

胡佳佳, 杨转芳, 孙喜喆, 等. 海马 ICAM5 对小鼠饮酒行为的影响及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(6): 1-10.
Hu JJ, Yang ZF, Sun XZ, et al. Effect and mechanism of ICAM5 on alcohol dependence behavior of mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 1-10.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.001

海马 ICAM5 对小鼠饮酒行为的影响及机制研究

胡佳佳, 杨转芳, 孙喜喆, 袁娟娟, 程 燕, 张 宇, 殷丽天*

(山西医科大学基础医学院生理学系, 细胞生理学教育部重点实验室, 太原 030001)

【摘要】 目的 分析小鼠海马组织中 ICAM5 对小鼠饮酒偏好、运动能力等行为的影响, 并分析其可能的作用机制。**方法** 选取 8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠, 随机将小鼠分为饮水组和饮酒组, 建立双瓶饮酒模型。检测 ICAM5 在小鼠内侧前额叶皮层、海马及杏仁核脑区的表达改变。构建 ICAM5 过表达腺相关病毒, 通过脑立体定位方法注射至海马脑区。通过免疫荧光技术和 Western blot 检测海马组织 ICAM5 的蛋白表达水平。通过旷场实验、条件位置偏爱实验和翻正反射实验, 观察小鼠对酒精的偏好性以及 ICAM5 对小鼠行为的影响。通过 Western blot 检测分析树突棘 F-actin/G-actin 比值, 高尔基染色方法检测树突棘形态。**结果** 在双瓶饮酒模型中, 与饮水组相比, 饮酒组小鼠海马脑区 ICAM5 的表达显著下降 ($P < 0.001$)。结果显示, 通过荧光显微镜观察到 ICAM5 在小鼠海马脑区特异性表达。在旷场实验中, AAV-ICAM5 组小鼠较对照组小鼠在旷场中心位置停留时间 ($P < 0.01$) 和运动距离明显增加 ($P < 0.001$)。在 CPP 实验中, 测试期 AAV-ICAM5 小鼠在伴药箱的停留时间较对照组小鼠明显降低 ($P < 0.001$)。在 LORR 实验中, 过表达 ICAM5 可以明显降低小鼠镇静潜伏期 ($P < 0.01$), 但同时显著缩短镇静作用的持续时间 ($P < 0.001$)。与 AAV-mCherry+Water 组相比, 饮酒后小鼠海马 F-actin/G-actin 比值显著升高 ($P < 0.01$), 而 ICAM5 过表达后这一比值显著降低 ($P < 0.001$)。与 AAV-mCherry+Water 组相比, 饮酒后小鼠海马 CA1 区树突棘密度增加 ($P < 0.001$), 但是 AAV-ICAM5+Alcohol 组树突棘密度显著降低 ($P < 0.01$)。**结论** 海马 ICAM5 可能通过调节细胞骨架蛋白的表达, 形成树突棘结构可塑性改变, 最终引起小鼠饮酒和运动行为的改变。

【关键词】 酒精依赖; ICAM5; 海马; 树突棘结构; CPP 模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0001-10

Effect and mechanism of ICAM5 on alcohol dependence behavior of mice

HU Jiajia, YANG Zhuanfang, SUN Xizhe, YUAN Juanjuan, CHENG Yan, ZHANG Yu, YIN Litian*

(Department of Physiology, School of Basic Medicine, Shanxi Medical University, Key Laboratory of Cell Physiology, Ministry of Education, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 Objective We investigated the effects of ICAM5 in the hippocampus on the alcohol drinking preference of mice, and the potential mechanisms. **Methods** An alcohol two-bottle choice model was developed in 8-week-old male C57BL/6J mice, which were randomly divided to two groups: water group and alcohol group. The protein expression of ICAM5 in the hippocampus, amygdala, and medial prefrontal cortex was detected. An ICAM5-overexpressing adeno-associated virus was constructed and injected into the hippocampus by stereotaxic method. The expression level of ICAM5 protein in the hippocampus was detected by immunofluorescence and Western blot. We then detected the alcohol preference and locomotor activity of mice with a conditioned place preference (CPP) experiment, open field test, and loss-of-righting reflex test. Western blot analysis was used to identify the neuron F-actin/G-actin ratio. Using Golgi staining, the

【基金项目】 国家自然科学基金青年项目 (81601167); 山西省基础研究计划面上项目 (20210302123304); 山西省研究生科研创新项目 (2023KY390)。

【作者简介】 胡佳佳 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 神经生理学。E-mail: 19723513100@163.com

【通信作者】 殷丽天 (1982—), 女, 教授, 研究方向: 神经生理学。E-mail: litianyin@sxmu.edu.cn

morphology of dendritic spines was identified. **Results** The expression of ICAM5 in the hippocampus of alcohol two-bottle choice model mice in the alcohol group was considerably lower than that of the water group ($P < 0.001$). The specific expression of ICAM5 in the hippocampus of mice was observed by fluorescence microscopy. In the open field experiment, the staying time and moving distance of the AAV-ICAM5 group were significantly increased compared with those of the control group ($P < 0.01$). In the CPP experiment, the residence time of AAV-ICAM5 mice in the alcohol-paired compartment was significantly lower than that of control mice ($P < 0.001$). In the loss-of-righting reflex experiment, overexpression of ICAM5 significantly reduced sedation latency ($P < 0.01$), but significantly shortened the duration of sedation ($P < 0.001$). Compared with AAV-mCherry+Water group, the ratio of F-actin/G-actin in the hippocampus was significantly increased after drinking ($P < 0.01$), but after ICAM5 overexpression, their F-actin/G-actin ratio was significantly decreased ($P < 0.001$). Compared with AAV-mCherry+Water group, the density of dendritic spines in the hippocampal CA1 region was increased ($P < 0.001$), but the density of dendritic spines in the AAV-ICAM5+Alcohol group was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusions** ICAM5 modulated the expression of cytoskeleton proteins to change the structural plasticity of dendritic spines, which contributed to alcohol-drinking and locomotor behavioral changes in mice.

【Keywords】 alcohol dependence; ICAM5; hippocampus; dendritic spinous structure; CPP model

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

酒精可能是最常被使用的成瘾物质,酒精依赖(成瘾)是多种疾病的高危因素,引起如心血管疾病、多种消化道疾病、记忆力下降及神经系统的不可逆障碍等,还会引发心理疾病^[1]。酒精依赖体现为强迫性饮酒、对酒精的长期需求和戒断后渴求。目前,对于酒精依赖的神经作用机制仍不清楚,也尚无有效的治疗手段^[2]。

酒精的病理生理学机制是神经系统的适应性改变,这一复杂的过程与特定脑区突触结构和功能可塑性改变有关,海马是药物成瘾和复发中的关键脑区。结构可塑性在形态上表现为突触数量和密度的增减、突触类型的变化和树突棘形态的多样性变化等^[3]。树突棘内含高浓度的肌动蛋白,而肌动蛋白的变化会造成树突棘形态结构的改变^[4]。

细胞间粘附分子 5 (intercellular adhesion molecule 5, ICAM5) 属于免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 超家族,在脑组织兴奋性神经元的胞体、树突轴和树突丝/棘中表达^[5-6]。在神经系统中,ICAM5 参与免疫和神经发育功能,是细胞间隙调节突触形成的关键分子。ICAM5 是树突棘成熟的负性调控分子^[7],其表达量和功能活性与树突丝的形成和树突棘的成熟密切相关,调节树突棘的发育、突触可塑性、神经环路形成以及情感与学习记忆^[8]。但其在药物以及酒精依赖中的作用及相关作用机制仍不清楚。

1 材料和方法

1.1 实验动物

由于小鼠性别差异、便于控制和避免混淆等因

素,选用 SPF 级 8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠 ($n = 60$),体重 20~25 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010],适应 1 周后进行手术或检测。所有小鼠饲养于山西医科大学兽医学系 SPF 级动物房[SYXK(京)2019-0030],控制温度(22 ± 1)℃,昼夜循环 12 h/12 h(关灯:19:00),自由进食和饮水,动物设施和饲养符合动物保护原则。所有动物实验均按照中国太原山西医科大学伦理委员会的指导方针进行(2021-024),实验过程中遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

腺相关病毒(AAV-ICAM5)(上海和元生物技术股份有限公司);ICAM5 抗体(英国 Abcam 公司,货号:AB232785);HRP-山羊抗兔 IgG(上海爱必信生物科技有限公司,货号:abs20040ss);F-actin/G-actin *in vivo* assay kit(美国 Cytoskeleton 公司,货号: BK037);FD Rapid GolgiStain™ Kit(美国 FD Neuro Technologies 公司,货号:PK401);超敏 ECL 化学发光液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号:17L12B71、17K01A46);无水乙醇、甲醇(天津市致远化学试剂有限公司,批号:20230901、20230801)。

PVDF 膜(德国 Merk millipore 公司);脑立体定位仪(深圳瑞沃德生命科技股份有限公司);电泳仪、电泳槽、半干转印槽、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);荧光显微镜(日本 Olympus 公司);旷场实验设备(成都泰盟软件有限公司);条件性位置偏爱箱系统(安徽正华生物仪器设备有限公司);冰冻切片机(德国 Leica 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 双瓶选择饮酒模型构建

将 12 只小鼠随机分为饮水组 (water group) 和饮酒组 (alcohol group), 每组 6 只。期间每只小鼠单笼喂养, 先喂养 1 周使小鼠适应环境, 在此期间, 每只鼠笼上放置两个大小相同的饮水瓶, 第 7 天时, 将两个瓶子的剩余水量进行记录并计算出每只小鼠单瓶饮水量, 排除存在饮水位置偏好小鼠。实验期间, 饮酒组放置外观相同的饮水瓶和饮酒瓶各 1 个, 饮酒瓶中的酒精浓度每 4 d 升高或更换 1 次, 酒精浓度依次为 2.5%、5%、10%、20%, 最终在饮水组随机抓取 3 只小鼠, 饮酒组中选取 3 只饮酒量 24 h 内大于 10 g/kg 以及酒精偏好率 >60% 的小鼠用于后续实验。这是双瓶选择模型筛选的通用方式, 计算小鼠酒精饮用量即在 24 h 内小鼠酒精饮用量/小鼠体重; 酒精偏好率即小鼠饮用酒精溶液/总液体饮用量。

1.3.2 9% 慢性酒精暴露模型

将 48 只小鼠随机分为 4 组, 分别为 AAV-mCherry+Water 组、AAV-mCherry+Alcohol 组、AAV-ICAM5+Water 组和 AAV-ICAM5+Alcohol 组, 每组 12 只。期间 AAV-mCherry+Water 组和 AAV-ICAM5+Water 组正常饮水, AAV-mCherry+Alcohol 组和 AAV-ICAM5+Alcohol 组每只鼠笼上放置外观相同的饮酒瓶, 酒精浓度为 9%^[9], 饮酒瓶每 4 d 更换 1 次, 持续 30 d。

1.3.3 Western blot 检测

小鼠海马、内侧前额叶皮层和杏仁核组织在蛋白裂解液 (RIPA Buffer) 中匀浆, 并且添加蛋白酶抑制剂混合物。样品采用超声波破碎机均质, 4 ℃, 14 000 r/min 离心 30 min。收集上清, 采用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白含量。然后将组织裂解液依次经 SDS-PAGE 处理、转 PVDF 膜、封闭、孵育一抗、孵育二抗后, 使用超敏 ECL 化学发光液制备印迹, 用凝胶成像系统分析密度测定数据。

1.3.4 脑立体定位手术

随机将小鼠分为对照组 (control group) 和 AAV-ICAM5 组。腺相关病毒 (pAAV) 构建于 pAAV-hSyn-ICAM5-3 × Flag-P2A-mCherry-tWPA 质粒中。小鼠麻醉后固定于立体定位装置。以 0.1 μL/min 的速度, 将总体积为 0.8 μL 的 pAAV 以双侧方式注射到 AAV-ICAM5 组小鼠海马区 (-1.98 mm 前后 (AP), ±1.5 mm 中外侧, -1.8 mm 背腹侧 (DV))。

每次注射后, 针留在原地 10 min。

1.3.5 冰冻切片

病毒注射 3 周后, 用 4% 多聚甲醛溶液对小鼠进行心脏灌注, 取脑, 在蔗糖溶液中进行梯度脱水, 将脱水后的脑组织用包埋剂固定在托盘上, 放入 -22 ℃ 冰冻切片机中进行切片, 贴在载玻片上, 滴加抗荧光衰减剂, 封片, 在荧光显微镜下观察并拍照。

1.3.6 旷场实验

将小鼠放置在一个正方体黑色塑料箱 (50 cm × 50 cm) 中, 使其自由探索 5 min。使用行为学实验系统记录并分析小鼠总运动距离、中心区停留的时间和运动距离、中心区停留时间所占比例和外周区域运动时间。

1.3.7 条件位置偏爱 (conditioned place preference, CPP) 实验

CPP 调节装置是一个长方形的箱子, 由两个颜色和质地不同的独立的调节隔间 (32 cm × 25 cm × 32 cm) 组成, 由一个可移动的门 (8 cm × 25 cm) 隔开。两个隔间通过墙的颜色 (黑与白) 和地板的纹理 (条纹与虚线) 来区分。实验包括以下 3 个阶段: 预适应期 (第 1 天), 抽出 CPP 中间箱中的隔板, 小鼠在 A、B 两箱之间自由探索 15 min, 根据停留时间将小鼠非偏爱侧作为伴药箱; 训练期 (第 2~5 天), 4 轮训练; 测试期 (第 6 天) 抽出隔板, 记录小鼠在 A、B 箱停留的时间 15 min, 比较各组 CPP 分数。CPP 分数的计算方法是用在伴药箱中花费的时间减去在非伴药箱中花费的时间。

1.3.8 翻正反射 (lose the righting reflex, LORR) 实验

给小鼠腹腔注射 25% 的酒精 3.5 g/kg, 并立即放入空笼中。当小鼠出现共济失调并停止运动至少 30 s 时, 至翻正反射消失, 这一段时间称为失去翻正反射的潜伏期 (latency to lose the righting reflex, L-LORR)。然后将小鼠腹部向上放置, 观察小鼠翻转身体 (腹部向下的体位) 的次数, 在 1 min 内恢复正常体位 3 次, 即被认定为从酒精作用中恢复, 这段时间为恢复时间, 可反应酒精镇静持续时间 (duration of lose the righting reflex, D-LORR)。记录动物失去翻正反射所需的时间和从酒精作用中恢复的时间。

1.3.9 细胞骨架蛋白检测 (F-actin/G-actin 比值)

采用丝状肌动蛋白/球状单体肌动蛋白 (filamentous actin/globular actin, F-actin/G-actin) 检

测试剂盒,将每只小鼠的脑组织匀浆置于 LAS2 缓冲液中。裂解液在 4 ℃,20 000 r/min 下离心 1 h,生成含有 G-actin 的上清。沉淀物重悬于等量的 F-actin 解聚缓冲液(LAS2)中,在冰上孵育 1 h,每 15 min 轻轻混匀 1 次,然后在 20 000 r/min 中 4 ℃离心 30 min,得到含有 F-actin 的上清液。之后用 Western blot 方法检测,使用凝胶成像系统分析密度测定数据。

1.3.10 高尔基染色实验

染色过程按照说明书进行。小鼠用 1%戊巴比妥钠(i. p.,50 mg/kg)麻醉,然后迅速切除小鼠的大脑。将脑组织浸泡在 A、B 两种溶液等量混合制成的浸渍溶液中,室温避光保存 2 周。将组织转移到溶液 C 中,在黑暗中再储存 5 d。脑组织在异戊烷中浸泡后置于-80 ℃。将脑组织切成 100 μm 冷冻切片,用于显微镜观察。对于树突棘的分析,显微镜采集图像,使用 Image J(NIH)计算每 10 μm 树突

长度的棘数为脊柱密度。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计学软件进行数据分析,实验数据均采用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。双瓶选择模型实验采用双因素重复测量方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。CPP 检验的数据采用单因素方差分析,考虑时间或运动距离作为实验因素。CPP 评分采用学生 *t* 检验。Western blot 数据采用单因素方差分析。采用双尾 *t* 检验分析 F-actin/G-actin 蛋白水平。在组间比较用 Tukey's Post Hoc 检验进行。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠饮酒量及酒精偏好

小鼠随机分为饮水组、饮酒组,每组 6 只,如图 1 为双瓶选择实验的流程图。随着饮酒浓度的升高,饮酒组小鼠的饮酒量逐渐增加。

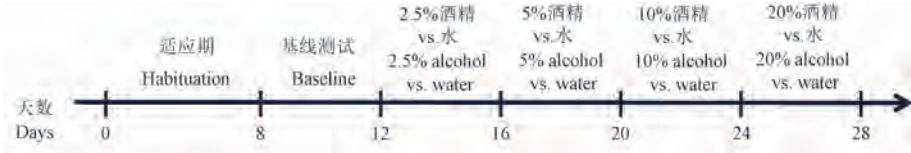


图 1 小鼠双瓶选择模型流程图

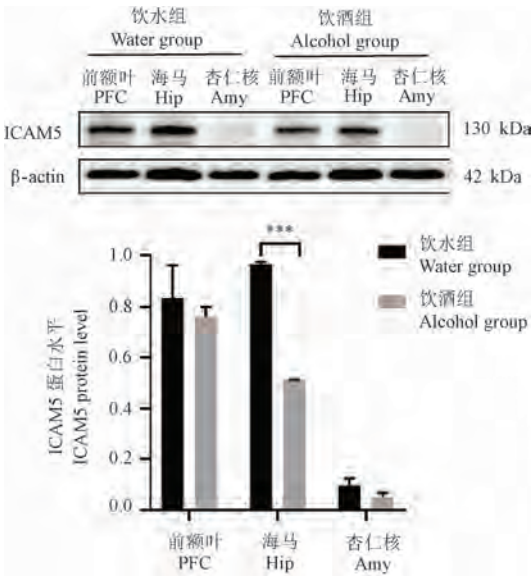
Figure 1 Flow chart of alcohol two-bottle choice mice model

2.2 小鼠不同脑区中 ICAM5 的蛋白表达情况

通过 Western blot 实验分析饮水组和饮酒组小鼠内侧前额叶皮层(prefrontal cortex, PFC)、海马(hippocampus, Hip)和杏仁核(amygdala, Amy)中 ICAM5 的蛋白表达情况。结果显示,与饮水组相比,饮酒组小鼠 ICAM5 在海马脑区的表达水平显著降低(*P* < 0.001);在前额叶皮层,ICAM5 的表达量有下降趋势(*P* = 0.7744);在杏仁核两组无统计学差异(*P* = 0.9220)(图 2)。

2.3 海马注射 AAV-ICAM5 定位及表达情况

通过病毒注射,在小鼠海马中特异性过表达 ICAM5 蛋白。在小鼠海马中注射由 hSyn 启动子驱动的携带 ICAM5 的 AAV 构建体(图 3A、3B)。小鼠双侧海马立体定位注射 AAV 腺相关病毒 3 周以后,在荧光显微镜下观察到海马脑区有明显的红色荧光,并且周围其他脑区无红色荧光,表明 ICAM5 可以在海马脑区特异性表达 ICAM5。通过蛋白免疫印迹实验,进一步检测 ICAM5 蛋白水平的变化,与对照组相比,注射病毒后小鼠海马脑区 ICAM5 的表达水平显著升高(*P* < 0.01)(图 3C、3D)。



注:与饮水组比较,*** *P* < 0.001。

图 2 ICAM5 在饮水组和饮酒组小鼠不同脑区的蛋白表达情况($\bar{x}\pm s, n=3$)

Note. Compared with the water group, *** *P* < 0.001.

Figure 2 Expression of ICAM5 protein in different brain regions of mice in water group and alcohol group

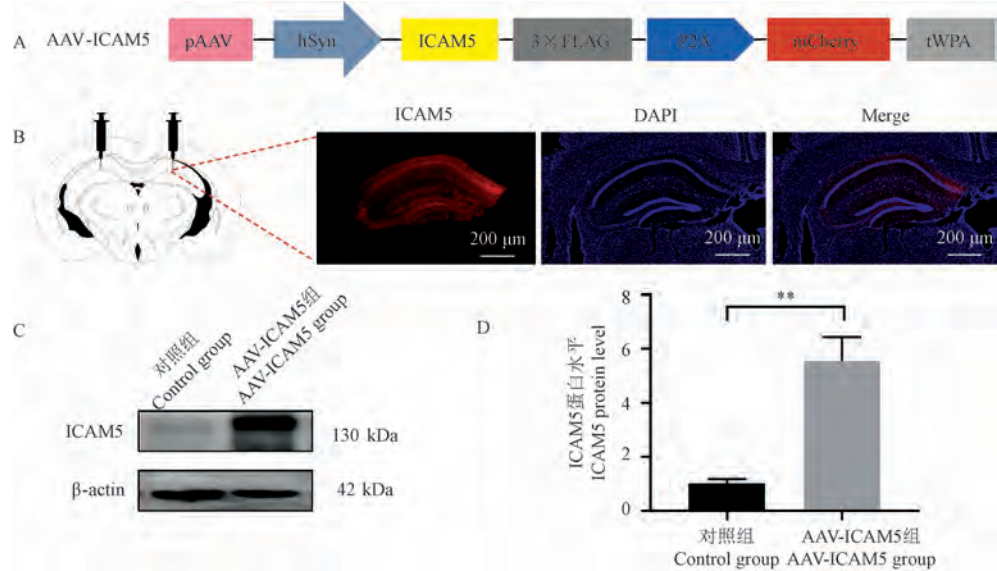
2.4 ICAM5 减弱小鼠焦虑样情绪

通过旷场轨迹热图可以明显看出,对照组小鼠在中位置的运动轨迹较四周稀疏,而 AAV-ICAM5 组小鼠在各区域运动轨迹几乎一致,热图颜色分布较均匀,表明 ICAM5 可以增加小鼠对新鲜环境的探索欲望。AAV-ICAM5 组小鼠较对照组在旷场中心位置停留时间($P<0.01$)和运动距离明显增加($P<$

0.001),表明 ICAM5 可以减弱小鼠焦虑样情绪;两组的运动总距离没有差异,ICAM5 对小鼠的运动能力没有影响(图 4)。

2.5 ICAM5 可减少酒精诱导的 CPP 奖赏效应

根据预适应期测试结果,将过度偏好某一侧的小鼠剔除,对照组和 AAV-ICAM5 组小鼠的 CPP 评分差异无统计学意义。训练期后,观察到两组小鼠

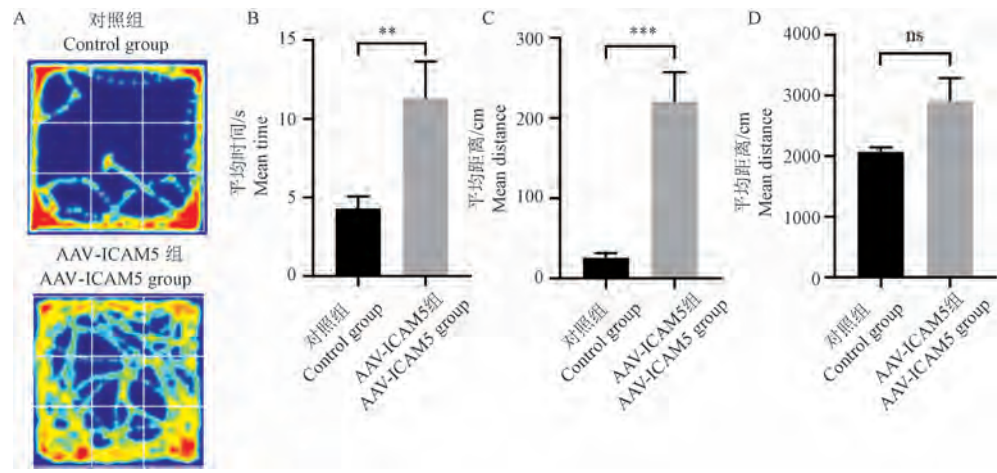


注:A:构建 AAV-ICAM5 质粒的结构图;B:小鼠脑立体定位注射病毒 3 周后小鼠海马荧光表达情况;C:蛋白表达图;D:定量结果。与对照组比较, ** $P<0.01$ 。

图 3 小鼠海马脑区立体定位注射后 ICAM5 蛋白表达情况 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Note. A, Structure map of AAV-ICAM5 plasmid was constructed. B, Fluorescence expression in hippocampus of mice after 3 weeks of stereotaxic injection of virus. C, Protein expression of ICAM5. D, Quantitative results. Compared with control group, ** $P<0.01$.

Figure 3 Expression of ICAM5 protein in hippocampus of mice after stereotaxic injection



注:A:旷场实验轨迹图;B:中心停留时间;C:中心运动距离;D:运动总距离。与对照组比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 4 过表达 ICAM5 对小鼠自主探索行为的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Note. A, Track in open field test. B, Time in center. C, Distance in center. D, Total distance traveled. Compared with the control group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 4 Effect of overexpression of ICAM5 of locomotion activity in mice

在伴药箱停留时间均显著增加,酒精诱导出对伴药箱的显著偏好,表明腹腔注射 2 g/kg 酒精可以引起明显的酒精奖赏效应,模型制备成功。在测试期观察到 AAV-ICAM5 组小鼠 CPP 评分较对照组小鼠明显降低 ($F_{1,44} = 13.41, P < 0.001$),提示 ICAM5 会干扰酒精奖赏效应与特定环境关联的形成(图 5)。

2.6 ICAM5 减弱酒精的镇静作用

采用 LORR 实验测试酒精对小鼠的镇静作用。结果显示,过表达 ICAM5 可以明显降低小鼠的镇静潜伏期(latency) ($P < 0.01$,图 6A),但同时也显著缩短了镇静作用的持续时间(duration) ($P < 0.001$,图 6B)。这些结果表明 ICAM5 可以减弱酒精引起的镇静作用。

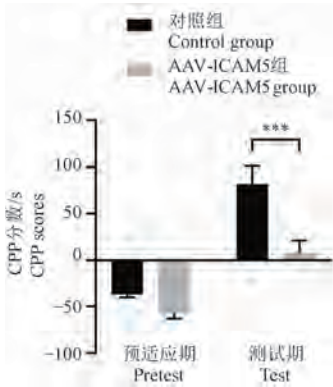
2.7 ICAM5 对小鼠海马组织中肌动蛋白的影响

细胞骨架肌动蛋白是树突棘的重要组成部分,

突触结构和功能的可塑性的改变源于肌动蛋白细胞骨架动力学驱动,其中 F-actin/G-actin 比值可以反应神经元树突棘的结构改变^[10-11]。在慢性饮酒模型后,利用 Western blot 技术检测 4 组小鼠海马组织中骨架蛋白 F-actin/G-actin 相对表达量。如图 7 所示,4 个组之间小鼠海马组织中 F-actin/G-actin 相对表达量存在显著差异 ($F_{3,8} = 15.65, P < 0.01$)。与 AAV-mCherry+Water 组相比,AAV-mCherry+Alcohol 组 F-actin/G-actin 比值显著升高 ($P < 0.01$);而在 ICAM5 过表达后,AAV-ICAM5+Alcohol 组小鼠 F-actin/G-actin 比值显著降低 ($P < 0.001$)。

2.8 ICAM5 可调节海马神经元可塑性变化

如图 8 检测小鼠海马 CA1 区树突棘密度结果显示,各组间有显著差异 ($F_{3,20} = 12.09, P < 0.001$)。AAV-mCherry+Alcohol 组树突棘密度 ($13.64 \pm$

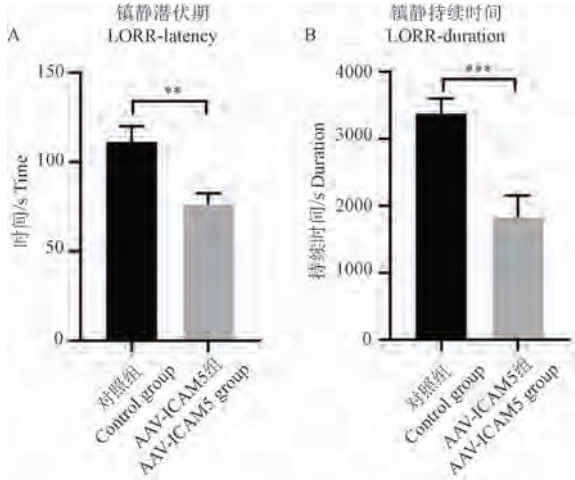


注:与对照组比较, *** $P < 0.001$ 。

图 5 过表达 ICAM5 对小鼠条件性位置偏爱的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

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

Figure 5 Effect of overexpression of ICAM5 on conditioned place preference in mice

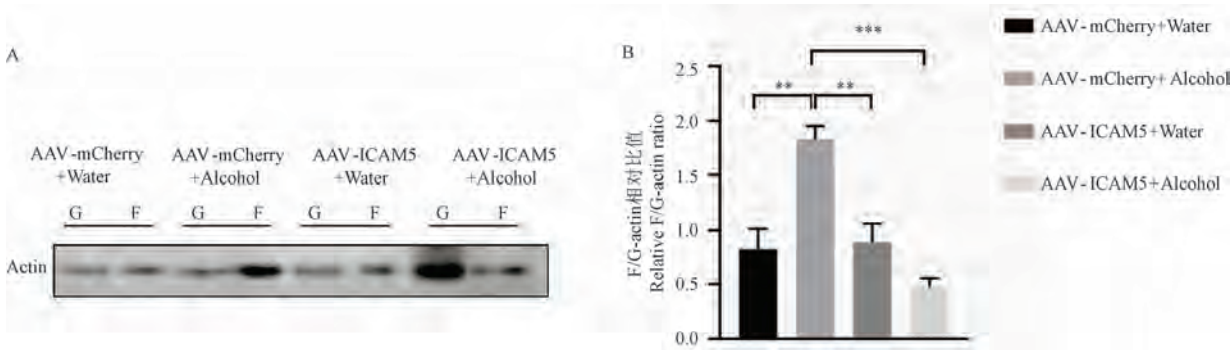


注:与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 6 ICAM5 对小鼠翻正反射的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

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

Figure 6 Effect of ICAM5 on LORR behavior in mice

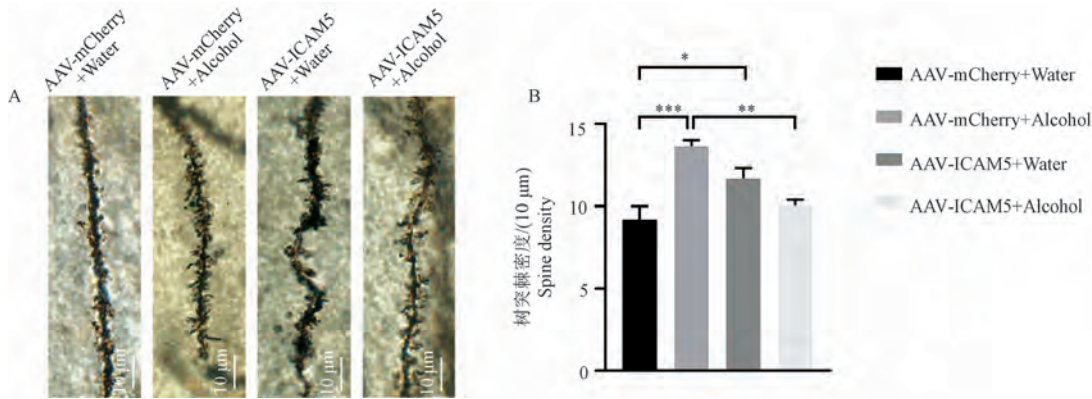


注:A:蛋白表达图;B:定量结果。与 AAV-mCherry+Alcohol 组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 7 ICAM5 调节酒依赖小鼠海马中细胞骨架蛋白变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. A, Protein expression of Actin. B, Quantitative results. Compared with AAV-mCherry+Alcohol group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 7 ICAM5 regulates cytoskeletal protein changes in the hippocampus of alcohol-dependent mice



注:A:高尔基染色海马树突棘染色图;B:定量结果。与 AAV-mCherry+Alcohol 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 8 ICAM5 对饮酒后海马树突棘密度的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Note. A, Golgi staining Staining of hippocampal dendritic spines. B, Quantitative results. Compared with AAV-mCherry+Alcohol group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 8 ICAM5 affects hippocampal dendrite spine density after alcohol drinking

0.80)/10 μm 显著高于 AAV-mCherry + Water 组 (9.21 ± 1.78)/10 μm ($P<0.001$);而在 ICAM5 过表达后,AAV-ICAM5+Alcohol 组小鼠树突棘密度显著降低 (10.05 ± 0.75)/10 μm ($P<0.01$)。

3 讨论

酒精在世界各地被广泛使用,并在社会中被许多人所接受。但是,酒精也是全球疾病负担的主要风险因素,并导致大量人群健康状况和生活质量下降^[12]。根据 2016 年世界卫生组织报告,全球因酒精有害使用致残和死亡人数分别占总死亡人数的 5.1%和 5.3%,在 20~39 岁年龄段中,约 13.5%的死亡原因为酒精所引起^[13]。酒精依赖或酒精成瘾是一种以反复过量饮酒为特征的复杂行为障碍,最终导致对饮酒失去控制,产生耐受性和依赖性^[14]。酒精成瘾导致大量精神疾病,如阿尔茨海默病、癫痫等,对神经中枢系统的影响不可忽视^[15]。尽管最近对酒精生物作用的了解有所进展,但对酒精的许多分子靶点和酒精对行为的影响背后的机制仍然知之甚少。酒精成瘾显著影响大脑的结构、功能和神经化学方面,特别是奖赏环路,如伏隔核、杏仁核、海马和内侧前额叶皮层等,这些区域在成瘾的发展和延续中起着重要作用。其中海马是大脑中成瘾记忆形成和巩固的关键区域,海马 CA1 区在记忆和空间认知方面起着关键作用,主要参与成长时程记忆,并与空间导航有关;CA3 区在模式分辨和记忆容量方面起重要作用;齿状回 (dentate gyrus, DG) 区主要涉及新陈代谢调节、抑制作用的实施,以

及对新神经元的产生和成熟的调节。酒精对海马 CA1 区树突棘形成及突触可塑性有显著影响,突触可塑性变化在功能上表现为突触传递的长时程增强和长时程抑制等,因此侧重海马 CA1 区使我们的研究显得更有意义。明确酒精在海马中活跃的特定机制可能有助于减少药物成瘾行为^[16]。

近年来的研究发现,除了神经环路、神经递质受体和离子通道的作用,细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 在调节突触形成中起着重要作用,他们可以稳定初始突触接触,招募突触结构蛋白,并触发细胞内信号传导至肌动蛋白细胞骨架,诱导突触形成^[17]。ICAM5 作为细胞黏附分子,在端脑兴奋性神经元表达,与脑组织发育有关,在许多神经系统疾病发挥作用。如在阿尔茨海默病患者的脑部,尤其是海马 ICAM5 明显减少^[18]。ICAM5 在海马脑区的减少与它参与介导神经元间相互作用有关,可能引起阿尔茨海默病患者的认知功能受损。脆性 X 染色体综合征患者树突棘异常和空间记忆、恐惧记忆在内的行为障碍与 ICAM5 mRNA 的翻译水平升高有关。因此,ICAM5 的调控可能在脆性 X 染色体综合征的神经元形态缺陷和认知障碍之间提供了功能联系^[19]。

本研究首先采用经典的慢性酒精暴露模型,双瓶选择模型观察海马中 ICAM5 在自发性饮酒行为中的表达情况^[20],实验期间酒精浓度梯度递增 (2.5%~20%),选取饮酒偏好 >60% 的小鼠。结果显示在饮酒组小鼠海马组织中 ICAM5 的表达显著降低,在内侧前额叶皮层有降低趋势,而在杏仁核

中没有差异。以上结果推测酒精可能通过海马中 ICAM5 改变导致小鼠饮酒量和饮酒偏好性改变。

为进一步明确 ICAM5 对小鼠饮酒及运动行为的影响及在酒精依赖过程中的作用,我们构建了包含神经元特异性启动子 hSyn 和红色荧光蛋白 mCherry 的 ICAM5 腺相关病毒载体,并通过脑立体定位方法在小鼠的海马神经元特异性表达 ICAM5。这种方法可以使得 ICAM5 较长期稳定的特异性在海马神经元高效表达,排除使用药物激动剂引起的非特异性因素^[21]。实验结果显示,ICAM5 可以在海马组织中稳定过表达。

随后,通过旷场实验观察 ICAM5 对小鼠运动行为的影响。发现 AAV-ICAM5 组小鼠在陌生环境中的探究行为以及自主行为增强。相较于对照组,ICAM5 高表达小鼠在旷场中心位置停留时间和运动距离明显增加,提示过表达 ICAM5 可以增强小鼠适应新环境的能力并减弱小鼠焦虑样情绪。

海马神经元对伏隔核的投射可以减少其细胞外多巴胺的释放水平,这是在奖赏系统中的重要回路^[22],通过 CPP 模型可以检测小鼠对药物的寻求偏好分析奖赏效应^[23-24]。实验结果显示,与预适应期结果相比,两组小鼠在训练期后在伴药箱停留时间均有增加,表明模型制备成功。而 AAV-ICAM5 组小鼠 CPP 评分相较于对照组显著降低,表明在海马中过表达 ICAM5 可以抑制酒精诱导的 CPP,降低小鼠酒精对小鼠的奖赏效应。提示海马中的 ICAM5 可以调节由酒精引起的条件奖赏效应^[25]。在啮齿动物的研究表明,药物奖赏的减少以及药物诱导多巴胺反应的减少,与更高的可卡因等成瘾药物主动摄取动机有关^[26]。人群结果显示,有家族病史的年轻人对精神兴奋剂的多巴胺反应降低和对酒精获得的低反应都预示着成瘾的高风险^[27-28]。

对酒精镇静作用的高耐受性是人类酒精成瘾的一个危险因素。然而,饮酒和镇静的神经元机制经常分离^[29]。因此,本研究使用 LORR 试验测试了酒精对 ICAM5 高表达小鼠的镇静作用。结果显示,表达 ICAM5 小鼠对大剂量酒精注射后的镇静潜伏期明显降低,并且显著缩短了镇静作用的持续时间。提示过表达 ICAM5 小鼠可能比对照组更快地吸收或代谢乙醇,同时 ICAM5 可以降低酒精的镇静作用,这可能反过来解释了对酒精消耗的抑制作用。有研究表明,多发性硬化症的动物模型 ICAM5 敲除小鼠在慢性期表现出更严重的自身免疫性脑

脊髓炎病程,表明 ICAM5 在进行性神经退行性变中具有神经保护功能^[30-31]。推测 ICAM5 会增加神经元兴奋性以降低酒精镇静的作用,而通过减少厌恶效应来促进酒精消耗。

肌动蛋白作为主要的细胞骨架蛋白在神经元形态发生和树突棘中发挥作用。肌动蛋白细胞骨架是一种动态的结构,能够以 ATP 水解依赖的方式自组装构建,包含 G-肌动蛋白(球形和单体形式)和 F-肌动蛋白(聚合状态)存在于细胞内。F-actin/G-actin 比值是分析肌动蛋白纤维和细胞骨架形态稳定程度的重要指标^[32]。结果显示,慢性酒精暴露后可以增加小鼠海马 F-actin/G-actin 比值,但在 ICAM5 过表达后,这一比值显著下降,表明 ICAM5 可能通过调节肌动蛋白动力学参与突触可塑性。肌动蛋白的动态变化是长时程增强(late long-term retention, L-LTP)和长期记忆(long-term memory, LTM)突触结构的必要基础,对记忆巩固起着至关重要的作用。因此,我们推测 ICAM5 可以抑制由酒精引起的 G-actin 向 F-actin 转化过程,最终调节树突棘结构。表明 ICAM5 对酒精引起的突触结构可塑性改变可能是通过改变神经元中的肌动蛋白组成的实现的^[33]。

ICAM5 以多种方式调节神经元发育,并在神经元的树突和胞体上高度表达^[34]。神经元突触可塑性的改变是酒精成瘾的重要机制之一,药物和酒精暴露会在神经元棘和树突水平上诱导形态可塑性改变。树突棘是构成脑兴奋性神经传递的主要突触后部位。棘的形态发育始于树突丝状伪足的形成,随后形成棘的前体^[35-36],最终以树突棘/突触形式成熟,并与突触的稳定和加强有关^[37]。本实验采用高尔基染色法测量海马 CA1 区树突棘密度,可以直接反映神经元的突触结构^[38]。实验结果显示,AAV-mCherry+Alcohol 组小鼠相较 AAV-mCherry+Water 组小鼠在海马中的树突棘密度增加,这之前报告中酒精暴露后小鼠海马树突棘密度增加一致^[39]。酒精作用后,会引起神经元树突棘形态和数量的改变,但已有研究结果并不一致。有文献报道,急性酒精给药后,大鼠中央杏仁核(central amygdaloid, CeA)和内侧杏仁核(medial amygdala, MeA)的树突棘增加;而在慢性酒精暴露终止后,大鼠的 CeA 和 MeA 中的树突棘则减少^[40-41]。此外,慢性酒精暴露终止也会减少海马和伏隔核(nucleus accumbens, NAc)的树突棘^[42-43]。另外也有数据显

示,人类酗酒者死后研究结果显示皮质锥体神经元的树突棘密度降低^[44]。因此,酒精作用后不同研究树突棘密度结果并不一致,酒精暴露可以使树突棘棘形、突触数量以及密度发生改变,这可能与多种因素有关,包括神经适应、受体调节、信号传导通路等。我们的结果显示,在 ICAM5 过表达后,AAV-ICAM5+ Alcohol 组小鼠树突棘密度会降低,提示 ICAM5 可能通过调节肌动蛋白动力学改变树突棘结构。

综上所述,研究发现在酒精双瓶选择模型中,小鼠在海马脑区 ICAM5 的表达量显著下降。在小鼠海马区特异性过表达 ICAM5 后,会干扰酒精的奖赏效应与特定环境关联的形成,并且可以减弱酒精的镇静作用。机制研究表明,ICAM5 可能通过调节 F-actin 的解聚和重构抑制与酒精作用有关的树突棘密度增加,这为酒精及药物成瘾提供了新的研究思路。ICAM5 对酒依赖调控的这一过程是复杂的,因此需要进一步探索 ICAM5 的作用靶点和作用方式,明确其在酒精成瘾过程中的关键作用。

参考文献:

- [1] MATTHEWS D B, ROSSMANN G. Using animal models to identify clinical risk factors in the older population due to alcohol use and misuse [J]. Alcohol, 2023, 107: 38-43.
- [2] JUAREZ B, MOREL C, KU S M, et al. Midbrain circuit regulation of individual alcohol drinking behaviors in mice [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 2220.
- [3] BEN HAMIDA S, MENDONÇA-NETTO S, AREFIN T M, et al. Increased alcohol seeking in mice lacking Gpr88 involves dysfunctional mesocorticolimbic networks [J]. Biol Psychiatry, 2018, 84(3): 202-212.
- [4] KASAI. Unraveling the mysteries of dendritic spine dynamics: Five key principles shaping memory and cognition [J]. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2023, 99(8): 254-305.
- [5] GAHMBERG C G, TIAN L, NING L, et al. ICAM-5—a novel two-facetted adhesion molecule in the mammalian brain [J]. Immunol Lett, 2008, 117(2): 131-135.
- [6] MITSUI S, SAITO M, HAYASHI K, et al. A novel phenylalanine-based targeting signal directs telencephalin to neuronal dendrites [J]. J Neurosci, 2005, 25(5): 1122-1131.
- [7] BAGNI C, OOSTRA B A. Fragile X syndrome: From protein function to therapy [J]. Am J Med Genet A, 2013, 161A(11): 2809-2821.
- [8] GAHMBERG C G, NING L, PAETAU S. ICAM-5: a neuronal dendritic adhesion molecule involved in immune and neuronal functions [J]. Adv Neurobiol, 2014, 8: 117-132.
- [9] LI H, TAO Y, MA L, et al. β -Arrestin-2 inhibits preference for

- alcohol in mice and suppresses Akt signaling in the dorsal striatum [J]. Neurosci Bull, 2013, 29(5): 531-540.
- [10] 马丽娜, 王蓉. Drebrin 与认知功能障碍 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(6): 67-70, 78.
MA L N, WANG R. Relationship between drebrin and cognitive impairment [J]. Chin J Comp Med, 2013, 23(6): 67-70, 78.
- [11] KURUBA B, STARKS N, JOSTEN M R, et al. Effects of tropomodulin 2 on dendritic spine reorganization and dynamics [J]. Biomolecules, 2023, 13(8): 1237.
- [12] FAROKHNIA M, HARRIS J C, SPEED S N, et al. Lifetime use of alcohol and cannabis among U. S. adolescents across age: Exploring differential patterns by sex and race/ethnicity using the 2019 NSDUH data [J]. Drug Alcohol Depend Rep, 2023, 10: 100214.
- [13] WITKIEWITZ K, HEATHER N, FALK D E, et al. World Health Organization risk drinking level reductions are associated with improved functioning and are sustained among patients with mild, moderate and severe alcohol dependence in clinical trials in the United States and United Kingdom [J]. Addiction, 2020, 115(9): 1668-1680.
- [14] ROBBINS T W, EVERITT B J. Drug addiction: bad habits add up [J]. Nature, 1999, 398(6728): 567-570.
- [15] SHIELD K D, PARRY C, REHM J. Chronic diseases and conditions related to alcohol use [J]. Alcohol Res, 2013, 35(2): 155-173.
- [16] MEWS P, EGERVARI G, NATIVIO R, et al. Alcohol metabolism contributes to brain histone acetylation [J]. Nature, 2019, 574(7780): 717-721.
- [17] LIE E, YEO Y, LEE E J, et al. SALM4 negatively regulates NMDA receptor function and fear memory consolidation [J]. Commun Biol, 2021, 4(1): 1138.
- [18] MARTÍN-DE-SAAVEDRA M D, SANTOS M D, PENZES P. Intercellular signaling by ectodomain shedding at the synapse [J]. Trends Neurosci, 2022, 45(6): 483-498.
- [19] PEI Y P, WANG Y Y, LIU D, et al. ICAM5 as a novel target for treating cognitive impairment in fragile X syndrome [J]. J Neurosci, 2020, 40(6): 1355-1365.
- [20] 吕振, 龚志刚. 酒精使用障碍动物模型构建的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(3): 382-389.
LYU Z, GONG Z G. Advances in establishment of alcohol use disorder models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(3): 382-389.
- [21] LI D, JING D, LIU Z, et al. Enhanced expression of secreted α -klotho in the hippocampus alters nesting behavior and memory formation in mice [J]. Front Cell Neurosci, 2019, 13: 133.
- [22] LUJÁN M Á, COVEY D P, YOUNG-MORRISON R, et al. Mobilization of endocannabinoids by midbrain dopamine neurons is required for the encoding of reward prediction [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 7545.
- [23] MU L, LIU X, YU H, et al. cAMP-mediated upregulation of HCN channels in VTA dopamine neurons promotes cocaine reinforcement [J]. Mol Psychiatry, 2023, 28(9): 3930-3942.

[24] MARTINS J S, JOYNER K J, MCCARTHY D M, et al. Differential brain responses to alcohol-related and natural rewards are associated with alcohol use and problems: Evidence for reward dysregulation [J]. *Addict Biol*, 2022, 27(2): e13118.

[25] YIN L T, FENG R R, XIE X Y, et al. Matrix metalloproteinase-9 overexpression in the hippocampus reduces alcohol-induced conditioned-place preference by regulating synaptic plasticity in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2023, 442: 114330.

[26] SONG R, ZHANG H Y, LI X, et al. Increased vulnerability to cocaine in mice lacking dopamine D3 receptors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(43): 17675–17680.

[27] CASEY K F, BENKELFAT C, CHERKASOVA M V, et al. Reduced dopamine response to amphetamine in subjects at ultra-high risk for addiction [J]. *Biol Psychiatry*, 2014, 76(1): 23–30.

[28] KING A, VENA A, HASIN D S, et al. Subjective responses to alcohol in the development and maintenance of alcohol use disorder [J]. *Am J Psychiatry*, 2021, 178(6): 560–571.

[29] ZHENG F, PUPPEL A, HUBER S E, et al. Activin controls ethanol potentiation of inhibitory synaptic transmission through GABAA receptors and concomitant behavioral sedation [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2016, 41(8): 2024–2033.

[30] BIRKNER K, LOOS J, GOLLAN R, et al. Neuronal ICAM-5 plays a neuroprotective role in progressive neurodegeneration [J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 205.

[31] FIGIEL I, KRUK P K, ZAREBA-KOZIOŁ M, et al. MMP-9 signaling pathways that engage rho GTPases in brain plasticity [J]. *Cells*, 2021, 10(1): 166.

[32] WAGSTAFF J M, PLANELLES-HERRERO V J, SHAROV G, et al. Diverse cytomotive actins and tubulins share a polymerization switch mechanism conferring robust dynamics [J]. *Sci Adv*, 2023, 9(13): eadf3021.

[33] STEFANIUK M, BEROUN A, LEBITKO T, et al. Matrix metalloproteinase-9 and synaptic plasticity in the central amygdala in control of alcohol-seeking behavior [J]. *Biol Psychiatry*, 2017, 81(11): 907–917.

[34] YOSHIHARA Y, OKA S, NEMOTO Y, et al. An ICAM-related neuronal glycoprotein, telencephalin, with brain segment-specific expression [J]. *Neuron*, 1994, 12(3): 541–553.

[35] HOTULAINEN P, HOOGENRAAD C C. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function [J]. *J Cell Biol*, 2010, 189(4): 619–629.

[36] KOROBOVA F, SVITKINA T. Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis [J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(1): 165–176.

[37] KRAMER D A, NARVAEZ-ORTIZ H Y, PATEL U, et al. The intrinsically disordered cytoplasmic tail of a dendrite branching receptor uses two distinct mechanisms to regulate the actin cytoskeleton [J]. *eLife*, 2023, 12: e88492.

[38] CARPENTER-HYLAND E P, CHANDLER L J. Adaptive plasticity of NMDA receptors and dendritic spines: implications for enhanced vulnerability of the adolescent brain to alcohol addiction [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2007, 86(2): 200–208.

[39] YIN L T, XIE X Y, XUE L Y, et al. Matrix metalloproteinase-9 overexpression regulates hippocampal synaptic plasticity and decreases alcohol consumption and preference in mice [J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(8): 1902–1912.

[40] PANDEY S C, ZHANG H, UGALE R, et al. Effector immediate-early gene arc in the amygdala plays a critical role in alcoholism [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(10): 2589–2600.

[41] YOU C, ZHANG H, SAKHARKAR A J, et al. Reversal of deficits in dendritic spines, BDNF and Arc expression in the amygdala during alcohol dependence by HDAC inhibitor treatment [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2014, 17(2): 313–322.

[42] ZHOU F C, ANTHONY B, DUNN K W, et al. Chronic alcohol drinking alters neuronal dendritic spines in the brain reward center nucleus accumbens [J]. *Brain Res*, 2007, 1134(1): 148–161.

[43] RILEY J N, WALKER D W. Morphological alterations in hippocampus after long-term alcohol consumption in mice [J]. *Science*, 1978, 201(4356): 646–648.

[44] FERRER I, FÁBREGUES I, RAIRIZ J, et al. Decreased numbers of dendritic spines on cortical pyramidal neurons in human chronic alcoholism [J]. *Neurosci Lett*, 1986, 69(1): 115–119.

[收稿日期] 2024-01-20

马凌桔,迟宏扬,吴昕雪,等. UBC9 介导 SUMO 化修饰在同型半胱氨酸诱导巨噬细胞焦亡中的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(6): 11-17.

Ma LJ, Chi HY, Wu XX, et al. Role of UBC9-mediated SUMO modification in homocysteine-induced pyroptosis of macrophages [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 11-17.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.002

UBC9 介导 SUMO 化修饰在同型半胱氨酸诱导巨噬细胞焦亡中的作用研究

马凌桔^{1,2}, 迟宏扬^{2,3}, 吴昕雪⁴, 马福军³, 田彦成³, 赵彩齐³, 何天宇², 彭红建²,
姜怡邓², 杨力¹, 黄晖^{1*}, 马胜超^{2,3*}

(1.宁夏医科大学总医院老年与特需医学科,银川 750004;2.国家卫生健康委员会代谢性心血管疾病研究重点实验室,银川 750004;3.宁夏医科大学检验学院,银川 750004;4.宁夏医科大学基础医学院,银川 750004)

【摘要】 目的 探讨泛素结合酶 9 (ubiquitin conjugating enzyme 9, UBC9) 介导 SUMO 化修饰在同型半胱氨酸诱导巨噬细胞焦亡中的作用。**方法** 首先采用细胞计数试剂 (cell counting kit-8, CCK-8) 法和 Western blot 检测不同浓度 (0 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$, 150 $\mu\text{mol/L}$ 和 200 $\mu\text{mol/L}$) 同型半胱氨酸对小鼠巨噬细胞 (RAW264.7) 的活力及焦亡的影响;采用 Western blot 检测不同组细胞中 UBC9、SUMO 化修饰蛋白 SUMO-1、炎症因子 IL-1 β 的表达水平;qRT-PCR 检测干扰前后 UBC9 的 mRNA 表达,同时检测干扰 UBC9 后,UBC9、焦亡相关蛋白、IL-1 β 及 SUMO-1 相关表达。**结果** 当采用 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 Hcy 刺激后,巨噬细胞的活力影响最小且焦亡蛋白 NLRP3、Caspase-1 表达最明显 ($P<0.001$);与 Control 组相比,Hcy 组 IL-1 β 的表达水平升高 ($P<0.01$),SUMO-1 表达升高 ($P<0.01$);与 Control 组相比,Hcy 组中 UBC9 蛋白水平及 mRNA 水平表达均增高 ($P<0.05$);转染 si-UBC9 后,与 si-NC+Hcy 组相比,si-UBC9+Hcy 组 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、UBC9、SUMO-1 表达降低 ($P<0.01$)。**结论** 同型半胱氨酸诱导巨噬细胞焦亡的发生,其机制与上调泛素结合酶 9 发生 SUMO 化修饰有关。

【关键词】 UBC9;SUMO 化;巨噬细胞;同型半胱氨酸;细胞焦亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0011-07

Role of UBC9-mediated SUMO modification in homocysteine-induced pyroptosis of macrophages

MA Lingju^{1,2}, CHI Hongyang^{2,3}, WU Xinxue⁴, MA Fujun³, TIAN Yancheng³, ZHAO Caiqi³, HE Tianyu², PENG Hongjian²,
JIANG Yideng², YANG Li¹, HUANG Hui^{1*}, MA Shengchao^{2,3*}

(1. Department of Geriatrics and Special Needs Medicine, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China.

2. Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Disease Research of National Health Commission, Yinchuan 750004.

3. School of Laboratory Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004. 4. Basic School of Medicine,

Ningxia Medical University, Yinchuan 750004)

【基金项目】 国家自然科学基金 (81900273, 82270492); 宁夏青年科技拔尖人才培养项目; 宁夏自然科学基金优秀青年项目 (2023AAC05035)。

【作者简介】 马凌桔 (1994—), 男, 硕士, 医师, 研究方向: 老年慢性代谢性疾病的研究。E-mail: mlingju@163.com

【通信作者】 黄晖 (1973—), 男, 主任医师, 研究方向: 老年性代谢性心血管病的发病机制和治疗。E-mail: 371970906@qq.com

马胜超 (1985—), 男, 副教授, 研究方向: 代谢性心血管疾病发病机制。E-mail: solarmsc@163.com

* 共同通信作者

[Abstract] Objective To study the role of ubiquitin-conjugating enzyme 9 (UBC9) in the pyroptosis of homocysteine-induced macrophages mediated by small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification. **Methods** First, the effects of homocysteine at different concentrations (0 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$, 150 $\mu\text{mol/L}$ and 200 $\mu\text{mol/L}$) on the viability and pyrodeath of mouse macrophages (RAW264.7) were detected by CCK-8 and Western blot. Western blot was used to detect the expression levels of UBC9, SUMO-1, and the inflammatory cytokine IL-1 β in different groups of cells. qRT-PCR was used to detect the mRNA expression of UBC9 before and after RNA interference and the expression of UBC9, pyrogen-related protein, and SUMO-1 after RNA interference. **Results** After stimulation with 100 $\mu\text{mol/L}$ homocysteine, the effect of macrophage activity was minimal, and NLRP3 and Caspase-1 were the proteins with the most obvious increase in expression ($P<0.05$). Compared with the Control group, the Hcy group's expression of IL-1 β and SUMO-1 was increased ($P<0.01$). Compared with the Control group, the Hcy group's UBC9 protein and mRNA levels were increased ($P<0.05$). The expression of NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , UBC9, and SUMO-1 was decreased in the si-UBC9 + Hcy group compared with the si-NC+Hcy group ($P<0.01$). **Conclusions** Homocysteine induces pyroptosis in macrophages, and its mechanism of action is related to the up-regulation of UBC9 to induce SUMO modification.

[Keywords] UBC9; SUMO; macrophage; homocysteine; pyroptosis

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

冠心病、高血压、脑卒中等心脑血管疾病发病率逐年上升,已经成为全球死亡和残疾的主要原因^[1],动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是多种细胞参与的慢性炎症性疾病,是心脑血管疾病主要病理基础。同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是一种含巯基的非必须氨基酸,被公认为是心脑血管病的一项独立危险因素^[2],其代谢障碍导致高同型半胱氨酸血症(hyperhomo-cysteinemia, HHcy),可通过多种途径损伤血管内皮,从而促进 As 的发生发展^[3-4]。细胞焦亡(pyroptosis)依赖于 Gasdermin(GSMD)家族介导的膜孔形成和随后的细胞裂解,促进大量炎症因子的释放^[5]。近年来,越来越多的证据表明,巨噬细胞焦亡在动脉粥样硬化脆弱斑块的形成、破裂和免疫炎症反应中起着比传统的程序性细胞死亡方式(如细胞凋亡、自噬等)更重要的作用,但在 Hcy 引起的 As 发生中的作用尚研究较少^[6-7]。小分子泛素样修饰(small ubiquitin-related modifier, SUMO)是一种蛋白质翻译后修饰方式,在各种细胞内广泛存在^[8],参与多种细胞生物学过程中,包括细胞周期调控、细胞凋亡、细胞自噬、细胞焦亡、细胞衰老等^[9]。UBC9 作为 SUMO 修饰的 E2 结合酶,通过活化 SUMO 与蛋白质底物结合来发挥调节作用^[10];Tomasi 等^[11]在巨噬细胞中磷酸化 UBC9 通过调节 NF- κ B 抑制剂(I κ B α)促进 NF- κ B 信号传导发挥抗炎作用,提示 UBC9 介导的 SUMO 修饰参与调控巨噬细胞的炎症反应^[11]。鉴于 UBC9 参与多种调节作用机制,而目前却很少有文献报道是否与巨噬细胞焦亡存在一定调节作用,故我们猜测 UBC9 可能作为一种关键调节因子调控巨噬细胞焦

亡水平表达。本研究通过探究 UBC9 在 Hcy 诱导巨噬细胞焦亡中的作用,为进一步研究动脉粥样硬化的治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 细胞

小鼠巨噬细胞系(RAW264.7)购买于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

Hcy(美国 Sigma 公司);DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);胰蛋白酶、青霉素-链霉素(北京碧云天生物技术公司);LipofectamineTM 2000(美国 Invitrogen 公司);NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 和 β -actin 抗体(英国 Abcam 公司);UBC9、SUMO-1(英国 affinity 公司);HRP 标记的山羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);UBC9 上下游引物(中国擎科生物);蛋白提取试剂盒(上海凯基生物技术有限公司);总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、荧光 PCR 试剂盒(北京天根公司);化学发光显色剂(中国新赛美公司);蛋白上样缓冲液(上海碧云天有限公司);细胞增殖-毒性检测试剂盒(北京兰博利德公司)。

电转仪、电泳仪、Model680 全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);CO₂ 培养箱、5415D 型微量台式离心机(美国 Eppendorf 公司);超净工作台(中国苏州安泰有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞模型建立与分组

RAW264.7 细胞培养使用含有 10% 胎牛血清的

DMEM 培养基,在 37 ℃、含 5% CO₂ 的细胞培养条件下培养,2 d 换 1 次液,观察到细胞生长状态良好时用同型半胱氨酸干预 RAW264.7 细胞 48 h 后,将细胞收集于离心管中,收集细胞进行后续实验,设置同型半胱氨酸的终浓度为 0 mmol/L 为对照 (Control) 组,以终浓度为 100 μmol/L 为同型半胱氨酸 (Hcy) 组。

1.3.2 CCK-8 法检测细胞活力

以 15×10³/孔的密度取对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板。细胞贴附后,使用同型半胱氨酸浓度为 (0 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L、150 μmol/L、200 μmol/L) 进行处理,再培养 24 h 后去除培养基,加入 10 μL 的 CCK-8 溶液后孵育 40 min,最后在 450 nm 处测量吸光度 (A) 来计算细胞存活率。细胞活力/%=(A(加药)-A(空白))/(A(0 加药)-A(空白))×100。

1.3.3 细胞转染与分组

根据 Lipofectamine™ 2000 说明书将 UBC9 干扰片段转染到 RAW264.7 中,将培养瓶置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,8 h 后更换培养液,Hcy 干预 48 h 后收细胞,以便进行后续其他实验。转染后设置分组为对照 (Control) 组、同型半胱氨酸 (Hcy) 组、干扰对照+同型半胱氨酸 (si-NC+Hcy) 组、UBC9 干扰+同型半胱氨酸 (si-UBC9+Hcy) 组。转染后,qRT-PCR 检测转染 UBC9 mRNA 表达。

1.3.4 用 qRT-PCR 方法检测 UBC9 的表达

分别取对数生长期的各组细胞,按照试剂盒操作步骤提取总 RNA,再逆转录成 cDNA 最后进行 qRT-PCR 的检测。UBC9 基因序列查询与 Gene Bank 数据库,委托中国擎科生物设计引物。引物序列见表 1。qRT-PCR 扩增程序设定程序为:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s,共 40 个循环。使用 GAPDH 为内参为对照进行平衡,同体系扩增目的基因的相对量。反应结束后,根据扩增曲线数据,根据公式

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算, $\Delta\Delta Ct=[Ct_{UBC9}(\text{待测样本})-Ct_{GAPDH}(\text{待测样本})]-[Ct_{UBC9}(\text{校正样本})-Ct_{GAPDH}(\text{校正样本})]$ 。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法分析目的基因相对表达。

1.3.5 用 Western blot 检测细胞焦亡相关蛋白 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、UBC9、SUMO-1 蛋白表达

收刮细胞,提取总蛋白,与 5×蛋白上样缓冲液,混合煮沸 5 min 后,进行 SDS-PAGE 电泳;电泳后半干法电转移至 PVDF 膜,用含 5%脱脂奶粉 PBST 缓冲液封闭,加入一抗室温 4 ℃ 过夜,洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或鼠 IgG 二抗孵育 2 h,暗室中 ECL 发光液覆盖膜 30 s,用凝胶成像分析仪成像并测定区带的光密度值,以用目的片段与 β-actin 的光密度比值表示蛋白得相对水平。

1.4 统计学方法

使用 Graphpad Prism 9.3 统计软件对实验数据进行统计分析,上述实验计量结果采用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两样本均数比较采用独立样本 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hcy 干预后巨噬细胞活力及对焦亡的影响

用细胞计数试剂 (CCK-8) 法不同浓度 (0 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L、150 μmol/L、200 μmol/L) Hcy 对小鼠巨噬细胞的活力;蛋白印迹法测量检测巨噬细胞焦亡相关蛋白 NLRP3、Caspase-1 的表达水平,结果显示,100 μmol/L、150 μmol/L、200 μmol/L Hcy 可显著抑制细胞的活性 (*P*<0.05);与 Control 组相比,100 μmol/L Hcy 组焦亡相关蛋白 NLRP3、Caspase-1 的表达水平明显升高 (*P*<0.01)。因此,后续 Hcy 的实验干预浓度选择 100 μmol/L。见图 1。

2.2 Hcy 干预后巨噬细胞 IL-1β、UBC9、SUMO-1 蛋白及 UBC9 mRNA 的表达情况

蛋白印迹法测量巨噬细胞 UBC9、SUMO-1 的表达水平,qRT-PCR 检测巨噬细胞 UBC9 mRNA 的表达水平,结果显示,Hcy 组 UBC9 蛋白及 mRNA、SUMO-1 蛋白的表达水平高于 Control 组 (*P*<0.01),见图 2。

2.3 干扰 UBC9 在巨噬细胞对自身表达的影响

在巨噬细胞干扰 UBC9 后,使用 qRT-PCR、蛋白印迹法分别检测 UBC9 的 mRNA 及蛋白水平,结果显示,干扰 UBC9 后,si-UBC9+Hcy 组 UBC9 的

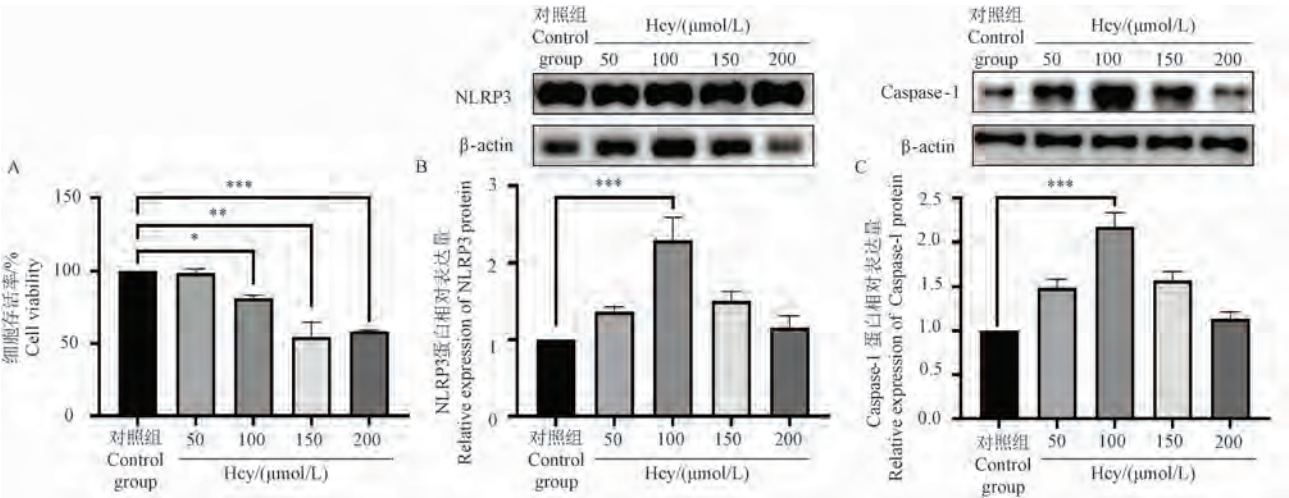
表 1 qRT-PCR 相关引物	
Table 1 Primers used for the qRT-PCR	
名称 Name	引物序列 Primer sequence
UBC9	F:5'-GAACCTGATGGCACAATGAA-3'
	R:5'-TTGAAAAGCATCCGTAGCTTGA-3'
GAPDH	F:5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'
	R:5'-GGGTCGTTGATGGCAACA-3'

mRNA、蛋白表达水平低于 si-NC+Hcy 组 ($P<0.05$)。表明 UBC9 干扰巨噬细胞系构建成功,见图 3。

2.4 干扰 UBC9 对 Hcy 诱导巨噬细胞焦亡及 SUMO 化的影响

如图 4 结果所示,干扰 UBC9 后,与 si-NC+Hcy

组相比,si-UBC9+Hcy 组 SUMO 化相关蛋白 SUMO-1 的表达水平显著下降 ($P<0.01$);干扰 UBC9 后,与 si-NC+Hcy 组相比,si-UBC9+Hcy 组 NLRP3 ($P<0.05$)、Caspase-1、IL-1 β 的表达水平显著降低 ($P<0.01$)。

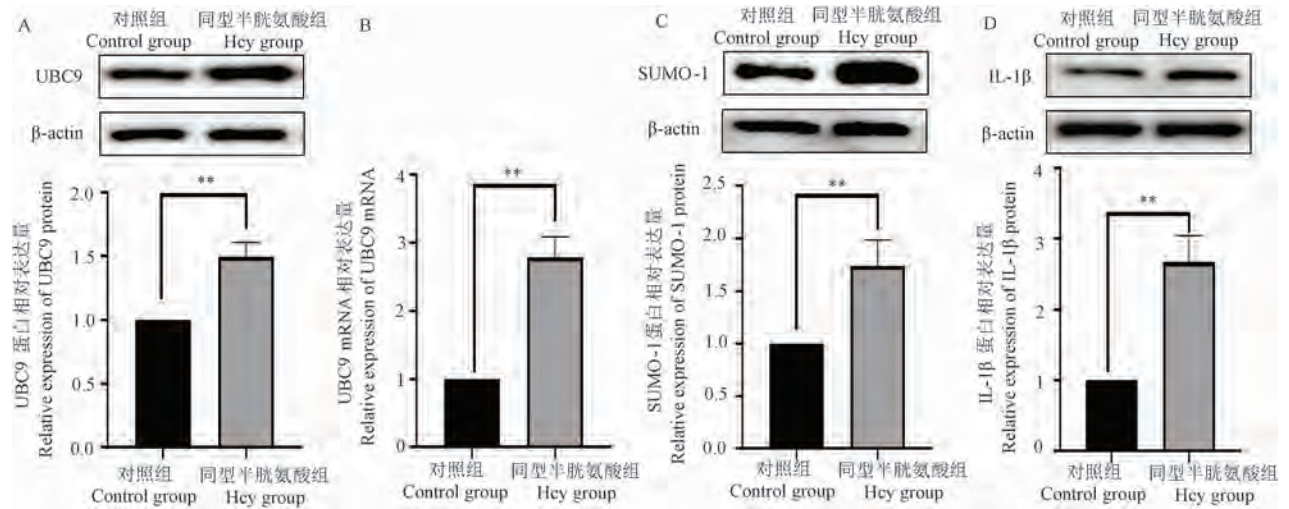


注:A:Hcy 干预后,细胞活力情况;B:Hcy 干预后,NLRP3 蛋白表达水平;C:Hcy 干预后,Caspase-1 蛋白表达水平。与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 1 Hcy 对巨噬细胞焦亡水平的影响

Note. A, Cell viability after Hcy intervention. B, Expression level of NLRP3 protein after Hcy intervention. C, Expression level of Caspase-1 protein after Hcy intervention. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 1 Effect of Hcy on the pyroptosis level of macrophages

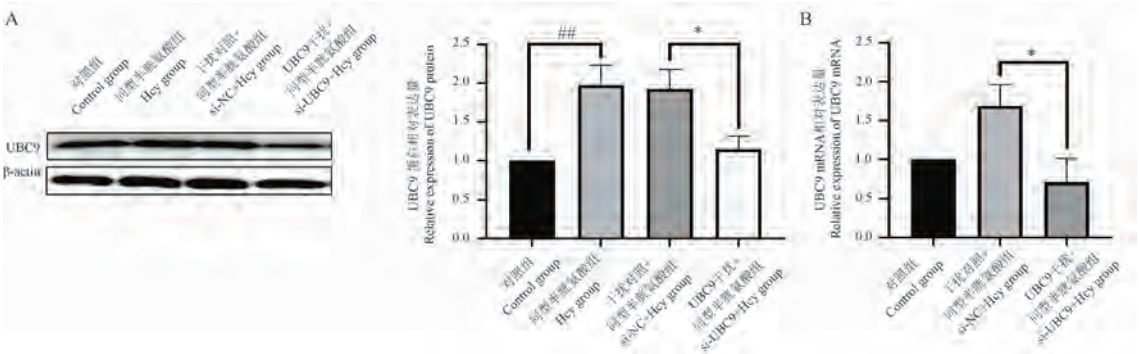


注:A:Hcy 干预后,UBC9 蛋白表达水平;B:Hcy 干预后,UBC9 mRNA 表达水平;C:Hcy 干预后;SUMO-1 蛋白表达水平;D:Hcy 干预后,IL-1 β 蛋白表达水平。与对照组比较, ** $P<0.01$ 。

图 2 UBC9、SUMO-1、IL-1 β 蛋白及 UBC9 mRNA 在 Hcy 干预巨噬细胞表达情况

Note. A, Expression level of UBC9 protein after Hcy intervention. B, Expression level of UBC9 mRNA after Hcy intervention. C, Expression level of SUMO-1 protein after Hcy intervention. D, Expression level of IL-1 β protein after Hcy intervention. Compared with Control group, ** $P<0.01$.

Figure 2 Expression of UBC9, SUMO-1, IL-1 β protein and UBC9 mRNA in macrophages interfered by Hcy

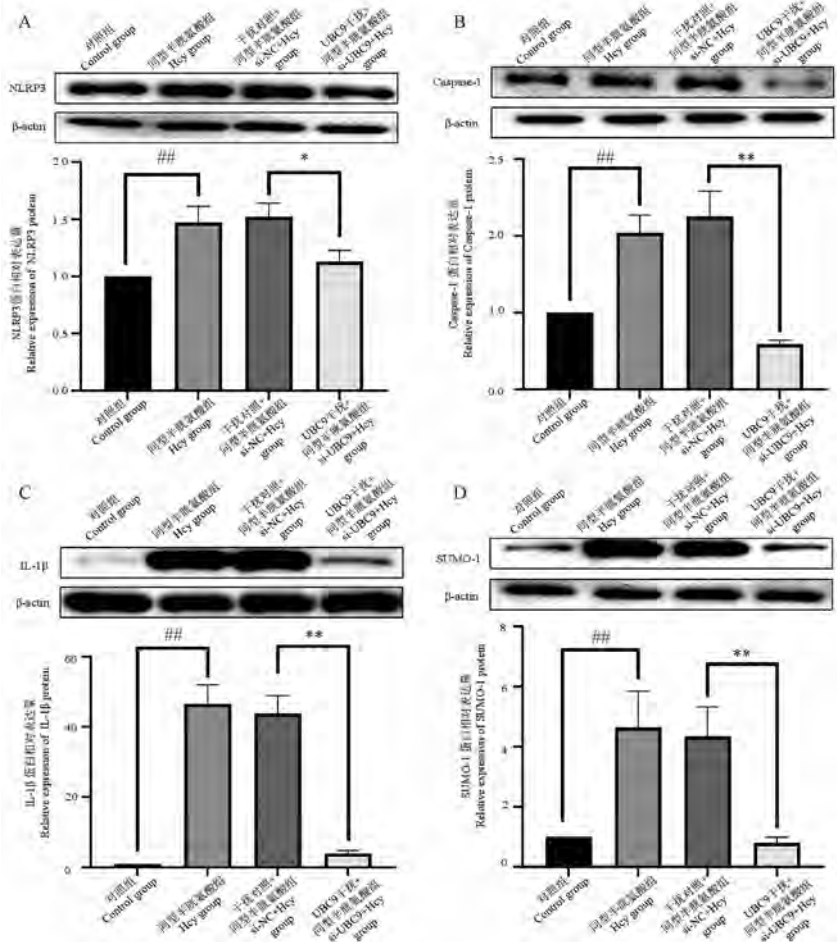


注:A:转染 si-UBC9 后,UBC9 蛋白表达水平;B:转染 si-UBC9 后,UBC9 mRNA 表达水平。与对照组比较, ^{##} $P<0.01$; 与干扰对照+同型半胱氨酸组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。

图 3 转染 si-UBC9 后的 mRNA 及蛋白表达水平

Note. A, Expression levels UBC9 transfected with si-UBC9. B, Expression levels ofUBC9 mRNA transfected with si-UBC9. Compared with Control group, ^{##} $P<0.01$. Compared with si-NC+Hcy group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.

Figure 3 After transfection of UBC9 interference,the levels of mRNA and protein expression .



注:A:干扰 UBC9 后,NLRP3 蛋白表达水平;B:干扰 UBC9 后,Caspase-1 蛋白表达水平;C:干扰 UBC9 后,IL-1 β 蛋白表达水平;D:干扰 UBC9 后,SUMO-1 蛋白表达水平。与对照组比较, ^{##} $P<0.01$; 与干扰对照+同型半胱氨酸组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。

图 4 转染 si-UBC9 后巨噬细胞焦亡及 SUMO 化的影响

Note. A, Expression levels NLRP3 transfected with si-UBC9. B, Expression levels of Caspase-1 transfected with si-UBC9. C, Expression levels IL-1 β transfected with si-UBC9. D, Expression levels of SUMO-1 transfected with si-UBC9. Compared with Control group, ^{##} $P<0.01$. Compared with si-NC+Hcy group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.

Figure 4 Effect of pyroptosis and SUMO in macrophages after transfection with si-UBC9

3 讨论

心血管疾病仍是全球死亡主要原因,导致严重的致死率和过高的疾病负担^[12]。由多种免疫细胞及因子参与的动脉粥样硬化是心血管疾病的重要病理生理基础^[13]。其中巨噬细胞是机体免疫系统的重要组成部分,在动脉粥样硬化发生发展过程中发挥着关键作用^[14-15]。HHcy 是 As 的独立危险因素,通过诱导免疫炎症反应、脂蛋白代谢障碍、氧化应激等方式参与 As 的病理生理发生过程^[16]。本研究拟探究同型半胱氨酸对巨噬细胞的功能影响,找到关键分子为临床 As 的治疗提供新的治疗靶点。

目前研究发现巨噬细胞程序性死亡模式,如细胞凋亡、焦亡、自噬、坏死性凋亡和铁死亡等,均在 As 中的存在,且之间相互联系共同影响 As 的发生发展^[17]。其中细胞焦亡是由半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 1 (Caspase-1) 介导的促炎性细胞死亡方式,近年来研究显示细胞焦亡与 As 的发生、发展、转归密切相关^[18]。如 Jiang 等^[19]研究发现在冠状动脉粥样硬化性心脏病患者的外周血中 Caspase-1 和 GSDMD 表达增高,并且诱导巨噬细胞焦亡促进炎症反应参与 As 的形成。Hcy 作为一种促炎和免疫刺激分子,在本课题组的既往研究中发现,Hcy 可以诱导胰岛 β 细胞及心肌细胞发生焦亡,促进炎症因子释放^[20-21]。于是本研究探索了 Hcy 对巨噬细胞焦亡的影响,结果显示,与 Control 组相比,不同浓度 Hcy 均可导致巨噬细胞中焦亡相关蛋白 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 的表达水平升高,其中 100 μ mol/L Hcy 干预细胞,细胞焦亡发生最为明显,且细胞活力较好。综上所述,Hcy 可以诱导巨噬细胞发生焦亡,促进炎症因子的释放,但是 Hcy 诱导巨噬细胞发生焦亡的机制目前尚不明确。

小分子泛素样修饰物 (small ubiquitin-related modifier, SUMO) 化修饰在真核细胞的代谢调控、基因表达、免疫应答等诸多生理病理过程中发挥作用^[22-24]。目前研究发现 UBC9 作为 SUMO 修饰过程中的 E2 结合酶,在肿瘤、心血管等疾病中具有调控作用^[25-26]。近年来研究发现 UBC9 介导的 SUMO 修饰及与动脉粥样硬化的发生发展密切相关,如 Kobayashi 等^[27]发现 UBC9 过表达会增强 COS-1 细胞中 ER α 介导的转录活性,促进动脉粥样硬化的发展;Yan 等^[28]发现食用鱼油激活 AMPK α 2 抑制细胞核以及血管平滑肌细胞中 SUMO 结合 E2 酶 UBC9

和 SUMO2/3 的转录拮抗动脉粥样硬化进展;另外 Velatooru 等^[29]发现黏着斑激酶 152 SUMO 化修饰通过 ROS 产生形成正反馈回路激活促炎信号通路参与动脉粥样硬化的进展。因此我们考虑 UBC9 介导的 SUMO 化修饰可能通过调控 Hcy 诱导的巨噬细胞焦亡促进炎症反应发生。结合研究结果,与 Control 组相比,UBC9、SUMO-1 蛋白在 Hcy 组中表达降低;抑制 UBC9 后,巨噬细胞焦亡相关蛋白 NLRP3、Caspase-1 表达降低,炎性因子 IL-1 β 表达降低, SUMO-1 蛋白也相应降低。证明了 Hcy 通过上调 UBC9 介导整体 SUMO 化修饰激活巨噬细胞焦亡。

综上所述,本研究发现 Hcy 通过上调 UBC9 介导整体 SUMO 化修饰激活巨噬细胞焦亡。为动脉粥样硬化的防治提供新的思路。但本研究只是研究了 UBC9 介导整体 SUMO 化修饰对巨噬细胞焦亡的调控,UBC9 如何调控巨噬细胞焦亡具体机制以及相结合的重要靶蛋白还不明确,需要进一步研究。

参考文献:

- [1] ROTH G A, MENSAH G A, JOHNSON C O, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990-2019: update from the GBD 2019 study [J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(25): 2982-3021.
- [2] GUIEU R, RUF J, MOTTOLA G. Hyperhomocysteinemia and cardiovascular diseases [J]. Ann Biol Clin, 2022, 80(1): 7-14.
- [3] YUAN D, CHU J, LIN H, et al. Mechanism of homocysteine-mediated endothelial injury and its consequences for atherosclerosis [J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 1109445.
- [4] EL HADRI K, SMITH R, DUPLUS E, et al. Inflammation, oxidative stress, senescence in atherosclerosis: thioredoxine-1 as an emerging therapeutic target [J]. Int J Mol Sci, 2021, 23(1): 77.
- [5] QIU Y, SHI Y N, ZHU N, et al. A lipid perspective on regulated pyroptosis [J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(8): 2333-2348.
- [6] LIU C, JIANG Z, PAN Z, et al. The function, regulation and mechanism of programmed cell death of macrophages in atherosclerosis [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 809516.
- [7] QIAO L, MA J, ZHANG Z, et al. Deficient chaperone-mediated autophagy promotes inflammation and atherosclerosis [J]. Circ Res, 2021, 129(12): 1141-1157.
- [8] XIAO H, ZHOU H, ZENG G, et al. SUMOylation targeting mitophagy in cardiovascular diseases [J]. J Mol Med, 2022, 100(11): 1511-1538.
- [9] SHENG Z, ZHU J, DENG Y N, et al. SUMOylation modification-mediated cell death [J]. Open Biol, 2021, 11

- (7): 210050.
- [10] YI J, WANG Y, LI Q, et al. Interaction between *Brucella melitensis* 16M and small ubiquitin-related modifier 1 and E2 conjugating enzyme 9 in mouse RAW_{264.7} macrophages [J]. J Vet Sci, 2019, 20(5): e54.
- [11] TOMASI M L, RAMANI K, RYOO M. Ubiquitin-conjugating enzyme 9 phosphorylation as a novel mechanism for potentiation of the inflammatory response [J]. Am J Pathol, 2016, 186(9): 2326–2336.
- [12] VADUGANATHAN M, MENSAH G A, TURCO J V, et al. The global burden of cardiovascular diseases and risk: a compass for future health [J]. J Am Coll Cardiol, 2022, 80(25): 2361–2371.
- [13] ABDOLMALEKI F, GHEIBI HAYAT S M, BIANCONI V, et al. Atherosclerosis and immunity: a perspective [J]. Trends Cardiovasc Med, 2019, 29(6): 363–371.
- [14] FENG X, CHEN W, NI X, et al. Metformin, macrophage dysfunction and atherosclerosis [J]. Front Immunol, 2021, 12: 682853.
- [15] FIDLER T P, XUE C, YALCINKAYA M, et al. The AIM2 inflammasome exacerbates atherosclerosis in clonal haematopoiesis [J]. Nature, 2021, 592(7853): 296–301.
- [16] GOSPODARCZYK A, MARCZEWSKI K, GOSPODARCZYK N, et al. Homocysteine and cardiovascular disease—a current review [J]. Wiad Lek, 2022, 75(11 pt 2): 2862–2866.
- [17] 张皓南, 任博文, 纪元浩, 等. 巨噬细胞程序性死亡在动脉粥样硬化中的研究进展 [J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(8): 43–49.
- ZHANG H N, REN B W, JI Y H, et al. Advance on the roles of programmed cell death of macrophages in atherosclerosis [J]. China J Mod Med, 2023, 33(8): 43–49.
- [18] 黄舒宁, 蔡宏文. 细胞焦亡与动脉粥样硬化关系进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 146–150.
- HUANG S N, CAI H W. Progression of research into the relationship between pyroptosis and atherosclerosis [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 146–150.
- [19] JIANG M, SUN X, LIU S, et al. Caspase-11-gasdermin D-mediated pyroptosis is involved in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 657486.
- [20] 董小艳, 刘达越, 徐灵博, 等. 脂肪酸结合蛋白 4 在同型半胱氨酸致大鼠心肌细胞焦亡中的作用 [J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(1): 33–38.
- DONG X Y, LIU D Y, XU L B, et al. Effect of fatty acid binding protein 4 in cardiomyocyte pyroptosis induced by homocysteine [J]. Med J Chin People's Liberation Army, 2022, 47(1): 33–38.
- [21] 揭育祯, 杨慧霞, 周瑜瑾, 等. TRPC6 DNA 甲基化在同型半胱氨酸致胰岛 β 细胞焦亡中的作用研究 [J]. 广东医学, 2022, 43(2): 162–168.
- JIE Y Z, YANG H X, ZHOU Y J, et al. The role of TRPC6 DNA methylation in homocysteine-induced pancreatic islet β -cell pyrolysis [J]. Guangdong Med J, 2022, 43(2): 162–168.
- [22] CHANG H M, YEH E T H. SUMO: from bench to bedside [J]. Physiol Rev, 2020, 100(4): 1599–1619.
- [23] XIAO J, SUN F, WANG Y N, et al. UBC9 deficiency enhances immunostimulatory macrophage activation and subsequent antitumor T cell response in prostate cancer [J]. J Clin Invest, 2023, 133(4): e158352.
- [24] 梁会娟, 任志芳, 刘伟, 等. 冬凌草甲素通过调控 UBC9 表达对肝星状细胞增殖、凋亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 98–104.
- LIANG H J, REN Z F, LIU W, et al. Effects of Oridonin on proliferation and apoptosis in hepatic stellate cells by regulating UBC9 [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 98–104.
- [25] CHEN Z, WANG S, LI H L, et al. FOSL1 promotes proneural-to-mesenchymal transition of glioblastoma stem cells via UBC9/CYLD/NF- κ B axis [J]. Mol Ther, 2022, 30(7): 2568–2583.
- [26] KUMAR R, SINGH A K, STAROKADOMSKYY P, et al. Cutting edge: hypoxia-induced Ubc9 promoter hypermethylation regulates IL-17 expression in ulcerative colitis [J]. J Immunol, 2021, 206(5): 936–940.
- [27] KOBAYASHI S, SHIBATA H, YOKOTA K, et al. FHL2, UBC9, and PIAS1 are novel estrogen receptor α -interacting proteins [J]. Endocr Res, 2004, 30(4): 617–621.
- [28] YAN C H, LIU H W, TIAN X X, et al. AMPK α 2 controls the anti-atherosclerotic effects of fish oils by modulating the SUMOylation of GPR120 [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 7721.
- [29] VELATOORU L R, ABE R J, IMANISHI M, et al. Disturbed flow-induced FAK K152 SUMOylation initiates the formation of pro-inflammation positive feedback loop by inducing reactive oxygen species production in endothelial cells [J]. Free Radic Biol Med, 2021, 177: 404–418.

[收稿日期] 2024-02-27

孔维姣, 晏乙月, 赵佩凯, 等. 慢性溃疡性结肠炎小鼠疾病活动度、组织病理及细胞因子动态变化分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(6): 18-27.

Kong WJ, Yan YY, Zhao PK, et al. Dynamic changes to disease activity, histopathology, and cytokines in mice with chronic ulcerative colitis [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 18-27.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.003

慢性溃疡性结肠炎小鼠疾病活动度、组织病理及细胞因子动态变化分析

孔维姣, 晏乙月, 赵佩凯, 毛晓健*, 王 亭*

(云南中医药大学中药学院暨云南省南药可持续利用研究重点实验室, 昆明 650500)

【摘要】 目的 分析慢性溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 小鼠疾病活动度、结肠炎症和组织病理及血清细胞因子水平的动态变化。**方法** 2.5% 葡聚糖硫酸钠 (诱导) + 饮用水 (缓解) 各 5 d 自由饮用为 1 个周期, 重复 3 个周期。记录疾病活动指数、结肠长度及组织病理损伤等, 检测结肠髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、血清和结肠 IL-1 β 等细胞因子含量。**结果** 在 3 个周期中, 小鼠疾病活动度和结肠长度缩短现象在诱导期加重、缓解期减轻。第 2 和 3 周期便血时间提前, 便血小鼠数量增多, 体重短暂低幅度降低后迅速回升。第 1 和 3 周期结肠组织病理损伤程度和 MPO 含量在诱导期升高、缓解期降低, 升降幅度低于 DAI 值变化幅度; 在第 2 周期缓解期升高。在诱导中, 脾指数、血清 IL-1 β 、IL-6 和 IL-17A 含量持续升高, 实验结束时均高于正常组; TNF- α 水平在诱导期升高、缓解期降低, IL-10 变化趋势与 TNF- α 相似; TGF- β 含量先升高后降低, 第 3 周期结束后高于正常组。结肠 IL-6、IL-1 β 和 IL-17A 的含量呈现相似的先升高后降低趋势; TNF- α 含量无明显变化; IL-10 含量在诱导期降低、缓解期升高。**结论** 在慢性 UC 诱导过程中, 小鼠便血症状和全身性炎症反应逐渐加重, 在死亡率、体重和结肠组织病理学损伤表现出逐渐增强的耐受力 and 恢复能力, 结肠组织病理学损伤的发生和缓解滞后于症状变化, 结肠炎症逐渐转变为以 PMN 活化为主的模式。

【关键词】 溃疡性结肠炎; 慢性模型; 葡聚糖硫酸钠; 细胞因子; 中性粒细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0018-10

Dynamic changes to disease activity, histopathology, and cytokines in mice with chronic ulcerative colitis

KONG Weijiao, YAN Yiyue, ZHAO Peikai, MAO Xiaojian*, WANG Ting*

(College of Chinese Materia Medica and Yunnan Key Laboratory of Southern Medicinal Utilization, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

【Abstract】 Objective To analyze the dynamic changes to disease activity, colonic inflammation, histopathology, and serum cytokine levels in mice with chronic ulcerative colitis (UC). **Methods** For UC induction, 2.5% dextran sodium sulfate solution was provided ad libitum for 5 days, and to model remission, tap water was supplied for another 5

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (82360810, 81960750, 81760745); 云南省科技厅-云南中医药大学应用基础研究联合专项重点项目 (202001AZ070001-004); 云南省科技人才和平台计划 (202305AC160039, 202105AG070012); 云南 (昆明) 杨国源专家工作站 (YSZJGZZ-2020037); 云南省王源超专家工作站 (202305AF150018)。

【作者简介】 孔维姣 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药质量控制与评价。E-mail: 1926696366@qq.com

【通信作者】 毛晓健 (1967—), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 临床中药学, 中药药理学。E-mail: 1224346204@qq.com

王亭 (1985—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 中药、民族药抗炎免疫药理学。E-mail: wangt662@hotmail.com * 共同通信作者

days in one induction cycle. Disease activity index (DAI), colon length, and pathological changes to colon tissue were determined. The levels of myeloperoxidase (MPO) in colon tissue and of cytokines such as IL-1 β in serum and colon were detected. **Results** During the three cycles, disease activity was aggravated and colon length shortened in mice during the induction periods, both of which were relieved during the remission periods. The blood appeared was observed in the stool was earlier in cycles 2 and 3. The number of mice with stool blood increased, and their body weight decreased by a small amount briefly, then recovered rapidly. The degree of histopathological damage to the colon and MPO content in cycles 1 and 3 increased in the induction periods and decreased in the remission periods, with the magnitude of change smaller than that of the change in DAI values; and they increased in the remission period of cycle 2. During induction, the spleen index and serum levels of IL-1 β , IL-6, and IL-17A increased continuously and were higher than those in the control group at the end of the experiment. Levels of TNF- α were increased in the induction periods and decreased in the remission periods, and the trend in IL-10 change was similar to that of TNF- α . TGF- β content increased and then decreased and was higher than that in the control group at the end of cycle 3. The colon contents of IL-1 β , IL-6, and IL-17A showed similar trends of increasing and then decreasing, but there was no significant change in colon TNF- α . The concentration of IL-10 decreased during the induction periods and increased during the remission periods. **Conclusions** During the induction of chronic UC in mice, the symptoms of hematochezia and systemic inflammatory reactions gradually increased, and the mice showed an increase in tolerance and ability to resist mortality, weight loss, and histopathological injury to the colon. The onset and remission of colonic histopathological damage lags behind symptomatic changes, and there is a gradual shift in colonic inflammation to a pattern dominated by polymorphonuclear neutrophils (PMN) activation.

[Keywords] ulcerative colitis; chronic model; dextran sulfate sodium; cytokines; neutrophil

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

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种病因不明的慢性非特异性肠道炎症性疾病, 病变主要涉及直肠、结肠黏膜和黏膜下层, 以腹痛、腹泻、里急后重、便下黏液脓血等症状为主要临床表现。UC 的病因和发病机制尚未明确, 大多研究认为可能与遗传易感性、环境因素、肠道黏膜免疫紊乱及肠道菌群失调有关^[1-2]。UC 反复发作、迁延不愈, 药物治疗仍以诱导和维持缓解为主, 因此, 治疗效果监测和复发预测是影响临床决策和疾病长期结果的关键。目前 UC 治疗效果和复发风险多通过临床检查、内镜检查、实验室检查等手段进行综合评估^[3]。近年来, 大量临床观察发现, 结肠组织学特征与临床和内镜检查结果相比, 与 UC 的炎症活动度和复发风险有更高相关度, 且有研究者主张将组织学评估纳入临床决策的依据^[4]。此外, 炎性因子、自身抗体、酶类等血清和粪便潜在生物标志物检测则因非侵入性优势受到大量关注^[3]。然而, 上述新颖的指标与 UC 临床症状、内镜下黏膜状态的动态关联以及与疾病长期结果的关系, 仍有待深入研究。本实验在小鼠采用周期饮用葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 溶液模拟 UC 发作-缓解交替的过程, 在慢性 UC 的自然进程中, 观察和分析不同时间点小鼠疾病活动度、结肠炎症和组织病理、结肠和血清促炎/抗炎细胞因子水平的动态变化和关联。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 102 只, 6~8 周龄, (22 $\pm$ 2) g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司 [SCXK(京)2019-0010]。所有动物分笼饲养于云南中医药大学实验动物中心动物房 [SYXK(滇)K2022-0004], 每天光照 12 h, 相对湿度 45%~55%, 环境温度 20~25 $^{\circ}$ C, 自由摄食、饮水。实验条件和方法经云南中医药大学动物实验中心伦理委员会审查合格 (R-062022064), 实验过程中对动物遵循 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

DSS, M. W. = 36000-50000 (MP Biomedicals 公司, 批号: 160110); 通用型组织固定液 (Biosharp, 批号: BL539A); 小鼠 MPO ELISA 试剂盒 (MULTISCIENCES, 批号: A213330351); 白细胞介素 (IL)-6 (批号: MM-0163M1)、IL-1 β (批号: MM-0040M1)、IL-10 (批号: MM-0176M1)、IL-17A (批号: MM-0759M1)、肿瘤坏死因子 (TNF)- α (批号: MM-0132M1) 和转化生长因子 (TGF)- β (批号: MM-0689M1) ELISA 试剂盒购自酶免生物科技有限公司。高速低温组织研磨仪 (Servicebio, KZ-III-F); 可调式混匀仪 (SCLOGEX, SCI-VS(MX-S)); 恒温振荡仪 (常州国华电器有限公司, THZ-82A); 酶标仪

(Tecan, SPARK10M); 掌上离心机 (Servicebio, D1008E); 玻片扫描影像系统 (深圳市生强科技有限公司, SQS-1000); 超低温冰箱 (赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 DSS 诱导小鼠慢性 UC 模型

2.5% DSS 溶液+饮用水各 5 d 交替自由饮用法复制慢性 UC 模型。C57BL/6J 雄性小鼠共 102 只, 适应性喂养 1 周, 禁食 12 h 不禁水后, 将其随机分为 d0、d10、d20 和 d30 正常组, 对应取材时间为第 0、10、20 和 30 天, 每组 6 只; d5、d10、d15、d20、d25 和 d30 模型组, 对应取材时间为第 5、10、15、20、25 和 30 天, 每组 13 只。实验开始当天记为第 0 天。自第 0 天开始, 正常组给予纯水, 模型组按周期给予纯水或 2.5% DSS 溶液。动物分组、造模周期及取材时间见图 1。



图 1 动物分组、造模周期及取材时间

Figure 1 Animal grouping, modeling cycle and sampling time

表 1 DAI 评分
Table 1 DAI scoring

评分 Score	体重下降/% Body weight loss	大便性状 Feces status	便血情况 Bloody stools
0	/	正常 Normal	阴性 Negative
1	1~5	稀便(±) Loose stools (±)	阳性(±) Positive (±)
2	5~10	稀便(+) Loose stools (+)	阳性(+) Positive (+)
3	10~15	粘液便 Mucous stool	阳性(++) Positive (++)
4	>15	水样便 Watery stool	肉眼便血(>++) Hematochezia with naked eyes (>++)

注:大便性状(±表示稀便所含水分较少,+表示稀便含较多水分);便血情况(±表示隐约可见便血,+表示有可见血迹,++表示血量较多,>++表示大量便血)。
Note. Feces status (“±” indicates that loose stool contains less water, “+” indicates that loose stool contains more water). Bloody stools (“±” indicating faint blood in stool, “+” indicating visible blood, “++” indicating more blood, “>++” indicating a large amount of blood in the stool).

1.3.2 小鼠一般情况观察及 DAI 评分

实验期间,每日观察并记录小鼠体重、食量、毛色、精神状态及粪便情况,根据 DAI 评分表(表 1)对小鼠体重、大便性状和便血进行评分。DAI=(体重下降分数+大便性状分数+便血情况分数)/3。

1.3.3 血液及组织样本采集

分别于实验的第 0 天、第 5 天、第 10 天、第 15 天、第 20 天、第 25 天和第 30 天,观察小鼠一般情况 2 h 后,眼眶采血于 EP 管中,常温静置约 1 h,于 4 ℃、3000 r/min 离心 15 min,收集上层血清,分装,-80 ℃冰箱保存备用。后用脱颈椎法处死小鼠,打开腹腔,收集从肛门至盲肠的整段盲结直肠,放在坐标纸上读取并记录结肠长度;剪取近肛门端无肠内容物处 0.5~1 cm 的结肠组织,固定于 4%多聚甲醛溶液;除去盲肠,将剩余结肠组织沿肠中轴线轻轻剖开后,在预冷的生理盐水中将肠内容物漂洗干净,用滤纸吸收表面水分后转移至-80 ℃冰箱冻存;随后摘取小鼠肝、脾、肾,分别称重记录,以脏器与体重的比值作为脏器指数。

1.3.4 结肠病理组织切片制作及评分

4%多聚甲醛固定完全后,常规取材、脱水、包埋、切片、HE 染色。镜下观察切片中结肠黏膜损伤情况并按结肠病理组织切片评分表(表 2)做出评分。

1.3.5 结肠组织中炎症因子水平检测

用酶联免疫吸附(ELISA)法检测各模型组小鼠结肠组织中 MPO 含量及血清和结肠组织中 IL-6、IL-1β、IL-10、IL-17A、TNF-α 和 TGF-β 水平。

1.4 统计学方法

实验数据采用 SPSS 25.0 进行分析处理,以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。 t 检验用于两组间比较,单因素方差分析(ANOVA)用于多组间比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠慢性 UC 诱导情况

2.1.1 小鼠死亡情况

在实验第 1 周期, d10 模型组小鼠于第 7 和 9 天各死亡 1 只, d30 模型组小鼠于第 10 天死亡 1 只, 至实验第 2 周期, d20 模型组于第 16 天死亡 1 只, 第 3 周期无小鼠死亡。

2.1.2 小鼠体重变化

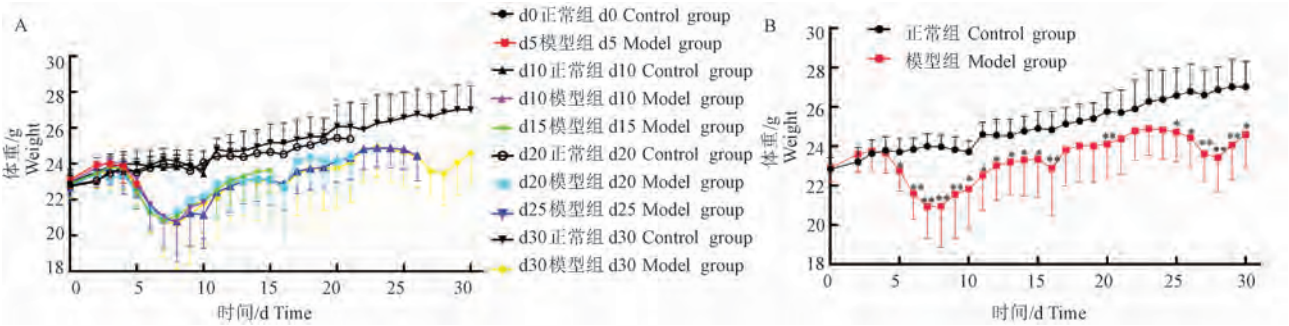
在实验的第 1 周期, 给予 DSS 5 d 后, 模型组小鼠的体重开始迅速下降, 并显著低于正常组 ($P<0.001$)。模型组小鼠体重于第 7 天降至最低, 之后逐渐回升; 在第 2 周期, 模型组小鼠的体重仅在第 16 天短暂下降后恢复缓慢增长; 在第 3 周期, 小鼠体重从第 24 天开始缓慢下降, 至第 28 天降至最低值, 之后逐渐回升, 但仍显著低于正常组小鼠的体重 ($P<0.05$, 图 2)。

2.1.3 DAI 评分

根据小鼠体重减轻、大便性状和便血情况进行 DAI 评分。由图 3 可见, 自第 2 天开始至实验结束, 模型组小鼠 DAI 评分显著高于正常组 ($P<0.01$)。在 3 个诱导周期中, 模型组 DAI 评分均在给予 DSS 溶液后的第 5 天(第 5 天, 第 15 天, 第 25 天)达到最高, 后逐渐降低, 至更换为饮用水后 5 d(第 10 天, 第 20 天, 第 30 天)后降至最低(图 3A), 3 个周期平均降低比例为 70%; 且 d5、d15 和 d25 模型组小鼠 DAI 主要由大便性状和便血情况评分构成, 约为 2~3 分, 体重下降占比较小, 随着时间的推移, 体重下降减少, d10、d20 和 d30 模型组小鼠 DAI 主要由大便性状评分构成, 约为 1~2 分, 便血和体重下降仅为偶见(图 3B)。另外, 随着模型的进展, 在 3 个周期中, 小鼠出现便血的数量呈上升趋势, 在第 1 周期, 小鼠在第 4~7 天出现便血, 第 5 天数量最多(8 只), 在第 2 周期, 小鼠在第 12~18 天出现便血, 第 15 天数量

表 2 结肠组织病理评分
Table 2 Histological grading of colitis

评分 Score	炎症程度 Extent of inflammation	隐窝损伤 Crypt damage	炎症深度 Inflammation depth	炎症浸润面积 Inflammatory infiltration area	病变深度(非炎症) Depth of lesion (non-inflammatory)
0	无 None	无 None	无 None	0	无 None
1	浅显炎症 Slight inflammation	少量隐窝变形 Low crypt deformation	黏膜层 Mucosal layer	0~10%	黏膜层 Mucosal layer
2	轻微溃疡 Minor ulcer	中等水平隐窝变形 Medium crypt deformation	黏膜下层 Submucous laye	11%~25%	黏膜下层 Submucous layer
3	明显溃疡 Obvious ulcer	高水平隐窝变形 High crypt deformation	肌层 Muscular layer	26%~50%	肌层及浆膜层 Muscular layer and serosa layer
4	/	明显隐窝缺失 Entire crypt and epithelium lost	/	51%~100%	/



注: A: 不同时间点各组小鼠体重变化; B: 正常组和模型组小鼠体重整体变化情况。与 d0 正常组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Figure 2 小鼠体重变化 ($\bar{x}\pm s, n=18\sim70$)
Note. A, Weight changes of mice in different time points. B, Overall changes of body weight in Control group and Model group. Compared with d0 Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

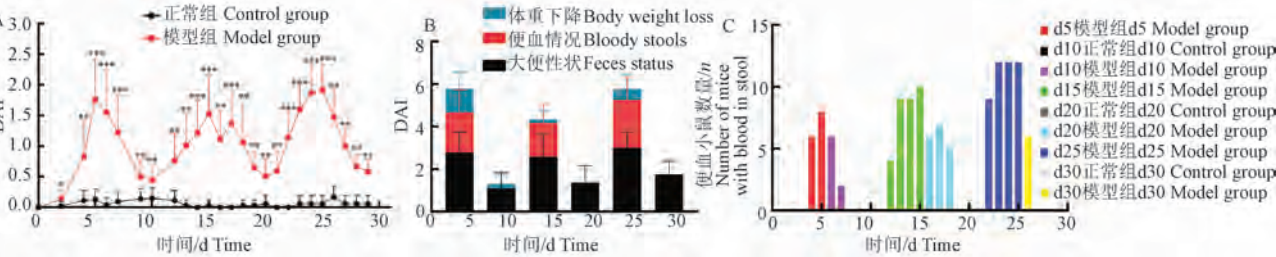
Figure 2 Body weights change of mice

最多(10 只),在第 3 周期,小鼠在第 22~26 天出现便血,第 23~25 天数量最多(12 只)(图 3C)。

2.1.4 各组小鼠结肠长度变化

随着实验的进行,正常小鼠的结肠长度有缓慢增长趋势,但直至第 30 天,与 d0 正常组相比,仍无显著性差异(图 4);在 3 个诱导周期,小鼠结肠长度变化均表现为,给予 DSS 溶液后缩短(第 5 天,第 15 天,第 25 天),更换为饮用水后一定程度恢复(第 10

天,第 20 天,第 30 天),但始终较正常组短。
2.1.5 小鼠脏器指数
从脏器指数看,各时间点正常小鼠的脏器指数无显著性差异(图 5A、5C、5E);给予 DSS 后,小鼠肝指数(第 10 天,第 15 天,第 20 天和第 25 天)、脾指数(第 15 天,第 20 天和第 25 天)和肾指数(第 15 天,第 20 天)显著升高($P<0.05$,图 5B、5D、5F),且随着造模时间的延长,脾指数持续上升(图 5D)。

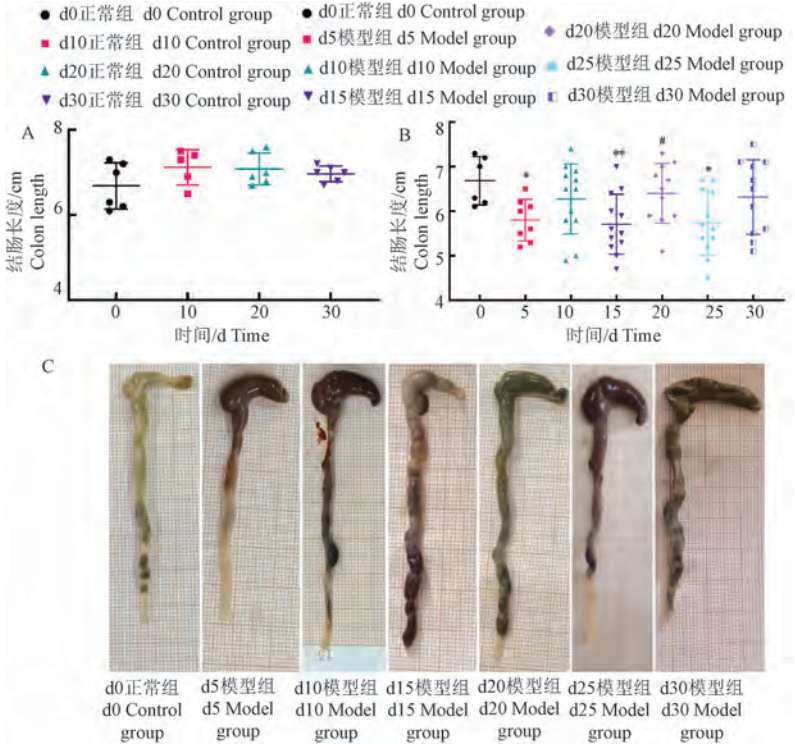


注:A:DAI 评分;B:构成 DAI 评分的体重下降、大便性状及便血情况评分;C:便血小鼠数量。与 d0 正常组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 3 DAI 评分($\bar{x}\pm s, n=18\sim70$)

Note. A, DAI scoring. B, Body weight loss, feces status and bloody stools which constitute DAI score. C, Number of mice with blood in stool. Compared with d0 Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 3 DAI scoring



注:A:各正常组结肠长度;B:各模型组结肠长度;C:各模型组结肠代表图。与 d0 正常组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 d15 模型组相比, # $P<0.05$ 。

图 4 小鼠结肠长度($\bar{x}\pm s, n=6\sim12$)

Note. A, Colon lengths of control groups. B, Colon lengths of model groups. C, Representative images of colonic and colonic segments in each model group. Compared with d0 Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with d15 Model group, # $P<0.05$.

