

杨震杰,萨出拉,于天源,等. 经 TRPV1/TRPA1-cGMP 信号通路探究推拿对 minor CCI 模型大鼠背根神经节镇痛启动机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 1-9.

Yang ZJ, Sa CL, Yu TY, et al. Exploring the analgesic initiation mechanism of tuina on the dorsal root ganglion in minor chronic constriction injury model rats via the TRPV1/TRPA1-cGMP signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 1-9.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.001

经 TRPV1/TRPA1-cGMP 信号通路探究推拿对 minor CCI 模型大鼠背根神经节镇痛启动机制

杨震杰,萨出拉,于天源*,张英琦,张润龙,陈金平,刘家玥,张汉钰,孙佳伟

(北京中医药大学针灸推拿学院,北京 102446)

【摘要】 目的 探究三法三穴推拿手法对 minor CCI 模型大鼠的镇痛启动机制。**方法** 将 56 只 SD 大鼠随机分为 8 组,即正常组、假手术组、模型 1 组、模型 2 组、推拿 1 组、推拿 2 组、推拿 1+TRPV1 拮抗剂组和推拿 2+TRPA1 拮抗剂组。模型组、推拿组和推拿+拮抗剂组建立 minor CCI 模型。推拿组和推拿+拮抗剂组在造模后 7 d 进行 1 次三法(点法、拨法、揉法)三穴(殷门穴、承山穴、阳陵泉穴)干预,模型组与假手术组进行抓握束缚,正常组不予干预。干预结束后各组先后进行机械缩足反射阈值(MWT)和热缩足反射潜伏期(TWL)测试不同性质痛觉的变化;采用硝酸还原酶法观察各组造模侧 DRG 中 NO 含量,ELISA、Western blot、qPCR 等方法观察各组造模侧 DRG 内 TRPV1/TRPA1-NO-cGMP-PKG 信号通路蛋白、基因表达的变化情况。**结果** 与模型组比较,行为学检测显示推拿 1 组、推拿 2 组 MWT、TWL 均有不同程度的延长;推拿 1 组、推拿 2 组、推拿 1+TRPV1 拮抗剂组、推拿 2+TRPA1 拮抗剂组 DRG 内 TRPV1、TRPA1、NO、sGCβ、cGMP、PKG1 的表达量均明显降低。**结论** 推拿干预 1 次后即可有效改善周围神经损伤引起的温度觉、机械痛觉过敏症状;推拿可通过 TRPV1/TRPA1-NO-cGMP-PKG 信号通路发挥即刻镇痛和持续镇痛作用。

【关键词】 三法三穴;神经病理性疼痛;瞬时受体电位;环磷酸鸟苷;背根神经节;镇痛

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0001-09

Exploring the analgesic initiation mechanism of tuina on the dorsal root ganglion in minor chronic constriction injury model rats via the TRPV1/TRPA1-cGMP signaling pathway

YANG Zhenjie, SA Chula, YU Tianyuan*, ZHANG Yingqi, ZHANG Runlong, CHEN Jinping, LIU Jiayue,

ZHANG Hanyu, SUN Jiawei

(School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102446, China)

【Abstract】 Objective To explore the analgesic initiation mechanism of three-manipulation and three-acupoint tuina in model rats with minor chronic constriction injury (CCI). **Methods** Fifty-six SD rats were divided randomly into eight groups: normal group, sham group, model 1 group, model 2 group, tuina 1 group, tuina 2 group, tuina 1 + transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) antagonist group, and tuina 2 + transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonist group. The model, tuina, and tuina + antagonist groups were established with minor CCI models. The tuina and

【基金项目】 北京自然科学基金(7232278);国家自然科学基金(82074573,82274675)。

【作者简介】 杨震杰(1989—),女,博士研究生,研究方向:推拿治疗周围神经损伤的机理。E-mail:941206257@qq.com

【通信作者】 于天源(1965—),男,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:推拿治疗周围神经损伤的机理。E-mail:yutianyuan@sina.com

tuina + antagonist groups received the three-method three-point intervention (point method, dial method, kneading method, Yinmen point, Chengshan point, Yanglingquan point) 7 days after modeling. The model and sham groups were subjected to grasping restraint, and the normal group received no intervention. After the respective interventions, each group was tested for changes in mechanical withdrawal threshold (MWT) and thermal withdrawal latency (TWL) to detect different types of pain. The nitric oxide (NO) content of the dorsal root ganglion (DRG) was determined by the nitrate reductase method, and changes in protein and gene expression levels of components of the TRPV1/TRPA1-NO-cGMP-protein kinase G (PKG) signaling pathway in the DRG of each group were determined by enzyme-linked immunosorbent assay, Western blot, and qPCR. **Results** Compared with the model group, MWT and TWL were prolonged in the tuina 1 and tuina 2 groups. Expression levels of TRPV1, TRPA1, NO, soluble guanylate cyclase- β , cGMP, and PKG1 in the DRG were significantly decreased in the tuina 1, tuina 2, tuina 1 + TRPV1 antagonist, and tuina 2 + TRPA1 antagonist groups. **Conclusions** Tuina can effectively improve the symptoms of thermal and mechanical hyperalgesia caused by peripheral nerve injury after one-time intervention. Tuina can exert immediate and continuous analgesic effects via the TRPV1/TRPA1-NO-cGMP-PKG signaling pathway.

[Keywords] three-manipulation and three-acupoint; neuropathic pain; TRP; cGMP; dorsal root ganglion; analgesic

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

周围神经病理性疼痛(peripherally-induced neuropathic pain, pNP)是指由外周体感神经系统损伤或疾病引起的疼痛,病程持续时间长,临床表现复杂,严重影响人们的生活质量^[1-2]。推拿作为一种中国传统的中医外治法,临床上对治疗许多 pNP 相关疾病具有显著的即刻镇痛效果。课题组前期采用转录组测序技术对推拿干预 1 次后的轻度慢性压迫性神经损伤(minor chronic constriction injury, minor CCI)模型大鼠脊髓背角及背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)进行分析,发现包括瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)蛋白相关基因在内的 118 个差异基因有显著变化,并富集到包括 NO-cGMP-PKG 信号通路在内的 111 条通路上^[3]。痛觉过敏是 pNP 典型临床表现之一,TRPV1、TRPA1 是主要存在于 DRG 内有害热、机械刺激的关键感受器,NO-cGMP-PKG 信号通路是参与外周水平痛觉调节机制的关键通路之一,作为阳离子通道的 TRP 系列可以通过钙离子内流激活 NO-cGMP-PKG 信号通路进行痛觉调节^[4]。

本项研究选用 minor CCI 模型大鼠模拟临床 pNP,在“三法三穴”推拿干预 1 次后,通过行为学、分子生物学等实验方法进行镇痛效果观察及对 DRG 内 TRPV1/TRPA1-NO-cGMP-PKG 信号通路相关蛋白进行检测分析,探究推拿是否通过此通路启动镇痛。

1 材料和方法

1.1 实验动物

于北京斯贝福生物科技有限公司[SCXK(京)

2019-0010]购入 56 只 6~8 周龄 SPF 级雄性 Sprague-Dawley 大鼠,体重 190~210 g。于北京中医药大学实验动物饲养室[SYXK(京)2020-0033]适应性饲养 7 d,室内温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(50 ± 5)%。本次研究已获得北京中医药大学动物伦理委员会批准(BUCM-4-2022082605-3043)。饲养过程中严格按实验动物使用的 3R 原则进行,并每天由实验固定人员给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

TRPV1 拮抗剂(MedChemExpress<上海>有限公司, AMG517); TRPA1 拮抗剂(MedChemExpress<上海>有限公司, A-967079); TRPA1 抗体(Proteintech, 19124-1-AP); TRPV1 抗体(Proteintech, 66983-1-Ig); 动物用异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司, R510-22-10); 大鼠环磷酸鸟苷(cGMP)酶联免疫分析(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司, ml003133); nNOS 抗体(Proteintech, 18984-1-AP); sGC β 抗体(Proteintech, 11936-1-AP); PKG1 抗体(Proteintech, 21646-1-AP); 辣根酶标记山羊抗兔/小鼠 IgG1(北京中山金桥生物技术有限公司, ZB-2306); 一氧化氮(NO)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, A013-2-1); SweScript All-in-One RT SuperMix for qPCR(One-Step gDNA Remover)试剂盒(武汉赛维尔科技有限公司, G3337); 2 $\times$ Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix 试剂(武汉赛维尔科技有限公司, G3326); RNA 提取液(武汉赛维尔科技有限公司, G3013); RNA 溶解液(武汉赛维尔科技有限公司, G3029); 1 $\times$ (Phosphate Buffered Saline)(武汉赛维尔科技有限公司, G4202); Water

Nuclease-Free(武汉赛维尔科技有限公司, G4700); 氯仿代替物(武汉赛维尔科技有限公司, G3014); 引物(qPCR 实验所需试剂均来自武汉赛维尔科技有限公司); 快速封闭液(新赛美生物科技有限公司, P30500); 快速转膜液(新赛美生物科技有限公司, WB4600)。

微量注射器(上海高鸽工贸有限公司, 尖头/气相 50 μL); 可吸收性外科缝线(山东博达医疗用品股份有限公司, 规格铬制 4-0); 吸入式麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司, 型号 R500); Von Frey 痛觉测量仪(深圳市瑞沃德生命科技有限公司, 型号 BIO-EVF5); 热刺痛仪(成都泰盟软件有限公司, 型号 PL-200); 多功能全波长酶标仪(美谷分子仪器<上海>有限公司, 型号 SpectraMax M2); 荧光定量 PCR 仪(伯乐生命医学产品<上海>有限公司, 型号 CFX96 TOUCH); 全能型成像系统(伯乐生命医学产品<上海>有限公司, 型号 ChemiDoc MP); 电泳仪(伯乐生命医学产品<上海>有限公司, 型号 PowerPac HC); 按摩推拿手法模拟仪(自制, 中国发明专利号: No. ZL 2023 20511277. 5)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组与造模

将 56 只雄性 SD 大鼠按照随机数字表法分为 8 组, 即正常组、假手术组、模型 1 组、模型 2 组、推拿 1 组、推拿 2 组、推拿 1+TRPV1 拮抗剂组、推拿 2+TRPA1 拮抗剂组, 每组 7 只。

根据前人叙述及课题组前期造模方法进行^[5-6], 造模前 24 h 禁食水。麻醉: 将大鼠置于通有 4%~5% 动物用异氟烷的透明麻醉盒内, 待大鼠麻醉后, 取出俯卧位置于大鼠固定板上, 并使大鼠持续吸入 2%~3% 异氟烷; 剃毛: 将大鼠右侧髌骨与股骨交界处进行剃毛并消毒; 切口: 在消毒区域内沿坐骨神经干体表投影于坐骨结节下缘部进行切口约 0.5~1 cm, 将坐骨神经进行钝性分离并暴露; 结扎: 采用 4-0 铬制可吸收性外科缝线于右侧坐骨神经分叉前进行结扎, 力度大小以不影响神经外模血流为准; 缝合: 采用医用非吸收性外科缝合线进行逐层缝合; 转移: 待大鼠复苏后转移至实验动物饲养室。其中假手术组仅暴露神经不予结扎, 正常组不予任何操作。

1.3.2 干预方法

(1) 注射拮抗剂

推拿 1+TRPV1 拮抗剂组在造模后于大鼠尾静

脉注射 TRPV1 拮抗剂(AMG517), 注射浓度为 0.3 mg/kg, 连续注射 3 d^[7]; 推拿 2+TRPA1 拮抗剂组在造模后推拿前 35 min 于大鼠尾静脉注射 TRPA1 拮抗剂(A-967079), 注射浓度为 6.2 mg/kg^[8]。

(2) 推拿

于造模后 7 d 对推拿 1 组、推拿 2 组、推拿 1+TRPV1 拮抗剂组、推拿 2+TRPA1 拮抗剂组进行推拿干预 1 次。使用自制按摩推拿手法模拟仪(No. ZL 2023 20511277. 5)分别模拟点法、拨法、揉法作用于右侧殷门穴、承山穴、阳陵泉穴(穴位定位方法参照《实验动物穴位图谱》), 设置参数: 力量 4 N, 频率 60 times/min。每法每穴干预 1 min, 共 9 min。假手术组与模型组大鼠分别进行抓握束缚 9 min, 正常组不予任何干预措施。

1.3.3 行为学检测

对各组大鼠分别与造模前、造模后、干预后进行机械缩足反射阈值、热缩足反射阈值检测, 根据前期实验结果, 正常组、假手术组、模型 1 组、推拿 1 组于干预后即刻进行热缩足反射潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL)行为学检测; 正常组、假手术组、模型 2 组、推拿 2 组于干预后 24 h 进行行为学机械缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)检测^[9]。

(1) TWL 检测

应用 PL-200 型热刺痛仪对各组大鼠热缩足反射潜伏期(TWL)进行评估。将大鼠置入顶盖有孔底面透明隔板为黑色的测试盒内, 适应环境 15~30 min, 待大鼠的探究活动停止进行检测。将仪器参数最长测试时间设置为 20 s, 强度设置为 50%。将红外探头移动至大鼠右足底中央, 点按红外开关开始检测, 待大鼠出现抬足、舔足时记录仪器所显示缩足反射潜伏期值, 连续测量 5 次, 每次测量间隔 10 min。

(2) MWT 检测

应用 BIO-EVF5 型 Von Frey 痛觉测量仪对各组大鼠机械缩足反射阈值(MWT)进行评估。将大鼠放入带有挡板且底面为网格的透明鼠箱内, 适应环境 15~30 min, 待大鼠的探究活动停止进行检测。将痛觉测量仪探头移动至大鼠右足底中央, 持续线性增加压力, 待大鼠出现抬足、舔足时记录仪器显示阈值, 连续测量 5 次, 每次测量间隔 10 min。

1.3.4 取材

各组大鼠所有行为学测试结束后, 于腹腔注射

1%戊巴比妥钠进行麻醉,待大鼠角膜反射消失后,取 L₄₋₆ DRG,于-80 ℃保存。

1.3.5 ELISA 法检测 L₄₋₆ DRG 中 cGMP 表达水平

将组织标本从-80 ℃冰箱取出后称重,加入一定量 PBS(pH=7.4)于冰上超声匀浆充分,3000 r/min 离心 20 min 后取上清进行检测。检测按照大鼠环磷酸鸟苷(cGMP)酶联免疫分析(ELISA)试剂盒使用说明书中的操作步骤进行,以检测各组大鼠 L₄₋₆ DRG 中 cGMP 表达水平。

1.3.6 硝酸还原酶法测定 L₄₋₆ DRG 中 NO 含量

将大鼠 DRG 从-80 ℃冰箱取出后称重,按重量与生理盐水体积比 1:9 的比例进行机械匀浆,于离心机内 3500 r/min 离心 10 min,离心后取上清即 10%匀浆上清 300 μL 分装后,按照试剂盒说明书操作步进行,以检测各组大鼠 L₄₋₆ DRG 中 NO 含量。

1.3.7 Western blot 法检测 L₄₋₆ DRG 中 TRPV1、TRPA1、nNOS、sGCβ、PKG1 表达水平

将 DRG 加入蛋白裂解液后于冰上裂解 30 min,1200 r/min 离心 15 min 后取上清;采用 BCA 法对上清进行蛋白浓度测定;根据浓度测定结果加入 PBS 及 Loading buffer 进行配置蛋白体系;蛋白上样量为 30 μg,根据分子量大小分别采用 6%、10% SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离蛋白;将分离后蛋白凝胶采用三明治转模方法转移到 PVDF 膜上;采用快速封闭液于摇床上慢摇封闭 30 min;采用 PBST 洗膜 10 min×3 次;孵一抗 TRPA1(1:1000)、TRPV1(1:1000)、nNOS(1:1000)、sGCβ(1:1000)、PKG1(1:1000)、β-actin(1:1000),4 ℃过夜;收集一抗;采

用 PBST 洗膜 10 min×3 次;加相应种属二抗(1:10 000),于摇床上慢摇室温孵育 1 h;采用 ECL 发光法于全能成像系统上采集图像,并用 Image J 软件对蛋白灰度值进行计算。

1.3.8 qPCR 法检测 L₄₋₆ DRG 中 TRPV1、TRPA1、nNOS、sGCβ、cGMP、PKG1 基因表达水平

采用 TRIzol 试剂提取相应组织和细胞中总 RNA,采用 SweScript All-in-One RT SuperMix for qPCR(One-Step gDNA Remover)试剂盒,根据说明书将 RNA 样本于普通 PCR 仪上逆转录为 cDNA,再根据 2×Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix 试剂说明书荧光定量 PCR 仪上完成扩增反应。GADPH、TRPV1、TRPA1、nNOS、sGCβ、cGMP、PKG1 引物序列见表 1。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件对行为学、ELISA、NO 含量检测、qPCR 检测结果进行统计学分析,采用 Image J 软件对 Western blot 条带灰度值进行分析。组间进行单因素方差分析,当 P<0.05 时差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组行为学结果及分析

2.1.1 热缩足反射潜伏期(TWL)在推拿后即刻显著提高

如图 1 所示,造模前各组基线值无差异,说明痛阈均一。在进行造模后三法三穴推拿手法干预前,与正常组、假手术组比较,模型 1 组和推拿 1 组的 TWL 显著降低(P<0.01);推拿干预 1 次后即刻测

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因 Genes	引物序列(5'-3') Primers(5'-3')	退火温度/℃ Annealing temperature
GAPDH	F:CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG R:GGTGAAGAATGGGAGTTGCT	60
TRPV1	F:ACGACTTCAAGGCTGTCTTCATC R:TAGTCCAGTTTACCTCGTCCACC	60
TRPA1	F:TCTTCTGCTATTGGCTTTTGG R:ATCTCGGTAATTGATGTCTCCCA	60
nNOS	F:GCCAAAGCAGAGATGAAAGACAC R:CCCACTTCTTGACCTTGAGGAA	60
sGCβ	F:CCTCAATGGCACTGTGATGGT R:ATGCCGTGTTTCACAAGGGTT	60
PDE5A (cGMP)	F:AAGCAGGCAAGATTTCAGAACAA R:CTGGGCTGTTTAGAACCATCAA	60
PKG1	F:GGTCACTGGTGTATGTCATGGAA R:TCCGGGTACAGTTGTAAAGAATAGC	60

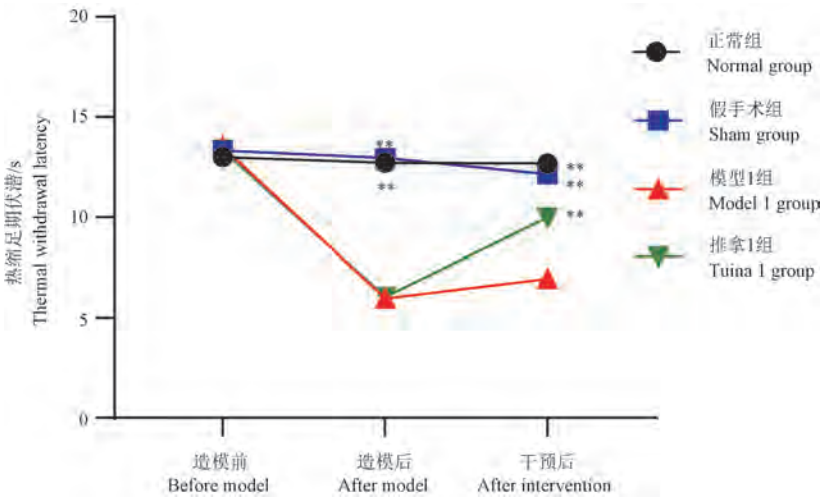
量后显示,与模型 1 组比较,推拿 1 组显著上升($P<0.01$),且模型 1 组较之前无显著变化,表明三法三穴推拿手法可有效降低热痛敏,且具有即刻镇痛作用。

2.1.2 机械缩足反射阈值(MWT)在推拿后 24 h 显著提高

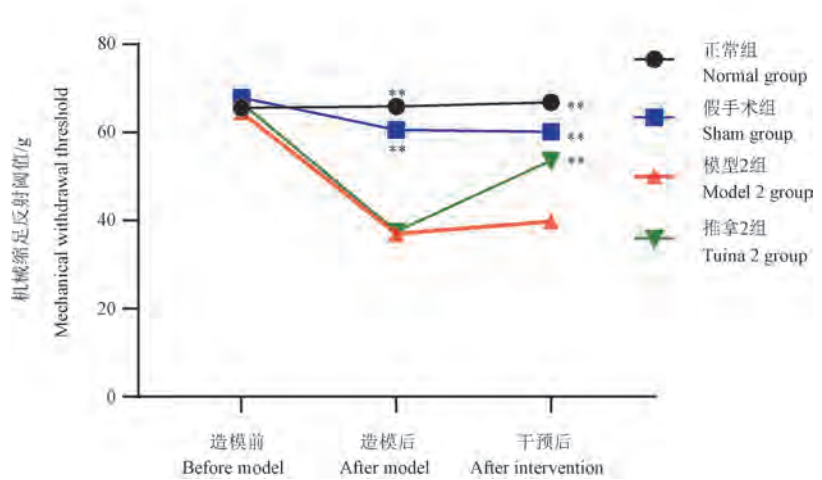
如图 2 所示,造模前各组基线值无差异,说明痛阈均一。在进行造模后三法三穴推拿手法干预前检测,与正常组、假手术组比较,模型 2 组和推拿 2 组显著降低($P<0.01$);推拿干预 1 次 24 h 后测量显示,与模型 2 组比较,推拿 2 组显著上升($P<0.01$),而模型 2 组较之前无显著变化,表明三法三

穴推拿手法可有效减轻机械刺痛。
2.2 各组大鼠 L_{4-6} DRG 中 cGMP 表达水平变化情况

如图 3A 所示,与热痛敏相关组中,推拿干预及尾静脉注射 TRPV1 拮抗剂后,与正常组、假手术组比较,模型 1 组 cGMP 表达量显著升高($P<0.01$);与模型 1 组比较,推拿 1 组、推拿 1+TRPV1 拮抗剂组 cGMP 表达量显著降低($P<0.01$)。如图 3B 所示,与机械刺痛相关组别中,推拿干预及尾静脉注射 TRPA1 拮抗剂后,与正常组、假手术组比较,模型 2 组 cGMP 表达量显著升高($P<0.01$);与模型 2 组比较,推拿 2 组、推拿 2+TRPA1 拮抗剂组 cGMP 表



注:与模型 1 组相比, ** $P<0.01$ 。
图 1 各组大鼠热缩足潜伏期(TWL)检测结果($\bar{x}\pm s, n=7$)
Note. Compared with model 1 group, ** $P<0.01$.
Figure 1 Results of thermal withdrawal latency (TWL) in each group of rats



注:与模型 2 组相比, ** $P<0.01$ 。
图 2 各组大鼠机械缩足反射阈值(MWT)检测结果($\bar{x}\pm s, n=7$)
Note. Compared with model 2 group, ** $P<0.01$.
Figure 2 Results of mechanical withdrawal threshold (MWT) in each group of rats

达量显著降低($P<0.01$)。综上,表明三法三穴推拿手法可有效降低 minor CCI 模型大鼠 DRG 内 cGMP 的表达。

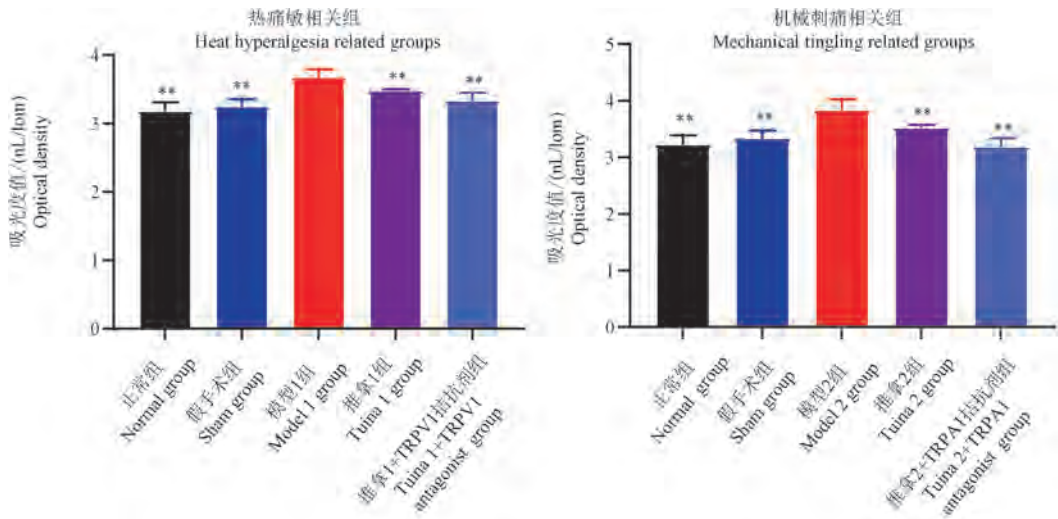
2.3 各组大鼠 L₄₋₆DRG 中 NO 含量变化情况

如图 4A 所示,与热痛敏相关组中,推拿干预及尾静脉注射 TRPV1 拮抗剂后,与正常组、假手术组比较,模型 1 组 NO 含量显著升高($P<0.01$);与模型 1 组比较,推拿 1 组 NO 含量明显降低($P<0.05$);与模型 1 组比较,推拿 1+TRPV1 拮抗剂组 NO 含量显著降低($P<0.01$)。如图 4B 所示,与机

械刺痛相关组别中,推拿干预及尾静脉注射 TRPA1 拮抗剂后,与正常组、假手术组比较,模型 2 组 NO 含量显著升高($P<0.01$);与模型 2 组比较,推拿 2 组、推拿 2+TRPA1 拮抗剂组 NO 含量显著降低($P<0.01$)。综上,表明三法三穴推拿手法可有效降低 minor CCI 模型大鼠 DRG 内 NO 的表达。

2.4 各组大鼠 L₄₋₆DRG 中 TRPV1、TRPA1、nNOS、sGCβ、PKG1 蛋白表达量变化情况

如图 5A 所示,与热痛敏相关组中,推拿干预及尾静脉注射 TRPV1 拮抗剂后,与正常组、假手术组

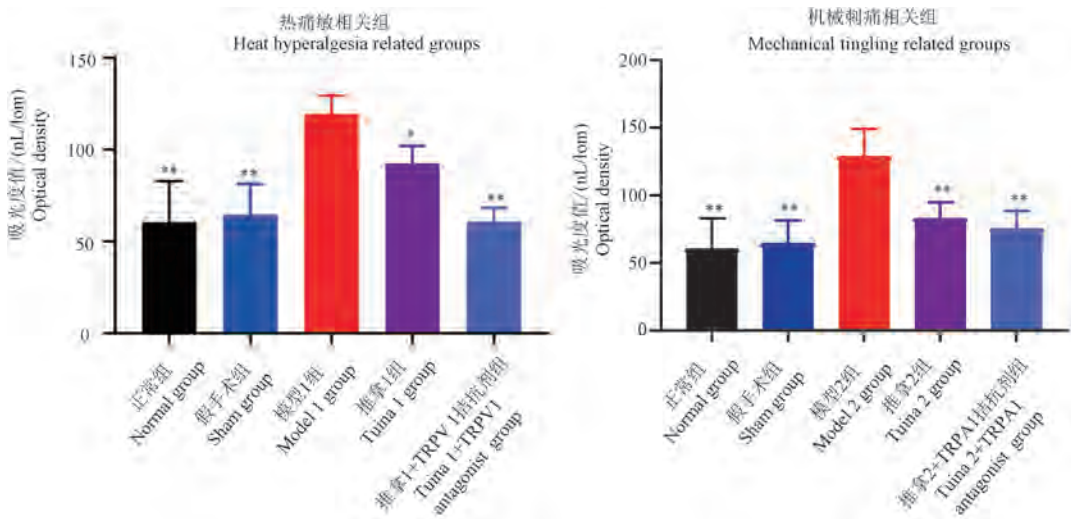


注:与模型 1 组相比, ** $P<0.01$;与模型 2 组相比, ** $P<0.01$ 。

图 3 各组大鼠 DRG 内环磷酸鸟苷(cGMP)检测结果($\bar{x}\pm s, n=7$)

Note. Compared with model 1 group, ** $P<0.01$. Compared with model 2 group, ** $P<0.01$.

Figure 3 Results of (cGMP) protein content in the DRG of rats in each group



注:与模型 1 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型 2 组相比, ** $P<0.01$ 。

图 4 各组大鼠 DRG 内 NO 检测结果($\bar{x}\pm s, n=7$)

Note. Compared with model 1 group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with model 2 group, ** $P<0.01$.

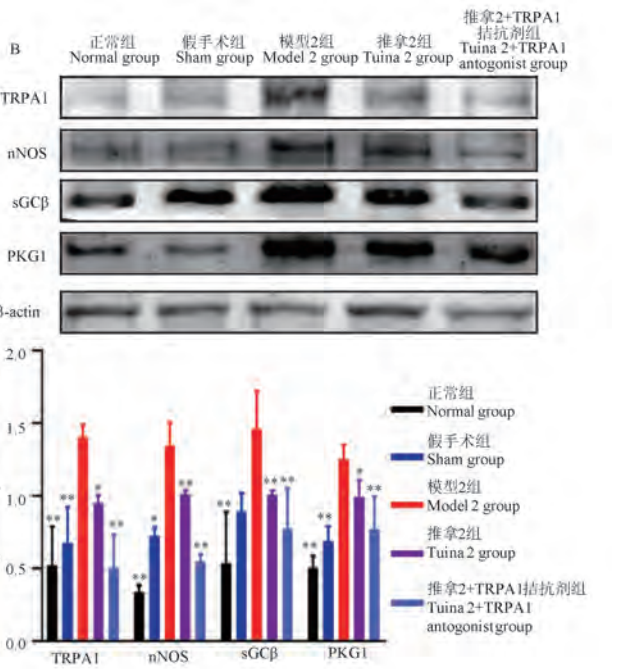
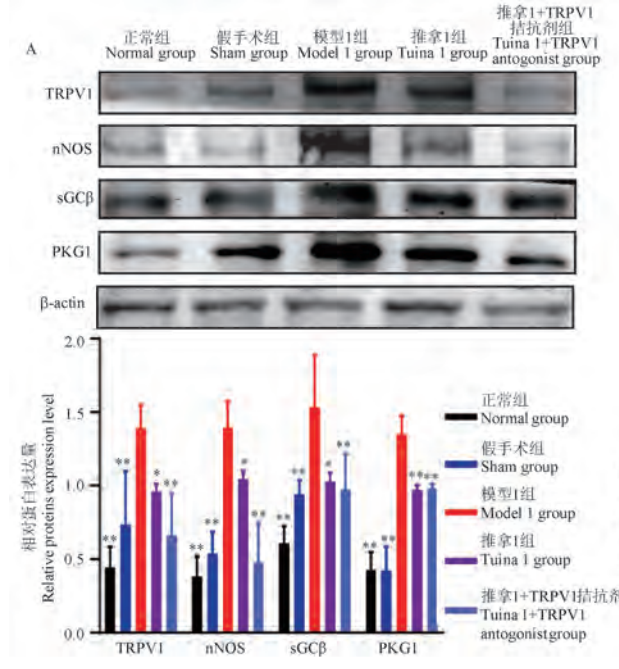
Figure 4 Results of NO content in the DRG of rats in each group

比较,模型 1 组 4 种蛋白含量显著升高($P<0.01$);与模型 1 组比较,推拿 1 组 TRPV1、nNOS、sGCβ 含量明显降低($P<0.05$),PKG1 含量显著降低($P<0.01$);与模型 1 组比较,推拿 1+TRPV1 拮抗剂组 4 种蛋白含量显著降低($P<0.01$)。如图 5B 所示,与机械刺痛相关组别中,推拿干预及尾静脉注射 TRPA1 拮抗剂后,与正常组、假手术组比较,模型 2 组 4 种蛋白含量显著升高($P<0.01$);与模型 2 组比较,推拿 2 组 TRPA1、nNOS、sGCβ 含量明显降低(P

<0.05),PKG1 含量显著降低($P<0.01$);推拿 2+TRPA1 拮抗剂组 4 种蛋白含量显著降低($P<0.01$)。综上,表明三法三穴推拿手法可有效降低 minor CCI 模型大鼠 DRG 内 TRPV1、TRPA1、nNOS、sGCβ、PKG1 蛋白的表达。

2.5 各组大鼠 L₄₋₆DRG 中 TRPV1、TRPA1、nNOS、sGCβ、PDE5A (cGMP)、PKG1 基因表达量变化情况

如图 6A 所示,在与热痛敏相关组中,推拿干预

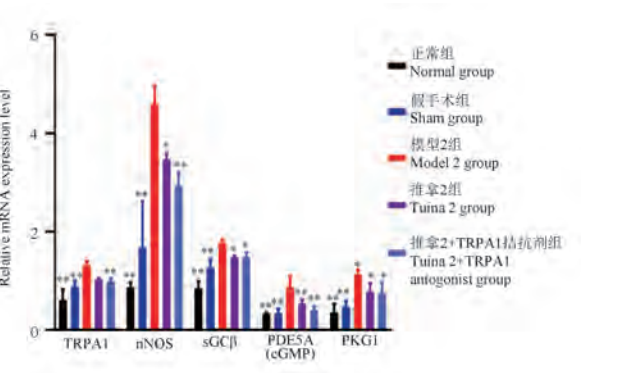
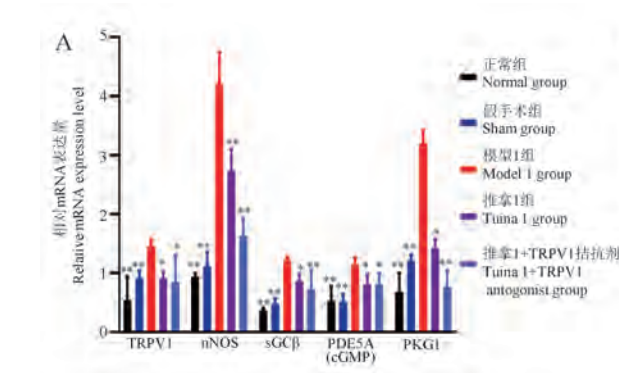


注:与模型 1 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型 2 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 5 各组大鼠 DRG 内 TRPV1、TRPA1、nNOS、sGCβ 和 PKG1 表达情况($\bar{x}\pm s, n=3$)

Note. Compared with model 1 group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with model 2 group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 5 Expression of TRPV1, TRPA1, nNOS, sGCβ, and PKG1 in the DRG of rats in each group



注:与模型 1 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型 2 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 6 各组大鼠 DRG 内 TRPV1、TRPA1、nNOS、sGCβ、PDE5A (cGMP) 和 PKG1 表达情况($\bar{x}\pm s, n=3$)

Note. Compared with model 1 group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with model 2 group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 6 Expression of TRPV1, TRPA1, nNOS, sGCβ, PDE5A (cGMP), and PKG1 in DRG of rats in each group

及尾静脉注射 TRPV1 拮抗剂后,与正常组、假手术组比较,模型 1 组 5 种蛋白基因表达量显著升高($P < 0.01$);与模型 1 组比较,推拿 1 组 TRPV1、sGC β 、PDE5A(cGMP)、PKG1 含量明显降低($P < 0.05$),nNOS 基因表达量显著降低($P < 0.01$);与模型 1 组比较,推拿 1+TRPV1 拮抗剂组 TRPV1、PDE5A(cGMP) 基因表达量明显降低($P < 0.05$),nNOS、sGC β 、PKG1 基因表达量显著降低($P < 0.01$)。如图 6B 所示,在与机械刺痛相关组别中,推拿干预及尾静脉注射 TRPA1 拮抗剂后,与正常组、假手术组比较,模型 2 组 5 种基因表达量显著升高($P < 0.01$);与模型 2 组比较,推拿 2 组 TRPA1、nNOS、sGC β 、PKG1 基因表达量明显降低($P < 0.05$),PDE5A(cGMP) 基因表达量显著降低($P < 0.01$);推拿 2+TRPA1 拮抗剂组 sGC β 基因表达量明显降低($P < 0.05$),TRPA1、nNOS、PDE5A(cGMP)、PKG1 基因表达量显著降低($P < 0.01$)。综上,表明三法三穴推拿手法可有效降低 minor CCI 模型大鼠 DRG 内 TRPV1、TRPA1、nNOS、cGMP、sGC β 、PKG1 基因的表达。

3 讨论

研究通过 minor CCI 模型模拟临床坐骨神经损伤导致的 pNP,形成稳定的慢性疼痛后,给予推拿 1 次干预后通过行为学检测疼痛变化、分子生物学检测相关蛋白基因的变化,进一步验证了推拿具有即刻镇痛和持续镇痛作用,并发现推拿可通过减少 TRPV1/TRPA1-NO-cGMP-PKG 信号通路相关蛋白的表达启动镇痛,从而发挥推拿即刻镇痛和持续镇痛作用。

推拿可通过降低 minor CCI 模型大鼠 DRG 内 TRPV1、TRPA1 的表达改善 pNP 后痛觉过敏症状。TRPV1、TRPA1 为 TRP 家族中典型的感应有害热、机械刺激的离子通道蛋白,主要在 DRG 等初级感觉神经元亚群中表达,机械过敏反应的发展在很大程度上取决于 TRPA1 变化,TRPV1 表达变化与热敏反应的发展密切相关^[10-12]。顾乐盈等^[13]研究发现 CCI 模型鼠的机械缩足反射阈值以及 TRPA1 表达显著高于正常组。杜俊英等^[14]研究发现在大鼠注射 TRPV1 激动剂后,缩足、抬腿持续时间均显著多于正常对照组。课题组前期研究中发现,推拿 20 d 后可有效减少坐骨神经损伤模型大鼠 DRG 中 TRPA1 蛋白的表达而发挥镇痛作用,并且在推拿 1

次的基因测序中就发现了相关 TRP 蛋白基因的表达变化^[15-16]。本次研究 TWL 和 MWT 作为行为学检测方法,以检测 minor CCI 模型大鼠热刺痛觉和机械刺痛觉变化情况,发现推拿后即刻热痛觉和推拿后 24 h 机械痛觉得到明显改善,再次验证了推拿 1 次后的镇痛疗效。随后取出各组大鼠 DRG 进行 TRPV1、TRPA1 蛋白及基因表达含量的检测,发现推拿组、推拿+拮抗剂组中 2 种蛋白的表达量均显著降低,表明三法三穴推拿手法可有效降低 minor CCI 模型大鼠 DRG 内 TRPV1、TRPA1 的表达,改善其痛觉过敏症状而发挥推拿的即刻镇痛作用。

推拿可通过 TRPV1/TRPA1-NO-cGMP-PKG 信号通路启动镇痛。当机体受到伤害性刺激后,使 DRG 内初级感觉神经元的 TRP 通道开放,促进钙离子内流,与钙调蛋白(CaM)偶联,共同作用于神经元型一氧化氮合酶(nNOS)以分子氧和 L-精氨酸为底物产生 NO,多以扩散的方式作用于邻近细胞或其所在细胞,与胞浆可溶型鸟苷酸环化酶(sGC)血红素模体结合,催化鸟苷三磷酸(GTP)转化为环鸟苷酸(cGMP)而增加 cGMP,从而进一步激活 cGMP 依赖的 PKG,促进疼痛介质的释放,把伤害性信息进一步传向中枢^[17-18]。一氧化氮合酶有 3 种亚型,即神经元型一氧化氮合酶(nNOS)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS),iNOS 主要协助巨噬细胞在免疫系统对抗病原体,只有在细胞受到刺激后才会产生;eNOS 主要位于血管内产生 NO,协助调节血管功能;而 nNOS 是存在于中枢神经系统和周围神经组织中产生 NO,参与疼痛调节的病理生理过程^[19]。PKG 是 cGMP 重要的效应器,有两个亚型即 PKG1 和 PKG2,PKG1 分布广泛,主要存在于神经系统中,而 PKG2 仅存在于浆膜,只分布于肾、小脑和粘膜层等部位^[20]。本次研究选择 AMG517、A-967079 作为 TRPV1 和 TRPA1 受体拮抗剂,采用 ELISA、Western blot、qPCR 等方法检测其下游 NO-cGMP-PKG 信号通路内相关蛋白的变化,发现 2 个推拿组和 2 个推拿+拮抗剂组中 NO 含量以及 nNOS、cGMP、sGC β 、PKG1 的表达量均显著降低,表明推拿可通过降低 TRPV1/TRPA1-NO-cGMP-PKG 信号通路中相关蛋白的表达启动镇痛机制,从而发挥镇痛作用。

综上所述,本次研究采用 minor CCI 模型大鼠模拟临床 pNP,通过多种行为学、分子生物学方法再次验证了推拿 1 次后的镇痛效果,并验证了推拿可通

过调节 TRPV1/TRPA1-NO-cGMP-PKG 信号通路中相关蛋白的表达启动镇痛机制,减轻周围损伤所造成的热痛觉和机械痛觉过敏的症状。

参考文献:

[1] FINNERUP N B, KUNER R, JENSEN T S. Neuropathic pain; from mechanisms to treatment [J]. *Physiol Rev*, 2021, 101 (1):259-301.

[2] 中国医师协会疼痛科医师分会. 周围神经病理性疼痛诊疗中国专家共识 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2020, 26 (5): 321-328.

Chinese Physicians Association of Pain Physicians Branch. Chinese expert consensus on the diagnosis and treatment of peripheral neuropathic pain [J]. *Chin J Pain Med*, 2020, 26 (5): 321-328.

[3] WANG H, LIU Z, YU T, et al. Exploring the mechanism of immediate analgesic effect of 1-time tuina intervention in minor chronic constriction injury rats using RNA-seq [J]. *Front Neurosci*, 2022, 16: 1007432.

[4] ZHANG M, MA Y, YE X, et al. TRP (transient receptor potential) ion channel family: structures, biological functions and therapeutic interventions for diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 261.

[5] BENNETT G J, XIE Y K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. *Pain*, 1988, 33(1): 87-107.

[6] 王厚融, 刘志凤, 于天源, 等. Minor CCI 与经典 CCI 大鼠模型成模特点的比较研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 8 (10): 1-7.

WANG H R, LIU Z F, YU T Y, et al. Comparison of the characteristics of Minor and classic CCI models [J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 8(10): 1-7.

[7] LONG M, WANG Z, ZHENG D, et al. Electroacupuncture pretreatment elicits neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats associated with transient receptor potential vanilloid 1-mediated anti-oxidant stress and anti-inflammation [J]. *Inflammation*, 2019, 42(5): 1777-1787.

[8] MCGARAUGHTY S, CHU K L, PERNER R J, et al. TRPA1 modulation of spontaneous and mechanically evoked firing of spinal neurons in uninjured, osteoarthritic, and inflamed rats [J]. *Mol Pain*, 2010, 6: 14.

[9] YANG Z, WU S, YU T, et al. Characteristics of pain changes in rats with nerve injury within 24 hours after one-time tuina intervention [J]. *J Vis Exp*, 2024, 203: e65593.

[10] BASSO L, ALTIER C. Transient Receptor Potential Channels in neuropathic pain [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2017, 32: 9-15.

[11] FERRER-MONTIEL A, FERNÁNDEZ-CARVAJAL A, PLANELLAS-CASES R, et al. Advances in modulating thermosensory TRP channels [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2012,

22(9): 999-1017.

[12] NILIUS B, OWSIANIK G. Transient receptor potential channelopathies [J]. *Pflugers Arch*, 2010, 460(2): 437-450.

[13] 顾乐盈, 杨姐姐, 于康英, 等. 白芷在神经病理性疼痛中对 MrgprD-TRPA1 通路的调控作用分析 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(2): 219-229.

GU L Y, YANG N N, YU K Y, et al. Analysis of the regulatory effect of *Angelica dahurica* on the MrgprD-TRPA1 pathway in neuropathic pain [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(2): 219-229.

[14] 杜俊英, 房军帆, 项璇儿, 等. 基于 TRPV1 和 P2X3 交互作用的大鼠外周痛感觉调控机制 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(4): 485-492.

DU J Y, FANG J F, XIANG X E, et al. Regulation mechanism of peripheral pain sensation in rats based on the interaction between TRPV1 and P2X3 [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(4): 485-492.

[15] 吴帅. “三法三穴”推拿干预对坐骨神经损伤模型大鼠冷超敏反应的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.

WU S. Effects of “three methods and three points” massage intervention on cold hypersensitivity in rats with sciatic nerve injury model [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2018.

[16] 王厚融, 刘志凤, 于天源, 等. 以 RNA-Seq 技术探究推拿三法三穴对 minor CCI 模型大鼠的镇痛作用及启动机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2023, 9(8): 3791-3794.

WANG H R, LIU Z F, YU T Y, et al. Discussion on the analgesic effect and starting mechanism of three-manipulation and three-acupoint on minor CCI model rats via RNA sequencing [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2023, 9(8): 3791-3794.

[17] DING Y, YAO P, HONG T, et al. The NO-cGMP-PKG signal transduction pathway is involved in the analgesic effect of early hyperbaric oxygen treatment of neuropathic pain [J]. *J Headache Pain*, 2017, 18(1): 51.

[18] 阚宇. 慢性痛大鼠海马 NO/cGMP/PKG 信号通路在针刺累积镇痛效应中的作用分析 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2013.

KAN Y. Involvement of hippocampal NO/cGMP/PKG signaling pathway in the accumulative analgesic effect of electroacupuncture stimulation [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2013.

[19] LI D Y, GAO S J, SUN J, et al. Targeting the nitric oxide/cGMP signaling pathway to treat chronic pain [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(5): 996-1003.

[20] GEISELHÖRINGER A, GAISA M, HOFMANN F, et al. Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues [J]. *FEBS Lett*, 2004, 575(1/2/3): 19-22.

陈枝凡,陈钰璘,聂莎,等. 瓜蒌薤白白酒汤调节肠道菌群及其代谢物改善小鼠动脉粥样硬化的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 10-19.

Chen ZF, Chen YL, Nie S, et al. Mechanism of Gualou Xiebai Baijiu Decoction for regulating the intestinal microflora and its metabolites to improve atherosclerosis in mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 10-19.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.002

瓜蒌薤白白酒汤调节肠道菌群及其代谢物改善小鼠动脉粥样硬化的实验研究

陈枝凡^{1,2}, 陈钰璘^{1,2}, 聂莎^{1,2}, 孙文昊^{1,2}, 李畅^{1,2}, 马梓珊^{1,2}, 胡凯^{1,2},
何莹莹^{1,2}, 刘鹰¹, 唐耀平^{1,2,3*}

(1.广西中医药大学, 南宁 530200; 2.广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011;
3.广西高发传染病中西医结合转化医学重点实验室, 南宁 530200)

【摘要】目的 探索瓜蒌薤白白酒汤通过调节肠道菌群 (gut microbiota, GM) 及其代谢物从而改善小鼠动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的作用机制。**方法** 将 32 只雄性 *ApoE*^{-/-} 小鼠随机分为空白 (Blank) 组、模型 (Model) 组、阿托伐他汀 (Ato) 组、瓜蒌薤白白酒汤 (GXB) 组, 每组 8 只。除 Blank 组以外的 3 组小鼠建立 AS 模型后按组别灌胃给药。用油红 O 染色检测主动脉斑块面积, HE 染色观察主动脉组织病理变化。采用 16S rRNA 基因测序技术分析小鼠 GM。检测小鼠 GM 代谢物氧化三甲胺 (TMAO)、短链脂肪酸 (SCFA) 以及血清中 TG、TC、LDL-C、HDL-C 和 NO 水平。**结果** 与 Blank 组比较, Model 组、Ato 组 AS 斑块面积均增多 ($P<0.01$, $P<0.001$); Model 组血清 TG、TC、LDL-C 水平升高 ($P<0.001$), HDL-C、NO 水平降低 ($P<0.01$, $P<0.001$)。与 Model 组比较, Ato 组、GXB 组斑块面积减少 ($P<0.001$); Ato 组、GXB 组中血清 TG、TC、LDL-C 水平降低 ($P<0.001$), NO 水平升高 ($P<0.01$); GXB 组 HDL-C 水平升高 ($P<0.05$)。与 Ato 组比较, GXB 组斑块面积减少 ($P<0.05$), NO 水平升高 ($P<0.01$)。16S rRNA 所得特征序列有 6345 个。 α 多样性分析提示 GXB 能降低 AS 小鼠 GM 的丰富度 ($P<0.001$) 并提升其均匀度 ($P<0.05$)。 β 多样性分析提示 GXB 组的菌群群落结构与 Blank 组较为相似。各组菌群丰度在门水平、属水平上均存在差异。门水平上, 小鼠 AS 造模后 *Proteobacteria* 的丰度上升 ($P<0.01$), GXB 干预后能使其丰度下降 ($P<0.01$) 的同时提升 *Verrucomicrobiota* 的丰度 ($P<0.05$)。属水平上, GXB 干预后能有效提升 *Akkermansia* 的丰度水平 ($P<0.05$)。与 Model 组比较, GXB 组中 SCFA 水平显著升高 ($P<0.01$), TMAO 水平显著降低 ($P<0.01$)。**结论** 本研究发现, 瓜蒌薤白白酒汤可以调节 GM 及其代谢物 SCFA、TMAO 来改善 AS, *Akkermansia* 可能是 GXB 通过 GM 改善 AS 的关键菌属。

【关键词】 动脉粥样硬化; *Akkermansia*; 16S rRNA 测序; 瓜蒌薤白白酒汤; 肠道菌群; 肠道菌群代谢物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0010-10

Mechanism of Gualou Xiebai Baijiu Decoction for regulating the intestinal microflora and its metabolites to improve atherosclerosis in mice

CHEN Zhifan^{1,2}, CHEN Yulin^{1,2}, NIE Sha^{1,2}, SUN Wenhao^{1,2}, LI Chang^{1,2}, MA Zishan^{1,2}, HU Kai^{1,2}, HE Yingying^{1,2},
LIU Ying¹, TANG Yaoping^{1,2,3*}

【基金项目】 国家自然科学基金 (82160856, 81774115)。

【作者简介】 陈枝凡 (1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 心血管疾病的中西医结合防治。E-mail: chenzhifan777@126.com

【通信作者】 唐耀平 (1969—), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 心血管疾病的中西医结合防治。E-mail: tangyp2014@gxtcmu.edu.cn

(1. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China. 2. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530011. 3. Guangxi Key Laboratory of Translational Medicine of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine with High Infectious Diseases, Nanning 530200)

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of Gualou Xiebai Baijiu Decoction (GXB) in improving atherosclerosis (AS) in mice by regulating the gut microbiota (GM) and its metabolites. **Methods** Thirty-two male *ApoE^{-/-}* mice were divided randomly into a Blank group, Model group, atorvastatin (Ato) group, and GXB group ($n=8$ mice per group). AS was established in all mice, except the Blank group, and the respective treatments were administered by gavage. Aortic plaques were detected by Oil red O staining and pathological changes in aortic tissue were detected by hematoxylin and eosin staining. The GM was analyzed using 16S rRNA gene sequencing technology, and mouse GM metabolites, including trimethylamine oxide (TMAO), short-chain fatty acids (SCFA), and serum levels of triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and nitric oxide (NO) were determined. **Results** Compared with the Blank group, mice in the Model and Ato groups showed an increase in AS plaque area ($P<0.05$). Serum levels of TG, TC, and LDL-C were increased ($P<0.001$) while levels of HDL-C and NO were decreased ($P<0.01$, $P<0.001$) in the Model group compared with the Blank group. The plaque area was decreased ($P<0.05$), serum levels of TG, TC, and LDL-C were decreased ($P<0.001$), and NO levels were increased ($P<0.01$) in the Ato and GXB groups, while HDL-C levels were increased in the GXB group ($P<0.05$) compared with the Model group. Plaque area was decreased ($P<0.05$) and the NO level was increased ($P<0.01$) in the GXB group compared with the Ato group. A total of 6345 characteristic sequences were obtained from 16S rRNA analysis. α -Diversity analysis indicated that GXB reduced the richness of the GM in AS mice ($P<0.001$) and improved its uniformity ($P<0.05$). β -Diversity analysis suggested that the microbial community structure in the GXB group was similar to that in the Blank group. The abundance of microbial communities differed among the groups at the phylum and genus levels. At the phylum level, the abundance of *Proteobacteria* was increased ($P<0.01$) in AS mice, while GXB intervention reduced the abundance of *Proteobacteria* ($P<0.01$) and increased the abundance of *Verrucomimicrobiota* ($P<0.05$). At the genus level, GXB effectively increased the abundance of *Akkermansia* ($P<0.05$). SCFAs were significantly increased ($P<0.01$) and TMAO levels were significantly decreased ($P<0.01$) in the GXB group compared with the Model group. **Conclusions** GXB can regulate the intestinal flora and intestinal flora metabolites SCFA and TMAO to improve AS. *Akkermansia* may be a key bacterial genus of the gut microbiota through which GXB may improve AS.

