

刘茂林,王晓堂,宋晓娜,等. Gli2 调控 Hedgehog 通路活化对 Tca8113 细胞增殖、转移和上皮间充质转化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 1-9.

Liu ML, Wang XT, Song XN, et al. Gli2 regulates the activation of Hedgehog pathway in proliferation, metastasis, and epithelial mesenchymal transformation of Tca8113 cells [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 1-9.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.001

Gli2 调控 Hedgehog 通路活化对 Tca8113 细胞增殖、转移和上皮间充质转化的影响

刘茂林^{1#}, 王晓堂^{2#}, 宋晓娜², 马云辉², 常潇琪², 宋国华^{2*}

(1.山西医科大学资产管理部,太原 030001;2.山西医科大学实验动物中心,
实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室,太原 030001)

【摘要】 目的 本研究通过在细胞水平检测 Gli2 对口腔癌细胞 Tca8113 增殖、生长、迁移和侵袭的影响,明确 Gli2 调控口腔癌细胞迁移和侵袭的分子机制。**方法** 本研究利用 siRNA 抑制 Tca8113 细胞中 Gli2 的表达,通过 CCK-8、平板克隆以及 transwell 小室实验分别检测 Gli2 对 Tca8113 细胞增殖、生长、迁移与侵袭的影响。进一步利用 qRT-PCR 与 Western blot 实验探究 Gli2 调控 Tca8113 细胞恶性增殖和转移机制。**结果** 口腔癌细胞 Tca8113 中 Gli2 的 mRNA 和蛋白表达升高。干扰 Gli2 表达可抑制 Tca8113 细胞增殖、生长、迁移及侵袭。进一步研究发现干扰 Gli2 表达可抑制 Hedgehog (Hh) 通路关键因子的 mRNA 与蛋白表达。此外,干扰 Gli2 表达可显著影响上皮间充质转化(epithelial mesenchymal transformation, EMT)通路关键因子的 mRNA 与蛋白表达。**结论** 口腔癌病变过程中 Gli2 被异常激活,干扰 Gli2 表达显著抑制口腔癌细胞的增殖、生长、迁移和侵袭。Gli2 通过调控 Hh 通路 EMT 通路,进而影响口腔癌细胞的迁移和侵袭。本研究为阐明口腔癌的发病机制提供新思路,并为口腔癌的临床治疗提供新视角。

【关键词】 Tca8113 细胞;口腔癌;Gli2;细胞迁移;细胞侵袭;Hedgehog 通路;上皮间充质转化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0001-09

Gli2 regulates the activation of Hedgehog pathway in proliferation, metastasis, and epithelial mesenchymal transformation of Tca8113 cells

LIU Maolin^{1#}, WANG Xiaotang^{2#}, SONG Xiaona², MA Yunhui², CHANG Xiaoqi², SONG Gouhua^{2*}

(1. Asset Management Department, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China.

2. Shanxi Key Laboratory of Laboratory Animals and Animal Models of Human Disease,
Center for Laboratory Animals, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Gli2 on the proliferation, growth, migration, and invasion of oral cancer cells (Tca8113) at the cellular level, and to clarify the molecular mechanism of how Gli2 regulation affects the migration and invasion of oral cancer cells. **Methods** Small interfering (si) RNA was used to inhibit Gli2 expression in Tca8113 cells. The effects of Gli2 on the proliferation, growth, migration, and invasion of Tca8113 cells were examined by

【基金项目】国家自然科学基金(31970513);山西省中央引导地方科技发展资金项目(YDZJSX2022A060);山西省回国留学人员科研项目(2021-086);山西省科技创新人才团队项目(202204051002032)。

【作者简介】刘茂林(1975—),男,实验师,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail:571143392@qq.com

王晓堂(1997—),女,博士研究生,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail:2432137746@qq.com [#]共同第一作者

【通信作者】宋国华(1973—),女,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail:ykdsg@163.com

CCK-8, plate cloning, and transwell chamber assay. Further qRT-PCR and Western blot assays were used to explore the mechanism of how Gli2 regulation effects the malignant proliferation and metastasis of Tca8113 cells. **Results** The mRNA and protein expression of Gli2 in oral cancer cells (Tca8113) increased. Interference of Gli2 expression inhibited the proliferation, growth, migration, and invasion of Tca8113 cells. Further experiments showed that interfering with Gli2 expression inhibited the mRNA and protein expression of key factors in the Hedgehog (Hh) pathway. In addition, interference of Gli2 expression significantly affected the mRNA and protein expression of key factors in epithelial mesenchymal transformation (EMT) pathways. **Conclusions** Gli2 is abnormally activated during oral cancer, and interference of Gli2 expression significantly inhibits the proliferation, growth, migration, and invasion of oral cancer cells. Gli2 influences the migration and invasion of oral cancer cells by regulating the Hh and EMT pathways. This study has provided a new way to elucidate the pathogenesis of oral cancer and new perspectives on the clinical treatment of oral cancer.

【Keywords】 Tca8113 cells; oral cancer; Gli2; cell migration; cell invasion; Hedgehog pathway; EMT

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

肿瘤的发病率与死亡率的增长尚未得到有效控制,俨然成为 21 世纪全世界的负担和亟待解决的问题。恶性肿瘤作为一个被低估的公共卫生问题,对患者的身心健康造成一定影响。口腔癌是世界范围内严重威胁人类生命健康的常见多发性恶性肿瘤之一。全球每年有超过 45 万患者被诊断为口腔癌,其 5 年生存率低于 50%^[1]。口腔鳞状细胞癌是口腔癌的主要形式,占口腔癌发病率的 90% 以上,其具有高恶性、易转移、易复发等特点,大部分患者预后较差且术后生活质量显著下降,甚至影响患者的日常人际交往^[2]。因此,阐明口腔癌的发病机制,寻找新型的诊治靶点,对患者的生存预后至关重要。

基因靶向治疗是近年来肿瘤学的研究热点,在肿瘤相关信号通路上筛选治疗肿瘤的最佳药物靶点将有利于提高患者的临床治疗效果^[3]。随着对口腔癌发病机制的深入研究,越来越多的分子靶点被发现。作为众多致癌信号通路的汇聚点,Hedgehog(Hh)通路在调节肿瘤发生发展的过程中发挥重要作用^[4-5]。大量文献报道,该通路在胚胎时期的细胞分化、组织发育及器官形成中起重要作用,且在多种肿瘤组织中均存在 Hh 通路的异常激活,其异常激活与肿瘤的增殖分化、细胞凋亡、血管新生、侵袭转移等细胞生物学功能密切相关,提示异常激活的 Hh 通路在肿瘤发生发展中起重要作用^[6-8]。

Gli2 是 Hh 通路的关键转录因子,在该通路中起连接作用,可将胞外信号转导至细胞核,激活靶基因转录,进而在多种肿瘤的发展进程中发挥关键作用^[9]。目前,Gli2 被认为是新的癌基因,具有促进肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭和上皮间充质转化

(epithelial mesenchymal transformation, EMT) 的作用^[10]。He 等^[11]研究发现, circZNF609 通过调控 miR-15a-5p/15b-5p 和 Gli2 的表达激活 Hh 通路,增强肝癌细胞的增殖和转移能力及肿瘤干性。Huang 等^[12]研究发现 Gli2 通过转录激活 ARHGEF16 促进人胶质瘤细胞的增殖和迁移。Zhang 等^[13]研究发现 FGF19/Gli2 信号轴通过诱导 EMT 进而促进肺鳞状细胞癌转移。值得一提的是,有研究发现口腔癌患者中 Gli2 的表达显著升高,且 Gli2 的表达和口腔癌患者的较差预后密切相关^[14]。

综上所述,Gli2 可能在口腔癌发生发展过程中发挥重要作用,但其潜在作用机制仍有待揭示。因此,本研究将在细胞水平检测 Gli2 对口腔癌细胞 Tca8113 增殖、生长、迁移和侵袭的影响,明确 Gli2 调控口腔癌细胞迁移和侵袭的分子机制,为阐明口腔癌的发病机制提供新思路,并为口腔癌的临床治疗提供新视角。

1 材料和方法

1.1 细胞

人类口腔癌细胞 Tca8113 购买于 BOSTER 公司,正常上皮角质细胞 HOK 由山西医科大学口腔医学院重点实验室惠赠。

1.2 主要试剂与仪器

TRIzol(日本,TaKaRa 公司);异丙醇(中国,博迪化工有限公司);氯仿(中国,博迪化工有限公司);Prime Script™ RT reagent kit 试剂盒(日本,TaKaRa 公司)蛋白 RIPA 裂解液(中国,BOSTER 公司);PMSF(中国,BOSTER 公司);广谱磷酸酶抑制剂(中国,BOSTER 公司);BCA 蛋白检测试剂盒(中国,BOSTER 公司);5×蛋白上样缓冲液(中国,

BOSTER 公司);NC 膜(中国,BOSTER 公司);蛋白干粉(中国,BOSTER 公司);ECL 发光液(中国,BOSTER 公司); β -actin 抗体(中国,ABclonal 公司);Shh 抗体(中国,ABclonal 公司);Ptc1 抗体(中国,ABclonal 公司);Gli1 抗体(中国,ABclonal 公司);Gli2 抗体(中国,ABclonal 公司)。超低温冰箱(日本,三洋电器株式会社);高速冷冻离心机(美国,Sigma 公司);倒置显微镜(日本,OLYMPUS 公司);酶标仪(日本,Biotek 公司);实时荧光定量 PCR 仪(美国,AB 公司);逆转录 PCR 仪(美国,Bio-Rad 公司);垂直电泳仪(美国,Bio-Rad 公司);转印电泳仪(美国,Bio-Rad 公司);转移脱色摇床(中国,麒麟医用仪器厂公司);化学发光成像仪(英国,Syngene 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

HOK 细胞培养于含有 10% FBS 的 RPMI1640 培养基, Tca8113 细胞培养于含有 10% FBS 的 DEME 培养基。上述细胞均培养于 37 ℃ 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中。

1.3.2 qRT-PCR 实验

细胞样本利用 TRIzol 法提取样本的总 RNA,利用酶标仪检测 RNA 样本的纯度与浓度,并保存于 -80 ℃。采用 Prime Script™ RT reagent Kit 试剂盒将细胞样本的总 RNA 反转录为 cDNA。通过实时荧光定量 PCR 验证细胞样本中不同基因的表达量。本研究所需的基因引物序列见表 1。

1.3.3 Western blot 实验

采用 RIPA 裂解液(蛋白酶抑制剂 1%,磷酸酶

抑制剂 1%)提取细胞样本中的总蛋白,采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。将蛋白煮沸后于 -80 ℃ 保存。采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,浓缩胶电压 80 V(30 min),分离胶电压 120 V(90 min)。采用湿法转膜,转膜条件 100 V(80 min)。转膜完成后用 5%的蛋白干粉在室温下封闭 NC 膜。封闭完成后,将其置于一抗稀释液中 4 ℃ 孵育过夜。次日,利用 TBST 清洗后,在二抗稀释液中室温孵育 60 min。TBST 清洗后利用 ECT 发光液在凝胶成像仪中进行化学显影。

1.3.4 细胞转染

根据 Gli2 靶点设计并合成 siRNA 与无关干扰序列。按照说明书的步骤将上述引物配制成 20 μ mol/L 的母液。提前将细胞接种于细胞培养板,待 Tca8113 细胞生长密度在 80% 左右,按照说明书要求采用 siRNA-Mate 进行细胞转染。转染后 4 h 进行细胞换液,根据不同实验需求进行下一步实验。本研究所需的引物序列见表 2。

1.3.5 细胞增殖实验

利用 CCK-8 试剂盒检测干扰 Gli2 表达对 Tca8113 细胞增殖的影响。将实验分为 5 组(完全培养基组、control 组、si-control 组、siRNA1 组、siRNA2 组),每组设置 5 个复孔。将 Tca8113 细胞接种于 96 孔板中,待贴壁细胞密度接近 80%时按上述分组处理细胞。分别于细胞处理后的 0 h、24 h、48 h 与 72 h 后,分别向每孔细胞加 10 μ L 的 CCK-8 试剂,孵育 2 h 后,采用酶标仪检测细胞光密度值。

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

基因 Gene	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
Shh	5'-CTTTAGCCTACAAGCAGTTTATCC-3'	5'-CTCCGGTGTTTTCTTCATCCT-3'
Ptc1	5'-CAACCCTGTGCTAGTATGAAATGT-3'	5'-CACGAAGAAAAGATATCCTGACG-3'
Gli1	5'-GCCAATAGGGCTTCACATAGG-3'	5'-TCATCCAGAATAGCCACAAAAGTC-3'
Gli2	5'-TGGCCGCTTCAGATGACAGATGTTG-3'	5'-CGTTAGCCGAATGTCAGCCGTGAAG-3'
GAPDH	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

表 2 Gli2 基因 siRNA 引物序列(5'-3')
Table 2 Gli2 gene siRNA primer sequence(5'-3')

基因 Gene	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
siRNA1	GUGGCCUACAUCAACAACUTT	AGUUGUUGAUGUAGGCCACTT
siRNA2	GGGAGAAGAAGGAGUUUGUTT	ACAAACUCCUUCUUCUCCCTT
si-control	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.3.6 平板克隆实验

采用平板克隆实验检测干扰 Gli2 表达对 Tca8113 细胞生长的影响。实验分组如 1.3.5 所述。将 Tca8113 细胞接种于 24 孔板中,待贴壁细胞密度接近 80%时按上述分组处理细胞。待细胞转染 48 h 后收集各组细胞,将其重悬后,按 2000/孔将其接种于 6 孔板,于培养箱中培养 15 d,用 4%的多聚甲醛固定细胞,用 0.1%的结晶紫进行染色。利用光学显微镜进行拍照,并统计集落形成数。

1.3.7 细胞迁移实验

采用 transwell 小室实验检测干扰 Gli2 表达对 Tca8113 细胞迁移的影响。实验分组如 1.3.5 所述。将 Tca8113 细胞接种于 24 孔板中,待贴壁细胞密度接近 80%时按上述分组处理细胞。待细胞转染 48 h 后收集各组细胞,将其重悬后,向 transwell 小室的上室分别加入 1×10^4 个细胞,下室中分别加入 600 μ L 含 20% FBS 的完全培养基。培养 48 h 后倒掉培养液,用棉签擦去小室的上层细胞,PBS 清洗后,用 4%的多聚甲醛固定细胞,用 0.1%的结晶紫进行染色。利用光学显微镜进行拍照,并统计发生细胞迁移数。

1.3.8 细胞侵袭实验

采用基质胶侵袭实验检测干扰 Gli2 表达对 Tca8113 细胞侵袭的影响。实验分组如 1.3.5 所述。向 transwell 小室的上室中分别加入 100 μ L 的基质胶。将 Tca8113 细胞接种于 24 孔板中,待贴壁细胞密度接近 80%时按上述分组处理细胞。待细胞转染 48 h 后收集各组细胞,将其重悬后,向含有基质胶的 transwell 小室的上室分别加入 1×10^4 个细胞,下室中分别加入 600 μ L 含 20% FBS 的完全培养基。培养 48 h 后倒掉培养液,用棉签擦去小室的上层细胞,PBS 清洗后,用 4%的多聚甲醛固定细胞,用 0.1%的结晶紫进行染色。利用光学显微镜进行拍照,并统计细胞侵袭数。

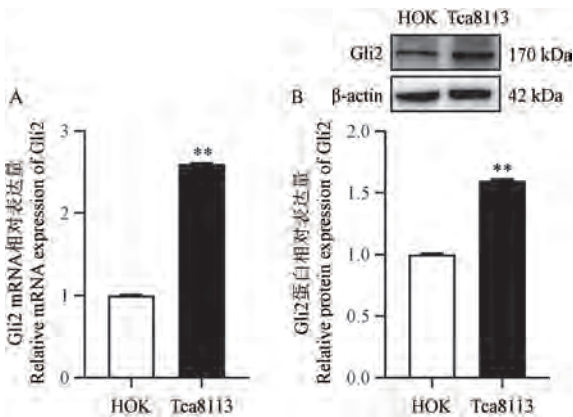
1.4 统计学方法

本研究通过 SPSS Statistics 20.0 版本分析实验数据结果,组间比较采用 LSD-*t* 检验法,所用实验数据结果通过平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 表示差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 口腔癌细胞中 Gli2 的 mRNA 和蛋白表达

本研究以 HOK 细胞为对照,检测 Tca8113 中 Gli2 的表达情况。图 1 结果表明与 HOK 细胞相比,



注:A:Tca8113 中 Gli2 的 mRNA 表达;B:Tca8113 中 Gli2 的蛋白表达。与 HOK 相比, ** $P<0.01$ 。

图 1 Tca8113 细胞中 Gli2 的 mRNA 和蛋白表达($n=3$)

Note. A, mRNA expression of Gli2 in Tca8113. B, Protein expression of Gli2 in Tca8113. Compared with HOK, ** $P<0.01$.

Figure 1 mRNA and protein expression of Gli2 in Tca8113 cell

Tca8113 中 Gli2 的 mRNA 和蛋白表达均极显著提高($P<0.01$),这表明在口腔癌细胞中 Gli2 被异常激活。

2.2 口腔癌细胞中 Gli2 的干扰效率

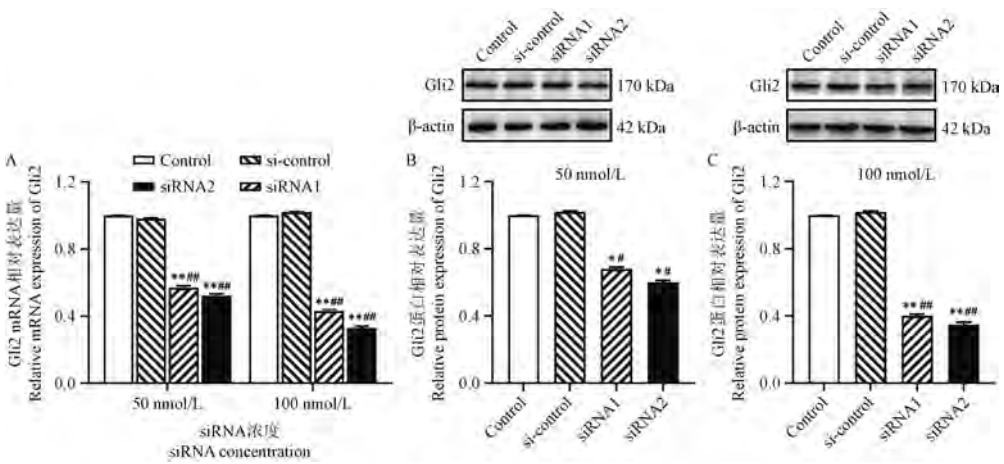
前期研究证实 Tca8113 细胞中 Gli2 的 mRNA 与蛋白表达显著升高,表明其在口腔癌的癌变过程中发挥重要作用。本研究利用 siRNA 干扰 Gli2 表达,并对其转染效率进行检测。图 2 结果表明与 control 组相比,si-control 组中 Gli2 的 mRNA 和蛋白表达无明显差异($P>0.05$)。而与 control 组和 si-control 组相比,采用 siRNA1 与 siRNA2 干扰 Gli2 表达后显著抑制 Tca8113 细胞中 Gli2 的 mRNA 与蛋白表达($P<0.05, P<0.01$)。此外,与 50 nmol/L 的转染浓度相比,100 nmol/L 的转染效果更佳。因此,本研究以 100 nmol/L 作为后续实验的转染浓度。

2.3 干扰 Gli2 对口腔癌细胞增殖和生长的影响

图 3 所示,细胞增殖实验结果表明,与 control 组和 si-control 组相比,Tca8113 细胞转染 24 h 后对其增殖能力无明显影响,而将转染时间延长至 48 h、72 h 后发现,干扰 Gli2 表达可显著抑制 Tca8113 细胞增殖($P<0.01$)。平板克隆实验结果表明,与 control 组和 si-control 组相比,干扰 Gli2 表达可显著抑制 Tca8113 细胞集落形成。上述结果表明 Gli2 在 Tca8113 细胞增殖和生长过程中发挥关键作用,干扰该基因表达可抑制 Tca8113 细胞增殖和生长。

2.4 干扰 Gli2 对口腔癌细胞迁移和侵袭的影响

图 4 所示,细胞迁移实验结果表明,与 control

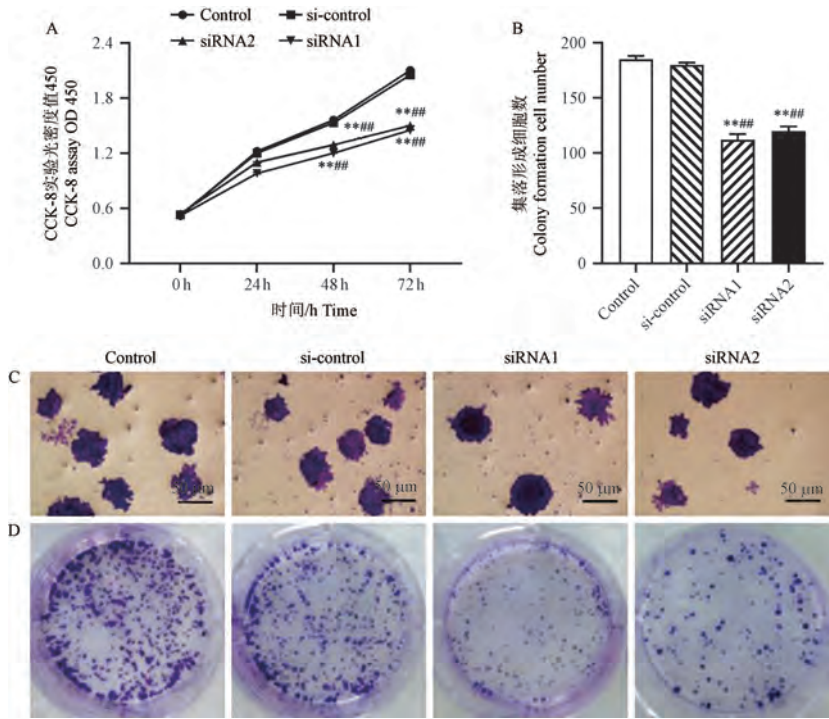


注:A:干扰 Gli2 表达后 Tca8113 细胞中 Gli2 的 mRNA 表达;B:干扰 Gli2 表达后 Tca8113 细胞中 Gli2 的蛋白表达(药物处理浓度 50 nmol/L);C:干扰 Gli2 表达后 Tca8113 细胞中 Gli2 的蛋白表达(药物处理浓度 100 nmol/L)。与 control 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 si-control 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 2 干扰 Gli2 表达后 Tca8113 细胞中 Gli2 的 mRNA 与蛋白表达

Note. A, mRNA expression of Gli2 in Tca8113 cells after interference with Gli2 expression. B, Protein expression of Gli2 in Tca8113 cells after interference with Gli2 expression (the drug treatment concentration is 50 nmol/L). C, Protein expression of Gli2 in Tca8113 cells after interference with Gli2 expression (the drug treatment concentration is 100 nmol/L). Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with si-control group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 2 mRNA and protein expression of Gli2 in Tca8113 cells after interference with Gli2 expression



注:A:Tca8113 细胞 CCK-8 增殖实验;B:Tca8113 细胞集落形成细胞数量;C:光镜下 Tca8113 细胞集落形成;D:相机拍摄 Tca8113 细胞集落形成。与 control 组相比, ** $P<0.01$;与 si-control 组相比, ## $P<0.01$ 。

图 3 干扰 Gli2 对口腔癌细胞增殖和生长的影响

Note. A, Tca8113 cell CCK-8 proliferation experiment. B, Tca8113 cell colony formation cell number. C, Tca8113 cell colony formation under light microscope. D, Tca8113 cell colony formation cell number taken by camera. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with si-control group, ## $P<0.01$.

Figure 3 Effect of interference with Gli2 on proliferation and growth of oral cancer cell

组和 si-control 组相比,Tca8113 细胞转染 24 h 后对其增殖能力无明显影响,干扰 Gli2 表达可显著抑制 Tca8113 细胞迁移($P<0.01$)。细胞侵袭实验结果同样证实,与 control 组和 si-control 组相比,干扰 Gli2 表达可显著抑制 Tca8113 细胞侵袭($P<0.01$)。以上研究表明 Gli2 在 OSCC 细胞的迁移和侵袭过程中发挥重要作用,干扰 Gli2 表达可显著抑制 Tca8113 细胞迁移和侵袭。

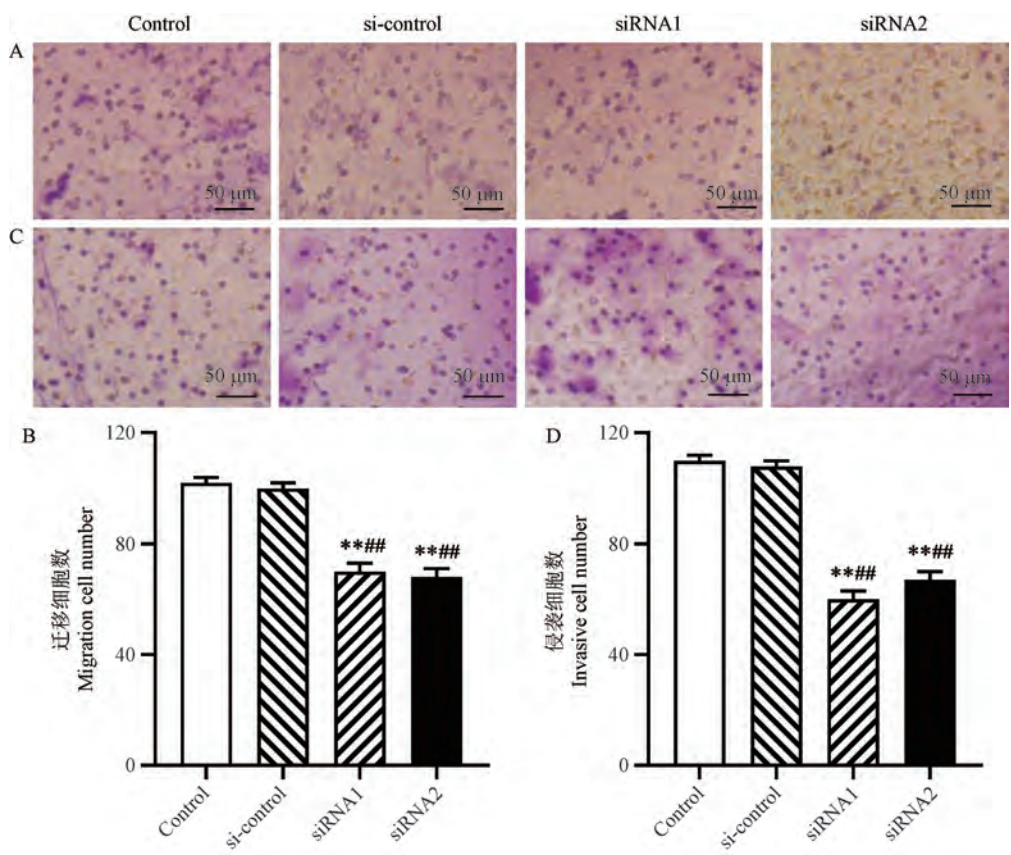
2.5 干扰 Gli2 对口腔癌细胞中 Hh 通路的影响

为验证 Gli2 在调控 Tca8113 细胞恶性增殖转移的潜在机制。干扰 Tca8113 细胞中 Gli2 表达后检测其对 Hh 通路相关基因的表达影响。图 5 结果表明,与 control 组和 si-control 组相比,干扰 Gli2 表达显著抑制 Tca8113 细胞中 Hh 通路关键因子 Ptch1、Gli1 与 Gli2 的 mRNA 表达($P<0.05$, $P<0.01$)。进一步通过 Western blot 检测干扰 Gli2 表达对 Hh 通路关键因子的蛋白表达影响,发现干扰 Gli2 表达也

可显著抑制 Shh、Ptch1、Gli1 与 Gli2 的蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$)。qRT-PCR 检测与 Western blot 结果保持一致,这表明 Gli2 在 Hh 通路活化中起重要作用。干扰 Gli2 表达可以抑制 Hh 通路关键因子的表达,从而有效阻止 Hh 通路持续活化,进而影响 Tca8113 细胞的生物学功能。

2.6 干扰 Gli2 对口腔癌细胞中 EMT 通路的影响

为进一步揭示 Gli2 调控 Tca8113 细胞恶性增殖转移的分子机制。本研究进一步通过干扰 Tca8113 细胞中 Gli2 表达,检测其对 EMT 通路关键因子 MMP2、MMP9、E-Cadherin 与 Vimentin 的 mRNA 与蛋白表达。图 6 结果表明,与 control 组和 si-control 组相比,干扰 Gli2 表达显著抑制 Tca8113 细胞中 MMP2、MMP9 与 Vimentin 的 mRNA 与蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$),但同时促进 E-Cadherin 的 mRNA 与蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$)。

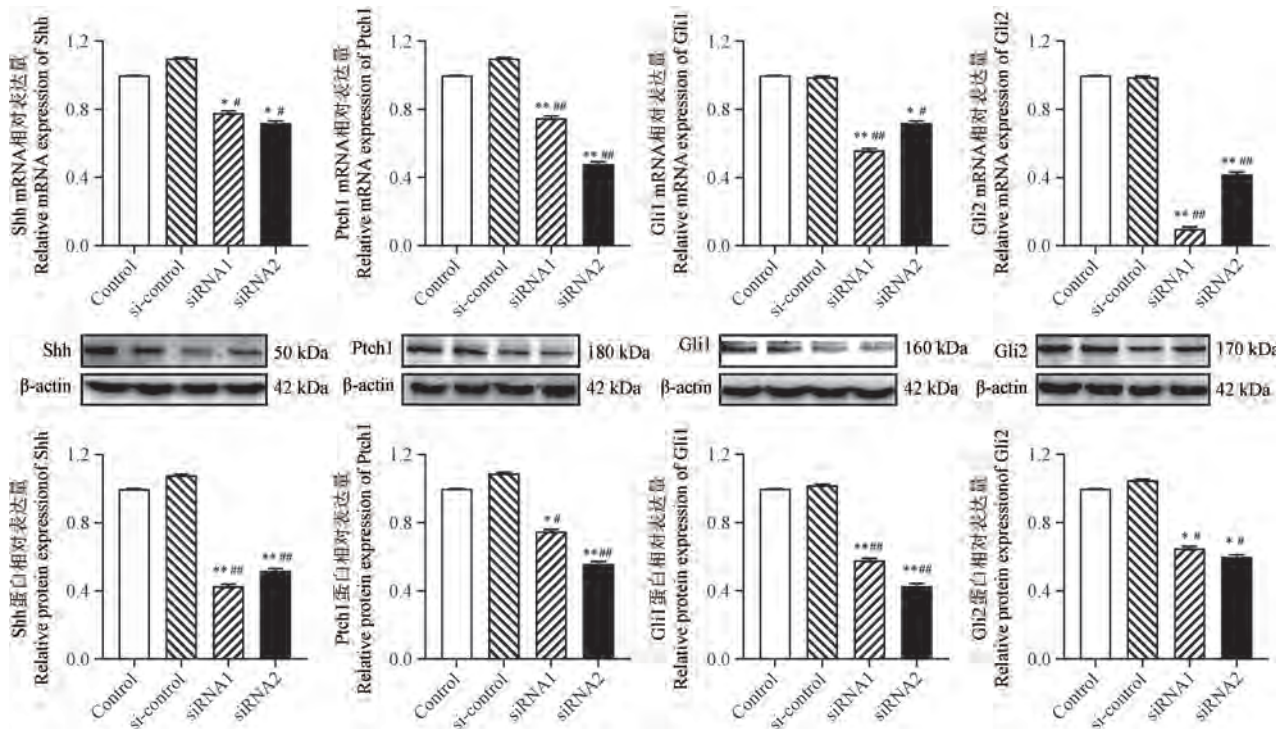


注:A/B:Tca8113 细胞迁移;C/D:Tca8113 细胞侵袭。与 control 组相比, ** $P<0.01$;与 si-control 组相比, ### $P<0.01$ 。

图 4 干扰 Gli2 对口腔癌细胞迁移和侵袭的影响($n=3$)

Note. A/B, Tca8113 cell migration. C/D, Tca8113 cell invasion. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with si-control group, ### $P<0.01$.

Figure 4 Effect of interference with Gli2 on migration and invasion of oral cancer cell

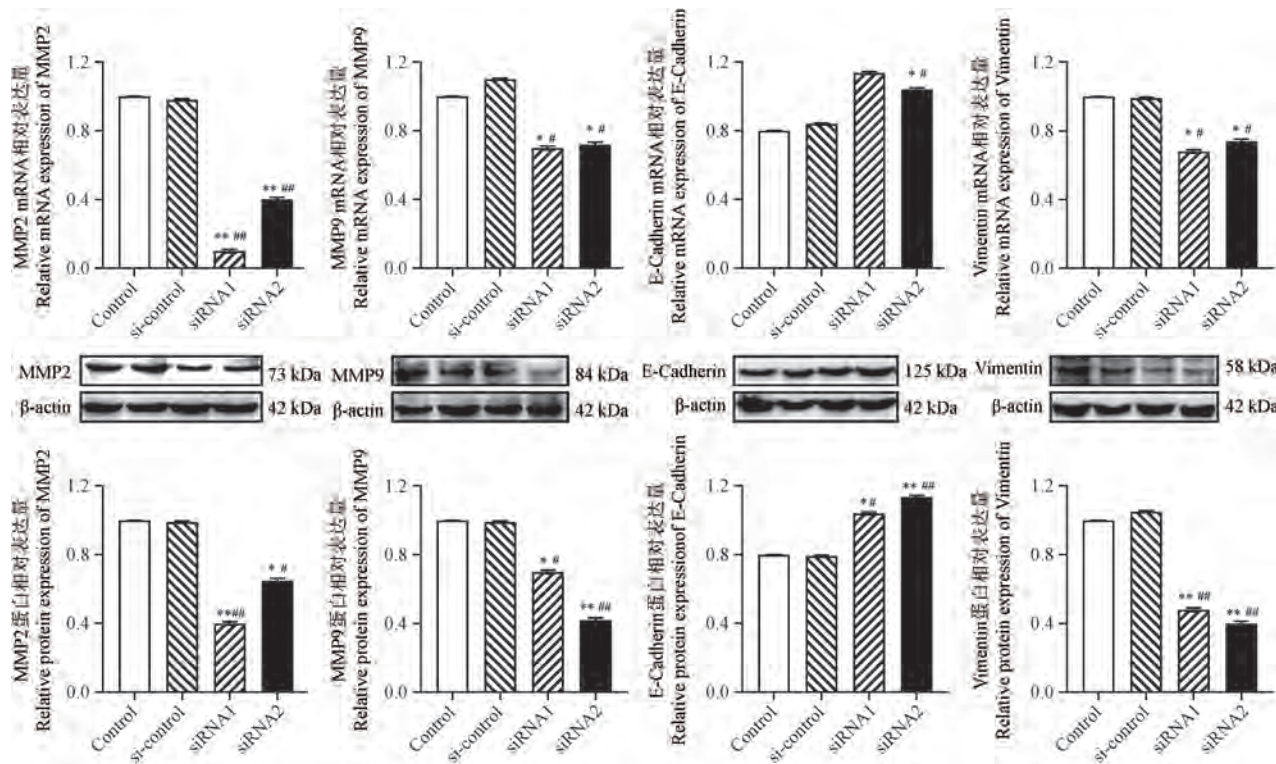


注:与 control 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 si-control 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 5 干扰 Gli2 对口腔癌细胞中 Hh 通路关键因子的表达影响

Note. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with si-control group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 5 Influence of Gli2 interference on the expression of key factors of Hh pathway in oral cancer cell



注:与 control 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 si-control 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 6 干扰 Gli2 对口腔癌细胞中 EMT 通路关键因子的表达影响

Note. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with si-control group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 6 Influence of Gli2 interference on the expression of key factors of EMT pathway in oral cancer cell

3 讨论

口腔是一种全球性疾病,尽管目前针对口腔癌的临床治疗已取得一定进展,但由于该病发病位置特殊,以及公众对口腔癌的重视度相对较低,导致多数患者就诊时已处于中晚期,这无疑增大了治疗难度^[15]。若能有效阻碍口腔癌早期迁移、侵袭及其他恶性生物学行为,将有望降低患者的死亡率。因此,迫切需要筛选口腔癌早期诊断与预后治疗标志物,为口腔癌临床治疗提供新思路。

Gli2 是 Hh 通路最重要的终末效应分子,其表达水平可直接反映 Hh 通路的激活状态^[16]。Gli2 可将细胞外信号传递到细胞内,直接作用于下游靶标,参与调控多种肿瘤的增殖、迁移、侵袭和 EMT 过程^[17]。本研究发现 Tca8113 细胞中 Gli2 的 mRNA 和蛋白表达显著升高,这表明在口腔癌细胞中 Gli2 被异常激活。采用 siRNA 干扰 Gli2 表达后发现,抑制 Gli2 表达可显著抑制 Tca8113 细胞的增殖、生长、迁移和侵袭。鉴于 Gli2 在 Hh 通路中发挥重要作用,推测 Gli2 可能通过调控 Tca8113 细胞中 Hh 通路的活化,进而影响细胞的增殖生长和迁移侵袭。因此,我们进一步检测了干扰 Gli2 表达对 Hh 通路关键因子表达的影响,发现干扰 Gli2 表达也可显著抑制 Shh、Ptc1、Gli1 与 Gli2 的 mRNA 与蛋白表达。这表明干扰 Gli2 表达可抑制 Hh 通路关键因子的表达,可有效阻止 Hh 通路持续活化,进而影响 Tca8113 细胞的生物学功能。

肿瘤细胞过度增殖及侵袭迁移能力增强与肿瘤细胞的 EMT 密切相关^[18]。EMT 是指经特定程序转化后的上皮细胞转变为间质表型细胞的过程,此过程极其复杂,涉及细胞之间黏附能力改变,细胞外基质的降解以及细胞运动能力的改变等^[19-20]。研究表明,EMT 可促进肿瘤细胞的转移和浸润,并增强肿瘤细胞对药物治疗及临床放化疗的耐受性,在肿瘤的恶化过程中起关键作用^[21-22]。E-钙粘蛋白(E-Cadherin)与波形蛋白(Vimentin)是上皮间质转化相关蛋白,基质金属蛋白酶(MMPs)家族关键成员 MMP2 和 MMP9 被认为是肿瘤侵袭转移的潜在生物标志物,也是 EMT 通路中的关键调控因子^[23-24]。为阐明 Hh/Gli2 通路调控口腔癌细胞恶性增殖转移的具体机制,进一步检测了干扰 Gli2 表达对 EMT 通路关键因子表达的影响,发现干扰 Gli2 表达显著抑制 Tca8113 细胞中 MMP2、MMP9 与

Vimentin 的 mRNA 与蛋白表达,但同时促进 E-Cadherin 的 mRNA 与蛋白表达。

综上所述,Gli2 作为癌基因参与调控 Tca8113 细胞的发生发展,抑制 Gli2 表达能够有效阻碍 Hh 通路的持续异常激活,并影响 EMT 通路关键组分的表达,进而抑制 Tca8113 细胞的增殖、生长、迁移和侵袭,其有望作为临床治疗口腔癌的新型靶点。但本研究仅仅在细胞水平探究 Gli2 对口腔癌细胞发生发展的影响,因体内外肿瘤细胞生活的环境存在差异,仅通过体外细胞实验获得的结果存在一定局限性。因此,下一步计划进行体内原位瘤实验深入揭示口腔癌发生发展中 Gli2 的作用机制。同时,筛选针对 Gli2 位点的靶向治疗药物。为口腔癌临床治疗提供有效的早期诊断治疗标志物及临床干预治疗靶点。

参考文献:

- [1] HAMILTON K L, SHEEHAN S A, RETZBACH E P, et al. Effects of *Maackia amurensis* seed lectin (MASL) on oral squamous cell carcinoma (OSCC) gene expression and transcriptional signaling pathways [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2021, 147(2): 445-457.
- [2] PITUSKIN E. Cancer as a new chronic disease: Oncology nursing in the 21st Century [J]. Can Oncol Nurs J, 2022, 32(1): 87-92.
- [3] GOVINDARASU M, PRATHAP L, GOVINDASAMY R. Histone deacetylase inhibitors regulate the oral cancer via PI3K/AKT signaling pathway [J]. Oral Oncol, 2022, 135: 106221.
- [4] SKODA A M, SIMOVIC D, KARIN V, et al. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: a comprehensive review [J]. Bosn J Basic Med Sci, 2018, 18(1): 8-20.
- [5] BRECHBIEL J, MILLER-MOSLIN K, ADJEI A A. Crosstalk between hedgehog and other signaling pathways as a basis for combination therapies in cancer [J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(6): 750-759.
- [6] FAROOQI A, SHU C W, HUANG H W, et al. TRAIL, Wnt, sonic hedgehog, TGFβ, and miRNA signalings are potential targets for oral cancer therapy [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(7): 1523.
- [7] SALARITABAR A, BERINDAN - NEAGOE I, DARVISH B, et al. Targeting Hedgehog signaling pathway: paving the road for cancer therapy [J]. Pharmacol Res, 2019, 141: 466-480.
- [8] JIANG J. Hedgehog signaling mechanism and role in cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 85: 107-122.
- [9] YANG H L, YAN L, SUN K, et al. lncRNA BCAR4 increases viability, invasion, and migration of non-small cell lung cancer cells by targeting glioma-associated oncogene 2 (GLI2) [J]. Oncol Res, 2019, 27(3): 359-369.
- [10] MA J, ZHOU C, CHEN X. miR-636 inhibits EMT, cell

proliferation and cell cycle of ovarian cancer by directly targeting transcription factor Gli2 involved in Hedgehog pathway [J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 64.

[11] HE Y, HUANG H, JIN L, et al. CircZNF609 enhances hepatocellular carcinoma cell proliferation, metastasis, and stemness by activating the Hedgehog pathway through the regulation of miR-15a-5p/15b-5p and GLI2 expressions [J]. Cell Death Dis, 2020, 11: 358.

[12] HUANG D, WANG Y, XU L, et al. GLI2 promotes cell proliferation and migration through transcriptional activation of ARHGEF16 in human glioma cells [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 247.

[13] ZHANG Y, WU T, WANG Y, et al. Reciprocal FGF19-GLI2 signaling induces epithelial-to-mesenchymal transition to promote lung squamous cell carcinoma metastasis [J]. Cell Oncol (Dordr), 2023, 46(2): 437-450.

[14] YAN M, WANG L, ZUO H, et al. HH/GLI signalling as a new therapeutic target for patients with oral squamous cell carcinoma [J]. Oral Oncol, 2011, 47(6): 504-509.

[15] LI R, XIAO L, GONG T, et al. Role of oral microbiome in oral oncogenesis, tumor progression, and metastasis [J]. Mol Oral Microbiol, 2023, 38(1): 9-22.

[16] WANG Q, WEI X, HU L, et al. Hedgehog-Gli2 signaling promotes chemoresistance in ovarian cancer cells by regulating MDRI [J]. Front Oncol, 2022, 11: 794959.

[17] PANTAZI E, GEMENETZIDIS E, TEH M T, et al. GLI2 is a regulator of β -catenin and is associated with loss of E-cadherin, cell invasiveness, and long-term epidermal regeneration [J]. J Invest Dermatol, 2017, 137(8): 1719-1730.

[18] SCHEAU C, BADARAU I, COSTACHE R, et al. The role of matrix metalloproteinases in the epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma [J]. Anal Cell Pathol (Amst), 2019, 2019: 9423907.

[19] BAKIR B, CHIARELLA A M, PITARRESI J R, et al. EMT, MET, plasticity, and tumor metastasis [J]. Trends Cell Biol, 2020, 30(10): 764-776.

[20] SHI Q, JI T, TANG X, et al. The role of tumor-platelet interplay and micro tumor thrombi during hematogenous tumor metastasis [J]. Cell Oncol, 2023, 46(3): 521-532.

[21] 柳森森, 毛玉宁, 张彩勤, 等. MMP2 在肿瘤侵袭和转移中的调控机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 123-128.

LIU S S, MAO Y N, ZHANG C Q, et al. The role of MMP2 in tumor invasion and metastasis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 123-128.

[22] LING Z, CHENG B, TAO X. Epithelial-to-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma: challenges and opportunities [J]. Int J Cancer, 2021, 148(7): 1548-1561.

[23] NILAND S, RISCANEVO A X, EBLE J A. Matrix metalloproteinases shape the tumor microenvironment in cancer progression [J]. Int J Mol Sci, 2021, 23(1): 146.

[24] 肖兰飞, 高继萍, 闫晓如, 等. 槲皮素对口腔癌 Tca-8113 细胞增殖、迁移和侵袭的影响及 PI3K/AKT 信号通路的调控作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(6): 30-34.

XIAO L F, GAO J P, YAN X R, et al. Effect of quercetin on cell proliferation, migration, and invasion and PI3K/AKT signaling pathway regulation in the oral cancer cell line Tca-8113 [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(6): 30-34.

[收稿日期] 2023-06-26

李彦红,修晶辉,周澧,等. 刹车片颗粒及其主要成分硫化锑呼吸暴露对小鼠健康危害研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34 (3): 10-17.

Li YH, Xiu JH, Zhou L, et al. Experimental study on the health hazards of respiratory exposure to brake pad particles and their main component antimony sulfide in mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 10-17.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.002

刹车片颗粒及其主要成分硫化锑呼吸暴露对小鼠健康危害研究

李彦红,修晶辉,周 澧,郭建国*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,国家中医药管理局人类动物模型三级实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 研究刹车制动来源颗粒物对机体的潜在危害。**方法** 研磨刹车片颗粒、硫化锑颗粒,小鼠通过气管灌注暴露 1 个月后,观察肺、心脏、肝等内脏器官病理改变,同时用流式细胞术分析外周血巨噬细胞和自然调节 T 淋巴细胞(regulatory T cell, Treg)的变化。**结果** 刹车片颗粒及硫化锑颗粒暴露小鼠肺泡壁外源物质沉积,血管周围出现明显的炎症细胞浸润并随着暴露浓度的增加而加重,同时可出现心脏血管炎症和微血栓以及肝细胞肿胀等病理改变;Treg 细胞减少,硫化锑组和低剂量刹车片组巨噬细胞增加,同时 M2 型巨噬细胞比例下调。**结论** 刹车片颗粒及其成分硫化锑颗粒暴露对小鼠肺、心脏、肝等脏器具有不同程度的毒性作用,并对免疫系统造成了影响,提示刹车来源的空气污染存在潜在健康危害。

【关键词】 刹车片颗粒;硫化锑颗粒;PM_{2.5};炎症;免疫应答

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0010-08

Experimental study on the health hazards of respiratory exposure to brake pad particles and their main component antimony sulfide in mice

LI Yanhong, XIU Jinghui, ZHOU Li, GUO Jianguo*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Center of Comparative Medicine, Peking Union Medical College; NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To study the potential harmful effects of brake-pad sourced particles. **Methods** Grind the brake pad particles or antimony sulfide particles. Mice were exposed brake pad or antimony sulfide particles by tracheal perfusion for 1 month. We observed pathological changes to the lungs, heart, and liver, and analyzed changes in peripheral blood macrophages and regulatory T cells (Tregs) via flow cytometry. **Results** After exposure, the deposition of foreign substances in the alveolar wall of mice was seen, with the obvious infiltration of inflammatory cells around blood vessels, which worsened with increasing particle concentration. Pathological changes, such as vascular inflammation and

【基金项目】国家重点研发计划项目(2022YFF0710803,2021YFF0703400);国家自然科学基金面上项目(82070103);中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2021-I2M-1-036,2018-I2M-1-001);中国医学科学院一院基科费—基地平台(2023-PT180-01)。

【作者简介】李彦红(1982—),女,硕士,副主任技师,研究方向:病理学与病理生理学。E-mail:liyanhong8408@163.com

【通信作者】郭建国(1983—),男,博士,副研究员,研究方向:环境暴露与机体健康。E-mail:guojianguo@cnilas.org

microthrombosis in the heart and hepatocyte swelling in the liver, were observed. Treg cells in peripheral blood decreased and macrophages increased in the antimony sulfide group and low-dose brake pad particles group, while the proportion of M2-type macrophages decreased, in the antimony sulfide group and low-dose brake pad particle group. **Conclusions** Exposure to brake pad particles and their component antimony sulfide has varying degrees of toxic effects on the lung, heart, and liver of mice and has an impact on the immune system, indicating the potential health hazards of brake-pad-derived air pollution.

[Keywords] brake pad particles; antimony sulfide; $PM_{2.5}$; inflammation; immune response

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

大气颗粒物对城市空气环境造成了严重的污染,并且严重影响社会群体的身体健康。长期暴露在大气颗粒物污染下可导致肺部病变。大气颗粒物是大气中存在的各种固态和液态颗粒状物质的总称,包括总悬浮颗粒物(粒径 $\leq 100\ \mu m$),其中粒径 $>10\ \mu m$ 的颗粒,几乎都可被鼻腔和口咽阻拦,而粒径 $\leq 10\ \mu m$ 的颗粒物是可吸入颗粒物,也称作 PM_{10} (Particulate Matter 10),可通过呼吸道进入人体。在 PM_{10} 中,粒径 $\leq 2.5\ \mu m$ 的颗粒为 $PM_{2.5}$,约占 PM_{10} 的60%~70%,形状多样且不规则,内含铅、汞等重金属和其他毒性或致癌物质,可以吸入肺泡中,损害人类健康,其中 $0.3\sim 2\ \mu m$ 的粒子几乎全部沉积于肺泡而不能呼出,进而进入血液循环。这些颗粒有自然产生,也有人为因素形成^[1-3]。北京市城区 $PM_{2.5}$ 主要来源于二次无机气溶胶、机动车、扬尘和扬尘、工业排放、燃煤和生物质燃烧等,其中机动车来源成分占较大比重(22.7%),轮胎和制动刹车片磨损颗粒是交通颗粒物的重要来源^[4-5]。

大量的研究表明短期接触 $PM_{2.5}$ 与哮喘、肺功能障碍、肺癌、心脏病、中风和其他身心疾病密切相关^[6-8]。 $PM_{2.5}$ 进入呼吸道深部与肺组织接触,通过刺激和作用于肺泡巨噬细胞、II型肺泡上皮细胞,诱发炎症导致呼吸道局部免疫力下降和肺组织纤维化^[9]。自然调节T淋巴细胞(regulatory T cell, Treg)具有免疫调节作用,可抑制过度炎症反应,形成自身和非自身免疫耐受,在过敏、自身免疫和器官移植中发挥关键作用^[10]。Treg细胞的耗竭可导致广泛的自身免疫和/或炎症性疾病^[11]。巨噬细胞在固有免疫和适应性免疫反应中具有重要的作用,根据功能及炎症因子分泌水平可分为经典激活M1型巨噬细胞和交替激活M2型巨噬细胞^[12-13]。M1型巨噬细胞表现出强的促炎及抗原呈递能力,而M2型巨噬细胞则表现出抗炎、促进伤口愈合和组织修复的作用^[14]。

本研究通过小鼠气管滴注刹车片研磨细颗粒

物及其主要成分硫化锑(antimony sulfide, Sb_2S_3)颗粒,模拟交通制动来源的细颗粒物暴露空气污染,观察其对组织器官损伤的影响,并从免疫调节的角度分析Treg细胞、巨噬细胞与组织病理改变和炎症反应的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本研究采用8周龄C57BL/6雄性小鼠,体重约18~22 g,共56只,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2019-0008]。实验小鼠为SPF级,饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所小鼠SPF屏障设施[SYXK(京)2018-0019],动物房温度范围(16~26) $^{\circ}C$,相对湿度40%~60%,明暗周期12 h/12 h,动物自由摄食饮水。本研究中动物的使用及其相关操作,经过中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用和管理委员会批准(IACUC-QC2016001)。所有的动物实验操作过程严格按照实验动物使用的3R原则和动物伦理的相关规定进行,给予实验动物人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

刹车片(0986AB3826, Bosch)购自博世汽车部件公司; Sb_2S_3 (#244562, Sigma-Aldrich)购自Sigma-Aldrich公司;HE染色试剂盒(C0105 S, Beyotime)购自上海碧云天生物技术有限公司;异氟烷(I-0147068, Heowns)购自天津希恩思奥普德科技有限公司;红细胞裂解液(R1010, Solarbio)购自北京索莱宝科技有限公司;流式细胞染色抗体PE-anti-Foxp3(#118904, Biolegen)、APC-anti-CD25(#162105, Biolegen)、FITC-anti-CD4(#100406, Biolegen)、FITC-anti-F4/80(#123108, Biolegen)、APC/cy7-anti-CD11b(#101226, Biolegen)、CD206(#141706, Biolegen)购自Biolegend公司。

球磨机(DECO-PBM-V-2 L, 德科, 中国);粒度分析仪(Mastersizer 3000, Malvern, 英国);小动物麻

醉机(R520IP,瑞沃德,中国);组织脱水机(ASP300 S,Leica,德国);石蜡包埋机(ASP300 S,Leica,德国);石蜡切片机(SM2500,Leica,德国);显微镜(DM4B,Leica,德国);流式细胞仪(FACSAria™ III, BD,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 颗粒物制备

打碎机粗磨刹车片,再用球磨机研磨刹车片颗粒至 $2.5\ \mu\text{m}$ 粒径,收集后用生理盐水稀释备用。 Sb_2S_3 颗粒同样研磨至粒径 $2.5\ \mu\text{m}$ 用生理盐水稀释后备用,颗粒粒径大小通过粒度分析仪进行检测。

1.3.2 动物分组和颗粒物暴露

将小鼠随机分为刹车片组(低、中、高,每周每只分别滴注 $8.4\ \mu\text{g}$ 、 $12.5\ \mu\text{g}$ 、 $16.7\ \mu\text{g}$)、 Sb_2S_3 组(低、中、高,每周每只分别滴注 $1.2\ \mu\text{g}$ 、 $1.8\ \mu\text{g}$ 、 $3\ \mu\text{g}$)和对照组,每组 8 只小鼠。剂量根据雾霾中颗粒物的分级标准和国家环境空气质量指数(AQI)技术规定以及 $\text{PM}_{2.5}$ 中锑的含量和刹车片中锑的含量计算出相对应的等效剂量,分别对应 $200\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ (重度污染)、 $300\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ (严重污染)和 $500\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ (极重污染)的 $\text{PM}_{2.5}$ 浓度^[15-17]。对照组给予 0.9%生理盐水气管滴注,干预组给予刹车片颗粒物或 Sb_2S_3 颗粒物悬液气管滴注。小鼠异氟烷麻醉后,将研磨好的刹车片细颗粒和 Sb_2S_3 细颗粒经生理盐水稀释成悬液后取 $25\ \mu\text{L}$ 通过气管滴注暴露给小鼠,每周滴注 2 次,暴露 4 周^[17]。实验结束后麻醉取材,观察小鼠肺、心脏和肝病理改变。

1.3.3 组织病理学检测

小鼠异氟烷麻醉后下腔静脉抽取抗凝血用于流式细胞分析,解剖取材肺、心脏和肝,10%福尔马林溶液固定,石蜡包埋切片,脱水,经苏木素染色,盐酸酒精分化,氨水返蓝后伊红染色,脱水,透明,封片,观察组织病理改变。

1.3.4 流式细胞检测

全血 EDTA 抗凝,红细胞裂解液裂解红细胞,洗涤重悬,加入荧光标记抗体染色,上机检测 Treg 细胞和巨噬细胞水平。Treg 细胞检测为 $\text{CD4}^+//\text{CD25}^+//\text{Foxp3}^+$ 细胞, $\text{M}\phi$ 巨噬细胞检测为 $\text{CD11b}^+//\text{F4/80}^+$ 细胞, M2 型巨噬细胞检测为 $\text{CD11b}^+//\text{F4/80}^+//\text{CD206}^+$ 细胞。

1.4 统计学方法

实验数据采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析和绘图,以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组

间比较采用双因素方差分析,两两比较应用 t 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 研磨刹车片颗粒及 Sb_2S_3 粒径分析

研磨不同时间(4 h、12 h、16 h)刹车片颗粒粒径通过粒度分析仪检测,结果发现研磨 16 h 后 93.73%的颗粒粒径 $<2.5\ \mu\text{m}$ (图 1A~1D)。市售 Sb_2S_3 颗粒在研磨 4 h 后 94.74%的颗粒粒径 $<2.5\ \mu\text{m}$ (图 1E、1F)。

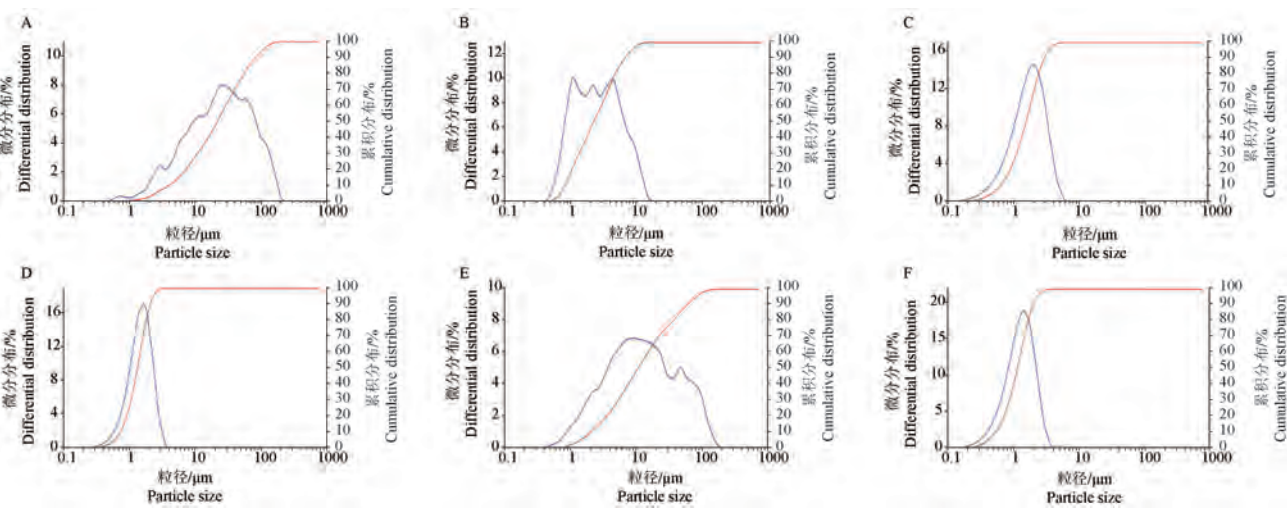
2.2 小鼠暴露于不同剂量刹车片颗粒及 Sb_2S_3 颗粒 1 个月后的组织病理改变

小鼠不同剂量刹车片颗粒暴露 1 个月后病理分析显示,对照组小鼠肺、心脏、肝组织病理未见异常; $8.4\ \mu\text{g}$ 低剂量组肺泡壁出现轻微外源性物质沉积,血管周围轻微的炎性细胞浸润;心脏未观察到明显异常;肝细胞肿胀。 $12.5\ \mu\text{g}$ 中剂量组肺泡壁出现轻微的外源性物质沉积,血管周围轻微的炎性细胞浸润;心血管间质轻微炎性细胞浸润,心血管血栓,肌纤维变性;肝细胞肿胀,局灶性炎性细胞浸润。 $16.7\ \mu\text{g}$ 高剂量组局部肺泡壁增厚,肺泡融合,肺泡壁外源性物质沉积,巨噬细胞增多;心血管周围炎性细胞浸润,血管微血栓;肝细胞肿胀。(图 2)

小鼠不同剂量 Sb_2S_3 暴露 1 个月后病理分析显示,对照组小鼠肺、心脏、肝组织病理未见异常; $1.2\ \mu\text{g}$ 低剂量组肺泡壁散在的炎性细胞浸润;心脏未观察到明显异常;肝细胞肿胀,胞浆内空泡形成。 $1.8\ \mu\text{g}$ 中剂量组肺泡壁和血管壁炎性细胞浸润;心脏未观察到明显异常;肝细胞肿胀,局灶性炎性细胞浸润。 $3\ \mu\text{g}$ 高剂量组肺泡壁轻度增厚,炎性细胞浸润,毛细血管扩张充血;心脏血管可见微血栓;肝细胞肿胀,局灶性炎性细胞浸润。(图 3)

2.3 不同剂量刹车片或 Sb_2S_3 颗粒暴露 1 个月后小鼠外周血 Treg 和巨噬细胞分析

不同剂量刹车片颗粒或 Sb_2S_3 颗粒暴露后,与对照组相比,外周血中 Treg 细胞均减少($P<0.05$),但未显示出明显的剂量依赖性。同时,与对照组相比, Sb_2S_3 低、中、高剂量干预后巨噬细胞水平均上调($P<0.05$),而刹车片干预仅低剂量组巨噬细胞水平上调($P<0.05$),同时进一步检测 CD206^+ 巨噬细胞显示所有刹车片或 Sb_2S_3 干预组的 M2 型巨噬细胞均下调($P<0.05$),提示持续的免疫活化和免疫损伤。(图 4)

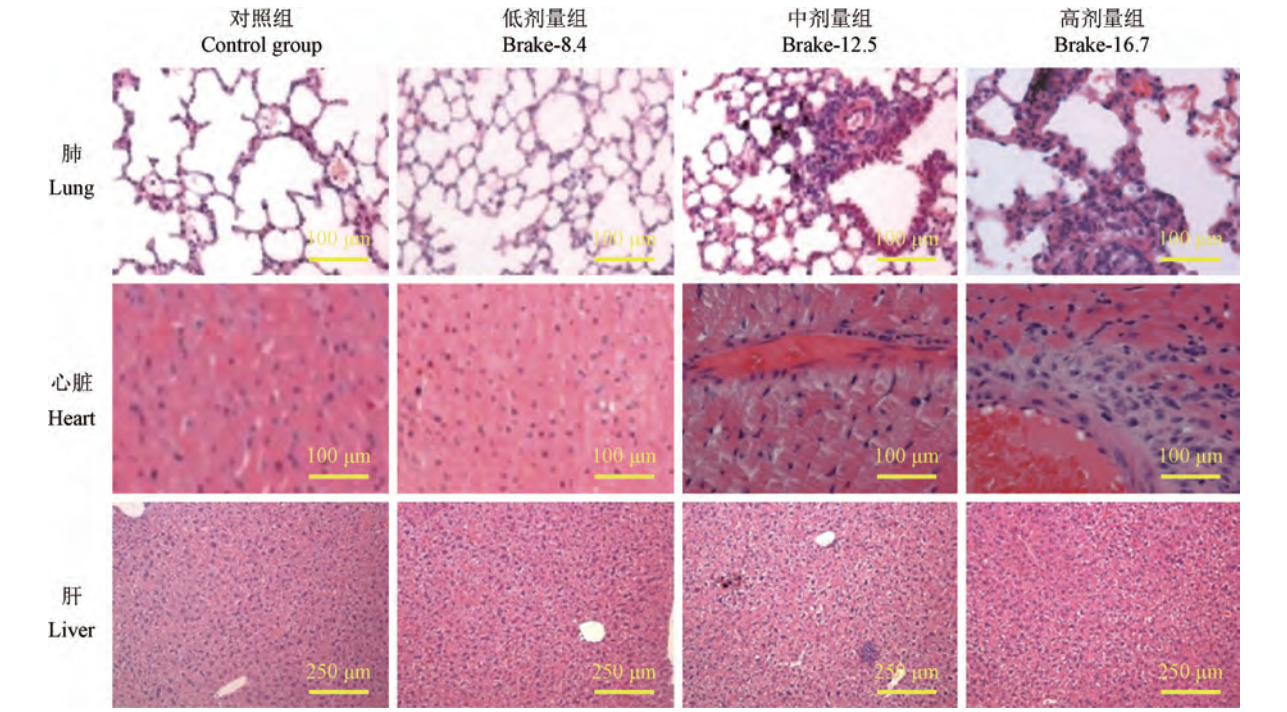


注: A:粗磨后刹车片颗粒粒径大小在 0.527~250 μm 之间,大多数粒径在 10 μm 以上;B:研磨 4 h 后刹车片颗粒粒径在 0.527~20 μm 之间;C:研磨 12 h 后刹车片颗粒粒径在 0.127~10 μm 之间;D:研磨 16 h 后刹车片颗粒粒径在 0.127~3.527 μm 之间,其中 93.73% 的颗粒粒径 < 2.5 μm;E:购买的 Sb₂S₃ 颗粒粒径在 0.127~200 μm 之间,多数粒径>10 μm;F:研磨 4 h 后 Sb₂S₃ 颗粒粒径在 0.127~2.781 μm 之间,其中 94.74% 的颗粒粒径<2.5 μm。

图 1 刹车片颗粒及 Sb₂S₃ 颗粒粒径分析

Note. A, Particles size of the brake pads after rough grinding was between 0.527~250 μm, with most particles being larger than 10 μm. B, After grinding for 4 h, the particles size of the brake pad was 0.527~20 μm. C, After 12 hours of grinding, the particles size of the brake pad was 0.127~10 μm. D, After 16 h of grinding, the particles size of the brake pad was 0.127~3.527 μm, with most particles being less than 2.5 μm. E, Particles size of Sb₂S₃ purchased was 0.127~200 μm, with most particles being larger than 10 μm. F, After 4 h of grinding, the particle size of Sb₂S₃ was 0.127~2.781 μm, with 94.74% particles being less than 2.5 μm.

Figure 1 Particle size analysis of brake pad particles and Sb₂S₃ particles

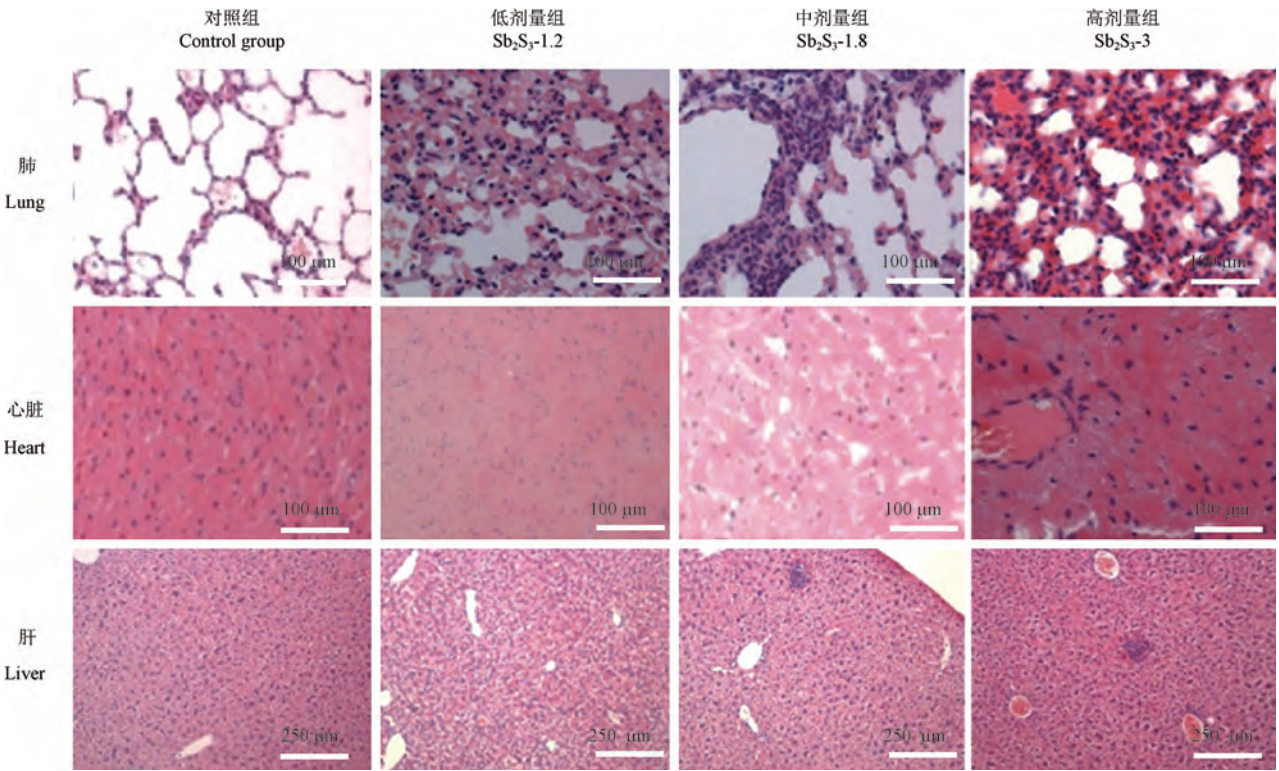


注:小鼠暴露不同剂量刹车片颗粒 1 个月后肺、心脏、肝典型病理改变。

图 2 小鼠暴露不同剂量刹车片颗粒 1 个月后病理改变

Note. Typical pathological changes in the lungs, heart, and liver of mice exposed to different doses of brake pad particles for one month.

Figure 2 Pathological changes in mice exposed to different doses of brake pad particles for 1 month

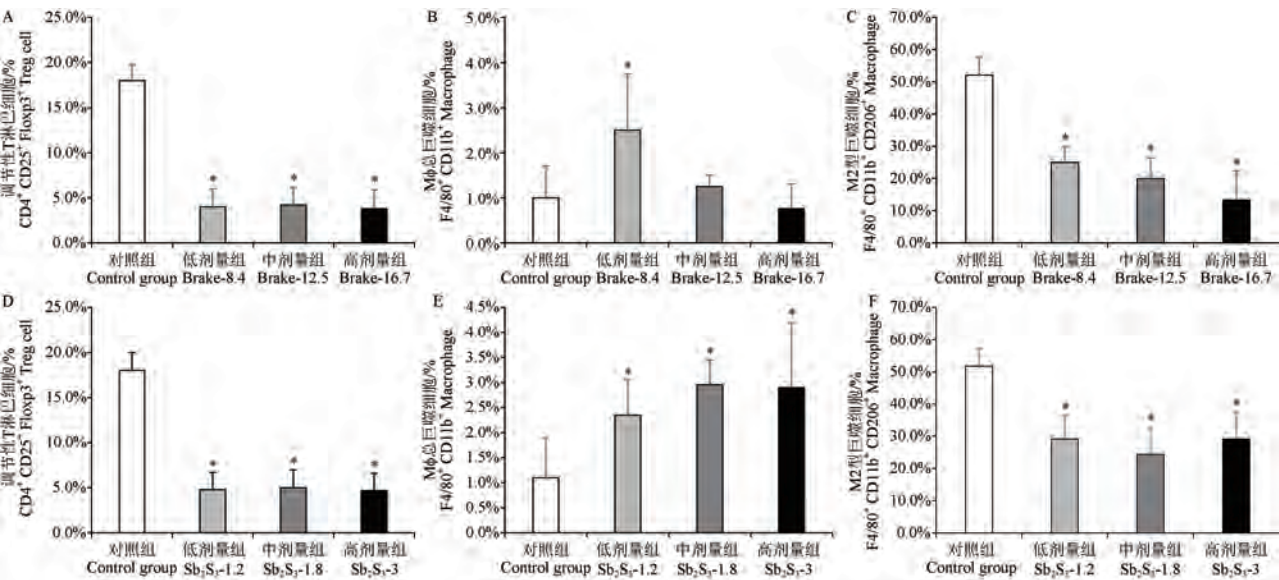


注:小鼠暴露不同剂量 Sb_2S_3 颗粒 1 个月 后肺、心脏、肝典型病理改变。

图 3 小鼠暴露不同剂量 Sb_2S_3 颗粒 1 个月 后病理改变

Note. Typical pathological changes in the lungs, heart, and liver of mice exposed to different doses of brake pad particles for one month.

Figure 3 Pathological changes in mice exposed to different doses of Sb_2S_3 particles for one month



注:A~C:不同剂量刹车片颗粒暴露 1 个月 后外周血 Treg 和巨噬细胞流式分析;D~F:不同剂量 Sb_2S_3 颗粒暴露 1 个月 后外周血 Treg 和巨噬细胞流式分析。与对照组相比, * $P<0.05$ 。

图 4 外周血 Treg 和巨噬细胞流式细胞分析

Note. A~C, Flow cytometry analysis of Treg and macrophages in peripheral blood after 1 month of exposure to different doses of brake pad particles. D~F, Peripheral blood Treg and macrophage flow cytometry analysis after 1 month of exposure to different doses of Sb_2S_3 particles. Compared with the control group, * $P<0.05$.

Figure 4 Flow cytometry analysis of Treg and macrophages in peripheral blood

3 讨论

随着电动汽车的普及和燃烧控制及尾气排放处理系统的技术升级,非尾气来源颗粒在大气颗粒物污染中的比重稳步增长。其中,制动磨损是交通来源颗粒污染的重要来源^[5],评估其对人肺细胞的潜在毒性风险十分重要。目前,关于空气中制动磨损颗粒对机体的影响研究尚少^[18]。据报道,由交通工具制动产生的 PM_{2.5} 增加了室上性早搏的频率,并引发了健康青年男性促炎和促血栓反应^[19]。在细胞模型中,刹车颗粒暴露会加剧炎症反应并损害巨噬细胞的吞噬作用^[20]。此外,体外研究显示刹车磨损纳米颗粒不产生明显毒性和炎症,但可增加粘液的分泌并影响气道上皮细胞的损伤修复^[21]。在动物研究中,一项比较不同来源 PM_{2.5} 毒性的小鼠吸入暴露急性实验显示,包括刹车来源在内的不同来源 PM_{2.5} 短期暴露均具有诱发炎症的潜能,但未观察到明显的细胞毒性和氧化应激,同时不同类型刹车片的成分差异可影响颗粒的毒性效应^[22]。刹车材料中润滑剂材料影响刹车衬里的磨损特性,占据刹车衬里质量的 5%~29%^[23]。在刹车片润滑剂材料中,金属锑(Sb)是其中的一种主要成分,约占刹车制动衬片约 1%~5% 的含量,其形式为辉石(Sb₂S₃),用作润滑剂可以有效改善摩擦稳定性^[23]。制动磨损排放的 Sb 被认为是潜在的空气重金属污染重要来源。长期吸入金属锑和氧化锑烟尘可引起肺功能和结构变化,并可导致锑尘肺病^[24-25]。在动物实验中,大、小鼠锑尘暴露可导致明显的肺毒性和纤维化病变,并增加致癌风险^[26-27]。这些研究中,锑尘多为氧化锑颗粒,而硫化锑颗粒毒性研究少见报道。目前,刹车磨损颗粒长期暴露对健康的危害尚未见动物实验研究报道,在本研究中,我们使用研磨后的刹车片及其主要成分 Sb₂S₃ 颗粒,通过气管滴注暴露于小鼠,观察其对小鼠肺、心脏、肝等组织病理的影响。

研究发现刹车片颗粒及 Sb₂S₃ 颗粒暴露小鼠的肺、心脏、肝等都出现了血管相关的炎症性病变,并随着浓度的增加病变程度加重,而其他组织器官如脾、肾、小肠、脑等未观察到明显的病理改变(结果未展示)。流式细胞分析显示不同剂量刹车片和 Sb₂S₃ 颗粒暴露 1 个月后外周血中抑制炎症的 Treg 细胞减少,巨噬细胞比例增加而 M2 型巨噬细胞比例降低。Treg 细胞对机体的免疫反应起到负调节

作用,在感染、代谢性疾病、自身免疫性疾病、组织修复和肿瘤中扮演重要角色^[28-29]。本研究中刹车片和 Sb₂S₃ 暴露小鼠 Treg 细胞减少,炎性细胞浸润增加,提示免疫抑制反应减弱和持续的免疫损伤。单核-巨噬细胞是免疫系统的重要组成部分,M1/M2 型巨噬细胞极化平衡决定着组织在炎症或损伤中的命运^[30]。当感染、刺激或炎症发生时巨噬细胞首先表现出 M1 表型,调动免疫反应清除有害刺激。但是,M1 期持续激活可造成组织损伤,在炎症后期或组织修复阶段,巨噬细胞可转化为 M2 型极化,分泌 IL-10 等抑制炎症,有助于组织修复和重塑^[30]。在本研究中,刹车片和 Sb₂S₃ 颗粒暴露后,外周血巨噬细胞增加而 M2 型巨噬细胞比例降低,提示刹车片和 Sb₂S₃ 颗粒暴露产生持续的有害刺激源促使机体募集和活化巨噬细胞吞噬有害颗粒物。Treg 可以通过分泌 IL-10 等诱导巨噬细胞向 M2 型转化,暴露后 Treg 细胞减少可能是 M2 型抗炎巨噬细胞比例降低的重要原因,并由此导致持续的炎症反应和免疫损伤。刹车片和 Sb₂S₃ 颗粒暴露主要沉积于肺组织,在小鼠心脏、肝器官中未发现受试物颗粒。Sb 具有肝和心脏毒性,吸入 Sb₂S₃ 粉尘可导致多种动物出现心肌退行性病变和心电图异常,而腹腔注射锑剂后,实验动物可出现体重下降和肝、肾损伤^[31]。同时研究显示 Sb 以及铜(Cu)、砷(As)、锡(Sn)和钨(W)等无机组分可能是 PM_{2.5} 中诱导脂肪细胞变性的关键毒性组分^[32]。这些研究提示刹车片和 Sb₂S₃ 颗粒暴露引起的心脏和肝病理改变可能和 Sb 的累积毒性有关。同时肺部引发的炎症因子进入外周循环引起的系统炎症反应也可能是导致心脏和肝发生血管炎症和血栓的重要原因。

本研究表明刹车片颗粒及其成分 Sb₂S₃ 颗粒暴露可对小鼠肺、心脏、肝造成不同程度的毒性损害,并降低 Treg 细胞水平,可能与 M2 型巨噬细胞转化受阻和持续的免疫损伤有关。制动刹车来源的颗粒污染对机体健康的影响不容忽视,本研究的初步结论为预防和关注刹车制动污染提供了理论基础,其毒性效应及应答机制尚需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 李杏茹,白羽,陈曦,等. 北京冬季重污染过程大气细颗粒物化学组成特征及来源分析[J]. 环境化学, 2018, 37(11): 2397-2409.
- LI X R, BAI Y, CHEN X, et al. Chemical composition and source apportionment of PM_{2.5} during winter in Beijing [J].

- Environ Chem, 2018, 37(11): 2397-2409.
- [2] 我国大气细颗粒物污染的急性健康风险及防治建议专家共识编写组, 中华预防医学会环境卫生分会, 中华医学会公共卫生分会, 等. 我国大气细颗粒物污染的急性健康风险及防治建议 [J]. 中华医学杂志, 2022, 8(18): 1341-1350.
- Expert Consensus Writing Group on Acute Health Risks of Atmospheric Fine Particulate Matter Pollution and Recommendations for Prevention and Control in China, Chinese Society of Preventive Medicine, Environmental Health Branch, Chinese Medical Association, Public Health Branch, et al. Acute health risks of atmospheric fine particulate matter pollution and recommendations for prevention and control in China [J]. Natl Med J China, 2022, 8(18): 1341-1350.
- [3] 任金苗, 张仙平, 段焕林, 等. PM_{2.5} 的研究进展 [J]. 制冷与空调(四川), 2019, 33(2): 211-219.
- REN J M, ZHANG X P, DUAN H L, et al. Review of PM_{2.5} in China [J]. Refrig Air Cond, 2019, 33(2): 211-219.
- [4] 李妙玲. 北京大气细颗粒物的化学组成特征及来源解析 [D]. 北京: 北京化工大学, 2018.
- LI M L. Chemical composition and source apportionment of atmospheric fine particles in Beijing [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2018.
- [5] WAHID S M S. Automotive brake wear: a review [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2018, 25(1): 174-180.
- [6] GAVETT S H, KOREN H S. The role of particulate matter in exacerbation of atopic asthma [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2001, 124(1/2/3): 109-112.
- [7] HALEY V B, TALBOT T O, FELTON H D. Surveillance of the short-term impact of fine particle air pollution on cardiovascular disease hospitalizations in New York State [J]. Environ Health, 2009, 8: 42.
- [8] VALLEJO M, RUIZ S, HERMOSILLO A G, et al. Ambient fine particles modify heart rate variability in young healthy adults [J]. J Expo Sci Environ Epidemiol, 2006, 16(2): 125-130.
- [9] CHURG A, BRAUER M, DEL CARMEN AVILA-CASADO M, et al. Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling [J]. Environ Health Perspect, 2003, 111(5): 714-718.
- [10] FRANCO A, TOUMA R, SONG Y, et al. Specificity of regulatory T cells that modulate vascular inflammation [J]. Autoimmunity, 2014, 47(2): 95-104.
- [11] SAKAGUCHI S, SAKAGUCHI N, ASANO M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases [J]. J Immunol, 1995, 155(3): 1151-1164.
- [12] LAWRENCE T, NATOLI G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity [J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(11): 750-761.
- [13] MOSSER D M, EDWARDS J P. Exploring the full spectrum of macrophage activation [J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(12): 958-969.
- [14] SHALHOUB J, FALCK-HANSEN M A, DAVIES A H, et al. Innate immunity and monocyte-macrophage activation in atherosclerosis [J]. J Inflamm, 2011, 8: 9.
- [15] 环境保护部. 环境空气质量指数(AQI)技术规定: HJ 633-2012[S]. 2016.
- Ministry of Environmental Protection. Technical regulation for Environmental Air Quality Index (AQI): HJ 633-2012 [S]. 2016.
- [16] 北京市人民政府. 北京市空气重污染日应急方案(暂行): 京政发[2012]34号[S]. 2012.
- Beijing Municipal People's Government. Emergency plan for heavy air pollution in Beijing (Provisional): Jing Zheng Fa [2012] No. 34[S]. 2012.
- [17] IIJIMA A, SATO K, YANO K, et al. Emission factor for antimony in brake abrasion dusts as one of the major atmospheric antimony sources [J]. Environ Sci Technol, 2008, 42(8): 2937-2942.
- [18] GASSER M, RIEDIKER M, MUELLER L, et al. Toxic effects of brake wear particles on epithelial lung cells *in vitro* [J]. Part Fibre Toxicol, 2009, 6: 30.
- [19] RIEDIKER M, DEVLIN R B, GRIGGS T R, et al. Cardiovascular effects in patrol officers are associated with fine particulate matter from brake wear and engine emissions [J]. Part Fibre Toxicol, 2004, 1(1): 2.
- [20] SELLEY L, SCHUSTER L, MARBACH H, et al. Brake dust exposure exacerbates inflammation and transiently compromises phagocytosis in macrophages [J]. Metallomics, 2020, 12(3): 371-386.
- [21] PUISNEY-DAKHLI C, OIKONOMOU E K, THARAUD M, et al. Effects of brake wear nanoparticles on the protection and repair functions of the airway epithelium [J]. Environ Pollut, 2023, 327: 121554.
- [22] GERLOFS-NIJLAND M E, BOKKERS B G H, SACHSE H, et al. Inhalation toxicity profiles of particulate matter: a comparison between brake wear with other sources of emission [J]. Inhal Toxicol, 2019, 31(3): 89-98.
- [23] GRIGORATOS T, MARTINI G. Brake wear particle emissions: a review [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2015, 22(4): 2491-2504.
- [24] MCCALLUM R I. Occupational exposure to antimony compounds [J]. J Environ Monit, 2005, 7(12): 1245-1250.
- [25] ROUBICEK V, RACLAVSKA H, JUCHELKOVA D, et al. Wear and environmental aspects of composite materials for automotive braking industry [J]. Wear, 2008, 265(1/2): 167-175.
- [26] 辛业志, 周旭, 邹伦伶, 等. 镉尘致肺纤维化作用的实验观察 [J]. 中华预防医学杂志, 1984, 18(1): 23-26.
- Xin Y Z, ZHOU X, ZOU L L, et al. Experimental observation on pulmonary fibrosis induced by antimony dust [J]. Chin J Prev Med, 1984, 18(1): 23-26.
- [27] BOREIKO C J, ROSSMAN T G. Antimony and its compounds: health impacts related to pulmonary toxicity, cancer, and

genotoxicity [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2020, 403: 115156.

[28] PROTO J D, DORAN A C, GUSAROVA G, et al. Regulatory T cells promote macrophage efferocytosis during inflammation resolution [J]. Immunity, 2018, 49(4): 666-677.

[29] VAN DER VEEKEN J, GONZALEZ A J, CHO H, et al. Memory of inflammation in regulatory T cells [J]. Cell, 2016, 166(4): 977-990.

[30] ESSANDOH K, LI Y, HUO J, et al. MiRNA-mediated macrophage polarization and its potential role in the regulation of inflammatory response [J]. Shock, 2016, 46(2): 122-131.

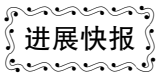
[31] 王晋昆, 曹晶晶, 张永昌. 镉对人体健康影响研究进展 [J]. 职业卫生与应急救援, 2019, 37(6): 601-604.

WANG J K, CAO J J, ZHANG Y C. Advance in research on adverse effect of antimony on human health [J]. Occup Health Emerg Rescue, 2019, 37(6): 601-604.

[32] 闫志鹏, 李舒月, 南楠, 等. PM_{2.5} 诱导肝脏脂肪变性的体外研究及其关键组分初探 [J]. 环境科学学报, 2023, 43(6): 494-502.

YAN Z P, LI S Y, NAN N, et al. Preliminary exploration of effects and critical components for PM_{2.5}-induced hepatic steatosis *in vitro* [J]. Acta Sci Circumstantiae, 2023, 43(6): 494-502.

[收稿日期] 2023-09-08



一种用于相位对比 X 射线成像应用的遗体乳腺癌组织模拟器

随着乳腺 X 射线成像技术的进步,需要可靠的成像模拟器捕捉临床早期癌变和癌症病例中的细节,同时消除模拟器而引起的伪影。本研究介绍了一种从遗体乳腺组织制作的乳腺组织成像模拟器,适用于透射和折射增强成像系统。具体方法是在裸鼠体内正位植入人类癌细胞瘤,并植入固定组织,同时保持原始肿瘤/脂肪组织界面,得到的人-鼠组织混合模拟器被安装在透明丙烯酸盒中,用于吸收和折射 X 射线成像。此外还进行了数字乳腺层析成像。最终呈现了模拟器的衰减成像和折射成像,以确认该模拟器适用于两种成像模式。

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 Oct;6(5):427-432. <https://doi.org/10.1002/ame2.12340>.)

陆杰,李群生,周磊,等. 精索静脉曲张合并勃起功能障碍动物模型的构建和评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 18-26.

Lu J, Li QS, Zhou L, et al. Establishment and evaluation of an animal model of varicocele and erectile dysfunction [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 18-26.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.003

精索静脉曲张合并勃起功能障碍动物模型的构建和评价

陆杰², 李群生¹, 周磊¹, 李东润¹, 申振南³, 李凝华², 陈冬², 唐文平²,
朱璠宇², 杨文涛^{1,2*}

(1.广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011; 2.广西中医药大学, 南宁 530200;
3.广西壮族自治区南溪山医院, 广西 桂林 541000)

【摘要】 目的 通过手术诱导 SD 大鼠精索静脉曲张 (VC), 阿扑吗啡试验 (APO 试验) 筛选 VC 后勃起功能障碍 (ED) 的大鼠, 探讨建立 VC 合并 ED 模型的方法。方法 将 60 只大鼠随机分为空白组、假手术组、模型组, 每组 20 只; 参照 Turner 法, 部分结扎左侧肾静脉, 诱导左侧 VC; 并进行 3 次 APO 试验, 筛选诱导 VC 后出现 ED 的大鼠, 观察并记录勃起次数、生殖器梳理次数、打哈欠次数; 测量双侧精索静脉直径; 对双侧睾丸和肾称重; HE 染色观察阴茎和左睾的病理改变; 统计模型组大鼠的成模率。结果 模型组 20 只大鼠中有 15 只成功进行 VC 合并 ED 造模, 成模率 75%; 造模后, 模型组左侧精索静脉直径显著增加 ($P < 0.01$), 且显著高于造模前 ($P < 0.01$), 模型组右侧精索静脉直径增加 ($P < 0.05$), 且高于造模前 ($P < 0.05$); 模型组左侧睾丸与右侧睾丸相比, 重量显著降低 ($P < 0.01$); 各组双侧肾重量相比, 组间及组内无明显差异 ($P < 0.05$); 模型组勃起次数、打哈欠次数、生殖器梳理次数显著减少 ($P < 0.01$), 且随造模时间递减; 模型组左侧睾丸和阴茎病理改变显著。结论 Turner 法可以诱导大鼠精索静脉曲张直径增加, 引起睾丸损伤和重量下降, APO 试验可以筛选诱导 VC 后出现 ED 的大鼠, 二者相结合适用于构建与人类 VC 合并 ED 状态较相似的动物模型。

【关键词】 精索静脉曲张; 勃起功能障碍; 造模; 阿扑吗啡试验

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0018-09

Establishment and evaluation of an animal model of varicocele and erectile dysfunction

LU Jie², LI Qunsheng¹, ZHOU Lei¹, LI Dongrun¹, SHEN Zhennan³, LI Ninghua², CHEN Dong², TANG Wenping²,
ZHU Fanyu², YANG Wentao^{1,2*}

(1. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China.

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200. 3. Nanxishan Hospital of
Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541000)

【Abstract】 Objective By employing surgically induced varicocele (VC) in SD rats and an apomorphine (APO) test, we screened rats with erectile dysfunction (ED) after VC and explored method to establish VC and ED models.

【基金项目】 国家自然科学基金 (82160905, 82260933); 广西中医药大学研究生教育创新计划项目 (YCBXJ2023019)。

【作者简介】 陆杰 (1987—), 男, 博士研究生, 研究方向: 中西医结合男科学。E-mail: 116908501@qq.com

【通信作者】 杨文涛 (1972—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合男科学。E-mail: 251081291@qq.com

Methods Sixty rats were randomly divided into Control, Sham, and Model groups with 20 rats in each group. Using the Turner method, we partially ligated the left renal vein to induce left VC three times. APO tests were conducted to screen rats with ED after inducing VC. The numbers of erections, genital grooming, and yawning were observed and recorded. The diameter of bilateral spermatic veins were measured. Both testis and kidneys were weighed. HE staining was used to observe pathological changes of penis and left testis. The success rate of modeling was calculated in the Model group.

Results A VC and ED model was successfully established in 15 out of 20 rats in the Model group with a success rate of 75%. After modeling, the diameter of the left spermatic vein in the model group was increased significantly ($P < 0.01$) and was significantly larger than that before modeling ($P < 0.01$). The diameter of the right spermatic vein in the Model group was increased ($P < 0.05$) and higher ($P < 0.05$) than that before modeling. The weight of the left testis in the Model group was significantly decreased ($P < 0.01$) compared with that of the right testis. No significant difference in the bilateral kidney weights were observed between or within groups ($P < 0.05$). In the Model group, the numbers of erections, yawning, and genital grooming decreased significantly ($P < 0.01$) with the time of modeling. Pathological changes of the left testis and penis were significant in the Model group. **Conclusions** The Turner method increases the diameter of the spermatic vein in rats, causing testis injury and weight loss, and APO tests can be used to screen rats with ED after VC induction. The combination of the two method is suitable to establish an animal model of VC with an ED status similar to humans.

[Keywords] varicocele; erectile dysfunction; modeling; apomorphine test

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

精索静脉曲张 (varicocele, VC) 是一种常见的男科疾病,以精索内蔓状静脉丛的异常扩张为主要临床特征,发生在大约 15% 的男性人群^[1]。勃起功能障碍 (erectile dysfunction, ED) 是最常见的一种男性性功能障碍,可由心理、血管、内分泌等因素引起。长期临床研究发现部分 VC 患者同时伴有 ED,经 VC 手术后,勃起功能明显改善,VC 和 ED 之间可能存在某种联系,但二者间关系的研究报道较少。Levinger 等^[2]学者报道青春后期精索静脉曲张的发病率会随年龄增长而增加,对男性的精神体力、性功能、生育能力均会产生不同程度的负面影响。

因此,制备稳定的动物模型对探讨 VC 与 ED 的相关性和探究潜在药物作用机制和防治等具有重要意义。目前手术诱导 VC 使用最广泛的是 Turner 法^[3],通过部分缩窄左肾静脉,使左侧精索内静脉压力增加,导致左侧精索内静脉和片状静脉丛扩张。此外还有 Najari 等^[4]的显微手术左髂总静脉与左精索静脉沟通支结扎法和 Wang 等^[5]的结扎左侧精索静脉主干与部分缩窄左肾静脉法。动物 ED 筛查主要通过不同疾病的诱导方法^[6],主要有海绵体内压测定法^[7]和阿扑吗啡 (apomorphine, APO) 试验^[8]。Turner 法与 APO 试验相结合,操作简单,推测可能适合 VC 合并 ED 模型的构建。本研究通过 Turner 法诱导大鼠精索静脉曲张,联合 APO 试验筛选 ED 大鼠,探讨建立 VC 合并 ED 模型的方法,为进一步实验奠定模型基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只,体重 180~200 g,8 周龄,由斯贝福 (北京) 生物技术有限公司提供 [SCXK(京)2019-0010]。动物饲养于卓强生物科技有限公司 SPF 级实验动物中心 [SYXK(桂)2021-0007],温度 (20 ± 6) °C,湿度 40%~70%,12 h/12 h 明暗交替。实验方案符合 3R 原则并获得广西中医药大学动物伦理委员会批准 (DW20220526-303)。

1.2 主要试剂与仪器

异氟烷 (青岛欧博方公司,批号:20211106);阿扑吗啡 (上海阿拉丁生化科技公司,批号:K2212027);苏木素 (Sigma 公司,批号:71014544);伊红 (国药集团,批号:H9627);中性树胶 (国药集团,批号:10004160)。手术器械 (J31110,上海医疗器械有限公司);头戴式放大镜 (MG-9892B2,东莞市比高电子有限公司);游标卡尺 (GB/T21389-2008,青岛美吉特精密工具有限公司);倒置显微镜 (IX71,OLYMPUS 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

大鼠随机分为 3 组:空白组 (Control group),不处理+APO 试验;假手术组 (Sham group),假手术+APO 试验;模型组 (Model group),手术诱导 VC+APO 试验。每组 20 只,适应性喂养 1 周后,第 2 周进行动物模型的构建。

1.3.2 诱导大鼠 VC 的原理

Turner^[3]认为通过部分阻塞左肾静脉可导致阻塞端静脉压力增加,压力可传递到左侧精索静脉,导致左侧 VC,此种机制模仿人类中的“胡桃夹子”现象,即当左肾静脉在主动脉和肠系膜上动脉之间被压迫出现部分闭塞时,就会发生这种现象。本研究按照此方法,在左肾静脉和下腔静脉的夹角处用 4-0 丝线打结造成左肾静脉部分阻塞,迫使左肾静脉压力增大,从而使左精索静脉回流压力加剧,导致 VC。(图 1)

1.3.3 操作步骤

诱导大鼠左侧 VC 的操作步骤:(1)术者佩戴头戴式放大镜操作,予大鼠 2% 异氟烷,以 10 L/min 流速持续吸入麻醉;(2)消毒后打开腹腔,充分暴露术野,区分左肾静脉、左肾上腺静脉、下腔静脉、左精索静脉及左输尿管静脉;(3)钝性游离左肾静脉和下腔静脉,将直径为 0.8 mm 的 8#平头注射器针头放置于左肾上腺静脉和下腔静脉之间,在左肾静脉及下腔静脉交叉处用 4-0 丝线将针头和左肾静脉一并结扎;(4)检查线结松紧,避免误扎其他血管,结扎后可观察到左肾静脉较术前膨隆颜色加深,可认为左肾静脉已被部分阻塞;(5)用 0.9% NaCl 注射液冲洗腹腔后,缝合术口,手术过程严格按照无

菌要求,常规抗菌预防感染。(图 2)

1.3.4 大鼠勃起的测定及模型的筛选

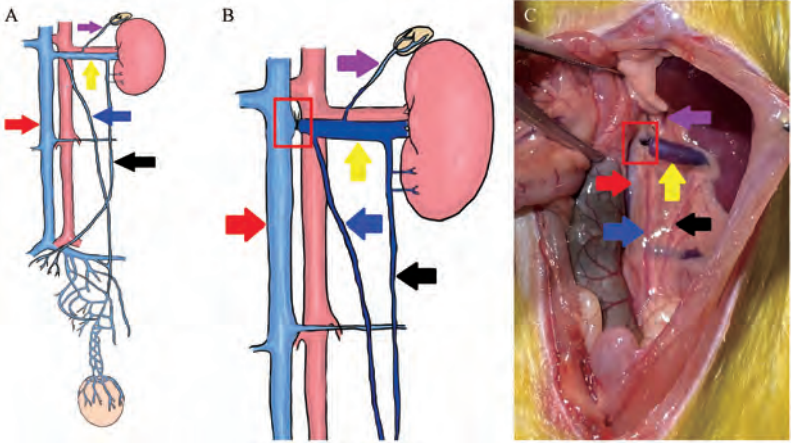
共进行 3 次 APO 试验,第 1 周末进行第 1 次 APO 试验检测术前大鼠的勃起功能是否正常。第 3、6 周末进行第 2、3 次以筛选出现 ED 的大鼠。在安静的条件下,房间里的光线减弱,使大鼠能够适应环境 10 min。将 100 μg/kg APO 皮下注射到颈部柔软的皮肤中。在透明玻璃笼子观察大鼠 30 min,并使用数码相机录制视频。当观察到背部凹弓,臀部推力,龟头和阴茎远端完全出现时,计算 1 次勃起。记录勃起次数、打哈欠次数和生殖器梳理次数^[9]。(图 3)

1.3.5 VC 合并 ED 模型的判定及脱落标准

造模成功判定:大鼠诱导 VC 后出现 ED,且左侧精索静脉直径>1 mm 或测量直径扩张 3 倍以上视为 VC 合并 ED 大鼠模型成功建立。脱落标准:诱导 VC 前,各组大鼠 APO 试验勃起反应不明显的;诱导 VC 后,模型组大鼠发现左侧精索静脉直径未超过 1 mm 或无 ED 表现的;喂养过程中出现因腹腔感染、肠梗阻等因素死亡的。最后计算成功造模数和模型组总数之比作为成模率。

1.3.6 各组大鼠双侧精索静脉直径的测量

第 2 周,打开假手术组、模型组的腹腔,测量双

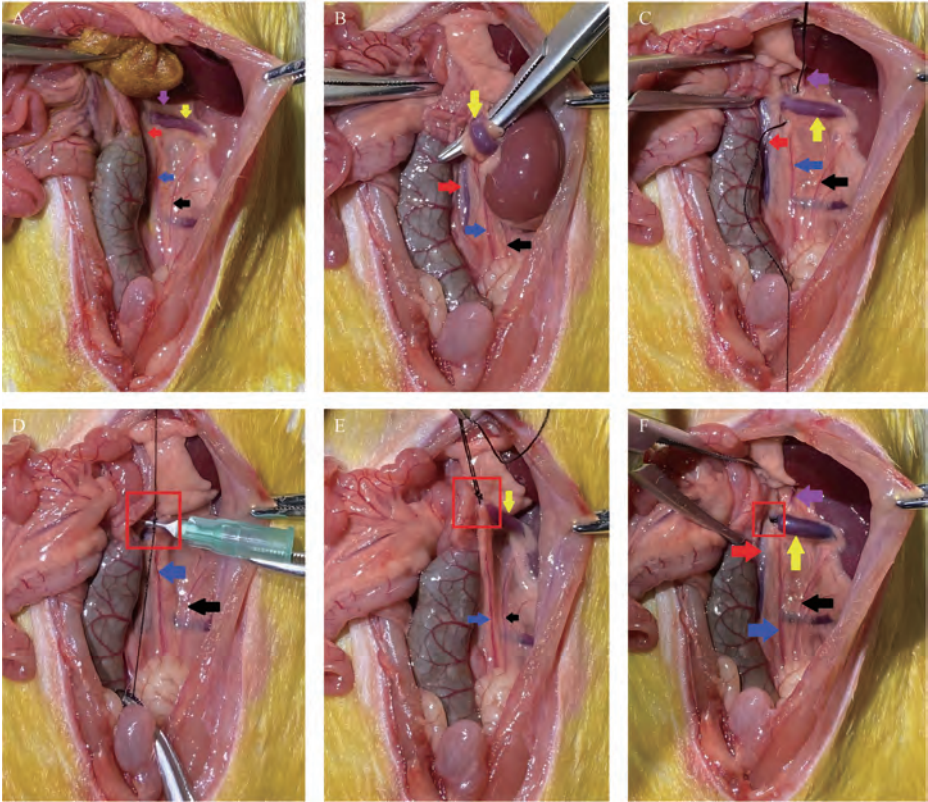


注:A、B 由 Photoshop2020 软件制作。A:左肾静脉、下腔静脉、左精索静脉位置关系示意;B:左肾静脉部分结扎位置;C:大鼠用 4-0 丝线部分结扎左侧肾精脉位置。红色箭头表示下腔静脉,蓝色箭头表示左侧精索静脉,黄色箭头表示左肾精脉,紫色箭头表示左肾上腺静脉,黑色箭头表示左侧输尿管静脉,红色方框表示左侧肾精脉部分结扎位置。

图 1 左侧精索静脉曲张造模原理示意图

Note. A and B produced by Photoshop2020. A, Position relationship of left renal vein, inferior vena cava and left spermatic vein. B, Partial ligation of the left renal vein. C, Position of the left renal vein partially ligation with 4-0 suture in the rat. The red arrow indicates the inferior vena cava, the blue arrow indicates the left spermatic vein, the yellow arrow indicates the left renal spermatic vein, the purple arrow indicates the left adrenal vein, the black arrow indicates the left ureteral vein, and the red box indicates the location of partial ligation of the left renal spermatic vein.

Figure 1 Schematic diagram of the modeling principle of left varicocele



注:A:术野各静脉位置;B:用止血钳穿过左肾精脉与下腔静脉交叉处;C:用4-0 丝线穿过左肾精脉与下腔静脉交叉处;D:将直径为 0.8 mm 的 8#平头注射器针头放置于二者之间,用 4-0 丝线将针头和左肾静脉一并结扎;E:确认左肾静脉为部分结扎,并检查各血管是否损伤;F:左肾静脉部分结扎后较术前膨隆,颜色加深,其余各静脉结构完整。红色箭头表示下腔静脉,蓝色箭头表示左侧精索静脉,黄色箭头表示左肾精脉,紫色箭头表示左肾上腺静脉,黑色箭头表示左侧输尿管静脉,红色方框表示左侧肾精脉部分结扎位置。

图 2 精索静脉曲张造模主要操作步骤示意图

Note. A, Position of each vein in the surgical field. B, Hemostatic forcep was passed through the intersection of the left renal seminal vein and the inferior vena cava. C, A 4-0 suture passing through the intersection of the left renal seminal vein and the inferior vena cava. D, An 8# flat-headed syringe needle with a diameter of 0.8 mm was placed between them. E, Confirming partial ligation of the left renal vein, and examining the veins for injury. F, Left renal vein was swollen and dark in color after partial ligation, and the other veins were intact. The red arrow indicates the inferior vena cava, the blue arrow indicates the left spermatic vein, the yellow arrow indicates the left renal spermatic vein, the purple arrow indicates the left adrenal vein, the black arrow indicates the left ureteral vein, and the red box indicates the location of partial ligation of the left renal spermatic vein.

Figure 2 Schematic diagram of the main procedure of varicocele modeling



图 3 大鼠勃起反应表现

Figure 3 Erection response in rats

侧精索静脉直径。第 8 周末,打开各组大鼠腹腔,观察左侧精索静脉是否增宽,同时观察右侧精索静脉是否增宽,用游标卡尺在髂腰静脉处测量双侧精索

静脉直径,对比各组造模后两侧精索静脉直径。
1.3.7 双侧睾丸、双肾的重量的测定
第 8 周末,摘除大鼠双侧睾丸,置于有刻度的方

格板中,观察双侧睾丸大小,用电子天平测量睾丸的重量,对比各组大鼠双侧睾丸的体积和重量。摘取大鼠双侧肾,体积和重量的测量方法与睾丸相同,对比各组大鼠双侧肾的体积和重量。

1.3.8 大鼠阴茎和左侧睾丸的苏木精-伊红染色

将大鼠阴茎组织和左侧睾丸组织固定在 Bouin 溶液中,用 70%乙醇洗涤,组织样品用石蜡包埋,取 5 μm 切片。滴加苏木素染色,蒸馏水洗至组织呈蓝紫色,滴加 1%盐酸乙醇分化 2 s,待组织变红,蒸馏水洗至组织呈蓝紫色,伊红染色,无水乙醇脱水,滴加中性树胶,封片,镜下观察并拍照。观察组织的病理改变。

1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 25.0 统计分析软件处理。计量资料所有数据均采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布的数据组间比较采用方差分析,组内比较采用配对 T 检验;不符合正态分布的数据以及计数资料采用非参数检验。组间等级资料采用 Wilcoxon 秩和检验,以 $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

2 结果

2.1 成模率及脱落情况

空白组 1 只、假手术组 2 只、模型组 1 只大鼠在第 1 次 APO 试验中勃起反应不明显而脱落。空白组 1 只大鼠在喂养过程中死亡,假手术组 1 只大鼠因肠梗阻死亡而脱落。模型组 1 只大鼠因左侧精索静脉 $<1\text{ mm}$,2 只第 2、3 次 APO 试验中无 ED 表现,1 只大鼠二者均有而脱落。脱落后最终有 15 只大鼠造模成功,成模率为 75%。各组最终成活大鼠

数量分别为空白组 18 只、假手术组 17 只、模型组 15 只。

2.2 VC 造模结果及双侧精索静脉直径比较

模型组明显可见迂曲增粗的静脉丛,表明左侧精索静脉明显曲张。而空白组和假手术组左侧精索静脉则无明显变化(图 4)。模型组造模前左侧精索静脉直径与假手术组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),造模后与空白组和假手术组比较直径显著增加($P < 0.01, P < 0.01$),且显著高于造模前($P < 0.01$)。模型组造模前右侧精索静脉直径与假手术组比较无统计学意义($P > 0.05$),造模后与空白组和假手术组比较直径增加($P < 0.05, P < 0.05$),且高于造模前($P < 0.05$)。(图 5)

2.3 各组大鼠双侧肾、睾丸重量比较

模型组左侧睾丸与空白组、假手术组比较重量显著降低($P < 0.01, P < 0.01$),与右侧睾丸比较重量显著降低($P < 0.01$)。模型组右侧睾丸与空白组、假手术组比较重量略有下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组双侧肾重量相比,组间及组内均无明显差异($P > 0.05$)。(图 6)

2.4 大鼠勃起功能测定结果

第 1 周末,各组大鼠勃起次数、打哈欠次数、生殖器梳理次数无明显差别($P > 0.05$)。第 3、6 周末,模型组与空白组、假手术组比较,勃起次数、打哈欠次数、生殖器梳理次数均显著减少($P < 0.01, P < 0.01$)。模型组内,第 1 周末与第 3、6 周末比较,勃起、打哈欠、生殖器梳理次数均显著下降($P < 0.01, P < 0.01$)。模型组大鼠勃起次数、打哈欠次数、生殖器梳理次数随时间递减。(图 7)

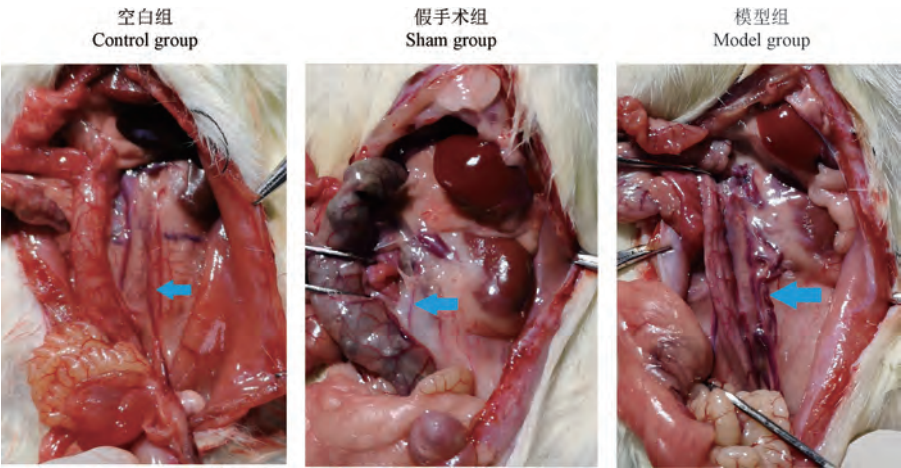
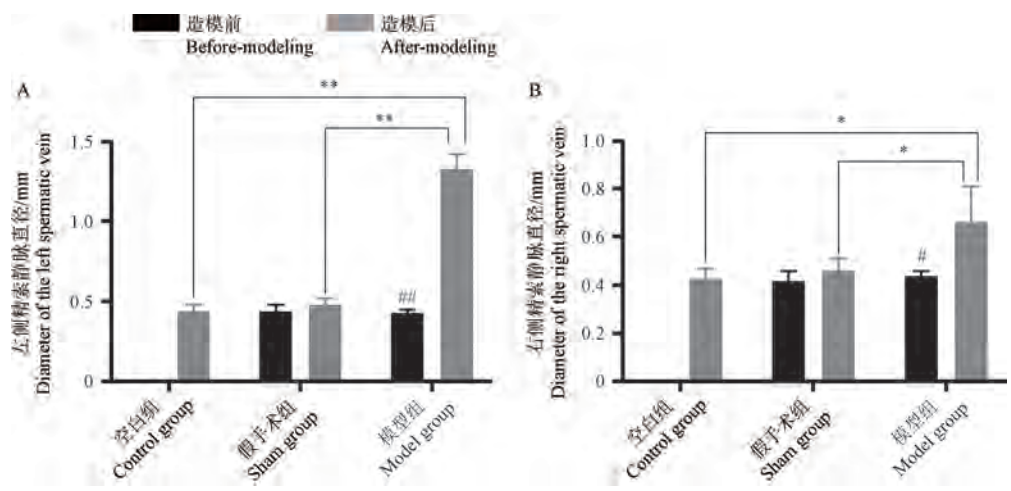


图 4 各组大鼠左精索静脉曲张程度

Figure 4 Severity of the left varicocele of rats in each group

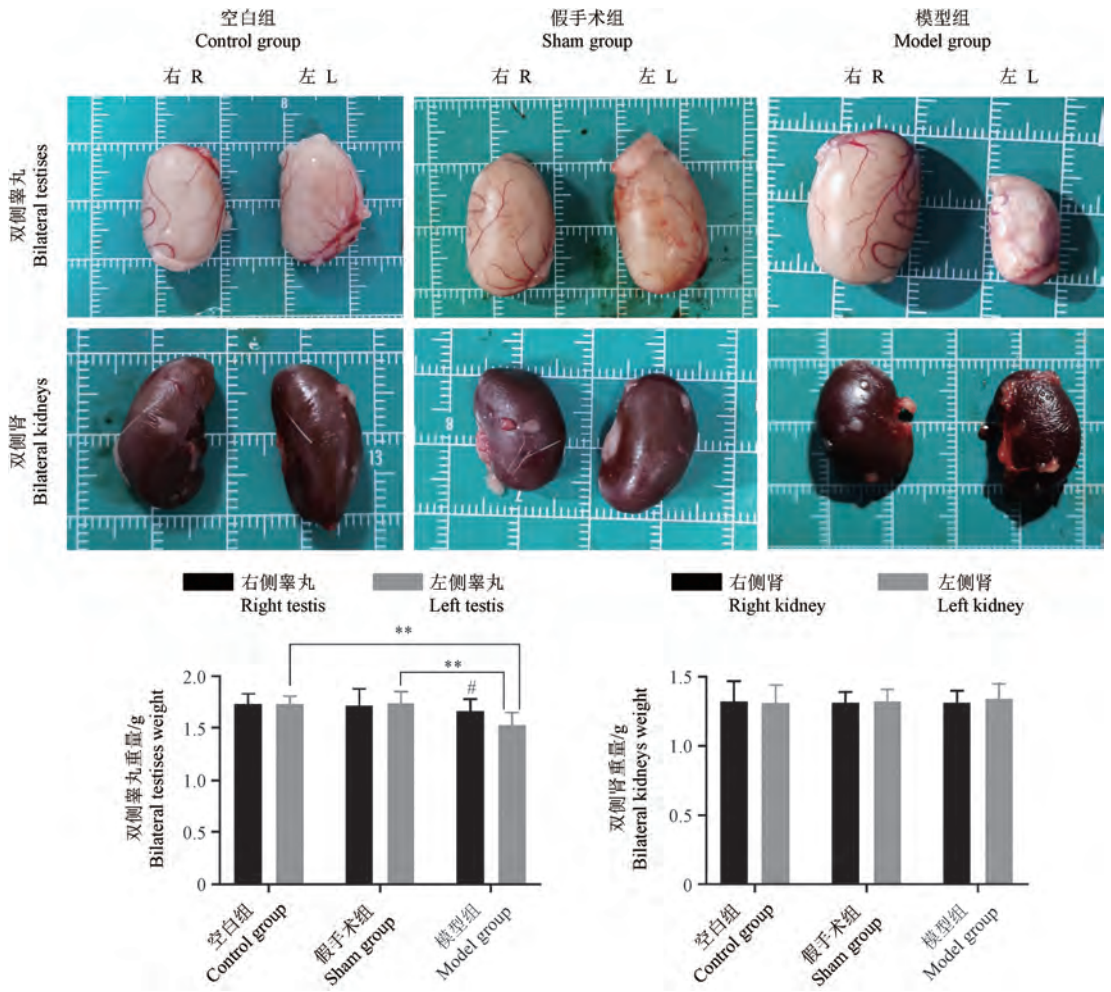


注:与假手术组和空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与造模后比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 5 各组大鼠双侧精索静脉直径的比较

Note. Compared with the Sham group and the Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with of after-modeling, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 5 Comparison of the diameter of bilateral spermatic vein in each group



注:与假手术组和空白组比较, ** $P<0.01$;与左侧睾丸比较, # $P<0.05$ 。

图 6 各组大鼠双侧睾丸、双侧肾重量的比较

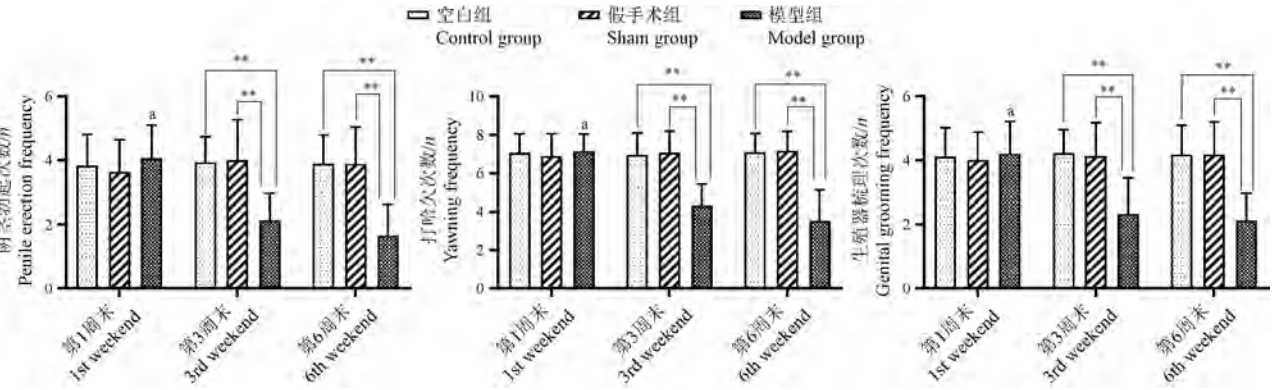
Note. Compared with the Sham group and the Control group, ** $P<0.01$. Compared with the left testis, # $P<0.05$.