Figure 4 Colon lengths of mice

2.2 小鼠结肠组织病理学变化

组织病理学观察发现,正常小鼠结肠组织未见明显病理改变。在第 1 周期接受 DSS 刺激后,结肠黏膜固有层可见大量炎性细胞和淋巴细胞浸润,伴有结缔组织增生,黏膜上皮形态结构尚存(第 5 天),更换为饮用水后,上述病理损伤有减轻趋势(第 10 天与第 5 天相比)。在第 2 周期,给予 DSS 溶液和饮用水期间,病理损伤无明显变化。在第 3 周期,病理损伤在接受 DSS 刺激后明显加重,炎性细胞逐渐浸润直至黏膜下层,黏膜层小灶性溃疡,黏膜上皮及肠腺结构消失(第 25 天与第 20 天相比),更换为饮用水后,上述病理损伤显著减轻($P<0.05$,第 30 天与第 25 天相比)(图 6A~6C)。3 个周期中,更换为饮用水后 5 d,组织病理学评分平均降低比例约为 16%。

2.3 小鼠结肠组织 MPO 含量变化

在第 1 周期,给予 DSS 后,小鼠结肠组织 MPO 含量显著升高($P<0.01$,第 5 天与第 0 天相比),更换为饮用水后呈现降低趋势,但仍高于正常小鼠($P<0.05$,第 10 天与第 0 天相比);在第 2 周期,给予 DSS 后,MPO 含量继续降低,更换为饮用水后无明显变化。在第 3 周期,给予 DSS 后,MPO 含量显著

升高($P<0.05$,第 25 天与第 20 天相比),更换为饮用水后有降低趋势但仍高于正常小鼠($P<0.05$,第 30 天与第 0 天相比)(图 7)。

2.4 小鼠血清中细胞因子变化

本实验观察了各时间点模型组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、IL-17A、TNF- α 、IL-10 和 TGF- β 水平变化。在第 1 周期,IL-1 β (图 8A)含量呈下降趋势,并在第 10 天降至最低后持续升高至第 30 天显著高于正常组($P<0.05$,第 30 天与第 0 天相比)。血清中 IL-6(图 8B)和 IL-17A(图 8C)含量随实验的进展逐渐升高,d20、d25 和 d30 模型组显著高于正常组($P<0.05$,第 20 天、第 25 天、第 30 天与第 0 天相比)。在 3 个诱导周期中,给予 DSS 溶液 5 d 后,血清中 TNF- α (图 8D)含量均显著高于正常组($P<0.05$,第 5 天、第 15 天、第 25 天与第 0 天相比),更换为饮用水后有下降趋势,至实验结束仍显著高于正常小鼠($P<0.05$,第 30 天与第 0 天相比)。IL-10(图 8E)含量在第 1 周期给予 DSS 5 d 后显著下降($P<0.05$,第 5 天与第 0 天相比),更换为饮用水 5 d 后显著低于正常组($P<0.05$,第 10 天与第 0 天相比);在第 2 和第 3 周期,DSS 诱导后升高,更换为饮用水后降低。TGF- β (图 8F)含量从实验开始至第 15 天缓慢上

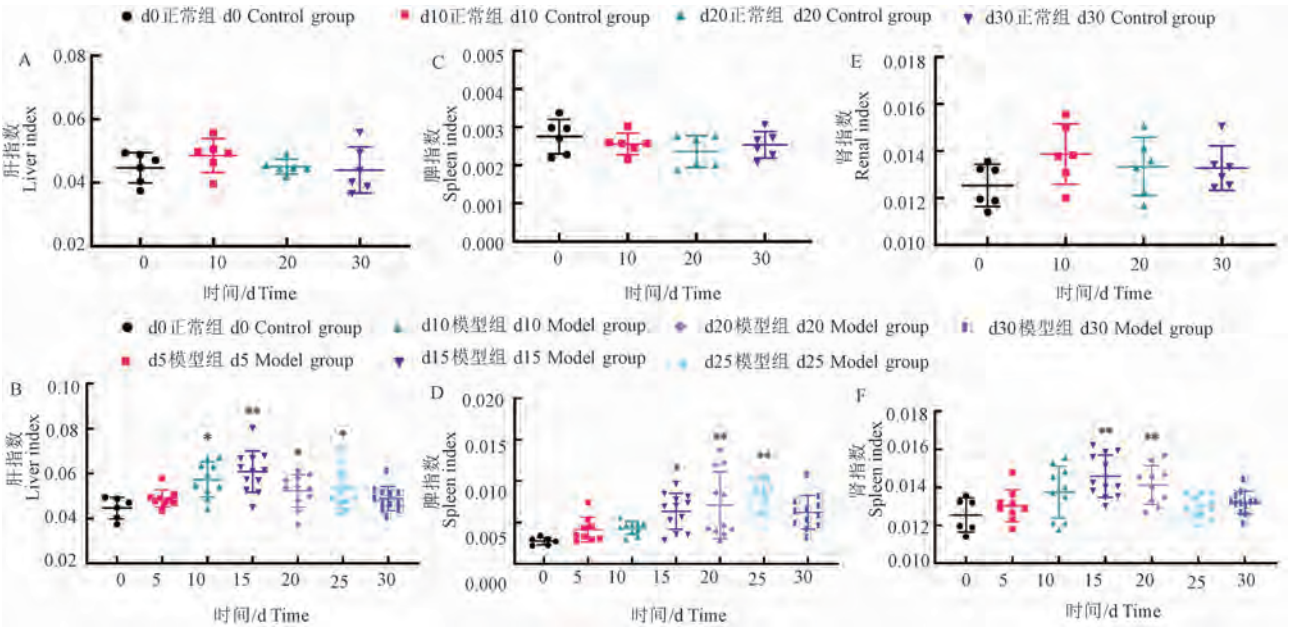
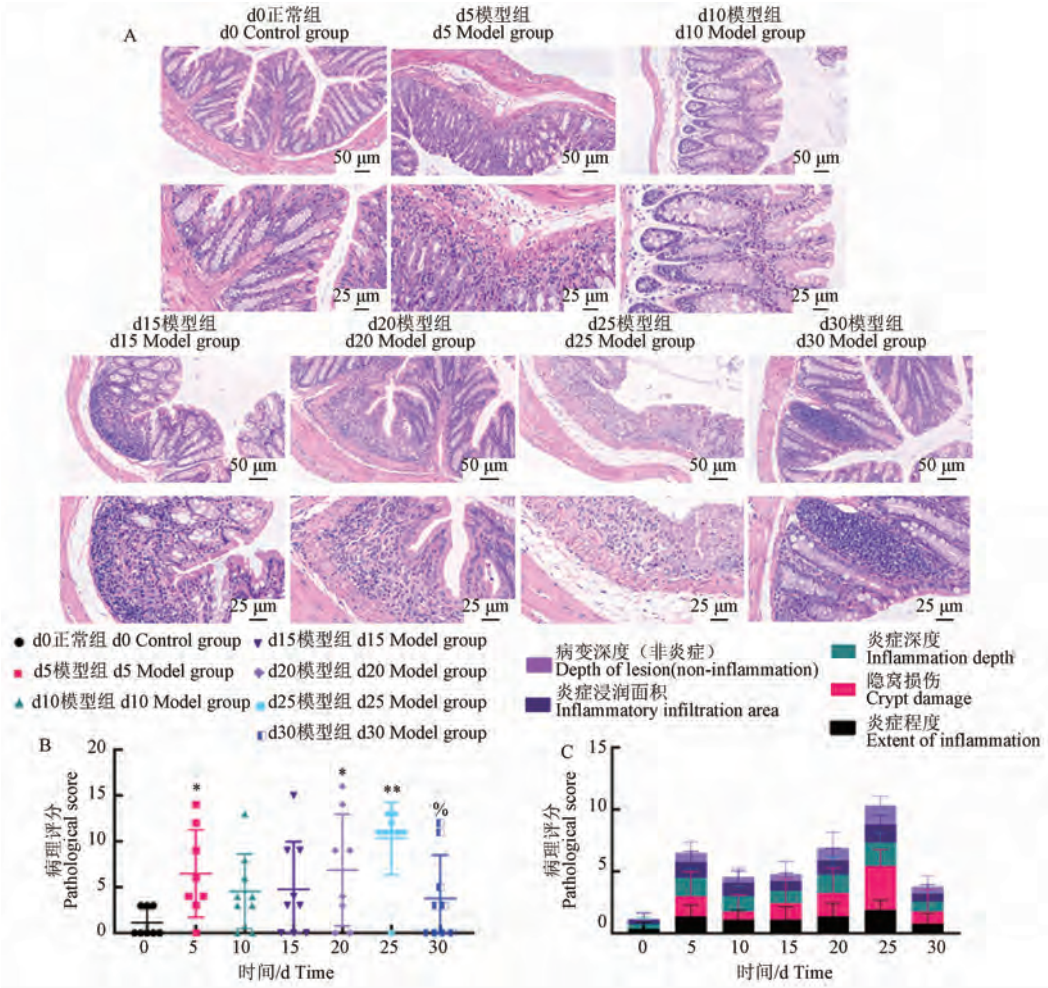


图 5 小鼠脏器指数对比($\bar{x}\pm s,n=6\sim12$)

Note. A, Liver index of control groups. B, liver index of model groups. C, Spleen index of control groups. D, Spleen index of model groups. E, Renal index of control groups. F, Renal index of model groups. Compared with d0 Control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 5 Comparison of organ indexes in mice



注:A:小鼠结肠组织切片 HE 染色代表图;B~C:小鼠结肠组织病理评分。与 d0 正常组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 d25 模型组相比, # $P<0.05$ 。

图 6 小鼠结肠组织病理学变化 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

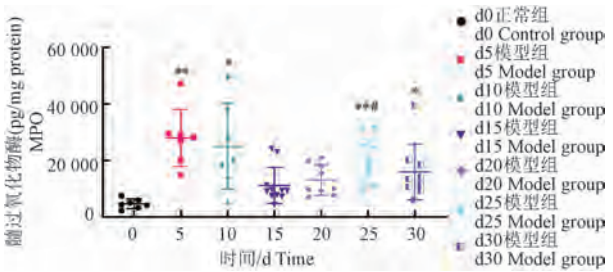
Note. A, Representative images of hematoxylin and eosin (HE) staining in the colon tissues. B~C, Histological score. Compared with d0 Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with d25 Model group, # $P<0.05$.

Figure 6 Histological changes in the colon tissues in mice

升,在第 2 周期更换为饮用水后有下降趋势,在第 3 周期缓慢升高至第 30 天显著高于正常组 ($P<0.01$)。

2.5 小鼠结肠组织中细胞因子变化

在 3 个诱导周期,小鼠结肠中 TNF- α 水平无显著变化(数据未显示)。在第 1 周期,IL-1 β 在更换为饮用水后显著升高 ($P<0.05$,图 9A,第 10 天与第 5 天相比);在第 2 周期,DSS 诱导后,IL-1 β 水平显著下降 ($P<0.01$,第 15 天与第 10 天相比),更换为饮用水后无明显变化;在第 3 周期,IL-1 β 水平逐渐升高,至实验结束与正常组比无显著差异。IL-6(图 9B)水平在 DSS 刺激 5 d 后显著升高 ($P<0.05$,第 5 天与第 0 天相比),此后呈下降趋势,至第 20 天至最

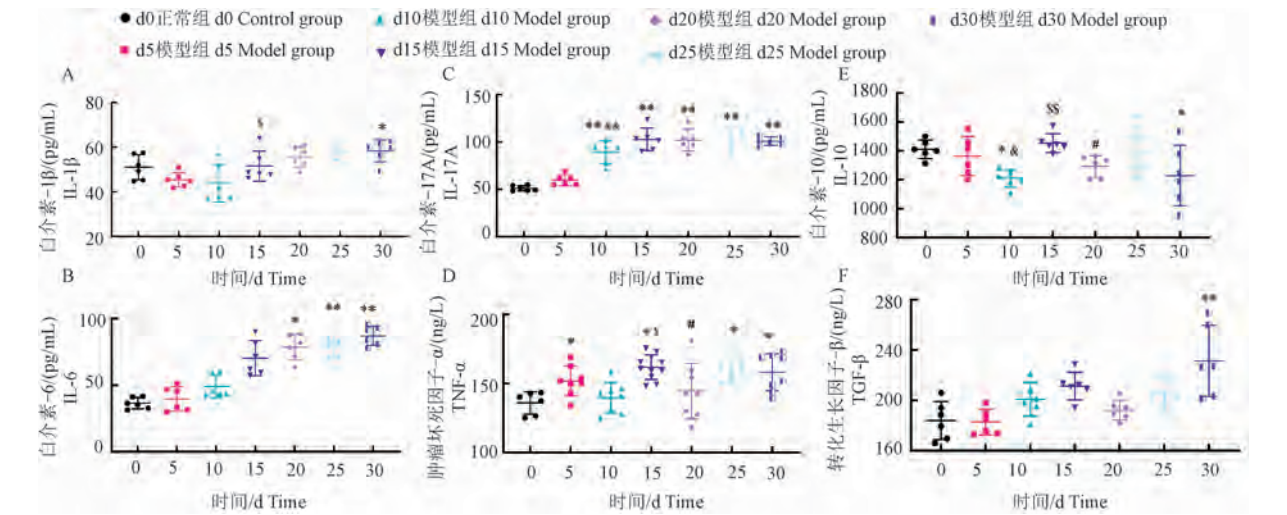


注:与 d0 正常组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 d20 模型组相比, # $P<0.05$ 。

图 7 小鼠结肠组织 MPO 含量变化 ($\bar{x}\pm s, n=7\sim 12$)

Note. Compared with d0 Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with d20 Model group, # $P<0.05$.

Figure 7 Changes of MPO content in colon tissue of mice

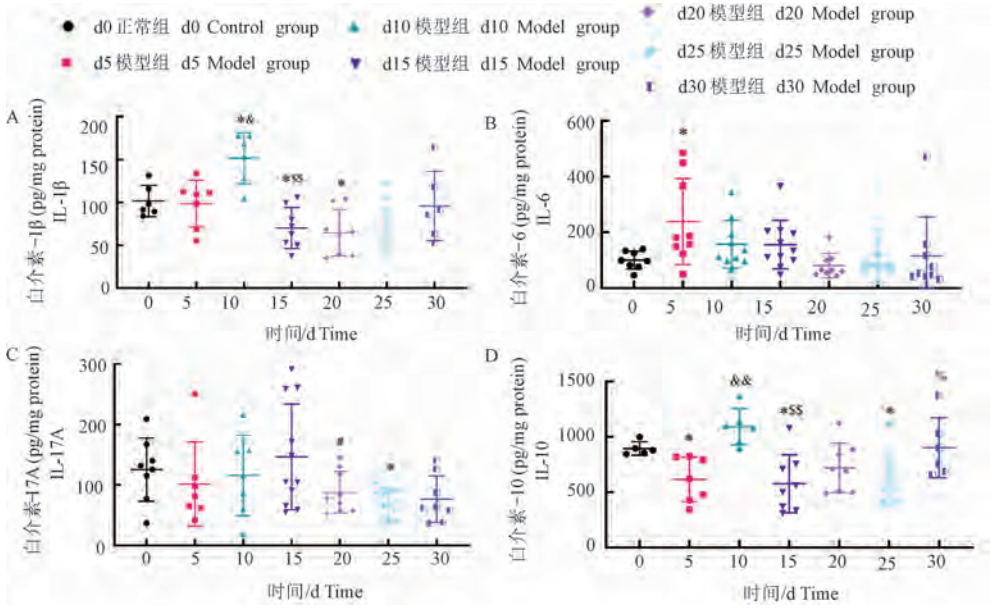


注:与 d0 正常组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 d5 模型组相比, & $P<0.05$, && $P<0.01$;与 d10 模型组相比, \$ $P<0.05$, \$\$ $P<0.01$;与 d15 模型组相比, # $P<0.05$ 。

图 8 小鼠血清中细胞因子水平 ($\bar{x}\pm s, n=6\sim10$)

Note. Compared with d0 Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with d5 Model group, & $P<0.05$, && $P<0.01$. Compared with d10 Model group, \$ $P<0.05$, \$\$ $P<0.01$. Compared with d15 Model group, # $P<0.05$.

Figure 8 Levels of inflammatory cytokines in serum in mice



注:与 d0 正常组相比, * $P<0.05$;与 d5 模型组相比, & $P<0.05$, && $P<0.01$;与 d10 模型组相比, \$\$ $P<0.01$;与 d15 模型组相比, # $P<0.05$;与 d25 模型组相比, % $P<0.05$ 。

图 9 小鼠结肠组织中细胞因子水平 ($\bar{x}\pm s, n=6\sim10$)

Note. Compared with d0 Control group, * $P<0.05$. Compared with d5 Model group, & $P<0.05$, && $P<0.01$. Compared with d10 Model group, \$\$ $P<0.01$. Compared with d15 Model group, # $P<0.05$. Compared with d25 Model group, % $P<0.05$.

Figure 9 Levels of inflammatory cytokines in colon tissue in mice

低,在第 3 周期无明显变化。IL-17A(图 9C)水平在实验前 2 个周期至第 15 天有上升趋势;自第 2 周期更换为饮用水后逐渐下降,至第 25 天显著低于正常组($P<0.05$,第 25 天与第 0 天相比)。在 3 个诱导周期,IL-10(图 9D)含量表现出诱导期降低、恢复期升高,d5、d15、d25 模型组显著低于正常组($P<0.05$,第 5 天、第 15 天、第 25 天与第 0 天相比),至实验结束与正常组无显著差异。

3 讨论

DSS 诱导法因简单可控、重复性好且诱导出的模型与人类 UC 高度相似等优势而被广泛使用^[5-6]。DSS 的剂量和应用周期可根据诱导目的调节。通常慢性 UC 模型诱导以 1%~3% DSS 溶液灌胃或自由饮用,连续 5~7 d 后改为饮用水继续喂养 5~14 d,重复 3~5 周期即可形成慢性结肠炎。本实验室前期研究表明,建立急性 UC 模型,DSS 自由饮用造模法优于灌胃法^[7]。在预实验中,选用“5 d DSS 溶液+5~7 d 饮用水”为 1 个周期,循环 3 个周期诱导慢性 UC,DSS 溶液自由饮用为诱导期,更换为饮用水后为恢复期,发现若恢复期过长,下一个周期则更不容易诱导出相应症状。因此,本实验结合文献报道^[8]将诱导方案确定为,2.5% DSS 溶液自由饮用 5 d,更换为纯水喂养 5 d,重复 3 个周期。

在诱导过程中,小鼠在诱导期出现明显体重下降、腹泻和便血现象,进入恢复期后体重逐渐回升,腹泻减轻,便血频率逐渐减少至偶见。同时,结肠长度缩短现象也表现为诱导期加重、缓解期减轻。在第 2 周期,小鼠疾病活动度(以 DAI 值示)低于第 1 周期相应时间点,且死亡率降低,推测可能与小鼠对 DSS 产生了一定耐受能力有关。在第 3 周期,小鼠症状加重且进展更快。构成 DAI 评分的大便性状评分在 3 个周期较接近,且缓解期结束仍未完全恢复;但小鼠在诱导期出现便血的时间逐渐提前,便血小鼠数量逐渐增多。值得注意的是,在第 2 和 3 周期,小鼠体重降低评分在 DAI 评分中所占比重均小于第 1 周期,在体重绝对值上,呈现低幅度一过性降低后迅速回升,提示随着诱导的进展,尽管便血症状加重更快,但小鼠体重变化对诱导的耐受力 and 恢复能力逐渐增强,与逐渐降低的死亡率和结肠组织病理损伤变化规律相一致。

UC 小鼠结肠组织病理损伤程度在第 1 周期诱导期升高、缓解期降低;在第 2 周期诱导期无显著变化、缓解期升高;在第 3 周期诱导期尽管达到最高,但在缓解期迅速恢复至最低,表现出对 DSS 诱导的明显耐受和逐渐增强的恢复能力。与大便性状和便血情况相比,结肠组织病理损伤表现在时间上滞后,在变化幅度上小于后者,提示在慢性 UC 状态,组织学缓解相对滞后于症状变化,而据临床观察,临床缓解且内镜缓解的患者,仍有近 40% 显示轻度到中度活动性,且持续的组织学活动与较高的复发

率有关^[4],因此,尽管尚未达成共识^[9],在治疗目标确定和疾病复发预测时,仍应重视组织学缓解。随着模型的进展,在组织病理损伤中,加重趋势最为明显的是隐窝损伤,且隐窝损伤评分在组织病理学评分中所占比重不断增大,提示持续的隐窝结构损伤可能是组织学未缓解的重要表现。隐窝结构改变及存在于上皮和隐窝腔内的中性粒细胞(PMN)增多能有效预测临床复发^[10]。MPO 主要由 PMN 产生,是后者活化的标志,其含量和活力可反映 PMN 相关炎症的严重程度^[11]。本实验发现,结肠组织 MPO 含量变化也表现出整体滞后于症状变化的特征,与结肠组织病理损伤,尤其是隐窝结构损伤的变化特点一致,提示实现组织学缓解应以隐窝结构损伤和 PMN 浸润消退为主要目标。

临床观察发现,UC 患者严重者可累及肝、肾和脾等器官,可能导致脏器积水^[12]。随着实验的进行,小鼠肝和脾发生了水肿、充血或增生。其中,脾指数随着实验的进行持续上升,提示机体存在逐渐加重的全身性炎症反应。血清促炎/抑炎因子含量的变化印证了这一点。促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 IL-17A 与炎症的发生发展密切相关,其含量升高是结肠组织损伤的标志^[13-15]。IL-10 和 TGF- β 作为抑炎细胞因子,主要由 Treg 等细胞产生,可抑制 Th17 细胞分化^[16-18]。在 3 个周期,UC 小鼠血清中 TNF- α 水平在诱导期升高、缓解期降低,变化规律与 DAI 值变化相似,至实验结束仍高于正常组,但其他促炎因子 IL-6、IL-1 β 和 IL-17A 含量持续增加且保持高水平状态。第 1 和 2 周期小鼠血清 IL-10 水平呈上下波动,可能与机体自身被动应对炎症反应有关,至实验结束显著低于正常组,提示 IL-10 水平的升高不足以抵消持续的炎症,最终导致机体促炎/抑炎平衡状态逐渐转变为促炎细胞因子优势状态。血清 TGF- β 含量在第 3 周期结束显著上调,推测可能与慢性炎症后的纤维化倾向有关^[19-20]。

与血清中含量变化不同的是,结肠组织中 TNF- α 水平在 3 个周期中并无显著变化(结果未显示)。此外,结肠中 IL-1 β 、IL-6 和 IL-17A 含量均表现出在急性期(第 1 周期)短暂升高或逐渐升高,在慢性阶段(第 2、3 周期)逐渐降低,至实验结束与正常组无显著差异,提示当疾病进入慢性期,结肠组织炎症逐渐转变为以 PMN 活化为主的模式^[15,21]。结肠中 IL-10 水平在 3 个周期诱导期降低、缓解期升高,提示诱导和缓解过程对结肠局部抗炎细胞因子产生

规律的影响。

综上所述,在本研究的诱导条件下,小鼠表现出症状的周期发作和缓解。在个周期的诱导中,小鼠大便性状改变趋势和幅度相似且不易完全恢复,便血症状逐渐加重,但在死亡率、体重和结肠组织病理学损伤等方面表现出逐渐增强的耐受力 and 恢复能力。同时,结肠组织病理学损伤的发生和缓解明显滞后于症状变化,且随着诱导的进行,结肠炎症逐渐转变为以 PMN 活化为主的模式,而全身性炎症反应则持续加重,提示在症状缓解的另一面,全身性炎症、结肠组织病理损伤和局部 PMN 相关炎症消退异常等现象持续存在,可能参与了疾病复发,可为慢性 UC 病程进展分析、复发预测、药物发现和药效评估提供参考。

参考文献:

- [1] SEGAL J P, LEBLANC J F, HART A L. Ulcerative colitis: an update [J]. Clin Med, 2021, 21(2): 135-139.
- [2] 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.
- [3] VITELLO A, MAIDA M, SHAHINI E, et al. Current approaches for monitoring of patients with inflammatory bowel diseases: a narrative review [J]. J Clin Med, 2024, 13(4): 1008.
- [4] GUPTA A, YU A, PEYRIN-BIROULET L, et al. Treat to target: the role of histologic healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2021, 19(9): 1800-1813.
- [5] CHASSAING B, AITKEN J D, MALLESHPA M, et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice [J]. Curr Protoc Immunol, 2014, 104: 15.25.1-15.25.14.
- [6] BILSBOROUGH J, FIORINO M F, HENKLE B W. Select animal models of colitis and their value in predicting clinical efficacy of biological therapies in ulcerative colitis [J]. Expert Opin Drug Discov, 2021, 16(5): 567-577.
- [7] 茶亚飞, 郭雪艳, 李宝晶, 等. 葡聚糖硫酸钠自由饮用与灌胃诱导小鼠溃疡性结肠炎模型比较 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(5): 735-740.
- CHA Y F, GUO X Y, LI B J, et al. Comparison of murine models of ulcerative colitis induced by free drinking and intragastric administration of dextran sulfate sodium with different concentrations [J]. Chin Pharmacol Bull, 2021, 37(5): 735-740.
- [8] 赵闪闪, 黄雪, 覃蒙斌, 等. 葡聚糖硫酸钠诱导慢性溃疡性结肠炎小鼠模型的建立及评价 [J]. 广西医科大学学报, 2019, 36(4): 559-562.
- ZHAO S S, HUANG X, QIN M B, et al. Establishment and evaluation of chronic ulcerative colitis mice model induced by dextran sodium sulfate [J]. J Guangxi Med Univ, 2019, 36

(4): 559-562.

- [9] DANESE S, RODA G, PEYRIN-BIROULET L. Evolving therapeutic goals in ulcerative colitis: towards disease clearance [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17(1): 1-2.
- [10] 贺涛, 潘鹏, 王秋野, 等. 预测临床缓解期溃疡性结肠炎复发的组织学特征 [J]. 中国临床研究, 2022, 35(2): 162-166.
- HE T, PAN P, WANG Q Y, et al. Histological features predicting recurrence of ulcerative colitis in clinical remission [J]. Chin J Clin Res, 2022, 35(2): 162-166.
- [11] SØRENSEN O E, BORREGAARD N. Neutrophil extracellular traps-the dark side of neutrophils [J]. J Clin Invest, 2016, 126(5): 1612-1620.
- [12] MORIICHI K, FUJIYA M, OKUMURA T. The endoscopic diagnosis of mucosal healing and deep remission in inflammatory bowel disease [J]. Dig Endosc, 2021, 33(7): 1008-1023.
- [13] NAKASE H, SATO N, MIZUNO N, et al. The influence of cytokines on the complex pathology of ulcerative colitis [J]. Autoimmun Rev, 2022, 21(3): 103017.
- [14] 周欣欣, 刘茜茜, 任珍, 等. 溃疡性结肠炎动物模型的特点及应用分析 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(7): 896-904.
- ZHOU X X, LIU Q Q, REN Z, et al. Characteristics and application analysis of animal models of ulcerative colitis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(7): 896-904.
- [15] LI Y H, ADAM R, COLOMBEL J F, et al. A characterization of pro-inflammatory cytokines in dextran sulfate sodium-induced chronic relapsing colitis mice model [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 60: 194-201.
- [16] LUO S, WEN R, WANG Q, et al. Rhubarb Peony Decoction ameliorates ulcerative colitis in mice by regulating gut microbiota to restoring Th17/Treg balance [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 231: 39-49.
- [17] QU C, YUAN Z W, YU X T, et al. Patchouli alcohol ameliorates dextran sodium sulfate-induced experimental colitis and suppresses tryptophan catabolism [J]. Pharmacol Res, 2017, 121: 70-82.
- [18] JIANG X P, HUANG X L, YANG Z P, et al. Iguratimod ameliorates inflammatory responses by modulating the Th17/Treg paradigm in dextran sulphate sodium-induced murine colitis [J]. Mol Immunol, 2018, 93: 9-19.
- [19] LIU J L, GAO Y Y, ZHOU J, et al. Changes in serum inflammatory cytokine levels and intestinal flora in a self-healing dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis murine model [J]. Life Sci, 2020, 263: 118587.
- [20] LIU R M, DESAI L P. Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: a perverse cycle for fibrosis [J]. Redox Biol, 2015, 6: 565-577.
- [21] ALEX P, ZACHOS N C, NGUYEN T, et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis [J]. Inflamm Bowel Dis, 2009, 15(3): 341-352.

[收稿日期]2023-09-26

王瑾茜,喻嵘,黄娟,等. 基于 CiteSpace 的中性粒细胞在糖尿病领域研究进展可视化分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34 (6): 28-39.

Wang JX, Yu R, Huang J, et al. Visual analysis of the role of neutrophils in diabetes based on CiteSpace [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 28-39.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.004

基于 CiteSpace 的中性粒细胞在糖尿病领域研究进展可视化分析

王瑾茜¹, 喻 嵘², 黄 娟^{1*}, 刘洋洋³, 张田田⁴, 郭 纯¹, 李 薇¹,
杨 蕙¹, 雷诗卉¹

(1.湖南中医药大学第一附属医院,长沙 410007;2.湖南中医药大学,长沙 410208;
3.天津市滨海新区北塘街社区卫生服务中心,天津 300453;4.湖南省中医药研究院,长沙 410031)

【摘要】 目的 本文旨在阐明中性粒细胞和糖尿病领域的发展以及中性粒细胞在糖尿病研究领域的演变特征、潜在趋势及研究热点。**方法** 检索 Web of Science(科学引文索引)中 2010~2023 年收录的中性粒细胞在糖尿病领域相关的 2998 篇文献,采用 CiteSpace 6.1.R6 对中性粒细胞在糖尿病领域的相关文献进行可视化分析。**结果** 自 2012 年以来,有关这一主题的出版物迅速增长。Bayat Mohammad、Liu Tong、Amini Abdollah 和 Zhang Rui 均为高产作者,有 7 篇相关领域的文章发表。中国和上海交通大学分别是发表论文最多的国家和机构。该领域最有影响力的期刊是《NATURE MEDICINE》。文献共被引分析显示,目前与糖尿病相关的主题中,焦点最高的是“extracellular trap(细胞外诱捕网)”“COVID-19 patient(新冠肺炎患者)”。关键词共现分析、聚类分析和关键词爆发分析表明,lymphocyte ratio(淋巴细胞比值)(13.08)、neutrophil extracellular trap(中性粒细胞胞外诱捕网)(7.2)是目前中性粒细胞和糖尿病领域研究最多的主题。这一领域的文献主要分布在“myocardial infarction(心肌梗死)”“endothelial(内皮细胞)”“oxidative stress(氧化应激)”和“apoptosis(细胞凋亡)”之间。**结论** 本文运用 CiteSpace 对中性粒细胞在糖尿病领域的演变趋势进行分析,为研究人员今后开展糖尿病领域相关研究提供新思路。

【关键词】 糖尿病;中性粒细胞;文献计量分析;CiteSpace

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0028-12

Visual analysis of the role of neutrophils in diabetes based on CiteSpace

WANG Jinxi¹, YU Rong², HUANG Juan^{1*}, LIU Yangyang³, ZHANG Tiantian⁴, GUO Chun¹, LI Wei¹,
YANG Hui¹, LEI Shihui¹

(1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine First Affiliated Hospital, Changsha 410007, China. 2. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208. 3. Binhai New Area Beitang Street Community Health Service Center, Tianjing 300453. 4. Hunan Province Academy of Chinese Medicine, Changsha 410031)

【Abstract】 Objective This aim of this review was to clarify the role of neutrophils in diabetes by summarizing the characterization studies, potential trends, and research hotspots relating to neutrophils in the diabetes research field.

Methods 2998 relevant studies on neutrophils in the diabetes research field indexed in Web of Science from 2010 to 2023

【基金项目】国家自然科学基金区域联合创新研究重点支持项目(U21A20411);湖南省自然科学基金青年项目(2023JJ40505);湖南省自然科学基金医卫行业联合基金(2024JJ9436);湖南省卫健委科研基金项目(w20243161);湖南中医药大学校级科研基金项目(2022XYLH005)。

【作者简介】王瑾茜(1991—),女,助理研究员,研究方向:内分泌及其并发症的中医证治研究。E-mail:273067155@qq.com

【通信作者】黄娟(1982—),女,副教授,硕士生导师,研究方向:内分泌及其并发症的中医证治研究。E-mail:310702@hnu.edu.cn

were retrieved, and a visual analysis of the relevant literature was conducted using CiteSpace 6.1.R6. **Results** Since 2012, the number of publications on this topic has grown rapidly. Bayat Mohammad, Liu Tong, Amini Abdollah, and Zhang Rui are high-yield authors, with seven related articles published. China and Shanghai Jiao Tong University are the country and institution with the most published papers. The most influential journal in this field is “Nature Medicine”. Literature co-citation analysis of topics related to diabetes showed that the greatest focus is currently on “extracellular trap” and “COVID-19 patient”. Co-occurrence analysis, clustering analysis, and keyword burst analysis indicated that “lymphocyte ratio” (13.08) and “neutrophil extracellular trap” (7.2) are the most researched topics in the field of neutrophils and diabetes. Literature in this field mainly focuses on “myocardial infarction”, “endothelial”, “oxidative stress”, and “apoptosis”. **Conclusions** This article highlights the evolving trends in research into neutrophils in the diabetes field using CiteSpace, providing new insights for researchers aiming to conduct research in this area.

[Keywords] diabetes; neutrophils; bibliometrics analysis; CiteSpace

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

糖尿病的严重性不仅体现在对个体健康的威胁,还涉及到生活质量、经济负担和全球公共卫生等方面的问题。因此,需要对糖尿病的发病机制和治疗策略进行更深入的研究。近年来研究表明,与糖尿病相关的高血糖状态改变中性粒细胞行为及功能^[1]。高血糖导致中性粒细胞异常激活,导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)异常释放并致使中性粒细胞经历死亡程序,形成中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular trap, NET)。NET是一种以双链DNA(double-stranded DNA, dsDNA)为骨架,嵌有髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、组织蛋白酶及弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)等颗粒蛋白的纤维状结构^[2]。研究表明,NET是糖尿病和糖尿病相关并发症主要调节因子。在2型糖尿病患者血液中的中性粒细胞更倾向释放更多的NET,而dsDNA水平升高与糖尿病并发症密切相关^[3]。然而,中性粒细胞在糖尿病研究领域的文献尚未通过计量学分析进行系统的评估。本研究使用文献计量学分析2010~2023年中性粒细胞在糖尿病领域的作者合作、国家和机构合作、期刊和文献共被引网络以及关键词的使用情况,旨在揭示中性粒细胞在糖尿病领域的研究格局和热点趋势。

1 材料和方法

1.1 数据来源

本研究以TS=((Neutrophils OR “Neutrophilic granulocytes”) AND (diabetes OR diabetic OR “diabetes mellitus” OR “DM”))为检索式,检索时间设置为2013年1月1日~2023年7月31日。选择“Article”和“Review article”,语种选择“English”。本研究选取科学引文索引数据库核心合集(Web of

Science Core Collection, WOSCC)作为数据来源,WOSCC作为一个高质量的数字文献资源数据库已经被诸多研究人员接受,被认为是最适合进行文献计量分析的数据库^[4]。

1.2 文献处理方法

CiteSpace 6.1.R6(64-bit)软件进行年发文量趋势分析、作者、出版国家及研究机构分析、期刊共被引网络分析、文献共被引网络分析及关键词分析;打开CiteSpace,选择Data,选择WOSCC,在“input directory”中存放input文件夹,“output directory”中存放output文件夹;点击“Remove Directory”将input文件夹中内容存储入output文件夹中,获取年发文量数据;在主面板中Projects中选择new,在project home中存放project文件夹,在data directory中存放data;设置时间参数为2010~2023年,参数阈值设为1,Top N(N=50),LRF=3.0,LBY=5,e=1.0。分别获取作者网络、机构合作网络、期刊共被引网络、文献共被引网络及关键词共现网络;将参数设置为:Increase or decrease the scale factor k=12,选择“pathfinder”“pruning the merged network”,依次点击“Find Cluster”-“K”-“LLR”,获取关键词聚类分析图;设置状态转换值为1.5,状态差异比率为2,进行关键词突现分析;Tableau Desktop 2023.2软件进行世界地图绘制。

2 结果

2.1 年发文量趋势分析

年度发文量扩散曲线(散点图)与标准S曲线(使用累积发文量拟合Logistic曲线获得)(图1)在一定程度上反映了该领域知识量的增长情况。从图中可见,2010年开始有论文发表,在此后的发文量缓慢增长,2012年作为一个拐点,此后发文量开

病理机制被认为与氧化应激增加、促炎通路激活及细胞外基质重塑之间的相互作用密切相关^[12,15-16]。

2.2.2 国家和机构的分布与合作网络

在国家分布图谱中(图 3),文献量超过 100 篇的国家有 9 个,从图中可知,中国以 755 篇的文献量位居第一,其次为美国(684 篇)和土耳其(219 篇)。虽然中国发表的文献数量最多,但是中心性为 0.00,说明中国对中性粒细胞在糖尿病领域的文献虽多但影响力有待提升。中心性大于 0.20 的国家有德国(0.40)、加拿大(0.32)、以色列(0.33)、爱尔兰(0.27)、罗马尼亚(0.51)、巴基斯坦(0.38)、匈牙利(0.44)、芬兰(0.78)、尼日利亚(0.29)、科威特(0.26)、新西兰(0.37)及卡塔尔(0.23)。这些国家的文章主要关注氧化应激及炎症反应在新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019, COVID-19)及

糖尿病并发症的发病机制的作用,这些研究普遍认为中性粒细胞通常是第一个对炎症做出反应的免疫细胞,可以通过募集巨噬细胞和抗原呈递细胞加剧炎症状态,中性粒细胞通过分泌 NET 介导高脂饮食小鼠的胰岛素抵抗^[17-20]。

根据网络修剪结果图(图 4),一共有 433 个节点,768 条连线。通过对机构合作关系进行分析,发文量≥30 的机构有 5 位,分别为上海交通大学(44)、圣保罗大学(40)、华中科技大学(32)、武汉大学(31)和中南大学(30)(表 1)。第一位是上海交通大学,发文量为 44,中心性为 0.04,由其构成的合作机构群体为卡迪夫大学、复旦大学及香港大学等 17 所大学。研究的领军机构为上海交通大学,该机构主要以 NETs 异常释放对内皮细胞的负面影响为切入点,对 NETosis 导致巨噬细胞炎性体活化,从

表 1 机构合作关系(发文量≥30)
Table 1 Institutional collaborations (with publication counts ≥30)

序号 Number	频次 Count	中心性 Centrality	年份 Year	机构 Institutions
1	44	0.04	2012	上海交通大学 Shanghai Jiao Tong Univ
2	40	0.03	2012	圣保罗大学 Univ Sao Paulo
3	32	0.01	2014	华中科技大学 Huanzhong Univ Sci&Technol
4	31	0.01	2014	武汉大学 Wuhan Univ
5	30	0.03	2019	中南大学 Cent South Univ

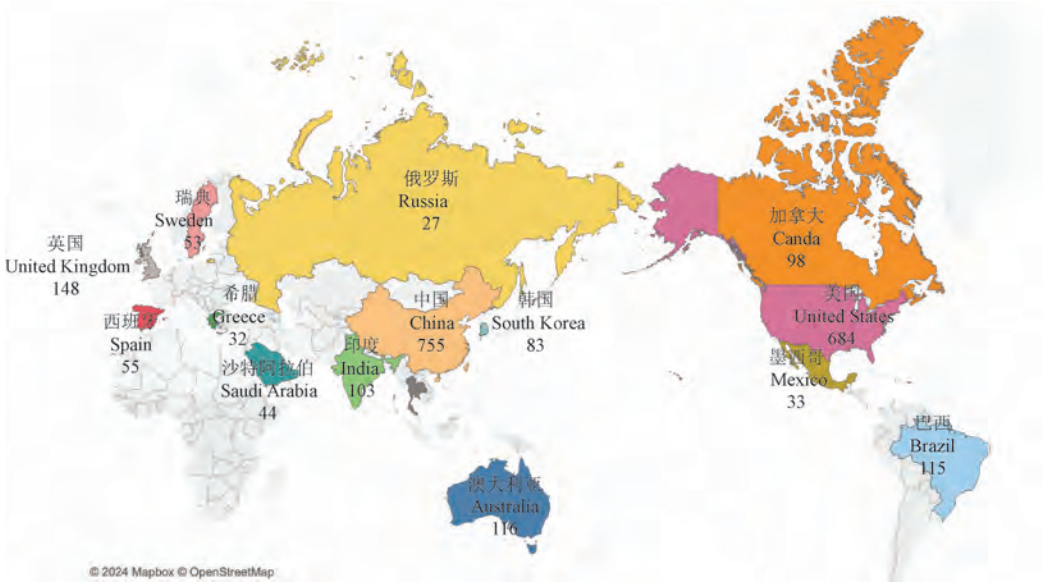


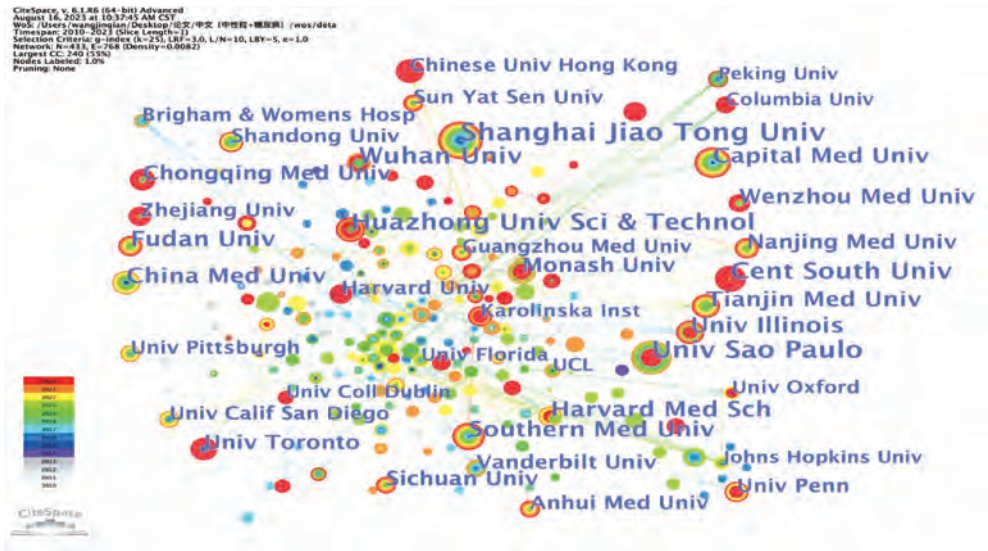
图 3 2010~2023 年 WOSCC 数据库中中性粒细胞在糖尿病领域世界地图
Figure 3 World map of neutrophils in the diabetes field in the WOSCC database from 2010 to 2023

而加速糖尿病并发症的机理展开了研究^[21-22]。总览全图,可以看出上海交通大学与中南大学、香港大学、南通大学、隆德大学和北京大学的合作相对更频繁。

2.3 期刊共被引网络分析

根据网络修剪结果(图 5),一共有 98 个节点,201 条连线。我们根据中性粒细胞在糖尿病领域发

细胞在糖尿病领域研究中有影响力的期刊包括《NATURE MEDICINE》(336)、《JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY》(307)、《PERIODONTOLOGY 2000》(302)、《JOURNAL OF HEPATOLOGY》(274)和《NATURE》(225)。被引用期刊之间的中心性(带有紫色圆圈的节点)而言,中心性超过 0.3 的期刊包括《DIABETES》(0.59)、《J CLIN INVEST》(0.64)、《J IMMUNOL》(0.52)、

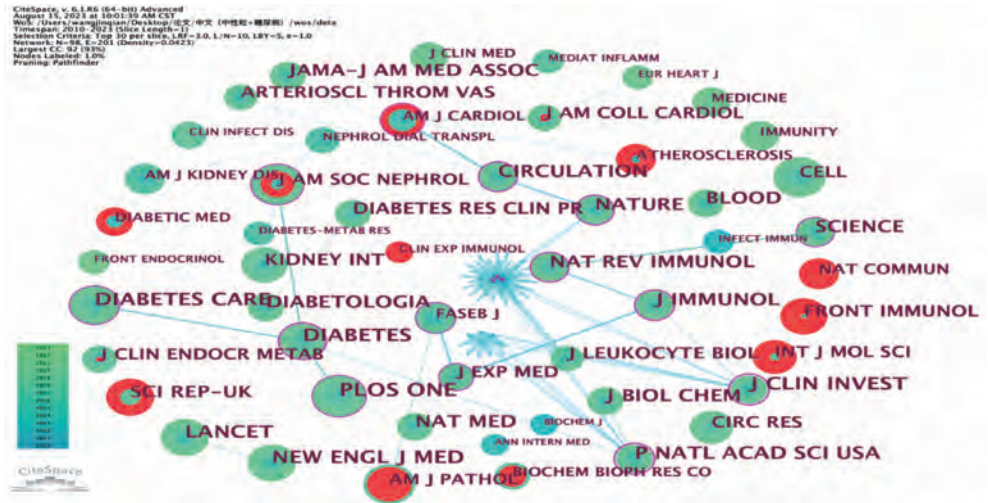


注:被引用的节点大小和链接厚度分别代表被引频次和被引水平,红圈代表短时间大量发文。

图 4 2010~2023 年 WOSCC 数据库中中性粒细胞在糖尿病领域

Note. Size of the nodes and the thickness of the links represent the citation frequency and citation level, respectively. The red circles indicate a high volume of publications in a short period of time.

Figure 4 Neutrophil research in the field of diabetes in the WOSCC database from 2010 to 2023



注:被引用的节点大小和链接厚度分别代表被引频次和被引水平,紫圈代表被引用期刊之间的中心性高。

图 5 2010~2023 年 WOSCC 数据库中中性粒细胞在糖尿病领域期刊共被引网络分析

Note. Size of the cited nodes and the thickness of the links represent the citation frequency and citation level, respectively, and the purple circles represent high centrality between the cited journals.

Figure 5 Network analysis of neutrophils in the field of diabetes in the WOSCC database from 2010 to 2023

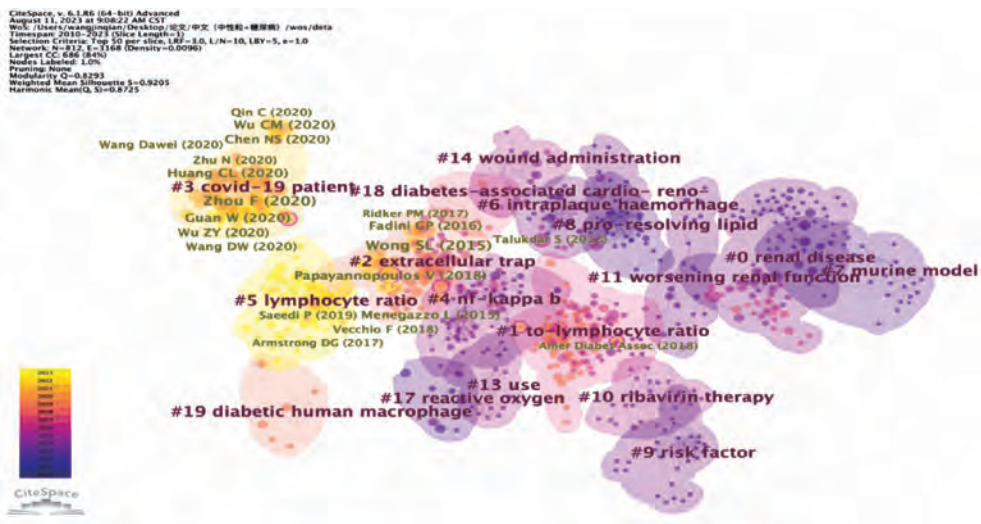
《P NATL ACAD SCI USA》(0.69)、《ADV PROSTAG THROMB R》(0.42)、《ANTIVIR RES》(0.42) 及《ALDRICH LIB 13C IH F》(0.42),他们在很大程度上连接了其他期刊。

2.4 对文献共被引网络分析阐明了该领域最具影响力的论文

在文献的共被引分析中,将 2010~2023 年进行数据切分,提取了每个时间切片中排名前 50 的施引论文的参考文献来构建文献的共被引网络,合成的网络包含 812 个参考文献,3168 条连线。分析得到 20 个聚类(图 6),模块化值(Q 值)为 0.8293,表明每个聚类具有明确定义的特殊性。平均轮廓值(sihouette 值)为 0.9467,说明文献的同质性较高,反映学者们对中性粒细胞在糖尿病研究领域的高度专注和深入探索。聚类序号按照从 0 开始依次变大的形式标记,序号越小表明对应聚类中所包含的文献数量越多,这里最大的聚类被命名为#0 renal disease(肾疾病),表明有大量关于“renal disease”的研究引用了该聚类中的文献。从网络中可以得出, #7 murine model(鼠模型)(2009)、#8 pro-resolving lipid(促分解脂质)(2009)、#9 risk factor(风险因素)(2009)、#11 worsening renal function(恶化的肾功能)(2008)、#17 reactive oxygen(活性氧)(2009)的发表时间普遍距离现在较远,属于糖尿病与中性粒细胞研究较早的文献,这些早期的研究论文主要分布在网络右侧,例如 Nielsen(2011)等^[23]对中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutropil

gelatinase-associated lipocalin, NGAL)作为 1 型糖尿病的预测因子,在糖尿病肾病发生发展中的作用进行了研究,做出了重要推进工作的研究成果。位于共被引网络左侧的聚类文献的发表时间距离现在更近一些,进一步结合共被引关系的时间特征和各类文献的平均时间,可以得出目前糖尿病与中性粒细胞研究分布的领域主要为有#3 COVID-19 patient(新冠肺炎患者)(2019)、#5 lymphocyte ratio(淋巴细胞比率)(2019)。在这些聚类中,产生出一批有重要影响的研究成果。例如 Njeim(2020)等^[3]发现在 T2DM 患者中,NETs 释放产物显著升高。dsDNA 水平的增加与心血管疾病和糖尿病肾病的存在相关。Moschonas 等^[24]发现 NETosis 可能导致巨噬细胞炎症小体的激活及白细胞介素 IL-1 β 和 IL-18 的分泌,最终导致动脉粥样硬化斑块侵蚀和血栓形成。Peric 等^[25]认为糖尿病患者 COVID-19 临床病程较重,死亡率明显升高。作者们认为动脉粥样硬化斑块破裂与 COVID-19 的致命结局相关,在严重 COVID-19 发病之前,强劲的 NETs 形成可能会传播炎症风暴。

知识基础可以认为是学者在研究中频繁引用的文献,这些文献好比巨人的肩膀,为新的研究提供基础知识支撑。在文献共被引网络中,对高被引文献的分析有助于对热点领域知识基础有一个清晰的认识。同时对由基础构成的文献进行聚类,有助于认识研究前沿。整体被引排名前 10 的文献的被引频次都超过了 40 次,这些高被引论文主要源于



注:被引用的节点大小和链接厚度分别代表被引频次和被引水平。

图 6 2010~2023 年 WOSCC 数据库中中性粒细胞在糖尿病领域文献共被引网络分析

Note. Size and thickness of the nodes quoted represent the frequency and level of citation.

Figure 6 Network analysis of neutrophil literature in the field of diabetes in the WOSCC database from 2010 to 2023

聚类 # 3 COVID-19 patient (6 篇), 其次为 # 2 extracellular trap (4 篇) (表 2) 。其中 Zhou (2020) 等^[26]发现 d-二聚体 > 1 μg/L 与 COVID-19 的致命结局相关, 促成机制包括全身性促炎细胞因子反应, 它是动脉粥样硬化的介质, 通过局部炎症直接促进斑块破裂, 诱导促凝因子和血流动力学改变, 易导致缺血和血栓形成。Wong (2015) 等^[19]证实了高血糖刺激中性粒细胞过量产生 PAD4 和 NETs, 并确定 NETs 是延迟伤口愈合的关键因素。

研究前沿与新兴趋势主要分布在聚类 # 5 lymphocyte ratio、# 2 extracellular trap。# 2 extracellular trap (表 3) 。这些施引文献的时间主要

集中在 2020 年, 引用了聚类 # 2 extracellular trap 中至少 18% 的文献。作者们主要论述了 NETs 可能成为预防 COVID-19 急性呼吸窘迫综合征的潜在治疗靶点^[14]。NETosis 和内皮细胞功能障碍可以相互作用促使血管损伤。对中性粒细胞和巨噬细胞在动脉粥样硬化中的相互作用进行了剖析, 并为 NET 的非感染性刺激提供了线索^[2, 20]。这些高被引频次的论文体现了其在近年来研究上的关注, 是研究新趋势的知识基础。

2.5 关键词分析

2.5.1 关键词共现分析揭示了该领域的热点话题
通过表 4 和图 7 分析可知, 高频关键词为

表 2 中性粒细胞在糖尿病领域的知识基础论文
Table 2 Knowledge-based papers on neutrophils in the field of diabetes

序号 Number	频次 Counts	出版物 Publication	年份 Year	所属聚类 Cluster
1	86	柳叶刀 LANCET	2020	3
2	86	自然医学 NAT MED	2015	2
3	53	自然免疫学评论 NAT REV IMMUNOL	2018	2
4	53	新英格兰医学杂志 NEW ENGL J MED	2020	3
5	52	柳叶刀 LANCET	2020	3
6	47	贾玛内科杂志 JAMA INTERN MED	2020	3
7	43	美国医学会杂志 JAMA-J AM MED ASSOC	2020	3
8	43	糖尿病 DIABETES	2016	2
9	42	糖尿病行为学 ACTA DIABETOL	2015	2
10	40	柳叶刀 LANCET	2020	3

表 3 聚类 # 2 extracellular trap 对应的施引文献 (Coverage ≥ 10%)

Table 3 References of the knowledge base papers on neutrophils in the field of diabetes corresponding to cluster # 2 extracellular trap (Coverage ≥ 10%)			
覆盖范围 Coverage	全领域被引次数 GCS	本地被引次数 LCS	参考文献 Bibliography
18	34	0	免疫衰老: 导致 COVID-19 发展的易感风险因素? Immunosenescence; a predisposing risk factor for the development of COVID-19?
12	35	0	中性粒细胞死亡在糖尿病和心脏代谢紊乱的研究进展 A perspective on netosis in diabetes and cardiometabolic disorders
10	77	0	中性粒细胞胞外诱捕网与心血管疾病: 最新进展 Neutrophil extracellular traps and cardiovascular diseases; an update
10	78	0	中性粒细胞胞外诱捕网在动脉粥样硬化和血栓形成中的途径 Pathway of neutrophil extracellular traps towards towards atherosclerosis and thrombosis

“Inflammation(炎症)”“Diabetes mellitus(糖尿病)”“Neutrophil(中性粒细胞)”“Expression(表达)”“Disease(疾病)”“Risk(风险)”和“Oxidative stress(氧化应激)”等。然而,不是所有的高频关键词都具有高的中心度。因此,依靠高频关键词不能很精准的确定研究热点。在 CiteSpace 软件中,中心度高

的关键词 (Centrality ≥ 0.01) 容易看作关键词词频知识图谱的拐点,在一定程度上代表了该领域的研究热点。从中心度来看,“Myocardial infarction(心肌梗死)”和“Endothelial(内皮)”的中心度是 0.05,“Oxidative stress”和“Apoptosis(细胞凋亡)”的中心度都是 0.04,是研究的支撑点,对网络起到支撑作用。

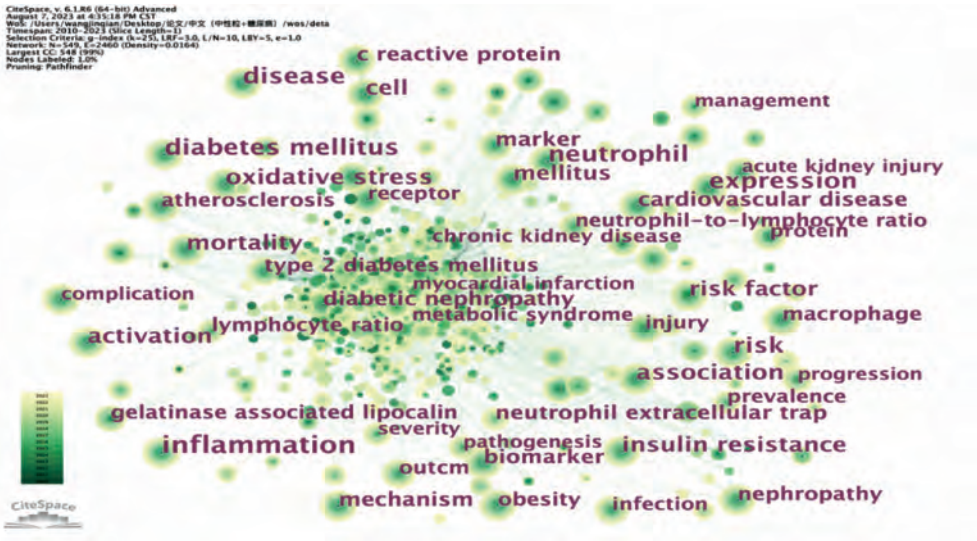


图 7 2010~2023 年 WOSCC 数据库中中性粒细胞在糖尿病领域关键词共现分析

Figure 7 Co-occurrence analysis of neutrophils in the field of diabetes in the WOSCC database from 2010 to 2023

2.5.2 关键词聚类分析

关键词聚类是研究领域内具有相似研究主题的关键词形成的互相联系的网络集群,各集群的内涵是由各自包含文章中高频使用的标题词来标识。图 8 中共得到 13 个聚类,聚类从 0 开始编号,即聚类#0 是最大的集群,而聚类#1 是第二大的,依次递推。根据网络修剪,一共有 323 个节点,437 条连线。一般地, $Q>0.3$ 意味着得到的网络图结构是显著的。该网络的 Q 值为 0.8236,表明中性粒细胞在糖尿病领域中的关键词聚类有明确的定义。Mean Silhouette(平均轮廓)得分用于衡量整个网络的平均同质性,得分越接近 1,网络的同质性越高。该网络为 0.8728,可以认为聚类结果是合理的。在参考聚类分析中,聚类#0 Neutrophil extracellular traps 是最大的集群。

2.5.3 关键字突发分析和聚类分析解释了该领域的研究前沿

关键词突现是指在某段时期内相关领域突然增加的关键词,关键词共现分析源于文献计量分析中的耦合分析。综合关键词突现分析与关键词共

表 4 中性粒细胞在糖尿病领域的高频关键词 (counts ≥ 30)

Table 4 High-frequency keywords of neutrophils in the field of diabetes (counts ≥ 30)

关键词 Keywords	中心性 Centrality	年份 Year	频次 Count
炎症 Inflammation	0.01	2012	484
糖尿病 Diabetes mellitus	0.01	2012	314
中性粒细胞 Neutrophil	0.01	2012	311
氧化应激 Oxidative stress	0.04	2012	233
胰岛素抵抗 Insulin resistance	0.02	2012	208
心血管 Cardiovascular	0.02	2012	131
C 反应蛋白 C reactive protein	0.03	2012	122
中性粒细胞胞外诱捕网 Neutrophil extracellular trap	0.01	2016	122
动脉粥样硬化 Atherosclerosis	0.02	2012	109
淋巴细胞比率 Lymphocyte ratio	0.01	2014	108
肥胖 Obesity	0.01	2012	107
巨噬细胞 Macrophage	0.02	2012	105

现分析,可以提取出相关领域具有突现推动作用的技术,理论和方法等研究热点与热点的演变。在分析研究前沿、预测研究趋势和挖掘热点方面均有重要的价值。图 9 列出了利用 CiteSpace 关键词突现分析得到的近 13 年(2010~2023 年)突现的关键词以及突现强度和时间。Strength(强度)为突现值,突现值越大代表值越重要。与中性粒细胞在糖尿病领域研究密切相关的关键词中,lymphocyte ratio(13.08)的关键词爆发最强,其次是 nitric oxide(一氧化氮)(10.6)、NF- κ B(9.17)、type 1 diabete(8.78)、neutrophil/lymphocyte ratio(中性粒细胞/淋

巴细胞比率)(7.86)、atherosclerosis(动脉粥样硬化)(7.77)。聚类时间线显示了 2010 年~2023 年中性粒细胞在糖尿病领域的发展情况,根据按照持续时间分析。该领域主要研究 nitric oxide(10.6)、NF- κ B(9.17)、necrosis factor alpha(肿瘤坏死因子- α)(7.03)、monocyte(单核细胞)(6.53)、atherosclerosis(7.77)和 coronary heart disease(冠心病)(7.11)。可以看到,lymphocyte ratio(13.08)、neutrophil extracellular trap(7.2)是近年来新兴的且一直活跃的主题。其中 Neutrophil extracellular traps 的爆发起始年份为 2010,说明近年来 Neutrophil



图 8 关键词聚类网络图

Figure 8 Keyword cluster network diagram

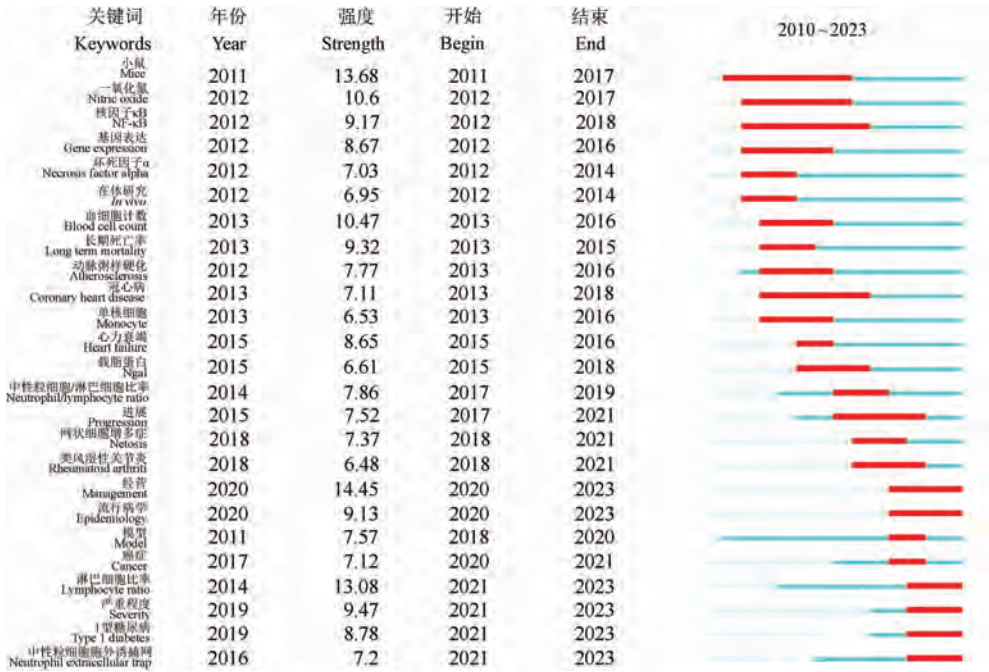


图 9 突现词分析图(前 25 名)

Figure 9 Top 25 keywords with the strongest citation bursts

extracellular traps 是一直活跃的主题。

3 讨论

在本文中我们使用文献计量学来阐明中性粒细胞在糖尿病领域的主要特征,阐明潜在趋势与热点。值得注意的是,由于动脉粥样硬化及 COVID-19 与糖尿病、细胞炎症风暴及 NET 存在关联,因此也被纳入研究热点范围。

作者合作网络分析表明,作者们的关注点从仅以 NET 及其循环标志物表达发散到 NET 对巨噬细胞调控及动脉粥样硬化的作用,说明学者们对中性粒细胞在糖尿病领域的研究逐渐深入。从国家合作分析来看,中国在论文产出方面排名位居世界首位,说明中国在该领域研究方面具有国际影响力。研究机构合作分析表明,研究的领军机构为上海交通大学,该机构与其他国家机构的合作比较频繁,结合作者合作网络分析来看,国际合作,尤其是知名机构、学者之间的合作,对于提升发文质量、数量及学术水平具有积极影响。文献共被引网络分析表明,《NATURE MEDICINE》、《JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY》、《PERIODONTOLOGY 2000》、《JOURNAL OF HEPATOLOGY》及《NATURE》于中性粒细胞在糖尿病领域具备一定的知名度及影响力,表明中性粒细胞在糖尿病领域的研究的认可度较高,研究前景较好。

从文献分析来看该领域的研究趋势,研究集中在 3 个主题上:(1)中性粒细胞氧化应激及 NETosis 与糖尿病心血管并发症的关系。(2)NETs 触发巨噬细胞含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3 (recombinant NLR family, pyrin domain containing protein 3, NLRP3)炎性体激活在动脉粥样硬化中的潜在机制。(3)糖尿病合并动脉粥样硬化及心血管疾病的发生机制(图 10)。首先,中性粒细胞能量的主要来源为糖酵解代谢,这使得中性粒细胞对葡萄糖水平改变特别敏感^[27-29]。在高血糖状态下,中性粒细胞下调葡萄糖转运蛋白-1 (glucose transporter type 1, GLUT-1)使自身糖酵解速率增加^[30-31],随之而来的是线粒体 ROS 过度产生进而引发 DNA 损伤后的修复机制。该过程中甘油醛 3 - 磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 的活性降低,导致高级糖酵解终产物 (advanced glycation end-products, AGEs) 的积累,进一步促进 ROS 的形成^[32-33]。同时,高血糖引起还原型辅酶 II 氧化酶 (NADPH oxidase, NOX) 过表达也加速了 ROS 产生^[34]。第二,ROS 在 NETosis 中发挥核心作用,ROS 通过诱导 NE 和 MPO 从嗜天青颗粒中释放并激活肽基精氨酸脱亚胺酶 4 (recombinant peptidyl arginine deiminase type IV, PAD4), 最终引发 NETosis^[35-37]。第三,NET 是病理性血栓的关键支架,通过诱导促凝因子和血流变动力学改变,加剧炎症和心血管疾病的发生发展^[38]。同时,ROS 可使

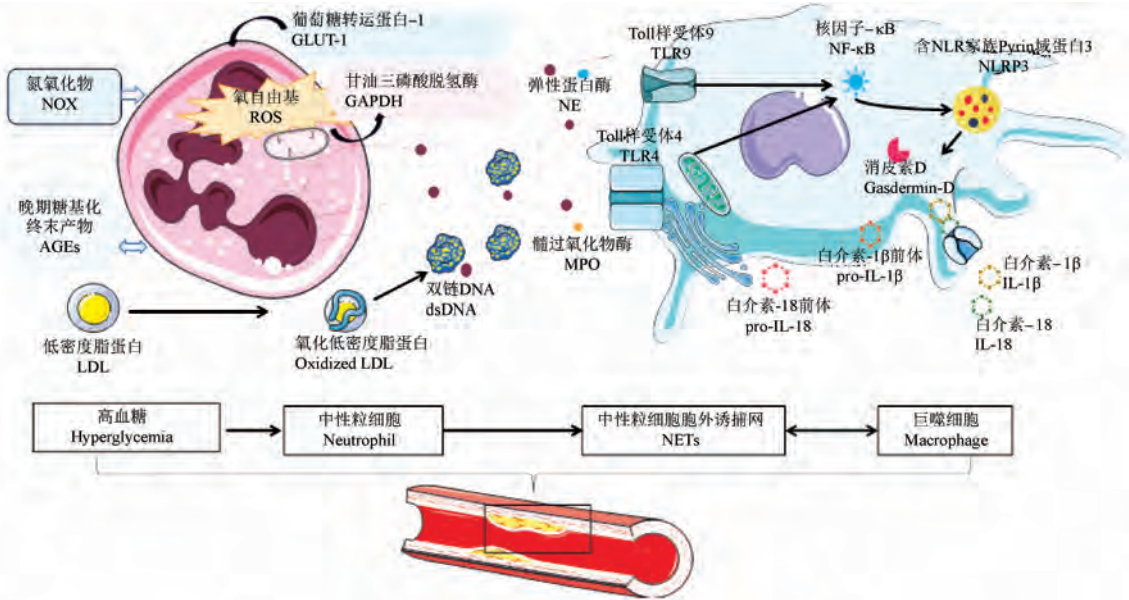


图 10 研究内容示意图
Figure 10 Schematic diagram of research content

血管内皮渗透力并促进巨噬细胞滞留,巨噬细胞通过摄取低密度脂蛋白形成泡沫细胞,导致动脉粥样硬化的形成。此外,NET 通过 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR-4)/Toll 样受体 9 (Toll-like receptor 4, TLR-9)/核因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 通路上调巨噬细胞 NLRP3 炎性体水平,加速消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 裂解,促进白介素释放,通过局部炎症加剧 NETosis 并直接促进斑块破裂^[39-40]。

考虑到这些正在进行的研究工作,我们可以设想中性粒细胞发生 NETosis 并形成 NET 在糖尿病并发症的发生发展中起到一定的作用,NET 可能成为糖尿病并发症的潜在治疗靶点。然而还需进一步研究来验证这一假设。

参考文献:

[1] GIOVENZANA A, CARNOVALE D, PHILLIPS B, et al. Neutrophils and their role in the aetiopathogenesis of type 1 and type 2 diabetes [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2022, 38 (1): e3483.

[2] FADINI G P, MENEGAZZO L, SCATTOLINI V, et al. A perspective on NETosis in diabetes and cardiometabolic disorders [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2016, 26(1): 1-8.

[3] NJEIM R, AZAR W S, FARES A H, et al. NETosis contributes to the pathogenesis of diabetes and its complications [J]. *J Mol Endocrinol*, 2020, 65(4): R65-R76.

[4] MERIGÓ J M, YANG J B. A bibliometric analysis of operations research and management science [J]. *Omega*, 2017, 73: 37-48.

[5] DEMIRTAS L, DEGIRMENCI H, AKBAS E M, et al. Association of hematological indices with diabetes, impaired glucose regulation and microvascular complications of diabetes [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(7): 11420-11427.

[6] BAKIRCI E M, DEMIRTAS L, DEGIRMENCI H, et al. Relationship of the total atrial conduction time to subclinical atherosclerosis, inflammation and echocardiographic parameters in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2015, 70(2): 73-80.

[7] AKBAS E M, DEMIRTAS L, OZCICEK A, et al. Association of epicardial adipose tissue, neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio with diabetic nephropathy [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(7): 1794-1801.

[8] AKBAS E M, HAMUR H, DEMIRTAS L, et al. Predictors of epicardial adipose tissue in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2014, 6: 55.

[9] LEE S, ZHOU J, WONG W T, et al. Glycemic and lipid variability for predicting complications and mortality in diabetes mellitus using machine learning [J]. *BMC Endocr Disord*, 2021, 21(1): 94.

[10] ZHANG R, CHEN J, XIONG Y, et al. Increased neutrophil count is associated with the development of chronic kidney disease in patients with diabetes [J]. *J Diabetes*, 2022, 14(7): 442-454.

[11] ZHANG H, GUO S H, XUE Z K, et al. Effect of calcium dobesilate in preventing contrast-induced nephropathy in patients with diabetes and chronic kidney disease [J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2021, 76: e2942.

[12] JOHNSON J, JAGGERS R M, GOPALKRISHNA S, et al. Oxidative stress in neutrophils: implications for diabetic cardiovascular complications [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2022, 36(10/11/12): 652-666.

[13] ALGUWAIHES A M, AL-SOFIANI M E, MEGDAD M, et al. Diabetes and Covid-19 among hospitalized patients in Saudi Arabia: a single-centre retrospective study [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2020, 19(1): 205.

[14] HAZELDINE J, LORD J M. Immunesenescence: a predisposing risk factor for the development of COVID-19? [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 573662.

[15] TALL A R, WESTERTERP M. Inflammasomes, neutrophil extracellular traps, and cholesterol [J]. *J Lipid Res*, 2019, 60 (4): 721-727.

[16] BEGUM R, THOTA S, ABDULKADIR A, et al. NADPH oxidase family proteins: signaling dynamics to disease management [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19: 660-686.

[17] SHARIFI-RAD M, ANIL KUMAR N V, ZUCCA P, et al. Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: back and forth in the pathophysiology of chronic diseases [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 694.

[18] YAN Y, YANG Y, WANG F, et al. Clinical characteristics and outcomes of patients with severe covid-19 with diabetes [J]. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2020, 8(1): e001343.

[19] WONG S L, DEMERS M, MARTINOD K, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing [J]. *Nat Med*, 2015, 21(7): 815-819.

[20] TALUKDAR S, OH D Y, BANDYOPADHYAY G, et al. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase [J]. *Nat Med*, 2012, 18(9): 1407-1412.

[21] LIU D, YANG P, GAO M, et al. NLRP3 activation induced by neutrophil extracellular traps sustains inflammatory response in the diabetic wound [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(4): 565-582.

[22] YAN C, GAO N, SUN H, et al. Targeting imbalance between IL-1 β and IL-1 receptor antagonist ameliorates delayed epithelium wound healing in diabetic mouse corneas [J]. *Am J Pathol*, 2016, 186(6): 1466-1480.

[23] NIELSEN S E, HANSEN H P, JENSEN B R, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients in a four-year follow-up study [J]. *Nephron Clin Pract*, 2011, 118(2): c130-c135.

- [24] MOSCHONAS I C, TSELEPIS A D. The pathway of neutrophil extracellular traps towards atherosclerosis and thrombosis [J]. *Atherosclerosis*, 2019, 288: 9–16.
- [25] PERIC S, STULNIG T M. Diabetes and COVID-19: disease-management-people [J]. *Wien Klin Wochenschr*, 2020, 132 (13/14): 356–361.
- [26] ZHOU F, YU T, DU R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study [J]. *Lancet*, 2020, 395 (10229): 1054–1062.
- [27] KRAAKMAN M J, LEE M K, AL-SHAREA A, et al. Neutrophil-derived S100 calcium-binding proteins A8/A9 promote reticulated thrombocytosis and atherogenesis in diabetes [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(6): 2133–2147.
- [28] WILLSON J A, ARIENTIS, SADIKU P, et al. Neutrophil HIF-1 α stabilization is augmented by mitochondrial ROS produced via the glycerol 3-phosphate shuttle [J]. *Blood*, 2022, 139(2): 281–286.
- [29] SHIMA T, TANIGUCHI K, TOKUMARU Y, et al. Glucose transporter-1 inhibition overcomes imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumor cells [J]. *Oncol Rep*, 2022, 47 (1): 7.
- [30] FLYNN M C, KRAAKMAN M J, TIKELLIS C, et al. Transient intermittent hyperglycemia accelerates atherosclerosis by promoting myelopoiesis [J]. *Circ Res*, 2020, 127(7): 877–892.
- [31] KATIRCI E, KENDIRCI K R, KORGUN ET. Effects of stevioside on the expressions of GLUT 1, GLUT 3, and GLUT 4 proteins in diabetic rat placenta [J]. *Planta Med*, 2023, 89 (7): 735–745.
- [32] GIACCO F, BROWNLEE M. Oxidative stress and diabetic complications [J]. *Circ Res*, 2010, 107(9): 1058–1070.
- [33] CHEN Y, ZOU Z, GAMAN MA, et al. NADPH oxidase mediated oxidative stress signaling in FLT3-ITD acute myeloid leukemia [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 208.
- [34] DANG H, SHENG J, TANG P, et al. The role and mechanism of NADPH oxidase in the development and progression of thyroid carcinoma [J]. *Am J Cancer Res*, 2023, 13(9): 4366–4375.
- [35] CARNEVALE R, LEOPIZZI M, DOMINICI M, et al. PAD4-induced netosis via cathepsin g-mediated platelet-neutrophil interaction in ChAdOx1 vaccine-induced thrombosis-brief report [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2023, 43(10): e396–e403.
- [36] SHAH M S, BROWNLEE M. Molecular and cellular mechanisms of cardiovascular disorders in diabetes [J]. *Circ Res*, 2016, 118 (11): 1808–1829.
- [37] VERMOT A, PETIT-HÄRTLEIN I, SMITH S M E, et al. NADPH oxidases (NOX): an overview from discovery, molecular mechanisms to physiology and pathology [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(6): 890.
- [38] KWAK S B, KIM S J, KIM J, et al. Tumor regionalization after surgery: Roles of the tumor microenvironment and neutrophil extracellular traps [J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(6): 720–729.
- [39] ZHONG Z, LIANG S, SANCHEZ-LOPEZ E, et al. New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation [J]. *Nature*, 2018, 560(7717): 198–203.
- [40] CHEN K W, MONTELEONE M, BOUCHER D, et al. Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps [J]. *Sci Immunol*, 2018, 3(26): eaar6676.

[收稿日期]2024-03-28

李鹏, 黄敏丽, 谭邓旭, 等. 胰腺癌类器官模型的构建与应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(6): 40-46.

Li P, Huang ML, Tan DX, et al. Construction and application of patient-derived pancreatic tumor organoid model [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 40-46.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.005

胰腺癌类器官模型的构建与应用

李 鹏^{1,2}, 黄敏丽^{1,2}, 谭邓旭², 张彩勤², 张永斌¹, 师长宏^{2*}

(1. 广州中医药大学动物实验中心, 广州 510405; 2. 第四军医大学实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 目的 构建胰腺癌类器官 (patient-derived tumor organoid, PDO) 并进行药物治疗评价, 评估 PDO 模型的有效性。**方法** 收集胰腺癌患者新鲜手术标本, 用于 PDO 培养; 分析 PDO 模型与原发瘤的病理学和遗传学特征; 利用 PDO 模型开展临床化疗药物的疗效评价, 测试模型的有效性。**结果** 成功建立一例胰腺癌 PDO 模型, 组织形态学分析显示 PDO 模型基本保持了原发肿瘤病理学特征。全外显子测序结果显示, PDO 在基因突变类型和特征方面与原始肿瘤保持一致。药物筛选试验显示, PDO 模型对临床常用的化疗药物吉西他滨、伊立替康具有较好的敏感性。**结论** 成功构建了一例胰腺癌 PDO 模型, 该模型能够反应原始肿瘤的组织学和遗传学特征, 并可以进行体外药物敏感性实验, 证明了 PDO 模型的有效性, 有望应用于胰腺癌的个体化治疗。

【关键词】 胰腺癌; 类器官; 药物筛选; 个体化治疗

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0040-07

Construction and application of patient-derived pancreatic tumor organoid model

LI Peng^{1,2}, HUANG Minli^{1,2}, TAN Dengxu², ZHANG Caiqin², ZHANG Yongbin¹, SHI Changhong^{2*}

(1. Animal Laboratory Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China.

2. Laboratory Animal Center, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

【Abstract】 Objective To construct a patient-derived pancreatic tumor organoid (PDO) and evaluate its effectiveness. **Methods** We collected fresh surgical specimens from pancreatic cancer patients for PDO culture and compared the pathological and genetic characteristics of the PDO model with those of primary tumors. The PDO model was used to evaluate the efficacy of clinical chemotherapy drugs, and the effectiveness of the model was assessed. **Results** A PDO model of pancreatic cancer was successfully established. Histomorphological analysis indicated that the PDO model maintained the basic pathological characteristics of the primary tumor. Whole-exon sequencing showed that both the organoids and original tumor tissue remained consistent in their gene mutation type and characteristics. Drug screening tests revealed that the PDO model had good sensitivity to gemcitabine and irinotecan. **Conclusions** A pancreatic cancer PDO was successfully constructed that reflected the histological and genetic characteristics of the original tumor. The model was shown to be effective for drug sensitivity experiments *in vitro* and is expected to have implications for precision medicine assays.

【Keywords】 pancreatic cancer; organoid; drug screening; precision treatment

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

【基金项目】 国家自然科学基金 (32270566)。

【作者简介】 李鹏 (1996—), 男, 硕士, 研究方向: 类器官模型的构建和应用。E-mail: 1715557495@qq.com

【通信作者】 师长宏 (1973—), 男, 教授, 研究方向: 肿瘤模型的制备与评价。E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 是一种临床常见的恶性肿瘤, 30% 的 PDAC 患者被诊断为临床局限性疾病, 可以进行手术切除。但是手术切除后, 大多数患者会出现局部或远处复发^[1-2]。化疗是患者术后的首要选择, 但是 PDAC 患者的术后化疗通常基于临床经验和患者状态, 仅有一小部分患者对化疗敏感。因此, 建立合适的临床前模型, 为患者最有效的化疗方案选择提供依据成为现在临床的迫切要求。

最近几年, 一种新的临床前类器官 (patient-derived tumor organoid, PDO) 模型为评估患者药物敏感性提供新的选择^[3-4]。PDO 模型是一种 3D 培养的具有自我扩增、自我组织的细胞聚集物。相较于长期传代丧失了亲本组织的遗传学特征和肿瘤异质性的肿瘤细胞系模型, 该模型较好地保留了原始肿瘤的生物学特征和肿瘤标志物, 这可能在评估患者的药物敏感性和精准医疗方面具有巨大的潜力^[5-6]。

本研究通过收集临床胰腺癌患者手术标本, 建立相应的胰腺癌 PDO 模型, 分析模型与原始肿瘤组织的异质性, 进一步利用 PDO 模型筛选敏感化疗药物, 从而评估 PDO 模型作为临床前模型的有效性, 期望能为胰腺癌的临床治疗提供理想的临床前模型。

1 材料和方法

1.1 胰腺癌组织标本

所有胰腺癌组织样本取自西京医院消化外科进行手术的胰腺癌患者。肿瘤组织通过病理学检查确定为胰腺癌肿瘤组织。所有患者均签署知情同意书, 同意使用肿瘤标本进行科学研究。本研究所有实验过程均通过西京医院医学伦理委员会审查 (KY20203128-1)。

1.2 主要试剂与仪器

DMED/F12 培养基 (Gibco 公司, 11330057); TrypLE 酶 (Gibco 公司, 12605010); Matrigel 基质胶 (Corning 公司, 356231); 胶原酶 II (Sigma-Aldrich 公司, 1148090); 胶原酶 IV (Sigma-Aldrich 公司, C4-BIOC); FGF10 (RD 公司, 345-FG-025/CF); EGF (RD 公司, 236-EG-200); A83-01 (RD 公司, 2939/10); 烟酰胺 (RD 公司, 4106/50); B27 (RD 公司, MAB4212F); Forskolin (RD 公司, 344281-M); Noggin (RD 公司, GF173); Y-27623 (Selleck 公司, S1049);

吉西他滨 (Selleck 公司, S1714); 伊立替康 (Selleck 公司, S1198); 5-氟脲嘧啶 (Selleck 公司, S1209); 紫杉醇 (Selleck 公司, S1150); 胎牛血清 (Gibco 公司, A5669701); CA19-9 (abcam 公司, ab3982); CEA (abcam 公司, ab133633); Ki67 抗体 (abcam, ab238020)。24 孔平底组织培养板 (Corning 公司, 3337); 50 mL 离心管 (Corning 公司, 480143); 70 μ m 滤网 (Corning 公司, 431751); CellTiter-Glo (Promega 公司, G7570); 倒置光学显微镜 (Nikon 公司, 中国); 酶标仪 (Thermo Fisher Scientific 公司, 中国); 全外显子测序由杭州联川生物完成。

1.3 实验方法

1.3.1 样本处理

术后取胰腺癌样本大小约 1 cm $\times$ 1 cm $\times$ 1 cm 置于无血清培养基中。快速转移到超净工作台。将样本分为 3 部分, 较大的部分进行 PDO 培养, 小部分使用 4% 多聚甲醛固定用作包埋切片, 一部分置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻用作基因测序。

1.3.2 肿瘤组织消化

使用无菌剪刀将较大的肿瘤组织剪碎, 用 1.5 mg/mL 胶原酶 II, 10 μ g/mL 透明质酸酶 IV 和 10 μ mol Y-27632 进行消化酶解。将消化液和剪碎的组织混合在 15 mL 离心管中, 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床上震动消化, 待混合液中无明显组织块后, 使用含有 10% 血清的培养基终止消化。用 100 μ m 滤网将混合液过滤, 过滤后在 4 $^{\circ}$ C 800~1200 r/min 条件下离心 3 min, 弃掉上清。加 PBS 重悬, 洗涤 2~3 次。

1.3.3 类器官培养

Matrigel 提前置于冰上解冻, 将细胞沉淀重悬在 70% 的 Matrigel 和 30% 的 DMED/F12 培养基的混合液中, 以每孔 30 μ L 的体积加入到 24 孔板底部中间, 倒置 24 孔板于 37 $^{\circ}$ C 孵箱中 15~30 min。待 Matrigel 凝固之后, 每孔加入 500 μ L 配好的 PDO 培养。PDO 培养基成分为 DMEM/F12、HEPES 10 mmol、Glutamax 1X、A83-01 500 nmol、hEGF 50 ng/mL、hNoggin 100 ng/mL、hFGF10 100 ng/mL、hGastrin I 0.01 μ mol、Nacetylcysteine 1.25 mmol、Nicotinamide 10 mmol、PGE2 1 μ mol、B27 supplement 1X、Rspodin1 conditioned media 10% 和 Afamin/Wnt3A 条件培养基 50%^[7-8]。每 3 d 换液 1 次, 每 1~2 周传代 1 次。

1.3.4 类器官传代

机械传代, 用 1000 μ L 枪头轻轻刮下 Matrigel,

吹打 2~3 min,离心弃上清。以每孔 30 μL 的体积加入到 24 孔板底部中间,倒置 24 孔板于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中 15~30 min。Matrigel 凝固之后,每孔加入 500 μL 配好的 PDO 培养;消化液传代,待 PDO 直径达到 200 μm ,弃去 PDO 培养基。每孔加入 500 μL TrypLE 酶,用 1000 μL 枪头轻轻刮下 Matrigel,轻轻吹散,在显微镜下观察 PDO 破碎之后,加入含有 10% 血清的培养基终止消化。离心弃上清,使用预冷的含 1% 双抗的 PBS 重复 2~3 次,其余操作同上。传代后的 PDO 根据数量按照 1:2~1:4 的比例重新铺板。

1.3.5 类器官冻存和复苏

类器官的冻存:待 PDO 直径达到 100 μm ,用 1000 μL 枪头轻轻刮下 Matrigel,离心弃上清,使用预冷的含 1% 双抗的 PBS 重复 2~3 次,在 90% 的血清和 10% 的 DMSO 配成的冻存液重悬,置于冻存管中,放入冻存盒后转移到 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,24 h 后放入到液氮中保存。

类器官的复苏:快速将冻存管从液氮中取出,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中解冻,后使用含有 10% 血清的培养基重悬,离心弃上清得到 PDO,其余操作同类器官培养。

1.3.6 HE 染色及免疫组化检测

待 PDO 直径达到 200~300 μm 时,将 PDO 从板中刮下离心,收集 PDO 于 4% 多聚甲醛中,进行石蜡包埋切片。HE 染色:石蜡切片脱蜡后,使用梯度浓度乙醇脱水,细胞核使用苏木精染色,细胞质使用伊红染色,脱水后用中性树脂封片,干燥后置于显微镜下拍摄。

免疫组化染色:脱蜡后的石蜡切片梯度浓度乙醇脱水,抗原修复,封闭,添加抗体 CA19-9 (1:200)、CEA (1:2000)、Ki-67 (1:200) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 15 min, DAB 显色,细胞核使用苏木精染色,脱水后用中性树脂封片,干燥后置于显微镜下拍摄。

1.3.7 药物敏感性测试

PDO 被消化成单细胞,计数后重悬在 10 μL 10% Matrigel/PDO 培养基中,每孔 3500 个细胞铺在 96 孔板中。第一列和最后一列不加细胞,第二列和倒数第二列加入细胞和 DMSO。待基质胶凝固后加入 100 μL PDO 培养基,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中。24 h 后,按照人的血药浓度为最高计量,以 5 倍稀释设置 5 个给药浓度给予吉西他滨 (Gemcitabine)、紫杉醇

(Paclitaxel)、5-FU 尿嘧啶 (5-Fluorouracil) 和伊利替康 (Irinotecan),72 h 后使用 CellTiter-Glo 试剂盒由酶标仪检测并读数。

1.3.8 全外显子测序

使用 1 mL 移液枪将 PDO 由 24 板孔中吹下,转移到 15 mL 离心管中。以 1200 r/min,5 min 进行离心,弃去上清。对沉淀吹打 30~50 次,加入预冷的 PBS 清洗细胞沉淀 2~3 次,最后加入 200 μL PBS 重悬细胞备用。全外显子测序由杭州联川生物完成。

1.4 统计学方法

应用 GraphPad Prism 8 软件对实验数据进行绘图和统计学分析。

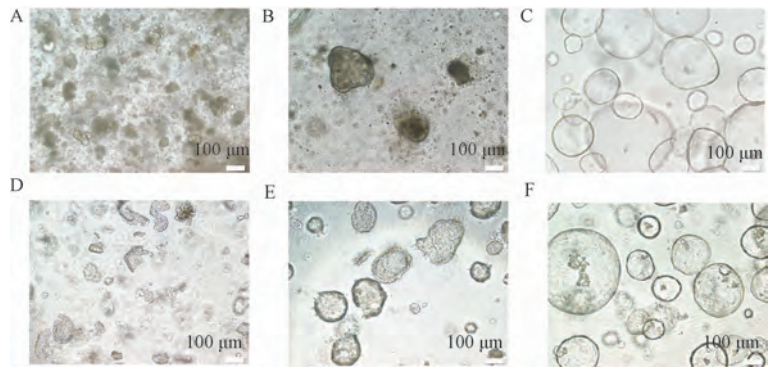
2 结果

2.1 胰腺癌 PDO 模型的构建

本研究从接受外科手术的胰腺癌患者手术标本中获取部分肿瘤组织,2 h 内运输到实验室。经过肿瘤组织消化酶处理后过滤得到胰腺癌肿瘤细胞,包裹在 Matrigel 胶中培养。光镜下,部分肿瘤细胞在 48 h 内已经组装成 PDO,呈现管腔与实心的混合形态,较大的 PDO 直径已经达到 100 μm (图 1A)。P1 代时,PDO 直径达到 200 μm 。为了保护细胞活性,P1 代选择机械消化,继续培养 15 d 后,PDO 最大直径可达到 400 μm (图 1B)。P3 代可观察到 PDO 数量明显增多,Matrigel 背景逐渐干净,PDO 呈现管腔样并大量扩增 (图 1C)。传代、复苏和冻存操作会短时间丧失 PDO 结构 (图 1D 和 1E),72 h 后 3D 结构恢复 (图 1F)。该例胰腺癌 PDO 可持续生长,并可传代 5 代以上。

2.2 胰腺导管腺癌 PDO 形态学鉴定

将原始肿瘤组织和 PDO 模型包埋成石蜡切片。对原始肿瘤组织和 PDO 模型进行组织形态学鉴定。HE 染色显示,导管腺癌 PDO 呈现管腔样形态,在形态上和原始肿瘤组织基本保持一致 (图 2A)。进一步做 IHC 染色,PDO 在糖类蛋白肿瘤标志物 CA19-9 (图 2B)、癌胚抗原 CEA (图 2C)、增殖标志物 Ki-67 (图 2D) 的表达上均为阳性,并和原始组织保持一致^[9]。值得注意的是,在 PDO 模型中,肿瘤标志物 CA19-9 和 CEA 的表达明显高于原始组织。这可能是由于肿瘤干细胞的富集导致^[10-11]。结果显示,胰腺导管腺癌 PDO 可以较好的维持原肿瘤形态结构和特征。



注:A:肿瘤组织处理后 48 h 后的明场图;B、C:类器官构建后的 P1 代和 P3 代的明场结果;D、E:传代和复苏操作使类器官短时间会失去结构;F:复苏 72 h 后类器官恢复完整的 3D 结构。

图 1 类器官光镜图

Note. A, Bright field image of the tumor tissue in this case 48 hours after processing. B/C, Bright field results of the P1 and P3 generations after organoid construction. D/E, Generations and resuscitation operations can cause the organoids to lose their structure in a short period of time. F, After 72 hours of resuscitation, the organoids have regained their complete 3D structure.

Figure 1 Photomicrographs of PDO

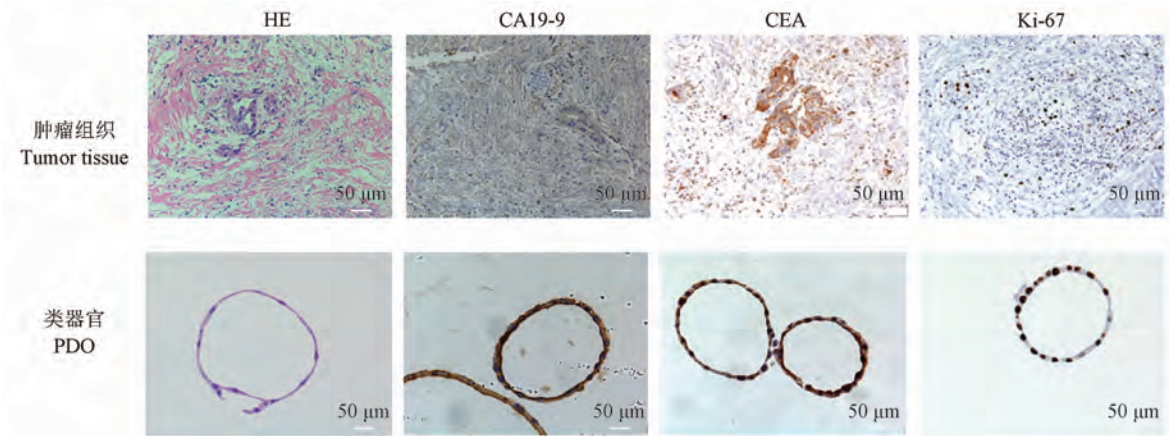


图 2 胰腺癌组织和对应 PDO 的 HE 染色和免疫组化染色

Figure 2 HE staining and Immunohistochemical staining of pancreatic cancer tissue and PDO

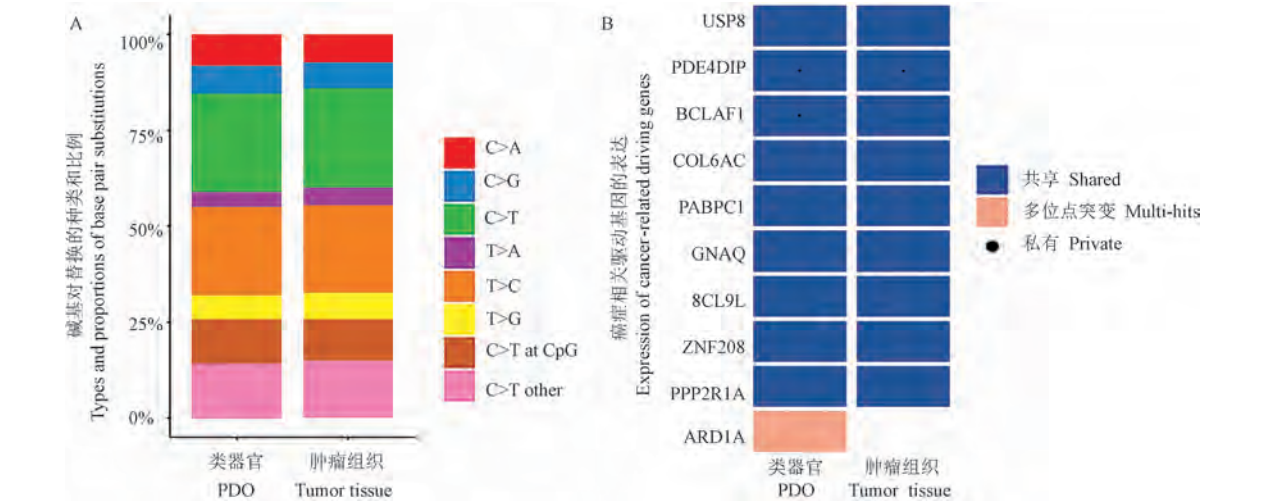
2.3 胰腺癌 PDO 与肿瘤组织基因组学测序

为进一步探究 PDO 能否在基因水平上反应原始肿瘤的生物学特性,我们对 PDO 和原始组织进行 WGS 测序。外显子是指一个物种基因组全部外显子区域的总和,其中包含着合成蛋白质所需的重要信息。由于和生物体表型变化相关的功能性突变大部分位于外显子区域,因此外显子对于研究疾病和个体差异具有重要意义。测序结果显示,胰腺癌 PDO 和原始组织的单核苷酸变体 (single nucleotide variant, SNV) 高度相似,说明 PDO 保留了原始肿瘤组织的突变特征(图 3A)。分析来自 PDO 和原始组织的癌症相关基因的体细胞变异结果,用来说明两者在体细胞突变层面具有遗传稳定性(图 3B)。结

果显示胰腺癌类器官和原始肿瘤组织在突变特征上和体细胞基因突变高度相似,胰腺癌 PDO 很好地保留了原发瘤的遗传特征。

2.4 胰腺癌 PDO 药物敏感性

为了检测 PDO 对化疗药物的敏感性。使用 4 种临床常用的一线化疗药物盐酸吉西他滨、紫杉醇、5-氟尿嘧啶和伊立替康对 PDO 进行药物敏感性测试。参考文献以血药浓度为最高浓度,以 5 倍稀释设置五个浓度梯度,并根据结果绘制剂量效应曲线^[12]。结果显示,该 PDO 对于盐酸吉西他滨(图 4A)、紫杉醇(图 4B)、5-氟尿嘧啶(图 4C)和伊立替康(图 4D)呈现出不同的药物敏感性,并呈浓度依赖。盐酸吉西他滨和伊立替康最为敏感,72 h 的肿

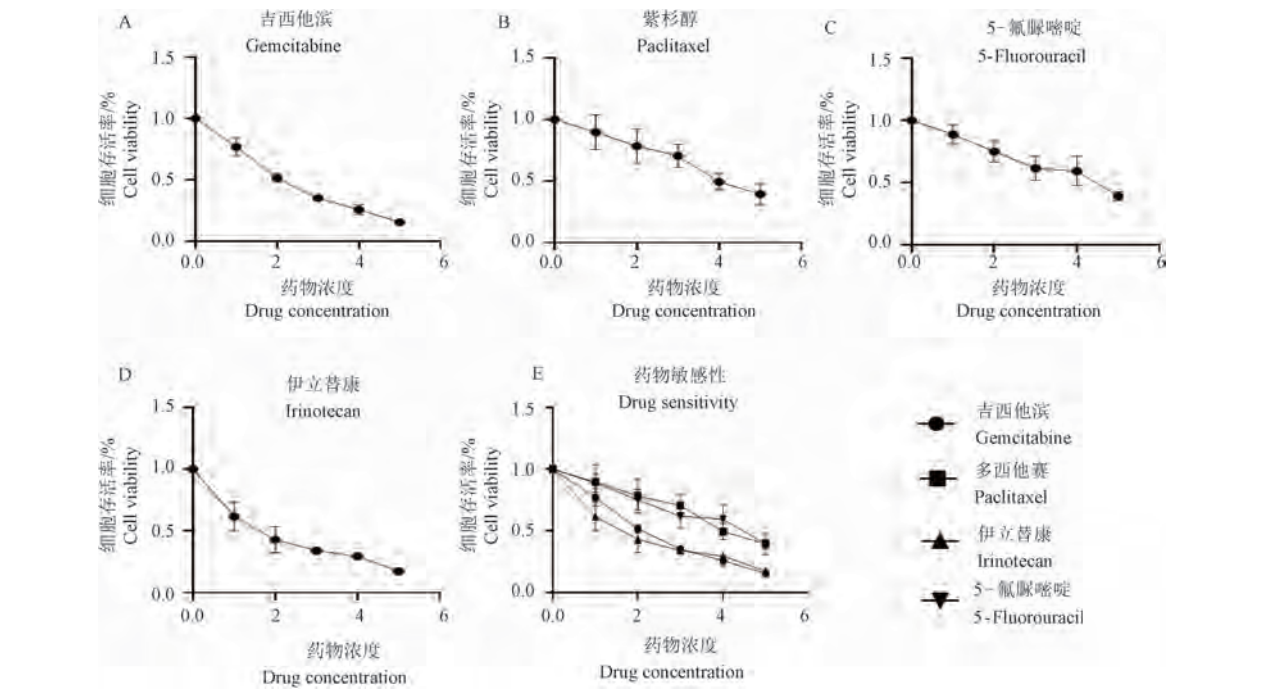


注:A:在 SNV 中原始肿瘤组织和类器官在碱基对替换的类型和比例;B:原始组织和类器官在癌症相关驱动基因的表达。

图 3 胰腺癌组织与胰腺癌类器官的突变特征

Note. A, Types and proportion of base pair replacement in the original tumor tissue and organoids in SNV. B, Expression of cancer-related driving genes in primitive tissues and organoids.

Figure 3 Mutation characteristics of pancreatic cancer tissues and PDO



注:按照不同浓度处理 72 h 后,通过 CellTiter-Glo 测定细胞活力,并将结果标准化为与 DMSO 处理的对照细胞。每个数据点代表 3 个副本的均值。

图 4 胰腺癌 PDO 的药物敏感性

Note. After treatment with various concentrations for 72 hours, cell viability was measured using CellTiter-Glo and the results were normalized to control cells treated with DMSO. Each date point represents the mean of the three replicas.

Figure 4 Drug sensitivity of PDO in pancreatic cancer

瘤抑制率分别达到 85%、87%(图 4E)。

3 讨论

胰腺导管腺癌是一种具有高度异质性的恶性

肿瘤,目前的临床治疗面临着巨大难题。建立合适的临床前模型对于预测胰腺癌患者的药物敏感性、制定有效的治疗策略具有重要意义^[13]。PDO 模型作为现在最有前景的临床前模型备受瞩目。相比

较于传统的 2D 模型, PDO 模型较好地保留了原始肿瘤组织的分子特征和空间结构, 并且存在更高的建立效率, 在多种癌症中得到应用^[14]。相比较于 PDX 模型, PDO 模型成本低、建模速度快, 可以在体外长期传代, 还可进行高通量药物筛选, 这使得 PDO 模型作为临床前模型存在巨大优势。

在本研究中, 我们成功建立胰腺癌 PDO 模型。在 PDO 构建过程中, 我们观察到伴随传代的进行, 细胞死亡减少, PDO 直径和数量逐渐增加, 细胞增殖速度加快。P3 代即可获得足够数量的细胞, 以支持高通量药物筛选。这一整个过程只需要 1~2 个月的时间。因此, PDO 模型作为一种临床前模型, 在时间和通量上具有巨大的优势。

CA19-9、CEA 和 Ki-67 作为胰腺癌组织学的常用指标, 可以提供关于肿瘤的诊断、治疗反应和预后等方面的重要信息^[15]。通过 HE 染色和组化分析检测其在 PDO 和 PDOX 模型中的表达, 发现 PDO 和原始组织的表达均为阳性。值得注意的是, 在 PDO 模型中, 肿瘤标志物和增殖标志物的表达更高。这可能是由于 PDO 培养基对于上皮细胞和肿瘤干细胞具有选择性。全外显子测序结果显示, PDO 在突变特征和体细胞突变基因上和原始组织一致, 很好地保留了胰腺癌原始组织的基因组学特征。证明 PDO 模型作为肿瘤发生发展的研究模型具有重要意义。

最后, 我们使用了临床常用的一线化疗药物对胰腺癌 PDO 进行药物敏感性实验^[16]。结果显示, 该胰腺癌 PDO 对伊立替康和吉西他滨具有较好的敏感性, 可能对患者的临床药物选择具有指导意义。在使用 PDO 进行药物敏感性测试时, 为减少体外培养产生的突变对测试结果的影响, 建议使用低代次的样本(2~3 代)进行药物测试^[8]。如果使用冻存后解冻的样本, 则至少传代 1 次再进行测试, 以避免复苏时 PDO 失去形态带来的影响。若存在细胞活力低下的情况, 则需延长培养时间以恢复细胞状态。在药敏实验过程中, PDO 作为具有 3D 结构的细胞团相较于传统 2D 细胞体积较大, 在重力作用下会导致铺板不均匀。因此可根据实际情况进行消化, 尽量将其直径缩小或消化到单个细胞。同时, 为了更好地模拟体内环境, 仍需将 PDO 包裹在基质胶中以有效支撑 PDO 的三维结构, 且不会阻碍药物进入。最后使用 3D 细胞专用检测试剂盒来进行药物敏感性检测^[17-18]。但本研究也存在一些局限

性, 缺乏体内实验验证。通过将 PDO 植入到免疫缺陷小鼠皮下, 可以构建类器官异种移植模型(PDOX)。体内、体外实验的相互验证, 可以进一步检测类器官模型作为临床前模型的有效性。

总之, PDO 是目前最具有前景的个性化临床前模型, 通过建立胰腺癌 PDO 模型, 为基础研究提供快速、精准、高通量的实验平台。同时, 这种模型有助于优化患者治疗方案、推动精准治疗、改善患者预后, 促进药物研发和临床转化的进程。

参考文献:

- [1] KHORANA A A, MANGU P B, BERLIN J, et al. Potentially curable pancreatic cancer: American society of clinical oncology clinical practice guideline [J]. J Clin Oncol, 2016, 34(21): 2541-2556.
- [2] WINTER J M, CAMERON J L, CAMPBELL K A, et al. 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: a single-institution experience [J]. J Gastrointest Surg, 2006, 10(9): 1199-1211.
- [3] BOJ S F, HWANG C I, BAKER L A, et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer [J]. Cell, 2015, 160(1/2): 324-338.
- [4] TIRIAC H, BUCOBO J C, TZIMAS D, et al. Successful creation of pancreatic cancer organoids by means of EUS-guided fine-needle biopsy sampling for personalized cancer treatment [J]. Gastrointest Endosc, 2018, 87(6): 1474-1480.
- [5] LI L, KNUTSDOTTIR H, HUI K, et al. Human primary liver cancer organoids reveal intratumor and interpatient drug response heterogeneity [J]. JCI Insight, 2019, 4(2): e121490.
- [6] SHI X, LI Y, YUAN Q, et al. Integrated profiling of human pancreatic cancer organoids reveals chromatin accessibility features associated with drug sensitivity [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 2169.
- [7] GROSSMAN J E, MUTHUSWAMY L, HUANG L, et al. Organoid sensitivity correlates with therapeutic response in patients with pancreatic cancer [J]. Clin Cancer Res, 2022, 28(4): 708-718.
- [8] TIRIAC H, BELLEAU P, ENGLE D D, et al. Organoid profiling identifies common responders to chemotherapy in pancreatic cancer [J]. Cancer Discov, 2018, 8(9): 1112-1129.
- [9] DRIEHUIS E, VAN HOECK A, MOORE K, et al. Pancreatic cancer organoids recapitulate disease and allow personalized drug screening [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(52): 26580-26590.
- [10] KRETZSCHMAR K. Cancer research using organoid technology [J]. J Mol Med, 2021, 99(4): 501-515.
- [11] MAI C W, SHU Y, CHEONG S K, et al. Prostate organoid technology-the new POT of gold in prostate stem cell and cancer research [J]. Acta Physiol Sin, 2021, 73(2): 181-196.