【Keywords】 atherosclerosis; *Akkermansia*; 16S rRNA sequencing; Gualou Xiebai Baijiu Decoction; gut microbiota; metabolites of gut microbiota

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

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)引起的心脑血管疾病是非传染性疾病中威胁人类健康的首要疾病^[1-2]。近年来,随着对肠道菌群(gut microbiota, GM)的研究逐渐深入,越来越多的证据表明 GM 及其代谢产物与 AS 的发生发展密切相关。随着 GM 的改变,其代谢产物的产出也随之发生变化^[3]。其中,短链脂肪酸(short chain fatty acid, SCFA)与氧化三甲胺(trimethylamine oxide, TMAO)备受关注。SCFA 通过调节炎症、免疫系统和相关的 G 蛋白偶联受体来降低血压和降低 AS 的风险^[4]。TMAO 能通过多种机制加重 AS,包括增强泡沫细胞的形成、直接激活炎症反应和干扰胆固醇的反向转运等^[5]。人体血浆中 TMAO 对不良心血管事件具有独立预

测价值^[6]。

临床与实验研究提示中医药能过调节 GM 结构,改善肠道屏障功能障碍,降低机体慢性炎症,促进脂质代谢,对 AS 的防治具有巨大的潜在价值^[7]。瓜蒌薤白白酒汤出自于《金匱要略》,由瓜蒌、薤白、白酒 3 味中药组成,是治疗冠心病的常用经方,具有通阳散结、行气祛痰的功效。方中的瓜蒌和薤白同归胃、大肠经,具有润肠通便的功效。这提示该方与胃肠道存在着密切关系。目前,尚没有研究揭示瓜蒌薤白白酒汤是否能够通过调节 GM 来改善 AS,瓜蒌薤白白酒汤、GM 以及 AS 的关系未有明确定论^[8]。本研究拟从 GM 及其代谢物的角度阐释瓜蒌薤白白酒汤治疗 AS 的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 8 周龄雄性 C57BL/6N *ApoE*^{-/-} 小鼠 32 只, 体重 20~22 g, 来源于赛业模式生物研究中心(太仓)有限公司[SCXK(苏)2018-0003]。饲养于广西中医药大学动物中心[SYXK(桂)2019-0001], SPF 级环境温度(25±1)℃, 湿度(55%±5%), 12 h/12 h 光/暗循环, 并严格按照 3R 原则进行实验。本实验经广西中医药大学实验动物福利与伦理委员会审查批准(DW20230830-166)。

1.2 主要试剂与仪器

4%多聚甲醛通用型组织固定液(北京兰杰柯科技有限公司, 货号: BL539A); 饱和油红 O 染色液(北京索莱宝科技有限公司, 货号: G1260); 苏木素、伊红(北京中杉金桥生物技术有限公司, 货号: ZLI-9610、ZLI-9613); 甘油三酯(TG)测试盒、总胆固醇(TC)测试盒、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测试盒、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测试盒(南京建成生物工程研究所, 货号: A110-1-1、A111-1-1、A113-1-1、A112-1-1); 总 NO 试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司, 货号: S0024); 小鼠短链脂肪酸(SCFA)ELISA 检测试剂盒(上海源桔生物科技中心, 货号: YJ406150); 小鼠氧化三甲胺(TMAO)定量检测试剂盒(ELISA)(深圳市优品生物科技有限公司, 货号: YPJ1180); 中药饮片购自中国北京同仁堂(集团)有限公司; 10% Vol 米酒购自贵州忆香醇酒业有限公司。

Tecan Infinite 200Pro 酶标仪(上海迪奥生物科技有限公司); 包埋机(武汉俊杰电子有限公司); 病理切片机(Thermo Fisher)。

1.3 实验方法

1.3.1 药物与制备

按照《金匱要略》所记载: 瓜蒌实 1 枚, 薤白 0.5 L, 白酒 7 L。参照全小林^[9]《方药量效学》经方剂量折算标准, 方中瓜蒌与薤白的比例约为 1:1。经方白酒实为现代米酒, 1 L 约 200 mL^[10]。按比例瓜蒌、薤白在米酒中浸泡 30 min 后大火煮沸, 煮沸后小火煎煮 40 min, 过滤, 浓缩至浓度为 1.3 g/mL 浓缩液, 即为瓜蒌薤白白酒汤药液。

1.3.2 模型建立

将 32 只雄性 *ApoE*^{-/-} 小鼠分笼饲养, 实验前所有小鼠适应性喂养 1 周, 随机选择 8 只小鼠作为空白组, 以普通饲料喂养, 剩余 24 只小鼠饲喂高脂饲

料(2%胆固醇, 10%猪油, 0.5%胆酸钠, 10%蛋黄粉, 0.1%丙基硫氧嘧啶, 5%白糖, 72.4%基础饲料), 喂养 16 周。

1.3.3 分组及给药

8 只以普通饲料喂养的小鼠作为空白(Blank)组, 24 只模型小鼠随机分为模型(Model)组、阿托伐他汀(Ato)组、瓜蒌薤白白酒汤(GXB)组, 每组 8 只。Blank 组与 Model 组小鼠给予等量无菌 0.9% NaCl 溶液, Ato 组小鼠给予浓度 0.26 mg/mL 阿托伐他汀混悬液, GXB 组小鼠给予瓜蒌薤白白酒汤药液, 每只小鼠 200 μ L/d, 灌胃给药。每天给药 1 次, 连续 4 周。

1.3.4 样本收集

末次给药 2 h 后, 经异氟烷气体过量麻醉各组小鼠, 取血, 4℃下 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液, -80℃保存。同时收集小鼠主动脉组织、结肠内容物, 主动脉用 4%多聚甲醛固定保存, 结肠内容物 -80℃保存。

1.3.5 油红 O 染色

取固定好的主动脉组织, 蒸馏水充分洗涤, 60%异丙醇浸洗。配制好的油红 O 染液染色 10 min。60%异丙醇分化至间质清晰, 蒸馏水洗。固定在白色滤纸中观察染色结果。

1.3.6 HE 染色

取固定好的主动脉组织, 按常规方式包埋, 切片, 脱蜡至水, 然后用苏木素和伊红染色, 显微镜下观察染色结果。

1.3.7 血脂水平检测

按照试剂盒说明, 使用测定试剂盒检测小鼠血清 TG、TC、HDL-C、LDL-C 水平。

1.3.8 NO 水平检测

按照试剂盒说明, 使用总 NO 试剂盒检测小鼠血清中 NO 水平。

1.3.9 16S rRNA 生物信息学分析

提取每组结肠内容物样本总 DNA, 使用引物对细菌 16S rDNA V3-V4 区进行扩增, 定量后构建文库并使用 Qubit 和 qPCR 对文库进行定量, 将检测合格后的文库使用 NovaSeq 6000 测序系统对其进行双末端测序。每个样本集的数据经过过滤处理, 与物种注释的数据库核对检测后最终得到有效数据。

1.3.10 GM 代谢物水平检测

按照试剂盒说明, 使用 ELISA 试剂盒检测小鼠血清 SCFA、TMAO 水平。

1.4 统计学方法

本实验数据采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数据符合正态性和方差齐,两组比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,不符合正态性采用非参数检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠主动脉油红 O 染色结果

与 Blank 组比较,Model 组、Ato 组 AS 斑块面积均增多($P<0.01$ 、 $P<0.001$);与 Model 组比较,Ato 组、GXB 组斑块面积减少($P<0.001$)。与 Ato 组比较,GXB 组斑块面积减少($P<0.05$)(表 1,图 1)。

2.2 小鼠主动脉 HE 染色结果

观察到 Model 组斑块发生程度较 Blank 组加重,而 Ato、GXB 组较 Model 组减轻(图 2)。

2.3 血脂水平检测结果

与 Blank 组比较,Model 组中血清 TG、TC、LDL-C 水平升高($P<0.001$),HDL-C 水平降低($P<0.01$)。与 Model 组比较,Ato 组、GXB 组中血清

TG、TC、LDL-C 水平降低($P<0.001$),GXB 组 HDL-C 水平升高($P<0.05$)(表 2)。

2.4 NO 检测结果

与 Blank 组比较,Model 组小鼠血清 NO 降低($P<0.001$)。与 Model 组比较,Ato 组、GXB 组中血清 NO 水平升高($P<0.01$ 、 $P<0.001$)。与 Ato 组比较,GXB 组中血清 NO 水平升高($P<0.01$)(表 3)。

表 1 $ApoE^{-/-}$ 小鼠主动脉粥样硬化斑块面积($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Table 1 $ApoE^{-/-}$ mouse aortic atherosclerotic plaque area

组别 Groups	斑块面积/% Plaque area
空白组 Blank group	0.71±0.37
模型组 Model group	15.72±2.5***
阿托伐他汀组 Ato group	6.72±0.83**△△△
瓜蒌薤白白酒汤组 GXB group	2.71±1.86△△△#

注:与空白组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组比较,△△△ $P<0.001$;与阿托伐他汀组比较,# $P<0.05$ 。
Note. Compared with Blank group,** $P<0.01$,*** $P<0.001$. Compared with Model group,△△△ $P<0.001$. Compared with Ato group,# $P<0.05$.

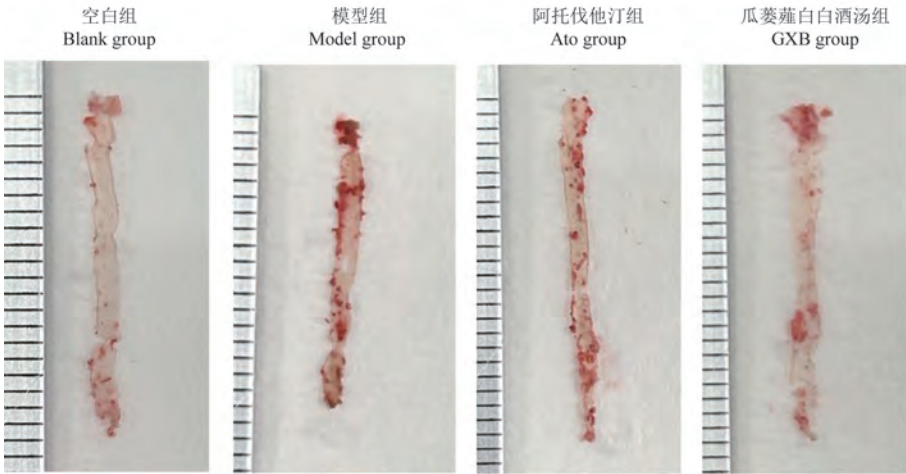


图 1 小鼠降主动脉油红 O 染色代表性照片

Figure 1 Representative photos of mouse descending aorta stained with Oil red O

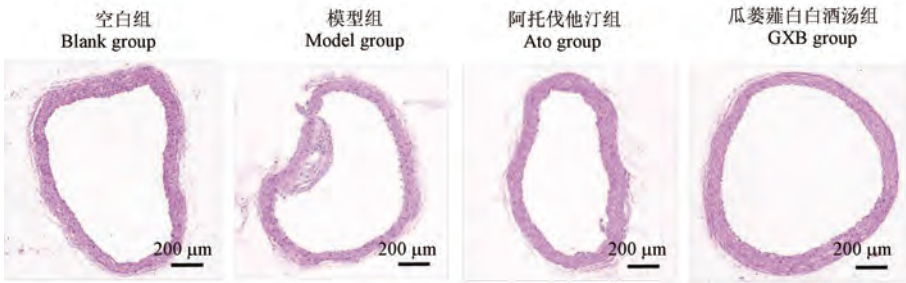


图 2 小鼠主动脉横截面 HE 染色代表性照片

Figure 2 Representative photos of HE staining of mouse aorta cross-section

2.5 16S rRNA 生物信息学分析结果

2.5.1 ASV 分析

测序得到有效数据使用 DADA2 降噪,产生的每个序列去重后得到的 ASVs (Amplicon Sequence Variants)。本研究得到的特征序列有 6345 个,绘制 4 组的特征序列组成 Venn 图(图 3),其结果显示,Blank 组、Ato 组、GXB 组、Model 组的特征序列数量分别为 1063 个、3362 个、1786 个、3022 个,其

中 4 组共有特征序列为 277 个。同时 4 组分别检验出特有的特征序列,Blank 组、Ato 组、GXB 组、Model 组中数目分别为 384 个、2193 个、518 个、1839 个。

2.5.2 α 多样性分析

α 多样性指数可以反映菌群的丰富度和均匀性,其中 chao1 指数与丰富度相关、pielou_e 指数与均匀性相关。本研究图 4 显示,与 Blank 组比较,Model 组 chao1 指数明显升高($P<0.001$),pielou_e

表 2 ApoE^{-/-}小鼠血脂水平($\bar{x}\pm s,n=5$)
Table 2 ApoE^{-/-} mouse lipid levels

组别 Groups	TG/(mmol/L)	TC/(mmol/L)	LDL-C/(mmol/L)	HDL-C/(mmol/L)
空白组 Blank group	1.00±0.1	1.57±0.06	1.57±0.17	3.24±0.64
模型组 Model group	3.74±0.12***	3.14±0.08***	4.50±0.13***	1.37±0.39***
阿托伐他汀组 Ato group	1.31±0.12*** ^{△△△}	1.77±0.06*** ^{△△△}	1.74±0.09 ^{△△△}	1.78±0.47***
瓜蒌薤白白酒汤组 GXB group	1.55±0.11*** ^{△△△}	2.13±0.06*** ^{△△△}	3.07±0.19*** ^{△△△}	2.08±0.25** [△]

注:与空白组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta\Delta}P<0.001$ 。
Note. Compared with Blank group,** $P<0.01$,*** $P<0.001$. Compared with Model group, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta\Delta}P<0.001$.

表 3 ApoE^{-/-}小鼠血清 NO 水平($\bar{x}\pm s,n=5$)
Table 3 ApoE^{-/-} mouse serum NO levels

组别 Groups	NO/(μmol/L)
空白组 Blank group	216.05±3.69
模型组 Model group	160.75±8.8***
阿托伐他汀组 Ato group	181.00±13.5*** ^{△△}
瓜蒌薤白白酒汤组 GXB group	199.46±10.56* ^{△△△##}

注:与空白组比较,* $P<0.05$,*** $P<0.001$;与模型组比较, $^{\Delta\Delta}P<0.01$, $^{\Delta\Delta\Delta}P<0.001$;与阿托伐他汀组比较,## $P<0.01$ 。
Note. Compared with Blank group,* $P<0.05$,*** $P<0.001$. Compared with Model group, $^{\Delta\Delta}P<0.01$, $^{\Delta\Delta\Delta}P<0.001$. Compared with Ato group,## $P<0.01$.

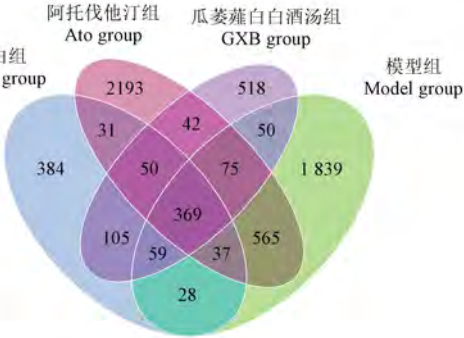
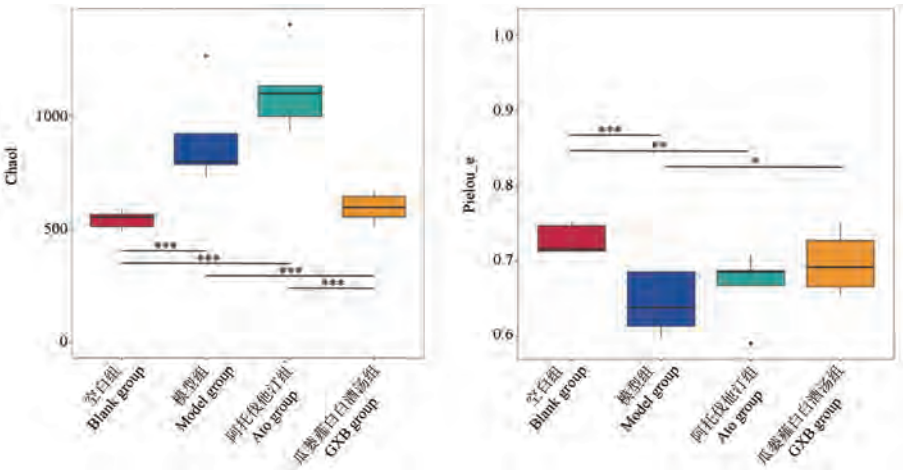


图 3 特征序列分布 Venn 图

Figure 3 Venn plot of feature sequence distribution



注:与空白组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组比较,* $P<0.05$,*** $P<0.001$;与阿托伐他汀组比较,*** $P<0.001$ 。

图 4 Chao1 指数、pielou_e 指数箱型图

Note. Compared with Blank group,** $P<0.01$,*** $P<0.001$. Compared with Model group,* $P<0.05$,*** $P<0.001$. Compared with Ato group,*** $P<0.001$.

Figure 4 Chao1 index, pielou_e index box plot

指数明显下降($P<0.001$);Ato 组 chao1 指数明显升高($P<0.001$),pielou_e 指数下降($P<0.01$)。与 Model 组比较,GXB 组的 pielou_e 指数升高($P<0.05$),chao1 指数明显下降($P<0.001$)。与 Ato 组比较,GXB 组的 chao1 指数明显下降($P<0.001$)(图 4)。

2.5.3 β 多样性分析

β 多样性分析可以对不同样本的 GM 群落构成进行比较分析,主坐标分析(principal co-ordinates analysis,PCoA)是 β 多样性主要分析方法之一。PCoA 的结果发现 Blank 组样本与 Model 组样本距离较远,提示与 Blank 组比较,Model 组群落构成发

生较大改变;GXB 组与 Model 组距离较远,提示与 Model 组比较,GXB 干预后的群落构成发生较大改变;GXB 组与 Blank 组较近,提示 GXB 组与 Blank 组群落构成最为相似(图 5)。

2.5.4 GM 群落结构分析

在门水平排名前 5 的物种有:*Bacteroidota*、*Firmicutes*、*Verrucomicrobiota*、*Proteobacteria*、*Campilobacterota*(图 6、图 7)。与 Blank 组比较,Model 组 *Proteobacteria* 丰度升高($P<0.01$),差异有统计学意义。与 Blank 组比较,Ato 组 *Firmicutes*、*Proteobacteria* 丰度升高($P<0.05$ 、 $P<0.001$),*Bacteroidota* 丰度下降($P<0.05$),差异有统计学意

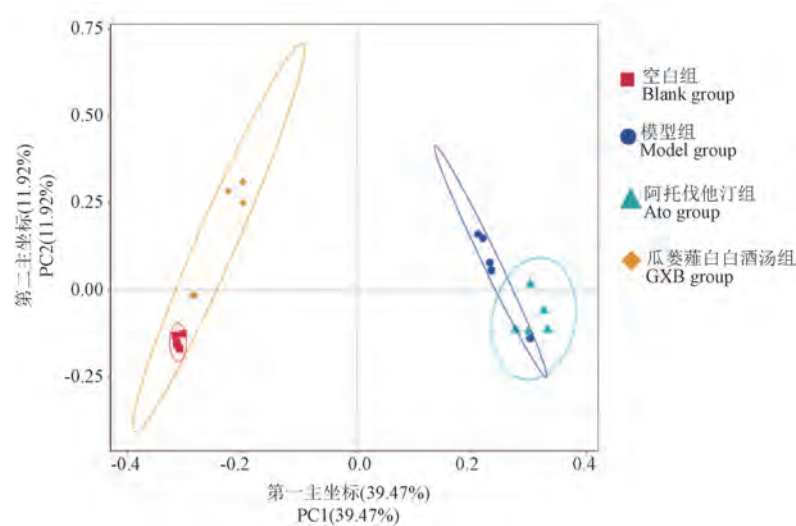


图 5 基于 unweighted_unifrac 算法的 PCoA 图
Figure 5 PCoA graph based on unweighted_unifrac algorithm

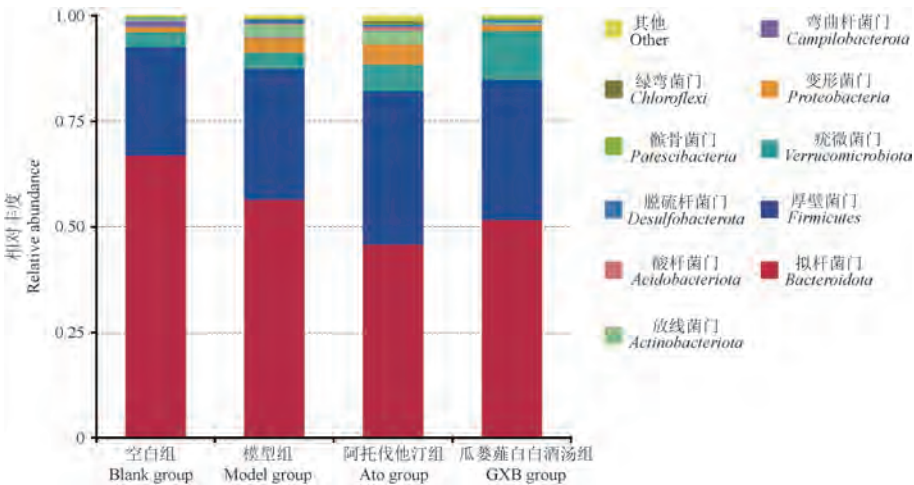


图 6 门水平上物种相对丰度柱状图
Figure 6 Bar chart of relative species abundance at the phylum level

义。与 Blank 组比较,GXB 组 *Verrucomicrobiota* 丰度升高($P<0.05$),差异有统计学意义。与 Model 组比较,GXB 组 *Verrucomicrobiota* 丰度升高($P<0.05$),*Proteobacteria* 丰度下降($P<0.01$),差异有统计学意义。与 Ato 组比较,GXB 组 *Proteobacteria* 丰度下降($P<0.001$),差异有统计学意义(表 4)。

在属水平排名前 5 的物种有 *Muribaculaceae*、*Lactobacillus*、*Bacteroides*、*Akkermansia*、*Lachnospiraceae* _NK4A136_group(图 8、图 9)。与 Blank 组比较,Ato 组 *Muribaculaceae* 丰度下降($P<0.05$),差异有统计

学意义。与 Blank 组比较,GXB 组 *Akkermansia* 丰度升高($P<0.05$),差异有统计学意义。与 Model 组比较,GXB 组 *Akkermansia* 丰度升高($P<0.05$),差异有统计学意义(表 5)。

2.6 TMAO、SCFA 水平检测结果

与 Blank 组比较,Model 组 TMAO 水平升高($P<0.05$),SCFA 水平降低($P<0.05$)。与 Model 组比较,GXB 组中 TMAO 水平降低($P<0.01$),SCFA 水平升高($P<0.01$)。与 Ato 组比较,GXB 组 SCFA 水平升高($P<0.05$)(表 6)。

表 4 门水平 GM 分析($\bar{x}\pm s,n=5$)
Table 4 Analysis of gut microbiota at the phylum level

组别 Groups	<i>Bacteroidota</i> /%	<i>Firmicutes</i> /%	<i>Verrucomicrobiota</i> /%	<i>Proteobacteria</i> /%	<i>Campilobacterota</i> /%
空白组 Blank group	66.96±11.38	25.69±8.24	3.48±3.74	1.24±0.8	1.51±2.44
模型组 Model group	56.46±6.23	30.97±5.97	3.85±5.17	3.55±1.18**	0.23±0.22
阿托伐他汀组 Ato group	45.87±7.26*	36.32±7.82*	6.29±5.14	4.79±1.82***	0.06±0.06
瓜蒌薤白白酒汤组 GXB group	51.73±6.37	33.12±5.63	11.57±5.42* [△]	1.27±0.8 ^{△△###}	0.20±0.2

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与阿托伐他汀组比较,### $P<0.001$ 。
Note. Compared with Blank group,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$. Compared with Model group,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$. Compared with Ato group,### $P<0.001$.

表 5 属水平 GM 分析($\bar{x}\pm s,n=5$)
Table 5 Analysis of gut microbiota at the genus level

组别 Groups	<i>Muribaculaceae</i> /%	<i>Lactobacillus</i> /%	<i>Bacteroides</i> /%	<i>Akkermansia</i> /%	<i>Lachnospiraceae</i> _NK4A136_group/%
空白组 Blank group	47.84±11.34	1.38±0.85	7.72±3.98	3.48±3.74	4.64±2.09
模型组 Model group	41.43±4.67	6.84±7.6	9.11±9.65	3.79±5.17	3.55±3.36
阿托伐他汀组 Ato group	29.16±9.92*	8.67±11.44	8.49±2.35	6.16±5.09	2.48±1.21
瓜蒌薤白白酒汤组 GXB group	40.47±4.11	2.75±1.39	5.2±1.38	11.57±5.43* [△]	5.76±3.78

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$ 。
Note. Compared with Blank group,* $P<0.05$. Compared with Model group,[△] $P<0.05$.

表 6 *ApoE*^{-/-}小鼠血清 TMAO 和 SCFA 水平($\bar{x}\pm s,n=5$)
Table 6 *ApoE*^{-/-} mouse serum TMAO and SCFA levels

组别 Groups	氧化三甲胺/(ng/mL) TMAO	短链脂肪酸/(μg/mL) SCFA
空白组 Blank group	313.58±22.09	77.89±7.31
模型组 Model group	369.76±19.87*	69.29±2.57*
阿托伐他汀组 Ato group	325.91±55.74	72.96±6.11
瓜蒌薤白白酒汤组 GXB group	298.83±41.27 ^{△△}	81.06±5.87 ^{△△#}

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,^{△△} $P<0.01$;与阿托伐他汀组比较,# $P<0.05$ 。
Note. Compared with Blank group,* $P<0.05$. Compared with Model group,^{△△} $P<0.01$. Compared with Ato group,# $P<0.05$.

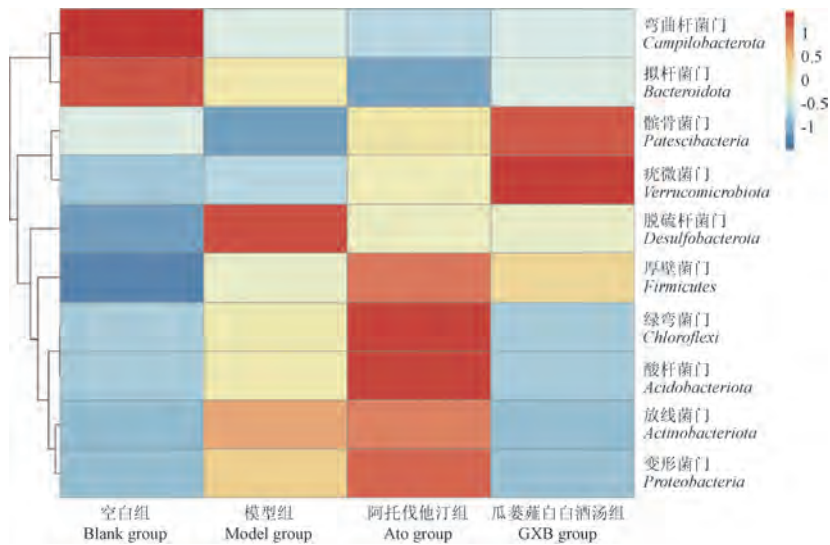


图 7 门水平上物种相对丰度热图

Figure 7 Heatmap of relative species abundance at the phylum level

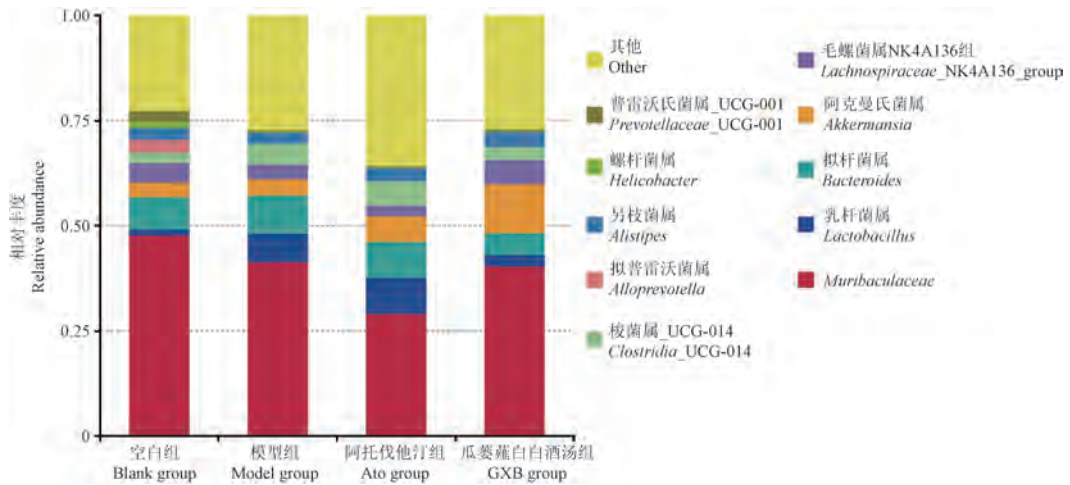


图 8 属水平上物种相对丰度柱状图

Figure 8 Bar chart of relative species abundance at the genus level

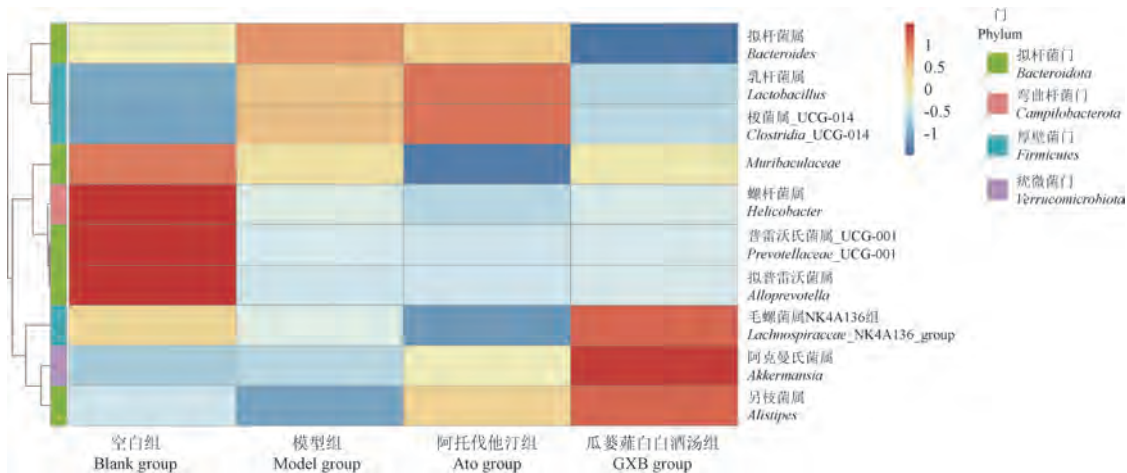


图 9 属水平上物种相对丰度热图

Figure 9 Heatmap of relative species abundance at the genus level

3 讨论

近年来,随着高通量测序技术的不断发展,GM 对人体健康影响引起广泛关注。GM 参与到机体的消化、吸收、代谢、免疫等多个环节,一旦 GM 的平衡被打破,肠 GM 的结构、功能和代谢活性的差异就会影响到代谢和免疫等环节,引发各种疾病^[10]。作为 GM 代谢产物之一的 TMAO,已经成为心血管疾病的独立危险因素和预后指标。GM 通过分解食物中的磷脂酰胆碱、L-肉碱、甜菜碱而产生 TMAO 的前体三甲胺(trimethylamine, TMA),然后进入血液,在肝进一步转化 TMAO。研究者发现,TMAO 能通过促进氧化应激以及降低 NO 的生物利用度来损伤血管内皮功能^[11],使血管内皮依赖性舒张功能减弱、血小板聚集增加、白细胞黏附、血管平滑肌增生等,最终导致 AS^[12]。一项临床研究表明,高脂血症患者的 TMAO 水平明显较高,TMAO 水平明显与 TG 呈正相关、与 HDL-C 呈负相关^[13]。另一 GM 代谢物 SCFA 能通过调节肠腔 pH 值和粘液产生为上皮细胞提供燃料,影响粘膜免疫功能从而调节胃肠功能、修复损伤肠道黏膜。SCFA 可以激活整个胃肠道的一系列 G 蛋白偶联受体(GPR41、GPR43 和 GPR109A)从而影响到关键代谢过程,如能量代谢、脂质代谢和调节饱腹感^[14]。

中医药在调节 GM 抗 AS 方面有着独特优势。GM 可通过参与中药成分体内代谢,增加机体对其吸收作用,调节 GM 比例,促进 GM 与中医药的相互作用参与 AS 进程。多项研究以 GM 为切入点,初步证实了部分中药单体、单味中药及中药复方能通过改变 GM 结构干预其发生发展及参与治疗,具有改善脂代谢紊乱、稳定斑块、抗凝等作用^[15]。研究发现,化痰祛痰方能通过改变 GM 结构,减少 TMAO 合成,从而抑制 AS 发生发展^[16]。炙红芪可以通过调节 GM,改善 SCFA 代谢起到治疗脾气虚大鼠作用^[17]。瓜蒌薤白白酒汤是一组传统的中药复方,不仅用于治疗心血管疾病,还具有宽胸理气,润肠通便等作用。瓜蒌薤白白酒汤的主要活性成分能影响人 GM 中的代谢,瓜蒌薤白白酒汤能提高 NO 的生物活性,对缺血心肌具有良好的保护作用,可有效改善血脂水平及血液流变学状态^[18-20]。

故本研究基于 16S rRNA 基因测序技术,对小鼠 GM、瓜蒌薤白白酒汤和 TMAO、SCFA 的关系展开研究。结果表明,瓜蒌薤白白酒汤及阿托伐他汀

均能降低 AS 小鼠的血脂,提升 AS 小鼠 NO 水平,可显著减少动脉斑块的面积,具有抗 AS 的作用。相较阿托伐他汀,瓜蒌薤白白酒汤的作用更为显著。 α 多样性指数分析结果显示,小鼠的 GM 群落丰富度可因 AS 的发生而升高,群落均匀度可因 AS 的发生而降低,瓜蒌薤白白酒汤能有效降低其群落丰富度、提升群落均匀度,使二者恢复到正常水平。 β 多样性分析结果表明,小鼠的 GM 群落构成会因 AS 的发生较大的变化,经瓜蒌薤白白酒汤干预后的群落构成与 AS 发生前较为相似,可认为瓜蒌薤白白酒汤能使小鼠的 GM 群落构成得到一定的恢复。本研究中各组菌群丰度在门水平、属水平上均存在差异。门水平上,AS 小鼠造模后会提高 *Proteobacteria* 的丰度,瓜蒌薤白白酒汤干预后能使其下降。瓜蒌薤白白酒汤干预后能提高 *Verrucomicrobiota* 的丰度水平。属水平上,瓜蒌薤白白酒汤干预后能有效提高 *Akkermansia* 的丰度水平。小鼠发生 AS 会提高体内的 TMAO、降低 SCFA,但瓜蒌薤白白酒汤能使 AS 小鼠的 TMAO 降低,SCFA 升高。

Akkermansia 是属于 *Verrucomicrobiota* 的菌属。研究发现,增加 *Akkermansia* 丰度能减轻 TMAO 诱导的动脉粥样硬化^[21]。同时, *Akkermansia* 能促进 SCFA 的分泌,负向调节炎症反应,影响肥胖、糖尿病和心血管代谢疾病的发生发展^[22]。因此,瓜蒌薤白白酒汤能通过提升 *Akkermansia* 的丰度从而降低 TMAO 的代谢和促进 SCFA 的分泌,提高 NO 的生物利用度,调节脂质紊乱。*Akkermansia* 可能是瓜蒌薤白白酒汤通过 GM 改善 AS 的关键菌属之一。

综上所述,瓜蒌薤白白酒汤能通过调节 GM 的关键菌属 *Akkermansia* 及其代谢物 SCFA、TMAO,进而改善血脂紊乱,增加 NO 生物利用度,最终改善 AS。

参考文献:

- [1] 马丽媛,王增武,樊静,等.《中国心血管健康与疾病报告 2022》要点解读[J].中国全科医学,2023,26(32):3975-3994.
MA L Y, WANG Z W, FAN J, et al. Interpretation of report on cardiovascular health and diseases in China 2022 [J]. Chin Gen Pract, 2023, 26(32): 3975-3994.
- [2] TSAO C W, ADAY A W, ALMARZOOQ Z I, et al. Heart disease and stroke statistics-2023 update: a report from the American heart association [J]. Circulation, 2023, 147(8): e93-e621.
- [3] WANG J, ZHU N, SU X, et al. Gut-microbiota-derived

- metabolites maintain gut and systemic immune homeostasis [J]. Cells, 2023, 12(5): 793.
- [4] HU T, WU Q, YAO Q, et al. Short-chain fatty acid metabolism and multiple effects on cardiovascular diseases [J]. Ageing Res Rev, 2022, 81: 101706.
- [5] MA S R, TONG Q, LIN Y, et al. Berberine treats atherosclerosis via a vitamine-like effect down-regulating Choline-TMA-TMAO production pathway in gut microbiota [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 207.
- [6] ZONG X, FAN Q, YANG Q, et al. Trimethyllysine, a trimethylamine N-oxide precursor, predicts the presence, severity, and prognosis of heart failure [J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 907997.
- [7] FENG W, AO H, PENG C, et al. Gut microbiota, a new frontier to understand traditional Chinese medicines [J]. Pharmacol Res, 2019, 142: 176-191.
- [8] 李艳, 王省, 张瑞. 瓜蒌薤白白酒汤的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(5): 707-712.
- LI Y, WANG X, ZHANG R. Research progress of Gualou Xiebai Baijiu Decoction and prediction analysis on its Q-marker [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2023, 34(5): 707-712.
- [9] 仝小林. 方药量效学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2019.
- TONG X L. Quantitative and effective science of prescription drugs [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press, 2019.
- [10] CHEN Y, ZHOU J, WANG L. Role and mechanism of gut microbiota in human disease [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 625913.
- [11] BRUNT V E, GIOSCIA-RYAN R A, CASSO A G, et al. Trimethylamine-N-oxide promotes age-related vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in mice and healthy humans [J]. Hypertension, 2020, 76(1): 101-112.
- [12] 郭玉洪, 唐耀平, 赵洋洋, 等. 瓜蒌薤白白酒汤通过 NO_3^- - NO_2^- -NO 途径保护小鼠缺血心肌的实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(1): 202-207, 224.
- GUO Y H, TANG Y P, ZHAO Y Y, et al. Study on Gualou Xiebai Baijiu Decoction protecting ischemic myocardium of mice through NO_3^- - NO_2^- -NO pathway [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2022, 49(1): 202-207, 224.
- [13] XIONG X, ZHOU J, FU Q, et al. The associations between TMAO-related metabolites and blood lipids and the potential impact of rosuvastatin therapy [J]. Lipids Health Dis, 2022, 21(1): 60.
- [14] BLAAK E E, CANFORA E E, THEIS S, et al. Short chain fatty acids in human gut and metabolic health [J]. Benef Microbes, 2020, 11(5): 411-455.
- [15] 吴琼, 何金涛, 罗舒文, 等. 肠道菌群与动脉粥样硬化关联性中医药干预作用的研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2021, 30(21): 67-71.
- WU Q, HE J T, LUO S W, et al. Research progress on the relationship between intestinal flora and atherosclerosis and the intervention effect of TCM [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharmacy, 2021, 30(21): 67-71.
- [16] 隋国媛, 赵娜, 宋囡, 等. 化痰祛痰方对 $\text{ApoE}^{-/-}$ 动脉粥样硬化模型小鼠肠道菌群驱动 TMA/FMO3/TMAO 通路的影响 [J]. 中医杂志, 2021, 62(8): 700-706.
- SUI G Y, ZHAO N, SONG N, et al. Effect of Huayu qutan formula on gut microbiota-driven TMA/FMO3/TMAO pathway in $\text{ApoE}^{-/-}$ atherosclerosis model mice [J]. J Tradit Chin Med, 2021, 62(8): 700-706.
- [17] 李国峰, 李咸慰, 宋沁洁, 等. 炙红芪对脾气虚大鼠肠道菌群组成与短链脂肪酸代谢的调节作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(18): 2669-2673.
- LI G F, LI X W, SONG Q J, et al. Regulatory effects of Hedysari *Radix* Preparata cum Melle on intestinal flora composition and short-chain fatty acid metabolism in rats with spleen deficiency [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2023, 39(18): 2669-2673.
- [18] 邹纯才, 李玉龙, 鄢海燕, 等. 米酒对瓜蒌薤白中 3, 29-二苯甲酰基栝楼仁三醇在人肠道菌群降解影响的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(1): 53-56.
- ZOU C C, LI Y L, YAN H Y, et al. Effect of rice wine on degradation of 3, 29-dibenzoyl karounitriol in Gualou-xiebai in human intestinal flora [J]. Chin Pharm J, 2017, 52(1): 53-56.
- [19] 黄汕梅, 郭玉洪, 赵洋洋, 等. 基于 NO_3^- - NO_2^- -NO 通道探索白酒在瓜蒌薤白白酒汤保护小鼠缺血心肌中的佐使作用 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(4): 23-27.
- HUANG S M, GUO Y H, ZHAO Y Y, et al. Exploration of the adjuvant effect of white liquor in Gualou Xiebai Baijiu Decoction on protecting ischemic myocardium in mice based on NO_3^- - NO_2^- -NO pathway [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2021, 23(4): 23-27.
- [20] 毛信心, 肖志凯, 朱雪萍, 等. 瓜蒌薤白白酒汤加减治疗冠心病心绞痛随机对照试验的 Meta 分析 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(6): 961-968.
- MAO X X, XIAO Z K, ZHU X P, et al. Meta-analysis of the randomized controlled trials in treating angina pectoris of coronary heart disease with modified Gualou Xiebai Baijiu Decoction [J]. Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis, 2023, 21(6): 961-968.
- [21] STIEFVATTER L, NEUMANN U, RINGS A, et al. The microalgae *Phaeodactylum tricornutum* is well suited as a food with positive effects on the intestinal microbiota and the generation of SCFA: results from a pre-clinical study [J]. Nutrients, 2022, 14(12): 2504.
- [22] HE Z, ZHU H, LIU J, et al. Mangiferin alleviates trimethylamine-N-oxide (TMAO)-induced atherogenesis and modulates gut microbiota in mice [J]. Food Funct, 2023, 14(20): 9212-9225.

尹小溪,陈孜旋,袁漪,等. 地榆通过影响 PPARG 和 SLC7A11/GPX4 表达减轻溃疡性结肠炎小鼠损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 20-28.

Yin XX, Chen ZX, Yuan Y, et al. Sanguisorbae Radix alleviates damage in ulcerative colitis model mice based on PPARG and SLC7A11/GPX4 [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 20-28.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.003

地榆通过影响 PPARG 和 SLC7A11/GPX4 表达减轻 溃疡性结肠炎小鼠损伤

尹小溪,陈孜旋,袁漪,马京男,王晶,吕添熠,佟苗苗*,李丽*

(河北医科大学药学院,石家庄 050017)

【摘要】目的 基于生物信息学探究地榆 (Sanguisorbae Radix, SR) 改善小鼠溃疡性结肠炎的机制。**方法** 利用 R 语言对高通量基因表达数据库 (GEO) 中 GSE92415 数据集进行溃疡性结肠炎 (UC) 差异表达基因筛选和加权基因共表达网络分析 (WGCNA), 并结合 FerrDb 数据库, 获得 UC 相关铁死亡特征基因。对特征基因进行蛋白互作分析 (PPI) 和相关性分析, 筛选 UC 铁死亡核心基因。构建葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导的 UC 小鼠模型, 并灌胃给予 SR 水提物 9 d, 记录疾病活动指数 (DAI) 和结肠长度, 采用 HE 染色法观察结肠组织病理变化, 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测小鼠结肠组织炎症因子肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素-6 (IL-6), 生化试剂盒检测脂质过氧化因子丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH) 水平, 免疫荧光法检测结肠组织闭锁小带蛋白 1 (ZO-1) 表达, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测结肠组织过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) 和谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 蛋白表达。**结果** 通过生物信息学筛选得到 9 个 UC 相关铁死亡特征基因, 其中核心基因为 PPARG。相关性分析发现 PPARG 与铁死亡高度相关。结合生物信息学筛选结果, 探讨 SR 改善小鼠 UC 的机制, 实验结果发现, SR 可降低 UC 小鼠 DAI 值, 缓解结肠缩短, 改善肠道粘膜屏障功能, 对 TNF- α 、IL-6、MDA、GSH 水平有显著回调作用, 并可提高结肠组织 PPARG、SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达。**结论** 铁死亡与 UC 密切相关, SR 可通过影响 PPARG 和 SLC7A11/GPX4 蛋白, 进而改善 UC 小鼠结肠上皮损伤和功能障碍, 为 UC 治疗策略提供了思路与方向。

【关键词】 生物信息学; 溃疡性结肠炎; 铁死亡; 核心基因; 地榆

【中图分类号】 R-33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-7856 (2024) 07-0020-09

Sanguisorbae Radix alleviates damage in ulcerative colitis model mice based on PPARG and SLC7A11/GPX4

YIN Xiaoxi, CHEN Zixuan, YUAN Yi, MA Jingnan, WANG Jing, LYU Tianyi, TONG Miaomiao*, LI Li*

(College of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

【Abstract】Objective To investigate the mechanism of Sanguisorbae Radix (SR) in the treatment of ulcerative colitis (UC). **Methods** Using the GSE92415 dataset from the Gene Expression Omnibus database, we analyzed

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目 (82003913); 河北省高等学校科学技术研究项目 (BJK2024082); 河北省自然科学基金资助项目 (H2020206010); 河北省中医药管理局项目 (20211120, 2023131)。

【作者简介】 尹小溪 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 炎症性肠病。E-mail: yinx0126@163.com

【通信作者】 李丽 (1990—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药活性成分及中药生物技术研究。E-mail: 19001479@hebm. edu. cn

佟苗苗 (1985—), 女, 讲师, 研究方向: 中药药效机制研究。E-mail: 18500965@hebm. edu. cn

* 共同通信作者

differentially expressed genes and carried out weighted gene correlation network analysis and FerrDb analysis. Core genes were identified through protein-protein interaction (PPI) network and correlation analysis. UC mouse model induced by dextran sulfate sodium (DSS) was constructed and treated with SR via intragastric administration for 9 days. Disease activity index (DAI) and colon length were recorded. Pathological changes in colon tissue were observed using the HE staining. Levels of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Lipid peroxidation factors such as malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) were detected using biochemical test kits. Protein expression levels of zonula occludens protein-1 (ZO-1) tight junction protein, peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG), solute carrier family 7 member 11 (SCL7A11), and glutathione peroxidase 4 (GPX4) were examined by Western blot or immunofluorescence labeling.

Results Nine differentially expressed genes associated with ferroptosis were screened and *PPARG* was identified as a key gene. Correlation analysis showed a strong correlation between *PPARG* and ferroptosis. Subsequently, the potential mechanism of SR in improving UC in mice was discussed according to the bioinformatics screening results. The experimental results demonstrated that SR significantly reduced the DAI, prevented colon shortening and improved intestinal mucosal barrier function in the colon. SR decreased TNF- α and IL-6 levels, MDA content and GSH levels in colon tissues. SR also enhanced the expression of PPARG, SCL7A11 and GPX4, which reversed the effect of DSS in mice with colitis.

Conclusions Ferroptosis is closely related to UC. SR can inhibit ferroptosis by regulating PPARG and SCL7A11/GPX4 expression, thereby improving colon epithelial injury and dysfunction in UC mice. This provides ideas and directions for UC treatment strategies.

[Keywords] bioinformatics; ulcerative colitis; ferroptosis; core genes; *Sanguisorbae Radix*

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

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种慢性炎症性疾病, 目前病因不明, 其发病率逐年增加, 被世界卫生组织列为现代难治性疾病之一^[1]。研究表明 UC 的发病机制可能涉及多种因素, 例如宿主遗传、免疫应答失调、环境因素和肠黏膜屏障受损^[2-3]。UC 的治疗药物包括激素、生物制剂和免疫抑制剂^[4-6], 但其多以缓解症状为主, 具有易复发、肾损伤、严重感染和静脉血栓栓塞^[4,7]等副作用。因此, UC 治疗新策略亟待开发。铁死亡是一种铁依赖性、非凋亡细胞死亡形式^[8]。近期研究发现, 铁死亡与多种肠道疾病有关, 包括肠缺血再灌注损伤、炎症性肠病和结直肠癌^[3], 抑制铁死亡可抑制肠上皮细胞死亡、脂质过氧化及炎症状态, 从而减少结肠病理损伤^[9-10]。因此, 抑制铁死亡有望成为预防和治疗肠道疾病的新方向。地榆 (*Sanguisorbae Radix*, SR) 是蔷薇科植物地榆 *Sanguisorba officinalis* L. 或长叶地榆 *S. officinalis* L. var. *longifolia* (Bert.) Yü et Li 的干燥根, 始载于《神农本草经》, 具有止血凉血、清热解毒、收敛止泻功效, 多用于止血、烧烫伤、腹泻、痔疮^[11]、结肠癌^[12-13]、UC^[14]、白细胞减少等疾病治疗^[15]。现代研究发现, SR 化学成分主要包括鞣质、酚酸、皂苷等化合物^[16], 具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤等作用^[17-18]。近期报道, SR 提取物可通过抑制 PI3K-

AKT/NF- κ B/STAT3 通路、调节脂质代谢等改善 UC 小鼠的炎症反应及黏膜屏障损伤^[14,19]。然而, 关于地榆调节铁死亡治疗 UC 的机制尚未报道。GEO 数据库收录临床样本基因芯片数据, 从中筛选得到的差异表达基因能够更加准确地体现疾病特征和生物机制。综上, 本研究通过生物信息学方法, 利用 GEO 临床芯片数据筛选 UC 相关铁死亡的核心基因, 并探讨 SR 通过抑制铁死亡缓解 UC 的作用机制, 可为治疗 UC 提供潜在靶点, 为阐明中医药治疗价值提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

24 只 7 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠购自斯贝福生物技术有限公司 (中国北京) [SCXK (京) 2019-0010], 体重 (20 $\pm$ 2) g。小鼠均饲养于河北医科大学实验动物中心 [SYXK (冀) 2020-002], 给予充足的饲料和清水, 饲养环境温度 (22 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, 相对湿度 45%~65%, 12 h/12 h 明暗交替。本文涉及的动物实验由河北医科大学动物伦理专业委员会批准 (No. IACUC-Hebmu-P2023153), 遵守实验动物 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

SR 饮片购自中国广西仙荣中药科技有限公司

(批号 20220701),经河北医科大学赵丽丽教授鉴定为蔷薇科植物地榆 *Sanguisoba officinalis* L. 的干燥根。SR 饮片粉碎,过 100 目筛,将 30.00 g 地榆粉末与 300 mL 水混合,加热回流 2 次,每次 2 h,冷却后合并两次滤液。将滤液浓缩至生药浓度 3 g/mL 备用。

DSS(大连美仑生物技术有限公司,批号 123894-06);便隐血 OB 试剂盒(珠海贝索生物技术有限公司,批号 B230101);磷酸盐缓冲液(PBS,批号 G0002-15);丙二醛(malondialdehyde,MDA)检测试剂盒(批号 G4300-96T);还原型谷胱甘肽(reduced glutathione,GSH)检测试剂盒(批号 GM1139)、anti-ZO-1(批号 GB111402-100)均购于赛维尔生物技术有限公司;SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号 P0012A);anti-GPX4(批号 30388-1-AP)、anti-SLC7A11(批号 26864-1-AP)、anti-β-actin(批号 81115-1-RR)、anti-PPARG(批号 16643-1-AP)一抗和 HRP 标记的二抗(批号 SA00001-2)均购于武汉三鹰生物技术有限公司。

电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);低温型组织研磨仪(武汉塞维尔生物科技有限公司);涡旋混匀仪(武汉塞维尔生物科技有限公司);脱色水平摇床(北京六一生物科技有限公司);酶标仪(北京六一生物科技有限公司);电泳系统(美国 Bio-Rad 公司);荧光显微镜 BX63(日本奥林巴斯)。

1.3 实验方法

1.3.1 生物信息学分析

(1)UC 差异表达基因筛选

在 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中,获得 GSE92415 数据集,分为 Control 组及 UC 组,采用 R 语言“factoextra”进行主成分分析;“limma”包进行差异分析,筛选阈值为 $P<0.05$ 和 $|\log_2FC| \geq 1$,获得 UC 相关差异表达基因;使用“ggplot2”包绘制火山图来可视化差异表达基因。

(2)铁死亡基因集获取和加权共表达网络分析

从 FerrDb 数据库(<http://www.zhounan.org/ferrdb/>)下载铁死亡相关基因。使用 R 语言中的“WGCNA”包构建 GSE92415 基因集的 WGCNA 网络。根据基因间的无标度拓扑拟合指数($R^2 = 0.85$)以及平均连接度,确定软阈值 $\beta = 8$ 。通过构建共表达网络绘制模块聚类树状图,使用 Pearson

法分析基因模块间的相关性,选择与临床表型相关性较高的模块与 UC 差异表达基因、铁死亡基因取交集,获取 UC 相关铁死亡的差异表达基因。

(3)UC 铁死亡核心基因筛选

使用 Cytoscape 软件建立上述交集基因的 PPI 网络,利用 Cytohubba 插件筛选与 UC 相关铁死亡的核心差异表达基因。

1.3.2 实验研究

(1)UC 模型建立及 SR 给药

将 C57BL/6J 小鼠随机分为 4 组:对照组、模型组、地榆低剂量组、地榆高剂量组,每组各 6 只。在开始实验之前,动物进行 7 d 的适应性饲养。对照组在整个实验期间接受等剂量生理盐水。模型组小鼠给予 3.5%(w/v)DSS 溶液,自由饮用 7 d,然后饮用正常水 2 d,诱导实验性结肠炎。治疗组在饮用 3.5% DSS 溶液的同时,分别灌胃 SR 水提物(生药质量浓度 1.5 g/kg 和 3.0 g/kg,以成人 70 kg、等效系数 9.1 为依据),每天 1 次,持续 9 d。实验结束后处死小鼠,测量结肠长度,清除结肠内残留粪便,取近肛门端 2 cm 结肠固定在 4%多聚甲醛中过夜,石蜡包埋;剩余组织液氮保存。

(2)苏木精和伊红(HE)染色

将石蜡结肠组织切成 5 μm 厚度,进行 HE 染色,使用光学显微镜观察并拍照。

(3)ELISA 法检测炎症因子和试剂盒检测脂质过氧化水平

取各组结肠组织适量,加入裂解液进行匀浆后,以 4℃、12 000 r/min 离心 5 min,收集匀浆上清液;采用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度;ELISA 法检测炎症因子 IL-6、TNF-α,使用生化试剂盒检测脂质过氧化 MDA、GSH 水平。

(4)免疫荧光染色

脱蜡至水后的结肠组织切片放置在 0.5% Triton X-100 的 PBS 中,室温通透 10 min,PBS 漂洗,4℃下与 5% BSA 的 ZO-1 一抗孵育 12 h。PBS 洗涤 2 次,每次 3 min,二抗(1:1000)室温避光孵育 2 h,PBS 洗涤 2 次,每次 3 min。加入 DAPI 染核,室温避光孵育 5 min;去除 DAPI 工作液,用 PBS 洗涤 1 次,5 min;封片,于荧光显微镜下观察并采集图像。通过 Image J 软件分析荧光强度。

(5)Western blot 检测

取各组结肠组织,加入 1% PMSF 的 RIPA 裂解液进行匀浆,BCA 试剂盒进行蛋白质定量。用 10%

SDS-PAGE 分离蛋白质并转移到聚偏二氟乙烯膜上。用 5% 牛血清白蛋白封闭 2 h, 然后将膜与 anti-SLC7A11 (1 : 1000)、anti-GPX4 (1 : 1000)、anti-PPARG (1 : 1000) 和 anti-β-actin (1 : 3000) 在 4 ℃ 孵育 12 h。TBST 洗涤膜 3 次, 每次 5 min, 将膜与 HRP 偶联的二抗 (1 : 2000) 在室温下放置 2 h, 采用 ECL 显影, 使用 Image J 软件定量相对蛋白表达水平。

1.4 统计学方法

数据以平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。使用 GraphPad Prism 8.0.1 分析软件进行统计分析。使用单因素方差分析比较各组间的差异。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学分析

2.1.1 UC 差异表达基因

GSE92415 基因集中, 有 21 个对照样本, 87 个 UC 样本。PCA 结果表明, Control 组和 UC 组中基因差异显著 (图 1A)。与 Control 组相比, UC 组中筛选出 299 个差异表达基因, 其中上调基因 193 个, 下调基因 106 个, 使用火山图对 UC 差异表达基因进行可视化, 见图 1B。