Figure 6 Comparison of bilateral testes and kidneys weights in each group

2.5 VC 造模后阴茎和左侧睾丸组织病理变化

睾丸 HE 结果显示,空白组和假手术组曲精小管内各类精细胞形态和数目正常,间质细胞胞质丰富,边界清晰。模型组曲精小管内各类精细胞发生

退化变性,层数减少,间质细胞排列疏松。阴茎 HE 染色结果显示,空白组和假手术组大鼠阴茎海绵体组织排列整齐,无明显断裂现象;模型组海绵体组织结构不完整、排列紊乱,甚至断裂。(图 8)



注:与空白组和假手术组比较, ** $P<0.01$;与第 3 和第 6 周末比较, ^a $P<0.01$ 。
Note. Compared with the Control group and the Sham group, ** $P<0.01$. Compared with the 3rd and 6th weekend, ^a $P<0.01$.

图 7 各组大鼠勃起、打哈欠和生殖器梳理次数的比较

Figure 7 Comparison of the frequency of erection, yawning and genital grooming in each group

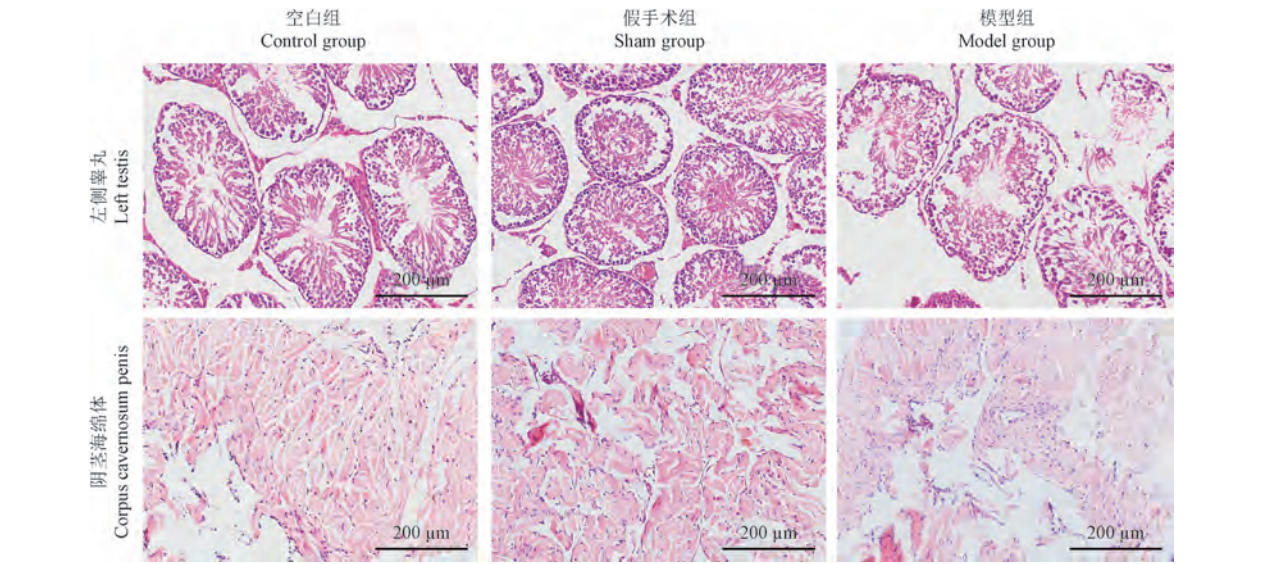


图 8 各组大鼠左侧睾丸组织和阴茎海绵体组织病理变化(HE 染色)

Figure 8 Pathological changes of left testis and corpus cavernosum penis in each group (HE staining)

3 讨论

目前,VC 合并 ED 的机制仍有待进一步研究,有学者指出 VC 因静脉回流不畅、静脉血液返流引起睾丸损害并出现性腺功能减退,进而引起 ED^[10-11]。精索静脉与阴茎血管在解剖上虽无直接的通路,但 VC 可通过改变正常的激素水平来影响 ED,VC 引起间质细胞水平的下丘脑-垂体-性腺轴功能障碍,并导致睾酮等激素代谢紊乱^[12-13]。阴茎

勃起机制中静脉闭塞功能是关键因素,VC 也属于静脉功能异常的一种表现,二者发病均与静脉功能有密切关系,可能导致 VC 与 ED 的合并出现。如果从整体考虑,也可能 VC 与 ED 都是全身性疾病的局部表现,只是 VC 加重了 ED 或是加速了 ED^[14]。基于现有研究,我们通过手术诱导 VC,结合 APO 筛选 VC 后存在 ED 的大鼠,以此来制备稳定可靠的 VC 合并 ED 动物模型是进一步探究其发病机制的重要保证。

关于 VC 的诱导,多数学者至今仍采用 Turner 法^[15]。此法通过部分阻塞左肾静脉,可导致阻塞端静脉压力的增加,压力可传递到左侧精索静脉,导致左侧精索静脉曲张。为确保模型的稳定性,我们在部分结扎左肾静脉时,使用 0.8 mm 的平头针,适中的打结力度,避开左肾动脉,避免了肾的萎缩。有研究认为,当左肾静脉管腔直径减小至 0.8 mm 以下时,会发生左肾萎缩,发病率与收缩程度呈正相关,使用 0.8 mm 平头针可以将左肾静脉缩小到合适的大小,而不会引起肾病变^[16]。因此,结果显示各组大鼠未出现肾萎缩,且双侧肾重量差异无统计学意义。各个研究在测量精索静脉直径的标准也不一致,主要有测量左侧精索静脉直径最大处^[17]、蔓状静脉与精索静脉主干之间的静脉直径^[18]、髂腰静脉水平左侧精索静脉直径^[19]等,本研究测量左髂腰静脉水平左侧精索静脉直径,髂腰静脉在大鼠腹腔中容易辨认,左侧精索静脉曲张恰好经过左髂腰静脉适合用作测量左侧精索静脉的标记,保证了测量的准确性。因此,造模后模型组大鼠左侧精索静脉直径较空白组和假手术组显著增加,对比右侧也明显增加。此外,我们还发现模型组右侧精索静脉直径也有不同程度的增加,可能由于左侧 VC 引起对侧代偿性增宽。

APO 是一种非选择性多巴胺(dopamine, DA)能受体激动剂,通过中枢 DA 能系统的 D₂/D₄ 受体介导能有效地促进勃起作用,很早被用于检测大鼠的勃起功能^[20-21]。本研究在低光照、安静的环境下,应用录像的方法,进行了多次 APO 试验,筛选出现 ED 的大鼠,降低了因为人为、环境、应激等因素造成的误差。除了统计阴茎勃起次数外,本研究还通过观察大鼠打哈欠反应、梳理阴茎等性兴奋行为的频率,更全面客观地评估大鼠的勃起功能。低剂量的 APO 会引起大鼠打哈欠反应,与阴茎勃起类似,是中枢神经系统中突触前膜 DA 受体被刺激的结果^[22]。Melis 等^[23]研究表明,APO 后的勃起、打哈欠反应和正常的性反应都被证明有睾酮依赖性,很大程度上依赖于睾丸的功能,因为阉割显著降低了反应的频率。打哈欠频繁地发生与生殖器梳理有关,一系列的内源性介质,如 DA、乙酰胆碱、NO 和阿片类肽等引发这些反应^[24-25]。在青春期前后,雄性大鼠出现包括睾丸下降、生殖器自我梳理和自发性阴茎勃起的变化,这被认为是性成熟的指标,且与雄性大鼠的勃起功能有关^[26]。本次实验中,模型

组手术诱导 VC 后,剔除了未出现 ED 的大鼠,APO 试验后表现为勃起次数下降、打哈欠和生殖器梳理次数降低,并且随时间递减。

此外,我们还观察到模型组左睾重量显著低于空白组和假手术组,与对侧比小于右睾。可能是 VC 对睾丸产生包括静脉淤积、睾丸温度升高、氧化应激等负面影响,导致睾丸的损伤或萎缩,引起生精细胞和间质细胞的凋亡,从而使睾丸生精功能下降的同时睾酮也降低,最终使大鼠勃起反应下降^[27-28]。也有研究表明,造模后的大鼠左侧睾丸重量较对照组降低,睾丸病理切片显示模型组睾丸的曲细精管、间质细胞均有不同程度的损伤,与本研究结果一致^[29-31]。同时,阴茎 HE 染色也显示模型组阴茎海绵体组织结构不完整、排列紊乱,甚至断裂。因此,本研究通过比较各组大鼠双侧睾丸的重量、睾丸和阴茎的病理改变,验证了该方法的可靠性和稳定性,同时成模率达到 75%,进一步表明该方法具备可重复性。

综上,Turner 法可以诱导大鼠精索静脉直径增加,引起睾丸损伤和重量下降,APO 试验可以筛选诱导 VC 后出现 ED 的大鼠,二者相结合适用于构建与人类 VC 合并 ED 状态较相似的动物模型,为 VC 合并 ED 机制的进一步研究奠定基础。

参考文献:

- [1] MINHAS S, BETTOCCHI C, BOERI L, et al. European association of urology guidelines on male sexual and reproductive health: 2021 update on male infertility [J]. Eur Urol, 2021, 80 (5): 603-620.
- [2] LEVINGER U, GORNISH M, GAT Y, et al. Is varicocele prevalence increasing with age? [J]. Andrologia, 2007, 39 (3): 77-80.
- [3] TURNER T T. The study of varicocele through the use of animal models [J]. Hum Reprod Update, 2001, 7(1): 78-84.
- [4] NAJARI B B, LI P S, RAMASAMY R, et al. Microsurgical rat varicocele model [J]. J Urol, 2014, 191(2): 548-553.
- [5] WANG R, CHANG J S, ZHOU X M, et al. Varicocele in the rat: a new experimental model. Effect on histology, ultrastructure and temperature of the testis and the epididymis [J]. Urol Res, 1991, 19(5): 319-322.
- [6] KAPOOR M S, KHAN S A, GUPTA S K, et al. Animal models of erectile dysfunction [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2015, 76: 43-54.
- [7] 颜俊峰, 吕伯东. 阴茎海绵体内压测定技术在阴茎勃起功能障碍动物模型中的应用 [J]. 中华男科学杂志, 2016, 22 (4): 352-355.
- YAN J F, LV B D. Intracavernosal pressure measurement

- technology in the animal model of erectile dysfunction [J]. *Natl J Androl*, 2016, 22(4): 352–355.
- [8] BRIEN S E, WILSON E, HEATON J P, et al. The conditioned response erection (CRE)—a new approach to modelling erectile responses in the rat [J]. *Int J Impot Res*, 2000, 12(2): 91–96.
- [9] HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ M. Prepubertal genital grooming and penile erections in relation to sexual behavior of rats [J]. *Physiol Behav*, 2000, 71(1/2): 51–56.
- [10] ZOHDI W, GHAZI S, ARAFA M. Impact of varicocelectomy on gonadal and erectile functions in men with hypogonadism and infertility [J]. *J Sex Med*, 2011, 8(3): 885–893.
- [11] 李秋伯, 李杰, 周志豪, 等. 显微镜下精索静脉结扎术对患者性功能影响的临床研究 [J]. *现代医药卫生*, 2019, 35(5): 661–663, 667.
- LI Q B, LI J, ZHOU Z H, et al. Effect of microsurgical varicocelectomy on male sexual function [J]. *J Mod Med Health*, 2019, 35(5): 661–663, 667.
- [12] LI F, YUE H, YAMAGUCHI K, et al. Effect of surgical repair on testosterone production in infertile men with varicocele: a meta-analysis [J]. *Int J Urol*, 2012, 19(2): 149–154.
- [13] DABAJA A A, GOLDSTEIN M. When is a varicocele repair indicated: the dilemma of hypogonadism and erectile dysfunction? [J]. *Asian J Androl*, 2016, 18(2): 213–216.
- [14] 李群生, 杨文涛, 周磊, 等. 精索静脉曲张致勃起功能障碍患者性激素水平及活血起痿颗粒干预研究 [J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(8): 1929–1931.
- LI Q S, YANG W T, ZHOU L, et al. Study on the level of sex hormones in patients with erectile dysfunction caused by varicocele and the intervention of Huoxue Qiwei Granule [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2018, 29(8): 1929–1931.
- [15] 曹欢, 周铁, 侯建国. 精索静脉曲张大鼠模型的构建及评价 [J]. *实验动物与比较医学*, 2013, 33(4): 324–328.
- CAO H, ZHOU T, HOU J G. Establishment and assesment of varicocele model in rat [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2013, 33(4): 324–328.
- [16] YAO B, ZHOU W L, HAN D Y, et al. The effect of the degree of left renal vein constriction on the development of adolescent varicocele in Sprague-Dawley rats [J]. *Asian J Androl*, 2016, 18(3): 471–474.
- [17] 马征, 贾月峰, 李强, 等. 实验性精索静脉曲张大鼠生精状态评价 [J]. *中国男科学杂志*, 2011, 25(1): 19.
- MA Z, JIA Y F, LI Q, et al. Evaluation of the spermatogenic status of rats with experimental varicocele [J]. *Chin J Andrology*, 2011, 25(1): 19.
- [18] 姜应传, 俞建军, 闫涛, 等. 改进型实验性左侧精索静脉曲张的建立及其对大鼠卵泡刺激素及抑制素 B 的影响 [J]. *中华男科学杂志*, 2010, 16(6): 495–497.
- JIANG Y C, YU J J, YAN T, et al. Improved experimental varicocele increases follicle-stimulating hormone and reduces inhibin B in rats [J]. *Natl J Androl*, 2010, 16(6): 495–497.
- [19] ZHOU T, CAO H, CHEN G, et al. Outcomes of experimental rat varicocele with and without microsurgery [J]. *BMC Urol*, 2015, 15: 19.
- [20] RAMPIN O, JÉROME N, SUAUDEAU C. Proerectile effects of apomorphine in mice [J]. *Life Sci*, 2003, 72(21): 2329–2336.
- [21] HSIEH G C, HOLLINGSWORTH P R, MARTINO B, et al. Central mechanisms regulating penile erection in conscious rats: the dopaminergic systems related to the proerectile effect of apomorphine [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 308(1): 330–338.
- [22] HEATON J P, VARRIN S J, MORALES A. The characterization of a bio-assay of erectile function in a rat model [J]. *J Urol*, 1991, 145(5): 1099–1102.
- [23] MELIS M R, MAURI A, ARGOLAS A. Apomorphine-and oxytocin-induced penile erection and yawning in intact and castrated male rats: effect of sexual steroids [J]. *Neuroendocrinology*, 1994, 59(4): 349–354.
- [24] COLLINS G T, EGUIBAR J R. Neuropharmacology of yawning [J]. *Front Neurol Neurosci*, 2010, 28: 90–106.
- [25] GAMBERINI M T, BOLOGNESI M L, NASELLO A G. The modulatory role of M2 muscarinic receptor on apomorphine-induced yawning and genital grooming [J]. *Neurosci Lett*, 2012, 531(2): 91–95.
- [26] HERNÁNDEZ-ARTEAGA E, HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ M, RENTERÍA M L R, et al. Prenatal stress alters the developmental pattern of behavioral indices of sexual maturation and copulation in male rats [J]. *Physiol Behav*, 2016, 163: 251–257.
- [27] DABAJA A, WOSNITZER M, GOLDSTEIN M. Varicocele and hypogonadism [J]. *Curr Urol Rep*, 2013, 14(4): 309–314.
- [28] PASTUSZAK A W, WANG R. Varicocele and testicular function [J]. *Asian J Androl*, 2015, 17(4): 659–667.
- [29] ZHANG L T, KIM H K, CHOI B R, et al. Analysis of testicular-internal spermatic vein variation and the recreation of varicocele in a Sprague-Dawley rat model [J]. *Andrology*, 2014, 2(3): 466–473.
- [30] GUO W B, YANG C, BIAN J, et al. With a new clip technique surgically inducing varicocele in Sprague-Dawley rats [J]. *BMC Urol*, 2018, 18(1): 58.
- [31] KEIVAN M, MANSOURI TORGHABEH F, DAVOODI S, et al. Single intratesticular injection of blood-serum-derived exosomes can potentially alleviate testopathy following testicular torsion [J]. *Animal Model Exp Med*, 2022, 5(4): 362–368.

马立威,姚宏玉,陈哲,等. PI3k/Akt 通路在大戟大枣汤抗不同分子表型乳腺癌中的调控作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 27-35.

Ma LW, Yao HY, Chen Z, et al. Effects of decoction of *Euphorbia fischeriana* Steud. and jujuba against breast cancer of different molecular phenotypes via PI3k/Akt pathway [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 27-35.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.004

PI3k/Akt 通路在大戟大枣汤抗不同分子表型乳腺癌中的调控作用

马立威¹,姚宏玉²,陈哲³,倪世宇⁴,陈颂²,李京⁵,刘吉成^{1*}

(1.齐齐哈尔医学院 医药科学研究院,黑龙江 齐齐哈尔 161006;2.齐齐哈尔医学院 药学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006;
3.齐齐哈尔医学院 公共卫生学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006;4.齐齐哈尔医学院附属第五医院,黑龙江 大庆 163001;
5.齐齐哈尔医学院附属第三医院,黑龙江 齐齐哈尔 161099)

【摘要】 目的 探讨 PI3k/Akt 通路在大戟大枣汤 (decoction of *Euphorbia fischeriana* Steud. and jujuba, DEFSJ) 抗雌激素受体 (ER) 阴性 (-) 和 ER 阳性 (+) 乳腺癌中的调控作用,为乳腺癌的针对性治疗提供参考。**方法** 制备 DEFSJ 提取液,采用 UHPLC-Triple Quad 仪进行质控分析。DEFSJ 含药血清 (containing serum, CS) 依照体外血清药理学方法进行获取,乳腺癌 (ER-) MDA-MB-453 和 (ER+) MCF-7 细胞分别用不同浓度 DEFSJ-CS 干预 48 h。流式细胞术检测细胞周期分布, DNA ladder 实验评估细胞凋亡程度, Western blot 法检测 PI3k/Akt 通路相关蛋白表达,实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 法检测 FoxO3a、FoxO1a 及 Bim mRNA 表达;激光共聚焦显微镜观察 FoxO3a 蛋白核转位。**结果** UPLC 对 5 批 DEFSJ 提取物进行了分析,结果表明制备工艺可行,质量可控,保证了药理学实验结果的准确性。体外实验中发现, DEFSJ-CS 能阻断细胞在 G2/M 期 ($P<0.05$, $P<0.01$); DNA ladder 实验中呈现典型的细胞凋亡梯带;与阴性对照组比较, DEFSJ-CS 能使 p-PI3k、p-Akt、p-FoxO3a 及 p-FoxO1a 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), Bim 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 使 FoxO3a、FoxO1a mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), Bim mRNA 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 并能使细胞中 FoxO3a 蛋白呈现显著的核转位变化;且各数据结果均显示 DEFSJ-CS 对 (ER-) MDA-MB-453 细胞比对 (ER+) MCF-7 细胞作用效果更好。**结论** PI3k/Akt 通路参与了大戟大枣汤抗乳腺癌作用的调控,作用效果因乳腺癌表型差异而不同。

【关键词】 狼毒大戟; MDA-MB-453 细胞; MCF-7 细胞; PI3k/Akt 通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0027-09

Effects of decoction of *Euphorbia fischeriana* Steud. and jujuba against breast cancer of different molecular phenotypes via PI3k/Akt pathway

MA Liwei¹, YAO Hongyu², CHEN Zhe³, NI Shiyu⁴, CHEN Song², LI Jing⁵, LIU Jicheng^{1*}

(1. Research Institute of Medical Science and Pharmacy, Qiqihaer Medical University, Qiqihaer 161006, China.

2. School of Pharmacy, Qiqihaer Medical University, Qiqihar 161006. 3. School of Public Health, Qiqihaer

Medical University, Qiqihaer 161006. 4. the Fifth Affiliated Hospital of Qiqihaer Medical University, Daqing 163001.

5. the Third Affiliated Hospital of Qiqihaer Medical University, Qiqihar 161099)

【Abstract】 Objective To explore the effect of decoction of *Euphorbia fischeriana* Steud. and jujuba (DEFSJ) against estrogen receptor (ER) negative (-) and ER positive (+) breast cancer via the PI3k/Akt pathway, and to provide

【基金项目】 国家自然科学基金 (82174207); 齐齐哈尔市科技局联合引导项目 (LHYD-202028); 黑龙江省中医药管理局科技计划项目 (ZHY2020-179)。

【作者简介】 马立威 (1987—), 男, 副研究员, 研究方向: 药物抗肿瘤。E-mail: maliwei@qmu.edu.cn

【通信作者】 刘吉成 (1958—), 男, 教授, 研究方向: 药物抗肿瘤。E-mail: jeliu@qmu.edu.cn

a reference for the targeted treatment of breast cancer. **Methods** DEFSJ extract was prepared and analyzed using UHPLC-Triple Quad. DEFSJ containing serum (CS) was prepared via a serum pharmacology method. Different concentrations of DEFSJ-CS were applied to (ER-) MDA-MB-453 and (ER+) MCF-7 breast cancer cells *in vitro* for 48 h. The distribution of cells in different stages of the cellular cycle was evaluated using a Flow cytometer. DNA ladder assay was used to assess the degree of apoptosis, and the expression of PI3k/Akt pathway-related proteins was evaluated by Western blot assay. The expression of FoxO3a, FoxO1a, and Bim mRNA was detected by Real-time quantitative PCR. Nuclear transposition of FoxO3a protein was analysed using a confocal laser microscopy. **Results** Five batches of DEFSJ extract were analyzed using UPLC, and the result showed that the preparation technology was feasible and the quality was controllable, ensuring the accuracy of the pharmacological experiment result. DEFSJ-CS blocked cells in the G2/M phase ($P<0.05$, $P<0.01$). Cells treated with DEFSJ-CS displayed the typical apoptotic ladder in the DNA ladder experiment. Compared with the negative control cells, the DEFSJ-CS group cells had decreased protein expression of p-PI3k, p-Akt, p-FoxO3a, and p-FoxO1a ($P<0.05$, $P<0.01$); increased protein expression of Bim ($P<0.05$); decreased mRNA expression of FoxO3a and FoxO1a ($P<0.05$, $P<0.01$); increased mRNA expression of Bim ($P<0.05$, $P<0.01$); and enhanced nuclear translocation of FoxO3a protein. The data showed that DEFSJ-CS had a stronger effect on (ER-) MDA-MB-453 cells than (ER+) MCF-7 cells. **Conclusions** The regulatory effect of DEFSJ extract on anti-breast cancer involves the PI3k/Akt pathway, and the effect varies with phenotypic differences.

[Keywords] *Euphorbia fischeriana* Steud.; MDA-MB-453 cells; MCF-7 cells; PI3k/Akt pathway
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

在 2020 年《全球癌症统计报告》中的数据显示,全球范围内新增乳腺癌病例约 226 万,超过了肺癌的新增病例数,成为全球第一大癌^[1]。而现今,临床上针对乳腺肿瘤患者的治疗仍是以手术为第一选择,辅以放、化疗及内分泌治疗等,但弊端是术后易出现复发的情况,且放、化疗易产生不良反应^[2]。激素依赖性乳腺肿瘤的发生发现,和雌激素的产生量关系密切。近些年,乳腺癌患者给予内分泌药物治疗能够有效改善病人的预后,特别作为主要的治疗方案针对激素受体为阳性的乳腺癌患者^[3]。有研究指出,在乳腺肿瘤患者中,按基因分型的雌激素受体阴性(ER-)患者占近 1/3,这部分人群中还以年轻女性为主^[4]。在临床上相比其它分型,高的侵袭性及不良的预后是 ER-乳腺癌的特点。因而,在乳腺癌的治疗研究中,有效治疗 ER-乳腺癌是重点和难点。

中药及其活性提取物在抗乳腺癌中发挥着重要作用,有报道证实,众多中药的活性成分均能抑制乳腺肿瘤细胞的增殖、迁移和复发,并影响其耐药性^[5]。中医药防治乳腺癌效果确切,将中医药的辨证论治及整体观思想与现代医学的精准治疗相结合,就能起到扬长避短发挥中西医各自优势的作用,在乳腺癌防治中有着重要意义^[6]。狼毒大戟(*Euphorbia fischeriana* Steud.)为传统中草药,2020 年版药典记载其味辛、性平,有毒,归肝、脾经,能起到散结及杀虫的功效,作为外用药治疗淋巴结结

核、皮癣;课题组前期从辨证论治的角度提出并证实了基于以毒攻毒理论,ER-乳腺癌是乳腺癌毒(癌毒、邪毒)性的表现形式,能够被狼毒大戟的毒(药性)所攻;本研究以此作为理论依据开展。同时前期研究也证实大戟大枣汤含药血清对乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖有一定的抑制效果并能诱导其产生凋亡^[7];而它的抗乳腺肿瘤效果能否因分子表型不同呈现不同的治疗效果,将在本研究中探讨。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

由哈尔滨医科大学实验动物医学部[SCXK(黑)2019-001]提供的 8~9 周龄的 20 只 SPF 级 SD 大鼠,雄性,体重 300~330 g,按 SPF 级动物饲养要求在齐齐哈尔医学院下属的实验动物中心进行喂养及实验[SYXK(黑)2021-013],相关动物实验内容经齐齐哈尔医学院学术伦理委员会授权(QMU-AECC-2021-67),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 细胞株

乳腺癌(ER+)MCF-7 细胞、(ER-)MDA-MB-453 细胞均采购自中国科学院细胞资源中心,在液氮中储藏备用。

1.2 主要试剂与仪器

L15 培养基、MEM 培养基(Hyclone 试剂公司,

批号: AF29500573、AH30050286); FBS 血清 (Clark 试剂公司, 批号: JC63436); DAPI 染料 (Thermo 生物公司, 批号: 1890342); 周期检测 kit (美国 BD 生物科学公司, 批号: 9283024); ActinGreen488 染料 (Gene Copoeia 试剂公司, 批号: 1501136 T); PrimeScript^{RT} reagent Kit、DNA 提取试剂盒、TBGreen PremixEx Tap、TRIzol (TaKaRa 生物技术公司, 批号: AJ60658A、AK1301、AJG1421A、AI51028A); 兔抗人 p-PI3k 单克隆抗体; 兔抗人 p-FoxO3a 多克隆抗体、兔抗人 Bim 单克隆抗体为美国 Abcam 公司产品; 兔抗人 p-FoxO1a 单克隆抗体、兔抗人 p-Akt 单克隆抗体、羊抗兔 IgG 抗体为美国 CST 公司产品。

6500+ 型 UHPLC-Triple Quad (美国 AB SCIEX 公司); Spark 型酶标仪 (奥地利 TECAN 公司); 3111 型细胞培养箱 (美国 Thermo 生物公司); R-300 型旋转蒸发 (瑞士 Buchi 公司); Observer A1 型荧光显微镜、LSM710 型激光共聚焦显微镜 (德国 Zeiss 仪器公司); Q5 型 PCR 仪 (美国应用生物系统公司); FACSCalibur 型流式细胞仪 (美国 BD 生物科学公司); ChemiDoc MP 型荧光及化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad 生命医学产品有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验药物制备

狼毒大戟药材采摘于黑龙江省泰康县, 经郭丽娜教授 (本校天然药物化学实验中心) 鉴定后使用, 样品收集在齐齐哈尔医学院地方药物标本室 (标本号: 1123C0006000000128); 大枣采购于齐齐哈尔药材批发市场。大戟大枣汤 (DEFSJ) 制备已在前期研究中完成^[7]; 狼毒大戟根切片与医用大枣按重量比 1:1 的比例混合, 加入 10 倍量的蒸馏水, 混合后经浸泡、煎煮 (每次 2 h, 共煎煮 2 次)、旋蒸 5 倍浓缩后即得 DEFSJ 提取液 (1 g 生药/mL)。

1.3.2 含药血清制备

SD 大鼠适应性喂养 1 周后进行实验。大戟大枣汤含药血清 (DEFSJ-CS) 的制备已在前期研究中完成^[7]; 简述制备过程如下, 阴性对照组 SD 大鼠灌胃适量生理盐水, DEFSJ 低、中、高剂量组分别灌胃给予 DEFSJ 提取液 2.5、5.0 和 10.0 g/kg, 每天间隔给药 2 次, 不间断持续 3 d, 最后 1 次给药 60 min 后, 麻醉大鼠并开腹找到腹主动脉取血、分离血清, 备用。

1.3.3 细胞培养

取出液氮中的 MCF-7 细胞用含 10% 血清的

MEM 完全培养基进行培养及传代; 同时取出 MDA-MB-453 细胞用含 10% 血清的 L15 完全培养基进行培养及传代, MCF-7 细胞置于 5% CO₂、95% 空气的培养箱中培养; MDA-MB-453 细胞置于 100% 空气的培养箱中培养, 细胞约 2~3 d 传代 1 次。

1.3.4 实验分组

实验分阴性对照组 (10% 阴性对照组含药血清 +90% 培养基)、DEFSJ-CS 低 (10% DEFSJ 低剂量组含药血清 +90% 培养基)、中 (10% DEFSJ 中剂量组含药血清 +90% 培养基)、高 (10% DEFSJ 高剂量组含药血清 +90% 培养基) 剂量组。

1.3.5 质控分析

按照“1.3.1”中的方法分别制备 5 批 DEFSJ 提取液, 取各批次提取液 100 μL 用 400 μL 蒸馏水稀释 1 倍, 旋涡 30 s, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。采用 UHPLC-Triple Quad 对 DEFSJ 提取液进行质控分析。ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm, Waters 公司), 在 40 °C 条件下, 流速为 0.4 mL/min, 注入量设置为 1.0 μL。流动相是由 A (含 0.1% 甲酸的超纯水) 和 B (含 0.1% 甲酸的乙腈) 组成。梯度洗脱条件: 0~2.5 min, 95% A, 5% B; 2.5~3.5 min, 75% A, 25% B; 3.5~4.5 min, 50% A, 50% B; 4.5~7.5 min, 25% A, 75% B; 7.5~8.0 min, 25% A, 75% B 和 8.0~17.0 min, 100% B。

1.3.6 流式细胞术检测细胞周期分布

将处于对数生长期的 (ER-) MDA-MB-453、(ER+) MCF-7 细胞用细胞计数仪计数 6 孔细胞培养板 2.0 × 10⁵/孔, 并添加 2 mL 完全培养基, 待细胞贴壁后进行实验, 实验分阴性对照组、DEFSJ-CS 低、中、高剂量组。待 DEFSJ-CS 作用细胞 48 h 后, 胰酶消化后收集细胞悬液至流式管中, 按试剂盒说明操作, 依次加入 250 μL 试剂 A 液, 室温下反应 10 min, 加入 200 μL 试剂 B 液, 室温下反应 10 min, 加入 200 μL 试剂 C 液, 室温避光反应 10 min 后, 上流式细胞仪检测, 并分析细胞各周期分布情况。

1.3.7 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析细胞凋亡

细胞准备及分组处理情况同“1.3.6”, 依据 DNA 提取试剂盒说明书简述实验方案如下, 向装有各组细胞的离心管中, 依次加入试剂 RNaseA、Protease K、裂解液轻轻混匀, 置于 70 °C 水浴中反应 10 min; 冷却后将无水乙醇滴加进各组离心管内, 管中呈现白色絮状沉淀, 随后将管内液体移到试剂盒提供的 DNA 纯化柱中; 将柱子离心弃上清并加入试

剂盒自带洗涤液洗涤,重复 2 次,随后将柱子镶套在 1.5 mL 的离心管中,滴加一定体积的洗脱液,在常温下静置 10 min,随后在离心机上低温离心,将洗脱下来的各组细胞的 DNA 收集。将纯化的 DNA 样品上样至预先配置的 1% 浓度的琼脂糖凝胶中,并加入电泳液在电泳仪上电泳约 30 min,然后在全自动荧光及化学发光系统中成像并拍照分析。

1.3.8 Western blot 法检测相关蛋白表达

将处于对数期的 (ER-) MDA-MB-453、(ER+) MCF-7 细胞,以 2.0×10^5 /mL 接种到 100 mm 的细胞培养皿中,每个皿中含 8.0 mL 完全培养基,放入培养箱中过夜后用于实验;消化、离心收集实验药物处理 48 h 的各组细胞置于 Ep 管内,每个 Ep 管内滴加 2.0 mL 的 RIPA 裂解液 (含一定浓度的磷酸酶、蛋白酶抑制剂),置于冰浴中 0.5 h (每 10 min 混匀 1 次),随后将 Ep 管离心,将含有蛋白的上清液移到另一干净的 Ep 管中,按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书,对提取的各组蛋白进行定量。将定量的蛋白样品依次经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、转膜、封闭,一抗反应、二抗反应后,滴加 ECL 发光液在成像系统仪内发光,获取目的蛋白及内参蛋白 (GAPDH) 图像信息,通过 Image J 软件分析蛋白灰度值。

1.3.9 qRT-PCR 法检测 Bim、FoxO3a、FoxO1a mRNA 表达

细胞准备及分组处理情况同“1.3.6”;取出 DEFSJ-CS 作用 48 h 的各组细胞。采用 TRIzol 法,将 1 mL TRIzol 溶液加到培养板的各孔中以获取总 RNA, RNA 的浓度和纯度通过微量分光光度计分析用 A_{260}/A_{280} 处的吸光度比值来评估,依据 PrimeScript^{RT} reagent Kit 说明书,进行 cDNA 的合成,然后以 cDNA 为模板,依据 PremixEx Tap 说明书执行定量 PCR 反应,将 β -actin 当做管家基因,检测 FoxO3a、FoxO1a、Bim 基因;待测基因引物序列及扩增长度见表 1。测得各组样本的 Ct 值,用如下公式进行相对定量计算:待测基因的相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{对照基因}}) - (Ct_{\text{管家目的基因}} - Ct_{\text{管家对照基因}})$)。

1.3.10 激光共聚焦显微镜下观察 FoxO3a 蛋白核转位变化

将处于对数期的 (ER-) MDA-MB-453、(ER+) MCF-7 细胞,以 2.0×10^5 /mL 的密度移植置共聚焦 12 孔培养板 (黑壁底透) 内,每孔 1.0 mL 完全培养基,放入培养箱中过夜后用于实验,分组设置为阴

表 1 引物的组成和被扩增产物的长度 Table 1 Designed primer and amplified length		
基因 Gene	引物序列 Primer sequences	长度/bp Length
β -actin	F: 5'-GTTGTCGACGACGAGCG-3' R: 5'-GCACAGAGCCTCGCCTT-3'	93
FoxO3a	F: 5'-AGTTCCCTCATTTCTGGACCC-3' R: 5'-CTTCAAGGATAAGGGCGACA-3'	102
FoxO1a	F: 5'-GCACACGAATGAAGTCTGCTG-3' R: 5'-AAGAGCGTGCCTACTTCAA-3'	106
Bim	F: 5'-GATAGTGGTTGAAGGCCTGG-3' R: 5'-CCTCCCTACAGACAGAGCCA-3'	102

性对照组、DEFSJ-CS 中剂量组、DEFSJ-CS 中剂量组 + LY294002 (PI3k 信号通路抑制剂) 组,置培养箱中继续孵育 48 h 后终止,进行免疫染色,具体步骤如下:培养板中的细胞经固定液固定,通透液通透,在室温中用含有 1% BSA 的磷酸盐缓冲液进行封闭 0.5 h;滴加 anti-FoxO3a 抗体,在 4 ℃ 环境中反应过夜,次日加入荧光二抗在室温条件下避光、孵育 1.5 h;并用 DAPI 染料对细胞核进行染色;激光共聚焦显微镜下获取接受不同处理的细胞形态变化、目的蛋白表达位置的变化并拍照,所有图片拍摄时激光强度设置相同。

1.4 统计学方法

实验结果数据以平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用 SPSS 19.0 软件处理,根据方差齐性检验结果,多组间比较采用单因素方差分析,组间的对比采取 Dunnett-*t* 方法,数据的比较结果按照 $P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 UHPLC 对 DEFSJ 提取液质控分析结果

采用 UHPLC 对 5 批 DEFSJ 提取液进行质控分析,结果如图 1 所示,各批次提取液成分稳定,证明制备工艺可行,质量可控,保证了后续药理实验结果的准确性。

2.2 DEFSJ-CS 对乳腺癌细胞 DNA“梯带”形成的影响

通过琼脂糖凝胶电泳分析 DEFSJ-CS 作用后乳腺癌细胞的核酸片段化程度,以判断细胞凋亡程度。结果发现阴性对照组细胞无 DNA 损伤,电泳图显示为一条区带;DEFSJ-CS 作用后的各组细胞,电泳均呈现“梯形”条带,且“梯形”条带特征呈显著浓度依赖,结果如图 2 所示。

2.3 DEFSJ-CS 对细胞中 Bim、FoxO3a、FoxO1a mRNA 表达的影响

由图 3 可知,与阴性对照组比较,DEFSJ-CS 可浓度依赖性的对细胞中 FoxO3a、FoxO1a mRNA 表达下调,对 Bim mRNA 表达上调($P<0.05$, $P<0.01$),且对 (ER-) MDA-MB-453 细胞中相关基因表达的作用趋势更为显著。

2.4 DEFSJ-CS 对细胞中 p-PI3k、p-Akt、p-FoxO3a、p-FoxO1a 和 Bim 蛋白表达影响

通过 Western blot 法检测 DEFSJ-CS 对细胞中 PI3k/Akt 信号通路相关蛋白的表达变化,由图 4 可知,与阴性对照组比较,DEFSJ-CS 作用可抑制 (ER+) MCF-7 细胞 p-PI3k、p-Akt 和 p-FoxO3a 蛋白的表

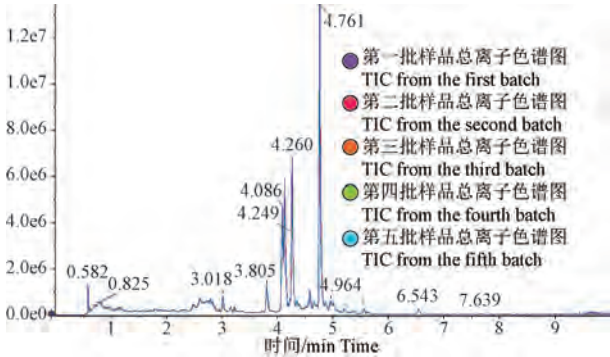
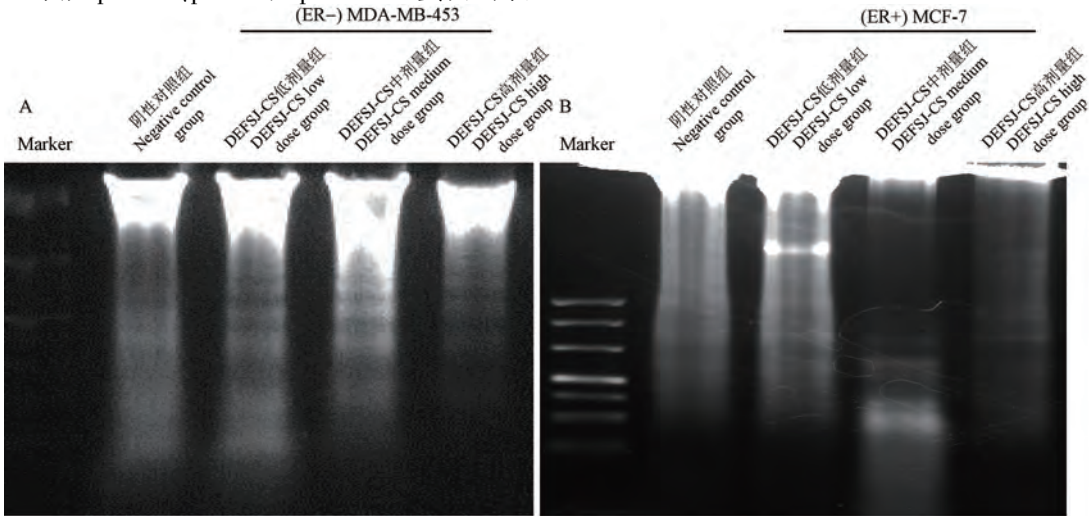
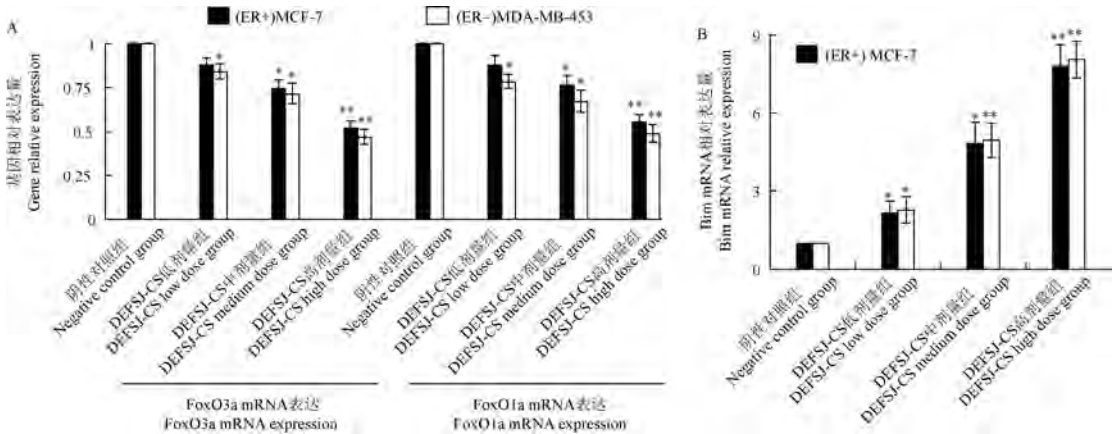


图 1 5 批 DEFSJ 提取液的离子峰图拼图
Figure 1 Base peak chromatograms of the DEFSJ extract derived from five batches



注:A: (ER-) MDA-MB-453 细胞效果图;B: (ER+) MCF-7 细胞效果图。
图 2 DEFSJ-CS 对 (ER-) MDA-MB-453 和 (ER+) MCF-7 细胞 DNA ladder 形成的影响
Note. A, (ER-) MDA-MB-453 cell drawing. B, (ER+) MCF-7 cell drawing.

Figure 2 Effect of DEFSJ-CS on DNA ladder in (ER-) MDA-MB-453 and (ER+) MCF-7 cells

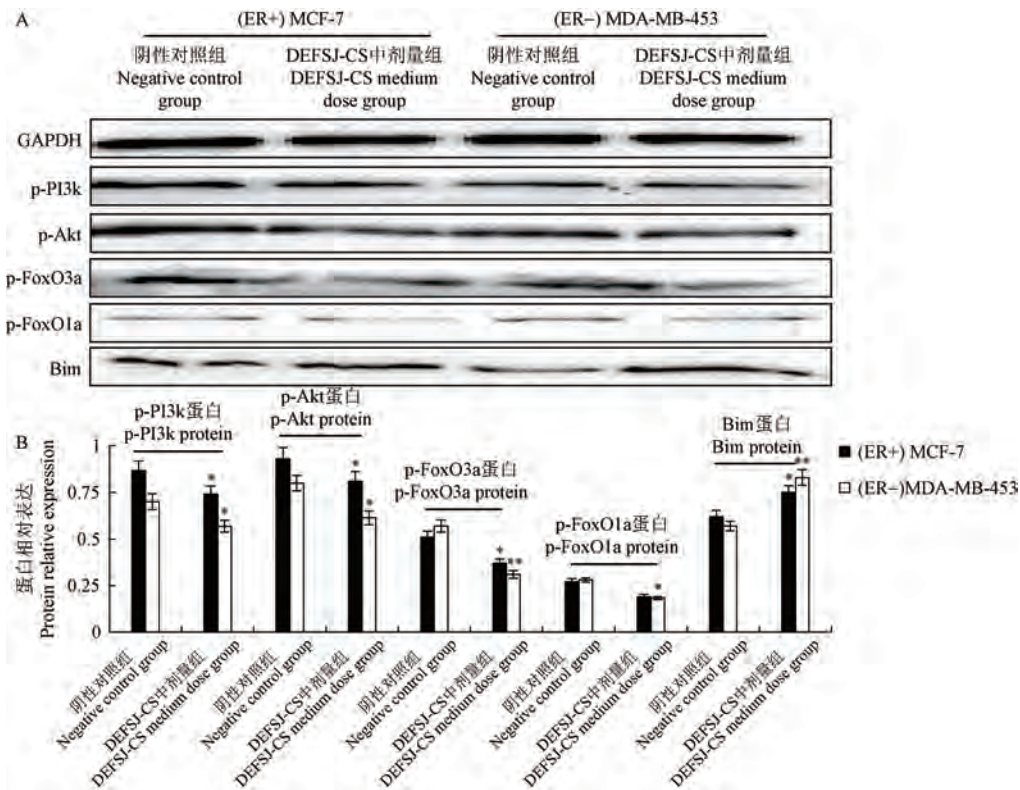


注:A:FoxO3a mRNA 和 FoxO1a mRNA 表达;B:Bim mRNA 表达。与阴性对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
图 3 DEFSJ-CS 对 (ER-) MDA-MB-453 和 (ER+) MCF-7 细胞中相关 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Note. A, FoxO3a and FoxO1a mRNA rendering. B, Bim mRNA rendering. Compared with negative control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 3 Effect of DEFSJ-CS on levels of related mRNA in (ER-) MDA-MB-453 and (ER+) MCF-7 cells

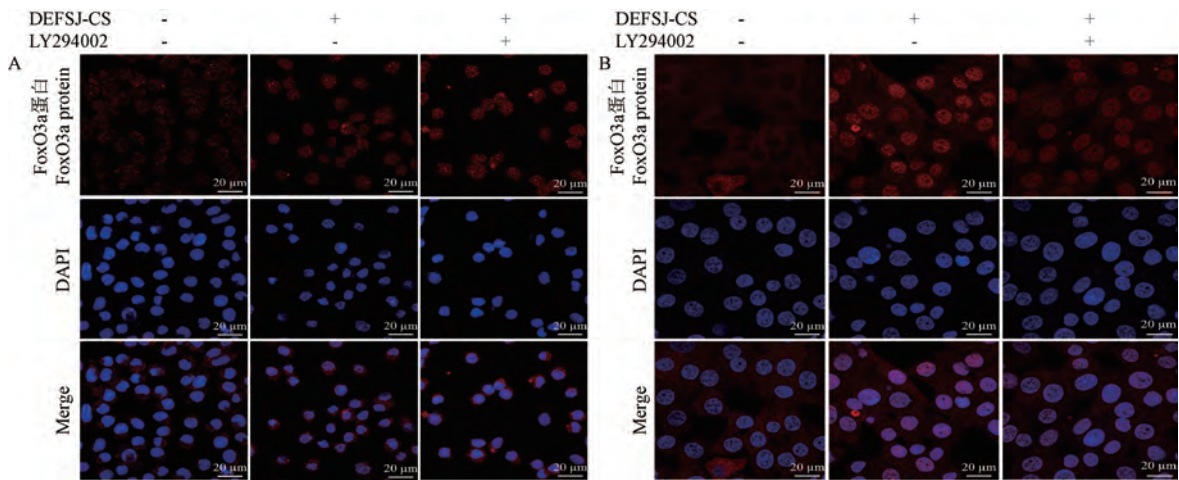
达水平,上调 Bim 蛋白的表达 ($P<0.05$);抑制(ER-)MDA-MB-453 细胞 p-PI3k、p-Akt、p-FoxO3a 和 p-FoxO1a 蛋白的表达水平,上调 Bim 蛋白的表达 ($P<0.05$, $P<0.01$),且对(ER-)MDA-MB-453 细胞中相

关蛋白表达的作用趋势更为显著。
2.5 DEFSJ-CS 对乳腺癌细胞中 FoxO3a 蛋白核转位的影响
DEFSJ-CS或联合LY294002药理性封闭对(ER



注:A:作用效果图;B:定量结果。与阴性对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。
图 4 DEFSJ-CS 对(ER-)MDA-MB-453 和(ER+)MCF-7 细胞 PI3k/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Note. A, Rendering. B, Quantitive result. Compared with negative control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 4 Effect of DEFSJ-CS on levels of PI3k/Akt signal pathway related protein in (ER-) MDA-MB-453 and (ER+) MCF-7 cells



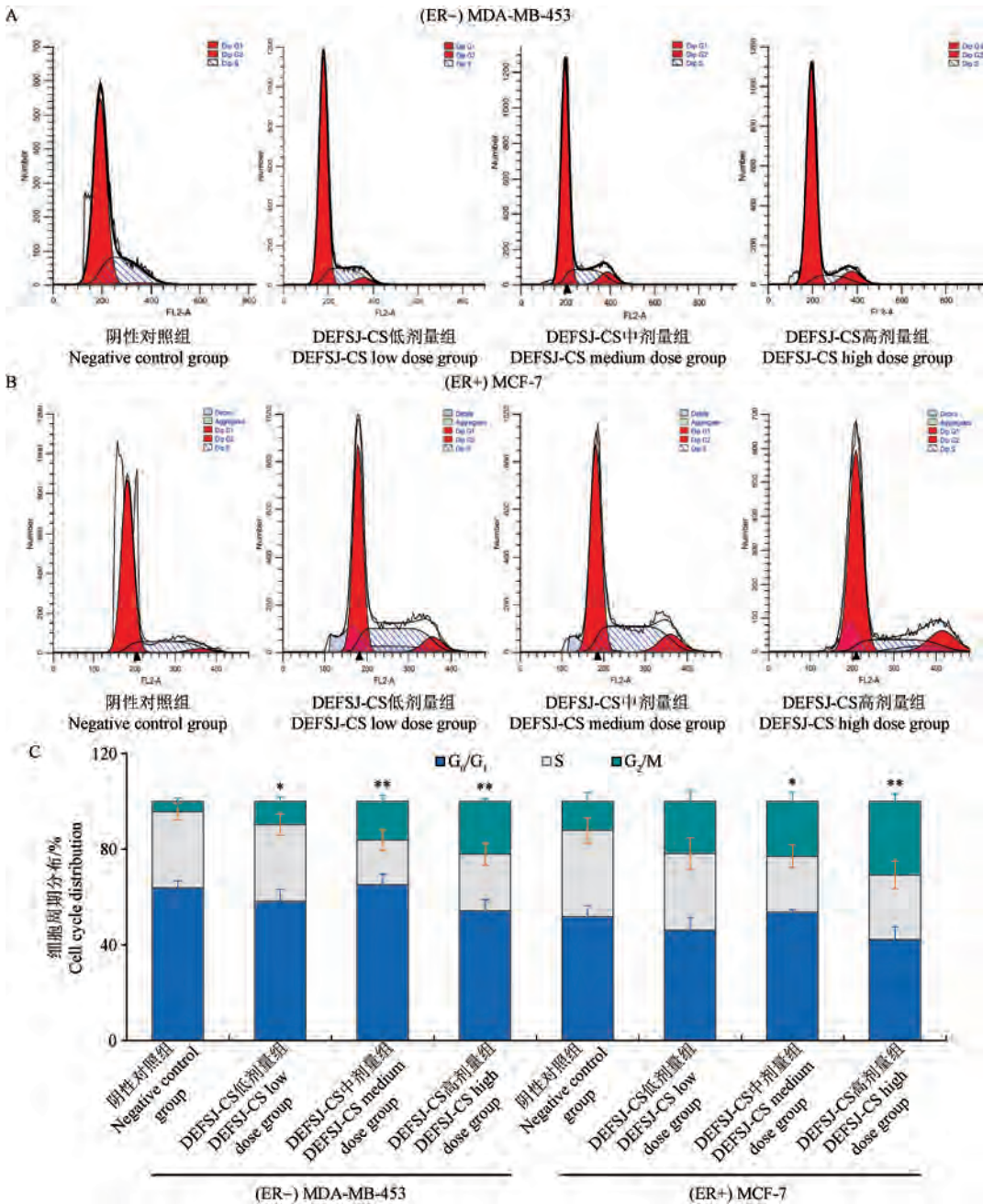
注:A:(ER-)MDA-MB-453 细胞效果图;B:(ER+)MCF-7 细胞效果图。
图 5 DEFSJ-CS 对(ER-)MDA-MB-453 或(ER+)MCF-7 细胞 FoxO3a 蛋白核转位的影响
Note. A, (ER-) MDA-MB-453 cell drawing. B, (ER+) MCF-7 cell drawing.

Figure 5 Effect of DEFSJ-CS on nuclear translocation of FoxO3a protein in (ER-) MDA-MB-453 and (ER+) MCF-7 cells

-)MDA-MB-453、(ER+)MCF-7 细胞中 FoxO3a 蛋白核转位的变化结果如图 5 所示。阴性对照组中 DAPI 染色的核区域内无明显红色荧光,但胞质中红色荧光相对较明显,而 DEFSJ-CS 作用后胞质及胞核中均可见红色荧光,DEFSJ-CS 联合 LY294002 共同反应的细胞核区域中可见红色荧光强度增加,呈现蛋白的核转位变化。

2.6 DEFSJ-CS 对乳腺癌细胞周期分布的影响

如图 6 所示,与阴性对照组比较,DEFSJ-CS 低、中、高剂量组能阻断 (ER-) MDA-MB-453 细胞于 G₂/M 期 ($P<0.05, P<0.01$), DEFSJ-CS 中、高剂量组能阻断 (ER+) MCF-7 细胞于 G₂/M 期 ($P<0.05, P<0.01$),可见对 (ER-) MDA-MB-453 细胞的周期阻断效果更为显著。



注:A:(ER-)MDA-MB-453 细胞效果图;B:(ER+)MCF-7 细胞效果图;C:定量结果。与阴性对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 6 DEFSJ-CS 对 (ER-)MDA-MB-453 和 (ER+)MCF-7 细胞周期分布的影响($\bar{x}\pm s,n=3$)

Note. A, (ER-) MDA-MB-453 cell drawing. B, (ER+) MCF-7 cell drawing. C, Quantitive results. Compared with negative control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 6 Effect of DEFSJ-CS on cell cycle distribution in (ER-) MDA-MB-453 and (ER+) MCF-7 cells

3 讨论

在民间,狼毒蒸枣,食其枣来治疗实体瘤^[8],如今现临床上对此说法并未得到证实。狼毒大戟被制成各种类型的制剂,用于治疗肺结核、坏血病、胸闷、溃疡等疾病^[9];但目前并没有治疗肿瘤的制剂上市。但有相关的文献报道,5.0 g/kg 狼毒大戟水提液对 S180 腹水瘤小鼠的抑瘤率达到 33.6%^[10]。另外,前期对大戟大枣汤(DEFJSJ)的急性毒性实验研究发现,DEFJSJ 在昆明小鼠上的半数致死量为 12.60 g/kg^[11],结合前期研究也证实 DEFJSJ 在体外有较好的抗乳腺肿瘤作用^[7-8]。这些为本研究用药剂量的确定奠定了基础。

本研究首先对 DEFJSJ 提取液进行了质控分析,结果证实其成分稳定,制备工艺可行,保证了后续药理学实验结果的准确性。研究发现,DEFJSJ-CS 作用 48 h 可阻滞乳腺癌(ER-)MDA-MB-453 细胞及(ER+)MCF-7 细胞于 G₂/M 期,且对 MDA-MB-453 细胞的阻断效果更为显著。文献报道,细胞周期出现异常对于肿瘤发生、发展的影响至关重要^[12]。抗肿瘤药物也可通过诱导 DNA 的异常嵌入和损伤,催化下游底物包括细胞周期相关因子等进一步磷酸化来实现抗肿瘤作用^[13]。研究中又通过 DNA 琼脂糖凝胶电泳实验发现,DEFJSJ-CS 的作用也可使两种乳腺癌细胞呈现核酸片段化的 DNA ladder 梯带。而 DNA 损伤是许多药物发挥抗肿瘤作用的重要机制^[14-15]。抗癌药物亦可诱导癌细胞 DNA 双链断裂,进而促进肿瘤细胞的凋亡^[16]。研究证实,致使肿瘤细胞发生无限增殖的一个重要因素是细胞凋亡的失衡;因此,针对干预肿瘤细胞凋亡的研究也是肿瘤治疗研究中的热点^[12]。这与前期研究结果,“DEFJSJ 在体外可抑制乳腺癌细胞增殖并诱导细胞凋亡的作用”^[7]相符合。

无论细胞周期阻断还是诱导细胞凋亡作用,都要受到相关信号通路的调控。有研究指出,作为人体内重要信号通路之一的 PI3k/Akt 信号通路影响甚广,其与机体内的生理、病理过程以及生物学过程如细胞的增殖、凋亡、蛋白质的翻译等均密切相关^[17]。FoxO1a 及 FoxO3a 均为 Fox 家族的重要成员,是 PI3k/Akt 通路下游的关键因子^[18]。FoxO1a 作为 PI3k/Akt 信号途径下游重要靶蛋白之一,随着 PI3K/Akt 通路的活化而被磷酸化激活后可影响细胞的增殖、凋亡等生物学活动^[19]。在 PI3k/Akt 转

导途径遭受抑制作用时,去磷酸化的 FoxO3a 就能从细胞浆中转入细胞核内,从而导致下游细胞中的 Bim 蛋白表达水平增多,进而使细胞出现凋亡状态^[20]。内源性 FoxO3a 核转位的发生也被公认成是细胞发生凋亡的显著特征^[21]。

前期研究也发现,PI3k/Akt 通路可能参与了 DEFSJ 对乳腺癌增殖及凋亡的调控^[7];本研究进一步通过 Western blot 法及 qRT-PCR 法检测了 PI3k/Akt 通路相关因子的表达,发现 DEFSJ-CS 能使两种不同表型的乳腺癌细胞中 p-PI3k、p-Akt、p-FoxO3a 及 p-FoxO1a 蛋白表达降低,使 Bim 蛋白表达升高,使 FoxO3a、FoxO1a mRNA 表达降低,使 Bim mRNA 表达升高;并进一步通过激光共聚焦显微镜观察到 DEFSJ-CS 作用后细胞呈现显著的 FoxO3a 蛋白核转位;且各数据结果均显示 DEFSJ-CS 对(ER-)MDA-MB-453 细胞比对(ER+)MCF-7 细胞作用效果更好。

综上,DEFJSJ 在体外可通过 PI3k/Akt 通路参与对激素受体阴性和激素受体阳性乳腺癌细胞的增殖抑制及诱导凋亡作用的调控,且作用效果因乳腺癌表型的差异而不同。本研究将为乳腺癌的个体化精准治疗研究提供思路和依据。

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] 辛雨濛,梁恒熙,孙震晓.甘草干姜汤抗小鼠乳腺癌实验研究[J].癌变·畸变·突变,2022,34(2):88-92.
XIN Y M, LIANG H X, SUN Z X. Effectiveness of licorice and dried ginger decoction against mouse breast cancers [J]. Carcinog Teratog Mutagen, 2022, 34(2): 88-92.
- [3] 邹辣,吴绮楠.激素受体阳性乳腺癌的内分泌治疗[J].重庆医科大学学报,2021,46(1):91-96.
ZOU L, WU Q N. Endocrine therapy in hormone receptor positive breast cancer [J]. J Chongqing Med Univ, 2021, 46(1): 91-96.
- [4] GARCIA-CLOSAS M, COUCH F J, LINDSTROM S, et al. Genome-wide association studies identify four ER negative-specific breast cancer risk loci [J]. Nat Genet, 2013, 45(4): 392-398, 398e1-398e2.
- [5] 李云祥,梁引库,高飞雄,等.中药治疗乳腺癌疾病研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(3):211-219.
LI Y X, LIANG Y K, GAO F X, et al. Research progress of traditional Chinese medicine in treating breast cancer [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2019, 25(3): 211-219.
- [6] 卢雯平,卓至丽.乳腺癌的中医药防治现状及展望[J].中国

- 医药, 2022, 17(3): 321–325.
- LU W P, ZHUO Z L. Current situation and prospect of traditional Chinese medicine in prevention and treatment of breast cancer [J]. China Med, 2022, 17(3): 321–325.
- [7] 马立威, 陈哲, 陈颂, 等. 狼毒大戟配伍大枣水煎液体外抗乳腺癌作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(2): 66–75.
- MA L W, CHEN Z, CHEN S, et al. Study of the anti-breast cancer effects and mechanisms of decoction of *Euphorbia fischeriana* Steud. and *jujuba in vitro* [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(2): 66–75.
- [8] 马立威, 陈哲, 李京, 等. 大戟大枣汤含药血清通过 PI3k/Akt 通路对乳腺癌细胞凋亡的影响 [J]. 中成药, 2020, 42(10): 2584–2591.
- MA L W, CHEN Z, LI J, et al. Effects of Decoction of *Euphorbia fischeriana* Steud. and *Ziziphus jujuba* Mill. medicated serum on apoptosis of breast cancer cells via p13k/Akt pathway [J]. Chin Tradit Pat Med, 2020, 42(10): 2584–2591.
- [9] LI Y N, HE J, ZHANG J, et al. Existing knowledge on *Euphorbia fischeriana* Steud. (Euphorbiaceae): traditional uses, clinical applications, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 275: 114095.
- [10] 邢世江, 王镜, 李兴玉. 复方狼毒对小鼠移植性肿瘤生长的影响 [J]. 兰州医学院学报, 1998(1): 13–14.
- XING S J, WANG J, LI X Y. Effect of compound *Euphorbiae ebracteolatae* Radix on the growth of transplanted tumors in mice [J]. J Lanzhou Med Coll, 1998(1): 13–14.
- [11] 马立威, 樊丽, 倪世宇, 等. 狼毒粉、狼毒大枣汤的单次给药毒性研究 [J]. 中国医药导报, 2018, 15(2): 4–8, 18.
- MA L W, FAN L, NI S Y, et al. Study on single drug toxicity of *Euphorbia fischeriana* Steud Powder and Decoction of Compatibility of *Euphorbia fischeriana* Steud and *Jujubae* [J]. China Med Her, 2018, 15(2): 4–8, 18.
- [12] 李霖枫, 陈重华, 李天平. 牛蒡子苷对三阴性乳腺癌 MDA-MB-453 细胞增殖和凋亡的影响及作用机制 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(8): 602–608.
- LI L F, CHEN C H, LI T P. Effect and mechanism of arctiin on cell proliferation and apoptosis of triple negative breast cancer MDA-MB-453 cells [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2021, 35(8): 602–608.
- [13] FOSTIRA F, TSITLAIDOU M, PAPADIMITRIOU C, et al. Prevalence of BRCA1 mutations among 403 women with triple-negative breast cancer: implications for genetic screening selection criteria: a Hellenic Cooperative Oncology Group Study [J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 134(1): 353–362.
- [14] 戴奇男, 张景红. 肿瘤多药耐药与自噬、DNA 修复和肿瘤干细胞相关的分子机制研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2020, 40(4): 69–77.
- DAI Q N, ZHANG J H. Advances in molecular mechanisms related to tumor multi-drug resistance, autophagy, DNA repair and tumor stem cells [J]. China Biotechnol, 2020, 40(4): 69–77.
- [15] RUDOLF E, KRALOVA V, RUDOLF K, et al. The role of p38 in irinotecan-induced DNA damage and apoptosis of colon cancer cells [J]. Mutat Res, 2013, 741/742: 27–34.
- [16] BARBOSA F A R, SIMINSKI T, CANTO R F S, et al. Novel pyrimidinic selenourea induces DNA damage, cell cycle arrest, and apoptosis in human breast carcinoma [J]. Eur J Med Chem, 2018, 155: 503–515.
- [17] MAETANI Y, ASANO S, MIZOKAMI A, et al. Expression of PRIP, a phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate binding protein, attenuates PI3K/AKT signaling and suppresses tumor growth in a xenograft mouse model [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 552: 106–113.
- [18] FU Z, TINDALL D J. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis [J]. Oncogene, 2008, 27(16): 2312–2319.
- [19] HE F, ZHANG N, LV Y, et al. Low-dose lipopolysaccharide inhibits neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia/reperfusion injury via the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway in rats [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(3): 1443–1452.
- [20] SEDDING D G. FoxO transcription factors in oxidative stress response and ageing—a new fork on the way to longevity? [J]. Biol Chem, 2008, 389(3): 279–283.
- [21] LIU Z, SHI Z, LIN J, et al. Piperlongumine-induced nuclear translocation of the FOXO3A transcription factor triggers BIM-mediated apoptosis in cancer cells [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 163: 101–110.

〔收稿日期〕2023–04–19

刘燕, 彭梦薇, 刘高源, 等. 4T1 乳腺癌细胞株接种联合慢性束缚应激诱导乳腺癌合并抑郁小鼠模型构建探索 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 36-44, 50.

Liu Y, Peng MW, Liu GY, et al. Exploration of mouse model of breast cancer complicated with depression induced using 4T1 breast cancer cell inoculation combined with chronic restraint stress [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 36-44, 50.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.005

4T1 乳腺癌细胞株接种联合慢性束缚应激诱导 乳腺癌合并抑郁小鼠模型构建探索

刘 燕^{1,3}, 彭梦薇¹, 刘高源¹, 杨铁柱², 张文娴¹, 吴耀松¹, 陈玉龙^{1*}

(1. 河南中医药大学中医学院(仲景学院), 河南省中医方证信号传导重点实验室, 郑州 450046;

2. 河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)重症医学科, 郑州 450000;

3. 河南中医药大学, 河南省豫药全产业链研发协同创新中心, 郑州 450046)

【摘要】 目的 研究 4T1 乳腺癌细胞株接种联合慢性束缚应激方法构建乳腺癌合并抑郁症小鼠模型核心行为症状、生物学指标、病理学等改变。**方法** BABL/c 小鼠随机分为正常(Control)组、束缚(Stress)组、移植瘤(Tumor)组和束缚移植瘤(Stress+Tumor, S+T)组, 将 4T1 细胞株接种于 Tumor 和 S+T 组小鼠腋下, 待成瘤后, 给予 Stress 和 S+T 组小鼠束缚应激 21 d。造模期间监测各组小鼠体重、摄食量。实验结束后, 采用糖水偏好、旷场、高架十字迷宫、强迫游泳等试验评价各组小鼠抑郁样行为。小鼠处死后, 测量小鼠瘤体重量和体积; 采用 ELISA 方法检测各组小鼠血清肿瘤标志物糖类抗原(CA199)、癌胚抗原(CEA)、血管内皮生长因子(VEGF)以及相关神经递质 5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)、皮质酮(CORT)的含量; 运用 HE 染色法观察小鼠肿瘤和海马组织病理学改变。**结果** S+T 组小鼠体重、摄食量显著降低, 瘤体重量和体积明显增大, 血清肿瘤标志物(CA199、CEA、VEGF)水平显著升高, 快感和对新环境的探索欲望减弱, 紧张和绝望行为显著增强, 血清神经递质 5-HT 和 NE 水平显著降低, CORT 水平显著升高; 另外肿瘤组织细胞排列松散, 间质减少, 病理性核分裂象增多, 海马 CA3 区神经元细胞排列和形态紊乱, 核内空泡化样改变明显。**结论** 4T1 乳腺癌细胞株接种联合慢性束缚应激诱导的乳腺癌合并抑郁小鼠模型出现了乳腺癌和抑郁症双重典型症状和生物学指标改变, 可为乳腺癌合并抑郁实验研究提供较好的模型参考。

【关键词】 乳腺癌合并抑郁; 移植瘤; 慢性束缚应激; 肿瘤标志物; 神经递质; 行为学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0036-09

Exploration of mouse model of breast cancer complicated with depression induced using 4T1 breast cancer cell inoculation combined with chronic restraint stress

LIU Yan^{1,3}, PENG Mengwei¹, LIU Gaoyuan¹, YANG Tiezhu², ZHANG Wenxian¹, WU Yaosong¹, CHEN Yulong^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine(Zhoujing College), Henan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Prescription and Syndrome Signaling, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Intensive Care Unit, Luoyang Orthopedic Hospital of Henan Province (Orthopedic Hospital of Henan Province), Zhengzhou 450000.

【基金项目】 国家自然科学基金(82104717); 河南省“双一流”创建学科中医学科学研究专项(HSRP-DFCTCM-2023-1-11); 河南省科技厅河南省重点研发与推广专项(科技攻关)(232102310443, 202102310493); 河南省特色骨干学科中医学学科建设项目(STG-ZYXKY-2020028)。

【作者简介】 刘燕(1984—), 女, 博士, 高级实验师, 硕士生导师, 研究方向: 肝郁方证基础研究。E-mail: hnyan@163.com

【通信作者】 陈玉龙(1973—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医方证基础研究。E-mail: cyl72621@163.com

3. Henan University of Chinese Medicine, Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry Chain of Yu-Yao, Henan Province, Zhengzhou 450046)

【Abstract】 Objective To study the core behavioral symptoms, biological indicators, and pathological changes of a mouse model of breast cancer complicated with depression induced using 4T1 breast cancer cell inoculation combined with chronic restraint stress (CRS). **Methods** BALB/c mice were randomly divided into Control, Stress, Tumor, and stress combined with tumor (S+T) groups. Mice in the tumor and S+T groups were inoculated under the front legs with breast cancer 4T1 cells. After tumor formation, mice in the stress and S+T groups were subjected to CRS for 21 days. The body weight and food intake of each group were monitored during modeling. After the experiment, the occurrence of depression-like behavior of mice in each group was evaluated by sucrose preference test, open field test, elevated plus-maze test, and forced swimming test. After the mice were decapitated, the weights and volumes of the tumors were measured. Concentrations of serum tumor markers, including carbohydrate antigen (CA199), carcinoembryonic antigen (CEA), and vascular endothelial growth factor (VEGF), and related neurotransmitters, including 5-hydroxytryptamine (5-HT), norepinephrine (NE), and corticosterone (CORT), were determined using ELISA. HE staining was used to observe histopathological changes to the hippocampus and tumor. **Results** In S+T group mice, body weight and food intake were significantly decreased, tumor weight and volume were significantly increased, serum tumor marker (CA199, CEA, VEGF) levels were significantly increased, enthusiasm and desire to explore a new environment were reduced, stress and despair behaviors were significantly increased, and levels of the serum neurotransmitters 5-HT and NE and levels of CORT were significantly increased. In addition, the cell arrangement in the tumor tissue was loose, the amount of intercellular substance decreased, the pathological nuclear classification phase was increased, the arrangement and morphology of neurons in the CA3 region of the hippocampus were disordered, and there were obvious nuclear vacuolation-like changes. **Conclusions** A mouse model of breast cancer complicated with depression induced by 4T1 breast cancer cell inoculation combined with CRS showed the typical dual symptoms and biological indicators of breast cancer and depression and can be used as a good reference model for experimental studies of breast cancer complicated with depression.

【Keywords】 breast cancer complicated with depression; transplanted tumor; chronic restraint stress; tumor marker; neurotransmitter; behavior

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

根据世界卫生组织国际癌症研究机构公布的 2020 年数据,乳腺癌最新诊断发病率首次超过肺癌,成为全球发病率第一的癌症^[1]。随着医疗策略的转变,人们逐渐意识到乳腺癌的发生不仅与生理因素有关,还与个人神经、心理因素和社会环境所造成的压力密切相关。与其他类型癌症相比,由于放化疗、乳房切除术、更年期等因素的副作用,乳腺癌患者的抑郁症发生率显著升高,而且抑郁情绪又可导致乳腺癌的复发和转移,从而直接影响乳腺癌患者的预后和生存率^[2]。因此,抑郁与乳腺癌之间的联系越来越受到研究者的重视,然而,目前关于乳腺癌合并抑郁症(breast cancer related depression,BCRD)的研究多倾向于临床,由于临床研究局限性较多,因此其深层分子机制研究的开展仍需要依靠动物模型来完成,故探索和构建乳腺癌合并抑郁症动物模型可为BCRD的防治研究,以及抑郁症和乳腺癌之间的关系研究等提供可靠的

模型参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

由北京华卓康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2019-0008]提供的 SPF 级 5 周龄,体重(13±2)g 的雌性 BALB/c 小鼠 40 只,饲养于河南中医药大学屏障动物房[SYXK(豫)2021-0015],饲养环境温度(22±2)℃,湿度 30%~40%,适应性喂养 1 周后进行造模。本实验中涉及的动物造模及相关操作程序得到河南中医药大学伦理委员会审核批准(DWLL202206003),实验设计及动物使用遵循 3R 原则。

1.1.2 细胞株

4T1 小鼠乳腺癌细胞株购于中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库(KCB200967YJ),以含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 (内含 2 mmol/L L-

glutamine)完全培养基,置于温度为 37 ℃,CO₂ 浓度为 5%的培养箱中常规传代培养。

1.2 主要试剂与仪器

小鼠 5-羟色胺酶联免疫吸附测定试剂盒 (Elabscience, 规格:48 T, 批号:E-EL-0033c);小鼠皮质酮酶联免疫吸附测定试剂盒 (Elabscience, 规格:48 T, 批号:E-OSEL-M0001);小鼠去甲肾上腺素 (NA/NE) 酶联免疫吸附测定试剂盒 (Elabscience, 规格:48 T, 批号:E-EL-0047c);小鼠血管内皮细胞生长因子 B (VEGF-B) 酶联免疫吸附测定试剂盒 (Elabscience, 规格:48 T, 批号:E-EL-M1229c);小鼠癌胚抗原 (CEA) 酶联免疫吸附检测试剂盒 (ELK Biotechnology, 48 T, 批号:ELK1130);小鼠 CA199 ELISA 试剂盒 (Fine Test, 规格:48 T, 批号:M0889I030);HE 染液 (索莱宝, 规格:500 mL, 批号:G1120);RPMI Medium1640 培养液 (Solarbio, 规格:500 mL, 批号:20221230);胎牛血清 (美国 Hyclone, 规格:500 mL, 批号:RK09403)。Tracking Master V3.1.59 型行为学分析系统 (北京众实科技有限公司);BioTek EPOCH 型多功能酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司);全自动生物组织脱水和石蜡包埋机 (Thermo 公司);DM750 型生物显微镜 (德国 LEICA)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及造模

40 只 BALB/c 小鼠根据随机数字表法平均分为正常 (Control) 组、束缚 (Stress) 组、移植瘤 (Tumor) 组和束缚移植瘤 (Stress+Tumor, S+T) 组,每组 10 只。4T1 细胞传代培养后,调整细胞浓度为 2×10^7 /mL,除正常组和束缚组外,其余各组小鼠均进行皮下接种 0.1 mL,75%乙醇消毒 BALB/c 小鼠右腋下皮毛,1 mL 注射器轻轻刺入皮下,推入细胞悬液,为保证细胞活力,实验过程将 4T1 细胞悬液置于含冰块的烧杯中,整个接种过程于 1 h 内完成^[3-4]。待 7 d 左右成瘤后,除正常组和移植瘤组小鼠外,其余各组小鼠均接受 21 d 束缚应激造模。

1.3.2 动物一般情况观察

体重和摄食量监测:每周记录小鼠摄食量和体重的改变,并算出各组每只小鼠的平均体重和摄食量。

肿瘤体积和重量:剥离移植瘤小鼠瘤体,称取瘤体重量,游标卡尺测量肿瘤体积大小,肿瘤体积 (cm^3) = $1/2ab^2$ (a 为肿瘤长径, b 为肿瘤短径)。

1.3.3 动物行为学检测

糖水偏好试验 (sucrose preference test, SPT) 是评估动物快感缺失症状及抑郁程度的重要手段。将小鼠单笼饲养,第 1 天给予小鼠两个均装满 1% 蔗糖水的饮水瓶;第 2 天给予小鼠两个饮水瓶,一个装纯净水,一个装 1% 蔗糖水;第 3 天禁食禁水;第 4 天正式试验开始时同时给予小鼠 1 瓶纯净水和 1 瓶 1% 蔗糖水,1 h 后同时取走两个水瓶并称重,根据公式:糖水偏好 = 糖水消耗量/总耗水量 $\times 100\%$, 计算各组动物糖水偏好。

强迫游泳试验 (forced swimming test, FST) 过程中的不动时间为反映动物绝望行为的主要指标。将小鼠放入注水的强迫游泳桶中进行 15 min“前游泳”,24 h 后,将小鼠再次置于游泳桶中进行 5 min“测试游泳”并录像,评测小鼠游泳行为与不动行为。

旷场试验 (open field test, OFT) 主要用来评价动物的自主运动能力,探索紧张、抑郁等行为。将小鼠放入 40 cm $\times$ 40 cm $\times$ 40 cm 规格且内部和底部为灰色的旷场箱底部中心位置,计时的同时进行视频采集,观察 5 min 内小鼠的活动情况,运用 Tracking Master V3.1.59 行为学分析系统对每组小鼠活动情况和行为进行分析和评价。

高架十字迷宫试验 (elevated plus-maze test, EPM) 是一个简单、快速、结果重复性好的焦虑检测模型,由两条开放臂 (50 cm $\times$ 10 cm)、两条封闭臂 (50 cm $\times$ 10 cm $\times$ 35 cm) 和连接四臂的中央区 (10 cm $\times$ 10 cm) 组成,距离地面高 60 cm。在中央区正上方 1.5 m 处安置摄像头。将小鼠面向闭合臂放入迷宫中央格,计时的同时进行视频采集,记录 5 min 内小鼠的活动情况,运用 Tracking Master V3.1.59 行为学分析系统对每组小鼠开放臂、封闭臂进入次数和停留时间进行分析。

1.3.4 小鼠血清神经递质 (5-HT、CORT、NE) 和肿瘤标志物 (VEGF、CEA、CA199) 含量检测

将各组小鼠全血样品室温放置 1 h 后,4 ℃, 1000 r/min 离心 20 min,取上清进行检测。分别设定标准孔、空白孔和样本孔。标准孔内按要求加入 50 μL 倍比稀释的标准品,空白孔加入 50 μL 样本稀释液,样本孔加入 50 μL 待测样本 (每个样本设立 3~5 个复孔),然后按照要求分别加入生物素化抗体工作液,37 ℃ 孵育 45 min,洗板,加入加酶结合工作液 100 μL ,37 ℃ 孵育 30 min,洗板,加入底物溶

液 90 μL, 37 ℃ 孵育 15 min, 当标准孔出现明显梯度时(前 4 个显色孔出现明显蓝色梯度), 每孔加入终止液 50 μL, 立即用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的光密度(OD 值)。

1.3.5 小鼠海马和肿瘤组织病理改变观察

石蜡切片脱蜡、水化——苏木素染色 5 min——流水冲洗 1 min——1% 盐酸酒精分色——伊红染色——自来水冲洗 30 s——梯度乙醇脱水——二甲苯透明——封片——显微镜观察拍照。

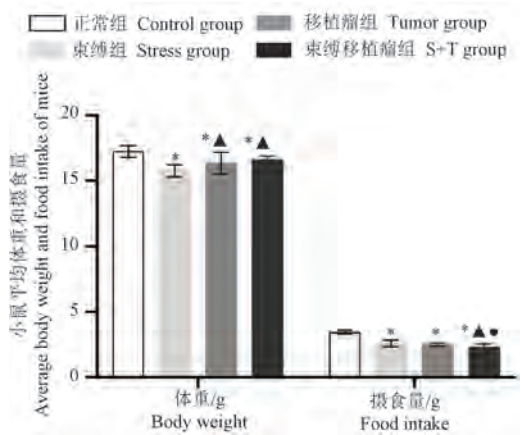
1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行分析, 计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述。方差齐性且符合正态分布数据时, 采用 One-Way ANOVA 方法对数据进行分析, 组间比较采用 LSD 检验, 数据不符合方差齐性组间比较采用 *T* 检验, *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠体重和摄食量比较

如图 1 所示, 束缚组、移植瘤组和束缚移植瘤组小鼠体重和摄食量较正常组均显著下降(*P*<0.05); 束缚组和束缚移植瘤组小鼠体重较束缚组显著增加(*P*<0.05); 束缚移植瘤组小鼠摄食量较束缚组和移植瘤组显著减少(*P*<0.05)。



注: 与正常组比较, **P*<0.05; 与束缚组比较, ▲*P*<0.05; 与移植瘤组比较, ●*P*<0.05。

图 1 各组小鼠体重和摄食量比较

Note. Compared with Control group, **P*<0.05. Compared with Stress group, ▲*P*<0.05. Compared with Tumor group, ●*P*<0.05.

Figure 1 Comparison of body weight and food intake of mice in each group

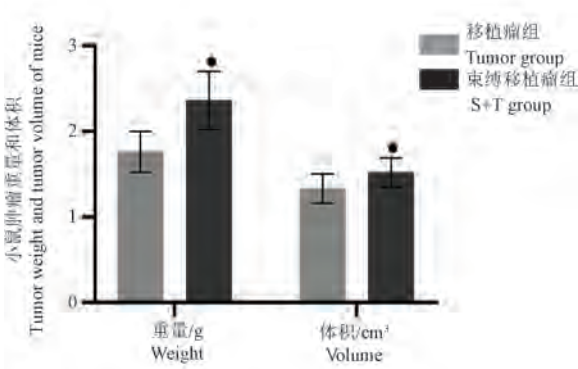
2.2 各组小鼠肿瘤重量和体积比较

如图 2 所示, 与移植瘤组比较, 束缚移植瘤组小鼠肿瘤重量和体积均显著增加(*P*<0.05)。

2.3 各组小鼠行为学检测结果

快感缺失变化如图 3 所示, 与正常组比较, 其余 3 组小鼠糖水消耗显著减少(*P*<0.05); 与束缚组和移植瘤组比较, 束缚移植瘤组小鼠糖水消耗量显著减少(*P*<0.05)。

绝望行为变化如图 4 所示, 与正常组比较, 其余 3 组小鼠 5 min 不动时间显著增加(*P*<0.05), 其中

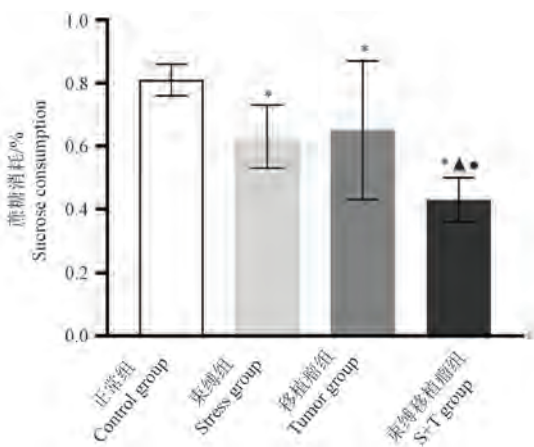


注: 与移植瘤组比较, ●*P*<0.05。

图 2 各组小鼠肿瘤重量和体积比较

Note. Compared with Tumor group, ●*P*<0.05.

Figure 2 Comparison of tumor weight and tumor volume of mice in each group



注: 与正常组比较, **P*<0.05; 与束缚组比较, ▲*P*<0.05; 与移植瘤组比较, ●*P*<0.05。

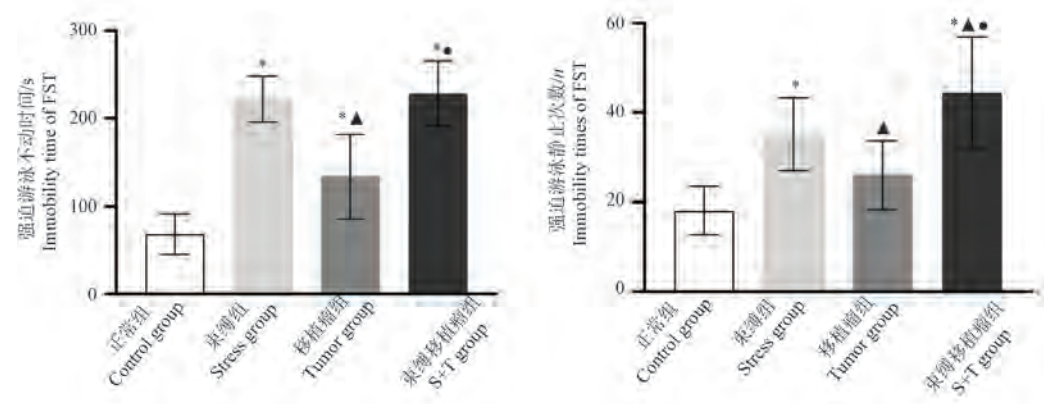
图 3 各组小鼠糖水偏好比较

Note. Compared with Control group, **P*<0.05. Compared with Stress group, ▲*P*<0.05. Compared with Tumor group, ●*P*<0.05.

Figure 3 Comparison of sucrose consumption of mice in each group

束缚组和束缚移植瘤组小鼠 5 min 不动次数也显著增加 ($P<0.05$) ;与束缚组比较,移植瘤组小鼠不动时间和次数显著增加 ($P<0.05$) ,束缚移植瘤组不动次数显著增加 ($P<0.05$) ;与移植瘤组比较,束缚移植瘤组小鼠不动时间和次数显著增加 ($P<0.05$) 。

自主运动和紧张意识的变化如图 5 所示,与正常组比较,其余 3 组小鼠总运动距离和中央区进入次数显著减少 ($P<0.05$) ,其中束缚和束缚移植瘤组小鼠中央区停留时间显著减少 ($P<0.05$) ;与束缚组比较,移植瘤组小鼠中央区停留时间显著增加 ($P<$

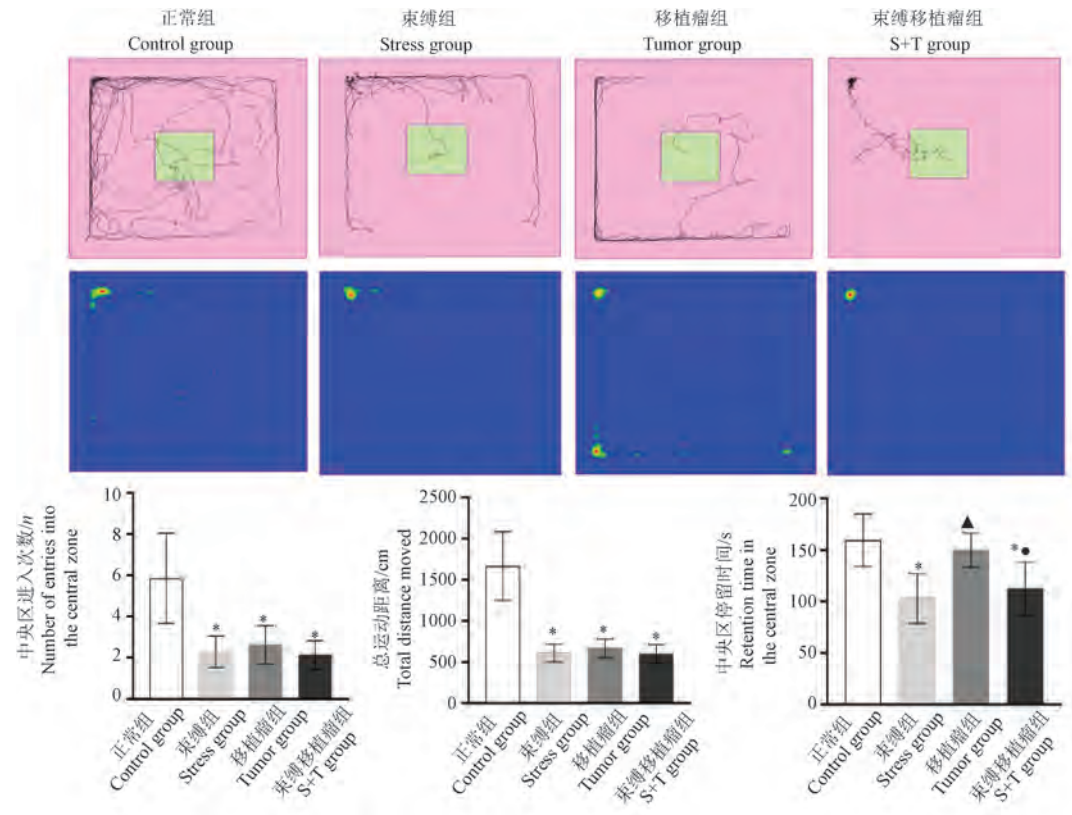


注:与正常组比较, * $P<0.05$;与束缚组比较, ▲ $P<0.05$;与移植瘤组比较, ● $P<0.05$ 。

图 4 各组小鼠 FST 过程中 5 min 不动时间和不动次数比较

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Stress group, ▲ $P<0.05$. Compared with Tumor group, ● $P<0.05$.

Figure 4 Comparison of immobility time and immobility times in 5 min during FST in each group of mice



注:与正常组比较, * $P<0.05$;与束缚组比较, ▲ $P<0.05$;与移植瘤组比较, ● $P<0.05$ 。

图 5 各组小鼠 OFT 过程总运动距离、中央区进入次数和停留时间比较

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Stress group, ▲ $P<0.05$. Compared with Tumor group, ● $P<0.05$.

Figure 5 Comparison of total distance moved, number of entries into the central zone, and retention time in the central zone of mice in each group

0.01);与移植瘤组比较,束缚移植瘤组小鼠中央区停留时间显著减少($P<0.05$)。

焦虑行为变化如图 6 所示,与正常组比较,其余各组小鼠开放臂停留时间比例显著减少($P<0.05$),束缚组和束缚移植瘤组小鼠开放臂进入次数比例显著减少($P<0.01$);与束缚组比较,移植瘤组小鼠开放臂进入次数显著增加($P<0.05$);与移植瘤组比较,束缚移植瘤组小鼠开放臂进入次数和停留时间比例显著减少($P<0.05$)。

2.4 各组小鼠血清神经递质含量

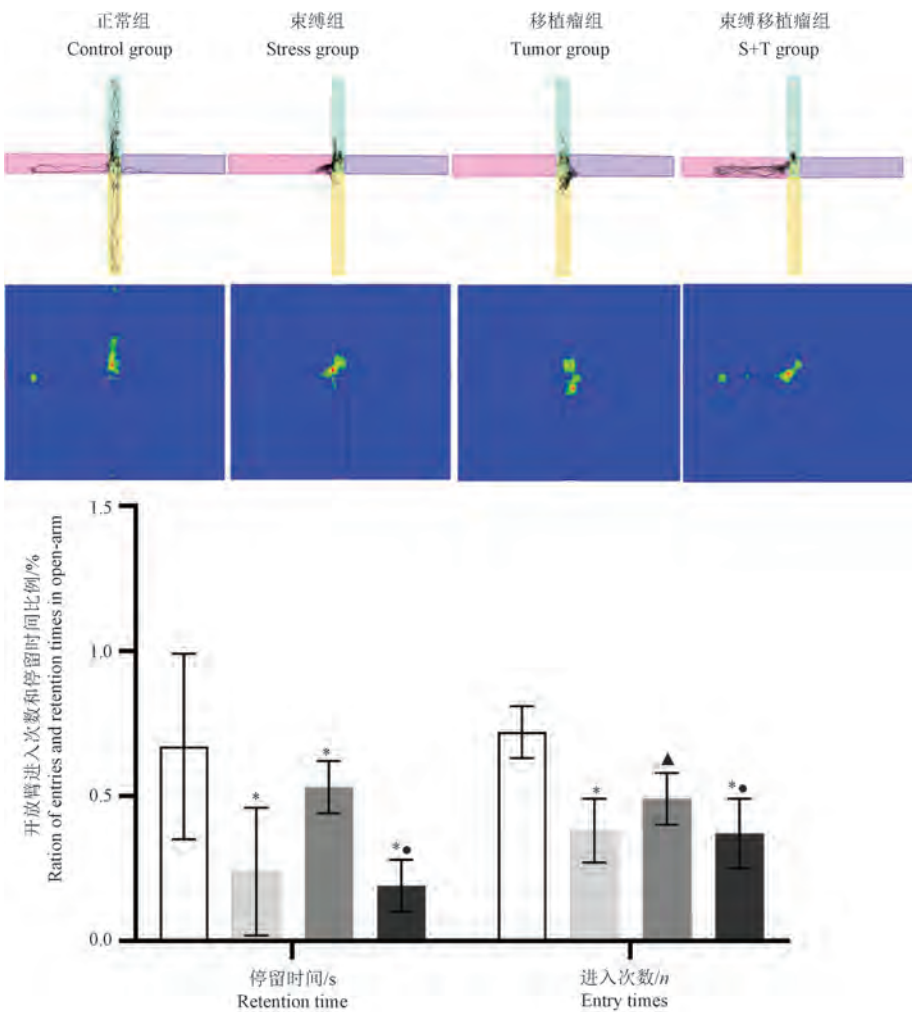
5-HT 含量如图 7A 所示,与正常组比较,其余各组小鼠血清 5-HT 含量显著减少($P<0.05$);与束缚组比较,移植瘤组 5-HT 显著升高($P<0.05$),而束缚移植瘤组显著降低($P<0.05$);与移植瘤组比较,束

缚移植瘤组 5-HT 显著降低($P<0.05$)。
CORT 含量如图 7C 所示,与正常组比较,其余各组小鼠血清 CORT 含量均显著升高($P<0.05$);与束缚组比较,移植瘤组小鼠血清 CORT 含量显著降低($P<0.05$),而束缚移植瘤组小鼠 CORT 含量显著升高($P<0.05$);与移植瘤组比较,束缚移植瘤组小鼠 CORT 含量显著升高($P<0.05$)。

NE 含量如图 7B 所示,与正常组比较,其余各组小鼠血清 NE 含量显著降低($P<0.05$);与束缚组比较,移植瘤组小鼠血清 NE 含量显著增加($P<0.05$),与移植瘤组比较,束缚移植瘤组小鼠血清 NE 含量显著减少($P<0.05$)。

2.5 各组小鼠血清肿瘤标志物含量

CEA 含量如图 8A 所示,与正常组和束缚组比



注:与正常组比较, * $P<0.05$;与束缚组比较, ^ $P<0.05$;与移植瘤组比较, • $P<0.05$ 。
图 6 各组小鼠 EPM 过程开放臂进入次数和停留时间比例比较
Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Stress group, ^ $P<0.05$. Compared with Tumor group, • $P<0.05$.
Figure 6 Comparison of ration of entries and retention time in the open-arm of EMP of mice in each group

较,移植瘤组和束缚移植瘤组小鼠血清 CEA 含量显著升高($P<0.05$);与移植瘤组比较,束缚移植瘤组小鼠血清 CEA 含量显著升高($P<0.05$)。

VEGF 含量如图 8B 所示,与正常组和束缚组比较,移植瘤组和束缚移植瘤组小鼠血清 VEGF 含量显著升高($P<0.05$);与移植瘤组比较,束缚移植瘤组小鼠血清 VEGF 含量显著升高($P<0.05$)。

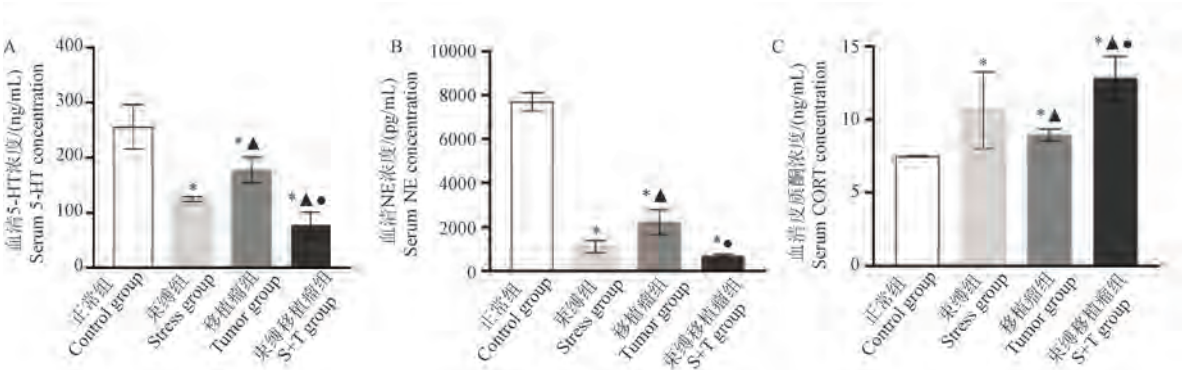
CA199 含量如图 8C 所示,与正常组比较,其余各组小鼠血清 CA199 含量显著升高($P<0.05$);与束缚组比较,移植瘤组和束缚移植瘤组小鼠血清 CA199 含量显著升高($P<0.05$);与移植瘤组比较,束缚移植瘤组小鼠血清 CA199 含量显著升高($P<0.05$)。

2.6 小鼠肿瘤和海马组织病理改变

肿瘤组织病理改变如图 9 所示,小鼠离体瘤呈

不规则球形或椭圆形,可见丰富的血管,呈肉样红色,部分瘤体有黑色的坏死区,质硬。HE 染色显示,移植瘤组小鼠移植瘤组织肿瘤细胞界限不清,细胞排列无规则,呈巢团状,间质细胞较少,可见较多病理性核分裂象;束缚移植瘤组小鼠移植瘤组织细胞排列较松散,间质细胞较移植瘤组减少,核大深染,病理性核分裂象较移植瘤组增多。

海马 CA3 区组织病理改变 HE 染色结果如图 10 所示,正常组小鼠海马 CA3 区神经元细胞排列整齐,细胞形态规则,间隙清晰;束缚组小鼠海马 CA3 区神经元细胞数量减少,细胞核内空泡样改变明显,细胞间隙增大,连接松散;移植瘤组小鼠和束缚移植瘤组小鼠海马 CA3 区神经元细胞排列紊乱,形态不规则,细胞间隙不清,核内空泡化样改变明显。

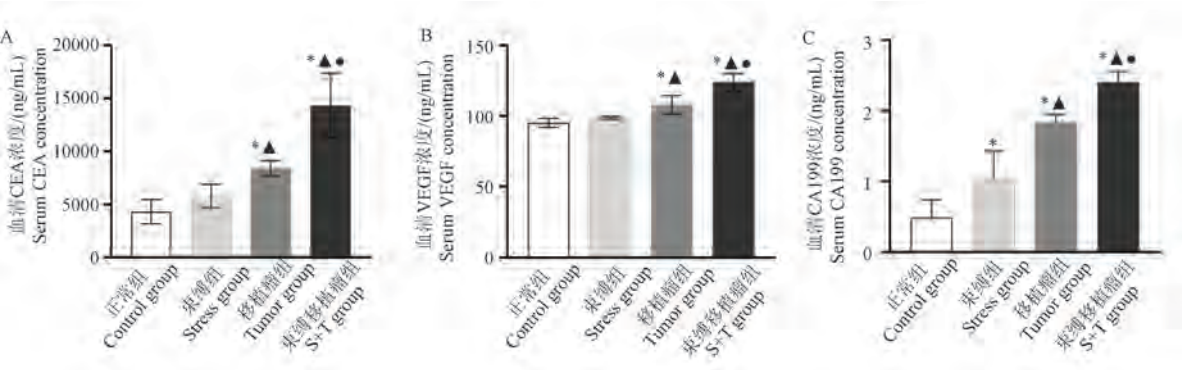


注:与正常组比较, * $P<0.05$;与束缚组比较, ▲ $P<0.05$;与移植瘤组比较, ● $P<0.05$ 。

图 7 各组小鼠血清神经递质 5-HT、NE 和 CORT 含量比较

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Stress group, ▲ $P<0.05$. Compared with Tumor group, ● $P<0.05$.

Figure 7 Comparison of serum neurotransmitter 5-HT, NE and CORT concentration of mice in each group



注:与正常组比较, * $P<0.05$;与束缚组比较, ▲ $P<0.05$;与移植瘤组比较, ● $P<0.05$ 。

图 8 各组小鼠血清肿瘤标志物含量比较

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Stress group, ▲ $P<0.05$. Compared with Tumor group, ● $P<0.05$.

Figure 8 Comparison of serum tumor marker concentration of mice in each group

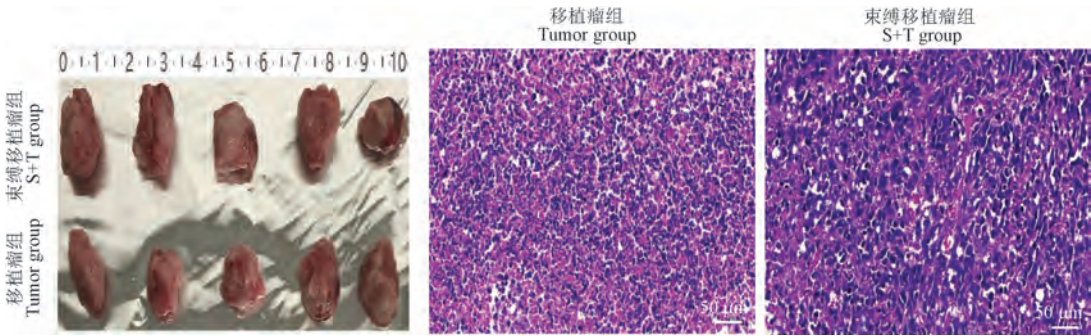


图 9 小鼠瘤块肉眼形态特征及肿瘤组织病理改变

Figure 9 Gross morphologic characteristics of tumor mass and pathological changes of tumor tissue in mice

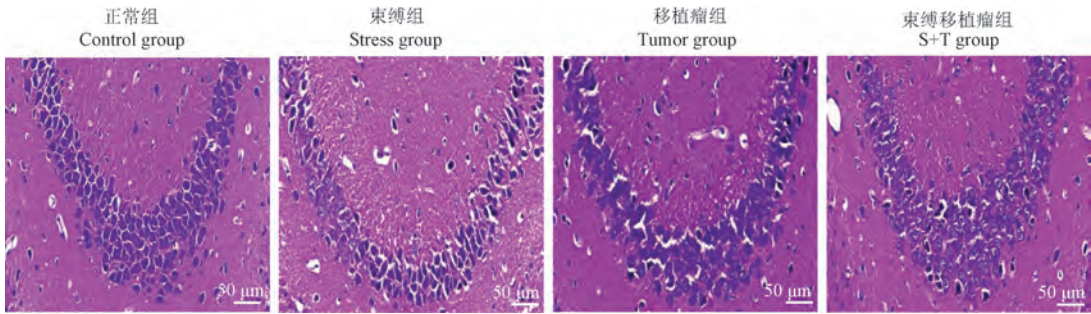


图 10 各组小鼠海马 CA3 区组织病理改变

Figure 10 Histopathologic changes in hippocampal CA3 region of mice in each group

3 讨论

随着乳腺癌合并抑郁症研究的不断深入,此两种疾病之间的密切关系被越来越多的研究所揭示。由于人体研究的局限性,动物模型成为了疾病研究中的重要载体。乳腺癌合并抑郁症动物模型的构建可为阐释乳腺癌和抑郁症之间的关系及相互影响机制研究起到重要的辅助作用。

基于此,本研究首先以 4T1 炎性乳腺癌细胞接种于 BALB/c 小鼠腋下的方式建立了经典的乳腺癌小鼠模型,该模型构建方法成熟,动物生存期较长,是临床乳腺癌药物筛选使用最多的一种动物模型^[5-6]。其次,在该经典乳腺癌小鼠模型的基础上采用慢性束缚应激方法进行抑郁症造模,慢性束缚应激是抑郁症常用的造模手段,可重复性好,能够模拟抑郁症兴趣缺失的核心症状^[7]。故本研究运用 4T1 乳腺癌细胞株接种联合慢性束缚应激方法构建 BALB/c 小鼠乳腺癌合并抑郁模型不失为一次有益的探索。

CA199 和 CEA 为较常见的肿瘤标志物,其中 CEA 为肿瘤细胞增殖活力敏感指标,当患者病情进入恶化阶段时,其水平可呈明显的上升趋势^[8]。CA199 是一种类粘蛋白的糖蛋白成分,消化系统、

呼吸系统和妇科等恶性肿瘤患者血清中均会出现异常的升高,是早期筛查恶性肿瘤的辅助指标^[9]。临床研究显示恶性乳腺癌患者血清 CA199 和 CEA 的水平显著高于良性和正常对照组^[10],另外在腋下接种 4T1 细胞株的乳腺癌小鼠血清中同样也观察到了 CEA 水平的显著升高^[11]。血管内皮生长因子 (VEGF) 作为血管生成的主要调控因子,在健康人组织和血清中 VEGF 呈低表达,而在肿瘤患者中其表达异常升高,与乳腺癌的发展、复发和转移密切相关^[12-13]。吕思琦等^[14]研究观察到恶性乳腺癌患者术前血清 VEGF 的表达显著高于良性患者和健康人。吴梓政等^[15]运用含二甲基苯萘的芝麻油建立乳腺癌小鼠模型,并在其血清中检测到 VEGF 水平的显著升高。由此可见 CEA、CA199 和 VEGF 可作为乳腺癌诊断和评估的重要依据。据本研究结果可知,移植瘤组小鼠血清中 CA199、CEA 和 VEGF 水平升高,给予慢性束缚应激后小鼠血清中 3 种肿瘤标志物较单纯移植瘤组显著增加。此外结合对肿瘤重量、体积分析结果可知,慢性束缚应激联合移植瘤组小鼠肿瘤重量和体积均较单纯移植瘤组小鼠显著增加,同时结合肿瘤病理表现推测慢性束缚应激可能会促进乳腺癌的进展。

抑郁症动物模型构建中其症状须与抑郁病患

者具有相同的表现,例如食欲不振、体重下降、快感缺失、行为绝望及社交障碍等^[16]。故本试验主要针对抑郁症以上几个方面的行为改变选择强迫游泳、糖水偏好、旷场和高架十字迷宫试验对模型小鼠的行为学进行了评价。另外,本研究还针对与抑郁病变密切相关的神经递质 5-HT、CORT 和 NE 水平以及海马病理改变进行了观察,与行为学指标协同佐证,以评价各组小鼠的抑郁状态。研究结果显示,在造模 3 周后,乳腺癌小鼠出现快感缺失、绝望、恐惧心理增加和对新环境的探索欲望下降等行为学表现,而体内的神经递质水平也出现了不同程度的改变。而接受慢性束缚应激的乳腺癌小鼠,其抑郁样行为以及体内神经递质水平变化均较乳腺癌小鼠更为明显,其抑郁程度较单纯乳腺癌小鼠更为严重。另外该结果在食欲及海马病理改变上也得到了进一步验证,接受束缚应激的乳腺癌小鼠食欲较乳腺癌小鼠下降更为明显,且海马 CA3 区神经元排列、形态、空泡化等改变均较单纯乳腺癌组小鼠严重,虽然其体重改变与乳腺癌组小鼠无明显差异,但是接受束缚应激的乳腺癌小鼠的瘤体显著重于乳腺癌小鼠,因此两组小鼠体重无显著差异与瘤体重量影响有关。另外,根据实验结果可知,在本研究中观察到乳腺癌小鼠也表现出了部分抑郁样行为,这可能与移植瘤体造成小鼠身体机能和行动能力下降有关,但此时动物模型的抑郁程度个体差异较大,如在单纯的乳腺癌模型基础上开展抑郁研究,模型的可重复性较差。因此,只有在乳腺癌动物模型的基础上再施加一定的抑郁症造模措施,得到稳定的乳腺癌合并抑郁症动物模型后,其抑郁样行为、神经递质水平等才会出现显著而稳定的改变,更适合乳腺癌合并抑郁的深入机制研究。

因此,4T1 乳腺癌细胞株接种联合慢性束缚应激诱导的乳腺癌合并抑郁症小鼠模型不仅在乳腺癌标志物等方面表现出明显的异常,同时也出现了典型抑郁症症状和相应的神经递质改变,可为乳腺癌合并抑郁发病机制以及药物防治研究提供较好的模型参考。

参考文献:

[1] LIU H M, MA L L, LI C, et al. The molecular mechanism of chronic stress affecting the occurrence and development of breast cancer and potential drug therapy [J]. Transl Oncol, 2022, 15 (1): 101281.