[12] TAN D, AN J, GONG M, et al. Screening of an individualized treatment strategy for an advanced gallbladder cancer using patient-derived tumor xenograft and organoid models [J]. Front Oncol, 2022, 12: 1043479.

[13] CORSINI N S, KNOBLICH J A. Human organoids: new strategies and methods for analyzing human development and disease [J]. Cell, 2022, 185(15): 2756–2769.

[14] DROST J, CLEVERS H. Organoids in cancer research [J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18(7): 407–418.

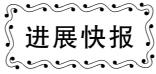
[15] GE L, PAN B, SONG F, et al. Comparing the diagnostic accuracy of five common tumour biomarkers and CA19-9 for pancreatic cancer: a protocol for a network meta-analysis of diagnostic test accuracy [J]. BMJ Open, 2017, 7(12): e018175.

[16] ADAMSKA A, DOMENICHINI A, FALASCA M. Pancreatic ductal adenocarcinoma: current and evolving therapies [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(7): 1338.

[17] VLACHOGIANNIS G, HEDAYAT S, VATSIOU A, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers [J]. Science, 2018, 359(6378): 920–926.

[18] GONG M, MENG H, TAN D, et al. Establishment of organoid models for pancreatic ductal adenocarcinoma and screening of individualized therapy strategy [J]. Animal Model Exp Med, 2023, 6(5): 409–418.

[收稿日期] 2023–11–10



焦虑症动物模型与病理机制的最新研究进展

焦虑症是一种以持续性的精神性焦虑、躯体性焦虑、睡眠障碍等为主要特征的精神疾病,其全球患病率为 7.3%~28.0%,被列为全球残疾的第六大贡献者,也是位居我国成人精神疾病首位。焦虑症受到多种复杂且相互作用的遗传、心理、社会和环境因素的影响,导致体内稳态破坏或失衡,并最终导致病理性焦虑。由于动物模型在探索疾病的病因、病理生理以及促进新药开发中均发挥着基石作用,本文在重点综述焦虑症最新的病理机制研究进展时,也对现有的焦虑动物模型及其评价方法进行了总结。

在本综述中,作者总结了现有的焦虑疾病动物模型,包括天敌暴露、社会隔离、母婴分离等非条件性应激模型、束缚应激、条件恐惧等条件性应激模型、药物诱导模型、转基因动物模型,以及常见的焦虑模型评价方法,并探讨上述模型和评价方法的优点与局限性。

通常认为,焦虑症的发生与神经递质功能、神经内分泌功能或者免疫功能的改变有关,而随着前沿科技手段的应用,一些新的潜在病理机制也被逐步发现,如离子通道信号改变、杏仁核线粒体自噬、神经环路协同损伤等。本文从神经递质、神经内分泌、免疫功能、神经营养因子、突触可塑性、离子通道、内源性大麻素系统、神经环路、肠道菌群、线粒体自噬、遗传等 11 个方面对焦虑症的病理机制进行综述,以期为焦虑症的后续研究提供参考。

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): 559–572. <https://doi.org/10.1002/ame2.12360>)。

于品,徐艳峰,韩云林,等.脊髓灰质炎疫苗脑内法猴体神经毒力试验的神经病理研究[J].中国比较医学杂志,2024,34(6):47-53.

Yu P, Xu YF, Han YL, et al. Neuro-pathological study of intrathalamic neurovirulence test of poliomyelitis vaccine in rhesus macaques [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 47-53.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.006

脊髓灰质炎疫苗脑内法猴体神经毒力试验的神经病理研究

于品,徐艳峰,韩云林,赵文杰,秦川*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,卫生部人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021)

【摘要】目的 探讨脊髓灰质炎疫苗猴体神经毒力试验毒力返强对神经免疫反应的影响及病理机制。**方法** I型、II型和III型Sabin株脊髓灰质炎灭活疫苗(Vero细胞)的原液(≥ 7000 lgCCID₅₀/L)以及 10^{-1} 稀释各型脊髓灰质炎疫苗采用脑内法进行神经毒力试验,观察脊髓灰质炎的病理变化,并利用免疫组织化学法检测脊髓灰质炎病毒受体CD155以及CD4⁺T淋巴细胞、CD20⁺B淋巴细胞和CD68⁺小胶质细胞的分布。**结果** 发生脊髓灰质炎的猴体出现脊髓炎症细胞浸润,少量神经元变性,脊髓神经元变性坏死、卫星现象、噬神经细胞现象、血管周围炎症细胞袖套状浸润和胶质细胞增生;主要为CD4⁺T淋巴细胞、CD20⁺B淋巴细胞和CD68⁺小胶质细胞大量浸润在血管袖套和增生的胶质结节中;在发生和未发生脊髓灰质炎的猴体中,CD155分布未见明显差别,均表达在神经元和胶质细胞,而血管内皮细胞未见表达。**结论** 脊髓灰质炎疫苗毒力返强导致典型病毒性脑脊髓炎。

【关键词】 脊髓灰质炎;疫苗;恒河猴;神经毒力试验;病理学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)06-0047-07

Neuro-pathological study of intrathalamic neurovirulence test of poliomyelitis vaccine in rhesus macaques

YU Pin, XU Yanfeng, HAN Yunlin, ZHAO Wenjie, QIN Chuan*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College, Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Beijing 100021, China)

【Abstract】Objective To study the effect and pathological mechanisms of the neuro-immune response to viral encephalomyelitis caused by virulence reversion following the intrathalamic neurovirulence test for poliomyelitis vaccine in rhesus macaques. **Methods** Stock solutions (≥ 7000 lgCCID₅₀/L) of inactivated polio vaccines (Vero cells) of type I, type II, and type III Sabin strains and 10^{-1} dilution of each type of polio vaccine were given to macaques, which were subjected to a intrathalamic neurovirulence test. Using immunohistochemical method, the pathological changes caused by polio, as determined by the distribution of CD155 and CD4⁺ receptor T lymphocytes, CD20⁺B lymphocytes, and CD68⁺ microglia, were detected. **Results** Lesions were observed on the virulence-reverted polio cases. Inflammatory cell infiltration, neuronal degeneration and necrosis, satellite phenomena, perivascular cuffing, and glial cell proliferation were observed in the spinal cord. The inflammatory cells in the perivascular cuffing and proliferative glial nodules were mainly

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2022-I2M-1-012)。

【作者简介】 于品(1984—),男,博士,研究方向:毒理病理学。E-mail:pinyupumc@126.com

【通信作者】 秦川(1959—),女,教授,博士生导师,研究方向:毒理病理学。E-mail:qinchuan@pumc.edu.cn

CD4⁺T lymphocytes, CD20⁺B lymphocytes, and CD68⁺ microglia. There was no significant difference in the distribution of the poliovirus receptor CD155 in the neurons and glial cells of monkeys with and without polio, and no expression was observed in their vascular endothelial cells. **Conclusions** Polio caused by virulence reversion of the intrathalamic neurovirulence test is viral encephalomyelitis.

[Keywords] poliomyelitis; vaccine; rhesus monkey; neurovirulence test; pathology

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

脊髓灰质炎 (poliomyelitis, polio) 是一种由 I 型、II 型和 III 型脊髓灰质炎病毒感染而引起的, 主要损害中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 的急性传染病, 多见于儿童, 俗称“小儿麻痹症”^[1]。脊髓灰质炎病毒通过结合免疫球蛋白样受体 CD155 和内存作用侵入人体, 感染 CNS^[2], 损害脊髓前角运动神经元, 少数患者会出现肢体肌肉分布不规则及轻重不等的弛缓性麻痹, 而导致瘫痪, 罕见患者因延髓神经细胞受到感染而导致呼吸麻痹甚至骤停, 危及生命^[1,3]。预防脊髓灰质炎的疫苗有 2 类, 一类是脊髓灰质炎灭活疫苗 (inactivated poliomyelitis vaccine, IPV), 1960 年由 Salk 等^[4]研制成功; 另一类是口服脊髓灰质炎减毒活疫苗 (oral poliomyelitis attenuated live vaccine, OPV), 1957 年由 Sabin 等^[5-6]研制成功, 脊髓灰质炎疫苗的推广使用有效地控制了脊髓灰质炎的感染与流行, 是预防和消灭该病的有力武器。IPV 通常由野毒株研制, 可能存在毒株泄露的生物安全风险; OPV 接种可能导致罕见的疫苗相关麻痹型脊髓灰质炎 (vaccine-associated paralytic poliomyelitis, VAPP) 以及疫苗衍生脊髓灰质炎病毒 (vaccine derived poliovirus, VDPV) 的传播^[1,7-9]。因此, 世界卫生组织鼓励利用减毒 Sabin 毒株生产制备 IPV。在某些情况下, 脊髓灰质炎疫苗可能会恢复神经毒性而导致脊髓灰质炎病变的发生, 对脊髓灰质炎疫苗的安全性评价可以提示临床上可能出现的不良反应。Sabin 疫苗免疫可能导致低风险的疫苗相关脊髓灰质炎, 这种低风险不良反应的发生率为 1/750 000^[10]。疫苗相关脊髓灰质炎是由于减毒疫苗基因组出现变异而导致, 而其导致脊髓灰质炎的情况仅出现在少数干扰素 α/β (interferon α/β , IFN α/β) 反应缺陷的接种者中^[11-13]。《中华人民共和国药典 (三部)》(2020 年版) 及世界卫生组织的相关规定指出, 脊髓灰质炎疫苗的神经毒性需要通过猴体神经毒力试验进行评价, 分为脊髓法和脑内法, 有报道称脑内法比脊髓法更为敏感^[14]。但对脑内法毒力返强所导致的神经免疫机制并不很清楚, 因此, 本研究对猴体神

经毒力试验的脊髓灰质炎病毒受体 CD155 以及毒力返强导致的病毒性脑脊髓炎的各种炎症细胞分布进行观察, 并分析其神经损伤机制, 从而为脊髓灰质炎疫苗临床前研制、动物模型建立以及临床诊治疫苗不良反应提供组织病理学基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

健康的普通级恒河猴 60 只, 1~3 年龄, 雌雄各半, 体重 1.5~3.0 kg, 购自中国医学科学院医学实验动物研究所北方资源中心 [SCXK (京) 2019-0014]。本实验前期进行脊髓灰质炎病毒中和抗体、结核、猴 B 病毒、泡沫病毒筛查工作, 检测排除以上潜在的疾病方可选入本实验。动物实验在中国医学科学院医学实验动物研究所新药安全研究评价中心进行 [SYXK (京) 2021-0058]。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。实验动物的福利和伦理遵循医学实验动物研究所有关实验动物福利和伦理方面的规定 (按照 AAALAC 标准) (ILAS-GLP-2015-002)。兽医每天对动物进行日常巡视观察, 当动物出现异常情况, 及时进行护理和治疗。

1.1.2 供试品

受试疫苗为 Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗 (Vero 细胞) I 型病毒工作种子批、Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗 (Vero 细胞) II 型病毒工作种子批和 Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗 (Vero 细胞) III 型病毒工作种子批。

1.2 主要试剂与仪器

甲醛 (批号 20150306)、二甲苯 (批号 20150618)、无水乙醇 (批号 20150413) 和苏木精 (批号 20150011)-伊红 (批号 20150011) 染色液均购自北京益利精细化学品有限公司; 没食子蓝染料 (批号 20150105) 购自上海源叶生物科技有限公司; 兔抗人 CD155 多克隆抗体 (bs-2525R) 购自中国 Bioss 公司; 大鼠抗人 CD3 单克隆抗体 (ab11089)、小鼠抗人 CD20 单克隆抗体 (ab9475) 和小鼠抗人 CD68 单克

隆抗体(ab74704)购自英国 Abcam 公司;CD4 抗体试剂(ZA-0519)、CD8 抗体试剂(ZA-0508)、超敏型二抗试剂盒和 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥公司;复方氯胺酮(国药准字 H42021639,批号 20151214)购自武汉久安药业有限公司。

Stoelting51600 型脑立体定位仪购自美国 Stoelting 公司;IVS-410 推拉式切片机购自日本 Sakura 公司;ASP300 全自动组织脱水机、ST5010 全自动染色机和 EG1150 H+C 石蜡包埋机购自德国 Leica 公司;BX53 光学显微镜购自日本 OLYMPUS 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组与处理方法

动物共分为 6 组,各组供试品分别为 I 型、II 型和 III 型 Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗(Vero 细胞)的原液($\geq 7000 \text{ lgCCID}_{50}/\text{L}$)以及 10^{-1} 稀释各型脊髓灰质炎疫苗,每组 10 只。采用脑内法在两侧视丘分别注入 0.5 mL 各组供试品。手术实验前 12 h 动物禁食不禁水,肌肉注射 0.1 mL/kg 复方氯胺酮进行麻醉,手术中途按需以麻醉药 1/3 体积进行追加。将动物麻醉后固定于脑立体定位仪上,暴露颅骨,于矢状缝和冠状缝交界处后方 1.5 cm 的矢状缝左右两侧各 1.0 cm 处打孔,穿透颅骨,进针深度为 2.4 cm。在恒河猴的两侧视丘分别注入 0.5 mL 供试品,不低于 $7000 \text{ lgCCID}_{50}/\text{L}$ 及 10^{-1} 供试品,注射速度为 0.05 mL/min,注入后留针 10 min 局部压迫止血 5 min。一侧完成后,进行另一侧丘脑内的注射。两侧供试品注射完成后,动物进行头皮缝合,等待其苏醒。术后 48 h 后密切观察动物的存活及术后恢复情况。

1.3.2 动物解剖与取材

术后观察 21 d 后安乐处死动物,进行病理解剖,观察各组织脏器,取出脑和脊髓,采用 10% 甲醛溶液浸泡固定并取材,经石蜡包埋后,制备厚度为 8~15 μm 的病理切片,包括额叶、顶叶、注射点(注射点前后各取 1 个切面)、颞叶、枕叶、海马、纹状体、基底节、丘脑(以上组织每个部位从两侧取材)、中脑、小脑、脑桥、延髓(2 个切面)、颈膨大(10 个切面)、腰膨大(12 个切面)。

1.3.3 HE 染色、没食子蓝染色和免疫组织化学法检查猴神经组织病理变化

采用常规 HE 染色、没食子蓝染色及免疫组织化学法(IHC)检测脊髓灰质炎受体 CD155、CD3⁺T

淋巴细胞、CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞、CD20⁺B 淋巴细胞和 CD68⁺小胶质细胞,使用光学显微镜观察;同时各个指标的 IHC 设置阴性对照、阳性对照和同型对照,以排除染色的非特异性反应。

2 结果

2.1 一般症状观察

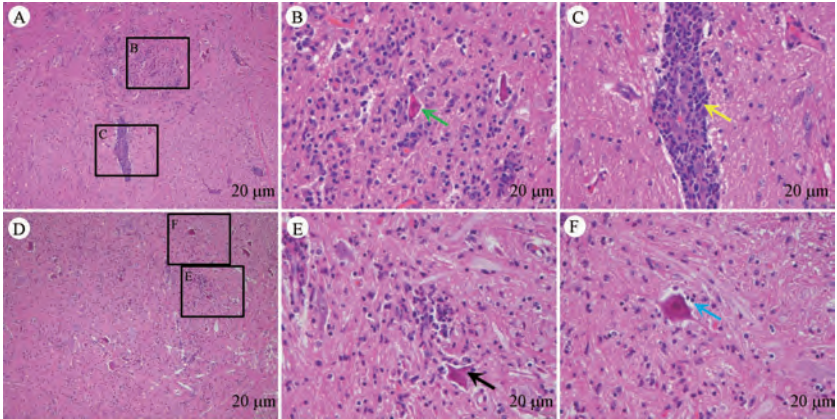
脊髓灰质炎疫苗供试品视丘内接种恒河猴,密切观察 48 h,动物未见明显异常表现,上、下肢运动自如。接种后第 2 天,动物饮食正常,对外界刺激反应灵敏。观察期内,未见有嗜睡、昏迷、惊厥、癫痫、共济失调、上下肢震颤和眼球震颤及偏瘫等神经功能异常症状。

2.2 脊髓灰质炎疫苗毒力返强导致神经免疫损伤

对受检中枢神经系统组织切片进行光学显微镜下观察,检查部位包括额叶、顶叶、注射点(注射点前后各取 1 个切面)、颞叶、枕叶、海马、纹状体、基底节、丘脑(以上组织每个部位从两侧取材)、中脑、小脑、脑桥、延髓(2 个切面)、颈膨大(10 个切面)、腰膨大(12 个切面),发现 60 只恒河猴中, Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗(Vero 细胞)I 型病毒工作种子批原液组中出现 2 例轻度神经系统病变(包括 1 例注射点部位轻度脑炎和轻度脊髓灰质炎、1 例注射点部位轻度脑炎)。对上述 2 只恒河猴中枢神经系统组织切片进行神经免疫病理学研究,针迹周围可见炎症细胞浸润,丘脑血管袖套形成,少量神经元变性,颈膨大部分颈髓切面炎症细胞浸润,少量神经元变性,腰膨大部分腰髓切面炎症细胞浸润,少量神经元变性,脊髓出现神经元变性坏死、尼氏小体消失、卫星现象、噬神经细胞现象、血管周围炎症细胞袖套状浸润和胶质细胞增生,呈轻度脑炎和轻度脊髓灰质炎病变特征,结果如图 1 和图 2 所示。其他 58 只恒河猴的脑组织切片上,仅表现为轻微炎症细胞浸润,未见神经细胞损伤,提示未发生脊髓灰质炎。

2.3 脊髓灰质炎疫苗毒力返强对受体 CD155 分布的影响

IHC 检测结果显示,在未出现脊髓灰质炎的猴体中,CD155 的表达位点在正常脊髓的神经元和胶质细胞中,而非血管内皮细胞中(图 3A);在发生脊髓灰质炎的猴体中,CD155 的表达位点在脑部注射针迹处的胶质细胞(图 3B)和脊髓的神经元和胶质细胞中,而非血管内皮细胞中(图 3C、3D)。

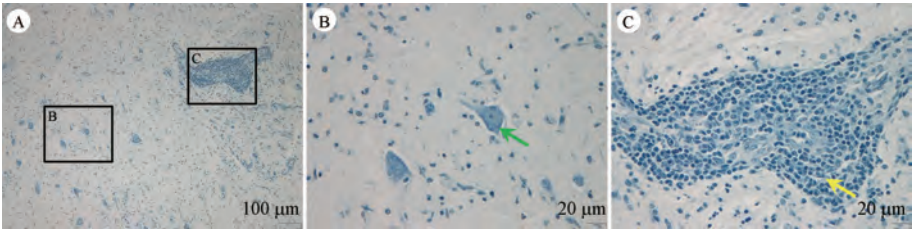


注:A:脊髓灰质炎的病理改变,血管袖套和胶质细胞增生;B~C:A 的局部放大,绿色箭头显示神经元坏死,黄色箭头显示血管袖套;D:脊髓灰质炎神经元坏死和噬神经细胞现象的病理变化;E~F:D 的局部放大,黑色箭头显示神经元坏死和噬神经现象,蓝色箭头显示噬神经现象和“卫星”现象。A 和 D 分别取自两只具有轻度损伤的恒河猴脊髓。

图 1 脊髓灰质炎疫苗神经毒性试验的神经损害(HE 染色)

Note. A, Pathologic changes of poliomyelitis, perivascular cuffing and glial cell hyperplasia. B~C, Focal magnifications of A, green arrow indicates the neuronal necrosis, yellow arrow indicates perivascular cuffing. D, Pathologic changes of poliomyelitis neuronal necrosis and neuronophagia phenomenon. E~F, Focal magnification of D, black arrow indicates neuronal necrosis and neuronophagia phenomenon, blue arrow indicates neuronophagia phenomenon and “satellite” phenomenon. A and D were captured from spinal cords of two rhesus macaques with mild lesions, respectively.

Figure 1 Neural lesions of poliomyelitis by poliomyelitis vaccine neurotoxicity test(HE staining)

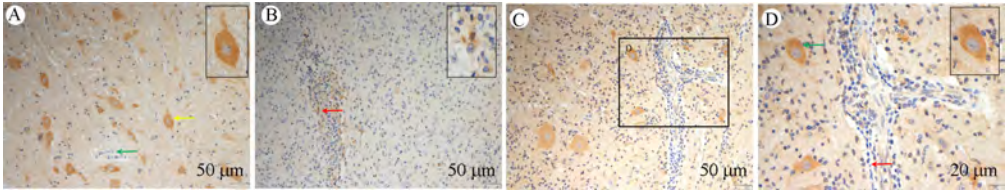


注:A:脊髓灰质炎的病理变化,血管袖套和神经胶质细胞增生;B~C:A 的局部放大,绿色箭头显示噬神经现象和“卫星”现象,黄色箭头显示血管袖套。

图 2 脊髓灰质炎疫苗导致恒河猴脊髓的神经损伤

Note. A, Pathologic changes of poliomyelitis, perivascular cuffing and glial cell hyperplasia. B~C, Focal magnification of A, green arrow indicates neuronophagia phenomenon and “satellite” phenomenon, yellow arrow indicates perivascular cuffing.

Figure 2 Neural lesions by poliomyelitis vaccine neurotoxicity test in the spinal cord of rhesus macaque



注:A:CD155 在空白对照组的脊髓神经元(黄色箭头)和神经胶质细胞中表达,在血管内皮细胞中呈阴性(绿色箭头);B:在注射部位的神经胶质细胞(红色箭头)中表达的 CD155;C:CD155 在脊髓灰质炎猴的脊髓神经元和神经胶质细胞中表达;D:C 的局部放大,CD155 在神经元(绿色箭头)和神经胶质细胞中表达,在血管内皮细胞中显示为阴性(红色箭头)。A~B 和 C~D 分别取自两只轻度损伤恒河猴的脊髓。

图 3 脊髓灰质炎疫苗神经毒性试验中 CD155 在神经组织中的分布(免疫组织化学染色)

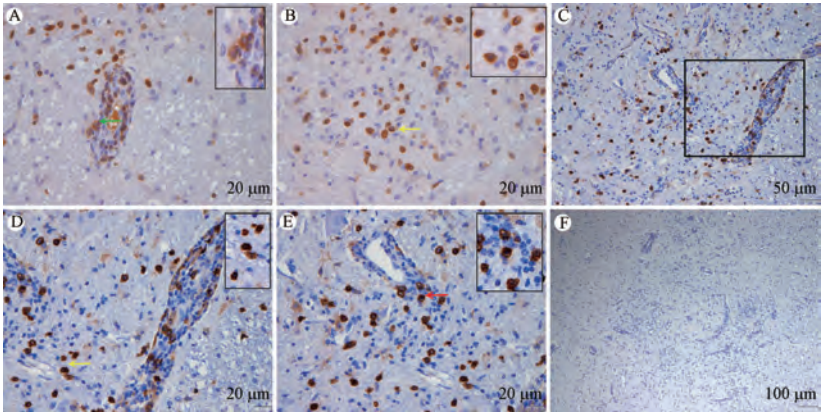
Note. A, CD155 expressed in neurons (yellow arrow) and glial cells of normal spinal cord in non-poliomyelitis monkeys, yet in vascular endothelial cells showed negative (green arrow). B, CD155 expressed in glial cells (red arrow) at the stitching position in the brain. C, CD155 expressed in neurons and glial cells of spinal cord in poliomyelitis monkeys. D, Focal magnification of C, CD155 expressed in neurons (green arrow) and glial cells, yet in vascular endothelial cells showed negative (red arrow). A~B and C~D were captured from spinal cords of two rhesus macaques with mild lesions, respectively.

Figure 3 Distribution of CD155 in the neural tissues of poliomyelitis vaccine neurotoxicity test (immunohistochemical staining)

2.4 脊髓灰质炎疫苗毒力返强对炎症细胞分布的影响

2.4.1 T 淋巴细胞分布

在脊髓灰质炎病灶中,出现大量 $CD3^{+}T$ 淋巴细胞浸润,主要分布在血管袖套和增生的胶质结节中(图 4A~4B); $CD4^{+}T$ 淋巴细胞大量浸润在增生的胶质结节和血管袖套中(图 4C~4E)。而在脊髓灰质炎病灶中未见 $CD8^{+}T$ 淋巴细胞(图 4F)。未出现脊髓灰质炎猴体的脊髓中未检测到 $CD3^{+}T$ 淋巴细胞、 $CD4^{+}T$ 淋巴细胞或 $CD8^{+}T$ 淋巴细胞的分布。

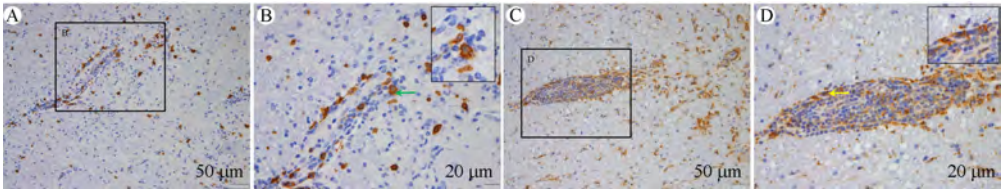


注:A: $CD3^{+}T$ 淋巴细胞分布在血管周围(绿色箭头);B: $CD3^{+}T$ 淋巴细胞分布在增生的神经胶质结节中(黄色箭头);C: $CD4^{+}T$ 淋巴细胞分布在脊髓灰质炎病灶中;D:C 的局部放大,分布在增生的神经胶质结节中的 $CD4^{+}T$ 淋巴细胞(黄色箭头);E:C 的局部放大,分布在血管周围的 $CD4^{+}T$ 淋巴细胞(红色箭头);F:未观察到 $CD8^{+}T$ 淋巴细胞。

图 4 脊髓灰质炎疫苗对 T 淋巴细胞的分布检测猕猴脊髓的神经毒性(免疫组织化学染色法)

Note. A, $CD3^{+}T$ lymphocytes distributed in perivascular cuffing (green arrow). B, $CD3^{+}T$ lymphocytes distributed in hyperplastic glial nodule (yellow arrow). C, $CD4^{+}T$ lymphocytes distributed in lesions of poliomyelitis. D, Focal magnification of C, $CD4^{+}T$ lymphocytes distributed in hyperplastic glial nodule (yellow arrow). E, Focal magnification of C, $CD4^{+}T$ lymphocytes distributed in perivascular cuffing (red arrow). F, $CD8^{+}T$ lymphocytes not observed.

Figure 4 Distribution of T lymphocytes by poliomyelitis vaccine neurotoxicity test in the spinal cord of rhesus macaque (immunohistochemical staining)



注:A: $CD20^{+}B$ 淋巴细胞分布在脊髓灰质炎病灶中;B:A 的局部放大,分布在血管周围的 $CD20^{+}B$ 淋巴细胞(绿色箭头)。C: $CD68^{+}$ 小胶质细胞分布在脊髓灰质炎病灶中;D:C 的局部放大, $CD68^{+}$ 小胶质细胞分布在血管周围(黄色箭头)。A 和 C 分别取自具有轻度损伤的两只恒河猴的脊髓。

图 5 脊髓灰质炎疫苗神经毒性试验中 B 淋巴细胞和小胶质细胞的分布

Note. A, $CD20^{+}B$ lymphocytes distributed in lesions of poliomyelitis. B, Focal magnification of A, $CD20^{+}B$ lymphocytes distributed in perivascular cuffing (green arrow). C, $CD68^{+}$ microglial cells distributed in lesions of poliomyelitis. D, Focal magnification of C, $CD68^{+}$ microglial cells distributed in perivascular cuffing (yellow arrow). A and C were captured from spinal cords of two rhesus macaques with mild lesions, respectively.

Figure 5 Distribution of B lymphocytes and microglial cells by poliomyelitis vaccine neurotoxicity test

3 讨论

脊髓灰质炎病毒经口感染,从口、咽、胃或肠道黏膜侵入人体,并定植于局部淋巴组织,仅需 3 d 即可引起第 1 次病毒血症,病毒即可感染呼吸道、心、肾、肝和胰等多处非神经组织,尤其可在全身淋巴组织繁殖,而引起第 2 次病毒血症,部分患者因抵抗力弱或体液免疫不足,脊髓灰质炎病毒可透过血脑屏障侵犯 CNS,甚至造成瘫痪^[15-17]。得益于脊髓灰质炎疫苗的广泛应用,全球脊髓灰质炎的病例数逐年下降,已由 1988 年的 35 万例降至 2004 年的 1189 例,而接种 OPV 可能出现疫苗衍生病例^[18],且疫苗衍生病例的病理表现鲜有报道。已有研究表明,人体感染脊髓灰质炎病毒的特点是病毒在神经细胞中生长,引起的脊髓麻痹型病变主要发生在脊髓前角运动神经元而导致瘫痪,严重的可在脑干、小脑、丘脑和大脑的皮质运动区引起散在病灶^[19-20]。镜下早期变化为神经细胞尼氏小体消失,细胞肿胀,由多角形变为圆形,进一步出现神经细胞坏死、噬神经细胞现象,胶质细胞增生结节,血管周围出现炎症细胞袖套状浸润^[19]。本研究对脑内法猴体神经毒力试验的脊髓灰质炎疫苗毒力返强的脊髓病变进行观察,发现其与人类感染而导致的 CNS 病变类似,表现为轻度脑炎和轻度脊髓灰质炎病变,颈膨大炎症细胞浸润,少量神经元变性,腰膨大炎症细胞浸润,少量神经元变性,脊髓出现神经元变性坏死、尼氏小体消失、卫星现象、噬神经细胞现象、血管周围炎症细胞袖套状浸润和胶质细胞增生;而与人体感染脊髓灰质炎不同之处在于,在猴脑组织中的病变主要集中在丘脑和脊髓部位,未见到在严重患者中存在的脑干、小脑和大脑的皮质运动区的病变。文献报道,脊髓灰质炎急性感染患者的脊髓灰质中出现特征性的血管袖套现象、噬神经细胞现象和脑膜炎,浸润的炎症细胞主要为淋巴细胞^[19,21]。本研究对猴体神经毒力试验中毒力返强造成的脑脊髓炎参与炎症反应的细胞进行了分类,血管周围袖套状的炎症细胞浸润灶和胶质结节中主要为 CD4⁺T 淋巴细胞、CD20⁺B 淋巴细胞和 CD68⁺小胶质细胞,而这些炎症细胞引起的神经免疫损伤分子病理机制有待进一步研究,本研究的意义在于对脊髓灰质炎疫苗的应用和副作用进行深入的分子病理学探讨,脊髓灰质炎疫苗的广泛应用对全球病例数的下降会产生积极的影响,同时强调

了接种脊髓灰质炎疫苗可能引发的疫苗衍生不良反应,从动物实验的角度强调了对这些可能发生的风险病例病理学表现,突出了猴体神经毒力试验中观察到的脊髓病变,表现为轻度脑炎和脊髓灰质炎病变,同时指出其与人类感染的相似性和差异性。

脊髓灰质炎病毒 3 个血清型的细胞受体都是 CD155,CD155 的 V 型结构域与脊髓灰质炎病毒相互作用,促进病毒颗粒释放病毒 RNA 基因组到被感染细胞的细胞质中^[13]。CD155 在肠道细胞表达的研究显示了脊髓灰质炎病毒的细胞嗜性,人类肠上皮细胞产生大量 CD155RNA,提示了这些细胞是脊髓灰质炎病毒在人体最初发生复制的部位^[22]。在人体,CD155 蛋白在肠上皮中的 Peyer's 结中的 M 细胞以及生发中心中检测到,恒河猴并不适合经口途径感染,其 CD155 蛋白在滤泡相关上皮中很少表达^[23]。本研究观察到,脊髓灰质炎受体 CD155 在恒河猴脊髓组织中的分布未见明显差别,均表达在神经元和胶质细胞,而血管内皮细胞未见表达,推测受体 CD155 可能并不是造成毒力返强的原因。人类是脊髓灰质炎病毒唯一的天然宿主,因此用于实验性脊髓灰质炎病毒感染的动物很少,黑猩猩和旧大陆猴(如恒河猴和非洲绿猴),可进行实验性感染研究,受体 CD155 分子与脊髓灰质炎病毒的结合部位,在哺乳动物中呈现丰富的多样性,这可能解释了非人灵长类动物不易感染脊髓灰质炎病毒的重要原因之一^[13]。

综上所述,本研究对猴体神经毒力试验中毒力返强导致的 CNS 病变进行观察,对脊髓灰质炎病毒受体 CD155 以及毒力返强导致的病毒性脑脊髓炎的各种炎症细胞分布进行定位,发现 CD4⁺T 淋巴细胞、CD20⁺B 淋巴细胞、CD68⁺小胶质细胞是参与病毒性脑脊髓炎的主要炎症细胞,通过免疫病理学角度,我们解释了脊髓灰质炎病毒引起的神经损伤的免疫机制。这一认识将为脊髓灰质炎疫苗的临床前研制提供关键的组织病理学基础。此外,我们的研究还为建立相应的动物模型和深入研究分子神经病理损伤机制提供了重要信息。通过病理学角度初步阐释了脊髓灰质炎病毒的神经损伤的免疫机制,这项研究通过深入的病理学观察和免疫学分析,为脊髓灰质炎的感染机制、疫苗应用和病理学表现提供了重要的实验病理学基础,为疫苗研发和潜在治疗提供了有益的信息,将为脊髓灰质炎疫苗临床前研制、动物模型建立以及分子神经病理损伤

机制提供组织病理学基础,从实验病理学的角度解释临床诊治疫苗不良反应的病理机制。

参考文献:

[1] PLATT R, ESTIVARIZ F, SUTTER W. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis: a review of the epidemiology and estimation of the global burden [J]. J Infect Dis, 2014, 210 (Suppl 1): S380-S389.

[2] BRANDENBURG B, LEEL Y, LAKADAMYALI M, et al. Imaging poliovirus entry in live cells [J]. PLoS Biol, 2007, 5 (7): e183.

[3] DUINTJERTEBBENS R J, PALLANSCHM A, KIMJ H, et al. Oral poliovirus vaccine evolution and insights relevant to modeling the risks of circulating vaccine-derived polioviruses (cVDPVs) [J]. Risk Anal, 2013, 33(4): 680-702.

[4] SALK J E. Persistence of immunity after administration of formalin-treated poliovirus vaccine [J]. Lancet, 1960, 2 (7153): 715-723.

[5] SABINA B. Properties and behavior of orally administered attenuated poliovirus vaccine [J]. J Am Med Assoc, 1957, 164 (11): 1216-1223.

[6] SABINA B. Oral, live poliovirus vaccine for elimination of poliomyelitis [J]. Arch Intern Med, 1960, 106: 5-9.

[7] AGOLV I. Vaccine-derived polioviruses [J]. Biologicals, 2006, 34(2): 103-108.

[8] KEWO M, SUTTER W, DEGOURVILLE E M, et al. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication [J]. Annu Rev Microbiol, 2005, 59: 587-635.

[9] KHETSURIANI N, PREVOTSD R, QUICK L, et al. Persistence of vaccine-derived polioviruses among immunodeficient persons with vaccine-associated paralytic poliomyelitis [J]. J Infect Dis, 2003, 188(12): 1845-1852.

[10] NKOWANE M, WASSILAKS G, ORENSTEINW A, et al. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis. United States: 1973 through 1984 [J]. JAMA, 1987, 257(10): 1335-1340.

[11] EVANS M, DUNN G, MINORP D, et al. Increased neurovirulence associated with a single nucleotide change in a noncoding region of the Sabin type 3 poliovaccine genome [J]. Nature, 1985, 314(6011): 548-550.

[12] MARTINEZCV, OLDM O, KWOCKD K, et al. Shedding of

sabin poliovirus Type 3 containing the nucleotide 472 uracil-to-cytosine point mutation after administration of oral poliovirus vaccine [J]. J Infect Dis, 2004, 190(2): 409-416.

[13] RACANIELLOV R. One hundred years of poliovirus pathogenesis [J]. Virology, 2006, 344(1): 9-16.

[14] 罗其胜, 罗国祥, 陈淑范, 等. 口服脊髓灰质炎减毒活疫苗猴体神经毒力试验病理检定分析 [J]. 生物制品学杂志, 1990, 3(2): 73-77.

LUO Q S, LUO G X, CHEN S F, et al. The analysis of pathology for the monkey neurovirulence test of oral polio vaccine [J]. Chin J Biol, 1990, 3(2): 73-77.

[15] WARREN M D. Poliomyelitis and polioencephalitis with opsoclonia following appendectomy [J]. Lancet, 1951, 1 (6648): 213-214.

[16] MURRAY L H. Poliomyelitis and polioencephalitis; the case for a review of terminology [J]. Br Med J, 1947, 2(4538): 1028-1030.

[17] KOSAKA T, KUROHA Y, TADA M, et al. A fatal neuromuscular disease in an adult patient after poliomyelitis in early childhood: consideration of the pathology of post-polio syndrome [J]. Neuropathology, 2013, 33(1): 93-101.

[18] BOMPART F. Vaccination strategies for the last stages of global polio eradication [J]. Indian Pediatr, 2005, 42(2): 163-169.

[19] SOLOMON I H, MILNER D A Jr. Histopathology of vaccine-preventable diseases [J]. Histopathology, 2017, 70(1): 109-122.

[20] MINOR P. The polio endgame [J]. Hum Vaccin Immunother, 2014, 10(7): 2106-2108.

[21] HATANPAAK J, KIMJ H. Neuropathology of viral infections [J]. Handb Clin Neurol, 2014, 123: 193-214.

[22] REN R, RACANIELLO V R. Poliovirus spreads from muscle to the central nervous system by neural pathways [J]. J Infect Dis, 1992, 166(4): 747-752.

[23] IWASAKI A, WELKER R, MUELLER S, et al. Immunofluorescence analysis of poliovirus receptor expression in Peyer's patches of humans, primates, and CD155 transgenic mice; implications for poliovirus infection [J]. J Infect Dis, 2002, 186(5): 585-592.

[收稿日期] 2023-11-13

王兆博,潘熠,林谦,等. 基于慢性心肌缺血小鼠模型探究心电图 T 波低平的电生理机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34 (6): 54-62.

Wang ZB, Pan Y, Lin Q, et al. Exploring the electrophysiological mechanisms of T-wave flattening in electrocardiogram in the mouse model of chronic myocardial ischemia [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 54-62.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.007

基于慢性心肌缺血小鼠模型探究心电图 T 波低平的电生理机制

王兆博^{1#}, 潘熠^{1#}, 林谦^{1*}, 钟菊迎^{2*}

(1.北京中医药大学东直门医院,心血管内科一区,北京 100700;2.中国中医科学院,医学实验中心,北京 100700)

【摘要】 目的 建立通过稳定的冠心病慢性心肌缺血小鼠模型,初步阐述缺血状态下 T 波低平的电生理原理。**方法** 将 APOE^{-/-}小鼠随机分为模型组和降脂药 (lipid-lowering drug, LLD) 组,高脂饮食喂养 3 个月,同时设立 C57BL/6J 小鼠作为空白组。检测造模前后小鼠心电图变化,通过核素 PET/CT 扫描评估心脏血流灌注情况,使用主动脉苏木伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色和油红染色评估斑块动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 病理。同时,分离小鼠心肌细胞并记录心肌细胞动作电位。**结果** 高脂喂养 3 个月后模型组小鼠的胆固醇 (cholesterol, CHO) 和低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL-C) 显著升高,同时主动脉出现脂质斑块。LLD 组病变减少,空白组无斑块。心肌核素扫描显示模型组小鼠的心肌血流灌注显著低于 LLD 组和空白组。小鼠心电图显示模型组和 LLD 组的 T/QRS 显著降低,空白组无明显改变。记录心肌细胞动作电位发现,缺血的内层心肌细胞复极速率增加,内外电位差减小是 T 波低平的主要电生理机制。**结论** APOE^{-/-}小鼠可用于慢性心肌缺血小鼠模型,缺血状态下内层心肌复极速率的增加可能是心电图 T 波降低的主要原因。

【关键词】 冠心病;慢性心肌缺血;小鼠心电图;T 波低平

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0054-09

Exploring the electrophysiological mechanisms of T-wave flattening in electrocardiogram in the mouse model of chronic myocardial ischemia

WANG Zhaobo^{1#}, PAN Yi^{1#}, LIN Qian^{1*}, ZHONG Juying^{2*}

(1. First District of Cardiovascular Medicine, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China.
2. Experimental Research Center of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700)

【Abstract】 Objective To establish a stable mouse model of chronic myocardial ischemia in coronary artery disease and preliminarily elucidate the electrophysiological mechanisms of T-wave flattening under ischemic conditions. **Methods** APOE^{-/-} mice were randomly divided into a model group and a lipid-lowering drug (LLD) group and subjected to a high-fat diet for 3 months. C57BL/6J mice fed a normal diet were used as the control group. Electrocardiograms were used to assess the mice before and after modeling, and cardiac perfusion was evaluated via nuclear PET/CT scans. Hematoxylin-eosin and oil red O staining were employed to assess pathological atherosclerosis (AS) plaque formation. Mouse myocardial cells were isolated, and action potentials were recorded. **Results** After modeling, mice in the model group exhibited a significant increase in cholesterol (CHO) and low-density lipoprotein C (LDL-C), along with the

【基金项目】 中国医学科学院自主课题资助项目 (zz2019015);高水平重点学科 (404053502)。

【作者简介】 王兆博 (1991—),男,博士,研究方向:心血管疾病的中西医结合治疗研究。E-mail:954172498@qq.com

潘熠 (1989—),女,硕士,研究方向:心血管疾病的中西医治疗研究。E-mail:287568160@qq.com *共同第一作者

【通信作者】 钟菊迎 (1981—),女,副研究员,研究方向:中医药心血管实验研究。E-mail:zhongjuying@hotmail.com

林谦 (1964—),女,主任医师,博士生导师,研究方向:心血管临床及研究。E-mail:bigbiglinqian@163.com

* 共同通信作者

appearance of lipid plaques in the aorta. Lesions in the LLD group were noticeably reduced, and no plaques formed in the control group. Myocardial nuclear scans revealed impaired blood perfusion in the hearts of the model group mice that was significantly lower than that in the LLD and control groups. The electrocardiograms indicated a significant reduction in T/QRS in both the model and LLD groups, with no significant changes observed in the control group. Myocardial cell action potential recordings revealed an accelerated repolarization rate in the inner-layer myocardial cells under ischemia, and a reduction in the inner-to-outer potential difference was identified as the primary electrophysiological mechanism underlying T-wave flattening. **Conclusions** APOE^{-/-} mice can be used to establish a model of chronic myocardial ischemia. The increased repolarization rate of inner-layer myocardial cells is likely to be the main cause of T-wave flattening in electrocardiograms under ischemic conditions.

[Keywords] coronary artery disease; chronic myocardial ischaemia; mouse electrocardiogram; T-wave flattening
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

尽管近年在治疗方面取得了很多进展,冠心病仍是全世界最主要的死亡原因之一^[1-2]。随着科技的发展,近些年涌现了大量先进的诊疗手段^[3],但心电图凭借其简便、廉价的巨大优势仍是心血管疾病诊疗中最常用的检查手段之一^[4-5]。冠心病心肌缺血常伴随着不同程度的心电图 QRS 波至 T 波起点区域(QRS to T-wave region,ST)改变,由于缺血心肌的部位和程度不同主要存在 3 种形式:ST 弓背样抬高、ST 压低及 T 波低平^[6]。其中 ST 抬高和压低是急性透壁、内膜下心梗的主要心电图表现,T 波低平则多出现在慢性心肌缺血状态下。目前急性心肌梗死的电生理研究比较充分,在严重缺血的心肌细胞会出现内外离子梯度的改变,除极静息电位高于复极后电位,因此出现了心电图 ST 抬高。而在慢性心肌缺血中常见的 T 波低平则缺少充分的电生理机制阐释^[7]。其中一个重要原因是尚缺少可靠易行的慢性心肌缺血小动物模型。目前实验中常通过结扎大、小鼠前降支冠脉进行心肌缺血造模^[8],但这种急性心肌梗死或严重缺血的病理状态与慢性心肌缺血存在较大差异^[9]。对 T 波低平的认识更多依据体外缺氧细胞模型的实验结果,这也是 T 波低平了解不够深入的重要原因。为了更加深入阐述缺血心肌 T 波低平的病理生理过程,本实验依靠成熟的动脉粥样硬化 APOE^{-/-}小鼠建立了可靠易行的慢性心肌缺血动物模型,结合既往相关研究成果对慢性心肌缺血 T 波低平进行了研究和阐述。

1 材料和方法

1.1 实验动物

APOE^{-/-}及 C57BL/6J 雄性小鼠共 43 只无病原体(specific pathogen free, SPF)级,来自北京斯贝福

生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010],6 周龄,体重(19±2)g。所有小鼠均饲养在中国科学院医学实验中心的动物房中[SYXK(京)2019-0030],温度为(24±2)℃,湿度(50±10)%。10 只雄性 C57BL/6J 小鼠作为空白组,喂食普通饲料 3 个月。其余 33 只雄性 APOE^{-/-}小鼠随机分为模型组(20 只)和降脂药(lipid-lowering drug, LLD)组(13 只)(阿托伐他汀+依折麦布+阿利西尤单抗),喂食高脂饲料 3 个月。实验通过了中国中医科学院医学实验中心动物伦理审查(ERCCACMS11-2209-03)。所有实验动物饲养和实验过程中遵循 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

氟-18 代脱氧葡萄糖(Fluoro-18-deoxyglucose, 18F-FDG)(华大原子制药有限公司,上海, F221221);阿托伐他汀钙片(DN9900,规格:每片 10 mg,辉瑞制药有限公司);其他药物为依折麦布(W021856,每片 10 mg,默沙东制药有限公司);阿利西尤单抗注射液(CW1785,1.0 mL:75 mg,赛诺菲生物制药有限公司);高脂饲料(H10141,北京华富康生物技术有限公司)。

十二导联心电图仪(ECG-3303B,中国三瑞);正电子发射断层显像/X 线计算机体层成像(positron emission tomography/computed tomography, PET/CT)仪(Supernova PET/CT, SNPC-303,中国平生);高速冷冻离心机(5942000091,德国 Eppendorf);冰冻切片机(RM2016,上海徕卡仪器有限公司);光学显微镜(Nikon Eclipse E100,日本 Nikon);全景扫描仪(OLYMPUS-BX61VS,日本 OLYMPUS)。

1.3 实验方法

1.3.1 HE 染色

在麻醉状态下处死小鼠,剥离并包埋心脏,使

用恒温冷冻切片机在主动脉窦和主动脉近端制作冷冻切片(10 nm)。切片在苏木精中浸泡 10 min,然后在 4%多聚甲醛中固定 10 min。用蒸馏水冲洗后,用 1%盐酸分核。切片用伊红溶液染色,用 85%、90%、95%和 100%乙醇脱水,然后用滴入式凝胶封片。最后,使用全景扫描仪对切片进行扫描。

1.3.2 油红染色

将切片在 60%异丙醇中浸泡 1 min,然后立即放入密闭容器中的油红染色液中浸泡 15 min(主动脉浸润 1 h)。在 60%异丙醇中浸泡 5 min(主动脉在 60%异丙醇中浸泡过夜并保存在多聚甲醛中)。在苏木精染色液中保留 30 s。

1.3.3 小鼠心电图

在本研究中,实验员对十二导联心电图仪做了小幅度改动,在每个导联上连接针灸针。四肢导联的连接方式与人类相同,但由于胸腔面积较小,只能固定 3 个胸导联:V1 导联(正中线上,平第五肋骨)、V2 导联(左锁骨中线,平第五肋骨)和 V3 导联(左腋前线,平第五肋骨)。将导联水平刺入小鼠皮下 3 mm 处,心电图参数设置为 20 ms/mV 及 50 ms/s。分别在小鼠造模前和造模后记录心电图。由于小鼠体表面积小,导联位置的微小差异产生的影响比人类大得多,因此保持位置的一致性非常重要。此外,大多数小鼠的 AVL 导联没有明显的 QRS 波和 T 波,这可能是由于心电图向量的方向与房室导联垂直,因此本研究没有对此导联进行统计分析。

1.3.4 心肌核素 PET/CT 扫描

实验前小鼠禁食 12 h(不禁水),吸入 2%异氟醚/氧气进行气体麻醉,钝性剥离腹股沟处的表皮和粘膜,暴露髂静脉,注射 100 mL 18F-FDG(约 10 MBq)。如果注射失败,可在对侧髂静脉再次注射。

注射示踪剂 30 min 后,使用 PET/CT 扫描仪每隔 15 min 进行 1 次粗扫描,以动态观察示踪剂在心脏中的吸收情况。在心脏摄取峰值 15 min 后进行 15 min 静态 PET 图像扫描,并在 Cruiser 软件(1.1.6.4 版)的帮助下采用三维有序子集(OSEM3D)算法重建图像。利用 Avatar 软件(1.7.6.4 版)测量 18F-FDG 摄取量,并以标准化摄取值(standard uptake value, SUV)表示。

1.3.5 心肌动作电位

台式液(100 mL):NaCl 137 mg、KCl 5.4 mg、CaCl₂ 1.8 mg、NaH₂PO₄ 0.33 mg、MgCl₂ 1.0 mg、HEPES 10 mg、Glucose 10 mg。用 NaOH 将溶液 pH

调整至 7.4。Buffer A:台式液 80 mL+100 mg 牛磺酸+80 mg of BDM+10 μ L $\times$ 0.1 mol CaCl₂; Buffer E:取 40 mL Buffer A+20 mg collagenase II; Buffer S:取 20 mL Buffer A+200 mg BSA。

在麻醉状态下取出小鼠心脏,放入预冷的台式液中,去除多余组织,在插管底部结扎主动脉。以恒定速率(灌注速率 3 mL/min,蠕动泵速度:10 r/min)灌注心脏约 2 min,然后抽出残留血液。用 Buffer A 对心脏灌注 5 min,使心脏完全停止跳动。用氧气饱和的 Buffer E 40 mL 进行灌注。2 min 后开始循环流动,整个消化过程中压力不超过 40 mmHg。用注射器注入 1 mL Buffer S,冲洗心脏中的消化酶。将左心室剪开放入 Buffer S 中,用小刀切割心肌组织并轻轻吹打以加速分离,用 80 目筛网过滤,然后将细胞悬液吸入离心管中,以 500 r/min 的转速离心 30 s,将细胞重悬于 Buffer S 中。钙重新悬浮分 3 次进行,弃上清液,加入下一浓度的钙溶液,1/3 Ca²⁺静置 10 min(1/3 含钙质台式溶液+2/3 Buffer S),2/3 Ca²⁺静置 6 min,全钙台式溶液静置 6 min。灌注后,不取出心脏。左手用眼科镊子轻轻夹起心室肌外层,用眼科剪刀剪下心室肌内层。取出心脏,用眼科剪刀沿心室中部横轴剪开心室肌外层。将上述心肌组织放入台式待切液中,吹干、过滤,室温培养 1~2 h,即可得到内外层心肌细胞。

电极液(100 mL):NaCl 876.6 mg、KCl 40.257 mg、CaCl₂ 19.98 mg、MgCl₂ 9.522 mg、D-Glu 270.24 mg、HEPES 357.45 mg、H₂O 100 mL。电极内液 100 mL:KCl 1117.5 mg、MgCl₂ 47.61 mg、CaCl₂ 22.20 mg、EGTA 190.175 mg、HEPES 238.3 mg、Na₂ATP 275.575 mg、H₂O 100 mL。在电流钳模式下,给予 5 ms 宽、900 mA 的电流刺激,记录外层和内层心肌细胞的动作电位。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)进行统计。各组数据不符合正态分布或未通过方差齐性检验时,采用非参数检验进行统计学分析。 $P<0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

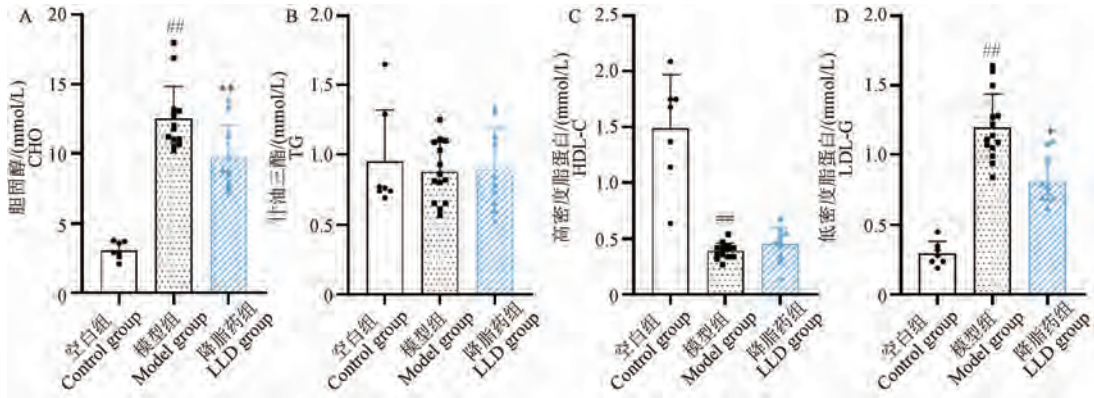
2.1 血脂与模型建立

高脂喂养 3 个月后,模型组的 CHO 及 LDL-C

显著高于空白组，高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL-C) 显著低于空白组。降脂药的应用有效降低了 CHO、LDL-C, 同时升高了 HDL-C 水

平。但是也发现三组的甘油三酯 (triglyceride, TG) 差异不大, 见图 1。

如图2所示, 模型组小鼠的主动脉出现明显的

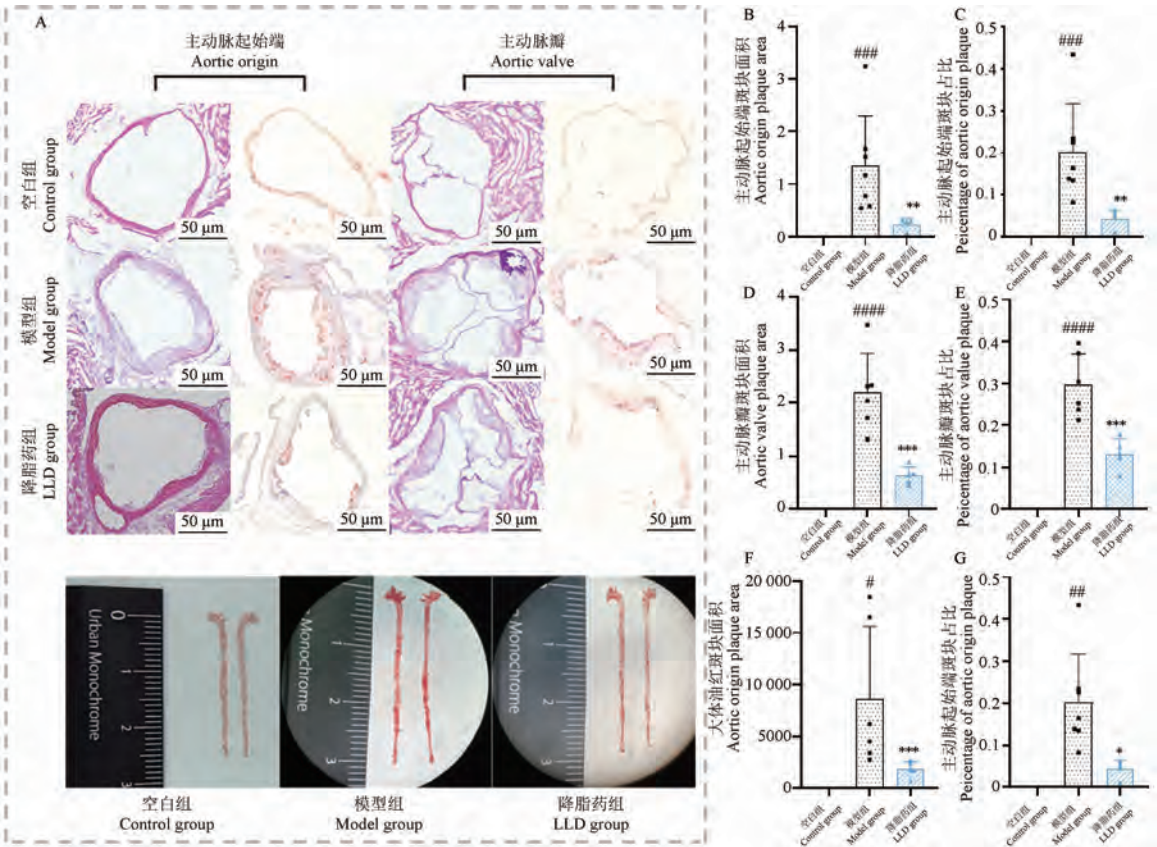


注: 与空白组相比, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组相比, ⁺ $P < 0.05$, ⁺⁺ $P < 0.01$ 。

图 1 血脂水平

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

Figure 1 Blood lipids



注: A: 主动脉开口、主动脉瓣及整个主动脉的病理染色 (HE 及油红)。B~G: 主动脉开口、主动脉瓣及整个主动脉斑块面积及占比。与空白组相比, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$, ^{####} $P < 0.0001$; 与模型组相比, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ 。

图 2 动脉粥样硬化病理

Note. A, Pathological staining (HE and oil red) of the aortic opening, aortic valve and whole aorta. B~G, Plaque area and percentage of aortic opening, aortic valve and whole aorta. Compared with the control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$, ^{####} $P < 0.0001$. Compared with the model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$.

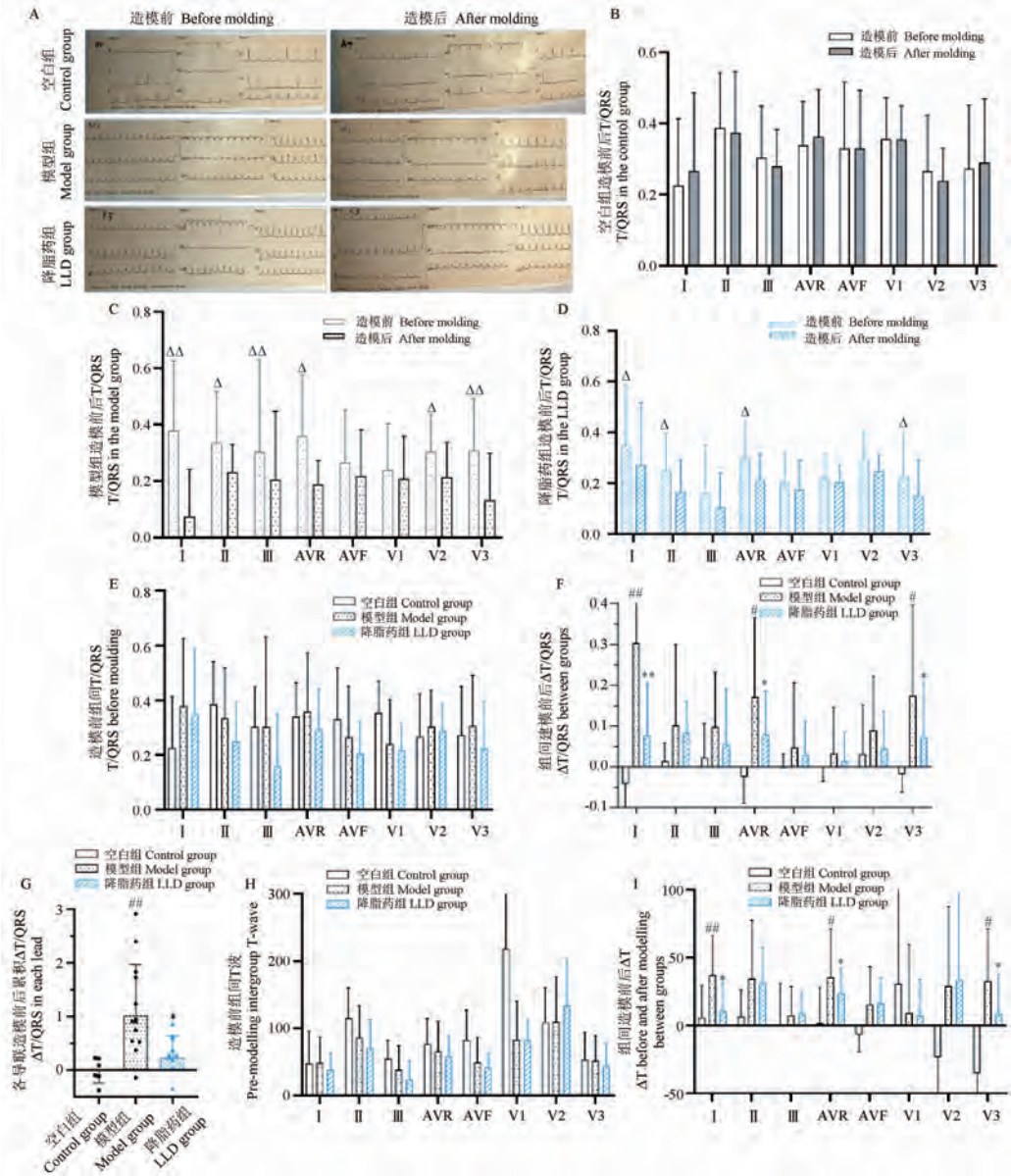
Figure 2 Pathology of atherosclerosis

脂质斑块,而在主动脉弓和肾动脉分支中更为明显。在显微镜下可以看到模型组小鼠冠状动脉成为瓷白色,而空白组冠状动脉是透明的且很难辨别的。本研究随机选取了多个样品,对主动脉的起始端(在血管周围可见少量的心肌和心耳组织)和主动脉窦进行了 HE 和油红染色。在空白组中,没有发现斑块形成。模型组的血管壁明显增厚,周围有

许多炎症细胞,血管的内膜形成了大量的脂质斑块。相比之下,降脂药组的病变明显减少,这也说明高血脂是斑块形成的重要诱因之一。

2.2 小鼠心电图

心电图 T 及 T/QRS 趋势相近,但 T 波出现不稳定的情况,这主要是导联连接位置的细小变化引起的(图 3A、3H、3I)。T/QRS 则更加稳定,与人类心



注:电传导方向与此导联垂直导致“AVL”导联的波形不明显,因此未进行统计分析。A:各组别造模前后心电图;B~I:造模前后各心电图导联的 T/QRS 及 Δ T/QRS。造模前后比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与空白组相比, $\# P < 0.05$, $\## P < 0.01$;与模型组相比, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$ 。

图 3 小鼠心电图

Note. Waveforms in the “AVL” lead are not obvious due to the direction of electrical conduction being perpendicular to this lead, and therefore were not statistically analysed. A, ECG before and after molding in each group. B ~ I, T/QRS and Δ T/QRS in each ECG lead before and after molding. Comparing before and after molding, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$. Compared with the control group, $\# P < 0.05$, $\## P < 0.01$. Compared with the model group, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$.

Figure 3 Electrocardiogram of mice

心电图分析相似,T/QRS 是对结果误差的纠正。在造模前各组之间的 T/QRS 是没有显著差异的(图 3E),此外空白组在普通饮食喂养 3 个月后 T/QRS 亦无显著变化(图 3B),模型和降脂药组的多数导联在造模后出现 T/QRS 的显著降低(图 3C、3D)。本实验关注了造模前后 T/QRS 的变化(组间 Δ T/QRS 的比较,此“ Δ ”为疗前 T/QRS 与疗后作差,值越大代表 T 波压低越明显)。在部分导联中模型组 Δ T/QRS 显著高于空白组,本研究对不同导联 Δ T/QRS 进行了整合分析,结果显示模型组显著高于空白组,同时降脂药显著改善了模型组压低的 T 波(图 3A、3F、3G)。

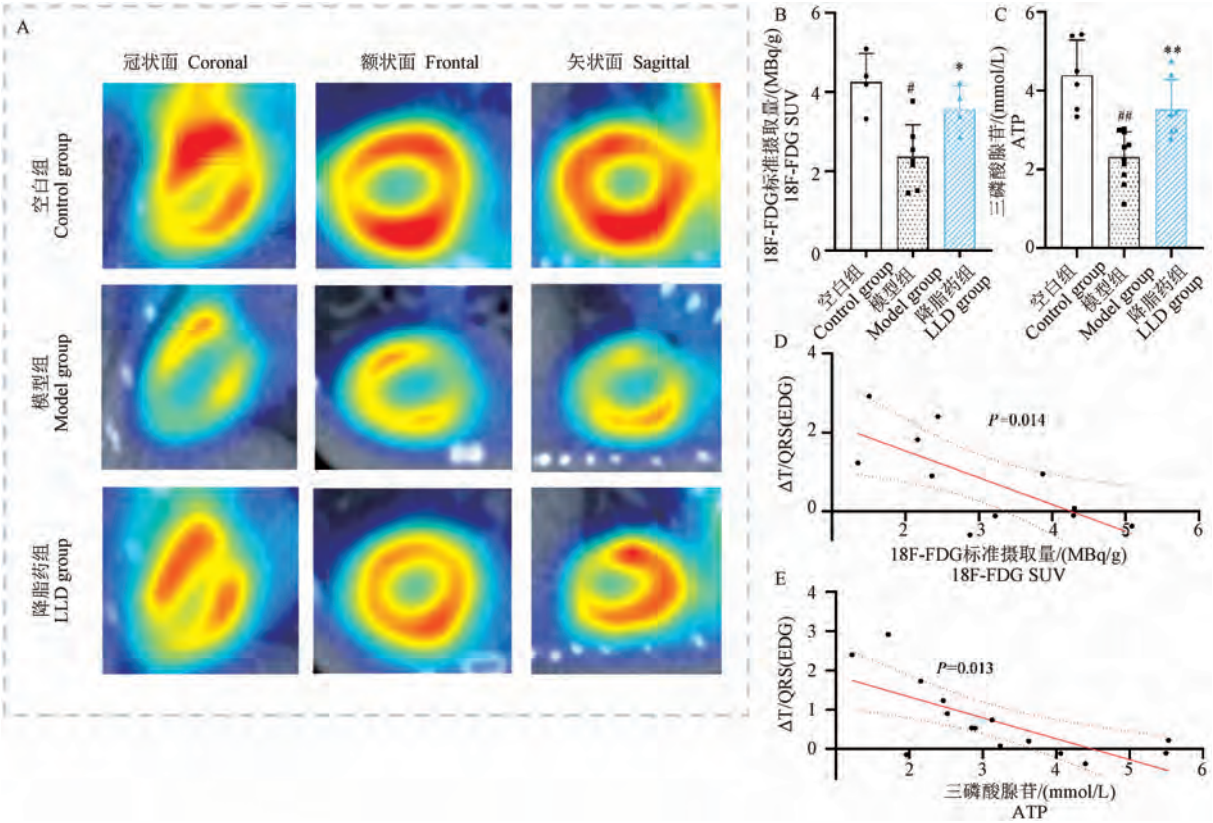
2.3 心肌核素灌注-PET/CT 扫描

在本研究中,模型组心肌组织三磷酸腺苷

(adenosine triphosphate,ATP) 含量明显低于空白组 ($P<0.01$),而降脂药组心肌 ATP 含量显著高于模型组,说明降脂药有效改善了模型组心肌缺血状态(图 4C、4E)。在核素灌注扫描的实验中我们发现模型组心肌在不同部位的核素摄取有缺陷,核素摄取显著降低,说明其出现了心肌血流灌注障碍,而降脂药组显著增加了模型组的血流灌注量 ($P<0.05$)(图 4A、4B、4D)。

2.4 心肌细胞膜电位

本实验通过膜片钳技术对内层和外层心肌细胞膜电位进行了测量。结果显示小鼠内层与外层心肌动作电位差异明显,内层心肌细胞的复极过程更加缓慢(主要因为内层心肌细胞 3 期更为平缓),这与人类心肌细胞的电生理活动相似(图 5A)。当

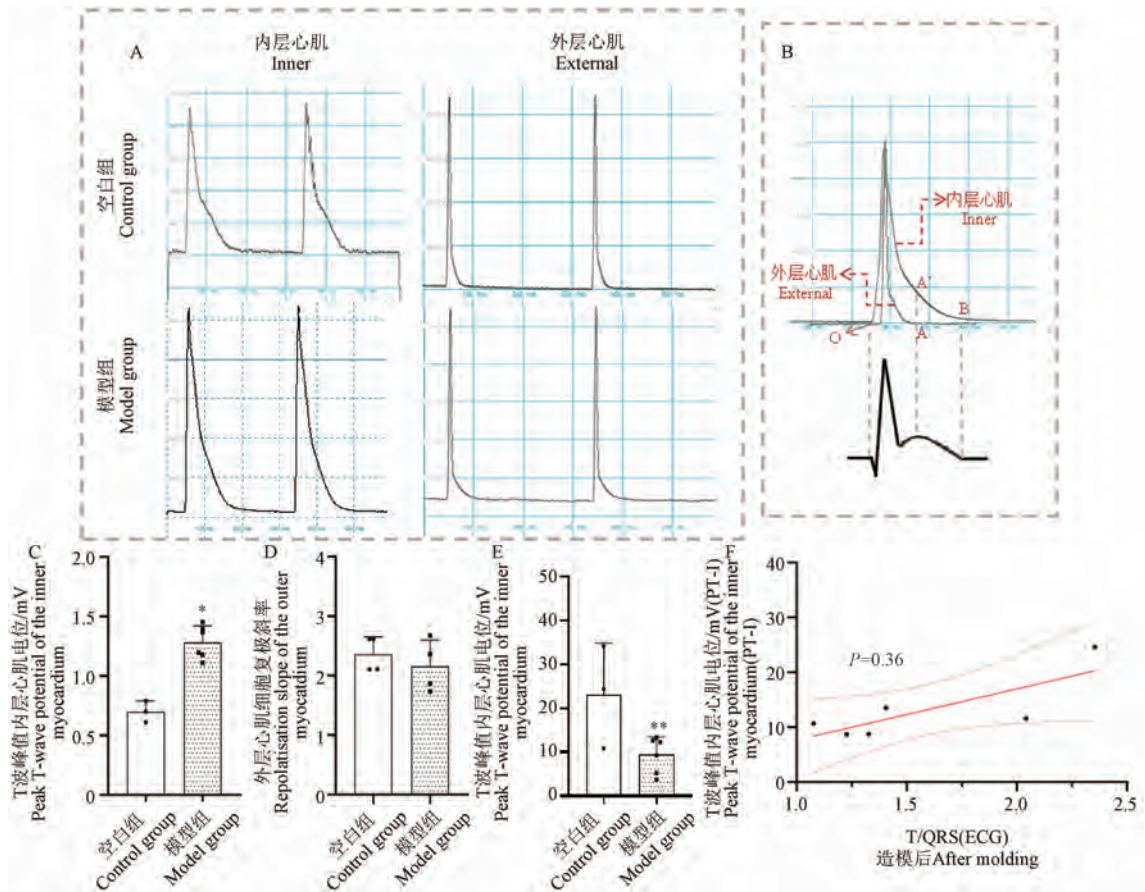


注:A:对比空白组,模型组小鼠心肌出现明显的核素摄取量减低,同时出现灌注缺损的情况,这说明模型组心肌血流灌注出现了障碍;B:18F-FDG 标准摄取量;C:ATP 含量;D~E:相关性分析显示核素灌注量(及心肌 ATP 含量)与 T 波压低程度成线性关系。与空白组相比, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$;与模型组相比, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。

图 4 心肌核素灌注-CT/PET 扫描及 ATP 含量

Note. A, In contrast to the control and LLD group, the myocardium of the model group mice showed markedly reduced nuclide uptake and concomitant perfusion deficits, which suggests that myocardial perfusion was impaired in the model group. B, 18F-FDG SUV. C, ATP content. D~E, Correlation analysis shows a linear relationship between the amount of nuclide perfusion (and myocardial ATP content) and the degree of T-wave depression. Compared with the control group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$. Compared with the model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.

Figure 4 Myocardial nuclide-CT/PET and ATP content



注:A:对比空白组,模型组内层心肌细胞复极速率显著升高,而外层心肌的差异则不明显;B~F:内外层心肌细胞形成的电位差是T波产生的主要原因,外层心肌腹肌完成时(A)这种差异最大(A-A'),也是T波的最高峰(P_{T-I})。与空白组相比,**P*<0.05,***P*<0.01。

图5 内、外层心肌细胞膜电位

Note. A, Compared with the control group, the repolarisation rate of the inner cardiomyocytes was significantly higher in the model group, whereas the difference in the outer myocardium was not significant. B~F, Potential difference formed by the inner and outer cardiomyocytes is the main cause of T-wave generation, and this difference is greatest at the completion of the ventral myocardium of the outer layer (A) (A-A'), which is also the highest value of the T-wave (P_{T-I}). Compared with the control group, **P*<0.05, ***P*<0.01.

Figure 5 Membrane potential of inner and outer cardiomyocytes

外层心肌恢复静息电位时,内外层的电位差最大,此时也是T波的最高点。由于此时外层心肌恢复静息,内层心肌的电位决定了T波的高度(图5B)。因此我们对此时间点小鼠内层心肌细胞电位(potential of the inner myocardium at the peak of T-wave, P_{T-I})进行了测量,结果显示模型组的 P_{T-I} 显著小于空白组,同时模型组内层心肌的复极斜率显著高于空白组,同时两组外层心肌细胞复极斜率差异不大(图5A~5E)。此外,Spearman 相关性分析显示各样本的T波与 P_{T-I} 存在高度关联性,这也验证了我们上述提出的假说和此缺血模型的科学性(图5F)。

3 讨论

为了研究心肌缺血状态下T波低平的原因,本

实验设计了慢性心肌缺血的小鼠模型。一直以来高脂喂养 APOE^{-/-}小鼠是成熟的动脉粥样硬化造模方法^[10-11],本实验证实通过长时间的高脂喂养, APOE^{-/-}小鼠同样可以成为可靠的慢性心肌缺血模型。

在前期实验中单独使用阿托伐他汀无法有效降低模型组的血脂,因此我们将三联降脂疗法(阿托伐他汀+依折麦布+阿利西尤单抗)作为阳性对照方案。高脂饲养3个月后,模型组小鼠的血脂(CHO、LDL-C)显著高于空白组。模型组的主动脉及冠状动脉因长有脂质斑块而变成非透明的瓷白色,同时主动脉窦开口处也附着明显的白色斑块,这种脂质斑块在油红染色下呈现红色。空白组的动脉是透明的,其冠状动脉很难辨认的,同时血管

壁未见斑块形成。降脂药显著降低了 APOE^{-/-}小鼠的 CHO 和 LDL-C 水平,也大幅度减少了模型小鼠主动脉上的脂质斑块。本实验对小鼠进行了心肌核素-PET/CT 扫描,我们发现模型组小鼠心肌出现了灌注不足及缺损的情况,这是血流灌注障碍引起的,而空白组和 LLD 组小鼠的血流灌注则更加充盈。这说明模型组小鼠已经出现了心肌缺血的情况,而降脂药有效改善了血流灌注障碍。

3.1 小鼠心电图

和人类相比,小鼠心电图存在更加明显的个体差异,仅在造模后进行心电图评价是不足以反应疾病程度的,而造模前后“T 波”的变化值更加具有意义。因此,本实验对每个样本均进行了造模前及造模后的评价。对比造模前,多数模型小鼠会出现“T 波”压低的现象,空白组小鼠在饲养 3 个月后没有明显的“T 波”变化。模型组心电图整体 $\Delta T/QRS$ 显著高于空白组。上述实验结果说明模型组在造模后“T 波”压低更加明显。三联降脂药的应用不仅大幅度降低了模型组小鼠的血脂水平,也显著减少了主动脉斑块的形成,同时也改善了模型组小鼠“T 波”压低的情况。Spearman 相关性分析显示 $\Delta T/QRS$ 与血脂(CHO、LDL-C、HDL-C)及 AS 病变存在线性关系。

3.2 心肌缺血与 T 波低平

T 波是由心室复极化产生的,心肌去极化是从内层扩散到外层心肌的,如图中实线箭头所示。然而外层心肌(Epi)动作电位的持续时间比内层心肌(Endo)细胞更短,虽然外层心肌细胞是最后去极化的,但他们先完成复极化的过程。因此,在大多数导联中 T 波并不是倒置的。T 波的持续时间比 QRS 波长,这是因为去极化涉及到高速的浦肯野系统,从而在整个心室快速传导动作电位,而复极化的传导则不涉及这个路径,因此复极需要更多的时间。

人类外层心肌复极速度显著快于内层心肌,内、外层心肌复极电位出现了差异,因此形成了 T 波^[12]。当外层心肌完成复极时电位差最大,此时也是 T 波的峰值,而当内层心肌继续完成复极,T 波也逐渐消失^[13-15]。本实验运用膜片钳技术记录了小鼠内层及外层心肌的动作电位。与人类不同,小鼠心肌缺少明显的平台期,因此在小鼠心电图上我们看不到 ST 段。但小鼠内层心肌复极速率同样小于外层,因此小鼠心电图上也出现了“T 波”。

T 波是因为内、外层心肌电位差形成的,将心肌

作为一个整体去研究和阐释显然是不恰当的。本实验中模型组小鼠内层心肌动作电位出现了明显的外层化,其复极的速率明显高于空白组,更快的复极速率意味着内层心肌更低的电位。然而,模型与空白组的外层心肌复极斜率差异并不明显,这在各样本中均有相似的结果。内外层电位差的减少导致小鼠“T 波”出现了压低的情况。单纯用内层心肌比外层更容易缺血来解释内外层心肌的差异是不充分的^[16]。另一种可能的原因是离子通道分布的差异导致内层心肌复极速率对缺血更加敏感,也具有更容易变化的动作电位。

心肌复极速率的增加与 ATP 依赖型 K 离子通道(ATP-dependent K⁺ channels, K_{ATP})的激活关系密切。缺血导致组织氧分压的下降,细胞内 ATP 水平下降^[17]。当 ATP 下降时, K_{ATP} 通道打开,允许 K⁺ 离开细胞,这加速了心肌细胞复极化的过程。此外,ATP 的减少可能会降低 Na/K-ATP 泵的活性,导致细胞外 K⁺ 的积累和静息电位的升高^[18]。对于缺血心肌的自我保护及维持心肌膜电位稳定, K_{ATP} 是一种重要的调节机制。

此外,在缺血状态下儿茶酚胺从神经末梢和细胞中大量释放,葡萄糖氧化受到抑制,糖酵解受到刺激,乳酸产量增加^[19]。糖酵解活性及内环境 PH 值是细胞外 K⁺ 水平主要影响因素,在缺血状态下,以往的动态平衡被打破,细胞外出现 K⁺ 累积^[20]。当细胞外 K⁺ 水平升高时,细胞电导性增加,依靠电压激活的电流如 I_{K1} 通道、I_{Kr} 和 I_{to} 以及 K⁺ 配体通道如 K_{ACh}、K_{AA} 和 K_{Na} 都增加了电导性,这带来了更多的外向电流^[21]。

3.3 ST 抬高与压低

心电图可以通过 ST 段的变化来为缺血提供额外的证据。QRS 结束和 T 波开始之间的部分通常是等电的(心电图记录为 0 mV)。如果冠状动脉血流不足以满足运动时心脏增加的氧气需求,心肌就会缺氧,ST 段就会出现变化^[14]。

ST 段抬高通常是严重的心肌缺血的标志,并发生在大多数急性心肌梗死中。这是 AS 斑块破裂导致冠状动脉完全阻塞并随后形成血栓所引起的。这种心肌梗死常伴随心脏酶含量升高(如肌钙蛋白),并被称为 ST 段抬高心肌梗死(ST elevation myocardial infarction, STEMI)。在 ST 段抬高的情况下,通常是心肌的透壁梗死^[11]。因为他无法维持正常的离子梯度,该缺血组织的静息电位高于正常电

位(去极化状态)。由于是透壁心梗,内外层坏死心肌不具有电位差,但其电位高于周围正常心肌,其方向远离电极,因此在心电图上记录为负电压(在 T 波结束和 QRS 开始之间)。而当整个心室应该去极化后,心电图基线电压为零(在 QRS 与 T 波之间),电极就会记录一个基线电压。因其高于复极后的静息负值电压,因此心电图上显示为 ST 的相对抬高。类似的理论可以应用于对 ST 压低解释。

心内膜下缺血导致心室壁该区域的静息电位升高,并形成朝向电极片的正向电位,这也被成为舒张期损伤电流。当内外层心肌去极化之后进入平台期,内外层电压相同(电压差为 0),并在心电图上形成 0 mV 的基线。但此时 0 mV 的基线相对于复极后升高的电位处于相对负值,因此 ST 段会形成相对的凹陷状下移^[16]。

综上所述,本实验说明常用于动脉粥样硬化的 APOE^{-/-}小鼠也可用于建立稳定的慢性心肌缺血小鼠模型。而小鼠心电图与人类一样可以用来评价心肌血供状态,其“T 波”与人类相似同样可以成为评价心肌缺血的重要标志。通过对小鼠心肌细胞膜电位的测量证实“T 波”的高低与复极时内、外层心肌电位差有关,但外层心肌动作电位受缺血影响不明显,而内层心肌复极速率增加可导致心肌内外电位差减少,是缺血状态下“T 波”压低的主要原因。

参考文献:

[1] GOLDSBOROUGH E 3rd, TASDIGHI E, BLAHA M J. Assessment of cardiovascular disease risk: a 2023 update [J]. Curr Opin Lipidol, 2023, 34(4): 162-173.

[2] MORISHITA T, TAKADA D, SHIN J H, et al. Impact of policy alterations on elective percutaneous coronary interventions in Japan [J]. Heart, 2023, 109(8): 612-618.

[3] 晋晓丽, 于力, 王岚. 早发冠心病 PCI 术后发生不良心血管事件的危险因素分析 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2023, 15(6): 737-739.

JIN X L, YU L, WANG L. Risk factors of adverse cardiovascular events in patients with premature coronary artery disease after percutaneous coronary intervention [J]. Chin J Evid Based Cardiovasc Med, 2023, 15(6): 737-739.

[4] LIEW R. Electrocardiogram-based predictors of sudden cardiac death in patients with coronary artery disease [J]. Clin Cardiol, 2011, 34(8): 466-473.

[5] GOULD K L, JOHNSON N P, BATEMAN T M, et al. Anatomic versus physiologic assessment of coronary artery disease. Role of coronary flow reserve, fractional flow reserve, and positron emission tomography imaging in revascularization decision-making [J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 62(18): 1639-1653.

[6] KLABUNDE R E. Cardiac electrophysiology: normal and

ischemic ionic currents and the ECG [J]. Adv Physiol Educ, 2017, 41(1): 29-37.

[7] GOLDMAN S, RAYA T E. Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure [J]. J Card Fail, 1995, 1(2): 169-177.

[8] 张世田, 庞路路, 唐汉庆, 等. 大鼠心肌缺血模型制备方法的比较及改进浅析 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(7): 98-101.

ZHANG S T, PANG L L, TANG H Q, et al. Comparison and improvement of the methods for establishment of rat models of myocardial ischemia [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(7): 98-101.

[9] KUMAR D, HACKER T A, BUCK J, et al. Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation [J]. Coron Artery Dis, 2005, 16(1): 41-44.

[10] SIMON F, LARENA-AVELLANEDA A, WIPPER S. Experimental atherosclerosis research on large and small animal models in vascular surgery [J]. J Vasc Res, 2022, 59(4): 221-228.

[11] ZHAO Y, QU H, WANG Y, et al. Small rodent models of atherosclerosis [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110426.

[12] FORD T J, CORCORAN D, BERRY C. Stable coronary syndromes: pathophysiology, diagnostic advances and therapeutic need [J]. Heart, 2018, 104(4): 284-292.

[13] BARTOS D C, GRANDI E, RIPPlinger C M. Ion channels in the heart [J]. Compr Physiol, 2015, 5(3): 1423-1464.

[14] LI D, LI C Y, YONG A C, et al. Source of electrocardiographic ST changes in subendocardial ischemia [J]. Circ Res, 1998, 82(9): 957-970.

[15] NERBONNE J M, KASS R S. Molecular physiology of cardiac repolarization [J]. Physiol Rev, 2005, 85(4): 1205-1253.

[16] KJEKSHUS J K. Mechanism for flow distribution in normal and ischemic myocardium during increased ventricular preload in the dog [J]. Circ Res, 1973, 33(5): 489-499.

[17] CARMELIET E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias [J]. Physiol Rev, 1999, 79(3): 917-1017.

[18] KLÉBER A G. Resting membrane potential, extracellular potassium activity, and intracellular sodium activity during acute global ischemia in isolated perfused guinea pig hearts [J]. Circ Res, 1983, 52(4): 442-450.

[19] SCHÖMIG A, FISCHER S, KURZ T, et al. Nonexocytotic release of endogenous noradrenaline in the ischemic and anoxic rat heart: mechanism and metabolic requirements [J]. Circ Res, 1987, 60(2): 194-205.

[20] GWILT M, NORTON B, HENDERSON C G. Pharmacological studies of K⁺ loss from ischaemic myocardium *in vitro*: roles of ATP-dependent K⁺ channels and lactate-coupled efflux [J]. Eur J Pharmacol, 1993, 236(1): 107-112.

[21] CARMELIET E. Induction and removal of inward-going rectification in sheep cardiac Purkinje fibres [J]. J Physiol, 1982, 327: 285-308.

唐梓宁,陈相池,刘学武,等. 免疫抑制介导大鼠侵袭性黑曲霉菌肺病模型的构建与评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34 (6): 63-72.

Tang ZN, Chen XC, Liu XW, et al. Construction and evaluation of an immunosuppression-mediated model of invasive *Aspergillus niger* lung disease in rats [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 63-72.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.008

免疫抑制介导大鼠侵袭性黑曲霉菌肺病模型的构建与评价

唐梓宁^{1,2}, 陈相池^{1,2}, 刘学武^{1,2}, 周志敏^{1,2}, 厉巧^{1,2}, 肖洒^{1,2}, 姜德建^{1,2}, 彭冬冬^{1,2*}

(1.湖南普瑞玛药物研究中心有限公司,长沙 410329;2.新药药效与安全性评价湖南省重点实验室,长沙 410329)

【摘要】 目的 本研究建立免疫抑制大鼠侵袭性黑曲霉菌肺病模型,为抗侵袭性肺曲霉病药物药效学评价及机制研究提供理论支持。**方法** 将 60 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、环磷酰胺对照组、环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组,每组 12 只动物。每天进行一般临床观察,分别于造模第 3、7 天采用 ELISA 法检测血清中免疫球蛋白 G(IgG)、免疫球蛋白 M(IgM)、血清半乳糖甘露聚糖(GM)水平,并检测外周血 CD4⁺、CD8⁺ 细胞比例及白细胞(WBC)、中性粒细胞(Neu)含量,同时观察肺泡灌洗液黑曲霉菌负荷和大鼠肺组织形态学变化。**结果** 环磷酰胺对照组、环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组大鼠造模后均出现自主活动减少及竖毛,且环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组大鼠伴有呼吸急促,可闻及肺部湿啰音;与正常对照组比较,环磷酰胺对照组大鼠血中 CD4⁺、WBC、Neu、IgG、IgM 水平均显著减少,CD8⁺ 比例显著增加($P<0.05$, $P<0.01$);与环磷酰胺对照组比较,环磷酰胺+真菌感染中、高剂量组大鼠血中 IgG、IgM、CD4⁺ 水平均显著减少($P<0.05$, $P<0.01$),环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组大鼠血中 WBC、Neu 水平均显著减少($P<0.05$, $P<0.01$),环磷酰胺+真菌感染中、高剂量组大鼠血中 CD8⁺ 水平显著升高($P<0.05$, $P<0.01$),环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组大鼠血中 GM 水平及肺泡灌洗液黑曲霉菌负荷均显著增加($P<0.05$, $P<0.01$);环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组大鼠肺组织出现菌丝分布和肺泡上皮破坏、肺泡内支气管上皮杯状细胞增多、炎症细胞浸润,其病变程度与造模剂量呈正相关。**结论** 本研究采用黑曲霉菌联合环磷酰胺免疫抑制剂构建侵袭性黑曲霉菌肺病模型,病程与菌液浓度和造模时间呈正相关,证实细胞免疫在该病发病机制方面中发挥重要作用,同时免疫球蛋白也可影响侵袭性肺曲霉病疾病的发展过程,推测侵袭性肺曲霉病发病机制可能与体液免疫中免疫球蛋白水平有关。

【关键词】 侵袭性肺曲霉病;免疫抑制;体液免疫;细胞免疫

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0063-10

Construction and evaluation of an immunosuppression-mediated model of invasive *Aspergillus niger* lung disease in rats

TANG Zining^{1,2}, CHEN Xiangchi^{1,2}, LIU Xuewu^{1,2}, ZHOU Zhimin^{1,2}, LI Qiao^{1,2}, XIAO Sa^{1,2},
JIANG Dejian^{1,2}, PENG Dongdong^{1,2*}

(1. Hunan Prima Drug Research Center Co. Ltd, Changsha 410329, China.

2. Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410329)

【Abstract】 Objective This study established a model of invasive *Aspergillus niger* lung disease in immunosuppressed rats to provide theoretical support for the pharmacodynamic evaluation of anti-invasive pulmonary

【基金项目】 湖南省企业科技创新创业团队支持计划(2021)。

【作者简介】 唐梓宁(1997—),男,研究方向:新药药效与安全性评价。E-mail: tangzininga@163.com

【通信作者】 彭冬冬(1990—),男,研究方向:新药药效与安全性评价。E-mail: pengdongdong@hnse.org

aspergillosis drugs and mechanism studies. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into a normal control group; cyclophosphamide control group, and cyclophosphamide+fungal infection low, medium, and high dose groups, with 12 animals in each group. General clinical observations were performed daily, and the serum levels of immunoglobulin (Ig)G and IgM and galactomannan (GM) were detected by ELISA on the 3rd and 7th days of modeling. Simultaneously, the ratio of CD4⁺ and CD8⁺ cells, content of white blood cells (WBCs) and neutrophils (Neu) in peripheral blood, the *Aspergillus niger* load in alveolar lavage, and morphological changes to rat lung tissue were observed. **Results** Rats in the cyclophosphamide control and cyclophosphamide+fungal infection groups showed reduced voluntary activity and erect hair after modeling, and rats in the cyclophosphamide+fungal infection group also had shortness of breath and audible wet rhonchi in the lungs. Compared with the normal control group, rats in the cyclophosphamide control group showed significant reductions in the levels of CD4⁺, WBC, Neu, IgG, and IgM in the blood, and their proportion of CD8⁺ cells was significantly higher ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the cyclophosphamide control group, rats in the cyclophosphamide+fungal infection medium- and high-dose groups had significantly reduced blood levels of IgG, IgM, and CD4⁺ cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$); while the cyclophosphamide+fungal infection low-, medium-, and high-dose groups had significantly reduced blood levels of WBC and Neu ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Additionally, rats in the cyclophosphamide+fungal infection medium- and high-dose groups had significantly increased blood CD8⁺ cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Blood GM levels and the alveolar lavage *Aspergillus niger* load were significantly increased in rats in the cyclophosphamide+fungal infection low-, medium-, and high-dose groups compared with the cyclophosphamide control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The lung tissues of the cyclophosphamide+fungal infection low-, medium-, and high-dose groups showed mycelial distribution and destruction of alveolar epithelium, increase of bronchial epithelial cup cells in the alveoli, and infiltration of inflammatory cells, and the degree of lesions was positively correlated with the modeling dose. **Conclusions** In this study, we used *Aspergillus niger* combined with cyclophosphamide immunosuppressant to construct a model of invasive *Aspergillus niger* lung disease. The duration of the disease was positively correlated with the concentration of bacterial fluid and modeling time, confirming that cellular immunity plays an important role in the pathogenesis of the disease. At the same time, Ig can also affect the development of invasive pulmonary aspergillosis, and it is speculated that the pathogenesis may be related to the level of Ig produced by humoral immunity.

[Keywords] invasive pulmonary aspergillosis; immunosuppression; humoral immunity; cellular immunity
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

侵袭性肺曲霉病 (invasive pulmonary aspergillosis, IPA) 是指由曲霉菌侵入支气管及肺组织,进而引起局限肉芽肿或广泛化脓性组织病理损伤的真菌感染性疾病,主要感染免疫力低下人群^[1-3]。在自然界中有多种曲霉菌能够引起人类和动物的感染,最常见的致病菌为烟曲霉,其次为黄曲霉和黑曲霉等^[4]。虽然黑曲霉为低毒力真菌,通常不会引起侵袭性感染,但其易通过空气传播感染免疫抑制治疗或接受化疗后中性粒细胞减少或实质性器官移植的患者,在患者气管内定植、感染引发 IPA,从而导致 IPA 的发病率和病死率逐年升高,因此黑曲霉的病例报告逐渐走入大众视野,并引起人们广泛的关注。有研究证明免疫细胞可参与侵袭性肺曲霉菌病的发病机制,但体液免疫在该病发病机制中的作用尚不清楚^[5-9]。因此本研究拟采用黑曲霉联合环磷酰胺免疫抑制剂构建大鼠侵袭性黑曲霉菌肺炎模型,进一步验证细胞免疫是否参与该病的发病机制,同时探讨体液免疫介导大鼠侵袭性黑

曲霉菌肺炎的发病机制,为该类疾病模型的构建以及药物的药效作用评价提供新的方向。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,5~6 周龄,体重 160~180 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供 [SCXK(湘)2019-0004],饲养于湖南普瑞玛药物研究中心有限公司屏障环境动物实验室 ABSL-II (长卫健实备字(2021)第 B010 号) [SYXK(湘)2020-0015],期间给予大鼠全价颗粒饲料,自由饮水,室温 20~26 ℃,湿度 40%~70%,光照明暗各 12 h,通风良好,动物实验经湖南普瑞玛药物研究中心有限公司实验动物管理伦理委员会批准 (IACUC-2022 (3)045),实验过程中遵循 3R 原则。

1.1.2 真菌

黑曲霉菌,编号:500373389,由中南大学湘雅二

医院检验科提供,在病原微生物 BSL-II 实验室培养和扩增,实验前 2 d 将菌株复苏并接种于实验室自制培养基上,于 CO₂ 恒温培养箱 37 ℃ 培养 48 h,收集真菌并用 0.9% 氯化钠注射液分别稀释浓度为 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 CFU/mL 的混悬液,2~8 ℃ 备用。

1.2 主要试剂与仪器

注射用环磷酰胺(规格:每瓶 0.2 g,有效期 2022.12,生产单位:Baxter Oncology GmbH);舒泰 50(规格:每瓶 5 mL,批号:8EM1A,生产单位:法国维克有限公司);大鼠半乳甘露聚糖(GM)试剂盒、大鼠免疫球蛋白 G(IgG)、免疫球蛋白 M(IgM)试剂盒(规格:96 T,生产单位:黄石市艾恩斯生物科技有限公司);CD3 Monoclonal Antibody(Invitrogen);CD4 Monoclonal Antibody(BD Pharmingen);CD8 Monoclonal Antibody(Biolegend)。

BC-5000Vet 型兽用五分类血液细胞分析仪(深圳迈瑞公司);C6 流式细胞仪(美国 BD);BCR-MI02-72-C11-PPSU 大鼠独立通气笼盒系统(山东新华医疗器械股份有限公司);BSC1300-II-B2 型生物安全柜(山东新华医疗器械股份有限公司);DFC 420C 病理成像系统(德国 Leica 公司生产);BX43 型生物显微镜+MD50 型数码成像系统(日本奥林巴斯公司);Spectra Max i3x 多功能酶标仪(上海美谷光子公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组与造模

取检疫合格 SPF 级 SD 大鼠 60 只,按体重随机分为正常对照组、环磷酰胺对照组、环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组(1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 CFU/mL),每组 12 只。除正常对照组外其余各组大鼠腹腔注射 45 mg/kg 环磷酰胺,隔天 1 次,连续注射 3 次,诱导大鼠免疫力低下,正常对照组大鼠同期腹腔注射等量的 0.9% 氯化钠注射液。末次注射后 24 h,各组大鼠轻微麻醉后,将其仰卧解剖板上呈 30~45° 角倾斜位置,用 1 mL 的注射器吸取黑曲霉菌悬液 0.5 mL,连接穿刺长针,耳镜下暴露大鼠气管,注入气管内,抽出插管后,实验动物仍旧保持原倾斜位置约 10 s,使残留感染悬液,由于重力的作用流入支气管和肺泡内而引起感染,当天造模 1 次,复制侵袭性肺曲霉病模型。

1.3.2 黑曲霉菌鉴定

选择真菌 ITS 通用引物(ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS2: 5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')为待测菌液(Sample1)扩增引物,使用 TSINGKE 植物 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,扩增目标菌株的 ITS rDNA 序列,将 PCR 产物进行测序。根据测序的结果,通过 NCBI 数据库进行相似序列搜索,使用 MEGA 软件构建菌株发育树。

1.3.3 一般体征观察

每天观察各组大鼠活动状态、背毛、呼吸、自主活动等。

1.3.4 免疫球蛋白及血清半乳甘露聚糖含量测定

各组于造模第 3、7 天(D3、D7),各组选取 6 只动物采用颈静脉采血 0.5 mL,3000 r/min 离心 10 min,取上清液,采用大鼠 ELISA 试剂盒检测血清中 IgG、IgM、GM 含量。

1.3.5 细胞免疫指标检测

各组于造模 D3 和 D7,各组选取 6 只动物采用颈静脉采血 1 mL,采用流式细胞仪检测淋巴细胞亚群 CD4⁺、CD8⁺ 百分比。

1.3.6 血常规检测

各组于造模 D3 和 D7,各组选取 6 只动物采用颈静脉采血 0.5 mL,置于 1.5 mL EDTA 抗凝 EP 管中,采用兽用五分类血细胞分析仪检测血中白细胞、中性粒细胞数量。

1.3.7 肺泡灌洗液中黑曲霉菌负荷量测定

各组于造模 D3 和 D7,各组选取 6 只动物按 60 mg/kg 腹腔注射舒泰 50 后,腹主动脉放血安乐死,解剖取肺,将大鼠右肺中下叶进行结扎,采用 4 mL 的 0.9% 氯化钠注射液,从气管开口处注入右肺上叶进行肺泡灌洗,收集肺泡灌洗液。取肺泡灌洗液进行 10 倍、100 倍、1000 比例稀释: 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 。无菌条件下分别吸取原液及 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 3 个稀释度的菌液 0.1 mL,均匀涂布到沙氏葡萄糖琼脂培养基上,每个稀释度重复 2 个平板,平放恒温箱上 30 min 左右,使菌液渗入培养基表层内,然后倒置平板于 (35±2) ℃ 恒温箱中培养 3 d,真菌计数结果参考 GB4719.15-2016 霉菌计数。

1.3.8 肺组织病理学观察

分别于造模 D3 和 D7,各组选取 6 只动物按 60 mg/kg 腹腔注射舒泰 50 后,腹主动脉放血安乐死,解剖取左侧肺组织置于 10% 中性福尔马林液中固定,切片包埋,HE 染色,利用病理成像系统观察肺组织形态学的改变。

1.4 统计学方法

本实验数据采用 SPSS 22.0 统计软件进行分

析,计量资料采用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$),两组间数据比较,采用 t 检验,多组间数据进行方差齐和正态性检验比较,以 $P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 黑曲霉菌鉴定

如图 1 所示,对 Sample1 菌液 ITS rDNA 扩增产物进行进行测序,根据测序结果,构建菌株发育树。根据形态学特征和分子特征的鉴定结果,确认 Sample1 为黑曲霉菌(*Aspergillus niger*)。

2.2 一般体征观察

试验期间正常对照组大鼠活动状态佳,背部毛发光泽,呼吸频率稳定,无明显异常变化;环磷酰胺对照组和各真菌感染组大鼠均出现自主活动减少及竖毛现象,且真菌感染组大鼠伴有呼吸急促,可闻及肺部湿罗音,随着造模时间延长,部分动物出

现萎靡不振。

2.3 大鼠血清中免疫球蛋白含量的变化

表 1、表 2 所示,与正常对照组比较,造模 D3 和造模 D7 环磷酰胺对照组大鼠血清中 IgG、IgM 的含量显著降低($P<0.05$, $P<0.01$);与环磷酰胺对照组比较,造模 D3 和造模 D7 环磷酰胺+真菌感染中、高剂量组大鼠血清中 IgG、IgM 的含量显著降低($P<0.05$, $P<0.01$)。

2.4 大鼠血清中曲霉菌血清标志物 GM 含量变化

如表 3 所示,与正常对照组比较,造模 D3 和造模 D7 环磷酰胺对照组大鼠血清半乳糖甘露聚糖含量无统计学意义;与环磷酰胺对照组比较,造模 D3 和造模 D7 环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组血清半乳糖甘露聚糖含量均显著升高($P<0.05$, $P<0.01$)。

2.5 大鼠血中淋巴细胞亚群的变化

如表 4、表 5 及图 2 所示,与正常对照组比较,

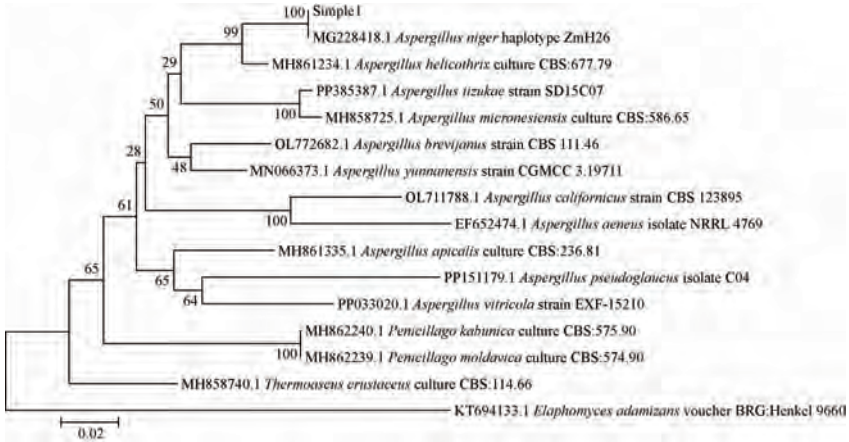


图 1 Sample1 待测菌液系统发育树
Figure 1 Phylogenetic tree of Sample1 bacterial fluids to be tested

表 1 黑曲霉菌对免疫抑制大鼠血清 IgG 的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Table 1 Effect of *Aspergillus niger* on serum IgG in immunosuppressed rats

组别 Groups	染菌剂量 /(CFU/mL) Bacterial dose	IgG/(mg/mL)	
		造模 D3 Modeling D3	造模 D7 Modeling D7
正常对照组 Normal control group	/	13.26±0.87	12.68±0.83
环磷酰胺对照组 Cyclophosphamide control group	/	11.51±1.17*	10.31±0.63**
低剂量组 Low-dose group	1×10 ⁷	10.56±0.64	10.28±0.98
环磷酰胺+真菌感染 Cyclophosphamide + fungal infection	中剂量组 Medium-dose group	8.72±1.01 [#]	9.47±0.71 [#]
	高剂量组 High-dose group	8.60±0.76 ^{##}	8.32±0.66 ^{##}

注:与正常对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与环磷酰胺对照组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$. Compared with the cyclophosphamide control group,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$.

造模 D3 和造模 D7 环磷酰胺对照组大鼠外周血中 CD4⁺细胞比例显著降低,CD8⁺细胞比例显著升高 ($P<0.05,P<0.01$);与环磷酰胺对照组比较,造模 D3 和造模 D7 环磷酰胺+真菌感染中、高剂量组大鼠外周血中 CD4⁺细胞比例显著降低,CD8⁺细胞比例显著升高 ($P<0.05,P<0.01$)。

表 2 黑曲霉菌对免疫抑制大鼠血清 IgM 的影响 ($\bar{x}\pm s,n=6$)
Table 2 Effect of *Aspergillus niger* on serum IgM in immunosuppressed rats

组别 Groups	染菌剂量 /(CFU/mL) Bacterial dose	IgM/(mg/mL)	
		造模 D3 Modeling D3	造模 D7 Modeling D7
正常对照组 Normal control group	/	1.20±0.18	1.32±0.06
环磷酰胺对照组 Cyclophosphamide control group	/	1.01±0.07 [*]	1.11±0.10 ^{**}
环磷酰胺+真菌感染 Cyclophosphamide + fungal infection	低剂量组 Low-dose group	0.94±0.11	0.98±0.18
	中剂量组 Medium-dose group	0.90±0.10 [#]	0.89±0.09 ^{##}
	高剂量组 High-dose group	0.84±0.06 ^{##}	0.85±0.10 ^{##}

注:与正常对照组相比, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$;与环磷酰胺对照组相比, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal control group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$. Compared with the cyclophosphamide control group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

表 3 黑曲霉菌对免疫抑制大鼠血清半乳糖甘露聚糖的影响 ($\bar{x}\pm s,n=6$)
Table 3 Effect of *Aspergillus niger* on GM in immunosuppressed rats

组别 Groups	染菌剂量 /(CFU/mL) Bacterial dose	血清半乳糖甘露聚糖/(pg/mL)GM	
		造模 D3 Modeling D3	造模 D7 Modeling D7
正常对照组 Normal control group	/	517.70±4.57	526.55±21.67
环磷酰胺对照组 Cyclophosphamide control group	/	523.80±18.12	512.45±12.36
环磷酰胺+真菌感染 Cyclophosphamide + fungal infection	低剂量组 Low-dose group	562.85±20.29 [#]	613.26±43.21 ^{##}
	中剂量组 Medium-dose group	563.33±17.04 [#]	621.86±17.71 ^{##}
	高剂量组 High-dose group	590.73±32.31 ^{##}	629.35±8.89 ^{##}

注:与环磷酰胺对照组相比, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the cyclophosphamide control group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

表 4 黑曲霉菌对免疫抑制大鼠外周血 CD4⁺细胞比例的影响 ($\bar{x}\pm s,n=6$)
Table 4 Effect of *Aspergillus niger* on the percentage of CD4⁺ cells in the peripheral blood of immunosuppressed rats

组别 Groups	染菌剂量 /(CFU/mL) Bacterial dose	CD4 ⁺ %	
		造模 D3 Modeling D3	造模 D7 Modeling D7
正常对照组 Normal control group	/	73.5±3.6	70.9±1.7
环磷酰胺对照组 Cyclophosphamide control group	/	66.8±4.4 [*]	67.8±2.1 [*]
环磷酰胺+真菌感染 Cyclophosphamide + fungal infection	低剂量组 Low-dose group	61.8±2.7	64.2±4.2
	中剂量组 Medium-dose group	60.5±2.0 [#]	61.8±2.1 ^{##}
	高剂量组 High-dose group	59.6±2.7 ^{##}	59.4±2.9 ^{##}

注:与正常对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与环磷酰胺对照组相比, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the cyclophosphamide control group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

表 5 黑曲霉菌对免疫抑制大鼠外周血 CD8⁺ 细胞比例的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of *Aspergillus niger* on the percentage of CD8⁺ cells in the peripheral blood of immunosuppressed rats

组别 Groups	染菌剂量 /(CFU/mL) Bacterial dose	CD8 ⁺ /%	
		造模 D3 Modeling D3	造模 D7 Modeling D7
正常对照组 Normal control group	/	22. 5±2. 0	23. 5±1. 6
环磷酰胺对照组 Cyclophosphamide control group	/	26. 1±1. 0 **	26. 1±1. 8 *
环磷酰胺+真菌感染 Cyclophosphamide + fungal infection	低剂量组 Low-dose group	1×10 ⁷	28. 7±3. 5
	中剂量组 Medium-dose group	1×10 ⁸	31. 9±1. 6 ^{##}
	高剂量组 High-dose group	1×10 ⁹	32. 2±2. 8 ^{##}
			29. 7±2. 0 [#]
			32. 6±2. 9 ^{##}

注:与正常对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与环磷酰胺对照组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the cyclophosphamide control group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

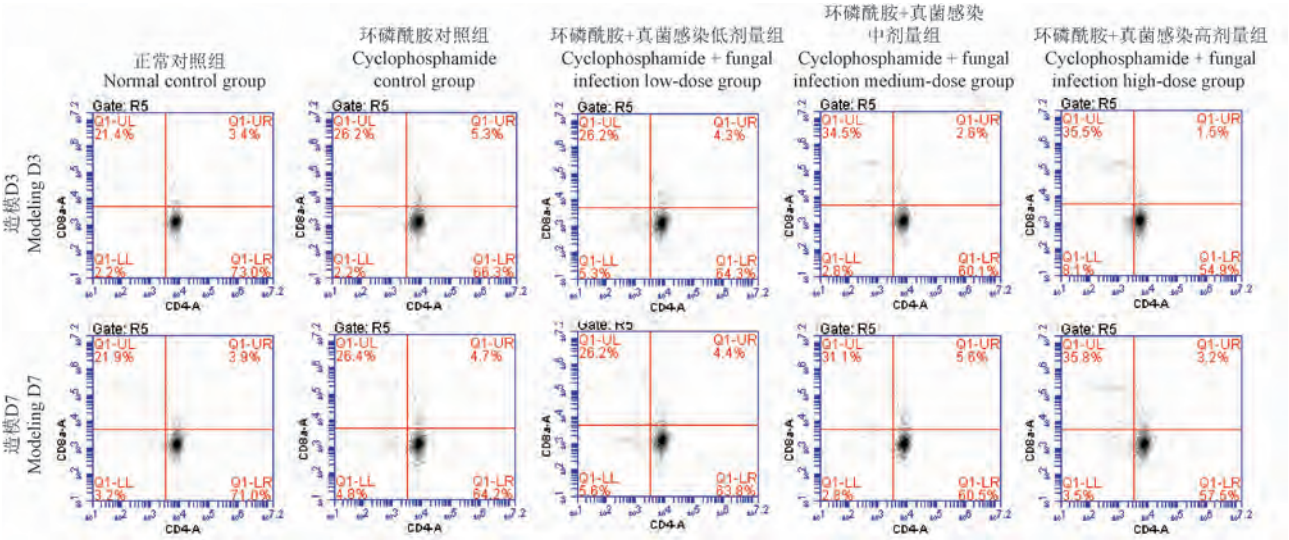


图 2 黑曲霉菌感染免疫抑制大鼠后机体外周血中 CD4⁺、CD8⁺ 细胞比例的变化 ($n=6$)

Figure 2 Changes in the ratio of CD4⁺ and CD8⁺ cells in the peripheral blood of immunosuppressed rats infected with *Aspergillus niger*

2.6 大鼠血中白细胞、中性粒细胞数量的变化

如表 6、表 7 所示,与正常对照组比较,造模 D3 和造模 D7 环磷酰胺对照组大鼠白细胞和中性粒细胞总数均显著降低 ($P<0.05, P<0.01$);与环磷酰胺对照组比较,造模 D3 环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组白细胞总数均显著降低,造模 D7 环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组白细胞总数和中性粒细胞总数均显著降低 ($P<0.05, P<0.01$)。

2.7 大鼠肺泡灌洗液中曲霉菌负荷量变化

如表 8 及图 3 所示,与正常对照组比较和环磷酰胺对照组比较,造模 D3 和造模 D7 各感染组大鼠肺泡灌洗液中曲霉菌负荷量均显著增高 ($P<0.01$);各感染组间比较,造模 D3 环磷酰胺+真菌感染高剂

量组和造模 D7 环磷酰胺+真菌感染中、高剂量组肺泡灌洗液中曲霉菌负荷量均显著高于环磷酰胺+真菌感染低剂量组 ($P<0.05, P<0.01$)。

2.8 大鼠肺组织形态学变化

如图 4 所示,镜下观察正常对照组和环磷酰胺对照组动物肺泡、细支气管黏膜及肺泡腔于各时期均未见异常;环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组动物分别经气管注射 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 CFU/mL 的曲霉菌悬液后,各感染组动物肺均出现少量至大量菌丝分布和不同程度肺泡上皮破坏、血管出血、肺泡内支气管上皮杯状细胞增多、炎症细胞浸润等症状,且病程随着造模时间的延长和接种菌液剂量的提高呈增重趋势。

表 6 黑曲霉菌对免疫抑制大鼠外周血白细胞数量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of *Aspergillus niger* on the number of WBC in peripheral blood of immunosuppressed rats

组 别 Groups	染 菌 剂 量 /(CFU/mL) Bacterial dose	白细胞总数/(10^9 /L) WBC	
		造模 D3 Modeling D3	造模 D7 Modeling D7
正常对照组 Normal control group	/	6. 34±0. 84	6. 41±0. 85
环磷酰胺对照组 Cyclophosphamide control group	/	3. 65±0. 58 **	4. 75±1. 38 *
环磷酰胺+真菌感染 Cyclophosphamide + fungal infection	低剂量组 low-dose group	1×10 ⁷	1. 84±0. 81 ##
	中剂量组 medium-dose group	1×10 ⁸	1. 11±0. 38 ##
	高剂量组 high-dose group	1×10 ⁹	0. 72±0. 15 ##

注:与正常对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与环磷酰胺对照组相比, ## $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the cyclophosphamide control group, ## $P<0.01$.

