

何宪顺,林锬,陆舜,等. 基于免疫炎症-肠道微生态探讨清热解毒方对痛风小鼠治疗作用的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 1-12.

He XS, Lin K, Lu S, et al. Therapeutic effects of Qingre jiedu formula on mice with gout based on immune inflammation and gut microbiota [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 1-12.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.001

基于免疫炎症-肠道微生态探讨清热解毒方 对痛风小鼠治疗作用的研究

何宪顺^{1,2}, 林 锬^{1,2}, 陆 舜^{1,2}, 韦雨柔^{1,2}, 田佳庆^{1,2}, 江禹来^{1,2}, 魏腾飞^{1,2},
林天烨^{2,3}, 何敏聪^{2,3}, 魏秋实^{2,3*}

(1.广州中医药大学第三临床医学院,广州 510378;2.广东省中医骨伤研究院,广州 510378;
3.广州中医药大学第三附属医院,广州 510378)

【摘要】 目的 探究清热解毒方对痛风小鼠抗炎作用及对肠道菌群的影响。**方法** 将 40 只 7~8 周龄、体重 20~22 g 的 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠随机分为空白组 (CON 组)、模型组 (MOD 组)、别嘌醇组 (ALLO 组)、清热解毒方组 (QRJD 组),第 1~35 天每天早上 CON 组灌胃 10 g/0.1 mL 羧甲基纤维素,其余各组均灌胃氧嗪酸钾 (500 mg/kg)+酵母膏 (10 g/kg) 混悬液制备高尿酸血症小鼠模型;第 29 天在异氟烷麻醉下,往 CON 组小鼠右踝关节注射 50 μ L 无菌羧甲基纤维素,其余各组小鼠右踝关节注射等量尿酸钠溶液 (50 mg/mL) 制备痛风性关节炎模型,同时各组每天灌服相应药物进行治疗;第 35 天取材,取材小鼠禁食不禁水 6 h,检测血尿酸、血肌酐、尿素氮等血液指标,踝关节苏木精-伊红、番红-固绿染色;踝关节免疫组化检测白细胞介素-10 (interleukin 10, IL-10)、转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 抗炎指标;收集小鼠盲肠内容物,采用 16S rDNA 高通量测序法检测肠道菌群变化。**结果** (1) 用药治疗 7 d 后,与 MOD 组相比,QRJD 组能有效降低疾病模型小鼠血尿酸 ($P<0.001$)、肌酐 ($P<0.01$)、尿素氮 ($P<0.05$) 浓度,有效保护肾功能。(2) 病理结果提示,与 MOD 组相比,苏木精-伊红染色发现 QRJD 组治疗后,关节滑膜增生有所减少,炎症细胞浸润得到减轻;番红-固绿发现中药复方软骨排列较前有序,软骨破坏较 MOD 组减轻,基质未见失染。(3) 踝关节免疫组化结果提示 CON 组、MOD 组 IL-10、TGF- β 1 未见明显升高;与 MOD 组相比,QRJD 组的 IL-10、TGF- β 1 表达升高 ($P<0.05$)。(4) 肠道菌群交互关系、多样性上,与 CON 组相比,MOD 组特有的 OTUs 数目增加 75 个,而 QRJD 能减少 MOD 特有的 OTUs 数量,更接近 CON 组;4 组间的 α 多样性未见明显差异 ($P>0.05$),而 β 多样性发现 QRJD 组的菌群组成更趋向于 CON 组水平 ($P=0.001$)。(5) 肠道菌群差异分析结果显示,与 CON 组相比,MOD 组 *Ruminococcaceae* spp.、*Dubosiella* sp.、*Tyzerella* sp.、*Ileibacterium* sp. 和 *Bacteroidales* spp. 等丰度增高 ($P<0.05$);与 MOD 组对比,QRJD 组 *Lactobacillus* sp.、*Ligilactobacillus* sp. 和 *Bacteroides* sp. 等丰度上升 ($P<0.05$),且肠道菌群相互作用图显示菌群之间存在相互作用。(6) 肠道菌群与肾功能、抗炎因子相关性分析中,*Dubosiella* sp.、*Tyzerella* sp.、*Bacteroidales* spp. 的相对丰度与 SUA、SCR 呈显著正相关 ($P<0.05$);而 *Lactobacillus* sp.、*Ligilactobacillus* sp.、*Mitochondria* spp. 与 IL-10、TGF- β 1 抗炎因子呈正相关,其中与 TGF- β 1 较为显著 ($P<0.05$)。(7) COG 功能预测提示 QRJD 组功能集中于无机离子转运和代谢、碳水化合物运输

【基金项目】国家自然科学基金面上项目 (82274544);国家自然科学基金青年基金 (82004392);广东省自然科学基金面上项目 (2023A1515010551);广州中医药大学“双一流”与高水平大学学科协同创新团队培育项目 (2021XK41);广东省新黄埔中医药联合创新研究院 2022 年度第一批联合创新研究项目 (2022IR012);毕节市科学技术局 2022 年度“揭榜挂帅”项目 (毕科合重大专项 [2022]1 号)。

【作者简介】何宪顺 (1993—),硕士研究生,研究方向:骨与关节的临床与基础研究。E-mail:hexianshun123@126.com

【通信作者】魏秋实 (1982—),博士,中西医结合医学双博士后,主任医师,博士生导师,研究方向:骨与关节的临床与基础研究。

E-mail:weiqshi@126.com

与代谢等。结论 QRJD 能有效调节免疫炎症-肠道微生态紊乱从而治疗痛风疾病,推测其防治痛风的机制是调节肠道菌群多样性以及调控 *Ruminococcaceae* spp.、*Dubosiella* sp.、*Lactobacillus* sp. 等差异菌群丰度实现治疗痛风的目的。

【关键词】 清热解毒方;免疫炎症;肠道菌群;痛风;高尿酸血症

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856 (2024) 05-0001-12

Therapeutic effects of Qingre jiedu formula on mice with gout based on immune inflammation and gut microbiota

HE Xianshun^{1,2}, LIN Kun^{1,2}, LU Shun^{1,2}, WEI Yurou^{1,2}, TIAN Jiaqing^{1,2}, JIANG Yulai^{1,2}, WEI Tengfei^{1,2},
LIN Tianye^{2,3}, HE Mincong^{2,3}, WEI Qiushi^{2,3*}

(1. the Third Clinical Medical School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510378, China.

2. Guangdong Research Institute for Orthopedics and Traumatology of Chinese Medicine, Guangzhou 510378.

3. the Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510378)

【Abstract】 Objective To explore the anti-inflammatory effect of Qingre Jiedu (QRJD) formula on mice with gout and its effect on gut microbiota. **Methods** Forty C57BL/6 mice weighing 20~22 g were divided into control (CON), model (MOD), allopurinol (ALLO), and QRJD formula (QRJD) groups, and i. g. 10 g/0.1 mL carboxymethyl cellulose was administered to the CON every morning from 1 to 35 days. A hyperuricemia mouse model was prepared by intragastric injection of a potassium oxalic acid (500 mg/kg) and yeast extract (10 g/kg) suspension. On day 29, 50 μ L sterile carboxymethyl cellulose was injected into the right ankle of mice in the CON group under isoflurane-induced anesthesia, and a gouty arthritis model was prepared by injecting the same volume of sodium urate (50 mg/mL) into the right ankle of mice in the other groups. Each group was treated with corresponding drugs every day. On day 35, samples were collected from mice that had been fasted for 6 hours without water. Blood indexes, such as uric acid, creatinine, and urea nitrogen, were assessed. Hematoxylin-eosin and saffranine O-fast green staining was performed on ankle joints. Anti-inflammatory indexes of interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) were detected by ankle joints immunohistochemical assay. The cecum contents of mice were collected, and changes in gut microbiota were analyzed by high-throughput sequencing of 16S rDNA. **Results** (1) After 7 days of treatment, compared with the MOD group, QRJD formula effectively reduced the blood concentrations of uric acid ($P<0.001$), creatinine ($P<0.01$), and urea nitrogen ($P<0.05$), and effectively protected renal functions. (2) Compared with the MOD group, HE staining showed that synovial hyperplasia and inflammatory cell infiltration were reduced in the QRJD formula group after treatment. The cartilage arrangement of the compound was more orderly than before, cartilage destruction was less than that in the MOD group, and no matrix loss was observed. (3) Immunohistochemical analysis of the ankle joint indicated that IL-10 and TGF- β 1 were not significantly increased in CON and MOD groups. Compared with the MOD group, IL-10 and TGF- β 1 expression in the QRJD formula group were increased ($P<0.05$). (4) In terms of biodiversity, the number of MOD-specific OTUs increased by 75 compared to the CON group, while the QRJD was able to reduce the number of MOD-specific OTUs to more closely resemble the CON group; no significant difference was found in α -diversity among the four groups ($P<0.05$), whereas β -diversity was more similar to the CON group ($P=0.001$). (5) Compared with the CON group, the MOD group exhibited increased abundances ($P<0.05$) of *Ruminococcaceae* spp., *Dubosiella* sp., *Tyzzereella* sp., *Ileibacterium* sp., and *Bacteroidales* spp.. In contrast to the MOD group, the QRJD formula group showed elevated abundances ($P<0.05$) of *Lactobacillus* sp., *Ligilactobacillus* sp., and *Bacteroides* sp.. Furthermore, an interaction network of gut microbiota indicated mutual interactions among these microorganisms. (6) In the correlation analysis between gut microbiota and renal functions as well as anti-inflammatory factors, the relative abundances of *Dubosiella* sp., *Tyzzereella* sp., and *Bacteroidales* spp. were significantly positively correlated to SUA and SCR ($P<0.05$). However, *Lactobacillus* sp., *Ligilactobacillus* sp., and *Mitochondria* spp. exhibited a positive correlation to anti-inflammatory factors IL-10 and TGF- β 1 with a more significant association observed for TGF- β 1 ($P<0.05$). (7) COG function prediction suggested that the functions of the QRJD formula group were concentrated on inorganic ion transport and metabolism, and carbohydrate transport and

metabolism. **Conclusions** QRJD effectively modulates immune inflammation and gut microbiota dysbiosis, thereby treating gout. Its mechanism of gout prevention and treatment may involve regulation of gut microbiota diversity and abundance, as well as the control of the abundance of differential bacterial species, such as *Ruminococcaceae* spp., *Dubosiella* sp., and *Lactobacillus* sp., to achieve gout therapy.

[Keywords] QRJD formula; immunoinflammation; gut microbiota; gout; hyperuricemia

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

痛风疾病的发生与长期高尿酸血症密切相关,现代饮食结构的改变、含糖饮料的摄入,都增加了痛风疾病的患病率及发病率^[1-2]。研究发现,过饱和的尿酸晶体沉积于关节诱发的一系列免疫炎症反应,离不开巨噬细胞的介导^[3-4]。痛风急性期在炎症诱导下滑膜常驻巨噬细胞会向经典活化型(M1 macrophages, M1)极化,其分泌的促炎因子会促进及加重炎症反应;其后巨噬细胞会逐渐向替代活化型(M2 macrophages, M2)极化,分泌的细胞因子如 IL-10、TGF- β 1 能发挥抗炎、促进组织修复等功能^[5],病情逐步过渡至缓解期。因此,促进巨噬细胞 M2 极化为痛风性关节的治疗提供了思路。

目前临床上的疗法主要针对不同阶段的痛风疾病进行对症施治,包括控制尿酸的合成与排泄、快速消炎止痛等,但这些治疗都有应用禁忌并有一定的不良反应^[6]。中医药治疗痛风具有多靶点、不良反应少的优势,因此临床上运用中医药治疗痛风独具特色^[7-9]。本课题组前期研究发现高尿酸血症因湿聚毒成,客于骨节脉络,毒侵骨骼而发病,构建辨“毒”治“毒”的诊治理念,对痛风性关节炎急性期热毒证应以清热解毒为主,清热解毒方是基于上述治法理念组方而成,由大黄、黄柏、连翘、宽筋藤、土茯苓、独活、苦参、紫花地丁等八味中药组成院内制剂,具有清热解毒定风作用^[10]。

现有研究表明肠道菌群作为隐匿的器官,调控着疾病的发生与进展,而肠道菌群紊乱与痛风发病密切相关,其自身菌群丰度变化及代谢产物产生驱动着机体的炎症反应^[11]。然而,关于清热解毒方与肠道菌群的关系、该中药是否通过调节肠道菌群治疗痛风疾病等问题尚不清楚。因此本文旨在探究清热解毒方对踝关节免疫调节作用及对痛风小鼠肠道菌群的影响,为临床应用提供更多实验证据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康成年雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 40 只,7~8 周龄,体重 20~22 g,购自广州中医药大学动物实

验中心[SCXK(粤)2018-0034]。动物饲养及实验在广州中医药大学动物实验中心完成[SYXK(粤)2018-0001],动物实验均通过广州中医药大学动物实验伦理审查审批(20220430003),实验过程严格遵循 3R 原则。技术人员均具备在该设施中从事动物实验的资质。

1.2 主要试剂与仪器

大黄、黄柏、连翘、宽筋藤、土茯苓、独活、苦参、紫花地丁均购自广州中医药大学第三附属医院;异氟烷(批号 21122601,瑞沃德);酵母膏(批号 C12779205,麦克林);氧嗪酸钾(批号 C13387385,麦克林);尿酸钠盐(批号 U886060,麦克林);尿酸试剂盒(批号 20220413,南京建成);肌酐试剂盒(批号 20220507,南京建成);尿素氮试剂盒(批号 20220117,南京建成);黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒(批号 20220525,索莱宝);别嘌呤(批号 20210404,合肥久联制药);IL-10(批号 ER1911-19,华安生物);TGF- β 1(批号 ER31210,华安生物);OMEGA Stool DNA Kit(美国 Omega Bio-Tek 公司,批号 D4015-02);AxyPrep PCR Clean-up Kit(爱思进生物技术有限公司,批号 AP-GX-250);Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit(赛默飞世尔科技有限公司,批号 P7589)。

Qubit2.0 型荧光定量 PCR 仪、酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司);离心机(德国 eppendorf 公司);TP1020 型自动台式组织脱水机、HistoCore Arcadia 型全自动组织包埋机、切片机(徕卡显微系统上海贸易有限公司);倒置显微镜(德国徕卡公司);Leica Bond RXM 全自动染色机(德国 Leica 公司);Miseq 测序仪(美国 Illumina 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组、造模及给药

C57BL/6J 小鼠随机分为空白组(Control, CON 组)、模型组(Model, MOD 组)、别嘌呤组(Allopurinol, ALLO 组)、清热解毒方组(Qingrejiedu, QRJD 组),每组 8 只。将 1 g 氧嗪酸钾和 20 g 酵母膏溶解在 20 mL 羧甲基纤维素中,用超声清洗机充

分超声震碎 60 min, 形成混悬液。按小鼠体重 0.1 mL/10 g 进行灌胃, 每天 1 次, CON 组用等体积羧甲基纤维素进行灌胃, 其余均为氧嗪酸钾+酵母膏混悬液灌胃, 造模时间为 35 d, 建立高尿酸血症小鼠模型, 第 35 天末次眼眶采血监测血尿酸水平; 第 29 天参考文献^[12]建立急性痛风模型, 并且在成模 2 h 后 CON 组用等量羧甲基纤维素灌胃, 其余各组小鼠灌胃相应的药物进行治疗, 疗程为 7 d; 在第 35 天末次给药 6 h 后处死小鼠进行取材。

1.3.2 粪便收集

第 35 天取材, 取材前小鼠禁食不禁水 6 h, 予异氟烷吸入麻醉后, 使用 75% 乙醇消毒立即转移到无菌操作台, 迅速剥离盲肠从中提取盲肠内容物至无菌冻存管, 置于液氮中保存。

1.3.3 肾功能检测

末次小鼠摘眼球取血, 静置 2 h 后, 2500 r/min 离心 10 min, 收集上层血清, 按照试剂盒说明书测定血尿酸 (serum uric acid, SUA)、血肌酐 (serum creatinine, SCR)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 含量, BUN 含量测定按照说明书使用血浆。

1.3.4 踝关节组织病理学及免疫组化检测

使用无菌手术器械剥离双侧肌肉、韧带及其他软组织后, 暴露出踝关节。将踝关节置于 4% 多聚甲醛固定 48 h, 后放入 15% EDTA 中脱钙处理。脱钙、脱水后使用石蜡包埋踝关节组织, 将蜡块切割为 5 μ m 的切片, 使用苏木精-伊红 (hematoxylin-Eosin, HE)、番红-固绿进行染色。免疫组化实验中将各组小鼠踝关节组织切片按照免疫组化试剂盒操作步骤进行封闭, 滴加相应 I 抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜滴加相应 II 抗、DAB 显影、PBS 冲洗、复染脱水、透明和树脂封片。在光镜下观察结果, 图像的平均光密度用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统进行测定。

1.3.5 16S rDNA 测序

随机数字表法选取各组 5 只小鼠的盲肠内容物样本进行 DNA 提取, 检测其纯度及浓度。使用 Phusion 酶并添加特异性 Barcode 序列对 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增。产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 目标片段使用 AxyPrep PCR Cleanup Kit 进行回收。纯化后的 PCR 产物采用 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 在 Promega QuantiFluor 荧光定量系统上对文库进行定量、混库。使用 Illumina 测序平台进行双端测序。16S rDNA 测序委托杭州联川生物技术股份有限公司完成。

1.3.6 测序结果分析

使用 Illumina MiSeq 平台将双端数据进行拼接, 并进行质控、嵌合体过滤、DADA2 去噪, 获得最终的 ASV (amplicon sequence variants) 特征表以及特征序列。使用 SILVA (release 138) 以及 NT-16S 数据库做物种分类及后续分析。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件分析, 图片使用 Graph Pad Prism 9.0 进行绘制, 符合正态分布和方差齐性计量资料数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 Bonferroni 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。为了确定在痛风疾病进展中起作用的关键菌群, 将 MOD 组和 QRJD 组的差异菌属与肾功能血清指标、抗炎因子进行 Pearson 相关性分析。

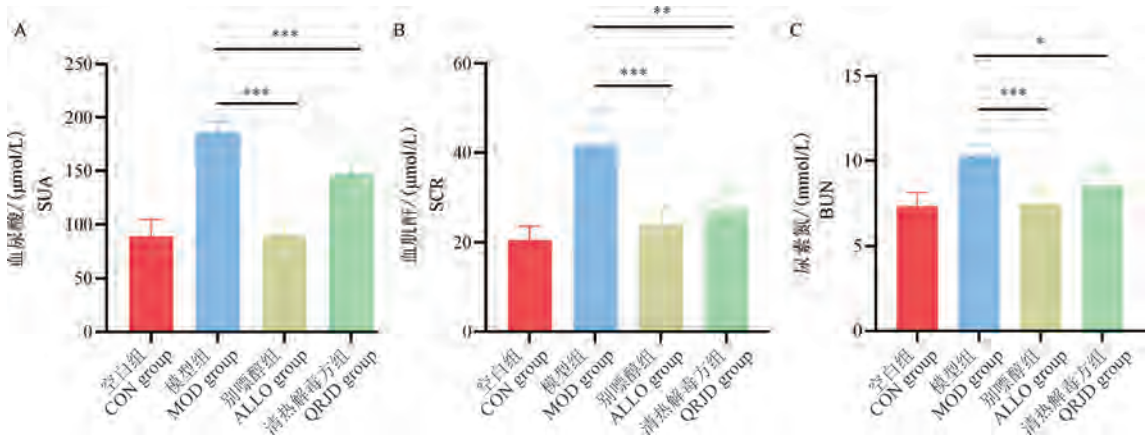
2 结果

2.1 肾功能指标结果

末次 SUA 结果显示: 与 MOD 组相比, ALLO 组能明显有效降低 SUA 水平 ($P<0.001$); QRJD 组经治疗后, 也能起到降低 SUA 作用 ($P<0.001$) (图 1A); 末次 SCR 结果显示: 与 MOD 组相比, ALLO 组、QRJD 用药后能有效降低 SCR 水平 ($P<0.01$) (图 1B); 末次 BUN 结果显示: 与 MOD 组相比, ALLO 组能明显有效降低 BUN 水平 ($P<0.001$), 且 QRJD 组经用药治疗后对 BUN 水平有降低作用 ($P<0.05$) (图 1C)。结合血清指标, QRJD 虽药效不及 ALLO 迅猛, 但能降低 SUA、SCR 和 BUN, 从而有效改善肾功能。

2.2 踝关节病理染色结果分析 (HE、番红-固绿)

踝组织病理染色结果提示: HE 染色中, 与 CON 组相比, MOD 组小鼠踝关节滑膜增生明显, 滑膜排列紊乱, 并有炎性细胞浸润; 与 MOD 组相比, ALLO 组踝关节滑膜增生现象未改善, 可见炎症细胞浸润; 经 QRJD 组治疗后, 关节滑膜增生有所减少, 炎症细胞浸润得到减轻 (图 2A); 番红-固绿染色中, CON 组关节结构完整, 软骨排列整齐, 关节软骨面光滑平整, 软骨基质为均匀的红色, 未见失染; 与 CON 组相比, MOD 组关节软骨排列紊乱, 软骨面可见部分基质失染现象和软骨凋亡; 与 MOD 组相比, ALLO 组软骨排列紊乱表现未见改善, 部分软骨面基质依然可见失染和软骨凋亡, 经 QRJD 干预后, 软

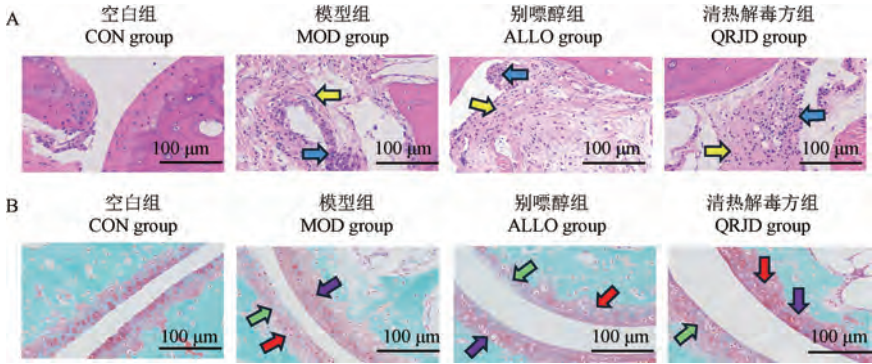


注:与模型组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 1 各组小鼠肾功能变化图

Note. Compared with the MOD group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 1 Renal function of mice in each group



注:A:蓝色箭头为炎性细胞浸润,黄色箭头为滑膜增生;B:红色箭头为软骨排列紊乱,绿色箭头为基质失染,紫色箭头为软骨凋亡。

图 2 各组踝关节组织 HE、番红-固绿病理学结果

Note. A, Blue arrow shows inflammatory cell infiltration, and the yellow arrow shows synovial hyperplasia. B, Red arrows indicate disordered cartilage arrangement, green arrows indicate stromal dysstaining, and purple arrows indicate cartilage apoptosis.

Figure 2 Pathological results of HE and safranin O-fast green staining in ankle tissue of each group

骨排列较前有序,软骨凋亡较 MOD、ALLO 组减轻,基质未见失染(图 2B)。

2.3 踝关节 IL-10、TGF-β1 免疫组化分析

免疫组化染色结果显示,与 CON 组相比,MOD 组小鼠踝关节 IL-10、TGF-β1 未见明显阳性表达($P>0.05$),见图 3A、3B;而经 QRJD 治疗后,相比 MOD 组,该组小鼠踝关节 IL-10、TGF-β1 抗炎因子表达较 MOD 组升高($P<0.05$),而 ALLO 组未见明显升高($P>0.05$),如图 3C、3D 所示。说明该中药复方能促进滑膜内抗炎因子 IL-10、TGF-β1 表达,从而减轻炎症。

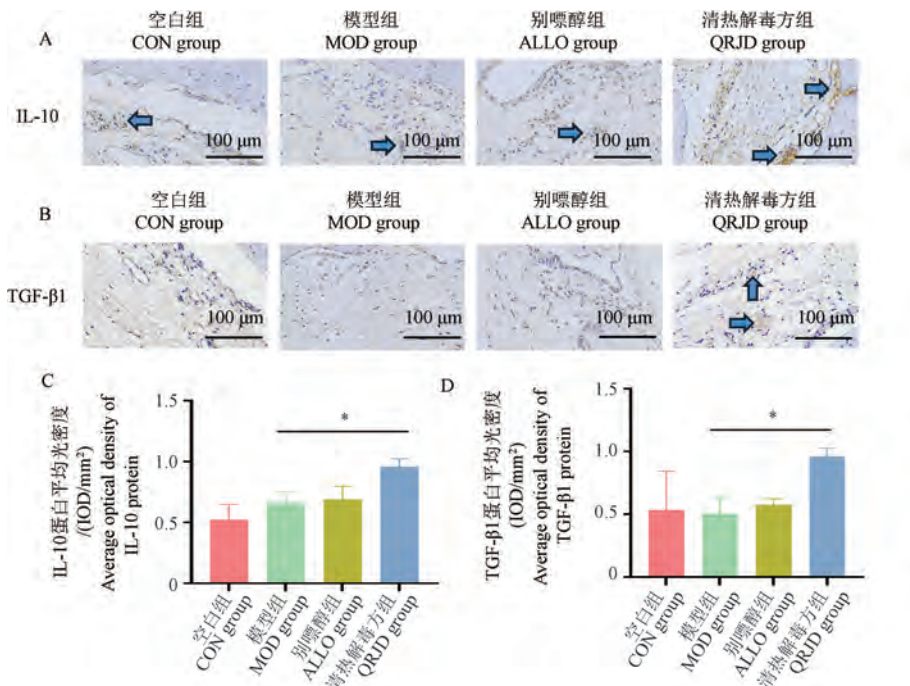
2.4 肠道菌群交互关系与多样性分析

对 4 组小鼠共 20 例样本进行 16S rDNA 进行测序,对检测的原始数据进行拼接、过滤,结果表明当 Shannon 指数处于 6~7 时,稀释曲线末端趋于平滑,说明测序质量良好,测序数据量已达到饱和可进行

后续分析(图 4A)。为了研究各组小鼠肠道菌群组成间交互关系的调节,采用 UpSet 图比较各组间独有和共有的 OTU 数目(图 4B)。结果显示,CON 组共检出 1934 个 OTUs,特有 1093 个;MOD 组中共检出 2338 个 OTUs,特有 75 个;ALLO 组共检测出 1898 个 OTUs,无特有 OTU;QRJD 共检测出 2263 个 OTUs,无特有 OTU。CON 组、MOD 组、ALLO 组和 QRJD 方组共同拥有的 OTUs 为 808 个,占 4 组总 OTUs 数的 15.18%。

肠道菌群 α 多样性是指肠道菌群内不同微生物群落的多样性水平,用来反应菌群内多样性。4 组小鼠肠道菌群 α 多样性分析未见明显差异($P>0.05$,图 4C)。

为进一步分析菌群间的多样性,采用了多样性主成分分析(principal component analysis,PCA),其分析用来反应不同分组间的物种差异性。4 组样本



注:A:IL-10 免疫组化;B:TGF-β1 免疫组化;C:IL-10 免疫组化相对表达量统计;D:TGF-β1 免疫组化相对表达量统计;蓝色箭头为阳性表达。与模型组相比, * $P<0.05$ 。

图 3 各组踝关节组织 IL-10 和 TGF-β1 免疫组化结果

Note. A, Immunohistochemistry of IL-10. B Immunohistochemistry of TGF-β1. C, IL-10 immunohistochemistry relative expression statistics. D, TGF-β1 immunohistochemistry relative expression statistics. Blue arrow shows the positive expression. Compared with MOD group, * $P<0.05$.

Figure 3 Immunohistochemical results of IL-10 and TGF-β1 in ankle tissues of each group

虽然存在部分重叠,但能够区分各组的菌落结构,相似性分析结果显示,组间差异显著大于组内差异 ($P=0.001$,图 4D)。

2.5 肠道菌群结构分析

门水平上,从柱状堆叠图进行分析结果可见厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)、放线菌门(*Actinobacteriota*)、*Patescibacteria*、变形菌门(*Proteobacteria*)为 TOP 5 优势菌,并且占总菌群数的绝大多数。肠道菌群占比中,厚壁菌门丰度 CON 组为 48.62%, MOD 组为 48.29%, ALLO 组为 58.74%, QRJD 组为 58.94%;拟杆菌门丰度在上述 4 组占比依次为 34.89%、31.07%、24.37%、29.05%;放线菌门丰度在上述 4 组占比依次为 7.26%、10.53%、3.17%、3.29%;*Patescibacteria* 门在上述 4 组占比依次为 2.21%、2.64%、5.94%、3.52%;变形菌门丰度在上述 4 组占比依次为 3.35%、3.74%、2.63%、3.02%(图 5A)。

属水平上,从柱状堆叠图进行分析可见 *Muribaculaceae_spp.*、*Lactobacillus_spp.*、*Allobaculum_spp.*、*Lachnospiraceae_NK4A136_group*、*HT002_spp.* 为 TOP 5 优势菌。肠道菌群占比中,*Muribaculaceae_spp.*

sp. 丰度 CON 组为 29.03%, MOD 组为 26.17%, ALLO 组为 18.65%, QRJD 组为 25.06%; *Lactobacillus_spp.* 丰度在上述 4 组占比依次为 6.26%、2.87%、7.90%、14.81%; *Allobaculum_spp.* 丰度在上述 4 组占比依次为 14.76%、11.07%、1.89%、2.03%; *Lachnospiraceae_NK4A136_group* 丰度在上述 4 组占比依次为 4.53%、2.79%、7.09%、5.59%; *HT002_spp.* 菌属丰度在上述 4 组占比依次为 5.39%、1.69%、4.98%、3.99%(图 5B)。上述结果表明,中药 QRJD 能改善痛风小鼠肠道菌群紊乱状态,使其恢复到 CON 组相似的菌群结构。

2.6 肠道菌群差异分析

通过对肾功能血清指标、踝关节病理结果分析,证实 QRJD 组具有降尿酸、护肾和抗炎的作用。因此,为探究经 QRJD 组治疗后小鼠肠道菌群差异变化,重点关注 CON 组与 MOD 组、MOD 组与 QRJD 组的菌群差异,对 3 组菌群进行 LEfSe 分析, LDA 效应量>3.0 以及 $P<0.05$ 具有显著性差异,差异菌群分析聚焦在属水平。如图 6 所示,与 CON 组相比, MOD 组的差异菌群为 *Ruminococcaceae_spp.*、*Dubosiella_spp.*、*Tyzzereella_spp.*、*Ileibacterium_spp.* 和

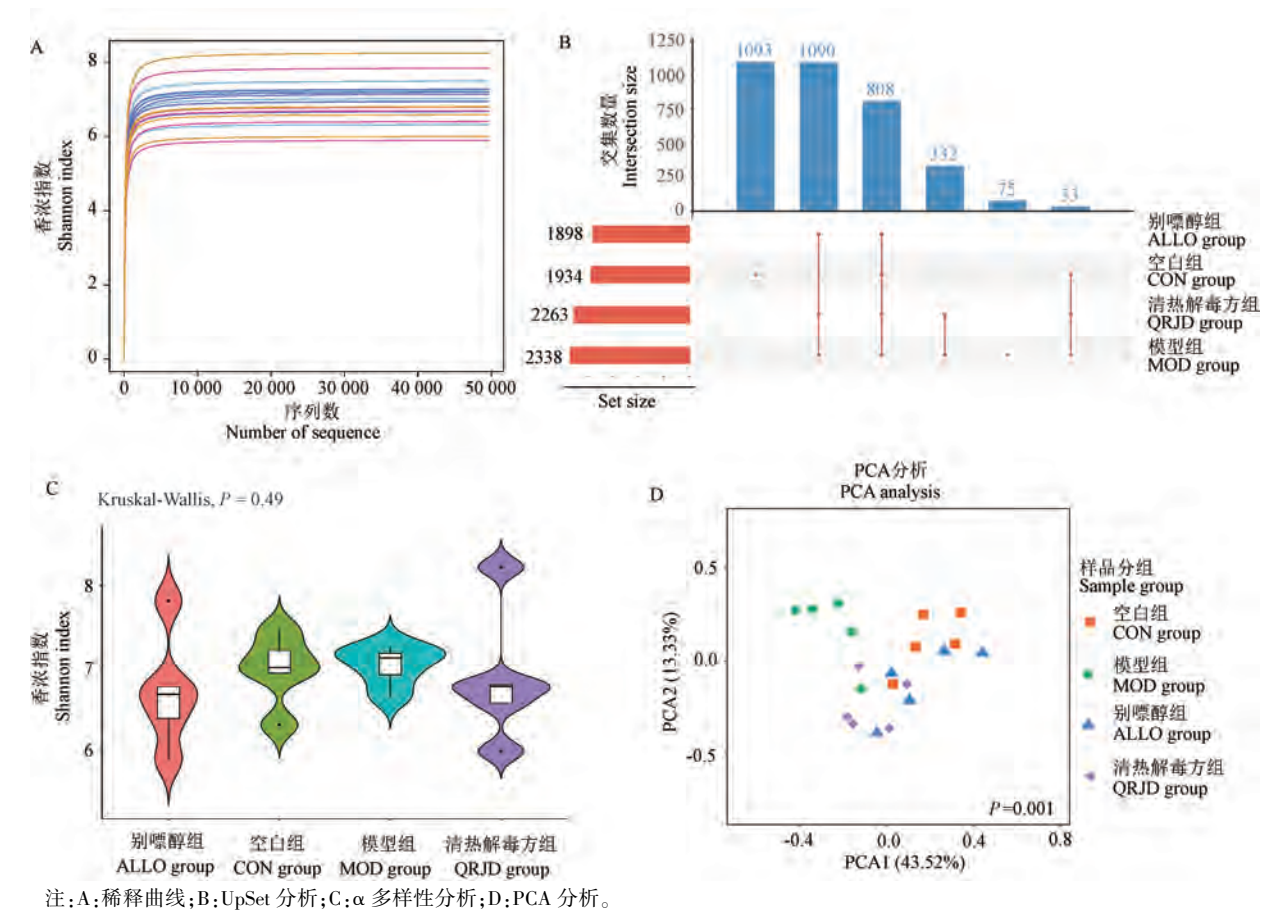


图 4 肠道菌群交互关系与多样性分析

Note. A, Dilution curve. B, UpSet analysis. C, α diversity analysis. D, PCA analysis.

Figure 4 Interaction and diversity analysis of intestinal flora

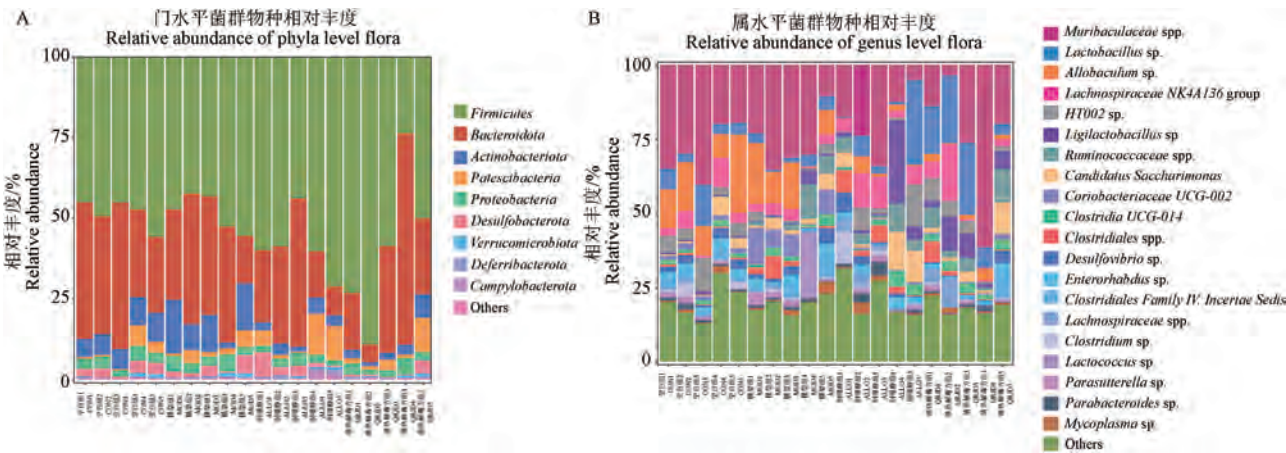


图 5 肠道菌群结构分析

Figure 5 Analysis of intestinal flora structure

Bacteroidales_spp.。与 MOD 组相比, QRJD 组的差异菌群为 *Lactobacillus sp.*、*Ligilactobacillus sp.* 和 *Bacteroides sp.*。

2.7 肠道菌群相互作用分析

为探究菌群之间相互作用关系,以属水平进行相关性分析,以 $P < 0.05$ 、 $\rho \geq |0.5|$ 为筛选条

件,重点研究 LEfSe 筛选出的差异菌群相互作用,如图 7 相关性网络图 (Correlation Network) 所示,其中 MOD 组上调的 *Ruminococcaceae spp.* 与 *Candidatus_Saccharimonas sp.* ($\rho = 0.6$, $P < 0.05$)、*Ligilactobacillus sp.* ($\rho = 0.677$, $P < 0.01$) 呈正相关,而与 *Allobaculum sp.* ($\rho = -0.638$, $P = 0.0031$)、

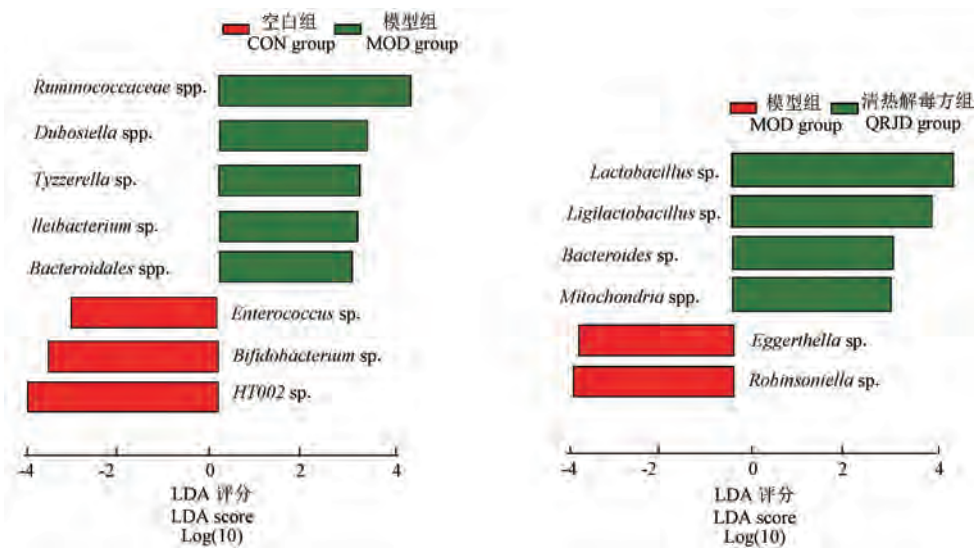


图 6 各组肠道菌群在属水平上的 LEfSe 分析

Figure 6 LEfSe analysis of bacteria in each group at genus level

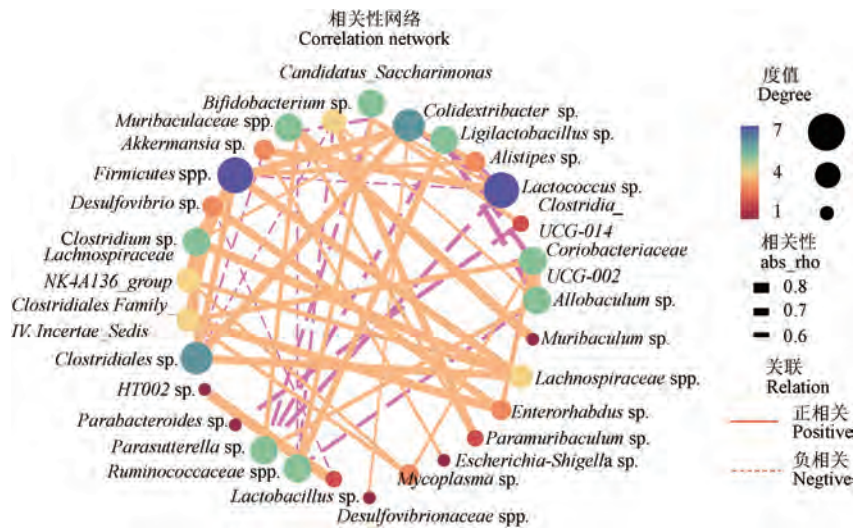


图 7 肠道菌群相互作用网络分析图

Figure 7 Analysis of intestinal flora interaction network

Bifidobacterium sp. ($\rho = -0.585, P = 0.0078$) 呈负相关; QRJD 组上调的 *Lactobacillus* sp. 与 *HT002* sp. ($\rho = 0.812, P < 0.001$) 呈正相关, 而与 *Desulfovibrio* sp. ($\rho = -0.508, P = 0.00236$) 呈显著负相关; *Ligilactobacillus* sp. 与 *Allobaculum* sp. ($\rho = -0.7849, P < 0.001$)、*Coriobacteriaceae* UCG-002 ($\rho = -0.7338, P < 0.001$)、*Parasutterella* sp. ($\rho = -0.6601, P < 0.01$) 呈显著负相关, 一定程度上说明菌群之间存在相互调控作用。

2.8 肠道菌群与肾功能、抗炎因子的相关性分析

为探索差异菌群与肾功能血清指标、抗炎因子之间的相关性, 在肾功能血清指标中, *Dubosiella* sp. ($r = 0.46, r = 0.58$)、*Tyzzerella* sp. ($r = 0.22, r =$

0.27)、*Bacteroidales* spp. ($r = 0.24, r = 0.68$) 的相对丰度与 SUA、SCR 呈显著正相关 ($P < 0.05$), 而 *Lactobacillus* sp. ($r = -0.10, r = -0.15, r = -0.13$)、*Ligilactobacillus* sp. ($r = -0.15, r = -0.16, r = -0.19$)、*Bacteroides* sp. ($r = -0.09, r = -0.07, r = -0.10$) 相对丰度与 SUA、SCR、BUN 呈负相关 ($P > 0.05$); 抗炎因子指标中, *Dubosiella* sp. ($r = -0.12, r = -0.13$)、*Bacteroidales* spp. ($r = -0.15, r = -0.10$) 相对丰度与 IL-10、TGF- β 1 呈负相关 ($P > 0.05$); 而 *Lactobacillus* sp. ($r = 0.18, r = 0.31$)、*Ligilactobacillus* sp. ($r = 0.15, r = 0.30$)、*Mitochondria* spp. ($r = 0.15, r = 0.32$) 与上述抗炎因子呈正相关, 其中 TGF- β 1 较为显著 ($P < 0.05$), 结果见图 8。

2.9 肠道菌群功能预测

图 9 所示,为了研究痛风小鼠中肠道菌群的功

能变化及 QRJD 组调控肠道菌群的通路机制,使用 PICRUS2.0 软件进行 (clusters of orthologous groups

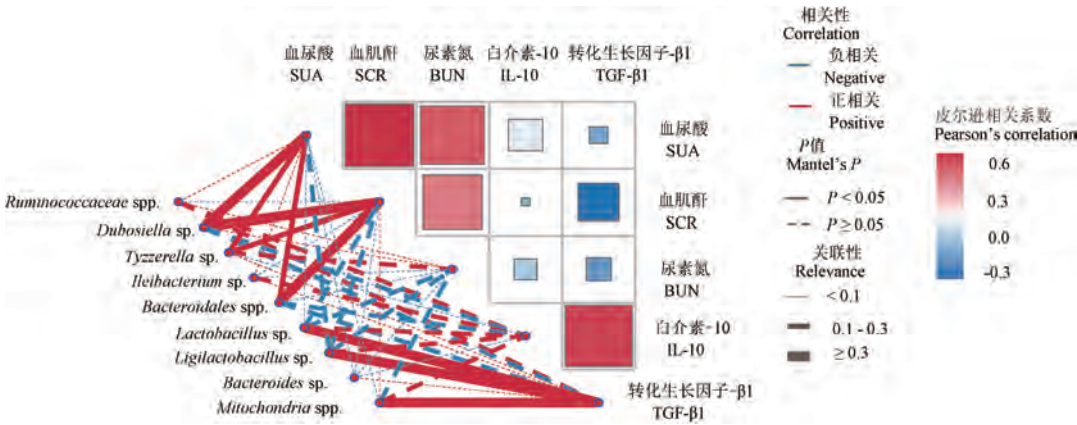


图 8 差异菌群与肾功能、抗炎因子的相关性热图

Figure 8 Network heat map of correlation between differential flora and renal function and anti-inflammatory factors

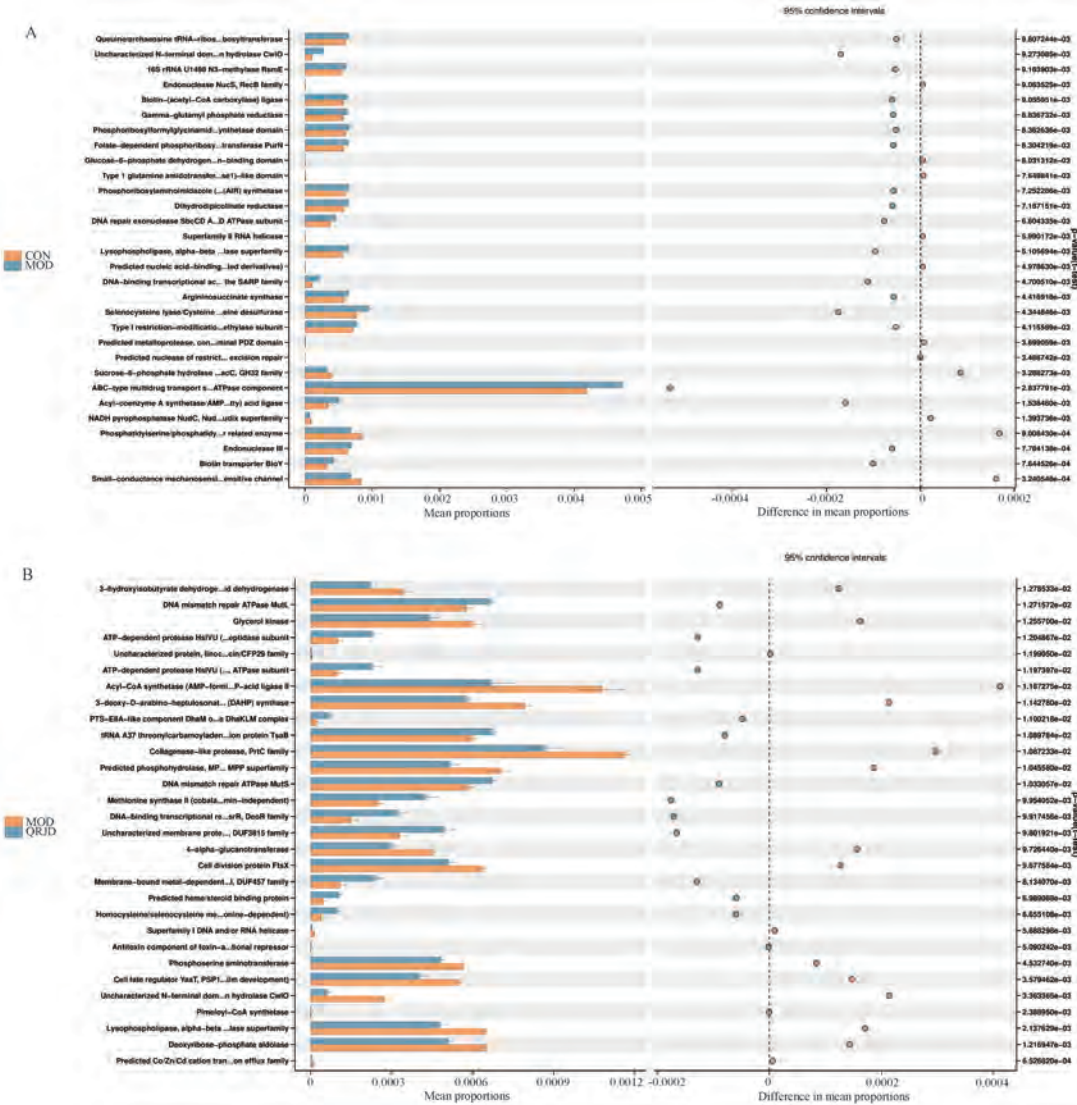


图 9 各组菌群 COG 功能预测

Figure 9 COG function prediction of each group

of proteins, COG) 功能预测, 并选取 $P < 0.05$ 的前 30 个功能进行展示。主要对比 CON 组与 MOD 组、MOD 组与 QRJD 组, 与 MOD 组相比, QRJD 组功能集中于碳水化合物运输、糖脂代谢与无机离子转运等, 且 QRJD 组提高了复制、重组和修复、转录、细胞周期控制等功能水平。

3 讨论

痛风前期的高尿酸血症往往因其临床症状不明显而容易被忽略^[13], 随着疾病的进展, 急性关节炎发作伴随的剧烈疼痛及肾组织损害, 给患者身心带来巨大的负担^[14-15]。以往对痛风疾病的治疗聚焦在降尿酸和抗炎止痛上, 忽略了其对免疫炎症-肠道微生态的影响。研究表明, 当免疫微环境失衡时, 体内免疫应答机制促使免疫细胞分泌抗炎因子减轻炎症进展, 而 IL-10、TGF- β 1 作为重要的免疫调控因子, 能阻止中性粒细胞迁移和软骨降解, 从而减轻痛风炎症反应^[16]。肠道菌群作为人类的“隐匿”器官, 能通过多样性、丰富度的变化和代谢物的释放参与多种骨骼肌肉疾病^[17], 课题组前期研究认为无论是传统中医还是现代医学, 肾、脑、肠、骨四者都具有重要相关性^[18]。因此, 如何运用中医药调节免疫炎症-肠道微生态紊乱从而防治痛风显得尤为重要。

尿酸钠生物学上具有强致炎性^[14], 易导致痛风患者发生肾、关节、软骨等组织损害的可能, 因此本研究通过建立痛风模型小鼠, 从免疫炎症角度分别探究 QRJD 对痛风模型小鼠的肾、关节、软骨治疗作用。从血清指标结果分析, QRJD 能有效减轻肾功能损害 ($P < 0.05$), 起到护肾作用; 踝关节病理结果显示, QRJD 能有效减少关节滑膜增生、炎症细胞浸润和软骨损害等病理改变; 为进一步探索该方的免疫调节作用, 对免疫组化结果分析发现 QRJD 能上调关节滑膜 IL-10、TGF- β 1 的分泌, 起到抗炎作用。

为明确 QRJD 是否通过肠道菌群治疗痛风, 课题组探究了痛风小鼠肠道菌群的变化。通过 UpSet 分析和 α 多样性分析得知各组的 α 多样性未有明显差异, QRJD 降低了 OUTs 数目, 使其更接近于 CON 组, 并且 QRJD 组 β 多样性也趋向于 CON 组, 说明各样本的肠道菌群多样性相似, 但群落结构存在一定差异。肠道菌群差异分析发现 MOD 组 *Ruminococcaceae* spp.、*Dubosiella* sp.、*Tyzerella* sp.、*Ileibacterium* sp. 和 *Bacteroidales*_spp. 丰度增高 ($P <$

0.05); QRJD 组的 *Lactobacillus* sp.、*Ligilactobacillus* sp. 和 *Bacteroides* sp. 丰度升高 ($P < 0.05$)。 *Ruminococcaceae* spp. 作为一种革兰氏阳性菌, 在临床糖尿病等相关代谢疾病患者中丰度升高^[19], 提示该菌可能与炎症相关, 这与本研究踝关节 HE 病理结果中 MOD 组滑膜出现炎性细胞聚集相符; 另外, 在肠道菌群与肾功能、抗炎因子相关性分析中, *Dubosiella* sp. 作为一种差异菌群, 与 SUA、SCR 呈显著正相关, 与 IL-10、TGF- β 1 呈负相关。已有研究表明 *Dubosiella* sp. 与炎症氧化损伤增加、抗炎能力下降密切相关^[20-21], 但有文献报道 *Ruminococcaceae* spp.、*Dubosiella* sp. 这两种菌能产生短链脂肪酸^[22-23], 而短链脂肪酸能调节机体炎症反应并且 Liang 等^[24] 在临床研究发现高尿酸患者中 *Ruminococcaceae* 的相对丰度减少。目前学界对 *Ruminococcaceae* spp.、*Dubosiella* sp. 在痛风疾病的尿酸代谢作用鲜有研究, 结合前人发现与本次研究的不同结果, 作者推测这种差异与测序的物种、测序深度、饮食密切相关, 未来课题组仍需进一步结合宏基因组测序及代谢组学进一步揭示这两种菌在痛风疾病的作用。而 *Lactobacillus* sp. 作为一种益生菌, 参与了人体中免疫驱动、抗氧化和代谢活动^[25-26], 通过免疫途经保护人体。本研究发现 MOD 组中 *Lactobacillus* sp. 丰度减低, 经 QRJD 治疗后, 该组的 *Lactobacillus* sp. 丰度升高, 血清肾功能得到改善, 与 Morais 等^[27] 研究结论一致。有文献报道, *Lactobacillus* sp. 缺乏能够导致肠道粘膜屏障, 增加炎症^[28]。结合本次研究, 作者认为 *Ruminococcaceae* spp.、*Dubosiella* sp.、*Lactobacillus* sp. 这 3 种肠道菌群在痛风发病和治疗中起到重要作用。

肠道菌群相互作用的网络分析结果显示菌群之间存在相互作用, 当 MOD 组 *Ruminococcaceae* spp. 升高时, 相应引起 *Ligilactobacillus* sp. 的升高。作者推测尿酸代谢障碍、肠道菌群紊乱时, 部分肠道益生菌会代偿性增加, 协助机体增加尿酸排泄, 维持肠道稳态, 同时 *Ruminococcaceae* spp. 的升高, 会减少小鼠肠道 *Bifidobacterium* sp. 的丰度, 且有研究发现这种双歧杆菌在痛风人群肠道中会减少^[29], 本研究也发现两者呈现负反馈调节, 说明两菌之间有拮抗作用。同时 QRJD 特性上调的 *Lactobacillus* sp.、*Ligilactobacillus* sp.、*HT002* sp. 存在共生关系。其中 *HT002* sp. 作为 *Lactobacillaceae* sp. 的下属类

群,两者在尿酸调控中起到协同作用;而 *Desulfovibrio* sp. 与 *Lactobacillaceae* sp. 两者互为拮抗, *Desulfovibrio* sp. 能损伤肠道上皮屏障并诱导巨噬细胞炎症^[30], 因此推测中药复方通过调控 *Lactobacillaceae* sp. 下调 *Desulfovibrio* sp. 的丰度,能有效减轻痛风的炎症发生与进展。

综上所述,课题组研究发现了 QRJD 能通过免疫调节促进抗炎因子 IL-10、TGF- β 1 表达有效减轻关节滑膜增生和炎症浸润,并有效改善肾功能;其中 QRJD 防治痛风的机制推测与调节肠道菌群多样性以及调控 *Ruminococcaceae* spp.、*Dubosiella* sp.、*Lactobacillus* sp. 等差异菌群丰度相关。由于肠道菌群的复杂性及多样性,QRJD 在防治痛风中发挥的作用机制仍值得进一步探索,因此本次研究结果为课题组研究提供了方向性指导,后续我们将采用肠道菌群宏基因组学并扩大样本量,进一步探索肠道相关差异性菌群对痛风疾病的免疫调节机制,同时为肠道菌群与临床治疗应用转化奠定了重要基础。

参考文献:

[1] DEHLIN M, JACOBSSON L, RODDY E. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence, treatment patterns and risk factors [J]. Nat Rev Rheumatol, 2020, 16(7): 380-390.

[2] JAMNIK J, REHMAN S, BLANCO MEJIA S, et al. Fructose intake and risk of gout and hyperuricemia; a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies [J]. BMJ Open, 2016, 6(10): e013191.

[3] 林丛,曹灵,徐睿,等. 巨噬细胞在急性痛风性关节炎中的研究进展 [J]. 中华内科杂志, 2021, 60(8): 773-776.

LIN C, CAO L, XU R, et al. The role of macrophages in gout arthritis [J]. Chin J Intern Med, 2021, 60(8): 773-776.

[4] LIU L, ZHU L, LIU M, et al. Recent insights into the role of macrophages in acute gout [J]. Front Immunol, 2022, 13: 955806.

[5] 蒋仪,何怡曦,廖霞,等. 巨噬细胞极化在痛风炎症机制中的研究 [J]. 中华风湿病学杂志, 2022, 26(6): 410-415.

JIANG Y, HE Y X, LIAO X, et al. Study on macrophage polarization in the mechanism of gout inflammation [J]. Chin J Rheumatol, 2022, 26(6): 410-415.

[6] 曹启江,宋庆凤,姚满,等. 治疗痛风新型药物研究进展 [J]. 广东医学, 2019, 40(10): 1497-1500.

CAO Q J, SONG Q F, YAO M, et al. Research progress of new drugs for gout [J]. Guangdong Med J, 2019, 40(10): 1497-1500.

[7] 郭赫,倪青. 高尿酸血症与痛风的诊断与中医药治疗策略

[J]. 中国临床医生杂志, 2018, 46(11): 1268-1270.

GUO H, NI Q. Diagnosis of hyperuricemia and gout and treatment strategy of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Clin, 2018, 46(11): 1268-1270.

[8] 李建峰. 中医药治疗痛风性关节炎 [J]. 中医药临床杂志, 2019, 31(8): 1468-1469.

LI J F. Analysis on the treatment of gouty arthritis by traditional Chinese medicine [J]. Clin J Tradit Chin Med, 2019, 31(8): 1468-1469.

[9] 施建明,朱延涛. 中医药治疗痛风研究进展 [J]. 新中医, 2020, 52(11): 22-25.

SHI J M, ZHU Y T. Research progress of Chinese medicine in treating gout [J]. J N Chin Med, 2020, 52(11): 22-25.

[10] 魏秋实,何究顺,何敏聪. 治疗痛风性关节炎的清热解毒组合物:CN202310042722. 2. [P]. 2023-06-23.

WEI Q S, HE X S, ME M C. A purgative composition for the treatment of gouty arthritis:CN202310042722. 2 [P]. 2023-06-23.

[11] WANG Z, LI Y, LIAO W, et al. Gut microbiota remodeling: a promising therapeutic strategy to confront hyperuricemia and gout [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 935723.

[12] CAO L, ZHAO T, XUE Y, et al. The anti-inflammatory and uric acid lowering effects of Si-Miao-San on gout [J]. Front Immunol, 2021, 12: 777522.

[13] CHALÈS G. How should we manage asymptomatic hyperuricemia? [J]. Joint Bone Spine, 2019, 86(4): 437-443.

[14] MEI Y, DONG B, GENG Z, et al. Excess uric acid induces gouty nephropathy through crystal formation: a review of recent insights [J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 911968.

[15] 罗佳,李统宇,农复香,等. 高尿酸血症肾病中医与中西医结合研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 9(10): 274-282.

LUO J, LI T Y, NONG F X, et al. Hyperuricemic nephropathy in traditional Chinese medicine and integrated traditional Chinese and western medicine: a review [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 9(10): 274-282.

[16] LIU Y, TANG H, LIU X, et al. Frontline Science: Reprogramming COX-2, 5-LOX, and CYP4A-mediated arachidonic acid metabolism in macrophages by salidroside alleviates gouty arthritis [J]. J Leukoc Biol, 2019, 105(1): 11-24.

[17] OHLSSON C, SJÖGREN K. Osteomicrobiology: a new cross-disciplinary research field [J]. Calcif Tissue Int, 2018, 102(4): 426-432.

[18] 韦雨柔,詹芝玮,魏腾飞,等. 肾-脑-肠-骨轴及其在骨伤科疾病防治中的应用 [J]. 中医正骨, 2022, 34(9): 57-62.

WEI Y R, ZHAN Z W, WEI T F, et al. Kidney-brain-gut-bone

axis and its application in prevention and treatment of orthopedic and traumatic diseases [J]. J Tradit Chin Orthop Traumatol, 2022, 34(9):57-62.

[19] MICHELS N, ZOUIOUCH S, VANDERBAUWHEDE B, et al. Human microbiome and metabolic health: an overview of systematic reviews [J]. Obes Rev, 2022, 23(4): e13409.

[20] ZHUGE A, LI S, LOU P, et al. Longitudinal 16S rRNA sequencing reveals relationships among alterations of gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease progression in mice [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(3): e0004722.

[21] QIAO Y, ZHANG Z, ZHAI Y, et al. Apigenin alleviates obesity-associated metabolic syndrome by regulating the composition of the gut microbiome [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 805827.

[22] XIE J, LI L F, DAI T Y, et al. Short-chain fatty acids produced by Ruminococcaceae mediate α -linolenic acid promote intestinal stem cells proliferation [J]. Mol Nutr Food Res, 2022, 66(1): e2100408.

[23] WAN F, WANG M, ZHONG R, et al. Supplementation with Chinese medicinal plant extracts from *Lonicera hypoglauca* and *Scutellaria baicalensis* mitigates colonic inflammation by regulating oxidative stress and gut microbiota in a colitis mouse model [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 798052.

[24] LIANG M, LIU J, CHEN W, et al. Diagnostic model for predicting hyperuricemia based on alterations of the gut microbiome in individuals with different serum uric acid levels [J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 925119.

[25] HEENEY D D, GAREAU M G, MARCO M L. Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? [J]. Curr Opin Biotechnol, 2018, 49: 140-147.

[26] KUMAR H, BHARDWAJ K, VALKO M, et al. Antioxidative potential of *Lactobacillus* sp. in ameliorating D-galactose-induced aging [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2022, 106(13/14/15/16): 4831-4843.

[27] MORAIS A H A, PASSOS T S, MACIEL B L L, et al. Can probiotics and diet promote beneficial immune modulation and purine control in coronavirus infection? [J]. Nutrients, 2020, 12(6): 1737.

[28] 王敬. 肠道菌群介导的甘草酸治疗大鼠慢性肝损伤机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.

WANG J. Research on the Mechanism of Intestinal Flora-mediated Therapeutic Effect of Glycyrrhizic Acid on Chronic Liver Injury in Rats [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2019.

[29] MÉNDEZ-SALAZAR E O, VÁZQUEZ-MELLADO J, CASIMIRO-SORIGUER C S, et al. Taxonomic variations in the gut microbiome of gout patients with and without tophi might have a functional impact on urate metabolism [J]. Mol Med, 2021, 27(1): 50.

[30] NIE Y, XIE X Q, ZHOU L, et al. *Desulfovibrio fairfieldensis*-derived outer membrane vesicles damage epithelial barrier and induce inflammation and pyroptosis in macrophages [J]. Cells, 2022, 12(1): 89.

[收稿日期] 2023-07-07

田敏萍,张清源,向双娣,等. 蠲哮汤调节三型固有淋巴样细胞治疗肥胖哮喘小鼠机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 13-25.

Tian MP, Zhang QY, Xiang SD, et al. Mechanism of Juanxiao decoction regulating type 3 innate lymphoid cells in treatment of obese asthmatic mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 13-25.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.002

蠲哮汤调节三型固有淋巴样细胞治疗肥胖哮喘小鼠机制

田敏萍¹, 张清源¹, 向双娣¹, 陈玲玲¹, 孙 朋², 薛汉荣^{2*}

(1.江西中医药大学临床医学院,南昌 330006;2.江西中医药大学附属医院,南昌 330006)

【摘要】 目的 探讨蠲哮汤(Juanxiao decoction, JXD)调节三型固有淋巴样细胞(type 3 innate lymphoid cells, ILC3s)治疗肥胖型哮喘的可能作用机制。**方法** 60只BALB/c小鼠随机分为正常组、模型组(60%高脂饲料+OVA)、JXD组(低、中、高剂量分别为8.5、17、34 g/kg)、地塞米松组(1 mg/kg),每组10只。除正常组,其余组高脂饲料喂养12周后,OVA致敏及雾化激发建立肥胖哮喘模型。首次雾化起,JXD低、中、高剂量组及地塞米松组给予相应药物灌胃,正常组和模型组给予等量生理盐水灌胃,持续7 d。苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察肺部病理改变,全自动生化仪检测血脂四项及肺泡灌洗液(alveolar lavage fluid, BALF)炎症细胞分类计数,酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测BALF和血清免疫球蛋白E(immunoglobulin E, IgE)水平,肺组织中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-13(interleukin-13, IL-13)、C-C趋化因子受体17(CCL17)水平,流式细胞术分析肺和外周血中IL-17A⁺ILC3、IL-22⁺ILC3水平,Western blot检测肺组织中STAT3蛋白磷酸化水平。**结果** 与正常组相比,模型组小鼠气道炎性细胞浸润,气道壁增厚,经地塞米松和JXD中、高剂量干预后小鼠肺部炎症情况得到改善,其中高剂量效果更明显。与正常组相比,模型组小鼠肺组织中IL-1 β 、IL-17A⁺ILC3、IL-13、CCL17水平显著升高($P<0.05$),IL-22⁺ILC3比例和P-STAT3蛋白表达水平明显降低($P<0.01$, $P<0.05$);与模型组相比,经JXD中、高剂量干预后肺组织中IL-1 β 、IL-17A⁺ILC3、IL-13、CCL17水平显著下降,IL-22⁺ILC3比例和P-STAT3表达明显增加($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)。**结论** JXD能改善肥胖哮喘小鼠机体炎症环境,减轻肺部炎症和过敏反应,其机制可能与调节ILC3分泌细胞因子功能有关。

【关键词】 蠲哮汤;肥胖型哮喘;流式细胞术;ILC3s;气道炎症

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)05-0013-13

Mechanism of Juanxiao decoction regulating type 3 innate lymphoid cells in treatment of obese asthmatic mice

TIAN Minping¹, ZHANG Qingyuan¹, XIANG Shuangdi¹, CHEN Lingling¹, SUN Peng², XUE Hanrong^{2*}

(1. School of Clinical Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China.

2. Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006)

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of Juanxiao decoction in regulating type 3 innate lymphoid cells (ILC3s) in treating obese asthma. **Methods** Sixty male BALB/c mice were randomly divided into a normal group, model

【基金项目】 国家自然科学基金(81960802,81760801)。

【作者简介】 田敏萍(1998—),硕士研究生,研究方向:中医肺系疾病的临床与基础研究。E-mail:2427657395@qq.com

【通信作者】 薛汉荣(1969—),二级教授,博士生导师,研究方向:中医肺系疾病的临床与基础研究。E-mail:xuehanrong99@163.com

group (high-fat diet + OVA), Juanxiao decoction groups (low, middle, and high doses of 8.5, 17, and 34 g/kg, respectively), and dexamethasone group (1 mg/kg) with 10 mice in each group. Except for the normal group, the other groups were fed a high-fat diet for 12 weeks, and OVA sensitization by inhalation of an atomized OVA solution was used to establish the obese asthma model. From the first inhalation, the low-, medium-, and high-dose groups of Juanxiao decoction and the dexamethasone group were administered corresponding drugs by gavage, whereas normal and model groups were administered equal amounts of saline by gavage for 7 days. The state of mice and changes in typical symptoms of obese asthma were observed. At 24 hours after the last challenge, a fully automated biochemical analyzer was used to assess four blood lipids and count inflammatory cells in alveolar lavage fluid (BALF). Hematoxylin-eosin staining was used to observe morphological changes in lung tissue and abdominal fat. Enzyme-linked immunosorbent assays were used to measure the immunoglobulin E in BALF and serum, and interleukin (IL)-1 β , IL-13, and mouse thymus activation regulating chemokine (CCL17) in lung tissue. IL-17A⁺ ILC3 and IL-22⁺ ILC3 in lung tissue and peripheral blood were analyzed by flow cytometry. Western blot was used to detect expression of P-STAT3 protein in lung tissue. **Results** Compared with the normal group, model group mice showed infiltration of airway inflammatory cells and thickening of airway walls. However, compared with the model group, lung inflammation in dexamethasone and Juanxiao decoction groups was improved, especially in middle- and high-dose groups. Compared with the normal group, IL-1 β , IL-17A⁺ ILC3, IL-13, and CCL17 in lung tissue of the model group were significantly increased ($P < 0.05$), whereas the proportion of IL-22⁺ ILC3 and expression of P-STAT3 were significantly decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with the model group, IL-1 β , IL-17A⁺ ILC3, IL-13, and CCL17 in lung tissue were significantly decreased and the proportion of IL-22⁺ ILC3 and expression of P-STAT3 were significantly increased in middle- and high-dose Juanxiao decoction groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusions** Juanxiao decoction improves the inflammatory environment of obese asthmatic mice and alleviates lung inflammatory and allergic reactions. Its mechanism may be related to regulating secretion of cytokines by ILC3s.

【Keywords】 Juanxiao decoction; obese asthma; flow cytometry; ILC3s; airway inflammation

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

支气管哮喘(简称哮喘)是一种常见的慢性呼吸系统疾病,以慢性气道炎症和气道高反应为主要特征。目前,全球哮喘患病人数已达 3 亿,我国成人哮喘患病率高达 4.2%,其发病率与死亡率仍呈上涨趋势^[1-2]。现代研究发现肥胖会诱发哮喘,降低肺功能,加剧机体分泌炎症因子介导的气道炎症和气道高反应,因此临床上肥胖型哮喘更容易发展为重症,治疗较为困难^[3-5]。中医药在治疗肥胖哮喘中具有独特认识和优势^[6-7]。哮喘属于中医“哮病”范畴,诱因是“伏痰”引动。《症因脉治》中言:“哮病之因,痰饮留伏郁结而成,潜伏于内”,故治法多提倡以“去痰为先”。《丹溪心法》多次论及“肥白人多痰湿”,可见哮喘与肥胖病因相似,两者都与“痰”关系密切^[8-9]。痰来自津,瘀本乎血,津血同源互生,痰、瘀在疾病过程中往往相互转化,胶结不解。哮喘和肥胖的血液流变学均表现为高粘状态,说明肥胖哮喘病因病机与“痰瘀”相关^[10-11]。

研究表明,三型固有淋巴样细胞(type 3 innate lymphoid cells, ILC3s)与肥胖型哮喘发病关系密切。肥胖导致体内白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)分泌增多,诱导 ILC3 激活分泌白细胞介素-17A

(interleukin-17A, IL-17A), IL-17A 作为促炎和促纤维因子能将中性粒细胞募集到肺部导致气道粘液高分泌和组织损伤。而哮喘发生后同样由 ILC3 分泌的白细胞介素-22(interleukin-22, IL-22)能诱导肺部 STAT3 蛋白磷酸化,减少炎症因子白细胞介素-13(interleukin-13, IL-13)和小鼠胸腺活化调节趋化因子(CCL17)的产生,抑制 CCL17 对 Th2 细胞及嗜酸性粒细胞向肺部募集从而抑制肺部炎症发生^[12-14]。课题组前期已验证疏利气机、涤痰行瘀方(蠲哮汤, JXD)能显著改善哮喘患者肺功能,降低肺部炎症因子水平,减轻气道炎症和气道重塑^[15-17],然而 JXD 作用于 ILC3 治疗肥胖哮喘的机制尚不清楚,本实验通过建立肥胖哮喘小鼠模型,旨在明确 JXD 对 ILC3 的调节作用,为其临床应用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 BALB/c 小鼠 60 只,体重 16~18 g, 4~6 周龄,购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2021-0002],饲养于江西中医药

大学实验动物房[SYXK(赣)2022-0002],温度 20~25℃、湿度 55%~60%、自由进食、饮水,本实验研究通过江西中医药大学伦理委员会批准(JZLLSC20230626011),小鼠饲养和实验过程中严格遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

蠲痹汤制备。药物组成:葶苈子 10 g、鬼箭羽 10 g、青皮 10 g、陈皮 10 g、槟榔 10 g、牡荆子 15 g、大黄 10 g、生姜 10 g,将所有药物按 1:1:1:1:1:1:1.5:1:1 比例配制,经浸泡、煎熬、过滤浓缩成药汁(1.7 g/mL 含生药量),进行包装,置于 4℃ 冰箱保存。中药饮片由江西中医药大学附属医院提供,各饮片均由江西中医药大学附属医院主管中药师陈浩进行鉴定,符合 2020 年版《中华人民共和国药典》规范;醋酸地塞米松片用无水乙醇溶解再与 PBS 混合(DXM,浙江仙琚制药股份有限公司,批号:191064)。

卵清蛋白(Sigma,货号:A5503);HE 染色试剂盒(Servicebio,货号:G1003);IL-1 β 、IL-13、CCL17 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(泉州睿信,货号:RX203063M、RX203070M、RX202323M);免疫球蛋白(Ig)E 试剂盒(爱博泰克,货号:RK00170);60%高脂饲料(协同生物,货号:XT19033);小鼠 eFluor 450-Lineage、PE-ROR γ t、FITC-CD127、APC-IL-22、PECY7-CD45、PCY5.5-IL-17A 抗体、FVD、Foxp3/转录因子染色液组合套件(eBioscience,货号:88-7772-72、12-6988-80、11-1271-81、17-7222-80、25-0451-81、45-7177-80、65-0865-14、00-5523);CD16/CD32(2.4G2)(赛信通,货号:88280S);PMA(MCE,货号:HY-18739);离子霉素(索莱宝,货号:II2200);胶原酶 I(翌圣,货号:40507ES60);STAT3 抗体(Affinity Biosciences,货号:AF6294);兔抗 P-STAT3(Tyr705)抗体(博奥森,货号:bs-1658R); β -actin 兔单克隆抗体、HRP 标记羊抗小鼠二抗(Proteintech,货号:66009-1-Ig、SA00001-1);HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗(Jackson,货号:111-035-003)。全自动生化分析仪(深圳 LWPOCT 公司,型号:PBC22A Plus);酶标检测仪(美国 BioTeK 公司,型号:Epoch);病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号:RM2016);PARI Turbo BOY 型超声雾化器(德国百瑞有限公司);流式细胞检测仪(美国 BD 公司,型号:LSRF ortessa)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组、造模及给药

小鼠适应性饲养 7 d 后,随机分为 6 组:正常组、模型组、JXD 低、中、高剂量组及地塞米松组,每组 10 只。除正常组,其余组小鼠采用 60%高脂饲料喂养,正常组喂食常规维持饲料,持续 12 周,判断肥胖小鼠模型制备成功的标准:((造模动物体质量-正常动物体质量)/正常动物体质量) $\geq 20\%$ ^[18]。之后参考文献^[19-21]的方法并进一步改进制备哮喘模型,除正常组外各组小鼠分别于第 1 天和第 8 天腹腔注射 50 μ g OVA+2 mg 氢氧化铝混悬液 0.2 mL,第 21 天开始用 1% OVA 雾化吸入,每天 1 次,每次 30 min,持续 7 d,正常组小鼠用同体积生理盐水代替致敏和激发。以模型组小鼠出现哮喘症状,肺组织支气管出现明显炎性细胞浸润、支气管平滑肌细胞增生等典型肺部病理改变作为判断造模成功的标准^[21]。

以成人体重 60 kg 计算,临床成人每日生药用量为 1.4 g/kg,根据人与小鼠体表面积药物剂量换算系数计算^[22],设 JXD 低、中、高剂量分别为 8.5、17、34 g/kg,不同浓度药液用白开水稀释。于每次雾化激发前 30 min 进行灌胃给药,其中 JXD 低、中、高剂量每日灌服 2 次,地塞米松组则按每 12 h 用地塞米松 1 mg/kg 灌服,其余组用等体积生理盐水代替灌胃,共持续 7 d。

1.3.2 样本收集

于末次雾化激发后 24 h 内称重、取材,采用 20%乌拉坦麻醉,取血后处死,将血液进行分装并做好标记,用于后续流式分析及嗜酸性粒细胞计数。收集肺泡灌洗液用于 IgE 含量测定和炎症分类计数,血清用于 IgE 含量测定及血脂四项检测。取未经灌洗的肺组织用于 HE 病理染色、ELISA 检测、流式细胞术分析及 Western blot 检测。

1.3.3 指标检测

(1) 观察各组小鼠一般情况及计算 Lee's 指数

全程记录观察小鼠的状态,记录腹腔脂肪、肝重量,测量身长(小鼠鼻尖到肛门外沿的距离)计算 Lee's 指数^[23]=(体重/g/体长/cm $\times 1000$)^{1/3}。

(2) ELISA 法检测肺组织炎症因子水平

肺组织称重后剪碎(冰上进行),按 1:9 的重量体积比加入 PBS(1 g 肺组织加入 9 mL PBS),置于匀浆机中充分研磨,离心取上清,加入蛋白酶抑制剂(蛋白酶抑制剂与组织上清液比例为 1:100),

采用 ELISA 试剂盒对各组小鼠肺组织中炎症因子 IL-1 β 、IL-13、CCL17 进行检测,操作过程严格按照检测说明书上的步骤分别进行检测。

(3) 肺组织及外周血流式检测

肺组织单细胞悬液制备:预冷的 PBS 中清洗干净肺组织后尽量剪碎,加入含 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 HBSS 溶液和胶原酶 I (2.5 mg/mL),置于 37 °C 摇床消化 6 h。用 70 μ m 细胞过滤器收集消化液,红细胞裂解液去除红细胞。将 3 mL 70% Percoll 梯度溶液铺于锥形离心管底,3 mL 30% Percoll 梯度溶液轻柔叠加在 70% Percoll 上,两层液面有一明显分界线。将单细胞悬液轻铺在 30% Percoll 上,1100 r/min 室温离心 30 min,轻柔取出离心管,收集 30%~70% 层之间不透明层即为淋巴细胞。外周血收集于肝素钠抗凝管后加入红细胞裂解液,室温孵育 5 min。染色前用 PMA 和离子霉素刺激 4 h,收集细胞前 2 h 添加布雷菲德菌素 A,随后加入 CD16/32 (1:100,200 μ L/T),4 °C 孵育 30 min。ILC3 染色方案:CD45⁺ Lin⁻ CD127⁺ ROR γ t⁺。其中 Lineage 包含以下抗体:小鼠 CD3 (17A2)、CD45R (B220) (RA3-6B2)、CD11b (M1/70)、TER-119 (TER-119)、Ly-G6 (Gr-1) (RB6-8C5) 抗体。

ILC3 的染色流程:细胞表面染色,将死活染料溶 (FVD,0.5~1 μ L/T) 与 CD45 (0.125 μ g/T)、Lin (20 μ L/T)、CD127 (1 μ g/T) 抗体在流式染色缓冲液中混合加入样本,终染色体积为 100 μ L,全程 4 °C 避光孵育 30 min,结束后清洗细胞 2 次。胞内染色,样本中加入 1 mL Foxp3 固定/破膜工作液并脉冲涡旋,4 °C 避光孵育 60 min。加入 2 mL 1X 破膜液,室温 900 r/min 离心 5 min 去上清,在 1X 破膜液中重悬沉淀,保留体积 100 μ L。加入 ROR γ t-PE (0.5 μ g/T)、IL-22-APC (0.25 μ g/T)、IL-17A-PerCP-Cy5.5 (0.03 μ g/T),室温下避光孵育 30 min。结束后用 2 mL 1X 破膜液室温 900 r/min 离心 5 min,弃上清,重复 1 次,将细胞重悬于流式染色缓冲液中,使终浓度为 1 $\times$ 10⁶/mL 上机检测。结果采用 FlowJo V10 软件进行分析。

(4) 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测肺组织 STAT3、P-STAT3 蛋白表达

提取肺组织总蛋白,用 BCA 法测定其蛋白浓度,Loading buffer 缓冲稀释高温变性,按蛋白浓度计算每孔上样量进行上样、电泳、转膜和封闭,4 °C 一抗孵育 (STAT3 和 P-STAT3 1:1000、 β -actin 1:

5000)、TBST 洗膜、二抗 (HRP 标记的二抗山羊抗兔 IgG、羊抗小鼠二抗 1:5000) 孵育、TBST 洗膜等步骤,ECL 化学发光显影,使用 Image J 软件定量蛋白条带灰度值,实验重复 3 次。

(5) HE 染色观察小鼠肺组织支气管及脂肪组织病理形态学变化

取小鼠右肺组织及腹腔脂肪组织,称重后用生理盐水冲洗干净表面血液及杂质置于 10% 甲醛中固定,按照试剂说明书操作进行组织脱水、透明、石蜡包埋、切片与烤片、苏木素、伊红染色,使用中性树胶封片,通风处晾干,在光学显微镜下观察组织病理形态学变化。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 25.0 软件对数据进行分析处理,数据表示方式为平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$),各组数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验 (LSD 法),方差不齐采用非参数秩和检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 JXD 对肥胖哮喘小鼠的一般情况、体重、脂肪重量、肝重量及 Lee's 指数的影响

造模结束后,与正常组相比,模型组小鼠出现体重增加、活动度下降、皮毛蓬松无光泽、反应迟钝、抓耳挠腮、弓背、点头呼吸、口鼻分泌物增加、呛咳等一系列肥胖哮喘症状改变,蠲哮汤组和地塞米松组均有不同程度改善。与正常组相比,模型组小鼠体重、腹腔脂肪重量显著增加, Lee's 指数明显增高 ($P<0.01$, $P<0.001$),说明肥胖模型建立成功;与模型组相比,经 JXD 高剂量治疗后肥胖哮喘小鼠体重、Lee's 指数和腹腔脂肪重量明显下降 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$),见表 1。

2.2 JXD 对肥胖哮喘小鼠血脂水平的影响

与正常组相比,模型组小鼠血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白 (LDL) 显著升高 ($P<0.05$, $P<0.01$),高密度脂蛋白 (HDL) 显著降低 ($P<0.001$),说明已出现高胆固醇血症脂代谢紊乱。与模型组相比,JXD 高剂量组小鼠 TC、TG、LDL 显著降低 ($P<0.01$, $P<0.05$),HDL 显著升高 ($P<0.001$),表明 JXD 能改善肥胖哮喘小鼠血脂水平,见表 2。

2.3 JXD 对肥胖哮喘小鼠 BALF 和血清中 IgE 含量,肺组织中 IL-1 β 、IL-13、CCL17 水平的影响

与正常组比,模型组小鼠 BALF 和血清中 IgE

表 1 各组小鼠体重、脂肪重量、肝重量及 Lee's 指数的变化($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Changes in body weight, fat weight, liver weight and Lee's index in each group of mice

组别 Groups	剂量 Dose	体质量/g Body weight	腹腔脂肪湿重/g Fat weight	肝重量/g Liver weight	Lee's 指数 Lee's index
正常组 Nomal group	/	25.10±0.38	0.21±0.60	1.24±0.07	13.84±0.07
模型组 Model group	/	31.00±0.52**	0.58±0.10***	1.40±0.03	15.09±0.11***
地塞米松组 Dexamethasone group	1 mg/kg	27.00±1.00	0.45±0.06*	1.31±0.10	14.25±0.16
薏苡汤低剂量组 Low-dose of JXD group	8.5 g/kg	27.60±1.41	0.51±0.07**	1.05±0.07##	14.29±0.26
薏苡汤中剂量组 Middle-dose of JXD group	17 g/kg	27.10±1.54	0.38±0.05#	1.34±0.08	14.15±0.24
薏苡汤高剂量组 High-dose of JXD group	34 g/kg	26.10±1.18#	0.32±0.06##	1.34±0.07	13.77±0.17###

注：与正常组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ；与模型组相比，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ，### $P<0.001$ 。
Note. Compared with normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

表 2 各组小鼠血脂四项水平($\text{mmol/L}, \bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Levels of four items of blood lipids in each group of mice

组别 Groups	剂量 Dose	总胆固醇/(mmol/L) TC	甘油三酯/(mmol/L) TG	低密度脂蛋白/(mmol/L) LDL	高密度脂蛋白/(mmol/L) HDL
正常组 Nomal group	/	2.14±0.11	0.76±0.09	0.14±0.02	2.64±0.13
模型组 Model group	/	3.42±0.21**	1.21±0.21*	0.23±0.02**	1.60±0.06***
地塞米松组 Dexamethasone group	1 mg/kg	3.37±0.50*	0.98±0.17	0.20±0.02	3.09±0.26###
薏苡汤低剂量组 Low-dose of JXD group	8.5 g/kg	2.96±0.21	1.02±0.13	0.20±0.02	2.42±0.13##
薏苡汤中剂量组 Middle-dose of JXD group	17 g/kg	3.11±0.19	0.91±0.14	0.17±0.02#	2.55±0.16###
薏苡汤高剂量组 High-dose of JXD group	34 g/kg	2.80±0.18	0.63±0.07##	0.17±0.01#	2.71±0.15###

注：与正常组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ；与模型组相比，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ，### $P<0.001$ 。
Note. Compared with normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

水平显著增高($P<0.05, P<0.001$)，与模型组比，经地塞米松和 JXD 中、高剂量治疗后 IgE 水平显著下降($P<0.05, P<0.01$)，见图 1。与正常组比，模型组小鼠肺组织内 IL-1 β 、IL-13、CCL17 含量显著升高($P<0.05, P<0.01, P<0.001$)；与模型组比，经 JXD 中、高剂量组和地塞米松治疗后，小鼠肺组织内 IL-1 β 、IL-13、CCL17 含量明显降低($P<0.05, P<0.01, P<0.001$)，表明中、高剂量薏苡汤能有效抑制肥胖哮喘导致的体内炎症因子水平升高和过敏反应，见表 3。

2.4 JXD 对肥胖哮喘小鼠肺组织及外周血内 IL-17A⁺ILC3、IL-22⁺ILC3 细胞水平的影响

与正常组小鼠相比，模型组小鼠肺组织及外周血中 IL-17A⁺ILC3 细胞比例显著增加($P<0.001$)，IL-22⁺ILC3 细胞比例显著减少($P<0.01, P<0.001$)；与模型组相比，JXD 中、高剂量组小鼠肺组

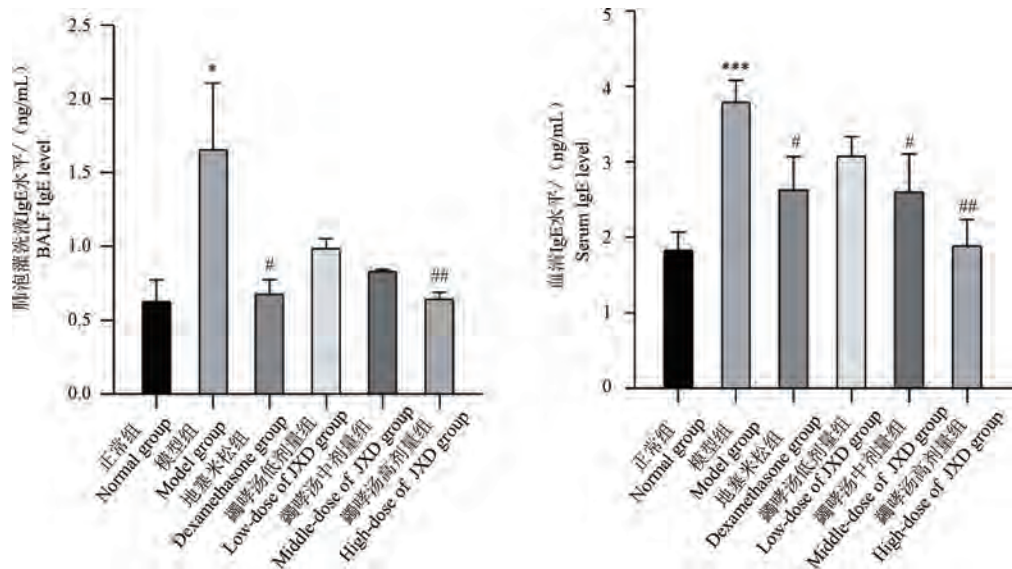
织及外周血中 IL-17A⁺ILC3 细胞比例显著减少($P<0.01, P<0.001$)，IL-22⁺ILC3 细胞比例显著增加($P<0.05, P<0.01, P<0.001$)，见图 2、图 3。

2.5 JXD 对肥胖哮喘小鼠肺组织 STAT3、P-STAT3 蛋白表达水平的影响

与正常组小鼠相比，模型组小鼠肺组织内 STAT3 蛋白磷酸化水平显著下降($P<0.01$)；与模型组相比，经地塞米松和 JXD 治疗后，小鼠肺组织内 STAT3 蛋白磷酸化水平均有增高，其中 JXD 高剂量组显著升高($P<0.05$)，表明高剂量薏苡汤干预能有效上调肥胖哮喘小鼠肺组织内 IL-22⁺ILC3 水平，增强 STAT3 蛋白磷酸化表达，见图 4。

2.6 JXD 对肥胖哮喘小鼠 BALF 和外周血中炎症细胞水平的影响

与正常组相比，模型组小鼠 BALF 中白细胞、中



注:与正常组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$;与模型组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 1 各组小鼠 BALF 和血清总 IgE 水平($\bar{x}\pm s, n=10$)

Note. Compared with normal group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$. Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 1 BALF and serum total IgE levels of mice in each group

表 3 各组小鼠肺组织中 IL-1 β 、IL-13 和 CCL17 水平($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Levels of IL-1 β , IL-13, and CCL17 in lung tissues of mice in each group

组别 Groups	剂量 Dose	IL-1 β /(pg/mL)	IL-13 /(pg/mL)	CCL17 /(pg/mL)
正常组 Nomal group	/	52.80 $\pm$ 8.74	2.80 $\pm$ 0.26	31.67 $\pm$ 2.19
模型组 Model group	/	113.90 $\pm$ 13.80**	4.90 $\pm$ 0.33***	42.33 $\pm$ 3.42*
地塞米松组 Dexamethasone group	1 mg/kg	51.14 $\pm$ 19.66##	2.10 $\pm$ 0.20###	28.05 $\pm$ 2.63##
罂粟汤低剂量组 Low-dose of JXD group	8.5 g/kg	102.69 $\pm$ 16.50	3.16 $\pm$ 0.22	32.42 $\pm$ 2.59#
罂粟汤中剂量组 Middle-dose of JXD group	17 g/kg	46.59 $\pm$ 14.70##	2.65 $\pm$ 0.24###	29.76 $\pm$ 2.53##
罂粟汤高剂量组 High-dose of JXD group	34 g/kg	61.71 $\pm$ 8.31#	2.95 $\pm$ 0.17###	26.75 $\pm$ 2.92###

注:与正常组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与模型组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ 。

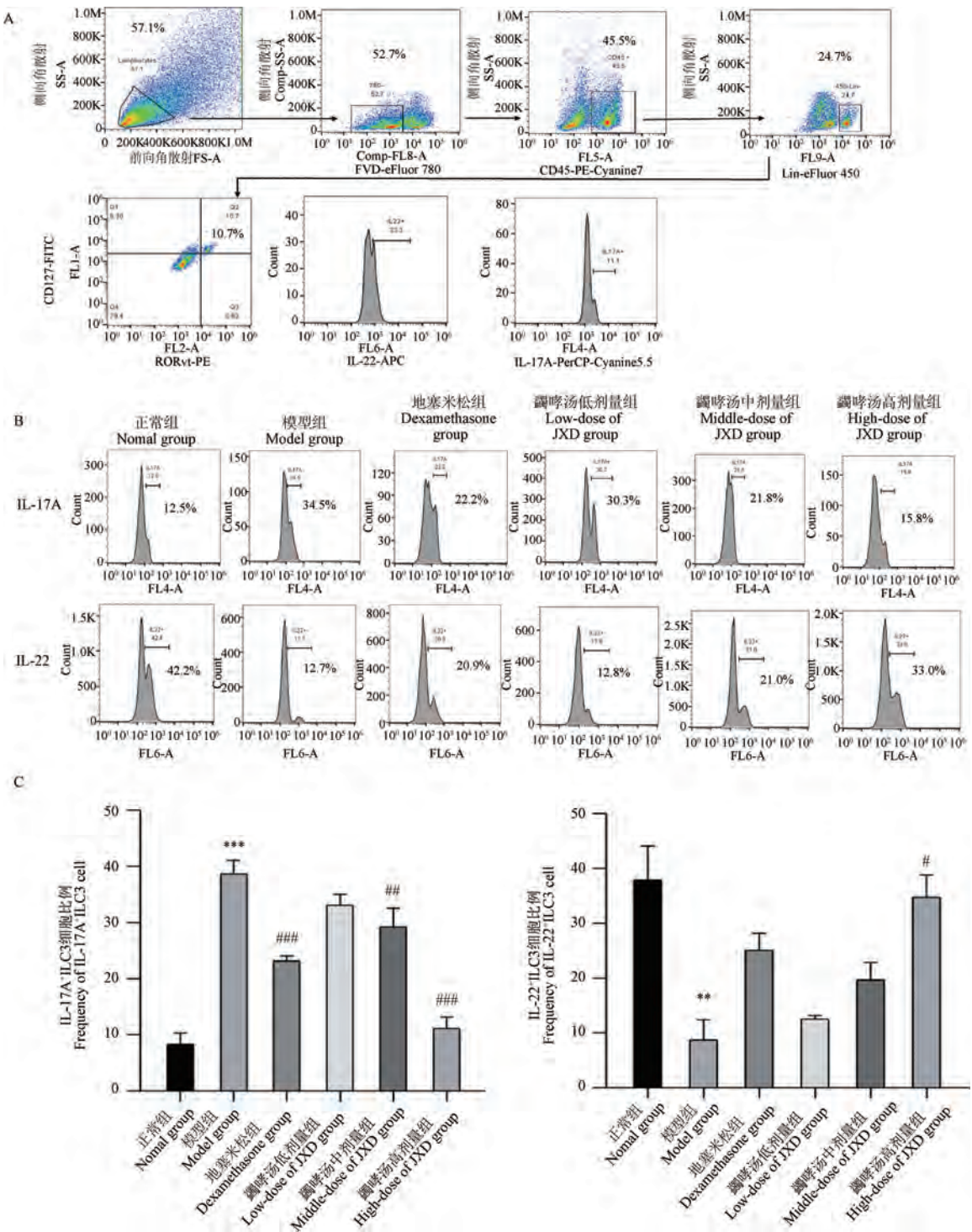
Note. Compared with normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with model group # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

性粒细胞和淋巴细胞数量显著增多 ($P<0.05, P<0.01$), 外周血中嗜酸性粒细胞显著增多 ($P<0.001$);与模型组相比, JXD 中、高剂量组 BALF 中白细胞、中性粒细胞和淋巴数量, 外周血中嗜酸性粒细胞数量显著降低 ($P<0.001, P<0.01, P<0.05$), 见表 4。

2.7 JXD 对肥胖哮喘小鼠支气管肺组织及腹腔脂肪病理变化的影响

与正常组相比, 模型组小鼠肺组织出现典型哮喘炎症改变, 支气管及血管周围炎性细胞浸润明

显, 气道平滑肌增生管腔狭窄, 肺泡结构破坏;与模型组相比, 地塞米松组和罂粟汤在炎性细胞浸润和气管受损上均有改善, 其中地塞米松组和 JXD 中、高剂量组改善更明显。与正常组相比, 模型组小鼠腹腔脂肪细胞变形, 直径明显增大, 细胞边缘模糊不清, 排列不规则, 说明高脂饮食喂养使得小鼠腹腔脂肪堆积;与模型组相比, JXD 中、高剂量组小鼠脂肪细胞直径明显减小, 形状较为规则。表明中、高剂量罂粟汤能有效降低肥胖哮喘小鼠肺组织内炎症细胞水平, 减轻肺部病理损伤。如图 5。

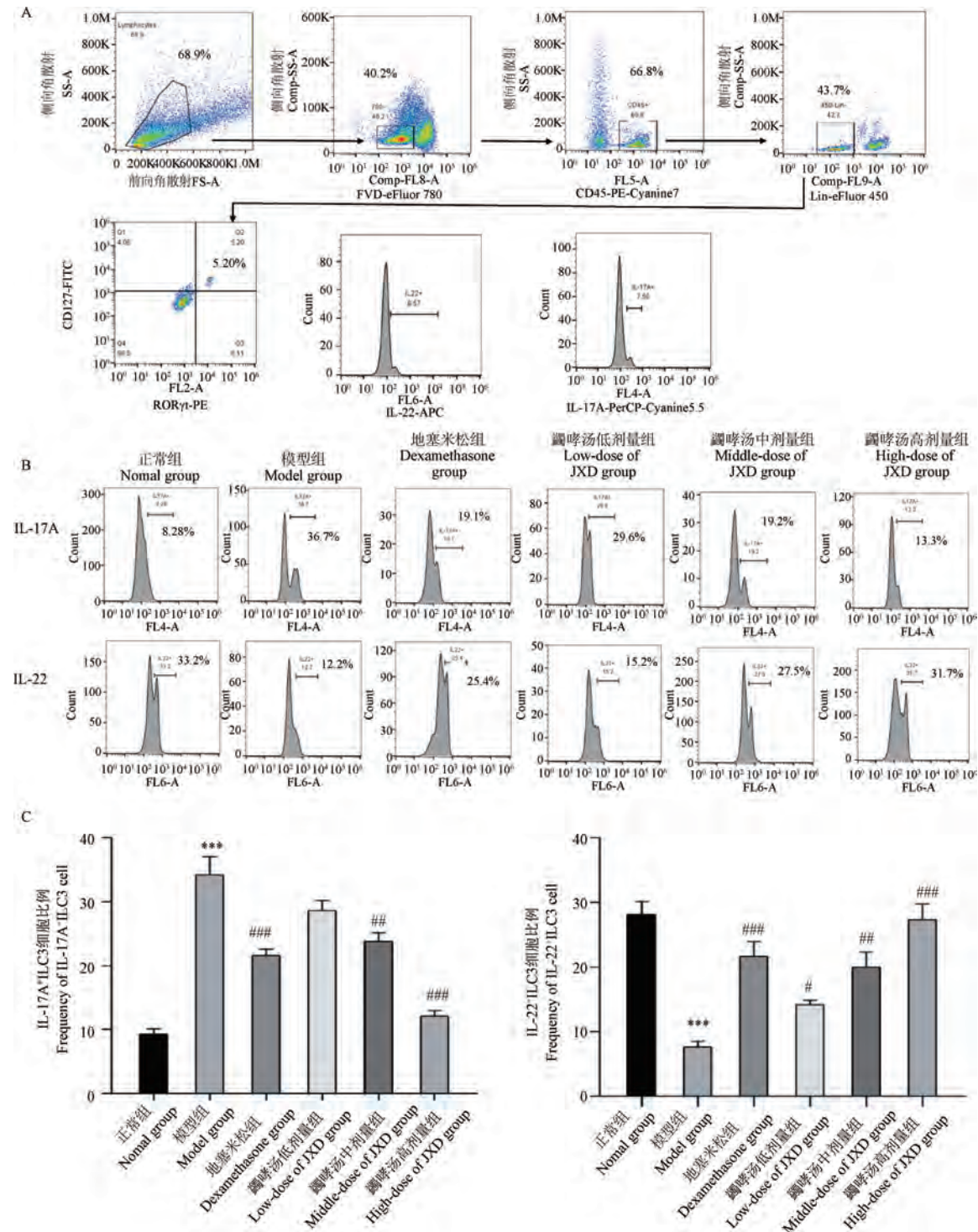


注:A:流式细胞术检测小鼠肺组织 IL-17A⁺ILC3、IL-22⁺ILC3 比例;B:流式细胞术检测各组小鼠肺组织 IL-17A⁺ILC3、IL-22⁺ILC3 比例直方图;C:IL-17A⁺ILC3、IL-22⁺ILC3 比例的定量分析统计图。与正常组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与模型组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ 。

图 2 各组小鼠肺组织 IL-17A⁺ILC3 和 IL-22⁺ILC3 细胞流式图($\bar{x}\pm s, n=4$)

Note. A, Proportion of IL-17A⁺ILC3 and IL-22⁺ILC3 in lung tissue of mice were detected by flow cytometry. B, Proportion histograms of 17A⁺ILC3 and IL-22⁺ILC3 in lung tissue of mice in each group were detected by flow cytometry. C, Statistical chart of quantitative analysis of the proportion of IL-17A⁺ILC3 and IL-22⁺ILC3. Compared with normal group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

Figure 2 Frequency of IL-17A⁺ILC3 and IL-22⁺ILC3 cells in the lung tissues of mice in each group

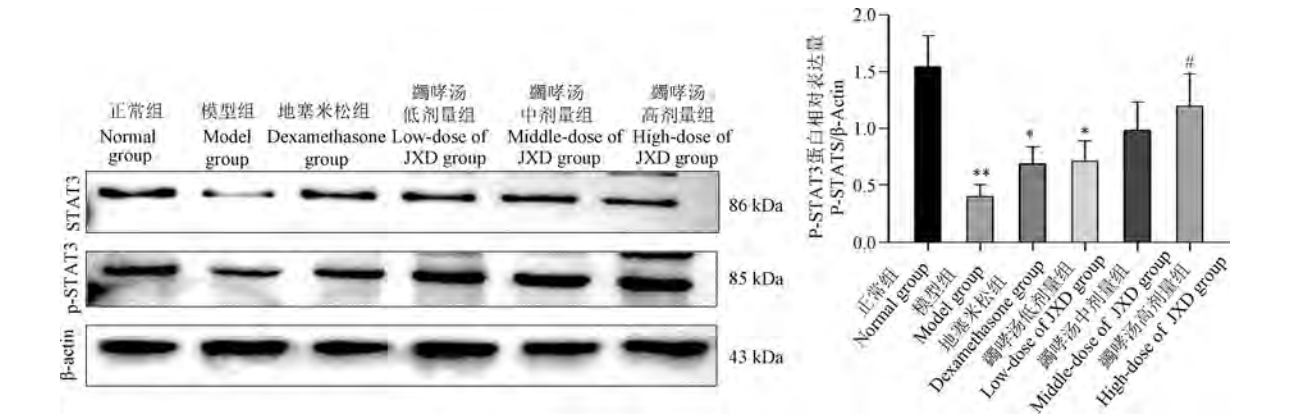


注:A:流式细胞术检测小鼠外周血 IL-17A⁺ILC3、IL-22⁺ILC3 比例;D:流式细胞术检测各组小鼠外周血 IL-17A⁺ILC3、IL-22⁺ILC3 比例直方图;C:IL-17A⁺ILC3、IL-22⁺ILC3 比例的定量分析统计图。与正常组相比,****P*<0.001;与模型组相比,#*P*<0.05,##*P*<0.01,###*P*<0.001。

图3 各组小鼠外周血中 IL-17A⁺ILC3 和 IL-22⁺ILC3 细胞流式图($\bar{x}\pm s,n=4$)

Note. A, Proportion of IL-17A⁺ILC3 and IL-22⁺ILC3 in peripheral blood of mice were detected by flow cytometry. B, Proportion histograms of 17A⁺ILC3 and IL-22⁺ILC3 in peripheral blood of mice in each group were detected by flow cytometry. C, Statistical chart of quantitative analysis of the proportion of IL-17A⁺ILC3 and IL-22⁺ILC3. Compared with normal group, ****P*<0.001. Compared with model group, #*P*<0.05, ##*P*<0.01, ###*P*<0.001.

Figure 3 Frequency of IL-17A⁺ILC3 and IL-22⁺ILC3 cells in the blood of mice in each group



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

图 4 各组小鼠肺组织 STAT3、P-STAT3 蛋白表达水平($\bar{x}\pm s, n=3$)

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

Figure 4 STAT3 and P-STAT3 protein expression levels in lung tissues of mice in each group

表 4 各组小鼠 BALF 及外周血炎症细胞分类计数($10^9/L, \bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Classified counts of inflammatory cells in BALF and peripheral blood of mice in each group

组别 Groups	剂量 Dose	外周血 Peripheral blood		肺泡灌洗液 BALF		
		嗜酸性粒细胞 Eosinophilic granulocyte		白细胞 White blood cell	中性粒细胞 Neutrophil	淋巴细胞 Lymphocyte
正常组 Normal group	/	4.33±0.95		2.42±0.31	0.04±0.03	2.35±0.28
模型组 Model group	/	19.83±1.90***		10.47±2.31*	0.50±0.06**	7.17±1.20*
地塞米松组 Dexamethasone group	1 mg/kg	11.33±1.80##		3.50±0.59	0.14±0.02	5.76±0.72
罂粟汤低剂量组 Low-dose of JXD group	8.5 g/kg	16.17±1.67***		8.73±1.14*	0.46±0.12**	5.22±0.81
罂粟汤中剂量组 Middle-dose of JXD group	17 g/kg	10.67±0.80###		2.39±0.56##	0.20±0.05	2.24±0.49#
罂粟汤高剂量组 High-dose of JXD group	34 g/kg	7.50±0.99###		2.79±0.48#	0.06±0.02##	2.18±0.54##

注:与正常组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与模型组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ 。

Note. Compared with normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

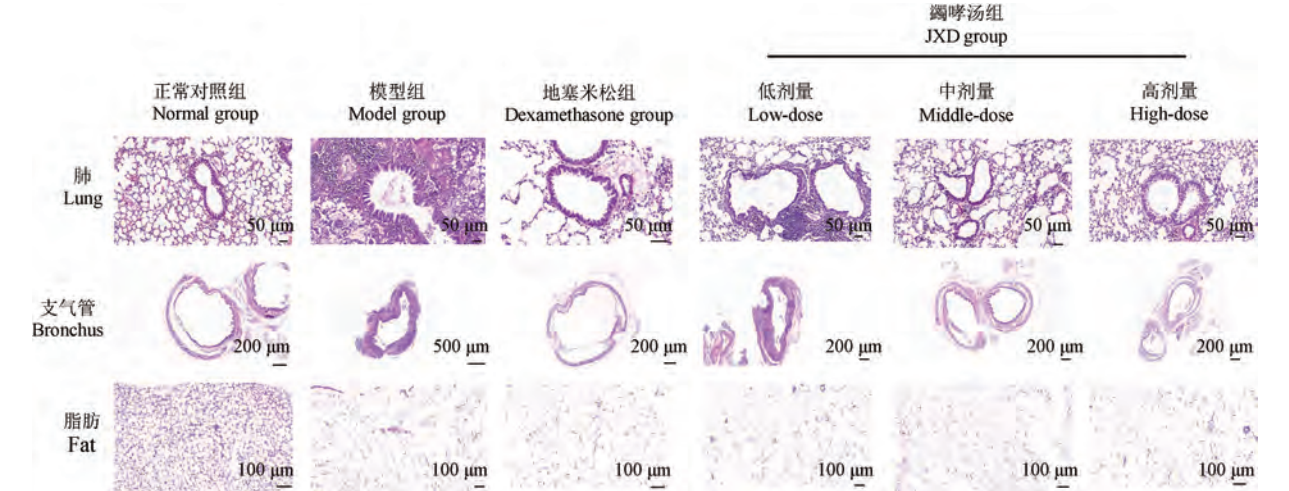


图 5 各组小鼠肺组织及脂肪组织 HE 染色病理学切片

Figure 5 HE stained pathological sections of lung and adipose tissues of mice in each group

3 讨论

哮喘作为一种复杂的异质性疾病,因具有不同的临床表型是其难以控制的主要原因。肥胖型哮喘临床症状重,激素治疗反应差且发病机制尚未完全阐明,病情往往控制不佳,寻找补充及替代疗法是关键^[24]。中医药防治哮喘历史悠久,中医理论认为“痰瘀伏肺”是哮喘发病的根本^[25]。本研究所用蠲哮汤为国医大师洪广祥^[26]针对“痰瘀伏肺”为哮证反复发作的夙根,并根据《内经》“肺苦气上逆,急食苦以泻之”的理论为基础创制而成。由葶苈子、鬼箭羽、青皮、陈皮、槟榔、牡荆子、大黄、生姜八味药组成,药用葶苈子、青皮、陈皮、槟榔、牡荆子疏利气机,泻肺除壅,俾气顺则痰降,气行则痰消之意;又“肺与大肠相表里”,肺病累及大肠传导功能失司,进一步影响肺气宣发肃降,故配伍大黄通腑气,意在通腑泻肺,化浊降逆,缓解肺气壅滞之喘证;鬼箭羽活血祛瘀兼有抗过敏作用,与逐瘀除壅之大黄相配,更能增强行瘀之力;哮喘发作多感于外邪,配伍生姜散寒化饮,生姜性温,又能防止葶苈子、大黄苦寒伤胃,诸药合用共奏疏利气机、涤痰行瘀、调节肺脾气机之功,对于哮喘急性发作具有良好临床疗效。本研究结果显示,中、高剂量蠲哮汤能有效抑制肥胖,改善肥胖哮喘小鼠血脂水平,减轻气道炎症和肺组织损伤。

ILC3 作为一种固有免疫细胞与肥胖型哮喘的发生发展密切相关^[27],ILC3 是近十年才被定义的一群新型天然免疫细胞,属于固有淋巴细胞家族,主要分布于肠道、肺及皮肤等黏膜组织,在机体免疫调节、组织修复和淋巴发育中起重要作用^[28]。不同于 T、B 淋巴细胞,ILC3 在分化过程中没有经历 Rag 基因的重排过程,通过接受刺激,迅速活化并分泌细胞因子参与黏膜免疫反应^[29]。ILC3 细胞发育和功能受转录因子 ROR γ t 调控,成熟的 ILC3 在 IL-1 β 和 IL-23 刺激下活化,分泌细胞因子 IL-17 和 IL-22 表达 IL-17A、IL-22 mRNA^[30]。研究表明,高脂饮食 (high-fat diet, HFD) 喂养导致肥胖哮喘小鼠体内巨噬细胞分泌 IL-1 β 增加,诱导 ILC3 激活分泌大量 IL-17A。IL-17A 具有极为广泛的生物学效应,不仅能通过促进成纤维细胞和气道上皮细胞释放 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 等多种细胞因子使中性粒细胞在气道募集,促进气道上皮细胞黏蛋白表达,刺激气道粘液分泌,造成气道损伤,同时又能通过促进前炎

性细胞因子 IL-1 β 、IFN- γ 和 TNF- α 的释放来放大局部炎症反应,加剧哮喘气道炎症和气道重塑^[31-34]。临床研究表明,在重症哮喘患者的痰液、BALF 以及肺组织中均检测出较高水平的 IL-17A 和中性粒细胞,而通过敲除 IL-17 基因可有效减少 BALF 中白细胞总数,减轻气道炎性浸润^[35-36]。此外 Everaere 等^[27]发现,与瘦小鼠相比,利用屋尘螨 (HDM) 攻击后的胖小鼠气道高反应更为显著,且气道和肺组织中中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、IL-13、IL-17 及 ILC3s 的水平更高,因此抑制 IL-17A⁺ILC3 是治疗肥胖哮喘的关键。本实验通过流式细胞术检测小鼠肺组织和外周血中 IL-17A⁺ILC3 比例发现,肥胖哮喘小鼠肺组织中 IL-1 β 和 IL-17A⁺ILC3 比例远高于正常小鼠,与先前的研究结果一致。确定了由 ILC3 分泌的 IL-17A 在肥胖哮喘发病中的关键作用,而经过中、高剂量蠲哮汤干预后,肥胖哮喘小鼠肺组织内 IL-1 β 、IL-17A⁺ILC3、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞水平得到明显抑制,哮喘症状和肺部炎症明显减轻,提示蠲哮汤能够改善肥胖导致的机体炎症环境,降低体内炎症因子 IL-1 β 水平,抑制 ILC3 激活分泌 IL-17A 介导的气道炎症和气道重塑发生。

同样由 ILC3 分泌的 IL-22 被认为是一种具有防御粘膜病原体的效应细胞因子,在维持肺部、肠道及皮肤等黏膜屏障稳态发挥关键作用^[37]。IL-22 常通过与表达 IL-22R1/IL-10R2 受体复合物的呼吸道上皮细胞、呼吸道平滑肌细胞等结合发挥相应作用^[38]。在哮喘中,IL-22 诱导肺部气道上皮细胞 STAT-3 蛋白磷酸化,减少 2 型炎症因子 IL-13 和 TNF- α 诱导上皮细胞产生趋化因子 CCL17, CCL17 作为 Th2 细胞的趋化因子,能将 Th2 细胞募集到肺部参与炎症反应^[12]。此外,在哮喘发生早期阶段,IL-22 能抑制 OVA 诱导的 CD4⁺T 细胞启动分泌 Th2 和 Th17 细胞因子 IL-5、IL-13、IFN γ 、IL-17,减少气道中嗜酸性粒细胞水平^[39]。IL-22 也能够抑制 OVA 诱导的抗原呈递细胞 DC 上的共刺激分子 CD80、CD86 和 CD40 表达,降低 Th2 反应,减少其释放嗜酸性粒细胞向肺部募集^[40]。我们的数据表明,肥胖哮喘小鼠肺组织和外周血中 IL-22⁺ILC3 比例较正常组显著降低,而中、高剂量蠲哮汤干预可明显提高肺组织 IL-22⁺ILC3 比例和 STAT3 蛋白磷酸化水平,有效抑制 2 型炎症因子 IL-13 和趋化因子 CCL17 产生,减少中性粒细胞和嗜酸性粒细胞水平,从而抑制肺部 2 型炎症反应。

综上所述,蠲哮汤可以明显减轻肥胖哮喘小鼠气道炎症反应和肺组织损伤,改善机体炎症环境,可能与其抑制体内巨噬细胞分泌 IL-1 β ,下调 IL-17A⁺ILC3 水平,上调 IL-22⁺ILC3 水平,从而减少细胞因子 IL-13 和 CCL17 的产生,抑制炎症细胞的产生及 Th2 细胞向肺部的募集相关,关于蠲哮汤上调 IL-22⁺ILC3 水平的具体机制,课题组将在后续进行更深入的研究。

参考文献:

[1] STERN J, PIER J, LITONJUA A A. Asthma epidemiology and risk factors [J]. *Semin Immunopathol*, 2020, 42(1): 5-15.

