TIGAR) 表达显著高于邻旁组织, TIGAR 通过 ROS/AMPK/SCD1 信号通路在结直肠癌细胞中诱导铁死亡抗性, 铁死亡已成

为结直肠癌治疗的一个有希望的靶点^[27]。众所周知,黑色素瘤是表皮黑色素细胞恶变引起的致命皮肤癌,CAMKK2 通过激活 AMPK-NRF2 通路在铁死亡中发挥保护作用,这可能扩宽铁死亡诱导剂和免疫疗法协同治疗黑色素瘤疗效的前景^[28]。ALOX5 是黑色素瘤独立的预后因素,ALOX5 缺陷通过抑制 AMPK/mTOR 通路抵抗自噬和铁死亡,这一调控机制为黑色素瘤药物开发提供新思路^[29]。基于铁死亡的 AMPK 调控为维持机体健康稳态发挥了重要作用,也为揭示 AMPK 与铁死亡在疾病进展中的作用提供了重要理论依据(图 2)。

3 AMPK 与细胞器的调控

3.1 AMPK 与线粒体

越来越多的研究表明,AMPK 与线粒体之间也存在串扰。线粒体作为一种重要细胞器,通过改变其数量、大小、形状和细胞内位置以维持平衡^[30]。AMPK 已经成为线粒体的守护者,因为几乎所有的线粒体损伤都能激活 AMPK。线粒体的结构和功能变化在疾病条件下可被放大。因此,对其功能和特

性进行深入研究,将对促进细胞生物学研究和疾病治疗具有重要意义^[31]。在正常神经肌肉系统中,线粒体的更新和动力学过程受到 AMPK 的调控。杜氏肌营养不良症、1 型强直性肌营养不良症和脊髓性肌萎缩症是儿童及成年患者常见的三种不同类型神经肌肉疾病,这些疾病之间存在的线粒体压力可能作为减轻神经肌肉疾病的潜在治疗靶点,靶向 AMPK 以改善神经肌肉系统的线粒体健康,这是未来基于 AMPK 开发相关治疗药物的一个重要方向和机遇^[32]。AMPK 调节泛醇-细胞色素 c 还原酶核心蛋白 2 (ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 2 gene,UQCRC2)是线粒体自噬中的重要线粒体事件,它确定了一个新的信号轴 AMPK-NFE2L2-UQCRC2,可以调节肝中的线粒体自噬水平,线粒体自噬可以防止酒精引起的肝损伤,这有助于去除受损的线粒体,以减少 ROS 的积累,为治疗酒精性肝病提供了一种可能的治疗策略^[33](图 3)。

3.2 AMPK 与溶酶体

AMPK 作为能量传感器的经典机制是通过感知核苷酸的变化来进行调节。但研究发现了一种新

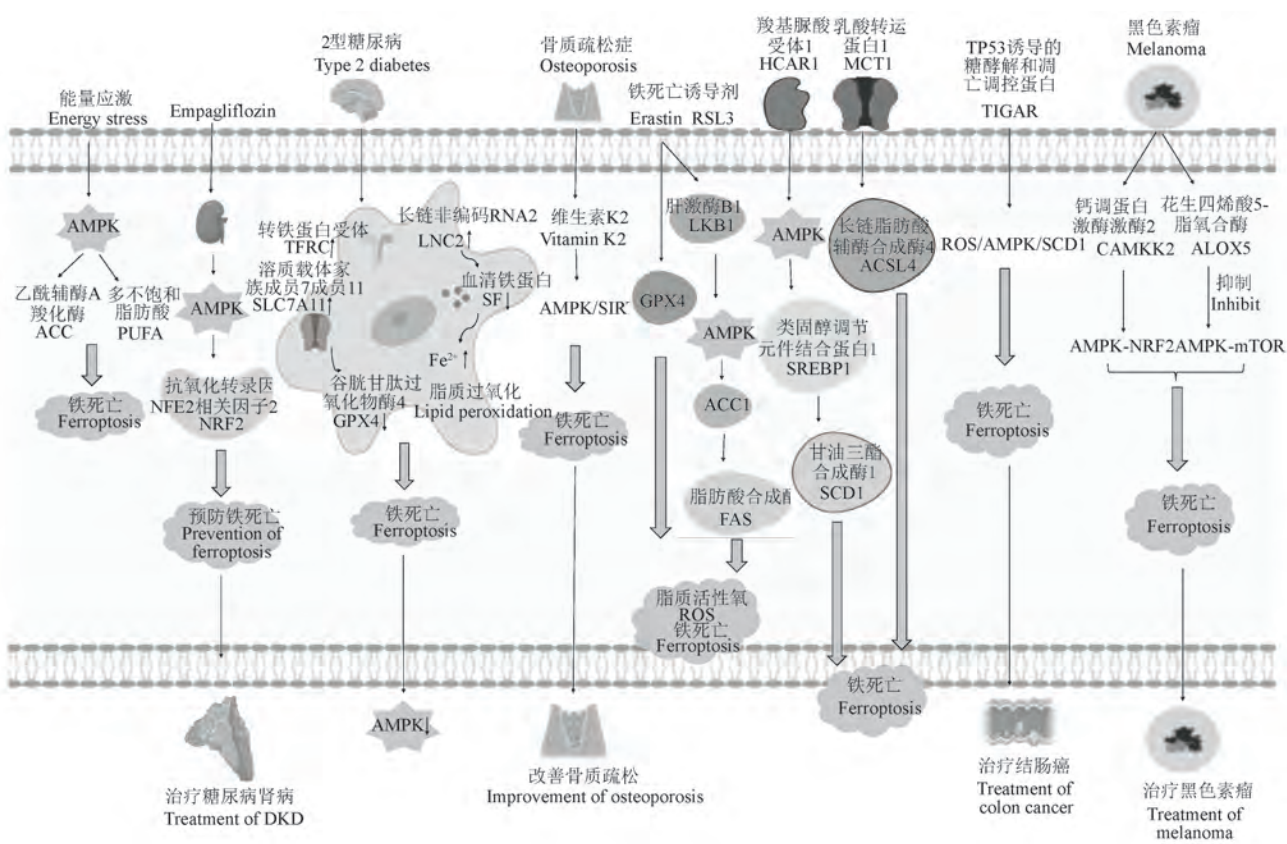


图 2 AMPK 和铁死亡的调控示意图

Figure 2 Schematic diagram of the regulation of AMPK and ferroptosis

的特异性机制,AMPK 可以在没有细胞能量变化的情况下在溶酶体处被激活^[34]。AMPK 的活性与葡萄糖的细胞可用性呈负相关。在葡萄糖和 1,6-二磷酸果糖(1,6-fructose biphosphate,FBP)降低时,醛缩酶促进溶酶体复合物的形成,但 AMPK 不依赖于