表 7 黑曲霉菌对免疫抑制大鼠外周血中性粒细胞数量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 7 Effect of *Aspergillus niger* on the number of Neu in peripheral blood of immunosuppressed rats

组别 Groups	染 菌 剂 量 /(CFU/mL) Bacterial dose	中性粒细胞总数/(10^9 /L) Neu	
		造模 D3 Modeling D3	造模 D7 Modeling D7
正常对照组 Normal control group	/	1. 29±0. 19	1. 46±0. 14
环磷酰胺对照组 Cyclophosphamide control group	/	0. 18±0. 06 **	0. 37±0. 09 **
环磷酰胺+真菌感染 Cyclophosphamide + fungal infection	低剂量组 Low-dose group	1×10 ⁷	0. 11±0. 09
	中剂量组 Medium-dose group	1×10 ⁸	0. 16±0. 18
	高剂量组 High-dose group	1×10 ⁹	0. 09±0. 08

注:与正常对照组相比, ** $P<0.01$;与环磷酰胺对照组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal control group, ** $P<0.01$. Compared with the cyclophosphamide control group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

表 8 黑曲霉菌对免疫抑制大鼠肺泡灌洗液中曲霉菌负荷量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 8 Effect of *Aspergillus niger* on *Aspergillus* load in alveolar lavage fluid of immunosuppressed rats

组别 Groups	染 菌 剂 量 /(CFU/mL) Bacterial dose	真菌计数/(10^5 CFU/mL) Fungal count	
		造模 D3 Modeling D3	造模 D7 Modeling D7
正常对照组 Normal control group	/	0. 00±0. 00	0. 00±0. 00
环磷酰胺对照组 Cyclophosphamide control group	/	0. 00±0. 00	0. 00±0. 00
环磷酰胺+真菌感染 Cyclophosphamide + fungal infection	低剂量组 Low-dose group	1×10 ⁷	1. 56±0. 29 ##
	中剂量组 Medium-dose group	1×10 ⁸	2. 54±1. 04 ##
	高剂量组 High-dose group	1×10 ⁹	4. 79±2. 08 ###+

注:与环磷酰胺对照组相比, ## $P<0.01$;与环磷酰胺+真菌感染低剂量组相比, * $P<0.05$, + $P<0.01$ 。
Note. Compared with the cyclophosphamide control group, ## $P<0.01$. Compared with the Cyclophosphamide + fungal infection low-dose group, * $P<0.05$, + $P<0.01$.

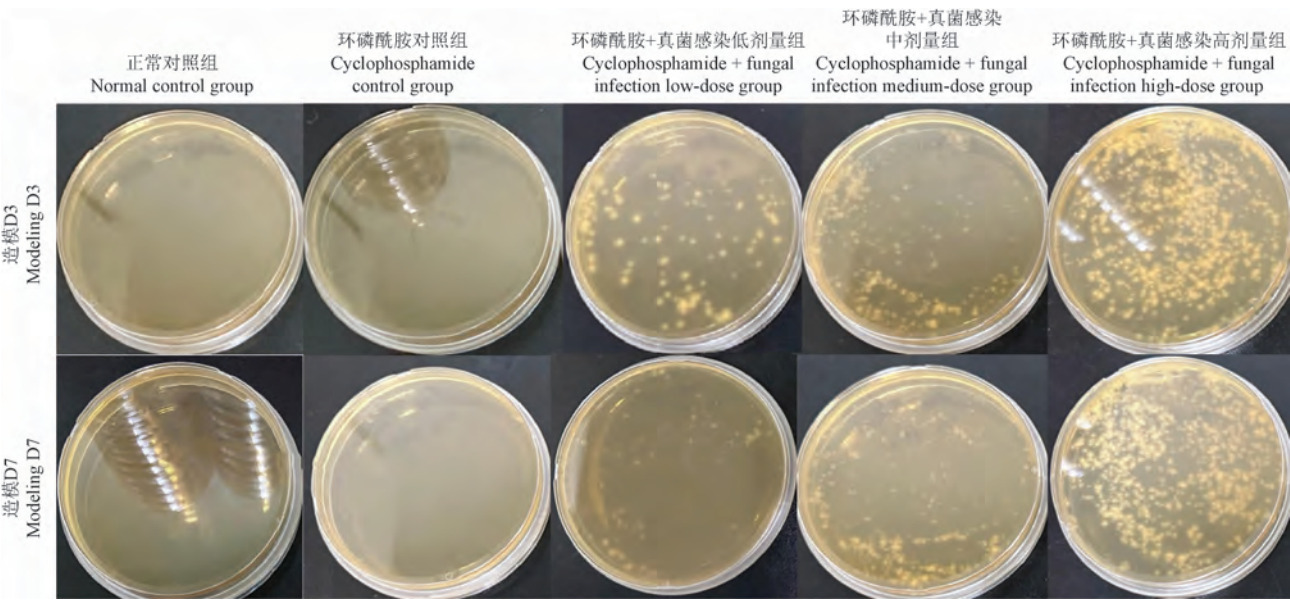


图 3 黑曲霉菌感染免疫抑制大鼠后机体肺泡灌洗液中曲霉菌负荷量的变化 (n=6)

Figure 3 Changes in *Aspergillus* load in the alveolar lavage fluid of the organism after infection of immunosuppressed rats by *Aspergillus niger*

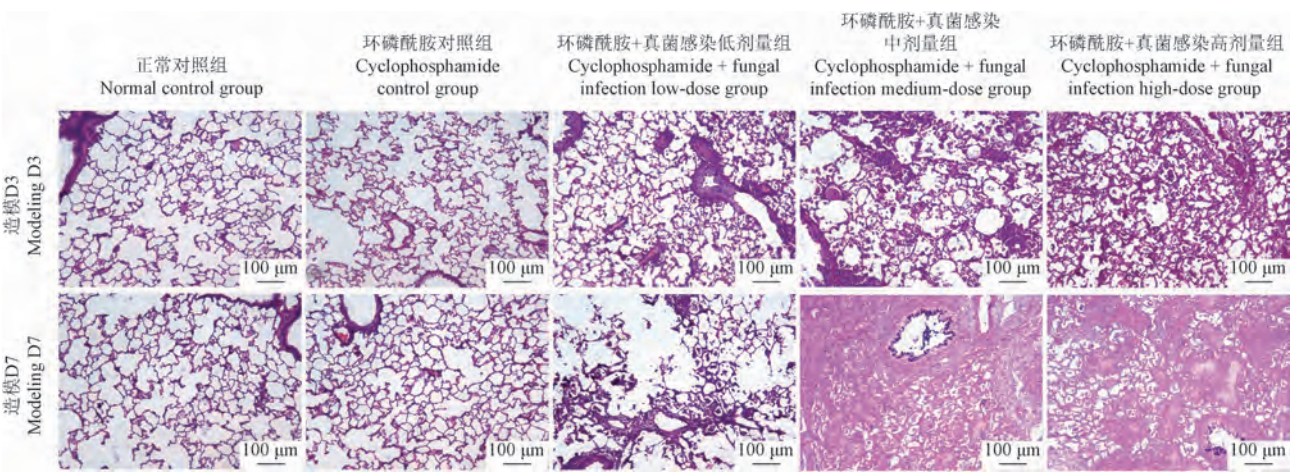


图 4 黑曲霉菌感染免疫抑制大鼠后机体肺组织病理变化 (HE)

Figure 4 Histopathologic changes in the lungs of immunosuppressed rats infected with *Aspergillus niger* (HE)

3 讨论

黑曲霉菌为条件致病菌,当机体免疫功能正常时,支气管上皮的纤毛会将大多数曲霉菌孢子排除在肺部之外,若机体免疫屏障遭到破坏,曲霉菌将在肺部大量繁殖和沉积,进而引起 IPA,由于该病具有治疗难度高、预后差等特点,其病死率居高不下,仍为医疗界急需解决的持续性难题,因此探究侵袭性黑曲霉菌肺病发病机制成为该病防治的首要任务^[10-12]。侵袭性黑曲霉菌是一种严重的真菌感染,常见于免疫系统受损的人群,其发病因素包括长期使用免疫抑制剂、器官移植、化疗、恶性肿瘤等。其

中环磷酰胺是一种烷化剂,在多种肿瘤的治疗过程中均有所使用,但与此同时,环磷酰胺表现为骨髓抑制和白细胞下降,阻断 T/B 细胞的分化过程,对细胞和体液免疫均有抑制作用,进而增加机体对 IPA 的易感性^[13-15]。为真实模拟患者接受免疫抑制治疗或化疗后感染 IPA 的发生发展过程及发病机制,本研究采用黑曲霉菌联合环磷酰胺免疫抑制剂构建大鼠侵袭性黑曲霉菌肺病模型,通过观察各组大鼠体征、细胞及体液免疫指标水平、血常规、GM 含量、肺组织真菌定植和肺组织病理变化对不同处理组大鼠模型进行评价,在验证细胞免疫参与该病发生的同时,并进一步探讨体液免疫对 IPA 发病的

影响。

IPA 的诊断指标包括真菌抗原检测、组织病理学检查和病原学检查等,其中真菌抗原检测技术已在临床中广泛应用,动物感染后血清中 GM 的水平与组织的真菌负荷量成正比,当菌丝生长时,GM 可作为最早释放的抗原,从薄弱的菌丝顶端释放;组织病理学检查和病原学检查作为传统诊断方法可通过检测真菌侵袭和肺组织破坏情况来确定病变范围和疾病发生发展的程度^[16-17]。在本实验条件下,环磷酰胺对照组动物中性粒细胞在不同时间点均显著低于正常对照组,且出现自主活动减少及竖毛现象,提示动物均处于免疫抑制状态;当环磷酰胺免疫抑制的大鼠给予不同浓度黑曲霉菌后,GM 含量明显升高,肺组织出现肺泡上皮破坏、炎症细胞浸润等症状,病程随着造模时间的延长和接种菌液剂量的提高呈增重趋势,且肺泡灌洗液培养后均可见大量黑曲霉菌,虽随着造模时间的延长,曲霉菌负荷量总体呈降低趋势,但负荷量仍处较高位置,提示动物仍处于肺感染严重阶段,且上述症状与彭冬冬等^[18]构建大鼠混合菌细菌性肺炎症状相符,表明 IPA 模型构建成功。

真菌可引起急性呼吸道感染,免疫系统作为重要防线可抵御病原微生物入侵,在细胞免疫过程中,T 淋巴细胞在全身免疫器官和组织中发挥免疫功能,CD4⁺主要表达于辅助 T 细胞,CD8⁺是 T 淋巴细胞的一个亚群,二者对免疫功能的判断具有重要作用^[19-21]。本研究结果与王润超等^[22]报道趋势相近,证实机体细胞免疫受损后可引起 T 淋巴细胞动态平衡紊乱,进而抑制效应细胞抗曲霉菌的能力,导致机体易感曲霉菌,引发 IPA。在体液免疫过程中,T 细胞参与调节 B 细胞的活化和分泌,活化的 B 细胞可产生抗感染作用的 IgG、IgM,直接参与机体体液免疫反应,其中 IgG 具有活化补体作用,可与巨噬细胞、自然杀伤细胞联合,具有抗感染作用,IgM 有溶解细菌的作用,在感染早期起到抗感染作用^[23-24]。本研究结果显示,与正常对照组相比,环磷酰胺免疫抑制和黑曲霉菌联合环磷酰胺免疫抑制的大鼠 IgG、IgM 水平均显著降低,与此同时,黑曲霉菌联合环磷酰胺免疫抑制的大鼠 IgG、IgM 水平显著低于环磷酰胺对照组,结合细胞免疫结果,提示环磷酰胺可介导机体免疫功能受损,导致 T 细胞协助的 B 细胞分泌抗体功能减弱,促使体液免疫功能紊乱,抗感染作用不足,导致黑曲霉菌在机体

不断复制和传播,引发 IPA;此外,机体在抵抗黑曲霉菌感染时消耗大量免疫球蛋白,加重体液免疫功能的紊乱,可能是 IgG、IgM 水平降低的原因之一。

综上所述,本研究采用黑曲霉菌联合环磷酰胺免疫抑制剂构建侵袭性黑曲霉菌肺病模型,从动物临床症状、血常规、血清半乳甘露聚糖含量、肺组织真菌定植和肺组织病理方面对模型进行评价,其中高剂量黑曲霉菌联合环磷酰胺免疫抑制剂构建肺炎模型较为严重,病程与菌液浓度和造模时间呈正相关,此外通过细胞及体液免疫指标检测后,进一步证实细胞免疫在该病发病机制方面中发挥重要作用,同时免疫球蛋白也可影响 IPA 疾病的发展过程,推测 IPA 发病机制可能还与体液免疫中免疫球蛋白水平有关。

参考文献:

- [1] HÉRIVAUX A, WILLIS J R, MERCIER T, et al. Lung microbiota predict invasive pulmonary aspergillosis and its outcome in immunocompromised patients [J]. Thorax, 2022, 77 (3): 283-291.
- [2] 周黎明. 内参标化的肺泡灌洗液半乳甘露聚糖试验在侵袭性肺曲霉病诊断中的价值研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2018. ZHOU L M. Study on the value of galactomannan test in alveolar lavage fluid standardized by internal reference in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis [D]. Nanchang: Nanchang University, 2018.
- [3] GEBREMARIAM T, ALKHAZRAJI S, ALQARIHI A, et al. APX001 is effective in the treatment of murine invasive pulmonary aspergillosis [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(2): e01713-e01718.
- [4] 栗方, 曹彬, 曲久鑫, 等. 侵袭性肺曲霉病小鼠动物模型建立的实验研究 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2015, 9(8): 1403-1407. LI F, CAO B, QU J X, et al. Study of animal model of invasive pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice [J]. Chin J Clin Electron Ed, 2015, 9(8): 1403-1407.
- [5] SONG L, ZHAO Y, WANG G, et al. Investigation of predictors for invasive pulmonary aspergillosis in patients with severe fever with thrombocytopenia syndrome [J]. Sci Rep, 2023, 13 (1): 1538.
- [6] SEIF M, KAKOSCHKE T K, EBEL F, et al. CAR T cells targeting *Aspergillus fumigatus* are effective at treating invasive pulmonary aspergillosis in preclinical models [J]. Sci Transl Med, 2022, 14(664): eabh1209.
- [7] DENNING D W. Therapeutic outcome in invasive aspergillosis [J]. Clin Infect Dis, 1996, 23(3): 608-615.
- [8] TONG X, LIU T, JIANG K, et al. Clinical characteristics and prognostic risk factors of patients with proven invasive pulmonary aspergillosis: a single-institution retrospective study [J]. Front

- Med, 2021, 8; 756237.
- [9] ATCHADE E, JEAN-BAPTISTE S, HOUZÉ S, et al. Fatal invasive aspergillosis caused by *Aspergillus niger* after bilateral lung transplantation [J]. Med Mycol Case Rep, 2017, 17: 4–7.
- [10] 林亚纳, 张小菲, 洪亚妮, 等. 不同免疫状态侵袭性肺曲霉菌患者实验室指标分析 [J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(10): 2211–2216.
- LIN Y N, ZHANG X F, HONG Y N, et al. Laboratory index analysis of patients with invasive pulmonary *Aspergillus* with different immune status [J]. Chin J Immunol, 2023, 39(10): 2211–2216.
- [11] 刘继红, 陈黛诗, 李展, 等. 流感病毒及新型冠状病毒相关侵袭性肺曲霉病的诊治进展 [J]. 解放军医学院学报, 2023, 44(10): 1151–1156.
- LIU J H, CHEN D S, LI Z, et al. Progress in diagnosis and treatment of influenza-associated pulmonary aspergillosis and COVID-19-associated pulmonary aspergillosis [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2023, 44(10): 1151–1156.
- [12] 金文芳. 侵袭性肺曲霉病的临床特点及其危险因素分析 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2019.
- JIN W F. Clinical characteristics and risk factors of invasive pulmonary aspergillosis [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2019.
- [13] 吴佳敏, 张晨阳, 卢芳国, 等. 免疫抑制剂对小鼠流感病毒性肺炎模型建立的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(10): 1446–1450.
- WU J M, ZHANG C Y, LU F G, et al. Effect of immunosuppressive agent on establishment of influenza virus pneumonia in mice [J]. Chin J Immunol, 2018, 34(10): 1446–1450.
- [14] 康慧琳, 樊卫平, 雷波, 等. 不同剂量环磷酰胺对小鼠免疫功能的影响 [J]. 免疫学杂志, 2018, 34(4): 308–312.
- KANG H L, FAN W P, LEI B, et al. The immunosuppression and immunoenhancement effects of cyclophosphamide on normal mice [J]. Immunol J, 2018, 34(4): 308–312.
- [15] FENG C, ZHANG M, ZHANG S, et al. Therapeutic effects of pentoxifylline on invasive pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice [J]. BMC Pulm Med, 2021, 21(1): 31.
- [16] 马欣雨, 于世寰. 侵袭性肺曲霉菌病检测方法进展 [J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(6): 1584–1589.
- MA X Y, YU S H. Progress in detection methods of invasive pulmonary aspergillosis [J]. J Clin Pathol Res, 2020, 40(6): 1584–1589.
- [17] VANDEWOUDE K H, BLOT S I, DEPUYDT P, et al. Clinical relevance of *Aspergillus* isolation from respiratory tract samples in critically ill patients [J]. Crit Care, 2006, 10(1): R31.
- [18] 彭冬冬, 陈相池, 夏伟, 等. 大鼠混合细菌感染性肺炎模型的建立与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 800–807.
- PENG D D, CHEN X C, XIA W, et al. Establishment and evaluation of a mixed bacterial pneumonia rat model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 800–807.
- [19] LAWLER C, STEVENSON P G. A CD4⁺ T cell-NK cell axis of gammaherpesvirus control [J]. J Virol, 2020, 94(3): e01545–e01519.
- [20] ZANDER R, SCHAUDER D, XIN G, et al. CD4⁺ T cell help is required for the formation of a cytolytic CD8⁺ T cell subset that protects against chronic infection and cancer [J]. Immunity, 2019, 51(6): 1028–1042.
- [21] 刘欢, 王锁英, 李红. 利可君对流感病毒感染伴中性粒细胞减少患儿的疗效评估 [J]. 江苏大学学报(医学版), 2023, 33(4): 333–337.
- LIU H, WANG S Y, LI H. Evaluation of the effect of Leucogen on neutropenia in children with influenza virus infection [J]. J Jiangsu Univ Med Ed, 2023, 33(4): 333–337.
- [22] 王润超, 万哲, 李若瑜. 21 例侵袭性肺曲霉病患者 Th 以及 Treg 细胞的检测 [J]. 中国真菌学杂志, 2014, 9(5): 287–292.
- WANG R C, WAN Z, LI R Y. Detection of helper T cells and regulatory T cells of 21 cases with invasive pulmonary aspergillosis patients [J]. Chin J Mycol, 2014, 9(5): 287–292.
- [23] 黄晓茹, 林珊, 张忠龙, 等. 鼻病毒引起儿童支气管肺炎 41 例免疫功能变化分析 [J]. 福建医药杂志, 2023, 45(2): 67–69.
- HUANG X R, LIN S, ZHANG Z L, et al. Analysis of immune function changes in 41 children with bronchopneumonia caused by rhinovirus [J]. Fujian Med J, 2023, 45(2): 67–69.
- [24] 江娟, 李静, 夏可, 等. 反复肺炎患儿肠道菌群与免疫功能指标变化及相关性研究 [J]. 陕西医学杂志, 2023, 52(9): 1200–1203.
- JIANG J, LI J, XIA K, et al. Changes of intestinal flora and immune function indexes in children with recurrent pneumonia and their correlation [J]. Shaanxi Med J, 2023, 52(9): 1200–1203.

[收稿日期] 2023–10–25

朱玉, 苏莹实, 刘溪, 等. 低剂量莠去津暴露饮用水诱导小鼠肝损伤模型的建立及验证 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(6): 73-81.

Zhu Y, Su YS, Liu X, et al. Establishment and validation of a mouse liver injury model induced by chronic low-dose exposure to atrazine [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 73-81.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.009

低剂量莠去津暴露饮用水诱导小鼠肝损伤模型的建立及验证

朱 玉, 苏莹实, 刘 溪, 何宝国, 秦 嫒*

(齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

【摘要】 目的 建立长期饮喂低剂量莠去津诱发小鼠肝损伤模型, 并评价莠去津引起的肝毒性作用。**方法** C57BL/6-N 雄性小鼠随机分为对照组以及 1.5 mg/L 和 150 mg/L 剂量 (ATR-L、ATR-H) 组, 于饮喂后第 35 天和 63 天检测血清肝功能生化指标和炎症因子水平, 计算肝体比并对肝进行病理组织学和超微结构观察, 检测肝组织中脂质过氧化水平和抗氧化能力, 以及主要 I 相代谢酶和 II 相解毒酶的活性及相关蛋白表达。**结果** 与对照组相比, 莠去津组 AST/ALT 比值, 促炎因子 CCL2、TNF- α 和 IL-6, H_2O_2 含量以及代谢酶 NCR、CYT b5 和 UDPGT 活性均有显著变化 ($P < 0.05$); 150 mg/L 剂量组肝功能 GGT 含量, 过氧化物 MDA 水平及 CYP1A2 表达量极显著升高 ($P < 0.01$), 而 GSH 含量显著降低 ($P < 0.05$), 观察肝细胞损伤和线粒体空泡化更严重。**结论** 在建立低剂量莠去津诱导小鼠肝损伤模型时, 1.5 mg/L 和 150 mg/L 莠去津饮用水暴露均能够引起小鼠肝损伤, 其中 150 mg/L 莠去津暴露 63 d 后引起的肝代谢毒性更强。

【关键词】 莠去津; 饮用水; 肝损伤; 动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0073-09

Establishment and validation of a mouse liver injury model induced by chronic low-dose exposure to atrazine

ZHU Yu, SU Yingshi, LIU Xi, HE Baoguo, QIN Lei*

(Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China)

【Abstract】 Objective To establish a model of long-term atrazine (ATR)-induced liver injury in mice and to evaluate the hepatotoxic effects induced by ATR. **Methods** C57BL/6-N male mice were randomly divided into a control group and 1.5 mg/L and 150 mg/L ATR dose (ATR-L, ATR-H) groups. After 35 and 63 days, serum liver function biochemical indexes and inflammatory factors were detected, the hepatosomatic ratio was calculated, and the histopathology and ultrastructure of the liver were observed. Lipid peroxidation levels and antioxidant capacity, the activities of major phase I metabolic enzymes and phase II detoxification enzymes, and the expression of related proteins in liver tissues were detected. **Results** Compared with the control group, the ATR groups showed significant changes in the AST/ALT ratio, levels of pro-inflammatory factors CCL2, TNF- α and IL-6, H_2O_2 content and activities of the metabolic enzymes NCR,

【基金项目】 黑龙江省教育厅项目 (2018-KYYWF-0109); “新时代龙江优秀硕士、博士学位论文”资助项目 (LJYXL2023-066); 齐齐哈尔医学科学院项目 (QMSI2023B-18)。

【作者简介】 朱玉 (1989—), 女, 助理研究员, 硕士, 研究方向: 动物模型标准化建立。E-mail: zhuyu@qmu.edu.cn

【通信作者】 秦嫒 (1989—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 环境持久性污染物毒理学。E-mail: leileiqin@qmu.edu.cn

CYT b5, and UDPGT ($P < 0.05$). In the 150 mg/L ATR group, GGT content, peroxide levels (as indicated by malondialdehyde), and CYP1A2 expression were significantly increased ($P < 0.01$), while GSH content was significantly decreased ($P < 0.05$), and hepatocyte injury and mitochondrial vacuolation were more serious when compared to control and 1.5 mg/L groups. **Conclusions** In a mouse model of low-dose ATR liver injury, both 1.5 mg/L and 150 mg/L ATR exposure induced liver injury in mice, with 150 mg/L ATR inducing the maximum metabolic toxicity in the liver after 63 days.

【Keywords】 atrazine; drinking water; liver injury; animal model

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

随着人类社会的发展,农业对除草剂、杀虫剂等化学农药的依赖程度越来越高。莠去津 (atrazine, 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-triazine, $C_8H_{14}ClN_5$) 是一种选择性三嗪类除草剂,具有广谱、高效、廉价等优点,在全球范围内得到了广泛应用。在喷洒和除草过程中,只有 10%~30% 的莠去津被目标植物或土壤颗粒吸收,使大量的莠去津滞留在土壤中^[1]。而由于其土壤溶出性,莠去津很容易被雨水或灌溉水淋滤到较深的土壤中,通过降雨或地表径流污染地表水,并最终被输送到海洋。更由于其含有的三唑烷结构稳定^[2],使莠去津能够在环境中持久存在,同时莠去津在水中的低溶解度使其在短期内达不到污染的阈值,导致监测结果无法反应莠去津的实际污染情况^[3]。

由于科学使用除草剂的意识不足,超剂量使用农药和除草剂的现象普遍存在,人类最有可能是通过饮用水接触莠去津,据报道其饮用水污染浓度在 $0.01 \sim 5 \mu\text{g/L}$ ^[4],在 2020 年对我国 31 个省市地区 884 个采样点自来水中莠去津的分布调查研究表明,我国自来水中莠去津的污染浓度为 $0.02 \sim 3.04 \mu\text{g/L}$ ^[5]。莠去津因能干扰人类、野生动物和家畜的内分泌系统、对生态环境有强毒害作用而被很多国家列入内分泌干扰物 (EDCs),近几年关于莠去津暴露引发多生物诱变性^[6-7]、致畸性^[8-9]和致癌性^[10-11]的研究被大量报道,造成重大的公共卫生问题^[12],而关于长期低剂量的暴露莠去津对生态系统造成的损害一直没有得到足够的关注和重视。

肝是机体对抗外源性化学物质的主要解毒器官,莠去津在体内的解毒反应主要通过 I 相代谢酶细胞色素 P450 酶系 (如 NADPH-细胞色素 C 还原酶 (NCR)、细胞色素 b5 (Cytochrome b5, CYT b5) 等) 和 II 相解毒酶 (如谷胱甘肽硫转移酶 (GST)、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (UDPGT) 等)^[13] 进行。当外源性物质长期蓄积而无法充分代谢或直接抑制了肝解毒反应进行时,则会造成肝功能的损伤,

甚至引起肝毒性。本研究以小鼠为受试对象,建立饮用水中长期暴露低剂量莠去津对哺乳动物肝损伤模型,评价莠去津对小鼠肝功能的损伤作用及肝解毒酶的代谢作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

3 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6-N 小鼠 50 只,体重 (13.0 ± 0.8) g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司 [SCXK (辽) 2020-0001]。实验小鼠在齐齐哈尔医学院实验动物中心 IVC 系统动物实验室饲养 [SYXK (黑) 2021-013]。光照昼夜分别为 12 h/12 h,饮水采食自由,饲养温度 (20 ± 2) °C,湿度 (55 ± 10) %。本实验通过齐齐哈尔医学院实验动物伦理委员会审批 (DWLL2021-006),符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

莠去津购自北京索莱宝科技有限公司,货号为 A9150;丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 检测试剂盒 (20764957322, IFCC 法)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 检测试剂盒 (20764949322, 比色法)、碱性磷酸酶 (ALP) 检测试剂盒 (03333752190, 比色法) 和 γ -谷氨酰转移酶 (GGT) 检测试剂盒 (03002721122, 酶比色法) 均购自罗氏公司;ELISA 试剂盒 CCL2 (CSB-E07430m)、IL-1 β (CSB-E08054m)、TNF- α (CSB-E04741m) 和 IL-6 (CSB-E04639m) 购自 CUSABIO 公司;总蛋白 (考马斯亮蓝法, A045-2-2)、丙二醛 (MDA, A003-1)、过氧化氢 (H_2O_2 , A064-1-1)、过氧化氢酶 (CAT, A007-2-1)、总超氧化物歧化酶 (T-SOD, A001-1-2)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX, A005-1-2) 和还原型谷胱甘肽 (GSH, A006-1-1) 购自南京建成生物工程研究所;BCA 蛋白定量试剂盒 (P0012S)、RIPA 裂解液 (P0013B) 和 PMSF (ST506) 购自碧云天生物公司;NADPH-细胞色素 C 还原酶 (NCR, BC2720)、细胞色素 b5 (CYT b5, BC2760)、谷胱甘肽 S-转移酶 (GST, BC0350) 和

尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UDPGT,BC5810)生化试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;抗体 CYP2E1(ab28146)、CYP1A2(ab22717)和 GST(ab92)购自 Abcam 公司;抗体 β -actin(AC026)和 UDPGT(A6186)购自 ABclonal 公司;PVDF 膜(IPVH00010)购自 Millipore 公司;IRDye[®] 800 山羊抗兔(5230-0412)和抗小鼠(5230-0416)的二抗购自 KPL 公司。

低温高速离心机(BECKMAN COULTER,美国);多功能酶标仪(PERKINELMER,美国);722 s 可见光分光光度计(上海仪电,中国);手持式匀浆机(科麦,中国);罗氏生化分析仪(c311,瑞士);蛋白电泳仪和转膜仪(Bio-Rad,美国);近红外荧光扫描成像系统(LI-COR,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组与造模

适应性饲养 7 d 后,采用随机数字表将 50 只 C57BL/6-N 雄性小鼠随机分为对照组(饮用灭菌水)、1.5 mg/L 剂量(ATR-L)组和 150 mg/L 剂量(ATR-H)组(饮用水中分别含莠去津 1.5 mg/L 和 150 mg/L),其中对照组 10 只,剂量组各 20 只,5 只/笼饲养。每天统计各组小鼠饮水体积,每周记录小鼠的体重和总采食量,观察小鼠的日常行为表现,并在暴露第 35 和 63 天各取对照组小鼠 5 只、1.5 mg/L 和 150 mg/L 剂量组小鼠各 10 只进行样本采集。样本采集前 12 h 禁食,称重麻醉后眼眶取血,室温静置 2 h 后 3000 r/min 离心 10 min,取上清分装保存,用于生化分析和炎症因子检测。另在冰袋上剖开腹腔并迅速取出小鼠肝,称量后取左外侧叶,剪取其中 1 cm³ 左右大小肝组织用 4% 的多聚甲醛溶液固定后进行 HE 常规染色和肝组织病理检查;剪取 0.5 cm³ 左右大小在 2.5% 戊二醛中固定后用于肝组织超微结构观察;左外侧叶其余部分进行分装冻存,用于 RT-qPCR 检测和 Western blot 检测。同时随机取小鼠肝组织进行分装称量,液氮速冻后转移至-80℃冻存,用于抗氧化指标检测和提取肝微粒体。

1.3.2 小鼠血清肝功能指标和炎症因子检测

(1)根据罗氏试剂盒说明书通过 c311 生化分析仪检测各组小鼠血清中 ALT、AST、ALP 和 GGT 含量,并计算 ALT/AST 的比值。

(2)小鼠血清中细胞因子 CCL2、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的含量采用酶联免疫吸附法(ELISA),按照

试剂盒说明书进行检测。

1.3.3 小鼠肝组织抗氧化指标检测

取冻存的小鼠肝组织,称取 0.5 g 左右后加入预冷的 PBS,按照质量体积比 1:9 进行组织匀浆,3000 r/min 低温离心 10 min 后取上清,按照各试剂盒说明书检测小鼠肝组织中 MDA、H₂O₂、CAT、T-SOD、GSH-PX 和 GSH 的含量。

1.3.4 小鼠肝组织解毒酶系活性测定

(1)取冻存的肝组织通过差速离心法制备肝微粒体,按照质量/体积比 1:4 加入 Tris-HCl 后在冰浴中匀浆,匀浆液通过 4℃、10 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,再进行 4℃、25 000 r/min 离心 10 min,取上清经 4℃、105 000 r/min 离心 60 min 后的沉淀即为肝微粒体,用 Tris-HCl 缓冲溶液混悬后分装,-80℃冻存备用。

肝微粒体 4℃下解冻后,依据 BCA 试剂盒说明书测定肝微粒体蛋白含量,用 Tris-HCl 缓冲液调整蛋白浓度为 1.0 mg/mL,分别根据 NCR 和 CYT b5 生化试剂盒说明书检测肝微粒体酶含量。

(2)另分别取 0.1 g 冻存的肝组织,按照 GST 和 UDPGT 生化试剂盒操作检测肝组织中 GST 和 UDPGT 酶含量。

1.3.5 Western blot 检测蛋白水平

取冻存的肝组织加入含有 PMSF 的 RIPA 蛋白裂解液研磨后在冰上孵育 2 h,4℃12 000 r/min 离心 10 min 后取上清,使用 BCA 蛋白试剂盒定量蛋白浓度,与适量的上样缓冲液混合后煮沸变性。经 SDS-PAGE 电泳分离蛋白后将蛋白转印至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,PBST 洗膜 3 次后室温孵育一抗(CYP1A2、CYP2E1、GST 和 UDPGT)1 h,PBST 再次洗膜 3 次后用对应的二抗室温避光孵育 1 h,使用红外扫描系统成像。

1.4 统计学方法

本研究的所有实验结果均以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并使用 Graphpad Prism 9.0 软件进行数据的差异性分析和结果图展示。各组数据间采用单因素方差分析进行(ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。另外蛋白条带分析使用 Image J 进行。

2 结果

2.1 长期莠去津暴露对小鼠肝功能影响

莠去津暴露期间记录各组小鼠的每周饮水量

无显著性差异 ($P>0.05$), 表明莠去津在 1.5 mg/L 和 150 mg/L 暴露浓度下对小鼠日饮水量没有显著影响(图 1A); 同时统计暴露期间各组小鼠每周体重, 结果表明与对照组和 1.5 mg/L 剂量组相比, 150 mg/L 剂量组小鼠体重在暴露 28 d 后显著升高 ($P<0.001$) (图 1B), 在日常观察中也发现 150 mg/L 剂量组小鼠的饲料消耗量大于对照组和 1.5 mg/L 剂量组(结果未展示)。暴露后第 35 和 63 天的肝体比如图 1C 所示, 与对照组相比, 150 mg/L 剂量组小鼠的肝体比显著增加 ($P<0.05$)。为进一步评估莠去津诱导的肝损伤程度, 检测小鼠血清肝酶含量变化, 结果表明暴露后小鼠 AST/ALT 比值极显著升高 ($P<0.05$) (图 1D), 150 mg/L 剂量组小鼠 GGT 含量极显著升高 ($P<0.01$) (图 1E), 暴露 63 d 后血清 ALP 水平极显著升高 ($P<0.01$) (图 1F)。结果表明 150 mg/L 莠去津暴露能够影响小鼠体征和肝功能。

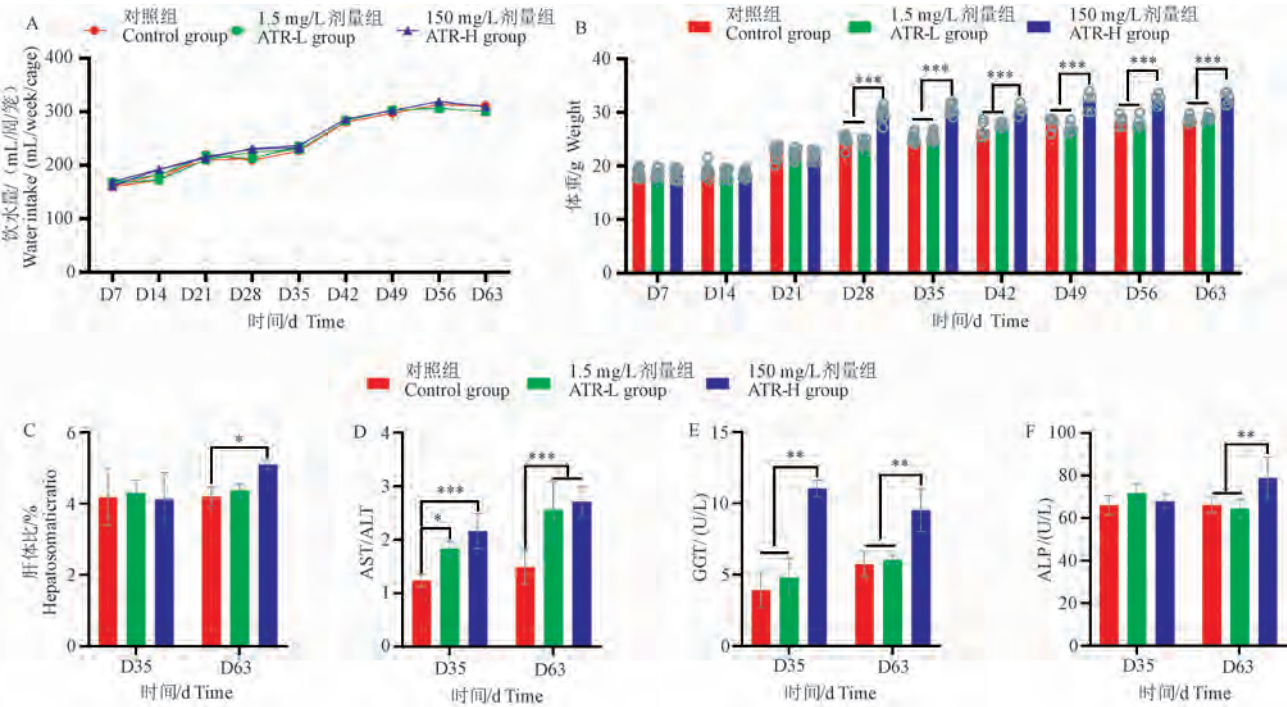
2.2 长期莠去津暴露对小鼠肝细胞形态的影响

病理组织学检查可见 1.5 mg/L 剂量组肝组织

有部分炎性细胞浸润(红色箭头), 而 150 mg/L 剂量 ATR-H 组肝细胞在暴露 35 d 发生脂肪变性(黑色箭头), 脂滴增多, 细胞间隙增大, 在第 63 天可见广泛肝细胞变性坏死(蓝色箭头)且伴随多发性的 小块炎性细胞浸润(图 2)。

2.3 长期莠去津暴露对小鼠炎性因子和过氧化反应的影响

小鼠血清中炎性因子含量可用于分析莠去津引起的炎性损伤, 如图 3A~3D 所示, TNF- α 和 IL-6 含量极显著升高 ($P<0.001$); 剂量组 CCL2 的分泌量在暴露 63 d 后极显著升高 ($P<0.001$), 35 d 时 150 mg/L 剂量组发生极显著变化 ($P<0.01$); 1.5 mg/L 剂量组小鼠 IL-1 β 含量在暴露期间无差异性改变, 150 mg/L 剂量组在 63 d 时 IL-1 β 极显著升高 ($P<0.001$)。莠去津暴露后小鼠肝组织的抗氧化损伤结果如图 3E~3J 所示, 150 mg/L 剂量组小鼠肝组织中 MDA 含量极显著升高 ($P<0.01$); 剂量组 H₂O₂ 含量极显著升高 ($P<0.001$); 150 mg/L 剂量组 GSH 含量显著降低 ($P<0.05$), 在暴露 35 d 时 CAT 水平



注:A:各组小鼠每周饮水量;B:体重变化;C:暴露 35 d 和 63 d 肝体比;D~F:血清肝酶含量。与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

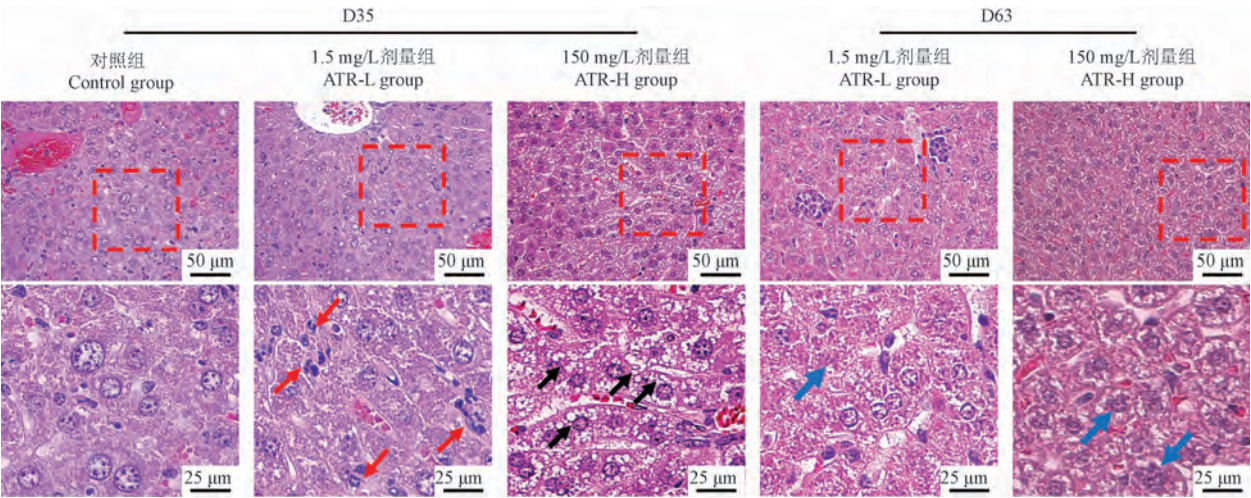
图 1 长期莠去津暴露对小鼠肝功能影响

Note. A, Drinks per week during ATR exposure. B, Weight changes of mice. C, Hepatosomatic index on days 35 and 63 of exposure. D~F, Serum liver enzyme of mice. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 1 Effects of chronic ATR on liver function of mice

显著降低 ($P<0.05$), 在暴露 63 d 时 T-SOD 水平极显著降低 ($P<0.01$), GSH-PX 水平无显著变化 ($P>0.05$); 与对照组相比, 1.5 mg/L 剂量组的 CAT 和 T-SOD 水平无显著变化 ($P>0.05$), 在暴露 63 d 时

GSH-PX 水平极显著升高 ($P<0.001$), GSH 的含量显著降低 ($P<0.05$)。结果表明莠去津能够引起小鼠肝组织炎性和抗氧化功能的损伤, 诱发肝组织病变。

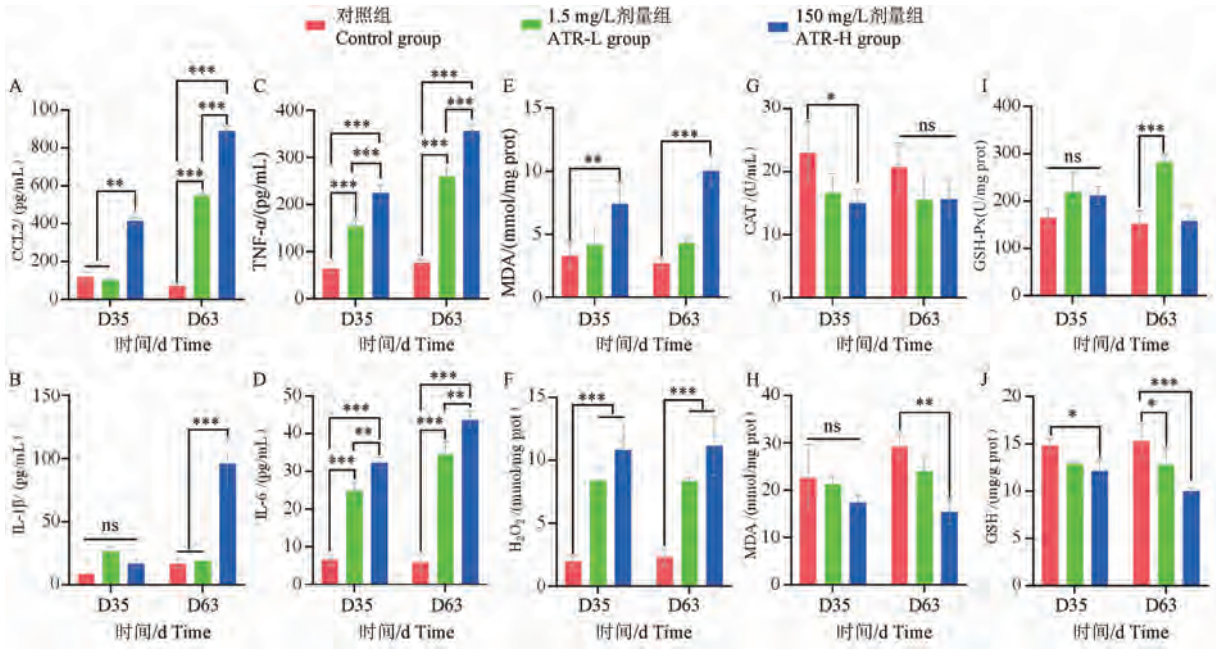


注: 下方图像为上方图像红色虚线框放大部分, 红色箭头指向炎性细胞浸润, 黑色箭头指向脂肪变性, 蓝色箭头指向坏死性肝细胞。

图 2 长期莠去津暴露对肝细胞形态的影响

Note. Lower image was the enlarged red dotted box of the upper, with the red arrow to the inflammatory cells infiltration, the black arrow to steatosis, and the blue arrow to the necrotizing hepatocytes.

Figure 2 Effects of chronic ATR on morphology of liver



注: A~D: 血清炎症因子含量; E~J: 肝组织抗氧化能力检测。与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 3 长期莠去津暴露对小鼠炎症因子和过氧化反应的影响

Note. A~D, Serum inflammatory factors. E~J, Detection of antioxidant index of liver. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 3 Effects of chronic ATR on inflammatory factors and peroxidation in mice

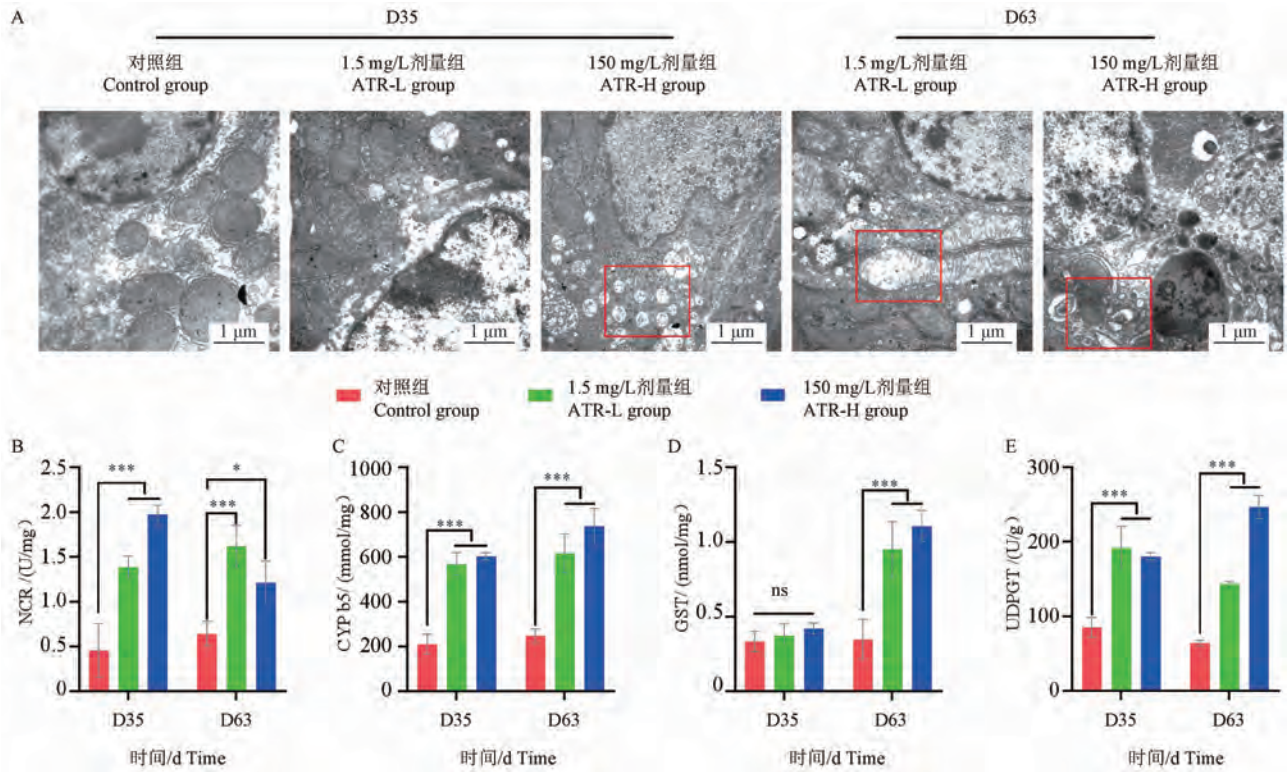
2.4 长期莠去津暴露对小鼠肝组织解毒酶系活性的影响

用含有 1.5 mg/L、150 mg/L 莠去津的饮用水饮喂小鼠 35 d 和 63 d 后,肝细胞超微结构和肝组织解毒酶系活性发生了不同程度的变化。与对照组相比,150 mg/L 剂量组饲喂 35 d 时部分肝细胞线粒体空泡化,在饮喂 63 d 后观察,1.5 mg/L 剂量组大量肝细胞线粒体出现脊断裂,150 mg/L 剂量组肝细胞线粒体形态发生改变,大范围空泡化(图 4A)。检测各组小鼠肝微粒体中 NCR 和 CYT b5 含量,与对照组相比,暴露 35 d 后 1.5 mg/L 剂量组和 150 mg/L 剂量组肝微粒体 NCR 含量分别升高了 204. 24% 和 332. 82%($P<0.001$),而在 63 d 后 1.5 mg/L 剂量组肝微粒体 NCR 含量升高 152. 33%($P<0.001$),150 mg/L 剂量组肝微粒体 NCR 含量升高了 88. 49%($P<0.05$),可见随着莠去津暴露时间的延长和暴露剂量的增加,抑制了部分 NCR 活性(图 4B);同时 CYT b5 含量在莠去津暴露后极显著上升

($P<0.001$)(图 4C)。各组小鼠肝组织中Ⅱ相解毒酶 GST 水平在暴露 35 d 后无显著差异,在 63 d 后剂量组极显著增高($P<0.001$)(图 4D),UDPGT 含量在暴露期间均极显著升高($P<0.001$)(图 4E)。以上结果表明长期莠去津暴露作用下能够引起小鼠肝细胞线粒体损伤,促进肝组织解毒酶系分泌。

2.5 长期莠去津暴露对小鼠肝组织解毒酶蛋白表达影响

CYP1A2 和 CYP2E1 在三嗪类化合物的体内降解代谢中有主要作用,通过 Western blot 检测莠去津长期暴露后小鼠肝组织中 CYP1A2 和 CYP2E1 蛋白表达,结果如图 5A 和 5B 所示,63 d 后 ATR 剂量组 CYP1A2 和 CYP2E1 的表达量均极显著升高($P<0.01$),同时参与莠去津进一步降解的Ⅱ相解毒酶 UDPGT 的表达有相同变化(图 5D)。而 GST 在暴露 63 d 的 150 mg/L 剂量组表达量极显著升高($P<0.01$)(图 5C)。

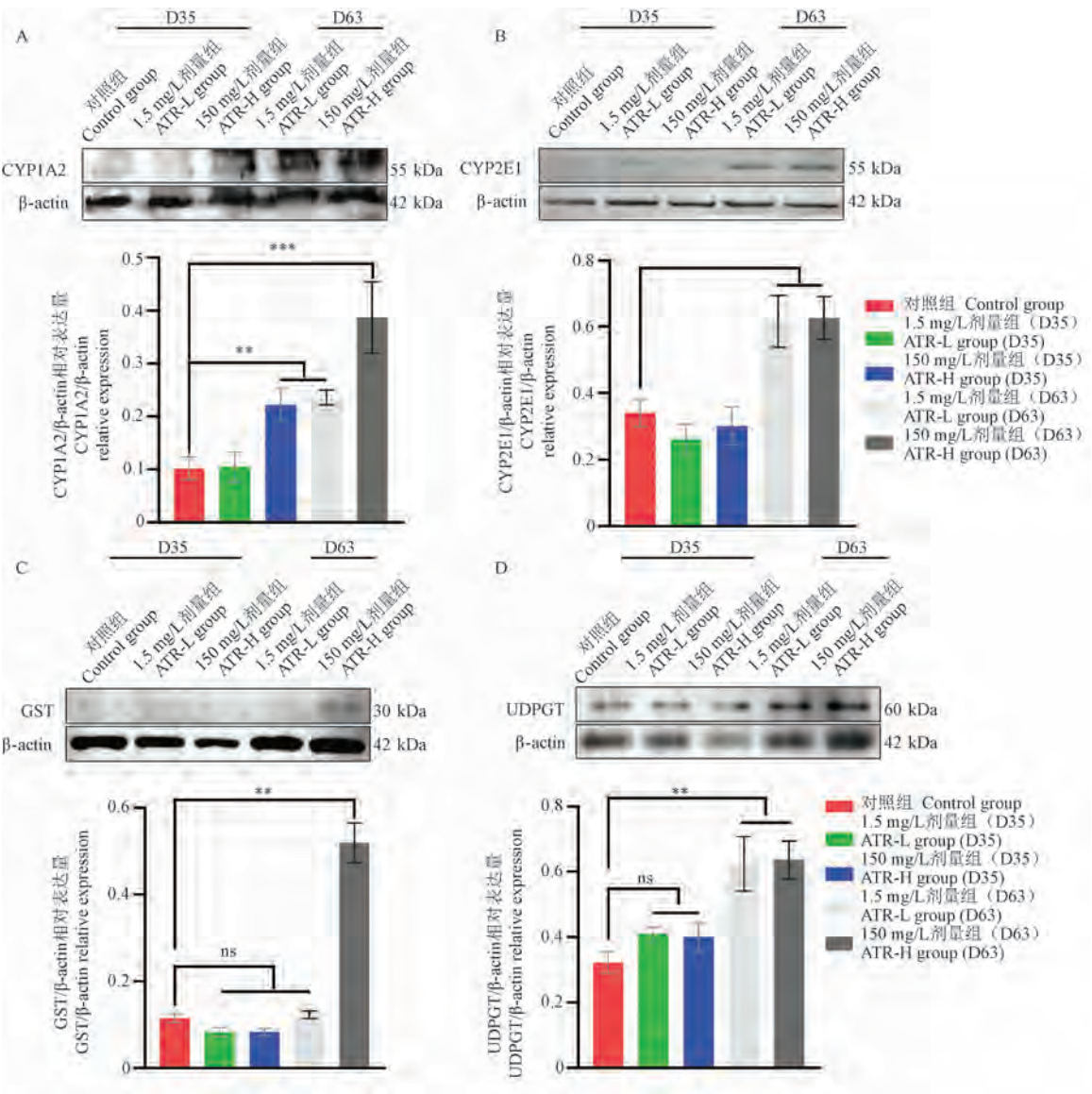


注:A:肝组织超微结构观察;B~C:肝微粒体中 NCR 和 CYT b5 含量;D~E:小鼠肝组织中 GST 和 UDPGT 含量检测。与对照组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

图 4 长期莠去津暴露对小鼠肝组织解毒酶系活性的影响

Note. A, Ultrastructural observation of liver. B~C, Content of NCR and CYT b5 in liver microsomes. D~E, Detection of GST and UDPGT in mouse liver. Compared with control group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

Figure 4 Effects of chronic ATR induced liver injury of mice



注:与对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 5 长期莠去津暴露对解毒酶蛋白表达影响

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

Figure 5 Effects of chronic ATR exposure on the expression of detoxification enzyme proteins

3 讨论

作为世界玉米带使用量最大的除草剂,莠去津施用于土壤中,却一直能够在水体中被检测到(包括地表水、地下水和降水),由于其在环境中的滞留期长,且自然降解和转化效率低,莠去津的累积效应已对水生生态和人类饮用水源构成严重威胁^[14-15]。关于莠去津在毒性剂量下对各类生物的系统性损伤早有报道,目前已证明莠去津的暴露与某些癌症风险增加以及生殖和发育问题有关^[14-16]。而由于莠去津对各种动物的半数致死量都比较高,

物种间对莠去津的敏感性差异较大,且大部分研究都集中在毒性剂量下的生物危害性,而对环境暴露浓度下的慢性毒性研究较少,使得与莠去津有关的生物风险研究之间存在比较大的争议^[17]。如 Singh 等^[18]报道 300 mg/kg 剂量给予大鼠莠去津 21 d 能显著降低大鼠体重;而另一项研究表明产前 9 d 给予妊娠小鼠 5 mg/(kg·d)莠去津至仔鼠断奶后小鼠和仔鼠的体重都没有显著变化^[4];在本研究饮水中暴露 150 mg/L 莠去津 28 d 后小鼠体重极显著升高。这种研究结果的不一致性除了与受试动物差异相关,还与莠去津的暴露方式和暴露浓度有

关,因此探究和评价莠去津污染导致的生物多种危害需要构建稳定的动物模型。已有研究表明莠去津作为一种内分泌干扰物,在 50 mg/kg 暴露下能够引起鸟类体重升高且能延后第二性征的出现,而在毒性剂量下(250 mg/kg 或 500 mg/kg)则可导致体重下降^[19],这个现象同其他常见的内分泌干扰物如邻苯二甲酸酯类化合物^[20]或双酚 A^[21]的相关研究结果一致,这可能与内分泌干扰物在低剂量暴露下首先影响机体脂肪细胞的糖转运和分化有关。肥胖症是本世纪影响健康的最重要问题之一,其病因与环境因素有很大关系,且多数肥胖症患者都会出现肝脂肪变性,甚至由于胰岛素抵抗导致肝疾病发生^[21],本研究结果也表明长期暴露于莠去津可引起小鼠肝的脂肪变性和氧化损伤。

有报道用 25 mg/kg 的灌胃毒性剂量暴露莠去津 30 d 可使小鼠的肝体比显著下降^[22],而另一研究给予大鼠 50 mg/kg 莠去津 90 d 后肝体比显著增加,肝组织发生脂肪变性^[23];本研究在含 150 mg/L 莠去津饮用水饮喂的 63 d 中,小鼠平均日饮水量从开始的 3.4 mL/d 到 8.8 mL/d,日平均摄入量由 26.8 mg/kg 到 40.4 mg/kg 递增,可使小鼠肝体比增加,同时饮喂莠去津组的小鼠血清 AST/ALT 均显著升高,且饮喂 63 d 时 150 mg/L 剂量组 AST/ALT 比值是对照组的 1.81 倍,GGT 和 ALP 含量也显著升高,肝形态学观察发现肝细胞结构紊乱,有炎性细胞和脂滴浸润,提示莠去津暴露损伤小鼠肝功能,肝中脂肪的氧化过程可能出现了障碍。

在本研究中剂量组小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 浓度升高,而相对来说 CCL2 和 IL-1 β 水平变化产生得更缓慢,说明莠去津能够促进炎性因子分泌,使动物机体处于慢性炎症状态。MDA 是脂质过氧化过程中产生的一种醛类物质,自此过程中的 O²⁻主要由 T-SOD 歧化生成 H₂O₂,之后由 CAT 催化或由 GSH 在 GSH-PX 催化下将 H₂O₂ 分解为 H₂O 和 O₂^[24]。150 mg/L 剂量组 MDA 和 H₂O₂ 含量极显著升高以及 T-SOD 和 GSH 水平的下降表明含 150 mg/L 莠去津的饮用水能使小鼠肝组织内氧化产物的生成和抗氧化作用失去平衡。当氧化应激发生将会进一步对亚细胞结构产生毒性作用^[25],本研究与前人研究结果相一致,肝内的氧化应激导致肝细胞线粒体脊断裂和空泡化。

CYP450 酶系是机体内参与外源性环境污染物 I 相代谢反应的主要参与者^[13],低剂量莠去津诱使

小鼠肝微粒体 CYP450 主要代谢酶 NCR 及 CYT b5 活性显著上升,芳香酶多与机体生殖和内分泌激素的转化有关^[26],而相较而言肝内 CYP1A2 和 CYP2E1 蛋白表达量的升高却有一定的滞后性,表明莠去津体内积累能够干扰小鼠内分泌调节功能。GST 和 UDPGT 是 II 相解毒酶的重要组成部分^[25],GST 的活性和 GSH 含量能直接影响外源化合物及其代谢产物在肝中蓄积,以上研究结果表明莠去津可通过酶抑制作用损害肝代谢,使代谢产物积累产生毒性损伤。

综上,评价饮用水中莠去津对哺乳动物机体各项机能的损伤作用需要建立一个暴露方式相同、有暴露剂量依据且可重复性强的动物模型,本研究长期饮喂小鼠含有与环境暴露浓度接近的莠去津饮用水,通过小鼠肝功能检测、炎性因子和抗氧化损伤检测,以及病理和超微结构观察发现 1.5 mg/L 和 150 mg/L 的莠去津都会引起肝毒性,干扰肝中主要 I 相代谢酶和 II 相解毒酶的活性和表达,使代谢产物蓄积造成肝损伤,且肝损伤程度呈现剂量依赖性。本研究是对莠去津体内蓄积毒性模型构建的初探,具有局限性,可为后续探究莠去津作为环境持久污染物的代谢毒性和损伤机制提供一种模型方案。

参考文献:

- [1] WEI X, LIU C, LI Z, et al. A cell-based electrochemical sensor for assessing immunomodulatory effects by atrazine and its metabolites [J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 203: 114015.
- [2] MAHAJAN P G, DIGE N C, VANJARE B D, et al. Synthesis and biological evaluation of 1, 2, 4-triazolidine-3-thiones as potent acetylcholinesterase inhibitors: *in vitro* and *in silico* analysis through kinetics, chemoinformatics and computational approaches [J]. *Mol Divers*, 2020, 24(4): 1185–1203.
- [3] 徐聪. 典型河口水库痕量有机污染物赋存特征及其迁移转化模拟研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2020.
- [4] XU C. Occurrence characteristics and transport modeling of trace organic contaminants in typical estuary reservoirs [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2020.
- [5] HARPER A P, FINGER B J, GREEN M P. Chronic atrazine exposure beginning prenatally impacts liver function and sperm concentration with multi-generational consequences in mice [J]. *Front Endocrinol*, 2020, 11: 580124.
- [6] WANG A, HU X, WAN Y, et al. A nationwide study of the occurrence and distribution of atrazine and its degradates in tap water and groundwater in China: Assessment of human exposure potential [J]. *Chemosphere*, 2020, 252: 126533.
- [7] 杜渝, 邹思颖, 张立实. 小鼠淋巴瘤细胞 TK 基因突变试验

- 检测阿特拉津的诱变性 [J]. 现代预防医学, 2013, 40(10): 1903-1905, 1913.
- DU Y, ZOU S Y, ZHANG L S. Mutagenicity detection of atrazine by TK gene mutation test [J]. Mod Prev Med, 2013, 40(10): 1903-1905, 1913.
- [7] GONÇALVES M W, MARINS DE CAMPOS C B, BATISTA V G, et al. Genotoxic and mutagenic effects of Atrazine Atanor 50 SC on *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 (*Anura*: Hylidae) developmental larval stages [J]. Chemosphere, 2017, 182: 730-737.
- [8] ZALUSKI A B, WIPRICH M T, DE ALMEIDA L F, et al. Atrazine and diuron effects on survival, embryo development, and behavior in larvae and adult zebrafish [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 841826.
- [9] BRENDER J D, WEYER P J. Agricultural compounds in water and birth defects [J]. Curr Environ Health Rep, 2016, 3(2): 144-152.
- [10] SIMPKINS J W, SWENBERG J A, WEISS N, et al. Atrazine and breast cancer: a framework assessment of the toxicological and epidemiological evidence [J]. Toxicol Sci, 2011, 123(2): 441-459.
- [11] HONG J, BOUSSETTA N, ENDERLIN G, et al. Degradation of residual herbicide atrazine in agri-food and washing water [J]. Foods, 2022, 11(16): 2416.
- [12] ZENG X, DU Z, DING X, et al. Protective effects of dietary flavonoids against pesticide-induced toxicity: a review [J]. Trends Food Sci Technol, 2021, 109: 271-279.
- [13] 金毅, 邢伟, 吕爱贞, 等. 不同方法诱导大鼠非酒精性单纯性脂肪肝模型的 CYP 酶活性比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 75-83.
- JIN Y, XING W, LYU A Z, et al. Comparison of CYP enzyme activities in rat models of nonalcoholic fatty liver established by different methods [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(12): 75-83.
- [14] 李慧冬. 莠去津等多种农药残留风险评估及莠去津在水/沉积物体系中降解研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- LI H D. Risk assessment of atrazine and other pesticide residues and degradation of atrazine in water/sediment system [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020.
- [15] BHATTI P, DUHAN A, PAL A, et al. Ultimate fate and possible ecological risks associated with atrazine and its principal metabolites (DIA and DEA) in soil and water environment [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2022, 248: 114299.
- [16] ROH T, KNAPPEP T P S K, HAN D, et al. Characterization of arsenic and atrazine contaminations in drinking water in Iowa: a public health concern [J]. Int J Environ Res Public Health, 2023, 20(7): 5397.
- [17] OCTOBRE G, DELPRAT N, DOUMÈCHE B, et al. Herbicide detection: a review of enzyme-and cell-based biosensors [J]. Environ Res, 2024, 249: 118330.
- [18] SINGH M, SANDHIR R, KIRAN R. Effects on antioxidant status of liver following atrazine exposure and its attenuation by vitamin E [J]. Exp Toxicol Pathol, 2011, 63(3): 269-276.
- [19] QIN L, DU Z H, ZHU S Y, et al. Atrazine triggers developmental abnormality of ovary and oviduct in quails (*Coturnix Coturnix coturnix*) via disruption of hypothalamo-pituitary-ovarian axis [J]. Environ Pollut, 2015, 207: 299-307.
- [20] HAO C, CHENG X, XIA H, et al. The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice [J]. Biosci Rep, 2012, 32(6): 619-629.
- [21] TRASANDE L, ATTINA T M, BLUSTEIN J. Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents [J]. JAMA, 2012, 308(11): 1113-1121.
- [22] ABARIKWU S O, MGBUDOM-OKAH C J, NDUFEIYA-KUMASI L C, et al. Influence of triazines and lipopolysaccharide coexposure on inflammatory response and histopathological changes in the testis and liver of BalB/c mice [J]. Heliyon, 2024, 10(2): e24431.
- [23] QIAN H, ZHAO Y, WANG Y, et al. ATR induces hepatic lipid metabolism disorder in rats by activating IRE1 α /XBP1 signaling pathway [J]. Toxicology, 2024, 501: 153696.
- [24] QI L, DONG Y M, CHAO H, et al. Glyphosate based-herbicide disrupts energy metabolism and activates inflammatory response through oxidative stress in mice liver [J]. Chemosphere, 2023, 315: 137751.
- [25] 徐飞博. 番茄红素干预小鼠肝脏 AFB₁ 代谢和线粒体损伤的作用及机制 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019.
- XU F B. Effect and mechanism of lycopene on liver AFB₁ metabolism and mitochondrial damage in AFB₁-exposed mice [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2019.
- [26] DU Z H, XIA J, SUN X C, et al. A novel nuclear xenobiotic receptors (AhR/PXR/CAR)-mediated mechanism of DEHP-induced cerebellar toxicity in quails (*Coturnix japonica*) via disrupting CYP enzyme system homeostasis [J]. Environ Pollut, 2017, 226: 435-443.

[收稿日期] 2024-03-01

李晓娟,修叶,李兴杰,等. 17-DMAG 对 PD-1 人源化小鼠肝癌移植瘤的抑制作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(6): 82-86, 160.

Li XJ, Xiu Y, Li XJ, et al. Inhibitory effect of 17-DMAG on PD-1 humanized mouse liver cancer transplantation tumor [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 82-86, 160.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.010

17-DMAG 对 PD-1 人源化小鼠肝癌移植瘤的抑制作用

李晓娟^{1#}, 修叶^{2#}, 李兴杰¹, 孙岩峰^{3*}, 李瑞生^{1*}

(1.中国人民解放军总医院第五医学中心感染病医学部研究所,北京 100039;

2.中国人民解放军总医院第五医学中心肝病医学部研究所,北京 100039;

3.中国人民解放军总医院第三医学中心儿科,北京 100039)

【摘要】目的 探讨 17-二甲基胺乙基-17-去甲基格尔德霉素(17-DMAG)对 PD-1 人源化小鼠人肝癌移植瘤生长的抑制作用。**方法** 选取 30 只 PD-1 人源化小鼠,将 HepG2 细胞悬液注射于小鼠右侧腹股沟皮下组织,构建人肝癌移植瘤模型;将荷瘤人源化小鼠随机分为 3 组(每组 10 只):①模型组(注射生理盐水 10 mg/kg);② 17-DMAG 组(按 25 mg/kg 腹腔注射 17-DMAG,3 次/周);③顺铂组(腹腔注射 20 mg/kg,2 次/周),实验持续 4 周。注射结束后测量人源化小鼠移植瘤的长、短径计算体积,测量肿瘤质量计算抑瘤率,同时采用免疫组化方法检测肿瘤组织中 CD31(以阳性细胞数计算肿瘤微血管密度(MVD))及血管内皮生长因子(VEGF)的表达。**结果** 17-DMAG 组和顺铂组的肿瘤体积和质量均较模型组显著减小($P<0.05$),17-DMAG 组的抑瘤率略高于顺铂组,但 17-DMAG 组和顺铂组肿瘤质量和体积以及抑瘤率均不存在显著性差异。17-DMAG 组和顺铂组 MVD 标记微血管数量及 VEGF 表达均低于模型组($P<0.05$),且 17-DMAG 组又低于顺铂组($P<0.05$)。**结论** 17-DMAG 可显著降低肝癌移植瘤中 VEGF 的表达,抑制新生血管在肿瘤中发生发展,从而对人源化小鼠肝癌移植瘤发挥抑制作用。

【关键词】 PD-1 人源化小鼠;17-DMAG;肝癌;微血管密度;血管内皮细胞生长因子

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0082-05

Inhibitory effect of 17-DMAG on PD-1 humanized mouse liver cancer transplantation tumor

LI Xiaojuan^{1#}, XIU Ye^{2#}, LI Xingjie¹, SUN Yanfeng^{3*}, LI Ruisheng^{1*}

(1. Research Institute of Department of Infectious Diseases, Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China. 2. Research Institute of Department of Hepatology, Fifth

Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039. 3. Pediatrics Department,

Third Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039)

【Abstract】Objective To explore the inhibitory effect of 17-DMAG on the growth and angiogenesis of PD-1 humanized mouse liver cancer transplantation tumors. **Methods** 30 PD-1 humanized mice were selected, and a human HepG2 cell suspension was injected into the subcutaneous tissue of the right inguinal region to construct a human liver

【基金项目】军队实验动物专项基金面上项目(SYDW[2020]05号)。

【作者简介】李晓娟(1980—),女,硕士,研究方向:实验动物模型研究。E-mail: sxlily55@163.com

修叶(1999—),女,硕士研究生,研究方向:中药药理与临床应用。E-mail: xiuye09@163.com [#]共同第一作者

【通信作者】孙岩峰(1973—),女,硕士,副主任医师,研究方向:儿科肿瘤方面研究。E-mail: eksyf@qq.com

李瑞生(1969—),男,博士,副研究员,研究方向:实验动物模型研究。E-mail: lrsheng@sohu.com

* 共同通信作者

cancer transplant tumor model. Tumor-bearing humanized mice were randomly divided into three groups (10 mice per group): ① model group (injected with 10 mg/kg of physiological saline), ② 17-DMAG group (intraperitoneal injection of 17-DMAG at 25 mg/kg, 3 times/week), and ③ cisplatin group (intraperitoneal injection of 20 mg/kg, 2 times per week). The experiment lasted for 4 weeks. After injection, the length and shortest diameter of humanized mouse transplanted tumors were measured to calculate the volume, and tumor mass was measured to calculate the tumor inhibition rate. At the same time, immunohistochemical method were used to detect the expression of CD31 (tumor microvessel density, MVD) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in tumor tissue. **Results** The tumor volume and mass of the 17-DMAG group and cisplatin group were significantly reduced compared to those of the model group ($P<0.05$), and the tumor inhibition rate of the 17-DMAG group was slightly higher than that of the cisplatin group. However, there were no significant differences in tumor mass, volume, and tumor inhibition rate between the 17-DMAG group and cisplatin group. The number of MVD-labeled microvessels and level of VEGF expression in the 17-DMAG group and cisplatin group were lower than those in the model group ($P<0.05$), and those of the 17-DMAG group were also lower than those in the cisplatin group ($P<0.05$). **Conclusions** 17-DMAG can inhibit the growth of humanized mouse liver cancer xenografts by reducing the expression of VEGF in liver cancer xenograft tissue, thereby inhibiting the generation of tumor neovascularization.

[Keywords] PD-1 humanized mice; 17-DMAG; liver cancer; microvessel density; vascular endothelial growth factor

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

肝癌是全世界尤其是我国最常见的恶性肿瘤之一,因其发病率逐年上升,同时又受到临床诊断治疗技术的限制,大多数患者确诊时即为晚期,肝肿瘤已发展为多发或弥散性病灶,后续临床治疗将遇到很大的难题,因此寻找肝癌新的治疗药物及治疗方式迫在眉睫^[1]。17-二甲基胺乙基-17-去甲氧基格尔德霉素(17-DMAG)是热休克蛋白(Hsp90)N末端抑制剂,其水溶性强,提高了口服生物利用度,具有更好的抗肿瘤活性^[2]。研究者在前期待外实验研究发现 17-DMAG 对肝癌 HepG2 细胞具有抑制作用^[3]。因此本实验通过构建 PD-1 人源化小鼠皮下移植肝癌模型,并观察 17-DMAG 对肝癌组织 VEGF 的表达和肿瘤微血管生长的影响,并观察了 17-DMAG 对肝癌移植瘤生长的影响作用,以期探讨 17-DMAG 可能的抗肝癌机制及 PD-1 人源化小鼠作为构建优质肿瘤模型的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

选取由赛业模式生物研究中心(太仓)有限公司提供[SCXK(苏)2020-0006],在解放军总医院第五医学中心动物实验室繁殖鉴定^[4]并得到的纯合子 PD-1 人源化小鼠 30 只,SPF 级,雌性,体重 18~20 g。饲养在解放军总医院第五医学中心动物实验室内[SYXK(军)2022-0016],屏障环境内温度控制

在 20~25 ℃,湿度控制在 40%~70%,光照周期 12 h/12 h,实行自由采食和饮水。饲料垫料购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010]。动物的使用按照解放军总医院第五医学中心动物伦理委员会(IACUC-2021-0020)的审查要求执行,依照 3R 原则给予实验动物人道主义关怀。

1.1.2 细胞

人肝癌细胞株 HepG2 由解放军总医院第五医学中心肝病医学部研究所提供并保存。

1.2 主要试剂与仪器

17-DMAG(HY-12024)、顺铂(HY-17349)购于购自美国 MedChemExpress 公司,17-DMAG 溶解后配成 2.5 mg/mL 的储存液,保存于-20 ℃冰箱。二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, QN0746)购自北京百奥莱博科技有限公司;聚乙二醇 300(IP9020)、吐温 80(C21PA259)购自北京阳光英锐生物科技有限公司;抗 CD31 抗体、重组抗 VEGF 抗体购自美国 Abcam 公司;DAB 染色液二抗试剂盒购自基因科技。

组织脱水机、石蜡切片机和组织烤片机均购自武汉赛尔思科技有限公司;游标卡尺购自上海台海工量具有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 PD-1 人源化小鼠肝癌模型构建

将 HepG2 细胞株传代,待其稳定生长后收集细胞悬液,将其浓度调整为 $1\times 10^7/\mu\text{L}$,分别取 200 μL

细胞悬液注射于 PD-1 人源化小鼠右侧腹股沟皮下组织,共 30 只。观察当瘤体生长至约 100 mm³ 时,小鼠一般情况良好,说明建模成功。

1.3.2 分组及给药方式

随机将荷瘤小鼠分为 3 组(10 只/组):①模型组,注射生理盐水(每次 10 mg/kg);②17-DMAG 组,腹腔注射 17-DMAG(每次 25 mg/kg),3 次/周;③顺铂组,腹腔注射(每次 20 mg/kg),2 次/周;实验持续 4 周。实验过程中观测小鼠的一般状态。

1.3.3 抑瘤率计算及标本固定

在给药完成后第 2 天,采用无菌手术取出移植瘤,清除包膜和血液后先称瘤重,并按以下公式计算抑瘤率:抑瘤率=(对照组瘤重-实验组瘤重)/对照组瘤重×100%,再用卡尺分别测量移植瘤的长径和短径,计算肿瘤体积(肿瘤体积=0.52×长径×短径²)。随后将肿瘤标本置于 10% 甲醛溶液中固定,后续常规石蜡包埋连续切片备用。

1.3.4 免疫组化 CD31 和 VEGF 表达及计算微血管密度

对切片进行 CD31 和 VEGF 相关抗原免疫组化染色,分别检测肿瘤组织的微血管密度(microvessel density, MVD)及 VEGF 表达情况。MVD 判断标准:按 Weidner 等^[5]推荐的方法,根据肿瘤微血管内皮细胞 CD31 阳性情况判断 MVD,每个阳性细胞计为一微血管,选取具有代表性的组织切片,排除出血区及边缘反应区,100 倍镜下确定切片中血管密度最高的区域,然后 200 倍镜下计数 5 个视野中肿瘤内微血管数目,以平均数目表示 MVD。VEGF 判断标准:观察棕黄或棕褐色颗粒的分布情况,有棕黄或棕褐色颗粒且强度高于背景的非特异性着色为阳性细胞,细胞内无棕黄或棕褐色颗粒为阴性细胞^[6]。

1.4 统计学方法

采用 Image Viewer 读片。采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析。各组肿瘤质量、肿瘤体积均符合正态分布,以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析对 3 组间样本均数进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 表示为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组小鼠基本状态及移植肿瘤外观对比结果

3 组小鼠在接种肿瘤后均生命体征良好,能够正常进食,活动度良好,无中途死亡情况。取出移植瘤后观察到:模型组肿瘤的体积最大,周围关联血管较丰富,表面呈淡红色;而 17-DMAG 组和顺铂组的肿瘤体积较模型组明显减小,且大部分表面呈灰白色,质地较韧,但 17-DMAG 组的肿瘤较顺铂组的肿瘤形状大小更加均匀(图 1)。

2.2 3 组肿瘤质量、肿瘤体积及抑瘤率对比结果

与模型组比较,17-DMAG 组和顺铂组的肿瘤质量和肿瘤体积均显著减小($P < 0.05$)。而与顺铂组比较,17-DMAG 组肿瘤质量和肿瘤体积均不存在显著性差异。17-DMAG 组的抑瘤率略高于顺铂组,但不具有统计学意义(表 1)。

2.3 3 组肿瘤组织 CD31(计算 MVD)及 VEGF 的表达对比结果

如图 2 和表 2 所示,免疫组化结果显示,3 组中均可观察到 MVD 标记的微血管内皮细胞呈棕色,棕色环状微血管散在分布于残留肿瘤组织的间质,模型组的 MVD 标记微血管数量及残留肿瘤组织在 3 组中最多,17-DMAG 组和顺铂组 MVD 标记微血管数量及残留肿瘤组织均低于模型组,且 17-DMAG 组少于顺铂组(图 2A~2C)。3 组中也均能观察到 VEGF 在肿瘤细胞的胞质胞膜均有表达,主要表达



图 1 各组小鼠皮下移植肿瘤外观比较(标尺=1 cm)

Figure 1 Appearance of liver tumors in each group (Bar=1 cm)

表 1 各组肿瘤质量、肿瘤体积及抑瘤率结果
Table 1 Results of tumor mass, tumor volume, and tumor inhibition rate in each group

组别 Groups	肿瘤质量/g Tumor weight	肿瘤体积/mm ³ Tumor volume	抑瘤率/% Tumor inhibitory rate
模型组 Model group	1. 25±0. 31 ^Δ	236. 08±108. 42 ^Δ	/
17-DMAG 组 17-DMAG group	0. 34±0. 14 [*]	14. 00±5. 68 [*]	70. 83±13. 44
顺铂组 Cisplatin group	0. 48±0. 15 [*]	23. 24±11. 07 [*]	56. 66±23. 60

注：与模型组比较，^{*}*P*<0. 05；与顺铂组比较，^Δ*P*<0. 05。
Note. Compared with the model group, ^{*}*P*<0. 05. Compared with the cisplatin group, ^Δ*P*<0. 05.

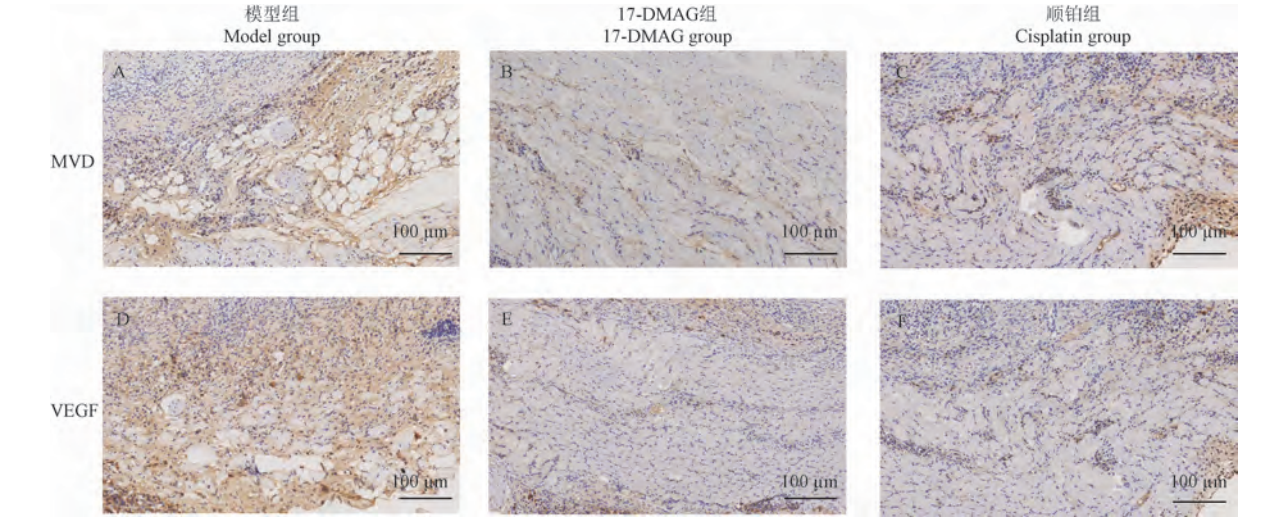


图 2 各组肿瘤 MVD 和 VEGF 的表达
Figure 2 Expression of MVD and VEGF in each group of tumors

表 2 各组免疫组化 MVD 及 VEGF 表达情况
Table 2 Immunohistochemical MVD and VEGF expression in each group

组别 Groups	MVD	VEGF/%
模型组 Model group	37. 56±2. 65 ^Δ	36. 35±1. 99 ^Δ
17-DMAG 组 17-DMAG group	20. 86±1. 66 ^{* Δ}	22. 94±2. 00 ^{* Δ}
顺铂组 Cisplatin group	24. 38±2. 69 [*]	25. 15±4. 37 [*]

注：与模型组比较，^{*}*P*<0. 05；与顺铂组比较，^Δ*P*<0. 05。
Note. Compared with the model group, ^{*}*P*<0. 05. Compared with the cisplatin group, ^Δ*P*<0. 05.

在胞膜呈棕褐色,胞质呈棕黄色,模型组 VEGF 的表达是 3 组中最强的,17-DMAG 组和顺铂组 VEGF 的表达均低于模型组,且 17-DMAG 组 VEGF 的表达又低于顺铂组(图 2D~2F)。与模型组比较,17-DMAG 组和顺铂组肿瘤组织中 MVD 及 VEGF 表达均显著降低(*P*<0. 05),而 17-DMAG 组肿瘤组织中 MVD 及 VEGF 表达均显著性低于顺铂组(*P*<0. 05)。

3 讨论

Hsp90 虽然广泛存在于真核以及原核生物中最

丰富的热休克蛋白,但其在肿瘤细胞中的表达却异常高,可以达到正常水平的 2~10 倍,并且几乎控制了所有恶性肿瘤细胞信号转导通路及表型组成^[7-8]。17-DMAG 作为 Hsp90 抑制剂,通过与 Hsp90 调节位点结合引起 Hsp90 构象改变,进一步诱导底物蛋白发生降解从而发挥抑制作用,因此以 Hsp90 为靶点进行抑制剂的开发仍然具有重要意义^[9]。高风彩等^[10]研究发现 17-DMAG 能够抑制白血病 K562 细胞的增殖,诱导 K562 细胞凋亡。吴文辉等^[11]研究发现 17-DMAG 可抑制肿瘤新生血管的

生成,与 5-FU 联合用药对胃癌细胞具有显著的抑制作用,两种药物具有协同作用。肖隆斌等^[12]研究表明 17-DMAG 能够抑制肿瘤新生血管生成,也可降低胃癌组织中 VEGF 的表达,从而抑制裸鼠移植胃癌肿瘤的生长。但是将 17-DMAG 用于抑制肝癌的研究报道甚少。

因此,本实验选取前期实验室成功鉴定的 PD-1 人源化小鼠构建人肝癌移植肿瘤模型,并观察了 17-DMAG 对模型小鼠肿瘤的作用以及对肿瘤 MVD 及 VEGF 表达的影响,实验结果显示,3 组小鼠肿瘤外观上具有很直观的差异,模型组肿瘤的体积和质量均最大,17-DMAG 组和顺铂组的肿瘤体积和质量均较模型组显著减小($P<0.05$),17-DMAG 组的抑瘤率略高于顺铂组,但 17-DMAG 组和顺铂组肿瘤质量和体积以及抑瘤率均不存在显著性差异,但 17-DMAG 组的肿瘤较顺铂组的肿瘤形状大小更加均匀,表明 17-DMAG 与顺铂具有相似的抑制肿瘤的能力,且优于顺铂。同时免疫组化结果都显示,17-DMAG 组和顺铂组 MVD 标记微血管数量及 VEGF 表达均低于模型组($P<0.05$),且 17-DMAG 组又低于顺铂组($P<0.05$)。众所周知,新生血管不仅为实体瘤组织提供新陈代谢的营养,滋养实体瘤快速生长,还有利于肿瘤细胞不断地向外浸润和转移^[13-14]。而与肿瘤血管新生密切相关的血管生成因子等在一定程度上也反映了肿瘤血管的新生情况^[15]。因此,从上述结果可以判断,17-DMAG 可以通过抑制肿瘤新生血管的形成,从而对抑制肿瘤发挥一定的作用。大量研究表明 Hsp90 抑制剂可能会影响肿瘤细胞中多条信号转导通路,从而全面影响肿瘤的生长、侵袭和转移等发生过程^[16-17],而我们本实验只研究了 17-DMAG 对新生血管的影响,后期我们将继续应用本人源化小鼠模型对 17-DMAG 的抗肿瘤作用机制进行深入详细的研究。

综上所述,本实验选取 PD-1 人源化小鼠构建人肝癌移植肿瘤模型,应用 Hsp90 抑制剂 17-DMAG 对模型小鼠肿瘤模型进行治疗,可观察到 17-DMAG 可能通过抑制肿瘤血管的生成和发展进而发挥抑制肿瘤的作用,以期为临床研究提供更好的人源化小鼠模型,同时能够使该人源化小鼠在免疫检查点抑制剂研究中发挥其独特优势。

参考文献:

[1] 李晓娟,李兴杰,孙慧伟,等. 基于 Image J 软件对 BALB/c 突变卷毛鼠肝肿瘤的定量分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(11): 16-20.

LI X J, LI X J, SUN H W, et al. Quantitative comparative analysis of liver tumors in BALB/c mutant curly mice by Image J software [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(11): 16-20.

[2] HOLLINGSHEAD M, ALLEY M, BURGER A M, et al. *In vivo* antitumor efficacy of 17-DMAG (17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin hydrochloride), a water-soluble geldanamycin derivative [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2005, 56(2): 115-125.

[3] 彭树松,阳静,刘霆,等. 17-DMAG 对肝癌 HepG2 细胞的作用研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(11): 30-35.

PENG S S, YANG J, LIU T, et al. Effect of 17-DMAG on liver cancer cell lines HepG2 [J]. China J Mod Med, 2012, 22(11): 30-35.

[4] 李晓娟,孙岩峰,修叶,等. PD-1 人源化小鼠构建繁殖与基因型鉴定 [J]. 实验动物科学, 2023, 40(4): 34-38.

LI X J, SUN Y F, XIU Y, et al. Breeding and genotype identification of PD-1 humanized mice [J]. Lab Anim Sci, 2023, 40(4): 34-38.

[5] WEIDNER N, FOLKMAN J, POZZA F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma [J]. J Natl Cancer Inst, 1992, 84(24): 1875-1887.

[6] DIAS F J, ISSA J P M, BARBOSA A P A, et al. Effects of low-level laser irradiation in ultrastructural morphology, and immunoexpression of VEGF and VEGFR-2 of rat masseter muscle [J]. Micron, 2012, 43(2/3): 237-244.

[7] GOOLJARSINGH L T, FERNANDES C, YAN K, et al. A biochemical rationale for the anticancer effects of Hsp90 inhibitors: slow, tight binding inhibition by geldanamycin and its analogues [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(20): 7625-7630.

[8] BURROWS F, ZHANG H, KAMAL A. Hsp90 activation and cell cycle regulation [J]. Cell Cycle, 2004, 3(12): 1530-1536.

[9] 张钟元,阎爱侠. Hsp90 抑制剂的研究进展 [J]. 中国医药生物技术, 2021, 16(1): 41-50.

ZHANG Z Y, YAN A X. Research progress in Hsp90 inhibitors [J]. Chin Med Biotechnol, 2021, 16(1): 41-50.

[10] 高风采,郭荣,田文亮,等. HSP90 抑制剂 17-DMAG 对白血病细胞株 K562 增殖及凋亡的影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(4): 998-1002.

GAO F C, GUO R, TIAN W L, et al. Proliferation and apoptosis of leukemia cell line K562 treated with HSP90 inhibitor 17-DMAG [J]. J Exp Hematol, 2017, 25(4): 998-1002.

[11] 吴文辉,朱佳成,罗特东,等. 热休克蛋白 90 抑制剂 17-DMAG 联合 5-FU 对人胃癌裸鼠移植瘤的抑制作用研究 [J]. 消化肿瘤杂志(电子版), 2015, 7(2): 99-105.

WU W H, ZHU J C, LUO T D, et al. Inhibitory effect of HSP90 inhibitor 17-DMAG combined with 5-FU in human gastric cancer transplanted in nude mice [J]. J Dig Oncol Electron Version, 2015, 7(2): 99-105.

再那吾东·玉山,李晓燕,鹿双双,等. 动物生物安全三级模拟实验室的建设与实践探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34 (6): 87-92.

Zainawudong YS, Li XY, Lu SS, et al. Analysis of the construction and practice of an animal biosafety level-3 simulated laboratory [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 87-92.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.011

动物生物安全三级模拟实验室的建设与实践探讨

再那吾东·玉山^{1#}, 李晓燕^{1#}, 鹿双双¹, 王嘉琪¹, 卡力比夏提·艾木拉江²,
刘 美¹, 刘科亮³, 卢选成^{1*}

(1. 传染病溯源预警与智能决策全国重点实验室, 中国疾病预防控制中心, 北京 102206;
2. 省部共建中亚高发病因与防治国家重点实验室, 新疆医科大学第一附属医院临床医学研究院,
乌鲁木齐 830054; 3. 四川省疾病预防控制中心, 成都 610044)

【摘要】 动物生物安全三级实验室 (ABSL-3 实验室) 是可以开展高致病性病原微生物感染实验动物的生物安全防护水平为三级的高级别生物安全实验室。近年来随着新发、再发传染病的不断出现, 高级别生物安全实验室在病原致病机理、药物和疫苗研发等方面发挥了越来越重要的硬件支撑作用, ABSL-3 实验室的需求与日俱增。与此同时, 对于能够胜任 ABSL-3 实验室工作的人员需求也越来越多, 岗前培训的系统化、规范化、标准化成为进入 ABSL-3 实验室开展工作的人员生物安全的重要保证。ABSL-3 实验室的岗前培训工作需要特定的场所——模拟实验室内开展, 因此有必要建立 ABSL-3 模拟实验室, 并建立科学有效的运行标准和机制。本文全面介绍了 ABSL-3 模拟实验室的设计、建设、运行及作用。

【关键词】 ABSL-3 实验室; ABSL-3 模拟实验室; 实验室获得性感染; 生物安全; 风险评估; 培训

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0087-06

Analysis of the construction and practice of an animal biosafety level-3 simulated laboratory

ZAINAWUDONG Yushan^{1#}, LI Xiaoyan^{1#}, LU Shuangshuang¹, WANG Jiaqi¹, KALIBIXIATI Aimulajiang², LIU Mei¹,
LIU Keliang³, LU Xuancheng^{1*}

(1. National Key Laboratory of Intelligent Tracking and Forecasting for Infectious Diseases (NITFID), Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China. 2. State Key Laboratory on Pathogenesis, Prevention and Treatment of High Incidence Diseases in Central Asia, Clinical Medicine Institute, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054. 3. Sichuan Center for Diseases Control and Prevention, Chengdu 610044)

【Abstract】 An animal biosafety level-3 laboratory (ABSL-3) is a high-level biosafety installation that can conduct experiments on animals infected with highly pathogenic microorganisms. In recent years, with the continuous characterization of emerging and re-emerging infectious diseases, high-level biosafety laboratories have played increasingly important roles in pathogenic mechanism and drug and vaccine research and development. The demand for ABSL-3 is increasing year by year. At the same time, there is also a growing demand for personnel who are competent in working in

【基金项目】 国家重点研发计划 (2022YFC2304302)。

【作者简介】 再那吾东·玉山 (1978—), 男, 研究员, 研究方向: 疾病预防控制及卫生管理。E-mail: znwdys@chinacdc.cn

李晓燕 (1977—), 女, 副研究员, 研究方向: 实验动物管理, 生物安全。E-mail: lixy@chinacdc.cn [#]共同第一作者

【通信作者】 卢选成 (1977—), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物与生物安全。E-mail: luxc@chinacdc.cn

ABSL-3. The systematization, normalization, and standardization of pre-service training have become important to guarantee a reduction in the risks to personnel working in ABSL-3. Training of ABSL-3 staff needs to be carried out in specific simulated laboratories. Therefore, it is necessary to construct simulated ABSL-3 and establish scientific and effective operating standards and mechanisms. This paper comprehensively introduces the design, construction, operation, and functions of a simulated ABSL-3 installation.

[Keywords] ABSL-3 laboratory; ABSL-3 simulated laboratory; laboratory acquired infection; biosafety; risk assessment; training

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

近年来全球各地不同程度地经历了由人类免疫缺陷病毒 (HIV) 引起的艾滋病、人感染高致病性禽流感、SARS、MERS 等新发再发传染病的流行,尤其是 2019 年爆发的新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 感染疫情对全球人类的健康、经济发展构成严重威胁,生物安全形势面临前所未有的严重挑战。新冠疫情爆发之初也暴露了我国在公共卫生应急体系和生物安全体系建设方面的一些不足,尤其是疫苗和药物研发所需的高级别动物生物安全实验室的匮乏是当时国内面临的严峻挑战。加强高级别生物安全实验室的建设,对从事高致病病原微生物相关工作的人员开展必要的标准培训是当前国家公共卫生应急管理体系建设和生物安全治理能力建设的重要任务之一。

1 生物安全实验室介绍

自微生物培养技术发明以来实验室获得性感染的报道就从未间断。20 世纪 40 年代,美国为了制造生物武器,大量使用高致病性病原体进行实验研究,造成实验室感染事件频发。20 世纪 50~70 年代 Pike 和 Sulkin 对实验室获得性感染事件开展了广泛大量的研究^[1]。同期美国开始了生物安全实验室的建设,随后英国、前苏联、加拿大、日本等发达国家也陆续建造了不同防护级别的生物安全实验室。生物安全实验室建设的初衷为了保护操作致病性病原微生物的工作人员,降低其遭受感染的风险。

生物安全实验室是指通过防护屏障和管理措施,达到生物安全要求的微生物实验室和动物实验室,根据实验室所处理对象的生物危害程度和采取的防护措施,生物安全实验室分为四级,微生物生物安全实验室可采用 BSL-1、BSL-2、BSL-3、BSL-4 表示相应级别的实验室;动物生物安全实验室可采用 ABSL-1、ABSL-2、ABSL-3、ABSL-4 表示相应级别的实验室,ABSL-3 和 ABSL-4 实验室为从事高致病性

病原微生物动物试验研究的高级别生物安全实验室,操作对象对人体、动植物或环境具有高度危害性。其中 ABSL-3 实验室适用于操作能够引起人类或者动物严重疾病的微生物,该类微生物比较容易直接或者间接在人与人、动物与人、动物与动物间传播,ABSL-4 实验室适用于操作能够引起人类或者动物非常严重疾病的微生物,以及我国尚未发现或者已经宣布消灭的微生物。21 世纪以来,随着全球贸易、商品流通以及交通旅游业的日益频繁,全球生物安全问题日渐突出,烈性传染病带来的生物安全问题已引起各国的高度重视,而高级别生物安全实验室为应对突发公共卫生事件、开展新发再发传染病防控研究提供了基础保障设施,具有战略性意义,加速了全球高级别生物安全实验室的建设步伐。

2 需要在高级别生物安全实验室开展研究的病原微生物

按照国家卫生健康委发布的《人间传染的病原微生物目录》(国卫科教发[2023]24 号)规定,需要在 ABSL-3 内开展相关工作的高致病性病原微生物(一类和二类)有 82 种,占全部病原(508 种)的 16.1%,详见表 1。此外,第三类病原,如甲型流行性感冒病毒 H2N2 流感病毒,WHO 建议应提高防护等级,在 ABSL-3 内开展动物感染实验^[2]。

3 建设高级别生物安全模拟实验室的必要性和战略意义

3.1 建设高级别生物安全模拟实验室的必要性

高级别生物安全实验室研究的对象为高致病性病原微生物,能够引起人类或者动物严重甚至非常严重的疾病,因此操作风险很大。开展相关工作的人员上岗前必须经过严格培训。《病原微生物实验室生物安全管理条例》规定,实验室或者实验室的设立单位应当每年定期对工作人员进行培训,保证其掌握实验室技术规范、操作规程、生物安全防护知识和实际操作技能,并进行考核,工作人员经考核合格的方可上岗^[3]。从事 ABSL-3 实验室工作

表 1 需要在 ABSL-3 实验室开展的高致病性病原分类统计
Table 1 Classification statistics of high pathogenic microorganism to be carried out in ABSL-3

分类 Classification	一类 Group 1	二类 Group 2	总计 Total
病毒 Virus	9	44	160
细菌、放线菌、衣原体、支原体、立克次体、螺旋体 Bacteria, Actinomycetes, Chlamydia, Mycoplasma, Rickettsia, Spirochete	/	18	190
真菌 Fungus	/	7	151
朊病毒 Prion	/	4	7
合计 Total	9	73	508
占比/% Proportion	1. 71	14. 37	/

的人员实操培训需要在真实的 ABSL-3 环境下开展,才能达到培训目的。因此亟需建立 ABSL-3 模拟实验室。除了操作的病原为模拟病原外,ABSL-3 模拟实验室的围护结构、关键防护设备、生物安全体系要求等各方面都与真正的 ABSL-3 实验室完全一致。ABSL-3 模拟实验室的建设对于从事高致病病原微生物感染动物相关工作的人员(包括单位新进人员、专业生物安全实验室工作人员、进修人员、研究生等)在标准培训、能力提升方面将发挥切实有效的硬件支撑作用。只有在这样的真实场景下进行培训并经反复、充分模拟演练的工作人员,在开展 ABSL-3 实验室工作时,才能最大程度的保证生物安全,将 ABSL-3 实验室内的操作风险降低到可接受的范围。

ABSL-3 模拟实验室的建成,不仅可以提升单位内部相关工作人员的专业能力,对于全国范围内诸如各大高校、科研院所、企事业单位等有相关需求的从业人员,也可提供培训基地服务,从而更好地发挥建设我国高级别生物安全实验室网络体系的资源共享、分工明确的作用。

3.2 建设高级别生物安全模拟实验室的战略意义

2001 年美国“炭疽”邮件生物恐怖事件发生后,欧美等国家将建设高级别生物安全实验室的初衷做出了调整,由最初的单纯保护操作者和环境安全上升为国家应对突发公共卫生事件及军事研究的高度,比如在“大健康”计划、生物两用技术研究、烈性传染病实验室急救治专业技能培训等方面发挥了战略作用。

2003 年 SARS 疫情发生后,我国也加强了对高级别生物安全实验室建设的步伐,2004 年发布了

《国家高级别生物安全实验室建设规划》,随后的几年内迅速搭建起了以科研院所和高校为依托的高级别生物安全实验室体系的基本框架。但是与欧美等发达国家相比,实验室种类和数量方面差距显著。随着国际生物安全形势日趋复杂多变,国内对高级别生物安全实验室的需求量也日益增多,已有的高级别生物安全实验室建设布局已经不能满足需求。2016 年国家发展和改革委员会、科学技术部联合印发了《高级别生物安全实验室体系建设规划(2016~2025 年)》,该规划提出力争到 2025 年实现每个省份至少设有 1 家三级实验室的目标。因此,在生物安全实验室网络体系建设方面,我国必须通过布局合理、功能齐备、特色突出的策略来加快建设国家高级别生物安全实验室,才能在复杂多变的国际生物安全形势下更好地应对生物安全风险、生物威胁甚至生物恐怖,从而达到维护国家生物安全、社会稳定的目的。而建立高级别生物安全模拟实验室,强化实验室生物安全理论和实践培训,建立高级别实验室生物安全专业技术人员培训和记录制度是《高级别生物安全实验室体系建设规划(2016~2025 年)》完善实验室保障条件的一项重点任务之一^[4]。2022 年国家卫生健康委启动了实施实验室生物安全人才培养项目,遴选出首批包括中国医学科学院、浙江省疾控中心、中国疾控中心等 6 家国家高等级实验室生物安全培训基地,积极探索开展实验室生物安全规范化培训^[5]。

4 ABSL-3 模拟实验室平面布局及建设特点

ABSL-3 模拟实验室从设计到建设要立足国情,以高级别生物安全实验室国家标准、技术规范为依

据合理布局,同时还要兼顾实验动物设施相关规范和标准的要求,因此要统筹考虑《中华人民共和国生物安全法》、《生物安全实验室建筑技术规范》(GB 50346-2011)、《实验室生物安全通用要求》(GB 19489-2008)、《实验动物环境及设施》(GB 14925-2023)、《实验动物建筑技术规范》(GB 50447-2008)、《实验室设备生物安全性能评价技术规范》(RB/T 199-2015)等法律法规标准对设施建筑的要求^[6-11]。

按照《生物安全实验室建筑技术规范》的要求,根据所操作致病性生物因子的传播途径,生物安全实验室可分为 a 类和 b 类,其中 a 类指的是操作非经空气传播生物因子的实验室,对应《实验室生物安全通用要求》(GB 19489-2008)实验室生物安全防护水平分级中的 4.4.1 类实验室,比如艾滋病感染的实验动物操作可以在这类实验室中开展。b 类指的是操作经空气传播生物因子的实验室,按照是否配置有效安全隔离装置的标准,b 类实验室划分为 b1 类和 b2 类,其中 b1 类为可有效利用安全隔离装置进行操作的实验室,对应《实验室生物安全通用要求》(GB 19489-2008)实验室生物安全防护水平分级中的 4.4.2 类实验室,该类实验室通常是配备了可开展啮齿类动物感染性实验的生物安全型独立通风笼具(individual ventilation cage, IVC)、中等动物的负压饲养柜(比如兔)、禽类的隔离器等设备。b2 类为不能有效利用安全隔离装置进行操作的实验室,对应《实验室生物安全通用要求》(GB 19489-2008)实验室生物安全防护水平分级中的 4.4.3 类实验室,实验室内通常可以操作犬、猴等中大型感染性实验动物,这些动物的饲养设备无法达到完全隔离的效果,该类实验室在密闭性的要求上高于 b1 类实验室,建成后需要进行密闭性测试,且需要根据所操作病原的特性调整实验人员的个体防护装备。如同一动物设施内需要包含上述 3 种不同类别实验室,因其建筑和防护要求不同,应考虑将相同类别的实验室集中布局,方便后期的运行管理。

ABSL-3 模拟实验室要达到系统化、规范化和标准化培训需求,其实验室种类就应全部覆盖上述 a 类和 b 类实验室。

5 ABSL-3 模拟实验室宜通过的检测验证和获得资质

ABSL-3 模拟实验室的基础建设与设备配置要

同时满足《生物安全实验室建筑技术规范》(GB 50346-2011)和《实验动物建筑技术规范》(GB 50447-2008)的要求,虽然平时主要是作为教学培训使用,但从战略性的角度来看,也是备用的高级别生物安全实验室,如遇突发疫情,可紧急启用用于疫情处置。ABSL-3 模拟实验室具有平战结合的特点,因此项目验收时建议按照生物安全三级实验室和动物实验室的各项建筑指标要求进行检测验收,并对关键防护设备的安全性能指标和消毒效果进行验证。

在运行管理上,ABSL-3 模拟实验室需要参照实验动物相关的法规标准要求,首先要获得实验动物使用许可证,同时建议按照高等级病原微生物实验室的要求,通过中国合格评定国家认可委员会(CNAS)实验室认可,并按照 CNAS 的要求接受监督评审和复评审,这样既可以发现示教过程中出现的问题,及时纠正,方便突发疫情处置的紧急启用。

5.1 实验动物使用许可证

依据《实验动物许可证管理办法》的相关规定,使用实验动物从事科研、教学、生产、检定、检验和其他科学实验的单位和个人应当取得《实验动物使用许可证》^[12]。ABSL-3 模拟实验室属于一种特殊的动物实验设施,其使用目的虽然主要用于教学培训,依然涉及到实验动物的使用,因此投入使用前应按照规定要取得《实验动物使用许可证》。

5.2 实验室综合性能及关键防护设备安全性能评价

5.2.1 实验室综合性能评价

ABSL-3 实验室综合性能评价包括维护结构气密性和严密性、换气次数、静压差、温度、相对湿度、洁净度、噪声、照度等参数的测定,实验室维护结构的严密性、静压差是高级别生物安全实验室生物安全的重要保证,换气次数、温湿度、洁净度等参数是实验动物质量的重要保障,因此实验室综合性能指标在使用前要经过评价达到标准的要求。

5.2.2 关键防护设备安全性能评价

ABSL-3 实验室关键防护设备评价主要包括高效过滤器、生物安全柜、双扉高压蒸汽灭菌器、传递窗、正压头套、正压防护服、污水处理设备、动物残体处理系统、气体消毒设备以及动物饲养设备,如生物安全型独立通风笼具(IVC)、隔离器、负压饲养柜等的安全性能评价。这些关键防护设备是操作者与被操作动物之间的一级防护屏障,关乎操作者

的安全,其安全性能在投入使用前必须进行检测,目前的检测方法主要是依据行业标准“实验室设备生物安全性能评价技术规范”(RB/T 199-2015)。

5.3 消毒及灭菌效果验证

ABSL-3 实验室、设施设备及实验废弃物的有效消毒与灭菌处理是确保操作人员及环境生物安全的重要保障,动物生物安全三级实验室(ABSL-3)与单纯的病原生物安全三级实验室(BSL-3)最大的不同在于需要在活体动物上对高致病性病原开展相关的研究活动,动物实验周期长,涉及每次动物操作后需对动物饲养设备、生物安全柜及饲养间地面进行消毒剂喷洒或擦拭消毒。整个动物实验项目结束后,需要对饲养设备、实验设备和房间采用消毒剂熏蒸的方式进行终末消毒并进行消毒效果验证。

ABSL-3 实验室内产生的固体废弃物包括实验过程中使用的一次性个体防护装备、实验材料、手术器材、废弃的饲料垫料、动物尸体等,需要用高压蒸汽灭菌器或动物残体处理系统进行消毒灭菌处理;大量的液体废弃物通常需要集中到具有高温高压功能的污水处理器中进行灭菌;实验室内的气体需要通过高效过滤器过滤后进入排风管道,高效过滤器需具备原位消毒和检漏的功能。

5.4 CNAS 实验室认可

影响 ABSL-3 实验室生物安全的因素很多,为了保证实验室安全运行,防止所操作的病原和动物对实验室工作人员、环境和他人造成危害,必须对影响因素进行全面的控制。生物安全管理体系就是从实验室生物安全角度出发,对可能影响安全的因素和环节进行全面控制、管理,使这些因素都处于受控状态,把风险控制在可接受的范围内。按照 CNAS-CL05:2009 关于三级实验室认可的要求,生物安全管理体系文件包括安全管理手册、程序文件、说明及操作规程、安全手册和记录。体系文件编写过程中,要结合实验室实际情况,明确实验室的法律地位和组织管理框架,明确所有人员的职责、明确管理责任和个人责任,建立完善的风险评估制度,制定应急预案并定期开展演练,做好人员培训考核、健康监测及准入管理,做好安全计划、定期开展安全检查,对不符合项采取纠正措施。

模拟 ABSL-3 实验室要根据发布的体系文件进行模拟实验活动,对模拟实验活动、应急演练、设施设备运行、内审和管理评审进行记录,按照安全管

理体系核查表对体系文件进行全面的核查,以验证体系文件是否有效。

6 ABSL-3 模拟实验室在模拟训练过程中发挥的全方位作用

ABSL-3 实验室从设计、建设到运行,涉及到人员比较多,包括实验室设立单位的法人、实验室负责人、实验室管理部门负责人、从事实验室体系文件编制、档案管理、实验室废弃物处置、安全保卫等从事管理岗位的人员,以及实验室内开展病原操作、感染性动物饲养与操作的实操人员,和实验室硬件设施、设备维护、检测、维修等的运行维护人员。三大类人员的模拟训练是保证实验室安全开展工作的必要条件。此外,ABSL-3 实验室应有病毒、细菌、真菌等专业领域的专家团队支持,尤其在面对新发和突发传染病,开展未知病原的实验活动研究前,必须由专家组成的生物安全委员会进行风险评估后给出建议,指导实验室活动的安全防护等级和标准操作。稳定的实验动物专业操作技术队伍是 ABSL-3 实验室不可缺少的主力军,正式开展实验前对其进行严格的充足培训是安全开展实验的重要保证。接受培训的人员,需要在模拟 ABSL-3 实验室对实验过程中涉及到的各种操作进行反复训练,包括个体防护装备的穿脱、进出核心间的流程、动物的麻醉、保定、采样、解剖、取材、安乐死、废弃物处置、突发事件的应急处置等,尤其是双人或多人操作的默契,都需要长时间的模拟训练才能完成。对各种可能遇到的突发情况进行充分的演练,尤其可以开展一些灾害事件(包括地震、火灾)的应急演练,保证今后在 ABSL-3 实验室开展工作时遇到突发状况临危不乱、沉稳应对。

7 结语

随着社会经济的全球化和国际形势的多端变化,新发再发传染病不断出现,人类社会面对的生物安全挑战日渐凸显,生物安全问题与国家稳定、人民福祉和公共健康密不可分,世界各国不同程度地加大了生物安全的研究力度,尤其是高致病性病原的研究。为维护国家安全,保障人民生命健康,防范和应对生物安全风险,推动构建人类命运共同体,2021 年我国颁布并实施了《中华人民共和国生物安全法》^[6]。在生物安全科技研究,生物安全风险防御与管控技术研究等方面给予大力支持,提倡整合优势力量和资源,建立多学科、多部门协同创

新的联合攻关机制,推动生物安全核心关键技术和重大防御产品的成果产出与转化应用,提高生物安全科技保障能力。

ABSL-3 模拟实验室借助其平急结合的特点,平时可作为培训基地培养合格的实验室工作人员,如遇突发疫情,还可紧急启用开展病原相关的研究工作。随着我国高级别生物安全实验室的不断建设,人员培训需求将会不断增加,ABSL-3 模拟实验室在高致病性病原微生物研究和国家生物安全治理能力建设方面必将发挥着越来越重要的作用。

参考文献:

[1] PIKE R M, SULKIN S E, SCHULZE M L. Continuing importance of laboratory-acquired infections [J]. Am J Public Health Nations Health, 1965, 55(2): 190-199.