2.1.2 WGCNA 关键模块分析

当软阈值 $\beta = 8$ 时, 各基因模块的平均连接度更高 (图 2A)。通过动态树切割和层次聚类绘制基因共表达模块 (图 2B)。相关性分析显示结果显示, GSE92415 基因集聚集成 16 个共表达模块。其中

red 模块 (Pearson = 0.78, $P = 7e-23$)、turquoise 模块 (Pearson = 0.71, $P = 1e-17$)、blue 模块 (Pearson = 0.59, $P = 1e-11$) 3 个模块与临床表型和 UC 的进展高度相关 (图 2C)。因此, 选择以上 3 个模块基因进行后续分析。

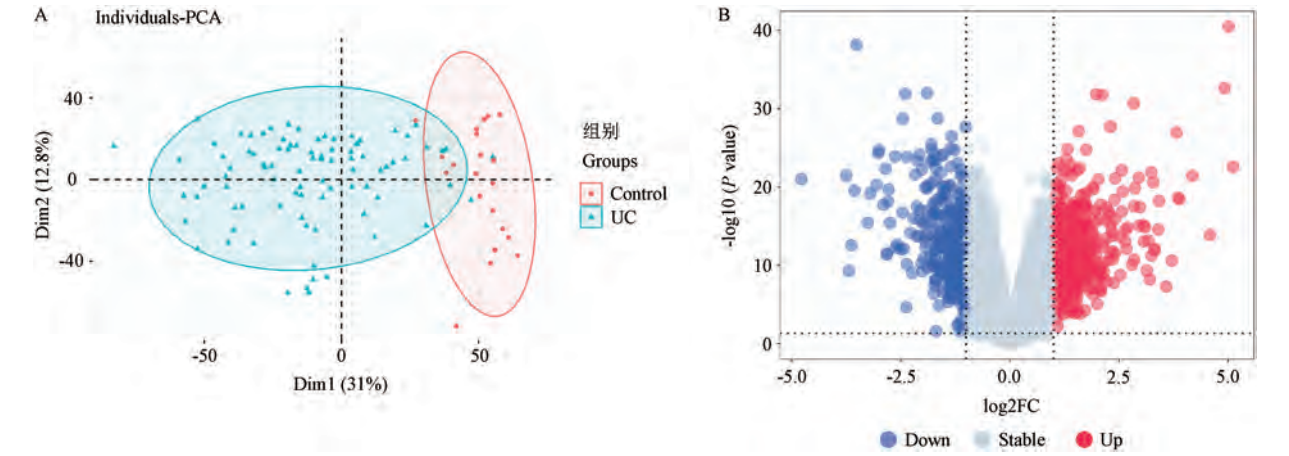
2.1.3 UC 铁死亡核心基因的筛选和相关性分析

采用 R 语言“Venn”包对 UC 差异表达基因、WGCNA 模块基因和铁死亡基因进行交集, 获得 9 个 UC 相关铁死亡特征基因 (*NOS2*、*ACSF2*、*PTGS2*、*TIMP1*、*IDO1*、*SLC16A1*、*PROK2*、*PPARG* 和 *LCN2*) (图 3A), 将 9 个基因进行蛋白质-蛋白质相互作用网络分析。通过 CytoHubba 插件筛选出 *PPARG* 是 9 个特征基因中的核心基因 (图 3B)。*PTGS2* 是铁死亡标志物, *TIMP1*、*IDO1*、*LCN2* 是铁死亡中的驱动基因, *PROK2*、*NOS2*、*ACSF2*、*SLC16A1* 是铁死亡中的抑制基因。相关性分析结果显示, 核心基因 *PPARG* 与 *TIMP1* 铁死亡正调控基因的表达呈负相关 ($r = -0.71, P < 0.01$), 与 *SLC16A1* 铁死亡负调控基因的表达呈正相关 ($r = 0.78, P < 0.01$) (图 3C), 说明 *PPARG* 可能是铁死亡的抑制基因。

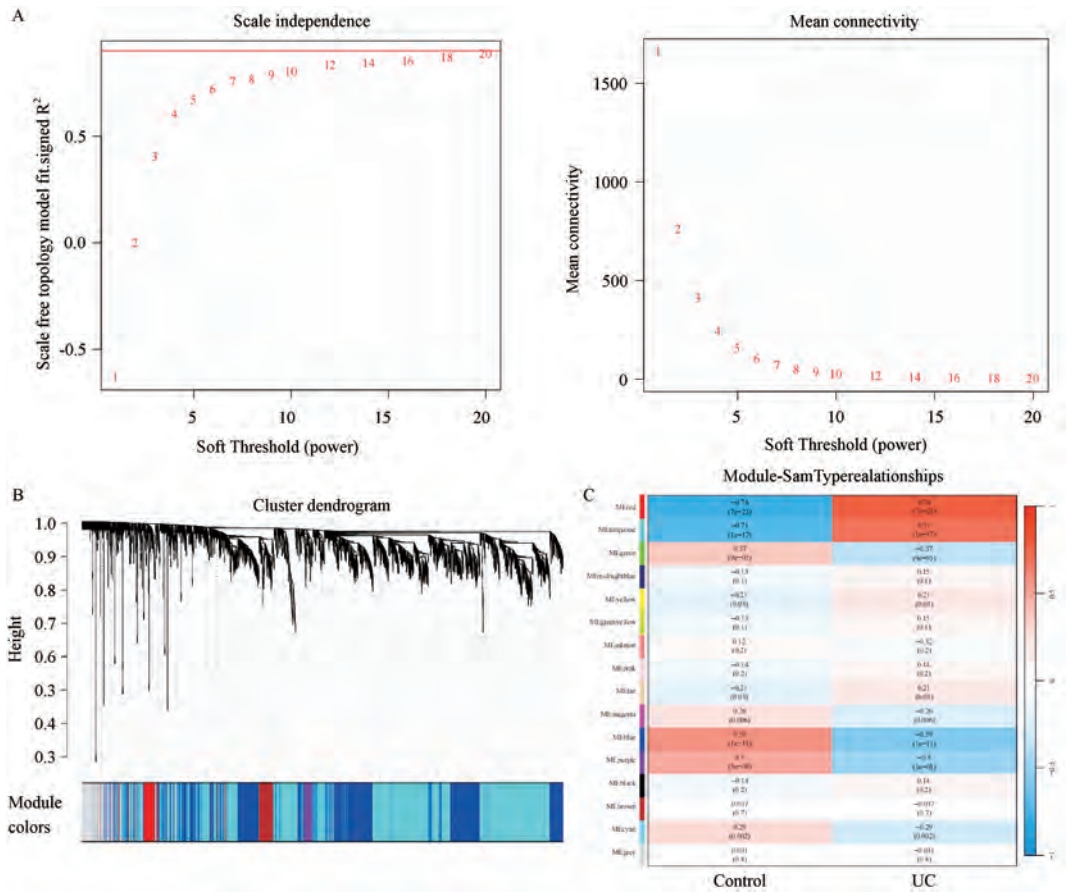
2.2 动物实验

2.2.1 SR 改善 UC 小鼠 DAI 值、结肠长度和组织病理变化

与对照组相比, 模型组小鼠 DAI 值升高, 结肠缩短 ($P < 0.001$); 与模型组相比, SR 低、高剂量组小鼠 DAI 值降低, 结肠长度增加 ($P < 0.01, P < 0.05$)。HE 结果显示, 对照组结肠黏膜上皮完整, 结构边缘清晰, 腺体整齐规则, 未见炎性细胞浸润。



注:A:PCA 图;B:UC 差异表达基因火山图。
Figure 1 UC 差异表达基因的筛选
Note. A, PCA map. B, Visual volcano map of UC differential genes.
Figure 1 Screening of UC differential genes

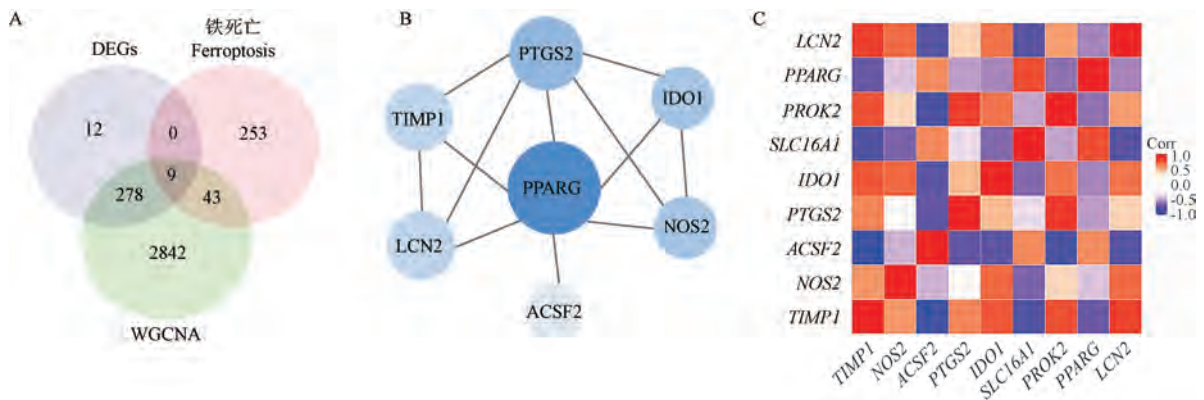


注:A:软阈值筛选结果;B:基因聚类树状图与共表达模块;C:基因模块与临床特征相关性热图。

图 2 WGCNA 分析

Note. A, Analysis of independence and connectivity for various soft-thresholding powers. B, Clustering dendrograms of gene modules. C, Relationship with module eigengenes.

Figure 2 WGCNA analysis



注:A:UC 中差异表达铁死亡特征基因;B:核心基因筛选;C:Spearman 相关性分析。

图 3 核心基因筛选和相关性热图

Note. A, Differential expression of iron death characteristic genes in UC. B, Core gene screening. C, Spearman correlation analysis.

Figure 3 Core gene screening and correlation heatmap

模型组结肠粘膜和粘膜下层出现大量的炎性细胞浸润,腺体萎缩破坏,杯状细胞丢失,固有层结构损伤明显。SR 给药组结肠黏膜、黏膜下层炎性减少,结构逐渐清晰,随着剂量增加,水肿、糜烂、溃疡明显减轻,见图 4。以上结果表明 SR 可一定程度逆转 UC 小鼠的肠道炎症和病理损伤。

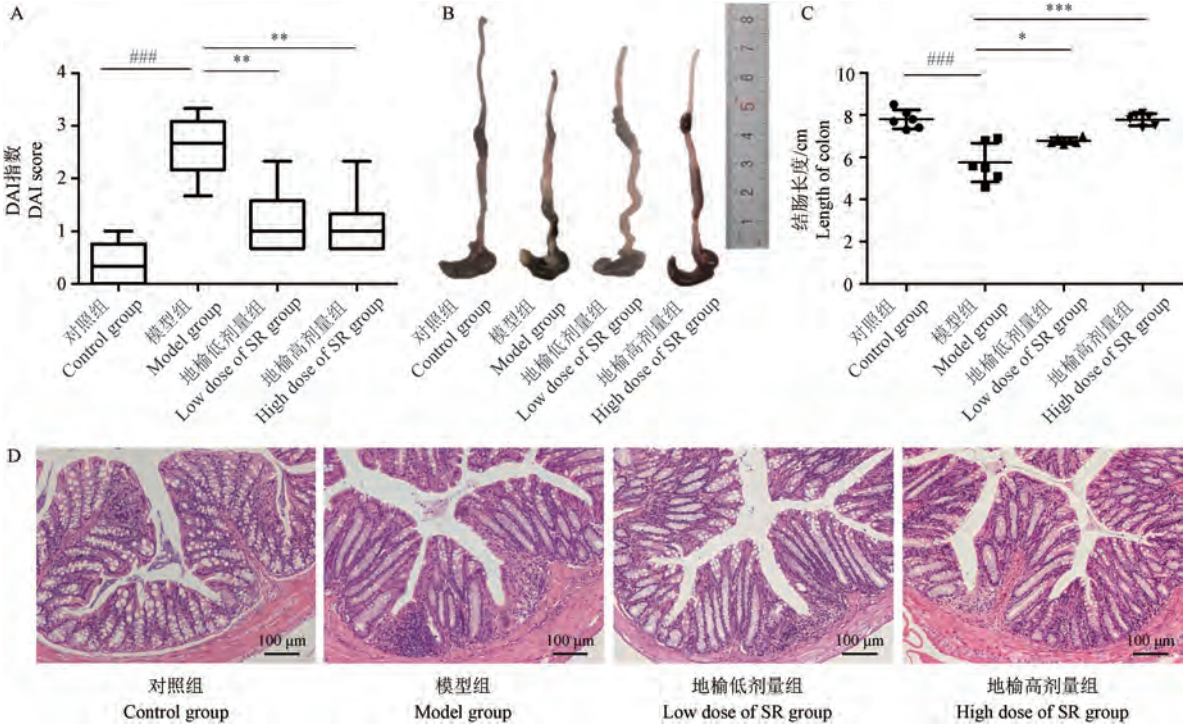
2.2.2 SR 调节 UC 小鼠结肠组织炎症、脂质过氧化水平和肠上皮屏障功能障碍

与对照组相比,模型组小鼠结肠组织 TNF- α 、IL-6 水平显著较高($P<0.001$);MDA 含量显著增加($P<0.01$),GSH 活性显著下降($P<0.01$);与模型组相比,SR 各组 TNF- α 、IL-6 水平显著较低($P<0.01$),MDA 含量下降($P<0.05$),GSH 活性明显升高($P<0.05$,图 5)。免疫荧光结果显示,模型组 ZO-

1 的蛋白荧光表达强度降低,SR 给药后 ZO-1 的蛋白荧光表达强度明显高于模型组($P<0.001$,图 6)。以上结果说明 SR 可以降低 UC 肠道炎症因子水平,调节脂质过氧化水平并改善其肠上皮屏障功能。

2.2.3 SR 增加 UC 小鼠结肠组织中 PPARG、SLC7A11 及 GPX4 的表达

Western blot 结果(图 7)显示,与对照组比较,模型组中 PPARG、SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达明显

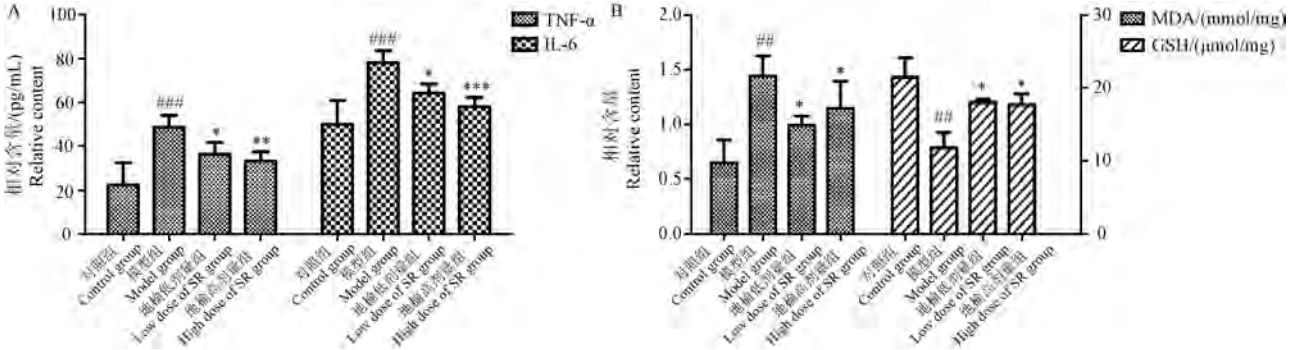


注:A;DAI 指数;B:结肠长度示例图;C:结肠长度;D:HE 染色。与对照组相比,### $P<0.001$;与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图 4 SR 对 UC 小鼠 DAI 值、结肠长度和结肠病理变化的影响

Note. A, DAI score. B, Colon length graph example. C, Length of colon. D, HE staining. Compared with control group, ### $P<0.001$. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 4 Effect of SR on DAI, colon length and pathological changes of colon in UC mouse

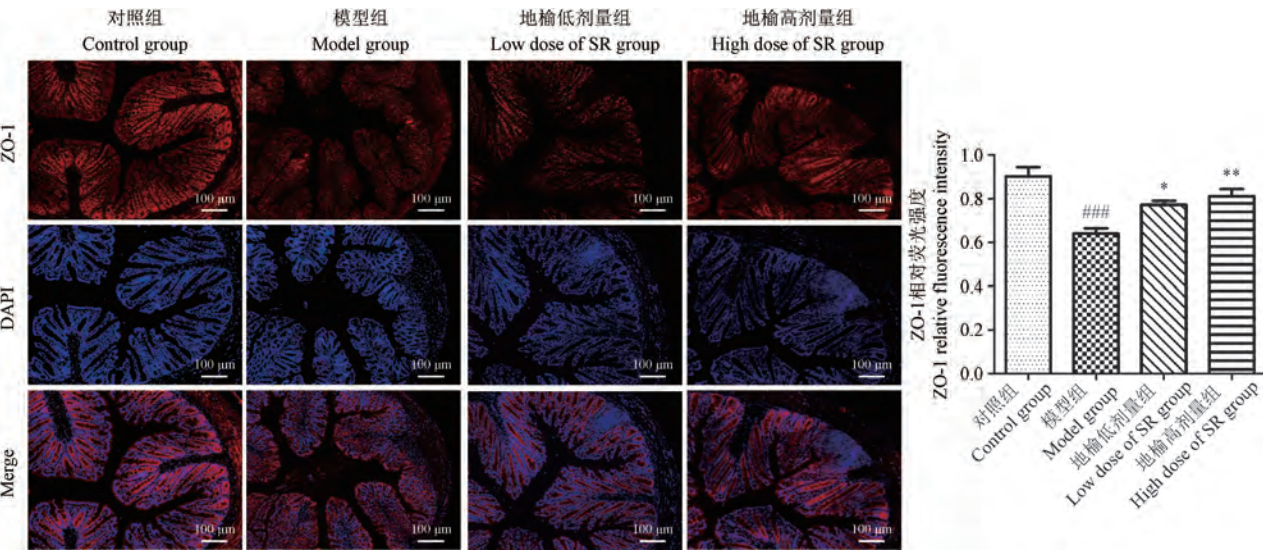


注:与对照组相比,### $P<0.01$,#### $P<0.001$;与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图 5 SR 对 UC 小鼠结肠组织炎症和脂质过氧化水平的影响

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

Figure 5 Effect of SR on contents of inflammatory cytokines and lipid peroxidation level in colon of UC mouse

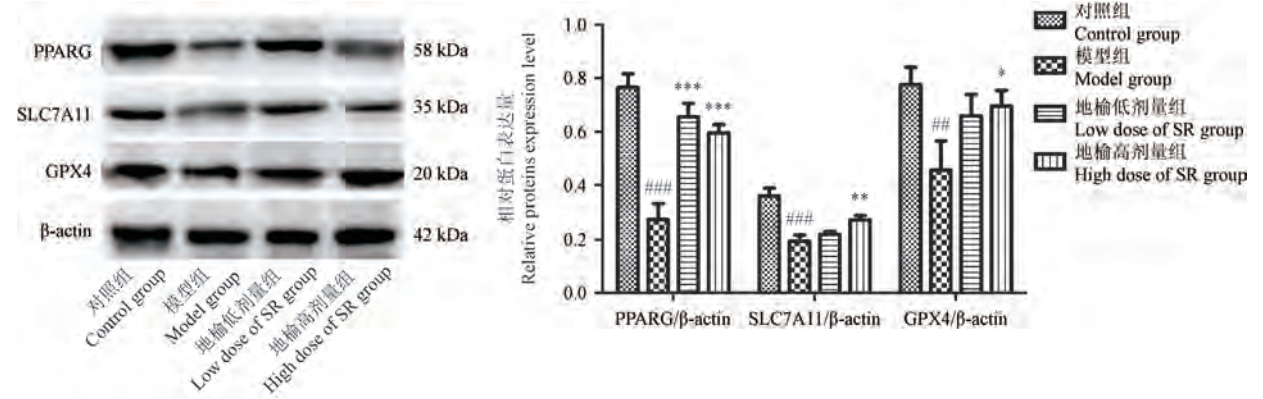


注:与对照组相比,*** $P<0.001$;与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 6 SR 对 UC 小鼠肠上皮屏障功能影响

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

Figure 6 Effect of SR on contents of epithelial barrier function in colon of UC mouse



注:与对照组相比,## $P<0.01$,### $P<0.001$;与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图 7 SR 对 UC 小鼠结肠组织 PPARG、SLC7A11 和 GPX4 表达影响

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

Figure 7 Effect of SR on PPARG, SLC7A11 and GPX4 proteins in colon of UC mouse

降低($P<0.01$),与模型组比较,SR 各剂量组中 PPARG、SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达明显升高($P<0.05$)。以上结果表明,SR 对 UC 小鼠肠道铁死亡相关蛋白 PPARG、SCL7A11、GPX4 具有调节作用。

3 讨论

UC 是一种复杂的慢性肠道疾病,主要累及结肠黏膜及其下层,便血和腹泻是其最常见的临床症状,约 15% 的患者最终会发展为重症^[20]。目前,UC 的病因和机制仍然不明确,但免疫反应、肠上皮屏障受损、菌群失调及细胞凋亡等被认为是 UC 的主要发病机制^[10,21-22]。研究表明,铁死亡主要特征

包括铁沉积、脂质过氧化积累、GSH 耗竭及 GPX4 失活等,这些与 UC 的发病机制有关^[9,23]。膳食中铁补充可能加剧 DSS 诱导的小鼠结肠炎,而一些铁螯合剂和抗氧化剂则可减轻 UC 临床症状^[24],另外,抑制铁死亡也可有效改善 DSS 诱导的 UC 炎症^[10]。以上研究说明铁死亡在 UC 疾病进程中有重要调节作用。SR 使用历史悠久,在 UC 治疗中的作用已被明确,但其对 UC 铁死亡的影响和作用机制鲜有报道。因此,本研究首先利用生物信息学筛选 UC 中调控铁死亡的核心基因,并基于此探讨了 SR 影响核心基因及铁死亡相关蛋白表达,从而缓解 UC 的可能分子机制。

实验发现,SR 可降低结肠组织炎症因子水平,改变组织病理变化,缓解小鼠 UC 症状,显示出良好的治疗作用。临床研究指出,UC 患者肠道紧密连接蛋白表达改变,肠道屏障完整性丧失,使肠腔中共生菌群和病原微生物转移至肠道固有层,最终诱发肠道炎症^[25-26]。因此本研究进一步对肠道紧密连接蛋白进行了检测,发现 SR 可提高紧密连接蛋白 ZO-1 的表达,进而维持肠黏膜屏障功能。

脂质过氧化是铁死亡的关键迹象,MDA、ROS 等脂质过氧化物会引起细胞膜流动性和通透性的变化,最终导致细胞结构和功能发生变化,诱导铁死亡^[27],GPX4 及其辅助因子 GSH 是消除脂质过氧化产物抑制铁死亡的主要途径^[28-29]。因此,测定 MDA 和 GSH 有利于铁死亡的判断。本研究中,UC 小鼠结肠组织中 MDA 含量的增加以及 GSH 水平的降低证明了脂质过氧化紊乱的存在,这与其他研究的结论一致^[9,30]。SR 治疗逆转了 MDA 和 GSH 水平,表明 SR 可能通过抑制脂质过氧化途径影响 UC 的铁死亡。

在铁死亡中,SLC7A11 和 GPX4 是其主要抗氧化靶标^[31]。SLC7A11 可将胞外的胱氨酸引入细胞,还原为半胱氨酸,随后用于 GSH 的合成,以进行抗氧化防御。然而,细胞中持续氧化应激或半胱氨酸不足可能导致 GSH 的消耗和 GPX4 失活^[32],增强 GPX4 和 SLC7A11 表达可增强细胞铁死亡过程中的抗氧化能力^[33]。PPARG 是一种配体激活的转录因子。它调节多个基因的表达,对脂质和葡萄糖代谢至关重要^[34]。近期研究表明,在神经组织中,激活 PPARG 能促进 GPX4 表达,从而预防脑出血所致神经元铁死亡^[35-36]。在本研究中,PPI 网络分析结果表明,PPARG 在 UC 铁死亡相关蛋白相互作用中,处于重要地位。Pearson 相关性结果提示了 PPARG 很可能抑制铁死亡进程。为明确 SR 抑制 UC 小鼠铁死亡的分子机制,本研究采用 Western blot 法分析了结肠组织中 PPARG、SLC7A11 和 GPX4 的表达。我们观察到与模型组相比,SR 可提高 UC 小鼠结肠组织中 PPARG、SLC7A11 和 GPX4 的表达,与我们分析结果相一致。进一步揭示了 PPARG 在 UC 中的作用以及 SR 可能通过调节 PPARG、SLC7A11 和 GPX4 而影响铁死亡发挥 UC 治疗作用的机制。

综上,本研究通过生物信息学筛选出 *PPARG* 与 UC 铁死亡的关系,提示 PPARG 可能是 UC 潜在的

治疗靶点。同时,阐明了 SR 可能通过降低 UC 结肠炎症,改善肠上皮屏障功能,降低脂质氧化水平,影响 PPARG 和 SLC7A11/GPX4 通路,从而缓解 UC 小鼠症状的机制。本研究为 UC 治疗提供了思路,为 SR 后续开发探索提供了理论依据。

参考文献:

- [1] KOBAYASHI T, SIEGMUND B, LE BERRE C, et al. Ulcerative colitis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6: 1-20.
- [2] UNGARO R, MEHANDRU S, ALLEN P B, et al. Ulcerative colitis [J]. Lancet, 2017, 389(10080): 1756-1770.
- [3] XU S, HE Y, LIN L, et al. The emerging role of ferroptosis in intestinal disease [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(4): 289.
- [4] SANDBORN W J, PANÉS J, SANDS B E, et al. Venous thromboembolic events in the tofacitinib ulcerative colitis clinical development programme [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2019, 50(10): 1068-1076.
- [5] SEGAL J P, LEBLANC J F, HART A L. Ulcerative colitis: an update [J]. Clin Med, 2021, 21(2): 135-139.
- [6] FEAGAN B G, RUTGEERTS P, SANDS B E, et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis [J]. N Engl J Med, 2013, 369(8): 699-710.
- [7] LAMB C A, KENNEDY N A, RAINE T, et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults [J]. Gut, 2019, 68(Suppl 3): s1-s106.
- [8] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. Cell, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [9] XU M, TAO J, YANG Y, et al. Ferroptosis involves in intestinal epithelial cell death in ulcerative colitis [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2): 86.
- [10] CHEN Y, ZHANG P, CHEN W, et al. Ferroptosis mediated DSS-induced ulcerative colitis associated with Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Immunol Lett, 2020, 225: 9-15.
- [11] 王英英, 朱洁, 鲁兰, 等. 中药地榆的成分以及其药理作用研究进展 [J]. 四川中医, 2022, 40(8): 216-223.
WANG Y Y, ZHU J, LU L, et al. Advances in the study of components and pharmacological effects of traditional Chinese medicine *Sanguisorba officinalis* L [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2022, 40(8): 216-223.
- [12] ZHANG W, SANG S, PENG C, et al. Network pharmacology and transcriptomic sequencing analyses reveal the molecular mechanism of *Sanguisorba officinalis* against colorectal cancer [J]. Front Oncol, 2022, 12: 807718.
- [13] ZHANG W, PENG C, YAN J, et al. *Sanguisorba officinalis* L. suppresses 5-fluorouracil-sensitive and-resistant colorectal cancer growth and metastasis via inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway [J]. Phytomedicine, 2022, 94: 153844.
- [14] YU T, WU L, ZHANG T, et al. Insights into Q-markers and molecular mechanism of *Sanguisorba* saponins in treating ulcerative colitis based on lipid metabolism regulation [J].

Phytomedicine, 2023, 116: 154870.

[15] LONG W, LIU S, LI X X, et al. Whole transcriptome sequencing and integrated network analysis elucidates the effects of 3, 8-Di-O-methylellagic acid 2-O-glucoside derived from *Sanguisorba officinalis* L., a novel differentiation inducer on erythroleukemia cells [J]. Pharmacol Res, 2021, 166: 105491.

[16] LACHOWICZ S, OSZMIANSKI J, RAPAK A, et al. Profile and content of phenolic compounds in leaves, flowers, roots, and stalks of *Sanguisorba officinalis* L. determined with the LC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS analysis and their *in vitro* antioxidant, antidiabetic, antiproliferative potency [J]. Pharmaceuticals, 2020, 13(8): 191.

[17] ZHU H L, CHEN G, CHEN S N, et al. Characterization of polyphenolic constituents from *Sanguisorba officinalis* L. and its antibacterial activity [J]. Eur Food Res Technol, 2019, 245(7): 1487-1498.

[18] SONG J, ZENG J, ZHENG S, et al. *Sanguisorba officinalis* L. promotes diabetic wound healing in rats through inflammation response mediated by macrophage [J]. Phytother Res, 2023, 37(9): 4265-4281.

[19] LI C, GONG L, JIANG Y, et al. *Sanguisorba officinalis* ethyl acetate extract attenuates ulcerative colitis through inhibiting PI3K-AKT/NF- κ B/STAT3 pathway uncovered by single-cell RNA sequencing [J]. Phytomedicine, 2023, 120: 155052.

[20] DIGNASS A, LINDSAY J O, STURM A, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 2: current management [J]. J Crohns Colitis, 2012, 6(10): 991-1030.

[21] WAN Y, YANG L, JIANG S, et al. Excessive apoptosis in ulcerative colitis: crosstalk between apoptosis, ROS, ER stress, and intestinal homeostasis [J]. Inflamm Bowel Dis, 2022, 28(4): 639-648.

[22] CUI L, GUAN X, DING W, et al. *Scutellaria baicalensis* Georgi polysaccharide ameliorates DSS-induced ulcerative colitis by improving intestinal barrier function and modulating gut microbiota [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 166: 1035-1045.

[23] LIU R, ZHOU Y, CAO Y. CircRNA and ferroptosis in human disease: Insights for new treatments [J]. Animal Model Exp Med, 2023, 6(6): 508-517.

[24] KOBAYASHI Y, OHFUJI S, KONDO K, et al. Association between dietary iron and zinc intake and development of ulcerative colitis: a case-control study in Japan [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2019, 34(10): 1703-1710.

[25] VERMEIRE S. Combination biologic therapy for ulcerative colitis [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2023, 8(4): 288-290.

[26] 李婷, 邹秋萍, 毛泽伟, 等. 三点金中黄酮类化合物对溃疡性结肠炎小鼠的干预作用及其对肠道菌群的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 29-38.

LI T, ZOU Q P, MAO Z W, et al. Therapeutic effect of flavonoids from *Desmodium triflorum* on an ulcerative colitis mouse model and the influence on intestinal flora [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 29-38.

[27] STOCKWELL B R, FRIEDMANN ANGELI J P, BAYIR H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. Cell, 2017, 171(2): 273-285.

[28] IMAI H, MATSUOKA M, KUMAGAI T, et al. Lipid peroxidation-dependent cell death regulated by GPx4 and ferroptosis [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2017, 403: 143-170.

[29] WANG S, LIU W, WANG J, et al. Curculigoside inhibits ferroptosis in ulcerative colitis through the induction of GPX4 [J]. Life Sci, 2020, 259: 118356.

[30] DONG S, LU Y, PENG G, et al. Furin inhibits epithelial cell injury and alleviates experimental colitis by activating the Nrf2-Gpx4 signaling pathway [J]. Dig Liver Dis, 2021, 53(10): 1276-1285.

[31] 刘玉倩, 杨雯茜, 王海涛. GSH/GPx4 介导的铁死亡通路在有氧运动预防自然衰老小鼠模型肝过氧化损伤中的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1581-1587.

LIU Y Q, YANG W Q, WANG H T. Role of the ferroptosis pathway mediated by GSH/GPx4 in preventing hepatocyte peroxidative injury following aerobic exercise in an elderly mouse model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1581-1587.

[32] LEI G, ZHANG Y, HONG T, et al. Ferroptosis as a mechanism to mediate p53 function in tumor radiosensitivity [J]. Oncogene, 2021, 40(20): 3533-3547.

[33] WANG H, AN P, XIE E, et al. Characterization of ferroptosis in murine models of hemochromatosis [J]. Hepatology, 2017, 66(2): 449-465.

[34] CAI W, YANG T, LIU H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ): a master gatekeeper in CNS injury and repair [J]. Prog Neurobiol, 2018, 163/164: 27-58.

[35] BAI X, ZHENG E, TONG L, et al. Angong Niuhuang Wan inhibit ferroptosis on ischemic and hemorrhagic stroke by activating PPAR γ /AKT/GPX4 pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 321: 117438.

[36] DUAN C, JIAO D, WANG H, et al. Activation of the PPAR γ prevents ferroptosis-induced neuronal loss in response to intracerebral hemorrhage through synergistic actions with the Nrf2 [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 869300.

[收稿日期] 2024-02-07

王蕾,宋辉欠,李斌,等. 西方饮食饲料对 APOE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化造模的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 29-38.

Wang L, Song HQ, Li B, et al. Effect of Western diet on APOE^{-/-} atherosclerosis model mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 29-38.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.004

西方饮食饲料对 APOE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化造模的影响

王蕾,宋辉欠,李斌,梁超,陈敏,田玉淑,吴旭颖,张文明,刘云波*

(北京华阜康生物科技股份有限公司,北京 102202)

【摘要】 目的 为了研究西方饮食饲料快速建模及对 APOE^{-/-}小鼠生物学指标及组织病理学的影响。**方法** 用 48 ♀ 48 ♂ APOE^{-/-}小鼠、48 ♀ 48 ♂ C57BL/6J 进行了试验,分为 8 组,分别为 APOE^{-/-}普通繁殖料组(24 ♀ 24 ♂)和 APOE^{-/-}西方饮食饲料组(24 ♀ 24 ♂)、C57BL/6J 普通繁殖料组(24 ♀ 24 ♂)和 C57BL/6J 西方饮食饲料组(24 ♀ 24 ♂)。从 3 周开始饲喂,直到 20 周实验结束。实验结束后采集血清检测生化指标,分离主动脉做大体油红 O 染色及分析,主动脉根部做石蜡切片和 HE 染色。**结果** 西方饮食没有显著增加 APOE^{-/-}体重,但可以显著提高 APOE^{-/-}鼠的血脂指标、总胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白,促进动脉粥样硬化斑块的形成,雄鼠适合主动脉大体斑块的造模,雌鼠适合主动脉弓根部斑块造模。**结论** 西方饮食饲料可以促进 APOE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化造模,增加主动脉斑块面积比,缩短建模时间,提高建模的均一性。

【关键词】 APOE^{-/-}小鼠;西方饮食饲料;动脉粥样硬化;生化指标;建模

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0029-10

Effect of Western diet on APOE^{-/-} atherosclerosis model mice

WANG Lei, SONG Huiqian, LI Bin, LIANG Chao, CHEN Min, TIAN Yushu, WU Xuying, ZHANG Wenming, LIU Yunbo*
(Beijing HFK Bioscience CO., LTD, Beijing 102202, China)

【Abstract】 Objective To study the impact of a Western diet-type feed on biological indicators and histopathology in APOE^{-/-} mice. **Methods** Forty-eight female and 48 male APOE^{-/-} mice, and 48 female and 48 male C57BL/6J mice were divided into eight breeding groups: APOE^{-/-} breeding feed group, APOE^{-/-} Western dietary feed group, C57BL/6J breeding feed group, and C57BL/6J Western dietary feed group (24 male and 24 female mice per group). Mice were fed the respective diets from 3 weeks until the end of the experiment at 20 weeks. After the experiment, serum was collected for measurement of biochemical indicators. Aortas were removed for oil red O staining and gross examination and the aorta root was paraffin sectioned and stained with hematoxylin and eosin. **Results** A Western diet did not significantly increase body weight in APOE^{-/-} mice, but did significantly improve the blood lipid index and total cholesterol, low-density lipoprotein, and high-density lipoprotein levels, and promoted the formation of atherosclerotic plaques. Male mice were suitable for modeling gross aortic plaques while female mice were suitable for modeling aortic arch root plaques. **Conclusions** A Western diet can promote atherosclerosis in APOE^{-/-} mice, increase the aortic plaque area ratio, shorten modeling time, and improve modeling uniformity.

【基金项目】 国家实验动物资源库服务科技创新能力提升关键技术研究示范(2021YFF0702800)。

【作者简介】 王蕾(1978—),女,博士,研究方向:预防兽医学。E-mail:wanglei@hfkbio.com

【通信作者】 刘云波(1962—),男,研究员,研究方向:实验动物学。E-mail:liuyunbo@hfkbio.com

[Keywords] APOE^{-/-} mice; Western dietary feed; atherosclerosis; biochemical index; modeling

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

APOE^{-/-}小鼠是中国医学科学院实验动物研究所利用基因敲除技术对 C57BL/6J 小鼠的载脂蛋白 E (apolipoprotein E, APOE) 基因进行敲除而得,北京华阜康生物科技股份有限公司于 2009 年引入。APOE 基因位于小鼠第 7 号染色体,该小鼠是对该基因的第 3 外显子进行敲除。APOE 是乳糜微粒 (CM)、极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL)、高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 的重要组分,可调节胆固醇和脂蛋白代谢。同时, APOE 在调节蛋白结构、信号转导、氧化应激、脂质代谢等方面具有重要作用^[1]。

APOE^{-/-}小鼠表现高血浆胆固醇症,最早 3 月龄在近端主动脉出现纸质条纹,损伤严重程度随年龄增长而加剧,出现动脉粥样硬化 (AS) 病变的部位涉及多个血管,但以主动脉根为主^[1]。APOE^{-/-}小鼠基本涵盖了 AS 病变的整个过程,包括斑块形成等,而且在喂食高脂饮食 (high-fat diet, HFD) 或西式饮食 (Western diet, WD) 时能够更快地推进病变发展^[1]。

APOE^{-/-}小鼠常作为动脉粥样硬化模型,其优点是在正常饲养条件下也可以产生复杂的血管病变,并且这些病变与人类 AS 病变具有可比性,发展过程类似于人类 II 型高脂血症^[2]。APOE^{-/-}小鼠也存在一些缺陷,人类 AS 病变过程中最为关键的蛋白是低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL),而 APOE^{-/-}小鼠血浆胆固醇主要受脂蛋白残粒运载并不是 LDL,而 APOE 蛋白还有其他功能,包括影响免疫、巨嗜细胞生理和脂肪组织生理功能,每项功能都对动脉粥样硬化有影响,使得分析具体发病机制复杂困难^[3]。由于上述特点, APOE^{-/-}小鼠还被用

于研究糖尿病、尿毒症、系统红斑狼疮合并动脉粥样硬化、银屑病和血脂异常综合症、神经退化性疾病、肾疾病等^[4]。

APOE^{-/-}小鼠自发出血清血脂的指标紊乱,给予高脂饮食后进一步加重,但是因不同的高脂饲料配方及造模方式的不同,模型构建时间长短不一^[4]。有报道称给与西方饮食饲料喂养 12 周,可显著增加其血脂含量,在主动脉根部位置,管壁有增厚,斑块也有明显增多,表现出典型的动脉粥样硬化病理特征^[5]。本研究探讨我公司生产的西方饮食饲料,从 3 周饲养到 20 周对 APOE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化造模的影响,为研究人员提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验动物均由北京华阜康生物科技股份有限公司提供 [SCXK (京) 2019-0008]。随机分为 8 个试验组,每组 24 只, APOE^{-/-}普通繁殖饲料组 (雌雄各 24 只)、APOE^{-/-}西方饮食饲料组 (雌雄各 24 只)、C57BL/6J 普通繁殖饲料组 (雌雄各 24 只)、C57BL/6J 西方饮食饲料组 (雌雄各 24 只)。从 3 周开始饲喂,饲喂到 20 周。具体使用动物介绍见表 1。

以上动物在本公司 SPF 设施 G1 饲养 [SYXK (京) 2019-0022], 隔离环境的洁净度为 5 级标准,温度控制在 (24±2)℃,相对湿度 (50%±10%),换气次数每小时 20 次,明/暗照明周期为 12 h/12 h,动物自由采食与饮水。所有动物实验均经过北京华阜康实验动物伦理委员会审批确认符合动物伦理学要求和实验动物保护的相关规定 (HFK-AP-

表 1 本研究使用动物简介

Table 1 Introduction to the use of animals in this study

品系 Strain	性别 Sex	数量/ <i>n</i> Number	微生物等级 Microbial level	周龄/week Age	体重/g Weight
C57BL/6J	♂	24	SPF	3	8.60±0.90
C57BL/6J	♀	24	SPF	3	8.40±0.80
C57BL/6J	♂	24	SPF	3	8.50±0.85
C57BL/6J	♀	24	SPF	3	8.45±0.70
APOE ^{-/-}	♂	24	SPF	3	9.32±0.43
APOE ^{-/-}	♀	24	SPF	3	7.67±0.56
APOE ^{-/-}	♂	24	SPF	3	9.42±0.63
APOE ^{-/-}	♀	24	SPF	3	7.60±0.41

20221116)。在实验中,动物饲养和实验过程中按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

西方饮食饲料是北京华阜康生物科技股份有限公司生产[京饲证(2019)06076],主要配方为每公斤饲料中酪蛋白 195 g、蛋氨酸 3 g、玉米淀粉 50 g、麦芽糖糊精 100 g、蔗糖 341 g、纤维素 50 g、玉米油 10 g、奶油 200 g、矿物质混合物 35 g、碳酸钙 4 g、微生物混合物 10 g、胆碱 2 g、胆固醇 1.5 g、抗氧化剂 0.04 g。普通繁殖饲料是北京华阜康生物科技股份有限公司生产[京饲证(2019)06076],主要配方为每公斤饲料中次粉 300 g、麸皮 100 g、鱼粉 70 g、酵母 10 g、豆粕 210 g、玉米 237 g、豆油 20 g 石粉和碳酸氢钙 35.2 g、矿物盐 2 g、赖氨酸和蛋氨酸 6 g、胆碱 4 g、微生物 1.2 g、食盐 4 g。

无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司,64-17-5);二甲苯(国药集团化学试剂有限公司,1330-20-7);苏木素染液(北京永欣康泰科技发展有限公司,517-28-2);伊红染色(北京永欣康泰科技发展有限公司,17372-87-1);盐酸(国药集团化学试剂有限公司,7647-01-0);氨水(国药集团化学试剂有限公司,1336-21-6);环保型中性树胶(北京永欣康泰科技发展有限公司,NA)。希森美康生化仪(BX4000)及配套试剂;眼科剪(14381-43,F.S.T);显微镊、显微剪(WA3050,上海金钟);体式显微镜(ST2-ST,OLYMPUS CORPORATION,TOKYO,JAPAN);油红 O 染色液(Solarbio,Cat#G1260);扫描仪(Epson periection V370 photo,J232D);脱水机(武汉俊杰电子有限公司,JT-12S);包埋机(武汉俊杰电子有限公司,JB-P7);病理切片机(德国徕卡,RM2235);冻台(武汉俊杰电子有限公司,JB-L7);组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司,KD-P);烤片机(常州国华电器有限公司,常州国华电器有限公司,DB-B2);烤箱(邦西仪器科技(上海)有限公司,101-1BS);倒置显微镜(日本尼康,Nikon Ci-S);成像系统(日本尼康,Nikon DS-U3)。

1.3 实验方法

1.3.1 20 周体重比较

饲喂到 20 周后,称量体重,比较西方饮食对 APOE^{-/-}小鼠和 C57BL/6J 小鼠体重的影响。

1.3.2 血生化检测

饲养到 20 周,各组动物用纸盒包装出车间,运输到公司实验室后,内眦采血,用 CO₂ 安乐死。血

液在室温放置 1 h,再放入 4 ℃ 冰箱 1 h。离心 3000 r/min 离心 10 min,分离血清。血清用希森美康生化仪(BX4000)检测乳酸脱氢酶(LDH)、胆碱酯酶(CHE)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)、总胆红素(TBil)、直接胆红素(DBil)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总甘油三酯(TG)、总胆固醇(CHO)、尿酸(UA)含量。

1.3.3 主动脉大体油红 O 染色

取材:分离摘除脏器,在显微镜下小心剥离周围脂肪使整根血管暴露,劈开后取下(可短时间暂存在盐水中)。

染色:将血管浸在饱和油红 O 染色液中染色 15 min 后取出,用 75%乙醇分化剥离血管外壁多余脂肪,使无斑块处接近于无色透明,然后将血管展开铺在载玻片上,10%福尔马林中固定。

拍照:将固定好的血管在干净载玻片上重新展开铺平,使用扫描仪扫描采集图像。

分析:采集图像后,应用 Image-Pro Plus 图像分析软件分别记录斑块面积和血管整体面积,计算斑块比例/%=斑块面积/血管整体面积×100%

1.3.4 主动脉弓根部石蜡切片和 HE 染色

固定:用 10%中性福尔马林溶液固定各组小鼠主动脉弓根部,每组固定 6 只主动脉弓根部。进行石蜡切片和 HE 染色。

制片:组织样本,取材 3 mm 厚,梯度乙醇脱水 70%、80%、95%、100%各 30 min,二甲苯两瓶各 20 min,石蜡浸蜡两缸各 30 min,包埋,切片 4 μm,烤片。

染色:二甲苯(Ⅰ)10 min;二甲苯(Ⅱ)10 min;100%乙醇(Ⅰ)5 min;95%乙醇(Ⅱ)5 min;80%乙醇 5 min;自来水洗 5 min;苏木素染液染色 5 min;自来水洗 5 min;1%盐酸乙醇 3~5 s;自来水洗 30 s;1%氨水返蓝 10 s;自来水洗 3 min;蒸馏水洗 1 min;0.5%伊红染液染色 1 min;自来水洗 5 min;80%乙醇分化至合适(镜下观察);95%乙醇(Ⅰ)10 s;95%乙醇(Ⅱ)10 s;无水乙醇 5 min;二甲苯(Ⅰ)5 min;二甲苯(Ⅱ)5 min;环保型中性树胶封片。

1.3.5 主动脉弓根部斑块面积分析

使用 K-Viewer 软件打开 HE 病理图片,每张病理片按照 4×截取主动脉根部图,按原文件名称命名,图片保存为 TIF 格式。使用 Image-Pro Plus 软件打开截取的 TIF 格式图片,Irregular AOI 框选主动脉

根部内壁斑块,Count and measure objects 计算斑块面积,截屏保留数据。

1.4 统计学方法

数据采用软件 SPSS 25.0,数值以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 西方饮食饲料对 APOE^{-/-}小鼠体重的影响

由表 2 可以看出 8 组动物饲喂结束后 20 周时,不同饲料对同一品系相同性别小鼠体重的影响。西方饮食饲喂可显著增加 C57BL/6J 雄鼠的体重($P<0.05$),极显著增加 C57BL/6J 雌鼠的体重($P<0.01$);但是对于 APOE^{-/-}小鼠没有显著增加体重。相同饲料不同品系,相同性别小鼠体重比较,普通繁殖料饲喂 APOE^{-/-}小鼠体重极显著大于普通繁殖饲料 C57BL/6J 小鼠($P<0.01$)。西方饮食饲料饲喂的 APOE^{-/-}小鼠体重和西方饮食饲料饲喂的 C57BL/6J 小鼠体重未见显著差异($P>0.05$)。

2.2 西方饮食饲料对 APOE^{-/-}小鼠血生化指标的影响

由表 3 可知,西方饮食饲料可以极显著增加 C57BL/6J 小鼠胆碱酯酶、C57BL/6J 雄鼠的高密度脂蛋白和直接胆红素($P<0.01$),西方饮食饲料可以显著增加 C57BL/6J 小鼠白蛋白的含量($P<0.05$)。西方饮食可以极显著增加 APOE^{-/-}小鼠总胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白, APOE^{-/-}雌鼠的乳酸脱氢酶、胆碱酯酶、谷草转氨酶, APOE^{-/-}雄鼠的总蛋白($P<0.01$)。普通繁殖料饲喂的 C57BL/6J 小鼠尿酸极显著高于西方饮食饲喂($P<0.01$),普通繁殖料饲喂的 APOE^{-/-}雌鼠尿酸显著高于西方饮食组($P<0.05$),普通繁殖料饲喂的 APOE^{-/-}雄鼠谷丙转氨酶和碱性磷酸酶显著高于西方饮食饲喂($P<$

0.05)。

相同饲料,不同品系,同性别比较,可以看出在饲喂普通繁殖饲料和西方饮食饲料时, APOE^{-/-}与 C57BL/6J 小鼠血生化的品系差异。对甘油三酯、胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白,进行进一步分析(相同饲料, APOE^{-/-}品系,不同性别组差异)发现西方饮食组雄鼠 LDL 极显著高于雌鼠($P<0.01$),雌鼠的 HDL 极显著高于雄鼠($P<0.01$),雄鼠的 TG 显著高于雌鼠($P<0.05$),雌鼠和雄鼠的 CHO 无显著差异。普通繁殖料组, APOE^{-/-}雌鼠和雄鼠比较上述 4 个指标均无差异($P>0.05$)。

2.3 西方饮食饲料对 APOE^{-/-}小鼠主动脉斑块面积的影响

图 1 和图 2 显示了各组雌鼠和雄鼠主动脉大体 O 红染色的扫描图片,从图片上可以看出西方饮食组可以显著增加 APOE^{-/-}小鼠的主动脉斑块面积/血管面积比。

从表 4 可以看到各组主动脉大体 O 红染色数据和分析结果,通过分析主动脉大体油红 O 染色斑块面积与血管面积比,普通繁殖饲料 APOE^{-/-}组比普通繁殖饲料 C57BL/6J 组斑块面积与血管面积比显著增加($P<0.05$),西方饮食饲料 APOE^{-/-}组比普通繁殖饲料 APOE^{-/-}组,斑块面积与血管面积比显著增加($P<0.05$)。而且相同饲料情况下雄性 APOE^{-/-}小鼠的主动脉斑块面积比血管面积更大。

2.4 各组主动脉弓根部石蜡切片和 HE 染色观察

8 个实验组每组 6 只做主动脉弓根部石蜡切片和 HE 染色,观察各组主动脉弓根部斑块形成情况,明显看出西方饮食饲料明显促进主动脉弓根部斑块的形成,每组挑选 1 只照片拼图展示(见图 3),箭头指向斑块。各组主动脉弓根部面积结果见图 4 和表 5。

表 2 西方饮食饲料对 APOE^{-/-}小鼠体重的影响
Table 2 Effect of Western diet on body weight of APOE^{-/-} mice

类型 Types	20 周 C57BL/6J ♂ 体重/g Average weight of 20 weeks C57BL/6J ♂	20 周 C57BL/6J ♀ 体重/g Average weight of 20 weeks C57BL/6J ♀	20 周 APOE ^{-/-} ♂ 体重/g Average weight of 20 weeks APOE ^{-/-} ♂	20 周 APOE ^{-/-} ♀ 体重/g Average weight of 20 weeks APOE ^{-/-} ♀
普通繁殖料 Breeding feed	27.31±1.88	19.91±0.95	30.17±1.81 ^B	23.24±1.01 ^B
西方饮食饲料 Western dietary feed	28.98±2.31 ^a	23.03±1.45 ^A	30.16±1.98	24.06±1.59

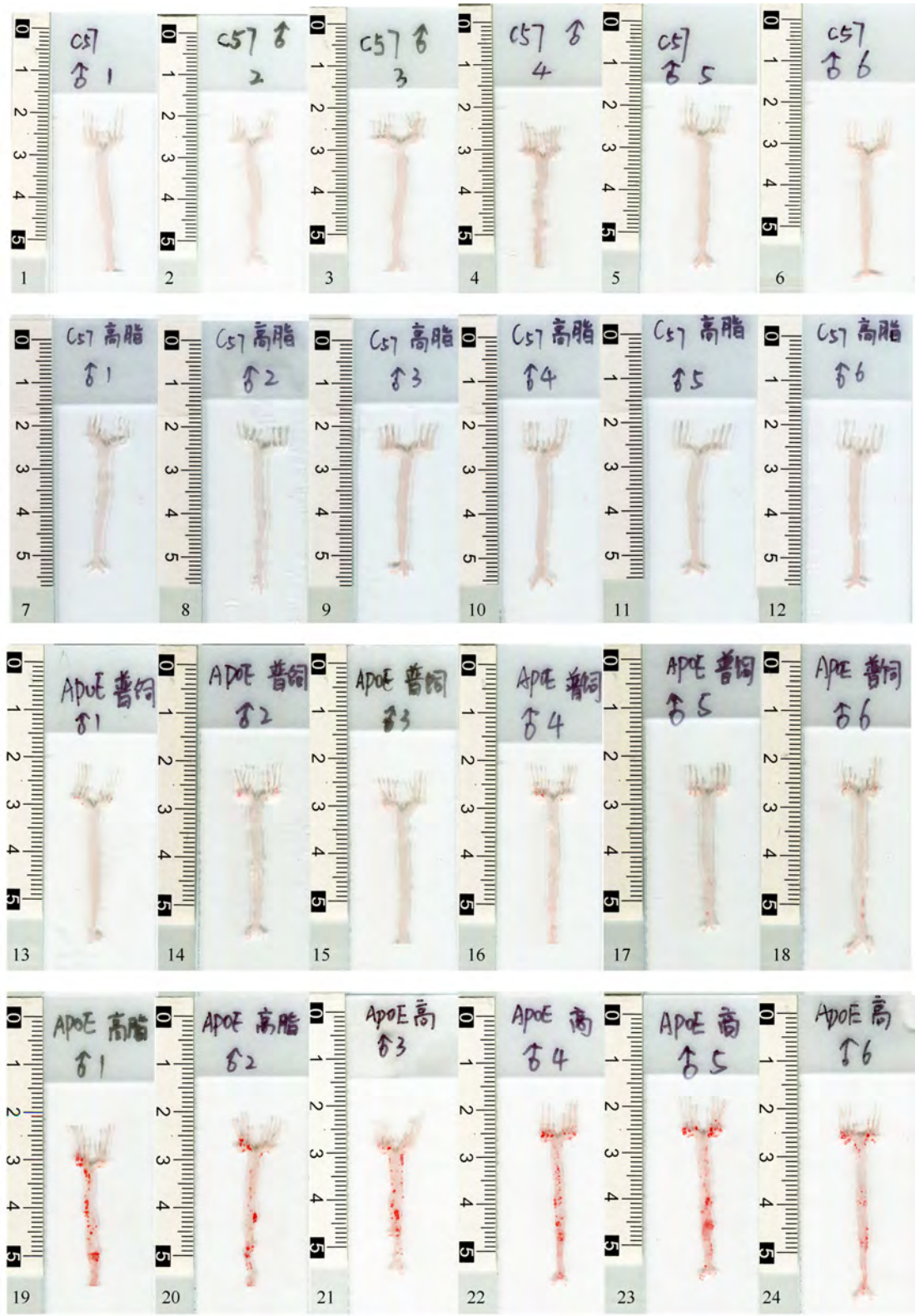
注:不同饲料对相同品系、相同性别体重比较,^a $P<0.05$,^A $P<0.01$;相同饲料对不同品系、相同性别体重比较,^B $P<0.01$ 。
Note. Comparison of body weight of same strain fed with different feed same sex, ^a $P<0.05$, ^A $P<0.01$. Comparison of body weight of different strain and fed with same feed of same sex, ^B $P<0.01$.