核苷酸的改变而识别葡萄糖。糖酵解过程的中间产物 FBP 可被醛缩酶识别并与 V-ATP 在溶酶体表面结合;当没有 FBP 时,醛缩酶和 V-ATP 之间的相互作用会发生变化,促进基于 AXIN-LKB1 复合物的形成,最终引起 AMPK 激活增加^[35](图 4)。

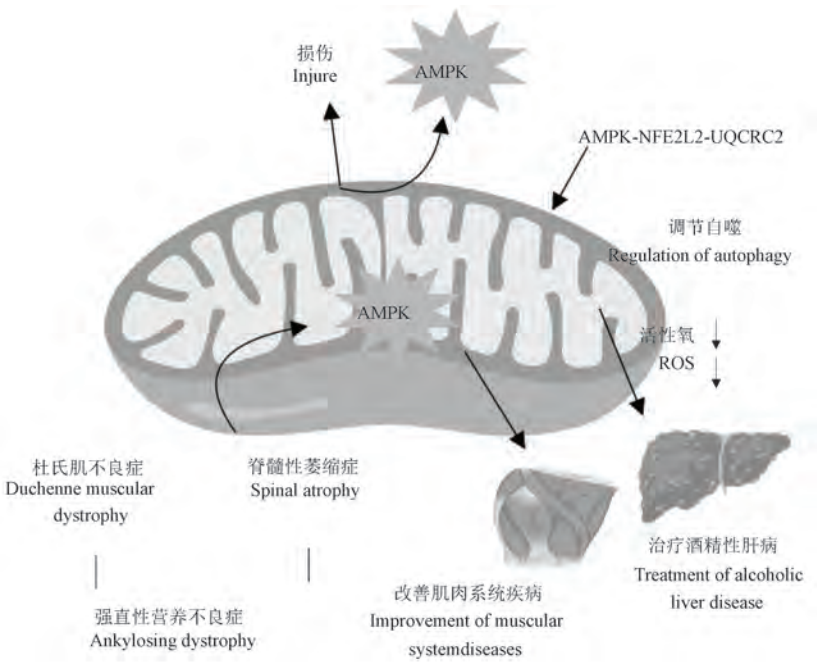


图 3 AMPK 和线粒体调控示意图
Figure 3 Schematic diagram of the regulation of AMPK and mitochondria

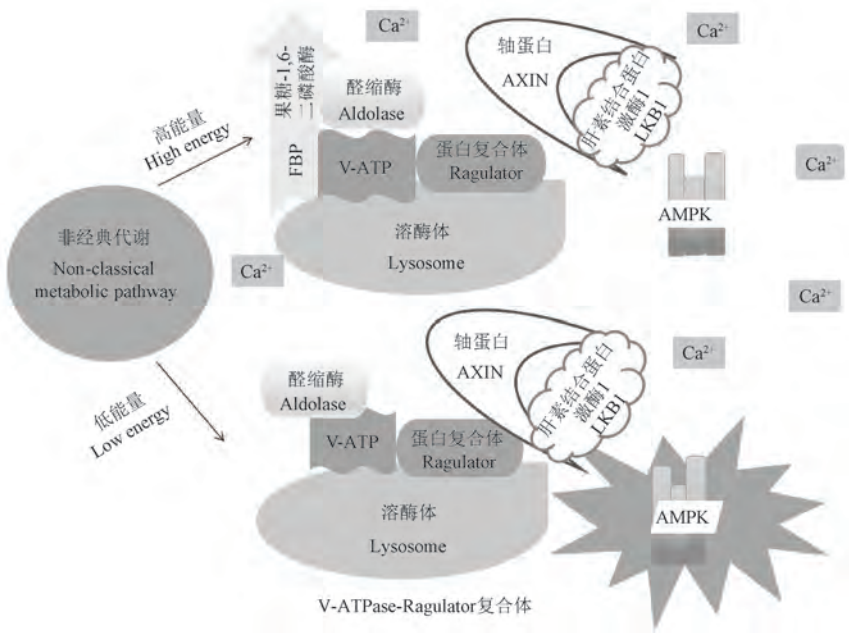


图 4 AMPK 的非经典代谢途径
Figure 4 Non-classical metabolic pathway of AMPK

3.3 AMPK 与内质网

Ghrelin 是一种胃内分泌肽以浓度依赖方式减轻衣霉素诱导的内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 应激, 并可能通过抑制 AMPK 的磷酸化来减轻细胞的 ER 应激, 在成骨细胞中诱导细胞凋亡, 这项研究可能为胃泌素通过维持 ER 平衡和调节内质网应激对骨骼的保护作用提供新见解^[36] (图 5)。褪黑激素对草酸盐诱导的内质网应激和细胞凋亡的保护作用部分依赖于 HK-2 细胞中的 AMPK 激活, 这为预防和治疗肾结石提供了见解^[37]。血管钙化 (vascular calcification, VC) 是慢性肾病糖尿病的重要特征, 死亡相关蛋白激酶 3 (death-associated protein kinase, DAPK3) 参与高血压的血管重塑, 研究表明, DAPK3 通过 AMPK 介导的内质网应激信号传导调节血管平滑肌细胞钙化^[38]。二甲双胍通过激活 AMPK 诱导的自噬和抑制内质网应激反应减少心肺复苏后的脑损伤^[39]。此外, 植物甾醇酯 α -亚麻酸 (PS-ALA) 通过激活 AMPK 减弱内质网应激介导的细胞凋亡, 这为非酒精性脂肪肝中的保护作用提供了新的见解^[40]。