[2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 人间传染的病原微生物目录 [EB/OL]. (2023-08-28) [2024-02-27]. <http://www.nhc.gov.cn/qjjys/s7948/202308/b6b51d792d394fbeat75e4c8094dc87e.shtml>. National Health Commission of the People's Republic of China. Catalogue of Pathogenic microorganisms that are transmitted between humans [EB/OL]. (2023-08-28) [2024-02-27]. <http://www.nhc.gov.cn/qjjys/s7948/202308/b6b51d792d394fbeat75e4c8094dc87e.shtml>.

[3] 中华人民共和国国务院令 第 424 号. 病原微生物实验室生物安全管理条例 [EB/OL]. (2018-03-19) [2024-02-27]. https://zwfw.nhc.gov.cn/kzx/zcfg/gzbxbywsyssp_243/201803/t20180319_1339.html. Decree of The State Council of the People's Republic of China No. 424. Regulations on Biosafety management of pathogenic microorganism laboratories [EB/OL]. (2018-03-19) [2024-02-27]. https://zwfw.nhc.gov.cn/kzx/zcfg/gzbxbywsyssp_243/201803/t20180319_1339.html.

[4] 国家发展改革委员会, 科技部. 高级别生物安全实验室体系建设规划(2016-2025) [EB/OL]. (2016-11-30) [2024-02-27]. https://www.ndre.gov.cn/xxgk/zcfb/tz/201612/t20161220_962822.html. National Development and Reform Commission, Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Construction planning of high-level biosafety laboratory system (2016-2025) [EB/OL]. (2016-11-30) [2024-02-27]. https://www.ndre.gov.cn/xxgk/zcfb/tz/201612/t20161220_962822.html.

[5] 健康报. 实验室安全,从培训起步[EB/OL]. (2022-10-24) [2024-02-27]. <https://www.jkb.com.cn/news/industryNews/2022/1024/486803.html>. Health newspaper. Laboratory biosafety, start with training [EB/

OL]. (2022-10-24) [2024-02-27]. <https://www.jkb.com.cn/news/industryNews/2022/1024/486803.html>.

[6] 全国人民代表大会. 中华人民共和国生物安全法 [EB/OL]. (2020-10-17) [2024-02-27]. http://www.npc.gov.cn/npc/c2/c30834/202010/t20201017_308282.html. The National People's Congress of the People's Republic of China. Biosecurity Law of the People's Republic of China [EB/OL]. (2020-10-17) [2024-02-27]. http://www.npc.gov.cn/npc/c2/c30834/202010/t20201017_308282.html.

[7] 中华人民共和国住房和城乡建设部. 生物安全实验室建筑技术规范: GB 50346-2011 [S]. 2012. Ministry of Housing and Urban-Rural Development of the People's Republic of China. Technical specifications for biosafety laboratory construction: GB 50346-2011 [S]. 2012.

[8] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验室 生物安全通用要求: GB 19489-2008 [S]. 2009. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Laboratory biosafety general requirements: GB 19489-2008 [S]. 2009.

[9] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 实验动物环境及设施: GB 14925-2023 [S]. 2023. State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China. Laboratory animal environment and facilities: GB 14925-2023 [S]. 2023.

[10] 中华人民共和国住房和城乡建设部. 实验动物设施建筑技术规范: GB 50447-2008 [S]. 2008. Ministry of Housing and Urban-Rural Development of the People's Republic of China. Technical specifications for the construction of laboratory animal facilities: GB 50447-2008 [S]. 2008.

[11] 中国国家认证认可监督管理委员会. 实验室设备生物安全性能评价技术规范: RB/T 199-2015 [S]. 2015. Certification and Accreditation Administration of the People's Republic of China. Technical specifications for biosafety performance evaluation of laboratory equipment: RB/T 199-2015 [S]. 2015.

[12] 科学技术部, 卫生部, 教育部, 等. 实验动物许可证管理办法(试行) [EB/OL]. (2001-12-05) [2024-02-27]. https://www.most.gov.cn/xxgk/xinxifenlei/fdzdgknr/fgzc/gfxwj/gfxwj2010before/201712/t20171227_137230.html. Ministry of Science and Technology, Ministry of Health, Ministry of Education, et al. Measures for the administration of laboratory animal licenses (for trial implementation) [EB/OL]. (2001-12-05) [2024-02-27]. https://www.most.gov.cn/xxgk/xinxifenlei/fdzdgknr/fgzc/gfxwj/gfxwj2010before/201712/t20171227_137230.html.

[收稿日期] 2024-02-27

丁宁, 梁佳琪, 富宏坤, 等. 输日实验动物检疫监管政策的解析与思考 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(6): 93-99.

Ding N, Liang JQ, Fu HK, et al. Reflections on quarantine and supervision policies of imported experimental animals in Japan [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 93-99.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.012

输日实验动物检疫监管政策的解析与思考

丁宁^{1#}, 梁佳琪^{1#}, 富宏坤², 王莹¹, 王春霞¹, 任娇¹, 鱼海琼¹, 林志雄¹,
麻丽丹³, 朱道中¹, 高志强⁴, 吴晓薇^{1*}, 陶雨风^{2*}

(1. 广州海关技术中心, 广州 510623; 2. 中国合格评定国家认可中心, 北京 100062;

3. 丹东海关综合技术服务中心, 辽宁 丹东 118300; 4. 中国海关科学技术研究中心, 北京 100026)

【摘要】 日本是我国进出口实验动物的主要贸易伙伴之一, 对于实验动物的进出口检疫监管政策十分细致而严格。本文以实验犬、猫和猴为例, 对出口日本的主要实验动物检疫监管政策进行了深入解析, 同时对我国目前实验动物相关的法律法规、进出境管理办法、标准、生物安全、养殖和管理现状以及进出口业务现状展开思考, 在完善实验动物法律法规和进出境管理办法、保障国门生物安全、提高实验动物养殖管理水平以及促进实验动物进出口贸易等方面给出了建议, 以期全面提升我国实验动物生产、使用、养殖管理水平, 加强中日实验动物贸易往来提供参考。

【关键词】 实验动物; 进出境检疫监管; 政策解读; 行业发展

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 04-0093-07

Reflections on quarantine and supervision policies of imported experimental animals in Japan

DING Ning^{1#}, LIANG Jiaqi^{1#}, FU Hongkun², WANG Ying¹, WANG Chunxia¹, REN Jiao¹, YU Haiqiong¹, LIN Zhixiong¹,
MA Lidan³, ZHU Daozhong¹, GAO Zhiqiang⁴, WU Xiaowei^{1*}, TAO Yufeng^{2*}

(1. Guangzhou Customs Technology Center, Guangzhou 510623, China. 2. China National Accreditation

Service for Conformity Assessment, Beijing 100062. 3. Dandong Customs Comprehensive Technical

Service Center, Dandong 118300. 4. Science and Technology Research Center of China Customs, Beijing 100026)

【Abstract】 Japan is one of the main trading partners for the import and export of experimental animals in China, and its quarantine and supervision policies for the import and export of experimental animals are very detailed and strict. This article takes experimental dogs, cats, and monkeys as examples to provide an in-depth analysis of the quarantine and supervision policies for the main experimental animals exported to Japan. At the same time, it reflects on the current laws and regulations, import and export management method, standards, biosafety, breeding and management status, as well as the import and export business status of experimental animals in China. Suggestions are provided in improving the laws and regulations, import and export management method, ensuring national biosafety, improving the management level of experimental animal breeding, and promoting the import and export trade of experimental animals, in order to provide reference for comprehensively improving the production, use, and breeding management level of experimental animals in China and strengthening the trade between China and Japan.

【基金项目】 国家重点研发计划重点专项 (2022YFF0711000)。

【作者简介】 丁宁 (1982—), 男, 硕士, 高级兽医师, 研究方向: 动物检疫。E-mail: 79958704@qq.com

梁佳琪 (1993—), 女, 博士, 研究方向: 动物传染病。E-mail: 475796540@qq.com [#] 共同第一作者

【通信作者】 陶雨风 (1970—), 女, 博士, 研究方向: 实验室认可技术及质量控制。E-mail: taoyf@cnas.org.cn

吴晓薇 (1975—), 女, 硕士, 研究员, 研究方向: 动物检疫。E-mail: wuxiaowei8@126.com ^{*} 共同通信作者

[Keywords] experimental animals; entry and exit quarantine supervision; policy interpretation; industry development

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

实验动物是指经人工培育,对其携带微生物和寄生虫实行控制,遗传背景明确或者来源清楚,用于科学研究、教学、生产、检定以及其他科学实验的动物^[1]。实验动物的种类繁多,包括小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠、兔、犬、鸡、猪、鱼、猴、猫、羊等,不同的实验动物在科学研究中发挥着不同的用途。自 2019 年新型冠状病毒席卷全球以来,世界各国都对于生物医药的研发越来越重视。实验动物作为临床前模型和“活的试剂和度量衡”,是支撑国家科技发展的战略资源,其作用是不可替代的。我国生物医药创新能力不断增强,产业发展也开始由“跟踪仿制”向“自主创新”转变。实验动物资源已成为我国生物医药基础研究和产业创新发展的关键因素。随着各国贸易经济往来和科技文化的交融,全球生物医药研发投入呈现稳步增长的态势,实验动物市场需求前景广阔。在此背景下,行业对实验动物的需求正呈现井喷式增长,实验动物消耗量激增,各国用于特定疫病研究的实验动物物种资源不断被培育和引进。

与国外实验动物产业相比,我国实验动物产业发展仍处于起步阶段。英国注重实验动物福利,以“3R”即“替代、减少、优化”而出名^[2],其制定的实验动物法律法规所包含的的监管内容十分细致;美国政府在立法和监督之外,还注重与社会社团、非营利性组织的协同运作,法律制度全面合理^[3]。日本高度重视实验动物学科的发展,对进口实验动物制定了严格的法规和标准,包括对实验动物的品种、来源、遗传背景、健康状况等方面进行严格审查和检测^[4]。日本与我国地理位置相近,其生物医药行业处于世界领先地位,对于高品质实验动物的需求较大,与欧美等国相比,日本对实验动物的进口条件(比如企业注册考核制度、病毒检测项目等)更加严格,因此,本文选择了对于日本进口主要实验动物的监管政策进行分析,同时对我国实验动物行业的现状进行思考,并提出了建议。

1 输日主要实验动物监管政策介绍

1.1 许可与监管

输日实验动物需要符合相关法规和标准^[4-5],其中不容忽视的是日方的注册管理制度。实验动

物养殖场必须首先向口岸检疫机关申请备案,须经过日本相关部门的考核注册,获得注册认可资格。申请注册的养殖场的申请材料提交海关,由海关总署统一提交给日本农林水产省日本动物卫生主管部门,对方收到材料后派官方代表对养殖场进行现场考核。通过考核获得出口资格的养殖企业方可向日本出口实验动物,但后续仍需要接受日方的年检^[6]。

此外,输日实验动物具体程序和要求可能因用途、动物种类、数量等因素有所不同,我国主要的输日实验动物包括实验犬、猫和猴等。

1.1.1 实验犬、猫养殖场认可要求

日方要求养殖场实验犬、猫的相关记录资料保存时间在 2 年以上。同时,输日的实验犬、猫须采用符合国际标准化组织(ISO)11784 和 11785 的电子芯片识别身份。如果出口养殖场使用针印(一列数字或字母)进行生产管理,必须达到电子芯片识别身份相同的效果。进境检疫时,电子芯片或针印的序号须与动物一一对应,否则实验动物将被隔离 180 d 或被拒绝入境。

此外,由于日本是无狂犬病的地区,所以对方要求输入日本的实验犬类必须满足以下条件^[7]:(1)动物从出生后就一直饲养在指定的设施中(比如获得日方注册认可资质的养殖场),不曾接触到狂犬病毒;(2)接种多次灭活狂犬病疫苗并获得足够的抗狂犬病病毒抗体,可在检测血样抗体后隔离饲养 180 d 后出口日本^[8]。

1.1.2 实验猴养殖场认可要求

日方要求养殖场实验猴的相关记录资料保存时间在 5 年以上。同时,非人灵长类动物必须是来自日本指定的国家(美利坚合众国、中华人民共和国(不包括香港和澳门)、印度尼西亚、菲律宾、越南、圭亚那及苏里南共和国)并在该国家出生、饲养的动物。其次,输出国没有发生埃博拉和马尔堡病,并且输出动物的地区或者饲养场在过去 12 个月内没有检测到 B 病毒病、结核病、沙门氏菌病和志贺氏菌病^[9]。

1.2 入境报检

输日实验动物需要符合日本的动物检疫规定,包括健康证明、疫苗接种情况、携带疾病的筛查等。

日本方进口商应在实验动物出境前 30 d 向其所在官方检疫机构报关。其中,实验猴被列入了《濒危野生动植物种国际贸易公约》^[10]的关注物种^[9],出口方须按照国际濒危物种国际贸易公约出具允许出口证明。此外,贸易合同有特殊检疫要求的应提供其他有关书面材料。日本要求每个出口企业必须提供英文版或日语版的养殖企业的标准操作规程(SOP)。SOP 具体规定了养殖企业的各种详细信息,包括动物饲养管理流程、日常疫病检疫和处理等措施。实验动物随后经口岸核验材料、现场检疫后带去隔离。

1.3 隔离检疫

实验犬、猫出口隔离检疫期最长为 30 d。出口实验犬、猫没有狂犬病和钩端螺旋体的临床症状;出口前 5 d 内进行驱除体内外寄生虫的处理,或者按照买卖双方的贸易合同的要求实施隔离检疫。满足日方规定的卫生要求、安装电子芯片或同等效果的识别标识的输日实验犬、猫的隔离检疫期可缩短为 12 d。倘若该批次动物拥有出口国签发的犬、猫的卫生证书并确认符合相关要求,则隔离期可压缩在 12 h 内^[7]。例如,从注册养殖场出口的配有电子芯片犬、猫,由于背景清晰,隔离检疫时间可以缩短至 12 h 内。

实验猴隔离检疫时间 30 d。对出口动物逐只检查健康状况,进行两次结核病皮内变态反应试验。出口前还需采样送实验室分别对沙门氏菌、志贺氏菌等项目进行检验,并在出口前 5 d 进行体外寄生虫驱虫处理^[9]。

检疫隔离场所的卫生条件应当符合日方要求,当日本动物卫生部门认为出口检疫隔离场的实际情况于动物卫生要求不符时,将取消指定出口资格。此外,如果出口检疫隔离场 1 年或 1 年多没有向日本出口非人灵长类动物,将考虑取消其指定出口资格。

2 输日主要实验动物监管政策分析

2.1 输日实验动物监管政策严格的原因

日本对于实验动物的重视程度很高,相关政策要求也也十分严格,其主要原因是由于实验动物的用途所致。日本的实验动物主要应用于以下几个方面:生物医学研究,比如医疗器械生物安全测试和病理模型等,研究人类疾病的病因、病理、诊断和治疗,模拟人类疾病的症状和体征,帮助科学家们

更好地理解人类疾病的本质和机制,从而为开发新的药物和治疗方案提供重要的实验依据;药物安全性评价和化合物毒性研究,在进行新药研发时使用实验动物进行安全性评价,可以预测及预防新药和化妆品可能带来的不良反应和副作用;教育和培训,作为生理和病理模型教授学生和医生基础的医学知识和实验技能。此外,日本实验动物还用于研究材料供应,出口境外^[11]。由于用途的特殊性,因此对于实验动物的要求才变的十分苛刻,可以有效保障后续研究的成果和数据的客观与可靠。鉴于日本的实验动物用于支撑生物医药、化妆品等多行业的基础研究和临床研究,所以日本对于进口实验动物的要求非常严格。首先,对于输日的养殖企业实行注册-考核制度,在源头上进行第一轮筛选。其次,对于入境实验动物制定了详细的入境检疫监管流程,包括入境报检的材料、隔离场的审核、疫病项目的检查以及动物信息溯源系统等。这些举措有效保障了进口实验动物的品质和安全,使得日本实验动物行业走在了世界前列,同时也为上游的生物医药等行业的发展夯实了基础。

2.2 完善的法律法规和标准体系

日本是全球最大的实验动物市场之一,对实验动物的需求量很大。为了确保实验动物的质量和合法性,日本对进口实验动物制定了严格的法规 and 标准^[12]。例如《实验动物法》、《动物进出口检疫法》和《实验动物饲养及保育准则》在实验动物的使用、饲养、健康管理、进出口检疫、动物福利和伦理等方面进行了规范。同时出于生物安全方面的考虑,日本严格监管实验动物的来源、饲养和使用,以确保实验动物在运输和饲养过程中不受到伤害或感染疾病,保证了在科学研究中的安全性和动物福利。

法律法规在政策体系中起到导向性和强制性的作用^[11]。日本对于实验动物的使用有严格的法规和政策。实验动物的使用受到《动物爱护管理法》的监管,该法律于 1973 年实施,2013 年进行了修订,是日本国内第一部供实验动物机构参照的综合法律^[12]。日本实验动物行业在政府、协会和学术团体颁布的法规、标准的管理下,形成了比较规范的行业自律^[12]。

从上文可以看出日本对于实验动物制定了严格的入境检疫监管程序,实验动物的出口日本可能需要遵循特定的科研机构、监管部门(如日本动物检疫所)或国际组织(如国际标准化组织 ISO)的规

定,获得特定研究许可或证明;而普通动物的进出口主要受动植物检疫监管机构的管理。日本有针对性地为实验动物制定颁布了法规政策,确立了实验动物在国家科技发展和进步中的重要地位。日本在实验动物学科领域发展的几十年间取得了一定的成果,使得日本实验动物科学在世界处于领先地位^[11]。

2.3 注重生物安全防控

日本对于进口实验动物的生物安全防控措施高度重视,这与日本的产业结构和国情是密不可分的。首先,日本每年用于药物研发、疾病治疗和预防、疫苗研发以及肿瘤学、神经学方面的实验动物数量可观。日本的食物、化妆品、医疗器械、生物医药等行业处于国际领先地位,这些行业的基层研究与实验动物行业息息相关。对于进口实验动物的检疫要求不仅仅是健康证明、疫苗接种、携带疾病的筛查等,还会关注其纯度、特定遗传特征、免疫状态等方面,因为这些因素不仅能对科研实验结果产生影响,而且也会对生物安全带来隐患。所以还要求部分实验动物具有溯源码,并且要求厂家保存长时间的实验动物资料。此外,日本是一个四面环海的国家,具有天然的屏障隔离疫病的传播和发展,因此日本对于输入性动物疫病更是高度重视。以实验犬、猫为例,日本作为无狂犬病的地区,如果对进口实验动物监管力度不够造成疫病传入,对其本身实验动物行业会造成毁灭性打击的同时,也会给其他相关产业等带来灭顶之灾。

因此,日本对于不同实验动物的输出国家、隔离时长、隔离场检测疫病的项目甚至动物背景信息管理都非常严格,以防进口实验动物把关不严造成生物安全事故,进而影响国内实验动物甚至其他动物生物安全,给国民经济甚至国民身体健康造成损失和损害。

3 我国实验动物行业现状的思考与建议

3.1 我国实验动物管理方面的思考与建议

通过对我国实验动物相关法律法规、管理办法以及标准文件的比较分析(表 1)发现:我国对于实验动物的管理涉及农业、林业、科技、海关等多个部门,其中科技部门主管全国实验动物工作,国务院各有关部门负责管理本部门的实验动物工作,进出口实验动物的检疫工作,按照《中华人民共和国进出境动植物检疫法》的规定办理,涉及出口应用国

家重点保护的野生动物物种开发的实验动物,必须取得出口许可证后,方可办理出口手续^[13]。目前,海关系统还未出台针对实验动物的进出口管理办法,只能参照动物进出口管理办法执行,随着我国实验动物进出口贸易的高速发展,现行的管理办法已经不能满足当前实验动物进出口贸易的检疫监管需求,需要得到进一步完善。此外,我国虽然制定了一系列进出境实验动物的相关标准,但是涉及进出境监管规程的标准仅提及了现场检疫监管环节,缺乏进出境全流程的规范性标准文件,既不能规范海关执法人员的行为,又不能给进出口贸易企业提供清晰的指引,不利于通关效率提升和执法把关质量的保障。建议尽快修订一版适用于实验动物进出口检疫的标准化监管规程,包括隔离场的审批、检疫审批、现场检疫、隔离检疫、检疫处置、检疫放行以及资料归档等全链条的标准,详细列明各个环节的具体内容和要求,明确办事程序。

3.2 保障生物安全方面的思考与建议

实验动物相比于普通动物虽然对其携带微生物和寄生虫实行了控制,但对于疫病的防控措施也是不能放松警惕,日本对于实验动物的管控比普通动物更加严格,或许值得我国借鉴。即便我国与实验动物的不同来源国家分别签订了议定书,但随着新发传染病和潜在传染病的蔓延,很多议定书已经不能与时俱进,建议尽快修订完善,提高人病动防,端口向前的认识,及时发现并阻断疫病传播。另外,《中华人民共和国生物安全法》是我国生物安全领域的一部基础性、综合性、系统性的法律,主要包括生物安全风险防控、生物安全管理、生物安全信息和资源管理等^[14]。其中第四十七条,明确提出了实验动物在病原生物实验室的管控,说明在国家层面已经开始对实验动物引起了足够的重视。希望国家早日出台关于实验动物管理方面的法律法规,有效防范因实验动物管理不善造成的生物安全风险。

此外,我国对于实验动物指定隔离检疫场的监管应加大执法力度,指定隔离场与国家隔离场建议采取不同的监管模式尽快完善《进境动物隔离检疫场使用监督管理办法》,加强对实验动物指定隔离场环境的疫病监测,考虑利用视频监控等手段加强监督管理,同时应考虑指定隔离场是否应该具备实验动物生产许可证等资质条件,以此来加强国门生物安全防范措施。

表 1 我国应用于实验动物的主要法规和标准			
Table 1 Major regulations and standards applied to laboratory animals in China			
名称 Name	发布年份 Issued year	修订年份 Revised year	主要内容 Major contents
《中华人民共和国进出境动植物检疫法》 Law of the People's Republic of China on the Entry and Exit Animal and Plant Quarantine	1992	2015	动植物进出境的基本法, 主要包括实施对象、执行单位以及进出境检疫的一系列措施。 It is the basic law on the entry and exit of animals and plants, mainly including the implementation of the object, the implementation unit and a series of measures for entry and exit quarantine.
《中华人民共和国进出境动植物检疫法实施条例》 Regulations for the Implementation of the Law of the People's Republic of China on the Entry and Exit Animal and Plant Quarantine	1996	/	根据《中华人民共和国进出境动植物检疫法》制定, 对进出境检疫的相关事项进行了更详细的说明或补充。 According to the Law of the People's Republic of China on the Entry and Exit Animal and Plant Quarantine, more detailed explanations or supplements are made on matters related to the entry and exit quarantine.
《中华人民共和国动物防疫法》 Animal Epidemic Prevention Law of the People's Republic of China	1998	2015	动物疫病的通告、防控、诊疗以及监督管理、保障措施等。 It involves the notification, prevention and control, diagnosis and treatment, supervision and management, and safeguard measures of animal diseases.
《中华人民共和国进境动物检疫疫病名录》 List of Quarantine Diseases for the Animals Imported to the People's Republic of China	1992	2013	曾用名《中华人民共和国进境动物一、二类传染病、寄生虫病名录》, 主要疫病进行危害程度的分类。 It used to be named List of Class I and II Infectious Diseases and Parasitic Diseases of Imported Animals of the People's Republic of China and classifies the degree of harm to major diseases.
《实验动物管理条例》 Regulations on the Management of Laboratory Animals	1988	2017	对实验动物进行了定义, 并对实验动物饲养管理、疫病检疫防控、应用以及进出口管理进行了说明。 It defines the experimental animals, and explains the breeding management of experimental animals, epidemic quarantine prevention and control, application and import and export management.
《进境动物隔离检疫场使用监督管理办法》 Measures for the Supervision and Administration of the Use of Quarantine Sites for Isolating Imported and Exported Animals	2009	/	根据《中华人民共和国进出境动植物检疫法》及其实施条例制定了进境实验动物隔离检疫场的管理办法。 In accordance with the Law of the People's Republic of China on the Entry and Exit Animal and Plant Quarantine and its implementation regulations, the administration measures for quarantine sites for entry laboratory animals have been formulated.
《进出境重大动物疫情应急处置预案》 Emergency Response Plan for Import and Export Major Animal Epidemics	2005	2019	用于海关系统对境内外发生或流行及进出境检疫工作中检出或疑似的重大动物疫情的应急处置。 It is used for the customs system to deal with the occurrence or epidemic of major animal epidemics at home and abroad, and detected or suspected in the entry-exit quarantine work.
《进出境实验动物现场检疫监管规程》 Quarantine Procedure on the Port for Import and Export Laboratory Animal	2009	/	规定了实验动物进境和出境现场检疫监管的主要流程。 Main procedures of quarantine supervision for laboratory animals entering and leaving the country are stipulated.
《进出境实验猴现场检疫监管规程》 Quarantine Procedure for Import and Export Non-human Primates Laboratory Animal on the Port	2012	/	规定了进出境食蟹猴、猕猴等实验猴现场检疫监管的内容和措施。 Contents and measures of on-site quarantine supervision for imported and exported crab-eating monkeys, macaques and other experimental monkeys are stipulated.

3.3 对于我国实验动物养殖管理水平的思考与建议

经过多年的发展建设,我国初步建成实验动物种质资源开发与共享平台。资源库中收集保存了大鼠、小鼠、猴、犬等十多类实验动物的生理生化、遗传解剖等一系列数据,为国家相关政策的判断提供了数据依据。此外,在产业化发展和市场需求的推动下,实验动物整体数量和规模品质得到了显著提升,逐渐成为国际实验动物资源市场的主要供应商之一^[15]。但从整体情况来看,目前我国实验动物生产企业任然以中小型为主,品种培育、品系鉴定和动物品质与国际知名厂商仍具有一定的差距,仍需在养殖技术、管理水平方面不断提升,进一步优化。

与日本相比,我国科研机构和院校对实验动物的重视程度还有待进一步加强,对于从业人员的招聘条件还需进一步提高,对工作人员应制定具体的、系统的培养方案,加强工作人员的管理和考核,尽快提升工作人员的养殖管理水平。建议招聘专业人员、加强人才培养建设、建立工作考核评估制度等措施,只有持续有效地提高我国实验动物行业养殖管理水平,提高专业水准,才能更好地保障实验动物行业发展,使我国实验动物走向国门、走向世界。

3.4 对于促进我国实验动物进出口贸易的思考与建议

我国实验动物进出口贸易的高质量发展既需要企业自身的不断努力又离不开政府的大力扶持。企业需要不断引进新技术、新设备,提高实验动物养殖的技术水平和管理能力;加强专业人员培养,保障实验动物的生产品质;实施科学合规管理,建立完善的管理制度和管理体系,确保实验动物养殖质量和生物安全;加强与政府的沟通,积极响应政府的号召和政策,为实验动物养殖业的发展做出贡献。同时,政府可以通过设立专项资金、提供低息贷款等方式,为企业提供资金支持,帮助企业解决资金难题;为企业搭建协同创新模式,通过联合研发、资源共享等方式,提高实验动物养殖的技术水平和管理能力,减少动物之间疫病的传播,比如开发动物溯源系统、动物信息化管理系统等;加强对实验动物生产企业的监管力度,保障实验动物的产品质量;有针对性的出台进出口管理办法,促进实验动物进出口贸易。

综上所述,实验动物在当今全球化社会中已经是不可小觑的战略资源,在改善我国国民生活质量、促进国民经济发展以及提升国际科研竞争力等方面发挥着着不容忽视的作用。随着各国对实验动物认识的提高,实验动物行业也得到了快速的发展,进出口贸易呈现活跃的趋势,对于我国而言,这既是机遇也是挑战,相对于实验动物产业发达的国家,我们还有很多需要完善的地方。伴随着新兴行业的冉冉升起,我们应该未雨绸缪,举一反三,一方面对实验动物行业加强管理,立章建制,堵住风险漏洞,有效防控动物疫病传播,另一方面不断提升我国实验动物养殖技术水平,借鉴先进的方式方法,保障实验动物的品质,促进行业高质量发展。希望我国的实验动物行业能够可持续健康发展,早日在国际实验动物市场树立品牌,为全球经济发展和人类健康贡献力量!

参考文献:

[1] 国家市场监督管理总局、中国国家标准化管理委员会. 实验动物 术语: GB/T 39759-2021 [S]. 2021. State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China. Laboratory animal terminology: GB/T 39759-2021 [S]. 2021.

[2] 李楠, 孙荣泽, 王天奇, 等. “我们”的福音——实验动物福利伦理法规与标准 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(3): 89-90. LI N, SUN R Z, WANG T Q, et al. The gospel of “we” — ethical regulations and standards for the welfare of laboratory animals [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(3): 89-90.

[3] 巩和凌子, 孔琪, 刘江宁. 国内外实验动物法制化管理现状比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(9): 71-75. GONG H, KONG Q, LIU J N. Comparison of legal systems in China and abroad for improved management of laboratory animals [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(9): 71-75.

[4] 陈博文, 何宏恺, 高彦生, 等. 中日出入境动物检验检疫法律体系比较研究 [J]. 检验检疫科学, 2007, 17(4): 10-16. CHEN B W, HE H K, GAO Y S, et al. Comparative study of legal systems on entry-exit animal inspection and quarantine between China and Japan [J]. Insp Quar Sci, 2007, 17(4): 10-16.

[5] 农林水产省. 关于进口动物检疫的常见问题 [EB/OL]. [2023-12-12]. https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/katiku_yobo/FAQ.html. Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. Frequently asked questions on quarantine of imported animals [EB/OL]. [2023-12-12]. https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/katiku_yobo/FAQ.html.

[6] 边红彪, 刘金龙, 兰乃洪. 日本进口实验动物检疫措施变化

- 与对策建议 [J]. WTO 经济导刊, 2007, 6(S1): 71-72.
- BIAN H B, LIU J L, LAN N H. Changes of quarantine measures for imported experimental animals in Japan and countermeasures [J]. China WTO Tribune, 2007, 6(S1): 71-72.
- [7] 许赢升. 日本进口伴侣动物检疫制度对我国的启示 [J]. 中国动物检疫, 2011, 28(3): 73-75.
- XU Y S. The quarantine systems for importation of pet animals to Japan and the enlightenment to our country [J]. China Anim Health Insp, 2011, 28(3): 73-75.
- [8] 日本农林水产省动物检疫所. 日本关于实验用犬、猫的进口指南 [EB/OL]. [2015-12]. https://www.maff.go.jp/aqs/languages/pdf/guide_nonfree-cn.pdf.
- Animal Quarantine Service, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan. Japan's import guidelines for laboratory dogs and cats [EB/OL]. [2015-12]. https://www.maff.go.jp/aqs/languages/pdf/guide_nonfree-cn.pdf.
- [9] 孙秀丽. 浅谈实验猴出口检疫 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2012, 57(6): 64.
- SUN X L. Discussion on export quarantine of experimental monkeys [J]. Shanghai J Anim Husb Vet Med, 2012, 57(6): 64.
- [10] 国家林业局濒危物种进出口管理办公室. 《濒危野生动植物种国际贸易公约》附录 I、II、III [EB/OL]. (2019-12-02) [2023-12-04]. https://www.forestry.gov.cn/html/bwwz/bwwz_2790/20191202101942901794339/file/20191202102502527120782.pdf.
- Office of Endangered Species Management. Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora Appendices I, II and III [EB/OL]. (2019-12-02) [2023-12-04]. https://www.forestry.gov.cn/html/bwwz/bwwz_2790/20191202101942901794339/file/20191202102502527120782.pdf.
- [11] 苟欢, 安新颖, 童俞嘉, 等. 日本实验动物发展现状分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(2): 194-204.
- GOU H, AN X Y, TONG Y J, et al. Analysis on the development status of laboratory animals in Japan [J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(2): 194-204.
- [12] 王杨杨, 刘江宁. 日本实验动物管理进程 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(12): 126-132.
- WANG Y Y, LIU J N. Management process of laboratory animals in Japan [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 126-132.
- [13] 薛康宁, 刘晓宇, 赵赤鸿. 我国实验用动物卫生相关法律法规与国际陆生动物卫生法典的内容比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(2): 7-11.
- XUE K N, LIU X Y, ZHAO C H. Comparison of domestic laws and regulations related to experimental animals and international terrestrial animal health codes [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(2): 7-11.
- [14] 中华人民共和国生态环境部. 《中华人民共和国生物安全法》: 总则 [EB/OL]. (2020-10-17) [2023-12-04]. https://www.mee.gov.cn/ywgz/fgbz/fl/202303/t20230314_1019536.shtml.
- Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China. Biosecurity Law of the People's Republic of China: General provisions [EB/OL]. (2020-10-17) [2023-12-04]. https://www.mee.gov.cn/ywgz/fgbz/fl/202303/t20230314_1019536.shtml.
- [15] 赵心刚, 卢凡, 程苹, 等. 我国实验动物资源建设的问题与展望 [J]. 中国科学院院刊, 2019, 34(12): 1371-1378.
- ZHAO X G, LU F, CHENG P, et al. Problems and prospects of laboratory animal resources in China [J]. Bull Chin Acad Sci, 2019, 34(12): 1371-1378.

[收稿日期] 2023-12-04

苗晋鑫,曹利华,苗明三. 医学研究生动物实验课教学改革:培养学生主动学习和创新思维的能力 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(6): 100-105.

Miao JX, Cao LH, Miao MS. Educational reform of animal experiment courses for medical graduate students; cultivating students' active learning and innovative thinking abilities [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 100-105.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.013

医学研究生动物实验课教学改革:培养学生主动学习和创新思维的能力

苗晋鑫,曹利华,苗明三*

(河南中医药大学,豫药全产业链研发河南省协同创新中心,中医药科学院,郑州 450000)

【摘要】 动物实验课是医学及生命科学相关专业中重要的实践教学环节,对医学类研究生的实验技能、科学思维和创新能力的培养具有重要意义。然而,传统的动物实验课教学方式存在内容单一、研究生参与度不高等问题。为更好地促进研究生主动学习和创新思维的培养,本文旨在探讨动物实验课的教学改革。首先,介绍动物实验课教学改革的背景和意义,强调其对研究生能力培养的重要性。其次,提出动物实验课教学改革的原则,包括以研究生为中心、注重问题解决和实践探索、促进跨学科融合等,同时将中国实验动物福利伦理审查贯穿其中。然后,从课程设计、教学方法、评价方式等方面,详细阐述动物实验课教学改革的具体措施。在课程设计上,应注重选取有挑战性和探索性的实验项目,充分考虑研究生的兴趣和专业需求。在教学方法上,应鼓励研究生主动参与、探索和合作,引导他们进行问题解决和创新思维的培养。在评价方式上,应采用多样化的评价手段,如实验报告、小组讨论和项目展示等,以全面评估研究生的综合能力和创新思维。最后,通过实践验证和效果评估,总结动物实验课教学改革的经验和成果,并提出进一步完善的建议。

【关键词】 动物实验课;教学改革;主动学习;创新思维

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0100-06

Educational reform of animal experiment courses for medical graduate students: cultivating students' active learning and innovative thinking abilities

MIAO Jinxin, CAO Lihua, MIAO Mingsan*

(Academy of Chinese Medical Sciences, Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry Chain of Yu-yao, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

【Abstract】 Animal experiment courses are important for developing students' practical skills in medical and life science education. They help to cultivate students' experimental skills, scientific reasoning, and innovative thinking ability. However, the traditional teaching method used in animal experiment courses tend to focus on a single topic and have minimal student participation. Courses should aim to promote students' active learning and innovative thinking abilities, and this paper discusses the ways teaching in animal experiment courses can be reformed. First, the paper

【基金项目】 河南省高等教育教学改革研究与实践项目(2021SJGLX047Y);岐黄学者(国中医药人教函 2022-6)。

【作者简介】 苗晋鑫(1986—),男,医学博士,副研究员,硕士生导师,研究方向:新药开发及疾病动物模型研究及教学。

E-mail:miaojinxin2022@163.com

【通信作者】 苗明三(1965—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:中药药理学研究与教学。E-mail:miaomingsan@163.com

introduces the background and significance of teaching in animal experiment courses and emphasizes the importance of cultivating the students' abilities. Second, it puts forward the principles of improved animal experiment course teaching, including designing student-centered lessons, providing opportunities for problem solving and practical exploration, and promoting interdisciplinary integration. At the same time, we integrate an ethical review of the welfare of experimental animals in China. Then, from the aspects of course design, teaching method, and evaluation method, this paper expounds several concrete measures of teaching reform in animal experiment courses in detail. When designing a course, attention should be paid to the selection of challenging and exploratory experimental projects, and students' interests and professional needs should be fully considered. Using improved teaching method, students should be encouraged to actively participate in explorative and cooperative classes, be guided through problem solving tasks, and encouraged to cultivate innovative thinking. Diversified evaluation method, such as experimental reports, group discussions, and project presentations, should be used to comprehensively evaluate students' practical and innovative thinking abilities. Finally, with practical verification and effect evaluation, the experiences and outcomes from a reform of animal experiment course teaching are summarized, and suggestions for further improvements are put forward.

[Keywords] animal experiment course; educational reform; active learning; innovative thinking

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

动物实验课是指在生命科学、医学、生物技术等相关专业中,为医学生提供动物实验操作和实践训练的^[1]课程。研究生阶段开展的动物实验课程,旨在通过动物实验的方式,让研究生学习和掌握生命科学的基本理论知识、实验技术和科学方法,培养学生的实验操作能力、数据分析能力和科学研究能力^[2]。同时,实验课也能够培养学生的团队合作精神、沟通能力和实验安全意识,为将来从事相关基础科研和临床工作奠定基础。传统的动物实验课教学注重学生对实验过程的理解和技术操作的掌握,但忽视了培养学生的创新能力和综合素质。随着社会的不断进步和教育理念的更新,传统的课堂教学模式已经不能满足研究生的需求^[3-4]。秦川等编写的《医学实验动物学》“十三五”规划教材结合时代所需,培养学生在动物实验课的应用与创新能力。现代教育更加强调研究生的综合素质培养,包括实践能力、创新能力、问题解决能力和团队合作精神等。同时,现代研究生对教学方式和内容有更高的期望和要求。他们希望能够参与到实验中去,进行实践探索和自主学习,而不仅仅是被动地接受知识传授。他们也希望能够在实验中培养自己的创新思维和问题解决能力。新型冠状病毒肺炎动物模型帮助快速了解 SARS-CoV-2 感染的发病机制、宿主的免疫反应、开发预防和治疗药物与疫苗方面发挥了重要作用^[5-6]。后疫情时代的动物实验课要结合新形势,课程如何开展?因此,以研究生为中心的“新三中心”^[7]动物实验课教学改革是为了适应教育现代化发展的需要,培养研究生的创新能力和实践能力,提高教学效果和研究生综合素质

而进行的一项重要改革。本文将详细论述动物实验课教学改革的原则、措施、实践与效果评估等内容,为研究生教学研究提供一定参考。

1 动物实验课教学改革的原则

首先,以坚持动物伦理为原则进行动物实验课教学改革。动物实验教学改革的首要原则是尊重和保护动物的福利^[8-9]。教学活动应该获得伦理委员会的批准,动物教学活动应符合伦理规范和法律法规,动物饲养条件符合标准,并确保动物受到适当的照顾和对待,这对于树立研究生在开展动物实验前进行伦理审批报备的意识具有重要的引导意义。经调查,很多研究生对动物使用和 3R 原则相关法律法规了解不够或者完全不了解。而目前,专业教师通常重点讲授动物实验本身的原理、操作,而忽视了实验动物伦理知识的传授。加强动物伦理学教育是培养研究生良好医德、师德的重要途径。充分利用实验课传授动物伦理学知识,帮助学生树立敬畏生命、善待动物的意识。详细讲述在实验过程中,对动物可能造成的所有伤害及其防控措施,如麻醉、镇痛、特殊护理和安死术方法。在培养医学研究生时,将 Animal Models and Experimental Medicine 发表的关于实验动物福利伦理指南——中华人民共和国国家标准 GB/T 35892-2018 融入其课程设计和实践当中^[10]。在实验之前,优化项目设计方案,符合动物福利伦理原则要求,使用动物替代方法,合理确定实验终结的指标,充分发挥实验动物的价值,避免不科学的过多或过度地使用实验动物造成的不必要伤害;在实验操作过程中,对动

物进行辅助性的安慰以减少动物的惊恐和疼痛,对动物手术时,进行必要的麻醉,术后注射镇痛剂、消炎药等。例如,在医学研究生实验技术课中,采用线栓法建立局灶性脑缺血再灌注大鼠模型时,要求学生善待动物,尽可能减轻动物痛苦。因此,首先腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉,手术时尽可能开创较小伤口,确保动物能快速恢复;在手术过程中,时刻注意动物的状态(呼吸),注意保暖,减少对动物不必要的伤害;术毕在缝合部位认真消毒,并腹腔注射青霉素,以防止术后伤口发生感染,然后将造模大鼠送保暖箱等待苏醒。实验动物福利伦理这一原则融入实践教学当中,是实验教学改革重点之一。

其次,动物实验课教学改革要明确教学目标和方法的改进。改革应旨在提高学生的教育效果、实践能力以及如何使学生更好地掌握实验技术。因此,教学目标应与课程内容和学生的实际需求相匹配。采用互动式、多媒体式、模拟仿真实验等的教学方法,激发研究生学习兴趣,并增强创新能力和实践能力。按照研究生的专业进行分小组讨论、学科专业问题解决、案例研究等,这样可以激发研究生积极参与针对其自身专业特征的问题讨论。

同时,动物实验课教学改革要强调实验设计和数据分析。医学统计课和动物实验课往往是独立教学的,研究生常常难以解决自己遇到的动物实验中得到的大量数据。因此,改革应加强对动物实验设计和数据分析的教学,如开展 SPSS、Python、SAS 等软件分析课程,从而培养学生科学研究和解决实际问题的能力。学生应学会设计常见的科学实验及收集和分析数据,并就实验结果进行合理的解释和推论,撰写实验论文。另外,改革要倡导替代方法和 3R 原则,鼓励教学过程中体外实验、计算机模拟和细胞培养等替代方法,从而减少对动物的伤害和提高动物的福利^[11-12]。

再者,动物实验课教学改革要注重能力培养^[13]。动物实验基本技术是医学研究生学生在动物实验中必备技能,要求学生在学好课本基础知识的同时,提升实验操作能力以适应时代发展需要,是实验动物学教学的根本内容和教改基础。因此,改革应加强学生能够独立进行动物实验的能力,加强常用实验动物的基本操作技术(如动物的抓取、灌胃、注射、固定、解剖、麻醉等)的培养,并强化研究生的卫生管理及防护意识。重点培养研究生善

待动物、合理利用动物,严格遵守动物福利政策以及职业道德操守,保障在操作过程中实验人员及动物的安全。

最后,改革要注重多学科合作和资源共享。研究生动物实验教学改革需要跨学科的合作和资源共享^[14]。不同专业导师和实验室之间应该建立资源信息共享平台,加强合作,提供更好的实验设备、动物设施和培训资源,使相关实验动物得到最大化的利用^[15]。

总之,医学研究生动物实验课教学改革的原则是尊重动物福利、提高教学效果、强调实验设计和数据应用分析、倡导替代方法和 3R 原则,强化实验技能和安全意识,并促进多学科合作和资源共享。这些原则将有助于改进动物实验教学的质量和教学效果,同时保护动物的权益。

2 动物实验课教学改革的措施

2.1 教学方法的改革

动物实验课应开展探索性的学习方法,更加注重学生的实践能力的培养;加强小组合作学习,增强研究生的合作精神和创新意识;改变教学方式方法,使用多媒体、仿真模拟实验等,提高研究生对相关知识的理解和记忆,激发学生的学习兴趣;设计动物实验课题,培养研究生科研设计以及独立承担科研项目的能力;加强交流合作提高教师科研、教学能力,更好地传授研究生先进学术思想和实验技能;最后,应加强学生个人防护能力,保障研究生个人安全。使学生在学习中能够全面发展,并为未来的科学研究和实践奠定坚实的基础。

首先,开展探索性学习方法^[16]。鼓励研究生在实验前先进行背景知识的学习和研究,培养他们主动提出问题和解决问题的能力。教师不再只是讲授者,还是引导者和组织者。引导研究生通过 Embase、Cochrane Library、Pubmed 等数据库,进行文献检索、文献阅读、讨论和互动,了解实验的目的、设计和预期结果,培养他们的科学思维和实验设计能力。其次,增加实践操作机会。通过提供实践操作机会,让研究生亲自参与实验的设计、操作和数据收集。鼓励研究生积极参与实验操作过程,熟练掌握电泳仪、酶标仪、病理染色等技能,培养他们的观察力和实验技能^[17]。

同时,加强小组合作学习^[18]。积极组织研究生进行小组合作学习,让他们共同讨论专业领域内遇

到的实验问题。通过小组合作,研究生可以相互交流和分享经验,提高团队合作精神和解决问题的能力。鼓励学生在小组中扮演不同的角色,如实验设计者、操作者和数据分析者,培养他们的多元思维能力。此外,提高技术工具的应用能力。引入计算机模拟、虚拟实验平台和数据分析软件等先进的技术工具和设备,以增强学生的实验和数据处理能力。

其次,从教学方法上改革,重点增强研究生对实验技术的掌握。例如可以将实验操作的内容,制成动态的多媒体课件呈现在投影屏幕上,使学习内容变得生动有趣、容易记忆、理解和掌握,加深学生对自然科学知识的理解和记忆,激发学生的学习兴趣。采用多媒体技术让研究生先在计算机前进行某些复杂实验的模拟操作后,再进行实际操作,大大提高学生实验的效果。

设立研究性的学习项目。组织研究生参与项目的撰写、申报、立项、实施与结题,并让他们深入探究特定的科学问题,进行独立的实验设计和数据分析,从而让研究生更深入地理解科学原理和实验方法,培养他们的科学研究能力和创新思维。如“以糖尿病动物模型评价某味中药”为例,让研究生分析如何独立完成项目的撰写,在此过程中将“实验动物的选择与应用”“动物模型的制作与评价”等章节内容融入其中。鼓励研究生作为主持人进行高校针对学生设立的项目申报,如苗圃工程、创新基金等,培养其独自承担项目的能力。

再者,建立资源信息共享平台,加强多个实验平台之间的交流合作,提高教师的传道授业解惑能力。专业教师更要注重学术交流,保持科研学术思想的先进性,提高个人教学、科研、实验技术等能力。利用学校不同实验平台、动物设施和动物实验相应设施,与校内外课题组进行广泛学术交流与技术合作。

最后,加强研究生卫生管理、个人防护和规范实验操作技术^[19]。要求研究生在接触实验动物、排泄物等材料时,须穿戴手套、口罩、实验服,禁止用手触摸面部、口、鼻、眼睛,禁止在实验室内饮食或存放食物。强调动物实验中研究生的自身防护,如抓取大鼠或其他大型动物时,需要有一定的安全措施。若实验操作过程中被动物攻击(咬伤或者抓伤),或者是实验人员伤口接触了实验动物的排泄物,应马上处理伤口,及时前往防疫部门注射相应疫苗(24 h 以内),切勿抱侥幸心理。

2.2 评价方式的改革

采用多元化的评价方法,不仅仅依靠传统的笔试和实验报告评分^[20],在理论考试的基础上(占总成绩的 20%),引入实验技能考核、科研素养考核和创新思维考核。

首先,开展实验技能考核。注重对研究生实践操作能力的评价,通过设置实验操作技能的考核项目和细则,观察和记录学生在实验中的操作流程和技术熟练程度,然后来评估他们的实验操作能力,占总成绩的 40%。

其次,科研素养考核和创新思维考核。引入口头报告、小组讨论、实验设计和执行能力的评估、科学思维和批判性思维的评估等多种评价方式,以全面了解研究生的实验能力、科学素养和创新思维能力。引入数据分析和解释评价,占总成绩的 10%。重视对研究生数据分析和解释能力的评价,通过要求研究生进行实验数据的收集、分析、作图,并让他们解释数据背后的科学原理和结果意义。通过评估研究生对数据的处理和解释能力,来了解他们对实验结果的理解和推理能力,占总成绩的 10%。同时,进行课堂参与评价方法。评估研究生在课堂上的积极参与程度和贡献,观察研究生的课堂参与、提问和回答问题的能力,评估他们对实验课内容的理解和掌握程度,以及他们在课堂上的表现和互动能力,占总成绩的 10%。最后,实施项目评估的评价方法。引入项目评估,让研究生参与老师们的研究性学习项目,并对他们的项目设计、实验执行、结果呈现等内容进行评估^[21]。通过评估研究生在项目中的表现和成果,可以从一定程度上评估他们的独立研究和解决问题的能力,占总成绩的 10%。

采用综合考核方式包括:实验技能考核、科研素养考核和创新思维、理论考核,在总成绩中所占比例依次为 40%、40%、20%。其中实验技能考核包括实验动物基本操作、实验仪器操作、实验软件操作及数据处理能力等;科研素养考核和创新思维包括项目的研究思路、内容、方案设计等撰写,或者以论文形式如中医药证动物模型的发展、符合中医特点的病症结合动物模型评价等,学生以其为主旨完成 800~1000 字的小论文,共安排 1~2 次,以学术论文评判标准给予一定分数,拓宽研究生知识视野,培养研究生独立思维能力;理论考核是以基本知识为主融入动物实验相关前沿热点等进行理论考试。

改革动物实验课的评价方式,应以学生的实践能力、科学素养和伦理意识为核心,注重多元化评价方法的应用,旨在全面了解学生的实验能力、科学思维 and 创新能力,培养具有综合素质和伦理意识的科学人才。

3 教学改革的实践与效果评估

3.1 建立实践验证的方式

首先,确定改革的目标和预期的教学效果。这可能包括提高研究生的实验技能、培养科学思维能力、加强动物福利意识等。制定相应的评估指标,用于衡量这些目标的实现程度。其次,设计实验组和对照组。将参与教学改革的学生随机分配到实验组和对照组。实验组接受改革后的教学方法,而对照组继续接受传统的教学方法作为对比。通过自制评分量表,统计两组学生各项能力指标的差异。

然后,比较数据收集和分析。通过观察、问卷调查、测试成绩等方式收集,包括研究生的参与程度、学习成绩、实验技能掌握情况等数据。并使用适当的统计方法对数据进行分析,比较教学改革的实验组和传统教学方法的对照组之间的差异。重要的是,要进行教学效果和学生反馈评估。根据收集到的数据,评估改革的教学效果。可以考虑的评估指标包括学生的学习成绩改善情况、实验技能的提高、对动物福利的认识程度等。收集学生的反馈和评估意见,通过问卷调查、小组讨论、个别面谈等方式进行收集数据,了解他们对改革后教学方法的看法和体验。

最后,根据实践验证的结果和学生的反馈,对教学方法进行评估和解读,确定改革的优势和不足之处,并提出改进的建议。这可能包括进一步优化教学策略、调整课程设计、增加教师培训等。同时,根据实践验证的结果,进行持续改进并推广成功的教学方法。这可能涉及到教师培训、教材更新、课程评估等方面的工作,以确保改革的可持续发展和推广。

通过实践验证,可以对动物实验课的教学改革提供科学的依据和实证数据,为教学方法和策略的进一步改进提供指导,同时促进教师和学生的参与和反馈,不断提高教学质量和学生的学习效果。

3.2 效果评估

首先,进行学习成绩评估。学习成绩是评估教学改革效果的重要指标之一。使用考试、作业、实

验报告等形式,比较改革前后研究生在知识理解、实验技能掌握等方面的成绩变化,并进行统计分析。其次,引入实验技能评估。可以通过评估学生在实验设计、操作技巧、数据分析和实验结果解读等方面的能力来衡量实验技能的提升程度。这可以通过观察研究生在实验中的表现、实验报告的质量和准确性等来评估。

同时,对研究生参与度进行评估。可以通过观察学生的提问、回答问题的能力、小组合作等方面,来评估学生在课堂中的积极参与程度。此外,可以通过问卷调查、小组讨论、个别面谈等方式,收集研究生的反馈和评估意见,了解他们对教学改革的想法和体验。这样可以提供有关教学方法和策略的实用信息,以便进行改进和调整。

最后,进行教师评估和同行评审。对教师的评估也是评估教学改革效果的一部分,可以通过同行评审、教师自评、教学观摩等方式评估教师在教学改革中的角色和表现。

综合使用多种评估方法可以获得更全面和准确的评估结果。评估的目的是为了提供科学的依据,评估动物实验课教学改革的效果,并为教学方法和策略的进一步改进提供指导,以提高教学质量和学生的学习效果。

4 总结

综上所述,通过动物实验课教学改革,可以促进学生主动学习和创新思维的培养,提高他们的实验技能和科学素养。同时,通过实践验证和效果评估,不断总结经验 and 改进教学方法,进一步完善动物实验课的教学模式和内容,以更好地满足学生的学习需求和培养目标。

参考文献:

- [1] YANG Y N, TSAI H L, LIN Y C, et al. Role of vasopressin V1 antagonist in the action of vasopressin on the cooling-evoked hemodynamic perturbations of rats [J]. *Neuropeptides*, 2019, 76: 101939.
- [2] 姜锦鹏, 赵春芳, 应如海. 动物生理学实验课思政元素的挖掘与实践 [J]. *安徽农业科学*, 2022, 50(5): 280-282.
JIANG J P, ZHAO C F, YING R H. Excavation and practice of ideological and political elements in animal physiology experiment course [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2022, 50(5): 280-282.
- [3] 朱大卫. 外科动物手术学实验课教学实践与心得探析 [J]. *现代职业教育*, 2020, 6(33): 194-195.
ZHU D W. Teaching practice and experience of experimental

- course of surgical animal surgery [J]. Mod Vocat Educ, 2020, 6 (33): 194-195.
- [4] 徐晓, 吕心瑞. 人体实验、动物实验及虚拟实验三位一体生理学实验教学改革探讨 [J]. 中国教育技术装备, 2021, 35 (21): 110-112.
- XU X, LYU X R. Discussion on the reform of physiological experiment teaching in the trinity of human experiment, animal experiment and virtual experiment [J]. China Educ Technol Equip, 2021, 35(21): 110-112.
- [5] 苗晋鑫, 宋韶鹤, 王峥, 等. COVID-19 动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(7): 120-126.
- MIAO J X, SONG S H, WANG Z, et al. Research progress of COVID-19 animal model [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30 (7): 120-126.
- [6] YU P, QI F, XU Y, et al. Age-related rhesus macaque models of COVID-19 [J]. Animal Model Exp Med, 2020, 3(1): 93-97.
- [7] 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.
- [8] 董守良, 马明, 唐晓龙, 等. 动物福利原则下的混合式生理学实验教学改革 [J]. 基础医学教育, 2022, 24(7): 504-507.
- DONG S L, MA M, TANG X L, et al. Application of blended teaching mode in experimental teaching of physiology under the principle of animal welfare [J]. Basic Med Educ, 2022, 24 (7): 504-507.
- [9] 罗晶晶, 郭英惠, 张荣, 等. 医学实验中实验动物伦理现状调查与反思 [J]. 基础医学教育, 2023, 25(5): 415-418.
- LUO J J, GUO Y H, ZHANG R, et al. A questionnaire survey on animal ethics in medical experiments for nursing students [J]. Basic Med Educ, 2023, 25(5): 415-418.
- [10] MACARTHUR CLARK J A, SUN D. Guidelines for the ethical review of laboratory animal welfare People's Republic of China National Standard GB/T 35892-2018 [Issued 6 February 2018 Effective from 1 September 2018] [J]. Animal Model Exp Med, 2020, 3(1): 103-113.
- [11] 蒋亚君, 荣蓉, 刘晓宇, 等. 教学中动物实验替代方法应用进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(7): 133-138.
- JIANG Y J, RONG R, LIU X Y, et al. Alternatives to the use of experimental animals in education [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(7): 133-138.
- [12] 郭欣, 严火其. 实验室动物福利 3Rs 原则确立的行动者网络分析 [J]. 自然辩证法研究, 2021, 37(3): 71-76.
- GUO X, YAN H Q. An analysis of the establishment of the 3R principles from the perspective of actor-network theory [J]. Stud Dialectics Nat, 2021, 37(3): 71-76.
- [13] 张连江, 孙淑霞, 刘建博, 等. 大数据时代背景下提高学生动物实验技能的改革与实践 [J]. 黑龙江科学, 2021, 12 (11): 41-43.
- ZHANG L J, SUN S X, LIU J B, et al. Reform and practice of the improvement of the animal experiment skill of the students under the background of big data [J]. Heilongjiang Sci, 2021, 12(11): 41-43.
- [14] 孙喆, 张莉, 李庆章, 等. 国家级精品资源共享课程“动物生物化学”实验教学准备工作 [J]. 实验技术与管理, 2015, 32(6): 221-223.
- SUN Z, ZHANG L, LI Q Z, et al. Experience in preparation of experimental teaching of national excellent resource sharing curriculum named Animal Biochemistry [J]. Exp Technol Manag, 2015, 32(6): 221-223.
- [15] 郭欣. 动物福利科学兴起的哲学研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- GUO X. Philosophical research on the rise of animal welfare science [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016.
- [16] 郑毅. 高职公共体育教学中应用探索性学习模式探究 [J]. 辽宁师专学报(自然科学版), 2018, 20(4): 71-73.
- ZHENG Y. Research on applying the exploratory learning mode to public physical education teaching in higher vocational colleges [J]. J Liaoning Teach Coll Nat Sci Ed, 2018, 20(4): 71-73.
- [17] 饶玉良, 张亚东, 严钰锋. 医学功能学科实验融入动物伦理教育的思考与探究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(3): 397-401.
- RAO Y L, ZHANG Y D, YAN Y F. Exploration of animal ethics education for medical functional experiments [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(3): 397-401.
- [18] 黄璞玮, 陆先翠, 柴龙会, 等. 动物福利课程“小组合作”教学模式研究 [J]. 智慧农业导刊, 2023, 3(9): 111-114.
- HUANG P Y, LU X C, CHAI L H, et al. Research on “group cooperation” teaching mode of animal welfare course [J]. J Smart Agric, 2023, 3(9): 111-114.
- [19] 王春田, 王健. 基础医学动物实验教学经验初探 [J]. 中国民族民间医药, 2011, 20(5): 56.
- WANG C T, WANG J. Preliminary study on experimental teaching experience of basic medical animals [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharmacy, 2011, 20(5): 56.
- [20] 张明珏, 姚刚, 朱清, 等. 学习范式下的“多元评价, 双轨驱动”考评体系构建与探究 [J]. 化工高等教育, 2023, 40 (3): 31-38.
- ZHANG M J, YAO G, ZHU Q, et al. Construction and exploration of “multiple evaluations, dual-track driven” assessment system under learning paradigm [J]. High Educ Chem Eng, 2023, 40(3): 31-38.
- [21] 杨野, 林连兵, 陈媛, 等. “制药工程项目评估”课程教学研究 [J]. 教育教学论坛, 2022, 14(27): 141-144.
- YANG Y, LIN L B, CHEN Y, et al. Teaching research of the course of pharmaceutical engineering project evaluation [J]. Educ Teach Forum, 2022, 14(27): 141-144.

解有成,肖曙芳,林雪梅,等.线粒体质量控制系统在脓毒性心肌病发病中的研究进展[J].中国比较医学杂志,2024,34(6):106-112.

Xie YC, Xiao SF, Lin XM, et al. Progress of research into mitochondrial mass control system's role in the pathogenesis of septic cardiomyopathy [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 106-112.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.014

线粒体质量控制系统在脓毒性心肌病发病中的研究进展

解有成¹,肖曙芳²,林雪梅³,陈顺³,徐进^{1*},王菲^{1*}

(1.中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院,兰州 730050;
2.昆明市儿童医院,昆明 650500;3.云南省滇南中心医院,云南 红河 661000)

【摘要】 脓毒性心肌病(septic cardiomyopathy, SIC)是脓毒症中常见的器官功能障碍,其与患者高死亡率和不良预后密切相关。SIC发病机制复杂且缺乏有效的治疗手段是亟待解决的关键问题。既往研究表明,线粒体功能障碍在SIC的发生发展中扮演着重要角色。当机体发生SIC导致线粒体功能障碍时,线粒体质量控制系统(mitochondrial quality control system, MQC)的异常调控可使心肌细胞损伤加重。最近的研究显示, MQC可通过调节线粒体生物发生、线粒体融合/裂变和线粒体自噬来维持线粒体动态平衡。因此,本文就MQC在SIC发病中的作用及最新研究进行综述,并对其作为潜在的治疗靶点进行分析与展望。

【关键词】 脓毒症心肌病;线粒体质量控制系统;线粒体生物发生;线粒体融合和裂变;线粒体自噬

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0106-07

Progress of research into mitochondrial mass control system's role in the pathogenesis of septic cardiomyopathy

XIE Youcheng¹, XIAO Shufang², LIN Xuemei³, CHEN Shun³, XU Jin^{1*}, WANG Fei^{1*}

(1. the 940 Hospital of Joint Service Support Forces of the Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050, China.
2. Kunming Children's Hospital, Kunming 650500. 3. South Yunnan Central Hospital of Yunnan Province, Honghe 661000)

【Abstract】 Septic cardiomyopathy (SIC) is an organ dysfunction frequently observed in sepsis and characterized by high mortality and poor prognosis. Understanding the complex pathogenesis of SIC and developing effective therapeutic tools are critical issues that require attention. Previous studies have demonstrated the significant role of mitochondrial dysfunction in the development of SIC. In the presence of SIC, and the mitochondrial dysfunction that result, the aberrant regulation of the mitochondrial quality control system (MQC) can exacerbate cardiomyocyte injury. Recent studies have demonstrated that the MQC maintains the dynamics of mitochondrial homeostasis through its regulation of mitochondrial

【基金项目】 国家自然科学基金(82160367);甘肃省自然科学基金(21JR1RA181);甘肃省卫生健康行业健康计划项目(GSWSKY2022-49)。

【作者简介】 解有成(1996—),男,硕士研究生,研究方向:脓毒性心肌病基础研究。E-mail:229627374@qq.com

【通信作者】 徐进(1982—),女,副主任医师,研究方向:脓毒症研究。E-mail:295146963@qq.com

王菲(1978—),女,硕士,副主任医师,硕士生导师,研究方向:脓毒症研究。E-mail:13919760202@126.com * 共同通信作者

biogenesis, fusion/fission, and autophagy. This article provides an overview of the role of MQC in SIC pathogenesis, reviews the latest studies in the field, and analyzes MQC’s potential as a therapeutic target.

[Keywords] septic cardiomyopathy; mitochondrial quality control system; mitochondrial biogenesis; mitochondrial fusion and fission; mitochondrial autophagy

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

脓毒性心肌病(septic cardiomyopathy, SIC)是脓毒症中常见的器官功能障碍,其典型的临床特征是心室扩张和收缩力降低,是导致患者高死亡率和不良预后的主要原因之一^[1]。据最新的流行病学调查显示,脓症患者 SIC 的发病率在 10%~70% 不等,且有超过 40% 的脓症患者死于 SIC 所介导的心肌抑制^[2-3]。既往研究显示,SIC 的潜在病理生理机制包括心肌细胞凋亡、氧化应激、过度炎症、线粒体功能障碍等,且缺乏有效的治疗方法^[4-5]。线粒体作为心肌容积的重要组成部分,越来越多证据表明线粒体功能障碍和结构损伤在 SIC 发生发展中起着关键作用^[6]。此外,有研究发现线粒体质量控制系统(mitochondrial quality control system, MQC)是维持线粒体平衡的重要机制,通过恢复 MQC 可改善由脓毒症所致的 SIC 和多器官衰竭^[7]。因此,本文对 MQC 在 SIC 发病中机制及靶向 MQC 在 SIC 患者中治疗

的最新研究进展进行综述,以期加深对其认识。

1 MQC 的组成及作用

MQC 是一组调节线粒体生物发生、线粒体融合/裂变和线粒体自噬的适应性反应,其通过清除有缺陷的线粒体碎片和诱导线粒体分裂或再生对线粒体数量和质量进行调控,进而维持线粒体稳态^[8]。其中,线粒体生物发生和线粒体自噬主要参与对受损的线粒体清除和产生新的线粒体,而线粒体融合和裂变则是允许线粒体通过共享组件来补偿缺陷或清除受损线粒体的,从而保持线粒体的健康^[9]。当 SIC 致使线粒体功能障碍时,MQC 的异常调控导致过度的线粒体裂变、线粒体自噬缺陷和生物发生的延迟,使得心肌细胞损伤加重。因此,针对 MQC 异常的靶向治疗在 SIC 患者中具有重要的潜在治疗价值(图 1)。

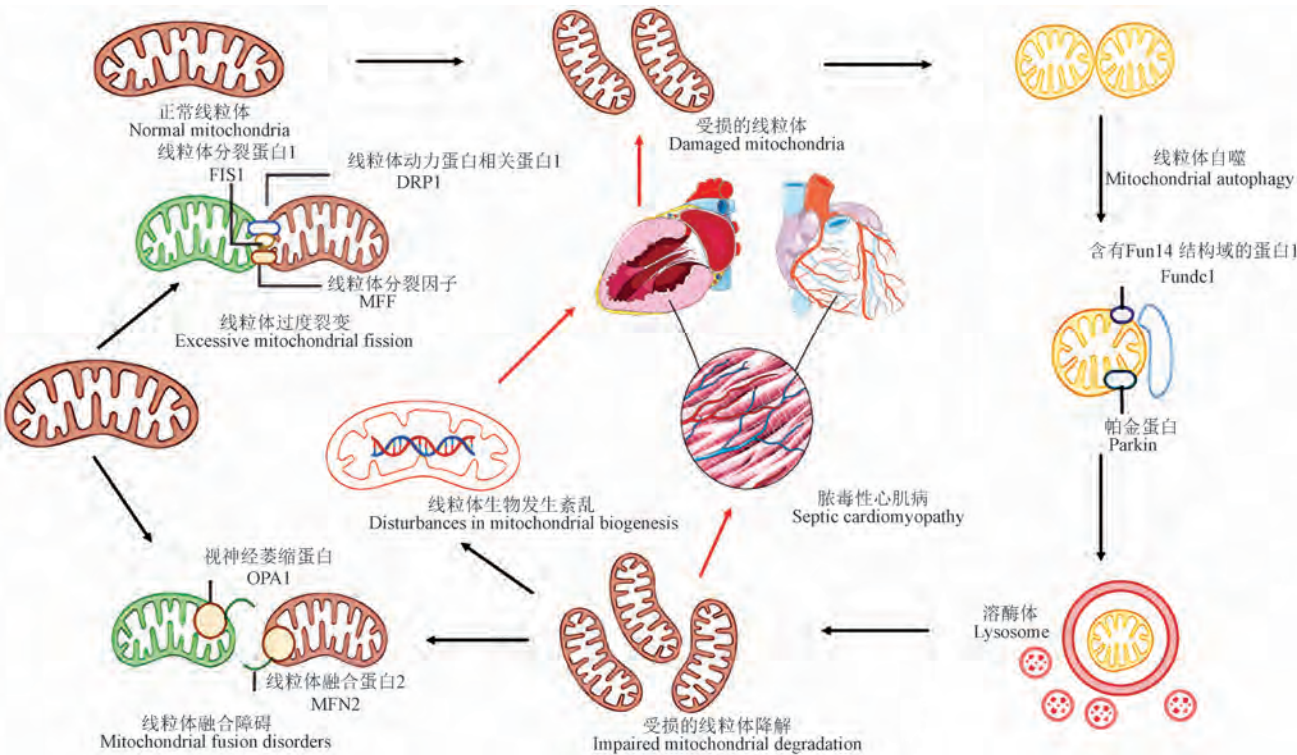


图 1 线粒体质量控制系统在脓毒性心肌病的调控作用
Figure 1 Regulatory role of MQC in SIC

2 线粒体生物发生与 SIC

线粒体生物发生是通过多种因素的调控,包括核基因和线粒体基因的共同作用,从现有线粒体产生新线粒体的过程^[10],这一动态过程使得线粒体能够保持结构、功能和数量的稳定,以适应细胞能量需求增加的情况^[11]。在哺乳动物中,过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator- 1α , PGC- 1α) 是线粒体生物发生的主要调控因子,与线粒体生成的增加相关。PGC- 1α 受到沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1)、SIRT3 和蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK) 等上游信号调节因子的控制,而 NRF1 和 NRF2 则是 PGC- 1α 的下游关键调节因子^[12]。

最近,一些研究探索了线粒体生物发生与 SIC 之间的相关性。Zhang 等^[13] 研究发现,在脓毒性心肌病的大鼠模型和脂多糖 (LPS) 处理 H9c2 心肌细胞模型中,PGC- 1α 蛋白低表达,而激活 PGC- 1α 的表达,可以激活线粒体生物发生和自噬功能,减少线粒体损伤,减少心肌细胞的凋亡。Hickson-bick 等^[14] 研究显示,在脓毒症大鼠模型中,与成年大鼠相比,新生大鼠心肌细胞中参与生物发生相关的因子如线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM)、核呼吸因子 1 (nuclear respiratory factor 1, NRF-1) 及 PGC-1 的表达更加明显,对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的心肌凋亡表现出更高的抵抗力。Kokkinaki 等^[15] 在脓毒症小鼠模型中发现心脏线粒体生物发生标志物 PGC 1α 和 PGC 1β 基因表达降低,线粒体中 TFAM 无明显变化,而 LGM2605 治疗可增加线粒体丰度且不影响线粒体生物发生相关基因表达。Oliveira 等^[16] 研究发现,在脓毒症期间,过量的活性氧 (reactive oxygen stke, ROS) 和自由基的产生损害了线粒体,导致线粒体合成受损,而生物发生在脓毒症早期减少,在脓毒症后期增加。Kraft 等^[17] 首次在临床中研究脓毒症患者中 MQC 相关生物标志物的表达水平,结果表明,相较非脓毒症患者,脓毒症休克患者血清 NRF1、TFAM、血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HMOX1) 等因子水平上升且与脓毒症患者器官功能障碍呈显著相关性,这也进一步验证了前期脓毒症动物和细胞模型中的结果。此外,Preau 等^[18] 研究

发现,线粒体生物发生的增加可以改善脓毒症的预后,而线粒体生物生成的抑制可以增加死亡率。上述这些研究结果均表明,增加线粒体生物发生可减轻脓毒症所致的心肌病,因此,靶向线粒体生物发生可作为治疗 SIC 的潜在策略。

3 靶向线粒体生物发生与 SIC 的治疗

目前,越来越多的证据表明靶向线粒体生物发生的治疗策略可作为潜在逆转脓毒症引起的器官功能障碍的手段^[7]。Rahmel 等^[19] 研究表明,在脓毒症患者早期阶段刺激 TFAM 的表达已被证明有利于防止脓毒症所致的器官功能障碍,因为它的信号传导可以激活线粒体生物发生并保护线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)。此外,有研究发现,给予脓毒症小鼠外源性硫氢化钠治疗后线粒体生物发生增加更明显,且线粒体功能得到改善,这表明针对粒体生物发生治疗可以改善脓毒症心肌损伤。Smeding 等^[20] 证明,盲肠结扎穿刺 (cecal ligation puncture, CLP) 诱导的脓毒症小鼠中,白藜芦醇治疗增加了 PGC- 1α 表达,提高了参与解毒、氧化应激和生物发生相关因子的基因表达水平,抑制了炎症,改善了心肌收缩力,并逆转了与脓毒症相关的心脏重塑,维持心肌的能量生成能力,防止了二次损伤,但对 48 h 的小鼠死亡率没有影响。研究发现,由 AICAR (AMP 依赖的蛋白激酶激动剂) 诱导的去乙酰化酶 3 (Sirtuin-3, SIRT3) 的过表达可以通过 AMP 依赖的蛋白激酶 (AMPK) 途径维持线粒体生物生成并减少活性氧的产生,从而保护心肌细胞免受脓毒症的影响^[21]。另一项研究表明,乙酰胆碱可通过 PGC- 1α 途径促进线粒体生物生成,从而改善线粒体功能^[22]。然而,值得注意的是,过度的生物生成会加重线粒体的功能障碍。Lehman 等^[23] 研究表明,心肌细胞特异性 PGC- 1α 的过度表达导致线粒体生物生成显著增加,但也会导致心力衰竭。因此,当前需要更多的研究去进一步阐明线粒体生物生成在 SIC 治疗中的作用。Zhu 等^[6] 发现,苯丙素类化合物毛蕊花糖苷可通过抑制氧化应激、炎症和细胞凋亡以及促进线粒体生物发生来预防脓毒症诱发的心肌病。

4 线粒体融合裂变与 SIC

线粒体动态调控包括融合和裂变,由核心蛋白包括线粒体动力蛋白相关蛋白 1 (dynamin-related

protein 1, Drp1)、线粒体分裂蛋白 1 (fission protein 1, Fis1)、线粒体融合蛋白 1 (mitofusin1/2, Mfn1/2) 以及视神经萎缩因子 1 (opticatrophy 1, Opa1) 等介导。裂变通过 Drp1 和 Fis1 复合物使线粒体分裂成多个独立的线粒体^[9], 融合则由 Mfn1/2 和 Opa1 介导促进线粒体合并形成大型或网状结构, 并实现物质和能量交换^[24]。当机体遭受脓毒症时, 线粒体融合和裂变的失调导致结构和功能的改变, 进一步导致氧化应激的产生和细胞凋亡。

目前, 有少量研究评估了心脏线粒体裂变和融合与 SIC。在脓毒症期间, 线粒体功能障碍导致线粒体裂变的激活和线粒体融合的失活, 这导致了线粒体功能障碍和损伤, 最终导致器官衰竭。最近, Zhu 等^[25]研究发现, 在 CLP 小鼠心脏模型中心脏过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR) 信号通路下降最显著, PPAR α 在 3 个 PPAR 家族成员中下降最显著, 此外, 还伴有线粒体复合物活性降低以及 Drp1/Mfn1 蛋白水平升高, 最后导致线粒体功能障碍, 线粒体受损和 ATP 含量降低, RNA 测序结果进一步表明, 心肌细胞 PPAR 缺乏症增强了 LPS 处理的肝脏组织中脂肪酸代谢的损害。Shang 等^[26]在 LPS 诱导的心肌细胞模型中发现, 巨噬细胞刺激蛋白 1 (macrophage-stimulating protein1, Mst1) 表达迅速上调, 增加的 Mst1 通过诱导线粒体应激促进心肌细胞死亡。其具体机制是 Mst1 表达升高上调了 Drp1, 后者启动了线粒体裂变。线粒体过度裂变引起线粒体氧化损伤、线粒体膜电位降低、线粒体促凋亡元件易位进入细胞质/细胞核、线粒体能量功能障碍和线粒体凋亡活化, 而抑制线粒体裂变可维持线粒体功能并有利于心肌细胞存活。另一研究表明, 小鼠脓毒症模型中, 内毒素血症使 Drp1 激活和 OPA1 下调与线粒体结构异常、心肌线粒体裂变和融合的不平衡, 最后导致心脏收缩力下降^[27]。Preau 等^[28]在 LPS 小鼠的心脏中也观察到了类似的现象。然而, 值得注意的是, Piquereau 等^[29]在对小鼠进行亚致死性 LPS 剂量处理后, OPA1 的表达有轻微增加, 这些相互矛盾的结果可能反映了脓毒症的类型和严重程度不同时, Drp1 和 OPA1 的表达也存在差异。

5 靶向线粒体融合和分裂与 SIC 治疗

大量研究已经证实, 线粒体裂变的增加促进了

线粒体碎片的形成诱导的心肌细胞死亡, 而抑制 Drp1 和 Mfn1/2 的过度表达可以提高心肌细胞的线粒体存活, 减少心肌损伤。因此, 维持线粒体裂变和融合的动态平衡, 可能是预防和治疗 SIC 的一个新方法^[30]。研究发现, mdivi-1 可以通过抑制 Drp1 的 GTP 酶活性来抑制其功能, 并通过保护线粒体形态, 改善线粒体功能、防止细胞凋亡、抑制线粒体通透性转换孔开放等来保护心脏免受损伤^[31]。Tan 等^[32]研究报道, 鸢尾素治疗通过抑制 JNK-LATS2 信号通路, 抑制 DRP1 相关的线粒体裂变, 从而减弱了败血症介导的心肌抑制和心肌细胞死亡。Wang 等^[33]研究发现, CLP 诱导的 SIC 大鼠模型和 LPS 刺激的 H9c2 细胞中, 氯马斯汀下调了 Drp1 的表达和活性氧的产生, 并上调了 ATP 水平和抗氧化剂线粒体超氧化物歧化酶的表达, 这表明氯马斯汀对线粒体损伤、功能紊乱和线粒体氧化应激有保护作用。Shang 等^[34]研究显示, SRV2 (一种促裂变蛋白) 敲除促进了心肌细胞的存活, 并减弱了 LPS 诱导的炎症反应, 进一步研究发现 SRV2 通过 Mst1-Hippo 信号调节 Drp1 的表达, 激活 Mst1-Hippo 途径可以消除 SRV2 敲除对 Drp1 表达的抑制作用, 提高的心肌细胞存活率和增加线粒体保护。这表明 SRV2-Mst1-Drp1 信号通路是 SIC 中提高心肌细胞存活率和线粒体稳态的一个新的调节因子。另一研究显示, 新型化合物 NSC228155 可调控脓毒症小鼠心肌细胞中线粒体 Drp1 和 Mfn1/2 的表达, 裂变和融合的动态平衡, 减轻心肌细胞的线粒体损伤, 显著改善了心脏功能, 因此可能是治疗脓毒性心肌病的潜在新疗法^[4]。Wu 等^[35]研究发现钙结合蛋白 S100a8/a9 在介导 SIC 中起关键作用, 可通过激活 TLR4-ERK1/2-Drp1 依赖性线粒体裂变和功能障碍, 阻断 S100a8/a9 可能是预防脓毒症患者 SIC 的有前途的治疗策略。

6 线粒体自噬与 SIC

线粒体自噬是清除多余或受损线粒体的过程, 以维持细胞中线粒体数量和功能。研究表明, 有两种不同的途径参与线粒体自噬调节, 分别是 PINK1/Parkin 途径和与泛素无关的途径, 诱导线粒体自噬发生, 完成受损线粒体的清除^[7]。

最近的研究报道, 在脓毒症期间线粒体自噬的变化。Wu 等^[36]研究发现, 在败血症小鼠的心脏和 LPS 处理的心肌细胞中线粒体自噬被上调, 表现为

LC3II 和 Beclin-1 的表达增加, p62 的表达减少, 以及自噬体的积累。此外, Beclin-1 是最早被发现的哺乳动物自噬效应因子之一, 研究发现, 在心肌细胞中过量表达 Beclin-1 信号, 可以通过激活 PINK1/Parkin 途径增加有丝分裂, 以改善心脏功能障碍^[37]。研究表明, 与 *nlrp3*^{-/-} 脓毒症小鼠相比, *nlrp3*^{+/+} 的脓毒症小鼠的线粒体损伤、细胞凋亡和线粒体自噬更为明显, 且 Parkin 和 PINK1 表达水平更高^[38]。此外, 在严重腹膜炎的脓毒症模型大鼠中, Watts 等^[39]观察到心脏功能下降, 细胞能量储存耗尽, 以及线粒体密度减少约 30%, 且心脏的超微结构分析显示, 在退化的线粒体中, 有两个形态正常的线粒体群体, 这表明有选择的自噬的发生。

7 靶向线粒体自噬与 SIC 治疗

鉴于自噬在 SIC 的进展中扮演的重要角色, 因此, 基于自噬的药理调节剂有望在 SIC 疾病模型中产生治疗效果^[40]。Shang 等^[26]研究结果表明, Mst1 通过调节 Parkin 相关的线粒体自噬和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) - 细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 信号通路在 SIC 发挥有害作用, 而调节 Mst1 表达的策略可被视为控制败血症诱发的心脏损伤的有效方法。Zhang 等^[41]研究表明, 米诺环素能诱导脓毒症小鼠的心肌有丝分裂, 它还能激活 mTORC2, 增肌的心肌细胞线粒体自噬, 减少线粒体损伤和改善心脏功能。Wu 等^[36]研究发现, 木犀草素可在增加脓毒症细胞和动物模型中 Lc3II 和 Beclin-1 的表达, 减少 p62 的表达, 增加脓毒症大鼠心肌细胞中自噬体的数量。而值得注意的是, 自噬抑制剂 3-MA 治疗可以逆转木犀草素诱导的自噬上调, 同时伴随着线粒体膜电位的降低和心肌细胞凋亡的增加, 这也进一步表明木犀草素治疗可能通过增加自噬而在脓毒症中发挥保护作用。Andres 等^[42]证明, 长期服用辛伐他汀可以通过转运 Parkin 和 p62/自噬接头受体蛋白 1 (sequestosome 1 receptor protein, Sqstm1) 诱导 HL-1 细胞和心肌细胞的有丝分裂, 从而提供心脏保护的益处。同时, 还能诱导生物生成, 改善线粒体功能。雷帕霉素一种常用的自噬诱导药理制剂, 有研究报道, 在小鼠 CLP 诱导的脓毒症模型中, 可以保护败血症引起的器官损伤, 提高脓毒症小鼠的生存率被证明可以改善心脏性能^[43]。然而, 也有报道称, 雷帕霉素对 CLP 诱导

的脓毒症小鼠存活率以及对 LPS 诱导的脓毒症小鼠的肺部损伤有不利影响^[44]。但鉴于雷帕霉素对自噬缺乏特异性, 因此目前自噬在脓毒症中的病理作用暂无明确结论。迄今为止, 对 SIC 如何激发线粒体自噬反应的具体机制仍不明确, 但该领域研究将极大地促进针对自噬因素的新型药物干预的发展, 这可能成为对抗 SIC 治疗的潜在的有效策略。

8 前景与展望

当前, 各种药物已被用于治疗脓毒症, 以防止脓毒症引起的心肌病或多器官功能障碍, 然而, 其未能产生令人期待的临床效果, 这也推动着研究者去探索更多针对 SIC 的治疗策略。近些年, 大量研究对 MQS 在 SIC 的发生和发展的作用进行了广泛的探索, 并取得了一定的进步, 但绝大多数的结果都是基于动物实验或基于细胞的研究, 缺乏向临床的转化。因此, 临床医生、研究人员和科学家应考虑对这些针对线粒体异常的药物进行更多和更大的临床研究, 并将动物和细胞操作转移到临床试验中, 以产生对脓毒症心肌病患者的治疗效果。除此之外, 在将基础研究结果转化为临床实践前有几个关键问题需要前瞻性解决。首先, MQS 受损的血清生物标志物缺乏特异性, 很难评估或持续监测 SIC 的进展。其次, 对 MQS 的复杂的交互作用仍然未知, 迫切需要探究与线粒体生物发生、线粒体动力学以及线粒体自噬有关的上游和下游因素之间的关系。在一些临床试验中, 一些药物或小分子化合物部分证明对 SIC 中心肌线粒体功能的保护作用, 然而, 还需要进一步尝试寻找针对 MQS 的联合疗法。此外, 如何开发针对 MQS 患者更精确、个性化和优化的治疗方法也是需要解决的关键问题。最后, 目前需要对 SIC 有一个明确的定义和诊断标准, 因为这对及时识别和治疗有帮助。综上, 当前针对 SIC 中靶向 MQC 的治疗具有极大的潜力, 有可能改变当前治疗格局, 使更多 SIC 患者受益。

参考文献:

- [1] MARTIN L, DERWALL M, AL ZOUBI S, et al. The septic heart: current understanding of molecular mechanisms and clinical implications [J]. Chest, 2019, 155(2): 427-437.
- [2] SHANG X, LIN K, ZHANG Y, et al. Mst1 deletion reduces septic cardiomyopathy via activating Parkin-related mitophagy [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(1): 317-327.
- [3] VALLABHAJOSYULA S, SHANKAR A, VOJJINI R, et al. Impact of right ventricular dysfunction on short-term and long-

- term mortality in sepsis: a meta-analysis of 1373 patients [J]. *Chest*, 2021, 159(6): 2254–2263.
- [4] JIANG Y, LI Y, ZHANG Y, et al. NSC228155 alleviates septic cardiomyopathy via protecting mitochondria and inhibiting inflammation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 116: 109847.
- [5] ZHENG X, ZHENG Y, WANG J, et al. Binimetinib ameliorates the severity of septic cardiomyopathy by downregulating inflammatory factors [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 113(Pt B): 109454.
- [6] ZHU X, SUN M, GUO H, et al. Verbascoside protects from LPS-induced septic cardiomyopathy via alleviating cardiac inflammation, oxidative stress and regulating mitochondrial dynamics [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 233: 113327.
- [7] WU Y, YAO Y M, LU Z Q. Mitochondrial quality control mechanisms as potential therapeutic targets in sepsis-induced multiple organ failure [J]. *J Mol Med*, 2019, 97(4): 451–462.
- [8] JI L, HE Q, LIU Y, et al. Ketone body β -hydroxybutyrate prevents myocardial oxidative stress in septic cardiomyopathy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 2513837.
- [9] CHANG X, TOAN S, LI R, et al. Therapeutic strategies in ischemic cardiomyopathy: focus on mitochondrial quality surveillance [J]. *EBioMedicine*, 2022, 84: 104260.
- [10] GUREEV A P, SHAFOROSTOVA E A, POPOV V N. Regulation of mitochondrial biogenesis as a way for active longevity: interaction between the Nrf2 and PGC-1 α signaling pathways [J]. *Front Genet*, 2019, 10: 435.
- [11] ZHU H, TOAN S, MUI D, et al. Mitochondrial quality surveillance as a therapeutic target in myocardial infarction [J]. *Acta Physiol*, 2021, 231(3): e13590.
- [12] STANZANI G, DUCHEN M R, SINGER M. The role of mitochondria in sepsis-induced cardiomyopathy [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(4): 759–773.
- [13] ZHANG T, LIU C F, ZHANG T N, et al. Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1- α protects cardiomyocytes from lipopolysaccharide-induced mitochondrial damage and apoptosis [J]. *Inflammation*, 2020, 43(5): 1806–1820.
- [14] HICKSON-BICK D L M, JONES C, BUJA L M. Stimulation of mitochondrial biogenesis and autophagy by lipopolysaccharide in the neonatal rat cardiomyocyte protects against programmed cell death [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 44(2): 411–418.
- [15] KOKKINAKI D, HOFFMAN M, KALLIORA C, et al. Chemically synthesized Secoisolariciresinol diglucoside (LGM2605) improves mitochondrial function in cardiac myocytes and alleviates septic cardiomyopathy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 127: 232–245.
- [16] OLIVEIRA T S, SANTOS A T, ANDRADE C B V, et al. Sepsis disrupts mitochondrial function and diaphragm morphology [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 704044.
- [17] KRAFT B D, CHEN L, SULIMAN H B, et al. Peripheral blood mononuclear cells demonstrate mitochondrial damage clearance during sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2019, 47(5): 651–658.
- [18] PREAU S, VODOVAR D, JUNG B, et al. Energetic dysfunction in sepsis: a narrative review [J]. *Ann Intensive Care*, 2021, 11(1): 104.
- [19] RAHMEL T, MARKO B, NOWAK H, et al. Mitochondrial dysfunction in sepsis is associated with diminished intramitochondrial TFAM despite its increased cellular expression [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 21029.
- [20] SMEDING L, LEONG-POI H, HU P, et al. Salutary effect of resveratrol on sepsis-induced myocardial depression [J]. *Crit Care Med*, 2012, 40(6): 1896–1907.
- [21] LIU J, YAN W, ZHAO X, et al. Sirt3 attenuates post-infarction cardiac injury via inhibiting mitochondrial fission and normalization of AMPK-Drp1 pathways [J]. *Cell Signal*, 2019, 53: 1–13.
- [22] SUN L, ZHAO M, YU X J, et al. Cardioprotection by acetylcholine: a novel mechanism via mitochondrial biogenesis and function involving the PGC-1 α pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(6): 1238–1248.
- [23] LEHMAN J J, BARGER P M, KOVACS A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(7): 847–856.
- [24] FORRESTER S J, PRESTON K J, COOPER H A, et al. Mitochondrial fission mediates endothelial inflammation [J]. *Hypertension*, 2020, 76(1): 267–276.
- [25] ZHU X X, WANG X, JIAO S Y, et al. Cardiomyocyte peroxisome proliferator-activated receptor α prevents septic cardiomyopathy via improving mitochondrial function [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(11): 2184–2200.
- [26] SHANG X, LI J, YU R, et al. Sepsis-related myocardial injury is associated with Mst1 upregulation, mitochondrial dysfunction and the Drp1/F-actin signaling pathway [J]. *J Mol Histol*, 2019, 50(2): 91–103.
- [27] SÁNCHEZ-VILLAMIL J P, D'ANNUNZIO V, FINOCCHIETTO P, et al. Cardiac-specific overexpression of thioredoxin 1 attenuates mitochondrial and myocardial dysfunction in septic mice [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 81(Pt B): 323–334.
- [28] PREAU S, DELGUSTE F, YU Y, et al. Endotoxemia engages the RhoA kinase pathway to impair cardiac function by altering cytoskeleton, mitochondrial fission, and autophagy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 24(10): 529–542.
- [29] PIQUEREAU J, GODIN R, DESCHÊNES S, et al. Protective role of PARK2/Parkin in sepsis-induced cardiac contractile and mitochondrial dysfunction [J]. *Autophagy*, 2013, 9(11): 1837–1851.
- [30] CIMOLAI M C, ALVAREZ S, BODE C, et al. Mitochondrial mechanisms in septic cardiomyopathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(8): 17763–17778.
- [31] JI Y, LENG Y, LEI S, et al. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorates myocardial ischemia-reperfusion

injury by enhancing PINK1/Parkin-mediated mitophagy in type 2 diabetic rats [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2022, 27(4): 353–367.

[32] TAN Y, OUYANG H, XIAO X, et al. Irisin ameliorates septic cardiomyopathy via inhibiting DRP1-related mitochondrial fission and normalizing the JNK-LATS2 signaling pathway [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2019, 24(3): 595–608.

[33] WANG X, XIE D, DAI H, et al. Clemastine protects against sepsis-induced myocardial injury *in vivo* and *in vitro* [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 7134–7146.

[34] SHANG X, ZHANG Y, XU J, et al. SRV2 promotes mitochondrial fission and Mst1-Drp1 signaling in LPS-induced septic cardiomyopathy [J]. *Aging*, 2020, 12(2): 1417–1432.

[35] WU F, ZHANG Y T, TENG F, et al. S100a8/a9 contributes to sepsis-induced cardiomyopathy by activating ERK1/2-Drp1-mediated mitochondrial fission and respiratory dysfunction [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 115: 109716.

[36] WU B, SONG H, FAN M, et al. Luteolin attenuates sepsis-induced myocardial injury by enhancing autophagy in mice [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(5): 1477–1487.

[37] SUN Y, YAO X, ZHANG Q J, et al. Beclin-1-dependent autophagy protects the heart during sepsis [J]. *Circulation*, 2018, 138(20): 2247–2262.

[38] RAHIM I, SAYED R K, FERNÁNDEZ-ORTIZ M, et al. Melatonin alleviates sepsis-induced heart injury through activating the Nrf2 pathway and inhibiting the NLRP3 inflammasome [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2021, 394(2): 261–277.

[39] WATTS J A, KLINE J A, THORNTON L R, et al. Metabolic dysfunction and depletion of mitochondria in hearts of septic rats [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 36(1): 141–150.

[40] GALLUZZI L, BRAVO-SAN PEDRO J M, LEVINE B, et al. Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(7): 487–511.

[41] ZHANG E, ZHAO X, ZHANG L, et al. Minocycline promotes cardiomyocyte mitochondrial autophagy and cardiomyocyte autophagy to prevent sepsis-induced cardiac dysfunction by Akt/mTOR signaling [J]. *Apoptosis*, 2019, 24(3/4): 369–381.

[42] ANDRES A M, HERNANDEZ G, LEE P, et al. Mitophagy is required for acute cardioprotection by simvastatin [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(14): 1960–1973.

[43] LIU W, GUO J N, MU J, et al. Rapamycin protects sepsis-induced cognitive impairment in mouse hippocampus by enhancing autophagy [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2017, 37(7): 1195–1205.

[44] FIELHABER J A, CARROLL S F, DYDENSBORG A B, et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin augments lipopolysaccharide-induced lung injury and apoptosis [J]. *J Immunol*, 2012, 188(9): 4535–4542.

[收稿日期]2023-07-15

纪少秀,张恒耀,张媛,等. Notch 信号通路在肝纤维化中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(6): 113-118.
Ji SX, Zhang HY, Zhang Y, et al. Progress of research into Notch signaling pathway in liver fibrosis [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 113-118.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.015

Notch 信号通路在肝纤维化中的研究进展

纪少秀¹, 张恒耀¹, 张媛¹, 文莉^{2*}

(1. 宁夏医科大学附属银川市中医医院, 银川 750001;
2. 成都中医药大学基础医学院, 成都 611137)

【摘要】 肝纤维化是慢性肝病向肝硬化甚至肝癌发展的必经病理过程。肝纤维化发生是一个高度整合的、动态的病理过程,是诸多细胞相互串扰以及细胞因子彼此作用的结果。Notch 信号通路是一种进化上保守的细胞间信号传导机制,在调节多细胞动物发育和组织更新方面发挥重要作用。越来越多的研究表明 Notch 信号通路通过多种途径参与肝纤维化形成。本研究旨在综述 Notch 信号通路在肝纤维化形成中的作用,以期为肝纤维化临床及基础研究提供参考。

【关键词】 Notch 信号通路;肝纤维化;综述

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0113-06

Progress of research into Notch signaling pathway in liver fibrosis

JI Shaoxiu¹, ZHANG Hengyao¹, ZHANG Yuan¹, WEN Li^{2*}

(1. Yinchuan Traditional Chinese Medicine Hospital affiliated with Ningxia Medical University, Yinchuan 750001, China.
2. School of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137)

【Abstract】 Liver fibrosis is a key pathological process in the progression of chronic liver disease to cirrhosis and even liver cancer. The occurrence of liver fibrosis is a highly integrated and dynamic pathological process result ing from the interactions of many cells and cytokines. The Notch signaling pathway is an evolutionarily conserved intercellular signal transduction mechanism that plays important roles in regulating the development and tissue renewal of multicellular animals. Multiple studies have shown that Notch signal transduction participates in the formation of liver fibrosis in a variety of ways. Therefore, this paper reviews the role of Notch signaling in cells involved in the formation of liver fibrosis to explain the function of this signaling pathway in liver fibrosis.