表 3 西方饮食饲料对 APOE^{-/-}小鼠血脂生化影响

Table 3 Effect of Western dietary feed on blood biochemistry of APOE^{-/-} mice

组别 Groups	繁殖饲料 Breeding feed				西方饮食饲料 Western dietary feed			
	20 周		20 周		20 周		20 周	
	C57BL/6J ♂ 20 weeks	C57BL/6J ♀ 20 weeks	APOE ^{-/-} ♂ 20 weeks	APOE ^{-/-} ♀ 20 weeks	C57BL/6J ♂ 20 weeks	C57BL/6J ♀ 20 weeks	APOE ^{-/-} ♂ 20 weeks	APOE ^{-/-} ♀ 20 weeks
乳酸脱氢酶/(U/L) LDH	793.27±99.79	667.01±84.47	782.87±141.05	673.74±58.27	696.03±252.97	483.15±102.55	949.17±256.59 ^b	1085.88±571.21 ^{AB}
胆碱酯酶/(U/L) CHE	4326.88±352.30	5677.04±640.62 ^D	5534.93±390.27 ^B	7581.70±787.21 ^{BD}	6596.88±715.22 ^A	8376.9±440.97 ^{AD}	6339.51±1885.78	9381.50±1914.37 ^{ABD}
低密度脂蛋白/(mmol/L) LDL	0.25±0.06	0.34±0.06	4.35±0.63 ^B	5.19±0.83 ^B	0.43±0.07	0.41±0.05	15.04±5.52 ^{ABD}	10.96±1.87 ^{AB}
高密度脂蛋白/(mmol/L) HDL	1.75±0.19	1.34±0.23	2.79±0.29 ^B	2.89±0.34 ^B	2.87±0.98 ^{AD}	1.6±0.46	3.82±1.54 ^{AB}	5.26±1.25 ^{ABD}
总胆红素/(μmol/L) TBil	5.40±0.34	5.26±0.11	6.04±0.55	5.75±0.40	5.73±1.04	5.32±0.18	5.92±0.32	7.06±4.91 ^b
直接胆红素/(μmol/L) Dbil	4.49±0.92	5.14±0.15	4.54±0.37	4.68±0.34	5.73±1.07 ^{AB}	5.24±0.16	3.97±1.02	5.41±2.12 ^D
谷丙转氨酶/(U/L) ALT	54.31±15.25	42.40±9.86	140.21±180.77 ^a	78.94±46.71	55.02±48.69	30.03±7.08	39.45±17.58	140.04±248.71 ^{bd}
谷草转氨酶/(U/L) AST	179.03±42.15	166.93±22.86	189.03±113.61	168.61±26.56	201.48±81.98	161.88±35.6	144.93±41.96	338.11±373.42 ^{ABD}
碱性磷酸酶/(U/L) ALP	115.29±12.98	184.71±24.43 ^D	166.93±22.98 ^{AB}	263.93±27.32 ^B	130.80±74.06	157.5±15.72 ^D	132.86±49.69	250.64±33.28 ^D
总蛋白/(g/L) TP	64.66±2.69	64.19±6.44	60.29±2.59	63.41±1.38	58.68±3.09	61.47±2.56	69.68±19.06 ^{AB}	69.31±4.07 ^b
白蛋白/(g/L) ALB	26.97±1.65 ^B	29.69±2.76 ^{AB}	22.14±1.61	25.68±1.09 ^d	29.64±1.73 ^a	32.61±1.49 ^{ad}	22.84±7.24 ^B	25.73±1.23 ^{bd}
总甘油三酯/(mmol/L) TG	1.06±0.14	1.18±0.20	1.22±0.38	1.17±0.21	0.94±0.20	0.98±0.1	1.37±0.54 ^{bd}	1.07±0.29
总胆固醇(mmol/L) /CHO	2.55±0.3	2.13±0.38	12.38±1.68 ^B	14.35±2.40 ^B	4.72±1.39	3.63±0.38	37.46±11.44 ^{AB}	36.16±4.94 ^{AB}
尿酸/(μmol/L) UA	298.71±55.33 ^{AB}	307.14±66.58 ^{AB}	158.79±39.91	173.86±48.58 ^{AD}	144.30±14.29	56.7±21.1	151.21±60.13	125.86±40.31 ^B

注:不同饲料,相同品系,相同性别比较,^a*P*<0.05,^A*P*<0.01;相同饲料,不同品系,相同性别比较,^b*P*<0.05,^B*P*<0.01;相同饲料,相同品系,不同性别比较,^d*P*<0.05,^D*P*<0.01。
Note. Compared between same sex mice and same strain of the different feed group, ^a*P*<0.05, ^A*P*<0.01. Compared between same sex mice and same feed of the different strain, ^b*P*<0.05, ^B*P*<0.01. Compared between same strain and same feed of the different sex, ^d*P*<0.05, ^D*P*<0.01.

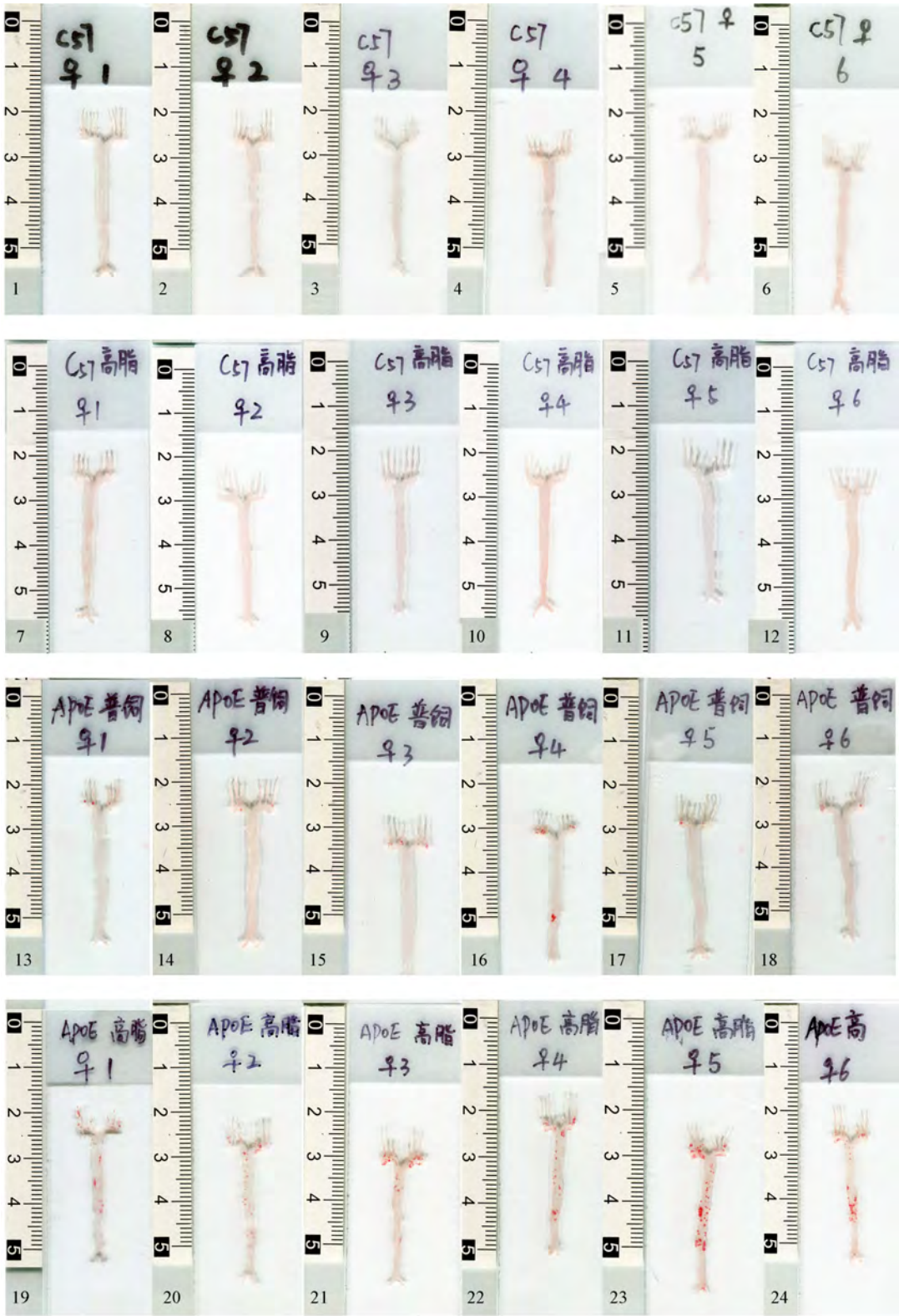


注:1~6:C57BL/6J 雄鼠普通繁殖料组;7~12:C57BL/6J 雄鼠西方饮食饲料组;13~18:APOE^{-/-} 雄鼠普通繁殖料组;19~24:APOE^{-/-} 雄鼠西方饮食饲料组。

图 1 各组雄鼠主动脉大体油红 O 染色

Note. 1~6, C57BL/6J male mice in the breeding feed group. 7~12, C57BL/6J male mice in the Western dietary feed group. 13~18, APOE^{-/-} male mice in the breeding feed group. 19~24, APOE^{-/-} male mice in the Western dietary feed group.

Figure 1 Macroscopic oil red O staining of the aorta of male mice in each group

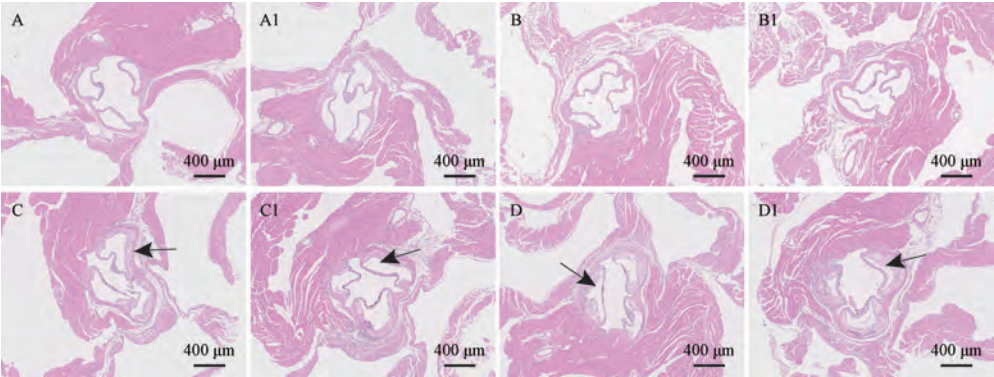


注:1~6:C57BL/6J 雌鼠普通繁殖饲料组;7~12:C57BL/6J 雌鼠西方饮食饲料组;13~18:APOE^{-/-} 雌鼠普通繁殖饲料组;19~24:APOE^{-/-} 雌鼠西方饮食饲料组。

图 2 各组雌鼠主动脉大体油红 O 染色

Note. 1~6, C57BL/6J female mice in the breeding feed group. 7~12, C57BL/6J female mice in the Western dietary feed group. 13~18, APOE^{-/-} female mice in the breeding feed group. 19~24, APOE^{-/-} female mice in the Western dietary feed group.

Figure 2 Macroscopic oil red O staining of the aorta of female mice in each group



注:A、A1: C57BL/6J 小鼠饲喂普通繁殖饲料; B、B1: C57BL/6J 小鼠饲喂西方饮食饲料; C、C1: APOE^{-/-} 小鼠饲喂普通繁殖饲料; D、D1: APOE^{-/-} 小鼠饲喂西方饮食饲料; A~D: 雄鼠; A1~D1: 雌鼠。图中箭头指的是主动脉弓根部斑块。

图 3 各组主动脉弓根部切片和 HE 染色

Note. A/A1, C57BL/6J mice in breeding feed group. B/B1, C57BL/6J mice in Western dietary feed group. C/C1, APOE^{-/-} mice in breeding feed group. D/D1, APOE^{-/-} mice in Western dietary feed group. A~D, Male mice. A1~D1, Female mice. The arrows in the figure refer to the root plaque of the aortic arch.

Figure 3 Root section and HE staining of aortic arch in each group

表 4 各组主动脉大体油红 O 染色数据

Table 4 Aorta macroscopic oil red O staining data of each group

分组 Groups	血管面积/mm ² Vascular area	斑块面积/mm ² Plaque area	斑块面积/血管面积 Vascular area/plaque area
C57BL/6J ♂ 普通繁殖料 C57BL/6J male mice fed with breeding feed	50434.67±2534.49	0.00±0.00	0.00±0.00
C57BL/6J ♀ 普通繁殖料 C57BL/6J female mice fed with breeding feed	45432.83±3837.65	0.00±0.00	0.00±0.00
C57BL/6J ♂ 西方饮食饲料 C57BL/6J male mice fed with Western dietary feed	48565.70±4331.15	0.00±0.00	0.00±0.00
C57BL/6J ♀ 西方饮食饲料 C57BL/6J female mice fed with Western dietary feed	459289.40±4004.44	0.00±0.00	0.00±0.00
APOE ^{-/-} ♂ 普通繁殖料 APOE ^{-/-} male mice fed with breeding feed	49967.00±3112.71	888.17±817.02	1.78±1.76 [*]
APOE ^{-/-} ♀ 普通繁殖料 APOE ^{-/-} female mice fed with breeding feed	49133.50±4439.59	738.50±601.57	1.59±1.64 [*]
APOE ^{-/-} ♂ 西方饮食饲料 APOE ^{-/-} male mice fed with Western dietary feed	53321.17±2271.01	7023.83±1391.80	13.19±2.82 [#]
APOE ^{-/-} ♀ 西方饮食饲料 APOE ^{-/-} female mice fed with Western dietary feed	46093.83±3197.37	4951.50±3276.36	10.82±7.97 [#]

注:斑块面积/血管面积,相同性别,相同饲料 APOE^{-/-} 组与 C57BL/6J 组相比, ^{*}P<0.05; APOE^{-/-} 同性别不同饲料组相比, [#]P<0.05。
Note. Plaque to vascular area ratio, compared between same sex of C57BL/6J and APOE^{-/-} feed with common feed, ^{*}P<0.05. Compared between same sex of APOE^{-/-} feed with different feed, [#]P<0.05.

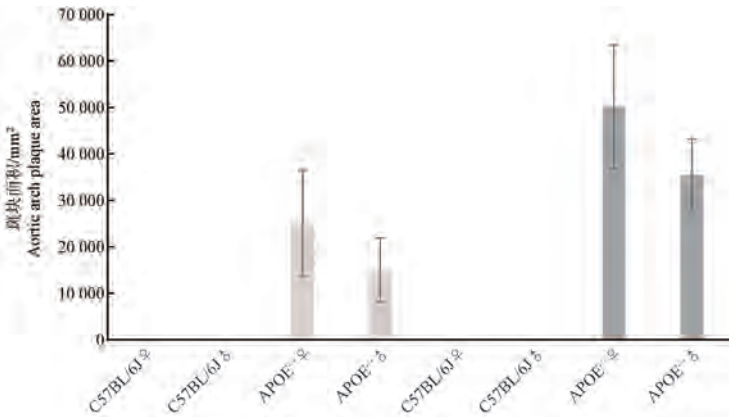


图 4 各组主动脉弓根部斑块面积比较

Figure 4 Comparison of the plaque area of the aortic arch root in each group

表 5 各组主动脉弓根部斑块面积
Table 5 Plaque area of the aortic arch root in each group

分组 Groups	斑块面积/mm ² Plaque area
C57BL/6J ♂ 普通繁殖料	0.00±0.00
C57BL/6J male mice fed with breeding feed	
C57BL/6J ♀ 普通繁殖料	0.00±0.00
C57BL/6J female mice fed with breeding feed	
C57BL/6J ♂ 西方饮食饲料	0.00±0.00
C57BL/6J male mice fed with Western dietary feed	
C57BL/6J ♀ 西方饮食饲料	0.00±0.00
C57BL/6J female mice fed with Western dietary feed	
APOE ^{-/-} ♂ 普通繁殖料	14973.33±6906.93
APOE ^{-/-} male mice fed with breeding feed	
APOE ^{-/-} ♀ 普通繁殖料	25136.67±11293.06
APOE ^{-/-} female mice fed with breeding feed	
APOE ^{-/-} ♂ 西方饮食饲料	35403.17±7722.12 ^{##}
APOE ^{-/-} male mice fed with Western dietary feed	
APOE ^{-/-} ♀ 西方饮食饲料	50151.50±13385.02 ^{##+}
APOE ^{-/-} female mice fed with Western dietary feed	

注:斑块面积,不同饲料,APOE^{-/-}同性别小鼠主动脉弓根部相同部位斑块面积比较,^{##}*P*<0.01;相同饲料,APOE^{-/-}异性小鼠主动脉弓根部相同部位斑块面积比较,⁺*P*<0.05。
Note. Plaque area at the same root of aortic arch compared between same sex of APOE^{-/-} fed with different feed, ^{##}*P*<0.01. Plaque area at the same root of aortic arch compared between different sex of APOE^{-/-} fed with same feed, ⁺*P*<0.05.

3 讨论

有报道称 APOE 是一种糖蛋白,分子大小约为 34 kDa,作为低密度脂蛋白受体家族成员的配体,能够清除乳糜微粒和极低密度脂蛋白残体^[6]。从血生化结果看,不论是普通繁殖料组还是西方饮食饲料组 APOE^{-/-}小鼠低密度脂蛋白都显著高于普通繁殖料 C57BL/6J 组低密度脂蛋白指标。还有报道指出 APOE^{-/-}小鼠正常饮食即可达到较高血浆总胆固醇水平(400~600 mg/dL),为野生型小鼠的 4~5 倍^[2],根据血生化检测结果分析,确实与文献报道相符。有报道指出 APOE^{-/-}小鼠血浆三酰甘油含量明显升高^[7],但是本研究表明未发现 APOE^{-/-}小鼠总甘油三酯显著增加。APOE^{-/-}小鼠自发出现血清血脂指标紊乱(TG、CHOL、LDL-C 升高,HDL-C 明显降低),给予高脂饮食后进一步加重,且肝功能损伤(AST、ALT、ALP 显著升高)^[8],本研究表明西方饮食促进 APOE^{-/-}小鼠 AST 的升高,但是 ALT 和 ALP 未见显著升高。文献报道血清心肌酶和肾功能指标未见明显变化(ALB、CREA、UREA)^[8],本研究表明西方饮食确实对 ALB 指标影响不显著。

有报道指出 12 月龄 APOE^{-/-}小鼠心脏和肝无明显病变,而肾出现肾小球肿胀,肾小囊变小等病变,尿素氮(UN)、肌酐(Cr)和尿酸(UA)明显升高,雌性血压出现升高^[9]。分析西方饮食没有明显增加 UA 可能与 APOE^{-/-}小鼠发病进程和月龄有关。观察 20 周 APOE^{-/-}和 C57BL/6J 各组小鼠血生化指标,可见普通繁殖饲料 APOE^{-/-}雌鼠尿酸显著高于

西方饮食 APOE^{-/-}雌鼠,普通繁殖饲料 C57BL/6J 小鼠白蛋白、尿酸指标显著高于普通繁殖饲料 APOE^{-/-}小鼠(同性别比较),可能与饮食影响血液浓缩有关。

APOE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化(AS)病变部位涉及主动脉根、主动脉弓、头臂干动脉及其分支、颈动脉、胸主动脉、腹主动脉、腹主动脉叉、髂总动脉、股动脉、肠系膜上动脉及其分支、肾动脉、肺动脉、冠状动脉近端,但以主动脉根为主。饲喂普通饲料的 APOE^{-/-}小鼠主动脉根部在 10 周时出现黄白色结节,内皮下泡沫细胞聚积,以及单核细胞与内皮细胞的粘附,15 周时出现中度病变,表现为梭状的平滑肌细胞与泡沫细胞相互混杂,并有少许结缔组织基质沉积;20 周后出现纤维斑块。西方饮食则会加速 AS 病变进程,导致小鼠出现更多晚期病变,病变处胆固醇结晶、坏死核和钙化更明显,老龄 APOE^{-/-}小鼠可发生斑块内出血尤其是头臂干动脉处^[2]。本研究从 3 周开始饲喂,直到 20 周结束研究。通过分析主动脉斑块面积与血管面积的比值,可以确定 APOE^{-/-}雄鼠比 APOE^{-/-}雌鼠斑块面积与血管面积比值更大,但是差异不显著(*P*>0.05)。

本研究对主动脉弓根部进行了石蜡切片和 HE 染色,通过分析相同部位主动脉弓根部石蜡切片斑块面积数据,发现西方饮食可显著增加 APOE^{-/-}雄鼠和雌鼠的斑块面积(*P*<0.05)。相同饲料,不同性别 APOE^{-/-}小鼠斑块面积比较,普通饲料组不同性别 APOE^{-/-}小鼠未见差异(*P*>0.05),西方饮食饲料组雌性 APOE^{-/-}小鼠比雄性 APOE^{-/-}小鼠斑块面积

大($P<0.05$)。

综合生化数据中对雌鼠和雄鼠甘油三酯、总胆固醇和低密度及高密度脂蛋白的分析,笔者认为用 APOE^{-/-}雄鼠造主动脉大体斑块比较合适。用 APOE^{-/-}雌鼠造主动脉弓根部斑块较合适,具体发生原因可能和雌雄不同性别生理特点有关,还需进一步研究。

有报道指出低密度脂蛋白日久发动动脉血栓、斑块破裂、钙化结节等严重不良事件^[8]。血管内壁分布了丰富的免疫细胞,低密度脂蛋白在血管内壁集聚,容易被氧化或修饰以及血管内皮损伤引起的炎症反应,触发先天和获得性免疫反应,可能是促进斑块形成的主要原因^[10]。西方饮食饲料可以增加 2~3 倍 LDL 值。主要是西方饮食饲料中没有粮食和鱼粉等常规原料,取而代之的是蛋氨酸、玉米淀粉、麦芽糊精、蔗糖、胆碱等原料。油脂以奶油为主,高蛋氨酸(Met)摄入在动脉粥样硬化发展过程中起着重要作用,随着基因组表观遗传学研究的深化,DNA 甲基化修饰成为动脉粥样硬化发病机制之一,高 Met 膳食促动脉粥样硬化的原因可能是 S-腺苷同型半胱氨酸通过影响基因甲基化从而影响动脉粥样硬化相关基因的表达,最终引起动脉粥样硬化的发生和发展^[10]。酒石酸胆碱是一种营养增补剂及祛脂剂,它能促进脂肪的代谢,防止脂肪在肝中的积累。玉米淀粉促进 LDL 的提高^[11],麦芽糊精和蔗糖进入体内促进生糖,导致 TG 升高。奶油含有中等含量不饱和脂肪酸,而饱和脂肪的摄入是影响 LDL 水平的主要因素^[12]。

综上所述,西方饮食饲料从 3 周饲喂到 20 周明显加速 APOE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的造模,促进主动脉斑块和主动脉弓根部斑块形成。

参考文献:

[1] 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.

[2] NAKASHIMA Y, PLUMP A S, RAINES E W, et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree [J]. Arterioscler Thromb, 1994, 14(1): 133-140.

[3] ZHANG S H, REDDICK R L, BURKEY B, et al. Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption [J]. J Clin Invest, 1994, 94:

937-945.

[4] 宋珂,侯彦宏,杨会,等. ApoE 基因敲除小鼠疾病模型的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2019, 16(18): 42-44, 48.
SONG K, HOU Y H, YANG H, et al. Advances in research on disease model of ApoE knockout mice [J]. China Med Her, 2019, 16(18): 42-44, 48.

[5] WANG S Z, WU M, CHEN K J, et al. Hawthorn extract alleviates atherosclerosis through regulating inflammation and apoptosis related factors: an experimental study [J]. Chin J Integr Med, 2018, 25(2): 108-115.

[6] GETZ G S, REARDON C A. Apoprotein E and reverse cholesterol transport [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): 3479.

[7] 季丹,黄大可,桂丽,等. ApoE 基因敲除小鼠海马 CA3 区神经元形态学和微管相关蛋白 2 表达变化 [J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(11): 1600-1603.
JI D, HUANG D K, GUI L, et al. Neuronal morphology and microtubule associated protein 2 expression changes in ApoE knockout mice hippocampal CA3 area [J]. Acta Univ Med Anhui, 2016, 51(11): 1600-1603.

[8] 李南,杨安宁,孙岳,等. 高脂饮食对 ApoE^{-/-}小鼠血清生化指标的影响 [J]. 宁夏医科大学学报, 2016, 38(8): 876-878, 882.
LI N, YANG A N, SUN Y, et al. Effect of high-fat diet on blood biochemical indexes in ApoE^{-/-} mice [J]. J Ningxia Med Univ, 2016, 38(8): 876-878, 882.

[9] 田枫,张阔,康爱君,等. 12 月龄 ApoE^{-/-}动脉粥样硬化小鼠心脏、肝脏和肾脏病变的特点 [J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(2): 190-192.
TIAN F, ZHANG K, KANG A J, et al. Characteristics of heart, liver and kidney lesions in 12-month-old ApoE^{-/-} atherosclerotic mice [J]. Chin J Gerontol, 2010, 30(2): 190-192.

[10] 李然,刘建勋,李磊,等. 不同饲料配方对大鼠 TC, LDL-C, Hcy 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 207-210.
LI R, LIU J X, LI L, et al. Effect of different feeds on TC, LDL-C, Hcy in rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2013, 19(9): 207-210.

[11] 张珍珍,尹富贵,黄菊,等. 不同消化速率的淀粉对断奶仔猪脂肪代谢相关血清生化指标的影响 [J]. 营养学报, 2010, 32(2): 105-108, 112.
ZHANG Z Z, YIN F G, HUANG J, et al. Effect of starches with different digestion rates on serum biochemical parameters of lipid metabolism in weaning pig [J]. Acta Nutr Sin, 2010, 32(2): 105-108, 112.

[12] 徐红华,王明丽. 膳食脂肪对心血管疾病的影响 [J]. 中国食物与营养, 2001, 7(1): 44-45.
XU H H, WANG M L. Effect of dietary fat on cardiovascular diseases [J]. Food Nutr China, 2001, 7(1): 44-45.

班汝波,杨婕琳,王晓媛,等. RANBP9 调控 TGF- β 诱导结肠癌 Colo320 细胞凋亡的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 39-47.

Ban RB, Yang JL, Wang XY, et al. Ran-binding protein 9 targets transforming growth factor- β 1 expression and induces cell apoptosis in colorectal cancer Colo320 cells [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 39-47.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.005

RANBP9 调控 TGF- β 诱导结肠癌 Colo320 细胞凋亡的机制研究

班汝波¹, 杨婕琳², 王晓媛², 武雪亮^{1*}, 路永刚³

(1.普通外科,河北北方学院附属第一医院,河北 张家口 075000;2.消化内科,河北北方学院附属第一医院,河北 张家口 075000;3.实验室,河北省人民医院,河北 石家庄 050000)

【摘要】 目的 探讨 Ran 蛋白微管组织中心结合蛋白(RANBP9)靶向调控转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 的表达,及其对结直肠癌 Colo320 细胞凋亡的影响。方法 分析 TCGA 数据库中 625 例结肠癌组织以及 20 例正常结肠组织中 RANBP9 的表达数据, KMPLLOT 分析 RANBP9 的表达与结肠癌患者生存期的关系。人类蛋白免疫组化数据库分析 TGF- β 1 在正常结肠组织和结肠癌组织中的表达情况,使用 UALCAN 数据库分析 TGF- β 1 的表达与结肠癌患者生存期的关系。双荧光素酶实验分析 RANBP9 和 TGF- β 1 的关系。将 pcDNA3.1-GFP-RANBP9 和 pcDNA3.1-GFP-RANBP9-NC 分别转染至实验组和对照组细胞中,转染完成后细胞常规培养,另设立正常组细胞,不经过转染操作,常规培养;噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)法检测各组细胞的生长活力,流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率, JC-1 染色检测各组细胞的线粒体膜电位, Western blot 检测各组细胞中 RANBP9 和 TGF- β 1 的表达。结果 RANBP9 在结肠癌组织中的表达明显降低,与 RANBP9 表达低的患者相比, RANBP9 高表达的结肠癌患者具有较高的生存期曲线, TGF- β 1 在结肠癌组织的表达明显升高,与 TGF- β 1 表达高的患者相比, TGF- β 1 低表达的患者具有较高的生存期曲线,差异均具有统计意义($P < 0.05$)。在结肠癌中, RANBP9 能靶向调控 TGF- β 1 的表达。与正常组细胞相比,实验组细胞的生长活力、线粒体的膜电位、TGF- β 1 的表达明显下调,细胞的凋亡率和 RANBP9 的表达明显升高,差异均具有统计意义($P < 0.05$)。结论 RANBP9 能靶向调控 TGF- β 1 的表达,促使结肠癌细胞 Colo320 的生长活力和线粒体膜电位下降,诱导其凋亡。

【关键词】 Ran 蛋白微管组织中心结合蛋白;转化生长因子 β 1;结直肠癌;细胞凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0039-09

Ran-binding protein 9 targets transforming growth factor- β 1 expression and induces cell apoptosis in colorectal cancer Colo320 cells

BAN Rubo¹, YANG Jielin², WANG Xiaoyuan², WU Xueliang^{1*}, LU Yonggang³

(1. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China.

2. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000.

3. Laboratory, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050000)

【基金项目】 河北省科技厅重点研发计划项目(2237784D);2020 张家口市级科技计划自筹经费项目(2021050D)。

【作者简介】 班汝波(1994—),男,硕士,住院医师,研究方向:消化道肿瘤的基础与临床研究。E-mail:15369305892@163.com

【通信作者】 武雪亮(1984—),男,博士,副主任医师,副教授,硕士生导师,研究方向:消化道肿瘤的基础研究与临床诊疗。

E-mail:wxlwk@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the targeting of transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) expression by Ran-binding protein 9 (RANBP9) and its effect on colorectal cancer Colo320 cell apoptosis. **Methods** Gene expression levels of *RANBP9* were analyzed in 625 colon cancer tissues and 20 normal colon tissues in The Cancer Genome Atlas database. The relationship between *RANBP9* expression and survival time of patients with colon cancer was analyzed using KMPLLOT. The expression of TGF- $\beta 1$ in normal colon tissues and colon cancer tissues was analyzed using the human protein immunohistochemistry database and the relationship between *TGF- $\beta 1$* expression and the survival of patients with colon cancer was analyzed using the UALCAN database. The relationship between *RANBP9* and *TGF- $\beta 1$* was analyzed by dual luciferase experiments. Colo320 cells were transfected with pcDNA3.1-GFP-RANBP9 and control pcDNA3.1-GFP-RANBP9-NC plasmids, respectively, and normal control cells were established without transfection. The cells were cultured and the growth viability of each group of cells was detected by the iazolyl blue tetrazolium bromide method, apoptosis was detected by flow cytometry, the mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 staining, and RANBP9 and TGF- $\beta 1$ protein expression were detected by Western blot. **Results** *RANBP9* expression was significantly reduced in colon cancer tissues. Compared with patients with low *RANBP9* expression, patients with high *RANBP9* expression had a higher survival curve and significantly higher expression of *TGF- $\beta 1$* in colon cancer tissue. Compared with patients with high *TGF- $\beta 1$* expression, patients with low *TGF- $\beta 1$* expression had a significantly higher survival curve ($P < 0.05$). *RANBP9* targeted the expression of *TGF- $\beta 1$* in colon cancer. Compared with the normal group, cell growth, mitochondrial membrane potential, and TGF- $\beta 1$ expression were all significantly down-regulated and the apoptosis rate and RANBP9 expression were significantly increased in the experiment group ($P < 0.05$). **Conclusions** RANBP9 can target the expression of TGF- $\beta 1$, promote the growth of Colo320 colon cancer cells, decrease the mitochondrial membrane potential, and induce apoptosis.

【Keywords】 Ran-binding protein 9; transforming growth factor- $\beta 1$; colorectal cancer; apoptosis

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

结肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一,是全球癌症死亡的第四大主要原因,其发病率随着社会经济 的进展、饮食结构的调整而逐年升高,并且其发病年龄趋于年轻。由于起病隐匿,早期尚无特异性的临床症状,大多数患者确诊时已错过最佳手术切除治疗时机,加上该病极易复发,诊断以及治疗费用高^[1],给患者的家庭带来沉重的负担,不利于社会公共健康卫生事业的可持续发展。研究显示下调肿瘤细胞的无限恶性增殖活性是结肠癌干预治疗的关键事件^[2]。如何降低癌细胞的增殖活力,诱导其凋亡成为众多学者研究的重点。已有的研究显示血管紧张素转化酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)、内质网活化转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6)、神经纤毛蛋白 2 (neuropilin-2, NRP-2) 等众多基因参与调控结肠癌细胞的凋亡过程^[3]。但是由于结肠癌细胞凋亡的分子机制尚未完全阐明,仍需更为深入、系统的研究。Ran 蛋白微管组织中心结合蛋白 (Ran-binding protein in microtubule-organization center, RanBPM) 是新近发现的在多种组织和细胞中都有表达的由脯氨酸和谷氨酰胺构成的小分子蛋白质,研究显示 RanBPM 与不同基因的蛋白相结合,具有调控细胞

增殖、分化、粘附、运动、凋亡、衰老等生物活性的效用,存在与转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 等多种基因发生特异性结合的结构域,又被称为 RANBP9^[4]。郭栢枫等^[5] 研究显示 RANBP9 在骨肉瘤组织中的表达降低,增强 RANBP9 的表达后,骨肉瘤细胞 SaOS2 的凋亡率明显升高。但是有关 RANBP9 在结肠癌中的作用的报道较少。国内外众多研究数据显示 TGF- $\beta 1$ 信号参与结肠癌细胞的增殖与凋亡等生理过程^[6]。本研究通过研究 RANBP9 和 TGF- $\beta 1$ 在结肠癌组织的表达,从 TGF- $\beta 1$ 信号入手,探讨 RANBP9 对结肠癌细胞 Colo320 凋亡的机制,以期 为结肠癌的临床治疗拓展新的方向。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

BALB/c 裸鼠,4~5 周龄,SPF 级, (20±2) g,雄性,30 只,由中国科学院上海药物研究所提供 [SCXK (沪)2020-0005],饲养在河北北方学院动物房中 [SYXK (冀)2019-004],温度保持在 22 ℃左右,湿度 (40±10) %,进行适应性喂养后用于实验,

实验动物的操作经河北北方学院附属第一医院动物伦理委员会批准(IACUC-2020-05073BN-001),在实验操作过程中,遵循 3R 原则,给与动物人道关怀,尽量减轻动物的痛苦。

1.1.2 细胞

封存在标准液氮中的结直肠癌 Colo320 细胞株由北纳创联生物(北京)技术研究院提供。pcDNA3.1-GFP-RANBP9 和 pcDNA3.1-GFP-RANBP9-NC 由上海吉玛生物制药有限公司提供。

1.2 主要试剂与仪器

兔抗小鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, 批号 GJH-LR01)、RANBP9(批号 GJH-YB98)和 TGF- β 1(批号 GJH-HC37)单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)试剂盒(批号 62574)、二甲苯(批号 37256)、中性树脂(批号 27539)、Western blot 试剂盒(批号 73691)(武汉聚合美生物科技有限公司);双荧光素酶试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,批号 85-EV-96);线粒体膜电位分析试剂盒 5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基苯并咪唑羰花青碘化物(1,1',3,3'-tetraethyl-5,5',6,6'-tetrachloroimidacarbocyanin iodide, JC-1)染色试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号 37-AF-83);转染试剂 Lipofectamine™ 2000(美国 CST 公司,批号 8763-4MT-001)。台式离心机(浙江研特科学仪器有限公司,型号 YT-LX2800);恒温 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司,型号 1501 型);全自动凝胶成像系统(上海巴玖实业有限公司,型号 JS-2000);垂直电泳槽(上海达洛科学仪器有限公司,型号 JY-SCZ2)。

1.3 实验方法

1.3.1 RANBP9 和 TGF- β 1 在结肠癌中的表达

提取癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)中 625 例结肠癌组织以及 20 例正常结肠组织差异表达的基因的表达数据,利用 R 软件对其进行 MicroRNA 阵列分析,绘制基因热图;同时使用 KMPlot (<https://kmplot.com/analysis/>)分析 RANBP9(基因)的表达与结肠癌患者生存期的关系。在人类蛋白免疫组化(the human protein atlas, HPA)数据库(<https://www.proteinatlas.org>)检索 TGF- β 1 蛋白在正常结肠组织和结肠癌组织中的表达情况,使用 UALCAN 数据库(<http://ualcan.path>

[uab.edu/index.html](http://ualcan.path))分析 TGF- β 1 的表达与结肠癌患者生存期的关系^[7]。同时运用 ENCORI 数据库(<http://starbase.sysu.edu.cn>)统计分析在结肠癌中 RANBP9 和 TGF- β 1 的表达的关系。

同时选取封存在河北北方学院附属第一医院病理研究室的 102 例结肠癌组织和对应的癌旁组织,样本时限与本研究同步,年龄 28~73(42.38±9.56)岁,男 65 例,女 37 例,所有样本均为原发性结肠癌,并经病理检测确诊。经统计分析样本在年龄、性别方面的差异不具有统计学意义($P>0.05$)。本研究已获得患者或其直系家属的知情同意书,且经河北北方学院附属第一医院伦理委员会批准(2020-003-THB-01)。将样本经 PCR 分析检测临床样本中 RANBP9 和 TGF- β 1 的表达。

1.3.2 双荧光素酶实验

从 GENEMANIA 数据库(<http://genemania.org/>)查询 RANBP9 和 TGF- β 1 的相互作用关系;然后按双荧光素酶试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司)要求构建 TGF- β 1 突变型(pGL3-TGF- β 1-3-UTR-MUT)和 TGF- β 1 野生型(pGL3-TGF- β 1-3-UTR-WT)两种质粒,在 Lipofectamine™ 2000 的辅助下,pGL3-TGF- β 1-3-UTR-MUT 和 pGL3-TGF- β 1-3-UTR-WT 分别与 RANBP9 mimic、RANBP9 mimic-NC 进行共转染操作,待细胞在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 48 h 后,以双荧光素酶报告试剂盒检测荧光素酶强度。

1.3.3 细胞转染和分组

将封存的 Colo320 细胞复苏后接种在 RPMI 1640 培养基上,在 37℃、5% CO₂ 条件下培养,取对数生长期的细胞进行转染,根据转染试剂 Lipofectamine™ 2000(美国 CST 公司)的说明书要求将 pcDNA3.1-GFP-RANBP9 和 pcDNA3.1-GFP-RANBP9-NC 分别转染至实验组和对照组细胞中,转染完成后细胞常规培养,另设立正常组细胞,不经过转染操作,常规培养。

1.3.4 MTT 法检测各组的细胞生长活力

调整 Colo320 细胞的浓度至 1×10^5 /孔,并接种在 96 孔板中,分组处理同上,每组设 8 个复孔,1501 型恒温 CO₂ 细胞培养箱中设定(37℃、5% CO₂)培养 24 h,每孔加入 20 μ L 的 0.5% MTT 反应液,室温下孵育 6 h、12 h、18 h、24 h,弃掉上清液,检测各组细胞在 450 nm 处的吸光光度值 A;按照 $A_{\text{实验孔}}/A_{\text{对照孔}} \times 100\%$ 计算各组细胞的生长活力。

1.3.5 电镜观察各组细胞的超微结构改变

调整 Colo320 细胞的浓度至 5×10^5 /孔,并接种在 24 孔培养板中,分组处理同上,每组设定 8 个复孔,在 37°C ,5% CO_2 条件下培养 24 h,培养基清洗细胞 2 次,每次 3 min,离心后,依次以戊二醛、锇酸固定,磷酸盐缓冲液清洗后,脱水,中性树脂包埋,切片,铀-铅双染色,镜检。

1.3.6 流式细胞术检测各组细胞凋亡率的变化

调整 Colo320 细胞的浓度至 1×10^6 /孔,并接种在 6 孔培养板中,分组处理同上,每组设定 8 个复孔,在 37°C ,5% CO_2 条件下培养 24 h,以 5 μL Annexin V-FITC 重悬细胞,加入 5 μL 碘化丙啶(propidium iodide,PI)染色液,室温下,避光孵育 15 min,流式细胞仪检测。晚期凋亡细胞和死亡细胞在流式细胞分析图上为右上区位置,早期凋亡细胞在流式细胞分析图上为右下区位置。

1.3.7 JC-1 染色检测各组细胞的线粒体膜电位

调整 Colo320 细胞的浓度至 6×10^5 /孔,并接种于 6 孔培养板中,分组处理同上,每组设定 8 个复孔,1501 型恒温 CO_2 细胞培养箱中设定(37°C ,5% CO_2)培养 24 h 后,弃去培养液,每孔加入 JC-1 工作液,孵育 2 h,封片,镜检,细胞线粒体膜电位的变化通过红色荧光和绿色荧光的比值来表示。

1.3.8 裸鼠模型检测各组细胞的体内生长

调整 Colo320 细胞的浓度至 1×10^6 /孔,并接种于 6 孔培养板中,分组处理同 1.3.5,置于 37°C ,5% CO_2 的细胞培养箱 24 h 后,将 30 只 BALB/c 裸鼠随机分为正常组、对照组、实验组,每组 10 只,以微量上样器将各组细胞分别注射到 BALB/c 裸鼠体内,3 天后可观察到原位肿瘤,2 周后处死裸鼠,收集各组小鼠的肿瘤组织,称重。

1.3.9 蛋白质免疫印迹检测各组细胞中 RANBP9、TGF- β 1 的表达

调整 Colo320 细胞的浓度至 3×10^5 /孔接种在 6 孔培养板中,分组处理同 1.3.5,每组设定 8 个复孔,置于 37°C ,5% CO_2 的细胞培养箱 24 h 后,按试剂盒要求进行洗涤、提取总蛋白,上样,电泳,转膜,封闭,加入一抗(RANBP9,TGF- β 1,GAPDH)(1:500),孕育 1 h,以 1:1500 的二抗稀释,3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine,DAB)显色,复染,水洗,梯度乙醇脱水,透明,封片,将目的蛋白与 GAPDH 的灰度进行比较。

1.4 统计学方法

统计分析通过 SPSS 19.0 软件进行,所有数据

符合正态分布检验,以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)进行表示,采用 LSD- t 检验进行分析,当 $P < 0.05$,表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RANBP9 和 TGF- β 1 在结肠癌中的表达

采用 R 软件将 TCGA 数据库中差异表达的基因绘制成热图,结果显示,RANBP9 在结肠癌组织中的表达明显降低,见图 1A;KMPLLOT 生存分析显示,与 RANBP9 表达低的患者相比,RANBP9 高表达的结肠癌患者具有较高的生存期曲线,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),见图 1B;从人类蛋白质组化数据库进行分析结果显示,TGF- β 1 在结肠癌组织的表达明显升高,见图 1C;UALCAN 生存分析显示,与 TGF- β 1 表达高的患者相比,TGF- β 1 低表达的患者具有较高的生存期曲线,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),见图 1D;使用 ENCORI 数据库对 RANBP9 和 TGF- β 1 在结肠癌组织进行共表达分析,结果显示,在结肠癌中 RANBP9 和 TGF- β 1 表达呈现明显的负相关($r = -0.752$, $P < 0.05$),见图 1E。

经 PCR 分析结果显示,在临床组织样本中,与癌旁正常组织相比,RANBP9 的 mRNA 在结肠癌组织中的表达明显降低,TGF- β 1 的 mRNA 在结肠癌组织的表达明显升高,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),见图 1F。

2.2 双荧光素酶实验

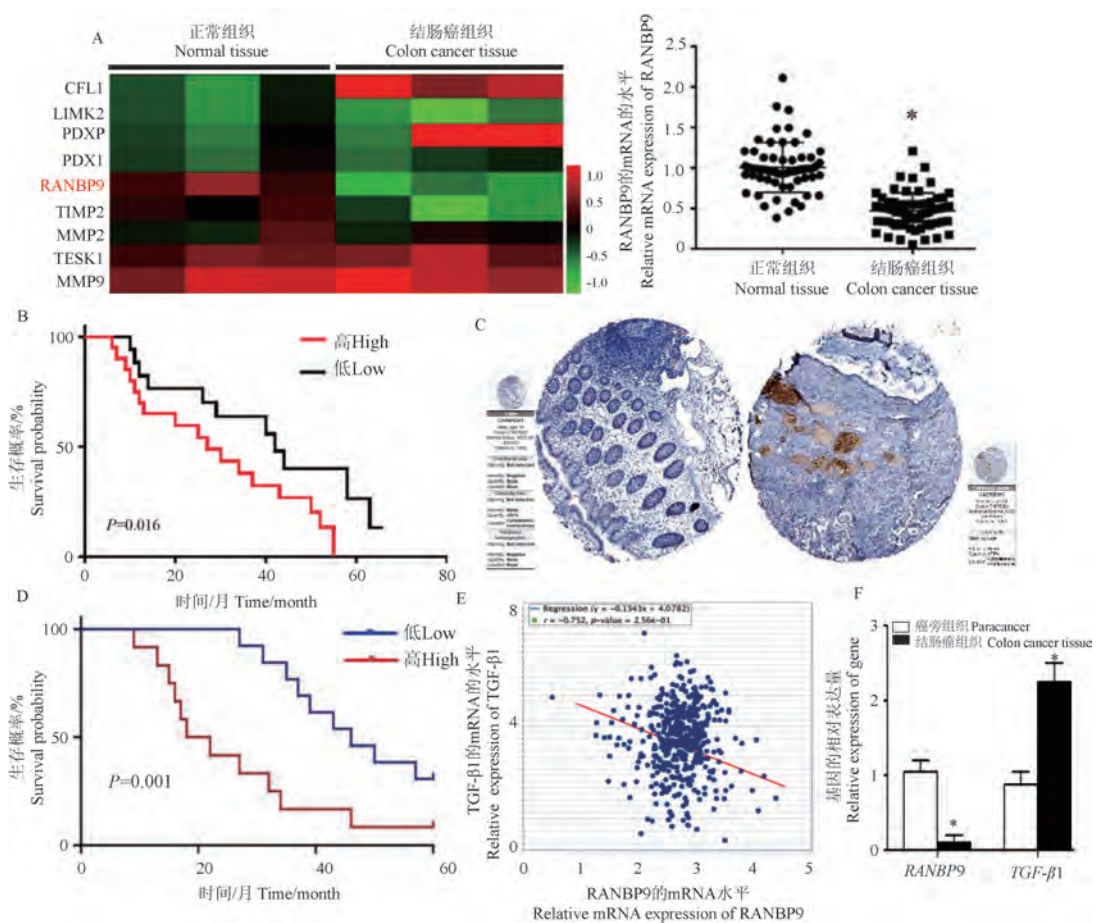
从 GENEMANIA 数据库中研究发现 RANBP9 与 TGF- β 1 存在特异性的调控关系,见图 2A。推测 RANBP9 的作用位点可能为 TGF- β 1。进行双荧光素酶实验,结果显示,过表达 RANBP9 后,TGF- β 1 野生型的荧光素酶活性呈现出明显下降的趋势($P < 0.05$),TGF- β 1 突变型的荧光素酶活性却无明显变化($P > 0.05$),说明 RANBP9 能靶向调控 TGF- β 1 的表达,见图 2B。

2.3 MTT 法检测各组的细胞生长活力

经 MTT 试剂盒检测后,与正常组 Colo320 细胞相比,实验组 Colo320 细胞的生长活力出现了明显下降的趋势($P < 0.05$),对照组与正常组相比,差异不具有统计学意义($P > 0.05$),见图 3。

2.4 各组细胞超微结构变化

电镜下观察各组细胞的超微结果显示,正常组细胞的胞膜清晰,结构完整,未见扩张、凹陷等异常

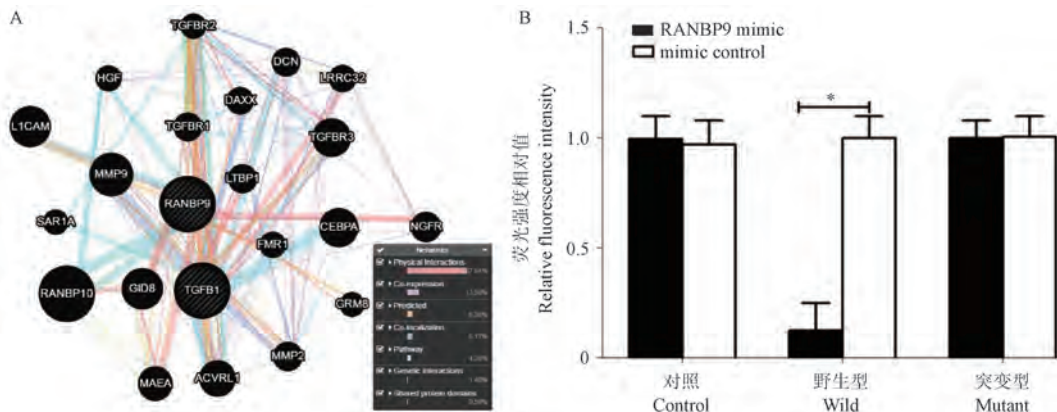


注:A:TCCA 中结肠癌差异表达基因的热图以及 *RANBP9* 的表达,与正常结肠组织相比, * $P<0.05$;B:*RANBP9* 的表达对结肠癌患者生存期的影响;C:HPA 中 *TGF-β1* 在结肠癌组织中的表达;D:*TGF-β1* 的表达对结肠癌患者生存期的影响;E:结肠癌组织中 *RANBP9* 和 *TGF-β1* 的共表达分析;F:临床样本中 *RANBP9* 和 *TGF-β1* 的表达。

图 1 结肠癌中 *RANBP9* 和 *TGF-β1* 的表达

Note. A, Heatmap of differentially expressed genes in colon cancer and the expression of *RANBP9* in TCCA, compared with normal colon tissue, * $P<0.05$. B, Impact of *RANBP9* expression on the survival of colon cancer patients. C, Expression of *TGF-β1* in colon cancer in HPA. D, Impact of the expression of *TGF-β1* on the survival of colon cancer patients. E, Co-expression analysis of *RANBP9* and *TGF-β1* in colon cancer tissue. F, Expression of *RANBP9* and *TGF-β1* in clinical samples.

Figure 1 Expression of *RANBP9* and *TGF-β1* in colon cancer



注:A:*RANBP9* 和 *TGF-β1* 的作用网络;B:双荧光素酶实验结果。与 mimic control 相比, * $P<0.05$ 。

图 2 *RANBP9* 靶向调控 *TGF-β1* 的表达

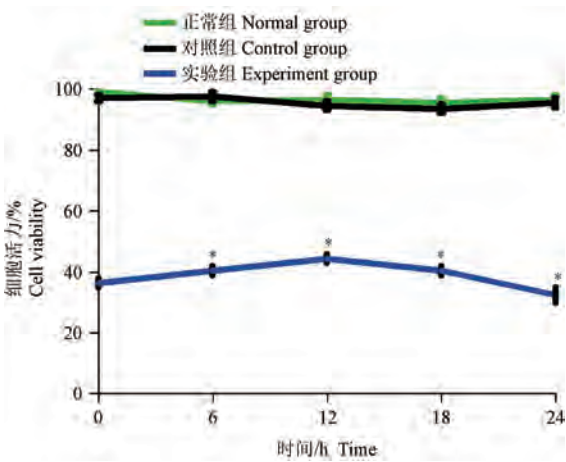
Note. A, Action network of *RANBP9* and *TGF-β1*. B, Experimental results of double luciferase. Compared with mimic control, * $P<0.05$.

Figure 2 *RANBP9* regulated the expression of *TGF-β1*

现象,胞浆中的线粒体数量丰富,线粒体双侧膜结构性态无明显病变,嵴结构完整,核膜完整,染色质性态未见异常;对照组细胞与正常组细胞的超微结构未见明显差异,线粒体以及其他细胞器的结构清晰可辨,无肿胀、断裂现象;实验组细胞的胞膜凹陷、缺失明显,线粒体肿胀明显,双层膜结构明显扩张,空泡样变性严重,嵴结构或变形,或缺失,或断裂,线粒体的基膜已失去清晰的界限,数量明显减少,见图 4。

2.5 流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率

经流式细胞仪检测后,与正常组 Colo320 细胞相比,实验组 Colo320 细胞的凋亡率出现了明显升高的趋势($P<0.05$),对照组 Colo320 细胞与正常组 Colo320 细胞的凋亡率相比,差异不具有统计学意义($P>0.05$),见图 5。



注:与正常组相比, * $P<0.05$ 。
图 3 各组细胞的生长活力
Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$.

Figure 3 Growth activity of cells in each group

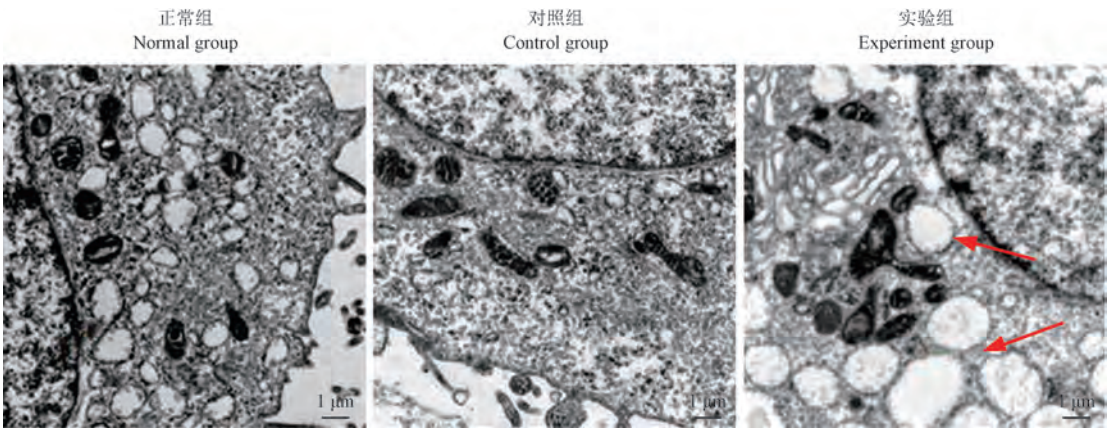
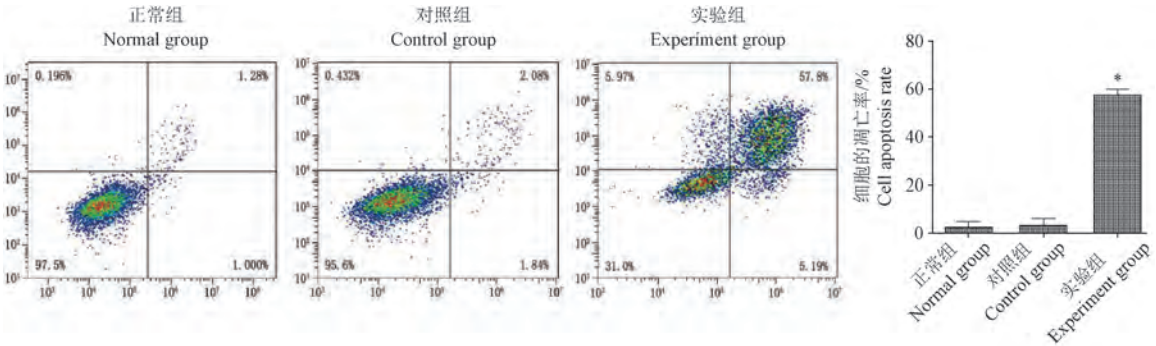


图 4 各组细胞的超微结构(红色箭头即为肿胀的线粒体)
Figure 4 Ultrastructure of cells in each group (the red arrow was the swollen mitochondria)



注:与正常组相比, * $P<0.05$ 。
图 5 各组细胞的凋亡率
Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$.