[2] HUANG K, YANG T, XU J, et al. Prevalence, risk factors, and management of asthma in China: a national cross-sectional study [J]. *Lancet*, 2019, 394(10196): 407-418.

[3] MUKADAM S, ZACHARIAS J, HENAO MP, et al. Differential effects of obesity on eosinophilic vs. non-eosinophilic asthma subtypes [J]. *J Asthma*, 2018, 55(7): 720-725.

[4] FORNO E, HAN Y Y, MULLEN J, et al. Overweight, obesity, and lung function in children and adults-a meta-analysis [J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2018, 6(2): 570-581.

[5] BARROS R, MOREIRA P, PADRAO P, et al. Obesity increases the prevalence and the incidence of asthma and worsens asthma severity [J]. *Clin Nutr*, 2017, 36(4): 1068-1074.

[6] 韩静, 赵锐恒, 王建新, 等. 超重或肥胖对哮喘患者气道炎症、哮喘控制水平及中医体质的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2022, 8(8): 1023-1026, 1033.

HAN J, ZHAO R H, WANG J X, et al. Effects of overweight or obesity on airway inflammation, asthma control and TCM constitution in asthma patients [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*, 2022, 8(8): 1023-1026, 1033.

[7] 黄程程, 潘光霞, 王佳, 等. 基于“分消走泄”法探究温胆汤治疗儿童肥胖型哮喘的思路剖析 [J]. *天津中医药*, 2022, 39(4): 470-473.

HUANG C C, PAN G X, WANG J, et al. Analysis of Wendan Decoction in the treatment of obese asthma in children based on “Fenxiao Zouxie” method [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med*, 2022, 39(4): 470-473.

[8] 李冀, 邓夏烨, 胡晓阳, 等. 基于“肥人多痰湿”理论探讨肥胖型哮喘的辨证特点 [J]. *中医学报*, 2021, 49(5): 61-64.

LI J, DENG X Y, HU X Y, et al. Exploration on the pathogenesis and treatment of obesity asthma based on excess phlegm-Dampness in obese people [J]. *Acta Chin Med Pharmacol*, 2021, 49(5): 61-64.

[9] 柯诗文, 曾丽珍, 李少峰, 等. 浅析国医大师洪广祥“治痰治癖以治气为先”学术思想 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(1): 176-179.

KE S W, ZENG L Z, LI S F, et al. Discussion on TCM master HONG Guang-Xiang’s academic thought of ‘treating phlegm and

blood stasis first by treating Qi’ [J]. *China Ind Econ*, 2020, 35(1): 176-179.

[10] 宋咏梅, 宋昌红. 肥胖体型者辨证论治规律初探 [J]. *甘肃中医学院学报*, 1997, 13(3): 8-9.

Song Y M, Song C H. A preliminary study on the pattern of identification and treatment of obese body types [J]. *J Gansu Coll Tradit Chin Med*, 1997, 13(3): 8-9.

[11] 董峰, 徐茜, 苗鑫星, 等. 哮喘大鼠模型血液系统指标的改变 [J]. *解放军医学院学报*, 2013, 34(7): 760-761, 778.

DONG F, XU H, BI X X, et al. Changes of hematological system parameters in allergic asthma model of rats [J]. *Acad J Chin PLA Med Sch*, 2013, 34(7): 760-761, 778.

[12] TAUBE C, TERTILT C, GYULVESZI G, et al. IL-22 is produced by innate lymphoid cells and limits inflammation in allergic airway disease [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e21799.

[13] KIM HY, LEE H J, CHANG Y J, et al. Interleukin-17-producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity [J]. *Nat Med*, 2014, 20(1): 54-61.

[14] 吕文漪, 王炜, 陈彦. IL-17 家族与哮喘 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2017, 3(4): 61-64.

LYU W Y, WANG W, CHEN Y. IL-17 family and asthma [J]. *Prog Microbiol Immunol*, 2017, 3(4): 61-64.

[15] 喻强强, 鲍梦婕, 余建玮, 等. 蠲哮汤对哮喘大鼠肺组织 CysLTs 和 CysLTR1 mRNA 的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(6): 2437-2440.

YU Q Q, BAO M J, YU J W, et al. Effects of Juanxiao Decoction on mRNA expression of CysLTs and CysLTR1 in the lung tissue of asthmatic rats [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2019, 34(6): 2437-2440.

[16] 喻强强, 鲍梦婕, 余建玮, 等. 蠲哮汤对哮喘大鼠 CysLTs 和 IL-4、IFN- γ 的影响及相关性研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(10): 4614-4618.

YU Q Q, BAO M J, YU J W, et al. Effects and relative research of Juanxiao Decoction on CysLTs, IL-4 and IFN- γ in asthmatic rats [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2018, 33(10): 4614-4618.

[17] 余建玮, 薛汉荣, 喻强强, 等. 蠲哮汤对哮喘大鼠气道重塑细胞增殖信号通路的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(12): 5339-5341.

YU J W, XUE H R, YU Q Q, et al. Effects of Juanxiao Decoction on regulating cell proliferation signaling pathway of airway remodeling in asthmatic rats [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2017, 32(12): 5339-5341.

[18] 喻松仁, 刘彩玲, 周丽, 等. 温胆汤通过调控 PI3K/Akt/mTOR 通路介导的脂肪细胞自噬对肥胖痰湿证炎症状态的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 9(14): 1-10.

YU S R, LIU C L, ZHOU L, et al. Effect of Wendan Tang on inflammatory state of obesity phlegm-dampness syndrome through regulating PI3K/akt/mTOR pathway-mediated adipocyte autophagy [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2023, 9(14): 1-10.

- [19] 邓凡. 肠道菌群代谢产物米那普仑通过活化芳烃受体促进 3 型固有淋巴细胞释放白介素-22 减轻肠缺血/再灌注损伤 [D]. 广州: 南方医科大学, 2021.
- DENG F. Minapram, a metabolite of intestinal flora, promotes the release of interleukin-22 from type 3 intrinsic lymphocytes by activating aromatic hydrocarbon receptors to alleviate intestinal ischemia/reperfusion injury [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2021.
- [20] 蔡佳玉, 卢红艳, 苏兆亮, 等. 支气管肺发育不良小鼠肺组织 3 型固有淋巴细胞 (ILC3) 数量及相关细胞因子 IL-17 和 IL-22 分泌增加 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2020, 36 (10): 865-870.
- CAI J Y, LU H Y, SU Z L, et al. The number of ILC3 and their related cytokines IL-17 and IL-22 increase in lungs of mice with bronchopulmonary dysplasia [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2020, 36(10): 865-870.
- [21] 高琴琴, 丁子桐, 李友林, 等. 不同剂量卵蛋白诱发 BALB/c 小鼠支气管哮喘模型的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 52-57.
- GAO Q Q, DING Z T, LI Y L, et al. Comparison of asthma models induced by different doses of ovalbumin in BALB/c mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 52-57.
- [22] 向双娣, 程林辉, 喻强强, 等. 益气温阳护卫汤调控 PI3K/Akt/mTOR 自噬途径治疗支气管哮喘大鼠机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 9(14): 38-46.
- XIANG S D, CHENG L H, YU Q Q, et al. Yiqi Wenyang Huwei Decoction regulates PI3K/Akt/mTOR autophagic pathway for treatment of bronchial asthma in rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 9(14): 38-46.
- [23] 石海莲, 郑沁乐, 吴大正. 吴茱萸碱对肥胖并发血管肥厚的作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(12): 1687-1692.
- SHI H L, ZHENG Q Y, WU D Z. The preventive effect of evodiamine on vascular hypertrophy in obese rats [J]. Chin Pharmacol Bull, 2011, 27(12): 1687-1692.
- [24] MIETHE S, KARSONOVA A, KARAULOV A, et al. Obesity and asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2020, 146(4): 685-693.
- [25] 余涛, 丁明, 喻强强, 等. 薛汉荣治疗哮喘的学术经验与临证思路 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(4): 655-658.
- YU T, DING M, YU Q Q, et al. XUE Han-Rong's academic experience and clinical thinking in treating asthma [J]. J Basic Chin Med, 2021, 27(4): 655-658.
- [26] 洪广祥. 哮喘治疗之我见 [J]. 中医杂志, 1988, 29(3): 7-9.
- HONG G X. My opinion on the treatment of asthma [J]. J Tradit Chin Med, 1988, 29(3): 7-9.
- [27] EVERAERE L, AIT-YAHIA S, MOLENDI-COSTE O, et al. Innate lymphoid cells contribute to allergic airway disease exacerbation by obesity [J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 138 (5): 1309-1318.
- [28] 谢慧欣, 郭赟, 钟豪杰, 等. III 型固有淋巴细胞在炎症性疾病中的作用 [J]. 生理学报, 2022, 8(2): 265-275.
- XIE H X, GUO Y, ZHONG H J, et al. Emerging pathogenic role of group 3 innate lymphoid cells in inflammatory diseases [J]. Acta Physiol Sin, 2022, 8(2): 265-275.
- [29] VIVIER E, ARTIS D, COLONNA M, et al. Innate lymphoid cells: 10 years on [J]. Cell, 2018, 174(5): 1054-1066.
- [30] SPITES H, ARTIS D, COLONNA M, et al. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature [J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(2): 145-149.
- [31] ONISHI RM, GAFFEN SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease [J]. Immunology, 2010, 129(3): 311-321.
- [32] RUIZ DE MORALES JMG, Puig L, DAUDEN E, et al. Critical role of interleukin (IL)-17 in inflammatory and immune disorders: an updated review of the evidence focusing in controversies [J]. Autoimmun Rev, 2020, 19(1): 102429.
- [33] 王熠杰. IL-17A 对哮喘气道嗜酸性粒细胞炎症的影响及其免疫机制研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2017.
- WANG Y J. Effect of IL-17A on airway eosinophilic inflammation in asthma and its immune mechanism [D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2017.
- [34] 张鑫, 王孟清, 罗银河, 等. 五虎汤对 RSV 诱导的哮喘小鼠模型树突细胞自噬和炎症因子 IL-17A 和 IL-17F 水平的影响 [J]. 中草药, 2021, 7(3): 718-726.
- ZHANG X, WANG M Q, LUO Y H, et al. Effect of Wuhu Decoction on autophagy in dendritic cells and levels of inflammatory factors IL-17A and IL-17F in RSV-induced asthmatic mice [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 7(3): 718-726.
- [35] 赵倩楠, 李文文, 李鑫, 等. 白介素-17 在重症哮喘中作用的研究进展 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2019, 5 (2): 147-151.
- ZHAO Q N, LI W W, LI X, et al. Role of interleukin-17 in severe asthma [J]. Chin J Clin Electron Ed, 2019, 5(2): 147-151.
- [36] 杨莹莹, 梅丛进, 董盼盼, 等. 日本血吸虫感染小鼠下调 IL-17 抑制尘螨过敏性哮喘及其机制的实验研究 [J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 7(12): 1425-1429.
- YANG Y Y, MEI C J, DONG P P, et al. A study on how dust mite allergic asthma is inhibited by a *Schistosoma japonicum* infection via down-regulation of IL-17 and that mechanism [J]. J Pathog Biol, 2021, 7(12): 1425-1429.
- [37] SONNENBERG G F, FOUSER L A, ARTIS D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22 [J]. Nat Immunol, 2011, 12(5): 383-390.
- [38] 王明磊, 王文革, 张俊红, 等. 布地奈德对哮喘小鼠模型 IL-22 的调控作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(5): 55-59.
- WANG M L, WANG W G, ZHANG J H, et al. Budesonide inhibits murine asthmatic airway inflammation through reduction

IL-22 secretion [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(5): 55-59.

[39] NAKAGOME K, IMAMURA M, KAWAHATA K, et al. High expression of IL-22 suppresses antigen-induced immune responses and eosinophilic airway inflammation via an IL-10-associated mechanism [J]. J Immunol, 2011, 187(10): 5077-5089.

[40] SCHNYDER B, LIMA C, SCHNYDER-CANDRIAN S. Interleukin-22 is a negative regulator of the allergic response [J]. Cytokine, 2010, 50(2): 220-227.

[收稿日期] 2023-09-25



《动物模型与实验医学(英文)》(*Animal Models and Experimental Medicine, AMEM*) 审稿人招募

《动物模型与实验医学(英文)》(*Animal Models and Experimental Medicine, AMEM*) 自创刊以来,相继被 CSCD(核心)、DOAJ、PubMed、WJCI、MEDLINE、ESCI、Scopus 等国内外数据库收录,连续 3 年入选“中国国际影响力优秀学术期刊”。为提供更广阔的学术交流平台和成长空间,同时增强 AMEM 在实验动物科学领域的学科引领作用,AMEM 诚挚邀请海内外对动物模型研究和实验医学方面有浓厚兴趣、有高度热忱、有专业素养、有独到洞察的专家学者成为审稿人。

招募条件:

- 博士学位,研究背景为实验动物科学。
- 近3年以通讯作者或第一作者发表至少 IF > 3 的论文。
- 能以客观公正的态度审稿,并能严格按期完成任务。
- 具有英文期刊审稿经验者优先。

权益:

- 颁发《*Animal Models and Experimental Medicine*》审稿人证书。
- 每期出刊后可免费获赠本刊电子刊或纸刊一本。
- 个人及团队投稿享受优先审稿绿色通道。
- 可优先申请成为本刊编委。
- 可以申请进行专栏组稿,扩大您及您团队的影响力。
- 可推荐研究热点,编辑部帮助联系相关专家合作。
- 有助于及时获取个人研究领域的新进展。
- 有助于获得审稿和编辑经验。

需要承担的工作:

- 负责期刊审稿,每月需要完成高质量审稿 1 篇及以上。

请将申请表和学术简历(含个人基本信息、教育、访学和工作经历、主要研究领域、主持科研项目、代表性论文列表等),发送至 amem@cnilas.org

官网网址:<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/25762095>

附件:AMEM 审稿人申请表

扫码跳转至官网通知,在通知结尾点击“申请表”,下载填报后与个人学术简历一并发送至邮箱。



吴玉琪,黄桂林,肖丽君,等. 基于 NLRP3 研究放射对小鼠涎腺组织损伤的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 26-31.

Wu YQ, Huang GL, Xiao LJ, et al. Effect of radiation on damage of mouse salivary gland tissue based on NLRP3 [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 26-31.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.003

基于 NLRP3 研究放射对小鼠涎腺组织损伤的影响

吴玉琪^{1,2}, 黄桂林³, 肖丽君¹, 张敏¹, 张霓霓^{1*}

(1.遵义医科大学附属口腔医院, 贵州 遵义 563000; 2.邵阳市中心医院口腔科, 湖南 邵阳 422000;

3.遵义医科大学第五附属医院, 广东 珠海 519000)

【摘要】 目的 研究放射对小鼠涎腺组织形态、功能及 NLRP3 表达的影响, 为修复放射性涎腺组织损伤提供新思路。**方法** 建立小鼠下颌下腺放射损伤模型, 记录饮水情况, 于照射后 1、3、7、14 d 进行唾液流率检测, HE 染色观察下颌下腺损伤情况, 免疫组织化学法及 Real-time PCR 检测 NLRP3 及 Caspase-1 在小鼠放射性下颌下腺损伤中的表达情况。**结果** 随着时间的累积, 放射组小鼠饮水量逐渐增多, 唾液流率减少, 下颌下腺中炎症细胞不断增多, 腺泡细胞逐渐出现核固缩及空泡化等病变; 在照射后的 7 和 14 d, 放射组 NLRP3 和 Caspase-1 蛋白及基因表达水平均明显高于正常组 ($P < 0.05$)。**结论** 辐射可诱导小鼠下颌下腺组织损伤, 并激活 NLRP3 炎症体促使其表达量增加。

【关键词】 NLRP3 炎症体; 放射; 涎腺损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0026-06

Effect of radiation on damage of mouse salivary gland tissue based on NLRP3

WU Yuqi^{1,2}, HUANG Guilin³, XIAO Lijun¹, ZHANG Min¹, ZHANG Nini^{1*}

(1. Affiliated Stomatological Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China.

2. Department of Stomatology, the Central Hospital of Shaoyang, Shaoyang 422000.

3. the Fifth Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zhuhai 519000)

【Abstract】 Objective To study the effects of radiation on the morphology, function, and NLRP3 expression of mouse salivary gland tissue, and provide new ideas to repair radiation-induced damage to salivary gland tissue. **Methods** We established a mouse model of radiation-induced submandibular gland injury and Recorded the weight of drinking water. The salivary flow rate was assessed, and HE staining was used to observe submandibular gland injury. Immunohistochemistry and Real-time PCR were used to assess expression of NLRP3 and Caspase-1 in the radiation-injured submandibular gland of mice at 1, 3, 7 and 14 days after radiation exposure. **Results** Over time, the amount of water consumed by radiation group mice was gradually increased, the salivary flow rate was decreased, and inflammatory cells in the submandibular gland continued to increase. Acinar cells gradually showed lesions, such as nuclear pyknosis and vacuolization. At 7 and 14 days after radiation exposure, expression levels of NLRP3 and Caspase-1 proteins and genes in the radiation group were significantly higher than those in the normal group ($P < 0.05$). **Conclusions** Radiation damages mouse submandibular gland tissue and activates the NLRP3 inflammasome to increase its expression level.

【Keywords】 NLRP3 inflammasome; radiation; salivary gland injury

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

【基金项目】 国家自然科学基金(81960204, 81860198); 遵义医科大学“未来临床名医”项目(20211017); 贵州省临床重点建设项目(黔卫计办函[2017]24号); 贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2024]一般339)。

【作者简介】 吴玉琪(1995—), 女, 口腔执业医师, 硕士研究生, 研究方向: 口腔颌面部放射性组织损伤的修复。E-mail: 467507875@qq.com

【通信作者】 张霓霓(1982—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 唾液腺损伤的修复。E-mail: kqzhangni@163.com

放射性涎腺损伤是头颈部恶性肿瘤患者接受放疗后常伴随的一种不良反应性疾病,使患者的生存质量大打折扣^[1],一直以来是颌面外科医师临床与科研上的难题。近年有研究表明,NOD 样受体蛋白 3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)参与了诸多组织的放射性损伤,并在其中发挥重要作用^[2-3]。NLRP3 炎症体是一种在机体免疫炎症反应中扮演重要角色的多聚体炎症复合体^[4-5]。当机体感受到微环境有异常变化时就会释放一些信号激活 NLRP3 炎症体,随后导致半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(cysteiny aspartate specific proteinase-1, Caspase-1)活化,进而释放炎症因子以调节免疫反应^[6-7]。一旦 NLRP3 被过度活化就会导致机体产生大量炎症物质而导致机体致病^[8]。但目前尚未发现 NLRP3 在放射性涎腺损伤中的相关研究,因此本研究探索了放射对涎腺组织及 NLRP3 表达的影响,为寻找放射性涎腺组织损伤的修复与治疗方法提供新的科研思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,8 周龄,体重(22±2)g,48 只,购买自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2019-0004]。小鼠统一饲养在遵义医科大学实验动物中心[SYXK(黔)2021-0004],条件为温度 22~24℃、昼夜光照均 12 h 的环境中,自由饮食,适应性饲养 1 周后开始实验。本实验经遵义医科大学实验动物福利伦理委员会审查((2019)2-167),遵循 3R 原则,符合动物福利伦理要求。

1.2 主要试剂与仪器

试剂:4%多聚甲醛(中国 Biosharp 公司,批号:71060900);盐酸毛果芸香碱(中国罗恩公司,批号:RH116485,纯度 99%);PrimeScript™ RT Reagent Kit 和 TB Green® Premix Ex Taq™ II(TaKaRa 公司,批号分别为 AJG2300A、AKE1151A);通用 SP 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:2131C0615);DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:2111A0608);Rabbit anti-NLRP3 抗体、Caspase-1 抗体(美国 Novus 公司,货号分别为 NBP1-77080SS、NB100-566564SS)。

仪器:电子直线加速器(瑞典医科达公司,型号:Synergy);染片机(德国莱卡公司,型号:AUTOSTAINER);荧光定量 PCR 检测仪(美国 BIO-

RAD 公司,型号:CFX96)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠下颌下腺放射损伤模型构建、分组

小鼠随机分为正常组和放射组,各 24 只。照射前小鼠统一禁食 12 h,将放射组小鼠麻醉后以仰卧位排成一行,用直线加速器一次性给予照射剂量为 18 Gy 的射线局部下颌下区照射^[9],其余部位使用铅板保护。正常组小鼠麻醉后假放射,其余的条件均与放射组保持一致。

1.3.2 饮水量及唾液流率检测

造模后,每天给予每笼小鼠同等量的水和食物,并每天记录两组所有小鼠平均饮水量。于照射后 1、3、7、14 d 从各组随机抽取 6 只小鼠测量唾液流率,测前小棉球及棉片称重记为 A,麻醉小鼠后于颈部皮下注射 0.2%毛果芸香碱(2 mg/kg)收集唾液 30 min,此时将棉球和棉片再称重记为 B,唾液流率=B-A,唾液流率按 1 g/mL 计算其体积。随后摘取小鼠下颌下腺进行后续实验。

1.3.3 HE 染色

把包埋的下颌下腺组织切片后,用二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、冲洗、苏木素染色、分化、伊红染色、常规脱水、透明、封片后光学显微镜观察两组下颌下腺损伤情况。

1.3.4 免疫组化染色

切片常规脱蜡水化,抗原修复,加入内源性过氧化物酶、山羊血清,一抗过夜,二抗室温孵育,标记 HRP 标记链霉卵白素,DAB 显色后复染苏木素,常规脱水透明后封片观察。每个标本随机选取 400 倍高倍镜下 5 个视野,应用 Image J 检测平均光密度进行半定量分析。

1.3.5 Real-time PCR

不同时间点收集样本,提取颌下腺组织总 RNA。然后用 PrimeScript™ RT Reagent Kit 进行逆转录。内参基因为 β -actin,引物序列由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成:基因的引物序列为 NLRP3 Forward:5'-CTTTATCCACTGCCGAGAG-3', Reverse:5'-AGCTCATCAAAGCCATCC-3';Caspase-1 Forward:5'-GCTCTGCGGTGTAGAAAAG-3', Reverse:5'-ATAGGTCCCCTGCCTTG-3'; β -actin Forward:5'-CGACAGCAGTTGTTGG-3', Reverse:5'-GGGAGGGTGAGGGACTT-3'。严格按照 PCR 实验步骤进行操作,TB Green® Premix Ex Taq™ II 进行实时荧光定量 PCR。

1.4 统计学方法

本实验采用 SPSS 18.0 进行统计分析,结果以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组之间的差异采用两组独立样本 *t* 检验, $P<0.05$ 可认为差异具有统计学意义。

2 结果

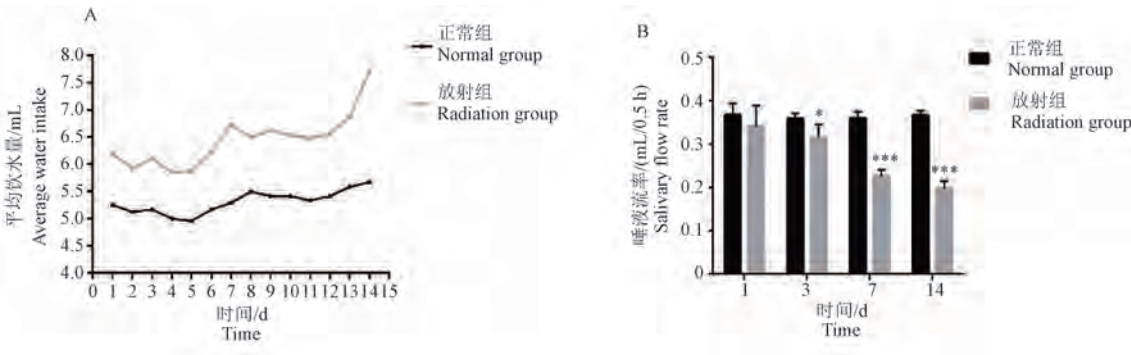
2.1 放射对小鼠下颌下腺分泌功能的影响

观察饮水量发现,随着时间的推移,放射组小鼠每天平均饮水量相比正常组有增加趋势(图 1A);放射组小鼠 14 d 平均每天饮水量($5.307\pm$

0.210)mL 相比正常组(6.443 ± 0.488)mL 明显增加($P<0.05$);测量唾液流率结果显示(图 1B),相比正常组小鼠,接受过照射的小鼠唾液流率在照射后 3、7、14 d 时明显减少($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.001$)。

2.2 放射后小鼠下颌下腺病理学改变

HE 染色结果显示(图 2),正常组下颌下腺内腺体及导管细胞形态规则,大小较均匀,排列紧密,炎症细胞较少。放射组随着时间累积,炎症细胞不断增加,细胞间隙不断增宽,细胞出现萎缩,并逐渐出现核固缩及空泡化等病理改变,在照射后第 14 天这些变化尤为显著。



注:与正常组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。
图 1 放射后小鼠平均饮水量及唾液流率变化
Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

Figure 1 Changes in average water intake and saliva flow rate in mice after radiation

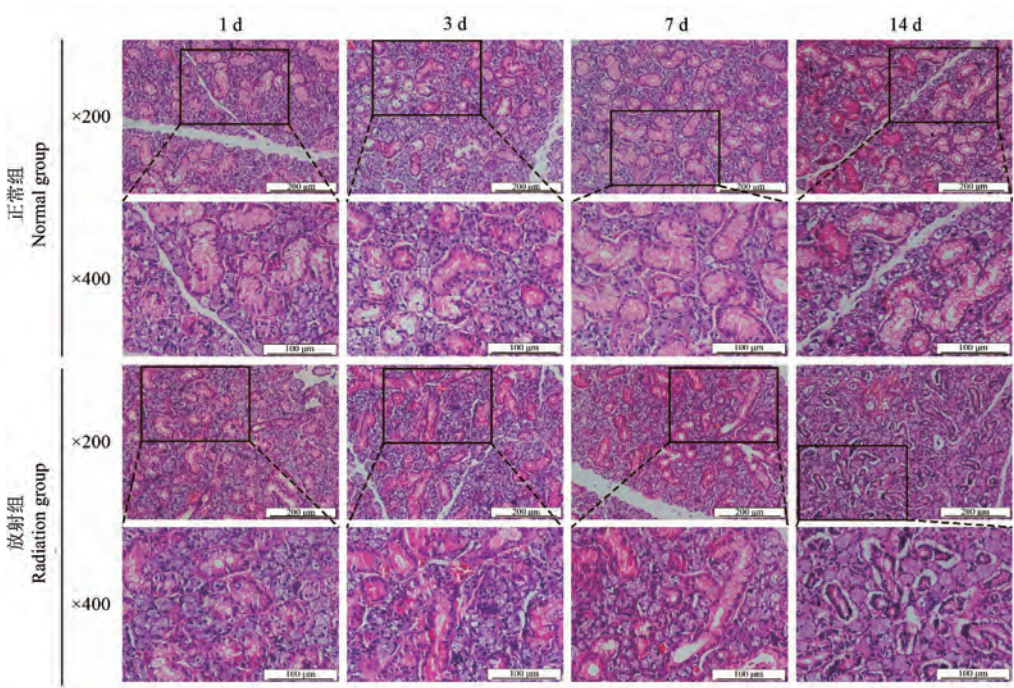


图 2 两组小鼠颌下腺苏木精-伊红染色
Figure 2 HE staining of submandibular gland in two groups of mice

2.3 放射对小鼠下颌下腺中 NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达的影响

免疫组化结果显示(图 3、图 4),正常组下颌下腺组织中 NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达量较少;经照射处理后的放射组小鼠,随着腺体组织损伤加重,其下颌下腺组织内 NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达量比正常组有所增加,在第 7 和 14 天时,两组间

2.4 放射对小鼠下颌下腺中 NLRP3 和 Caspase-1 mRNA 表达的影响

Real-time PCR 结果显示(图 5),经过照射处理后,放射组 NLRP3 和 Caspase-1 mRNA 相对表达量均比正常组增加,第 7 和 14 天时两组检测到明显差异($P<0.01$)。

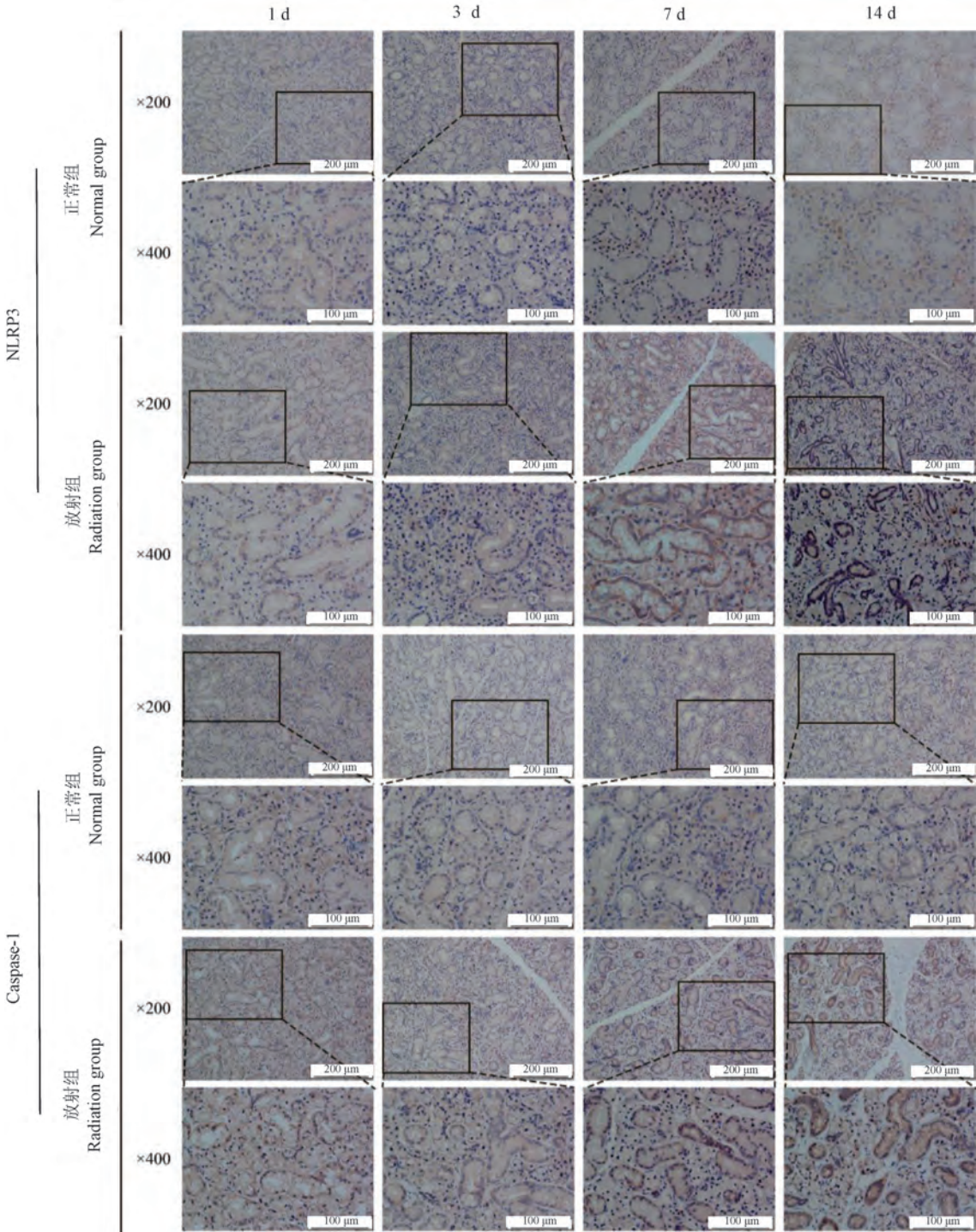
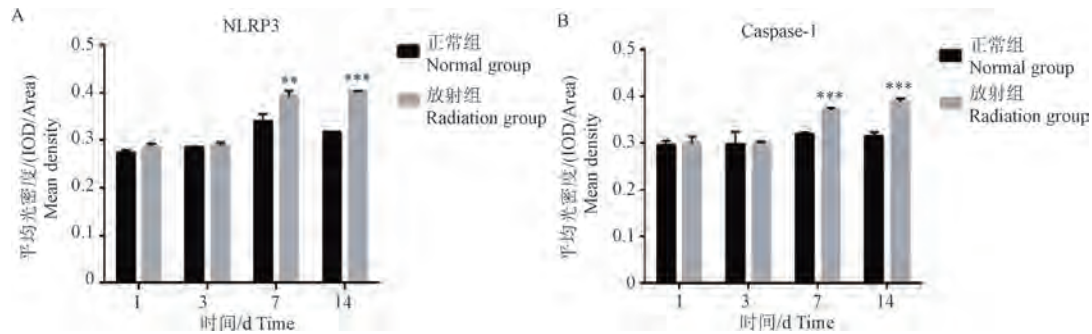


图 3 NLRP3 和 Caspase-1 在两组小鼠下颌下腺组织中的表达

Figure 3 Expression of NLRP3 and Caspase-1 in submandibular gland of two groups of mice

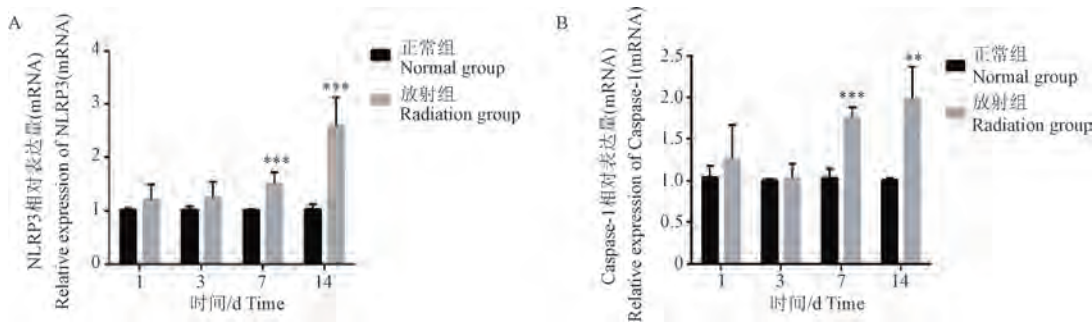


注:与正常组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 4 免疫组化检测两组小鼠下颌下腺组织中 NLRP3 和 Caspase-1 蛋白的变化

Note. Compared with the normal group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 4 Changes of NLRP3 and Caspase-1 protein in submandibular gland tissues of two groups of mice were detected by immunohistochemistry



注:与正常组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 5 Real-time PCR 检测 NLRP3 和 Caspase-1 mRNA 的相对表达量

Note. Compared with the normal group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 5 Relative expression of NLRP3 and Caspase-1 mRNA was detected by Real-time PCR

3 讨论

头颈部恶性肿瘤患者常因接受放疗而导致放射性涎腺组织损伤^[10]。随后唾液量减少继而出现口干症、唾液粘稠、口腔疼痛、咀嚼吞咽困难等一系列症状,严重干扰患者的生存品质^[11-12],对此目前并没有很好的手段进行防治。随着分子生物学的发展,人们开始关注分子靶点作为防治疾病的切入点^[13]。有研究发现,辐射可以激活微血管内皮细胞中 NLRP3 等炎症体,炎症体使 Caspase-1 活化而释放促炎因子,从而诱导细胞焦亡^[14],另一方面有研究发现抑制其活化可能会降低组织的损伤^[15],这为防治辐射损伤提供了新思路,而 NLRP3 在唾液腺中的研究却鲜有报道。本实验通过构建小鼠下颌下腺放射损伤模型,观察照射后小鼠涎腺组织损伤及 NLRP3 的表达情况,为寻找防治放射性涎腺损伤方法提供思路。

唾液流率改变是放疗期间最常见的急性毒性反应之一^[16],也是反映唾液腺功能的重要方式^[17],

本实验通过照射后对小鼠饮水量记录及照后 1、3、7、14 d 唾液流率检测和 HE 染色来综合观察造模情况。本实验结果显示,随着照射后时间的增加,与正常组比,放射组饮水量逐渐增多;照后第 3、7、14 天可检测到放射组唾液流率比正常组明显降低,这可能是因为放射导致小鼠唾液腺出现早期急性损伤,引起唾液分泌减少出现口干而增大饮水量的摄取,这与其他研究者结果一致^[18]。与此同时病理切片染色结果显示,照射后小鼠下颌下腺逐渐出现细胞萎缩、空泡化,炎症细胞增多等病理改变,说明辐射对下颌下腺造成了一定的影响,其导致下颌下腺组织内细胞结构发生改变,进而影响到腺体的分泌功能,这与其他文献报道基本一致^[19-20]。故综合一般情况和病理切片结果可以认为本实验造模成功。

在造模成功的基础上,我们对小鼠下颌下腺组织进行了免疫组化及 Real-time PCR 实验,从分子水平分析 NLRP3 和放射性涎腺组织损伤的关系及照射后 NLRP3 炎症体的激活情况。本实验结果发现,相较于正常组,随着放射组小鼠下颌下腺组织损伤

的加重,在照射后 7 和 14 d 可观察到 NLRP3 的 mRNA 及蛋白表达均明显升高,而它的大量增加可能是在为 NLRP3 炎症体组装活化做前期准备。众所周知 NLRP3 炎症体激活就会促使 Caspase-1 活化^[21],一旦 Caspase-1 过度活化就会导致相关炎症物质被大量释放而致病^[22]。故本实验对 Caspase-1 进行了检测,结果发现放射组 Caspase-1 的 mRNA 和蛋白表达也明显增加,此结果与 NLRP3 的表达变化趋势一致,说明放射后小鼠下颌下腺组织中 NLRP3 炎症体被激活了,而该炎症活化可能对放射性涎腺组织损伤的发展有一定影响。

综上所述,辐射可诱导小鼠下颌下腺损伤并激活 NLRP3 炎症体促使其表达量增加。而通过调控 NLRP3 是否可以改善因放射诱导的涎腺损伤程度尚不清楚,值得进一步研究与探讨。

参考文献:

- [1] KIM J H, JEONG B K, JANG S J, et al. Alpha-lipoic acid ameliorates radiation-induced salivary gland injury by preserving parasympathetic innervation in rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (7): 2260.
- [2] WEI J, ZHAO Q, ZHANG Y, et al. Sulforaphane-mediated Nrf2 activation prevents radiation-induced skin injury through inhibiting the oxidative-stress-activated DNA damage and NLRP3 inflammasome [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(11): 1850.
- [3] HUANG S, HUANG Y, LIN W, et al. Sitagliptin alleviates radiation-induced intestinal injury by activating NRF2-antioxidant axis, mitigating NLRP3 inf—lammasome activation, and reversing gut microbiota disorder [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 2586305.
- [4] LIAO H, WANG H, RONG X, et al. Mesenchymal stem cells attenuate radiation-induced brain injury by inhibiting microglia pyroptosis [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 1948985.
- [5] LI Z, GUO J, BI L. Role of the NLRP3 inflammasome in autoimmune diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110542.
- [6] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y, et al. The NLRP3 inflammasome; an overview of mechanisms of activation and regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13): 3328.
- [7] BLEVINS H M, XU Y, BIBY S, et al. The NLRP3 inflammasome pathway: a review of mechanisms and inhibitors for the treatment of inflammatory diseases [J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 879021.
- [8] GROSLAMBERT M, PY B F. Regulation of the NLRP3 inflammasome [J]. *Med Sci*, 2018, 34(1): 47-53.
- [9] 王艳, 胡翰青, 刘彦普, 等. 小鼠下颌下腺放射损伤效应的实验研究 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2013, 29(2): 170-175. WANG Y, HU H Q, LIU Y P, et al. The experimental study on irradiation injury of mouse submandibular gland [J]. *J Pract Stomatol*, 2013, 29(2): 170-175.

- [10] LI S S, WU C Z, QIAO X H, et al. Advances on mechanism and treatment of salivary gland in radiation injury [J]. *West China J Stomatol*, 2021, 39(1): 99-104.
- [11] SHI D, QIAO J J, FAN G H, et al. Salivary gland function in nasopharyngeal carcinoma before and late after intensity-modulated radiotherapy evaluated by dynamic diffusion-weighted MR imaging with gustatory stimulation [J]. *BMC Oral Health*, 2019, 19(1): 288.
- [12] PEZDIREC M, STROJAN P, BOLTEZAR I H. Swallowing disorders after treatment for head and neck cancer [J]. *Radiol Oncol*, 2019, 53(2): 225-230.
- [13] 安妮. 抑制 Rac1 减轻小鼠放射性肺损伤并增敏肺癌放疗的作用与机制 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2020. AN N. Inhibition of Rac1 Attenuates Radiation-induced lung injury while sensitizes lung cancer to radiotherapy [D]. Shanghai: Naval Medical University, 2020.
- [14] SMITH A O, JU W, ADZRAKU S Y, et al. Gamma radiation induce inflammasome signaling and pyroptosis in microvascular endothelial cells [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 3277-3288.
- [15] HU L, CHEN H, ZHANG X, et al. Rosiglitazone ameliorates radiation-induced intestinal inflammation in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome and TNF- α production [J]. *J Radiat Res*, 2020, 61(6): 842-850.
- [16] CAVALLO A, IACOVELLI N A, FACCHINETTI N, et al. Modelling radiation-induced salivary dysfunction during IMRT and chemotherapy for nasopharyngeal cancer patients [J]. *Cancers*, 2021, 13(16): 3983.
- [17] GONG B, ZHENG L, HUANG W, et al. Murine embryonic mesenchymal stem cells attenuated xerostomia in Sjögren-like mice via improving salivary gland epithelial cell structure and secretory function [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(5): 954-963.
- [18] 李碧霞, 陈倩怡, 戴振晖, 等. 放射性口干症动物模型建立及颌下腺放射性组织损伤的生物学效应 [J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(32): 5164-5169. LI B X, CHEN Q Y, DAI Z H, et al. Modeling and biological effects of radiation-induced xerostomia [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2017, 21(32): 5164-5169.
- [19] REN J, HUANG R, LI Y, et al. Radioprotective effects and mechanism of HL-003 on radiation-induced salivary gland damage in mice [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 8419.
- [20] BARAZZUOL L, COPPES R P, VAN LUIJK P. Prevention and treatment of radiotherapy-induced side effects [J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(7): 1538-1554.
- [21] FENG Y, LI M, YANGZHONG X, et al. Pyroptosis in inflammation-related respiratory disease [J]. *J Physiol Biochem*, 2022, 78(4): 721-737.
- [22] GROSLAMBERT M, PY B F. Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway [J]. *J Inflamm Res*, 2018, 11: 359-374.

闫阮玉,吴洪雨,黄恺,等. 两种肝毒性化学物诱导的肝纤维化小鼠模型转录组学的比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 32-45.

Yan RY, Wu HY, Huang K, et al. Comparative study of transcriptomics in two murine liver fibrosis models induced by hepatotoxic chemicals [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 32-45.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.004

两种肝毒性化学物诱导的肝纤维化小鼠模型 转录组学的比较研究

闫阮玉¹, 吴洪雨¹, 黄 恺², 孙 鑫², 薛静波¹, 陶艳艳¹, 刘成海^{1,2,3*}, 彭 渊^{1*}

(1.上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所, 上海 201203; 2.上海市中医临床重点实验室, 上海 201203;
3.肝肾疾病病证教育部重点实验室, 上海 201203)

【摘要】 目的 比较四氯化碳(CCl₄)和3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氢可力丁(DDC)两种肝毒性化学物诱导的肝纤维化小鼠模型的转录组学差异,为使用肝纤维化小鼠模型的研究提供参考依据。**方法** 分别采用10% CCl₄ (2 mL/kg)腹腔注射和0.1% DDC 饮食喂养诱导小鼠肝纤维化模型。造模4周后,检测血清ALT、AST、TBil水平;HE染色观察肝内炎症浸润情况;天狼猩红染色观察肝胶原沉积情况;Jamall's法测定肝组织羟脯氨酸(Hyp)含量;ELISA检测肝组织上清TNF- α 、IL-6和IL-1 β 含量。提取小鼠总RNA进行测序(RNA-Seq),使用R软件分析2种肝纤维化模型的差异基因,并进行GO和KEGG富集分析,并验证差异显著的基因。**结果** 与正常小鼠相比,CCl₄染毒小鼠和DDC饮食小鼠血清ALT、AST、TBil水平和肝组织TNF- α 、IL-6和IL-1 β 含量显著升高,血清Alb水平下降。病理染色提示CCl₄染毒小鼠肝组织结构破坏,中央静脉周围大量肝细胞玻璃样变及坏死;DDC饮食小鼠肝内卟啉沉积,大量炎症细胞在汇管区和胆管周围浸润;两种模型小鼠肝内均有不同程度胶原沉积。通过筛选条件(|logFC| > 2倍且P < 0.05)获得CCl₄染毒模型、DDC饮食模型的差异基因分别为1820、2373个,其中上调基因分别为1302、1978个,下调基因分别为518、395个。GO注释发现2种模型在分子功能(MF)、生物学过程(BP)、细胞成分(CC)等方面具有重要功能,KEGG分析发现CCl₄染毒模型、DDC饮食模型分别激活22、29条信号通路,其中细胞外基质受体的相互作用、细胞周期、蛋白的消化与吸收、焦点粘附、PI3K-Akt等16条信号通路在2种模型中均显著富集(P < 0.05)。聚类分析发现在2种模型中均明显下调基因包括Mup11、Mup15、Mup17、Mup1等,采用RT-qPCR得以证实(P < 0.05)。**结论** 本研究报道了CCl₄染毒和DDC饮食两种肝纤维化模型的RNA-Seq转录组学特点并进行比较,观察基因表达的场所、基因表达所调节的通路等方面,为后续肝纤维化的发病机制和治疗研究的动物模型的选择提供参考依据。

【关键词】 肝纤维化;实验动物模型;四氯化碳;3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氢可力丁;RNA测序

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0032-14

Comparative study of transcriptomics in two murine liver fibrosis models induced by hepatotoxic chemicals

YAN Ruanyu¹, WU Hongyu¹, HUANG Kai², SUN Xin², XUE Jingbo¹, TAO Yanyan¹, LIU Chenghai^{1,2,3*}, PENG Yuan^{1*}

【基金项目】 国家自然科学基金(81874363, 82174057, 82274305, 82205052);曙光四明学者计划(SGXZ-201910);山西中医药大学科技创新团队项目(2022TD2003)。

【作者简介】 闫阮玉(1998—),女,硕士研究生,研究方向:中医药防治肝病的基础与临床。E-mail:yu20220212@126.com

【通信作者】 刘成海(1965—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:慢性肝病的治疗学。E-mail:chenghailiu@hotmail.com

彭渊(1983—),女,博士,副研究员,硕士生导师,研究方向:中医药防治慢性肝病。E-mail:pengyuan1026@shutcm.edu.cn

* 共同通信作者

- (1. Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China. 2. Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine, Shanghai 201203.
3. Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases, Ministry of Education, Shanghai 201203)

[Abstract] Objective To assess transcriptomic differences between carbon tetrachloride (CCl_4)-induced and diethyl 1,4-dihydro-2,4,6-trimethyl-3,5-pyridinedicarboxylate (DDC) diet-induced mouse models of liver fibrosis to provide a framework for future research using mouse liver fibrosis models. **Methods** Mouse models of liver fibrosis were induced by a 10% CCl_4 (2 mL/kg) injection or a 0.1% DDC diet. After 4 weeks of induction, serum levels of ALT, AST, and TBil were measured. HE and Sirius red staining were used to observe hepatic inflammation and collagen deposition. Jamall's method was used to evaluate hydroxyproline (Hyp) content in liver tissues. Hepatic tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6, and IL-1 β were measured by ELISA. Total RNA was extracted from murine liver tissues for RNA-sequencing (RNA-seq). Differentially expressed genes of the two models were analyzed by R software and then GO and KEGG enrichment was performed. Then, genes with significant differences were verified. **Results** Compared with normal mice, serum levels of ALT, AST, and TBil and hepatic expression of TNF- α , IL-6, and IL-1 β were significantly increased in mice that received CCl_4 and DDC, while the Alb serum level was decreased. Pathological staining showed that the structures of liver tissues were destroyed and a large number of hepatocytes around the central vein were hyalinized and necrotic in CCl_4 -treated mice. In DDC diet-treated mice, a large amount of porphyrins had been deposited in the liver and a large number of inflammatory cells had infiltrated into the portal area and bile duct. Different degrees of collagen deposition were observed in the liver tissues of the two model mice. Different genes (DEGs) of CCl_4 - and DDC diet-treated mice were screened using a filter ($|\log\text{FC}| > 2$ -fold and $P < 0.05$). As a result, 1820 and 2373 DEGs in CCl_4 - and DDC diet-treated mice were analyzed, including 1302 and 1978 upregulated genes, and 518 and 395 downregulated genes, respectively. GO annotation showed that the two models had important functions in molecular function, biological process, and cell component. KEGG analysis showed that 22 and 29 signaling pathways were activated in CCl_4 - and DDC diet-induced models, respectively. Among them, 16 signaling pathways, such as extracellular matrix receptor interaction, cell cycle, protein digestion and absorption, focal adhesion, and PI3K-Akt, were significantly enriched in the two models ($P < 0.05$). Cluster analysis showed that *Mup11*, *Mup15*, *Mup17*, and *Mup1* were significantly down-regulated in both models, which were identified by RT-qPCR ($P < 0.05$). **Conclusions** This study conducted a comparative analysis of the RNA-Seq transcriptomic features of liver fibrosis models induced by exposure to CCl_4 and a DDC diet. It examined the gene expression patterns and the pathways influenced by gene expression. The findings serve as a valuable resource for selecting appropriate animal models for future research on the pathogenesis and treatment of liver fibrosis.

[Keywords] liver fibrosis; experimental animal models; carbon tetrachloride; diethyl 1,4-dihydro-2,4,6-trimethyl-3,5-pyridinedicarboxylate; RNA-sequencing

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

肝纤维化是由于肝内弥漫性细胞外基质过度沉积引起的肝疾病^[1],目前常见的肝纤维化模型主要有毒性、胆汁和代谢诱导的肝纤维化模型,具有代表性的有四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4)、硫代乙酰胺/胆管结扎、3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氢可力丁(diethyl 1,4-dihydro-2,4,6-trimethyl-3,5-pyridinedicarboxylate, DDC)和高脂肪饮食诱发引起的^[2]。 CCl_4 模型是经典的肝毒素诱导的肝纤维化模型,主要表现为小叶中心肝细胞坏死,中央静脉周围纤维化;DDC模型是饮食诱导胆汁淤积的模型,主要变现为门静脉周围炎症、胆管增殖(也称为胆管反应)和胆汁性肝纤维化^[3]。本研究采用转录

组学基因测序的方法,比较两种模型血清肝功能、病理及肝组织差异基因的表达,以期为深入研究肝纤维化的发病机制和临床治疗提供模型的依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

C57BL/6小鼠,雄性,32只,SPF级,8周龄,体重(23 ± 2)g,购于维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0006]。所有小鼠饲养于上海中医药大学动物实验中心[SYXK(沪)2020-0009],自由饮水、饮食不受限,维持12h/12h光明/黑暗循环光照,室温22~23℃。本实验经上海中医药大学

实验动物中心伦理委员会审查批准 (SZY201710014, SZY201804009), 并按实验动物使用 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

DDC (批号: 102579026)、反式-4-羟基-L-脯氨酸 (Trans-4-Hydroxy-L-prolin, Hyp, 批号: 20230621) 购于 Sigma-Aldrich 公司; CCl_4 (批号: 20161116) 购于国药集团化学试剂有限公司; Mouse IL-6 Uncoated ELISA Kit (批号: 279559-008)、Mouse IL-1 beta (IL-1 β) Uncoated Elisa Kit (批号: 267273-010)、Mouse TNF alpha (TNF- α) Uncoated ELISA Kit (批号: 297764-002) 均购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司。DP71 显微图像分析仪 (OLYMPUS, 日本); NanoDrop 2000 分光光度计 (Thermo Scientific, 美国); Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, 美国); Novaseq 6000 测序平台 (Illumina, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与小鼠模型制备

CCl_4 染毒模型: 16 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠, 适用性饲养 2 周后, 按体重分层随机分为 2 组: 正常对照组 1 (CCl_4 -N, $n=8$)、模型对照组 1 (CCl_4 -M, $n=8$)。 CCl_4 -M 组予腹腔注射 10% CCl_4 诱导肝纤维化模型, 剂量为 $2 \text{ mL/kg}^{[4]}$, 2 d 1 次, 每周连续 3 次, 共持续 4 周。 CCl_4 -N 组小鼠于相同时间点腹腔注射等体积橄榄油。

DDC 饮食模型: 16 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠, 适用性饲养 2 周后, 按体重分层随机分为 2 组: 正常对照组 2 (DDC-N, $n=8$)、模型对照组 2 (DDC-M, $n=8$)。 DDC-M 组予 0.1% DDC 饲料喂养^[5], DDC-N 组予不含 DDC 的普通饲料喂养, 共连续喂养 4 周。

1.3.2 样本采集

造模 4 周后, 各组小鼠按体重腹腔注射 3% 戊巴比妥钠溶液进行麻醉, 剂量为 30 mg/kg 。下腔静脉取血, 收集血清; 摘取肝、脾, 称重记录。留取约 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm} \times 0.3 \text{ cm}$ 大小肝组织, 10% 甲醛溶液固定。

1.3.3 血清肝功能检测

按试剂盒说明书操作检测小鼠血清 ALT、AST、TBil 及 Alb 水平。

1.3.4 肝组织 Hyp 含量检测

在冰水混合物上称取约湿肝 50 mg, 参照 Jamall 盐酸水解法^[6]检测肝组织 Hyp 含量, 结果以“ $\mu\text{g/g}$

肝组织”表示。

1.3.5 肝组织病理染色

取 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 0.3 \text{ cm}$ 大小肝组织固定于 10% 中性甲醛溶液。固定 24 h 后, 梯度乙醇逐级脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片。HE 染色观察肝组织炎症活动情况, 并根据 Scheuer 评分系统对炎症程度进行分级^[7]。天狼猩红染色观察肝组织胶原沉积情况, 采用 Ishak 评分系统对肝纤维化进行分期^[8]。

1.3.6 ELISA 检测

称取 50 mg 的肝组织置于含 0.5 mL RIPA 裂解液的离心管中, 置入组织匀浆机中裂解蛋白, 4°C 以 $12\,000 \text{ r/min}$ 离心 10 min, 收集组织上清液。按试剂盒说明书检测肝组织上清 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量。

1.3.7 RNA 提取、文库构建和测序

采用 TRIzol 裂解液提取小鼠的总 RNA, 检测 RNA 纯度及分析 RNA 的完整性。质检合格后构建转录组文库, 并在 Illumina Novaseq 6000 测序平台对文库进行测序, 获得待测片段的序列信息。利用 Fastp 软件对原始数据进行质控并过滤, 去除低质量及冗余序列^[9]。

1.3.8 差异表达基因筛选

采用 R4.2.1 软件的“DESeq2 包”对原始 Counts 矩阵进行标准化处理及差异分析^[10], 将筛选条件设为 $|\text{LogFC}| > 2$ 和 $p.\text{adj} < 0.05$, 获取上调和下调的差异基因。利用“ggplot2[3.3.6]包”和“VennDiagram[1.7.3]包”绘制火山图、韦恩图和 UpSet 图^[11]。

1.3.9 蛋白质与蛋白质互作 (protein-protein interaction, PPI) 分析

采用 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>, 更新至 2023 年 8 月 13 日), 检索类型为 Multiple Proteins by Names/Identifiers, 基因类型为小鼠 (mus musculus); 对网络呈现交互分数选择高等可信值 0.7; 同时隐藏孤立的蛋白, 获得差异表达基因的 PPI 网络图。

1.3.10 GO 和 KEGG 富集分析

利用 R4.2.1 软件的“org. Mm. eg. db 包”将差异基因 ($|\text{LogFC}| > 2$ 且 $p.\text{adj} < 0.05$) 转换成 EntrezID, 再通过“clusterProfiler[4.4.4]包”进行 GO 和 KEGG 富集分析, 显著性 cut-off 值设置为 $p.\text{adj} < 0.05$, 获得生物学过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能

(molecularfunction, MF) 上的基因富集数, 并绘制 GO 和 KEGG 气泡图^[12]。

1.3.11 关键基因的实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 验证

通过 RT-qPCR 检测关键基因的表达水平, 进一步验证转录序列数据的可靠性。提取 15 mg 肝组织的总 RNA, 逆转录为 cDNA 模板, 并参照说明书进行 PCR 扩增。根据各组的 Ct 值, 选用 *GAPDH* 作为内参基因, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组样本 mRNA 的相对表达量。引物序列详见表 1。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。计量资料以平均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示; 若符合正态分布时采用独立样本 *t* 检验分析; 若不符合正态分布时采用非参数检验。单有序分类资料采用 Ridit 分析;

以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种模型小鼠一般情况比较

正常小鼠皮毛有光泽, 活泼好动, 自由饮食饮水不受限。与正常小鼠相比, CCl₄ 染毒小鼠随着造模时间的延长, 出现体重下降、食欲减退、行动迟缓, 肝/体比与脾/体比明显增加 ($P<0.01$)。DDC 饮食的小鼠食量减退、反应迟缓、活动减少、皮毛无光泽, 小鼠脚掌及耳缘皮肤黄染明显, 肝指数显著增加 ($P<0.05$)。见表 2、表 3。

2.2 两种模型血清肝功能情况比较

经 CCl₄ 染毒或 DDC 饮食后, 小鼠血清 ALT、AST、TBil 水平均显著升高 ($P<0.01$), Alb 水平均明显降低 ($P<0.01$)。见表 4、表 5。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因名 Gene name	上游引物序列 (5'→3') Upstream primer sequence (5'→3')	下游引物序列 (5'→3') Downstream primer sequence (5'→3')
<i>Mup15</i>	TGAAGATGCTGTGCTGCTGTG	GTCAGAGGCCAGGATAATAGTATGC
<i>Mup-ps16</i>	TGGCAGGTAGTAGCAAAGAAAGTG	AATCTCATTCATTCTCGGTCCACAC
<i>Mup12</i>	TGTGAGAAGCATGGAATCCTTAGAG	TGGAGGCAGCGATCTGTAGTGG
<i>Mup7</i>	GTTCAGACATCAAGGAAAGGTTTGC	GAGGCAGCGATTGGCATTGG
<i>Mup19</i>	GTTCAGACATCAAGGAAAGGTTTGC	GAGGCAGCGATTGGCATTGG
<i>Mup17</i>	GTTCAGACATCAAGGAAAGGTTTGC	GGAGGCAGCGATTGGCATTG
<i>Mup1</i>	GTTCAGACATCAAGGAAAGGTTTGC	GAGGCAGCGATTGGCATTGG
<i>Mup5</i>	TCGAGAACCAGATTGAGTTCAGAC	GGAGGCAGCGATTGGCATTG
<i>Mup11</i>	GTTCAGACATCAAGGAAAGGTTTGC	GAGGCAGCGATTGGCATTGG
<i>Hsd3b5</i>	AGCCAAGGTGACGGTACTGAG	GCAGCGGTGTGGATGATGAC
<i>Mup13</i>	GTTCAGACATCAAGGAAAGGTTTGC	GAGGCAGCGATTGGCATTGG
<i>Moxd1</i>	GCCTGCCAGTGAATGTGAGATG	ACACCAAAGGTTCTGCTTTATAGGG
<i>S100g</i>	CCGGACCAGCTCTCCAAGG	AACTTCTCCATCGCCATTCTTATCC
<i>Sprr1a</i>	GCCAGCCTAAGGTGCCAGAG	GTATGCTGATGGAGTGACAGTTGAG
<i>Gpnmf</i>	AGATGCCAGAAGGAAGATGCTAATG	CAGGTCAGATGTCAGTCCCAAATC
<i>Vmn2r3</i>	AACGTGTTTCTCCACCACCAAAGC	CTCCAGCAAGTGACATAGTTGATCC
<i>Atf3</i>	GGAAGAGCTGAGATTCGCCATC	TCTGTTGTTGACGGTAACTGACTC
<i>Egr2</i>	CCTGAACTGGACCACCTCTACTC	GGCGGCGATAAGAATGCTGAAG
<i>Dmkn</i>	AACAGCGGCAACAGCAACAG	ACCACCCTTCCACCCTTCC
<i>Cyp2b9</i>	AGCGGAGTGTGAGGAGAGG	AAGACAATGGAGCAGATGATGTTGG
<i>Cdc25c</i>	TGACAACTGAACTTGCTGGACAG	ATCTCTTCTGCCTGGTCTTCTCC
<i>Tinag</i>	CACCTCTGATTGCTGTCTGATTAC	TCTGGGTCTGAAGGCTGTTGG
<i>Sle7a11</i>	GTTCGCTGTCTCCAGGTTATTCTAC	AGAGCATCACCATCGTCAGAGG
<i>Fmo3</i>	TGCCTTCTGTAAACGACATGATGG	GTCTGGATGGTGGTCTATTGC
<i>Cftr</i>	AATAGTCGTCTCGGCATTACAACC	GCTGTGCTGTATGAAGGAAGTAGG
<i>Aszl</i>	GGCTGCTGGAGGCGAGAG	GGTGTGCTAGTCTTTCTTAAATGTC
<i>Mmp12</i>	GGACAACTCAACTCTGGCAATAATG	CGCTTCATCCATCTTGACCTCTG
<i>Cla3a2</i>	GCAGAGACAGTACTTGGACTTAC	ATGTGAGCGGTAGCCAGGAG
<i>Fbn2</i>	TCTGAATGCTGCTGTGCTAATCC	GATGCCGATGCCACTGCTAC
<i>Gapdh</i>	GACTCCACTCAGGCAAAATTCAC	GACACCACTAGACTCCACGACATAC

表 2 CCl₄ 染毒对小鼠肝/体比和脾/体比的影响 (n=8, $\bar{x}\pm s$)
Table 2 Effect of CCl₄ toxicity on liver/body and spleen/body ratios in mice

组别 Groups	肝/体比/% Liver/body ratio	脾/体比/% Spleen/body ratio
正常对照组 1 CCl ₄ -N group	4. 21±0. 08	3. 70±0. 35
模型对照组 1 CCl ₄ -M group	5. 32±0. 08 **	6. 10±0. 35 **

注:与正常对照组 1 相比, ** P<0. 01。
Note. Compared with CCl₄-N group, ** P<0. 01.

表 3 DDC 饮食对小鼠肝、脾体比的影响 (n=8, $\bar{x}\pm s$)
Table 3 Effect of DDC diet on liver/body and spleen/body ratios in mice

组别 Groups	肝/体比/% Liver/body ratio	脾/体比/% Spleen/body ratio
正常对照组 2 DDC-N group	3. 85±0. 26	4. 48±1. 44
模型对照组 2 DDC-M group	9. 01±0. 77 **	6. 14±0. 74 *

注:与正常对照组 2 相比, * P<0. 05, ** P<0. 01。
Note. Compared with DDC-N group, * P<0. 05, ** P<0. 01.

表 4 CCl₄ 染毒对小鼠血清肝功能的影响 (n=8, $\bar{x}\pm s$)
Table 4 Effects of CCl₄ toxicity on serum liver function in mice

组别 Groups	丙氨酸氨基转移酶/(IU/L) ALT	天门冬氨基转移酶/(IU/L) AST	总胆红/(μmol/L) TBIL	白蛋白/(g/L) Alb
正常对照组 1 CCl ₄ -N group	23. 94±1. 56	32. 56±3. 90	4. 02±0. 19	29. 95±0. 69
模型对照组 1 CCl ₄ -M group	162. 49±2. 13 **	131. 45±6. 19 **	9. 55±0. 44 **	21. 90±0. 18 **

注:与正常对照组相比, ** P<0. 01。
Note. Compared with CCl₄-N group, ** P<0. 01.

表 5 DDC 喂养对小鼠血清肝功能的影响 (n=8, $\bar{x}\pm s$)
Table 5 Effects of DDC diet on serum liver function in mice

组别 Groups	丙氨酸氨基转移酶/(IU/L) ALT	天门冬氨基转移酶/(IU/L) AST	总胆红/(μmol/L) TBIL	白蛋白/(g/L) Alb
正常对照组 2 DDC-N group	22. 92±6. 66	21. 54±8. 86	2. 65±0. 59	32. 56±0. 73
模型对照组 2 DDC-M group	153. 18±12. 20 **	118. 15±17. 02 **	11. 88±0. 90 **	26. 26±1. 61 **

注:与正常对照组 2 相比, ** P<0. 01。
Note. Compared with DDC-N group, ** P<0. 01.

2.3 两种模型肝组织 HE 和天狼猩红染色比较

正常小鼠肝组织肝小叶结构完整、肝窦清晰;肝细胞呈条索状排列整齐,在中央静脉周围呈放射状分布;汇管区无明显炎症细胞浸润,炎症分级均为 G0,纤维化分期均为 S0。CCl₄ 染毒小鼠肝板结构破坏,肝细胞排列紊乱呈气球样变,汇管区周围可见许多炎性细胞浸润,炎症分级主要以 G3 为主,纤维化分期主要以 S3 为主。DDC 喂养小鼠肝肝细胞排列紊乱,汇管区及胆管周围可见大量炎症细胞

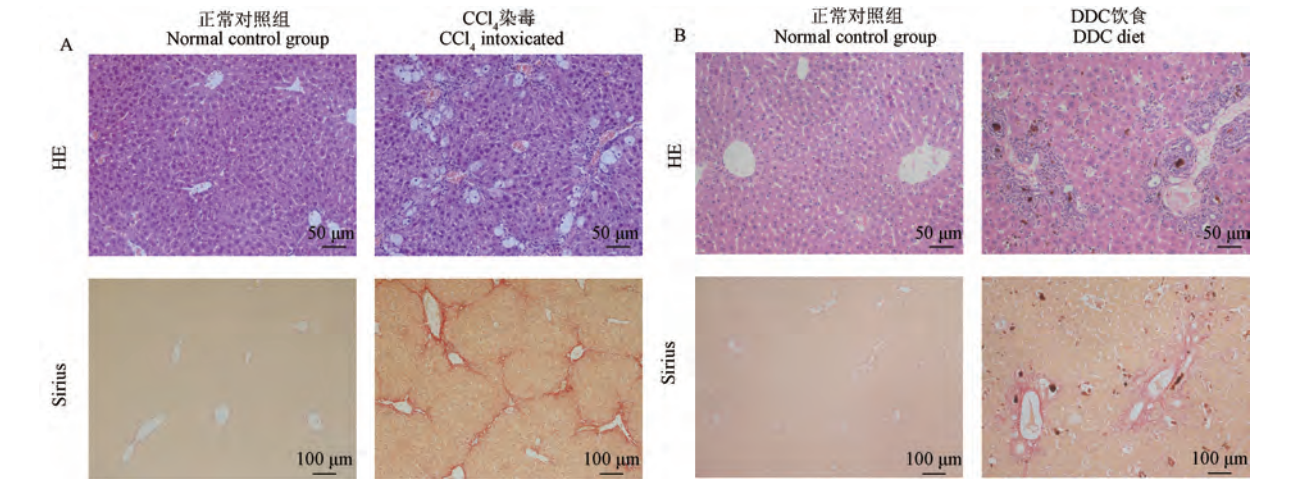
浸润,炎症分级主要以 G3 为主,纤维化分期主要以 S2 为主。见图 1、表 6~表 9。

2.4 两种模型肝组织 Hyp 水平比较

经 CCl₄ 染毒或 DDC 饮食后,小鼠肝组织 Hyp 含量均显著升高(P<0. 01)。见表 10、表 11。

2.5 两种模型肝组织炎症因子水平比较

经 CCl₄ 染毒或 DDC 饮食后,小鼠肝组织炎症因子 IL-1β、TNF-α、IL-6 含量均显著升高 (P<0. 01)。见表 12、表 13。



注:A:CCl₄ 模型;B:DDC 模型。

图 1 两种模型肝组织 HE 和天狼猩红染色情况

Note. A, CCl₄ model. B, DDC model.

Figure 1 HE and Sirius red staining of liver tissue in two models

表 6 CCl₄ 染毒对小鼠肝炎症分级的影响 (n=8, $\bar{x}\pm s$)

Table 6 Effects of CCl₄ toxicity on the grades of liver inflammation in mice

组别 Groups	肝炎症分级 Grades of liver inflammation					Ridit 分析 Ridit analysis
	0 级	1 级	2 级	3 级	4 级	R 值
	G0	G1	G2	G3	G4	R value
正常对照组 1 CCl ₄ -N group	8	0	0	0	0	0.25
模型对照组 1 CCl ₄ -M group	0	1	2	4	1	0.75 **

注:与正常对照组 1 相比, ** P<0.01。

Note. Compared with CCl₄-N group, ** P<0.01.

表 7 CCl₄ 染毒对小鼠肝纤维化分期的影响 (n=8, $\bar{x}\pm s$)

Table 7 Effects of CCl₄ toxicity on the stages of liver fibrosis in mice

组别 Groups	肝纤维化分期 Stages of liver fibrosis					Ridit 分析 Ridit analysis
	0 期	1 期	2 期	3 期	4 期	R 值
	S0	S1	S2	S3	S4	R value
正常对照组 1 CCl ₄ -N group	8	0	0	0	0	0.25
模型对照组 1 CCl ₄ -M group	0	0	3	5	0	0.75 **

注:与正常对照组 1 相比, ** P<0.01。

Note. Compared with CCl₄-N group, ** P<0.01.

表 8 DDC 饮食对小鼠肝炎症分级的影响 (n=8, $\bar{x}\pm s$)

Table 8 Effects of DDC diet on the grading of liver inflammation in mice

组别 Groups	肝炎症分级 Grades of liver inflammation					Ridit 分析 Ridit analysis
	0 级	1 级	2 级	3 级	4 级	R 值
	G0	G1	G2	G3	G4	R value
正常对照组 2 DDC-N group	8	0	0	0	0	0.25
模型对照组 2 DDC-M group	0	0	2	5	1	0.75 **

注:与正常对照组 2 相比, ** P<0.01。

Note. Compared with DDC-N group, ** P<0.01.

表 9 DDC 饮食对小鼠肝纤维化分期的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)
Table 9 Effects of DDC diet on the staging of liver fibrosis in mice

组别 Groups	肝纤维化分期 Stages of liver fibrosis					Ridit 分析 Ridit analysis
	0 期	1 期	2 期	3 期	4 期	R 值
	S0	S1	S2	S3	S4	R value
正常对照组 2 DDC-N group	8	0	0	0	0	0.25
模型对照组 2 DDC-M group	0	4	4	0	0	0.75**

注:与正常对照组 2 相比, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with DDC-N group, ** $P<0.01$.

表 10 CCl₄ 染毒对小鼠肝组织 Hyp 水平的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)
Table 10 Effects of CCl₄ toxicity on Hyp levels in mouse liver tissue

组别 Groups	Hyp (μg/g 肝组织) Hyp (μg/g liver tissue)
正常对照组 1 CCl ₄ -N group	45.10±6.29
模型对照组 1 CCl ₄ -M group	202.37±54.32**

注:与正常对照组 1 相比, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with CCl₄-N group, ** $P<0.01$.

表 11 DDC 饮食对小鼠肝组织 Hyp 水平的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)
Table 11 Effects of DDC diet on Hyp levels in mouse liver tissue

组别 Groups	Hyp (μg/g 肝组织) Hyp (μg/g liver tissue)
正常对照组 2 DDC-N group	44.70±10.17
模型对照组 2 DDC-M group	149.94±7.69**

注:与正常对照组 2 相比, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with DDC-N group, ** $P<0.01$.

表 12 CCl₄ 染毒对小鼠血清炎症因子水平的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)
Table 12 Effects of CCl₄ toxicity on serum inflammatory factor levels in mice

组别 Groups	白介素-1β IL-1β	肿瘤坏死因子-α TNF-α	白介素-6 IL-6
正常对照组 1 CCl ₄ -N group	4.27±2.16	3.45±1.09	2.68±0.53
模型对照组 1 CCl ₄ -M group	44.31±6.23**	12.28±2.25**	5.04±0.62**

注:与正常对照组 1 相比, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with CCl₄-N group, ** $P<0.01$.

表 13 DDC 饮食对小鼠血清炎症因子水平的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)
Table 13 Effects of DDC diet on serum inflammatory factor levels in mice

组别 Groups	白细胞介素-1β IL-1β	肿瘤坏死因子-α TNF-α	白介素-6 IL-6
正常对照组 2 DDC-N group	3.38±0.35	1.86±0.79	2.20±0.89
模型对照组 2 DDC-M group	1392.36±227.64**	350.66±123.90**	16.36±1.45**

注:与正常对照组 2 相比, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with DDC-N group, ** $P<0.01$.

2.6 两种模型小鼠肝的差异表达基因

差异表达基因热图和火山图显示了两种模型小鼠肝差异基因的分布情况。与正常小鼠相比, CCl₄ 染毒小鼠肝组织 *S100g*、*Sprr1a*、*Gpnmb*、*Vmn2r3*、*Atf3*、*Egr2*、*Dmkn*、*Cyp2b9*、*Cdc25c*、*Bhlha15* 等 1302 个基因表达显著上调, *Mup15*、*Mup-ps16*、*Mup12*、*Mup7*、*Mup19*、*Mup17*、*Mup1*、*Mup5*、*Mup11*、*Hsd3b5* 等 518 个基因表达显著下调;DDC 饮食小鼠肝组织 *Sprr1a*、*Cacna1b*、*Tinag*、*Slc7a11*、*Fmo3*、*Cftr*、

Asz1、*Mmp12*、*Clca3a2*、*Fbn2* 等 1978 个基因表达显著上调, *Mup13*、*Mup1*、*Mup11*、*Mup7*、*Mup15*、*Mup19*、*Moxd1*、*Mup17*、*Mup12*、*Hsd3b5* 等 395 个基因表达显著下调。

将 CCl₄ 染毒模型的差异基因与 DDC 饮食模型的差异基因取交集,结果发现共有 1055 个交集基因,其中同时在 CCl₄ 染毒与 DDC 饮食小鼠肝组织上调基因有 880 个: *Sprr1a*、*Gpnmb*、*Atf3*、*Egr2*、*Cyp2b9*、*Cdc25c*、*Fosl1*、*Akr1c18*、*Tinag* 等;同时下调

基因有 103 个：*Mup7*、*Mup1*、*Mup16*、*Hsd3b5*、*Mup19*、*Mup17*、*Mup11*、*Mup14*、*Mup18* 等(图 2)。

进一步分析,仅在 CCl₄ 染毒模型中表达的差异基因有 792 个,其中上调基因有 415 个：*S100 g*、*Vmn2r3*、*Dmkn*、*Bhlha15*、*Areg* 等;下调基因有 377 个：*Irx1*、*Fitm1*、*Slc22a3*、*Vwa5b2*、*Dmrt2* 等;仅在 DDC 饮食模型中表达的差异基因有 1345 个,其中上调基因有 1060 个：*Cacna1b*、*Fmo3*、*Asz1*、*Krt20*、*Gjb3* 等;下调基因有 285 个：*Pitx3*、*Serpina9*、*Serpina1e*、*Trhde*、*Mup10* 等。

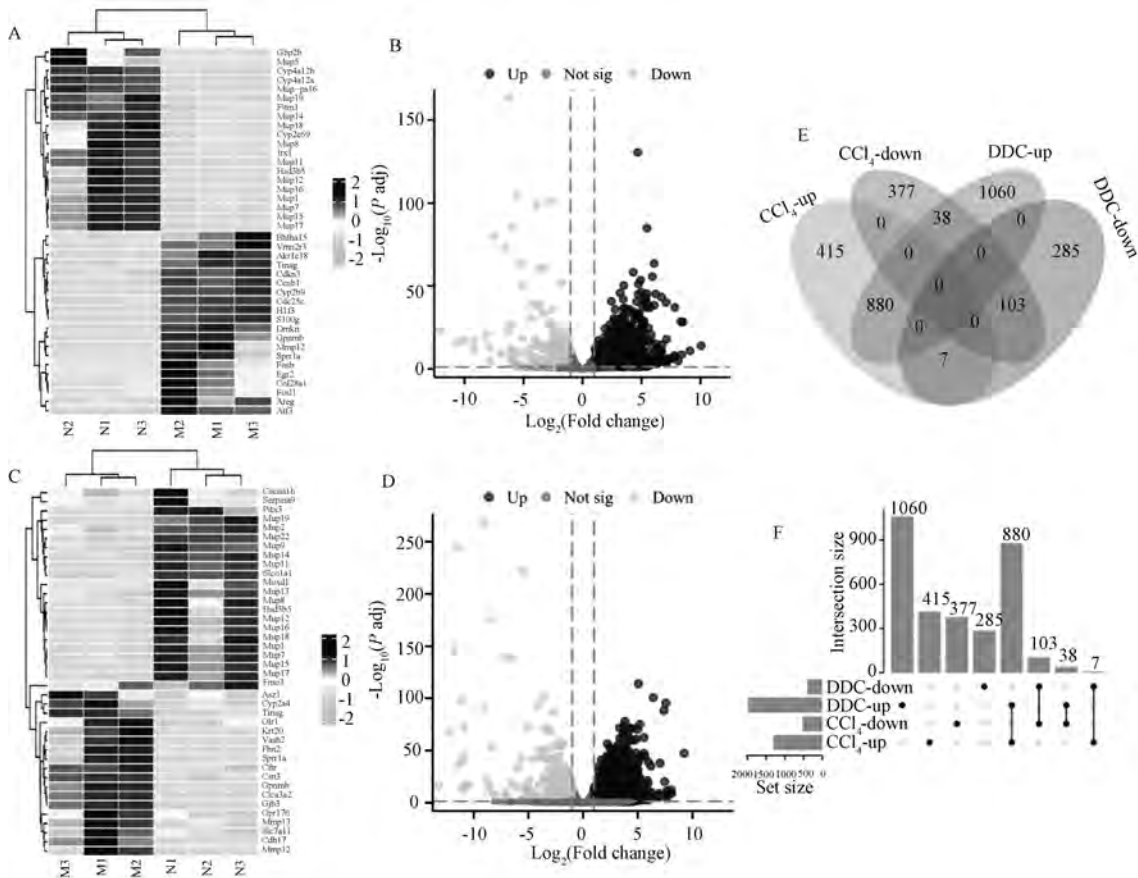
2.7 两种模型肝组织差异基因的 PPI 分析

通过 String 数据库构建差异两种模型肝组织差异基因的蛋白网络互作图,CCl₄ 染毒模型的差异基

因组成互作网络主要与 *Bublb*、*Kif11*、*Plk1*、*Cdk1*、*Cdc20*、*Cenpe*、*Bub1*、*Ccna2*、*Cdca8*、*Cenpf* 等蛋白相关,占据了其 PPI 网络的中心位置;DDC 饮食模型的差异基因组成互作网络主要与 *Bublb*、*Cdk1*、*Plk1*、*Cenpe*、*Ccna2*、*Cenpf*、*Bub1*、*Kif20a*、*Cdc20*、*Cdca8* 等蛋白相关,占据了其 PPI 网络的中心位置;将 CCl₄ 染毒模型的差异基因与 DDC 饮食模型的差异基因取交集,结果发现两者的交集基因组成的互作网络主要与 *Kif11*、*Bublb*、*Plk1*、*Cdk1*、*Cenpe*、*Bub1*、*Cdc20*、*Ccna2*、*Cdca8*、*Cenpf* 等蛋白相关,占据了其 PPI 网络的中心位置(图 3)。

2.8 两种模型肝组织差异表达基因的 GO 分析

CCl₄ 染毒模型中,小鼠肝差异表达基因在 1853

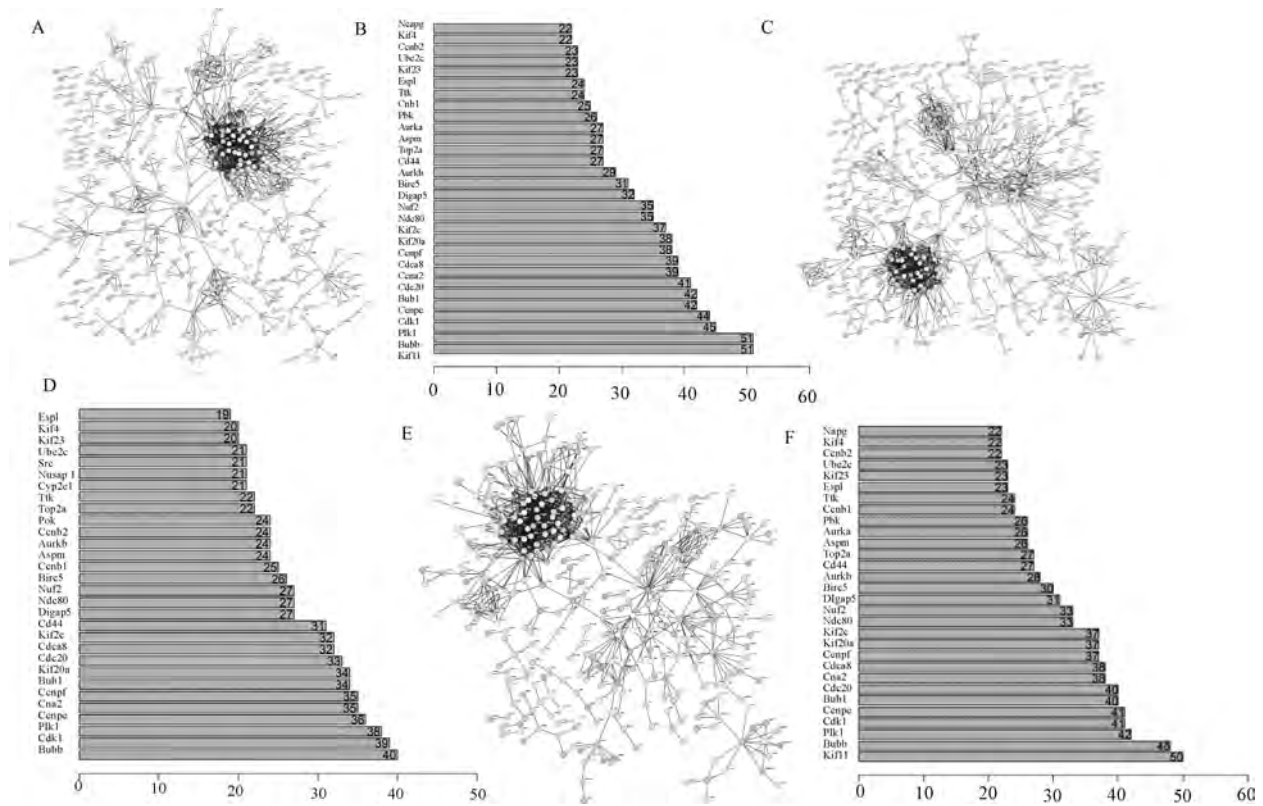


注:A:正常小鼠和 CCl₄ 染毒小鼠肝差异基因热图;B:正常小鼠和 CCl₄ 染毒小鼠肝差异基因火山图;C:正常小鼠和 DDC 饮食小鼠肝差异基因热图;D:正常小鼠和 DDC 饮食小鼠肝差异基因火山图;E:CCl₄ 模型和 DDC 模型差异基因的韦恩图;F:CCl₄ 模型和 DDC 模型差异基因的 Upset 图。

图 2 两种模型肝组织差异基因比较情况

Note. A, Heat map for hepatic differential genes between normal mice and CCl₄ toxicity mice. B, Volcano map for hepatic differential genes between normal mice and CCl₄ toxicity mice. C, Heat map for hepatic differential genes between normal mice and DDC diet mice. D, Volcano map for hepatic differential genes between normal mice and DDC diet mice. E, Venn diagram for differential genes between CCl₄ and DDC models. F, Upset diagram for differential genes between CCl₄ and DDC models.

Figure 2 Comparisons of differential genes between two models in liver tissue



注:A:正常小鼠和 CCl₄ 染毒小鼠肝差异基因 PPI 网络图;B:调控正常小鼠和 CCl₄ 染毒小鼠肝差异基因 PPI 网络排名前 30 名关键基因;C:正常小鼠和 DDC 饮食小鼠肝差异基因 PPI 网络图;D:调控正常小鼠和 DDC 饮食小鼠肝差异基因 PPI 网络排名前 30 名关键基因;E:CCl₄ 模型和 DDC 模型小鼠肝差异基因 PPI 网络图;F:调控 CCl₄ 模型和 DDC 模型小鼠肝差异基因 PPI 网络排名前 30 名关键基因。

图 3 两种模型肝组织差异基因的 PPI 网络图

Note. A, PPI network map of liver differential genes in normal mice and CCl₄ toxicity mice. B, Top 30 genes in the PPI network that regulate the differential expression of liver genes in normal mice and CCl₄ toxicity mice. C, PPI network map of liver differential genes in normal mice and DDC diet mice. D, Top 30 genes in the PPI network that regulate the differential expression of liver genes in normal mice and DDC diet mice. E, PPI network map of liver differential genes in CCl₄ toxicity mice and DDC diet mice. F, Top 30 genes in the PPI network that regulate the differential expression of liver genes in CCl₄ toxicity mice and DDC diet mice.

Figure 3 PPI network for differential genes of the two models in liver tissue

个生物过程 (biological process, BP)、204 个细胞组分 (cell component, CC) 和 257 个分子功能 (molecular function, MF) 中富集。BP 包括染色体分离、减数分裂细胞周期、核分离、细胞器位置的建立、膜电位的调节等过程;CC 包括含胶原蛋白的细胞外基质、微管、谷氨酸能突出、浓缩染色体、离子通道复合物等组分;MF 包括细胞粘附分子结合、离子通道激活、细胞外基质结构组成、糖胺聚糖结合、GTP 酶调节器的激活等功能(图 4A)。

DDC 饮食模型中,小鼠肝差异表达基因在 2184 个 BP、180 个 CC 和 242 个 MF 中富集。BP 包括细胞粘附的正向调节、细胞外基质组织形成、细胞趋化、外界刺激正向调控、免疫系统的负向调节等过程;CC 包括包含胶原蛋白的外基质、微管、染色体区

域、基底膜、跨膜转运蛋白复合物等组分;MF 包括细胞粘附分子结合、肌动蛋白结合、微管蛋白结合、糖胺聚糖结合、G 蛋白偶联受体结合等功能(图 4B)。

CCl₄ 染毒模型的差异基因与 DDC 饮食模型的差异基因取交集,结果发现两者的交集基因在 1355 个 BP、128 个 CC 和 146 个 MF 中富集。BP 包括细胞外基质组织的形成、核分离、突触组织的形成、染色体分离调节、减数核分裂等过程(图 4C);CC 包括胶原蛋白的外基质、染色体着丝粒区、染色体区域、突触前、胶原蛋白三聚体等组分(图 4D);MF 包括细胞外基质结构组成、细胞粘附分子结合、细胞外基质结构的抗拉强度、糖胺聚糖结合、肝素结合等功能(图 4E)。

进一步分析两种模型的非交集基因在 BP、CC

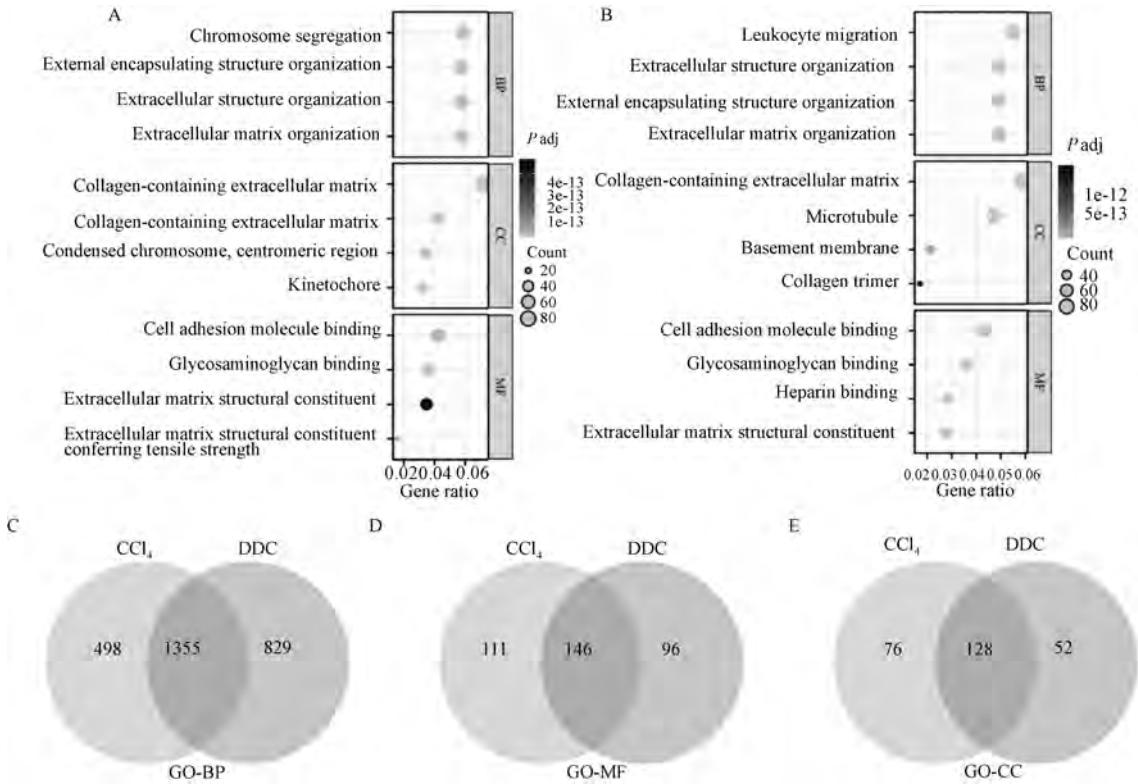
和 MF 中的富集情况,结果发现:仅在 CCl₄ 染毒模型表达的差异基因在 984 个 BP、151 个 CC 和 190 个 MF 中富集。BP 包括突触组织、认识、学习或者记忆等过程;CC 包括突触前、突触膜、神经元突触等过程;MF 被动跨膜转运体活性、通道活性、离子通道活性等过程。仅在 DDC 饮食模型表达的差异基因在 1421 个 BP、159 个 CC 和 234 个 MF 中富集。BP 包括突触认识、白细胞迁移、认识等过程;CC 包括突触前、受体复合体、突触膜等过程;MF 包括金属离子跨膜转运体活性、通道活性、门控通道活动等过程。

2.9 两种模型肝组织差异表达基因的 KEGG 分析

CCl₄ 染毒模型中,小鼠肝差异表达基因 KEGG 结果显示,共激活 22 条信号通路。排名前 5 位的信号通路包括:PI3K-Akt、MAPK、焦点粘附、细胞因子间相互作用、细胞周期等(图 5A)。DDC 饮食模型

中,小鼠肝差异表达基因 KEGG 结果显示,共激活 29 条信号通路,排名前 5 位的信号通路包括:细胞因子间相互作用、PI3K-Akt、焦点粘附、趋化因子、MAPK 等信号通路(图 5B)。将两种模型的 KEGG 通路取交集,共 16 条信号通路有交集,分别是细胞外基质受体的相互作用、细胞周期、蛋白的消化与吸收、焦点粘附、PI3K-Akt 等信号通路(图 5C)。

进一步分析两种模型的非交集基因在 KEGG 中的富集情况,结果发现:仅在 CCl₄ 染毒模型表达的差异基因在 19 个 KEGG 通路中富集,包括神经活性配体-受体相互作用、MAPK 信号通路、钙离子信号通路、cAMP 信号通路等。仅在 DDC 饮食模型表达的差异基因在 22 个 KEGG 通路中富集,包括细胞因子与细胞因子受体的相互作用、钙离子信号通路、Rap1 信号通路、趋化因子信号通路、PPAR 信号通路等。



注:A:正常小鼠和 CCl₄ 染毒小鼠差异表达基因的 GO 分析图;B:正常小鼠和 DDC 饮食小鼠肝差异基因 GO 分析图;C: CCl₄ 模型和 DDC 模型小鼠肝差异基因的 GO 分析中 BP 的韦恩图;D: CCl₄ 模型和 DDC 模型小鼠肝差异基因的 GO 分析中 CC 的韦恩图 E: CCl₄ 模型和 DDC 模型小鼠肝差异基因的 GO 分析中 MF 的韦恩图。

图 4 两种模型肝组织差异表达基因的 GO 分析

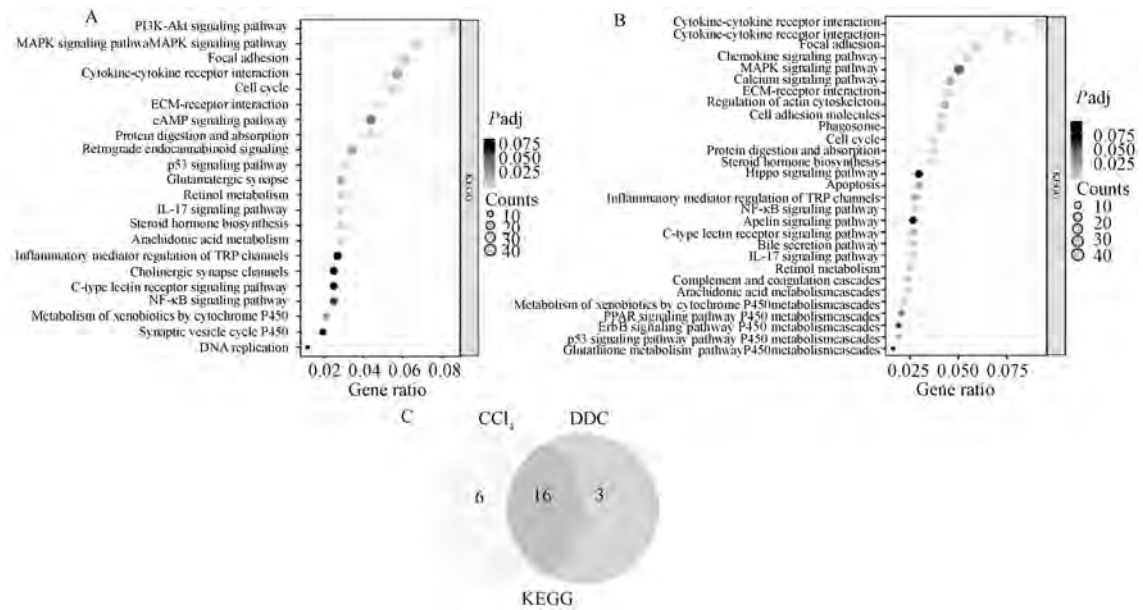
Note. A, GO analysis of differentially expressed genes between normal mice and CCl₄ toxicity mice. B, GO analysis of liver differential genes in normal mice and DDC diet mice. C, Venn diagram of BP in GO analysis of liver differential genes in CCl₄ and DDC models. D, Venn diagram of CC in GO analysis of liver differential genes in CCl₄ and DDC models. E, Venn diagram of MF in GO analysis of liver differential genes in CCl₄ and DDC models.

Figure 4 GO analysis of differentially expressed genes of the two models in liver tissues

2.10 两种模型肝组织差异表达基因的 RT-qPCR 验证

为进一步验证转录组测序差异基因的表达水

平,将两组小鼠肝差异表达基因关键基因进行 RT-qPCR 验证。在 CCl₄ 模型中,上调最显著的 top10 基因是*Bhlha15*、*Cdc25c*、*Cyp2b9*、*Dmkn*、*Egr2*、*Atf3*、

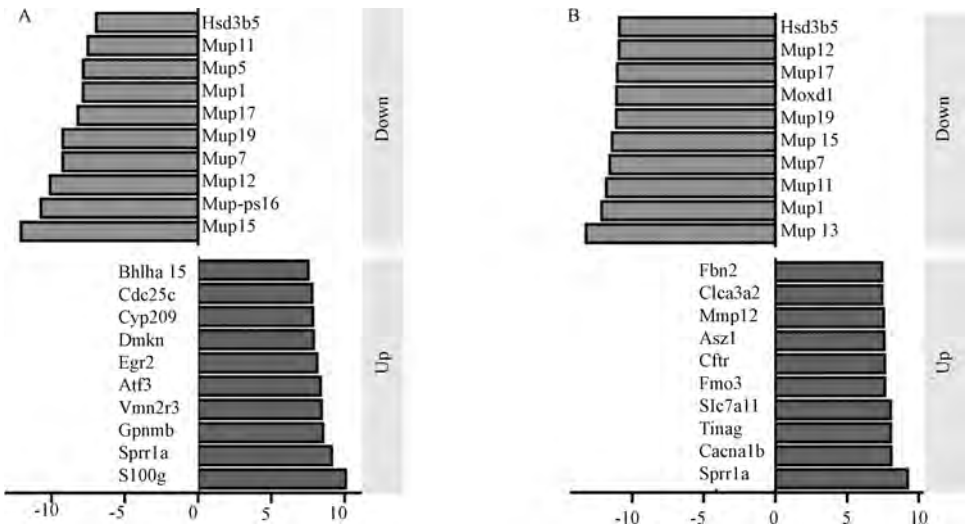


注:A:正常小鼠和 CCl₄ 染毒小鼠差异表达基因的 KEGG 分析图;B:正常小鼠和 DDC 饮食小鼠肝差异基因 KEGG 分析图;C:CCl₄ 模型和 DDC 模型小鼠肝差异基因的 KEGG 分析的韦恩图。

图 5 两种模型肝组织差异表达基因的 KEGG 分析

Note. A, KEGG analysis of differentially expressed genes between normal mice and CCl₄ toxicity mice. B, KEGG analysis of liver differentially genes between normal mice and DDC diet mice. C, Venn diagram of KEGG analysis of liver differential genes between CCl₄ and DDC models.

Figure 5 KEGG analysis of differentially expressed genes of the two models in liver tissues



注:A:正常小鼠与 CCl₄ 染毒小鼠肝组织差异基因表达双向柱状图;B:正常小鼠与 DDC 染毒小鼠肝组织差异基因表达双向柱状图。

图 6 两种模型肝组织上调和下调差异基因的表达水平

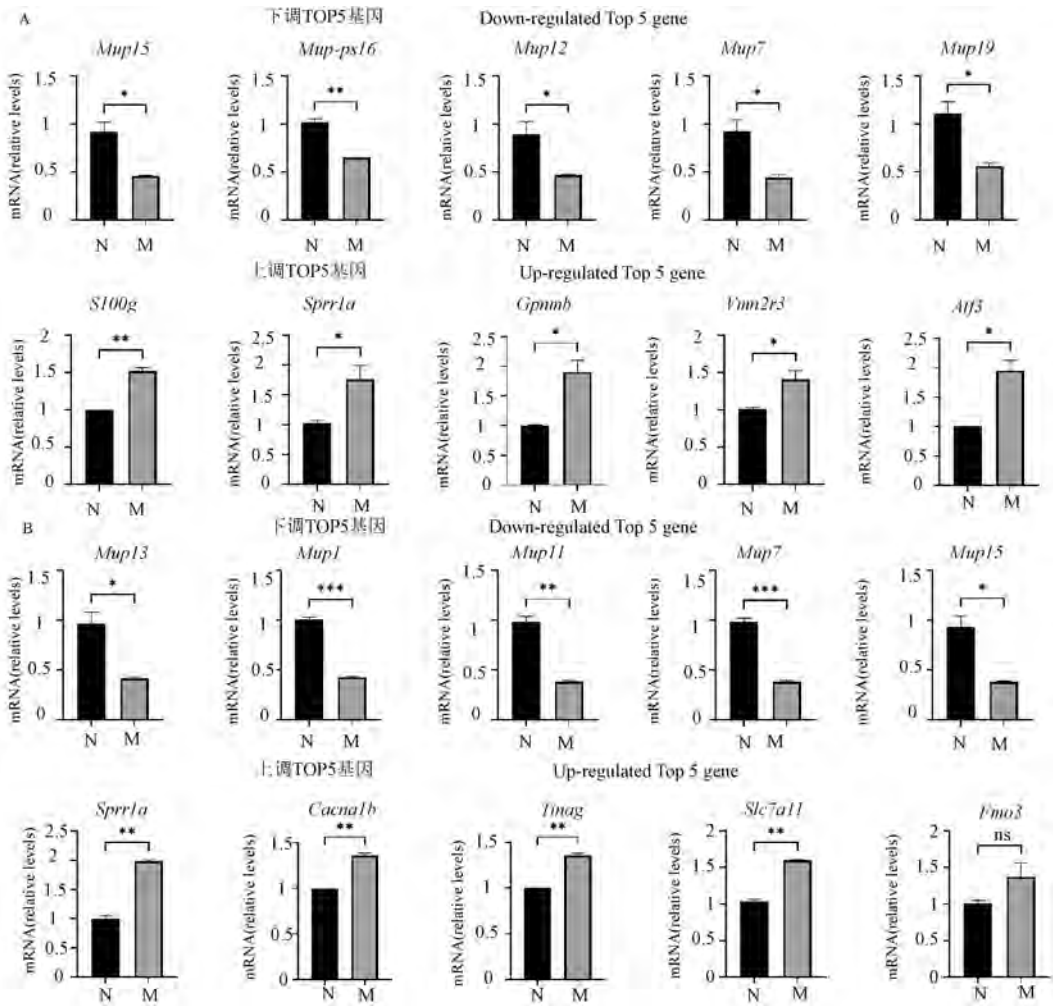
Note. A, Two-way histogram of differential genes expression between normal mice and CCl₄ toxicity mice. B, Two-way histogram of differential genes expression between normal mice and DDC diet mice.