[2] 卞绿, 臧娅, 赵丽华. 乳腺癌患者的焦虑、抑郁情绪和生存

质量的相关性研究 [J]. 实用预防医学, 2021, 28 (12): 1529-1532.

BIAN L, ZANG Y, ZHAO L H. Correlation of anxiety and depression with quality of life in patients with breast cancer [J]. Pract Prev Med, 2021, 28 (12): 1529-1532.

[3] XU X R, XIAO Q, HONG Y C, et al. Activation of dopaminergic VTA inputs to the mPFC ameliorates chronic stress-induced breast tumor progression [J]. CNS Neurosci Ther, 2021, 27 (2): 206-219.

[4] 孙丽华, 崔海峰, 彭博, 等. 4 种方法制备小鼠乳腺癌移植瘤模型的比较研究 [J]. 中国新药杂志, 2020, 29 (4): 449-455.

SUN L H, CUI H F, PENG B, et al. Comparative study of 4 methods for the establishment of mouse breast cancer xenograft model [J]. Chin J N Drugs, 2020, 29 (4): 449-455.

[5] 严丽, 李莉, 郝芳, 等. BALB/c 小鼠乳腺癌 4T1 细胞株移植模型的建立 [J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30 (6): 794-796.

YAN L, LI L, HAO F, et al. Establishment of mice breast cancer model in BALB/c mice with 4T1 cells [J]. Chin J Immunol, 2014, 30 (6): 794-796.

[6] 王硕. 小鼠乳腺癌细胞 4T1 对不同品系小鼠乳腺癌模型的影响 [J]. 天津医科大学学报, 2018, 24 (4): 281-283.

WANG S. Effects of mouse breast cancer cell line 4T1 on breast cancer animal model in different types of mice [J]. J Tianjin Med Univ, 2018, 24 (4): 281-283.

[7] 高杰, 张楠, 宋铭晶, 等. 慢性束缚应激模型对小鼠社交行为的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25 (3): 9-12.

GAO J, ZHANG N, SONG M J, et al. Effect of chronic restraint stress on sociability in mice [J]. Chin J Comp Med, 2015, 25 (3): 9-12.

[8] 梁劲文, 白剑, 苏少琴, 等. 卡培他滨与替吉奥对 HER-2 阳性乳腺癌抑癌基因表达及血清 CA125、CA199、CEA 水平的影响 [J]. 广东医科大学学报, 2021, 39 (4): 424-428.

LIANG J W, BAI J, SU S Q, et al. Effect of capecitabine versus tegafur-gimeracil-oteracil on tumor suppressor genes and serum CA125/199 and CEA levels in HER-2 positive breast cancer [J]. J Guangdong Med Univ, 2021, 39 (4): 424-428.

[9] 冯万锐, 苗立群. 乳腺癌患者血清肿瘤标志物的变化及意义 [J]. 临床医学研究与实践, 2018, 3 (8): 66-67.

FENG W R, MIAO L Q. Changes and significance of serum tumor markers in patients with breast cancer [J]. Clin Res Pract, 2018, 3 (8): 66-67.

[10] 雷田. 血清 CEA、AFP、CA199、CA125、CA153 检测诊断乳腺癌的临床价值 [J]. 医学理论与实践, 2020, 33 (23): 4012-4013.

LEI T. Clinical value of serum CEA, AFP, CA199, CA125 and CA153 in the diagnosis of breast cancer [J]. J Med Theory Pract, 2020, 33 (23): 4012-4013.

[11] 石国建, 顾蓓, 荣鸣, 等. 大蒜素辅助乳腺癌及对小鼠血清 CA153、CEA 及免疫功能的影响 [J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2018, 15 (6): 100-103.

余奎,梁晓强,韩冕,等. 大鼠急性梗阻性化脓性胆管炎模型的建立与评估 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 45-50.
Yu K, Liang XQ, Han M, et al. Optimization and evaluation of acute obstructive suppurative cholangitis model in rats [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 45-50.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.006

大鼠急性梗阻性化脓性胆管炎模型的建立与评估

余奎¹, 梁晓强^{2*}, 韩冕², 张静喆^{3*}

(1.上海中医药大学附属龙华医院浦东分院, 上海 200126; 2.上海中医药大学附属龙华医院中医外科研究所, 上海 200032;
3.上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

【摘要】目的 建立一种稳定的大鼠急性梗阻性化脓性胆管炎模型, 检测其病理生理指标, 为急性胆管炎、胆汁淤积等疾病的研究提供稳定可靠的标准化动物模型。**方法** 选用 SPF 级雄性 SD 大鼠, 采用胆总管下段注射类毒素及胆总管结扎方式进行模型构建, 评估大鼠造模前后的体重变化、死亡情况、肝功能主要指标变化及肝组织病理改变情况。**结果** 造模后模型组大鼠体重明显降低; 假手术组大鼠无死亡, 肝功能无异常; 模型组大鼠死亡 3 只, 模型组死亡率 12%, 肝功能主要指标及肝病理呈现出明显的胆汁淤积及肝功能损伤性改变。**结论** 本研究成功建立了大鼠急性梗阻性化脓性胆管炎模型, 该模型具有操作简便、损伤小、死亡率低、造模成功率高等优势, 可为多种常见疾病的机制研究和药物研发提供标准化的实验动物模型。

【关键词】 急性梗阻性化脓性胆管炎; 胆总管梗阻; 动物模型; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0045-06

Optimization and evaluation of acute obstructive suppurative cholangitis model in rats

YU Kui¹, LIANG Xiaoqiang^{2*}, HAN Mian², ZHANG Jingzhe^{3*}

(1. Pudong Branch, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200126, China.

2. Institute of Traditional Chinese Medicine and Surgery, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032. 3. Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032)

【Abstract】Objective A stable model of acute obstructive suppurative cholangitis was established in rats to detect pathophysiological indexes and provide a reliable standardized animal model for the study of acute cholangitis and cholestasis. **Methods** SPF-grade male SD rats were selected, and the model was constructed via the injection of toxoid into the lower bile duct, followed by ligation of the common bile duct. Changes in body weight, mortality, major indexes of liver function, and histopathological changes in the liver were evaluated before and after modeling. **Results** After modeling, the body weight of rats in the model group decreased significantly. There were no deaths and no abnormalities of liver function in the sham-operation group. Three rats died in the model group, and the mortality rate of the model group was 12%. The main indexes of liver function and liver pathology showed obvious cholestasis and injurious changes to hepatic function in the model. **Conclusions** In this study, an acute obstructive suppurative cholangitis model rat was

【基金项目】 国家自然科学基金青年项目 (82004372); “龙医科技创新培育计划”临床医学引导项目 (YD202206)。

【作者简介】 余奎 (1985—), 男, 副主任医师, 研究方向: 肝胆胰疾病及围手术期疾病的基础与临床研究。E-mail: yukuitem@126.com

【通信作者】 梁晓强 (1980—), 女, 博士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 肝胆胰疾病的基础研究。E-mail: jennielxq@126.com

张静喆 (1955—), 男, 硕士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肝胆胰疾病基础与临床研究。E-mail: zjzzzq@sina.com

* 共同通信作者

successfully established. The model has the advantages of ease of operation, minimal injury, low mortality, and a highly successful modeling rate, and it can provide a standardized experimental animal model for studying the mechanisms of and developing drugs for these common diseases.

[Keywords] acute obstructive suppurative cholangitis; obstruction of common bile duct; animal model; rat
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

急性梗阻性化脓性胆管炎 (acute obstructive suppurative cholangitis, AOSC) 是由细菌感染引起的一种急性胆道梗阻及继发化脓性感染的疾病,是外科急腹症常见病因之一,为外科常见病、多发病、难治性疾病,是临床常见的危急重症。由于该病临床进展迅速,死亡率曾高达 50%^[1-2],因结石、肿瘤等原因引起胆管部分或完全性梗阻是 AOSC 发生的关键因素,胆管内压力增加,胆管上皮细胞血流供应减少,继发胆管上皮细胞缺血损伤、上皮屏障破坏,细菌移位入血引起感染和败血症^[3]。因此,急性胆管炎一直是外科临床研究的重要疾病之一。

模式动物是进行基础研究的重要手段之一,肝外胆管梗阻动物模型是研究急性胆管炎 (包括 AOSC)、急性胰腺炎、胆总管结石、脓毒血症、肝纤维化等疾病的重要手段^[4-7],大鼠胆总管梗阻模型有多种不同的造模方式^[8-10],但传统的造模方式操作较复杂,在此基础上改进的急性胆管炎模型造模成功率低,造模后 72 h 大鼠死亡率高达 50%^[5]。模型大鼠死亡的主要原因有腹腔感染、胆汁泄漏及由此引起的腹膜炎、坏死性胰腺炎等。为此,本研究旨在既往模型研究的基础上,建立一种操作简便、可重复性强、造模成功率高、模型动物死亡率低的造模方式,为急性胆管炎的防治和药物研发提供一种可靠的标准化动物模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

采用 SPF 级雄性 SD 大鼠 37 只 (体重 180~200 g),由浙江维通利华实验动物技术有限公司提供 [SCXK (浙) 2019 - 0001] (合格证编号: 20210429Aazz0619000383),由上海中医药大学实验动物中心适应性饲养 1 周 [SYXK (沪) 2020-0009]。本研究所使用大鼠经过上海中医药大学实验动物伦理委员会的审核批准 (PZSHUTCM210129005),符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

舒泰 50 (Virbac, 82T7A); 内毒素 (biosharp, 20217948); 丙氨酸氨基转移酶检测试剂盒 (IFCC 速

率法) (贝克曼库尔特商贸有限公司, AUZ7933); 天门冬氨酸氨基转移酶检测试剂盒 (酶法) (贝克曼库尔特商贸有限公司, AUZ7793); γ -谷氨酰转移酶检测试剂盒 (GCANA 底物法) (贝克曼库尔特商贸有限公司, AUZ8527); 总胆红素检测试剂盒 (重氮法) (贝克曼库尔特商贸有限公司, AUZ8520); 直接胆红素检测试剂盒 (重氮法) (贝克曼库尔特商贸有限公司, AUZ8332); 总胆汁酸检测试剂盒 (循环酶法) (贝克曼库尔特商贸有限公司, AUZ8460)。

动物用无菌手术包 (包括血管钳、精细镊、剪刀、持针器等); 外科用 4-0 慕丝线 (爱惜康, SA83 G); 医用缝合用三角针 (上海复星医药股份有限公司, N210105); 一次性使用无菌胰岛素注射器 (BD Insulin Syringe, 1 mL 规格); 贝克曼库尔特 AU5800 全自动生化分析仪。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

实验大鼠分为 2 组,其中假手术组 12 只,皮肤切开后缝合;模型组 25 只,进行造模。

1.3.2 模型制备方法

麻醉前 15 min,给予适量硫酸阿托品皮下注射,麻醉药按照 0.05 mg/kg 体重进行皮下注射。采用碘酒消毒手术区域皮肤两次,不作褪毛处理。

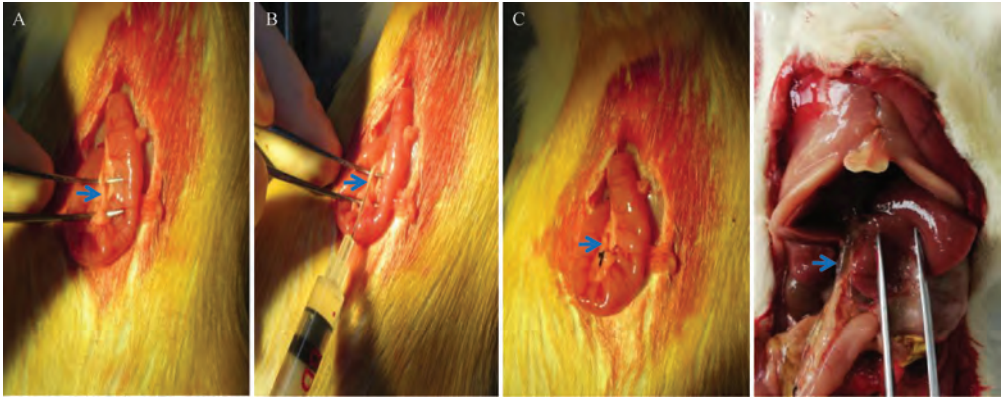
于剑突下 1 cm 处向尾部方向作一纵行切口,长约 2~3 cm。以大鼠胃为标志,从幽门往下将十二指肠拉出切口外,用手指将十二指肠展平,暴露出胰腺及胆总管 (图 1A)。在胆肠汇合处上方约 0.2~0.7 cm 段用精细弯镊露出一小截胆总管,并在暴露出的胆总管中段位置,采用一次性胰岛素注射器朝肝方向斜 15°~20°左右刺入胆总管,注入约 0.1 mL 类毒素 (图 1B);以 0 号丝线,在穿刺点上方结扎胆总管 (图 1C)。最后采用连续缝合方式分层缝合切口,并以 75%乙醇擦除皮毛上的血迹。

1.3.3 观察指标

术后 3 d 取材,麻醉后开腹,抽取腹主动脉血,留取肝组织。

(1) 一般情况

分别于术前及取材前称重,观察大鼠造模前后



注:A:暴露胆总管;B:胆总管注射;C:胆总管结扎;D:造模后扩张的胆总管,蓝色短箭头所示为胆总管。

图1 造模过程及造模后胆总管

Note. A, Exposure of common bile duct. B, Common bile duct injection. C, Common bile duct ligation. D, Dilated common bile duct after molding, the short blue arrow shows the common bile duct.

Figure 1 Molding process and post-molding common bile duct

体重变化;记录大鼠造模后死亡情况。

(2) 血指标

肝功能检测,包括丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素 (total bilirubin, TBILC)、直接胆红素 (direct bilirubin , DBILC)、 γ -谷氨酰转移酶 (γ -glutamyltransferase, GGT) 和总胆汁酸 (total bile acid, TBA)。

(3) 病理检测

留取大鼠肝组织,固定并切片后,采用 HE 病理染色进行观察。

1.4 统计学方法

采用 IBM SPSS Statistics 23.0 软件进行分析,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$),平均数比较采用独立样本的 *T* 检验,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

造模后,大鼠体重明显下降,模型组大鼠共死亡 3 只,死亡率较传统造模方式显著降低。模型组大鼠肝功能指标及肝病理均呈现出肝功能损伤及胆汁淤积表现。

2.1 一般情况

2.1.1 大鼠死亡情况

大鼠共死亡 3 只,最终纳入分析大鼠 34 只。假手术组大鼠无死亡,肝、胆、胰均无异常。模型组大鼠死亡 3 只,其中 2 只大鼠的胰腺组织消失,胰腺区域出现大量皂化斑,有 1 只伴有腹水;还有 1 只大鼠胰腺正常,胆总管扩张不明显,有腹水,大鼠眼球有

明显出血。其余模型组大鼠的胆总管均明显扩张,肝有胆汁淤积表现。所有大鼠均无切口感染及缝线断裂。

2.1.2 体重变化

经适应性喂养后,手术前称重,假手术组大鼠平均体重为 (257.28 ± 11.61) g,模型组大鼠平均体重为 (255.42 ± 10.57) g,方差齐性检验 ($F=0.075$ 、 $P=0.786$) 可以认为两组大鼠体重方差齐 ($t=0.474$ 、 $P=0.639$),两组大鼠体重无统计学意义;经造模,取材前称重,假手术组大鼠平均体重为 (250.87 ± 11.73) g,模型组大鼠平均体重为 (229.05 ± 10.36) g,方差齐性检验 ($F=0.558$ 、 $P=0.461$) 可以认为两组大鼠体重方差齐 ($t=5.605$ 、 $P=0.000$),两组大鼠体重有显著性差异 ($P<0.05$),提示模型组大鼠术后体重下降较多。

2.2 肝功能

造模后肝功能各项指标的组间方差齐性检验 *P* 值均 <0.05 ,提示组间方差不齐。ALT ($t=-11.354$)、AST ($t=-9.629$)、GGT ($t=-15.043$)、TBILC ($t=-13.275$)、DBILC ($t=-17.715$)、TBA ($t=-13.351$) 指标的两组间比较 *P* 值均 <0.01 ,组间有显著性差异,提示造模后各项指标均出现了显著变化。模型组造模后出现明显肝功能损伤 (ALT、AST、GGT 显著升高, $P<0.01$) 及胆汁淤积 (TBILC、DBILC、TBA 显著升高, $P<0.01$),提示造模成功 (表 1)。

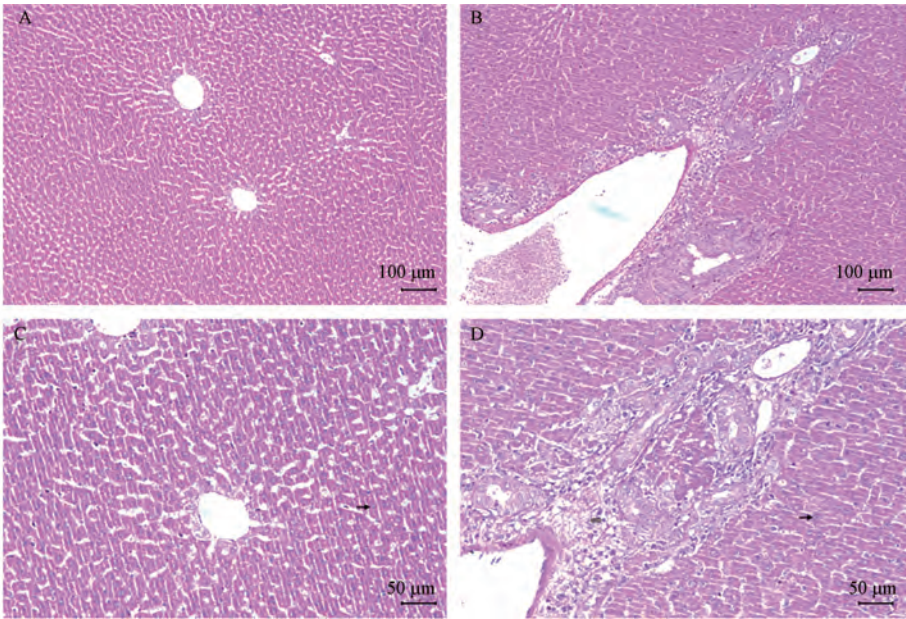
2.3 肝病理

肝 HE 染色病理切片结果如图 2 所示,假手术组切片可见肝细胞排列整齐,无肿胀。模型组

表 1 大鼠肝功能指标
Table 1 Liver function indexes of rats

分组 Groups	谷丙转氨酶/(U/L) ALT	谷草转氨酶/(U/L) AST	谷氨酰转氨酶/(U/L) GGT	总胆红素/(μmol/L) TBILC	直接胆红素/(μmol/L) DBILC	总胆汁酸/(μmol/L) TBA
假手术组 Sham-operation group	37.43±6.88	205.29±61.07	0.92±0.26	2.04±0.63	0.68±0.26	38.75±25.24
模型组 Model group	720.68±282.11**	1634.33±691.17**	42.68±13.02**	129.85±45.15**	89.04±23.39**	408.44±125.29**

注：与假手术组相比，** $P<0.01$ 。
Note. Compared with Sham-operation group, ** $P<0.01$.



注：黑色实心箭头指示肝细胞核，黑色空心箭头指示炎症细胞。

图 2 大鼠肝 HE 染色

Note. Black solid arrow indicates the liver nucleus, black hollow arrow indicates inflammatory cells.

Figure 2 HE staining of rat liver

切片的肝细胞胞核明显增大，染色质变粗，见有多核仁，汇管区可见炎症细胞浸润。

3 讨论

AOSC 是外科常见危急重症，胆总管结石、胆管癌、十二指肠壶腹部肿瘤、胰头癌等疾病均可引起胆管梗阻，从而引起胆汁淤积、继发性胆管炎、肝纤维化等。胆管梗阻动物模型是肝胆疾病机制研究的重要模型之一，是研究各种肝胆疾病发病机制、评价疗效和药物开发的基础^[10-12]，应用范围较为广泛。为此，本研究以 SD 大鼠为研究对象，结合既往团队制作梗阻性胆管炎模型的工作基础，对该模型制作过程进行进一步优化，主要的改进及优势如下：第一，选择腹部小切口，减少对大鼠的手术创伤；在中上腹作一纵行小切口，以可以充分暴露大鼠的胃为度，一般长 2~3 cm 即可，无需作贯彻全腹

的大切口，这样操作既可以缩短手术时间，也有利于大鼠的术后康复^[13]。第二，以幽门为标记，改进寻找和暴露胆总管的方法；根据大鼠的解剖特点^[14-16]，从小切口中用镊子将大鼠的胃拖出切口外，这样可以轻易找到大鼠的幽门区，进而寻找到大鼠的十二指肠，再向左右两侧及下方呈扇形展开大鼠的十二指肠，即可暴露出胆总管。第三，优化胆总管注射部位及结扎方式，本模型选择的注射部位为胆总管下段，此处的胰腺和血管分布较少，胆总管暴露操作较为简单，分离过程中不容易引起胰腺损伤，穿刺注射后，在穿刺点上方处进行结扎，阻断了胆汁和胰液的混合，避免了胰酶被胆汁激活而导致胰腺炎^[17]。

既往的梗阻性胆管炎模型有如下两种，一种是采用远端胆总管切开及硅胶管置入插管^[6,18]，此模型的缺点是操作复杂，胆总管插管失败率高，大鼠

存活率低;第二种是胆总管结扎及胆管内注射模型^[5],操作方式是从十二指肠乳头对侧的肠壁进行穿刺注射,盲穿探查进入胆总管,此模型的缺点是穿刺会直接损伤十二指肠,部分动物穿刺后会有腹腔感染,盲探胆总管还容易导致胆总管破损,造成胆汁泄漏及腹膜炎。既往研究表明,胆总管结扎后 48 h 左右,胆汁淤积、肝细胞核分裂相最明显^[19],电镜下可见微胆管扩张等改变^[20],72 h 左右,肝功能损伤会达到最高峰^[21],本团队之前采用胆总管结扎及胆管内注射模型时发现,造模后胰腺炎的发生概率非常高,大鼠 72 h 存活率不到 50%。相比之下,本研究所建立的大鼠模型有针对性地解决了上述模型的缺点,且操作更加简便,模型成功率更高,便于推广使用。

急性梗阻性化脓性胆管炎是外科临床研究的热点与难点之一,建立稳定的标准化动物模型有助于探索该疾病治疗的分子生物学机制,对进一步深化该领域的研究具有重要的意义。

参考文献:

- [1] AN Z, BRASETH A L, SAHAR N. Acute cholangitis: causes, diagnosis, and management [J]. Gastroenterol Clin North Am, 2021, 50(2): 403-414.
- [2] ITOH N, AKAZAWA N, ISHIBANA Y, et al. Clinical and microbiological features of obstructive cholangitis with bloodstream infection caused by *Pandoraea apista* identified by MALDI-TOF mass spectrometry and ribosomal RNA sequencing in a cancer patient [J]. BMC Infect Dis, 2022, 22(1): 529.
- [3] KIRIYAMA S, KOZAKA K, TAKADA T, et al. Tokyo Guidelines 2018: diagnostic criteria and severity grading of acute cholangitis (with videos) [J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2018, 25(1): 17-30.
- [4] 颜丽萍, 邝晓聪, 梁勇, 等. 急性梗阻性胰腺炎大鼠模型的建立 [J]. 广西医学, 2008, 30(12): 1848-1849.
YAN L P, KUANG X C, LIANG Y, et al. Establishment of rat model of acute obstructive pancreatitis [J]. Guangxi Med J, 2008, 30(12): 1848-1849.
- [5] 寇丽萍, 薛承锐, 齐清会, 等. 大鼠急性不全梗阻性胆管炎模型的建立 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2005, 11(2): 138-140.
KOU L, XUE C R, QI Q H, et al. Establishment and evaluation of acute cholangitis model [J]. Chin J Surg Integr Tradit West Med, 2005, 11(2): 138-140.
- [6] 秦明放, 白月华. 化脓性胆管炎兔模型与内毒素血症的研究 [J]. 中华实验外科杂志, 1993, 10(2): 51-53.
QIN M F, BAI Y H. Purulent cholangitis model and endotoxemia [J]. Chin J Exp Surg, 1993, 10(2): 51-53.
- [7] OZOZAN O V, DINC T, VURAL V, et al. An electron

microscopy study of liver and kidney damage in an experimental model of obstructive jaundice [J]. Ann Ital Chir, 2020, 91: 122-130.

- [8] 方辉, 陈强谱, 张兴元, 等. 可复性梗阻性黄疸大鼠模型的建立与评价 [J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(25): 4015-4023.
FANG H, CHEN Q P, ZHANG X Y, et al. Establishment and evaluation of a rat model of reversible obstructive jaundice [J]. World Chin J Dig, 2015, 23(25): 4015-4023.
- [9] 陈芳芳, 鲁正, 付晓君, 等. 一种新型可复性梗阻性黄疸大鼠模型的建立 [J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(9): 1767-1770.
CHEN F F, LU Z, FU X J, et al. Establishment of a new rat model of reversible obstructive jaundice [J]. Chin J Exp Surg, 2018, 35(9): 1767-1770.
- [10] LUO W W, ZHOU X L, WANG Q Q, et al. The application of Compont gel in chronic obstructive jaundice rats model [J]. Acta Cir Bras, 2019, 34(5): e201900504.
- [11] 葛军涛, 李龙, 魏延栋, 等. 哺乳期 BALB/c 小鼠胆道梗阻模型的探索 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(4): 35-37, 97-98.
GE J T, LI L, WEI Y D, et al. Exploration of establishment of a newborn BALB/c mouse model of biliary obstruction [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2013, 21(4): 35-37, 97-98.
- [12] 任波, 沈世强, 张爱民, 等. 改良型大鼠梗阻性黄疸肝切除术后肝衰模型的建立 [J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(3): 640-642.
REN B, SHEN S Q, ZHANG A M, et al. Rat model of postoperative liver failure induced by modified method of hepatectomy with obstructive jaundice [J]. Chin J Exp Surg, 2013, 30(3): 640-642.
- [13] 张睿, 崔翔, 潘子杰, 等. 损伤控制手术的发展概述 [J]. 中国急救复苏与灾害医学杂志, 2022, 17(8): 1109-1112.
ZHANG R, CUI X, PAN Z J, et al. Overview of the development of injury control surgery [J]. China J Emerg Resusc Disaster Med, 2022, 17(8): 1109-1112.
- [14] NEŠIĆ I, KRSTI N, DJELIĆ N, et al. Liver anatomy, intrahepatic vascular and biliary branching system of the mole rat (*Spalax leucodon*) [J]. Folia Morphol, 2021, 80(4): 888-894.
- [15] AZMAIPARASHVILI E, PATARASHVILI L, BEBLASHVILI I, et al. Spatial architecture of biliary tree in mammals: Fractal and Euclidean geometric features [J]. J Anat, 2021, 239(3): 682-692.
- [16] KRUEPUNGA N, HAKVOORT T B M, HIKSPOORS J P J M, et al. Anatomy of rodent and human livers: what are the differences? [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(5): 869-878.
- [17] MARIOTTI V, STRAZZABOSCO M, FABRIS L, et al. Animal models of biliary injury and altered bile acid metabolism [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(4 Pt B): 1254-1261.

[18] 陆贯一, 李乐天, 毕庚年. 大鼠不全梗阻型胆管炎模型研制 [J]. 河北医学院学报, 1993, 14(4): 242, 277.
LU G Y, LI L T, BI G N. Development of rat model of incomplete obstructive cholangitis [J]. J Hebei Med Univ, 1993, 14(4): 242, 277.

[19] 孙侠, 黄小琼, 钟海潮, 等. 四氯化碳、酒精与四氯化碳联合、胆管结扎致 SD 大鼠肝纤维化病理学比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(3): 36-39, 82.
SUN X, HUANG X Q, ZHONG H C, et al. Pathology comparison of hepatic fibrosis SD rat caused by carbon tetrachloride, alcohol and carbon tetrachloride combination and bile duct ligation [J]. Chin J Comp Med, 2012, 22(3): 36-39, 82.

[20] 何如昆, 周德义, 何志恒, 等. 大鼠胆总管结扎后肝脏形态及酶学变化的动态观察 [J]. 广西医学院学报, 1993, 10(3): 272-277.
HE R K, ZHOU D Y, HE Z H, et al. An observation of the morphological and enzymetic dynamically changes in liver of rat after ligation of common bile duct [J]. J Guangxi Med Univ, 1993, 10(3): 272-277.

[21] 元海成, 秦鸣放, 邹富胜, 等. 大鼠胆总管结扎后不同时间点的生化指标变化 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2011, 17(6): 583-585.
YUAN H C, QIN M F, ZOU F S, et al. Time-related changes of biochemical markers after common bile duct ligation in rats [J]. Chin J Surg Integr Tradit West Med, 2011, 17(6): 583-585.

[收稿日期] 2023-03-29

(上接第 44 页)

SHI G J, GU B, RONG M, et al. Effects of allicin on breast cancer and its effects on serum CA153, CEA and immune function in mice [J]. J Hunan Norm Univ Med Sci, 2018, 15(6): 100-103.

[12] 梁小芹, 苏勤军. CCR7 和 VEGF-D 蛋白在乳腺癌发生发展过程中的表达及意义 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2016, 23(6): 715-721.
LIANG X Q, SU Q J. Expression and significance of CCR7 protein and VEGF-D protein in progression of breast cancer [J]. Chin J Bases Clin Gen Surg, 2016, 23(6): 715-721.

[13] 黄波. CEA、VEGF、nm-23-H1 蛋白在乳腺癌患者中的表达及临床意义 [J]. 检验医学与临床, 2021, 18(20): 3006-3009.
HUANG B. Expression and clinical significance of CEA, VEGF and nm-23-H1 protein in breast cancer patients [J]. Lab Med Clin, 2021, 18(20): 3006-3009.

[14] 吕思琦, 李靖若. 术前血清 VEGF 在乳腺癌中的表达及临床意义 [J]. 河南外科学杂志, 2021, 27(3): 100-102.

LYU S Q, LI J R. Expression of preoperative serum VEGF in breast cancer and its clinical significance [J]. Henan J Surg, 2021, 27(3): 100-102.

[15] 吴梓政, 韦丽光, 刘银凤, 等. 脂联素对乳腺癌小鼠血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶-9 表达的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(21): 2302-2305.
WU Z Z, WEI L G, LIU Y F, et al. Effect of adiponectin on the VEGF and MMP-9 expression in breast cancer mice [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2020, 29(21): 2302-2305.

[16] 孙秀萍, 张楠, 高杰, 等. 慢性束缚应激模型致焦虑和抑郁共病的行为学研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(6): 18-22.
SUN X P, ZHANG N, GAO J, et al. Chronic restraint stress produces comorbidity behavior of anxiety and depression disorders in mice [J]. Chin J Comp Med, 2015, 25(6): 18-22.

[收稿日期] 2023-05-04

黄储涵,杨顶权,钟施怡,等. 散结祛癍方对 BALB/C 裸鼠癍痕疙瘩模型的作用及转化生长因子- β 1 的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 51-56.

Huang CH, Yang DQ, Zhong SY, et al. Effect of Sanjie Quban recipe on keloid model of BALB/C nude mice and influence on transforming growth factor- β 1 [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 51-56.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.007

散结祛癍方对 BALB/C 裸鼠癍痕疙瘩模型的作用及转化生长因子- β 1 的影响

黄储涵¹, 杨顶权², 钟施怡¹, 吴瑞英¹, 杨知山¹, 方慧娟¹, 刘青武^{2*}

(1.北京中医药大学,北京 100029;2.中日友好医院,北京 100029)

【摘要】 目的 探讨散结祛癍方对癍痕疙瘩裸鼠模型的作用及转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 的影响。**方法** 将人手术切除后癍痕疙瘩组织移植至 6~8 周龄健康 SPF 级 BALB/C 雌性裸鼠背部皮下,建立癍痕疙瘩裸鼠模型,随机分成散结祛癍方组、积雪苷片组 and 对照组,每组 5 只,分别用散结祛癍方、积雪草苷片及无菌纯水进行干预,连续灌胃 28 d 后剥取癍痕疙瘩组织,进行称重、苏木精伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色、Masson 染色和免疫组化 (TGF- β 1) 染色。比较 3 组间治疗前后的癍痕疙瘩重量差值的差异,比较 3 组间治疗后的胶原纤维、成纤维细胞数量及 TGF- β 1 表达的差异。**结果** 积雪草苷片组的癍痕疙瘩重量差值大于对照组,且散结祛癍方组与积雪草苷片组、对照组相比,散结祛癍方组癍痕疙瘩治疗前后重量差值最大 ($P < 0.01$);散结祛癍方组较对照组胶原纤维疏松、数量减少,成纤维细胞数量减少;散结祛癍方组较对照组 TGF- β 1 表达减少 ($P < 0.01$)。**结论** 散结祛癍方对癍痕疙瘩具有一定的治疗作用,其机制可能是通过减少癍痕疙瘩组织中 TGF- β 1 的表达,从而减少成纤维细胞的增殖与细胞外基质的合成。该研究为临床用中药治疗癍痕疙瘩提供了实验基础与理论依据。

【关键词】 癍痕疙瘩;散结祛癍方;TGF- β 1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0051-06

Effect of Sanjie Quban recipe on keloid model of BALB/C nude mice and influence on transforming growth factor- β 1

HUANG Chuhan¹, YANG Dingquan², ZHONG Shiyi¹, WU Ruiying¹, YANG Zhishan¹, FANG Huijuan¹, LIU Qingwu^{2*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China. 2. China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029)

【Abstract】 Objective This study aimed to investigate the therapeutic efficacy of Sanjie Quban recipe in a keloid nude mice model and its impact on transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). **Methods** Keloid tissue after surgical resection was subcutaneously transplanted into the backs of healthy SPF BALB/C female nude mice, aged 6~8 weeks, and a keloid nude mice model was thus established. The mice were randomly divided into three groups, the Sanjie Quban recipe group, the Asiaticoside tablet group and the control group, with five in each group. They were respectively treated with Sanjie Quban recipe, Asiaticoside tablets, or sterile pure water. After 28 days of continuous gavage, the keloid tissue was exfoliated and weighed, and HE staining, Masson staining, and immunohistochemical staining for TGF- β 1 were conducted. Differences in keloid weight between the three groups before and after treatment were compared, as were the differences in collagen fiber, fibroblast numbers, and TGF- β 1 expression between the three groups after treatment. **Results** The difference in keloid weight before and after treatment in the Asiaticoside tablet group was greater than that of the control

【基金项目】 国家自然科学基金青年项目 (82205115); 中央高水平医院临床科研业务费资助 (ZRJY2023-QM12); 中日友好医院“菁英计划”人才培养工程资助 (ZRJY2023-QM12)。

【作者简介】 黄储涵 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 癍痕疙瘩及毛发疾病机制研究。E-mail: 17312390516@163.com

【通信作者】 刘青武 (1991—), 男, 博士, 主治医师, 研究方向: 癍痕疙瘩及毛发疾病机制研究。E-mail: 454293138@qq.com

group, and the weight difference before and after treatment keloid treatment was the largest in the Sanjie Quban recipe group ($P<0.01$). Compared with the control group, collagen fibers in the Sanjie Quban recipe group were looser and less numerous, and fibroblasts were decreased in number. The expression of TGF- β 1 in the Sanjie Quban recipe group was decreased compared with that of the control group ($P<0.01$). **Conclusions** Sanjie Quban recipe has certain therapeutic effects on keloids. The mechanism may involve reducing the expression of TGF- β 1 in keloid tissue and thereby reducing the proliferation of fibroblasts and the synthesis of extracellular matrix. This study provides experimental and theoretical bases for the clinical treatment of keloids with Chinese medicine.

[Keywords] keloid; Sanjie Quban recipe; TGF- β 1

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

瘢痕疙瘩(keloid)是继发于皮肤外伤或者自发形成的良性皮肤肿瘤,具有肿瘤样侵袭性生长的特点,临床表现为高出皮肤表面,质硬韧,呈片状、条索状或结节状的瘢痕,不仅影响皮肤美观,引发皮肤功能障碍,还可导致剧烈瘙痒和疼痛,极其严重者可致使关节畸形,甚至产生癌变,给病患带来巨大心理负担^[1]。

中医药历史悠久,其治疗瘢痕疙瘩具有简、便、效、廉,且副作用少的特点。中医称瘢痕疙瘩为“蟹足肿”“肉蜈蚣”等^[2],目前瘢痕疙瘩用药多集中于外用药上,对于中医内治法治疗瘢痕疙瘩的研究较少。散结祛瘀方是团队在总结前人经验和课题组长期临床实践的基础上,创立的治疗气滞血瘀型瘢痕疙瘩的口服经验方剂。本文拟通过动物实验验证,探讨散结祛瘀方治疗瘢痕疙瘩的作用机制与潜在靶点,为临床瘢痕疙瘩的中医药疗法提供理论依据与实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6~8 周龄 SPF 级健康雌性 BALB/C 裸鼠 15 只,体重 20~28 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[SCXK(京)2021-0006],实验动物饲养于中日友好医院临床研究所[SYXK(京)2023-0001],于温度为 22~25℃、相对湿度为 45%~60%、光照时间为 12 h/12 h 光暗循环的动物房内适应性饲养 1 周后用于后续实验。所有实验方案研究均得到中日友好医院动物伦理委员会的批准(zryhy-21-23-04-01),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

散结祛瘀方(中日友好医院制剂,成分为三棱、莪术、黄芪、夏枯草、浙贝母、生牡蛎、皂角刺、积雪草、生白术、甘草);积雪苷片(上海现代制药股份有

限公司,批号 220904,纯度 $\geq 99\%$);HE 染色试剂盒、Masson 三色染色试剂盒(北京 Solarbio 公司,批号 G1120、G1340);TGF- β 1 兔抗鼠多克隆抗体(美国 Immunoway 公司);二抗山羊抗兔 Ig G (H+L)、DAB 试剂盒、HRP 试剂均购自北京康为世纪生物科技有限公司。

高精度 0.001 g 电子秤(深圳市帝衡电子有限公司);Axio Imager A2 型蔡司光学显微镜(德国卡尔蔡司公司);TP1020 型组织脱水机、EG1140 H 型包埋机、AUTOSTAINERXL 型 HE 半自动染色仪均来自德国 Leica 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 标本来源

瘢痕疙瘩标本来源于中日友好医院皮肤科瘢痕疙瘩手术患者(已通过中日友好医院伦理委员会批准(2023-KY-146-1),手术患者术前签署知情同意书),取材位置为前胸部瘢痕疙瘩组织。瘢痕疙瘩的诊断参照《中国瘢痕疙瘩临床治疗推荐指南》^[3]采纳的蔡景龙^[4]提出的标准。患者纳入标准:2 年内未接受放射疗法、局部药物注射或外科治疗,瘢痕疙瘩处无伤口或伤口愈合良好、完全上皮化 1 月后的无系统疾病者。排除有严重肝、肾、心脏及造血系统疾病,有明显精神症状不能配合试验、孕妇或其他研究者认识不适合参加试验的情况。

1.3.2 模型制备

将动物适应性饲养 1 周,称重,使用腹腔注射戊巴比妥钠(60 mg/kg)进行麻醉。将外科手术切除的同一患者的瘢痕疙瘩组织立即在无菌条件下分成 8 mm $\times$ 5 mm $\times$ 5 mm 大,置入含生理盐水的离心管中,转移至无菌操作台。精度为 0.001 g 的精密电子秤称量并记录瘢痕疙瘩质量,无菌手术刀在裸鼠背部两肩胛中心纵向切开皮肤约 1 cm 长,将瘢痕疙瘩组织植入裸鼠两侧背部皮下,5-0 尼龙线间断缝合,外抹红霉素软膏抗感染,隔天抹药 1 次。两周

后,瘢痕组织块存活、无感染及排斥现象。

1.3.3 动物分组、给药

将 15 只瘢痕疙瘩裸鼠随机分成散结祛癍方组、积雪苷片组和对照组,每组 5 只,分别用散结祛癍方、积雪草苷片及无菌纯水进行灌胃,每天 1 次,共给药 28 d。散结祛癍方按每天成年人(99 g/70 kg)剂量、小鼠(12.87 g/kg)剂量,取 99 g 药材加水煎煮、过滤并浓缩至生药浓度 1.65 g/mL。积雪苷片按每天成年人(36 mg/70 kg)剂量、小鼠(4.68 mg/kg)剂量,取积雪苷片研磨成粉末,加无菌纯水配制为生药浓度 0.468 mg/mL。

1.3.4 HE 染色

在灌胃 28 d 后,处死小鼠,剥取瘢痕疙瘩组织,称重后用 4%多聚甲醛溶液固定组织 48 h,石蜡包埋切片。切片用二甲苯脱蜡、水化,进行 HE 染色,显微镜下观察染色结果。

1.3.5 Masson 染色

将石蜡切片、脱蜡、水化处理,逐步进行核染液染色、冲洗液冲洗、质染液染色,冲洗液再次冲洗,分化液分色后弃分色液,用复染液染色,纯乙醇洗净浮色,二甲苯透明,中性树脂封片并在显微镜下观察染色结果,拍摄照片。

1.3.6 免疫组织化学染色

将石蜡包埋好的瘢痕疙瘩组织进行切片、脱蜡、水化处理,用 PBS 冲洗 3 次后紧接着进行 20 min 热修复,2 次 PBS 冲洗;滴加浓度为 3%的 H₂O₂ 后于室温下孵育约 10 min,再次用 PBS 冲洗;滴加 5%羊血清,于室温下孵育 20 min,弃多余液体后滴

加一抗,4 ℃过夜,PBS 冲洗;滴二抗,于 37 ℃环境下孵育 20 min,PBS 冲洗;滴辣根酶标记链霉卵白素工作液(S-A/HRP),37 ℃环境下孵育 20 min,PBS 冲洗;滴加 DAB 试剂盒混匀显色 6 min 后水洗充分;苏木素染色;脱水、二甲苯透明;中性树脂封片;石蜡切片;光学显微镜观察并拍摄照片。

1.4 统计学方法

实验数据使用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。本实验数据运用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,采用单因素方差分析及 LSD-*t* 法检验来分析多组之间的统计显著性, $P<0.05$ 即为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

各组小鼠均存活,生活状态良好,饮食饮水、体重增长、大小便、活动情况均正常。瘢痕疙瘩植入切口处愈合,瘢痕疙瘩组织被结缔组织包绕,且瘢痕疙瘩组织表面可见明显的毛细血管,证明组织在裸鼠皮下存活良好,见图 1。

2.2 散结祛癍方对瘢痕疙瘩质量的影响

在治疗前后称量各组小鼠的瘢痕疙瘩质量,结果显示在治疗前各组小鼠的瘢痕疙瘩质量组间比较无统计学差异($P>0.05$);经干预后,与对照组比较,积雪苷片组瘢痕疙瘩重量差值增大,但无统计学差异($P>0.05$);与对照组比较,散结祛癍方组瘢痕疙瘩重量差值显著增大($P<0.01$);与积雪苷片组比较,散结祛癍方组瘢痕疙瘩重量差值显著增大($P<0.05$),见图 2。

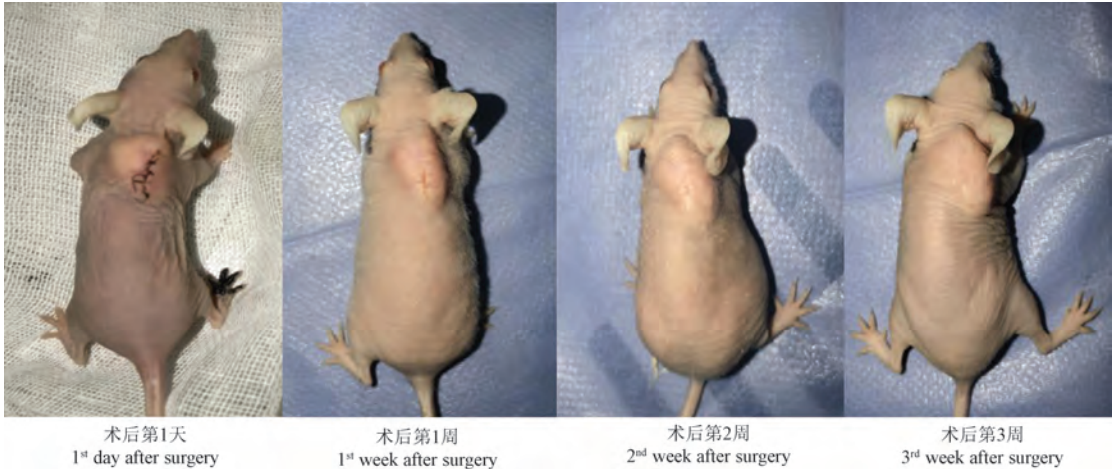


图 1 小鼠术后瘢痕疙瘩植入处切口愈合

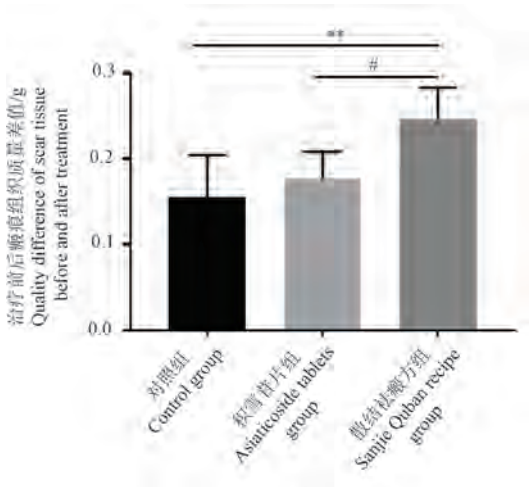
Figure 1 Wound healing at keloid implantation in mice after surgery

2.3 散结祛癍方对癍痕疙瘩组织学和胶原形态的影响

HE 染色结果显示在治疗后 28 d,对照组癍痕疙瘩中可见大量成纤维细胞,散在炎性细胞浸润,积雪苷片组和散结祛癍方组成纤维细胞数量较少,炎性细胞浸润不明显,见图 3A。Masson 染色结果显示,在治疗后 28 d,对照组胶原纤维粗大致密,积雪苷片组和散结祛癍方组胶原相对细小、疏松,见图 3B。

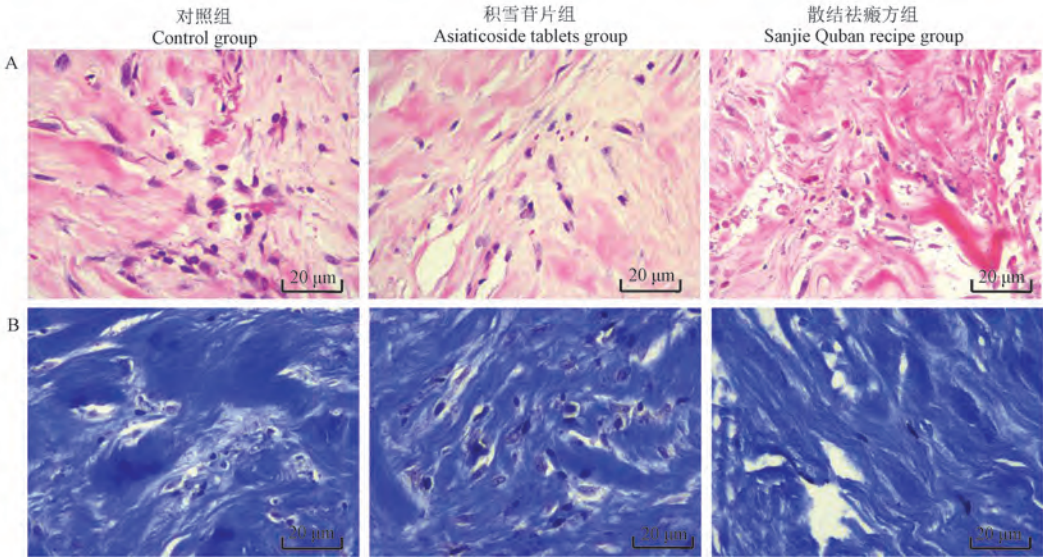
2.4 散结祛癍方对癍痕疙瘩 TGF-β1 表达的影响

采用免疫组织化学染色检测各组癍痕疙瘩 TGF-β1 的表达情况,结果显示在治疗后 28 d,与对照组比较,积雪苷片组 TGF-β1 的表达显著降低($P<0.05$),与对照组比较,散结祛癍方组 TGF-β1 的表达显著降低($P<0.05$),与积雪苷片组比较,散结祛癍方组 TGF-β1 的表达降低,但无统计学意义($P>0.05$)。见图 4,表 1。



注:与对照组相比, ** $P<0.01$;与积雪苷片组相比, # $P<0.05$ 。
图 2 治疗前后各组癍痕疙瘩质量差值的比较($n=5$)
Note. Compared with the control group, ** $P<0.01$. Compared with the Asiaticoside tablets group, # $P<0.05$.

Figure 2 Comparison of quality difference of keloid between groups before and after treatment



注:A:组织学 HE 染色结果;B:胶原形态 Masson 染色结果。
图 3 散结祛癍方对癍痕疙瘩组织学和胶原形态的影响
Note. A, Histological HE staining results. B, Collagen morphology Masson staining results.

Figure 3 Influence of keloid histology and collagen morphology

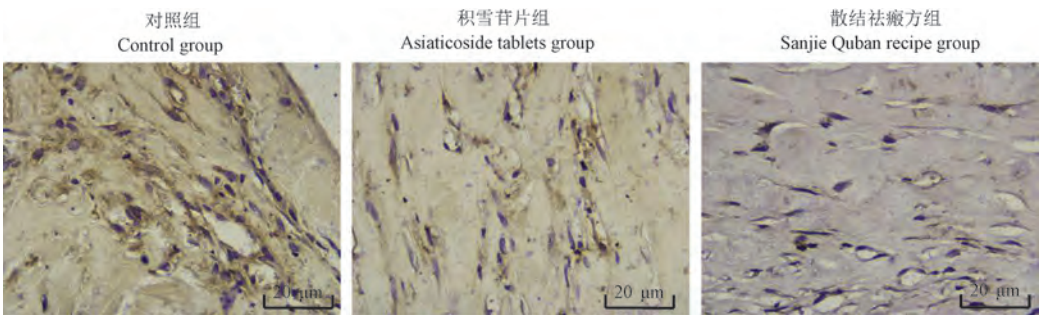


图 4 各治疗组对癍痕疙瘩组织 TGF-β1 表达的影响
Figure 4 Effect of treatment groups on TGF-β1 expression in keloid tissue

表 1 各治疗组瘢痕疙瘩中 TGF-β1 表达 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Expression of TGF-β1 in keloid in each treatment group

组别 Groups	TGF-β1
对照组	0.245±0.032
Control group	
积雪苷片组	0.193±0.005 *
Asiaticoside tablets group	
散结祛癍方组	0.189±0.012 *
Sanjie Quban recipe group	

注:与对照组相比, * $P<0.05$ 。

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

3 讨论

瘢痕疙瘩临床发病率较高,约 4.5% ~ 16.0%^[5]。我国是瘢痕疙瘩的高发区域,且与欧美国家相比,我国患者疾病程度通常更为严重,对各种治疗手段的抵抗程度及复发率均可能更高。目前临床上针对瘢痕疙瘩主要采用类固醇激素注射、化疗药物(如 5-氟尿嘧啶)皮损局部注射、放射疗法、激光、冷冻、手术切除等多种方法联合治疗,虽有一定的效果,然而这些治疗方法具有易产生药物抵抗性、副作用明显和复发率高等肿瘤类疾病特性^[6]。因此,瘢痕疙瘩已成为整形外科、皮肤外科和烧伤创外科关注的焦点和难点,探索安全有效的治疗药物和方法具有迫切性。

中医药治疗瘢痕疙瘩早在宋代《太平圣惠方·灭癍痕诸方》便有记载,“夫癍痕者,皆是风热毒气,在于脏腑,冲注于肌肉,而生疮疹”。治疗上多用破血逐瘀,软坚消癥,清解余毒为法。参考文献^[7]中赵炳南教授认为瘢痕疙瘩多因机体内外因素,造成气机阻碍,气滞血瘀而成,参考文献^[8]中史洪涛认为血瘀贯穿于瘢痕疙瘩发病的全过程。因此,气滞血瘀、瘀而生毒是瘢痕疙瘩的核心病机,活血化瘀、软坚散结是其主要治则^[9]。课题组团队长期从事瘢痕疙瘩的临床研究,在总结前人经验和团队临床实践的基础上,创立了具有活血化瘀、软坚散结功效的散结祛癍方,方中三棱、莪术苦泄辛散温通,能破血散瘀,消癥散结,行气止痛,三棱偏于破瘀,莪术偏于破气,两药相须为用,破瘀散结之力甚佳;夏枯草、浙贝母、生牡蛎、皂角刺软坚散结;积雪草苦、辛,性寒,解毒消肿,兼能活血;方中药物大多苦寒伤胃,故用黄芪益气健脾,托毒排脓,白术性温,健脾燥湿,固护胃气,甘草调和诸药,全方配伍,活血化瘀,软坚结散,故擅治气滞血瘀之瘢痕疙瘩。本实验研究结果显示人瘢痕疙瘩组织植入裸鼠背部后,治疗前后各组瘢痕疙瘩质量差值均增大且有统

计学意义,散结祛癍方组较对照组和积雪苷片组瘢痕疙瘩质量下降明显,提示口服汤药、积雪苷片治疗裸鼠瘢痕疙瘩均有效,散结祛癍方治疗效果更佳。

瘢痕疙瘩的病因涉及皮肤张力升高、慢性炎症、缺氧以及遗传因素等多种因素的相互作用。其发病机制目前尚不明确,但目前其公认的病理表现特征为成纤维细胞过度增殖、侵袭或迁移,并产生大量的胶原、纤连蛋白等细胞外基质成分^[10],尤其是胶原的过度堆积,导致真皮的持久纤维化^[11]。与正常皮肤组织相比,皮肤损伤后,伤口中的巨噬细胞分泌大量的 TGF-β1,通过自分泌和旁分泌的方式作用于修复细胞与炎症^[12],TGF-β1 在瘢痕疙瘩形成的过程中发挥重要作用^[13]。过往研究表明,当瘢痕疙瘩中的成纤维细胞的增殖、迁移、胶原产生量增多时,TGF-β1 会过量表达,若此时阻断或拮抗 TGF-β1 蛋白信号能够有效减少胶原合成以及促进胶原降解,从而抑制瘢痕疙瘩形成及发展^[14]。目前散结祛癍方治疗瘢痕疙瘩的作用机制尚不明确,而 TGF-β1 在瘢痕疙瘩的形成与增长中起重要作用,故本研究旨在探讨散结祛癍方对 BALB/C 裸鼠瘢痕疙瘩模型的作用及转化生长因子-β1 的影响。本实验结果显示散结祛癍方及积雪苷片均能降低瘢痕疙瘩组织中 TGF-β1 的表达,减少瘢痕疙瘩组织中成纤维细胞的增生,减轻周围炎性细胞浸润,使胶原纤维细小、疏松,提示散结祛癍方可能通过减少 TGF-β1 表达,减少胶原合成,从而达到抑制瘢痕疙瘩生长的作用。

本实验模型采用人瘢痕疙瘩组织径直植入裸鼠皮下,优势是实验所需标本、环境与操作相对简单,有利于大规模样本研究。移植小鼠体内的瘢痕疙瘩在一定的时间范围内可以保持原有的组织学特性,且环境因素的影响相对较小,对于瘢痕疙瘩药物的作用效果研究具有说服力;此外,动物模型保留有宏观瘢痕疙瘩的相对完整形态,便于直观评价。然而,采用瘢痕疙瘩径直移植到裸鼠皮下的方法也有一定的不足,如瘢痕疙瘩分离切除时,每一块移植体大小、形态、理化性质不可能完全相同,而且瘢痕疙瘩移植后组织所处的微环境与人体也不同,随着瘢痕疙瘩植入时间的推移,人的瘢痕疙瘩组织与植入小鼠体内的瘢痕疙瘩组织相似性减弱,并在一段时间后,植入的瘢痕疙瘩体积有所缩小,对于评判瘢痕疙瘩治疗效果有较大影响^[15]。目前也有应用瘢痕疙瘩细胞与条件培养基复合载体构

建的瘢痕疙瘩裸鼠模型造模,其优点为造模标准统一,动物模型之间个体差异较小,且能反映出人瘢痕疙瘩的病理生理变化,然而缺点在于造模需要较高的实验条件^[16]。

瘢痕疙瘩裸鼠模型对于研究新技术以及新药物的作用效果具有重要价值。但由于目前没有有效方法诱导实验动物直接产生瘢痕疙瘩,所以难以进一步研究瘢痕疙瘩的具体发病机制。此外,现有的瘢痕疙瘩模型基本都为移植模型,其在模型内形成的瘢痕组织扩增和侵袭能力远低于临床实际情况,尚不十分理想,还需要更多学者共同努力。

综上所述,本实验中散结祛癍方治疗 BALB/C 裸鼠瘢痕疙瘩模型效果显著,其作用机制可能是通过减少瘢痕疙瘩组织中 TGF-β1 的表达,从而减少成纤维细胞的增殖与细胞外基质的合成,减少胶原的产生,达到抑制瘢痕疙瘩形成及生长的作用,该研究为临床运用中医药疗法治疗瘢痕疙瘩提供了一定的理论依据与实验基础。

参考文献:

[1] 冯阳,董芸,丁继平,等. 瘢痕疙瘩 133 例术后放疗有效率分析 [J]. 临床皮肤科杂志, 2022, 51(11): 648-652.
FENG Y, DONG Y, DING J P, et al. Clinical factors affecting the effective rate of postoperative radiotherapy in 133 patients with keloid [J]. J Clin Dermatol, 2022, 51(11): 648-652.

[2] 马学芹,魏瑞丰,牛志健,等. 蟹足肿案 [J]. 中国针灸, 2019, 39(11): 1254.
MA X Q, WEI R F, NIU Z J, et al. Crab foot swelling case [J]. Chin Acupunct Moxibustion, 2019, 39(11): 1254.

[3] 中国整形美容协会瘢痕医学分会常务委员会专家组. 中国瘢痕疙瘩临床治疗推荐指南 [J]. 中国美容整形外科杂志, 2018, 29(5): 前插3-前插14.
Expert Group of Scar Medicine Branch Standing Committee of Chinese Plastic and Aesthetic Association. Recommended guidelines for clinical treatment of keloid in China [J]. Chin J Aesthetic Plast Surg, 2018, 29(5): insert3-insert14.

[4] 蔡景龙. 瘢痕疙瘩的诊疗指南建议 [J]. 中国美容医学, 2016, 25(6): 38-40.
CAI J L. Suggestions on guidelines for diagnosis and treatment of keloid [J]. Chin J Aesthetic Med, 2016, 25(6): 38-40.

[5] LIMANDJAJA G C, NIESSEN F B, SCHEPER R J, et al. The keloid disorder: heterogeneity, histopathology, mechanisms and models [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 360.

[6] LIU X G, ZHANG D. Evaluation of efficacy of corticosteroid and corticosteroid combined with botulinum toxin type a in the treatment of keloid and hypertrophic scars: a meta-analysis [J]. Aesthetic Plast Surg, 2021, 45(6): 3037-3044.

[7] 曹为. 瘢痕疙瘩的中医论述及黑布药膏治疗临床体会 [J]. 中国中西医结合皮肤性病学期刊, 2011, 10(5): 308-309.
CAO W. Traditional Chinese medicine discussion on keloid and clinical experience of treating keloid with black cloth ointment [J]. Chin J Dermatovenereology Integr Tradit West Med, 2011, 10(5): 308-309.

[8] 刘青武,王思丹,陈静,等. 瘢痕疙瘩的中医药治疗 [J]. 皮肤科学通报, 2017, 34(6): 656-661.
LIU Q W, WANG S D, CHEN J, et al. The treatment for keloid with TCM [J]. Dermatol Bull, 2017, 34(6): 656-661.

[9] 廖红华,段砚方,李厚东. 试论活血化瘀药在病理性瘢痕中的应用进展 [J]. 中国烧伤创疡杂志, 2020, 32(3): 207-210.
LIAO H H, DUAN Y F, LI H D. Application progress of blood-activating and stasis-resolving drugs in treating pathological scar [J]. Chin J Burns Wounds Surf Ulcers, 2020, 32(3): 207-210.

[10] MUROTA H, YANG L, KATAYAMA I. Periostin in the pathogenesis of skin diseases [J]. Cell Mol Life Sci, 2017, 74(23): 4321-4328.

[11] 杨艳,郭桂珍,王卫涛,等. 积雪苷软膏对 BALB/C 裸小鼠瘢痕疙瘩模型成纤维细胞及胶原蛋白表达的影响 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2019, 35(7): 398-401.
YANG Y, GUO G Z, WANG W T, et al. Effect of asiaticoside ointment on fibroblast and collagen expression in the keloid model of nude mice [J]. China J Lepr Skin Dis, 2019, 35(7): 398-401.

[12] 王若涵,张霄霏,孙佳,等. TGF-β 及 Smad 家族在瘢痕疙瘩形成中作用的研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 2022, 44(10): 2051-2056.
WANG R H, ZHANG X P, SUN J, et al. Research progress on the role of TGF-β and smad family in keloid formation [J]. Chin J Cell Biol, 2022, 44(10): 2051-2056.

[13] HUANG Y, LIU W, XIAO H, et al. Matricellular protein periostin contributes to hepatic inflammation and fibrosis [J]. Am J Pathol, 2015, 185(3): 786-797.

[14] NAGAR H, KIM S, LEE I, et al. Downregulation of CR6-interacting factor 1 suppresses keloid fibroblast growth via the TGF-β/Smad signaling pathway [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 500.

[15] MATSUMOTO N M, PENG W X, AOKI M, et al. Histological analysis of hyalinised keloidal collagen formation in earlobe keloids over time: collagen hyalinisation starts in the perivascular area [J]. Int Wound J, 2017, 14(6): 1088-1093.

[16] 杨知山,刘青武,吴瑞英,等. 瘢痕疙瘩的裸鼠模型介绍 [J]. 临床皮肤科杂志, 2020, 49(10): 637-640.
YANG Z S, LIU Q W, WU R Y, et al. Introduction to keloid model of nude mice [J]. J Clin Dermatol, 2020, 49(10): 637-640.

沈婷婷,李素云,李亚,等. 基于 IRS-1/PI3K 信号轴探究补肺健脾方对 COPD 大鼠骨骼肌线粒体损伤的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 57-67.

Shen TT, Li SY, Li Y, et al. Role of IRS-1/PI3K signaling axis in the effects of Bufe Jianpi formula on mitochondrial damage in skeletal muscle of chronic obstructive pulmonary disease rats [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 57-67.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.008

基于 IRS-1/PI3K 信号轴探究补肺健脾方对 COPD 大鼠骨骼肌线粒体损伤的影响

沈婷婷^{1,2}, 李素云^{3,4*}, 李亚², 轩银霜^{1,2}, 李景梅^{1,2}, 李高峰^{1,2}, 韩冰洋^{1,2}

(1.河南中医药大学,郑州 450046;2.河南中医药大学第一附属医院中心实验室中药药理(呼吸)实验室,河南省呼吸病防治中医药重点实验室,郑州 450000;3.河南中医药大学第一附属医院呼吸科,郑州 450000;4.河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心,郑州 450046)

【摘要】 目的 探究补肺健脾方(Bufe Jianpi formula,BJF)通过调控 IRS-1/PI3K 信号轴对 COPD 大鼠骨骼肌线粒体损伤的影响。**方法** 将 60 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为空白(Control)组、COPD 稳定期模型(Model)组、氨茶碱(Am)组、补肺健脾方(BJF)组、吡格列酮(PIO)组以及补肺健脾方+吡格列酮(BJF+PIO)组,10 只/组。采用烟熏加鼻腔滴菌(肺炎克雷伯杆菌)的方法建立 COPD 稳定期大鼠模型,自第 9 周开始给药至 20 周结束后取材,每周给予大鼠体重测量。分别对肺组织和骨骼肌组织进行常规切片与 HE 染色,并于光镜下观察其相应的病理学改变。分别于第 0、8、20 周采用非束缚全身体积描记系统观察大鼠肺功能,包括 VT、PEF、EF50。采用 qPCR 技术检测大鼠骨骼肌组织中 IRS-1、PI3K、PGC-1 α 以及 Leptin mRNA 的表达。采用 Western blot 技术检测大鼠骨骼肌组织中 IRS-1、PI3K、AKT、p-AKT、PGC-1 α 、TFAM 和 Leptin 蛋白的表达。**结果** 光镜观察显示与 Control 组比,Model 组肺病理可见肺泡间质以及肺支气管存有大量的炎性细胞浸润,部分肺泡壁出现断裂并融合形成气腔、纤维网被破坏等;与 Model 组比,用药治疗后各组肺泡壁的断裂以及纤维网的破坏均得到改善,支气管中炎性细胞浸润减轻,其中以 BJF 组与 Am 组尤为明显。用药治疗后各组骨骼肌病理与 Model 组比,可不同程度改善肌纤维之间排列间隙、萎缩与断裂,肌细胞胞质染色不均一等,其中以 BJF 组疗效较为显著。与 Control 组比,Model 组 PEF、VT 和 EF50 第 8 周起显著降低($P<0.01$),BJF 组、BJF+PIO 组和 Am 组可以显著提高 PEF、EF50($P<0.01$)。与 Control 组比,Model 组中 IRS-1、PGC-1 α 和 PI3K mRNA 与蛋白表达水平显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),Leptin mRNA 与蛋白表达水平显著增高($P<0.01$);与 Model 组比,BJF 组 IRS-1、PGC-1 α 、PI3K mRNA 与蛋白表达水平显著增高($P<0.05$, $P<0.01$);PIO 组 IRS-1 mRNA 表达水平显著增高($P<0.01$);BJF+PIO 组 PGC-1 α mRNA 水平显著增高($P<0.01$),IRS-1、PI3K mRNA 与蛋白水平显著升高($P<0.05$, $P<0.01$);Am 组中 PI3K mRNA 与蛋白表达水平显著增高($P<0.01$);4 个用药组中 Leptin mRNA 的表达水平均显著降低($P<0.01$),除 Am 组外,其余 3 个用药组 Leptin 蛋白表达显著降低($P<0.01$);与 Control 组比,Model 组股四头肌组织中 TFAM、p-AKT 蛋白表达有明显的下降趋势,各治疗组的 TFAM、p-AKT 蛋白表达均有升高趋势,但无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 补肺健脾方可通过调控 IRS-1/PI3K 信号轴,改善骨骼肌线粒体的损伤,同时提高 PGC-1 α 与线粒体转录因子 TFAM 的表达,增强线粒体的生物合成,从而减轻肺与骨骼肌组织的病理性损伤。

【关键词】 COPD;骨骼肌功能障碍;IRS-1/PI3K 信号通路;补肺健脾方

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0057-11

【基金项目】 国家重点研发计划项目(2018YFC1704800,2018YFC1704801);省级科技研发计划联合基金项目(222301420081);国家自然科学基金面上项目(82074413)。

【作者简介】 沈婷婷(1991—),女,博士研究生,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病方向。E-mail:shenting208@163.com

【通信作者】 李素云(1965—),教授,主任医师,研究方向:中医药防治呼吸疾病临床与基础研究。E-mail:lisuyun2000@126.com

Role of IRS-1/PI3K signaling axis in the effects of Bufeijianpi formula on mitochondrial damage in skeletal muscle of chronic obstructive pulmonary disease rats

SHEN Tingting^{1,2}, LI Suyun^{3,4*}, LI Ya², XUAN Yinshuang^{1,2}, LI Jingmei^{1,2}, LI Gaofeng^{1,2}, HAN Bingyang^{1,2}
(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Chinese Medicine Pharmacology (Respiratory) Laboratory, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Henan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for the Prevention and Treatment of Respiratory Diseases, Zhengzhou 450000. 3. Respiratory Department of the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000. 4. Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan&Education Ministry of China, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

[Abstract] **Objective** To explore the action of Bufeijianpi formula (BJF) on mitochondrial damage to skeletal muscle in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) rats via its regulation of the IRS-1/PI3K signaling axis. **Methods** 60 SPF SD rats were randomly divided into Control group, Model group (COPD stable stage group), aminophylline (Am) group, BJF group, pioglitazone (PIO) group and BJF+PIO group, with 10 rats per group. A stable COPD rat model was established via forced smoking and *Klebsiella pneumoniae* nasal drip method. Samples were taken from the 9th week to the end of the 20th week, and the weight of the rats was measured every week. Routine sectioning and HE staining were performed on lung and skeletal muscle tissue, and corresponding pathological changes were observed under a light microscope. The lung function of the rats was observed by whole-body plethysmography in weeks 0, 8, and 20, including tidal VT, PEF, and EF50. The mRNA expression of IRS-1, leptin, PGC1- α , and PI3K in rat skeletal muscle was detected by qPCR. The expression of PGC1- α , TFAM, IRS-1, PI3K, AKT, p-AKT, and leptin in rat skeletal muscle tissue was detected by Western blot. **Results** The Model group, but not the Control group, showed a large number of inflammatory cells infiltrating the alveolar interstitium and bronchus, indicative of lung disease; some alveolar walls had broken and fused to form air cavities, and fiber networks were destroyed. After drug treatment, the rats showed improved alveolar wall and fiber network integrity and reduced inflammatory cell infiltration in the bronchus, especially those in the BJF and Am groups. In the drug treatment groups, the skeletal muscle pathology of each group showed improved spatial arrangement, the atrophy and fracturing of muscle fibers were ameliorated to different degrees, and cytoplasmic staining of muscle cells was uneven, and the BJF group showed the most significant effects. Compared with the Control group, the Model group's PEF, VT, and EF50 significantly decreased from week 8 ($P<0.01$), while the BJF, BJF+PIO and Am groups had significantly increased PEF and EF50 ($P<0.01$). Compared with Control group, the Model group's mRNA and protein expression levels of IRS-1, PGC1- α , and PI3K were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), the level of leptin was significantly increased ($P<0.01$). Compared with the Model group, the mRNA and protein expressions of IRS-1, PGC1- α and PI3K in the BJF group were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$), and the mRNA expression of IRS-1 in the PIO group was significantly increased ($P<0.01$). The BJF+PIO group's mRNA levels of PGC1- α ($P<0.01$) and mRNA and protein levels of IRS-1 and PI3K were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). The mRNA and protein expression levels of PI3K in the Am group were significantly increased ($P<0.01$). The expression levels of leptin mRNA were significantly decreased in the four treatment groups ($P<0.01$), and the expression of leptin protein was significantly decreased in all treatment groups except the Am group ($P<0.01$). Compared with the Control group, the Model group's quadriceps femoris tissue showed a significant decrease in TFAM and p-AKT expression. TFAM and p-AKT expression in all the treatment groups showed an increasing trend, but the difference was not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusions** By regulating the IRS-1/PI3K signaling axis, Bufeijianpi reduces mitochondrial damage to skeletal muscle, increases the expression of PGC1- α and mitochondrial transcription factor TFAM, enhances mitochondrial biosynthesis, and reduces pathological damage to lung and skeletal muscle tissue.

[Keywords] COPD; skeletal muscle dysfunction; IRS-1/PI3K signaling pathway; Bufeijianpi formula
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive lung disease, COPD) 是一种以不可逆气流受限和 (或) 慢性气道炎症为主要特征的呼吸系统疾病。预计到 2030 年,将上升至全球第 3 位死亡原因,俨然已成为一个国际性的公共健康问题^[1-2]。骨骼肌功能障碍 (skeletal muscle dysfunction, SMD) 是 COPD 常见的肺外表现^[3],其特征是功能性运动能力受损和体力活动减少^[4],多达 1/3 的 COPD 患者可表现出骨骼肌力量与耐力的障碍,以及易疲劳性增加等^[5-6];其发病机制复杂,涉及全身性炎症、氧化应激和线粒体功能损伤等^[7-8]。线粒体功能损伤可引发细胞能量代谢障碍、柠檬酸合成酶活性降低、氧化应激增强、呼吸链受抑制、线粒体 DNA 损伤等,可进一步加重 SMD^[9-11]。

胰岛素受体底物 1 (insulin receptor substrate 1, IRS-1)、磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K) 是 PI3K 信号轴的主要调节因子,IRS-1/PI3K 作为线粒体功能和胰岛素信号转导的主要信号轴,在调节能量代谢和细胞生长、分化中起重要作用。骨骼肌是胰岛素调控葡萄糖摄取、代谢和利用的主要目标组织之一,生理条件下,通过刺激标准的 IRS-PI3K 途径实现肌细胞对葡萄糖的摄取。当线粒体功能受到破坏时,会导致内源性氧化物产生增加,进而引发免疫失衡、炎症反应以及机体代谢异常等问题。这些因素促进了 COPD 骨骼肌功能障碍的发生和发展^[12-13];因此,调控 IRS-1/PI3K 信号通路可能是改善骨骼肌线粒体损伤的重要途径。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助活化因子 1 α (peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator 1 α , PGC-1 α) 是一个骨骼肌内胰岛素信号通路和线粒体内稳态关系的双向调节因子,肌小管中胰岛素和葡萄糖含量升高可干扰胰岛素信号通路、线粒体生物合成和线粒体生物能量代谢^[14],胰岛素增敏剂吡格列酮 (pioglitazone, PIO) 可修复上述变化并诱导 PGC-1 α 生成。此外,线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 作为线粒体基因组最重要的转录激活因子^[15],在调控线粒体 DNA (mtDNA) 表达及线粒体基因组复制中也起到了重要作用^[16-17]。

瘦素 (leptin, LEP) 是一种蛋白质类激素,由脂肪组织分泌,参与调节糖、脂肪与能量代谢,减低食欲,抑制脂肪细胞合成,降低体重。目前 SMD 常见的临床治疗有经皮神经肌肉电刺激和高流量鼻导

管氧疗法等^[18-19],但除康复训练有一定的疗效外,尚无有效药物^[20]。

中医药治疗 COPD 效果显著,课题组前期研究成果表明,补肺健脾方能够确切地改善患者的临床症状,减缓肺功能下降的速率,减少急性加重的次数,并提高患者的生存质量^[21-22]。基础研究显示,补肺健脾方能够显著改善 COPD 大鼠的氧化应激^[23-24],但其具体机制尚不清楚。本研究通过观察骨骼肌线粒体生物合成及 IRS-1/PI3K 相关指标变化,探讨补肺健脾方的作用机制,为寻求有效的治疗方法提供思路。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 60 只,6~8 周龄,体重 (200±20) g,雌雄各半,购于济南朋悦实验动物繁育中心 [SCXK (鲁) 2019-0003]。在河南中医药大学第一附属医院中心实验室开展饲养工作 [SYXK (豫) 2022-0004]。适应环境 7 d,无菌饲料喂养,自由饮用无菌水,饲养环境安静;实验过程中遵循实验动物“3R”原则,本实验经河南中医药大学实验动物伦理委员会审查批准 (YFYDW2016027)。

1.1.2 细菌

肺炎克雷伯杆菌 (46114),由中国医学细菌保藏管理中心提供。使用之前将其浓度调整为 6×10^8 CFU/mL。

1.2 主要试剂与仪器

红旗渠牌过滤嘴香烟,硬金红,烤烟型,焦油量 10 mg,烟碱量 1 mg,烟气 CO 含量 12 mg,河南中烟工业有限责任公司生产。补肺健脾方 (黄芪、党参、白术、茯苓等) 浸膏,由河南中医药大学药学院药物分析实验室提供,1 g 含生药量 2.1 g;吡格列酮胰岛素增敏剂,每盒 20 mg,称取 2 g 吡格列酮粉置入 1000 mL 配制好的甲基纤维素钠 (CMC) 溶液中,于磁力搅拌器上搅拌,直至混匀,配成 2 mg/mL 吡格列酮溶液;氨茶碱片,每片 0.1 g,国药准字 H41020704,由海南制药厂有限公司制药一厂提供,使用前加蒸馏水将其配成 1.0 mg/mL 浓度的混悬液;生理盐水 (0.9% NaCl),每瓶 500 mL,由河南竹林众生制药股份有限公司提供。TRIzol Reagent (Invitrogen, 货号: 15596018); 逆转录试剂盒 (Invitrogen, 货号: 4368814); SybrGreen Mix kit

(Invitrogen, 货号: A25742); 无酶水 (Solarbio, 货号: R1600); PI3K p110 兔多克隆抗体 (Gene Tex, 货号: GTX111173); Leptin 兔单克隆抗体 (Gene Tex, 货号: GTX109204); TFAM 兔多克隆抗体 (Gene Tex, 货号: GTX112760); IRS1 兔多克隆抗体 (Gene Tex, 货号: GTX78916); PGC-1 α 兔多克隆抗体 (Gene Tex, 货号: GTX37356); AKT 兔多克隆抗体 (Gene Tex, 货号: GTX121937); AKT (phosphoSer473) 兔多克隆抗体 (Gene Tex, 货号: GTX128414); 高效 RIPA 裂解液 (Solarbio, 货号: R0010); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Solarbio, 货号: PC0020); SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (Solarbio, 货号: P120); 彩虹 245plus 广谱蛋白 Marker (Solarbio, 货号: PR1930); GAPDH 兔多克隆抗体 (货号: 10494-1-AP)、HRP 标记山羊抗兔二抗 (货号: SA00001-2) 均由武汉三鹰提供, 引物序列见表 1。IVC-Ⅱ 动物饲养笼具 (冯氏实验动物设备有限公司, 江苏省苏州市); 全身体积描记系统 (Buxco, 美国); PM-10AD 光学显微镜及照相系统 (OLympus optical, 日本); 7500 型实时荧光定量 PCR 仪 (ABI, 美国); 核酸蛋白定量检测仪 (NanoVuePlus, 美国); ChemiDoc MP 全能成像系统 (BIO-RAD, 美国); 高速台式冷冻离心机 (Thermo, 美国); BS210 S 电子天平 (赛多利斯, 德国)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备

大鼠购回后放于动物饲养笼具中适应环境 7 d。无菌饲料、无菌水喂养, 保持室内环境安静, 温度湿度适宜, 通风系统正常。参照课题组前期研究建立的 COPD 模型制备方法^[25], 采用香烟烟雾暴露联合细菌感染法制备 COPD 稳定期大鼠模型: 采用经鼻腔滴入的方法, 在大鼠吸气时, 将 0.1 mL 菌液经左右鼻孔交叉进行滴入, 菌液浓度 6 $\times 10^8$ CFU/mL, 每

5 d 滴 1 次, 持续 8 周。给予模型组和用药组大鼠烟熏, 点燃香烟并使烟熏箱烟雾浓度达到 (3000 $\pm$ 500) ppm, 每天 2 次, 每次 30 min, 两次烟熏间隔 $\geq$ 3 h, 持续 12 周。

1.3.2 分组

采用 Microsoft Excel 中“RAND()”函数, 将 SD 大鼠随机分为空白 (Control) 组、COPD 稳定期模型 (Model) 组、吡格列酮 (PIO) 组、补肺健脾方 (BJF) 组、补肺健脾方+吡格列酮 (BJF+PIO) 组以及氨茶碱 (aminophylline, Am) 组, 10 只/组。

1.3.3 给药

自第 9 周开始至第 20 周结束, BJF 组、BJF+PIO 组和 Am 组大鼠分别给予 BJF (12.42 g/(kg $\cdot$ d))、Am (0.027 g/(kg $\cdot$ d)) 灌胃, 每天灌胃 2 次, 间隔 $\geq$ 3 h。Control 组和 Model 组大鼠均给予生理盐水灌胃 (每只 2 mL)。至第 15 周, BJF+PIO 组和 PIO 组大鼠分别给予 PIO (0.01 g/(kg $\cdot$ d)) 腹腔注射, 每天 1 次, 共 6 周。补肺健脾方的临床人用计量为 1.97 g/kg, 大鼠药物剂量采用等效剂量换算公式计算。

1.3.4 指标检测

(1) 肺功能

分别于第 0、8、20 周结束时, 采用无束缚全身体积描记系统 (WBP) 测定大鼠肺功能, 包括潮气量 (VT)、呼气峰流速 (PEF) 和 50% 潮气量呼气流量 (EF50)。

(2) 肺病理

取出肺, 用 10 % 中性甲醛灌注左肺 20 min、固定 72 h, 梯度脱水后进行石蜡包埋, 调整厚度至 4 μ m 进行切片, 常规 HE 染色, 然后通过光学显微镜观察小气道和肺泡病理变化。

(3) 股四头肌病理

分离并取出股四头肌, 顺着肌肉纹理剥离位于左右两边大腿前侧的股四头肌组织, 分离干净后, 生理盐水冲洗; 将一块股四头肌固定在 10% 中性甲醛中, 后续进行石蜡包埋及病理检测; 另一块分装在冻存管中, 液氮条件下-80 $^{\circ}$ C 冻存, 待后续蛋白与基因检测。

(4) RT-qPCR 检测股四头肌组织 IRS-1、Leptin、PGC-1 α 以及 PI3K mRNA 表达

用 TRIzol 法提取大鼠股四头肌组织中的总 RNA, 按照逆转录试剂盒的操作方法逆转录为 cDNA。配制 20 μ L qPCR 反应体系进行 PCR 反应,

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence		
基因名称		序列 (5'-3')
Gene name		Sequence (5'-3')
PGC1- α	F	AACTCTCTGGAAGTGCAGGC
	R	GCTTTGGCGAAGCCTTGAAA
PI3K	F	ATCGACCTACACTTGGGGGA
	R	CAATATCTTCTGGCCGGGCT
Leptin	F	CAGCTTGCCCTCCCAAAACG
	R	TGTGGAGTAGACGAGGCTT
IRS1	F	TGACAGCTCCCAATGGTAC
	R	GGTAGCACCTGGGATGTAGC
GAPDH	F	CACCCGCGAGTACAACCTTC
	R	CACCCGCGAGTACAACCTTC

采用 GAPDH 作为内参,根据试剂盒说明书设定反应条件进行 PCR 扩增,数据导出进行定量分析,按照 mRNA 相对表达量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算。

(5) Western blot 检测股四头肌组织 PGC-1 α 、TFAM、IRS-1、PI3K、AKT、p-AKT、Leptin 蛋白表达

取各组大鼠股四头肌组织,按照蛋白提取试剂盒提取股四头肌总蛋白,使用 BCA 法检测样本蛋白浓度。取 40 μ g 蛋白进行电泳、转膜,用 5%脱脂牛奶封闭 1 h,加入 PGC-1 α 抗体 1:1000、TFAM 抗体 1:1000、IRS1 抗体 1:500、PI3K 抗体 1:500、AKT 抗体 1:2000、p-AKT 抗体 1:500 以及 Leptin 抗体 1:1000,4 $^{\circ}$ C 摇床上振摇过夜,1 $\times$ TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。再加入 1:1000 山羊抗兔 IgG-HRP,室温振摇反应 1 h,1 $\times$ TBST 漂洗 5 min,3 次。ECL 试剂显色、曝光,并用 Image J 软件分析。

1.4 统计学方法

采用 IBM SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,对计量资料的组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。所有数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。方差齐者采用最小显著差法(LSD),方差不齐者采用 Dunnett's T3 法,显著性水准取 $\alpha = 0.05$ 。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

在动物饲养周期内,Control 组大鼠毛发光泽,饮食、饮水量正常,二便可,日常活动度无异常。Model 组大鼠自第 2 周开始,出现不同程度的躁动、

皮毛微黄、活动量减少等症状;造模第 4~8 周,Model 组大鼠毛发枯黄无光泽,精神欠佳,口鼻腔分泌物增加,部分大鼠出现大便溏薄,明显消瘦,肺部可闻及哮鸣音。在第 9 周给药治疗后,上述症状得以一定程度的缓解和改善。治疗组中以 BJJ 组和 BJJ+PIO 组改善显著。

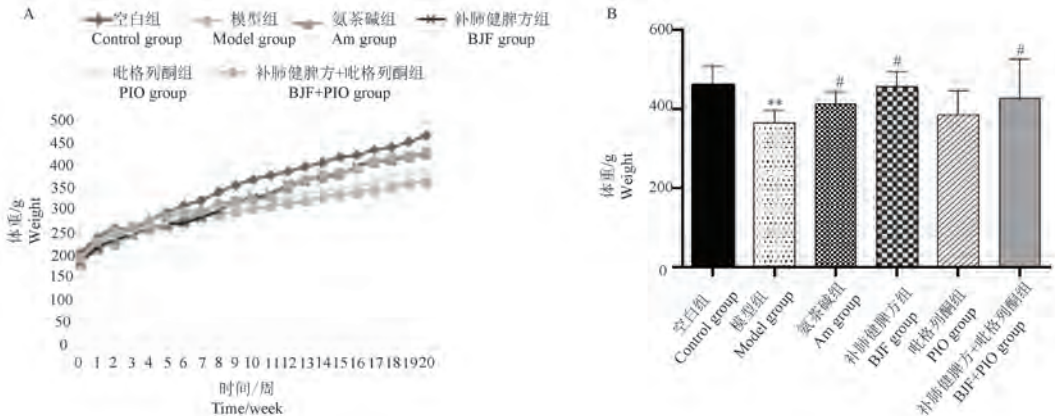
造模期间 Model 组大鼠共死亡 3 只,其中第 8 周死亡 2 只,于烟熏后出现窒息死亡,口鼻四肢呈发绀状;第 14 周死亡 1 只,四肢羸弱,呈恶病质状;解剖可见肺有瘀血斑,胸膜处出现严重粘连。第 9 周,Am 组大鼠死亡 1 只,因灌胃操作不当所致,解剖可见肺部斑块,散在小脓点。第 20 周取材时,PIO 组死亡 1 只,因腹腔注射麻醉剂过量所致。

2.2 体重变化

与 Control 组大鼠相比,Model 组大鼠体重虽总体呈现上升趋势,但增长较为缓慢;自第 7 周起,Model 组大鼠体重较 Control 组明显减轻($P<0.05$)。自第 12 周起,BJJ、BJJ+PIO 和 Am 组大鼠体重均较 Model 组显著增加($P<0.05$, $P<0.01$),其中以 BJJ+PIO 组尤为显著($P<0.01$),自第 17 周起 PIO 组大鼠体重较 Model 组明显增加($P<0.05$)。见图 1。

2.3 肺功能变化

与 Control 组相比,第 8 周 Model 组的 VT 显著降低($P<0.01$),第 20 周,各用药组中以 BJJ 组、BJJ+PIO 组和 Am 组大鼠 VT 较 Model 组显著升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与 Control 组相比,第 8 周 Model 组的 PEF 显著降低($P<0.01$),第 20 周,各用药组中 BJJ 组、BJJ+PIO 组和 Am 组大鼠 PEF 较 Model 组



注:A:各组大鼠 0~20 周体重增长趋势;B:第 20 周各组大鼠体重水平。与空白组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图 1 各组大鼠体重变化(g, $\bar{x}\pm s$)

Note. A, Body weight growth trend of rats in each group from 0~20 weeks. B, Body weight of rats in each group at week 20. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, # $P<0.05$.

Figure 1 Changes of body weight in each group

显著升高($P<0.01$),而 PIO 组与 Model 组无显著性差异($P>0.05$)。

与 Control 组比较,第 8 周 Model 组的 EF50 显著降低($P<0.01$),各个用药组与 Control 组之间无显著性差异($P>0.05$)。第 20 周,BJF 组、BJF+PIO 组和 Am 组大鼠 EF50 较 Model 组显著升高($P<0.05,P<0.01$),而 PIO 组与 Model 组无显著性差异($P>0.05$)。见表 2。

2.4 肺组织病理变化

于光镜下观察 Control 组大鼠肺泡结构完整,气道周围无炎性细胞浸润,无肺泡破裂融合,肺小气道结构正常。Model 组大鼠肺病理可见肺泡间质以及肺支气管存有大量的炎性细胞浸润,部分肺泡壁出现断裂并融合形成气腔、纤维网被破坏等。与 Model 组大鼠相比,各用药组药物治疗后均可不同

程度改善肺泡壁的断裂以及纤维网的破坏,减轻支气管中炎性细胞浸润,其中以 BJF 组与 Am 组改善尤为明显。见图 2。

2.5 股四头肌病理变化

光镜下观察 Control 组大鼠肌纤维之间排列整齐,纤维无萎缩与断裂,肌细胞胞质染色均一。Model 组大鼠股四头肌病理结果显示骨骼肌肌纤维之间的间隙明显增宽,纤维部分出现萎缩和断裂,肌细胞胞质染色不均等,用药治疗后各组均可不同程度改善上述病理变化,其中以 BJF 组较为显著。见图 3。

2.6 股四头肌组织中 IRS-1、Leptin、PGC-1α 和 PI3K mRNA 表达变化

结果见表 3 和图 4,与 Control 组比较,Model 组中 IRS-1、PGC-1α 和 PI3K mRNA 的表达水平显著

表 2 各组大鼠 VT、PEF 和 EF50 变化(mL, $\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Table 2 VT, PEF and EF50 changes of rats in each group

指标 Indicator	空白组 Control group	模型组 Model group	氨茶碱组 Am group	补肺健脾方组 BJF group	吡格列酮组 PIO group	补肺健脾方+ 吡格列酮组 BJF+PIO group
VT	Week(0)	1.67±0.09	1.73±0.11	1.76±0.08	1.75±0.12	1.68±0.10
	Week(8)	1.77±0.10	1.68±0.09**	1.64±0.11	1.67±0.07	1.64±0.09
	Week(20)	1.82±0.06	1.54±0.10**	1.69±0.07 [#]	1.70±0.11 ^{##}	1.63±0.08 ^{ΔΔ}
PEF	Week(0)	16.22±0.77	15.98±0.69	16.18±1.02	16.11±0.92	16.36±1.22
	Week(8)	16.89±0.71	13.14±0.83**	13.43±0.92	13.26±0.97	13.63±1.07
	Week(20)	17.12±0.92	11.43±0.88**	14.23±0.56 ^{##}	13.34±0.76 ^{##}	14.30±0.91 ^Δ
EF50	Week(0)	1.46±0.16	1.38±0.07	1.39±0.08	1.34±0.82	1.37±0.11
	Week(8)	1.52±0.09	1.16±0.08**	1.21±0.10	1.18±0.08	1.14±0.07
	Week(20)	1.57±0.07	1.07±0.06**	1.35±0.06 ^{##}	1.31±0.10 ^{##}	1.16±0.05 ^Δ

注:与空白组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与补肺健脾方组相比,^Δ $P<0.05$,^{ΔΔ} $P<0.01$ 。
Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$. Compared with BJF group, ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$.

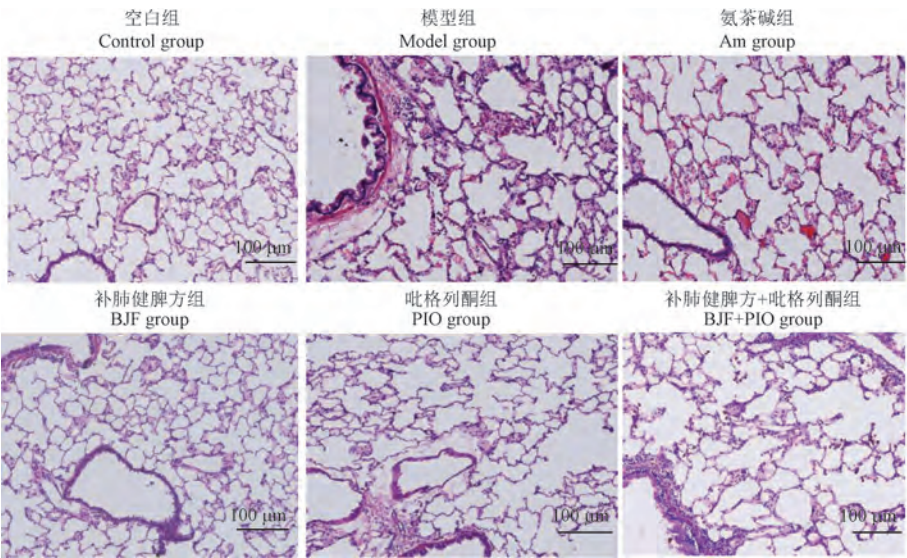


图 2 肺组织病理(HE)
Figure 2 Lung pathology (HE)

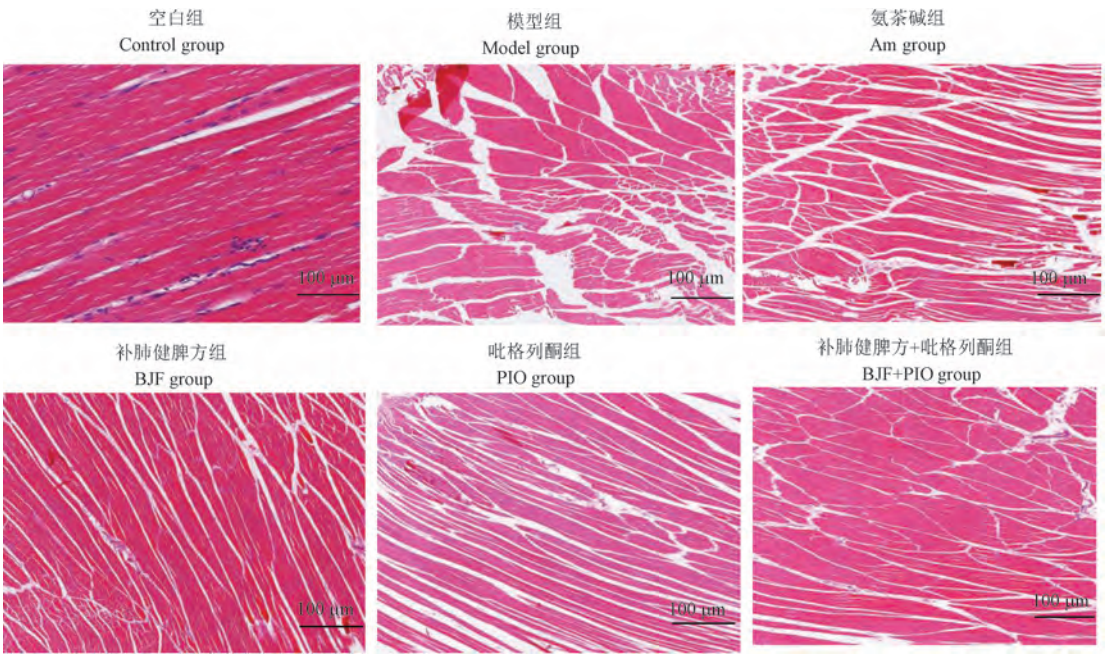


图 3 股四头肌组织病理(HE)
Figure 3 Quadriceps muscle pathology(HE)

表 3 IRS-1/PI3K 信号轴相关基因 mRNA 的表达变化($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Changes of mRNA expression of genes related to IRS-1/PI3K signaling axis

组别 Groups	IRS1	Leptin	PGC-1α	PI3K
空白组 Control group	1.00±0.15	1.00±0.14	1.00±0.16	1.00±0.16
模型组 Model group	0.29±0.03 [*]	5.53±0.40 ^{**}	0.38±0.03 [*]	0.16±0.04 ^{**}
氨茶碱组 Am group	0.36±0.05	3.85±0.50 ^{##}	0.46±0.05	0.38±0.05 ^{##}
补肺健脾方组 BJF group	0.71±0.04 ^{##□□}	1.64±0.06 ^{##□□}	0.96±0.08 ^{##□□}	0.90±0.13 ^{##□□}
吡格列酮组 PIO group	0.53±0.05 ^{##□Δ}	3.09±0.26 ^{##□□ΔΔ}	0.36±0.03 ^{ΔΔ}	0.26±0.04 ^{ΔΔ}
补肺健脾方+吡格列酮组 BJF+PIO group	0.91±0.03 ^{##□□ΔΔ▲▲}	1.94±0.14 ^{##□□▲▲}	0.73±0.05 ^{##□□ΔΔ▲▲}	0.68±0.07 ^{##□□ΔΔ▲▲}

注:与空白组相比, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$;与模型组相比, ^{##} $P<0.01$;与补肺健脾方组相比, ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$;与吡格列酮组相比, ^{▲▲} $P<0.01$;与氨茶碱组相比, [□] $P<0.05$, ^{□□} $P<0.01$ 。
Note. Compared with Control group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$. Compared with Model group, ^{##} $P<0.01$. Compared with BJF group, ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$. Compared with PIO group, ^{▲▲} $P<0.01$. Compared with Am group, [□] $P<0.05$, ^{□□} $P<0.01$.

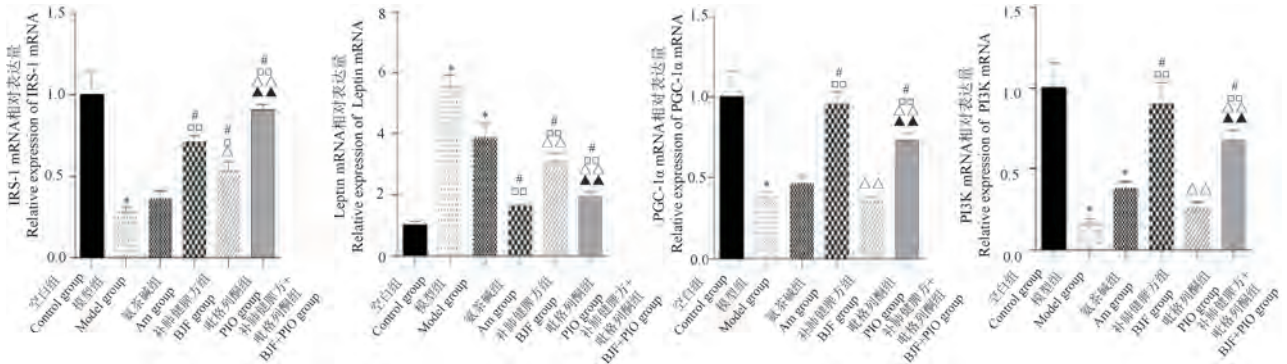


图 4 各组 COPD 大鼠股四头肌组织 IRS-1、Leptin、PGC-1α 和 PI3K mRNA 的表达比较($\bar{x}\pm s$)
Note. Compared with Control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with Model group, [#] $P<0.05$. Compared with BJF group, ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$. Compared with PIO group, ^{▲▲} $P<0.01$. Compared with Am group, [□] $P<0.05$, ^{□□} $P<0.01$.

Figure 4 Comparison of IRS-1, Leptin, PGC-1α and PI3K mRNA expression in quadriceps muscle of COPD rats in each group

降低($P<0.05$),Leptin mRNA 的表达水平显著增高($P<0.01$);与 Model 组比较,4 个用药组中 Leptin mRNA 的表达水平均显著降低($P<0.01$),BJF、PIO 和 BJF+PIO 组 IRS1 mRNA 的表达水平均显著增高($P<0.05$, $P<0.01$);BJF 和 BJF + PIO 组 PGC-1 α mRNA 的表达水平较 Model 组显著升高($P<0.01$);BJF、BJF+PIO 和 Am 组 PI3K mRNA 的表达水平较 Model 组显著增高($P<0.01$)。

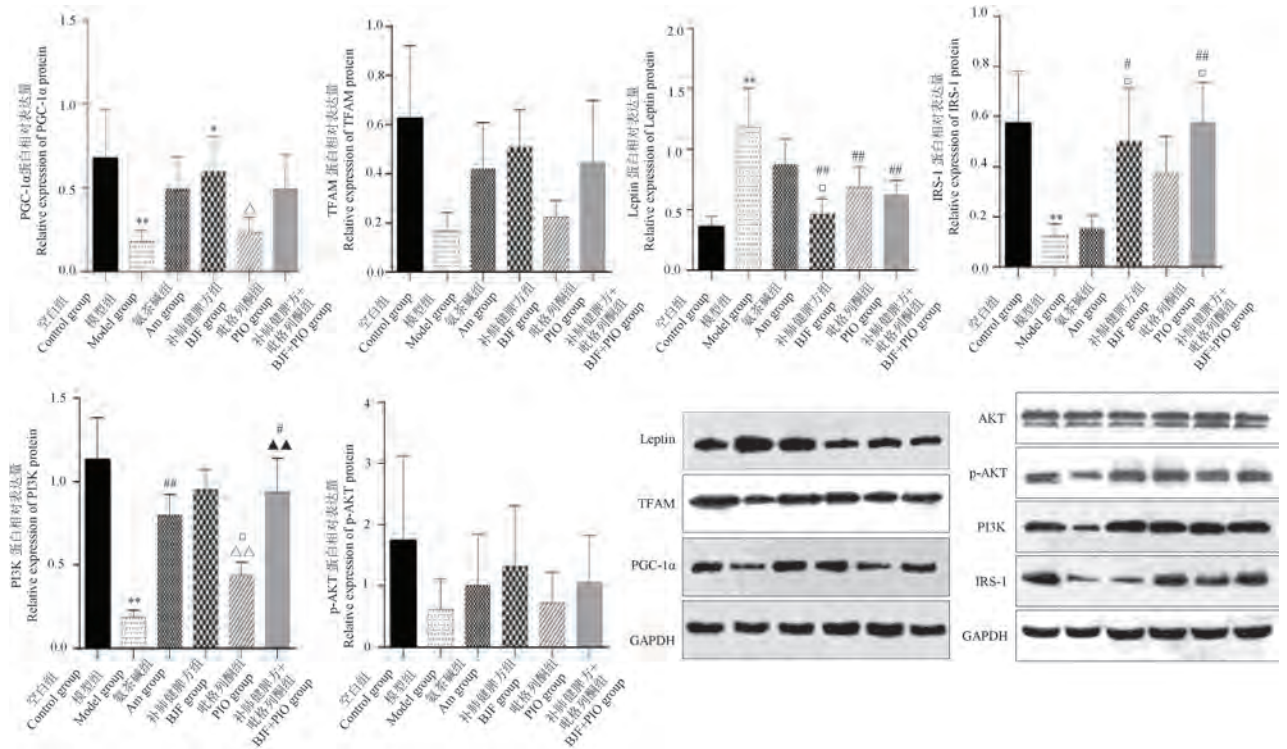
2.7 股四头肌组织中 PGC-1 α 、TFAM、IRS-1、PI3K、p-AKT 以及 Leptin 相关蛋白的表达变化

结果见表 4 和图 5,与 Control 组比较,Model 组股四头肌组织中 PGC-1 α 、IRS-1、PI3K 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$),Leptin 蛋白的表达水平显著增高($P<0.01$)。与 Model 组比较,BJF 组 PGC-1 α 蛋白的表达水平显著增高($P<0.05$),其他各治疗组 PGC-1 α 蛋白表达均有不同程度升高,但无显著性

表 4 大鼠股四头肌组织 PGC-1 α 、TFAM、Leptin、IRS-1、PI3K 和 p-AKT 的蛋白表达变化($\bar{x}\pm s$)
Table 4 Protein expression changes of PGC-1 α , TFAM,Leptin,IRS-1,PI3K and p-AKT in quadriceps muscle of rats

组别 Groups	PGC-1 α	TFAM	Leptin	IRS-1	PI3K	p-AKT
空白组 Control group	0.67 $\pm$ 0.29	0.62 $\pm$ 0.30	0.36 $\pm$ 0.09	0.57 $\pm$ 0.21	1.13 $\pm$ 0.25	1.75 $\pm$ 1.38
模型组 Model group	0.18 $\pm$ 0.07**	0.17 $\pm$ 0.08	1.18 $\pm$ 0.32**	0.12 $\pm$ 0.05**	0.19 $\pm$ 0.04**	0.62 $\pm$ 0.50
氨茶碱组 Am group	0.49 $\pm$ 0.19	0.42 $\pm$ 0.19	0.87 $\pm$ 0.21	0.15 $\pm$ 0.06	0.80 $\pm$ 0.13##	1.01 $\pm$ 0.84
补肺健脾方组 BJF group	0.60 $\pm$ 0.21#	0.51 $\pm$ 0.15	0.46 $\pm$ 0.12##□	0.50 $\pm$ 0.21□	0.95 $\pm$ 0.12##	1.32 $\pm$ 0.98
吡格列酮组 PIO group	0.24 $\pm$ 0.09 Δ	0.22 $\pm$ 0.07	0.69 $\pm$ 0.17##	0.38 $\pm$ 0.15	0.44 $\pm$ 0.08□ $\Delta\Delta$	0.73 $\pm$ 0.50
补肺健脾方+吡格列酮组 BJF+PIO group	0.49 $\pm$ 0.20	0.44 $\pm$ 0.25	0.62 $\pm$ 0.13##	0.58 $\pm$ 0.16##□□	0.94 $\pm$ 0.20## $\Delta\Delta$	1.05 $\pm$ 0.78

注:与空白组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与补肺健脾方组相比, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与吡格列酮组相比, $\Delta\Delta P<0.01$;与氨茶碱组相比,□ $P<0.05$,□□ $P<0.01$ 。
Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with BJF group, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$. Compared with PIO group, $\Delta\Delta P<0.01$. Compared with Am group, □ $P<0.05$, □□ $P<0.01$.



注:与空白组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与空白组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与补肺健脾方组相比, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与吡格列酮组相比, $\Delta\Delta P<0.01$;与氨茶碱组相比,□ $P<0.05$ 。

图 5 COPD 大鼠股四头肌组织 Leptin、TFAM、PGC-1 α 、p-AKT、PI3K 和 IRS-1 蛋白的表达比较($\bar{x}\pm s$)

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with Model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with BJF group, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$. Compared with PIO group, $\Delta\Delta P<0.01$. Compared with Am group, □ $P<0.05$.