4 AMPK 与癌症是敌是友

癌细胞中的营养获取和代谢途径被改变, 以满

足生物能量和生物合成的需求。AMPK 是细胞代谢和能量稳态的主要调节剂, 在癌症形成前, AMPK 充当肿瘤抑制因子。然而, 在癌症发作后, AMPK 既能发挥抑制作用又能发挥促进作用, AMPK 作为肿瘤抑制因子或癌基因的双面性是由不同的细胞微环境决定的, 因此, 未来研究中应正确判断和应用 AMPK 靶标^[41]。

4.1 AMPK 与主要癌症

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全世界癌症死亡的第三大诱因^[42]。肝在新陈代谢中起重要作用, 并参与败血症的先天免疫和炎症反应, 在实验中证明了 AMPK α 1 是败血症中的重要肝保护酶^[43]。研究已知异丙酚通过诱导自噬和激活 AMPK 能抑制 HepG2 细胞的增殖、凋亡和细胞周期^[44]。特比萘芬可激活 AMPK 来抑制 mTORC1 信号传导, 有效抑制肝细胞的增殖^[45]。核苷酸结合寡聚结构域 2 (NOD2) 是已知的先天免疫传感器, 能引起对病原体的强烈免疫反应, NOD2 可以通过直接激活 AMPK 通路在 HCC 细胞中起到肿瘤抑制和化疗调节剂的作用。因此, 调节 NOD2-AMPK 信号轴有望治疗 HCC^[46]。

乳腺癌 (breast carcinoma, BC) 是基因、激素失

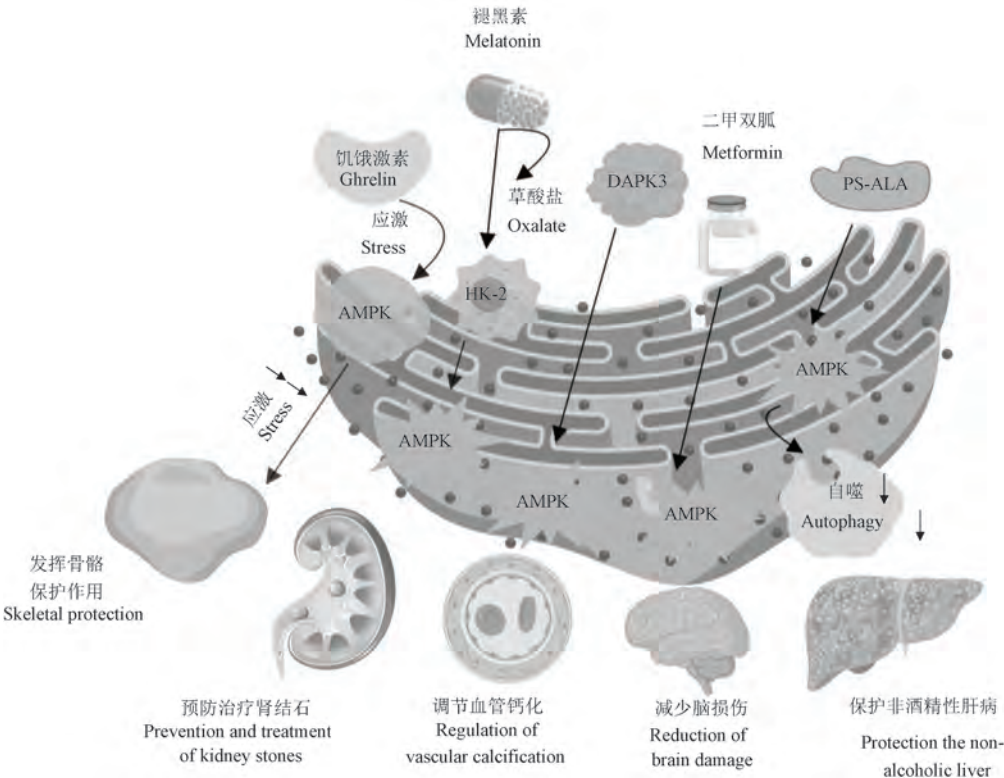


图 5 AMPK 在内质网中的调节
Figure 5 Regulation of AMPK in the endoplasmic reticulum

调引起的乳腺组织癌变的恶性肿瘤,现在是最常见的妇科恶性肿瘤。研究表明,AMPK 活性降低与乳腺肿瘤发展有关^[47]。AMPK 介导的铜转运蛋白 1 (CTR1)的磷酸化和稳定性揭示了能量反应和铜吸收之间的串扰,突出了 AMPK 激动剂与铜螯合剂相结合来对抗乳腺癌的潜力^[48]。AMPK 在人类乳腺癌的调控中发挥着重要作用,在多种激酶、基因和压力条件下,AMPK 在三阴性乳腺癌 (triple negative breast cancer, TNBC) 细胞内过表达,而在其他一些乳腺癌细胞中被抑制。AMPK 的激活或抑制针对各种下游分子,调控乳腺癌细胞的生长、增殖、凋亡和 MDR^[49]。

肾细胞癌 (renal cell carcinoma, RCC) 通过 AMPK 激活剂可以促进细胞生长,AMPK 的激活在正常情况下抑制 RCC 细胞的增殖,但在葡萄糖剥夺条件下通过与丙酮酸激酶 M2 (PKM2) 相互作用而促进 RCC 细胞的增殖,这表明了 AMPK 在正常和糖剥夺 (glucose deprivation, GD) 条件下介导 RCC 细胞增殖的双重作用,因此,AMPK 激活与抑制核 PKM2 相结合才能为 RCC 患者获得更好的治疗效果^[50]。RCC 最常见的亚型是透明细胞 RCC (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC),而 ccRCC 的命运与 TP53 调控基因的改变有关,p53 的功能异常会影响自噬,自噬在不同晚期癌症中会增加,可能与癌症的进展有关,由于线粒体钙单向转运蛋白 (mitochondrial calcium unidirectional transporter, MCU) 的下调引起 ATP 生成减少,引发 AMPK 激活,导致线粒体钙的吸收减少,破坏 p53,从而促进了 ccRCC 的细胞增殖^[51]。营养感应激酶 mTOR 和 AMPK 在许多细胞类型中表达,在肾中,生理水平的 mTOR 和 AMPK 活性可维持肾细胞的生长分化和肾细胞的完整性。mTORC1 的过度激活使荚膜细胞和肾小管细胞容易受损和发生功能紊乱,导致某些慢性肾疾病的发展。因此,针对 mTOR/AMPK 可能是控制或预防这些疾病的有效方法^[52]。