Figure 5 Cell apoptosis rate of cells in each group

2.6 JC-1 染色检测各组细胞的线粒体膜电位

经 JC-1 染色试剂盒后,与正常组 Colo320 细胞相比,实验组 Colo320 细胞中红色荧光与绿色荧光的比值出现了明显下降的趋势,Colo320 细胞的线粒体膜电位明显下降($P<0.05$)。对照组 Colo320 细胞与正常组 Colo320 细胞的线粒体膜电位相比,差异不具有统计学意义($P>0.05$),见图 6。

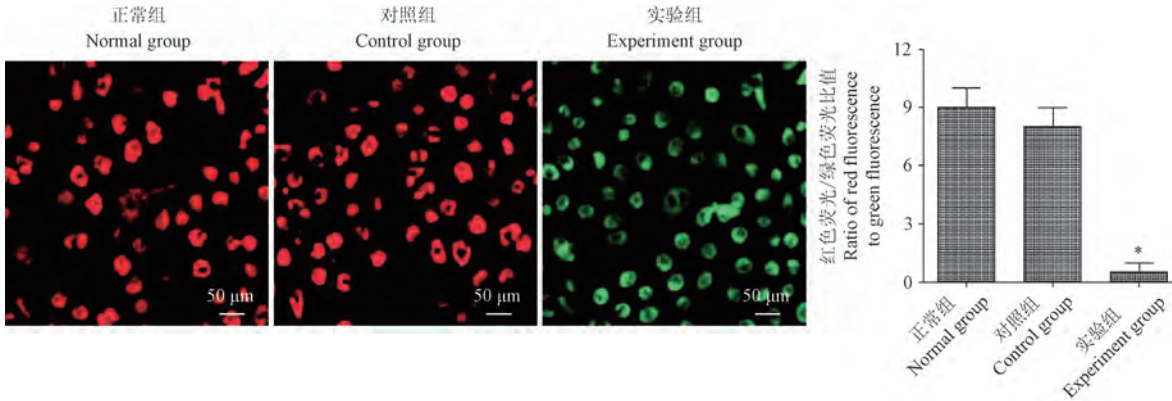
2.7 裸鼠实验模型

Colo320 细胞在动物体内生长后,与正常组 Colo320 细胞的瘤体组织相比,实验组 Colo320 细胞的瘤体质量出现了明显下降的趋势,Colo320 细胞体内生长的能力明显下降,差异具有统计学意义($P<$

0.05);正常组实验动物与对照组实验动物的肿瘤组织的质量相比,差异不具有统计学意义($P>0.05$),见图 7。

2.8 各组细胞中 RANBP9、TGF-β1 的表达

各组细胞经 Western blot 实验后,与正常组 Colo320 细胞相比,实验组 Colo320 细胞中 RANBP9 的表达呈现明显升高的趋势,TGF-β1 的表达呈现明显下降的趋势,差异均具有统计学意义($P<0.05$),正常组 Colo320 细胞与对照组 Colo320 细胞中 RANBP9、TGF-β1 的表达相比,差异不具有统计学意义($P>0.05$),见图 8。

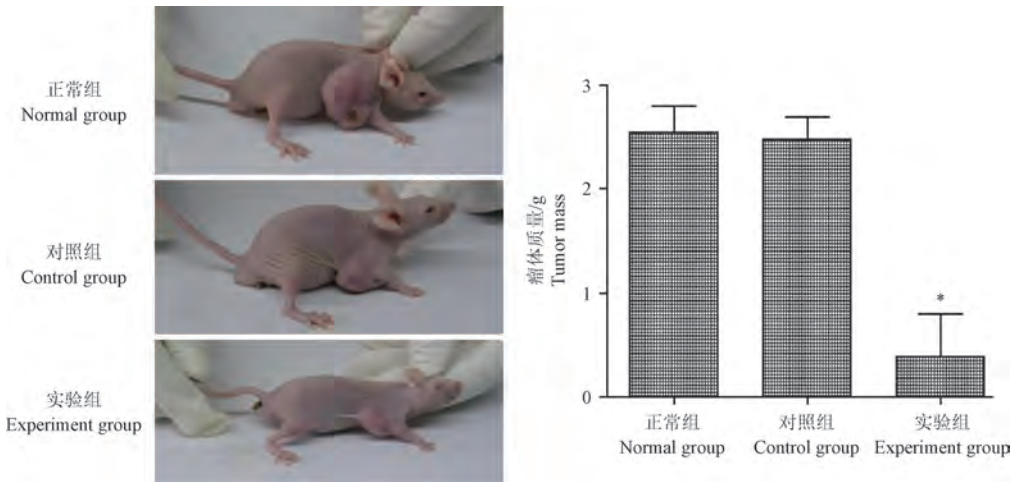


注:与正常组相比,* $P<0.05$ 。

图 6 各组细胞的线粒体膜电位(JC-1 染色)

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

Figure 6 Mitochondrial membrane potential of cells in each group (JC-1 staining)

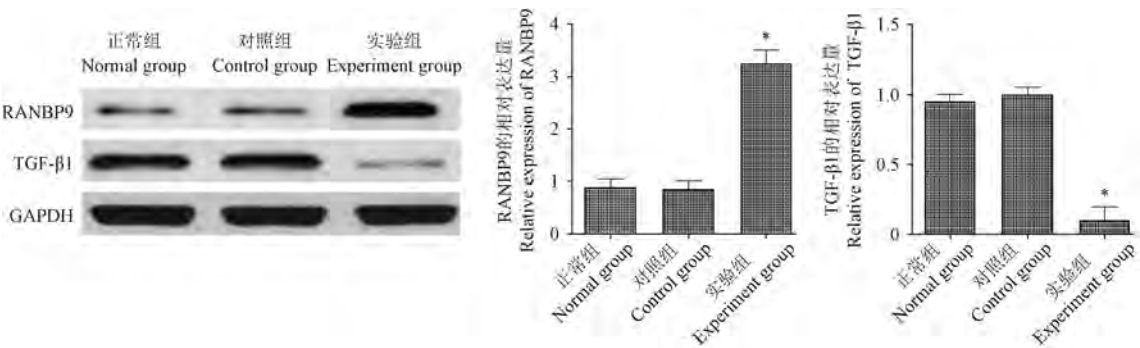


注:与正常组相比,* $P<0.05$ 。

图 7 裸鼠成瘤以及瘤体质量的比较

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

Figure 7 Comparison of tumor formation and tumor quality in nude mice



注:与正常组相比, * $P<0.05$ 。

图 8 各组细胞中 RANBP9 和 TGF-β1 的表达

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

Figure 8 Expression of RANBP9 and TGF-β1 in each group of cells

3 讨论

据相关数据统计,至 2030 年将全球将有 220 万确诊结肠癌病例,因缺乏可靠而有效的治疗措施,并且肿瘤细胞对放化疗耐药机制的增强,将有近一半的患者会失去生命,在一些不发达的国家或者地区,结肠癌的形势更为严峻^[8]。因此,抗结肠癌药物的研发刻不容缓。但是由于结肠癌的分子机制尚未完全阐明,抗肿瘤药物的靶点以及安全性均在新药开发的研究日程上。因此深入探索结肠癌的分子起病机制,寻找肿瘤病情进展可靠的分子标记物,不仅有助于新的筛查方式的建立,帮助临床医师及时地诊断出潜在的高风险患者,更有助于结肠癌抗肿瘤药物的研发,有助于改善患者预后。

细胞的凋亡是一个与肿瘤起病、进展以及预后均相关的病理过程,越来越多的学者将研究侧重揭示肿瘤细胞凋亡的分子机制方面^[9]。Zhang 等^[10]研究报道从结肠癌细胞的细胞形态入手,下调某些特异性的分子表达,促使细胞结构或功能发生改变,进而诱导细胞凋亡是目前结肠癌靶向治疗的一个重要方向。线粒体是肿瘤细胞胞浆中重要的细胞器,为细胞的增殖提供坚实的能量。线粒体膜电位是维系结构稳定和功能的因子。RANBP9 是一种机体内广泛存在的核质支架蛋白,在胃癌和肺癌等恶性肿瘤中显示了良好的抑癌作用^[11]。Das 等^[12]研究报道在肺癌中,RANBP9 特异性结合线粒体膜的泛素蛋白酶,致使线粒体结构失衡,膜电位下降,促使细胞趋于凋亡。Wei 等^[13]研究显示 RANBP9 负向调控白三烯 B4 受体 2 (leukotriene B4 receptor 2, BLT2) 的表达,抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-435 的生长活性以及侵袭能力。本研究通过对

TCGA 数据库中 *RANBP9* 在结肠癌中的表达结果显示,*RANBP9* 在结肠癌组织中的表达明显下降,并且直接影响患者的生存期。细胞实验结果显示,上调 *RANBP9* 的表达后,实验组细胞的生长活力明显受限,超微结构损伤明显,线粒体的膜电位明显下降,细胞的凋亡率明显升高,肿瘤细胞体内生长的能力随之下降。

TGF-β1 信号是细胞内具有多种功能的调控因子。研究显示 TGF-β1 信号在乳腺癌、胃癌、肝癌等恶性肿瘤中表达升高,能明显推动癌细胞的恶性进展^[14]。Hu 等^[15]研究显示在前列腺癌中沉默 TGF-β1 的表达,能明显抑制阳性调控域锌指蛋白 1 (positive regulatory domain zinc finger protein 1, PRDM1) 的表达,下调癌细胞增殖和侵袭的能力。Tan 等^[16]研究显示增强 TGF-β1 的表达后,正常人口腔成纤维细胞自噬失控,增强其向癌细胞的成纤维细胞的表型转换,同时推动线粒体能量代谢相关蛋白的表达,该表型转换过程提供足够的能量基础。本研究从人类蛋白质免疫组化数据库中研究发现,TGF-β1 在结肠癌组织的表达明显升高,TGF-β1 高表达的患者的预后明显不佳。ENCORI 数据库显示,在结肠癌中 *RANBP9* 和 *TGF-β1* 表达呈现明显的负相关。双荧光素酶结果显示 *RANBP9* 能靶向调控 *TGF-β1* 的表达。细胞实验结果显示,升高 *RANBP9* 的表达后,TGF-β1 的表达明显降低。

综上,*RANBP9* 能靶向调控 TGF-β1 的表达,促使结肠癌细胞 Colo320 的生长活力和线粒体膜电位下降,诱导其凋亡。但是在结肠癌中,该信号轴完整的调控机制仍需要更为深入的探索。

参考文献:

- [1] RENZI G D, GABALLO G, GAZZANIGA P, et al. Molecular biomarkers according to primary tumor location in colorectal cancer: current standard and new insights [J]. *Oncology*, 2021, 99(3): 135–143.
- [2] BIAN Y, YANG L, SHENG W, et al. Ligustrazine induces the colorectal cancer cells apoptosis via p53-dependent mitochondrial pathway and cell cycle arrest at the G0/G1 phase [J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10(2): 1578–1588.
- [3] 康清杰, 向征. 沉默胶质瘤相关癌基因同源物 2 基因对结肠癌细胞系 SW620 增殖和凋亡的影响 [J]. *中国癌症杂志*, 2020, 30(10): 785–790.
- KANG Q J, XIANG Z. Effect of glioma-associated oncogene homolog 2 silencing on proliferation and apoptosis of colon cancer cell line SW620 [J]. *China Oncol*, 2020, 30(10): 785–790.
- [4] SOLIMAN S H A, STARK A E, GARDNER M L, et al. Tagging enhances histochemical and biochemical detection of Ran Binding Protein 9 *in vivo* and reveals its interaction with Nucleolin [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 7138.
- [5] 郭栎枫, 吕杨帆, 曹亚, 等. RanBP9 激活线粒体途径诱导骨肉瘤细胞凋亡 [J]. *第三军医大学学报*, 2020, 42(12): 1174–1181.
- GUO L F, LYU Y F, CAO Y, et al. Ran-binding protein 9 overexpression induces apoptosis in osteosarcoma cells by activating endogenous mitochondrial pathway [J]. *J Third Mil Med Univ*, 2020, 42(12): 1174–1181.
- [6] YANG T, WANG H, LI M, et al. CD151 promotes Colorectal Cancer progression by a crosstalk involving CEACAM6, LGR5 and Wnt signaling via TGF β 1 [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(3): 848–860.
- [7] 颜彦, 吴琳, 林道锐. 花青素协同奥沙利铂对人结肠癌 HCT116 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *现代消化及介入诊疗*, 2020, 25(4): 472–476.
- YAN Y, WU L, LIN D R. Effects of anthocyanin combined with oxaliplatin on proliferation and apoptosis of human colon cancer HCT116 cells [J]. *Mod Dig Interv*, 2020, 25(4): 472–476.
- [8] PERVAIZ A, ZEPP M, GEORGES R, et al. Antineoplastic effects of targeting CCR5 and its therapeutic potential for colorectal cancer liver metastasis [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2021, 147(1): 73–91.
- [9] SHANG P, GAO R, ZHU Y, et al. VEGFR2-targeted antibody fused with IFN α mut regulates the tumor microenvironment of colorectal cancer and exhibits potent anti-tumor and anti-metastasis activity [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(2): 420–433.
- [10] ZHANG Y, LI Z, LAN Z. Silencing UNC5B antisense lncRNA 1 represses growth and metastasis of human Colon cancer cells via raising miR-622 [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1): 60–67.
- [11] MCTAVISH C J, BÉRUBÉ-JANZEN W, WANG X, et al. Regulation of c-raf stability through the CTLH complex [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(4): 934.
- [12] DAS S, HAQ S, RAMAKRISHNA S. Scaffolding protein RanBPM and its interactions in diverse signaling pathways in health and disease [J]. *Discov Med*, 2018, 25(138): 177–194.
- [13] WEI J D, JANG J H, KIM J H. RanBPM inhibits BLT2-mediated IL-8 production and invasiveness in aggressive breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 483(1): 305–311.
- [14] LI D D, DENG L, HU S Y, et al. SH3BGRL2 exerts a dual function in breast cancer growth and metastasis and is regulated by TGF- β 1 [J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(4): 1238–1254.
- [15] HU Y M, LOU X L, LIU B Z, et al. TGF- β 1-regulated miR-3691-3p targets *E2F3* and *PRDM1* to inhibit prostate cancer progression [J]. *Asian J Androl*, 2021, 23(2): 188–196.
- [16] TAN M L, PARKINSON E K, YAP L F, et al. Autophagy is deregulated in cancer-associated fibroblasts from oral cancer and is stimulated during the induction of fibroblast senescence by TGF- β 1 [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 584.

[收稿日期] 2024-01-16

李红伟,徐若颖,周宁,等. 盐益智仁-盐小茴香药对止泻活性部位筛选及“谱效”关系研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 48-59.

Li HW, Xu RY, Zhou N, et al. Screening of active antidiarrheal components and study of the “spectrum-effect” relationship of salt-processed *Alpiniae oxyphyllae* Fructus-Foeniculi Fructus medicines [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 48-59.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.006

盐益智仁-盐小茴香药对止泻活性部位筛选 及“谱效”关系研究

李红伟^{1,2,3}, 徐若颖¹, 周宁¹, 曹彦刚¹, 田连起¹, 石延榜¹, 李凯^{1,2,3*}

(1.河南中医药大学,郑州 450046;2.豫药全产业链研发河南省协同创新中心,郑州 450046;
3.河南省中药特色炮制技术工程研究中心,郑州 450046)

【摘要】 目的 筛选盐益智仁-盐小茴香药对(YZYH)止泻活性部位,并通过“谱效”关系研究推测其药效物质基础和质量标志物。方法 制备大鼠脾肾阳虚泄泻模型,测定盐益智仁-盐小茴香药对石油醚(YZYH-L)、乙酸乙酯(YZYH-M)、水(YZYH-H)3 部位药效指标,包括体重、肛温、腹泻潜伏期(diarrhea incubation period, DIP)、腹泻指数(diarrheal index, DI)等行为学指标及一氧化氮合成酶(nitric oxide synthetase, NOS)、环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)、磷酸肌酸激酶(creatine phosphate kinase, CPK)等生化指标;建立不同部位高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)图谱,采用灰色关联法分析各部位化学成分与止泻药效指标间的“谱效”关系。结果 与空白对照组大鼠相比,15 d 后,模型组大鼠出现泄泻证主症关键病理指标—水样便,同时,伴随食后腹胀、食欲不振和弓背等脾阳和肾阳虚泄泻的次症典型特征;给与治疗药物后,泄泻主症和次症均有不同程度的改善,其中阳性药、YZYH-M 部位第 28 天后泄泻模型大鼠关键指标 DIP 极显著延长($P<0.01$)、DI 极显著降低($P<0.01$),以及脾、肾阳虚泄泻的次症典型特征代表性指标体重、24 h 摄食、饮水量、肛温和血清生化指标 NOS、cGMP、CPK 等活性的调节作用均较其它给药组好;“谱效”关系研究表明茴香醛、4 号色谱峰等成分与 DIP、DI、NOS、cGMP、CPK 5 个药效指标的关联度重要。结论 YZYH-M 部位为药对止泻活性部位,其作用机制与抑制胃肠功能亢进和调节机体能量代谢与免疫相关;茴香醛及 4 号峰作为药对的质量标志物。

【关键词】 盐益智仁-盐小茴香药对;止泻作用;活性部位;“谱效”关系;灰色关联法;茴香醛

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0048-12

Screening of active antidiarrheal components and study of the “spectrum-effect” relationship of salt-processed *Alpiniae oxyphyllae* Fructus-Foeniculi Fructus medicines

LI Hongwei^{1,2,3}, XU Ruoying¹, ZHOU Ning¹, CAO Yangang¹, TIAN Lianqi¹, SHI Yanbang¹, LI Kai^{1,2,3*}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry Chain of Yu-Yao, Henan Province, Zhengzhou 450046. 3. Henan Research Center for Special Processing Technology of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

【基金项目】 河南省科技攻关(232102311214,242102310542);河南省科技研发计划联合基金(优势学科培育类)项目(232301420073)。

【作者简介】 李红伟(1979—),男,副教授,硕士生导师,研究方向:中药炮制机理及饮片标准化研究。E-mail:lh20130819@126.com

【通信作者】 李凯(1982—),男,教授,博士生导师,研究方向:中药炮制机理及饮片标准化研究。E-mail:cpulikai@163.com

[Abstract] Objective To screen the active antidiarrheal components of salt-processed *Alpiniae oxyphyllae* Fructus-Foeniculi Fructus medicines (YZYH) and investigate its pharmacological basis and quality markers by examining its “spectrum-effect” relationship. **Methods** A spleen and kidney yang deficiency model of diarrhea was established in rats. The pharmacodynamic indexes of ZYH in petroleum ether, ethyl acetate, and water fractions were measured, including behavioral indicators such as body weight, anal temperature, diarrhea incubation period (DIP), diarrhea index (DI), and biochemical indicators such as nitric oxide synthase (NOS), cGMP, and creatinine phosphokinase (CPK). We analyzed the components of ZYH by high performance liquid chromatography, and analyzed the “spectrum-effect” relationship between the chemical components and the antidiarrheal efficacy indicators using the grey correlation method. **Results** Compared with the blank control group, rats in the model group developed watery stools after 15 days, which was the key pathological index of the main syndrome of diarrhea. Rats in the model group also developed abdominal distension, loss of appetite, and back arching, as secondary symptoms of spleen and kidney yang deficiency diarrhea. Administration of the therapeutic drugs improved both the main and secondary symptoms of diarrhea. The positive drug and ZYH-M significantly prolonged DIP ($P<0.01$) and decreased DI ($P<0.01$) after 28 days. These key indexes of diarrhea, as well as body mass, 24 h food intake, water intake, anal temperature, and the serum biochemical indexes NOS, cGMP, CPK were all improved in the positive drug and ZYH-M groups. Examination of the spectral effect relationship showed that anisaldehyde, chromatographic peak 4, and other components were correlated with the pharmacodynamic indexes of DIP, DI, NOS, cGMP, and CPK. **Conclusions** The ethyl acetate fraction was the active antidiarrheal fraction of salt-processed *Alpiniae oxyphyllae* Fructus-Foeniculi Fructus medicines. It acts by inhibiting gastrointestinal hyperfunction, regulating energy metabolism and immunity. Ingredients such as anisaldehyde and peak 4 served as quality indicators for its antidiarrheal effect.

[Keywords] salt-processed *Alpiniae oxyphyllae* Fructus-Foeniculi Fructus medicines; antidiarrheal effect; active site; “spectrum-effect” relationship; grey correlation method; anisaldehyde

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

泄泻是排便频率增加,大便稀溏或排出未消化食物,甚至泻出水样便为主症的病证,是中医常见疾病,中医辨证治疗常常取得较好疗效^[1]。中医认为脾肾阳虚为最常见证型,缘由患者长期饮食不节,或因年老病久迁延,脾胃受损,日久伤肾,命门火衰,脾失温煦,水谷不化,运化无权,则发为泄泻,治疗以温肾健脾、固涩止泻为法,中医临床治疗常以补骨脂和肉豆蔻药对为主方加减配伍,但补骨脂“性本大燥,毒”,肉豆蔻“辛香颇动恶心,服之欲吐”,同时,现代临床应用发现补骨脂存在诸多风险,能引起过敏、皮肤毒性及光敏等症状^[2];肉豆蔻有拟精神活性、低血压和心动过速等毒副反应^[3],故二者临床应用为历代中医药学家所忌憚。团队长期致力于盐炙对补骨脂-肉豆蔻药对治疗脾肾阳虚泄泻研究,在此基础上,挖掘古今中医药文献,结合现代药效学研究,筛选出安全性高,且可显著改善脾肾阳虚泄泻大鼠病理状态的盐益智仁-盐小茴香药对 (YZYH)^[4-5]。

YZYH 用于治疗脾肾阳虚泄泻,可见于清代《医略六书》载“椒朴丸”方,前期药理学研究明确了 ZYH 可显著改善脾肾阳虚泄泻大鼠的病理指标,但药对的活性部位、物质基础和质量标志物还不清

楚,因此,本研究利用 HPLC 图谱技术,通过药效学研究筛选 ZYH 止泻活性部位,采用灰色关联法研究其药效物质基础和质量标志物,为 ZYH 的临床应用提供科学支撑。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠,雄性,145 只,6 周龄,体重 190~230 g,购于济南朋悦实验动物繁育有限公司 [SCXK(鲁)2019-0003]。动物饲养于河南中医药大学 SPF 级动物室 [SYXK(豫)2020-0004],动物室温度(23±4)℃,相对湿度(45±5)%,光照周期为明/暗 12 h/12 h。动物实验研究由河南中医药大学实验动物伦理委员会审批同意 (DWLLGZR2022 02193),实验动物按 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

食盐 (批号 C201912280211,纯度≥99.1%),中盐长江盐化有限责任公司;圆柚酮 (批号 DST210710-254,GC≥97%),德思特生物技术有限公司;芦丁 (批号 MUST-12040302,纯度≥98%),成都曼思特生物科技有限公司;杨牙黄素 (批号 PRF21051005,HPLC≥98%),成都普瑞法科技开发

有限公司;反式茴香脑(批号 Y24N6S6391,纯度 $\geq 98\%$)、白杨素(批号 X24O6C4947, HPLC $\geq 98\%$)、茴香醛(批号 H04J10Z78823, HPLC $\geq 98\%$)均购自上海源叶生物科技有限公司;氢化可的松注射液(批号 2106203),国药集团容生制药有限公司;四神丸(批号 20201101),山西华康药业股份有限公司;胃泌素(GAS)、胃动素(MTL)、环磷酸鸟苷(cGMP)、一氧化氮合成酶(NOS)、磷酸肌酸激酶(CPK)ELISA 试剂盒(批号 202112),江苏酶免实业有限公司;乳酸脱氢酶(LDH,批号 20220119)、琥珀酸脱氢酶(SDH,批号 20220216)、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶(批号 20220114)、 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶(批号 20220111)试剂盒,索莱宝生化试剂盒事业部;甲醇、甲酸、乙腈均为色谱纯,赛默飞世尔科技有限公司。

益智(批号 210406)、小茴香(批号 210406)及番泻叶(批号 210403)均购自河南省庄霖农业科技有限公司,经河南中医药大学付钰副教授分别鉴定为姜科植物益智 *A. oxyphylla* Miq.、伞形科植物茴香 *F. vulgare* Mill. 的干燥成熟果实及豆科植物狭叶番泻 *Cassia angustifolia* Vahl. 的干燥小叶。盐益智仁、盐小茴香分别按照前期盐炙工艺优化实验结果制备,盐益智仁:取净益智仁,用 20% 的食盐水(100 kg 益智仁用食盐 2 kg)拌匀,闷润 5 h,置炒制容器内,255℃炒制 9 min,出锅,放凉;盐小茴香按照参考文献^[6]制备。

Agilent 1260 型高效液相色谱仪, PDA (photo-diode array) 检测器,美国安捷伦科技有限公司;GTR16-2 型高速冷冻离心机,北京时代北利离心机有限公司;BT25S 型十万分之一电子分析天平,赛多利斯科学仪器有限公司;EPOCH 酶标仪,美国 BioTek Instruments, Inc.。

1.3 实验方法

1.3.1 受试药液制备

将盐益智仁、盐小茴香捣碎,过 1 号药典筛。分别取盐益智仁、盐小茴香粉末各 400 g,按参考文献^[5]制备 ZYH 水煎液,并于 45℃真空减压浓缩至适量体积,加入等体积石油醚反复萃取,至萃取液无色,萃取液于 45℃真空减压浓缩至浸膏,于 60℃真空干燥箱中干燥,得 ZYH-L 部位;石油醚萃取后剩余部分,加入等体积乙酸乙酯反复萃取至萃取液无色,回收溶剂,浓缩至浸膏,于 70℃真空干燥,得 ZYH-M 部位;萃取后剩余部位水浴蒸干得到

ZYH-H 部位。以上 ZYH 各萃取部位均用含 0.1%聚山梨酯-80 的水溶解至 0.60 g/mL(按生药计)^[5]。

1.3.2 四神丸混悬液、番泻叶水煎液制备

取适量四神丸,打粉,过 6 号筛,加水均匀混合配制得四神丸混悬液(0.2 g/mL)。

取番泻叶适量,浸泡 30 min,加水煮沸 10 min,用 2 层纱布滤过,滤液于 45℃下减压浓缩至生药质量浓度 1 g/mL 的番泻叶水煎液^[5]。

1.3.3 分组、造模及给药

SD 大鼠适应性喂养 3 d 后,随机分为 6 组,每组 9 只,分别为空白对照组、模型组、阳性药组、ZYH-L 组、ZYH-M 组、ZYH-H 组,除空白对照组外,其它各组大鼠每天上午灌胃给予氢化可的松注射液(15.0 mg/kg),连续 14 d 相继出现软稀便,以及肾虚泄泻的次症典型特征(脐腹冷痛—弓背表现),表明模型出现肾虚,并从第 15 天开始每天上午灌胃冰番泻叶水煎液(10.0 g/kg),连续 21 d 出现溏泄,且部分大鼠有不同程度的脾胃虚弱泄泻次症典型特征,表现为食后腹胀、食欲不振,甚至脱肛情况,表明模型出现脾阳虚特征,空白对照组给予同等体积纯化水^[5]。

除空白对照组和模型组外,其余各给药组从第 15 天开始灌胃给药,阳性药组给予四神丸混悬液(2.0 g/kg),其余 3 组按生药 6.0 g/kg 剂量分别给药,连续给药 21 d,空白对照组和模型组给予等体积纯化水。

1.3.4 指标检测

(1)大鼠体重、摄食量、饮水量、肛温

实验期间每 7 d 统计大鼠体重、24 h 摄食量、24 h 饮水量、肛温。

(2)DIP、DI

第 15、21、28 和 35 天,从给完番泻叶水煎剂后开始计时,至出现稀便或黏液便之间的时间为腹泻潜伏期时间,连续观察 5 h。

腹泻指数 = 稀便率 $\times$ 平均稀便级。稀便率 = 稀便数/粪便总数 $\times 100\%$,稀便级为稀便污染的滤纸所形成的污迹直径定级^[6]。大鼠给药后更换滤纸,连续观察给药后 3 h 内的排便情况,计算腹泻指数。

(3)生化指标检测

按 ELISA 试剂盒说明书操作,检测各组大鼠血清 MTL、GAS、NOS、cGMP、CPK 水平;取各组大鼠肝组织按试剂盒检测 LDH、SDH、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+} -$

Mg²⁺-ATPase 活性。

1.3.5 HPLC 图谱建立

(1) 对照品溶液制备

分别精密称取圆柚酮、杨牙黄素、白杨素、反式茴香脑、茴香醛、芦丁适量,加甲醇溶解并定容至 5 mL 容量瓶中,得质量浓度分别为 0.830、0.520、1.065、2.000、2.000、0.700 mg/mL 的单一对照品储备液,再分别精密量取上述单一对照品储备液适量至 5 mL 容量瓶中,甲醇稀释至刻度,得混合对照品母液,将混合对照品母液逐级稀释,得一系列不同质量浓度的混合对照品溶液,待测。

(2) 供试品溶液制备

将盐益智仁、盐小茴香捣碎,过 1 号药典筛。分别取盐益智仁与盐小茴香各 10 g,精密称定,按文献方法^[5]制备水煎液,减压浓缩至 100 mL,8000 r/min 离心 20 min,取上清液按“1.3.1”方法得到各部位干燥样品,分别加 50% 含水甲醇溶解并定容至 100 mL,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,即分别得到 ZYH 石油醚部位 (ZYH-L)、乙酸乙酯部位 (ZYH-M) 和水部位 (ZYH-H) 供试品溶液。每个样品均平行制备 3 份。

(3) 色谱条件

色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为 A: 乙腈-B: 0.1% 甲酸水,梯度洗脱条件: 0~20 min, 95%~94% B; 20~34 min, 94%~92% B; 34~40 min, 92%~90% B; 40~42 min, 90%~80% B; 42~72 min, 80%~60% B; 72~77 min, 60%~25% B; 77~80 min, 25%~21% B; 80~85 min, 21% B; 85~98 min, 21%~95% B; 98~100 min, 95% B; 流速 0.8 mL/min; 检测波长 254 nm; 进样量 2.0 μL; 柱温 30 ℃。

(4) 方法学考察

对圆柚酮、杨牙黄素、白杨素、反式茴香脑、茴香醛、芦丁的线性关系、专属性、精密度、重复性、稳定性和加样回收率进行考察,考察结果用相对标准偏差 (RSD) 表示。

1.4 统计学方法

采用灰色关联法,将分析样品分别与其脾肾阳虚泄泻指标 DIP、DI、NOS、cGMP、CPK 相关联,计算关联度^[7]。药理学指标评价应用 SPSS 22.0 软件对数据进行处理,检测结果用平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。灰色关联度评价规则:应用 SPSS 22.0

软件对数据进行处理,检测结果高于 0.700 为重要因素,处于 0.500~0.700 之间为比较重要因素,其余为不重要因素^[8]。

2 结果

2.1 止泻作用考察

2.1.1 大鼠症状与体征情况

与空白对照组大鼠相比,造模 7 d 后,模型组及各给药组大鼠反应迟钝、精神萎靡、毛发暗淡变黄,出现蜷缩弓背等情况;造模 15 d 后,模型组大鼠出现泄泻证主症的关键病理指标—水样便,同时,伴随脾胃虚弱泄泻次症典型特征——食后腹胀、食欲不振;肾阳虚泄泻的次症典型特征脐腹冷痛—弓背等,表明造模成功^[5]。

各给药组大鼠给药后,阳性药组、ZYH-M 组大鼠腹泄症状明显减轻,其它给药组大鼠部分略有减轻;所有给药组大鼠弓背、食欲等脾、肾阳虚泄泻次症典型特征也得到改善。

2.1.2 体重、24 h 摄食、饮水量

脾胃虚弱泄泻次症典型特征表现为食后腹胀、食欲不振,因此,体重、24 h 摄食量、饮水量变化可衡量脾阳虚运化失司、纳差情况^[5,9]。与空白对照组大鼠相比,模型组大鼠第 7 天开始摄食量明显下降,第 21 天开始饮水量明显升高,体重显著降低 ($P < 0.05$),表明脾阳虚运化失司,造模兼有脾阳虚特征;与模型组大鼠相比,各给药组大鼠 21 d 后体重均呈增高趋势,其中阳性药组、ZYH-M 组大鼠给药后摄食量明显增加,ZYH-M 组饮水量明显降低,体重显著增高 ($P < 0.01$),表明 ZYH-M 部位明显改善模型大鼠的脾阳虚病理指标。体重结果见表 1, 24 h 摄食、饮水量见表 2。

2.1.3 DIP、DI

依据《中药新药临床研究指导原则》中 DIP、DI 为泄泻证的关键检测指标,除空白对照组外,其它各组大鼠第 15、21、28、35 天灌胃番泻叶后均出现泄泻现象;与模型组相比,给药后,阳性药组、ZYH-M 组大鼠第 28 天后 DIP 极显著延长 ($P < 0.01$)、DI 极显著降低 ($P < 0.01$),说明 ZYH-M 部位为止泻的活性部位。结果见表 3。

2.1.4 肛温

肾阳虚证常伴有体温下降次症,肛温可反映肾阳虚形寒肢冷情况^[10],与空白对照组大鼠相比,模型组大鼠第 7 天开始肛温极显著下降 ($P < 0.01$);与

模型组相比,给药后阳性药组、YZYH-M 组大鼠第 28 ~35 天肛温显著升高,说明 YZYH-M 部位显著改善模型大鼠的肾阳虚泄泻次症病理指标。见表 4。

2. 1. 5 生化指标

CPK 是肌肉中一种特异性酶,其活性变化可直接影响肌肉能量来源,为脾虚证指标,脾阳虚模型

大鼠血清 CPK 活性低于正常大鼠^[11]。与空白对照组大鼠相比,模型组大鼠血清 CPK 水平显著降低($P<0.01$);给药后,与模型组相比,阳性药组、YZYH-M 组大鼠血清 CPK 水平显著升高($P<0.01$),进一步说明 YZYH-M 部位明显改善模型大鼠的脾阳虚病理指标。

表 1 各组大鼠平均体重变化情况($\bar{x}\pm s,n=9$)
Table 1 Average body weight of rats in each group

组别 Groups	体重/g Body weight					
	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
空白对照 Blank control	238.67±7.57	256.44±11.82	284.78±11.64	333.89±13.52	346.67±14.65	368.89±16.76
模型 Model	232.00±8.56	244.89±10.25 [*]	243.33±21.17 ^{**}	240.67±18.74 ^{**}	250.33±17.95 ^{**}	266.00±16.73 ^{**}
阳性药 Positive drug	234.13±6.22	239.78±15.00	240.89±25.77	259.33±17.68 ^{##}	271.89±19.34 ^{##}	314.00±19.10 ^{##}
YZYH-L	236.78±8.14	244.22±11.02	254.44±16.71	247.89±10.95	252.56±11.09	282.11±14.38 [#]
YZYH-M	240.22±7.29	241.56±8.85	260.44±13.54 [#]	250.00±15.22	280.56±15.39 ^{##}	333.67±17.56 ^{##}
YZYH-H	235.11±7.22	244.00±12.43	250.56±15.16	251.78±12.00	263.33±11.49	279.44±14.54

注:与空白对照组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the blank control group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

表 2 各组大鼠 24 h 平均摄食、饮水量变化情况($\bar{x}\pm s,n=9$)
Table 2 24 h average food and water intake of rats in each group

组别 Groups	24 h 摄食量/g Food intake in 24 h						24 h 饮水量/g Water intake in 24 h					
	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
空白对照 Blank control	32.21	29.39	30.00	27.51	35.17	37.29	53.44	50.33	41.83	45.85	50.65	53.06
模型 Model	27.03	16.52	15.19	15.55	17.69	18.33	38.25	31.42	40.00	61.58	73.79	78.81
阳性药 Positive drug	29.98	19.31	14.46	17.83	22.52	27.89	48.71	37.02	32.90	66.41	63.51	63.09
YZYH-L	27.98	18.84	16.02	16.91	20.28	19.75	32.52	33.37	39.99	56.71	67.65	67.50
YZYH-M	28.38	20.65	15.14	19.96	23.59	31.94	41.84	30.36	28.82	61.14	57.40	51.87
YZYH-H	27.25	20.52	14.50	18.18	19.11	22.04	29.35	32.07	35.68	53.63	69.59	71.37

表 3 各组大鼠 DIP、DI 变化情况($\bar{x}\pm s,n=9$)
Table 3 Diarrhea incubation period and Diarrhea index of rats in each group

组别 Groups	DIP/min				DI			
	15 d	21 d	28 d	35 d	15 d	21 d	28 d	35 d
空白对照 Blank control	/	/	/	/	/	/	/	/
模型 Model	148.00±15.68	138.00±11.94	167.89±9.78	189.56±13.46	1.20±0.25	1.29±0.30	1.28±0.15	1.11±0.26
阳性药 Positive drug	149.22±13.59	156.44±9.83 ^{##}	196.22±13.59 ^{##}	223.67±12.51 ^{##}	1.15±0.26	0.97±0.19 [#]	0.67±0.16 ^{##}	0.48±0.17 ^{##}
YZYH-L	156.56±18.76	139.56±9.46	177.00±12.83	197.44±10.30	1.15±0.39	1.06±0.28	1.11±0.25	1.13±0.20
YZYH-M	155.78±10.95	147.00±14.53	199.56±18.08 ^{##}	236.11±22.87 ^{##}	1.43±0.56	1.17±0.17	0.59±0.10 ^{##}	0.42±0.23 ^{##}
YZYH-H	151.78±18.12	140.78±8.42	177.67±17.31	201.78±15.47 [#]	1.17±0.41	1.04±0.33	1.10±0.29	0.87±0.23 [#]

注:与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

下丘脑 NOS/cGMP 信号传导系统作用增强(即肾阳虚使 NOS 活性增强,催化 L-精氨酸生成过量的 NO,导致 cGMP 生成量增大)是肾阳虚证的主要表现之一^[12]。与空白对照组大鼠相比,模型组大鼠血清 NOS、cGMP 水平显著升高($P<0.01$);给药后,与模型组相比,阳性药组、YZYH-M 组大鼠血清 NOS、cGMP 水平显著降低($P<0.01$),进一步说明 YZYH-M 部位能够明显改善模型大鼠的肾阳虚病理指标。

脾肾阳虚泄泻证伴随有胃肠运动亢进和能量

代谢紊乱,表征能量代谢指标常以肝组织 LDH、SDH、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 活性进行评价^[12]。其中, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 也是肾功能的重要表征指标之一^[9]。与空白对照组大鼠相比,模型组大鼠肝组织 LDH、SDH、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 活性显著降低;给药后,与模型组相比,阳性药组、YZYH-M 组大鼠肝组织 LDH、SDH、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 活性均显著升高($P<0.01$),MTL、GAS 水平极显著降低($P<0.01$),从而抑制胃肠功能亢进。结果见表 5 和表 6。

表 4 各组大鼠肛温变化情况($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 4 Rat anal temperature in each group

组别 Groups	肛温/℃ Anal temperature					
	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
空白对照 Blank control	37.66±0.21	37.52±0.14	37.64±0.11	37.50±0.07	37.69±0.18	37.71±0.16
模型 Model	37.56±0.18	35.41±0.80**	34.59±1.12**	35.46±1.08**	35.44±0.77**	36.07±0.60**
阳性药 Positive drug	37.60±0.19	36.06±0.56	34.70±1.36	35.52±0.70	37.09±0.48 [#]	37.37±0.37 ^{##}
YZYH-L	37.66±0.22	35.53±0.91	35.03±1.30	35.14±0.75	36.57±0.65	36.79±0.39
YZYH-M	37.53±0.14	35.82±0.74	35.00±0.71	35.88±0.75	37.13±0.73 [#]	37.39±0.33 ^{##}
YZYH-H	37.58±0.17	35.74±1.06	35.03±1.33	35.48±0.72	36.89±0.66	37.11±0.72

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the blank control group, ** $P<0.01$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

表 5 各组大鼠血清 NOS、cGMP、CPK 水平($\bar{x}\pm s, n=9$)
Table 5 Detection of NOS, cGMP and CPK in serum of rats in each group

组别 Groups	NOS/($\mu\text{mol/L}$)	cGMP/(nmol/L)	CPK/(pg/mL)	MTL/(pg/mL)	GAS/(pg/mL)
空白对照 Blank control	155.82±15.00	68.28±4.52	138.50±4.89	774.19±21.29	604.38±29.11
模型 Model	178.26±11.36**	78.58±8.42**	127.00±9.17**	843.94±21.81**	687.88±36.76**
阳性药 Positive drug	146.04±10.12 ^{##}	69.78±6.24 [#]	137.26±7.37 ^{##}	795.05±22.29 ^{##}	626.79±33.53 ^{##}
YZYH-L	169.11±17.58	76.06±6.90	129.19±9.25	819.59±22.71	685.71±29.89
YZYH-M	143.19±11.46 ^{##}	63.14±6.93 ^{##}	148.88±9.30 ^{##}	769.70±22.32 ^{##}	581.61±33.48 ^{##}
YZYH-H	162.56±18.69 [#]	77.92±8.72	134.27±10.31	814.69±30.69 [#]	676.24±35.22

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the blank control group, ** $P<0.01$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

表 6 各组大鼠肝组织 LDH、SDH、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 活性($\bar{x}\pm s, n=9$)
Table 6 Activities of LDH, SDH, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ in liver tissues of rats in each group

组别 Groups	LDH/(U/mg)	SDH/(U/g)	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}/(\text{U/g})$	$\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}/(\text{U/g})$
空白对照 Blank control	179.87±4.22	7599.26±782.78	1098.26±67.90	1269.50±63.56
模型 Model	161.03±8.96**	6067.94±684.94**	943.51±58.50**	1077.63±92.72**
阳性药 Positive drug	175.62±7.36 ^{##}	7435.35±988.03 ^{##}	1090.49±88.15 ^{##}	1203.18±121.16 [#]
YZYH-L	164.95±7.17	6565.95±897.55	1007.25±84.84	1055.20±123.52
YZYH-M	178.70±11.26 ^{##}	8061.57±637.51 ^{##}	1183.11±125.73 ^{##}	1307.02±96.64 ^{##}
YZYH-H	164.24±10.39	6577.31±1392.90	977.23±130.77	1033.63±143.93

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the blank control group, ** $P<0.01$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

2.2 HPLC 图谱

2.2.1 方法学考察

圆柚酮、杨牙黄素、白杨素、反式茴香脑、茴香醛、芦丁专属性考察色谱图见图 1,结果显示各组分分离度良好,无干扰;各组分线性关系、精密度、稳定性、重复性、加样回收率考察结果见表 7,结果显示该方法良好。

2.2.2 YZYH 各部位共有峰信息

分别将 YZYH 各部位供试品溶液 HPLC 谱图导

入“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”中,设置参照图谱,时间窗宽度均设为 0.1,按中位数法生成对照图谱,并进行多点校正和全谱峰匹配。得到 YZYH 各部位 3 个平行样品共有峰,共有峰信息见表 8,YZYH 不同部位 HPLC 图谱叠加图见图 2。由表 8 可知,YZYH 石油醚部位、乙酸乙酯部位、水部位分别有 8、23、19 个共有峰,经对照品比对鉴定 19、28、29、31、32、33 号峰分别为芦丁、茴香醛、白杨素、反式茴香脑、杨牙黄素、圆柚酮,各部位样品 6 种成分含量见表 8。

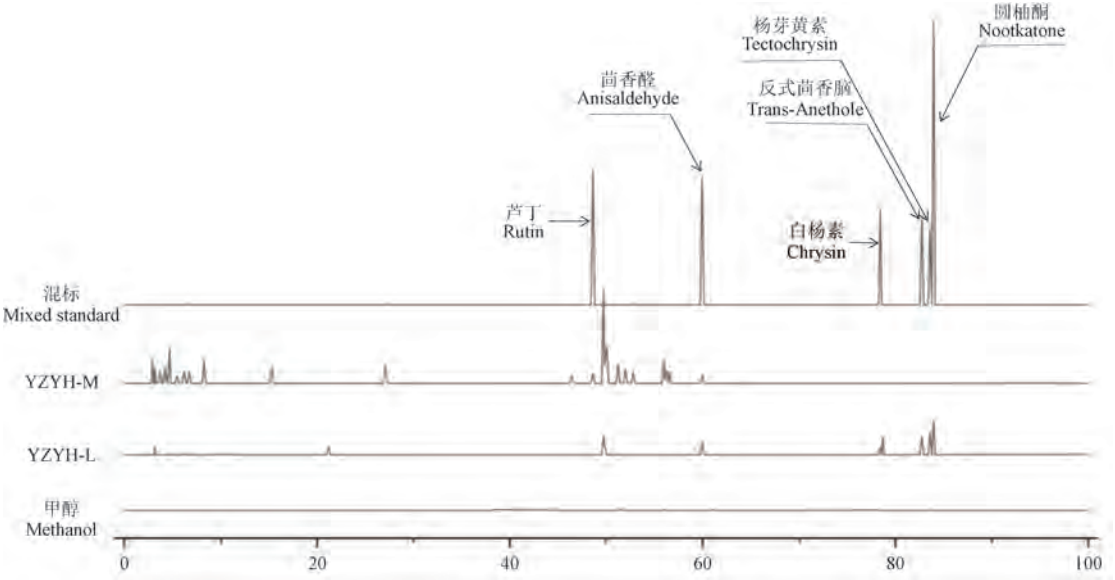


图 1 专属性考察结果
Figure 1 Specific investigation results

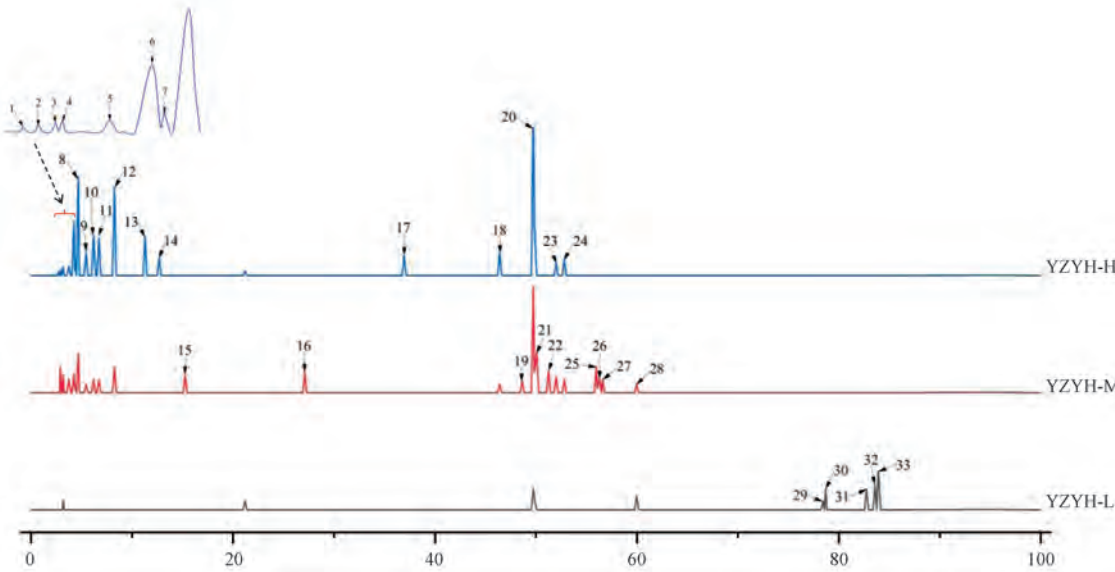


图 2 YZYH 不同部位供试品溶液 HPLC 图谱叠加图
Figure 2 Overlay of HPLC chromatograms of different fraction of YZYH

表 7 方法学考察结果
Table 7 Methodological investigation results

成分 Compound	回归方程 Regression equations	r	RSD(<i>n</i> = 6) / %				
			线性范围/(μg/mL) Linear range	精密度 Precision	稳定性 Stability	重复性 Repeatability	加样回收率 Recovery
圆柚酮 Nootkatone	Y = 4133. 9X+29. 669	0. 9997	5. 19~166. 00	0. 51	2. 65	2. 21	2. 80
杨牙黄素 Tectochrysin	Y = 7403. 9X-2. 0908	0. 9995	3. 25~26. 00	1. 13	1. 70	1. 71	2. 65
白杨素 Chrysin	Y = 11870X-10. 838	0. 9990	1. 96~21. 30	1. 05	2. 99	1. 69	3. 59
反式茴香脑 Trans-Anethole	Y = 19705X+19. 433	0. 9999	0. 31~10. 00	2. 35	2. 53	2. 50	4. 77
茴香醛 Anisaldehyde	Y = 7997. 4X+3. 2563	0. 9998	1. 40~40. 00	0. 96	0. 89	1. 99	2. 40
芦丁 Rutin	Y = 4872. 9X+0. 4389	0. 9998	3. 50~70. 00	2. 05	1. 43	0. 16	1. 48

表 8 YZYH 各部位样品共有峰信息($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 8 Common peak information of samples from different fraction of YZYH

峰号 Chromatographic peak	RT/min	峰面积/(mAU * S)Peak area		
		YZYH-L	YZYH-M	YZYH-H
1	2. 720	—	—	13. 412±5. 839
2	2. 903	—	55. 413±2. 787	16. 063±6. 063
3	3. 101	—	—	19. 077±3. 368
4	3. 185	19. 959±0. 956	37. 563±3. 376	20. 800±2. 406
5	3. 735	—	27. 145±2. 791	20. 235±1. 298
6	4. 240	—	35. 600±5. 942	125. 878±5. 168
7	4. 388	—	13. 932±0. 514	38. 111±3. 889
8	4. 668	—	77. 607±8. 622	229. 966±25. 706
9	5. 444	—	16. 706±1. 311	60. 093±7. 073
10	6. 183	—	23. 548±6. 115	99. 470±9. 757
11	6. 716	—	22. 432±6. 231	94. 145±9. 216
12	8. 255	—	49. 888±6. 671	214. 186±16. 593
13	11. 287	—	—	91. 382±5. 774
14	12. 682	—	—	42. 877±4. 072
15	15. 268	—	37. 660±3. 531	—
16	27. 108	—	46. 547±2. 184	—
17	36. 965	—	—	51. 177±5. 037
18	46. 389	—	17. 061±2. 080	43. 812±6. 961
19	48. 617	—	26. 569±1. 562	—
20	49. 728	38. 135±10. 180	209. 870±42. 047	441. 318±43. 637
21	50. 067	—	86. 187±6. 624	—
22	51. 230	—	49. 599±2. 985	—
23	51. 985	—	36. 308±5. 938	29. 829±2. 179
24	52. 795	—	29. 004±0. 752	43. 341±6. 050
25	55. 967	—	59. 197±1. 821	—
26	56. 228	—	32. 810±4. 243	—
27	56. 587	—	32. 472±4. 344	—
28	59. 958	31. 916±2. 406	23. 454±5. 038	—
29	78. 429	17. 569±0. 582	—	—
30	78. 684	44. 584±1. 501	—	—
31	82. 731	53. 396±3. 116	—	—
32	83. 570	52. 786±1. 008	—	—
33	83. 904	82. 900±7. 778	—	—

注: “—”表示样品中未检测到该信号。
Note. “—” indicates that the signal is not detected in the sample.

表 9 YZYH 各部位 6 种成分含量($\bar{x}\pm s$, $\mu\text{g/g}$, $n=3$)
Table 9 Content of 6 components in each fraction of YZYH

成分 Compound	YZYH-L	YZYH-M	YZYH-H
芦丁 Rutin	—	26. 81±1. 60	—
茴香醛 Anisaldehyde	17. 11±1. 01	10. 21±0. 05	—
白杨素 Chrysin	12. 46±0. 24	—	—
反式茴香脑 Trans-Anethole	7. 93±1. 01	—	—
杨牙黄素 Tectochrysin	38. 88±1. 71	—	—
圆柚酮 Nootkatone	64. 38±9. 41	—	—

注：“—”表示样品中未检测到该信号。
Note. “—” indicates that the signal is not detected in the sample.