【Keywords】 Notch signaling pathway; liver fibrosis; review

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

肝纤维化(liver fibrosis, LF)是各种致病因素包括嗜肝病毒感染、酒精、代谢紊乱、自身免疫紊乱以及肝毒性药物等引起的以细胞外基质大量合成并不断累积为特点的病理过程^[1]。进行性的肝纤维

化可向肝硬化甚至肝癌发展,因此,针对肝纤维化发病机制以及治疗方法的研究至关重要。Notch 信号通路在调节多细胞动物发育和组织更新方面发挥重要作用,Notch 信号失调或缺失是许多人类疾

【基金项目】国家自然科学基金(82104569);四川省科技厅应用基础研究项目(2021YJ0253);成都中医药大学“十四五”“基础增厚”行动计划团队(242022007)。

【作者简介】纪少秀(1987—),女,博士,研究方向:温病与感染病证治规律研究。E-mail:jishaoxiu0430B@163.com

【通信作者】文莉(1987—),女,博士,副教授,研究方向:温病与感染病证治规律研究。E-mail:wenliccn@163.com

病(从发育综合征到成人疾病发生和肿瘤)的基础^[2-3]。越来越多的研究表明 Notch 信号转导参与肝纤维化发生和发展^[4-6]。因此,本研究旨在综述 Notch 信号通路在肝纤维化中的作用。

1 Notch 信号转导

Notch 信号通路是一种进化上保守的细胞间信号传导机制,由四个 Notch 受体(Notch1、Notch2、Notch3 和 Notch4)和五个配体(Delta-like 1、Delta-like 3、Delta-like 4、Jagged1 和 Jagged2)相互作用完成信号转导^[7]。Notch 受体属于单程跨膜蛋白,胞外结构域含有大量表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)样重复序列,Notch 配体同样也是含 EGF 重复序列的跨膜蛋白^[8]。Notch 信号可介导局部细胞间通讯^[9]。该信号转导依赖于配体诱导 Notch 受体蛋白水解并释放其细胞内结构域的能力。在配体刺激之前,受体静止由负调节区维持,该负调节区掩盖了相邻细胞膜外部的关键配体依赖性加工位点;当受到配体刺激时,该位点暴露,并被 ADAM 金属蛋白酶切割,被截短后的受体又成为伽马分泌酶的底物被再次剪切成胞外部分和胞内部分。胞外结构域仍然与配体结合,并在内吞作用后被表达配体的细胞降解,胞内区域(Notch

intracellular domain, NICD)在核定位信号的指引下易位到细胞核,并与免疫球蛋白 κ J(immunoglobulin κ J region, RBPJ)蛋白的重组信号结合蛋白形成复合物。在没有 NICD 的情况下,RBPJ 蛋白与各靶基因调控元件中的特定 DNA 序列结合,并通过招募组蛋白去乙酰酶和其他成分形成共抑制复合物来抑制这些基因的转录。NICD 的核易位从 RBPJ 蛋白中置换出组蛋白去乙酰化酶-共阻遏物复合物。NICD-RBPJ 复合物招募其他蛋白质,如主导控制样蛋白 1(mastermind-like 1, MAML1)和组蛋白乙酰转移酶,导致 Notch 靶基因的转录激活^[10-11]。Notch 通路信号转导过程见图 1。

2 Notch 在肝纤维化中的作用

2.1 Notch 信号通路参与肝星状细胞活化

肝纤维化是各种损伤引起的伤口愈合反应,当致病因素去除后,肝纤维化可以实现逆转。在肝纤维化进展和消退的过程中,肝星状细胞表型(静止、活化、失活、衰老)转换起关键作用^[1]。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)属于常驻型间充质细胞,位于由肝细胞和肝窦内皮细胞构成的 Disse 间隙内。在正常肝中,HSC 维持非增殖、静态表型。肝损伤时,一方面 HSC 失去了肝窦内皮细胞的限制

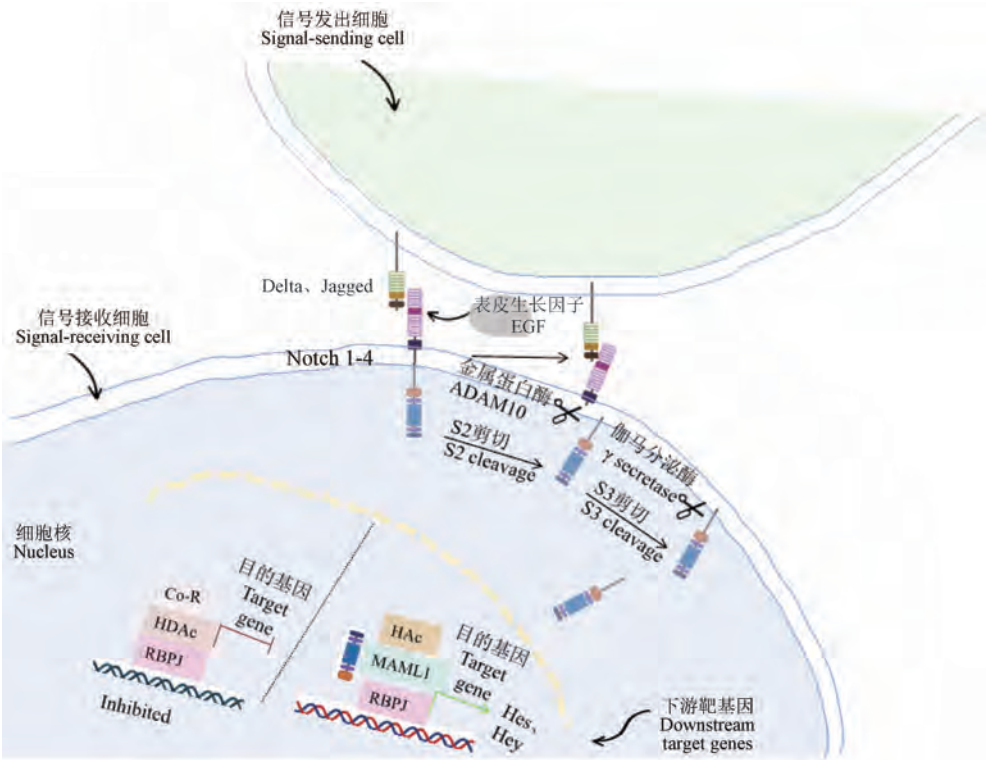


图 1 Notch 信号通路
Figure 1 Notch signaling pathway

作用,另一方面由于其他细胞释放刺激信号使 HSC 从静态表型转分化为肌成纤维细胞样表型(活化),并具备增殖、收缩和促炎特性^[12]。活化的 HSC 向组织修复部位迁移和积累,合成大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM)并在 Disse 间隙中累积^[13]。ECM 是由蛋白质和多糖组成的三维网络结构,为组织和器官中的细胞提供结构支架。MCM 中的纤维蛋白如胶原蛋白、弹性蛋白、层粘连蛋白等为组织提供拉伸强度,并支持细胞粘附、增殖、凋亡、存活和分化^[14]。当 ECM 合成与降解失衡时,肝组织结构重置进而形成纤维化。在病因去除后,活化的 HSC 可发生凋亡或者转化为失活表型使 ECM 合成减少,纤维生成相应减少,肝纤维化逐渐开始消退^[1]。由此可见,HSC 活化是肝纤维化发生的关键事件。

有研究发现,Notch 信号通路随肝纤维化进展和消退而变化,即在肝纤维化过程中,Notch 信号通路通过促进 HSC 活化来增加纤维生成;而在肝纤维化消退过程中,Notch 信号通路通过诱导凋亡因子表达促进活化的 HSC 凋亡来加速纤维消退^[15]。近年来,随着高通量测序技术的不断革新,一些非编码 RNA 不断被筛出,其发挥的生物功能也逐渐被认知。研究显示,肝纤维化相关的长链非编码 RNA(lnc-LFAR1)通过直接结合 Smad2/3 促进 TGF β 、Smad2、Smad3、Notch2、Notch3 转录,激活 TGF β 和 Notch 信号通路,诱导 HSC 活化,促进肝纤维化形成^[16]。当 lnc-LFAR1 沉默后,由 TGF β 诱导的肝细胞凋亡减少,HSC 激活受到抑制,肝纤维化得到改善。此外,微小 RNA(microRNA, miRNA)通过作用于 Notch 信号通路在调节与肝纤维化相关的各种生物学过程中也发挥重要作用^[17]。研究表明,人脐带间充质干细胞通过上调 miR-148-5p 的表达来抑制 Notch 信号通路活性,进而干预 HSCs 的活化,缓解肝纤维化^[18]。

2.2 Notch 信号通路调控肝窦内皮细胞去分化

肝窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cells, LSEC)在维持肝内稳态中发挥重要作用,其中包括调节血管张力、炎症和血栓形成等^[19]。LSEC 具有特殊的窗孔结构,并缺乏连续的基底膜和隔膜^[20],这些窗孔聚集成簇,形成筛板,有助于氧气交换以及液体、离子、营养物质、大小溶质和代谢物自由转移到 Disse 空间,从而实现与实质肝细胞(肝细胞)和非实质细胞(肝星状细胞)直接接触^[21]。在生理

状态下,肝窦细胞受生理剪切应力的影响,会激活 Kruppel 样转录因子 2(Kruppel-like factor 2),相应地使具有扩血管作用的一氧化氮(NO)释放,而具有收缩血管作用的细胞因子(如 ANG1)含量降低,这不仅有助于平衡肝门静脉内外的血管压力,还能维持肝星状细胞处于静止、非增殖状态^[22-23]。在急性肝损伤时,这种损伤的危害由肝再生能力补偿;而当处于慢性肝病时,持续的炎症反应使肝内微环境改变,LSEC 去分化,丧失对肝星状细胞的牵制作用,肝星状细胞激活,转变为增殖和炎症表型,产生大量细胞外基质,从而引起肝纤维化。反过来,随着肝星状细胞的不断活化,一些促血管生成因子开始释放,如 VEGF、Ang1 等,这些细胞因子都在促进血管生成方面发挥重要作用^[19,24]。

Notch 信号通过调控 LSEC 生物功能发挥抗肝纤维化的作用主要体现在其对血管生成的调节。研究表明,Notch 信号激活会抑制一氧化氮合酶/可溶性鸟苷酸环化酶的活性导致 LSEC 去分化,进而引起肝纤维化加重^[25]。此外,Notch 信号激活还能减少 Wnt 配体和肝细胞生长因子的产生,阻碍肝纤维化期间肝细胞的增殖,损害肝损伤修复反应。在蛋氨酸-胆碱缺乏饮食诱导的 NASH 小鼠模型中,Notch 信号在 NASH 小鼠的 LSEC 中被激活,这促使 LSEC 稳态破坏,NASH 加重。而运用不同 γ -分泌酶抑制剂阻断 Notch 信号传导后,LSEC 表观形态逐渐恢复,肝脂肪变性,炎症和肝纤维化得到改善^[26]。另有研究也表明,无论是肝硬化患者或者 CCL4 诱导的小鼠肝纤维化还是体外原代 LSEC 模型中,Notch 信号配体 DLL4 表达上调,并且与 LSEC 去分化以及肝纤维化平行,而特异性 DLL4 沉默能减轻 LSEC 毛细血管化进而改善肝纤维化^[27]。体内外研究发现,将负载 miR-30c 的纳米颗粒递送至 LSEC 能抑制 DLL4/Notch 信号通路激活和血管生成,进而减轻肝纤维化^[28]。以上说明,LSEC 是肝的守门员,其生理功能的正常发挥在维持肝稳态方面至关重要^[19]。而 Notch 信号通路通过调节 LSEC 去分化使肝稳态破坏,病理性连锁反应发生,尤其表现在对 HSC 表型的维持上,这将导致肝纤维化的发生。

2.3 Notch 信号通路调节肝巨噬细胞极化

肝纤维化是慢性炎症引起的伤口愈合反应^[29]。肝慢性炎症反应主要由肝巨噬细胞介导^[30]。巨噬细胞具有很强的可塑性,在病理条件下,除了常驻巨噬细胞外,其他来源的巨噬细胞也不断被招募到

组织中,根据组织微环境的变化分化为不同的表型^[31],参与机体免疫防御、炎症反应、组织重塑、体内平衡^[32]。越来越多的研究证明肝巨噬细胞在肝纤维化的形成和逆转过程中至关重要^[33-34]。

Notch 信号作为肝巨噬细胞生物学功能的关键调节因子,其配体 DLL4 可使巨噬细胞极化类型发生特异性变化,既能促进 M1 巨噬细胞分化进而驱动 Notch 依赖性生物过程,又能抑制 M2 巨噬细胞分化^[35]。有研究以细胞膜表面分子 ly6C 表达的高低将巨噬细胞分为不同亚群(ly6C^{high} 和 ly6C^{low}),通过向肝纤维化小鼠体内回输 M1 型巨噬细胞,不仅促进肝星状细胞凋亡,减少胶原产生,还促进肝巨噬细胞由 ly6C^{high} 向 ly6C^{low} 亚群转变,增加胶原纤维降解,但特异性阻断 Notch 信号通路有助于肝巨噬细胞 ly6C^{high} 向 ly6C^{low} 亚群转变^[36]。研究表明,辣椒素通过调节 Notch 信号传导抑制 M1 巨噬细胞极化,从而减少炎症细胞因子 TNF- α 的分泌,促使肌成纤维细胞再生减少并抑制 CCL4 诱导的小鼠肝纤维化形成^[37]。另有研究发现,在血吸虫感染引起的小鼠肝纤维化模型中,肝巨噬细胞极化以 M2 型为主,同样在体外用可溶性虫卵抗原诱导的细胞模型中显示 M2 表型,而这些巨噬细胞中可见明显的 Notch/Jagged1 表达上调,但给予 γ 分泌酶抑制剂干预后,以上现象被阻断,相应的小鼠血吸虫感染引起的肝肉芽肿和纤维化得到缓解^[38]。最新的研究显示,通过将 RBPJ 转录因子诱饵寡脱氧核苷酸加载至外泌体中能有效抑制巨噬细胞中 Notch 信号转导并改善肝纤维化^[39]。说明在肝纤维化过程中,肝巨噬细胞的极化亚型随组织微环境变化而不同,而 Notch 信号转导在这种亚型转换中起重要作用。

2.4 Notch 信号通路在肝细胞凋亡中的作用

肝纤维化的形成除了以 ECM 沉积为特征外,肝细胞凋亡、再生减少也是其另一特征。一方面受损的肝细胞会衍生并释放危险信号直接激活肝星状细胞^[40-41],另一方面由 TGF- β 1/Smads 信号通路介导的肝细胞间充质转换会促进肝细胞凋亡,进而导致 ECM 沉积^[42-43]。因此,作为占比最多的肝实质细胞,肝细胞与肝纤维化的形成也密切相关。尽管相关机制研究尚不充分,但有研究表明 Notch 信号通路通过作用于肝细胞在肝纤维化形成过程中发挥作用。

研究表明,在非酒精性脂肪性肝炎患者中,Notch 信号通路下游靶基因 Hes1 的表达随 NASH 严

重程度而变化^[44]。在正常患者肝中,Hes1 几乎不表达,在单纯脂肪肝患者中,Hes1 轻度升高,而在肝纤维化患者中,Hes1 表达明显升高,并且表达位置主要集中在肝细胞。同样,在饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis,NASH)和肝纤维化小鼠模型中,肝细胞 Notch 信号被激活,当肝细胞特异性 Notch 功能丧失时,NASH 相关肝纤维化减轻。这一研究结果在最新的研究中得到印证并深化,该研究发现 Notch 信号通路配体 Jagged1 在非酒精性脂肪性肝炎/肝纤维化患者和小鼠体内激活,进一步的机制研究表明,肝细胞通过依赖 TLR4-NF- κ B 信号传导激活 Jagged1,当特异性敲除 Jagged1 后,小鼠将免受 NASH 诱导的肝纤维化^[45]。另有研究发现,抑制 Notch 信号通路活性后,肝细胞凋亡减少,再生增强^[18]。说明除了肝非实质细胞外,实质细胞如肝细胞也在 Notch 信号介导的肝纤维化中起作用。

3 小结

肝纤维化是多因子、多通路参与的动态病理过程,是多种细胞相互串扰的结果。近年来,针对肝纤维化发病机制和治疗方法的研究不断取得进展,但目前仍无有效的抗肝纤维化治疗方法进入临床。研究表明,在去除各种慢性肝病的根本原因后,部分患者可以实现纤维化逆转^[46]。但是,自发性逆转通常发生较为迟缓或者发生率较低,无法及时避免危及生命的并发症,特别是晚期纤维化。因此,亟需深入研究肝纤维化发病机制和治疗方法,以期为肝纤维化的治疗提供更多机会和选择。Notch 信号通路的调控作用已经在许多研究中得到证实,包括肝纤维化。该信号通路通过调控 HSC 活化、巨噬细胞极化、LSEC 去分化和肝细胞凋亡等生物过程在肝纤维化发生发展中起作用。因此,聚焦 Notch 信号通路是一种值得期待的抗肝纤维化方法。

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] ZHOU B, LIN W, LONG Y, et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 95.
- [3] 张兵林. Notch 信号与细胞分化、死亡及神经发育关系的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2003, 13(1): 54-57.
- ZHANG B L. Study advances in Notch signaling of cell

- differentiation, apoptosis and neural development [J]. *Chin J Lab Anim Sci*, 2003, 13(1): 54–57.
- [4] 张望, 万义鹏, 朱莹. Notch 信号通路在肝纤维化中的研究进展 [J]. *天津医药*, 2021, 49(7): 773–777.
- ZHANG W, WAN Y P, ZHU X. Research progress of Notch signaling pathway in liver fibrosis [J]. *Tianjin Med J*, 2021, 49(7): 773–777.
- [5] XIAO X, ZHANG Q. Asiaticoside conveys an antifibrotic effect by inhibiting activation of hepatic stellate cells via the Jagged-1/Notch-1 pathway [J]. *J Nat Med*, 2023, 77(1): 128–136.
- [6] 李明芳, 李曹飞, 左东泽, 等. 肝纤维化的发病机理及相关信号转导机制研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(8): 147–152.
- LI M F, LI C F, ZUO D Z, et al. Research progress on the pathogenesis and related signal transduction mechanisms of liver fibrosis [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(8): 147–152.
- [7] TRICARICO P M, CROVELLA S. Notch signaling in health and disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(22): 16113.
- [8] LI X, YAN X, WANG Y, et al. The Notch signaling pathway: a potential target for cancer immunotherapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2023, 16(1): 45.
- [9] KANG T Y, BOCCI F, NIE Q, et al. Spatial-temporal order-disorder transition in angiogenic NOTCH signaling controls cell fate specification [J]. *eLife*, 2024, 12: RP89262.
- [10] SPRINZAK D, BLACKLOW S C. Biophysics of Notch signaling [J]. *Annu Rev Biophys*, 2021, 50: 157–189.
- [11] SUAREZ RODRIGUEZ F, SANLIDAG S, SAHLGREN C. Mechanical regulation of the Notch signaling pathway [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2023, 85: 102244.
- [12] TSUCHIDA T, FRIEDMAN S L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(7): 397–411.
- [13] BAGHAEI K, MAZHARI S, TOKHANBIGLI S, et al. Therapeutic potential of targeting regulatory mechanisms of hepatic stellate cell activation in liver fibrosis [J]. *Drug Discov Today*, 2022, 27(4): 1044–1061.
- [14] MATSUDA M, SEKI E. The liver fibrosis niche: Novel insights into the interplay between fibrosis-composing mesenchymal cells, immune cells, endothelial cells, and extracellular matrix [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 143: 111556.
- [15] YUE Z, JIANG Z, RUAN B, et al. Disruption of myofibroblastic Notch signaling attenuates liver fibrosis by modulating fibrosis progression and regression [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(9): 2135–2146.
- [16] ZHANG K, HAN X, ZHANG Z, et al. The liver-enriched lnc-LFAR1 promotes liver fibrosis by activating TGF β and Notch pathways [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 144.
- [17] ZHOU G, LI C, ZHANG R, et al. Kaempferol inhibits hepatic stellate cell activation by regulating miR-26b-5p/Jag1 axis and Notch pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 881855.
- [18] ZHOU Q, RONG C, GU T, et al. Mesenchymal stem cells improve liver fibrosis and protect hepatocytes by promoting microRNA-148a-5p-mediated inhibition of Notch signaling pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 354.
- [19] MCCONNELL M J, KOSTALLARI E, IBRAHIM S H, et al. The evolving role of liver sinusoidal endothelial cells in liver health and disease [J]. *Hepatology*, 2023, 78(2): 649–669.
- [20] WISSE E. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids [J]. *J Ultrastruct Res*, 1970, 31(1): 125–150.
- [21] WISSE E, DE ZANGER R B, CHARELS K, et al. The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse [J]. *Hepatology*, 1985, 5(4): 683–692.
- [22] GRACIA-SANCHO J, MARRONE G, FERNÁNDEZ-IGLESIAS A. Hepatic microcirculation and mechanisms of portal hypertension [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(4): 221–234.
- [23] MARRONE G, RUSSO L, ROSADO E, et al. The transcription factor KLF2 mediates hepatic endothelial protection and paracrine endothelial-stellate cell deactivation induced by statins [J]. *J Hepatol*, 2013, 58(1): 98–103.
- [24] GRACIA-SANCHO J, CAPARRÓS E, FERNÁNDEZ-IGLESIAS A, et al. Role of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(6): 411–431.
- [25] DUAN J L, RUAN B, YAN X C, et al. Endothelial Notch activation reshapes the angiocrine of sinusoidal endothelia to aggravate liver fibrosis and blunt regeneration in mice [J]. *Hepatology*, 2018, 68(2): 677–690.
- [26] FANG Z Q, RUAN B, LIU J J, et al. Notch-triggered maladaptation of liver sinusoidal endothelium aggravates nonalcoholic steatohepatitis through endothelial nitric oxide synthase [J]. *Hepatology*, 2022, 76(3): 742–758.
- [27] CHEN L, GU T, LI B, et al. Delta-like ligand 4/DLL4 regulates the capillarization of liver sinusoidal endothelial cell and liver fibrogenesis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019, 1866(10): 1663–1675.
- [28] GU T, SHEN B, LI B, et al. MiR-30c inhibits angiogenesis by targeting delta-like ligand 4 in liver sinusoidal endothelial cell to attenuate liver fibrosis [J]. *FASEB J*, 2021, 35(5): e21571.
- [29] YANG A T, KIM Y O, YAN X Z, et al. Fibroblast activation protein activates macrophages and promotes parenchymal liver inflammation and fibrosis [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2023, 15(4): 841–867.
- [30] NGUYEN-LEFEBVRE A T, AJITH A, PORTIK-DOBOS V, et al. The innate immune receptor TREM-1 promotes liver injury and fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(11): 4870–4883.
- [31] LOCATI M, CURTALE G, MANTOVANI A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity [J]. *Annu Rev Pathol*, 2020, 15: 123–147.
- [32] WANG C, MA C, GONG L, et al. Macrophage polarization and its role in liver disease [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 803037.
- [33] CHENG D, CHAI J, WANG H, et al. Hepatic macrophages:

Key players in the development and progression of liver fibrosis [J]. *Liver Int*, 2021, 41(10): 2279–2294.

[34] MA P F, GAO C C, YI J, et al. Cytotherapy with M1-polarized macrophages ameliorates liver fibrosis by modulating immune microenvironment in mice [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(4): 770–779.

[35] PAGIE S, GÉRARD N, CHARREAU B. Notch signaling triggered via the ligand DLL4 impedes M2 macrophage differentiation and promotes their apoptosis [J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16(1): 4.

[36] 马鹏飞. 巨噬细胞 ly6Chigh 向 ly6Clow 亚群转变在肝损伤修复中的调控作用与机制研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2017.

MA P F. Study on the regulatory effect and mechanism of the transformation of macrophages from ly6Chigh to ly6Clow subgroup in the repair of liver injury [D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University, 2017.

[37] SHENG J, ZHANG B, CHEN Y, et al. Capsaicin attenuates liver fibrosis by targeting Notch signaling to inhibit TNF- α secretion from M1 macrophages [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2020, 42(6): 556–563.

[38] ZHENG S, ZHANG P, CHEN Y, et al. Inhibition of Notch signaling attenuates schistosomiasis hepatic fibrosis via blocking macrophage M2 polarization [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166808.

[39] HE F, LI W N, LI X X, et al. Exosome-mediated delivery of RBP-J decoy oligodeoxynucleotides ameliorates hepatic fibrosis in mice [J]. *Theranostics*, 2022, 12(4): 1816–1828.

[40] AN P, WEI L L, ZHAO S, et al. Hepatocyte mitochondria-derived danger signals directly activate hepatic stellate cells and drive progression of liver fibrosis [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2362.

[41] GAUL S, LESZCZYNSKA A, ALEGRE F, et al. Hepatocyte pyroptosis and release of inflammasome particles induce stellate cell activation and liver fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2021, 74(1): 156–167.

[42] SONG L, CHEN T Y, ZHAO X J, et al. Pterostilbene prevents hepatocyte epithelial-mesenchymal transition in fructose-induced liver fibrosis through suppressing miR-34a/Sirt1/p53 and TGF- β 1/Smads signalling [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(11): 1619–1634.

[43] SHRESTHA N, CHAND L, HAN M K, et al. Glutamine inhibits CCl₄ induced liver fibrosis in mice and TGF- β 1 mediated epithelial-mesenchymal transition in mouse hepatocytes [J]. *Food Chem Toxicol*, 2016, 93: 129–137.

[44] ZHU C, KIM K, WANG X, et al. Hepatocyte Notch activation induces liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(468): eaat0344.

[45] YU J, ZHU C, WANG X, et al. Hepatocyte TLR4 triggers inter-hepatocyte Jagged1/Notch signaling to determine NASH-induced fibrosis [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(599): eabe1692.

[46] PEI Q, YI Q, TANG L. Liver fibrosis resolution: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9671.

[收稿日期]2023-10-24

陈露, 江小霞, 朱玲玲. 高原低压低氧环境下牙周炎与中枢神经系统炎症的相关性 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(6): 119-126.

Chen L, Jiang XX, Zhu LL. Correlation of periodontitis with central nervous system inflammation in hypobaric hypoxia environments at plateau [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 119-126.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.016

高原低压低氧环境下牙周炎与中枢神经系统炎症的相关性

陈 露^{1,2}, 江小霞^{2*}, 朱玲玲^{1,2*}

(1. 南华大学衡阳医学院, 军事科学院军事医学研究院研究生协作培养基地, 湖南 衡阳 421001;

2. 军事医学研究院, 北京 100850)

【摘要】 近年来, 随着在高原和山区活动人群的增多, 高海拔暴露变得越来越普遍, 许多基础疾病患者受高原低压低氧环境影响, 病程进一步加重甚至导致认知障碍的现象频发。牙周炎是一种常见的炎症性疾病, 能诱发牙周局部炎症反应, 甚至中枢神经系统炎症。在高海拔环境下, 机体出现免疫力下降、组织缺氧等反应, 这些反应会促进牙周炎的发生发展, 甚至有可能增加牙周炎引发中枢神经系统炎症的风险。随着高原医学研究的不断深入, 高原低压低氧环境下牙周炎与中枢神经系统炎症之间的关系引发越来越多的关注。本文就牙周炎与中枢神经系统炎症的研究进展进行综述, 并对高原低压低氧环境下牙周炎与中枢神经系统炎症之间的相关性进行讨论。

【关键词】 高原; 低压低氧; 牙周炎; 中枢神经系统炎症

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0119-08

Correlation of periodontitis with central nervous system inflammation in hypobaric hypoxia environments at plateau

CHEN Lu^{1,2}, JIANG Xiaoxia^{2*}, ZHU Lingling^{1,2*}

(1. Graduate Collaborative Training Base of Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China. 2. Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

【Abstract】 With the increase in human activity in plateau and mountainous areas in recent years, high-altitude exposure has become increasingly common. Many patients with underlying diseases are affected by hypobaric hypoxia in plateau environments, which further aggravates disease processes and even leads to cognitive disorders. Periodontitis is a common inflammatory disease that induces periodontal local inflammatory responses and even causes central nervous system inflammation. At high altitudes, the body suffers from decreased immunity and tissue hypoxia, which can promote the occurrence and development of periodontitis and may even increase the risk of periodontitis-induced central nervous system inflammation. As plateau medical research advances, the relationship between periodontitis and central nervous system inflammation in hypobaric hypoxia environments at plateau is attracting more and more attention. This work reviews the

【基金项目】 国家自然科学基金 (82072104)。

【作者简介】 陈露 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 高原医学研究。E-mail: chlu2971@163.com

【通信作者】 朱玲玲 (1966—), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 高原医学研究。E-mail: linglingzhuamms@126.com

江小霞 (1976—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 情绪与认知调控研究。E-mail: smilovjiang@163.com * 共同通信作者

progress of research on periodontitis and central nervous system inflammation and discusses the correlation between periodontitis and central nervous system inflammation when exposed to hypobaric hypoxia in plateau environments.

[Keywords] plateau; hypobaric hypoxia; periodontitis; central nervous system inflammation

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

随着社会的进步,迁移至高海拔地区就业和居住的人不断增多,低压低氧是高原地区的主要环境特征^[1],可以引发机体一系列不良反应^[2-4],甚至导致高原低压低氧脑损伤^[5-6]。而炎症在高原低压低氧脑损伤中发挥着重要作用^[7-8],系统性炎症和局部炎症的存在会增加高原低压低氧脑损伤的风险^[9-10]。牙周炎作为一种口腔局部炎症性疾病,以牙周袋壁炎症、牙槽骨吸收、牙齿松动为主要特征,高原低压低氧环境对牙周炎的病情会产生负面影响^[11],尽管已有研究发现牙周炎能够引发中枢神经系统炎症导致学习与记忆障碍^[12],但高原低压低氧环境下牙周炎与中枢神经系统炎症的讨论尚未见报道。因此,本文就高原低压低氧环境下牙周炎与中枢神经系统炎症的相关性进行讨论,或可为高原低压低氧环境下牙周炎和中枢神经系统炎症的预防提供思路。

1 牙周炎的现状

牙周炎是由牙周病原微生物引发的牙周组织炎症性疾病,初期牙龈轻微出血,随着时间的推移,牙菌斑生长,牙结石积聚,牙周炎症加重,最终导致牙齿脱落^[13]。除了微生物因素外,环境、宿主炎症和遗传等因素也推动着牙周炎的发生和发展^[14],使牙周炎在人群中广泛流行。我国第四次全国口腔疾病流行病学调查显示,牙周炎影响了一半以上中国成年人的口腔健康^[15-16]。在全球范围内,约 7.43 亿人的口腔健康受牙周炎影响^[17],且患病率呈上升趋势^[18],牙周炎已成为全球口腔健康问题。不仅如此,研究发现牙周炎还是中枢神经系统炎症的重要危险因素之一^[12]。

2 牙周炎对中枢神经系统炎症的影响

长期以来,中枢神经系统炎症是中枢神经系统疾病的重要病理机制^[19],牙周炎作为一种局部炎症与中枢神经系统炎症密切相关^[20-21]。而牙周炎引发中枢神经系统炎症的主要病因一方面是牙周病原微生物及其产物^[20],包括牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, Pg)^[22]、齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*, Td)^[23]、具核梭杆菌

(*Fusobacterium nucleatum*, Fn)^[24]等,这些病原微生物进入脑内能引发免疫反应,还能产生多种毒力因子激活脑内免疫细胞,如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)^[25-26]、牙龈蛋白酶^[27-28]、荚膜^[29]、外膜囊泡(outer membrane vesicle, OMV)^[30]、新型鞘脂^[31]。另一方面,牙周炎症状态时释放的炎症因子一旦进入大脑,不仅会增加炎症因子的数量,也会刺激神经胶质细胞产生额外的炎症因子,引发脑内炎症反应^[32]。这些致炎物质从牙周组织出发,通过多种途径进入脑内(图 1),主要分为以下 4 种途径:

(1)血液循环途径:研究显示,牙龈卟啉单胞菌通过牙周袋渗漏进入血液循环,一旦进入脑血管,可能会通过多种方式诱导血脑屏障(blood brain barrier, BBB)的破坏,使 Pg 经血脑屏障进入脑内^[32-33]。牙周炎症部位还能释放炎症因子进入血液循环,炎症因子穿过血脑屏障进入脑内^[34]。不仅如此,脑室周围器官(circumventricular organs, CVO)缺乏连续的血脑屏障,当牙周病原微生物和炎症因子进入血液后可能经此位置进入大脑^[35]。另外,大脑表面蛛网膜与软脑膜间的蛛网膜下腔含有丰富的血管^[36],Pg-LPS 经血液循环到达脑血管后能使外周巨噬细胞产生炎症因子,软脑膜细胞能够将外周巨噬细胞炎症信号转导到脑内^[37],炎症因子还能与脑血管内皮细胞(endothelial cells, EC)上的炎症因子受体结合,激活血管周围巨噬细胞与小胶质细胞间的通讯,使小胶质细胞分泌炎症因子,导致神经炎症^[38]。

(2)神经旁路途径:齿垢密螺旋体是牙周炎的病原微生物之一^[39],能通过三叉神经进入大脑到达三叉神经中脑核和海马体^[40-41],也能沿着嗅神经进入大脑^[35]。牙龈卟啉单胞菌细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)能通过三叉神经进入大脑,诱发神经炎症^[42]。此外,外周炎症因子还能刺激周围神经传入纤维,激活迷走神经将信号传入大脑,导致脑内炎症因子水平升高^[43]。

(3)口腔微生物-肠-脑轴途径:研究发现,肠道微生物通过肠-脑轴影响其宿主的大脑功能,涉及神经、内分泌和免疫途径^[44],而口腔菌群变化会引起肠道菌群的改变^[45]。因此,口腔微生物通过影响

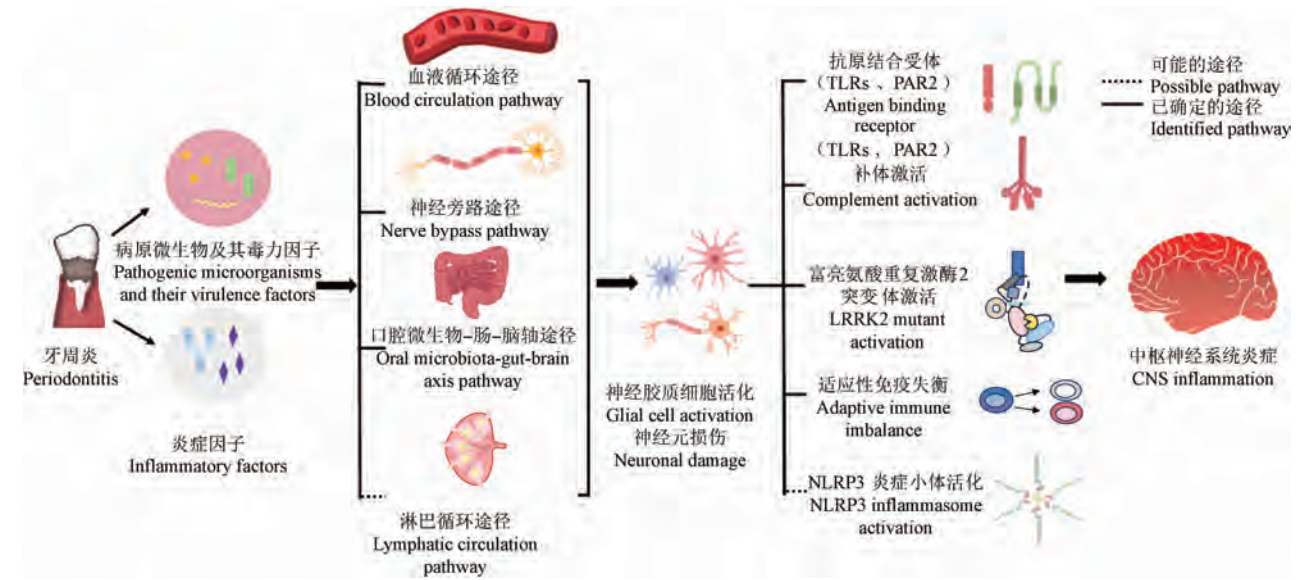


图 1 牙周炎影响中枢神经系统炎症的途径

Figure 1 Pathways of periodontitis affecting CNS inflammation

肠-脑轴从而影响中枢神经系统炎症发生是有可能的。在小鼠模型中,牙周炎相关唾液微生物群的持续灌胃损害认知功能,导致脑内神经炎症^[46]。Xue 等^[47]发现小鼠慢性牙周炎诱导口腔微生物-肠-脑轴紊乱导致中枢神经系统炎症与认知障碍也为此途径提供了直接证据。

(4)淋巴循环途径:淋巴管中含有大量抗原呈递细胞,能识别抗原并呈递至区域淋巴结进行处理^[48],其中第三和第四脑室与颈部中深淋巴结相连^[49-50],口腔区域淋巴也与颈部中深淋巴结相连^[32],虽然目前没有证据表明它是将口腔细菌传播到大脑的通路,但是是一种可能的途径。

以上研究表明,牙周病原微生物及其产物和炎症因子能通过多种方式侵入脑内,引发中枢神经系统炎症。而作为脑内的主要免疫细胞,小胶质细胞和星形胶质细胞在大脑中有调节神经炎症的作用,是脑内炎症因子的重要来源^[51]。在牙周炎与中枢神经系统炎症的联系中,小胶质细胞和星形胶质细胞的活化占据重要地位。根据文献报道,牙周病原微生物及其产物和炎症因子使小胶质细胞和星形胶质细胞活化,引发神经元损伤,导致脑内神经炎症的具体机制包括以下 5 点:

(1)抗原结合受体:研究发现,Pg-LPS 能通过结合细胞膜上的 Toll 样受体,激活 NF- κ B/STAT3 信号通路,上调炎症因子表达,活化小胶质细胞和星形胶质细胞^[25,52]。此外,Pg 产生的牙龈蛋白酶能与蛋白酶激活受体 2 (proteinase activated receptor-2,

PAR2)结合,激活 PI3K/AKT 信号通路和 ERK 信号通路,使小胶质细胞释放 IL-6 和 TNF- α ^[28]。

(2)补体激活:在阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 小鼠中, Pg 能够穿过血脑屏障进入脑内,激活小胶质细胞产生炎症因子,并且还能够诱导补体成分 1q (complement component 1q, C1q) 过表达,使小胶质细胞进一步活化,加剧中枢神经系统炎症^[53]。

(3)富亮氨酸重复激酶 2 (leucine-rich repeat kinase 2, LRRK2) 突变体激活:富亮氨酸重复激酶 2 突变体是帕金森病发病机制中最常见的遗传因素^[54]。研究发现, Pg 能激活 LRRK2 突变体,使小胶质细胞活化,诱导的神经变性具有 LRRK2 突变依赖性^[55]。

(4)适应性免疫失衡:适应性免疫的主要参与者是 CD4⁺T 细胞,通过分化为辅助性 T 细胞 (helper T cell, Th) 和调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg), 可以调控脑内神经炎症^[56]。研究发现,在 Pg-LPS 诱导的牙周炎小鼠中, Th17 相关促炎细胞因子在血液和大脑中的表达增加,而 Treg 相关抗炎细胞因子的表达降低,神经元凋亡加剧^[57]。

(5)NLRP3 炎症小体活化: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) 炎症小体是先天免疫系统的关键部分,在多种炎症性疾病中起重要作用^[58]。Gong 等^[30]研究发现,口服饲喂小鼠牙龈卟啉单胞菌外膜囊泡后,可在海马体和皮层中检测

到外膜囊泡,星形胶质细胞和小胶质细胞活化,IL-1 β 水平增加,海马体中 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达上调,表明外膜囊泡能激活脑内免疫细胞进而引发中枢神经系统炎症,NLRP3 炎症小体激活是一种可能的机制。这些研究进一步证明牙周炎是中枢神经系统炎症的重要危险因素之一。

3 高原低压低氧环境下牙周炎与中枢神经系统炎症的关系

随着高原医学研究的深入,科学家们开始探索高原低压低氧环境下牙周炎与中枢神经系统炎症之间的可能关联。目前关于这方面的研究,杜灿等^[59]讨论了高原慢性低氧环境慢性牙周炎与阿尔茨海默病的相关性,提出了相关见解,但高原低压低氧环境下牙周炎与中枢神经系统炎症的研究目前仍未见报道。因此,接下来围绕以下两个部分对高原低压低氧环境下牙周炎与中枢神经系统炎症相关关系进行讨论,为进一步的实验研究提供思路。

3.1 高原低压低氧环境对牙周炎的影响

近年来,高原低压低氧环境对牙周炎的影响引发关注。根据我国口腔流行病学调查统计,平原地区生活人群牙结石、牙龈出血检出率分别为 53.5%、18.8%,而西藏地区的高原移民检出率为 68.6%、30.4%^[60]。不仅如此,在一项针对中国西部地区青少年牙龈状况与海拔的相关性分析中发现,64.09%和 77.15%的青少年分别患有牙龈出血和牙结石,高原地区青少年患病率显著高于平原地区青少年^[61]。以上研究均表明,高原环境下牙周炎的发病率明显高于平原地区。此外,一项对空军部队的口腔健康状况调查分析也显示,驻高原空军官兵牙周炎患病率显著高于平原空军官兵,且随高原驻军时间延长,牙周炎逐渐加重^[62],这提示高原环境与牙周炎发病率和病情发展相关。

首先,在人群研究中发现,高原牙周炎患者血清中内脂素(visfatin, VF)水平升高,促炎作用增强,导致牙周组织损伤加重^[63]。此外,在牙周炎兔模型中,低压低氧后血清和牙龈组织中细胞间黏附分子-1(soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1)、可溶性血管黏附分子-1(soluble vascular cell adhesion molecule-1, sVCAM-1)显著上调^[64],提示血管通透性增加;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力降低,超氧自由基(superoxide radical, SR)增多,炎症加剧^[65]。而在牙周炎大鼠模型中,低压低氧后牙周组织炎症因子水平显著上

升^[66],龈沟液中 C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)水平增加^[67],血清中基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)和基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinase-3, MMP-3)表达上调^[68-69],增强牙周组织细胞外基质的降解,使炎症进一步发展。以上人群和实验动物模型的研究结果均表明低压低氧能够加速牙周炎的发生发展,而高原低压低氧加重牙周炎症的主要原因可能涉及以下 4 个方面:

(1) 低压低氧使牙周病原微生物增多

牙周病原微生物是导致牙周炎的主要因素,黄镜静等^[70]研究发现牙周炎兔模型低压低氧后龈下菌斑中牙龈卟啉单胞菌水平相比其余各组显著升高。李森等^[71]采用高通量测序检测菌群,发现高原牙周炎人群口腔菌群中齿垢密螺旋体等专性厌氧菌增多,表明低压低氧有利于牙周病原微生物生长。而牙周病原微生物能产生多种毒力成分^[72],使口腔微生物生态失调,诱发牙周组织炎症。

(2) 低压低氧加重牙周组织局部缺血缺氧

人在高原低压低氧条件下血氧饱和度(oxygen saturation, SaO₂)远低于正常水平^[73],为保证机体供氧,人体产生更多红细胞和血红蛋白以捕捉氧气分子,从而引发小血管破裂,使局部组织缺血缺氧,引发无氧代谢,细菌大量繁殖^[74]。此外,牙周组织缺氧会抑制人牙周膜细胞(human periodontal ligament cells, hPDLs)的增殖和迁移能力^[75]。同时,缺氧也会引发自由基累积,炎症因子大量释放^[65-66],使牙周炎症加重。

(3) 低压低氧破坏牙周组织防御功能

正常状态下,口腔中的中性粒细胞能够发挥杀灭病原微生物的作用^[76],而在高原低压低氧条件下牙周炎患者产生的中性粒细胞减少,识别和清除病原微生物的效果减弱,加速牙周组织感染发炎^[11]。

(4) 高原环境其他特点加重牙周炎症

高原地区与平原相比风力、昼夜温差和日照强度明显增强,当上升到高原后唾液分泌无法达到正常水平,导致口腔清洁能力减弱,牙周微生物加快繁殖。此外,高原地区饮食以肉奶制品为主,蔬菜水果食用频率较低,缺乏人体所需的维生素和微量元素,易导致口腔疾病的发生。同时,高原水中丰富的矿物质易沉积在牙齿表面,导致牙结石的形成,加重牙周炎^[77]。

以上研究表明高原低压低氧环境会加重牙周

局部炎症,而牙周炎症引发中枢神经系统炎症的研究已有报道,但在高原特殊环境下牙周炎与中枢神经系统炎症之间的关系更为复杂。

3.2 高原低压低氧环境下牙周炎与中枢神经系统炎症的相关性

近年来,高原低压低氧环境下牙周炎与中枢神经系统炎症的关系引发关注,赵婷婷^[78]研究发现牙周炎能够导致藏族中老年人认知功能明显下降,提示慢性牙周炎有可能是高原地区认知障碍的危险因素。此外,2018 年报道了一例与海拔升高相关的牙周感染导致脑脓肿的病例,表明海拔升高后低压环境对血流动力学的长期影响会导致牙周菌群分流,从而导致脑内神经炎症的发生^[79]。以上研究表明高原低压低氧环境下牙周炎与中枢神经系统炎症相关,并且高原低压低氧环境可能对牙周炎引发中枢神经系统炎症具有促进作用,虽未阐明具体机制,但为高原低压低氧环境下牙周炎与中枢神经系统炎症的研究做出了初步探索。

4 展望

目前,高原低压低氧环境下牙周炎与中枢神经系统炎症之间的研究尚有待进一步深入。虽然已有研究表明高原低压低氧能够加重牙周炎,且牙周炎与中枢神经系统炎症之间存在关联,但仅限于对平原地区牙周炎与中枢神经系统炎症的研究较多,高原地区不仅对于牙周炎的研究较少,对于牙周炎与中枢神经系统炎症的研究更少,特别是在高原低压低氧环境下的特殊变化及其变化规律,与高海拔暴露的时间的关联性等都有待深入探究。此外,牙周炎进程包含不同阶段,不同阶段牙周炎在低压低氧环境下对中枢神经系统炎症的影响是否不同,牙周炎处于何种阶段在高原低压低氧环境下会引发中枢神经系统炎症,这些问题尚待进一步的研究。另外,中枢神经系统炎症是引发神经退行性疾病的重要原因,并且在高原环境下与高原脑水肿等高原病也有关联。因此,高原环境下牙周炎与神经退行性疾病和高原病的关系均是需要进一步探讨的问题。当牙周炎与高原低压低氧两种风险因素都存在时,发生中枢神经系统炎症的风险是否增加?是否会引发神经退行性疾病和高原病?其中的具体机制是什么?对这些问题的研究将阐明高原低压低氧环境下牙周炎对中枢神经系统炎症以及相关疾病发生和发展的影响,从而为高原低压低氧环境

下中枢神经系统炎症的预防与治疗提供思路,为到高海拔地区的人群的健康提供有价值的建议。

参考文献:

- [1] 范明,朱玲玲.低氧研究受到关注[J].生理学报,2019,71(5):806-808.
FAN M, ZHU L L. Hypoxia research receives attention [J]. Acta Physiol Sin, 2019, 71(5): 806-808.
- [2] 向雪梅,郭鑫,曾佳容,等.高原肺水肿动物模型研究进展[J].中国实验动物学报,2022,30(2):291-298.
XIANG X M, GUO X, ZENG J R, et al. Evolution of animal models of high altitude pulmonary edema [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 291-298.
- [3] 付鹏宇,胡扬,李燕春,等.低氧暴露所致大鼠骨骼肌萎缩的蛋白转化调节机制[J].中国实验动物学报,2019,27(4):423-432.
FU P Y, HU Y, LI Y C, et al. Protein turnover regulation mechanism of rat skeletal muscle atrophy induced by hypoxia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4): 423-432.
- [4] LI F, QIAO Z, DUAN Q, et al. Adaptation of mammals to hypoxia [J]. Animal Model Exp Med, 2021, 4(4): 311-318.
- [5] 张梦雅,赵名,江亚群,等.慢性高原低氧暴露对小鼠神经行为学的影响[J].中国比较医学杂志,2023,33(4):28-35.
ZHANG M Y, ZHAO M, JIANG Y Q, et al. Effects of chronic high-altitude hypoxia exposure on neurobehavior in mice [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(4): 28-35.
- [6] 刘鹏飞,胡艳婷,姜静雯,等.通心络胶囊对大鼠低压低氧暴露后炎症反应和脑组织水肿及认知功能的影响[J].中国比较医学杂志,2021,31(6):69-76.
LIU P F, HU Y T, JIANG J W, et al. Effects of tongxinluo capsule on hippocampal inflammation, brain edema, and cognitive function of rats exposed to acute hypobaric hypoxia [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(6): 69-76.
- [7] PHAM K, PARIKH K, HEINRICH E C. Hypoxia and inflammation: insights from high-altitude physiology [J]. Front Physiol, 2021, 12: 676782.
- [8] 史子毕. IL-6 与高原病的研究进展[J].中国高原医学与生物学杂志,2021,42(3):190-194.
SHI Z B. Research progress of IL-6 and altitude sickness [J]. Chin High Alt Med Biol, 2021, 42(3): 190-194.
- [9] ZHOU Y, HUANG X, ZHAO T, et al. Hypoxia augments LPS-induced inflammation and triggers high altitude cerebral edema in mice [J]. Brain Behav Immun, 2017, 64: 266-275.
- [10] HAN Y, DING L, CHENG X, et al. Hypoxia augments cerebral inflammation in a dextran sulfate sodium-induced colitis mouse model [J]. Front Cell Neurosci, 2020, 14: 611764.
- [11] 李婧.高原地理环境与牙周炎的关系研究进展[J].全科口腔医学杂志(电子版),2020,7(1):26,36.
LI J. Research progress on the relationship between plateau geographical environment and periodontitis [J]. Electron J Gen

- Stomatol, 2020, 7(1): 26, 36.
- [12] HU Y, LI H, ZHANG J, et al. Periodontitis induced by *P. gingivalis*-LPS is associated with neuroinflammation and learning and memory impairment in sprague-dawley rats [J]. Front Neurosci, 2020, 14: 658.
 - [13] JOHNSON A, HE J L, KONG F, et al. Surfactin-loaded K-carrageenan oligosaccharides entangled cellulose nanofibers as a versatile vehicle against periodontal pathogens [J]. Int J Nanomedicine, 2020, 15: 4021–4047.
 - [14] TELES F, COLLMAN R G, MOMINKHAN D, et al. Viruses, periodontitis, and comorbidities [J]. Periodontol 2000, 2022, 89(1): 190–206.
 - [15] SUN H Y, JIANG H, DU M Q, et al. The prevalence and associated factors of periodontal disease among 35 to 44-year-old Chinese adults in the 4th national oral health survey [J]. Chin J Dent Res, 2018, 21(4): 241–247.
 - [16] SUN H, DU M, TAI B, et al. Prevalence and associated factors of periodontal conditions among 55- to 74-year-old adults in China: results from the 4th National Oral Health Survey [J]. Clin Oral Investig, 2020, 24(12): 4403–4412.
 - [17] YOST S, DURAN-PINEDO A E, TELES R, et al. Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis [J]. Genome Med, 2015, 7(1): 27.
 - [18] YAN Y, ZHAN Y, WANG X, et al. Clinical evaluation of ultrasonic subgingival debridement versus ultrasonic subgingival scaling combined with manual root planing in the treatment of periodontitis: study protocol for a randomized controlled trial [J]. Trials, 2020, 21(1): 113.
 - [19] MITHAIWALA M N, SANTANA-COELHO D, PORTER G A, et al. Neuroinflammation and the kynurenine pathway in CNS disease: molecular mechanisms and therapeutic implications [J]. Cells, 2021, 10(6): 1548.
 - [20] 刘珂珂, 胡韶光, 吕代雨, 等. 结扎诱导牙周炎大鼠脑内炎性及 β 淀粉样蛋白变化的实验研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(7): 1048–1053.
 - LIU K K, HU S G, LYU D Y, et al. Changes of inflammatory and β -amyloid in the brain of rats with periodontitis induced by ligation [J]. Acta Univ Med Anhui, 2022, 57(7): 1048–1053.
 - [21] WANG R P, HUANG J, CHAN K W Y, et al. IL-1 β and TNF- α play an important role in modulating the risk of periodontitis and Alzheimer's disease [J]. J Neuroinflammation, 2023, 20(1): 71.
 - [22] TANG Z, LIANG D, CHENG M, et al. Effects of *Porphyromonas gingivalis* and its underlying mechanisms on Alzheimer-like tau hyperphosphorylation in Sprague-Dawley rats [J]. J Mol Neurosci, 2021, 71(1): 89–100.
 - [23] WU L, SU X, TANG Z, et al. *Treponema denticola* induces neuronal apoptosis by promoting amyloid- β accumulation in mice [J]. Pathogens, 2022, 11(10): 1150.
 - [24] YAN C, DIAO Q, ZHAO Y, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection-induced neurodegeneration and abnormal gut microbiota composition in Alzheimer's disease-like rats [J]. Front Neurosci, 2022, 16: 884543.
 - [25] ZHANG J, YU C, ZHANG X, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces cognitive dysfunction, mediated by neuronal inflammation via activation of the TLR4 signaling pathway in C57BL/6 mice [J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 37.
 - [26] WU Z, NI J, LIU Y, et al. Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in mice [J]. Brain Behav Immun, 2017, 65: 350–361.
 - [27] HADITSCH U, ROTH T, RODRIGUEZ L, et al. Alzheimer's disease-like neurodegeneration in *Porphyromonas gingivalis* infected neurons with persistent expression of active gingipains [J]. J Alzheimers Dis, 2020, 75(4): 1361–1376.
 - [28] LIU Y, WU Z, NAKANISHI Y, et al. Infection of microglia with *Porphyromonas gingivalis* promotes cell migration and an inflammatory response through the gingipain-mediated activation of protease-activated receptor-2 in mice [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 11759.
 - [29] DÍAZ-ZÚÑIGA J, MORE J, MELGAR-RODRÍGUEZ S, et al. Alzheimer's disease-like pathology triggered by *Porphyromonas gingivalis* in wild type rats is serotype dependent [J]. Front Immunol, 2020, 11: 588036.
 - [30] GONG T, CHEN Q, MAO H, et al. Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* trigger NLRP3 inflammasome and induce neuroinflammation, tau phosphorylation, and memory dysfunction in mice [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 925435.
 - [31] YAMADA C, AKKAOUI J, HO A, et al. Potential role of phosphoglycerol dihydroceramide produced by periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Front Immunol, 2020, 11: 591571.
 - [32] SANSORES-ESPAÑA D, CARRILLO-AVILA A, MELGAR-RODRIGUEZ S et al. Periodontitis and alzheimer's disease [J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2021, 26(1): e43–e48.
 - [33] NONAKA S, KADOWAKI T, NAKANISHI H. Secreted gingipains from *Porphyromonas gingivalis* increase permeability in human cerebral microvascular endothelial cells through intracellular degradation of tight junction proteins [J]. Neurochem Int, 2022, 154: 105282.
 - [34] FURUTAMA D, MATSUDA S, YAMAWAKI Y, et al. IL-6 induced by periodontal inflammation causes neuroinflammation and disrupts the blood-brain barrier [J]. Brain Sci, 2020, 10(10): 679.
 - [35] RANJAN R, ABHINAY A, MISHRA M. Can oral microbial infections be a risk factor for neurodegeneration? A review of the literature [J]. Neurol India, 2018, 66(2): 344–351.
 - [36] WELLER R O, SHARP M M, CHRISTODOULIDES M, et al. The meninges as barriers and facilitators for the movement of

- fluid, cells and pathogens related to the rodent and human CNS [J]. *Acta Neuropathol*, 2018, 135(3): 363-385.
- [37] LIU Y, WU Z, ZHANG X, et al. Leptomeningeal cells transduce peripheral macrophages inflammatory signal to microglia in reponse to *Porphyromonas gingivalis* LPS [J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 407562.
- [38] D'MELLO C, SWAIN M G. Immune-to-brain communication pathways in inflammation-associated sickness and depression [J]. *Curr Top Behav Neurosci*, 2017, 31: 73-94.
- [39] LI R, WANG J, XIONG W, et al. The oral-brain axis: can periodontal pathogens trigger the onset and progression of Alzheimer's disease? [J]. *Front Microbiol*, 2024, 15: 1358179.
- [40] PISANI F, PISANI V, ARCANGELI F, et al. The mechanistic pathways of periodontal pathogens entering the brain: the potential role of *Treponema denticola* in tracing Alzheimer's disease pathology [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(15): 9386.
- [41] RIVIERE G R, RIVIERE K H, SMITH K S. Molecular and immunological evidence of oral *Treponema* in the human brain and their association with Alzheimer's disease [J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2002, 17(2): 113-118.
- [42] HA J Y, SEOK J, KIM S J, et al. Periodontitis promotes bacterial extracellular vesicle-induced neuroinflammation in the brain and trigeminal ganglion [J]. *PLoS Pathog*, 2023, 19(10): e1011743.
- [43] 边梦瑶, 陈莉丽, 雷利红. 慢性牙周炎与帕金森病相关性的研究进展 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2022, 51(1): 108-114.
- BIAN M Y, CHEN L L, LEI L H. Research progress on the relationship between chronic periodontitis and Parkinson's disease [J]. *J Zhejiang Univ Med Sci*, 2022, 51(1): 108-114.
- [44] SUDA K, MATSUDA K. How microbes affect depression: underlying mechanisms via the gut-brain axis and the modulating role of probiotics [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1172.
- [45] HAN Y, WANG B, GAO H, et al. Insight into the relationship between oral microbiota and the inflammatory bowel disease [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(9): 1868.
- [46] LU J, ZHANG S, HUANG Y, et al. Periodontitis-related salivary microbiota aggravates Alzheimer's disease via gut-brain axis crosstalk [J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2126272.
- [47] XUE L, ZOU X, YANG X Q, et al. Chronic periodontitis induces microbiota-gut-brain axis disorders and cognitive impairment in mice [J]. *Exp Neurol*, 2020, 326: 113176.
- [48] MAGOLD A I, SWARTZ M A. Pathogenic exploitation of lymphatic vessels [J]. *Cells*, 2022, 11(6): 979.
- [49] LOUVEAU A. Cerebral lymphatic drainage: implication in the brain immune privilege [J]. *Med Sci*, 2015, 31(11): 953-956.
- [50] LOUVEAU A, SMIRNOV I, KEYES T J, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels [J]. *Nature*, 2015, 523(7560): 337-341.
- [51] TANAKA T, KAI S, MATSUYAMA T, et al. General anesthetics inhibit LPS-induced IL-1 β expression in glial cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82930.
- [52] QIU C, YUAN Z, HE Z, et al. Lipopolysaccharide preparation derived from *Porphyromonas gingivalis* induces a weaker Immuno-inflammatory response in BV-2 microglial cells than *Escherichia coli* by differentially activating TLR2/4-mediated NF- κ B/STAT3 signaling pathways [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 606986.
- [53] HAO X, LI Z, LI W, et al. Periodontal infection aggravates C1q-mediated microglial activation and synapse pruning in Alzheimer's mice [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 816640.
- [54] CHANG E E S, HO P W, LIU H F, et al. LRRK2 mutant knock-in mouse models: therapeutic relevance in Parkinson's disease [J]. *Transl Neurodegener*, 2022, 11(1): 10.
- [55] FENG Y K, WU Q L, PENG Y W, et al. Oral *P. gingivalis* impairs gut permeability and mediates immune responses associated with neurodegeneration in LRRK2 R1441G mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 347.
- [56] CAMPOS-ACUÑA J, ELGUETA D, PACHECO R. T-cell-driven inflammation as a mediator of the gut-brain axis involved in Parkinson's disease [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 239.
- [57] ZHANG X, ZHANG X, QIU C, et al. The imbalance of Th17/Treg via STAT3 activation modulates cognitive impairment in *P. gingivalis* LPS-induced periodontitis mice [J]. *J Leukoc Biol*, 2021, 110(3): 511-524.
- [58] FU J, WU H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation [J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 301-316.
- [59] 杜灿, 武洲, 朱爱琴. 高原慢性低氧环境慢性牙周炎与阿尔茨海默病的相关性 [J]. *中华老年医学杂志*, 2015, 34(4): 452-454.
- DU C, WU Z, ZHU A Q. The correlation of Alzheimer disease and chronic periodontitis in chronic hypoxia environment at plateau [J]. *Chin J Geriatr*, 2015, 34(4): 452-454.
- [60] 肖娴, 张纲, 李焰, 等. 驻高原和平原官兵口腔健康状况调查 [J]. *解放军预防医学杂志*, 2010, 28(1): 40-41.
- XIAO X, ZHANG G, LI Y, et al. Investigation on oral health status of officers and men stationed in plateau and plain [J]. *J Prev Med Chin People's Liberation Army*, 2010, 28(1): 40-41.
- [61] WU Z, ZHANG R, CHENG L, et al. The correlation of altitude with gingival status among adolescents in Western China: a cross-sectional study [J]. *Environ Geochem Health*, 2021, 43(8): 3151-3167.
- [62] 余建祯, 冯帆, 周兴田, 等. 驻高原与驻平原空军官兵口腔健康现状调查 [J]. *西南军医*, 2016, 18(2): 101-103.
- SHE J Z, FENG F, ZHOU X T, et al. Oral health status of air force personnel on plateau and on plain [J]. *J Mil Surg Southwest China*, 2016, 18(2): 101-103.
- [63] 李燕, 张羽涛, 刘倩雯, 等. 高原地区牙周炎患者血清内脂

- 素和瘦素水平的检测分析 [J]. 口腔医学, 2022, 42(1): 58-61.
- LI Y, ZHANG Y T, LIU Q W, et al. Serum visfatin and leptin levels and their associations with periodontal indexes in patients with periodontitis in plateau section [J]. Stomatology, 2022, 42(1): 58-61.
- [64] 武曦, 黄镜静, 张纲, 等. 模拟高原低氧兔牙周炎模型血清和牙龈组织中 sICAM-1 及 sVCAM-1 的含量 [J]. 实用口腔医学杂志, 2012, 28(2): 178-181.
- WU X, HUANG J J, ZHANG G, et al. sICAM-1 and sVCAM-1 levels in blood serum and gingival tissues in rabbits with periodontitis in analogic high altitude anoxia environment [J]. J Pract Stomatol, 2012, 28(2): 178-181.
- [65] 武曦, 黄镜静, 张纲, 等. 高原低氧环境对兔牙周炎模型血清和牙龈组织中超氧化物歧化酶活力的影响 [J]. 华西口腔医学杂志, 2012, 30(3): 247-250.
- WU X, HUANG J J, ZHANG G, et al. Effects of the activity of superoxide dismutase in blood serum and gingival tissues of rabbit in periodontitis model after hypoxia exposure at high altitude [J]. West China J Stomatol, 2012, 30(3): 247-250.
- [66] 张丹丹, 许晓虎. 牙周炎大鼠 MMP-2、BGP 及炎症细胞因子的表达特点及低氧对于相关因子的影响 [J]. 医学研究杂志, 2018, 47(6): 176-179.
- ZHANG D D, XU X H. Effect of hypoxia on periodontitis and the effect of MMP-2, BGP and inflammatory cytokines [J]. J Med Res, 2018, 47(6): 176-179.
- [67] 周霞, 刘鲁川, 孔耀, 等. 模拟高原条件下牙周炎动物模型龈沟液中 C-反应蛋白的变化 [J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(2): 107-110.
- ZHOU X, LIU L C, KONG Y, et al. Gingival crevicular fluid C-reactive protein level in periodontitis rats living in simulated plateau-condition [J]. J Army Med Univ, 2010, 32(2): 107-110.
- [68] 孔耀, 刘鲁川, 周霞, 等. 模拟高原缺氧对慢性牙周炎大鼠血清中 MMP-2 表达的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(4): 324-326.
- KONG Y, LIU L C, ZHOU X, et al. Effect of simulated high altitude hypoxia on matrix metalloproteinase-2 expression in serum of rats with chronic periodontitis [J]. J Army Med Univ, 2010, 32(4): 324-326.
- [69] 孔耀, 刘鲁川, 周霞, 等. 模拟高原缺氧对慢性牙周炎大鼠血清中 MMP-3 含量变化的影响 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2009, 19(12): 677-680, 725.
- KONG Y, LIU L C, ZHOU X, et al. Effect of the level of MMP-3 in serum of chronic periodontitis model in rat exposed to hypoxia simulating high altitude [J]. Chin J Conservative Dent, 2009, 19(12): 677-680, 725.
- [70] 黄镜静, 武曦, 张纲, 等. 模拟高原低氧环境对牙龈卟啉单胞菌的影响 [J]. 解放军医学杂志, 2012, 37(4): 375-378.
- HUANG J J, WU X, ZHANG G, et al. Effect of simulated high-altitude hypoxia on *Porphyromonas gingivalis* [J]. Med J Chin People's Liberation Army, 2012, 37(4): 375-378.
- [71] 李森, 张文瑾, 王思凡, 等. 甘肃省高原环境中人群牙周菌群研究 [J]. 兰州大学学报(医学版), 2022, 48(10): 52-56.
- LI M, ZHANG W J, WANG S F, et al. Analysis of periodontal flora in plateau environment of Gansu Province [J]. J Lanzhou Univ Med Sci, 2022, 48(10): 52-56.
- [72] HOW K Y, SONG K P, CHAN K G. *Porphyromonas gingivalis*: an overview of periodontopathic pathogen below the gum line [J]. Front Microbiol, 2016, 7: 53.
- [73] LI C, LI X, LIU J, et al. Investigation of the differences between the Tibetan and Han populations in the hemoglobin-oxygen affinity of red blood cells and in the adaptation to high-altitude environments [J]. Hematology, 2018, 23(5): 309-313.
- [74] 武曦, 张纲, 谭颖徽. 高原低氧环境下牙周炎的发病机制 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(13): 2587-2589, 2593.
- WU X, ZHANG G, TAN Y H. Pathogenesis of periodontitis in Anoxia and high altitude environment [J]. Prog Mod Biomed, 2011, 11(13): 2587-2589, 2593.
- [75] 萧智利. 低氧诱导 HIF1 α 抑制 hPDLcs 生物学活性及牙周炎组织中差异表达 LncRNA 的筛选 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2019.
- XIAO Z L. Hypoxia-induced HIF-1 α inhibits the biological activity of hPDLcs and screening the differentially expressed LncRNA in periodontitis tissues [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2019.
- [76] BASSANI B, CUCCHIARA M, BUTERA A, et al. Neutrophils' contribution to periodontitis and periodontitis-associated cardiovascular diseases [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(20): 15370.
- [77] 何雪娇, 蒋俊强, 罗勇军. 高原地理环境与牙周炎的关系研究进展 [J]. 国外医学(医学地理分册), 2015, 36(2): 102-104.
- HE X J, JIANG J Q, LUO Y J. Research progress in the relationship between plateau geographical environment and periodontitis [J]. Foreign Med Sci Sect Medgeogr, 2015, 36(2): 102-104.
- [78] 赵婷婷. 高原地区藏族中老年牙周炎与认知功能障碍相关性研究 [D]. 西宁: 青海大学, 2019.
- ZHAO T T. Correlation between periodontitis and cognitive dysfunction in Tibetan middle-aged and elderly people in plateau area [D]. Xining: Qinghai University, 2019.
- [79] CANO SIERRA J D, MESTRA C F, NIETO J C G, et al. Teeth infection may "shunt" through Fontan in high-altitude conditions [J]. Ann Transl Med, 2018, 6(7): 118.

史阳琳, 杨建雅, 常晴晴, 等. 铁死亡在脓毒症急性肺损伤中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(6): 127-134.
Shi YL, Yang JY, Chang QQ, et al. Research progress in the role of ferroptosis in sepsis-associated acute lung injury [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 127-134.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.017

铁死亡在脓毒症急性肺损伤中的研究进展

史阳琳^{1,2}, 杨建雅^{1,2}, 常晴晴², 王倩倩², 王明航^{1,2}, 李素云^{1,2*}

(1.河南中医药大学第一附属医院呼吸科, 郑州 450000; 2.河南中医药大学
呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心 河南省中医药防治呼吸病重点实验室, 郑州 450046)

【摘要】 脓毒症是由于宿主对感染的反应失调而导致的危及生命的器官功能障碍, 死亡率极高, 其是导致急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 的主要危险因素, 然而脓毒症 ALI 的病理生理学和发病机制尚不完全清楚, 有效药物极为有限。因此, 当务之急是挖掘脓毒症 ALI 的发病机制, 并试图发现有效的干预措施, 以改善脓毒症 ALI 患者的预后。近年来, 铁死亡被认为与脓毒症 ALI 的病理生理过程密切相关, 抑制相关细胞铁死亡可有效延缓疾病的发生发展。本文对靶向相关细胞铁死亡的治疗策略进行综述, 以期对脓毒症 ALI 铁死亡相关研究提供借鉴并为脓毒症 ALI 的治疗提供新的视角。

【关键词】 脓毒症; 急性肺损伤; 铁死亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0127-08

Research progress in the role of ferroptosis in sepsis-associated acute lung injury

SHI Yanglin^{1,2}, YANG Jianya^{1,2}, CHANG Qingqing², WANG Qianqian², WANG Minghang^{1,2}, LI Suyun^{1,2*}

(1. Respiratory Department of the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China. 2. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases Co-constructed by Henan Province & Education Ministry of P. R. China/Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

【Abstract】 Sepsis is defined as a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection with an extremely high mortality rate, and it is the main risk factor for acute lung injury (ALI). However, the pathophysiology and pathogenesis of sepsis-associated ALI are not fully understood, and effective drugs are extremely limited. Therefore, it is urgent that we explore the pathogenesis of sepsis-associated ALI and attempt to discover effective intervention measures to improve the prognosis of sepsis-associated ALI patients. In recent years, ferroptosis has been considered closely related to the pathological and physiological processes of sepsis-associated ALI, and inhibiting related cell ferroptosis can effectively slow down the occurrence and development of the disease. In this paper, therapeutic strategies targeting ferroptosis in related cells are reviewed to provide a reference for future research on ferroptosis in sepsis-associated ALI and provide a new perspective on potential treatments.

【基金项目】 国家自然科学基金 (82374416); 河南省卫生健康委国家中医临床研究基地科研专项 (2022JDZX124); 国家中医药管理局中医药防治新型冠状病毒感染应急专项 (2023ZYLCYJ02-14); 河南省中医药科学研究专项 (2023ZYD03); 河南省呼吸疾病临床医学研究中心资助 (豫科 (2020) 158 号)。

【作者简介】 史阳琳 (1991—), 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 呼吸与危重症疾病的临床与基础研究。E-mail: syl_hnjy@126.com

【通信作者】 李素云 (1965—), 女, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 中医药防治呼吸系统疾病。E-mail: suyunli2000@126.com

[Keywords] sepsis; acute lung injury; ferroptosis

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

脓毒症是由于宿主对感染的反应失调而导致的危及生命的器官功能障碍^[1],是导致急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的主要危险因素,在多器官功能障碍阶段,肺部极易受到损伤^[2],超 40% 的脓毒症患者患有 ALI^[3]。脓毒症发生时肺毛细血管内皮损伤,血管通透性增加,大量富含蛋白质的渗出液破坏肺上皮细胞屏障并在肺泡内积聚,使有效通气减少,导致顽固性低氧血症,此即 ALI^[4]。我国的一项流行病学调查显示,44 个重症监护病房的 2322 例脓毒症患者 90 d 病死率高达 35.5%,而其中 68.2% 的脓毒症患者合并 ALI^[5]。然而目前针对脓毒症 ALI 的临床治疗主要仍以支持治疗为主,如呼吸支持(无创/有创/俯卧位通气)、体外膜肺氧合治疗等为主,强调基础疾病治疗或病因治疗,给社会带来沉重经济负担^[6]。另外脓毒症 ALI 的病理生理学和发病机制尚不完全清楚,有效药物极为有限^[7]。因此,当务之急是挖掘脓毒症 ALI 的发病机制,并试图发现有效的干预措施,以改善脓毒症 ALI 患者的预后。

铁死亡(ferroptosis)于 2012 年首次被发现,作为一种新的细胞死亡方式而受到广泛关注。铁死亡的发生是因为细胞内铁蓄积、氧化应激、脂质过氧化反应,引起铁依赖性的线粒体损伤以及产生过多的脂质氧化物造成铁死亡抑制剂耗尽,最终导致细胞死亡^[8]。本文着重对脓毒症 ALI 铁死亡相关研究进行综述,以期对脓毒症 ALI 防治药物的开发提供新视角和新靶点。

1 铁死亡的发生过程

铁死亡是一种依赖于铁和活性氧(reactive oxygen species, ROS)的细胞死亡途径,形态学方面以线粒体皱缩、嵴减少或消失、膜密度增加、完整性被破坏为特点;生化特点即为铁和活性氧的积累^[9]。其机制主要涉及铁代谢紊乱、脂质过氧化物积累和抗氧化能力的下降。

1.1 铁代谢紊乱

铁离子在铁死亡中扮演重要角色,铁离子的氧化还原过程影响细胞对铁死亡的敏感性^[10]。血液中的 Fe^{3+} 与转铁蛋白结合并运输,通过转铁蛋白受体 1(transferrin receptor protein 1, TFR1)进入细胞后被还原并释放到胞质的不稳定铁池(labile iron

pool, LIP)中。由于 Fe^{2+} 的不稳定性和高反应活性,极易与 H_2O_2 发生芬顿反应(Fenton reaction)生成羟基自由基,羟基自由基可直接与细胞膜中的多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)反应,产生大量脂质 ROS,导致细胞铁死亡^[11]。

1.2 脂质过氧化物积累

脂质过氧化被视为铁死亡的驱动信号^[12]。游离 PUFA 是合成脂质信号递质的底物,由于其不稳定的碳-碳双键结构极易发生脂质过氧化。酶酰基辅酶 A 合成酶长链 4(acly-CoA synthetase long chain family 4, ACSL4)能够协助将 PUFA 整合到磷脂上,携带有 PUFA 的磷脂继续被氧化成有毒的脂质过氧化物,造成生物膜结构的改变,最终导致细胞铁死亡^[13]。丙二醛(malonaldehyde, MDA)和 4-羟基壬烯酸(4-hydroxynonenal, HNE)是两个强毒力的脂质过氧化终产物,在 ROS 氧化生物膜发生脂质过氧化过程中形成,加剧膜损伤,常常被用作反映细胞膜脂质过氧化的程度^[14]。

1.3 抗氧化能力下降

胱氨酸/谷氨酸反向转运体(System Xc-)作为主要的抗氧化体系,由溶质载体家族 3 成员 2(solute carrier family 3 member 2, SLC3A2)和 SLC7A11 二聚体组成,嵌于细胞膜表面。其中 SLC7A11 负责主要的转运活性,用胞内谷氨酸来换取胞外的胱氨酸,胱氨酸是谷胱甘肽(glutathione, GSH)合成的原料^[15]。谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)作为一种抗氧化酶,将磷脂过氧化氢(PL-OOH)还原为无毒的磷脂羟基衍生物(PL-OH),保护细胞免受脂质过氧化的伤害^[16]。而 GSH 是 GPX4 发挥活性的必须辅助因子,其以直接或酶促方式与 ROS 等反应,被氧化成谷胱甘肽二硫化物(GSSG)。当 GSH 生成受抑制,GPX4 活性下降,细胞抗氧化能力降低,使过氧化的脂质不能被 GPX4 消耗,PUFA 过氧化,ROS 聚集,催化脂质过氧化物堆积,细胞膜破裂,最终导致细胞铁死亡^[9]。铁死亡过程复杂,经上述文献梳理,绘制图 1,以期后续相关研究提供借鉴。

2 调节脓毒症 ALI 相关细胞铁死亡

ALI 病理过程中肺毛细血管内皮损伤,血管通透性增加,大量富含蛋白质的渗出液破坏肺上皮细

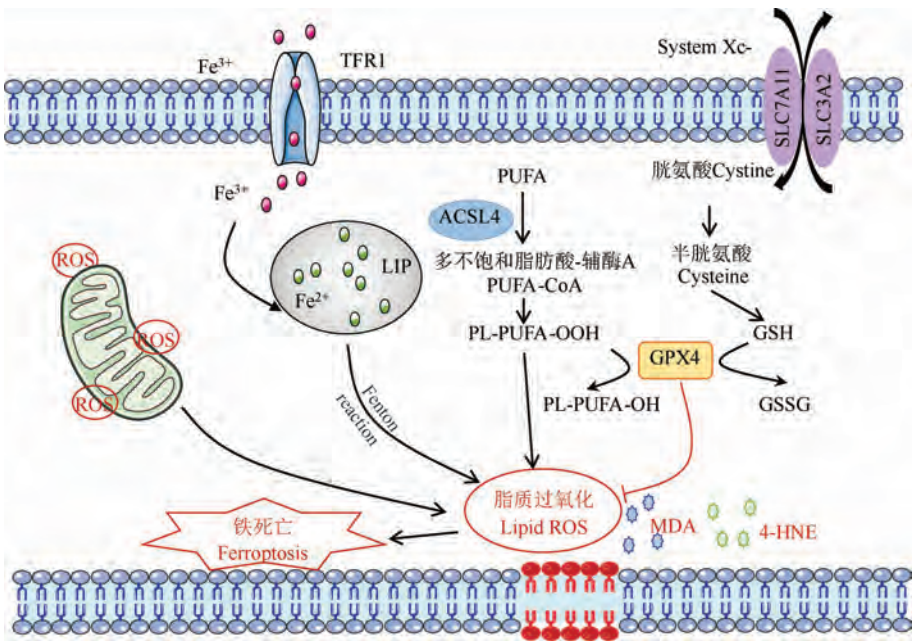


图 1 铁死亡过程示意图
Figure 1 Diagram of ferroptosis

胞屏障并在肺泡内积聚,使有效通气减少,最终导致顽固性低氧血症^[4]。而稳态条件下,肺泡巨噬细胞是人类和小鼠肺泡中的主要免疫细胞,占比 90% 以上^[17]。在 ALI 过程中,肺泡巨噬细胞协调炎症发生发展及消退,起核心作用^[18]。因此本研究重点关注肺微血管内皮细胞、上皮细胞和肺泡巨噬细胞的铁死亡情况。

2.1 抑制微血管内皮细胞铁死亡

肺微血管内皮细胞 (pulmonary microvascular endothelial cells, PMVECs) 受损导致血管通透性增加,在脓毒症中 PMVECs 损伤和屏障功能障碍导致富含蛋白的水肿液和循环中中性粒细胞渗漏到肺间质和肺泡间隙加重 ALI。有研究称来自干细胞的外泌体不仅可以促进受损组织的修复和再生,还可以抑制炎症,对一系列炎症性疾病 (如脓毒症) 发挥保护作用^[19]。脂肪源性干细胞外泌体 miR-125b-5p 即可通过调节 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein1, Keap1)/核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)/GPX4 轴抑制了脓毒症 ALI 时的肺微血管内皮细胞铁死亡^[20]。另外环状 RNA (circular RNAs, CircRNAs) 表达失调已被证实与脓毒症早期炎症反应、免疫抑制和凝血功能障碍有关,这种失调会最终导致多器官功能障碍^[21]。如 CircEXOC5 可以通过与 RNA 结合蛋白多聚嘧啶区结合蛋白 1 (polyrimidine tract binding protein 1, PTBP1) 结合,增强靶基因 ACSL4

的稳定性,并上调其表达,从而促进肺微血管内皮细胞铁死亡,加重脓毒症 ALI^[22]。前列腺六段跨膜上皮抗原 (six-segment transmembrane epithelial antigen of prostate, STEAP) 家族属于跨膜蛋白,其在细胞与细胞之间的通讯方面起着重要作用。有研究发现 STEAP1 在脓毒症 ALI 模型中表达升高,而抑制 STEAP1 可增加 SLC7A11 和 GPX4 的表达,从而减少脂质过氧化,抑制人肺微血管内皮细胞铁死亡减轻脓毒症 ALI^[23]。综上提示我们可从抑制肺微血管内皮细胞铁死亡出发,继续深入探索防治脓毒症 ALI 的新途径。

2.2 抑制上皮细胞铁死亡

肺上皮细胞是肺结构和功能的基础,脓毒症 ALI 时肺上皮细胞发生铁死亡,肺组织严重破坏,呼吸功能严重受损。相关研究以小鼠肺上皮细胞株 MLE-12 细胞和盲肠结扎穿刺法制备的动物模型为研究对象,证实 GPX4 的 m6A 修饰可以降低 GPX4 水平从而促进了脓毒症诱导的 MLE-12 细胞凋亡和脓毒症小鼠 ALI 过程中的铁死亡^[24];Yes 相关蛋白 1 (Yes-associated protein 1, YAP1) 作为 Hippo 通路重要的下游效应因子,在气道、支气管平滑肌细胞和肺组织上皮细胞中广泛表达,Zhang 等^[25]的研究表明 YAP1 可以通过抑制肺上皮细胞中铁自噬介导的铁死亡,从而减轻脓毒症 ALI;另外前期已被证实可减轻 ALI 小鼠的炎症级联反应的阿魏酸^[26],经研究发现,可通过激活 Nrf2/血红素加氧酶-1 (heme

oxygenase-1, HO-1) 通路抑制铁死亡来缓解脓毒症诱导的 ALI 中的肺泡上皮屏障功能障碍^[3]。目前研究的热点分子富含 AU 元件的 RNA 结合因子 1 (AU-rich element-RNA binding factor 1, AUF1) 不仅可抑制炎症反应和减轻脓毒症相关症状^[27], 还可通过正向调节 Nrf2 和负向调节激活转录因子 3 (activation transcription factor 3, ATF3) 抑制肺泡上皮细胞铁死亡来减轻脓毒症 ALI^[28]。PCTRI (protectin conjugates in tissue regeneration 1) 是保护素家族的成员, 是一种特异性的消炎调节剂, 可促进炎症消退, 加速组织修复^[29], 同样有研究表明 PCTRI 可能通过激活 ALX (lipoxin A4)/蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)/cAMP 反应元件结合蛋白 (cyclic-AMP response binding protein, CREB) 通路抑制 ALI 中肺上皮细胞的铁死亡^[30]。上述研究提示, 以肺上皮细胞铁死亡通路为调节靶点, 有可能成为控制脓毒症 ALI 发生及发展的有效治疗途径。

2.3 抑制巨噬细胞铁死亡

巨噬细胞是肺部最主要的免疫细胞之一, 在脓毒症 ALI 中起着至关重要的作用。脓毒症模型中巨噬细胞被募集和活化释放促炎细胞因子, 并同时诱导中性粒细胞浸润, 进一步加重炎症、破坏内皮屏障、阻塞肺微循环, 加剧肺损伤^[31]。衣康酸是近年来在巨噬细胞中发现的具有显著抗炎活性的小分子代谢物, 已被证实广泛参与免疫调节、氧化应激和脂质过氧化过程。较新的研究也表明衣康酸还可通过 Nrf2 途径抑制巨噬细胞铁死亡改善脓毒症 ALI^[32]。尿苷是一种嘧啶核苷, 是人体血液中最丰富的核苷, 近些年研究报道了其抗炎^[33]、抗纤维化^[34]、抗氧化^[35]和抗衰老^[36]的功能。研究还报道了尿苷可通过激活 Nrf2 通路和抑制 ACSL4 表达从而抑制巨噬细胞铁死亡改善脓毒症 ALI^[37]。H₂S 是一种生理气体可自由穿过细胞膜, 其作为信号分子独立于任何特定的转运蛋白起作用。有研究称 H₂S 可调节微生物的各种生理功能, 包括炎症、线粒体功能、氧化应激、内质网应激、神经保护和血管舒张等^[38]。在铁死亡相关研究中 H₂S 通过阻断哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号传导抑制巨噬细胞铁死亡并刺激细胞自噬减弱脓毒症 ALI^[39]。因此抑制巨噬细胞铁死亡或将成为调节脓毒症 ALI 新的治疗靶点。

目前已证实脓毒症 ALI 的发生与多种细胞的铁

死亡密切相关, 以上皮细胞、微血管内皮细胞及巨噬细胞的破坏最为常见 (表 1), 抑制铁死亡的治疗方法在脓毒症 ALI 的治疗中发挥潜在作用。

3 细胞死亡之间的串扰

细胞死亡分坏死和程序性细胞死亡。坏死是一种非程序性细胞死亡形式, 通常由创伤性损伤引起; 程序性细胞死亡是一种受基因调控的细胞死亡, 其不仅对机体的生长发育及组织器官的稳态具有重要作用, 还参与了多种病理过程。长久以来, 各种细胞死亡途径一直被认为是并行运作几无重叠的, 然而目前越来越多的证据强调它们之间存在广泛的串扰, 并且可以相互交叉调节^[40]。

新的细胞死亡形式不断被发现, 凋亡、焦亡、坏死性凋亡、自噬、铁死亡、铜死亡、泛凋亡等^[41]。随着泛凋亡被报道, 细胞死亡之间的串扰机制也相应被不断揭开^[42]。泛凋亡是一种炎症性程序细胞死亡, 受到泛凋亡小体复合物的调控, 具有细胞焦亡、凋亡和 (或) 坏死性凋亡的关键特征, 且不被其中任意一种死亡方式单独表征^[43]。细胞凋亡、自噬和铁死亡以 ROS 介导的脂质过氧化为中枢环节相互串扰影响疾病发生发展^[44]。在二氧化硅诱导的矽肺纤维化病理过程中, 细胞自噬、凋亡和焦亡相互串扰, Bcl-2 蛋白、NLRP3 炎症小体或是其发生串扰的关键分子^[45]。铁和铜作为人体重要的微量元素, 他们对于维持身体机能至关重要, 在慢性肾病的研究中, 铁死亡和铜死亡或可通过 ROS 的积累导致线粒体损伤发生相互串扰导致疾病进展^[46]。在急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 疾病过程中, 铁死亡、焦亡和坏死性凋亡之间相互高度关联, 相互补偿以促进细胞死亡, 促进疾病发生发展^[47]。在脓毒症 ALI 的研究中, 小鼠模型不仅表现出脂质过氧化损伤、铁含量和肺前列腺素内过氧化物合成酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2) 蛋白表达增加、GPX4 蛋白表达降低, 还表现出 NLRP3 炎症小体的增多和焦亡相关蛋白的表达, 由此可见在此过程中铁死亡和焦亡相互串扰, 而上述过程可被线粒体醛脱氢酶 2 所逆转^[48]。

细胞死亡之间的相互串扰机制将在未来的研究中不断明了, 而阐明何时以及如何使用治疗策略调节其串扰的中心环节, 同时阻断多种死亡方式的启动, 将成为未来研究中的重中之重。

表 1 脓毒症急性肺损伤的治疗靶点-抑制铁死亡
Table 1 Therapeutic target of sepsis-associated acute lung injury-inhibit ferroptosis

干预化合物/方式 Interventional compounds/methods	损伤细胞类型 Damaged cell types	机制 Mechanism	指标监测及变化 Indicators monitoring and changes
微小 RNA-125b-5p ^[20] miR-125b-5p	肺微血管内皮细胞 Pulmonary microvascular endothelial cells	Kelch 样 ECH 相关蛋白 1/核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 Keap1/Nrf2/HO-1	死亡率↓;肺组织干湿比重↓;肺组织病理损伤评分↓;谷胱甘肽过氧化物酶 4↑;谷胱甘肽↑;活性氧↓;丙二醛↓;4-羟基壬烯酸↓;超氧化物歧化酶↑;过氧化氢酶↑;核因子 E2 相关因子 2↑;血红素加氧酶-1↑;Kelch 样 ECH 相关蛋白 1↓;铁离子还原抗氧化能力↑;线粒体膜电位↑
			Mortality↓;Lung wet/dry weight ratio↓;Lung injury score↓;GPX4↑;GSH↑;ROS↓;MDA↓;4-HNE↓;SOD↑;CAT↑;Nrf2↑;HO-1↑;Keap1↓;FRAP↑;MMP↑
敲除环状 RNA EXOC5 ^[22] Knock down circEXOC5	微血管内皮细胞 Microvascular endothelial cells	多聚嘧啶区结合蛋白 1/酶酰基辅酶 A 合成酶长链 4 PTBP1/ACSL4	死亡率↓;肺组织病理损伤↓;细胞活力↑;谷胱甘肽过氧化物酶 4↑;活性氧↓;Fe ²⁺ ↓;丙二醛↓;4-羟基壬烯酸↓;酶酰基辅酶 A 合成酶长链 4↓;多聚嘧啶区结合蛋白 1↓
			Mortality↓;Lung injury↓;Cell viability↑;GPX4↑;ROS↓;Fe ²⁺ ↓;MDA↓;4-HNE↓;ACSL4↓;PTBP1↓
抑制前列腺六段跨膜上皮抗原 1 ^[23] Inhibit six-segment transmembrane epithelial antigen of prostate 1	肺微血管内皮细胞 Pulmonary microvascular endothelial cells	溶质转运家族 7A11/谷胱甘肽过氧化物酶 4 SLC7A11/GPX4	细胞活力↑;线粒体损伤↓;白介素-1β↓;白介素-6↓;细胞间黏附分子 1↓;谷胱甘肽过氧化物酶 4↑;谷胱甘肽↑;Fe ²⁺ ↓;活性氧↓;丙二醛↓;核因子 E2 相关因子 2↑;溶质转运家族 7A11↑
			Cell viability↑;Mitochondria injury↓;IL-1β↓;IL-6↓;ICAM-1↓;GPX4↑;GSH↑;Fe ²⁺ ↓;ROS↓;MDA↓;Nrf2↑;SLC7A11↑
谷胱甘肽过氧化物酶 4 ^[24] Glutathione peroxidase 4	肺上皮细胞 Lung epithelial cells	GPX4 的 m ⁶ A 修饰 GPX4 m ⁶ A modification	细胞活力↑;活性氧↓;Fe ²⁺ ↓;肺组织病理损伤;谷胱甘肽过氧化物酶 4;谷胱甘肽;丙二醛
			Cell viability↑;ROS↓;Fe ²⁺ ↓;Lung injury;GPX4;GSH;MDA
Yes 相关蛋白 1 ^[25] Yes-associated protein 1	肺上皮细胞 Lung epithelial cells	铁蛋白自噬 Ferritinophagy	肺组织病理损伤↓;细胞活力↑;线粒体损伤↓;谷胱甘肽过氧化物酶 4↑;谷胱甘肽↑;Fe ²⁺ ↓;铁蛋白重链 1↑;丙二醛↓;活性氧↓;酶酰基辅酶 A 合成酶长链 4↓;溶质转运家族 7A11↑;线粒体铁离子转运蛋白↓;核受体共激活因子 4↓
			Lung injury↓;Cell viability↑;Mitochondria injury↓;GPX4↑;GSH↑;Fe ²⁺ ↓;FTH1↑;MDA↓;ROS↓;ACSL4↓;SLC7A11↑;SFXN1↓;NCOA4↓
阿魏酸 ^[3] Ferulic acid	肺泡上皮细胞 Alveolar epithelial cells	核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 Nrf2/HO-1	肺组织病理损伤↓;肺组织干湿比重↓;肺泡灌洗液总蛋白↓;细胞活力↑;谷胱甘肽过氧化物酶 4↑;谷胱甘肽↑;丙二醛↓;Fe ²⁺ ↓;活性氧↓;髓过氧化物酶↓;核因子 E2 相关因子 2↑;血红素加氧酶-1↑;闭锁小带蛋白 1↑;闭锁蛋白 1↑;紧密连接蛋白 1↑;细胞通透性↓
			Lung injury↓;Lung wet/dry weight ratio↓;Total bronchoalveolar lavage fluid protein↓;Cell viability↑;GPX4↑;GSH↑;MDA↓;Fe ²⁺ ↓;ROS↓;MPO↓;Nrf2↑;HO-1↑;ZO-1↑;Occludin↑;Claudin-1↑;Cell permeability↓

续表1

干预化合物/方式	损伤细胞类型	机制	指标监测及变化
Interventional compounds/methods	Damaged cell types	Mechanism	Indicators monitoring and changes
富含 AU 元件的 RNA 结合因子 1 ^[28] AU-rich element-RNA binding factor 1	肺泡上皮细胞 Alveolar epithelial cells	调节核因子 E2 相关因子 2 和激活转录因子 3 Regulate NRF2 and ATF3	肺组织病理损伤↓;肺组织干湿比重↓;细胞活力↑;谷胱甘肽过氧化物酶 4↑;谷胱甘肽↑;总铁↓;丙二醛↓;髓过氧化物酶↓;细胞中脂质过氧化物↓;肿瘤坏死因子-α↓;白介素-1β↓;白介素-6↓;核因子 E2 相关因子 2↑;血红素加氧酶-1↑;酶酰基辅酶 A 合成酶长链 4↓;溶质转运家族 7A11↑;激活转录因子 3↓ Lung injury ↓; Lung wet/dry weight ratio ↓; Cell viability ↑; GPX4 ↑; GSH ↑; Iron ↓; MDA ↓; MPO ↓; 细胞中脂质过氧化物 ↓; TNF-α ↓; IL-1β ↓; IL-6 ↓; Nrf2 ↑; HO-1 ↑; ACSL4 ↓; SLC7A11 ↑; ATF3 ↓
组织再生相关性保护素 1 ^[30] Protectin conjugates in tissue regeneration 1	肺上皮细胞 Lung epithelial cells	脂氧素 A4/蛋白激酶 A/cAMP 反应元件结合蛋白 ALX/PKA/CREB	肺组织病理损伤↓;细胞活力↑;线粒体损伤↓;肿瘤坏死因子-α↓;白介素-1β↓;白介素-6↓;谷胱甘肽过氧化物酶 4↑;谷胱甘肽↑;活性氧↓;丙二醛↓;4-羟基壬烯酸↓;前列腺素内过氧化物合酶↓;Fe ²⁺ ↓;磷酸化蛋白激酶 A/蛋白激酶 A↑;磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白/cAMP 反应元件结合蛋白↑ Lung injury ↓; Cell viability ↑; Mitochondria injury ↓; TNF-α ↓; IL-1β ↓; IL-6 ↓; GPX4 ↑; GSH ↑; ROS ↓; MDA ↓; 4-HNE ↓; PTGS2 ↓; Fe ²⁺ ↓; p-PKA/ PKA ↑; p-CREB/CREB ↑
衣康酸 ^[32] Itaconate	巨噬细胞 Macrophages	核因子 E2 相关因子 2 Nrf2	肺组织病理损伤↓;肺组织干湿比重↓;细胞活力↑;肿瘤坏死因子-α↓;白介素-1β↓;白介素-6↓;谷胱甘肽过氧化物酶 4↑;谷胱甘肽↑;活性氧↓;总铁↓;丙二醛↓;4-羟基壬烯酸↓;核因子 E2 相关因子 2↑;血红素加氧酶-1↑;溶质转运家族 7A11↑;前列腺素内过氧化物合酶 2↓;谷氨酸-半胱氨酸连接酶修饰亚基↑ Lung injury ↓; Lung wet/dry weight ratio ↓; Cell viability ↑; TNF-α ↓; IL-1β ↓; IL-6 ↓; GPX4 ↑; GSH ↑; ROS ↓; Iron ↓; MDA ↓; 4-HNE ↓; Nrf2 ↑; HO-1 ↑; SLC7A11 ↑; PTGS2 ↓; GCCLM ↑
尿苷 ^[37] Uridine	巨噬细胞 Macrophages	核因子 E2 相关因子 2 Nrf2	肺组织病理损伤↓;肺组织干湿比重↓;细胞活力↑;肺泡灌洗液总蛋白↓;谷胱甘肽过氧化物酶 4↑;谷胱甘肽↑;活性氧↓;总铁↓;丙二醛↓;髓过氧化物酶↓;还原脂质/氧化脂质↑;肿瘤坏死因子-α↓;白介素-1β↓;白介素-6↓;核因子 E2 相关因子 2↑;血红素加氧酶 1↑;溶质转运家族 7A11↑;酶酰基辅酶 A 合成酶长链 4↓ Lung injury ↓; Lung wet/dry weight ratio ↓; Cell viability ↑; Total bronchoalveolar lavage fluid protein ↓; GPX4 ↑; GSH ↑; ROS ↓; Iron ↓; MDA ↓; MPO ↓; R-bodipy/O-bodipy ↑; TNF-α ↓; IL-1β ↓; IL-6 ↓; Nrf2 ↑; HO1 ↑; SLC7A11 ↑; ACSL4 ↓
硫化氢 ^[39] H ₂ S	巨噬细胞 Macrophages	哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 mTOR	死亡率↓;肺组织干湿比重↓;肺组织病理损伤↓;白介素-1β↓;白介素-18↓;白介素-17↓;丙二醛↓;超氧化物歧化酶↑;谷胱甘肽还原酶活性系数↑;铁蛋白↑;铁蛋白轻链↑;环氧化酶 2↓;NADPH 氧化酶 1↓;溶质转运家族 7A11↑;苯氯素 1↓;微管相关蛋白 1 的轻链 3~ II/I↑ Mortality ↓; Lung wet/dry weight ratio ↓; Lung injury ↓; IL-1β ↓; IL-18 ↓; IL-17 ↓; MDA ↓; SOD ↑; GRAC ↑; Ferritin ↑; Ferritin light chain ↑; COX2 ↓; NOX1 ↓; SLC7A11 ↑; Beclin1 ↓; LC3-II/LC3-I ↑

4 展望

越来越多的证据表明,铁死亡不仅在脓毒症ALI疾病过程中发挥重要作用,在脓毒症多器官损伤中也占据重要地位,抑制铁死亡可显著缓解相应器官损伤,包括心脏损伤^[49]、肝损伤^[50]、急性肾损伤^[51]、脑损伤^[52]等。因此,抑制铁死亡或可作为脓毒症的一种新型潜在治疗策略。然而,铁死亡调控治疗的临床意义和治疗潜力也仍需进一步评估。因此,在未来的工作中,深入阐明铁死亡或细胞死亡之间的串扰在脓毒症ALI中发挥的具体作用、探索其全过程通路与疾病预后的关系等,将有望为脓毒症ALI的治疗提供新的潜在靶点和治疗策略。

参考文献:

[1] SINGER M, DEUTSCHMAN C S, SEYMOUR C W, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801-810.

[2] KUMAR V. Pulmonary innate immune response determines the outcome of inflammation during pneumonia and sepsis-associated acute lung injury [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1722.

[3] TANG X, LIU J, YAO S, et al. Ferulic acid alleviates alveolar epithelial barrier dysfunction in sepsis-induced acute lung injury by activating the Nrf2/HO-1 pathway and inhibiting ferroptosis [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 2286-2294.

[4] 张宇, 卢笑晖, 连新宝. 脓毒症急性肺损伤的发生机制及治疗研究进展 [J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(11): 1159-1164.

ZHANG Y, LU X H, LIAN X B. Mechanism and treatment of acute lung injury caused by sepsis: research progress [J]. *Med J Chin People's Liberation Army*, 2021, 46(11): 1159-1164.

[5] XIE J, WANG H, KANG Y, et al. The epidemiology of sepsis in Chinese *ICUs*: a national cross-sectional survey [J]. *Crit Care Med*, 2020, 48(3): e209-e218.

[6] 李林, 邢福席, 付全有, 等. 脓毒症急性肺损伤治疗的研究进展 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2024, 34(1): 149-155.

LI L, XING F X, FU Q Y, et al. Progress of research on treatment of sepsis-induced acute lung injury [J]. *Chin J Nosocomiology*, 2024, 34(1): 149-155.

[7] PATEL V J, BISWAS ROY S, MEHTA H J, et al. Alternative and natural therapies for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 2476824.

[8] SEDLACKOVA L, KOROLCHUK V I. Mitochondrial quality control as a key determinant of cell survival [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019, 1866(4): 575-587.

[9] XIE Y, HOU W, SONG X, et al. Ferroptosis: process and function [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(3): 369-379.

[10] TANG D, CHEN X, KANG R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications [J]. *Cell Res*, 2021, 31

(2): 107-125.

[11] KAJARABILLE N, LATUNDE-DADA G O. Programmed cell-death by ferroptosis: antioxidants as mitigators [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4968.

[12] 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.

[13] CHEN X, LI J, KANG R, et al. Ferroptosis: machinery and regulation [J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2054-2081.

[14] AYALA A, MUÑOZ M F, ARGÜELLES S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 360438.

[15] YANG W S, STOCKWELL B R. Ferroptosis: death by lipid peroxidation [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(3): 165-176.

[16] LI J, CAO F, YIN H L, et al. Ferroptosis: past, present and future [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 88.

[17] LUGG S T, SCOTT A, PAREKH D, et al. Cigarette smoke exposure and alveolar macrophages: mechanisms for lung disease [J]. *Thorax*, 2022, 77(1): 94-101.

[18] MALAINOU C, ABDIN S M, LACHMANN N, et al. Alveolar macrophages in tissue homeostasis, inflammation, and infection: evolving concepts of therapeutic targeting [J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(19): e170501.

[19] BAI X, LI J, LI L, et al. Extracellular vesicles from adipose tissue-derived stem cells affect Notch-miR148a-3p axis to regulate polarization of macrophages and alleviate sepsis in mice [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1391.

[20] SHEN K, WANG X, WANG Y, et al. MiR-125b-5p in adipose derived stem cells exosome alleviates pulmonary microvascular endothelial cells ferroptosis via Keap1/Nrf2/GPX4 in sepsis lung injury [J]. *Redox Biol*, 2023, 62: 102655.

[21] WEI L, YANG Y, WANG W, et al. Circular RNAs in the pathogenesis of sepsis and their clinical implications: a narrative review [J]. *Ann Acad Med Singap*, 2022, 51(4): 221-227.

[22] WANG W, XU R, ZHAO H, et al. CircEXOC5 promotes ferroptosis by enhancing ACSL4 mRNA stability via binding to PTBP1 in sepsis-induced acute lung injury [J]. *Immunobiology*, 2022, 227(4): 152219.

[23] ZOU X, LIU C, HUANG Z, et al. Inhibition of STEAP1 ameliorates inflammation and ferroptosis of acute lung injury caused by sepsis in LPS-induced human pulmonary microvascular endothelial cells [J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(7): 5667-5674.

[24] 柳红英, 丁璐, 王卉, 等. GPX4 m⁶A 修饰在脓毒症诱导急性肺损伤小鼠肺上皮细胞铁死亡过程中的调控作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(9): 1659-1666.

LIU H Y, DING L, WANG H, et al. Regulatory role of GPX4 m⁶A modification in ferroptosis of lung epithelial cells in mice with sepsis-induced acute lung injury [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2022, 38(9): 1659-1666.

[25] ZHANG J, ZHENG Y, WANG Y, et al. YAP1 alleviates sepsis-

- induced acute lung injury *via* inhibiting ferritinophagy-mediated ferroptosis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 884362.
- [26] MIR S M, RAVURI H G, PRADHAN R K, et al. Ferulic acid protects lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by suppressing inflammatory events and upregulating antioxidant defenses in Balb/c mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 100: 304–315.
- [27] LU J Y, SADRI N, SCHNEIDER R J. Endotoxic shock in AUFI knockout mice mediated by failure to degrade proinflammatory cytokine mRNAs [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(22): 3174–3184.
- [28] WANG Y, CHEN D, XIE H, et al. AUFI protects against ferroptosis to alleviate sepsis-induced acute lung injury by regulating NRF2 and ATF3 [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(5): 228.
- [29] SERHAN C N, DE LA ROSA X, JOUVENE C. Novel mediators and mechanisms in the resolution of infectious inflammation: evidence for vagus regulation [J]. *J Intern Med*, 2019, 286(3): 240–258.
- [30] LV Y, CHEN D, TIAN X, et al. Protectin conjugates in tissue regeneration 1 alleviates sepsis-induced acute lung injury by inhibiting ferroptosis [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 293.
- [31] PARK I, KIM M, CHOE K, et al. Neutrophils disturb pulmonary microcirculation in sepsis-induced acute lung injury [J]. *Eur Respir J*, 2019, 53(3): 1800786.
- [32] HE R, LIU B, XIONG R, et al. Itaconate inhibits ferroptosis of macrophage via Nrf2 pathways against sepsis-induced acute lung injury [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 43.
- [33] LUO Y J, CHEN H, HUANG R D, et al. Guanosine and uridine alleviate airway inflammation via inhibition of the MAPK and NF- κ B signals in OVA-induced asthmatic mice [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2021, 69: 102049.
- [34] ZHENG W V, LI Y Q, CHENG X Y, et al. Uridine alleviates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis by regulating the activity of liver-related cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(3): 840–854.
- [35] JIANG N, ZHAO Z W. Intestinal aging is alleviated by uridine via regulating inflammation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* [J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(14): 1519–1531.
- [36] YE J, JIN Z H, CHEN S, et al. Uridine relieves MSCs and chondrocyte senescence *in vitro* and exhibits the potential to treat osteoarthritis *in vivo* [J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(1): 33–48.
- [37] LAI K, SONG C, GAO M, et al. Uridine alleviates sepsis-induced acute lung injury by inhibiting ferroptosis of macrophage [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5093.
- [38] MENG G, ZHAO S, XIE L, et al. Protein S-sulphydration by hydrogen sulfide in cardiovascular system [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(8): 1146–1156.
- [39] LI J, LI M, LI L, et al. Hydrogen sulfide attenuates ferroptosis and stimulates autophagy by blocking mTOR signaling in sepsis-induced acute lung injury [J]. *Mol Immunol*, 2022, 141: 318–327.
- [40] 孙可心, 肖雨倩, 万俊, 等. 程序性细胞死亡在脑卒中后认知障碍中的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(3): 161–171.
- SUN K X, XIAO Y Q, WAN J, et al. Advances in programmed cell death in post-stroke cognitive impairment [J]. *Chin J Comp Med*, 2024, 34(3): 161–171.
- [41] PARK W, WEI S, KIM B S, et al. Diversity and complexity of cell death: a historical review [J]. *Exp Mol Med*, 2023, 55(8): 1573–1594.
- [42] MALIREDDI R K S, KESAVARDHANA S, KANNEGANTI T D. ZBP1 and TAK1: master regulators of NLRP3 inflammasome/pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PAN-optosis) [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 406.
- [43] MALIREDDI R K S, TWEDELL R E, KANNEGANTI T D. PANoptosis components, regulation, and implications [J]. *Aging*, 2020, 12(12): 11163–11164.
- [44] WANG B, WANG Y, ZHANG J, et al. ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome: mechanisms behind apoptosis, autophagy, and ferroptosis [J]. *Arch Toxicol*, 2023, 97(6): 1439–1451.
- [45] TAN S, CHEN S. The mechanism and effect of autophagy, apoptosis, and pyroptosis on the progression of silicosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8110.
- [46] HUANG J Y, TONG Z Y, XU T H, et al. Copper homeostasis in chronic kidney disease and its crosstalk with ferroptosis [J]. *Pharmacol Res*, 2024, 202: 107139.
- [47] ZHENG Y, HUANG Y, XU Y, et al. Ferroptosis, pyroptosis and necroptosis in acute respiratory distress syndrome [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 91.
- [48] CAO Z, QIN H, HUANG Y, et al. Crosstalk of pyroptosis, ferroptosis, and mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2-related mechanisms in sepsis-induced lung injury in a mouse model [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 4810–4820.
- [49] FANG X, ARDEHALI H, MIN J, et al. The molecular and metabolic landscape of iron and ferroptosis in cardiovascular disease [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(1): 7–23.
- [50] WEI S, BI J, YANG L, et al. Serum irisin levels are decreased in patients with sepsis, and exogenous irisin suppresses ferroptosis in the liver of septic mice [J]. *Clin Transl Med*, 2020, 10(5): e173.
- [51] XIAO J, YANG Q, ZHANG Y A, et al. Maresin conjugates in tissue regeneration-1 suppresses ferroptosis in septic acute kidney injury [J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 221.
- [52] WANG J, ZHU Q, WANG Y, et al. Irisin protects against sepsis-associated encephalopathy by suppressing ferroptosis via activation of the Nrf2/GPX4 signal axis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 187: 171–184.

苏杭,张淑孜,任献青. 中医药治疗过敏性紫癜的动物实验研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(6): 135-143.
Su H, Zhang SZ, Ren XQ. Progress of animal experimental research into treatment of Henoch-Schonlein purpura with traditional Chinese medicine [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 135-143.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.018

中医药治疗过敏性紫癜的动物实验研究进展

苏杭^{1,2}, 张淑孜², 任献青^{1,2*}

(1.河南中医药大学第一附属医院儿科医院,郑州 450046;2.河南中医药大学儿科医学院,郑州 450000)

【摘要】 过敏性紫癜 (Henoch-Schonlein purpura, HSP) 是儿童期最常见的系统性血管炎,中医称之为“斑毒”“紫癜风”“葡萄疫”。现代医学研究认为该病与细胞免疫及体液免疫失衡、细胞因子分泌异常、凝血与纤溶机制紊乱等因素相关,但具体发病机制仍不明确。此病发病率逐年上升,复发率高,肾受损比例高,严重影响患儿身心健康,社会危害性大。众多研究表明中医药治疗 HSP 临床疗效良好,但其作用机制尚不完全明晰。近年来,随着 HSP 动物模型的建立,开展了大量的动物实验进行中药疗效机制的研究,但缺乏较系统的、细致的综述,故对近十年中医药治疗 HSP 的动物实验相关文献进行整理,从中医药在缓解 IgA1 异常糖基化、调节 Th1/Th2 及 Treg/Th17 免疫失衡、减少循环免疫复合物、抑制炎症反应等方面作出归纳和总结,以期为中医药治疗 HSP 的深入研究提供参考,启发新的研究思路。

【关键词】 过敏性紫癜;动物实验研究;中医药;综述

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0135-09

Progress of animal experimental research into treatment of Henoch-Schonlein purpura with traditional Chinese medicine

SU Hang^{1,2}, ZHANG Shuzi², REN Xianqing^{1,2*}

(1. Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. College of Pediatrics, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Henoch-Schonlein purpura (HSP) is the most common systemic vasculitis of childhood, and is called “spot toxin”, “purpura wind”, and “grape plague” in traditional Chinese medicine (TCM). Modern medical research suggests that the disease is related to factors such as an imbalance in cellular and humoral immunity, the abnormal secretion of cytokines, and disturbances to coagulation and fibrinolysis mechanisms, but the exact pathogenesis is still unclear. The incidence of this disease is increasing year by year, and it has a high recurrence rate and a high proportion of kidney damage, which seriously affects the physical and mental health of affected children and poses a great risk to human health. Numerous studies have shown the clinical efficacy of TCM treatment for HSP, but the mechanism of action is not completely clear. In recent years, following the establishment of animal models of HSP, a large number of animal experiments have been carried out to study the efficacy and mechanisms of TCM for HSP, but there is a lack of systematic and detailed

【基金项目】 国家自然科学基金 (82374519, U2004107); 河南省青年科学基金项目 (232300421309); 河南省中医药科学研究专项 (20-21ZY2161)。

【作者简介】 苏杭 (1988—), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 中医药防治小儿肾病及风湿免疫性疾病。E-mail: 362504467@ qq. com

【通信作者】 任献青 (1973—), 男, 博士, 教授, 主任医师, 研究方向: 中医药防治小儿肾病及风湿免疫性疾病。E-mail: renxq723@ 163. com

reviews. Therefore, animal experimental literature related to the treatment of HSP with TCM in the past decade was reviewed. The effects of TCM in alleviating the abnormal glycosylation of IgA1, regulating the imbalances in Th1/Th2 and Treg/Th17 immune cells, reducing circulating immune complexes, and inhibiting inflammatory responses were compiled and summarized to provide a reference for further research on TCM for the treatment of HSP and inspire new research ideas.