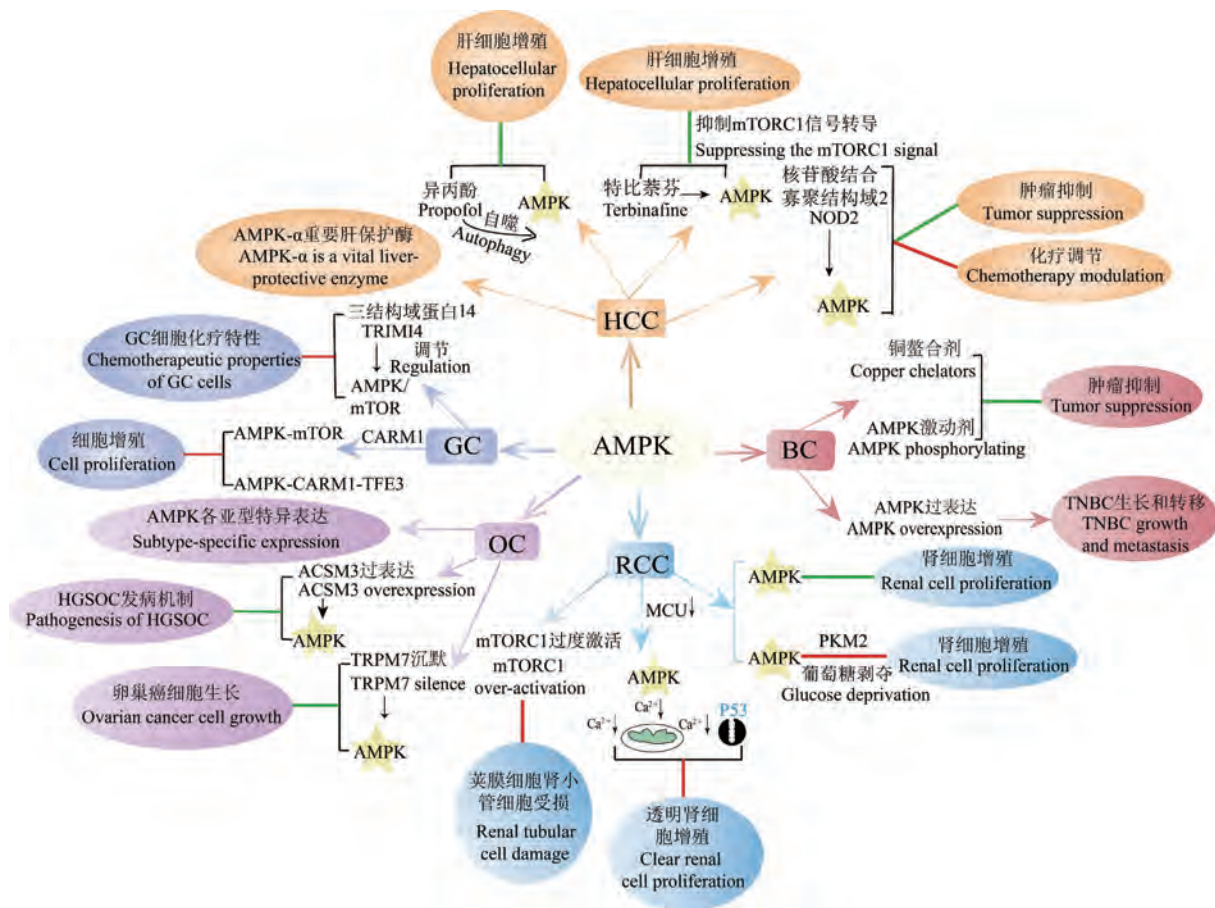
卵巢癌 (ovarian cancer, OC) 是女性五大常见的恶性肿瘤之一且易复发。在卵巢癌组织中,AMPK 各亚型异构体的特异性表达和功能有所不同。AMPK α 2、AMPK β 1 mRNA 水平在卵巢癌组织中明显高于良性肿瘤,但 AMPK β 2、AMPK γ 1 和 AMPK γ 2 mRNA 在卵巢癌中与良性卵巢肿瘤中表达无差异,AMPK 亚基之间的差异可能与 AMPK 在多种肿瘤中的多种功能有关^[53]。高级别浆液性卵巢癌 (high

grade serous ovarian cancer, HGSOC) 是卵巢癌主要亚型,ACSM3 过表达会增加 AMP/ATP 比值和 AMPK 磷酸化水平,研究表明,ACSM3-AMPK 轴参与了 HGSOC 的发病机制,可以作为卵巢癌的治疗靶点^[54]。瞬时受体电位 7 (transient receptor potential 7, TRPM7) 沉默增强了 AMPK 的激活,促进了低氧诱导因子在卵巢癌细胞中的泛素化和降解,抑制卵巢癌的生长,这可能揭示了 TRPM7 在卵巢癌生长中的新功能^[55]。Mfn2 表达增加会触发 AMPK,促进自噬减少 ROS,并通过下调 p-Mtor (2481 和 2448) 和 p-ERK 轴来抑制 OC 进展,研究表明,Mfn2 介导线粒体融合的恢复抑制了 OC 的进展,并表明该过程可能是 OC 治疗的潜在策略^[56]。

胃癌 (gastric carcinoma, GC) 是发生于胃上皮组织的恶性肿瘤,具有高度异质性,淋巴间质的胃癌显示出组织形态学和生物学行为之间的低相关性^[57]。TRIM14 通过调节 AMPK/mTOR 途径促进了 GC 细胞的化疗抗性,并可能成为治疗 GC 的一个新的生物标志物^[58]。CARM1 在临床 GC 组织和细胞系中上调,并且 CARM1 的高表达与不利的预后有关。更重要的是,有研究首次证明了 CARM1 治疗能明显抑制 GC 肿瘤在体内和体外的生长,并与自噬抑制剂协同作用,这表明了一种有前景的治疗策略^[59]。从机制上讲,CARM1 通过激活细胞膜 AMPK-mTOR 和核 AMPK-CARM1-TFE3 信号通路,促进 TFE3 核转位并增强其活性,从而增强自噬作用,促进了 GC 细胞增殖^[59] (图 6)。