Figure 6 Expression levels of liver up-regulated and down-regulated differentially expressed genes in two models

Vmn2r3、*Gpnmb*、*Sprr1a*、*S100 g*；下调最显著的 top10 基因是 *Hsd3b5*、*Mup11*、*Mup5*、*Mup17*、*Mup19*、*Mup7*、*Mup12*、*Mup-ps16*、*Mup15* (图 6A)。在 DDC 饮食模型中,上调最显著的 top10 基因是 *Sprr1a*、*Cacna1b*、*Tinag*、*Slc7a11*、*Fmo3*、*Cftr*、*Asz1*、*Mmp12*、*Clca3a2*、*Fbn2*；下调最显著的 top10 基因是 *Mup13*、*Mup1*、*Mup11*、*Mup7*、*Mup15*、*Mup19*、*Moxd1*、*Mup17*、*Mup12*、*Hsd3b5* (图 6B)。

与正常小鼠相比,CCl₄ 染毒小鼠的 *Bhlha15*、*Cdc25c*、*Cyp2b9*、*Dmkn*、*Egr2*、*Atf3*、*Vmn2r3*、*Gpnmb*、

Sprr1a、*S100 g* 基因 mRNA 表达显著上调 ($P < 0.05$)；*Hsd3b5*、*Mup11*、*AMup5*、*Mup1*、*Mup17*、*Mup19*、*Mup7*、*Mup12*、*Mup-ps16*、*Mup15* 基因 mRNA 表达显著下调 ($P < 0.05$)，与转录组测序趋势一致 (图 7A)。与正常小鼠相比,DDC 饮食小鼠的 *Sprr1a*、*Cacna1b*、*Tinag*、*Slc7a11*、*Fmo3*、*Cftr*、*Asz1*、*Mmp12*、*Clca3a2*、*Fbn2* 基因 mRNA 表达显著上调 ($P < 0.05$)；*Mup13*、*Mup1*、*Mup11*、*Mup7*、*Mup15*、*Mup19*、*Moxd1*、*Mup17*、*Mup12*、*Hsd3b5* 基因 mRNA 表达显著下调 ($P < 0.05$)，与转录组测序趋势一致 (图 7B)。



注:A:CCl₄ 染毒小鼠肝差异表达基因中下调 TOP 5 和上调 TOP 5 基因的 RT-qPCR 分析;B:DDC 饮食小鼠肝差异表达基因中下调 TOP 5 和上调 TOP 5 基因的 RT-qPCR。N:正常对照组;M:模型对照组。与模型对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图 7 CCl₄ 染毒和 DDC 饮食模型小鼠肝差异表达基因 RT-qPCR 分析

Note. A, RT-qPCR analysis of liver down-regulated TOP 5 and up-regulated TOP 5 differentially expressed genes in CCl₄ toxicity mice. B, RT-qPCR analysis of liver down-regulated TOP 5 and up-regulated TOP 5 differentially expressed genes in DDC diet mice. N, Normal control group. M, Model control group. Compared with model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 7 RT-qPCR analysis of liver differentially expressed genes in CCl₄ toxicity and DDC diet mice

3 讨论

肝纤维化是多种慢性肝疾病共同的病理结局，常见病因包括病毒感染、酒精滥用、毒物接触、药品使用不当、遗传代谢性疾病、自身免疫性疾病等^[13]。

尽管不同病因导致肝纤维化的血清生化及肝组织病理学特点有所差异,但多有肝组织炎症细胞浸润和肝胶原沉积等共同表现。目前,肝纤维化的治疗仍存在难点,针对各种病因引起的肝纤维化的病理机制以及相关治疗药物筛选的研究仍存在巨大挑战。目前,针对肝纤维化的病理、药理研究仍较大幅度地依赖于与人类肝纤维化病理机制相似的实验动物模型的建立与应用。

动物模型是研究肝纤维化病理生理机制重要的工具。在肝纤维化的研究中可采用的模型种类较多,目前常见的肝纤维化模型主要有:化学物质诱导的模型(如乙醇、四氯化碳、硫代乙酰胺、二甲基亚硝胺和二乙基亚硝胺等)、饮食诱导模型(如蛋氨酸和胆碱缺乏饮食、高脂肪饮食、胆碱缺乏的 L-氨基酸限定的饮食、DDC 饮食等)、手术模型(如胆管结扎)、转基因模型(如多药耐药相关蛋白 2 缺陷小鼠)、感染模型(如肝炎病毒感染)等^[14]。尽管这些模型均可导致不同程度的肝炎症和纤维化,但制备模型使用的诱导剂和诱导途径等不同都会影响模型小鼠的病理生理过程。 CCl_4 诱导肝纤维化模型是经典的肝毒素诱导模型,其模型特点表现为肝细胞气球样变及坏死、库普弗细胞激活和炎症反应,导致多种细胞因子产生,促进 HSC 激活,从而促进肝纤维化^[15]。DDC 饮食诱导肝纤维化模型是饮食诱导胆汁淤积的模型,其模型特点表现为原卟啉在肝的积累,进而在导管内形成卟啉栓,阻塞小胆管,损害胆管上皮,从而导致门静脉周围炎症、胆管增殖(也称为胆管反应)和胆汁性肝纤维化^[16]。以上两种模型在肝纤维化病理和药理机制研究中广泛应用,本研究复制 CCl_4 染毒和 DDC 饮食两种肝毒性化合物诱导的肝纤维化小鼠模型,旨在观察 CCl_4 染毒和 DDC 饮食这两种不同的肝毒性化合物诱导的肝纤维化模型共性和差异性的病理生理机制,拟通过转录组测序进一步洞悉这两种模型细胞和组织学特异性的表达特征,以进一步了解肝纤维化模型的分子机制。

研究通过检测 CCl_4 和 DDC 两种模型的血清肝功能(ALT、AST、TBil、Alb)、肝组织炎症因子(IL-6、IL-1 β 、TNF- α)、HE 病理染色评价肝炎症情况,通过检测肝组织 Hyp 含量及肝组织天狼猩红染色评价肝纤维化程度,发现这两种模型均可引起血清肝功能异常、肝炎症浸润和胶原沉积,与文献报道一致^[17]。但两种模型的病理表现有所差别: CCl_4 染毒

模型表现为小叶中心肝细胞坏死、细胞凋亡、中央静脉周围纤维化;DDC 饮食小鼠表现为门静脉周围炎症、胆管增殖(也称为胆管反应)和胆汁淤积性肝纤维化。

研究进一步使用生物信息学方法分析比较两种模型的转录组数据,探索这两种肝毒性化合物诱导肝纤维化模型关键基因构建的信号通路的共性和差异。结果发现, *Mup1*、*Mup11*、*Mup7*、*Mup15*、*Mup17*、*Mup12* 等基因在两种模型中均明显下调,且均在肝纤维化病理过程中参与了细胞因子-细胞因子受体相互作用、花生四烯酸代谢、类固醇激素生物合成、谷氨酸能突触、TRP 通道的炎症介质调节等与肝纤维化密切相关的通路及生物学过程。值得注意的是,这些共性作用基因均属于主要尿蛋白(major urinary protein, Mup)基因家族。Mup 由一个 ca. 35 基因家族编码,在几个分泌器官中以组织特异性方式表达,在肝、颌下、舌下腺、腮腺和泪腺以及皮肤皮脂腺中大量分布^[18-19]。Mups 与肝疾病密切相关,涉及肠道菌群调控^[20]、内质网应激反应^[21],并受到上皮-间质转分化重要蛋白锌指和同源盒 2 的调控^[22]。此外,在 CCl_4 和 DDC 两个肝纤维化模型中共同上调的基因主要涉及 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、ECM-受体相互作用、细胞周期、蛋白质消化和吸收等环节。更值得注意的是, *Cldn15*、*Derl3*、*Hspa1b*、*Lrp2*、*Ltf* 等基因在 CCl_4 模型中上调,而在 DDC 模型中表现为下调; *Amer2*、*Aplp1*、*Bex2*、*Bsn*、*Camk2a* 等基因在 CCl_4 模型中下调,而在 DDC 模型中表现为上调,这提示同种基因在不同的生理病理状态下可能发挥不同的作用。

研究通过 PPI 网络分析还发现, CCl_4 染毒和 DDC 饮食模型共同的枢纽基因有 *Bub1*、*Plk1*、*Cdk1*、*Cenpe*、*Cdc20* 等基因,他们是肝纤维化 p53 信号通路、细胞周期环节调节中的关键基因。通过 GO 和 KEGG 富集分析发现,两者共有的 BP 涉及细胞外基质组织的形成、核分离、突触组织的形成、染色体分离调节等过程;MF 涉及细胞外基质结构组成、细胞粘附分子结合、细胞外基质结构的抗拉强度、糖胺聚糖结合、肝素结合等功能;CC 主要是胶原蛋白的外基质、染色体着丝粒区、染色体区域、突触前、胶原蛋白三聚体等组分;KEGG 主要是细胞外基质受体的相互作用、细胞周期、蛋白的消化与吸收、焦点粘附、PI3K-Akt 等信号通路,提示这两种模型均可用于研究上述通路及肝纤维化发病机制。而谷氨

酸能突触、逆行内源性大麻素信号传导、cAMP 信号通路、胆碱能突触、突触囊泡周期等通路特异性地 CCl₄ 模型富集;类固醇激素生物合成、吞噬体、细胞粘附分子、胆汁分泌、补体和凝血级联等通路特异性地在 DDC 饮食模型富集,这提示在研究 cAMP 信号通路通路与肝纤维化发病机制时,CCl₄ 模型可能是更好的选择;而在研究胆汁分泌通路与肝纤维化发病机制时,DDC 模型可能是更合适的模型。

本研究通过高通量测序技术发现 CCl₄ 染毒和 DDC 饮食两种模型的差异基因以及 KEGG 的通路,符合肝纤维化的临床病理生理及转录基因水平的变化差异。然而,本研究仍存在一定的局限性。首先,小鼠和人类存在种属差异,小鼠测序所得差异基因并不能完美地模仿人类肝纤维化的疾病表达谱。其次,该研究局限于转录组学水平上的观察,缺乏蛋白组学、代谢组学等其他技术方法评价,为该模型的分子机制提供多维度的验证。最后,通过 RNA-Seq 检查获得的差异表达基因的确切功能和临床肝纤维化相关疾病中的作用也有待进一步深入研究,以期为肝纤维化的防治提供理论依据。

参考文献:

- [1] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(3): 151–166.
- [2] FRIEDMAN S L, PINZANI M. Hepatic fibrosis 2022: Unmet needs and a blueprint for the future [J]. Hepatology, 2022, 75(2): 473–488.
- [3] RAVICHANDRA A, SCHWABE R F. Mouse models of liver fibrosis [J]. Methods Mol Biol, 2021, 2299: 339–356.
- [4] RADAIEVA S, SUN R, JARUGA B, et al. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners [J]. Gastroenterology, 2006, 130(2): 435–452.
- [5] MARONI L, AGOSTINELLI L, SACCOMANNO S, et al. Nlrp3 activation induces il-18 synthesis and affects the epithelial barrier function in reactive cholangiocytes [J]. Am J Pathol, 2017, 187(2): 366–376.
- [6] JAMALL I S, FINELLI V N, QUE HEE S S. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues [J]. Anal Biochem, 1981, 112(1): 70–75.
- [7] DESMET V J, GERBER M, HOOFNAGLE J H, et al. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging [J]. Hepatology, 1994, 19(6): 1513–1520.
- [8] ISHAK K, BAPTISTA A, BIANCHI L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis [J]. J Hepatol, 1995,

- 22(6): 696–699.
- [9] CHEN S, ZHOU Y, CHEN Y, et al. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884–i890.
- [10] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. Genome Biol, 2014, 15(12): 550.
- [11] ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data [J]. Bioinformatics, 2010, 26(1): 139–140.
- [12] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. OMICS, 2012, 16(5): 284–287.
- [13] BAO Y L, WANG L, PAN H T, et al. Animal and organoid models of liver fibrosis [J]. Front Physiol, 2021, 12: 666138.
- [14] YANGUAS S C, COGLIATI B, WILLEBRORDS J, et al. Experimental models of liver fibrosis [J]. Arch Toxicol, 2016, 90(5): 1025–1048.
- [15] GAO J, WEI B, DE ASSUNCAO T M, et al. Hepatic stellate cell autophagy inhibits extracellular vesicle release to attenuate liver fibrosis [J]. J Hepatol, 2020, 73(5): 1144–1154.
- [16] LUA I, LI Y, ZAGORY J A, et al. Characterization of hepatic stellate cells, portal fibroblasts, and mesothelial cells in normal and fibrotic livers [J]. J Hepatol, 2016, 64(5): 1137–1146.
- [17] XU L M, LIU P. Hepatology Committee of Chinese Association of Integrative Medicine C. Guidelines for diagnosis and treatment of hepatic fibrosis with integrated traditional Chinese and Western medicine (2019 edition) [J]. J Integr Med, 2020, 18(3): 203–213.
- [18] SHI Y, RODRIGUEZ M, SHAHAN K, et al. Subfamily of submaxillary gland-specific Mup genes: chromosomal linkage and sequence comparison with liver-specific Mup genes [J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(15): 6191–6203.
- [19] SHAW P H, HELD W A, HASTIE N D. The gene family for major urinary proteins: expression in several secretory tissues of the mouse [J]. Cell, 1983, 32(3): 755–761.
- [20] TUNG Y T, CHEN Y J, CHUANG H L, et al. Characterization of the serum and liver proteomes in gut-microbiota-lacking mice [J]. Int J Med Sci, 2017, 14(3): 257–267.
- [21] GAO R, WANG H, LI T, et al. Secreted MUP1 that reduced under ER stress attenuates ER stress induced insulin resistance through suppressing protein synthesis in hepatocytes [J]. Pharmacol Res, 2023, 187: 106585.
- [22] JIANG J, CREASY K T, PURNELL J, et al. Zfx2 (zinc fingers and homeoboxes 2) regulates major urinary protein gene expression in the mouse liver [J]. J Biol Chem, 2017, 292(16): 6765–6774.

曲保全, 吕书影, 林文君, 等. 芍药甘草颗粒对斑秃样小鼠毛发生长、行为学及下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 46-54.

Qu BQ, Lyu SY, Lin WJ, et al. Effects of Shaoyao Gancao granule on hair growth, behavior, and the hypothalamic pituitary adrenal axis in mice with alopecia areata [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 46-54.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.005

芍药甘草颗粒对斑秃样小鼠毛发生长、行为学及下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响

曲保全¹, 吕书影², 林文君¹, 杨顶权^{3*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京 100010;

3. 中日友好医院, 北京 100029)

【摘要】 目的 探讨芍药甘草颗粒对斑秃样小鼠毛发生长、行为学及下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响。**方法** C3H/HeJ 小鼠 42 只, 随机分为空白对照组、模型组、芍药甘草颗粒高、中、低剂量组、促肾上腺皮质激素释放激素 1 型受体拮抗剂组、复方甘草酸苷片组, 每组 6 只, 分别予以不同药物干预。进行照片和毛发镜拍摄、体重称量、行为学测定, 以及促肾上腺皮质激素释放激素、促肾上腺皮质激素、皮质醇、糖皮质激素受体、脑源性神经营养因子检测。**结果** 与模型组比较, 高剂量芍药甘草颗粒可加速斑秃样小鼠毛发再生及体重增长 ($P < 0.05$), 增加旷场实验运动总路程及中央区运动路程占总路程百分比 ($P < 0.05$), 减少强迫游泳实验及悬尾实验不动时间 ($P < 0.05$), 降低外周血促肾上腺皮质激素释放激素、促肾上腺皮质激素、皮质醇水平 ($P < 0.05$), 增加海马体糖皮质激素受体及脑源性神经营养因子表达 ($P < 0.05$)。**结论** 芍药甘草颗粒能促进斑秃样小鼠毛发生长、改善其行为学表现, 其作用的发挥可能与下调促肾上腺皮质激素释放激素、促肾上腺皮质激素、皮质醇水平, 上调糖皮质激素受体、脑源性神经营养因子表达, 抑制下丘脑-垂体-肾上腺轴过度活化相关。

【关键词】 芍药甘草颗粒; 斑秃; 下丘脑-垂体-肾上腺轴

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0046-09

Effects of Shaoyao Gancao granule on hair growth, behavior, and the hypothalamic pituitary adrenal axis in mice with alopecia areata

QU Baoquan¹, LYU Shuying², LIN Wenjun¹, YANG Dingquan^{3*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China.

2. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010.

3. China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029)

【Abstract】 Objective To explore the effects of Shaoyao Gancao granule on hair growth, behavior, and the hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis in mice with alopecia areata (AA). **Methods** Forty-two C3H/HeJ mice were randomly divided into control, model, Shaoyao Gancao granule high-, middle-, low-dose, corticotropin-releasing hormone receptor 1 (CRHR1) antagonist, and compound glycyrrhizin tablet (CGT) groups. Photography, dermoscopy, weight analysis, and behavioral measurement were performed. Corticotropin-releasing hormone (CRH), adrenocorticotropic

【基金项目】 国家自然科学基金 (81973691)。

【作者简介】 曲保全 (1995—), 男, 博士研究生, 研究方向: 中西医结合治疗皮肤病。E-mail: 2296938307@qq.com

【通信作者】 杨顶权 (1971—), 男, 博士生导师, 主任医师, 研究方向: 中西医结合治疗皮肤病。E-mail: ydqlx@163.com

hormone (ACTH), cortisol, glucocorticoid receptor (GR), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were also assessed. **Results** Compared with the model group, high-dose Shaoyao Gancao granules improve hair regeneration and weight gain ($P<0.05$), increased the percentage of total exercise distance and central area exercise distance in an open field test ($P<0.05$), reduced the immobility time in the forced swimming and tail suspension experiments ($P<0.05$), reduced peripheral blood levels of CRH, ACTH, and cortisol ($P<0.05$), and increased expression of GR and BDNF in the hippocampus ($P<0.05$). **Conclusions** Shaoyao Gancao granule promotes hair growth and improves behavioral performance in mice with AA. These effects may be related to downregulating CRH, ACTH, and cortisol expression, upregulating GR and BDNF expression, and inhibiting excessive activation of the HPA axis.

【Keywords】 Shaoyao Gancao granule; alopecia areata; hypothalamic pituitary adrenal axis
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

斑秃(alopecia areata, AA)是一种突然发生的局限性脱发,可发生于任何年龄,尤其好发于青壮年,且复发率较高,其主要危害为损容性问题造成的心理压力,如抑郁、焦虑、自卑等,可严重影响患者心理健康、降低生活质量^[1]。临床治疗 AA 的药物主要有糖皮质激素、免疫抑制剂等,这些药物虽效果良好,但存在停药复发、副作用明显等问题,不适宜长期使用^[2]。

芍药甘草汤出自《伤寒论》,由芍药、甘草二药组成,具有酸甘化阴、柔肝益脾、通顺血脉等多种功效,近年来许多研究表明芍药甘草颗粒及其主要有效成分治疗 AA 有效,无明显不良反应^[3-6],但具体治疗机制尚不十分明确。本实验通过观察芍药甘草颗粒对 AA 样小鼠毛发生长、行为学及对促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)、促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、皮质醇(Cortisol)、糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的调节作用,探讨芍药甘草颗粒通过调控下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic pituitary adrenal, HPA)轴治疗 AA 的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 6~8 周龄雌性 C3H/HeJ 小鼠 42 只,体重 18~20 g 购于北京唯尚立德生物科技有限公司[SCXK(京)2021-0010],饲养于中日友好医院临床医学研究所 SPF 级动物实验中心[SYXK(京)2023-0001],环境温度 22~25 ℃,湿度 50%~70%,适应性喂养 7 d 后,无异常者纳入实验。本实验经中日友好医院实验动物伦理委员会批准(zryhy21-21-08-05),实验设计及实施过程严格遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

芍药甘草颗粒(Shaoyao Gancao granule, SYGC):芍药与甘草配伍比例为 3:1,中药的采购及加工由中日友好医院药剂科完成;复方甘草酸苷片(Compound Glycyrrhizin Tablet, CGT)(国药准字 J20130077,批号 21076, Akiyama Jozai Co., Ltd. Head Factory, 日本);促肾上腺皮质激素释放激素 1 型受体(corticotropin-releasing hormone receptor 1, CRHR1)拮抗剂 Antalarmin(A8727, Sigma, 美国);咪喹莫特乳膏(国药准字 H20030129,批号 40210604,四川明欣药业有限责任公司);CD4 抗体(NBP2-46149, Novus Biologicals, 美国);CD8 抗体(ab17147, Abcam, 英国);CRH、ACTH、Cortisol ELISA 试剂盒(YS02873B、YS02788B、YS02748B,上海雅吉生物科技有限公司);GR、BDNF 抗体(ab183127、ab203573, Abcam, 英国)。

手持毛发镜(Handyscope, FotoFinder, 德国);旷场、束缚器、游泳桶(自制);旷场实验分析仪(XR-XZ301, 上海欣软信息科技有限公司);光学显微镜(BH-2, OLMPUS, 日本);酶标仪(CMax Plus, Molecular Devices, 美国);垂直电泳槽(Mini Protean Tetra, Bio-Rad, 美国);转印槽(Mini Trans Blot, Bio-Rad, 美国);电泳仪(PowerpacBasic, Bio-Rad, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型建立

42 只小鼠随机抽取 6 只作为空白对照组,余下 36 只进行 AA 模型构建^[7]。

实验第 1~7 天,空白对照组背部涂抹凡士林,其余 36 只小鼠背部涂抹咪喹莫特乳膏,面积约 1.5 cm×2 cm,剂量约 0.15 g,每天涂抹 1 次,连续涂抹 7 d。随后停止涂抹 3 d,观察小鼠脱毛情况,并于实验第 11 天进行拍照,选取有明显片状脱毛的小鼠进

行后续给药干预,随后每 3 d 涂抹 1 次凡士林或咪喹莫特乳膏^[8]。

同时,从实验第 1~25 天,除空白对照(control)组外,其余小鼠还需持续应激 25 d 制备慢性不可预知温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)模型^[9],应激因素包括潮湿垫料、夹尾、束缚、倾斜鼠笼、禁食水、频闪、游泳。每天随机施加 1 种应激,应激施加的时间也随机,使小鼠无法预见应激,以免对应激产生适应。

1.3.2 分组与给药

将第 11 天有明显片状脱毛的小鼠随机分为模型(model)组、芍药甘草颗粒高、中、低剂量(SYGC-H、SYGC-M、SYGC-L)组、CRHR1 拮抗剂(CRHR1)组、CGT 组。空白对照组、模型组:等体积生理盐水灌胃;芍药甘草颗粒高、中、低剂量组:芍药甘草颗粒的临床用量为 30 g/d,根据人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值^[10],计算得出小鼠的 2 倍等效剂量、等效剂量和 0.5 倍等效剂量分别是 7.8 g/kg、3.9 g/kg、1.95 g/kg。CGT 的临床用量为每天 6 片(含主要有效成分甘草酸苷 150 mg),根据人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值^[10],计算得出小鼠的等效剂量为 20 mg/kg。以上各组于实验第 12 天开始灌胃,每天 1 次,持续 14 d。CRHR1 拮抗剂组:Antalarmin 溶液腹腔注射(20 mg/kg)^[11],于实验第 19 天开始注射,每天 1 次,持续 7 d。

1.3.3 实验指标观察及测定方法

(1) 一般情况

每天观察小鼠毛发光泽程度、精神状态、活动情况、摄食情况、大便情况等。分别在实验第 1、26 天对小鼠进行称重。

(2) 毛发生长情况

分别在实验第 1、11、26 天对小鼠进行大体照片及项背部毛发镜照片拍摄,以记录毛发脱落及生长情况。

(3) 行为学测定

旷场实验^[12](open field test, OFT):在实验第 26 天进行 OFT,将单只小鼠置于自制 50 cm×50 cm×25 cm 旷场箱中央,由摄像头拍摄小鼠 5 min 内运动轨迹及行为表现并上传至分析仪,分析仪自动分析小鼠运动总路程、中央区运动路程等数据。

强迫游泳实验^[13](forced swimming test, FST):在实验第 26 天进行 FST,将小鼠放入水温 23~25 ℃、深 15 cm 的水域中,共放置 6 min,记录后 4 min

的不动时间、游泳时间。

悬尾实验^[14](tail suspension test, TST):在实验第 26 天进行 TST,固定小鼠尾巴悬挂,另其头部朝下,共悬挂倒置 6 min,记录后 4 min 的不动时间。

(4) 免疫组化染色检测皮肤组织 CD4⁺、CD8⁺T 细胞的表达

实验第 11 天,从空白对照组挑选 1 只小鼠,从其余 36 只造模小鼠中随机挑选 3 只小鼠,进行项背部脱毛区皮肤组织取材,随后进行固定、脱水、包埋、切片、免疫组化染色,显微镜下观察 CD4⁺、CD8⁺T 细胞表达情况。

(5) ELISA 检测血清 CRH、ACTH、Cortisol 水平

采用眼眶静脉丛取血法采集小鼠外周血,置于无抗凝剂的离心管内,室温静置,4 ℃条件下 3000 r/min 离心 15 min,收集上层血清。按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清 CRH、ACTH、Cortisol 水平。

(6) Western blot 检测海马体 GR、BDNF 表达

分离小鼠双侧海马体,使用 RIPA 裂解液提取蛋白,测定蛋白浓度,以 GAPDH 为内参进行凝胶电泳,转膜后使用脱脂奶粉封闭,加入一抗 GR(1:2000)、BDNF(0.2 μg/mL)、GAPDH(1:5000)4 ℃孵育过夜,次日用 TBST 洗膜 3 次,二抗孵育 1 h。ECL 曝光,目的蛋白与 GAPDH 灰度值比值表示蛋白相对表达量。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 20.0 进行分析处理,数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间计量资料比较,若符合正态分布且方差齐,则采用单因素方差分析;若多组间比较有差异,采用 LSD 法进行两两比较;若不符合正态分布或方差不齐,则采用秩和检验; $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 一般情况及体重变化

实验初期,所有小鼠精神状态均较好,活动灵敏,毛发浓密有光泽,粪便性状正常,进行应激时反应强烈,挣扎不断。随着实验进行,相较于空白对照组,模型组小鼠逐渐出现精神萎靡、活动减少、喜蜷缩于角落、大便时不成形等表现,进行应激时挣扎抵抗减少;相较于模型组,5 个用药干预组小鼠精神状态尚可,活动较多,粪便性状基本正常,对应激仍有较为强烈的抵抗挣扎。

实验第 1 天(造模前或实验开始前),各组小鼠

体重比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。实验第 26 天(实验结束前),相较于空白对照组,模型组体重降低 ($P<0.05$);与模型组比较,芍药甘草颗粒高剂量组体重增加 ($P<0.05$),其余组小鼠体重增加,但无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

2.2 毛发生长情况

实验第 1 天(造模前或实验开始前),所有小鼠均无明显脱毛,皮毛光滑有光泽,全身呈棕褐色;毛发镜下可见毛发浓度,毛干粗壮,毛发颜色呈灰褐色,皮肤光滑。

实验第 11 天(药物干预前),空白对照组小鼠毛发较第 1 天无明显变化。而另外 6 组小鼠,背部涂抹咪喹莫特乳膏区域,均出现类 AA 样片状脱毛,脱毛区域皮肤光滑,呈粉红色,上附有少许鳞屑,无溃疡、瘢痕、破损、出血等。脱毛区毛发镜下可见大片光滑皮肤,伴少许细软毳毛、断发、感叹号样毛发、黑点征。上述表现与 AA 临床及毛发镜表现十分相似,提示 AA 模型成立。

实验第 26 天(实验结束前),空白对照组小鼠毛发较前无明显变化。另外 6 组脱毛区毛发再生面积由大到小排序大致如下:芍药甘草颗粒高、中剂量组及 CGT 组>芍药甘草颗粒低剂量组、CRHR1 拮抗剂组>模型组。见图 1、图 2。

2.3 皮肤组织 CD4⁺、CD8⁺T 细胞的表达

第 11 天(药物干预前)皮肤组织免疫组化染色可见空白对照组小鼠项背部皮肤毛囊周围无明显 CD4⁺、CD8⁺T 细胞,而在造模小鼠项背部脱毛区皮肤毛囊周围存在 CD4⁺、CD8⁺T 细胞环绕,并侵入毛囊上皮,符合 AA 组织病理学特征,提示 AA 模型成立。见图 3。

2.4 行为学测定

在 OFT 运动总路程以及中央区运动路程占总路程百分比方面,模型组均少于空白对照组 ($P<0.05$);而相较于模型组,5 个用药组均显著增加 ($P<0.05$),其中芍药甘草颗粒高剂量组增加最为明显。

在 FST 及 TST 不动时间方面,空白对照组不动时间最短,相比而言,模型组不动时间在 CUMS 联合咪喹莫特干预后增加 ($P<0.05$)。与模型组相比,5 个用药组不动时间均有所下降(除芍药甘草颗粒低剂量组的 FST 不动时间,其余均 $P<0.05$)。见表 2。

2.5 血清 CRH、ACTH、Cortisol 浓度

相较于空白对照组,模型组 CRH、ACTH、Cortisol 水平均有升高 ($P<0.05$)。除 CRHR1 拮抗剂组外,其余各给药组与模型组相比,CRH 浓度均有不同程度的下降,其中尤以芍药甘草颗粒高剂量组和 CGT 组最为明显 ($P<0.05$)。相较于模型组,各给药组 ACTH 浓度均有不同程度的下降,其中尤以芍药甘草颗粒高剂量组和 CRHR1 拮抗剂组最为明显 ($P<0.05$)。相较于模型组,各给药组 Cortisol 浓度亦有不同程度下降,其中尤以芍药甘草颗粒高剂量组、CRHR1 拮抗剂组、CGT 组最为明显 ($P<0.05$)。见表 3。

2.6 海马体 GR、BDNF 表达

与空白对照组相比,模型组 GR 及 BDNF 表达均降低 ($P<0.05$)。相较于模型组,除芍药甘草颗粒低剂量组,其余 4 个用药组 GR 及 BDNF 表达均升高,其中芍药甘草颗粒高、中剂量组及 CGT 组的 GR 表达和芍药甘草颗粒高剂量组的 BDNF 表达具有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 4、图 4。

表 1 各组小鼠体重比较
Table 1 Comparison of body weight in each group

组别 Groups	第 1 天数量/ <i>n</i> Day 1	第 1 天体重/g Day 1 weight	第 26 天数量/ <i>n</i> Day 26	第 26 天体重/g Day 26 weight
空白对照组 Control group	6	19.53±1.14	5	23.25±0.50
模型组 Model group	6	19.79±1.68	4	20.59±0.38 [▲]
芍药甘草颗粒高剂量组 SYGC-H group	6	19.45±1.20	4	22.38±1.24 [#]
芍药甘草颗粒中剂量组 SYGC-M group	6	19.49±0.68	5	22.00±0.66
芍药甘草颗粒低剂量组 SYGC-L group	6	19.74±1.59	4	21.93±0.97
CRHR1 拮抗剂组 CRHR1 group	6	19.35±1.89	4	21.92±1.47
CGT 组 CGT group	6	19.73±1.01	4	21.95±1.41

注:与空白对照组比较, [▲] $P<0.05$;与模型组比较, [#] $P<0.05$ 。
Note. Compared with Control group, [▲] $P<0.05$. Compared with Model group, [#] $P<0.05$.

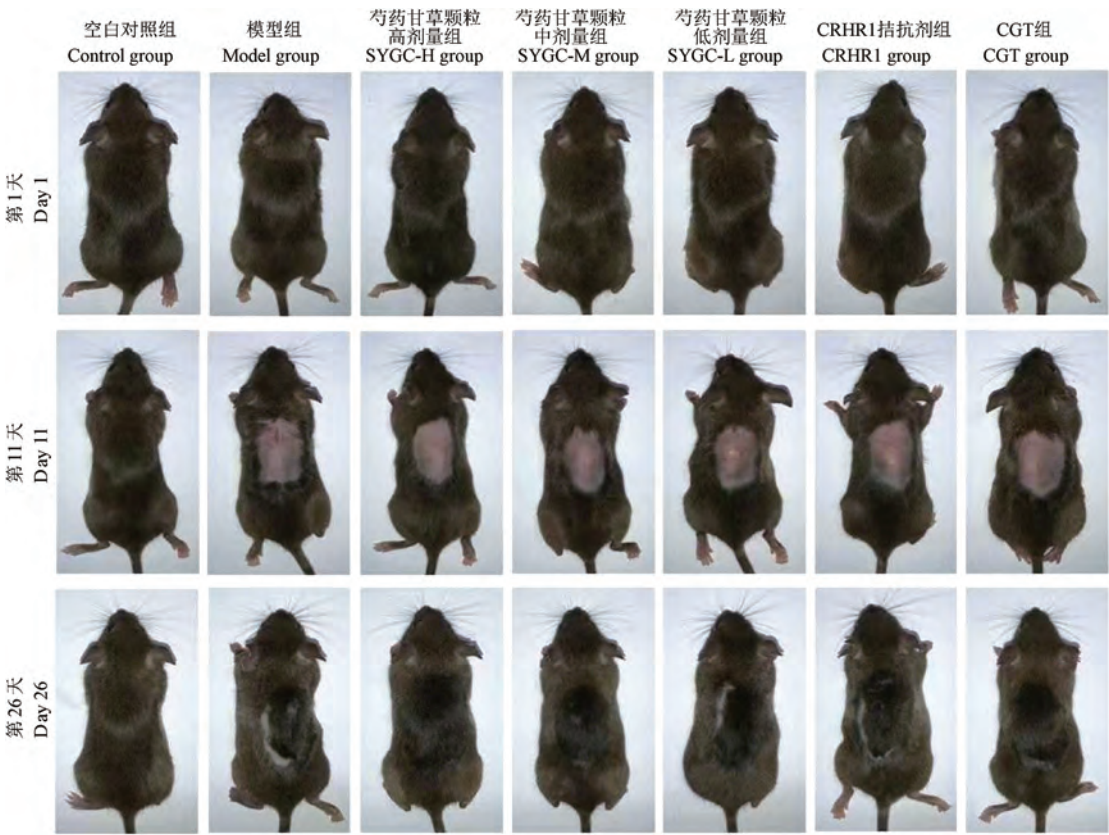


图 1 各组小鼠毛发生长情况对比

Figure 1 Comparison of hair growth in each group

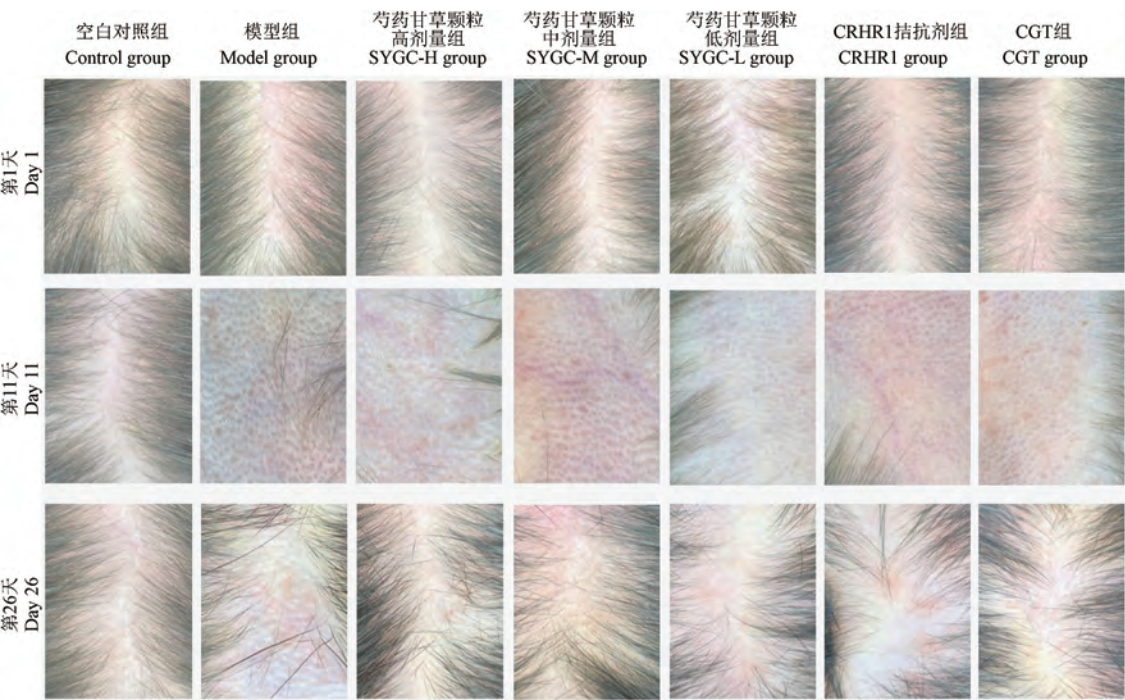


图 2 各组小鼠毛发镜照片对比

Figure 2 Comparison of dermoscopy photography in each group

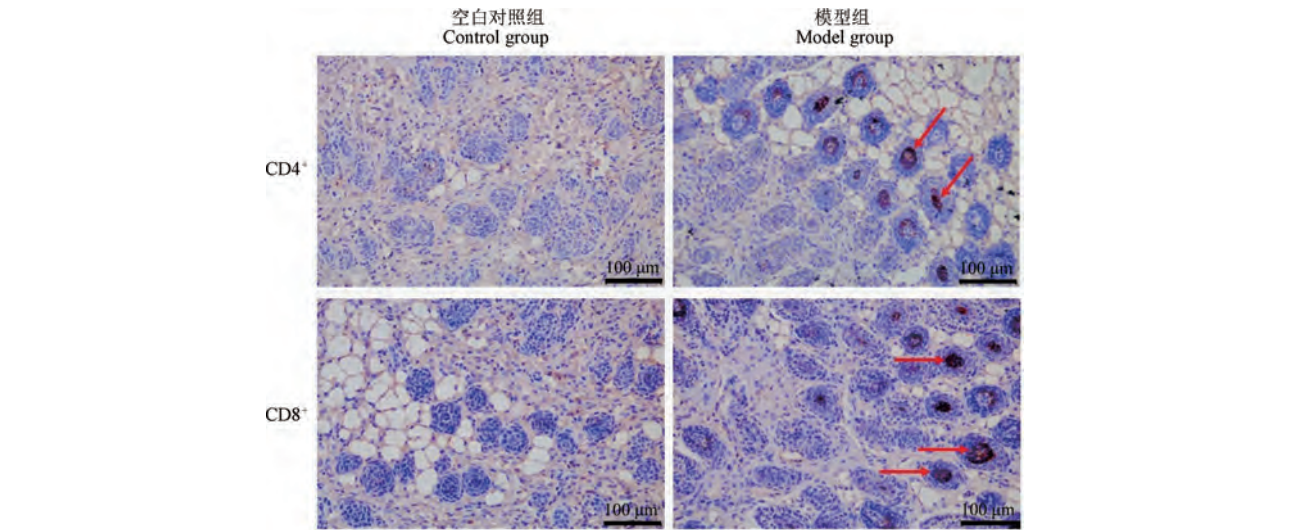


图 3 皮肤组织 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞表达情况

Figure 3 Expression of CD4⁺and CD8⁺T cells in skin

表 2 各组小鼠行为学测定比较

Table 2 Comparison of behavioral measurements in each group

组别 Groups	<i>n</i>	OFT 运动总路程/cm Total distance of OFT	OFT 中央区运动路程百分比/% Percentage of distance in central district of OFT	FST 不动时间/s Immobility time of FST
空白对照组 Control group	5	1499.29±162.09	8.04±1.51	36.60±6.92
模型组 Model group	4	835.47±137.23 [▲]	3.14±0.59 [▲]	73.19±10.85 [▲]
芍药甘草颗粒高剂量组 SYGC-H group	4	1305.85±200.68 [#]	6.55±1.53 [#]	49.22±6.79 [#]
芍药甘草颗粒中剂量组 SYGC-M group	5	1270.87±210.74 [#]	5.89±1.04 [#]	58.74±7.29 [#]
芍药甘草颗粒低剂量组 SYGC-L group	4	1165.28±142.88 [#]	5.45±0.86 [#]	63.94±9.15
CRHR1 拮抗剂组 CRHR1 group	4	1220.08±112.13 [#]	6.18±0.55 [#]	54.94±5.64 [#]
CGT 组 CGT group	4	1205.10±171.49 [#]	6.39±0.78 [#]	56.18±9.56 [#]

注:与空白对照组比较, [▲]*P*<0.05;与模型组比较, [#]*P*<0.05。
Note. Compared with Control group, [▲]*P*<0.05. Compared with Model group, [#]*P*<0.05.

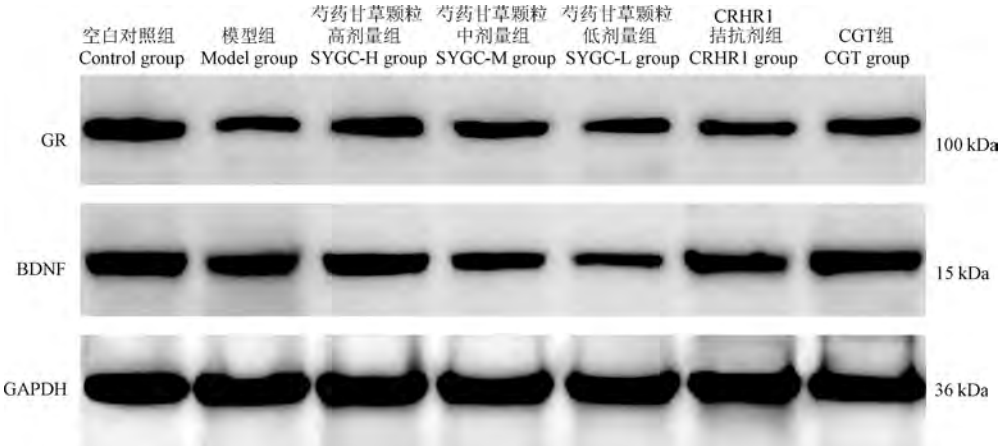


图 4 各组小鼠 Western blot 检测海马体 GR 和 BDNF 表达

Figure 4 Western blot detection of GR and BDNF expression in the hippocampus in each group

表 3 各组小鼠血清 CRH、ACTH 和 Cortisol 浓度比较
Table 3 Comparison of serum CRH, ACTH, and Cortisol levels in each group

组别 Groups	n	CRH 浓度/(pg/mL) CRH level	ACTH 浓度/(pg/mL) ACTH level	Cortisol 浓度/(ng/mL) Cortisol level
空白对照组 Control group	5	51.35±8.08	29.57±11.00	3.99±1.86
模型组 Model group	4	66.10±11.34 [▲]	52.44±6.06 [▲]	8.40±1.94 [▲]
芍药甘草颗粒高剂量组 SYGC-H group	4	51.73±4.65 [#]	38.85±5.33 [#]	4.87±0.23 [#]
芍药甘草颗粒中剂量组 SYGC-M group	5	58.68±6.08	48.34±6.42	6.72±0.28
芍药甘草颗粒低剂量组 SYGC-L group	4	58.28±4.85	45.49±4.46	7.85±0.59
CRHR1 拮抗剂组 CRHR1 group	4	66.65±7.69	39.62±1.53 [#]	5.00±0.36 [#]
CGT 组 CGT group	4	45.89±2.23 [#]	43.46±6.82	5.36±2.15 [#]

注:与空白对照组比较, [▲]*P*<0.05;与模型组比较, [#]*P*<0.05。
Note. Compared with Control group, [▲]*P*<0.05. Compared with Model group, [#]*P*<0.05.

表 4 各组小鼠海马体 GR、BDNF 表达比较(*n*=3)
Table 4 Comparison of GR and BDNF expression in each group

组别 Groups	GR 相对表达量 GR relative expression level	BDNF 相对表达量 BDNF relative expression level
空白对照组 Control group	0.87±0.16	0.83±0.21
模型组 Model group	0.39±0.06 [▲]	0.36±0.14 [▲]
芍药甘草颗粒高剂量组 SYGC-H group	0.74±0.11 [#]	0.70±0.15 [#]
芍药甘草颗粒中剂量组 SYGC-M group	0.58±0.09 [#]	0.49±0.19
芍药甘草颗粒低剂量组 SYGC-L group	0.34±0.02	0.32±0.14
CRHR1 拮抗剂组 CRHR1 group	0.50±0.03	0.46±0.11
CGT 组 CGT group	0.59±0.05 [#]	0.53±0.14

注:与空白对照组比较, [▲]*P*<0.05;与模型组比较, [#]*P*<0.05。
Note. Compared with Control group, [▲]*P*<0.05. Compared with Model group, [#]*P*<0.05.

3 讨论

目前研究认为 AA 是一种 T 细胞介导的毛囊失去免疫赦免的自身免疫性疾病,其病因包括遗传、免疫、精神应激、过敏、维生素 D 等因素^[15]。随着人们生活方式的改变、学习工作压力的增加,精神应激因素在 AA 发病中的作用逐渐受到重视^[16-17]。

中医学称 AA 为“油风”“鬼剃头”,历代医家对 AA 病因病机的观点各有侧重,大多以肝肾不足、精血亏虚为主^[18]。而近年来越来越多医家关注情志对 AA 的重要作用,认为其主要病机为肝郁脾虚,肝气郁结则气血运行不畅,肝郁乘脾,久之脾虚失运则气血生化不足,从而发失濡养而落,治以疏肝健脾、益气养血^[19]。芍药甘草汤由芍药、甘草二药组成,方中芍药酸敛补益阴血,甘草甘温补益中焦,针对土虚木乘的主要病机,两者共奏敛木扶土之效。

相关研究表明,持续过度的刺激可导致 HPA 轴过度活化,CRH、ACTH、糖皮质激素水平异常增高,久而久之,海马等脑区 GR 表达和(或)功能下调,HPA 轴负反馈机制功能受损,HPA 轴持续处于活化状态^[20]。同时伴随着大脑 BDNF 表达的下调^[21-22],BDNF 不仅具有促神经元增殖发育等功能,还可缓解抑郁情绪和行为^[23]。而 HPA 轴激素的高表达与 AA 发病相关^[24]。由此可知,精神应激因素可能通过影响 HPA 轴功能参与 AA 的发病。

为探究精神应激因素及 HPA 轴功能障碍在 AA 发病中的作用,本研究使用咪喹莫特联合 CUMS 制备 AA 样小鼠模型。与空白对照组相比,造模小鼠出现片状脱毛,毛发镜下可见大片光滑皮肤,CD4⁺、CD8⁺T 细胞环绕并侵入脱毛区毛囊,提示 AA 样小鼠模型制备成功。在 CUMS 持续干预下,模型组小鼠毛发再生及体重增长缓慢,OFT 运动总路程及中央区运动路程占总路程百分比降低,FST 及 TST 不

动时间增加,提示 CUMS 改变了小鼠行为学表现,导致其应激抑郁状态^[25],并延缓了毛发再生。模型组小鼠外周血 CRH、ACTH、Cortisol 水平升高,海马体 GR 及 BDNF 表达降低,则提示长期慢性应激导致 HPA 轴过度活化、负反馈功能障碍,并损伤小鼠脑神经元^[26]。

本研究中,芍药甘草颗粒可促进 AA 样小鼠毛发生长、体重增加,并改善其行为学表现、缓解其抑郁状态,其中以高剂量芍药甘草颗粒效果最佳。高剂量芍药甘草颗粒治疗后,小鼠外周血 CRH、ACTH、Cortisol 水平均有所下调,海马体 GR 及 BDNF 表达均有所上调,表明芍药甘草颗粒可能通过抑制 HPA 轴过度活化、保护脑神经元,以缓解 AA 样小鼠抑郁状态、促进其毛发生长。而 Antalarmin 作为 HPA 轴 CRHR1 的拮抗剂,亦能够促进毛发再生,进一步佐证了 HPA 轴过度活化在 AA 发病中的重要作用,而调节 HPA 轴功能障碍是可行的 AA 治疗策略之一。

综上所述,本研究发现 CUMS 联合咪喹莫特乳膏可成功制备 AA 样小鼠模型,该模型符合中医肝郁脾虚证表现。AA 的发病与 HPA 轴过度活化密切相关,而芍药甘草颗粒能促进小鼠毛发生长、改善其应激抑郁状态,其作用的发挥可能与下调 CRH、ACTH、Cortisol 水平,上调 GR、BDNF 表达,抑制 HPA 轴过度活化,保护脑神经元相关。

参考文献:

[1] STERKENS A, LAMBERT J, BERVOETS A. Alopecia areata; a review on diagnosis, immunological etiopathogenesis and treatment options [J]. Clin Exp Med, 2021, 21(2): 215-230.

[2] FUKUYAMA M, ITO T, OHYAMA M. Alopecia areata; current understanding of the pathophysiology and update on therapeutic approaches, featuring the Japanese Dermatological Association guidelines [J]. J Dermatol, 2022, 49(1): 19-36.

[3] 王思丹. 芍药甘草颗粒治疗重症斑秃的临床研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.

WANG S D. Clinical study on treatment of severe alopecia areata with Shaoyao Gancao Granules [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2018.

[4] 秦春芳. 芍药甘草颗粒治疗重症斑秃的临床及免疫机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.

QIN C F. Clinical and immune mechanism of shaoyao gancao granule in treating severe alopecia areata [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2020.

[5] YANG D Q, YOU L P, SONG P H, et al. A randomized controlled trial comparing total glucosides of paeony capsule and compound glycyrrhizin tablet for alopecia areata [J]. Chin J

Integr Med, 2012, 18(8): 621-625.

[6] YANG D, ZHENG J, ZHANG Y, et al. Total glucosides of paeony capsule plus compound glycyrrhizin tablets for the treatment of severe alopecia areata in children: a randomized controlled trial [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 378219.

[7] 吕书影, 曲保全, 林文君, 等. 咪喹莫特联合慢性温和性不可预知应激建立斑秃样小鼠模型 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(7): 846-852.

LYU S Y, QU B Q, LIN W J, et al. Imiquimod combined with chronic unpredictable mild stress to establish a mouse model of alopecia areata [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(7): 846-852.

[8] 赵恒光. 咪喹莫特诱导 C3H/HeJ 小鼠斑秃动物模型的建立及发病机理初步研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2007.

ZHAO H G. Establishment of animal model of alopecia areata induced by imiquimod in C3H/HeJ mice and preliminary study on its pathogenesis [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2007.

[9] WILLNER P, TOWELL A, SAMPSON D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. Psychopharmacology, 1987, 93(3): 358-364.

[10] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 4 版 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.

WEI W, WU X M, LI Y J. Pharmacology laboratory methodology 4th edition [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2010.

[11] ROSZKOWSKI M, MANUELLA F, VON ZIEGLER L, et al. Rapid stress-induced transcriptomic changes in the brain depend on beta-adrenergic signaling [J]. Neuropharmacology, 2016, 107: 329-338.

[12] 姜宁, 张亦文, 姚彩虹, 等. 大小鼠抑郁行为实验方法概述 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 830-838.

JIANG N, ZHANG Y W, YAO C H, et al. Overview of animal behavioral tests of depression [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 830-838.

[13] PORSOLT R D, BERTIN A, JALFRE M. "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine [J]. Eur J Pharmacol, 1978, 51(3): 291-294.

[14] STERU L, CHERMAT R, THIERRY B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice [J]. Psychopharmacology, 1985, 85(3): 367-370.

[15] ZHOU C, LI X, WANG C, et al. Alopecia areata; an update on etiopathogenesis, diagnosis, and management [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2021, 61(3): 403-423.

[16] TORALES J, CASTALDELLI-MAIA J M, VENTRIGLIO A, et al. Alopecia areata: a psychodermatological perspective [J]. J Cosmet Dermatol, 2022, 21(6): 2318-2323.

[17] MA Y Q, SUN Z, LI Y M, et al. Oxidative stress and alopecia areata [J]. Front Med, 2023, 10: 1181572.

[18] 彭静, 段行武. 斑秃的中医药研究概况 [J]. 中国医药导报,

2017, 14(9): 46-49.

PENG J, DUAN H W. Research overview about alopecia areata in traditional Chinese medicine [J]. China Med Her, 2017, 14(9): 46-49.

[19] 张圆圆, 罗霞, 雷文雯. 吴军治疗斑秃经验 [J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(9): 33-34.

ZHANG Y Y, LUO X, LEI W W. Wu Jun's experience in treating alopecia areata [J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2015, 31(9): 33-34.

[20] HEESSEN C, GOLD S M, HUITINGA I, et al. Stress and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis-a review [J]. Psychoneuroendocrinology, 2007, 32(6): 604-618.

[21] MCEWEN B S. Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain [J]. Metabolism, 2005, 54(5): 20-23.

[22] VOLLMAYR B, FAUST H, LEWICKA S, et al. Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF) stress response in rats bred for learned helplessness [J]. Mol Psychiatry, 2001, 6(4): 471-474, 358.

[23] OGLODEK E A, JUST M J, SZROMEK A R, et al. Melatonin and neurotrophins NT-3, BDNF, NGF in patients with varying levels of depression severity [J]. Pharmacol Rep, 2016, 68(5): 945-951.

[24] AHN D, KIM H, LEE B, et al. Psychological stress-induced pathogenesis of alopecia areata: autoimmune and apoptotic pathways [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(14): 11711.

[25] 刘佳蕾, 王宇亮, 赵宏, 等. 百合多糖与黄芪多糖联用对慢性应激小鼠抑郁行为的影响及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 8(5): 62-70.

LIU J L, WANG Y L, ZHAO H, et al. Effect and mechanism of lily polysaccharide combined with *Astragalus* polysaccharide on depressive behavior in chronic stress mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 8(5): 62-70.

[26] 李媛媛, 张碧涛, 范培健, 等. 类风湿关节炎伴发抑郁症模型大鼠制备与评价探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(9): 1105-1113.

LI Y Y, ZHANG B T, FAN P J, et al. Establishment and evaluation of a rat model of rheumatoid arthritis with depression [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(9): 1105-1113.

[收稿日期] 2023-08-25

编者·读者·作者

《中国比较医学杂志》稿约

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

一、杂志介绍

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

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

二、投稿要求及注意事项

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

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com>

期待您的来稿!

张士滨,王璐,王储,等. 不同时间急性睡眠剥夺对大鼠行为学及突触生物标志物表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 55-64.

Zhang SB, Wang L, Wang C, et al. Effects of acute sleep deprivation on behavior and synaptic biomarker expression in rats [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 55-64.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.006

不同时间急性睡眠剥夺对大鼠行为学及突触生物标志物表达的影响

张士滨¹, 王璐¹, 王储¹, 郭鹏程¹, 闫旭升², 霍东升², 杨占君²,
王艳国^{2*}, 贾建新^{2*}

(1. 内蒙古科技大学包头医学院研究生学院, 内蒙古 包头 014040;
2. 内蒙古科技大学包头医学院人体解剖学教研室, 内蒙古 包头 014040)

【摘要】 目的 探究不同时间急性睡眠剥夺对大鼠行为学及突触蛋白表达的影响。**方法** 健康雄性 Wistar 大鼠 70 只随机分为 7 组, 即空白对照组 (Control)、睡眠剥夺 24 h 组、48 h 组、72 h 组、96 h 组、120 h 组、144 h 组, 采用改良多平台水环境睡眠剥夺法建立大鼠睡眠剥夺模型, 通过 Morris 水迷宫检测空间学习记忆能力, 旷场实验检测大鼠焦虑状况, Nissl 染色观察大鼠海马神经元形态、数量的改变, Western blot、Real-time PCR 实验分别测定大鼠突触相关分子标志物突触素 (synaptophysin, SYN)、突触后膜致密物质 95 (post-synaptic density protein-95, PSD-95)、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 的表达。**结果** 与 Control 组比较, 随着睡眠剥夺时间的延长, 大鼠的站立次数和修饰行为次数均显著增加 ($P < 0.05$); 120 h、144 h 组大鼠的逃避潜伏期与上台前路程均显著增加 ($P < 0.05$), 而穿越平台次数和目标象限时间百分比均显著下降 ($P < 0.01$), 且与睡眠剥夺时间呈负相关; BDNF、SYN 及 PSD-95 蛋白/基因的表达式均随睡眠剥夺时间的延长呈明显下降趋势 ($P < 0.01$), 且与睡眠剥夺时间呈负相关。**结论** 随着睡眠剥夺时间的增加, 模型大鼠空间学习记忆损害与焦虑情绪逐渐加重, 其可能与突触相关分子标志物表达减少有关。

【关键词】 大鼠; 睡眠剥夺; 学习认知; 海马; 突触可塑性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0055-10

Effects of acute sleep deprivation on behavior and synaptic biomarker expression in rats

ZHANG Shibin¹, WANG Lu¹, WANG Chu¹, GUO Pengcheng¹, YAN Xusheng², HUO Dongsheng², YANG Zhanjun²,
WANG Yanguo^{2*}, JIA Jianxin^{2*}

(1. Graduate School of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040, China.

2. Department of Human Anatomy, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of acute sleep deprivation on the behavior and synaptic protein expression of rats. **Methods** Seventy healthy male Wistar rats were randomly divided into seven groups, a Control group

【基金项目】 内蒙古自治区高等学校“青年科技英才支持计划” (NJYT-20-A08); 内蒙古自治区高等学校创新团队发展计划 (NMGIRT2328); 内蒙古自然科学基金 (2021LHMS08018); 国家自然科学基金 (81860215)。

【作者简介】 张士滨 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中枢神经系统退行性疾病的防治研究。E-mail: 17865587009@163.com

【通信作者】 王艳国 (1977—), 男, 副教授, 研究方向: 神经系统病理生理学。E-mail: wanyanguo7975@163.com

贾建新 (1981—), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中枢神经系统退行性疾病的防治研究。E-mail: jiajianxindx@163.com

* 共同通信作者

and sleep deprivation groups (24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours). The sleep deprivation rat model was established by the modified multiplatform water environment sleep deprivation method. Spatial learning and memory were assessed by the Morris water maze. Anxiety was assessed by the open field test. The morphology and quantity of hippocampal neurons were observed by Nissl staining. Western blot and Real-time PCR were used to determine the expression of synaptophysin (SYN), post-synaptic density protein-95 (PSD-95), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rats. **Results** Compared with the Control group, the numbers of standing and modification were significantly increased by prolongation of the sleep deprivation time ($P<0.05$). The escape latency and path length were significantly increased in 120 and 144 h groups ($P<0.05$), whereas the number of platform crossings and the percentage of the target quadrant time were significantly decreased ($P<0.01$) and negatively correlated to the sleep deprivation time. The expression levels of BDNF, SYN, and PSD-95 were significantly decreased with the prolongation of sleep deprivation time ($P<0.01$). **Conclusions** With the increase in sleep deprivation time, cognitive dysfunction and anxiety gradually deteriorated, which may be related to decreases in the expression of synaptic biomarkers.

【Keywords】 rat; sleep deprivation; learning cognition; hippocampus; synaptic plasticity

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

睡眠是大脑清除代谢废物的一种特殊方式,对于大脑功能的维持、运行以及神经元的生长至关重要^[1-2]。《中国睡眠研究报告 2023》显示,2023 年我国居民睡眠指数得分为 67.77 分,较 2021 年(64.78 分)增加了 2.99 分,《报告》显示我国居民总体睡眠时间延长了,但仍有 16.7% 的成年人睡眠时长不足 7 h,睡眠问题仍是各国共同面临的健康问题^[3]。睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)是指各种原因导致的严重睡眠不足,普遍存在于各行各业,其主要的临床症状包括入睡困难、早醒、多梦、易惊醒等^[4-5]。长期睡眠不足可引起记忆力减退、学习能力降低、注意力不集中、情绪和行为异常、激素水平变化、免疫力降低等现象^[6-7]。

相关研究表明,睡眠剥夺与学习认知功能密切相关^[8-9]。睡眠是支持学习和记忆功能的重要生理状态,正常的睡眠-觉醒周期能够提高学习能力、巩固记忆^[10],而睡眠不足会产生记忆巩固缺陷。突触可塑性(synaptic plasticity)是指神经元间随着活动的增强或减弱,突触形态、结构及功能可以发生相应改变的能力,是哺乳动物中枢神经系统储存信息的主要机制,被认为是学习记忆活动的生物学基础^[11-14]。突触相关蛋白的表达在突触可塑性中发挥了重要的生理功能,突触后膜致密物质 95(post-synaptic density protein-95, PSD-95)是维持突触间连接、促进突触传递效能的重要支架蛋白,对突触可塑性产生重要影响^[15]。突触素(synaptophysin, SYN)是突触囊泡膜的一种特殊糖蛋白,能促进突触囊泡前移和神经递质的释放,被认为是突触前膜发育和活性的标志性蛋白^[16],脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是具有神

经营养作用的蛋白质,能够促进神经环路的发育和成熟,在突触的正常生长发育和可塑性中发挥重要作用^[17-19]。睡眠剥夺导致的学习认知功能障碍机制复杂,至今尚未阐明其确切机制,既往研究表明,学习认知功能减退与突触可塑性密切相关^[20],但不同时间急性睡眠剥夺是否通过调控突触可塑性进而影响学习认知功能鲜有报道。因此本实验通过探究不同时间急性睡眠剥夺后大鼠行为学及突触相关蛋白表达的变化,进而研究大鼠急性睡眠剥夺与学习认知功能之间的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 6~8 周龄 Wistar 大鼠 70 只,体重 300~320 g,购自北京斯贝福生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010],所有实验动物均饲养于内蒙古科技大学包头医学院动物实验中心 SPF 级动物房[SYXK(蒙)2018-0001],温度(24.0 ± 1.0)℃,光照条件为每 12 h 昼夜交替 1 次,自由进食进水。本实验经内蒙古科技大学包头医学院伦理审查委员会批准(包医伦审 2022 第(63)号),饲养和实验过程中严格遵循 3R 原则,并给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

高效 RIPA 裂解液(R0010)、ECL Plus 超敏发光液(PE0010)、电泳缓冲液(T1070)、转膜液(D1060)、蛋白上样缓冲液(P1015)等均购自购自北京索莱宝;免疫组化试剂盒(PV-9000)购自北京中杉金桥;BCA 蛋白检测试剂盒(23227)购自美国 Thermo Scientific; PSD-95 (AB192757)、SYN (ab32127)抗体购自美国 Abcam;BDNF(48503-2)、

β -actin (52901) 购自美国 SAB; 羊抗兔二抗 (SA00001-2) 购自美国 Proteintech。

石蜡切片机(德国 Leica 公司);光学显微镜(德国 Leica 公司);旷场实验箱(上海欣软);-80℃超低温冰箱(美国 Thermo Fisher 公司);电泳仪(北京六一生物科技有限公司);脱色摇床(北京六一生物科技有限公司);蛋白凝胶成像分析系统(上海 Tanon 科技);酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组及模型制备

将 70 只大鼠随机分为 7 组,即空白对照组(Control)、睡眠剥夺 24 h 组、48 h 组、72 h 组、96 h 组、120 h 组、144 h 组。采用改良多平台水环境法制备睡眠剥夺模型^[21],实验设备为长 130 cm×宽 50 cm×高 45 cm 的长方体聚乙烯树脂水箱。水箱内放置直径为 5 cm,高 20 cm 的小平台,水箱注水深度约为 18 cm,维持水温(20±1)℃。实验开始前 1 周每天将大鼠放入水箱平台上适应环境 1 h,除 Control 组外,其余各组均放置在小平台上进行睡眠剥夺。自由摄食和水,每天 12 h/12 h 明/暗交替。

1.3.2 体重变化

所有大鼠于行为学实验开始的前一天上午 8:00 统一称量体重并记录,睡眠剥夺实验开始后每天同一时间称量体重并记录。

1.3.3 Morris 水迷宫

定位航行实验:水迷宫划分为 4 个象限,平台置于第四象限内,水面高出平台约 2 cm,水温保持在(25±1)℃。记录 60 s 内大鼠找到平台时游泳的距离、时间以及游泳轨迹,未找到平台的大鼠将其引导至平台上并停留 20 s,连续训练 5 d。

空间探索实验:第 6 天把平台撤掉,记录 120 s 内穿越平台次数和目标象限停留时间百分比。

各组大鼠均在睡眠剥夺最后 1 d 结束后进行空间探索实验,24 h 组在水迷宫第 5 天进行睡眠剥夺实验;48 h 组在水迷宫第 4 天进行睡眠剥夺实验;72 h 组在水迷宫第 3 天进行睡眠剥夺实验;96 h 组在水迷宫第 2 天进行睡眠剥夺实验;120 h 组在水迷宫第 1 天进行睡眠剥夺实验;144 h 组在水迷宫实验开始前 24 h 进行睡眠剥夺实验。

1.3.4 旷场实验

实验开始时将测试大鼠依次放入旷场实验箱固定角落,使用行为分析软件记录 5 min 内大鼠的站立次数、修饰行为及次数、粪便数量等指标。实

验过程中要求环境安静,并且两次实验之间用清水和 75%乙醇酒精分别擦拭实验装置,以免上次实验动物残留信息影响下次实验结果。

1.3.5 尼氏染色

将脑组织用 4%多聚甲醛固定,脱水、包埋、切片、脱蜡至水,切片厚度为 5 μ m,尼氏染液染色、分化,无水乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,显微镜下观察神经细胞形态、数量的变化。

1.3.6 免疫组织化学染色

常规脑组织脱水、包埋、切片、脱蜡至水,高压微波抗原热修复,PBS 洗 5 min×3 次,滴加内源性过氧化物酶阻断剂,室温孵育 10 min,PBS 洗 5 min×3 次。一抗孵育,4℃过夜,室温复温 30 min,PBS 洗 5 min×3 次,滴加反应增强液,37℃孵育 25 min,PBS 洗 5 min×3 次,滴加增强酶标山羊抗兔 IgG 聚合物,37℃孵育 25 min,PBS 洗 5 min×3 次,DAB 显色 2 min,自来水洗,苏木精复染,上行梯度乙醇脱水,二甲苯透明,封片。

1.3.7 蛋白免疫印迹(Western blot)

取海马组织加入蛋白 RIPA 裂解液,冰浴环境下超声匀浆,低温超速离心机离心 12 000 r/min,15 min,取上清并采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定其蛋白浓度,取 20 μ g 蛋白加蛋白上样缓冲液置于 100℃金属浴变性 5 min 制备蛋白样品并-20℃保存。提前配制浓缩胶和分离胶并安装在电泳槽内进行电泳,电泳结束后恒流转膜 2 h,取出 PVDF 膜用 5%脱脂奶粉常温封闭 2 h;将 PVDF 膜置于一抗(1:1000)中于脱色摇床 4℃过夜,1×TBST 中进行漂洗后,二抗常温孵育 2 h;利用成像分析系统扫描拍照并分析各组条带灰度值进行定量分析。

1.3.8 RT-PCR

使用 TRIzol 法提取海马组织总 RNA 并进行浓度测定。使用反转录试剂盒进行逆转录,反转录条件为 42℃ 15 min,95℃ 3 min,完成后置于-20℃保存,使用荧光定量试剂盒进行荧光定量扩增反应,反应体系为 20 μ L,反应条件为 95℃ 3 min,1 个循环,95℃ 5 s,59℃ 10 s,72℃ 15 s,40 个循环,结果采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 进行数据分析。引物序列见表 1,引物序列由上海生物工程有限公司合成。

1.4 统计学方法

所有实验结果均采用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,并用 Graphpad Prism 9.5 软件进行数据统计分析和绘图。两两比较采用 SNK-*q* 检验,多样本比较

采用单因素方差分析 (one-way ANONA), 以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时间睡眠剥夺对大鼠体重的影响

急性期各组睡眠剥夺大鼠体重变化结果显示, Control 组大鼠在 0~144 h 体重未见明显变化。与 Control 组比较, 急性睡眠剥夺 24 h 后, 大鼠体重明显下降 ($P<0.05$), 48~96 h 大鼠体重维持在相对恒定的水平且呈下降趋势, 120 h 和 144 h 组大鼠体重较前下降更显著 ($P<0.05$, 图 1)。说明急性睡眠剥夺可以引起大鼠体重下降。

2.2 不同时间睡眠剥夺对大鼠空间学习记忆的影响

2.2.1 定位航行实验结果

随着定位航行实验天数的增加, 各组大鼠上台路程和逃避潜伏期均逐渐减小。与 Control 组比较, 24 h、48 h、72 h、96 h 组上台路程和逃避潜伏期均无显著性差异, 120 h 和 144 h 组模型大鼠上台路程和逃避潜伏期仅在第 5 天均显著增加 ($P<0.05$, 图 2)。

2.2.2 空间探索实验结果

与 Control 组比较, 随着睡眠剥夺时间的增加, 大鼠穿越平台次数呈现逐渐减少的趋势 ($P<0.05$, 图 3A), 且与睡眠剥夺时间呈负相关 (图 3C); 与 Control 组比较, 24 h、48 h、72 h 组目标象限停留时间所占百分比无显著性差异, 但 96 h、120 h、144 h 组目标象限停留时间所占百分比呈明显下降趋势 ($P<0.01$, 图 3B), 且与睡眠剥夺时间呈负相关 (图 3D)。大鼠游泳轨迹热图显示, 随着睡眠剥夺时间的延长大鼠的游泳轨迹逐渐紊乱, 在目标象限停留的时间逐渐减少 (图 4)。上述结果表明, 睡眠剥夺

对大鼠记忆功能影响更为显著。

2.3 不同时间睡眠剥夺对大鼠焦虑行为的影响

旷场实验结果显示, 睡眠剥夺前各组大鼠站立次数、修饰次数无显著性差异。随着睡眠剥夺时间的增加, 24 h、48 h、72 h 组模型大鼠站立次数显著增多 ($P<0.05$), 而 96 h、120 h、144 h 组大鼠站立次数显著减少 ($P<0.01$)。睡眠剥夺后各组大鼠修饰次数显著增加, 其中 72 h 组尤为显著 ($P<0.01$); 至此之后, 随着睡眠剥夺时间的增加, 大鼠修饰次数逐渐减少, 但仍高于睡眠剥夺前 ($P<0.05$, 图 5)。上述结果表明, 随着睡眠剥夺时间的延长, 各组大鼠出现了焦虑情绪。

表 1 RT-PCR 引物序列
Table 1 RT-PCR primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')
β-actin	F: GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
	R: TGCTGAAGACGCCAGTGGA
BDNF	F: AGGTCTGACGACGACATCACT
	R: CTTGCTTGGGCCGAACCTT
SYN	F: AGTGCCCTCAACATCGAAGTC
	R: CGAGGAGGACTAGTCACCAAC
PSD-95	F: ACCAGAAGAGTATAGCCGATTCC
	R: GGTCTTGTCTAGTCAAACAGG

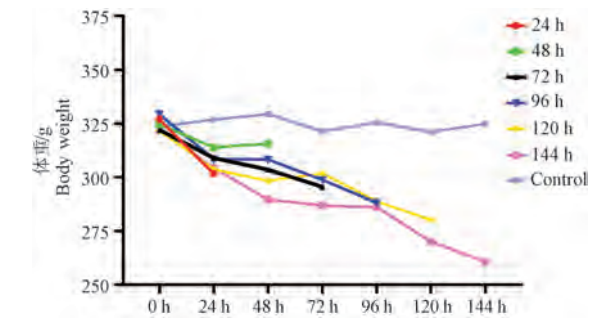


图 1 不同时间睡眠剥夺模型大鼠体重变化
Figure 1 Weight changes in rats at different times after sleep deprivation

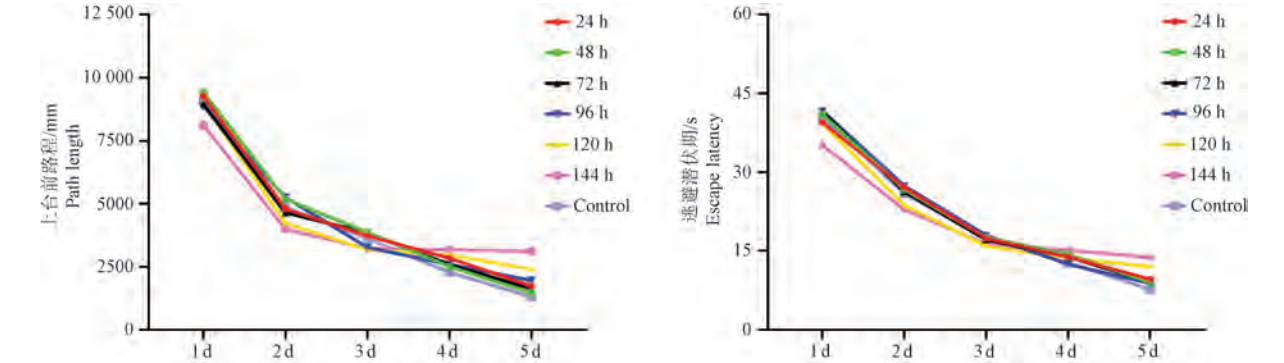
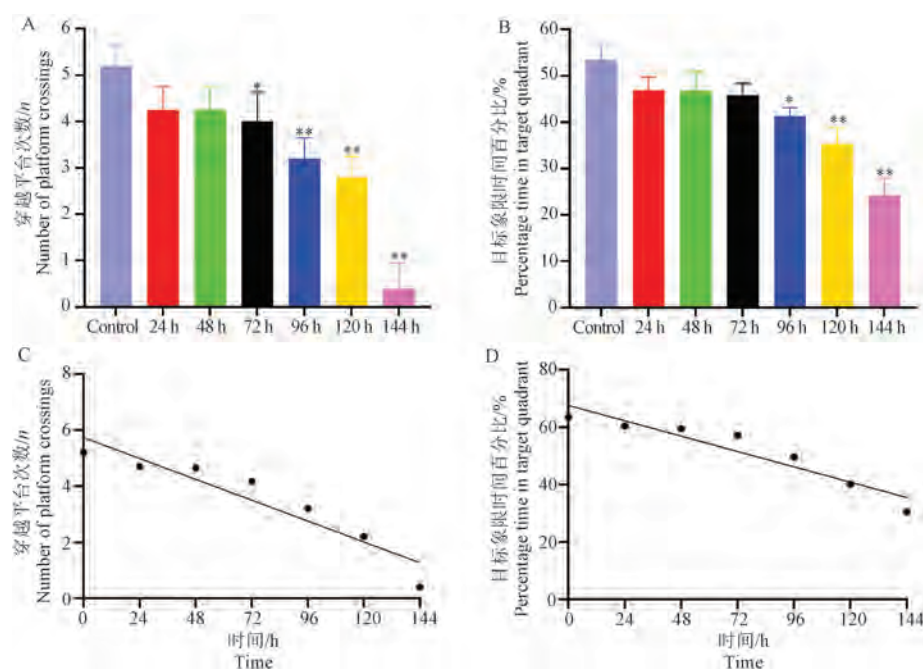


图 2 Morris 水迷宫定位航行实验结果
Figure 2 Results of Morris water maze navigation test



注:A:空间探索实验穿越平台次数;B:空间探索实验目标象限时间百分比;C:睡眠剥夺时间与穿越平台次数相关性分析;D:睡眠剥夺时间与目标象限时间百分比相关性分析。与 Control 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图3 Morris 水迷宫空间探索实验结果

Note. A, Number of platform crossing. B, Percentage time in target quadrant. C, Correlation analysis between sleep deprivation time and number of platform crossings. D, Correlation analysis between sleep deprivation time and target quadrant time percentage. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 3 Results of Morris water maze space exploration test

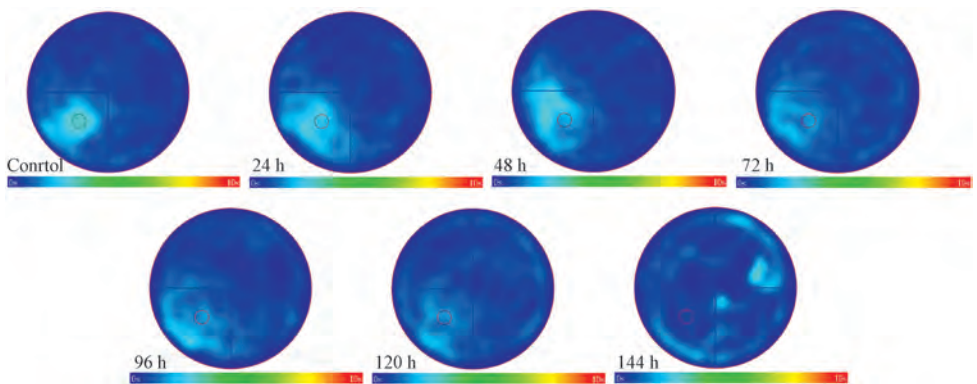


图4 空间探索实验各组大鼠游泳轨迹热图

Figure 4 Swimming trajectory heat map of rats in each group of space exploration test

2.4 不同时间睡眠剥夺对大鼠海马 CA1 区细胞形态的影响

尼氏染色结果显示,与 Control 组比较,急性睡眠剥夺后 24 h、48 h、72 h、96 h 组大鼠海马 CA1 区神经细胞数量未见明显减少,排列整齐,轮廓清晰,尼氏体核仁深染、清晰、居中,细胞形态结构基本正常;120 h、144 h 组海马 CA1 区细胞数目较前减少,形态不规则,排列疏松紊乱,间隙增大(图 6)。

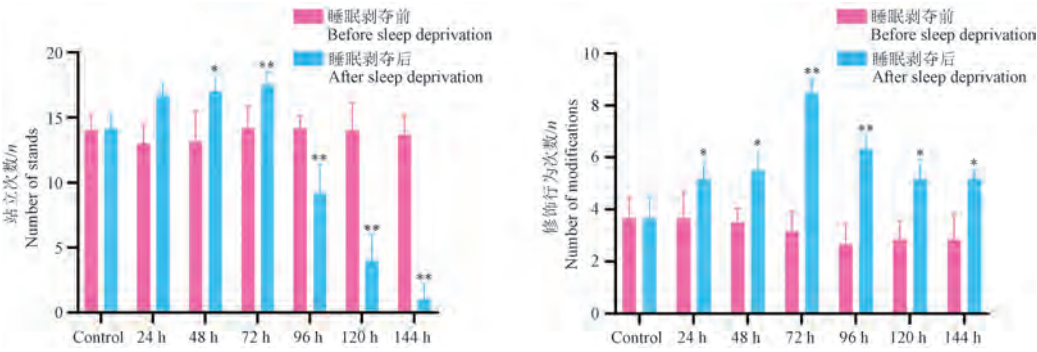
2.5 不同时间睡眠剥夺对大鼠突触相关分子标志物表达的影响

如图 7 免疫组织化学染色结果显示,与 Control

组比较,睡眠剥夺 24 h、48 h、72 h、96 h 组模型大鼠海马 CA1 区 BDNF、SYN、PSD-95 阳性细胞数未见明显减少,而 120 h、144 h 组阳性细胞表达减少($P<0.05$),且 CA1 区神经细胞排列疏松,着色浅。

图 8 所示,Western blot 检测各组大鼠海马 BDNF、SYN、PSD-95 蛋白表达量结果显示,与 Control 组比较,随着睡眠剥夺时间的增加,各组大鼠海马组织中 BDNF、SYN、PSD-95 蛋白表达量均呈下降趋势($P<0.01$),且与睡眠剥夺时间呈负相关。

如图 9 的 RT-PCR 结果显示,与 Control 组比较,随着睡眠剥夺时间的延长,各组大鼠海马组织中



注:与 Control 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 5 旷场实验结果

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

Figure 5 Open field test results

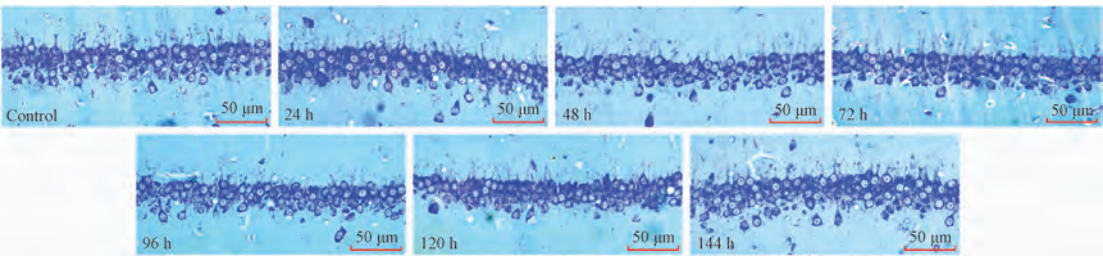


图 6 Nissl 染色观察不同时间睡眠剥夺对大鼠海马 CA1 区神经元形态、数量的影响

Figure 6 Effects of sleep deprivation at different times on the morphology and number of neurons in the CA1 region of the hippocampus in rats observed by Nissl staining

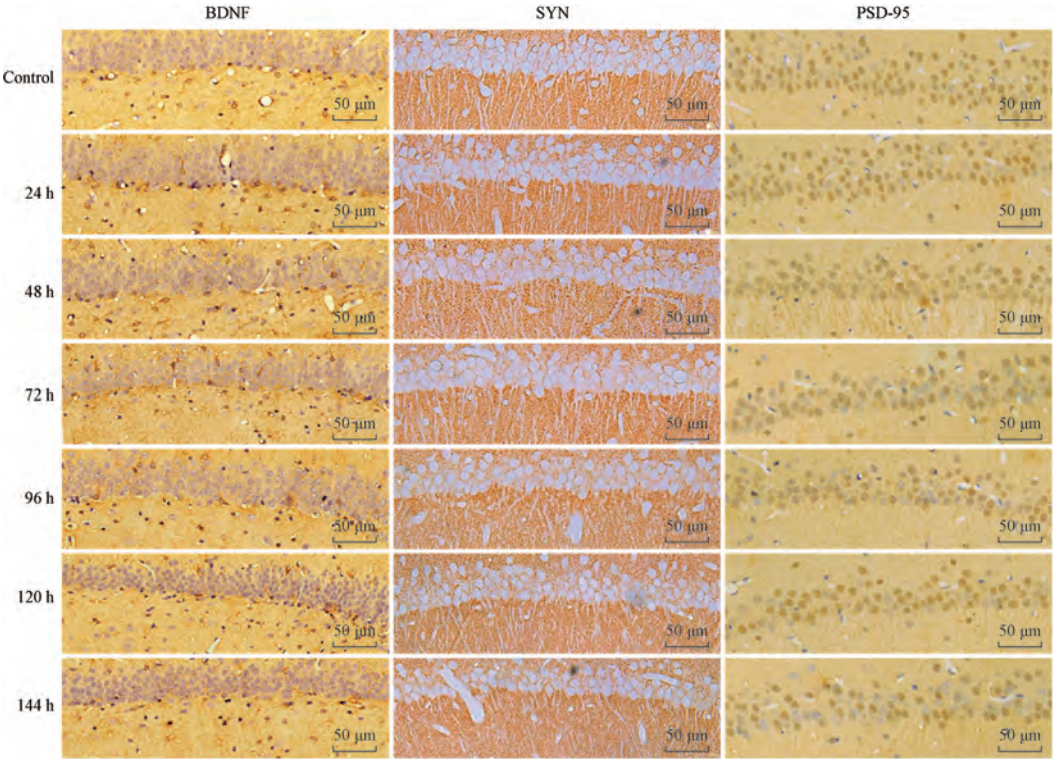
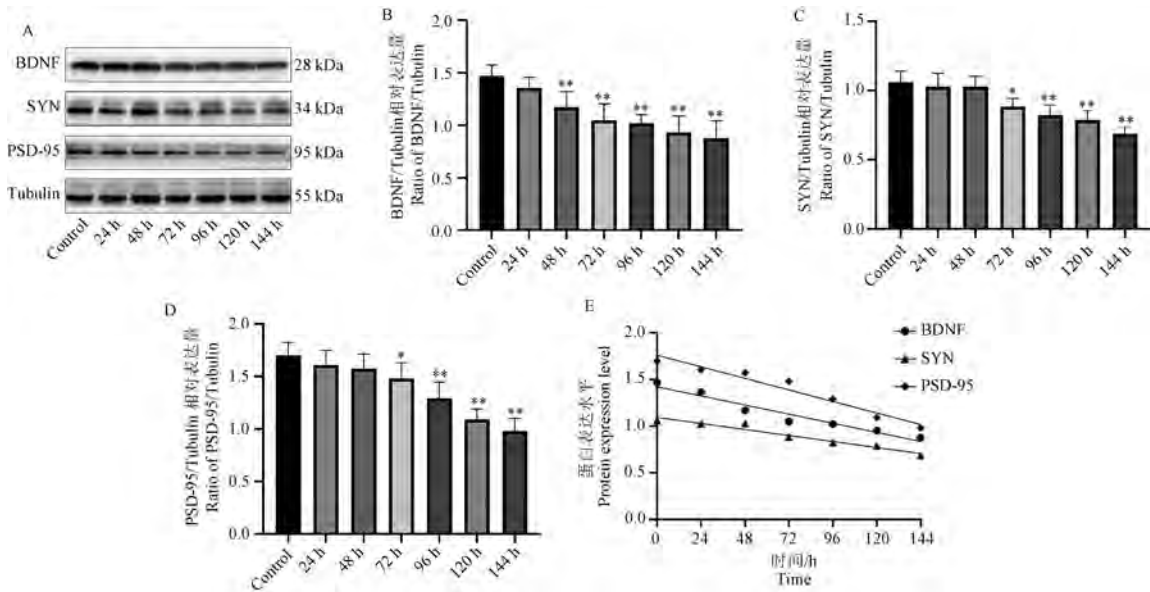


图 7 免疫组织化学染色观察不同时间睡眠剥夺对大鼠海马 CA1 区突触相关蛋白 BDNF、SYN 和 PSD-95 阳性细胞表达的影响

Figure 7 Effects of sleep deprivation at different times on the expression of synaptic related proteins BDNF, SYN and PSD-95 positive cells in the CA1 region of the hippocampus in rats observed by immunohistochemical staining

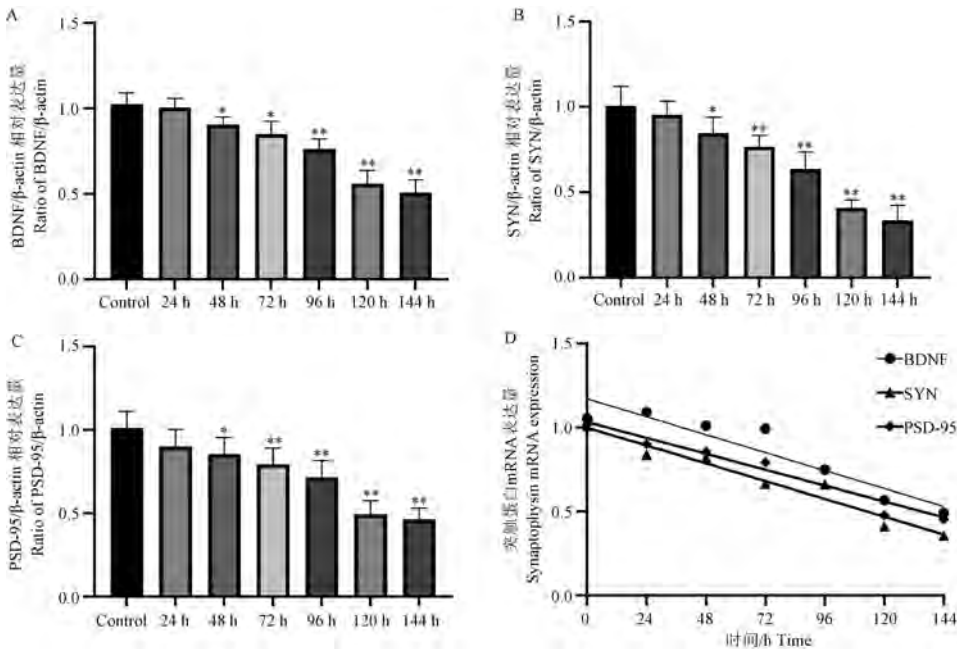


注:A:条带图片;B:BDNF 蛋白表达;C:SYN 蛋白表达;D:PSD-95 蛋白表达;E:睡眠剥夺时间与突触相关蛋白表达量的相关性分析。与 Control 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 8 Western blot 检测不同时间睡眠剥夺模型大鼠海马组织突触相关蛋白的表达

Note. A, Strip picture. B, Expression of BDNF. C, Expression of SYN. D, Expression of PSD-95. E, Correlation analysis between sleep deprivation time and synaptic related protein expression. Compared with Control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 8 Western blot detects the expression of synaptic related proteins of hippocampus with sleep deprivation models at different times in rats



注:A:BDNF mRNA 的表达水平;B:SYN mRNA 的表达水平;C:PSD-95 mRNA 的表达水平;D:突触蛋白 mRNA 的表达水平。与 Control 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 9 RT-PCR 检测不同时间睡眠剥夺模型大鼠海马组织突触相关蛋白基因的表达

Note. A, Expression level of BDNF mRNA. B, Expression level of SYN mRNA. C, Expression level of PSD-95 mRNA. D, Expression level of synaptophysin mRNA. Compared with Control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 9 RT-PCR detects the expression of synaptic related protein genes of hippocampus with sleep deprivation models at different times in rats

BDNF、SYN、PSD-95 的 mRNA 表达水平均显著降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)且与睡眠剥夺时间呈负相关。上述结果表明,睡眠剥夺可以导致大鼠海马组织突触相关分子标志物表达异常。

3 讨论

睡眠在中枢神经系统的正常运行中起着至关重要的作用,良好睡眠有利于学习记忆的形成与巩固^[22],而睡眠剥夺则会导致记忆功能紊乱以及认知功能下降^[8,23]。既往研究报道,睡眠剥夺可以导致学习认知功能减退,但具体机制错综复杂,至今尚未明确。突触可塑性是突触的形态和功能发生较为持久改变的特性,长期以来一直被认为是学习和记忆的重要组成部分^[12]。突触相关蛋白的表达在增强突触传递效能中发挥了重要作用,是构成突触可塑性重要的生物学基础^[24]。

最近的相关研究报道主要集中在药物干预对急、慢性睡眠剥夺诱导的学习认知功能障碍,但睡眠剥夺导致学习认知功能障碍的确切机制研究鲜有报道,本实验通过改良多平台水环境法制备大鼠睡眠剥夺模型,探究不同时间睡眠剥夺是否通过调控突触相关标志物的表达影响突触可塑性,进而导致睡眠剥夺模型大鼠学习认知功能减退。结果显示,睡眠剥夺后大鼠站立次数和修饰次数逐渐增加,出现易激惹、互相撕咬等焦虑样行为,随着睡眠剥夺时间的延长,大鼠站立次数和修饰次数均呈升高的趋势且在 72 h 达高峰,96 h、120 h、144 h 呈逐渐下降趋势,表明大鼠对新鲜事物探索的好奇心减弱,兴奋性降低,焦虑情绪增加。Liu 等^[25]研究发现改良多平台法诱导的急性反常睡眠剥夺持续 6 h 可导致小鼠焦虑样行为,与本研究结果一致。Morris 水迷宫定位航行实验中,120 h、144 h 组逃避潜伏期和上台前路程增加,可能是由于随着睡眠剥夺时间的延长,大鼠体力不支、耐力下降导致的;在空间探索实验中,大鼠穿越平台次数和目标象限停留时间百分比随睡眠剥夺时间的延长呈明显下降趋势且呈负相关。此外,本研究结果发现随着睡眠剥夺时间的增加,动物的学习能力(大鼠逃避潜伏期和上台前路程)没有明显改变,但记忆功能(大鼠目标象限停留时间百分比和穿越平台次数)呈明显下降趋势,且与睡眠剥夺时间呈负相关,由此表明,睡眠剥夺可能对大鼠记忆功能的影响更为显著。

Zhou 等^[26]研究结果显示,睡眠剥夺可以导致

海马神经元数量减少,诱导海马神经元损伤,异槲皮素通过抑制 NLRP3 诱导的焦亡来减轻睡眠剥夺依赖性海马神经元损伤改善学习认知功能。本研究结果中各组大鼠海马神经元形态和结构未发生明显改变,但结合 Morris 水迷宫、Western blot 和 RT-PCR 结果推测,急性睡眠剥夺短期内对海马神经细胞形态和结构不会产生明显改变,但其功能发生了变化,主要表现为大鼠记忆能力明显减退。

突触与学习认知功能密不可分,突触可塑性是学习记忆形成的神经基础^[27],研究表明,蒙药珍宝丸通过促进 PSD-95 的合成,修复 PSD 结构来维持长时程增强的功能,进而改善睡眠剥夺模型大鼠的学习记忆能力^[28]。相关文献报道,SAMP8 小鼠大脑内 BDNF 的表达下降,突触传递效能减低,上调 BDNF 的表达可以有效增强突触可塑性,改善学习认知功能^[29]。研究发现,SYN 表达的增加能够增强大鼠的学习记忆能力^[30-31]。Pei 等^[32]研究认为,睡眠剥夺大鼠空间记忆缺陷与海马神经元突触可塑性有关。本实验 Western blot 和 RT-PCR 结果均显示突触可塑性相关蛋白 BDNF、SYN、PSD-95 的表达随着睡眠剥夺时间的增加呈逐渐下降的趋势且呈负相关,本研究发现,睡眠剥夺主要通过影响突触相关蛋白的表达进而影响动物的空间学习记忆功能。

随着睡眠剥夺时间的增加,当达到 120 h、144 h 时大鼠进食量减少、体重减轻、情绪暴躁、出现攻击行为,部分大鼠出现血尿、血便,并且落水频率增加,不能稳定站立于平台上,出现溺水而亡。故推测大鼠死亡原因可能与睡眠剥夺时间过长食欲素分泌紊乱、体力不支、消化系统功能紊乱等有关。后期仍需进行相关实验进行验证。

综上所述,急性睡眠剥夺可增加大鼠焦虑样情绪,导致学习认知功能下降,其可能与突触生物标志物表达降低有关。

参考文献:

- [1] XIE L, KANG H, XU Q, et al. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain [J]. Science, 2013, 342 (6156): 373-377.
- [2] EIDE P K, VINJE V, PRIPE A H, et al. Sleep deprivation impairs molecular clearance from the human brain [J]. Brain, 2021, 144 (3): 863-874.
- [3] 何静文, 苏彤, 唐云翔. 关注睡眠, 关爱健康:《中国睡眠研究报告 2023》解读 [J]. 海军军医大学学报, 2023, 44(11): 1261-1267.

- HE J W, SU T, TANG Y X. Care for sleep, care for health; interpretation of Annual Sleep Report of China 2023 [J]. Acad J Nav Med Univ, 2023, 44(11): 1261-1267.
- [4] HÄRMÄ M, TENKANEN L, SJÖBLOM T, et al. Combined effects of shift work and life-style on the prevalence of insomnia, sleep deprivation and daytime sleepiness [J]. Scand J Work Environ Health, 1998, 24(4): 300-307.
- [5] SALEHPOUR F, FARAJDOKHT F, ERFANI M, et al. Transcranial near-infrared photobiomodulation attenuates memory impairment and hippocampal oxidative stress in sleep-deprived mice [J]. Brain Res, 2018, 1682: 36-43.
- [6] LEWIS L D. The interconnected causes and consequences of sleep in the brain [J]. Science, 2021, 374(6567): 564-568.
- [7] LO J C, CHONG P L, GANESAN S, et al. Sleep deprivation increases formation of false memory [J]. J Sleep Res, 2016, 25(6): 673-682.
- [8] KILLGORE W D. Effects of sleep deprivation on cognition [J]. Prog Brain Res, 2010, 185: 105-129.
- [9] ZHU Y, GONG S. Research progress in the effect of sleep deprivation on working memory and its mechanisms [J]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2023, 54(2): 240-245.
- [10] 李运, 王海云. Homer1a 在睡眠剥夺损伤学习和记忆功能中的研究进展 [J]. 临床麻醉学杂志, 2021, 37(8): 891-894. LI Y, WANG H Y. Research progress of Homer1a in learning and memory impairment induced by sleep deprivation [J]. J Clin Anesthesiol, 2021, 37(8): 891-894.
- [11] 左昕, 潘奇波, 林春辉. 学习记忆中长时记忆形成的分子机制 [J]. 海军医学杂志, 2008, 29(4): 364-366. ZUO X, PAN Q B, LIN C H. Molecular mechanism of long-term memory formation in learning and memory [J]. J Navy Med, 2008, 29(4): 364-366.
- [12] MAGEE J C, GRIENBERGER C. Synaptic plasticity forms and functions [J]. Annu Rev Neurosci, 2020, 43: 95-117.
- [13] MANSVELDER H D, VERHOOG M B, GORIUNOVA N A. Synaptic plasticity in human cortical circuits: cellular mechanisms of learning and memory in the human brain? [J]. Curr Opin Neurobiol, 2019, 54: 186-193.
- [14] BIN IBRAHIM M Z, BENOY A, SAJIKUMAR S. Long-term plasticity in the hippocampus: maintaining within and ‘tagging’ between synapses [J]. FEBS J, 2022, 289(8): 2176-2201.
- [15] COMPANS B, CAMUS C, KALLERGI E, et al. NMDAR-dependent long-term depression is associated with increased short term plasticity through autophagy mediated loss of PSD-95 [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2849.
- [16] WANG X, HUANG X, YANG M, et al. Tongxinluo promotes axonal plasticity and functional recovery after stroke [J]. Transl Neurosci, 2020, 11(1): 428-438.
- [17] VON BOHLEN UND HALBACH O, VON BOHLEN UND HALBACH V. BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function [J]. Cell Tissue Res, 2018, 373(3): 729-741.
- [18] KOWIANSKI P, LIETZAU G, CZUBA E, et al. BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity [J]. Cell Mol Neurobiol, 2018, 38(3): 579-593.
- [19] KEIFER J. Regulation of AMPAR trafficking in synaptic plasticity by BDNF and the impact of neurodegenerative disease [J]. J Neurosci Res, 2022, 100(4): 979-991.
- [20] 刘心朗, 周丽丽, 杨占君, 等. 肉苁蓉总苷对 SAMP8 小鼠学习记忆能力及突触可塑性的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(1): 110-115, 276-277. LIU X L, ZHOU LL, YANG Z J, et al. Effects of glycosides of *Cistanche* on cognitive function and synaptic plasticity in SAMP8 mice [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2022, 40(1): 110-115, 276-277.
- [21] 王若冲, 戴宁, 李儒婷, 等. 平台水环境法构建人类疾病动物模型的应用与思考 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(22): 205-213. WANG R C, DAI N, LI R T, et al. Application and thinking of platform method in construction of animal model of human disease [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(22): 205-213.
- [22] REYES-RESINA I, SAMER S, KREUTZ M R, et al. Molecular mechanisms of memory consolidation that operate during sleep [J]. Front Mol Neurosci, 2021, 14: 767384.
- [23] NABAE E, KESMATI M, SHAHRIARI A, et al. Cognitive and hippocampus biochemical changes following sleep deprivation in the adult male rat [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 104: 69-76.
- [24] HENLEY J M, SEAGER R, NAKAMURA Y, et al. SUMOylation of synaptic and synapse-associated proteins: an update [J]. J Neurochem, 2021, 156(2): 145-161.
- [25] LIU H, HUANG X, Li Y, et al. TNF signaling pathway-mediated microglial activation in the PFC underlies acute paradoxical sleep deprivation-induced anxiety-like behaviors in mice [J]. Brain Behav Immun, 2022, 100: 254-266.
- [26] ZHOU H, WU J, GONG Y, et al. Isoquercetin alleviates sleep deprivation dependent hippocampal neurons damage by suppressing NLRP3-induced pyroptosis [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2022, 44(5): 766-772.
- [27] FENG Y, SHI R, HU J, et al. Effects of neural-derived estradiol on actin polymerization and synaptic plasticity-related proteins in prefrontal and hippocampal cells of mice [J]. Steroids, 2022, 177: 108935.
- [28] 周芮. 蒙药珍宝丸改善大鼠睡眠剥夺所致海马氧化应激及突触可塑性的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2021. ZHOU R. Improvement of Mongolian Zhenbao Pills on Hippocampus Oxidative Stress and Synaptic Plasticity in Sleep Deprivationinduced Rats [D]. Hohhot: Inner Mongolia Medical University, 2021.
- [29] LIAN W W, ZHOU W, ZHANG B Y, et al. DL0410 ameliorates cognitive disorder in SAMP8 mice by promoting mitochondrial dynamics and the NMDAR-CREB-BDNF pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(7): 1055-1068.
- [30] YAO Y, WANG F, YANG X, et al. Bombesin attenuated

ischemia-induced spatial cognitive and synaptic plasticity impairment associated with oxidative damage [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 87-93.

[31] DANDI E, KALAMARI A, TOULOUMI O, et al. Beneficial effects of environmental enrichment on behavior, stress reactivity and synaptophysin/BDNF expression in hippocampus following early life stress [J]. Int J Dev Neurosci, 2018, 67: 19-32.

[32] PEI W, MENG F, DENG Q, et al. Electroacupuncture promotes the survival and synaptic plasticity of hippocampal neurons and improvement of sleep deprivation-induced spatial memory impairment [J]. CNS Neurosci Ther, 2021, 27 (12): 1472-1482.

[收稿日期] 2023-10-15



《中国比较医学杂志》不接受重复投稿说明

本刊严格执行国家有关科研诚信建设的相关规定及标准,包括但不限于《CY/T 174-2019:学术出版规范 期刊学术不端行为界定》、《关于进一步加强科研诚信建设的若干意见》(国务院公报 2018 年第 17 号)、《发表学术论文“五不准”》(科协发组字〔2015〕98 号)等,严肃对待各种学术不端行为。

本刊不接受重复发表(包括不同语种),也不允许作者一稿多投。具体表现形式包括:
重复发表:

- a) 不加引注或说明,在论文中使用自己(或自己作为作者之一)已发表文献中的内容。
- b) 在不做任何说明的情况下,摘取多篇自己(或自己作为作者之一)已发表文献中的部分内容,拼接成一篇新论文后再次发表。
- c) 被允许的二次发表不说明首次发表出处。
- d) 不加引注或说明地在多篇论文中重复使用一次调查、一个实验的数据等。
- e) 将实质上基于同一实验或研究的论文,每次补充少量数据或资料后,多次发表方法、结论等相似或雷同的论文。

f) 合作者就同一调查、实验、结果等,发表数据、方法、结论等明显相似或雷同的论文。
一稿多投:

- a) 将同一篇论文同时投给多个期刊。
- b) 在首次投稿的约定回复期内,将论文再次投给其他期刊。
- c) 在未接到期刊确认撤稿的正式通知前,将稿件投给其他期刊。
- d) 将只有微小差别的多篇论文,同时投给多个期刊。
- e) 在收到首次投稿期刊回复之前或在约定期内,对论文进行稍微修改后,投给其他期刊。
- f) 在不做任何说明的情况下,将自己(或自己作为作者之一)已经发表论文,原封不动或做些微修改后再次投稿。

若存在以上问题,一经查实,编辑部有责任揭露,给予书面警告,拒绝发表有其署名的文稿,通知其所在单位,并在我刊公开曝光。

《中国比较医学杂志》编辑部

黄俊杰,陈民利,朱科燕,等. WHBE 兔膝关节关节炎模型的建立与 PRFr 的干预研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 65-73.

Huang JJ, Chen ML, Zhu KY, et al. Establishment of a WHBE rabbit knee osteoarthritis model and therapeutic effect of platelet-rich fibrin releasates [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 65-73.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.007

WHBE 兔膝关节关节炎模型的建立与 PRFr 的干预研究

黄俊杰¹, 陈民利¹, 朱科燕¹, 江劲翱², 张静惠³, 蒋超¹, 潘永明^{1*}

(1. 浙江中医药大学 动物实验研究中心/比较医学研究中心, 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学第二临床医学院, 杭州 310053; 3. 浙江中医药大学生命科学学院, 杭州 310053)

【摘要】 目的 采用内侧副韧带和部分髌韧带切除术建立 WHBE 兔 KOA 模型并用富血小板纤维蛋白释放液 (PRFr) 干预, 探讨 WHBE 兔 KOA 模型软骨损伤和炎症的机制以及 PRFr 干预疗效。**方法** 取 WHBE 兔 24 只, 随机分成 3 组, 即对照 (NC) 组 ($n=6$)、模型 (KOA) 组 ($n=12$) 和治疗 (PRFr) 组 ($n=6$); 其中 KOA 组和 PRFr 组分别于术后第 7 天和第 14 天时向两侧关节腔内注射生理盐水和 PRFr 0.5 mL。造模 4、8 周时, 各组动物进行行为学评分、X 线影像学观察, 并取血清进行 ELISA 检测 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 水平, 4 周时 KOA 组处理 6 只, 8 周时处理各组剩余动物, 取兔双侧膝关节, 进行大体评分, 脱钙后行病理切片制作, 然后进行 HE 染色、甲苯胺蓝染色和番红 O 固绿染色以及 TGF- β 、BMP3 和 NF- κ B 免疫组化表达检测。**结果** 与 NC 组比, 造模后 WHBE 兔 Lequesne MG 行为学评分, Mankin's 评分, Pelletier 评分均显著升高 ($P<0.01$), 可见膝关节肿胀明显、关节疼痛刺激和活动受限明显, 且 X 光显示软组织呈高密度阴影, 关节积液较多, 解剖观察显示关节面粗糙, 病理观察显示软骨表面缺损, 软骨细胞丢失或部分丢失, 表明 WHBE 兔 KOA 模型成立。与 KOA 组比较, PRFr 干预治疗后血清炎症水平 (IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13) 均显著降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 软骨表面粗糙程度低, 大部分软骨细胞分布整齐; 同时 TGF- β 、BMP3 和 NF- κ B 表达水平亦显著降低 ($P<0.01$)。**结论** 本研究成功建立了 WHBE 兔 KOA 模型, 且 PRFr 可通过 TGF- β /BMP 和 NF- κ B 途径改善 WHBE 兔 KOA 模型软骨损伤和炎症。

【关键词】 WHBE 兔; 膝关节关节炎; 富血小板纤维蛋白释放液; NF- κ B

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0065-09

Establishment of a WHBE rabbit knee osteoarthritis model and therapeutic effect of platelet-rich fibrin releasates

HUANG Junjie¹, CHEN Minli¹, ZHU Keyan¹, JIANG Jingao², ZHANG Jinghui³, JIANG Chao¹, PAN Yongming^{1*}

(1. Laboratory Animal Research Center/Comparative Medical Research Institute, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China. 2. the Second Affiliated College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053.

3. School of Life Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053)

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of cartilage injury and inflammation in the WHBE rabbit KOA model and the effect of platelet-rich fibrin releasates (PRFr) treatment on the KOA process, we established a WHBE rabbit KOA model by excision of medial collateral and partial patellar ligaments and administered a PRFr solution. **Methods** Twenty-four WHBE rabbits were randomly divided into three groups: normal control (NC) group ($n=6$), model (KOA) group ($n=12$), and cure (PRFr) group ($n=6$). KOA and PRFr groups were injected with 0.5 mL saline

【基金项目】 浙江省卫生健康委医药卫生科技计划项目 (2021KY219)。

【作者简介】 黄俊杰 (1990—), 男, 实验师, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: 306999492@qq.com

【通信作者】 潘永明 (1979—), 男, 副研究员, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: pym918@126.com

and PRFr into both joint cavities on 7 and 14 postoperative days, respectively. At 4 and 8 weeks of modeling, the knee joint grade scoring, X-ray imaging, and gross scoring were performed. Serum levels of IL-1 β , TNF- α , and MMP-13 were measured by ELISA. At 4 weeks, 6 animals in the KOA group were euthanized, and at 8 weeks, the remaining animals in each group were euthanized. Pathological sections were prepared after decalcification, and then HE, toluidine blue, and safranin O-fast green staining and immunohistochemical analysis of TGF- β , BMP3, and NF- κ B were conducted. **Results** The Lequesne MG behavioral score, Mankin's score, and Pelletier score of WHBE rabbits after the operation were significantly increased compared with the NC group ($P<0.01$). Pathological observations revealed surface defects of the cartilage and partial loss of chondrocytes. These result indicated that the KOA model was established successfully. In KOA rabbits, knee joint swelling, joint pain stimulation, and movement limitation were obvious. X-rays showed a high-density soft tissue shadow, indicating more joint effusion and a rough articular surface in general. After PRFr treatment, the serum levels of proinflammatory factors IL-1 β , TNF- α , and MMP-13 in KOA model rabbits were significantly reversed ($P<0.05$, $P<0.01$). Additionally, the cartilage surface became smooth, and most chondrocytes were neatly distributed. Expression levels of TGF- β , BMP3, and NF- κ B induced by KOA were also significantly decreased ($P<0.01$). **Conclusions** We successfully established a KOA model in WHBE rabbits, and PRFr improved the cartilage injury and inflammation of the WHBE rabbit KOA model through TGF- β /BMP and NF- κ B pathways.