Figure 5 Expression of Leptin, TFAM, PGC-1 α , p-AKT, PI3K and IRS-1 in the quadriceps muscle of COPD rats

差异($P>0.05$)。BJF+PIO 与 BJJ 组 IRS-1 蛋白表达水平较 Model 组显著增高($P<0.05$, $P<0.01$),其他各治疗组 IRS-1 蛋白表达水平有升高趋势,但无显著性差异($P>0.05$)。Am、BJJ 和 BJJ+PIO 组 PI3K 蛋白的表达水平较 Model 组显著增高($P<0.01$),且以 BJJ+PIO 组增高最为显著,PIO 组 PI3K 蛋白的表达水平有所升高,但无显著性差异($P>0.05$)。与 Control 组比较,Model 组股四头肌组织中 TFAM、p-AKT 蛋白表达有明显的下降趋势,各治疗组 TFAM、p-AKT 蛋白表达均有不同程度的升高趋势,但均无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

全身性炎症、氧化应激和能量代谢紊乱被认为是导致 COPD 骨骼肌功能障碍的因素^[26],但确切的分子机制尚不清楚。线粒体损伤是 COPD 患者骨骼肌功能障碍的最重要机制之一,线粒体对机体氧化应激和能量代谢的调节发挥了关键作用,保护线粒体免受损伤对于改善 COPD 骨骼肌功能障碍至关重要。线粒体的生物发生属于动态调节,需要不断产生新的线粒体,以维持适当数量形态正常的活动细胞器,因此,刺激线粒体的生物发生可能会改善线粒体功能损伤^[27]。PGC-1 α 是一小类转录调节因子的成员,主要存在于骨骼肌,是线粒体生物合成的关键因子,控制参与着线粒体的生物发生、氧化应激、代谢调节以及基因的表达;研究表明它是通过与转录因子如核呼吸因子(NRF)相互作用来控制线粒体基因的表达水平并诱导线粒体生物发生^[28]。TFAM 是一种 DNA 结合刺激蛋白,调节线粒体 DNA 的转录和复制以维持 mtDNA 含量^[29]。当 PGC-1 α 与 NRF1 相互作用时,可激活下游 TFAM 的表达,当 TFAM 蛋白和 mRNA 平行增加 2 倍时,线粒体含量也会相应增加 2~3 倍^[30],从而刺激线粒体的生物发生^[31]。COPD 大鼠骨骼肌中 PGC-1 α 与 TFAM 基因表达明显降低,线粒体功能的改善可能与 PGC-1 α 和 TFAM 的大量表达且参与调节线粒体的转录机制相关^[32]。本研究结果表明,Model 组大鼠骨骼肌中 PGC-1 α 与 TFAM 基因和蛋白表达均较 Control 组显著降低,各治疗组均可以不同程度的增加 PGC-1 α 与 TFAM 基因和蛋白表达,提示补肺健脾方能够通过提高 PGC-1 α 与 TFAM 的表达,增强线粒体的生物合成,改善 COPD 骨骼肌线粒体损伤。

从 IRS-1/PI3K 通路干预骨骼肌的角度去探析

COPD 的发病机制,对临床探寻其防治靶点具有重要意义。当线粒体功能发生损伤时,脂肪酸会在细胞内大量堆积^[8],使得胰岛素受体底物(IRS)-1 丝/苏氨酸发生磷酸化,从而抑制 IRS-1 酪氨酸的磷酸化,不能激活 PI3K,下调 Glut4 的活性,导致机体代谢异常、体能活动不足,加重骨骼肌功能障碍^[12]。同时,Leptin 作为调节能量代谢的主要激素,在能量代谢方面发挥着重要的作用。研究发现 COPD 合并骨骼肌萎缩大鼠血清中 Leptin 水平较正常大鼠偏高且体重明显减轻^[33]。本研究结果显示 Model 组大鼠 IRS-1、PI3K、p-AKT 基因和蛋白表达水平较 Control 组大鼠显著降低,Leptin 基因和蛋白的表达水平较 Control 组大鼠显著增高;BJJ 组、BJJ+PIO 组和 PIO 组均可以不同程度的增加 IRS-1、PI3K、p-AKT 基因和蛋白的表达,4 个用药组均可降低 Leptin 基因和蛋白的表达;提示补肺健脾方可通过调控 IRS-1/PI3K 信号轴,改善骨骼肌线粒体的损伤,对 COPD 骨骼肌功能障碍发挥治疗作用。

COPD 合并骨骼肌功能障碍在中医属于“痿症”范畴,《素问·平人氣象论》中记载:“脏真濡于脾,脾藏肌肉之气也”“肺主气司呼吸”“脾主肌肉四肢”,若肺脾气虚则宗气不足、脾失健运,血液生化乏源,四肢肌肉失于濡养,肌肉萎缩甚至功能障碍。肺五行属金,脾属土,两者为母子关系,肺胀病久,子盗母气致肺脾两虚,肌肉失养,而致痿症^[34]。因此,培土生金、健脾益肺可作为 COPD 骨骼肌功能障碍的有效治疗方法。

导师李素云教授根据多年临床经验,以“补肺健脾,培土生金”为法,拟定了补肺健脾方(黄芪、党参、白术、茯苓、浙贝母等)治疗骨骼肌功能障碍患者。经多中心、随机对照临床试验表明,对于 COPD 稳定期患者,补肺健脾颗粒能够减轻患者气流受限、改善肺通气、增强肺功能,减少 AECOPD 的发生次数,提高患者生活质量等^[21]。开展相关动物实验结果也表明,补肺健脾方通过减轻骨骼肌的炎症反应,调节肌细胞能量代谢,提高骨骼肌线粒体密度等^[35-36]。

综上所述,补肺健脾方可通过调控 IRS-1/PI3K 信号轴,改善骨骼肌线粒体的损伤,同时提高线粒体辅激活因子 PGC-1 α 与线粒体转录因子 TFAM 的表达,增强线粒体的生物合成,从而减轻肺与骨骼肌组织的病理性损伤,但其确切机制仍需进一步展开探究。

参考文献:

- [1] Asia Pacific COPD Roundtable Group. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease; an Asia-Pacific perspective [J]. *Respirology*, 2005, 10 (1): 9-17.
- [2] ZHANG Q, LI W, AYIDAERHAN N, et al. IP₃ R attenuates oxidative stress and inflammation damage in smoking-induced COPD by promoting autophagy [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25 (13): 6174-6187.
- [3] CRUTHIRDS C L, VAN DER MEIJ B S, WIERZCHOWSKA-MCNEW A, et al. Presence or absence of skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease is associated with distinct phenotypes [J]. *Arch Bronconeumol*, 2021, 57 (4): 264-272.
- [4] KOHLBRENNER D, SIEVI N A, ROEDER M, et al. Handgrip strength seems not to be affected by COPD disease progression: a longitudinal cohort study [J]. *COPD*, 2020, 17(2): 150-155.
- [5] JAITOVICH A, BARREIRO E. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: what we know and can do for our patients [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 198 (6): 824-825.
- [6] MARKLUND S, BUI K L, NYBERG A. Measuring and monitoring skeletal muscle function in COPD: current perspectives [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2019, 14: 1825-1838.
- [7] PIEGUEZUELOS E, ESQUINAS C, MORENO E, et al. Muscular dysfunction in COPD: systemic effect or deconditioning? [J]. *Lung*, 2016, 194(2): 249-257.
- [8] BARREIRO E, GEA J. Molecular and biological pathways of skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chron Respir Dis*, 2016, 13(3): 297-311.
- [9] DE BRANDT J, SPRUIT M A, DERAWE W, et al. Changes in structural and metabolic muscle characteristics following exercise-based interventions in patients with COPD: a systematic review [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2016, 10(5): 521-545.
- [10] BUTTERFIELD D A, HALLIWELL B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2019, 20(3): 148-160.
- [11] AREA-GOMEZ E, DE GROOF A, BONILLA E, et al. A key role for MAM in mediating mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 335.
- [12] AFFOURTIT C. Mitochondrial involvement in skeletal muscle insulin resistance: a case of imbalanced bioenergetics [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1857(10): 1678-1693.
- [13] YANG S, LIAN G. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply [J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 467: 1-12.
- [14] PAGEL-LANGENICKEL I, BAO J, JOSEPH J J, et al. PGC-1 α integrates insulin signaling, mitochondrial regulation, and bioenergetic function in skeletal muscle [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(33): 22464-22472.
- [15] NASSIR F, IBDAH J A. Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(5): 8713-8742.
- [16] CAMPBELL C T, KOLESAR J E, KAUFMAN B A. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819(9/10): 921-929.
- [17] GOLDENTHAL M J. Mitochondrial involvement in myocyte death and heart failure [J]. *Heart Fail Rev*, 2016, 21(2): 137-155.
- [18] JAITOVICH A, BARREIRO E. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. what we know and can do for our patients [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 198 (2): 175-186.
- [19] 王亚南, 郑莉, 耿婉如, 等. 经鼻高流量氧疗与常规氧气疗法对急性左心衰竭患者心脏功能作用研究 [J]. *内蒙古民族大学学报(自然科学版)*, 2019, 34(6): 532-534.
WANG Y N, ZHENG L, GENG W R, et al. Study on the effects of high flow nasal *Cannula* oxygen therapy and conventional oxygen therapy on heart function in patients with acute left heart failure [J]. *J Inn Mong Univ Natl Nat Sci*, 2019, 34(6): 532-534.
- [20] LATIMER L E, CONSTANTIN D, GREENING N J, et al. Impact of transcutaneous neuromuscular electrical stimulation or resistance exercise on skeletal muscle mRNA expression in COPD [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2019, 14: 1355-1364.
- [21] LI S Y, LI J S, WANG M H, et al. Effects of comprehensive therapy based on traditional Chinese medicine patterns in stable chronic obstructive pulmonary disease: a four-center, open-label, randomized, controlled study [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012, 12: 197.
- [22] YU X Q, WANG M H, LI J S, et al. Effect of comprehensive therapy based on Chinese medicine patterns on self-efficacy and effectiveness satisfaction in chronic obstructive pulmonary disease patients [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(10): 736-742.
- [23] 张蓝熙, 田燕歌, 朱丽华, 等. 补肺益肾方通过调控 Nrf2 通路抗氧化应激治疗慢性阻塞性肺疾病机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(5): 2374-2379.
ZHANG L X, TIAN Y G, ZHU L H, et al. Mechanism of Bufeiyishen Formula antioxidant stress in rats with chronic obstructive pulmonary disease via Nrf2 signaling pathway [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2020, 35(5): 2374-2379.
- [24] 田燕歌, 李亚, 李建生, 等. 调补肺肾三法对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织氧化应激的影响和远后效应 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(2): 621-624.
TIAN Y G, LI Y, LI J S, et al. Influence and long-term effect of tiaobu Feishen therapies on oxidative stress in lungs of rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2014, 29(2): 621-624.
- [25] LI Y, LI S Y, LI J S, et al. A rat model for stable chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke

- inhalation and repetitive bacterial infection [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(10): 1752-1760.
- [26] GOUZI F, ABDELLAOUI A, MOLINARI N, et al. Fiber atrophy, oxidative stress, and oxidative fiber reduction are the attributes of different phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease patients [J]. J Appl Physiol, 2013, 115(12): 1796-1805.
- [27] WHITAKER R M, CORUM D, BEESON C C, et al. Mitochondrial biogenesis as a pharmacological target: a new approach to acute and chronic diseases [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2016, 56: 229-249.
- [28] VILLENA J A. New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond [J]. FEBS J, 2015, 282(4): 647-672.
- [29] YUN C W, HAN Y S, LEE S H. PGC-1 α controls mitochondrial biogenesis in drug-resistant colorectal cancer cells by regulating endoplasmic reticulum stress [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20: 1707-1720.
- [30] COLLU-MARCHESE M, SHUEN M, PAULY M, et al. The regulation of mitochondrial transcription factor A (Tfam) expression during skeletal muscle cell differentiation [J]. Biosci Rep, 2015, 35(3): e00221.
- [31] HALLING J F, JESSEN H, NØHR-MELDGAARD J, et al. PGC-1 α regulates mitochondrial properties beyond biogenesis with aging and exercise training [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2019, 317(3): E513-E525.
- [32] LU J J, WANG Q, XIE L H, et al. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis regulates quadriceps muscle atrophy and fiber-type alteration in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Tob Induc Dis, 2017, 15: 43.
- [33] 李亚, 李素云, 毛静, 等. 补肺健脾方调控 NF- κ B 信号通路对 COPD 大鼠骨骼肌瘦素的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8): 3663-3666.
LI Y, LI S Y, MAO J, et al. Effects of Bufeijianpi Formula on skeletal muscular leptin via NF- κ B signaling in rats with COPD [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(8): 3663-3666.
- [34] 林文波. 补脾肺汤方在慢性阻塞性肺疾病稳定期的应用效果观察 [J]. 中国中医药科技, 2020, 27(2): 250-252.
LIN W B. Observation on the application effect of Bupifei Decoction in the stable stage of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol, 2020, 27(2): 250-252.
- [35] DONG Y, LI Y, SUN Y, et al. Bufeijianpi Granules improve skeletal muscle and mitochondrial dysfunction in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. BMC Complement Altern Med, 2015, 15: 51.
- [36] LI Y, MAO J, TIAN Y, et al. Bufeijianpi granules down-regulated pNF- κ B, p53, JHIF-1 α and Bax in muscle tissues: muscular protection in chronic obstructive pulmonary disease rats [C]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine; 2015.

[收稿日期]2023-05-05

倪建宇,白宁宁,刘贤莉,等. 不同因素诱导高尿酸血症小鼠模型的比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 68-74.
Ni JY, Bai NN, Liu XL, et al. Comparative study of hyperuricemia induced by different factors in mouse models [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 68-74.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.009

不同因素诱导高尿酸血症小鼠模型的比较研究

倪建宇¹, 白宁宁¹, 刘贤莉³, 龚丽红⁴, 寿旗扬^{1,2*}

(1. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310000; 2. 浙江中医药大学第二临床医学院, 杭州 310000;
3. 浙江中医药大学基础医学院, 杭州 310000; 4. 浙江中医药大学第三临床医学院, 杭州 310000)

【摘要】 目的 探讨三联造模法(氧嗪酸钾、次黄嘌呤以及 30% 酵母膏饲料联用)能否在 ICR 背景小鼠上建立稳定可靠的高尿酸血症模型, 并采用阳性药非布司他对该造模方法进行评价。**方法** 采用氧嗪酸钾、次黄嘌呤和 30% 酵母膏饲料, 分别单用、两药或三药联用建立 ICR 小鼠高尿酸血症模型, 检测血清尿酸、肌酐含量、黄嘌呤氧化酶(XOD)、尿酸氧化酶(UOX)活性, 尿酸转运蛋白(URAT)1、葡萄糖转运蛋白(Glut)9、阴离子转运蛋白(OAT)1、ATP 结合盒亚家族 G 成员(ABCG)2 mRNA 水平等指标评价高尿酸血症模型成功与否。**结果** 氧嗪酸钾单用对 ICR 小鼠血清尿酸水平没有明显改变, 与 30% 酵母膏饲料和次黄嘌呤分别联用组血尿酸有升高趋势但无显著差异, 而三联给药组在 7 d 时显著提高($P < 0.01$); 同时, 三联给药组 XOD 酶活性提升($P < 0.001$), UOX 酶活性降低($P < 0.001$); URAT1、Glut9 表达水平升高($P < 0.05$, $P < 0.001$), OAT1、ABCG2 表达水平降低($P < 0.001$); 14 d 的动态监测发现三联给药诱导的 ICR 小鼠血尿酸水平在 7 d 时达到峰值。此外, 三联给药诱导的 ICR 小鼠高尿酸血症模型对阳性药物非布司他反应敏感, 血尿酸水平显著下降($P < 0.001$)。**结论** 通过三联给药的方法可以在 7 d 时稳定诱导 ICR 小鼠的高尿酸血症模型。

【关键词】 高尿酸血症; ICR 小鼠; 动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0068-07

Comparative study of hyperuricemia induced by different factors in mouse models

NI Jianyu¹, BAI Ningning¹, LIU Xianli³, GONG Lihong⁴, SHOU Qiyang^{1,2*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310000, China.
2. Second Clinical Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310000. 3. School of Basic Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310000. 4. Third Clinical Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310000)

【Abstract】 Objective To investigate whether a stable and reliable hyperuricemia model can be established in mice with an ICR background via a triple-modeling method (combined potassium oxazine, hypoxanthine, and 30% yeast paste), and to evaluate the effect of the positive drug febuxostat on the model. **Methods** A hyperuricemia model of ICR mice was established using a single drug or double- or triple-drug combinations. Serum uric acid and creatinine concentrations, xanthine oxidase (XOD) and urate oxidase (UOX) activity, and uric acid transporter (URAT)1, glucose transporter (Glut)9, anion transporter (OAT)1, and ATP-binding box subfamily G member (ABCG)2 mRNA levels were detected to evaluate whether the hyperuricemia model was formed successfully. **Results** The serum uric acid levels of ICR mice were not significantly changed by potassium oxazine alone, as they showed an increase but were not significantly different to those of the 30% yeast paste diet or hypoxanthine combined groups. Serum uric acid levels in the triple

【基金项目】 国家自然科学基金(82274175); 浙江省中医药管理局重点项目(GZY-ZJ-KJ-23069)。

【作者简介】 倪建宇(1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理与肿瘤免疫。E-mail: 942770814@qq.com

【通信作者】 寿旗扬(1979—), 男, 博士, 博士生导师, 研究方向: 中药药理与肿瘤免疫。E-mail: sqy133@126.com

administration group were significantly increased at 7 days ($P<0.01$), while XOD enzyme activity had increased ($P<0.01$) and UOX enzyme activity decreased ($P<0.001$) at the same timepoint. There were increased expression levels of URAT1 and Glut9 ($P<0.05$, $P<0.001$), and decreased expression levels of OAT1 and ABCG2 ($P<0.001$). During dynamic monitoring, the blood uric acid levels of triple administration-induced ICR mice peaked at 7 days. In addition, triple administration-induced hyperuricemia in ICR mice was sensitive to the positive drug febuxostat, which caused a significant decrease in blood uric acid levels ($P<0.001$). **Conclusions** A hyperuricemia model in ICR mice can be stably induced by triple administration for 7 days.

【Keywords】 hyperuricemia; ICR mice; animal model

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

高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 是嘌呤代谢紊乱, 肝尿酸生物合成增加或肾及肠道尿酸盐排泄减少所引起的尿酸代谢异常综合征^[1]。高尿酸血症与痛风、糖尿病、高血压、动脉粥样硬化和肾疾病等代谢紊乱疾病相关^[2], 严重威胁了中年人群的身体健康。而在人类高尿酸血症发生机制以及新药物的研究开发中, 稳定、高效、安全的动物模型占有举足轻重的地位^[3]。

目前用于研究高尿酸血症的小鼠模型的方式主要分为基因敲除模型和环境诱导模型两类^[4]。基因敲除的高尿酸小鼠模型常伴有出生率低^[5]、幼鼠在 4~5 周龄时死亡率高^[6]等问题, 致使实验成本较高, 实验稳定性较差。而环境诱导模型主要通过增加尿酸合成的前体物质, 从而促进尿酸的合成或抑制肝、肾对尿酸的排泄导致尿酸堆积来引发高尿酸血症, 更为贴合人类的发病原因^[7]。然而, 小鼠模型的建立具有一定的不稳定性, 不同的造模药物、造模时间、给药方式以及小鼠品系均会对最终结果有较大的影响^[8-9]。目前通常选择对 KM 小鼠使用灌胃给予氧嗪酸钾、次黄嘌呤、酵母膏^[10-11]的方式来诱导相对稳定的高尿酸血症模型。而在药效学评价中, 多种不同的可靠动物模型, 可以增加研究的真实性、可信性。除使用 KM 小鼠外, 研究人员也尝试采用皮下或腹腔注射氧嗪酸钾、次黄嘌呤、乙胺丁醇和腺嘌呤等药物^[12-13]的方法在 ICR 品系的小鼠上诱导高尿酸血症模型。由于氧嗪酸钾、次黄嘌呤等常用造模药物不易溶于水, 多使用羧甲基纤维素钠作为溶媒后腹腔注射及皮下注射, 长期频繁操作刺激性较大, 模型动物可能会出现腹腔积水、腹膜硬化等症状^[14], 动物死亡率较高。通过灌胃及进食的途径建立模型是较好的造模方法, 不易产生不良反应, 但按照常规方法处理, 在 ICR 品系小鼠上建立高尿酸血症模型存在一定的难度。因此, 本实验探讨三药联用口服造模方法在 ICR 品系

小鼠上建立高尿酸血症模型的可能性, 将为高尿酸血症的研究提供多种动物模型的选择。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠 104 只, 体重 30~35 g; SPF 级雄性 KM 小鼠 14 只, 体重 35~40 g, 均购自杭州启真实验动物责任有限公司 [SCXK (浙) 2022-0005]。所有动物均饲养于浙江中医药大学动物实验中心 [SYXK (浙) 2021-0012], 以标准饮食喂养, 并在稳定条件下 ($(23\pm2)^{\circ}\text{C}$ 、40%~70% 相对湿度) 保持 12 h/12 h 的光/暗循环。所有动物操作及程序均按照《浙江中医药大学实验动物护理和使用指南》进行, 并经浙江中医药学院动物伦理委员会批准 (IACUC-20220328-22), 遵守 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

氧嗪酸钾 (上海麦克林, P831461-25 G); 次黄嘌呤 (上海麦克林, H811076-100 G); 30% 酵母饲料 (江苏协同生物, XT19004); 羧甲基纤维素钠 (上海源叶, S14017-500 g); 尿酸转运蛋白 (URAT) 1、葡萄糖转运蛋白 (Glut) 9、阴离子转运蛋白 (OAT) 1、ATP 结合盒亚家族 G 成员 (ABCG) 2 引物 (上海生物工程股份有限公司合成)。电子分析天平 (Sartorius, 德国); 离心机 (Thermo Fisher Scientific, 美国); 多功能酶标仪 (Biotek, 德国); 自动生化分析仪 (日立 3100, 日本); UOX 酶联免疫吸附试剂盒 (MM-46494 M1); XOD 酶联免疫吸附试剂盒 (MM-44143 M1); 组织破碎仪 (Precellys evolution, 德国); 梯度 PCR 仪 (Veriti 96, 美国); 荧光定量 PCR 仪 (Roche, 瑞士); 移液器 (Eppendorf, 德国)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与造模

将 30 只雄性 ICR 小鼠随机分为空白对照组、氧嗪酸钾组、氧嗪酸钾+酵母饲料组、二联给药组 (氧

噻酸钾+次黄嘌呤)和三联给药组(氧噻酸钾+次黄嘌呤+酵母饲料)($n=6$);14 只雄性 ICR 小鼠及 14 只雄性 KM 小鼠各自随机分为空白对照组、三联给药组($n=7$);28 只雄性 ICR 小鼠随机分为空白对照组、三联给药组、阳性药物组 1(5 mg/kg 非布司他)和阳性药物组 2(2.5 mg/kg 非布司他)($n=7$);60 只雄性 ICR 小鼠随机分为两组,然后将两组再各自分为空白对照 0 d、3 d、7 d、10 d、14 d 和三联给药 0 d、3 d、7 d、10 d、14 d 共 10 组($n=6$)。

氧噻酸钾组每天给予氧噻酸钾 250 mg/kg 灌胃;氧噻酸钾+酵母饲料组每天给予氧噻酸钾 250 mg/kg 灌胃同时使用 30% 酵母饲料喂养;二联给药组每天给予氧噻酸钾 250 mg/kg+次黄嘌呤 300 mg/kg 灌胃,三联给药组在二联给药组的基础上额外使用 30% 酵母饲料喂养。阳性药物组 1 和 2 分别在三联给药组的基础上每天增加非布司他 5 mg/kg、2.5 mg/kg 灌胃。各组造模药物均使用 0.5% 羧甲基纤维素钠配制为混悬液,空白对照组给予等量的 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液灌胃。空白对照与三联给药 0 d、3 d、7 d、10 d、14 d 组小鼠分别于造模 0 d、3 d、7 d、10 d、14 d 后动物标本取材,其余小鼠 7 d 后动物标本取材。

1.3.2 组织取材与血液留取

各组小鼠于造模 2 h 后取颌下静脉血或 CO₂ 处死后取心脏血,取肝、双肾置于-80 ℃ 冰箱中备用。

1.3.3 评价指标

(1)体重变化:各组小鼠均于实验开始的第 1、3、5、7 天测量小鼠体重,绘制时间-体重曲线。

(2)血清生化指标检测:取小鼠血液使用离心机 3500 r/min、8 min 离心取上清,采用自动生化分

析仪检测血清尿酸(UA)、肌酐(Crea)水平。

(3)肝 XOD 酶、肾 UOX 酶表达检测:取小鼠肝、肾组织,PBS 清洗表面血液,滤纸吸干表面水分后称重,加入适量 PBS 缓冲液、磁珠后使用组织破碎仪破碎。使用高速离心机 12 000 r/min、4 ℃ 下离心 15 min 后取上清液。使用 ELISA 试剂盒检测 XOD、UOX 酶浓度,具体操作参考试剂盒生产商家说明书。

(4)肾 OAT1、URAT1、Glut9、ABCG2 mRNA 表达水平检测:取小鼠肾组织,PBS 清洗表面血液,滤纸吸干表面水分后称重,加入 TRIzol、磁珠后使用组织破碎仪破碎提取 RNA。后逆转录为 cDNA 检测尿酸代谢相关指标在 mRNA 层面表达水平。

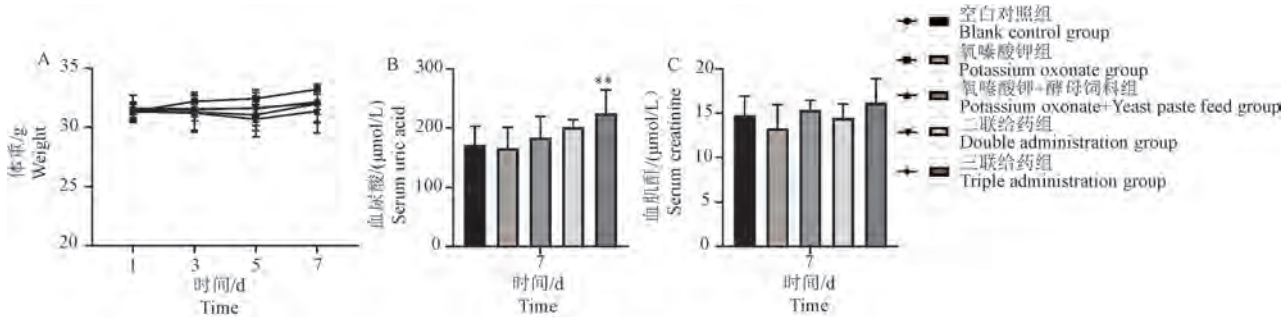
1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件对本实验所有数据结果进行统计分析,结果均用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组样本之间采用 *t* 检验,多组数据之间比较采用 One Way ANOVA 分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同因素诱导对 ICR 小鼠体重、尿酸、肾功能的影响

首先,我们观察了单独及二联给药对 ICR 小鼠体重、尿酸、肾功能的影响。体重变化曲线如图 1A 所示,与空白对照组相比,氧噻酸钾组小鼠体重呈上升趋势,二联及三联给药组体重呈下降趋势,但均无统计学差异($P>0.05$)。血尿酸及血肌酐的变化如图 1B、1C 所示,与空白对照组相比,在造模 7 d 时氧噻酸钾与次黄嘌呤及氧噻酸钾与 30% 酵母饲



注:与空白对照组相比, ** $P<0.01$ 。
图 1 单独、二联及三联给药造模对 ICR 小鼠体重、血尿酸、血肌酐的影响

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

Figure 1 Effects of single, double and triple administration of modeling drugs on body weight, serum uric acid and serum creatinine in ICR mice

料联用组血尿酸均有升高趋势,但结果均无统计学意义($P>0.05$),三联给药组血尿酸水平显著升高($P<0.01$),提示三联法可在 ICR 品系小鼠上诱导高尿酸血症模型;各造模组血肌酐水平均没有显著差异($P>0.05$),单独、二联及三联造模法不会对小鼠肾造成损伤。

2.2 三联造模法对 ICR 小鼠动态血尿酸水平的影响

结合上述结果,我们观察了三联造模法对 ICR 小鼠动态血尿酸水平的影响。结果如图 2 所示,相较于空白对照组,三联给药组小鼠在造模第 3 天时血尿酸水平升高($P<0.05$),造模第 7 天时血尿酸水平达到峰值($P<0.001$),第 10 天时血尿酸水平有所回落但仍显著高于空白对照组($P<0.01$),在第 14 天时血尿酸浓度回落至正常水平。

2.3 三联造模法对 ICR 和 KM 两种品系小鼠血尿酸的影响

我们对比三联造模法对 ICR 和 KM 两种品系小鼠造模后血尿酸的影响。结果如图 3 所示,在 7 d 时,与空白对照组相比,ICR 及 KM 小鼠三联给药组血尿酸水平均显著提升($P<0.01$)。

2.4 三联造模法对 ICR 和 KM 小鼠 XOD 酶、UOX 酶活性的影响

三联造模法对两种品系高尿酸血症模型小鼠 XOD 酶和 UOX 酶活性的影响如图 4 所示。ICR 与 KM 三联给药组小鼠 XOD 酶活性均显著高于空白对照组($P<0.01$),UOX 酶活性显著低于空白对照组($P<0.001$)。

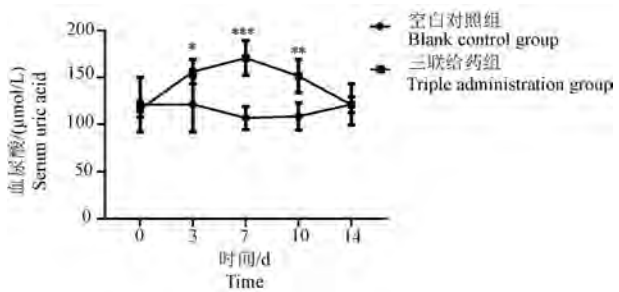
2.5 三联造模法对 ICR 和 KM 小鼠肾尿酸代谢、转运与排泄相关 mRNA 表达水平的影响

三联造模法对两种品系高尿酸血症模型小鼠

肾中尿酸代谢、转运与排泄相关 mRNA 表达水平的影响如图 5 所示。在造模 7 d 后,与空白对照组相比,两种品系的三联给药组小鼠 OAT1、ABCG2 的表达均显著下调($P<0.001$),Glut9、URAT1 的表达均显著上升($P<0.001$, $P<0.05$)。

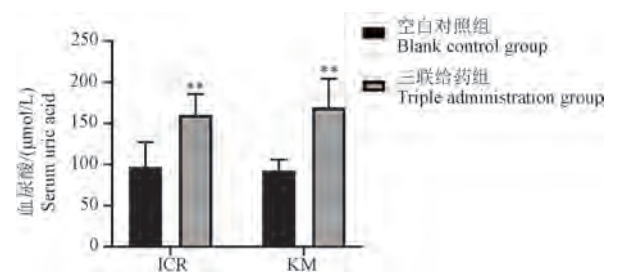
2.6 非布司他对 ICR 小鼠血尿酸水平的影响

结果如图 6 所示,我们观察了阳性药物(非布



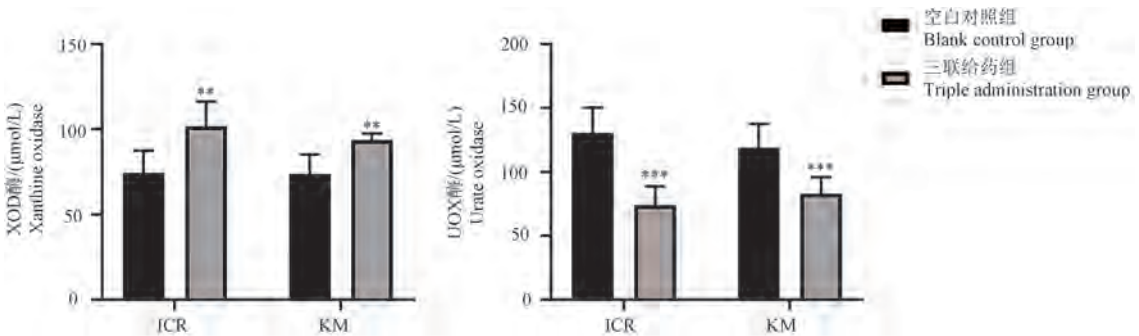
注:与空白对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。
图 2 三联造模法不同时间点对 ICR 小鼠血尿酸的影响
Note. Compared with blank control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 2 Effects of different time of triple modeling method on serum uric acid of ICR mice



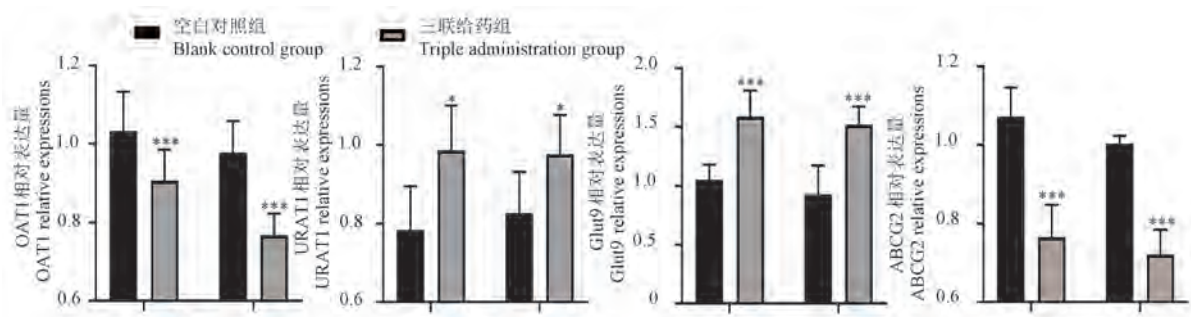
注:与空白对照组相比, ** $P<0.01$ 。
图 3 三联造模法对 ICR 及 KM 小鼠血尿酸的影响
Note. Compared with blank control group, ** $P<0.01$.

Figure 3 Effect of triple modeling method on serum uric acid of ICR and KM mice



注:与空白对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。
图 4 三联造模法对 ICR 及 KM 小鼠 XOD、UOX 活性的影响
Note. Compared with blank control group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 4 Effects of triple modeling method on the activities of XOD and UOX in ICR and KM mice

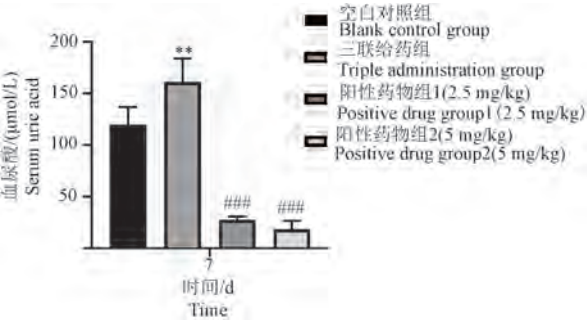


注:与空白对照组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

图 5 三联造模法对 ICR 和 KM 小鼠肾尿酸代谢、转运与排泄相关 mRNA 表达水平的影响

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

Figure 5 Effects of triple modeling method on mRNA expression levels related to uric acid metabolism, transport and excretion in kidney of ICR and KM mice



注:与空白对照组相比, ** $P<0.01$;与三联给药组相比, ### $P<0.001$ 。

图 6 三联造模法及阳性药对 ICR 小鼠血尿酸水平的影响

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

Figure 6 Effect of triple modeling and positive drug on serum uric acid level in ICR mice

司他)对三联造模法诱导的 ICR 品系小鼠高尿酸血症模型尿酸的影响。与空白对照组相比,三联给药组在 7 d 时血尿酸显著升高 ($P<0.001$);阳性药物组 1 和 2 尿酸水平均显著低于三联给药组 ($P<0.001$)。

3 讨论

尿酸是大多数动物体内嘌呤代谢的终产物,分为外源性和内源性。含有大量嘌呤类物质的食物是外源性尿酸的来源^[15],内源性尿酸则主要来自于机体内氨基酸及其他小分子的合成和核酸的代谢^[16]。尿酸增加的主要原因包括大量嘌呤类物质的摄入以及肾尿酸代谢异常。因此研究人员常通过以下方法建立高尿酸血症模型:(1)抑制尿酸的分解,尿酸氧化酶(UOX)是尿酸代谢过程中的关键

酶。编码尿酸酶的基因在人体内是失活的,但在小鼠中没有,或许这也是人类易患高尿酸血症的原因之一^[17-18]。因此使用尿酸氧化酶抑制剂氧嗪酸钾抑制尿酸氧化酶的活性可以使小鼠血尿酸水平升高;(2)增加尿酸前体物质,如酵母膏、次黄嘌呤等^[19-20]。次黄嘌呤会在黄嘌呤氧化酶的作用下生成尿酸前体物质黄嘌呤,进而代谢为尿酸。酵母即核糖核酸,在摄入大剂量酵母后会干扰机体正常的嘌呤代谢导致黄嘌呤氧化酶活性增强,从而加速尿酸的生成;(3)抑制尿酸的排泄,常用的抗结核药物吡嗪酰胺和乙胺丁醇可以通过促进肾小管对尿酸的重吸收而升高尿酸^[6]。但在 ICR 品系的小鼠上并没有通过口服途径建立稳定高尿酸血症模型的先例。

血清尿酸水平、UOX 活性、XOD 活性的改变是小鼠高尿酸血症的重要评价指标^[16], OAT1、URAT1、Glut9、ABCG2 基因的表达也与尿酸的代谢、转运和排泄密切相关^[21]。其中 URAT1 和 Glut9 在肾中尿酸的重吸收过程中起关键作用,URAT1 和 Glut9 的表达增加,可以增强肾对尿酸的重吸收,从而导致尿酸水平的升高^[22];OAT1 和 ABCG2 在肾小管细胞中参与尿酸的排出,通过促进尿酸的转运,将其从细胞内排泄至尿液中,间接参与尿酸的排泄调节,而它们表达的下调会减少尿酸的代谢,进而导致血尿酸水平升高^[23-24]。本实验主要使用氧嗪酸钾、次黄嘌呤、酵母饲料三种造模剂,分别单用氧嗪酸钾、氧嗪酸钾与 30%酵母膏饲料和次黄嘌呤分别联用、氧嗪酸钾+次黄嘌呤+酵母饲料三联使用,观察不同造模方式对 ICR 小鼠尿酸水平的影响。实验结果表明氧嗪酸钾单用及二联给药在 7 d 时不

能在 ICR 品系小鼠上建立高尿酸血症模型,也不会造成肾功能损伤。三联给药组的血尿酸水平在 7 d 时显著高于空白对照组小鼠($P<0.01$),同时体重与肌酐水平和空白对照组相比并没有显著差异,提示没有肾功能损伤。氧嗪酸钾+酵母饲料的造模方法由于没有直接补充次黄嘌呤及黄嘌呤,机体缺乏合成尿酸的前体物质,无法有效维持较高的尿酸水平;氧嗪酸钾+次黄嘌呤的造模方法虽然使机体获得了充足的尿酸合成前体物质,但是没有有效提升黄嘌呤氧化酶水平,因此尿酸水平出现升高趋势但并无显著差异。而三联造模法在补充尿酸合成前体物质的同时增强了黄嘌呤氧化酶活性,所以机体可以维持较高的尿酸水平。

为了更加科学及全面评价三联造模法所建立的高尿酸血症模型。我们观察了三联造模法对 ICR 小鼠动态血尿酸水平的影响,并将 ICR 小鼠与较为常用的 KM 小鼠做对比,观察三联造模法在 7 d 时对 ICR 小鼠与 KM 高尿酸血症模型的影响。在实验中我们发现三联造模法在 7 d 时能够使 ICR 小鼠的血尿酸水平达到最高值,因此选择造模 1 周是最为合理的时间。与 KM 小鼠对比的实验结果表明,通过三联造模法,两种品系小鼠的血尿酸水平和 XOD 活性均增加,而 UOX 活性降低。此外,在 mRNA 水平上观察到 OAT1 和 ABCG2 的表达下调,而 URAT1 和 Glut9 的表达上调。两种品系小鼠在所有指标上的趋势相同,并且与空白对照组相比存在显著差异。这些差异性仅与是否进行造模有关,而与小鼠品系无关。

最后,我们观察了阳性药物(非布司他)对三联造模法诱导的 ICR 品系小鼠高尿酸血症模型尿酸的影响。参照相关文献^[25]提供的方法,我们分别选择剂量为 5 mg/kg 及 2.5 mg/kg 的非布司他作为阳性对照组,实验结果表明通过三联给药法诱导的 ICR 小鼠高尿酸血症模型对非布司他反应敏感,表明该模型可用于高尿酸血症的药效评估。

综上所述,我们认为三联造模法可以在 7 d 时稳定在 ICR 品系小鼠上建立高尿酸血症模型,为后续高尿酸血症的机制研究与药效学评价的动物模型提供了新的选择。

参考文献:

[1] 王琳,沈嘉艳,谢招虎,等. 高尿酸血症动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 112-119.
WANG L, SHEN J Y, XIE Z H, et al. Progress of

hyperuricemia animal model research [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 112-119.
[2] 陈林军,杨焱,吴迪,等. 高尿酸血症及其并发症大鼠模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 510-516.
CHEN L J, YANG Y, WU D, et al. Establishment of a rat model of hyperuricemia and its complications [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 510-516.
[3] 朱祥祥,方颖莹,庞敏霞,等. 不同造模因素复制小鼠高尿酸血症模型的比较研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2018, 42(2): 142-148.
ZHU X X, FANG Y Y, PANG M X, et al. Comparative study of hyperuricemia models in mice with different modeling factors [J]. J Zhejiang Chin Med Univ, 2018, 42(2): 142-148.
[4] LU J, DALBETH N, YIN H, et al. Mouse models for human hyperuricaemia: a critical review [J]. Nat Rev Rheumatol, 2019, 15(7): 413-426.
[5] PREITNER F, BONNY O, LAVERRI RE A, et al. Glut9 is a major regulator of urate homeostasis and its genetic inactivation induces hyperuricosuria and urate nephropathy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(36): 15501-15506.
[6] WU X, WAKAMIYA M, VAISHNAV S, et al. Hyperuricemia and urate nephropathy in urate oxidase-deficient mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(2): 742-746.
[7] 夏晓琴. 高尿酸血症的发病机制及应用降尿酸药物治疗的研究现状 [J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2022, 6(16): 125-128.
XIA X Q. Pathogenesis of hyperuricemia and research status of application of drugs to reduce uric acid [J]. Mod Med Health Res Electron J, 2022, 6(16): 125-128.
[8] 刘晓燕,朱学江,郭军,等. 不同品系小鼠对代谢性高尿酸血症造模的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(24): 4824-4827.
LIU X Y, ZHU X J, GUO J, et al. The effect of different strains on mouse hyperuricemia model [J]. Prog Mod Biomed, 2011, 11(24): 4824-4827.
[9] 裴忆雪,刘永杰,张笛,等. 建立高尿酸血症性肾损害小鼠模型的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(9): 46-54.
PEI Y X, LIU Y J, ZHANG D, et al. Establishment of a hyperuricemia mouse model with renal damage [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(9): 46-54.
[10] 胡居吾. 蔓三七提取物对酵母膏和氧嗪酸钾致小鼠急性高尿酸血症治疗效果的研究 [J]. 生物化工, 2021, 7(6): 18-21.
HU J W. Study of Gynura procumbens extract on the treatment of acute hyperuricemia induced by yeast extract and potassium oxonate in mice [J]. Biol Chem Eng, 2021, 7(6): 18-21.
[11] 褚亚慧,孔维佳. 天麻素对次黄嘌呤诱导小鼠急性高尿酸血症的影响和机制研究 [J]. 中国当代医药, 2021, 28(26): 23-26.
CHU Y H, KONG W J. Study of the effects and mechanisms of gastrodin on acute hyperuricemia of mice induced by

- hypoxanthine [J]. *China Mod Med*, 2021, 28(26): 23-26.
- [12] 韩铨, 王昱植, 付国峰, 等. 氧嗪酸钾联合不同造模剂对小鼠高尿酸血症的尿酸值的影响 [J]. *中国当代医药*, 2021, 28(18): 21-25.
- HAN Q, WANG Y Z, FU G F, et al. Effect of potassium oxonate combined with different modelling agents on the uric acid value of hyperuricemia in mice [J]. *China Mod Med*, 2021, 28(18): 21-25.
- [13] ZHU L, DONG Y, NA S, et al. Saponins extracted from *Dioscorea colletii* rhizomes regulate the expression of urate transporters in chronic hyperuricemia rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 88-94.
- [14] 李明慧, 吴铠初, 陈哲, 等. 高尿酸血症肾病小鼠模型的优化及效果评价 [J]. *药学报*, 2022, 57(6): 1673-1678.
- LI M H, WU K R, CHEN Z, et al. Establishment and optimization of a hyperuricemic nephropathy mouse model [J]. *Acta Pharm Sin*, 2022, 57(6): 1673-1678.
- [15] 徐明珠. 植物性膳食指数与高尿酸血症关系的横断面研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2022.
- XU M Z. Association between Plant-based Dietary Index and Hyperuricemia; A Cross-sectional Study [D]. Shenyang: China Medical University, 2022.
- [16] 岳义松, 张雯, 谢逸菲, 等. 高尿酸血症实验动物模型研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(2): 201-206.
- YUE Y S, ZHANG W, XIE Y F, et al. Research progress on experimental animal models of hyperuricemia [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2023, 39(2): 201-206.
- [17] 杨阳, 严采馨, 林翠婷, 等. 黄芩素对慢性高尿酸小鼠模型心肾功能的影响研究 [J]. *生命科学研究*, 2022, 26(2): 111-116, 138.
- YANG Y, YAN C X, LIN C T, et al. The influence of baicalin on heart and kidney injury in a mouse model of chronic hyperuricemia [J]. *Life Sci Res*, 2022, 26(2): 111-116, 138.
- [18] 白莉, 刘广运, 张晓萍, 等. 牡丹花总黄酮对高尿酸血症大鼠降尿酸作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(18): 38-45.
- BAI L, LIU G Y, ZHANG X P, et al. Effect of total flavonoids in flower of *Paeonia suffruticosa* on uric acid in rats with hyperuricemia [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2022, 28(18): 38-45.
- [19] 潘志, 段富津, 王颖航, 等. 黄柏与苍术提取物对高尿酸血症小鼠血尿酸的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(1): 112-113.
- PAN Z, DUAN F J, WANG Y H, et al. Effect of extract of cortex phellodendri and *Atractylodes lancea* on hyperuricemia in mice [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2008, 19(1): 112-113.
- [20] 陈光亮, 段玉光, 李莉, 等. 加味四妙汤对高尿酸血症和痛风性关节炎防治作用的实验研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2008, 14(3): 48-52.
- CHEN G L, DUAN Y G, LI L, et al. Experimental study of the protective effects and mechanisms of additional Si - Miao Decoction on acute gouty arthritis and hyperuricemia [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2008, 14(3): 48-52.
- [21] 辛家东, 高建东. 基于尿酸转运蛋白调控机制探讨中药改善高尿酸血症的研究进展 [J]. *上海中医药杂志*, 2023, 57(2): 14-20.
- XIN J D, GAO J D. Research progress of traditional Chinese medicine in improving hyperuricemia by regulating uric acid transporter [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2023, 57(2): 14-20.
- [22] SO A, THORENS B. Uric acid transport and disease [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(6): 1791-1799.
- [23] OHASHI Y, KURIYAMA S, NAKANO T, et al. Urate transporter ABCG2 function and asymptomatic hyperuricemia; a retrospective cohort study of CKD progression [J]. *Am J Kidney Dis*, 2023, 81(2): 134-144.
- [24] VVRA J, MANČKOV A, PAVELCOV K, et al. Functional characterization of rare variants in OAT1/SLC22A6 and OAT3/SLC22A8 urate transporters identified in a gout and hyperuricemia cohort [J]. *Cells*, 2022, 11(7): 1063.
- [25] 李芳, 姚嘉怡, 姚建华, 等. 非布司他对高尿酸血症大鼠 p38 MAPK/NF- κ B 通路及脑血管粥样硬化的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2022, 8(18): 4527-4531.
- LI F, YAO J Y, YAO J H, et al. Effects of febuxostat on p38 MAPK/NF- κ B pathway and cerebrovascular atherosclerosis in hyperuricemic rats [J]. *Chin J Gerontol*, 2022, 8(18): 4527-4531.

[收稿日期] 2023-05-30

马嫻,高萍,刘真一,等.补阳还五汤减轻氧化应激保护脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障的作用研究[J].中国比较医学杂志,2024,34(3):75-84,101.

Ma X, Gao P, Liu ZY, et al. Effect of Buyang Huanwu Decoction in reducing oxidative stress and protecting cerebral ischemia-reperfusion injury to rat blood-brain barrier [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 75-84, 101.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.010

补阳还五汤减轻氧化应激保护脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障的作用研究

马嫻^{1,2},高萍^{1,2},刘真一^{1,2},辛紫媛^{2,3},靳晓飞^{1,2},周晓红^{1,2},高维娟^{1,2*}

(1.河北中医学院,石家庄 050000;2.河北省心脑血管病中医药防治研究重点实验室,石家庄 050000;

3.承德医学院附属医院,河北承德 067000)

【摘要】 目的 探究补阳还五汤(Buyang Huanwu Decoction, BYHWD)降低氧化应激水平保护脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia/reperfusion injury, CIRI)大鼠血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的机制。**方法** 采用线栓法建立大鼠大脑中动脉栓塞再灌注(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)模型,应用 PeriCam PSI 激光散斑血流成像系统检测脑血流量判定模型建立是否成功。通过 Zea Longa 评分评价大鼠神经功能缺损情况;HE 染色观察大鼠脑组织病理学改变;干湿重法检测脑水肿程度;伊文思蓝(Evans blue, EB)染色检测 BBB 通透性;透射电镜观察 BBB 超微结构改变;试剂盒检测氧化应激相关指标活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)的含量及总超氧化物歧化酶(SOD)活性;免疫组织化学染色及 Western blot 检测基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达水平;免疫荧光双染及 Western blot 检测紧密连接蛋白(tight junction protein, TJP)中 Occludin、ZO-1、Claudin-5 蛋白的表达水平。**结果** BYHWD 能够降低 MCAO/R 大鼠神经功能缺损评分,减轻脑组织病理学损伤,减轻血脑屏障结构破坏,延长紧密连接结构致密区,减轻缺血侧大脑脑水肿情况,降低 BBB 通透性。BYHWD 可以降低 ROS 与 MDA 水平,提高 SOD 活性,降低 MMP-9 表达水平,提高 Occludin、Claudin-5、ZO-1 蛋白表达水平。**结论** BYHWD 可以升高 BBB 紧密连接蛋白的表达水平,降低血脑屏障通透性,保护血脑屏障超微结构,减轻脑水肿,其机制可能与 BYHWD 抗氧化应激,抑制 MMP-9 的激活相关。

【关键词】 补阳还五汤;脑缺血再灌注损伤;透射电镜;氧化应激;血脑屏障;基质金属蛋白酶-9

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0075-10

Effect of Buyang Huanwu Decoction in reducing oxidative stress and protecting cerebral ischemia-reperfusion injury to rat blood-brain barrier

MA Xian^{1,2}, GAO Ping^{1,2}, LIU Zhenyi^{1,2}, XIN Ziyuan^{2,3}, JIN Xiaofei^{1,2}, ZHOU Xiaohong^{1,2}, GAO Weijuan^{1,2*}

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050000, China. 2. Hebei Key Laboratory of Chinese Medicine Research on Cardio-cerebrovascular Disease, Shijiazhuang 050000. 3. Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde 067000)

【Abstract】 Objective To explore the mechanisms of Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) in reducing oxidative stress levels to protect the blood-brain barrier (BBB) in cerebral ischemia/reperfusion injury (CIRI) rats. **Methods** A

【基金项目】 中央引导地方科技发展资金项目(206Z7706G);河北省科技研发平台与新型研发机构建设专项(20567626H);河北中医学院科技能力提升重点项目(KTZ2019018)。

【作者简介】 马嫻(1995—),女,硕士研究生,研究方向:缺血性脑血管病的发生机制及中医药防治。E-mail:530199749@qq.com

【通信作者】 高维娟(1966—),博士,女,教授,博士生导师,研究方向:脑血管疾病的发生机制及中医药防治。E-mail:gwj6088@163.com

middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) model in rats was established via wire embolization method . PeriCam PSI laser speckle flow imaging was applied to detect whether the model was successfully established. Neurological deficits in the rats were evaluated by Zea Longa score, and histopathological changes in the rat brain were observed by HE staining. The degree of brain edema was detected by the dry and wet weight method. BBB permeability was detected by Evans blue staining, and ultrastructural changes to the BBB were observed by transmission electron microscopy. The levels of ROS, MDA and SOD activities, which are related to oxidative stress, were detected using kits. The expression levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) were detected by immunohistochemical staining and Western blot. The expression levels of Occludin, ZO-1, and Claudin-5 tight junction proteins were determined via immunofluorescence and Western blot.

Results BYHWD reduced neurological deficit scores, alleviated brain histopathological damage, alleviated BBB structural disruption, prolonged the appearance of dense regions in the tight junction structure, attenuated edema of the brain on the ischemic side, and reduced BBB permeability in MCAO/R rats. BYHWD decreased the levels of ROS and MDA, increased the activity of SOD, decreased the expression levels of MMP-9, and increased the expression levels of Occludin, Claudin-5 and ZO-1.

Conclusions BYHWD can increase BBB tight junction protein expression levels, reduce the permeability of the BBB, protect the ultrastructure of the BBB, and reduce brain edema, and its mechanisms may be related to its antioxidant activity and inhibition of MMP-9 activation.

[Keywords] Buyang Huanwu Decoction; cerebral ischemia-reperfusion injury; transmission electron microscopy; oxidative stress; blood-brain barrier; matrix metalloproteinase-9

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

近年来,我国脑血管疾病的病死率逐年升高^[1]。脑卒中属于急性脑血管疾病的范畴,其中缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)的发病率高达83%左右,严重危害国民健康^[2]。目前,IS的主要治疗方法是采用溶栓治疗恢复缺血区的血液供应。然而,血液恢复会进一步引起脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)^[3],造成CIRI的机制复杂、因素众多,往往是多种因素共同作用导致。CIRI的机制研究还不够透彻,给临床的用药和治疗带来诸多困难。

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)破坏导致脑水肿是造成脑卒中患者记忆力丧失、癫痫、昏迷甚至死亡的关键因素。研究发现, BBB 的破坏主要表现在其结构和通透性改变, BBB 通透性主要与脑血管内皮细胞间的紧密连接结构相关^[4]。CIRI过程中BBB受损,脑血管通透性增加,水分溢出增多,积存在细胞间质造成脑水肿。脑水肿又可造成神经元损伤或凋亡,加重细胞功能障碍,进一步加重CIRI,影响BBB,形成恶性循环^[5]。CIRI期间同时产生大量ROS,导致SOD抗氧化能力不足,引发氧化应激反应^[6],也是加重CIRI的关键因素。因此,减轻脑缺血再灌注导致的氧化应激损伤和血脑屏障破坏在CIRI的治疗中至关重要。

补阳还五汤(Buyang Huanwu Decoction, BYHWD)是由清朝名医王清任首创的传统中医经典方剂。现临床上BYHWD原方及其加减化裁方广

泛应用于气虚血瘀证的中风及中风后遗症的治疗^[7-8]。现代药理学研究表明, BYHWD 中药理活性成分复杂, 可进行多靶点调节, 能够通过抗氧化应激、调节钙超载、调控自噬、抑制炎症反应等途径减轻 CIRI^[9-11]。但是, BYHWD 抗氧化应激保护血脑屏障减轻 CIRI 的研究还比较少。本研究基于脑缺血再灌注后氧化应激导致血脑屏障破坏这一病理过程, 进一步探讨 BYHWD 减轻 CIRI 的作用机制, 为 BYHWD 的临床应用提供更加充分的理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

104 只实验用 SPF 级 8 周龄雄性 SD 大鼠, 体重(250±10)g, 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0011], 饲养于河北中医院动物房[SYXK(冀)2022-0005], 实验过程严格参照河北中医学院实验动物伦理审查标准执行(DWLL202302004), 遵守 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

补阳还五汤方剂组成: 黄芪 120 g、当归尾 6 g、赤芍 5 g、红花 3 g、地龙 3 g、桃仁 3 g、川芎 3 g, 以上药材均购自北京同仁堂石家庄桥东店; 丁苯酞软胶囊(国药准字 H20050299) 购自石药集团恩必普药业; 伊文思蓝(E2129) 购自德国 Sigma 公司; 甲酰胺(F103361) 购自阿拉丁试剂有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0012 S) 购自碧云天生物; 伊红染液

(G1001)、苏木素染液(G1004)、电镜固定液(G1102)、DAB 显色试剂盒(G1212)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;ROS 测定试剂盒(E004-1)、总 SOD 测定试剂盒(A001-3)、MDA 测定试剂盒(A003-1)均购自南京建成生物工程研究所;TIMP-1 抗体(AF7007)、Claudin-5 抗体(AF5216)均购自 Affinity 公司;ZO-1 抗体(21773-1-AP)、Occludin 抗体(66378-1)、MMP-9 抗体(10375-2-AP)均购自美国 Proteintech 公司。PeriCam PSI 激光散斑血流监测视频系统购自瑞典 Perimed 公司;Western blot 垂直电泳系统购自美国 Bio-Rad 公司;Odyssey Fc 双色红外激光成像系统购自美国 Li-COR 公司;组织包埋机、全自动轮转切片机均来自德国 Leica 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组及给药

将 SD 大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、模型组(MCAO/R 组)、补阳还五汤组(BYHWD 组)、阳性对照药丁苯酞组(NBP 组),每组 26 只。BYHWD 组和 NBP 组大鼠术后 2 h 灌胃给药,BYHWD 组药液制备及给药参照实验室前期研究^[10],剂量为 14.3 g/(kg·d),NBP 组药液制备及给药参照文献^[12],剂量为 80 mg/(kg·d),BYHWD 组和 NBP 组每天给药 1 次,连续给药 3 d。Sham 组和 MCAO/R 组给予蒸馏水。

1.3.2 大脑中动脉栓塞再灌注(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)模型的建立

将 SD 大鼠麻醉后仰卧固定于手术台上,颈部备皮,消毒切口,分离出颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉,在颈外动脉剪一小口插入线栓,线栓经颈内动脉到达脑内 Willis 环,实现大脑中动脉栓塞,2 h 后取出线栓,再灌注 72 h。

1.3.3 大鼠脑血流量的监测

将 SD 大鼠麻醉后,充分暴露前凶颅骨,应用 PeriCam PSI 激光散斑血流监测系统的监测探头在距离大鼠前凶 11 cm 处监测大鼠缺血前、缺血中、缺血再灌注后大脑中动脉供血区脑血流灌注量变化。

1.3.4 神经功能学评分

根据 Zea Longa 神经功能缺损评分标准^[13],对各实验组大鼠进行神经功能学评分并记录。分数为 0~4 分,分数越高,神经系统功能损伤越严重。1~3 分大鼠随机分配入组。

1.3.5 HE 染色观察脑组织病理学改变

SD 大鼠麻醉后,经心脏灌流取脑,4%多聚甲醛

固定 24 h 后,经脱水进行石蜡包埋,随后制备 5 μm 石蜡切片。石蜡切片脱蜡、脱水后,用苏木素染色液将细胞核染为蓝色,再将切片放入 1%盐酸酒精分化液中分化,随后放入返蓝液中返蓝,最后将切片置于伊红染液中使细胞质染成红色,切片经乙醇脱水、二甲苯透明后用中性树胶封片,镜下采集图像。

1.3.6 大鼠脑含水量的测定

采用干湿重法测定各实验组大鼠左侧及右侧大脑半球的脑含水量^[14]。大鼠经麻醉后,迅速断头取脑,将大脑沿矢状位切开,分别称取左侧和右侧大脑半球的重量,记为湿重;将两侧大脑放入 110℃烘干箱内 9 h 后记为干重,按照公式计算脑含水量:脑含水量/%=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.3.7 伊文思蓝(Evans blue, EB)染色测定血脑屏障通透性

各实验组大鼠于取材前 2 h 尾静脉注射 2%的 EB 染色液(4 mL/kg),体循环 2 h 后,心脏灌流取脑,置于脑切片模具中制备 2 mm 的连续冠状脑切片,拍照记录各实验组大鼠 EB 染色面积并通过酶标仪测定其吸光度,计算标准曲线,依据标准曲线求得各实验组脑组织内 EB 含量(μg/g)。

1.3.8 透射电镜观察血脑屏障超微结构改变

各实验组大鼠脑组织经麻醉取材后,先放入电镜固定液内固定,经 1%锇酸后固定、乙醇脱水后渗透包埋,制备 80 nm 的超微切片,用醋酸铀、柠檬酸铅染色,随后在透射电子显微镜下采集图像并分析。

1.3.9 免疫荧光双染法检测血脑屏障紧密连接相关蛋白的表达量

各实验组大鼠脑组织取材后制备石蜡切片,切片脱蜡脱水后置于抗原修复液(pH=6.0)中进行抗原修复,随后滴加 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶,免疫荧光封闭液进行室温封闭,15 min 后轻轻甩去封闭液滴加小鼠来源一抗 Occludin 抗体(1:50)及家兔来源的 ZO-1 抗体(1:50)、Claudin-5 抗体(1:50)于 4℃过夜,次日清洗一抗,滴加相应种属荧光二抗室温避光孵育 1 h,最后滴加含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂封片。在荧光显微镜下采集图像,Image J 软件分析平均荧光强度。

1.3.10 氧化应激相关指标的检测

大鼠麻醉取材后脑组织立即放入预冷的 PBS 内漂洗组织,加入适量酶消化液消化细胞,用 300 目尼龙网过滤去掉组织块,收集滤过的细胞,离心后,

去上清液留沉淀, PBS 清洗后加入荧光探针, 测定 ROS 的水平。

大鼠麻醉后取脑组织, 对半暗带脑组织进行称重, 按照重量/g: 体积/mL=1: 9 加入 9 倍体积生理盐水, 剪碎组织, 制备 10% 匀浆上清液, 按照试剂盒说明书操作, 并计算 SOD 活力、MDA 含量。

1.3.11 免疫组织化学染色检测 MMP-9 的表达量

脑组织石蜡切片经脱蜡脱水、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、室温封闭 20 min 后, 滴加适量一抗 MMP-9 抗体(1: 100)于 4℃ 过夜, 次日清洗一抗后滴加二抗(1: 200)室温孵育 1 h, PBS 清洗二抗后滴加 DAB 显色液, 置于镜下观察到细胞呈棕黄色时终止显色, 切片经脱水、透明后封片, 使用 Image J 软件分析平均吸光度值。

1.3.12 Western blot 法检测各组大鼠脑组织紧密连接蛋白(ZO-1、Occludin、Claudin-5)及 MMP-9 的表达

取各实验组大鼠缺血半暗带脑组织进行蛋白样品制备, 蛋白样品用 SDS-PAGE 凝胶进行电泳(80 V, 30 min; 120 V, 90 min), 湿转法转膜(200 mA, 2 h), 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 封闭后滴加以下一抗溶液: ZO-1(1: 2000)、Occludin(1: 10 000)、Claudin-5(1: 1000)、MMP-9(1: 2000)以及内参 β -actin(1: 2000) 4℃ 孵育过夜, TBST 摇洗一抗, 随后室温孵育二抗 2 h, 经 TBST 摇洗 30 min 后, 滴加 ECL 显影液显色, 采用 Odyssey Fc 双色红外激光成像系统拍照并分析。

1.4 统计学方法

实验数据均以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用 Graghpad Prism 8.0.2 软件进行数据分析并绘图。计量资料采用单因素方差分析, 两两比较用

Tukey 法, 计数资料采用卡方(χ^2)检验, 以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑血流量评价模型构建是否成功

PeriCam PSI 激光散斑血流监测系统结果显示, SD 大鼠左侧脑血流灌注量(ROI)在脑缺血时(TOI2)下降了 54.50%, 再灌注后(TOI3)的脑血流灌注量上升至缺血前(TOI1)的 74.14% 水平, 提示脑缺血再灌注成功(图 1)。

2.2 补阳还五汤减轻 MCAO/R 大鼠神经功能损伤

与 Sham 组相比, MCAO/R 组大鼠神经功能缺损评分显著升高($P<0.01$); 与 MCAO/R 组相比, BYHWD 组和 NBP 组大鼠神经功能缺损评分显著降低($P<0.01$); 与 NBP 组相比, BYHWD 组评分与之无统计学差异($P>0.05$, 图 2)。

2.3 补阳还五汤减轻 MCAO/R 大鼠脑组织病理损伤

Sham 组大鼠脑组织形态和结构未见异常, 细胞完整、排列整齐; MCAO/R 组大鼠脑组织可见细胞水肿, 数量减少、形态不规则, 核固缩、空泡变性等病理学改变; 与 MCAO/R 组相比, BYHWD 组和 NBP 组脑组织病变程度减轻, 细胞数量增多, 细胞排列较整齐, 且 BYHWD 组与 NBP 组病理损伤程度相当(图 3)。

2.4 补阳还五汤减轻 MCAO/R 大鼠脑水肿

左侧(Left)含水量结果, 与 Sham 组相比, MCAO/R 组含水量显著升高($P<0.01$); 与 MCAO/R 组相比, BYHWD 组和 NBP 组含水量明显下降($P<0.01$); 与 NBP 组相比, BYHWD 组含水量较低, 但两治疗

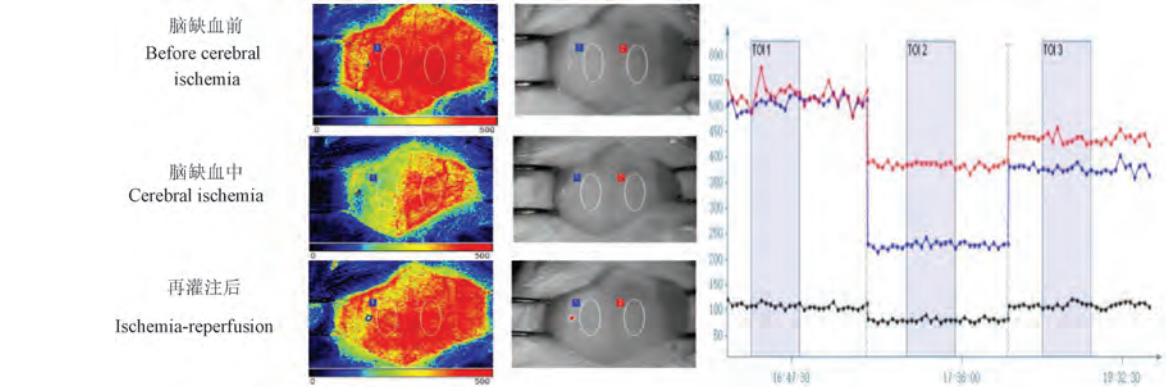
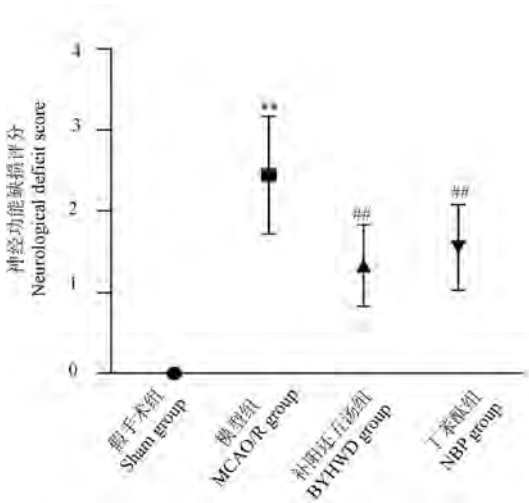


图 1 脑血流监测
Figure 1 Cerebral blood flow monitoring



注:与假手术组相比, ** $P < 0.01$;与模型组相比, ## $P < 0.01$ 。

图2 各组大鼠神经功能缺损评分($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. Compared with Sham group, ** $P < 0.01$. Compared with MCAO/R group, ## $P < 0.01$.

Figure 2 Neurological deficit score of rats in each group

组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。右侧(Right)脑含水量各组间差异无统计学意义($P > 0.05$,图4)。

2.5 补阳还五汤降低 MCAO/R 大鼠血脑屏障通透性

与 Sham 组相比,MCAO/R 组的 EB 渗漏量升高,提示 BBB 通透性明显上升,具有显著性差异($P < 0.01$);与 MCAO/R 组相比,BYHWD 组和 NBP 组的 EB 含量均显著下降,说明 BBB 通透性降低($P < 0.01$);与 NBP 组相比,BYHWD 组的 EB 含量较低,但两治疗组间差异无意义($P > 0.05$,图5)。

2.6 补阳还五汤减轻 MCAO/R 大鼠血脑屏障超微结构损伤

Sham 组血脑屏障各组成部分未见损伤;与 Sham 组相比,MCAO/R 组血脑屏障组成部分呈重度损伤:血管外基质明显水肿,内皮细胞水肿,线粒体重度肿胀,基质溶解,嵴消失,空泡变化,基底膜稀疏,厚薄不一,内皮细胞间紧密连接明显变少、消失,星形胶质细胞终足明显水肿,大面积基质溶解;与 MCAO/R 组相比,BYHWD 组和 NBP 组血脑屏障

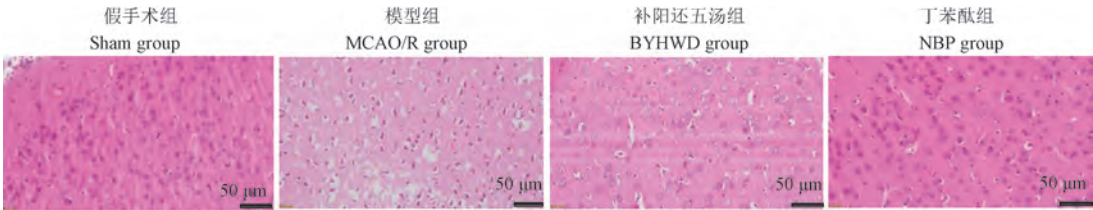
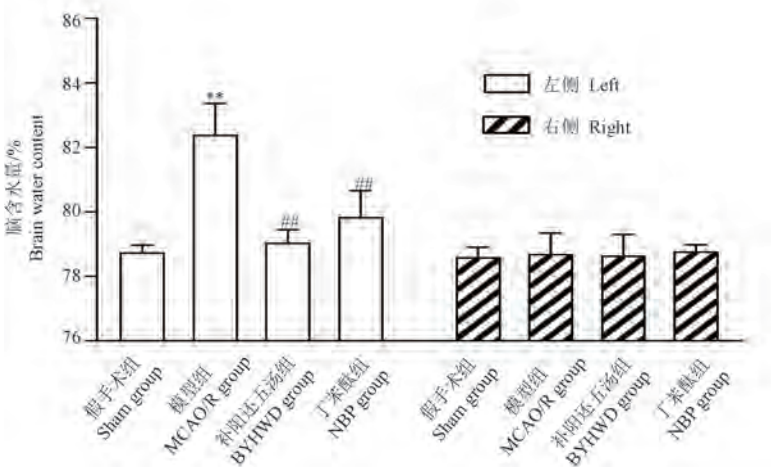


图3 HE 染色观察各组大鼠脑组织病理变化

Figure 3 Pathological changes of brain tissue were observed by HE staining



注:与假手术组相比, ** $P < 0.01$;与模型组相比, ## $P < 0.01$ 。

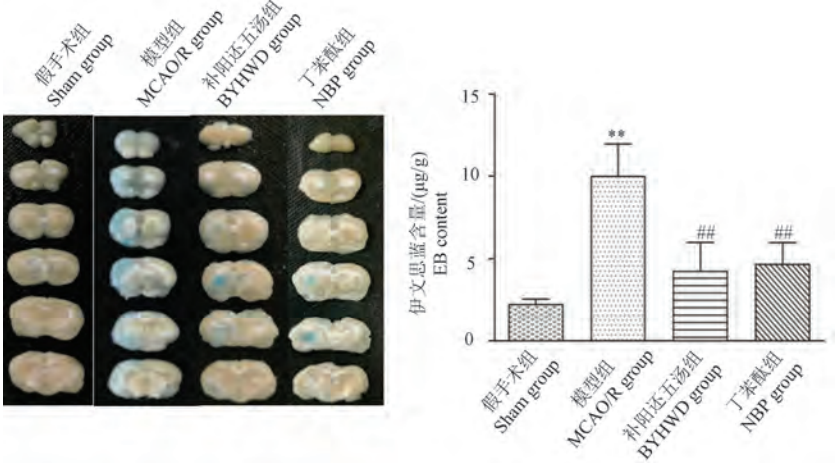
图4 各组大鼠脑含水量($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. Compared with Sham group, ** $P < 0.01$. Compared with MCAO/R group, ## $P < 0.01$.

Figure 4 Brain water content of rats in each group

损伤程度较轻, 血脑屏障呈轻度损伤: 内皮细胞细胞膜完整, 呈长梭形, 细胞器轻度肿胀, 线粒体膜完整, 嵴减少, 局部基质变淡, 基底膜结构略显稀疏, 部分区域断裂, 内皮细胞间紧密连接致密区较长,

星形胶质细胞终足水肿较轻(图 6)。
2.7 补阳还五汤减轻 MCAO/R 大鼠氧化应激损伤
结果见图 7, 与 Sham 组相比, MCAO/R 组的



注: 与假手术组相比, $**P<0.01$; 与模型组相比, $^{##}P<0.01$ 。
图 5 EB 染色定量分析 BBB 通透性($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Note. Compared with Sham group, $**P<0.01$. Compared with MCAO/R group, $^{##}P<0.01$.

Figure 5 Quantitative analysis of BBB permeability by EB staining

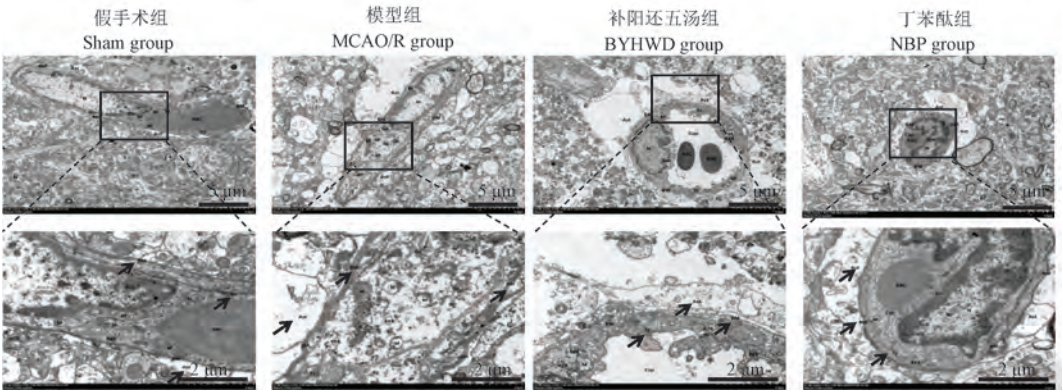
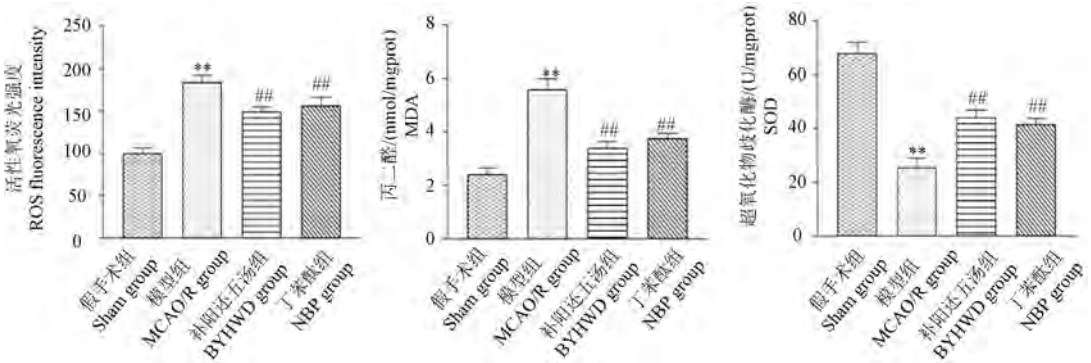


图 6 血脑屏障超微结构
Figure 6 Ultrastructure of blood-brain barrier



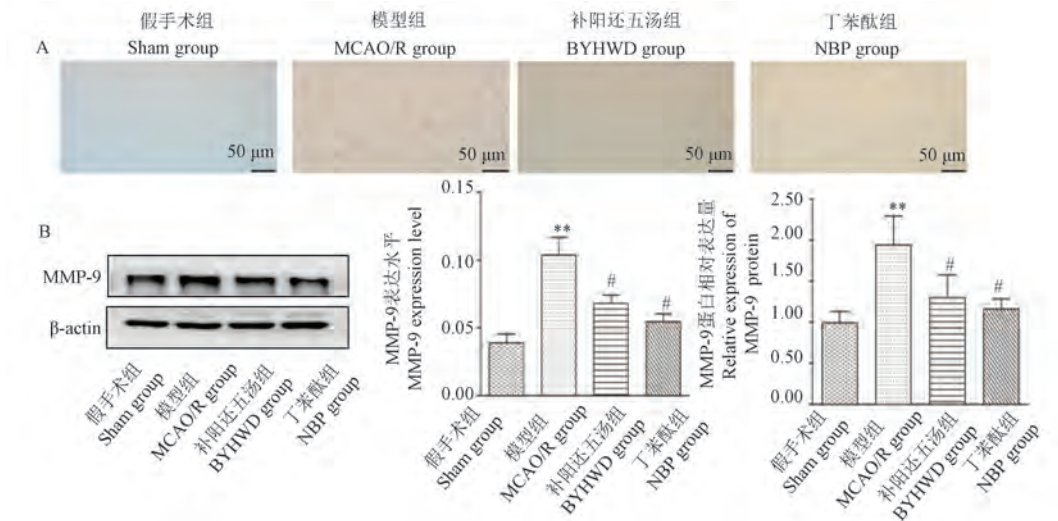
注: 与假手术组相比, $**P<0.01$; 与模型组相比, $^{##}P<0.01$ 。
图 7 各实验组脑组织中 ROS、MDA 和 SOD 的含量($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Note. Compared with Sham group, $**P<0.01$. Compared with MCAO/R group, $^{##}P<0.01$.

Figure 7 Content of ROS, MDA and SOD in brain tissues of each experimental group

ROS 与 MDA 含量显著升高,SOD 含量显著降低($P<0.01$);与 MCAO/R 组相比,BYHWD 组和 NBP 组的 ROS 与 MDA 含量显著降低,SOD 含量显著升高($P<0.01$);与 NBP 组相比,BYHWD 组的 ROS 与 MDA 含量较低,SOD 含量较高,但组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.8 补阳还五汤降低 MMP-9 蛋白的表达水平

与 Sham 组相比,MCAO/R 组的 MMP-9 表达水平显著升高 ($P<0.01$);与 MCAO/R 组相比,BYHWD 组和 NBP 组的 MMP-9 表达水平明显降低 ($P<0.05$);与 NBP 组相比,BYHWD 组的 MMP-9 表达略高,但组间差异无统计学意义($P>0.05$)(图 8)。

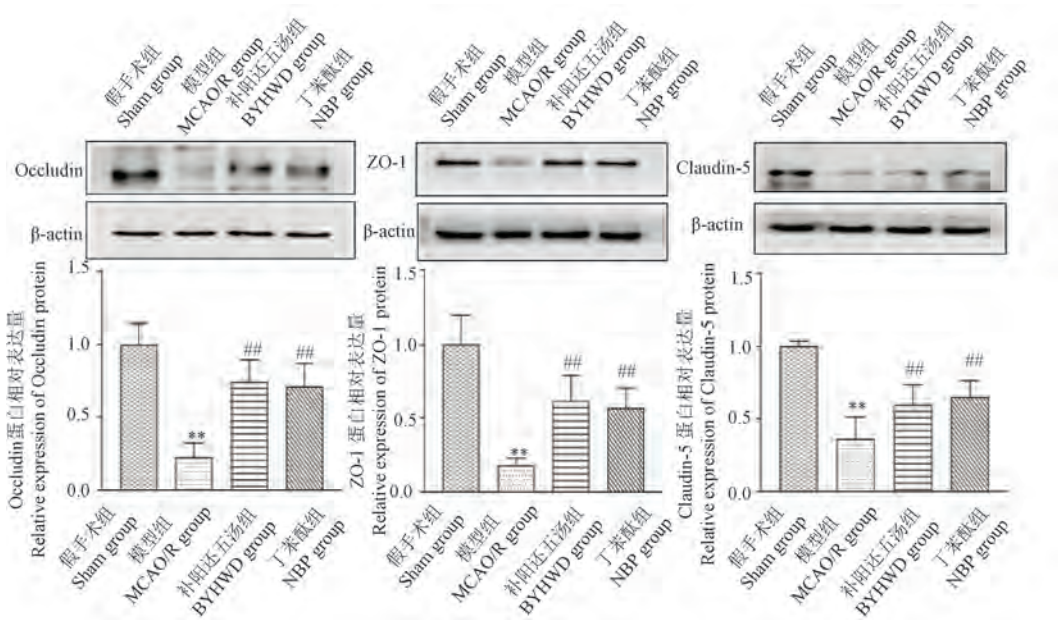


注:A:免疫组化染色结果;B:Western blot 检测结果。与假手术组相比, ** $P<0.01$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。

图 8 免疫组化染色及 Western blot 检测 MMP-9 的表达水平($\bar{x}\pm s,n=3$)

Note. A, Immunostaining result. B, Western blot result. Compared with Sham group, ** $P<0.01$. Compared with MCAO/R group, # $P<0.05$.

Figure 8 Expression levels of MMP-9 were determined by immunostaining and Western blot



注:与假手术组相比, ** $P<0.01$;与模型组相比, ## $P<0.01$ 。

图 9 ZO-1、Claudin-5 和 Occludin 蛋白的表达水平($\bar{x}\pm s,n=3$)

Note. Compared with Sham group, ** $P<0.01$. Compared with MCAO/R group, ## $P<0.01$.

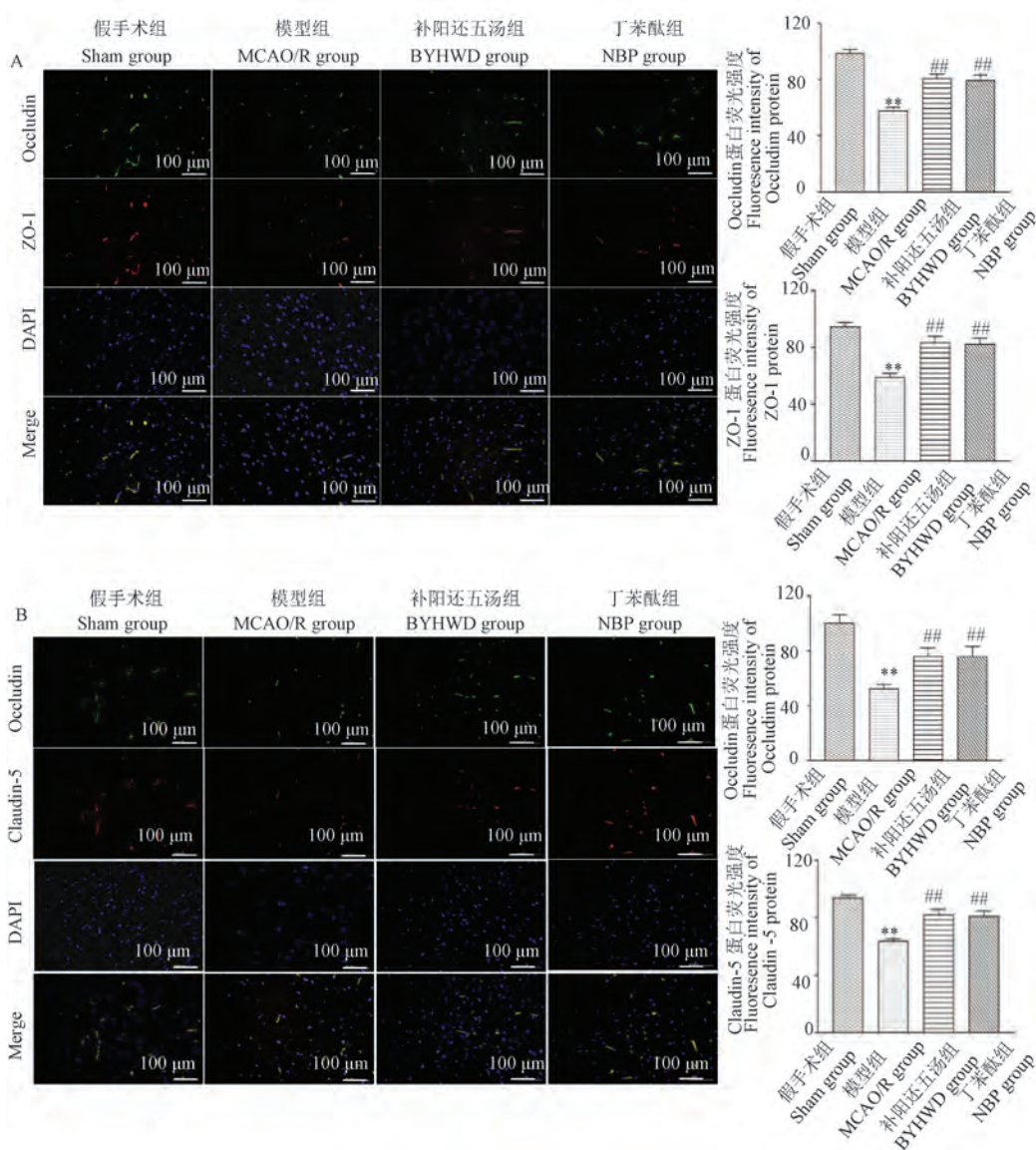
Figure 9 Protein expression levels of ZO-1, Claudin-5 and Occludin

2.9 补阳还五汤对紧密连接蛋白的表达水平的影响

与 Sham 组相比,MCAO/R 组的紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1、Claudin-5 的表达水平均有不同程度的下降($P<0.01$);与 MCAO/R 组相比,BYHWD 组及 NBP 组的 Occludin、ZO-1、Claudin-5 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$);与 NBP 组相比,BYHWD 组的 Occludin、ZO-1 蛋白表达较高,Claudin-5 略低,但两组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.10 补阳还五汤对紧密连接相关蛋白的平均荧光强度的影响

结果见图 10,与 Sham 组相比,MCAO/R 组的紧密连接蛋白 Occludin (绿光)与 ZO-1 (红光)、Claudin-5 (红光)平均荧光强度均有不同程度的下降($P<0.01$);与 MCAO/R 组相比,BYHWD 组及 NBP 组 Occludin、ZO-1、Claudin-5 的平均荧光强度显著升高($P<0.01$);与 NBP 组相比,BYHWD 组 Occludin、ZO-1、Claudin-5 的平均荧光强度较高,但



注:A:Occludin 和 ZO-1 蛋白的荧光表达强度;B:Occludin 和 Claudin-5 蛋白的荧光表达强度。与假手术组相比, ** $P<0.01$;与模型组相比, ## $P<0.01$ 。

图 10 Occludin 和 ZO-1、Claudin-5 蛋白的荧光表达强度($\bar{x}\pm s, n=3$)

Note. A, Fluorescence expression intensity of Occludin and ZO-1 protein. B, Fluorescence expression intensity of Occludin and Claudin-5 protein. Compared with Sham group, ** $P<0.01$. Compared with MCAO/R group, ## $P<0.01$.

Figure 10 Fluorescence expression intensity of Occludin and ZO-1, Claudin-5 proteins

差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

BBB 由血管内皮细胞、内皮细胞间的紧密连接、基底膜、周细胞及星形胶质细胞突触末端终板组成^[15-16]。其中,脑血管内皮细胞间的紧密连接蛋白(tight junction protein, TJP)表达与排列对维持 BBB 结构完整性产生重要影响。CIRI 期间 TJP 表达降低,导致 BBB 通透性增加,有害物质进入脑组织,引发血管源性脑水肿,脑水肿作为 CIRI 的危重并发症,对患者的死亡率产生重大影响。Occludin 是 TJP 中的主要结构蛋白;Claudin-5 是 TJP 中的主要跨膜蛋白;ZO-1 是 TJP 中的重要连接枢纽,连接了跨膜蛋白与骨架蛋白。已有研究表明, Occludin、Claudin-5、ZO-1 蛋白的表达水平影响 BBB 的结构及通透性^[17-18]。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类高度进化保守的 Zn^{+} 依赖性内肽酶家族,可降解细胞外基质^[19],其中基质金属蛋白酶 9(MMP-9)在神经元等多种细胞中表达并参与多种生理病理过程。MMP-9 可以通过氧化和 S-亚硝基化被激活^[20],活化的 MMP-9 通过降解 TJP 破坏 BBB,诱发脑水肿。Montaner 等^[21]的研究发现 MMP-9 水平与急性缺血性脑卒中的 BBB 通透性及脑水肿的严重程度相关,李晒等^[22]实验表明 MMP-9 导致的脑水肿与其对 Occludin 蛋白的降解相关。可见,MMP-9 的激活诱导 TJP 的降解,造成 BBB 结构破坏,是引发脑水肿的关键机制。因此,抑制 MMP-9 的激活成为治疗 CIRI 后脑水肿的关键。

氧化应激反应是由于细胞氧化与抗氧化活性失衡导致的一种病理过程。中枢神经系统因其需氧量高,抗氧化损伤能力较差,极易受到氧化应激损伤的影响^[23]。缺血缺氧的脑组织恢复血供时,ROS 产生过多,超出 SOD 的代谢水平,引发氧化应激反应加重神经系统损伤^[24]。已有研究表明,过量的 ROS 在创伤性脑损伤、术后谵妄等中枢神经疾病的 BBB 功能障碍中起着关键作用^[25-26]。ROS 导致 BBB 功能障碍造成脑水肿,可能与其介导 MMPs 激活,导致 TJP 下调, BBB 通透性升高有关^[27]。目前,国内外学者对于 CIRI 病理学机制方面的研究相对独立,氧化应激、炎症反应、BBB 等发病机制相结合的研究较少,人体是一个复杂的整体,各种因素、机制、机理乃至通路、蛋白、靶点均具有内在的联系,

CIRI 病理生理学进程复杂,多种因素相结合的研究可以更深入、更全面探究 CIRI 病理学和有效药物的药理学机制。

中医理论认为,中风多由气虚血瘀导致,气不能运,血不能行,形成血瘀。血瘀是形成各种病理变化的基础,《血证论》中提到“瘀血化水,亦发水肿”。血液运行不畅,阻滞气机,气机不畅,不能行血,血中之津液成分不能在脉内正常运行渗透于脉外形成水肿。BYHWD 由黄芪、当归、赤芍、桃仁、川芎、红花和地龙 7 味中药材组成,具有补气、活血、通络的功效,此方用于治疗中风气虚血瘀证疗效显著,沿用至今。BBB 在脑组织中具有重要作用,能防止有害物质进入脑细胞,保护脑组织从而发挥正常的生理功能。中医理论中,“气血”是生命活动得以正常进行的根本,生命活动正常,组织细胞功能稳定又可以使气血充足。BYHWD“补气活血”的功效可能与维持 BBB 稳定性,恢复脑细胞生理功能密切相关。目前,虽然已有实验证明 BYHWD 能够减轻中风后的脑水肿,但是,涉及到 BYHWD 抑制氧化应激、恢复血脑屏障功能的研究还比较浅薄,没有挖掘更深入的机制和机理,其现代药理学机制尚不完全明确,仍有待更深入探究。本实验通过对 MCAO/R 大鼠的脑水肿程度的检测发现补 BYHWD 可以减轻 CIRI 大鼠脑水肿,进一步探讨其机制,结果表明, BYHWD 可以降低 CIRI 大鼠脑组织中 ROS、MDA 的含量,升高 SOD 的含量,降低氧化应激水平。氧化应激是多种病理学因素的始动环节,本研究发现, BYHWD 降低氧化应激的同时可以降低 MMP-9 的表达,升高 TJP 的表达水平。本研究将 BYHWD 降低氧化应激水平和恢复 BBB 功能进行结合研究,更深入挖掘了 BYHWD 的药理作用机制。综上所述, BYHWD 可以抑制氧化应激以及 MMP-9 的激活,保护血脑屏障结构和功能的完整性,可能是其发挥“补气活血通络”功效减轻脑水肿,改善 CIRI 的机制之一。

参考文献:

[1] 赵继宗. 我国脑心血管共患疾病现状与临床研究[J]. 首都医科大学学报, 2022, 43(5): 671-673.
ZHAO J Z. Current status and clinical research of brain-heart comorbid vascular diseases in China [J]. J Cap Med Univ, 2022, 43(5): 671-673.

[2] 刘流, 张华, 莫永佳, 等. 缺血性脑卒中后脑水肿的研究进展[J]. 中国当代医药, 2023, 30(7): 29-34.
LIU L, ZHANG H, MO Y J, et al. Research progress of cerebral

- edema after ischemic stroke [J]. *China Mod Med*, 2023, 30(7): 29-34.
- [3] Li M, TANG H, LI Z, et al. Emerging treatment strategies for cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Neuroscience*, 2022, 507: 112-124.
- [4] 张志刚, 范小璇, 连露露, 等. 芳香开窍药对血脑屏障通透性调控作用的研究进展 [J]. *环球中医药*, 2022, 15(8): 1510-1516.
- ZHANG Z G, FAN X X, LIAN L L, et al. The research progress about the effect of Aromatic on the regulation of blood brain barrier permeability [J]. *Glob Tradit Chin Med*, 2022, 15(8): 1510-1516.
- [5] 王征, 吴建华, 方云祥, 等. 脑脉泰胶囊对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤血脑屏障和脑水肿的影响 [J]. *中国药学杂志*, 2009, 44(19): 1483-1487.
- WANG Z, WU J H, FANG Y X, et al. Effect of Naomaitai capsules on rat blood-brain barrier and cerebral edema induced by cerebral ischemic reperfusion injury [J]. *Chin Pharm J*, 2009, 44(19): 1483-1487.
- [6] 谢明, 朱俊德, 周璐, 等. 依达拉奉对大鼠脑缺血再灌注损伤后氧化应激及凋亡的影响 [J]. *神经解剖学杂志*, 2021, 37(4): 418-424.
- XIE M, ZHU J D, ZHOU L, et al. Effects of edaravone on oxidative stress and apoptosis after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Chin J Neuroanat*, 2021, 37(4): 418-424.
- [7] 夏杰玲, 黄年正. 补阳还五汤治疗中风(中经络-气虚血瘀)的临床疗效分析 [J]. *系统医学*, 2022, 7(17): 1-4.
- XIA J L, HUANG N Z. Analysis of clinical efficacy of Buyang Huanwu Decoction in the treatment of stroke(middle meridian-qi deficiency and blood stasis) [J]. *Syst Med*, 2022, 7(17): 1-4.
- [8] 李梦. 补阳还五汤在缺血性脑血管病中的临床应用 [J]. *浙江中医杂志*, 2022, 57(6): 456.
- LI M. Clinical application of Buyanghuanwu Decoction in ischemic cerebrovascular disease [J]. *Zhejiang J Tradit Chin Med*, 2022, 57(6): 456.
- [9] 李磊, 图门巴雅尔, 宁康健, 等. 黄芪甲苷脑保护作用研究进展 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2017, 38(6): 62-65.
- LI L, TU M, NING K J, et al. Research progress on cerebral protection of astragaloside IV [J]. *Anim Husb Feed Sci*, 2017, 38(6): 62-65.
- [10] 马秀娟, 赵艳萌, 王文良, 等. 补阳还五汤通过 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路调控自噬减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤 [J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(1): 147-152.
- MA X J, ZHAO Y M, WANG W L, et al. Buyang Huanwu Decoction attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by regulating autophagy through AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2022, 38(1): 147-152.
- [11] 辛紫媛, 靳晓飞, 周晓红, 等. 补阳还五汤通过 SIRT1/NF- κ B p65 信号通路减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(8): 1454-1462.
- XIN Z Y, JIN X F, ZHOU X H, et al. Buyang-Huanwu decoction reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in rats through SIRT1/NF- κ B p65 signaling pathway [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2022, 38(8): 1454-1462.
- [12] 马阳. 丁苯酞对慢性脑低灌注大鼠的认知功能及血脑屏障的影响 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2020.
- MA Y. Effects of butylphthalide on cognitive function and blood-brain barrier in rats with chronic cerebral hypoperfusion [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2020.
- [13] 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.
- [14] 李琳瑶, 岳志伟, 刘丽, 等. 脑水肿干湿重法的测定条件分析 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2016, 32(3): 282-283.
- LI C Y, YUE Z W, LIU L, et al. Measuring condition analysis of dry/wet weight method of brain edema determination [J]. *Chin J Appl Physiol*, 2016, 32(3): 282-283.
- [15] 申杰, 徐桂华. 血脑屏障与中枢神经系统疾病的相关性研究进展 [J]. *中华神经医学杂志*, 2020, 19(9): 961-965.
- SHEN J, XU G H. Recent advance in relation between blood-brain barrier and central nervous system diseases [J]. *Chin J Neuromed*, 2020, 19(9): 961-965.
- [16] 郑明华. 载脂蛋白 E 对实验性自身免疫脑脊髓炎血脑屏障通透性的影响 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2014.
- ZHENG M H. Effect of apolipoprotein E on permeability of blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis [D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2014.
- [17] 杨丽娟. 甲基苯丙胺调节紧密连接结构蛋白的表达改变血脑屏障通透性 [J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(6): 1172.
- YANG L J. Methamphetamine regulates the expression of tight junction structural protein and changes the permeability of blood-brain barrier [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2008, 24(6): 1172.
- [18] 阚红军, 刘丛华, 孙保中, 等. 右美托咪定复合羟考酮对高血压脑出血大鼠模型血脑屏障的保护作用及机制研究 [J]. *解剖科学进展*, 2022, 28(4): 424-428.
- KAN H J, LIU C H, SUN B Z, et al. Protective effect and mechanism of dexmedetomidine combined with oxycodone on blood-brain barrier in hypertensive intracerebral hemorrhage rat model [J]. *Prog Anat Sci*, 2022, 28(4): 424-428.
- [19] 温晓洲, 孙爱华, 李广平, 等. 基质金属蛋白酶 9 的研究进展 [J]. *岭南急诊医学杂志*, 2021, 26(2): 216-218.
- WEN X Z, SUN A H, LI G P, et al. Research progress of matrix metalloproteinase 9 [J]. *Lingnan J Emerg Med*, 2021, 26(2): 216-218.
- [20] CHANG M, NGUYEN T T. Strategy for treatment of infected diabetic foot ulcers [J]. *Acc Chem Res*, 2021, 54(5): 1080-1093.
- [21] MONTANER J, RAMIRO L, SIMATS A, et al. Matrix metalloproteinases and ADAMs in stroke [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(16): 3117-3140.

宋艳梅,孙宁鑫,刘晨,等. miR-379-5p 抑制小鼠乳腺癌 4T1 细胞的增殖、侵袭和迁移 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 85-92.

Song YM, Sun NX, Liu C, et al. MiR-379-5p inhibits proliferation, invasion, and migration of mouse breast cancer 4T1 cells [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 85-92.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.011

miR-379-5p 抑制小鼠乳腺癌 4T1 细胞的增殖、侵袭和迁移

宋艳梅¹, 孙宁鑫¹, 刘晨¹, 宋宜芬¹, 李洪利², 尹崇高^{1*}

(1. 潍坊医学院护理学院, 山东 潍坊 261053;

2. 潍坊医学院医学研究实验中心, 山东 潍坊 261053)

【摘要】 目的 通过研究 miR-379-5p 对小鼠乳腺癌 4T1 细胞增殖、侵袭和迁移的影响, 为临床抑制乳腺癌增殖、侵袭和转移提供新的治疗靶点。方法 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 miR-379-5p 在质粒转染后 4T1 细胞中的表达情况; 采用 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 细胞增殖实验与 Transwell 实验检测各组 4T1 细胞增殖能力与侵袭能力; 然后通过伤口愈合实验来检测过表达以及敲低 miR-379-5p 对 4T1 细胞迁移能力的影响; 利用 BABL/c 小鼠建立乳腺癌小鼠移植瘤模型, 观察 miR-379-5p 过表达后对体内肿瘤生长状况, 肺转移灶数量及大小的影响。结果 EdU 结果显示, 与对照组相比, 敲低 miR-379-5p 能增强乳腺癌细胞的增殖能力, 过表达 miR-379-5p 能够抑制乳腺癌细胞的增殖能力 ($P < 0.05$); Transwell 与伤口愈合实验结果显示, 敲低 miR-379-5p 能够增强乳腺癌细胞的侵袭和迁移能力, 过表达 miR-379-5p 显著抑制细胞的侵袭和迁移能力 ($P < 0.01$)。BABL/c 小鼠体内成瘤实验显示, 过表达 miR-379-5p 可显著减缓肿瘤的生长速度 ($P < 0.05$), 对肺转移有抑制作用 ($P < 0.01$)。结论 miR-379-5p 在乳腺癌中起到抑癌基因的作用, 抑制小鼠乳腺癌 4T1 细胞的增殖、侵袭和迁移。

【关键词】 乳腺癌; miR-379-5p; 增殖; 侵袭; 迁移

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0085-08

MiR-379-5p inhibits proliferation, invasion, and migration of mouse breast cancer 4T1 cells

SONG Yanmei¹, SUN Ningxin¹, LIU Chen¹, SONG Yifen¹, LI Hongli², YIN Chonggao^{1*}

(1. College of Nursing, Weifang Medical University, Weifang 261053, China.

2. Medicine Research Center, Weifang Medical University, Weifang 261053)

【Abstract】 **Objective** By investigating the effects of miR-379-5p on the proliferation, invasion and metastasis of mouse breast cancer 4T1 cells, we aimed to provide new therapeutic targets for the clinical inhibition of breast cancer proliferation, invasion, and metastasis. **Methods** After plasmid transfection, 4T1 cells were utilized to detect the expression of miR-379-5p using fluorescence quantitative PCR. While 5-ethynyl-2'-doxyuridine (EdU) cell proliferation and Transwell assays were employed to detect changes in the proliferation and invasion ability of 4T1 cells in each group.

【基金项目】 山东省自然科学基金 (ZR2022MH311); 山东省教育厅 2019 年高等学校青创人才引育计划团队项目 (205)。

【作者简介】 宋艳梅 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤护理学。E-mail: 2021899@stu.wfmc.edu.cn

【通信作者】 尹崇高 (1979—), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤侵袭与转移的分子机制。E-mail: yinchg@wfmc.edu.cn

The migration ability of 4T1 cells after overexpression and knockdown of miR-379-5p was examined by scratch healing assay. A transplanted tumor model of breast cancer was established in BABL/c mice, and the effects of overexpressing miR-379-5p on tumor growth and the number and size of lung metastases were observed. **Results** EdU result showed that knocking down miR-379-5p enhanced the proliferation ability of the cells compared with the control group cells, and miR-379-5p overexpression reduced the capacity of breast cancer cells to proliferate ($P<0.05$). Transwell and wound healing assays showed that miR-379-5p knockdown enhanced, while miR-379-5p overexpression significantly inhibited, the invasion and migratory ability of breast cancer cells ($P<0.01$). An *in vivo* tumorigenesis experiment with BABL/c mice showed that miR-379-5p overexpression significantly slowed the tumor growth rate ($P<0.05$) and inhibited lung metastasis ($P<0.01$). **Conclusions** MiR-379-5p plays a role in tumor gene suppression in breast cancer and inhibits the proliferation, invasion, and migration of mouse breast cancer 4T1 cells.

[Keywords] breast cancer; miR-379-5p; proliferation; invasion; migration

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

在全球范围内,乳腺癌在女性癌症中占比很大,是癌症死亡的主要原因^[1]。肿瘤的侵袭和转移影响患者的不良预后,严重威胁患者的身心健康和生活质量^[2]。随着医疗水平的提高,乳腺癌的死亡率有所下降,但乳腺癌的高转移性仍然是当今乳腺癌治疗亟需解决的难题,因此有必要深入研究乳腺癌病因及预后的分子机制,确定其有效治疗靶点和预后生物标志物,这为乳腺癌的早期诊断、治疗和预后提供了理论依据。

微小 RNAs (microRNAs, miRNAs) 由 18~25 个核苷酸构成,是一种非编码小分子 RNA,几乎涉及所有与癌症相关的关键通路^[3]。miRNAs 的复杂调控功能参与多种生物过程,包括细胞增殖、分化、侵袭、迁移和凋亡^[4-5]。随着测序技术和分子生物学的巨大进步,发现 miRNAs 和乳腺癌的发生发展以及侵袭转移密切相关^[6]。因此,miRNAs 在乳腺癌的诊断、预防和治疗等方面都具有重要的参考价值。

研究发现 miR-379-5p 在口腔鳞状细胞癌、鼻咽癌、子宫内膜癌、非小细胞肺癌等恶性肿瘤的发生和发展中具有重要的调控作用^[7-10]。本课题组先前研究表明 miR-379-5p 可以抑制人三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖和侵袭^[11],但对小鼠乳腺癌细胞 4T1 的影响未见探讨。通过生物信息学数据库分析发现 miR-379-5p 为人鼠同源基因,序列为 5'-UGGUAGACUAUGGAACGUAGG-3'。因此本文展开研究 miR-379-5p 对小鼠乳腺癌细胞增殖、侵袭与迁移的影响,进一步为 miR-379-5p 抑制乳腺癌细胞增殖、侵袭、转移提供更多的实验和理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

10 只 BABL/c 雌性小鼠,SPF 级,4 周龄,18~20 g,购买自济南市朋悦实验动物繁育有限公司[SCXK(鲁)2019-0003]。饲养在潍坊医学院动物研究实验中心[SYXK(鲁)2019-0016],环境温度 22~26℃,相对湿度 40%~60%,12 h/12 h 昼夜交替,将所有小鼠饲养在无病原体的条件下,提供充足的食物和水。按 3R 原则给予实验动物人道关怀,按照美国《实验动物护理和使用指南》进行,并且经过潍坊医学院伦理委员会(教学和研究中使用活体动物委员会)的批准(2020SDL073)。

1.1.2 细胞

4T1 细胞购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。4T1 小鼠乳腺癌细胞使用含有 20% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养,放于 37℃、含 5% CO₂ 的细胞恒温培养箱中。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清和 RPMI-1640 培养基购自美国 HyClone 公司;总 RNA 提取试剂盒、miR-379-5p 茎环结构、上下游引物及 U6 上下游引物由上海生物工程技术有限公司设计合成;慢病毒、质粒购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司;Transwell 小室购自 BD Biosciences;Lipofectamine™ 2000 购自 Thermo Scientific 公司;EdU 试剂盒购自 Beyotime biotechnology 公司。

CO₂ 细胞培养箱购自 Thermo 公司;Applied Biosystems™ 7500 FAST PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司;CX31 显微镜购自 OLYMPUS 公司;DM4B 显微镜购自 Leica 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 分组

4T1 细胞分组: (1) 对照 (con) 组: 转入 miR-379-5p 质粒的对照质粒; (2) over-miR-379-5p 组: 转入 miR-379-5p 过表达质粒; (3) sh-miR-379-5p 组: 转入 miR-379-5p 敲低质粒 (上述质粒用于细胞实验); (4) con-LV 组: 转入 miR-379-5p 过表达的空载慢病毒; (5) over-LV-miR-379-5p 组: 转入 miR-379-5p 过表达慢病毒。慢病毒感染细胞用于小鼠体内实验。乳腺癌小鼠移植瘤模型随机分为 con-LV 组和 over-LV-miR-379-5p 组, 每组 5 只小鼠。

1.3.2 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)

质粒转染采用 qRT-PCR 进行检测。细胞中总 RNA 提取以及逆转录详细过程详见本课题组既往发表文献^[12]。使用茎环法进行 miRNA 的定量测量。PCR 条件设置为 95 ℃、5 s、63 ℃、30 s、72 ℃、30 s 进行 35 个循环。使用 U6 作为内参, 引物序列如下, miR-379-5p 的 RT 引物: 5'-GTCGTATCCA GTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACC CTACG-3'; miR-379-5p 正向引物: 5'-GCCGCTGGTAGACTATGGAA-3'; miR-379-5p 反向引物 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'; U6 正向引物: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', U6 反向引物: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。使用 2^{-ΔΔCt} 分析的方法对 miR-379-5p 的相对表达量进行分析。

1.3.3 EdU 细胞增殖实验

向各组细胞中加入 500 μL EdU 工作液, 于 37 ℃ 培养箱中孵育 2 h 后弃除工作液。4% 多聚甲醛在室温下固定 15 min, PBS 洗涤细胞 2 次。0.2% 的 Triton X-100 进行透膜 40 min 左右。然后将 Click 反应液加入各组细胞, 在室温下避光孵育 30 min 左右。然后使用移液器将反应液吸去, 用 PBS 充分洗涤 3 次。DAPI 染核, 观察并进行拍照分析。实验独立重复 3 次。

1.3.4 Transwell 实验

Transwell 实验在 Transwell 小室中进行。迁移: 将 4T1 细胞 (4×10⁴) 滴加于 200 μL 无血清的 RPMI-1640 培养基中, 吹散细胞后加至无基质胶的 Transwell 上室中, 下室滴加 500 μL FBS。侵袭: 将 4T1 细胞 (4×10⁴) 滴加于 200 μL 无血清的 RPMI-1640 培养基中, 吹散细胞后加至有基质胶的

Transwell 上室中, 下室采用 500 μL FBS 进行培养。将其放入培养箱内培养至 24 h 后使用甲醇溶液进行细胞固定, 时间在 15 min 左右, 用 PBS 充分洗涤 3~4 次, 擦拭棒拭去上室未穿膜细胞, 使用姬姆萨染料对其染色, 30 min 后用蒸馏水将其充分冲洗, 自然晾干 45 min 左右, 显微镜下拍照统计。实验独立重复 3 次。

1.3.5 伤口愈合实验

将各组 4T1 细胞接种于六孔板, 显微镜下观察汇合度达到 90% 时, 制造划痕使用 20 μL 的枪头, 并且保证划痕的宽度尽量一致。用 PBS 充分进行清洗 2 次, 使用移液器吸掉弃液。然后加入无血清培养基 RPMI-1640, 通过镜下拍照记录此时的细胞状态为 0 h 划痕状态。后续将培养基换成 1% FBS 的 RPMI-1640, 将六孔板移回培养箱进行培养, 24 h 后再观察划痕愈合情况并于显微镜下观察拍照, 通过图像数据比较来确定细胞迁移的情况。划痕愈合率/% = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度 × 100%。实验独立重复 3 次。

1.3.6 乳腺癌小鼠移植瘤模型

将 con-LV 组细胞及 over-LV-miR-379-5p 组细胞用胰酶消化后制备成细胞悬液, 将细胞用 PBS 稀释至 1×10⁷/mL, 按照无菌操作要求接种到 BABL/c 小鼠皮下, 每只接种细胞悬液 0.1 mL。每组 5 只, 每天观察小鼠肿瘤生长情况, 游标卡尺测量瘤体大小, 瘤体积/mm³ = 1/2ab² (a 为肿瘤长径, b 为肿瘤短径)^[13], 连续测定肿瘤体积, 绘制出肿瘤生长曲线。

1.3.7 观察小鼠肺转移情况

将解剖的肺组织置于 4% 多聚甲醛中固定, 用显微镜进行观察, 统计肺转移灶数目以及大小, 根据转移灶的大小分级。按以下公式计算: 总转移灶数 = I 级转移灶数 + 2×II 级转移灶数 + 3×III 级转移灶数 + 4×IV 级转移灶数。(据直径将其分为 4 级: I 级 < 0.5 mm, 0.5 mm ≤ II 级 < 1 mm, 1 mm ≥ III 级 ≤ 2 mm, IV > 2 mm)。两名研究者分别计算肺表面的转移灶, 最后得出平均值。将肺组织进行切片, HE 染色。

1.3.8 关键基因生物学分析

使用在线数据库 miRwalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) 与 StarBase (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) 预测 miR-379-5p 的关键基因, 使用 DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) 在

线网站进行 KEGG 信号通路分析,使用微生信在线平台进行 KEGG 数据可视化处理,本研究基于网站进行信号通路分析。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 23.0 和 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行数据的处理分析,计量结果使用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较使用独立样本 *t* 检验进行分析。*P*<0.05 表明具有显著性差异。所有实验均独立重复 3 次。

2 结果

2.1 qRT-PCR 验证 miR-379-5p 过表达质粒的转染效率

为了研究 miR-379-5p 对乳腺癌 4T1 细胞增殖、侵袭和迁移的影响,本研究构建了过表达和敲除质粒转染细胞。通过 qRT-PCR 结果显示,与 con 组相比,转染过表达质粒 over-miR-379-5p 后 4T1 细胞中 miR-379-5p 的表达量显著上升 2.2 倍(*P*<0.05),表明过表达成功。

2.2 miR-379-5p 抑制小鼠乳腺癌 4T1 细胞的增殖能力

经过 EdU 细胞增殖实验的检测结果表明,与转染 miR-379-5p 对照质粒的 con 组相比,过表达 miR-379-5p 即 over-miR-379-5p 组的 EdU 阳性细胞率显著降低,这表明 miR-379-5p 在 4T1 细胞增殖能力方

面发挥了重要作用。而转染敲除 miR-379-5p 质粒即 sh-miR-379-5p 组的 EdU 阳性细胞率显著升高(图 1,*P*<0.01),这提示 miR-379-5p 能抑制乳腺癌 4T1 细胞的增殖能力。

2.3 miR-379-5p 抑制小鼠乳腺癌 4T1 细胞的迁移、侵袭能力

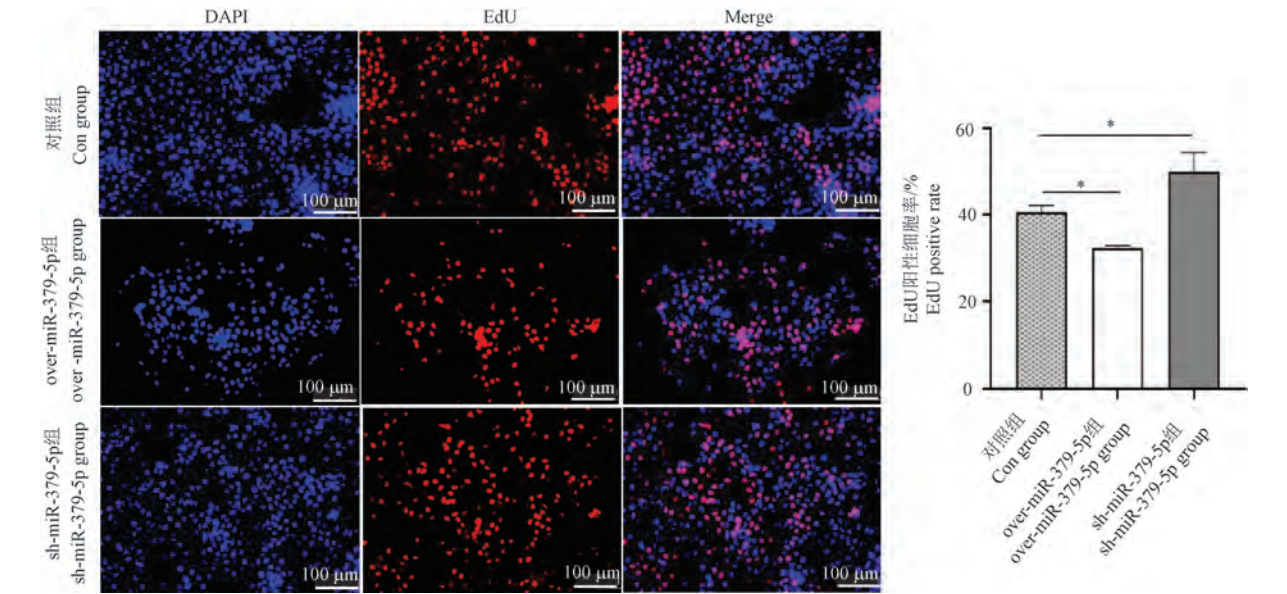
Transwell 迁移实验结果表明,与 con 组比较,over-miR-379-5p 组穿过下室的细胞数目显著降低,而 sh-miR-379-5p 组穿过下室的细胞数显著增多(*P*<0.01);Transwell 侵袭实验也表明,与 con 组穿过基底膜的细胞数相比,over-miR-379-5p 组细胞数显著减少,sh-miR-379-5p 组细胞数显著增多(图 2,*P*<0.01)。提示过表达 miR-379-5p 能够使乳腺癌细胞的迁移与侵袭能力受到抑制。

2.4 miR-379-5p 抑制小鼠乳腺癌 4T1 细胞的迁移能力

伤口愈合实验能够进一步检测 4T1 细胞过表达和敲低 miR-379-5p 对其迁移能力的影响。实验结果表明,对比 con 组,过表达 miR-379-5p 后划痕愈合率显著降低(*P*<0.01),而 sh-miR-379-5p 组划痕愈合率显著增加(图 3,*P*<0.01),证明过表达 miR-379-5p 能降低乳腺癌 4T1 细胞的迁移能力。

2.5 过表达 miR-379-5p 可延缓小鼠肿瘤的生长速度

体外实验表明了 miR-379-5p 与 4T1 细胞增殖、

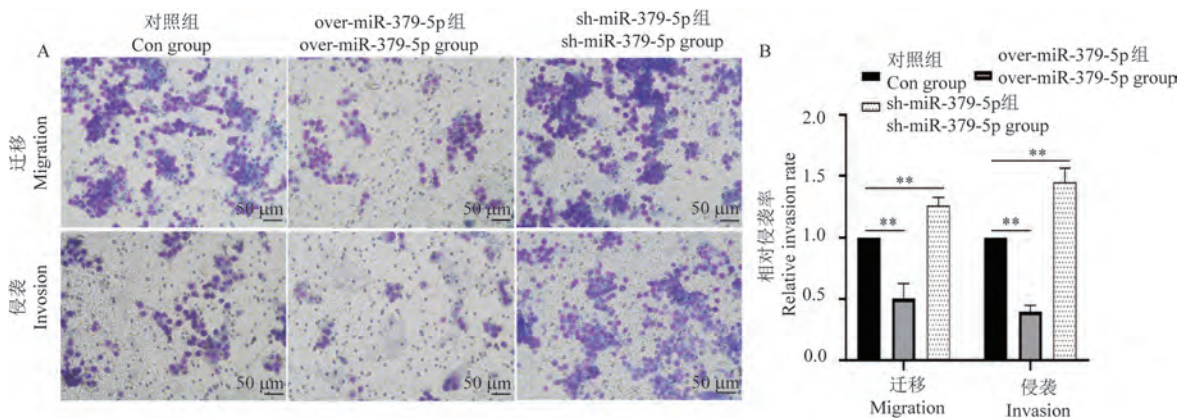


注:与对照组相比, * *P*<0.05。

图 1 EdU 实验检测 miR-379-5p 抑制乳腺癌 4T1 细胞的增殖

Note. Compared with con group, * *P*<0.05.