4.2 AMPK 与其他癌症

食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 是多病因引起的食管鳞状细胞分化的恶性上皮肿瘤,具有复杂的肿瘤生态学特征^[60]。子宫内膜癌 (endometrial cancer, EC) 是最常见的妇科恶性肿瘤之一。小鼠淋巴瘤 2 (PIM2) 使 AMPK α 1 磷酸化导致 AMPK α 1 激酶活性降低,进而促进有氧糖酵解和肿瘤生长^[61]。前列腺癌细胞 (prostate cancer, PCa) 对细胞外物质的巨胞饮作用是一种关注较少的相互作用,在抑癌基因 PTEN 缺陷与 AMPK 激活的情况下增加巨胞饮作用,同位素标记证实巨胞饮作用的坏死细胞蛋白促进了 PCa 中新蛋白的合成^[62]。EGFR-TKIs 是小分子靶向治疗药物,VEGFR-TKIs 的一个子集在 LKB1 突变肺癌中激活 AMPK,体现了 VEGFR-TKI 子集在治疗



注:红线:促进作用;绿线:抑制作用。

图 6 AMPK 参与部分癌症的调控机制

Note. Red line, Promoting effect. Green line, Inhibiting effect.

Figure 6 Regulation of AMPK involvement in some cancers

LKB1 突变非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 中具有潜在价值^[63]。胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 基因组图谱数据的分析显示, AMPK 亚型在 GBM 中高度表达, 抑制 AMPK 可以显著降低 GBM 干细胞增殖及成瘤能力^[64]。丁酸盐抑制结肠癌细胞的生长, 但长期接触丁酸盐会增加人结肠癌对丁酸盐的抵抗, AMPK 的激活通过抑制 Akt/mTOR 恢复了对丁酸盐的敏感性。因此, 激活 AMPK 为克服抗性恢复对癌症治疗和丁酸盐的敏感性提供了解决方案^[65]。AMPK 及其各种亚型在恶性肿瘤的微环境中扮演了重要角色, AMPK 被激活后通过复杂的途径参与调控肿瘤的发展, 因此, 进一步研究 AMPK 家族的活性机制有望成为开发新型癌症治疗剂的新策略。

癌症转移是癌症相关死亡的主要原因之一。研究表明在小鼠转移模型中激活的 AMPK 驱动丙酮酸脱氢酶复合物 (PDHc) 激活以维持 TCA 循环,

并通过使癌细胞适应代谢和氧化应激促进癌症转移^[66]。癌症化疗常见并发症之一是肿瘤溶解综合征 (tumor lysis syndrome, TLS), 这种由化疗带来的代谢改变导致疗效差。TLS 通过抑制 AMPK 诱导了癌症化疗耐药机制, 导致疗效不佳, 甚至治疗后复发^[67]。在大多数癌症中, 受影响的器官若能使癌细胞获得足够的营养, 则 AMPK 抑制癌症生长和增殖; 但在某些癌症中, 微环境的营养不足, 癌细胞反而依赖 AMPK 的活性, 这时 AMPK 的激活会增加肿瘤细胞的活力, 降低患者的生存率^[68]。AMPK 在癌症治疗中扮演的角色可能是“敌”也可能是“友”, 这为将来的临床治疗提供了新的可能性, 也增加了 AMPK 靶向治疗的更多思考。

5 其他

生长分化因子 11 (growth differentiation factor 11, GDF11) 与不同病理条件下心脏病的发病机制有

关,GDF11 激活 AMPK α 以减少辐射诱导的氧化损伤,GDF11 通过激活 AMPK α 减轻心脏放射毒性^[69]。还有研究越来越倾向于利用 AMPK 途径来治疗眼部疾病,抑制 AMPK 可能比激活 AMPK 更能贴切地治疗眼部疾病^[70]。弱精子症是男性不育症中的常见形式,氧化应激可以通过激活 AMPK/mTOR2 信号通路影响精浆代谢,从而导致精子活力降低^[71]。此外,丁香油的主要成分丁香酚能通过 TRPV1 介导的 CaMKK2/AMPK 通路促进食欲^[72]。帕金森病是常见的神经系统变性疾病,胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 是具有抗神经炎作用的激素,利拉鲁肽是 GLP-1 受体激动剂,可以通过 AMPK/NF- κ B 途径介导神经炎症的抑制^[73]。已有研究表明,在传统药物与疾病调节过程中 AMPK 也发挥了作用,例如,小檗碱是对多种癌症具有抗肿瘤作用的天然产物,通过 AMPK 途径抑制糖酵解来抑制胰腺上皮内瘤变^[74]。Capilliposide B (CPS-B) 是一种从珍珠菜中发现的新型齐墩果烷三萜皂苷 Hemsl,是一种有效的抗癌剂,CPS-B 通过 ROS/AMPK/mTOR 通路诱导自噬抑制前列腺癌迁移,是一种潜在的癌症治疗剂^[75]。金丝桃苷是从贯叶金丝桃中提取的一种中药有效成分,其可能通过激活 AMPK/mTOR/ULK1 通路促进肾细胞自噬活性,减轻肾病综合征大鼠的足细胞损伤等肾病变^[76]。黄酮醇类化合物槲皮素预处理可能通过激活肝缺血再灌注大鼠肝组织中 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬,缓解肝损伤^[77]。巨噬细胞特异性敲除 AMPK α 1 对非酒精性脂肪肝小鼠模型口服糖耐量受损,血清甘油三酯上调,肝脂肪变性以及血清中丙酸与乳酸水平下调相关^[78]。AMPK 的多样性调控有利于打开在疾病治疗过程中的新思路,为临床治疗提供新视角。

6 小结及展望

AMPK 作为能量感应器,在机体代谢过程中起着关键的调控作用,是调节机体代谢稳态的重要机制,因其具有多种重要的生物学调控效应而备受关注。AMPK 通过不同的信号通路和作用机理在疾病和癌症中发挥独特的调理作用,也因此成为重要的药物靶点。然而如本文所述,由于 AMPK 激活与功能的复杂性,针对其进行靶向治疗仍是个难题,AMPK 在癌症中的作用是一个复杂的平衡过程,取决于多种因素,AMPK 双重效应的作用发挥依赖于