表 10 各共有峰与 DIP、DI、NOS、cGMP、CPK 的灰色关联度

Table 10 Relevancy between each common peak and DIP, DI, NOS, cGMP, CPK

峰号 Chromatographic peak	RT/min	DIP		DI		NOS		cGMP		CPK	
		关联度 Correlation degree	排序 Order	关联度 Correlation degree	排序 Order	关联度 Correlation degree	排序 Order	关联度 Correlation degree	排序 Order	关联度 Correlation degree	排序 Order
1	2. 720	0. 601	24	0. 599	21	0. 594	16	0. 601	16	0. 601	18
2	2. 903	0. 710	9	0. 607	20	0. 673	15	0. 663	15	0. 712	9
3	3. 101	0. 590	25	0. 590	22	0. 585	22	0. 591	17	0. 591	25
4	3. 185	0. 904	1	0. 741	1	0. 842	1	0. 833	1	0. 901	1
5	3. 735	0. 760	6	0. 676	6	0. 729	5	0. 738	5	0. 763	5
6	4. 240	0. 683	11	0. 672	8	0. 694	10	0. 703	10	0. 688	11
7	4. 388	0. 711	8	0. 668	12	0. 727	6	0. 738	4	0. 717	8
8	4. 668	0. 702	10	0. 672	7	0. 716	9	0. 727	8	0. 708	10
9	5. 444	0. 682	12	0. 682	4	0. 693	11	0. 702	11	0. 687	12
10	6. 183	0. 669	14	0. 668	11	0. 677	13	0. 685	13	0. 673	14
11	6. 716	0. 670	13	0. 668	13	0. 678	12	0. 686	12	0. 674	13
12	8. 255	0. 667	15	0. 676	5	0. 674	14	0. 683	14	0. 671	15
13	11. 287	0. 588	28	0. 588	25	0. 583	25	0. 589	20	0. 589	28
14	12. 682	0. 589	27	0. 588	23	0. 583	23	0. 589	19	0. 590	26
15	15. 268	0. 607	18	0. 514	27	0. 569	28	0. 563	28	0. 601	19
16	27. 108	0. 607	22	0. 514	32	0. 569	32	0. 563	33	0. 600	23
17	36. 965	0. 589	26	0. 588	24	0. 583	24	0. 589	18	0. 590	27
18	46. 389	0. 719	7	0. 670	9	0. 732	4	0. 747	3	0. 727	7
芦丁 Rutin	48. 617	0. 607	21	0. 514	31	0. 569	31	0. 563	31	0. 600	22
20	49. 728	0. 763	4	0. 688	3	0. 752	2	0. 765	2	0. 772	3
21	50. 067	0. 607	19	0. 514	26	0. 569	29	0. 563	29	0. 601	20
22	51. 230	0. 607	20	0. 514	30	0. 569	30	0. 563	30	0. 600	21
23	51. 985	0. 761	5	0. 669	10	0. 725	8	0. 733	6	0. 762	6
24	52. 795	0. 775	2	0. 653	14	0. 726	7	0. 730	7	0. 774	2
25	55. 967	0. 607	23	0. 514	33	0. 569	33	0. 563	32	0. 600	24
26	56. 228	0. 608	17	0. 514	29	0. 569	27	0. 564	27	0. 601	17
27	56. 587	0. 608	16	0. 514	28	0. 570	26	0. 564	26	0. 601	16
茴香醛 Anisaldehyde	59. 958	0. 773	3	0. 702	2	0. 739	3	0. 723	9	0. 766	4
白杨素 Chrysin	78. 429	0. 586	33	0. 620	18	0. 591	21	0. 584	25	0. 583	33

2.3 YZYH 止泻作用“谱效”关系

DIP、DI、NOS、cGMP、CPK 指标与脾肾阳虚泄泻关系较为密切,故选择 YZYH-L、YZYH-M、YZYH-H 组大鼠第 35 天 DIP、DI 及血清 NOS、cGMP、CPK 水平为参考序列,YZYH 各部位 HPLC 图谱共有峰峰面积数据为比较序列进行灰度关联分析,结果见表 10。

关联度的大小反映因子的重要性,关联度越大,表明因子的作用越大,其评价也越好。本研究结果表明,关联度>0. 700 以上的化学成分种类以 YZYH-M 部位最多,进一步表明该部位为止泻活性部位。茴香醛与 4 号色谱峰与 5 个药效指标的关联度均>0. 7,说明二者与药对止泻作用密切相关。

续表10

峰号 Chromatographic peak	RT/min	DIP		DI		NOS		cGMP		CPK	
		关联度 Correlation degree	排序 Order	关联度 Correlation degree	排序 Order	关联度 Correlation degree	排序 Order	关联度 Correlation degree	排序 Order	关联度 Correlation degree	排序 Order
30	78.684	0.586	32	0.620	17	0.591	20	0.584	24	0.583	32
反式茴香脑 Trans-Anethole	82.731	0.586	30	0.622	15	0.592	17	0.585	21	0.583	30
杨芽黄素 Tectochrysin	83.570	0.586	31	0.620	19	0.591	19	0.584	23	0.583	31
圆柚酮 Nootkatone	83.904	0.587	29	0.620	16	0.592	18	0.584	22	0.583	29

3 讨论

3.1 模型评价与活性部位筛选

本研究脾肾阳虚泄泻大鼠模型采用“番泻叶+氢化可的松”复合法建立,造模 15 d 后,模型组大鼠出现水样便;21 d 后,模型组大鼠 DIP 明显缩短、DI 明显升高,均出现明显泄泻等宏观表征。

益智仁盐制前后水提物均能使番泻叶所致小鼠的 DIP 延长 ($P<0.05$),抑制家兔离体肠肌的收缩 ($P<0.01$),活性部位为脂溶性部位^[13];益智仁 95% 乙醇提取物和 90% 乙醇洗脱液均能显著对蓖麻油致急性腹泻、大黄诱导慢性腹泻和离体豚鼠回肠收缩的发病时间延迟,明显降低湿便率,对胃肠推进有显著的抑制作用^[14]。以上研究表明益智仁止泻的活性部位及药效物质基础的极性相对偏小,同时,进一步说明 YZYH-M 部位为止泻活性部位。

益智仁主治肾阳虚证,尤以肾虚遗尿、小便频数的多尿证见长,可显著改善缺血/再灌注诱导的急性肾功能衰竭(acute respiratory failure, ARF)下调所致的多尿证,其机制是通过恢复肾 $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPase}$ 的表达水平^[9]。益智仁通过介导胆碱能、肾上腺素能和组胺等受体,调节 NOS、MTL 和 GAS 等水平发挥止泻活性^[15];小茴香挥发油拮抗乙酰胆碱作用,缓解胃肠道痉挛^[14]。盐小茴香与盐补骨脂配伍,能有效缓解能量代谢紊乱病症—脂肪性腹泻、渗透性利尿、营养不良和体重减轻的症状^[4]。结合本实验对脾肾阳虚中脾阳虚、肾阳虚和能量代谢等指标的检测和分析,说明 YZYH-M 部位治疗通过脾肾阳虚泄泻的机制是通过调节模型大鼠的脾阳虚和肾阳虚指标,以及能量代谢指标来实现的。

3.2 “谱效”关系—药效物质基础及质量标志物

现有文献表明,益智仁止泻作用与其所含的二苯庚烷、倍半萜和黄酮类成分有关,其中黄酮类代

表性成分有杨芽黄素等,倍半萜类代表性成分为圆柚酮;杨芽黄素可减轻氯化氨甲酰胆碱引起十二指肠收缩,分子对接表明杨芽黄素对腹泻相关的钠氢交换蛋白 3 和水通道蛋白 4 表达具有较强的抑制作用^[16];小茴香盐炙后促进补骨脂-小茴香药对中黄酮类成分煎出,增强止泻作用,代表性成分芦丁^[13];以上研究表明,杨芽黄素、圆柚酮和芦丁可能是 YZYH 止泻的活性成分。同时,益智仁盐炙炮制过程中白杨素含量相对降低,圆柚酮含量呈上升趋势且小肠吸收增大,盐炙促进圆柚酮入血吸收,增加其生物利用度^[17-18];益智仁盐炙后缩泉丸的入血成分为杨芽黄素、白杨素、圆柚酮等^[19];此外,小茴香精油通过抑制转录因子(nuclear factor kappa B, NF- κ B)的表达来减轻醋酸诱导的大鼠结肠炎,酚类成分通过免疫调节和抗氧化特性对肠上皮细胞发挥保护作用^[20-21]。

本实验研究结果圆柚酮、杨芽黄素、白杨素、反式茴香脑、芦丁关联度在 0.560~0.620 范围内,表明以上成分在药对止泻活性中具有比较重要的作用。综上,YZYH-M 部位为 YZYH 治疗脾肾阳虚泄泻证的活性部位,其作用机制可能是通过调节 MTL、GAS 等胃肠肽类激素,抑制胃肠功能亢进,并调节机体能量代谢和免疫,以及细胞保护作用实现的。茴香醛及 4 号峰与其止泻作用的关联度较强,而圆柚酮、杨芽黄素、白杨素、反式茴香脑、芦丁也表现比较重要的关联性。但 4 号峰等代表性成分尚未鉴定出,还需进一步研究确定。

参考文献:

[1] 王楷, 侯雨君, 宋玮, 等. 泄泻中医证候动物模型研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 823-829.
WANG K, HOU Y J, SONG W, et al. Research progress on animal model construction and evaluation of different TCM syndromes of diarrhea [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29

- (6): 823-829.
- [2] 郭兆娟, 李品, 康倩君, 等. 补骨脂肝毒性的安全性分析及思考 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(5): 2616-2621.
GUO Z J, LI P, KANG Q J, et al. Safety analysis and consideration on hepatotoxicity of *Psoralea corylifolia* L [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(5): 2616-2621.
- [3] 范蒙蒙, 张雨, 李红伟, 等. 肉豆蔻曲代替麸煨肉豆蔻组成方新二神丸的止泻作用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(1): 48-57.
FAN M M, ZHANG Y, LI H W, et al. Study on the antidiarrheal effect of the new "Ershen pills" composed of nutmeg koji instead of bran stewed nutmeg [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(1): 48-57.
- [4] ZHOU N, LI Z, WANG J J, et al. Correlation analysis between extracts and endogenous metabolites to characterise the influence of salt-processing on compatibility mechanism of ' *Psoraleae Fructus* & *Foeniculi Fructus* ' [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 270: 113782.
- [5] 徐若颖, 豆市蓉, 曹彦刚, 等. 盐炙对益智仁-小茴香药对止泻作用的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(4): 351-355.
XU R Y, DOU S R, CAO Y G, et al. The effect of salt-processing on the antidiarrheal efficacy of *Alpiniae oxyphyllae Fructus*-*Foeniculi Fructus* medicines [J]. Chin J Hosp Pharm, 2023, 43(4): 351-355.
- [6] 李小雅, 朱佳源, 吴仪, 等. 泄泻肾阳亏虚证小鼠模型的建立与验证 [J]. 中医杂志, 2022, 63(14): 1368-1373.
LI X Y, ZHU J Y, WU Y, et al. Model building and validation of diarrhea mice with kidney-Yang depletion syndrome [J]. J Tradit Chin Med, 2022, 63(14): 1368-1373.
- [7] 毋启桐, 王金金, 杨安南, 等. 基于盐炙前后成分煎出差异与止泻作用相关性探讨补骨脂丸增效机制 [J]. 中草药, 2021, 52(21): 6493-6500.
WU Q T, WANG J J, YANG A N, et al. To explore synergistic mechanism of Buguzhi Pills based on correlation between antidiarrheal effect and difference of ingredients before and after salt processing [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(21): 6493-6500.
- [8] 时艳杰, 赵玥, 张颖, 等. 基于灰色关联分析方法对射干米泔水炮制品抑制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌谱-效关系的研究 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(8): 1882-1885.
SHI Y J, ZHAO Y, ZHANG Y, et al. Spectrum-activity relationships of Shegan (*Belamcanda chinensis*) Processing with Rice-washed Water Inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA) upon grey relational analysis [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2022, 33(8): 1882-1885.
- [9] KIM E J, LEE Y J, AHN Y M, et al. Renoprotective effect of *Alpiniae oxyphyllae Fructus* on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure [J]. Arch Pharm Res, 2013, 36(8): 1004-1012.
- [10] 张利棕, 方明笋, 杨伟吉, 等. Lewis 大鼠下丘脑中肾阳虚相关 mRNA 表达及超微结构观察 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(5): 511-515.
ZHANG L Z, FANG M S, YANG W J, et al. Changes of the mRNA expression of "kidney Yang deficiency"-related genes and ultrastructural observation of the hypothalamus in Lewis rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2016, 24(5): 511-515.
- [11] 王颖, 王辉, 郑小伟. 基于核磁共振技术的脾气虚证、脾阳虚证血浆代谢组学研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(8): 2270-2274.
WANG Y, WANG H, ZHENG X W. NMR-spectroscopy-based metabonomic study on plasma of rats with spleen-qi deficiency pattern and spleen-Yang deficiency pattern [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2013, 28(8): 2270-2274.
- [12] 潘新, 胡昌江, 耿媛媛, 等. 脾肾虚泄泻大鼠模型造模方法研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(23): 4658-4663.
PAN X, HU C J, GENG Y Y, et al. Research on building method of spleen kidney Yang deficiency diarrhea rats model [J]. China J Chin Mater Med, 2014, 39(23): 4658-4663.
- [13] 李兴华. 益智仁温脾止泻作用及盐炙对其影响的研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2009.
LI X H. Study on the effect of Yi Zhi Ren on warming the spleen and stopping diarrhea and the effect of salt baking on it [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2009.
- [14] 张思超, 安丽君, 钟佩茹, 等. 小茴香挥发油对小鼠胃排空和肠推进的影响 [J]. 天津中医药大学学报, 2019, 38(5): 473-477.
ZHANG S C, AN L J, ZHONG P R, et al. Effects of essential oil of fennel on gastric emptying and small bowel peristalsis in mice [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2019, 38(5): 473-477.
- [15] WANG S, ZHAO Y, ZHANG J, et al. Antidiarrheal effect of *Alpinia oxyphylla* Miq. (Zingiberaceae) in experimental mice and its possible mechanism of action [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 168: 182-190.
- [16] ZHANG J, WANG S, LI Y, et al. Anti-diarrheal constituents of *Alpinia oxyphylla* [J]. Fitoterapia, 2013, 89: 149-156.
- [17] 舒雪纯, 胡璇, 于福来, 等. HPLC 测定益智仁及其盐炙炮制品中白杨素和圆柚酮含量 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(10): 2231-2236.
SHU X C, HU X, YU F L, et al. Content determination of chrysin, nootkatone with Non-processed or Salt-processed alpiniae oxyphyllae fructus fruits by HPLC [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2019, 21(10): 2231-2236.
- [18] 吴珊珊, 李梦琪, 郑凯旋, 等. 益智仁盐炙有效部位中圆柚酮大鼠在体肠吸收 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(5): 65-68.
WU S S, LI M Q, ZHENG K X, et al. The characteristic of nootkatone of effective parts from *Alpiniae oxyphyllae Fructus* after salt processing *in situ* intestinal absorption in rats [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2016, 32(5): 65-68.
- [19] 李梦琪, 龚晓猛, 吴珊珊, 等. 益智仁盐炙后缩泉丸入血成

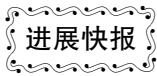
分的分析 [J]. 中成药, 2017, 39(8): 1675-1678.

LI M Q, GONG X M, WU S S, et al. Analysis of constituents migrating to blood in Suoquan Pills after stir-frying with salt-water of *Alpinia oxyphylla* [J]. Chin Tradit Pat Med, 2017, 39(8): 1675-1678.

[20] REZAYAT S M, DEHPOUR A R, MOTAMED S M, et al. *Foeniculum vulgare* essential oil ameliorates acetic acid-induced colitis in rats through the inhibition of NF-κB pathway [J]. Inflammopharmacology, 2018, 26(3): 851-859.

[21] YAKUT H I, KOYUNCU E, CAKIR U, et al. Preventative and therapeutic effects of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts against necrotizing enterocolitis [J]. J Food Biochem, 2020, 44(8): e13284.

[收稿日期] 2024-01-16



中和外周循环的 IL1β 可减缓慢病毒感染 OPTNE478G 肌萎缩侧索硬化症小鼠模型的进展

肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种不可逆的神经退行性疾病, 大部分患者一旦发病, 仅有三到五年存活期, 且目前没有安全有效的延缓该疾病进展的药物。因此, 迫切需要开发一种基于症状的治疗方法, 以提高 ALS 患者的生存率并改善他们的生活质量。据报道, 炎症状态, 尤其是白细胞介素 1β (IL1β) 升高, 在 ALS 进展中起关键作用。本研究发现通过中和外周循环 IL1β 可减缓 ALS 小鼠模型的进展。

通过将携带 OPTNE478G (视神经蛋白, ALS 患者的一种突变) 的慢病毒微量注射到小鼠的运动皮层内制备 ALS 小鼠模型。先前的研究发现, ALS 小鼠模型中 IL1β 分泌显著升高。本文通过尾静脉注射抗 IL1β 抗体中和外周循环 IL1β, ELISA 和 RT-PCR 检测到 IL1β 的蛋白和基因表达水平降低, TUNEL 检测到神经细胞死亡, MAP2 和 CASP3 的免疫荧光染色发现神经元细胞凋亡, GFAP 染色发现星形胶质细胞的数量减少。在旋转杆试验、握力试验、平衡木试验和足迹试验中, 发现抗 IL1β 治疗后的 ALS 小鼠肌肉力量和运动功能增强。

该模型显示神经炎症可加快 ALS 的进展。同时, ALS 小鼠表现出神经炎症和 IL1β 分泌升高。中和外周循环 IL1β 后, ALS 小鼠表现出神经细胞的死亡和星形胶质细胞增生减少, 肌肉力量和运动能力得到改善。综上所述, 阻断 IL1β 是减缓 ALS 进展的有效策略。

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(1): 18-25. <http://doi.org/10.1002/ame2.12297>).

陈苇善,汪舒云,袁路云,等. *Apc-Kras-Cre* 肠腺瘤转基因小鼠模型构建 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 60-67, 156.
Tan WS, Wang SY, Yuan LY, et al. Establishment of intestinal polyp animal model with *Apc-Kras-Cre* genetic mutation [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 60-67, 156.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.007

Apc-Kras-Cre 肠腺瘤转基因小鼠模型构建

陈苇善,汪舒云,袁路云,王皓月,孙可向,高嘉敏,邓皖利*

(上海中医药大学附属普陀医院,上海 200062)

【摘要】 目的 探讨构建 *Apc-Kras-Cre* 肠腺瘤小鼠模型最佳他莫昔芬诱导方式,建立小鼠模型。**方法** 以 C57BL/6J 野生型小鼠为健康的对照组。以不同浓度、剂量、给药时长他莫昔芬腹腔注射于转基因小鼠,即组 1 以低剂量他莫昔芬(5 mg/kg)给药 1 d,组 2 以低剂量他莫昔芬(5 mg/kg)给药 3 d,组 3 以高剂量他莫昔芬(50 mg/kg)给药 1 d,组 4 以高剂量他莫昔芬(50 mg/kg)给药 3 d,给药 4 周后观察各组小鼠生存率、体重变化,药物诱导 4 周后观察各组小鼠肠道长度变化、肠内腺瘤生长数量以及大小,再通过苏木精伊红染色、显微镜下观察肠道组织、腺瘤的生理情况。**结果** 第一部分实验发现雌鼠生存率低于雄鼠($P<0.001$),死亡率高于雄鼠($P<0.05$),各组不同浓度与剂量之间比较生存率差异具有统计学意义($P<0.01$)。各组小鼠体重变化与对照组相比差异具有统计学意义($P<0.001$),组 1 与组 2,组 2 与组 3,组 1 与组 4 之间差异各具统计学意义($P<0.001, P<0.01, P<0.05$)。各组小鼠大肠长度与对照组相比未具统计学意义($P>0.05$),组 1 与组 3 差异具有统计学意义($P<0.05$)。各组小鼠大肠内都长有腺瘤,多数于结肠远端,组 3 与组 4 腺瘤较多也较大。给药组小鼠大肠病理情况与健康对照组相比出现腺瘤生长,腺体组织排列紊乱、上皮细胞排列不齐,肠道黏膜屏障松散,隐窝分歧不规则,组 3、组 4 也有炎症发生,组 4 部分区域发现细胞坏死。**结论** 他莫昔芬诱导 *Apc-Kras-Cre* 肠腺瘤转基因小鼠造模成功,并且由此判断,他莫昔芬浓度 10 mg/mL、5 mg/kg 的剂量诱导 1 d 的诱导方式最为合适。

【关键词】 肠腺瘤; *Apc* 基因; *Kras* 基因; 动物模型; 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0060-08

Establishment of intestinal polyp animal model with *Apc-Kras-Cre* genetic mutation

TAN Weishan, WANG Shuyun, YUAN Luyun, WANG Haoyue, SUN Kexiang, GAO Jiamin, DENG Wanli*
(Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China)

【Abstract】 Objective To create a mouse model of colorectal polyps with *Apc-Kras-Cre* gene mutations using the tamoxifen induction method. **Methods** Mice with *Apc-Kras-Cre* mutations were divided into four groups and injected intraperitoneally with different concentrations and dosages of tamoxifen for different durations, with group 1 injected with low dosage tamoxifen (5 mg/kg) for 1 day, group 2 injected with low dosage tamoxifen (5 mg/kg) for 3 days, group 3 injected with high dosage tamoxifen (50 mg/kg) for 1 day, group 4 injected with high dosage tamoxifen (50 mg/kg) for 3 days. C57BL/6J mice were used as a healthy control group and survival and changes in body weight were observed. All mice were

【基金项目】上海市卫健委上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划项目(ZY[2021-2023]-0302);上海市普陀区卫生健康系统临床特色专科建设项目(2021tszk01)。

【作者简介】陈苇善(1995—),女,硕士研究生,研究方向:中医药防治恶性肿瘤临床及基础研究。E-mail:tw_s_weishan@hotmail.com

【通信作者】邓皖利(1970—),女,主任医师,博士生导师,研究方向:中医药防治恶性肿瘤临床及基础研究。E-mail:tcmdwl@163.com

euthanized 4 weeks post-tamoxifen induction and the colon length and number and size of intestinal polyps were observed. Histological changes in the intestinal tissue and polyps were detected by hematoxylin and eosin staining. **Results** The survival rate of male mice was higher ($P<0.001$) and the morbidity rate of male mice was lower compared with female mice ($P<0.05$). The survival rate differed significantly among the four groups ($P<0.01$). All groups showed significant changes in body weight compared with the healthy control group ($P<0.001$). There were also significant differences in weight changes between tamoxifen-induced groups 1 and 2, between groups 2 and 3, and between groups 1 and 4 ($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.05$, respectively). There were no significant differences in colon length between any treated group and the healthy control group ($P>0.05$), but colon length did differ between tamoxifen-induced groups 1 and 3 ($P<0.05$). Polyp size varied in each group of tamoxifen-treated mice, with most polyps occurring at the distal end of the colon, while mice in groups 3 and 4 had more and larger polyps. Histopathological examination showed intestinal polyps with uneven and misaligned glandular and epithelial arrangements, a loosely-packed intestinal mucosal barrier, and irregularly-distributed crypts in tamoxifen-induced mice compared with the healthy control group, while mice in tamoxifen-induced groups 3 and 4 showed signs of inflammation and mice in group 4 showed necrosis of cells in some regions. **Conclusions** Tamoxifen-induced *Apc-Kras-Cre* model mice were successfully established, with the group 3 induction method being the most suitable.

[Keywords] intestinal polyps; *Apc* gene; *Kras* gene; animal model; mice

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

根据世界卫生组织,大肠癌(colorectal cancer, CRC)是最具威胁性的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率分别排列第二、三位,而其发病率呈上升趋势,同时发病年龄也在逐渐年轻化,侵犯年龄较低的人群^[1]。研究发现肠腺瘤是大肠癌的主要癌前病变之一^[2],成为了大肠癌发病的重要危险因素,为了更有效地研究大肠癌的发展机制和对其的预防与治疗作用,并为药物干预的研究提供合适的模型,构建了肠腺瘤小鼠模型。在此,我们对 *Apc-Kras-Cre* 小鼠模型的构建进行探讨。

1 材料和方法

1.1 实验动物

采用 SPF 级 7 周龄 B6 Cg-Kras^{tm4Tyj} Apc^{tm1Tno} Tg (CDX2-cre/ERT2)752Erf/MaraJ 鼠,雄性 2 只(基因型:WILD HOM HOM,体重 20~22 g)、雌性 4 只(基因型:HET HOM NCAR,体重 18~20 g),由美国 The Jackson Laboratory 购买。6 只 7 周龄 C57BL/6 小鼠(体重 18~20 g),SPF 级,购自上海必凯科翼生物科技有限公司[SCXK(沪)2018-0006](合格证编号:20180006048551)。转基因小鼠进行交配繁殖,产下基因符合的小鼠共 48 只(雄性 41 只、雌性 7 只,体重 16~20 g)于上海中医药大学附属普陀区中心医院动物中心饲养[SYXK(沪)2022-0002],7~8 周龄进行研究。本研究所使用小鼠经上海市普陀区中心医院动物伦理委员会的审核批准(DWEC-A-202206012F)。小鼠于 SPF 级,温度 21~25 ℃,湿度

45%~65%环境下饲养,利用 12 h/12 h 昼夜间断照明,小鼠食用标准饲料,随意饮水进食。饲养小鼠期间遵守动物实验使用 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

1×小鼠组织裂解液(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,B2292CAA);2×Taq Plus Master Mix 2(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,B2291JAA);Apc 基因扩增引物 53856F、53857R(生工生物工程(上海)股份有限公司,1535528436,1535528437);KRAS 基因扩增引物 oIMR9592、22907、22908(生工生物工程(上海)股份有限公司,1535528440,1535528438,1535528439);Cre 基因扩增引物 M-Cre(trans)-R、M-Cre(trans)-F、oIMR7338、oIMR7339(生工生物工程(上海)股份有限公司,1535528442、1535528443、1535528445、1535528446);他莫昔芬(美国 Sigma-Aldrich 公司,T5648-1G);玉米油(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,8001-30-7);DNA 分子量标准 Marker(生工生物工程(上海)股份有限公司,B500350-0500);4S Green Plus 核酸染料(生工生物工程(上海)股份有限公司,A616696-0500);琼脂糖(生工生物工程(上海)股份有限公司,A620014-0100);50×TAE 缓冲液(生工生物工程(上海)股份有限公司,B548101-0500);0.9%生理盐水(石家庄四药有限公司,2303273602);4%多聚甲醛(北京兰杰柯科技有限公司 Biosharp, BL539A);石蜡(德国徕卡公司,39601006)。

PCR 8 联管(美国 Axygen 公司,PCR-0208-CP-

C); 1.0 mL 注射器(上海讯同器械有限公司, V274257);美国精骐试管旋转混匀器(上海松茂生物科技有限公司, HYQ-2230/HYQ-2231); T100™ PCR 仪(美国 Bio-Rad Laboratories 公司, 1861096); Gel Doc™ EZ System(美国 Bio-Rad Laboratories 公司, 1708270); PowerPac 200 基础电泳仪电源(美国 Bio-Rad Laboratories 公司, 165-5052); Sub-Cell® Model 96 Cell(美国 Bio-Rad Laboratories 公司, 1704514);全自动脱水机(武汉俊杰电子有限公司, JJ-12J);组织包埋机(武汉俊杰电子有限公司, JB-P5);轮转式手动切片机(上海徠卡仪器有限公司, RM2016);冻台(武汉俊杰电子有限公司, JB-L5);组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司, KD-P);烘箱(上海福玛实验仪器有限公司, DGX-9003B);载玻片(江苏世泰实验器材有限公司, 188105W);盖玻片(江苏世泰实验器材有限公司, 10212432C);显微镜(CIC, BK1201)。

1.3 实验方法

1.3.1 转基因小鼠

The Jackson Laboratory 购买的雌雄转基因鼠进行交配, 新生小鼠 4 周龄取材进行基因鉴定(图 1)。第一部分采用新生雌雄小鼠进行实验, 小鼠在 7~8 周龄时给予低剂量低浓度他莫昔芬诱导肠道腺瘤生长。第二部分采用雄性小鼠进行实验, 小鼠在 7~8 周龄时通过 SPSS 随机数字随机分组, 各组给予不同浓度和剂量的他莫昔芬诱导肠道腺瘤

生长, 并且以雄性野生型 C57BL/6J 小鼠为健康对照组观察各组小鼠体重和病理情况的变化。

1.3.2 他莫昔芬配制以及药物诱导

以 2.5 mg 和 10 mg 配制低、高浓度他莫昔芬, 分别以 5 mg/kg、50 mg/kg 低、高剂量, 通过腹腔注射给小鼠诱导。各剂量浓度分别给药 1、3 d, 并于末次给药后 4 周将小鼠处死取材观察大肠情况, 期间观察小鼠生存率(表 1)。

1.3.3 小鼠大肠 HE 染色

将小鼠处死后取大肠, 量好大肠长度。将大肠剪开, 于 4% 多聚甲醛固定 24~48 h, 进而进行脱水、石蜡包埋, 以 4 μm 厚度切片。组织 HE 染色后于显微镜下观察小鼠肠道腺瘤生长情况。

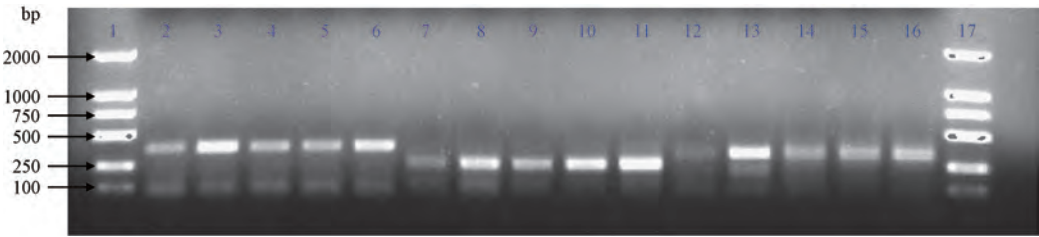
1.4 统计学方法

本实验采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件绘制曲线图, 以 SPSS 26 进行数据分析, 数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 计数资料以 χ^2 检验进行分析, 符多样本组间比较采用方差分析, 组间生存率区别比较使用 Logrank 检验进行分析, 分析结果以 $P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠生存率

第一部分实验发现雌鼠在低剂量、低浓度的他莫昔芬诱导后第 11 天死亡 1 只、第 12 天死亡 3 只、第 14 天死亡 1 只, 雄鼠则在他莫昔芬诱导后的第



注: 1、17; DNA 分子量标准 Marker; 2~6; *Apc* 基因鉴定结果; 7~11; *Kras* 基因鉴定结果; 12~16; *Cre* 基因鉴定结果。

图 1 小鼠基因鉴定结果

Note. 1/17, DNA molecular weight ladder. 2~6, *Apc* gene. 7~11, *Kras* gene. 12~16, *Cre* gene.

Figure 1 Results of genetic testing of mice

表 1 小鼠分组以不同剂量、给药诱导天数

Table 1 Different groups of mice with tamoxifen injection of different dosage, concentration and duration

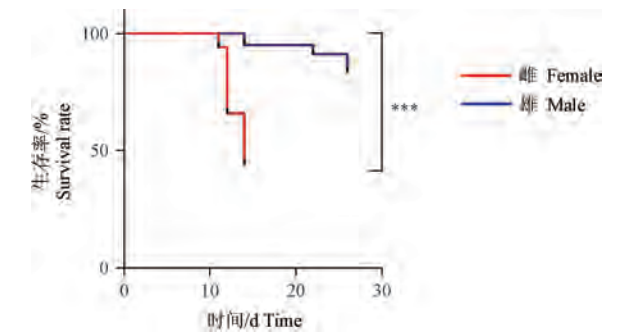
组别 Groups	他莫昔芬浓度/(mg/mL) Tamoxifen concentration	他莫昔芬注射量/(mg/kg) Tamoxifen dosage	给药时长/d Duration
组 1 Group 1			1
组 2 Group 2	2.5	5	3
组 3 Group 3			1
组 4 Group 4	10	50	3

14 天死亡 2 只、第 22 天死亡 1 只、第 26 天死亡 1 只,雌鼠生存率低于雄鼠($P<0.001$),死亡率高于雄鼠($P<0.05$),差异具有统计学意义,因此在后续实验选择雄鼠造模(表 2,图 2)。各组小鼠生存曲线如下所示(图 3),组间比较存活率差异具有统计学意义($P<0.01$)。

表 2 雌雄小鼠死亡率

Table 2 Mortality rates of different gendered mice			
组别 Groups	动物数/ <i>n</i> Number of animals	死亡数/ <i>n</i> Number of deaths	死亡率/% Mortality rate
雌 Female	7	5	71.43
雄 Male	17	4	23.53 [*]

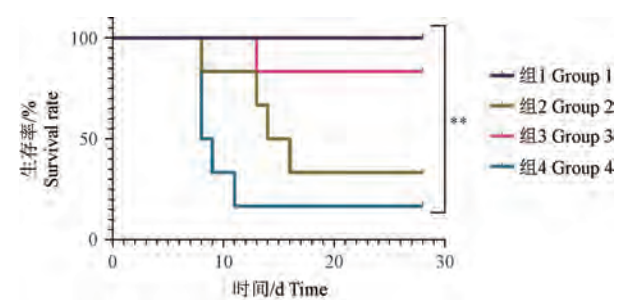
注:雌雄鼠药物诱导后死亡率比较, $^*P<0.05$ 。
Note. Difference in mortality rate between different gendered mice, $^*P<0.05$.



注:两组存活率比较, $^{***}P<0.001$ 。
图 2 不同性别小鼠以低浓度、低剂量他莫昔芬诱导后的生存曲线

Note. Survival rate compared between both groups, $^{***}P<0.001$.

Figure 2 Survival plot of mice of different genders after tamoxifen injection of low concentration and low dosage



注:各组之间生存率的相互比较, $^{**}P<0.01$ 。
图 3 各组小鼠不同浓度、剂量他莫昔芬诱导后的生存曲线

Note. Survival rate compared between groups, $^{**}P<0.01$ 。
Figure 3 Survival plot of mice groups after different tamoxifen injection of different concentration and dosage

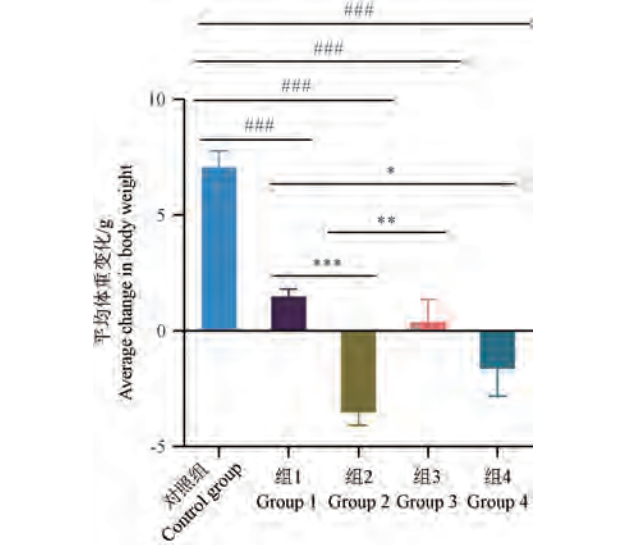
2.2 各组小鼠体重变化

各组小鼠经药物诱导 4 周后体重有显著改变。各组与对照组相比,体重的变化差异具有统计学意义($P<0.001$)。组间比较组 1 与组 2、组 2 与组 3、组 1 与组 4 体重改变具有统计学意义($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.05$)(表 3,图 4)。

表 3 各组小鼠他莫昔芬诱导前后体重变化($n=6$)
Table 3 Change in weight of mice in different groups before and after tamoxifen injection

组别 Groups	药物诱导前体重/g Weight before tamoxifen injection	解剖前体重/g Weight before dissection
对照组 Control group	21.83±1.03	28.88±2.61
组 1 Group 1	16.83±1.20	18.30±0.99 ^{###}
组 2 Group 2	18.27±0.71	14.76±1.50 ^{###}
组 3 Group 3	19.99±1.34	20.37±3.19 ^{###}
组 4 Group 4	21.52±1.09	20.87±3.18 ^{###}

注:与对照组比较, $^{###}P<0.001$ 。
Note. Compared with control group, $^{###}P<0.001$.



注:与对照组比较, $^{###}P<0.001$;各组之间相互比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ 。

图 4 各组小鼠平均体重变化
Note. Compared with control group, $^{###}P<0.001$. Compared between different groups, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$.

Figure 4 Average in weight of different groups of mice

2.3 各组小鼠大肠长度

各组小鼠药物诱导后 4 周的大肠长度与对照组相比,大肠长度差异未具统计学意义($P>0.05$)。组 1 与组 3 之间大肠长度具有统计学意义($P<0.05$) (表 4,图 5、图 6)。

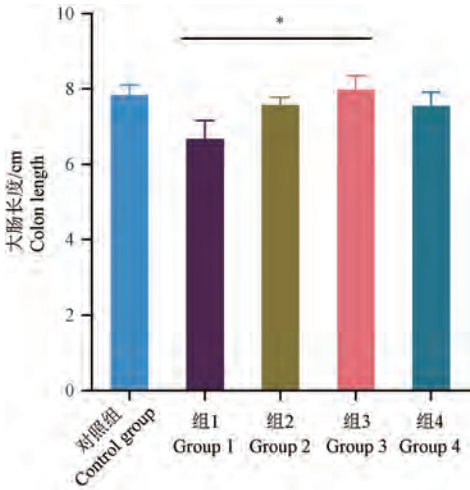
2.4 各组小鼠大肠内腺瘤大小、数量

各组小鼠不同剂量浓度药物诱导后,大肠内腺瘤大小、数量有所不同。与对照组相比,各组小鼠肠内长有腺瘤,多数长在大肠尾端或盲肠。此外,

组 3 与组 4 腺瘤数量较多,与前 3 组相比腺瘤也较大(图 7)。

2.5 各组小鼠大肠病理状况

对照组小鼠上皮细胞形态完整,肠道黏膜屏障结构紧密、排列整齐,未见损伤或炎症。他莫昔芬诱导后小鼠各组出现不同大小腺瘤生长,腺体组织排列紊乱,并且出现上皮细胞参差不齐,肠道黏膜屏障松散,隐窝分歧不规则。组 3、组 4 发生炎症,而组 4 出现部分区域细胞坏死现象(图 8)。



注:药物诱导 4 周后小鼠平均大肠长度, * $P<0.05$ 。

图 5 各组小鼠平均大肠长度

Note. Average length of colons between groups 4 weeks post tamoxifen injection, * $P<0.05$.

Figure 5 Average length of colons between different groups of mice



图 6 各组小鼠药物诱导 4 周后大肠长度

Figure 6 Length of colons of different groups of mice 4 weeks post-tamoxifen injection

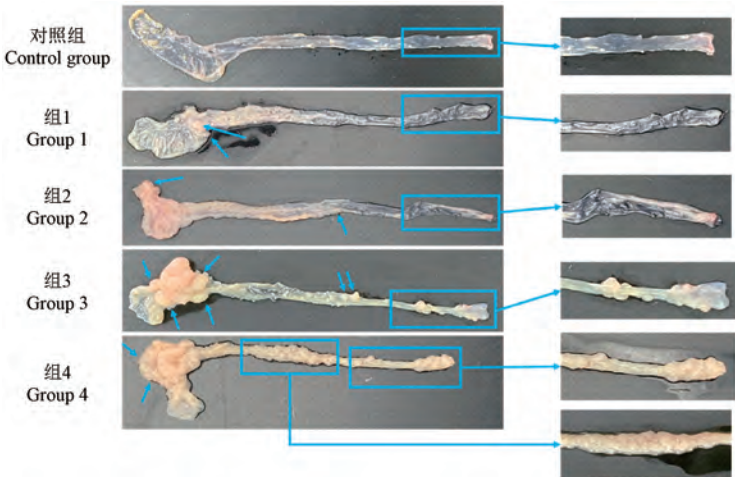


图 7 各组小鼠药物诱导 4 周后肠内腺瘤生长情况

Figure 7 Growth of intestinal polyps in different groups of mice 4 weeks post-tamoxifen injection

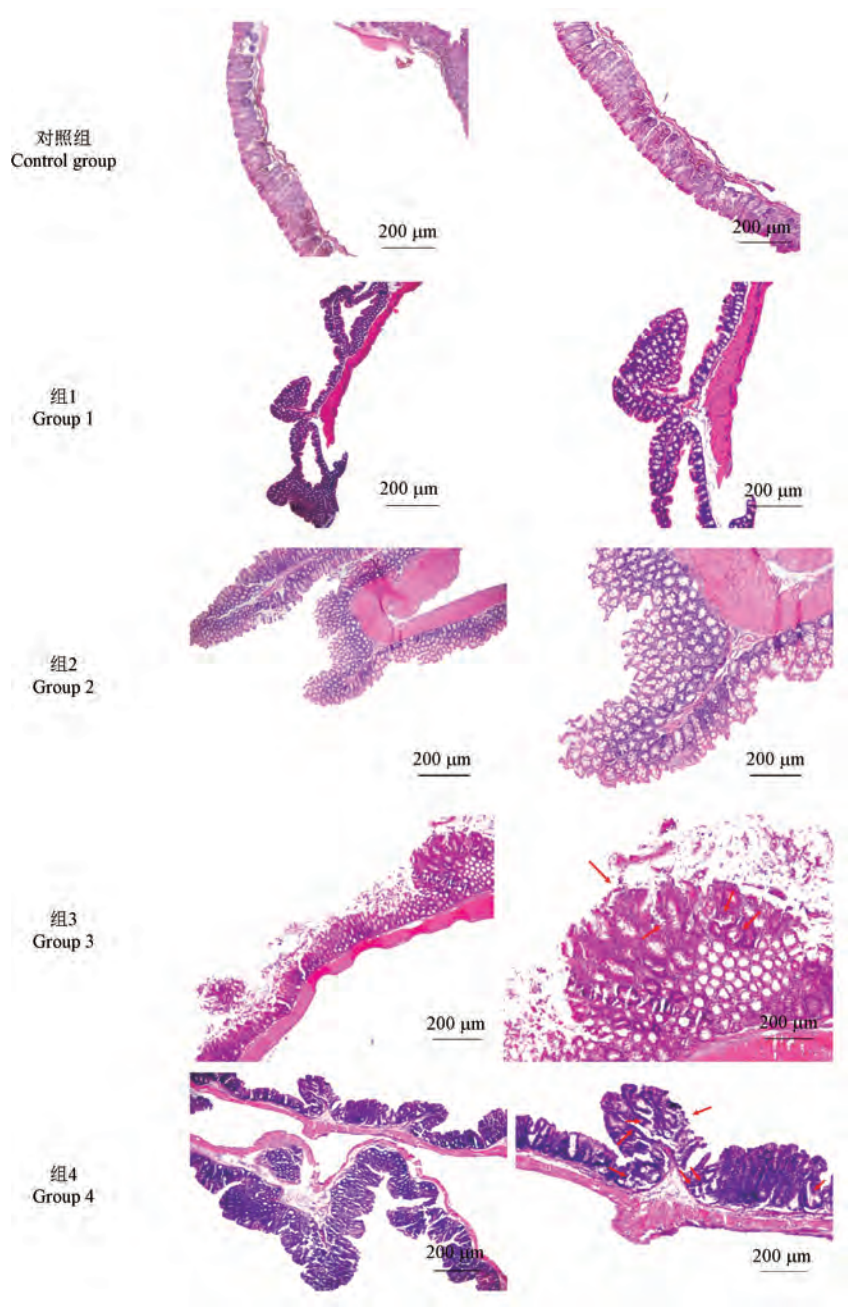


图 8 各组小鼠他莫昔芬诱导后 4 周肠道病理状况

Figure 8 Pathological changes of each groups of mice 4 weeks post-tamoxifen injection

表 4 各组小鼠大肠长度 (n=6)

Table 4	Colon length in different groups of mice
组别 Groups	大肠长度/cm Colon length
对照组 Control group	7.85±0.62
组 1 Group 1	6.68±1.17
组 2 Group 2	7.59±0.52
组 3 Group 3	7.98±0.90
组 4 Group 4	7.56±0.95

3 讨论

动物实验的运用让我们更深入地探讨并理解大肠癌的发病机制,也利于我们研究各种药物对于结直肠癌的治疗机制。研究发现,炎症性肠病,包括溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis) 以及克罗恩病 (Crohn's disease) 都是结直肠癌发生的危险因素^[3], 因此数年来,偶氮甲烷/硫酸葡聚糖 (azoxymethane/dextran sulfate sodium, AOM/DSS) 诱

导的小鼠模型成为最常见、广泛运用的大肠癌小鼠模型。AOM/DSS 小鼠模型的发病过程以及病理特征更接近结肠炎相关性大肠癌,用以探讨“炎癌转变”更为合适,但炎症只是大肠癌发病因素之一,并非所有临床大肠癌患者都因为首发炎症再发展为大肠癌,基因层面上的失调也有可能致大肠癌的发生^[4-5],此外,AOM/DSS 小鼠模型的构建方式缺少规范化标准,AOM 和 DSS 分别的浓度、剂量、诱导时间在不同的实验中都带着巨大的差别,因此其实验结果难以进行比较分析^[4]。另外,近期研究 AOM/DSS 小鼠模型在基因突变的层面上并无法模拟临床大肠癌患者的情况,说明使用此模型小鼠进行对大肠癌机制、药物等探讨依然存在缺陷^[6],因此,*Apc-Kras-Cre* 小鼠模型的构建更精准地为大肠癌的研究提供更新颖的方法、途径以及思路。

研究发现 *Apc* 基因是临床大肠癌患者体内最常发生突变的基因之一,同时也降低免疫治疗的效果、反映大肠癌不良预后^[7],而 *Apc*^{Min+/-} 基因小鼠模型的病情、发病机制较与临床大肠癌患者为相似,再加上此模型小鼠适合用于探讨与大肠癌的发展具有直接关系的信号通路,比如 *Wnt/β-catenin*、*NF-κB*、*TGF-β* 等^[8-9],成为了适合进行大肠癌机制研究的模型之一。虽然如此,单用 *Apc*^{Min+/-} 基因小鼠模型往往只能构建出小肠的息肉,无法模拟临床大肠癌患者的结肠病变^[10],对疾病的发展机制的探讨依然缺乏完整性。

另外,研究发现结 *Kras* 基因也是在结直肠癌最常见的突变基因之一,在 40% 的患者中皆可见^[11],其中变异最常见于密码子 G12、G13,而 G13 基因突变的早期结直肠癌患者会有更短的生存期^[12]。此外,使用 *Kras* 基因小鼠对目前肿瘤治疗主要策略—免疫治疗进行研究,让人类可以通过此基因小鼠模型更精准地研究探讨肿瘤的发展与治疗^[13]。*Kras* 基因成为了探讨结直肠癌病变、转移特殊与复杂的架构以及免疫、靶向治疗的目标^[14-16]。虽然如此,研究表示单含 *Kras* 基因突变的小鼠模型会出现胚胎致死的情况,无法构建存 *Kras* 基因突变的模型小鼠,而多数临床结直肠癌患者身上都带有 *Apc-Kras* 双基因突变,故此模型小鼠在于实验、临床研究都具有重要意义,成为本实验的重点研究目标^[17],而基因模型小鼠的优势在于仅需要通过某些诱导因素就可导致实体瘤的形成^[18],加上 *Cre* 基因的参与,只需要通过他莫昔芬药物的诱导即可,是一个

造模方便、省时省力的方法。

Apc-Kras-Cre 转基因小鼠在非天然配体他莫昔芬的诱导下于 *Cre-ER^T* 结合蛋白,即人类雌激素受体 (Estrogen, ER) 和 *Cre* 重组酶间进行两个 *LoxP* 结 点条件性 DNA 切割,进而,*Apc-Kras-Cre* 转基因小鼠中的 *CDX* 启动因子能够将 *Cre* 重组酶引导至小鼠回肠、盲肠、结肠处,其中也包括隐窝基部至管腔表面上皮^[19-20],因此,*Apc-Kras-Cre* 转基因小鼠需要通过他莫昔芬的诱导以激活小鼠大肠瘤体的生长。本实验为了探讨他莫昔芬诱导模型小鼠肠内瘤体生长的最佳给药浓度、剂量和次数,即天数,因此在实验设计中未安排 *Apc-Kras-Cre* 转基因小鼠空白组。据文献参考,在动物模型构建过程中他莫昔芬的给药方式有所不同。部分参考提供的他莫昔芬配制浓度为 20 mg/mL^[20-21],但都并非为 *Apc-Kras-Cre* 转基因小鼠而设的浓度,因此在此实验中根据所参考浓度进行改良。一般给药剂量为 5 mg/kg^[17]、50 mg/kg^[17]、75 mg/kg^[21-22]、100 mg/kg^[23]、200 mg/kg^[23],给药时长建议 1~3 d,最多为 5 d,大肠瘤体在他莫昔芬诱导后 25~30 d 长出^[17,21-24],因此,我们根据参考和他莫昔芬诱导方式的建议上首先从较低的剂量,即 5 mg/kg、50 mg/kg 和较短的给药时长,即 1~3 d 进行研究,并且设置于他莫昔芬诱导后 28 d(4 周),探讨 *Apc-Kras-Cre* 转基因小鼠的最佳诱导方式。

此研究中发现除了组 1 以外,各组小鼠在他莫昔芬诱导成瘤后都出现疲乏、消瘦、便血的情况,符合临床结直肠癌患者的症状^[25],故剔除组 1 的诱导方式。另外,值得一提的是,无论在高浓度或低浓度的情况下,3 d 的药物诱导都会导致小鼠精神状态突然大退步、体重大跌、死亡率过高,于是,虽然解剖后肉眼能见组 4 的小鼠成瘤率高,HE 染色下也发现组 2、组 4 小鼠有腺瘤生长,但依然不适合用于进行动物实验,故剔除此两组诱导方式。

本实验结果发现小鼠腺瘤一般生长在结肠远端。在临床上,肠道远端腺瘤为传统锯齿状腺瘤 (traditional serrated adenoma, TSA),本实验中呈现于组 4 的病理状况,可见长皮绒毛结构复杂而呈锯齿状、肠腔畸形、异位性隐窝,其癌变可能性较高,同时与 *Kras* 基因突变具相关性,但 TSA 在临床上相对少见^[26-27]。增生性息肉 (hyperplastic polyps, HP) 和无柄锯齿状息肉 (sessile serrated adenoma, SSA) 较多呈现于组 3 小鼠的病理情况下,见于肠上皮层的

非典型性增生、扩张性且不规律的隐窝分支,其癌变可能性与 TSA 相比较低,但也与 *Kras* 基因突变相关,在临床上也较为普遍^[28-29],而且,也具有癌变可能^[30],是实验中值得研究的方向,因此,组 3 的他莫昔芬诱导方式所引起的病变与临床大肠癌患者更为相似,较适合用于大肠癌发病机制的研究。

综上所述,此模型小鼠肠道腺瘤生长,破坏小鼠肠道黏膜屏障,导起肠道炎症,同时导致小鼠体重下降,并具有较好的生存率便于实验统计,观察实验结果。同时,发现他莫昔芬浓度 10 mg/mL、50 mg/kg 的剂量诱导 1 d 为最佳的药物诱导方式,故认为 *Apc-Kras-Cre* 肠腺瘤转基因小鼠模型造模成功。*Apc-Kras-Cre* 肠腺瘤转基因小鼠模型构建通过购买雄性基因小鼠(基因型:WILD HOM HOM),雌性基因小鼠(基因型:HET HOM NCAR)相互配繁产生,基因测定后获得实验用 *Apc-Kras-Cre* 小鼠,肿瘤模型出现时间短,而且与临床结直肠癌患者体内最常发生突变的基因 *Apc*、*Kras* 相同,因此认为模型具有实验研究和临床应用意义,造模省时省力可以更精准地为大肠癌的研究提供新途径。

参考文献:

[1] XI Y, XU P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040 [J]. Transl Oncol, 2021, 14 (10): 101174.

[2] LI X, HU M, WANG Z, et al. Prevalence of diverse colorectal polyps and risk factors for colorectal carcinoma *in situ* and neoplastic polyps [J]. J Transl Med, 2024, 22(1): 361.

[3] PORTER R J, ARENDS M J, CHURCHHOUSE A M D, et al. Inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer: translational risks from mechanisms to medicines [J]. J Crohns Colitis, 2021, 15(12): 2131-2141.

[4] ZHANG F, QIAO S. Research progress on the relationship between inflammation and colorectal cancer [J]. Ann Gastroenterol Surg, 2021, 6(2): 204-211.

[5] DZHALILOVA D, ZOLOTOVA N, FOKICHEV N, et al. Murine models of colorectal cancer: the azoxymethane (AOM)/dextran sulfate sodium (DSS) model of colitis-associated cancer [J]. PeerJ, 2023, 11: e16159.

[6] PAN Q, LOU X, ZHANG J, et al. Erratum: Genomic variants in mouse model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate improperly mimic human colorectal cancer [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 2784.

[7] LI B, ZHANG G, XU X. APC mutation correlated with poor response of immunotherapy in colon cancer [J]. BMC Gastroenterol, 2023, 23(1): 95.

[8] REN J, SUI H, FANG F, et al. The application of *Apc*^{Min/+}

mouse model in colorectal tumor researches [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2019, 145(5): 1111-1122.

[9] YU S, YIN Y, WANG Q, et al. Dual gene deficient models of *Apc*^{Min/+} mouse in assessing molecular mechanisms of intestinal carcinogenesis [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 108: 600-609.

[10] JACKSTADT R, SANSOM O J. Mouse models of intestinal cancer [J]. J Pathol, 2016, 238(2): 141-151.

[11] ZHU G, PEI L, XIA H, et al. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer [J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 143.

[12] DINU D, DOBRE M, PANAITESCU E, et al. Prognostic significance of *KRAS* gene mutations in colorectal cancer—preliminary study [J]. J Med Life, 2014, 7(4): 581-587.

[13] FITZGERALD B, CONNOLLY K A, CUI C, et al. A mouse model for the study of anti-tumor T cell responses in *Kras*-driven lung adenocarcinoma [J]. Cell Rep Methods, 2021, 1 (5): 100080.

[14] The Lancet Oncology. Undruggable KRAS-time to rebrand? [J]. Lancet Oncol, 2021, 22(3): 289.

[15] MENG M, ZHONG K, JIANG T, et al. The current understanding on the impact of KRAS on colorectal cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 140: 111717.

[16] PORRU M, POMPILI L, CARUSO C, et al. Targeting KRAS in metastatic colorectal cancer: current strategies and emerging opportunities [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 57.

[17] MAITRA R, THAVORNWATANAYONG T, VENKATESH M K, et al. Development and characterization of a genetic mouse model of KRAS mutated colorectal cancer [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(22): 5677.

[18] CHUNG W J, DAEMEN A, CHENG J H, et al. *Kras* mutant genetically engineered mouse models of human cancers are genomically heterogeneous [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(51): E10947-E10955.

[19] INDRA A K, WAROT X, BROCARD J, et al. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases [J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(22): 4324-4327.

[20] The Jackson Laboratory. KPC: APC Strain Details [EB/OL]. [2024] <https://www.jax.org/strain/035169#>.

[21] Xin Chen Lab. Tamoxifen injection [EB/OL]. [2002-2024] <https://pharm.ucsf.edu/xinchen/protocols/tamoxifen-injection>.

[22] Caleb Heffner. Intraperitoneal injection of tamoxifen for inducible Cre-driver lines [EB/OL]. [2011-07-25]. <https://www.jax.org/research-and-faculty/resources/cre-repository/tamoxifen>.

[23] SUN M R, STEWARD A C, SWEET E A, et al. Developmental malformations resulting from high-dose maternal tamoxifen exposure in the mouse [J]. PLoS One, 2021, 16 (8): e0256299.

贝雪怡,姜宁,姚彩虹,等. 人参皂苷 Rg1 和 Rb1 改善慢性不可预测应激致大鼠抑郁、焦虑样行为的作用比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 68-78.