[Keywords] Henoch-Schonlein purpura; animal experimental study; TCM; review

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

过敏性紫癜 (Henoch-Schonlein purpura, HSP) 是儿童期最常见的系统性血管炎,以 IgA 主导的免疫复合物沉积于病变血管壁为特征,故又称为 IgA 血管炎^[1]。临床典型症状包括皮肤紫癜、关节炎或关节痛、腹痛、血尿或蛋白尿^[2]。HSP 的发病率为每 10 万儿童 8~22 例,呈逐年上升趋势^[3],本病易反复发作,迁延难愈^[4]。HSP 患者中有 20%~54% 可能出现肾损伤^[5],继发紫癜性肾炎 (Henoch-Schonlein purpura nephritis, HSPN),而 HSPN 患者中有 20% 会发展为终末期肾病^[6]。严重影响患儿的生长发育和身心健康,给社会家庭带来了一定的负担。中医药在提高 HSP 缓解率、降低复发率、预防肾损伤、药物副作用少等方面具有明显的优势^[7-9],但其作用机制尚不完全明晰。近年来,中医药通过建立多种 HSP 动物模型,并在此基础上开展了大量的动物实验,进行中药疗效机制的研究。但缺乏较系统的、细致的综述,故本文拟对中医药治疗 HSP 的动物实验研究情况进行整理、归纳和总结,以期对中医药治疗 HSP 的深入研究提供参考,启发新的研究思路。

1 HSP 发病机制

HSP 病因复杂,发病机制仍未完全阐明,常与 IgA1 糖基化异常^[10]、细胞免疫失衡^[11]、凝血机制异常和遗传因素有关。Gd-IgA1 在 HSP 的发病机制中发挥重要作用^[12]。研究表明,HSPN 患者血清 IgA1 和 Gd-IgA1 水平显著升高,且急性期高于缓解期^[13-14]。机体内 Gd-IgA1 可以自我聚集或与其自身抗体结合,从而形成循环免疫复合物 (circulating immune complex, CIC)。含有 Gd-IgA1 的免疫复合物沉积在皮肤小血管壁、肾以及系膜细胞上而致病^[15]。同时,Gd-IgA1 循环免疫复合物会影响 T 淋巴细胞免疫,表现为 T 淋巴细胞数量、比例和功能的改变^[16]。辅助性 T 细胞 (Th 细胞) 可分为不同的亚群:Th1、Th2、Th17、滤泡辅助性 T 细胞 (Tfh) 和调节性 T 细胞 (Treg)。多项研究表明,T 细胞参与 HSP 的组织损伤^[17],HSPN 急性期患者的血液和肾

组织中均存在 Th1/Th2 细胞免疫失衡^[11]和 Th17/Treg 细胞免疫失衡^[18]。此外,T 淋巴细胞亚群异常可引起细胞因子相应变化,HSP 患者血清 IL-6、IL-8、IL-17A、TNF- α 水平显著高于健康对照组,而负调节因子 IL-10、IL-27、TGF- β 1 明显减低^[19-21]。而这些因子同时可调节 IgA1 糖基化过程的酶活性和基因表达^[22],从而影响 Gd-IgA1 的形成。最新研究显示,HSP 的典型组织病理学表现是血管壁内皮细胞损伤和白细胞浸润,内皮细胞损伤与 HSP 发病密切相关,外部抗原引起 IgA 反应,IgA 免疫复合物沉积在毛细血管中,形成抗内皮细胞的抗体 (anti-endothelial cell antibody, AECA),IgA 型抗内皮细胞抗体 (IgA-AECA) 可以引起 HSP 患者血管内皮细胞损伤^[11]。见图 1。

2 实验动物模型的研究

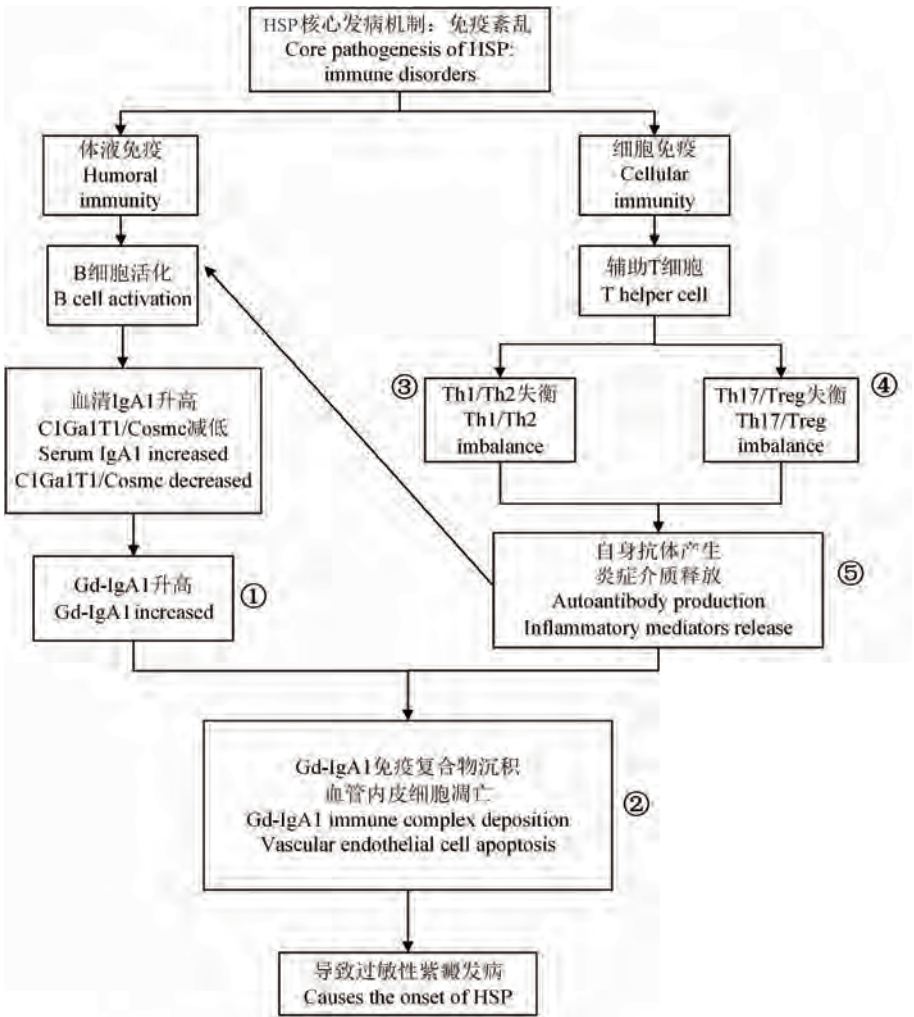
选择最适合的实验动物模型开展中医药研究是必然的方式^[23]。目前 HSP 的主要造模方式为病理模型及病证结合模型。常用的动物模型有大鼠、小鼠、大耳白兔,动物月龄为 6~8 周龄^[24]。

2.1 基于促进 IgA 分泌造模

使用牛血清白蛋白 (BSA) 刺激消化道黏膜,促进 IgA 分泌,脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 作为免疫佐剂,进一步增加 IgA 分泌;四氯化碳 (CCl₄) 导致肝纤维化,减弱 IgA1 的清除,使其沉积于皮肤、胃肠道及肾,引起组织损伤^[25]。张奕星等^[26]将上述方法与中医热证相结合,形成了病证结合的 HSP 动物模型。结果显示模型组出现少量皮下紫斑,免疫组化提示有 IgA 沉淀,肾病理存在异常改变。

2.2 模拟 HSP 内皮系统损伤造模

张晓强等^[27]首先参照中医学热证动物模型,造就动物的偏颇体质,再使用印度墨水封闭动物网状内皮系统,机体应激状态下产生清除障碍反应,继续用麦胶蛋白作为抗原,刺激机体黏膜免疫系统,导致免疫复合物增加、沉积,引起组织损伤^[28]。该方法很好地模拟了 HSP 的临床表现,利于研究 HSP 的发病机制。



注：①中医药能缓解 IgA1 异常糖基化；②中医药能减少循环免疫复合物沉积；③中医药能调节 Th1/Th2 免疫失衡；④中医药能调节 Treg/T17 免疫失衡；⑤中医药能抑制炎症反应。

图 1 过敏性紫癜发病机制及中药干预靶点

Note. ①TCM can alleviate IgA1 abnormal glycosylation. ②TCM can reduce the deposition of circulating immune complexes. ③TCM can regulate Th1/Th2 immune imbalance. ④TCM can regulate Treg/T17 immune imbalance. ⑤TCM can inhibit the inflammatory response.

Figure 1 Pathogenesis of HSP and therapeutic targets of TCM

2.3 激发Ⅲ型变态反应造模

学者们从 HSP 的病因出发,采用热性药物(干姜、茺菟、胡椒)构建过敏体质,再采用卵清蛋白(ovalbumin,OVA)作为抗原,与体内抗体结合,形成免疫复合物,诱导并激发Ⅲ型变态反应^[29-31]。

HSP 动物模型构建经历了从单纯复制 HSP 病理状态到以 HSP 病因出发、病证结合造模的过程,并从不同程度的皮肤改变及肾损伤证实了动物模型的可靠性。HSP 病证结合模型法虽然存在操作复杂、皮损非自发性的不足,但其造模时间短、操作性强、可重复率更高更适用于中医、中西医结合研究。因此,HSP 病证结合动物模型的成功构建为中医对 HSP 发病机制及中药作用机制研究提供了帮助。

3 中医药治疗 HSP 的主要作用机制

3.1 中医药能缓解 IgA1 异常糖基化

2010 年欧洲抗风湿病联盟会议高度强调了组织活检发现 IgA 沉积在 HSP 诊断标准中的重要性,表明 IgA 在 HSP 的发病中扮演了重要角色^[32]。国内外研究显示 HSP 患儿皮肤、消化道粘膜、肾活检均可检出 IgA1 及其免疫复合物沉积。沉积在全身各小血管的 IgA1 由于半乳糖基转移酶 C1Ga1T1 及其伴侣蛋白 Cosmc 表达水平减低,形成异常糖基化 IgA1,进而导致 HSP 发生^[33]。故 IgA1 异常糖基化在 HSP 发病中起着关键作用。中药则可通过降低 HSP 患儿 IgA1 及 Gd-IgA1 的表达发挥治疗作

用^[34]。杨云等^[35]通过动物实验观察川芎嗪对 HSP 血清 IgA1 异常糖基化与晚期氧化蛋白产物 (advanced oxidation protein products, AOPPs) 水平的影响,结果发现,与模型组比较,川芎嗪组小鼠 IgA1 异常糖基化程度与 AOPPs 含量水平显著降低,提示川芎嗪可通过降低 AOPPs 含量,缓解 IgA1 异常糖基化,抑制其氧化损伤,对 HSP 起治疗作用。

3.2 中医药能减少循环免疫复合物沉积

过敏性紫癜是一种以免疫复合物在受累组织小血管内皮沉积为主要特征的、多种免疫介导的系统性免疫性血管炎^[36]。HSP 急性期免疫功能紊乱,血清中 IgA 水平增高,机体清除功能障碍,形成 CIC,此状态下,CIC 可随血流沉积在机体的毛细血管壁或嵌合在肾小球基底膜上,造成局部组织的损伤和炎症,引起血管通透性增加,发生水肿及血性渗出。实验研究证实,中医药能够减少 CIC 在机体的沉积^[37]。赵志华等^[38]以血宁胶囊干预用印度墨水封闭免疫系统,加麦胶蛋白饮食及静脉注射抗原法建立的小鼠 HSP 模型,结果显示血宁胶囊可以降低模型小鼠尿蛋白定量(24 h),降低血清 CIC 含量,从而减轻了肾小球和间质的炎性反应。另有研究发现,芪元冲剂(黄芪、玄参、当归、金银花、白茅根、茜草、夏枯草、防风和甘草)可提高 HSP 模型鼠的网状内皮系统功能,增加血清 CIC 的清除,减少 CIC 局部沉积的机会^[39]。而仙蓟化斑胶囊具有降低血清中 IgG、IgM 和 CIC 含量的作用、并能增加红细胞免疫复合物花结形成,对 HSP 急性期发生的变态反应具有一定的抑制作用^[40]。

3.3 中医药能调节 Th1/Th2 免疫失衡

过敏性紫癜是由 T 细胞介导的自身免疫反应引起,辅助性 T 细胞(T helper cells,Th)参与了 HSP 和 HSPN 的发病。Th1/Th2 细胞免疫失衡、Th2 细胞过度活化参与 HSP 发病已成为一个研究焦点^[41]。Th1 细胞主要分泌 IL-2 等细胞因子,Th2 细胞主要分泌 IL-6、IL-4 等细胞因子。既往文献报道急性期 HSP 患儿血清中 IL-2、IL-6 等细胞因子在 HSP 的发病过程中发挥重要作用^[42]。众多实验结果显示中医药能够调节 Th1/Th2 相关细胞因子水平,进而干预 Th1/Th2 细胞免疫失衡。小儿紫癜疹消颗粒(紫草、白薇、黄芩、侧柏叶、白鲜皮、茜草、鸡血藤)的高、中、低剂量组均可以不同程度的改善 HSP 兔模型后背皮肤,缩短皮肤瘀点瘀斑修复与好转的病程,同时可使 HSP 兔 IL-6 及 IgA 含量趋于正

常^[43-44]。《外科正宗》经典方剂消风散可减少 IL-6 等细胞因子的表达,从而减轻炎性损伤治疗 HSP,甚至能预防 HSPN 的发生^[45]。而芪元颗粒(黄芪、元参、当归、金银花、白茅根、甘草)及其有效提取成分(总多糖和蛋白质、总黄酮、总皂苷、总挥发油)均可以降低大鼠 24 h 尿蛋白定量,降低血清 IL-2 含量,减少肾小球系膜 IgA、IgG、IgA+IgG 沉积,改善肾血管内皮^[46]。最近研究显示新红花-8 可通过改善 IL-2、IL-6 分泌水平调节 HSP 大鼠免疫反应,从而治疗 HSP^[47-48]。青紫颗粒对 HSP 大鼠 IL-6、ET-1、NO、SAA 的干预作用与地塞米松及芦丁片相当^[49-50]。生地黄提取物可通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路激活,减轻 HSP 小鼠的症状^[51]。

3.4 中医药能调节 Treg/Th17 免疫失衡

在 HSP 的发病机制中,免疫失衡学说已得到共识^[52],Treg 细胞及 Th17 细胞因其独特的免疫学特点及功能,逐渐被认为与 HSP 的发病密切相关^[53],且 Th17 及其相关因子 IL-17 表达升高是导致患儿出现多种并发症的关键事件^[54]。周丽娟等^[55]通过复制 HSP 小鼠模型,从 JAK1/STAT3 信号角度发现中药白芍的主要活性成分白芍总苷可调控 HSP 小鼠 Treg/Th17 免疫失衡。

3.5 中医药能抑制炎症反应

炎症是多型变态反应的终末效应表现,特别是 I 型、Ⅲ型及Ⅳ型变态反应。HSP 本质上是一种Ⅲ型变态反应^[56],炎症早期的主要表现是毛细血管扩张、通透性亢进、渗出和水肿。苏慧等^[57]通过测定仙蓟化斑胶囊干预后豚鼠血清中 NO 和 PGE₂ 的含量观察其抗炎作用,结果显示治疗组中炎性介质 NO 和 PGE₂ 的含量明显降低。初步研究证实中医药可减轻炎症的发生,对 HSP 具有一定的治疗作用(表 1)。

4 小结

HSP 归属于祖国医学“斑毒”“紫癜风”“葡萄疫”等范畴。古代医家认为 HSP 病因主要归于“风、热、瘀、虚”。现代医家在总结前人认识的基础上,结合自身临床经验、理论认识及临床研究,形成了“热毒作祟致瘀,瘀滞化热,瘀贯始终”的毒邪理论^[58];“风热毒邪与血分伏热相合,诱发伏邪、灼伤脉络”的伏邪理论^[59];“伏邪潜内,新感触发,络脉受损”的络病理论^[60];“邪气怫郁,玄府郁闭”的玄府理论^[61];以及“营卫不和,卫气亏虚,荣血偏盛”

表 1 中医药治疗过敏性紫癜作用机制、指标及信号通路

Table 1 Mechanism, index and signal pathway of TCM in the treatment of Henoch-Schonlein purpura

中药 Traditional Chinese medicine	作用机制 Action mechanism	主要指标 Main index	相关信号通路及分子 Related signaling pathways and molecules
川芎嗪 ^[35] Ligustrazine	缓解 IgA1 异常糖基化 Relieve IgA1 abnormal glycosylation	降低 AOPPs Reduce AOPPs	阻断 MPO 途径 Blocking the MPO pathway
小儿紫癜疹消颗粒 ^[43-44] Zidianzhenxiao Granule	调节 Th1/Th2 免疫失衡 Regulate Th1/Th2 immune imbalance	降低 IL-6 水平 Reduce IL-6 level	IL-6
消风散 ^[45] Xiaofeng Powder	调节 Th1/Th2 免疫失衡 Regulate Th1/Th2 immune imbalance	减少 IL-6 表达 Reduce IL-6 expression	MAPK 和/或 NF-κB 信号通路 MAPK and/or NF-κB signaling pathway
芪元颗粒 ^[46] Qi Yuan Granule	调节 Th1/Th2 免疫失衡 Regulate Th1/Th2 immune imbalance	降低 IL-2、CIC 含量 Reduce IL-2, CIC content	IL-2
新红花-8 ^[47-48] Xingurgum-8	调节 Th1/Th2 免疫失衡 Regulate Th1/Th2 immune imbalance	降低 IL-2、IL-6 含量 Reduce IL-2, IL-6 content	IL-2、IL-6
青紫颗粒 ^[49-50] Qingzi Granules	调节 Th1/Th2 免疫失衡 Regulate Th1/Th2 immune imbalance	降低 IL-6、ET-1、NO、CIC Reduce IL-6, ET-1, NO, CIC	IL-6
生地黄提取物 ^[51] Unprocessed Rehmannia Root Extract	调节 Th1/Th2 免疫失衡 Regulate Th1/Th2 immune imbalance	调节 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白 表达 Regulate p-JAK2 and p-STAT3 protein expression	JAK2/STAT3 信号通路 JAK2/STAT3 signaling pathway
白芍总苷 ^[55] Total Glucosides of Paeoniae	调节 Treg/Th17 免疫失衡 Regulate Th1/Th17 immune imbalance	升高 IL-10、降低 IL-17 Increase IL-10, reduce IL-17	JAK1/STAT3 信号通路 JAK1/STAT3 signaling pathway
血宁胶囊 ^[38] Xuening Capsules	减少 CIC 沉积 Reduce CIC deposition	增加 CIC 清除 Increase CIC clearance	CIC
芪元冲剂 ^[39] Qiyuan Granules	减少 CIC 沉积 Reduce CIC deposition	减少 CIC Reduce CIC	增强网状内皮系统功能 Enhance the function of the reticuloendothelial system
仙蓟化斑胶囊 ^[40,57] Xianji Huaban Capsules	减少 CIC 沉积 Reduce CIC deposition	减少 CIC Reduce CIC	CIC
	抑制炎症反应 Inhibit inflammation	降低 NO 和 PGE ₂ 含量 Reduce NO and PGE ₂ contents	NO、PGE ₂

的营卫理论^[62]等,详细阐述了 HSP 的病因病机。根据复杂的致病因素,近代医家辨证论治思想各异且存在学术百家争鸣的特点,或基于理论从络脉^[63]、三焦^[64]、脏腑^[65]辨证论治;或分型论治^[66-67],或分期论治^[68-70],总体将 HSP 分为实证与虚证,实证以祛邪通络为主,虚证以补益扶正为主,临床均有一定的疗效。

中医药治疗 HSP 具有明显优势和特色,可有效减轻临床症状,降低复发率,预防肾损伤。动物实验研究是探讨中医药作用机制的主要方法,亦是中医药现代化的必由之路。学者们将具有疏风清热、凉血解毒、活血化瘀等复方药应用于 HSP 动物,结

果显示中医药可以通过缓解 IgA1 异常糖基化、减少 CIC 沉积、调节细胞因子平衡、抑制炎症反应等作用机制来治疗 HSP。尽管目前实验研究从细胞因子、免疫细胞等方面证实中医药能够通过调节免疫而改善 HSP,但中药的有效成分复杂,系统地确定中药活性成分及复方治疗 HSP 的功效及机制仍然存在很大挑战:(1)动物模型作为研究疾病机制的基本工具,目前 HSP 动物模型构建方法各异,无论是模拟 IgA 肾病模型造模,还是病证结合造模,均无法有效地模拟 HSP 发病机制及疾病变化过程。需要进一步探索既能表现出中医特色,又能体现病理变化和诊断标准的病证结合动物模型。(2)文中多数

中药的作用机制研究仍然处于初级阶段,针对 HSP 发病核心机制 IgA1 异常糖基化的中药干预研究较少,而针对 Th17/Treg 细胞失衡的研究更是鲜有报道。(3)目前实验研究多针对某些细胞因子或某条通路,缺乏更系统的研究,如影响 IgA1 异常糖基化的催化酶 C1GalT1/Cosmc 通路,如中药调节 Th1/Th2 细胞失衡与影响 IL-2、IL-6 等蛋白表达变化之间的具体过程等,故中药治疗 HSP 的具体靶点和信号通路有待进一步阐明。(4)目前基于肠道微生物、网络药理学、代谢组学的中医药干预 HSP 的研究主要集中在临床试验,尚缺乏动物实验研究,有待通过完善相关动物模型进一步探讨。综上所述,为了更好地总结治疗 HSP 的方法,提高临床效果,使这些中医药治法得以使用及推广,使中医药得以更好地传承与发展,未来我们需要开展更深入、更系统的基础研究,为 HSP 的治疗提供更完善和科学的依据。

参考文献:

- [1] RUAN J W, FAN G Z, NIU M M, et al. Serum immunoglobulin profiles in Chinese children with Henoch-Schönlein purpura [J]. Scand J Immunol, 2022, 96(3): e13191.
- [2] SONG Y, HUANG X, YU G, et al. Pathogenesis of IgA vasculitis: an up-to-date review [J]. Front Immunol, 2021, 12: 771619.
- [3] 李伟霞, 许爽, 陈毓龙, 等. 基于网络药理学和代谢组学探讨凉血退紫合剂治疗过敏性紫癜的潜在成分和作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(12): 3327-3344.
LI W X, XU S, CHEN Y L, et al. Potential components and mechanism of Liangxue Tuezhi Mixture in treating Henoch-Schönlein purpura based on network pharmacology and metabolomics [J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(12): 3327-3344.
- [4] BARUT K, SAHIN S, KASAPCOPUR O. Pediatric vasculitis [J]. Curr Opin Rheumatol, 2016, 28(1): 29-38.
- [5] PERUZZI L, COPPO R. IgA vasculitis nephritis in children and adults: one or different entities? [J]. Pediatr Nephrol, 2021, 36(9): 2615-2625.
- [6] 郑茜, 任献青. 过敏性紫癜病证结合实验动物模型研究进展 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(12): 3955-3960.
ZHENG Q, REN X Q. Research progress of henoch-schönlein Purpura experimental animal model based on the combination of disease and syndrome [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2023, 25(12): 3955-3960.
- [7] 孙凤, 金丹, 邹鹏, 等. 凉血止血法治疗儿童血热风盛型紫癜风 83 例临床疗效分析 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(11): 2681-2683.
SUN F, JIN D, ZOU P, et al. Analysis of clinical effect of cooling blood and hemostasis on 83 cases of purpura in children [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2016, 27(11): 2681-2683.
- [8] 张森, 杨燕, 赵蓁. 青紫合剂治疗儿童热毒血瘀型过敏性紫癜的临床疗效观察 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(4): 1822-1824.
ZHANG M, YANG Y, ZHAO Q. Clinical efficacy observation of Qingzi Mixture treating Henoch-Schönlein purpura children with heat-toxicity and blood stasis syndrome [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(4): 1822-1824.
- [9] 李晓丽, 黄岩杰, 吴光华, 等. 凉血解毒活血方治疗 94 例过敏性紫癜血热妄行证儿童临床疗效评价 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(1): 381-383.
LI X L, HUANG Y J, WU G H, et al. Clinical efficacy evaluation of Liangxue Jiedu Huoxue Formula on the treatment of Henoch-Schönlein purpura with syndrome of bleeding due to blood heat in 94 children [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(1): 381-383.
- [10] NIKOLAISHVILI M, PAZHAVA A, DI LERNIA V. Viral infections may be associated with henoch-schönlein Purpura [J]. J Clin Med, 2023, 12(2): 697.
- [11] XU L, LI Y, WU X. IgA vasculitis update: Epidemiology, pathogenesis, and biomarkers [J]. Front Immunol, 2022, 13: 921864.
- [12] PILLEBOUT E, SUNDERKÖTTER C. IgA vasculitis [J]. Semin Immunopathol, 2021, 43(5): 729-738.
- [13] MIZERSKA-WASIAK M, GAJEWSKI Ł, CICHON-KAWA K, et al. Serum GDIGAI levels in children with IgA nephropathy and Henoch-Schönlein nephritis [J]. Cent Eur J Immunol, 2018, 43(2): 162-167.
- [14] BERTHELOT L, JAMIN A, VIGLIETTI D, et al. Value of biomarkers for predicting immunoglobulin A vasculitis nephritis outcome in an adult prospective cohort [J]. Nephrol Dial Transplant, 2018, 33(9): 1579-1590.
- [15] NEUFELD M, MOLYNEUX K, PAPPELBAUM K I, et al. Galactose-deficient IgA1 in skin and serum from patients with skin-limited and systemic IgA vasculitis [J]. J Am Acad Dermatol, 2019, 81(5): 1078-1085.
- [16] IMAI T, NISHIYAMA K, UEKI K, et al. Involvement of activated cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells in Henoch-Schönlein purpura nephritis [J]. Clin Transl Immunology, 2020, 9(11): e1212.
- [17] AUDEMARD-VERGER A, PILLEBOUT E, JAMIN A, et al. Recruitment of CXCR3⁺ T cells into injured tissues in adult IgA vasculitis patients correlates with disease activity [J]. J Autoimmun, 2019, 99: 73-80.
- [18] LI B, REN Q, LING J, et al. The change of Th17/Treg cells and IL-10/IL-17 in Chinese children with Henoch-Schönlein purpura: a PRISMA-compliant meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(3): e13991.
- [19] PAN L, WANG J, LIU J, et al. Deficiency in the frequency and function of Tr1 cells in IgAV and the possible role of IL-27 [J].

- Rheumatology (Oxford), 2021, 60(7): 3432–3442.
- [20] KURET T, LAKOTA K, ŽIGON P, et al. Insight into inflammatory cell and cytokine profiles in adult IgA vasculitis [J]. Clin Rheumatol, 2019, 38(2): 331–338.
- [21] JASZCZURA M, MIZGAŁA-IZWORSKA E, ŚWIĘTOCHOWSKA E, et al. Serum levels of selected cytokines (interleukin (IL)-17A, IL-18, IL-23) and chemokines (RANTES, IP10) in the acute phase of immunoglobulin A vasculitis in children [J]. Rheumatol Int, 2019, 39(11): 1945–1953.
- [22] SUZUKI H, RASKA M, YAMADA K, et al. Cytokines alter IgA1 O-glycosylation by dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II enzymes [J]. J Biol Chem, 2014, 289(8): 5330–5339.
- [23] 李磊, 刘建勋, 任钧国, 等. 中医药动物模型研究现状及展望 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 104–110.
- LI L, LIU J X, REN J G, et al. Research status and perspective of animal models in research and development traditional Chinese medicine [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 104–110.
- [24] 徐闪闪, 王龙, 张霞, 等. 过敏性紫癜动物模型研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(3): 1539–1542.
- XU S S, WANG L, ZHANG X, et al. Research progress on animal models of Henoch-Schönlein purpura [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(3): 1539–1542.
- [25] 黄华, 马丽杰, 李寅如. 固本培元化瘀颗粒对紫癜性肾炎的实验研究 [J]. 内蒙古中医药, 2013, 32(35): 47–49.
- HUANG H, MA L J, LI Y R. The empirical study on the effects of gubenpeiyuan granules on *Purpura* nephritis [J]. Nei Mongol J Tradit Chin Med, 2013, 32(35): 47–49.
- [26] 张奕星, 袁斌, 周立华, 等. 过敏性紫癜性肾炎动物模型的探讨 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(2): 548–550.
- ZHANG Y X, YUAN B, ZHOU L H, et al. Discussion on animal model of Henoch-Schönlein purpura nephritis [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2014, 29(2): 548–550.
- [27] 张晓强, 刘品莉, 李孟芳, 等. 过敏性紫癜动物模型的研制思路 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(10): 2319–2321.
- ZHANG X Q, LIU P L, LI M F, et al. Thinking for establishing animal model of HSP [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2011, 26(10): 2319–2321.
- [28] 赵丽丽, 丁显春, 马宇, 等. 霉酚酸酯对过敏性紫癜小鼠 T-bet, GATA3 表达及 Th1/Th2 平衡的影响 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2020, 34(2): 149–154.
- ZHAO L L, DING X C, MA Y, et al. Effects of mycophenolate mofetil on T-bet and GATA3 expressions and Th1/Th2 balance in mice with allergic *Purpura* [J]. Chin J Dermatovenereology, 2020, 34(2): 149–154.
- [29] 李彦红, 朱华, 隋小龙, 等. 初步探讨过敏性紫癜兔模型的构建 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(5): 36–41, 103–104.
- LI Y H, ZHU H, SUI X L, et al. Preliminary study to establish a rabbit model of allergic purpura [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2013, 21(5): 36–41, 103–104.
- [30] LI Y, FENG X, HUANG L, et al. Hematologic and immunological characteristics of Henoch-Schönlein purpura in rat and rabbit models induced with ovalbumin based on type III hypersensitivity [J]. Sci Rep, 2015, 5: 8862.
- [31] 潘仕红, 钟建桥. 简化版过敏性紫癜大鼠模型的构建与鉴定 [J]. 四川医学, 2021, 42(7): 669–672.
- PAN S H, ZHONG J Q. Construction and identification of simplified rat model of henoch-schönlein *Purpura* [J]. Sichuan Med J, 2021, 42(7): 669–672.
- [32] SUGINO H, SAWADA Y, NAKAMURA M. IgA vasculitis: etiology, treatment, biomarkers and epigenetic changes [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(14): 7538.
- [33] YAMADA K, HUANG Z Q, RASKA M, et al. Inhibition of STAT3 signaling reduces IgA1 autoantigen production in IgA nephropathy [J]. Kidney Int Rep, 2017, 2(6): 1194–1207.
- [34] 陈治峰, 王丽, 杜娟, 等. 益气化痰方治疗过敏性紫癜疗效及对患儿 Gd-IgA1、NF-κB 水平的影响 [J]. 陕西中医, 2019, 40(2): 237–240.
- CHEN Z F, WANG L, DU J, et al. Effect of Yiqi Huaban Decoction on children with Henoch Schönlein purpura and the effect on Gd-IgA1 and NF-κB level [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 2019, 40(2): 237–240.
- [35] 杨云, 马喜兴, 王大虎, 等. 川芎嗪对过敏性紫癜小鼠血清 IgA1 异常糖基化与晚期氧化蛋白产物的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(10): 1241–1244.
- YANG Y, MA X X, WANG D H, et al. Study on effects of Ligustrazine on serum abnormal glycosylation of IgA1 and oxidation protein products in Henoch-Schönlein purpura mice [J]. Chin J Immunol, 2019, 35(10): 1241–1244.
- [36] 尹薇, 陈晶. 儿童过敏性紫癜免疫机制研究 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2017, 32(21): 1604–1607.
- YIN W, CHEN J. Immune pathogenesis of Henoch-Sch(ö)nlein purpura in children [J]. Chin J Appl Clin Pediatr, 2017, 32(21): 1604–1607.
- [37] 张圆圆, 靳培培, 靳贺超, 等. 基于 C1GALT1/C1GALT1C1 通路探讨加味升降散对 IgA 肾病大鼠 Gd-IgA1 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(14): 70–80.
- ZHANG Y Y, JIN P P, JIN H C, et al. Effect of modified Shengjiangsan on Gd-IgA1 in IgA nephropathy rats: based on C1GALT1/C1GALT1C1 signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(14): 70–80.
- [38] 赵志华, 范惠霞, 史红鱼. 中药血宁对过敏性紫癜模型小鼠药效学研究 [J]. 中国药物与临床, 2013, 13(8): 1054–1055.
- ZHAO Z H, FAN H X, SHI H Y. Pharmacodynamic study of Xuening on allergic purpura model mice [J]. Chin Remedies Clin, 2013, 13(8): 1054–1055.
- [39] 刘建宏, 弓彦飞, 门九章, 等. 芪元冲剂对过敏性紫癜小鼠网状内皮功能及免疫复合物的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(9): 1873–1874.
- LIU J H, GONG Y F, MEN J Z, et al. Effect of qi yuan granule on reticular endothelial function and immune complex in henoch-schönlein *Purpura* mice [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2012, 39(9): 1873–1874.

- [40] 苏慧, 刘松涛, 张森, 等. 仙菊化斑胶囊对豚鼠血清 IgG、IgM 影响的研究 [J]. 中国药师, 2014, 17(8): 1257-1258, 1291.
- SU H, LIU S T, ZHANG M, et al. Effect of xianji Huaban capsules on IgG and IgM in serum of guinea pigs [J]. China Pharm, 2014, 17(8): 1257-1258, 1291.
- [41] LI Y, ZHOU Y, ZHU D, et al. The role of T cells in the development of Henoch-Schonlein purpura [J]. Front Biosci, 2018, 23(5): 837-851.
- [42] 李亚凤, 夏海龙. 过敏性紫癜患者血清中 IL-27、IL-17 的表达及意义 [J]. 免疫学杂志, 2020, 36(4): 337-342.
- LI Y F, XIA H L. Expression and significance of IL-27 and IL-17 in serum of patients with Henoch-Schoenlein purpura [J]. Immunol J, 2020, 36(4): 337-342.
- [43] 崔庆科. 小儿紫癜疹消(免煎)颗粒对过敏性紫癜兔模型血清免疫分子影响的研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2017.
- CUI Q K. Study on the effect of Xiaoer *Purpura* Erxiao Granule on serum immune molecules in rabbit model of allergic purpura [D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2017.
- [44] 官文. 小儿紫癜疹消颗粒(免煎)对过敏性紫癜兔模型血管炎症的作用机理研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2018.
- GONG W. Study on the mechanism of Xiaoer Zhizi Chuanxiao Granule (free decoction) on vascular inflammation in rabbit model of allergic purpura [D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2018.
- [45] 宋均亚. 儿童紫癜性肾炎风险预测模型的初步构建及消风散治疗过敏性紫癜的机制研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2020.
- SONG J Y. Preliminary construction of risk prediction model for henoch-schonlein *Purpura* nephritis in children and study on mechanism of Xiaofeng Powder in treating henoch-schonlein purpura [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [46] 李灵. 芪元颗粒及有效部位对 HSP 模型大鼠治疗作用的实验研究 [D]. 晋中: 山西中医药大学, 2017.
- LI L. Experimental study on the therapeutic effect of Qi Yuan granule and its effective fraction on HSP rats [D]. Jinzhong: Shanxi University of Chinese Medicine, 2017.
- [47] 敖毕德斯. 新红花-8 对 HSP 模型动物免疫作用研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2019.
- ALBIADES. XIN GURGUM-8 to HSP model animals immune function research [D]. Hohhot: Inner Mongolia Medical University, 2019.
- [48] 胡苏勒. 新红花-8 对 HSP 模型动物止血作用研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2019.
- HU S L. Study on hemostatic effect of safflower-8 on HSP model animals [D]. Hohhot: Inner Mongolia Medical University, 2019.
- [49] 苗丰, 董琳琳, 丰晨然, 等. 青紫颗粒抑制卵蛋白致过敏性紫癜大鼠血清免疫复合物保护肾组织作用 [J]. 中南药学, 2020, 18(5): 756-760.
- MIAO F, DONG L L, FENG C R, et al. Qingzi granules inhibit serum immune complex and protect renal tissues in rats with Henoch-Schonlein *Purpura* induced by ovalbumin [J]. Cent South Pharm, 2020, 18(5): 756-760.
- [50] 丰晨然, 赵一颖, 苗丰, 等. 青紫颗粒对 Arthus 反应动物模型皮肤损害的保护作用及机制研究 [J]. 中南药学, 2022, 20(4): 785-792.
- FENG C R, ZHAO Y Y, MIAO F, et al. Protect effect of Qingzi Granules on skin damage in animal models with Arthus response and related mechanism of action [J]. Cent South Pharm, 2022, 20(4): 785-792.
- [51] 陈宏, 邓琳千, 陈群, 等. 基于成纤维细胞的激活 JAK2/STAT3 信号通路探讨生地黄提取物对过敏性紫癜的机制研究 [J]. 吉林中医药, 2023, 43(10): 1188-1192.
- CHEN H, DENG L Q, CHEN Q, et al. Mechanism of unprocessed rehmannia root extract on Henoch-Schönlein purpura based on activation of JAK2/STAT3 signaling pathway by fibroblasts [J]. Jilin J Chin Med, 2023, 43(10): 1188-1192.
- [52] 王成祥, 常绍鸿, 邢二庆, 等. 肺炎支原体感染对过敏性紫癜患儿外周血 Th17/Treg 平衡及病情进展的影响 [J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32(21): 3326-3330.
- WANG C X, CHANG S H, XING E Q, et al. Influence of *Mycoplasma pneumoniae* infection on peripheral blood Th17/Treg balance and illness condition of children with Henoch-Schonlein purpura [J]. Chin J Nosocomiology, 2022, 32(21): 3326-3330.
- [53] 赵利平, 梁卫章, 张俊民, 等. 甘草酸铵对过敏性紫癜性肾炎小鼠肾功能及 IL-23/STAT3 通路的影响 [J]. 疑难病杂志, 2022, 21(1): 74-79.
- ZHAO L P, LIANG W Z, ZHANG J M, et al. Effects of ammonium glycyrrhizinate on renal function and IL-23/STAT3 pathway in mice with Henoch-Schonlein purpura nephritis [J]. Chin J Difficult Complicat Cases, 2022, 21(1): 74-79.
- [54] 杨晓庆, 郭文兴, 骆媚芬, 等. 过敏性紫癜并幽门螺杆菌感染患儿辅助性 T 淋巴细胞/调节性 T 淋巴细胞失衡的研究 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2020, 35(22): 1703-1707.
- YANG X Q, GUO W X, LUO M F, et al. Study on the imbalance of T helper 17 cells/regulatory T cells in children with Henoch-Schonlein purpura complicated with *Helicobacter pylori* infection [J]. Chin J Appl Clin Pediatr, 2020, 35(22): 1703-1707.
- [55] 周丽娟, 单馨慧, 胥卫青, 等. 白芍总苷对过敏性紫癜小鼠 Treg/Th17 免疫平衡及 JAK1/STAT3 信号通路蛋白的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(8): 1660-1664.
- ZHOU L J, SHAN X H, XU W Q, et al. Effects of total glucosides of paeoniae on Treg/Th17 immune balance and JAK1/STAT3 signaling pathway protein in henoch purpura mice [J]. Chin J Immunol, 2023, 39(8): 1660-1664.
- [56] 宋丹阳, 江雅静, 刘昱, 等. T 细胞亚群分布对过敏性紫癜患儿复发风险的预测价值 [J]. 标记免疫分析与临床, 2020, 27(12): 2126-2131.

- SONG D Y, JIANG Y J, LIU Y, et al. The predictive value of the distribution of T cell subsets in children with allergic *Purpura* [J]. *Labeled Immunoass Clin Med*, 2020, 27 (12): 2126–2131.
- [57] 苏慧, 张森, 刘松涛, 等. 仙蓟化斑胶囊对血清中 NO、PGE₂ 影响的研究 [J]. *中医药信息*, 2014, 31(4): 88–89.
- SU H, ZHANG M, LIU S T, et al. Effect of xianji Huaban capsule on NO and PGE₂ in serum [J]. *Inf Tradit Chin Med*, 2014, 31(4): 88–89.
- [58] 孙莹莹, 吴文先, 李露萍, 等. 从“热毒作祟致瘀”探析刘霞治疗小儿过敏性紫癜经验 [J]. *北京中医药*, 2016, 35(8): 745–748.
- SUN Y Y, WU W X, LI L P, et al. Clinical study of Xiefei Lishui method for the treatment of chronic heart failure accompanied with diuretic resistance [J]. *Beijing J Tradit Chin Med*, 2016, 35(8): 745–748.
- [59] 任献青, 张凯, 张博, 等. 基于伏邪理论探讨小儿过敏性紫癜的发病特点 [J]. *中医杂志*, 2019, 60(8): 660–663.
- REN X Q, ZHANG K, ZHANG B, et al. Exploring the incidence characteristics of henoch-schonlein *Purpura* in children based on the theory of hidden pathogen [J]. *J Tradit Chin Med*, 2019, 60(8): 660–663.
- [60] 袁振华, 任献青, 丁樱, 等. 基于络病学说探讨小儿过敏性紫癜辨治规律 [J]. *中医杂志*, 2021, 62(1): 75–78.
- YUAN Z H, REN X Q, DING Y, et al. Syndrome differentiation and treatment of children's allergic *Purpura* based on the collateral disease theory [J]. *J Tradit Chin Med*, 2021, 62(1): 75–78.
- [61] 谭慧月, 文华, 曾传, 等. 基于“玄府学说”探讨小儿过敏性紫癜发病机制及治疗 [J]. *中医儿科杂志*, 2019, 15(6): 11–13.
- TAN H Y, WEN H, ZENG C, et al. Pathogenesis and treatment of allergic purpura in children based on “sweat pore theory” [J]. *J Pediatr Tradit Chin Med*, 2019, 15(6): 11–13.
- [62] 朱华贺, 薛征. 基于营卫理论探讨小儿过敏性紫癜的病机和证治 [J]. *河南中医*, 2019, 39(1): 14–18.
- ZHU H H, XUE Z. Exploring the pathogenesis and treatment of henoch-schonlein *Purpura* in children based on yingqi-weiqi theory [J]. *Henan Tradit Chin Med*, 2019, 39(1): 14–18.
- [63] 李爽, 张君, 张少卿. 张君从“络”论治过敏性紫癜 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2019, 25(4): 465–466, 475.
- LI S, ZHANG J, ZHANG S Q. Professor ZHANG Jun's treatment of allergic *Purpura* from “collateral” [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*, 2019, 25(4): 465–466, 475.
- [64] 崔洪涛, 原晓风. 原晓风三焦辨治小儿过敏性紫癜临床经验 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2021, 27(4): 669–670, 677.
- CUI H T, YUAN X F. Professor Yuan Xiao-Feng's clinical experience about Sanjiao in treatment of pediatric Henoch-schönlein *Purpura* [J]. *J Basic Chin Med*, 2021, 27(4): 669–670, 677.
- [65] 冯晓纯, 段晓征, 张强, 等. 三期分治、腑辨证、综合治疗小儿过敏性紫癜的探讨 [J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(9): 2349–2351.
- FENG X C, DUAN X Z, ZHANG Q, et al. Viscera diagnosis and comprehensive treatment of children allergic purpura of in three phases [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2012, 27(9): 2349–2351.
- [66] 张霞, 徐向宇, 于文静, 等. 1228 例过敏性紫癜儿童中医证候分布规律研究 [J]. *中医杂志*, 2013, 54(18): 1577–1579, 1595.
- ZHANG X, XU X Y, YU W J, et al. TCM pattern distribution in 1228 children with allergic *Purpura* [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 54(18): 1577–1579, 1595.
- [67] 周婉婷, 赢双, 夏笛, 等. 边天羽教授治疗过敏性紫癜的临床经验 [J]. *内蒙古中医药*, 2019, 38(6): 67–68.
- ZHOU W T, YING S, XIA D, et al. Professor Bian Tianyu's clinical experience in treating allergic *Purpura* [J]. *Nei Mongol J Tradit Chin Med*, 2019, 38(6): 67–68.
- [68] 冯文雅, 牟敬康, 闫小宁, 等. 韩世荣治疗过敏性紫癜经验 [J]. *中医药导报*, 2022, 28(4): 162–165.
- FENG W Y, MOU J K, YAN X N, et al. Han Shirong's experience in treating allergic purpura [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm*, 2022, 28(4): 162–165.
- [69] 李冰冰, 朱晔. 朱晔治疗小儿过敏性紫癜经验 [J]. *湖南中医杂志*, 2022, 38(3): 55–57.
- LI B B, ZHU Y. Zhu Ye's experience in treating allergic purpura in children [J]. *Hunan J Tradit Chin Med*, 2022, 38(3): 55–57.
- [70] 张毅, 张弢, 王正平. 张士卿教授辨证治疗小儿过敏性紫癜经验 [J]. *中医研究*, 2022, 35(1): 87–91.
- ZHANG Y, ZHANG T, WANG Z P. Professor Zhang Shiqing's experience in treating allergic purpura in children based on syndrome differentiation [J]. *Tradit Chin Med Res*, 2022, 35(1): 87–91.

[收稿日期] 2024-03-20

郭孝静,王艳,张立,等. 基于线粒体质量控制探讨运动对骨骼肌萎缩的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(6): 144-150.

Guo XJ, Wang Y, Zhang L, et al. Research progress in the benefits of exercise in muscular atrophy based on mitochondrial quality control [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 144-150.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.019

基于线粒体质量控制探讨运动对骨骼肌萎缩的研究进展

郭孝静¹, 王艳^{2*}, 张立², 裴飞², 张博¹, 秦欢¹, 王淑瑾¹, 李晓童¹

(1.黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2.黑龙江中医药大学附属第二医院, 哈尔滨 150001)

【摘要】 骨骼肌萎缩是指骨骼肌质量的下降和肌肉功能的丧失。线粒体质量控制 (mitochondrial quality control, MQC) 是维持线粒体正常生理功能的基础, 主要涉及线粒体生物生成、线粒体动力学 (分裂/融合)、线粒体自噬等调控过程, 其通过调控线粒体的形态、数量及质量的相对稳定以维持肌肉稳态。运动干预是一种防治肌萎缩经济有效的治疗方式, 目前已得到广泛应用, 但其与 MQC 的关系尚未明确。本文就线粒体生物生成、线粒体动力学、线粒体自噬这 3 个质量控制环节在骨骼肌萎缩中的作用及其相关分子靶点的研究展开论述, 深入分析 MQC 介导运动改善衰老、废用、癌症恶病质导致骨骼肌萎缩的机制, 以期运动干预肌萎缩提供理论指导。

【关键词】 肌萎缩; 运动; 线粒体生物生成; 线粒体动力学; 线粒体自噬

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0144-07

Research progress in the benefits of exercise in muscular atrophy based on mitochondrial quality control

GUO Xiaojing¹, WANG Yan^{2*}, ZHANG Li², PEI Fei², ZHANG Bo¹, QIN Huan¹, WANG Shujin¹, LI Xiaotong¹

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China.

2. the Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150001)

【Abstract】 Skeletal muscle wasting refers to a loss of skeletal muscle mass and function. Mitochondrial quality control (MQC) is the basis by which normal physiological mitochondrial function is maintained and mainly involves the regulation of mitochondrial biogenesis, mitochondrial dynamics (fission/fusion), and mitophagy. MQC maintains muscle homeostasis by regulating the relative stability of mitochondrial shape, quantity, and quality. As an economical and effective treatment for muscular atrophy, exercise interventions are widely used, but the relationship between exercise intervention and MQC is not clear. This paper discusses the role of mitochondrial biogenesis, mitochondrial dynamics, and mitophagy in skeletal muscle atrophy and related molecular targets. We thoroughly analyze the mechanisms by which MQC-mediated exercise can improve the skeletal muscle atrophy caused by aging, disuse, and cancer cachexia in order to provide theoretical guidance for intervention.

【Keywords】 muscle atrophy; exercise; mitochondrial biogenesis; mitochondrial dynamics; mitophagy

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

【基金项目】 国家自然科学基金 (82274623, 81973926)。

【作者简介】 郭孝静 (1996—), 女, 博士研究生, 研究方向: 周围神经损伤的基础研究。E-mail: 656193893@qq.com

【通信作者】 王艳 (1967—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 周围神经损伤康复及儿童康复。E-mail: swallow-1113@163.com

骨骼肌萎缩是指骨骼肌质量的下降和肌肉功能的丧失,病理学表现为肌纤维横截面积变小,不仅影响患者的运动能力和日常生活能力,还与多种疾病的发生发展及预后密切相关。衰老、废用、去神经支配及癌症恶病质等均可导致骨骼肌萎缩^[1-3],其发病机制复杂,与线粒体质量控制(mitochondrial quality control, MQC)失调密切相关^[4]。线粒体是真核细胞中以三磷酸腺苷分子形式提供代谢能量的双层膜结构细胞器,参与细胞分解代谢、蛋白质稳态等重要生物过程,对肌肉稳态的维持具有重要作用^[5]。MQC 是维护线粒体正常生理功能的基础^[6]。MQC 主要涉及线粒体生物生成、线粒体动力学和线粒体自噬等调控过程。本文就 MQC 与肌萎缩的关系展开论述,并分析运动改善肌萎缩的机制。

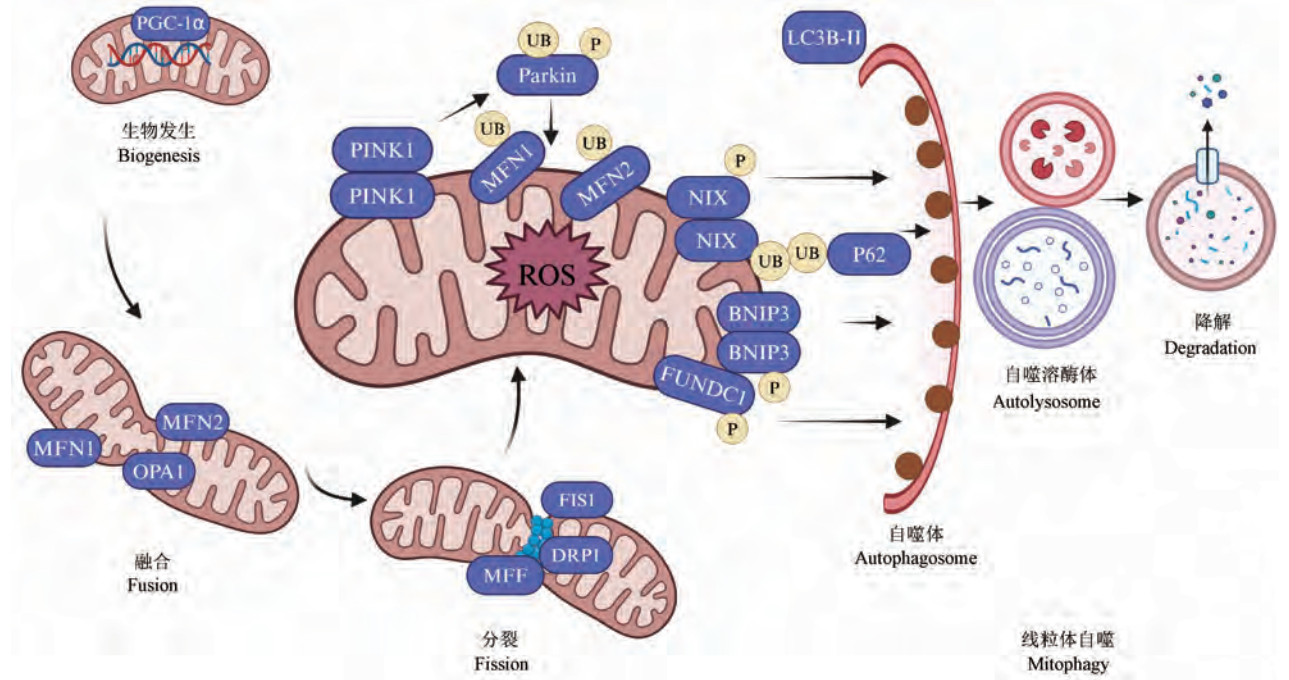
1 线粒体质量控制与肌萎缩

MQC 在肌肉萎缩中的作用,一方面是通过线粒

体生物生成过程补充线粒体数量,另一方面是通过线粒体动力学过程将受损的线粒体分离,继而通过线粒体自噬过程将其清除以维持线粒体稳态的平衡,保持肌肉健康^[7](图 1)。

1.1 线粒体生物生成与肌萎缩

线粒体生物生成是新线粒体产生的过程,伴随着线粒体数量、质量、大小的变化,以满足细胞能量供应。过氧化物酶体增植物激活受体 γ 辅激活因子 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 是线粒体生物生成和氧化能力的主要调节因子。PGC-1 α 激活多种转录因子,如核呼吸因子 1/2 (nuclear respiratory factor-1/2, NRF-1/2)、雌激素相关受体 (estrogen-related receptor, ERR)、过氧化物酶体增植物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ),从而促进线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 的转录和表达,稳定和



注:BNIP3;Bcl-2 相互作用蛋白 3;DRP1:动力相关蛋白 1;FIS1:线粒体裂变蛋白 1;FUNDC1;FUN14 结构域蛋白 1;LC3B-II:微管相关蛋白 1 轻链 3B-II;MFF:线粒体分裂因子;MFN1/2:线粒体融合蛋白 1/2;NIX;NIP3 样蛋白 X;OPA1:视神经萎缩蛋白 1;P:磷酸化;P62:选择性自噬接头蛋白;Parkin;PARK2 基因编码蛋白;PGC-1 α :过氧化物酶体增植物激活受体 γ 辅激活因子 1 α ;PINK1;PTEN 诱导假定激酶 1;ROS:活性氧;UB:泛素化。

图 1 线粒体质量控制作用机制

Note. BNIP3, Bcl-2-interacting protein 3. DRP1, Dynamin-related protein 1. FIS1, Mitochondrial fission 1 protein. FUNDC1, FUN14 domain containing protein 1. LC3B-II, Microtubule-associated proteins 1 light chain 3B-II. MFF, Mitochondrial fission factor. MFN1/2, Mitochondrial fusion protein 1/2. NIX, NIP3-like protein X. OPA1, Optic atrophy 1. P, Phosphorylation. P62, Sequestosome-1. Parkin, Parkin RBR E3 ubiquitin-protein ligase. PGC-1 α , Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α . PINK1, PTEN-induced kinase 1. ROS, Reactive oxygen species. UB, Ubiquitination.

Figure 1 Mechanism of mitochondrial quality control

保护线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 免受损伤和降解,进而导致活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 减少^[8]。研究表明,特异性敲除骨骼肌中 PGC-1 α 基因可导致小鼠肌纤维类型从氧化型向糖酵解型转化,疲劳程度增加且运动能力下降^[9]。也有研究表明,PGC-1 α 过表达可通过抑制叉头框蛋白 O3 (forkhead box protein O3, FoxO3) 活性来激活线粒体自噬途径以延缓废用引起的小鼠胫骨前肌萎缩^[10],还可以增强衰老肌肉中线粒体氧化功能和抗氧化酶活性来改善线粒体缺陷^[11]。其他研究表明,腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 和沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 的激活可诱导 PGC-1 α 的表达增加,恢复骨骼肌代谢^[12]。此外,TFAM 过表达,可平衡氧化还原反应,防止废用性肌萎缩的发生^[13]。总之,促进线粒体生物生成可以延缓肌萎缩发生,PGC-1 α 作为线粒体生物生成的主要调节因子,其上游可受 AMPK 和 SIRT1 的调节,其下游可调控 FoxO3a 的活性从而调节线粒体自噬途径,然而具体分子机制仍需进一步研究。

1.2 线粒体动力学与肌萎缩

线粒体动力学是线粒体融合和分裂的动态调节过程,从而使线粒体形态适应细胞的生物能量需求。线粒体融合过程主要是通过线粒体融合蛋白 (mitochondrial fusion protein, MFN) 1、MFN2 和内膜视神经萎缩蛋白 1 (optic atrophy 1, OPA1) 形成相互连接的网络,使线粒体融合并重新分配其代谢产物、蛋白质和 mtDNA^[14]。在线粒体分裂过程中,动力相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, DRP1)、线粒体分裂因子 (mitochondrial fission factor, MFF) 和线粒体裂变蛋白 1 (mitochondrial fission protein 1, FIS1) 将受损的线粒体分裂成两个单独的线粒体,并通过线粒体自噬途径将其降解。

线粒体融合蛋白对肌肉质量的维持至关重要。特异性破坏 MLC-Cre 转基因小鼠骨骼肌中的线粒体融合基因 *Mfn1* 和 *Mfn2*,破坏了 mtDNA 的完整性,导致其功能丧失^[15]。也有研究发现,肌肉中 *Opa1* 受到抑制时,诱导肌肉功能丧失和全身衰老,甚至会导致比 *Mfn1/2* 缺失更严重的致死表型^[16]。线粒体分裂蛋白对于肌肉质量的维持具有同等重要的作用。研究表明,在 DRP1 和 FIS1 共转染的肌纤维中,线粒体形态发生了变化,引起的肌肉萎缩可被 AMPK/FoxO3 轴所调控^[17]。此外,小鼠 *Drp1*

缺失可导致线粒体形态异常增大,线粒体功能失调,诱导泛素-蛋白酶体和展开蛋白反应,线粒体 Ca^{2+} 摄取增加和肌纤维死亡^[18]。也有研究表明,对 18 月龄小鼠过表达或沉默 *Drp1* 均可导致腓肠肌萎缩^[19]。总之,线粒体融合和分裂失衡均会导致肌萎缩,维持其平衡对于改善肌萎缩至关重要,但各分子与肌萎缩之间的关系尚未完全明确,未来仍需进一步探索。

1.3 线粒体自噬与肌萎缩

线粒体自噬是自噬小体包裹线粒体与溶酶体融合的过程,其作为调控线粒体网络的中介,在决定细胞生存和死亡上发挥重要作用。一般情况下,适度的线粒体自噬有利于清除受损线粒体,而过度的线粒体自噬则加重肌萎缩。线粒体自噬途径包括,一是泛素依赖的自噬,主要由 PTEN 诱导假定激酶 1 (PTEN-induced kinase 1, PINK1) 和 PARK2 基因编码蛋白 (Parkin RBR E3 ubiquitin-protein ligase, Parkin) 参与;二是受体介导的自噬,主要由 Bcl-2 相互作用蛋白 3 (Bcl-2-interacting protein 3, BNIP3)、NIP3 样蛋白 X (NIP3-like protein X, NIX)、FUN14 结构域蛋白 1 (FUN14 domain containing protein 1, FUNDC1) 参与。

PINK1/PARKIN 介导的线粒体自噬:在健康线粒体中,进入线粒体基质的 PINK1 被线粒体加工肽酶裂解;而在功能失调的线粒体中,PINK1 无法进入线粒体基质,其在线粒体外膜上积累并形成二聚体,进而激活 PARKIN。PINK1 可以直接磷酸化 PARKIN,也可以通过磷酸化泛素途径间接激活 PARKIN,泛素化 PARKIN 随后泛素化 MFN1/2,使其从线粒体外膜中提取并降解,从而起到抑制线粒体融合的作用^[20-21]。泛素化的线粒体通过自噬适配器蛋白 (sequestosome 1, SQSTM1/P62) 与自噬微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC-3) B-II 蛋白结合形成的复合物将受损线粒体引导至自噬小体,最终在溶酶体中降解^[22-23]。通过 P62 的参与,受损的线粒体可被有效地清除,从而维持线粒体的功能和数量^[24-25]。研究表明老年及脓毒症小鼠静脉注射腺相关病毒 *Parkin*,小鼠肌肉线粒体含量增加,肌萎缩程度减轻^[26-27]。总之,PARKIN 过表达可成为延缓骨骼肌萎缩的潜在靶点。

受体介导的线粒体自噬:BNIP3、NIX 和 FUNDC1 与 LC3 的相互作用对细胞内自噬通路起着

重要作用。BNIP3/NIX 一旦表达,二聚并定位于线粒体外膜上,通透性过渡孔被打开,线粒体肿胀,线粒体膜电位丧失,从而增强自噬能力。这些受体蛋白不仅自身促进线粒体自噬,而且其二聚化和磷酸化状态也可进一步增强线粒体自噬。研究发现,在人类受试者单腿石膏固定 7 d 和小鼠后肢悬吊 3 d 的肌肉中,NIX 蛋白水平和 mRNA 表达增加,线粒体自噬增强^[28]。也有研究发现,在后肢卸荷诱导的废用性肌萎缩小鼠模型中,雌性小鼠在 24~48 h 时 BNIP3 含量比雄性高 4~10 倍,表明性别与肌萎缩中的线粒体自噬存在相关性^[29]。衰老过程中,人类和小鼠肌肉中 BNIP3 表达增加,可抑制衰老引起的炎症^[30]。此外,在衰老性肌萎缩中,BNIP3 还通过调节线粒体自噬和溶酶体功能来维持线粒体健康^[30],这一发现对以受体介导的线粒体自噬相关蛋白与溶酶体之间关系的研究提供了依据,未来可进一步探索。总之,维持线粒体自噬稳态对于延缓骨骼肌萎缩具有十分重要的作用。

2 运动对不同类型肌萎缩的影响

2.1 运动对衰老性肌萎缩的影响

人类随着年龄的增长,骨骼肌质量逐渐下降,增加了老年人跌倒和骨折的风险,限制了行动能力,进而增加了残疾的风险。因此,对于老年人来说,骨骼肌质量在保持身体健康方面起着重要作用。在衰老性肌萎缩中,PGC-1 α 下降^[11],由此增加 PGC-1 α 可有效缓解肌萎缩发生^[31]。然而线粒体生物生成并不意味着线粒体功能的增强,只有在受损细胞器数量减少的情况下,才能保持线粒体正常的功能。肥胖的老年人在线粒体生物生成中存在问题^[32],尽管 PGC-1 α 的 mRNA 升高,但是线粒体自噬被抑制,进而导致肌萎缩的发生。因此,维持线粒体生物生成与受损线粒体数量的平衡至关重要。老龄鼠的肌肉损失与 OPA1 表达降低相关,定期的运动训练可重新激活老龄鼠肌肉中 OPA1 的表达,进而延缓衰老性肌萎缩^[16]。另有研究证实,有氧运动可以增加线粒体的适应能力^[33]。老龄大鼠、小鼠进行爬梯训练、跑台训练、自由轮转训练,其肌纤维横截面积均增加,肌肉线粒体生物生成和线粒体自噬水平提高,与 AMPK/PGC-1 α 、AKT/mTOR 和 AKT/FoxO3a 信号轴相关,线粒体稳态得到维持,能够有效防治老年性肌萎缩^[34-35]。其中,爬梯训练效果显著。爬梯训练相当于抗阻训练,是促进肌肉肥

大最有效的方式。此外,高强度间歇训练通过激活 SIRT3/PGC-1 α 通路促进线粒体生物生成和线粒体自噬,改善骨骼肌线粒体功能,此研究仅针对雌性大鼠,存在一定的局限性^[36],未来需进一步研究性别对衰老肌萎缩的影响。综上,不同类型的运动均可延缓衰老性肌萎缩,但是性别及运动方式的不同,对于衰老性肌萎缩均会产生不同的影响,未来仍需进一步研究。

2.2 运动对废用性肌萎缩的影响

废用性肌萎缩是指长期不使用某肌肉或某肌群导致其萎缩和功能减退的情况。日常生活中,废用性肌萎缩可由术后卧床休息、长久坐立、微重力环境等因素引起,其在啮齿类动物模型中表现为肢体卸载、悬吊、固定等。有研究显示,后肢废用肌萎缩中的 PGC-1 α 蛋白和 mRNA 含量降低^[37],线粒体自噬活性增加^[38]。Rosa-Caldwell 等^[37]证实多次的后肢悬吊对线粒体质量的降低不会产生叠加效应,此项研究对于多次术后患者由于卧床休息次数过多导致肌萎缩的发生发展具有一定的临床指导意义。此外,线粒体退化发生在废用性肌萎缩前后因性别差异而不同,具体发生在雄性小鼠萎缩之前,雌性之后^[29]。研究表明,运动预处理可以改善机械通气引起的膈肌萎缩和后肢悬吊导致的肢体萎缩。与未进行运动预处理组大鼠相比较,运动预处理组提高了膈肌 PGC-1 α 的表达^[39]、腓肠肌和比目鱼肌 PGC-1 α 和 TFAM 的表达,改善肌萎缩^[40]。也有研究表明,在废用后进行运动疗法同样具有治疗意义。有研究显示,大鼠后肢固定重新活动的 3 d 或 7 d 内^[41-42],PINK1/Parkin 或 BNIP3 分别介导了线粒体自噬途径,同时,PGC-1 α 、NRF-1 和 TFAM 表达增加,线粒体含量增加^[42]。然而,大鼠后肢卸载肌肉恢复的 28 d 或 56 d 后,线粒体自噬标记物水平下降^[37]。由此推测早期阶段线粒体自噬活性的增加可能是一种保护机制,用于清除废用性肌萎缩中肿胀或功能失调的线粒体。然而这种过度的线粒体自噬可导致细胞死亡,加剧骨骼肌萎缩程度^[41]。因此,维持线粒体自噬的稳态至关重要。另有研究表明,对于废用性肌萎缩老年人来说,有氧运动是一种较为合适的运动方式。一项研究对固定 1 周的老年雄性大鼠进行运动干预,发现有氧训练相较于阻力训练来说,足底肌的肌纤维横截面积显著改善,泛素蛋白酶体活性降低,PGC-1 α 表达上调^[43]。另有研究发现,卧床休息的老年人,短期抗阻运动对

骨骼肌线粒体含量无影响^[44]。总之,废用前后进行运动疗法都可改善肌萎缩,其通过促进线粒体生物生成来调节线粒体自噬发挥作用的机制仍需进一步深入研究。

2.3 运动对癌症性肌萎缩的影响

骨骼肌萎缩是癌症的一个主要特征,表现为骨骼肌质量的下降和功能的改变。癌症性肌萎缩与 MQC 失调相关,因此调控 MQC 逐渐成为治疗靶点^[45-46]。研究表明,在接受联合(有氧和抗阻)训练 4 周的 C26 肿瘤携带小鼠中,LC3I/II 比例下降,通过抑制自噬来改变线粒体功能,改善肌萎缩^[47]。此外,对 C26 肿瘤携带小鼠进行中等强度训练,同样降低了自噬相关因子的表达,其与抗氧化能力的提高有关^[48]。癌症化疗后也会导致肌肉萎缩、纤维化和疲劳。有研究表明,对化疗后的 C26 荷瘤小鼠进行中等强度轮跑 2 周可逆转骨骼肌线粒体自噬的增加,提高肌肉的 ATP 含量和代谢能力^[45]。总之,运动可以延缓癌症导致的肌萎缩,大多与抑制线粒体自噬相关。有研究报道了线粒体变性与癌症性肌萎缩的关系,表明癌症小鼠股四头肌中的线粒体变性和在 2 周时明显,而肌肉萎缩在 4 周时明显,说明线粒体变性的峰值出现于肌萎缩发生之前^[49]。由此推测在肌萎缩发生前,早期进行运动干预改善线粒体的变性可作为未来的研究内容。虽然线粒体裂变是线粒体自噬的先决条件,但在癌症肌萎缩模型中对线粒体动力学的研究较少,未来可将线粒体动力学过程作为出发点,研究运动对癌症性肌萎缩的影响。需要注意的是,癌症患者的并发症(如厌食症、贫血等)可能会对肌肉功能的发挥产生一定的影响,未来可将运动疗法与抗贫血治疗^[50]或营养支持^[51]相结合改善肌萎缩。然而有研究表明,癌症晚期患者进行运动会缩短生命^[45]。因此,对癌症患者采用仔细评估的个性化运动治疗方案显得十分重要。

3 总结与展望

MQC 与肌萎缩的发生发展密切相关。不同运动方式对于不同类型肌萎缩发挥着不同的作用。对于废用性肌萎缩的早期阶段,运动可通过促进线粒体生物生成,激活线粒体自噬发挥积极作用;后期阶段则需要抑制线粒体自噬来改善肌萎缩。但对于肌萎缩后期阶段研究较少,未来仍需深入研究。另外,运动基于 MQC 改善肌萎缩仍需探讨线粒

体退化与肌萎缩发生的先后顺序,以寻找运动预处理的最佳治疗时机,为临床研究提供理论基础。此外,今后仍需进行大量实验及临床研究,探讨运动强度、运动时间等作用于肌萎缩不同时期的影响,以期更加系统规范地探讨运动基于 MQC 改善肌萎缩的具体机制,制定个性化运动方案。

参考文献:

- [1] ZHANG H J, WANG B H, WANG X, et al. Handelin alleviates cachexia- and aging-induced skeletal muscle atrophy by improving protein homeostasis and inhibiting inflammation [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2024, 15(1): 173-188.
- [2] TAKAHASHI A, HONDA Y, TANAKA N, et al. Skeletal muscle electrical stimulation prevents progression of disuse muscle atrophy via forkhead box O dynamics mediated by phosphorylated protein kinase B and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha [J]. *Physiol Res*, 2024, 73(1): 105-115.
- [3] JEONG J S, KIM J W, KIM J H, et al. Korean red ginseng suppresses mitochondrial apoptotic pathway in denervation-induced skeletal muscle atrophy [J]. *J Ginseng Res*, 2024, 48(1): 52-58.
- [4] AFFOURTIT C, CARRÉ J E. Mitochondrial involvement in sarcopenia [J]. *Acta Physiol*, 2024, 240(3): e14107.
- [5] DONG H, TSAI S Y. Mitochondrial properties in skeletal muscle fiber [J]. *Cells*, 2023, 12(17): 2183.
- [6] SLAVIN M B, MEMME J M, OLIVEIRA A N, et al. Regulatory networks coordinating mitochondrial quality control in skeletal muscle [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2022, 322(5): C913-C926.
- [7] PAEZ H G, PITZER C R, ALWAY S E. Age-related dysfunction in proteostasis and cellular quality control in the development of sarcopenia [J]. *Cells*, 2023, 12(2): 249.
- [8] RIUS-PÉREZ S, TORRES-CUEVAS I, MILLÁN I, et al. PGC-1α, inflammation, and oxidative stress: an integrative view in metabolism [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 1452696.
- [9] HANDSCHIN C, CHIN S, LI P, et al. Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1α muscle-specific knock-out animals [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(41): 30014-30021.
- [10] KANG C, JI L L. PGC-1α overexpression via local transfection attenuates mitophagy pathway in muscle disuse atrophy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 93: 32-40.
- [11] YEO D, KANG C, GOMEZ-CABRERA M C, et al. Intensified mitophagy in skeletal muscle with aging is downregulated by PGC-1α overexpression *in vivo* [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 130: 361-368.
- [12] KONG S, CAI B, NIE Q. PGC-1α affects skeletal muscle and adipose tissue development by regulating mitochondrial biogenesis

- [J]. *Mol Genet Genomics*, 2022, 297(3): 621–633.
- [13] THEILEN N T, JEREMIC N, WEBER G J, et al. TFAM overexpression diminishes skeletal muscle atrophy after hindlimb suspension in mice [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 666: 138–147.
- [14] GARCÍA-PEÑA L M, ABEL E D, PEREIRA R O. Mitochondrial dynamics, diabetes, and cardiovascular disease [J]. *Diabetes*, 2024, 73(2): 151–161.
- [15] CHEN H, VERMULST M, WANG Y E, et al. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations [J]. *Cell*, 2010, 141(2): 280–289.
- [16] TEZZE C, ROMANELLO V, DESBATS M A, et al. Age-associated loss of OPA1 in muscle impacts muscle mass, metabolic homeostasis, systemic inflammation, and epithelial senescence [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(6): 1374–1389.
- [17] ROMANELLO V, GUADAGNIN E, GOMES L, et al. Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy [J]. *EMBO J*, 2010, 29(10): 1774–1785.
- [18] FAVARO G, ROMANELLO V, VARANITA T, et al. DRP1-mediated mitochondrial shape controls calcium homeostasis and muscle mass [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2576.
- [19] DULAC M, LEDUC-GAUDET J P, CEFIS M, et al. Regulation of muscle and mitochondrial health by the mitochondrial fission protein Drp1 in aged mice [J]. *J Physiol*, 2021, 599(17): 4045–4063.
- [20] CHAN N C, SALAZAR A M, PHAM A H, et al. Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(9): 1726–1737.
- [21] HYATT H, DEMINICE R, YOSHIHARA T, et al. Mitochondrial dysfunction induces muscle atrophy during prolonged inactivity: a review of the causes and effects [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 662: 49–60.
- [22] YANG X, XUE P, YUAN M, et al. SESN2 protects against denervated muscle atrophy through unfolded protein response and mitophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(9): 805.
- [23] JI L L, YEO D, KANG C. Muscle disuse atrophy caused by discord of intracellular signaling [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2020; 33(11): 727–744.
- [24] MEMME J M, OLIVEIRA A N, HOOD D A. p53 regulates skeletal muscle mitophagy and mitochondrial quality control following denervation-induced muscle disuse [J]. *J Biol Chem*, 2022, 298(2): 101540.
- [25] WANG Z, XIA T, JIN S, et al. Chronic restraint stress-induced muscle atrophy leads to fatigue in mice by inhibiting the AMPK signaling pathway [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(10): 1321.
- [26] LEDUC-GAUDET J P, REYNAUD O, HUSSAIN S N, et al. Parkin overexpression protects from ageing-related loss of muscle mass and strength [J]. *J Physiol*, 2019, 597(7): 1975–1991.
- [27] LEDUC-GAUDET J P, MAYAKI D, REYNAUD O, et al. Parkin overexpression attenuates sepsis-induced muscle wasting [J]. *Cells*, 2020, 9(6): 1454.
- [28] LEERMAKERS P A, KNEPPERS A E M, SCHOLS A M W J, et al. Skeletal muscle unloading results in increased mitophagy and decreased mitochondrial biogenesis regulation [J]. *Muscle Nerve*, 2019, 60(6): 769–778.
- [29] ROSA-CALDWELL M E, LIM S, HAYNIE W S, et al. Mitochondrial aberrations during the progression of disuse atrophy differentially affect male and female mice [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2021, 12(6): 2056–2068.
- [30] IRAZOKI A, MARTINEZ-VICENTE M, APARICIO P, et al. Coordination of mitochondrial and lysosomal homeostasis mitigates inflammation and muscle atrophy during aging [J]. *Aging Cell*, 2022, 21(4): e13583.
- [31] LIANG J, ZHANG H, ZENG Z, et al. Lifelong aerobic exercise alleviates sarcopenia by activating autophagy and inhibiting protein degradation via the AMPK/PGC-1 α signaling pathway [J]. *Metabolites*, 2021, 11(5): 323.
- [32] POTES Y, PÉREZ-MARTINEZ Z, BERMEJO-MILLO J C, et al. Overweight in the elderly induces a switch in energy metabolism that undermines muscle integrity [J]. *Aging Dis*, 2019, 10(2): 217–230.
- [33] TROUWBORST I, VERREIJEN A, MEMELINK R, et al. Exercise and nutrition strategies to counteract sarcopenic obesity [J]. *Nutrients*, 2018, 10(5): 605.
- [34] ZENG Z, LIANG J, WU L, et al. Exercise-induced autophagy suppresses sarcopenia through Akt/mTOR and Akt/FoxO3a signal pathways and AMPK-mediated mitochondrial quality control [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 583478.
- [35] WANG C, LIANG J, REN Y, et al. A preclinical systematic review of the effects of chronic exercise on autophagy-related proteins in aging skeletal muscle [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 930185.
- [36] HAN C, LU P, YAN S Z. Effects of high-intensity interval training on mitochondrial super complex assembly and biogenesis, mitophagy, and the AMP-activated protein kinase pathway in the soleus muscle of aged female rats [J]. *Exp Gerontol*, 2022, 158: 111648.
- [37] ROSA-CALDWELL M E, BROWN J L, PERRY R A Jr, et al. Regulation of mitochondrial quality following repeated bouts of hindlimb unloading [J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2020, 45(3): 264–274.
- [38] YAMASHITA S I, KYUUMA M, INOUE K, et al. Mitophagy reporter mouse analysis reveals increased mitophagy activity in disuse-induced muscle atrophy [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(11): 7612–7624.
- [39] SMUDER A J, MORTON A B, HALL S E, et al. Effects of exercise preconditioning and HSP72 on diaphragm muscle function during mechanical ventilation [J]. *J Cachexia*

Sarcopenia Muscle, 2019, 10(4): 767-781.

[40] THEILEN N T, JEREMIC N, WEBER G J, et al. Exercise preconditioning diminishes skeletal muscle atrophy after hindlimb suspension in mice [J]. J Appl Physiol, 2018, 125(4): 999-1010.

[41] WANG F, ZHOU T, ZHOU C X, et al. The worsening of skeletal muscle atrophy induced by immobilization at the early stage of remobilization correlates with BNIP3-dependent mitophagy [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2023, 24(1): 632.

[42] DEVAL C, CALONNE J, COUDY-GANDILHON C, et al. Mitophagy and mitochondria biogenesis are differentially induced in rat skeletal muscles during immobilization and/or remobilization [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(10): 3691.

[43] VECHETTI-JUNIOR I J, BERTAGLIA R S, FERNANDEZ G J, et al. Aerobic exercise recovers disuse-induced atrophy through the stimulus of the LRP130/PGC-1 α complex in aged rats [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2016, 71(5): 601-609.

[44] MARSHALL R N, SMEUNINX B, SEABRIGHT A P, et al. No effect of five days of bed rest or short-term resistance exercise prehabilitation on markers of skeletal muscle mitochondrial content and dynamics in older adults [J]. Physiol Rep, 2022, 10(13): e15345.

[45] BALLARÒ R, BELTRÀ M, LUCIA S D, et al. Moderate exercise in mice improves cancer plus chemotherapy-induced muscle wasting and mitochondrial alterations [J]. FASEB J, 2019, 33(4): 5482-5494.

[46] MALLARD J, HUCTEAU E, HUREAU T J, et al. Skeletal muscle deconditioning in breast cancer patients undergoing chemotherapy: current knowledge and insights from other cancers [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 719643.

[47] RANJBAR K, BALLARÒ R, BOVER Q, et al. Combined exercise training positively affects muscle wasting in tumor-bearing mice [J]. Med Sci Sports Exerc, 2019, 51(7): 1387-1395.

[48] BALLARÒ R, PENNA F, PIN F, et al. Moderate exercise improves experimental cancer *Cachexia* by modulating the redox homeostasis [J]. Cancers, 2019, 11(3): 285.

[49] BROWN J L, ROSA-CALDWELL M E, LEE D E, et al. Mitochondrial degeneration precedes the development of muscle atrophy in progression of cancer cachexia in tumour-bearing mice [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2017, 8(6): 926-938.

[50] HASSAN TALUKDER M A H, LEE J I, HEGARTY J P, et al. Obligatory role of Schwann cell-specific erythropoietin receptors in erythropoietin-induced functional recovery and neurogenic muscle atrophy after nerve injury [J]. Muscle Nerve, 2021, 63(2): 268-272.

[51] WU Z J, LI W H, YANG Y H, et al. Eicosapentaenoic acid-enriched phospholipids alleviate skeletal muscle atrophy in lewis lung carcinoma mouse model [J]. Mol Nutr Food Res, 2023, 67(13): e2300033.

[收稿日期]2023-11-30

曹湘雯,李敏,殷琦,等. MHC 功能及其转基因小鼠模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(6): 151-160.

Cao XW, Li M, Yin Q, et al. Progress of research on MHC function and transgenic mouse models [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 151-160.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.020

MHC 功能及其转基因小鼠模型的研究进展

曹湘雯^{1,2}, 李 敏², 殷 琦², 韩雪莲², 王 原², 赵光宇^{1,2*}

(1.牡丹江医学院公共卫生学院,黑龙江 牡丹江 157011;2.军事科学院军事医学研究院
微生物流行病学研究所,病原微生物生物安全全国重点实验室,北京 100071)

【摘要】 主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)与机体免疫调节密切相关,不仅具有遗传多态性,而且 MHC 限制性存在种属差异。人类的 MHC 被称为人白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA),小鼠 MHC 则被称为 H-2。构建人源化 MHC 转基因小鼠模型是突破 MHC 种属差异并模拟人体免疫应答特征的重要策略。MHC 转基因小鼠主要分为 MHC I 或 MHC II 单转基因小鼠模型和 MHC I 与 MHC II 双转基因小鼠模型。HLA I 类转基因小鼠模型发展经历了 3 个阶段,目前采取敲除 H-2K^b 和 H-2D^b 或者敲除鼠源 β_2m 的策略来消除内源的 H-2 I 类分子对 HLA I 类分子的竞争性抑制;HLA II 类转基因小鼠模型的构建则是将鼠源 β 链敲除,转入 HLA II 类基因。随着构建策略的优化,MHC 转基因小鼠模型被应用于表位疫苗研发、肿瘤治疗及疾病遗传关联研究中,成为临床前试验的有力工具。本文对 MHC 转基因小鼠模型相关资料进行了总结,概述了 MHC 转基因小鼠模型的构建策略及其在疫苗研发、疾病治疗等方面的应用进展。

【关键词】 主要组织相容性复合体;小鼠模型;免疫;表位疫苗;肿瘤治疗

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0151-10

Progress of research on MHC function and transgenic mouse models

CAO Xiangwen^{1,2}, LI Min², YIN Qi², HAN Xuelian², WANG Yuan², ZHAO Guangyu^{1,2*}

(1. Public Health School, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China.

2. State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology,
Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

【Abstract】 The major histocompatibility complex (MHC) is closely related to immune regulation. MHC shows distinct genetic polymorphism, and there are also species differences in MHC restriction. The human MHC is called human leukocyte antigen (HLA), and the mouse MHC is called H-2. The construction of humanized MHC transgenic mouse models is an important strategy to overcome the differences in MHC among species and simulate the characteristics of a human immune response. MHC transgenic mice are mainly divided into MHC I or MHC II single-transgenic mouse models and MHC I and MHC II double-transgenic mouse models. The development of HLA I transgenic mouse model went through three stages, at present, the strategy of knocking out H-2K^b and H-2D^b or murine β_2m is adopted to eliminate the competitive inhibition of HLA I molecules by endogenous H-2 class I molecules. In the construction of an HLA II transgenic mouse model, the β strand of murine origin is knocked out and HLA II class genes are inserted. With the optimization of construction strategies, MHC transgenic mouse models have been applied to epitope vaccine development, tumor treatment, and genetic disease-association studies, becoming a powerful tool for preclinical trials. In this paper, we

【基金项目】 国家重点研发计划(2022YFC2304103)。

【作者简介】 曹湘雯(1997—),女,硕士研究生,研究方向:动物模型及感染免疫防护。E-mail: CXWcxw0313@163.com

【通信作者】 赵光宇(1979—),男,博士,研究员,研究方向:动物模型及感染免疫防护。E-mail: guangyu0525@163.com

summarize the relevant data on MHC transgenic mouse models, as well as the construction strategies used for MHC transgenic mouse models and their application in vaccine development and disease treatment.

[Keywords] major histocompatibility complex; mouse models; immunity; epitope vaccines; oncology treatment

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

MHC 是哺乳动物染色体上的一组基因群,编码细胞膜上与抗原呈递相关的蛋白^[1]。由于 MHC 在宿主免疫反应中发挥关键作用^[2-3],而人类和动物 MHC 存在种属差异,因此通过转基因动物模型模拟人体 MHC 功能的相关研究得到关注和发展。小鼠模型具备体型小、繁殖能力强、遗传背景清晰等优势,是实验中常用的动物模型^[4]。由于 MHC 的种属差异性,导致常规的小鼠模型在研究人类自身免疫性疾病、异种移植、肿瘤治疗等方面存在局限性。为解决上述问题,科学家们将人类 MHC 整合到小鼠基因组中,以构建 MHC 转基因小鼠模型,尽可能消除动物模型实验和人类受试者研究间的差异。随着 MHC 转基因策略的优化,人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)可在 MHC 转基因小鼠体内稳定表达,训练出足够数量的免疫细胞并发挥正常功能,使模型具备与人类相近的免疫反应。本文从 MHC 的结构功能和多态性入手,阐述了 MHC 与疾病的关联,对 MHC 转基因小鼠的构建策略和应用情况进行综述。

1 MHC 相关研究进展

1.1 MHC 的命名与功能

人们对于 MHC 的研究可追溯到上个世纪, Snell 等^[5]将引起排异反应的抗原命名为组织相容性抗原。MHC 分为 3 类(MHC I 类、II 类和 III 类),编码主要组织相容性抗原,几乎所有的脊椎动物都携带 MHC I 类和 II 类基因。H-2 由小鼠的第 17 号染色体编码;HLA 位于人类 6 号染色体的短臂 6p21.31 区,基因大小为 3.6 Mb,覆盖了 0.13% 的人类基因组^[6-7]。随着越来越多的 HLA 等位基因被检测发现,为便于命名,2010 年 HLA 命名委员会正式规整新的命名法,将所有等位基因用斜体表示,名称至少包含两组数字^[8],如 *HLA-A*24:02*。

MHC I 类分子表达在有核细胞表面,与内源性抗原肽结合,供 CD8⁺T 细胞识别^[9]。MHC II 类分子主要表达在专职性抗原递呈细胞(antigen-presenting cell, APC)表面,APC 与 CD4⁺T 细胞相互作用,促进免疫系统对外源性抗原的识别和清除。MHC 对免疫系统的调节作用与 TCR 的形成和选择

相关。最新研究发现,胸腺细胞上前 T 细胞受体(preTCR)的信号传导是 $\alpha\beta$ T 细胞系发育的关键检查点,双阴性胸腺细胞的 preTCR 同双阳性胸腺细胞的 $\alpha\beta$ TCR 均通过分子对接方式将肽与胸腺基质上的 MHC 分子(pMHC)结合;MHC 调控细胞在胸腺的增殖和细胞库的发育,当 pMHC 与 preTCR 不能正常相互作用时,胸腺细胞的去分化转录程序将出现问题,DN 和 DP 亚群增殖异常,显现骨髓性恶性肿瘤的前驱特征^[10]。锚定 MHC 的肽位置对预测 T 细胞反应尤为重要,通过预测常见 HLA 等位基因的高概率锚定位点,实现对新抗原的正确识别^[11-12]。鉴于有限的 pMHC 结构与肽和 MHC 的多样性,研究者利用 MHC 分子对接结构理论,设计了根据结合位点构建 3D MHC 模型的软件“PANDORA”^[13-14],实现了对蛋白组结构的高效分析,丰富了 pMHC 结合亲和力和质谱数据。总之,MHC 在免疫系统中的重要功能,使它成为构建人源化转基因小鼠模型的理想选择;而锚定位是抗原呈递的关键所在,为后期 HLA 限制性多肽疫苗的设计提供了理论支撑。

1.2 MHC 的多态性

长期的自然选择和病原体入侵使 HLA 在人群中不同个体间具有丰富的多态性和多基因性^[15-16],每个基因座上有两种以上等位基因,编码超过 160 种不同功能的蛋白质^[17]。HLA 等位基因频率数据库(allele frequency net database, AFND)引入了新的数据集分类标准,比如样本量大于 50,等位基因频率总和为 1 等^[18],但是该数据库并未更新近年数据,不利于研究人员对 HLA 的统计分析;另外,HLA 等位基因频率计算方法不同,影响不同群体间 HLA 基因频率的对比。2022 年,复旦大学徐书华团队发布了数据库和计算分析平台——PGG. MHC,收录了 66 个国家,190 个人群,53 254 个个体的全基因组、全外显子组测序数据,对每个样本进行了经典 HLA 基因座的基因分型^[18],该平台的可视化板块方便检索者更直观地了解全球、各地区和各国家的等位基因频率分布。

随着新一代测序技术能够更准确、高通量、高分辨率地对 HLA 基因进行分型,更多的 HLA 新等

位基因被发现^[19],如 *HLA-C* * 03 : 538^[20]、*HLA-C* * 04 : 438^[21]、*HLA-C* * 05 : 255^[22]、*HLA-B* * 15 : 583^[23]和 *HLA-DRB1* * 11 : 279^[23]等。参照 IMGT/HLA 数据库相关数据^[24],截至 2023 年 10 月,已经发现的 HLA 等位基因数共 37 516 个,其中 HLA I 类等位基因数为 26 341 个,HLA II 类等位基因数为 11 175 个。*HLA-B* 是 HLA I 类中等位基因最多的基因,有 9573 个;在 HLA II 类中,等位基因数最多的是 *HLA-DRB*,有 4530 个。HLA 多态性检测有助于进一步加深对自身免疫性疾病(如系统性红斑狼疮、类风湿关节炎^[25-26])和感染性疾病(如艾滋病、结核病等)的易感性研究,有助于推进个体化医疗的进程。

由于 MHC 等位基因非随机性表达和连锁不平衡的特点,MHC 的地理分化和族群分布存在显著差异^[19]。高频率等位基因的连锁,为多聚体表位疫苗的设计策略提供了理论支撑。据 HLA 等位基因频率相关文献^[18]和 PGG. MHC 数据库(<https://www.pggmhc.org/pggmhc>)统计,中国人群 MHC I 类分子高频率等位基因为 *HLA-A* * 02、*HLA-A* * 11、*HLA-A* * 24、*HLA-B* * 40、*HLA-B* * 15、*HLA-C* * 03、*HLA-C* * 01,MHC II 类分子高频率等位基因为 *HLA-DRB1* * 15、*HLA-DRB1* * 09、*HLA-DQB1* * 03、*HLA-DQB1* * 06,以上基因频率均高于 10%。值得关注的是,汉族是世界上人口最多的民族,约有 13 亿人口,占中国人口的 92%,占全球人口的 18%;中国汉族人群中 *HLA-A* * 30:01~*C* * 06:02~*B* * 13:02~*DRB1* * 07:01~*DQA1* * 02:01~*DQB1* * 02:01~*DPA1* * 02:01~*DPB1* * 17:01 基因型连锁出现的频率最高,为 2.51%,而新加坡汉族人群中 *HLA-A* * 33:03~*C* * 03:02~*B* * 58:01~*DRB1* * 03:01~*DQA1* * 05:01~*DQB1* * 02:01~*DPA1* * 01:03~*DPB1* * 04:01 基因型连锁出现的频率最高,为 3.42%。在中国和新加坡,汉族人 HLA 优势亚型基因频率略有不同。中国人群优势 HLA I 类基因亚型以 *HLA-A* * 24:02、*HLA-A* * 02:07 和 *HLA-A* * 11:01 为主,而在世界人群中,这些 HLA 基因亚型频度低于 8%;中国人群优势 HLA II 类基因亚型主要是 *HLA-DRB1* * 09:01 等,其在水人群中频度不足 5%。

1.3 MHC 与疾病的关联

上个世纪末,众多学者发现 MHC 的变异是各种复杂疾病的主要危险因素^[27],MHC 与特定疾病的易感性研究始终是科研领域的热点话题^[28]。

MHC 分型技术的发展推动了以单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)为遗传标志的癌症遗传关联研究,推进了序列变异与疾病风险关联评估的发展。从区域 SNP 推断 HLA 类型的方法得到广泛应用,可对各种疾病的 MHC 变异做出精确定位^[29]。

在对自身免疫性疾病的研究中发现,MHC 的改变可导致 6% 的遗传变异,同时引发系统性红斑狼疮^[30]、1 型糖尿病^[31]、强直性脊柱炎^[32]等疾病。系统性红斑狼疮和类风湿关节炎患者的血浆可溶性主要组织相容性人类白细胞抗原 G(soluble HLA-G, sHLA-G)的水平显著高于健康人群^[33],且与患者病情呈正相关,提示 sHLA-G 在病理过程中可能发挥重要作用。在对血管疾病的研究中发现,血清 β_2 微球蛋白(β_2 -microglobulin, β_2m)能快速反映机体的免疫状态,或可成为预测急性缺血性卒中(AIS)复发的新颖生物标志物,当 AIS 患者的 β_2m 水平高于 2.31 mg/L 时,易复发该病^[34]。在白血病与 *HLA-B* * 51 的相关性研究中发现,*HLA-B* * 51 是白血病的危险因素,但该基因不能作为白血病的诊断标准^[35]。除上述疾病外,MHC 在神经系统疾病中同样扮演重要角色,这表明神经系统疾病存在自身免疫性。MHC 的多基因突变会增加精神分裂症与双相情感障碍的患病风险^[36-37],单一 MHC I 类分子 HLA-F 的高表达可以保护人类运动神经元免受肌萎缩性侧索硬化症星形细胞介导的毒性影响^[38]。另有研究强调帕金森^[39]与 HLA 区域变异有密不可分的关系,发现不同种族帕金森患者 MHC 区域共同的遗传特征在于 *HLA-DRB1* 的 13 位氨基酸^[40]。根据全基因组关联研究(genome-wide association studies, GWAS)分析帕金森风险变异基因情况,至今已鉴定出 20 多个帕金森相关基因,为该病治疗药物的开发提供了新靶点^[41-43]。HLA 基因型与肿瘤抗原在免疫系统中的呈递密切相关,因此了解 HLA 基因型对于研究癌症患者的免疫反应至关重要,但就现有的测序技术而言,HLA 突变型并非肿瘤诊断的金标准。因此,有研究者尝试 sHLA-G 的角度进行癌症生物标志物的潜力分析^[44-45]。

在 HLA 相关肽筛选鉴定及其与疾病关联性研究中,MHC 转基因小鼠模型是不可或缺的工具,当缺少人类样本或分析 MHC 分子功能时,能够有效模拟 MHC I 和 MHC II 分子功能的动物模型具有重要价值。

2 MHC 转基因小鼠的构建

2.1 MHC I 类单转基因小鼠模型的构建策略与优化

H-2 与 HLA 呈递的表位不完全相同,在进行 HLA 限制性表位研究时,普通小鼠模型不能完全呈现 HLA 对 T 细胞活化的影响和效应。鼠源基因测序结果表明,小鼠与人类基因相似度达 90%^[46],基因高同源性有利于 HLA 片段顺利整合到小鼠基因组中并保持稳定遗传。1987 年首例人 MHC 转基因小鼠模型构建成功^[47],随后,科学家们为减弱物种间的免疫反应特异性,对 MHC 转基因的改造进行了探索。为增强人源 $\alpha 3$ 和 CD8 分子结合的竞争力,研究人员一方面尝试将 HLA I 类基因序列和人 CD8 基因序列同时转入小鼠基因组中,另一方面尝试对 HLA I 类分子进行结构优化,将人源 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 结构域和鼠源 $\alpha 3$ 结构域进行嵌合,即组建为 HHM 结构,转入小鼠基因组,获得了代表性的小鼠模型 HLA-B27(HHM)转基因小鼠^[48]。按照上述策略构建的小鼠模型,H-2 仍然具备调控免疫细胞反应的能力。为了消除 H-2 I 类分子对 HLA I 类分子的竞争性抑制,使小鼠模型仅产生 HLA I 类分子限制性反应,研究人员通过 Linker(15 个氨基酸组成)将人类或小鼠的 β_2m 与 α 链的氨基末端连接,最终形成的模型构建策略是以 H-2D^{b/-}/ β_2m ^{-/-}双敲除小鼠为受体,转入以下三种方案改造的 HLA I 类基因:HHH,人类 HLA 的 β_2m 与 α 链;HHD,人类 HLA 的前导区、 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域以及小鼠 H-2D^d 的 $\alpha 3$ 、跨膜结构和胞质结构域;MHD,人类 HLA 的前导区、 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域以及小鼠 β_2m ^b、跨膜结构和胞质结构域^[49-50]。依据上述 HHD 方法构建的小鼠模型,无法形成完整的 H-2 I 类分子异源二聚体,导致鼠源 H-2 功能受限,最终 HLA I 类分子能够在转基因小鼠体内主导细胞免疫反应^[51]。例如,HLA-A2(HHD)单转基因小鼠模型,其具备正常比例和数量的 CD8⁺T 细胞,表明在该 MHC 转基因小鼠中,HLA 能够正常参与 T 细胞在胸腺发育的阴性选择和阳性选择,这类人源化小鼠模型后被应用到创新性疫苗的效果评价中,如人类巨细胞病毒疫苗效果评估^[52]等。

2.2 MHC II 类单转基因小鼠模型的构建策略与优化

MHC II 类单转基因小鼠模型的构建策略也在

逐步改进。最初,科学家们直接将 MHC II 类分子的 α 链或 β 链相关基因整合到小鼠基因组中^[53],如构建的 HLA-DR1 转基因小鼠,其内源性 H-2 II 类分子的表达降低了 HLA-DR1 限制性反应的强度,而对于 H-2 I A β 敲除的 HLA-DR1 转基因小鼠而言,不论是在胸腺对 T 细胞的训练还是 HLA-DR1 限制性反应均强于 H-2 I A β 未敲除的 MHC 转基因小鼠^[54]。为提高同源 MHC II 类分子($\beta 2$ 结构域)与 CD4 分子的识别结合,使用鼠源 $\alpha 2$ 与 $\beta 2$ 结构域,或是将小鼠体内引入人源 CD4(hCD4)分子相关基因,最终优化策略为敲除鼠源 β 链相关基因,并将人类 HLA II 类基因整合到小鼠体内。该策略有利于 HLA II 类分子与鼠源 CD4 分子的结合。依据上述策略构建了 HLA-DR15 转基因小鼠^[55],即敲除 H-2 I A β ,同时嵌合 *HLA-DRB1* * 15:01 的启动子和非编码区,通过显微注射的方式整合到受体小鼠的胚胎中。经验证,HLA-DR15 转基因小鼠模型可进行人体免疫反应模拟实验,后被应用到 HLA 表位的筛选和疫苗评价中。

2.3 MHC I 和 MHC II 双转基因小鼠模型

为利用 MHC 转基因小鼠更准确地评估候选疫苗在免疫系统中的免疫原性,构建了 MHC I 和 MHC II 双转基因小鼠模型,如 HLA-A2/DR1 小鼠模型^[56]等。运用 HHD 的构建策略嵌合 HLA 转基因片段,敲除 H-2 I 类基因和 H-2 II 类基因。最终将构建的 MHC 转基因小鼠模型应用到人体免疫反应模拟实验中,监测到 H-2 不会干扰 HLA 限制性的 CD8⁺和 CD4⁺T 细胞免疫应答。

转基因 HLA 在人群中的覆盖率会影响 MHC 人源化模型在 HLA 限制性研究中的实用性,可利用不同人群的 MHC 分型数据对模型进行改良,以期建立更大适用范围的模型。现有的 HLA-A2/DR1 小鼠模型只涵盖了约 3%~9% 的人类群体,而 *HLA-DP4* 基因座是最具多态性的 HLA 等位基因之一^[57],有广泛的免疫原性^[58],可被不同的 TCR 识别^[59],在人群中占 20%~80%,其中在欧洲人群中占 50%,在北美人群中占 80%,在南美人群中占 60%^[60]。将依据 HHD 方法构建的 HLA-A2.1 转基因小鼠模型与 HLA-DP4/hCD4 转基因 H-2 II (I A β)/mCD4 敲除小鼠模型杂交,最终获得的 HLA-A2.1^{+/+}/HLA-DP4^{+/+}/hCD4^{+/+}小鼠模型可以模拟与 25% 的人类相似的免疫反应^[60],利用该转基因小鼠模型筛选的 HLA-A2 和 HLA-DP4 限制性表位疫苗,

对绝大多数人产生免疫保护。另外,根据中国人群 MHC 频率特征(HLA 基因频率较高的 *HLA-A2*、*HLA-A11*、*HLA-A24*、*HLA-DR09*、*HLA-DR15* 和 *HLA-DR01* 等)构建具有中国人群 MHC 优势的人源化小鼠模型,如 *HLA-A11/DR1* 双转基因小鼠模型^[61]等,在针对中国人群的疾病免疫防治方面具有明显优势。

3 MHC 转基因小鼠模型在疾病防治中的应用

3.1 MHC 转基因小鼠模型在肿瘤治疗中的应用

人体对肿瘤细胞的识别依赖于 TCR 与多肽-主要组织相容性复合物(pMHC)的相互作用,肿瘤细胞的抗原密度会影响 TCR-pMHC 的结合动力学,进而调控 T 细胞的活化。近年来,免疫治疗如火如荼地开展,MHC 转基因小鼠模型通过模拟人体对肿瘤细胞的监测与攻击测试多种免疫疗法对肿瘤的治疗效果,为抗击肿瘤带来新的曙光。

MHC 转基因小鼠模型在肿瘤治疗中的相关应用主要有:①肿瘤演进与异质化的研究:将人类肿瘤细胞移植到 MHC 转基因小鼠模型体内,可有效地表达人类肿瘤抗原,有利于研究肿瘤在人体内演进(生长、增殖、凋亡、浸润和转移等)机制,如免疫细胞源性胞外囊泡可抑制或促进肿瘤生长,继而影响机体对肿瘤的免疫应答^[62]。②肿瘤免疫治疗策略的研究:利用共价抑制剂产生的半抗原肽作为 MHC 呈递的新抗原,将靶向疗法和免疫疗法结合,能够选择性杀死耐药癌细胞^[63];利用 HLA 设计靶向疫苗^[64],如 *HLA-A2* 靶向疫苗治疗胶质母细胞瘤^[65],前列腺癌表位与 MHC 表位配体分析^[66]。MHC 转基因小鼠可用于评价肿瘤免疫治疗策略,其中 *HLA-A2* 转基因小鼠已经是研究肿瘤相关 *HLA-A2* 限制性 CTL 表位的成熟模型,如利用 *HLA-A2* 转基因小鼠评价脂质体端粒酶逆转录酶肽的免疫原性和抗肿瘤效率^[67],发现了候选表位肽 p944v 对 $\text{IFN-}\gamma^+$ CD107a^+ CD8^+ T 细胞的有效诱导。尽管肿瘤抗原肽的免疫原性较低,但 MHC 转基因小鼠的使用有力推进了创新型肿瘤疫苗的效果评价。另外,MHC 还与细胞因子^[68]、免疫检查点抑制剂等治疗策略相关,为临床癌症患者提供了新的治疗选择,如人乳头瘤病毒表位的治疗性疫苗^[69]等。③肿瘤免疫逃逸机制的研究:MHC I 类分子作为肿瘤免疫反应的关键组分,通过递呈肿瘤特异性肽段给 CD8^+ T 细胞而触发细胞免疫应答^[70]。在肿瘤的演进过程中,由 T 细胞介导的 MHC I 类阴性肿瘤细胞的

选择逐渐增强,使 MHC I 类分子呈现出不同的表达模式^[71],而肿瘤细胞通过降低免疫细胞表面 MHC I 类分子的表达水平躲避了免疫细胞的识别和攻击,通过增加免疫检查点分子(如 CTLA-4、PD-1、PD-L1 等)的表达抑制了 T 细胞的活性^[72],从而能够避开免疫系统的监视。了解肿瘤免疫逃逸的机制有利于制订更有效的肿瘤免疫治疗策略,进一步发展 MHC 肿瘤疫苗^[73]、免疫检查点抑制剂^[74-75]和 CAR-T 细胞疗法^[76]等,为肿瘤患者带来更多福音。

3.2 MHC 转基因小鼠模型在表位疫苗研发中的应用

MHC 转基因小鼠接种研发成熟的人类疫苗,如乙型肝炎 DNA 疫苗等,观察小鼠体内特异性抗体的水平,验证所建模型模拟人体免疫反应的能力。MHC 在新型表位疫苗研制中居于重要地位,尤其在研发抗病毒保护性疫苗方面,凭借 MHC 的高频率覆盖,可使多数人群获得保护性免疫。如今,在预测出覆盖全球 98% 以上人群的 MHC 基因的基础上,通过使用免疫表位数据库(immune epitope database, IEDB)等前沿的信息学算法系统成功分析出了汉坦病毒包膜糖蛋白 C 末端(hantaan virus glycoprotein C-terminal, HTNV Gc)9 肽和 15 肽表位^[77]。这些表位具备亲和力高、保守性强和免疫原性强的特性,其中,HLA I 类亚型 *HLA-B15* 优势表位数目最多,有 24 个 9 肽表位;HLA II 类亚型 *HLA-DRB1* 优势表位数目最多,有 41 个 15 肽表位;另外,人鼠共同优势表位有 8 个。通过对 HLA 限制性表位肽进行多维度的分析和探索,这些优势表位为 HTNV Gc 特异性人群保护性表位疫苗的研发奠定了基础。

MHC 限制性表位疫苗也给新型冠状病毒的防疫带来了契机。在新型冠状病毒(SARS-CoV-2)肆虐、病毒 S 蛋白关键位点突变的情况下,不断出现新的变异毒株。常规的疫苗仅通过病毒的 S 蛋白抗原表位或 B 细胞表位诱导人体产生以体液免疫为主的免疫应答,通过中和抗体对病毒进行中和,这种保护远不能应对病毒变异的速度。已报道的以人群优势 HLA 限制性 T 细胞表位为疫苗抗原制备的 mRNA 疫苗,能够使 MHC 转基因小鼠同时产生 Th1 和 Th2 细胞免疫反应,使人体产生稳定保护性免疫,可有力应对 SARS-CoV-2 的变异。由于 mRNA 疫苗与多肽疫苗翻译的蛋白结构不同,表位呈递的形式

和效率不同,所以对疫苗在佐剂和递送系统转录骨架优化的选择上有更严苛的要求^[78-79]。运用 HLA-A2/DR1 转基因小鼠评价多表位 mRNA 候选疫苗的成效,以 C57BL/6 小鼠为对照组,结果发现:在混合抗原肽的刺激下,MHC 转基因小鼠模型能够产生极强的 CTL 细胞免疫反应和 Th 细胞免疫反应,而对对照组小鼠无法准确评价疫苗的效果^[80]。基于 MHC 转基因小鼠模型的评价,多表位 mRNA 候选疫苗的成效得到了可靠的验证,为疫苗研发和免疫治疗的进一步发展提供了宝贵的参考,详见表 1。

4 总结与展望

随着 MHC 与疾病相关性的研究进展,MHC 转基因小鼠模型已成为生物医学研究的关键模型,在人类疫苗的评价、候选表位疫苗的筛选、肿瘤治疗等方面具有重要的应用前景。由于不同疾病所受 HLA 限制性可能不同,在设计 MHC 转基因小鼠时,需要根据研究目的选择合适的 HLA 基因。目前,主

要以 MHC 单转基因小鼠模型杂交的方式获得 MHC 双转基因小鼠模型,未来希望对 MHC 转基因的设计更加灵活,优化出可将多种 MHC 基因同时转入小鼠体内的构建策略,使 HLA 基因在小鼠体内更高效地表达,提高模型的可靠性和适用性。另外,在繁育 MHC 转基因小鼠模型的过程可能伴随 HLA 基因丢失,考虑与外源基因整合方法有关。未来期待有更先进的转基因技术和基因编辑技术确保外源基因的精准整合,维持外源基因的稳定表达和正常功能。

综上所述,MHC 转基因动物模型的发展已经开始助力人类疾病防治基础和应用研究,随着 MHC 转基因动物模型模拟人体免疫应答状态的程度不断提高和模拟 MHC 在宿主免疫识别、防御和调节过程中的功能越来越精准,人们对免疫系统的理解将更进一步加深,MHC 影响宿主免疫防御力的精细机制会不断得到深入解析,疫苗、药物及免疫疗法的研发和应用将得到更加强有力的技术支撑。

表 1 MHC 转基因小鼠模型的应用
Table 1 Application of MHC transgenic mouse models

MHC 转基因小鼠模型 MHC transgenic mouse model	应用 Application	备注 Note
HLA-A11/DR1 ^[55]	筛选鉴定获得埃博拉病毒核蛋白 HLA-A11 限制性 CTL 表位肽 Ebola virus nucleoprotein HLA-A11 restriction CTL epitope peptide was identified by screening	HHD/H-2D ^{b-}
HLA-A11/DR1 ^[70]	T 细胞对瓜氨酸化静脉蛋白和烯醇化酶的识别应用于抗肿瘤免疫 T cell recognition of citrullinated venous proteins and enolases for anti-tumor immunity	HHD/H-2D ^{b-}
HLA-A2. 1/DP4 ^[80]	验证新型冠状病毒多表位 mRNA 疫苗 Validation of novel coronavirus multi-epitope mRNA vaccines	HHD/H-2D ^{b-}
HLA-A2/DR1 ^[81]	HLA-A2 介导的 HPV16 表位的治疗性疫苗接种 HLA-A2-mediated therapeutic vaccination with HPV16 epitopes	HHD/H-2D ^{b-}
HLA-DP4 ^[82]	验证肽精氨酸脱亚胺酶 2 介导的核磷蛋白瓜氨酸化是肿瘤免疫治疗的有效靶点 Validation of peptide arginine deiminase 2-mediated nucleophosphoprotein citrullination as an effective target for tumor immunotherapy	H-2D ^{b-} /mβ ₂ m ⁻
HLA-A2. 1 ^[83]	验证 HLA I 类限制性表位是 1 型糖尿病自身免疫反应的靶点 Validation of HLA class I restricted epitopes as targets for the autoimmune response in type 1 diabetes	HHD/H-2D ^{b-}
HLA-B39 ^[84]	改良 HLA 转基因小鼠模型用于 1 型糖尿病的治疗 A modified HLA transgenic mouse model for the treatment of type 1 diabetes	HHD/mMHC I ^{-/-}
HLA-DQ8 ^[85]	HLA-DQ8 小鼠模型麦胶蛋白特异性肠病机制研究 Mechanism of gliadin-specific intestinal disease in HLA-DQ8 mouse model	mMHC II ^{-/-}
HLA-DR15 ^[86]	验证工程化髓鞘碱性蛋白特异性人调节性 T 细胞可改善磷脂寡糖细胞糖蛋白诱导的脑脊髓炎效应 T 细胞抑制 Validation of engineered myelin basic protein-specific human regulatory T cells to improve myelin oligosaccharide cell glycoprotein-induced inhibitory T cell suppression of cerebral myelitis effector T cells	mMHC II ^{-/-}
HLA-DR2 ^[87]	验证 TNFR2 限制性星形胶质细胞的功能 To verify the function of TNFR2-restricted astrocytes	mMHC II ^{-/-}

参考文献:

- [1] KO H J, KIM Y J. Antigen delivery systems: past, present, and future [J]. *Biomol Ther*, 2023, 31(4): 370–387.
- [2] MEDHASI S, CHANTRATITA N. Human leukocyte antigen (HLA) system: genetics and association with bacterial and viral infections [J]. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 9710376.
- [3] BASU A, ALBERT G K, AWSHAH S, et al. Identification of immunogenic MHC class II human HER3 peptides that mediate anti-HER3 CD4⁺ Th1 responses and potential use as a cancer vaccine [J]. *Cancer Immunol Res*, 2022, 10(1): 108–125.
- [4] 李浩, 张琪. 动脉粥样硬化小鼠模型应用进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(6): 787–794.
- LI H, ZHANG Q. Progress in the application of arteriosclerosis mouse models [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(6): 787–794.
- [5] SNELL G D, RUSSELL E, FEKETE E, et al. Resistance of various inbred strains of mice to tumor homoiotransplants, and its relation to the H-2 allele which each carries [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1953, 14(3): 485–491.
- [6] CLAEYS A, MERSEBURGER P, STAUT J, et al. Benchmark of tools for in silico prediction of MHC class I and class II genotypes from NGS data [J]. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 247.
- [7] KANG J B, SHEN A Z, GURAJALA S, et al. Mapping the dynamic genetic regulatory architecture of HLA genes at single-cell resolution [J]. *Nat Genet*, 2023, 55(12): 2255–2268.
- [8] HURLEY C K. Naming HLA diversity: a review of HLA nomenclature [J]. *Hum Immunol*, 2021, 82(7): 457–465.
- [9] CH'NG A C W, LAM P, ALASSIRI M, et al. Application of phage display for T-cell receptor discovery [J]. *Biotechnol Adv*, 2022, 54: 107870.
- [10] DUKE-COHAN J S, AKITSU A, MALLIS R J, et al. Pre-T cell receptor self-MHC sampling restricts thymocyte dedifferentiation [J]. *Nature*, 2023, 613(7944): 565–574.
- [11] XIA H, MCMICHAEL J, BECKER-HAPAK M, et al. Computational prediction of MHC anchor locations guides neoantigen identification and prioritization [J]. *Sci Immunol*, 2023, 8(82): eabg2200.
- [12] ZHAI Y, CHEN L, ZHAO Q, et al. Cysteine carboxyethylation generates neoantigens to induce HLA-restricted autoimmunity [J]. *Science*, 2023, 379(6637): eabg2482.
- [13] MARZELLA D F, CROCIONI G, PARIZI F M, et al. The PANDORA software for anchor-restrained peptide: MHC modeling [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2673: 251–271.
- [14] MARZELLA D F, PARIZI F M, VAN TILBORG D, et al. PANDORA: a fast, anchor-restrained modelling protocol for peptide: MHC complexes [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 878762.
- [15] KWOK A J, MENTZER A, KNIGHT J C. Host genetics and infectious disease: new tools, insights and translational opportunities [J]. *Nat Rev Genet*, 2021, 22(3): 137–153.
- [16] KUIPER J J, PRINZ J C, STRATIKOS E, et al. EULAR study group on ‘MHC-I-opathy’: identifying disease-overarching mechanisms across disciplines and borders [J]. *Ann Rheum Dis*, 2023, 82(7): 887–896.
- [17] MILLION K M, LIVELY C M. Trans-specific polymorphism and the convergent evolution of supertypes in major histocompatibility complex class II genes in darters (*Etheostoma*) [J]. *Ecol Evol*, 2022, 12(1): e8485.
- [18] ZHAO X, MA S, WANG B, et al. PGG. MHC: toward understanding the diversity of major histocompatibility complexes in human populations [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D1102–D1108.
- [19] TRAN J N, SHERWOOD K R, MOSTAFA A, et al. Novel alleles in the era of next-generation sequencing-based HLA typing calls for standardization and policy [J]. *Front Genet*, 2023, 14: 1282834.
- [20] ZHAO S, CHEN N, HE Y, et al. The novel HLA-C allele, C * 03: 538 was identified by next-generation sequencing [J]. *HLA*, 2022, 100(4): 378–379.
- [21] JACOB V, FARCE F, KAVERI R, et al. Characterization of the novel HLA-C * 04: 438 allele by next generation sequencing [J]. *HLA*, 2022, 99(1): 53–54.
- [22] GATOULLAT G, TABARY T, TONYE-LIBYH M, et al. Characterization of the novel HLA-C * 05: 255 allele by next-generation sequencing [J]. *HLA*, 2022, 99(1): 55–56.
- [23] LOGINOVA M, MAKHOVA O, KUTYAVINA S, et al. Two new HLA alleles, HLA-B * 15: 583 and DRB1 * 11: 279, detected in individuals from the Irkutsk Region [J]. *HLA*, 2021, 97(5): 458–459.
- [24] BARKER D J, MACCARI G, GEORGIOU X, et al. The IPD-IMGT/HLA database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D1053–D1060.
- [25] RAVINDRANATH M H, RAVINDRANATH N M, AMATO-MENKER C J, et al. Antibodies for β 2-microglobulin and the heavy chains of HLA-E, HLA-F, and HLA-G reflect the HLA-variants on activated immune cells and phases of disease progression in rheumatoid arthritis patients under treatment [J]. *Antibodies*, 2023, 12(2): 26.
- [26] 李日许, 叶晓彤, 陈健钊, 等. 风湿性关节炎胶原诱导型与佐剂诱导型大鼠模型的建立与对比分析 [J]. *实验动物科学*, 2023, 40(2): 49–60.
- LI R X, YE X T, CHEN J Z, et al. Establishment and comparative analysis of collagen-induced arthritis (CIA) and adjuvant-induced arthritis (AA) rat models of rheumatoid arthritis [J]. *Lab Anim Sci*, 2023, 40(2): 49–60.
- [27] SINGH J, RONSARD L, PANDEY M, et al. Molecular and genetic characterization of natural variants of HIV-1 nef gene from North India and its functional implication in down-regulation of MHC-I and CD-4 [J]. *Curr HIV Res*, 2021, 19(2): 172–187.