肿瘤微环境,更可能依赖于肿瘤的进程与能量需求。在代谢障碍环境中或持续处于能量匮乏状态的肿瘤,很可能依赖 AMPK 的活性来维持能量平衡和细胞生存。AMPK 既可通过抑制合成代谢途径来抑制肿瘤细胞的生长和增殖,又可通过维持肿瘤细胞在代谢或能量应激条件下的存活来促进肿瘤进展。因此,确定特定的肿瘤类型和肿瘤微环境对加强我们对抑制/激活 AMPK 作为癌症治疗策略的理解是非常有意义的。AMPK 在不同细胞器中的作用形成了复杂的调控网络,这种多层次的调控有助于维持细胞的稳态;AMPK 作为代谢传感器参与了多种传统药物的调节机制,这也将可能为传承、创新、改造和提升当代中药的研发开启一个新阶段;AMPK 信号通路在多种方向为疾病和药物研发提供了更多新方向,比如循环系统疾病、生殖系统疾病、神经系统疾病、消化系统疾病、泌尿系统疾病、感官系统疾病等。此外,AMPK 通过对能量、葡萄糖等的感知维持能量稳态,在多种代谢综合征乃至延缓衰老、延长寿命方面也有独特的贡献,这引发了阐述延长寿命和维持稳态潜在机制和治疗靶标的广泛兴趣。今后,围绕着 AMPK 调节和功能上的“时间性”“空间性”开展日益深入的研究,将多维度展示其在疾病和癌症治疗的靶标作用机制及功能。进一步深入确立 AMPK 活性机制、作用新靶点以及 AMPK 在复杂调控网络维持能量平衡的机制至关重要,更透彻地阐明 AMPK 异构体的调节作用,加深 AMPK 信号通路多样性调控的认识,有益于揭示正确有意义的生物学见解和未来治疗策略的方向,为人类在疾病探索进程中发现新视角及人类未来战胜癌症提高了自信心。

参考文献:

- [1] STEINBERG G R, HARDIE D G. New insights into activation and function of the AMPK [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023, 24(4): 255-272.
- [2] MENG S S, GU H W, ZHANG T, et al. Gradual deterioration of fatty liver disease to liver cancer *via* inhibition of AMPK signaling pathways involved in energy-dependent disorders, cellular aging, and chronic inflammation [J]. Front Oncol, 2023, 13: 1099624.
- [3] ROSS F A, MACKINTOSH C, HARDIE D G. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours [J]. FEBS J, 2016, 283(16): 2987-3001.
- [4] GARCIA D, SHAW R J. AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance [J]. Mol Cell, 2017, 66(6): 789-800.

- [5] SINGH V, RAM M, KUMAR R, et al. Phosphorylation; implications in cancer [J]. Protein J, 2017, 36(1): 1–6.
- [6] SEOANE-COLLAZO P, LÓPEZ M. Analyzing AMPK function in the hypothalamus [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1732: 433–448.
- [7] PAQUETTE M, EL-HOUJEIRI L, ZIRDEN L C, et al. AMPK-dependent phosphorylation is required for transcriptional activation of TFEB and TFE3 [J]. Autophagy, 2021, 17(12): 3957–3975.
- [8] LIU J, ZHUANG Y, WU J, et al. IKK β mediates homeostatic function in inflammation *via* competitively phosphorylating AMPK and I κ B α [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(2): 651–664.
- [9] JIA J, BISSA B, BRECHT L, et al. AMPK is activated during lysosomal damage via a galectin-ubiquitin signal transduction system [J]. Autophagy, 2020, 16(8): 1550–1552.
- [10] JIA J, BISSA B, BRECHT L, et al. AMPK, a regulator of metabolism and autophagy, is activated by lysosomal damage via a novel galectin-directed ubiquitin signal transduction system [J]. Mol Cell, 2020, 77(5): 951–969, e9.
- [11] YANG S J, JEON S J, VAN NGUYEN T, et al. Ubiquitin-dependent proteasomal degradation of AMPK gamma subunit by Cereblon inhibits AMPK activity [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2020, 1867(8): 118729.
- [12] JIANG P, REN L, ZHI L, et al. Negative regulation of AMPK signaling by high glucose via E3 ubiquitin ligase MG53 [J]. Mol Cell, 2021, 81(3): 629–637, e5.
- [13] ZHANG E, JIN L, WANG Y, et al. Intestinal AMPK modulation of microbiota mediates crosstalk with brown fat to control thermogenesis [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 1135.
- [14] HE L, ZHOU X, WU Z, et al. Glutamine in suppression of lipopolysaccharide-induced piglet intestinal inflammation: the crosstalk between AMPK activation and mitochondrial function [J]. Anim Nutr, 2022, 10: 137–147.
- [15] ZECHA J, BAYER F P, WIECHMANN S, et al. Decrypting drug actions and protein modifications by dose-and time-resolved proteomics [J]. Science, 2023, 380(6640): 93–101.
- [16] WANG S, LI H, YUAN M, et al. Role of AMPK in autophagy [J]. Front Physiol, 2022, 13: 1015500.
- [17] SPENGLER K, KRYEZIU N, GROßE S, et al. VEGF triggers transient induction of autophagy in endothelial cells via AMPK α 1 [J]. Cells, 2020, 9(3): 687.
- [18] FANG S, WAN X, ZOU X, et al. Arsenic trioxide induces macrophage autophagy and atheroprotection by regulating ROS-dependent TFEB nuclear translocation and AKT/mTOR pathway [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(1): 88.
- [19] RISHI G, HUANG G, SUBRAMANIAM V N. Cancer; the role of iron and ferroptosis [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2021, 141: 106094.
- [20] SUN Y, XUE Z, HUANG T, et al. Lipid metabolism in ferroptosis and ferroptosis-based cancer therapy [J]. Front Oncol, 2022, 12: 941618.
- [21] LEE H, ZHUANG L, GAN B. Energy stress inhibits ferroptosis via AMPK [J]. Mol Cell Oncol, 2020, 7(4): 1761242.
- [22] LU Q, YANG L, XIAO J J, et al. Empagliflozin attenuates the renal tubular ferroptosis in diabetic kidney disease through AMPK/NRF2 pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2023, 195: 89–102.
- [23] XIE Z, WANG X, LUO X, et al. Activated AMPK mitigates diabetes-related cognitive dysfunction by inhibiting hippocampal ferroptosis [J]. Biochem Pharmacol, 2023, 207: 115374.
- [24] JIN C, TAN K, YAO Z, et al. A novel anti-osteoporosis mechanism of VK2: interfering with ferroptosis via AMPK/SIRT1 pathway in type 2 diabetic osteoporosis [J]. J Agric Food Chem, 2023, 71(6): 2745–2761.
- [25] LI C, DONG X, DU W, et al. LKB1-AMPK axis negatively regulates ferroptosis by inhibiting fatty acid synthesis [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 187.
- [26] ZHAO Y, LI M, YAO X, et al. HCAR1/MCT1 regulates tumor ferroptosis through the lactate-mediated AMPK-SCD1 activity and its therapeutic implications [J]. Cell Rep, 2020, 33(10): 108487.
- [27] LIU M Y, LI H M, WANG X Y, et al. TIGAR drives colorectal cancer ferroptosis resistance through ROS/AMPK/SCD1 pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2022, 182: 219–231.
- [28] WANG S, YI X, WU Z, et al. CAMKK2 defines ferroptosis sensitivity of melanoma cells by regulating AMPK-NRF2 pathway [J]. J Invest Dermatol, 2022, 142(1): 189–200, e8.
- [29] WANG M, ZENG G, XIONG B, et al. ALOX5 promotes autophagy-dependent ferroptosis by activating the AMPK/mTOR pathway in melanoma [J]. Biochem Pharmacol, 2023, 212: 115554.
- [30] YU S B, PEKKURNAZ G. Mechanisms Orchestrating Mitochondrial Dynamics for Energy Homeostasis [J]. Mol Biol. 2018 Oct 19;430(21):3922–3941.
- [31] WU S, ZOU M H. AMPK, mitochondrial function, and cardiovascular disease [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(14): 4987.
- [32] MIKHAIL A I, NG S Y, MATTINA S R, et al. AMPK is mitochondrial medicine for neuromuscular disorders [J]. Trends Mol Med, 2023, 29(7): 512–529.
- [33] LU X, XUAN W, LI J, et al. AMPK protects against alcohol-induced liver injury through UQCRC2 to up-regulate mitophagy [J]. Autophagy, 2021, 17(11): 3622–3643.
- [34] MORRISON K R, SMILES W J, LING N X Y, et al. An AMPK α 2-specific phospho-switch controls lysosomal targeting for activation [J]. Cell Rep, 2022, 38(7): 110365.
- [35] ZHANG C S, LI M, WANG Y, et al. The aldolase inhibitor aldometanib mimics glucose starvation to activate lysosomal AMPK [J]. Nat Metab, 2022, 4(10): 1369–1401.
- [36] LV X, ZHANG Q, CHENG B, et al. Ghrelin alleviates endoplasmic reticulum stress in MC3T3E1 cells by inhibiting AMPK phosphorylation [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 9940355.
- [37] SONG Q, HE Z, LI B, et al. Melatonin inhibits oxalate-induced