[Keywords] WHBE rabbit; knee osteoarthritis; platelet-rich fibrin releasates; NF- κ B
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是由多因素引起的关节退行性疾病,可导致膝关节疼痛、关节不稳定和功能受限^[1]。近几年来, KOA 已成为人类高患病率和发病率的疾病之一,在全球 KOA 患病率高达 9.4%,给越来越多的家庭带来沉重的经济负担^[1]。KOA 表现为关节软骨退化、骨赘和滑膜组织炎症,目前认为环境和遗传因素相互作用导致 KOA 的发生和发展,如肥胖会增加关节的承重负荷,也可能增加关节对炎症因子的敏感性^[2]。此外,目前一些常用的 KOA 治疗手段如非甾体类消炎药、止痛剂等长期使用后,可能会产生副反应^[3]。因此,建立适合且安全有效的 KOA 疗法在临床应用中至关重要。研究表明,运动、减肥、关节内注射透明质酸或富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)等在长期治疗中(>12 月)具有较低的副作用和较高的获益,尤其 PRP 含多种关键的生长因子,作为生长材料已成功应用于临床^[3]。值得一提的是,富血小板纤维蛋白(platelet-rich fibrin, PRF)是血小板浓缩物的另一种制剂,具有很强的纤维蛋白凝胶聚合作用,可持续性地释发生长因子用以治疗肌腱、软骨等,且在大鼠肌腱治疗中,PRF 比 PRP 能更快地加速肌腱愈合,从而具有更好的改善作用^[4]。前期研究发现改良的自体富血小板纤维蛋白释放液(platelet-rich fibrin releasates, PRFr)能明显促进兔软骨细胞修复^[5],但机制未明。

近来研究发现转化生长因子- β (TGF- β)和骨形态发生蛋白(BMP)信号通路在内的几个分子通

路在 KOA 的发生和发展中起着关键作用^[6]。另外, NF- κ B 在炎症、免疫和应激反应以及软骨降解中起着至关重要的作用^[7]。兔膝关节大体解剖结构与人类相似性较高,课题组前期发现 WHBE 兔比日本大耳白兔更易产生骨代谢紊乱而导致前肢畸形,并且高脂高糖饮食诱导后 WHBE 兔易产生肥胖、脂代谢紊乱、胰岛素抵抗和炎症^[8],表明 WHBE 兔存在骨代谢调控的敏感性和环境诱导的易感性。因此,本项目根据膝骨关节炎的病理特征,通过外科手术方法模拟膝关节力学不稳,建立 WHBE 兔 KOA 模型,进一步从 TGF- β /BMP 和 NF- κ B 途径研究 WHBE 兔 KOA 模型软骨损伤和炎症的发生机制,同时探讨 PRFr 对 WHBE 兔 KOA 模型的疗效。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康普通级雄性成年 WHBE 兔 24 只,体重为 2.0~2.5 kg,购自新昌县大市聚镇欣健兔场[SCXK(浙)2020-0005],合格证编号为 20211223Cezz0412999223,饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心普通级实验室[SYXK(浙)2021-0012],室温 20~22℃,相对湿度 40%~60%,12 h/12 h 明/暗交替,动物自由饮食和饮水。所有操作均符合浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会要求(IACUC-20211213-15),遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

白介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、

基质金属蛋白酶 13 (MMP-13) ELISA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; VET1800B X 光机, 南京普爱医疗设备股份有限公司; Varioscan Flash 连续光谱酶标仪, 美国 Thermo Fisher 公司; Allerga X-15 离心机, 美国 Beckman 公司; HistoSTAR 包埋机, 美国 Thermo 公司; Shandon Excelsior AS 组织脱水机, 美国 Thermo 公司; HistoCore MULTICUT 半自动石蜡切片机, 德国 Leica 公司; GEMINI AS 染色机, 美国 Thermo 公司; 120P 徕卡数字切片扫描设备, 上海徕卡医疗科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 PRFr 的制备

兔静脉取 10 mL 静脉血, 置于不含抗凝剂的真空采血管中, 于 3000 r/min 离心 10 min, 取出 PRF, 4 °C 下静置于无菌离心管内, 24 h 后收集析出液体, -20 °C 冷冻备用。

1.3.2 KOA 模型建立与 PRFr 的干预

WHBE 兔适应性饲养 7 d 后, 随机分成 3 组, 即对照 (NC) 组 ($n=6$)、模型 (KOA) 组 ($n=12$)、治疗 (PRFr) 组 ($n=6$)。KOA 组与 PRFr 组兔禁食不禁水 12 h 后, 于耳缘静脉注射 8 mg/kg 丙泊酚注射液诱导全身麻醉, 使用 1%~3% 异氟烷进行面罩吸入维持麻醉, 双侧膝关节周围备皮消毒。参考杨松滨等^[9]方法, 在无菌条件下于膝关节内侧做一长约 2 cm 的纵向切口, 切开皮肤、皮下筋膜, 暴露内侧副韧带及髌韧带, 然后切断内侧副韧带, 并截除断端约 5 mm, 同时切除 2/3 内侧髌韧带 (长 1.5 cm 和宽 0.8 cm), 生理盐水冲洗后缝合创面。NC 组仅切开皮肤, 暴露内侧副韧带和髌韧带, 不做其它处理。术后连续 3 d 肌肉注射 40 万单位的青霉素预防感染; 模型组和 PRFr 组分别在术后第 7 天和第 14 天时向两侧关节腔内注射生理盐水和 PRFr 0.5 mL。4 周时 KOA 组处理 6 只动物, 8 周时每组各处理 6 只动物。

1.3.3 一般情况观察

试验期间, 观察动物的一般情况并每隔 1 周空腹称重。

1.3.4 Lequesne MG 膝关节级别评分

造模 4 周 (4W) 和 8 周 (8W) 时, 参考 Lequesne MG 膝关节评估级别法^[10]进行行为学评分。包括疼痛刺激反应 (0~3 分)、步态改变 (0~3 分)、关节活动 (0~3 分) 和关节肿胀 (0~2 分)。

1.3.5 X 线影像学观察

造模 4 W 和 8 W 时, 兔常规麻醉后进行侧位膝

关节 X 线检查。

1.3.6 血液炎症因子测定

造模 4W 和 8W 时, 空腹取兔耳中动脉血 3 mL, 分离血清。根据试剂盒提供的标准品稀释制作标曲, 按说明书测得样品吸光度并计算得到 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 水平。

1.3.7 大体观察评分

采用 3% 戊巴比妥钠溶液 100 mg/kg 经耳缘静脉过量注射致动物安乐死后, 取双侧膝关节采用 Pelletier 评分^[11]进行大体观察膝关节软骨损伤情况, 评分细节如下: 关节面光滑, 色泽如常 (0 分); 关节面粗糙, 有小的裂隙且色泽灰暗 (1 分); 关节面糜烂, 软骨缺损深达软骨表中层 (2 分); 关节面溃疡形成, 缺损深达软骨深层 (3 分); 软骨剥脱, 软骨下骨暴露 (4 分)。

1.3.8 病理组织学形态观察

造模 4W 和 8W 时, 取兔双侧膝关节, 经甲醛固定 24 h 后, EDTA 脱钙处理后, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡组织包埋, 制作石蜡切片, 行 HE 染色, 观察软骨组织病变; 另取组织切片, 在甲苯胺蓝染液中室温染色 20 min, 观察软骨和成骨细胞的变化; 经番红 O 和固绿染液染色, 光学显微镜下观察病变情况, 并对番红 O-固绿染色结果进行 Mankin's 评分, 包括软骨结构、软骨细胞、基质染色、潮线完整性 4 个方面^[12]。

1.3.9 免疫组化观察

造模 4W 和 8W 时, 取各组兔双侧膝关节的石蜡切片, 采用免疫组化法观察 TGF- β 、BMP3 和 NF- κ B 的蛋白表达情况。

1.4 统计学方法

所有数据均用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 采用 SPSS 19.0 统计软件分析, 采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 若方差齐, 用 Tukey 法进行多样本均数间的两两比较; 若方差不齐, 则改用 Dunnett's T3 法。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般体征与 Lequesne MG 行为学观察

试验期间, 各组兔术后 1 周时创面愈合较好, 且各组兔的体重均呈正常的增长模式, 未见明显差异 ($P>0.05$), 见图 1A, 表明本研究的 KOA 术式对 WHBE 兔的机体生长影响较少。PRFr 干预后 4 周

时可见部分动物膝关节肿胀,疼痛刺激不明显,关节活动略有受限,奔跑时偶见跛行,8 周时,动物膝关节未见明显肿胀,疼痛刺激不明显,关节活动未见异常,奔跑时偶见跛行,且治疗组 Lequesne MG 行为学评分在术后 4 周和 8 周时均显著低于 KOA 组 ($P<0.01$),表明 PRFr 干预能明显改善 KOA 模型兔的关节活动行为,见图 1B。

2.2 X 射线影像学变化

X 射线侧位片检查显示,PRFr 干预后虽可见胫骨平台表面略有粗糙(红箭头),但较 KOA 组损伤程度降低明显,见图 2。

2.3 大体观察与 Pelletier 评分

图 3A 大体观察显示,治疗组可见表面略粗糙,并有光泽,较模型组损伤程度降低。同时,Pelletier 评分显示,治疗组的评分显著高于对照组 ($P<$

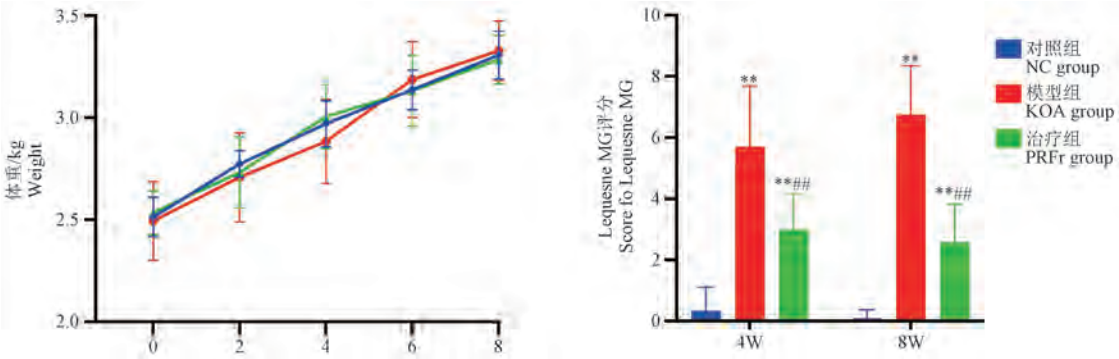
0.01),但显著低于 4W 和 8W 时模型组 ($P<0.01$),见图 3B。

2.4 病理组织学形态观察与 Mankin's 评分

HE 染色、甲苯胺蓝染色及番红 O-固绿染色结果见图 4A,PRFr 干预治疗后,蛋白多糖表达基本均匀,软骨厚度较模型组明显增加;进一步 Mankin's 评分结果显示,治疗组的评分显著高于对照组 ($P<0.01$),但显著低于 4W 和 8W 时模型组 ($P<0.01$),见图 4B。

2.5 WHBE 兔 KOA 模型的建立

WHBE 兔经手术建立 KOA 模型,术后 4 周和 8 周时,对照组膝关节均未见肿胀,疼痛刺激不明显,关节活动未见异常,未见跛行;而模型组术后可见膝关节肿胀明显,部分有明显的骨性突出,质地坚硬,触摸可见糙面且不光滑,疼痛刺激明显,关节活



注:与对照组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, ## $P<0.01$ 。
图 1 各组 Lequesne MG 行为学评分结果($n=6$)
Note. Compared with NC group, ** $P<0.01$. Compared with KOA group, ## $P<0.01$.

Figure 1 Results of Lequesne MG behavioral scores in each group

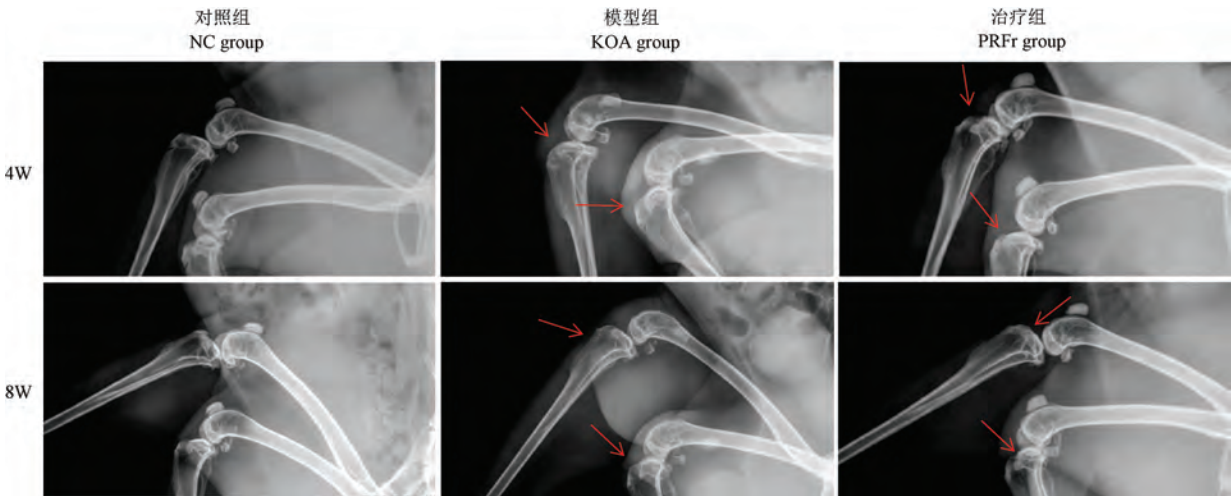
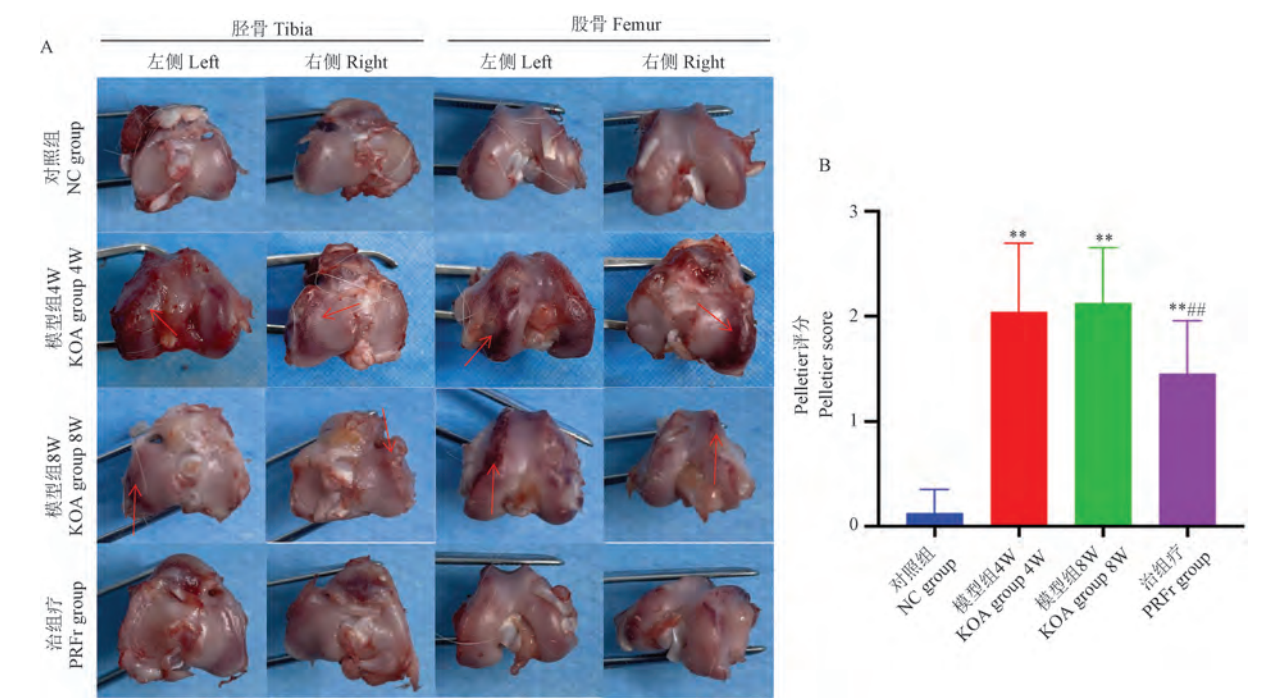
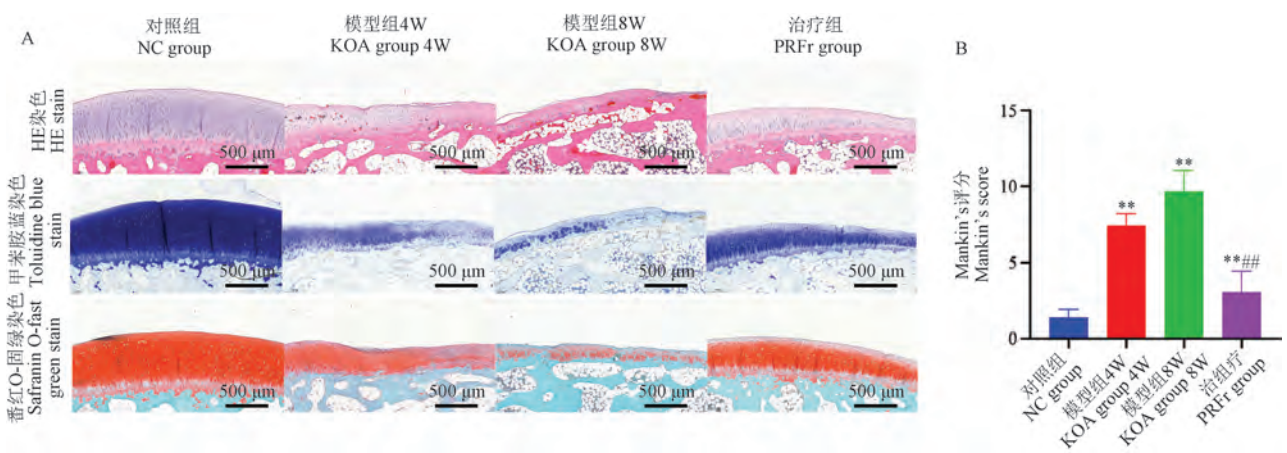


图 2 X-ray 侧位片的变化
Figure 2 Changes of X-ray lateral film



注:与对照组比较, ** $P<0.01$;与模型组 8W 比较, ## $P<0.01$ 。
图 3 各组动物膝关节大体观察和 Pelletier 评分($n=12$)
Note. Compared with NC group, ** $P<0.01$. Compared with KOA group 8W, ## $P<0.01$.

Figure 3 General observation of knee joint and Pelletier score of animals in each group



注:与对照组比较, ** $P<0.01$;与模型组 8W 比较, ## $P<0.01$ 。
图 4 各组膝关节病理观察和 Mankin's 评分($n=12$)
Note. Compared with NC group, ** $P<0.01$. Compared with KOA group 8W, ## $P<0.01$.

Figure 4 Pathological observation and Mankin's score of knee joint in each group

动受限明显,奔跑时有轻度跛行;同时,Lequesne MG 行为学评分也显示,模型组 4 周和 8 周时的评分均显著高于对照组 ($P<0.01$),表明 KOA 模型 WHBE 兔存在明显的关节活动异常,见图 1。X 射线侧位片检查显示,术后 4 周和 8 周时 NC 组胫骨平台表面光滑,周围软组织影像学密度正常,膝关节无明显病理改变;而模型组胫骨平台表面粗糙(红箭头),膝关节软组织呈高密度阴影,关节积液较多,提示模型组存在膝关节病变损伤,见图 2。大体观察显示,8 周时对照组胫骨和股骨表面颜色正常、边缘平整、表面光滑有光泽,无损伤;而模型组 4 周与 8 周时损伤严重,边缘不齐整,表面粗糙且无光泽,可见明显软骨破损(红色箭头),提示 KOA 模型组存在明显的关节软骨损伤,见图 3A;同时, Pelletier

评分显示,模型组的评分显著高于对照组 ($P < 0.01$),见图 3B。HE 染色、甲苯胺蓝染色及番红 O-固绿染色结果见图 4A,对照组 8 周时关节软骨表面光滑,各层的软骨细胞状态完好层次清晰,排列整齐有序,无肥大和空泡化;而模型组 4 周时可见软骨表面凹凸不平且有裂痕存在,软骨细胞因体积增大而呈肥大、分布无序,部分软骨细胞丢失,蛋白多糖表达明显不均匀,8 周时软骨表面进一步出现缺损,软骨细胞因体积增大而呈肥大、分布无序,部分软骨细胞丢失较多且有裂痕存在,软骨厚度明显变薄,纤维化程度和范围变大;进一步 Mankin's 评分结果显示,模型组的评分均显著高于对照组 ($P < 0.01$),见图 4B。以上结果说明手术后 WHBE 兔

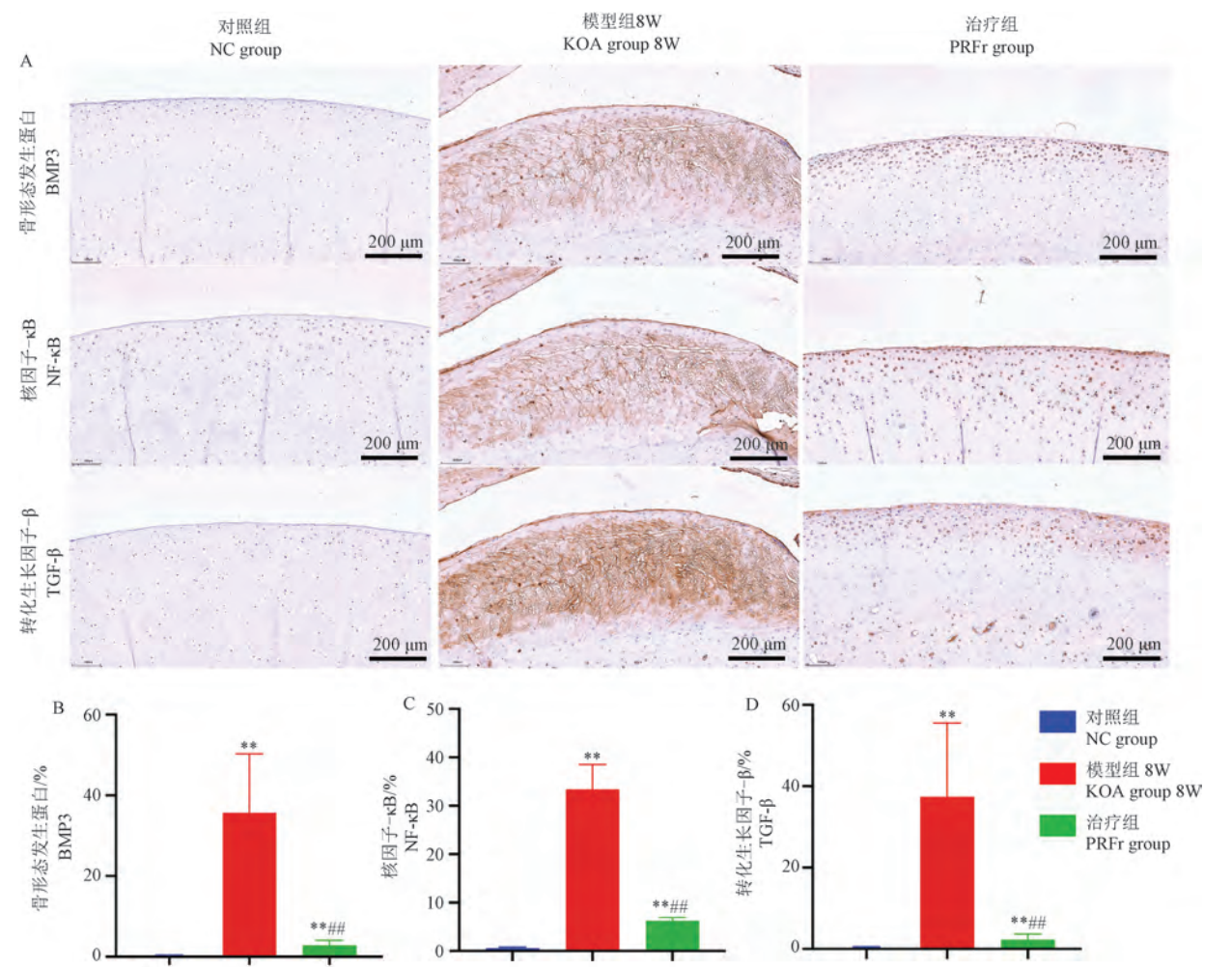
KOA 模型建立成功。

2.6 免疫组化观察

图 5A 显示,与对照组比较,模型组在 8 周时软骨内 BMP3、NF- κ B、TGF- β 的阳性细胞表达均显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组干预治疗后软骨内 BMP3、NF- κ B、TGF- β 的阳性细胞表达均显著下降 ($P < 0.01$),见图 5B~5D。

2.7 血清 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 水平测定

术后 4 周和 8 周时,模型组模型兔的血清 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 水平均显著高于对照组 ($P < 0.01$)。而治疗组在术后 4 周和 8 周时血清中 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 水平均显著低于模型组 ($P < 0.05, P < 0.01$),见图 6。

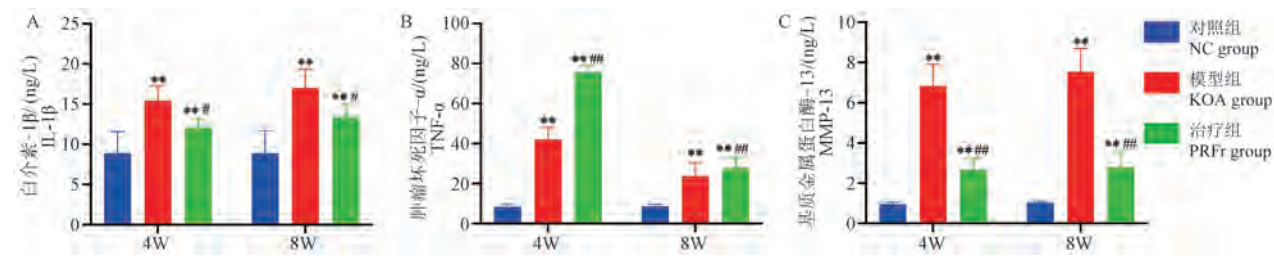


注:与对照组比较, ** $P < 0.01$;与模型组 8W 组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 5 各组动物疫组化观察情况

Note. Compared with NC group, ** $P < 0.01$. Compared with KOA group 8W, ## $P < 0.01$.

Figure 5 Histochemical observation of animal epidemics in each group



注:与对照组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 6 各组血清 IL-1β、TNF-α、MMP-13 水平的变化 ($n=6$)

Note. Compared with NC group, ** $P<0.01$. Compared with KOA group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 6 Changes of serum levels of IL-1β, TNF-α and MMP-13 in each group

3 讨论

KOA 影响软骨、韧带,具有病程长、治愈难、疼痛强烈等特点,严重影响患者的生活质量,给家庭造成重大的经济负担^[2]。因此,在长期治愈过程中,提升 KOA 治疗手段的安全性和有效性至关重要,而符合临床症状的动物模型是研究 KOA 病因、病机和干预治疗的前提。目前制备 KOA 模型的动物包括大小鼠、兔、犬、羊、猪等,而大动物价格昂贵、获取来源困难、实验成本高等不足,同时大小鼠自愈比人类快,骨结构中不含有哈弗斯系统,不能完全模拟人类的骨骼重建过程,身型小而操作不便;但兔相比鼠类的体型大,操作比鼠类方便,且经济方面也更能接受,故兔是目前 KOA 模型制备常用的模型动物。另外,诱导性 KOA 模型复制方法主要包括关节内药物注射、关节制动、手术等,药物造模方法则会影响关节液生化的检测,关节制动的造模方法还尚不明确,易引起动物应激或肢体溃疡,手术方法中目前以 Hulth 法最为典型,但该法也存在着操作复杂、最终关节病变严重,并对术者技能要求较高,易误伤关节软骨,导致感染和死亡率也较高。因此,寻找易感并建立符合临床 KOA 发病特征和病变特点的实验动物模型,对促进 KOA 的研究具有重要意义。

WHBE 兔是本课题组所在单位于 1998 年发现,并自主培育而成的封闭群兔新品系,通过多年的生物学特性研究,发现 WHBE 兔在生物医学中具有特殊的应用价值^[13]。本研究从生物力学角度出发,基于关节力学失衡的特点,采用手术方法对 WHBE 兔进行内侧副韧带和部分髌韧带切除术,造成膝关节的不稳定与关节内部的应力失衡,进而引发软骨退行性病变;可能符合临床中大多关节损伤多与韧带损伤有密切相关。本研究结果显示,KOA 组兔造模

后膝关节肿胀明显,部分有明显的骨性突出,触摸可见糙面,疼痛刺激明显,关节活动受限明显,奔跑时有轻度跛行,且 Lequesne MG 行为学评分显著增加;X 射线检查显示胫骨平台表面粗糙,膝关节软组织呈高密度阴影,关节积液较多,Peletier 评分升高;病理观察亦显示软骨表面出现缺损、裂痕,软骨细胞因体积增大而呈肥大、分布无序,部分丢失,且 Mankin's 评分显著升高;机体中的炎性因子水平明显升高,提示 WHBE 兔 KOA 模型成立,且该法创伤较小,模型稳定性好,未见造模后出现死亡。进一步经 PRFr 干预治疗后,KOA 模型 WHBE 兔的膝关节肿胀和疼痛明显缓解,关节活动未见异常,Lequesne MG 行为学评分、Peletier 评分和 Mankin's 评分显著减少,这些与之前的研究一致^[5],表明 WHBE 兔 KOA 模型的有效性,适于 KOA 的早中期病理研究。另外,相较于传统的 PRP,PRF 因不含添加剂,可以降低发生感染和免疫排斥反应的风险,通过静置分离,得到的 PRFr 可以诱导间充质干细胞成骨分化,其特征是钙骨化物的形成^[14],明确了 PRFr 治疗的有效性。

促炎因子释放到关节间隙可吸引免疫细胞从而导致关节损伤和疼痛^[15],其中 TNF-α、MMP-13 和 IL-1β 的表达与 KOA 的严重程度呈正相关^[16],这与本研究观察到 KOA 模型 WHBE 兔 4 周和 8 周时血清中 IL-1β、TNF-α、MMP-13 水平升高一致,表明 WHBE 兔模型骨关节炎持续发展的进程,这与病理观察到关节软骨退变相一致。另外,IL-1β 在 OA 发展中可诱导软骨细胞炎症,激活 MMP 来加剧软骨破坏^[17]。软骨细胞分泌 IL-1β 的过表达会导致 NF-κB 通路的激活,而 NF-κB 信号传导是 OA 发病机理中最主要的机制^[18]。同时,NF-κB 信号的激活诱导产生 MMP-13,而 MMP-13 是最有效的胶原酶 II 之一,被认为是软骨变性的标志物^[16]。TNF-α 可致胶

原酶代谢分解,而 II 型胶原蛋白碎片亦可促进 IL-1 β 表达上调,从而导致软骨细胞凋亡,并诱导 MMP 产生,分解维持软骨生物学特性的细胞外基质^[19]。KOA 组膝关节 NF- κ B 含量显著增加,进一步证实了 WHBE 兔 KOA 模型存在明显软骨变性,这与软骨基质合成和降解出现失衡有关。此外,PRFr 治疗后的兔血清 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13、NF- κ B 含量较 KOA 组相比显著降低,提示可能是通过 NF- κ B 途径发挥作用。

值得关注的是,IL-1 β 作为一种关键的炎症介质可以激活 TGF- β 信号通路^[20]。TGF- β 家族信号通路包含两个分支 TGF- β 和 BMP,本研究发现 KOA 组兔膝关节 TGF- β 、BMP3 表达均显著增加,而 PRFr 治疗后降低了 TGF- β 、BMP3 表达。TGF- β 是一种促纤维化因子,抑制其表达可减少 KOA 的纤维化^[15]。BMP 参与许多细胞的增殖、生长、分化及凋亡,而滑膜细胞就是 BMP 信号的特异性靶细胞^[21],并且发生 KOA 后,BMP 在关节液中的表达也会升高,且 BMP 对关节软骨的合成以及代谢都具有明显的促进作用^[21]。表明 BMP 和 TGF- β 在维持关节内环境的稳定及对损伤的关节软骨修复中均发挥着十分重要的作用,特别是 TGF- β 受体在 BMP 的信号转导中起着承上启下的作用,是 BMPs 发挥功能的关键节点。可见,TGF- β /BMP 信号传导在成骨细胞分化和骨形成中起着关键的调节功能,也表明了 WHBE 兔 KOA 模型存在明显的关节内环境失衡和软骨变性,而 PRFr 能显著改善 KOA 关节软骨损伤和炎症因子的表达,提示其可能与 TGF- β /BMP 和 NF- κ B 途径有关。

综上所述,本研究成功建立了内侧副韧带和部分髌韧带切除术形成的 WHBE 兔 KOA 模型,该法操作简单,成功率高,适于 KOA 早中期病变的研究,且 PRFr 可通过 TGF- β /BMP 和 NF- κ B 途径改善 WHBE 兔 KOA 模型软骨损伤和炎症。

参考文献:

[1] RIEWRUJA K, PHAKHAM S, SOMPOLPONG P, et al. Cytokine profiling and intra-articular injection of autologous platelet-rich plasma in knee osteoarthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(2): 890.

[2] ZMERLY H, EL GHOCH M, ITANI L, et al. Personalized nutritional strategies to reduce knee osteoarthritis severity and ameliorate sarcopenic obesity indices: a practical guide in an orthopedic setting [J]. *Nutrients*, 2023, 15(14): 3085.

[3] CHARLESWORTH J, FITZPATRICK J, PERERA N K P, et

al. Osteoarthritis-a systematic review of long-term safety implications for osteoarthritis of the knee [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2019, 20(1): 151.

[4] DIETRICH F, DURÉ G L, P KLEIN C, et al. Platelet-rich fibrin promotes an accelerated healing of Achilles tendon when compared to platelet-rich plasma in rat [J]. *World J Plast Surg*, 2015, 4(2): 101-109.

[5] HSU Y K, SHEU S Y, WANG C Y, et al. The effect of adipose-derived mesenchymal stem cells and chondrocytes with platelet-rich fibrin releasates augmentation by intra-articular injection on acute osteochondral defects in a rabbit model [J]. *Knee*, 2018, 25(6): 1181-1191.

[6] WANG C, SILVERMAN R M, SHEN J, et al. Distinct metabolic programs induced by TGF- β 1 and BMP2 in human articular chondrocytes with osteoarthritis [J]. *J Orthop Translat*, 2018, 12: 66-73.

[7] ZHANG Q, LENARDO M J, BALTIMORE D. 30 years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology [J]. *Cell*, 2017, 168(1/2): 37-57.

[8] 刘军平,潘永明,陈民利,等. 白毛黑眼兔与日本大耳白兔胰岛素抵抗动脉粥样硬化模型的比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(3): 339-346.

LIU J P, PAN Y M, CHEN M L, et al. Comparison of the WHBE and Japanese white rabbit models of insulin resistance atherosclerosis [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(3): 339-346.

[9] 杨松滨,刘益杰,冯伟,等. 基于关节力学失稳方法建立兔膝关节炎模型 [J]. *上海中医药杂志*, 2015, 49(4): 11-15.

YANG S B, LIU Y J, FENG W, et al. Establishment of knee osteoarthritis models in rabbits based on joints' mechanical instability method [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2015, 49(4): 11-15.

[10] LEQUESNE M G, MERY C, SAMSON M, et al. Indexes of severity for osteoarthritis of the hip and knee. Validation—value in comparison with other assessment tests [J]. *Scand J Rheumatol Suppl*, 1987, 65: 85-89.

[11] PELLETIER J P, JOVANOVIĆ D, FERNANDES J C, et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis *in vivo* by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase [J]. *Arthritis Rheum*, 1998, 41(7): 1275-1286.

[12] SA L, WEI X, HUANG Q, et al. Contribution of salidroside to the relieve of symptom and sign in the early acute stage of osteoarthritis in rat model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 259: 112883.

[13] 吕建敏,蔡兆伟,蔡月琴,等. 基于 OPG-RANK-RANKL 系统研究饲料不同钙水平对生长期 WHBE 兔骨代谢的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(6): 618-623.

LYU J M, CAI Z W, CAI Y Q, et al. Effects of different dietary calcium levels on the bone metabolism in growing WHBE rabbits via OPG-RANK-RANKL systems [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2017, 25(6): 618-623.

[14]

WONG C C, LIAO J H, SHEU S Y, et al. Novel transplant of combined platelet-rich fibrin releasate and bone marrow stem cells prevent bone loss in ovariectomized osteoporotic mice [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2020, 21(1): 527.

[15]

DING L, LIAO T, YANG N, et al. Chrysin ameliorates synovitis and fibrosis of osteoarthritic fibroblast-like synoviocytes in rats through PERK/TXNIP/NLRP3 signaling [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1170243.

[16]

ZHAO Q H, LIN L P, GUO Y X, et al. Matrix metalloproteinase-13, NF-κB p65 and interleukin-1β are associated with the severity of knee osteoarthritis [J]. Exp Ther Med, 2020, 19(6): 3620-3626.

[17]

YANG G, WANG K, SONG H, et al. Celastrol ameliorates osteoarthritis via regulating TLR2/NF-κB signaling pathway [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 963506.

[18]

CSAKI C, MOBASHERI A, SHAKIBAEI M. Synergistic

chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-β1-induced NF-κB-mediated inflammation and apoptosis [J]. Arthritis Res Ther, 2009, 11(6): R165.

[19]

GUAN T, DING L G, LU B Y, et al. Combined administration of curcumin and chondroitin sulfate alleviates cartilage injury and inflammation via NF-κB pathway in knee osteoarthritis rats [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 882304.

[20]

MENG X M, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. TGF-β: the master regulator of fibrosis [J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(6): 325-338.

[21]

YU P, LIU K, GAO X, et al. Transforming growth factor-β and bone morphogenetic protein 2 regulation of microRNA-200 family in chronic pancreatitis [J]. Pancreas, 2018, 47(2): 252-256.

[收稿日期] 2023-07-25

植物来源的 miRNA 在哺乳动物系统中的调控

微小 RNA(miRNA)是一类长度为 21~24 bp 的小型非编码 RNA 分子,广泛分布于不同生物体内,充当基因表达的关键调控者。特别是,植物来源的 miRNA 已被证明在哺乳动物的循环和系统中一定的稳定性,并且能够对哺乳动物的基因进行调控。然而,在此领域中仍然存在争议,尤其是关于植物来源的 miRNA 在哺乳动物系统中的稳定性以及含量。

在本综述中,中国科学院生物物理研究所的冯寒和杨临溥比较了动物和植物 miRNA 在来源、在细胞内的加工过程以及调控机制方面的异同,强调了相较于动物 miRNA 而言,植物 miRNA 在 3' 端的 2'-O-甲基化使其在哺乳动物的消化以及循环系统中具备更强的稳定性,为其跨界调控提供理论基础。此外,本综述介绍了四种在哺乳动物系统中广泛研究的植物 miRNA——MIR168a, MIR156a, MIR159 和 MIR2911——在肿瘤以及免疫方面的作用,并提供了相应的分子机制,为其跨界调控提供证据。最后,本文提出了中药成分中存在 miRNA 调控的可能性,并总结了近年来对于植物来源的 miRNA 的争议以及应用前景。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2023, 6(6):518-525. <http://doi.org/10.1002/ame2.12358>)。

宋雨, 张小莉, 陈换换, 等. 熊果酸改善 I 型糖尿病大鼠胰岛 β 细胞损伤的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 74-83.

Song Y, Zhang XL, Chen HH, et al. Ursolic acid ameliorates pancreatic β -cell injury in type I diabetic rats via the TLR4/NF- κ B pathway and Th17/Treg cell homeostasis [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 74-83.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.008

熊果酸改善 I 型糖尿病大鼠胰岛 β 细胞损伤的实验研究

宋雨, 张小莉*, 陈换换, 唐聪

(河南中医药大学医学院, 郑州 450046)

【摘要】目的 探究熊果酸(UA)对 I 型糖尿病(T1DM)大鼠 TLR4/NF- κ B 信号通路及 Th17/Treg 细胞的影响。**方法** 腹腔注射链脲佐菌素(STZ)制备 T1DM 大鼠模型, 随机分为空白组(Control 组)、模型组(Model 组)、二甲双胍组(MET 组)和熊果酸组(UA 组)。记录大鼠体重、血糖等一般情况, 灌胃 6 周后采集大鼠外周血、胰腺组织评估胰岛素干预情况。免疫组化观察胰腺组织病理变化; 鲎试剂检测血清脂多糖(LPS)含量变化; qRT-PCR 法检测胰腺 TLR4、MyD88、IkB α 、NF- κ B p65 mRNA 的表达, 以及转录因子 ROR γ t、Foxp3 mRNA 的表达; Western blot 法检测胰腺 TLR4、MyD88、IkB α 、NF- κ B p65 蛋白的表达, 以及转录因子 ROR γ t、Foxp3 蛋白的表达; 流式细胞术检测外周血 Th17、Treg 细胞比例变化; ELISA 法检测血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量变化。**结果** 经 STZ 诱导的糖尿病大鼠经 6 周灌胃处理, 与模型组相比, 二甲双胍组大鼠和熊果酸组大鼠空腹血糖(FBG)均明显下降, 体重均明显升高; 胰岛 β 细胞炎症浸润减少; TLR4、MyD88、IkB α 、NF- κ B p65、ROR γ t mRNA 和蛋白的表达明显降低; LPS 含量明显下降; IkB α 、Foxp3 mRNA 和蛋白表达明显升高; Th17/Treg 比值明显下降; TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量明显下降。**结论** UA 可通过减少 LPS 移位, 抑制 TLR4/NF- κ B 通路, 下调 ROR γ t 并上调 Foxp3 的表达纠正 T1DM 大鼠 Th17/Treg 细胞比例失衡来改善大鼠症状。

【关键词】 I 型糖尿病; 熊果酸; TLR4/NF- κ B 通路; Th17/Treg 细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0074-10

Ursolic acid ameliorates pancreatic β -cell injury in type I diabetic rats via the TLR4/NF- κ B pathway and Th17/Treg cell homeostasis

SONG Yu, ZHANG Xiaoli*, CHEN Huanhuan, TANG Cong

(Medicine College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

【Abstract】Objective To investigate the effects of ursolic acid (UA) on the TLR4/NF- κ B signaling pathway and Th17/Treg cells in type 1 diabetes mellitus (T1DM) rats. **Methods** T1DM rat models were established by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) and randomly divided into blank (Control), Model, metformin (MET), and UA groups. General conditions, such as body weight and blood glucose, were recorded, and peripheral blood and pancreatic tissues were collected after 6 weeks of gavage to assess insulin treatment. Immunohistochemistry was used to observe pathological changes in pancreatic tissues. Horseshoe crab reagent was used to assess changes in serum lipopolysaccharide (LPS)

【基金项目】 河南省科技攻关项目(212102311081); 河南中医药大学研究生科研创新基金(2022KYCX082)。

【作者简介】 宋雨(1993—), 男, 硕士, 研究方向: 免疫相关疾病与感染性疾病机理及中医药防治。E-mail: 740708970@qq.com

【通信作者】 张小莉(1963—), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药与免疫性疾病相关性研究。E-mail: zxl7666@163.com

content. qRT-PCR was used to measure expression of pancreatic TLR4, MyD88, I κ B α , and NF- κ B p65 mRNAs, and mRNA expression of transcription factors ROR γ t and Foxp3. Western blot was used to assess pancreatic TLR4, MyD88, I κ B α , NF- κ B p65, ROR γ t, and Foxp3. Flow cytometry was used to assess changes Th17/Treg cell ratio in peripheral blood. ELISA were used to measure serum contents of TNF- α , IL-6, and IL-1 β . **Results** After STZ-induced diabetic rats were treated by gavage for 6 weeks, compared with the Model group, the fasting blood glucose of rats in MET and UA groups was significantly decreased and their body weights were increased. Inflammatory infiltration of pancreatic islet β -cells was reduced. Expression of TLR4, MyD88, I κ B α , NF- κ B p65, and ROR γ t mRNAs and proteins was significantly decreased. LPS content was significantly decreased. I κ B α and Foxp3 mRNA and protein expression was significantly increased. The Th17/Treg ratio was significantly decreased, and TNF- α , IL-6, and IL-1 β contents were significantly decreased. **Conclusions** UA improves the symptoms of rats by reducing the LPS shift, inhibiting the TLR4/NF- κ B pathway, down-regulating ROR γ t expression, and up-regulating Foxp3 expression to correct the imbalance in the Th17/Treg cell ratio in T1DM rats.

【Keywords】 type 1 diabetes mellitus; ursolic acid; TLR4/NF- κ B pathway; Th17/Treg cells

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

I 型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus, T1DM) 是胰岛 β 细胞被自身免疫系统进行性破坏所导致的胰岛素分泌不足引发的自身免疫性疾病。T1DM 患者血糖高、控制难度大;易出现酮症酸中毒、肾病、心血管疾病等并发症^[1-2]。目前,T1DM 的治疗仍以胰岛素注射为主^[3],新的治疗方式包括干细胞疗法、抗体治疗等^[4-5],但由于其造价昂贵、技术要求高,目前仍以胰岛素注射为主要治疗方式,缺乏有效的治疗手段。据世界糖尿病联盟最新统计,2021 年中国 T1DM 发病率位居世界第五位,T1DM 人数位居世界第四位^[6],成人出现 T1DM 常被误诊为 II 型糖尿病,T1DM 的危害性被严重低估。因此,探究有效药物作用新靶点、开发新药物对于治疗 T1DM 具有重要意义。

Toll 样受体 (Toll like receptors, TLR) 是参与非特异性免疫的一类重要分子蛋白,研究表明,TLR 参与自身免疫性疾病炎症的发生发展,在治疗自身免疫性疾病中具有巨大潜力^[7]。TLR 等先天免疫受体在宿主防御和炎症反应中有着重要作用,可直接识别并结合病原相关分子受体模式,导致炎症因子和趋化因子的释放^[8],可通过感知来自外源性微生物的特定配体触发先天免疫反应,从而诱导适应性免疫,在防御感染方面发挥关键作用^[9]。有研究显示,TLR4 是 β 细胞上的主要受体,在自身免疫性糖尿病的发展过程中,TLR4 信号通路选择性地损伤 β 细胞^[10]。辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17) 细胞和调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 是 CD4⁺T 细胞的两个功能相反的亚群。Th17 细胞能够诱导炎症反应,Treg 细胞在 T1DM 的发病过程中具有保护作用^[11]。最新研究表明,TLR4 在 CD4⁺

T 细胞上的表达普遍较高,与总 CD4⁺T 细胞相比,Treg 细胞始终表现出 TLR 表达的增加^[12]。TLR4/NF- κ B 通路可通过调控 Th17 细胞来改变 Th17/Treg 细胞平衡,Th17/Treg 细胞失衡也可通过调控 TLR4/MyD88/NF- κ B 途径调节 Th17 细胞和 Treg 细胞的转录因子 ROR γ t 和 Foxp3^[13-15]在 T1DM 患者中,CD4⁺T 细胞中 IL-6 的反应性增强,其通过调控先天免疫反应以促进 Th17 细胞并抑制 Treg 细胞。因此,IL-6 反应性增强有可能促进炎症和自身免疫^[16]。

熊果酸 (ursolic acid, UA) 是一种天然的五环三萜化合物,能够从木瓜、夏枯草、枇杷叶等水果和中药中提取^[17],具有抗炎、降糖、降脂、抑菌等作用^[18-20]。其降糖的分子机制尚未明确。

本研究通过链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导 T1DM 大鼠模型^[21],UA 灌胃 6 周后取外周血、胰腺组织,检测 UA 对 TLR4/NF- κ B 通路相关指标及 Th17/Treg 细胞比例的变化,以此探究 UA 对 T1DM 的改善作用,为深入研究 UA 对 T1DM 的治疗作用,探究治疗 T1DM 的新靶点及 UA 的临床应用提供了重要基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 50 只,6 周龄,体重 160 ~ 180 g,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供 [SCXK (鲁) 2022-0006],所有实验动物均按照 12 h/12 h 光照黑暗循环,温度 (22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C 的标准在河南中医药大学动物房进行饲养 [SYXK (豫) 2021-0015]。动物实验操作均遵守河南中医药大学实验

动物伦理规范 (DWLL201903001),按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

UA (纯度 95%,毕得医药,批号:ALT428);链脲佐菌素 (纯度 98%,SIGMA-ALDRICH,批号:WXBD1402V);二甲双胍 (每片 0.25 g,上海信宜天平药业有限公司,批号:67180806);0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液 (Solarbio 公司,批号:20190917);通用组织固定液 (批号:HP193504)、柠檬酸 (pH=6.0) 抗原修复液 (批号:G1202)、3% 双氧水 (批号:G0115)、BSA (批号:G5001)、胰岛素抗体 (批号:GB11334)、HRP 标记的山羊抗兔抗体 (批号:GB23303)、DAB 显色剂 (批号:G1211)、RIPA 裂解液 (批号:G2002)、BCA 蛋白定量检测试剂盒 (批号:G2026)、抗大鼠 β -actin (批号:LS203204)、抗大鼠 TLR4 (批号:LS203045)、抗大鼠 MyD88 (批号:00077168)、抗大鼠 $\text{IkB-}\alpha$ (批号:542619112702)、抗大鼠 NF- κ B p65 (批号:LS203564) 均购自武汉塞维尔生物科技有限公司;鲎试剂 (厦门鲎试剂生物科技有限公司,批号:20100154);无酶无菌水 (Solarbio,批号:20210315);RNA 提取液 (Solarbio,批号:20210205);无水乙醇 (上海沃凯生物技术有限公司,批号:20200220);TRIpure Reagent (艾德莱生物技术有限公司,批号:312326AX);HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (Vazyme,批号:7E452K0);SYBRTM Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific,批号:01000432)。血糖仪 (爱奥乐医疗器械有限公司,型号:G-425-3);正置荧光显微镜 (日本 OLYMPUS 公司,型号:DP73);实时荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司,型号:7500);蛋白电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司,型号:POWER PAC 1000);自动凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司,型号:ChemiDoc);低温离心机 (美国 SCILOGEX 公司,型号:9013121121)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组、造模及给药

50 只 SPF 雄性 Wistar 大鼠,适应性喂养 7 d 后,造模组一次性腹腔注射 1%链脲佐菌素 60 mg/kg,空白组 (Control 组) 注射等体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,7 d 后,连续 3 次空腹血糖 (fasting blood glucose,FBG) ≥ 16.7 mmol/L 为造模成功标准。将造模成功的大鼠随机分为模型组 (Model 组, $n=12$)、二甲双胍组 (metformin, MET 组, $n=12$) 和熊果酸组 (UA 组, $n=12$)。根据课题组前期实验,用药

组每天给药 100 mg/kg,空白组和模型组给予等体积羧甲基纤维素钠灌胃,每天 9:00 定时灌胃 1 次,每周根据体重调整灌胃量。

1.3.2 一般情况

每天检测大鼠体重、毛发、排便情况;每周提前 12 h 禁食不禁水,同一时间测大鼠 FBG。

1.3.3 采集标本

末次灌胃后禁食 12 h,采集大鼠血液和胰腺组织,用于后续实验。

1.3.4 免疫组化观察大鼠胰腺组织病理变化

将大鼠胰腺组织置于 4% 多聚甲醛固定 24 h 后,进行脱水、包埋、切片、中性树胶封片后,进行胰岛素抗体染色,镜下观察组织病理状态、炎性浸润情况,并拍摄照片。

1.3.5 鲎试剂检测内毒素含量

采用内毒素定量检测鲎试剂盒检测脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS),微板定量显色基质法。严格按照试剂盒说明书进行操作,酶标仪于 450 nm 波长读取吸光度值。

1.3.6 qRT-PCR 法检测大鼠胰腺 TLR4、MyD88、 $\text{IkB}\alpha$ 、NF- κ B p65 mRNA 的表达

用 PCR 试剂盒提取胰腺组织 RNA,微型分光光度计检测 A260/A280 比值,逆转录合成 cDNA,使用 15 μ L 体系进行 qRT-PCR 反应程序:50 $^{\circ}$ C, 2 min; 95 $^{\circ}$ C, 2 min; 95 $^{\circ}$ C, 15 s, 60 $^{\circ}$ C, 1 min, 40 个循环。绘制溶解曲线用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算基因的相对表达量。基因引物序列见表 1。

表 1 PCR 基因引物序列
Table 1 PCR gene primer sequences

名称 Name	引物 Primer
GAPDH-F	5'-ACAGCAACAGGCTGCTGGAC-3'
GAPDH-R	5'-TTTGAGGTCAGCGAACTT-3'
TLR4-F	5'-TCCACAAGAGCCGAAAGTT-3'
TLR4-R	5'-TGAAGATGATGCCAGAGCGG-3'
MyD88-F	5'-GAGCAGTGTCCACAGACAA-3'
MyD88-R	5'-AGTAGCAGATGAAGCGCTCG-3'
$\text{IkB}\alpha$ -F	5'-CCACTCCACTTGCTGTGAT-3'
$\text{IkB}\alpha$ -R	5'-TTCCTCGAAAGTCTCGGAGC-3'
NF- κ B p65-F	5'-TGTATTTACGGGACCTGGC-3'
NF- κ B p65-R	5'-CAGGCTAGGGTCAGCGTATG-3'
ROR γ t-F	5'-TGGAAGACGTGGACTTCAGC-3'
ROR γ t-R	5'-CGTCTCTCGGTAGACTTCGC-3'
Foxp3-F	5'-CCATAATATCGGCCCCCTT-3'
Foxp3-R	5'-GCGGGGTGGTTTCTGAAGTA-3'

1.3.7 Western blot 法检测大鼠胰腺 TLR4、MyD88、IκBα、NF-κB p65 及转录因子 RORγt、Foxp3 蛋白表达水平

取大鼠胰腺组织,匀浆提取蛋白,电泳、转膜、封闭、孵育一抗(1:1000 稀释)、二抗、ELC 化学发光检测,使用 Alpha 软件处理目标条带光密度值,计算蛋白相对表达量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 进行数据统计分析,多组间数据比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用 LSD 检验,结果以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

空白组精神状态良好,进食进水正常,二便正常。模型组出现明显“三多一少”症状,FBG 升高,体重减轻,精神状态不佳,大便稀溏。二甲双胍组和熊果酸组随着用药时间延长,较模型组 FBG 明显下降($P<0.01$),体重增加($P<0.05$),精神状态明显

好转,毛发泛黄,大便成形,小便减少。见表 2、表 3。

2.2 胰腺组织病理改变

空白组胰岛形状完整,胰岛 β 细胞胞浆呈黄褐色,胞核呈蓝色,排列整齐,与周围组织界限清晰。模型组与空白组相比,胰岛形状不规则,胰岛 β 细胞有大量炎性浸润,细胞体积缩小,排列不规则,与周围组织界限不清。二甲双胍组和熊果酸组与模型组相比,胰岛形状较规则,胰岛 β 细胞有少量炎性浸润,细胞体积变大,排列较规则,与周围组织界限清楚。见图 1。

2.3 血清 LPS 水平变化

模型组与空白组相比,大鼠血清 LPS 含量明显升高($P<0.01$),二甲双胍组和熊果酸组与模型组相比,大鼠血清 LPS 含量明显降低($P<0.01$)。见图 2。

2.4 TLR4、MyD88、IκBα、NF-κB p65、RORγt、Foxp3 mRNA 表达变化

表 4 结果显示,模型组与空白组相比,大鼠胰腺 TLR4、MyD88、NF-κB p65、RORγt mRNA 表达水平明显升高($P<0.01$),IκBα、Foxp3 mRNA 表达水平明显降低。二甲双胍组和熊果酸组与模型组相比,

表 2 各组大鼠 FBG 变化(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)
Table 2 Changes in FBG in rats in each group

组别 Groups	数量 <i>n</i>	0 周 0 week	3 周 3 weeks	6 周 6 weeks
空白组 Control group	10	4.63±0.54	4.90±0.90	5.15±0.41
模型组 Model group	12	22.90±2.31**	23.73±5.04**	25.38±5.30**
二甲双胍组 MET group	12	22.20±2.84	17.10±5.06##	9.82±3.78##
熊果酸组 UA group	12	22.17±3.53	16.80±2.33##	9.53±2.03##

注:与空白组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。
Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, ## $P<0.01$.

表 3 各组大鼠体重变化(g, $\bar{x}\pm s$)
Table 3 Changes in body weight of rats in each group

Groups	数量 <i>n</i>	0 周 0 week	3 周 3 weeks	6 周 6 weeks
空白组 Control group	10	218.75±10.81	319.25±14.86	373.50±21.61
模型组 Model group	12	189.67±14.40**	197.83±6.91**	199.83±11.41**
二甲双胍组 MET group	12	190.83±11.03	220.00±17.04##	244.17±19.19##
熊果酸组 UA group	12	185.17±17.61	215.33±12.23#	236.17±14.15##

注:与空白组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。
Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

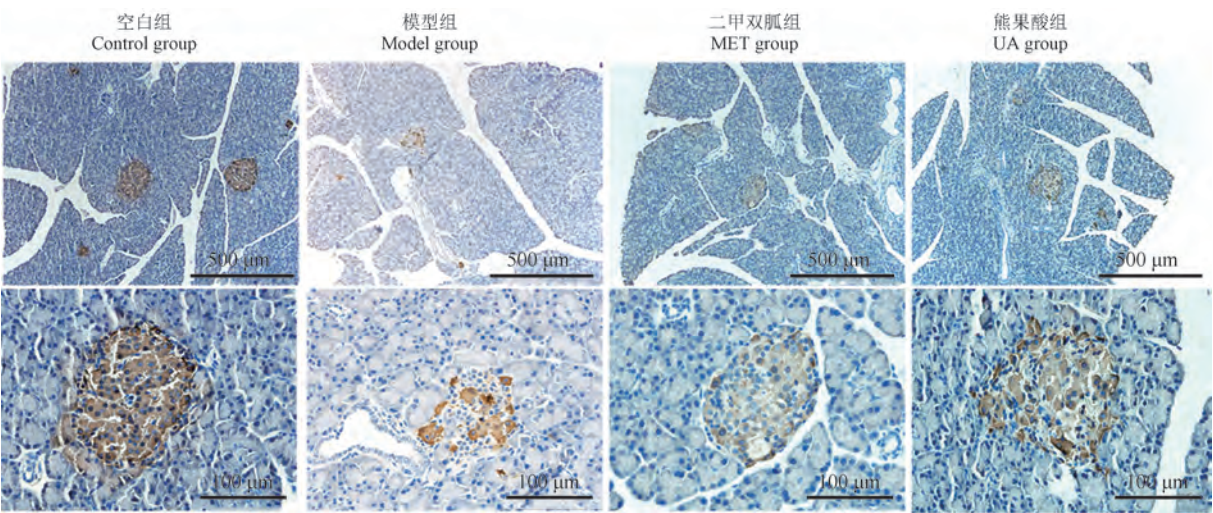


图 1 各组大鼠胰腺组织免疫组化(IHC)

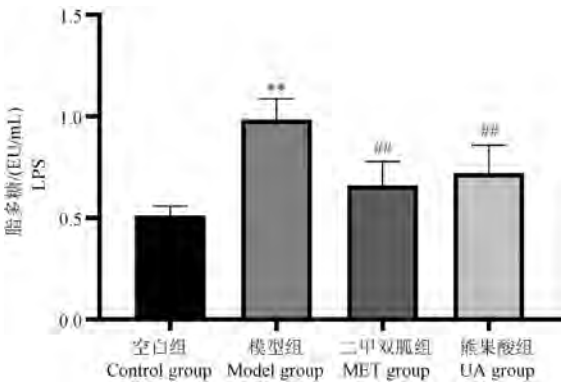
Figure 1 Immunohistochemistry of rat pancreatic tissue in various groups (IHC)

表 4 各组大鼠胰腺 TLR4、MyD88、IκBα、NF-κB p65、RORγt、Foxp3 mRNA 表达变化(̄x±s,n=6)

Table 4 Changes in pancreatic TLR4, MyD88, IκBα, NF-κB p65, RORγt, Foxp3 mRNA expression in rats in each group

组别 Groups	TLR4	MyD88	IκBα	NF-κB p65	RORγt	Foxp3
空白组 Control group	1	1	1	1	1	1
模型组 Model group	2.15±0.30**	2.06±0.60**	0.72±0.13**	1.35±0.24**	2.53±0.58**	0.66±0.09**
二甲双胍组 MET group	1.26±0.25##	1.28±0.19##	1.34±0.22##	1.09±0.12#	1.42±0.35##	1.39±0.20##
熊果酸组 UA group	1.37±0.27##	1.14±0.13##	1.14±0.09##	1.06±0.18##	1.26±0.18##	1.50±0.31##

注:与空白组相比, ** $P<0.01$;与模型组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。
Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.



注:与空白组相比, ** $P<0.01$;与模型组相比, ## $P<0.01$ 。

图 2 各组大鼠血清 LPS 水平变化

Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, ## $P<0.01$.

Figure 2 Changes in serum LPS levels in various groups of rats

大鼠胰腺 TLR4、MyD88、RORrt mRNA 表达水平明显降低($P<0.01$),NF-κB p65 mRNA 表达水平降低

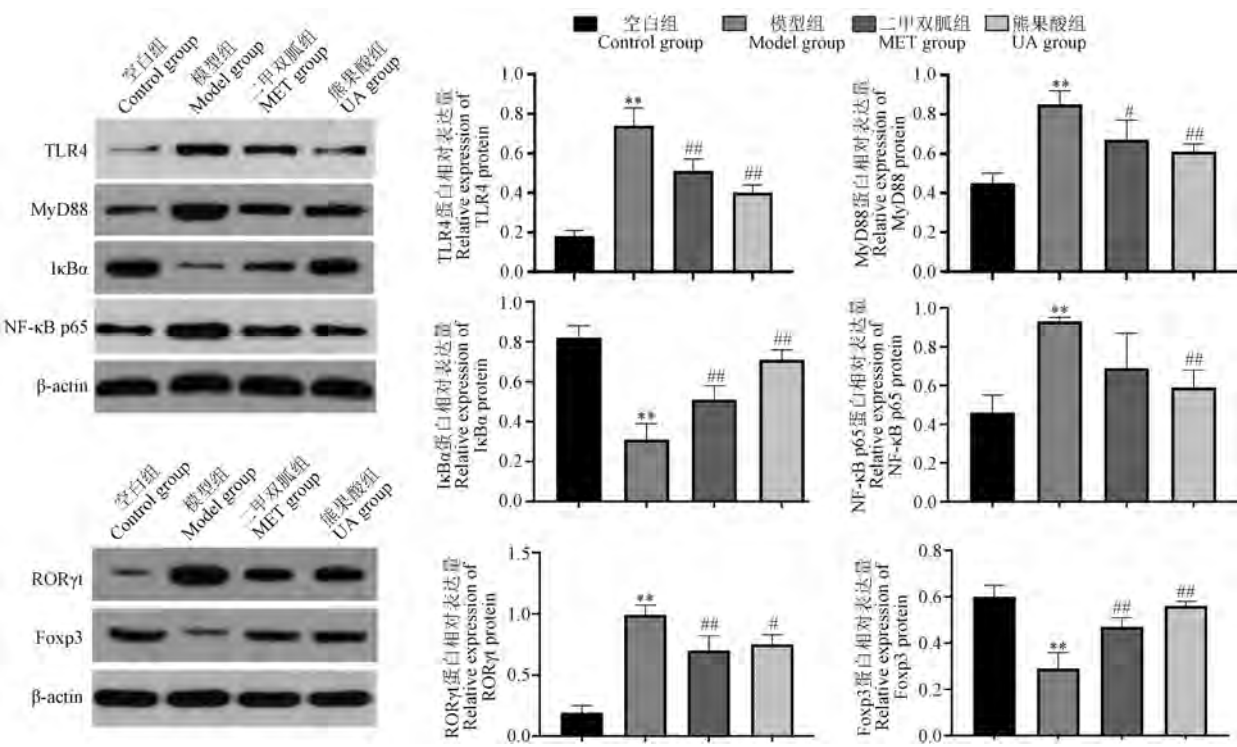
($P<0.05$, $P<0.01$),IκBα、Foxp3 mRNA 表达水平明显升高($P<0.01$)。

2.5 TLR4、MyD88、IκBα、NF-κB p65 及转录因子 RORγt、Foxp3 蛋白表达变化

模型组与空白组相比,大鼠胰腺 TLR4、MyD88、NF-κB p65 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$),IκBα 蛋白表达水平明显降低。二甲双胍组和熊果酸组与模型组相比,TLR4 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$),MyD88 蛋白表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$),IκBα 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$),熊果酸组大鼠 NF-κB p65 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$),见图 3。

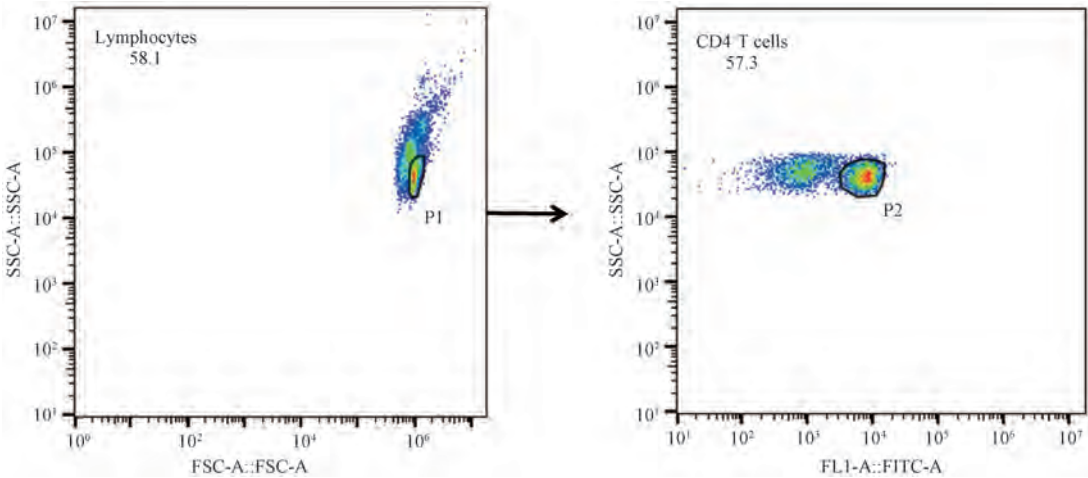
2.6 外周血 Th17、Treg 细胞比例变化

如图 4~图 6 所示,连续灌胃 6 周后,模型组与空白组大鼠相比,外周血 CD4⁺IL-17A⁺Th17 细胞比例明显升高($P<0.01$),CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例明显降低($P<0.01$),Th17/Treg 比值明显升高



注:与空白组相比, ** $P<0.01$;与模型组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。
图3 各组大鼠胰腺 TLR4、MyD88、IκBα、NF-κB p65、RORγt、Foxp3 蛋白表达情况
Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 3 Protein expression of TLR4, MyD88, IκBα, NF-κB p65, RORγt, Foxp3 in pancreas of rats in each group



注:P1 门为淋巴细胞,P2 门为 CD4⁺ 淋巴细胞。
图4 设门信息
Note. Gate P1 for lymphocytes, gate P2 for CD4⁺ lymphocytes.

Figure 4 Gate information

($P<0.01$)。二甲双胍组和熊果酸组分别与模型组相比,大鼠外周血 CD4⁺IL-17A⁺Th17 细胞比例明显降低($P<0.01$),CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例明显升高($P<0.01$),Th17/Treg 比值明显降低($P<0.01$)。

2.7 血清 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平变化

连续灌胃 6 周后,与空白组相比,模型组大鼠血清 TNF-α、IL-6、IL-1β 含量明显升高($P<0.01$),与模型组相比,二甲双胍组、熊果酸组大鼠血清 TNF-α、IL-6、IL-1β 含量明显降低($P<0.01$,图 7)。

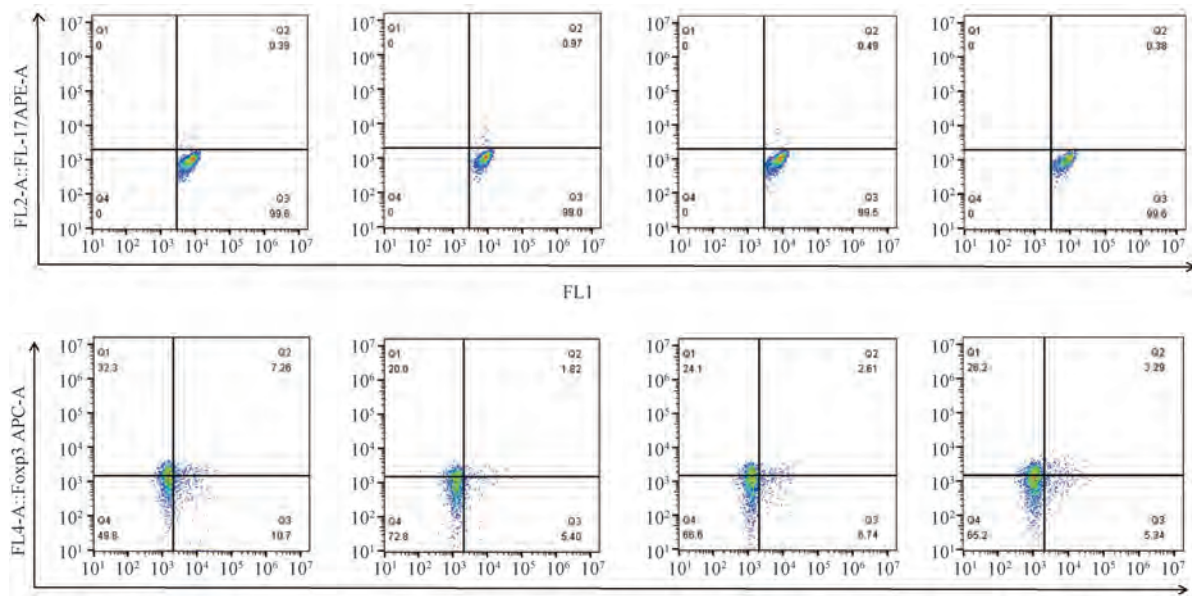
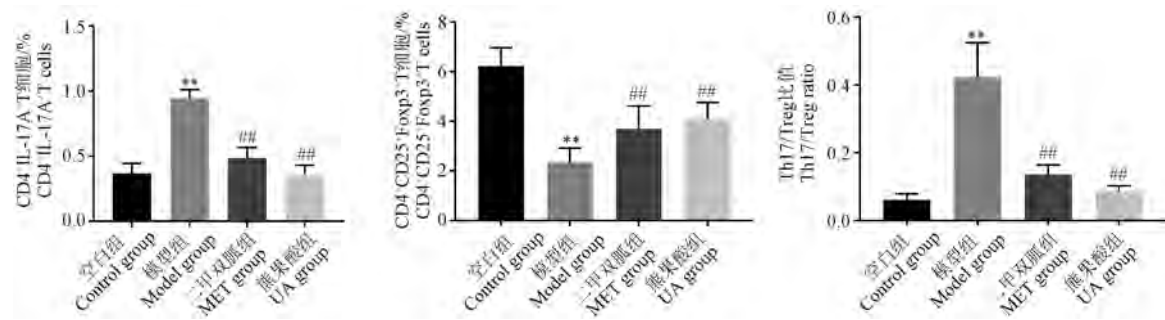


图 5 各组大鼠外周血 CD4⁺IL-17A⁺Th17、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例

Figure 5 Percentage of peripheral blood CD4⁺IL-17A⁺Th17, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg cells in each group of rats

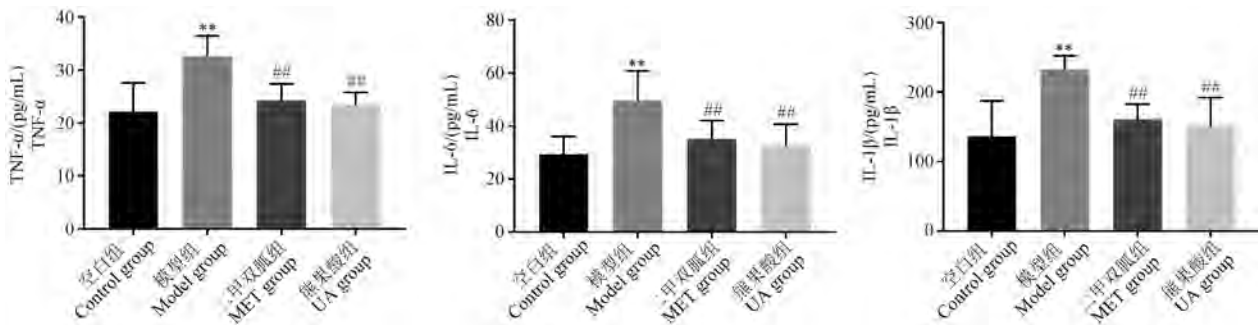


注:与空白组相比, ** $P<0.01$;与模型组相比, ## $P<0.01$ 。

图 6 各组大鼠外周血 Th17、Treg 细胞比例

Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, ## $P<0.01$.

Figure 6 Percentage of peripheral blood Th17 and Treg cells in each group of rats



注:与空白组相比, ** $P<0.01$;与模型组相比, ## $P<0.01$ 。

图 7 各组大鼠血清 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 表达的变化

Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, ## $P<0.01$.

Figure 7 Changes in the expression of serum TNF-α, IL-6 and IL-1β in rats of all groups

3 讨论

T1DM 是一种以胰岛素分泌受损和持续性高血糖为特征的异质性自身免疫性疾病。目前, T1DM 的发病机制尚不完全清楚, 主要认为是由环境、遗传等因素引起的一类自身免疫性疾病, T1DM 发病率呈逐年上升的趋势, 患者易出现酮症酸中毒、肾病、心血管疾病等并发症^[2,22]。研究证实, 先天免疫和获得性免疫都参与了 T1DM 的发生^[23]。研究表明, UA 是一种广泛存在于植物中的亲脂性五环三萜类化合物, 具有降糖、抗炎、抗氧化等作用^[18,20], 但其降糖机制尚不明确。

TLR4/NF- κ B 通路及 Th17/Treg 细胞平衡的破坏在自身免疫性疾病中起着重要作用。研究表明, TLR4/NF- κ B 信号通路可能是增强天然免疫和获得性免疫的潜在机制^[24]。TLR4 是革兰氏阴性菌外膜的主要成分 LPS 的受体, TLR4 的促炎活性与自身免疫性疾病对内源性配体的病理反应有关。当微生物突破肠道屏障, TLR4 与 LPS 结合可激活级联反应触发适应性免疫的启动^[25]。TLR4 通过受体二聚化与下游的 NF- κ B 联系, NF- κ B 被激活后, 使磷酸化抑制剂 I κ B 被磷酸化并降解, NF- κ B 二聚体释放转移到细胞核并激活基因表达, 在免疫调节中发挥核心作用。最近, TLR4 被证实在 T1DM 发展过程中促进炎症状态和胰岛 β 细胞的自身免疫性破坏^[26-27]。研究表明, 炎症触发因子可能通过 TLR4 发出信号, 选择性损伤 β 细胞^[28]。与非糖尿病相比, T1DM 的 TLR4 mRNA 明显增加, TLR4 阻断可降低 CD4⁺T 细胞活化和自身抗原特异性增值, 降低浸润性胰岛炎症, 防止糖尿病的发生发展^[29]。Th17 和 Treg 细胞平衡对保护性免疫和自身免疫疾病的发展至关重要。Duan 等^[11]发现 MET 以剂量依赖的方式抑制 T 细胞的增值, 通过抑制 Th17 细胞分化, 促进 Treg 的产生, 可显著缓解自身免疫性胰岛炎症。Th17 细胞特异性表达 ROR γ t 产生促炎细胞因子, 介导炎症反应, Treg 细胞在 Foxp3 的调控下能阻止 Th17 细胞的诱导和增值, 恢复免疫平衡^[30-31]。靶向 ROR γ t 的小分子通过抑制 Th17 细胞分化能抑制自身免疫性疾病^[32]。Th17 细胞能够促进炎症发展, Treg 细胞能够抑制自身免疫, 因此, Th17/Treg 细胞平衡对于炎症发展至关重要^[33]。研究表明, Th17/Treg 细胞平衡和 TLR4/NF- κ B 通路参与组织

损伤和免疫应答, Th17/Treg 细胞比例失衡也可以通过调节 Th17 和 Treg 细胞的转录因子 RoR γ t 和 Foxp3, 通过 TLR4/NF- κ B 信号转导途径来改变^[34]。有研究证明, 当小鼠中的 TLR4 被敲低之后, NF- κ B 也随之被抑制, 同时, 血浆中的 IL-1 β 等也显著降低^[35]。

本实验采用 STZ 复制 T1DM 大鼠模型, 通过单次注射 STZ (50~65 mg/kg) 诱导胰岛 β 细胞发生结构改变^[36]。以 MET 作为阳性药物, 观察熊果酸组 T1DM 改善效果。研究表明, MET 可通过抑制 Th17, 并促进 Treg 改善自身免疫性胰岛炎症^[11], 可改善 T1DM 患者体重, 胰岛素抵抗, 对患者心脏有着保护作用^[37]。本实验以 UA 作为治疗药物, 课题组前期通过对 T1DM 大鼠转录因子 T-bet/GATA-3 表达的研究发现, UA 不仅能通过下调 T-bet, 上调 GATA-3 的表达纠正 Th1/Th2 细胞因子失衡, 从而发挥降糖作用; 还可通过调节肠道微生物群并纠正 Th17/Treg 细胞失衡改善 T1DM 大鼠胰岛 β 细胞损伤, 降低 FBG 水平^[38-39]。Wang 等^[40]研究发现, UA 能通过抑制 TLR4/NF- κ B 并激活 Nrf2/HO-1 来改善小鼠的皮炎症状。

本研究证明, T1DM 大鼠存在 LPS 的移位, 激活 TLR4/NF- κ B 通路, 使 Th17/Treg 细胞比例失衡, 增加炎性细胞因子的分泌。通过 UA 干预 T1DM 大鼠 6 周后, 不仅能减少 LPS 移位, 抑制 TLR4/NF- κ B 通路, 还能纠正 Th17/Treg 细胞比例失衡, 减少炎性细胞因子的分泌, 进而改善 T1DM 大鼠症状, 减缓胰岛 β 细胞的进行性破坏。

综上所述, 研究表明 UA 能够通过调控 TLR4/NF- κ B 通路及 Th17/Treg 细胞平衡降低大鼠 FBG, 抑制大鼠胰岛炎症水平, 减轻胰岛 β 细胞损伤, 有效改善 T1DM 症状。本研究为 UA 的新应用提供了实验基础, 也进一步为 UA 等中药单体成分在糖尿病等自身免疫性疾病中的应用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] COLOM C, RULL A, SANCHEZ-QUESADA J L, et al. Cardiovascular disease in type 1 diabetes mellitus: epidemiology and management of cardiovascular risk [J]. J Clin Med, 2021, 10(8): 1798.
- [2] VERONIKI AA, SEITIDIS G, STEWART L, et al. Comparative efficacy and complications of long-acting and intermediate-acting

- insulin regimens for adults with type 1 diabetes: an individual patient data network meta-analysis [J]. *BMJ Open*, 2022, 12(11): e058034.
- [3] TAKITA M. Multicenter trial of closed-loop control in type 1 diabetes [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(6): 577.
- [4] 张芮, 司维. 干细胞移植治疗 1 型糖尿病的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(6): 128-132.
- ZHANG R, SI W. Progress in the treatment of type 1 diabetes mellitus with stem cell transplantation [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(6): 128-132.
- [5] ZHANG X, DONG Y, LIU D, et al. Antigen-specific immunotherapies in type 1 diabetes [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2022, 73: 127040.
- [6] SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, et al. IDF Diabetes Atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119.
- [7] DASGUPTA S, DASGUPTA S, BANDYOPADHYAY M. Regulatory B cells in infection, inflammation, and autoimmunity [J]. *Cell Immunol*, 2020, 352: 104076.
- [8] 杨冬晗, 张文龙, 侯瑞丽, 等. Toll 样受体 4 信号途径在酒精性肝损伤中的作用研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(10): 126-130.
- YANG D H, ZHANG W L, HOU R L, et al. The role of the toll-like receptor 4 signaling pathway in alcoholic liver injury [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(10): 126-130.
- [9] KIM T K, LEE M S. Innate immune receptors in type 1 diabetes: the relationship to cell death-associated inflammation [J]. *Biochem Soc Trans*, 2020, 48(3): 1213-1225.
- [10] LI M, SONG L, GAO X, et al. Toll-like receptor 4 on islet β cells senses expression changes in high-mobility group box 1 and contributes to the initiation of type 1 diabetes [J]. *Exp Mol Med*, 2012, 44(4): 260-267.
- [11] DUAN W, DING Y, YU X, et al. Metformin mitigates autoimmune insulinitis by inhibiting Th1 and Th17 responses while promoting Treg production [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(4): 2393-2402.
- [12] SCHARMACHER J, WARTENBERG M, SAUER H. The pro-inflammatory signature of lipopolysaccharide in spontaneous contracting embryoid bodies differentiated from mouse embryonic stem cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2023, 27(14): 2045-2058.
- [13] QU X, HAN J, ZHANG Y, et al. TLR4-RelA-miR-30a signal pathway regulates Th17 differentiation during experimental autoimmune encephalomyelitis development [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 183.
- [14] CHANG Y, ZHAI L, PENG J, et al. Timosaponin AIII and its metabolite sarsasapogenin ameliorate colitis in mice by inhibiting NF- κ B an [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 141: 111931.
- [15] CHANG Y, ZHAI L, PENG J, et al. Phytochemicals as regulators of Th17/Treg balance in inflammatory bowel diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 141: 111931.
- [16] IHANTOLA E L, VIISANEN T, GAZALI A M, et al. Effector T cell resistance to suppression and STAT3 signaling during the development of human type 1 diabetes [J]. *J Immunol*, 2018, 201(4): 1144-1153.
- [17] 刘慧妍, 黄馨慧, 张艳海. HPLC 法快速测定 8 种中药中齐墩果酸和熊果酸 [J]. *中草药*, 2017, 48(10): 1998-2001.
- LIU H Y, HUANG X H, ZHANG Y H. Rapid determination of oleanolic acid and ursolic acid in eight kinds of Chinese materia medica by HPLC [J]. *Acupunct Res*, 2017, 48(10): 1998-2001.
- [18] PIRONI A M, DE ARAÚJO P R, FERNANDES M A, et al. Characteristics, biological properties and analytical methods of ursolic acid: a review [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2018, 48(1): 86-93.
- [19] MA X, BAI Y, LIU K, et al. Ursolic acid inhibits the cholesterol biosynthesis and alleviates high fat diet-induced hypercholesterolemia via irreversible inhibition of HMGCS1 *in vivo* [J]. *Phytomedicine*, 2022, 103: 154233.
- [20] ZHAO J, ZHENG H, SUI Z, et al. Ursolic acid exhibits anti-inflammatory effects through blocking TLR4-MyD88 pathway mediated by autophagy [J]. *Cytokine*, 2019, 123: 154726.
- [21] 蒋升, 谢自敬, 张莉. 链脲佐菌素诱导 1 型糖尿病大鼠模型稳定性观察 [J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(1): 16-18.
- JIANG S, XIE Z J, ZHANG L. Observation of stability of type I diabetic rat models induced by streptozotocin [J]. *Chin J Comp Med*, 2006, 16(1): 16-18.
- [22] CALIMAG A P P, CHLEBEK S, LERMA E V, et al. Diabetic ketoacidosis [J]. *Dis Mon*, 2023, 69(3): 101418.
- [23] SUN L, XI S, HE G, et al. Two to tango: dialogue between adaptive and innate immunity in type 1 diabetes [J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020: 4106518.
- [24] LAI J L, LIU Y H, LIU C, et al. Indirubin inhibits LPS-induced inflammation via TLR4 abrogation mediated by the NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. *Inflammation*, 2017, 40(1): 1-12.
- [25] ZENG X, LIU G, PENG W, et al. Combined deficiency of SLAMF8 and SLAMF9 prevents endotoxin-induced liver inflammation by downregulating TLR4 expression on macrophages [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(2): 153-162.
- [26] CHEN M, ZHANG Q, WEI Y, et al. Anti-CD20 therapy ameliorates β cell function and rebalances Th17/Treg cells in NOD mice [J]. *Endocrine*, 2022, 76(1): 44-52.
- [27] BEHL T, SHARMA E, SEHGAL A, et al. Expatriating the molecular approaches of HMGB1 in diabetes mellitus: highlighting signalling pathways via RAGE and TLRs [J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(2): 1869-1881.
- [28] SAVCHENKO L G, DIGTIAR N I, SELIKHOVA L G, et al. Liraglutide exerts an anti-inflammatory action in obese patients with type 2 diabetes [J]. *Rev Roum De Med Interne*, 2019, 57

- (3): 233–240.
- [29] ALIBASHE-AHMED M, BRIOUDES E, REITH W, et al. Toll-like receptor 4 inhibition prevents autoimmune diabetes in NOD mice [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 19350.
- [30] XIE J, NIE S, YU Q, et al. *Lactobacillus plantarum* NCU116 attenuates cyclophosphamide-induced immunosuppression and regulates Th17/treg cell immune responses in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(6): 1291–1297.
- [31] 丁习, 赵洋, 伍丽萍, 等. 不同条件下建立自身免疫性甲状腺炎小鼠模型的比较研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(4): 449–458.
- DING X, ZHAO Y, WU L P, et al. Mouse models of experimental autoimmune thyroiditis under different conditions; a comparative study [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(4): 449–458.
- [32] TAN J, LIU H, HUANG M, et al. Small molecules targeting ROR γ t inhibit autoimmune disease by suppressing Th17 cell differentiation [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(8): 697.
- [33] YAN J B, LUO M M, CHEN Z Y, et al. The function and role of the Th17/treg cell balance in inflammatory bowel disease [J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020: 8813558.
- [34] WEI C B, TAO K, JIANG R, et al. Quercetin protects mouse liver against triptolide-induced hepatic injury by restoring Th17/Treg balance through Tim-3 and TLR4-MyD88-NF- κ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 53: 73–82.
- [35] 李嘉慧, 王欣佩, 冷静. TLR4/NF- κ B 参与动脉粥样硬化发生发展机制的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(4): 137–142.
- LI JH, WANG X P, LENG J. The mechanism of TLR4/NF- κ B in atherosclerosis [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(4): 137–142.
- [36] WANG-FISCHER Y, GARYANTES T. Improving the reliability and utility of streptozotocin-induced rat diabetic model [J]. *J Diabetes Res*, 2018, 2018: 8054073.
- [37] BJORNSTAD P, SCHÄFER M, TRUONG U, et al. Metformin improves insulin sensitivity and vascular health in youth with type 1 diabetes mellitus [J]. *Circulation*, 2018, 138(25): 2895–2907.
- [38] 宋超杰, 张小莉, 陈维维, 等. 熊果酸对 1 型糖尿病大鼠转录因子 T-bet/GATA-3 表达的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(18): 2489–2494.
- SONG C J, ZHANG X L, CHEN W W, et al. Effect of ursolic acid on the expression of transcription factor T-bet/GATA-3 in type 1 diabetic rats [J]. *J Pract Med*, 2020, 36(18): 2489–2494.
- [39] CHEN W, YU Y, LIU Y, et al. Ursolic acid regulates gut microbiota and corrects the imbalance of Th17/Treg cells in T1DM rats [J]. *PLoS One*, 2022, 17(11): e0277061.
- [40] WANG Z, ZHANG H, QI C, et al. Ursolic acid ameliorates DNCB-induced atopic dermatitis-like symptoms in mice by regulating TLR4/NF- κ B and Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 118: 110079.

[收稿日期]2023-09-07

米传靓,付彬,李思迪,等. Adra1a 调节 LPS 诱导的 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞炎症反应 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 84-91.

Mi CL, Fu B, Li SD, et al. Adra1a regulates LPS-induced inflammation in primary hepatocytes of *Lbp*^{-/-} mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 84-91.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.009

Adra1a 调节 LPS 诱导的 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞炎症反应

米传靓¹, 付彬^{1*}, 李思迪^{1,2}, 陈志达¹, 郭中坤¹, 王可洲^{1*}

(1. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)实验动物学院(省实验动物中心), 济南 250117;

2. 济南朋悦实验动物繁育有限公司, 济南 250000)

【摘要】目的 探究 Adra1a 调节 LPS 诱导的 LBP 敲除小鼠(*Lbp*^{-/-})原代肝细胞炎症反应。**方法** 利用二步灌注法提取 WT 型、*Lbp*^{-/-} 型小鼠原代肝细胞, 构建由 LPS 诱发的原代肝细胞原发炎症模型; 采用加入抑制剂哌啶嗪、转染 siRNA 来下调 LBP 敲除小鼠原代肝细胞 Adra1a 的表达; 抑制剂法将原代肝细胞分为 3 组分别是对照组 A、LPS 组 A、抑制剂哌啶嗪组, 转染 siRNA 主要是对原代肝细胞进行分组, 包括对照组 B、LPS 组 B、si-NC 组、si-Adra1a 组; 将 WT 型小鼠的原代肝细胞分为两组分别为对照组(空白对照)、LPS 组(LPS 刺激 12 h)。本研究以 WT 型、*Lbp*^{-/-} 型小鼠原代肝细胞为研究对象利用 Western blot 方法验证 Adra1a 在 LPS 刺激下的变化情况, 采用 CCK-8、qRT-PCR、Western blot 等实验方法验证哌啶嗪及 si-Adra1a 对 *Lbp*^{-/-} 小鼠的原代肝细胞的炎症及存活率的改善情况。**结果** 在 LPS 刺激下 *Lbp*^{-/-} 小鼠的原代肝细胞 Adra1a 蛋白表达显著升高($P<0.01$), 而野生型没有显著变化; 抑制剂哌啶嗪组及干扰组的细胞存活率显著升高($P<0.01$, $P<0.05$); 抑制剂哌啶嗪组及 si-Adra1a 组的 TNF- α 、IL-1 β 炎症因子表达情况显著降低($P<0.01$), 与细胞损伤及炎症相关的蛋白 p-p38、p-ERK、p-JNK 的表达量也显著降低($P<0.01$)。**结论** LPS 刺激 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞后 Adra1a 表达上调、炎症信号因子上调, 使用哌啶嗪与 si-Adra1a 特异性降低 Adra1a 表达后使 LPS 相关的 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞炎症因子明显下降, 可验证敲除 LBP 导致 Adra1a 在 LPS 诱导的炎症调节中参与反应。

【关键词】 肾上腺素受体 α 1A 型受体; *Lbp*^{-/-} 小鼠; 原代肝细胞; 哌啶嗪; 干扰 RNA; MAPK 信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0084-08

Adra1a regulates LPS-induced inflammation in primary hepatocytes of *Lbp*^{-/-} mice

MI Chuanliang¹, FU Bin^{1*}, LI Sidi^{1,2}, CHEN Zhida¹, GUO Zhongkun¹, WANG Kezhou^{1*}

(1. School of Laboratory Animal & Shandong Laboratory Animal Center, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250117, China. 2. Jinan Pengyue Experimental Animal Breeding Co., Ltd, Jinan 250000)

【基金项目】 山东省医学科学院医药卫生科技创新工程; 济南市科技局“高校 20 条”(2021GXRC011); 山东省医药卫生科技发展计划(2019WS177); 山东省生猪产业技术体系(SDAIT-08-17)。

【作者简介】 米传靓(2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 免疫药理学。E-mail: 2085411485@qq.com

【通信作者】 王可洲(1974—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 药理毒理学研究。E-mail: wangkezhou_cn@163.com

付彬(1991—), 男, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 基因工程模式动物研究。E-mail: fubin@sdfmu.edu.cn

* 共同通信作者

[Abstract] Objective To explore the role of *Adra1a* in regulating the LPS-induced inflammation response in primary hepatocytes of lipopolysaccharide-binding protein knockout (*Lbp*^{-/-}) mice. **Methods** Primary hepatocytes were extracted from WT and *Lbp*^{-/-} mice using a two-step perfusion method, and an inflammation model was established using LPS induction. Expression of *Adra1a* in primary hepatocytes of *Lbp*^{-/-} mice was suppressed by administering the inhibitor prazosin and transfection with si-*Adra1a*. The cells were divided into three groups under inhibitor conditions: control group A, LPS group A, and prazosin group. For siRNA transfection, cells were also divided into groups: control group B, LPS group B, si-NC group, and si-*Adra1a* group. WT primary hepatocytes were divided into two groups: control group (blank) and LPS group (12 h stimulation). Changes in the *Adra1a* response to LPS stimulation were verified by Western blot. Other method ologies, such as CCK-8, qRT-PCR, and Western blot assays, were used to confirm improvements in cell inflammation and the survival rate by prazosin and si-*Adra1a*. **Results** Significant elevation in *Adra1a* protein expression in *Lbp*^{-/-} primary hepatocytes was observed post-LPS stimulation ($P<0.01$), whereas no notable change was found in the wildtype. A remarkable increase in the cell survival rate was noted in prazosin and si-*Adra1a* groups ($P<0.01$, $P<0.05$). Furthermore, prazosin and si-*Adra1a* groups exhibited significantly reduced expression of proinflammatory factors TNF- α and IL-1 β ($P<0.01$), p-p38, p-ERK, and p-JNK ($P<0.01$), which are associated with cell damage and inflammation. **Conclusions** Following LPS stimulation, upregulation of *Adra1a* and proinflammatory cytokine expression was observed in *Lbp*^{-/-} primary hepatocytes. Specific downregulation of *Adra1a* expression using prazosin and si-*Adra1a* significantly decreased LPS-induced proinflammatory cytokines in *Lbp*^{-/-} primary hepatocytes. *Adra1a* is implicated in the regulation of the LPS-induced inflammation response in primary hepatocytes of *Lbp*^{-/-} mice.

[Keywords] *Adra1a*; *Lbp*^{-/-} mice; primary hepatocytes; prazosin; RNAi; MAPK signaling pathway

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

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性菌外膜的主要脂质成份^[1], 而脂多糖结合蛋白 (lipopolysaccharide-binding protein, LBP) 是在肝细胞中生成的 58 kDa 的糖基化蛋白, 其释放在急性期刺激状态下^[2]。当 LPS 进入宿主后, 首先被 LBP 识别生成复合物 LBP-LPS^[3], 复合物将 LPS 传递给 CD14, 接下来与细胞表面 Toll 样受体、骨髓分化因子 2 (myeloid differentiation protein-2, MD2) 结合^[4], 将信号传导至细胞内。有研究证明 LBP 的敲除可以有效改善由 LPS 刺激引起的肝细胞的损伤, 降低炎症因子的表达^[5]。先前研究表明, 在 *Lbp*^{-/-} 小鼠注射 LPS 后其肝的炎症在得到有效缓解的同时其炎症反应却出现了明显的迟缓现象^[6], 而后以 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞为研究对象时验证了血管紧张素 II 受体 1a 型 (Agtr1a angiotensin II receptor, type 1a, Agtr1a) 参与了 LPS 诱导的炎性传递, 使用抑制剂或 si-Agtr1a 特异性降低 Agtr1a 的表达时并未完全阻断 LPS 诱导的炎症反应, 其炎症及损伤的降低程度还有待提高^[7], 因此我们推测 LPS 刺激信号在 *Lbp*^{-/-} 敲除后还存在其它传递途径。由此, 本研究旨在寻 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞中其他 LPS 信号传导途径, 希望能为临床上治疗革兰氏阴性菌引发的机体严重免疫损伤提供一定参考。

肾上腺素受体 $\alpha 1A$ 型受体 (adrenoceptor alpha

1A, *Adra1a*) 为其中一种 G 蛋白偶联受体, 被激活后和 Gq 蛋白发生偶联反应, 随后引起下游相关细胞反应^[8]。 $\alpha 1A$ 肾上腺素受体被活化以后能够将细胞与组织里面的丝裂原活化蛋白 (mitogen activated protein kinases, MAPK) 激酶途径激活, 同时对细胞生长起到调节作用^[9], MAPK 信号家族的 C-Jun N-末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK)、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 与 p38 丝裂原活化蛋白 (p38 MAP kinase, p38MAPK) 激酶通路, 对细胞的重要信号, 如炎症、氧化应激、增殖和衰亡等均存在介导作用^[10], 有科学研究证实在动物实验中, $\alpha 1$ 肾上腺素受体的抑制剂哌唑嗪具有抑制肝纤维化、细胞外基质沉积、保护肝细胞功能作用^[11]。Si-*Adra1a* 作为干扰 RNA 是通过特定靶点来降低基因的表达, 起到抑制作用。因此本文通过抑制剂哌唑嗪法, si-RNA 法特异性降低 *Adra1a* 表达, 缓解了由 LPS 导致的 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞炎症反应。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选购置自济南朋悦实验动物繁育有限公司的 10 只等级为 SPF 的 *Lbp*^{-/-} 雌性 6 周龄体重为 20~22 g 的小鼠, 5 只等级为 SPF 的 C57BL/6J 雌性 6 周龄

体重为 20~22 g 的小鼠[SCXK(鲁)2019-0003],实验用鼠均在山东省实验动物中心,光照/黑暗循环 12 h/12 h、温度(22~25 ℃)、湿度(55%~60%)的标准条件下饲养[SYXK(鲁)2019-0007],此次研究在山东省实验动物中心伦理审批通过情况下进行(SYDW20220403-1),实验小鼠根据 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

LPS(美国 Sigma-Aldrich 公司, L5418); 干扰 RNA(于北京擎科生物公司合成); 哌啶嗪(美国 Selleck 公司, S1424); 逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司, RR047A); RNA 提取试剂盒(美国 Omega 公司, R6934-02); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海生工生物工程有限公司, C503041); Lipofectamine™ RNAiMAX 转染试剂(美国 Invitrogen 公司, 13778-150); β -肌动蛋白(β -actin)、ERK1/2、p-ERK、p38、p-p38、Adra1a、山羊抗兔二抗(中国 Cohension 公司, CPA9100、CPA1944、CPA4924、CPA7126、CPA5055、CPA7096、CSA1036); JNK、p-JNK(美国 CST 公司, #9252、#9251)。

高通量三通道读板仪(美国 SpectraMax 公司, 型号:i3x); 倒置显微镜(德国 ZEISS 公司, 型号:382011386); 超高灵敏度化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司, 型号:BR17952); 细胞培养箱(德国 Thermo 公司, 型号:i160); LightCycle 480 II 实时荧光定量 PCR 仪(德国 Thermo 公司, 型号:Light Cycle 480 II); 蛋白电泳印迹系统(美国 Bio-Rad 公司, 型号:Mini protean)。

1.3 实验方法

1.3.1 二步灌注法分离培养小鼠原代肝细胞及细胞分组

对小鼠实施麻醉后,使用 75%乙醇浸泡身体消毒并在操作台上固定,将腹腔打开,将留置针插入下腔静脉,将 15 mL 无钙灌注液以 20 mL/min 速度灌注小鼠体内,之后使用 0.5 g/L 的含钙胶原酶 IV 灌注液 II,当肝柔软塌陷、压力之处留痕则停止消化结束。分离肝并放入培养皿中用 PBS 清洗干净,加入 15 mL 新鲜 HDMEM 完全培养基,用镊子小心撕裂肝包膜,肝细胞自然流出形成肝细胞混悬液,用 200 目细胞网筛滤过,收集滤液。用 4 ℃ 50 r/min 转速离心肝细胞混悬液 3 min,弃上清,重复 3 次,随后用 40% percoll 进行密度梯度离心,4 ℃ 550 r/min 离心 10 min 以提高细胞活率,弃掉上清,加入

新鲜细胞培养基混匀,台盼蓝染色活细胞数,确定细胞存活率大于 80%后,进行后续实验。利用哌啶嗪法将细胞分为对照组 A(空白对照)、LPS 组 A(LPS 刺激 12 h)、哌啶嗪组(哌啶嗪干预 1 h 后加入 LPS 刺激 12 h),转染 siRNA 法将细胞分组,包括对照组 B(空白对照)、si-NC 组(si-NC 干扰 12 h 后再加入 LPS 刺激 12 h)、LPS 组 B(LPS 刺激 12 h)、si-Adra1a 组(si-Adra1a 干扰 12 h 后再加入 LPS 刺激 12 h);WT 型小鼠原代肝细胞则分为两组分别为对照组(空白对照)、LPS 组(LPS 刺激 12 h),分组方法参考文献^[7]。

1.3.2 LPS 刺激构建炎症模型

对小鼠原代肝细胞的各 LPS 组、哌啶嗪组、si-NC 组、si-Adra1a 组中加入 LPS 使其终浓度为 10 μ g/mL,刺激 12 h 后再做后续实验。

1.3.3 哌啶嗪处理原代肝细胞

取小鼠原代肝细胞,按 70%细胞满度铺于六孔板,对抑制剂哌啶嗪组中加入哌啶嗪使其终浓度是 0.05 μ mol/L,1 h 后将 LPS 加入,使浓度最终达到 10 μ g/mL,经过 12 h 刺激后,收集备用。

1.3.4 细胞转染

在原代肝细胞的 si-NC 组和 si-Adra1a 组加入干扰 RNA 使其终浓度为 50 nmol/L,经过 12 h 转染后,将 LPS 加入其中,使其达到 10 μ g/mL 的终浓度,对细胞进行收集,备用,si-Adra1a 的靶向序列为 CCTTCAAGATCAGCTACTA,正向为:5'-CCUUCA AGAUCAGCUACUA-3';反向为:5'-UAGUAGCU GAUCUUGAAGG-3'。

1.3.5 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测相关因子 mRNA 表达水平

实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)对 Adra1a、 β -actin、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达水平进行检测。使用 TRIzol 法提取到肝细胞总 RNA 并按照逆转录试剂盒,合成 cDNA,然后以 cDNA 为模板扩增目标基因的基因编码段,反应结束后分析溶解曲线,确定有无非特异性扩增,将 β -actin 作为内参照,通过相对定量 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法分析相对表达量。引物序列见表 1。

1.3.6 CCK-8 检测细胞存活率

在 96 孔板中接种细胞(每孔 1×10^4 个细胞),每组设复孔 4 个,置于含 5% CO₂ 的细胞培养箱中在 37 ℃ 条件下培养,抑制剂及干扰 RNA 处理完细胞后,使用 10 μ g/mL 的 LPS 对 LPS 组、哌啶嗪组、

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

基因 Gene	物种 Specie	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
Adra1a	Mice	CTAAGGCCATTCTACTTGGGGT	CGAGTGCAGATGCCGATGA
β-actin	Mice	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
IL-1β	Mice	GCAACTGTTCTCTGAAGTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
TNF-α	Mice	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG

干扰组细胞进行 12 h 的刺激。向每孔加入 10 μL Cell Counting Kit-8,充分混合,继续于培养箱中培养 1~4 h,随后用酶标仪读取吸光度,设置标准曲线,计算细胞存活率。

1.3.7 Western blot 检测相关蛋白的表达情况

提取原代肝细胞总蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒检测吸光度,计算蛋白浓度。取约 25 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,利用半干转设置电流 0.2 A,电压 1.5 V,转膜时间 9 min。用封闭液在 37 ℃ 封闭 PVDF 膜 2 h;一抗 β-actin(1 : 500~1 : 1000)、Adra1a、ERK、p-ERK、p38、p-p38、JNK、p-JNK (1 : 500)置于 4 ℃ 条件下孵育过夜,1×TBST 进行 3 遍清洗,1 次 15 min;滴加兔抗二抗(1 : 3000~1 : 5000),置于 37 ℃ 条件下进行 2 h 孵育,1×TBST 清洗 3 遍,1 次 15 min;滴加 ECL 发光液显色拍照,以 β-actin 作为内参蛋白,利用 Imagelab 分析蛋白条带,计算出每种蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

实验数据用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,并采用 Graphpad 8.4.2 软件进行统计学分析,数据统计组间两两比较采用 *t* 检验方法,认为 *P*<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LBP 蛋白的敲除情况

Western blot 实验结果显示,*Lbp*^{-/-}小鼠原代肝细胞中的 LBP 蛋白不再有表达(图 1)。

2.2 Adra1a 蛋白表达变化情况

如图 2A,在野生型小鼠原代肝细胞中与对照组

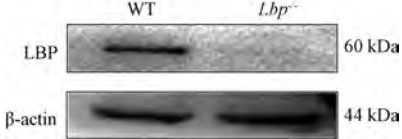
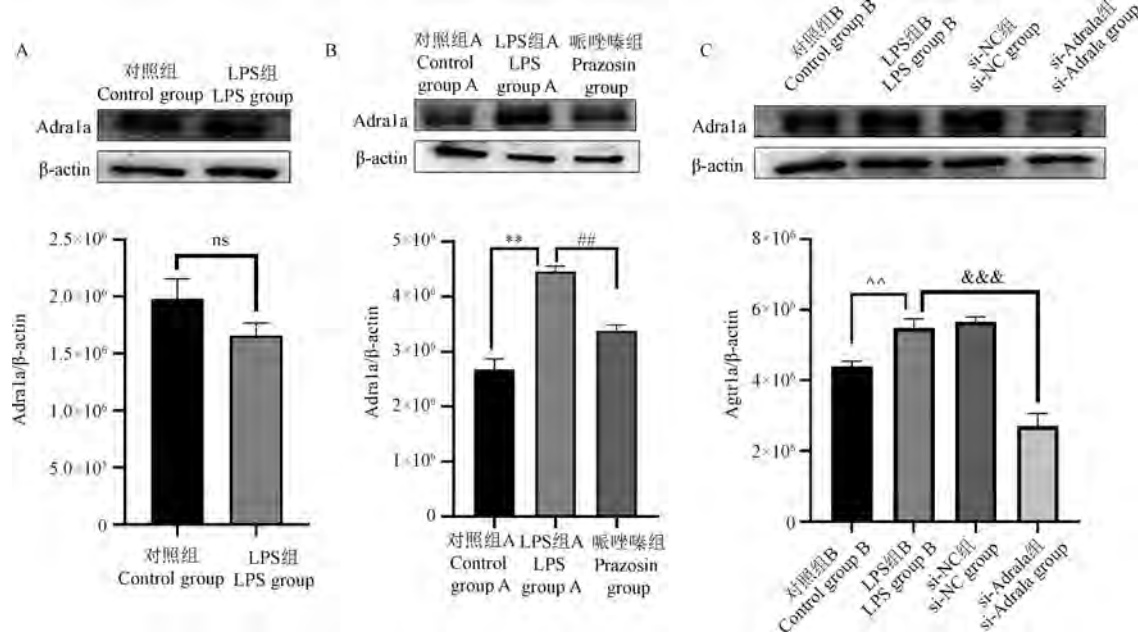


图 1 原代肝细胞中 LBP 蛋白的表达量

Figure 1 Expression of LBP protein in primary hepatocytes



注:与对照组 A 比较, ** *P*<0.01;与哌唑嗪组比较, ## *P*<0.01;与对照组 B 比较, ~ *P*<0.01;与 si-Adra1a 组比较, &&& *P*<0.001。

图 2 LPS 刺激及抑制和干扰后 Adra1a 蛋白的表达变化

Note. Compared with the control group A, ** *P*<0.01. Compared with the prazosin group, ## *P*<0.01. Compared with the control group B, ~ *P*<0.01. Compared with the si-Adra1a group, &&& *P*<0.001.

Figure 2 Changes in the expression of Adra1a protein after LPS stimulation and inhibition and interference

相比,LPS 组 Adra1a 蛋白表达量无显著性差异($P>0.05$);而在 $Lbp^{-/-}$ 小鼠原代肝细胞中与对照组相比,LPS 组蛋白表达量显著升高($P<0.01$),加入哌唑嗪后其蛋白表达量显著降低($P<0.01$),如图 2B;加入 si-Adra1a 后蛋白表达量显著降低($P<0.001$),如图 2C。

2.3 下调 Adra1a 表达对细胞存活率的影响

由 CCK-8 结果可知,对比 LPS 组,哌唑嗪组细胞存活率显著上升($P<0.01$),如图 3A;si-Adra1a 组细胞存活率也有明显提高($P<0.05$),如图 3B。

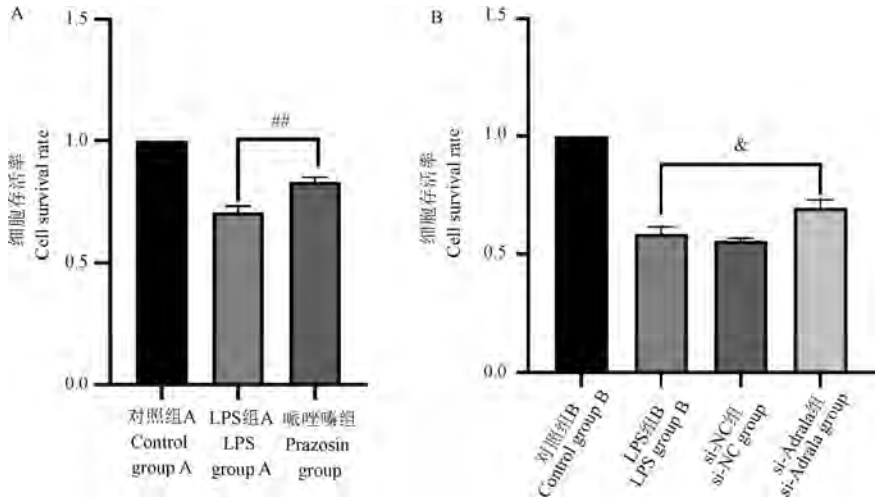
2.4 下调 Adra1a 表达对炎症因子 TNF-α、IL-1β 的影响

在 LPS 的刺激下, $Lbp^{-/-}$ 小鼠原代肝细胞炎症

因子表达量升高;而加入哌唑嗪后,TNF-α、IL-1β 的表达量均有显著下降($P<0.01, P<0.001$),如图 4A、4B。对 Adra1a 进行干扰后,TNF-α、IL-1β 表达显著性降低($P<0.001, P<0.01$),如图 4C、4D。

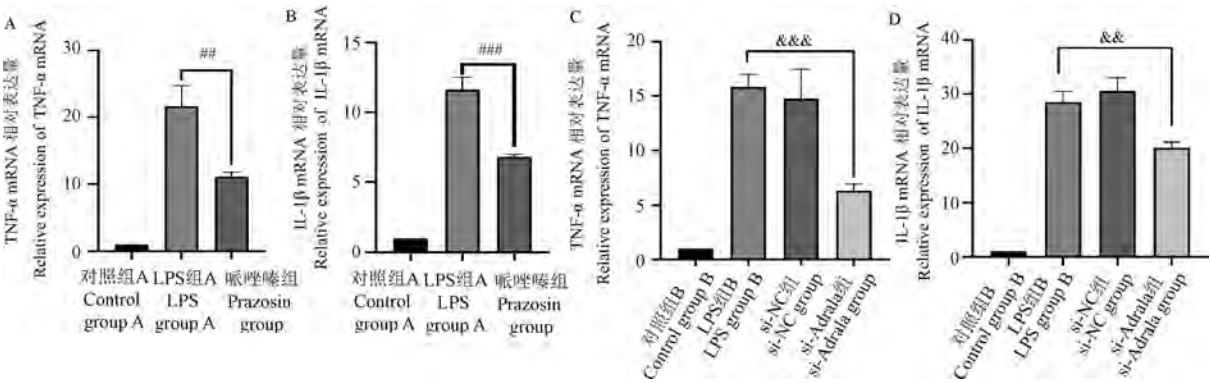
2.5 下调 Adra1a 表达对 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响

在 LPS 刺激下,ERK、JNK、p38 蛋白磷酸化会显著升高($P<0.01, P<0.001, P<0.001$),加入哌唑嗪抑制 Adra1a 表达后 JNK、ERK、p38 蛋白磷酸化显著性降低($P<0.01, P<0.001, P<0.001$),如图 5A~5C。而转染 si-Adra1a 下调 Adra1a 表达后,JNK、ERK、p38 蛋白磷酸化显著性降低($P<0.001$),如图 5D~5F。



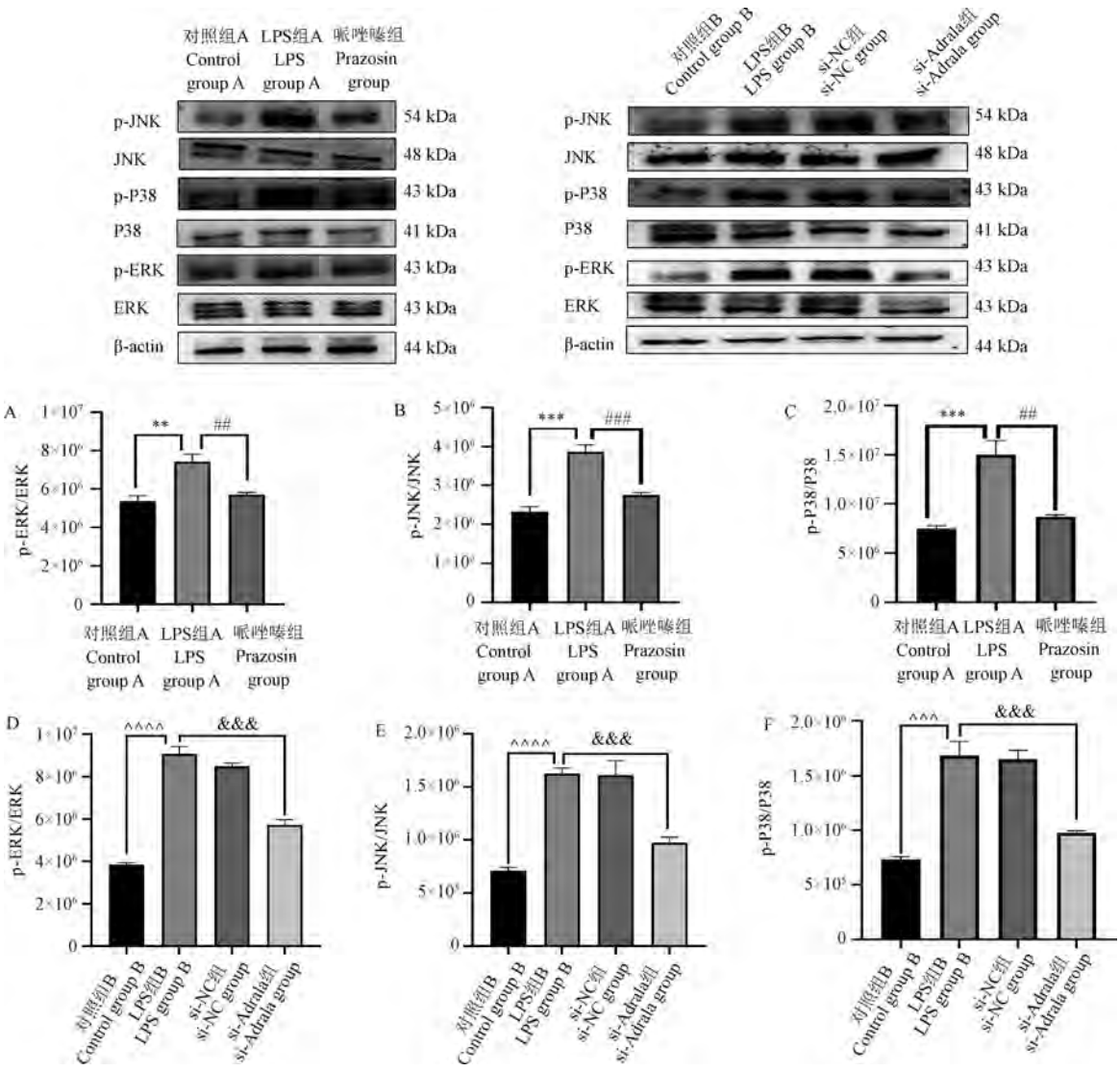
注:与哌唑嗪组比较,## $P<0.01$;与 si-Adra1a 组比较,& $P<0.05$ 。
图 3 抑制 Adra1a 表达对 $Lbp^{-/-}$ 小鼠原代肝细胞存活率的影响
Note. Compared with the prazosin group, ## $P<0.01$. Compared with the si-Adra1a group, & $P<0.05$.