Figure 1 EdU assay detects miR-379-5p inhibits proliferation of breast cancer 4T1 cells

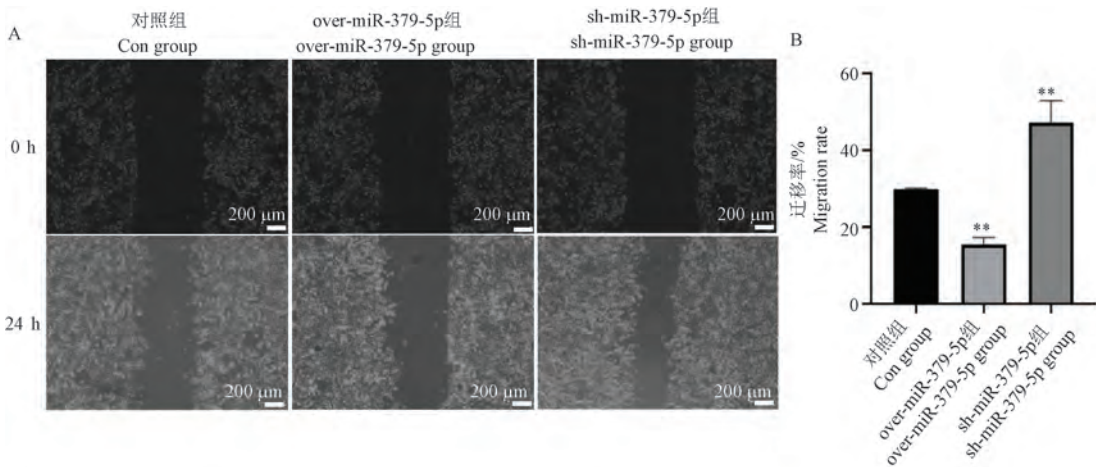


注:A:Transwell 实验检测转染 miR-379-5p 对 4T1 细胞迁移和侵袭能力的影响;B:Transwell 实验定量结果分析。与对照组相比, ** $P<0.01$ 。

图 2 miR-379-5p 抑制小鼠乳腺癌 4T1 细胞的迁移与侵袭能力

Note. A, Transwell assay to detect the effect of transfected miR-379-5p on the migration and invasion ability of 4T1 cells. B, Statistical analysis of the results of the Transwell experiment. Compared with con group, ** $P<0.01$.

Figure 2 miR-379-5p blocks the capacity of mouse breast cancer 4T1 cells to migrate and invade



注:A:转染 4T1 细胞在 0 和 24 h 后的伤口愈合试验;B:划痕实验定量结果分析。与 con 组相比, ** $P<0.01$ 。

图 3 miR-379-5p 抑制小鼠乳腺癌 4T1 细胞的迁移能力

Note. A, Wound healing assay of transfected 4T1 cells at 0 and 24 h. B, Analysis of quantitative results of scratch assay. Compared with con group, ** $P<0.01$.

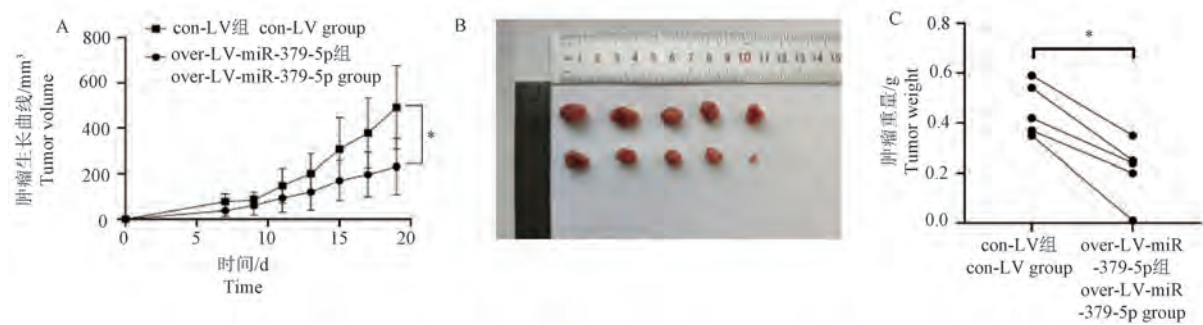
Figure 3 Ability of miR-379-5p to inhibit the migration of mouse breast cancer 4T1 cells

侵袭和迁移能力相关,于是进一步进行体内实验来验证 miR-379-5p 在体内的功能,将 con-LV 组细胞及 over-LV-miR-379-5p 组细胞以 $1\times 10^7/\text{mL}$ 接种到 BABL/c 小鼠皮下,每天观察并使用游标卡尺测量肿瘤的长径(a)与短径(b),绘制肿瘤生长曲线,结果显示过表达 miR-379-5p 慢病毒以后即 over-LV-miR-379-5p 组小鼠肿瘤生长速度明显小于 con-LV 组,差异具有统计学意义(图 4A, $P<0.05$)。19 d 后,处死小鼠,剖取肿瘤,拍照观察 over-LV-miR-

379-5p 组肿瘤体积明显小于 con-LV 组(图 4B)。con-LV 组肿瘤的平均重量是 0.45 g, over-LV-miR-379-5p 组的肿瘤平均重量是 0.21 g,两组肿瘤重量差异具有统计学意义(图 4C, $P<0.05$)。结果提示 miR-379-5p 能够抑制 BABL/c 小鼠体内肿瘤生长速度,减缓肿瘤增殖能力。

2.6 miR-379-5p 抑制小鼠乳腺癌细胞肺转移

图 5A 所示,观察小鼠肺转移,con-LV 组小鼠肺表面可见明显白色转移灶,而 over-LV-miR-

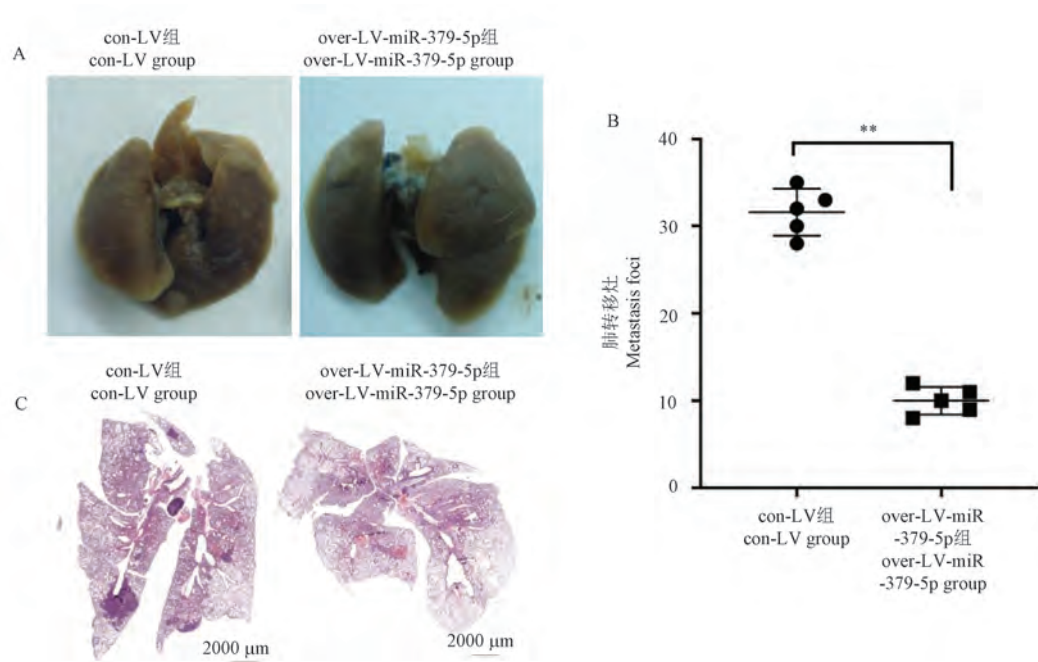


注:A;BABL/c 小鼠皮下肿瘤大小;B;两组小鼠皮下肿瘤外观对比;C;肿瘤重量。与 con-LV 组相比, * $P<0.05$ 。

Figure 4 miR-379-5p 抑制小鼠肿瘤生长

Note. A, Subcutaneous tumour size in BABL/c mice. B, Comparison of the appearance of subcutaneous tumours in two groups of mice. C, Tumor weight. Compared with con-LV group, * $P<0.05$.

Figure 4 MiR-379-5p inhibits tumor growth in mice



注:A;小鼠肺解剖学观察;B;肺转移灶数;C;肺切片 HE 染色。与 con-LV 组相比, ** $P<0.01$ 。

Figure 5 肺转移检测

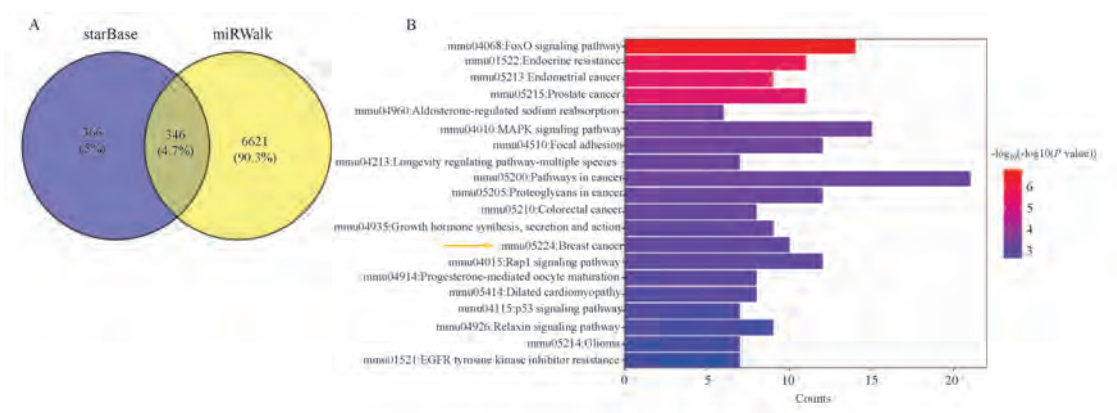
Note. A, Anatomical observation of lung in mice. B, Number of lung metastases. C, HE staining of lung sections. Compared with con-LV group, ** $P<0.01$.

Figure 5 Lung metastasis detection

379-5p 组不明显。与 over-LV-miR-379-5p 相比, con-LV 组小鼠转移灶数目显著增多(图 5B, $P<0.01$)。HE 染色可见 con-LV 组存在大小不等的肿瘤灶,多见大片肿瘤灶,而 over-LV-miR-379-5p 组肿瘤灶明显少于 con-LV 组(图 5C)。由此可见,miR-379-5p 能够抑制小鼠乳腺癌细胞肺转移。

2.7 关键基因生物学分析

通过 miRwalk 与 StarBase 数据库预测与 miR-379-5p 相互结合的靶基因,然后将预测结果比较取交集,得到 346 个目的基因(图 6A)。将筛选得到的基因通过 KEGG 富集分析,结果显示 miR-379-5p 的靶基因主要与乳腺癌相关信号通路、MAPK 信号通路、p53 信号通路、子宫内膜癌等癌症信号通路相关(图 6B)。



注:A:预测基因的韦恩图;B:KEGG 通路分析 miR-379-5p 所结合靶基因的富集情况。

图 6 关键基因生物学分析

Note. A, Venn diagram for predicting genes. B, KEGG pathway analysis of the enrichment of target genes bound to miR-379-5p.

Figure 6 Biological analysis of key genes

3 讨论

国际癌症研究机构发表的 GLOBOCAN 2020 年癌症数据统计显示,全球每年新发乳腺癌病例超过 220 万 (11.7%),因乳腺癌死亡的病例高达 70 万 (6.9%),乳腺癌的发病率已经超过肺癌,对患者的生活质量及生命健康都造成了极大的威胁^[14-15]。随着近年来对乳腺癌生物学认识的变化,尽管在治疗方面取得了一定的进展,但治疗后发生复发和转移的病例居高不下^[16]。

多种 miRNAs 可以在癌症进展中发挥作用,参与肿瘤免疫过程。在过去的二十年中,miRNAs 与各种癌症之间的联系得到了广泛的研究^[17],其在乳腺癌发病中的作用主要分为两方面,抑制或者促进癌症发生^[18-19]。miRNAs 可以通过芯片、深度测序以及 qRT-PCR 等方法检测到,其对乳腺癌发生的广泛作用表明,它们可能作为新的诊断或预后因素以及治疗靶点^[20]。

miR-379-5p 已被证明在子宫内膜癌中扮演肿瘤抑制因子的角色^[7],在鼻咽癌与肺癌中同样起到抑制作用^[8,10]。既往研究证明,miR-379-5p 可以抑制乳腺癌细胞 MDB-MA-231 增殖、侵袭及迁移^[11],但 miR-379-5p 在小鼠乳腺癌 4T1 细胞中的作用尚不清楚。本研究通过体内、体外实验揭示了 miR-379-5p 在乳腺癌中发挥的作用。生物学信息库显示,鼠源与人源 miR-379-5p 的基因序列一致,为了进一步确定 miR-379-5p 对乳腺癌的影响,本研究通过细胞实验观察 miR-379-5p 对 4T1 细胞生物学行为的调节。通过实验证明过表达 miR-379-5p 能抑制 4T1 细胞增殖、侵袭和迁移能力,而敲低 miR-379-5p 起到促进 4T1 细胞的增殖、侵袭和迁移的作用。这些实验验证 miR-379-5p 能够在乳腺癌中发挥抑制作用。进一步通过建立动物模型来验证 miR-379-5p 对肿瘤增殖能力的影响,实验结果表明,miR-379-5p 过表达后可以显著抑制 4T1 细胞的增殖,因此肿瘤的质量和体积会有明显降低,且对肺转移有显著的抑制作用。这些结果都表明了 miR-379-5p 对乳腺癌有抑制作用。

复杂的 miRNA-mRNA 网络可以通过一种 miRNA 直接或间接靶向数百种 mRNA 来调节细胞过程,包括乳腺癌的转移。本研究通过对在线数据库预测的靶基因进行 KEGG 富集分析得知,miR-379-5p 的关键基因与乳腺癌相关信号通路、MAPK 信号通路具有显著相关性。并且在本研究中,我们通过体内与体外实验验证了 miR-379-5p 能够影响乳腺癌增殖、侵袭和体内的转移,但 miR-379-5p 究竟通过哪种信号转导通路影响乳腺癌的发生、发展过程尚未可知。这将成为我们后续研究的重点。

综上所述,在本研究中,通过体内、体外实验首次证明了 miR-379-5p 能够抑制小鼠乳腺癌 4T1 细胞的增殖、侵袭和迁移,从而延缓肿瘤的生长与转移。说明 miR-379-5p 在乳腺癌发生发展中发挥重要作用,本研究为后续在乳腺癌中的研究提供新思路,有望成为早期诊断以及治疗乳腺癌的新靶点。

参考文献:

[1] KATSURA C, OGUNMWONYI I, KANKAM H, et al. Breast cancer: presentation, investigation and management [J]. Br J

Hosp Med, 2022, 83(2): 1-7.

[2] QIAO Y, JIN T, GUAN S, et al. Long non-coding RNA Lnc-408 promotes invasion and metastasis of breast cancer cell by regulating LIMK1 [J]. *Oncogene*, 2021, 40(24): 4198-4213.

[3] AGGARWAL T, WADHWA R, GUPTA R, et al. MicroRNAs as biomarker for breast cancer [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2020, 20(10): 1597-1610.

[4] PETRI B J, KLINGE C M. Regulation of breast cancer metastasis signaling by miRNAs [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2020, 39(3): 837-886.

[5] 邱方, 周杨, 张严焱, 等. MiR-328 在运动改善高血压大鼠胸主动脉 L 型钙通道表达中的作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(6): 749-758.

QIU F, ZHOU Y, ZHANG Y Y, et al. Effect of miR-328 in the exercise-induced improvement of the L-type calcium channel expression in thoracic aorta from hypertensive rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(6): 749-758.

[6] LOH H Y, NORMAN B P, LAI K S, et al. The regulatory role of micrornas in breast cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4090.

[7] MOSAAD H, ABDELRAHMAN A E, ABDULLATIF A, et al. miR-379-5p expression in endometrial cancer and its correlation with ROR1 expression [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2023, 24(1): 239-248.

[8] JIANG Y, ZHU P, GAO Y, et al. miR-379-5p inhibits cell proliferation and promotes cell apoptosis in non-small cell lung cancer by targeting β -arrestin-1 [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(6): 4499-4508.

[9] MENG L, DU Y, DENG B, et al. miR-379-5p regulates the proliferation, cell cycle, and cisplatin resistance of oral squamous cell carcinoma cells by targeting ROR1 [J]. *Am J Transl Res*, 2023, 15(3): 1626-1639.

[10] ZHANG F, DUAN C, YIN S, et al. microRNA-379-5p/YBX1 axis regulates cellular EMT to suppress migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 4335-4346.

[11] YANG K, LI D, JIA W, et al. miR-379-5p inhibits the proliferation, migration, and invasion of breast cancer by targeting KIF4A [J]. *Thorac Cancer*, 2022, 13(13): 1916-1924.

[12] ZHANG G, LI H, SUN R, et al. Long non-coding RNA ZEB2-AS1 promotes the proliferation, metastasis and epithelial mesenchymal transition in triple-negative breast cancer by epigenetically activating ZEB2 [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(5): 3271-3279.

[13] 李晓娟, 李兴杰, 冯帆, 等. BALB/c 突变卷毛小鼠肝癌移植模型对比分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(7): 85-88.

LI X J, LI X J, FENG F, et al. Comparative analysis of liver cancer transplantation model in BALB/c mutant curly mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(7): 85-88.

[14] 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.

[15] RASHID A A, HUSSEIN R A M, WAFEE N W N. Assessing the quality of life in breast cancer women: a cross sectional descriptive study [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2022, 23: 2299-2307.

[16] DENG M, ZHANG Z, LIU B, et al. Localization of GPSM2 in the nucleus of invasive breast cancer cells indicates a poor prognosis [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 227.

[17] HE B, ZHAO Z, CAI Q, et al. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(14): 2628-2647.

[18] WANG H, TAN Z, HU H, et al. microRNA-21 promotes breast cancer proliferation and metastasis by targeting LZTFL1 [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 738.

[19] YU Y Z, MU Q, REN Q, et al. miR-381-3p suppresses breast cancer progression by inhibition of epithelial-mesenchymal transition [J]. *World J Surg Oncol*, 2021, 19(1): 230.

[20] ZHANG M, BAI X, ZENG X, et al. circRNA-miRNA-mRNA in breast cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2021, 523: 120-130.

[收稿日期] 2023-07-11

刘艺,李小雷,梁新培,等. 两种常用压力性损伤大鼠模型的建立方法与效果评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 93-101.

Liu Y, Li XL, Liang XP, et al. Establishment and evaluation of two common pressure ulcer rat models [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 93-101.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.012

两种常用压力性损伤大鼠模型的建立方法与效果评价

刘艺¹,李小雷²,梁新培³,王娜⁴,马珊⁴,张新平⁴,贾汝福⁵,张素³,李贤^{4*}

(1.河北医科大学研究生院,石家庄 050000;2.河北省疾病预防控制中心,石家庄 050000;

3.北京大学人民医院,北京 100000;4.河北省人民医院,石家庄 050000;

5.沧州市中心医院,河北 沧州 061000)

【摘要】 目的 通过比较两种不同的压力性损伤大鼠模型的建立方法,探索更合适的压力性损伤动物模型制备方法。**方法** 将 18 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组($n=6$)、模型 A 组($n=6$)和模型 B 组($n=6$)。对照组对模拟造模部位脱毛后进行碘伏处理。模型 A 组采用单纯深部组织异物植入法进行纵向加压;模型 B 组使用磁铁加压法进行横向加压,记录制备各组大鼠产生压力性损伤模型的全程时间及各分期时间,观察大鼠的一般情况,并进行成模率、死亡率、感染率的比较。**结果** 肉眼观察到模型 A 组和模型 B 组均逐渐出现受压部位红肿、溃烂,出现渗血、渗液并伴有坏死现象。模型 A 组与模型 B 组产生压力性损伤全程时间比较:两组之间差异有统计学意义($P<0.05$)。模型 A 组与模型 B 组产生压力性损伤各期时间比较:Ⅰ期两组之间差异无统计学意义($P>0.05$);Ⅱ期两组之间差异有统计学意义($P<0.05$);Ⅲ期两组之间差异有统计学意义($P<0.05$);Ⅳ期两组之间差异有统计学意义($P<0.05$)。对照组大鼠精神、运动评分与模型 A 组、模型 B 组比较有显著性差异($P<0.05$)。模型 A 组大鼠与模型 B 组大鼠一般状态有明显区别,均出现毛色黯淡、活跃度下降的现象。模型 A 组大鼠与模型 B 组成模率为 100%。模型 A 组死亡率、感染率高于模型 B 组,分别为 33.34%、16.70%。**结论** 两种方式均可成功制备压力性损伤Ⅳ期模型,二者既有共性也有各自特点,磁铁加压法用时短,大鼠一般状态良好,死亡率和感染率低,适合短时间内干预性研究;单纯深部组织异物植入法用时长,需要大鼠有一定耐受性,感染率高,死亡率高,可运用于长期的观察类压力性损伤大鼠的研究。

【关键词】 压力性损伤;大鼠模型;方法

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0093-09

Establishment and evaluation of two common pressure ulcer rat models

LIU Yi¹, LI Xiaolei², LIANG Xinpei³, WANG Na⁴, MA Shan⁴, ZHANG Xinping⁴, JIA Rufu⁵, ZHANG Su³, LI Xian^{4*}

(1. Graduate School of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China. 2. Hebei Center for Disease

Control and Prevention, Shijiazhuang 050000. 3. Peking University People's Hospital, Beijing 100000.

4. Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050000. 5. Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061000)

【Abstract】 Objective A comparison of two method of establishing pressure ulcer rat models to determine which is the most suitable for experimental use. **Methods** 18 male SD rats were randomly divided into control ($n=6$), model A

【基金项目】河北省卫生健康委员会 2020 年政府资助临床医学人才培养项目(冀卫办科教[2021]1 号)。

【作者简介】刘艺(1999—),女,硕士研究生,研究方向:临床护理,护理管理。E-mail:liuyi123611@163.com

【通信作者】李贤(1966—),女,教授,硕士生导师,研究方向:临床护理,护理管理,老年护理。E-mail:lixian1966@126.com

($n=6$) and model B ($n=6$) groups. In the control group, iodophor treatment was given after hair removal at the simulated modeling site. In model group A, longitudinal compression was performed by simple deep-tissue foreign body implantation. In model group B, transverse compression was performed via the magnet compression method. The times required to complete the process and for each stage of pressure ulcer model establishment in each group were recorded. The general condition of the rats was observed, and the modeling rate, mortality rate, and infection rate were compared. **Results** By naked eye, we observed that the model A and model B groups gradually developed redness and swelling, ulceration, bleeding, exudation, and necrosis. Comparison of the whole time to produce pressure ulcer between model A and model B groups; the difference between the two groups was statistically significant ($P<0.05$). Comparison of the time to produce pressure injury between Model A and Model B; The difference between the two groups at stage I was not statistically significant ($P>0.05$); the difference between the two groups at stage II was statistically significant ($P<0.05$); the difference between the two groups at stage III was statistically significant ($P<0.05$); the difference between the two groups at stage IV was statistically significant ($P<0.05$). The mental and sports scores of the rats in the control group were significantly different from those in the model A and model B groups ($P<0.05$). The general state of rats in the model group A was significantly different from that in the model B group, and coat color was dimmer and activity decreased in the model group A. The modelling rate of rats in both model A and model B groups was 100%. The mortality and infection rates of the model group A were higher than those of the model group B, which were 33.34% and 16.70%, respectively. **Conclusions** Successful preparation of a four-stage model of pressure ulcers in both modalities. The two methods have both commonalities and distinct characteristics. The magnet compression method required less time, the rats were generally in good condition, and the mortality and infection rates were low; thus it is suitable for short-term intervention research. The simple deep-tissue foreign body implantation method took longer, required rats to have a certain level of tolerance, had high infection and mortality rates, and is more suitable for use for long-term observations of pressure ulcers.

【Keywords】 pressure ulcer; rat model; method
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

压力性损伤是指由压力或压力联合剪切力导致的皮肤和/或皮下组织的局部损伤,通常位于骨隆突处,但也可能与医疗器械或其他物体有关^[1]。目前,我国老龄化程度进一步加深,随着老年患者慢性病的患病率增高,压力性损伤的发生率依然很高,治疗不当会继发感染,危及患者生命,给患者带来巨大的痛苦。据研究显示,国外的老龄卧床患者发生率为 5.0%~23.1%^[2],我国的老龄卧床患者发生率可高达 62.5%^[3]。压力性损伤发生率的居高不下,不仅消耗巨大的医疗卫生资源,也给社会带来了沉重的负担^[4],在美国,压疮的治疗成本保守估计为每年 16.8~68.0 亿美元,超过美国医疗总预算的 1%^[5]。

压力性损伤也成为研究的热点之一,简单可靠的动物模型是治疗压力性损伤临床前研究的保障,为寻求更好的治疗方案,我们需要探索合适的动物模型,大鼠皮肤与人类皮肤组织具有相似性,并因其经济、可操控性强的特点,成为压力性损伤模型的首选实验对象。实验研究中常用到的模型为磁铁夹压组织损伤模型和单纯深部组织异物植入模型。基于此,本实验以雄性 SD(Sprague Dawley)大鼠为造模对象,通过对磁铁加压组织和单纯深部组

织异物植入两种造模方式作横向对比,对模型成功率、感染率、死亡率以及产生压力性损伤时间等进行统计分析,以期筛选稳定且短时间内可重复的压力性损伤大鼠模型提供客观数据支持,为临床护理提供基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级的健康雄性 SD 大鼠 18 只,6~8 周龄,体重(200±20)g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2019-0008],饲养于河北省人民医院实验动物中心 SPF 级屏障动物设施内[SYXK(冀)2020-0005]。房间控制光照/黑暗 12 h/12 h,温度 20~26℃,湿度 50%~70%,自由摄食、水,使其适应所处实验环境,直至达到适合年龄。实验动物及实验步骤符合国家实验动物管理条例,严格遵循实验动物使用的 3R 原则,实验已获河北省人民医院动物伦理委员会批准(202326)。

1.2 主要试剂与仪器

8%硫化钠(天津泰兴化学试剂厂,批号:7757-83-7);1%戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司,批号:P3761);非吸收性外科缝线(南通华利康医疗器

械有限公司,B-103);医用缝合针(江西成元科技有限公司,YY0043-2005);5 mL 注射器(江苏治宇医疗器械有限公司,苏食药械生产许 20010243 号);10 mL 注射器(江苏治宇医疗器械有限公司,苏食药械生产许 20010243 号);手术剪(湖南可孚医疗科技发展有限公司,湘长械备 20160011);止血钳(湖南可孚医疗科技发展有限公司,湘长械备 20180176);持针钳(湖南可孚医疗科技发展有限公司,湘长械备 20180176);医用脱脂纱布块(河南省安宇医疗科技开发有限公司,豫食药监械生产许 200700045 号);碘伏(山东利尔康医疗科技股份有限公司,鲁卫消证字(2002)第 0059 号)。圆片形铁片(直径 15.0 mm,厚 0.3 mm,重 0.6 g,高压灭菌消毒)购自超强磁业深圳有限公司,批号:ASTM08F;圆形磁铁(直径 15.0 mm,厚 5 mm,重 2.6 g,磁通量高达 3000 高斯)购自深圳市天士凯电子有限公司,批号:NDB2Z-63;扭力天平(精确到小数点后 3 位)购自上海魅宇仪器设备有限公司,批号:型号 TN-100F。

1.3 实验方法

1.3.1 造模原理

缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是组织器官缺血一段时间后,血液重新灌注冲击血管,导致组织器官损伤进一步加重的现象^[6]。皮肤组织长时间缺血会影响灌注量,多次缺血再灌注灌注会形成皮肤软组织特异性损伤,抗氧化能力受到影响,形成过度氧化应激反应,对压力性损伤产生部位的伤口愈合造成直接的伤害,进而引起炎症。

1.3.2 分组和造模

依据大鼠体重,随机将 18 只雄性 SD 大鼠分为对照组、模型 A 组和模型 B 组,每组 6 只。3 组大鼠实验前禁食、禁水 8 h。模型 A 组采用纵向加压法,

使用 Wassermann 等^[7]的方法,大鼠经 1%戊巴比妥钠溶液 0.4 mL/100 g 腹腔注射麻醉后,在其背部正中线右侧臀部脱毛处理备皮区域大小为 5 cm×5 cm,用碘伏消毒手术区域。在大鼠左臀部靠近头端切一 2 cm 的切口,用镊子钝性分离筋膜和组织,将无菌铁片置于肌肉下面,用 4-0 的 dexon 聚羟基乙酸线缝合切口,再用碘伏消毒缝合处以防感染。48~72 h 后,伤口恢复,无红肿感染迹象,模型 A 组大鼠接受缺血再灌注造模,在体外放置圆形磁铁对肌肉和皮肤产生压力,造成局部组织缺血,每次加压 2 h 后将磁铁取下血流灌注 0.5 h,如此循环,每天大鼠连续进行 5 个循环后将磁铁取下,第 2 天早上重复以上步骤(图 1A)。模型 B 组大鼠采用横向加压法,使用王旌臻等^[8]改良的方法,单笼适应性饲养 1 周后,用 8%的硫酸钠给大鼠脱毛,备皮区域在背部正中线右侧臀部,脱毛后涂抹碘伏消毒。依次以两块 75%乙醇消毒磁铁将背部皮肤对称夹起,中间折叠长度约 1 mm。压迫 3 h,放松 0.5 h 为 1 个循环,两次循环后继续压迫 16 h 至次日清晨(图 1B)。正常组对模拟造模部位脱毛后进行碘伏消毒处理(图 1C)。

1.3.3 观察指标

(1) 全程成模时间

观察记录使用两种方法制备压力性损伤模型产生的全程时间,即模型 A 组和模型 B 组从脱毛开始至Ⅳ期压力性损伤模型形成的总时间。

(2) 各期成模时间

每隔 2.5 h,取下磁铁,分别观察记录模型 A 组,模型 B 组大鼠从磁铁加压开始至Ⅰ期、Ⅱ期、Ⅲ期、Ⅳ期压力性损伤各分期产生的时间。成模标准参考张亚楠等^[9]的研究,Ⅰ期标准造模区域皮肤组织完整,压迫区域出现触之不褪色的红斑;Ⅱ期标



注:A:模型 A 组造模过程;B:模型 B 组造模过程;C:对照组皮肤。

图 1 各组大鼠造模过程

Note. A, Modeling process of model group A. B, Modeling process of model group B. C, Control group skin.

Figure 1 Modeling process of each group of rats

准造模区域皮肤暗红,周边红肿,不出现出血破溃的现象,压按局部皮肤出现清晰疼痛感;Ⅲ期标准压迫处皮肤变硬变黑,针扎不流血,无疼痛感,肉眼可见到脂肪漏出,但还看不见其他皮下组织;Ⅳ期标准受压部位红肿、溃烂,出现渗血、渗液并伴有坏死现象,针扎皮肤没有明显疼痛,皮肤变硬、变黑,可看到肌肉、肌腱、骨骼的暴露。

(3) 一般情况

观察各组大鼠的毛色、活跃程度、体重变化,精神运动状态等一般情况。通过观察参考张译心等^[10]建立的大鼠运动、精神状态评分表给各分期大鼠的精神及运动状态分别进行评分,分值越高,表明大鼠运动及精神状态越差(表 1)。

(4) 成模率、感染率和死亡率

造模成功率:成模率=各组成模大鼠数量/各组大鼠总数×100%;造模感染率:感染率=各组感染大鼠数量/各组大鼠总数×100%;造模死亡率:分别计算两组大鼠产生Ⅳ期压力性损伤时的造模死亡率,造模死亡率=各组死亡大鼠数量/各组大鼠总数×100%。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 27.0 软件进行统计分析,所有符合正态分布计量资料以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 graphPad prism 9.3.0 作图。两组之间应用 *t* 检

验进行比较。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠造模情况

模型 A 组、模型 B 组均能成功复制压力性损伤模型 I ~Ⅳ期。模型 A 组、模型 B 组大鼠造模区域皮肤组织完整,压迫区域出现触之不褪色的红斑,证明出现 I 期压力性损伤。模型 A 组、模型 B 组皮肤暗红,周边红肿,不出现出血破溃的现象,压按局部皮肤出现清晰疼痛感,证明出现 II 期压力性损伤。模型 A 组、模型 B 组压迫处皮肤变硬变黑,针扎不流血,无疼痛感,肉眼可见到脂肪漏出,但还看不见其他皮下组织,证明出现 III 期压力性损伤。模型 A 组、模型 B 组受压部位红肿、溃烂,出现渗血、渗液并伴有坏死现象,针扎皮肤没有明显疼痛,皮肤变硬、变黑,可看到肌肉、肌腱、骨骼的暴露,证明出现Ⅳ期压力性损伤。模型 B 组较模型 A 组来看,出现压力性损伤面积更大,效果更加显著(图 2)。

2.1.1 全程压力性损伤产生时间比较

模型 A 组与模型 B 组产生压力性损伤全程时间比较,两组之间差异有统计学意义(*P*<0.05),模型 A 组压力性损伤产生全程时间((10.50±1.38) d)显著高于模型 B 组((4.00±6.00) d,*P*<0.0001)(图 3)。

表 1 运动和精神状态评分表
Table 1 A rating scale for state of motion and state of mind

评分 Score	运动状态 Motion state	精神状态 Mental state
0 分 0 point	活跃 Activity, even the slightest sound, caused the rats to raise their heads	正常 Normal
1 分 1 point	行动迟缓,声响加重才抬头 Rats were slow to move, and the sound made the rats louder before they raised their heads	呆滞 Dull
2 分 2 point	对声响无反应,抓起再放下后无行动 No response to sound, pick up and then put down after no action	萎靡 Listlessness

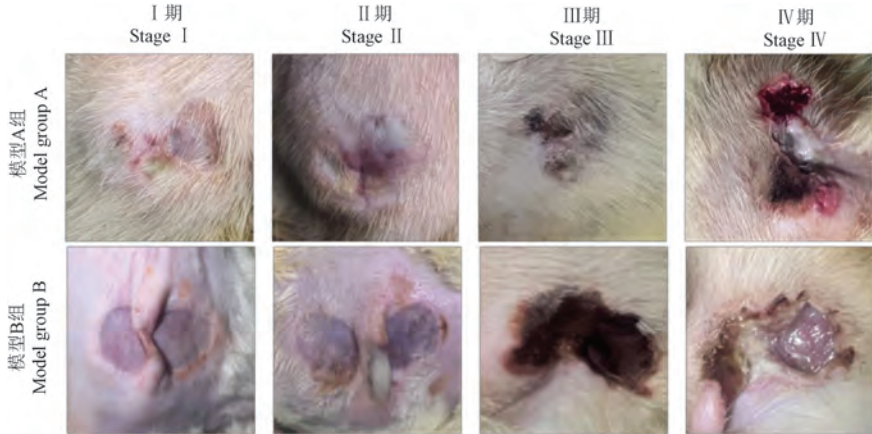


图 2 模型 A 组、B 组造模情况
Figure 2 Model group A, Model group B modeling situation

2.1.2 各期压力性损伤产生时间比较

模型 A 组与模型 B 组产生各期压力性损伤时间比较, I 期两组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$); II 期两组之间差异有统计学意义 ($P<0.05$); III 期两组之间差异有统计学意义 ($P<0.05$); IV 期两组之间差异有统计学意义 ($P<0.05$; 表 2), 从两组大鼠各期压力性损伤出现时间横向比较来看, 模型 A 组较模型 B 组 III 期、IV 期压力性损伤时差异更显著(图 4)。

2.2 一般情况

2.2.1 一般情况观察

实验开始前各组大鼠精神状态良好, 反应灵敏、毛色有光泽。造模期间对照组大鼠毛色光泽柔顺光滑, 无掉毛现象, 活动正常, 反应敏捷; 模型 A、B 组两组大鼠状态较差, 体重均有不同程度下降, 饮食量有不同程度减少。模型 A 组部分大鼠毛发脱落, 干枯无光泽, 反应迟钝, 出现跛行、拖行的行为。模型 B 组大鼠毛发黯淡发黄, 反应变慢, 行动迟缓。

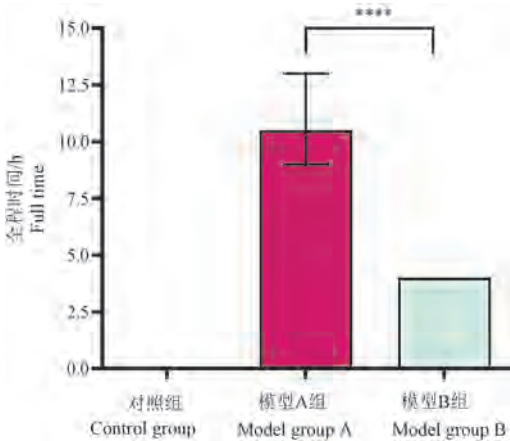
2.2.2 一般状态评分

结果显示, 对照组大鼠精神、运动评分与模型 A

组、模型 B 组比较存在差异(表 3), 对照组大鼠精神状态、运动状态评分始终为 0, 表明对照组大鼠精神状态良好, 行动活跃; 模型 A 组大鼠 0~III 期精神评分、运动评分增长趋势较快, 并且该组精神状态评分、运动状态评分始终高于模型 B 组大鼠, 说明模型 B 组大鼠在 0~III 期的精神状态和运动状态始终好于模型 A 组大鼠。IV 期时, 模型 A 组大鼠精神评分与模型 B 组精神评分相等, 均达到最大值, 没有显著性差异。表明大鼠精神状态由呆滞转为萎靡; 模型 A 组运动评分则高于模型 B 组运动评分。两组大鼠各期精神和运动状态评分变化趋势, 说明大鼠精神状态逐渐由正常转为萎靡, 行动逐渐变得迟缓, 且均有显著性差异 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.0001$; 图 5)。

2.3 大鼠造模成功率、死亡率、感染率的比较

对照组成模 0 只、死亡 0 只、感染 0 只; 模型 A 组成模 6 只, 死亡 2 只, 感染 1 只, 对照组成模率、死亡率和感染率均为 0%; 模型 A 组成模率 100%, 死亡率 33.34%, 感染率 16.70%; 模型 B 组成模率 100%, 死亡率和感染率均为 0%(表 4)。



注: 与模型 A 组比较, **** $P<0.0001$ 。

图 3 压力性损伤产生全程时间比较

Note. Compared with model group A, **** $P<0.0001$.

Figure 3 Comparison of the whole time of pressure ulcer

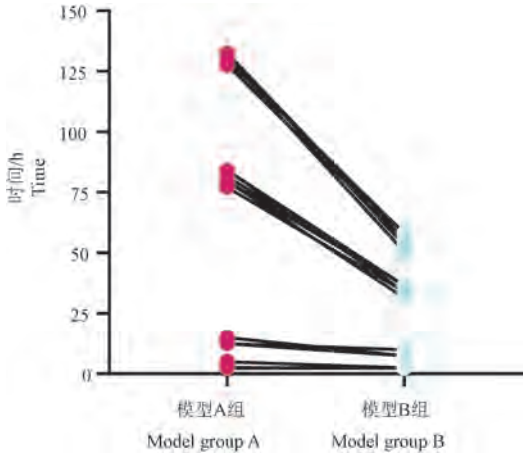


图 4 两组大鼠各期压力性损伤出现时间横向比较

Figure 4 Cross-sectional comparison of the time of onset of pressure ulcers in the two groups of rats at various stages

表 2 各期压力性损伤产生时间比较($n=6$)

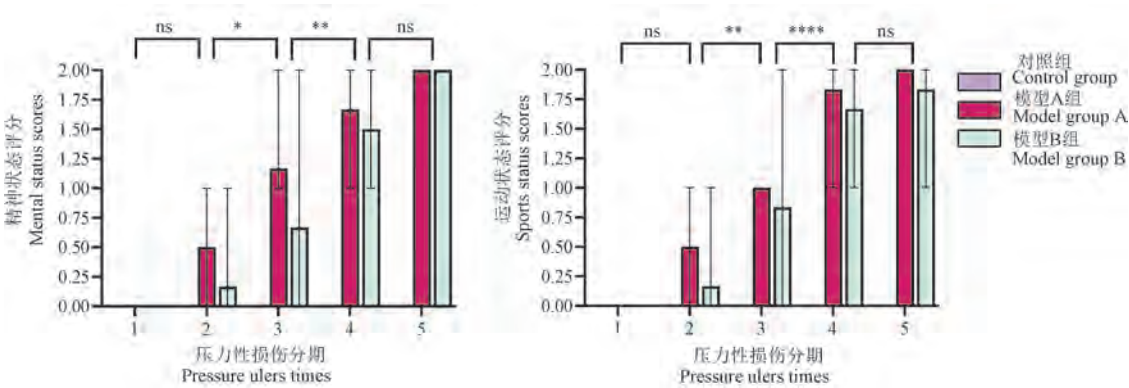
Table 2 Comparison of the time of onset of pressure ulcers by stage

周期 Stage	模型 A 组 Model group A	模型 B 组 Model group B	MeanDiff(95% CI)	<i>t</i>	<i>P</i>
I	2.92±1.02	2.50±0.00	0.42(-0.65, 1.49)	1.000	0.363
II	12.92±1.02	7.92±1.02	5.00(3.34, 6.66)	7.746	<0.001
III	80.92±2.78	34.83±2.04	46.08(43.07, 49.10)	39.320	<0.001
IV	130.83±2.04	54.67±2.58	76.17(72.58, 79.75)	54.622	<0.001

表 3 各组大鼠产生不同压力性损伤分期的一般状态评分情况 (n=6)

Table 3 General status scores for each group of rats producing different stages of plessure ulcers

组别 Groups	0 期 Stage 0		I 期 Stage I		II 期 Stage II		III 期 Stage III		IV 期 Stage IV	
	运动 Motion	精神 Mental	运动 Motion	精神 Mental	运动 Motion	精神 Mental	运动 Motion	精神 Mental	运动 Motion	精神 Mental
对照组 Control group	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
模型 A 组 Model group A	0	0	3	3	6	7	11	10	12	12
模型 B 组 Model group B	0	0	1	1	5	4	10	9	11	12



注:与模型 A 组比较, * P<0. 05, ** P<0. 01, **** P<0. 0001。

图 5 大鼠一般状态评分观察

Note. Compared with model group A, * P<0. 05, ** P<0. 01, **** P<0. 0001.

Figure 5 Observation of general status score of rat

表 4 不同造模组的成模率、死亡率和感染率 (n=6)

Table 4 Modeling rate, mortality rate and infection rate of different modeling groups

组别 Groups	成模率/% Success rate	死亡率/% Mortality rate	感染率/% Infection rate
对照组 Control group	0	0	0
模型 A 组 Model group A	100	33. 34	16. 70
模型 B 组 Model group B	100	0	0

3 讨论

压疮是衡量医院医疗护理质量的重要考核指标,更是影响患者健康的常见并发症^[11]。目前,我国人口老龄化程度不断加深,老年人口的占比逐渐增加,国内外预防压力性损伤的发生和应用于压力性损伤的治疗虽获得了重大进展,但压力性损伤的发生率仍居高不下,因此提高压疮愈合率和降低死亡率仍是临床研究的重点难题^[12]。由于伦理的限制,许多实验不宜在临床病人身上进行,因此,使用

实验动物模型进行实验,对探索压力性损伤机制及预防压力性损伤产生具有重要意义^[13]。

缺血再灌注机制是压力性损伤形成最重要的机制,该机制指出缺血的组织或器官在受压一段时间后恢复血流反而导致器官组织损伤进一步加重,这可能与缺血后产生的自由基所造成细胞损伤有关^[14]。目前,国内外常用的压力性损伤模型都是以该发生机制为基础进行制备。依据该发生机制,目前有多种不同的造模方法,比如磁铁加压法、深部组织异物植入法、机械压迫法^[15](即自行设置机械加压装置进行造模^[16])、细菌感染法^[17]以及弹簧压迫法等,针对于不同实验周期应选择不同的干预造模方法^[18]。在造模方法的选择上,不仅要考虑操作的难易程度和实验的成本,更要考虑造模效果是否符合压疮在临床上的实际情况、后期实验指标研究的要求及药物对实验干预效果的观察。因此,深部组织异物植入法和磁铁加压法由于其简便易行和成本低廉成为目前最常用的两种造模方法。

从成模时间来看,单纯深部组织异物植入法产

生压力性损伤的全程时间和各分期时间均长于磁铁加压法,单纯深部组织异物植入法在产生Ⅲ期、Ⅳ期压力性损伤时差异更显著。这是因为单纯深部组织异物植入法经手术将铁片放置到大鼠臀肌下,通过磁力使磁铁固定在计划产生压力性损伤的皮肤表皮侧,前期准备时间较长,通常需要 48~72 h 手术伤口才会愈合,恢复速度较慢。磁铁加压法不需麻醉,无需手术,直接进行磁铁加压,耗时短,成模快。单纯深部组织异物植入法优点是模型稳定,更易精准地把控产生Ⅲ期、Ⅳ期的深部组织压力性损伤的时间,不会出现时间过快导致分期界限模糊,错过最佳观察时机的情况,有利于观察类压力性损伤实验各分期的精细化研究。而磁铁加压法相较于深部组织异物植入法更易在短时间内产生浅层皮肤压力性损伤,并且由于难以对两磁铁中间的大鼠皮肤折叠长度进行标准化把控,因此不易评估肌肉层是否产生损伤,有可能影响后期实验的进行。单纯深部组织异物给压力性损伤相关的实验提供了实验观察的足够时间,有利于研究者调整实验方向,及时改进实验方案。复制率高、专一性强、再现性好是一个动物模型应该具备的优良特点^[19]。磁铁加压法易复现,无需麻醉,简化实验操作,造模时间快,减少了时间和培训人员的成本,适合需要快速制备深部压力性损伤模型的研究方案,因此适合一些短期的实验研究,以便后期干预性实验的顺利进行。研究者可根据自己需求任意选择产生浅期压力性损伤的造模方法。

从一般状况来看,单纯深部组织异物植入法和磁铁加压法造模成功后,实验大鼠的一般状态均受到不同程度的影响。使用单纯深部组织异物植入法的实验动物,初始精神、运动状态比使用磁铁加压法的动物更差。这是因为铁片植入大鼠体内,不可避免地造成组织损伤,这就要求对铁片进行高温无菌处理,手术过程中必须严格执行无菌操作,避免术中感染。单纯深部组织异物植入法较磁铁加压法更复杂,该造模方法属于侵入性模型^[20],操作时需要将实验动物麻醉,切开皮肤及皮下组织,侵入性造模对于造模位置、深度、组织的把握都相对精准,但缺点是实验动物免疫力降低,出现萎靡不振、灵敏度下降的状态,不利于后期施加干预实验。压力性损伤模型的建立与造模工具有很大的关联,磁铁加压法属于非侵入性模型^[21],仅需要在实验动物的背部剃毛,因此大鼠可在正常状态下自由摄食

水,这能将实验动物的损伤降到最小,最大程度地使实验动物保持良好的精神、运动状态,适合大规模进行实验。但操作时需要反复将磁铁摘取,该方法不易使磁铁保持在同一个位置上,与临床中压力性损伤的形成过程有异,会在一定程度上影响实验效果。潘叙恩等^[22]报道,3R 原则提出以来,实验动物福利的问题得到了更多的关注,人们越来越重视利用体外模型和实验方法代替动物实验进行医学研究。磁铁加压的表皮造模方法相较于单纯深部组织异物植入法而言,不需要切开大鼠皮肤,无需对大鼠进行麻醉,减少了大鼠的不适感,维持了最佳的实验状态,有利于后续实验的推进。并且磁铁加压法操作过程相对简单,学习曲线更短,因此值得推广。

从成模率、死亡率、感染率来看,两种方法均能制备出Ⅳ期压力性损伤模型。本研究过程中死亡大鼠均采用单纯深部组织异物植入法造模,推测 1 只在出现Ⅳ期压力性损伤时因感染死亡,1 只在Ⅳ期压力性损伤时铁片压迫内脏死亡。导致后期感染率、死亡率高于磁铁加压法进行造模的大鼠。单纯深部组织异物植入法是侵入性模型,术后对手术伤口护理操作不规范极易发生伤口感染,从而导致伤口延迟愈合甚至不愈合,严重者会导致大鼠死亡率增加,影响实验进度。研究表明,造模过程中减少麻醉剂的摄入,可以避免使用麻醉剂给实验大鼠带来的负损伤,减少对大鼠行为学观察以及对实验相关的观测指标造成的干扰等弊端^[23]。使用磁铁加压法造模的大鼠,在无麻醉状态下进行实验,属于非侵入性缺血再灌注模型,无需严格的无菌操作条件的限制,实验动物一般状况良好,无不良反应,没有感染和大鼠死亡,较其他造模方式副作用更小,极大程度提高了该模型的稳定性。

综上所述,两种造模方法均能成功制备大鼠压力性损伤的模型。单纯深部组织异物植入法适合长期进行的观察类研究,以及针对压力性损伤各分期的对比研究。磁铁加压法适合短期的干预性研究以及针对压力性损伤的愈合性研究等,实验时应结合各自的研究需求选择适合的动物造模方法。本研究通过比较两种常用性压力性损伤制备方法,明确了两类模型的适用范围及各自的优缺点,并且规范了常用压力性损伤模型制备的操作流程,为后续护理人员进行压疮相关临床研究提供充分的理论依据。

参考文献:

- [1] 陈丽娟, 孙林利, 刘丽红, 等. 2019 版《压疮/压力性损伤的预防和治疗: 临床实践指南》解读 [J]. 护理学杂志, 2020, 35(13): 41-43, 51.
- CHEN L J, SUN L L, LIU L H, et al. An interpretation of the International Clinical Practice Guideline for the prevention and treatment of pressure ulcers/injuries 2019 [J]. J Nurs Sci, 2020, 35(13): 41-43, 51.
- [2] WESTBROOK J I, LI L, LEHNBOM E C, et al. What are incident reports telling us? A comparative study at two Australian hospitals of medication errors identified at audit, detected by staff and reported to an incident system [J]. Int J Qual Health Care, 2015, 27(1): 1-9.
- [3] MERVIS J S, PHILLIPS T J. Pressure ulcers: Pathophysiology, epidemiology, risk factors, and presentation [J]. J Am Acad Dermatol, 2019, 81(4): 881-890.
- [4] HARTMANN C W, SOLOMON J, PALMER J A, et al. Contextual facilitators of and barriers to nursing home pressure ulcer prevention [J]. Adv Skin Wound Care, 2016, 29(5): 226-238.
- [5] 贾晓明. 压疮的流行病学特点及诊断与治疗进展 [J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2018, 13(1): 4-7.
- JIA X M. Epidemiological characteristics and diagnosis and treatment progress of pressure ulcer [J]. Chin J Inj Repair Wound Heal Electron Ed, 2018, 13(1): 4-7.
- [6] 兰园淞, 高文, 廖海涛, 等. 超氧化物歧化酶、丙二醛和内皮素在大鼠压疮模型损伤中的表达及作用 [J]. 护理学报, 2017, 24(9): 1-6.
- LAN Y S, GAO W, LIAO H T, et al. Expression and role of superoxide dismutase, malondialdehyde and endothelin in rat model of pressure ulcer injury [J]. J Nurs China, 2017, 24(9): 1-6.
- [7] WASSERMANN E, VAN GRIENSVEN M, GSTALTNER K, et al. A chronic pressure ulcer model in the nude mouse [J]. Wound Repair Regen, 2009, 17(4): 480-484.
- [8] 王旌臻, 胡芳, 张杰, 等. 大鼠 4 期压力性损伤模型的快速制备 [J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(3): 464.
- WANG J Z, HU F, ZHANG J, et al. Rapid preparation of phase 4 pressure ulcer model in rats [J]. Chin J Exp Surg, 2020, 37(3): 464.
- [9] 张亚楠, 李贤, 严德云, 等. 构建各期大鼠压疮模型方法的实验研究 [J]. 护理研究, 2017, 31(31): 3945-3948.
- ZHANG Y N, LI X, YAN D Y, et al. Experimental study on establishing method of pressure ulcer model of rats [J]. Nurs Res China, 2017, 31(31): 3945-3948.
- [10] 张译心, 王鑫, 刘博, 等. 2 型糖尿病气阴两虚病证结合动物模型的制备及评价指标的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 219-229.
- ZHANG Y X, WANG X, LIU B, et al. Preparation of animal model of type 2 diabetes with Qi-Yin deficiency syndrome and establishment of evaluation index [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 219-229.
- [11] GREŠŠ HALÁSZ B, BÉREŠOVÁ A, TkÁCOVÁ L, et al. Nurses' knowledge and attitudes towards prevention of pressure ulcers [J]. Int J Environ Res Public Health, 2021, 18(4): 1705.
- [12] 施晓宇, 蒋琪霞, 刘喜平. 营养支持在老年压疮病人预后影响因素中重要性的临床分析 [J]. 肠外与肠内营养, 2020, 27(1): 37-41.
- SHI X Y, JIANG Q X, LIU X P. Nutritional support as an important prognostic factor of older patients with pressure ulcers [J]. Parenter Enter Nutr, 2020, 27(1): 37-41.
- [13] 徐烽, 樊炜静, 张寅峰, 等. 老年慢性创面动物模型的建立及研究进展 [J]. 实验动物科学, 2021, 38(4): 73-77.
- XU F, FAN W J, ZHANG Y F, et al. Establishment and research progress of animal model of chronic wound in elderly [J]. Lab Anim Sci, 2021, 38(4): 73-77.
- [14] 刘立华, 卫洁, 朱惠红, 等. 基于文献计量学探索我国压疮相关基础实验的研究现状 [J]. 循证护理, 2020, 6(11): 1268-1273.
- LIU L H, WEI J, ZHU H H, et al. Research about status quo of basic experiment related to pressure ulcers in China: a bibliometric analysis [J]. Chin Evid Based Nurs, 2020, 6(11): 1268-1273.
- [15] 肖洪玲, 龙子江, 施慧, 等. 压疮灵对大鼠压疮模型局部 SOD、MDA、VEGF 和 EGF 表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(1): 137-140.
- XIAO H L, LONG Z J, SHI H, et al. Effects of Yachuangling on the expression of SOD, MDA, VEGF and EGF in rats exposed pressure ulcer [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2016, 32(1): 137-140.
- [16] 郭玉怀, 孙忠人, 孙琦, 等. 简易大鼠压疮缺血再灌注模型造模装置的设计及应用 [J]. 护理研究, 2015, 29(5): 592-593.
- GUO Y H, SUN Z R, SUN Q, et al. Design and application of molding device of simple ischemia reperfusion rats model with pressure ulcer [J]. Chin Nurs Res, 2015, 29(5): 592-593.
- [17] 吴晓文, 王爱洁, 李晓晶, 等. 褥疮康对体表溃疡模型小鼠创面愈合的影响 [J]. 食品与药品, 2013, 15(6): 402-404.
- WU X W, WANG A J, LI X J, et al. Effect of ruchuang Kang on the healing of body surface ulcer in mice [J]. Food Drug, 2013, 15(6): 402-404.
- [18] 王厚融, 刘志凤, 于天源, 等. Minor CCI 与经典 CCI 大鼠模型成模特点的比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 1-7.
- WANG H R, LIU Z F, YU T Y, et al. Comparison of the characteristics of Minor and classic CCI models [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 1-7.
- [19] 刘克辛. 肝疾患基础及其实验动物模型 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003.
- LIU K X. The basis of liver disease and its experimental animal model [M]. Beijing: China Medical Science and Technology

Press, 2023.

[20] 孙忠人, 杨蕊, 郭玉怀, 等. 压力性损伤动物模型的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(4): 1920–1923.
SUN Z R, YANG R, GUO Y H, et al. Research progress of animal models by pressure injury [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(4): 1920–1923.

[21] SAMI D G, ABDELLATIF A. Histological and clinical evaluation of wound healing in pressure ulcers: a novel animal model [J]. J Wound Care, 2020, 29(11): 632–641.

[22] 潘叙恩, 卢章顺, 杨光, 等. 皮肤腐蚀和皮肤刺激替代试验的发展及其在化学品危险性分类的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 99–106.

PAN X E, LU Z S, YANG G, et al. Application of alternative tests of skin corrosion and irritation for chemical hazard classification [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 99–106.

[23] 于杰, 孙忠人, 李洪玲, 等. 对大鼠压疮缺血-再灌注损伤模型构建及应用的思考 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(7): 1210–1214.
YU J, SUN Z R, LI H L, et al. Reflection on the establishment and application of the model of pressure ulcer in rats with ischemia reperfusion injury [J]. Prog Mod Biomed, 2017, 17(7): 1210–1214.

[收稿日期]2023-05-30

(上接第 84 页)

[22] 李晒, 李丽, 闵思敏, 等. 大豆异黄酮可减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤: 基于抑制铁死亡及炎症级联反应 [J]. 南方医科大学学报, 2023, 43(2): 323–331.
LI S, LI L, MIN S M, et al. Soybean isoflavones alleviate cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting ferroptosis and inflammatory cascade reaction [J]. J South Med Univ, 2023, 43(2): 323–331.

[23] ZHOU L, WANG Q. Advances of H₂S in regulating neurodegenerative diseases by preserving mitochondria function [J]. Antioxidants (Basel), 2013, 12(3): 652.

[24] LIANG G, SHI B, LUO W, et al. The protective effect of caffeic acid on global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Behav Brain Funct, 2015, 11: 18.

[25] LIU L F, HU Y, LIU Y N, et al. Reactive oxygen species contribute to delirium-like behavior by activating Cyp4/MMP9 signaling and inducing blood-brain barrier impairment in aged mice following anesthesia and surgery [J]. Front Aging Neurosci, 2022, 14: 1021129.

[26] XU M, WANG W, LU W, et al. Evodiamine prevents traumatic brain injury through inhibiting oxidative stress via PGK1/NRF₂ pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 153: 113435.

[27] HERANDES M S, XU Q, Griendling K K. Role of NADPH oxidases in blood-brain barrier disruption and ischemic stroke [J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(10): 1966.

[收稿日期]2023-04-20

陈昱君, 苏美洋伊, 王清玄, 等. 医学领域应急科技攻关项目的管理创新机制探究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 102-110.

Chen YJ, Su MYY, WANG QX, et al. Exploring the management innovation mechanisms of emergency science and technology research projects in the medical field [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 102-110.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.013

医学领域应急科技攻关项目的管理创新机制探究

陈昱君, 苏美洋伊, 王清玄, 高 苒*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 应急科技攻关项目凸显“应急”和“攻关”两个关键, 即如何高效地取得目标成果。承接此类项目的机构需要制定合理的项目管理机制, 为应急科技攻关项目的成功落实保驾护航。本文旨在通过调查研究, 调研目前医学领域应急科技攻关项目管理存在的问题, 分析可改进的措施, 提高科研管理的效率和质量。**方法** 本文结合作者实践经验, 调查相关单位的科研管理运行现状, 并就科管和科研人员最关心的管理环节开展问卷调查。基于调查反映出来的问题, 再组织专家座谈进行论证。**结果** 调研发现 (1) 目前针对应急科技攻关项目的管理规范鲜有制定; (2) 科研人员最关注的是行政审批和项目经费的问题; (3) 科管人员最关注的是如何在合法合规的前提下, 同时满足上级单位的管理以及科研人员的需求。**结论** 应急科技攻关项目与常规科技项目相比有其特殊之处, 在立项审批、经费使用、资源分配和安全等方面可以进行管理优化, 本研究针对应急科技攻关项目管理提供创新方案, 为各科研单位对此类项目的管理提供有益的经验 and 借鉴。

【关键词】 项目管理; 应急; 调查研究; 医学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0102-09

Exploring the management innovation mechanisms of emergency science and technology research projects in the medical field

CHEN Yujun, SU Meiyangyi, WANG Qingxuan, GAO Ran*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Comparative Medicine Center,
Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective Emergency technology research projects have two key aspects, “emergency” and “research”, but it is not always clear how to effectively achieve the desired result. Organizations that undertake emergency technology research projects need to develop reasonable project management mechanisms to ensure their successful implementation. In this study, we investigated the current problems faced by those managing emergency technology research projects in the medical field. We researched and analyzed possible measures to improve the efficiency and quality of scientific research management. **Methods** This study leveraged the author’s practical experience to investigate the current status of scientific research management in relevant units. Questionnaire surveys were conducted to ascertain the management aspects that most concern scientific managers and researchers. The problems raised by the survey were categorized and discussed. **Results** Through the research, we found that (1) at present, there are few management standards for emergency technology research projects; (2) the issue of greatest concern for scientific researchers is

【基金项目】 北京协和医学院教育基金会项目; 北京协和医学院中央高校基本科研业务费项目 (3332022093)。

【作者简介】 陈昱君 (1992—), 女, 助理研究员, 研究方向: 科研管理。E-mail: chenyj@cnilas.org

【通信作者】 高苒 (1980—), 女, 研究员, 研究方向: 科研管理。E-mail: gaoran@cnilas.org

administrative approval and project funding; (3) the issue of greatest concern for scientific management personnel is how to meet the management requirements of higher-level units and the needs of scientific researchers under the premise of legal compliance. **Conclusions** Emergency technology research projects have unique characteristics distinct from those of conventional technology projects. Management optimization can be carried out in terms of project approval, funding use, resource allocation, and safety. This study has provided innovative solutions to improve the management of emergency technology research projects and a useful reference of the experiences of various scientific research units in managing such projects.

【Keywords】 project management; emergency; research; medical

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

应急科技攻关项目是指应对突发应急公共事件需要,或者完成国家各级政府决议以及上级领导批示在一定时限内完成的科研任务,由有关部门组织具备条件的单位进行科技攻关而设立的项目^[1]。近年来在医学领域中,从 SARS、流感再到 MERS、新冠、猴痘疫情,由科研院所承接应急科技攻关项目已成为国家疫情防控的常规模式,通过项目的实施,为国家研究疫情防控提供重要数据和重要决策依据^[2]。随着医学领域的应急科技攻关项目数量不断增多,重大成果不断推广宣传,以及公众科学素养不断提高,项目涉及到的科研诚信问题(如伦理审批、经费使用等)受到越来越多的审视与监督^[3]。鉴于此,我们需要一个有针对性的管理制度来保障项目高质量实施,同时也可用来规范科管和科研人员行为,为涉及其中的科学研究、伦理审批、资源协调、经费使用等环节的合规性保驾护航。

应急科技攻关项目与常规科技项目相比,管理方法的特殊之处在哪里?目前各研究机构的管理现状是什么?应急科技攻关项目管理待解决问题都有哪些?都是我们首先要厘清的问题。应急科技攻关项目的管理策略,要凸显“应急”和“攻关”两个关键点^[4-6],以目的为导向,从合规、时效和质量 3 个角度去思考如何优化管理制度,以确保能够找到最优解,为项目进展的迅速推进、资源的合理分配以及研究团队的有效沟通提供帮助。同时通过总结分析此类项目管理模式,进而促进科研机构项目管理的标准化和规范化,提升科研管理队伍的业务能力水平,为应急科技攻关项目管理提供范本。

1 研究方法

1.1 开展针对依托单位如何有效管理应急科技攻关项目的问卷调研

以采集应急科技攻关项目管理中,科管和科研急难愁盼的问题为目标,设计针对依托单位如何有

效管理应急科技攻关项目调研问卷。问卷设计为两个部分:第一部分为个人信息资料填写,主要调查调研对象所在单位性质和工作岗位性质。第二部分从询问所在单位和个人是否参与过应急科技攻关项目入手,结合调研问卷逻辑设置问题^[7],用以对科研机构管理现状、科管和科研人员最关心的问题进行调研。

问卷题目定为“针对依托单位如何有效管理应急科技攻关项目的调查问卷”(表 1),通过“问卷星”第三方平台(<http://www.wjx.cn/>)发布,相关从业人员可通过自愿扫描二维码或点击链接方式匿名参与本次调查。共收回有效问卷 171 个,使用 SPSS 和 Microsoft Excel 软件对结果进行统计和分析,讨论应急科技攻关项目管理现状和需要优化的措施。

1.2 开展应急科技攻关项目管理现状的调研

通过 SARS、新冠等医学领域应急科技攻关项目立项情况,对参与过此类项目的单位和个人开展调研,采用信息检索、专家咨询和座谈的方式,调研项目管理现状,收集科管和科研人员最关心的管理问题,掌握调研对象对应急攻关项目管理和运行机制的诉求。

2 调研数据与分析

2.1 问卷调研数据与分析

2.1.1 问卷调研对象分布

通过问卷 1~3 题的结论可知,本次调研对象的单位类型包括部委机关、研究所、高校、医院、企业等,调研群体包括项目管理机构人员、项目依托单位管理人员、科研人员等,其中科研人员是调研人数最多的群体,占 73.68%(图 1、图 2)。根据图 3,81.87%的受访者表示所在单位参与过应急科技攻关项目。以上结论说明本次调研对象大部分直接或间接参与过应急科技攻关项目的管理和科研工作,保证了本研究的针对性、专业性和有效性。

表 1 调研问卷
Table 1 Survey questionnaire

序号 Number	题目 Question
1	工作单位类型 Work unit type
2	身份 Occupation
3	是否承担过应急科研攻关项目 Have you undertaken any emergency scientific research projects
4	所在单位是否建立应急科研攻关项目管理规定 Has the unit established management regulations for emergency scientific research projects
5	建立相关管理规定是否有必要 Is it necessary to establish relevant management regulations
6	应急科技攻关项目管理过程中风险最大的部分 Most risky part in the management process of emergency technology research projects
7	项目管理中可以优化的环节 Links that can be optimized in project management
8	应急科技攻关项目开展的难点有哪些 Difficulties in carrying out emergency technology research projects
9	应急科技攻关项目管理中最重要环节有哪些 Most important link in emergency technology project management
10	对应急科技攻关项目管理的建议 Suggestions for emergency science and technology project management



图 1 单位类型
Figure 1 Unit type



图 2 职业
Figure 2 Occupation

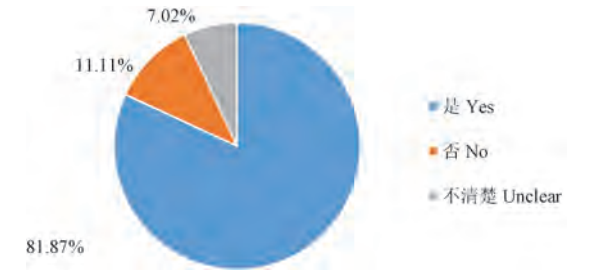


图 3 是否承担过应急科研攻关项目
Figure 3 Have you undertaken any emergency scientific research projects

2. 1. 2 问卷反馈数据与分析

76.02%的受访者表示其所在单位没有制定与应急科技攻关项目相关的管理规定(图4),95.32%的受访者认为建立相关管理规定是必要的。通过交叉分析,这76.02%所在单位没有制定制度的受访者中,有96.92%表达了对制度建设必要性的肯定(图5)。

这些数据进一步揭示了一个现象:那些没有相关管理规定的单位,其员工对建立相关制度的渴求程度更高。这也意味着,对于承担过应急科技攻关项目的科研和管理人员来说,他们普遍认为需要加强相关管理制度的建设和宣传。

根据图6的数据,我们可以得出以下结论:生物安全、伦理、人遗审批的管理被认为是管理环节中风险最大的部分,占比达到59.65%。这可能是因为在进行涉及生物安全、伦理、人遗方面的项目管理过程中,需要遵守严格的法规和伦理要求,一旦违反可能会带来论文撤稿等严重后果,对科研团队和单位的负面影响巨大。

其次,资源调度和行政审批管理也被认为是风险较大的部分,占比分别是45.61%和42.69%。这可能是因为一些科研机构对应急项目的管理仍然采用常规科技项目管理模式,导致行政审批程序繁琐,需要花费较多的时间和精力。同时也存在审批结果不确定性的风险,使得科研人员无法高效地开

展应急攻关工作。应急项目管理中的资源调度和人员团队协作的管理十分复杂,需要协调各方人力、物力、财力,出现问题后可能会对项目进展产生重大影响。

其他的,例如人员团队协作管理和知识产权分配也被认为是风险比较大的部分。这些结果可以为项目管理者提供参考,重点关注和加强这些方面的管理,以降低项目风险。

目前依托单位在应急科技攻关项目管理中,大家认为可以“弹性”管理的环节,主要体现在生物安

全、伦理、人遗合并审批和经费管理放宽这两个方面(图 7),侧面体现了科研人员的需求所在。

在问卷的最后 3 个开放性问答题中,调研对象可以自由填写答案。从他们的回答中可以发现,“行政”“审批”“流程”“合规”“应急”和“高效”是出现频率较高的关键词。这表明在当前的管理环境下,应急科技攻关项目实施过程中的瓶颈主要集中在“管理审批”问题上。此外,与常规科技项目相比,应急科技攻关项目的管理应更加注重“高效”和“安全”,并为科研人员提供高度自主权,以确保攻

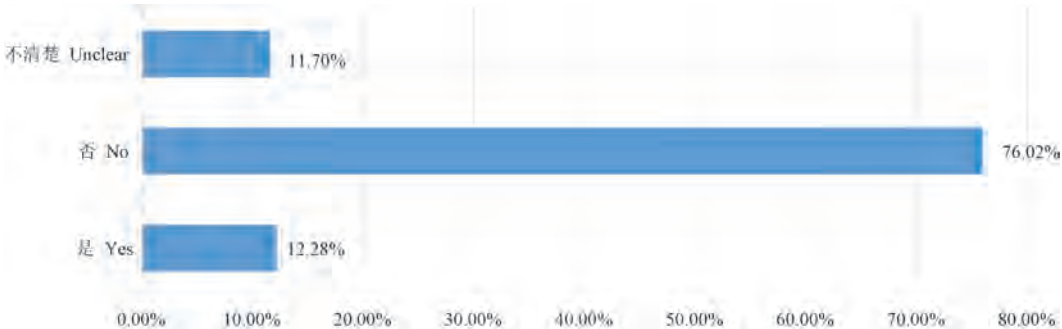


图 4 单位是否建立应急科研攻关项目管理规定

Figure 4 Has the unit established management regulations for emergency scientific research projects

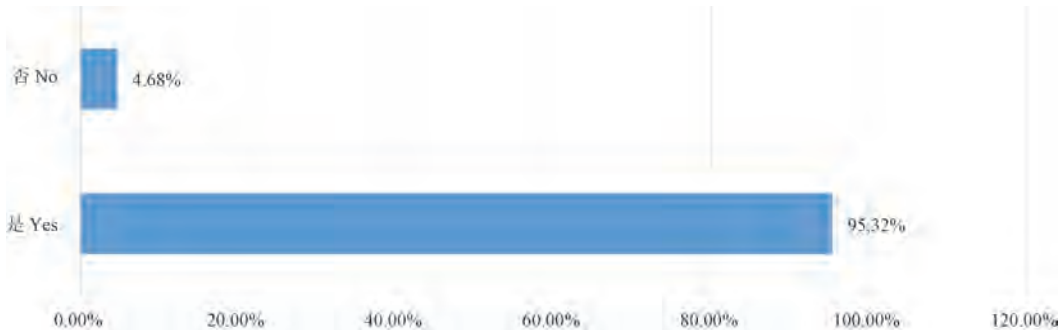


图 5 建立相关管理规定是否有必要

Figure 5 Is it necessary to establish relevant management regulations

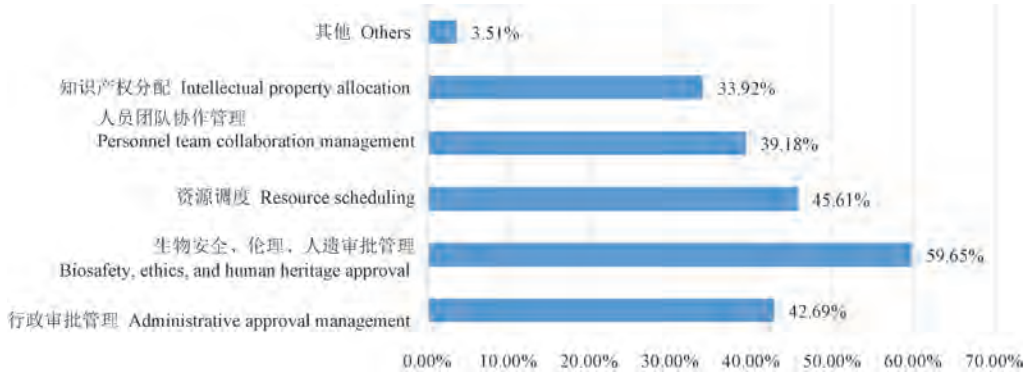


图 6 应急科技攻关项目管理过程中风险最大的部分

Figure 6 Most risky part in the management process of emergency technology research projects

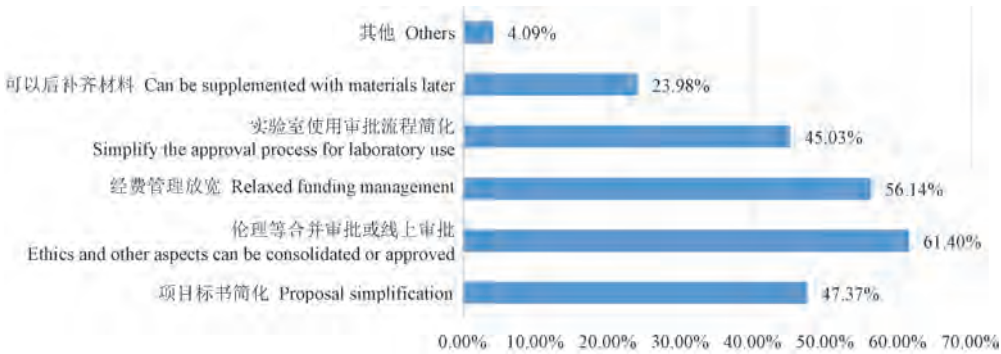


图 7 项目管理中可以优化的环节

Figure 7 Links that can be optimized in project management

关任务的时效性。这 3 个问题的答案所涉及的关键词非常集中,因此可以推断,应急科技攻关项目迫切需要创新管理机制来满足科管和科研的需求。

2.2 信息检索、专家咨询和座谈的调研结果分析

通过信息检索和实地走访项目主管部门、项目承担单位以及其他相关机构,我们组织了一批承担过应急科技攻关项目并且具备丰富经验的科管和科研专家进行座谈,针对前期间卷调研结果进行了深入探讨。汇总和交流的信息显示,各单位目前主要存在的问题是对应急科技攻关项目的管理大多没有制定专门的管理办法。科管人员只是在常规科技项目管理规定的基础上,按照上级的要求或凭借工作经验,临时对相关管理环节进行变动,这些变动都属于“一过性”的特别流程。

2.2.1 上级主管部门缺少指导文件

近年来,国内外学者对突发公共卫生事件的研究主要集中在应急管理、预警管理和风险管理等方面,但在具体实施应急科技攻关项目时,关于立项、实施、验收等方面的系统性管理研究或实施方案的制定却鲜有涉及。自新冠疫情爆发以来,根据检索结果,仅有部分省份修订或出台了配套的应急项目管理办法。海南省于 2020 年 6 月发布了《海南省应急科技攻关项目管理办法》;上海市于 2021 年 5 月修订了《上海市科技计划项目管理办法》,新增了应急攻关项目立项机制;四川省于 2022 年 8 月发布了《四川省中医药管理局科技应急项目管理办法》;福建省于 2023 年 5 月发布了《福建省应急攻关科技计划项目管理暂行办法》。

值得一提的是,上述管理办法具有以下共性:(1)允许自上而下指定依托单位或负责人;(2)减少公示期,加快立项和经费拨付速度;(3)允许“边研究边申报”“先立项补申报”;(4)允许项目根据实际

研究情况调整技术路线;(5)承担单位和项目负责人不受年度项目申报数和承担的省科技计划在研项目数量限制;(6)要求成果共享。通过这 6 点,可以总结出应急科技攻关管理工作的重点,其他机构在制定管理办法时候可以参考借鉴。

2.2.2 项目依托单位缺少管理制度

按照“扩大科研项目管理自主权”有关政策要求,上级项目主管部门会将项目经费执行、事项变更、项目处置和成果管理等事项的监督与保障权限下放到各项目依托单位,所以依托单位是项目的责任主体,要制定相关制度、强化自我约束和自我规范,确保下放的管理权限“接得住”“管得好”^[8]。但是在走访时发现,大部分单位缺少针对应急科技攻关项目的管理制度。部分科管人员反应,在没有制度的情况下,经常陷入“要不要管”“怎么管”“如果不管,后续会不会被指责工作不到位”的两难境地。在实际工作中,应急科技攻关项目也可能出现伦理审查不及时、事项调整审批材料滞后、项目档案材料缺损、资源调度不及时等问题,在绩效考评时候就会被要求补充整改材料^[9]。

通过以上两点,我们可以清楚地看到缺乏应急科技攻关项目管理办法会给项目管理和科研工作带来诸多困难。因此,为了提高应急科技攻关项目的管理质量,项目主管部门和项目依托单位都需要加强管理机制的建立,这将有助于确保项目取得更好的成果产出。

3 讨论与建议

医学领域的应急科技攻关项目通常涉及新发突发传染病的重大疫情防控工作,其涉及范围广泛,影响力巨大,与人民生命财产安全紧密相关。因此,对于参与其中的科管人员来说,全力保障项

目的高效、高质量开展是首要任务。为了实现这一目标,我们需要对其管理机制进行深入研究和改进。

3.1 应急科技攻关项目管理现状

根据本文第二部分对调研结果的分析,可以发现应急科技攻关项目的管理制度目前仍处于初步制定阶段。尤其是在项目依托单位,缺乏系统的管理机制,项目管理缺乏标准化的规范和流程。这可能导致科研人员不清楚审批流程,科管人员在该管理时不敢管理,以及项目进展混乱等问题。因此,对应急科技攻关项目的管理制度进行研究和改进是至关重要的。

3.2 应急科技攻关项目管理特点

常规科技项目的管理流程注重公开竞争、形式审查、人员限项以及经费、技术路线等各类调整的程序性文件,并且在结题验收时特别关注全流程材料档案的整理。然而,在伦理、经费等行政审批环节时间较长,文本类材料在项目立项和执行期间占据了很大比重。通过回顾 SARS、流感以及新冠等应急科技攻关项目的工作经验,我们发现与常规项目相比,应急科技攻关项目的管理具有以下 5 个特点。

3.2.1 启动时间短

应急科技攻关项目大多是疫情爆发时期根据国家要求进行项目立项,允许边开展科研活动边撰写标书,时间紧任务重,项目在极短的时间内需完成技术路线的确认、团队的组建和资源的调配^[10-11]。对科管人员来说,需要迅速做好沟通协调工作,帮助科研人员快速完成各类审批手续。

3.2.2 不确定性强

应急科技攻关项目执行过程中,项目的技术路线会根据疫情传播、政策变动等因素而随时改变,配套的团队、经费、资源会随之发生变化,一切都具有很强的不确定性。就要求对应急科技攻关团队给予高度自主权。项目团队可以根据科研实际情况,对经费和研究内容自行调整,科管部门给予监督。

3.2.3 受关注度高

承担应急科技攻关项目的团队都是国家的高水平团队,产出成果会直接影响全国乃至全世界的疫情防控工作,所以每个成果都会被国内外给予高度关注。因此对应急科技攻关项目的成果管理需更严谨,要求产生的数据、图片、资料进行全流程备案留档,要经得起监督和审查,规避被质疑学术不

端的问题。

3.2.4 团队结构复杂

应急科技攻关项目往往是由多个单位、团队(如政府、科研机构、军队、公司等)组合而成,人员涉及有领导、PI、技术人员、行政管理人员等。这样一个庞大的团队协同合作,除了要求科管人员极高的组织协调能力外,更需要拥有一套适用性强且普适化的内部管理体系。此外还需对成果分配、资源共享和经费拨付进行约定,以减少矛盾纠纷。

3.2.5 资源高度共享

与常规科技项目相比,应急科技攻关项目的数据有更高的公开共享要求,这就要求对项目的共享机制提前进行规范。如果缺少明确的信息共享机制和标准,可能导致不健康的竞争关系,阻碍疫情防控工作的。

3.3 应急科技攻关项目管理运行机制

应急科技攻关项目的运行管理机制是目标导向特别强的管理体系。通过对立项审批、经费使用和成果产出 3 个环节的重点把控,制定符合项目特点的管理办法。在此,结合前期调研中管理和科研人员最关注的问题,经过专家论证,提出以下几点创新管理机制供大家思考。

3.3.1 协作审查机制

2023 年 2 月 18 日,国家卫生健康委等 4 个部门联合印发的《涉及人的生命科学研究伦理审查办法》中有关于伦理审查“协作机制”的表述,即“在多个机构开展的研究可以建立伦理审查协作机制,确保各机构遵循一致性和及时性原则。简易程序审查由伦理审查委员会主任委员指定两个或者以上的委员进行伦理审查,并出具审查意见,审查意见应当在伦理审查委员会会议上报告。”对不同机构间进行伦理合作审批的方法进行描述,可以看做是协作审查的参照物^[12-13]。据此,我们可以探讨把协作审查的范围扩大,制定一个包含实验动物福利伦理、人类遗传资源、医学伦理、生物安全等审查在内的《协作审查制度》的可能性。同时参考《中华人民共和国生物安全法》以及国家标准《实验动物福利伦理审查指南》《实验动物福利伦理委员会工作指南》的相关规定,制订《协作审查制度》管理细则,成立协作审查委员会。制定各委员会互认机制,设立通用的审批批号和申请表格。明确不同类型项目的特殊要求,以便协作审查委员会能够根据具体情况做出决策。以上措施可以减少立项审批

的重复性工作,包括文件提交、审查和批准程序,从而满足科研人员对管理流程简化的需求^[14-15]。

具体实施做法:(1)单位法人作为协同审查委员会主席,并指定一人作为秘书。(2)应急科技攻关项目启动时,由项目负责人发起协作审查申请。秘书通知协同审查委员会主席和涉及的相关委员会主席,共同启动协作审查工作。(3)在评选委员时,优先选择各委员会中重叠部分的专家,按照各委员会要求的最少委员数量确认参评人数。(4)允许通过电话、电子邮件等通讯方式进行线上审核,完成实验动物伦理、人类遗传资源、医学伦理、生物安全等协同审批。(5)对不符合要求的申请,除出现重大原则性问题,其他情况允许在审批过程中,申请人直接整改直至符合要求。(6)协同审批需要在短时间内回复审查意见,一般不超过 6 h。

尽管制定协作审批制度可以提高立项审批效率,但仍需要仔细平衡审批的速度、项目伦理和安全要求,确保项目在伦理和安全方面的合规性是至关重要的,不应因提高效率而牺牲审核质量。因此,协同审批流程需要在维护项目合法合规性的前提下进行。

3.3.2 经费包干机制

扩大科研项目管理自主权是推动科研创新和提高研究效率的关键一步^[16],其中经费包干管理是一项重要的改革举措^[17],这种自主权的引入有助于更高效地应对项目中的紧急需求和变化情况,从而提高项目执行的效率和灵活性。经费包干机制是指将科研项目的经费管理权下放到项目负责人或研究团队手中的一种管理模式。这种模式赋予科研团队更多的自主权和责任,项目团队可以更自由地规划、支配和调整项目经费,以更好地满足应急攻关需求。

为了确保经费使用的合法合规性,科管人员需要在平时建立有效的财务管理和报告机制,组织科研人员培训,确保经费的使用符合相关法规和政策^[18]。此外,应该建全内审制度,以监督项目经费的使用情况。

3.3.3 成果分配机制

应急科技攻关项目管理的重要措施之一是对科研成果的分配进行规范和约定。这一措施有助于确保项目参与者之间的权益和责任得到明确界定,同时也有助于推动科研成果的最大化利用和社会价值的实现。在项目开展的早期阶段,必须明确

定义项目中涉及的知识产权和各个项目参与者的贡献。这包括已有技术和知识的版权、专利、商业机密等。通过确立这些权益,规定项目参与者之间的权利和义务,避免日后的纠纷和争议,确保所有参与者的期望得到满足,获得应有的回报。

3.3.4 风险评估和容错机制

制定容错机制也是应急科技攻关项目管理中的关键措施之一,它为项目提供了一种应对不可预测情况的灵活性和韧性。应急攻关项目的实施是有规律可循的,科管人员可以通过总结归纳,对项目进行合理的风险预测,包括技术风险、资源不足、合作伙伴问题等。在风险评估后,综合考虑项目的风险和复杂性,制定清晰明确的容错机制,在符合法律法规以及合同约定的前提下,明确在项目执行过程中可以容忍的错误和问题程度^[19]。在项目执行期间,如若出现错误或者问题,可以据此做出调整,把影响控制在最小范围内。

3.3.5 安全保密机制

首先,研究机构要在平日加强安全保密工作的培训^[20],提高科管和科研人员的保密意识。尤其在应对疫情等紧急情况时,保密机制更显重要,因为信息的安全性和可靠性对应急应对至关重要。在承接应急科技攻关项目时,管理团队首先需要明确项目保密等级,包括疫情数据、病毒株信息、研究成果的密级等。规范和约定安全保密机制有助于确保项目中的敏感信息得到妥善保护,防止信息泄露和滥用。要规定项目中对机密信息的保护措施、存储方式、共享原则和访问权限,其中包括限制信息的传播和披露,确保只有有权人员能够访问敏感信息。

3.3.6 全方位沟通机制

建立高效的信息流动和决策协调的沟通机制,以应对紧急情况和应急科技攻关项目的复杂性。项目中建立多层次的上下级沟通渠道,包括项目管理团队、项目负责人、相关政府部门、科研机构和合作伙伴。确保信息能够自上而下和自下而上流动,不受层级限制。确保每个层级的职责和权限得到明确界定,以避免混淆和不必要的决策延误。明确谁负责项目管理、决策权在何处,并确保责任的清晰性。提供透明的信息和数据,使上级能够准确了解应急防控当前的状态和面临的挑战。对于紧急情况,建立快速响应和通报机制,以确保信息及时传达给上级,并协调行动。这对于疫情防控等应急

攻关项目至关重要^[21]。

沟通机制还应包括日常对科管和科研人员沟通技巧的培训,以确保信息传递的清晰性和有效性。这有助于避免误解和信息失真。如果项目涉及多个合作伙伴,还要确保与外部合作伙伴的沟通协调。这样的沟通机制有助于提高项目的响应速度和资源调配效率。

3.3.7 资源共享机制

在面对疫情防控时,资源共享的重要性更加凸显^[22-23],因为它有助于迅速盘活资源,加速研究工作的进程,从而更好地服务社会和保护公共健康。建立清晰的资源共享协议和合同,明确资源使用的权益和义务。鼓励团队成员分享知识、经验、技能和设备,以增强整个项目团队的能力。提倡信息的透明和开放,确保项目参与者能够共享项目进展、数据和研究成果,有助于避免信息壁垒,提高决策的质量和准确性。

4 结语

基础医学领域应急科技攻关项目的管理是一个充满挑战的工作。在本研究中,我们通过调研的方式,深入探讨了应急科技攻关项目的管理现状、管理特点以及管理机制的建议。科技应急攻关项目需要围绕“应急”和“攻关”,结合项目特点,做到合规与高效两手抓。在国家法律法规和相关规定的框架内,通过创新管理机制,如制定协同审查机制、经费包干机制、风险评估和容错机制、安全保密机制和资源共享机制,多途径解决科管及科研人员对此类项目管理的需求。

最后,科研项目管理不仅是一个方法论,更是一种责任和使命。在基础医学领域的应急攻关项目中,我们的目标是保护公共健康、推动科学进步、应对紧急情况。通过科学合理的项目管理,我们可以更好地实现这些目标,为社会的福祉作出更大的贡献。希望本研究可以为基础医学领域的应急攻关项目管理提供有益的思考和指导。

参考文献:

[1] 王小伟. 四措并举,建立健全应急科技攻关机制[N]. 科技日报, 2020-06-23(5).
WANG X W. Four measures to establish and improve emergency scientific research mechanism [N]. Science and Technology Daily. June 23, 2020; 5.
[2] 吕雯倩, 朱万, 江一峰. 医院伦理委员会在重大突发公共卫

生事件一级响应下的工作原则和机制研究 [J]. 中国医学伦理学, 2020, 33(9): 1062-1065.
LYU W Q, ZHU W, JIANG Y F. Research on working principles and mechanisms of the hospital ethics committee when activating the first-level response to major public health emergency [J]. Chin Med Ethics, 2020, 33(9): 1062-1065.
[3] 容榕, 李礼安, 丘成, 等. 医院突发公共卫生事件应急管理实践的伦理探索 [J]. 医学与哲学, 2022, 43(20): 30-32.
RONG R, LI LA, QIU C, et al. Ethical exploration of emergency management practice of public health emergency in hospital [J]. Med Philos, 2022, 43(20): 30-32.
[4] 赵丽梅. 美国国家安全视野中的突发公共卫生事件对策研究 (1992-2008) [D]. 长春: 东北师范大学, 2015.
ZHAO L M. A Study of Public Health Emergencies Strategies in the Vision of United States National Security (1992-2008) [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2015.
[5] 宋雨薇, 安实, 董昌其. 应急科研攻关快速响应与精准研发何以兼顾? ——基于应急科研攻关项目的政策评价分析 [J]. 行政论坛, 2023, 30(3): 94-103.
SONG Y W, AN S, DONG C Q. How to combine the rapid response as well as precise research and development of emergency scientific research? -policy evaluation analysis based on emergency scientific research project [J]. Adm Tribune, 2023, 30(3): 94-103.
[6] 王思源. 国内外突发公共卫生事件研究分析 [D]. 太原: 山西医科大学, 2022.
WANG S Y. Research and Analysis of Public Health Emergencies at Home and Abroad [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2022.
[7] 王西冀. 调查研究方法论 [M]. 桂林: 广西师范大学出版社, 2022.
WANG X G. Methodology of survey research [M]. Guilin: Guangxi Normal University Press, 2022.
[8] 陈昱君. “放管服”背景下医学科研院所科研项目过程管理方法的优化探索 [J]. 中国卫生产业, 2019, 16(23): 57-58.
CHEN Y J. Optimization of process management methods of scientific research projects in medical research institutes under the background of “streamline administration, delegate power, strengthen regulation and improve services” [J]. China Health Ind, 2019, 16(23): 57-58.
[9] 李烨, 鲁杰, 胡金凤. 医药卫生领域科研项目绩效管理问题与对策 [J]. 中国医药生物技术, 2021, 16(3): 275-277.
LI Y, LU J, HU J F. Problems and countermeasures of performance management of scientific research projects in medical and health fields [J]. Chin Med Biotechnol, 2021, 16(3): 275-277.
[10] 陈之瑶, 罗军. PDCA 模型在科技项目全流程质量管理的应用——以广东省重点领域研发计划项目管理为例 [J]. 科技管理研究, 2022, 42(22): 169-176.
CHEN Z Y, LUO J. Application of PDCA model in the whole-process quality management of science and technology programs: taking key-area R & D program management in Guangdong

- Province as an example [J]. *Sci Technol Manag Res*, 2022, 42(22): 169-176.
- [11] 傅晋华, 蔡劲松. 重大突发公共卫生事件背景下应急研发的新型举国体制研究:以新冠疫苗研发为例 [J]. *中国科技论坛*, 2023(4): 168-177.
- FU J H, CAI J S. Research on the new national system for the R & D in emergency in the context of major public health emergencies: taking China's COVID-19 vaccine R & D as an example [J]. *Forum Sci Technol China*, 2023(4): 168-177.
- [12] 陈仲林, 杨梦婕, 侯旭敏, 等. 从医疗机构视角思考《涉及人的生命科学和医学研究伦理审查办法》[J]. *中国医学伦理学*, 2023, 36(5): 482-487.
- CHEN Z L, YANG M J, HOU X M, et al. Thinking from the perspective of medical institutions on measures for ethical review of life science and medical research involving humans [J]. *Chin Med Ethics*, 2023, 36(5): 482-487.
- [13] 周运翱, 万钢, 杨志云, 等. 某传染病医院提高伦理审查效率的实践路径与管理策略 [J]. *中国新药杂志*, 2022, 31(11): 1085-1090.
- ZHOU Y A, WAN G, YANG Z Y, et al. Practice path and management strategy on accelerating ethical review efficiency in one infectious disease hospital [J]. *Chin J N Drugs*, 2022, 31(11): 1085-1090.
- [14] 刘丽艳, 张宏馨, 边佳悦, 等. 实验动物福利伦理审查发现问题之思考 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(9): 63-68.
- LIU L Y, ZHANG H X, BIAN J Y, et al. Reflection of the problems found in the ethical review of experimental animal welfare [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(9): 63-68.
- [15] 鹿双双, 师晓萌, 刘晓宇, 等. 实验动物福利伦理审查与监管实践及探索 [J]. *实验动物与比较医学*, 2020, 40(4): 339-343.
- LU S S, SHI X M, LIU X Y, et al. Practice and exploration on laboratory animal welfare and ethical reviewing and monitoring [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2020, 40(4): 339-343.
- [16] 习近平. 加强基础研究 实现高水平科技自立自强 [J]. *求知*, 2023(8): 4-6.
- XI J P. Strengthening basic research and realizing high-level scientific and technological self-reliance [J]. *Seek Knowl*, 2023(8): 4-6.
- [17] 徐妍. 高校科研经费“包干制”模式下内部控制体系建设研究 [J]. *教育财会研究*, 2022, 33(2): 11-15, 31.
- XU Y. On the construction of the inner control system under “the contracting system” of scientific research funds in universities [J]. *Stud Finance Account Educ*, 2022, 33(2): 11-15, 31.
- [18] 李爱彬, 唐巧玉. “放管服”视域下高校科研经费“包干制”的实施困境与应对策略 [J]. *煤炭高等教育*, 2022, 40(3): 40-46.
- LI A B, TANG Q Y. Difficulties and countermeasures of overall rationing system for university scientific research funds from the perspective of reform of government functions [J]. *Meitan High Educ*, 2022, 40(3): 40-46.
- [19] 陈朋. 容错机制的建构逻辑及其效能提升 [J]. *苏州大学学报(哲学社会科学版)*, 2022, 43(1): 29-37.
- CHEN P. The logic of construction of the fault tolerance mechanism and its effectiveness enhancement [J]. *J Soochow Univ Philos Soc Sci Ed*, 2022, 43(1): 29-37.
- [20] 潘炜, 陈杨林, 郭健, 等. 高校科研保密风险分析与管理对策 [J]. *信息安全与通信保密*, 2012, 10(3): 64-67.
- PAN W, CHEN Y L, GUO J, et al. Risk analysis and management strategy for university research confidentiality [J]. *Inf Secur Commun Priv*, 2012, 10(3): 64-67.
- [21] 查庆, 孔又专. 科研项目管理工作中的沟通与协调 [J]. *四川教育学院学报*, 2009(4): 12-13.
- ZHA Q, KONG Y Z. Communication and coordination in project research management [J]. *J Sichuan Coll Educ*, 2009(4): 12-13.
- [22] 杨洪源. 从抗击疫情看“全国一盘棋”的重要地位 [J]. *理论探索*, 2020(3): 13-21.
- YANG H Y. The importance of “a coordinated national response” from the perspective of fighting against the epidemic [J]. *Theor Explor*, 2020(3): 13-21.
- [23] 王斌楠, 林晖平, 黄富贵. 疫情防控下高校科技资源共享策略探究 [J]. *实验室研究与探索*, 2020, 39(10): 270-273.
- WANG B N, LIN H P, HUANG F G. Research on sharing strategies of scientific and technological resources among colleges under epidemic prevention and control [J]. *Res Explor Lab*, 2020, 39(10): 270-273.

[收稿日期]2023-09-27

梁钰莹,黄泳,刘俊升,等. 自噬与神经系统疾病 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 111-119.

Liang YY, Huang Y, Liu JS, et al. Autophagy and neurological diseases [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3):111-119.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.014

自噬与神经系统疾病

梁钰莹¹,黄泳^{1,2},刘俊升¹,欧毅琳¹,李逸文¹,张睿¹,李政¹,张治楠^{1*}

(1.南方医科大学中医药学院,广州 510515;2.南方医科大学南方医院,广州 510515)

【摘要】 自噬是细胞内异常聚集蛋白和受损细胞器主要的降解和循环途径,维持着细胞正常的代谢平衡及物质更新。自噬具有神经保护作用,可通过调节神经元和胶质细胞的稳态、发育和凋亡等生理过程影响神经系统的功能状态。近年来大量研究表明,神经系统疾病与异常自噬密切相关,自噬的抑制或过度激活均能影响抑郁症、神经退行性疾病和精神分裂症的发生发展。了解自噬在神经系统疾病中的作用机制对于预防与治疗相关疾病具有重要意义。该文主要对当前自噬与上述神经系统疾病的研究进展进行综述,为以上疾病的进一步研究提供参考。

【关键词】 自噬;神经系统疾病;作用机制;研究进展

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0111-09

Autophagy and neurological diseases

LIANG Yuying¹, HUANG Yong^{1,2}, LIU Junsheng¹, OU Yilin¹, LI Yiwen¹, ZHANG Rui¹, LI Zheng¹, ZHANG Zhinan^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China.

2. Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515)

【Abstract】 Autophagy is the main degradation and recycling pathway for abnormal aggregates and damaged organelles in cells, and it maintains the normal metabolic balance and material renewal in cells. Autophagy has neuroprotective effects and can affect the functional state of the nervous system by regulating homeostasis, development, apoptosis, and other physiological processes of neurons and glial cells. In recent years, a large number of studies have shown that nervous system diseases are closely related to abnormal autophagy, and inhibition or overactivation of autophagy affects the occurrence and development of depression, neurodegenerative diseases, and schizophrenia. Understanding the mechanisms of autophagy in nervous system diseases is of great significance for their prevention and treatment. This paper mainly reviews the current progress of autophagy research and the above diseases of the nervous system, providing a reference for further research into these diseases.