- endoplasmic reticulum stress and apoptosis in HK-2 cells by activating the AMPK pathway [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(20): 2600–2610.
- [38] LI K X, DU Q, WANG H P, et al. Death-associated protein kinase 3 deficiency alleviates vascular calcification via AMPK-mediated inhibition of endoplasmic reticulum stress [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 852: 90–98.
- [39] CHUAN L, ZHANG L, FU H, et al. Metformin prevents brain injury after cardiopulmonary resuscitation by inhibiting the endoplasmic reticulum stress response and activating AMPK-mediated autophagy [J]. *Scott Med J*, 2021, 66(1): 16–22.
- [40] HAN H, XUE T, LI J, et al. Plant sterol ester of α -linolenic acid improved non-alcoholic fatty liver disease by attenuating endoplasmic reticulum stress-triggered apoptosis via activation of the AMPK [J]. *J Nutr Biochem*, 2022, 107: 109072.
- [41] HSU C C, PENG D, CAI Z, et al. AMPK signaling and its targeting in cancer progression and treatment [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 85: 52–68.
- [42] WEI J, FANG D. Endoplasmic reticulum stress signaling and the pathogenesis of hepatocarcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1799.
- [43] KIKUCHI S, PIRAINO G, O'CONNOR M, et al. Hepatocyte-specific deletion of AMPK α 1 results in worse outcomes in mice subjected to sepsis in a sex-specific manner [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 210.
- [44] WANG Y, XU B, ZHOU J, et al. Propofol activates AMPK to inhibit the growth of HepG2 cells *in vitro* and hepatocarcinogenesis in xenograft mouse tumor models by inducing autophagy [J]. *J Gastrointest Oncol*, 2020, 11(6): 1322–1332.
- [45] ZHANG E B, ZHANG X, WANG K, et al. Antifungal agent Terbinafine restrains tumor growth in preclinical models of hepatocellular carcinoma via AMPK-mTOR axis [J]. *Oncogene*, 2021, 40(34): 5302–5313.
- [46] MA X, QIU Y, SUN Y, et al. NOD2 inhibits tumorigenesis and increases chemosensitivity of hepatocellular carcinoma by targeting AMPK pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(3): 174.
- [47] PONNUSAMY L, NATARAJAN S R, THANGARAJ K, et al. Therapeutic aspects of AMPK in breast cancer: progress, challenges, and future directions [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1874(1): 188379.
- [48] ZHANG X, JIANG Q, SU Y, et al. AMPK phosphorylates and stabilises copper transporter 1 to synergise metformin and copper chelator for breast cancer therapy [J]. *Br J Cancer*, 2023, 128(8): 1452–1465.
- [49] PENG B, ZHANG S Y, CHAN K I, et al. Novel anti-cancer products targeting AMPK: natural herbal medicine against breast cancer [J]. *Molecules*, 2023, 28(2): 740.
- [50] LIU M, ZHANG Z, WANG H, et al. Activation of AMPK by metformin promotes renal cancer cell proliferation under glucose deprivation through its interaction with PKM2 [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(3): 617–627.
- [51] PATERGNANI S, GUZZO S, MANGOLINI A, et al. The induction of AMPK-dependent autophagy leads to P53 degradation and affects cell growth and migration in kidney cancer cells [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 395(1): 112190.
- [52] HUYNH C, RYU J, LEE J, et al. Nutrient-sensing mTORC1 and AMPK pathways in chronic kidney diseases [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2023, 19(2): 102–122.
- [53] 姚莎莎, 彭启松. 腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 部分亚基在卵巢癌组织中的表达及临床意义 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2020, 36(7): 628–633.
- YAO S S, PENG Q S. Partial isoform-specific expression and function of AMPK in ovarian carcinoma [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2020, 36(7): 628–633.
- [54] YANG X, WU G, ZHANG Q, et al. ACSM3 suppresses the pathogenesis of high-grade serous ovarian carcinoma via promoting AMPK activity [J]. *Cell Oncol*, 2022, 45(1): 151–161.
- [55] CHEN Y, LIU L, XIA L, et al. TRPM7 silencing modulates glucose metabolic reprogramming to inhibit the growth of ovarian cancer by enhancing AMPK activation to promote HIF-1 α degradation [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 44.
- [56] ASHRAF R, KUMAR S. Mfn2-mediated mitochondrial fusion promotes autophagy and suppresses ovarian cancer progression by reducing ROS through AMPK/mTOR/ERK signaling [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(11): 573.
- [57] UNER M, ISIK A, OZTOP S, et al. Gastric carcinoma with lymphoid stroma: a combination of mismatch repair deficient medullary type and epstein-barr virus-associated gastric carcinomas [J]. *Int J Surg Pathol*, 2022, 30(6): 623–633.
- [58] XIAO F, OUYANG B, ZOU J, et al. Trim14 promotes autophagy and chemotherapy resistance of gastric cancer cells by regulating AMPK/mTOR pathway [J]. *Drug Dev Res*, 2020, 81(5): 544–550.
- [59] YANG S, ZHANG J, CHEN D, et al. CARM1 promotes gastric cancer progression by regulating TFE3 mediated autophagy enhancement through the cytoplasmic AMPK-mTOR and nuclear AMPK-CARM1-TFE3 signaling pathways [J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 102.
- [60] ZHANG X, PENG L, LUO Y, et al. Dissecting esophageal squamous-cell carcinoma ecosystem by single-cell transcriptomic analysis [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5291.
- [61] HAN X, REN C, YANG T, et al. Negative regulation of AMPK α 1 by PIM2 promotes aerobic glycolysis and tumorigenesis in endometrial cancer [J]. *Oncogene*, 2019, 38(38): 6537–6549.
- [62] KIM S M, NGUYEN T T, RAVI A, et al. PTEN deficiency and AMPK activation promote nutrient scavenging and anabolism in prostate cancer cells [J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(7): 866–883.
- [63] YANG L, ZHANG Q, XIONG Y, et al. A subset of VEGFR-TKIs activates AMPK in LKB1-mutant lung cancer [J]. *Cancer Sci*, 2023, 114(4): 1651–1662.