Bei XY, Jiang N, Yao CH, et al. Effects and comparison of ginsenosides Rg1 and Rb1 in depression- and anxiety-like behaviors induced by chronic unpredictable stress in rats [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 68-78.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.008

人参皂苷 Rg1 和 Rb1 改善慢性不可预测应激致大鼠抑郁、焦虑样行为的作用比较

贝雪怡^{1,2,3}, 姜宁⁴, 姚彩虹⁴, 张亦文⁴, 孙欣然⁴, 罗燕琴⁴, 李亮^{1,2,3*},
谢梦洲^{1,2,3}, 刘新民^{5*}

(1.湖南中医药大学,长沙 410208;2.湖南中医药大学湖南省药食同源功能性食品工程技术研究中心,长沙 410208;
3.湖南中医药大学中医心肺病证辨证与药膳食疗重点实验室,长沙 410208;4.中国医学科学院北京协和医学院药用
植物研究所,北京 100193;5.宁波大学新药技术研究院,浙江 宁波 315000)

【摘要】目的 研究人参皂苷 Rg1 和 Rb1 改善慢性不可预测应激诱导大鼠的抑郁样和焦虑样行为的作用及比较。**方法** SPF 级 SD 雄性大鼠 70 只,适应 5 d 后进行糖水偏爱实验检测,根据糖水偏爱指数将动物分为 7 组,即对照组、模型组、氟西汀组、人参皂苷 Rg1 24 mg/kg 剂量组、人参皂苷 Rg1 48 mg/kg 剂量组、人参皂苷 Rb1 33 mg/kg 剂量组、人参皂苷 Rb1 67 mg/kg 剂量组。除对照组外,其余大鼠每天随机接受 1~2 种不同的刺激,造模时间共 35 d。于第 36 天进行糖水偏爱、旷场实验、新奇环境摄食抑制实验、大鼠高架十字迷宫实验、强迫游泳等行为学实验,考察其抗抑郁、抗焦虑作用。采用 ELISA 法测定大鼠血清和海马 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 炎症因子水平,血清皮质酮 (CORT) 水平。**结果** 与模型组相比,人参皂苷 Rg1、Rb1 组大鼠糖水偏爱指数提升,强迫游泳不动时间显著减少,人参皂苷 Rg1 48 mg/kg 剂量组新奇抑制摄食潜伏期显著减少,人参皂苷 Rg1 (24 和 48 mg/kg) 剂量组开臂时间的比例显著上升,人参皂苷 Rg1、Rb1 两个剂量组血清中皮质酮的含量显著减少,人参皂苷 Rg1 24 mg/kg 剂量组血清中 IL-1 β 和 IL-6 的水平显著降低,人参皂苷 Rb1 33 mg/kg 剂量组血清中 TNF- α 和 IL-6 的水平显著降低,人参皂苷 Rg1 (48 mg/kg)、Rb1 (67 mg/kg) 剂量组海马中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量显著降低。**结论** 两种人参皂苷均可能通过调节 HPA 轴、抑制神经炎症,从而改善慢性不可预测应激致大鼠抑郁、焦虑样行为,此外人参皂苷 Rg1 的抗焦虑作用优于 Rb1。

【关键词】 人参皂苷 Rg1; 人参皂苷 Rb1; 慢性不可预测应激模型; 炎症因子; 抑郁症; 焦虑症

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

Effects and comparison of ginsenosides Rg1 and Rb1 in depression- and anxiety-like behaviors induced by chronic unpredictable stress in rats

BEI Xueyi^{1,2,3}, JIANG Ning⁴, YAO Caihong⁴, ZHANG Yiwen⁴, SUN Xinran⁴, LUO Yanqin⁴, LI Liang^{1,2,3*},
XIE Mengzhou^{1,2,3}, LIU Xinmin^{5*}

【基金项目】 中国医学科学院创新工程 (2021-I-12M-034)。

【作者简介】 贝雪怡 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中医药膳学。E-mail: 294773448@qq.com

【通信作者】 刘新民 (1962—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药神经药理及实验方法。E-mail: liuxinmin@hotmail.com

李亮 (1980—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医辨证学与数字中医药。E-mail: superliliang@126.com

* 共同通信作者

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China. 2. Hunan Engineering and Technology Research Center of Medicinal and Edible Homologous Functional Food, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208. 3. Key Laboratory of TCM Cardiopulmonary Syndrome Differentiation and Medicinal Diet Diet Therapy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208. 4. Institute of Medicinal Plants, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193. 5. Institute of New Drug Technology, Ningbo University, Ningbo 315000)

[Abstract] Objective To compare the effects of ginsenosides Rg1 and Rb1 on depression- and anxiety-like behaviors in chronic unpredictable stress-induced rats. **Methods** Seventy male SPF grade SD rats were tested for sugar and water preference after 5 days of adaptation and divided into seven groups according to their preference index; a control group, model group, fluoxetine hydrochloride group, ginsenoside Rg1 24 mg/kg group, ginsenoside Rg1 48 mg/kg group, ginsenoside Rb1 33 mg/kg group, and ginsenoside Rb1 67 mg/kg group. All rats, except for the control group, were subjected randomly to one or two different stimulating factors every day for a total of 35 days. On the 36th day, behavioral experiments including sugar and water preference, open field, novel environment feeding inhibition, elevated cross maze, and forced swimming experiments were conducted to investigate the anti-depression and anti-anxiety effects of the treatments. Serum and hippocampal levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α and serum corticosterone were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Compared with the model group, ginsenoside Rg1 and Rb1 significantly increased sucrose consumption in the sucrose preference test and decreased immobility in the forced swimming test. Ginsenoside Rg1 (48 mg/kg) significantly reduced the latency to eat in the novelty-suppressed feeding test, and ginsenoside Rg1 (24 and 48 mg/kg) significantly increased the percentage of open arm entries and time in the elevated cross maze test. Serum corticosterone levels were significantly decreased in the ginsenoside Rg1 and Rb1 groups, serum IL-1 β and IL-6 levels were significantly decreased in the ginsenoside Rg1 (48 mg/kg) group, serum TNF- α and IL-6 levels were significantly decreased in the ginsenoside Rb1 (33 mg/kg) group, and IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels in the hippocampus were significantly decreased in the ginsenoside Rg1 (48 mg/kg) and Rb1 (67 mg/kg) groups. **Conclusions** Both ginsenosides can regulate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and inhibit neuroinflammation, improving depression- and anxiety-like behaviors in rats induced by chronic unpredictable stress. Ginsenoside Rg1 has a significantly better anti-anxiety effect than Rb1.

[Keywords] ginsenoside Rg1; ginsenoside Rb1; chronic unpredictable stress model; inflammatory factor; depression; anxiety

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

抑郁症是一种内心产生显著持久低落情绪的精神心理疾病,多伴随有兴趣丧失、情绪低落、精力不足、思维迟缓、意志活动减退、焦虑情绪等症状^[1-2];焦虑症是一种以暂时性或持续性情绪紧张为主要临床症状,伴有心烦不安、自主神经紊乱、运动障碍等症状的神经类疾病^[3-4];临床上大部分抑郁症患者伴有焦虑症,抑郁症与焦虑症几乎有 50%~60%的共病率,两种病症相互影响,会加重患者的临床病情,延长患者的病程,严重影响患者的生活与健康,给社会带来了极大的经济负担^[5-6]。抑郁症的发病机制复杂,研究表明,与脑单胺能传递的减少、神经递质受体和神经营养因子的功能失调、促炎细胞因子的增加、下丘脑-垂体-肾上腺轴功能失调等相关^[7]。目前,抑郁症的治疗仍然以药物治疗为主,且以西药为主,临床常用的抗抑郁西药比

如氟哌噻吨、丙咪嗪及盐酸帕罗西汀等,大多存在较多副作用,长期服用会导致患者出现一定的耐药性^[8]等缺陷,因此找寻安全有效、副作用少的抗抑郁药物对抑郁症患者的治疗尤为关键。

凭借治疗效果好、药效相对安全等优点,对传统中药抗抑郁药物的研究开发已日渐成为社会的热点。人参是我国传统的名贵中草药,有“补益上品”之称,《神农本草经》中记载人参的功效:补五脏;安精神、定魂魄、止惊悸;除邪气;开心益智^[9]。大量研究表明,三醇型人参皂苷 Rg1 和二醇型人参皂苷 Rb1 是人参发挥主要药理作用的活性成分,对中枢神经系统有明显的保护作用^[10-11];人参皂苷 Rg1 具有抗神经炎症、抗氧化应激、抗神经凋亡和增强记忆力等神经保护作用^[12-14];人参皂苷 Rb1 常作为抗炎和改善学习记忆类药物使用,通过

抑制炎症反应、促进神经发生从而发挥抗抑郁的作用^[15-16]。本课题组前期研究发现 Rg1 和 Rb1 在神经保护方面具有不同的特点和作用,也发现 Rg1 在增强逃避习得和逆转记忆缺陷方面比 Rb1 更为有效,而 Rb1 在改善非空间记忆、抑制胶质细胞激活以及减少 SAMP8 小鼠海马中 Ab 和 NLRP3 炎症小体相关蛋白积累方面表现出更强的效果;此外,Rg1 在抑制 SAMP8 小鼠大脑中 iNOS 表达方面比 Rb1 更为有效^[17]。但迄今为止,研究 Rg1 和 Rb1 两者对情绪(抑郁、焦虑)改善作用及作用特点有无差异的研究涉及不多。因此本文采用经典抑郁、焦虑症动物模型-慢性不可预测应激模型(chronic unpredictable mild stress,CUMS)模型来比较 Rg1 和 Rb1 的抗抑郁、抗焦虑作用,并基于神经炎症方面对其作用特点进行比较。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 74 只,体重 180~200 g,6~8 周龄,购于北京维通利华实验动物科技股份有限公司[SCXK(京)2021-0011]。实验开展于中国医学科学院药用植物研究所[SYXK(京)2023-0008]。本实验遵守 3R 原则,并遵循中国医学科学院药用植物研究所实验动物伦理委员会相关规定(SLXD-20210326012)。饲养条件:温度 22~24 ℃,湿度(55±10)%,动物房内 12 h/12 h 明/暗交替(8:00~20:00 亮灯),饲养期间大鼠自由饮食饮水。

1.2 主要试剂与仪器

人参皂苷 Rg1(CAS:22427-39-0)、人参皂苷 Rb1(CAS:41753-43-9),成都瑞芬思生物科技有限公司;盐酸氟西汀片(H20064844),苏州中化药品工业有限公司;皮质酮试剂盒(H205-1-2)、IL-1β 试剂盒(H002-1-2)、TNF-α 试剂盒(H052-1-2)、IL-6 试剂盒(H007-1-2),南京建成生物工程研究所有限公司。

大鼠自主活动测定仪 KSME02(中国医学科学院药用植物研究所、中国航天员科研训练中心和北京康森益友科技有限公司联合研发);PMT-100 型高架十字迷宫(成都泰盟软件有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组及给药

适应环境 5 d 后,造模前进行糖水偏爱实验检测,计算出每只大鼠的糖水偏爱指数。根据糖水偏爱指数将动物分为 7 组,每组 10 只。造模方法及灌胃剂量见表 1,从第 9 天起开始灌胃直至行为学实验结束^[18-19]。

1.3.2 慢性不可预测应激模型的建立

对照组大鼠不给予刺激。其余各组每天给予不同的应激刺激,包括频闪 12 h、束缚 6 h、冰水(4 ℃)游泳 5 min、噪音 24 h、热水(42 ℃)游泳 5 min、电击 10 min、湿笼 12 h、昼夜颠倒、禁食禁水 24 h 等刺激。造模时,每天随机选取 1~2 种刺激,并且同一种刺激不能连续出现,造模时间持续 35 d(表 2)。

从造模开始,各组给予相应药液进行灌胃,灌

表 1 CUMS 模型分组及给药
Table 1 Grouping and administration of CUMS model

分组 Groups	是否给予 CUMS 应激 Whether CUMS stress was given	灌胃液体 Gavage fluid	剂量 Dose
对照组 Control group	否 No	蒸馏水 Distilled water	20 mL/(kg·d)
模型组 Model group	是 Yes	蒸馏水 Distilled water	20 mL/(kg·d)
氟西汀组 Fluoxetine group	是 Yes	氟西汀溶液 Fluoxetine solution	10 mg/(kg·d)
人参皂苷 Rg1 24 mg/kg 剂量组 Ginsenoside Rg1 24 mg/kg group	是 Yes	人参皂苷 Rg1 溶液 Ginsenoside Rg1 solution	24 mg/(kg·d)
人参皂苷 Rg1 48 mg/kg 剂量组 Ginsenoside Rg1 48 mg/kg group	是 Yes	人参皂苷 Rg1 溶液 Ginsenoside Rg1 solution	48 mg/(kg·d)
人参皂苷 Rb1 33 mg/kg 剂量组 Ginsenoside Rb1 33 mg/kg group	是 Yes	人参皂苷 Rb1 溶液 Ginsenoside Rb1 solution	33 mg/(kg·d)
人参皂苷 Rb1 67 mg/kg 剂量组 Ginsenoside Rb1 67 mg/kg group	是 Yes	人参皂苷 Rb1 溶液 Ginsenoside Rb1 solution	67 mg/(kg·d)

表 2 慢性不可预测性刺激时间表
Table 2 Schedule of chronic unforeseeable stimuli

时间 Time	造模方式 Molding method	具体安排 Specific arrangement
星期一 Monday	冰水游泳 10 min+频闪 12 h+噪音 30 min Ice water swimming 10 min+strobe 12 h+noise 30 min	8:50~9:00 冰水游泳 9:00~9:30 噪音 9:00~21:00 频闪 8:50~9:00 Ice water swimming 9:00~9:30 Noise 9:00~21:00 Stroboscopic
星期二 Tuesday	禁水 12 h+湿笼 12 h Water prohibition 12 h+wet cage 12 h	21:00~9:00 湿笼 21:00~9:00 Wet cage
星期三 Wednesday	电击 5 min+昼夜颠倒 Shock 5 min+day and night reverse	9:00~9:30 电击 9:00~9:30 Shock
星期四 Thursdays	热水游泳 10 min+频闪 12 h+噪音 30 min Hot water swimming 10 min+stroboscopic 12 h+noise 30 min	8:50~9:00 热水游泳 9:00~9:30 噪音 9:00~21:00 频闪 8:50~9:00 Hot water swimming 9:00~9:30 Noise 9:00~21:00 Stroboscopic
星期五 Friday	禁食 12 h+间断照明 30 min Abstinence 12 h+intermittent lighting 30 min	8:30~20:30 禁食 9:00~21:00 间断照明 8:30~20:30 Abstinence 9:00~21:00 Intermittent lighting
星期六 Saturday	夹尾 3 min+频闪 12 h+噪音 30 min Clip 3 min+stroboscopic 12 h +noise 30 min	8:50~9:30 夹尾 9:00~9:30 噪音 9:00~21:00 频闪 9:00~9:30 Clip 9:00~9:30 Noise 9:00~21:00 Stroboscopic
星期天 Sunday	束缚 6 h+倾笼 12 h Bind 6 h+tilting cage 12 h	9:30~21:30 束缚 21:30~9:30 倾笼 9:30~21:30 Bind 21:30~9:30 Tilting cage

胃周期为 35 d。灌胃期间继续造模,末次给药后需进行相应行为学检测,检测结束后取脑组织进行相关检测。

1. 3. 3 糖水偏爱实验

实验共需 3 d,包括 2 d 的糖水训练期和 1 d 的测试期:

训练期第 1 天(9:00),所有动物单笼饲养,给予每只大鼠两瓶液体:两瓶蔗糖糖水(1%)。在此期间让大鼠自由饮食饮糖水,每隔 12 h 更换水瓶位置。

训练期第 2 天(9:00),更换每只大鼠的两瓶液体:1 瓶蔗糖糖水(1%)+1 瓶纯水,期间让大鼠自由饮食饮水,每隔 12 h 更换水瓶位置。训练期次日(9:00),将食物和水瓶取出,动物禁食禁水 24 h。

禁食进水结束后,早上 9:00,进行糖水偏爱实验测试:每只大鼠自由饮用提前称好重量的糖水和纯水共 1 h,测试期间要保持实验室内环境安静。早上 10:00 取下所有糖水瓶和纯水瓶。随后称水瓶的

重量,并计算动物的糖水偏爱指数(糖水消耗/总液体消耗×100%)。检测结束后,立即给动物加食加水,所有大鼠自由饮食饮水。

1. 3. 4 旷场实验

测试箱为黑色圆形敞箱(直径 90 cm,高 50 cm),顶部支架上装有摄像机,与电脑相连,检测时,将大鼠放入测试箱中央,点击“开始测试”实验开始,总的检测时间为 5 min。5 min 实验结束后,系统(旷场实验计算机实时检测分析处理系统)进行测试,自动记录的大鼠的运动路程。

1. 3. 5 新奇环境摄食抑制实验

采用圆形敞箱(直径 90 cm,高 60 cm),每次检测前在敞箱中心放入 3 粒食物,大小相同,下一组大鼠检测前需喷洒 75%乙醇清理敞箱中大鼠的排泄物,并更换敞箱中的食物。所有大鼠提前 1 d 禁食禁水,共 24 h。次日同一时间开始检测,检测时需将大鼠背向食物放入敞箱内,记录大鼠自放入测试箱中至大鼠第一次咬食食物的时间,为摄食潜伏期,

总的测试时间为 15 min。

1.3.6 大鼠高架十字迷宫实验

测试前,先将大鼠放在开阔场地中适应 5 min,适应后将大鼠置于高架十字迷宫中央,大鼠头部朝着高架十字迷宫的开臂方向,开始实验后计时 5 min,实验结束后喷洒酒精清理高架十字迷宫中大鼠的排泄物。检测指标包括进入开臂时间比、进入开臂次数比。

1.3.7 大鼠强迫游泳实验

大鼠强迫游泳实验方法分为训练期和测试期,大鼠放入装有 30 cm 水的透明亚克力塑料圆桶内(直径 18 cm,高 40 cm),水温维持在(24 ±1)℃,连续 2 d 游泳。第一天使其预游泳(预适应)15 min。24 h 后进入测试期,将大鼠放入桶中,用 DV 摄像机拍摄记录 5 min 内大鼠运动情况,采用随机双盲的方法人工统计 5 min 中内大鼠不动时间。

1.3.8 样本采集

行为学实验检测结束后取材。所有大鼠采用戊巴比妥钠麻醉后,取腹主动脉血,血液于 4℃ 静置过夜后,3500 r/min、10 min、4℃ 条件下分离血清,后分装于 0.5 mL 离心管内,于-80℃ 保存备用。取血后,所有大鼠取脑部,在冰上用大号手术剪剥开大鼠脑壳,用手术镊迅速剥离出大鼠左右两侧海马组织,然后按顺序分装于提前标号的 2 mL 灭菌 EP 管中,取材结束后统一转移到-80℃ 冰箱中保存。

1.3.9 CUMS 大鼠模型机制检测

使用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清中皮质酮的水平,检测大鼠血清和海马中炎症因子 IL-6、IL-1β、

TNF-α 的水平。按照说明书步骤进行。

1.4 统计学方法

实验结果采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,结果表示为平均数±标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$),当 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。实验结果符合正态分布,用单因素方差分析(one-way ANOVA),最小显著差数法(LSD)多重比较方法比较组间差异;若数据为非正态分布或者方差不齐,用非参数方差分析(Kruskal-Wallis test)检验。最后使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件作图。

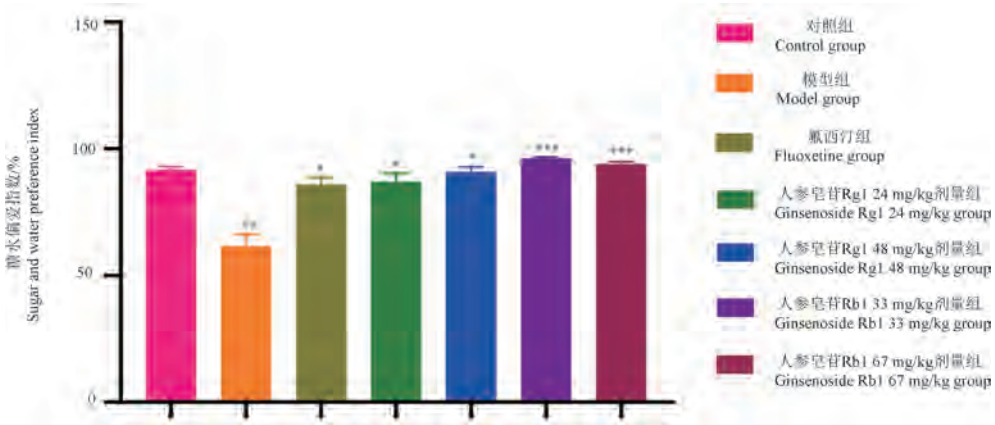
2 结果

2.1 人参皂苷 Rg1 与 Rb1 对 CUMS 模型大鼠糖水偏爱指数的影响

如图 1,与对照组相比,模型组大鼠的糖水偏爱指数降低($P < 0.01$);与模型组相比,氟西汀组、人参皂苷 Rg1 24 mg/kg 剂量组、人参皂苷 Rg1 48 mg/kg 剂量组、人参皂苷 Rb1 33 mg/kg 剂量组、人参皂苷 Rb1 67 mg/kg 剂量组的糖水偏爱指数均有提升($P < 0.05, P < 0.05, P < 0.05, P < 0.001, P < 0.001$)。

2.2 人参皂苷 Rg1 与 Rb1 对 CUMS 模型大鼠旷场实验的影响

如图 2,与对照组相比,CUMS 模型组大鼠在空场实验中的运动路程(cm)、平均速度(cm/s)均明显下降($P < 0.01, P < 0.01$);与模型组相比,各个给药组的两项指标均未见显著性差异。结果表明,人参皂苷 Rg1 与 Rb1 对 CUMS 大鼠的自主活动无影响。



注:与对照组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$ 。

图 1 Rg1 与 Rb1 对 CUMS 大鼠糖水偏爱的影响($n = 8$)

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

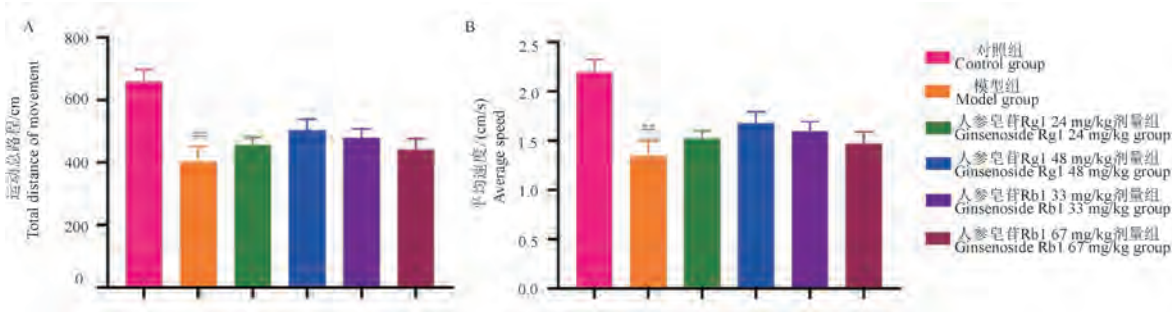
Figure 1 Effects of Rg1 and Rb1 on sugar and water preference in CUMS rats

2.3 人参皂苷 Rg1 与 Rb1 对 CUMS 模型大鼠新奇环境摄食抑制实验的影响

如图 3,与对照组相比,CUMS 模型组大鼠的摄食潜伏期上升($P<0.001$);与模型组相比,人参皂苷 Rg1 48 mg/kg 剂量组的摄食潜伏期降低,且有显著性差异($P<0.01$),其余剂量组的摄食潜伏期有下降趋势,但未见显著性差异。

2.4 人参皂苷 Rg1 与 Rb1 对 CUMS 模型大鼠高架十字迷宫实验的影响

如图 4,与对照组相比,模型组的进入开臂时间的比例显著下降($P<0.05$);进入开臂次数的比例有下降趋势,但没有显著性差异。与模型组相比,人参皂苷 Rg1 24 mg/kg 和 48 mg/kg 剂量组均能使大鼠进入开臂时间的比例显著上升($P<0.05$, $P<0.05$),而人参皂苷 Rb1 67 mg/kg 剂量组有上升趋势,但没有显著性差异。各个剂量组大鼠进入开臂次数的比例有下降趋势,但没有显著性差异。

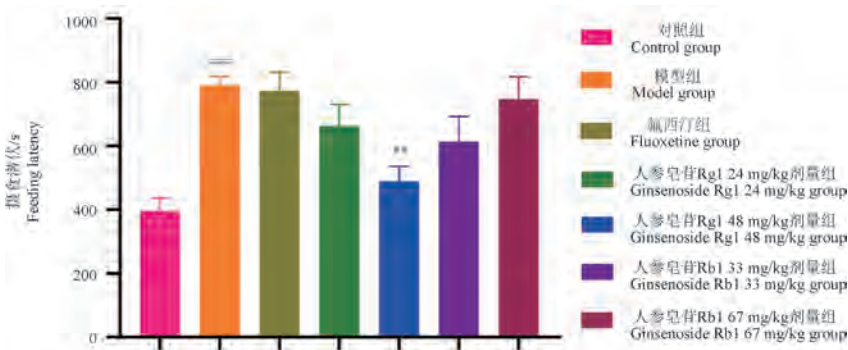


注:与对照组比较,## $P<0.01$ 。

图2 Rg1 与 Rb1 对 CUMS 模型大鼠旷场实验的影响($n=8\sim12$)

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

Figure 2 Effects of Rg1 and Rb1 on open field experiment of CUMS model rats

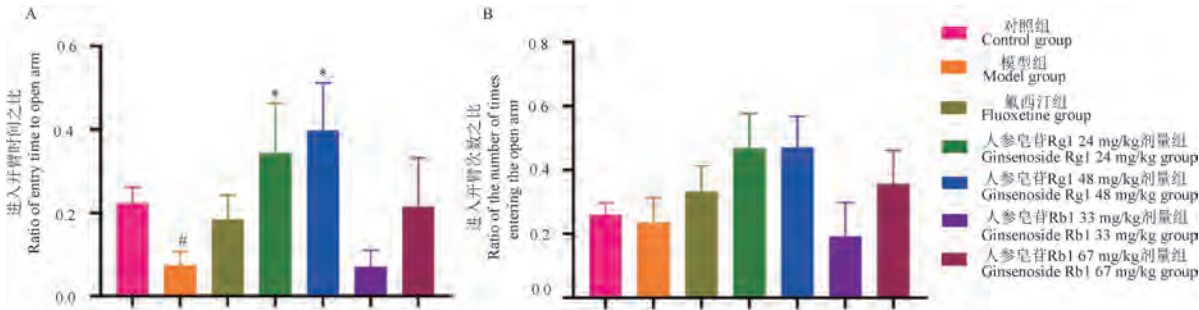


注:与对照组比较,### $P<0.001$;与模型组比较,** $P<0.01$ 。

图3 Rg1 与 Rb1 对 CUMS 大鼠新奇摄食抑制实验的影响($n=8$)

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

Figure 3 Effects of Rg1 and Rb1 on novel feeding inhibition experiment in CUMS rats



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

图4 Rg1 与 Rb1 对 CUMS 模型大鼠进入开臂次数比与时间比的影响($n=8\sim12$)

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

Figure 4 Effects of Rg1 and Rb1 on the ratio of times and time to enter the open arm of CUMS model rats

2.5 人参皂苷 Rg1 与 Rb1 对 CUMS 模型大鼠强迫游泳实验的影响

如图 5,与对照组相比,模型组大鼠在水中的不动时间显著升高($P<0.001$);与模型组相比,氟西汀组、人参皂苷 Rg1 24 mg/kg 剂量组、人参皂苷 Rg1 48 mg/kg 剂量组、人参皂苷 Rb1 33 mg/kg 剂量组、人参皂苷 Rb1 67 mg/kg 剂量组的不动时间均显著降低($P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.001$)。大鼠强迫游泳的结果表明,人参皂苷 Rg1 与 Rb1 均可以降低 CUMS 大鼠在水中的不动时间。

2.6 人参皂苷 Rg1 与 Rb1 对 CUMS 模型大鼠血清中皮质酮水平的影响

如图 6,与对照组相比,模型组大鼠血清中皮质酮的水平上升,且有显著性差异($P<0.01$);与模型组相比,人参皂苷 Rg1 24 mg/kg 剂量组、人参皂苷 Rg1 48 mg/kg 剂量组、人参皂苷 Rb1 33 mg/kg 剂量组、人参皂苷 Rb1 67 mg/kg 剂量组均能使大鼠血清中的皮质酮含量显著下降($P<0.001$, $P<0.001$, $P<$

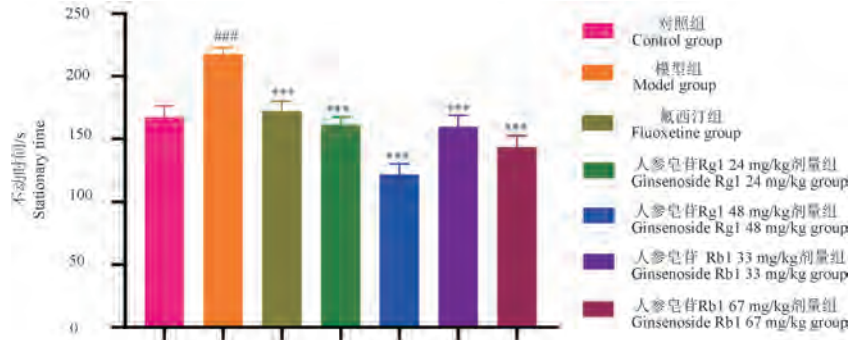
0.001 , $P<0.001$)。结果表明,人参皂苷 Rg1 与 Rb1 均可以降低 CUMS 模型大鼠血清中皮质酮的含量。

2.7 人参皂苷 Rg1 与 Rb1 对 CUMS 模型大鼠血清中炎症因子的影响

如图 7,与对照组相比,CUMS 模型组的血清中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 的水平均显著上升($P<0.05$, $P<0.001$),CUMS 模型组的血清中炎症因子 TNF- α 的水平有上升趋势,但没有显著性差异;与模型组相比,人参皂苷 Rg1 24 mg/kg 剂量组与人参皂苷 Rg1 48 mg/kg 剂量组能够显著降低血清中 IL-1 β 、IL-6 的水平($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.001$),人参皂苷 Rb1 33 mg/kg 剂量组显著降低血清中 TNF- α 、IL-6 的水平($P<0.05$, $P<0.001$),人参皂苷 Rb1 67 mg/kg 剂量组能显著降低血清中 IL-1 β 、IL-6 的水平($P<0.05$, $P<0.001$)。

2.8 人参皂苷 Rg1 与 Rb1 对 CUMS 模型大鼠海马中炎症因子的影响

如图 8,与对照组相比,CUMS 模型组的海马中

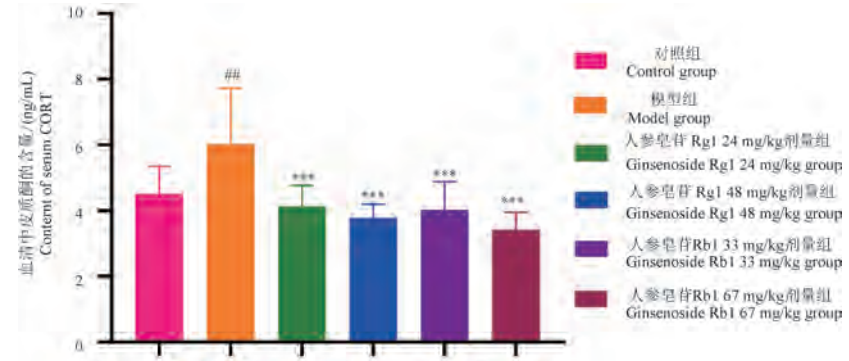


注:与对照组比较,### $P<0.001$;与模型组比较,*** $P<0.001$ 。

图 5 Rg1 与 Rb1 对 CUMS 模型大鼠强迫游泳实验的影响($n=8\sim12$)

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

Figure 5 Effects of Rg1 and Rb1 on forced swimming experiment in CUMS model rats

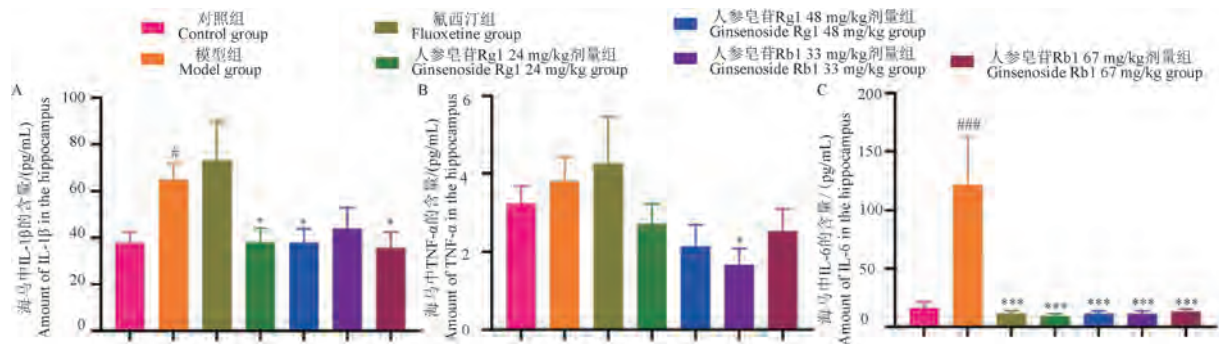


注:与对照组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,*** $P<0.001$ 。

图 6 Rg1 与 Rb1 对 CUMS 模型大鼠血清中皮质酮的影响($n=8$)

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

Figure 6 Effects of Rg1 and Rb1 on serum corticosterone in CUMS model rats

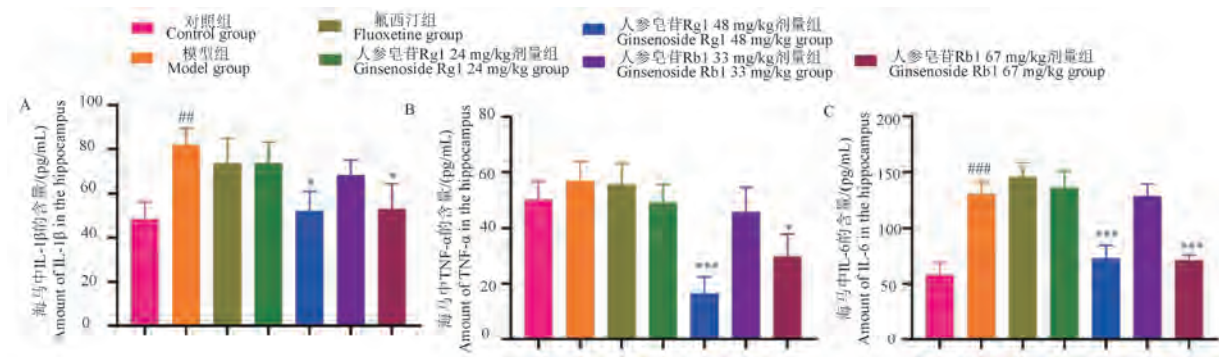


注:与对照组比较, # $P<0.05$, ### $P<0.001$;与模型组比较, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

图 7 Rg1 与 Rb1 对 CUMS 模型大鼠血清中炎症因子的影响 ($n=8$)

Note. Compared with control group, # $P<0.05$, ### $P<0.001$. Compared with the model group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

Figure 7 Effects of Rg1 and Rb1 on serum inflammatory factors in CUMS model rats



注:与对照组比较, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$;与模型组比较, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

图 8 Rg1 与 Rb1 对 CUMS 模型大鼠海马中炎症因子的影响 ($n=8$)

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

Figure 8 Effects of Rg1 and Rb1 on inflammatory factors in hippocampus of CUMS model rats

炎症因子 IL-1 β 、IL-6 的水平均显著上升 ($P<0.01$, $P<0.001$), CUMS 模型组的血清中炎症因子 TNF- α 的水平有上升趋势,但没有显著性差异;与模型组相比,人参皂苷 Rg1 48 mg/kg 剂量组能够显著降低模型大鼠海马中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的水平 ($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.001$), 人参皂苷 Rb1 67 mg/kg 剂量组也能够显著降低海马中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的水平 ($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.001$), 其余剂量组也改变了海马中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的趋势,但未出现显著性差异。

3 结论

抑郁症在现今社会中是一种常见的精神类疾病,患者长时间处于悲伤和压力的状态下,甚至难以参与正常的日常生活,外界快节奏、强压力使得人们精神时刻紧绷,抑郁症的发病群体也逐渐年轻化^[20-21]。CUMS 模型可以让动物经历多种慢性不可预知、低强度的刺激,从而使动物产生抑郁情绪,

是一种经典的抑郁症动物模型,广泛应用于抗抑郁药物作用的研究,其病理机制接近人类的抑郁症,主要模拟了人类抑郁的症状(快感缺乏、兴趣愉快丧失、社会交往能力下降等)^[22-24]。

本实验采用 CUMS 模型进行大鼠抑郁状态造模,连续造模 35 d 后进行行为学检测,检测结果显示, CUMS 模型大鼠与正常组相比,糖水偏爱指数下降、强迫游泳不动时间延长、新奇抑制摄食实验潜伏期延长、高架十字迷宫实验进入开臂时间下降,均具有显著性差异,表明模型建立成功。人参皂苷 Rg1 与 Rb1 灌胃给药能够显著提高 CUMS 模型大鼠的糖水消耗量、减少动物的绝望行为,改善大鼠的抑郁情绪;此外,焦虑行为学实验检测结果发现,与 CUMS 模型组相比,人参皂苷 Rg1 与 Rb1 用药组在新奇抑制摄食实验中大鼠摄食潜伏期减少,人参皂苷 Rg1 组大鼠高架十字迷宫实验进入开臂时间百分率明显增加,提示人参皂苷 Rg1 与 Rb1 能够有效改善模型大鼠抑郁焦虑的情绪。

下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA 轴)参与认知、学习、记忆等高级生理活动,抑郁症的发病与 HPA 轴异常亢进有密切关系,糖皮质激素水平持续升高直接影响 HPA 轴调节。皮质酮是糖皮质激素的一种,在应激状态下,HPA 轴亢进后释放皮质酮,皮质酮浓度过高可破坏海马神经元生理功能导致抑郁^[25-26]。在本实验中,人参皂苷 Rg1 与 Rb1 均可以使模型大鼠血清中皮质酮水平下降,差异具有统计学意义,或表明人参皂苷 Rg1 与 Rb1 改善 CUMS 模型大鼠抑郁焦虑行为的作用机制与降低血清皮质酮水平,抑制下丘脑-垂体-肾上腺轴过度亢进有关。

有研究表明,抑郁症的发病与炎症密切相关,外周血 IL-6、IL-1β、TNF-α 等被证实为抑郁症患者中可靠的炎症标志物^[27-28],海马与皮层等部位的变化与抑郁症的发生、发展密切相关^[29]。新奇抑制摄食实验与高架十字迷宫实验均可以用于评价抑郁动物模型出现的焦虑样行为,本研究结果显示,新奇抑制摄食实验中,人参皂苷 Rg1 48 mg/kg 剂量组的摄食潜伏期明显降低,高架十字迷宫实验中人参皂苷 Rg1 两个剂量组的大鼠进入开臂时间的比例显著上升,说明人参皂苷 Rg1 可以改善 CUMS 模型

大鼠的焦虑样行为,而人参皂苷 Rb1 两个剂量组的大鼠模型均未发生行为学上的改变;后续实验表明,人参皂苷 Rg1 与 人参皂苷 Rb1 两个剂量组在治疗后,血清与海马中的 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平均较治疗前有所改善,但人参皂苷 Rg1 两个剂量组血清中 IL-1β、IL-6 水平下降更为明显,提示人参皂苷 Rg1 通过下调大鼠血清与海马中的炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 的表达,发挥更强的抗炎、抗焦虑的作用;且在同等剂量的情况下,人参皂苷 Rg1 的抗焦虑作用强于人参皂苷 Rb1(表 3)。

综上,人参皂苷 Rg1 与 Rb1 能够改善 CUMS 模型大鼠的抑郁、焦虑样行为,其作用机制可能是通过降低大鼠血清与海马中炎症因子的表达,减轻炎症反应,减少细胞损伤,达到抗抑郁、抗焦虑的作用。此外,在动物实验中,我们还发现,同等剂量下人参皂苷 Rg1 的抗焦虑作用优于人参皂苷 Rb1。但本实验检测了血清皮质酮水平与血清和海马中炎症因子 IL-6、IL-1β、TNF-α 的水平,证明两种人参皂苷均能在一定程度上改善慢性不可预测模型大鼠的抑郁焦虑样行为,但两组之间的差异没有统计学意义,更深的作用机制仍待继续研究。

表 3 Rg1 与 Rb1 对 CUMS 模型大鼠实验结果对比(n=8)
Table 3 Comparison of experimental results of Rg1 and Rb1 on CUMS model rats

分组 Group	糖水偏爱实验 Sugar and water prefers experimentation	空场实验 Open field experiment	新奇抑制摄食 Novelty-suppressed feeding test	高架十字迷宫 (进入开臂时间比) Elevated cross maze experiment (ratio of entry time to open arm)	强迫游泳实验 Forced swimming test	血清皮质酮 Content of serum CORT	血清中炎症因子含量 Inflammatory factors in the serum			海马中炎症因子含量 Inflammatory factors in the hippocampus		
							IL-1β	TNF-α	IL-6	IL-1β	TNF-α	IL-6
人参皂苷 Rg1 24 mg/kg 剂量组 Ginsenoside Rg1 24 mg/kg group	* / ↑	/	/	* / ↑	*** / ↓	*** / ↓	* / ↓	/	*** / ↓	/	/	/
人参皂苷 Rg1 48 mg/kg 剂量组 Ginsenoside Rg1 48 mg/kg group	* / ↑	/	** / ↓	* / ↑	*** / ↓	*** / ↓	* / ↓	/	*** / ↓	* / ↓	*** / ↓	*** / ↓
人参皂苷 Rb1 33 mg/kg 剂量组 Ginsenoside Rb1 33 mg/kg group	*** / ↑	/	/	/	*** / ↓	*** / ↓	/	* / ↓	*** / ↓	/	/	/
人参皂苷 Rb1 67 mg/kg 剂量组 Ginsenoside Rb1 67 mg/kg group	*** / ↑	/	/	/	*** / ↓	*** / ↓	* / ↓	/	*** / ↓	* / ↓	* / ↓	*** / ↓

注:与模型组比较,* P<0.05,** P<0.01,*** P<0.001。
Note. Compared with model group,* P<0.05,** P<0.01,*** P<0.001.

参考文献:

- [1] MCCARRON R M, SHAPIRO B, RAWLES J, et al. Depression [J]. Ann Intern Med, 2021, 174(5): ITC65-ITC80.
- [2] MURRAY C J, LOPEZ A D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study [J]. Lancet, 1997, 349(9064): 1498-1504.
- [3] 张依萍, 徐旭, 吕亿婷, 等. 基于网络药理学和实验验证研究柠檬精油缓解焦虑症的作用机制 [J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36(2): 336-347.
ZHANG Y P, XU X, LYU Y T, et al. Mechanism of lemon essential oil in mitigation of anxiety based on network pharmacology and experimental validation [J]. Nat Prod Res Dev, 2024, 36(2): 336-347.
- [4] PENNINX B W, PINE D S, HOLMES E A, et al. Anxiety disorders [J]. Lancet, 2021, 397(10277): 914-927.
- [5] 李燕清, 齐玉梅. 枸橼酸坦度螺酮联合草酸艾司西酞普兰治疗抑郁症伴焦虑的疗效观察 [J]. 中国处方药, 2024, 22(1): 113-116.
LI Y Q, QI Y M. Clinical observation of tandospirone citrate combined with escitalopram oxalate in the treatment of depression with anxiety [J]. J China Prescr Drug, 2024, 22(1): 113-116.
- [6] FILE S E. Recent developments in anxiety, stress, and depression [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1996, 54(1): 3-12.
- [7] CHOPRA K, KUMAR B, KUHAD A. Pathobiological targets of depression [J]. Expert Opin Ther Targets, 2011, 15(4): 379-400.
- [8] 张瑜玉, 张伟, 孔德志. 人参皂苷 Rd 的神经保护作用机制研究进展 [J]. 现代中药研究与实践, 2023, 37(2): 92-97.
ZHANG Y Y, ZHANG W, KONG D Z. Research progress on the neuroprotective mechanism of ginsenoside rd [J]. Res Pract Chin Med, 2023, 37(2): 92-97.
- [9] (清)孙星衍, (清)孙冯翼. 神农本草经 [M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2018.
SUN X Y, SUN F Y. Shennong's Herbal Classics [M]. Taiyuan: Shanxi Science and Technology Press, 2018.
- [10] 韩文静, 侯丽慧, 王乐, 等. 人参有效成分改善老年性记忆力减退和阿尔茨海默病的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(11): 2811-2815.
HAN W J, HOU L H, WANG Y, et al. Research progress of effective components of ginseng in improving senile memory loss and Alzheimer's disease [J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(11): 2811-2815.
- [11] Wang G, Lei C, Tian Y, et al. Rb11, the primary active ingredient in Panax ginseng C. A. Meyer, exerts antidepressant-like effects via the BDNF-Trkb-CREB pathway [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1034.
- [12] 龙俊鹏, 孙洋, 刘莎莎, 等. 人参皂苷 Rg1 的神经保护作用研究进展 [J]. 药学报, 2023, 9(1): 21-26.
LONG J P, SUN Y, LIU S S, et al. Progress on the neuroprotective effects of ginsenoside Rg1 [J]. Acta Pharm Sin, 2023, 9(1): 21-26.
- [13] LIU Z, XIE R, ZHONG C, et al. Recent progress (2015-2020) in the investigation of the pharmacological effects and mechanisms of ginsenoside Rb1, a main active ingredient in Panax ginseng Meyer [J]. J Ginseng Res, 2022, 46(1): 39-53.
- [14] YOUSUF S, LIU H, YINGSHU Y, et al. Ginsenoside Rg1 modulates intestinal microbiota and supports re-generation of immune cells in dexamethasone-treated mice [J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 2022, 69(4): 259-269.
- [15] 卢永颖, 朱茂晶, 倪丽娜, 等. CUMS+LPS 致小鼠抑郁模型的建立及人参皂苷 Rb1 的抗抑郁机制研究 [J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2019, 32(2): 146-150.
LU Y Y, ZHU M J, NI L N, et al. Establishment of CUMS + LPS induced depression model in mice and antidepressant mechanism research of ginsenoside Rb1 [J]. J Yantai Univ Nat Sci Eng Ed, 2019, 32(2): 146-150.
- [16] 唐敏敏. 人参皂苷 Rb1 的抗抑郁作用及其神经免疫机制的研究 [D]. 成都: 电子科技大学, 2017.
TANG M M. The antidepressant effect of ginsenoside Rb1 and its immune mechanism in CMS mode mice [D]. Chengdu: University of Electronic Science and Technology of China, 2017.
- [17] YANG Y, LI S, HUANG H, et al. Comparison of the protective effects of ginsenosides Rb11 and Rg11 on improving cognitive deficits in SAMP8 mice based on anti-neuroinflammation mechanism [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 834.
- [18] 姜宁, 范琳犀, 杨玉洁, 等. 金钗石斛提取物对慢性不可预见应激模型小鼠的抗抑郁作用 [J]. 生理学报, 2017, 69(2): 159-166.
JIANG N, FAN L X, YANG Y J, et al. Antidepressant effects of the extract of *Dendrobium nobile* Lindl on chronic unpredictable mild stress-induced depressive mice [J]. Acta Physiol Sin, 2017, 69(2): 159-166.
- [19] 姜宁, 姚彩虹, 叶帆, 等. 大小鼠焦虑行为实验方法概述 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 698-704.
JIANG N, YAO C H, YE F, et al. Overview of animal behavioral tests of anxiety [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 698-704.
- [20] SHOREY S, NG E D, WONG C H J. Global prevalence of depression and elevated depressive symptoms among adolescents: a systematic review and meta-analysis [J]. Br J Clin Psychol, 2022, 61(2): 287-305.
- [21] 江寒寒, 曾智. 中国儿童青少年抑郁症疾病负担变化趋势分析 [J]. 中国预防医学杂志, 2024, 25(3): 379-384.
JIANG X H, ZENG Z. Trends of disease burden of depression in children and adolescents in China [J]. Chin Prev Med, 2024,

25(3): 379-384.

[22] WANG Y L, WU H R, ZHANG S S, et al. Catalpol ameliorates depressive-like behaviors in CUMS mice via oxidative stress-mediated NLRP3 inflammasome and neuroinflammation [J]. *Transl Psychiatry*, 2021, 11(1): 353.

[23] 贾晓蕾, 王颖. 痛泻要方合四逆散颗粒对 CUMS 诱导的抑郁大鼠 HPA 轴及 PI3K/Akt 信号通路的影响 [J]. *四川中医*, 2023, 41(12): 69-73.

JIA X L, WANG Y. Effects of Tongxieyao Fang and Sini Powder on HPA axis and PI3K/akt signal pathway in depressed rats Induced by CUMS [J]. *J Sichuan Tradit Chin Med*, 2023, 41(12): 69-73.

[24] WANG J Y, ZHANG Y, CHEN Y, et al. Mechanisms underlying antidepressant effect of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation on CUMS model rats based on hippocampal $\alpha 7$ nAChR/NF- κ B signal pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 291.

[25] 孟霜, 史敏, 冯振宇, 等. 温阳解郁颗粒对皮质酮损伤型海马神经细胞的保护作用及其机制[J/OL]. *江苏大学学报(医学版)* [2023-12-13]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=3_cPGLZMhAl6KwTRC0o6_-1dni9d-gAgdy-kGnXQVthH9YsZHa8IbYJvfcwpjRvg97cY1vB4gY2xBq6BBcpMuDoXx34vfTe4J6rRljeNSqZRFFqjkhxHI53UUewpM206kVnpHL9o8=&uniplatform=NZKPT&language=CHS.10.13312/j.issn.1671-7783.y220255.

MENG S, SHI M, FENG Z Y, et al. The protective effect and mechanism of Wenyang Jieyu granule on hippocampal neurons damaged by corticosterone[J/OL]. *Journal of Jiangsu University (Medicine Edition)* [2023-12-13]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=3_cPGLZMhAl6KwTRC0o6_-1dni9d-gAgdy-kGnXQVthH9YsZHa8IbYJvfcwpjRvg97cY1vB4gY2xBq6BBcpMuDoXx34vfTe4J6rRljeNSqZRFFqjkhxHI53UUewpM206kVnpHL9o8=&uniplatform=NZKPT&language=CHS.10.13312/j.issn.1671-7783.y220255.

[26] KELLER J, GOMEZ R, WILLIAMS G, et al. HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition [J]. *Mol Psychiatry*, 2017, 22(4): 527-536.

[27] PETRALIA M C, MAZZON E, FAGONE P, et al. The cytokine network in the pathogenesis of major depressive disorder. Close to translation? [J]. *Autoimmun Rev*, 2020, 19(5): 102504.

[28] 郭朝, 冯素娟, 张毅. 抑郁症中小胶质细胞极化信号通路的研究进展 [J]. *海南医学*, 2023, 34(14): 2110-2113.

GUO C, FENG S J, ZHANG Y. Research progress on microglial polarization signaling pathways in depression [J]. *Hainan Med J*, 2023, 34(14): 2110-2113.

[29] KRONMÜLLER K T, SCHRÖDER J, KÖHLER S, et al. Hippocampal volume in first episode and recurrent depression [J]. *Psychiatry Res*, 2009, 174(1): 62-66.

[收稿日期]2023-12-13

黄恒,潘永明,黄俊杰,等. 1470 nm 半导体激光治疗仪对犬前列腺切除术的有效性研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34 (7): 79-88.