【Keywords】 autophagy; neurological diseases; mechanism of action; research progress

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

自噬指细胞的自我吞噬过程,属于细胞的一种保护机制,可通过降解和循环利用胞内的受损细胞器和异常蛋白聚集体来维持细胞的内环境稳态^[1]。而成年后,神经元不再分裂更新,其发育和健康的长期维持都需要及时有效地清除积累的细胞废物。

因此,自噬在神经系统功能调节上不可或缺^[2]。随着自噬与神经系统疾病的研究深入,我们对于自噬在神经系统疾病发生发展中的作用有了更多的了解,本综述旨在整理自噬与神经系统疾病的研究进展,为今后相关疾病的治疗提供新的思路。

【基金项目】 国家自然科学基金(81873359,82074519);广东省自然科学基金(2022A1515011658,2023A1515012235);广州市科技计划项目(2024A04J3988);广东省中医药局科研项目(20241197)。

【作者简介】 梁钰莹(2000—),女,本科,研究方向:中西医临床医学。E-mail:853819516@qq.com

【通信作者】 张治楠(1991—),女,主治医师,实验师,研究方向:针灸机理研究。E-mail:luuuuuna@163.com

1 自噬

1.1 自噬的过程

根据细胞物质运输到溶酶体内的途径不同,自噬主要分为微自噬、巨自噬和分子伴侣自噬。其中,巨自噬是目前最主要、研究最深入的途径,故本文讨论的自噬主要指巨自噬。

细胞自噬主要包括自噬的激活、自噬体的形成以及自噬体的降解 3 个过程,其涉及的分子机制主要由以下关键蛋白进行调控。

1.1.1 ULK1 复合物

启动细胞自噬的关键靶点是 UNC-51 激酶 1 (UNC-51 like kinase 1, ULK1) 复合物,该复合物包括 ULK1 蛋白、自噬相关基因 13 (autophagy-related gene 13, Atg13) 以及可反馈激活 ULK1 的 FIP200。ULK1 复合物受多个上游信号通路调节,其中较为公认的是 AMP 活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路。AMPK 是重要的能量代谢调节因子,在饥饿、缺氧等应激状态下,AMP/ATP 比值升高,促进 AMPK 发生磷酸化^[3]。mTOR 是自噬的负调控分子,它能使 Atg13 处于高度磷酸化状态而抑制 ULK1 复合物的活性。活化的 AMPK 通过磷酸化 mTOR 降低其活性,从而使 Atg13 发生去磷酸化并激活 ULK1,最终诱导自噬的发生^[4]。

1.1.2 III 型 PI3K 复合物

当诱导自噬的信号被接受后,Atg 蛋白会在液泡附近聚集,从自噬前体组装位点 (phagophore assembly site, PAS) 开始组装,形成双层膜的碗状结构,即自噬前体。活化的 ULK1 将进一步作用于定位在自噬前体的 III 型磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 复合物,该复合物还包括 Vps34、Beclin-1 和 p150。Vps34 因与 p150 结合而激活,Beclin-1 则在 ULK1 的刺激下发生磷酸化,并与 Vps34-p150 结合形成 Vps34-p150-Beclin-1 复合物^[5]。Vps34-p150-Beclin-1 可继续与自噬体形成相关蛋白结合而发挥不同的功能,如帮助定位于隔离膜 (隔离包裹自噬物形成自噬体的质膜) 上的 Atg14 和调节 Beclin-1 的自噬蛋白 1 (beclin-1-regulated autophagy protein 1, Ambra1)。III 型 PI3K 复合物激活后可促进细胞中第二信使分子磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI) 向 PI3P 转化,PI3P 是

募集下游自噬因子的关键信号分子,可通过聚集下一步的 Atg 帮助 Atg12、Atg5、Atg16 形成复合物以及促进 LC3 与质膜成分 PE 结合,转化为 LC3-II,从而参与隔离膜的扩展^[6]。

1.1.3 Atg12-Atg5-Atg16 和 LC3

Atg12-Atg5-Atg16 和 LC3 均为自噬的泛素样修饰系统,定位于隔离膜上,与隔离膜的延伸和闭合有关。(1) Atg12-Atg5-Atg16 系统:Atg12 因与 Atg7 结合而激活,接着被传递至 Atg10,Atg10 介导 Atg12 与 Atg5 结合形成 Atg12-Atg5 复合物,Atg12-Atg5 复合物又会进一步与 Atg16 结合,最终形成 Atg12-Atg5-Atg16 复合物^[7]。(2) LC3 系统:细胞内新合成的 LC3 经 Atg4 加工后形成 LC3-I,自噬发生后,LC3-I 由 Atg3、Atg7 继续修饰加工,并在 Atg12-Atg5-Atg16 复合物的帮助下,其羧基端甘氨酸与脂质磷脂酰乙醇胺 (phosphatidyl ethanolamine, PE) 共价结合,最终由水溶性的 LC3-I 转化为脂溶性、具有膜结合能力的 LC3-II,促进隔离膜的扩展与封闭^[8]。故 LC3-II 的数量以及 LC3-II/I 常被用来评价自噬水平。

1.1.4 p62

p62 在选择性自噬降解过程中发挥重要的介导作用^[9]。需要被自噬消化的底物表面被泛素化修饰标志,p62 可识别泛素化修饰与之结合,并作为接头蛋白促进泛素化的自噬底物与自噬体膜蛋白 LC3-II 结合,从而将底物与自噬体连接,促进自噬体包裹底物^[10]。随后,自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体而完成蛋白质的降解,因此,p62 间接反映了自噬体的清除水平。细胞自噬具体的分子机制见图 1。

1.2 自噬的生物学功能

1.2.1 参与脂质代谢

脂滴 (lipid droplets, LDs) 是细胞内储存脂质的主要细胞器。在饥饿状态下,自噬将其包裹于自噬体内后运输至溶酶体,降解后获取能量,该过程称为“脂噬”。因此,诱导自噬可增强 LDs 的分解作用,抑制自噬则会增加脂质的积累^[11]。CD36 是一种促进脂肪酸摄取的膜蛋白。研究发现,高脂肪饮食小鼠的肝存在明显的脂肪变性,其内 CD36 的表达增加,这可能是通过激活 AMPK 通路降低自噬水平而实现的^[12]。激活自噬可增强间质细胞对胆固醇的摄取,从而促进睾酮的合成^[13]。

1.2.2 降解错误折叠蛋白

蛋白聚集体来源于大量堆积的错误折叠或折

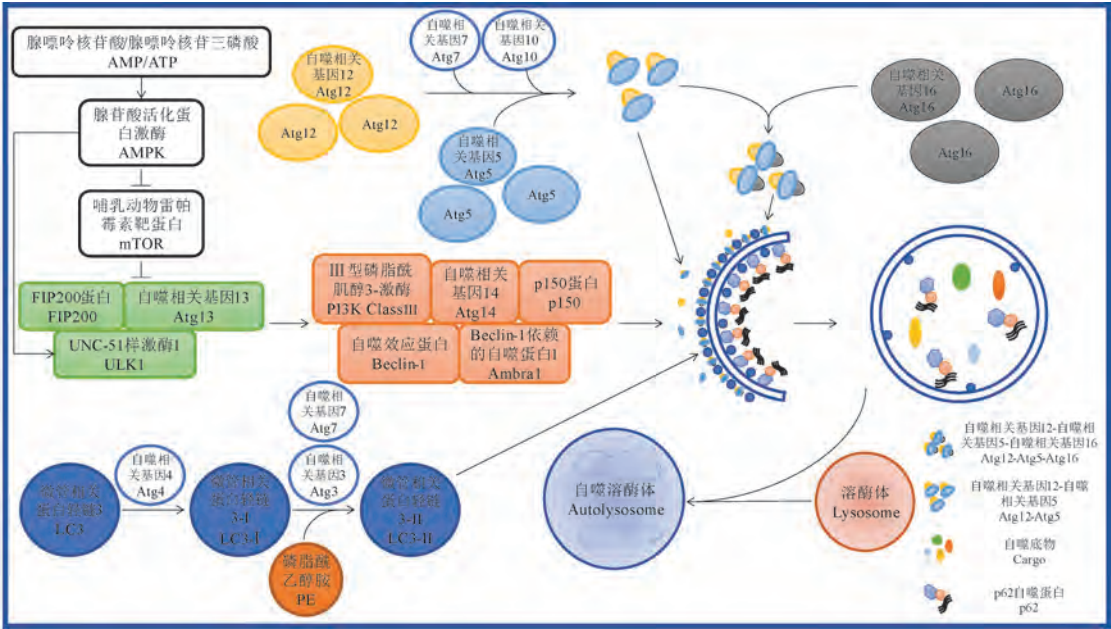


图 1 自噬具体分子机制图

Figure 1 Diagram of the molecular mechanism of autophagy

叠不充分蛋白,其产生的细胞毒性扰乱了细胞正常的生理活动,引发诸多疾病^[14]。除泛素-蛋白酶体系统外,自噬是另一通过降解蛋白聚集体(主要负责不溶性蛋白聚集体)而维持细胞内蛋白稳态平衡的重要机制^[15]。肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)的运动神经元存在基因突变,其中多个基因的产物直接参与自噬途径中降解蛋白质的过程,如 UBQLN2 突变可阻碍待降解蛋白质被识别,这提示 ALS 神经元内积累的神经毒性蛋白与基因突变导致的自噬障碍有关^[16]。

1.2.3 降解损伤的细胞器

自噬可通过降解受损或多余的细胞器而维持胞内细胞器的质量平衡。研究发现,细胞器特异性自噬能够缓解由炎症反应介导的多种疾病,如慢性阻塞性肺疾病和心血管病^[17]。线粒体自噬属于选择性自噬的一种,能够特异地降解受损或功能失调的线粒体。在脑缺血大脑中,使用蛋白酶体抑制剂卡非佐米可逆转线粒体自噬受体 BNIP3L 的降解,从而修复缺血神经元的线粒体自噬缺陷,减轻缺血性脑损伤^[18]。急性胰腺炎的腺泡细胞中存在内容酶体自噬系统的损伤与紊乱,这可能与自噬缺陷阻碍了胞内功能失调的线粒体和内质网的清除,进而使活性氧增加并激活促炎因子有关^[19]。

1.2.4 促进免疫作用

自噬主要通过直接清除细胞内的病原微生物、参与免疫系统的发育和调节免疫应答而发挥免疫

作用^[20]。mTOR 复合物具有驱动免疫祖 B 细胞向前 B 细胞转化,促进 B 细胞发育成熟的作用^[21]。STING 为先天免疫级联反应的关键调节因子,能够激活先天免疫,抵抗微生物感染。研究发现,STING 激活后能够与 LC3 直接相互作用而促进其向 LC3-II 转化,从而提高自噬水平,调节先天免疫^[22]。

2 神经系统自噬的生理功能

2.1 自噬与神经元

2.1.1 促进神经元发育

自噬影响着神经元发育的多个方面,如神经元的发生和分化、轴突的生长等^[23]。通过降解和回收胞内废物,自噬为神经干细胞不断分裂与自我更新并分化成新的神经元和胶质细胞提供支持作用^[24]。在一项研究中,Atg7 存在变异家族的成员均有着不同方面和程度的神经发育障碍,如共济失调、发育迟缓和小脑发育不全等^[25]。ULK1、Beclin-1 和 LC3 突变体均表现出轴突再生受损,其中 Beclin-1 突变导致的 PLM 神经元(一种成熟的轴突再生模型)轴突再生缺陷最严重;而轴突损伤亦会导致胞内自噬囊泡增加,使用自噬诱导剂雷帕霉素可抑制因轴突损伤而诱导的自噬激活的减弱^[26]。自噬上游信号通路 PI3K/PKB/AKT/mTOR 广泛参与了神经元存活和增殖分化的调控^[27]。

2.1.2 维持神经元稳态

自噬在维持神经元稳态中扮演着重要的角色。

研究发现,Atg7 缺陷的多巴胺能(dopamine, DA)神经元因自噬丧失而出现广泛的突触核蛋白聚集且存在神经元的丢失^[28]。转录因子 EB 可通过提高 LC3B-II 的表达水平而激活自噬-溶酶体途径,从而缓解 6-羟多巴胺/抗坏血酸对 DA 神经元造成的氧化应激损伤^[29]。白藜芦醇通过激活 PI3K/AKT/mTOR 通路抑制自噬,改善了慢性脑缺血大鼠额叶皮层及海马区细胞的结构损伤和神经元变性,而在给予 PI3K 抑制剂后,神经元损伤严重,且伴气泡样结构增多^[30]。在脊髓损伤模型小鼠中,ULK1 在轴突球和受损轴突中积累,并与在脊髓损伤导致的轴突变性中起关键作用的 SARM1 蛋白存在直接相互作用^[31]。自噬抑制剂 3-MA 也被证明在多个方面参与了神经元的损伤修复及再生^[32]。

2.1.3 调节神经元凋亡

研究发现,在体外神经元氧化模型中,经沉默调节蛋白 1(sirtuin 1, SIRT1)激动剂处理后神经元的凋亡水平明显降低,与此同时,mTOR 蛋白水平明显下降而 LC3B 水平显著上升,表明 SIRT1 可能通过促进神经元自噬而减轻神经元的凋亡^[33]。经凋亡诱导剂 Staurosporine 处理的神经元内,凋亡标志物 caspase3 的激活促进了 Beclin-1 的裂解,若使 Beclin-1 具有 caspase3 抗性,则能显著提高神经元的存活率,减轻神经元的损失,这提示 Beclin-1 的切割是 caspase3 介导神经元凋亡的关键步骤^[34]。睡眠剥夺小鼠可出现认知和学习障碍,其海马区神经元存在结构损伤,且伴有凋亡蛋白和 Beclin-1、LC3B 水平明显提高以及 AKT、PI3K、mTOR 的磷酸化水平降低,这提示自噬过度激活为促进睡眠剥夺小鼠海马神经元损伤和凋亡的可能机制之一^[35]。

2.2 自噬与胶质细胞

2.2.1 调节胶质细胞稳态

研究发现,敲除了小胶质细胞 Atg7 的癫痫小鼠表现出髓鞘标记物增多,成熟少突胶质细胞密度增高^[36]。经醋酸铅处理的海马星形胶质细胞自噬激活,其中 p-AKT、p-mTOR 和 p62 蛋白表达明显降低,LC3-II 和 Beclin-1 表达水平上调,IL-1 β 和 TNF- α 也同样增多,而雷帕霉素可加重上述情况,提示星形胶质细胞通过抑制 AKT/mTOR 通路而诱导自噬,从而促进炎症反应和氧化应激,降低细胞存活率^[37]。条件敲除 Atg7 后,小胶质细胞出现脂滴积聚和向促炎状态转变,病理性 tau 的扩散加剧^[38]。

2.2.2 激活胶质细胞

胶质细胞的过度活化会引起多种神经炎症,因

此了解自噬在激活胶质细胞中的作用十分必要。Atg5 缺陷引起的自噬抑制能够激活小胶质细胞,并引起相应的神经炎症^[39]。脑缺血小鼠的星形胶质细胞中出现神经退行性相关蛋白 FUS 的聚集,进一步研究发现,FUS 聚集物可持续激活自噬,显著提高 LC3-II 蛋白水平,最终导致过度自噬,促进星形胶质细胞的活化^[40]。大脑中动脉闭塞大鼠的半影区中存在自噬激活,其 Beclin-1 和 LC3B 表达上升;经自噬诱导剂 Tat-Beclin-1 处理后,小胶质细胞显著活化,炎症反应进一步加重^[41]。

2.2.3 调控胶质细胞极化

小胶质细胞的极化类型分为两种:(1)有害极化 M1,通过分泌促炎因子诱发炎症,加重对神经功能的损害;(2)有益极化 M2,通过分泌抗炎因子抑制炎症,促进组织恢复。研究发现,经富氢培养基处理后,小胶质细胞 M1 极化的表达下降,M2 极化的表达上升,败血症诱导的神经炎症也得到缓解,同时检测出 Beclin-1 和 LC3-II/I 的表达明显增加,而 p-mTOR 和 p62 的表达降低,提示氢可通过调节 mTOR 通路而诱导自噬,从而促进小胶质细胞从 M1 极化向 M2 极化来减轻神经炎症^[42]。促炎因子 TNF- α 通过 AKT/mTOR 通路抑制自噬,诱导小胶质细胞向 M1 极化转变,而使用雷帕霉素激活自噬则可以促进小胶质细胞炎症消退和向 M2 表型极化^[43]。在缺血小鼠脑中,应激传感器蛋白 Sestrin2 通过抑制 mTOR 的表达而激活自噬,提高了 LC3-II/I 的比值并驱动了小胶质细胞向 M2 极化发展,从而发挥神经保护作用^[44]。

3 自噬与神经系统疾病

3.1 自噬与抑郁症

抑郁症属情感性精神障碍,临床多表现为持久反复的情绪低落、快感缺失、睡眠认知障碍和动作迟滞等^[45]。抑郁的病理表现为前额叶和海马的萎缩^[46-47],伴随神经元损伤和胶质细胞激活^[48-49]。越来越多的研究表明,自噬可能参与心理应激诱导的神经疾病的发生^[50]。因此,自噬已成为许多学者研究抑郁症的热点方向。对重度抑郁症患者进行尸检发现,前额叶皮质中 mTOR 的活性显著增强,提示自噬被抑制^[51]。高脂喂养后的小鼠出现抑郁样行为,发现其小胶质细胞和星形胶质细胞被激活,同时海马神经元中 p-AMPK、Atg7、Beclin-1 和 LC3 水平下调,而 p-mTOR 和 p62 水平升高,提示高

脂饮食诱导的肥胖可能通过 AMPK/mTOR 通路抑制自噬而导致小鼠抑郁样行为;经自噬诱导剂雷帕霉素治疗后,小鼠的抑郁样行为得到改善,这可能与雷帕霉素抑制 mTOR 通路,激活自噬,从而调节脂质代谢、保护神经元有关^[52]。氟西汀治疗后的抑郁小鼠行为得到逆转,其 Atg5、Beclin-1 和 LC3-II 的表达均上调,相反,小胶质细胞特异性自噬缺陷小鼠因自噬抑制而引发炎症,进而引发产后抑郁^[53]。罗格列酮是 2 型糖尿病的一种治疗药物,已被证明具有神经保护作用^[54-55]。研究表明,罗格列酮在体内的抑郁模型中均能发挥抗抑郁作用;进一步研究发现,罗格列酮可通过促进小鼠前额叶皮质神经元中的 AMPK 磷酸化,维持必要的神经元自噬,从而发挥改善抑郁的作用^[56]。

虽然大部分研究均表明自噬的过度抑制会引发抑郁症,激活自噬可改善抑郁症状,但也有研究表明,自噬对抑郁症存在负调控。自噬的过度激活会加重神经元损伤和促进神经元凋亡^[57-58]。脑卒中后抑郁大鼠可检测出海马 CA1 区 Beclin-1 和 LC3B-II/I 的表达上升,而 PI3K、p-AKT 和 p-mTOR 的表达下降,说明其存在自噬激活;针刺特定穴位可明显改善大鼠的抑郁症状,且能逆转上述情况,表明针刺特定穴位可能是通过激活 PI3K/AKT/mTOR 通路抑制自噬而发挥抗抑郁作用^[59]。类似的,广藿香醇可通过激活 mTOR 通路抑制过度自噬,从而显著缓解慢性不可预知性轻度应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 大鼠的抑郁症状^[60]。重度抑郁症患者存在自噬基因 LC3、Beclin-1 和 Atg12 的表达上调^[61]。抗抑郁药氯丙咪嗪和氟西汀均可降低原代游离神经元的自噬通量^[62]。

目前,关于抑郁状态下自噬是激活还是抑制尚未有定论,有研究发现,Beclin-1 和 LC3B 的表达随着中风模型急性损伤后取材时间的变化而改变^[41];此外,在 CUMS 造模后的不同时段,海马齿状回神经元存在不同的病理变化^[63]。因此,推测抑郁状态下自噬状态的不同可能与不同造模的时间以及检测时间有关。

3.2 自噬与阿尔茨海默病

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 俗称老年痴呆症,临床主要表现为认知和时空障碍、记忆力减退、性格冷漠等,其病理变化主要是胞外 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, β A β) 聚集形成老年斑 (senile plaque, SP) 以及 tau 蛋白过度磷酸化造成

的神经纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs)。自噬-溶酶体途径 (autophagy-lysosome pathway, ALP) 是细胞内重要的蛋白降解途径,当自噬功能异常时,胞内的 β A β 和 tau 蛋白因生成和降解失衡而大量堆积,进而细胞发生功能障碍甚至死亡^[64]。而具有 mTOR 抑制剂作用的天然产物蓝萼甲素则可以促进涉及 AKT/mTOR 通路的 β A β 清除,同时还能抑制 tau 磷酸化^[65]。研究发现,AD 患者死后大脑皮层中存在大量 SP 沉积,同时发现,海马神经元中自噬标记物 LC3 的数量增多,而溶酶体标记物 Lamp1 的表达减少,两者的共表达降低,这提示自噬体和溶酶体的融合被阻断或者溶酶体的数量减少,导致 AD 患者海马神经元的自噬水平下降^[66]。在 AD 小鼠脑组织中同样发现,Beclin-1 和 LC3 的 mRNA 和蛋白水平均显著降低,LC3B-II/I 比值也有所下降,说明其存在自噬抑制^[67]。大脑海马 CA1 区与学习记忆和认知能力的关系最为密切,该区神经元自噬功能发生变化时易影响 AD 患者的病情。研究表明,针灸治疗可显著改善 AD 患者的记忆及认知障碍,对其作用机理和分子机制进一步研究发现,电针干预后,AD 大鼠的海马 CA1 区中与神经元自噬密切相关的尼氏小体表达明显升高,提示电针可能通过提高神经元自噬水平而改善 AD 症状^[68]。多种 AMPK 激动剂和 mTOR 抑制剂,如雷帕霉素和二甲双胍,均被证明可通过提高神经元自噬水平而有效减少 β A β 蛋白的聚集,具有改善记忆和认知功能的作用,被认为是治疗阿尔茨海默病的潜在药物^[69]。

3.3 自噬与亨廷顿舞蹈症

亨廷顿舞蹈症 (Huntington's disease, HD) 是以神经障碍、不自主动作以及进行性痴呆为主要临床表现的神经退行性疾病,病变发生于基底节和大脑皮层,其神经元内的亨廷顿蛋白 (Huntingtin, HTT) 因 N-末端延长多聚谷氨酰胺序列 (polyglutamine, polyQ) 而变异,形成突变型亨廷顿蛋白 (mutant HTT, mHTT)。HTT 的降解对自噬具有高度依赖性,使用 mTOR 抑制剂激活自噬可以增加 HTT 片段的清除,减少蛋白的聚集倾向^[70]。在 HD 早期,Beclin-1 的过表达能清除 mHTT 聚集物并恢复部分神经元功能,但在晚期,mHTT 聚集明显并损害 Beclin-1 依赖的自噬,导致其无法逆转 mHTT 的相关表型,病情也进一步加重^[71-72]。L 型钙通道为 mTOR 独立的自噬通路,低浓度的 L 型钙通道阻滞剂非洛地平具有诱导自噬和清除聚集蛋白的作用;研究表明,非洛地平可通过激活神经元自噬而增强

mHTT 的清除,从而改善 B6HD 小鼠的运动协调能力^[73]。同时,有计划地喂食能通过改变 YAC128 小鼠的营养感知途径,激活小鼠大脑自噬,从而有助于 mHTT 的清除^[74]。以上研究表明,自噬在 HD 中有助于降解异常聚集的 mHTT 而缓解病情。但也有研究结果表明,R6/2 模型小鼠在 HD 早期即出现 mHTT 聚集体,但基础自噬水平并无明显改变^[75]。

3.4 自噬与帕金森病

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是以黑质致密区中的 DA 神经元进行性、广泛性变性丢失为特征的神经变性疾病,其神经元内存在以 α -核突触蛋白(α -synuclein, α -Syn)为主要成分的嗜酸性路易小体,临床主要表现为肌肉僵直、静止性震颤以及运动缓慢。PD 患者的 α -Syn 因突变而发生错误折叠与聚集,最终形成不溶性 α -Syn,其主要通过自噬途径进行降解。神经元内的自噬异常则会导致变性蛋白不能被及时清除而大量堆积,产生炎症反应和神经毒性^[76]。多个尸检研究发现,PD 患者大脑病理相关区域存在自噬功能受损,如黑质 DA 细胞中的自噬泡显著减少^[77]。Atg5 缺陷小胶质细胞引起的自噬丧失可导致小鼠出现帕金森病样症状^[39]。类似的,在 MPTP 诱导的急性和亚急性 PD 小鼠模型中,小胶质细胞 Atg5 的缺失可以加重小鼠的运动障碍和 DA 神经退行性病变^[78]。对于 N370SGBA 突变导致的 PD,胆固醇的增加会阻碍自噬-溶酶体的功能,其突变细胞中出现自噬结构和 p62 的积累,使病情进一步恶化^[79]。研究表明阿托伐他汀可以降低 PD 的风险,进一步研究发现,经阿托伐他汀处理的 MPTP 损伤小鼠的 DA 神经元中自噬通量增加,LC3-II/I 的比例明显上调,同时 α -SynSer129 的表达水平降低,提示阿托伐他汀可能是通过上调自噬而改善帕金森症状^[80]。艾灸可通过抑制 mTOR/p70S6K 通路激活自噬,从而促进帕金森模型大鼠黑质致密带中 α -Syn 的清除,明显改善其行为学表现^[81]。以上研究表明,自噬功能受损为 PD 的可能发病机制之一,提高自噬水平可改善帕金森症状。

3.5 自噬与精神分裂症

精神分裂症(Schizophrenia, SZ)是一种好发于青壮年时期的慢性重型精神障碍,主要表现为在感知觉、思维、情绪、行为、认知等多方面的障碍,如妄想、幻觉、情感淡漠等^[82]。近年来多个研究表明,自噬是精神分裂症发生发展的重要参与者。SZ 患者的自噬相关基因存在异常,当自噬受损时,积累的代谢产物及蛋白可产生细胞毒性,引发神经元功能障碍^[83]。对死后 SZ 患者的大脑分析发现,其背外

侧前额叶皮层中 mTOR 蛋白的表达和磷酸化水平均降低,说明 mTOR 的活性下降,可能存在自噬激活^[84]。研究发现,ULK2 杂合小鼠会出现精神分裂样症状,其前额叶皮层神经元内的 p62 蛋白表达上调,提示自噬水平降低,而经自噬诱导剂雷帕霉素类似物处理后,ULK2 杂合小鼠的 p62 水平下调且感觉运动障碍和认知障碍均得到缓解^[85]。氯氮平是一种非典型抗精神病药,对于严重的难治性精神障碍具有良好的疗效。研究发现,在经氯氮平处理的大鼠的前额叶皮层中,AMPK、ULK1 和 Beclin-1 磷酸化水平升高,LC3-II 和 Atg5-Atg12 缀合物蛋白表达上调,透射电镜也显示其自噬体数量明显增加,提示自噬激活;而在体外注射 AMPK 抑制剂化合物 C 后,上述蛋白水平均受到显著抑制,说明氯氮平可能是通过前额叶皮层的 AMPK/ULK1/Beclin-1 信号通路激活自噬而发挥疗效^[86]。越来越多研究表明,调节神经元自噬可能为抗精神药物产生疗效的重要机制之一^[87]。

4 小结与展望

综上,大多数研究结果提示神经系统疾病的发生及加重是自噬的过度抑制所致,而激活自噬则可以改善相应的症状,这与自噬为细胞保护机制的说法相一致。但自噬对于抑郁症的调控可能具有双重作用^[88],也有研究发现 SZ 患者死后大脑的背外侧前额叶皮层存在自噬激活,这可能与 SZ 患者生前服用抗精神药物有关^[84]。此外,自噬在 HD 的早期和晚期所起的调控作用并不相同^[72]。因此,未来可进一步研究自噬在不同疾病状态下调控作用的差异,这将有助于临床根据病情阶段选择合适的以自噬为靶点的药物,从而取得更好的治疗效果。

参考文献:

- [1] DIKIC I, ELAZAR Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19(6): 349-364.
- [2] STAVOE A K H, HOLZBAUR E L F. Autophagy in neurons [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2019, 35(1): 477-500.
- [3] 杨龙灿, 张莹, 余曦, 等. 细胞自噬与 ULK1 蛋白关系的研究进展 [J]. 医学综述, 2018, 24(23): 4635-4639, 4646. YANG L C, ZHANG Y, YU X, et al. Research progress of the relationship between autophagy and ULK1 protein [J]. Med Recapitul, 2018, 24(23): 4635-4639, 4646.
- [4] KAMADA Y, FUNAKOSHI T, SHINTANI T, et al. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex [J]. J Cell Biol, 2000, 150(6): 1507-13.
- [5] CAUX M, CHICANNE G, SEVERIN S. Class III PI3K biology

- [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2022, 436: 69–93.
- [6] DOOLEY H C, RAZI M, POLSON H E, et al. WIPI₂ links LC3 conjugation with PI₃P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1 [J]. *Mol Cell*, 2014, 55 (2): 238–252.
- [7] WALCZAK M, MARTENS S. Dissecting the role of the Atg12-Atg5-Atg16 complex during autophagosome formation [J]. *Autophagy*, 2013, 9(3): 424–425.
- [8] JENSEN L E, RAO S, SCHUSCHNIG M, et al. Membrane curvature sensing and stabilization by the autophagic LC3 lipidation machinery [J]. *Sci Adv*, 2022, 8(50): eadd1436.
- [9] JEONG S J, ZHANG X, RODRIGUEZ-VELEZ A, et al. p62/SQSTM1 and selective autophagy in cardiometabolic diseases [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 31(6): 458–471.
- [10] PANKIV S, CLAUSEN T H, LAMARK T, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(33): 24131–24145.
- [11] SINGH R, KAUSHIK S, WANG Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism [J]. *Nature*, 2009, 458(7242): 1131–1135.
- [12] LI Y, YANG P, ZHAO L, et al. CD36 plays a negative role in the regulation of lipophagy in hepatocytes through an AMPK-dependent pathway [J]. *J Lipid Res*, 2019, 60(4): 844–855.
- [13] DING M, ZHOU F, LI Y, et al. *Cassiae Semen* improves non-alcoholic fatty liver disease through autophagy-related pathway [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(3): 421–429.
- [14] 花蕊, 葛亮, 马欣宇. 聚集体自噬研究进展 [J]. *自然杂志*, 2023, 45(1): 68–78.
- HUA R, GE L, MA X Y. Recent advances in aggrephagy research [J]. *Chin J Nat*, 2023, 45(1): 68–78.
- [15] KOCATURK N M, GOZUACIK D. Crosstalk between mammalian autophagy and the ubiquitin-proteasome system [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6: 268.
- [16] COZZI M, FERRARI V. Autophagy dysfunction in ALS: from transport to protein degradation [J]. *J Mol Neurosci*, 2022, 72 (7): 1456–1481.
- [17] YAO R Q, REN C, XIA Z F, et al. Organelle-specific autophagy in inflammatory diseases: a potential therapeutic target underlying the quality control of multiple organelles [J]. *Autophagy*, 2021, 17(2): 385–401.
- [18] WU X, ZHENG Y, LIU M, et al. BNIP3L/NIX degradation leads to mitophagy deficiency in ischemic brains [J]. *Autophagy*, 2021, 17(8): 1934–1946.
- [19] HABTEZION A, GUKOVSKAYA A S, PANDOL S J. Acute pancreatitis: a multifaceted set of organelle and cellular interactions [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156 (7): 1941–1950.
- [20] DERETIC V, LEVINE B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations [J]. *Cell Host Microbe*, 2009, 5(6): 527–549.
- [21] RAZA I G A, CLARKE A J. B cell metabolism and autophagy in autoimmunity [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 681105.
- [22] LIU D, WU H, WANG C, et al. STING directly activates autophagy to tune the innate immune response [J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(9): 1735–1749.
- [23] LV M, MA Q. Autophagy in neurodevelopmental disorders [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1207: 171–182.
- [24] LLAMAS E, ALIRZAYEVA H, LOUREIRO R, et al. The intrinsic proteostasis network of stem cells [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2020, 67: 46–55.
- [25] COLLIER J J, GUISSART C, OLÁHOVÁ M, et al. Developmental consequences of defective ATG7-mediated autophagy in humans [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(25): 2406–2417.
- [26] KO S H, APPLE E C, LIU Z, et al. Age-dependent autophagy induction after injury promotes axon regeneration by limiting NOTCH [J]. *Autophagy*, 2020, 16(11): 2052–2068.
- [27] 张治楠, 梁丽艳, 连嘉惠, 等. 中枢神经系统 PI3K/AKT/mTOR 信号通路研究进展 [J]. *实用医学杂志*, 2020, 36 (5): 689–694.
- ZHANG Z N, LIANG L Y, LIAN J H, et al. PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Central Nervous System [J]. *J Pract Med*, 2020, 36(5): 689–694.
- [28] SATO S, UCHIHARA T, FUKUDA T, et al. Loss of autophagy in dopaminergic neurons causes Lewy pathology and motor dysfunction in aged mice [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2813.
- [29] ZHUANG X X, WANG S F, TAN Y, et al. Pharmacological enhancement of TFEB-mediated autophagy alleviated neuronal death in oxidative stress-induced Parkinson's disease models [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 128.
- [30] 王楠. 白藜芦醇抑制自噬改善慢性脑缺血性认知功能障碍的机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- WANG N. Mechanism of resveratrol inhibiting autophagy and improving cognitive dysfunction in chronic cerebral ischemia [D]. Changchun: Jilin University, 2020.
- [31] CHOI H M C, LI Y, SURAJ D, et al. Autophagy protein ULK1 interacts with and regulates SARM1 during axonal injury [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(47): e2203824119.
- [32] 封秀梅, 许明敏, 黄辰, 等. 自噬抑制剂 3-MA 在神经系统疾病中的作用的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29 (8): 129–134.
- FENG X M, XU M M, HUANG C, et al. Research progress on the role of autophagy inhibitor, 3-methyladenine, in nervous system diseases [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(8): 129–134.
- [33] 王淳, 叶润发, 吕鹏飞, 等. SIRT1 调节 PI3K/AKT/mTOR 自噬途径对神经元凋亡的改善作用 [J]. *医学研究生学报*, 2022, 35(11): 1144–1149.
- WANG C, YE R F, LV P F, et al. SIRT1 reduces neuronal apoptosis by regulating the PI3K/AKT/mTOR autophagy pathway during nerve injury repair [J]. *J Med Postgrad*, 2022, 35(11): 1144–1149.
- [34] BIERI G, LUCIN K M, O' BRIEN C E, et al. Proteolytic cleavage of beclin 1 exacerbates neurodegeneration [J]. *Mol Neurodegener*, 2018, 13(1): 68.
- [35] CAO Y, LI Q, LIU L, et al. Modafinil protects hippocampal neurons by suppressing excessive autophagy and apoptosis in mice

- with sleep deprivation [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(9): 1282–1297.
- [36] ALAM M M, ZHAO X F, LIAO Y, et al. Deficiency of microglial autophagy increases the density of oligodendrocytes and susceptibility to severe forms of seizures [J]. *eNeuro*, 2021, 8(1): 183.
- [37] 黄营英. 海马星形胶质细胞自噬在铅诱导神经毒性中的作用及机制研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2022.
- HUANG Y Y. Study on the role and mechanism of autophagy of hippocampal astrocytes in lead-induced neurotoxicity [D]. Shenyang: China Medical University, 2022.
- [38] XU Y, PROPSON N E, DU S, et al. Autophagy deficiency modulates microglial lipid homeostasis and aggravates tau pathology and spreading [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(27): e2023418118.
- [39] CHENG J, LIAO Y, DONG Y, et al. Microglial autophagy defect causes parkinson disease-like symptoms by accelerating inflammasome activation in mice [J]. *Autophagy*, 2020, 16(12): 2193–2205.
- [40] WU S, YIN Y, DU L. FUS aggregation following ischemic stroke favors brain astrocyte activation through inducing excessive autophagy [J]. *Exp Neurol*, 2022, 355: 114144.
- [41] HE H Y, REN L, GUO T, et al. Neuronal autophagy aggravates microglial inflammatory injury by downregulating CX3CL1/fractalkine after ischemic stroke [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(2): 280–288.
- [42] ZHUANG X, YU Y, JIANG Y, et al. Molecular hydrogen attenuates sepsis-induced neuroinflammation through regulation of microglia polarization through an mTOR-autophagy-dependent pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 81: 106287.
- [43] JIN M M, WANG F, QI D, et al. A critical role of autophagy in regulating microglia polarization in neurodegeneration [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 378.
- [44] HE T, LI W, SONG Y, et al. Sestrin2 regulates microglia polarization through mTOR-mediated autophagic flux to attenuate inflammation during experimental brain ischemia [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 329.
- [45] BELVEDERI MURRI M, AMORE M, RESPINO M, et al. The symptom network structure of depressive symptoms in late-life: results from a European population study [J]. *Mol Psychiatry*, 2020, 25(7): 1447–1456.
- [46] BELLEAU E L, TREADWAY M T, PIZZAGALLI D A. The impact of stress and major depressive disorder on hippocampal and medial prefrontal cortex morphology [J]. *Biol Psychiatry*, 2019, 85(6): 443–453.
- [47] ZACKOVÁ L, JÁNI M, BRÁZDIL M, et al. Cognitive impairment and depression: Meta-analysis of structural magnetic resonance imaging studies [J]. *Neuroimage Clin*, 2021, 32: 102830.
- [48] IDUNKOVA A, LACINOVA L, DUBIEL-HOPPANOVA L. Stress, depression, and hippocampus: from biochemistry to electrophysiology [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2023, 42(2): 107–122.
- [49] JIA X, GAO Z, HU H. Microglia in depression: current perspectives [J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(6): 911–925.
- [50] WOO H, HONG C J, JUNG S, et al. Chronic restraint stress induces hippocampal memory deficits by impairing insulin signaling [J]. *Mol Brain*, 2018, 11(1): 37.
- [51] SALORT G, HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ E, GARCIA-FUSTER M J, et al. Regulation of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors, neuroprotective mTOR and pro-apoptotic JNK1/2 kinases in postmortem prefrontal cortex of subjects with major depressive disorder [J]. *J Affect Disord*, 2020, 276: 626–635.
- [52] LI Y, CHENG Y, ZHOU Y, et al. High fat diet-induced obesity leads to depressive and anxiety-like behaviors in mice via AMPK/mTOR-mediated autophagy [J]. *Exp Neurol*, 2022, 348: 113949.
- [53] TAN X, DU X, JIANG Y, et al. Inhibition of autophagy in microglia alters depressive-like behavior via BDNF pathway in postpartum depression [J]. *Front Psychiatry*, 2018, 9: 434.
- [54] KUSHWAHA R, MISHRA J, GUPTA A P, et al. Rosiglitazone up-regulates glial fibrillary acidic protein via HB-EGF secreted from astrocytes and neurons through PPAR γ pathway and reduces apoptosis in high-fat diet-fed mice [J]. *J Neurochem*, 2019, 149(5): 679–698.
- [55] PENG J, WANG K, XIANG W, et al. Rosiglitazone polarizes microglia and protects against pilocarpine-induced status epilepticus [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(12): 1363–1372.
- [56] ZHAO Z, ZHANG L, GUO X D, et al. Rosiglitazone exerts an anti-depressive effect in unpredictable chronic mild-stress-induced depressive mice by maintaining essential neuron autophagy and inhibiting excessive astrocytic apoptosis [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 293.
- [57] GUPTA R, AMBASTA R K, KUMAR P. Autophagy and apoptosis cascade: which is more prominent in neuronal death? [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78: 8001–8047.
- [58] LIU T, HAN S, DAI Q, et al. IL-17A-mediated excessive autophagy aggravated neuronal ischemic injuries via src-PP2B-mTOR pathway [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2952.
- [59] 孙培养, 李佩芳, 王涛, 等. “通督调神”针刺对脑卒中后抑郁大鼠海马 PI3K/Akt/mTOR 通路及自噬相关蛋白的影响 [J]. *中国针灸*, 2020, 40(11): 1205–1210.
- SUN P Y, LI P F, WANG T, et al. Effect of Tongdu Tiaoshen acupuncture on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and autophagy-related proteins of hippocampus in rats with post-stroke depression [J]. *Chin Acupunct Moxibustion*, 2020, 40(11): 1205–1210.
- [60] ZHUO J, CHEN B, SUN C, et al. Patchouli alcohol protects against chronic unpredictable mild stress-induced depressant-like behavior through inhibiting excessive autophagy via activation of mTOR signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110115.
- [61] ALCOCER-GÓMEZ E, CASAS-BARQUERO N, NÚÑEZ-VASCO J, et al. Psychological status in depressive patients correlates with metabolic gene expression [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2017,

- 23(10): 843–845.
- [62] CAVALIERE F, FORNARELLI A, BERTAN F, et al. The tricyclic antidepressant clomipramine inhibits neuronal autophagic flux [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 4881.
- [63] HUANG Y L, ZENG N X, CHEN J, et al. Dynamic changes of behaviors, dentate gyrus neurogenesis and hippocampal miR-124 expression in rats with depression induced by chronic unpredictable mild stress [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(6): 1150–1159.
- [64] KUANG H, TAN C Y, TIAN H Z, et al. Exploring the bi-directional relationship between autophagy and Alzheimer's disease [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2020, 26(2): 155–166.
- [65] ZHOU T, ZHUANG J, WANG Z, et al. Glaucoalyxin A as a natural product increases amyloid β clearance and decreases tau phosphorylation involving the mammalian target of rapamycin signaling pathway [J]. *Neuroreport*, 2019, 30(4): 310–316.
- [66] LONG Z, CHEN J, ZHAO Y, et al. Dynamic changes of autophagic flux induced by Abeta in the brain of postmortem Alzheimer's disease patients, animal models and cell models [J]. *Aging*, 2020, 12(11): 10912–10930.
- [67] WU S, WEI Y, LI J, et al. SIRT5 represses neurotrophic pathways and $a\beta$ production in Alzheimer's disease by targeting autophagy [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12(23): 4428–4437.
- [68] 赵盼盼. 电针对 AD 大鼠记忆能力和海马神经元自噬、凋亡及 Syn 表达的影响 [D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2020.
- ZHAO P P. Effects of electroacupuncture on memory ability, autophagy, apoptosis and Syn expression of hippocampal neurons in AD rats [D]. Xianyang: Shanxi University of Chinese Medicine, 2020.
- [69] ZHANG Z, YANG X, SONG Y Q, et al. Autophagy in Alzheimer's disease pathogenesis: therapeutic potential and future perspectives [J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 72: 101464.
- [70] CROCE K R, YAMAMOTO A. A role for autophagy in Huntington's disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 122: 16–22.
- [71] ASHKENAZI A, BENTO C F, RICKETTS T, et al. Polyglutamine tracts regulate beclin 1-dependent autophagy [J]. *Nature*, 2017, 545(7652): 108–111.
- [72] BRATTÅS P L, HERSBACH B A, MADSEN S, et al. Impact of differential and time-dependent autophagy activation on therapeutic efficacy in a model of Huntington disease [J]. *Autophagy*, 2021, 17(6): 1316–1329.
- [73] SIDDIQI F H, MENZIES F M, LOPEZ A, et al. Felodipine induces autophagy in mouse brains with pharmacokinetics amenable to repurposing [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1817.
- [74] EHRNHOFER D E, MARTIN D D O, SCHMIDT M E, et al. Preventing mutant huntingtin proteolysis and intermittent fasting promote autophagy in models of Huntington disease [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2018, 6(1): 16.
- [75] VIJAY KUMAR M J V, SHAH D, GIRIDHARAN M, et al. Spatiotemporal analysis of soluble aggregates and autophagy markers in the R6/2 mouse model [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 96.
- [76] HOU X, WATZLAWIK J O, FIESEL F, et al. Autophagy in Parkinson's disease [J]. *J Mol Biol*, 2020, 432(8): 2651–2672.
- [77] AROTICARENA M L, TEIL M, DEHAY B. Autophagy in synucleinopathy: the overwhelmed and defective machinery [J]. *Cells*, 2019, 8(6): 565.
- [78] QIN Y, QIU J, WANG P, et al. Impaired autophagy in microglia aggravates dopaminergic neurodegeneration by regulating NLRP3 inflammasome activation in experimental models of Parkinson's disease [J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 91: 324–338.
- [79] GARCÍA-SANZ P, ORGAZ L, FUENTES J M, et al. Cholesterol and multilamellar bodies: lysosomal dysfunction in GBA-parkinson disease [J]. *Autophagy*, 2018, 14(4): 717–718.
- [80] YAN J, HUANG J, LIU A, et al. Atorvastatin improves motor function, anxiety and depression by NOX2-mediated autophagy and oxidative stress in MPTP-lesioned mice [J]. *Aging*, 2020, 13(1): 831–845.
- [81] WANG S J, WANG Q, MA J, et al. Effect of moxibustion on mTOR-mediated autophagy in rotenone-induced Parkinson's disease model rats [J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(1): 112–118.
- [82] MARDER S R, CANNON T D. Schizophrenia [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(18): 1753–1761.
- [83] YANG Y, XU L. Autophagy and schizophrenia [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1207: 195–209.
- [84] CHADHA R, MEADOR-WOODRUFF J H. Downregulated AKT-mTOR signaling pathway proteins in dorsolateral prefrontal cortex in Schizophrenia [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2020, 45(6): 1059–1067.
- [85] SUMITOMO A, YUKITAKE H, HIRAI K, et al. Ulk2 controls cortical excitatory-inhibitory balance via autophagic regulation of p62 and GABAA receptor trafficking in pyramidal neurons [J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(18): 3165–3176.
- [86] KIM S H, PARK S, YU H S, et al. The antipsychotic agent clozapine induces autophagy via the AMPK-ULK1-Beclin1 signaling pathway in the rat frontal cortex [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2018, 81: 96–104.
- [87] VUCICEVIC L, MISIRKIC-MARJANOVIC M, HARHAJI-TRAJKOVIC L, et al. Mechanisms and therapeutic significance of autophagy modulation by antipsychotic drugs [J]. *Cell Stress*, 2018, 2(11): 282–291.
- [88] 吴婷, 张静思, 向军, 等. 自噬在抑郁症发生发展中作用的研究进展 [J]. *复旦学报(医学版)*, 2018, 45(4): 573–577.
- WU T, ZHANG J S, XIANG J, et al. Research progress in the role of autophagy in the development of depression [J]. *Fudan Univ J Med Sci*, 2018, 45(4): 573–577.

张千遥,程浩,黄依桢,等. Δ^9 -四氢大麻酚对血脑屏障作用的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 120-126.
Zhang QY, Cheng H, Huang YZ, et al. Research progress on the effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on the blood-brain barrier [J].
Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 120-126.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.015

Δ^9 -四氢大麻酚对血脑屏障作用的研究进展

张千遥¹,程浩¹,黄依桢¹,腾喊信²,张越¹,张瑞林^{1*}

(1.昆明医科大学法医学院,昆明 650500;2.昆明医科大学基础医学院,昆明 650500)

【摘要】 大麻素的精神活性是众所周知的,关于大麻素在全世界是否可以用于治疗也一直存在争议。而 Δ^9 -四氢大麻酚(Δ^9 -tetrahydrocannabinol, THC)作为大麻中最主要的精神活性物质,它的神经作用机制直到最近才发现,但其作用机理仍未完全明确。血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)是保护大脑的关键屏障结构,也是外来物质入脑的第一道防线,THC 的亲脂性及与内源性大麻素系统的相互作用使其更加容易对 BBB 产生作用。本文综述了 THC 的神经毒理作用,聚焦于 THC 对 BBB 的作用与机制,为阐明 THC 的神经作用机制提供理论依据。

【关键词】 Δ^9 -四氢大麻酚;血脑屏障;内源性大麻素系统;大麻;药物滥用;神经毒性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0120-07

Research progress on the effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on the blood-brain barrier

ZHANG Qianyao¹, CHENG Hao¹, HUANG Yizhen¹, TENG Hanxin², ZHANG Yue¹, ZAHNG Ruilin^{1*}

(1. Kunming Medical University, School of Forensic Medicine, Kunming 650500, China.

2. Kunming Medical University, School of Basic Medicine, Kunming 650500)

【Abstract】 The psychoactive properties of cannabinoids are well known, and there are controversies over whether cannabinoids can be used for therapeutic purposes worldwide. Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) is the main psychoactive substance in cannabis. The neurological mechanisms of THC were only recently discovered, and its neurological mechanism of action is still not fully understood. The blood-brain barrier (BBB) is a very important structure protecting the brain and is the first line of defense preventing foreign substances from entering the brain. THC's lipophilic nature and its interaction with the endocannabinoid system make it more likely to act on the BBB. In this paper, we review the neurotoxic effects of THC, focusing on its effect and mechanism of action on the BBB, and provide a theoretical basis for studies elucidating the neural mechanism of THC.

【Keywords】 Δ^9 -tetrahydrocannabinol; blood-brain barrier; endocannabinoid system; cannabinol; drug abuse; neurotoxicity

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

大麻是一种在世界范围内广泛种植的一年生草本植物,其种植历史悠久,应用广泛,是一种富有价值的经济作物。在现代,大麻的药用价值及经济

价值不断被开发,工业大麻产业化迅速发展,现代工业的发展使合成大麻素也层出不穷,在美国、加拿大等国家大麻使用已经合法化,并在国际范围内

【基金项目】 国家自然科学基金(82260654)。

【作者简介】 张千遥(2000—),女,硕士,研究方向:法医毒理与毒物学研究。E-mail:18717399962@163.com

【通信作者】 张瑞林(1986—),男,博士,副教授,研究方向:法医毒理与毒物学研究。E-mail:zrlorg@126.com

有扩大趋势。大麻中含有丰富的植物大麻素,目前已知的植物大麻素已经超过 545 种,其中研究最广泛、精神活性最强的成分是 Δ^9 -四氢大麻酚^[1] (Δ^9 -tetrahydrocannabinol, THC),也是大麻成瘾的关键成分。因此,在大麻产品于市场上广泛流通且难以管制之前,需要更好地了解 THC 在各种生命过程中的作用,以及如何有效评估所涉及的益处和风险。

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)是神经血管单元(the neurovascular unit, NVU)的核心,它在神经元组织和为大脑供血的血管网络之间形成半透性屏障,可以保护大脑免受外来物质侵袭损伤。血脑屏障受损,会导致外来毒性药物进入大脑,加重其神经毒性,引起神经元损伤,还会导致外周免疫细胞不必要地渗入大脑中,从而加剧免疫反应的过度激活。另一方面,毒性药物穿透或损伤血脑屏障是发挥神经毒理作用的前提。了解 THC 对 BBB 的作用可能为 THC 神经作用研究开拓新的研究思路,因此,本文总结了 THC 在 BBB 中的作用及机制,特别关注病理生理学背景下的 BBB,从而深入了解 THC 的作用机制和长期影响,更好地理解其药理效应,以便优化大麻的使用和管理。

1 Δ^9 -四氢大麻酚的药理毒理作用

THC 是天然大麻素中发挥精神活性作用的主要成分,含量也较高,其结构(图 1)最初是由 Mechoulam 和 Gaoni 于 1964 年确定的^[1]。基于大麻的药用价值,最初对于 THC 的研究集中于它的镇静、镇痛作用^[2]。后来研究发现 THC 对中枢神经系统也有一定的影响,使用后可产生欣快感,具有致幻、兴奋和成瘾性^[3]。长期摄入 THC 会使机体产生依赖性,并可损害认知记忆^[4],诱发精神病症状和焦虑,导致神经认知障碍^[5],也会引起神经炎症。近年来,开始关注 THC 对其他系统生理功能的影响,如生殖系统^[6-8]、心血管系统^[9-11]、免疫系统^[12-13]、消化系统^[14]等。最新研究开始开发 THC 的各种治疗作用^[15]。THC 的研究发展历程久远,关于 THC 的争议也从未停止,目前科学家们仍在辩论 THC 的长期影响。

2 Δ^9 -四氢大麻酚与内源性大麻素系统的作用机制

内源性大麻素系统(endocannabinoid system, ECS)包括内源性大麻素(endocannabinoids, ECB)、它们的生物合成酶和分解代谢酶,以及它们相应的受体。在过去的十余年中,研究发现内源性大麻素

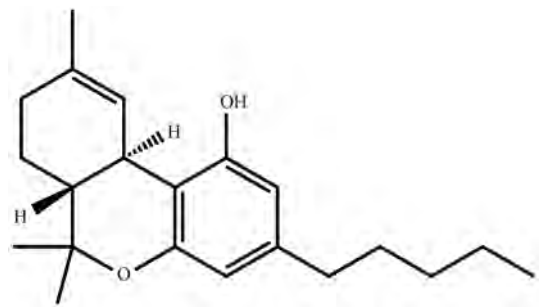


图 1 Δ^9 -四氢大麻酚(THC)的化学结构

Figure 1 Chemical structure of Δ^9 -tetrahydrocannabinol

系统参加包括中枢和周围神经系统以及外周器官等多部位的一系列生理和病理过程的调节。ECB 中花生四烯基乙醇胺(anandamide, AEA)和 2-花生四烯酰甘油(2-arachidinoylglycerol, 2-AG)是两种研究最广泛的内源性大麻素。据科学研究报道,由于 THC 与 AEA 结构上的类似性,THC 在啮齿动物和人类^[16]中引起与 AEA 相似的生物学效应。

THC 通过与内源性的脂质信号网络——内源性大麻素系统相互作用产生广泛的药理作用,特别是与大麻素受体 1(cannabinoid receptor 1, CB1R)和大麻素受体 2(cannabinoid receptor 2, CB2R)的相互作用。THC 通过在 CB1R 和 CB2R 上充当部分激动剂来模拟 AEA 和 2-AG^[17]。它在这些受体上的活性与许多生理效应有关,如抑制腺苷酸环化酶活性和 Ca^{2+} 内流,减少环磷酸腺苷的形成和蛋白激酶 A 活性,激活内向整流钾通道和刺激有丝分裂原激活的蛋白激酶信号级联^[18]。除 CB1R 和 CB2R 之外,THC 还与阿片样受体、肾上腺素受体等其他一些受体结合发挥作用^[19](表 1)。

3 Δ^9 -四氢大麻酚对血脑屏障的作用

BBB 是一个复杂的神经血管系统,在维持正常神经系统功能及多种神经系统疾病(如炎症反应、神经退行性疾病、缺血性脑卒中和创伤性脑损伤等)的发病机制中均发挥作用。血脑屏障内皮由脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMVECs)和紧密连接蛋白(tight junction proteins, TJPs)组成,与神经血管单元的其他组成部分(即星形胶质细胞、小胶质细胞、血管周围巨噬细胞、周细胞、神经元)通信,以协调进出中枢神经系统的生物分子运输。与外周内皮细胞相比, BBB 中的内皮细胞存在一些特殊的细胞形态、生理特性和功能:没有开窗,从而限制了外来物质进入大脑;存

表 1 THC 与 CB1R、CB2R 之外的某些受体和/或通道靶定

受体或通道 Receptor or channel	影响 Effect	浓度 Concentration
μ 阿片样受体 μ opioid	取代 Displacement	IC ₅₀ = 7 μmol/L
μ 阿片样受体 μ opioid	解离 Dissociation	EC ₅₀ = 21. 4 μmol/L
δ 阿片样受体 δ opioid	解离 Dissociation	EC ₅₀ = 10 μmol/L
β-肾上腺素受体 β-adrenoceptor	增强 Potentiation	3&10 μmol/L
5-HT _{3A}	拮抗 Antagonism	IC ₅₀ = 38 μmol/L
甘氨酸受体(α1) Glycine (α1)	增强 Potentiation	EC ₅₀ = 86 nmol/L
甘氨酸受体(α1β1) Glycine(α1β1)	增强 Potentiation	EC ₅₀ = 73 nmol/L
甘氨酸受体 Glycine	增强 Potentiation	EC ₅₀ = 115 nmol/L
T 型钙通道(Ca _v 3) T-type calcium (Ca _v 3) channels	抑制 Inhibition	1 μmol/L
K _v 1. 2 钾通道 Potassium K _v 1. 2 channels	抑制 Inhibition	IC ₅₀ = 2. 4 μmol/L
TRPA1	激活 Activation	20 μmol/L, 400 μmol/L
TRPV2	激活 Activation	EC ₅₀ = 16&43 μmol/L
PPARγ	激活 Activation	100 nmol/L, 10 μmol/L

注:激活:激活受体;拮抗:拮抗激动剂诱导的受体激活;取代:取代特定结合位点的放射性配体;解离:加速放射性配体从特定结合位点的解离;抑制:抑制通道电流;增强:增强激动剂的作用或增强离子通道电流及配体结合。
Note. Activation, Activation of a receptor. Antagonism, Antagonism of agonist-induced activation of a receptor. Displacement, Displacement of a radioligand from a specific binding site. Dissociation, Acceleration of dissociation of a radioligand from a specific binding site. Inhibition, Signs of inhibition of channel currents. Potentiation, Potentiation of the effect of an agonist or enhancement of ion channel currents or ligand binding.

在紧密连接蛋白,构成细胞间紧密连接,是 BBB 中调节屏障通透性的关键结构;线粒体数量增加。这些特性使 BBB 具有特殊的通透性及调节机制。基于上述结构和功能,BBB 通过限制进入大脑的物质运输,防止神经毒素、免疫细胞和外界有毒大分子的流入,从而防止这些物质诱导的神经元凋亡和胶质细胞激活,发挥神经保护作用。

THC 的脂溶性特性使其很容易与 BBB 结合,BBB 上存在的 ECS 也构成了 THC 的作用基础,THC 可以通过穿透或损伤 BBB 影响大脑。关于 THC 的研究众说纷纭,本文将 THC 对 BBB 产生影响的研究分为损伤和保护两部分进行论述。每部分又从细胞和机制两方面进行分析,讨论的机制包括体温极端变化、氧化应激、炎症、线粒体功能障碍、过量的细胞外谷氨酸导致活性氧(reactive oxygen species,ROS)和活性氮(reactive nitrogen species,RNS)的产生。

3.1 Δ⁹-四氢大麻酚对血脑屏障的损伤作用

3.1.1 细胞作用

THC 对 BBB 的细胞组成和功能具有广泛的作用(表 2)。最新研究发现 THC 在人内皮细胞中诱导产生细胞毒性,在小鼠模型中可以引起血管功能障碍,导致内皮细胞炎症和氧化应激^[20]。THC 可以激活 CB1R,而在病理条件下,内皮细胞中的 CB1R 激活可能会通过 ROS-MAPK 途径引起内皮细胞死亡^[20]。而 THC 也可以通过诱导 ERK1/2 激活抑制内皮细胞间连接通讯,进而抑制内皮衍生的超极化因子介导的血管舒张作用^[21]。此外,有研究表明 THC 通过 RhoA/MLC 信号传导导致胎盘微血管系统改变,损害胎盘血管生成^[26]。THC 还可以通过环氧化酶依赖性机制增加卵巢中血管内皮生长因子的分泌^[27],从而影响女性的生殖健康和生育能力,这种现象可能是由于损伤刺激引起的。许多的研究发现有理证明,THC 在很大程度上可以影响微

表 2 不同剂量的 THC 对血脑屏障细胞的影响
Table 2 Effects of different doses of THC on blood-brain barrier cells

给药剂量 Dose administration	影响细胞 Affected cells	影响机制 Impact mechanisms
5 μmol/L ^[20]	人脐静脉内皮细胞和人 冠状动脉内皮细胞 Human umbilical vein endothelial cells and human coronary artery endothelial cells	诱导炎症相关基因的表达,降低了抗氧化 相关基因的表达,产生细胞毒性 It induces the expression of inflammation-related genes, reduces the expression of antioxidant-related genes, and leads to cellular cytotoxicity
10 μmol/L ^[21]	人脐静脉内皮细胞 Human umbilical vein endothelial cells	增加了 ERK1/2 的磷酸化并抑制内皮细胞间连接通讯 It enhances the phosphorylation of ERK1/2 and inhibits intercellular communication in endothelial cells
2.5,5,10 mg/kg ^[22]	星形胶质细胞 Astrocyte	星形胶质细胞功能障碍,促炎标志物水平增加,抗炎细胞因子减少 Dysfunction of astrocytes, the level of pro-inflammatory markers is increased, while anti-inflammatory cytokines are decreased
8 mg/kg ^[23]	星形胶质细胞 Astrocyte	星形胶质细胞可以通过炎症信号放大 THC 产生的认知障碍 Astrocytes can amplify the cognitive impairment caused by THC through inflammatory signaling
≥20 μmol/L ^[24]	星形胶质细胞 Astrocyte	降低细胞活力,引起凋亡 Reduced cellular vitality leading to apoptosis
5 mg/kg ^[25]	小胶质细胞 Microglia	破坏小胶质细胞稳态,引起内源性大麻素系统功能障碍 Disruption of microglial homeostasis leading to dysfunction in the endocannabinoid system

血管内皮细胞正常生理功能。

在 BBB 中,星形胶质细胞与内皮细胞、周细胞接触,共同封闭了细胞间隙,同时星形胶质细胞也与神经元发生联系,有助于调节神经元兴奋性,保持神经递质稳态。而小胶质细胞在调控 BBB 组成与功能发挥上也具有重要作用。有研究发现,长期使用 THC 会导致雄性大鼠星形胶质细胞标志物 GFAP 的表达增加,促炎标志物水平增加,抗炎细胞因子表达减少,引起星形胶质细胞功能障碍^[22]。而青春期雌性大鼠频繁使用低剂量的 THC 会破坏小胶质细胞稳态,使小胶质细胞的关键功能失效,持续到成年早期,对大脑和心理健康产生潜在的广泛影响^[28]。

还有研究发现,THC 也会影响其他细胞的功能。Braille 等^[29]发现 CBR 激动剂通过还原血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A) 调节中性粒细胞,减少体外血管生成,降低内皮血管的通透性,而 THC 在体内是 CBR 的部分激动剂,也存在影响中性粒细胞的潜力。

3.1.2 损伤机制

体温的极端变化与 BBB 渗透性增加有关。Kiyatkin 和 Sharma^[30]报告说,体温过高和过低都会改变 BBB 功能,轻微的体温变化即可使 BBB 渗透性改变。在 THC 诱导的多种效应中,有 4 种标志性的反应,称为四联体效应^[31],即低体温、低运动、镇

痛和麻痹。而极低剂量 THC 又会导致小鼠体温升高、对有害刺激的反应增强和运动活动增加^[32]。无论是 THC 诱导的体温升高还是体温降低,均可以通过影响体温变化影响 BBB,进而影响物质通透性。

氧化应激在 BBB 破坏中的作用已得到充分表征。在伴随 BBB 破坏的各种神经退行性疾病中,氧化应激与 BBB 破坏有关^[33]。在新生小鼠的大脑发育期间,THC 暴露会影响神经营养、氧化应激和细胞凋亡的标志物从而影响大脑发育过程,导致不良后果^[34]。THC 暴露会对水生生物产生危害,会导致脂质过氧化、蛋白质羰基化和 DNA 损伤显著增加,进而导致生物毒性^[35]。动物实验表明,THC 急性暴露可以导致大鼠白细胞和脑细胞中的低水平 DNA 损伤,并诱导大脑发生氧化应激反应^[36]。

由于 BBB 独特的生理特性,使其对能量的需求增高,线粒体功能障碍会直接影响 BBB 的功能。Wolff 等^[37]证明 THC 诱导大鼠脑线粒体呼吸链功能障碍并增加氧化应激。然而,也有研究发现 THC 不会在离体心脏模型中导致线粒体功能障碍,并未观察到活性氧产生、线粒体肿胀、氧化应激和脂质过氧化等有害改变^[38]。

神经兴奋毒性作用,尤其是过量的细胞外谷氨酸会导致 ROS 和 RNS 的产生,并引起 BBB 破坏。有研究结果表明,在兔主动脉内皮细胞中,内源性大麻素 AEA 类似物通过激活 G_i 蛋白和磷脂酰肌醇

3-激酶作用于一种新型的非 CB1R、CB2R 和信号,导致内皮细胞 NOS 激活和 NO 生成,从而调节血管通透性^[39]。而 THC 作为 AEA 类似物,在体内发挥精神活性,也可能通过不同的途径对 RNS 产生不同的影响。

3.2 Δ^9 -四氢大麻酚对血脑屏障的保护影响

3.2.1 细胞作用

最近,有很多研究开始聚焦于开发 THC 的保护作用。有研究发现,大鼠脑外伤后星形胶质细胞和小胶质细胞的激活显著增加,而内源性大麻素 2-AG、AEA 的降解抑制剂治疗阻断了这两种细胞的激活^[40]。THC 作为外源性的 AEA 类似物,可以产生相当于 AEA 降解抑制的作用,从而通过阻断小胶质细胞激活,对脑损伤发挥一定的保护作用。THC 也可以通过 IFN- β /STAT 途径抑制 BV-2 小胶质细胞中脂多糖激活的炎症反应^[41],从而发挥一定的神经保护作用。

3.2.2 保护机制

炎症是导致血脑屏障损伤的重要因素。Henriquez 等^[42]发现在细胞水平,THC 处理可以通过抑制 CD8 效应细胞功能,减少 CD8 T 细胞衍生的炎性细胞因子对星形胶质细胞的活化,从而减轻 CD8 T 细胞依赖性神经炎症。在细胞共培养体系中,THC 可以通过抑制 Toll 样受体 7 (toll-like receptor 7, TLR7) 诱导的单核细胞分泌 IL-1 β ,从而导致星形胶质细胞 MCP-1 和 IL-6 分泌减少,抑制炎症反应^[43]。THC 在体外可以减弱 NLRP3 炎症小体信号的传导,抑制促炎细胞因子产生,从而抑制炎症反应^[44]。THC 作为选择性 CBR 激动剂,可以在体外激活 CB2R,并部分通过 CB1R 和/或 CB2R 激活减少小鼠炎症和炎症性疼痛^[45]。从炎症角度来讲,THC 可能对血脑屏障损伤产生一定的保护作用。

在线粒体功能障碍方面,Nguyen 等^[46]发现,在谷氨酸诱导的原代小鼠脑切片培养中,THC 可以恢复线粒体膜电位,通过 CB1R 依赖性机制拮抗细胞凋亡,发挥神经保护作用。关于 THC 对 BBB 中线粒体功能的作用及机制,有待于后续更多的研究来进行明确。

激活的离子型钙可通过谷氨酸受体(如 NMDA 和 AMPA 受体)使细胞内钙增加,随后激活半胱天冬酶和钙蛋白酶以及 NO 和 ROS 的产生。因此,细胞外谷氨酸的增加可能对脑内皮细胞有毒性作用,

因为它们表达 NMDA 受体并响应钙流入和氧化应激的增加^[47]。在暴露于毒性水平谷氨酸的大鼠皮质神经元培养物中发现 THC 可以降低谷氨酸毒性,防止 ROS 诱导的氧化损伤。THC 可能通过抑制谷氨酸释放对氧化应激诱导的 BBB 损伤发挥防御性保护作用。此外,大麻素也可能通过激活 CB1R 和抑制下游 PKA 信号,干扰小鼠皮层神经元 NO 的产生,从而保护神经元免受兴奋性毒性损伤^[48]。

4 结论与展望

THC 的神经毒性和精神依赖性已经有了许多的研究,与此相反,最近越来越多的研究开始聚焦于它的一些神经保护潜力和机制。基于 THC 的多重作用及亲脂性,在更深入的研究其神经保护作用时,需要关注 THC 的药效学和效力方面的差异,进一步开发其相关的潜在治疗靶点,同时应更加注意其毒理作用。由于 THC 是大麻中关键的精神活性成分,同时近年来层出不穷的合成大麻素也是根据 THC 的化学结构演变而来,明确 THC 的作用机制可以溯其本根,更好地优化大麻制品的使用。THC 对 BBB 的作用是 THC 发挥神经作用的前提,然而并没有太多研究关注 THC 对 BBB 的影响,因此明确 THC 与 BBB 相关的作用机制十分重要。本文综述了 THC 对大脑的影响,尤其关注了 THC 与内源性大麻素系统的相互作用,聚焦于 THC 对 BBB 的保护和损害作用以及机制研究,为 THC 的神经作用提供新的思路和借鉴。未来的研究应该集中于揭示确切的机制,阐明 THC 诱导血管损伤或保护作用时的不同生理状态、作用时机和给药剂量。有必要进行长期研究,观察在较长时间内损害的累积,并追踪是否有可能恢复以及恢复程度。THC 影响 BBB 的作用机制和产生的效应是复杂而充满未知的,今后需要更多的研究来阐明其影响。

参考文献:

- [1] CROCO M A. History of cannabis and the endocannabinoid system [J]. *Dialogues Clin Neurosci*, 2020, 22(3): 223-228.
- [2] PATON W. Cannabis and its problems [J]. *Proc R Soc Med*, 1973, 66: 718-722.
- [3] BHATTACHARYYA S, MORRISON P D, FUSAR-POLI P, et al. Opposite effects of Δ -9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on human brain function and psychopathology [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2010, 35(3): 764-774.
- [4] TSELNICKER I, KEREN O, HEFETZ A, et al. A single low dose of tetrahydrocannabinol induces long-term cognitive deficits

- [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 411(2): 108–111.
- [5] RAMAEKERS J G, MASON N L, KLOFT L, et al. The why behind the high: determinants of neurocognition during acute cannabis exposure [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2021, 22(7): 439–454.
- [6] LO J O, HEDGES J C, GIRARDI G. Impact of cannabinoids on pregnancy, reproductive health, and offspring outcomes [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2022, 227(4): 571–581.
- [7] METZ T D, ALLSHOUSE A A, HOGUE C J, et al. Maternal marijuana use, adverse pregnancy outcomes, and neonatal morbidity [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2017, 217(4): 478.e1–478.e8.
- [8] SHAH D S, TURNER E L, CHROUST A J, et al. Marijuana use in opioid exposed pregnancy increases risk of preterm birth [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2022, 35(25): 8456–8461.
- [9] O'SULLIVAN S E, TARLING E J, BENNETT A J, et al. Novel time-dependent vascular actions of Delta9-tetrahydrocannabinol mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337(3): 824–831.
- [10] BANASZKIEWICZ M, TARWACKA P, KRZYWONOS-ZAWADZKA A, et al. Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) improves ischemia/reperfusion heart dysfunction and might serve as a cardioprotective agent in the future treatment [J]. *Front Biosci*, 2022, 27(4): 114.
- [11] MERVE A O, SOBIECKA P, REMEŠKEVICIUS V, et al. Metabolites of *Cannabis* induce cardiac toxicity and morphological alterations in cardiac myocytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1401.
- [12] BHATT H K, SONG D, MUSGRAVE G, et al. Cannabinoid-induced changes in the immune system: the role of microRNAs [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 98: 107832.
- [13] RODRÍGUEZ MESA X M, MORENO VERGARA A F, CONTRERAS BOLAÑOS L A, et al. Therapeutic prospects of cannabinoids in the immunomodulation of prevalent autoimmune diseases [J]. *Cannabis Cannabinoid Res*, 2021, 6(3): 196–210.
- [14] TARTAKOVER MATALON S, AZAR S, MEIRI D, et al. Endocannabinoid levels in ulcerative colitis patients correlate with clinical parameters and are affected by *Cannabis* consumption [J]. *Front Endocrinol*, 2021, 12: 685289.
- [15] SARNE Y. Beneficial and deleterious effects of cannabinoids in the brain: the case of ultra-low dose THC [J]. *Am J Drug Alcohol Abuse*, 2019, 45(6): 551–562.
- [16] CLAPPER J R, MANGIERI R A, PIOMELLI D. The endocannabinoid system as a target for the treatment of cannabis dependence [J]. *Neuropharmacology*, 2009, 56(Suppl 1): 235–243.
- [17] MCPARTLAND J M, DUNCAN M, DI MARZO V, et al. Are cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(3): 737–753.
- [18] MERRICK J, LANE B, SEBREE T, et al. Identification of psychoactive degradants of cannabidiol in simulated gastric and physiological fluid [J]. *Cannabis Cannabinoid Res*, 2016, 1(1): 102–112.
- [19] PERTWEE R G. Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(14): 1360–1381.
- [20] WEI T T, CHANDY M, NISHIGA M, et al. Cannabinoid receptor 1 antagonist genistein attenuates marijuana-induced vascular inflammation [J]. *Cell*, 2022, 185(13): 2387–2389.
- [21] BRANDES R P, POPP R, OTT G, et al. The extracellular regulated kinases (ERK) 1/2 mediate cannabinoid-induced inhibition of gap junctional communication in endothelial cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2002, 136(5): 709–716.
- [22] ZAMBERLETTI E, GABAGLIO M, GRILLI M, et al. Long-term hippocampal glutamate synapse and astrocyte dysfunctions underlying the altered phenotype induced by adolescent THC treatment in male rats [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 111: 459–470.
- [23] JOUROUKHIN Y, ZHU X, SHEVELKIN A V, et al. Adolescent Δ^9 -tetrahydrocannabinol exposure and astrocyte-specific genetic vulnerability converge on nuclear factor- κ B-cyclooxygenase-2 signaling to impair memory in adulthood [J]. *Biol Psychiatry*, 2019, 85(11): 891–903.
- [24] CAMPBELL V A. Tetrahydrocannabinol-induced apoptosis of cultured cortical neurones is associated with cytochrome c release and caspase-3 activation [J]. *Neuropharmacology*, 2001, 40(5): 702–709.
- [25] LEE HL, JUNG KM, FOTIO Y, et al. Frequent low-dose Δ^9 -tetrahydrocannabinol in adolescence disrupts microglia homeostasis and disables responses to microbial infection and social stress in young adulthood [J]. *Biol Psychiatry*, 2022, 92(11): 845–860.
- [26] CHANG X, LI H, LI Y, et al. RhoA/MLC signaling pathway is involved in Δ^9 -tetrahydrocannabinol-impaired placental angiogenesis [J]. *Toxicol Lett*, 2018, 285: 148–155.
- [27] MARTÍNEZ-PEÑA A A, PETRIK J J, HARDY D B, et al. Δ^9 -tetrahydrocannabinol increases vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion through a cyclooxygenase-dependent mechanism in rat granulosa cells [J]. *Reprod Toxicol*, 2022, 111: 59–67.
- [28] ZAMBERLETTI E, GABAGLIO M, PRINI P, et al. Cortical neuroinflammation contributes to long-term cognitive dysfunctions following adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol treatment in female rats [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2015, 25(12): 2404–2415.
- [29] BRAILE M, CRISTINZIANO L, MARCELLA S, et al. LPS-mediated neutrophil VEGF-A release is modulated by cannabinoid receptor activation [J]. *J Leukoc Biol*, 2021, 109(3): 621–631.
- [30] KIYATKIN E A, SHARMA H S. Permeability of the blood-brain

- barrier depends on brain temperature [J]. *Neuroscience*, 2009, 161(3): 926–939.
- [31] LONG L E, CHESWORTH R, HUANG X F, et al. A behavioural comparison of acute and chronic Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in C57BL/6JArc mice [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2010, 13(7): 861–876.
- [32] SARNE Y, ASAF F, FISHBEIN M, et al. The dual neuroprotective-neurotoxic profile of cannabinoid drugs [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 163(7): 1391–1401.
- [33] NORTHROP NICOLE A, YAMAMOTO BRYAN K. Methamphetamine effects on blood-brain barrier structure and function [J]. *Front Neurosci*, 2015, 9: 69.
- [34] PHILIPPOT G, FORSBERG E, TAHAN C, et al. A single δ 9-tetrahydrocannabinol (THC) dose during brain development affects markers of neurotrophyl, oxidative stress, and apoptosis [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1156.
- [35] PAROLINI M, BINELLI A. Oxidative and genetic responses induced by Δ -9-tetrahydrocannabinol (Δ -9-THC) to *Dreissena polymorpha* [J]. *Sci Total Environ*, 2014, 468/469: 68–76.
- [36] KOPJAR N, FUCHS N, ŽUNEC S, et al. DNA damaging effects, oxidative stress responses and cholinesterase activity in blood and brain of wistar rats exposed to Δ^9 -tetrahydrocannabinol [J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 1560.
- [37] WOLFF V, SCHLAGOWSKI A I, ROUYER O, et al. Tetrahydrocannabinol induces brain mitochondrial respiratory chain dysfunction and increases oxidative stress; a potential mechanism involved in cannabis-related stroke [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 323706.
- [38] SALIMI A, NIKNEJAD M, MINOUEI M, et al. Analysis of toxicity effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on isolated rat heart mitochondria [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2022, 32(2): 106–113.
- [39] MCCOLLUM L, HOWLETT A C, MUKHOPADHYAY S. Anandamide-mediated CB1/CB2 cannabinoid receptor-independent nitric oxide production in rabbit aortic endothelial cells [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 321(3): 930–937.
- [40] KATZ P S, SULZER J K, IMPASTATO R A, et al. Endocannabinoid degradation inhibition improves neurobehavioral function, blood-brain barrier integrity, and neuroinflammation following mild traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2015, 32(5): 297–306.
- [41] KOZELA E, PIETR M, JUKNAT A, et al. Cannabinoids Delta (9)-tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF- κ B and interferon- β /STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(3): 1616–1626.
- [42] HENRIQUEZ J E, BACH A P, MATOS-FERNANDEZ K M, et al. Delta(9)-Tetrahydrocannabinol (THC) Impairs CD8(+) T Cell-Mediated Activation of Astrocytes [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2020, 15(4): 863–874.
- [43] RIZZO M D, CRAWFORD R B, BACH A, et al. Δ^9 -tetrahydrocannabinol suppresses monocyte-mediated astrocyte production of monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin-6 in a toll-like receptor 7-stimulated human coculture [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2019, 371(1): 191–201.
- [44] SURYAVANSHI S V, ZAIACHUK M, PRYIMAK N, et al. Cannabinoids alleviate the LPS-induced cytokine storm via attenuating NLRP3 inflammasome signaling and TYK2-mediated STAT3 signaling pathways *in vitro* [J]. *Cells*, 2022, 11(9): 1391.
- [45] BOLOGNINI D, COSTA B, MAIONE S, et al. The plant cannabinoid Delta9-tetrahydrocannabivarin can decrease signs of inflammation and inflammatory pain in mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 160(3): 677–687.
- [46] NGUYEN C H, KREWENKA C, RADAD K, et al. THC (Δ 9-tetrahydrocannabinol) exerts neuroprotective effect in glutamate-affected murine primary mesencephalic cultures through restoring mitochondrial membrane potential and anti-apoptosis involving CB1 receptor-dependent mechanism [J]. *Phytother Res*, 2016, 30(12): 2044–2052.
- [47] SHARP C D, HOUGHTON J, ELROD J W, et al. N-methyl-D-aspartate receptor activation in human cerebral endothelium promotes intracellular oxidant stress [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288(4): H1893–H1899.
- [48] KIM S H, WON S J, MAO X O, et al. Molecular mechanisms of cannabinoid protection from neuronal excitotoxicity [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 69(3): 691–696.

[收稿日期] 2023-05-31

朱美萍,张世忠. TRP 通道介导线粒体功能调控及其与心血管疾病关系研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 127-132.

Zhu MP, Zhang SZ. Progress of research into mitochondria functional regulation by transient receptor potential channels and its relevance to cardiovascular diseases [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 127-132.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.016

TRP 通道介导线粒体功能调控及其与心血管疾病关系研究进展

朱美萍,张世忠*

(三峡大学国家中医药管理局中药药理科研三级实验室,三峡大学基础医学院,湖北 宜昌 443000)

【摘要】 瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)通道是一类非选择性阳离子通道。近年来研究发现 TRP 通道与多种疾病有关,其中关于 TRP 通道通过线粒体功能调控参与相关心血管疾病机制的研究,正成为心血管疾病机制研究的热点之一。目前相关的文献主要集中在 TRPV、TRPM 和 TRPC。本文主要就上述 3 种 TRP 通道在线粒体功能调节中的作用及其与心血管疾病的关系研究进展进行综述。

【关键词】 TRP 通道;线粒体功能;心血管疾病

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0127-06

Progress of research into mitochondria functional regulation by transient receptor potential channels and its relevance to cardiovascular diseases

ZHU Meiping, ZHANG Shizhong*

(Third-grade Pharmacological Laboratory on Traditional Chinese Medicine, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Medical College, China Three Gorges University, Yichang 443000, China)

【Abstract】 Transient receptor potential (TRP) channels are non-selective cation channels. In recent years, a large number of studies have found that TRP channels participate in a variety of cardiovascular diseases. How mitochondrial function is regulated by TRP channels and the relationship to cardiovascular diseases have become research hotspots. Up to now, related studies have mainly focused on TRPV, TRPM, and TRPC channels. This review focuses on the roles of the above TRP channels in the regulation of mitochondrial function and their relationships to cardiovascular diseases.

【Keywords】 TRP channel; mitochondria function; cardiovascular disease

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

瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)通道属于一类非选择性的阳离子通道^[1-2]。在哺乳动物体内,根据其结构和序列的相似性分为 6 个亚家族,即 TRPC、TRPM、TRPML、TRPV、TRPP 和 TRPA,这些离子通道在结构上一般都有 6 次跨膜结

构,但各亚家族之间的整体结构差异很大。TRP 通道参与人体多种生理功能的调节,如视觉、触觉、味觉、温度觉、血压等^[3-4]。近年来研究发现 TRP 通道家族中的 TRPV、TRPM 和 TRPC 可通过线粒体功能调控在相关心血管疾病机制中发挥重要作用。

【基金项目】 国家自然科学基金(30872716)。

【作者简介】 朱美萍(1996—),女,硕士,研究方向:心血管生理药理。E-mail:1499551789@qq.com

【通信作者】 张世忠(1970—),男,教授,博士生导师,研究方向:心肌保护作用和抗心肌功能衰退机制。E-mail:zhangsz@ctgu.edu.cn

1 TRPV 通道的线粒体调控与心血管系统疾病

TRPV 通道中 TRPV1 和 TRPV4 与线粒体功能调节密切相关。

1.1 TRPV1

TRPV1 是非选择性的阳离子通道,可被缺氧、组织损伤和炎症、 H^+/K^+ 、缓激肽、活性氧和前列腺素等物理或化学物质激活^[5]。TRPV1 除在心脏的伤害性传入神经 C 纤维中表达外^[6]。在体外培养的 H9C2 细胞、原代心肌细胞中均发现 TRPV1 与线粒体之间存在共定位现象^[7-8]。提示 TRPV1 可通过调节线粒体功能参与心血管疾病的发生发展。

TRPV1 可通过促进线粒体相关内质网膜 (mitochondria-associated membranes, MAMs) 形成,减轻压力负荷过载诱导的心肌肥厚。MAMs 是内质网和线粒体之间形成的动态膜结构,是两者沟通的重要桥梁^[9]。MAMs 形成受阻,导致内质网与线粒体之间的沟通中断,细胞稳态破坏,从而引发相关的心血管疾病^[10-11]。在主动脉缩窄术模拟压力负荷增高模型的实验中发现,辣椒素激活 TRPV1 后,磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMP-dependent/activated protein kinase, AMPK) 磷酸化水平升高、丝裂融合蛋白 2 (mitofusin-2, MFN2) 的蛋白表达上调,促进了 MAMs 形成,从而改善线粒体功能,减少细胞凋亡,减轻压力负荷过载诱导的心肌细胞肥大;且利用 siRNA 将 MFN2 敲低后, MAMs 形成受阻, TRPV1 介导的线粒体保护效应消失,提示 TRPV1 可通过 AMPK/MFN2 途径促进 MAMs 形成,改善线粒体功能,减轻压力负荷过载诱导的心脏肥大^[12]。

TRPV1 通过影响线粒体 ATP 生成参与心肌重构的调节。线粒体通过氧化磷酸化生成 ATP 是心脏收缩舒张的主要能量来源^[13-15]。心力衰竭时心肌主要依赖于糖酵解生成 ATP,但合成量不到正常心脏需要的 5%;同时在此过程中大量葡萄糖会进入旁路代谢,乳酸生成增加导致 ATP 进一步减少,无法满足心脏的能量需求,加重病理性心肌重构^[16]。线粒体复合物 I 在细胞能量生成的过程中发挥了重要作用^[7],NDUFA9 是复合物 I 组装所需的必需亚单位之一,参与稳定复合体 I 的膜和基质臂之间的连接,对维持复合体 I 生物发生和活性至关重要^[17]。在瞬时电位离子通道蛋白 TRPV1 与心肌重构关系的研究中发现,TRPV1 基因敲除或高盐饮食可导致线粒体复合物 I 氧化磷酸化 (complex I

oxidative phosphorylation, CIOXPPOS) 的能力破坏,复合物 I 酶活性降低,心肌肥厚加重;然而给予 TRPV1 的激动剂辣椒素后 TRPV1 表达升高,去乙酰化蛋白酶 3 和 CI 生成的关键蛋白 NDUFA9 的表达上调, CIOXPPOS 的能力增强,从而维持 ATP 生成,改善心肌肥厚^[7]。表明 TRPV1 激活后可促进线粒体 ATP 生成。

TRPV1 通过调控线粒体 ROS 生成参与相关心血管疾病机制。ROS 可引起线粒体膜通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 开放增加,线粒体膜电位丢失,最终导致 ATP 生成减少、细胞色素 c 等释放增加,触发相关的凋亡途径引起心肌细胞死亡^[16],缺血再灌注损伤加重^[18]。线粒体呼吸链和 NADPH 氧化酶是心肌细胞中 ROS 的主要来源^[19]。研究发现,香烟烟雾成份巴豆醛激活 TRPV1 后, NADPH 氧化酶活性增强, ROS 生成增多,最终导致香烟介导的心脏收缩功能降低^[20]。

TRPV1 可通过调节线粒体膜电位参与心血管疾病的发生发展。在 H9C2 心肌细胞中, TRPV1 激动剂 capsaicin 可通过增加细胞内 Ca^{2+} 和线粒体超氧化物歧化酶水平,降低线粒体膜电位,抑制线粒体生物合成酶 β 的表达,促使细胞凋亡,加重 H9C2 心肌细胞缺氧/复氧损伤,而用 TRPV1 拮抗剂 capsazepine 或 TRPV1 siRNA 下调 TRPV1 后,细胞凋亡被抑制,线粒体膜电位得以恢复,心肌细胞缺氧/复氧损伤减轻^[21]。此外,在原代培养的心肌细胞中发现,辣椒素处理后, TRPV1 表达上调,钙调神经磷酸酶表达升高,线粒体膜电位降低;给予 TRPV1 拮抗剂辣椒碱或钙调神经磷酸酶抑制剂环孢菌素后,线粒体膜电位升高。这表明 TRPV1 介导的线粒体膜电位变化可能依赖于钙调神经磷酸酶^[8]。

乙醛脱氢酶 (aldehyde dehydrogenase, ALDH) 可以保护心肌免受阿霉素诱导的线粒体损伤, TRPV1 参与了该过程。ALDH 是一种线粒体酶,可将有毒的活性醛通过催化氧化成非活性酸而减轻细胞损伤^[22]。阿霉素可使小鼠 TRPV1 蛋白表达降低,线粒体完整性破坏,左心室收缩末期和舒张末期直径增大,收缩期缩短和细胞内 Ca^{2+} 减少,舒张期延长,细胞内 Ca^{2+} 衰减;而 ALDH 过表达小鼠, TRPV1 蛋白表达升高,上述现象逆转;给予 TRPV1 的拮抗剂后 ALDH 诱导的保护效应消失,说明 ALDH 可通过 TRPV1 介导的线粒体完整性抵抗阿霉素诱导的心

脏毒性^[23]。

1.2 TRPV4

TRPV4 是 TRP 通道香草醇家族的第四个成员,可被钙调素、低 pH、内源性大麻素等化学刺激和剪切力、热刺激等机械刺激激活^[24]。TRPV4 主要的生理作用是调节血管的舒张功能^[25],与心血管疾病的发生发展密切相关,如肺动脉高压^[26]、充血性心力衰竭^[27]、心肌肥厚^[28]、心纤维化^[29]、心肌缺血再灌注损伤^[30]、急性心肌梗死^[31]等。近年来,有研究报道 TRPV4 在各种细胞系的亚细胞器包括线粒体中有表达^[32]。并且 TRPV4 点突变会导致线粒体形态异常,导致疾病发生^[33-34]。在分离的人冠状动脉(human coronary arterioles, HCAs)中,4 α -PDD 激活 TRPV4,导致细胞内 Ca²⁺ 内流增加, H₂O₂ 和超氧化物的大量生成,血管强烈扩张,血流量增加;TRPV4 拮抗剂和 TRPV4 特异性小干扰 RNA 可抑制 TRPV4 激活,从而导致 Ca²⁺ 内流减少, H₂O₂ 和超氧化物的生成减少,最终抑制血管扩张,冠脉血流量减少^[25]。

2 TRPM 通道的线粒体调控与心血管疾病

TRPM 是 TRP 通道亚家族的成员之一,根据其 C-末端卷曲螺旋的同源序列将其分为 TRPM1/M3、M2/M8、M4/M5 和 M6/M7 4 个组^[35],目前研究报道表明其中的 TRPM2、TRPM4 和 TRPM8 与线粒体功能障碍介导的心血管疾病密切相关。

2.1 TRPM2

TRPM2 是一种非选择性 Ca²⁺ 通透性阳离子通道,对氧化应激十分敏感^[36]。TRPM2 可通过调节线粒体膜电位、ROS、ATP 的生成及线粒体自噬而影响疾病的发生发展^[37]。TRPM2 通道参与了缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)诱导的抗心肌损伤过程。HIF-1 是一种含碱性螺旋-环-螺旋-PAS 结构域的转录因子,由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 亚单位组成^[38],可调节参与能量和氧化还原稳态的 FoxO3a 和 SOD2、电子传递链中复合体 I 的 NDUFA4L2 和线粒体自噬 BNIP3 等的转录,其中, SOD2、BNIP3 和生理复合物 I 活性之间的协同作用可以降低线粒体 ROS 水平^[39]。在心肌缺血-再灌注、缺氧-复氧或多柔比星所诱导的氧化应激状态下,心脏 TRPM2 通道被激活后,引起 Ca²⁺ 内流并激活钙调神经磷酸酶,使活化 C 激酶 1 受体(receptor for activated C kinase 1, RACK1)去磷酸化,从而阻止其与热休克蛋白 90(heat shock protein 90, Hsp90)竞

争结合 HIF-1 α PAS 结构域, HIF-1 α 降解被抑制,进而导致 FoxO3a、SOD1、SOD2、NDUFA4L2 和 BNIP3 表达增加,ROS 生成减少,线粒体膜电位升高,心肌氧化应激损伤减轻^[39-40]。

TRPM2 还可通过调控富含脯氨酸的酪氨酸激酶-2(phosphorylates proline-rich tyrosine kinase-2, Pyk 2)影响线粒体功能,参与心肌缺血氧化应激损伤。Pyk 2 是一种细胞质酶^[41],心肌缺血再灌注氧化损伤时,TRPM2 表达增强, Ca²⁺ 内流增多, Pyk 2 磷酸化增强,导致其从胞质转移到线粒体基质,促进 MCU 磷酸化和低聚型 MCU 通道孔的形成,从而促使线粒体摄取 Ca²⁺ 并通过 Krebs 循环为线粒体电子传递链提供电子,维持低水平的 ATP 生成,为细胞提供生存所需的能量;磷酸化的 Pyk 2 还可通过激活其下游促存活信号通路,如 Akt 和 ERK1/2,从而保护心脏免受缺血氧化损伤^[42]。

2.2 TRPM4

TRPM4 是 TRP 通道亚家族成员之一^[43],其与心肌缺血再灌注损伤有关。缺血开始时,心肌 ATP 生成逐渐减少,钙离子泵功能障碍,导致细胞内 Ca²⁺ 积累;而 Ca²⁺ 增加会进一步消耗 ATP,从而导致 ATP 不断减少、Ca²⁺ 不断增加,最终激活心肌细胞中的 TRPM4^[44]。H₂O₂ 模拟大鼠心肌细胞的缺血再灌注损伤的实验中发现, H₂O₂ 处理后的心肌细胞, TRPM4 表达升高,同时细胞内 Ca²⁺ 水平升高,ROS 生成增加,线粒体膜电位和 ATP 水平降低;TRPM4 敲除后, H₂O₂ 诱导的心肌细胞内 Ca²⁺ 内流减少、ROS 生成减少,线粒体膜电位升高和 ATP 含量增加, H₂O₂ 介导的心肌细胞损伤减轻^[45]。

2.3 TRPM8

TRPM8 主要在感觉神经中分布^[46],可被低温(<28 °C)或薄荷醇激活,但也有研究表明其在脉管系统中大量表达^[47]。TRPM8 参与了 RhoA/Rho 介导的血管平滑肌功能损伤机制。RhoA 介导的 Rho 激酶是血管平滑肌细胞功能的主要调节因子^[48];可被活性氧激活,导致肌球蛋白磷酸酶靶亚基 1(myosin phosphatase target protein-1, MYPT-1)和肌球蛋白轻链 20(myosin light chain 20, MLC20)磷酸化增强,血管收缩加强^[49]。内质网中的 TRPM8 被薄荷醇激活后会促进内质网释放 Ca²⁺ 进入线粒体内,导致线粒体 Ca²⁺ 增加;而这种线粒体 Ca²⁺ 浓度的瞬变增强了三羧酸循环中丙酮酸脱氢酶的活性以及线粒体氧化磷酸化的能力,从而使 ROS 生成减

少,进而抑制 RhoA/Rho 信号通路激活,最终导致血管平滑肌收缩减弱^[46]。

3 TRPC 通道的线粒体调控与心血管系统疾病

TRPC 通道在神经系统和心血管系统中广泛分布,比如心脏、脑、视网膜内皮等。随着研究的深入,发现 TRPC3 在线粒体中也有定位^[50]。线粒体 TRPC3 激活后,Ca²⁺ 内流增加,ROS 生成增多。利用特异性抑制剂 Pyr 3 将 TRPC3 抑制后发现,血管

线粒体 Ca²⁺ 内流和 ROS 生成减少,进而导致 AngII 诱导的丙酮酸脱氢酶活性降低,复合体 I 氧化磷酸化能力增强,ATP 合成增多,血管收缩减弱,从而缓解高血压^[51]。

TRPC3 参与了高盐诱导的心肌肥厚。高盐饮食的小鼠心肌细胞线粒体 TRPC3 表达升高,线粒体摄取的钙增加,ROS 生成增多,心房钠尿肽、脑钠尿肽和 β-MHC 的蛋白表达升高,ATP 生成减少和线粒体复合物 I 和 II 酶活性降低;而抑制 TRPC3 后,

表 1 在心血管系统中 TRP 通道介导线粒体功能调控的总结
Table 1 Summary of TRP channel mediated mitochondrial function regulation in cardiovascular system

瞬时电位离子通 TRP channels	表达 Express	机制 Mechanism	损伤 Damage	作用 Function
瞬时受体电位香草酸亚型 1 (Transent receptor potential vanilloid 1,TRPV1)	升高 ^[12] Up	通过磷酸腺苷活化蛋白激酶/丝裂融合蛋白 2 促进线粒体相关内质网膜形成 By AMP-dependent/activated protein kinase/mitofusin-2 (AMPK/MFN2) to promote the synthesis of mitochondria-associated membranes (MAM)	压力负荷过载诱导的心肌肥厚 Cardiac hypertrophy induced by pressure overload	保护 Protection
	升高 ^[7] Up	通过去乙酰化蛋白酶 3/泛醌氧化还原酶亚基 A9 促进能量生成 By deacetylase3/NDUFA9 to promote the generate of ATP	高盐诱导的心肌肥厚 High salt-induced myocardial hypertrophy	保护 Protection
	升高 ^[21] Up	膜电降低 Reduce of membrane potential	心肌缺血再灌注损伤 Myocardial ischemia-reperfusion loss	伤害 Damage
	降低 ^[23] Down	破坏线粒体完整性 Disruption of the mitochondrial integrity	阿霉素诱导的心脏毒性 Adriamycin-induced cardiotoxicity	伤害 Damage
瞬时受体电位香草素受 4 型 通道蛋白 (Transent receptor potential vanilloid 4,TRPV4)	升高 ^[25] Up	促进活性氧生成 Promote the generate of ROS	冠脉血流减少 Decreased coronary blood flow	伤害 Damage
	升高 ^[39,40] Up	抑制活性氧生成 Inhibit the generate of ROS	氧化应激损伤 Oxidative stress loss	伤害 Damage
瞬时受体电位离子通道蛋白 2 (Transent receptor potential melastatin 2,TRPM2)	升高 ^[42] Up	维持低水平能量生成 Maintain a low level of ATP production	心肌缺血再灌注损伤 Myocardial ischemia-reperfusion loss	保护 Protection
	升高 ^[45] Up	活性氧大量生成、膜电位降低、能量生成减少 Production of ROS, decreased membrane potential and ATP	心肌缺血再灌注损伤 Myocardial ischemia-reperfusion loss	伤害 Damage
瞬时受体电位离子通道蛋白 4 (Transent receptor potential melastatin 4,TRPM4)	升高 ^[46] Up	钙离子内流增加、活性氧生成减少 Increases of Ca ²⁺ inflow,the decreased of ROS	血管平滑肌收缩功能 Contraction function of vascular smooth muscle	伤害 Damage
冷及薄荷醇感受器 (Transent receptor potential melastatin 8,TRPM8)	升高 ^[51] Up	活性氧生成减少 Decreased of ROS	高血压 Hypertension	伤害 Damage
瞬时受体电势通道 3 (Transent receptor potential canonical 3,TRPC3)	升高 ^[52] Up	线粒体钙摄取的增加和活性氧增生增多 Increased uptake of calcium ions by mitochondria and ROS	高盐诱导的心肌肥厚 High salt-induced myocardial hypertrophy	伤害 Damage

高盐诱导的 ROS 生成减少,ATP 生成增多,心肌细胞线粒体中的酶活性升高,心肌肥大减轻^[52]。这些研究结果表明抑制 TRPC3 可通过改善心肌线粒体功能障碍来拮抗高盐饮食介导的心肌肥大。

4 结语

综上所述,TRP 通道亚家族中 TRPM2、TRPM4、TRPM8、TRPV1、TRPV4 和 TRPC3 与线粒体功能障碍诱导的心血管疾病密切相关,这些 TRP 通道有望成为治疗线粒体功能障碍介导的心血管疾病的干预靶点(表 1)。除了上述 TRP 通道外,其它 TRP 通道亚家族成员与线粒体功能调节及其与心血管疾病的 关系值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] COSENS D J, MANNING A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant [J]. *Nature*, 1969, 224(5216): 285-287.
- [2] MONTELL C, RUBIN G M. Molecular characterization of the drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction [J]. *Neuron*, 1989, 2(4): 1313-1323.
- [3] BAMP S D, VRIENS J, DE HOON J, et al. TRP channel cooperation for nociception: therapeutic opportunities [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2021, 61: 655-677.
- [4] NIKOLAEV Y A, COX C D, RIDONE P, et al. Mammalian TRP ion channels are insensitive to membrane stretch [J]. *J Cell Sci*, 2019, 132(23): jcs238360.
- [5] SZABADOS T, GÖMÖRI K, PÁLVÖLGYI L, et al. Capsaicin-sensitive sensory nerves and the TRPV1 ion channel in cardiac physiology and pathologies [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4472.
- [6] GORBUNOV A S, MASLOV L N, JAGGI A S, et al. Physiological and pathological role of TRPV1, TRPV2 and TRPV4 channels in heart [J]. *Curr Cardiol Rev*, 2019, 15(4): 244-251.
- [7] LANG H, LI Q, YU H, et al. Activation of TRPV1 attenuates high salt-induced cardiac hypertrophy through improvement of mitochondrial function [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(23): 5548-5558.
- [8] HURT C M, LU Y, STARY C M, et al. Transient receptor potential vanilloid 1 regulates mitochondrial membrane potential and myocardial reperfusion injury [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(9): e003774.
- [9] SUN X, ALFORD J, QIU H. Structural and functional remodeling of mitochondria in cardiac diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 4167.
- [10] ZHANG Y, YAO J, ZHANG M, et al. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAMs): possible therapeutic targets in heart failure [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 10: 1083935.

- [11] YANG Y, LUAN Y. Editorial: recent advances in mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAMs) in heart-related diseases [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 10: 1168152.
- [12] WANG Y, LI X, XU X, et al. Transient receptor potential vanilloid type 1 protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy by promoting mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2022, 80(3): 430-441.
- [13] DE GEEST B, MISHRA M. Role of oxidative stress in heart failure: insights from gene transfer studies [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(11): 1645.
- [14] BERTERO E, MAACK C. Metabolic remodelling in heart failure [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(8): 457-470.
- [15] CHISTIakov D A, SHKURAT T P, MELNICHENKO A A, et al. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review [J]. *Ann Med*, 2018, 50(2): 121-127.
- [16] ZHOU B, TIAN R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128: 3716-3726.
- [17] STROUD D A, FORMOSA L E, WIJEYERATNE X W, et al. Gene knockout using transcription activator-like effector nucleases (TALENs) reveals that human NDUFA9 protein is essential for stabilizing the junction between membrane and matrix arms of complex I [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(3): 1685-1690.
- [18] BUGGER H, PFEIL K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(7): 165768.
- [19] CADENAS S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 117: 76-89.
- [20] PEI Z, ZHUANG Z, SANG H, et al. α , β -Unsaturated aldehyde crotonaldehyde triggers cardiomyocyte contractile dysfunction: role of TRPV1 and mitochondrial function [J]. *Pharmacol Res*, 2014, 82: 40-50.
- [21] SUN Z, HAN J, ZHAO W, et al. TRPV1 activation exacerbates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9C2 cells via calcium overload and mitochondrial dysfunction [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(10): 18362-18380.
- [22] MUNUKUTLA S, PAN G, PALANIYANDI S S. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 in diabetic heart diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1193: 155-174.
- [23] GE W, YUAN M, CEYLAN A F, et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase protects against doxorubicin cardiotoxicity through a transient receptor potential channel vanilloid 1-mediated mechanism [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(4): 622-634.
- [24] RANDHAWA P K, JAGGI A S. TRPV4 channels: physiological and pathological role in cardiovascular system [J]. *Basic Res Cardiol*, 2015, 110(6): 54.
- [25] BUBOLZ A H, MENDOZA S A, ZHENG X, et al. Activation of endothelial TRPV4 channels mediates flow-induced dilation in human coronary arterioles: role of Ca^{2+} entry and mitochondrial

- ROS signaling [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 302 (3): H634-H642.
- [26] YANG X R, LIN A H, HUGHES J M, et al. Upregulation of osmo-mechanosensitive TRPV4 channel facilitates chronic hypoxia-induced myogenic tone and pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302 (6): L555-L568.
- [27] THORNELOE K S, CHEUNG M, BAO W, et al. An orally active TRPV4 channel blocker prevents and resolves pulmonary edema induced by heart failure [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4 (159): 148-159.
- [28] ZOU Y, ZHANG M, WU Q, et al. Activation of transient receptor potential vanilloid 4 is involved in pressure overload-induced cardiac hypertrophy [J]. *Elife*, 2022, 11: e74519.
- [29] JIA X, XIAO C, SHENG D, et al. TRPV4 mediates cardiac fibrosis via the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway in diabetic rats [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2020, 20(5): 492-499.
- [30] WU Y, LU K, LU Y, et al. Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in neutrophils enhances myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *J Leukoc Biol*, 2023, 114 (3): 266-279.
- [31] WEI B Y, HOU J N, YAN C P, et al. Shexiang Baoxin Pill treats acute myocardial infarction by promoting angiogenesis via GDF15-TRPV4 signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115186.
- [32] KANTA ACHARYA T, KUMAR A, KUMAR MAJHI R, et al. TRPV4 acts as a mitochondrial Ca^{2+} -importer and regulates mitochondrial temperature and metabolism [J]. *Mitochondrion*, 2022, 67: 38-58.
- [33] ACHARYA T K, PAL S, GHOSH A, et al. TRPV4 regulates osteoblast differentiation and mitochondrial function that are relevant for channelopathy [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1066788.
- [34] YAN Z, HE Z, JIANG H, et al. TRPV4-mediated mitochondrial dysfunction induces pyroptosis and cartilage degradation in osteoarthritis via the Drp1-HK2 axis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 123: 110651.
- [35] JIMENEZ I, PRADO Y, MARCHANT F, et al. TRPM channels in human diseases [J]. *Cells*, 2020, 9(12): 2604.
- [36] MALKO P, JIANG L H. TRPM2 channel-mediated cell death; an important mechanism linking oxidative stress-inducing pathological factors to associated pathological conditions [J]. *Redox Biol*, 2020, 37: 101755.
- [37] ZHANG X M, SONG Y, ZHU X Y, et al. MITOCHONDRIA: the dual function of the transient receptor potential melastatin 2 channels from cytomembrane to mitochondria [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2023, 157: 106374.
- [38] KATANASAKA Y. Development of targeted pharmacotherapy for cardiovascular disease [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2017, 137(11): 1349-1353.
- [39] HOFFMAN N E, MILLER B A, WANG J, et al. Ca^{2+} entry via Trpm2 is essential for cardiac myocyte bioenergetics maintenance [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(6): H637-H650.
- [40] MILLER B A, HOFFMAN N E, MERALI S, et al. TRPM2 channels protect against cardiac ischemia-reperfusion injury: role of mitochondria [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289 (11): 7615-7629.
- [41] JIN O U, JHUN B S, XU S, et al. Adrenergic signaling regulates mitochondrial Ca^{2+} uptake through Pyk2-dependent tyrosine phosphorylation of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(6): 863-879.
- [42] MILLER B A, WANG J, SONG J, et al. Trpm2 enhances physiological bioenergetics and protects against pathological oxidative cardiac injury: Role of Pyk2 phosphorylation [J]. *Cell Physiol*, 2019, 234(9): 15048-15060.
- [43] DIENES C, KOVÁCS Z M, HÉZSO T, et al. Pharmacological modulation and (patho)physiological roles of TRPM4 channel-part 2: TRPM4 in health and disease [J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 15(1): 40.
- [44] WANG C, NARUSE K, TAKAHASHI K. Role of the TRPM4 channel in cardiovascular physiology and pathophysiology [J]. *Cells*, 2018, 7(6): 62.
- [45] WANG C, CHEN J, WANG M, et al. Role of the TRPM4 channel in mitochondrial function, calcium release, and ROS generation in oxidative stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 575: 96-98.
- [46] XIONG S, WANG B, LIN S, et al. Activation of transient receptor potential melastatin subtype 8 attenuates cold-induced hypertension through ameliorating vascular mitochondrial dysfunction [J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(8): e005495.
- [47] ROSSATO M, GRANZOTTO M, MACCHI V, et al. Human white adipocytes express the cold receptor TRPM8 which activation induces UCP_1 expression, mitochondrial activation and heat production [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 383 (1/2): 137-146.
- [48] NUNES K P, WEBB R C. New insights into RhoA/Rho-kinase signaling: a key regulator of vascular contraction [J]. *Small GTPases*, 2021, 12(5/6): 458-469.
- [49] MACKAY C E, SHAIPTA Y, SNETKOV V V, et al. ROS-dependent activation of RhoA/Rho-kinase in pulmonary artery: role of Src-family kinases and ARHGEF₁ [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 110: 316-331.
- [50] Feng S, Li H, Tai Y, et al. Canonical transient receptor potential 3 channels regulate mitochondrial calcium uptake [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(27): 11011-11016.
- [51] WANG B, XIONG S, LIN S, et al. Enhanced mitochondrial transient receptor potential channel, canonical type 3-mediated calcium handling in the vasculature from hypertensive rats [J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(7): e005812.
- [52] MA T, LIN S, WANG B, et al. TRPC3 deficiency attenuates high salt-induced cardiac hypertrophy by alleviating cardiac mitochondrial dysfunction [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 519(4): 674-681.

李超,李继安,高振安,等. 中医药调控谷氨酸治疗抑郁症的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 133-141.
Li C, Li JA, Gao ZA, et al. Research progress on the regulation of glutamate in traditional Chinese medicine for treatment of depression [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 133-141.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.017

中医药调控谷氨酸治疗抑郁症的研究进展

李 超¹, 李继安¹, 高振安¹, 申明宇¹, 蒲菁菁², 王 萌^{1*}

(1. 华北理工大学中医学院, 河北 唐山 063210;
2. 河北省中西医结合防治糖尿病及其并发症重点实验室, 河北 唐山 063210)

【摘要】 谷氨酸是中枢神经系统中主要的兴奋性神经递质,也是潜在的神经毒素。在抑郁症发生发展过程中存在海马区谷氨酸浓度升高的现象,谷氨酸发生堆积时,将对神经元和脑组织造成严重损伤,加重抑郁状态。因此谷氨酸堆积可能是造成抑郁症的重要机制。星形胶质细胞、谷氨酸转运体及谷氨酸受体对谷氨酸的浓度起着重要的调控作用。本文综述了中医药疗法通过调控星形胶质细胞、谷氨酸转运体、谷氨酸受体影响谷氨酸,进而治疗抑郁症的作用机制,为探究中医药治疗抑郁症提供新的思路。

【关键词】 中医药;抑郁症;谷氨酸;研究进展

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0133-09

Research progress on the regulation of glutamate in traditional Chinese medicine for treatment of depression

LI Chao¹, LI Jian¹, GAO Zhenan¹, SHEN Mingyu¹, PU Jingjing², WANG Meng^{1*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine of North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China.

2. Hebei Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Diabetes and Its Complications, Tangshan 063210)

【Abstract】 Glutamate is a major excitatory neurotransmitter in the central nervous system and a potential neurotoxin. During the development of depression, the glutamate concentration increases in the hippocampus. When glutamate accumulates, it causes serious damage to neurons and brain tissue, aggravating the depressive state. Therefore, glutamate accumulation may be a major mechanism of depression development. Astrocytes, glutamate transporters, and glutamate receptors play important regulatory roles in the glutamate concentration. This article reviews the mechanism-of-action of traditional Chinese medicine on depression by regulating astrocytes, glutamate transporters, and glutamate receptors, and provides new ideas to explore treatment of depression by traditional Chinese medicine.