- [28] NAITO T, OKADA Y. HLA imputation and its application to genetic and molecular fine-mapping of the MHC region in autoimmune diseases [J]. *Semin Immunopathol*, 2022, 44(1): 15–28.
- [29] RICAÑO-PONCE I, PEETERS T, MATZARAKI V, et al. Impact of human genetic variation on C-reactive protein concentrations and acute appendicitis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 862742.
- [30] HA E, BAE S C, KIM K. Recent advances in understanding the genetic basis of systemic lupus erythematosus [J]. *Semin Immunopathol*, 2022, 44(1): 29–46.
- [31] POSTIGO-FERNANDEZ J, FIRDESSA-FITE R, CREUSOT R J. Preclinical evaluation of a precision medicine approach to DNA vaccination in type 1 diabetes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(15): e2110987119.
- [32] XIONG Y, CAI M, XU Y, et al. Joint together: The etiology and pathogenesis of ankylosing spondylitis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 996103.
- [33] REZAEIYAZDI Z, REZAEIAN A, KHODASHAHI M. Serum level of soluble human leukocyte antigen G in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis [J]. *Curr Rheumatol Rev*, 2023, 19(1): 64–71.
- [34] HU F Y, WU W, LIU Q, et al. β 2-microglobulin is a novel and reliable biomarker for predicting ischemic stroke recurrence: a prospective cohort study [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 916769.
- [35] TAKENO M. The association of Behçet's syndrome with HLA-B51 as understood in 2021 [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2022, 34(1): 4–9.
- [36] 王凤娟, 于小亚, 丁瑜, 等. 精神分裂症动物模型的研究进展 [J]. *实验动物科学*, 2021, 38(5): 70–74.
- WANG F J, YU X Y, DING Y, et al. Research progression of animal model in schizophrenia [J]. *Lab Anim Sci*, 2021, 38(5): 70–74.
- [37] RICHARDS A L, CARDNO A, HAROLD G, et al. Genetic liabilities differentiating bipolar disorder, schizophrenia, and major depressive disorder, and phenotypic heterogeneity in bipolar disorder [J]. *JAMA Psychiatry*, 2022, 79(10): 1032–1039.
- [38] ALLARDYCE J, LEONENKO G, HAMSHERE M, et al. Association between schizophrenia-related polygenic liability and the occurrence and level of mood-incongruent psychotic symptoms in bipolar disorder [J]. *JAMA Psychiatry*, 2018, 75(1): 28–35.
- [39] 吕海燕, 侯广玉, 朱梅. MPTP 致帕金森病动物模型的研究进展 [J]. *实验动物科学*, 2022, 39(4): 64–68.
- LYU H Y, HOU G Y, ZHU M. Advances in animal models of MPTP induced Parkinson's disease [J]. *Lab Anim Sci*, 2022, 39(4): 64–68.
- [40] NAITO T, SATAKE W, OGAWA K, et al. Trans-ethnic fine-mapping of the major histocompatibility complex region linked to Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 2021, 36(8): 1805–1814.
- [41] FERNÁNDEZ-SANTIAGO R, SHARMA M. What have we learned from genome-wide association studies (GWAS) in Parkinson's disease? [J]. *Ageing Res Rev*, 2022, 79: 101648.
- [42] HAMZA T H, ZABETIAN C P, TENESA A, et al. Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(9): 781–785.
- [43] KUNG P J, ELSAYED I, REYES-PÉREZ P, et al. Immunogenetic determinants of Parkinson's disease etiology [J]. *J Parkinsons Dis*, 2022, 12(s1): S13–S27.
- [44] KHAN A, SHIN J Y, SO M K, et al. Characterization of HLA-A * 33:03 epitopes via immunoprecipitation and LC-MS/MS [J]. *Proteomics*, 2022, 22(1/2): e2100171.
- [45] TANUWIDJAYA E, SCHITTENHELM R B, FARIDI P. Soluble HLA peptidome: a new resource for cancer biomarkers [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 1069635.
- [46] 李雪婷, 韩乐, 王雪文, 等. 啮齿类动物衰老模型研究新进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(12): 1605–1609.
- LI X C, HAN L, WANG X W, et al. Research progress in aging rodent models [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(12): 1605–1609.
- [47] KRIMPENFORT P, RUDEENKO G, HOCHSTENBACH F, et al. Crosses of two independently derived transgenic mice demonstrate functional complementation of the genes encoding heavy (HLA-B27) and light (β 2-microglobulin) chains of HLA class I antigens [J]. *EMBO J*, 1987, 6(6): 1673–1676.
- [48] KALINKE U, ARNOLD B, HÄMMERLING G J. Strong xenogeneic HLA response in transgenic mice after introducing an alpha 3 domain into HLA B27 [J]. *Nature*, 1990, 348(6302): 642–644.
- [49] JIN D, LOH K L, SHAMEKHI T, et al. Engineering cell lines for specific human leukocyte antigen presentation [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2691: 351–369.
- [50] PASCOLO S, BERVAS N, URE J M, et al. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8⁺ T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice [J]. *J Exp Med*, 1997, 185(12): 2043–2051.
- [51] BIX M, RAULET D. Functionally conformed free class I heavy chains exist on the surface of beta 2 microglobulin negative cells [J]. *J Exp Med*, 1992, 176(3): 829–834.
- [52] CHIUPPESI F, NGUYEN J, PARK S, et al. Multiantigenic modified vaccinia virus Ankara vaccine vectors to elicit potent humoral and cellular immune responses against human cytomegalovirus in mice [J]. *J Virol*, 2018, 92(19): e01012–e01018.
- [53] FUGGER L, MICHIE S A, RULIFSON I, et al. Expression of HLA-DR4 and human CD4 transgenes in mice determines the variable region beta-chain T-cell repertoire and mediates an HLA-DR-restricted immune response [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,

- 1994, 91(13): 6151–6155.
- [54] PAJOT A, PANCRÉ V, FAZILLEAU N, et al. Comparison of HLA-DR1-restricted T cell response induced in HLA-DR1 transgenic mice deficient for murine MHC class II and HLA-DR1 transgenic mice expressing endogenous murine MHC class II molecules [J]. *Int Immunol*, 2004, 16(9): 1275–1282.
- [55] 李丹. 人 MHC 双转基因小鼠模型制备及埃博拉病毒核蛋白 MHC 限制性表位研究 [D]. 北京: 军事科学院, 2018.
- LI D. The Establishment of Humanized MHC Transgenic Mice and Reseach on the MHC-restricted epitopes in the EBOV-NP protein [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2018.
- [56] BALLHAUSEN A, PRZYBILLA M J, JENDRUSCH M, et al. The shared frameshift mutation landscape of microsatellite-unstable cancers suggests immunoediting during tumor evolution [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4740.
- [57] CASTELLI F A, BUHOT C, SANSON A, et al. HLA-DP4, the most frequent HLA II molecule, defines a new supertype of peptide-binding specificity [J]. *J Immunol*, 2002, 169(12): 6928–6934.
- [58] CIACCHI L, VAN DE GARDE M D B, LADELL K, et al. CD4⁺ T cell-mediated recognition of a conserved cholesterol-dependent cytolysin epitope generates broad antibacterial immunity [J]. *Immunity*, 2023, 56(5): 1082–1097.
- [59] LI F, ZHU M M, NIU B W, et al. Generation and expression analysis of BAC humanized mice carrying HLA-DP401 haplotype [J]. *Animal Model Exp Med*, 2021, 4(2): 116–128.
- [60] RU Z, XIAO W, PAJOT A, et al. Development of a humanized HLA-A2.1/DP4 transgenic mouse model and the use of this model to map HLA-DP4-restricted epitopes of HBV envelope protein [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32247.
- [61] 曾扬. 人 MHC 转基因小鼠模型建立及其应用基础研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2016.
- ZENG Y. The establishment and identification of humanized MHC transgenic mice and basic application research [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2016.
- [62] SHAO X, HUA S, FENG T, et al. Hypoxia-regulated tumor-derived exosomes and tumor progression: a focus on immune evasion [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11789.
- [63] HATTORI T, MASO L, ARAKI K Y, et al. Creating MHC-restricted neoantigens with covalent inhibitors that can be targeted by immune therapy [J]. *Cancer Discov*, 2023, 13(1): 132–145.
- [64] WU X, LI T, JIANG R, et al. Targeting MHC-I molecules for cancer: function, mechanism, and therapeutic prospects [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 194.
- [65] WEN P Y, REARDON D A, ARMSTRONG T S, et al. A randomized double-blind placebo-controlled phase II trial of dendritic cell vaccine ICT-107 in newly diagnosed patients with glioblastoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(19): 5799–5807.
- [66] FOOS G, BLAZESKA N, NIELSEN M, et al. A meta-analysis of epitopes in prostate-specific antigens identifies opportunities and knowledge gaps [J]. *Hum Immunol*, 2023, 84(11): 578–589.
- [67] HORIUCHI Y, TAKAGI A, UCHIDA T, et al. Targeting cryptic epitope with modified antigen coupled to the surface of liposomes induces strong antitumor CD8 T-cell immune responses *in vivo* [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(6): 2827–2836.
- [68] LEBRETON F, HANNA R, WASSMER C H, et al. Mechanisms of immunomodulation and cytoprotection conferred to pancreatic islet by human amniotic epithelial cells [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2022, 18(1): 346–359.
- [69] CHEN C W, SAUBI N, JOSEPH-MUNNÉ J. Chimeric human papillomavirus-16 virus-like particles presenting HIV-1 P18110 peptide: expression, purification, bio-physical properties and immunogenicity in BALB/c mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9): 8060.
- [70] BRENTVILLE V A, SYMONDS P, COOK K W, et al. T cell repertoire to citrullinated self-peptides in healthy humans is not confined to the HLA-DR SE alleles; targeting of citrullinated self-peptides presented by HLA-DP4 for tumour therapy [J]. *Oncoimmunology*, 2019, 8(5): e1576490.
- [71] GARRIDO F. MHC/HLA class I loss in cancer cells [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1151: 15–78.
- [72] KAUR K, CHEN P C, KO M W, et al. The role of checkpoint inhibitors in autoimmune diseases: similarities and differences compared with cancer [J]. *Crit Rev Immunol*, 2022, 42(3): 23–36.
- [73] RAVINDRANATH M H, RAVINDRANATH N M, SELVAN S R, et al. Four faces of cell-surface HLA class-I: their antigenic and immunogenic divergence generating novel targets for vaccines [J]. *Vaccines*, 2022, 10(2): 339.
- [74] MORAD G, HELMINK B A, SHARMA P, et al. Hallmarks of response, resistance, and toxicity to immune checkpoint blockade [J]. *Cell*, 2022, 185(3): 576.
- [75] 张静, 张赞, 赵磊, 等. CD40 免疫检查点人源化小鼠的制备及在抗体药物研究中的应用 [J]. *实验动物科学*, 2021, 38(3): 10–16, 28.
- ZHANG J, ZHANG Z, ZHAO L, et al. Establishment of CD40 immune checkpoint humanized mice and their application in antibody drug research [J]. *Lab Anim Sci*, 2021, 38(3): 10–16, 28.
- [76] ARJOMANDNEJAD M, KOPEC A L, KEELER A M. CAR-T regulatory (CAR-treg) cells: engineering and applications [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(2): 287.
- [77] 谢明阳, 孙报增, 马思婕, 等. 汉滩病毒 Gc 的细胞免疫反应性评估和验证 [J]. *陆军军医大学学报*, 2023, 45(19): 2007–2017.
- XIE M Y, SUN B Z, MA S J, et al. Evaluation and validation on cellular immunoreactivity of Hantaan virus Gc [J]. *J Army Med Univ*, 2023, 45(19): 2007–2017.
- [78] KALITA P, TRIPATHI T. Methodological advances in the design of peptide-based vaccines [J]. *Drug Discov Today*, 2022, 27(5): 1367–1380.

[79] POGOSTIN B H, YU M H, AZARES A R, et al. Multidomain peptide hydrogel adjuvants elicit strong bias towards humoral immunity [J]. *Biomater Sci*, 2022, 10(21): 6217–6229.

[80] 薛卫. 新型冠状病毒人 MHC 限制性多表位 mRNA 疫苗基础研究 [D]. 云南: 昆明理工大学, 2023.

XUE W. Basic research on HLA-restricted multi-epitope mRNA vaccines for SARS-CoV-2 [D]. Yunnan: Kunming University of Science and Technology, 2023.

[81] KRUSE S, BÜCHLER M, UHL P, et al. Therapeutic vaccination using minimal HPV16 epitopes in a novel MHC-humanized murine HPV tumor model [J]. *Oncoimmunology*, 2019, 8(1): e1524694.

[82] CHOUDHURY R H, SYMONDS P, PASTON S J, et al. PAD-2-mediated citrullination of nucleophosmin provides an effective target for tumor immunotherapy [J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(2): e003526.

[83] CALVIÑO-SAMPEDRO C, GOMEZ-TOURINO I, CORDERO O J, et al. Naturally presented HLA class I-restricted epitopes from the neurotrophic factor S100-β are targets of the autoimmune response in type 1 diabetes [J]. *FASEB J*, 2019, 33(5): 6390–6401.

[84] RACINE J J, STEWART I, RATIU J, et al. Improved murine MHC-deficient HLA transgenic NOD mouse models for type 1 diabetes therapy development [J]. *Diabetes*, 2018, 67(5): 923–935.

[85] MAURANO F, OGITA T, LUONGO D, et al. Innate immunity is a late event in the onset of gliadin-specific enteropathy in the HLA-DQ8 mice [J]. *Immunobiology*, 2020, 225(3): 151903.

[86] KIM Y C, ZHANG A H, YOON J, et al. Engineered MBP-specific human Tregs ameliorate MOG-induced EAE through IL-2-triggered inhibition of effector T cells [J]. *J Autoimmun*, 2018, 92: 77–86.

[87] RAPHAEL I, GOMEZ-RIVERA F, RAPHAEL R A, et al. TNFR2 limits proinflammatory astrocyte functions during EAE induced by pathogenic DR2b-restricted T cells [J]. *JCI Insight*, 2019, 4(24): e132527.

[收稿日期]2023-12-29

(上接第 86 页)

[12] 肖隆斌, 吴文辉, 刘其龙. 17-二甲基胺乙基-17-去甲基格尔德霉素对人胃癌裸鼠移植瘤血管内皮生长因子表达的抑制作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(8): 1489–1493.

XIAO L B, WU W H, LIU Q L. Inhibition of 17-DMAG on VEGF expression in transplanted human gastric cancer in nude mice [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2010, 26(8): 1489–1493.

[13] CHIEN C C, KEMPSON I M, WANG C L, et al. Complete microscale profiling of tumor microangiogenesis: a microradiological methodology reveals fundamental aspects of tumor angiogenesis and yields an array of quantitative parameters for its characterization [J]. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(3): 396–401.

[14] 廖坚松, 陈焕忠, 茹晃耀, 等. 17-DMAG 对人结直肠癌裸鼠移植瘤微血管形成的抑制作用 [J]. *新医学*, 2014, 45(6): 364–367.

LIAO J S, CHEN H Z, RU H Y, et al. Inhibition of 17-DMAG on microvessel formation in nude mice with transplanted human colorectal cancer [J]. *N Med*, 2014, 45(6): 364–367.

[15] 汤颖, 叶增纯, 李灿明, 等. VEGF 对小鼠足细胞黏附性的影响及 PI3K/Akt 信号通路在其中的作用 [J]. *新医学*, 2013, 44(10): 671–675.

TANG Y, YE Z C, LI C M, et al. Role of VEGF and associated PI3K/Akt signaling pathway on the adhesion of mouse podocyte [J]. *N Med*, 2013, 44(10): 671–675.

[16] KIM L S, KIM J H. Heat shock protein as molecular targets for breast cancer therapeutics [J]. *J Breast Cancer*, 2011, 14(3): 167–174.

[17] FRANCO M C, YE Y, REFAKIS C A, et al. Nitration of Hsp90 induces cell death [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(12): E1102–E1111.

[收稿日期]2023-12-08

徐菁菁,田燕歌,梅雪,等.线粒体质量控制在呼吸系统疾病中的研究进展[J].中国比较医学杂志,2024,34(6):161-171.
Xu JJ, Tian YG, Mei X, et al. Research progress in mitochondrial quality control in respiratory diseases [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 161-171.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.021

线粒体质量控制在呼吸系统疾病中的研究进展

徐菁菁¹, 田燕歌^{2,3}, 梅雪^{1*}, 赵鹏^{2,3}, 连云峰¹, 孙肖¹

(1.河南中医药大学医学院,郑州 450046;2.河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心,郑州 450046;3.河南中医药大学河南省中医药防治呼吸病重点实验室,郑州 450046)

【摘要】 呼吸系统疾病(肺部炎症、肺纤维化)严重危害人类健康。作为真核细胞特有的细胞器,线粒体不仅在产生能量、生物合成和维持细胞内稳态中具有重要功能,而且作为多样化的信号细胞器,参与炎症、增殖、分化、细胞修复等过程。线粒体质量控制系统包括线粒体生物发生、线粒体动力学和线粒体自噬。研究发现,呼吸系统疾病的某些病理机制如氧化应激、炎症等与线粒体质量控制失调密切相关。因此,本文总结线粒体质量控制失调在呼吸系统疾病(慢性阻塞性肺疾病、肺纤维化、急性肺损伤、哮喘和细菌性肺炎)的研究进展,以期从线粒体的角度寻求呼吸系统疾病防治的新思路。

【关键词】 线粒体生物发生;线粒体动力学;线粒体自噬;呼吸系统疾病

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0161-11

Research progress in mitochondrial quality control in respiratory diseases

XU Jingjing¹, TIAN Yangge^{2,3}, MEI Xue^{1*}, ZHAO Peng^{2,3}, LIAN Yunfeng¹, SUN Xiao¹

(1. School of Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Henan Provincial Education Office and Henan University of Traditional Chinese Medicine to Establish Joint Innovation Center for Respiratory Diseases in Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046. 3. Key Experimental Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Diseases in Henan Province, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

【Abstract】 Respiratory diseases (e.g., lung inflammation and pulmonary fibrosis) are a serious threat to human health. Mitochondria, organelles unique to eukaryotic cells, not only have important functions in energy production, biosynthesis, and the maintenance of intracellular homeostasis but also act as diverse signaling organelles involved in inflammation, proliferation, differentiation, cell repair, and other processes. The mitochondrial quality control system involves mitochondrial biogenesis, dynamics, and autophagy. Certain pathological mechanisms of respiratory diseases, such as oxidative stress and inflammation, are closely related to the dysregulation of mitochondrial quality control systems. This paper summarizes the progress of research into mitochondrial quality control dysregulation in respiratory diseases (chronic obstructive pulmonary disease, pulmonary fibrosis, acute lung injury, asthma, and bacterial pneumonia) to explore new ideas for the prevention and treatment of respiratory diseases.

【Keywords】 mitochondrial biogenesis; mitochondrial dynamics; mitochondrial autophagy; respiratory diseases

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

【基金项目】 河南省自然科学基金(242300421294);国家自然科学基金(82074406)。

【作者简介】 徐菁菁(1999—),女,硕士研究生,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病的基础研究。E-mail:xjjdeyouxiang99@163.com

【通信作者】 梅雪(1978—),女,硕士,教授,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病的基础研究。E-mail:meixue0363@sina.com

线粒体在大多数细胞内广泛分布,通常只有 1 μm 大小,并不断移动、分裂和融合,形成一个动态的网络。线粒体通过氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 产生能量,参与生物合成以及维持细胞内稳态^[1]。同时作为多样化的信号细胞器,线粒体参与炎症、增殖、分化、细胞衰老、细胞修复等过程^[2]。

肺的主要功能是进行气体交换,使循环中的通气血流比维持在正常范围。肺线粒体在为这一功能提供能量方面起着核心作用。大多数肺部细胞依赖吸进的 O_2 进行有氧糖酵解,以支持线粒体的 OXPHOS,进而为需要能量供应的活动提供三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP)^[3]。线粒体密度越高,它的呼吸能力和对 O_2 的依赖就越大^[4]。而线粒体对 O_2 的不完全还原会产生低水平的化学氧化剂如活性氧 (reactive oxygen species, ROS),过量产生的 ROS 会导致细胞供能方式从有氧糖酵解转为厌氧糖酵解和其他 ATP 生成反应^[5],影响线粒体的抗氧化能力,诱导线粒体损伤和线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的释放,从而激活炎症反应^[6]。除了能量代谢外,细胞内线粒体信号功能对于保护细胞也是不可或缺的。有多种信号转导机制将线粒体活动与细胞其他成分联系起来,从而完成细胞各种生理活动。例如线粒体与细胞质和内质网之间可以通过 Ca^{2+} 信号调节能量代谢,这对于细胞 Ca^{2+} 、脂质和 ATP 的交换很重要^[7]。此外有研究发现,线粒体在细胞凋亡中也起着重要作用。mtDNA 损伤、ROS 等可以激活线粒体膜上促凋亡的 B 淋巴细胞瘤蛋白-2 (B-cell lymphoma protein 2, Bcl-2) 家族成员,这导致线粒体膜电位 ($\Delta\Psi\text{m}$) 崩溃,促凋亡蛋白胱天蛋白酶 1 (caspase-1) 和 caspase-3 释放,进而诱导细胞凋亡^[8]。在本篇综述中,我们概述了线粒体质量控制与部分呼吸系统疾病的关系。

1 线粒体质量控制的概述

线粒体质量控制 (mitochondrial quality control, MQC) 是防止线粒体损伤和保护其完整性的自主调控系统^[9]。研究发现,线粒体质量控制包括 3 种机制,分别是线粒体的生物发生^[10]、线粒体动力学^[11]和线粒体自噬^[12]。这些环节相互协调作用以维持细胞线粒体稳态。

1.1 线粒体的生物发生

线粒体生物发生维持线粒体数目、构造和功能

的稳态,线粒体生物发生是一种细胞程序,通过合成新的线粒体来维护 mtDNA、调节能量的产生、维持机体内环境的稳态^[13]。线粒体包含自身遗传物质和转录系统,与其生物发生过程息息相关。在线粒体中,复制和转录紧密相连^[14]。线粒体生物发生涉及线粒体和核基因组之间的协调,这是一个复杂而多步骤的过程,主要涉及 mtDNA 的转录和翻译以及核 DNA 编码线粒体蛋白的合成、导入和组装^[10]。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 家族在线粒体生物发生中发挥着重要作用^[15],并且受 PGC-1 α -核因子 E2 相关因子 1/2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 1/2, NRF1/2)-线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 通路的调控,此通路的激活导致 mtDNA 和蛋白质的合成,产生新的线粒体^[13]。除了 PGC-1 α 外,还有其他通路参与线粒体生物发生,如沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1) 和腺单磷酸腺苷活化的蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)。SIRT1 以及 AMPK 可上调 PGC-1 α ,以调节线粒体中呼吸相关基因的转录和 mtDNA 水平^[16]。未来具有挑战性的是研究出基于线粒体生物发生相关靶点的疗法来治疗相关疾病。

1.2 线粒体动力学

线粒体动力学是高度动态的,经历融合、裂变、运输和降解的过程^[17]。线粒体动力学主要由线粒体融合和分裂组成。线粒体并不是互不干扰的,相反,线粒体之间可以通过内外膜融合变成一个线粒体^[18]。线粒体由线粒体外膜 (outer mitochondrial membrane, OMM)、膜间隙、内膜与基质组成^[19]。两个独立的线粒体融合在概念上很直观;先是两个线粒体物理上的并列,之后是可逆的鸟苷三磷酸酶 (GTPase) 独立的分子相连,随后是不可逆的 GTPase 依赖的线粒体外膜的融合,最后线粒体内膜融合^[20]。GTPase 家族蛋白分为融合与裂变相关蛋白。融合相关蛋白包括线粒体融合蛋白 1/2 (mitofusin 1/2, Mfn1/2) 和视神经萎缩蛋白 1 (optic atrophy protein-1, OPA1)^[21]。线粒体分裂对抗融合,可以产生一个或多个子代线粒体^[22]。最新研究发现,线粒体存在外周分裂和中区分裂两种形式。外周分裂导致受损物质脱落成更小的线粒体,用于

线粒体自噬。而中区分裂则导致了线粒体的增殖。这两种类型都是由 GTPase 家族的相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, Drp1) 也称为 DNMI1L 介导的。但内质网和肌动蛋白介导的预收缩和线粒体分裂因子 (mitochondrial fission factor, Mff) 只控制中间区裂变。外周裂变之前会发生溶酶体接触,并由线粒体分裂蛋白 1 (fission mitochondrial 1, Fis1) 调节。这些不同的分子机制解释了细胞如何调节线粒体分裂,导致了线粒体不同的命运^[23]。这或许可以给我们在调控特定的线粒体分裂方式来维护线粒体稳态的机制提供思路。

1.3 线粒体自噬

线粒体自噬可以清除受损或功能障碍的线粒体,从而在细胞的代谢、稳态、发育中发挥重要作用^[24]。线粒体自噬是一个过程,由线粒体产生的囊泡吞噬选定的线粒体成分,并将其送到溶酶体或过氧化物酶体进行降解^[25]。自噬机制较为复杂,目前研究发现主要通过以下两种途径介导。

一是不依赖泛素介导的线粒体自噬,包括线粒体自噬受体 BCL2 相互作用蛋白 3 (B lymphocytoma-2 gene-homology 3, BNIP3)、BNIP3 样蛋白^[26-28]和 FUN14 结构域包含体蛋白 (FUN14 domain-containing protein 1, FUNDC1)^[29]。它们具有泛素化结合位点及微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 相互作用区 (LC3-interacting region, LIR), LIR 与 LC3 结合将受损的线粒体转运至自噬小体,介导选择性线粒体自噬。二是需要泛素 PRKN (parkin RBR (ring-between-ring) E3 ubiquitin-protein ligase) 介导的自噬。Parkin 被选择性地招募到细胞中具有低 $\Delta\Psi_m$ 的功能失调的线粒体。在招募后, Parkin 蛋白介导自噬体对目标线粒体吞噬,并选择性地消除受损的线粒体。这表明 Parkin 蛋白促进了受损线粒体的自噬^[30]。随后有研究表明,通过 RNA 干扰对磷酸酶及张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN) 诱导假定激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1) 积累的抑制,发现 $\Delta\Psi_m$ 去极化依赖的 PINK1 激活与 PINK1 的积累是 Parkin 磷酸化的一个关键因素,尤其是每一个 PINK1 基因缺失和突变体都不能有效地刺激 Parkin 磷酸化,强烈表明完整的 PINK1 对 Parkin 磷酸化的重要性^[31]。生理情况下, PINK1 会被线粒体内膜蛋白酶识别、剪切,最终被降解;而在

受损线粒体中, PINK1 稳定积累在 OMM 上,并发生磷酸化激活 Parkin,导致多种 OMM 蛋白泛素化,从而吸引自噬关键蛋白 sequestosome 1 (SQSTM1)/p62、神经蛋白 (optineurin, OPTN)。这些受体蛋白可以与 OMM 蛋白结合,进而诱导其 LIR 基序与 LC3 结合,最终启动自噬程序降解被标记的线粒体^[32-33]。在细胞损伤早期,线粒体自噬增强通常可促进细胞生存,但线粒体长期或过度损伤可导致过度线粒体自噬,从而诱导细胞死亡和组织损伤^[34]。而自噬的不足则可能引起损伤线粒体堆积,耗氧量增加和 ROS 增多,对细胞造成损害^[31]。最近,更多研究线粒体自噬过程的新技术也被发明了出来,例如有研究者设计了一种名为 TOLLES (溶酶体环境耐受性) 的青色荧光蛋白,它可以抵抗酸性环境和溶酶体中的蛋白酶^[35]。然后将 TOLLES 与黄色荧光蛋白 YPet 融合。因为 YPet 对酸和蛋白酶都敏感,所以这种结构在溶酶体环境中失去了黄色荧光。因此在活细胞中可以观察到保留的青色荧光,来作为自噬的读数^[35]。

2 线粒体质量控制与慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)

COPD 是一个日益严重的重大全球健康问题,目前是全球第三大死亡原因^[36]。接触香烟烟雾和生物质烟雾是该病常见的危险因素,可直接影响肺上皮细胞^[37]。COPD 的特征是进行性气流受限、小气道的慢性炎症和纤维化以及肺实质的破坏^[38]。长期暴露于香烟烟雾中导致线粒体功能障碍、线粒体形态延长。COPD 患者支气管上皮细胞线粒体嵴碎裂和破坏,导致细胞凋亡和衰老,并且其肺泡灌洗液中 ATP 水平升高^[39-40]。ATP 通常由气道中多种类型的细胞释放,过量释放时可激活炎症小体,进而破坏线粒体,导致 mtDNA 和过量的线粒体 ROS (mitochondrial reactive oxygen species, mtROS) 释放到细胞质中,破坏细胞稳态^[41]。氧化应激似乎是 COPD 发病机制及其进展的驱动因素。过度的氧化应激能够改变线粒体的功能、形态以及 RNA 和蛋白质的含量^[42]。在香烟烟雾刺激下, mtROS 的数量大幅度增加^[43]。COPD 与 mtROS 生成增加、抗氧化能力下降、OXPHOS 水平受损和线粒体数量减少有关^[44]。也有证据表明, COPD 患者的膈肌和骨骼肌中存在线粒体生物发生和自噬的改变,可能导致患者肌力的丧失^[45]。因此,线粒体质量控制很可能在 COPD 发病机制中发挥关键作用。

2.1 线粒体生物发生在 COPD 发病中的作用

线粒体生物发生主要由 AMPK-PGC-1 α 通路调控,这一通路受到氧化应激的影响^[46]。香烟烟雾可以增加支气管上皮细胞中 AMPK 和白介素 8 (interleukin-8, IL-8) 的表达^[47]。香烟烟雾还会诱导 DNA 的损伤反应,这会增加 PGC-1 α 和线粒体的生物发生^[48]。PGC-1 α 在 COPD 模型的支气管上皮细胞中表达上调,表示在 COPD 中线粒体生物发生增加^[49]。PGC-1 α 诱导的线粒体生物发生可以恢复短暂暴露于氧化应激的细胞内的线粒体功能^[50]。

2.2 线粒体动力学在 COPD 发病中的作用

之前有研究表明,香烟烟雾暴露可诱导人气道平滑肌细胞中融合相关蛋白 Mfn2 表达下调,而裂变相关蛋白 Drp1 表达上调^[40]。并且有研究在体外观察了香烟烟雾对线粒体形态的不同影响。无毒剂量的香烟提取物在小鼠肺泡细胞中诱导线粒体伸长,伴随代谢活动增强,而不损伤线粒体和 ROS 的产生^[51]。而暴露于更大剂量的香烟烟雾会诱导人支气管上皮细胞线粒体破裂。这种形态变化是由 Drp1 募集到线粒体导致的^[51]。

2.3 线粒体自噬在 COPD 发病中的作用

关于线粒体自噬在 COPD 进展中的作用,现有的数据仍然互相矛盾。在 COPD 原发性支气管上皮细胞中,长期暴露于烟草烟雾中会诱发线粒体结构的强烈变化,导致受损线粒体在细胞质积累, PINK1 表达增加,线粒体自噬增强。表明线粒体自噬和 COPD 的发病机制有关^[51]。Ito 等^[52]证明香烟烟雾会诱导线粒体损伤,增加 mtROS 的产生,并诱发原代人支气管上皮细胞 (HBECS) 的衰老,而通过诱导 Parkin 在 HBECS 中过表达可以诱导线粒体自噬,恢复细胞内线粒体的正常状态,逆转细胞衰老现象。然而, Ahmad 等^[53]表明, HBECS 暴露于香烟烟雾 15 d 形成了细胞衰老, Parkin 过表达可以恢复细胞内线粒体的正常状态,但对细胞衰老的逆转没有显著影响。

3 线粒体质量控制与特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)

IPF 是不可逆的一种进行性肺间质性疾病,以干咳、逐渐加重的呼吸困难为主要临床症状,最终发展为呼吸功能障碍^[54]。超微结构研究发现, IPF 患者相较于正常人和 COPD 患者,其肺部存在更多 AECIIs^[55]。因此,在 IPF 中研究 AECIIs 的功能是至关重要的切入点。IPF 各年龄段均可发病,但衰

老是肺纤维化的重要发病机制之一^[56]。暴露于香烟后,肺上皮细胞和成纤维细胞中观察到线粒体形态延长,并伴有 ATP 水平的降低和细胞衰老^[53,57]。与正常受试者的肺成纤维细胞相比, IPF 肺成纤维细胞线粒体功能降低,线粒体膜破坏,提示线粒体稳态发生变化^[58]。肺泡上皮细胞暴露于应激物质例如香烟烟雾、病毒感染等,会引起上皮细胞内质网应激。内质网应激导致上皮细胞死亡和衰老,导致肺纤维化^[59]。内质网和线粒体连接紧密,存在线粒体相关内质网膜来调节内质网-线粒体之间的通信。其中 ROS 诱导钙从内质网释放到细胞质,细胞质钙增加会诱导 mtROS 的产生,形成一个循环^[60]。逐步有研究发现线粒体功能障碍在 IPF 的发病中起着至关重要的作用。

3.1 线粒体生物发生在 IPF 发病中的作用

在 IPF 中,线粒体生物发生增强可能具有抗纤维化作用。最近, Yu 等^[50]证实在特发性肺纤维化患者中线粒体生物发生减少,其机制可能在于 PGC-1 α 的减少。而通过上调 PGC-1 α 可以逆转特发性肺纤维化,提示可以增加线粒体生物发生来恢复线粒体功能。目前最新的医疗方法有使用接受活检或肺移植的患者的肺组织和/或细胞来开发 3D 肺类器官 (肺球),肺球更好地模拟了人肺中的微环境,可以作为评估抗纤维化药物在细胞线粒体生物发生相关机制靶向作用的模型,以实现个性化的医疗方法^[61]。对线粒体的研究可能为确定新的治疗肺纤维化提供新的途径。

3.2 线粒体动力学在 IPF 发病中的作用

人 AECIIs 线粒体与内质网的信号转导机制对线粒体动力学有重要影响,并影响肺纤维化的易感性。有研究表明, IPF 患者肺部的 AECIIs 中表现出更多明显畸形及功能失调的线粒体,这些线粒体异常与内质网应激标志物羟脯氨酸和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 上调有关;另外, IPF 患者 AECIIs 中线粒体形态增大且畸形,线粒体面积显著增加;并且 IPF 模型小鼠肺组织细胞中线粒体裂变相关蛋白 DRP1 的失活以及融合相关蛋白 OPA1 和 MFN1/2 表达的增强都表明线粒体融合可能在 IPF 中占主导地位^[55]。

3.3 线粒体自噬在 IPF 发病中的作用

线粒体自噬在 IPF 中具有两面性。一方面,线粒体自噬参与 IPF 中的 AECIIs 凋亡。线粒体质量受损,会导致 AECIIs 代谢途径改变从而导致凋亡。

AECIIs 发生凋亡后,会释放促纤维化因子和炎症因子,使 IPF 进展加快^[62]。研究发现,PINK1 在 IPF 患者中下调、PINK1 缺陷小鼠的肺纤维化程度比对照组小鼠更强,这都与 PINK1 缺陷导致线粒体自噬的减少,进而导致形态肿胀和功能失调的线粒体增多,AECIIs 凋亡增加,纤维化程度增强有关^[63]。另一方面,线粒体自噬参与 IPF 中的炎症反应。炎症反应与 IPF 息息相关,炎症介质可以促进肺成纤维细胞的增殖,加快 IPF 的进展^[64]。Meng 等^[65]发现,血管紧张素 II 增强线粒体自噬,而且诱导核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-leucine rich repeats containing pyrin domain 3,NLRP3)炎症小体激活,提示线粒体自噬增强可能促进了相关炎症反应,加速了 IPF 的进展。我们合理推测,调控线粒体自噬相关通路可作为靶点来治疗 IPF。

4 线粒体质量控制与急性肺损伤 (acute lung injury, ALI)

ALI 是指表现为急性呼吸衰竭的临床症状,其病理特征为肺血管通透性增高、肺泡腔渗出富含蛋白质的液体和肺水肿等^[66]。ALI 的病理和生理机制被认为与不受控制的肺部炎症有关,脓毒症是导致 ALI 最常见的病因^[67-68]。脓毒症是一种全身性炎症性疾病,最常见的感染部位是肺部^[69]。在脓毒症期间,过度的炎症反应产生细胞因子和各种炎症介质,如一氧化氮 (nitric oxide, NO)、一氧化碳 (carbon monoxide, CO)、ROS 等。虽然它们作为人体清除病原体的防御机制的一部分,但过度产生对细胞有害。它们直接损害线粒体的电子传递链,导致其功能障碍^[70]。线粒体功能障碍又可以促进脓毒症诱导的多器官衰竭^[71]。有研究人员观察到血液 mtDNA 水平以及炎症因子 IL-18 水平升高与脓毒症死亡率之间存在显著关联^[72-73]。

4.1 线粒体生物发生在 ALI 发病中的作用

线粒体生物发生的增强在缓解 ALI 中起到积极作用。Athale 等^[74]发现,Nrf2 在小鼠金黄色葡萄球菌诱导的 ALI 中通过促进肺泡细胞线粒体生物发生,缓解了 ALI 症状。在盲肠结扎穿孔术 (cecal ligation puncture, CLP) 诱导的脓毒症小鼠模型中,小鼠出现了 ALI。通过在小鼠体内过表达线粒体生物发生相关基因 SIRT1,改善了小鼠肺损伤,提高了小鼠存活率^[75]。

4.2 线粒体动力学在 ALI 发病中的作用

线粒体动力学稳态对于缓解 ALI 具有重要意

义。Mdivi-1 是线粒体分裂相关蛋白 DNMI1 抑制剂,可抑制线粒体分裂^[76]。有研究发现,在脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠 ALI 模型和小鼠单核细胞/巨噬细胞系 RAW264.7 中,线粒体出现了断裂增多,线粒体裂变蛋白 Drp1 从细胞质转移到线粒体增多进而诱导线粒体裂变,Mdivi-1 处理后,小鼠 ALI 症状减轻,血浆中促炎细胞因子水平降低,RAW264.7 中碎片化线粒体显著减少,融合线粒体增加,并且 Mdivi-1 逆转了 Drp1 的迁移^[77]。Shi 等^[78]发现,在 LPS 诱导的大鼠 ALI 模型和 RAW264.7 中,线粒体表现为碎片化增多,Mfn1/2 和 OPA1 的表达水平下调,Drp1 表达增加。血红素氧合 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 有强大的抗氧化和抗炎作用^[79],可以减轻 ALI 的反应,并且通过磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 通路上调 Mfn2 和 OPA1 的表达,下调 Drp1 的表达来维持线粒体动力学稳态进而防御脓毒症诱导的 ALI。因此从线粒体动力学与 ALI 相关的机制入手,可能会发现针对 ALI 的新的诊疗方法。

4.3 线粒体自噬在 ALI 发病中的作用

线粒体自噬对脓毒症引起的 ALI 是具有两面性的。一方面,适当的诱导自噬的增强可减轻 ALI。在 CLP 诱导的脓毒症小鼠模型中,小鼠出现了 ALI。在采用自噬激活剂雷帕霉素 (rapamycin, RAPA) 后,自噬程度上调并减轻了 ALI。而采用了自噬抑制剂巴佛洛霉素 A1 (bafilomycin A1) 后,自噬程度下调并加重了 ALI^[80]。有研究表明,腹腔注射金黄色葡萄球菌诱导脓毒症小鼠模型中,在诱导 ALI 成功 24 h,LC3-II 蛋白显著增加,p62 蛋白显著减少,表明肺部线粒体自噬增强并减轻了 ALI^[81]。另一方面,线粒体自噬的过度激活会损伤线粒体稳态,进而诱导细胞凋亡^[82]。在 CLP 诱导脓毒症致小鼠 ALI 模型中,LC3 与线粒体共定位增强,提示肺组织中线粒体自噬水平增强,但此线粒体自噬增强反而促进了 ALI 的发展。卡络磺钠是一种毛细血管维稳剂^[83]。其干预后,脓毒症致 ALI 大鼠肺组织中 parkin 的表达减少,线粒体自噬水平明显下降,ALI 损伤程度降低^[84]。提示我们需要注意线粒体自噬在脓毒症引起的 ALI 中的两面性,针对性地治疗 ALI。

5 线粒体质量控制与哮喘 (asthma)

哮喘是一种常见的慢性气道炎症性疾病,全球有超过 3 亿人患有哮喘。其特征为可逆性气流阻

塞、支气管高反应性和气道炎症^[85]。哮喘患者肺部细胞存在线粒体质量的改变。与正常人相比,哮喘患者气道上皮细胞和气道平滑肌细胞内观察到了线粒体体积增大和密度增高,形态表现更为破碎和肿胀^[86-87]。在过敏性哮喘小鼠模型的肺上皮细胞和气道平滑肌细胞中同样观察到了畸形线粒体^[88]。此外,有一些证据表明 mtDNA 缺陷可能与哮喘发病机制有关^[89]。

5.1 线粒体生物发生在哮喘发病中的作用

研究发现,哮喘中线粒体生物发生增强^[88]。与非哮喘患者相比,哮喘患者的气道上皮细胞线粒体体积和密度更大,这可能是由于线粒体生物发生的增加导致^[90]。最新研究表明,哮喘患者吸入刺激物和气道炎症引发的伤害导致线粒体功能障碍,继而诱导线粒体数量增加,以保持其正常呼吸,从而恢复细胞的正常功能^[91]。这表明哮喘的发生与线粒体的生物发生可能有着密切的关系。

5.2 线粒体动力学在哮喘发病中的作用

在哮喘发病中,线粒体的裂变程度增加。Aravamudan 等^[92]使用二维显微成像观察到,在中度哮喘患者气道平滑肌中线粒体裂变(即碎片)增加。辅助型 T 细胞 2(helper lymphocyte2, Th2)与哮喘的发病密切相关,Th2 细胞释放的促炎因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),在哮喘气道黏液分泌过程中起关键作用^[93]。在 TNF- α 导致的哮喘中,TNF- α 可以诱导人气道平滑肌细胞线粒体分裂和生物发生,表现为线粒体裂变相关蛋白 Drp1 表达增加,线粒体融合相关蛋白 Mfn2 表达减少,提示了线粒体裂变增加。表明暴露于 TNF- α 导致哮喘中,线粒体裂变增加以满足哮喘中 ATP 生成增加的需求^[86]。

5.3 线粒体自噬在哮喘发病中的作用

线粒体自噬的增强在减轻哮喘氧化应激的损伤方面起着重要作用。研究表明,自噬参与哮喘的发生发展^[94]。 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII)是广泛表达于各种组织的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其过表达可以诱导线粒体自噬的发生^[95-96]。CaMKII 与哮喘有很强的相关性^[97]。最近研究发现,在过敏原诱导哮喘动物模型中,CaMKII 通过调控线粒体自噬相关蛋白 OPTN 来调节线粒体自噬,OPTN 可以结合泛素和 LC3,将泛素化底物靶向到新形成的自噬体上,以自噬清除受损的

线粒体,恢复线粒体稳态^[98]。表明通过调控 CaMKII 来诱导线粒体自噬可能是哮喘的一个有吸引力的治疗靶点。

6 线粒体质量控制与细菌性肺炎 (bacteria pneumonia, BP)

细菌性肺炎 (bacteria pneumonia, BP) 目前最常见的感染性疾病之一。引起细菌性肺炎的主要细菌包括肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯杆菌等。目前针对细菌性肺炎的主要治疗方法是抗生素治疗,但抗生素滥用使耐药菌大量出现,导致细菌性肺炎死亡人数增加^[99]。因此我们需要探索新的靶点来治疗细菌性肺炎。线粒体是细胞能量的中心,同时也是炎症反应的中心,在对抗感染性疾病中起重要的作用^[100]。在细菌感染中,宿主细胞线粒体通过产生 ROS 作为一种防御机制,可以破坏细菌的代谢和生长^[101]。肺泡巨噬细胞可以通过线粒体调节 mtROS 的产生来以应对细菌^[102]。并且肺泡巨噬细胞对细菌的吞噬涉及线粒体参与的相关机制,例如从功能损伤或死亡的线粒体中释放危险分子(如 ATP)来激活肺部的 NLRP3^[103]。表明线粒体损伤使肺细胞中炎症小体激活不受控制,这可能导致慢性肺损伤。由于线粒体与炎症反应密切相关,为我们治疗和控制炎症提供新的靶点。

6.1 线粒体生物发生在 BP 发病中的作用

在细菌性肺炎中,线粒体生物发生增强以促进细胞存活,支持肺泡功能。Suliman 等^[104]发现,与正常组小鼠对比,在使用给小鼠鼻腔接种金黄色葡萄球菌构建的肺炎模型中,线粒体生物合成相关蛋白 NRF1 和 PGC-1 在造模后第 1 天增加了约 4 倍,并且此通路下游蛋白 TFAM 在随后也有升高。而在造模后第 4 天,炎症反应消退,这些蛋白的表达也下降。表明线粒体生物合成能增强细菌感染后存活肺部细胞的功能,以抵抗炎症反应的伤害。

6.2 线粒体动力学在 BP 发病中的作用

线粒体动力学在细菌感染中起着重要的作用。细菌可以通过影响线粒体动力学来操控宿主细胞的存亡,其可以通过分泌效应蛋白操纵线粒体形态和功能,进而提高宿主细胞的存活率来保持其在细胞内的生存,成功地建立感染^[105]。研究发现,在肺炎克雷伯杆菌感染的人肺癌细胞 A549 和人原代肺泡 NuLi-1 细胞中都观察到了线粒体形态被拉长、表面积增加和碎片化增多,表明了线粒体裂变增加,随后研究证明此裂变依赖于 Drp1^[106]。Escoll

等^[107]发现,军团菌肺炎的病原体嗜肺军团菌能够在感染肺泡巨噬细胞 6 h 后分泌线粒体断裂因子 (mitochondrial fragmentation factor, MitF), MitF 可以激活 GTPase 中的核内小分子 GTP 结合蛋白 (a small nuclear GTP-binding protein, Ran), 并触发线粒体裂变相关蛋白 Drp1 募集,从而诱导线粒体分裂,最终保持宿主细胞存活从而实现嗜肺军团菌复制。因此可以通过干预线粒体分裂相关通路的靶点来阻止细菌复制,进而治疗相应细菌性肺炎。

6.3 线粒体自噬在 BP 发病中的作用

线粒体自噬的双面性对于细菌性肺炎治疗具有重要意义。一方面,线粒体自噬的增强促进肺细胞消除和替换受损线粒体,从而支持细胞的存活^[4]。在小鼠金黄色葡萄球菌肺炎模型中,线粒体自噬相关蛋白 p62、PINK1 和 Parkin 紧随线粒体生物发生的诱导后表达增加,随后炎症因子 IL-1 β 、IL-8 和炎症小体 NLRP3 蛋白水平降低,细胞恢复正常^[104]。另一方面,肺炎链球菌溶血素 (pneumolysin, Ply) 是肺炎链球菌的重要毒力因子^[108],可以通过诱导 RAW264.7 细胞的线粒体自噬和细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达降低,导致线粒体自噬功能下降和细胞凋亡,加重对宿主的伤害^[109]。提示调控线粒体自噬相关通路可能是改善细菌性肺炎的炎症反应或降低细菌对宿主细胞伤害的一个新的思路。

7 总结

本篇综述讨论了几种常见的呼吸系统疾病与线粒体质量控制的关系。线粒体功能障碍会导致线粒体特征发生改变,包括生物发生、自噬、代谢以及 mtDNA 突变频率等。细胞防止线粒体损伤的机制如果被破坏,也可能导致或促进疾病的发生发展。对线粒体的生物发生、动力学和自噬的分析也需要一个严格和有效的方法,以更好地理解线粒体质量控制在呼吸系统相关疾病中正常的生理适应以及病理过程。因此,线粒体质量控制机制在寻找呼吸系统疾病的新型诊断和治疗方法中提供了广泛的有前途的新思路。

参考文献:

[1] MURPHY E, ARDEHALI H, BALABAN R S, et al. Mitochondrial function, biology, and role in disease: a scientific statement from the American heart association [J]. Circ Res, 2016, 118(12): 1960–1991.

[2] SHADEL G S, HORVATH T L. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis [J]. Cell, 2015, 163(3): 560–569.

[3] NUNNARI J, SUOMALAINEN A. Mitochondria: in sickness and in health [J]. Cell, 2012, 148(6): 1145–1159.

[4] PIANTADOSI C A, SULIMAN H B. Mitochondrial dysfunction in lung pathogenesis [J]. Annu Rev Physiol, 2017, 79: 495–515.

[5] SCHUMACKER P T, GILLESPIE M N, NAKAHIRA K, et al. Mitochondria in lung biology and pathology: more than just a powerhouse [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014, 306(11): L962–L974.

[6] GONG Z, PAN J, SHEN Q, et al. Mitochondrial dysfunction induces NLRP3 inflammasome activation during cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 242.

[7] DROMPARIS P, MICHELAKIS E D. Mitochondria in vascular health and disease [J]. Annu Rev Physiol, 2013, 75: 95–126.

[8] SANTOS J H, HUNAKOVA L, CHEN Y, et al. Cell sorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death [J]. J Biol Chem, 2003, 278(3): 1728–1734.

[9] 陈双, 吴矣汐, 王楠, 等. 靶向线粒体质量控制防治椎间盘退变的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(23): 6256–6263.

CHEN S, WU H X, WANG N, et al. Research advances in prevention and treatment of intervertebral disc degeneration by targeting mitochondrial quality control [J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(23): 6256–6263.

[10] POPOV L D. Mitochondrial biogenesis: an update [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(9): 4892–4899.

[11] DORN G W 2nd. Evolving concepts of mitochondrial dynamics [J]. Annu Rev Physiol, 2019, 81: 1–17.

[12] HUO Y, CHEN W, ZHENG X, et al. The protective effect of EGF-activated ROS in human corneal epithelial cells by inducing mitochondrial autophagy via activation TRPM2 [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(10): 7018–7029.

[13] CHODARI L, DILSIZ AYTEMIR M, VAHEDI P, et al. Targeting mitochondrial biogenesis with polyphenol compounds [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 4946711.

[14] FALKENBERG M. Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: overview of the pathway [J]. Essays Biochem, 2018, 62(3): 287–296.

[15] SURMA M, ANBARASU K, DUTTA S, et al. Enhanced mitochondrial biogenesis promotes neuroprotection in human pluripotent stem cell derived retinal ganglion cells [J]. Commun Biol, 2023, 6(1): 218.

[16] ZHANG Y J, WU Q. Sulforaphane protects intestinal epithelial cells against lipopolysaccharide-induced injury by activating the AMPK/SIRT1/PGC-1 α pathway [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 4349–4360.

[17] MISHRA P, CHAN D C. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics [J]. J Cell Biol, 2016, 212(4): 379–387.

- [18] CHAN D C. Fusion and fission; interlinked processes critical for mitochondrial health [J]. *Annu Rev Genet*, 2012, 46: 265–287.
- [19] YIN X, WANG J, YANG S, et al. Sam50 exerts neuroprotection by maintaining the mitochondrial structure during experimental cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2022, 28(12): 2230–2244.
- [20] ZHU T, HU Q, YUAN Y, et al. Mitochondrial dynamics in vascular remodeling and target-organ damage [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 10: 1067732.
- [21] WAN M C, TANG X Y, LI J, et al. Upregulation of mitochondrial dynamics is responsible for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured on self-mineralized collagen membranes [J]. *Acta Biomater*, 2021, 136: 137–146.
- [22] LIU A R, LV Z, YAN Z W, et al. Association of mitochondrial homeostasis and dynamic balance with malignant biological behaviors of gastrointestinal cancer [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 27.
- [23] KLEELE T, REY T, WINTER J, et al. Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis [J]. *Nature*, 2021, 593(7859): 435–439.
- [24] ALAO J P, LEGON L, DABROWSKA A, et al. Interplays of AMPK and TOR in autophagy regulation in yeast [J]. *Cells*, 2023, 12(4): 519.
- [25] YANG Y J, WANG Y, DENG Y, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides regulating miR-181/bcl-2 decreased autophagy of retinal pigment epithelium with oxidative stress [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2023, 2023: 9554457.
- [26] ZHAO Q, LIU K, ZHANG L, et al. BNIP3-dependent mitophagy safeguards ESC genomic integrity via preventing oxidative stress-induced DNA damage and protecting homologous recombination [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(11): 976.
- [27] GÓMORA-GARCÍA J C, MONTIEL T, HÜTTENRAUCH M, et al. Effect of the ketone body, D- β -hydroxybutyrate, on Sirtuin2-mediated regulation of mitochondrial quality control and the autophagy-lysosomal pathway [J]. *Cells*, 2023, 12(3): 486.
- [28] GOK M O, CONNOR O M, WANG X, et al. The outer mitochondrial membrane protein TMEM11 demarcates spatially restricted BNIP3/BNIP3L-mediated mitophagy [J]. *J Cell Biol*, 2023, 222(4): e202204021.
- [29] LIU L, FENG D, CHEN G, et al. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(2): 177–185.
- [30] NIELSEN P Y Ø, OKARMUS J, MEYER M. Role of deubiquitinases in Parkinson's disease-therapeutic perspectives [J]. *Cells*, 2023, 12(4): 651.
- [31] FIGUEIREDO-PEREIRA C, VILLAREJO-ZORI B, CIPRIANO P C, et al. Carbon monoxide stimulates both mitophagy and mitochondrial biogenesis to mediate protection against oxidative stress in astrocytes [J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(2): 851–863.
- [32] ONISHI M, YAMANO K, SATO M, et al. Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy [J]. *EMBO J*, 2021, 40(3): e104705.
- [33] 吴梦瑶, 张卉, 王陆, 等. 线粒体自噬受体蛋白 BNIP3 的研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(3): 534–542.
- WU M Y, ZHANG H, WANG L, et al. Advances in study of mitophagy receptor protein BNIP3 [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2023, 39(3): 534–542.
- [34] AGGARWAL S, MANNAM P, ZHANG J. Differential regulation of autophagy and mitophagy in pulmonary diseases [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 311(2): L433–L452.
- [35] STRACK R. A clearer view of mitophagy [J]. *Nat Methods*, 2020, 17(7): 656.
- [36] GBD Chronic Respiratory Disease Collaborators. Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990–2015; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. *Lancet Respir Med*, 2017, 5(9): 691–706.
- [37] SALVI S S, BARNES P J. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers [J]. *Lancet*, 2009, 374(9691): 733–743.
- [38] LIU S, XIE G, CHEN M, et al. Oral microbial dysbiosis in patients with periodontitis and chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1121399.
- [39] LOMMATZSCH M, CICKO S, MÜLLER T, et al. Extracellular adenosine triphosphate and chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181(9): 928–934.
- [40] HOFFMANN R F, ZARRINTAN S, BRANDENBURG S M, et al. Prolonged cigarette smoke exposure alters mitochondrial structure and function in airway epithelial cells [J]. *Respir Res*, 2013, 14(1): 97.
- [41] NAKAHIRA K, HISATA S, CHOI A M K. The roles of mitochondrial damage-associated molecular patterns in diseases [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 23(17): 1329–1350.
- [42] ANTUNES M A, LOPES-PACHECO M, ROCCO P R M. Oxidative stress-derived mitochondrial dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease; a concise review [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6644002.
- [43] DAILAH H G. Therapeutic potential of small molecules targeting oxidative stress in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a comprehensive review [J]. *Molecules*, 2022, 27(17): 5542.
- [44] KUME H, YAMADA R, SATO Y, et al. Airway smooth muscle regulated by oxidative stress in COPD [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(1): 142.
- [45] WANG Y, LI P, CAO Y, et al. Skeletal muscle mitochondrial dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: underlying mechanisms and physical therapy perspectives [J]. *Aging Dis*, 2023, 14(1): 33–45.
- [46] ZHANG Z, CHENG X, YUE L, et al. Molecular pathogenesis in

- chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic potential by targeting AMP-activated protein kinase [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(3): 1999–2006.
- [47] NOURIAN Y H, SALIMIAN J, AHMADI A, et al. cAMP-PDE signaling in COPD: review of cellular, molecular and clinical features [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2023, 34: 101438.
- [48] HIROSE E, NOGUCHI M, IHARA T, et al. Mitochondrial metabolism in X-irradiated cells undergoing irreversible cell-cycle arrest [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 1833.
- [49] TULEN C B M, DUISTERMAAT E, CREMERS J W J M, et al. Smoking-associated exposure of human primary bronchial epithelial cells to aldehydes: impact on molecular mechanisms controlling mitochondrial content and function [J]. *Cells*, 2022, 11(21): 3481.
- [50] YU G, TZOUVELEKIS A, WANG R, et al. Thyroid hormone inhibits lung fibrosis in mice by improving epithelial mitochondrial function [J]. *Nat Med*, 2018, 24(1): 39–49.
- [51] TULEN C B M, OPPERHUIZEN A, VAN SCHOOTEN F J, et al. Disruption of the molecular regulation of mitochondrial metabolism in airway and lung epithelial cells by cigarette smoke: are aldehydes the culprit? [J]. *Cells*, 2023, 12(2): 299.
- [52] ITO S, ARAYA J, KURITA Y, et al. PARK2-mediated mitophagy is involved in regulation of HBEC senescence in COPD pathogenesis [J]. *Autophagy*, 2015, 11(3): 547–559.
- [53] AHMAD T, SUNDAR I K, LERNER C A, et al. Impaired mitophagy leads to cigarette smoke stress-induced cellular senescence: implications for chronic obstructive pulmonary disease [J]. *FASEB J*, 2015, 29(7): 2912–2929.
- [54] MCGUIGAN A, KELLY P, TURKINGTON R C, et al. Pancreatic cancer: a review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(43): 4846–4861.
- [55] BUENO M, LAI Y C, ROMERO Y, et al. PINK1 deficiency impairs mitochondrial homeostasis and promotes lung fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(2): 521–538.
- [56] LEE J H, JANG J H, JANG H J, et al. New prognostic scoring system for mortality in idiopathic pulmonary fibrosis by modifying the gender, age, and physiology model with desaturation during the six-minute walk test [J]. *Front Med*, 2023, 10: 1052129.
- [57] BALLWEG K, MUTZE K, KÖNIGSHOFF M, et al. Cigarette smoke extract affects mitochondrial function in alveolar epithelial cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 307(11): L895–L907.
- [58] COOLEY J C, JAVKHLAN N, WILSON J A, et al. Inhibition of antiapoptotic BCL-2 proteins with ABT-263 induces fibroblast apoptosis, reversing persistent pulmonary fibrosis [J]. *JCI Insight*, 2023, 8(3): e163762.
- [59] YAN S, LI M, LIU B, et al. Neutrophil extracellular traps and pulmonary fibrosis: an update [J]. *J Inflamm*, 2023, 20(1): 2.
- [60] GUAN R, YUAN L, LI J, et al. Bone morphogenetic protein 4 inhibits pulmonary fibrosis by modulating cellular senescence and mitophagy in lung fibroblasts [J]. *Eur Respir J*, 2022, 60(6): 2102307.
- [61] SUROLIA R, LI F J, WANG Z, et al. 3D pulmospheres serve as a personalized and predictive multicellular model for assessment of antifibrotic drugs [J]. *JCI Insight*, 2017, 2(8): e94088.
- [62] KATZEN J, BEERS M F. Contributions of alveolar epithelial cell quality control to pulmonary fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(10): 5088–5099.
- [63] ZHANG Y, WANG J. Cellular and molecular mechanisms in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Adv Respir Med*, 2023, 91(1): 26–48.
- [64] XU X, ZHANG J, DAI H. IL-25/IL-33/TSLP contributes to idiopathic pulmonary fibrosis: do alveolar epithelial cells and (myo)fibroblasts matter? [J]. *Exp Biol Med*, 2020, 245(10): 897–901.
- [65] MENG Y, PAN M, ZHENG B, et al. Autophagy attenuates angiotensin II-induced pulmonary fibrosis by inhibiting redox imbalance-mediated NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 inflammasome activation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 30(4): 520–541.
- [66] MOKRÁ D. Acute lung injury-from pathophysiology to treatment [J]. *Physiol Res*, 2020, 69(Suppl 3): S353–S366.
- [67] PRETEROTI M, WILSON E T, EIDELMAN D H, et al. Modulation of pulmonary immune function by inhaled cannabis products and consequences for lung disease [J]. *Respir Res*, 2023, 24(1): 95.
- [68] THOMPSON B T, CHAMBERS R C, LIU K D. Acute respiratory distress syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(6): 562–572.
- [69] GOTTS J E, MATTHAY M A. Sepsis: pathophysiology and clinical management [J]. *BMJ*, 2016, 353: i1585.
- [70] MOHSIN M, TABASSUM G, AHMAD S, et al. The role of mitophagy in pulmonary sepsis [J]. *Mitochondrion*, 2021, 59: 63–75.
- [71] ARNHOLD J. Host-derived cytotoxic agents in chronic inflammation and disease progression [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 3016.
- [72] HEPOKOSKI M L, ODISH M, LAM M T, et al. Absolute quantification of plasma mitochondrial DNA by droplet digital PCR marks COVID-19 severity over time during intensive care unit admissions [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2022, 323(1): L84–L92.
- [73] HU S, ZHOU W, WANG S, et al. Global research trends and hotspots on mitochondria in acute lung injury from 2012~2021: a bibliometric analysis [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 20(1): 585.
- [74] ATHALE J, ULRICH A, MACGARVEY N C, et al. Nrf2 promotes alveolar mitochondrial biogenesis and resolution of lung injury in *Staphylococcus aureus* pneumonia in mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53(8): 1584–1594.
- [75] 臧宾宾, 李华, 杨颖, 等. 过表达 SIRT1 通过增强自噬水平调控巨噬细胞 M2 型极化减轻脓毒症诱导的急性肺损伤

- [J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(4): 698-703, 708.
- ZANG B B, LI H, YANG Y, et al. Overexpression of SIRT1 attenuates sepsis induced acute lung injury by increasing autophagy level and regulating M2 macrophage polarization [J]. Chin J Immunol, 2023, 39(4): 698-703, 708.
- [76] 刘冬, 王琨. 线粒体分裂抑制剂 Mdivi-1 通过抑制线粒体自噬促进炎症微环境下髓核细胞衰老退变的研究 [J]. 现代医学, 2022, 50(6): 735-741.
- LIU D, WANG K. Mitochondrial division inhibitor Mdivi-1 promotes the aging and degeneration of nucleus pulposus cells in inflammatory microenvironment by inhibiting mitochondrial autophagy [J]. Mod Med J, 2022, 50(6): 735-741.
- [77] DENG S, ZHANG L, MO Y, et al. Mdivi-1 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting MAPKs, oxidative stress and apoptosis [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2020, 62: 101918.
- [78] SHI J, YU J, ZHANG Y, et al. PI3K/Akt pathway-mediated HO-1 induction regulates mitochondrial quality control and attenuates endotoxin-induced acute lung injury [J]. Lab Invest, 2019, 99(12): 1795-1809.
- [79] YU J, WANG Y, LI Z, et al. Effect of Heme Oxygenase-1 on Mitofusin-1 protein in LPS-induced ALI/ARDS in rats [J]. Sci Rep, 2016, 6: 36530.
- [80] YEN Y T, YANG H R, LO H C, et al. Enhancing autophagy with activated protein C and rapamycin protects against sepsis-induced acute lung injury [J]. Surgery, 2013, 153(5): 689-698.
- [81] CHANG A L, ULRICH A, SULIMAN H B, et al. Redox regulation of mitophagy in the lung during murine *Staphylococcus aureus* sepsis [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 78: 179-189.
- [82] 张红, 赵自刚, 牛春雨. 细胞自噬在急性肺损伤发展进程中的双刃剑作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(4): 725-734.
- ZHANG H, ZHAO Z G, NIU C Y. Autophagy functions as a double-edged sword during acute lung injury [J]. Chin J Pathophysiol, 2020, 36(4): 725-734.
- [83] 王娇, 张秀琰, 王佳兴, 等. 卡络磺钠对脓毒症大鼠急性肺损伤的作用及机制 [J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(6): 550-556.
- WANG J, ZHANG X L, WANG J X, et al. Effect and mechanism of carbazochrome sodium sulfonate in reducing acute lung injury in rats with sepsis [J]. Med J Chin People's Liberation Army, 2021, 46(6): 550-556.
- [84] 王佳兴, 付鹤鹏, 王蓓蓓, 等. 卡络磺钠通过抑制 parkin 介导的线粒体自噬减轻脓毒症大鼠的肺损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(8): 1447-1454.
- WANG J X, FU H P, WANG B L, et al. Carbazochrome sodium sulfonate attenuates acute lung injury in septic rats by inhibiting parkin-induced mitophagy [J]. Chin J Pathophysiol, 2021, 37(8): 1447-1454.
- [85] REDDEL H K, BACHARIER L B, BATEMAN E D, et al. Global initiative for asthma strategy 2021: executive summary and rationale for key changes [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2022, 205(1): 17-35.
- [86] DELMOTTE P, MARIN MATHIEU N, SIECK G C. TNF α induces mitochondrial fragmentation and biogenesis in human airway smooth muscle [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2021, 320(1): L137-L151.
- [87] QIAN L, MEHRABI NASAB E, ATHARI S M, et al. Mitochondria signaling pathways in allergic asthma [J]. J Investig Med, 2022, 70(4): 863-882.
- [88] XIE Q M, CHEN N, SONG S M, et al. Itaconate suppresses the activation of mitochondrial NLRP3 inflammasome and oxidative stress in allergic airway inflammation [J]. Antioxidants, 2023, 12(2): 489.
- [89] REDDY P H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in asthma: implications for mitochondria-targeted antioxidant therapeutics [J]. Pharmaceuticals, 2011, 4(3): 429-456.
- [90] GIRODET P O, OZIER A, BARA I, et al. Airway remodeling in asthma: new mechanisms and potential for pharmacological intervention [J]. Pharmacol Ther, 2011, 130(3): 325-337.
- [91] CHANDRASEKARAN R, BRUNO S R, MARK Z F, et al. Mitoquinone mesylate attenuates pathological features of lean and obese allergic asthma in mice [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2023, 324(2): L141-L153.
- [92] ARAVAMUDAN B, KIEL A, FREEMAN M, et al. Cigarette smoke-induced mitochondrial fragmentation and dysfunction in human airway smooth muscle [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014, 306(9): L840-L854.
- [93] 黄柯婷, 王志旺, 梁可克, 等. 肿瘤坏死因子- α 介导的信号网络调控哮喘气道黏液高分泌的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(9): 1344-1348.
- HUANG K T, WANG Z W, LIANG K K, et al. New research progress of tumor necrosis factor- α signaling pathway regulating airway mucus hypersecretion in asthma [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2023, 39(9): 1344-1348.
- [94] XIA F, DENG C, JIANG Y, et al. IL4 (interleukin 4) induces autophagy in B cells leading to exacerbated asthma [J]. Autophagy, 2018, 14(3): 450-464.
- [95] LUO H M, WU X, LIU W X, et al. Calcitonin gene-related peptide attenuates angiotensin II-induced ROS-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells by inhibiting the CaMKII/CREB signalling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 521(2): 285-289.
- [96] HU C, ZHOU G, LIU K, et al. CaMKII as a key regulator of contrast-induced nephropathy through mPTP opening in HK-2 cells [J]. Cell Signal, 2020, 75: 109734.
- [97] QU J, DO D C, ZHOU Y, et al. Oxidized CaMKII promotes asthma through the activation of mast cells [J]. JCI Insight, 2017, 2(1): e90139.
- [98] ZHANG Y, DO D C, HU X, et al. CaMKII oxidation regulates cockroach allergen-induced mitophagy in asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2021, 147(4): 1464-1477, e11.
- [99] BENEŠOVÁ M, BERNATOVÁ S, MIKA F, et al. SERS-tags:

selective immobilization and detection of bacteria by strain-specific antibodies and surface-enhanced Raman scattering [J]. Biosensors, 2023, 13(2): 182.

[100] ANDRIEUX P, CHEVILLARD C, CUNHA-NETO E, et al. Mitochondria as a cellular hub in infection and inflammation [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(21): 11338.

[101] SMITH A N, SHAUGHNESS M, COLLIER S, et al. Therapeutic targeting of microglia mediated oxidative stress after neurotrauma [J]. Front Med, 2022, 9: 1034692.

[102] EYENGA P, REY B, EYENGA L, et al. Regulation of oxidative phosphorylation of liver mitochondria in sepsis [J]. Cells, 2022, 11(10): 1598.

[103] DE NARDO D, DE NARDO C M, Latz E. New insights into mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome and its role in lung disease [J]. Am J Pathol, 2014, 184(1): 42-54.

[104] SULIMAN H B, KRAFT B, BARTZ R, et al. Mitochondrial quality control in alveolar epithelial cells damaged by *S. aureus* pneumonia in mice [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017, 313(4): L699-L709.

[105] SPIER A, STAVRU F, COSSART P. Interaction between intracellular bacterial pathogens and host cell mitochondria [J]. Microbiol Spectr, 2019, 7(2): BAI-0016-2019.

[106] SÁ-PESSOA J, LÓPEZ-MONTESINO S, PRZYBYSZEWSKA K, et al. A trans-Kingdom T6SS effector induces the fragmentation of the mitochondrial network and activates innate immune receptor NLRX1 to promote infection [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 871.

[107] ESCOLL P, SONG O R, VIANA F, et al. *Legionella pneumophila* modulates mitochondrial dynamics to trigger metabolic repurposing of infected macrophages [J]. Cell Host Microbe, 2017, 22(3): 302-316, e7.

[108] KADIOGLU A, WEISER J N, PATON J C, et al. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease [J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(4): 288-301.

[109] 董姗姗, 王虹, 贺潇, 等. 肺炎链球菌溶血素经死亡受体/Fas 途径和线粒体途径诱导 RAW_{264.7} 细胞凋亡 [J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(3): 196-199, 204.

DONG S S, WANG H, HE X, et al. Pneumolysin induced apoptosis in murine RAW_{264.7} cells through death receptor/Fas and mitochondrial pathway [J]. Chin J Immunol, 2012, 28(3): 196-199, 204.

[收稿日期]2023-06-06



编者·读者·作者

《中国比较医学杂志》不接收使用水合氯醛进行动物麻醉文章的说明

本刊严格遵守我国实验动物相关法规和标准,为保障实验动物的福利权益,不断提升动物实验研究的水平并获得国际学术界同行的认可,根据国际和国内实验动物有关法规和标准,规定实验动物麻醉镇痛用药必须优先使用药用级麻醉剂,特别是当涉及存活手术的动物实验时。

鉴于水合氯醛属于镇静、催眠以及抗惊厥药物,其作为麻醉剂效果较差,只作用于中枢神经系统,无法阻断痛觉感受器达到镇痛效果,且刺激性强、毒副作用较大,存在干扰实验结果且有悖于实验动物伦理审查原则等问题,国际期刊普遍建议不再使用水合氯醛作为实验动物的麻醉剂。

本刊亦不接收使用水合氯醛作为实验动物麻醉剂的文章,特此告知广大作者及读者。

《中国比较医学杂志》编辑部

李妍锦,肖丽莹,吴道雄,等. miRNA 在肺动脉高压发病机制中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(6): 172-178.
Li YJ, Xiao LY, Wu DX, et al. Progress of research into the role of miRNA in the pathogenesis of pulmonary hypertension [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 172-178.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.022

miRNA 在肺动脉高压发病机制中的研究进展

李妍锦¹,肖丽莹¹,吴道雄²,管 蓉¹,闫春朗¹,雷 雯^{1*}

(1.昆明医科大学第二附属医院 呼吸与危重症医学科,昆明 650106;
2.昆明医科大学第二附属医院 检验医学科,昆明 650106)

【摘要】 肺动脉高压(pulmonary hypertension,PH)是一种以肺血管重塑为特征的进展性疾病。目前对 PH 的治疗效果仍不理想,迫切需要更好地解读潜在的病理机制以便寻找新的治疗靶点。miRNA(microRNA)是转录后机制中的关键元件,主要通过调节下游靶基因的表达来介导细胞功能。大量的体内和体外研究表明 miRNA 及其调节因子参与 PH 发生发展。然而,关于 miRNA 调控肺血管重塑的机制尚没有统一论。因此,本文就近年来 miRNA 在 PH 中的作用机制进行综述。

【关键词】 miRNA;肺动脉高压;发病机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0172-07

Progress of research into the role of miRNA in the pathogenesis of pulmonary hypertension

LI Yanjin¹, XIAO Liying¹, WU Daoxiong², GUAN Rong¹, YAN Chunlang¹, LEI Wen^{1*}

(1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650106, China. 2. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650106)

【Abstract】 Pulmonary hypertension (PH) is a progressive disease characterized by pulmonary vascular remodeling. Current treatments for PH remain suboptimal, and there is an urgent need to better decipher the underlying pathomechanisms to identify new therapeutic targets. MicroRNA (miRNA) are key components in the post-transcriptional machinery that mediates cellular functions and mainly act by regulating the expression of downstream target genes. Numerous *in vivo* and *in vitro* studies have demonstrated the involvement of miRNA and their regulators in PH development. However, there is no unified model for the mechanism of miRNA's regulation of pulmonary vascular remodeling. Therefore, this article provides a review on the mechanisms of miRNA in PH characterized in recent years.

【Keywords】 miRNA; pulmonary hypertension; pathogenesis

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

【基金项目】 云南省教育厅科学研究基金项目(2022J0197);昆明医科大学研究生创新基金(2023S304)。

【作者简介】 李妍锦(1999—),女,硕士研究生,研究方向:呼吸与危重症医学。E-mail:15288089596@163.com

【通信作者】 雷雯(1971—),女,硕士,主任医师,研究生导师,研究方向:肺血栓栓塞症的临床研究。E-mail:leiwenkm@163.com

肺动脉高压 (pulmonary hypertension, PH) 是一种致命且难以治愈的疾病,其特征是渐进性肺血管重构,进而导致肺血管阻力增加和肺动脉压升高,最终导致右心衰竭和死亡。流行病学结果显示,PH 全球患病率约 1%,在年龄 65 岁以上的个体中患病率高达 10%^[1]。PH 的确切病因尚不清楚,导致疾病发展的病理生物学过程多种多样,而肺血管重构是各类 PH 发生发展的病理基础。目前部分治疗方案已被证明可以提高 PH 患者的存活率和改善生活质量,但 PH 仍然无法治愈。了解 PH 肺血管重构的分子机制对于发现 PH 的新疗法至关重要。

1 miRNA 与 PH

miRNA 是约 19~25 个核苷酸的非编码 RNA,通过与 mRNA 上的互补序列结合来修饰蛋白质的表达,主要与靶 mRNA 的 3' 非翻译区结合,引起靶 mRNAs 的降解或抑制其翻译。miRNA 参与细胞增殖、凋亡、代谢和血管炎症等过程。近年来,越来越多的证据证实 miRNA 水平的失衡与 PH 的发病机制有关^[2]。miRNA 通过影响肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary arterial smooth muscle cell, PASC) 和肺动脉内皮细胞 (pulmonary artery endothelial cells, PAEC) 的增殖和凋亡,影响 PH 相关的表型转化、血管生成、血管钙化及免疫炎症等,从而参与血管重构过程。因此,明确 miRNA 调控肺血管重构的机制,对于探索 PH 新的治疗靶点,提高患者的生存质量和延长生存时间具有重要意义。下面就近年来发现的 miRNA 在 PH 中细胞增殖、凋亡、迁移、表型转换、血管生成、血管钙化及免疫炎症等方面进行阐述。

1.1 miRNA 与细胞增殖

肺血管重塑是 PH 发生和发展的关键病理生理机制, PASC 的增殖、肥大和分泌活性增加是 PH 肺血管重塑的主要病理变化^[3]。PASC 异常增殖导致肺微循环持续受阻和肺动脉压的持续升高。Zhao 等^[4]首次证明了 miR-122-5p 对 PASC 增殖的作用, miR-122-5p 在低氧诱导 PASC 中显著下调,在野百合碱 (monocrotaline, MCT) 诱导的大鼠肺组织以及特发性肺动脉高压 (idiopathic pulmonary artery hypertension, IPAH) 患者的肺组织中表达明显上调,细胞实验证明了 miR-122-5p 抑制物可促进 PASC 的增殖。并且 miR-122-5p 可能靶向 IPAH 患者肺组织中的二氢脂酰硫基转移酶

(dihydrolipoamide S-acetyltransferase, DLAT) 基因,而 DLAT 失衡与细胞增殖和迁移有关。此外,最近 Yen 等^[5]研究表明 miR-486-5p 在低氧诱导人 PASC 中显著上调并诱导人 PASC 增殖和迁移, miR-486-5p 可调控内皮素-1 (ET-1) 的表达和分泌,而 ET-1 是 PH 发展过程中引起人 PASC 增殖和迁移的关键因子。且 miR-486-5p 可以降低 Smad2/3 的活性, Smad2/3 也是参与 PH 诱导的血管重构的重要信号通路。同样,有研究表明 miR-212-5p 在 PH 患者和啮齿动物 PH 模型的 PASC 和肺组织中表达上调,体外细胞实验证明 miR-212-5p 显著抑制 PASC 增殖,动物实验证明 miR-212-5p 显著改善了缺氧诱导小鼠的 PH,表明内源性 miR-212-5p 在 PH 发病过程中作为一种保护剂减轻 PH 的严重程度,提示 miR-212-5p 可能是 PH 的潜在治疗靶点^[6]。Lu 等^[7]证实了 PH 大鼠模型中 PASC 的增殖可被 miR-153 抑制,而活化 T 细胞核因子 3/电压门控钾通道 (NFATc3/Kv1.5) 通路可能参与了这一过程。也有研究表明在成纤维细胞生长因子 21 (fibroblast growth factor-21, FGF-21) 的刺激下,缺氧诱导的 PH 模型中 miR-130 表达上调,继而负向调节过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 的表达,从而促进 PASC 的增殖^[8]。综上所述,miRNA 在 PH 的细胞增殖中发挥重要作用,靶向 miRNA 将为 PH 的治疗提供新思路。

1.2 miRNA 与细胞凋亡

PH 显著的病理改变是在闭塞的小动脉远端发生丛状病变,表现为“血管增殖”过程,这是由于细胞凋亡诱导的抗凋亡表型细胞过度增殖所致。相关研究表明 miRNA 参与了 PH 相关细胞凋亡的调控。Wang 等^[9]发现在 PH 患者血清及缺氧诱导的 PASC 中 miR-509-5p 显著下调, miR-509-5p 通过下调下游靶点 DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase1, DNMT1) 促进 PASC 的凋亡从而在 PH 中发挥保护作用。已有研究证实低氧诱导 PH 大鼠的 PASC 中 miR-98 表达下调,间变性淋巴瘤激酶 1 (anaplastic lymphoma kinase1, ALK1) 是 miR-98 的靶基因, miR-98 过表达可抑制 ALK1 mRNA 和蛋白的表达从而促进 PASC 凋亡^[10]。同时,也有研究证明 miR-30a-5p 通过靶向壳多糖酶 3 样蛋白质 1 (Chitinase-3-like protein 1, YKL-40) 促进缺氧条件下人 PAEC 生长,抑制人 PAEC 凋亡,因此, miR-30a-

5p/YKL-40 轴可能成为 PH 治疗的一个潜在靶点^[11]。此外,低氧诱导的大鼠 PSMC 中 miR-150 水平显著降低,抑制了 PSMC 凋亡,而 miR-150 过表达引起 AKT/mTOR 通路的失活以诱导 PSMC 凋亡^[12]。同样,PH 患者血浆及低氧诱导的人 PSMC 中 miR-629 的表达上调,而下调 miR-629 的表达水平可通过 FOXO3 和 PERP 信号通路促进 PSMC 凋亡。基于以上证据,不难看出 miRNA 参与了 PAEC 和 PSMC 细胞凋亡的过程,这对探索 PH 的病理机制和治疗具有重要意义。

1.3 miRNA 与细胞迁移

肺血管重塑以细胞的无序增殖和迁移为特征。大量研究表明,细胞迁移与 miRNA 有关。Li 等^[13]发现 PH 患者中 miR-663 的循环水平显著降低,细胞实验及动物实验表明 miR-663 通过作用于 TGF- β 1/smad2/3 信号通路,从而降低血小板衍生生长因子诱导的 PSMC 迁移及增殖,并阻止 MCT 诱导的 PH 肺血管重构和右室肥厚。据报道,低氧诱导的人 PSMC 中 miR-143-5p 水平升高,并通过抑制缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 通路从而促进 PSMC 的迁移^[14]。miR-410 在缺氧诱导的小鼠肺组织中下调,体外细胞实验证明 miR-410 过表达可抑制 PAEC 的迁移^[15]。低氧诱导的 PH 大鼠 PSMC 中 miR-153 显著降低,miR-153 通过靶向 ROCK1 和 NFATc3 抑制缺氧诱导的 PSMC 迁移。相反,miR-153 抑制剂可促进 PSMC 的迁移^[16]。Sun 等^[17]发现低氧暴露的肺微血管内皮细胞 (pulmonary microvascular endothelial cell, PMEC) 中 miR-27a-3p 表达增加,miR-27a-3p 抑制剂抑制了低氧暴露的 PMEC 的增殖和迁移,并增加了低氧暴露的 PMEC 的死亡率。提示 miR-27a-3p 的上调可能参与了肺动脉高压的发病机制。然而,另外一项研究发现 miR-27a-3p 在体外可抑制 PSMC 增殖及迁移从而起到保护作用^[18],导致两个研究结果不一致可能的原因是所研究的细胞及其细胞微环境不同。以上研究表明 miRNA 促进了肺血管内皮细胞及 PSMC 的迁移参与了 PH 的发生及发展。

1.4 miRNA 与表型转换

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, SMC) 是一种高度特殊化的细胞类型,表现出较强的可塑性,在血管损伤后,SMC 表型可从收缩分化表型转变为增殖或迁移去分化表型,以适应一系列的环境变化。这一过程在血管病变的形成和血管重

建的发展中起重要作用。相关研究表明,miRNA 在 PSMC 表型转换中起关键调控作用。Su 等^[19]发现 miR-96-5p 和泛素样修饰激活酶 1 蛋白通过与 CircItgb 5 (一种竞争性内源性 RNA) 相互作用可促进 PSMC 向合成表型转变。Hong 等^[20]发现在 PH 中,线粒体钙单向转运体 (mitochondrial calcium uniporter, MCU) 复合物的功能下降,主要是由其 MCU 亚基的下调引起的,是 PH 中去分化表型的主要原因。而 miR-138 和 miR-25 的表达增加可下调 MCU 从而促进 PSMC 去分化表型的产生。Zhang 等^[21]发现 miR-140-5p 在 PH 患者和低氧诱导的 PSMC 中表达下调,低氧条件下 miR-140-5p 可靶向 DNMT1 从而促进人 PSMC 的分化。此外,在 miR-17 ~ 92 簇成员中,miR-19a/b 可通过抑制 PSMC 中的纤溶酶原激活物抑制剂-1,正向调节 TGF- β /Smad2/calponin 信号通路,从而维持 PSMC 收缩表型^[22]。因此,miRNA 参与了 PSMC 表型维持与转换,部分 miRNA 可以缓解 PH 相关表型转换的进展。

1.5 miRNA 与血管再生

血管生成受损是导致肺血管压力升高的关键因素^[23]。血管生成是内皮细胞在现有血管内萌发并形成新血管的过程。内皮细胞功能受损或下游通路的失调或两者都导致血管生成减少,导致肺血管压力的升高。最近在一项小羊 PH 模型的研究中发现,与对照组相比,实验组 PAEC 中 miR-34c 上调,miR-34c 水平的升高通过降低 PAEC 中 Notch1 的表达减弱血管生成能力^[24]。此外,PH 小鼠模型和培养的 PAEC 在缺氧条件下 miR-495 的表达显著上调。抑制 miR-495 的表达可增强小鼠肺血管生成能力^[25]。另有研究表明在 PH 细胞模型中,环状 RNA HIPK3 (circHIPK3) 在人 PAEC 中表达水平升高,circHIPK3 通过结合 miR-328-3p 促进信号转导及转录激活因子 3 (Signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 的表达从而促进血管生成,circHIPK3-miR-328-3p-STAT3 通过刺激 PAEC 增殖、迁移和血管生成参与 PH 的发病机制^[26]。在低氧诱导的 PH 大鼠中,miR-210 参与了线粒体 ATP 敏感性钾通道对 HIF/miR-210/ISCU 信号轴的调控,形成正反馈环,从而刺激 PH 肺血管再生^[27]。因此,miRNA 参与了诱导 PH 血管生成的过程,可通过 miRNA 途径来诱导血管生成过程来降低 PH 发生的风险。

1.6 miRNA 与血管钙化

miRNA 在骨代谢中调节许多基因的表达和多种细胞功能,miRNA 调控骨前体细胞向成熟骨细胞的分化。同样,多种 miRNA 也参与了血管钙化的发展。研究表明,在 PH 患者中 miR-204 下调促进 Runt 相关转录因子 2 上调,进而使 HIF-1 α 激活,导致肺动脉增生和钙化病变^[28]。此外,中度缺氧使人 PSMC 中 miR-17-5p 表达增加^[29]。而 miR-17-5b 可能通过抑制 ANKH(组织局部矿化的关键调控因子之一)的表达促进血管钙化^[30]。如前所述,miR-140-5p 在 PH 患者和 PH 实验模型中表达下调。另有研究显示 miR-140-5p 上调可通过靶向 toll 样受体 4 抑制 β -甘油磷酸酯诱导的血管平滑肌钙化^[31]。有研究报道,在低氧诱导的 PSMC 中 miR-223-3p 下调,整合素亚基 β -3 上调,导致了缺氧诱导的 PSMC 异常增殖^[32]。而 miR-223-3p 可通过阻断 IL-6/STAT3 信号介导的 SMC 向成骨表型的转分化,从而抑制血管钙化的发生^[33]。如前所述,miR-486 水平在低氧诱导人 PSMC 中上调。而最近研究表明,在血管内皮细胞钙化之前,miR-145 和 miR-486 可调控血管内皮细胞的转分化、收缩表型的丧失和成骨基因的增加。在大鼠和人类动脉钙化患者的血清中,这两种 miRNA 都明显减少,表明它们均与血管钙化相关^[34]。总之,miRNA 可通过调节 SMC 的转分化、调节钙磷稳态以及下调血管平滑肌的收缩表型来诱导血管钙化^[35]。因此,miRNA 可能是导致 PH 血管钙化的重要途径。但抑制某些 miRNA 是否对 PH 血管钙化起保护作用还有待研究。

1.7 miRNA 与免疫炎症

PH 患者肺血管周围出现明显的炎性细胞浸润,免疫细胞受刺激后生成的炎症因子可调节造血系统功能的信号蛋白,促进机体炎症反应的发生,进而参与 PH 进展。有学者发现采用低氧诱导的人 PAEC 作为 PAH 模型时,PAEC 中 miR-27b 表达上调并通过靶向 PPAR γ 激活 NF- κ B 信号通路和炎症因子的表达,从而加重了低氧诱导的 PAEC 功能障碍。当用 FGF-21 处理低氧诱导的 PAEC 后,miR-27b 的表达降低,表明 FGF-21 可通过 miR-27b 介导的 PPAR γ 通路发挥其抗炎特性,从而成为 PAH 的治疗靶点^[36]。另外,在 IPAH 患者的血清中发现 miR-483 水平降低,生物信息学分析显示,miR-483 靶向多种 PH 相关基因,包括 TGF- β 、IL-1 β 和 ET-1

等,miR-483 在内皮细胞中可抑制这些基因的表达,从而抑制炎症反应及纤维化反应^[37]。miR-155 是炎症反应的关键调控因子,因为它可诱导巨噬细胞激活^[38]。将 MCT 诱导的 PH 大鼠暴露在寒冷环境中,miR-155-5p 及相关炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等的表达升高,TNF- α 通过 miR-155 的诱导间接调控骨形态发生蛋白 2 型受体和 Smad5 的表达导致炎症反应的加剧从而加重 PH^[39]。此外,在 MCT 诱导的 PH 大鼠模型中,miR-181a/b 表达减少,使用 TNF- α 处理原代大鼠 PAEC 后,miR-181a/b 可通过减少内啡肽来减轻 TNF- α 对 PAEC 刺激的炎症状态^[40]。总之,miRNA 参与了炎症诱导的 PH 进展,但 miRNA 能否成为 PH 患者抗炎治疗的靶点仍需进一步探索。

1.8 miRNA 相关的其他机制

miRNA 在 PH 的发生发展过程中涉及多种病理生理学途径,除上述机制外,有学者也发现在 Sugen5416(一种血管内皮生长因子受体抑制剂)及缺氧诱导的 PH 大鼠模型中,miR-1 降低 Kv1.5 通道活性并诱导膜去极化,导致 PSMC 肥大^[41]。此外,在 PH 患者的 PSMC 中,miR-138 可抑制线粒体钙离子单向转运蛋白(mitochondrial calcium uniporter,MCU),而 MCU 的功能障碍引发了 PSMC 中瓦博格效应的产生从而加重 PH。总之,这些研究从一些新的角度解释了 miRNA 对 PH 发生发展的重要作用,这有助于全面理解 miRNA 在血管细胞上的作用机制。

2 总结与展望

PH 是一种致命的进展性疾病,miRNA 在 PH 的发生发展中起到关键的调控作用,涉及 PH 发病机制的 miRNA 种类较多(表 1),影响与 PH 相关的多个进程,如细胞增殖、凋亡、迁移、表型转换、血管生成、血管钙化及免疫炎症等。随着基因测序技术的进步,我们将会筛选出更多与 PH 发病机制相关的 miRNA,从而加深对 PH 发病机制的认识,对于研究延缓 PH 进展的靶向药物尤为重要。然而,目前存在技术不够完善、有效性和安全性评价不足、缺乏大规模临床试验等问题,如何使 miRNA 靶向精准地进入肺组织发挥作用,如何避免靶向药物进入人体其他组织产生不良反应的脱靶效应,仍需进行大量深入和系统的研究。

表 1 miRNA 在 PH 中的表达及其功能
Table 1 Expression of miRNA in PH and their functions

miRNA	样本类型 Sample type	变化 Change	功能 Function	靶点 Target
miR-122-5p ^[4]	低氧诱导人 PASC	↓	细胞增殖 ↑	DLAT
	Hypoxic PH human PASC		Proliferation ↑	
miR-486-5p ^[5]	低氧诱导人 PASC	↑	细胞增殖 ↑	Smad2/3
	Hypoxic PH human PASC		Proliferation ↑	
miR-153 ^[7]	PH 大鼠 PASC	↓	细胞增殖 ↑	NFATc3
	PH rat PASC		Proliferation ↑	
miR-130 ^[8]	PH 大鼠 PASC	↑	细胞增殖 ↑	PPARγ
	PH rat PASC		Proliferation ↑	
miR-509-5p ^[9]	PH 患者血清及 PASC	↓	细胞凋亡 ↓	Dnmt1
	Plasma human PH and PASC		Apoptosis ↓	
miR-98 ^[10]	PH 大鼠 PASC	↓	细胞凋亡 ↓	ALK1
	PH rat PASC		Apoptosis ↓	
miR-30a-5p ^[11]	低氧诱导人 PAEC	↓	细胞凋亡 ↑	YKL-40
	Hypoxic PH human PAEC		Apoptosis ↑	
miR-150 ^[12]	PH 大鼠 PASC	↓	细胞凋亡 ↑	AKT/mTOR
	PH rat PASC		Apoptosis ↑	
miR-663 ^[13]	PH 患者	↓	细胞迁移 ↓	TGF-β1/smad2/3
	PH patient		Migration ↓	
miR-143-5p ^[14]	低氧诱导人 PASC	↑	细胞迁移 ↑	HIF-1α
	Hypoxic PH human PASC		Migration ↑	
miR-153 ^[16]	PH 大鼠 PASC	↓	细胞迁移 ↓	ROCK1
	PH rat PASC		Migration ↓	
miR-140-5p ^[21]	PH 患者	↓	细胞分化 ↑	Dnmt1
	PH patient		Differentiation ↑	
miR-34e ^[24]	PH 羊 PAEC	↑	血管再生 ↓	Notch1
	PH lamb PAEC		Angiogenesis ↓	
miR-328-3p ^[26]	PH 患者 PAEC	↓	血管再生 ↑	STAT3
	PH patient PAEC		Angiogenesis ↑	
miR-204 ^[28]	PH 患者	↓	血管钙化 ↑	RUNX2
	PH patient		Calcification ↑	
miR-17-5p ^[30]	低氧诱导人 PASC	↑	血管钙化 ↑	ANKH
	Hypoxic PH human PASC		Calcification ↑	
miR-155-5p ^[39]	MCT 诱导的 PH 大鼠	↑	血管炎症 ↑	TNF-α、IL
	MCT PH rat		Inflammation ↑	
miR-1 ^[41]	PH 大鼠 PASC	↑	细胞肥大 ↑	Kv1.5
	PH rat PASC		Hypertrophy ↑	

参考文献:

[1] HOEPER M M, HUMBERT M, SOUZA R, et al. A global view of pulmonary hypertension [J]. Lancet Respir Med, 2016, 4 (4) : 306-322.

[2] GUPTA S, LI L. Modulation of miRNAs in pulmonary hypertension [J]. Int J Hypertens, 2015, 2015: 169069.

[3] WANG A P, YANG F, TIAN Y, et al. Pulmonary artery smooth muscle cell senescence promotes the proliferation of PASMCs by paracrine IL-6 in hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. Front Physiol, 2021, 12: 656139.

[4] ZHAO H, DUAN R, WANG Q, et al. MiR-122-5p as a potential regulator of pulmonary vascular wall cell in idiopathic pulmonary arterial hypertension [J]. Heliyon, 2023, 9 (12) : e22922.

[5] YEN T A, HUANG H C, WU E T, et al. Microrna-486-5P regulates human pulmonary artery smooth muscle cell migration via endothelin-1 [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(18) : 10400.

[6] CHEN T, SUN M R, ZHOU Q, et al. MicroRNA-212-5p, an anti-proliferative miRNA, attenuates hypoxia and sugen/hypoxia-induced pulmonary hypertension in rodents [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2022, 29: 204-216.

[7] LU Y, LI D, SHAN L. MicroRNA153 induces apoptosis by targeting NFATc3 to improve vascular remodeling in pulmonary hypertension [J]. Clin Exp Hypertens, 2023, 45 (1) : 2140810.

[8] WANG M, SU L, SUN J, et al. FGF21 attenuates pulmonary arterial hypertension via downregulation of miR-130, which

- targets PPAR γ [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(4): 1034–1049.
- [9] WANG J, JIANG R, TAN Y, et al. Human pulmonary artery smooth muscle cell dysfunction is regulated by miR-509-5p in hypoxic environment [J]. Cell Cycle, 2022, 21(11): 1212–1221.
- [10] LI Q, ZHOU X, ZHOU X. Downregulation of miR-98 contributes to hypoxic pulmonary hypertension by targeting ALK1 [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(3): 2167–2176.
- [11] TAN H, YAO H, LIE Z, et al. MicroRNA-30a-5p promotes proliferation and inhibits apoptosis of human pulmonary artery endothelial cells under hypoxia by targeting YKL-40 [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(1): 236–244.
- [12] LI Y, REN W, WANG X, et al. MicroRNA-150 relieves vascular remodeling and fibrosis in hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 1740–1749.
- [13] LI P, SONG J, DU H, et al. MicroRNA-663 prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by targeting TGF- β 1/smad2/3 signaling [J]. J Mol Cell Cardiol, 2021, 161: 9–22.
- [14] TANG B I, TANG M M, XU Q M, et al. MicroRNA-143-5p modulates pulmonary artery smooth muscle cells functions in hypoxic pulmonary hypertension through targeting HIF-1 α [J]. J Biosci, 2020, 45: 37.
- [15] GAO H, CHEN J, CHEN T, et al. MicroRNA410 inhibits pulmonary vascular remodeling via regulation of nicotinamide phosphoribosyltransferase [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 9949.
- [16] ZHAO M, WANG W, LU Y, et al. MicroRNA-153 attenuates hypoxia-induced excessive proliferation and migration of pulmonary arterial smooth muscle cells by targeting ROCK1 and NFATc₃ [J]. Mol Med Rep, 2021, 23(3): 194.
- [17] SUN Y, JIANG R, HU X, et al. CircGSAP alleviates pulmonary microvascular endothelial cells dysfunction in pulmonary hypertension via regulating miR-27a-3p/BMPR2 axis [J]. Respir Res, 2022, 23(1): 322.
- [18] CHOE N, KWON D H, RYU J, et al. miR-27a-3p targets ATF3 to reduce calcium deposition in vascular smooth muscle cells [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 22: 627–639.
- [19] SU H, ZHU H, WANG S, et al. CircItgb5 promotes synthetic phenotype of pulmonary artery smooth muscle cells via interacting with miR-96-5p and Uba1 in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension [J]. Respir Res, 2023, 24(1): 165.
- [20] HONG Z, CHEN K H, DASGUPTA A, et al. MicroRNA-138 and microRNA-25 down-regulate mitochondrial calcium uniporter, causing the pulmonary arterial hypertension cancer phenotype [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2017, 195(4): 515–529.
- [21] ZHANG Y, XU J. MiR-140-5p regulates hypoxia-mediated human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation, apoptosis and differentiation by targeting Dnmt1 and promoting SOD2 expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 473(1): 342–348.
- [22] CHEN T, HUANG J B, DAI J, et al. PAI-1 is a novel component of the miR-17–92 signaling that regulates pulmonary artery smooth muscle cell phenotypes [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2018, 315(2): L149–L161.
- [23] RANA U, CALLAN E, ENTRINGER B, et al. AMP-kinase dysfunction alters Notch ligands to impair angiogenesis in neonatal pulmonary hypertension [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2020, 62(6): 719–731.
- [24] MUKHERJEE D, RANA U, KRIEGEL A J, et al. Fetal pulmonary hypertension: dysregulated microRNA-34c-Notch1 axis contributes to impaired angiogenesis in an ovine model [J]. Pediatr Res, 2023, 93(3): 551–558.
- [25] FU J, BAI P, CHEN Y, et al. Inhibition of miR-495 improves both vascular remodeling and angiogenesis in pulmonary hypertension [J]. J Vasc Res, 2019, 56(2): 97–106.
- [26] HONG L, MA X, LIU J, et al. Circular RNA-HIPK3 regulates human pulmonary artery endothelial cells function and vessel growth by regulating microRNA-328-3p/STAT3 axis [J]. Pulm Circ, 2021, 11(2): 20458940211000234.
- [27] LU Y, HUANG J, GENG S, et al. MitoKATP regulating HIF/miR210/ISCU signaling axis and formation of a positive feedback loop in chronic hypoxia-induced PAH rat model [J]. Exp Ther Med, 2017, 13(5): 1697–1701.
- [28] RUFFENACH G, CHABOT S, TANGUAY V F, et al. Role for runt-related transcription factor 2 in proliferative and calcified vascular lesions in pulmonary arterial hypertension [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2016, 194(10): 1273–1285.
- [29] LIU G, HAO P, XU J, et al. Upregulation of microRNA-17-5p contributes to hypoxia-induced proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells through modulation of p21 and PTEN [J]. Respir Res, 2018, 19(1): 200.
- [30] SHI C, TAN J, LU J, et al. MicroRNA-17-5p promotes vascular calcification by targeting ANKH [J]. Curr Neurovasc Res, 2022, 19(1): 108–116.
- [31] ZHANG F, LI J, GU C, et al. MiR-140-5p upregulation suppressed β -glycerophosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification via targeting TLR4 [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2022, 44(3): 295–305.
- [32] LIU A, LIU Y, LI B, et al. Role of miR-223-3p in pulmonary arterial hypertension via targeting ITGB3 in the ECM pathway [J]. Cell Prolif, 2019, 52(2): e12550.
- [33] HAN Y, ZHANG J, HUANG S, et al. MicroRNA-223-3p inhibits vascular calcification and the osteogenic switch of vascular smooth muscle cells [J]. J Biol Chem, 2021, 296: 100483.
- [34] FERNÁNDEZ-VILLABRILLE S, MARTÍN-CARRO B, MARTÍN-VÍRGALA J, et al. MicroRNA-145 and microRNA-486 are potential serum biomarkers for vascular calcification [J]. Nephrol Dial Transplant, 2023, 38(7): 1729–1740.
- [35] MACKENZIE N C W, STAINES K A, ZHU D, et al. miRNA-221 and miRNA-222 synergistically function to promote vascular

calcification [J]. Cell Biochem Funct, 2014, 32 (2): 209-216.

[36] YAO D, HE Q, SUN J, et al. FGF21 attenuates hypoxia-induced dysfunction and inflammation in HPAECs via the microRNA-27b-mediated PPAR γ pathway [J]. Int J Mol Med, 2021, 47(6): 116.

[37] ZHANG J, HE Y, YAN X, et al. MicroRNA-483 amelioration of experimental pulmonary hypertension [J]. EMBO Mol Med, 2020, 12(5): e11303.

[38] DE SANTIS R, LIEPELT A, MOSSANEN J C, et al. MiR-155 targets Caspase-3 mRNA in activated macrophages [J]. RNA Biol, 2016, 13(1): 43-58.

[39] SÁNCHEZ-GLORIA J L, CARBÓ R, BUELNA-CHONTAL M, et al. Cold exposure aggravates pulmonary arterial hypertension through increased miR-146a-5p, miR-155-5p and cytokines TNF- α , IL-1 β , and IL-6 [J]. Life Sci, 2021, 287: 120091.

[40] ZHAO H, GUO Y, SUN Y, et al. MiR-181a/b-5p ameliorates inflammatory response in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by targeting endocan [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(5): 4422-4433.

[41] MONDEJAR-PARREÑO G, CALLEJO M, BARREIRA B, et al. MiR-1 is increased in pulmonary hypertension and downregulates Kv1.5 channels in rat pulmonary arteries [J]. J Physiol, 2019, 597(4): 1185-1197.

[收稿日期] 2024-01-23

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!