Figure 3 Effect of inhibition of Adra1a expression on primary hepatocytes viability in $Lbp^{-/-}$ mice



注:与哌唑嗪组比较,## $P<0.01$,### $P<0.001$;与 si-Adra1a 组比较,&&& $P<0.001$ 。
图 4 抑制 Adra1a 表达对各组小鼠原代肝细胞 TNF-α 和 IL-1β 的影响
Note. Compared with the prazosin group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$. Compared with the si-Adra1a group, &&& $P<0.001$.

Figure 4 Inhibition of Adra1a expression on TNF-α and IL-1β in primary hepatocytes of mice



注:与对照组 A 比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与哌唑嗪组比较, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$;与对照组 B 比较, ~ $P<0.001$, ~~~ $P<0.0001$;与 si-Adra1a 组比较, &&& $P<0.001$ 。

图 5 抑制 Adra1a 表达对各组小鼠原代肝细胞 p-ERK、p-P38、p-JNK 蛋白表达的影响

Note. A, Compared with the control group A, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with the prazosin group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$. Compared with the control group B, ~ $P<0.001$, ~~~ $P<0.0001$. Compared with the si-Adra1a group, &&& $P<0.001$.

Figure 5 Inhibition of Adra1a expression on the protein expression of p-ERK, p-P38, p-JNK in primary hepatocytes of mice

3 讨论

LPS 是在大多数革兰氏阴性菌的外膜外小叶中发现的一种特征明确的病原体分子,它可以引发强烈的免疫反应,并作为细菌感染的早期预警信号^[12],而 LBP 为肝细胞产生的 I 类急性期蛋白^[13],LPS 刺激信号由 LBP 和 CD14 复合物呈递到 TLR4-MD-2 以触发炎症细胞因子的释放^[14],严重者可导致脓毒症。肝在脓毒症发生时发挥积极作用,通过分泌急性期蛋白、代谢调节机制等方式减少损伤;

但肝在脓毒症发生时受损较为严重,包括缺血和休克导致的缺氧性肝炎、药物毒性或严重炎症导致的肝细胞损伤^[15],在一项临床报道中将 LBP 作为早期标记物精准区分危重新生儿、儿童的非感染性全身性炎症和脓毒症,标明 LBP 可以作为一种生物标志物来诊断早期临床脓毒症^[16]。目前临床上对脓毒症的治疗大多数采用抗生素的方法,尽管目前医疗取得了迅速进展,由于滥用抗生素造成的耐药性,目前临床上脓毒症尚无安全有效治疗手段,致死率较高^[17]。由于 LBP 作为第一个传递 LPS 信号

的蛋白,Song 等^[5]建立了 LBP 敲除大鼠模型,通过与正常大鼠对比,LPS 给药的 LBP 敲除大鼠,其相关炎症因子表达降低,并且肝炎性损伤较轻。但又有研究发现,LBP 敲除小鼠的血液缺乏免疫反应性 LBP,基本上无法在体外将 LPS 转移到 CD14,并且细胞无法对 LPS 做出炎症反应。而体内注射 LPS 的野生型和 LBP 缺陷小鼠血浆中 TNF- α 水平没有显著差异,表明存在一种与 LBP 无关的脂多糖应答机制进行了炎症信号的传导^[18],因此,LBP 敲除小鼠可为探究 LPS 其他代偿性信号应答机制提供研究基础。

Adra1a 是 G 蛋白偶联受体(GPCR)之一^[19],同时又作为肝细胞上主要的肾上腺素受体,它特异性偶联于 Gq/11。应激状态下,机体的交感神经系统与肾上腺髓质的激动与释放均会增加,都可使得肝细胞上的 α_1 -AR 过度激活^[20], α_1 -AR 亚型可促进 ERK/ MAPK 磷酸化的激活,从而导致细胞出现各种炎症效应等^[21]。同时, α_{1A} -AR 转染的 PC12 细胞在用去甲肾上腺素处理后,将细胞外信号调节蛋白激酶、p38 丝裂原活化蛋白激酶与 c-Jun 末端激酶被激活,造成细胞损伤^[22]。有研究表明,利用化学交感神经切除术或使用 α 肾上腺受体抑制剂即哌唑嗪等都可以有效改善由 CCl4 诱导的肝脂质过氧化导致的氧化应激受损,使炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的表达降低^[23]。因此,以上实验表明,Adra1a 的激活可通过 MAPK 信号通路,对肝造成损伤,抑制其受体表达会改善损伤的发生和发展。

本次研究在对 Lbp 敲除小鼠进行 LPS 刺激时,发现其 Adra1a 表达量明显增加,而在野生型中却没有变化。随着 Adra1a 蛋白表达量的明显增加,丝裂原活化蛋白激酶家族的 ERK、p38、JNK 蛋白磷酸化程度也显著增加,MAPKs 调节细胞各种生命活动,包括增殖、凋亡、炎症和先天免疫反应^[24]。我们通过使用哌唑嗪以及转染干扰 RNA 的方法来抑制蛋白 Adra1a 的表达,两种方法都能显著降低 Adra1a 蛋白的表达,但相比较而言,由于抑制剂哌唑嗪特异性不高,因此干扰 RNA 的方法抑制效果要更好一些。Adra1a 蛋白的抑制,MAPKs 家族蛋白表达量显著降低,其通路下游的炎症因子的表达量下降,细胞存活率明显上升。因此我们猜想,Adra1a 蛋白激活了信号传导,使 MAPKs 家族蛋白磷酸化,造成了炎症因子的产生和细胞损伤的发生以及存活率的下降。目前实验室还发现 GPCR 家族其他蛋白,存

在与 Adra1a 相似的作用,因此后续希望可以通过联合抑制潜在代偿受体,更高效地抑制 LPS 诱发的炎症反应。与此同时该实验对象是小鼠原代肝细胞,后续将体外筛选到的有效治疗靶点应用到小鼠模型中做体内验证,希望可以找到 LBP 敲除后传递 LPS 诱导信号的有效代偿途径。

参考文献:

[1] NAGY G, PÁL T. Lipopolysaccharide: a tool and target in enterobacterial vaccine development [J]. Biol Chem, 2008, 389 (5): 513-520.

[2] SCHUMANN R R, LATZ E. Lipopolysaccharide-binding protein [J]. Chem Immunol, 2000, 74: 42-60.

[3] PERI F, PIAZZA M, CALABRESE V, et al. Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules [J]. Biochem Soc Trans, 2010, 38(5): 1390-1395.

[4] ALARCÓN-VILA C, BAROJA-MAZO A, DE TORRE-MINGUELA C, et al. CD14 release induced by P2X7 receptor restricts inflammation and increases survival during sepsis [J]. Elife, 2020, 9: e60849.

[5] SONG Z, MENG L, HE Z, et al. LBP protects hepatocyte mitochondrial function via the PPAR-CYP4A2 signaling pathway in a rat sepsis model [J]. Shock, 2021, 56(6): 1066-1079.

[6] 李思迪, 付彬, 郭中坤, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建脂多糖结合蛋白基因敲除小鼠 [J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(4): 294-300.

LI S D, FU B, GUO Z K, et al. Construction of lipopolysaccharide binding protein knockout mice using CRISPR/Cas9 technology [J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(4): 294-300.

[7] 米传靓, 付彬, 李思迪, 等. Agtr1a 调节 LPS 诱导的 Lbp^{-/-}小鼠原代肝细胞炎症 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31 (8): 1021-1027.

MI C L, FU B, LI S D, et al. Agtr1a regulates LPS-induced inflammation in primary hepatocytes of Lbp^{-/-} mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(8): 1021-1027.

[8] 秦国东, 肖明朝. α_1 肾上腺素能受体与前列腺炎症研究进展 [J]. 重庆医学, 2013, 42(15): 1781-1783.

QIN G D, XIAO M C. Advances in the study of α_1 adrenergic receptors and prostatitis [J]. Chongqing Med, 2013, 42(15): 1781-1783.

[9] MILANO C A, DOLBER P C, ROCKMAN H A, et al. Myocardial expression of a constitutively active 1B-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(21): 10109-10113.

[10] 董琳琳, 芦永良, 鄂维建, 等. MAPK 信号通路——肝棘球蚴病治疗新靶点 [J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 8(3): 714-718.

DONG L L, LU Y L, E W J, et al. The MAPK signaling pathway: a new target for the treatment of hepatic echinococcosis

- [J]. J Clin Hepatol, 2022, 8(3): 714–718.
- [11] 修爱媛, 王思宁, 丁茜, 等. α_1 肾上腺素能受体阻滞剂降低肝硬化门脉高压的实验研究 [J]. 中华消化病与影像杂志 (电子版), 2021, 7(3): 117–120.
XIU A Y, WANG S N, DING Q, et al. Experimental study of reducing cirrhotic portal hypertension by α_1 adrenergic receptor blocker [J]. Chin J Dig Med Imageology Electron Ed, 2021, 7(3): 117–120.
- [12] KIM Y J, LEE J O. Recognition of Lipopolysaccharides by TLR4 and its accessory proteins [J]. Bio Des, 2013, 45(12): 3–12.
- [13] HE Z, SONG Z, MENG L, et al. Lipopolysaccharide-induced transcriptional changes in LBP-deficient rat and its possible implications for liver dysregulation during sepsis [J]. J Immunol Res, 2021, 2021: 8356645.
- [14] QIU X, MISTRY A, AMMIRATI M J, et al. Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules [J]. Nat Struct Mol Biol, 2007, 14(2): 106–113.
- [15] STRNAD P, TACKE F, KOCH A, et al. Liver-guardian, modifier and target of sepsis [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(1): 55–66.
- [16] PAVCNIK-ARNOL M, HOJKE S, DERGAN M. Lipopolysaccharide-binding protein, lipopolysaccharide, and soluble CD14 in sepsis of critically ill neonates and children [J]. Intensive Care Med, 2007, 33(6): 1025–1032.
- [17] LEE S J, YOU J S, GHARBI A, et al. IOX1 activity as sepsis therapy and an antibiotic against multidrug-resistant bacteria [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 2942.
- [18] WURFEL M M, MONKS B G, INGALLS R R, et al. Targeted deletion of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein gene leads to profound suppression of LPS responses *ex vivo*, whereas *in vivo* responses remain intact [J]. J Exp Med, 1997, 186(12): 2051–2056.
- [19] DA SILVA S B, FEITOSA S G D, DE L ALVES S M, et al. A concise and useful guide to understand how Alpha₁ adrenoceptor antagonists work [J]. Mini Rev Med Chem, 2022, 22(18): 2383–2405.
- [20] 徐勇, 涂植光, 康格非. 哌唑嗪抑制脂多糖诱导的磷脂酶 A₂ 活性及肝细胞内钙离子超载 [J]. 中国危重病急救医学, 2001, 12(4): 216–219.
XU Y, TU Z G, KANG G F. Inhibitory effects of prazosin on lipopolysaccharide-induced phospholipase A₂ activity and hepatocytes calcium overload [J]. Chin Crit Care Med, 2001, 12(4): 216–219.
- [21] PEREZ-ASO M, SEGURA V, MONTÓ F, et al. The three α_1 -adrenoceptor subtypes show different spatio-temporal mechanisms of internalization and ERK1/2 phosphorylation [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1833(10): 2322–2333.
- [22] CIVANTOS CALZADA B, ALEIXANDRE DE ARTIÑANO A. α -adrenoceptor subtypes [J]. Pharmacol Res, 2001, 44(3): 195–208.
- [23] LIN J C, PENG Y J, WANG S Y, et al. Sympathetic nervous system control of carbon tetrachloride-induced oxidative stress in liver through α -adrenergic signaling [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 3190617.
- [24] KIM E K, CHOI E J. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update [J]. Arch Toxicol, 2015, 89(6): 867–882.

[收稿日期] 2023–09–13

贾亚静,杜耐一,赵炜,等. LIMK1 通过上调 ROS/Src 通路进而促进宫颈癌的进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 92-99.

Jia YJ, Du NY, Zhao W, et al. LIMK1 promotes the progression of cervical cancer by up-regulating the ROS/Src pathway [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 92-99.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.010

LIMK1 通过上调 ROS/Src 通路进而促进 宫颈癌的进展

贾亚静,杜耐一,赵炜,李永萍,刘雅坤*

(河北医科大学第四医院 妇科, 石家庄 050011)

【摘要】 目的 探究 LIMK1 对宫颈癌(cervical cancer)进展的影响。**方法** 构建 LIMK1 过表达人宫颈癌 HeLa 细胞及 C-33A 细胞,将 HeLa 细胞接种于裸鼠皮下,观察肿瘤体积并以 Western blot 实验检测其瘤体细胞中 NOX2、NOX4、p-Src、p-RUNX3、RUNX3 以及 MMP-9 蛋白表达情况;将 LIMK1 过表达 HeLa 细胞及 LIMK1 过表达 C-33A 细胞培养于 5% O₂ 条件下,并加入抗氧化剂,以 Western blot 实验检测细胞内 LIMK1、NOX4、p-Src、p-RUNX3、RUNX3 以及 MMP-9 蛋白表达情况,以划痕实验检测细胞迁移能力,以 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力,以单克隆增殖实验检测细胞增殖能力。**结果** 接种 LIMK1 过表达 HeLa 细胞的裸鼠肿瘤体积明显增大,其 NOX2、NOX4、p-Src、p-RUNX3 以及 MMP-9 蛋白升高,而 RUNX3 蛋白表达降低;LIMK1 过表达的 HeLa 细胞 LIMK1、NOX4、p-Src、p-RUNX3 以及 MMP-9 蛋白表达升高,RUNX3 蛋白表达降低,同时 LIMK1 过表达的 HeLa 细胞及 LIMK1 过表达 C-33A 细胞的迁移和侵袭能力以及细胞增殖能力增强,而加入抗氧化剂后,细胞的 NOX4、p-Src、p-RUNX3、RUNX3 以及 MMP-9 蛋白表达水平以及细胞迁移、侵袭和增殖能力与 LIMK1 正常表达的细胞无显著差异。**结论** LIMK1 通过促进 ROS/Src 通路进而促进宫颈癌细胞的迁移、侵袭和增殖能力,促进了宫颈癌的进展。

【关键词】 LIMK1;ROS;Src;宫颈癌;RUNX3

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0092-08

LIMK1 promotes the progression of cervical cancer by up-regulating the ROS/Src pathway

JIA Yajing, DU Naiyi, ZHAO Wei, LI Yongping, LIU Yakun*

(Department of Gynecology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect of LIMK1 on the progression of cervical cancer (CC). **Methods** HeLa and C-33A human cervical cancer cells overexpressing LIMK1 were established and injected subcutaneously into nude mice. The tumor volume was measured and expression of NOX2, NOX4, p-Src, p-RUNX3, RUNX3, and MMP-9 proteins in tumor cells was detected by Western blot assays. LIMK1-overexpressing HeLa and C-33A cells were cultured in 5% O₂ with antioxidants. The protein expression of LIMK1, NOX4, p-Src, p-RUNX3, RUNX3 and MMP-9 in the cells was detected by Western blot assays. Cell migration was assessed by a scratch assay. Transwell assays were used to assess cell migration and invasion. A monoclonal proliferation assay was used to assess cell proliferation. **Results** The tumor volume

in nude mice injected with LIMK1-overexpressing HeLa cells was increased significantly, and NOX2, NOX4, p-Src, p-RUNX3 and MMP-9 protein levels were increased, while RUNX3 protein expression was decreased. In LIMK1-overexpressing HeLa and C-33A cells, the protein expression of LIMK1, NOX4, p-Src, p-RUNX3, and MMP-9 was increased, RUNX3 protein expression was decreased, and cell migration, invasion, and proliferation were increased. However, after adding antioxidants, the expression levels of NOX4, p-Src, p-RUNX3, RUNX3 and MMP-9 proteins, and cell migration, invasion, and proliferation were not different from those of control cells.

Conclusions LIMK1 promotes the progression of cervical cancer by enhancing the ROS/Src pathway, thereby promoting the migration, invasion, and proliferation of cervical cancer cells.

【Keywords】 LIMK1; ROS; Src; cervical cancer; RUNX3

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

宫颈癌(cervical cancer,CC)作为全球女性第三大常见癌症,已成为发展中国家妇女癌症死亡的主要原因^[1],全球每年有超过 27 万人因 CC 而死亡^[2]。在中国,宫颈癌的发病率和死亡率呈显著上升趋势,这一点在年轻女性中表现尤为明显^[3]。CC 的主要危险因素包括 HPV 病毒感染、年龄、吸烟、分娩以及避孕药的使用等^[4]。手术和放疗仍然是治疗 CC 的主要方法,但患者所出现的转移和复发仍是临床治疗中的难点^[5],因此探究 CC 的发展机制对治疗 CC 具有非常重要的作用。

在 CC 的发生发展过程中,细胞中的 ROS 会升高^[6],ROS 是细胞呼吸的副产物,ROS 的增加有助于促进肿瘤的进展^[7]。有研究发现,细胞内的 ROS 会促进 Src 的活化^[8],而 Src 是位于细胞中的原癌基因^[9],其参与了癌细胞在增殖、迁移、干性和分化过程中的几个信号节点^[10]。有研究表明,Src 的表达促进了 CC 的发展^[11]。

LIM 结构域激酶 1(LIMK1)是一种属于 LIM 激酶蛋白家族成员的蛋白质^[12]。LIMK1 参与许多生物过程,例如细胞周期、细胞迁移和神经元分化等^[13]。LIMK1 的磷酸化会促进癌细胞的迁移和增殖^[14]。有研究发现,LIMK1 在 CC 中也显著上调,并与患者的预后不良有关^[15],但其机制尚不完全清楚。本研究基于此研究 LIMK1 对 CC 的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

12 只 SPF 级 BALB/c A-nu 雄性裸鼠,6~8 周龄,体重(20±2)g,购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司[SCXK(豫)2020-0005],并饲养于河北省人民医院动物中心[SYXK(冀)2020-005]。所有动物实验均通过河北医科大学第四医院实验动物使

用与管理委员会批准(Approval No. IACUC-4th Hos Hebmu-2023061022),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 细胞

人宫颈癌 HeLa 细胞系(CL-0101)及 C-33A 细胞系(CL-0045)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

pMD 18-T 载体(6011)、JM109 感受态细胞(9052)购自日本 TaKaRa 公司;BglII(R0144VVIAL)、SalI(R0138VVIAL)、T4 DNA ligase(M0202VVIAL)购自美国 NEB 公司;DEME 培养液(10313021)、Opti-MEM(51985091)、Lipofectamine 3000(L3000001)购自美国赛默公司;抗氧化剂 NAC(50303ES05)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;RIPA 裂解液(P0013K)、Matrigel 胶(C0383)购自江苏碧云天生物科技有限公司;NOX2 抗体(ab310337)、NOX4 抗体(ab154244)、p-Src 抗体(ab40660)、p-RUNX3 抗体(ab224642)、RUNX3 抗体(ab224641)、MMP-9 抗体(ab76003)、LIMK1 抗体(ab243137)以及 GAPDH 抗体(ab8245)购自美国 Abcam 公司;Transwell 小室(3378)购自美国康宁公司;吉姆萨染液(G8220)购自北京索莱宝科技有限公司。电泳仪(121-2100)购自北京六一生物科技有限公司;垂直电泳槽(A25977)购自上海赛默飞世尔科技公司;湿式转膜仪(NW2000)购自上海赛默飞世尔科技公司;化学发光成像仪(EI600)购自上海碧云天生物科技有限公司;超声波细胞破碎仪(Scientz-IID)购自中国宁波新芝生物科技股份有限公司;水平脱色摇床(WS-350R)购自北京维根技术有限公司;超洁净工作台(51900900)购自上海赛默飞世尔科技公司;超低温冰箱(-80℃)(TDEC06386FV)购自上海赛默飞世尔科技公司;纯

水系统(ZIQ7000T0C)购自 Millipore 科技公司。

1.3 实验方法

1.3.1 裸鼠肿瘤接种

将 HeLa 细胞以含 10%胎牛血清、100 U/L 青/链霉素的 DEME 培养液培养 24 h 后,铺到 6 孔板中,待细胞生长至 2×10^5 /孔,将 8.0 μg 质粒 PIRES2-EG-FP-LIMK1 以 Opti-MEM 稀释至 250 μL ,另取 10 μL Lipofectamine 3000 以 Opti-MEM 稀释至 250 μL ,将二者混合,并将混合液培养 6 h 后更换培养液为含 10%血清的 Opti-MEM,48 h 后将细胞传代,随后筛选阳性克隆 HeLa 细胞。将克隆阳性的 HeLa 细胞以皮下注射方式注射入裸鼠右侧前臂,定期观察裸鼠皮下成瘤情况,并测量肿瘤体积。7 d 后处死小鼠并取出肿瘤组织以进行后续实验。LIMK1 过表达 HeLa 细胞的裸鼠为研究组,接种 LIMK1 正常表达 HeLa 细胞的裸鼠为模型组。

1.3.2 LIMK1 过表达载体构建

将含有 LIMK1 引物序列 (LIMK1: F 5'-GGGGCATCATCAAGAGCA-3', R 5'-CCAGGCAGTTGTGGGAGT-3') 装入 pMD 18-T 载体,并转至 JM109 感受态细胞。利用 BglII 和 SalI 将 TA 克隆质粒以及 pIRES2-EGFP 进行酶切,随后电泳并回收 LIMK1 片段,并利用 T4 DNA ligase 将回收的片段与载体连接。

1.3.3 HeLa 细胞及 C-33A 细胞分组方法

将 HeLa 细胞及 C-33A 细胞于 5% O_2 条件下培养于含 10%胎牛血清、100 U/L 青/链霉素的 DEME 培养液中,随后以 1.3.1 中方式建立 LIMK1 过表达 HeLa 细胞模型及 LIMK1 过表达 C-33A 细胞模型,并将细胞根据处理方式分为 a 组(正常表达 LIMK1, LIMK1 NC)、b 组(过表达 LIMK1, LIMK1 OE)、c 组(培养基中加入 NAC, LIMK1 NC+NAC)以及 d 组(过表达 LIMK1 且培养基中加入 NAC, LIMK1 OE+NAC)。

1.3.4 Western blot 实验

将裸鼠肿瘤组织进行裁剪清洗后,将其与各组 HeLa 细胞利用 RIPA 裂解液进行裂解,利用 10% SDS-AGE 浓缩胶对蛋白进行分离,分离结束后,将蛋白流转至 PVDF 膜上。而后将 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉浓度的 TBST 溶液中浸泡。2 h 后将稀释后的 NOX2 抗体、NOX4 抗体、p-Src 抗体、p-RUNX3 抗体、RUNX3 抗体、MMP-9 抗体、LIMK1 抗体以及 GAPDH 抗体加入对应 PVDF 膜上在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下过

夜。次日以 TBST 溶液清洗 PVDF 膜 3 次,加入对应二抗室温下进行 1 h 孵育,再以 TBST 溶液进行 3 次清洗。以化学发光法曝光拍摄照片。

1.3.5 细胞划痕实验

将 HeLa 细胞及 C-33A 细胞以 5.0×10^5 /孔接种于 6 孔板并置于培养箱中培养,待细胞铺满,以 10 μL 枪头在与细胞平面垂直的方向划出两条平行线。以 PBS 对划线后的细胞进行清洗,将划下的细胞进行清除并加入无血清培养基,而后将其放入培养箱中培养,在 0 h 以及 48 h 时取样并拍照存档。

1.3.6 Transwell 实验

试验前将在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存的 Matrigel 胶置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜融化,并在实验前将其与无血清培养基进行稀释。在 Transwell 小室中铺 80 μL Matrigel 胶并置于培养箱中凝固,以胰蛋白酶对细胞进行消化,并调整细胞浓度为 5.0×10^5 /mL,接种到 Transwell 小室内,每小室加 0.3 mL 细胞悬液,下层 24 孔板加入 0.7 mL 10%血清培养基,放入培养箱培养 24 h 后,每孔加入甲醇溶液固定 30 min。固定后以 PBS 清洗,清洗后每孔加入 1 mL 0.5%结晶紫溶液染色,30 min 后以 PBS 清洗并晾干。观察并计数中间及四周视野中的细胞数。

1.3.7 单克隆增殖实验

当 HeLa 细胞及 C-33A 细胞在 6 孔板中汇和度达到 90%时,对其进行常规消化并以 1200 r/min 条件对其进行离心,离心时长为 5 min。重悬细胞沉淀后计数,将其细胞浓度调整为 1.0×10^5 /孔。取 200 μL 细胞悬液接种平皿并补加细胞培养液至 6 mL,晃动使细胞分散后放入培养箱 2 周。当出现肉眼可见的克隆多于 50 个时,弃去培养基并以 PBS 对其进行 3 次清洗,而后每孔加入 5 mL 甲醇使其固定,15 min 后弃去固定液并以 PBS 对其进行 3 次清洗。每孔加入吉姆萨染液染色,20 min 后以水清洗并干燥。

1.4 统计学方法

本研究所有实验均重复 3 次,所有数据通过 SPSS 23.0 进行分析,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 *t* 检验分析两组间差异, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠肿瘤生长情况

接种 LIMK1 过表达 HeLa 细胞的裸鼠肿瘤体积

大于接种 LIMK1 正常表达 HeLa 细胞的裸鼠 ($P < 0.05$), 见图 1, 说明 LIMK1 促进了 CC 的发展。

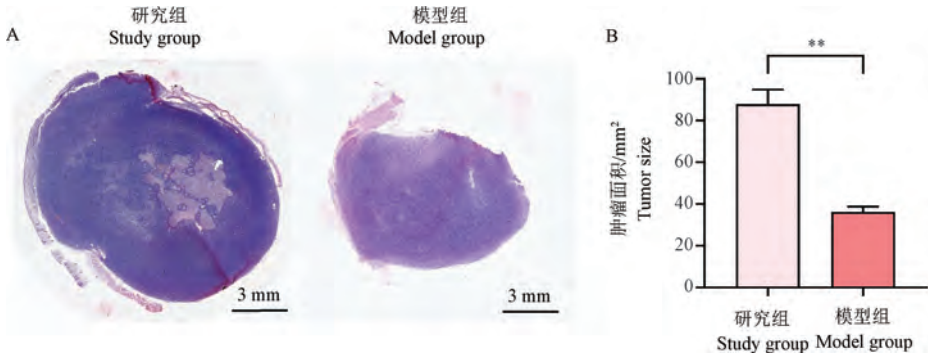
2.2 裸鼠肿瘤组织蛋白检测结果

Western blot 结果显示, 接种 LIMK1 过表达 HeLa 细胞的裸鼠肿瘤组织中 NOX2、NOX4、p-Src、p-RUNX3 及 MMP-9 蛋白表达高于接种 LIMK1 正常表达 HeLa 细胞的裸鼠 ($P < 0.05$), 而 RUNX3 蛋白表达

低于接种 LIMK1 正常表达 HeLa 细胞的裸鼠 ($P < 0.05$), 见图 2, 说明 LIMK1 通过促进 ROS/Src 通路进而促进了 RUNX3 的磷酸化水平以及 MMP-9 的表达。

2.3 HeLa 细胞蛋白检测结果

Western blot 实验结果显示, b 组 HeLa 细胞的 LIMK1、NOX4、p-Src、p-RUNX3 以及 MMP-9 蛋白表达高于 a 组 ($P < 0.05$), 而 RUNX3 蛋白表达低于 a

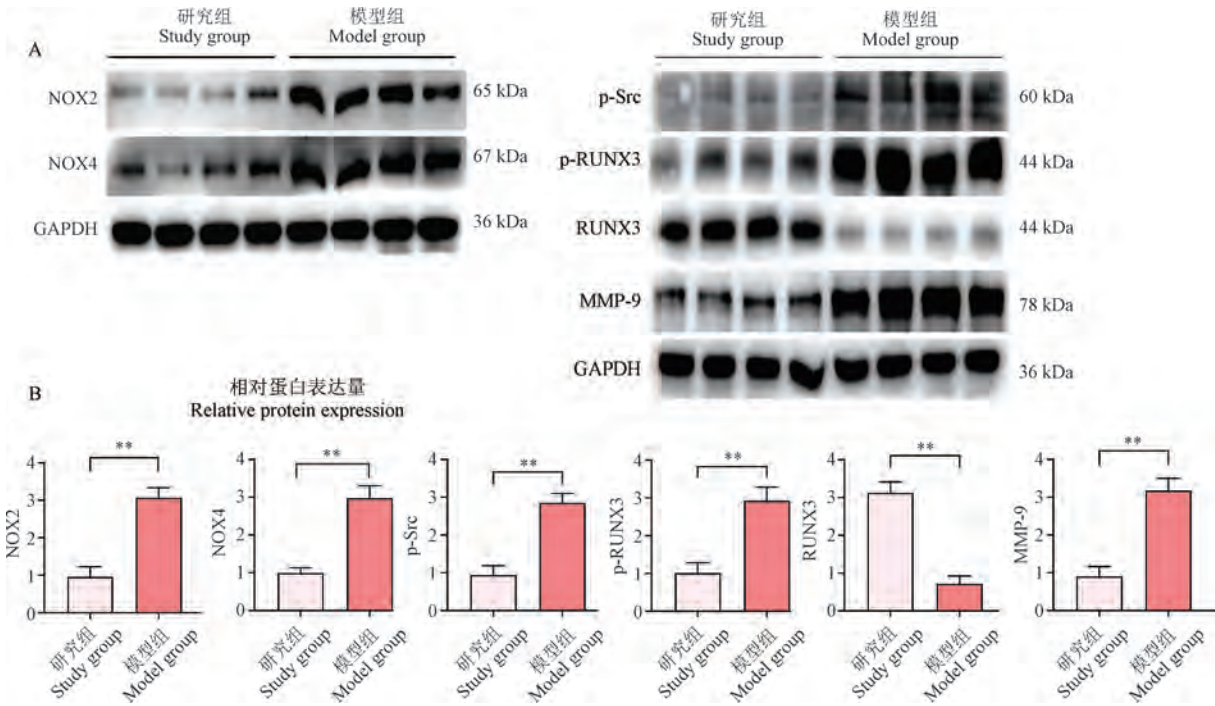


注: A: 裸鼠肿瘤生长情况; B: 裸鼠肿瘤体积统计图。与研究组相比, $^{**}P < 0.01$ 。

图 1 裸鼠肿瘤生长情况

Note. A. Tumor growth in nude mice. B. Statistical diagram of tumor volume in nude mice. Compared with study group, $^{**}P < 0.01$.

Figure 1 Tumor growth in nude mice



注: A: 各组裸鼠 Western blot 实验检测 NOX2、NOX4、p-Src、p-RUNX3、RUNX3 以及 MMP-9 蛋白结果; B: 各组裸鼠 Western blot 实验检测 NOX2、NOX4、p-Src、p-RUNX3、RUNX3 以及 MMP-9 蛋白表达结果统计。与研究组相比, $^{**}P < 0.01$ 。

图 2 裸鼠肿瘤组织蛋白检测结果

Note. A, Western blot assay results of NOX2, NOX4, p-Src, p-RUNX3, RUNX3, and MMP-9 protein in each group of nude mice. B, Statistical diagrams of Western blot analysis of NOX2, NOX4, p-Src, p-RUNX3, RUNX3, and MMP-9 protein expression results in each group of nude mice. Compared with study group, $^{**}P < 0.01$.

Figure 2 Tumor tissue protein detection results in nude mice

组($P<0.05$);c 组 HeLa 细胞 LIMK1 蛋白表达低于 d 组($P<0.05$),但 c 组 HeLa 细胞 NOX4、p-Src、p-RUNX3 以及 MMP-9 蛋白表达与 d 组无差异($P>0.05$),见图 3,说明 LIMK1 通过促进 ROS/Src 通路

进而促进了 RUNX3 的磷酸化水平及 MMP-9 的表达。

2.4 HeLa 细胞及 C-33A 细胞划痕实验结果

见图 4 细胞划痕实验结果显示,在 0 h 时,各组

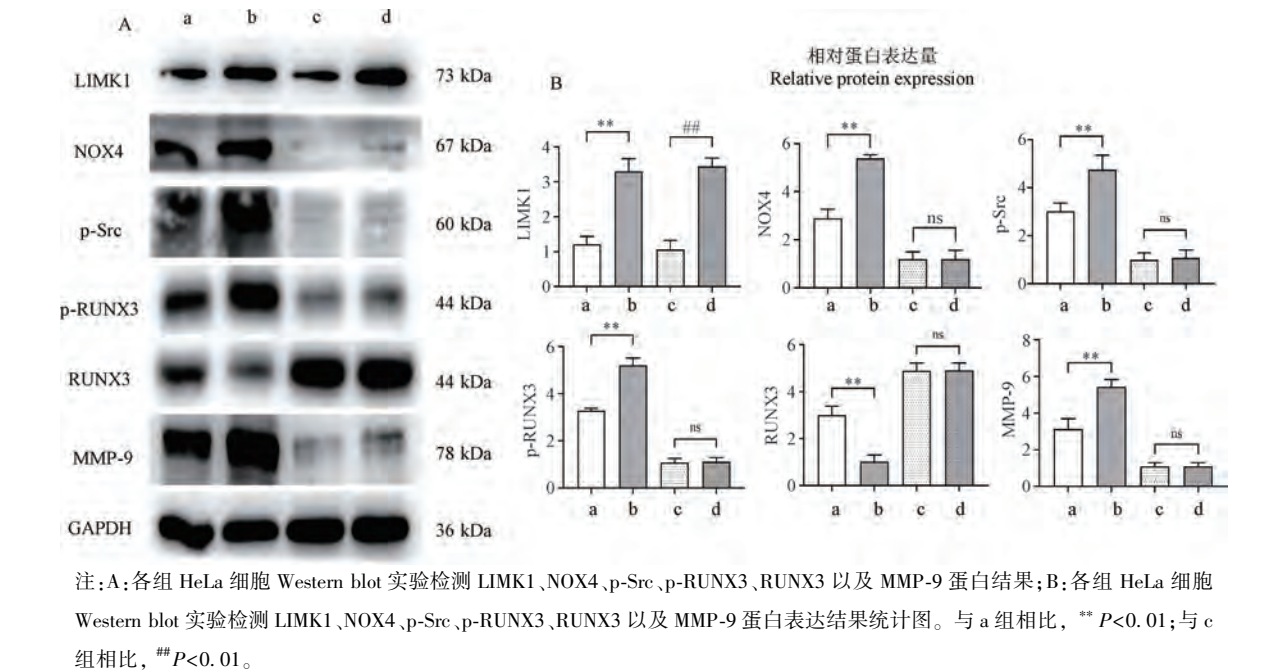


图 3 HeLa 细胞蛋白检测结果

Note. A, Results of LIMK1, NOX4, p-Src, p-RUNX3, RUNX3, and MMP-9 protein detected by Western blot assay in HeLa cells in each group. B, Statistical diagrams of the protein expression results of LIMK1, NOX4, p-Src, p-RUNX3, RUNX3, and MMP-9 detected by Western blot assay in HeLa cells in each group. Compared with group a, $**P<0.01$. Compared with group c, $##P<0.01$.

Figure 3 HeLa cells protein detection results

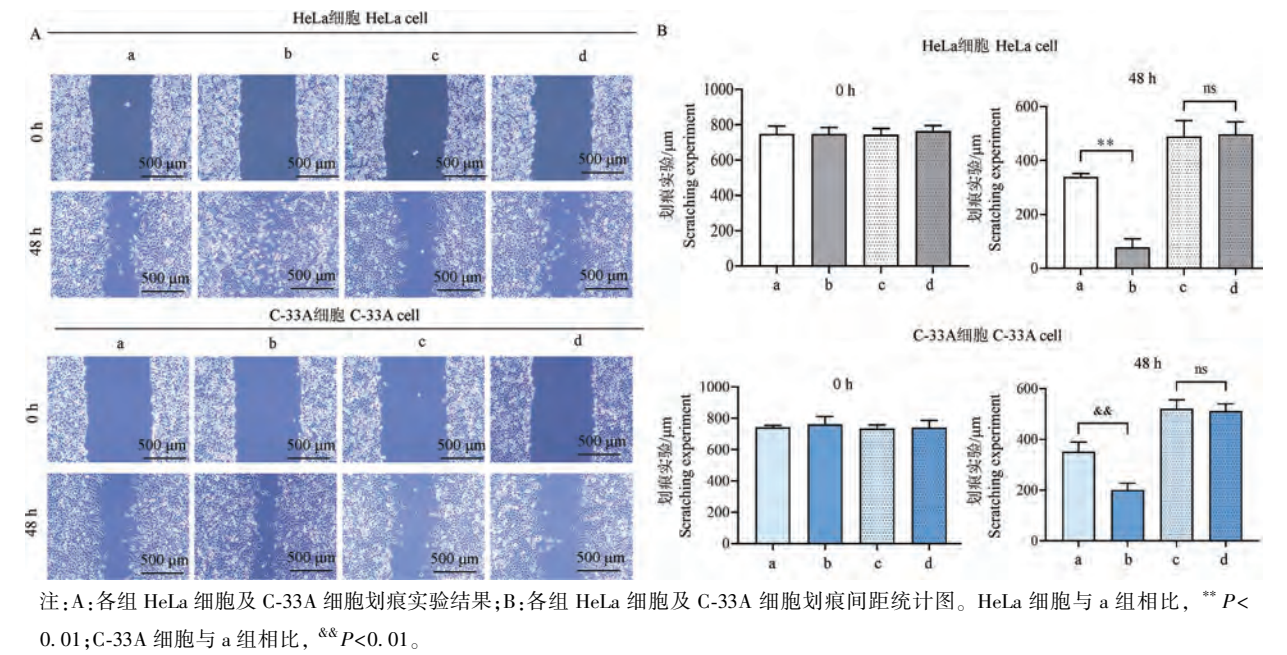


图 4 HeLa 细胞及 C-33A 细胞划痕实验结果

Note. A, Results of cell scratch assay of HeLa cells and C-33A cells in each group. B, Statistical diagrams of scratch spacing of HeLa cells and C-33A cells in each group. HeLa cell compared with group a, $**P<0.05$. C-33A cell compared with group a, $&&P<0.05$.

Figure 4 Cell scratch assay results of HeLa cells and C-33A cells

HeLa 细胞及 C-33A 细胞划痕间距无明显差异;48 h 后,b 组细胞划痕小于 a 组,c 组和 d 组细胞划痕间距无明显差异,说明 LIMK1 促进了 HeLa 细胞及 C-33A 细胞的迁移能力。

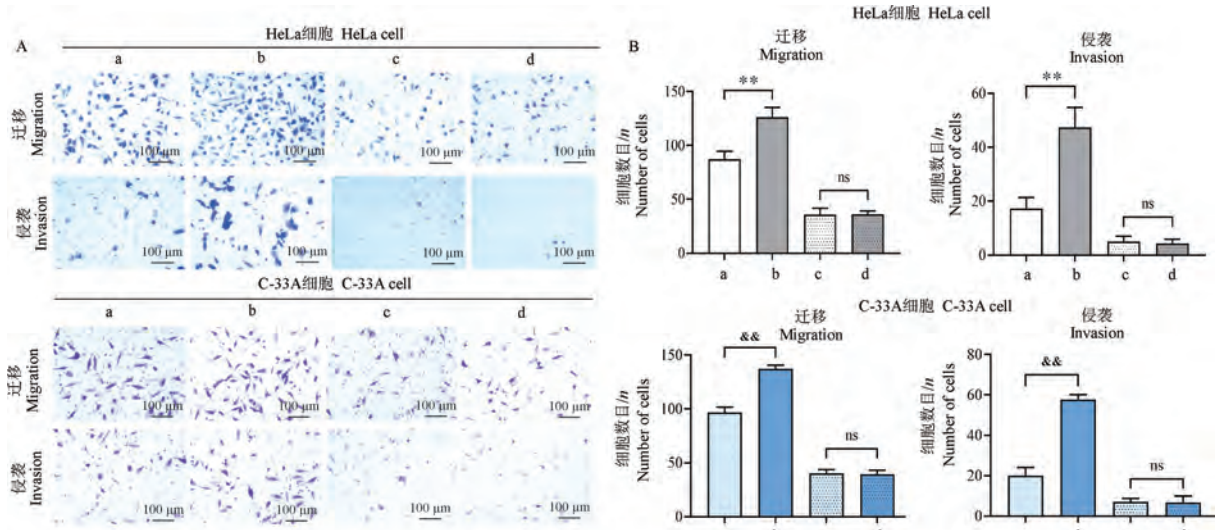
2.5 HeLa 细胞及 C-33A 细胞 Transwell 实验结果

Transwell 实验结果显示,a 组 HeLa 细胞及 C-33A 细胞的细胞迁移和侵袭数目低于 b 组,而 c 组和 d 组的细胞迁移和侵袭数目无差异,见图 5,说明

LIMK1 促进了 HeLa 细胞及 C-33A 细胞的迁移和侵袭能力。

2.6 HeLa 细胞及 C-33A 细胞单克隆增殖实验结果

单克隆增殖实验结果显示,a 组 HeLa 细胞及 C-33A 细胞的增殖数目低于 b 组,而 c 组和 d 组的细胞增殖数目无差异,见图 6,说明 LIMK1 促进了 HeLa 细胞及 C-33A 细胞的增殖能力。

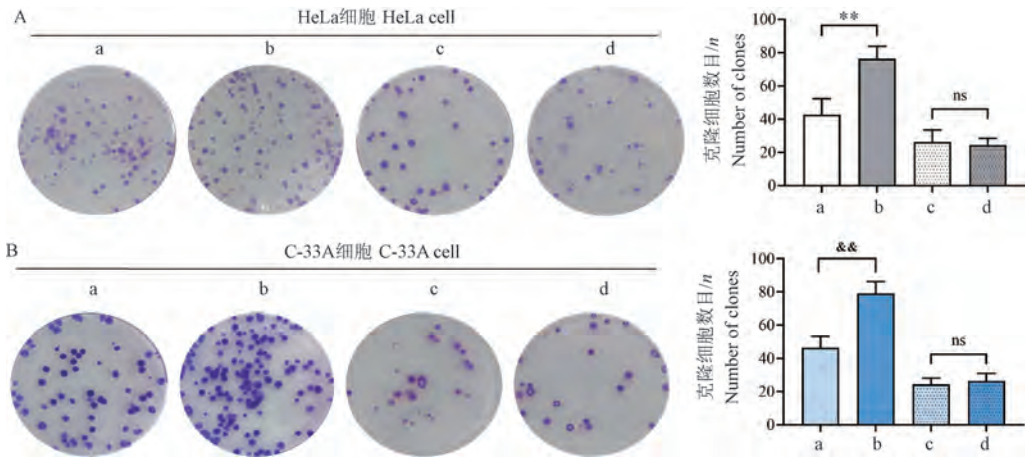


注:A:各组 HeLa 细胞及 C-33A 细胞 Transwell 实验结果;B:各组 HeLa 细胞及 C-33A 细胞迁移和侵袭数目统计图。HeLa 细胞与 a 组相比, ** $P<0.01$;C-33A 细胞与 a 组相比, && $P<0.01$ 。

图 5 HeLa 细胞及 C-33A 细胞 Transwell 实验结果

Note. A, Transwell experiment results of HeLa cells and C-33A cells in each group. B, Statistical diagrams of migration and invasion number of HeLa cells and C-33A cells in each group. HeLa cell compared with group a, ** $P<0.01$. C-33A cell compared with group a, && $P<0.01$.

Figure 5 Transwell experiment results of HeLa cells and C-33A cells



注:A:各组 HeLa 细胞单克隆增殖实验结果及数据统计图;B:各组 C-33A 细胞单克隆增殖实验结果及数目统计图。HeLa 细胞与 a 组相比, ** $P<0.01$;C-33A 细胞与 a 组相比, && $P<0.01$ 。

图 6 HeLa 细胞及 C-33A 细胞单克隆增殖实验结果

Note. A, Results of monoclonal proliferation assay of HeLa cells and statistical diagram of HeLa cell proliferation in each group. B, Results of monoclonal proliferation assay of C-33A cells and statistical diagram of C-33A cell proliferation in each group. HeLa cell compared with group a, ** $P<0.01$. C-33A cell compared with group a, && $P<0.01$.

3 讨论

在 CC 组织中, LIMK1 的表达明显强于正常组织^[16]。LIMK1 作为一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[17], 主要在细胞质中表达, 少量在细胞核中表达^[18]。LIMK1 的生理功能主要是磷酸化 Cofilin 成为失活的 p-Cofilin, 然后参与细胞肌动蛋白骨架的重组^[19]。近年来, LIMK1 已被证明通过诱导细胞增殖、迁移或侵袭来促进多种癌症的进展^[20]。

ROS 对 CC 的发展具有重要作用^[21], 细胞中的 ROS 主要由包括 NOX2 和 NOX4 在内的 NADPH 氧化酶(NOX)所生成^[22]。ROS 产生后会激活 Src 的活化^[23], 而活化的 Src 会增加抑癌因子 RUNX3 的磷酸化水平并导致 RUNX3 失活^[24]。此外, Src 的活化诱导了 MMP-9 的表达^[25], MMP-9 作为基质金属蛋白酶(MMP)之一, 与癌症的侵袭、转移和血管生成等病理表现密切相关^[26]。

本研究通过对裸鼠进行皮下接种 HeLa 细胞及 C-33A 细胞, 发现接种过表达 LIMK1 的 HeLa 细胞及过表达 LIMK1 的 C-33A 细胞的裸鼠肿瘤体积明显大于接种正常表达 LIMK1 的 HeLa 细胞及正常表达 LIMK1 的 C-33A 细胞的裸鼠, 这表明 LIMK1 促进了 CC 的发展。而通过对裸鼠肿瘤组织进行蛋白检测发现, 接种过表达 LIMK1 的 HeLa 细胞的裸鼠肿瘤组织相较于接种正常表达 LIMK1 的 HeLa 细胞的裸鼠肿瘤组织, 其 NOX2、NOX4、p-Src、p-RUNX3 以及 MMP-9 蛋白升高, 而 RUNX3 蛋白表达降低, 这表明 LIMK1 通过促进 ROS/Src 通路进而促进了 RUNX3 的磷酸化水平以及 MMP-9 的表达, 最终促进了 CC 的发展。

而在体外实验中, 本研究通过将 HeLa 细胞及 C-33A 细胞培养于低氧条件下, 发现 LIMK1 过表达的细胞相较于 LIMK1 正常表达的细胞, 其 LIMK1、NOX4、p-Src、p-RUNX3 以及 MMP-9 蛋白升高, 而 RUNX3 蛋白表达降低, 同时, 其细胞迁移、侵袭和增殖能力得到增强。而在加入抗氧化剂后, LIMK1 过表达的细胞的 LIMK1 蛋白表达水平明显高于 LIMK1 正常表达的细胞, 而 NOX4、p-Src、p-RUNX3、RUNX3 以及 MMP-9 蛋白表达水平与 LIMK1 正常表达的细胞无差异, 同时两组细胞的迁移、侵袭和增殖能力无差异。这进一步证明了 LIMK1 通过促进 ROS/Src 通路进而促进了 RUNX3 的磷酸化水平以及 MMP-9 的表达, 增强细胞的迁移、侵袭和增殖

能力, 最终促进了 CC 的发展。

综上所述, LIMK1 促进了 CC 的发展, 其作用机制为 LIMK1 通过促进 ROS/Src 通路进而促进了 RUNX3 的磷酸化水平以及 MMP-9 的表达, 增强细胞的迁移、侵袭和增殖能力, 最终促进了 CC 的发展。

参考文献:

[1] BEDELL S L, GOLDSTEIN L S, GOLDSTEIN A R, et al. Cervical cancer screening: past, present, and future [J]. Sex Med Rev, 2020, 8(1): 28-37.

[2] GAFFNEY D K, HASHIBE M, KEPKA D, et al. Too many women are dying from cervix cancer: problems and solutions [J]. Gynecol Oncol, 2018, 151(3): 547-554.

[3] HU Z, MA D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications [J]. Cancer Med, 2018, 7(10): 5217-5236.

[4] OLUSOLA P, BANERJEE H N, PHILLEY J V, et al. Human Papilloma virus-associated cervical cancer and health disparities [J]. Cells, 2019, 8(6): 622.

[5] GOPU P, ANTONY F, CYRIAC S, et al. Updates on systemic therapy for cervical cancer [J]. Indian J Med Res, 2021, 154(2): 293-302.

[6] LIU Y, GUO J Z, LIU Y, et al. Nuclear lactate dehydrogenase A senses ROS to produce α -hydroxybutyrate for HPV-induced cervical tumor growth [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4429.

[7] PERILLO B, DI DONATO M, PEZONE A, et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon [J]. Exp Mol Med, 2020, 52(2): 192-203.

[8] LEE J J, VAN DE VEN R A H, ZAGANJOR E, et al. Inhibition of epithelial cell migration and Src/FAK signaling by SIRT3 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(27): 7057-7062.

[9] LUO J, ZOU H, GUO Y, et al. SRC kinase-mediated signaling pathways and targeted therapies in breast cancer [J]. Breast Cancer Res, 2022, 24(1): 99.

[10] PELAZ S G, TABERNERO A. Src: coordinating metabolism in cancer [J]. Oncogene, 2022, 41(45): 4917-4928.

[11] DU Q, WANG W, LIU T, et al. High expression of integrin α 3 predicts poor prognosis and promotes tumor metastasis and angiogenesis by activating the c-src/extracellular signal-regulated protein kinase/focal adhesion kinase signaling pathway in cervical cancer [J]. Front Oncol, 2020, 10: 36.

[12] LU G, ZHOU Y, ZHANG C, et al. Upregulation of LIMK1 is correlated with poor prognosis and immune infiltrates in lung adenocarcinoma [J]. Front Genet, 2021, 12: 671585.

[13] VILLALONGA E, MOSRIN C, NORMAND T, et al. LIM kinases, LIMK1 and LIMK2, are crucial node actors of the cell fate: molecular to pathological features [J]. Cells, 2023, 12(5): 805.

[14] GONG H, ZHOU L, KHELFAT L, et al. Rho-associated protein kinase (ROCK) promotes proliferation and migration of PC-3 and DU145 prostate cancer cells by targeting LIM kinase 1 (LIMK1) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 3090–3099.

[15] YANG X, DU H, BIAN W, et al. FOXD3-AS1/miR-128-3p/LIMK1 axis regulates cervical cancer progression [J]. Oncol Rep, 2021, 45(5) : 62.

[16] XU Y, ZHENG Y, DUAN Y, et al. MicroRNA-125a-5p targets LIM kinase 1 to inhibit cisplatin resistance of cervical cancer cells [J]. Oncol Lett, 2021, 21(5) : 392.

[17] 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.

[18] LIU X, SONG Q, WANG D, et al. LIMK1: a promising prognostic and immune infiltration indicator in colorectal cancer [J]. Oncol Lett, 2022, 24(1) : 234.

[19] SUN X, LI S, LIN H. LIMK1 interacts with STK25 to regulate EMT and promote the proliferation and metastasis of colorectal cancer [J]. J Oncol, 2022, 2022: 3963883.

[20] KANG X, LI W, LIU W, et al. LIMK1 promotes peritoneal metastasis of gastric cancer and is a therapeutic target [J]. Oncogene, 2021, 40(19) : 3422–3433.

[21] CASTELLI S, CICCARONE F, TAVIAN D, et al. ROS-dependent HIF1 α activation under forced lipid catabolism entails glycolysis and mitophagy as mediators of higher proliferation rate in cervical cancer cells [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1) : 94.

[22] KHAYRULLINA G, BERMUDEZ S, HOPKINS D, et al. Differential effects of NOX2 and NOX4 inhibition after rodent spinal cord injury [J]. PLoS One, 2023, 18(3) : e0281045.

[23] LIN C C, LIN W N, CHO R L, et al. Induction of HO-1 by mevastatin mediated via a Nox/ROS-dependent c-Src/PDGFR α /PI3K/Akt/Nrf2/ARE cascade suppresses TNF- α -induced lung inflammation [J]. J Clin Med, 2020, 9(1) : 226.

[24] GOH Y M, CINGHU S, HONG E T H, et al. Src kinase phosphorylates RUNX3 at tyrosine residues and localizes the protein in the cytoplasm [J]. J Biol Chem, 2010, 285(13) : 10122–10129.

[25] KAEWMEESRI P, POCASAP P, KUKONGVIRIYAPAN V, et al. Anti-metastatic potential of natural triterpenoid cucurbitacin B against cholangiocarcinoma cells by targeting src protein [J]. Integr Cancer Ther, 2022, 21: 15347354221124861.

[26] HUANG H. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: recent advances [J]. Sensors, 2018, 18(10) : 3249.

[收稿日期] 2023–09–04

章敏,刘雁云,顾欣,等. 中医药院校实验动物学的特色创新教育 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 100-105.

Zhang M, Liu YY, Gu X, et al. Characteristics and innovations in education of laboratory animal science in Traditional Chinese Medicine Colleges and Universities [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 100-105.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.011

中医药院校实验动物学的特色创新教育

章 敏^{1*}, 刘雁云², 顾 欣³, 田代志¹, 杨 阳¹

(1.湖北中医药大学实验动物中心,武汉 430065;

2.湖北中医药大学基础医学院,武汉 430065;

3.湖北中医药大学药学院,武汉 430065)

【摘要】 实验动物学在医学生教育及培养过程中有着举足轻重的地位。中医药院校实验动物学教学除紧跟实验动物学学科发展,还应加强中医特色教育和特色创新教育,根植于提高中医传统文化素养,着眼于培养学生创新和拓展思维。通过传承教育、伦理教育、迁移教育、探讨教育、启发教育及延展教育等在日常教学中的体现,结合实验动物学的中医渊源、中医药研究的动物福利、动物实验中的中医理论、动物模型的中医考量、实验动物的种属选择以及新发展方向的指导引领等具体内容,旨在培养学生的科研创新能力和实践动手能力。着力于更优质的中医特色创新教育,为祖国医学的发展提供坚实保障,为传统医学的传承培养新型人才。

【关键词】 实验动物学;中医药;特色教育;创新教育

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0100-06

Characteristics and innovations in education of laboratory animal science in Traditional Chinese Medicine Colleges and Universities

ZHANG Min^{1*}, LIU Yanyun², GU Xin³, TIAN Daizhi¹, YANG Yang¹

(1. Laboratory Animal Center, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China.

2. School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065.

3. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065)

【Abstract】 Laboratory animal science plays a crucial role in the education and training of medical students. To ensure effective teaching of laboratory animal science in Chinese medicine institutions, the principles of Chinese medicine characteristics and innovation should be incorporated. This pedagogical approach aims to enrich traditional cultural literacy in Chinese medicine and foster the students' capacities for innovation and critical thinking. Daily teaching of laboratory animal science should encompass various educational aspects, including inheritance, ethics, migration, exploration, inspiration, and extension education. By integrating these components and emphasizing the intersections of Chinese medicine with laboratory animal science, important areas, such as animal welfare in Chinese medicine research, the application of Chinese medicine theories in animal experiments, considerations for animal models in Chinese medicine, and the selection of experimental animal species, can be addressed. Additionally, this approach guides new research directions and effectively cultivates the students' scientific research, innovation, and practical abilities. The primary objective of this program is to nurture scientific innovation and practical competence among students while prioritizing the superior quality of

【基金项目】 湖北省科技厅科技创新基地条件平台专项(2021DFE028);湖北省高等学校实验室项目(HBSY2021-87);湖北省科技厅中医药创新发展联合基金项目(2024AFD323)。

【作者简介】 章敏(1976—),女,高级实验师,博士,研究方向:实验动物学、中药药理学教学及科研工作。E-mail:149403938@qq.com

innovative education in the context of Chinese medicine. Such efforts offer a solid foundation to advance traditional medical practices and nurture a new generation of professionals dedicated to preserving traditional medicine.

[Keywords] laboratory animal science; Chinese medicine; characteristic education; innovative education

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

实验动物学是以实验动物和动物实验为研究对象,集成生物学、兽医学、医学、药学、生物医学工程等学科的理论和方法,为生命科学、医药学、农业、环境等领域发展提供实验动物资源和动物实验技术,是科技创新、产业发展及国家安全的基础,也是实验医学转化到临床医药学的桥梁^[1]。医学新知识的获取、新方法的应用都得益于动物实验^[2]。因此,实验动物学在医学生教育及培养过程中有着举足轻重的地位^[3]。

中医科研现代化是借助当代先进的科学技术,系统揭示人体健康与疾病本质的认识活动^[4]。因此,实验动物和动物实验作为先进的科学技术,也可以被认为是推动中医学术发展的核心力量和重要支撑之一。倡导中医药实验动物学是将实验动物学与中医固有的实验研究融为一体,在内容上为现代医学有关的理论方法所包容,在实验方法和思路体现和忠实于中医的学术思想^[5]。

自本校开设“实验动物学”课程以来,总结近 30 年的教学工作经验,我们认为中医药院校实验动物学教学除紧跟实验动物学学科发展,还应加强中医特色教育以及特色创新教育。无论是实验动物福利伦理思想的建立,还是中医动物模型的建立和选取、实验动物相关的新兴发展方向等都是让学生的教育根植于提高中医传统文化素养,着眼于培养学生创新和拓展思维。

1 传承教育——实验动物学的中医渊源

传统中医学的研究途径几乎全是通过临床观察方法来认识疾病的发生、发展、变化规律及总结有效的防治措施,涉及到实验动物的内容从数量上来看确实不多,但古代典籍所记载的通过观察药物对动物的作用而获取药物知识却很丰富^[6]。虽然中医在几千年来的动物实验是直观的、简单和零星的,也没有逐步独立完善发展,但通过观察动物机能及相关机理确是有力地促进了中医药的发展。

在讲授实验动物学“绪论”章节关于“实验动物学发展简史”时,大多数的教材及教学内容主要是介绍古希腊的动物解剖观察,无菌豚鼠的培育解决了生物在无菌条件下生存的理论,以及近交系小

鼠的培育和无胸腺裸小鼠的发现等。而对于实验动物的中医渊源,动物之用于实验是源于古代人们对自然界动物自救治病本能的跟踪观察及人为对动物施加某种因素后的结果分析^[7]。具体表现在 3 个方面^[8]:(1) 观察动物的治病本能。蛇衔草、刘寄奴等中药即由观察动物使用植物疗伤而得名。《抱朴子》云:“余数见人以蛇衔膏连已断之指,桑豆易鸡鸭之足,异物之益,不可诬也。”蛇在受伤后寻找药草疗伤,继而伤科草药蛇衔草被广泛应用于金创外伤,具有清热解毒、消痈散瘀的功效。(2) 观察动物应用药物的效果。乌头是人们较早认识的麻醉药,中唐时期的《仙授理伤续断秘方》记载“酒调服草乌头”用于整骨,而这个临床用药经验也正是与“草乌醉鸟”或无意识的动物实验有关。在验证自然铜接骨作用时,《本草纲目》描述“赤铜屑主折伤、能焊人骨,六畜有损者,细研酒服,直入骨损处,六畜死后,取骨视之,犹有焊痕可验。”(3) 观察动物对人为因素的反应。以动物实验结果断案亦是法医先河之举。《疑狱集》“张举烧猪”载:“张举吴人也,为句章令:有妻杀夫,因引火烧舍,乃诈称火烧夫死;夫家疑之,诣官诉妻;妻拒而不承,举乃取猪二口,一杀之,一活之,乃积薪烧之,察杀者口中无灰,活者口中有灰,因验夫口中果无灰,以此鞫之,妻乃伏罪。”古人通过对动物的观察,进行取向比类,并运用于对人类疾病的治疗。这些记载正反映了实验动物学与中医药学的渊源^[4],同时也培养了中医药专业学生学习实验动物学的兴趣。

2 伦理教育——中医药研究的动物福利

伦理教育是医学教育中不可或缺的一部分。中医施治遵循“医者仁心”“大医精诚”的从医道德,体现传统医学伦理学价值体系和规范。而随着中医药科学性探索的深入,同时带来了有关伦理的新问题、新挑战^[9]。医学生对待实验动物的态度,既是社会文明与发展程度的重要标志,也是科学素养与人文素质相互统一的体现。

加强实验动物伦理福利教育,引导医学生树立正确的伦理观,是培养良好医德的教育途径^[10]。另一个方面,动物实验所用到的实验动物,在整个实

验持续过程中获得的福利程度也会直接影响实验结果的准确性和科学性^[11]。动物福利本质上是倡导尊重实验动物、善待动物和敬畏生命。传统的实验动物伦理福利教学中,重点讲解实验动物享有的“不受饥渴”“生活舒适”“不受痛苦伤害和疾病”“生活无恐惧和悲伤感”以及“表达天性”等 5 项基本福利和“减少、替代、优化”的 3R 原则。结合中国传统文化,让学生不止限于实验动物福利就是现代医学产物的认识。儒家的“仁人爱物”“好生而恶杀”,将“恻隐之心”作为人性“四端之一”的思想,正是把超越狭隘的非人类中心主义“天人合一”境界视为人们道德成熟的标志^[12]。而“天人合一”也正是中医基础理论的实质内涵。道家“主而不宰”“类无贵贱”的思想,即人与自然万物和谐相处的道理。而佛家“扫地不伤蝼蚁命,爱惜飞蛾纱罩灯”的“好生之德”则更是反映出传统文化中源远流长的动物保护意识。实验动物的保护意识很好地契合了人与自然和谐共生理念。人与自然命运共同体理念也必然会以社会规范的力量进一步推动全社会关注动物福利,改善实验动物生存及使用状况^[13]。从 2006 年颁布《关于善待实验动物的指导意见》到 2018 年《实验动物福利伦理审查指南》正式实施,标志着我国实验动物福利伦理工作进入了新阶段。将实验动物伦理知识转化为实验过程中善待动物的具体行为,引导医学生将对实验动物的恻隐之心转化为敬畏生命的自觉行为^[14]。

在动物证候模型建立过程中,中医特色治疗手段如针刺、贴敷的操作,特色诊断指标如舌象、脉象的采集等,其操作是否存在动物伦理问题或应从动物伦理的何种角度进行判断还尚无标准可依。中医特色动物实验伦理审查也就存在缺乏科学性、规范性和统一性的情况^[9]。目前,教师们只能通过收集一些个案来告知学生,避免因在动物实验中使用中医特色诊疗手段不规范而出现的“跳坑”,让整个实验研究因为操作方式违反动物伦理而功亏一篑。例如,观察大鼠用药前后的舌象变化。在动物麻醉后,为了让观察到的舌质视野暴露得更加清晰和完整,学生使用了眼科镊和止血钳进行牵拉,并将该照片作为实验结果进行投稿,最终因违反实验动物伦理而被拒稿。

实验动物福利的保护不只是实验动物自身的需要,也是动物实验结果科学、可靠的基础^[15]。教学的同时应该将伦理意识落实到动物实验每个阶

段,尤其在动物实验方案的初始设计上。学生以研究者身份,从详尽、科学、合理、可行等角度,考虑将不必要的研究去除及动物实验替代方法;列出对动物可能造成的预期伤害;给药途径和剂量及其理由;实验方法与内容、麻醉与镇痛、安乐死与仁慈终点;实验分组、饲养空间是否合理;实验方案中是否包括执行安乐死的标准等^[16]。

3 迁移教育——动物实验中的中医理论

日常教学中,动物的血液采集是重要的实验操作训练之一。学生需要掌握根据动物机体受损伤程度、采血频率及采血量不同等情况选择合适的采血方法,以获得高质量的血液样本。在实际操作中,经心脏采血、腹主动脉采血、颈静脉采血、鼠尾采血、眼眶采血(眼眶后静脉丛)及摘眼球采血等多种方法对比,学生自主联系“肝开窍于目”“肝主藏血”等中医基础理论,提出与一般心脏、大血管采血不同,眼眶采血在体表,却之所以能适用于中等量采血,或成为避免小鼠死亡的血液指标连续监测方法,是因为“肝生气血”^[17]。肝藏血是血气化生的基础和保障,是血液营养物质合成交换的物质基础。由实验中的具体操作,联想迁移到“肝为血海”“肝受血而能视”等中医理论,在实验动物学教学过程中更加激发了学生们的兴趣。

再如,给学生开设“生大黄、制大黄对小鼠泻下作用比较研究”的实验中,实验方法要求试验当日小鼠禁食但不禁水。学生在实验过程中意外发现,其他实验参数不改变的情况下,动物禁食 24 h 或者仅禁食 4 h 但有少量取血操作后所得到的结论与原有实验设计的结论相差较大,以泻下功效著称的生大黄促泻作用反而不如生理盐水组。学生们推测,禁食 24 h 或在少量取血后可能会导致中医理论的“虚证”,而“虚证”可能会使胃肠排空减慢。而生理盐水在动物“虚”的情况下正好补充血容量、供给电解质,维持体液张力,较快地恢复原有肠道功能。这样与中医理论相联系的动物实验激发和培养了学生的创新和拓展思维。

4 探讨教育——动物模型的中医考量

动物实验所呈现的客观数据,能揭示事物本质,因而具有其科学性。对于中医药专业学生的培养,在他们迈入科研殿堂之初就能够具有科学合理地运用现代实验方法的意识,利用动物和人所具有

的生理、病理共性,模拟中医病因病机理论来建立动物模型,就可以从现代分子、细胞、组织学等各个层次揭示中医理论的实质,补足中医临床客观化指标不足的短板,加速中医药现代化,促进中医药走向世界^[18]。

在中医药院校本科生中开设的实验动物学选修课中,我们选取了“独参汤对小鼠游泳时间的影响”“独参汤对小鼠耐常压缺氧的作用”两个实验并进行合并。教学目的旨在学生掌握实验动物抓取、保定、灌胃等初步操作。因操作简单、模型易控、结果明显,深受低年级学生欢迎。在此基础上,激发起学习兴趣和动手能力强的学生则通过开放性实验进行不断改进、验证。对实验造模条件,如游泳时给水的深浅、耐常压缺氧的容器大小,对其他中草药或组方、或炮制方法或给药时间等进行摸索,根据所得结论进行深入思考,学习效果尤为明显。

将中医动物模型的建立引入实验动物研究生教学初期,曾经有争议地开设过“艾叶注射法建立肝郁证动物模型”的论证。将小鼠腹腔注射 50% 的艾叶注射液,隔日 1 次。在注射第 45、60 天后取动物大脑皮层、丘脑、肝等组织做各类检测^[19]。这种单纯的复制模型法是否真的能与中医的肝郁证所匹配?学生们在进行深入思考后认为,根据中医基础理论,肝郁证是中医情志致病的证候。尽管艾叶可引起小鼠活动量增加,表现出兴奋、易撕咬等情况,但其症状并不能套用情志“怒”的表现,所形成的证候也不能完全代表肝郁证^[20]。并且过量应用艾叶引起的中毒性肝炎与中医临床肝郁证也相去甚远。近年,越来越多的情志相关证候研究将禁食、禁水、冰水游泳、热环境、水平震荡、夹尾刺激、昼夜颠倒等负性刺激联合呈现,或将药物结合上述刺激用以建立肝郁模型^[21]。让学生深刻体会到建立中医情志动物实验模型时,也需要基于情志理论内涵,不能一味追求表征。

中医模型所采用的方法及模型动物所表现出来的症状、体征是否是中医的“证”,是否符合中医理论的本质内涵。这虽然是中医资深专家们对使用动物模型研究中医理论一直延续的争议,但学生们参与其中的探讨却可能引发多角度、深层次的思考。这种不固守、敢突破的思考也能激发和培养学生的创新和拓展思维。

5 启发教育——实验动物的种属选择

实验动物的种属差异在动物实验初始设计阶

段就是不容忽视的。中医古籍《续医说》“鱼食巴豆而死,鼠食之而肥,类不可必推。”在相同的实验条件和环境下,不同种属的实验动物可能会存在较大差异。这种差异可能会影响到中药药效与毒性的发挥,引起中药药物代谢方式和代谢速率的改变,并对中医动物模型成功与否起到关键作用^[22]。这些实验动物学理论教授给学生,同时也让学生在实验教学课堂上亲手验证。

同样是在开设的“生大黄、制大黄对小鼠泻下作用比较研究”的实验中,在通过小鼠实验验证了生大黄的泻下作用确实优于制大黄的基础上,又给学生提供了大鼠和豚鼠,启发学生进行 3 种动物的“离体肠平滑肌对比实验”。学生们检测到相同的生大黄水煎液对大、小鼠离体回肠平滑肌产生松弛作用,而对豚鼠则产生明显的收缩作用。

由此,在“实验动物的选择和应用”这个章节的讲解中,除了教师将常规的动物选择原则讲深讲透外,还启发学生将动物各自特点带入中医药动物模型进行思考。总结既往中医药研究中实验动物的选择经验:“卫气营血”“血瘀”模型可选用大鼠、家兔;“寒证”“热证”模型选用雌性大鼠;“血虚”“脾虚”模型选用雄性大鼠或小鼠;“阳虚”“阴虚”模型选用雄性小鼠;“气虚”模型可选用家兔等^[6]。我们希望在今后的实验动物学的教学课堂下,学生们能查阅文献,综合分析;课堂上则陈述理由,展开讨论,验证前人们的宝贵经验。这种启发加验证式教育无疑激发和培养了学生的创新和拓展思维。

6 延展教育——新发展方向的指导引领

新兴发展的模式动物因与人类疾病的各个方面相似,被广泛应用于生物分析、表型分析及药效分析与评价等领域。斑马鱼是一种被广泛用作生理学、毒理学及分子遗传学研究的脊椎类模式动物^[23]。斑马鱼实验动物模型,具有筛选周期短、胚胎透明易观察、用药量少且实验简单等特点,并且适宜观察活体状态下药物的作用状态,较为直观地评估药物的治疗作用、毒性作用及不良反应等^[24]。斑马鱼的研究已延伸和扩展到中医药领域,特别是对具有多靶点、多途径、多环节作用的传统单味中药、复方和中成药等药效物质的筛选^[25]。伴随基因编辑动物模型技术日新月异,基因打靶、基因捕获、基因敲除等技术应用也越来越广泛。对于医药学学生而言,普及基因编辑技术原理、基因编辑动物

模型在医学研究中的应用知识是大有裨益的。

在教学过程中,教师及其团队的研究课题及研发成果也会作为新方向、新进展提供给学生进行讨论。例如,将湖北省科技厅实验动物资源开发及利用项目“便携式纳米膜富集泵生物气溶胶自动监测联动防控”中装备研制及数据检测融入于“实验动物环境与质量控制”章节;将湖北省高等学校实验室项目“高校实验室生物安全装备探索研究”融入于“动物实验与生物安全”章节。在承担中医药发展联合基金项目——“阳起石温肾壮阳物质基础及安全性评价”过程中,引导学生进行中药毒理学的开放性实验,促进学生从动物选择、伦理要求、实验条件、结果评估等多方面理论到实践的综合跨越。

将实验动物学相关的新技术、新领域引入到学生的综合性和创新性实验教学,既体现该学科教学内容的前瞻性,也激发了学生的创新和拓展思维。

7 结语及展望

实验动物学作为医学院校重要的应用基础学科,其教学质量对学生的科研创新能力和实践动手能力有着重要影响。通过对课程建设的思考与探索,我们发现:在教学思路中采用先进的理念和方法,能充分培养学生自主学习以及分析、解决问题的能力;在教学内容中融入学科前沿知识,可激发学生兴趣并加深对理论知识的理解;在实验课程中优化并规范动物实验的操作,不仅可以让学生懂得如何获取稳定、可靠的实验数据,还能强化学生对动物福利和伦理的认识^[26]。另一个方面,作为推进中医药现代化发展的重要手段,实验动物学在中医药教育,尤其是中医药研究生教育中的作用尤为突出^[27]。中医药院校应结合自身特点,着力于中医特色创新教育。通过更优质的特色教育、创新教育,为祖国医学的发展提供坚实保障,为传统医学的传承培养新型人才。

参考文献:

[1] 秦川. 医学实验动物学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
QIN C. Medical laboratory animal science [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008.

[2] 吴艳玲, 张先, 崔振宇, 等. “双一流”模式下高校研究生实验动物学课程教学模式探索 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(11): 111-114.
WU Y L, ZHANG X, CUI Z Y, et al. Exploration of a teaching model of laboratory animal science for postgraduates under the “Double First Class” [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(11):

111-114.

[3] 孟寒, 张兆南, 杨子豪, 等. 基于“新三中心”的医学实验动物学教学模式创新 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 90-94.
MENG H, ZHANG Z N, YANG Z H, et al. Teaching method innovations in medical laboratory animal science under the “new three centers” education concept [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 90-94.

[4] 徐云浩, 王洋, 丁珊珊, 等. 中医科研现代化的系统反思 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(1): 34-38.
XU Y H, WANG Y, DING S S, et al. Systematic reflection on the modernization of traditional Chinese medicine scientific research [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 38(1): 34-38.

[5] 陈民利, 苗明三. 实验动物学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2020.
CHEN M L, MIAO M S. Laboratory animal science [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2020.

[6] 杨镇源. 也谈实验动物学与中医药学的关系 [J]. 光明中医, 2007, 22(8): 7-8.
YANG Z Y. Talking about the relationship between the laboratory zoology and Traditional Chinese Medicine and Pharmacy [J]. Guangming J Chin Med, 2007, 22(8): 7-8.

[7] 王思成, 杨龙会, 邹移海, 等. 中医理论基础研究中动物实验若干问题的探讨 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(4): 286-288.
WANG S C, YANG L H, ZOU Y H, et al. Discussion on some questions about animal experiments in basic research on theories of Chinese medicine [J]. J Basic Chin Med, 2010, 16(4): 286-288.

[8] 李伊为, 张延英. 实验动物学 3 版 [M]. 北京: 科学出版社, 2022.
LI Y W, ZHANG Y Y. Laboratory animal science 3rd edition [M]. Beijing: Science Press, 2022.

[9] 李磊, 周智豪, 訾明杰, 等. 中医药研究中存在的实验动物伦理问题 [J]. 中医杂志, 2021, 62(10): 833-836.
LI L, ZHOU Z H, ZI M J, et al. Problems of animal ethics in conducting Chinese medicine experimental researches [J]. J Tradit Chin Med, 2021, 62(10): 833-836.

[10] 张慧楠, 刘丹, 李明凯, 等. 动物伦理教育在基础医学综合实验教学中的应用 [J]. 中国医学伦理学, 2017, 30(11): 1387-1390.
ZHANG H N, LIU D, LI M K, et al. Application of animal ethical education in comprehensive experimental teaching of preclinical medicine [J]. Chin Med Ethics, 2017, 30(11): 1387-1390.

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

[12] 孙江, 何力. 我国动物福利立法价值初探 [J]. 理论导刊,

- 2008, 29(11): 38-40.
- SUN J, HE L. A preliminary study of the value of animal welfare legislation in China [J]. J Social Theory Guide, 2008, 29(11): 38-40.
- [13] 曹伟玲. 医学生动物实验伦理行为影响因素研究——基于理性行为理论和社会认知理论整合的视角 [J]. 医学与哲学, 2022, 43(13): 36-42.
- CAO W L. Research on influencing factors of medical students' ethical behavior in animal experiment—based on the integration of rational behavior theory and social cognitive theory [J]. Med Philos, 2022, 43(13): 36-42.
- [14] 雷宣, 明湘怡, 杨晗, 等. 某高校医学生实验动物伦理认知态度的十年对比研究 [J]. 中国医学伦理学, 2022, 35(5): 533-537.
- LEI X, MING X Y, YANG H, et al. A ten-year comparative study on ethical cognition of experimental animals among medical students in a university [J]. Chin Med Ethics, 2022, 35(5): 533-537.
- [15] 敬文宪, 张伶俐. 肿瘤研究中的实验动物福利问题探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(9): 1234-1240.
- JING W X, ZHANG L L. Discussing the welfare of laboratory animals in tumor research [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(9): 1234-1240.
- [16] 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.
- [17] 袁秋全, 代喜平. 试论《内经》“肝生血气”理论对血证从肝辨治的启示 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(1): 168-169.
- YUAN Q Q, DAI X P. Implications of the theory of “the liver generates blood and qi” of the Neijing on the treatment of blood syndrome from the liver [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2019, 30(1): 168-169.
- [18] 时文远, 施斌, 袁朵, 等. 建立中医动物模型的思考 [J]. 中医学报, 2015, 30(1): 65-67.
- SHI W Y, SHI B, YUAN D, et al. Thinking of establishing animal model of TCM [J]. Acta Chin Med, 2015, 30(1): 65-67.
- [19] 彭成. 中医药动物实验方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- PENG C. Methods of animal experimentation in Chinese medicine [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008.
- [20] 彭新, 徐晟翔, 尹玉芳, 等. 中医情志研究动物实验模型的思考 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(8): 1174-1175.
- PENG X, XU S X, YIN Y F, et al. Reflections on animal experimental models for the study of emotions in traditional Chinese medicine [J]. J Basic Chin Med, 2017, 23(8): 1174-1175.
- [21] 张晓龙. 肝郁证动物模型实验研究评述 [J]. 中医学报, 2016, 31(3): 398-401.
- ZHANG X L. Review of experimental animal model of liver depression syndrome [J]. Acta Chin Med, 2016, 31(3): 398-401.
- [22] 沈阳, 王丽娜, 殷子斐. 实验动物种属差异性对中医药研究的影响 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(9): 152-154.
- SHEN Y, WANG L N, YIN Z F. Effect of species difference of experimental animals on traditional Chinese medicine research [J]. Chin Med Mod Distance Educ China, 2020, 18(9): 152-154.
- [23] 王洁, 冯驰, 董武, 等. 斑马鱼肝纤维化动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(4): 531-540.
- WANG J, FENG C, DONG W, et al. Application and progress of zebrafish in the study of liver fibrosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(4): 531-540.
- [24] 刘晓金, 高燕, 丁晓彦, 等. 模式生物斑马鱼在中医药研究应用及安全评价现状 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(7): 1641-1643.
- LIU X J, GAO Y, DING X Y, et al. Zebrafish model organism in research of Chinese medicine and safety evaluation [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2016, 34(7): 1641-1643.
- [25] 王成, 龚莉虹, 郭朝成, 等. 模式生物斑马鱼在中药药效物质筛选中的应用进展 [J]. 中草药, 2019, 50(24): 6125-6134.
- WANG C, GONG L H, GUO C C, et al. Application progress on model organism zebrafish in screening of pharmacodynamic substances of Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(24): 6125-6134.
- [26] 石晓静, 杜春燕, 朱奎成, 等. 医学实验动物学教学改革探索 [J]. 基础医学教育, 2021, 23(11): 804-806.
- SHI X J, DU C Y, ZHU K C, et al. Exploration on teaching reform of medical laboratory animal science [J]. Basic Med Educ, 2021, 23(11): 804-806.
- [27] 王灵芝, 赵丕文, 张硕峰, 等. 关于中医药院校实验动物学课程改革的几点思考 [J]. 山东农业工程学院学报, 2020, 37(10): 180-183.
- WANG L Z, ZHAO P W, ZHANG S F, et al. The course reform of laboratory animal science in Chinese medicine colleges [J]. J Shandong Agric Eng Univ, 2020, 37(10): 180-183.

[收稿日期] 2023-07-27

田雪梅,久保幸子,吴英杰,等. 极端动物保护主义与实验动物福利伦理 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 106-112.
Tian XM, Sachiko KB, Wu YJ, et al. Extreme animal protectionism and experimental animal welfare ethics [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 106-112.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.012

极端动物保护主义与实验动物福利伦理

田雪梅¹, 久保幸子², 吴英杰², 苏涛^{2*}

(1. 山东第一医科大学附属省立医院 教育处, 济南 250021;
2. 山东第一医科大学附属省立医院 模式动物研究所, 济南 250021)

【摘要】 实验动物作为“活的试剂”, 推动了生命科学和医学的飞速发展, 其福利伦理问题日益受到社会各界的关注。实验动物福利伦理不仅是动物保护主义的重要组成部分, 也对于保障实验动物的权益、促进科学研究的合理性与道德性具有重要意义。然而, 在动物保护主义的演变过程中, 极端动物保护主义作为一种偏激的观点和理论逐渐浮现。本文旨在从实验动物福利伦理的视角出发, 总结动物保护主义的主要理论和实验动物福利伦理的发展历程; 分析极端动物保护主义的主要问题; 并针对我国实验动物福利伦理的现状提出建议, 以期为我国的实验动物福利伦理实践和制度建设提供参考。

【关键词】 实验动物福利; 伦理审查; 动物保护主义; 制度建设

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0106-07

Extreme animal protectionism and experimental animal welfare ethics

TIAN Xuemei¹, SACHIKO Kubo², WU Yingjie², SU Tao^{2*}

(1. Department of Education, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, China.
2. Model Animal Institute, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021)

【Abstract】 Experimental animals as living reagents promote the development of life science and medicine, and draw public attention to the welfare ethics of experimental animals. Experimental animal welfare ethics is important for animal protection and plays an important role in protecting the rights and interests of experimental animals and promoting the rationality and morality of scientific research. However, during the evolution of animal protectionism, some extreme theories, such as extreme animal protectionism, have also emerged. This article summarizes the main theories of animal protectionism and the development of animal welfare ethics, and analyzes the main problems of extreme animal protectionism. This article expounds on the present situation and problems of experimental animal welfare ethics and puts forward some suggestions to promote the practice of experimental animal welfare ethics to provide references for our country's experimental animal welfare ethics practice and system construction.

【Keywords】 experimental animal welfare; ethical review; animal protectionism; institutional construction

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

实验动物是指经过人类长期驯化, 按科学要求定向培育, 对其携带的微生物实行控制, 遗传背景明确或者来源清楚的, 用于教学、生产、检验及科学

研究的动物, 被称为“活的试剂”^[1]。实验动物福利伦理是从道德层面审视实验动物是否以及如何获得道德对待和道德关怀, 并约束和规范人类对实验

【基金项目】 科技部重点研发计划项目课题 (2021YFF0702102); 山东省立医院科研孵育基金 (2023FY044)。

【作者简介】 田雪梅 (1967—), 女, 副研究员, 研究方向: 医学科技教育管理。E-mail: tianxuemei@sdfmu.edu.cn

【通信作者】 苏涛 (1990—), 男, 助理研究员, 研究方向: 实验动物福利伦理。E-mail: 15607126210@163.com

动物的使用行为^[2-3]。实验动物属于动物的一个子集,因此在广义上,实验动物福利伦理也属于动物保护主义的一部分。动物保护主义于 20 世纪 60 年代在西方国家首先发展起来^[4];在社会层面上,公众保护动物的思潮和行为逐渐自发产生;在理论构建方面,动物伦理的研究也日益兴盛,出现了多种影响深远的理论与学说。而随着生命科学和医学的飞速发展,对实验动物的需求和使用以及由此而引发的对实验动物福利伦理的关注和重视也与日俱增。但在动物保护主义的演化过程中,极端动物保护主义作为一种偏激的观点和理论逐渐浮现,他们主张动物与人类拥有完全相同的权利,强制要求他人遵守自己认定的对待动物的“道德规范”,主张彻底停止使用实验动物并付诸实践。例如 2004 年美国爱荷华大学实验室,遭极端动物保护主义成员潜入,放跑了大量实验动物,造成了超 50 万美元的经济损失和潜在的生态危机。因此正确看待动物保护主义和实验动物福利伦理,发展具有中国特色的实验动物福利伦理审查和实践关系到我国生命科学和医学的正常发展,也关系到每个人的生命健康利益。本文将从实验动物福利伦理的视角总结动物保护主义的主要理论和实验动物福利伦理的发展历程;分析极端动物保护主义的主要问题;并针对我国实验动物福利伦理的现状提出建议,以期为我国的实验动物福利伦理实践和制度建设提供参考。

1 动物保护主义的主要理论和制度发展

在西方国家,关于动物保护主义的萌芽最早可以追溯到古希腊和古罗马时期哲学家关于非人类存在的法律思考^[5]。然而,随着基督教的兴起,人类中心主义思潮开始占据主导地位,动物被视为由上帝创造并受人类支配的物品^[6]。直到文艺复兴时期以及思想启蒙时期,仁慈主义慢慢成为了主流思潮。强调对动物的关爱和同情,这一时期,人们对动物福利的关注逐渐增加,并开始呼吁限制对动物的残忍行为。20 世纪 60 年代以来,人类进一步从伦理道德层面重新审视人与动物的关系,并逐渐形成了多种动物保护理论^[7](表 1):(1)动物同情论,主要主张从人类的伦理道德方面,反对肆意虐待动物。该理论认为仁慈对待动物也是人类的一项道德要求,并将动物保护融入到人类原有的伦理道德体系中,在符合人类利益的同时,也兼顾了对动物的保护,体现了人与动物和谐共存的思想。由于其相对保守并容易被大众接受,受到了广泛的传播。(2)动物福利论,主张认为脊椎动物相较于无脊椎动物具有复杂的中枢神经系统,能够表现出自我意识^[8],因此人类应该给予其一定的伦理地位,保证动物的基本权利,即动物应享有不受饥渴,免于不适、恐惧和焦虑,表达天性,以及不受痛苦、伤害和疾病的自由和权利^[9]。动物福利论将动物的伦理地位建立在其感知能力上,以动物本身为出发点,不反对合理使用动物,而是强调在这一过程中

表 1 动物保护理论的主要观点
Table 1 Main viewpoints of animal protectionism theory

理论 Theory	出发点 Start	动物伦理地位 Ethical status	对待动物的态度 Attitudes to animals	人与动物关系 Human and animal relationships
动物同情论 Animal compassion theory	人类伦理道德 Human ethics and morality	无伦理地位 No ethical status	仁慈对待动物,反对肆意虐待动物 Treat animals with kindness and oppose wanton cruelty to animals	人与动物和谐共存 Humans and animals coexist in harmony
动物福利论 Animal welfare theory	动物具有复杂神经和自我意识 Animals have complex nerves and self-awareness	具有一定的伦理地位 A certain ethical status	合理使用动物,保障动物基本权利 Rational use of animals and protect the basic rights of animals	维护人类合理利益,保证对动物的道德情感诉求 Protect the reasonable interests of human and ensure the moral and emotional appeal to animals
动物解放论 Animal liberation theory	以动物为出发点 Take the animal as the start	具有伦理地位 A certain ethical status	反对任何伤害动物的行为 Oppose any behavior that harms animals	强制性限制人类对于动物的利用 Mandatory restrictions on human use of animals
动物权利论 Animal rights theory	以动物为出发点 Take the animal as the start	与人类相同的伦理地位 Same ethical status as humans	反对一切使用动物的行为 Oppose all use of animals	从道德角度将人与动物平等的放置在一起 Animals and human are regarded as the same in moral terms

要平衡人类经济利益合理性和对动物的道德关怀,因此受到了世界多数国家的采纳,进入到动物保护的法律中。(3) 动物解放论,主张将道德关怀拓展到所有动物之上,要求将动物感知到的痛苦与人类遭受的痛苦平等地加以考虑,反对任何伤害动物的行为,主张素食主义。从这一理论开始,逐步主张强制性限制人类对于动物的利用,动物伦理地位也在逐渐上升。(4) 动物权利论,主张动物具有感知痛苦的能力,应具备与人一样的伦理道德地位,要求完全废除对动物的一切使用,也包括科学研究中使用的实验动物,从道德角度将人与动物平等的放置在一起,这也是极端动物保护主义的重要思想来源之一。

随着动物保护理论的兴起,西方国家关于动物保护的法律和制度建设也逐渐兴起,1822 年英国出台了关于动物福利伦理的《禁止虐待家畜法令》(马丁法案),这是世界上第一部关注和保障动物福利的法案^[10],他规定了动物不应受到不必要的痛苦和折磨,为后来的动物保护法律奠定了基础。到了 19 世纪后期,民众也将对动物的伦理关怀扩展到实验动物领域,第一部规定科学研究中实验动物福利伦理的法案,《科学研究动物法案》在英国也应运而生。时间到了 1966 年,美国出台了世界上第一部完整的关于实验动物福利伦理保障的《实验室动物福利法》,这部法律对实验动物的使用、护理和福利做出了详细的规定,并要求科研机构制定实验动物福利政策和程序。自此之后,西方众多国家都陆续建立了实验动物福利法律体系。随着几十年实验动物福利伦理实践的不断发展,3R 原则(Replacement 替代,Reduction 减少,Refinement 优化)已为国际上科研工作者所广泛接受^[11]。替代(Replacement)是指如果有其他替代动物实验的方法,应尽量避免使用动物,包括绝对替代(用组织学实验代替整体动物实验,人工合成材料替代动物实验,用物理、化学和信息技术方法代替实验动物的使用等),以及相对替代(进化程度低等的动物代替高等的动物,小动物代替大动物)。减少(Reduction)是指在不增加动物疼痛的前提下,减少使用动物数量获取相对等的信息。这要求科研人员对实验设计方案、数据分析统计方法进行优化,应用更新的技术,达到动物使用数量的最少化。优化(Refinement)是指应优化实验动物的饲养方式和实验过程,尽量减少非人道程序的影响范围和程度。在动物正常状态下取得

真实可靠的实验数据。同时,避免或减轻给动物造成额外的疼痛和紧张不安。通过推行实验动物福利伦理实践,科研人员更加注重减少对动物的伤害和痛苦,确保科学研究的合理性和道德性。这些实践也反映了科学界对于动物保护主义的共识,即科学研究和动物保护并不矛盾,而是可以相互促进。通过推行实验动物福利伦理,科研人员可以更好地保障动物的福利,同时也能够促进科学研究的进展。

2 极端动物保护主义及其主要问题

在动物保护主义的演化过程中,极端动物保护主义作为一种偏激的观点和理论逐渐浮现,他们主张动物与人类拥有完全相同的权利,强制要求他人遵守自己认定的对待动物的“道德规范”,主张素食主义,也主张彻底停止使用实验动物。极端动物保护主义的极端性表现在它对动物权利的绝对主张,以及对于任何以牺牲动物福利为代价的人类活动的反对,主要存在以下几点最突出的问题:(1) 将个人主张凌驾人权、法律、道德之上。极端动物保护主义者局限于自身的“正确理论”中,通过多种方式强迫他人认同自身的观点,过分强调对动物的保护而忽视人类的权益,将个人主张凌驾人权、法律、道德之上,导致产生众多违法行为。例如美国旧金山“动物爱护组织”中餐馆抢夺食用鸡;我国玉林狗肉节“动物爱护者”打砸摊位等。这种忽视人权、法律、道德的方式,不仅对动物福利的实践毫无帮助,也严重破坏社会秩序,触犯法律红线。(2) 隐蔽性高,会以偏概全发布误导性错谬信息造成社会恐慌。极端动物保护主义者常通过偷换概念、以偏概全、编造事实等方法,发布误导性错谬信息,几张煽情的图片和挑动人善心的言辞就能引发大规模的声讨和谴责,最终达成其个人目的。例如国内近期社会热点烈性犬咬伤女孩事件,部分宠物饲主利用往年新闻甚至于境外新闻,大肆传播对从各处拼凑出来的对狗进行扑杀的画面,搭配编造的“感人”故事,煽动民众对抗对烈性犬合理合法收容,不仅误导民众而且忽视了法律法规,更忽视了现实中受害者遭受的苦难,引起了网络舆论的巨大争议和论战。这样的错谬信息极易误导大量动物知识浅薄的民众,特别是青少年,近年来发生的因拦路抢劫救狗、盲目放生造成物种入侵、恶意抨击小众群体如爬宠玩家等的新闻事件中,不少肇事者都是 18 岁以下的青少年。(3) 保护主体过于泛化。极端动物

保护主义者践行动物权利论,在伦理道德角度将一切动物看做与人类平等的地位,不切实际的要求停止一切动物的使用,包括与人类社会接触频繁,依赖人类饲养繁衍的畜禽、宠物、实验动物等。这种过分强调对动物的保护,不仅使这些依赖人类饲养管理的动物失去生存条件,同时也忽视了人类利益,容易激化社会矛盾,反而不利于动物保护的实践。(4)只从自身情感出发,忽视科学规律和基本的科学知识。极端动物保护主义者主张素食主义,丝毫不考虑人类对优质动物蛋白的需求,一些西方企业也借机推行其“素食人造肉”等概念,违背人类基本的营养学概念。此外,部分以宠物饲主为代表的极端动物保护主义者,缺乏基本的科学知识和批判性思维能力,一方面要求给予动物与人类一致的权利,另一方面强迫动物进行违反本能的改造,例如强迫猫、狗等肉食动物素食,这些行为实际上是侵害动物福利的行为。同时他们也不考虑科学研究的客观规律,主观要求停止一切动物实验,这也为生命科学和医学的发展带来潜在的阻碍,例如前文提到的美国爱荷华实验室事件,实验动物被释放到野外环境,不仅给科学研究带来巨大损失,更带来了潜在的生态危机。相比之下,实验动物福利伦理相对于极端动物保护主义更具有科学性和可实践性,他并不是要求完全不使用动物,而是希望优化实验方案、改进实验步骤和规范实验操作,同时也能保证实验数据的可靠性、准确性和科学性。又能实现保护实验动物的目标(表2)。

3 我国实验动物福利伦理实践现状及存在的问题

道德不存在强制性,因此只从伦理道德角度呼吁实验动物福利伦理是远远不够的,必须由国家/

行业协会推进相关的法律、法规的制定,才能规范和制约实验动物从业人员的行为。在我国,实验动物福利伦理相关的实践和制度建设起步较晚,与国际接轨仍有待逐步推进。尽管如此,我国已经颁布了一系列法律法规来加强实验动物福利伦理的管理。1988 年颁布的《实验动物管理条例》首次规定了从事实验动物工作的人员对实验动物必须爱护,不许戏弄或虐待^[12]。随后国家相继出台了《关于善待实验动物的指导性意见》^[13]、《实验动物福利伦理审查指南》^[14]、《实验动物 动物实验方案审查方法》^[15]等国家标准和行业标准(表3),这些标准和制度的建立必将显著推动我国实验动物福利伦理的规范化管理,有力保障我国实验动物行业的健康发展^[3]。

随着近几十年生命科学和医学研究的快速发展,实验动物福利伦理实践在取得长足进步的同时,也暴露出一些亟待解决的问题:(1)国家层面的立法有待完善。前文中提到我国颁布了多个动物福利伦理相关的法规和标准,但存在权威性和可操作性不足的问题:相关立法多以生物安全和保障人类权益作为出发点,对动物福利保护的立场不够充分;已出台的规章制度内容较为模糊,缺少具体的实施细则和考核标准,导致可操作性差;立法层次较低,更多的是国家/行业标准,缺少必要的强制性,对虐待实验动物的人员处罚力度不足。(2)从业人员缺少必要专业知识,动物福利观念淡薄。目前从事实验动物行业的专业人员较少,大部分从业人员专业背景复杂,涉及医学、化学、药学、兽医学、生命科学等多种学科,缺乏对实验动物相关国家政策及国家标准的系统性学习;个别单位的主管领导动物福利观念淡薄,不重视也无法制定科学的实验

表 2 实验动物福利伦理与极端动物保护主义对比
Table 2 Comparison between experimental animal welfare ethics and extreme animal protectionism

理论 Theory	对待动物的态度 Attitudes to animals	对待人类的态度 Attitudes to human	是否被民众接受 Whether accepted by people	能否保护实验动物 Whether protect experimental animals
实验动物福利伦理 Experimental animal welfare ethics	合理使用动物,保障动物基本权利 Rational use animals and protect the basic rights of animals	保护人类合理利用动物权利 Protect human rights to rational use of animals	容易被民众接受 Accepted by people	有法律制度保证,能有效保护实验动物基本权益 Laws protect the basic rights and interests of experimental animals
极端动物保护主义 Extreme animal protectionism	反对一切使用动物的行为 Oppose all use of animals	无视人类权益 Disregard for human rights	被少数人群接受,引起巨大争议 Accepted by a minority of people and cause great controversy	不具有科学性和可操作性,无法保护实验动物 No scientific and operable, and cannot protect experimental animals

表 3 实验动物福利伦理相关法规
Table 3 Regulations on experimental animal welfare ethics

法规 Regulations	颁布机构 Promulgating agency	法规编号 Numbers	法规等级 Grade of regulation
实验动物管理条例 Regulations on the management of experimental animals	国家科学技术委员会 State Scientific and Technological Commission	Gkfcz [1988] No. 2	国家行政法规 State administrative regulations
关于善待实验动物的指导性意见 Guidance on the treatment of experimental animals	国家科学技术委员会 State Scientific and Technological Commission	Gkfcz [2006] No. 398	国家行政法规 State administrative regulations
实验动物机构 质量和能力的通用要求 Laboratory animal institutions—General requirements for quality and competence	国家质量监督检验检疫总局 国家标准化管理委员会 General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine Standardization Administration	GB/T 27416-2014	国家标准 National standards
实验动物 福利伦理审查指南 Laboratory animal—Guideline for ethical review of animal welfare	国家质量监督检验检疫总局 国家标准化管理委员会 General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine Standardization Administration	GB/T 35892-2018	国家标准 National standards
实验动物 环境及设施 Laboratory animal— Environment and housing facilities	国家质量监督检验检疫总局 国家标准化管理委员会 General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine Standardization Administration	GB-14925-2010	国家标准 National standards
动物实验人道终点评审指南 Guideline of assessment for humane endpoints in animal experiment	国家认证认可监督管理委员会 National Certification and Accreditation Administration	RB/T 173-2018	国家标准 National standards
实验动物 动物实验方案的审查办法 Laboratory animal—Methodology for the review of animal experimental protocols	中国实验动物学会 Chinese Association for Laboratory Animal Sciences	T/CALAS 52-2018	行业标准 Industry standards
实验动物 安乐死指南 Laboratory animal—Guidelines for euthanasia	全国实验动物标准化技术委员会 National Technical Committee for Standardization of Laboratory Animals	GB/T 39760-2021	国家标准 National standards

动物管理和伦理审查机制。(3) 动物伦理审查制度执行不严格。目前许多高校、医院、科研机构均设立了动物实验伦理委员会和动物实验伦理审查制度,这体现了我国实验动物福利伦理实践取得了重大的进步。但是也存在伦理审查制度执行不严格的问题,许多科研人员对动物实验伦理审查的认识不到位,经常出现“先实验,后申请审查”的问题,使动物实验伦理审查流于形式。(4) 动物伦理审查缺少全程监督。目前的动物伦理审查主要局限于实验开展前,对于实验进行中和实验完成后的监督非常有限。同时缺少必要的处罚措施,无法督促从业人员严格按照规定进行动物实验。(5) 对公众的宣传不足。目前民众对动物保护主义日益重视,相关的讨论也在日益增多。随着实验动物使用量的增加,关于实验动物福利伦理的矛盾和争议更加凸

显,常有民众提出是否有必要牺牲如此多的动物才能推动人类的生命科学和医学的进步。但目前实验动物从业人员对公众的宣传和科普是极其有限的,无法使民众了解动物实验的必要性以及我国实验动物福利伦理实践取得的进步,从而使民众容易受到极端动物保护主义的影响,无法科学地看待动物实验。以上这些问题,严重制约了我国实验动物福利伦理实践的发展。

4 推进实验动物福利伦理实践的建议

为了更好地推进我国实验动物福利伦理实践,笔者提出如下建议:(1) 加强从业人员教育与培训:实验动物从业人员主要包括实验动物管理者、科研人员、实验动物饲养维护人员以及研究生等,应实行准入制度,定期开展实验动物福利伦理培训,培

训通过考核合格后才可开展动物实验;培养从业人员动物福利意识,避免将实验动物看做单纯的研究工具;加强从业人员专业技术的培训,包括但不限于动物的抓取、保定、给药、手术、麻醉、安乐死、人道终点判断等,减少实验动物在饲养管理和实验过程中遭受的痛苦;科研人员应遵循 3R 原则,科学合理地设计实验方案,避免过多使用实验动物的情况出现;国内开设实验动物专业的高校还较少,专业人才较为稀缺,随着国家生命科学和医学科研水平的不断提高,对实验动物专业人才的需求也日益增大,应重视相关人才的培养。(2)全面成立实验动物管理委员会和实验动物伦理委员会:实验动物管理委员会和实验动物伦理委员会作为实验动物福利伦理实践的管理者,负责实验动物伦理审查、监督、批准,对本机构人员进行定期的动物伦理培训,针对本机构实际情况,提出实验动物伦理相关的意见和建议。根据张雷等^[16](2022 年)的研究,伦理委员会成员应具有较高的知识层次和较高的伦理认知水平,同时也应系统性地接受动物伦理培训。同时应该完善配套的制度和法规,强化伦理委员会委员的伦理认知,增强伦理委员会履行职责能力。(3)加强伦理审查后的全程监督,建立惩戒机制:目前许多机构设立了动物伦理审查机制,但主要局限于实验开展前,应建立伦理审查相关配套制度,重视对实验过程的检查和监督,规范手术、麻醉、人道终点判断、安乐死、动物尸体处理等环节^[17]。根据苏美洋伊等^[18](2023 年)的研究,可通过构建实验动物福利伦理审查质量评价指标体系,对各机构动物伦理审查的质量和水平进行评价,对严重违反动物福利伦理的机构和个人,建立惩戒机制,从而进一步保障伦理审查的规范化和严肃性。(4)提升兽医的地位和工作水平:兽医是动物运输、饲养、环境管理、安乐死的直接参与者,其主要职责贯穿了实验动物使用的全部环节,兽医的专业度和工作能力直接关系到动物福利伦理实践的水平。各机构的管理者应认识到兽医的重要性,在其履行职责的过程中提供支持和授权。兽医工作者也应提升自我专业能力和动物伦理意识,为实验动物谋求福利和尊重。(5)加强公众宣传:随着国家社会的不断发展,动物保护主义在民众中也逐渐获得了广泛的认可和支持,实验动物行业和机构应利用此机会,通过传统媒体、新媒体加强实验动物福利伦理的宣传,避免使极端动物保护主义等非科学理论占据輿

论高地。

5 小结

实验动物福利伦理在广义上属于动物保护主义的一部分,但与极端动物保护主义相比,实验动物福利伦理更能在推动生命科学和医学发展、保障人类权益的同时,减少实验动物所遭受的痛苦,也更具有可操作性和实际意义。正确认识实验动物福利伦理,通过加强立法、完善制度、提高从业人员素质、加强全程监督以及对公众进行宣传和教育,才能发展具有中国特色的实验动物福利伦理审查机制,不断推进实验动物福利伦理实践。

参考文献:

- [1] 秦川. 中华医学百科全书:医学实验动物学 [M]. 北京:中国协和医科大学出版社, 2018.
QIN C. Chinese medical encyclopedia: medical laboratory animal science [M]. Beijing: China Union Medical College Press, 2018.
- [2] MACARTHUR CLARK JA, SUN D. Guidelines for the ethical review of laboratory animal welfare People's Republic of China National Standard GB/T 35892-2018 [J]. Animal Model Exp Med, 2020, 3(1): 103-113.
- [3] 王贵平,周正宇. 关于我国实验动物福利伦理的思考及建议 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 683-689.
WANG G P, ZHOU Z Y. Reflections and suggestions on the ethics and welfare of laboratory animals in China [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 683-689.
- [4] 黄术兵. 中西实验动物伦理和福利发展比较研究 [J]. 医学与哲学, 2020, 41(17): 33-38.
HUANG S B. Comparative study on ethics and welfare of laboratory animals between China and the west countries [J]. Med Philos, 2020, 41(17): 33-38.
- [5] 纳什. 大自然的权利 [M]. 青岛:青岛出版社, 1999.
Nash R F. The Right of Nature [M]. Qingdao: Qingdao Publishing Group, 1999.
- [6] 莽萍. 动物福利法溯源 [J]. 河南社会科学, 2004, 12(6): 25-28, 51.
MANG P. Tracing back to the welfare Law for animals [J]. Henan Soc Sci, 2004, 12(6): 25-28, 51.
- [7] 黄雯怡,王国聘. 西方动物伦理思想的演进、困境和展望 [J]. 南京社会科学, 2016(6): 56-62.
HUANG W Y, WANG G P. The evolution, dilemma and prospects of western animal ethics [J]. Nanjing J Soc Sci, 2016(6): 56-62.
- [8] GALLOP G G Jr. Chimpanzees: self-recognition [J]. Science, 1970, 167(3914): 86-87.
- [9] 苏达,高利红. 实验动物伦理新原则的框架分析与我国相关立法发展方向 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 107

-112.

SU D, GAO L H. Analysis of the framework of new principles of laboratory animal ethics and the direction of relevant legislative development in China [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 107-112.

[10] 王禄增, 王捷, 于海英. 动物暨实验动物福利学法规进展 [M]. 沈阳: 辽宁民族出版社, 2004.

WANG L Z, WANG J, YU H Y. Advances in animal and laboratory animal welfare regulations [M]. Liaoning: Liaoning Nationalities Press, 2004.

[11] 李春令, 刘增祥, 温成丽, 等. 基于 3R 原则探讨动物实验中人道终点的判定与应用 [J]. 药学研究, 2023, 42(10): 825-829.

LI C L, LIU Z X, WEN C L, et al. Exploring the determination and application of humane end point in animal experiments based on 3R principles [J]. J Pharm Res, 2023, 42(10): 825-829.

[12] 中华人民共和国国家科学技术委员会. 实验动物管理条例 [EB/OL]. (1988-10-30) [2002-06-23]. <http://www.lascn.net/Item/14.aspx>.

State Scientific and Technological Commission of The People's Republic of China. Regulations on the management of experimental animals [EB/OL]. (1988-10-30) [2002-06-23]. <http://www.lascn.net/Item/14.aspx>.

[13] 科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见 [EB/OL]. (2006-09-13) [2022-05-19]. http://www.nsfc.gov.cn/nsfc/cen/pfzl/pufanew/20110801_02.pdf.

Ministry of Science and Technology. Guide for the care and use of laboratory animals [EB/OL]. (2006-09-13) [2022-05-19]. http://www.nsfc.gov.cn/nsfc/cen/pfzl/pufanew/20110801_02.pdf.

[14] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物福利伦理审查指南; GB/T 35892-2018[S]. 2018.

State Administration for Market Regulation, Standardization Administration. Laboratory animal guideline for ethical review of animal welfare; GB/T 35892-2018[S]. 2018.

[15] 中国实验动物学会. 实验动物 动物实验方案审查方法; T/CALAS 52-2018[S]. 2018.

Chinses Association for Laboratory Animals Sciences. Laboratory animals—Review of laboratory animal program; T/CALAS 52-2018[S]. 2018.

[16] 张雷, 张新庆, 李飞. 中国医学伦理委员会委员的伦理认知分析 [J]. 科技导报, 2022, 40(18): 49-55.

ZHANG L, ZHANG X Q, LI F. Analysis of ethical cognition state of members of Medical Ethic Committee in China [J]. Sci Technol Rev, 2022, 40(18): 49-55.

[17] 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.

[18] 苏美洋伊, 陈昱君, 陈星, 等. 我国实验动物福利伦理审查质量评价指标体系构建研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(4): 109-117.

SU M Y Y, CHEN Y J, CHEN X, et al. Development of an indicator system of quality evaluation for welfare ethical review of laboratory animal care and use in China [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(4): 109-117.

[收稿日期]2023-12-14

邱月清,王振涛,陈振翼,等. 调节性细胞死亡在扩张型心肌病中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 113-125.
Qiu YQ, Wang ZT, Chen ZY, et al. Research progress on the relationship between regulatory cell death and dilated cardiomyopathy [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 113-125.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.013

调节性细胞死亡在扩张型心肌病中的研究进展

邱月清¹, 王振涛^{1,2*}, 陈振翼^{1,2*}, 常红波¹, 禹笑阳¹, 薛祎琨¹

(1.河南中医药大学第二临床医学院,郑州 450053;2.河南省中医院,郑州 450053)

【摘要】 扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)起病隐匿,以左心扩大甚至全心扩大为主要影像学表现,是心力衰竭与心律失常的常见原发疾病之一。随着近年来研究的不断深入,调节性细胞死亡(regulatory cell death, RCD)的内在分子机制逐渐清晰,研究者们发现 RCD 方式在 DCM 的发生发展过程中扮演了十分重要的角色。目前已知 DCM 中所涉及的 RCD 方式主要包括凋亡、坏死性凋亡、焦亡、铁死亡、自噬、铜死亡等,并且它们之间具有一定的相关性,可相互作用和调控。本文就上述 6 种 RCD 方式参与 DCM 的机制研究现状进行概述,以期对未来基础研究及临床应用提供参考。

【关键词】 扩张型心肌病;调节性细胞死亡;凋亡;坏死性凋亡;焦亡;自噬;铁死亡;铜死亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0113-13

Research progress on the relationship between regulatory cell death and dilated cardiomyopathy

QIU Yueqing¹, WANG Zhentao^{1,2*}, CHEN Zhenyi^{1,2*}, CHANG Hongbo¹, YU Xiaoyang¹, XUE Yikun¹

(1. the Second Clinical School of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450053, China.

2. Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450053)

【Abstract】 Dilated cardiomyopathy (DCM) has a concealed onset with left or even whole heart enlargement as the main imaging manifestation. It is a common primary disease of heart failure and arrhythmia. With the continuous deepening of research in recent years, the intrinsic molecular mechanism of regulatory cell death (RCD) has gradually become clear. Researchers have found that the RCD mode plays a very important role in the occurrence and development of DCM. At present, the RCD modes involved in DCM mainly include apoptosis, necrotic apoptosis, pyroptosis, iron death, autophagy, and cuproptosis, and a certain correlation exists among them, which interact and regulate each other. This article provides an overview of the current research status on the mechanisms of the six RCD modes involved in DCM to provide a reference for future basic research and clinical applications.

【Keywords】 dilated cardiomyopathy; regulatory cell death; apoptosis; necroptosis; pyroptosis; autophagy; ferroptosis; cuproptosis

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

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81573920);2021 年河南省卫生健康委国家中医临床研究基地科研项目(2021JDZX2101);河南省中医学“双一流”创建科学研究专项(HSRP-DFCTCM-2023-1-20);2023 年度河南省重点研发与推广专项(科技攻关)(232102310432)。

【作者简介】 邱月清(1998—),女,博士研究生,研究方向:中医药防治心血管疾病的临床与基础研究。E-mail:18638934959@139.com

【通信作者】 陈振翼(1986—),男,主治医师,讲师,博士,研究方向:中医药防治心血管疾病的临床与基础研究。

E-mail:303435405@qq.com

王振涛(1962—),男,博士生导师,教授,主任医师,研究方向:中医药防治心血管疾病的临床与基础研究。

E-mail:13803817796@138.com * 共同通信作者

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)是一种异质性心肌病,在感染、免疫、遗传等因素的刺激下,心脏逐渐扩大,心肌组织表现为不同程度的苍白、松弛及纤维化,心室壁变薄。因心脏结构改变,心功能逐渐下降,并可伴随电传导障碍,临床表现为心力衰竭与心律失常,其5年病死率居高不下,是医疗上亟待解决的难题^[1-2]。

根据细胞死亡命名委员会于2018年对细胞死亡方式的分类,目前细胞死亡可分为意外性细胞死亡(accidental cell death, ACD)与调节性细胞死亡(regulatory cell death, RCD)两大类。ACD是不可被控制的细胞死亡,由生物、物理、化学等因素直接影响所致,超出了细胞调节范围,是一种被动的死亡方式^[3]。而RCD具有独特的生化特征、形态特征以及免疫学后果,其不同外在征象的背后涉及十分复杂的分子反应机制,可被干预而加速或抑制细胞死亡进程,进而干预疾病的发展过程^[4]。

Narula等^[5]对DCM患者的心肌组织进行了首次组织化学和组织学分析,表明细胞凋亡是导致DCM发展为终末期心力衰竭的重要机制。此后,随着对凋亡等调节性细胞死亡认识的不断深入,研究者们发现,除细胞凋亡外,其他RCD方式也与DCM的发生发展相关,其内在分子机制繁多复杂^[6]。RCD的作用是清除多余的细胞,但在应激、感染或

基因变异等因素下,RCD的失控可导致心肌细胞过度丢失而造成心肌损害,发展为DCM。现有研究证据认为,凋亡(apoptosis)、坏死性凋亡(necroptosis)、焦亡(pyroptosis)、铁死亡(ferroptosis)、自噬(autophagy)、铜死亡(cuproptosis)6种RCD方式是DCM病理过程的中心环节。并且,以上RCD之间存在相互联系,包括共同的触发因素、分子成分和保护机制。但是,其他新型细胞死亡方式如有丝分裂死亡(mitotic death)、免疫性细胞死亡(immunogenic cell death)以及PARP1依赖细胞死亡(parthanatos)等是否参与DCM的发生发展仍然未知。因此,本文就凋亡、坏死性凋亡、焦亡、自噬、铁死亡与铜死亡6种RCD方式在DCM中的研究进展进行阐述,以期临床与基础研究提供参考(表1)。

1 细胞凋亡与 DCM

细胞凋亡是一种由多个基因控制的细胞自主性死亡。在形态学表现方面,凋亡的细胞主要表现为细胞皱缩与核固缩、细胞分裂为含有细胞成分的凋亡小体(一种膜封闭结构)以及凋亡小体被巨噬细胞或邻近细胞吞噬等^[7]。因为凋亡的细胞能够及时被吞噬,同时凋亡细胞可通过多种机制主动抑制免疫应答,所以凋亡不引发炎症反应。

正常情况下机体内促凋亡机制与抗凋亡机制

表 1 不同 RCD 的形态特征、效应分子与免疫特征
Table 1 Morphological characteristics, effector molecules, and immune characteristics of different RCD

RCD 类型 RCD types	形态特征 Morphological features	效应分子 Effector molecule	免疫特征 Immune characteristics
凋亡 Apoptosis	细胞皱缩与核固缩,形成含有细胞成分的凋亡小体 Cellular shrinkage and nuclear pyrogenesis, forming apoptotic bodies containing cellular components	BCL-2, Caspase, BIM, BCL-XL, etc.	不引起炎症 Not related to inflammation
坏死性凋亡 Necroptosis	细胞肿胀,溶解,促炎因子释放 Cell swelling, dissolution, and release of pro-inflammatory factors	PIPK1, PIPK3, MLKL, etc.	促炎 Pro-inflammatory
自噬 Autophagy	吞噬体、自噬体、自噬溶酶体形成 Formation of phagosomes, autophagosomes, and autophagosomes	LC3-II, ATG9, ROS, etc.	不引起炎症 Not related to inflammation
焦亡 Pyroptosis	细胞膜破裂,细胞内容物释放 Cell membrane rupture and release of cell contents	Caspase, GSDMD, etc.	促炎 Pro-inflammatory
铁死亡 Ferroptosis	线粒体嵴减少(消失),线粒体外膜皱缩 Reduction (disappearance) of mitochondrial cristae and contraction of mitochondrial outer membrane	Fe ²⁺ , GSH, GPX4, ROS, etc.	促炎 Pro-inflammatory
铜死亡 Cuproptosis	线粒体皱缩,线粒体膜破裂 Mitochondrial wrinkling, mitochondrial membrane rupture	Cu ⁺ , FDX1, 脂酰化蛋白, 等. Cu ⁺ , FDX1, Acylated protein, etc.	促炎 Pro-inflammatory

相互平衡,细胞衰老或发育异常时会在胞内特定信号调控下产生自发有序的死亡。凋亡可由死亡受体、线粒体、内质网应激介导,并依赖半胱天冬酶家族蛋白(Caspases)的激活。第一,肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)超家族中的死亡受体与相应配体结合,形成顺序蛋白复合物 I (Complex I) 与顺序蛋白复合物 II (Complex II),随后激活下游 Caspases,触发细胞凋亡;第二,在 B 淋巴细胞瘤-2 (BCL-2)、相关 X 蛋白(BAX)与 BCL-2 拮抗剂(BAK)的共同介导下,细胞色素 C (cytochrome c, CYCS)生成,接着通过线粒体膜进入胞质,激活凋亡蛋白酶活化因子 1 (Apaf-1),诱导 Caspases 激活;第三,在内质网钙离子失衡或其他应激因素下,发生内质网应激,导致异常蛋白的大量聚集并招募 pro-Caspase-12,直接激活下游 Caspases,引发凋亡^[6,8]。

大约 1/3 的 DCM 与基因突变有关,目前已知的有超过 50 个基因与遗传性 DCM 相关,35%~40% 的遗传性 DCM 是由于肌节蛋白突变引起的^[9],其中编码肌联蛋白(titin)的 *TTN* 基因截短突变(*TTN*^{tr})是最主要的原因,占家族性 DCM 的 25%^[10]。Zhou 等^[11]将 *TTN*^{tr} 的杂合子小鼠(纯合子在子宫中死亡)诱导为 DCM 模型,检测到心肌细胞凋亡被激活的同时早期应答基因 3(*IER3*)的表达被抑制。随后研究证实,核转录因子- κ B (NF- κ B)在各种刺激作用下发生核易位,随后与早期应答基因 3(*IER3*)启动子结合,促进调控 *IER3* 转录,成熟的 *IER3* mRNA 在胞质中翻译为 IER3 蛋白入核,与凋亡基因启动子结合,靶向正调控凋亡保护因子 BCL-2、BCL-2 L、丝氨酸/3 氨酸蛋白激酶 1 (AKT1),提示 *TTN* 截短突变导致的 DCM 中, *IER3* 或可作为临床治疗靶点^[11]。

LI 等^[12]实验研究发现,白介素-6(interleukin-6, IL-6)敲除后阿霉素诱导 DCM 小鼠的心肌细胞凋亡受到抑制,心功能明显改善,心肌重构与心肌纤维化减轻,后续研究显示,这可能与 IL-6 敲除抑制了 DCM 小鼠心脏组织中 STAT3 的磷酸化有关。细胞色素 P450 2E1 (CYP2E1)是一种细胞色素 P450 酶,在某些疾病状态下, CYP2E1 的过表达可以增强内源酮体代谢,为心脏供应能量,同时也会增强 DCM 时心脏的氧化应激,加速心肌细胞凋亡,在动物模型中敲低或下调 CYP2E1 可缓解心力衰竭症状,减缓 DCM 发展进程^[13]。因此,下调 IL-6、CYP2E1 等细胞因子水平能够通过抑制心肌细胞凋

亡治疗 DCM,成为临床治疗靶点的可能。

内质网的功能因未折叠蛋白的累积而受到干扰,被称为内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS),并且这一过程引发了折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)。生理情况下,UPR 可维持内质网稳态,然而在氧化应激、缺血缺氧、基因变异等因素刺激下,ERS 的持续激活可诱发心肌病^[14-15]。UPR 受蛋白激酶 R 样 ER 激酶(protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)、激活转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6)、肌醇需求酶 1 (inositol requiring enzyme 1, IRE1)3 种主要效应蛋白调控。转录因子 C/EBP 同源蛋白(C/EBP-homologous protein, CHOP)介导了内质网应激相关的 DCM 心肌细胞凋亡,CHOP 可通过调控抗凋亡蛋白 BCL-2、BCL-XL 与促凋亡蛋白细胞死亡调节因子(BIM)、生长阻滞和 DNA 损伤诱导蛋白 34 (protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A, GADD34)的表达水平激活细胞凋亡^[16]。内质网应激持续激活时,能促进 IRE1 α -UPR 与 ATF6-PR 通路,由此增加 CHOP 的表达量,增强细胞凋亡^[15]。在 DCM 患者中检测到 LncRNA AC061961.2 下调^[17], Qiu 等^[18]报道称,在 DCM 中 LncRNA AC061961.2 可通过激活 Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路抑制内质网应激诱导的心肌细胞凋亡。克山病作为我国一种地方性扩张型心肌病,全部发生在低硒地区,早期的体内对比研究显示,克山病患者的心肌细胞凋亡率显著升高^[19],之后的研究证实,硒缺乏可诱发 ERS^[20],进一步研究发现,下调内质网应激反应信号的化学伴侣 4-苯基丁酸(4-PBA)可减轻缺硒大鼠心肌细胞凋亡^[21]。随后越来越多的证据表明氧化应激也可加剧硒缺乏诱导的细胞凋亡,谷胱甘肽过氧化物酶降解 H₂O₂ 的催化能力受损可能是导致氧化应激水平升高的关键因素。最新研究显示,硒缺乏症诱导的心肌细胞凋亡过程中,内源性、外源性通路及上游调控因子肿瘤蛋白 53 (p53)、BAX、BCL-2 和 BCL-XL 参与了硒缺乏症诱导的心肌细胞凋亡^[22]。ERS 介导的心肌细胞凋亡是导致 DCM 重要环节,当前研究证据显示,表观遗传变异、微量元素缺乏、氧化应激过度等均均为持续性 ERS 的诱发条件,细胞凋亡在 DCM 中的作用机制见图 1。

由上可得,在 DCM 患者及多种 DCM 动物模型中均观察到了显著的心肌细胞凋亡现象,提示心肌

细胞凋亡的增加是 DCM 发生发展的重要原因,并与基因突变、表观遗传变异、氧化应激、炎症反应等因素具有密切的相关关系。血清凋亡相关因子 BAX、BCL-2、BCL-XL 等含量检测或可作为 DCM 的评估指标,抑制心肌细胞凋亡也有望成为 DCM 临床治疗途径。

2 坏死性凋亡与 DCM

细胞凋亡在某些刺激因素、吞噬清除作用的缺失等条件下,可出现“程序性坏死”,即坏死性凋亡^[23-24]。这种坏死性凋亡的形态学特征在于细胞肿胀、溶解和促炎因子的释放,不同于细胞凋亡在免疫反应中的“沉默”,是一种炎性 RCD^[25]。

TGF-β 活化激酶 1 结合蛋白 2 (GF-β activated kinase 1 (MAP3K7) binding protein 2, TAB2) 是一种衔接蛋白,通过与 Lys63 连接的多聚泛素链结合,将来自 TNF 受体 1 (TNF receptor superfamily member 1A, TNFR1) 和其他受体的信号连接至 TGF-β 激活的激酶 1 (Tak1 TGF-β activated kinase 1, TAK1),成为信号传导复合物^[26]。研究发现, TAB2 对心肌存活及维持稳态具有重要作用,成人心脏中 TAB2 的急性缺失可导致 DCM^[6]。肿瘤坏死因子受体 (tumour necrosis factor receptor, TNFR) 或 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) -3/4 被激活,触发下游

效应因子反应。一方面,磷脂酰肌醇磷酸激酶 (phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, PIPK1) 被 IAPs 泛素化后通过 NF-κB 发挥促炎作用;另一方面, PIPK1 被 CYLD 去泛素化,招募 PIPK3,形成的复合体进一步招募混合谱系激酶样结构域 (mixed lineage kinase domain like pseudokinase, MLKL) 并使其磷酸化,形成 MLKL 寡聚物即坏死体,随后作用于细胞膜形成 MLKL 孔,导致离子内流、细胞肿胀、溶解,最终坏死死亡。Yin 等^[27] 实验发现, TAB2 缺失小鼠在应激后表现出 DCM 样心脏结构改变与心功能障碍,通过技术手段使 RIPK1 基因失活后,在很大程度上逆转了上述应激反应。提示 TAB2 缺失的情况下,通过激活 RIPK1 诱导 RIPK1-RIPK3 坏死复合物形成,促进坏死性凋亡,最终导致 DCM 心功能障碍,而 RIPK1 基因或可成为 TAB2 缺失 DCM 的临床治疗靶点,坏死性凋亡在 DCM 中的作用机制详见图 2。

3 细胞焦亡与 DCM

细胞焦亡是一种以炎症小体激活为特征的 RCD,在免疫应答与炎症反应中发挥重要作用^[28]。最突出的形态学表现在于其细胞膜孔的形成、细胞膜的迅速破裂、细胞肿胀与溶解、细胞内容物的释放、细胞外促炎因子的释放等。促炎因子可影响邻

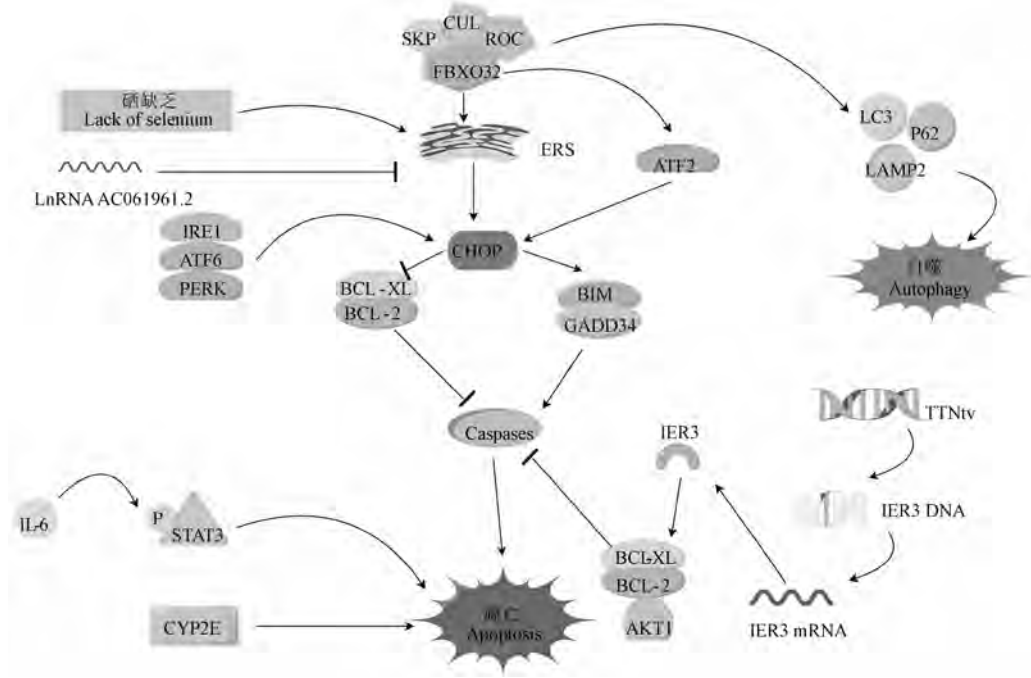


图 1 DCM 中心肌细胞凋亡机制图及其与自噬、铁死亡的串扰 (由 Figdraw 绘制)

Figure 1 Mechanism diagram of apoptosis in DCM cardiomyocytes and its crosstalk with autophagy and ferroptosis (by Figdraw)

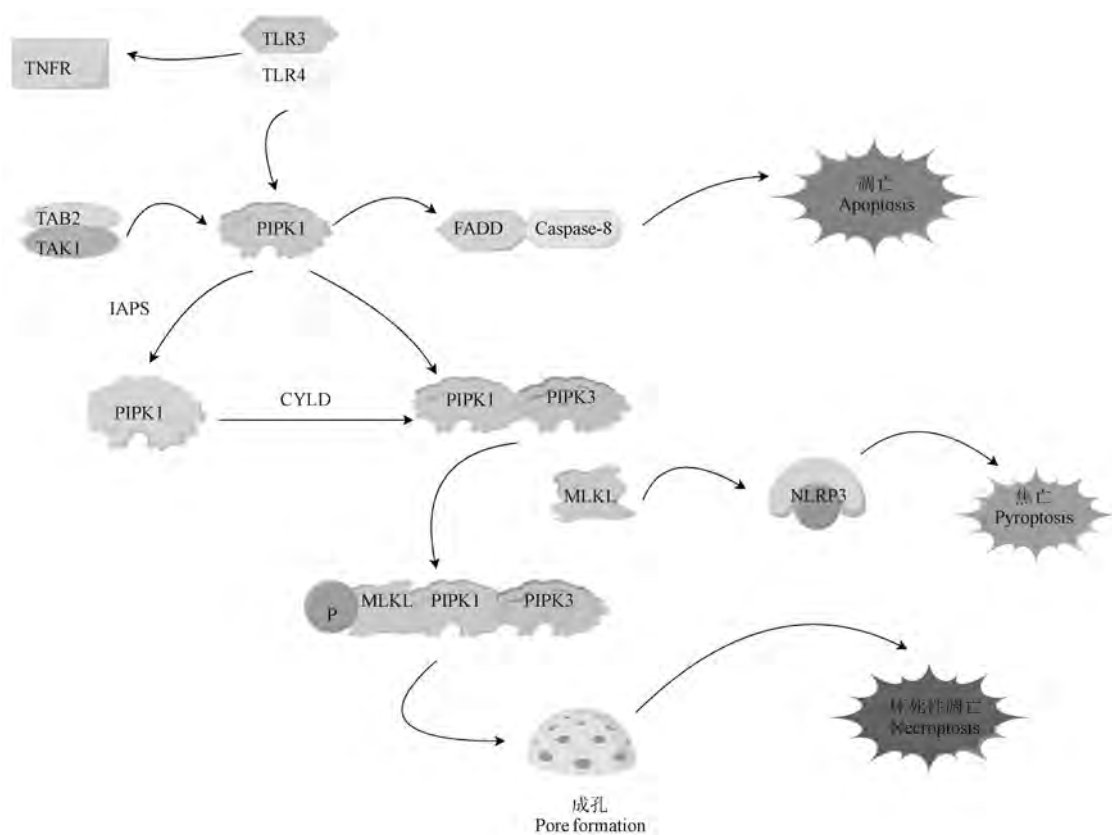


图 2 DCM 中心肌细胞坏死性凋亡机制图及其与焦亡、凋亡的串扰(由 Figdraw 绘制)

Figure 2 Mechanism of necrotic apoptosis in DCM cardiomyocytes and its crosstalk with pyroptosis and apoptosis (by Figdraw)

近细胞并招募炎性细胞,引发后续一系列的炎症反应,加速焦亡^[29]。

分子机制方面,焦亡可分为 Caspases-1 依赖的经典途径与 Caspases-4/5/11 依赖的非经典途径,其过程均与炎症小体的激活密切相关,NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 是最著名、研究最为充分的炎症小体^[30-31]。经典途径中,凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC) 招募活性 Caspase-1,随后 Caspase-1 识别并剪切 Gasdermin 家族蛋白 GSDMD,分离其 N 端片段,N 端被释放至细胞膜后可使细胞膜孔形成,诱发焦亡。同时,Caspase-1 识别白介素-1 β 前体 (pro-IL-1 β) 与白介素-18 前体 (pro-IL-18),将二者转化为具有活性的 IL-1 β 与 IL-18,通过膜孔释放至胞外,扩大炎症范围,加速焦亡进程^[28]。膜孔形成的同时,胞内 K⁺ 外排作用正反馈调节 NLRP3/ASC/Caspase-1 信号通路^[29]。非经典途径中,Caspase-3 可裂解 Gasdermin 家族蛋白 GSDME,同样通过释放其 N 端形成膜孔,诱发焦亡^[32]。

在以往的大部分研究中,凋亡的心肌细胞是通过 TUNEL 染色来确定的,最新证据显示,因为焦亡细胞和凋亡细胞相似性,也能被 TUNEL 阳性染色^[33]。因此,既往的研究并没有将凋亡的心肌细胞与焦亡的心肌细胞进行准确区分。Zeng 等^[34] 为了探究细胞焦亡是否干预了 DCM 的发生发展及其具体靶点,首次检测了接受心脏移植的 DCM 患者与其脑死亡供体心脏的左室游离壁心肌组织,与健康供体对照组相比,NLRP3 炎症小体、IL-1 β 、IL-18 等在 DCM 心肌中的表达显著升高,GSDMD 明显裂解,同时通过免疫荧光显色观察到 DCM 患者心肌组织 ASC 斑点形成^[34]。该研究同时采用 α -辅助肌动蛋白 (α -actinin) 染色、TUNEL 染色、Caspase-1 染色的三重染色方式,准确区分了凋亡的心肌细胞与焦亡的心肌细胞,研究数据显示,焦亡的心肌细胞百分比高于凋亡心肌细胞^[34]。另外,NOX1 和 NOX4 促进了 Drop1 介导的线粒体裂变,加速了活性氧 (ROS) 积累,NLRP3 炎症小体随之激活。NOX1/NOX4 双抑制剂可有效抑制心肌细胞焦亡,减缓 DCM 心功能障碍^[34]。另有研究表明,细胞焦亡能

够通过影响免疫浸润(免疫细胞在组织内的聚集)调节免疫微环境,在 DCM 免疫应答中起到了关键作用^[35],细胞焦亡在 DCM 中的作用机制见图 3。

综上,心肌细胞焦亡在 DCM 心肌中被强烈激活,并可能在 DCM 的发生发展中起到比凋亡更重要的作用,或可通过抑制甚至消灭焦亡相关效应分子阻断心肌细胞焦亡进程,达到治疗 DCM 的目的。

4 自噬与 DCM

自噬的本质是细胞内细胞器的自我吞噬,其降解产物可在细胞内循环利用,为细胞的新陈代谢提供能量及原料^[36]。自噬在细胞应激情况下发挥了维持细胞生存的作用,但目前的研究证据表明,虽然自噬常用于回收细胞组分,但也可以导致细胞的破坏^[6,37]。

自噬典型的形态表现为 3 种独特的膜结构的形成,即吞噬体、自噬体、自噬溶酶体^[38]。应激条件下,细胞质中受损的细胞器、异常折叠的蛋白质、病毒、细菌等周围可形成吞噬囊泡或分离膜,分离形成双层膜结构的自噬小体。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mechanistic target of rapamycin kinase, mTOR)/

磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)信号通路是参与调节自噬的主要信号通路。自噬过程可以分为启动、囊泡延伸、膜融合、囊泡溶解 4 个阶段。腺苷活化的蛋白激酶(Adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK)能抑制 mTOR 信号,调控自噬体与自噬溶酶体的形成^[39]。

与健康者相比,DCM 患者心肌细胞中的自噬结构明显增加^[40]。Kanamori 等^[41]使用电镜检测发现,与未发生心室逆重构(left ventricular reverse remodeling, LVRR)的 DCM 患者相比,发生 LVRR 的患者心肌细胞内含有更多的自噬空泡,且自噬溶酶体数量与组织蛋白酶 D 的表达均显著升高,提示自噬程度可作为 DCM 患者能否发生 LVRR 的预测指标之一。

既往研究显示,雷帕霉素能够改善 DCM 大鼠早期心功能^[42]。Jin 等^[43]通过实验研究首次报道,DCM 小鼠中 LC3II 的表达和自噬体的形成增加,雷帕霉素能够通过抑制 mTOR-4E 结合蛋白(eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1, 4EBP1)通路进一步诱导自噬激活,保护心

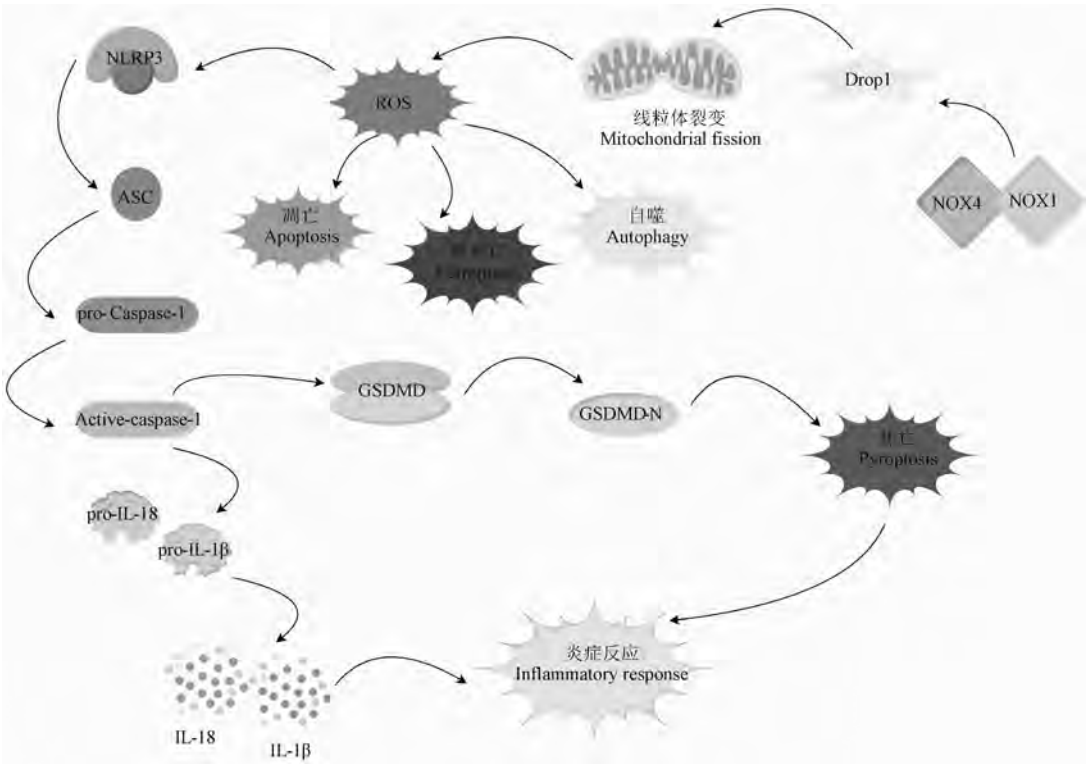


图 3 DCM 中心肌细胞焦亡机制图及其与凋亡、铁死亡、自噬的串扰(由 Figdraw 绘制)

Figure 3 Mechanism diagram of pyroptosis in DCM cardiomyocytes and its crosstalk with apoptosis, ferroptosis, and autophagy (by Figdraw)

脏,有助于改善 DCM 小鼠心功能。提示上调自噬可能是一个有前景的 DCM 治疗策略,可用以改善 DCM 的病理进展。mTOR 信号通路的激活后自噬溶酶体途径 (autophagy lysosomal pathway, ALP) 被抑制,而 ALP 能够有效去除功能失调的细胞器及蛋白质,导致异常折叠的蛋白在 DCM 患者心肌中积累^[44-45]。同时,转录因子 EB-tfeb-(溶酶体生物发生的主要调控因子)核定位减少,mTOR 的激活物支链氨基酸(BCAAs)累积,PP2Cm(调节 BCAAs 关键分解代谢步骤的磷酸酶)水平降低,miR-22(触发衰老的 PP2Cm 水平的调节因子)水平升高。下调 miR-22 后能够适当逆转上述分子缺陷^[44]。Kanamori 等^[46]观察到 δ -肌聚糖缺失的小鼠表现出广泛的左心室扩大与心功能障碍等 DCM 特征,心肌组织自噬空泡和溶酶体数量增加,且伴随 AMP 活化蛋白酶增加。二甲双胍给药通过促进 AMPK/mTOR 信号通路增强了自噬水平,能够改善 DCM 心功能。

针对 Bedouin 家族的研究表明,LEKHM2 突变将导致隐性遗传的 DCM 并伴随左心室心肌致密化不全 (non-compaction of left ventricular myocardium, LVNC),其分子机制涉及溶酶体功能障碍与自噬的失控。LEKHM2 与 LAMP2、BAG3 等基因共同参与调节心肌细胞中的自噬^[47]。BAG3 突变可导致常染色体显性遗传的 DCM^[42,48-49]。Enomoto 等^[50]发现,家族性 DCM 患者在 HSPD1 基因顶端结构域存在一个

点突变(Thr320Ala),该突变点与 nbl 突变斑马鱼的突变点 (Val324Glu) 仅相距 4 个氨基酸。nbl 突变斑马鱼受精后 8 个月即出现房室传导阻滞与猝死现象,成年阶段表现为典型 DCM 表型(心室壁厚度降低、心腔扩张、心肌纤维化等)。其心脏组织学检测显示,ROS 水平升高,线粒体损伤和自噬体增加,自噬相关基因 mRNA 和蛋白质表达显著增加。转染 HSPD1 与 nbl 突变的 HEK293 细胞系均表现为线粒体自噬过度激活,ROS 浓度升高及氧化应激加剧。因此推测,HSPD1 顶端结构域中的点突变通过 ROS 介导的线粒体自噬增加导致线粒体功能障碍,发展为 DCM 样表现,自噬在 DCM 中的作用机制见图 4。

根据以上研究,在维持细胞内稳态方面,自噬扮演了重要角色,不仅能够有效清除受损细胞器和有害的蛋白聚集体,还能在“饥饿”状态与应激时循环利用营养物质维持细胞生命活动。DCM 病理进展过程中自噬被激活,在此基础上继续适度激活自噬被认为可改善 DCM 预后,但自噬是一种精密调控的微观活动,过度激活将导致 ROS 积累,可对 DCM 病理进展产生不利影响,可能与 ROS 过度积累导致的氧化应激有关^[50]。既往研究报道,雷帕霉素小剂量(1 mg/(kg · d))及中剂量(2 mg/(kg · d))应用诱导自噬可改善 DCM 大鼠左心收缩功能,但其安全有效范围小,大剂量(4 mg/(kg · d))应用时导致死

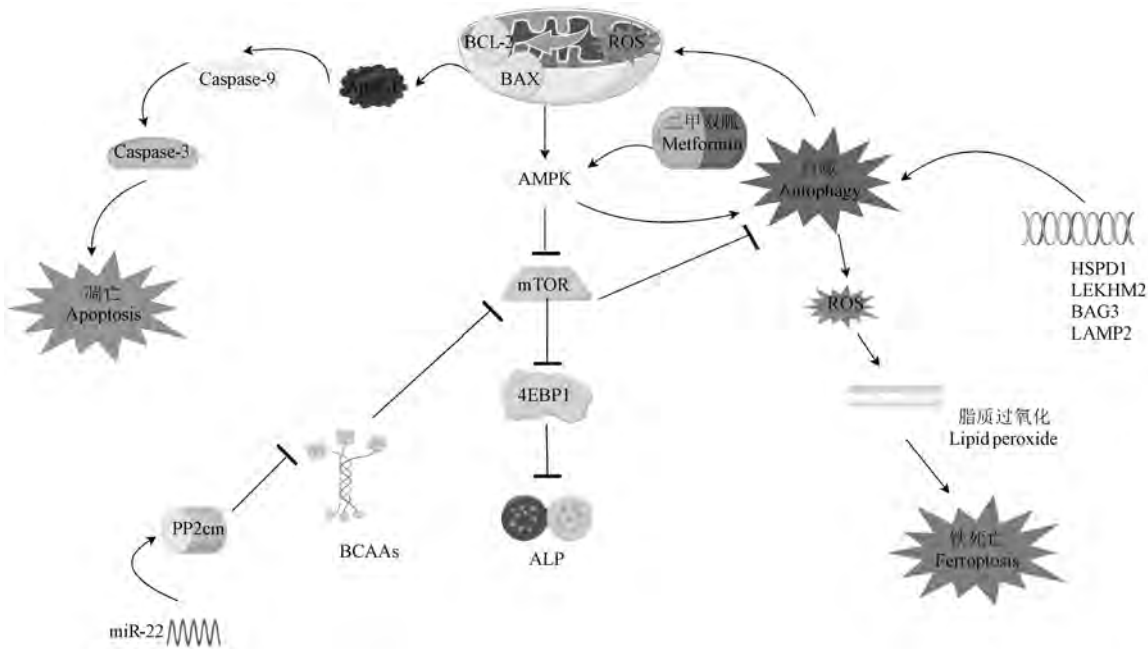


图 4 DCM 中自噬机制图及其与凋亡的串扰(由 Figdraw 绘制)

Figure 4 Mechanism diagram of autophagy in DCM cardiomyocytes and its crosstalk with apoptosis(by Figdraw)

亡率增加^[51]。因其安全有效范围狭窄,难以在临床应用“激活自噬”途径治疗 DCM 患者。

5 铁死亡与 DCM

铁是机体重要的微量元素,与氧气运输、能量代谢以及 DNA 的合成等关系密切,维持其含量与代谢稳态对正常的生命活动十分关键。虽然铁死亡在 2012 年才被正式提出,但事实上铁死亡是一种古老且普遍的细胞死亡方式^[52-53]。典型的铁死亡控制轴需要系统 Xc-谷氨酸-胱氨酸逆向转运体向细胞内摄取胱氨酸,还原为半胱氨酸后用以谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 的生物合成。GSH 是一种强效还原剂,也是谷胱甘肽过氧化酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 的辅助因子。GPX4 可将细胞中产生的任何磷脂氢过氧化物还原为相应的醇^[54]。铁死亡抑制蛋白 1 (ferroptosis-suppressor-protein 1, FSP1) 是脂质中最有效的天然抗氧化剂,可平行于 GPX4 完全阻断铁死亡进程;FSP1 可将泛醌还原为泛醇,直接减少氧化自由基数量,终止脂质过氧化^[52,55]。包括 AMPK、核转录因子 Nrf2 在内的多个

信号传导通路都参与了细胞铁死亡的调节^[52,56-58],当细胞内铁代谢障碍或能量代谢异常时,过量铁或 ROS 累积可诱导脂质过氧化,导致铁死亡^[53-54]。

肺腺癌与骨肉瘤等疾病机制研究中发现,其免疫异质性与铁死亡密切相关^[59-60]。因为 DCM 可分为多种亚型,不同的亚型之间存在显著异质性^[61],所以 Lu 等^[62]从免疫异质性角度出发,得出铁死亡可调节 DCM 患者的免疫微环境,铁死亡相关基因 OTU 去泛素酶家族成员之一 (OTU deubiquitinase 1, OTUD1) 能够通过调控 B 细胞与树突状细胞参与形成免疫异质性。微阵列数据分析显示,信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 与 DCM 中铁死亡相关^[63]。铁死亡作为一种新型细胞死亡方式,参与了动脉粥样硬化、心肌梗死、心力衰竭等心血管疾病的发生发展过程^[64]。并且,铁死亡已被证实存在于慢性心力衰竭、心房颤动时的心肌纤维化改变^[65-67],但目前在 DCM 中铁死亡的相关机制研究几乎仅停留在生物信息技术阶段,缺乏基础实验研究的验证,这是未来研究需要弥补的,铁死亡机制见图 5。

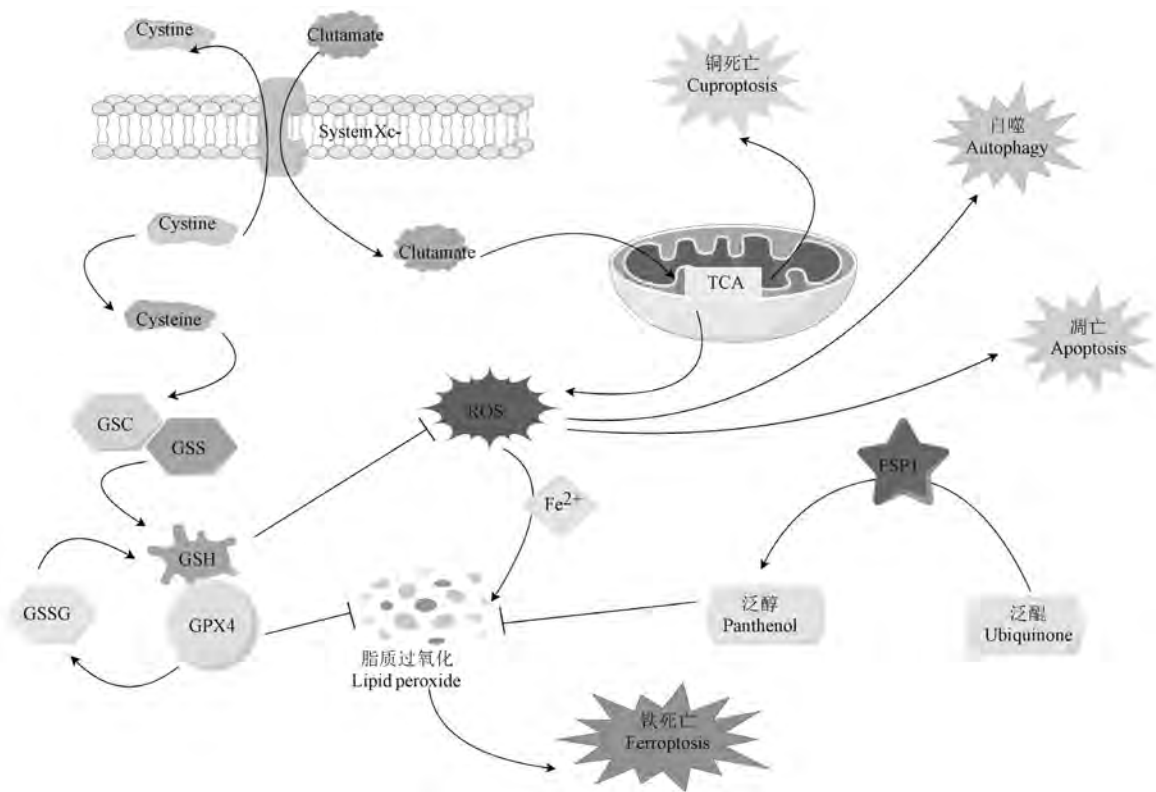


图 5 铁死亡机制图及其与铜死亡、自噬、凋亡的串扰 (由 Figdraw 绘制)

Figure 5 Mechanism diagram of ferroptosis and its crosstalk with cuproptosis, autophagy and apoptosis (by Figdraw)

6 铜死亡与 DCM

铜是人体所必需的微量元素,铜离子可与多种蛋白质或酶结合而表现出较强的氧化还原活性,是机体内许多必需酶的辅助因子^[68]。铜死亡是最近提出的一种新型 RCD 方式,铜离子在线粒体中靶向积累,与线粒体呼吸过程三羧酸(TCA)循环中的脂酰化蛋白质结合,驱动脂酰化修饰蛋白质聚集,进而导致铁硫簇蛋白丢失,诱发蛋白质毒性应激并最终导致细胞死亡^[69]。

当前实验证据表明,铜死亡参与了糖尿病性心肌病的病理过程^[70],且已有研究发现,DCM 中存在线粒体代谢紊乱,而铜螯合作用可以通过线粒体修复改善心功能^[71]。尽管高铜浓度已经被证实与 DCM 心衰的发生及其不良预后显著相关^[72],然而并没有铜死亡在 DCM 中作用机制的相关研究。基于此,Bian 等^[73]推测铜死亡也存在于 DCM 发生发展过程,利用机器学习算法分析 DCM 相关基因与铜死亡之间的联系,并预测中草药干预靶点,结果显示,两个特征基因 *FDX1* 与 *SLC31A1* 在外部验证数据集中表现良好,分子对接模型显示,天然药物芦丁、虎杖苷分别对应 *FDX1*、*SLC31A1*,是否可通过调控相应基因调控 DCM 中的铜死亡而发挥治疗作用,有待基础研究进一步验证,铜死亡机制见图 6。

7 RCD 串扰与 DCM

尽管不同 RCD 的机制有显著区别,但近年研究发现,在 DCM 中不同 RCD 之间存在串扰^[30,74-77],以

上机制图也体现不同 RCD 之间的串扰关系。

7.1 凋亡与坏死性凋亡

死亡受体与线粒体可同时介导凋亡与坏死性凋亡,当 TNFR 与其配体结合后,下游通路可通过 NF-κB 信号通路分别诱导凋亡、坏死性凋亡,下游关键分子受体相互作用蛋白酶 1(RIPK1)和 Caspase-8 等的表达水平决定了细胞调节性死亡的主要方式及其程度^[27,78]。

RIPK1 可以通过促进 RIPK1-Fas 相关死亡域蛋白(FADD)-Caspase-8 凋亡复合物与 RIPK1-RIPK3-MLKL 坏死复合物的组装诱导细胞凋亡与细胞坏死性凋亡^[27,79-80]。TAK1 能够不依赖 NF-κB 信号通路参与调节细胞凋亡与细胞坏死性凋亡^[26,80]。Yin 等^[27]观察到 TAB2 缺失转基因小鼠 DCM 样改变,与对照组相比,TAB2 缺失小鼠心肌组织 RIPK1、RIPK3、MLKL 的蛋白水平显著升高。后续实验数据表明,TAB2 不依赖 NF-κB,但依赖 RIPK1 调控心肌细胞凋亡与坏死性凋亡。并且当 RIPK1 的基因失活时,可逆转 TAB2 缺乏引起的心肌细胞丢失^[27]。

总之,细胞凋亡与坏死性凋亡的信号通路中涉及的分子相互重叠,能够相互影响,共同促进了 DCM 中心肌细胞的丢失,是导致 DCM 病理进展的重要机制。

7.2 凋亡与自噬

Zhang 等^[81]发现 DOX 抑制自噬诱导心肌细胞凋亡是诱发 DCM 的必要途径,激活 AMPK 下调 mTOR 可显著减弱由 DOX 引起的心肌组织氧化应激反应,维持自噬,减少心肌细胞凋亡^[81]。FBXO32

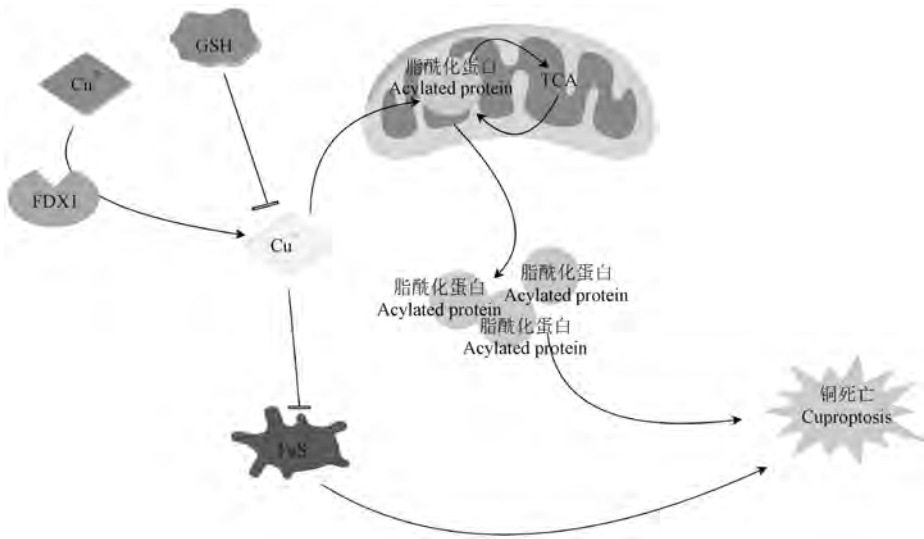


图 6 铜死亡机制图(由 Figdraw 绘制)

Figure 6 Mechanism diagram of cuproptosis(by Figdraw)

(MAFbx1/ATROGIN1)是心肌和骨骼肌中的特异性 F-Box 家族蛋白,是 E3 泛素蛋白连接酶家族 S 期激酶相关蛋白 1(S-phase kinase associated protein 1, SKP1)-CUL1-F-BOX(SCF)复合体的组成部分,通常被认为是心肌肥厚的负向调节因子^[82]。有研究报道,*FBXO32* 是一个隐性的家族性 DCM 遗传位点,其突变抑制了 SCF 复合蛋白的活性,进而影响正常泛素化过程。对突变个体心脏组织中 *FBXO32* 分子靶点的评估表明,*FBXO32* 突变后可通过自噬系统选择性蛋白表达受损诱发 DCM^[83]。最新证据显示,*FBXO32* 突变使心脏中内质网应激失调,CHOP、ATF2 表达上调,Caspase-3 被激活,细胞凋亡显著增加^[16]。因此,*FBXO32* 突变至少可通过影响心肌细胞自噬与凋亡两个方面导致遗传性 DCM。

心肌细胞作为完全分化的细胞,需要维持正常自噬以应对内源性环境的变化^[84]。由于凋亡和自噬之间存在着一种有效的联系,自噬可以在一定程度上抑制细胞凋亡,减少心肌细胞的丢失^[85]。当自噬水平降低严重时,心肌细胞耐受环境应激的能力将会下降,引发细胞死亡^[86]。自噬是细胞维持内环境稳态最重要的方式之一,心肌细胞的自噬调控能力可能影响细胞的命运,自噬失调可直接导致凋亡细胞数量增多,并随时间累积进展为 DCM。

7.3 其他

除上述 RCD 之间的串扰外,其他 RCD 之间也存在不同程度的串扰,但这些 RCD 之间的串扰关系尚未在 DCM 中得到验证,或可成为未来基础研究方向。例如:(1)细胞应激或受到潜在损伤后可诱发细胞焦亡,GSDMD、GSDME 与 MLKL 效应分子等均可诱导膜孔形成而发挥死亡效应。同时,由于 MLKL 也在坏死性凋亡中诱导膜损伤,并使 K⁺ 流出,这个过程中 NLRP3 炎症小体被激活,提示焦亡与坏死性凋亡也存在串扰^[29,73]。(2)ROS 诱导的脂质过氧化在凋亡、自噬、铁死亡中均起到了关键作用,过量的 ROS 攻击生物膜,传播脂质过氧化链式反应,并随后诱导不同类型的细胞死亡^[87]。(3)线粒体中的 TCA 循环为铁死亡提供 ROS^[64],铜死亡的重要成分脂酰化蛋白也来自 TCA 循环,故推测铜死亡与铁死亡可能通过 TCA 循环发生串扰^[68]。

8 总结与展望

DCM 是一种进行性加重的难治性心血管疾病,病理进程中存在多种形式的 RCD,这也是造成 DCM

心肌细胞丢失、心功能恶化的关键因素。随着研究的不断深入,部分 RCD 的内在分子机制逐渐清晰。截止目前的报道中,涉及的研究对象主要包括接受心脏移植的 DCM 患者(家族性与非家族性)、转基因 DCM 小鼠、转基因 DCM 大鼠、药物注射 DCM 小鼠、药物注射 DCM 小鼠、DCM 斑马鱼以及体外心肌细胞株等。针对以上研究对象的证据一致认为,细胞凋亡、细胞坏死性凋亡、自噬、细胞焦亡、铁死亡、铜死亡 6 种 RCD 方式均参与了 DCM 的病理发展过程。

虽然各种 RCD 之间存在显著的串扰关系,但其在 DCM 中的作用机制尚未完全明确,在 DCM 中探讨 RCD 之间串扰的研究数量少,研究设计难度大,是科研人员未来需要努力的方向。已知 RCD 方式多达 11 种,目前仍缺乏的是对有丝分裂死亡、免疫性细胞死亡、PARP1 依赖性细胞死亡等新型细胞死亡方式在 DCM 中的作用机制的研究数据。

心肌细胞是终末分化的细胞,在心脏组织中占比 70%,本文所涉及的体内实验均针对心脏组织中的心肌细胞而不是成纤维细胞等非心肌细胞,体外实验细胞株均为心肌细胞株。心肌细胞的丢失与修复缺乏将直接导致心肌收缩力下降与心脏结构改变,由于心肌细胞再生能力十分有限,所以避免心肌细胞的持续丢失是治疗包括 DCM 在内的心脏损伤的根本挑战。因为 RCD 具有可调控性,且各种 RCD 之间存在共同的中介分子与信号通路,故理论上通过抑制甚至阻止 RCD 进程能够有效避免心肌细胞死亡丢失,具有长远的临床治疗前景。

综上所述,凋亡、焦亡、自噬、铁死亡、铜死亡及坏死性凋亡 6 种 RCD 在 DCM 的发病及进展中占有重要地位。更因其具有可调控的特性,所以不仅是基础研究的热点,在不久的将来,也会成为 DCM 的预防与治疗的干预靶点。

参考文献:

- [1] SCHULTHEISS H P, FAIRWEATHER D, CAFORIO A L P, et al. Dilated cardiomyopathy [J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5 (1): 32.
- [2] 廖玉华. 中国扩张型心肌病诊断和治疗指南:创新与转化 [J]. 中国循环杂志, 2019, 34(S1): 120-121.
LIAO Y H. Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of dilated cardiomyopathy: innovation and translation [J]. Chin Circ J, 2019, 34(S1): 120-121.
- [3] NAGATA S, TANAKA M. Programmed cell death and the immune system [J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17(5): 333

- 340.
- [4] QI X, LI Q, CHE X, et al. Application of regulatory cell death in cancer: based on targeted therapy and immunotherapy [J]. Front Immunol, 2022, 13: 837293.
- [5] NARULA J, HAIDER N, VIRMANI R, et al. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure [J]. N Engl J Med, 1996, 335(16): 1182-1189.
- [6] DEL RE D P, AMGALAN D, LINKERMANN A, et al. Fundamental mechanisms of regulated cell death and implications for heart disease [J]. Physiol Rev, 2019, 99(4): 1765-1817.
- [7] LETAI A. Apoptosis: directly targeted at last [J]. J Clin Oncol, 2022, 40(15): 1693-1695.
- [8] SANZ A B, SANCHEZ-NIÑO M D, RAMOS A M, et al. Regulated cell death pathways in kidney disease [J]. Nat Rev Nephrol, 2023, 19(5): 281-299.
- [9] MCNALLY E M, GOLBUS J R, PUCKELWARTZ M J. Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy [J]. J Clin Invest, 2013, 123(1): 19-26.
- [10] MCNALLY EM, MESTRONI L. Dilated cardiomyopathy: genetic determinants and mechanisms [J]. Circ Res, 2017, 121(7): 731-748.
- [11] ZHOU Q, HAHN JK, NEUPANE B, et al. Dysregulated IER3 expression is associated with enhanced apoptosis in titin-based dilated cardiomyopathy [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(4): 723.
- [12] LI Q, YE W X, HUANG Z J, et al. Effect of IL-6-mediated STAT3 signaling pathway on myocardial apoptosis in mice with dilated cardiomyopathy [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(7): 3042-3050.
- [13] LU D, MA Y, ZHANG W, et al. Knockdown of cytochrome P450 2E1 inhibits oxidative stress and apoptosis in the cTnT (R141W) dilated cardiomyopathy transgenic mice [J]. Hypertension, 2012, 60(1): 81-89.
- [14] IURLARO R, MUÑOZ-PINEDO C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress [J]. FEBS J, 2016, 283(14): 2640-2652.
- [15] REN J, BI Y, SOWERS J R, et al. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cardiovascular diseases [J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(7): 499-521.
- [16] AL-YACCOUB N, COLAK D, MAHMOUD S A, et al. Mutation in FBXO32 causes dilated cardiomyopathy through up-regulation of ER-stress mediated apoptosis [J]. Commun Biol, 2021, 4(1): 884.
- [17] QIU Z, YE B, YIN L, et al. Downregulation of AC061961.2, LING01-AS1, and RP11-13E1.5 is associated with dilated cardiomyopathy progression [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(4): 4460-4471.
- [18] QIU Z, CHEN W, LIU Y, et al. LncRNA AC061961.2 overexpression inhibited endoplasmic reticulum stress induced apoptosis in dilated cardiomyopathy rats and cardiomyocytes via activating Wnt/β-catenin pathway [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2021, 41(5): 494-503.
- [19] PEI J, FU W, YANG L, et al. Oxidative stress is involved in the pathogenesis of Keshan disease (an endemic dilated cardiomyopathy) in China [J]. Oxid Med Cell Longev, 2013, 2013: 474203.
- [20] ZHENG Y, ZHANG B, GUAN H, et al. Selenium deficiency causes apoptosis through endoplasmic reticulum stress in swine small intestine [J]. Biofactors, 2021, 47(5): 788-800.
- [21] WANG S Q, NIU X L, LIU Z W, et al. Selenium deficiency is associated with endoplasmic reticulum stress in a rat model of cardiac malfunction [J]. Biol Trace Elem Res, 2013, 156(1/3): 196-201.
- [22] SHAN H, YAN R, DIAO J, et al. Involvement of caspases and their upstream regulators in myocardial apoptosis in a rat model of selenium deficiency-induced dilated cardiomyopathy [J]. J Trace Elem Med Biol, 2015, 31: 85-91.
- [23] UCKER D S. Exploiting death: apoptotic immunity in microbial pathogenesis [J]. Cell Death Differ, 2016, 23(6): 990-996.
- [24] ROGERS C, FERNANDES-ALNEMRI T, MAYES L, et al. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death [J]. Nat Commun, 2017, 8: 14128.
- [25] D'ARCY M S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy [J]. Cell Biol Int, 2019, 43(6): 582-592.
- [26] TAKAESU G, KISHIDA S, HIYAMA A, et al. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway [J]. Mol Cell, 2000, 5(4): 649-658.
- [27] YIN H, GUO X, CHEN Y, et al. TAB2 deficiency induces dilated cardiomyopathy by promoting RIPK1-dependent apoptosis and necroptosis [J]. J Clin Invest, 2022, 132(4): e152297.
- [28] YU P, ZHANG X, LIU N, et al. Pyroptosis: mechanisms and diseases [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 128.
- [29] CHAI R, XUE W, SHI S, et al. Cardiac remodeling in heart failure: role of pyroptosis and its therapeutic implications [J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 870924.
- [30] 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.
- [31] ZENG Z, LI G, WU S, et al. Role of pyroptosis in cardiovascular disease [J]. Cell Prolif, 2019, 52(2): e12563.
- [32] VASUDEVAN S O, BEHL B, RATHINAM V A. Pyroptosis-induced inflammation and tissue damage [J]. Semin Immunol, 2023, 69: 101781.
- [33] WU X, ZHANG H, QI W, et al. Nicotine promotes atherosclerosis via ROS-NLRP3-mediated endothelial cell pyroptosis [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 171.
- [34] ZENG C, DUAN F, HU J, et al. NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis contributes to the pathogenesis of non-ischemic dilated cardiomyopathy [J]. Redox Biol, 2020, 34: 101523.
- [35] WANG K, LV Z, FANG C, et al. Pyroptosis patterns are involved in immune microenvironment regulation of dilated

- cardiomyopathy [J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 4627845.
- [36] LIANG JR, CORN JE. A CRISPR view on autophagy [J]. *Trends Cell Biol*, 2022, 32(12): 1008–1022.
- [37] QIAO D, ZHANG T, TANG M. Autophagy regulation by inorganic, organic, and organic/inorganic hybrid nanoparticles; Organelle damage, regulation factors, and potential pathways [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2023, 37(10): e23429.
- [38] ZHENG G, REN J, SHANG L, et al. Role of autophagy in the pathogenesis and regulation of pain [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 955: 175859.
- [39] PARZYCH K R, KLIONSKY D J. An overview of autophagy; morphology, mechanism, and regulation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3): 460–473.
- [40] GIL-CAYUELA C, LÓPEZ A, MARTÍNEZ-DOLZ L, et al. The altered expression of autophagy-related genes participates in heart failure; NRBP2 and CALCOCO₂ are associated with left ventricular dysfunction parameters in human dilated cardiomyopathy [J]. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0215818.
- [41] KANAMORI H, YOSHIDA A, NARUSE G, et al. Impact of autophagy on prognosis of patients with dilated cardiomyopathy [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2022, 79(8): 789–801.
- [42] XIE K, JIN B, LI Y, et al. Modulating autophagy improves cardiac function in a rat model of early-stage dilated cardiomyopathy [J]. *Cardiology*, 2013, 125(1): 60–68.
- [43] JIN B, SHI H, ZHU J, et al. Up-regulating autophagy by targeting the mTOR-4EBP1 pathway: a possible mechanism for improving cardiac function in mice with experimental dilated cardiomyopathy [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2020, 20(1): 56.
- [44] CARAGNANO A, ALEKSOVA A, BULFONI M, et al. Autophagy and inflammasome activation in dilated cardiomyopathy [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(10): 1519.
- [45] MOYZIS A G, SADOSHIMA J, GUSTAFSSON Å B. Mending a broken heart; the role of mitophagy in cardioprotection [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(3): H183–H192.
- [46] KANAMORI H, NARUSE G, YOSHIDA A, et al. Metformin enhances autophagy and provides cardioprotection in δ -sarcoglycan deficiency-induced dilated cardiomyopathy [J]. *Circ Heart Fail*, 2019, 12(4): e005418.
- [47] MUHAMMAD E, LEVITAS A, SINGH S R, et al. PLEKHM2 mutation leads to abnormal localization of lysosomes, impaired autophagy flux and associates with recessive dilated cardiomyopathy and left ventricular noncompaction [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(25): 7227–7240.
- [48] ARIMURA T, ISHIKAWA T, NUNODA S, et al. Dilated cardiomyopathy-associated BAG3 mutations impair Z-disc assembly and enhance sensitivity to apoptosis in cardiomyocytes [J]. *Hum Mutat*, 2011, 32(12): 1481–1491.
- [49] NORTON N, LI D, RIEDER M J, et al. Genome-wide studies of copy number variation and exome sequencing identify rare variants in BAG3 as a cause of dilated cardiomyopathy [J]. *Am J Hum Genet*, 2011, 88(3): 273–282.
- [50] ENOMOTO H, MITTAL N, INOMATA T, et al. Dilated cardiomyopathy-linked heat shock protein family D member 1 mutations cause up-regulation of reactive oxygen species and autophagy through mitochondrial dysfunction [J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(4): 1118–1131.
- [51] 谢坤. 调控自噬水平对扩张型心肌病大鼠心功能的影响及其机制探讨 [D]. 上海: 复旦大学, 2013.
- XIE K. Effect of regulating autophagy level on cardiac function in dilated cardiomyopathy rats and its mechanism [D]. Shanghai: Fudan University, 2013.
- [52] JIANG X, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis; mechanisms, biology and role in disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266–282.
- [53] CHEN X, KANG R, KROEMER G, et al. Broadening horizons; the role of ferroptosis in cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(5): 280–296.
- [54] HUANG X, SONG Y, WEI L, et al. The emerging roles of ferroptosis in organ fibrosis and its potential therapeutic effect [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 116: 109812.
- [55] KANG N, SON S, MIN S, et al. Stimuli-responsive ferroptosis for cancer therapy [J]. *Chem Soc Rev*, 2023, 52(12): 3955–3972.
- [56] WANG Z, YAO M, JIANG L, et al. Dexmedetomidine attenuates myocardial ischemia/reperfusion-induced ferroptosis via AMPK/GSK-3 β /Nrf2 axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 154: 113572.
- [57] HAN D, JIANG L, GU X, et al. SIRT3 deficiency is resistant to autophagy-dependent ferroptosis by inhibiting the AMPK/mTOR pathway and promoting GPX4 levels [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(11): 8839–8851.
- [58] WANG X, CHEN X, ZHOU W, et al. Ferroptosis is essential for diabetic cardiomyopathy and is prevented by sulforaphane *via* AMPK/NRF2 pathways [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(2): 708–722.
- [59] ZHANG W, YAO S, HUANG H, et al. Molecular subtypes based on ferroptosis-related genes and tumor microenvironment infiltration characterization in lung adenocarcinoma [J]. *Oncoimmunology*, 2021, 10(1): 1959977.
- [60] LEI T, QIAN H, LEI P, et al. Ferroptosis-related gene signature associates with immunity and predicts prognosis accurately in patients with osteosarcoma [J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(11): 4785–4798.
- [61] VERDONSCHOT J A J, MERLO M, DOMINGUEZ F, et al. Phenotypic clustering of dilated cardiomyopathy patients highlights important pathophysiological differences [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42(2): 162–174.
- [62] LU H, XIE Y, ZHOU Z, et al. Identification of novel targets for treatment of dilated cardiomyopathy based on the ferroptosis and immune heterogeneity [J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 2461–2476.
- [63] WANG Z, XIA Q, SU W, et al. Exploring the communal pathogenesis, ferroptosis mechanism, and potential therapeutic

- targets of dilated cardiomyopathy and hypertrophic cardiomyopathy *via* a microarray data analysis [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 824756.
- [64] CHEN Z, YAN Y, QI C, et al. The role of ferroptosis in cardiovascular disease and its therapeutic significance [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 733229.
- [65] YUE H, ZHAN Y, ZHANG Z, et al. The emerging role of ferroptosis in myocardial fibrosis of atrial fibrillation [J]. *Arch Med Sci*, 2023, 19(2): 507–512.
- [66] YANG T, YANG Q, LAI Q, et al. AP39 inhibits ferroptosis by inhibiting mitochondrial autophagy through the PINK1/parkin pathway to improve myocardial fibrosis with myocardial infarction [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115195.
- [67] WANG J, DENG B, LIU Q, et al. Pyroptosis and ferroptosis induced by mixed lineage kinase 3 (MLK3) signaling in cardiomyocytes are essential for myocardial fibrosis in response to pressure overload [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(7): 574.
- [68] 雷海桃, 王海东, 王金海, 等. 铜死亡调控机制的研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(8): 1491–1498.
LEI H T, WANG H D, WANG J H, et al. Progress in regulation mechanism of copper death [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2023, 39(8): 1491–1498.
- [69] TSVETKOV P, COY S, PETROVA B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins [J]. *Science*, 2022, 375(6586): 1254–1261.
- [70] HUO S, WANG Q, SHI W, et al. ATF3/SPI1/SLC31A1 signaling promotes cuproptosis induced by advanced glycosylation end products in diabetic myocardial injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1667.
- [71] RUIZ L M, LIBEDINSKY A, ELORZA A A. Role of copper on mitochondrial function and metabolism [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 711227.
- [72] ZHANG L, SHAO J, TAN S W, et al. Association between serum copper/zinc ratio and lung cancer: a systematic review with meta-analysis [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2022, 74: 127061.
- [73] BIAN R, WANG Y, LI Z, et al. Identification of cuproptosis-related biomarkers in dilated cardiomyopathy and potential therapeutic prediction of herbal medicines [J]. *Front Mol Biosci*, 2023, 10: 1154920.
- [74] FRANK D, VINCE J E. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk [J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(1): 99–114.
- [75] ZHENG M, KANNEGANTI T D. The regulation of the ZBP1-NLRP3 inflammasome and its implications in pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PANoptosis) [J]. *Immunol Rev*, 2020, 297(1): 26–38.
- [76] ROBERTS J Z, CRAWFORD N, LONGLEY D B. The role of ubiquitination in apoptosis and necroptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(2): 272–284.
- [77] GUO X, YIN H, CHEN Y, et al. TAK1 regulates caspase 8 activation and necroptotic signaling via multiple cell death checkpoints [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(9): e2381.
- [78] FRITSCH M, GÜNTHER S D, Schwarzer R, et al. Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis [J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 683–687.
- [79] PASPARAKIS M, VANDENABEELE P. Necroptosis and its role in inflammation [J]. *Nature*, 2015, 517(7534): 311–320.
- [80] GENG J, ITO Y, SHI L, et al. Regulation of RIPK1 activation by TAK1-mediated phosphorylation dictates apoptosis and necroptosis [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 359.
- [81] ZHANG S, WEI X, ZHANG H, et al. Doxorubicin downregulates autophagy to promote apoptosis-induced dilated cardiomyopathy via regulating the AMPK/mTOR pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 162: 114691.
- [82] ADAMS V, LINKE A, WISLOFF U, et al. Myocardial expression of Murf-1 and MAFbx after induction of chronic heart failure: effect on myocardial contractility [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 73(1): 120–129.
- [83] AL-YACOUB N, SHAHEEN R, AWAD S M, et al. FBXO32, encoding a member of the SCF complex, is mutated in dilated cardiomyopathy [J]. *Genome Biol*, 2016, 17: 2.
- [84] IKEDA S, ZABLOCKI D, SADOSHIMA J. The role of autophagy in death of cardiomyocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2022, 165: 1–8.
- [85] NIKOLETOPOULOU V, MARKAKI M, PALIKARAS K, et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(12): 3448–3459.
- [86] ZOU M H, XIE Z. Regulation of interplay between autophagy and apoptosis in the diabetic heart: new role of AMPK [J]. *Autophagy*, 2013, 9(4): 624–625.
- [87] SU L J, ZHANG J H, GOMEZ H, et al. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 5080843.

[收稿日期] 2023-07-25

徐柳清,赵培源,刘喜红,等. 星形胶质细胞表观遗传学调控机制研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 126-133.
Xu LQ, Zhao PY, Liu XH, et al. Advances in the study of epigenetic regulatory mechanisms of astrocytes [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 126-133.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.014

星形胶质细胞表观遗传学调控机制研究进展

徐柳清,赵培源*,刘喜红,杜晓丹,范孟杨,侯俊林

(河南中医药大学,郑州 450046)

【摘要】 星形胶质细胞(astrocyte,AS)是中枢神经系统最丰富的神经胶质细胞,其参与神经系统诸多生理和病理过程。其表型的改变对中枢神经系统的健康尤为重要。表观遗传学机制包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、非编码 RNA 调控和染色质重塑等,皆与 AS 增殖、分化、炎症等表型特征的改变紧密联系,但这些机制如何发挥作用仍需要探索与总结。通过综述在不同的生理和病理状态下表观遗传学机制对 AS 作用的最新进展,以期对相关疾病的认识和治疗提供新思路。

【关键词】 星形胶质细胞;表观遗传学;甲基化;组蛋白修饰;非编码 RNA

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0126-08

Advances in the study of epigenetic regulatory mechanisms of astrocytes

XU Liuqing, ZHAO Peiyuan*, LIU Xihong, DU Xiaodan, FAN Mengyang, HOU Junlin
(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

【Abstract】 Astrocytes (AS) are the most abundant glial cells in the central nervous system and are involved in many physiological and pathological processes in the nervous system. Alterations in their phenotype are particularly important for the health of the CNS. Epigenetic mechanisms, including DNA methylation, histone modification, non-coding RNA regulation, and chromatin remodeling, are closely linked to alterations in AS proliferation, differentiation, inflammation, and other phenotypic features, but how these mechanisms function needs to be explored and summarized. By reviewing the recent advances in the role of epigenetic mechanisms in AS under various physiological and pathological states, we aim to provide new ideas for the understanding and treatment of related diseases.

【Keywords】 astrocyte; epigenetic; methylation; histone modification; non-coding RNA

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

星形胶质细胞(astrocyte,AS)由神经祖细胞分化而成,占大脑胶质细胞总数的 20%~40%,可沿放射状胶质突起的迁移而遍布中枢神经系统(central nervous system,CNS)^[1],对 CNS 功能的维持尤为重要。AS 的生理功能包括维持细胞内稳态、营养神经元、保证血脑屏障的形成、改善突触的形成和修剪

等^[2-6]。反应性星形胶质细胞(reactive astrocytes, RAS)增生是大多数神经退行性疾病(neurodegeneration,ND)的共有特征,这伴随着 AS 形态的变化^[6]。AS 在病理状态下参与炎症反应、细胞凋亡、神经保护与修复和神经递质代谢等过程;疾病和损伤状态下的 RAS 可以分化成不同亚型,例如 A1 型

【基金项目】 国家自然科学基金(82104579);中国博士后科学基金面上项目(2023M731024);河南省自然科学基金(2023000410258);河南省高等学校青年骨干教师培养计划(2023GGJS080);河南省科技攻关(242102310497)。

【作者简介】 徐柳清(1997—),女,硕士研究生,研究方向:中枢神经系统疾病研究。E-mail: Xlq17985@163.com

【通信作者】 赵培源(1990—),男,博士,副教授,研究方向:中医药防治中枢神经系统疾病研究。E-mail: prayertcm@163.com

AS 分泌促炎因子,形成神经炎症并加剧神经元的损伤,并进一步诱导神经元凋亡,而 A2 型 AS 分泌神经营养因子,促进神经元和组织修复,从而发挥保护神经元的作用^[7-8]。

表观遗传学是研究恒定的 DNA 序列与可变的基因表达模式之间信息流的分子过程,改变的表观模式可以随着有丝分裂进行遗传^[9],表观遗传学机制包括了 DNA 甲基化、组蛋白修饰、非编码 RNA 调控、染色质重塑等。通过综述表观遗传学在 AS 生理或病理过程中扮演的角色,从而认识不同机制对 AS 参与的疾病的发病机制和病变过程的影响,以期为干预 AS 表型和功能进而改善疾病提供新思路。

1 DNA 甲基化

DNA 甲基化是指在 DNA 序列中靠近鸟嘌呤残基一端,给胞嘧啶残基的 5' 端加上一个由 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylme thionine, SAM)提供的甲基基团^[10-11]。这些位点称为胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤(cytosine-phosphate-guanine, CpG)岛,其多富集在基因的启动子和增强子等调节区域。DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMT)催化胞嘧啶环上的 CpG 岛的甲基化,生成 5-甲基胞嘧啶来调节基因的表达^[12-13]。DNMT 主要包括维持 DNA 甲基化的 DNMT1,还包括催化 CpG 从头甲基化的 DNMT3a 和 DNMT3b^[14]。

DNMT 诱导的 DNA 甲基化可抑制 AS 的增殖。例如,DNMT1 识别 AS 中半甲基化的 DNA 并促进甲基化,敲除 DNMT1 促进 AS 的增殖^[15]。多发性硬化症患者海马体里 DNMT1 的 mRNA 水平显著增

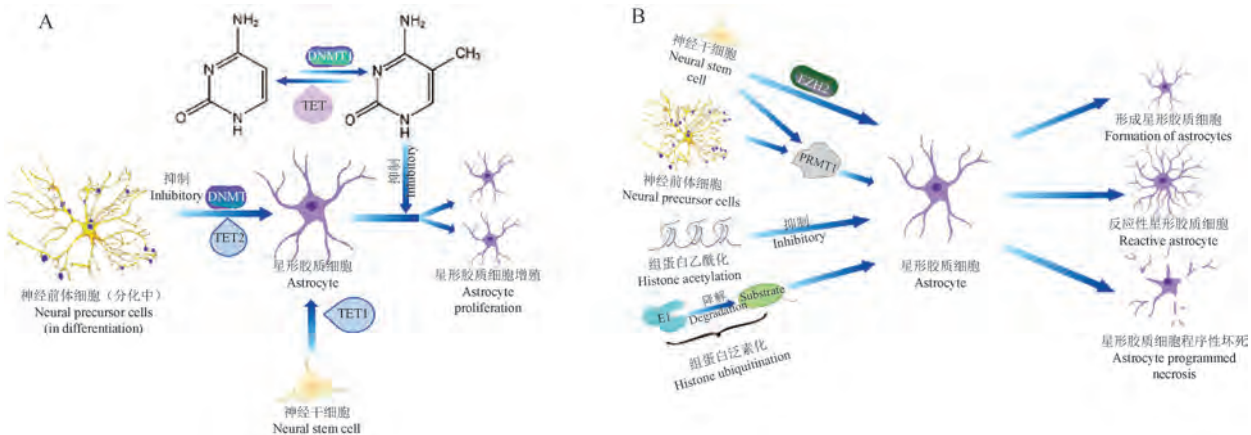
加,当抑制 DNMT 的活性时,可促使神经前体细胞向 AS 分化^[3]。

10-11 易位蛋白家族(ten-eleven translocation, TET)可以介导 DNA 去甲基化,TET 蛋白通过将 5 mC 转化为 5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)等中间产物,并进一步氧化 5hmC 为 5-甲酰胞嘧啶(5fC)和 5-羧基胞嘧啶(5caC)等,最终变成非甲基化状态^[16]。抗坏血酸与 TET1 的催化域特异性结合,募集 AS 基因中 5hmC 富集区域里转录因子(nuclear factor I, NFI)和转录激活因子(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3),导致 DNA 去甲基化,促进神经干细胞(一种具有自我更新和多能性的细胞类型)向多巴胺神经元和 AS 分化^[17-18]。在小于胎龄儿的下丘脑中,SIRT1 蛋白的高表达增强了 TET2 的活性,使胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的启动子区域的 DNA 去甲基化增强,增加 GFAP 的表达,促进神经前体细胞向 AS 的分化^[19]。

研究 AS 中不同 DNA 甲基转移酶对甲基化的调节,进而对 AS 表观遗传学进行改变(见图 1A),有利于对 AS 参与的疾病以及对表观遗传变化的认识。

2 组蛋白修饰

常见组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 分别以二聚体的形式组成组蛋白八聚体从而维护基因组的稳定并调节 DNA 的表达。研究组蛋白修饰与 AS 的关系(见图 1B)对于研究 CNS 功能障碍和 ND 至关重要。



注:A:DNA 甲基化;B:组蛋白修饰。

图 1 DNA 甲基化和组蛋白修饰对 AS 的作用(本图部分素材来源于 Figdraw)

Note. A, DNA methylation. B, Histone modifications.

Figure 1 Role of DNA methylation and histone modifications in AS (some of the material in this image is from Figdraw)

2.1 组蛋白甲基化

组蛋白甲基化主要依靠组蛋白甲基转移酶 (histone methyl transferase, HMT)。HMT 包括了精氨酸甲基转移酶 (protein arginine methyl transferases, PRMT) 和赖氨酸甲基转移酶 (lysine methyl transferase, KMT)^[20]。精氨酸甲基化会激活转录,而赖氨酸甲基化因甲基化位点的不同而激活或者抑制转录^[21]。

例如 PRMT1 使 STAT3 的精氨酸残基甲基化,促进神经干细胞和神经前体细胞向 AS 分化^[22]。zeste 基因增强子的人类同源物 2 (enhancer of zeste homolog2, Ezh2) 是催化组蛋白 3 第 27 位赖氨酸的三甲基化的一种 HMT, Ezh2 能够抑制神经干细胞向 AS 分化的关键因子 OLIG2 的表达;反之沉默 Ezh2 使 OLIG2 的表达增加,神经干细胞分化为 AS 的概率减少^[23]。此外,组蛋白 H3 甲基化位点差异可影响神经干细胞分化进而影响 AS 的生成和数量,若 STAT3 结合位点的组蛋白 3 上的第 9 个赖氨酸甲基化,则使神经干细胞丧失分化能力;若甲基化发生在组蛋白 3 上的第 4 个赖氨酸上,促使神经祖细胞向 AS 分化;也有研究发现组蛋白 3 上第 4 个赖氨酸的三甲基化在成人 AS 的迁移、凋亡、转录调控和 DNA 损伤反应中表达增加^[24]。对 AS 中组蛋白甲基化过程中不同的酶的作用的探索有利于维持 AS 生理功能和表型稳定。

2.2 组蛋白乙酰化

组蛋白乙酰化是在乙酰转移酶 (histone acetyltransferase, HAT) 的催化下,将乙酰基团转移且多添加在主要蛋白赖氨酸残基或蛋白 N 端上的过程。HAT 活化基因转录,组蛋白脱乙酰酶 (histone deacetylase, HDAC) 抑制基因转录。HDAC 可促进神经干细胞和 NPC 分化为神经元或神经胶质细胞^[25]。抑制 HDAC 可减少人脑中原代 AS 和星形细胞瘤细胞中 GFAP 的表达^[26]。AS 特异性组蛋白乙酰化的减少是导致 CNS 炎症反应增加的机制之一,这对 CNS 损伤后修复极为重要,因此有必要认识组蛋白乙酰化对 CNS 疾病中 AS 表观遗传学的改变。

组蛋白乙酰化可以减轻 AS 的炎症从而保护神经^[27]。在帕金森氏综合症中,HDAC 抑制剂能提高组蛋白乙酰化水平,使脑源性神经营养因子和 AS 源性神经营养因子的基因表达量增多,从而保护多巴胺能神经元^[28]。富马酸二甲酯具有抗炎作用,刺

激 AS 可使 HDAC1、HDAC2 和 HDAC4 的基因表达降低,从而激活红细胞 2 号核因子,抑制 AS 的炎症反应,达到治疗多发性硬化疾病的作用^[29]。此外,AS 分泌的载脂蛋白 E (ApoE) 通过抑制神经元细胞内胆固醇的合成来累积前体乙酰辅酶 A,增加 AS 中的组蛋白乙酰化修饰,起到降低炎症反应的作用^[30]。总之,组蛋白乙酰化的增加可以使 AS 的炎症反应降低,并导致神经保护作用增加^[31]。

2.3 组蛋白泛素化和类泛素化

泛素化是一种蛋白质翻译后修饰,是指蛋白和泛素分子通过共价键依次与泛素激活酶 E1、泛素偶联酶 E2 和泛素连接酶 E3 结合,介导蛋白降解^[31]。泛素化是一种翻译后修饰,参与细胞生存和先天免疫在内的多种生理过程。受体相互作用蛋白激酶 1 (receptor-interacting protein kinase1, RIP1) 在中间域的赖氨酸 377 位点进行泛素化,继而抑制 NF- κ B 通路,从而导致细胞死亡。因此,抑制 RIP1 的泛素化水平来减少 AS 的程序性坏死,能从根源上减轻神经炎症反应,促进脊髓损伤后的轴突再生与再髓鞘化^[32]。AS 在 ND 中的炎症反应可能部分依赖于 H2B 的单泛素化,具体机制仍待研究^[3]。阿尔茨海默病发生时,AS 激活导致神经元丢失,类泛素蛋白 SUMO-1 能维持 AS 非活化状态,保持神经元稳定^[29]。

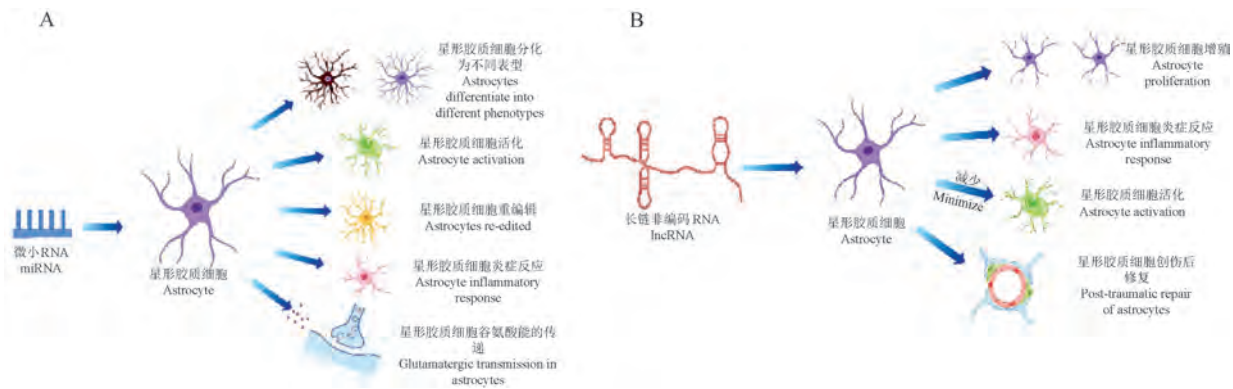
3 非编码 RNA 调控

非编码 RNA 中部分微小 RNA (microRNA, miRNA) 和长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 的功能对 AS 的表型及功能的改变密切相关^[33] (见图 2)。

3.1 miRNA 与 AS

miRNA 能抑制基因转录后的翻译^[34]。大脑特异性 miRNA 在 AS 的发育中有重要的作用^[35]。一些 miRNA 优先在 AS 中表达^[10],例如 miR-324-5p、miR-137 和 miR-223 能调节 AS 病理条件下分泌物的谷氨酸能的传递,作用于 VGluT2 等谷氨酸转运蛋白,影响神经元的兴奋性和突触可塑性,进而影响到神经元的兴奋性和突触可塑性,对神经元的功能产生影响^[36]。

miRNA 作为一把双刃剑,一方面对于损伤状态下 AS 功能的调节具有重要影响,另一方面对 miRNA 调控 AS 表型特征的机制的研究有助于改善损伤后修复。



注：A：miRNA；B：lncRNA。

图 2 miRNA 和 lncRNA 对 AS 的作用(本图部分素材来源于 Figdraw)

Note. A, miRNA. B, lncRNA.

Figure 2 Role of miRNA and in lncRNA in AS (some of the material in this image is from Figdraw)

miRNA 通过参与和维持 CNS 疾病中的 AS 炎症反应来加剧损伤^[37]。一些与 TNF- α 信号通路紧密关联的 miRNA 在炎症刺激后的大小鼠皮质 AS 中特异性表达,促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 通过 TLR 信号传导、吞噬化的髓磷脂、丝裂原和自由基激活 NF- κ B 信号传导,使下游炎症因子促进 AS 内 miR-146a 的增加,导致淋巴巨噬细胞募集,从而启动和维持 CNS 炎症,加重 AS 炎症^[28-29]。

miRNA 能调节 AS 的稳态、表型和保护作用从而修复 ND 带来的损伤。miR-132 通过靶向抑制 IRAK4 的表达,进一步抑制 IL-1 β 和 IL-6 的表达,从而减轻 AS 的炎症反应^[38]。miR-873 在 IL-17 刺激的 AS 内通过 A20/NF- κ B 途径促进炎性细胞因子的产生,并加重实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的病理过程^[39]。miR-21 下调使 A1s 转变为 A2s,可减少脊髓损伤后炎症反应,促进神经功能恢复;脊髓损伤后 miR-124-3p 激活 NF- κ B 通路,促进 AS 的活化^[40]。也有研究发现,miR-335-3p 通过抑制 AS 中胆固醇生成的关键酶 HMGCS1 和 HMGCR 的表达来减少胆固醇的生成^[41]。

此外,miRNA 还与 AS 的分化和重编程密切相关。例如 miR-184 显示与 Bcl2l1(一种在 AS 中高度表达的基因)的强保守的 8 聚体位点结合,抑制 AS 的分化;miR-1183 与真核翻译起始因子 2B 亚基 5 ϵ 的 mRNA 3' UTR 结合,促进 AS 分化^[42]。miRNA 可以作用于 AS 重编程,在大鼠 AS 中,miR-124 联合 SB203580、ruxolitinib 和 forskolin 三种小分子化合物抑制 RAS 增生,并使 RAS 转化为神经元^[43]。

3.2 lncRNA 与 AS

lncRNA 参与表观遗传、转录及转录后水平的调

控^[44]。lncRNA 可以影响 AS 的分化、凋亡等过程。lncRNA 可以减少 AS 的活化,例如, lncRNA-UCA1 过表达通过抑制 JAK/STAT 信号通路,从而减少颞叶癫痫中 AS 的活化^[45],但具体活化类型仍待研究。lncRNA NKILA 能够阻断 NF- κ B 的激活,并抑制 AS 增殖^[46]。

lncRNA 也可以参与 AS 的炎症反应, lncRNA SNHG14 能参与形成 SNHG14/miR-223-3p/NLRP3 轴来减轻 AS 介导的神经炎症^[47]。敲低 lncRNA MALAT1 能使 miR-145 水平上调,进而降低 AQP4 蛋白的表达,减少脑微血管内的水转运至 AS 而导致的损伤^[48]。lncRNA MEG3 可与核 p65/p50 结合,促进 NF- κ B 与核内 IL-6 和 TNF- α 启动子结合,进而刺激 LPS 处理过的 AS 产生炎性细胞因子^[49]。

此外, lncRNA 也对 AS 增殖和创伤后修复起重要作用。敲低 lncRNA SNHG14 能促进 OGD/R 诱导的 AS 的增殖,抑制细胞凋亡率,使炎症因子 TNF- α 、IL-10 显著降低,从而减轻 AS 损伤^[50]。总之, lncRNA 在 AS 生物学中有着多种复杂的作用,对于 AS 的健康发育、分化及相关疾病的理解 and 治疗具有重要的临床应用前景。

4 染色质重塑

染色质重塑复合物利用 ATP 水解的能量破坏 DNA 与组蛋白的结合,从而改变核小体位置,使转录因子能进入特定的 DNA 区域启动靶基因的转录^[51]。组蛋白 H3K9me3 是异染色质和转录沉默的一个标志,染色质重塑对 AS 的促炎能力影响颇大^[52]。生物材料的黏附性、纳米外貌及三维构造均

能重组细胞的骨架分子,使细胞核内的染色质发生重塑^[53],这也为 AS 表观遗传学的调控提供了可操作的方向。

5 总结与展望

许多疾病受遗传因素与表观遗传因素的共同影响,多种表观遗传学修饰也在不同状态下的 AS 中发挥着不同的作用。明确 AS 中不同 DNA 甲基转移酶对甲基化的调节机制及其带来的表观遗传学改变对 AS 的影响,有利于提高对 AS 相关疾病的认识。例如,可以通过克隆技术将 DNA 甲基转移酶的基因插入表达载体,并将表达载体转染到 AS 中,最后评估其对 AS 表型的改变。这同时也为相关疾病研究过程中实验模型的构建提供了思路,当然,仍需要发现其他策略来干预。

组蛋白修饰在 AS 的生理功能和表型稳定中起着重要作用,对 AS 的分化、炎症反应、迁移、凋亡、转录调控和 DNA 损伤反应等过程有显著影响。不

同组蛋白修饰酶在 AS 中的作用机制及其在 CNS 疾病中的调控作用仍然有待研究,利用组蛋白修饰酶的激活剂或者抑制剂以及底物可以调控组蛋白修饰进而研究如何治疗 AS 相关疾病。

探讨 miRNA 和 lncRNA 在 AS 发育和分化中的角色,有助于更好地理解 AS 的正常功能和生物学过程,并提出其治疗 AS 相关疾病的方法,为科研提供新的思路。研究非编码 RNA 在 AS 中的相互作用则有助于全面了解它们在 AS 中的调控网络,这也是未来研究的重要方向之一。基于非编码 RNA 的调控机制,开发新的治疗方法或药物,以改善 AS 相关疾病的治疗效果,也是研究的重要目标。总之,本文总结了常见表观遗传学机制对 AS 的改变及作用(见表 1)。表观遗传学影响 AS 的具体机制及其衍生效应仍有很大的研究空间,未来从表观遗传学机制方面对生理病理状态下 AS 的形态、功能等改变进行深入研究,以期对 ND 等疾病的认识与防治提供指导。

表 1 星形胶质细胞表观遗传学调控机制
Table 1 Mechanisms of epigenetic regulation of astrocytes

表观遗传学机制 Epigenetic mechanisms	作用分子 Functioning molecules	功能 Functionality	作用机制 Functioning mechanisms
DNA 甲基化 DNA methylation	DNA 甲基转移酶 DNA methyltransferase	DNA 甲基转移酶 1 DNMT1	抑制 AS 增殖 Inhibition of AS proliferation
	DNA 去甲基转移酶 DNA demethyltransferase	TET 蛋白 1 TET1	促进神经干细胞向 AS 分化 Promoting neural stem cell differentiation to AS
		TET 蛋白 2 TET2	促进神经前体向 AS 分化 Promotes differentiation of neural precursors to AS
组蛋白修饰 Histone modifications	精氨酸甲基转移酶 Protein arginine methyltransferases	精氨酸甲基转移酶 1 PRMT1	促进神经干细胞和神经前体细胞向 AS 分化 Promoting differentiation of neural stem cells and neural precursor cells to AS
	赖氨酸甲基转移酶 Lysine methyltransferase	zeste 基因增强子的人类同源物 2 Ezh2	促进神经干细胞向 AS 分化 Promoting neural stem cell differentiation to AS
	组蛋白去乙酰酶 Histone deacetylase (HDAC)	HDAC1 HDAC2 HDAC4	抑制 AS 的炎症反应 Suppression of the inflammatory response to AS
	泛素蛋白 Ubiquitin protein	受体相互作用蛋白激酶 1 RIP1	导致 AS 程序性坏死 Leads to AS programmed necrosis
			促进 AS 中半甲基化的 DNA 甲基化 ^[3] Methylated hemimethylated DNA in AS
			增强 AS 特异性基因 5-hmC 富集区域中 NF1 和 STAT3 的募集 ^[17,18] Enhanced recruitment of NF1 and STAT3 in the 5-hmC-enriched region of AS-specific genes
			降低 GFAP 启动子区域的甲基化水平 ^[19] Reduced methylation levels in the GFAP promoter region
			使 STAT3 的精氨酸残基甲基化 ^[22] Methylates the arginine residue of STAT3
			抑制转录因子 OLIG2 的表达 ^[23] Inhibition of the expression of the transcription factor OLIG2
			低表达可激活红细胞 2 号核因子减轻炎症 ^[29] Low expression reduces inflammation by activating nuclear factor erythroid 2
			抑制 NF-κB 通路,从而控制细胞死亡 ^[32] Inhibition of the NF-κB pathway, thereby controlling cell death

续表1

表观遗传学机制 Epigenetic mechanisms	作用分子 Functioning molecules	功能 Functionality	作用机制 Functioning mechanisms
微小 RNA miRNA	miR-324-5p miR-137 miR-223	调节 AS 病理状态下谷氨酸能的传递 Regulation of glutamatergic transmission in AS pathology	作用于 VGlut2 等谷氨酸转运蛋白,影响神经元的兴奋性和突触可塑性 ^[36] Acts on glutamate transporter proteins such as VGlut2 and affects neuronal excitability and synaptic plasticity
	miR-132	减轻 AS 的炎症反应 Reducing the inflammatory response to AS	靶向 IRAK4,抑制 IL-1β 和 IL-6 ^[38] Targets IRAK4, inhibits IL-1β and IL-6
	miR-124-3p	促进 AS 的活化 Promoting AS activation	激活 NF-κB 通路 ^[40] Promoting AS activation
非编码 RNA 调控 Non-coding RNA regulation	miR-184	miR-184 抑制 AS 的分化 miR-184 inhibited the differentiation of AS	miR-184 靶向增强子 Bcl2l1 的强保守 8mer 结合位点 miR-184 targets the strong conservation of the enhancer Bcl2l1 guard 8mer binding site
	miR-1183	miR-1183 促进 AS 的分化 miR-1183 promoted AS differentiation	miR-1183 靶向 Eif2b5 的 mRNA 3' UTR miR-1183 targets the mRNA 3' UTR of Eif2b5
	UCA1	抑制 AS 的活化 Inhibition of AS activation	抑制 JAK/STAT 信号通路 ^[45] Inhibition of JAK/STAT signaling pathway
	NKILA	抑制 AS 增殖 Inhibition of AS proliferation	阻断 NF-κB 途径的激活 ^[46] Blocking activation of the NF-κB pathway
	MALAT1	导致 AS 损伤 Causes AS damage	靶向 miR-145,增加 AQP4 的表达 ^[48] Targeting miR-145 to increase AQP4 expression
	MEG3	参与 AS 产生炎性细胞因子的过程 Involved in the production of inflammatory cytokines by AS	可与核 p65/p50 结合,促进 NF-κB 与核内 IL-6 和 TNF-α 启动子结合 ^[49] Binds to nuclear p65/p50, promotes NF-κB binding to nuclear IL-6 and TNF-α promoters
	SNHG14	抑制 AS 增殖和修复 Inhibition of AS proliferation and repair	降低 TNF-α、IL-10 ^[50] Reduces TNF-α, IL-10

参考文献:

[1] 李立亚,秦霏. 星形胶质细胞在中枢神经系统炎症性疾病中作用的研究进展 [J]. 基础医学与临床, 2023, 43(4): 665-668.
LI L Y, QIN P. Advances of researches on astrocytes in inflammatory diseases of central nervous system [J]. Basic Clin Med, 2023, 43(4): 665-668.

[2] LIDDELOW S, BARRES B. SnapShot: astrocytes in health and disease [J]. Cell, 2015, 162(5): 1170-1170.

[3] NEAL M, RICHARDSON J R. Epigenetic regulation of astrocyte function in neuroinflammation and neurodegeneration [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(2): 432-443.

[4] SOFRONIEW M V, VINTERS H V. Astrocytes: biology and pathology [J]. Acta Neuropathol, 2010, 119(1): 7-35.

[5] 刘洁,王文元. 星形胶质细胞的生理病理研究进展 [J]. 神经病学与神经康复学杂志, 2020, 16(1): 1-10.
LIU J, WANG W Y. Physiological and pathological functions of astrocytes [J]. J Neurol Neurorehabilit, 2020, 16(1): 1-10.

[6] BORGENTHEIMER E, HAMEL K, SHEELER C, et al. Single nuclei RNA sequencing investigation of the Purkinje cell and glial changes in the cerebellum of transgenic Spinocerebellar ataxia type 1 mice [J]. Front Cell Neurosci, 2022, 16: 998408.

[7] LIDDELOW S A, GUTTENPLAN K A, CLARKE L E, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia [J]. Nature, 2017, 541(7638): 481-487.

[8] 李倩,李玲玲,李爽,等. 脊髓 A1 型星形胶质细胞在外周炎性痛中的动态变化 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 578-584.
LI Q, LI L L, LI S, et al. Changes in spinal A1 astrocyte polarization during peripheral inflammatory pain [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 578-584.

[9] LI Y. Modern epigenetics methods in biological research [J]. Methods, 2021, 187: 104-113.

[10] PAVLOU M A S, GRANDBARBE L, BUCKLEY N J, et al. Transcriptional and epigenetic mechanisms underlying astrocyte identity [J]. Prog Neurobiol, 2019, 174: 36-52.

[11] 杨静,贾建新,庞一强. rhEPO 对缺氧糖缺氧大鼠星形胶质细胞的保护作用及对其 DNA 甲基转移酶的影响 [J]. 右江民族医学院学报, 2016, 38(6): 570-573.
YANG J, JIA J X, PANG Y Q. Protective function of rhEPO and the effects of rhEPO on DNMT in astrocytes of rats cultured

- by oxygen-glucose deprivation [J]. J Youjiang Med Univ Natl, 2016, 38(6): 570-573.
- [12] SIVALINGAM K, SAMIKKANNU T. Neuroprotective effect of piracetam against cocaine-induced neuro epigenetic modification of DNA methylation in astrocytes [J]. Brain Sci, 2020, 10(9): 611.
- [13] WANG B, LUO Q, LI Y, et al. Structural insights into target DNA recognition by R2R3-MYB transcription factors [J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(1): 460-471.
- [14] 姚志刚, 秦川. 表观遗传修饰在学习和记忆中的调节作用 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(5): 441-445.
- YAO Z G, QIN C. Epigenetic regulation in learning and memory: a review [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2011, 19(5): 441-445.
- [15] NGUYEN N H, MORLAND C, GONZALEZ S V, et al. Propionate increases neuronal histone acetylation, but is metabolized oxidatively by glia. Relevance for propionic acidemia [J]. J Neurochem, 2007, 101(3): 806-814.
- [16] JOSHI K, LIU S, BRESLIN S J P, et al. Mechanisms that regulate the activities of TET proteins [J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(7): 363.
- [17] SUN J, YANG J, MIAO X, et al. Proteins in DNA methylation and their role in neural stem cell proliferation and differentiation [J]. Cell Regen, 2021, 10(1): 7.
- [18] CAO F, HATA R, ZHU P, et al. Conditional deletion of Stat3 promotes neurogenesis and inhibits astrogliogenesis in neural stem cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(3): 843-847.
- [19] 山丹, 时青云. SIRT1 通过调控 TET2 促进小于胎龄儿下丘脑中星形胶质细胞分化 [J]. 现代妇产科进展, 2022, 31(1): 21-28.
- SHAN D, SHI Q Y. SIRT1 promotes astrocytes differentiation in the hypothalamus of small-for-gestational age infants by regulating TET2 [J]. Prog Obstet Gynecol, 2022, 31(1): 21-28.
- [20] HUSMANN D, GOZANI O. Histone lysine methyltransferases in biology and disease [J]. Nat Struct Mol Biol, 2019, 26(10): 880-889.
- [21] 邝小华, 赖仲宏, 刘午阳. 组蛋白修饰在成骨细胞中的调控作用 [J]. 赣南医学院学报, 2022, 42(12): 1330-1334.
- KUANG X H, LAI Z H, LIU W Y. Regulation of histone modifications in osteoblasts [J]. J Ganman Med Univ, 2022, 42(12): 1330-1334.
- [22] HONDA M, NAKASHIMA K, KATADA S. PRMT1 regulates astrocytic differentiation of embryonic neural stem/precursor cells [J]. J Neurochem, 2017, 42(6): 901-907.
- [23] HWANG W W, SALINAS R D, SIU J J, et al. Distinct and separable roles for EZH2 in neurogenic astroglia [J]. eLife, 2014, 3: e02439.
- [24] ZHAO H, LI G, WANG R, et al. MiR-424 prevents astrogliosis after cerebral ischemia/reperfusion in elderly mice by enhancing repressive H3K27me3 via NFIA/DNMT1 signaling [J]. FEBS J, 2019, 286(24): 4926-4936.
- [25] YANG J, TANG Y, LIU H, et al. Suppression of histone deacetylation promotes the differentiation of human pluripotent stem cells towards neural progenitor cells [J]. BMC Biol, 2014, 12: 95.
- [26] KANSKI R, SNEEBOER M A, VAN BODEGRAVEN E J, et al. Histone acetylation in astrocytes suppresses GFAP and stimulates a reorganization of the intermediate filament network [J]. J Cell Sci, 2014, 127(Pt 20): 4368-4380.
- [27] SUH H S, CHOI S, KHATTAR P, et al. Histone deacetylase inhibitors suppress the expression of inflammatory and innate immune response genes in human microglia and astrocytes [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2010, 5(4): 521-532.
- [28] WU X, CHEN P S, DALLAS S, et al. Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons [J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2008, 11(8): 1123-1134.
- [29] 王若楠, 牛小影, 王睿琚, 等. PFOS 对星形胶质细胞表观遗传调控作用初探 [J]. 生态毒理学报, 2019, 14(2): 98-105.
- WANG R N, NIU X Y, WANG R J, et al. Role of epigenetic modification in the PFOS neurotoxicity—a study in the rat primary astrocytes [J]. Asian J Ecotoxicol, 2019, 14(2): 98-105.
- [30] 王天昊. 黄体酮对大鼠神经痛的镇痛作用及机制研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2017.
- WANG T H. The Analgesic Effect of progesterone on neuropathic pain and its possible mechanisms in rats [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2017.
- [31] 杨妍, 刘璐娜, 汤冬娥. 结直肠癌表观遗传学及泛素化修饰的相关进展 [J]. 广东医科大学学报, 2022, 40(6): 711-715.
- YANG Y, LIU F N, TANG D E. Advances in epigenetics and ubiquitination modification in colorectal cancer [J]. J Guangdong Med Univ, 2022, 40(6): 711-715.
- [32] 赵鸿娉. 电针调控 RIP1 泛素化抑制小鼠脊髓损伤后星胶细胞程序性坏死的机制研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2022.
- ZHAO H D. Effects of electroacupuncture modulation of RIP1 Ubiquitination on the inhibition of astrocytic necroptosis after spinal cord injury in mice [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2022.
- [33] FOLLERT P, CREMER H, BÉCLIN C. MicroRNAs in brain development and function: a matter of flexibility and stability [J]. Front Mol Neurosci, 2014, 7: 5.
- [34] 黄玲巍, 张震宇, 王家敏, 等. MicroRNA 调控肿瘤形成相关的因素及信号通路 [J]. 中国细胞生物学报, 2023, 45(6): 962-973.
- HUANG L W, ZHANG Z Y, WANG J M, et al. Factors and signaling pathways related to microRNA regulation of tumor formation [J]. Chin J Cell Biol, 2023, 45(6): 962-973.
- [35] FIORE R, KHUDAYBERDIEV S, SABA R, et al. MicroRNA function in the nervous system [J]. Prog Mol Biol Transl Sci,

- 2011, 102: 47–100.
- [36] RAMÍREZ A E, GIL-JARAMILLO N, TAPIAS M A, et al. MicroRNA: a linking between astrocyte dysfunction, mild cognitive impairment, and neurodegenerative diseases [J]. *Life*, 2022, 12(9): 1439.
- [37] HOOGLAND I C, HOUBOLT C, VAN WESTERLOO D J, et al. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments [J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12: 114.
- [38] KONG H, YIN F, HE F, et al. The effect of miR-132, miR-146a, and miR-155 on MRP8/TLR4-induced astrocyte-related inflammation [J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 57(1): 28–37.
- [39] CHEN Z, LI Z, JIANG C, et al. MiR-92b-3p promotes neurite growth and functional recovery via the PTEN/AKT pathway in acute spinal cord injury [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 23043–23052.
- [40] 刘太聪, 贺雨晴, 史永强, 等. 星形胶质细胞在脊髓损伤中的作用及机制 [J]. *实用临床医药杂志*, 2022, 26(11): 143–148.
LIU T C, HE Y Q, SHI Y Q, et al. Role and mechanism of astrocytes in spinal cord injury [J]. *J Clin Med Pract*, 2022, 26(11): 143–148.
- [41] RAIHAN O, BRISHTI A, MOLLA M R, et al. The age-dependent elevation of miR-335-3p leads to reduced cholesterol and impaired memory in brain [J]. *Neuroscience*, 2018, 390: 160–173.
- [42] LETZEN B S, LIU C, THAKOR N V, et al. MicroRNA expression profiling of oligodendrocyte differentiation from human embryonic stem cells [J]. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10480.
- [43] 郑洋洋. MiR-124 联合小分子化合物协同调控大鼠反应性星形胶质细胞向神经元转分化 [D]. 长春: 吉林大学, 2021.
ZHENG Y Y. MiR-124 and small molecules synergistically regulate the conversion of neuronal cells from rat reactive astrocytes [D]. Changchun: Jilin University, 2021.
- [44] LYU Y, BAI L, QIN C. Long noncoding RNAs in neurodevelopment and Parkinson's disease [J]. *Animal Model Exp Med*, 2019, 2(4): 239–251.
- [45] WANG H, YAO G, LI L, et al. LncRNA-UCA1 inhibits the astrocyte activation in the temporal lobe epilepsy via regulating the JAK/STAT signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(10): 4261–4270.
- [46] GAO W, NING Y, PENG Y, et al. LncRNA NKILA relieves astrocyte inflammation and neuronal oxidative stress after cerebral ischemia/reperfusion by inhibiting the NF- κ B pathway [J]. *Mol Immunol*, 2021, 139: 32–41.
- [47] DUAN R, WANG S Y, WEI B, et al. Angiotensin-(1-7) analogue AVE0991 modulates astrocyte-mediated neuroinflammation via lncRNA SNHG14/miR-223-3p/NLRP3 pathway and offers neuroprotection in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 7007–7019.
- [48] WANG H, ZHENG X, JIN J, et al. LncRNA MALAT1 silencing protects against cerebral ischemia-reperfusion injury through miR-145 to regulate AQP4 [J]. *J Biomed Sci*, 2020, 27(1): 40.
- [49] ZHANG F, WANG Z, SUN B, et al. Propofol rescued astrocytes from LPS-induced inflammatory response via blocking LncRNA-MEG3/NF- κ B axis [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2022, 19(1): 5–18.
- [50] 王丹, 成刚, 廖英. LncRNA SNHG14 通过调控 miR-372-3p 对 OGD/R 诱导的星形胶质细胞增殖、凋亡和炎性反应的影响 [J]. *河北医药*, 2022, 44(13): 1925–1929.
WANG D, CHENG G, LIAO Y. Effects of long non-coding RNA-SNHG14 on the proliferation, apoptosis and inflammation of oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced astrocytes in rats by regulating miR-372-3p [J]. *Hebei Med J*, 2022, 44(13): 1925–1929.
- [51] REYES A A, MARCUM R D, He Y. Structure and function of chromatin remodelers [J]. *J Mol Biol*, 2021, 433(14): 166929.
- [52] VILLARREAL A, VIDOS C, Monteverde Busso M, et al. Pathological neuroinflammatory conversion of reactive astrocytes is induced by microglia and involves chromatin remodeling [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 689346.
- [53] 江小霞, 王常勇. 表观遗传学与组织工程 [J]. *生命科学*, 2020, 32(3): 299–307.
JIANG X X, WANG C Y. Epigenetics and tissue engineering [J]. *Chin Bull Life Sci*, 2020, 32(3): 299–307.

[收稿日期]2023-07-25

马云辉,王晓堂,高继萍,等. 基因编辑技术在免疫缺陷动物模型研究中的应用进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 134-143.

Ma YH, Wang XT, Gao JP, et al. Progress on the use of gene editing technologies in the research of immunodeficient animal models [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5):134-143.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.015

基因编辑技术在免疫缺陷动物模型研究中的应用进展

马云辉,王晓堂,高继萍,宋国华*

(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】 免疫缺陷动物模型在临床前研究中发挥重要作用,是现代生物医学研究领域的重要实验工具,广泛应用于免疫学、遗传学、肿瘤学与微生物学等研究领域。基因编辑是针对生物体基因组进行靶向修饰的技术,从出现到应用,极大推动了生物医学研究领域的发展。基因编辑技术主要包括 HEs、ZFNs、TALENs 与 CRISPR/Cas9 系统。目前,研究者已利用该技术建立了多种类型的免疫缺陷动物模型,各有其优势和局限性。近年来,大量研究证实人源化免疫缺陷动物模型能够精准模拟癌细胞、药物以及免疫系统在人体内的作用,可以更好地模拟人类疾病,广泛用于研究人类免疫生物学及人类复杂疾病的潜在机制。本文对利用基因编辑技术构建免疫缺陷动物模型的研究应用进展进行综述,对基因编辑技术在免疫缺陷动物模型制备中存在的问题及优化策略深入探讨,并对其未来发展前景进行了展望,以期为研究者选用和建立免疫缺陷动物模型提供参考。

【关键词】 免疫缺陷动物模型;基因编辑技术;锌指核酸酶;转录激活因子样效应核酸酶;CRISPR/Cas9

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0134-10

Progress on the use of gene editing technologies in the research of immunodeficient animal models

MA Yunhui, WANG Xiaotang, GAO Jiping, SONG Guohua*

(Laboratory Animal Center, Shanxi Medical University, Shanxi Key Laboratory of Experimental Animal Science and Human Disease Animal Model, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 Immunodeficient animal models play an important role in preclinical research and are important experimental tools in modern biomedical research that are widely used in immunology, genetics, oncology, microbiology, and other research fields. Gene editing is a technology for targeted modification of biological genomes. From emergence to application, it has greatly promoted the development of biomedical research. Gene editing technology mainly includes homing endonucleases, zinc finger nucleases, transcription activator-like effector nucleases, and the CRISPR/Cas9 system. Researchers have used these technologies to establish various types of immunodeficient animal models, each with advantages and limitations. In recent years, a large number of studies have confirmed that the human immunodeficient animal model accurately simulates the functions of cancer cells, drugs, and the human immune system, better simulates human diseases,

【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);山西省自然科学基金(20210302124093)。

【作者简介】 马云辉(1999—),男,硕士研究生,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: hui20210419@126.com

【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: ykdsgh@163.com

and is widely used to study human immunobiology and the potential mechanisms of complex diseases. In this article, we review the progress in the research and application of gene editing technology to the establishment of immunodeficient animal models, discuss in depth the problems and optimization strategies of gene editing technology in the preparation of immunodeficient animal models, and present its future development prospects to provide references for researchers to select and establish immunodeficient animal models.