【Keywords】 traditional Chinese medicine; depression; glutamic acid; research progress

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

抑郁症又称抑郁障碍,以显著而持久的心境低落为临床特征,是一种常见的心理疾病^[1]。世界卫生组织(WHO)统计,全球抑郁症患者累计人数超过3.5亿,每年因抑郁症自杀人数高达100万^[2],给全

【基金项目】 国家自然科学基金(82205066);河北省中医药管理局指令性项目(2022139);河北省创新能力提升计划项目(19392507D);河北省自然科学基金中医药联合基金重点项目(H2023209058);华北理工大学2023年度大学生创新项目(X2023069);华北理工大学2023年度研究生创新项目(2023S13)。

【作者简介】 李超(1997—),男,硕士研究生,研究方向:中医药防治抑郁症研究。E-mail:2731395586@qq.com

【通信作者】 王萌(1989—),女,博士,研究方向:中医药防治抑郁症研究。E-mail:wncdcm@163.com

球公共卫生造成了沉重的负担。抑郁症的发病机制复杂,与单胺类神经递质、脑源性神经营养因子、激素调节、遗传等多种因素有关^[3-4]。

谷氨酸 (glutamic acid, Glu) 是脑内一种兴奋性神经递质,在神经可塑性、学习和记忆过程中发挥着重要的作用^[5]。同时, Glu 是一种潜在的神经毒素,谷氨酸受体 (glutamate receptor, GluR) 的过度活化可以通过 Glu 兴奋性毒性引起神经元的功能障碍,进而引起神经元的损伤或凋亡^[6]。星形胶质细胞、谷氨酸转运体和谷氨酸受体是影响脑内 Glu 浓度的主要调控因素,其功能失常造成的 Glu 堆积是抑郁症的重要发病机制之一。临床目前常用药物为三环类抗抑郁药、NA 再摄取抑制剂和 5-HT 再摄取抑制剂等,存在起效慢、用药局限、副作用大等缺陷。中医药具有多靶点、多方位的治疗特点,治疗抑郁症效果显著^[7]。本文主要从中药复方、中药单体和针灸疗法分别对星形胶质细胞、谷氨酸转运体和谷氨酸受体的相关作用机制进行综述,为临床应用中医药诊疗抑郁症提供新思路。

1 Glu 与抑郁症

Glu 系统异常与抑郁症发病关系密切^[8]。Glu-谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 循环是维持中枢神经系统中 Glu 稳态的重要途径,由神经元和星形胶质细胞 (astrocyte, As) 共同参与调节。Glu 主要来自葡萄糖和 α -酮戊二酸,少量来自 Gln,在 As 合成。在神经元细胞中, Glu 经囊泡谷氨酸转运体,即低亲和力谷氨酸转运体 (vesicular glutamate transporters, VGLUTs) 储存在囊泡里,然后释放到突触间隙,被神经元和 As 膜上的兴奋性谷氨酸转运体,即高亲和力谷氨酸转运体 (excitatory amino acid transporters, EAATs) 重新摄取到细胞内,避免 Glu 堆积对神经元造成神经毒性^[9]。

Glu 浓度的升高可以造成神经元变性乃至凋亡,即产生兴奋神经毒性作用^[10]。Glu 堆积也是抑郁症的重要发病机制^[11]。在动物抑郁模型实验中,大鼠海马区和血清中均可检测到 Glu 水平升高的现象^[12-13];在临床观察中发现,抑郁症发作期患者的血清中 Glu 浓度也明显增高^[14-15]。因此,调控 Glu 浓度,抑制 Glu 神经毒性,是治疗抑郁症的关键。

2 谷氨酸的调控

2.1 As 对 Glu 的影响

As 是负责 Glu 合成和吸收的主要细胞,对维持

Glu 的稳态,维护神经元存活和功能的正常运行至关重要^[16]。As 通过谷氨酸转运体摄取 Glu,和神经元共同完 Glu 到 Gln 的循环。As 可以清除突触间隙 90% 的 Glu,维持 Glu 的低水平^[17]。Glu 浓度过高时对 As 也会产生兴奋性毒性作用,使其出现损伤或坏死。

2.2 谷氨酸转运体对 Glu 的影响

中枢神经系统 Glu 生理浓度的维持主要依赖于神经元和 As 上谷氨酸转运体,包括 EAATs 和 VGLUTs 两种类型^[18]。二者相互协调、相互作用,保证 Glu 正常的循环^[19]。

EAATs 在 Glu 摄取入胞中起着关键作用,当海马区细胞间隙 Glu 浓度过高,As 上 EAAT1、EAAT2 逆浓度差会将胞外 Glu 摄入细胞内,使细胞间隙 Glu 浓度维持在较低水平^[20]。

VGLUTs 的功能是特异地将突触囊泡外的 Glu 转运进入囊泡内。每个囊泡中 VGLUTs 的数量和活性决定着 Glu 进入囊泡的速度,影响着囊泡内 Glu 的浓度,对于突触间隙 Glu 的含量具有重要的调节作用^[21-22]。

2.3 谷氨酸受体对 Glu 的影响

谷氨酸受体分为代谢型和离子型,二者对 Glu 浓度起到重要的调控作用,防止 Glu 堆积对神经元及 As 造成损伤。代谢型谷氨酸受体 (metabotropic glutamate receptor, mGluRs) 存在于脑内神经突触前膜和突触后膜上,参与 Glu 的缓慢调节反应^[23]。离子型谷氨酸受体 (ionic glutamate receptor, iGluRs) 可以介导 Glu 快速兴奋性突触传递^[24]。

多数 mGluRs 位于突触前膜,对 Glu 的释放进行负反馈调节。而 1 型 mGluRs 主要位于突触后膜,被激活后可加强 iGluRs 的作用^[25]。由于 Glu 过度刺激 iGluRs,导致神经元产生活性氧和活性氮自由基而超负荷,同时诱导 Na^+ 流入,引发神经元的急性渗透性肿胀^[26-27]。这两种有害的级联反应进一步导致钙稳态功能障碍引起神经元死亡^[28]。

在 Glu-Gln 循环 (图 1) 中,不管是 As、谷氨酸转运体或是谷氨酸受体都起着重要的作用,任何一个环节出现问题都会导致 Glu 堆积。As 的数量和功能发生变化,可直接影响对 Glu 的摄取,导致 As 和神经元之间的信号传递和功能协作失调,进一步加剧抑郁症的发展^[29-30]。在实验研究中发现,抑郁症大鼠海马组织中谷氨酸转运体减少,当给予治疗后,转运体水平增加,抑郁症状也得到明显改

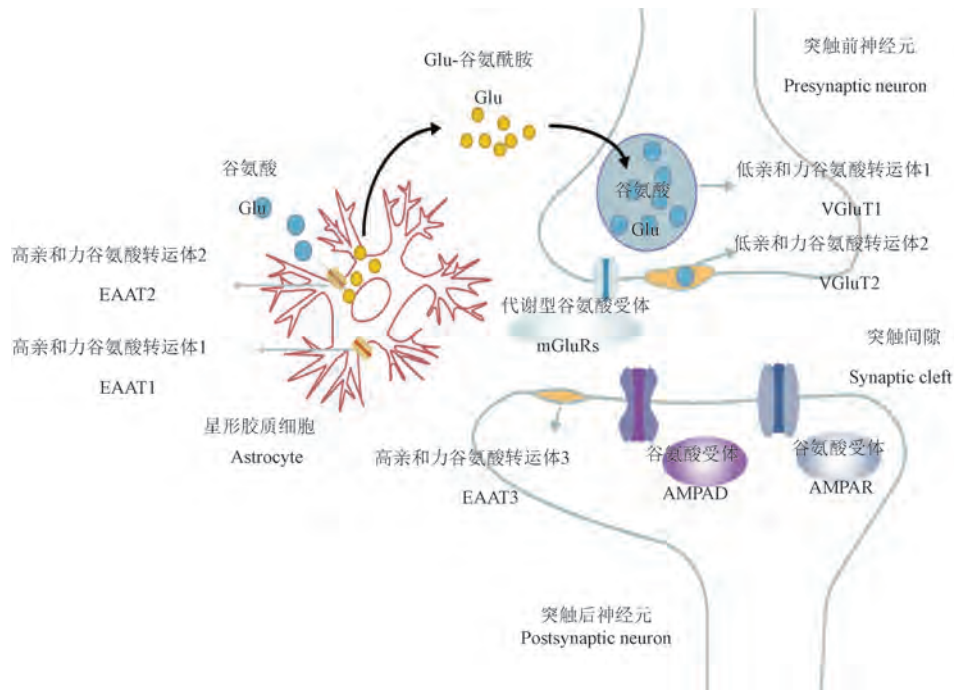


图 1 谷氨酸能循环图
Figure 1 Glutamate cycle diagram

善^[31-32]。Shin 等^[33]在人类重度抑郁症患者的 mPFC 中发现 mGluR5 的表达和可用性降低。且小鼠的 mGluR5 缺失后也会表现出明显的抑郁样行为^[34],证实了谷氨酸受体在抑郁症的治疗中起着重要的作用。因此,需要对 As、谷氨酸转运体和谷氨酸受体进行调控才可以改善 Glu 堆积对脑组织造成的损伤,起到治疗抑郁症的作用。

3 中医药对 Glu 的调节作用

3.1 中医药疗法对 As 的调控

3.1.1 中药复方

赵洪庆等^[35]发现左归降糖解郁方可以滋补肝肾、疏肝解郁,具有良好的抗抑郁功效,其抗抑郁机制可能与调控糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 和转化生长因子- β (transformation growth factor- β , TGF- β) 有关,GR 可以通过受体作用诱导 TGF- β 释放,TGF- β 具有增加 As 数量的功能。As 数量增多,可以增加对 Glu 的摄取、减少 Glu 堆积,起到治疗抑郁症的作用。通窍活血汤及其有效成分可以促进 As 进一步活化,增强谷氨酸转运体对 Glu 的转运功能,减少细胞间隙 Glu 的堆积,进而起到抗抑郁作用^[36]。胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 是 As 最为常用的标记蛋白,是其特异性标志物^[37]。在逍遥散治疗抑郁

症肝郁脾虚证大鼠实验中,GFAP 的表达在模型组出现了显著降低,经逍遥散干预后,GFAP 的表达明显升高,证实了逍遥散能够增加 As 的数量^[38]。

3.1.2 中药单体

人参皂苷可以改善抑郁症大鼠模型存在的 As 缝隙连接功能损伤,下调 As 膜上缝隙连接通道蛋白 Cx43 磷酸化水平,促进缝隙连接通道开放^[39],保护 As 功能,增加海马和额叶 As 生存率^[40]。

3.1.3 针灸

研究表明,针刺百会、内关穴可以改善抑郁症大鼠 As 形态和超微结构,治疗组和模型组比细胞数量增多,超微结构有所改善,对 Glu 的摄取功能有所提升^[41]。姜硕等^[42]发现针刺四关穴能促进抑郁大鼠海马 GFAP 阳性细胞的染色加深、数目增多及 GFAP 蛋白和 mRNA 含量增加,对 As 形态有很好修复作用,这可能是其发挥抗抑郁作用的重要机制。表 1 列举了不同中医药疗法改善 As 的作用机制。

3.2 中医药疗法对谷氨酸转运体的调控作用

3.2.1 中药复方

小柴胡汤是治疗抑郁症的常用方剂,临床治疗肝郁气结型抑郁症效果良好^[43]。在动物实验中发现,本方对慢性束缚抑郁模型大鼠海马谷氨酸转运体 EAATs、VGLUTs 表达起到调节作用。给予小柴胡汤干预后海马匀浆中 Glu 水平减低,而 EAAT1、

表 1 中医药疗法对 As 的改善动物实验

中医疗法 Traditional Chinese medicine therapy	作用对象 Target audience	作用机制 Mechanism
左归降糖方 ^[35] Zuogui Jiangtang Fang	星形胶质细胞 As	上调 GR、TGF-β1 的表达,从而诱导 As 数量的增加 Upregulation of GR and TGF-β1, induces an increase in As quantity
通窍活血汤 ^[36] Decoction for Activating Blood Circulation	星形胶质细胞 As	促进 As 的进一步活化,上调 GS、GFAP、GLT-1 的蛋白表达 Promote further activation of As and upregulate protein expression of GS, GFAP, and GLT-1
逍遥散 ^[38] Xiaoyao San	星形胶质细胞 As	上调 GFAP 的表达 Upregulation of GFAP expression
人参皂苷 ^[39] Ginsenoside	星形胶质细胞 As	下调 Cx43 磷酸化水平,保护细胞功能,增加细胞生存率 Downregulation of Cx43 phosphorylation level to protect cell function and increase cell survival rate
针刺百会、内关穴 ^[40] Acupuncture at Baihui and Neiguan acupoints	星形胶质细胞 As	细胞数量增多,微细、微管增多,线粒体致密及空泡化情况得到改善 Number of cells increases, the number of microtubules and microtubules increases, and the density and vacuolization of mitochondria are improved
针刺四关穴 ^[41] Acupuncture at Siguan acupoint	星形胶质细胞 As	GFAP 阳性细胞的染色加深、数目增多及 GFAP 蛋白和 mRNA 含量增加 Staining of GFAP positive cells deepens, the number increases, and the content of GFAP protein and mRNA increases

EAAT2、EAAT3 mRNA 和蛋白的表达均显著升高,对谷氨酸转运体起到上调作用,加快 Glu 的转运,减少堆积^[44]。实验证实左归降糖解郁方能有效控制谷氨酸兴奋性神经毒性,可以调控 A1R 和 EAAT2 的表达,A1R 和 EAAT2 存在着相互调控或者协同作用的关系,两者表达水平升高,可以加速 Glu 的转运,对神经元起到保护作用^[45]。Ding 等^[46]和 Liu 等^[47]发现,逍遥散可以调控谷氨酸转运体,在逍遥散干预下抑郁症大鼠海马和前额叶皮层中 EAAT1、EAAT2 蛋白及 mRNA 表达增多,对抑郁样行为具有治疗作用。

3.2.2 中药单体

灵芝多糖能够上调大鼠脑中 EAAT1、GLT1、EAAT3 的表达,加速 Glu 的清除,降低谷氨酸兴奋性毒性,减少神经系统损伤而抑制精神类疾病的发作^[48]。薛占霞等^[49]发现大黄酚具有逆转氨诱导的 As 损伤及谷氨酸转运抑制的作用,上调了氨诱导 EAAT1 基因表达,改善了谷氨酸转运体的作用。还有研究证实,大蒜提取物可能通过调控 VGLUTs 蛋白的表达来影响突触前 Glu 的释放^[50],减少了细胞间隙 Glu 堆积。

3.2.3 针灸

研究表明,脉冲电针、音乐电针在上调大鼠海马内 EAAT1、EAAT2 表达方面明显优于氟西汀;脉冲电针和音乐电针可通过增加海马 EAATs 的表达,

改善 Glu 再循环而发挥抗抑郁作用^[51]。在电针刺激太冲、合谷穴治疗抑郁症大鼠实验中,电针可以上调前额皮层 As 高亲和性兴奋性氨基酸转运体 EAAT1、EAAT2 和 GS 表达,提高 Glu 摄取功能,从而改善抑郁症状,这可能是针刺抗抑郁的机制之一^[52]。表 2 列举了不同中医药疗法对谷氨酸转运体的调控作用。

3.3 中医药疗法对谷氨酸受体的调控作用

3.3.1 中药复方

酸枣仁汤加味可以补益心脾、养血安神,常用于治疗心脾两虚型抑郁症。酸枣仁汤加减可以调控 GluR,不同中药剂量组 mGluR1 和 CaMK II β 表达均显著降低,而 GluR1、CaMK II α 表达显著增高,从而增强突触可塑性,改善 Glu 浓度,进而逆转抑郁行为^[53]。越鞠丸合甘麦大枣汤具有治疗抑郁症的作用,在探究合方的作用机制时发现,合方具有保护 Glu 诱导的神经元损伤的作用,可以使 NMDAR 亲和力下降,降低兴奋,减少 Ca²⁺ 的内流,保护神经元,从而改善抑郁症状^[54]。

3.3.2 中药单体

在芍药苷治疗血虚肝郁型抑郁症实验中,发现模型大鼠海马组织中 Glu 含量明显升高,但是不同谷氨酸受体亚基表达不同,给予芍药苷则可显著下调 Glu 含量及其受体 NR2A、GluR1、mGluR5 的基因表达,这可能是芍药苷治疗抑郁症的作用机制之

—^[55]。中药地黄的有效成分松果地苷,可有效改善 Glu 诱导的神经元损伤,可能是通过降低细胞内 Ca²⁺ 的堆积、抑制谷氨酸受体 NMDA 的表达以及抗氧化产生保护作用^[56]。有研究报道,葛根蛋白可增加其 PKA 位点的 GluR1 磷酸化并促进 AMPA 受体活化,增加 BDNF 释放进而达到治疗抑郁症的目的^[57]。人参皂苷等多种中药单体及有效成分都可以作用于谷氨酸受体,减少 Glu 兴奋性毒性对神经元的损伤,减轻抑郁症状^[58]。

3.3.3 针灸

罗乐^[59]发现,针刺四关穴可以调节抑郁大鼠海马 AMPA 受体及突触相关蛋白表达,增加模型大鼠海马 AMPA 受体亚基 GluR1 和 GluR2 的表达,减少神经元损伤,达到治疗抑郁症的效果。研究显示,病理状态下 GluR2 和 GluR4 出现下降趋势,而针刺治疗后 GluR2 和 GluR4 明显上升,使 Glu 循环维持平衡状态,减少脑组织损伤^[60]。表 3 列举了不同中医药疗法对谷氨酸受体的调控作用。

4 小结

随着对抑郁症发病机制的深入研究, Glu 及其

相关影响因素在抑郁症发病中的重要性也逐渐被认识。减少 Glu 堆积及调控其相关影响因素可能会是开发新型抗抑郁药的方向,例如 GluR 拮抗剂氯胺酮就具有很好的抗抑郁效果。近年来越来越多的学者证实中医药也可以通过调控 Glu 浓度及其相关因素,降低 Glu 堆积对神经元的损伤,起到治疗抑郁症的作用。

本文综述了中医复方、中药单体、针灸等中医疗法抑制 Glu 堆积及其诱导的神经性毒性,治疗抑郁症的相关机制。这些疗法主要通过保护 As、调控谷氨酸受体及其谷氨酸转运体发挥作用。本综述发现大多数研究为动物实验,缺乏临床随机对照实验,而且在中医药影响 Glu 诱导神经毒性的过程中存在一些医学问题需要明确:在针对不同类型抑郁症时,如何从大量中医药疗法中精准筛选出相应作用的中药复方或单体;中医药是如何调控相关谷氨酸转运体及受体起到治疗抑郁症的作用。中医药调控 Glu 及其相关因素治疗抑郁症是新的方向和方法,但具体相关效应成分及精准靶点仍需要进一步探究。

表 2 中医药疗法对谷氨酸转运体的调控作用动物实验

Table 2 Animal experiment on the regulatory effect of traditional Chinese medicine therapy on glutamate transporters		
中医疗法 Traditional Chinese medicine therapy	作用对象 Target audience	作用机制 Mechanisms
小柴胡汤 ^[44] Xiao Chaihu Tang	EAATs, VGLUTs	降低海马区 Glu 含量,上调 EAAT1、EAAT2、EAAT3 mRNA 和蛋白的表达 Reduce Glu content in the hippocampus and upregulate the expression levels of EAAT1, EAAT2, and EAAT3 mRNA and proteins
左归降糖解郁方 ^[45] Zuogui Jiangtang Jieyu Fang	EAATs, VGLUTs	调控 A1R 和 EAAT2 的表达 Regulating the expression of A1R and EAAT2
逍遥散 ^[46-47] Xiaoyao San	EAATs, VGLUTs	上调抑郁症大鼠海马和前额叶皮层中 EAAT1、EAAT2 蛋白及 mRNA 表达 Upregulation of EAAT1, EAAT2 protein and mRNA expression in the hippocampus and prefrontal cortex of depression rats
灵芝多糖 ^[48] Ganoderma lucidum polysaccharides	EAATs, VGLUTs	上调了大鼠脑中 GLAST、GLT1、EAAC1 的表达 Upregulated the expression of GLAST, GLT1, and EAAC1 in the rat brain
大黄酚 ^[49] Chrysophanol	EAATs, VGLUTs	逆转了氨诱导 GLAST 基因表达水平降低 Reversed ammonia induced decrease in GLAST gene expression levels
陈年大蒜提取物 ^[50] Aged garlic extract	EAATs, VGLUTs	调节 VGLUTs 蛋白的表达 Regulating the expression of VGLUTs protein
冲脉电针,音乐电针 ^[51] Chongmai electroacupuncture, music electroacupuncture	EAATs, VGLUTs	上调大鼠海马内 EAAT1、EAAT2 表达 Upregulation of EAAT1 and EAAT2 expression in the hippocampus of rats
针刺太冲、合谷 ^[52] Acupuncture of Taichong and Hegu	EAATs, VGLUTs	上调前额叶皮层中 EAAT1、EAAT2 和 GS 表达 Upregulation of EAAT1, EAAT2, and GS expression in the prefrontal cortex

表 3 中医药疗法对谷氨酸受体的调控作用基础实验

中医疗法 Traditional Chinese medicine therapy	作用对象 Target audience	作用机制 Mechanism
酸枣仁汤 ^[53] Suanzaoren Decoction	谷氨酸受体 Glutamate receptor	mGluR1 和 CaMK II β 表达均显著降低,而 GluR1、CaMK II α 表达显著增高 mGluR1 and CaMK II β expression levels were significantly reduced, while GluR1 and CaMK II α significantly increased expression
越鞠丸合 甘麦大枣汤 ^[54] Yue Ju Wan and Ganmai Da Zao Tang	谷氨酸受体 Glutamate receptor	使 NMDAR 亲和力下降,降低兴奋,减少 Ca ²⁺ 的内流 Decreased NMDAR affinity, reduced excitability, and reduced Ca ²⁺ influx
芍药苷 ^[55] Paeoniflorin	谷氨酸受体 Glutamate receptor	下调 Glu 含量及其受体 NR2A、GluR1、mGluR5 mRNA 的表达 Downregulation of Glu content and expression of its receptors NR2A, GluR1, and mGluR5 mRNA
松果地苷 ^[56] Pineapple glycoside	谷氨酸受体 Glutamate receptor	降低细胞内 Ca ²⁺ 的堆积、抑制谷氨酸受体 NMDA 的表达 Reduce intracellular Ca ²⁺ accumulation and inhibit the expression of glutamate receptor NMDA
葛根 ^[57] Pueraria lobata	谷氨酸受体 Glutamate receptor	增加其 PKA 位点的 GluR1 磷酸化并促进 AMPA 受体活化 Increase GluR1 phosphorylation at its PKA site and promote AMPA receptor activation
人参皂苷 ^[58] Ginsenoside	谷氨酸受体 Glutamate receptor	拮抗谷氨酸过度激活的 NMDA 受体,降低 NR2B 亚基的表达 Antagonism of NMDA receptors overactivated by glutamate and reduction of NR2B subunit expression
针刺四关穴 ^[59] Acupuncture at Siguan acupoint	谷氨酸受体 Glutamate receptor	增加了海马区 AMPA 受体亚基 GluR1 和 GluR2 的表达 Increased expression of AMPA receptor subunits GluR1 and GluR2 in the hippocampus
针刺百会、印堂、三阴交 ^[60] Acupuncture at Baihui, Yintang, and Sanyinjiao	谷氨酸受 Glutamate receptor	上调 GluR2 和 GluR4 Upregulate GluR2 and GluR4

参考文献:

[1] ZHANG B, YAN G, YANG Z, et al. Brain functional networks based on resting-state EEG data for major depressive disorder analysis and classification [J]. IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng, 2021, 29: 215-229.

[2] FANG X, ZHANG C, WU Z, et al. The association between somatic symptoms and suicidal ideation in Chinese first-episode major depressive disorder [J]. J Affect Disord, 2019, 245: 17-21.

[3] 李玥, 贺敏, 张磊阳, 等. 抗抑郁药物的研究进展 [J]. 临床药物治疗杂志, 2017, 15(1): 8-13.
LI Y, HE M, ZHANG L Y, et al. Progress on antidepressants [J]. Clin Med J, 2017, 15(1): 8-13.

[4] 杨丽英, 王艳丽, 郝立伟. 中医药治疗抑郁症的研究进展 [J]. 中医药信息, 2022, 39(7): 86-89.
YANG L Y, WANG Y L, HAO L W. Research progress of TCM in treating depression [J]. Inf Tradit Chin Med, 2022, 39(7): 86-89.

[5] 郭梦霞, 王俊丽, 牛争平. 谷氨酸与慢性偏头痛关系的研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20(2): 264-267.
GUO M X, WANG J L, NIU Z P. Research progress on the relationship between glutamic acid and chronic migraine [J].

[6] SONG J, YANG X, ZHANG M, et al. Glutamate metabolism in mitochondria is closely related to Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2021, 84(2): 557-578.

[7] 齐文辉, 江川, 高永刚. 抑郁症发病机制及中医药防治研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(13): 3302-3307.
QI W H, JIANG C, GAO Y G. Research progress on pathogenesis of depression and prevention and treatment of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(13): 3302-3307.

[8] SHEN Z, HARAGOPAL H, LI Y V. Zinc modulates synaptic transmission by differentially regulating synaptic glutamate homeostasis in hippocampus [J]. Eur J Neurosci, 2020, 52(7): 3710-3722.

[9] LINDSTRÖM S H, SUNDBERG S C, LARSSON M, et al. VGluT1 deficiency impairs visual attention and reduces the dynamic range of short-term plasticity at corticothalamic synapses [J]. Cereb Cortex, 2020, 30(3): 1813-1829.

[10] 陈艳清, 杨璇, 甄然, 等. 谷氨酸兴奋性毒性的产生及其相关机制 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2020, 28(5): 319-322.
CHEN Y Q, YANG X, ZHEN R, et al. Generation of excitatory toxicity of glutamic acid and its related mechanism [J]. J Brain Nerv Dis, 2020, 28(5): 319-322.

[11] ZHOU X M, LIU C Y, LIU Y Y, et al. Xiaoyaosan alleviates

Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis, 2022, 20(2): 264-267.

- hippocampal glutamate-induced toxicity in the CUMS rats via NR2B and PI3K/akt signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 586788.
- [12] MURROUGH J W, ABDALLAH C G, MATHEW S J. Targeting glutamate signalling in depression: progress and prospects [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(7): 472–486.
- [13] 李鑫, 王琼莹, 孙洪昊, 等. 十一味维命胶囊对抑郁症小鼠海马星形胶质细胞及谷氨酸代谢相关蛋白的影响 [J]. *中医药导报*, 2023, 29(3): 30–35.
- LI X, WANG Q Y, SUN H H, et al. Effects of Shi-Yi-Wei-Wei-Ming capsule on hippocampal astrocytes and glutamate metabolism related proteins in depression mice [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm*, 2023, 29(3): 30–35.
- [14] 廖继武, 王丝丝, 杨海华, 等. 抑郁症患者的血清谷氨酸及 γ -氨基丁酸系统水平 [J]. *中国心理卫生杂志*, 2020, 34(2): 87–91.
- LIAO J W, WANG S S, YANG H H, et al. Levels of serum glutamate and γ -aminobutyric acid system in patients with depression [J]. *Chin Ment Health J*, 2020, 34(2): 87–91.
- [15] DRAGANOV M, ARRANZ M J, VIVES-GILABERT Y, et al. Polymorphisms in the IL1- β gene are associated with increased Glu and Glx levels in treatment-resistant depression [J]. *Psychiatry Res Neuroimaging*, 2021, 316: 111348.
- [16] SARAWAGI A, SONI ND, PATEL A B. Glutamate and GABA homeostasis and neurometabolism in major depressive disorder [J]. *Front Psychiatry*, 2021, 12: 637863.
- [17] 李春艳, 赵洪庆, 杨蕙, 等. 谷氨酸兴奋毒性及其调节剂的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(5): 645–649.
- LI C Y, ZHAO H Q, YANG H, et al. Research progress on excitotoxicity of glutamate and its modulators [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2022, 38(5): 645–649.
- [18] COULTER D A, EID T. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy [J]. *Glia*, 2012, 60(8): 1215–1226.
- [19] LIU J, HAN Y, LIU L, et al. Abnormal Glu/mGluR 2/3/PI3K pathway in the hippocampal neurovascular unit leads to diabetes-related depression [J]. *Neural Regeneration Research*, 2021, 16(4): 727–733.
- [20] CERRI C, CALEO M, BOZZI Y. Chemokines as new inflammatory players in the pathogenesis of epilepsy [J]. *Epilepsy Res*, 2017, 136: 77–83.
- [21] PIETRANCOSTA N, DJIBO M, DAUMAS S, et al. Molecular, structural, functional, and pharmacological sites for vesicular glutamate transporter regulation [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(7): 3118–3142.
- [22] AGUILAR J I, DUNN M, MINGOTE S, et al. Neuronal depolarization drives increased dopamine synaptic vesicle loading via VGLUT [J]. *Neuron*, 2017, 95(5): 1074–1088.
- [23] STACHOWICZ K. Deciphering the mechanisms of regulation of an excitatory synapse via cyclooxygenase-2. A review [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 192: 114729.
- [24] PÁL B. Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(16): 2917–2949.
- [25] ISMAIL V, ZACHARIASSEN L G, GODWIN A, et al. Identification and functional evaluation of GRIA1 missense and truncation variants in individuals with ID: an emerging neurodevelopmental syndrome [J]. *Am J Hum Genet*, 2022, 109(7): 1217–1241.
- [26] MEHTA A, PRABHAKAR M, KUMAR P, et al. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 698(1/2/3): 6–18.
- [27] TEHSE J, TACHIBIGLOU C. The overlooked aspect of excitotoxicity: Glutamate-independent excitotoxicity in traumatic brain injuries [J]. *Eur J Neurosci*, 2019, 49(9): 1157–1170.
- [28] LAI T W, ZHANG S, WANG Y T. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection [J]. *Prog Neurobiol*, 2014, 115: 157–188.
- [29] 刘燕, 彭梦薇, 张文娟, 等. 脑内星形胶质细胞-神经元相互作用参与抑郁症发病研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(3): 124–129.
- LIU Y, PENG M W, ZHANG W X, et al. Research progress of brain astrocyte-neuron interactions involved in the pathogenesis of depression [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(3): 124–129.
- [30] MCGRATH T, BASKERVILLE R, ROGERO M, et al. Emerging evidence for the widespread role of glutamatergic dysfunction in neuropsychiatric diseases [J]. *Nutrients*, 2022, 14(5): 917.
- [31] QU D, YE Z, ZHANG W, et al. Cyanidin chloride improves LPS-induced depression-like behavior in mice by ameliorating hippocampal inflammation and excitotoxicity [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2022, 13(21): 3023–3033.
- [32] 杨丽丽, 张晓爽, 解雅英. Homer1a-mGluR5 在抑郁症中作用的研究进展 [J]. *临床与病理杂志*, 2022, 42(9): 2268–2273.
- YANG L L, ZHANG X S, XIE Y Y. Research progress in homer1a-mGluR5 in depression [J]. *J Clin Pathol Res*, 2022, 42(9): 2268–2273.
- [33] SHIN S, KWON O, KANG J I, et al. mGluR5 in the nucleus accumbens is critical for promoting resilience to chronic stress [J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(7): 1017–1024.
- [34] 谢莲萍, 赵玉梅, 陈丽萍, 等. 利培酮对抑郁症大鼠海马区神经元细胞损伤和免疫紊乱的调节 [J]. *局解手术学杂志*, 2023, 32(1): 15–21.
- XIE L P, ZHAO Y M, CHEN L P, et al. Regulation of risperidone for hippocampal neuron damage and immune disorder in depression rats [J]. *J Reg Anat Oper Surg*, 2023, 32(1): 15–21.
- [35] 赵洪庆, 王宇红, 孟盼, 等. 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠星形胶质细胞功能的影响及其机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(6): 3162–3166.
- ZHAO H Q, WANG Y H, MENG P, et al. Effects of Zuogui Jiangtang Jieyu Decoction on astrocyte function in diabetic depression rats and its mechanism [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(6): 3162–3166.

- [36] 张立娟, 张蕾, 娄原, 等. 通窍活血汤通过调节星形胶质细胞 Glu-Gln 循环降低 Glu 兴奋性毒性改善 CIRI 大鼠的神经功能 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(22): 31-40.
ZHANG L J, ZHANG Q, LOU Y, et al. Tongqiao Huoxuetang improves neurological deficits in CIRI rats by regulating glu-gln circulation to reduce glutamate excitotoxicity of astrocytes [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(22): 31-40.
- [37] MA X, YANG S, ZHANG Z, et al. Rapid and sustained restoration of astrocytic functions by ketamine in depression model mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 616: 89-94.
- [38] 宋明. 抑郁症肝郁脾虚证大鼠海马星形胶质细胞 GFAP 与 Glu-NMDA-CORT 受体通路的变化及逍遥散的调节作用 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
SONG M. Changes of GFAP and Glu-NMDA-CORT receptor pathways in hippocampal astrocytes of rats with liver-depression and spleen-deficiency syndromes in depression and the modulating effect of prolonged dispersal [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2018.
- [39] 王娟, 申丰铭, 张峥嵘, 等. 人参皂苷 Rg1 对慢性应激小鼠抑郁样行为、海马突触蛋白及胶质细胞的作用 [J]. 生物学杂志, 2021, 38(3): 26-30.
WANG J, SHEN F M, ZHANG Z R, et al. Effects of ginsenoside Rg1 on depression-like behaviors, expression of hippocampal synaptic proteins and activation of glial cells in stressed mice [J]. J Biol, 2021, 38(3): 26-30.
- [40] 任倩, 夏聪媛, 王真真, 等. 人参皂苷 Rg1 对皮质酮介导原代星形胶质细胞损伤的保护作用 [J]. 药学报, 2017, 52(9): 1410-1415.
REN Q, XIA C Y, WANG Z Z, et al. Protective effects of ginsenoside Rg1 against corticosterone-induced primary astrocytes injury [J]. Acta Pharm Sin, 2017, 52(9): 1410-1415.
- [41] 卢峻, 金树英, 包伍叶, 等. 针刺对慢性应激抑郁大鼠额叶皮层星形胶质细胞的影响 [J]. 中医杂志, 2014, 55(15): 1323-1326.
LU J, JIN S Y, BAO W Y, et al. Effects of acupuncture on astrocytes in prefrontal cortex of chronic stress depression rats [J]. J Tradit Chin Med, 2014, 55(15): 1323-1326.
- [42] 姜硕, 黄彬, 樊凌, 等. 电针四关穴对抑郁大鼠海马星形胶质细胞形态的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(1): 216-218.
JIANG S, HUANG B, FAN L, et al. Influence of electroacupuncture at Si-Guan on the morphology of hippocampal astrocytes in depressive rats [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2015, 30(1): 216-218.
- [43] 文燕, 陈琰, 王挺, 等. 小柴胡汤加减治疗抑郁症临床疗效的 Meta 分析 [J]. 上海中医药杂志, 2022, 56(1): 34-38.
WEN Y, CHEN L, WANG T, et al. Meta-analysis of clinical efficacy of modified Xiaochaihu Decoction on depression [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2022, 56(1): 34-38.
- [44] 许二平, 毛梦迪, 尚立芝, 等. 小柴胡汤加味对慢性束缚抑郁模型大鼠海马谷氨酸转运体 EAATs, VGLUTs 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(23): 27-36.
XU E P, MAO M D, SHANG L Z, et al. Effect of modified Xiaochaihutang on expression of EAATs and VGLUTs in hippocampus of chronic restraint stress depression model rat [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(23): 27-36.
- [45] 杨蕙, 王宇红, 刘林, 等. 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马腺苷 A1 受体及谷氨酸转运体的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(10): 2498-2501.
YANG H, WANG Y H, LIU L, et al. Effects of Zuogui Jiangtang Jieyu formula on adenosine A1 receptor and glutamate transporter in hippocampus of diabetes-related depression [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2018, 36(10): 2498-2501.
- [46] DING X F, LI Y H, CHEN J X, et al. Involvement of the glutamate/glutamine cycle and glutamate transporter GLT-1 in antidepressant-like effects of Xiao Yao San on chronically stressed mice [J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1): 326.
- [47] LIU Y, DING X F, WANG X X, et al. Xiaoyaosan exerts antidepressant-like effects by regulating the functions of astrocytes and EAATs in the prefrontal cortex of mice [J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1): 215.
- [48] 朱孔利, 谢莉莉, 刘辉. 灵芝多糖对癫痫大鼠脑中谷氨酸转运体的影响 [J]. 长春中医药大学学报, 2015, 31(6): 1104-1106.
ZHU K L, XIE L L, LIU H. Ganoderma lucidum polysaccharide on excitatory amino acid transporter in brain of epileptic rat [J]. J Changchun Univ Chin Med, 2015, 31(6): 1104-1106.
- [49] 薛占霞, 高永山, 沈丽霞, 等. 大黄酚对氨诱导星形胶质细胞肿胀及谷氨酸再摄取抑制的影响及其机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(1): 59-61, 64.
XUE Z X, GAO Y S, SHEN L X, et al. Effects of chrysophanol on ammonia-induced cell swelling and glutamate uptake inhibition in cultured astrocytes and the study of its mechanisms [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2016, 32(1): 59-61, 64.
- [50] THORAJAK P, PANNANGRONG W, WELBAT J U, et al. Effects of aged garlic extract on cholinergic, glutamatergic and GABAergic systems with regard to cognitive impairment in $\alpha\beta$ -induced rats [J]. Nutrients, 2017, 9(7): 686.
- [51] 纪倩, 李志刚, 唐银杉, 等. 不同电针刺激对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及海马谷氨酸转运体的影响 [J]. 针刺研究, 2013, 38(3): 202-207, 219.
JI Q, LI Z G, TANG Y S, et al. Effect of electroacupuncture intervention on behavioral changes and hippocampal excitatory amino acid transporter mRNA expression in depression rats [J]. Acupunct Res, 2013, 38(3): 202-207, 219.
- [52] 罗丁, 张雪淳, 肖瑶, 等. 电针对 CUMS 大鼠前额皮层星形胶质细胞 GS、EAAT1、EAAT2 的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(17): 4143-4146.
LUO D, ZHANG X C, XIAO Y, et al. Effect of electric acupuncture on GS, EAAT1, EAAT2 of astrocyte cell in CUMS rats' prefrontal cortex [J]. Chin J Gerontol, 2016, 36(17): 4143-4146.
- [53] 尚立芝, 毛梦迪, 许二平, 等. 酸枣仁汤加味对抑郁大鼠海马谷氨酸受体表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,

2020, 26(23): 20-26.

SHANG L Z, MAO M D, XU E P, et al. Effect of modified Suanzaoren Tang on expression of glutamate receptor in hippocampus of chronic restraint stress depression model rat [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(23): 20-26.

[54] 葛渴敏, 王薇, 薛文达, 等. 越鞠丸合甘麦大枣汤加减对谷氨酸诱导的 HT22 细胞损伤模型的神经保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(12): 22-27.

GE K M, WANG W, XUE W D, et al. Neuroprotective effect of modified yuejuwan and Ganmai Dazao Tang on glutamate-induced HT22 cell injury model [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2019, 25(12): 22-27.

[55] 李伟, 王景霞, 葛阳, 等. 芍药苷对血虚肝郁证模型大鼠海马谷氨酸及其不同类型受体 mRNA 表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(4): 1241-1244.

LI W, WANG J X, GE Y, et al. Effects of paeoniflorin on expression of Glu and different glutamate receptors in hippocampus of rats with syndrome of stagnation of liver qi and blood deficiency [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2016, 31(4): 1241-1244.

[56] 卢仁睿, 王慧慧, 张莉, 等. 地黄中松果菊苷对谷氨酸诱导的 PC-12 细胞神经损伤模型的氧化应激和 NMDAR1 表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(5): 45-48.

LU R R, WANG H H, ZHANG L, et al. Effect of echinacoside extracted from Dihuang on glutamate-induced oxidative stress and NMDAR1 expression in PC-12 cells [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2021, 37(5): 45-48.

[57] HUANG C C, TSAI M H, WU Y C, et al. Activity dependent mammalian target of rapamycin pathway and brain derived neurotrophic factor release is required for the rapid antidepressant effects of puerarin [J]. Am J Chin Med, 2018, 46(7): 1519-1534.

[58] LIU Y, WANG S, KAN J, et al. Chinese herbal medicine interventions in neurological disorder therapeutics by regulating glutamate signaling [J]. Curr Neuropharmacol, 2020, 18(4): 260-276.

[59] 罗乐. 针刺调节抑郁大鼠海马 AMPA 受体及突触相关蛋白表达的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.

LUO L. Study on acupuncture regulating the expression of AMPA receptor and synaptic related protein in hippocampus of depressed rats [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2017.

[60] 常磊, 姜会梨, 王瑜, 等. 针刺对慢性束缚应激模型大鼠额叶和海马谷氨酸受体 2/4 表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(6): 2327-2331.

CHANG L, JIANG H L, WANG Y, et al. Effects of acupuncture on the expression of glutamate AMPA receptor GluR2/4 in frontal lobe and hippocampus of chronic restrained-stress model rats [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(6): 2327-2331.

[收稿日期] 2023-06-20

编者·读者·作者

《中国比较医学杂志》不接收使用水合氯醛进行动物麻醉文章的说明

本刊严格遵守我国实验动物相关法规和标准,为保障实验动物的福利权益,不断提升动物实验研究的水平并获得国际学术界同行的认可,根据国际和国内实验动物有关法规和标准,规定实验动物麻醉镇痛用药必须优先使用药用级麻醉剂,特别是当涉及存活手术的动物实验时。

鉴于水合氯醛属于镇静、催眠以及抗惊厥药物,其作为麻醉剂效果较差,只作用于中枢神经系统,无法阻断痛觉感受器达到镇痛效果,且刺激性强、毒副作用较大,存在干扰实验结果且有悖于实验动物伦理审查原则等问题,国际期刊普遍建议不再使用水合氯醛作为实验动物的麻醉剂。

本刊亦不接收使用水合氯醛作为实验动物麻醉剂的文章,特此告知广大作者及读者。
《中国比较医学杂志》编辑部

张帆,田春雨,王景存,等. AIM 在炎症反应和脂质代谢疾病中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 142-148.
Zhang F, Tian CY, Wang JC, et al. Effect of apoptosis inhibitor of macrophage in inflammatory reactions and lipid metabolic diseases [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 142-148.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.018

AIM 在炎症反应和脂质代谢疾病中的作用

张帆¹, 田春雨^{1,2*}, 王景存¹, 喇孝瑾^{1,2}, 付茜茹¹, 李洁¹, 付文浩¹

(1.华北理工大学,河北唐山 063210;2.河北省中西医结合防治糖尿病及其并发症重点实验室,河北唐山 063210)

【摘要】 巨噬细胞凋亡抑制因子 (apoptosis inhibitor of macrophage, AIM), 是清道夫受体富含半胱氨酸残基超家族 (scavenger receptor cysteine rich-super family, SRCR-SF) B 组的成员之一。AIM 为巨噬细胞分泌的一种可溶性蛋白, 该蛋白的表达受肝 X 受体 (liver X receptor, LXR) 控制, 且在机体的免疫反应中起重要作用。AIM 作为巨噬细胞的一种分泌蛋白, 发挥着广泛的作用, 不仅对巨噬细胞的凋亡具有抑制作用, 并且可参与调控巨噬细胞极化。还有相关研究发现, AIM 参与炎症、肥胖、动脉粥样硬化和癌症等多种生理、病理过程; 可以作为结核病和肝硬化等疾病的生物诊断标志物; 可以通过抑制脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FAS) 活性从而促进脂肪细胞的脂解, 在调节脂质内稳态平衡、脂质代谢与自身免疫疾病中发挥着重要的作用。该文论述了 AIM 的分子特征及其在炎症反应和脂质代谢等相关疾病方面的作用, 展示 AIM 的多种功能特点, 为相关的医学研究提供依据。

【关键词】 AIM; 炎症反应; 脂质代谢

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0142-07

Effect of apoptosis inhibitor of macrophage in inflammatory reactions and lipid metabolic diseases

ZHANG Fan¹, TIAN Chunyu^{1,2*}, WANG Jingcun¹, LA Xiaojin^{1,2}, FU Qianru¹, LI Jie¹, FU Wenhao¹

(1. North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China.

2. Hebei Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Diabetes and Its Complications, Tangshan 063210)

【Abstract】 Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) belongs to group B of the scavenger receptor cysteine rich-super family. AIM is a soluble protein secreted by macrophages. The expression of this protein is controlled by the liver X receptor. AIM, which is secreted by macrophages, plays important and broad roles in the immune responses of the body. It not only inhibits the apoptosis of macrophages but also participates in the regulation of macrophage polarization. In addition, studies have revealed that AIM is involved in various physiological and pathological processes, such as inflammation, obesity, atherosclerosis, and cancer. It has been used as a biological marker for the diagnosis of diseases such as tuberculosis and liver cirrhosis. Moreover, it can promote the lipolysis of adipose cells by inhibiting the activity of fatty acid synthase (FAS), playing an important role in the regulation of lipid homeostasis, lipid metabolism, and autoimmune diseases. In this paper, we review the multiple functional characteristics of AIM and its effects on inflammation, lipid metabolism, and related diseases to provide a theoretical basis for relevant medical research.

【Keywords】 AIM; inflammatory reaction; lipid metabolism

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

【基金项目】 河北省自然科学基金 (H2020209235); 河北省中医药管理局科技计划 (2023137); 唐山市科技计划 (22130219H)。

【作者简介】 张帆 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中医药防治 2 型糖尿病及其并发症。E-mail: 1054032005@qq.com

【通信作者】 田春雨 (1981—), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中医药对 2 型糖尿病的治疗。E-mail: Tianchunyu@ncst.edu.cn

巨噬细胞凋亡抑制因子 (apoptosis inhibitor of macrophage, AIM), 又被称作凋亡抑制因子 6 (apoptosisinhibitor 6, Api6)、Sp α (secreted protein α) 或 CD5L (CD5 antigen like), 属于清道夫受体富含半胱氨酸残基超家族 (scavenger receptor cysteine rich-super family, SRCR-SF) B 组成员^[1]。AIM 是一种分子量为 40 kDa 的可溶性糖蛋白, 主要由骨髓、脾、淋巴结、胸腺及胎肝等淋巴组织中的巨噬细胞产生, 该蛋白的表达由肝 X 受体 (liver X receptor, LXR) 转录控制, 是肝 X 受体/类视黄醇 X 受体 (LXR/RXR) 异源二聚体调节的直接靶点, 在脂质稳态中发挥了重要作用^[2-3]。AIM 可以在组织巨噬细胞和上皮细胞中表达, 并且参与细菌感染、炎症反应及肿瘤等疾病的发生发展^[4-5]。AIM 还参与脂质内稳态平衡的调节与肥胖相关的自身免疫疾病的发生, 并且能够通过降低脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, FAS) 活性, 从而减少脂肪细胞中饱和脂肪酸的数量, 预防肥胖的发生^[6-7]。AIM 通过维持先天的体液防御而发挥调节稳态作用, 并在许多炎症疾病中发挥着作用^[8]。近年来研究发现, AIM 在心脏病^[9]、肺炎^[10]、甲状腺疾病^[11]和急性呼吸窘迫综合征^[12]等疾病中均发挥着重要作用, 在炎症反应和脂质代谢中的作用开始受到关注, 本文重点论述了 AIM 的分子特征及其在炎症反应和脂质代谢等相关疾病方面的作用。

1 AIM 基因及蛋白的分子特征

人 AIM (hAIM) 基因最早是由 Gebe 等^[13]在 1997 年, 通过荧光原位杂交和辐射杂交面板分析进行的染色体定位, 证实编码 AIM 的基因位于人类 1 号染色体长臂上 q21-q23 的重叠群 WC1.17 内。小鼠 AIM 基因则是由 Miyazaki 等^[1]在 1999 年通过 PCR 技术克隆小鼠清道夫受体 cDNA 的富含半胱氨酸结构域片段, 筛选小鼠巨噬细胞 cDNA 文库得到的。此外, Gebe 等^[14]通过噬菌斑杂交的方法从小鼠基因组文库获得编码小鼠 AIM 的基因, 并且证明了小鼠 AIM 与 hAIM 属同源基因。

在蛋白质水平上, 人类中的 AIM 由 347 个氨基酸组成, 其中 19 个疏水性氨基酸的分泌信号序列不存在于成熟蛋白质中, 紧随其后的是 3 个 SRCR 结构域, 每个结构域长约 100 个氨基酸, 在 SRCR 结构 1 和 2 之间的 O-连接糖基化的潜在区域具有唾液酸含量^[13]。Sarrias 等^[15]通过免疫印迹、免疫沉淀

和酶联免疫吸附试验筛选出 4 株抗 hAIM 的单克隆抗体, 单克隆抗体识别 AIM 上的 3 个不同表位, 显示存在 38 kDa 和 40 kDa 的两种 AIM 亚型, 这是由不同的唾液酸含量引起的。他们还表明 AIM 是一种相对丰富的血清蛋白 (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 主要与其他血清蛋白一起循环, 说明 AIM 是一种循环蛋白, 可能在免疫球蛋白 M (IgM) 抗体的体内平衡中发挥作用。小鼠与人的 AIM 序列同一性水平高达 68%, 它们氨基酸序列预测的大小相似 (38 kDa), 与小鼠 AIM 相比, hAIM 具有较小的分子量^[16]。小鼠 AIM 经历了不同的翻译后修饰, 其较大的分子量 (55 kDa) 可以通过存在 3 个可能的 N-糖基化位点来解释, 其中两个位点被证实与 N-聚糖结合并影响其分泌和功能^[17]。

2 AIM 在炎症反应及相关疾病中的作用

AIM 可以与真菌释放的游离病原相关分子模式 (PAMPs) 结合, 即脂多糖 (LPS) 和脂磷壁酸 (LTA) 以及肽聚糖 (PGN)、甘露聚糖、 β -D-葡聚糖和酵母聚糖, 并且在重组 AIM (rAIM) 的存在下, LPS、 β -D-葡聚糖和 PGN 诱导的小鼠脾细胞细胞因子释放受到抑制, 并抑制细胞因子介导的炎症反应^[8]。此外, 有研究证实, AIM 抑制单核细胞肿瘤坏死因子 (TNF) 和白细胞介素 1 β (IL-1 β) 的产生, 同时在增强 LPS 和 Toll 样受体 1/2 激动剂 Pam3CSK4 刺激后, 促进白细胞介素 10 (IL-10) 的分泌, 并且认为这种 AIM 抗炎作用部分是通过增强巨噬细胞的自噬机制介导的^[18]。

在炎症反应过程中, 组织巨噬细胞将通过分化成特定表型来适应微环境刺激, 称为巨噬细胞极化, 这使它获得必要的功能: 促炎、杀灭微生物和促进组织损伤的 M1 型巨噬细胞; 抗炎、免疫抑制和促进伤口愈合的 M2 型巨噬细胞^[19]。有研究表明, 用 rAIM 处理的外周血单核细胞, 诱导了 Mer 酪氨酸激酶 (MERTK)、CD36 (AIM 的主要细胞表面受体) 和血管内皮生长因子 (VEGF) mRNA 表达的显著增加, 其方式与 IL-10 非常相似, 并且证明 AIM 以与 IL-10 相似的方式通过上调 ID3 和自噬机制驱动巨噬细胞向 M2 型极化, 抑制炎症反应的发生^[20]。见表 1。

2.1 IgA 肾病

IgA 肾病 (IgA nephropathy, IgA N) 是最常见的原发性肾小球肾炎, 是慢性肾病和肾衰竭的主要原

表 1 AIM 在炎症反应及相关疾病中的作用
Table 1 Role of AIM in inflammatory reaction and related diseases

炎症反应及相关疾病 Inflammatory reactions and related diseases	作用机制 Action mechanisms
炎症反应 Inflammatory reactions	与 PAMPs 结合 ^[8] ;抑制 TNF 和 IL-1 β 的产生,促进 IL-10 分泌 ^[18] ;诱导 CD163、MERTK、CD36 和 VEGF 表达,驱动巨噬细胞向 M2 型极化 ^[20] Combining with PAMPs ^[8] ; inhibit the production of TNF and IL-1 β , and promote the secretion of IL-10 ^[18] ; induce the expression of CD163, MERTK, CD36 and VEGF, and drive macrophages to polarize to M2 type ^[20]
IgA 肾病 IgA N	与 IgM 结合,影响 IgG、IgA 和 C3 的沉积 ^[21-22] Binding to IgM, affect the deposition of IgG, IgA and C3
自身免疫性脑脊髓炎 Autoimmune encephalomyelitis	影响 Th17 细胞的可塑性 ^[23-24] ;与 p19 亚基结合 ^[25] Affect the plasticity of Th17 cells; binding to p19 subunit
心肌梗死 Myocardial infarction	影响 TLR4 通路驱动的炎症反应 ^[26] Affect the inflammatory response driven by TLR4 pathway

因,IgA N 进展受遗传和环境因素的影响,当免疫球蛋白 A (IgA)、IgM、免疫球蛋白 G (IgG)、补体 3 (C3) 等其他蛋白沉积在肾中导致局部炎症和肾损伤时发生,并可能导致疾病严重程度^[27-29]。在血液中,AIM 与五聚体 IgM 结合,从而稳定并保护其免受肾排泄^[21]。有研究使用一种自发重复人类 IgA N 发病机制的 gddY 小鼠模型,观察到 AIM 聚集在肾小球,并与 IgA 沉积物共定位,尽管在 AIM 缺陷 (AIM^{-/-}) 的 gddY 小鼠肾小球中也发现了 IgA 沉积,但由于缺乏 IgG、IgM 和 C3 沉积,这使小鼠免受肾损伤^[22]。因此,AIM 对于 IgM 和/或 IgG 与先前沉积的 IgA 结合,促进白细胞的浸润、肾小球和间质纤维化、细胞外基质扩张以及促炎基因 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达增加至关重要,这些共同促进 IgA N 的进展^[22]。

2.2 自身免疫性脑脊髓炎

相关研究证实 AIM 是 CD4⁺ 辅助性 T 细胞 17 (Th17) 细胞致病性的抑制因子,在非致病性 Th17 细胞中高度表达^[25]。AIM 影响 Th17 细胞的可塑性,Th17 细胞在自身免疫和炎症中发挥作用^[23-24]。Wang 等^[23]发现 AIM 在非致病性 Th17 细胞中表达而不在实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 小鼠的致病性细胞中表达,证实了 AIM 在体内的重要性,并且还发现 AIM 的缺失会将非致病性 Th17 细胞转化为致病性细胞。另外还有研究证实,IL-23 的 p19 亚基在 EAE 过程中与 AIM 结合,血清 p19/AIM 水平与临床症状高度相关,CD4⁺ T 细胞特异性 p19 缺失小鼠和完全 AIM^{-/-} 小鼠均显示 EAE 症状显著缓解,揭示了 p19/AIM 复合物是一种潜在的新型异源

二聚体细胞因子,在 EAE 的发生中发挥作用^[25]。

2.3 心肌梗死

心肌梗死会引起坏死细胞和细胞外基质释放内源性分子的炎症反应,这种炎症反应刺激炎症介质和生长因子的产生,依次诱导炎症细胞的募集、损伤组织的清除、血管生成和成纤维细胞的增殖,最终导致瘢痕形成和梗死愈合,这些机制的失调可能导致心肌细胞损伤和纤维化,最终导致心脏功能受损^[30]。有研究发现,AIM 的抑制作用与 Toll 样受体 4 (TLR4) 通路驱动的炎症反应的减少相关,在冠状动脉结扎后,与野生型 (WT) 小鼠相比,AIM^{-/-} 小鼠心肌组织 TLR4/NF- κ B 通路中 NF- κ B 和 IL-1 受体相关激酶 4 (IRAK4) 活化在心肌梗死后减少,并且心肌梗死后 AIM^{-/-} 小鼠心肌髓过氧化物酶和诱导型一氧化氮合酶活性也降低,这些数据表明,AIM^{-/-} 小鼠抑制心肌梗死后炎症的发生,从而使心肌组织损伤减少,表明 AIM 在维持炎症和心脏重塑进展中发挥着重要作用^[26]。

3 AIM 在脂质代谢及相关疾病中的作用

溶酶体酸性脂肪酶 (LAL) 是胆固醇酯和甘油三酯代谢的关键酶,有研究证实 LAL 基因缺失小鼠的肝、脾以及肺组织中均出现了异常的脂质积聚,并且发现与正常小鼠比较,其 LAL 基因敲除小鼠的肺组织中 AIM 是差异表达最高的基因,其表达上调了近 70 倍。该结果提示 AIM 在相关脂质代谢中发挥作用^[31]。

Kimura 等^[32]在肺组织的脂质组学分析结果显示,当给予 WT 小鼠 LPS 时,几种脂质介质的水平显著增加,但在 AIM^{-/-} 小鼠中这些脂质介质的浓度没

有被 LPS 显著上调,这些数据反映了 AIM 在脂质代谢中的重要作用,它可能在正常时抑制脂质代谢物,表明 AIM 改变了小鼠肺脂质介质的分布。见表 2。

3.1 动脉粥样硬化

动脉粥样硬化的病理特征是动脉壁内脂肪沉积和细胞碎片的累积,脂质代谢紊乱在动脉粥样硬化形成中起着至关重要的作用^[41]。低密度脂蛋白(LDL)是胆固醇主要的细胞外载体,其特定成分被氧化或以其他方式进行修饰,形成氧化低密度脂蛋白(oxLDL),使它的功能发生变化^[33]。oxLDL 颗粒作为单核细胞的化学引诱剂,促进单核细胞迁移和分化为巨噬细胞,并导致内皮细胞改变,oxLDL 被巨噬细胞通过清道夫受体摄取,从而转化为富含脂质的泡沫细胞^[33-34]。hAIM 与 oxLDL 结合并促进 CD36 介导的 oxLDL 摄取,并且 AIM 有助于增加泡沫细胞的形成^[35]。

AIM 蛋白是对 oxLDL 负荷的应答,在动脉粥样硬化病变的泡沫细胞中高度表达,AIM 在病变中的表达和氧化脂质对其的诱导都需要 LXR/RXR 异二聚体的作用,并且 AIM^{-/-}巨噬细胞在体外对 oxLDL 诱导的凋亡高度敏感,在体内动脉粥样硬化病变中加速凋亡^[36]。还有相关研究表明,与只缺乏低密度脂蛋白受体(LDLR)的小鼠对照组相比,AIM^{-/-}LDLR^{-/-}双敲除小鼠的早期动脉粥样硬化病变显著减少,因此得出结论,AIM 的产生促进了动脉粥样硬化病变中巨噬细胞的存活,而 AIM 的丧失通过增

加巨噬细胞凋亡而减少了早期病变的发展^[28]。有研究表示,MafB(主要在动脉粥样硬化病变泡沫细胞中表达的转录因子)介导 oxLDL 激活 LXR/RXR 诱导 AIM 的表达,巨噬细胞 MafB 缺陷导致泡沫细胞凋亡加速,泡沫细胞凋亡的增加可以改善早期动脉粥样硬化进展,这种现象主要是由于 LXR/RXR-AIM 调节轴的破坏^[37]。

3.2 肥胖

肥胖为 21 世纪的主要健康负担之一,是高血压、恶性肿瘤^[42]、胰岛素抵抗(IR)^[43]及高尿酸血症^[44]的关键风险因素。巨噬细胞是肥胖脂肪组织中介导胰岛素抵抗和代谢功能障碍的主要细胞类型,其炎性状态也可以被各种脂质物质修饰,源自膳食或脂肪细胞甘油三酯水解的饱和脂肪酸可通过 TLR4 依赖性机制驱动巨噬细胞向 M1 型极化^[45]。AIM 又能通过自噬机制驱动巨噬细胞向 M2 型极化^[20]。

AIM 通过 CD36 内吞到脂肪细胞,并与 FAS 结合,导致 FAS 酶活性降低而诱导脂解^[7]。此外,AIM 还可以使脂肪细胞过氧化物酶体增植物激活受体(PPAR γ)转录活性降低,从而导致三酰甘油储存所必需的两种蛋白质表达减少,即脂肪特异性蛋白 27(FSP27)和脂滴包被蛋白^[7]。Kurokawa 等^[38]通过体内研究证实,AIM 在血液中随肥胖进展而增加,并渗入脂肪细胞,从而诱导脂肪组织的脂解。

肥胖脂肪组织中慢性、低度炎症的这种亚临床炎症状态主要依赖于先天免疫系统,通过脂肪酸激

表 2 AIM 在脂质代谢及相关疾病中的作用
Table 2 Role of AIM in lipid metabolism and related disease

脂质代谢及相关疾病 Lipid metabolism and related diseases	作用机制 Action mechanism
脂质代谢 Lipid metabolism	影响 LAL,LPS 的表达 ^[31-32] Affect the expression of LAL and LPS
动脉粥样硬化 Atherosclerosis	参与巨噬细胞摄取 oxLDL ^[33-34] ;促进 CD36 介导的 oxLDL 内化 ^[35] ;LXR/RXR-AIM 调节轴影响细胞凋亡 ^[36-37] Participate in the uptake of oxLDL by macrophages; promote the internalization of oxLDL mediated by CD36; LXR/RXR-AIM regulatory axis affects apoptosis
肥胖 Obesity	调控巨噬细胞极化 ^[20] ;被 CD36 内吞到脂肪细胞,与 FAS 结合,诱导脂解 ^[7] ;降低脂肪细胞 PPAR γ 转录活性 ^[7] ;在血液中渗入脂肪细胞,从而诱导脂解 ^[38] ;为肥胖相关自身免疫性疾病的生物标志物 ^[39] Regulating macrophage polarization; it is swallowed into adipocytes by CD36 and combined with FAS to induce lipolysis; decrease PPAR γ transcription activity of adipocytes; infiltrate fat cells in the blood, thus inducing lipolysis; it is a biomarker of obesity-related autoimmune diseases
2 型糖尿病 T2DM	激活 TLR4 刺激产生脂肪细胞中的趋化因子 ^[38] ;为预测 T2DM 病患者肾功能下降的标志物 ^[40] Activating TLR4 stimulates the production of chemokines in adipocytes; it is a marker to predict the decline of renal function in patients with T2DM

活脂肪细胞上表达的 toll 样受体,导致 M1 巨噬细胞募集到脂肪组织中^[46]。IgM 对自身抗原具有反应性,载有抗原的血液五聚体 IgM 形成包含多种元素的大免疫复合物(IC),其中包括 AIM^[39]。有研究证明,IgM-AIM 联合有助于肥胖状态下自身抗体的产生,在肥胖相关的自身免疫过程中起关键作用。在高脂饮食的小鼠中,天然 IgM 通过 B 细胞 TLR4 刺激而增加^[39]。AIM 与 IgM 相关,IgM 可以保护 AIM 免于肾排泄,增加血液 AIM 水平,肥胖诱导的 IgM 也会随之增加。IgM 依赖性自身抗原向 B 细胞的呈递,刺激 IgG 自身抗体的产生。因此,与肥胖的 AIM^{-/-}小鼠相比,肥胖 WT 小鼠中观察到的多种 IgG 自身抗体的增加被消除,并且表明血液 AIM 是人类肥胖相关自身免疫性疾病的生物标志物^[39]。

3.3 2 型糖尿病

2 型糖尿病(diabetes mellitus type 2, T2DM)作为一种常见的慢性代谢性疾病^[47],主要临床特征为脂质代谢紊乱、IR 和高血糖^[48]。有研究表明,对于 T2DM 患者来说,仅葡萄糖本身并不会导致糖尿病并发症,相反是一系列血脂异常、高血压病、炎症和 IR 等因素对脂肪组织脂肪酸代谢产生影响,而脂肪酸代谢是糖尿病肾病和神经病变等糖尿病并发症发病和进展的基础^[49]。因此,T2DM 及其并发症的发生发展均与脂质代谢紊乱有密切关系。Caesar 等^[50]研究发现,给小鼠喂食富含饱和脂肪的食物可能会导致肠道菌群的失衡,使 T2DM 小鼠出现炎症,其机制是通过脂肪细胞中的 TLR4 所介导的。脂肪组织巨噬细胞(ATM)能够调节自身的脂质代谢,其主要是通过固醇调节元件结合蛋白和 LXR 两个转录因子家族,这两个家族控制胆固醇与脂肪酸的合成,摄入过多的膳食脂质,协调 ATM 代谢激活,从而调节自身脂质代谢,控制 T2DM 的发展^[51]。有研究证实,AIM 可以通过激活 TLR4 刺激产生脂肪细胞中的趋化因子,这种趋化因子产生的减少显著预防了 AIM^{-/-}小鼠的巨噬细胞脂肪组织的浸润,从而保护他们免受 IR 和葡萄糖不耐受^[38]。Peters 等^[40]的研究验证了一组血浆蛋白生物标志物 PromarkerD (包括 AIM)可以准确预测 T2DM 病患者未来的肾功能下降,在糖尿病肾病中具有诊断和预后作用。

4 结语和展望

综上所述,AIM 作为细胞凋亡抑制剂,在过去的研究中已经揭示了许多作用,不仅可以通过抑制

单核细胞 TNF 和 IL-1 β 的产生从而促进 IL-10 的分泌发挥抗炎作用,还可以通过增强巨噬细胞摄取 oxLDL,与 oxLDL 结合并促进 CD36 介导 oxLDL 的内吞来调节巨噬细胞脂质稳态。这些研究均证实了其在炎症反应及脂质代谢中发挥重要作用,因此可以将 AIM 置于维持组织内环境稳定和炎症过程中的必要组分,通过其多种活性来调节从炎症反应到相关脂质代谢驱动的肥胖、糖尿病、血脂异常和动脉粥样硬化等高患病率疾病的进展。此外,AIM 参与脂质代谢紊乱的相关疾病又常伴有炎症反应,二者之间相互作用分子机制还未被完全揭示。是否可以通过抗炎改善脂质代谢异常,或通过调控脂质代谢来减轻慢性炎症反应,尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] MIYAZAKI T, HIROKAMI Y, MATSUHASHI N, et al. Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine-rich domain superfamily [J]. J Exp Med, 1999, 189(2): 413-422.
- [2] SANJURJO L, ARAN G, ROHER N, et al. AIM/CD5L: a key protein in the control of immune homeostasis and inflammatory disease [J]. J Leukoc Biol, 2015, 98(2): 173-184.
- [3] 韩汶润, 张丹丹, 朱彦, 等. 肝 X 受体调控脂代谢研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(5): 391-400.
HAN W R, ZHANG D D, ZHU Y, et al. Research progress in regulation of lipid metabolism by liver X receptors [J]. Chin J Pharm Toxicol, 2021, 35(5): 391-400.
- [4] HARUTA I, KATO Y, HASHIMOTO E, et al. Association of AIM, a novel apoptosis inhibitory factor, with hepatitis via supporting macrophage survival and enhancing phagocytotic function of macrophages [J]. J Biol Chem, 2001, 276(25): 22910-22914.
- [5] QU P, DU H, LI Y, et al. Myeloid-specific expression of Api6/AIM/Sp α induces systemic inflammation and adenocarcinoma in the lung [J]. J Immunol, 2009, 182(3): 1648-1659.
- [6] KUROKAWA J, ARAI S, NAKASHIMA K, et al. Macrophage-derived AIM is endocytosed into adipocytes and decreases lipid droplets via inhibition of fatty acid synthase activity [J]. Cell Metab, 2010, 11(6): 479-492.
- [7] IWAMURA Y, MORI M, NAKASHIMA K, et al. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) diminishes lipid droplet-coating proteins leading to lipolysis in adipocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 422(3): 476-481.
- [8] MARTINEZ V G, ESCODA-FERRAN C, TADEU SIMões I, et al. The macrophage soluble receptor AIM/Api6/CD5L displays a broad pathogen recognition spectrum and is involved in early response to microbial aggression [J]. Cell Mol Immunol, 2014,

- 11(4): 343–354.
- [9] TARAZÓN E, CORBACHO-ALONSO N, BARDERAS M G, et al. Plasma CD5L and non-invasive diagnosis of acute heart rejection [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2020, 39(3): 257–266.
- [10] CHEN T, DUAN J, LI M, et al. Assessment of serum CD5L as a biomarker to distinguish etiology and predict mortality in adults with pneumonia [J]. *J Infect*, 2020, 80(4): 469–496.
- [11] NOCK S, JOHANN K, HARDER L, et al. CD5L constitutes a novel biomarker for integrated hepatic thyroid hormone action [J]. *Thyroid*, 2020, 30(6): 908–923.
- [12] 刘前程, 舒鹰, 何会, 等. ARDS 患者 BALF 中 CD5L 水平与早期肺纤维增生及临床结局的关系 [J]. *国际检验医学杂志*, 2023, 44(5): 617–621, 627.
LIU Q C, SHU Y, HE H, et al. Relationship between CD5L level in BALF and early pulmonary fibroplasia and clinical outcome in ARDS patients [J]. *Int J Lab Med*, 2023, 44(5): 617–621, 627.
- [13] GEBE J A, KIENER P A, RING H Z, et al. Molecular cloning, mapping to human chromosome 1 q21-q23, and cell binding characteristics of Spalpha, a new member of the scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) family of proteins [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(10): 6151–6158.
- [14] GEBE J A, LLEWELLYN M, HOGGATT H, et al. Molecular cloning, genomic organization and cell-binding characteristics of mouse Spalpha [J]. *Immunology*, 2000, 99(1): 78–86.
- [15] SARRIAS M R, PADILLA O, MONREAL Y, et al. Biochemical characterization of recombinant and circulating human Spalpha [J]. *Tissue Antigens*, 2004, 63(4): 335–344.
- [16] SANCHEZ-MORAL L, RÀFOLS N, MARTORI C, et al. Multifaceted roles of CD5L in infectious and sterile inflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 4076.
- [17] MORI M, KIMURA H, IWAMURA Y, et al. Modification of N-glycosylation modulates the secretion and lipolytic function of apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(20): 3569–3574.
- [18] SANJURJO L, AMÉZAGA N, ARAN G, et al. The human CD5L/AIM-CD36 axis: a novel autophagy inducer in macrophages that modulates inflammatory responses [J]. *Autophagy*, 2015, 11(3): 487–502.
- [19] LOCATI M, CURTALE G, Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity [J]. *Annu Rev Pathol*, 2020, 15: 123–147.
- [20] SANJURJO L, ARAN G, TÉLLEZ É, et al. CD5L promotes M2 macrophage polarization through autophagy-mediated upregulation of ID3 [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 480.
- [21] ARAI S, MIYAZAKI T. A scavenging system against internal pathogens promoted by the circulating protein apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) [J]. *Semin Immunopathol*, 2018, 40(6): 567–575.
- [22] TAKAHATA A, ARAI S, HIRAMOTO E, et al. Crucial role of AIM/CD5L in the development of glomerular inflammation in IgA nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31(9): 2013–2024.
- [23] WANG C, YOSEF N, GAUBLomme J, et al. CD5L/AIM regulates lipid biosynthesis and restrains Th17 cell pathogenicity [J]. *Cell*, 2015, 163(6): 1413–1427.
- [24] BOUCH R J, ZHANG J, MILLER B C, et al. Distinct inflammatory Th17 subsets emerge in autoimmunity and infection [J]. *J Exp Med*, 2023, 220(10): e20221911.
- [25] HASEGAWA H, MIZOGUCHI I, ORII N, et al. IL-23p19 and CD5 antigen-like form a possible novel heterodimeric cytokine and contribute to experimental autoimmune encephalomyelitis development [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 5266.
- [26] NISHIKIDO T, OYAMA J, SHIRAKI A, et al. Deletion of apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)/CD5L attenuates the inflammatory response and infarct size in acute myocardial infarction [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(4): e002863.
- [27] RAJASEKARAN A, JULIAN B A, RIZK D V. IgA nephropathy: an interesting autoimmune kidney disease [J]. *Am J Med Sci*, 2021, 361(2): 176–194.
- [28] WU M Y, CHEN C S, YIANG G T, et al. The emerging role of pathogenesis of IgA nephropathy [J]. *J Clin Med*, 2018, 7(8): 225.
- [29] AKIKO T, KENTO K, CHIEKO N, et al. aim(cd5l) regulates glomerular iga deposition and its phlogogenisity in iga nephropathyregulates the glomerular iga deposition and its phlogogenisity in iga nephropathy [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2016, 31(suppl1): i101–i102.
- [30] ONG S B, HERNÁNDEZ-RESÉNDIZ S, CRESPO-AVILAN G E, et al. Inflammation following acute myocardial infarction: multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 186: 73–87.
- [31] LIAN X, YAN C, QIN Y, et al. Neutral lipids and peroxisome proliferator-activated receptor- γ control pulmonary gene expression and inflammation-triggered pathogenesis in lysosomal acid lipase knockout mice [J]. *Am J Pathol*, 2005, 167(3): 813–821.
- [32] KIMURA H, SUZUKI M, KONNO S, et al. Orchestrating role of apoptosis inhibitor of macrophage in the resolution of acute lung injury [J]. *J Immunol*, 2017, 199(11): 3870–3882.
- [33] CHISTIakov D A, MELNICHENKO A A, MYASOEDOVA V A, et al. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis [J]. *J Mol Med*, 2017, 95(11): 1153–1165.
- [34] 王颖, 寇俊杰. OxLDL 对动脉粥样硬化血栓作用研究的进展 [J]. *心血管康复医学杂志*, 2021, 30(3): 344–347.
WANG Y, KOU J J. Research progress of role of oxLDL in atherosclerotic thrombosis [J]. *Chin J Cardiovasc Rehabil Med*, 2021, 30(3): 344–347.
- [35] AMÉZAGA N, SANJURJO L, Julve J, et al. Human scavenger protein AIM increases foam cell formation and CD36-mediated oxLDL uptake [J]. *J Leukoc Biol*, 2014, 95(3): 509–520.
- [36] ARAI S, SHELTON J M, CHEN M, et al. A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpha/Ap16 in atherosclerosis

development [J]. *Cell Metab*, 2005, 1(3): 201–213.

[37] HAMADA M, NAKAMURA M, TRAN M T, et al. MafB promotes atherosclerosis by inhibiting foam-cell apoptosis [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3147.

[38] KUROKAWA J, NAGANO H, OHARA O, et al. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) is required for obesity-associated recruitment of inflammatory macrophages into adipose tissue [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(29): 12072–12077.

[39] ARAI S, MAEHARA N, IWAMURA Y, et al. Obesity-associated autoantibody production requires AIM to retain the immunoglobulin M immune complex on follicular dendritic cells [J]. *Cell Rep*, 2013, 3(4): 1187–1198.

[40] PETERS K E, DAVIS W A, ITO J, et al. Validation of a protein biomarker test for predicting renal decline in type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study Phase II [J]. *J Diabetes Complications*, 2019, 33(12): 107406.

[41] POZNYAK A V, NIKIFOROV N G, MARKIN A M, et al. Overview of OxLDL and its impact on cardiovascular health; focus on atherosclerosis [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 613780.

[42] KHANNA D, KHANNA S, KHANNA P, et al. Obesity: a chronic low-grade inflammation and its markers [J]. *Cureus*, 2022, 14(2): e22711.

[43] ZATTERALE F, LONGO M, NADERI J, et al. Chronic adipose tissue inflammation linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 1607.

[44] 郭钰雪, 詹晓蓉, 刘雪梅. 改善肥胖对高尿酸血症合并心衰的影响 [J]. *心血管康复医学杂志*, 2023, 32(3): 308–311.

GUO Y X, ZHAN X R, LIU X M. Influence of improving obesity on hyperuricemia complicated heart failure [J]. *Chin J Cardiovasc Rehabil Med*, 2023, 32(3): 308–311.

[45] LEE Y S, OLEFSKY J. Chronic tissue inflammation and metabolic disease [J]. *Genes Dev*, 2021, 35(5/6): 307–328.

[46] XU H, BARNES G T, YANG Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12): 1821–1830.

[47] 肖鑫, 涂珺. 清热复方抗代谢炎症治疗 2 型糖尿病的研究进展 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2021, 23(10): 3712–3718.

XIAO X, TU J. Research progress of anti-meta-inflammation treatment of type 2 diabetes with heat-clearing Chinese herbal compound [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2021, 23(10): 3712–3718.

[48] 周颖, 罗英杰. 达格列净联合二甲双胍对肥胖 2 型糖尿病患者糖脂代谢和微炎症状态的影响 [J]. *中国民康医学*, 2023, 35(8): 138–141.

ZHOU H, LUO Y J. Effects of Dapagliflozin combined with Metformin on glucose and lipid metabolism and microinflammatory state in obese patients with type 2 diabetes [J]. *Med J Chin People's Health*, 2023, 35(8): 138–141.

[49] 毛清雯, 杨宇峰, 石岩. 基于“先后天之本”调控脂质代谢论治 2 型糖尿病机制 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25(1): 39–43.

MAO Q W, YANG Y F, SHI Y. Exploration of the mechanism of treating type 2 diabetes mellitus based on the regulation of lipid metabolism by the congenital foundation and the foundation of acquired constitution [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2023, 25(1): 39–43.

[50] CAESAR R, TREMAROLI V, KOVATCHEVA-DATCHARY P, et al. Crosstalk between gut microbiota and dietary lipids aggravates WAT inflammation through TLR signaling [J]. *Cell Metab*, 2015, 22(4): 658–668.

[51] DAHIK V D, FRISDAL E, LE GOFF W. Rewiring of lipid metabolism in adipose tissue macrophages in obesity: impact on insulin resistance and type 2 diabetes [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5505.

[收稿日期] 2023-06-26

杨智惠,胡扬,宗政,等. 卵巢功能不全病因病机及动物模型构建研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 149-160.
Yang ZH, Hu Y, Zong Z, et al. Etiology, pathogenesis and animal model building of premature ovarian insufficiency [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 149-160.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.019

卵巢功能不全病因病机及动物模型构建研究进展

杨智惠,胡 扬*,宗 政,孙向明,宋 辉,陈鹰翔,徐蓓蕾,张文君,
陈鲁宁,李文兰*

(哈尔滨商业大学药学院,哈尔滨 150076)

【摘要】 卵巢功能不全(premature ovarian insufficiency, POI)又称“卵巢功能低下”,其发病率高达 1%~5%,近年来还呈现不断上升的趋势,已经严重影响女性的身心健康及生活质量。目前,关于 POI 的发病原因及机制尚不明确,模型构建方法与应用也较混乱,且绝大多数模型在针对性、稳定性等方面存在一定不足,这也极大的限制了 POI 的相关研究及其临床诊断和治疗。因此本文对 POI 的病因病机与 POI 动物模型的构建进行综述和讨论,以期对 POI 的病因病机研究及模型的选择和构建提供更多参考。

【关键词】 卵巢功能不全;动物模型;病因病机

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0149-12

Etiology, pathogenesis and animal model building of premature ovarian insufficiency

YANG Zhihui, HU Yang*, ZONG Zheng, SUN Xiangming, SONG Hui, CHEN Yingxiang, XU Beilei, ZHANG Wenjun,
CHEN Luning, LI Wenlan*

(College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

【Abstract】 Premature ovarian insufficiency (POI), also known as “ovarian insufficiency”, has an incidence of 1%~5%. The incidence has been on the rise in recent years, seriously affecting women's physical and mental health and quality of life. At present, the cause and mechanisms of POI are still unclear, and the method and applications of model construction are also confusing. Most models have some shortcomings in pertinence and stability. The limitations greatly limit research into the clinical diagnosis and treatment of POI. This paper summarizes and discusses the etiology and pathogenesis of POI and the construction of POI animal models to provide a comprehensive reference for those studying POI.

【Keywords】 premature ovarian insufficiency; animal model; etiology and pathogenesis

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

卵巢功能不全(premature ovarian insufficiency, POI)是指女性在 40 岁以前出现卵巢功能减退的一

种医学、心理和生殖性疾病^[1],主要表现为闭经、月经稀发或频发,同时伴有雌激素缺乏、促性腺激素

【基金项目】 黑龙江省重点研发计划项目(2022ZX02C08)。

【作者简介】 杨智惠(2000—),女,硕士研究生,研究方向:中药药效物质基础及质量标准化研究。E-mail:1318500392@qq.com

【通信作者】 胡扬(1986—),女,高级工程师,研究方向:中药药效物质基础及质量标准化研究。E-mail:huy0506@126.com

李文兰(1967—),女,博士生导师,教授,研究方向:中药药效物质基础及质量标准化研究。E-mail:lwldzd@163.com

* 共同通信作者

水平升高等表现。POI 还会导致骨质疏松、老年痴呆、糖尿病、心血管疾病等^[1]。相关研究表明,POI 的发生受遗传、医源(放化疗、手术等)、感染、环境、代谢和自身免疫性疾病等多种因素的影响^[2]。截至目前,POI 的发病原因、机制均不明确,给 POI 的治疗及相关研究带来诸多困难;而建立与病理特征、发病机制相符的动物模型对于深入研究其病因病机和临床治疗具有重要意义。因此本文分别从 POI 的发病原因、机制与 POI 动物模型的构建两个方面进行综述,以期为 POI 模型的选择提供更科学、更具针对性的造模信息,为 POI 病因病机以及临床治疗等研究提供参考。

1 卵巢功能不全病因病机研究

1.1 发病因素

1.1.1 遗传因素

相关研究表明,机体内的部分遗传物质异常可

诱导 POI 的发生,故 POI 具有较强的遗传异质性^[3]。现阶段在 POI 的发病因素中,遗传因素占 POI 病因的 20%~25%,其中包括染色体异常和基因变异^[4],具体信息见表 1。

1.1.2 免疫性因素

相关研究表明,机体的免疫功能失调会诱导 POI 的发生,即自身免疫性 POI (autoimmune POI, aPOI)。POI 患者中有 4%~30% 患有自身免疫性疾病^[14],如自身免疫性卵巢炎、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等^[14-16],自身免疫性卵巢炎通过淋巴细胞介导,增加体内促炎因子的含量并诱导 B 细胞分泌抗体,导致卵巢过度免疫,进而加快颗粒细胞的凋亡过程^[17];此外临床研究表明,类风湿性关节炎患者体内抗缪勒试管激素 (anti-miao Lei's tube hormone, AMH) 水平降低,导致生育能力减弱^[18];陈婉乐等^[19]研究推测,系统性红斑狼疮可通过抑制相关激素的分泌、影响促性腺激素释放激素

表 1 与卵巢功能不全相关的遗传异常类型

Table 1 Types of genetic factors associated with premature ovarian insufficiency		
遗传异常类型 Genetic anomaly type	异常基因或染色体 Abnormal gene or chromosome	表现 Expression
染色体异常 Chromosome abnormalities	45,X/46,XY 染色体混合体 45,X/46,XY chromosome mixture	不同程度的性别模糊,胎儿阶段出现卵母细胞凋亡 ^[5] 。 Different degrees of gender ambiguity, fetal stage of oocyte apoptosis.
	47,XXX	卵巢功能障碍,周期性闭经和不孕 ^[5] 。 Ovarian dysfunction, periodic amenorrhea and infertility.
	46,XX	不同程度的卵巢发育不良,特发性卵巢功能不全 ^[6] 。 Different degrees of ovarian dysplasia, idiopathic ovarian insufficiency.
	FMR1 基因 FMR1 gene	卵泡早期发育停滞、数量减少,闭经、雌激素不足 ^[7] 。 Early follicular development is stagnant, the number is reduced, amenorrhea and estrogen are insufficient.
	BMP15 基因 BMP15 gene	多种类型的卵巢功能紊乱,如性早熟及 POI ^[8-9] 。 Many types of ovarian dysfunction, such as precocious puberty and POI.
单基因异常 Single gene abnormality	NOBOX 基因 NOBOX gene	影响卵母细胞的形成和卵泡的发育,导致卵巢早衰 ^[10] 。 Affecting the formation of oocytes and the development of follicles, leading to premature ovarian failure.
	NR5A1 基因 NR5A1 gene	性腺、肾上腺、垂体促性腺激素表达受损,促卵泡生成素 (follicle stimulating hormone, FSH) 和促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 受体失活现象 ^[11] 。 Expression of gonad, adrenal gland and pituitary gland is impaired, and the receptors of follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) are inactivated.
	FSHR 基因 FSHR gene	卵巢无法正常响应,阻断卵泡形成,抑制雌二醇 (estradiol 2, E ₂) 等激素的分泌 ^[9] 。 Ovary can't respond normally, blocking follicular formation and inhibiting the secretion of estradiol (E2) and other hormones.
多基因异常 Polygenic abnormality	FOXL2 基因 FOXL2 gene	破坏颗粒细胞和卵泡膜细胞的分化,影响类固醇生成,使生殖能力减弱 ^[9,12] 。 Destroy the differentiation of granulosa cells and theca cells, affect steroid production, and weaken reproductive ability.
	FIGLA 基因 FIGLA gene	破坏卵细胞,影响其生殖功能 ^[9] 。 Destroy egg cells and affect their reproductive function.
	GDF9 基因 GDF9 gene	颗粒细胞产生的孕激素含量降低 ^[13] 。 Content of progesterone produced by granulosa cells decreased.

(gonadotropin releasing hormone, GnRH) 的反馈机制等途径损伤下丘脑-垂体-卵巢轴进而诱发 aPOI。此外透明带糖蛋白(zona pellucida glycoprotein 3, ZP3)等自身免疫抗体会导致下丘脑-垂体-卵巢轴功能发生异常,从而引发月经不调、不孕等症状^[20]。同时相关报道,POI 的发生与接种四价人乳头瘤病毒疫苗具有一定的相关性,推测疫苗的免疫原含量、佐剂等可能会诱导 POI,但临床研究较少,还需进一步探索^[17]。

1.1.3 医源性因素

在 POI 的诸多发病因素当中,医源性因素尤为普遍,包括放疗、化疗、手术等。在癌症治疗当中放疗、化疗等手段在杀死癌细胞的同时,也会对卵巢的正常组织造成损伤。放疗过程中电离辐射如 X-射线、 γ -射线可抑制生殖细胞 DNA 的合成,使卵母细胞丢失,导致卵巢萎缩^[21];化疗药物包括顺铂、环磷酰胺、表柔比星等具有较强的毒性,顺铂作为一种 DNA 交联剂,可干扰 DNA 修复过程,抑制细胞分裂,诱导 DNA 损伤,并引发细胞凋亡、死亡过程;环磷酰胺的主要活性代谢产物为磷酰胺氮芥,可诱导 DNA 交联,抑制 DNA 复制过程,同时可减少原始卵泡数量、促进颗粒细胞的凋亡进而导致卵巢功能的减弱^[22];表柔比星可影响 DNA 损伤修复能力,损害卵巢血管系统,导致血管痉挛和卵巢皮质纤维化^[5],同时也会蓄积于卵母细胞中,产生剂量依赖性的毒性作用^[22]。此外研究表明,在一些妇科手术后也会出现 POI 的相关症状,比如卵巢子宫内异位症手术,在手术过程中使用电凝止血手术器械、意外破坏卵巢组织等会加速卵泡耗竭,使卵巢功能异常^[23]。

1.1.4 环境因素

日常环境中具有生殖毒性的化合物会诱导 POI 的发生,这些化合物可通过食物、空气、灰尘等经消化系统、呼吸系统进入人体,影响内分泌系统的正常功能与卵巢周围的环境,进一步影响卵巢功能。比如双酚 A、邻苯二甲酸酯类、全氟烷基和聚氟烷基类物质,双酚 A 可过度激活原始卵泡,使原始卵泡数量显著减少^[21,24];研究发现邻苯二甲酸酯类可减少原始卵泡、窦卵泡数量,抑制颗粒细胞的增殖并降低颗粒细胞类固醇激素的分泌,导致相关激素水平下降,氧化应激水平升高,进而诱导 POI 的发生^[21,25];全氟辛酸是全氟烷基类物质之一,研究表明全氟辛酸能显著降低血清孕酮水平,降低黄体数

量,进而诱发 POI^[26]。

1.2 发生机制

卵巢功能不全是一个复杂的病理状态,可能由多种机制引起。而对卵巢功能不全机制的深入了解对于研究该疾病、开发治疗策略、建立动物模型和指导临床实践具有重要影响,具体信息见表 2。

2 动物模型构建方法及机制

卵巢功能不全仍是影响女性健康的重大疾病之一,其发病机制尚未明确,还需更深入的研究。目前,POI 动物模型的构建方法多以西医理论为指导,根据其发病因素可分为医源性模型、代谢性模型、免疫性模型、基因工程模型、环境干扰模型等,其模型构建方法及其机制见表 3。

3 讨论与展望

3.1 不同发病因素模型的选择

在 POI 动物模型构建时,基于不同的病因应当选择更有针对性的模型。根据医源性因素构建 POI 动物模型时,可采用药物或者射线相关方法进行模型的构建;药物造模可选择环磷酰胺、顺铂、皮质酮、雷公藤多苷等,目前药物造模多数采用雷公藤多苷及环磷酰胺造模;研究放疗与 POI 疾病之间的关系时,通常选择 X-射线、 γ -射线照射,此类造模方法多用于肿瘤研究中,该方法虽然成功率高,但不具普遍性,因此本方法应用具有较强针对性,在肿瘤与 POI 相关研究中可选择应用。根据代谢因素构建 POI 动物模型时可选择 D-半乳糖进行造模,此方法适用于 POI 与代谢相关研究。根据免疫因素构建 POI 动物模型时可选择注射免疫制剂,该方法比较适用于 POI 与免疫相关研究。根据遗传因素构建 POI 动物模型时可选择基因工程法进行造模,该方法目前应用较少,但由于遗传因素导致 POI 占比较大,因此加强此类研究尤为重要。综上所述,在研究不同因素导致的 POI 疾病时,临床上可根据不同的致病因素选择合适的方法进行动物模型的构建。

3.2 不同发病机制模型的选择

POI 的发病机制主要涉及到细胞凋亡、自噬、氧化应激等途径,其相关通路有 TGF- β /Smad、PI3K/Akt、Wnt/ β -catenin、SIRT、VEGF/VEGF-2、Hedgehog 等。目前研究发现,医源性模型中诱导 POI 的主要途径有 PI3K/Akt/FOXO3a 信号通路;其中环磷酰胺

表 2 卵巢功能不全的发生机制

Table 2 Pathogenesis of premature ovarian insufficiency

机制类型 Mechanism type	相关信号通路 Correlation signal path	调控过程 Regulation process	相关基因或分子 Related genes or molecules
细胞凋亡 Apoptosis	磷脂酰肌醇 3-激酶信号通路 (PI3K/Akt) ^[27] Phosphatidylinositol 3-kinase signal pathway (PI3K/Akt)	包括刺激因子与受体结合、PI3K 激活、Akt 的激活、下游信号传导等过程(图 1)。 Including the binding of stimulator and receptor, PI3K activation, Akt activation, downstream signal transduction and other processes (Figure 1).	PI3K 酶、PIP2、PIP3、含 PH 结构域的蛋白质 (Akt、PDK 和 SGK 等)、半胱氨酸蛋白酶 (caspase)、B 淋巴细胞瘤 2 基因 (<i>Bcl-2</i>)、促凋亡蛋白 Bax、Bak、凋亡相关因子 Fas 和 Fas-L mRNA、NF-κB、FOXO3 因子等 ^[28] 。 PI3K enzyme, PIP2, PIP3, protein with PH domain (Akt, PDK, SGK, etc.), cysteine protease (caspase), B lymphocyte tumor 2 gene (<i>Bcl-2</i>), pro-apoptosis proteins Bax, Bak, apoptosis-related factors Fas and Fas-L mRNA, NF-κB, FOXO3, etc.
	转化生长因子-β 信号通路 (TGF-β) ^[29] Transforming growth factor-β signaling pathway (TGF-β)	包括刺激因子与受体结合、受体激活、Smad 磷酸化、Smad 核转录因子复合物形成、基因转录调控等过程(图 2)。 Including the binding of stimulator and receptor, receptor activation, Smad phosphorylation, Smad nuclear transcription factor complex formation, gene transcription regulation and other processes (Figure 2).	TGF-β 分子、Smad 激酶等。 TGF-β molecule, Smad kinase, etc.
	Wnt/β-catenin 信号通路 ^[30] Wnt/β-catenin signaling pathway	包括无 Wnt 信号状态、Wnt 信号的激活、复合物形成、β-catenin 核转位、基因转录调控等过程(图 3)。 Including Wnt-free state, Wnt signal activation, complex formation, β-catenin nuclear translocation, gene transcription regulation and so on (Figure 3).	FOXO3a、Wnt3a ^[31] 、Wnt 蛋白、TCF/LEF 等染色质蛋白等。 FOXO3a, Wnt3a, Wnt protein, TCF/LEF and other chromatin proteins.
	血管内皮生长因子信号通路 (VEGF) ^[5] Vascular endothelial growth factor signaling pathway (VEGF).	包括 VEGF 与受体结合、受体激活、下游信号传导(可激活 PI3K/Akt、MAPK/ERK 信号通路)等过程 ^[32] 。 Including VEGF binding to receptor, receptor activation, downstream signal transduction (which can activate PI3K/Akt and MAPK/ERK signal pathways) and other processes.	VEGF-A、RTK、PI3K 酶、PIP2、PIP3、含 PH 结构域的蛋白质 (Akt、PDK 和 SGK 等)。 VEGF-A, RTK, PI3K enzyme, PIP2, PIP3, protein with PH domain (Akt, PDK and SGK, etc.).
	刺猬信号通路 (Hedgehog) ^[33] Hedgehog signaling pathway	包括无刺猬信号状态、刺猬信号的激活、Gli 转录因子的激活、基因转录调控等过程(图 4)。 Including hedgehog-free signal state, hedgehog signal activation, Gli transcription factor activation, gene transcription regulation and other processes (Figure 4).	Gli 转录因子、Smo 蛋白、Gli1 蛋白、kinesin 家族蛋白 (Kif7)、Hh 通路调节分子 (SUFU) 等 ^[34] 。 Gli transcription factor, Smo protein, Gli1 protein, kinesin family protein (Kif7), Hh pathway regulator (SUFU), etc.
细胞自噬 Autophagy	氧感知通路 ^[35] Oxygen sensing pathway	包括氧感受器(如缺氧诱导因子-HIF)激活、HIFα 亚基稳定化、缺氧条件下的稳定化、HIFα 与 HIFβ 的结合、HIF 复合物的转录活性、基因转录调控等过程。 Include activation of oxygen receptors (such as hypoxia inducible factor-HIF), stabilization of HIFα subunit, stabilization under hypoxia, combination of HIFα and HIFβ, transcription activity of HIF complex, gene transcription regulation, etc.	HIF、VHL 蛋白、缺氧响应元件 (HRE)、VEGF、促红细胞生成素 (EPO) 等。 HIF, VHL protein, hypoxia response element (HRE), VEGF, erythropoietin (EPO), etc.
	去乙酰化酶 (SIRT) 信号通路 ^[36-37] Deacetylase (SIRT) signaling pathway	包括 SIRT 蛋白的活性激活、NAD ⁺ 催化、底物去乙酰化、基因表达调控等过程。 Including SIRT protein activation, NAD ⁺ catalysis, substrate deacetylation, gene expression regulation and other processes.	SIRT 蛋白家族、辅酶 NAD ⁺ 、p53、FOXO 转录因子等。 SIRT protein family, coenzyme NAD ⁺ , p53, FOXO transcription factor, etc.
	SIRT 信号通路 ^[36-37] SIRT signaling pathway	包括 SIRT 蛋白的活性激活、NAD ⁺ 催化、底物去乙酰化、基因表达调控等过程。 Including SIRT protein activation, NAD ⁺ catalysis, substrate deacetylation, gene expression regulation and other processes.	SIRT 蛋白家族、辅酶 NAD ⁺ 、p53、FOXO 转录因子等。 SIRT protein family, coenzyme NAD ⁺ , p53, FOXO transcription factor, etc.
	氧化应激 Oxidative stress	PI3K/Akt 信号通路 ^[28] PI3K/Akt signaling pathway	RTK、PI3K 酶、PIP2、PIP3、含 PH 结构域的蛋白质 (Akt、PDK 和 SGK 等)、半胱氨酸蛋白酶 (caspase) 等 ^[28] 。 RTK, PI3K enzyme, PIP2, PIP3, protein containing PH domain (Akt, PDK and SGK, etc.), cysteine protease (caspase), etc.

$\beta 1$ /Smad3 等通路;雷公藤多苷诱导 POI 是通过线粒体凋亡途径诱导 POI。环境干扰模型则多采用

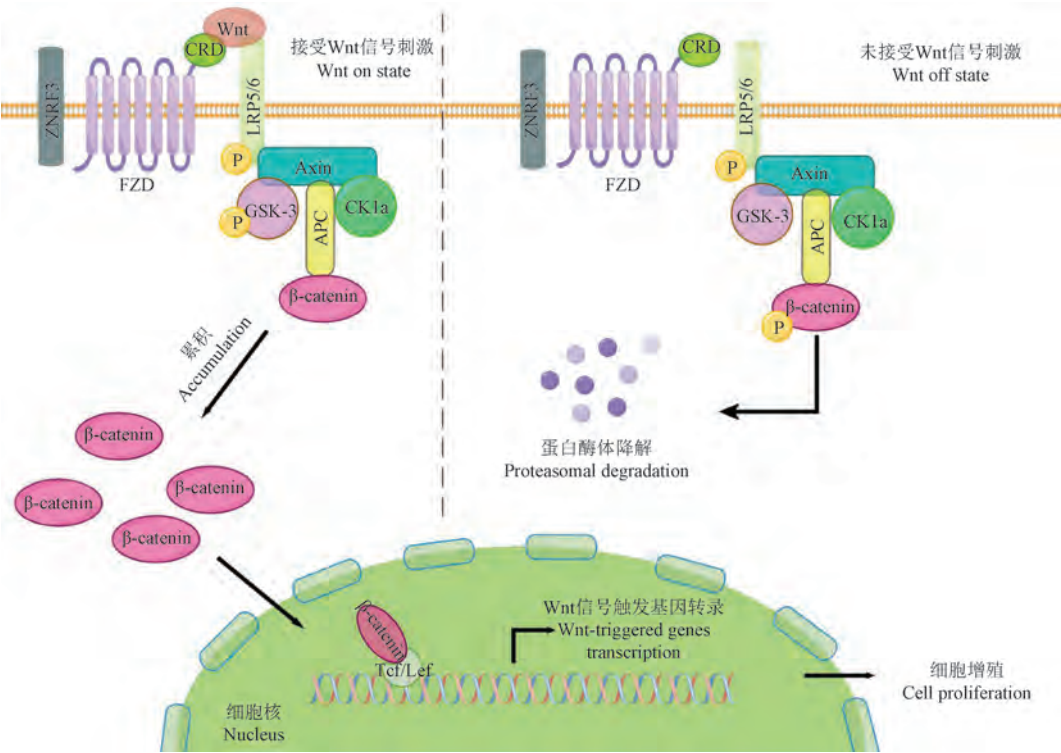


图 3 Wnt/β catenin 信号通路

Figure 3 Wnt/β catenin signaling pathway

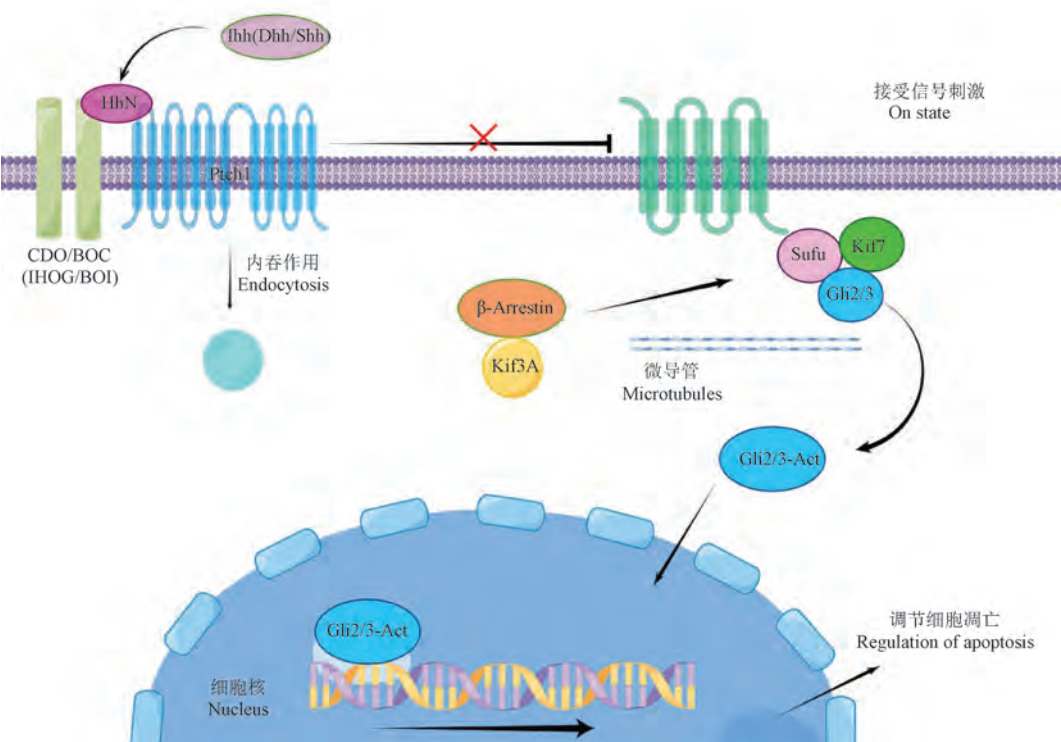


图 4 Hedgehog 信号通路

Figure 4 Hedgehog signaling pathway

VCD,其通过细胞凋亡、细胞自噬途径以及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导 POI。代谢性模型则采用 D-半乳糖,其主要通过内质网应激反应、PTEN/

PI3K/Akt 信号通路诱导 POI。免疫性模型则多采用注射混合免疫制剂进行模型的构建,其主要通过影响 Treg 细胞和 Th17 细胞中的特异性转录因子

表 3 POI 动物模型构建方法

Table 3 POI animal model construction methods

模型类型 Types of models	实验动物 Experimental animal	构建方法 Construction method	构建结果 Construction result	相关机制 Related mechanism	优缺点 Advantages and disadvantages	
	SD 大鼠 SD rats	腹腔注射 2 mg/mL 环磷酰胺溶液, 共 15 d ^[38] 。 2 mg/mL cyclophosphamide solution was injected intraperitoneally for 15 d.	体重下降, 动情周期紊乱; 卵巢间质增生和纤维化明显; 子宫腺体萎缩; 次级卵泡数及成熟卵泡数明显减少; AMH、E ₂ 水平降低, FSH 水平升高, Bax 表达水平升高, Bcl-2 表达水平下降。 Weight loss, estrous cycle disorder; Ovarian interstitial hyperplasia and fibrosis are obvious; Uterine gland atrophy; The number of secondary follicles and mature follicles decreased significantly; AMH and E ₂ levels decreased, FSH level increased, Bax expression level increased, and Bcl-2 expression level decreased.	Bax 及 Bcl-2 的调控使颗粒细胞凋亡; 释放 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 等因子诱发机体的氧化应激反应 ^[38] 。 Regulation of Bax and Bcl-2 makes granulosa cells apoptosis; Release of TNF-α, IL-1β, IL-6 and other factors induces oxidative stress in the body.	造模方法简单、构建时间短、成功率高、成本低; 但对实验操作要求高 ^[12] 。 Modeling method is simple, the construction time is short, the success rate is high and the cost is low; But it requires high experimental operation.	
	医源性 Iatrogenic	SD 大鼠 SD rats	腹腔注射 0.5 mg/mL 的顺铂溶液, 共 7 d ^[39] 。 0.5 mg/mL cisplatin solution was injected intraperitoneally for 7 d.	体重下降, 动情周期紊乱; 卵巢组织萎缩, 子宫内壁薄; 成熟卵泡数减少; AMH 水平降低。 Weight loss, estrous cycle disorder; ovarian tissue atrophy, thin uterine wall; Number of mature follicles decreased; AMH level decreased.	促进卵巢颗粒细胞中的铁性下垂并引起大鼠卵巢发育不良和卵巢组织纤维化 ^[40] ; 诱发内质网应激引发颗粒细胞的自噬 ^[41] ; 抑制泡细胞 TGF-β1/Smad3 途径调控卵巢的功能 ^[29] 。 It promotes iron sagging in ovarian granulosa cells and causes ovarian dysplasia and ovarian tissue fibrosis in rats; Inducing endoplasmic reticulum stress leads to autophagy of granular cells; Inhibition of follicular TGF-β1/Smad3 pathway to regulate ovarian function.	造模方法简单、构建时间短、成功率高、成本低; 但需注意注射剂量 ^[12] 。 Modeling method is simple, the construction time is short, the success rate is high and the cost is low; But pay attention to the injection dose.
	C57BL6 小鼠 C57BL6 mice	全身 0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy X-射线, 共 7 d ^[42] 。 Whole body X-rays of 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy and 6 Gy for 7 d.	体重下降, 动情周期紊乱; 双侧卵巢体积缩小; 原始卵泡数量减少; FSH 水平升高, AMH 水平降低。 Weight loss, estrous cycle disorder; Bilateral ovarian volume reduction; Number of primordial follicles decreased; FSH level increased and AMH level decreased.	氧化损伤、炎症损伤激活 PI3K/Akt/FOXO3a 信号通路, 导致 POI ^[43] 。 Oxidative injury and inflammatory injury activate PI3K/Akt/FOXO3a signaling pathway, leading to POI.	造模方法简单、构建时间短、成功率高; 但成本高、临床适用性低 ^[12] 。 Modeling method is simple, the construction time is short, and the success rate is high; But the cost is high and the clinical applicability is low.	
	Balb/c 小鼠 Balb/c mice	灌胃 40 mg/kg 雷公藤多苷混悬液, 共 14 d ^[44] 。 40 mg/kg tripterygium wilfordii polyglycoside suspension was given orally for 14 d.	受孕率呈下降趋势; 体重下降, 动情周期紊乱; 卵巢组织受损; 原始卵泡数量减少; FSH 呈上调趋势, E ₂ 呈下调趋势。 Pregnancy rate showed a downward trend; Weight loss, estrous cycle disorder; Ovarian tissue is damaged; Number of primordial follicles decreased; FSH showed an upward trend, while E ₂ showed a downward trend.	通过激活线粒体凋亡途径, 损伤线粒体功能, 使促凋亡蛋白 caspase3、caspase9、Bax 表达水平升高, 加速细胞凋亡 ^[45] 。 By activating mitochondrial apoptosis pathway and damaging mitochondrial function, the expression levels of pro-apoptosis proteins caspase3, caspase9 and Bax are increased and apoptosis is accelerated.	造模方法简单、成功率高、成本低 ^[12] 。 Modeling method is simple, with high success rate and low cost.	
	SD 大鼠 SD rats	下肢肌注氢化可的松 32 mg/kg, 共 12 d ^[46] 。 Hydrocortisone 32 mg/kg was injected into lower limbs for 12 d.	体重下降, 动情周期紊乱; 卵巢指数下降; E ₂ 水平降低, FSH 水平升高。 Weight loss, estrous cycle disorder; Ovarian index decreased; E ₂ level decreased and FSH level increased.	导致负反馈增加, 抑制下丘脑产生的 GnRH, 降低 FSH 和 LH 的分泌 ^[47] ; 抑制 VEGF 和其受体表达, 导致卵巢缺氧和萎缩。 It leads to the increase of negative feedback, inhibits GnRH produced by hypothalamus and reduces the secretion of FSH and LH; Inhibition of VEGF and its receptor expression leads to ovarian hypoxia and atrophy.	是一种中医证候相关模型, 造模方法简单、成本低; 但缺乏重复性 ^[12] 。 It is a TCM syndrome-related model with simple modeling method and low cost. But it lacks repeatability.	

续表3

模型类型 Types of models	实验动物 Experimental animal	构建方法 Construction method	构建结果 Construction result	相关机制 Related mechanism	优缺点 Advantages and disadvantages
	SD 大鼠 SD rats	皮下注射 40 mg/kg 皮质酮混悬液 ^[48] 。 Subcutaneous injection of 40 mg/kg corticosterone suspension.	体重下降,动情周期紊乱;卵巢萎缩;原始、窦前卵泡和成熟卵泡数量减少;AMH、E ₂ 水平降低,FSH 水平升高。 Weight loss, estrous cycle disorder; Ovarian atrophy; Number of primordial, preantral follicles and mature follicles decreased; Levels of AMH and E ₂ decreased and FSH increased.	通过激活 GR-CREB/AP1 轴抑制卵巢中促黄体素受体 (luteinizing hormone receptor, LHR) 的表达,影响相关激素表达水平 ^[49] 。 By activating GR-CREB/AP1 axis, the expression of luteinizing hormone receptor (LHR) in ovary was inhibited, and the expression level of related hormones was affected.	造模方法简单、成功率高、成本低、使用范围较广;但需严格把控用药剂量、时间 ^[12] 。 Modeling method is simple, the success rate is high, the cost is low, and the application range is wide; However, the dosage and time should be strictly controlled.
代谢性 Metabolic	Balb/c 小鼠 Balb/c mice	背部皮下注 200 mg/(kg·d)D-半乳糖,共 42 d ^[50] 。 200 mg/(kg·d) D-galactose was injected subcutaneously into the back for 42 d.	卵巢质量系数降低;各级卵泡数量减少;E ₂ 、LH 水平降低。 Ovarian mass coefficient decreased; Number of follicles at all levels decreased; Level of E ₂ and LH decreased.	通过下调 SIRT3/SOD2 表达水平,LH、E ₂ 水平降低 ^[51] 。 By down-regulating the expression level of SIRT3/SOD2, the levels of LH and E ₂ decreased.	造模方法简单、成本较低;但造模时间长 ^[12] 。 Modeling method is simple and the cost is low; But the modeling time is long.
免疫性 Immune	C57BL6 小鼠 C57BL6 mice	脚掌、尾根注射免疫抑制剂溶液;7 d 后注射混合免疫抑制剂 ^[52] 。 Inject immune preparation solution into sole and tail root; After 7 days, mixed immune preparation was injected.	动情周期紊乱;卵巢萎缩;卵巢、子宫脾、胸腺指数下降;各级卵泡数量减少;AMH、E ₂ 水平降低,FSH、LH 水平升高,抗透明带抗体水平升高。 Estrous cycle disorder; Ovarian atrophy; Index of ovary, uterus, spleen and thymus decreased; Number of follicles at all levels decreased; AMH and E ₂ levels decreased, FSH and LH levels increased, and anti-zona pellucida antibody levels increased.	通过影响 Treg 细胞和 Th17 细胞中的特异性转录因子 Foxp3 和 ROR- γ t 的基因表达水平,卵巢指数下降,出现卵巢早衰 ^[53] 。 By affecting the gene expression levels of specific transcription factors Foxp3 and ROR- γ t in Treg cells and Th17 cells, the ovarian index decreased and premature ovarian failure appeared.	成功率高、造模时间短;但造模方法繁琐、成本略高 ^[12] 。 High success rate and short modeling time; But the modeling method is complicated and the cost is slightly higher.
基因工程 Genetic engineering	<i>Gdf9</i> ^{cre+} 小鼠、 <i>Fkbp38</i> ^{fllox/fllox} 小鼠 <i>Gdf9</i> ^{cre+} mice、 <i>Fkbp38</i> ^{fllox/fllox} mice	通过两种小鼠交配获得卵母细胞特异性敲除 <i>Fkbp38</i> 转基 因小鼠 ^[54] 。 Oocyte-specific knock-out of <i>Fkbp38</i> transposon was obtained by mating two kinds of mice.	生育力下降;原始卵泡数量减少;颗粒细胞凋亡显著增加;E ₂ 、AMH、抑制素 B (inhibin B, INHB) 降低,FSH 水平升高。 Decline in fertility; Number of primordial follicles decreased; Granulocyte apoptosis increased significantly; E ₂ , AMH and B inhibin (NHB) decreased, while FSH level increased.	激活 mTORC1,过度活化原始卵泡从而导致卵巢早衰和不孕症 ^[54] 。 Activation of mTORC1 overactivates the primordial oocyte, which leads to premature ovarian failure and infertility.	造模时间短、成功率高;但造模方法繁琐、成本高,难以推广 ^[12] 。 Short modeling time and high success rate; However, the modeling method is complicated and costly, so it is difficult to popularize.
环境干扰 Environmental disturbance	SD 大鼠 SD rats	腹腔注射 160 mg/mL VCD 溶液,共 15 d ^[55] 。 160 mg/mL VCD solution was injected intraperitoneally for 15 d.	动情周期紊乱;卵巢组织受损;卵巢细胞凋亡水平升高;GnRH、FSH、LH 水平升高,AMH、E ₂ 水平降低。 Estrous cycle disorder; Ovarian tissue is damaged; Apoptosis level of ovarian cells increased; Levels of GnRH, FSH and LH increased, while the levels of AMH and E ₂ decreased.	抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路来激活颗粒细胞的自噬过程 ^[56] 。 Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway to activate autophagy of granulosa cells.	造模方法简单、成本低、成功率高;但需注意用量 ^[12] 。 Modeling method is simple, low in cost and high in success rate; But pay attention to the dosage.