- [64] CHHIPA R R, FAN Q, ANDERSON J, et al. AMP kinase promotes glioblastoma bioenergetics and tumour growth [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(7): 823–835.
- [65] YOO H Y, PARK S Y, CHANG S Y, et al. Regulation of butyrate-induced resistance through AMPK signaling pathway in human colon cancer cells [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(11): 1604.
- [66] CAI Z, LI C F, HAN F, et al. Phosphorylation of PDHA by AMPK drives TCA cycle to promote cancer metastasis [J]. *Mol Cell*, 2020, 80(2): 263–278, e7.
- [67] ABD EL-FATTAH E E. Tumor lysis syndrome promotes cancer chemoresistance and relapse through AMPK inhibition [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 114: 109568.
- [68] SADRIA M, SEO D, LAYTON A T. The mixed blessing of AMPK signaling in Cancer treatments [J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1): 105.
- [69] LI X, DING D, CHEN W, et al. Growth differentiation factor 11 mitigates cardiac radiotoxicity *via* activating AMPK α [J]. *Free Radic Res*, 2021, 55(2): 176–185.
- [70] SHUKAL D K, MALAVIYA P B, SHARMA T. Role of the AMPK signalling pathway in the aetiopathogenesis of ocular diseases [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2022, 41: 9603271211063165.
- [71] CAO N, HU C, XIA B, et al. The activated AMPK/mTORC2 signaling pathway associated with oxidative stress in seminal plasma contributes to idiopathic asthenozoospermia [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 4240490.
- [72] HUANG T, CHEN X, CHEN D, et al. Eugenol promotes appetite through TRP channels mediated-CaMKK2/AMPK signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(7): 2759–2770.
- [73] CAO B, ZHANG Y, CHEN J, et al. Neuroprotective effects of liraglutide against inflammation through the AMPK/NF- κ B pathway in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(2): 451–462.
- [74] LIU M, YANG Y, KANG W, et al. Berberine inhibits pancreatic intraepithelial neoplasia by inhibiting glycolysis via the adenosine monophosphate-activated protein kinase pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 915: 174680.
- [75] WANG L, HAN H, FENG Y, et al. Capilliposide B inhibits the migration of prostate cancer by inducing autophagy through the ROS/AMPK/mTOR pathway [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(7): 2902–2914.
- [76] 孔露娇, 王心, 刘静, 等. 金丝桃苷通过 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路对肾病综合征大鼠自噬反应的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(11): 88–95.
- KONG L J, WANG X, LIU J, et al. Influence of hyperoside on autophagy in rats with nephrotic syndrome through AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(11): 88–95.
- [77] 沈钦海, 张盟辉, 秦召敏, 等. 槲皮素预处理调节 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬途径改善大鼠肝缺血再灌注损伤 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(3): 16–22.
- SHEN Q H, ZHANG M H, QIN Z M, et al. Quercetin pretreatment modulates the autophagy pathway mediated by the AMPK/mTOR signaling pathway and improves liver ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 32(3): 16–22.
- [78] 王顺意, 陈思烁, 于天力, 等. 巨噬细胞 AMPK α 1 敲除对非酒精性脂肪肝小鼠模型的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(1): 85–92.
- WANG S Y, CHEN S S, YU T L, et al. Effect of macrophage AMPK α 1 knockout on a non-alcoholic fatty liver model in mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(1): 85–92.

[收稿日期]2023-07-18