[Keywords] immunodeficient animal models; gene editing technology; zinc finger nucleases; transcription activator-like effector nucleases; CRISPR/Cas9

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

实验动物是进行生物医学研究的重要实验材料,为相关研究的顺利开展提供源自实验动物“真实世界”的数据支撑。但其用于人类疾病的研究仍具有局限性,例如无法完全模拟人类疾病,缺少针对特定疾病的实验动物,从而导致利用实验动物进行临床试验的结果与预期相差甚远。因此,迫切需要利用特定技术和手段对实验动物加以修饰使之满足对人类疾病的研究要求,而基因编辑技术的出现正好满足这种需要。

基因编辑技术是指通过核酸酶对靶基因进行定点改造,实现特定 DNA 的定点敲除、敲入以及突变等,以使动植物、细胞等获得新表型的一种新型技术,极大地丰富了实验动物的品种品系。基因编辑技术主要包括归巢核酸内切酶(homing endonuclease, HEs)、锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)、转录激活因子样效应核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)与规律成簇间隔短回文重复序列/CRISPR 相关蛋白 9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins, CRISPR/Cas9)等^[1]。尽管基因编辑动物的出现拓展了相关疾病研究,但由于人源细胞在异种移植时免疫排斥反应等的局限性,极大限制了其在相关疾病中的应用,免疫缺陷动物很好地解决了这一问题。

免疫缺陷动物是指由于先天性遗传突变或用人工的方法改造的免疫功能缺陷的动物,与人类免疫系统缺陷相似,研究肿瘤、血液学、传染病、自身免疫和移植抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)等领域的评估都得益于使用免疫缺陷动物模型^[2]。目前,几乎所有类型的人源肿瘤均已在免疫缺陷动物体内建立了移植瘤模型,为肿瘤发生发展及转移机制研究、抗肿瘤药物筛选及治疗方法评估提供了载体。早在 1966 年,Flanagan^[3]首次验证了 Nude 小鼠的免疫缺陷性,由于 *Foxn1* 基因变异导致其 T 细胞缺失,伴随而来的免疫力显著下降,但

NK 细胞活性补偿性增加,正常体液免疫未受影响,人类造血干细胞移植后无法存活,开创了免疫缺陷动物研究的先河。自此,研究者陆续制备了免疫 T、B 以及 NK 细胞缺失的免疫缺陷动物,并推广其在肿瘤学、免疫学等领域研究的应用,尤其是以免疫缺陷动物为基础开发的人源化动物模型为新药研发提供了可靠的体内研究平台^[4]。

基因编辑技术不仅为疾病相关基因功能研究提供便捷途径,也有助于免疫缺陷动物模型构建,进而促进生物和医药等相关领域发展。因此,本文分析比较了 ZFNs、TALENs、CRISPR/Cas9 技术的优缺点,综述了现有的基因编辑技术在免疫缺陷动物模型的应用及其在人源化动物模型领域的研究,以期为多种人类疾病的研究提供新思路。

1 基因编辑技术的概述

基因编辑系统主要包括早期兴起的 HEs、ZFNs 和 TALENs 等技术,以及近年来以 CRISPR/Cas9 为代表的新型技术。研究者已采用上述技术成功构建了多种基因编辑动物模型^[5-6]。因此,本文首先针对不同的基因编辑技术的主要原理进行概述,并对其优缺点进行比较分析,如表 1 所示。

1.1 HEs

HEs 属于巨核酸酶,存在于各种细菌、真核生物和古生物中^[7]。该酶具有高特异性,能在 14~40 bp 的特定位点上识别并切割双链 DNA,且只与靶 DNA 相互作用。HEs 促进了遗传物质在生物体内的横向移动,该过程被称为“归巢”,其在归巢过程中诱导 DNA 激活双链 DNA 断裂(double strand breaks, DSBs)损伤修复。在真核生物中修复途径除同源重组(homologous recombination, HR)外,主要为非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)。然而,找到适合靶向特定基因序列的 HEs 的概率极低,实施起来耗时耗力。此外 HEs 的设计的另一困难是其 DNA 结合结构域和 DNA 裂解结构域很难分

离,很大程度上限制了其广泛应用。

1.2 ZFNs

ZFNs 又名锌指核酸酶,来源于真核生物,是杂交异质二聚体蛋白,每个亚基包含多个锌指结构域(锌指蛋白(zinc finger protein,ZFP)串联组成 DNA 结合域)和 1 个 FokI 内切酶结构域(FokI 是来自黄杆菌属细菌的限制性核酸内切酶)。单个 ZFP 识别 9~18 bp 的特定位点,两个单体 ZFN 相互作用产生酶切功能,从而达到靶向 DNA 剪切的目的。ZFNs 通过在特定位点诱导 DNA 中的 DSBs 来促进同源定向修复(homologous directed recombination,HDR)和 NHEJ^[8]。自 1996 年 Kim 等^[9]报道 ZFNs 以来,其显示出相当大的应用前景。目前,利用该酶已经成功地在原核生物和真核生物中进行了基因编辑^[10]。研究者根据靶 DNA 序列设计特异性的锌指蛋白,从而在特定位置导入外源基因,其特异性不仅取决于目标序列本身,还取决于基因组中相邻的序列,因而相比于其他基因编辑技术,ZFNs 具有成本低、剪切效率高的优点。

1.3 TALENs

TALENs 与 ZFNs 相似,也是由 DNA 结合域和 DNA 剪切靶点组成。TALENs 特异性识别 DNA 序列依赖于重复可变残基(repeat variable diresidues,RVDs),1 个锌指域可以识别 3 个碱基对。而 TALENs 的优势在于 1 个模块只能特异识别其 DNA 结合域中的 1 个核苷酸,即使在多个模块连接的情况下,也不会发生识别序列的干扰。这一特性促进了 TALENs 系统的创建,使其可以识别更多的目标序列。由于其目标序列的剪切比 ZFNs 更具有特异性,所以适用于任何生物基因组的任何 DNA 序列。此外,TALENs 也是通过在特定位点诱导 DSBs 来促进 HDR 和 NHEJ,但 TALENs 系统在体细胞和多能干细胞中产生 DSBs 更有效^[11]。目前,基因编辑细胞质中细胞器基因组的操作是具有挑战性的,除了一些 tRNA 可以导入线粒体或叶绿体,将 RNA 分子导入核外细胞器的难度仍较大。值得一提的是,最近有研究者将 TALENs 成功用于细胞器的基因编辑中,实现了线粒体和叶绿体基因组的碱基编辑^[12-13]。但是 TALENs 存在分子量巨大、成本较高

表 1 HEs、ZFNs、TALENs、CRISPR/Cas9 比较
Table 1 Comparison of HEs,ZFNs,TALENs and CRISPR/Cas9

比较 Comparison	HEs	ZFNs	TALENs	CRISPR/Cas9
来源 Source	细菌、动植物 Bacteria, animals and plants	真核生物 Eucaryon	细菌 Bacteria	细菌、古菌 Bacteria, archaea
结构 Structure	二聚体 Dimer	二聚体 Dimer	二聚体 Dimer	单体 Monomer
设计简易度 Simplicity of design	困难 Hard	中等 Medium	略微复杂 Slightly complicated	简单 Easy
靶点 DNA 序列的识别区域 Recognition region of the target DNA sequence	归巢核酸内切酶 Homing endonuclease	锌指结构域 Zinc finger domain	重复可变残基 Repeat variable diresidues	crRNA 或 sgRNA crRNA or sgRNA
DNA 的剪切结构 Shear structure of DNA	归巢核酸内切酶 Homing endonuclease	FokI 核酸酶 FokI nuclease	FokI 核酸酶 FokI nuclease	Cas9 蛋白 Cas9 protein
识别靶点大小 Identify the target size	12~40 bp	单体 9~18 bp Monomer 9~18 bp	单体 14~20 bp Monomer 14~20 bp	Cas9 22 bp
优点 Advantages	特异性高 High specificity	效率高 Efficient	特异性高 High specificity	靶向精确 Precise targeting
细胞核外基因组靶向修饰 Extracellular genome targeted modification	否 Cannot	否 Cannot	能 Can	否 Cannot
脱靶效率 Off-target	高 High	较高 Higher	低 Low	稍高 A little high
剪切效率 Shear efficiency	低 Low	高 High	较高 Higher	稍高 A little high
成本 Cost	高 High	低 Low	较高 Higher	低 Low

的局限性。

1.4 CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 系统于 2012 年首次被报道^[14]。规律间隔成簇短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR), 有时被称为“短规则间隔短重复”, 在 20 世纪 80 年代发现于大肠杆菌中。ZFNs 和 TALENs 技术对 DNA 位点的识别是基于需要 DNA-蛋白质相互作用的人工蛋白对序列的识别, 与 ZFNs 和 TALENs 两种技术不同, CRISPR/Cas 系统的 DNA 识别是 RNA-DNA 相互作用。其是由 Cas9 核酸酶和单链向导 RNA (single guide, sgRNA) 组成。其中 sgRNA 是由 crRNA 和 tracrRNA 组成的单链 RNA 分子, 可以指导 Cas9 定位目标 DNA 并切割它, 在原间隔邻近模体 (protospacer adjacent motif, PAM) 区域产生 DSBs^[15]。Cas9 核酸酶有组氨酸-天冬酰胺-组氨酸 (histidine-asparagine-histidine, HNH) 和 RuvC 两个功能结构域。HNH 结构域剪切与 sgRNA 互补的目标 DNA, RuvC 结构域剪切非目标链。此外, CRISPR/Cas9 也可通过 HDR 和 NHEJ 机制修复 DSBs。但与 TALENs 相比, 在缺乏 sgRNA 的传递方法的情况下, CRISPR/Cas9 系统目前不能直接用于细胞器基因组靶向修饰。

2 免疫缺陷动物概述

免疫缺陷小鼠是最先应用的免疫缺陷动物模型, 其发展主要经历了以下几次重要突破。1966 年 T 细胞缺乏的无胸腺裸鼠 (Nude mouse) 产生, 迄今为止其作为模型鼠用于肿瘤细胞成瘤仍有很高的价值^[2]; 1983 年产生了 T 细胞、B 细胞均缺乏的严重免疫缺陷的重症联合免疫缺陷 (severe combined immunodeficiency, SCID) 小鼠^[16]; 1991 年研究者首次研发出体内移植人外周血细胞的 Hu-SCID 小鼠^[17]; 1992 年研究者发现了重组激活基因 (recombination activating genes, *Rags*) *Rag1*、*Rag2* 基因敲除免疫缺陷小鼠^[18-19]; 2002 年研究者们在 NOD/SCID 小鼠品系引入白介素 2 受体 γ 链 (interleukin 2 receptor subunit gamma chain, *IL2rg*) 的突变, *IL2rg* 基因编码的蛋白是许多白介素受体的重要信号成分, 包括白介素-2、4、7 和 21, 因此被称为共同 γ 链, 进而产生了目前来讲免疫缺陷程度最高的 NSG 小鼠或 NOG 小鼠^[20]。除此之外, 其他物种的免疫缺陷动物也有很大突破, 例如大鼠、家兔、猪

等。目前, 免疫缺陷动物广泛应用在在肿瘤学研究、免疫学研究、干细胞研究、人源化类器官等方面。

3 基因编辑技术在免疫缺陷动物模型研究中的应用

在肿瘤学研究中, 利用免疫缺陷动物模型进行临床前研究至关重要。基因编辑技术在构建免疫缺陷动物模型中起着重要作用, 随着基因编辑技术的逐渐成熟, 各种免疫缺陷动物层出不穷。然而, 自发突变且适用于不同肿瘤研究的基因缺陷和免疫缺陷动物种类少之又少。传统胚胎干细胞打靶低效、耗时、费力、成本高昂、构建时间长, 并且有物种限制性, 只适用于小鼠, 而 CRISPR/Cas9 具有高效、快捷、简便、成本便宜、构建时间短, 无物种限制性等的优势^[21]。随着基因编辑技术的发展, 能够精确到靶向修饰基因, 简化了免疫缺陷动物模型的改造, 使针对性更强、免疫缺陷程度更高的动物模型供给临床前研究。

3.1 基因编辑技术在免疫缺陷小鼠模型研究中的应用

3.1.1 自发性免疫缺陷小鼠

目前, 无胸腺裸鼠在各研究领域特别是肿瘤学、免疫学、药品和生物制品的安全性评价及有效药品的筛选等方面展现出巨大的价值, 已成为医学生物学研究领域中不可缺少的实验动物模型^[22]。裸鼠是由位于 11 号染色体上的隐性基因 *Foxn1* 自发突变导致, 编码的蛋白提前终止而形成截短的无功能蛋白所致, 该编码蛋白可以调节胸腺的发育和角质形成细胞的分化, 突变后导致严重的原发性 T 细胞免疫缺陷和先天性脱发。因为裸鼠仍有 B 细胞和较强的 NK 细胞应答, 所以不适合用作淋巴瘤和白血病的研究。裸鼠来源于近交系, 导致其繁殖能力减弱, 乳腺发育不良, 无法有效哺育后代, 因此裸鼠成瘤模型难以制备。此外, 在裸鼠和重症联合免疫缺陷 (severe combined immunodeficiency, SCID) 小鼠模型中对人类肿瘤进行异种移植的研究受到了肿瘤生长不良以及宿主对移植反应性的限制, 改变了肿瘤结构和肿瘤微环境^[23]。

3.1.2 基因编辑技术改进的免疫缺陷小鼠

经基因编辑技术改造的严重免疫缺陷的 NOD-SCID 和携带 *IL2rg*^{null} 突变的 NOD^{Rag}^{null} 小鼠 (NSG 和 NRG) 使得人类原发性肿瘤的生长与临床上相似性更高^[24]。2002 年 Ito 等^[20] 将 *IL2rg*^{null} 小鼠回交到 NOD/ShiJic-*Prkdc*^{scid} 小鼠建立了免疫功能严重不

全的 NOD/SCID/ γ_c^{null} (NOD) 小鼠,在移植人造血细胞时有极高的植入后存活率。2005 年 Jakson 实验室通过将 *IL2rg^{null}* 小鼠回交到 NOD/ShiLtSz-*Prkdc^{scid}* 小鼠而得到 NSG 小鼠,该鼠 T、B 淋巴细胞、NK 细胞,树突状细胞和巨噬细胞缺陷,细胞渗漏率极低^[25]。在 CRISPR/Cas9 基因编辑系统出现后,刘亚宸等^[5]利用 CRISPR/Cas9 系统获得了 NOD 突变、成熟 B、T 和 NK 细胞完全缺失的 cNSG (中国 NSG) 小鼠新品系,与美国 Jakson 实验室开发的 NSG 小鼠具有相同的免疫水平,并且缩短了免疫缺陷动物模型的构建时间。M-NSG 重度免疫缺陷小鼠同样如此,其是利用 CRISPR/Cas9 技术在 NOD/SCID 的基础上敲除 *IL2rg* 基因,致该鼠缺失成熟 T、B、NK 细胞,成为目前免疫缺陷程度最高的小鼠之一国际公认的免疫缺陷程度较高,较适合人源细胞或组织移植的工具小鼠^[26]。

NOD *Rag2* gamma (NRG) 小鼠、NOD. Cg-*Rag^{tm1Mom} IL2rg^{tm1Wjl}* 小鼠与 NSG 小鼠非常类似,是由 *Rag* 基因缺失代替 *Prkdc* 基因缺陷^[27]。由 *Prkdc* 缺陷引起的 SCID 免疫缺陷小鼠在患者衍生的异种移植 (patient-derived tumor xenograft, PDX) 对标准化疗反应的研究中,在剂量、频率等方面存在局限性可能是由于 *Prkdc* 编码突变导致 DNA 修复缺陷和极端的放射敏感性,而 *Rag* 基因能够弥补 *Prkdc* 突变导致对辐射敏感等不足。在近些年,基因编辑技术迅猛发展,北京维通达公司利用 CRISPR/Cas9 技术获得 *Rag2* (recombination activating gene 2) 敲除的 C57BL/6 小鼠品系,然后与 NPG/Vst 小鼠杂交,在后代中筛选 *Rag2* 敲除、*IL2rg* 敲除、NOD 型 *Sirpa* 以及 *scid* 基因非纯合的个体,再通过杂合互配的方式获得纯合 NRG 小鼠^[28]。基因编辑技术能够更加快捷、更加高效地构建免疫缺陷动物模型,并能弥补以往免疫缺陷动物模型的缺陷。两种 NRG 小鼠表型主要为无胸腺和成熟 B、T、NK 细胞完全缺失,经由基因编辑技术改造的基因缺陷小鼠模型构建时间短,并且免疫指标相互接近。

3.2 基因编辑技术在免疫缺陷大鼠模型研究中的应用

3.2.1 SCID 大鼠

由于大鼠与人类的生理特性具有很高的相似性,是众多疾病研究的理想选择对象^[29]。成年大鼠的体重是成年小鼠的 10 倍左右,这使他们成为外科手术应用的首选动物模型。大鼠手术通常更容易,

手术造成的组织损伤也更少,并且大鼠可以比小鼠携带更大重量的移植物。另外,大鼠更适合连续样本收集,比如采血等操作,能更好地跟踪检测实验动物生理变化数据,只需更少的动物就能获得足够的材料与数据。更加重要的是,大鼠在药理、毒理实验等方面已有着广泛应用,可以直接对接临床前研究^[30]。小鼠在免疫缺陷动物模型发展早于大鼠,但在基因编辑技术出现后,大鼠免疫缺陷动物模型也在迅猛发展。*Rag* 基因表达和功能损伤会导致 T、B 细胞发育停滞,导致严重的联合免疫缺陷^[31]。2012 年, Zschemisch 等^[6]利用 ZFNs 技术靶向敲除 *Rag1* 构建该基因敲除大鼠,表型特征为胸腺严重发育不良,T、B 细胞比例显著减少,但 NK 细胞代偿性增加,外周血中分离到的 T 细胞群由成熟的 $CD4^+$ / $CD3^+$ /TCR $\alpha\beta^+$ 和 $CD8^+$ / $CD3^+$ /TCR $\alpha\beta^+$ T 细胞组成。在 2012 年, Mashimo 等^[32]利用 ZFNs 技术敲除 *Prkdc* 基因成功构建了 SCID 大鼠。SCID 大鼠表现为生长迟缓、成纤维细胞增殖缺陷和严重的免疫缺陷表型,且胸腺严重发育不良,脾体积减小,T、B 细胞缺陷。2014 年, Tsuchida 等^[33]利用 ZFNs 敲除大鼠 *Rag1* 基因建立了人源肝大鼠模型,该鼠在切除胸腺后可提高人源肝的重建率。2015 年, Liu 等^[34]利用 TALENs 技术敲除大鼠 *Rag2* 基因,建立了免疫缺陷特征与 *Rag1* 敲除大鼠一致,能够高效获得感染天花病毒免疫缺陷大鼠模型。2018 年, Noto 等^[35]利用 TALENs 技术敲除 SD 大鼠 *Rag2* 获得了 SDR 大鼠,与 *Rag1* 基因敲除大鼠一致,该鼠成熟 T 细胞近乎缺失、B 细胞比例显著降低,但 NK 细胞代偿性增加。同样 *Prkdc* 基因敲除大鼠与 *Rag* 基因敲除大鼠有正常 NK 细胞导致移植人类细胞寿命和功能有限,阻碍人类细胞的异种移植。

3.2.2 *IL2rg* 基因敲除大鼠

2010 年 Mashimo 等^[36]利用 ZFNs 靶向敲除大鼠 *IL2rg* 基因,获得了免疫缺陷大鼠 X 连锁重症联合免疫缺陷 (X-severe combined immunodeficiency, X-SCID) 模型。X-SCID 大鼠胸腺严重发育不良,脾轻度缩小,骨髓严重发育不良,几乎完全缺乏 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞,但外周血、骨髓和脾均有部分 T 细胞存在,其中 $CD4^+CD8^+$ T 细胞和 $CD4^+CD8^-$ T 细胞均有减少,外周血和骨髓中 $CD3^-CD45RA^+$ B 细胞和 $CD3^-CD161a^+$ NK 细胞数量明显减少。研究发现 X-SCID 大鼠在移植人类卵巢癌肿瘤细胞后 14 d 内发生肿瘤,成瘤时间短^[36]。X-SCID 动物模型为

药物治疗、基因治疗以及检查异种移植恶性肿瘤治疗效果提供了有价值的体内工具。Mashimo 等^[32]在敲除大鼠 *Prkdc* 基因的基础上敲除 *IL2rg* 基因后构建了 FSG 大鼠,在 FSG 大鼠中无 NK 细胞活性;在 2020 年时,Ménoret 等^[37]利用 HEs 和 TALENs 技术将 *Rag1* 和 *IL2rg* 基因敲除后敲入人信号调节蛋白 α (human signal regulatory protein α , *hSIRP α*) 基因,建立了 RRGs 大鼠。由于 RRGs 大鼠缺乏成熟的 T、B 和 NK 细胞,给 RRGs 大鼠注射人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)能有效地对 RRGs 动物进行免疫人源化,并能检测到抗肿瘤免疫反应。利用基因编辑技术可以成功克服 NK 细胞的代偿性增加后会阻碍人类细胞的异种移植的困难,使构建 PDX、细胞异种移植(cell derived xenograft, CDX)模型更加简便。*hSIRP α* 基因可以增强与人类 CD47 的结合,并通过 CD47-SIRP α 相互作用对大鼠吞噬细胞提供抑制调节(“不要吃我”信号),从而显著增加人造血干细胞(human hemopoietic stem cell, hHSCs)在大鼠骨髓(bone marrow, BM)中的定植和维持,这也为血液疾病研究提供了宝贵的动物模型资源^[38]。

3.2.3 重建人免疫系统大鼠

随着 CRISPR/Cas9 技术在大鼠的应用。2018 年 Yang 等^[39]利用 CRISPR/Cas9 技术构建了 *Prkdc* 和 *Il2rg* 基因双敲除表达 *hSIRP α* 的 NSG 样(NSG-like, NSGL)大鼠。NSGL 大鼠缺乏 T、B 淋巴细胞和 NK 细胞,生长迟缓,但表达 *hSIRP α* 。NSGL 大鼠比 SG 大鼠更有效植入人癌细胞,并且 NSGL 大鼠可以植入 hHSCs 来重建人类免疫系统。

2019 年 He 等^[40]通过 CRISPR/Cas9 技术靶向敲除了大鼠的 *Rag1*、*Rag2* 和 *IL2rg* 基因,获得了 SD-RG 大鼠。SD-RG 大鼠与 FSG 和 NSGL 大鼠类似,缺乏 T、B 淋巴细胞和 NK 细胞。SD-RG 大鼠胸腺急剧缩小,脾与野生型相当。相较于 NSG 小鼠,在 SD-RG 大鼠上肿瘤移植后 20 d 生长体积是 NSG 小鼠的 10 倍,适用于建立癌细胞 CDX 模型,并且肿瘤生长速度优于 NSG 小鼠。研究者通过该免疫缺陷模型成功建立了首例肺鳞癌的 PDX 大鼠模型,移植肿瘤生长迅速并具有原发肿瘤的病理学特征^[40]。

3.3 基因编辑技术在免疫缺陷家兔模型研究中的应用

家兔作为经典的实验动物,与人类基因同源性较高,成本较低、繁殖力强,且无胚胎干细胞、体细

胞克隆技术效率低的限制^[41]。因此,对其基因组进行高效的遗传改造,将促进其在生物医学模型中的广泛应用。2021 年, Song 等^[42]通过 CRISPR/Cas9 系统敲除 *Foxn1* 基因开发了裸兔模型,该兔无毛、无胸腺,并表现出指甲营养不良, T 淋巴细胞减少^[43]。目前,裸鼠是 CDX/PDX 研究的主要模型物种,裸兔能够扩展用作 CDX 和 PDX 研究的中型动物模型,可用于癌症研究、药物开发,并在再生医学中有广泛的应用。SCID 表型是由于 *Prkdc* 基因缺陷引起,2018 年, Song 等^[44]通过 CRISPR/Cas9 系统敲除 *Prkdc* 构建了 SCID 兔,其 T、B 淋巴细胞缺失,这些 SCID 兔模型有助于研究细菌和肺孢子虫感染,促进免疫缺陷患者早期诊断和治疗的发展^[44]。相似的,利用 ZFNs 敲除 *IL2rg* 构建的 X-SCID 大鼠,该技术也同样能应用在家兔中, Hashikawa 等^[45]通过 CRISPR/Cas9 系统敲除 *IL2rg* 基因构建的 X-SCID 兔能够正常发育并在四代内稳定遗传,缺乏 B、T 和 NK 细胞,并且 X-SCID 兔可以移植与人类相近或相同数量的细胞。由于 X-SCID 兔 NK 细胞缺失,使得此模型移植人癌细胞具有更好的效果。

3.4 基因编辑技术在免疫缺陷猪模型研究中的应用

猪在解剖学和生理学上比鼠、家兔更类似于人类,使他们成为临床前再生医学和癌症研究的宝贵工具^[46]。现有研究中已有多种由各种基因编辑技术构建的 SCID 猪模型,包括 *ARTEMIS*、*IL2rg* 或 *Rag1/2* 基因突变, SCID 猪具有缺乏 NK 细胞、T 细胞或 B 细胞的免疫表型^[47]。2016 年, POWELL 等^[48]发现由 *Artemis* 隐性突变引起的 SCID 猪缺乏 T、B 细胞,但拥有 NK 细胞,并且证明了人类癌细胞可以在体外被来自非 SCID 和 *Artemis* SCID 猪的活化 NK 细胞识别和杀死,导致在 SCID 猪中人类细胞移植效果差。2014 年, Huang 等^[49]应用 TALENs 技术敲除猪 *Rag1/2* 建立无成熟 T、B 淋巴细胞的 SCID 猪模型;以及 Lee 等^[50]利用 TALENs 技术敲除猪 *Rag2* 构建出的 SCID 猪模型,然而在移植人类细胞时效果仍然不佳。Watanabe 等^[51]研究者将公猪 X 染色体上的 *IL2rg* 利用 ZFNs 技术敲除后构建 X-SCID 猪^[51-52];以及 Kang 等^[53]利用 CRISPR/Cas9 技术以更高的效率靶向敲除猪 *IL2rg* 构建雌性 SCID 猪。不同的基因编辑技术构建出的 SCID 猪具有相同的表型,缺乏 T 细胞和 NK 细胞^[51]。2016 年, Lei 等^[54]通过 CRISPR/Cas9 系统靶向敲除 *Rag2/IL2rg*

基因,构建缺乏 T、B 淋巴细胞和 NK 细胞的 SCID 猪模型,能够移植人诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells)。Boettcher 等^[55]利用 CRISPR/Cas9 靶向突变 *ART^{-/-}* 胎儿成纤维细胞细胞系中的 *IL2rg* 基因构建 *ART^{-/-} IL2rg^{-/-}* SCID 猪。这种猪 T、B、NK 细胞都缺乏,在导入人 CD34⁺ 脐带血干细胞建立了人源化模型。基因编辑技术敲除 *IL2rg* 构建出的 SCID 猪缺乏 T 细胞和 NK 细胞,在移植人类细胞时具有良好的效果^[56]。与小鼠免疫缺陷模型类似,应用基因编辑技术后敲除 *IL2rg* 基因后,陆续开发出针对特定疾病的免疫缺陷猪,如 *Rag2⁻/IL2rg⁻/YFAH^{-/-}* (RGFKO) 猪,能较好地移植人肝细胞^[57]。

表 2 总结了近年来免疫缺陷的动物模型,包括小鼠、大鼠、家兔和猪。

4 基因编辑技术在免疫缺陷动物模型研究中新应用

4.1 免疫缺陷动物在人源化动物模型制备中的潜在价值

人源化动物模型是在免疫缺陷动物模型的基础上建立起来的,是指将人类细胞或组织植入免疫缺陷动物体内构建免疫系统人源化动物模型及人源化动物疾病模型,由于免疫系统缺陷,来源于人

的移植物才可在免疫缺陷动物体内存活^[58]。基于已有研究可知,人源化动物模型相较于普通动物模型能够更精确地模拟包括肿瘤在内的多种疾病在人体内的发生发展进程,为临床治疗提供精准的研究材料。

4.2 基因编辑技术在人源化动物模型制备中的应用

近年来,随着基因编辑技术的快速发展,广泛应用于人源化动物模型制备,极大推动了人源化动物模型的推广与应用,越来越多的新型人源化动物模型不断涌现^[59]。目前,采用基因编辑技术构建的人源化动物模型主要包括重建人免疫系统、基因人源化及嵌合体人源化动物模型。人源化免疫系统动物可分为人源化外周血单核细胞(huPBMCs)或人源化外周血淋巴细胞(huPBLs)、人源化造血干细胞(huHSCs)和人源化骨髓、肝、胸腺(huBLT)动物模型,且 huPBMCs (或 huPBLs)、huHSCs 和 huBLT 重建人免疫系统有不同的优缺点^[60]。基因人源化动物模型是利用转基因或同源重组技术,将人源基因插入动物基因组,从而表达人源基因而不是动物自身基因。Huang 等^[61]使用腺相关病毒(adenovirus-associated virus, AAV)载体在移植人类白细胞抗原 A2(human leukocyte antigen A2, HLA-A2)/HDD 至

表 2 近年来免疫缺陷动物模型
Table 2 Animal models of immune deficiency in recent years

动物种类 Animal species	突变 Mutations	突变方法 Mutation methods	细胞表型 Cell phenotypes	参考文献 References
小鼠 Mouse	<i>Prkdc</i> , <i>IL2rg</i>	杂交遗传	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[20, 25]
	<i>Prkdc</i> , <i>IL2rg</i>	Hybridization		
	<i>IL2rg</i> , <i>Rag1</i> / <i>Rag2</i>	CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[26]
		CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[27]
大鼠 Rats	<i>Rag1</i>	HEs, ZFNs	T ⁻ B ⁻ NK ⁺	[33–34]
	<i>Rag2</i>	TALENs	T ⁻ B ⁻ NK ⁺	[35, 37]
	<i>Rag1</i> , <i>IL2rg</i> , <i>hSIRPα</i>	HEs, TALENs	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[37]
	<i>Prkdc</i>	ZFNs	T ⁻ B ⁻ NK ⁺	[32]
	<i>Prkdc</i> , <i>IL2rg</i>	ZFNs	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[32]
	<i>IL2rg</i>	ZFNs	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[36]
	<i>Prkdc</i> , <i>IL2rg</i> , <i>hSIRPα</i>	CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[39]
	<i>Rag1</i> , <i>Rag2</i> , <i>IL2rg</i>	CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[40]
家兔 Rabbits	<i>Foxn1</i>	CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁺ NK ⁺	[42]
	<i>Prkdc</i>	CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁻ NK ⁺	[44]
	<i>IL2rg</i>	CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[45]
	<i>IL2rg</i>	ZFNs	T ⁻ B ⁺ NK ⁻	[51]
猪 Pigs	<i>IL2rg</i>	CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁺ NK ⁻	[53]
	<i>Rag1</i> / <i>2</i>	TALENs	T ⁻ B ⁻	[49]
	<i>Rag2</i>	TALENs	T ⁻ B ⁻	[50]
	<i>Rag2</i> , <i>IL2rg</i>	CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[54]
	<i>ARTEMIS</i> , <i>IL2rg</i>	CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[55]

NSG 小鼠,诱导表达人 HLA-A2。此外,Sharma 等^[62]也使用 AAV 载体移植 HLA-DR 导入 NSG 小鼠中,表达人 HLA-II 类(DR1 或 DR4),在感染呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)后,病毒清除速度比 NSG 小鼠快。表达主要组织相容性复合体-I(major histocompatibility complex I, MHC-I)类(HLA-A2)和 MHC-II 类(HLA-DR4)转基因的人免疫系统重建小鼠在免疫系统重建后产生 CD8⁺ T 细胞和细胞毒性,发生流感特异性抗体应答,而表达 MHC-I 类(HLA-A2)的小鼠中没有此现象^[63]。人源化动物在人类疾病方面具有广泛应用价值,构建多种人源化动物模型对于研究人类疾病发生发展、治疗手段等都有巨大的益处。

5 总结与展望

在最初偶然发现的裸小鼠到现今能够通过基因编辑技术靶向修饰基因构造免疫缺陷动物模型,是技术迭代进步,不断更新的结果,新技术带来的往往是更加高效且简便的方法。第三代基因编辑技术 CRISPR/Cas9 相较于 HEs、ZFNs、TALENs,以其设计简便、靶向更加精确、成本低等的优点,对免疫缺陷动物模型的构建起到了巨大作用。从自然突变而来的寥寥几种免疫缺陷动物模型,到利用基因编辑技术对目标物种特定基因进行修饰,数种免疫缺陷动物模型应运而生,免疫缺陷程度也有了质的提升,对肿瘤学、血液学、免疫学、药理学等研究领域大有裨益,更能够精确模拟人癌细胞、药物、免疫系统在人体内的作用。研究者能够根据自己的实验目的选择最适的免疫缺陷动物。

以免疫缺陷动物模型为基础的人源化动物模型,在当前的生物医学研究中具有重要地位^[64]。免疫缺陷小鼠是经典的免疫缺陷动物模型,发展迅速,品系众多,应用广泛。相较于小鼠,大鼠具有很多优势,肿瘤可以生长到小鼠允许的近 10 倍体积,采血量可满足血癌疗效评估、临床病理分析和药代动力学研究用量。肿瘤大鼠模型可同时评估化疗疗效、药代动力学以及初步测试毒理学,大大减少动物使用量大鼠模型具有重要的研究意义。猪在解剖结构及生理、免疫特性上与人类更相近,因此可构建人源化猪模型来大量生产人源多克隆抗体^[65]。目前,尚未有人源化动物模型完全模拟人类免疫系统,基因编辑技术在基因敲入方面具有独特优势,目前已构建出多种人免疫相关基因敲入动物

模型,有助于人源化免疫缺陷动物模型的构建,随着基因编辑技术的不断发展,有望构建出再现人类免疫缺陷系统的动物模型,为研究疾病发病机制、新型疗法以及药物开发和评价提供更加匹配的疾病动物模型。

参考文献:

- [1] JIANG C, MENG L, YANG B, et al. Application of CRISPR/Cas9 gene editing technique in the study of cancer treatment [J]. Clin Genet, 2020, 97(1): 73-88.
- [2] FUJIWARA S. Humanized mice: a brief overview on their diverse applications in biomedical research [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(4): 2889-2901.
- [3] FLANAGAN S P. "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse [J]. Genet Res, 1966, 8(3): 295-309.
- [4] HUDSON W A, LI Q, LE C, et al. Xenotransplantation of human lymphoid malignancies is optimized in mice with multiple immunologic defects [J]. Leukemia, 1998, 12(12): 2029-2033.
- [5] 刘亚宸, 陈渠, 杨兴龙, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术建立 NOD/SCID/IL2R $\gamma^{-/-}$ 免疫缺陷小鼠 [J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(6): 639-646.
LIU Y C, CHEN Q, YANG X L, et al. Generation of a new strain of NOD/SCID/IL2R $\gamma^{-/-}$ mice with targeted disruption of Prkdc and IL2R γ genes using CRISPR/Cas9 system [J]. J South Med Univ, 2018, 38(6): 639-646.
- [6] ZSCHEMISCH N H, GLAGE S, WEDEKIND D, et al. Zinc-finger nuclease mediated disruption of Rag1 in the LEW/Ztm rat [J]. BMC Immunol, 2012, 13: 60.
- [7] BABARYKA A, KÜHN E, KÖSTER R W. *In vivo* synthesis of meganuclease for generating transgenic zebrafish *Danio rerio* [J]. J Fish Biol, 2009, 74(2): 452-457.
- [8] SHALTZ S, JINKS-ROBERTSON S. Mutagenic repair of a ZFN-induced double-strand break in yeast: effects of cleavage site sequence and spacer size [J]. DNA Repair, 2021, 108: 103228.
- [9] KIM Y G, CHA J, CHANDRASEGARAN S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(3): 1156-1160.
- [10] JAISWAL S, SINGH D K, SHUKLA P. Gene editing and systems biology tools for pesticide bioremediation: a review [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 87.
- [11] JONLIN E C. Informed consent for human embryo genome editing [J]. Stem Cell Reports, 2020, 14(4): 530-537.
- [12] TAN J, FORNER J, KARCHER D, et al. DNA base editing in nuclear and organellar genomes [J]. Trends Genet, 2022, 38(11): 1147-1169.
- [13] BHARDWAJ A, NAIN V. TALENs-an indispensable tool in the era of CRISPR: a mini review [J]. J Genet Eng Biotechnol, 2021, 19(1): 125.

- [14] WANG H, YANG H, SHIVALILA C S, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910-918.
- [15] LI C, BRANT E, BUDAK H, et al. CRISPR/Cas: a Nobel Prize award-winning precise genome editing technology for gene therapy and crop improvement [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2021, 22(4): 253-284.
- [16] BOSMA G C, CUSTER R P, BOSMA M J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse [J]. *Nature*, 1983, 301(5900): 527-530.
- [17] ROWE M, YOUNG L S, CROCKER J, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferative disease in the SCID mouse model: implications for the pathogenesis of EBV-positive lymphomas in man [J]. *J Exp Med*, 1991, 173(1): 147-158.
- [18] SHINKAI Y, RATHBUN G, LAM K P, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D) J rearrangement [J]. *Cell*, 1992, 68(5): 855-867.
- [19] MOMBAERTS P, IACOMINI J, JOHNSON R S, et al. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes [J]. *Cell*, 1992, 68(5): 869-877.
- [20] ITO M, HIRAMATSU H, KOBAYASHI K, et al. NOD/SCID/ γ (c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells [J]. *Blood*, 2002, 100(9): 3175-3182.
- [21] 张丽娜, 刘国安, 杨红. 基因打靶技术的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2010, 36(9): 51-55.
ZHANG L N, LIU G A, YANG H. The research progress of gene targeting [J]. *Biotechnol Bull*, 2010, 36(9): 51-55.
- [22] FOGH J, FOGH J M, ORFEO T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1977, 59(1): 221-226.
- [23] TYAGI R K, LI J, JACOBSE J, et al. Humanized mouse models of genetic immune disorders and hematological malignancies [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 174: 113671.
- [24] MAYKEL J, LIU J H, LI H, et al. NOD-scidIl2rg (tm1Wjl) and NOD-Rag1 (null) Il2rg (tm1Wjl): a model for stromal cell-tumor cell interaction for human colon cancer [J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(6): 1169-1179.
- [25] SHULTZ L D, LYONS B L, BURZENSKI L M, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells [J]. *J Immunol*, 2005, 174(10): 6477-6489.
- [26] ZHANG H, LI F, CAO J, et al. A chimeric antigen receptor with antigen-independent OX40 signaling mediates potent antitumor activity [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(578): eaba7308.
- [27] PEARSON T, SHULTZ L D, MILLER D, et al. Non-obese diabetic-recombination activating gene-1 (NOD-Rag1 null) interleukin (IL)-2 receptor common gamma chain (IL2r gamma null) null mice: a radioresistant model for human lymphohaematopoietic engraftment [J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 154(2): 270-284.
- [28] BARVE A, CASSON L, KREM M, Et al. Comparative utility of NRG and NRGS mice for the study of normal hematopoiesis, leukemogenesis, and therapeutic response [J]. *Exp Hematol*, 2018, 67: 18-31.
- [29] HE X, LIU Y, USA K, et al. Ultrastructure of mitochondria and the endoplasmic reticulum in renal tubules of Dahl salt-sensitive rats [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 306(10): F1190-F1197.
- [30] 刁元元, 李玉梅, 李晓文, 等. 黄芪抗糖尿病并发症的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(4): 123-128.
DIAO Y Y, LI Y M, LI X W, et al. Review of Astragali radix for treating diabetic complications [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(4): 123-128.
- [31] YOSHIKAWA G, MIYAZAKI K, OGATA H, et al. The evolution of rag gene enhancers and transcription factor E and id proteins in the adaptive immune system [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5888.
- [32] MASHIMO T, TAKIZAWA A, KOBAYASHI J, et al. Generation and characterization of severe combined immunodeficiency rats [J]. *Cell Rep*, 2012, 2(3): 685-694.
- [33] TSUCHIDA T, ZHENG Y W, ZHANG R R, et al. The development of humanized liver with Rag1 knockout rats [J]. *Transplant Proc*, 2014, 46(4): 1191-1193.
- [34] LIU Q, FAN C, ZHOU S, et al. Bioluminescent imaging of vaccinia virus infection in immunocompetent and immunodeficient rats as a model for human smallpox [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11397.
- [35] NOTO F K, ADJAN-STEFFEY V, TONG M, et al. Sprague dawley Rag2-null rats created from engineered spermatogonial stem cells are immunodeficient and permissive to human xenografts [J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(11): 2481-2489.
- [36] MASHIMO T, TAKIZAWA A, VOIGT B, et al. Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8870.
- [37] MÉNORET S, OUISSE L H, TESSON L, et al. *In vivo* analysis of human immune responses in immunodeficient rats [J]. *Transplantation*, 2020, 104(4): 715-723.
- [38] MURATA Y, TANAKA D, HAZAMA D, et al. Anti-human SIRP α antibody is a new tool for cancer immunotherapy [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(5): 1300-1308.
- [39] YANG X, ZHOU J, HE J, et al. An immune system-modified rat model for human stem cell transplantation research [J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 11(2): 514-521.
- [40] HE D, ZHANG J, WU W, et al. A novel immunodeficient rat model supports human lung cancer xenografts [J]. *FASEB J*, 2019, 33(1): 140-150.
- [41] 薛莹, 范江霖, 刘恩岐. 基因修饰家兔研究进展 [J]. *实验动物与比较医学*, 2019, 39(3): 169-177.
XUE Y, FAN J L, LIU E Q. Genetically modified rabbit models for medical sciences [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2019, 39(3):

- 169–177.
- [42] SONG J, HOENERHOFF M, YANG D, et al. Development of the nude rabbit model [J]. Stem Cell Reports, 2021, 16(3): 656–665.
- [43] ROLSTAD B. The athymic nude rat: an animal experimental model to reveal novel aspects of innate immune responses? [J]. Immunol Rev, 2001, 184: 136–144.
- [44] SONG J, WANG G, HOENERHOFF M J, et al. Bacterial and *Pneumocystis* infections in the lungs of gene-knockout rabbits with severe combined immunodeficiency [J]. Front Immunol, 2018, 9: 429.
- [45] HASHIKAWA Y, HAYASHI R, TAJIMA M, et al. Generation of knockout rabbits with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using CRISPR/Cas9 [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 9957.
- [46] YAN S, TU Z, LIU Z, et al. A huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in Huntington's disease [J]. Cell, 2018, 173(4): 989–1002.
- [47] BOETTCHER A N, LOVING C L, CUNNICK J E, et al. Development of severe combined immunodeficient (SCID) pig models for translational cancer modeling; future insights on how humanized SCID pigs can improve preclinical cancer research [J]. Front Oncol, 2018, 8: 559.
- [48] POWELL E J, CUNNICK J E, KNETTER S M, et al. NK cells are intrinsically functional in pigs with Severe Combined Immunodeficiency (SCID) caused by spontaneous mutations in the *Artemis* gene [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2016, 175: 1–6.
- [49] HUANG J, GUO X, FAN N, et al. RAG1/2 knockout pigs with severe combined immunodeficiency [J]. J Immunol, 2014, 193(3): 1496–1503.
- [50] LEE K, KWON DN, EZASHI T, et al. Engraftment of human iPS cells and allogeneic porcine cells into pigs with inactivated RAG2 and accompanying severe combined immunodeficiency [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(20): 7260–7265.
- [51] WATANABE M, NAKANO K, MATSUNARI H, et al. Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76478.
- [52] HARA H, SHIBATA H, NAKANO K, et al. Production and rearing of germ-free X-SCID pigs [J]. Exp Anim, 2018, 67(2): 139–146.
- [53] KANG J T, CHO B, RYU J, et al. Biallelic modification of IL2RG leads to severe combined immunodeficiency in pigs [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2016, 14(1): 74.
- [54] LEI S, RYU J, WEN K, et al. Increased and prolonged human norovirus infection in RAG2/IL2RG deficient gnotobiotic pigs with severe combined immunodeficiency [J]. Sci Rep, 2016, 6: 25222.
- [55] BOETTCHER A N, LI Y, AHRENS A P, et al. Novel engraftment and T cell differentiation of human hematopoietic cells in *ART^{-/-}IL2RG^{-Y}* SCID pigs [J]. Front Immunol, 2020, 11: 100.
- [56] SUZUKI S, IWAMOTO M, SAITO Y, et al. IL2rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs [J]. Cell Stem Cell, 2012, 10(6): 753–758.
- [57] ZHAO H, YE W, GUO J, et al. Development of *RAG2^{-/-}IL2Rγ^{-Y}* immune deficient FAH-knockout miniature pig [J]. Front Immunol, 2022, 13: 950194.
- [58] 连晶瑶, 丁苗慧, 秦国慧, 等. 免疫系统人源化小鼠模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(10): 113–119.
- LIAN J Y, DING M H, QIN G H, et al. Research progress of humanized mouse models in immune system [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(10): 113–119.
- [59] KA Y, ITO R, NOZU R, et al. Establishment of a human microbiome-and immune system-reconstituted dual-humanized mouse model [J]. Exp Anim, 2023, 72(3): 402–412.
- [60] CHEN J, LIAO S, XIAO Z, et al. The development and improvement of immunodeficient mice and humanized immune system mouse models [J]. Front Immunol, 2022, 13: 1007579.
- [61] HUANG J, LI X, COELHO-DOS-REIS J G, et al. An AAV vector-mediated gene delivery approach facilitates reconstitution of functional human CD8⁺ T cells in mice [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88205.
- [62] SHARMA A, WU W, SUNG B, et al. Respiratory syncytial virus (RSV) pulmonary infection in humanized mice induces human anti-RSV immune responses and pathology [J]. J Virol, 2016, 90(10): 5068–5074.
- [63] MENDOZA M, BALLESTEROS A, QIU Q, et al. Generation and testing anti-influenza human monoclonal antibodies in a new humanized mouse model (DRAGA: HLA-A2. HLA-DR4. Rag1 KO. IL-2Rγc KO. NOD) [J]. Hum Vaccin Immunother, 2018, 14(2): 345–360.
- [64] ADIGBLI G, MÉNORET S, CROSS A R, et al. Humanization of immunodeficient animals for the modeling of transplantation, graft versus host disease, and regenerative medicine [J]. Transplantation, 2020, 104(11): 2290–2306.
- [65] CHEN F, WANG Y, YUAN Y, et al. Generation of B cell-deficient pigs by highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene targeting [J]. J Genet Genomics, 2015, 42(8): 437–444.

[收稿日期]2022–11–07

李玉梅, 杨悦, 易军, 等. 毒蛇咬伤后相关并发症的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 144-151.

Li YM, Yang Y, Yi J, et al. Research progress on complications after snakebite [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 144-151.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.016

毒蛇咬伤后相关并发症的研究进展

李玉梅¹, 杨悦², 易军³, 严张仁³, 王万春^{3*}, 董德刚^{2*}

(1. 江西中医药大学研究生院, 南昌 330004; 2. 江西中医药大学中医学院, 南昌 330004;
3. 江西中医药大学附属医院中医外科, 南昌 330006)

【摘要】 毒蛇咬伤是一种常见的临床急症, 具有发病急、病情变化迅速、致残率及死亡率高等特点。蛇毒中毒除出现常见的全身性和局部组织损伤外, 还会引起显著的毒蛇咬伤并发症, 包括即时性和延迟性。这些并发症也是导致毒蛇咬伤致残甚至死亡的主要原因, 严重影响患者的远期预后及生活质量。该文综合新近的研究成果, 重点从血液系统、神经系统、运动系统、内分泌系统、生殖系统及其他方面对毒蛇咬伤并发症的症状、诊断及治疗进行综述, 以期在临床上为毒蛇咬伤有效、精准治疗提供参考。

【关键词】 毒蛇咬伤; 并发症; 多系统损害

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0144-08

Research progress on complications after snakebite

LI Yumei¹, YANG Yue², YI Jun³, YAN Zhangren³, WANG Wanchun^{3*}, DONG Degang^{2*}

(1. Graduate School, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China.

2. School of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004.

3. Department of Traditional Chinese Medicine Surgery, Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006)

【Abstract】 Snakebite is a common clinical emergency with the characteristics of acute onset, rapid changes in condition, and high disability and mortality rates. In addition to the common systemic and local tissue damage, snake envenomation can cause significant complications, including immediate and delayed effects. These complications are the main causes of disability and even death caused by snakebites, which seriously affect the long-term prognosis and quality of life. This article summarizes the symptoms, diagnosis, and treatment of snakebite complications from the aspects of blood, nervous, motor, endocrine, and reproductive systems and other aspects to provide references for effective and precise treatment of snakebite in clinical practice.

【Keywords】 snakebite; complication; multi-system damage

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

毒蛇咬伤是一种严重被忽视且资源不足的公共卫生事件。2017 年世界卫生组织 (World Health

Organization, WHO) 将毒蛇咬伤重新列入被忽视的热带疾病清单^[1]。据 WHO 统计, 世界上每年约发

【基金项目】 国家自然科学基金地区项目资助 (81960874, 82260937); 江西省自然科学基金重点项目资助 (20202ACB206010); 江西中医药大学科技创新团队 (CXTD22009); 江西省 2023 年度研究生创新专项资金项目 (YC2023-B230)。

【作者简介】 李玉梅 (1996—), 女, 博士研究生, 研究方向: 毒蛇咬伤的临床及基础研究。E-mail: 2928803964@qq.com

【通信作者】 王万春 (1966—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 毒蛇咬伤的临床及基础研究。E-mail: 1210569577@qq.com

董德刚 (1982—), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药药理与毒理学。E-mail: andyda@126.com

* 共同通信作者

生 270 多万起毒蛇咬伤事件,造成约 10 万人死亡,40 万人肢体功能障碍^[2]。毒蛇咬伤以全身性表现(出血、溶血、神经毒性、心脏毒性、细胞毒性、休克等)和局部组织损伤(疼痛、肿胀、出血、软组织坏死等)为主^[3],导致严重的致残率和死亡率。既往人们对毒蛇咬伤引起的并发症知之较少,随着医学界对毒蛇咬伤研究的深入,其即时性和远期并发症不断被发现,包括血液系统、神经系统、运动系统、内分泌系统、生殖系统等多方面,见图 1。这些并发症不仅加重疾病,损害机体功能,如果管理不善甚至伴随终身,严重影响患者的生活质量。本文就毒蛇咬伤多系统并发症的最新研究成果进行综述,以期对相关并发症发生机制的研究及临床上早发现、早预防、早诊治提供参考。

1 引起毒蛇咬伤并发症因素分析

1.1 院前急救不当

毒蛇咬伤后院前结扎或固定被认为是有效减缓毒液传播的急救措施,能为院内治疗提供较有利的时间窗。然而,目前对毒蛇咬伤后结扎和固定的应用存在较大争议。一般地,蛇毒主要通过淋巴管传播(静脉内中毒极为罕见),使用压力绷带并用夹板固定患肢会大大阻碍毒液的流动,从而延缓全身效应的发展。但因患者或部分医生对毒蛇咬伤认知局限,以及结扎或固定的部位、绷带材料、压力大小、时间间距、蛇种差异等多方面因素,这些急救措施应用不当,常出现神经损伤、局部坏死等并发症,使得现实世界的急救应用效益差异很大^[4]。

美国医学毒理学会等组织提出,当北美

Crotalinae 属蛇中毒不引起广泛死亡率,而主要以局部组织为主要毒性靶点时,现有证据未能证实压力固定对人体的功效,反而可能会引起严重不良事件,不建议使用压力固定作为这种毒蛇咬伤的院前治疗^[5]。因此,急救措施应视实际中毒情况遵循循证原则审慎应用,以减少并发症发生。

1.2 抗蛇毒血清

抗蛇毒血清(antivenom, AV)是目前治疗毒蛇咬伤的唯一特效疗法,有效降低死亡率。然而 AV 实际应用中涉及血清使用的时效和剂量、血清药物质量、蛇种区域差异性以及血清交叉不良反应等问题。AV 的稳定性是其中一个主要的易引起后期不可预测并发症的因素,液体 AV 需要连续冷藏且保质期较短,常因血清质量问题导致不良治疗效果而产生并发症。

AV 与毒液的相互作用受多种因素的影响,包括释放的毒液量以及特定 AV 中毒素亚型的相对识别。关于 AV 使用剂量,目前普遍认为,临床中 AV 和毒液之间 1 : 1 的应用存在不能完全中和的潜在风险,因此,临床上 AV 多应用过量,而过量的 AV 也是后期潜在并发症发生的重要因素。

1.3 不恰当的手术治疗

不恰当的外科手术治疗也是引起毒蛇咬伤并发症的一个主要原因,其中以筋膜切开术为典型代表。筋膜切开术是目前毒蛇咬伤后降低筋膜室压力的常用手段。然而,在实际应用中应辨别毒蛇咬伤引起的皮下肿胀与其他外伤引起的深部组织肿胀的病理差异性。在未行室内压力测量,或没有证据表明患肢出现临界压力升高的情况下就进行筋



图 1 毒蛇咬伤后相关系统并发症

Figure 1 Related systemic complications after snakebite

膜切开术是不合理的。不恰当的手术治疗反而会引发出血过量,导致并发症甚至死亡事件发生。

1.4 被咬伤患者个体差异

在严格参照毒蛇咬伤治疗指南情况下,毒蛇咬伤后患者个体差异是产生并发症的主要原因。在临床实践中发现,即使在同种条件下,采用相同的治疗手段,有的患者出现毒蛇咬伤并发症,而有的患者没有并发症,这与患者的年龄、性别、区域以及体质等差异有关,使得毒蛇咬伤的治疗成为一个极具挑战的课题。

2 毒蛇咬伤多系统并发症

2.1 血液系统

2.1.1 消耗性凝血病

消耗性凝血病(venom-induced consumption coagulopathy, VICC)是毒液诱导的促凝剂毒素(包括凝血酶原激活物、凝血因子 V/X 激活物、类凝血酶等)激活了凝血通路,在促凝过程中消耗大量纤维蛋白原、凝血因子及血小板,形成“消耗性低凝状态”^[6]。临床表现为出血,轻者皮下、鼻或牙龈出血,重者呈血液失凝状态,可见颅内和脏器出血等。此类出血表现与弥散性血管内凝血类似,但后者伴有微血栓形成、微循环障碍,以终末器官衰竭为特征,往往难以自愈。本病的诊断主要基于凝血功能检查,可见国际标准化比、凝血酶原时间及 d-二聚体升高,纤维蛋白原降低。血栓弹力图^[7]能够监测凝血功能的损伤进展变化,可作为一种新型的 VICC 诊断工具和疗效评价指标。

毒蛇咬伤引起的 VICC 治疗以中和促凝剂毒素,恢复凝血因子水平,预防大出血及并发症为原则。AV 可结合并中和游离毒素,但具有很强的时效性,故强调早期使用^[8]。使用 AV 后应密切监测凝血功能,可通过血栓弹力图指导 AV 额外使用的剂量、时间及频率。研究表明,对于活动性出血的患者,使用外源性凝血因子替代疗法可加速凝血功能的恢复,在注射 AV 4 h 内给予新鲜冰冻血浆可缩短病程^[9]。

2.1.2 血栓性微血管病

部分 VICC 病例会发展为血栓性微血管病(thrombotic microangiopathy, TMA),VICC 常见于毒蛇咬伤后 1.5~2 h,注射 AV 后 12~24 h 内消退,而 TMA 常在咬伤后 1~3 d 出现,并持续更长时间^[10]。此外,尚有一些未经 VICC 的 TMA 病例报道^[11]。

Noutsos 等^[12]提出 TMA 的诊断标准为:血涂片检查显示贫血伴>1.0%的红细胞碎片,伴有绝对血小板减少($<150\times10^9/L$)或血小板较基线相对减少 25%。TMA 可累及内脏,肾是蛇伤相关 TMA 的主要靶器官,早期诊断急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)对减少并发症、挽救生命至关重要,而红细胞碎片对 TMA 合并 AKI 的诊断具有较高的敏感性和特异性^[13]。因此,临床上建议 TMA 患者应在毒蛇咬伤 24 h 内进行连续血涂片检查。

治疗上,血浆置换可清除血液中的毒素,减少血管内皮的进一步损伤,目前已用于一些较严重的 TMA 病例^[14]。对于 TMA 合并 AKI 患者,应强化支持性护理,维持血流动力学稳定,必要时行血液透析等肾支持及肾替代治疗。据研究统计,97%最初需透析治疗的 TMA 合并 AKI 患者均能获得无透析生存期,但仍存在发展为慢性肾病的风险,因此建议对此类患者进行长期肾功能监测^[15]。

2.1.3 毛细血管渗漏综合征

毛细血管渗漏综合征(capillary leak syndrome, CLS)是罗素蝰蛇(Russell's viper)咬伤的一种独特并发症,发病机制尚不明确,可能为毒素直接或间接作用于血管内皮,毛细血管通透性增加,血浆外渗至组织间隙^[16]。临床表现为球结膜及眶周水肿、腮腺肿胀,呈“毒蛇头外观”,甚或胸腔积液、全身弥漫性凹陷性水肿。由于血浆外渗、血容量减少,继而出现低血压、低蛋白血症和低容量性休克等并发症。组织灌注减少进一步致肾小管缺血坏死,故易进展为 AKI。若血流动力学未及时改善,还会导致多器官功能障碍和死亡。

毒蛇咬伤后 CLS 治疗的首要任务是稳定气道,给予氧供,必要时行气管插管辅助呼吸,积极液体复苏以维持组织灌注^[17]。血浆置换能够清除 AV 无法中和的毒素及与毛细血管损伤相关的细胞因子和炎症介质,目前已有成功治疗的案例报道^[18],但尚缺乏高质量的大规模研究。

2.2 神经系统

2.2.1 神经肌肉麻痹

神经毒性是常见的中毒类型,毒素通过阻滞神经肌肉传导而引起弛缓性麻痹。症状最早在毒蛇咬伤后 3 min 出现,进展迅速,最初累及眼外肌,逐渐累及面颈部、肢体肌肉和呼吸肌。呼吸衰竭是神经毒性蛇咬伤与死亡率相关的主要原因,也是临床上密切关注的焦点。一旦出现呼吸困难等症状,应

立即吸氧,监测呼吸功能,必要时行气管插管和机械通气。

2.2.2 中风

中风是与脑血管相关的神经系统损伤,包括缺血性和出血性两类,多继发于呼吸机麻痹、心脏骤停致缺血缺氧或血液毒性直接诱发。蛇伤后颅内出血发病率更高,已明确归因于凝血功能障碍;而缺血性中风的发病机制尚存在争议,可能与内皮损伤、高凝、自身免疫性血管炎、TMA 和全身性低血压等相关^[19]。此外,毒蛇咬伤后缺血性中风还可能发展为其它严重的并发症,包括截瘫、皮质性失明^[20]、脑白质病和帕金森病等^[21]。治疗上,给予通气支持,纠正凝血功能,早期注射 AV,并结合其它对症辅助治疗对于改善预后至关重要。

2.2.3 其它神经系统并发症

毒蛇咬伤后还可表现出其它罕见的神经系统并发症,如可逆性后部脑病综合征^[22]、急性播散性脑脊髓炎^[23]、Lance-Adams 综合征^[24]、复杂区域疼痛综合征^[25]等。这些并发症可通过 CT、MRI 等影像学及电生理检查诊断。可逆性后部脑病综合征是一种以头痛、癫痫发作、局灶性神经功能障碍等多重症状为特征,并伴有可逆性血管源性脑水肿的综合征,本病应重视病因治疗,包括降压、停用免疫抑制剂和改善肾功能等^[20]。急性播散性脑脊髓炎与麻疹、腮腺炎和单纯疱疹等病毒感染相关,是一种中枢神经系统脱髓鞘疾病,毒蛇咬伤后急性播散性脑脊髓炎可能与毒液或 AV 介导的免疫损伤相关,治疗包括激素、免疫调节、血浆置换、物理和康复疗法等^[21]。Lance-Adams 综合征又称为活动性肌阵挛综合征,表现为构音障碍、动作/意图肌阵挛、癫痫、认知障碍和共济失调,可予氯硝西泮、左乙拉西坦等镇静治疗,其预后差异显著,早期诊断至关重要^[22]。复杂区域疼痛综合征常发生在创伤后,特征为慢性疼痛、水肿、皮肤颜色及感觉异常、骨质疏松和肌阵挛,与交感神经障碍相关^[23]。持续疼痛给患者造成长期负担,蛇伤后应警惕此综合征,并通过早期治疗控制疼痛,以防严重的神经功能丧失。

2.3 运动系统

2.3.1 组织坏死

毒蛇咬伤后,蛇毒金属蛋白酶、透明质酸酶和磷脂酶 A2 等毒素通过降解细胞外基质,诱导炎症和细胞凋亡,导致组织坏死及再生不良^[26],是蛇伤的远期并发症之一,临床表现为慢性溃疡、瘢痕、畸

形、肌肉萎缩、关节僵硬、平衡受损等。此类并发症虽多无致命性,但严重影响患者的生活质量,造成重大的经济负担。临床上对毒蛇咬伤后严重的局部症状应及时采取清创、解除挛缩或截肢等处理,传统天然药物对局部损伤可起到有效的补充或替代治疗效果。

2.3.2 筋膜室综合征

蛇毒螫入后局部组织出血、肿胀、渗出、坏死,血供减少;筋膜室内压力升高,进一步加重血液循环障碍,导致室内神经肌肉缺血坏死,并发展为筋膜室综合征 (osteofascial compartment syndrome, OCS)。小腿和前臂筋膜厚韧,缺乏弹性,且存在双骨和骨间膜结构,为 OCS 的好发部位^[27]。OCS 临床表现可归纳为“6P”,即疼痛 (pain)、感觉异常 (paresthesia)、皮肤苍白 (pallor)、麻痹 (paralysis)、肤温异常 (poikilothermia) 及脉搏减弱或消失 (pulselessness)。OCS 病情进展迅速,如未及时诊治,轻者肌肉挛缩、损害神经功能,重者致神经干及肌肉坏死,发生毒血症及肾功能衰竭,甚至危及生命。

筋膜室压力测定是 OCS 诊断的金标准,当室筋膜压 $>30\sim40$ mmHg 或舒张压与室筋膜压差 $<30\sim40$ mmHg 可明确诊断^[28]。白细胞计数和 AST 水平升高是 OCS 的危险因素,有助于早期预测;MRI 可确定 OCS 涉及的肌间,推荐 MRI 结合筋膜室压力监测用于本病的诊断和疗效评估^[29]。治疗上,早期给予足量 AV 可降低组织压,减少肌坏死,常规治疗还包括抗生素、激素、破伤风免疫球蛋白、脱水及利尿剂等^[30]。筋膜切开术可快速降低腔室内压力,是蛇伤后 OCS 公认的治疗方法。目前对于切开时机尚没有统一标准,多数学者主张早期切开,既可缓解筋膜室高压,亦可清创引流^[31];也有研究表明即使早期行筋膜切开术,仍然无法改善肢体功能预后,故仅推荐用于筋膜下压力持续升高的难治性病例^[32]。此外,负压封闭引流术有助于减轻组织水肿及感染,加速创面的愈合,可作为辅助疗法^[33]。

2.3.3 钙化性肌坏死

本病常继发于 OCS,尤其是伴周围神经损伤的病例。其特征是肢体间室内肌肉坏死区域伴周围钙化和中央液化,好发于前腔室,其次是外侧腔室和后深腔室^[34]。表现为逐渐增大的无痛肿块,偶尔有压痛,易被误诊为软组织肉瘤,可通过病史及 X 线、MRI 等影像学检查诊断。早期诊治 OCS 可预防

该并发症的发生,由于手术感染风险较高,主张无症状者先进行观察和随访,严重者可行肿块完全切除和抽吸引流,术后运用抗生素 6~8 周^[35]。

2.4 内分泌系统

垂体功能减退(hypohypophysis, HP)是最常见的内分泌系统并发症,主要见于 Russell's viper 咬伤,少数病例也见于锯鳞蝰蛇(saw-scaled viper)。其发病机制尚不明确,可能为血液毒性致垂体血管中纤维蛋白微血栓沉积,或低血压致垂体缺血缺氧,或血管通透性增加致垂体出血肿胀^[36]。急性 HP 表现为低血糖、低血压和休克,死亡率较高;迟发性 HP 在蛇伤后数月至数年出现,临床特征包括虚弱、声音沙哑、身体肿胀、体毛减少、性欲减退、男性勃起功能障碍、女性月经紊乱,表现较隐匿^[37]。

垂体 MRI 可见部分空蝶鞍区,但存在假阴性诊断。继发性性腺功能减退和甲状腺功能减退是迟发性 HP 最常见的蛇伤并发症,其次是继发性肾上腺功能不全和生长激素缺乏。不明原因的反复低血糖和难治性低血压是 HP 的危险因素,AKI、CLS 和凝血功能障碍是 HP 的预测指标^[38],此类患者应长期随访,及时识别内分泌紊乱,早期激素替代治疗,以减轻症状,提高生活质量,降低死亡率。

此外,毒蛇咬伤还可能出现原发性肾上腺功能不全、电解质紊乱(包括低钠血症、低钾血症、高钾血症)、尿崩症和高血糖等广泛的内分泌相关并发症^[39]。因此,毒蛇咬伤后应密切监测患者内分泌水平,以减少及延缓毒蛇咬伤内分泌系统并发症的发生及进展。

2.5 生殖系统

生殖功能主要由下丘脑-垂体-性腺轴调节,研究表明,Russell's viper 咬伤后 HP 可继发性腺功能减退,激素水平发生改变,进而影响患者的生殖功能。此外,目前已开展多项动物实验研究,验证了蛇毒毒素对雄性动物生殖能力的影响。Reprotoxin 是第一种从 *Daboia russelii* 蛇毒中分离出来的对生殖系统有害的毒素,可致小鼠睾丸的生殖细胞和间质细胞退化、输精管萎缩^[40]。*Crotalus durissus* 蛇毒可影响染色质的凝聚和组装,增加异常形态精子的数量,其毒液的主要成分磷脂酶 A2 可诱导小鼠精子膜损伤,磷酸二酯酶可降解 H2B 组蛋白^[41]; *Bothrops jararaca* 蛇毒可诱导成年小鼠生精上皮结构和功能的改变,抑制精子产生,并增加睾丸蛋白总提取物中的一氧化氮水平,诱导内腔室的生殖细

胞释放到输精管,导致生精上皮支持细胞减少^[42]。

生殖系统损伤是既往被忽视的蛇伤并发症,而生育能力是备受关注的民生问题,上述研究提示临床医生在毒蛇咬伤患者的处理中应重视生殖系统功能的排查,早期诊治以防不可逆的生殖功能障碍发生。

2.6 其他蛇伤并发症

2.6.1 心理上并发症

因人们对蛇根深蒂固的恐惧,及肢体挛缩、瘢痕或残疾等并发症发生,毒蛇咬伤常给患者带来极大的心理压力和焦虑。研究显示,部分患者在毒蛇咬伤后 1~4 年内出现严重的心理疾病,表现为焦虑、抑郁、癔病、器质性妄想症、创伤后应激障碍(post-traumatic stress disorder, PTSD)和心理障碍^[43],导致患者行动力、注意力、学习和认知能力下降。一项回顾性研究表明毒蛇咬伤患者与未被蛇咬伤的患者相比,PTSD 的患病率分别为 43% 和 28%,且前者在心理和社会领域的生活质量评分显著降低($P<0.05$)^[44]。早期对患者进行心理健康筛查和干预,即使是非专业心理医生进行简短的心理教育和认知行为疗法,均有助于减轻患者焦虑和抑郁等精神症状,改善整体功能^[45]。

因此,提高临床医生对蛇伤患者心理健康状况的认识,提供心理监测及适当干预,对于蛇伤临床管理,开发综合护理模式,了解疾病的真实负担均有重要意义。

2.6.2 蛇伤后眼部并发症

毒蛇咬伤致眼部病变的途径分为蛇毒注射和蛇毒喷射两种。蛇毒喷射是指某些蛇类(如眼镜蛇、横纹蛇等)通过唾液腺或颈腺将毒液喷射入眼,多涉及单眼,主要为前节段损伤,表现为畏光、角膜水肿、结膜炎和葡萄膜炎等,由蛇毒中的胶原酶和蛋白酶触发的组胺和乙酰胆碱内释放造成。蛇毒注射是指毒素通过血液循环到达眼睛而致相应损伤,由于视网膜和脉络膜血管丰富,故常发生后节段损伤,临床表现取决于毒素类型。神经毒素可致眼部神经功能紊乱,表现为眼肌麻痹、上睑下垂、复视、视神经炎等;血液毒素可致凝血功能障碍,表现为葡萄膜炎、视网膜中央动脉阻塞、视网膜或玻璃体出血、黄斑梗死等^[46]。由于眼前房液体循环受到抑制,急性闭角型青光眼(acute angle closure glaucoma, ACG)也有发生。Kulkarni 等^[47]发现 ACG 可能与血毒性蛇咬伤后 CLS 和 AKI 有关,在毛细血

管广泛渗漏的情况下,睫状体水肿,进而睫状体突前旋转和晶状体虹膜前移位,导致眼压升高。另外,其它罕见的眼科急症如双侧增生性视网膜病变伴牵拉性视网膜脱离和皮质性失明等均有报道^[48-49]。

临床上应高度警惕毒蛇咬伤引起的 ACG 等眼科急症,对可疑患者进行眼底评估,及时诊断和治疗可预防视力丧失。治疗上,对于蛇毒喷射入眼,应立即用自来水或盐水清洗,大多症状可缓解。对于蛇毒注射入眼,AV 是主要治疗方法,其它治疗包括外用血管收缩剂(如肾上腺素)或局麻药镇痛,抗生素预防感染,阿托品、东莨菪碱预防睫状肌痉挛^[44]。

2.6.3 毒蛇咬伤后感染

毒蛇的口腔和毒牙含有多种致病菌,加之损伤坏死的组织有利于细菌定植,毒蛇咬伤后易产生严重的局部和全身化脓性并发症。临床上毒蛇咬伤后数小时至数天内可出现蜂窝织炎,若早期治疗不当或不及时,可发展为坏死性筋膜炎,严重者出现广泛的组织坏死和进行性脓毒症,并发急性肾功能衰竭、血小板减少和凝血功能障碍。Tsai 等^[50]研究发现,出血性大疱、白细胞计数和形态以及肝炎、糖尿病、心脏病、高血压、痛风和终末期肾病等慢性基础病均是坏死性筋膜炎的危险因素。对于毒蛇咬伤患者,入院后应密切观察局部感染情况,一般不建议预防性使用抗生素,如若存在感染风险或出现明显的感染症状,可经验性使用第三代头孢菌素,局部消毒、坏死组织切除和脓肿引流是治疗伤口感染的必要措施,对已明确的坏死性筋膜炎应尽早行筋膜切开术^[51]。

由于毒蛇的毒牙较骨头钙化低,X 线具有一定透光性,故蛇伤后异物滞留的延迟感染也时有发生。Gelman 等^[52]报道 1 例响尾蛇咬伤,尽管入院时完善了放射性检查和彻底清疮术,但后期由于组织中滞留的毒牙感染出现脓毒性关节炎。该病例强调了对残留异物仔细检查的重要性,增强 X 线及其它影像学方法如超声、暗场和相位对比成像均可辅助诊断。

3 结语

随着全球气候变暖增加了蛇的活动时间,以及农村等地区生态环境的改善,蛇类的猎物急剧增加,为毒蛇生存提供了有利条件,毒蛇咬伤事件逐

年增加。然而,因毒蛇咬伤主要发生在农村等偏远地区,其危害性被严重忽视;毒蛇咬伤记录保存不完整,使得现有毒蛇咬伤所致死亡或永久性损伤的相关数据被严重低估。而毒蛇咬伤后相关并发症更是为这些欠发达地区的患者增加了沉重的经济与心理负担,因病致残或因病致贫,使得毒蛇咬伤事件既是医学问题,也是社会学与经济学问题。

毒蛇咬伤具有广泛的危重并发症及慢性致残后遗症,由于蛇的种属、毒素类型、蛇咬伤和注射 AV 的时间间隔及地理差异,难以预测毒蛇咬伤后毒化作用的具体结果。此外,不当的急救和治疗包括伤口切割、止血带、电击以及无效的草药疗法等均能引起蛇伤并发症的发生与发展。目前,在降低毒蛇咬伤并发症发病率和提高患者治疗效果方面还有显著的改进空间。临床医生应关注毒蛇咬伤可能出现的即时性和延迟性并发症,建立与毒蛇咬伤相关的长期健康后遗症筛查机制。

总之,毒蛇咬伤后应积极监测并发症危险因素,遵循循证医学规律,采取相应防治措施,降低毒蛇咬伤并发症的发生发展,提高患者生存质量,以规避蛇伤急性事件转变为更为昂贵的慢性疾病负担。

参考文献:

- [1] CHIPPAUX J P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! [J]. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis, 2017, 23: 38.
- [2] HUANG Y K, CHEN Y C, LIU C C, et al. Cerebral complications of snakebite envenoming: case studies [J]. Toxins, 2022, 14(7): 436.
- [3] 董德刚, 宋梅, 邓中平, 等. 植物药抗蛇毒局部毒性效应作用与机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(7): 907-911.
DONG D G, SONG M, DENG Z P, et al. Research progress on local tissue damage of snake venom and intervention of plant medicine [J]. Chin Pharmacol Bull, 2020, 36(7): 907-911.
- [4] CURRIE B J, CANALE E, ISBISTER G K. Effectiveness of pressure-immobilization first aid for snakebite requires further study [J]. Emerg Med Australas, 2008, 20(3): 267-270.
- [5] SEIFERT S, WHITE J, CURRIE B J. Pressure bandaging for North American snake bite? No! [J]. Clin Toxicol, 2011, 49(10): 883-885.
- [6] SLAGBOOM J, KOOL J, HARRISON R A, et al. Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise [J]. Br J Haematol, 2017, 177(6): 947-959.
- [7] NOUTSOS T, CURRIE B J, LEK R A, et al. Snakebite

- associated thrombotic microangiopathy: a systematic review of clinical features, outcomes, and evidence for interventions including plasmapheresis [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2020, 14(12): e0008936.
- [8] 杨义明, 吴春波, 杨家成, 等. 银环蛇咬伤 27 例救治体会 [J]. *中国医药导报*, 2012, 9(7): 151-152.
- YANG Y M, WU C B, YANG J C, et al. Experience on the treatment of 27 cases with *Bungarus multicinctus* bite [J]. *China Med Her*, 2012, 9(7): 151-152.
- [9] ISBISTER G K, DUFFULL S B, BROWN S G A, et al. Failure of antivenom to improve recovery in Australian snakebite coagulopathy [J]. *QJM*, 2009, 102(8): 563-568.
- [10] CASAMENTO A J, ISBISTER G K. Thrombotic microangiopathy in two tiger snake envenomations [J]. *Anaesth Intensive Care*, 2011, 39(6): 1124-1127.
- [11] DINESHKUMAR T, DHANAPRIYA J, SAKTHIRAJAN R, et al. Thrombotic microangiopathy due to *Viperidae* bite; two case reports [J]. *Indian J Nephrol*, 2017, 27(2): 161-164.
- [12] NOUTSOS T, CURRIE B J, WIJEWICKRAMA E S, et al. Snakebite associated thrombotic microangiopathy and recommendations for clinical practice [J]. *Toxins*, 2022, 14(1): 57.
- [13] NOUTSOS T, CURRIE B J, BROWN S G, et al. Schistocyte quantitation, thrombotic microangiopathy and acute kidney injury in Australian snakebite coagulopathy ASP28 [J]. *Int J Lab Hematol*, 2021, 43(5): 959-965.
- [14] PIRASATH S, ATHIRAYAN C, GAJAN D. Thrombotic microangiopathy following saw-scaled viper (*Echis carinatus*) envenoming in Sri Lanka [J]. *SAGE Open Med Case Rep*, 2021, 9: 2050313X211032399.
- [15] NOUTSOS T, CURRIE B J, ISOARDI K Z, et al. Snakebite-associated thrombotic microangiopathy: an Australian prospective cohort study ASP30 [J]. *Clin Toxicol*, 2022, 60(2): 205-213.
- [16] KENDRE P P, JOSE M P, VARGHESE A M, et al. Capillary leak syndrome in *Daboia russelii* bite—a complication associated with poor outcome [J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2018, 112(2): 88-93.
- [17] DE BACKER D, BISTON P, DEVRIENDT J, et al. Comparison of dopamine and norepinephrine in the treatment of shock [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(9): 779-789.
- [18] ZENGIN S, YILMAZ M, AL B, et al. Plasma exchange as a complementary approach to snake bite treatment: an academic emergency department's experiences [J]. *Transfus Apher Sci*, 2013, 49(3): 494-498.
- [19] RANAWAKA U K, LALLOO D G, DE SILVA H J. Neurotoxicity in snakebite—the limits of our knowledge [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7(10): e2302.
- [20] SAMANTA S K, MAHAPATRA N C, FARIDUDDIN K, et al. Cortical blindness and paraplegia following hypoxic ischemic encephalopathy as a complication of common krait bite [J]. *Nepal J Ophthalmol*, 2011, 3(2): 206-209.
- [21] CHAUDHARY S C, SAWLANI K K, MALHOTRA H S, et al. Snake bite-induced leucoencephalopathy [J]. *BMJ Case Rep*, 2013, 2013: bcr2012007515.
- [22] IBRAHIM A M, ELSEFI T T, GHANEM M, et al. A horned viper bite victim with PRES [J]. *Case Rep Neurol Med*, 2017, 2017: 1835796.
- [23] TRIPATHY S, ROUTRAY P K, MOHAPATRA A K, et al. Acute demyelinating encephalomyelitis after anti-venom therapy in Russell's viper bite [J]. *J Med Toxicol*, 2010, 6(3): 318-321.
- [24] GHOSH R, MAITY A, BISWAS U, et al. Lance-Adams syndrome: an unusual complication of snakebite envenomation [J]. *Toxicon*, 2022, 209: 50-55.
- [25] İPEK S, GUNGOR S, GÜLLÜ U U, et al. Snakebites in pediatric patients in kahramanmara: is pro-brain natriuretic peptide a prognostic biomarker for snakebites? [J]. *Cureus*, 2022, 14(1): e21570.
- [26] GUTIÉRREZ JM, ESCALANTE T, HERNÁNDEZ R, et al. Why is skeletal muscle regeneration impaired after myonecrosis induced by viperid snake venoms? [J]. *Toxins*, 2018, 10(5): 182.
- [27] ENJETI A K, LINCZ L F, SELDON M, et al. Microangiopathy in snake bites—bubble trouble; response to commentary [J]. *Res Pract Thromb Haemost*, 2019, 3(2): 298-299.
- [28] 中国蛇伤救治专家共识专家组. 2018 年中国蛇伤救治专家共识 [J]. *蛇志*, 2018, 30(4): 561-567.
- China expert consensus group on the treatment of snakebite. 2018 China Expert Consensus on the management of snake-bites [J]. *J Snake*, 2018, 30(4): 561-567.
- [29] HSU C P, CHUANG J F, HSU Y P, et al. Predictors of the development of post-snakebite compartment syndrome [J]. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*, 2015, 23: 97.
- [30] MAZER-AMIRSHAHI M, BOUTSIKARIS A, CLANCY C. Elevated compartment pressures from copperhead envenomation successfully treated with antivenin [J]. *J Emerg Med*, 2014, 46(1): 34-37.
- [31] FIRAT C, ERBATUR S, AYTEKIN A H, et al. Effectiveness of early fasciotomy in the management of snakebites [J]. *Turk J Trauma Emerg Surg*, 2012, 18(5): 417-423.
- [32] HARDY DL S R, ZAMUDIO K R. Compartment syndrome, fasciotomy, and neuropathy after a rattlesnake envenomation: aspects of monitoring and diagnosis [J]. *Wilderness Environ Med*, 2006, 17(1): 36-40.
- [33] 穆学伟, 吴艺, 王盛, 等. 创面菱形分布切开联合负压封闭引流技术对毒蛇咬伤的临床价值 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(11): 112-115.
- MU X W, WU Y, WANG S, et al. Clinical observation of rhombotomy combined with VSD negative pressure suction for venomous snake bite wound [J]. *China J Mod Med*, 2020, 30(11): 112-115.
- [34] YUENYONGVIWAT V, LAOHAWIRIYAKAMOL T, SUWANNO P, et al. Calcific myonecrosis following snake bite:

- a case report and review of the literature [J]. J Med Case Rep, 2014, 8; 193.
- [35] PAPANIKOLAOU A, CHINI M, PAVLAKIS D, et al. Calcific myonecrosis of the leg: report of three patients presenting with infection [J]. Surg Infect, 2011, 12(3): 247–250.
- [36] SHIVAPRASAD C, AISWARYA Y, SRIDEVI A, et al. Delayed hypopituitarism following Russell’s viper envenomation; a case series and literature review [J]. Pituitary, 2019, 22(1): 4–12.
- [37] ANTONYPILLAI C N, WASS J A, WARRELL D A, et al. Hypopituitarism following envenoming by Russell’s vipers (*Daboia siamensis* and *D. russelii*) resembling Sheehan’s syndrome: first case report from Sri Lanka, a review of the literature and recommendations for endocrine management [J]. QJM, 2011, 104(2): 97–108.
- [38] GOLAY V, ROYCHOWDHARY A, DASGUPTA S, et al. Hypopituitarism in patients with vasculotoxic snake bite envenomation related acute kidney injury: a prospective study on the prevalence and outcomes of this complication [J]. Pituitary, 2014, 17(2): 125–131.
- [39] BHATTACHARYA S, KRISHNAMURTHY A, GOPALAKRISHNAN M, et al. Endocrine and metabolic manifestations of snakebite envenoming [J]. Am J Trop Med Hyg, 2000, 103(4): 1388–1396.
- [40] KUMAR J R, BASAVARAJAPPA B S, ARANCIO O, et al. Isolation and characterization of “Reprotxin”, a novel protein complex from *Daboia russelii* snake venom [J]. Biochimie, 2008, 90(10): 1545–1559.
- [41] FERNANDES F H, BUSTOS-OBREGON E, MATIAS R, et al. *Crotalus durissus* sp. rattlesnake venom induces toxic injury in mouse sperm [J]. Toxicon, 2018, 153: 17–18.
- [42] ALBERTO-SILVA C, FRANZIN C S, GILIO J M, et al. Toxicological effects of bioactive peptide fractions obtained from *Bothrops jararaca* snake venom on the structure and function of mouse seminiferous epithelium [J]. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis, 2020, 26; e20200007.
- [43] BHAUMIK S, KALLAKURI S, KAUR A, et al. Mental health conditions after snakebite: a scoping review [J]. BMJ Glob Health, 2020, 5(11): e004131.
- [44] HABIB Z G, SALIHU A S, HAMZA M, et al. Posttraumatic stress disorder and psycho-social impairment following snakebite in Northeastern Nigeria [J]. Int J Psychiatry Med, 2021, 56(2): 97–115.
- [45] WIJESINGHE C A, WILLIAMS S S, KASTURIRATNE A, et al. A randomized controlled trial of a brief intervention for delayed psychological effects in snakebite victims [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(8): e0003989.
- [46] CHANG K C, HUANG Y K, CHEN Y W, et al. Venom ophthalmia and ocular complications caused by snake venom [J]. Toxins, 2020, 12(9): 576.
- [47] KULKARNI C, GEORGE T A, AV A, et al. Acute angle closure glaucoma with capillary leak syndrome following snake bite [J]. J Clin Diagn Res, 2014, 8(10): VC01–VC03.
- [48] THOMAS N R, DAS D, SAURABH K, et al. A rare case of bilateral tractional retinal detachment following snakebite [J]. Indian J Ophthalmol, 2017, 65(11): 1238–1240.
- [49] KODIATTE A A, JOHN L. Hemotoxic snakebite presenting with bilateral blindness due to ischemic occipital infarcts [J]. Indian J Crit Care Med, 2019, 23(2): 99–101.
- [50] TSAI Y H, HSU W H, HUANG K C, et al. Necrotizing fasciitis following venomous snakebites in a tertiary hospital of southwest Taiwan [J]. Int J Infect Dis, 2017, 63: 30–36.
- [51] HOUCKE S, RESIERE D, LONTSINGOULA G R, et al. Characteristics of snakebite-related infection in French Guiana [J]. Toxins, 2022, 14(2): 89.
- [52] GELMAN D, BATES T, NUELLE J A V. Septic arthritis of the proximal interphalangeal joint after rattlesnake bite [J]. J Hand Surg Am, 2022, 47(5): 484.e1–484.e4.

[收稿日期]2023–11–06

王煜,吴勇,梁春南,等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建基因修饰小鼠模型的技术优化进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 152-158.

Wang Y, Wu Y, Liang CN, et al. Progress in the optimization of CRISPR/Cas9 technology for the establishment of genetically modified mouse models [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 152-158.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.017

利用 CRISPR/Cas9 技术构建基因修饰小鼠模型的技术优化进展

王煜, 吴勇, 梁春南, 范昌发*

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 北京 102629)

【摘要】 CRISPR/Cas9 技术的兴起,推动了生命科学各个领域的发展。随着对其认识的不断加深,人们进行了多重改进和优化,以适应不同的应用场景。在基因修饰小鼠模型制作中,CRISPR/Cas9 技术的优化也带来了众多突破性进展。本文简要回顾了 CRISPR/Cas9 技术的发展历程,并从 CRISPR/Cas9 元件优化、条件敲除/敲入基因修饰小鼠模型的构建以及 CRISPR/Cas9 元件和 HDR 模板的递送系统层面总结了优化策略,展望该技术未来的发展。

【关键词】 CRISPR/Cas9; 小鼠模型; 条件敲除/敲入; 递送

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0152-07

Progress in the optimization of CRISPR/Cas9 technology for the establishment of genetically modified mouse models

WANG Yu, WU Yong, LIANG Chunnan, FAN Changfa*

(Institute for Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control (NIFDC),
Beijing 102629, China)

【Abstract】 CRISPR/Cas9 technology has driven the development of various fields in life science. With continuous deepening of its understanding, researchers have made multiple improvements and optimizations to adapt to various application scenarios. The optimization of CRISPR/Cas9 technology has also provided breakthroughs in the establishment of genetically modified mouse models. This article briefly reviews the development process of CRISPR/Cas9 technology and summarizes optimization strategies of CRISPR/Cas9, establishment of conditional knockout/knockin gene-modified mouse models, and delivery systems for CRISPR/Cas9 elements and HDR templates.

【Keywords】 CRISPR/Cas9; mouse model; conditional knockout/knockin; delivery

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

小鼠和人类有着非常相似的遗传背景,二者约 90% 的基因组为保守共线性 (conserved syntenic) 区域^[1]。与人类其他同源关系较近的猴、大猩猩等动物相比,小鼠的体型小,繁殖能力强,饲养成本较

【基金项目】 国家重点研发计划 (2021YFC2301700)。

【作者简介】 王煜 (2000—),女,硕士研究生,研究方向:传染病动物模型构建与疫苗评价研究。E-mail: wangyu09075@163.com

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

低,更加符合实验动物伦理要求。因此,小鼠成为实验室人类疾病相关研究使用最广泛的模式动物。尽管其基因组与人类基因组有着较高的同源性,但二者之间的差异也不可小觑^[2]。例如,小鼠和人类在免疫系统发育、激活和对外来抗原的应答方面存在显著差异,导致无法用小鼠很好地模拟病原体感染人体的过程^[3]。正常小鼠与人类细胞固有的分子过程决定了组织特异性癌症发病率的显著差异,导致了与年龄相关的癌症类型在小鼠和人类中易发性不同^[4-5]。研究人类的疾病发生过程、评价新药的体内疗效以及研发应对流行病的疫苗,都需要合适的动物模型,以重现人类疾病临床症状。因此,研究人员尝试通过敲除某些基因或将人源基因插入到小鼠基因组的方法构建疾病动物模型,模拟人类疾病的发生^[6-8]。近年建立的 CRISPR/Cas 技术为构建基因修饰小鼠模型提供了有力的工具^[9-12]。随着科学技术的不断进步,科学家也在不断尝试新的技术手段,采取不同策略优化该基因编辑技术体系,以期更好地、更有效地利用 CRISPR/Cas 系统构建基因修饰动物模型,满足基础研究和临床试验的需要。本文就利用 CRISPR/Cas9 技术构建基因修饰动物模型的技术优化进展做简要回顾。

1 CRISPR/Cas 系统的发展历程

2007 年,法国科学家发现了一种细菌的获得性免疫系统—CRISPR/Cas 系统,细菌可以特异识别入侵的外源 DNA,利用 Cas 蛋白对其进行剪切破坏^[13],以消除外源 DNA 的影响。2011~2012 年,美国科学家和法国科学家等开展了大量的研究,并于 2012 年揭示了细菌和古细菌通过 CRISPR/Cas 系统进行免疫防御的分子机制^[14-18]。之后,两人合作成功构建了 CRISPR/Cas9 系统^[19]。2013 年,CRISPR/Cas9 技术开始用于小鼠内源基因的高效编辑^[20]。在 CRISPR/Cas9 系统建立之前,基因编辑技术已经历了锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)技术和转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)等技术^[21-22]。与这两种基因编辑技术相比,CRISPR/Cas9 技术更加精准、便捷和高效^[23]。

2 CRISPR/Cas9 技术优化及其在基因编辑小鼠中的应用

CRISPR/Cas9 系统由两部分构成,即 sgRNA

(small guide RNA)和 Cas9 (Cas9 nuclease)蛋白。sgRNA 能够通过碱基互补配对对靶序列的进行识别,在 sgRNA 的引导下,Cas9 核酸酶能够识别靶序列前的 PAM (protospacer adjacent motif) 序列,并在 PAM 序列上游 3~8 bp 处对靶位点精确剪切^[24]。经 Cas9 剪切的靶序列形成 DSB (double strand breaks) 缺口,在基因组本身存在的差错倾向修复机制的作用下,靶序列产生了错配,即发生了基因突变,导致该基因被敲除。如果此时存在外源 DNA 同源重组模板 HDR (Homology directed repair),就会发生同源重组修复,新的 DNA 序列就会在某一位点发生整合^[25]。基于 CRISPR/Cas9 技术原理,科学家尝试对 sgRNA 和 Cas9 两个元件进行改良,以期降低脱靶效率,提高外源基因敲入的精准度与效率,从而在基因编辑小鼠模型的构建方面获得更多突破。

2.1 Cas9 蛋白的加工修饰及其在构建小鼠模型中的应用

Cas9 核酸酶是 CRISPR/Cas9 基因编辑技术中常用的酶,它可以在靶基因的特定位置引起 DNA 双链断裂。其缺点是可能引起不必要的 DNA 双链断裂,导致非特异性编辑,即脱靶效应 (off-target effect)。因此,科学家尝试对 Cas9 核酸酶进行改造或者替换,以实现更加精准的基因编辑,降低脱靶效应。

2.1.1 Cas9n 蛋白

Cas9n (Cas9 nickase) 是在 Cas9 蛋白的基础上,通过丙氨酸取代 Cas9 两个结构域 RuvC 和 HNH 中的一个关键残基,从而形成一种只能引起 DNA 单链断裂的酶。目前,常用的 Cas9n 蛋白有两种,一种是通过用丙氨酸替代第 10 位的天冬氨酸使 RuvC 结构域失活形成的 D10A 突变内切酶 (D10A mutant nickase),另一种是通过用丙氨酸替代第 840 位的组氨酸使 HNH 结构域失活形成 H840A 突变内切酶 (H840A mutant nickase)。DNA 单链断裂主要通过高保真的碱基切除修复 (base-excision repair, BER) 途径修复^[26],因此,Cas9n 很难引起非特异性编辑。基于 Cas9n 的特性,科学家尝试采用对应两条互补 DNA 链的两个 sgRNA 介导,两个 Cas9n 蛋白在相近位置切割的策略,将脱靶效应最小化。在一项实验中,作者成功使用 D10A 突变体对小鼠的受精卵进行了基因修饰,最终在胚胎水平上检测基因编辑效率,大致与 Cas9 组相同^[27]。脱靶效应不仅导致目

标基因没有得到修饰,而且还会导致非靶基因被破坏,产生不符合预期的表型。经 Cas9n 处理的受精卵发育而成的小鼠,虽然也存在目标基因没有被修饰的情况,但其靶基因之外的基因组区域被破坏的概率较低。因此,这些未被基因编辑的小鼠大部分还是野生型,可以再次回收利用,减少了实验动物的数量,更加符合实验动物伦理。

2.1.2 fCas9 蛋白

fCas9(FokI-dCas9)是另一种改进的核酸酶,它是由 FokI 双链切割酶和双突变 Cas9 蛋白(dCas9)构成。其中 dCas9(dead Cas9)蛋白是由 Cas9 的 RuvC 和 HNH 两个核酸酶活性区域同时发生突变产生,只能在 sgRNA 的引导下进行定位结合,不能发挥剪切功能^[28]。而 FokI 双链切割酶只有在形成二聚体时才能发挥作用^[29]。因此,CRISPR/fCas9 系统的特异性不仅由双 sgRNA 决定,而且 FokI 的共定位也在发挥作用,所以特异性大大提高。一项研究表明,以将 Cas9 mRNA 和 sgRNA 注射到受精卵的方式构建基因修饰小鼠,使用 fCas9 与使用 Cas9n 相比,效率相近或更高^[30]。而另一项研究表明,通过将 CRISPR/Cas9 DNA 载体显微注射进入受精卵的方式构建基因修饰小鼠,fCas9 的基因修饰效率明显高于 Cas9 和 Cas9n^[31]。

2.1.3 Cas9 蛋白与碱基编辑器的融合

近年来,人们通过对 Cas9 蛋白的加工与修饰,使其功能进一步提升,有效地提高了基因编辑效率和精准度,甚至实现针对某几个特定碱基进行编辑。例如,在一项关于乳腺癌的研究中,建成了一个在乳腺中条件表达碱基编辑器 BE3 的小鼠模型。BE3 碱基编辑器(cytosine base editor,CBE)是一种杂合蛋白,包含化脓性链球菌 Cas9n(SpCas9^{D10A})与大鼠 APOBEC1 胞苷脱氨酶和尿嘧啶糖基化酶抑制剂(UGI)结构域。在递送 sgRNA 后,BE3 的 Cas9 部分与基因组靶位点结合,并将脱氨酶定位在其 5' 端,在 4~5 个核苷酸的小窗口内产生 C-T 转换^[32]。在另一项关于镰状贫血症的研究中,作者构建了一种 Cas9n 和反转录酶的融合蛋白,称为 PE(Prime editor)。他能够将 sgRNA 上的序列信息复制到目标 DNA 位点。在镰状红细胞小鼠模型中,PE 能够完成 T 到 A 的碱基替换,从而达到基因纠正的目的^[33]。既然 PE 能够纠正造成镰状红细胞的基因突变,那么也可以在小鼠体内构建这种基因突变。因此,无论是 BE3 CBE 还是 PE,都为构建基因突变

疾病的小鼠模型提供了契机。

2.2 Cas9 的补充——Cas12a 在小鼠模型构建中的应用

Cas12a 是一种 Cas9 蛋白的替代和补充工具,与 Cas9 蛋白相比,他有以下几个优点:首先,Cas12a 蛋白只有单个核酸位点,在切割 DNA 双链时形成 1 个交错互补的 DSB 缺口^[34],因此,他能更好地支持 HDR 模板修复,更有利于敲入工作的进行;其次,在进行基因编辑时 Cas12a 蛋白只需要 1 个 crRNA,不需要 tracrRNA,因此他比 Cas9 的结构更加简化^[35];最后,他能够与靶区域不可逆结合并且对脱靶序列进行严格区分,与 SpCas9 相比,Cas12a 脱靶效应较少^[36]。随着人们对 Cas12a 蛋白认识的不断加深,CRISPR/Cas12a 正在逐渐应用到哺乳动物细胞以及模型制作方面。在一项研究中,研究者使用博沃克利莫拉菌来源的 Cas12a(Mb3Cas12a),得到较高编辑效率的基因敲除小鼠,同时还发现使用标记有单体链霉素亲和素(mSA)的 Mb3Cas12a 能够提高基因敲入的效率^[37]。在另一项研究中,作者使用直肠真杆菌来源的 Cas12a 蛋白(MAD7)在小鼠基因组 Rosa26 位点实现了大小片段的敲入^[38]。CRISPR/Cas12a 基因编辑策略在动物模型制作方面仍然存在有待人们发掘的巨大潜力。

2.3 sgRNA 的优化

有研究发现,在 sgRNA 的 5' 端和 3' 端进行化学修饰,即 5' & 3' -sgRNA,能够提高 CRISPR/Cas9 在细胞中的基因编辑效率^[39]。在另一项研究中,发现将 sgRNA 的不变区(Cas9 结合区和尾区)用 2' 羟基和硫代磷酸酯键修饰,能够增强细胞中某靶基因的敲除效率,作者将该种修饰的 sgRNA 称为 e-sgRNA。用靶向肝细胞的脂质纳米粒包埋 sgRNA,以静脉注射的方式输送到组成型表达 Cas9 和绿色荧光蛋白 GFP 的小鼠体内,对比未修饰的 sgRNA、5' & 3' -sgRNA 以及 e-sgRNA 三组实验,结果显示,e-sgRNA 介导的基因编辑效率明显高于未修饰的 sgRNA 和 5' & 3' -sgRNA^[40]。但也有实验表明,e-sgRNA 增强基因编辑效率并不是一成不变的,某些情况下未修饰的 sgRNA 和 5' & 3' -sgRNA 介导的基因编辑效率比 e-sgRNA 高^[40]。

3 利用 CRISPR/Cas9 技术构建条件敲除/敲入小鼠

Cre-LoxP 重组酶系统是目前最常用的构建条件敲除/敲入小鼠的系统。利用 Cre-LoxP 重组酶系

统构建条件性敲入敲除小鼠的原理是:将两个 LoxP 基因座插入靶序列的两侧,以产生 flox 小鼠。flox 小鼠与 Cre 小鼠杂交后,LoxP 标记的 DNA 序列将被删除,而不同的启动子驱动 Cre 在不同的组织和细胞中表达^[41]。Cre 重组酶发挥作用的最适温度为 37 ℃,因此最适宜在哺乳动物中使用。在基因修饰小鼠模型的构建中,由于敲除某一基因或者敲入某一基因会导致小鼠胚胎发育不正常,从而导致较高的致死率。构建条件性敲除/敲入小鼠,能够起到很好的种系传递、特定时间敲除/敲入以及组织特异性表达的作用。

3.1 构建稳定遗传的敲除/敲入小鼠模型

能够稳定遗传的基因编辑小鼠需要在受精卵水平上对基因组进行遗传修饰。其优点是在后期实验中仅需将条件敲除/敲入小鼠与 Cre 工具鼠交配即可获得数量可观的目标鼠,大大节省了构建模型的成本。

3.1.1 构建稳定遗传的条件敲除小鼠

利用 Cre-LoxP 系统构建稳定遗传的条件敲除小鼠最传统的方式是直接靶基因的一个或多个外显子两侧插入 LoxP 基因座。在一些研究中,作者设计了针对靶序列两侧位点的两种 sgRNA,在靶基因的两侧分别形成 DSB 缺口;同时设计了一个带有两个 LoxP 基因座和敲除基因序列的 DNA 供体,这个 DNA 供体会通过同源重组的方式使两个 LoxP 基因座插入到靶序列的两侧^[42]。该方法中 HDR 模板较长,因此 HDR 供体与 CRISPR/Cas9 系统的递送需要使用显微注射的方法,操作复杂,对操作人员技术要求高。而 Nishizono 等^[43]和 Horii 等^[44]科学家结合电穿孔技术,利用 CRISPR/Cas9 技术将单个 LoxP 基因座的 HDR 插入到靶序列的两侧,能够大大降低实验操作的难度。

3.1.2 构建稳定遗传的条件敲入小鼠

LSL(LoxP-stop-LoxP)是由两个 LoxP 基因座中间夹一个终止蛋白构成的元件。当不存在 Cre 重组酶时,终止蛋白正常表达,被 LSL 标记的基因不能表达;当存在 Cre 重组酶时,被 LoxP 标记的终止蛋白基因被删除,从而使得被 LSL 标记的基因能够正常表达。构建稳定遗传的条件敲入小鼠需要将 LSL 元件与目的基因连接在同一个 HDR 模板上,然后插入基因组上的安全港位点。而如何将 HDR 模板导入受精卵是基因敲入成功的关键。通常使用双链 DNA 作为供体建立条件敲入小鼠的效率通常只有

1%~10%。而近年来发展起来的 Easi-CRISPR 技术使用 DNA 单链供体,敲入效率可以达到 30%~60%^[45-46]。虽然 Easi-CRISPR 技术大大提高了基因敲入的效率,但是仍然要依靠显微注射的方式递送。美国加州大学研究人员开发了一种叫做 CRISPR-READI 的技术,将腺相关病毒(AAV)介导的 HDR 供体递送与 Cas9/sgRNA RNP 电穿孔相结合,以高效率和高通量在小鼠基因组中工程化大的位点特异性修饰,并成功地将 1 个 774 bp 的荧光报告基因、1 个 2.1 kb 的 CreERT2 驱动基因和 1 个 3.3 kb 的表达盒插入到胚胎和活体鼠的内源基因座上^[47]。腺相关病毒的容纳量为 4.9 kb,因此,不仅可以容纳靶基因和 LoxP 基因座,还能将 Cre 基因直接插入到小鼠的基因组中,大大缩短了条件敲入小鼠的繁育时间。

3.2 构建临时性条件敲除/敲入小鼠

在构建条件性敲除/敲入小鼠时,都需要构建 LSL-Cas9 小鼠,即将 LSL 序列、Cas9 基因序列插入到 Rosa26 安全港位点。当给予 sgRNA 与 Cre 时,Cas9 蛋白能够正常表达,被 sgRNA 引导至靶序列,进行基因敲除。如果进行基因敲入,在基因敲除的基础上再递送一个 HDR 模板。在利用该种小鼠模型模拟疾病发生过程时,sgRNA 和 Cre 重组酶以及 HDR 模板的递送通常使用慢病毒或腺相关病毒载体。例如,在一项研究中,作者使用一种能够特异性感染神经元的 AAV,构建了 1 个 AAV-U6-sgRNA-Cre 载体,其中 sgRNA 能够靶向高表达神经元特异性 RNA 剪接因子 NeuN(RbFox3),然后将包装好的病毒通过立体定向注射进入 Cre 依赖型 Cas9 小鼠的前额叶皮层,后续实验发现 Cas9 蛋白成功在靶序列附近形成基因突变,并且与对照组相比,在注射 AAV-U6-sgRNA-Cre 载体的区域 NeuN 蛋白表达减少了 80%^[48]。在另一项研究中,作者应用一种能够特异性感染神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的 AAV9 变体递送 Cre 重组酶和 sgRNA,产生了星形胶质细胞特异性 Act1 敲除小鼠^[49]。也有研究人员成功使用某种 AAV9 变体装载 sgRNA、Cre 以及突变基因的 HDR 模板进行基因敲入,成功构建肺癌小鼠模型^[50]。

4 CRISPR/Cas9 系统的递送技术优化

4.1 受精卵水平的递送技术优化

如果要得到基因修饰小鼠的稳定遗传品系,就

要从受精卵或者胚胎干细胞的水平进行基因编辑。常用的将 CRISPR/Cas9 元件导入受精卵或胚胎干细胞的办法是显微注射。在进行基因敲除操作时,通过胞质注射方式递送 Cas9 mRNA 和 sgRNA 更容易成功^[51]。但在另一项研究中,作者成功通过原核注射的方式将含有 Cas9 和 sgRNA 的质粒递送到受精卵中并产生基因修饰小鼠^[31]。这种方式虽然免除了由 Cas9 和 sgRNA 的 DNA 转录到 mRNA 这一步,但其安全性和成功率是否优于前一种方式,有待进一步探索。在进行基因敲入操作时,需要将目的基因 HDR 模板递送至受精卵中,使目的基因整合到敲入位点。因此,使用原核注射成功率更高。有研究显示,在 S 期进行原核注射能够提高基因敲入的效率^[52]。另外,注射前受精卵的培养时间和温度对敲入效率也有影响^[53]。

显微注射法递送 CRISPR/Cas9 系统以及 HDR 模板的方法,操作复杂,对操作人员技术要求高。近年来新开发的电穿孔技术有望替代显微注射的方法^[54]。但是,目前电穿孔技术只能递送小片段,无法将大片段递送进入受精卵。因此,电穿孔技术有待进一步发展和优化。

4.2 个体水平的递送技术优化

当不需要建立稳定繁殖体系,并且需要构建条件敲入/敲除小鼠时,研究人员通常会以腺相关病毒载体(AAV)包裹 Cre、sgRNA 以及启动子载体感染小鼠^[48]。近年来,科学家也在尝试以各种方式优化这种递送方式。例如,在一项研究中报道了一种能够特异性靶向感染神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的 AAV9 变体^[49]。在另一项研究中,作者发现短期给予核糖核苷酸还原酶(RNR)抑制剂氟达拉滨可将小鼠肝中 CRISPR/Cas9 和 AAV-HR 介导的同源重组效率提高 2~7 倍,而不会引起明显的毒性^[55]。

5 总结与展望

随着科学技术的不断进步,科学家从不同角度进行完善和优化,以期用 CRISPR/Cas9 技术构建更加符合基础研究和临床试验需求的基因修饰小鼠模型,以解决人类疾病研究和药物研发过程中的模型缺乏瓶颈问题。尽管 CRISPR/Cas 基因编辑系统在小鼠中的基因编辑日趋完善,但是在未来,仍然有两大方向需要人们的持续努力:一是结合分子生物学、结构化学、蛋白质工程等学科,对 CRISPR/

Cas9 系统的元件进行改造和修饰甚至替换,进一步提高基因编辑效率,降低脱靶效应,通过对 Cas9 蛋白的加工改造衍生出更多修饰方法。二是解决长片段插入效率和递送问题,寻找一种便捷简单的递送方式,并且提高长片段的插入效率,是构建基因敲入小鼠亟待解决的问题之一。

参考文献:

- [1] WATERSTON R, LINDBLAD-TOH K, BIRNEY E, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome [J]. *Nature*, 2002, 420: 520-562.
- [2] BRESCHI A, GINGERAS T R, GUIGÓ R. Comparative transcriptomics in human and mouse [J]. *Nat Rev Genet*, 2017, 18(7): 425-440.
- [3] MESTAS J, HUGHES C C W. Of mice and not men; differences between mouse and human immunology [J]. *J Immunol*, 2004, 172(5): 2731-2738.
- [4] RANGARAJAN A, WEINBERG R A. Opinion: comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(12): 952-959.
- [5] DEPINHO R A. The age of cancer [J]. *Nature*, 2000, 408(6809): 248-254.
- [6] SUN S H, CHEN Q, GU H J, et al. A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis [J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 28(1): 124-133, e4.
- [7] JIANG Y, LI J, TENG Y, et al. Complement receptor C5aR1 inhibition reduces pyroptosis in hDPP4-transgenic mice infected with MERS-CoV [J]. *Viruses*, 2019, 11(1): 39.
- [8] XIAO C, OGLE S A, SCHUMACHER M A, et al. Loss of parietal cell expression of Sonic hedgehog induces hypergastrinemia and hyperproliferation of surface mucous cells [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(2): 550-561, e1-e8.
- [9] 赵勇, 师长宏, 赵亚, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 miRNA-29b1 基因敲除小鼠 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 2(12): 1-4.
ZHAO Y, SHI C H, ZHAO Y, et al. Construction of miRNA-29b1 knockout mice based on CRISPR/Cas9 technology [J]. *Chin J Comp Med*, 2016, 2(12): 1-4.
- [10] 张雨, 郭中坤, 付彬, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 Bpi 基因敲除小鼠 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(6): 39-46.
ZHANG Y, GUO Z K, FU B, et al. Construction of Bpi gene-knockout mice using CRISPR/Cas9 [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(6): 39-46.
- [11] 吴曦, 霍桂桃, 刘甦苏, 等. 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立 FcγR 基因大片敲除小鼠模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(5): 583-591.
WU X, HUO G T, LIU S S, et al. Establishment of a large fragment FcγR gene knockout mouse model using CRISPR/Cas9 genome editing technique [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019,

- 27(5): 583–591.
- [12] 陈丽香, 彭秀华, 谭丹, 等. 基于 CRISPR/Cas9 系统定点编辑小鼠 *MAD2L1* 基因及其脱靶效应分析 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(6): 587–593.
CHEN L X, PENG X H, TAN D, et al. Mouse *MAD2L1* gene editing by CRISPR/Cas9 and analysis of its off-target effect [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(6): 587–593.
- [13] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. Science, 2007, 315(5819): 1709–1712.
- [14] WIEDENHEFT B, VAN DUIN E, BULTEMA J B, et al. RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(25): 10092–10097.
- [15] SAPRANAUSKAS R, GASIUNAS G, FREMAUX C, et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli* [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(21): 9275–9282.
- [16] WIEDENHEFT B, LANDER GC, ZHOU K, et al. Structures of the RNA-guided surveillance complex from a bacterial immune system [J]. Nature, 2011, 477(7365): 486–489.
- [17] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [J]. Nature, 2011, 471(7340): 602–607.
- [18] SASHITAL D G, WIEDENHEFT B, DOUDNA J A. Mechanism of foreign DNA selection in a bacterial adaptive immune system [J]. Mol Cell, 2012, 46(5): 606–615.
- [19] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. Science, 2012, 337(6096): 816–821.
- [20] SHEN B, ZHANG J, WU H, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting [J]. Cell Res, 2013, 23(5): 720–723.
- [21] CARROLL D. Genome engineering with zinc-finger nucleases [J]. Genetics, 2011, 188(4): 773–782.
- [22] JOUNG J K, SANDER J D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(1): 49–55.
- [23] HUANG S, YAN Y, SU F, et al. Research progress in gene editing technology [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2021, 26(10): 916–927.
- [24] NISHIMASU H, RAN F A, HSU P D, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA [J]. Cell, 2014, 156(5): 935–949.
- [25] MA Y, ZHANG L, HUANG X. Genome modification by CRISPR/Cas9 [J]. FEBS J, 2014, 281(23): 5186–5193.
- [26] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. Science, 2013, 339(6121): 819–823.
- [27] RAN F A, HSU P D, LIN C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity [J]. Cell, 2013, 154(6): 1380–1389.
- [28] TSAI S Q, WYVEKENS N, KHAYTER C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing [J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(6): 569–576.
- [29] BITINAITE J, WAH D A, AGGARWAL A K, et al. FokI dimerization is required for DNA cleavage [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(18): 10570–10575.
- [30] HARA S, TAMANO M, YAMASHITA S, et al. Generation of mutant mice via the CRISPR/Cas9 system using FokI-dCas9 [J]. Sci Rep, 2015, 5: 11221.
- [31] NAKAGAWA Y, SAKUMA T, SAKAMOTO T, et al. Production of knockout mice by DNA microinjection of various CRISPR/Cas9 vectors into freeze-thawed fertilized oocytes [J]. BMC Biotechnol, 2015, 15: 33.
- [32] ANNUNZIATO S, LUTZ C, HENNEMAN L, et al. *In situ* CRISPR-Cas9 base editing for the development of genetically engineered mouse models of breast cancer [J]. EMBO J, 2020, 39(5): e102169.
- [33] LI C, GEORGAKOPOULOU A, NEWBY G A, et al. *In vivo* HSC prime editing rescues sickle cell disease in a mouse model [J]. Blood, 2023, 141(17): 2085–2099.
- [34] ZETSCHKE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system [J]. Cell, 2015, 163(3): 759–771.
- [35] PAUL B, MONTOYA G. CRISPR-Cas12a: functional overview and applications [J]. Biomed J, 2020, 43(1): 8–17.
- [36] STROHKENDL I, SAIFUDDIN F A, RYBARSKI J R, et al. Kinetic basis for DNA target specificity of CRISPR-Cas12a [J]. Mol Cell, 2018, 71(5): 816–824.
- [37] WANG Z, WANG Y, WANG S, et al. Efficient genome editing by CRISPR-Mb3Cas12a in mice [J]. J Cell Sci, 2020, 133(9): jcs240705.
- [38] LIU Z, SCHIEL JA, MAKSIMOVA E, et al. ErCas12a CRISPR-MAD7 for model generation in human cells, mice, and rats [J]. CRISPR J, 2020, 3(2): 97–108.
- [39] HENDEL A, BAK R O, CLARK J T, et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells [J]. Nat Biotechnol, 2015, 33(9): 985–989.
- [40] YIN H, SONG C Q, SURESH S, et al. Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral *in vivo* genome editing [J]. Nat Biotechnol, 2017, 35(12): 1179–1187.
- [41] KOS C H. Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models [J]. Nutr Rev, 2004, 62(6 Pt 1): 243–246.
- [42] XU M, XU H, CHEN J, et al. Generation of conditional Acvr1l knockout mice by CRISPR/Cas9-mediated gene targeting [J]. Mol Cell Probes, 2018, 37: 32–38.
- [43] NISHIZONO H, HAYANO Y, NAKAHATA Y, et al. Rapid generation of conditional knockout mice using the CRISPR-Cas9 system and electroporation for neuroscience research [J]. Mol Brain, 2021, 14(1): 148.
- [44] HORII T, MORITA S, KIMURA M, et al. Efficient generation

of conditional knockout mice via sequential introduction of lox sites [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7891.