Foxp3 和 ROR- γ t 的基因表达水平而诱导 POI。基因工程模型则利用卵母细胞特异性敲除 *Fkbp38* 转基因小鼠进行研究,其通过激活 mTORC1,过度活化原始卵泡而诱导 POI。由于 POI 的发生尤为复杂,并不是通过单一途径或通路诱导产生,往往是多途径、多通路共同作用产生,因此对 POI 的相关机制通路进行研究时,需要结合发病因素及机制相结合选择合适的模型进行研究。

3.3 不同模型的优缺点

在研究过程中,大多数 POI 动物模型是根据其不同的发病因素构建的。根据医源性因素构建模型可选择药物(如环磷酰胺、顺铂、雷公藤多苷、氢化可的松、皮质酮)以及放射等方法进行诱导,均有造模方法简单、成功率高的优点,但注射环磷酰胺、顺铂时需注意注射剂量,避免剂量过高对模型动物造成其他损伤,影响造模效果;氢化可的松可构建

肾阳虚卵巢早衰动物模型,但判定实验结果时存在主观因素的影响,同时该造模方法缺乏重复性,会影响实验结果的准确性;注射皮质酮时,模型构建时间较长;放射诱导 POI 时,通常选择 X-射线、 γ -射线进行照射,该方法成本较高,在临床上应用适用性、广泛性较低。根据代谢因素进行模型构建时,通常选择 D-半乳糖进行诱导,造模方法简单、成本低但造模周期较长。根据免疫性因素构建模型时通常选择免疫制剂及其混合制剂进行诱导,该方法成功率高、造模时间短但成本略高、造模方法较为繁琐。根据遗传因素进行模型构建时,目前研究中一般选择基因工程法,该方法造模时间短、成功率高,但成本高、操作繁琐,难以推广。根据环境干扰因素诱导时通常选择 VCD 溶液,该方法成功率高、造模时间短、成本低,但需要注意注射剂量。综上所述,从发病因素角度考虑,医源性模型可优先选择环磷酰胺、顺铂、雷公藤多苷进行诱导,其中以雷公藤多苷进行诱导最常见;代谢性模型可选择 D-半乳糖进行诱导,其应用较为广泛;构建免疫性模型时可选择免疫抑制剂及其混合制剂;在目前研究中,遗传性模型常用基因工程法进行构建;环境干扰模型可应用 VCD 进行诱导。从降低成本角度考虑,可构建医源性、代谢性、环境干扰型模型,使用环磷酰胺、顺铂、雷公藤多苷等化疗药物以及 D-半乳糖、VCD 进行 POI 诱导。从节省时间角度考虑,可构建医源性、免疫性动物模型以及应用基因工程法进行诱导,其中以医源性模型最为简洁、高效和常见。所以在构建 POI 动物模型时,可根据实验具体情况选择造模方法,同时在临床上研究 POI 的病因病机时,可根据不同的致病物质选择合适的方法进行动物模型的构建,更具针对性。

3.4 总结与展望

随着生活环境的变化、节奏的加快、手术和药品使用等诸多因素的影响,女性 POI 的发病率也逐年上升。据统计,全球 15% 的女性在生育年龄内会出现 POI 的症状。截至目前,关于 POI 的发病机制和治疗等方面仍存在诸多问题,其发病因素主要有遗传、免疫、医学、环境等,且其相关机制更为复杂。现阶段临床上 POI 已经有多种治疗手段,但仍存在许多的不足和难点。研究表明激素替代疗法虽可以改善症状,但长期使用可能会增加患者患乳腺癌、心血管等疾病的风险^[57];植物雌激素、细胞治疗和生殖技术等新兴治疗方法虽然有潜力,但其安全

性、有效性及适用范围等问题还需进一步研究^[58]。因此对 POI 的病因病机进行研究具有重要的意义。中医药是我国的传统瑰宝,而现阶段将 POI 与中医病证结合的动物模型研究较少,大部分均以西医标准进行评判。POI 在中医证候里面往往归结于虚证,如肾阳虚等,但仍缺少客观可行的统一标准。因此将 POI 与中医证候结合的研究具有十分重要的意义,这也将有助于 POI 的临床诊断以及中医药的治疗。

动物模型的构建对于 POI 的病因病机及相关研究尤为重要,但现阶段关于 POI 动物模型构建仍然存在许多问题。首先,目前 POI 动物模型多采用化学物质、手术等方法进行构建,这些方法极易导致其他不必要的伤害,且构建的模型在生理学和代谢方面可能与人类存在较大差异性,因此其可靠性尚需进一步验证;其次,POI 的发病机制复杂,还有很多未知的因素需要解析;此外当前大部分动物模型是通过损伤或注射药物来诱导疾病,但这些方法只能反映病理生理状态的变化,对于疾病的深度机制研究较为有限。随着现代医学技术的不断发展,许多新技术孕育而生,如基因编辑、诱导多能干细胞(iPSC)技术、基因传递等。在 POI 模型的构建当中,可以将一些新技术与传统方法相结合,如利用基因剔除小鼠加以医源性药物相结合进行造模;手术结合药物进行造模。模型的成模判断方面可以结合现代新兴组学技术寻找证候标志物加以判别。

本研究整理归纳了 POI 的发病因素、发病机制以及 POI 动物模型的构建方法,旨在为模型应用过程中能够选择与临床患者病症、指标更为符合的造模方法,有助于对不同病因、病机导致的 POI 进行深入研究,寻找更准确、更科学的 POI 治疗、预防方案。为 POI 模型的选择提供更科学、更具针对性的造模信息;为 POI 病因病机以及临床治疗等研究提供参考。

参考文献:

- [1] ISHIZUKA B. Current understanding of the etiology, symptomatology, and treatment options in premature ovarian insufficiency (POI) [J]. Front Endocrinol, 2021, 12: 626924.
- [2] KIRSCHENBAUM M, ORVIETO R. Premature ovarian insufficiency (POI) and autoimmunity-an update appraisal [J]. J Assist Reprod Genet, 2019, 36(11): 2207-2215.
- [3] 陈子江, 孙赞. 早发性卵巢功能不全的遗传因素 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2021, 37(1): 7-12.
CHEN Z J, SUN Y. Hereditary factors of primary ovarian

- insufficiency [J]. Chin J Pract Gynecol Obstet, 2021, 37(1): 7-12.
- [4] 吴瑞瑾.《早发性卵巢功能不全的临床诊疗中国专家共识》解读[A]. 2018 年浙江省医学会妇产科学与围产医学学术年会暨 2018 年浙江省医师协会妇产科医师分会学术年会论文汇编[C]; 2018.
- WU R J. Interpretation of the Chinese Expert Consensus on Clinical Diagnosis and Treatment of Early-Onset Ovarian Insufficiency [A]. Proceedings the 2018 Academic Annual Meeting of Obstetrics and Gynecology and Perinatal Medicine of Zhejiang Medical Association and the 2018 Academic Annual Meeting of the Branch of Obstetricians and Gynecologists of Zhejiang Physicians Association[C]; 2018.
- [5] 孙璐, 郑群, 范晓东, 等. 早发性卵巢功能不全病因学及发病机制的研究进展 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2023, 49(2): 534-541.
- SUN L, ZHENG Q, FAN X D, et al. Research progress in etiology and pathogenesis of premature ovarian insufficiency [J]. J Jilin Univ Med Ed, 2023, 49(2): 534-541.
- [6] 张碧云, 孟钊, 李秀媚, 等. TLR4 启动子遗传变异及环境交互与 46XX 早发性卵巢功能不全的关系 [J]. 广东医学, 2018, 39(2): 207-211.
- ZHANG B Y, MENG Z, LI X M, et al. Correlations between the susceptibility of premature ovarian insufficiency and TLR4 promoter SNPs or environmental factors [J]. Guangdong Med J, 2018, 39(2): 207-211.
- [7] ROSARIO R, STEWART H L, CHOUDHURY N R, et al. Evidence for a fragile X messenger ribonucleoprotein 1 (FMR1) mRNA gain-of-function toxicity mechanism contributing to the pathogenesis of fragile X-associated premature ovarian insufficiency [J]. FASEB J, 2022, 36(11): e22612.
- [8] LIU M N, ZHANG K, XU T M. The role of BMP15 and GDF₉ in the pathogenesis of primary ovarian insufficiency [J]. Hum Fertil, 2021, 24(5): 325-332.
- [9] CHEN M, JIANG H, ZHANG C. Selected genetic factors associated with primary ovarian insufficiency [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(5): 4423.
- [10] LI L, WANG B, ZHANG W, et al. A homozygous NOBOX truncating variant causes defective transcriptional activation and leads to primary ovarian insufficiency [J]. Hum Reprod, 2017, 32(1): 248-255.
- [11] BASHAMBOO A, MCELREAVEY K. NR5A1/SF-1 and development and function of the ovary [J]. Ann Endocrinol, 2010, 71(3): 177-182.
- [12] 李虹璇, 李思慧, 冯嘉欣, 等. 卵巢早衰动物模型构建方法及比较研究进展 [J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(6): 505-514.
- LI H X, LI S H, FENG J X, et al. Construction methods and comparative research progress of premature ovarian failure animal models [J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(6): 505-514.
- [13] DALBIES-TRAN R, CADORET V, DESMARCHAIS A, et al. A comparative analysis of oocyte development in mammals [J]. Cells, 2020, 9(4): 1002-1002.
- [14] 黄燕靖, 张明敏, 周凡茹, 等. 早发性卵巢功能不全致病因素及机制研究进展 [J]. 中西医结合研究, 2022, 14(1): 48-51, 55.
- HUANG Y J, ZHANG M M, ZHOU F R, et al. Research progress on pathogenic factors and mechanism of early-onset ovarian insufficiency [J]. Res Integr Tradit Chin West Med, 2022, 14(1): 48-51, 55.
- [15] JIAO X, ZHANG X, LI N, et al. T_{reg} deficiency-mediated T_H 1 response causes human premature ovarian insufficiency through apoptosis and steroidogenesis dysfunction of granulosa cells [J]. Clin Transl Med, 2021, 11(6): e448.
- [16] 徐孜惟. 自身免疫性甲状腺疾病与早发性卵巢功能不全的相关性研究 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2022.
- XU Z W. Correlation between autoimmune thyroid disease and early onset ovarian insufficiency [D]. Hangzhou: Zhejiang Chinese Medical University, 2022.
- [17] 朱璨, 夏宛廷, 韩娜娜, 等. 早发性卵巢功能不全与免疫的相关性及临床研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(5): 111-114.
- ZHU C, XIA W T, HAN N N, et al. Correlation between premature ovarian insufficiency and immunity and its clinical research progress [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023, 41(5): 111-114.
- [18] BROUWER J, HAZES J M, LAVEN J S, et al. Fertility in women with rheumatoid arthritis: influence of disease activity and medication [J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(10): 1836-1841.
- [19] 陈婉乐, 刘玉东, 李雪兰, 等. 早发性卵巢功能不全患者赠卵 IVF 获得妊娠在孕早期合并系统性红斑狼疮: 1 例报告并文献复习 [J]. 南方医科大学学报, 2017, 37(12): 1683-1687.
- CHEN W L, LIU Y D, LI X L, et al. Pregnancy outcome in a woman with premature ovarian insufficiency complicated by systemic lupus erythematosus during pregnancy: a case report [J]. J South Med Univ, 2017, 37(12): 1683-1687.
- [20] 林艇, 李潭, 杨非易. 排卵功能障碍不孕患者与卵巢自身抗体的关系 [J]. 北京大学学报(医学版), 2001, 33(2): 187-188.
- LIN T, LI T, YANG F Y. Relationship between infertility patients with ovulation dysfunction and ovarian autoantibodies [J]. J Beijing Med Univ, 2001, 33(2): 187-188.
- [21] DING N, HARLOW S D, RANDOLPH J F, et al. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and their effects on the ovary [J]. Hum Reprod Update, 2020, 26(5): 724-752.
- [22] CACCIOTTOLA L, DONNEZ J, DOLMANS M M. Ovarian tissue and oocyte cryopreservation prior to iatrogenic premature ovarian insufficiency [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2022, 81: 119-133.
- [23] 姜立娟, 张思辰, 刘斐然, 等. 医源性早发型卵巢衰老和功能不全的研究进展 [J]. 中国老年保健医学, 2021, 19(2): 82-85.
- JIANG L J, ZHANG S C, LIU F R, et al. Research progress of

- iatrogenic early-onset ovarian aging and dysfunction [J]. Chin J Geriatr Care, 2021, 19(2): 82-85.
- [24] HU Y, YUAN D Z, WU Y, et al. Bisphenol A initiates excessive premature activation of primordial follicles in mouse ovaries via the PTEN signaling pathway [J]. Reprod Sci, 2018, 25(4): 609-620.
- [25] LIU J C, XING C H, XU Y, et al. DEHP exposure to lactating mice affects ovarian hormone production and antral follicle development of offspring [J]. J Hazard Mater, 2021, 416: 125862.
- [26] CHEN Y, ZHOU L, XU J, et al. Maternal exposure to perfluorooctanoic acid inhibits luteal function via oxidative stress and apoptosis in pregnant mice [J]. Reprod Toxicol, 2017, 69: 159-166.
- [27] 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.
- [28] CAI L, ZONG D K, TONG G Q, et al. Apoptotic mechanism of premature ovarian failure and rescue effect of Traditional Chinese Medicine; a review [J]. J Tradit Chin Med, 2021, 41(3): 492-498.
- [29] 丁艳. TGF- β 1/Smad 信号通路在卵巢功能衰退中的表达及意义 [D]. 张家口: 河北北方学院, 2018.
DING Y. Expression and significance of TGF- β 1/Smad signaling pathway in ovarian function decline [D]. Zhangjiakou: Hebei North University, 2018.
- [30] 刘雪玲, 胡春艳, 刘港, 等. 卵巢早衰发病机制及相关治疗机制的最新研究进展 [J]. 江苏大学学报(医学版), 2021, 31(6): 541-548.
LIU X L, HU C Y, LIU G, et al. The latest research progress on the pathogenesis and related treatment mechanism of premature ovarian failure [J]. J Jiangsu Univ Med Ed, 2021, 31(6): 541-548.
- [31] 余庆. Wnt/ β -Catenin 信号通路的激活或抑制对水牛颗粒细胞雌二醇和孕酮合成的影响 [D]. 南宁: 广西大学, 2021.
YU Q. Effects of activation or inhibition of Wnt/ β -Catenin signaling pathway on estradiol and progesterone synthesis in buffalo granulosa cells [D]. Nanning: Guangxi University, 2021.
- [32] YANG Z, DU X, WANG C, et al. Therapeutic effects of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived microvesicles on premature ovarian insufficiency in mice [J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 250.
- [33] 于潇, 王玉超, 刘金星, 等. 补肾养精颗粒灌胃对早发性卵巢功能不全大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的抑制作用及其机制 [J]. 山东医药, 2022, 62(26): 12-16.
YU X, WANG Y C, LIU J X, et al. Inhibitory effect of Bushen Yangjing Granule on apoptosis of ovarian granulosa cells in rats with premature ovarian insufficiency and its mechanism [J]. Shandong Med J, 2022, 62(26): 12-16.
- [34] JIANG Y, ZHU D, LIU W, et al. Hedgehog pathway inhibition causes primary follicle atresia and decreases female germline stem cell proliferation capacity or stemness [J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 198.
- [35] 朱轶轩, 董晓英. 基于卵母细胞线粒体探讨早发性卵巢功能不全发生机制 [J]. 生殖医学杂志, 2020, 29(4): 545-549.
ZHU Y X, DONG X Y. Exploring mechanism of premature ovarian insufficiency based on oocyte mitochondria [J]. J Reprod Med, 2020, 29(4): 545-549.
- [36] 向恬, 马瑞红, 王宝娟, 等. SIRT1 调控卵泡发育、延缓卵巢衰老的研究进展 [J]. 中国生育健康杂志, 2020, 31(4): 389-391.
XIANG T, MA R H, WANG B J, et al. Research progress of SIRT1 regulating follicular development and delaying ovarian aging [J]. Chin J Reprod Health, 2020, 31(4): 389-391.
- [37] 贡涵芝, 邱丙全, 杨洋. SIRT1 调控其下游非组蛋白分子乙酰化修饰影响细胞凋亡的分子机制 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2021, 37(10): 1281-1289.
BEN H Z, QIU B Q, YANG Y. The molecular mechanism of SIRT1-catalysed deacetylation on non-histone proteins and its impact on cell apoptosis [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2021, 37(10): 1281-1289.
- [38] 魏天琴, 凌丽, 冯秀山, 等. 环磷酰胺对大鼠卵巢结构与功能的影响及机制 [J]. 解放军医学杂志, 2018, 43(3): 195-200.
WEI T Q, LING L, FENG X S, et al. Effects and mechanism of cyclophosphamide on the ovarian structure and function of rats with premature ovarian failure [J]. Med J Chin People's Liberation Army, 2018, 43(3): 195-200.
- [39] 刘希萍. 基于动物实验和网络药理研究调经汤对 POI 的作用及机制 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2022.
LIU X P. A study on the effects and mechanisms of tonifying menstruation on POI based on animal experiments and network pharmacology [D]. Hangzhou: Zhejiang Chinese Medical University, 2022.
- [40] DU R, CHENG X, JI J, et al. Mechanism of ferroptosis in a rat model of premature ovarian insufficiency induced by cisplatin [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 4463.
- [41] 吴玉萍. 内质网应激在顺铂诱发早发性卵巢功能不全中的作用机制 [D]. 广州: 南方医科大学, 2018.
WU Y P. Mechanisms of endoplasmic reticulum stress in cisplatin-induced early onset ovarian insufficiency [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2018.
- [42] 贺宇恒. 放疗致卵巢早衰鼠模型的构建及卵巢早衰患者 MCL-1 基因的初步研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2018.
HE Y H. Construction of a murine model of radiotherapy-induced premature ovarian failure and a preliminary study of the MCL-1 gene in patients with premature ovarian failure [D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2018.
- [43] HE L, LONG X, YU N, et al. Premature ovarian insufficiency (POI) induced by dynamic intensity modulated radiation therapy via P13K-AKT-FOXO3a in rat models [J]. Biomed Res Int,

- 2021, 2021: 7273846.
- [44] 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.
- [45] 楚玉凤. 雷公藤多苷诱导卵巢颗粒细胞经线粒体途径凋亡及枸杞多糖拮抗该损伤的机制研究 [D]. 银川: 宁夏医科大学, 2022.
- CHU Y F. GTW induced apoptosis of ovarian granulosa cells through mitochondrial pathway and the mechanism of LBP antagonizing the injury [D]. Yinchuan: Ningxia Medical University, 2022.
- [46] 王凯, 刘帅帅, 郭起岳, 等. 氢化可的松致 SD 大鼠肾阳虚证卵巢早衰模型研究 [J]. 成都医学院学报, 2016, 11(1): 10–15.
- WANG K, LIU S S, GUO Q Y, et al. Study on premature ovarian failure model induced by hydrocortisone in SD rats with kidney Yang deficiency pattern [J]. J Chengdu Med Coll, 2016, 11(1): 10–15.
- [47] 王秀秀, 李威, 吴效科. 肾上腺与多囊卵巢综合征 [J]. 世界中西医结合杂志, 2008, 3(11): 681–683.
- WANG X X, LI W, WU X K. Adrenal gland and polycystic ovary syndrome [J]. World J Integr Tradit West Med, 2008, 3(11): 681–683.
- [48] 廖梦琦, 石高峰, 卢燕, 等. 补肾方药干预皮质酮所致早发性卵巢功能不全大鼠比较研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(8): 63–67.
- MIAO M Q, SHI G F, LU Y, et al. Comparative study on effect of tonifying kidney prescriptions on corticosterone induced premature ovarian insufficiency rats [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2020, 27(8): 63–67.
- [49] 魏莹晖. 皮质酮对小鼠卵巢卵泡发育及卵巢颗粒细胞 LHR 表达的影响及机制 [D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- WEI Y H. Effect and mechanism of corticosterone on ovarian follicle development and LHR expression in ovarian granulosa cells in mice [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020.
- [50] 江银, 王徽, 于潇, 等. 枸杞多糖调控 AMPK/Sirt 自噬途径延缓 D-gal 诱导的卵巢早衰的机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(22): 6175–6182.
- JIANG Y, WANG H, YU X, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides regulate AMPK/Sirt autophagy pathway to delay D-gal-induced premature ovarian failure [J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(22): 6175–6182.
- [51] 王翠丽, 韩艳军, 刘小虎, 等. SIRT3/SOD2 通路在 D-半乳糖介导的卵巢早衰中的作用 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(98): 278–280.
- WANG C L, HAN Y J, LIU X H, et al. To explore the pathway of SIRT3/SOD2 on regulating the mice of premature ovarian failure by d-gal [J]. World Latest Med Inf, 2019, 19(98): 278–280.
- [52] 陈思. 补肾活血汤改善早发性卵巢功能不全的临床研究和调节模型小鼠 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路的机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- CHEN S. Clinical study of premature ovarian insufficiency improved by bu Shen Huo Xue Tang and mechanism study of Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway regulated by bu Shen Huo Xue Tang in model mice [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2021.
- [53] 王佩娟, 陈思, 卢燕. 基于免疫性卵巢早衰小鼠模型的建立研究卵巢早衰的免疫机制 [J]. 中国临床研究, 2017, 30(3): 298–301.
- WANG P J, CHEN S, LU Y. Study on immune regulatory mechanism of premature ovarian failure in mouse model [J]. Chin J Clin Res, 2017, 30(3): 298–301.
- [54] 周玉霞, 赵茵茵, 帅领, 等. Fkbp38 基因缺失导致小鼠早发性卵巢功能不全: 基于激活 mTOR 通路并诱导细胞凋亡 [J]. 南方医科大学学报, 2022, 42(11): 1611–1617.
- ZHOU Y X, ZHAO H H, SHUAI L, et al. Fkbp38 deletion induces premature ovarian insufficiency in mice by activating mTOR signaling and inducing granulosa cell apoptosis [J]. J South Med Univ, 2022, 42(11): 1611–1617.
- [55] 加秀凤, 陈瑞, 罗丹, 等. 调经养巢方对卵巢早衰模型大鼠卵巢超微结构及细胞凋亡的影响 [J]. 湖北中医药大学学报, 2022, 24(2): 5–9.
- JIA X F, CHEN R, LUO D, et al. Research on effect of Tiaojing Yangchao Paste and Decoction on ovarian ultrastructure and cell apoptosis in premature ovarian failure rats [J]. J Hubei Univ Chin Med, 2022, 24(2): 5–9.
- [56] ZHOU Q, JIN X, WANG J, et al. 4-vinylcyclohexene diepoxide induces premature ovarian insufficiency in rats by triggering the autophagy of granule cells through regulating miR-144 [J]. J Reprod Immunol, 2023, 157: 103928.
- [57] 陈莉, 马晓娟, 史大卓. 激素替代疗法: 获益还是风险 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20(11): 2012–2016.
- CHEN L, MA X J, SHI D Z. Hormone replacement therapy: benefit or risk [J]. Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis, 2022, 20(11): 2012–2016.
- [58] 尹仕红, 邹秀兰. 植物雌激素的作用及安全性 [J]. 国际内分泌代谢杂志, 2006, 26(6): 427–430.
- YIN S H, ZOU X L. Effect and safety of phytoestrogen [J]. Int J Endocrinol Metab, 2006, 26(6): 427–430.

孙可心,肖雨倩,万俊,等. 程序性细胞死亡在脑卒中后认知障碍中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 161-171.

Sun KX, Xiao YQ, Wan J, et al. Advances in programmed cell death in post-stroke cognitive impairment [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 161-171.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.020

程序性细胞死亡在脑卒中后认知障碍中的研究进展

孙可心¹,肖雨倩¹,万俊¹,陈淑颖¹,陈丽敏¹,王岩²,白艳杰^{2*}

(1.河南中医药大学,郑州 450000;2.河南中医药大学第一附属医院,郑州 450000)

【摘要】 脑卒中后认知障碍(post-stroke cognitive impairment,PSCI)是脑卒中后常见并发症之一,对卒中患者的生活质量影响较大,但发病机制尚未能完全解释清楚。越来越多的证据表明,程序性细胞死亡(programmed cell death,PCD)机制与PSCI有关,包括细胞凋亡、坏死性凋亡、细胞焦亡、泛凋亡、PARP-1 依赖性细胞死亡和铁死亡等。因此,清楚了解各种PCD机制及其与PSCI的关系,阐明PCD在疾病发病机制中的作用至关重要。文章综述了与PSCI相关的6种PCD途径,总结其在PSCI中的作用机制,并阐述了不同途径之间可能存在的串扰,以期临床靶向PCD途径的调节因子来治疗PSCI提供资料依据。

【关键词】 脑卒中后认知障碍;程序性细胞死亡;caspase-8;串扰

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0161-11

Advances in programmed cell death in post-stroke cognitive impairment

SUN Kexin¹, XIAO Yuqian¹, WAN Jun¹, CHEN Shuying¹, CHEN Limin¹, WANG Yan², BAI Yanjie^{2*}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China.

2. the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Post-stroke cognitive impairment (PSCI) is a common complication after stroke, which significantly affects quality of life. However, the pathogenesis has not been fully explained. Increasing evidence has shown that the mechanism of programmed cell death (PCD) is related to PSCI, including apoptosis, necroptosis, pyroptosis, PANoptosis, parthanatos, and ferroptosis. Therefore, it is crucial to clearly understand the various mechanisms of PCD and their relationship with PSCI, and to elucidate the role of PCD in PSCI pathogenesis. The article reviews six PCD pathways related to PSCI, summarizes their mechanisms of action in PSCI, and elucidates the possible crosstalk among pathways to provide a basis for clinical targeting of regulatory factors in the PCD pathway for PSCI treatment.

【Keywords】 post-stroke cognitive impairment; programmed cell death; caspase-8; crosstalk

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

脑卒中后认知障碍(post-stroke cognitive impairment,PSCI)是指在卒中事件后出现并持续到6个月时仍存在的以认知损害为特征的临床综合

征,研究发现,超过1/3的脑卒中患者可能出现认知障碍,会严重影响卒中患者的康复进程和生活质量^[1]。脑卒中通过缺血缺氧引起海马组织结构损

【基金项目】 河南省中医药科学研究专项重点课题(20-21ZY1009);河南省中医药传承与创新人才工程(仲景工程)中医药学科拔尖人才(CZ0237-08);河南省科技攻关计划(222102310529);河南省卫健委国家中医临床研究基地科研专项(2022JDZX005);河南省中医药拔尖人才培养项目专项课题(2022ZYBJ07)。

【作者简介】 孙可心(2000—),女,硕士研究生,研究方向:脑卒中后认知障碍。E-mail:565049543@qq.com

【通信作者】 白艳杰(1977—),女,副主任医师,副教授,硕士生导师,研究方向:脑卒中后认知障碍。E-mail:baiyj66@126.com

伤、神经元细胞死亡以及脑功能异常,最终导致不同程度的认知障碍^[2]。由于目前脑卒中的治疗时间窗口窄,无法及时有效地预防严重后遗症,因此,亟需一种治疗策略在脑卒中早期预防并改善患者认知功能。

程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)是一种由各种基因调节的细胞主动死亡模式,在生物体的发育中起着重要作用,不受控制的 PCD 可导致神经系统疾病,如帕金森、阿尔兹海默和脑卒中等^[3]。近几年研究发现,异常进展的程序性细胞死亡是诱发 PSCI 的危险因素之一,包括细胞凋亡、坏死性凋亡、细胞焦亡、泛凋亡、PARP-1 依赖性细胞死亡和铁死亡等,并且研究证明抑制细胞异常死亡可以通过减少炎症反应、氧化应激等病理反应,改善大脑海马及突触等组织结构及功能,来恢复部分认知功能^[4-5]。因此,文章就 PCD 的发生机制及其在 PSCI 中的作用展开综述,并发现各种 PCD 之间的串扰联系,以进一步挖掘治疗 PSCI 的潜在靶点。

1 PSCI 中的不同细胞死亡模式

1.1 细胞凋亡

细胞凋亡是多细胞生物中最常见的细胞死亡形式,是一种依赖半胱天冬酶切割和激活的程序性细胞死亡,凋亡细胞的形态特征主要表现为细胞皱缩、细胞质浓缩、核碎裂、DNA 片段化以及凋亡小体形成。这些变化不会引起炎症反应,甚至可能由炎症引发^[6]。目前,引起细胞凋亡的信号转导途径主要有内源性途径和外源性途径。

内源性途径,又称线粒体途径,可由多种内在刺激触发,当氧化应激、DNA 损伤、钙超载和内质网应激等细胞内事件打破 B 细胞淋巴瘤-2(B cell-lymphoma, Bcl-2)蛋白家族中抗凋亡蛋白与促凋亡蛋白间的平衡^[7],将引起促凋亡蛋白 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)和 Bcl-2 拮抗剂/杀手(Bcl-2 antagonist/killer, Bak)同源寡聚化并插入线粒体外膜,导致线粒体外膜通透化(mitochondrial outer membrane permeabilisation, MOMP),将线粒体成分释放到细胞质中^[8]。其中释放的促凋亡因子细胞色素 C(cytochrome C, Cyt C)与凋亡蛋白酶激活因子-1(recombinant apoptotic peptidase activating factor 1, APAF-1)相互作用,招募并激活半胱天冬酶 9(caspase-9)形成凋亡小体,随后激活下游效应物半胱天冬酶 3/7(caspase-3/7)以

介导内源性细胞凋亡途径^[9]。外源性途径,又称死亡受体途径,由细胞外微环境异常变化而触发。死亡受体在特异性识别他们各自的配体后,招募接头蛋白 Fas 相关死亡域蛋白(Fas-associated death domain, FADD)以及凋亡引发剂半胱天冬酶 8/10 的前体(pro-caspase-8/10)形成死亡诱导信号复合物(death inducing signaling complex, DISC),随后活化的 caspase-8/10 一方面直接裂解激活 caspase-3/7,从而启动外源性细胞凋亡途径,另一方面则可以在 N 末端切割促凋亡蛋白 BID 形成截短形式的 BID(tBID),然后 tBID 移位至线粒体外膜形成 MOMP,进一步促进线粒体途径的细胞凋亡^[10-11]。

此外,越来越多的证据表明,内质网应激也是诱导细胞凋亡的重要途径。缺氧、氧化应激和钙超载等条件会诱发内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS),导致内质网中未折叠蛋白和错误折叠蛋白积累,从而激活未折叠蛋白反应以抵抗不利环境^[12]。若 ERS 持续存在,则通过肌醇依赖性激酶 1 α (inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α)、蛋白激酶 R 样内质网激酶(pancreatic endoplasmic reticulum kinase, PERK)、激活转录因子 6(activating transcription factor 6, ATF6)3 条途径激活下游信号转导进而诱导细胞凋亡^[12]。

研究表明,在缺血后卒中神经元中可以观察到细胞凋亡的一系列形态学特征,并且在 PSCI 小鼠的海马 CA1 区域能够观察到明显的神经元凋亡^[13]。在大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)小鼠模型中发现,大脑缺血半影区海马组织中 Bcl-2 蛋白表达水平降低, Bax 蛋白以及凋亡执行蛋白 caspase-3 表达水平升高,与体外实验结果一致^[14-15]。并且在海马体中检测到 Fas、FADD 和裂解的 caspase-8 表达上调,而抑制这种上调后能够减少线粒体介导的细胞凋亡,有效改善模型小鼠学习记忆能力并减少梗死面积^[15]。这些研究证明细胞凋亡的内源性和外源性两条途径均参与 PSCI 的发生发展。

急性脑缺血期间,大脑缺血核心造成不可逆的损伤和细胞死亡,而缺血半影区神经元的凋亡似乎是可恢复的^[16]。一项网络药理学研究证明,银杏叶提取物舒血宁注射液(ShuXueNing injection, SXNI)可以通过多个靶点和途径治疗脑卒中, SXNI 在脑卒中急性期主要通过抑制炎症和调节氧化应激水平来减少大脑海马神经元的凋亡从而改善脑缺血再

灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, CI/R), 在亚急性期可通过调节神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 介导的 BDNF/酪氨酸激酶受体 (tyrosine kinase receptor, Trk) 信号通路减少卒中后海马 CA3 区域的细胞凋亡, 进一步恢复脑卒中后的认知和运动功能障碍^[17-18]。激活磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 信号通路也能够减少神经元的凋亡, 增加海马神经元的树突棘, 从而提高 MCAO 小鼠的学习记忆能力^[19]。据报道, miRNA 在 CI/R 的发展中起着重要作用。miR-203a-3p 和 miR-153-3p 可以通过抑制体内和体外非受体酪氨酸激酶 (SRC) 介导的丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路, 缓解细胞凋亡, 改善 MCAO 大鼠认知缺陷^[20]。此外, 抑制 ERS 可以减少 MCAO 大鼠海马神经元的凋亡以减轻 CI/R 引起的认知和神经行为障碍^[21]。以上研究表明, 细胞凋亡与 PSCI 的发生发展关系密切, 抑制细胞凋亡能有效改善 PSCI, 通过对脑卒中后细胞凋亡机制的研究, 为靶向细胞凋亡治疗 PSCI 提供新思路。

1.2 坏死性凋亡

坏死性凋亡, 也称程序性坏死, 是一种半胱天冬酶非依赖性细胞死亡模式, 其形态学特征包括细胞器肿胀和细胞膜破裂, 后者依赖于坏死小体的形成, 由受体相互作用蛋白激酶-1 (receptor-interacting protein kinase 1, RIPK1)、受体相互作用蛋白激酶-3 (receptor interacting protein kinase 3, RIPK3) 和混合谱系激酶结构域样蛋白 (mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL) 构成^[22-23]。

坏死性凋亡信号传导由死亡受体触发, 例如肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 受体 1 (TNF-receptor, TNFR1)、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor, TRAILR)、Fas、干扰素受体 (interferon receptor, IFNR) 和 Toll 样受体 3/4 (Toll-like receptors 3/4, TLR3/4)^[24]。以研究最为广泛的 TNFR1 为例, 细胞在受到坏死信号刺激后, TNF 与其受体 TNFR1 结合并与 RIPK1 等蛋白一起组成膜复合体 I (complex I)。死亡受体的激活导致肿瘤抑制因子头帕肿瘤综合征蛋白对 RIPK1 进行去泛素化, 活化的 RIPK1 与 FADD、caspase-8 和肿瘤坏死因子受体相关死亡结构域蛋白 (TNF receptor-associated death

domain, TRADD) 组成膜复合体 II a (complex II a)^[25]。研究证明, 微生物或药理学试剂对 caspase-8 的抑制能够触发坏死性凋亡。在 caspase-8 没有活性的情况下, RIPK1 募集并引起 RIPK3 的寡聚化和磷酸化, 形成一种磷酸化的 RIPK3 招募并磷酸化 MLKL, 从而形成 RIPK1/RIPK3/MLKL 信号传导复合物, 即膜复合体 II b (complex II b), 又称坏死小体, 随后易位至细胞质膜, 破坏膜完整性以致细胞膜破碎, 释放细胞内容物引起炎症反应^[26]。

坏死性凋亡已被公认为脑缺血和 CI/R 损伤后各种形式的细胞死亡之一, 在永久性 MCAO 模型以及体外糖氧剥夺 (oxygen and glucose deprivation, OGD) 条件中均发现 RIPK1 和 RIPK3 的增加以及 RIPK1/RIPK3 复合物的形成^[27]; 先前对实验性脑出血的研究认为 RIPK1 与神经元死亡和认知结果有关, 但坏死性凋亡的潜在作用仍未得到探索, 最近的研究表明, 在脑出血小鼠模型中检测到了 RIPK1 以及 MLKL 的活化, 并伴有脑水肿和血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 通透性增加, 这些结果的发生可能与神经元中 MLKL 依赖性坏死性凋亡的激活有关^[28]。

坏死抑素-1 (Nec-1) 是 RIPK1 的小分子抑制剂, Nec-1 能够逆转上述坏死性凋亡相关蛋白表达增加和核易位, 从而缓解脑水肿、改善海马突触结构^[29]。在此基础上, Nec-1 预处理可以通过抑制坏死性凋亡改善 MCAO 小鼠的学习记忆障碍、认知障碍和焦虑样行为, 并减轻海马 CA1 区神经元和白质损伤^[30]。另外, 有报道表明, 坏死性凋亡基因的基因修饰, 例如 siRNA RIPK3 和 MLKL 转染、shRNA RIPK1 转染, 可以减少 CI/R 后的脑梗死体积和神经功能缺损, 并且减轻由坏死性凋亡引起的炎症反应^[31-32]。由此可见, 坏死性凋亡的发生是引起 PSCI 的原因之一, 抑制坏死性凋亡可以有效预防/改善缺血性脑损伤动物模型的认知障碍并减少炎症反应, 为缺血性卒中的认知康复提供了潜在的治疗选择。

1.3 细胞焦亡

细胞焦亡是一种由消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 介导的促炎性 PCD 形式, 在焦亡过程中, 细胞发生肿胀、染色质浓缩、核固缩、DNA 损伤并伴有跨膜孔洞形成, 细胞内容物从跨膜孔洞释放到细胞外引起炎症反应^[33]。焦亡主要由两种途径引起, 有半胱天冬酶 1 (caspase-1) 参与的经典炎症小体途

径以及有人半胱天冬酶 4/5 (caspase-4/5) 和鼠半胱天冬酶 11 (caspase-11) 参与的非经典炎症小体途径^[34]。

经典焦亡途径以炎症小体的组装激活为起始事件,当模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 感受到细胞内外刺激后,PRRs 通过同型相互作用募集含有半胱天冬酶活化和募集结构域 (caspase recruitment domain, CARD) 的凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC),组成一种多蛋白复合物,即炎症小体,随后作为平台将 caspase-1 寡聚化以诱导其激活^[35]。活化的 caspase-1 介导焦亡执行蛋白 GSDMD 的裂解和促炎细胞因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-18 (IL-18) 的成熟。截短的 GSDMD N-末端片段 (N-GSDMD) 质膜中成孔并释放细胞内容物从而导致细胞焦亡和炎症反应^[36]。与经典焦亡途径不同,非经典焦亡途径不需要炎症小体的激活,而是由来源于革兰氏阴性菌的细胞质脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 直接激活 caspase-4/5/11,活化的 caspase-4/5/11 切割 GSDMD 产生 N-GSDMD 以诱导细胞焦亡的发生^[37]。

除了 GSDMD, Gasdermins 家族其他成员也被报道了在细胞焦亡中的作用。研究发现, casapse-3 能切割 gasdermin E (GSDME), 从而在表达 GSDME 的细胞中将非炎性的细胞凋亡转化为焦亡; 同样的, 颗粒酶 B (granzyme B, Gzm B) 也可以通过与

caspase-3 相同的作用位点直接切割 GSDME 来激活靶细胞中 caspase 非依赖性焦亡^[38]。另外, 有研究证明, 颗粒酶 A (granzyme A, Gzm A) 可以切割 gasdermin B (GSDMB), 活化的 caspase-8 能够切割 GSDMD, 而后两者形成的 N 端结构域均能易位至细胞膜成孔, 进一步诱发焦亡发生^[39-40]。目前被证明的细胞焦亡途径如表 1 所示。

当缺血性脑卒中发生时, 缺血核心区的坏死细胞分泌损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs) 可以被 PRRs 识别从而诱导大脑神经元细胞焦亡, 引起炎症级联反应, 加重缺血性损伤和脑卒中后继发性病变^[41]。在 CI/R 诱导的 PSCI 小鼠模型中发现, 黑色素瘤缺乏因子 2 (AIM2) 基因敲除能够抑制细胞焦亡以及炎症反应的发生, 减少海马神经元丢失, 显著改善了小鼠的认知功能^[42]。因此证明, AIM2 炎症小体介导细胞焦亡参与 PSCI 的发生。同时, PSCI 也与核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (NLRP3) 炎症小体介导的焦亡有关, 研究证明, CI/R 损伤后小鼠脑组织中 NLRP3、ASC、裂解的 caspase-3 以及炎症因子 IL-1 β 、IL-18 的蛋白表达增强, 使用 NLRP3 的药理学抑制剂 CY-09 抑制其激活可以下调焦亡相关蛋白的表达, 减少梗死面积, 缓解脑卒中后小鼠神经元焦亡并部分恢复小鼠的学习记忆能力^[43]。最近的研究关注了光生物调制 (PBM) 在改善脑卒中中组织功能和促进再生方面的潜力, PBM 可以通过减弱

表 1 细胞焦亡途径
Table 1 Pathway of pyroptosis

途径 Pathway	诱发因素 Inducing factors	调控因子 Regulation factor	炎症小体 Inflammasomes
经典焦亡途径 ^[36] Canonical inflammasome pathway	病原相关分子模式, 损失相关分子模式, DNA, RNA, 毒素等 PAMPs, DAMPs, DNA, RNA, toxins, etc.	半胱天冬酶 1, 消皮素 D Caspase-1, GSDMD	NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 1, NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3、黑色素瘤缺乏因子 2 等 NLRP1, NLRP3, AIM2, etc.
非经典焦亡途径 ^[37] Non-canonical inflammasome pathway	脂多糖 Lipopolysaccharide	半胱天冬酶 4/5/11, 消皮素 D Caspase-4/5/11, GSDMD	/
凋亡相关半胱天冬酶途径 ^[38] Apoptosis-associated aspase pathway	化疗药物, 肿瘤坏死因子 Chemotherapy drugs, TNF	半胱天冬酶 3, 消皮素 E Caspase-3, GSDME	/
凋亡相关半胱天冬酶途径 ^[39-40] Apoptosis-associated caspase pathway	转化生长因子激酶 1, 受体相互作用蛋白激酶 1 TAK1, RIPK1	半胱天冬酶 8, 消皮素 D Caspase-8, GSDMD	/
颗粒酶 A 途径 ^[39-40] Grazyme A pathway	干扰素- γ $\uparrow$ IFN- γ $\uparrow$	颗粒酶 A, 消皮素 B Gzm A, GSDMB	/
颗粒酶 B 途径 ^[38] Grazyme B pathway	杀伤性淋巴细胞 Killer lymphocytes	颗粒酶 B, 半胱天冬酶 3, 消皮素 E Gzm B, caspase-3, GSDME	/

AIM2 炎症小体介导的焦亡,抑制海马体和皮层小胶质细胞极化来提高缺血性脑卒中后的空间学习和记忆能力^[44]。以上证据表明,细胞焦亡加重卒中后的脑损伤并参与 PSCI 病理生理过程,抑制细胞焦亡途径中关键蛋白分子的表达可以减轻炎症反应改善 PSCI,可能成为未来预防 PSCI 以及脑卒中后神经元焦亡的潜在靶标。

1.4 泛凋亡

在所有提出的 PCD 形式中,细胞凋亡、坏死性凋亡和细胞焦亡的分子机制更加明确,研究发现,这些死亡程序之间存在复杂的分子网络,越来越多的证据表明这 3 种途径之间存在着显著的串扰,例如抑制 caspase-8 能够将外源性细胞凋亡转变为坏死性凋亡,激活 caspase-8 能切割 GSDMD 诱发细胞焦亡^[45]。基于这些发现建立了“泛凋亡(PANoptosis)”的概念。PANoptosis 是一种形式独特的先天免疫炎性 PCD 途径,由 PANoptosome 复合物调节,具有焦亡、细胞凋亡和/或坏死性凋亡的关键特征,但这些特征不能单独由这 3 种 PCD 途径中的任何一种途径解释^[46]。PANoptosome 是一种多蛋白复合物,可作为来自焦亡、细胞凋亡和坏死性凋亡的关键分子参与的平台,其组装需要特定的触发因素来启动 PANoptosome 的形成,触发器激活特定传感器启动 PANoptosome 的组装,进一步调节焦亡、细胞凋亡和坏死性凋亡的下游蛋白 GSDM、caspase-3/7 以及 MLKL 来执行 PANoptosis,导致裂解性细胞死亡^[46]。PANoptosome 通常由传感器(如细胞质传感器 Z-DNA 结合蛋白(ZBP1)、NLRP3、AIM2 等)、适配器(如 ASC、FADD 等)和效应物(如 RIPK1、RIPK3、caspase-8、caspase-1 等)组成。此外,值得注意的是,不同的感染或刺激可能会形成不同成分的 PANoptosome^[47]。研究证明,ZBP1 的激活可以诱导 ZBP1-PANoptosome 的形成,从而启动 PANoptosis,而 ZBP1 的缺失可以完全抑制甲型流感病毒(IVA)感染诱导的 PANoptosis^[48]。最近的研究还表明,耶尔森菌感染期间会刺激形成以 RIPK1 为中心的 PANoptosome,新型镰刀菌和 HSVI 感染将引起 AIM2-PANoptosome 的形成^[49-50]。

最近,Yan 等^[51]通过从文献中挖掘的数据证明,在 CI/R 研究中,相同的模型条件下上述 3 种细胞死亡形式可以同时发生,MCAO 诱导的大鼠或小鼠 CI/R 损伤以及 OGD 诱导的神经细胞缺血缺氧损伤后,焦亡、细胞凋亡和坏死性凋亡并存,这符合

PANoptosis 定义中的关键特点。这表明在神经系统疾病中存在 PANoptosis 的可能性很大。然而,目前的研究主要集中在传染病上,尚未有相关研究报道 PSCI 体内或体外模型中的 PANoptosis,但在 PSCI 的病理生理机制中,炎症反应和免疫反应起到的重要作用与其在传染病中的作用类似,对于 PANoptosis 和 PANoptosome 的持续研究将为发现 PSCI 治疗靶点提供新的机会。

1.5 PARP-1 依赖性细胞死亡(Parthanatos)

多聚 ADP 核糖聚合酶 1 (poly (ADP-ribose) polymerase 1, PARP-1) 依赖性细胞死亡(Parthanatos)是一种新的 PCD 模式,可被氧化应激、缺血缺氧和炎症等诱导的 DNA 损伤激活。发生 Parthanatos 的细胞通常表现出坏死和凋亡样的形态改变,包括细胞膜完整性丧失、染色质浓缩和 DNA 片段化,但不同的是,Parthanatos 不会引起细胞和细胞器肿胀^[52]。

PARP-1 作为 DNA 损伤传感器,能够响应 DNA 损伤或氧化应激,起到 DNA 损伤修复的作用,然而,DNA 损伤严重时将引起 PARP-1 过度激活从而导致 Parthanatos。PARP-1 异常活化可以将神经元烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)作为底物合成大量多聚二磷酸腺苷核糖(poly adenosine-diphosphate-ribose, PAR),PAR 聚集引起线粒体通透性增加,导致凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)从线粒体释放,AIF 在细胞质中招募巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)并易位至细胞核中,进一步发生染色质浓缩并产生大量 15~50 kb 的 DNA 片段^[53]。同时,大量消耗 NAD 抑制线粒体 ATP 的合成,导致线粒体功能障碍并加重细胞损伤^[54]。此外,虽然 caspase 在 Parthanatos 晚期被激活,caspase 抑制剂不能抑制 Parthanatos 的发生,但 PARP-1 抑制剂或 PARP-1 基因敲除可以完全阻断 Parthanatos 发生^[55]。由此说明,Parthanatos 的发生依赖于 PARP-1 的激活,而不依赖于 caspase。

研究证明,Parthanatos 可以介导 CI/R 损伤中的细胞死亡。缺血性脑卒中发生后,释放大量兴奋性神经递质,谷氨酸过量释放激活 N 甲基-D 天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDAR),导致 Ca^{2+} 、一氧化碳(NO)和活性氧(ROS)产生,NO 与过氧化物迅速反应生成的过氧亚硝酸盐诱导染色体 DNA 损伤以触发 PARP-1 激活,进而启动

Parthanatos^[56]。先前的研究证明,PARP-1 的过度活化可能会改变谷氨酸受体-离子通道的通透性,从而导致海马 CA1 区神经元死亡^[57]。后进一步研究发现,CI/R 损伤导致模型大鼠大脑缺血皮质中 PARP-1 以及细胞核中 AIF 和 MIF 的蛋白表达水平升高,而黄芩素通过抑制 PARP-1/AIF 途径来抑制 PARP-1 的激活、AIF 和 MIF 的核易位,减少 Parthanatos 从而降低脑梗死体积,改善 MCAO 大鼠神经功能^[58]。据报道,PARP-1 抑制剂有效降低了 CI/R 诱导的损伤组织中促炎细胞因子水平,抑制 PARP-1 活性有利于通过靶向炎症反应来减少 CI/R 诱导的脑损伤,并改善 CI/R 损伤引起的认知障碍^[59]。Wan 等^[60]通过原核注射培养神经肽过表达的转基因小鼠,在 CI/R 损伤的转基因小鼠海马体中可发现,PARP-1 的激活减少,轴突和突触再生相关蛋白表达增加,海马细胞 Parthanatos 发生率降低,这表明抑制 Parthanatos 能够通过促神经组织再生,减轻空间学习和记忆缺陷。这些发现完善了 PSCI 的发生发展机制,可能为开发治疗 PSCI 的药物提供新的研究思路。

1.6 铁死亡

铁死亡是一种铁依赖性的程序性细胞死亡,以脂质过氧化为主要特征,当细胞内氧化与抗氧化调节系统失衡,脂质过氧化物大量积累,导致铁死亡发生,其形态特征表现为线粒体体积缩小、双层膜密度增加、线粒体嵴减少或消失、外膜破裂、细胞核大小正常和染色质不凝集^[61]。

铁死亡的发生机制涉及多种分子及代谢途径。血浆中 Fe^{3+} 与转铁蛋白 (transferrin, TF) 结合,通过转铁蛋白受体 1 转运到细胞中并被金属还原酶 STEAP3 还原为 Fe^{2+} ,之后在二价金属转运蛋白 1 (divalent metal transporter 1, DMT1) 的作用下,将 Fe^{2+} 储存在细胞内不稳定铁池 (labile iron pool, LIP) 中。 Fe^{2+} 通过发生芬顿反应产生具有氧化能力的自由基,当细胞内铁过量时,大量自由基在酯氧合酶和 Fe^{2+} 的催化下与细胞磷脂的多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 反应,产生大量的脂质过氧化物,进而导致细胞死亡^[62]。此外,嵌于细胞膜表面的 System Xc-是由 SLC7A11 和 SLC3A2 组成的二聚体,负责将细胞内的谷氨酸 (glutamate) 运输至细胞外,并将等量的胱氨酸 (cystine) 输送到细胞内,胱氨酸进入细胞内被氧化成半胱氨酸 (cysteine),随后经谷氨酸-半胱氨酸连接酶

(glutamate-cysteine ligase, GCL) 和谷胱甘肽合成酶 (glutathione synthetase, GSS) 的催化合成抗氧化剂谷胱甘肽 (glutathione, GSH)^[53,62]。谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 在去除细胞内多余的脂质过氧化物过程中发挥重要作用,GPX4 能够将脂质过氧化物还原为相应的脂醇,使其失去过氧化物活性,起到防御细胞铁死亡的作用^[63]。

此外,最近研究发现,存在其他独立于 GPX4 的铁死亡防御系统。铁死亡抑制蛋白 1 (ferroptosis suppressor protein 1, FSP1) 利用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 将氧化型辅酶 Q10 (泛醌) 还原为具有抗氧化能力的活跃型辅酶 Q10 (泛醇),起到抑制脂质过氧化的作用;GTP 环化水解酶 1 (GTP cyclic hydrolase 1, GCH1) 产生亲脂性抗氧化剂四氢生物蝶呤 (tetrahydrobiopterin, BH4),其功能与泛醇类似,防止脂质过氧化^[64]。

近年来,一系列研究证实了铁死亡与 PSCI 有关。脑缺血后,一方面过度沉积的铁通过功能受损的 BBB 进入脑实质,通过芬顿反应促进 ROS 产生;另一方面 System Xc-受抑制导致细胞内半胱氨酸产生减少,从而导致 GSH 耗竭和 GPX4 活性降低,引起脂质过氧化,最终引发铁相关的细胞死亡,铁死亡的发生加重了脑组织损伤进而影响认知功能^[65]。研究证明,铁死亡抑制剂铁抑素 1 (Fer-1) 的治疗可减少炎症因子的释放,减轻 MCAO 引起的神经功能缺损^[66]。System Xc-中,SLC7A11 是抑制铁死亡的重要靶标,上调 SLC4A11 可以上调 GPX4 的表达,降低 CI/R 沙鼠大脑中的脂质过氧化水平,从而抑制海马神经元的铁死亡改善学习记忆能力^[67]。最新的研究发现,脂肪来源间充质干细胞 (ADSC-Exo) 中含有丰富的 miR-760-3p,可以调节铁死亡相关基因谷胱甘肽特异性 γ -谷氨酰环转移酶 1 (glutathione-specific γ -glutamylcyclotransferase 1, CHAC1) 的表达。经鼻给予 ADSC-Exo 治疗可以使 miR-760-3p 靶向神经元中的 CHAC1,通过下调其表达来抑制神经元的铁死亡,进而改善小鼠缺血性脑卒中后神经行为缺陷^[68]。综上,抑制脑卒中后的铁死亡可以有效改善认知功能,证明铁死亡可以作为 PSCI 的治疗靶点,目前研究主要通过抑制铁死亡氨基酸代谢途径来改善神经功能,未来可进一步着眼于其他铁死亡途径,为 PSCI 的治疗开辟新前景。

2 PCD 之间的串扰

以上 PCD 途径在多个水平上相互连接,级联共存,它们之间的串扰是不可避免且必要的,虽然每个 PCD 途径已经被阐明具有独特的分子特征,但不同形式的 PCD 确实存在共同的途径和分子特征,并且在细胞内复杂串扰网络中广泛地相互作用,一种途径可以补偿另一种途径,或多种途径在同一细胞中起作用。例如,铁死亡标志性事件铁超载可以导致线粒体通透性过渡孔打开,从而加剧 RIPK1 磷酸化并导致坏死性凋亡^[69]。热休克蛋白 90 (small heat shock protein 90, HSP90) 含有 6 个半胱氨酸,在 OGD 损伤期间表达增加,研究证明, HSP90 通过促进 RIPK1 磷酸化和抑制 GPX4 活化来诱导坏死性凋亡和铁死亡^[69]。HSP90 作为坏死性凋亡和铁死亡之间的共同调节节点,是潜在的治疗靶点。此外, caspase-8 既是外源性凋亡信号平台 DISC 的组成部分,又是胞质 TNF 诱导的膜复合体 II a 的一部分,说明其在细胞死亡途径的调节中具有复杂的作用。若 caspase-8 被激活,它通过切割 RIPK1 负调控坏死性凋亡,激活下游 caspase-3/7 并促进 tBID 形成,进入细胞凋亡模式;若 caspase-8 被抑制,将形成坏死小体,最终导致坏死性凋亡。除此之外,活化的 caspase-8 也可以切割 GSDMD 引起细胞焦亡^[45,70]。因此, caspase-8 的激活是细胞死亡途径中

的一个关键事件。细胞焦亡与坏死性凋亡之间的联系还体现在炎症小体的激活上, Frank 等^[24] 的研究数据证实了 caspase-1/4/5/11 诱导的 GSDMD 跨膜孔洞或 MLKL 诱导的膜损伤都会导致 K⁺ 外排从而激活 NLRP3 炎症小体以驱动炎症反应。

由此可知,相关研究已经证明了 PCD 在脑稳态中的作用以及它们之间存在串扰,但串扰在 PSCI 中的机制尚不清楚,阐明这种串扰背后的分子机制不仅有助于全面了解细胞死亡机制,而且还有助于发现治疗 PSCI 新药物的治疗靶点。以 caspase-8 为中心的 PCD 串联机制如图 1 所示。

3 小结和展望

PCD 在 PSCI 的作用机制一直是该领域的研究热点,脑卒中后发生 PCD 不仅会破坏大脑正常组织结构及功能,也可能引起炎症反应等病理过程,从而加重卒中后组织损伤进而引起认知功能障碍。既往实验室研究发现,使用中药、西药、靶向抑制剂以及组织工程等技术抑制细胞死亡,可以通过抑制炎症反应、降低氧化应激水平、增加海马树突棘、减轻白质损伤等途径有效改善认知障碍,为 PCD 参与 PSCI 的发生发展提供了临床前研究证据(表 2)。综上可知,PCD 是脑卒中发生后引起的重要病理机制之一,及时调控 PCD 的发生对于 PSCI 的预防和治疗有着重要意义。文章基于细胞凋亡、坏死性凋

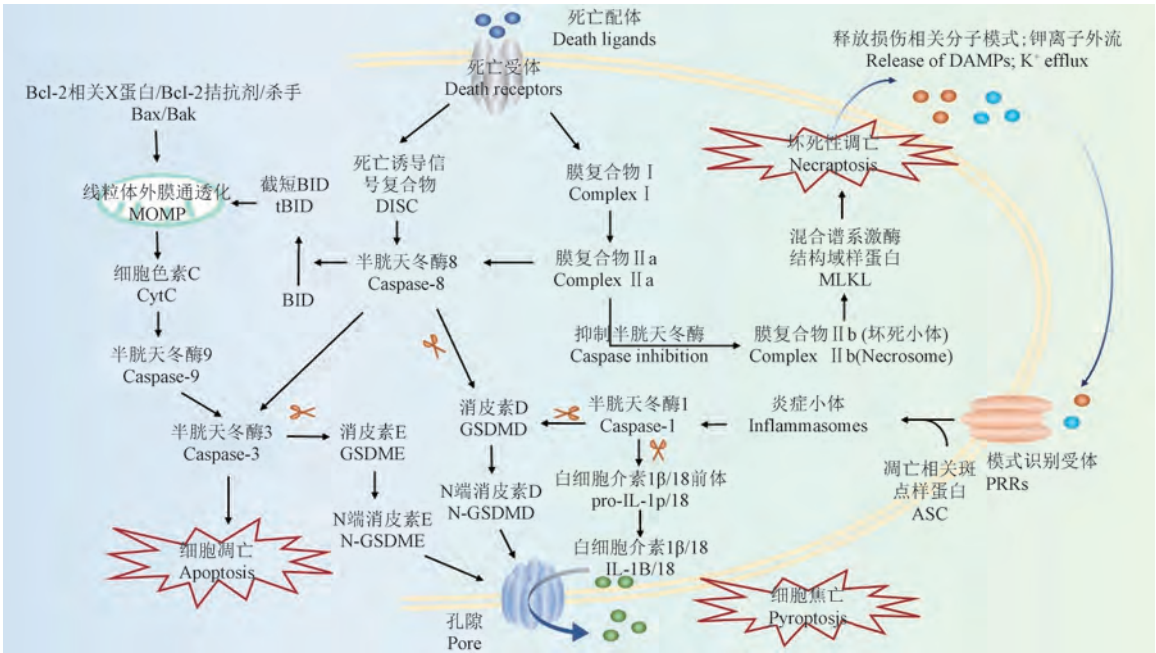


图 1 以 caspase-8 为中心的 PCD 串扰机制

Figure 1 PCD crosstalk mechanism centered on caspase-8

表 2 抑制 PCD 改善 PSCI 的作用机制
Table 2 Mechanism of regulating PCD to improve PSCI

抑制细胞死亡 Inhibits cell death	干预 Intervention	影响 Impact	结局 Outcome
	舒宁注射液 ^[17-18] SXNI	抑制炎症反应,降低氧化应激水平,减少大脑海马神经元凋亡 Inhibit the inflammatory reaction, reduce oxidative stress levels, reduce apoptosis of hippocampal neurons in the brain	改善缺血再灌注损伤 Improve ischemia-reperfusion injury
	Alisol A 24-乙酸酯 ^[19] Alisol A 24-acetate	激活 PI3K/AKT 信号通路,增加海马神经元树突棘,减少神经元凋亡 Activate the PI3K/AKT signaling pathway, increased dendritic spines of hippocampal neurons, reduces neuronal apoptosis	提高学习记忆能力 Improve learning and memory ability
细胞凋亡 Apoptosis	miR-203a-3p, miR-153-3p ^[20]	抑制 SRC/MAPK 信号通路,缓解细胞凋亡 Inhibit the SRC/MAPK signaling pathway, relieve apoptosis	改善认知缺陷 Improve cognitive deficits
	氟西汀 ^[21] Fluoxetine	GRP-78, caspase-12, CHOP 及 caspase-3 表达下调,抑制内质网应激,减少海马神经元凋亡 Expressions of GRP-78, caspase-12, CHOP and caspase-3 was down-regulated, inhibit endoplasmic reticulum stress, reduce hippocampal neuronal apoptosis	减轻认知和神经行为障碍 Relieve cognitive and neurobehavioral disorders
坏死性凋亡 Necroptosis	坏死抑素-1 ^[29-30] Nec-1	RIPK1、RIPK3 及 MLKL 表达上调,抑制核易位,缓解脑水肿改善海马突触结构,减轻海马 CA1 区神经元和白质损伤 Upregulation of RIPK1, RIPK3 and MLKL expressions, inhibition of nuclear translocation, relieve cerebral edema and improve hippocampal synaptic structure, reduce neuronal and white matter damage in the CA1 region of the hippocampus	改善认知功能和焦虑样行为 Improve cognitive function and anxiety-like behavior
	siRNA RIPK3 和 MLKL 转染, shRNA RIPK1 转染 ^[31-32] siRNA RIPK3 and MLKL transfection, shRNA RIPK1 transfection	减少脑梗死体积,减轻炎症反应 Reduce the volume of cerebral infarction, reduce inflammation	改善认知缺陷 Improve cognitive deficits
	AIM2 基因敲除 ^[42] AIM2 gene knockout	抑制细胞焦亡和炎症反应,减少海马神经元丢失 Inhibit pyroptosis and inflammatory responses, reduce hippocampal neuronal loss	改善认知功能 Improve cognitive function
细胞焦亡 Pyroptosis	CY-09 ^[43]	抑制 NLRP3 激活,ASC 及 caspase-3 表达下调;炎症因子 IL-1 β 、IL-18 表达下调,减少梗死体积,缓解神经元焦亡 Inhibit NLRP3 activation, downregulation of ASC and caspase-3 expression; Expressions of inflammatory factors IL-1 β and IL-18 is down-regulated, reduce infarct volume, relieve neuronal pyroptosis	恢复部分记忆能力 Restore partial memory ability
	光生物调制 ^[44] PBM	抑制 AIM2 介导的细胞焦亡,抑制小胶质细胞极化 Inhibit AIM2-mediated cell pyroptosis, inhibit microglial polarization	提高空间学习和记忆能力 Improve spatial learning and memory
	黄芩 ^[58] Baicalein	抑制 PARP-1 的激活,减少核易位,减少脑梗死体积 Inhibit the activation of PARP-1, reduce nuclear translocation, reduce cerebral infarction volume	改善神经功能 Improve neurological function
PARP-1 依赖性细胞死亡 Parthanatos	PJ34 ^[59]	降低促炎因子水平,缓解炎症反应 Reduce the level of pro-inflammatory factors, relieve inflammatory response	改善认知障碍 Improve cognitive impairment
	原核注射神经肽 ^[60] Prokaryotic injection of neuropeptides	PARP-1 激活减少,轴突和突触再生;海马细胞死亡发生率降低 Decrease PARP-1 activation, axon and synaptic regeneration; Incidence of hippocampal cell death was reduced	减轻空间学习和记忆缺陷 Alleviate spatial learning and memory deficits
	铁抑素-1 ^[66] Ferrostatin-1	减少炎症因子释放 Reduce the release of inflammatory factors	减轻神经功能缺损 Relieve neurological deficits
铁死亡 Ferroptosis	高良姜 ^[67] Galangin	SLC4A11 及 GPX4 表达上调,降低脂质过氧化水平,抑制海马神经元铁死亡 SLC4A11 and GPX4 expressions were up-regulated, reduce lipid peroxidation levels, inhibit hippocampal neuronal ferroptosis	改善学习记忆障能力 Improve learning and memory impairment
	miR-760-3p ^[68]	CHAC1 表达下调,抑制神经元铁死亡 CHAC1 expression was down-regulated, inhibit neuronal ferroptosis	改善神经行为缺陷 Improve neurobehavioral deficits

亡、细胞焦亡、泛凋亡、PARP-1 依赖性细胞死亡和铁死亡的发生机制,探讨并总结了抑制 PCD 改善 PSCI 的作用机制,另外,PCD 间存在的串扰联系为未来研究提供了新的思路,PCD 的精确调控可能未来在治疗 PSCI 中具有无限潜力。

但目前仍有需要继续研究并解决的部分:(1)随着对细胞死亡模式的不断探索,新的细胞死亡途径仍不断被发现,铜死亡、失巢凋亡、双硫死亡等新型细胞死亡形式在 PSCI 中的作用尚未见报道,亟需进一步研究。(2)值得注意的是,在一定条件下,多种类型的 PCD 途径可以同时发生,其之间的串扰需要进一步研究。目前许多实验室研究或干预措施仅针对单独的信号级联,忽略了不同细胞死亡途径之间的串扰,因此在治疗 PSCI 时同时靶向多个 PCD 途径可能是一种新策略。(3)有关调节细胞死亡改善 PSCI 的研究还停留在临床前阶段,尚未能很好地转化为临床,仍需要全面研究 PCD 途径的确切机制,不断揭示 PCD 在 PSCI 中发挥的具体作用以及它们之间的串扰。

参考文献:

- [1] O'SULLIVAN M J, LI X, GALLIGAN D, et al. Cognitive recovery after stroke: memory [J]. Stroke, 2023, 54(1): 44-54.
- [2] MORENO M, MINJAREZ C, VIGIL J, et al. Differences in hippocampal plasticity and memory outcomes in anterior versus posterior cerebellar stroke [J]. Neurobiol Dis, 2022, 168: 105701.
- [3] MOUJALLED D, STRASSER A, LIDDELL J R. Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases [J]. Cell Death Differ, 2021, 28(7): 2029-2044.
- [4] ZHANG Q, JIA M, WANG Y, et al. Cell death mechanisms in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Neurochem Res, 2022, 47(12): 3525-3542.
- [5] 邓寒冰,李春琴,张黎,等.基于 NLRP3/caspase-1 研究电针刺激对脑卒中大鼠小胶质细胞形态转换及神经元凋亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(2): 51-57.
- [6] JAIN M V, PACZULLA A M, KLONISCH T, et al. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development [J]. J Cell Mol Med, 2013, 17(1): 12-29.
- [7] NÖSSING C, RYAN K M. 50 years on and still very much alive: 'Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging

- implications in tissue kinetics' [J]. Br J Cancer, 2023, 128(3): 426-431.
- [8] BOCK F J, TAIT S W G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(2): 85-100.
- [9] LI K, VAN DELFT M F, DEWSON G. Too much death can kill you: inhibiting intrinsic apoptosis to treat disease [J]. EMBO J, 2021, 40(14): e107341.
- [10] MAHDIZADEH S J, THOMAS M, ERIKSSON L A. Reconstruction of the fas-based death-inducing signaling complex (DISC) using a protein-protein docking meta-approach [J]. J Chem Inf Model, 2021, 61(7): 3543-3558.
- [11] KETELUT-CARNEIRO N, FITZGERALD K A. Apoptosis, pyroptosis, and necroptosis-oh my! the many ways a cell can die [J]. J Mol Biol, 2022, 434(4): 167378.
- [12] ZHANG J, GUO J, YANG N, et al. Endoplasmic reticulum stress-mediated cell death in liver injury [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(12): 1051.
- [13] WANG H, ZHANG M, LI J, et al. Gut microbiota is causally associated with poststroke cognitive impairment through lipopolysaccharide and butyrate [J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 76.
- [14] LI Z, XIAO G, WANG H, et al. A preparation of *Ginkgo biloba* L. leaves extract inhibits the apoptosis of hippocampal neurons in post-stroke mice via regulating the expression of Bax/Bcl-2 and Caspase-3 [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 280: 114481.
- [15] LEE H Y, SONG S Y, HWANG J, et al. Very early environmental enrichment protects against apoptosis and improves functional recovery from hypoxic-ischemic brain injury [J]. Front Mol Neurosci, 2022, 15: 1019173.
- [16] RADAK D, KATSIKI N, RESANOVIC I, et al. Apoptosis and acute brain ischemia in ischemic stroke [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2017, 15(2): 115-122.
- [17] CUI Q, ZHANG Y L, MA Y H, et al. A network pharmacology approach to investigate the mechanism of Shuxuening injection in the treatment of ischemic stroke [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 257: 112891.
- [18] LI Z, WANG H, XIAO G, et al. Recovery of post-stroke cognitive and motor deficiencies by Shuxuening injection via regulating hippocampal BDNF-mediated Neurotrophin/Trk Signaling [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 141: 111828.
- [19] LU T, LI H, ZHOU Y, et al. Neuroprotective effects of alisol A 24-acetate on cerebral ischaemia-reperfusion injury are mediated by regulating the PI3K/AKT pathway [J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 37.
- [20] LI Y, PENG B, LI Y, et al. MiR-203a-3p/153-3p improves cognitive impairments induced by ischemia/reperfusion via blockade of SRC-mediated MAPK signaling pathway in ischemic stroke [J]. Chem Biol Interact, 2022, 358: 109900.
- [21] XU F, ZHANG G, YIN J, et al. Fluoxetine mitigating late-stage cognition and neurobehavior impairment induced by cerebral ischemia reperfusion injury through inhibiting ERS-mediated

- neurons apoptosis in the hippocampus [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 370: 111952.
- [22] DE ALMAGRO MC, VUCIC D. Necroptosis: pathway diversity and characteristics [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 39: 56–62.
- [23] LIAO S, APAIJAI N, CHATTIPAKORN N, et al. The possible roles of necroptosis during cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injury [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 695: 108629.
- [24] FRANK D, VINCE J E. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk [J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(1): 99–114.
- [25] NI H M, CHAO X, KASEFF J, et al. Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3 (RIPK3)-mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL)-mediated necroptosis contributes to ischemia-reperfusion injury of steatotic livers [J]. *Am J Pathol*, 2019, 189(7): 1363–1374.
- [26] BERTHELOOT D, LATZ E, FRANKLIN B S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(5): 1106–1121.
- [27] NI Y, GU W W, LIU Z H, et al. RIP1K contributes to neuronal and astrocytic cell death in ischemic stroke via activating autophagic-lysosomal pathway [J]. *Neuroscience*, 2018, 371: 60–74.
- [28] LULE S, WU L, SARRO-SCHWARTZ A, et al. Cell-specific activation of RIPK1 and MLKL after intracerebral hemorrhage in mice [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2021, 41(7): 1623–1633.
- [29] LI Y, ZOU C, CHEN C, et al. Myeloid-derived MIF drives RIPK1-mediated cerebrovascular endothelial cell death to exacerbate ischemic brain injury [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(5): e2219091120.
- [30] CHEN Y, ZHANG L, YU H, et al. Necrostatin-1 improves long-term functional recovery through protecting oligodendrocyte precursor cells after transient focal cerebral ischemia in mice [J]. *Neuroscience*, 2018, 371: 229–241.
- [31] NAITO MG, XU D, AMIN P, et al. Sequential activation of necroptosis and apoptosis cooperates to mediate vascular and neural pathology in stroke [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(9): 4959–4970.
- [32] ZHANG Y, LI M, LI X, et al. Catalytically inactive RIP1 and RIP3 deficiency protect against acute ischemic stroke by inhibiting necroptosis and neuroinflammation [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(7): 565.
- [33] YANG K, BAO T, ZENG J, et al. Research progress on pyroptosis-mediated immune-inflammatory response in ischemic stroke and the role of natural plant components as regulator of pyroptosis: a review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 157: 113999.
- [34] KIST M, VUCIC D. Cell death pathways: intricate connections and disease implications [J]. *EMBO J*, 2021, 40(5): e106700.
- [35] ZHENG Y, XU X, CHI F, et al. Pyroptosis: a newly discovered therapeutic target for ischemia-reperfusion injury [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(11): 1625.
- [36] YU P, ZHANG X, LIU N, et al. Pyroptosis: mechanisms and diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 128.
- [37] WRIGHT S S, VASUDEVAN S O, RATHINAM V A. Mechanisms and consequences of noncanonical inflammasome-mediated pyroptosis [J]. *J Mol Biol*, 2022, 434(4): 167245.
- [38] ZHANG Z, ZHANG Y, XIA S, et al. Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity [J]. *Nature*, 2020, 579(7799): 415–420.
- [39] ZHOU Z, HE H, WANG K, et al. Granzyme A from cytotoxic lymphocytes cleaves GSDMB to trigger pyroptosis in target cells [J]. *Science*, 2020, 368(6494): eaaz7548.
- [40] ZHENG Z, DENG W, BAI Y, et al. The lysosomal rag-regulator complex licenses RIPK1 and caspase-8-mediated pyroptosis by *Yersinia* [J]. *Science*, 2021, 372(6549): eabg0269.
- [41] Dong Z, Pan K, Pan J, et al. The possibility and molecular mechanisms of cell pyroptosis after cerebral ischemia [J]. *Neurosci Bull*, 2018, 34(6): 1131–1136.
- [42] KIM H, SEO J S, LEE S Y, et al. AIM2 inflammasome contributes to brain injury and chronic post-stroke cognitive impairment in mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2020, 87: 765–776.
- [43] SUN R, PENG M, XU P, et al. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) regulates NLRP3-mediated neuronal pyroptosis following cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 330.
- [44] KIM H, KIM M J, KWON Y W, et al. Benefits of a skull-interfaced flexible and implantable multilight emitting diode array for photobiomodulation in ischemic stroke [J]. *Adv Sci*, 2022, 9(11): e2104629.
- [45] KESAVARDHANA S, SUBBARAO MALIREDDI R K S, KANNEGANTI T D. Caspases in cell death, inflammation, and pyroptosis [J]. *Annu Rev Immunol*, 2020, 38: 567–595.
- [46] WANG Y, KANNEGANTI T D. From pyroptosis, apoptosis and necroptosis to PANoptosis: a mechanistic compendium of programmed cell death pathways [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021, 19: 4641–4657.
- [47] PANDIAN N, KANNEGANTI T D. PANoptosis: a unique innate immune inflammatory cell death modality [J]. *J Immunol*, 2022, 209(9): 1625–1633.
- [48] KARKI R, SUNDARAM B, SHARMA B R, et al. ADAR1 restricts ZBP1-mediated immune response and PANoptosis to promote tumorigenesis [J]. *Cell Rep*, 2021, 37(3): 109858.
- [49] SUBBARAO MALIREDDI R K S, KESAVARDHANA S, KARKI R, et al. RIPK1 distinctly regulates *Yersinia*-induced inflammatory cell death, PANoptosis [J]. *Immunohorizons*, 2020, 4(12): 789–796.
- [50] LEE S, KARKI R, WANG Y, et al. AIM2 forms a complex with pyrin and ZBP1 to drive PANoptosis and host defence [J]. *Nature*, 2021, 597(7876): 415–419.

- [51] YAN W T, YANG Y D, HU X M, et al. Do pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PANoptosis) exist in cerebral ischemia? Evidence from cell and rodent studies [J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(8): 1761–1768.
- [52] HUANG P, CHEN G, JIN W, et al. Molecular mechanisms of parthanatos and its role in diverse diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 7292.
- [53] PENG F, LIAO M, QIN R, et al. Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 286.
- [54] ANDRABI S A, UMANAH G K, CHANG C, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(28): 10209–10214.
- [55] WANG Y, LUO W, WANG Y. PARP-1 and its associated nucleases in DNA damage response [J]. *DNA Repair*, 2019, 81: 102651.
- [56] LIU S, LUO W, WANG Y. Emerging role of PARP-1 and PARthanatos in ischemic stroke [J]. *J Neurochem*, 2022, 160(1): 74–87.
- [57] GERACE E, MASI A, RESTA F, et al. PARP-1 activation causes neuronal death in the hippocampal CA1 region by increasing the expression of Ca(2+)-permeable AMPA receptors [J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 70: 43–52.
- [58] LI W H, YANG Y L, CHENG X, et al. Baicalein attenuates caspase-independent cells death via inhibiting PARP-1 activation and AIF nuclear translocation in cerebral ischemia/reperfusion rats [J]. *Apoptosis*, 2020, 25(5/6): 354–369.
- [59] JIAO Y, LI G. PARP inhibitor PJ34 ameliorates cognitive impairments induced by transient cerebral ischemia/reperfusion through its anti-inflammatory effects in a rat model [J]. *Neurosci Lett*, 2021, 764: 136202.
- [60] WAN K, MAO F, LI Q, et al. Neuritin-overexpressing transgenic mice demonstrate enhanced neuroregeneration capacity and improved spatial learning and memory recovery after ischemia-reperfusion injury [J]. *Aging*, 2020, 13(2): 2681–2699.
- [61] TONG L, YU H, HUANG X, et al. Current understanding of osteoarthritis pathogenesis and relevant new approaches [J]. *Bone Res*, 2022, 10(1): 60.
- [62] XU T, DING W, JI X, et al. Molecular mechanisms of ferroptosis and its role in cancer therapy [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(8): 4900–4912.
- [63] STOCKWELL B R. Ferroptosis turns 10: emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications [J]. *Cell*, 2022, 185(14): 2401–2421.
- [64] STOCKWELL B R, JIANG X, GU W. Emerging mechanisms and disease relevance of ferroptosis [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(6): 478–490.
- [65] DATTA A, SARMAH D, MOUNICA L, et al. Cell death pathways in ischemic stroke and targeted pharmacotherapy [J]. *Transl Stroke Res*, 2020, 11(6): 1185–1202.
- [66] XU Y, LIU Y, LI K, et al. COX-2/PGE2 pathway inhibits the ferroptosis induced by cerebral ischemia reperfusion [J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(3): 1619–1631.
- [67] GUAN X, LI Z, ZHU S, et al. Galangin attenuated cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibition of ferroptosis through activating the SLC7A11/GPX4 axis in gerbils [J]. *Life Sci*, 2021, 264: 118660.
- [68] WANG Y, NIU H, LI L, et al. Anti-CHAC1 exosomes for nose-to-brain delivery of miR-760-3p in cerebral ischemia/reperfusion injury mice inhibiting neuron ferroptosis [J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 109.
- [69] ZHOU Y, LIAO J, MEI Z, et al. Insight into crosstalk between ferroptosis and necroptosis: novel therapeutics in ischemic stroke [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 9991001.
- [70] BEDOUI S, HEROLD M J, STRASSER A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(11): 678–695.

[收稿日期] 2023-07-11

孙豪杰,朱俊雷,李伟,等. 细胞焦亡在肾缺血再灌注损伤中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 172-178.
Sun HJ, Zhu JL, Li W, et al. Progress of research into pyroptosis in renal ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 172-178.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.021

细胞焦亡在肾缺血再灌注损伤中的研究进展

孙豪杰^{1,2}, 朱俊雷^{1,2}, 李伟^{1,2}, 王锁刚^{1*}

(1.河南中医药大学第一附属医院泌尿外科一区,郑州 450003;2.河南中医药大学第一临床医学院,郑州 450003)

【摘要】 细胞焦亡是半胱氨酸蛋白酶介导的以线粒体参与、炎性小体组装、质膜穿孔、炎性释放为特征的细胞程序性死亡。作为介导机体炎症反应的重要机制,细胞焦亡在肾缺血再灌注损伤(renal ischemia-reperfusion injury, RIRI)中发挥了关键作用。本文就近年来细胞焦亡的分子机制、细胞焦亡在 RIRI 中的作用机制和治疗药物的研究进展进行综述,旨在为 RIRI 的早期治疗提供理论参考。

【关键词】 肾移植;缺血-再灌注损伤;细胞焦亡;抑制剂;干预手段

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0172-07

Progress of research into pyroptosis in renal ischemia-reperfusion injury

SUN Haojie^{1,2}, ZHU Junlei^{1,2}, LI Wei^{1,2}, WANG Suogang^{1*}

(1. the First Ward of Urology Department, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China. 2. the First Clinical Medical College of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003)

【Abstract】 Pyroptosis is a programmed cell death mediated by cysteine proteases and is characterized by mitochondrial participation, inflammasome assembly, plasma membrane perforation, and inflammatory release. As an important mechanism mediating the body's inflammatory responses, pyroptosis plays a key role in renal ischemia-reperfusion injury (RIRI). This article reviews the molecular mechanisms of pyroptosis, pyroptotic mechanisms in RIRI, and the progress of research into therapeutic drugs in recent years, with the aim of providing a theoretical reference for the development of early treatments for RIRI.

【Keywords】 kidney transplantation; ischemia-reperfusion injury; pyroptosis; inhibitors; intervention means

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

缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是指器官或组织血液供应受限一段时间后再恢复引起的病理过程,主要发生在大脑、心脏和肾等重要器官,常导致细胞死亡和器官功能障碍。肾是人体最重要的实体器官之一,血液灌注量较高,极易受 IRI 影响。肾缺血再灌注损伤(renal ischemia-

reperfusion injury, RIRI)是指肾组织短暂缺血后,恢复血供导致肾损伤加重的病理生理现象,临床常见于肾部分切除或肾移植等过程^[1]。RIRI 是肾小管和炎症细胞等多因素相互作用的炎症反应,涉及多种病理生理机制,是造成急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)和急性肾功能衰竭的主要原因之一。

【基金项目】 河南省中医药科学研究专项课题(20-21ZY2188)。

【作者简介】 孙豪杰(1999—),男,硕士研究生,研究方向:泌尿外科疾病基础与临床研究。E-mail: hjesun@163.com

【通信作者】 王锁刚(1981—),男,博士,副主任医师,副教授,硕士生导师,研究方向:泌尿外科疾病基础与临床研究。

E-mail: wangsuogang2005@126.com

细胞焦亡由 caspase 介导,是一种新的细胞死亡方式,其关键机制是裂解消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 蛋白,引起细胞肿胀、细胞膜成孔、破裂和物流出,伴随大量炎症因子释放,导致炎症反应发生,在 RIRI 的病理过程中发挥着关键作用^[2]。一般情况下,细胞焦亡是机体的重要免疫反应,有利于消灭机体内有害病原体,但过度激活会导致相关的器官结构和功能损伤。目前 RIRI 的治疗和管理还远远不能令人满意^[3],究其原因,RIRI 的病理生理机制尚不明确。本文深入分析了细胞焦亡在 RIRI 病理过程中的关键作用和相关的治疗药物,并结合最新研究进展,探讨未来 RIRI 中细胞焦亡的研究方向,为进一步改善 RIRI 患者预后提供理论参考。

1 细胞焦亡的机制

根据细胞焦亡的发生机制,主要分为经典焦亡途径、非经典焦亡途径和依赖 caspase-3/8 的新途径 (图 1)。

1.1 经典焦亡途径

由 caspase-1 介导,细胞通过病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 或危险相关分子模式 (danger-associated molecular

patterns, DAMPs) 刺激胞质模式识别受体蛋白 (nucleotide-binding oligomerization domain-leucine rich repeats containing pyrin domain 3, NLRP3), 使其结合接头蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC), 诱导 pro-caspase-1 自我剪接成活化的 caspase-1^[4], 进而裂解并激活 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 形成 IL-1 β 和 IL-18, 同时, 活化的 caspase-1 切割 GSDMD, 释放其 N 端结构域 (GSDMD-N), GSDMD-N 与细胞膜脂质结合, 形成直径约 10~15 nm 的膜通道, 释放 IL-1 β 和 IL-18, 致使细胞肿胀破裂和内容物外露, 引发细胞焦亡和炎症的级联反应^[5-6]。

1.2 非经典焦亡途径

在人体由 caspase-4/5 介导, 在大鼠中由 caspase-11 介导。细胞受到病原体刺激后, caspase-4/5/11 识别并结合脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 中的脂质 A, 进而裂解 GSDMD 蛋白释放 GSDMD-N, GSDMD-N 与细胞膜结合, 形成细胞膜孔, 最终导致细胞焦亡^[7]。此外, 活化的 caspase-11 可切断 pannexin-1 通道, 释放 ATP, 进而激活 pannexin-1/ATP/P2X7 通路, 引起 ATP 和 K⁺ 外流, 激活炎症小体, 进而激活经典焦亡途径。

1.3 依赖 caspase-3/8 的新途径

caspase-3 在肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis

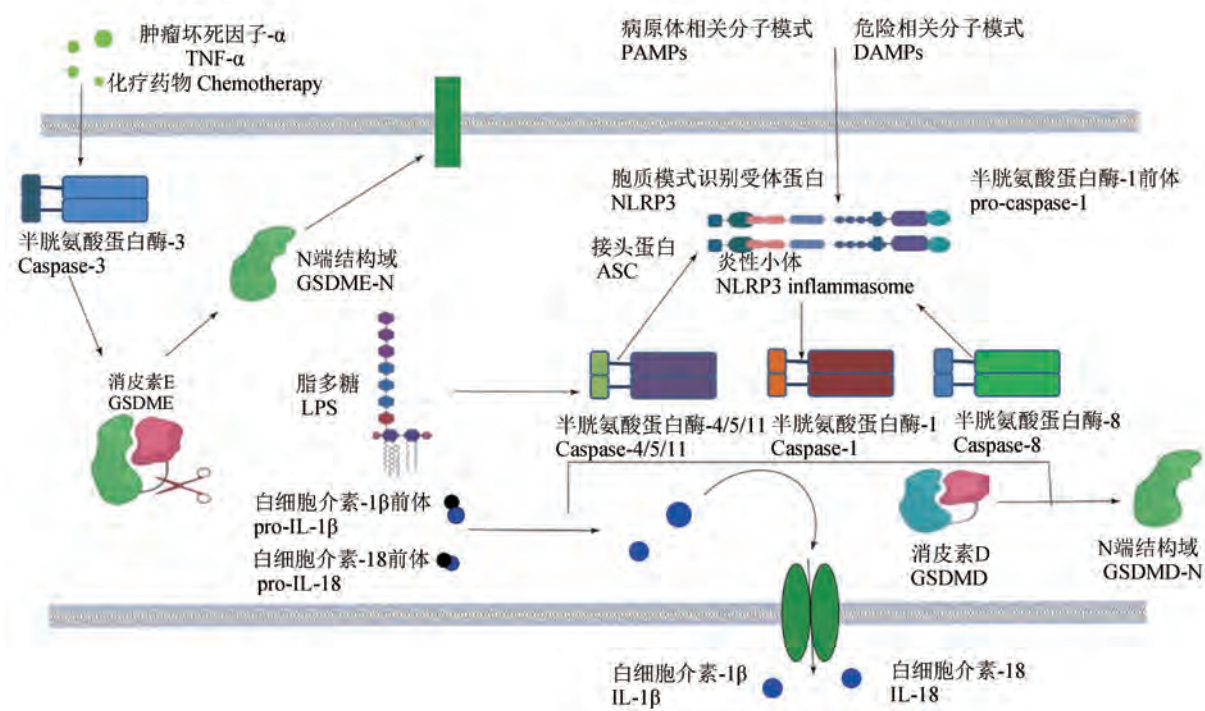


图 1 细胞焦亡的主要信号通路

Figure 1 Major signaling pathways of pyroptosis

factor- α , TNF- α) 或化疗药物刺激下,裂解 GSDME (gasdermin E),释放 GSDME-N。然后 GSDME-N 与细胞膜结合,形成膜通道,引发细胞焦亡^[8]。同年,研究发现当 caspase-1 活性被抑制时,caspase-8 可被炎症小体激活,裂解 GSDMD,启动焦亡途径^[9]。

1.4 其它激活途径

2020 年,Zhang 等^[10]发现细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 中的丝氨酸蛋白酶颗粒酶 B 可裂解 GSDME,诱导焦亡。同年,Zhou 等^[11]发现一种丝氨酸蛋白酶颗粒酶 A 可通过穿孔素进入靶细胞,切割 GSDMB 分子触发靶细胞焦亡,推翻了以前认为焦亡只能由 caspase 激活的认识。

2 细胞焦亡与肾缺血再灌注损伤的机制联系

2.1 细胞焦亡与肾缺血再灌注损伤

在 RIRI 模型中,细胞损伤和死亡伴随着细胞焦亡,机体产生 DAMP 时,炎症小体 NLRP3 被激活,触发了经典焦亡途径和非经典焦亡途径^[12],caspase-1 和 caspase-11 表达升高,进而裂解并激活 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 形成 IL-1 β 和 IL-18,同时,caspase-1 和 caspase-11 促使 GSDMD 剪切成 GSDMD-N,GSDMD-N 转移到细胞膜上,形成细胞膜孔,致使肾血管内皮细胞和肾小管上皮细胞肿胀破裂,炎症因子大量释放,诱导肾小管发生坏死,加重肾的结构和功能损伤^[13]。研究发现,RIRI 的小鼠 caspase-1 及 caspase-11 表达水平明显升高,而敲除 caspase-1 后,RIRI 小鼠肾的结构和功能都得到了改善^[14]。当前,细胞焦亡在 RIRI 中的作用和机制仍未完全阐明,并且除 caspase-1 及 caspase-11 外其它 caspase 蛋白在 RIRI 中的作用尚未明确,有待后续进一步实验验证。虽然上述所有研究都表明 GSDMD 是 RIRI 病理过程中的关键蛋白,但 Tonnus 等^[15]研究发现,GSDMD 缺陷小鼠对 RIRI 诱导的 AKI 高度敏感,并证明 GSDMD 也可作为 RIRI 中的抑制蛋白。尽管如此,这些结果仍揭示了焦亡在 RIRI 中的关键作用,并为 RIRI 的治疗提供了新的思路。

2.2 内质网应激与细胞焦亡

内质网在细胞焦亡的发生发展中起着至关重要的作用,静息的 NLRP3 位于内质网中,而炎症小体激活时,NLRP3 及 ASC 被重新分配到核周空间,与内质网和线粒体形成细胞器集群,随后线粒体功

能紊乱和内质网过度应激,导致蛋白质合成异常、脂质合成紊乱和内质网钙稳定紊乱,引发细胞焦亡。在缺氧复氧损伤 (hypoxia-reoxygenation injury, HRI) 诱导的细胞模型中,可观察到 caspase-11 表达水平在受到刺激 3 h 后明显升高,并伴有细胞膜孔洞增多和乳酸脱氢酶分泌增加,证明了细胞焦亡的发生。进一步的机制研究显示,适度内质网应激可作为一种自卫系统,保护细胞免受损伤,而 HRI 可使肾小管上皮细胞的内质网过度激活,进而介导细胞焦亡^[16]。

在 RIRI 大鼠早期,可发现内质网应激生物标志物葡萄糖调节蛋白和 C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 升高,CHOP 表达上调会增强 caspase-11 的转录^[17],触发非经典焦亡途径,caspase-11 促使 GSDMD 剪切成 GSDMD-N,GSDMD-N 转移到细胞膜上,形成细胞膜孔,致使肾小管上皮细胞肿胀破裂,炎症因子大量释放,肾小管发生坏死,肾的结构和功能损伤加重^[18],使用小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 沉默 CHOP 可显著降低 HRI 诱导细胞焦亡的发生,此外,柚皮素也可通过激活 Nrf4/HO-2 信号通路抑制内质网应激,进一步缓解焦亡和细胞凋亡,保护肾免受 IRI^[19]。这些都表明内质网应激在 RIRI 细胞焦亡机制中发挥着重要作用,RIRI 可诱发内质网应激,进而介导细胞焦亡。

2.3 线粒体与细胞焦亡

线粒体在焦亡中的作用主要是激活 NLRP3 炎症小体,在 ATP、菌素和真菌等 NLRP3 激活因子的作用下,线粒体沿微管向内质网迁移,内质网和线粒体可通过内质网上的动态调节蛋白 Mfn2 和线粒体上的 Mfn1 或 Mfn2 进行连接,当内质网和线粒体之间的距离小于 5 nm 时,可引起线粒体钙超载和不稳定,增加线粒体活性氧 (mitochondrial reactive oxygen species, mROS) 水平,进而启动和释放线粒体来源的配体,包括线粒体 DNA (mitochondrial deoxyribonucleic acid, mtDNA) 和心磷脂,最终激活 NLRP3 炎症小体并引发焦亡。RIRI 中 NADPH 氧化酶和线粒体呼吸链产生大量氧基依赖性活性氧 (reactive oxygen species, ROS),过量的 ROS 产生氧化应激,破坏细胞平衡,加剧炎症活性,促进包括 NLRP3 炎症小体在内的炎症信号因子形成,进而催化 pro-caspase-1 自我剪接成活化的 caspase-1,诱发经典焦亡途径^[20]。使用 miR-92a-3p 抑制 NRF1 可

减轻氧化应激并降低 NLRP3、caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 和 IL-18 的表达水平^[21]。此外, zeste 基因同源物 2 增强子在体内外小鼠 RIRI 模型中都能通过 ALK5/SMad2/3 信号通路阻断氧基依赖性活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生, 从而抑制肾小管上皮细胞经典焦亡途径, 减轻 RIRI^[22]。这些都说明线粒体在细胞焦亡中发挥重要作用, 是疾病治疗的潜在靶点。

2.4 NF- κ B 信号通路和细胞焦亡

NF- κ B 是广泛存在于细胞中的转录调节因子, 参与细胞对外部刺激的反应, 在细胞炎症和免疫反应中起着至关重要的作用。RIRI 可诱导 Tisp40 过表达, 进而导致 NF- κ B p65 (P-p65) 磷酸化。随后, P-p65 触发 NLRP3 炎症小体聚集, 激活的 NLRP3 结合 caspase-1 前体和 ASC。前体 caspase-1 转化为具有催化活性的 caspase-1, 促进 IL-1 β 和 IL-18 成熟, 引发强烈的炎症反应和细胞焦亡^[23]。由此可见, NF- κ B 信号通路在 RIRI 焦亡过程中发挥着关键作用。

3 基于细胞焦亡机制治疗 RIRI 的药物

近年来, 随着 RIRI 中细胞焦亡相关信号通路和相关分子之间的复杂联系逐渐明确, 针对这些通路和分子的靶向抑制剂也逐渐被发现, 但大多数仍处于动物实验阶段。今后, 这些抑制剂能否作为治疗 RIRI 的药物, 用量是多少, 联合使用是否比单独使用更有效, 还需经过多中心和大样本的临床研究。

3.1 caspase 蛋白抑制剂

caspase 蛋白家族在细胞焦亡机制中发挥着至关重要的作用, 其中 caspase-1 是细胞焦亡经典途径中的关键分子, 同时, 也是治疗 RIRI 的潜在靶标, Wen 等^[24]发现 caspase-1 选择性抑制剂 VX-765 可降低血清中血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、血肌酐 (serum creatinine, Scr)、IL-1 β 和 IL-18 浓度, 减少肾组织细胞焦亡, 改善肾功能。除直接作用于 caspase-1 外, 冯瑞康等^[25]发现 C 型凝集素 1 (dectin-1) 的拮抗剂 laminarin 可通过减少 dectin-1 间接降低 IL-1 β 、caspase-1 水平, 抑制细胞焦亡, 减轻小鼠 RIRI。

NLRP3/caspase-1 轴是细胞焦亡经典途径中的关键环节, 硫化氢 (hydrogen sulfide, HS) 可抑制 NLRP3/caspase-1 轴来减弱细胞焦亡, 缓解 IRI 诱导

的 AKI^[26]。除经典途径外, 非经典途径中的 caspase-11 蛋白也是重要的潜在靶点, 研究发现, 双硫仑是 caspase-11 的高效靶向抑制剂, 可通过抑制 caspase-11/GSDMD 途径拮抗肾细胞焦亡, 改善 RIRI^[27]。随着国内外学者的不断研究, caspase 蛋白的靶向抑制剂不断涌现, 但目前仍缺乏高效且副作用小的靶向抑制剂, 并且, 除 caspase-1/11 外的其它成员在 RIRI 中的作用尚不明确, 极大限制了相关靶向药物研究的开展, 今后应进一步研究以明确其发生机制, 并积极进行相关药物的研发。

3.2 GSDMD 抑制剂

GSDMD 是细胞焦亡机制中的关键分子, 在 RIRI 中发挥重要作用, 因此, 研发 GSDMD 的靶向抑制剂对治疗 RIRI 至关重要。富马酸二甲酯 (dimethyl fumarate, DMF) 具有轻微的毒性, 在日常生活中通常用作防腐剂和防霉剂^[28]。Humphries 等^[29]发现 DMF 和 GSDMD 在半胱氨酸残基处反应生成 S-(2-琥珀酰)-半胱氨酸。GSDMD 的琥珀化阻止了其 caspase 的相互作用, 限制了 GSDMD 加工、寡聚和诱导细胞焦亡的能力。除此之外, Hu 等^[30]发现双硫仑可共价修饰人 GSDMD 中的 Cys191 (小鼠中为 Cys192), 减少细胞膜孔洞的形成, 有效抑制焦亡的发生。这表明双硫仑可作为焦亡抑制剂, 为许多由过度炎症引发或加重的人类疾病提供新的治疗途径。近年来, GSDMD 的靶向抑制剂不断涌现, 在治疗 RIRI 方面发挥了积极作用, 但其具体机制和临床疗效仍需进一步研究。

3.3 NLRP3 抑制剂

NLRP3 是细胞焦亡途径中的核心分子, 因此, 拮抗 NLRP3 可抑制焦亡途径^[31]。CY-09 是 NLRP3 的特异性抑制剂, 可直接结合 NLRP3, 阻碍 NLRP3 的炎症小体组装和激活^[32], Pan 等^[33]证明 CY-09 可在小鼠模型中减弱 RIRI, 同时降低炎症因子 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 表达, 有效抑制 RIRI 过程中的细胞焦亡, 未来应进一步深入 CY-09 的研究, 充分发挥其对 RIRI 的抑制作用, 拓展其药用潜力。与此同时, Noh 等^[34]也发现环氧二十碳三烯酸 (epoxyeicosatrienoic acids, EET) 可抑制 NLRP3 对 RIRI 中肾结构和功能起保护作用。除此之外, Pang 等^[35]发现 RIRI 大鼠应用多酚酸盐 B 后, 细胞焦亡相关因子的表达水平均降低, 进一步研究发现, 多酚酸盐 B 可促进 Nrf2 的表达, 抑制氧化应激、

NLRP3 活化、促炎因子释放和细胞焦亡。目前, NLRP3 靶向抑制剤的研究不断深入, 越来越多的抑制剤被发现, 为 RIRI 的治疗提供了多样的药物选择。

3.4 NF- κ B 信号通路抑制劑

NF- κ B 信号通路可诱导细胞焦亡的发生, 是促进细胞焦亡的关键分子。Wu 等^[36]发现胆钙化醇预处理可通过抑制 NF- κ B 激活和减少 ROS 产生来抑制焦亡过程, 缓解 RIRI。除此之外, Zhu 等^[37]发现小白菊内酯(parthenolide, PTL)可抑制包括 TNF- α 、IL-1 β 以及 LPS 诱导的 NF- κ B 和 NF- κ B 介导的特定基因表达的激活, 阻断 NF- κ B 信号通路, 是 NF- κ B 信号通路的高效抑制劑。综上所述, NF- κ B 信号通路的抑制劑可有效抑制焦亡通路的激活和发展, 抑制 NF- κ B 信号传导通路的靶向药物将会是未来 RIRI 治疗的重要研究方向。

3.5 骨髓间充质干细胞治疗 RIRI

近年来, 应用干细胞及其外泌体治疗各种器官的 IRI 已成为新的热点, 研究发现, 人骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)来源的细胞外囊泡通过 miR-223-3p/HDAC2/SNRK 减少急性肾损伤中的炎症和细胞焦亡^[38], 与肾损伤模型组比较, BMSC 治疗后的大鼠 Scr、BUN、IL-1 β 、IL-18 水平均明显下降, NLRP3 及 caspase-1 的表达水平也均明显下降^[39]。目前, 应用 BMSC 治疗 RIRI 的方案较少, 但干细胞抑制细胞焦亡减轻 RIRI 已表现出巨大的研究前景。

3.6 天然产物治疗 RIRI

研究发现多种天然药物及其有效成分可通过抑制炎症小体介导的细胞焦亡信号通路发挥对 RIRI 的治疗作用。小檗碱(berberine, BBR)可降低 RIRI 大鼠的尿微量白蛋白、Scr 和 BUN, 其机制为下调肾组织 IL-1 β 、TNF- α 含量及 caspase-1 和 NLRP3 表达水平, 抑制细胞焦亡^[40-41]。青蒿琥酯是青蒿素衍生而来的水溶性半合成化合物, 袁强等^[42]发现 RIRI 大鼠使用青蒿琥酯治疗后, NLRP3、caspase-1 和 GSDMD 等表达水平均下降, 其作用机制为抑制炎症小体介导的细胞焦亡, 减少焦亡相关因子的表达及释放, 保护肾的结构和功能。天然产物通过介导细胞焦亡在治疗 RIRI 方面具有广阔前景, 但其具体机制需进一步阐明, 以期更好地为临床治疗服务。

4 总结与展望

当前, 医学技术不断发展, 器官移植等各类手术逐渐增多, 临床上肾移植、体外震波碎石、心脏停搏等患者由于 RIRI 而导致的 AKI 死亡率仍较高。因此, 深入研究 RIRI 的发生机制并进行精准治疗意义重大。RIRI 是一个涉及基因、分子、细胞和组织之间多层次、多因素相互作用的复杂过程, 细胞焦亡是其中的关键环节, 从分子机制层面研究细胞焦亡在 RIRI 中的作用越来越受到重视。细胞焦亡参与 RIRI 发生发展, 炎症小体的激活、caspase 酶的活化, 致使 RIRI 时细胞焦亡和炎症反应加重。减少炎症小体生成、抑制酶的活化, 可有效减轻再灌注后肾血管内皮细胞和肾小管内皮细胞损伤程度, 改善患者预后。因此, 深入探索 RIRI 的炎症机制及焦亡通路上的各个靶点, 并以此为基础进行靶向药物的研发和临床试验, 将会成为治疗 RIRI 的有效手段。但细胞焦亡在 RIRI 中的作用机制尚未完全阐明, 仍需进一步挖掘。近年来, 国内外学者已研发多种 RIRI 的治疗药物, 但是, 目前通过细胞焦亡治疗 RIRI 的探索几乎都限于动物实验研究, 因此, 如何探明药物在人类中应用的有效性及安全剂量仍是一项巨大的挑战。综上所述, 随着细胞焦亡在 RIRI 中作用机制研究的不断深入, 基于细胞焦亡分子机制的靶向药物有望成为治疗 RIRI 的有效方法。

参考文献:

- [1] 章林明, 许珍珍, 常越辰, 等. G 蛋白偶联雌激素受体可通过抑制氧化应激反应减轻肾缺血再灌注损伤[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 10-16, 24.
ZHANG L M, XU Z Z, CHANG Y C, et al. G protein-coupled estrogen receptor alleviates renal ischemia reperfusion injury by inhibiting oxidative stress[J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(6): 10-16, 24.
- [2] 付鹏宇, 杨璐瑶, 唐舒宁, 等. 基于细胞焦亡 PCR 芯片分析负重跑训练对增龄大鼠骨骼肌丢失的影响[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(2): 208-216.
FU P Y, YANG L Y, TANG S N, et al. Effect of weight-bearing running on skeletal muscle loss in aging rats based on pyroptosis PCR array[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(2): 208-216.
- [3] 邓宇, 李丽娜, 王鹏帆, 等. 雷帕霉素对大鼠肾缺血再灌注后心肌损伤的作用及机制研究[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(4): 40-45.
DENG Y, LI L N, WANG P F, et al. Effects and mechanism of

- rapamycin on cardiac injury after renal ischemia reperfusion in rats [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(4): 40–45.
- [4] ELIAS E E, LYONS B, MURUVE D A. Gasdermins and pyroptosis in the kidney [J]. Nat Rev Nephrol, 2023, 19(5): 337–350.
 - [5] WANG S, LIAO X, XIONG X, et al. Pyroptosis in urinary malignancies: a literature review [J]. Discov Oncol, 2023, 14(1): 12.
 - [6] XIA S, ZHANG Z, MAGUPALLI V G, et al. Gasdermin D pore structure reveals preferential release of mature interleukin-1 [J]. Nature, 2021, 593(7860): 607–611.
 - [7] JIA Y, WANG X, DENG Y, et al. Pyroptosis provides new strategies for the treatment of cancer [J]. J Cancer, 2023, 14(1): 140–151.
 - [8] CHEN C, YE Q, WANG L, et al. Targeting pyroptosis in breast cancer: biological functions and therapeutic potentials on It [J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 75.
 - [9] WANG J, SUN Z, XIE J, et al. Inflammasome and pyroptosis in autoimmune liver diseases [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1150879.
 - [10] ZHANG Z, ZHANG Y, XIA S, et al. Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity [J]. Nature, 2020, 579(7799): 415–420.
 - [11] ZHOU Z, HE H, WANG K, et al. Granzyme A from cytotoxic lymphocytes cleaves GSDMB to trigger pyroptosis in target cells [J]. Science, 2020, 368(6494): eaaz7548.
 - [12] MIAO N, YIN F, XIE H, et al. The cleavage of gasdermin D by caspase-11 promotes tubular epithelial cell pyroptosis and urinary IL-18 excretion in acute kidney injury [J]. Kidney Int, 2019, 96(5): 1105–1120.
 - [13] ZHANG Y, LV X, FAN Q, et al. miRNA155-5P participated in DDX3X targeted regulation of pyroptosis to attenuate renal ischemia/perfusion injury [J]. Aging (Albany NY), 2023, 15(9): 3586–3597.
 - [14] JAIN S, PLENTER R, JEREMY R, et al. The impact of Caspase-1 deletion on apoptosis and acute kidney injury in a murine transplant model [J]. Cell Signal, 2021, 85: 110039.
 - [15] TONNUS W, MAREMONTI F, BELAVGENI A, et al. Gasdermin D-deficient mice are hypersensitive to acute kidney injury [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(9): 792.
 - [16] JIN H, ZHU Y, WANG X D, et al. BDNF corrects NLRP3 inflammasome-induced pyroptosis and glucose metabolism reprogramming through KLF2/HK1 pathway in vascular endothelial cells [J]. Cell Signal, 2021, 78: 109843.
 - [17] WANG Q L, XING W, YU C, et al. ROCK1 regulates sepsis-induced acute kidney injury via TLR2-mediated endoplasmic reticulum stress/pyroptosis axis [J]. Mol Immunol, 2021, 138: 99–109.
 - [18] WU Z, DENG J, ZHOU H, et al. Programmed cell death in Sepsis associated acute kidney injury [J]. Front Med, 2022, 9: 883028.
 - [19] ZHANG B, WAN S, LIU H, et al. Naringenin alleviates renal ischemia reperfusion injury by suppressing ER stress-induced pyroptosis and apoptosis through activating Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 5992436.
 - [20] ZHANG B H, LIU H, YUAN Y, et al. Knockdown of TRIM8 protects HK-2 cells against hypoxia/reoxygenation-induced injury by inhibiting oxidative stress-mediated apoptosis and pyroptosis via PI3K/akt signal pathway [J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 4973–4983.
 - [21] WANG R, ZHAO H, ZHANG Y, et al. Identification of microRNA-92a-3p as an essential regulator of tubular epithelial cell pyroptosis by targeting Nrf1 via HO-1 [J]. Front Genet, 2020, 11: 616947.
 - [22] LIU H, CHEN Z, WENG X, et al. Enhancer of zeste homolog 2 modulates oxidative stress-mediated pyroptosis *in vitro* and in a mouse kidney ischemia-reperfusion injury model [J]. FASEB J, 2020, 34(1): 835–852.
 - [23] XIAO C, ZHAO H, ZHU H, et al. Tisp40 induces tubular epithelial cell GSDMD-mediated pyroptosis in renal ischemia-reperfusion injury via NF-κB signaling [J]. Front Physiol, 2020, 11: 906.
 - [24] WEN S, DENG F, Li L, et al. VX-765 ameliorates renal injury and fibrosis in diabetes by regulating caspase-1-mediated pyroptosis and inflammation [J]. J Diabetes Investig, 2022, 13(1): 22–33.
 - [25] 冯瑞康, 刘修恒, 王磊, 等. 树突状细胞相关的 C 型凝集素 1 在小鼠肾缺血再灌注中的作用及其机制 [J]. 中华实验外科杂志, 2022, 39(1): 95–98.
 - FENG R K, LIU X H, WANG L, et al. Effect of dendritic-cell-associated C-type lectin 1 on renal ischemia reperfusion in mice and mechanism [J]. Chin J Exp Surg, 2022, 39(1): 95–98.
 - [26] NI J, JIANG L, SHEN G, et al. Hydrogen sulfide reduces pyroptosis and alleviates ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury by inhibiting NLRP3 inflammasome [J]. Life Sci, 2021, 284: 119466.
 - [27] CAI Q, SUN Z, XU S, et al. Disulfiram ameliorates ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury by suppressing the caspase-11-GSDMD pathway [J]. Ren Fail, 2022, 44(1): 1169–1181.
 - [28] ZHAO Z, CAI W, SONG L, et al. Comprehensive property investigation of mold inhibitor treated raw cotton and ramie fabric [J]. Materials, 2020, 13(5): 1105.
 - [29] HUMPHRIES F, SHMUEL-GALIA L, KETELUT-CARNEIRO N, et al. Succination inactivates gasdermin D and blocks pyroptosis [J]. Science, 2020, 369(6511): 1633–1637.
 - [30] HU J J, LIU X, XIA S, et al. FDA-approved disulfiram inhibits pyroptosis by blocking gasdermin D pore formation [J]. Nat Immunol, 2020, 21(7): 736–745.
 - [31] KELLEY N, HE Y. Assessment of NLRP3 inflammasome

- activation and NLRP3-NEK7 complex assembly [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2641: 17–26.
- [32] WANG Y, LIU Y J, ZHANG M M, et al. CY-09 alleviates the depression-like behaviors via inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated neuroinflammation in lipopolysaccharide-induced mice [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2022, 13(23): 3291–3302.
- [33] PAN L L, LIANG W, REN Z, et al. Cathelicidin-related antimicrobial peptide protects against ischaemia reperfusion-induced acute kidney injury in mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(12): 2726–2742.
- [34] NOH M R, JANG H S, SALEM F E, et al. Epoxyeicosatrienoic acid administration or soluble epoxide hydrolase inhibition attenuates renal fibrogenesis in obstructive nephropathy [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2023, 324(2): F138–F151.
- [35] PANG Y, ZHANG P C, LU R R, et al. Andrade-oliveira salvianolic acid B modulates caspase-1-mediated pyroptosis in renal ischemia-reperfusion injury *via* Nrf2 pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 541426.
- [36] WU W, LIU D, ZHAO Y, et al. Cholecalciferol pretreatment ameliorates ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury through inhibiting ROS production, NF- κ B pathway and pyroptosis [J]. *Acta Histochem*, 2022, 124(4): 151875.
- [37] ZHU S, SUN P, BENNETT S, et al. The therapeutic effect and mechanism of parthenolide in skeletal disease, cancers, and cytokine storm [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1111218.
- [38] 尹云玉, 刘奎, 汤露, 等. 骨髓间充质干细胞可减轻脂多糖所致肾损伤大鼠的细胞焦亡 [J]. *中华危重病急救医学*, 2022, 34(3): 284–288.
- YIN Y Y, LIU K, TANG L, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells attenuate pyroptosis lipopolysaccharide-induced renal injury rats [J]. *Chin Crit Care Med*, 2022, 34(3): 284–288.
- [39] XIE Z, TANG J, CHEN Z, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles reduce inflammation and pyroptosis in acute kidney injury via miR-223-3p/HDAC2/SNRK [J]. *Inflamm Res*, 2023, 72(3): 553–576.
- [40] LI Z, WANG Y, XU Q, et al. Berberine and health outcomes: an umbrella review [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(5): 2051–2066.
- [41] 孙琳琳, 郝明月, 盛明薇, 等. SIRT1/Nrf2 信号通路在小檗碱减轻小鼠肾缺血再灌注损伤中的作用 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2021, 41(5): 598–602.
- SUN L L, HAO M Y, SHENG M W, et al. Role of SIRT1/Nrf2 signaling pathway in berberine-induced reduction of renal ischemia-reperfusion injury in mice [J]. *Chin J Anesthesiol*, 2021, 41(5): 598–602.
- [42] 袁强, 申开文, 张瑞波, 等. 青蒿琥酯通过 NLRP3 炎症小体抑制细胞焦亡减轻大鼠肾缺血-再灌注损伤 [J]. *器官移植*, 2021, 12(6): 733–740.
- YUAN Q, SHEN K W, ZHANG R B, et al. Artesunate alleviates renal ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting pyroptosis via NLRP3 inflammasome [J]. *Organ Transplant*, 2021, 12(6): 733–740.

[收稿日期]2023-05-29