[45] MIURA H, QUADROS R M, GURUMURTHY C B, et al. Easi-CRISPR for creating knock-in and conditional knockout mouse models using long ssDNA donors [J]. *Nat Protoc*, 2018, 13(1): 195–215.

[46] QUADROS R M, MIURA H, HARMS D W, et al. Easi-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins [J]. *Genome Biol*, 2017, 18(1): 92.

[47] CHEN S, SUN S, MOONEN D, et al. CRISPR-READI: efficient generation of knockin mice by CRISPR RNP electroporation and AAV donor infection [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(13): 3780–3789.

[48] KONERMANN S, BRIGHAM M D, TREVINO A, et al. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states [J]. *Nature*, 2013, 500(7463): 472–476.

[49] XIAO D, ZHANG W, WANG Q, et al. CRISPR-mediated rapid generation of neural cell-specific knockout mice facilitates research in neurophysiology and pathology [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, 20: 755–764.

[50] PLATT R J, CHEN S, ZHOU Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling [J]. *Cell*, 2014, 159(2): 440–455.

[51] HAN Y, SLIVANO O J, CHRISTIE C K, et al. CRISPR-Cas9 genome editing of a single regulatory element nearly abolishes target gene expression in mice—brief report [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(2): 312–315.

[52] ABE T, INOUE K I, FURUTA Y, et al. Pronuclear microinjection during S-phase increases the efficiency of CRISPR-Cas9-assisted knockin of large DNA donors in mouse zygotes [J]. *Cell Rep*, 2020, 31(7): 107653.

[53] NAKAGAWA Y, SAKUMA T, NISHIMICHI N, et al. Culture time of vitrified/warmed zygotes before microinjection affects the production efficiency of CRISPR-Cas9-mediated knock-in mice [J]. *Biol Open*, 2017, 6(5): 706–713.

[54] TAKEMOTO T. Zygote electroporation for CRISPR/Cas9 delivery to generate genetically modified mice [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2050: 121–126.

[55] TSUJI S, STEPHENS C J, BORTOLUSSI G, et al. Fludarabine increases nuclease-free AAV- and CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination in mice [J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(8): 1285–1294.

[收稿日期]2023-07-10

王鹏,樊建春,贾举名,等. SHP2在消化系统肿瘤中的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 159-168.

Wang P, Fan JC, Jia JM, et al. Research progress of SHP2 in digestive system tumors [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 159-168.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.018

SHP2在消化系统肿瘤中的研究进展

王 鹏¹,樊建春¹,贾举名¹,刁庆飞¹,薛 军^{2,3},武雪亮^{2,3*}

(1.河北北方学院,河北 张家口 075000;2.河北北方学院附属第一医院普通外科,河北 张家口 075000;
3.河北北方学院附属第一医院肿瘤研究所,河北 张家口 075000)

【摘要】 目前恶性肿瘤已经成为威胁人类身体健康的主要疾病之一,致残率、致死率在逐年上升。Src 同源性 2 的蛋白酪氨酸磷酸酶 2(src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2, SHP2) 是蛋白酪氨酸磷酸酶(proteintyrosine phosphatase, PTP) 家族中重要的一员,是一种功能广泛的酪氨酸磷酸酶,其在多种实体肿瘤中的表达量升高,在侵袭、转移、增殖、凋亡、耐药性等方面发挥着重要调控作用。已有大量研究表明, SHP2 在许多实体瘤的发生和发展中起着非常重要的作用,但现在尚无系统的报道 SHP2 在消化系统肿瘤中的作用。基于此该文综述了 SHP2 在 7 种消化系统中不同肿瘤的生物學功能及临床意义,探讨其在不同癌症发展阶段的作用与机制,并总结与展望 SHP2 抑制剂的发展,进一步寻找有效的早期诊断和基因治疗的潜在靶点,这对癌症患者生存率的提高具有十分重要的意义。

【关键词】 SHP2; 消化道肿瘤; 作用机制; 临床研究

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0159-10

Research progress of SHP2 in digestive system tumors

WANG Peng¹, FAN Jianchun¹, JIA Juming¹, DIAO Qingfei¹, XUE Jun^{2,3}, WU Xueliang^{2,3*}

(1. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China. 2. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000. 3. Cancer Research Institute, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

【Abstract】 Malignant tumors are a major disease threatening human health with disability and mortality rates increasing yearly. Protein tyrosine phosphatase 2 (SHP2) of Src homology 2, an important member of the protein tyrosine phosphatase family, has a wide range of functions, and its expression is elevated in a wide range of solid tumors. SHP2 plays an important regulatory role in invasion, metastasis, proliferation, apoptosis, and drug resistance. A large number of studies have shown that SHP2 plays a very important role in the genesis and development of many solid tumors, but no systematic studies have reported on the role of SHP2 in digestive system tumors. Here, we reviewed the biological functions and clinical significance of SHP2 in seven tumor types of the digestive system, explored its roles and mechanisms in cancer development stages, and summarized the development of SHP2 inhibitors to further search for potential targets for effective early diagnosis and gene therapy, which is of great significance to improvement the cancer patient survival rate.

【Keywords】 SHP2; digestive tract tumor; mechanism of action; clinical study

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

【基金项目】 2022 年河北省省自然科学基金精准医学联合基金项目(H2022405033)。

【作者简介】 王鹏(1996—),男,硕士研究生,研究方向:消化道肿瘤基础与临床诊疗研究。E-mail:17806179359@163.com

【通信作者】 武雪亮(1984—),男,副主任医师,副教授,博士,研究方向:消化道肿瘤基础与临床诊疗研究。E-mail:wxlwk@163.com

据世界卫生组织预测,到 2030 年,恶性肿瘤将导致全球 80% 的死亡,在 2030 年之后,恶性肿瘤将成为世界各地的主要死亡原因^[1-3]。消化道恶性肿瘤主要包括口腔癌、食管癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌、小肠癌以及结直肠癌。2020 年癌症分析提示结直肠癌、胃癌、肝癌、食管癌的发病率分别为第三、五、六、八,结直肠癌、肝癌、胃癌、食管癌的死亡率分别为第二、三、四、六。消化道恶性肿瘤占中国恶性肿瘤相关死亡人数的 45%^[4],呈现高发病率、高死亡率的趋势,这使得我国医疗负担进一步加剧^[5-8]。

由 PTPN11 编码的 SHP2 是 PTP 家族中第一个被鉴定的原位癌蛋白^[9]。作为汇聚节点,SH2 参与鼠肉瘤 (rat sarcoma, RAS) - 快速加速纤维肉瘤 (rapidly accelerated fibrosarcoma, RAF) - 丝裂原活化细胞外信号调节激酶 (mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase, MEK) - 细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) - 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine kinase, AKT)、Janus 激酶 (janus kinase, JAK) - 信号转导和转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 和程序性死亡受体 1 (programmed death-1, PD-1)/程序性死亡受体-配体 1 (programmed cell death-ligand 1, PD-L1) 等多个级联信号通路^[10-11], SHP2 在生物体各组织中均有表达,其在调控细胞生长、增殖、分化、迁移、凋亡和存活等多种细胞过程的主要生化途径中发挥关键作用^[12]。SHP2 的突变和过表达与遗传性发育性疾病和癌症有关,它可以介导努南综合征、急性髓系白血病、前体 B 细胞急性淋巴细胞白血病等多种疾病的发生与发展^[13-14]。SHP2 在多种癌症中调节恶性表型,它能促进肿瘤的增殖、侵袭、转移和对化疗的耐药性^[15]。虽然 SHP2 通常被认为是促癌基因,但是一些研究表明 SHP2 是否促进肿瘤生长取决于细胞类型和组织微环境。例如,SH2 在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)、多发性骨髓瘤以及软骨瘤中却发挥着抑癌作用^[16]。近年来,大量的研究表明,SH2 与肿瘤的发生和进展密切相关。SH2 在不同疾病中既可以作为致癌因子,也可以作为肿瘤抑制因子,其保守的催化去磷酸化机制和独特的变构调控机制为 SH2 靶向药物开发提供了机会^[17]。因此,了解 SH2 在消化系统肿瘤中的表

达及作用机制,对于研究其早期诊断、转移机制及后期治疗都具有十分重要意义。本文将对 SH2 在 7 种消化系统肿瘤发生、发展中的作用及相关机制进行综述,为诊断和治疗消化系统肿瘤提供新的方向和思路。

1 SH2 的概述

1.1 SH2 的基因及蛋白的结构

SH2 是由 PTPN11 基因编码的非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶,SH2 全长含有 593 个氨基酸,分子量为 68 kDa,由两个串联的 Src 同源 2 (src homology 2, SH2) 结构域 (N-SH2 和 C-SH2)、一个保守的 PTP 催化结构域和含两个磷酸化位点 (Tyr542 和 Tyr580) 的富含脯氨酸的无序 C 末端尾部组成^[18] (图 1)。N 末端的两个 SH2 结构域对于 SH2 的结构和功能特异性至关重要。PTP 催化结构域在进化上高度保守,由 P 环、pTyr 识别环、WPD 环、E 环和 Q 环组成。基本环区 P 环、pTyr 环和 WPD 环在含磷酸酪氨酸 (pTyr) 底物的结合和构象转变中发挥着重要作用。辅助环区 E 环和 Q 环富含谷氨酸和谷氨酰胺残基,有助于增强底物结合的亲和力和稳定催化过程中 SH2 的过渡态^[19]。SH2 在各种脊椎动物中普遍表达^[20]。SH2 是一种分布在细胞内的非跨膜蛋白酶,且在细胞膜上没有其相应受体,可在胞内与蛋白质酪氨酸转换基序相连,参与胞内信号转导,在细胞信号转导的下游发挥重要作用。

1.2 SH2 蛋白的激活及两个构象的变构造调节机制

SH2 的“分子开关”变构调控机制在 PTP 家族中是独一无二的。SH2 的结构构象控制着它的活性分布,在休眠状态下,SH2 蛋白的 N-SH2 结构域与 PTP 结构域结合,SH2 蛋白被 PTP 结构域和 N-SH2 结构域催化表面的残基自动抑制,处于封闭的自抑制构象,不能发挥去磷酸化功能,从而抑制了 SH2 蛋白的活性,限制了底物进入催化位点,这是因为 N-SH2 结构域的背面形成一个环并嵌入 PTP 结构域,导致催化位点被阻断,从而降低了活性^[18]。在含磷酸酪氨酸的肽或 PTPN11 突变的调节下,SH2 可由闭合非活性构象切换到开放活性构象,SH2 通过其 SH2 结构域与磷酸酪氨酸位点结合而募集,导致磷酸酪氨酸残基与 SH2 结构域的结合,从而解除了这种自抑制作用,由此产生的构象变化

暴露了催化位点,从而触发并激活了 SHP2 的磷酸酶功能,从而实现了对 SHP2 的精确催化活化, SHP2 的 C 端主要由 Tyr542 和 Tyr580 组成,其与酪氨酸磷酸化与磷酸酶活性的调节有关,包括其底物特异性的改变。SHP2 的 N-SH2 结构域在催化活化和细胞信号传导中起着重要作用(图 2)。SHP2 构象的激活需要含有 pTyr 的蛋白质,含有 pTyr 的蛋白质主要包括 3 类:(1)免疫抑制受体;(2)支架蛋白(生长因子受体结合蛋白 2(growth factor receptor-bound protein 2, Grb2) 相关的结合蛋白(Grb2-associated binders, Gabs))、成纤维细胞生长因子受体底物(fibroblast growth factor receptor substrate, FRS)、胰岛素受体底物(insulin receptor substrate, IRS)和受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase,

RTKs); (3) 细胞因子受体(cytokine receptor, CKR)^[21]。

1.3 SHP2 保守的催化去磷酸化机制

PTP 家族成员具有高度保守的催化去磷酸化机制,可以通过两个化学步骤和两个过渡态来定义,包含结合(K1)和解离(K2)两个可逆步骤,以及磷酸半胱氨酸(K3)的形成和硫代磷酸盐(K4)的水解两个过渡态^[22-24]。首先,P 环中半胱氨酸的亲核攻击导致磷酸酯键的断裂。磷酸基团和精氨酸之间的双氢键以及 WPD 环中天冬氨酸的酸性基序提供的质子有助于磷酸半胱氨酸中间体的形成和去磷酸化底物的释放。然后,WPD 环中的天冬氨酸和 Q 环中的谷氨酰胺介导水分子的去质子化,生成羟基亲核产物用于磷酸硫酯键的断裂。最后,脱辅基

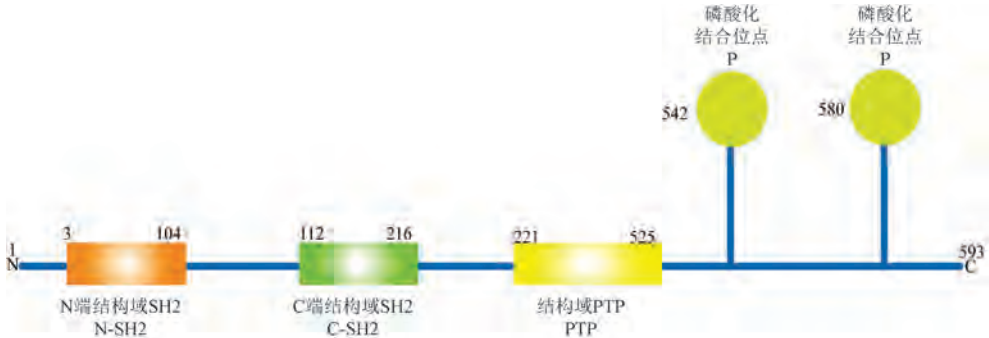


图 1 SHP2 的二级结构
Figure 1 Secondary structure of SHP2

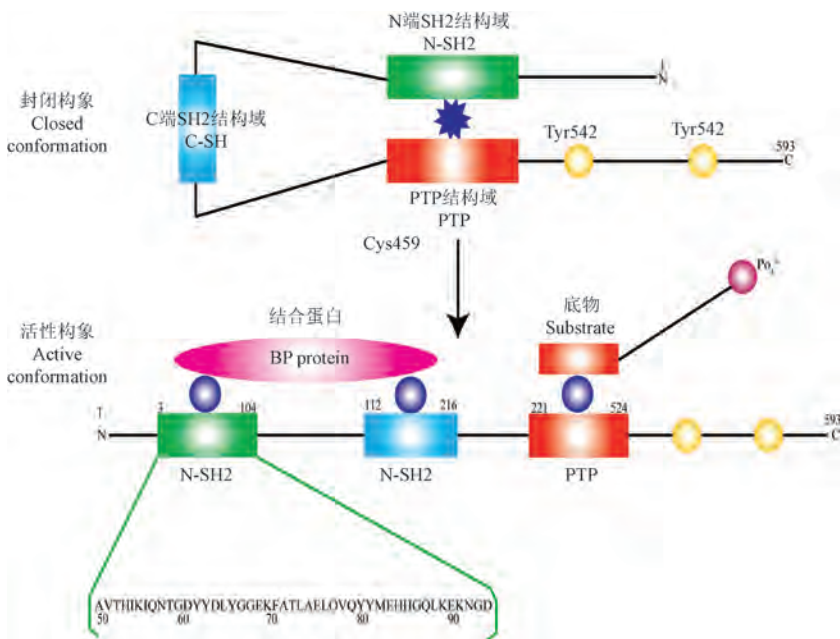


图 2 SHP2 的蛋白序列及其构象
Figure 2 Protein sequence and conformation of SHP2

酶随着无机磷酸的产生而再生^[25](图 3)。

1.4 SHP2 在消化道肿瘤中的功能及作用机制

近年来,SH P2 在多种消化道肿瘤的发生发展中作用逐步明确。SH P2 被认为是致癌信号通路中的关键蛋白酪氨酸磷酸酶,其调控信号通路的方式有以下几种。(1)在口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)中,微小 RNA-186(miR-186)通过负向调控 SH P2 的表达抑制 SH P2/ERK 和 SH P2/AKT 通路,在 OSCC 中发挥抑癌作用。(2)在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)中,SH P2 主要是通过 p-STAT3 的去磷酸化抑制 ESCC 的增殖。(3)在胃癌(gastric carcinoma, GC)中,细胞毒相关基因 A 抗原(cytotoxin-associated gene A, CAGA)通过激活 SH P2,引发 RAS 级联反应,促进 GC 增殖。(4)在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中,SH P2 促进 IL-6 对 ERK 的激活,同时促进 IL-6/STAT3 信号减弱,从而抑制 HCC 的进展;SH P2 通过协调激活 RAS/RAF/ERK、PI3K/AKT/mTOR 级联来促进 HCC 的生长和转移。(5)在胰腺癌(pancreatic cancer, PC)中,SH P2 的可以促进 PC 的 Kirsten 大鼠肉瘤病毒致癌基因同源基因(kirsten-RAS, KRAS)

KRAS 突变,从而促进 PC 的进展。(6)在胆管癌(cholangiocellular carcinoma, CCA)中,SH P2 可以直接调节 YES 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)活性,从而在 CCA 中发挥抑癌作用。(7)在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)中,SH P2 可以负向调节 STAT3 的激活,从而抑制肿瘤增长(图 4)。

2 SHP2 在不同消化道肿瘤细胞中的作用

2.1 SHP2 与 OSCC

SH P2 蛋白在 OSCC 中主要定位于细胞质中,在 OSCC 组织中的表达高于相邻的非肿瘤组且表达上调与肿瘤临床分期及淋巴结转移有关。研究发现,SH P2 的表达与 OSCC 进展有关,抑制 OSCC 细胞中 SH P2 的表达可显著降低肿瘤细胞的侵袭能力。在 OSCC 细胞中,敲低 SH P2 的表达也可以促进肿瘤蛋白(recombinant tumor protein p53, P53)、BCL2-Associated X 的蛋白质(bcl2-associated x, Bax)和 B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)蛋白的表达。SH P2 对 OSCC 细胞的作用可以归结为两个方面,一方面上调 SH P2 蛋白的表达可以抑制细胞凋亡,从而减少细胞死亡;另一方面 SH P2 可能下调某些细胞粘附分子的表达,从而诱导细胞迁移和

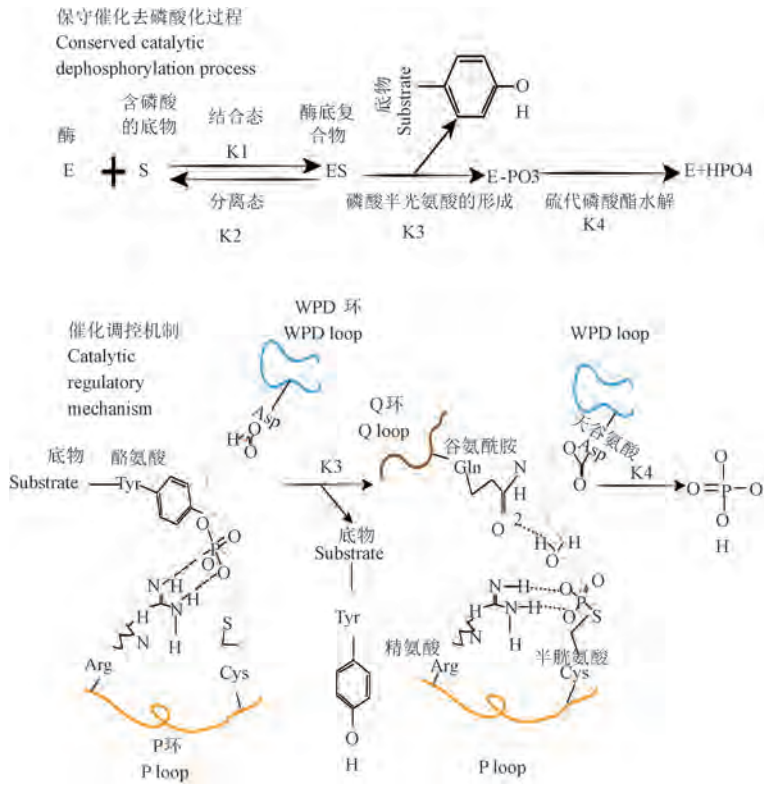


图 3 PTP 家族的保守催化去磷酸化过程和催化调控机制

Figure 3 Conserved catalytic dephosphorylation process and catalytic regulatory mechanism of the PTP family

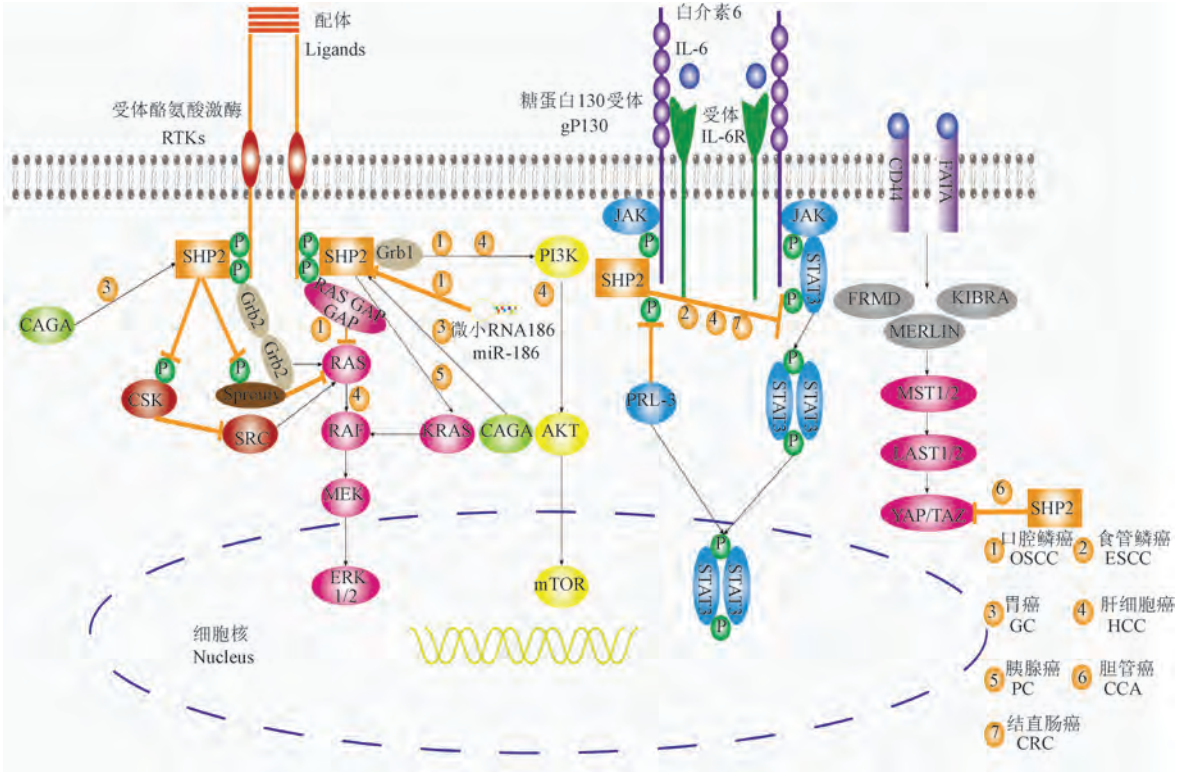


图 4 SHP2 在消化道肿瘤细胞中的作用机制

Figure 4 Mechanism of action of SHP2 in digestive tract tumor cells

侵袭^[26]。据报道,大量肿瘤抑制因子和促癌基因在 OSCC 中受微小 RNA-186(miR-186)调控,我们发现 miR-186 在 OSCC 组织和细胞系中表达显著下调,在 OSCC 组织中,miR-186 与 SHP2 呈负相关,miR-186 通过负向调控蛋白酪氨酸磷酸酶 SHP2 的表达,在 OSCC 中发挥抑癌作用,miR-186 抑制了促进生长的 SHP2/ERK 和 SHP2/AKT 通路,从而诱导细胞凋亡^[27-28]。总结来说,SHP2 在 OSCC 细胞中高表达,其促进肿瘤细胞的侵袭和迁移,但是可以诱导细胞的凋亡,其上调与临床分期和淋巴结转移有关,miR-186 通过负向调控 SHP2 的表达从而发挥抑癌作用。

2.2 SHP2 与 ESCC

我们通过数据库查询以及相关实验可知 SHP2 蛋白在 ESCC 中低表达,此外,对 ESCC 患者的癌症基因组图谱(TCGA)存活数据的 KAPLAN-MEIER 分析表明,与 SHP2 高表达患者相比,SHP2 低表达患者表现出更差的存活率,这提示 SHP2 的低表达与 ESCC 的发生发展密切相关。通过对 SHP2 的基因敲除可以观察到体外的肿瘤细胞显示出促进集落形成能力,产生更多和更大的集落^[29]。我们进一步评估了敲除 SHP2 基因的 ESCC 细胞在体内的作

用,与对照未敲除 ESCC 细胞相比,SHP2 敲除的皮下瘤模型中,肿瘤数量多、体积大。这表明 SHP2 对体内 ESCC 细胞增殖有抑制作用。SHP2 主要是通过 p-STAT3 的去磷酸化抑制 ESCC 的增殖。已经证明 SHP2 充当 STAT3 信号传导的负向调节剂。在 ESCC 组织中,p-STAT3 水平与 SHP2 表达呈现负相关。SHP2 还与肿瘤的耐药性有关,SHP2 缺失降低了 ESCC 对顺铂的敏感性,原因是 SHP2 缺失导致 ABCG2 和 NANOG 的过度表达^[29]。

2.3 SHP2 与 GC

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)是 GC 的高危因素,大量研究表明,HP 的感染可诱导胃萎缩和癌前病变^[30-31]。研究发现 SHP2 在 HP 感染的 GC 中表达升高^[32]。肿瘤发生的早期阶段,HP 通过 CAGA 蛋白注入胃上皮细胞,CAGA 分子粘附在胃上皮的细胞质膜内表面,在那被酪氨酸磷酸化,CAGA 蛋白经历酪氨酸磷酸化后,与胃上皮细胞的 SHP2 蛋白结合形成复合物。酪氨酸磷酸化的 CAGA 先获得与 SHP2 磷酸酶相互作用,且具有促进 SHP2 功能的能力。CAGA 与 SHP2 蛋白的 SH2 结构域的相互作用会诱导 SHP2 的构象变化,从而减弱 PTP 与 N-SH2 结构域之间的抑制相互作用,从

而激活 SHP2 的催化活性,从而引发 RAS 和细胞外信号调节的激酶依赖性信号级联反应,诱导胃上皮细胞异常增殖和迁移,导致胃萎缩和 GC^[33-34]。除此之外还发现 GC 中 SHP2 的表达与肿瘤分期、淋巴结转移及远处转移无关^[32]。

2.4 SHP2 与 HCC

SHP2 蛋白在 HCC 中的作用是双重的,既抑制又促进 HCC 的发展,这说明 SHP2 在恶性肿瘤中的作用是有组织特异性的^[35]。SHP2 抑制了 HCC 的进展,有研究表明 SHP2 在肿瘤组织中的表达较邻近非肿瘤组织明显降低,肝细胞特异性缺失 SHP2 抑制了 IL-6 对 ERK 的激活,导致炎症 IL-6/STAT3 信号强度显著增加,促进炎症信号传导和肝炎症和坏死,导致结节性增生和肿瘤的发展^[36]。此外,SH2 缺失显著增强二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN) 诱导的 HCC 的发展,同时也导致自发性肿瘤的增长,而肝细胞中 SHP2 和 STAT3 的同时缺失可以消除 HCC 的发展。除此之外,有研究表明 SHP2 消融在促进 IL-6 刺激的 STAT3 激活的同时,对 K 基因结合核因 (nuclear factor-k-gene binding, NF-KB) 没有影响,这表明 SHP2 在调节 STAT3 活性时是在 NF-KB 的下游或平行作用的。同时研究还发现 SHP2 表达降低是 HCC 的独立预后指标^[16,37]。SHP2 在 HCC 中还有另一作用,SH2 的过表达可以促进 HCC 的进展,干扰 SHP2 表达在体外抑制 HCC 的增殖,在体内抑制 HCC 异种移植物的生长,下调 SHP2 可减弱小鼠 HCC 的粘附和迁移,减少转移性 HCC 的形成。SHP2 通过协调激活 RAS/RAF/ERK 通路和 PI3K/AKT/mTOR 级联来促进 HCC 的生长和转移,同时 SHP2 的下调增强了 HCC 对索拉非尼治疗的敏感性,SH2 低表达的患者对索拉非尼的反应更佳。除此之外,研究还发现 SHP2 可能作为患者预后的生物标志物^[38]。原发性 HCC 或肿瘤周围正常组织相比,SH2 在转移灶中的表达显著升高,这表明 SHP2 在 HCC 转移中的潜在作用^[39]。

2.5 SHP2 与 PC

90% 以上的 PC 是由导管上皮形成的胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC),而且常伴有 KRAS 突变的表达^[40]。研究发现,编码 SHP2 蛋白的 PTPN11 基因的缺失将抑制由 KRASG12D 驱动的 PDAC 的发生。研究证实 SHP2 在 KRAS 驱动的 PDAC 中有不可或缺的核心作用,

突变 KRAS 在癌变过程中对 SHP2 具有关键的依赖性。此外,研究人员还发现 SHP2 的缺失会减缓肿瘤的进展,但不足以实现肿瘤消退,还会增强肿瘤细胞对 MEK 抑制剂的敏感性^[41]。关于 PDAC 的治疗,大多数 KRAS 突变亚型不能直接靶向调控,靶向单个 RAS 下游效应物可诱导自适应抗性机制,因此确定了一种靶向 KRAS 突变肿瘤的策略,该策略包括同时阻断 RAS 下游效应物 MEK 和上游激活物 SHP2,分别使用变张抑制剂 RMMC4550 和 LY3214996,可以观察到协同作用,这种策略被证实是有效的^[42]。一项研究发现,SH2 在 PC 组织中的表达比例 (55.7%) 明显高于非癌组织 (10.1%)。此外,研究发现 SHP2 高表达的患者比 SHP2 低表达的患者总体生存时间更短。因此,SH2 的高表达可能与 PC 的发生发展有关,这提示 SHP2 可能是一个潜在的胰腺癌预后标志物和治疗靶点。

2.6 SHP2 与 CCA

HIPPO 通路效应物 YAP 与 CCA 的发生和进展有关^[43-44]。HIPPO 通路效应物 YAP,定位于细胞核,在许多肿瘤类型中具有转录活性,包括大多数 CCA。SHP2 可以直接调节 YAP 活性,从而在 CCA 中发挥抑癌作用^[45-46]。SHP2 使 YAP 的 Y357 残基去磷酸化,甚至在 RAS/RAF 突变的情况下,直接调节 YAP 的活性,从而在 CCA 中发挥抑癌作用^[47]。CCA 细胞系的表征表明 SHP2 水平与 pYAP^{Y357} 呈反比关系。SHP2 和 YAP 相互作用不仅可调节 CCA 的转录协同活性还可以调节对化疗的敏感性。YAP 活性与化疗耐药有关,在 SHP2 水平较高的 CCA 细胞中,药理抑制或基因缺失的 SHP2 会增加 YAP^{Y357} 磷酸化和 YAP 靶基因 (包括抗凋亡调节因子 MCL1) 的表达,从而增加对吉西他滨和顺铂的耐药性,SH2 低表达和 pYAP^{Y357} 高表达的细胞系对吉西他滨和顺铂呈现出耐药性^[48]。

2.7 SHP2 与 CRC

研究表明 SHP2 在 CRC 中发挥抑癌作用,SH2 可以抑制 CRC 的增殖和迁移,其机制是在 CRC 中负向调控 STAT3 的磷酸化^[49]。SHP2 的表达与肿瘤分化、TNM 分期和淋巴结转移有显著相关性,研究表明 SHP2 的表达与肿瘤的分化和进展呈负相关^[50]。在 CRC 中,肿瘤中 SHP2 表达水平高的患者预后较好^[51]。SHP2 的表达与肿瘤的侵袭性密切相关,SH2 可以抑制 CRC 的侵袭性,同时负向调节 STAT3 的激活,并随着肿瘤的进展而降低。CRC 是

一种炎症相关肿瘤^[52],遗传学研究发现,PTPN11 编码的 SHP2 是一种炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBDs) 易感基因,而 SHP2 与溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 患者的内含子多态性相关,肠上皮细胞 (intestinal epithelial cells, IECs) 中 SHP2 的消融可导致 UC 的自发发展^[53-54]。在 CRC 中,肿瘤相关巨噬细胞 (tumor associated macrophage, TAM) 可以通过几种趋化因子如 CCL 2、CCL 5、VEGF 和 CSF-1 募集到肿瘤部位^[55]。TAM 需要 SHP2 才能发挥其抗肿瘤功能。TAM 上 SHP2 的缺失通过激活 p-STAT3 和抑制 p-NF- κ B p65 诱导其向 M2 表型极化, M2 巨噬细胞产生高水平的白介素 10 (interleukin-10, IL-10)、精氨酸酶 1 (arginase-1, ARG1)、几丁质酶 3 样蛋白 3 (chitinase-3-like protein, 3CHI 3L3)、和抵抗素样 A (resistin-like, ARETNLA),这有助于抗炎反应、伤口愈合和促癌活性^[56-57]。

3 SHP2 抑制剂的进展与展望

SHP2 抑制剂经历了从催化位点抑制剂到变构位点抑制剂,再到 SHP2 降解剂的研发历程。早期小分子 SHP2 抑制剂的尝试主要集中在活性位点抑制剂的开发,例如含磺胺基团、水杨酸的一类化合物和某些天然产物^[47,58]。尽管发现了几种催化 SHP2 抑制剂,但是由于 PTP 家族中磷酸酶活性域高度保守,使催化位点抑制剂在同源性高的 PTP1B、SHP1、SHP2 中缺乏选择性,且结构中大多含有模拟磷酸化底物与催化中心相互作用的极性和离子功能基团存在,导致催化位点抑制剂的细胞生物利用度和渗透性较差,由于他们明显缺乏所需的药代动力学特性,以及与其他 PTPs 的非特异性结合,使得靶向 SHP2 催化位点的抑制剂难以成药^[59-60]。后来研究表明, SHP2 的小分子抑制剂不仅与磷酸酪氨酸结合袋相互作用,还可以与特定 PTPs 特有的附近外周位点相互作用。2016 年,诺华团队在基于 SHP2 自抑制机制的磷酸酶测定研究中首次发现 SHP2 变构抑制剂 SHP099, SHP099 可以同时结合到 SHP2 的 N-SH2、C-SH2 和 PTP 结构域的界面上,并稳定 SHP2 的自抑制构象。变构抑制剂不仅具有良好的 SHP2 抑制活性,且选择性高、成药性好、可口服利用等优点弥补了催化位点抑制剂的不足,开启了新的研究方向。变构 SHP2 抑制剂也不是没有局限性,这些药物的一个关键局限性

是他们不能有效抑制 SHP2 突变体。因此,开发对 SHP2 突变体有效的抑制剂是后续研究的焦点。由于 SHP2 抑制剂不能有效作用 SHP2 突变体,因此通过蛋白降解靶向嵌合体 (proteolysis targeting chimera, PROTAC) 策略靶向降解 SHP2 成为 SHP2 介导的癌症治疗的替代策略,并为抑制 SHP2 活性提供了一种非常有效的方法。靶向蛋白水解嵌合体 PROTAC 是一种新型的、通过降解疾病相关蛋白而发挥治疗作用的策略^[61]。PROTAC 分子劫持 E3 连接酶与 POI 形成三元复合物,诱导蛋白酶体泛素化和随后的 POI 降解。其优势在于可以低剂量有效抑制 POI,并快速降解和清除,提供了一种高安全性、抗耐药性和广泛应用前景的有效策略。

4 总结与展望

我们总结归纳了 SHP2 在消化道肿瘤中的表达和预后。SHP2 在消化道肿瘤的表达量具有组织特异性, SHP2 在 OSCC、GC、PC 中高表达, SHP2 在 ESCC、HCC、CCA、CRC 中低表达。SHP2 在消化道肿瘤的作用同时也具有组织特异性, SHP2 在 OSCC、GC、PC 中发挥促癌作用, SHP2 在 ESCC、CCA、CRC 中发挥抑癌作用。

SHP2 既可作为致癌因子也可作为抑癌因子,在不同消化道肿瘤的作用机制是不同的。SHP2 作为抑癌因子,在 ESCC 中主要是通过 p-STAT3 的去磷酸化抑制 ESCC 的增殖和迁移从而发挥抑癌作用;在 CCA 中通过调节 HIPPO 通路效应物 YAP 从而发挥抑癌作用;在 CRC 中通过负向调节 STAT3 的激活从而发挥抑癌作用。SHP2 作为促癌因子,在 OSCC 中可能通过 SHP2 抑制某些细胞粘附分子的表达,诱导细胞迁移和侵袭,从而发挥促癌作用;在 HP 感染的 GC 中,通过 GAGA 蛋白与 SHP2 结合来激活 SHP2 的催化活性,从而引发 RAS 和细胞外信号调节的激酶依赖性信号级联反应,诱导胃上皮细胞异常增殖和迁移,从而发挥促癌作用;在 PDAC 中, SHP2 通过促进 KRAS 突变促进 PDAC 的发生,从而发生促癌作用。

SHP2 在 HCC 中作用是双重的,既是抑癌因子又是促癌因子。SHP2 作为促癌因子,通过激活 RAS/RAF/ERK 通路和 PI3K/AKT/mTOR 级联来促进 HCC 的生长和转移,从而发挥促癌作用。SHP2 作为抑癌因子,在肝细胞特异性缺失 SHP2 抑制了 IL-6 对 ERK 的激活,导致炎症 IL-6/STAT3 信号强

度显著增加,促进炎症信号传导和肝炎症和坏死,导致结节性增生和肿瘤的发展。

本文总结了 SHP2 在消化道肿瘤中的一致性作用规律。在消化道肿瘤中,SH2 作为抑瘤因子主要通过抑制或者拮抗 RAS-ERK、PI3K-AKT-mTOR、AK-STAT 通路介导细胞增殖、分化和迁移;除此之外 SHP2 还可以通过与肿瘤相关的其他物质发生作用参与细胞的增殖、分化、迁移,如 OSCC 中的 miR-186、CCA 中的 YAP。SHP2 作为促瘤因子主要是通过 RAS-ERK 通路中发挥促进细胞增殖、分化和迁移;除此之外 SHP2 与其相关通路上的 KRAS 突变发挥协同作用参与细胞的增殖、分化、迁移,如 PDAC 的 KRAS 突变。

SHP2 作为一种重要的磷酸化酶与多种消化道肿瘤的发生密切相关。根据作用底物的不同,SH2 在不同消化道肿瘤中发挥着不同的作用,既可以促进也可以抑制肿瘤的发生。PTPN11 作为 SHP2 的编码基因,为什么 PTPN11 的激活和失活突变会导致不同消化道肿瘤不同作用仍然令人费解,这仍然需要进一步去研究。

SHP2 药物的研发也在如火如荼的进行中,抑制或激活 SHP2 都为癌症治疗提供了希望,其保守的催化去磷酸化机制和独特的变构调控机制为 SHP2 靶向药物开发提供了机会。迄今为止,SH2 的靶向药物研发主要集中在小分子抑制剂领域,并且已进入临床试验阶段。SHP2 激活剂和基于蛋白水解靶向嵌合体(PROTAC) 的 SHP2 降解剂也显示出良好的治疗前景,但是相关研究仍处于起步阶段。此外,使用 SHP2 抑制剂与其他靶点抑制剂联合治疗耐药性癌症是一种很有前途的策略。总的来说近年来 SHP2 抑制剂的研究已取得了长足的进步,目前已经成功开发了多个靶向 SHP2 变构位点的抑制剂,并且已有多个 SHP2 抑制剂获批临床。但是已一些已进入临床试验阶段 SHP2 抑制剂仍具有改进的药代动力学和药效学特性,需要进一步开发研究。同时,由于 SHP2 在正常情况下参与调节各种生理过程,因此 SHP2 抑制所引起的潜在副作用值得广泛关注。我们有充足的理由相信,未来 SHP2 抑制剂将会成为下一个药物研发的宝藏之地,是有望产生重大突破的全新药物,也将会能造福更多的肿瘤患者。

参考文献:

[1] REIS E S, MASTELLOS D C, RICKLIN D, et al. Complement

in cancer: untangling an intricate relationship [J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18(1): 5-18.

[2] HOJMAN P, GEHL J, CHRISTENSEN J F, et al. Molecular mechanisms linking exercise to cancer prevention and treatment [J]. Cell Metab, 2018, 27(1): 10-21.

[3] MATTIUZZI C, LIPPI G. Current cancer epidemiology [J]. J Epidemiol Glob Health, 2019, 9(4): 217-222.

[4] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. Chin Med J, 2021, 134(7): 783-791.

[5] WU C, LI M, MENG H, et al. Analysis of status and countermeasures of cancer incidence and mortality in China [J]. Sci China Life Sci, 2019, 62(5): 640-647.

[6] 安庆玲, 谭邓旭, 师长宏. 结直肠癌基因工程小鼠模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 660-667.
AN Q L, TAN D X, SHI C H. Genetically engineered mouse models of colorectal cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 660-667.

[7] 毛玉宁, 柳森森, 巩森森, 等. MMP2 在胃癌侵袭和转移中的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 23-30.
MAO Y N, LIU S S, GONG M M, et al. Role of matrix metalloproteinase-2 in the invasion and metastasis of gastric cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 23-30.

[8] 罗宝花, 刘晓秋, 雷静玉, 等. 胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型的构建及评估 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 161-168.

LUO B H, LIU X Q, LEI J Y, et al. Construction and evaluation of humanized immune system mouse model with human pancreatic cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 161-168.

[9] CHAN R J, FENG G S. PTPN11 is the first identified proto-oncogene that encodes a tyrosine phosphatase [J]. Blood, 2007, 109(3): 862-867.

[10] MATOZAKI T, MURATA Y, SAITO Y, et al. Protein tyrosine phosphatase SHP-2: a proto-oncogene product that promotes Ras activation [J]. Cancer Sci, 2009, 100(10): 1786-1793.

[11] LIU Q, QU J, ZHAO M, et al. Targeting SHP2 as a promising strategy for cancer immunotherapy [J]. Pharmacol Res, 2020, 152: 104595.

[12] NIOGRET C, BIRCHMEIER W, GUARDA G. SHP-2 in lymphocytes' cytokine and inhibitory receptor signaling [J]. Front Immunol, 2019, 10: 2468.

[13] ROBERTS A E, ALLANSON J E, TARTAGLIA M, et al. Noonan syndrome [J]. Lancet, 2013, 381(9863): 333-342.

[14] BENTIREN-ALJ M, PAEZ J G, DAVID F S, et al. Activating mutations of the noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia [J]. Cancer Res, 2004, 64(24): 8816-8820.

[15] KERR D L, HADERK F, BIVONA T G. Allosteric SHP2 inhibitors in cancer: targeting the intersection of RAS, resistance, and the immune microenvironment [J]. Curr Opin Chem Biol, 2021, 62: 1-12.

- [16] BARD-CHAPEAU E A, LI S, DING J, et al. Ptpn11/Shp2 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinogenesis [J]. Cancer Cell, 2011, 19(5): 629–639.
- [17] SONG Z, WANG M, GE Y, et al. Tyrosine phosphatase SHP2 inhibitors in tumor-targeted therapies [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(1): 13–29.
- [18] HOF P, PLUSKEY S, DHE-PAGANON S, et al. Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2 [J]. Cell, 1998, 92(4): 441–450.
- [19] SONG Y, ZHAO M, ZHANG H, et al. Double-edged roles of protein tyrosine phosphatase SHP2 in cancer and its inhibitors in clinical trials [J]. Pharmacol Ther, 2022, 230: 107966.
- [20] ZHANG J, ZHANG F, NIU R. Functions of Shp2 in cancer [J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(9): 2075–2083.
- [21] TAJAN M, DE ROCCA SERRA A, VALET P, et al. SHP2 sails from physiology to pathology [J]. Eur J Med Genet, 2015, 58(10): 509–525.
- [22] ZHANG Z Y, WANG Y, DIXON J E. Dissecting the catalytic mechanism of protein-tyrosine phosphatases [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(5): 1624–1627.
- [23] ZHANG Z Y. Kinetic and mechanistic characterization of a mammalian protein-tyrosine phosphatase, PTP1 [J]. J Biol Chem, 1995, 270(19): 11199–11204.
- [24] DENU J M, LOHSE D L, VIJAYALAKSHMI J, et al. Visualization of intermediate and transition-state structures in protein-tyrosine phosphatase catalysis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(6): 2493–2498.
- [25] XIAO P, WANG X, WANG H M, et al. The second-sphere residue T263 is important for the function and catalytic activity of PTP1B via interaction with the WPD-loop [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 57: 84–95.
- [26] XIE H, HUANG S, LI W, et al. Upregulation of Src homology phosphotyrosyl phosphatase 2 (Shp2) expression in oral cancer and knockdown of Shp2 expression inhibit tumor cell viability and invasion *in vitro* [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2014, 117(2): 234–242.
- [27] WANG H C, CHIANG W F, HUANG H H, et al. Src-homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 promotes oral cancer invasion and metastasis [J]. BMC Cancer, 2014, 14: 442.
- [28] WANG J, OUYANG S, ZHANG X, et al. Deregulation of hsa_circ_0001971/miR-186 and hsa_circ_0001874/miR-296 signaling pathways promotes the proliferation of oral squamous carcinoma cells by synergistically activating SHP2/PLK1 signals [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 20561.
- [29] QI C, HAN T, TANG H, et al. Shp2 inhibits proliferation of esophageal squamous cell cancer via dephosphorylation of Stat3 [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(1): 134.
- [30] AMIEVA M, JR PEEK R M. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer [J]. Gastroenterology, 2016, 150(1): 64–78.
- [31] KABIR S. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on incidence of gastric cancer in human and animal models: underlying biochemical and molecular events [J]. Helicobacter, 2009, 14(3): 159–171.
- [32] JIANG J, JIN M S, KONG F, et al. Increased expression of tyrosine phosphatase SHP-2 in *Helicobacter pylori*-infected gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(4): 575–580.
- [33] YAMAZAKI S, YAMAKAWA A, ITO Y, et al. The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa [J]. J Infect Dis, 2003, 187(2): 334–337.
- [34] JIANG J, JIA Z F, KONG F, et al. Association of polymorphism of PTPN 11 encoding SHP-2 with gastric atrophy but not gastric cancer in *Helicobacter pylori* seropositive Chinese population [J]. BMC Gastroenterol, 2012, 12: 89.
- [35] CHAN G, KALAITZIDIS D, NEEL B G. The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) in cancer [J]. Cancer Metastasis Rev, 2008, 27(2): 179–192.
- [36] DRILON A, SHARMA M R, JOHNSON M L, et al. SHP2 inhibition sensitizes diverse oncogene-addicted solid tumors to re-treatment with targeted therapy [J]. Cancer Discov, 2023, 13(8): 1789–1801.
- [37] JIANG C, HU F, TAI Y, et al. The tumor suppressor role of Src homology phosphotyrosine phosphatase 2 in hepatocellular carcinoma [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(4): 637–646.
- [38] MULERO-SÁNCHEZ A, RAMIREZ C F A, DU CHATINIER A, et al. Rational combination of SHP2 and mTOR inhibition for the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. Mol Oncol, 2023, 17(6): 964–980.
- [39] HAN T, XIANG DM, SUN W, et al. PTPN11/Shp2 overexpression enhances liver cancer progression and predicts poor prognosis of patients [J]. J Hepatol, 2015, 63(3): 651–660.
- [40] QIN C, YANG G, YANG J, et al. Metabolism of pancreatic cancer: paving the way to better anticancer strategies [J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 50.
- [41] RUESS D A, HEYNEN G J, CIECIELSKI K J, et al. Mutant KRAS-driven cancers depend on PTPN11/SHP2 phosphatase [J]. Nat Med, 2018, 24(7): 954–960.
- [42] FRANK K J, MULERO-SÁNCHEZ A, BERNINGER A, et al. Extensive preclinical validation of combined RMC-4550 and LY3214996 supports clinical investigation for KRAS mutant pancreatic cancer [J]. Cell Rep Med, 2022, 3(11): 100815.
- [43] SMOOT R L, WERNEBURG N W, SUGIHARA T, et al. Platelet-derived growth factor regulates YAP transcriptional activity via Src family kinase dependent tyrosine phosphorylation [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1): 824–836.
- [44] SUGIHARA T, WERNEBURG N W, HERNANDEZ M C, et al. YAP tyrosine phosphorylation and nuclear localization in cholangiocarcinoma cells are regulated by LCK and independent of LATS activity [J]. Mol Cancer Res, 2018, 16(10): 1556–1567.
- [45] HILL K S, ROBERTS E R, WANG X, et al. PTPN11 plays

oncogenic roles and is a therapeutic target for *BRAF* wild-type melanomas [J]. *Mol Cancer Res*, 2019, 17(2): 583–593.

[46] ZHAO H, MARTIN E, MATAKHA F, et al. Conditional knockout of SHP2 in ErbB2 transgenic mice or inhibition in HER2-amplified breast cancer cell lines blocks oncogene expression and tumorigenesis [J]. *Oncogene*, 2019, 38(13): 2275–2290.

[47] XIE J, SI X, GU S, et al. Allosteric inhibitors of SHP2 with therapeutic potential for cancer treatment [J]. *J Med Chem*, 2017, 60(24): 10205–10219.

[48] BUCKARMA E H, WERNEBURG N W, CONBOY C B, et al. The YAP-interacting phosphatase SHP2 can regulate transcriptional coactivity and modulate sensitivity to chemotherapy in cholangiocarcinoma [J]. *Mol Cancer Res*, 2020, 18(10): 1574–1588.

[49] HUANG Y, WANG J, CAO F, et al. SHP2 associates with nuclear localization of STAT3: significance in progression and prognosis of colorectal cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17597.

[50] CAI P, GUO W, YUAN H, et al. Expression and clinical significance of tyrosine phosphatase SHP-2 in colon cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68(3): 285–290.

[51] YU S J, YU J K, GE W T, et al. SPARCL1, Shp2, MSH2, E-cadherin, p53, ADCY-2 and MAPK are prognosis-related in colorectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(15): 2028–2036.

[52] 樊建春, 荀敬, 朱梓嫣, 等. 蛋白质二硫键异构酶 A3 在消化系统肿瘤中的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(4): 141–146.

FAN J C, XUN J, ZHU Z Y, et al. Research progress into protein disulfide isomerase A3 in digestive system tumors [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(4): 141–146.

[53] GAGNÉ-SANSFACON J, LANGLOIS A, LANGLOIS M J, et al. The tyrosine phosphatase Shp-2 confers resistance to colonic inflammation by driving goblet cell function and crypt regeneration [J]. *J Pathol*, 2019, 247(1): 135–146.

[54] HEUBERGER J, KOSEL F, QI J, et al. Shp2/MAPK signaling controls goblet/paneth cell fate decisions in the intestine [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(9): 3472–3477.

[55] TARTAGLIA M, NIEMEYER C M, FRAGALE A, et al. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia [J]. *Nat Genet*, 2003, 34(2): 148–150.

[56] MÜLLER P J, RIGBOLT K T, PATEROK D, et al. Protein tyrosine phosphatase SHP2/PTPN11 mistargeting as a consequence of SH2-domain point mutations associated with Noonan Syndrome and leukemia [J]. *J Proteomics*, 2013, 84: 132–147.

[57] LEGIUS E, SCHRANDER-STUMPEL C, SCHOLLEN E, et al. PTPN11 mutations in LEOPARD syndrome [J]. *J Med Genet*, 2002, 39(8): 571–574.

[58] TANG K, JIA Y N, YU B, et al. Medicinal chemistry strategies for the development of protein tyrosine phosphatase SHP2 inhibitors and PROTAC degraders [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 204: 112657.

[59] FODOR M, PRICE E, WANG P, et al. Dual allosteric inhibition of SHP2 phosphatase [J]. *ACS Chem Biol*, 2018, 13(3): 647–656.

[60] QUINTANA E, SCHULZE C J, MYERS D R, et al. Allosteric inhibition of SHP2 stimulates antitumor immunity by transforming the immunosuppressive environment [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(13): 2889–2902.

[61] CHIRNOMAS D, HORNBERGER K R, CREWS C M. Protein degraders enter the clinic-a new approach to cancer therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20(4): 265–278.

[收稿日期]2023-09-06

孔冰慧,白龙洲,杨丽. 肠道菌群与微小 RNA 在炎症性肠病中相互作用关系研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 169–178.

Kong BH, Bai LZ, Yang L. Research progress on the interaction between gut microbiota and microRNA in inflammatory bowel disease [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 169–178.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.019

肠道菌群与微小 RNA 在炎症性肠病中相互作用关系研究进展

孔冰慧¹, 白龙洲¹, 杨 丽^{2*}

(1.河南中医药大学第五临床医学院(郑州人民医院),郑州 450046;2.郑州人民医院消化内科,郑州 450053)

【摘要】 炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种慢性肠道疾病,其特征是对肠道环境因素的免疫反应失调。肠道菌群(gut microflora, GM)的失调可能导致炎症过程的发展。已有大量研究表明粪菌移植、益生菌、益生元和膳食干预等可能发挥着重塑 GM 及治疗疾病的潜力。微小 RNA(microRNA, miRNA)参与细胞发育、增殖、凋亡等生理过程。此外,他们在炎症过程中发挥重要作用,参与促炎和抗炎途径的调节。miRNA 谱的差异可能是 IBD 诊断工具,并作为疾病的预后标志物。miRNA 与 GM 的关系尚未完全阐明,近期研究表明 miRNA 在 GM 的调节和诱导生态失调中的作用;反过来,菌群可以调节 miRNA 的表达,改善肠道稳态。因此,本综述旨在描述 GM 与 miRNA 在 IBD 中的相互作用,寻找潜在 IBD 精准靶向治疗方法。

【关键词】 肠道菌群;微小 RNA;炎症性肠病;克罗恩病;溃疡性结肠炎

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0169-10

Research progress on the interaction between gut microbiota and microRNA in inflammatory bowel disease

KONG Binghui¹, BAI Longzhou¹, YANG Li^{2*}

(1. the Fifth Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.

2. Department of Gastroenterology, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450053)

【Abstract】 Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic intestinal disorder characterized by an immune response to factors in the intestinal environment. Dysregulation of the gut microflora (GM) may lead to inflammation. Studies suggest that fecal microbiota transplantation, probiotics, prebiotics, and dietary treatments may reshape the GM and treat the disease. MicroRNAs (miRNAs) participate in physiological processes, including cell development, proliferation, and apoptosis. Additionally, miRNAs are important for inflammatory processes and play a role in regulating pro- and anti-inflammatory pathways. MiRNA profiles may serve as diagnostic and prognostic markers for IBD. The relationship between miRNAs and GM has not been fully elucidated, and recent studies have demonstrated their roles in regulating GM and inducing ecological dysbiosis. In turn, GM regulates miRNA expression and improves intestinal homeostasis. It is important to continue exploring this relationship. Therefore, the purpose of this review is to analyze the relationship between gut microbiota and miRNAs in IBD and identify possible precision-targeted therapies for IBD.

【基金项目】 河南省医学科技攻关计划项目(2018020818)。

【作者简介】 孔冰慧(1997—),女,硕士研究生,研究方向:炎症性肠病基础研究。E-mail:kongbh1227@163.com

【通信作者】 杨丽(1976—),女,博士,主任医师,硕士生导师,研究方向:炎症性肠病基础研究。E-mail:yangli7313@126.com

[Keywords] gut microbiota; microRNA; inflammatory bowel disease; Crohn's disease; ulcerative colitis

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

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一种非特异性慢性复发性的肠道炎症性疾病, 包括克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 和溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC)^[1]。最新数据显示, 欧洲估计有 130 万人患有 IBD, 相当于欧洲人口的 0.2%^[2]。目前, 对于 IBD 治疗目标已从单纯治疗症状和诱导临床缓解发展到更严格的结局, 包括维持无类固醇缓解、减少住院次数和达到粘膜和组织学愈合、改善患者生活质量, 以及控制与结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 发展相关的危险因素。CRC 发生风险与炎症活动的持续时间、范围、严重程度紧密相关^[3], 据估计 CRC 导致 IBD 患者死亡的比例高达 10%^[4]。

由于 IBD 的病因机制尚不完全清楚, 普遍认为与遗传、免疫和环境因素如肠道菌群 (gut microflora, GM) 失调等相关。研究发现, 在 IBD 炎症过程中, 氧化应激会促进病原菌丰度的增加而损害有益菌的数量, 导致 GM 失衡, GM 可能作为 IBD 检测的生物标志物^[5]。此外, 饮食干预、粪菌移植 (fecal microbiota transplantation, FMT)、益生菌、益生元等疗法已在研究中^[6]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是近年来研究的潜在疾病标志物。研究表明 miRNA 参与了 IBD 的发病机制, 已作为诊断生物标志物和治疗靶点。miRNA 可能是区分 UC 和 CD 的有用工具, 除了被用作疾病活动性、治疗反应的生物标志物之外, 还可能被用作疾病严重程度和并发症的预后标志物^[7]。GM 和 miRNA 均为近年来的研究热点, 了解他们在 IBD 中的作用与关系, 能够为 IBD 开发更有效、更准确的诊断工具和靶向治疗^[8]。因此, 本综述旨在阐明当前有关 GM 和 miRNA 在 IBD 相互作用的研究现状, 为该领域未来研究前景提供一些见解。

1 肠道菌群与炎症性肠病

1.1 肠道菌群概述

栖息于人类胃肠道中约 1000 多种细菌, 其中构成 GM 并定植于胃肠道的细菌有大约 90% 属于厚壁菌门和拟杆菌门。GM 组成的多样性与不同地区的文化习俗和饮食习惯有关, 宿主的遗传学也有助于塑造微生物群^[9-10]。宿主为 GM 提供营养环境, 而 GM 产生的一些物质则为人类提供了必要功能。

GM 参与多糖消化, 产生大量单糖和短链脂肪酸 (short chain fatty acids, SCFAs), 如丙酸、丁酸和乙酸, 供给人体能量。SCFAs 影响肠上皮细胞的增殖、分化和基因的表达调节, 诱导细胞内代谢变化, 影响肠道免疫及维护肠道稳态^[11-13]。

1.2 GM 失调可能诱发 IBD

肠道粘膜屏障将 GM 与黏膜淋巴组织分离, 防止炎症反应, 并整合来自饮食代谢产物、共生细菌和病原体的分子信号, 以调节免疫反应^[14]。肠上皮细胞 (intestinal epithelial cells, IEC) 是维持肠道稳态的关键成分之一, 紧密连接 (tight junctions, TJ) 是主要的联结成分。TJs 位于上皮细胞侧膜顶端附近, 连接相邻的 IEC, 并与细胞肌动蛋白和肌球蛋白网络相关联, 调节肠道的通透性。TJs 断裂会导致肠粘膜炎症反应、肠道通透性增加, 从而促进机会性感染的发生^[15-16]。

致病菌通过病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 与模式识别受体相互作用, 引发机体先天免疫反应, 从而损伤肠黏膜。致病菌过度生长导致粘膜持续炎症进而影响机体局部或全身形态和功能变化, 有利于 IBD 的发生^[17]。炎症反应的副产物促使宿主和 GM 氧化应激, 使得厚壁菌和拟杆菌减少, 并有利于肠杆菌和粘附/侵袭性大肠杆菌 (adherent-invasive *E. coli*, AIEC) 增殖, 激发 IBD 症状的恶化^[18-19]。AIEC 不仅通过抑制干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 介导的信号转导来逃避宿主免疫应答, 进而阻止抗菌效应^[20]; 还可以在巨噬细胞内复制, 诱导细胞死亡并加重肠道炎症^[21-22]。鞘脂是一类由宿主和特定细菌产生的特殊脂质, 由肠道细菌产生的鞘脂, 可以调节宿主免疫反应。例如, 拟杆菌产生的鞘脂抑制自然杀伤细胞 (nature killer, NK) 的增殖并防止化学诱导的结肠炎^[23]。代谢组学发现, IBD 患者体内的鞘脂含量较低, 当鞘脂丰度降低时, 炎症反应趋于升高^[24-25]。研究发现, 普拉梭菌与 IBD 的病因密切相关, 它产生的一种特殊蛋白质具有抗炎效应^[26]。Sokol 等^[27]通过体内外实验也证实, 该菌通过分泌特殊蛋白质能够阻断核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路激活和白介素-8 (interleukin-8, IL-8) 产生, 以及诱导抗炎因子 IL-10 分泌。因此, 普拉梭菌可能成为 IBD 治疗中具有潜力的益生菌候选物^[28]。

基因组测序数据分析证明 CD 和 UC 肠道菌群发生了重要变化,已有多项研究表明,这种变化体现在 IBD 患者体内保护性菌丰度较低(如双歧杆菌、拟杆菌、梭状芽胞杆菌、普拉梭菌等),而促炎性菌丰度较高(如韦荣菌科、巴氏杆菌、AIEC 和核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*,Fn)等)^[17,19]。此外,IBD 患者粪便中菌群代谢物的浓度也发生变化,如 SCFAs 减少、胆汁酸衍生物和色氨酸代谢物调节失调。然而这些物质是调节代谢紊乱、调控机体免疫、维持肠道黏膜屏障稳态的关键因素^[12,14,29]。

目前研究大多聚焦于肠道细菌与疾病的关系,对于肠道真菌的研究较少。真菌仅占 GM 总数的 0.1%,但是其在肠道免疫系统的发育和形成中同样起着重要作用^[30]。研究表明,IBD 患者肠内真菌生物群种类发生偏移,其中担子菌/子囊菌比值增加,酿酒酵母菌比例降低,白色念珠菌比例增加^[31]。酿酒酵母菌被证明为一种有益菌,研究表明,对复发性结肠炎和艰难梭菌感染性腹泻有显著效果^[32],可能通过调节 NF- κ B 和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)信号通路,抑制促炎因子 IL-1 β 的释放并上调抗炎因子转化生长因子- β (transforming growth factor β ,TGF- β) 表达,调节机体免疫环境稳态^[33]。然而,白色念珠菌作为一种致病菌,其胞壁组分(甘露聚糖、 β -葡聚糖)与 PAMPs 相互作用可促进 Th17 的分化,并增加促炎因子 IL-17、IL-22 分泌^[30]。Atarashi 等^[34] 证明用白色念珠菌单克隆的小鼠结肠固有层中 Th17 增加。研究证明,CARD9 和 Dectin-1 基因风险多态性与 IBD 有关,参与对真菌的先天免疫过程。马拉色菌在 CD 患者中大量存在,可能通过 CARD9 引发肠道炎症反应,促进疾病进展^[35]。因此,真菌 GM 失调也可能是诱发肠道炎症条件之一。

1.3 调节 GM 缓解 IBD

目前已有大量研究通过饮食干预或使用益生元、益生菌及 FMT 来调节肠道菌群稳态,对 IBD 的精准治疗有较大的研究潜力。

1.3.1 饮食干预

最近的研究发现,基于多糖的水凝胶具有调节 GM 的潜力。它经肠道微生物群发酵产生 SFCAs,促进有益菌的生长和活力,从而改善肠道健康状况^[36]。在膳食中补充 SCFAs 可以诱导病原体的抑制和有益菌的富集,同时提高先天免疫力,增强抗氧化能力,并增加宿主的抗病能力^[37]。然而,

Limketkai 等^[38] 分析评估了饮食干预,如高纤维、低精制碳水化合物饮食、限制性饮食以及低钙饮食等对疾病缓解或对 IBD 患者生活质量、手术需求或疾病进展的作用,并得出结论饮食干预对 CD 和 UC 的影响尚不确定,仍需要更多的研究。

1.3.2 益生菌

研究表明益生菌可诱导 UC 疾病缓解,接受 VSL#3(一种益生菌混合物)治疗的患者缓解率达 42.9%^[39]。Mar 等^[40] 证实 VSL#3 可减少与肠道组织损伤相关的菌群的多样性。此外,Wang 等^[41] 发现施加 VSL#3 显著降低 UC 相关肿瘤模型小鼠的肿瘤负荷,并降低结肠组织中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α) 和 IL-6 水平。联合 5-氨基水杨酸制剂,提高了肠粘膜乳酸杆菌和双歧杆菌丰度。

1.3.3 益生元

大量研究证明多种益生元可促进宿主肠道中双歧杆菌的增殖,其机制可能与双歧杆菌利用益生元的效率更高有关^[42]。低聚果糖广泛存在于洋葱、大葱、大蒜和芦笋等天然植物中^[43]。Liao 等^[44] 实验表明补充低聚果糖缓解了葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium,DSS)诱导小鼠的病理免疫应答,阻止 DSS 诱导的结肠粘膜粘蛋白和 TJ 蛋白丢失,防止肠道屏障受损,同时减少了粘螺菌丰度。此外,临床试验也证明了益生元的效用。Wilson 等^[45] 探讨了补充低聚半乳糖对 17 名活动性 UC 患者结肠炎症的影响,报告显示患者粪便稠度改善,稀便率和严重程度降低,排便紧迫性也降低。

1.3.4 FMT

FMT 是一种新兴疗法,在 IBD 治疗中显示出潜力价值。Caldeira 等^[46] 证明 FMT 在 UC 和 CD 的临床缓解和应答方面的益处,总体临床缓解率分别为 37% 和 53.8%。此外研究还发现 FMT 适用于抗生素耐药细菌定植于胃肠道的疾病治疗,尤其在治疗复发性艰难梭菌诱发的 UC 有较好的效果^[47]。

目前尚不清楚在 IBD 中炎症是否引起菌群失调或者生态失调是否先于疾病发生,仍需要进行大量研究才能更好地理解这种关系。

2 炎症性肠病中的 miRNA

miRNA 是一组小的单链非编码 RNA,靶向 mRNA 的 3'-非翻译区域调节基因表达,在信号转导及细胞分化、增殖、凋亡等方面发挥作用^[48]。每

个 miRNA 可以调节数百种 mRNA, 给定的 mRNA 序列可能被几种 miRNA 靶向。因此, miRNA 参与了超过 30% 的蛋白质编码基因的调控^[49]。自身免疫疾病特别是 IBD 中 miRNA 的关键功能是有助于在粘膜部位建立免疫稳态^[48]。在 IBD 的诊断与治疗中, miRNA 均发挥着不可替代的作用。

2.1 miRNA 反映 IBD 的疾病活动性

一项研究通过微阵列、定量逆转录聚合酶链反应和原位杂交分析揭示 UC 患者 miR-16、miR-21、miR-23a、miR-24、miR-29a、miR-126、miR-195 和 let-7f 显著增加, 而 miR-192、miR-375 和 miR-422b 减少^[50]。随着研究不断深入有更多的 miRNA 被发现, Wang 等^[51]发现 IBD 患者的血清 miR-223 水平显著升高, 且与疾病活动度呈正相关。此外, 与红细胞沉降率和 C 反应蛋白相比, miR-223 在 CD 患者显出更高的疾病活动度相关性。Cordes 等^[52]研究显示, IBD 患者 miR-320a 水平与内镜下疾病活动度密切相关, 凸显了其作为非侵入性生物标志物的潜力。但在将 miRNA 用作诊断工具之前, 需考虑 miRNA 对 IBD 的特异性, 因为已知一些 miRNA 与其他疾病相关, 例如 miR-21 不仅在 UC 患者中显著升高, 而且在 CRC 中也上调^[53-54]。

2.2 miRNA 对治疗反应预测

在严重 UC 患者中, Morilla 等^[55]在对初始类固醇治疗无反应的患者中发现了 15 种与类固醇反应相关的 miRNA, 6 种与英夫利昔单抗反应相关的 miRNA, 4 种与环孢素反应相关的 miRNA, 从而强调了 miRNA 作为 IBD 治疗反应预测因子的作用。此外, Heier 等^[56]研究表明在接受泼尼松或英夫利昔单抗治疗的 IBD 患儿中, miR-146a、miR-320a 和 miR-146b 均随两种药物使用而下降, 可能与炎症得到控制相关, miR-486 对泼尼松的反应有较显著的变化, 而对英夫利昔单抗则无。

2.3 miRNA 可能成为未来 IBD 的治疗靶点

研究发现一些 miRNA 与一些批准用于治疗 IBD 的药物作用于相同的炎症途径。据观察, miR-29 可降低 IL-23 水平, 而抗 IL12/23 抗体(乌司奴单抗)已用于治疗中度至重度 CD^[57-58]。miR-126 通过调节血管细胞黏附分子-1 抑制白细胞与内皮细胞的粘附, 从而减少白细胞募集, 这与维多珠单抗特异性结合辅助 T 淋巴细胞(helper T lymphocytes, Th)整合素 $\alpha 4 \beta 7$ 发挥抗炎作用机制相同, 后者已用于治疗中度至重度 IBD^[59-60]。miR-155 直接靶向细

胞因子信号抑制因子 1 调节 Janus 激酶(Janus kinase, JAK)信号通路, 效用同目前用于 UC 治疗的托伐菌素^[61-62]。另外, 已有二期临床试验证明口服信号转导分子 7(signal transduction molecule 7, Smad7)反义寡核苷酸可改善 CD 患者的临床症状^[63]。Tsujimura 等^[64]超级碳酸盐磷灰石-miR-497a-5p 复合物纳米投递系统通过增强 TGF- β /Smad 信号通路的活性恢复结肠粘膜的上皮结构并抑制肠道炎症。以上研究均证明 miRNA 具有治疗 IBD 的研究潜力(IBD 的主要 miRNA 及作用靶点见表 1)。此外, Moein 等^[65]还阐明了各种 miRNA 之间的关系以及 IBD 发病机制所涉及的机制, 即通过调节树突状细胞(dendritic cells, DC)、巨噬细胞、中性粒细胞、NK 细胞和 T 细胞的炎症反应, 改变 TJ 蛋白、形成粘液屏障以及调控凋亡过程等。研究发现, miRNA 在炎症级联反应中的作用为 IBD 的治疗带来了创新视角, 例如 miRNA 模拟物和 miRNA 拮抗剂。miRNA 拮抗剂优先抑制 miRNA 的“种子区”以阻断下游信号通路的激活^[66]。使用 miRNA 拮抗剂恢复因 miRNA 过表达而导致的 mRNA 靶标功能受损^[7]。miRNA 模拟物可以恢复导致靶功能增强的 miRNA 表达减少^[7], 然而, 使用 miRNA 拮抗剂和模拟物都存在着缺陷^[67]。因此, 未来的研究需要更加深入了解 IBD 的 miRNA 谱, 阐明其在 IBD 炎症触发和持续过程中的作用。

3 炎症性肠病中 miRNA 与 GM 的相互作用

近年来, miRNA 与宿主及 GM 的相互作用越来越受到重视, 并成为当前研究的目标, 这些研究表明 miRNA 参与 GM 的调节和诱导生态失调, 而菌群反过来可以调节 miRNA 的表达, 从而改变肠道内稳态^[8, 68-69]。(图 1)

3.1 miRNA 调节肠道菌群的作用

肠道 miRNA 与菌群在出生至成熟过程中共同进化, 细菌中存在的小 RNA 的功能与 miRNA 相似, 但具体作用机制尚不清楚。研究发现, 特异 miRNA 进入细菌与核酸共定位, 调节 GM 基因转录, 直接影响菌群生长。例如 miR-515-5p 和 miR-1226-5p 分别促进了 Fn 和大肠杆菌的生长^[70]。此外, miR-30 d-5p 调节嗜黏蛋白阿克曼菌中 β -半乳糖苷酶基因的表达, 从而促进这种细菌在肠道内丰度增加, 使其有望成为继乳酸菌、双歧杆菌的下一代益生菌^[71]。在 IBD 患者中发现 miRNA 的异常表达会影

表 1 IBD 中主要 miRNA 在中变化及作用靶点
Table 1 Main miRNA involved in inflammatory bowel disease patients

微小 RNA miRNA	炎症性肠病中变化 IBD	靶点 Target
miR-10a	↑	抑制 NOD2 Inhibit NOD2
miR-16	UC ↑	T 细胞亚群 T-cell sub-types
miR-21	UC ↑	T 细胞亚群 T-cell sub-types
miR-23a	UC ↑	/
miR-24	UC ↑	/
miR-29	在 CD 中降低 IL-12/IL-23 Decrease IL-12/IL-23 in CD	激活 NOD2 Through activation of NOD2
miR-29a	UC ↑	/
miR-30c	UC ↑	/
miR-124	CD ↑	AHR
miR-126	↑	VCAM-1
miR-130a	↑	/
miR-146a	↑	TNF-α
miR-146b	↑	TNF-α
miR-149-3p	↑	Th17
miR-155	UC ↑	SOCS1
miR-192	UC ↓	MIP-2α
miR-195	UC ↑	/
miR-223	↑	Claudin-8
miR-320a	↑	TNF-α
miR-375	UC ↓	抑制 KLF-5 Inhibit KLF5
miR-422b	UC ↓	/
miR-486	↑	/
Let-7f	↑	T 细胞亚群 T-cell sub-types
miR-497a	↓	TGF-β/Smad
miR-574a-5p	UC ↓	CARD3
miR-924	↑	Th17

注:KLF5:类克虏伯因子 5;MIP-2α:巨噬细胞抑制肽;NOD2:核苷酸结合寡聚结构域 2;SOCS1:细胞因子信号传导 1 抑制因子;AHR:芳香烃受体;VCAM-1:血管细胞粘附分子 1;CARD3:含半胱天冬酶募集结构域蛋白 3;↑:增加;↓:减少。
Note. KLF5, Krupp factor 5. MIP-2α, Macrophage inhibitory peptide. NOD2, Nucleotide-binding oligomeric domain 2. SOCS1, Cytokine signaling 1 inhibitor. AHR, Aryl-hydrocarbon receptor. VCAM-1, Vascular cell adhesion molecule 1. CARD3, Caspase recruitment domain-containing protein 3. ↑, Increased. ↓, Decreased.

响 Fn、大肠杆菌和节段丝状菌等菌群的增殖活性^[72]。Johnston 等^[69]证明 miR-21 的表达促使 GM 失调促进肠道炎症。敲除 miR-21 可以预防结肠炎,部分原因是拟杆菌的减少和保护性厚壁菌和梭状芽胞杆菌的增加。此外,Feng 等^[73]研究也通过 miR-149-3p 缺失的小鼠表现出 GM 失调,在施用 DSS 诱导出更强的肠道炎症。因此,可以通过调节 miRNA 影响 GM 分布,进而恢复肠道微生态环境。

肠道胞外 miRNA 主要来源于 IECs 和免疫细胞,但它是如何发挥作用的?细胞外囊泡(EV)是一种脂质膜泡,由原核细胞和真核细胞释放到细胞外环境。较小的 EV(<200 nm)外泌体是其一种亚型。EVs 的成分(蛋白质、脂质、DNA、miRNA 和其他 RNA)可通过内吞作用、脂筏或膜融合等途径被细胞吸收,进而参与调节靶细胞的功能^[74]。外泌体的生物学效应多归因于 miRNA,miRNA 通过与一些特定的结合基序被选择性地分选到 EV 中,进而发挥作用^[74-75]。在 IBD 中,外泌体 miRNA 在免疫细胞(如 DC、T 细胞和巨噬细胞)之间穿梭并调节其功能,从而协调 IBD 中的免疫系统。外泌体 miR-223 通过下调 TJ 蛋白损害肠上皮屏障而促进 IBD 进展^[76]。因此,推断 miRNA(如细胞外粪便 miRNA)也经由这种载体进入细菌,进行调控细菌基因的表达沉默,进而影响 GM 的丰度变化。然而,miRNA 对基因表达的调控如何影响细菌生长可能取决于 miRNA 靶向基因的功能^[70]。此外,外源性 miRNA 同样可以促进抗炎细胞因子的表达,激活调节抗微生物免疫和组织修复的下游分子通路,介导宿主免疫系统和 GM 之间的串扰^[77]。但目前的研究结果尚存在争议。

miRNA 参与基因调控过程不仅通过细菌摄取,还可能通过其他间接方式影响生态失调。例如通过修饰抗菌肽(antimicrobial peptide,AMP)表达来重塑 GM,其中 α-防御素 5(α-defensin5,HD-5)是肠粘膜中最丰富的 AMP。HD-5 主要来源于潘氏细胞,对人类肠道微生物群具有直接的杀菌活性,因此它可以改变体内的人类微生物组^[13]。研究发现 miR-124 和 miR-924 负调控 HD-5 表达^[78]。Salzman 等^[79]发现实验小鼠过表达 HD-5 后表现出丝状菌的减少而优势菌种类的变化。此外,miR-124 在活性 CD 的肠组织中上调,Zhao 等^[80]证实 miR-124 通过抑制芳香烃受体调节促炎细胞因子的产生从而诱导炎症,并在进一步实验表明下调 miR-124 可缓解化学诱导的结肠炎。上述作用可能通过影响肠道炎症稳态间接影响菌群的组成。至此,miRNA 对 GM 的直接或间接调节作用尚未明确,需要进一步研究它们之间的关联。

3.2 肠道菌群在 miRNA 表达中的作用

Dalmasso 等^[81]用健康小鼠 GM 定植无菌小鼠后显示肠道 miRNA 表达失调,由此证明宿主 miRNA 的表达因菌群定植而发生变化,同时也表明

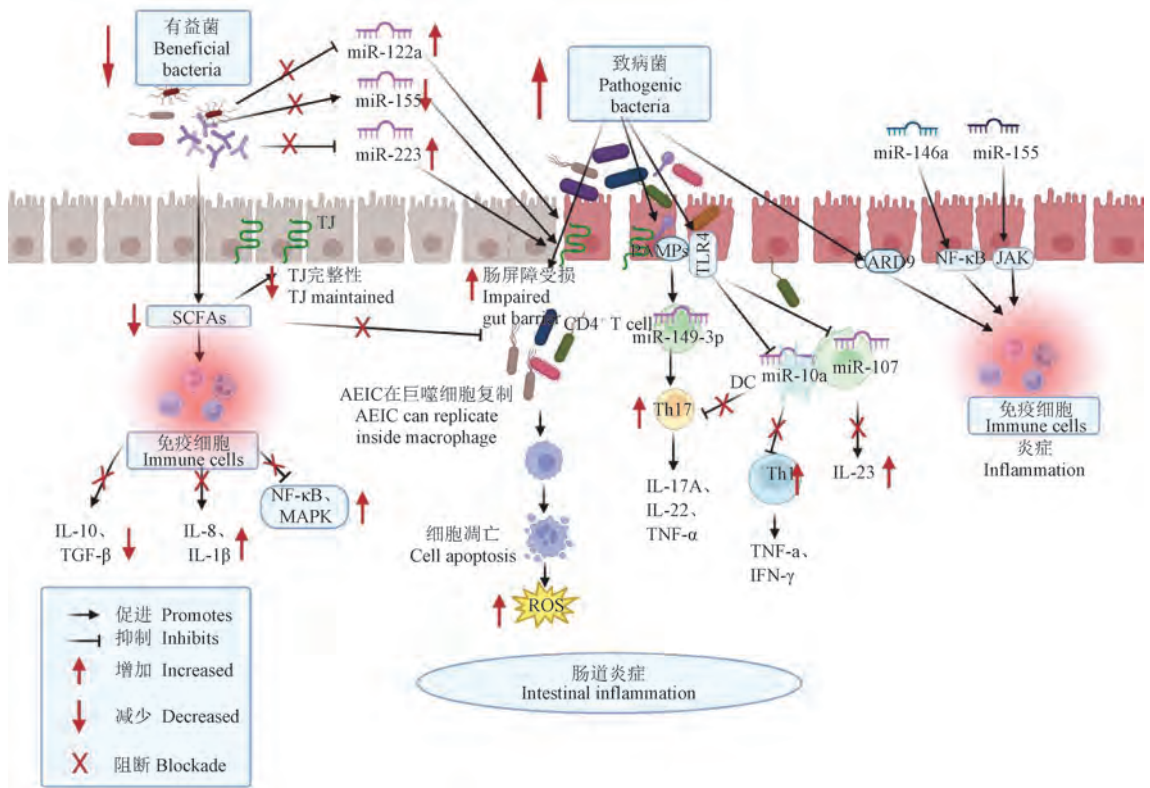


图 1 炎症性肠病中微小 RNA 与肠道菌群的相互作用机制图

Figure 1 Interaction mechanism between microRNAs and gut microbiota in inflammatory bowel disease

GM 可能通过调节宿主 miRNA 表达来调控基因表达。随着研究深入进展,发现 miRNA 可以重塑细菌感染后的机体免疫力和炎症反应。Zhou 等^[82]研究发现小鼠骨髓源巨噬细胞感染李斯特菌后,miRNA 表达谱鉴定出 miR-155、miR-146a、miR-125a-3p/5p 和 miR-149 在感染后显著上调。此外,Nguyen 等^[83]研究表明 AIEC 感染改变小鼠 miRNA 表达和免疫反应的机制是通过激活 NF- κ B 途径上调 T 细胞和 IEC 中 miR-30c 和 miR-130a 的水平。在临床试验中发现接受自体或异体 FMT 受试者移植前后粪便 miRNA 表达与 GM 组成存在显著相关性,表明 FMT 诱导的 GM 相对丰度变化改变了肠道 miRNA 谱^[8]。益生菌干预将参与炎症过程的部分 miRNA (miR-143、miR-150、miR-155、miR-223 和 miR-375) 恢复到正常水平,改善了炎症反应并恢复肠道稳态^[84]。由此说明,额外施加益生菌可以改善 miRNA 表达,调节 GM,进而缓解炎症。已有研究表明益生菌对免疫反应的调节机制。大肠杆菌 Nissle 1917 (*Escherichia coli* Nissle 1917, EcN) 用作益生菌时,对人体健康有益^[85]。体外实验表明 EcN 可诱导上皮细胞和免疫细胞中 miR-146a 的表达,增加人 T84 上皮细胞中内皮趋化因子配体 1 和 IL-8 的表达,增强

宿主的中性粒细胞浸润,促进抗原吞噬更有助于细菌清除^[86]。另有一项体外研究将益生菌鼠李糖乳杆菌 GG (*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG) 添加到人源 DC 中,研究益生菌对免疫反应的影响。结果表明,LGG 可以通过增加 miR-155 的水平以及降低靶向 NF- κ B 的 miR-146a 的表达来调节免疫系统反应^[87]。此外,LGG 可以通过抑制 miR122a 来影响肠道完整性,从而恢复长期摄入乙醇小鼠的 occludin 水平^[88]。

以上几项研究强调 GM 可以影响宿主的 miRNA 表达进而影响机体的免疫反应,可能是细菌代谢产物 SCFAs 发挥作用^[89]。最近的研究表明,细菌源囊泡 (BMV) 中 miRNA 的分泌是细菌和哺乳动物宿主细胞之间双向通讯的重要机制,微生物源胞外 miRNA 可以与宿主 RNA 诱导的沉默复合物结合,这意味着微生物源 miRNA 可作为宿主基因调节因子^[90]。Fn 源 BMV 可改变 IECs 的 miRNA 谱,尤其是增加 miR-574-5p 的水平。Fn 也可能通过激活 TLR4/MYD88/NF- κ B 信号上调 miR-21 转录水平,从而促进 CRC 的发展^[91]。此外,脆弱拟杆菌依赖于 METTL14 介导的 N6-甲基腺苷甲基化下调 miR-149-3p^[92]。此外,负向调控 miRNA 可能影响宿主

炎症反应相关 miRNA 表达^[93],如 miR-10a 通过核苷酸结合寡聚结构域 2 抑制 Th1 和 Th17 细胞反应。

3.3 miRNA 和肠道菌群在 IBD 中相互作用

在近年来,研究 miRNA 在宿主与 GM 中的作用越来越多,旨在探索治疗各种慢性炎症性疾病的新方法^[94]。目前的研究将 miRNA 视为信号级联组件而不是发病机制的主要驱动因素。miR-187 被认为依赖 IL-10 的 miRNA,由单核细胞在脂多糖刺激激活 toll 样受体-4 产生。miR-187 表达上调抑制促炎细胞因子 TNF、IL-6 的产生,这证明 miRNA 作为调节因子由 IL-10 驱动抗炎反应^[67]。一方面,致病菌通过调节机体 miRNA 表达,导致宿主功能失调、炎症反应扩大和 IBD 症状恶化。脆弱拟杆菌源 BMV-miR-149-3p 在 IECs 与 CD4⁺ T 细胞之间发生串扰,可促进 Th 17 细胞的分化,增加 IL17A、TNF- α 表达^[92]。Fn 通过调节 miR-574-5p/CARD3 轴增强自噬,从而促进结肠炎的发生发展^[91]。另一方面,miRNA 直接或间接参与调节 GM,影响 IBD 疾病进展。丁酸梭菌源 EVs 恢复 miR-199a-3p 表达,抑制促炎性 MAPK 和 NF- κ B 信号传导。宏基因组结果显示该 EV 也缓解 DSS 小鼠的 GM 失调,显著降低致病菌大肠杆菌和福氏志贺氏菌的丰度^[95]。双歧杆菌 MIMBb75 在 miRNA 转录上以时间依赖性的方式刺激宿主基因表达的变化,可能通过增加 miR-148a,抑制肠细胞中缺氧诱导因子-2 α 的功能,从而有助于预防或减轻结肠炎^[96]。至此,可推断出 miRNA 在 GM 与宿主之间的通信中扮演着重要角色,将 miRNA 可以作为治疗工具,作用于宿主或 GM,从而使 IBD 患者受益。同样研究证实使用添加益生元或益生菌等补充剂,可有助于调节 GM 和调控 miRNA 的表达,达到改善 IBD 肠道炎症进展的目的。然而,所有这些观点都需要进一步研究论证,以便更好地将他们应用于实际。

4 结论

多项研究强调了 GM 失调在 IBD 发展中的重要作用,维持 GM 平衡的策略对该疾病的治疗和预防也十分有用,另外 miRNA 也是研究的重点,进一步促进了对疾病的理解,并为 IBD 患者的诊断和治疗带来了新的视角,但未来还需要开展更多研究,以便更好地了解 GM 与 miRNA 在 IBD 发病机制中的复杂相互作用,阐明他们在诊断和治疗中的作用,并巩固在临床实践中的应用。

参考文献:

- [1] 陈晓芳,陈钰涵,马娟. 炎症性肠病新型治疗方法的研究进展 [J]. 中国全科医学, 2023, 26(27): 3349-3354.
CHEN X F, CHEN Y H, MA J. Recent strides in novel treatments for inflammatory bowel disease [J]. Chin Gen Pract, 2023, 26(27): 3349-3354.
- [2] ZHAO M, GÖNCZI L, LAKATOS P L, et al. The burden of inflammatory bowel disease in Europe in 2020 [J]. J Crohns Colitis, 2021, 15(9): 1573-1587.
- [3] QUAGLIO A E V, GRILLO T G, DE OLIVEIRA E C S, et al. Gut microbiota, inflammatory bowel disease and colorectal cancer [J]. World J Gastroenterol, 2022, 28(30): 4053-4060.
- [4] NADEEM M S, KUMAR V, AL-ABBASI F A, et al. Risk of colorectal cancer in inflammatory bowel diseases [J]. Semin Cancer Biol, 2020, 64: 51-60.
- [5] ČIPČIĆ PALJETAK H, BAREŠIĆ A, PANEK M, et al. Gut microbiota in mucosa and feces of newly diagnosed, treatment-naïve adult inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome patients [J]. Gut Microbes, 2022, 14(1): 2083419.
- [6] GUO X, HUANG C, XU J, et al. Gut microbiota is a potential biomarker in inflammatory bowel disease [J]. Front Nutr, 2021, 8: 818902.
- [7] JAMES JP, RIIS LB, MALHAM M, et al. MicroRNA biomarkers in IBD-differential diagnosis and prediction of colitis-associated cancer [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21): 7893.
- [8] WORTELBOER K, BAKKER G J, WINKELMEIJER M, et al. Fecal microbiota transplantation as tool to study the interrelation between microbiota composition and miRNA expression [J]. Microbiol Res, 2022, 257: 126972.
- [9] CLOONEY A G, ECKENBERGER J, LASERNA-MENDIETA E, et al. Ranking microbiome variance in inflammatory bowel disease: a large longitudinal intercontinental study [J]. Gut, 2021, 70(3): 499-510.
- [10] CAHANA I, IRAQI F A. Impact of host genetics on gut microbiome: take-home lessons from human and mouse studies [J]. Animal Model Exp Med, 2020, 3(3): 229-236.
- [11] TAN J K, MACIA L, MACKAY C R. Dietary fiber and SCFAs in the regulation of mucosal immunity [J]. J Allergy Clin Immunol, 2023, 151(2): 361-370.
- [12] 陈文轩,张哲,孙亚星,等. 短链脂肪酸在炎症性肠病中的作用研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(1): 185-188.
CHEN W X, ZHANG Z, SUN Y X, et al. Research progress of short chain fatty acids in inflammatory bowel disease [J]. Chin J Immunol, 2023, 39(1): 185-188.
- [13] GIERYNSKA M, SZULC-DABROWSKA L, STRUZIK J, et al. Integrity of the intestinal barrier: the involvement of epithelial cells and microbiota-a mutual relationship [J]. Animals, 2022, 12(2): 145.
- [14] FU Q, SONG T, MA X, et al. Research progress on the

- relationship between intestinal microecology and intestinal bowel disease [J]. *Animal Model Exp Med*, 2022, 5(4): 297–310.
- [15] SUZUKI T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients; the role of tight junctions [J]. *Nihon Chikusan Gakkaiho*, 2020, 91(1): e13357.
- [16] BARBARA G, BARBARO M R, FUSCHI D, et al. Inflammatory and microbiota-related regulation of the intestinal epithelial barrier [J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 718356.
- [17] ZHANG Y, SI X, YANG L, et al. Association between intestinal microbiota and inflammatory bowel disease [J]. *Animal Model Exp Med*, 2022, 5(4): 311–322.
- [18] PERNA A, HAY E, CONTIERI M, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC): cause or consequence of inflammation, dysbiosis, and rupture of cellular joints in patients with IBD? [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(6): 5041–5049.
- [19] CAENEPEEL C, SADAT SEYED TABIB N, VIEIRA-SILVA S, et al. Review article: how the intestinal microbiota may reflect disease activity and influence therapeutic outcome in inflammatory bowel disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2020, 52(9): 1453–1468.
- [20] OSSA J C, HO N K, WINE E, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* blocks interferon- γ -induced signal transducer and activator of transcription (STAT)-1 in human intestinal epithelial cells [J]. *Cell Microbiol*, 2013, 15(3): 446–457.
- [21] CHARGUI A, CESARO A, MIMOUNA S, et al. Subversion of autophagy in adherent invasive *Escherichia coli*-infected neutrophils induces inflammation and cell death [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51727.
- [22] XU Z, DONG X, YANG K, et al. Association of Adherent-invasive *Escherichia coli* with severe Gut Mucosal dysbiosis in Hong Kong Chinese population with Crohn's disease [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1994833.
- [23] AN D, OH SF, OLSZAK T, et al. Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells [J]. *Cell*, 2014, 156(1/2): 123–133.
- [24] DING N S, MCDONALD J A K, PERDONES-MONTERO A, et al. Metabonomics and the gut microbiome associated with primary response to anti-TNF therapy in Crohn's disease [J]. *J Crohns Colitis*, 2020, 14(8): 1090–1102.
- [25] FISCHBECK A, LEUCHT K, FREY-WAGNER I, et al. Sphingomyelin induces cathepsin D-mediated apoptosis in intestinal epithelial cells and increases inflammation in DSS colitis [J]. *Gut*, 2011, 60(1): 55–65.
- [26] QUÉVRAIN E, MAUBERT M A, MICHON C, et al. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease [J]. *Gut*, 2016, 65(3): 415–425.
- [27] SOKOL H, PIGNEUR B, WATTERLOT L, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(43): 16731–16736.
- [28] ANANTHAKRISHNAN A N. Microbiome-based biomarkers for IBD [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2020, 26(10): 1463–1469.
- [29] LAVELLE A, SOKOL H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(4): 223–237.
- [30] BEHESHTI-MAAL A, SHAHROKH S, ANSARI S, et al. Gut mycobiome: the probable determinative role of fungi in IBD patients [J]. *Mycoses*, 2021, 64(5): 468–476.
- [31] SOKOL H, LEDUCQ V, ASCHARD H, et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD [J]. *Gut*, 2017, 66(6): 1039–1048.
- [32] CZERUCKA D, RAMPAL P. Diversity of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 mechanisms of action against intestinal infections [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(18): 2188–2203.
- [33] RODRÍGUEZ-NOGALES A, ALGIERI F, GARRIDO-MESA J, et al. Intestinal anti-inflammatory effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* in DSS-induced colitis in mice: impact on microRNAs expression and gut microbiota composition [J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 61: 129–139.
- [34] ATARASHI K, TANOUE T, ANDO M, et al. Th17 cell induction by adhesion of microbes to intestinal epithelial cells [J]. *Cell*, 2015, 163(2): 367–380.
- [35] LIMON J J, TANG J, LI D, et al. *Malassezia* is associated with Crohn's disease and exacerbates colitis in mouse models [J]. *Cell Host Microbe*, 2019, 25(3): 377–388.
- [36] ZHANG Y, DONG L, LIU L, et al. Recent advances of stimuli-responsive polysaccharide hydrogels in delivery systems: a review [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(21): 6300–6316.
- [37] ZHONG X, LI J, LU F, et al. Application of zebrafish in the study of the gut microbiome [J]. *Animal Model Exp Med*, 2022, 5(4): 323–336.
- [38] LIMKETKAI B N, IHEOZOR-EJIOFOR Z, GJULADIN-HELLON T, et al. Dietary interventions for induction and maintenance of remission in inflammatory bowel disease [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2019, 2(2): CD012839.
- [39] KAUR L, GORDON M, BAINES P A, et al. Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2020, 3(3): CD005573.
- [40] MAR J S, NAGALINGAM N A, SONG Y, et al. Amelioration of DSS-induced murine colitis by VSL#3 supplementation is primarily associated with changes in ileal microbiota composition [J]. *Gut Microbes*, 2014, 5(4): 494–503.
- [41] WANG C S, LI W B, WANG H Y, et al. VSL#3 can prevent ulcerative colitis-associated carcinogenesis in mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(37): 4254–4262.
- [42] LIU F, LI P, CHEN M, et al. Fructooligosaccharide (FOS) and Galactooligosaccharide (GOS) Increase *Bifidobacterium* but reduce butyrate producing bacteria with adverse glycemic metabolism in healthy young population [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 11789.
- [43] DOU Y, YU X, LUO Y, et al. Effect of fructooligosaccharides supplementation on the gut microbiota in human: a systematic

- review and meta-analysis [J]. *Nutrients*, 2022, 14(16): 3298.
- [44] LIAO M, ZHANG Y, QIU Y, et al. Fructooligosaccharide supplementation alleviated the pathological immune response and prevented the impairment of intestinal barrier in DSS-induced acute colitis mice [J]. *Food Funct*, 2021, 12(20): 9844–9854.
- [45] WILSON B, EYICE Ö, KOUMOUTSOS I, et al. Prebiotic galactooligosaccharide supplementation in adults with ulcerative colitis: exploring the impact on peripheral blood gene expression, gut microbiota, and clinical symptoms [J]. *Nutrients*, 2021, 13(10): 3598.
- [46] CALDEIRA L F, BORBA H H, TONIN F S, et al. Fecal microbiota transplantation in inflammatory bowel disease patients: a systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2020, 15(9): e0238910.
- [47] REYGNER J, CHARRUEAU C, DELANNOY J, et al. Freeze-dried fecal samples are biologically active after long-lasting storage and suited to fecal microbiota transplantation in a preclinical murine model of *Clostridioides difficile* infection [J]. *Gut Microbes*, 2020, 11(5): 1405–1422.
- [48] MASI L, CAPOBIANCO I, MAGRÌ C, et al. MicroRNAs as innovative biomarkers for inflammatory bowel disease and prediction of colorectal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(14): 7991.
- [49] JUNG H, KIM J S, LEE K H, et al. Roles of microRNAs in inflammatory bowel disease [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(8): 2112–2123.
- [50] WU F, ZIKUSOKA M, TRINDADE A, et al. MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 α [J]. *Gastroenterology*, 2008, 135(5): 1624–1635, e24.
- [51] WANG H, ZHANG S, YU Q, et al. Circulating microRNA223 is a new biomarker for inflammatory bowel disease [J]. *Medicine*, 2016, 95(5): e2703.
- [52] CORDES F, DEMMIG C, BOKEMEYER A, et al. MicroRNA-320a monitors intestinal disease activity in patients with inflammatory bowel disease [J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2020, 11(3): e00134.
- [53] PARASKEVI A, THEODOROPOULOS G, PAPAConstantinou I, et al. Circulating microRNA in inflammatory bowel disease [J]. *J Crohns Colitis*, 2012, 6(9): 900–904.
- [54] KANAAN Z, RAI S N, EICHENBERGER M R, et al. Plasma miR-21: a potential diagnostic marker of colorectal cancer [J]. *Ann Surg*, 2012, 256(3): 544–551.
- [55] MORILLA I, UZZAN M, LAHARIE D, et al. Colonic microRNA profiles, identified by a deep learning algorithm, that predict responses to therapy of patients with acute severe ulcerative colitis [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2019, 17(5): 905–913.
- [56] HEIER C R, FIORILLO A A, CHAISSON E, et al. Identification of pathway-specific serum biomarkers of response to glucocorticoid and infliximab treatment in children with inflammatory bowel disease [J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2016, 7(9): e192.
- [57] CHAPMAN C G, PEKOW J. The emerging role of miRNAs in inflammatory bowel disease: a review [J]. *Therap Adv Gastroenterol*, 2015, 8(1): 4–22.
- [58] SANDBORN W J, GASINK C, GAO L L, et al. Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(16): 1519–1528.
- [59] OHTA M, KIHARA T, TORIUCHI K, et al. IL-6 promotes cell adhesion in human endothelial cells via microRNA-126-3p suppression [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 393(2): 112094.
- [60] SOUZA R F, CAETANO M A F, MAGALHÃES H I R, et al. Study of tumor necrosis factor receptor in the inflammatory bowel disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2023, 29(18): 2733–2746.
- [61] PATHAK S, GRILLO A R, SCARPA M, et al. MiR-155 modulates the inflammatory phenotype of intestinal myofibroblasts by targeting SOCS1 in ulcerative colitis [J]. *Exp Mol Med*, 2015, 47(5): e164.
- [62] SALAS A, HERNANDEZ-ROCHA C, DUIJVESTEN M, et al. JAK-STAT pathway targeting for the treatment of inflammatory bowel disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(6): 323–337.
- [63] MONTELEONE G, STOLFI C. Smad7 antisense oligonucleotide in Crohn's disease: a re-evaluation and explanation for the discordant results of clinical trials [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 15(1): 95.
- [64] TSUJIMURA N, OGINO T, HIRAKI M, et al. Super carbonate apatite-miR-497a-5p complex is a promising therapeutic option against inflammatory bowel disease [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 16(4): 618.
- [65] MOEIN S, VAGHARI-TABARI M, QUJEQ D, et al. MiRNAs and inflammatory bowel disease: an interesting new story [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 3277–3293.
- [66] SURI K, BUBIER J A, WILES M V, et al. Role of microRNA in inflammatory bowel disease: clinical evidence and the development of preclinical animal models [J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2204.
- [67] CASADO-BEDMAR M, VIENNOIS E. MicroRNA and gut microbiota: tiny but mighty—novel insights into their cross-talk in inflammatory bowel disease pathogenesis and therapeutics [J]. *J Crohns Colitis*, 2022, 16(6): 992–1005.
- [68] LIU S, WEINER H L. Control of the gut microbiome by fecal microRNA [J]. *Microb Cell*, 2016, 3(4): 176–177.
- [69] JOHNSTON D G W, WILLIAMS M A, THAISS C A, et al. Loss of microRNA-21 influences the gut microbiota, causing reduced susceptibility in a murine model of colitis [J]. *J Crohns Colitis*, 2018, 12(7): 835–848.
- [70] LIU S, DA CUNHA A P, REZENDE R M, et al. The host shapes the gut microbiota via fecal microRNA [J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 19(1): 32–43.

- [71] SONOYAMA K, OHSAKA F. Role of microRNAs in the crosstalk between the gut microbiota and intestinal immune system [J]. Biosci Microbiota Food Health, 2023, 42(4): 222–228.
- [72] JI Y, LI X, ZHU Y, et al. Faecal microRNA as a biomarker of the activity and prognosis of inflammatory bowel diseases [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(4): 2443–2450.
- [73] FENG Q, LI Y, ZHANG H, et al. Deficiency of miRNA-149-3p shaped gut microbiota and enhanced dextran sulfate sodium-induced colitis [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2022, 30: 208–225.
- [74] ISAAC R, REIS F C G, YING W, et al. Exosomes as mediators of intercellular crosstalk in metabolism [J]. Cell Metab, 2021, 33(9): 1744–1762.
- [75] LEE H J. Microbial extracellular RNAs and their roles in human diseases [J]. Exp Biol Med, 2020, 245(10): 845–850.
- [76] WANI S, MAN LAW I K, POTHOUKAKIS C. Role and mechanisms of exosomal miRNAs in IBD pathophysiology [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2020, 319(6): G646–G654.
- [77] MANZANEQUE-LÓPEZ M C, SÁNCHEZ-LÓPEZ C M, PÉREZ-BERMÚDEZ P, et al. Dietary-derived exosome-like nanoparticles as bacterial modulators; beyond microRNAs [J]. Nutrients, 2023, 15(5): 1265.
- [78] MILES D R, SHEN J, CHUANG A Y, et al. Alpha-defensin 5 expression is regulated by microRNAs in the caco-2 intestinal epithelial cell line [J]. J Inflamm Bowel Dis, 2016, 1(1): 105.
- [79] SALZMAN N H, HUNG K, HARIBHAI D, et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology [J]. Nat Immunol, 2010, 11(1): 76–83.
- [80] ZHAO Y, MA T, CHEN W, et al. MicroRNA-124 promotes intestinal inflammation by targeting aryl hydrocarbon receptor in Crohn's disease [J]. J Crohns Colitis, 2016, 10(6): 703–712.
- [81] DALMASSO G, NGUYEN H T, YAN Y, et al. Microbiota modulate host gene expression via microRNAs [J]. PLoS One, 2011, 6(4): e19293.
- [82] ZHOU X, LI X, WU M. miRNAs reshape immunity and inflammatory responses in bacterial infection [J]. Signal Transduct Target Ther, 2018, 3: 14.
- [83] NGUYEN H T, DALMASSO G, MÜLLER S, et al. Crohn's disease-associated adherent invasive *Escherichia coli* modulate levels of microRNAs in intestinal epithelial cells to reduce autophagy [J]. Gastroenterology, 2014, 146(2): 508–519.
- [84] RODRÍGUEZ-NOGALES A, ALGIERI F, GARRIDO-MESA J, et al. The administration of *Escherichia coli* nissle 1917 ameliorates development of DSS-induced colitis in mice [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 468.
- [85] ZHOU J, LI M, CHEN Q, et al. Programmable probiotics modulate inflammation and gut microbiota for inflammatory bowel disease treatment after effective oral delivery [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 3432.
- [86] SABHARWAL H, CICHON C, ÖLSCHLÄGER T A, et al. Interleukin-8, CXCL1, and microRNA miR-146a responses to probiotic *Escherichia coli* nissle 1917 and enteropathogenic *E. coli* in human intestinal epithelial T84 and monocytic THP-1 cells after apical or basolateral infection [J]. Infect Immun, 2016, 84(9): 2482–2492.
- [87] GIAHI L, AUMUELLER E, ELMADFA I, et al. Regulation of TLR4, p38 MAPkinase, IκB and miRNAs by inactivated strains of lactobacilli in human dendritic cells [J]. Benef Microbes, 2012, 3(2): 91–98.
- [88] ZHAO H, ZHAO C, DONG Y, et al. Inhibition of miR122a by *Lactobacillus rhamnosus* GG culture supernatant increases intestinal occludin expression and protects mice from alcoholic liver disease [J]. Toxicol Lett, 2015, 234(3): 194–200.
- [89] GASALY N, HERMOSO M A, GOTTELAND M. Butyrate and the fine-tuning of colonic homeostasis: implication for inflammatory bowel diseases [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(6): 3061.
- [90] STANTON B A. Extracellular vesicles and host-pathogen interactions: a review of inter-Kingdom signaling by small noncoding RNA [J]. Genes, 2021, 12(7): 1010.
- [91] WEI S, ZHANG J, WU X, et al. *Fusobacterium nucleatum* extracellular vesicles promote experimental colitis by modulating autophagy via the miR-574-5p/CARD3 axis [J]. Inflamm Bowel Dis, 2023, 29(1): 9–26.
- [92] CAO Y, WANG Z, YAN Y, et al. Enterotoxigenic *bacteroides fragilis* promotes intestinal inflammation and malignancy by inhibiting exosome-packaged miR-149-3p [J]. Gastroenterology, 2021, 161(5): 1552–1566.
- [93] DAS K, RAO L V M. The role of microRNAs in inflammation [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(24): 15479.
- [94] NIKOLAIEVA N, SEVCIKOVA A, OMEKKA R, et al. Gut microbiota-MicroRNA interactions in intestinal homeostasis and cancer development [J]. Microorganisms, 2022, 11(1): 107.
- [95] MA L, LYU W, SONG Y, et al. Anti-inflammatory effect of *Clostridium butyricum*-derived extracellular vesicles in ulcerative colitis: impact on host microRNAs expressions and gut microbiome profiles [J]. Mol Nutr Food Res, 2023, 67(13): e2200884.
- [96] WEN B, TAIBI A, VILLA C R, et al. Effects of *Bifidobacterium bifidum* in mice infected with *Citrobacter rodentium* [J]. Microorganisms, 2019, 7(2): 51.