Huang H, Pan YM, Huang JJ, et al. Effectiveness of 1470 nm semiconductor laser therapy for canine prostatectomy [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 79-88.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.009

1470 nm 半导体激光治疗仪对犬前列腺切除术的有效性研究

黄 恒¹, 潘永明², 黄俊杰², 张 辉¹, 郁 晨², 陈民利², 徐庆丰¹, 郑 国^{1*}

(1.合肥大族科瑞达激光设备有限公司, 合肥 230088; 2.浙江中医药大学动物实验研究中心, 杭州 310053)

【摘要】 目的 评估 1470 nm 半导体激光治疗仪(简称:科瑞达治疗仪)对犬前列腺切除术的有效性。**方法** 选取成年雄性 Beagle 犬 28 只,随机分为 3 组,即假手术组 3 只、试验组 15 只和同类对照组 10 只;其中试验组又分为 120 W/50 W、150 W/50 W、160 W/50 W 的汽化切割/凝固止血 3 个小组;同类对照组又分为 120 W/50 W、150 W/50 W 的汽化切割/凝固止血 2 个小组;每小组各 5 只。试验组和同类对照组均在电切镜下经膀胱颈入口行犬前列腺切除术。术中观察产品的操作适配性和有效性;术后观察犬的一般体征,以及在术前、术后即刻、3 d、7 d、28 d 时取血测定血液生化和血液学指标;分别在术后 1 h、4 周时,行超声和电切镜下观察尿道前列腺部情况,并取前列腺组织进行 HE 染色分析术后 1 h 的凝固层厚度和 4 周尿道上皮修复情况。**结果** 术中,试验品和同类对照品进行犬前列腺切除术的操作性能良好,具有较好的汽化切割和凝固止血性能;术后对犬的一般体征、血液学和血液生化指标均未见明显影响;且超声显示术后即刻可见尿道扩张,尿道上皮回声略有增强;4 周时,可见前列腺组织实质为略低回声,内部为均匀分布细小点状回声,包膜呈线状高回声,与假手术组一致。测量分析显示,试验组和同类对照组汽化切割前列腺组织重量约为 0.91~1.33 g,切除比例达 17.11%~20.27%;且随汽化切割功率的增加,激光发射时间逐渐减少,而汽化切割速度和效能均有所增加;但试验组与同类对照组比较均未见明显差异($P>0.05$)。电切镜下可见试验组和同类对照组在术后 1 h 时前列腺尿道部创面呈烧灼样改变,创面和正常尿路上皮分界明显;4 周时,前列腺部尿路上皮已修复平整,周围正常尿路上皮分界较模糊。同样,病理观察也显示,术后 1 h 时试验组和同类对照组均可见前列腺尿道口损伤明显,创面表面有少量碳化和凝固性坏死,少量炎性细胞聚集,凝固层厚度约在 0.4 mm 左右;术后 4 周时,假手术组前列腺尿道部形态未见异常,试验组和同类对照组均可见新生上皮基本覆盖创面,厚度较均匀,无凝固性坏死组织附在创面上,周围仍有轻度炎性反应,成纤维细胞增生明显,周围前列腺可见间质和上皮细胞增生,部分可见鳞状化发生;前列腺包膜完好,周围神经血管形态未见异常。**结论** 科瑞达治疗仪对 Beagle 犬前列腺切除术是有效的,具有较好的汽化切割和凝固止血性能,且术后的各项生理指标较假手术组无显著差异。

【关键词】 半导体激光治疗仪;1470 nm 激光波长;良性前列腺增生;犬

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0079-10

Effectiveness of 1470 nm semiconductor laser therapy for canine prostatectomy

HUANG Heng¹, PAN Yongming², HUANG Junjie², ZHANG Hui¹, YU Chen², CHEN Minli², XU Qingfeng¹, ZHENG Guo^{1*}

(1. Hefei Dazhu Curestar Laser Equipment Co., Ltd, Hefei 230088, China. 2. Laboratory Animal Research Center/Comparative Medical Research Institute, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053)

【作者简介】 黄恒(1964—),男,硕士,高级工程师,研究方向:激光在医学领域中的应用。E-mail:hansmd@163.com

【通信作者】 郑国(1987—),男,本科,中级工程师,研究方向:激光在医学领域应用。E-mail:zheo339@163.com

[Abstract] Objective To evaluate the effectiveness of a 1470 nm semiconductor laser therapeutic instrument (referred to as a curestar therapeutic instrument) for prostatectomy in Beagle dogs. **Methods** Twenty-eight adult male Beagle dogs were randomly divided into three groups: sham ($n=3$), experimental ($n=15$), and control ($n=10$). The experimental group was further divided into three subgroups: 120 W/50 W, 150 W/50 W, and 160 W/50 W for vaporization cutting/coagulation hemostasis. The control group was divided into two subgroups: 120 W/50 W and 150 W/50 W with five in each subgroup. Experimental and control groups underwent canine prostatectomy through the entrance of the bladder neck under electrocision. The operational suitability and effectiveness of the product during surgery were assessed. After the operation, the general condition of the dogs was observed, and blood biochemical and hematological indicators were measured before, immediately after, and at 3, 7, and 28 days after the operation. At 1 h and 4 weeks after surgery, B-ultrasound and electric resection were performed under anesthesia to observe the conditions of the urethra and prostate, and prostatic tissue was subjected to HE staining for pathological observations. The thickness of the coagulation layer at 1 h after the operation and repair of the urothelial epithelium at 4 weeks were analyzed. **Results** During the operation, experimental and control groups had good operability and showed good vaporization cutting and coagulation hemostasis performance. After the operation, no significant effects were observed on the general condition, and blood biochemical and hematological indicators of the dogs. Ultrasound showed that the urethral expansion was visible immediately after the operation, and the echo of the urethral epithelium was slightly enhanced. At 4 weeks, the prostate tissue had a slightly low echo with uniformly distributed small point-like echoes inside, and the capsule had a linearly high echo, consistent with the sham group. The weight of the vaporized prostate tissue in experimental and control groups was 0.91~1.33 g with a resection rate of 17.11%~20.27%. As the power of vaporization cutting increased, the laser emission time gradually decreased, while the vaporization cutting speed and efficiency both increased. However, no significant difference was found between experimental and control groups ($P>0.05$). Under the electrocision microscope, a burn-like change was observed in the surgical wounds of the prostate urethra in experimental and control groups at 1 h after surgery, and the boundary between the wound and normal urothelium was visible. At 4 weeks, the urothelium of the prostate had been repaired and flattened, and the boundary with the surrounding normal urothelium was blurred. Similarly, pathological observations showed that experimental and control groups had significant damage to the prostate urethral orifice at 1 h after surgery with a small amount of carbonization and coagulative necrosis on the surface of the wound, a small amount of inflammatory cell infiltration, and a coagulation layer thickness of approximately 0.4 mm. At 4 weeks, the prostate urethral morphology of the sham group was normal, whereas experimental and control groups showed new epithelial growth covering the wound with a uniform thickness and no coagulative necrosis tissue attached to the wound. A mild inflammatory reaction was still present in the surrounding area, fibroblast proliferation was obvious, and stromal and epithelial cell proliferation was visible in the surrounding prostate, some of which showed squamous metaplasia. The prostate capsule was intact and the morphology of the surrounding nerves and blood vessels was normal. **Conclusions** The curestar therapy instrument is effective for prostatectomy in Beagle dogs with good vaporization cutting and coagulation hemostasis performance. No significant difference was found in postoperative physiological indicators compared with the sham group.

[Keywords] semiconductor laser therapy instrument; 1470 nm laser wavelength; benign prostatic hyperplasia; dog
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

良性前列腺增生 (benign prostatic hyperplasia, BPH) 是一种常伴随下尿路症状 (lower urinary tract symptoms, LUTS) 出现的疾病, 常发生在中老年男性^[1]。目前常用的治疗方法包括药物治疗和手术治疗, 然而这两种疗法都伴有较多的副作用^[2-3], 如早期患者药物治疗虽能控制, 但 BPH 作为一种渐进性发展疾病, 相当多的患者在后期可能会出现 LUTS 等, 最终要进行手术治疗^[4]; 而手术治疗中经尿道前列腺电切术 (transurethral resection of the prostate, TURP) 虽是 BPH 治疗的金标准^[5], 但术中、术后出

血、膀胱颈痉挛、尿道或尿道口狭窄等, 常导致临床疗效不佳^[6-7]; 随着人口老龄化的进程, BPH 已成为当前严峻的社会公共卫生问题, 如何有效治疗 BPH 并减少并发症是临床医生和科研人员研究的重点和难点。
近年来, 随着现代医疗科学技术的发展, 激光技术已被应用于泌尿外科手术, 并已逐渐成为治疗 BPH 的常规方式^[8-9]。1470 nm 激光是一种半导体激光, 该波长处于水和血红蛋白的较高吸收区域, 与 532 nm 波长的绿激光比较, 1470 nm 激光组织消

融性更强,切割效率高;与 2140 nm 波长的钛激光相比,1470 nm 激光的止血效能更佳,具有较好的汽化切割和凝固止血性能^[10]。另外,由于汽化术具有操作相对简单、学习曲线较短的优点,因此,经尿道 1470 nm 激光前列腺汽化术和剜除术是目前常用的手术方式^[11-12]。本研究的 HANS-D1 型半导体激光治疗仪(简称:科瑞达治疗仪)也是一种治疗前列腺增生的激光设备,该产品通过 1470 nm 激光波长对组织进行汽化切割和凝固止血,相比已上市的同类产品,该产品的汽化切割最大输出功率可达到 160 W。为进一步了解科瑞达治疗仪在前列腺切除术中的有效性,本研究以雄性 Beagle 犬为模型动物,模拟临床汽化切除术,在直视下使用电切镜经膀胱颈口顺行进入前列腺尿道部进行前列腺切除术,以评估科瑞达治疗仪的有效性,为 1470 nm 半导体激光治疗仪在临床中的应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

28 只普通级雄性健康成年 Beagle 犬,18~24 月龄,体重 15~20 kg,购于南京柴门生物科技有限公司[SCXK(苏)2021-0008],质量合格证编号:320729220100007954,饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心普通级实验室[SYXK(浙)2021-0012],温度(22±1)℃,湿度 40%~70%,光照 150~200 Lux,12 h/12 h 明暗交替,噪音<50 dB,自由饮水,每餐定时给予犬 180 g 膨化饲料,1 d 两餐;研究方案经浙江中医药大学动物实验研究中心实验动物管理与使用委员会批准(IACUC-20220919-20),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要仪器与试剂

谷草转氨酶(AST,批号 220425101)、谷丙转氨酶(ALT,批号 220402101)、肌酸磷酸激酶(CK,批号 210608101)、乳酸脱氢酶(LDH,批号 220107101)、尿素氮(BUN,批号 220428101)、肌酐(CREA,批号 220621201)、血糖(GLU,批号 220613102)水平检测试剂盒均购自美康生物科技股份有限公司;血液学试剂包购自希森美康医用电子上海有限公司。试验品:HANS-D1 型 1470 nm 半导体激光治疗仪(简称“科瑞达治疗仪”,最大输出功率:160 W),合肥大族科瑞达激光设备有限公司生产;同类对照品:ML-DD01FI 型半导体激光治疗机(最大输出功率:150 W),武汉奇致激光技术股份有限公司生产;600 μm

光纤,合肥大族科瑞达激光设备有限公司;3110 全自动生化分析仪,日本日立公司;R419 智能型动物呼吸机,深圳市瑞沃德生命科技有限公司;DQ 型电切镜,浙江天松医疗器械股份有限公司;XN-1000V 全自动血细胞分析仪,日本 Sysmex 公司;HistoCore MULTICUT 半自动石蜡切片机,德国 Leica 公司;GEMINI AS 染色机,美国 Thermo 公司;120P 徕谱数字切片扫描设备,上海徕谱医疗科技有限公司;VETG60 彩色多普勒超声仪器,苏州飞依诺科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 分组

28 只 Beagle 犬经适应性饲养后,按体重分层随机分为 3 组,其中试验组 15 只,又分为 120 W/50 W、150 W/50 W、160 W/50 W 的汽化切割/凝固止血 3 个小组,每小组各 5 只。同类对照组 10 只,又分为 120 W/50 W、150 W/50 W 的汽化切割/凝固止血 2 个小组,每小组各 5 只。假手术组 3 只,行假手术处理,不作汽化切割/凝固止血。试验组和同类对照组各小组在术后 1 h 时随机处理 2 只,作为急性观察期,剩余 3 只与假手术组均在术后 4 周时处理,作为慢性观察期。

1.3.2 犬前列腺切除术与 1470 nm 半导体激光治疗仪的应用

术前禁食不禁水 12 h 后,口服布洛芬片 4 mg/kg 和肌肉注射 160 万青霉素钠予以术前镇痛和抗炎处理,随后肌肉注射 0.05 mg/kg 阿托品注射液以减少气管分泌物,15 min 后静脉注射 4 mg/kg 丙泊酚注射液诱导全身麻醉,备皮,行气管插管,连接气体麻醉呼吸机,用 1%~3% 异氟烷纯氧驱动维持麻醉。术中监测动物心电、呼吸和血氧等生理指标。麻醉稳定后,仰卧位固定,常规消毒铺巾。从下腹正中切口,分离腹壁肌层、腹膜,充分暴露膀胱。于膀胱前壁中央预置一荷包缝合线,在荷包中央切开膀胱壁,插入激光电切镜,收紧荷包缝合线,以生理盐水作为灌注冲洗液,直视下电切镜经膀胱颈口进入前列腺部尿道,模拟人体内汽化切除术,持续移动光纤,弧形汽化切除,试验组分别采用 120 W/50 W、150 W/50 W、160 W/50 W 的汽化切割和凝固止血;同类对照组分别采用 120 W/50 W、150 W/50 W 的汽化切割和凝固止血,精确切割时将光纤头埋于前列腺组织中,潜行切割,深约 1~2 mm,切除前列腺部全部尿路上皮和大部分前列腺组织,避免损伤

前列腺包膜。术毕缝合膀胱,关闭腹腔。术后连续 3 d 每只肌肉注射青霉素钠 160 万单位和口服给予 4 mg/kg 布洛芬片进行抗炎和镇痛处理。

1.3.3 观察指标

(1) 适配性观察

术中观察试验品和同类对照品的操作性能、汽化切割和凝固止血情况,以评估产品的操作性能。

(2) 一般体征观察

术后观察动物的精神、行为、饮食、粪尿等一般情况和伤口愈合感染等情况,记录术前、术后即刻、术后 3 d、1 周、2 周、4 周的空腹体重。

(3) B 超检查

分别在术前、术后即刻 B 超检查犬前列腺组织,测量前列腺头尾径、横径和背腹径,计算前列腺组织的体积,计算汽化切割前列腺组织重量/g=(术前前列腺体积/cm³ - 术后前列腺体积/cm³) × 1.05^[13]。术后 4 周时,B 超检查各组犬前列腺组织的修复情况。

(4) 血液生化与血液学检查

分别在术前、术后即刻、术后 3 d、7 d、28 d,取血 3 mL,分离血清,测定谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、肌酸磷酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)、尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)、血糖(GLU)水平的变化。同时取 EDTA-K₂ 抗凝血 1 mL,测定白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞压积(HCT)、血小板(PLT)数目的变化。

(5) 术后大体观察与病理组织学观察

术后 1 h 和术后 4 周时,动物麻醉后,经膀胱将电切镜伸入,分别观察术后前列腺部尿道和修复情况。动物安乐死后,取前列腺及其周边组织,经 4% 中性甲醛固定后,脱水、包埋、石蜡切片,进行病理

苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,观察前列腺组织及周边组织的病理改变,并测量术后 1 h 时试验组和同类对照组的凝固层厚度。

1.4 统计学方法

所有计量资料均用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 IBM SPSS 22.0 软件进行统计分析,采用单因素方差分析(One-way ANOVA),若方差齐,用 Tukey 法进行多样本均数间的两两比较。若方差不齐,则改用 Dunnett's T3 法。试验组与同类对照组比较采用独立样本 T 检验; $P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 半导体激光治疗仪在犬前列腺切除术中的操作适配性

在电切镜下,试验品采用 120 W/50 W、150 W/50 W、160 W/50 W 和同类对照品采用 120 W/50 W、150 W/50 W 分别行犬前列腺切除术,术中激光光纤与电切镜固定牢固,定位精准,能有效进行汽化切割,同时在凝固模式下对出血点凝固止血性能良好,术后即刻可见创面有明显的烧灼样改变,未见尿道击穿或前列腺包膜破损,操作适配性较好,见图 1。

2.2 一般体征观察

各组犬术后 2 h 内逐渐苏醒并自由活动,1 d 内均未见血性尿液,精神尚可,7 d 后皮肤伤口愈合,未见感染、血肿等发生;试验期间各组犬的饮食、粪尿均未见异常;各组犬体重在术后 7 d 内因禁食、取血等操作而略有降低,14 d 后恢复到术前且体重逐渐增加,各组间比较均未见显著差异($P>0.05$),见表 1。

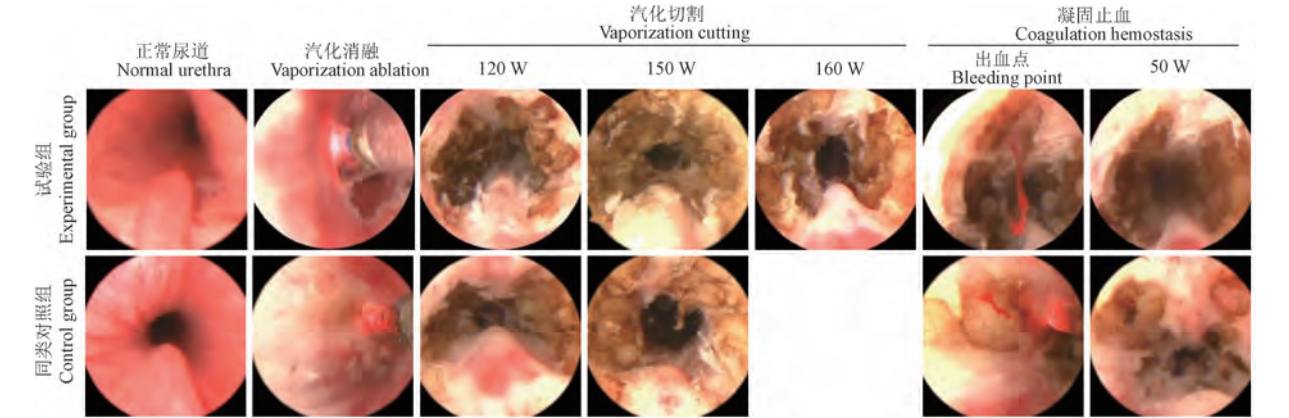


图 1 半导体激光治疗仪在犬前列腺切除术中的操作适配性

Figure 1 Operation suitability of semiconductor laser therapy instrument in canine prostatectomy

2.3 半导体激光治疗仪对犬前列腺切除术的有效性和 B 超观察

超声检查前列腺横切面显示,试验组和同类对照组术后即刻均可见尿道扩张,尿道上皮回声略有增强;4 周时,可见前列腺组织实质为略低回声,内部为均匀分布细小点状回声,包膜呈线状高回声,与假手术组一致,见图 2。测量分析显示,相比术前,试验组和同类对照组术后即刻前列腺组织体积均有所减少,汽化切割前列腺组织重量约为 0.91~1.33 g,切除比例达 17.11%~20.27%;激光发射时间随汽化切割功率的增加而减少,汽化切割速度和效能均随汽化切割功率的增加而有所增加;但试验组与同类对照组比较均未见明显的差异($P>0.05$),见表 2。

2.4 各组血液学指标的变化

与假手术组比较,试验组和同类对照组各时间点血液学指标均未见明显差异($P>0.05$),且同功率下试验组和同类对照组血液学指标在各时间点亦

均未见明显差异($P>0.05$),表明半导体激光治疗仪对犬前列腺切除术后血液学指标未产生明显的影响,见表 3。

2.5 各组血液生化指标的变化

与假手术组比较,试验组和同类对照组各时间点肝肾功能、血糖、心肌酶指标均未见明显差异($P>0.05$),且同功率下试验组和同类对照组比较亦未见明显差异($P>0.05$),表明半导体激光治疗仪对犬前列腺切除术后血液生化指标未产生明显的影响,见表 4。

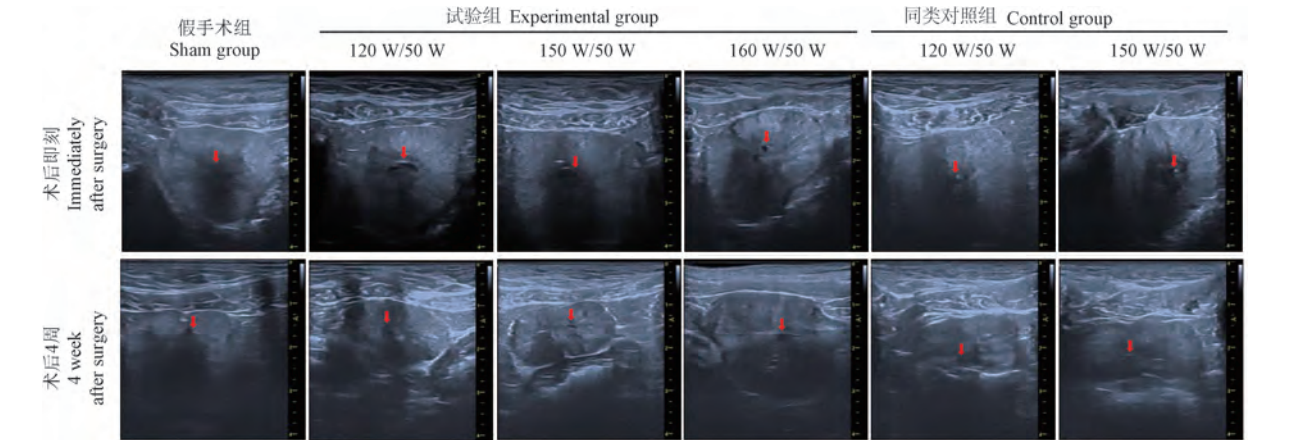
2.6 电切镜下大体观察

电切镜下检查显示,试验组和同类对照组术后 1 h 时前列腺尿道部创面呈烧灼样改变,无正常尿路上皮,创面和正常尿路上皮分界明显;4 周时,前列腺部创面上已完全覆盖尿路上皮,修复较平整,和周围正常尿路上皮分界较模糊,无渗血,无坏死组织覆盖在术后创面上,见图 3。另解剖观察也显示,周边膀胱、直肠组织亦未见明显的损伤。

表 1 各组犬前列腺切除术后体重的变化($\bar{x}\pm s$, kg)

组别 Groups	汽化切割/凝固功率 Vaporized cutting/ Coagulation power	术前 Pre-operation	术后 Post-operation				
			即刻 Immediately	3 d	7 d	14 d	28 d
假手术组 Sham group	/	18.91±1.23	18.74±1.20	19.02±1.26	19.53±1.26	20.35±1.95	21.05±2.21
试验组 Experimental group	120 W/50 W	19.90±2.79	19.57±2.65	19.32±2.48	19.49±2.67	19.92±2.45	20.71±2.82
	150 W/50 W	20.22±2.03	19.80±2.11	19.90±1.85	20.09±2.10	20.34±3.03	21.63±3.22
	160 W/50 W	19.72±3.54	19.36±3.51	18.68±3.28	19.26±3.92	19.27±3.74	20.47±3.38
同类对照组 Control group	120 W/50 W	18.65±1.78	18.27±1.79	17.61±0.69	18.04±0.96	19.39±0.65	20.23±0.98
	150 W/50 W	19.50±2.79	19.06±2.68	19.01±1.86	19.13±2.06	19.36±2.06	20.25±1.55

注:假手术组动物数为 3 只,试验组和同类对照组各小组在术前和术后即刻时的动物数均为 5 只,之后均为 3 只。
Note. The number of animals in the sham group was 3, while the number of animals in each group in the experimental group and the control group was 5 before and immediately after surgery, and thereafter was 3.



注:红色箭头指尿道。

图 2 各组犬前列腺术后即刻和 4 周时前列腺组织 B 超观察

Note. Red arrow indicates the urethra.

Figure 2 Ultrasound observation of prostate tissue immediately and 4 weeks after prostatectomy

表 2 半导体激光治疗仪对 Beagle 犬前列腺切除术后前列腺组织的变化
Table 2 Changes of prostate tissue in Beagle dogs after prostatectomy by semiconductor laser therapy

组别 Groups	汽化切割/ 凝固功率 Vaporized cutting/ Coagulation power	术前体 积/cm ³ Preoperative volume	术后体 积/cm ³ Postoperative volume	汽化切割前列腺 组织重量/g Vaporized cutting prostate tissue weight	前列腺切 除比例/% Prostate resection ratio	激光发射 时间/s Laser emission time	汽化切割 速度/(g/min) Vaporized cutting speed	汽化切割 效能/(g/KJ) Vaporized cutting efficiency
假手术组 Sham group	/	5.68±2.27	5.68±2.31	/	/	/	/	/
试验组 Experimental group	120 W/50 W	5.40±1.95	4.53±1.70	0.91±0.35	17.11±6.07	73.00±30.97	0.78±0.35	0.109±0.049
	150 W/50 W	7.30±6.01	6.05±5.08	1.31±1.01	17.77±4.37	69.60±25.21	1.01±0.45	0.112±0.050
同类对照组 Control group	160 W/50 W	7.12±8.88	6.19±8.24	0.98±0.70	19.03±7.72	53.80±20.77	1.12±0.63	0.116±0.066
	120 W/50 W	4.50±0.85	3.64±0.74	0.91±0.25	20.27±4.73	84.80±26.32	0.67±0.22	0.094±0.031
	150 W/50 W	8.45±9.34	7.18±8.35	1.33±1.05	18.88±4.59	77.20±22.80	1.00±0.63	0.112±0.070

注:假手术组动物数为 3 只,试验组和同类对照组各小组在术前和术后即刻时的动物数均为 5 只,之后均为 3 只。
Note. The number of animals in the sham group was 3, while the number of animals in each group in the experimental group and the control group was 5 before and immediately after surgery, and thereafter was 3.

表 3 各组犬前列腺切除术后血液学指标的变化
Table 3 Changes in hematological parameters after prostatectomy in different groups of dogs

指标 Indexes	组别 Groups	汽化切割/凝固功率 Vaporized cutting/ Coagulation power	术前 Pre-operation	术后 Post-operation			
				即刻 Immediately	3 d	7 d	28 d
WBC /(10 ⁹ /L)	假手术组 Sham group	/	13.59±3.59	9.48±1.98	12.10±2.97	13.29±2.57	12.10±2.97
	试验组 Experimental group	120 W/50 W	15.87±7.29	8.93±3.03	26.04±6.01	16.21±2.50	12.04±1.20
		150 W/50 W	13.63±4.73	7.17±3.91	28.47±9.97	20.55±5.39	14.30±3.21
		160 W/50 W	13.67±2.96	8.24±2.36	27.02±7.95	19.62±3.82	15.60±5.32
	同类对照组 Control group	120 W/50 W	14.40±4.45	6.96±1.93	22.35±3.83	14.23±0.91	10.86±0.96
RBC /(10 ¹² /L)	假手术组 Sham group	/	6.89±0.42	5.85±0.19	7.36±0.31	6.75±0.50	7.36±0.31
	试验组 Experimental group	120 W/50 W	6.73±0.79	5.92±0.49	6.48±0.25	6.72±0.24	7.39±0.87
		150 W/50 W	6.93±0.62	5.32±0.47	6.42±0.66	6.49±0.26	7.17±0.47
		160 W/50 W	6.87±0.59	5.96±0.57	6.42±0.74	6.13±0.49	7.23±0.27
	同类对照组 Control group	120 W/50 W	6.41±0.55	5.36±0.31	6.09±0.49	6.74±0.72	7.13±0.80
HGB /(g/L)	假手术组 Sham group	/	158.00±7.81	132.33±4.04	164.00±1.73	151.33±12.74	164.00±1.73
	试验组 Experimental group	120 W/50 W	154.60±17.62	134.20±14.53	153.00±7.00	159.00±7.21	170.00±24.27
		150 W/50 W	161.40±12.78	121.20±11.23	148.67±15.89	151.67±8.74	165.33±15.18
		160 W/50 W	158.80±14.43	134.00±12.10	146.00±19.31	140.00±9.64	164.00±7.21
	同类对照组 Control group	120 W/50 W	149.40±12.68	122.60±5.08	139.67±11.68	156.00±16.37	161.67±18.23
HCT /%	假手术组 Sham group	/	46.63±1.17	39.90±0.87	48.77±1.34	45.50±2.17	48.77±1.34
	试验组 Experimental group	120 W/50 W	45.56±4.40	39.90±3.75	43.93±1.75	45.57±2.21	49.60±5.67
		150 W/50 W	47.02±4.08	36.62±3.10	42.93±3.96	43.63±2.18	48.23±3.26
		160 W/50 W	46.68±3.64	40.74±3.23	43.00±5.41	41.27±3.69	48.50±2.76
	同类对照组 Control group	120 W/50 W	44.06±2.97	37.10±1.41	40.60±3.40	45.40±4.29	47.27±4.87
PLT /(10 ⁹ /L)	假手术组 Sham group	/	295.00±54.00	282.33±27.02	295.33±65.25	301.33±67.50	295.33±65.25
	试验组 Experimental group	120 W/50 W	280.00±52.45	210.80±37.14	205.00±14.18	235.33±22.72	238.00±15.39
		150 W/50 W	279.80±116.66	219.80±42.32	242.00±123.84	308.67±119.56	295.00±114.33
		160 W/50 W	291.00±81.32	263.60±29.30	237.67±23.18	329.00±81.66	311.33±102.03
	同类对照组 Control group	120 W/50 W	320.40±52.86	249.40±34.76	268.33±70.67	325.67±43.10	303.67±17.50
		150 W/50 W	259.80±98.36	219.00±53.98	286.00±93.74	286.33±71.06	336.00±99.83

注:假手术组动物数为 3 只,试验组和同类对照组各小组在术前和术后即刻时的动物数均为 5 只,之后均为 3 只。
Note. The number of animals in the sham group was 3, while the number of animals in each group in the experimental group and the control group was 5 before and immediately after surgery, and thereafter was 3.

表 4 各组犬前列腺切除术后血液生化指标的变化
Table 4 Changes in blood biochemical indicators after prostatectomy in different groups of dogs

指标 Indexes	组别 Groups	汽化切割/凝固功率 Vaporized cutting/ Coagulation power	术前 Pre-operation	术后 Post-operation			
				即刻 Immediately	3 d	7 d	28 d
ALT /(U/L)	假手术组 Sham group	/	32.40±13.15	39.93±23.56	42.40±23.22	39.00±22.73	42.63±26.66
	试验组 Experimental group	120 W/50 W	34.86±7.61	41.48±15.65	34.70±3.59	32.77±4.51	30.83±3.96
		150 W/50 W	42.08±7.58	39.72±8.48	34.27±5.23	27.70±1.57	31.17±4.91
		160 W/50 W	34.60±6.73	35.90±11.51	48.73±26.44	57.07±29.62	33.43±8.78
	同类对照组 Control group	120 W/50 W	40.54±10.46	39.88±7.25	40.57±17.52	35.83±8.83	45.23±12.31
AST /(U/L)	假手术组 Sham group	/	33.43±9.62	20.77±4.71	40.07±18.77	20.67±3.11	26.20±5.24
	试验组 Experimental group	120 W/50 W	29.76±3.64	20.76±3.96	25.07±4.83	20.53±3.13	24.20±3.82
		150 W/50 W	44.66±13.84	24.42±6.02	34.23±7.83	24.73±10.26	27.77±5.78
		160 W/50 W	33.62±4.23	24.28±7.12	35.77±22.63	27.63±6.82	26.1±0.97
	同类对照组 Control group	120 W/50 W	33.34±8.91	20.74±4.90	26.87±11.77	22.37±5.79	26.57±4.96
BUN /(μmol/L)	假手术组 Sham group	/	4.90±1.64	4.09±0.68	4.17±0.92	4.59±0.79	4.83±0.68
	试验组 Experimental group	120 W/50 W	3.93±0.71	3.68±0.62	2.86±0.37	3.59±0.83	4.06±0.64
		150 W/50 W	3.68±0.49	3.49±0.66	3.47±0.91	3.78±0.99	4.61±0.58
		160 W/50 W	4.13±0.87	4.72±1.45	3.71±2.74	4.26±0.55	3.96±0.66
	同类对照组 Control group	120 W/50 W	3.71±0.62	3.83±0.93	2.56±0.58	4.38±0.52	4.36±0.18
CREA /(mmol/L)	假手术组 Sham group	/	55.17±9.31	49.43±7.37	51.47±6.71	50.80±8.15	58.03±7.68
	试验组 Experimental group	120 W/50 W	52.10±10.31	52.44±10.96	40.50±5.16	46.47±8.97	60.30±11.23
		150 W/50 W	58.16±7.56	61.56±11.02	45.00±6.16	46.33±10.10	62.73±9.30
		160 W/50 W	54.98±4.35	60.42±13.02	41.47±19.92	45.20±4.97	52.90±6.43
	同类对照组 Control group	120 W/50 W	55.34±8.66	51.72±13.11	39.13±10.98	49.07±9.46	62.87±7.96
GLU /(mmol/L)	假手术组 Sham group	/	3.37±0.13	6.16±1.39	3.96±0.35	5.72±0.20	5.29±0.25
	试验组 Experimental group	120 W/50 W	3.23±0.63	5.67±0.60	5.19±0.66	5.51±0.41	5.43±0.31
		150 W/50 W	3.35±0.35	5.88±0.69	5.01±0.54	5.31±0.19	5.50±0.17
		160 W/50 W	3.48±0.19	6.44±1.11	4.11±0.21	5.60±0.16	5.30±0.27
	同类对照组 Control group	120 W/50 W	3.47±0.60	5.98±1.20	4.74±0.58	5.41±0.02	5.30±0.55
CK /(U/L)	假手术组 Sham group	/	283.50±145.84	82.63±17.06	300.23±134.32	79.10±8.35	98.47±28.79
	试验组 Experimental group	120 W/50 W	212.18±83.93	126.82±48.23	158.90±31.10	99.73±49.42	102.33±28.23
		150 W/50 W	413.58±265.87	178.30±116.99	276.03±113.83	185.87±150.37	124.17±27.87
		160 W/50 W	194.16±75.07	134.38±86.87	358.13±360.92	132.20±69.10	90.77±28.73
	同类对照组 Control group	120 W/50 W	282.52±218.00	140.44±103.08	233.17±116.02	70.83±4.81	96.60±40.31
LDH /(U/L)	假手术组 Sham group	/	368.03±250.37	45.60±32.36	121.40±100.88	23.83±2.63	75.20±62.91
	试验组 Experimental group	120 W/50 W	245.78±151.79	56.52±17.77	52.57±15.50	64.73±32.98	62.87±32.83
		150 W/50 W	410.78±386.99	66.28±42.87	58.57±18.91	196.03±238.58	71.50±5.17
		160 W/50 W	172.40±65.82	36.26±12.39	55.33±34.97	42.20±10.68	60.63±29.71
	同类对照组 Control group	120 W/50 W	312.88±303.78	74.76±79.74	37.13±6.51	32.57±10.19	57.03±45.39

注:假手术组动物数为 3 只,试验组和同类对照组各小组在术前和术后即刻时的动物数均为 5 只,之后均为 3 只。
Note. The number of animals in the sham group was 3, while the number of animals in each group in the experimental group and the control group was 5 before and immediately after surgery, and thereafter was 3.

2.7 病理组织学观察

HE 染色观察显示,试验组和同类对照组术后 1 h 时均可见前列腺尿道口损伤明显,创面表面有少量碳化,其下组织大量凝固性坏死,少量炎性细胞聚集,周围组织轻度水肿,血管充血,并伴有局部出血情况,周围局部前列腺腺泡上皮萎缩,可见部分上皮脱落,前列腺包膜完好,周围神经血管形态未见异常,见图 4A~4E,进一步对凝固层厚度测量显示,试验组 120 W/50 W、150 W/50 W、160 W/50 W 的凝固层厚度分别为 399.99 μm 、400.38 μm 、398.76 μm ;同类对照组 120 W/50 W、150 W/50 W

的凝固层厚度分别为 401.30 μm 、403.91 μm ,两组间比较均无明显差异($P>0.05$)。术后 4 周时,假手术组前列腺尿道部上皮细胞排列完整有序,厚度均匀,周围无炎性反应,周围前列腺结构清晰,无明显萎缩、增生等病变,前列腺包膜完好,周围神经血管形态未见异常;试验组和同类对照组均可见新生上皮基本覆盖创面,厚度较均匀,无凝固性坏死组织附在创面上,周围仍有轻度炎性反应,成纤维细胞增生明显,周围前列腺可见间质和上皮细胞增生,部分可见鳞状化生,前列腺包膜完好,周围神经血管形态未见异常,见图 4。

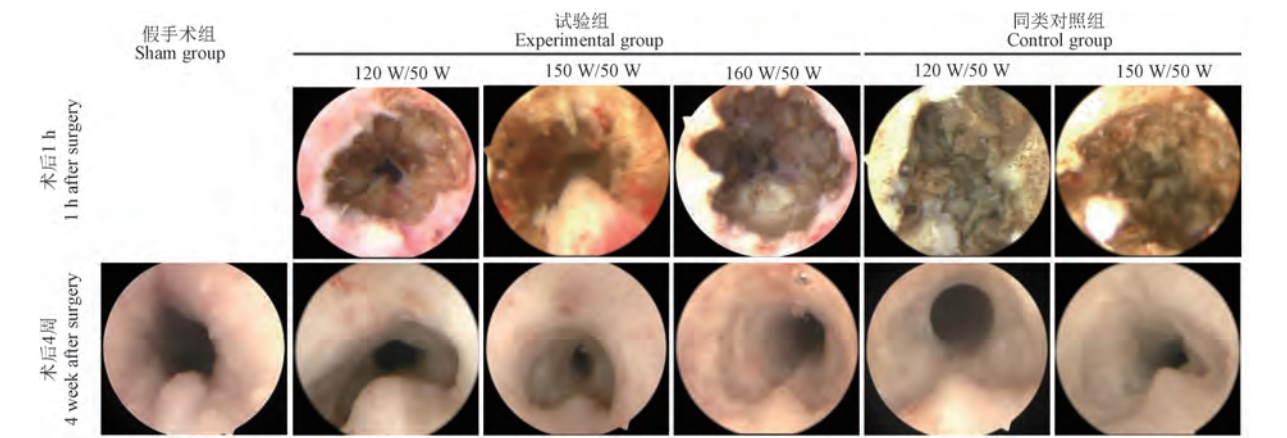
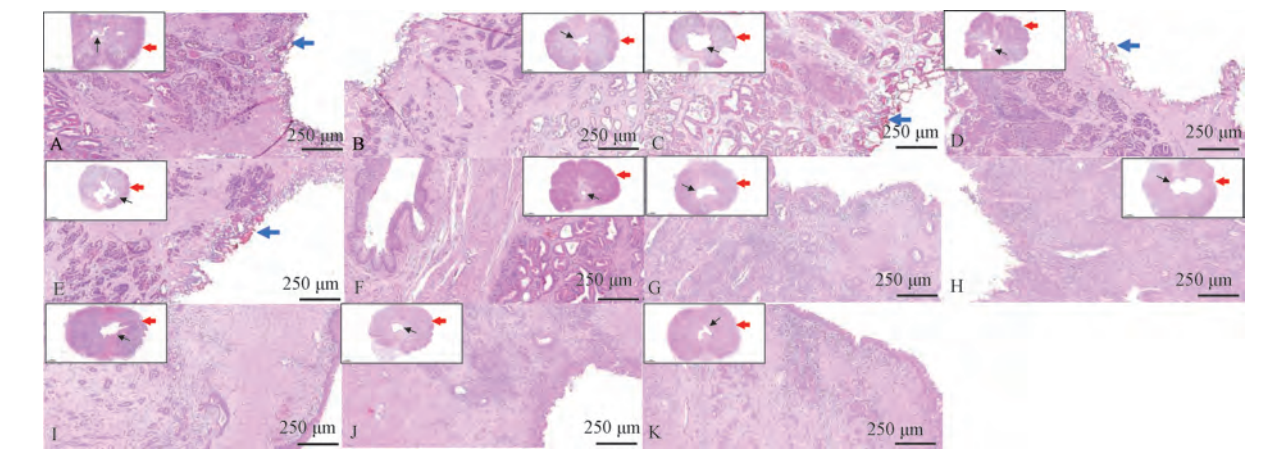


图 3 电切镜下术后 1 h 和 4 周时的前列腺尿道部的变化

Figure 3 Changes of prostatic urethra at 1 h and 4 weeks after resection by electroscopy



注:A~E 分别为术后 1 h 试验组 120 W/50 W、150 W/50 W、160 W/50 W 和同类对照组 120 W/50 W、150 W/50 W;F~K 分别为术后 4 周假手术组、试验组 120 W/50 W、150 W/50 W、160 W/50 W 和同类对照组 120 W/50 W、150 W/50 W;黑箭头为尿道,红箭头所指前列腺包膜,蓝箭头所示尿道汽化消融/凝固后的碳化,红三角形所示新生的尿道上皮。

图 4 各组术后 1 h 和 4 周时前列腺组织的病理变化

Note. A~E show the experimental groups 120 W/50 W, 150 W/50 W, 160 W/50 W, and control groups 120 W/50 W, 150 W/50 W at 1 h of post-operation, respectively. F~K shows the sham group, the experimental groups 120 W/50 W, 150 W/50 W, 160 W/50 W, and control groups 120 W/50 W, 150 W/50 W at 4 weeks of post-operation. The black arrow indicates the urethra, the red arrow points to the prostatic capsule, the blue arrow indicates the carbonization after urethral vaporization ablation/coagulation, and the red triangle indicates the newly formed urethral epithelium.

Figure 4 Pathological changes of prostate tissue in each group at 1 h and 4 weeks after operation

3 讨论

激光技术的应用是 BPH 治疗历程中的一个重大突破,激光具有较好的止血性能,围手术期出血量较等离子电切术出血少,临床治疗效果可靠的特点。在本研究中对 1470 nm 半导体激光治疗仪分别选择 120 W、150 W、160 W 三种汽化切割模式,其中 120 W 为临床常用功率,而 160 W 和 150 W 分别为试验品和同类对照品的最大功率,而 50 W 为试验品和同类对照品凝固最大输出功率,结合以上因素最终选择 120 W/50 W、150 W/50 W、160 W/50 W 三种汽化切割/凝固组合开展研究。另外,犬的前列腺与人类的前列腺在功能和解剖学上有很多相似之处,犬能自发前列腺增生,是研究人类 BPH 的理想动物模型^[14-15]。此外,为了解科瑞达治疗仪治疗前列腺增生的有效性和修复愈合情况,本试验选择术后 1 h 作为急性期观察,术后 4 周作为慢性期观察,全面评价科瑞达治疗仪在前列腺切除术中的有效性。

众所周知,1470 nm 半导体激光治疗仪具有较好的汽化切割和凝固止血性能,对 BPH 患者具有较好的治疗效果^[14]。本试验 25 只 Beagle 犬均顺利完成了前列腺切除术,且试验品和同类对照品均具有较好的操作适配性,汽化切割和凝固性能良好,前列腺组织切除比例达到 17.11%~20.27%,术后可见创面有明显的烧灼样改变,术中出血相对较少,这与报道 1470 nm 激光为持续性发射,光纤头端术中摆动幅度小,指向性好,精确度高,其穿透组织深度约 1.0 mm,组织凝固层厚度约 0.6 mm,凝血能力更强相符^[16]。同样,本研究发现试验组和同类对照组术后 1 h 凝固层厚度约 0.4 mm,且随着输出功率的增加,对前列腺组织的汽化切割速度均有所增加,所需的激光发射时间则有所减少,其中试验组 120 W/50 W、150 W/50 W、160 W/50 W 的汽化切割速度分别为 0.78 g/min、1.01 g/min、1.12 g/min,同类对照组 120 W/50 W、150 W/50 W 的汽化切割速度分别为 0.67 g/min 和 1.00 g/min,与相同输出功率的同类对照品比较均无明显差异。表明科瑞达治疗仪进行犬前列腺切除术具有较好的汽化切割和凝固止血性能,是有效的。

尽管 TURP 是治疗 BPH 的金标准手术方式,但也有部分患者 TURP 术后出现尿道水肿、组织坏死以及局部感觉神经不敏感,引起后续下尿路症状改

善不明显,导致排尿困难或短期内再次复发^[17]。因此,前列腺部尿道的再上皮化是 BPH 术后修复的关键步骤之一。本研究发现,术后即刻可见创面内无正常尿路上皮,创面和正常尿路上皮分界明显,这些损伤可能是由热凝固所致,但未见尿道穿孔、尿漏等并发症;4 周时,可见前列腺部尿路上皮创面已修复平整,和周围正常尿路上皮分界较模糊,表明科瑞达治疗仪进行犬前列腺切除术后能自行修复受损的尿道;并通过一般观察也未见术后犬尿道梗阻、排尿困难等下尿路症状发生,这些与同类对照品的反应类似,进一步证实科瑞达治疗仪进行前列腺切除术是有效的。

进一步评估科瑞达治疗仪对犬的术后生理指标影响,通过为期 4 周的一般体征、血液生化和血液学检测,发现术后各组动物的一般体征良好,未见尿漏、尿血、尿失禁等不良状况发生。试验品和同类对照品对犬术后的血液学指标、肝肾功能、血糖和心肌酶指标均无明显影响,表明科瑞达治疗仪对犬前列腺切除术后血液学、血液生化指标未产生明显的影响,且无远期肾损伤发生。

以上试验结果表明,科瑞达治疗仪对 Beagle 犬前列腺切除术具有较好的汽化切割和凝固止血性能,术后未见明显尿路梗阻和下尿路症状,且手术对犬的一般体征、血液学、血液生化均未见明显影响;其作用疗效与病理变化与同类对照品类似。表明科瑞达治疗仪进行前列腺切除术是有效的,且术后的各项生理指标较假手术组无显著差异。

参考文献:

- [1] SCIACQUA L V, VANZULLI A, MEO R D, et al. Minimally invasive treatment in benign prostatic hyperplasia (BPH) [J]. Technol Cancer Res Treat, 2023, 22: 15330338231155000.
- [2] RASSWEILER J, TEBER D, KUNTZ R, et al. Complications of transurethral resection of the prostate (TURP)—incidence, management, and prevention [J]. Eur Urol, 2006, 50(5): 969–979.
- [3] STEWART K L, LEPHART E D. Overview of BPH: symptom relief with dietary polyphenols, vitamins and phytochemicals by nutraceutical supplements with implications to the prostate microbiome [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(6): 5486.
- [4] 张浩,司徒杰,张炎,等. 膀胱内前列腺突出程度可作为良性前列腺增生临床进展的高危因素 [J]. 中华腔镜泌尿外科杂志(电子版), 2012, 6(4): 292–295.
- ZHANG H, SITU J, ZHANG Y, et al. Intravesical prostatic protrusion predicts clinical progression of benign prostatic hyperplasia [J]. Chin J Endourol Electron Ed, 2012, 6(4):

292–295.

[5] WANG B, ZHANG S, SUN C, et al. Comparison between a transurethral prostate split and transurethral prostate resection for benign prostatic hyperplasia treatment in a small prostate volume: a prospective controlled study [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8 (16): 1016.

[6] HOEKSTRA R J, VAN MELICK H H, KOK E T, et al. A 10-year follow-up after transurethral resection of the prostate, contact laser prostatectomy and electrovaporization in men with benign prostatic hyperplasia; long-term results of a randomized controlled trial [J]. *BJU Int*, 2010, 106(6): 822–826.

[7] CHEN S L, HSU C K, WANG C H, et al. Comparison of emergency room visits and rehospitalization for bleeding complications following transurethral procedures for the treatment of benign prostatic hyperplasia: a population-based retrospective cohort study [J]. *J Clin Med*, 2022, 11(19): 5662.

[8] 王允武, 章小毅, 周发友, 等. 1470 nm 激光联合双极等离子治疗超大前列腺增生的临床研究 [J]. *皖南医学院学报*, 2020, 39(2): 140–142.

WANG Y W, ZHANG X Y, ZHOU F Y, et al. Clinical study of 1470 nm laser with bipolar plasma kinetic resection for large-sized benign prostatic hyperplasia [J]. *J Wannan Med Coll*, 2020, 39 (2): 140–142.

[9] 徐明月, 曾晶, 王春喜, 等. 1470 nm 激光的临床应用进展 [J]. *中国激光医学杂志*, 2020, 29(1): 40–43.

XU M Y, ZENG J, WANG C X, et al. Clinical application of 1470 nm semiconductor laser [J]. *Chin J Laser Med Surg*, 2020, 29(1): 40–43.

[10] 阴正坤, 刘永胜. 经尿道前列腺电切术与 1470 nm 半导体激光汽化术治疗前列腺增生的效果 [J]. *中国性科学*, 2019, 28(3): 25–28.

YIN Z K, LIU Y S. Effects of transurethral resection of prostate and 1470 nm diode laser in the treatment of prostatic hyperplasia [J]. *Chin J Hum Sex*, 2019, 28(3): 25–28.

[11] 莫俊华, 张增强, 李志雄, 等. 经尿道前列腺电切术、经尿道等离子前列腺剜除术及 1470 nm 激光汽化术在良性前列腺增生手术治疗中的应用研究 [J]. *中国医学工程*, 2021, 29 (1): 68–71.

MO J H, ZHANG Z Q, LI Z X, et al. Transurethral resection of prostate, transurethral plasma enucleation of prostate and 1470 nm laser vaporization in treatment of benign prostatic hyperplasia [J]. *China Med Eng*, 2021, 29(1): 68–71.

[12] 史朝亮, 焦伟, 章俊, 等. 1470 nm 半导体激光前列腺汽化剜除术对良性前列腺增生患者勃起功能及盆底肌力的影响观察 [J]. *中华男科学杂志*, 2021, 27(1): 45–49.

SHI C L, JIAO W, ZHANG J, et al. Effects of 1470 nm semiconductor laser vaporization of the prostate on erectile function and pelvic floor muscle strength in patients with benign prostatic hyperplasia [J]. *Natl J Androl*, 2021, 27 (1): 45 –49.

[13] 刘萃龙, 欧阳昀, 鹿尔驯, 等. 根据前列腺体积估算选择性绿激光前列腺汽化术中能量消耗的可行性研究 [J]. *中华外科杂志*, 2010, 48(10): 758–760.

LIU C L, OUYANG Y, LU E X, et al. The feasibility study of estimating energy consumption in photoselective vaporization of prostate based on the volume of prostate [J]. *Chin J Surg*, 2010, 48(10): 758–760.

[14] LIU Z, ZHAO Y, WANG X, et al. Critical reviews of 1470-nm laser vaporization on benign prostatic hyperplasia [J]. *Lasers Med Sci*, 2018, 33(2): 323–327.

[15] 吴建辉, 徐斯翀, 潘琦, 等. 自发性及睾酮诱导犬前列腺增生模型的比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(3): 21–26, 94.

WU J H, XU S C, PAN Q, et al. Comparison of spontaneous and testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in dogs [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2013, 21(3): 21–26, 94.

[16] 张赞. 经尿道 1470 nm 激光前列腺汽化切除术与经 TURP 治疗良性前列腺增生的临床研究 [J]. *航空航天医学杂志*, 2022, 33(7): 775–778.

ZHANG Z. Clinical study of 1470 nm transurethral laser vaporization of prostate and transurethral resection of prostate for benign prostatic hyperplasia [J]. *J Aerosp Med*, 2022, 33(7): 775–778.

[17] GAO B, LU S, BHOJANI N, et al. Office-based procedures for BPH [J]. *Curr Urol Rep*, 2021, 22(12): 63.

[收稿日期] 2023–08–18

孙和勇,张刚利,吴济良,等. 应用植入式缓释泵实现大鼠脑室给药的操作方法及其改进 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34 (7): 89-94.

Sun HY, Zhang GL, WU JL, et al. Method and improvement of implantable osmotic pump for intraventricular drug administration in rats [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 89-94.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.010

应用植入式缓释泵实现大鼠脑室给药的操作方法 及其改进

孙和勇¹, 张刚利^{1,2*}, 吴济良¹, 曹培立¹, 李 硕¹, 孙浩钦¹

(1.山西医科大学第五临床医学院神经外科,太原 030012;2.山西省人民医院神经外科,太原 030012)

【摘要】 目的 介绍应用植入式缓释泵实现脑室给药的实验技术并予以改进。**方法** 选择 8 周龄雄性 SD 大鼠,准备所需器材及试剂。首先将缓释泵组装并孵育至工作状态,然后进行植入手术操作。实验动物麻醉后备皮,手术暴露颅骨上表面,使用脑立体定位仪定位脑室正上方一点,在该点用高速颅钻钻 1 个小孔。先将泵体埋置于颈部皮下,然后将针头插入小孔中,并用牙科水泥固定,凝固后剪去针头基座,逐层缝合皮下软组织和头皮,将动物放回笼内单独饲养。**结果** 缓释泵泵体成功植入大鼠颈部皮下,针头牢固固定于颅骨,导管接口未断开。取出完整脑组织检查,可见穿刺点及针道周围无明显血肿,脑室内及周围组织可见蓝色染料,表明本方法能够成功将药物送达脑室。**结论** 通过引入脑立体定位仪辅助定位,并对此技术的操作流程进行改进,使植入操作更加精准、安全,具有较高的脑室给药成功率。

【关键词】 植入式缓释泵;脑室给药;脑立体定位仪;实验方法;技术改进

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0089-06

Method and improvement of implantable osmotic pump for intraventricular drug administration in rats

SUN Heyong¹, ZHANG Gangli^{1,2*}, WU Jiliang¹, CAO Peili¹, LI Shuo¹, SUN Haoqin¹

(1. Department of Neurosurgery, the Fifth Clinical Medical College of Shanxi Medical University, Taiyuan 030012, China.

2. Department of Neurosurgery, Shanxi Provincial People's Hospital, Taiyuan 030012)

【Abstract】 Objective To introduce and enhance an experimental technique for intraventricular drug delivery via an implantable osmotic pump. **Methods** Eight-week-old male SD rats were selected and the requisite equipment and reagents were prepared. The osmotic pump was assembled and brought to operational status before conducting the implantation surgery. Following anesthesia, the rats underwent skin preparation and the upper surface of the skull was surgically exposed. A point directly above the ventricle was located using a brain stereotaxic apparatus, and a small hole was drilled at that location with a high-speed cranial drill. The pump body was then implanted subcutaneously in the neck and the needle was inserted into the drilled hole, and secured with dental cement. Once solidified, the needle base was removed, the subcutaneous soft tissue and scalp were sutured in layers, and the animal was returned to its cage for rearing in isolation. **Results** The osmotic pump was successfully implanted subcutaneously in the rat's neck, the needle was

【基金项目】 山西省自然科学基金 (202203021211060)。

【作者简介】 孙和勇 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 颅脑损伤与修复。E-mail: 1978418608@qq.com

【通信作者】 张刚利 (1973—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 神经重症方向, 颅脑肿瘤临床与基础研究。

E-mail: Zhanggangli1973@163.com

securely fixed to the skull, and the catheter interface remained intact. The rats were sacrificed and the brain tissue was removed. Examination of the extracted brain tissue revealed no significant hematoma around the puncture site or needle tract, and the presence of blue dye in the ventricular and adjacent tissues indicated successful drug delivery to the ventricle. **Conclusions** The introduction of a brain stereotaxic apparatus to aid localization, coupled with enhancements to the operational procedure, may improve the accuracy and safety of the implantation process resulting in a high success rate for intraventricular drug administration.

【Keywords】 implantable osmotic pump; intraventricular drug administration; brain stereotaxic apparatus; experimental method; technology improvement

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

在中枢神经系统(central nervous system, CNS)疾病的研究中,进行药物干预时经常遇到一个问题,即由于血脑屏障(blood brain barrier, BBB)的存在,许多药物难以透过发挥有效作用。血脑屏障作为一种保护机制,维持大脑的内环境稳态,并保护中枢神经系统抵御外来病原体侵袭^[1]。另一方面,血脑屏障中毛细血管内皮细胞紧密连接,且外表面几乎全被星形胶质细胞覆盖,这些结构特点导致大部分药物难以进入脑组织^[2]。

国外有研究者报道了使用植入式缓释泵进行脑室给药的实验方法^[3-5],这种方法使得药物直达病灶,避免了血脑屏障导致的损失,更好发挥药物的有效作用。有研究证实,植入式缓释泵由于具有持续释放药物的特点,能够维持有效的药物浓度,因而优于单次脑室内给药方式^[6]。然而,国内外文献尚未有对缓释泵植入操作的详细介绍,我们的实验中大量使用了植入式缓释泵,积累了一定的经验,本文介绍该方法的技术细节并对一些步骤加以改进。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验选择 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 10 只,体重 240~260 g,来源于山西省人民医院实验动物中心[SCXK(晋)2019-0001],大鼠饲养于山西省人民医院实验动物中心屏障环境内[SYXK(晋)2019-0003],自由饮水和进食。所有动物实验程序均经山西省人民医院伦理委员会批准((2022)省医科伦审字第 204 号),遵循实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

万古霉素(批号:C14533818)购自上海麦克林生化科技有限公司;玻璃离子水门汀(又称牙科水泥;型号:1 型)购自上海荣祥齿科材料有限公司;

2%伊文思蓝染色液(批号:J13HR11914A)购自上海源叶生物科技有限公司。

植入式缓释泵(型号:1001W)、脑输液导管(批号:I1900002)、全自动脑立体定位仪(型号:71000)均购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司;颅钻(编号:2111-6022)购于上海塔望智能科技有限公司;针头无菌过滤器(规格:有机系 13 mm×0.22 μm)购自常德比克曼生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 既往文献的操作方法

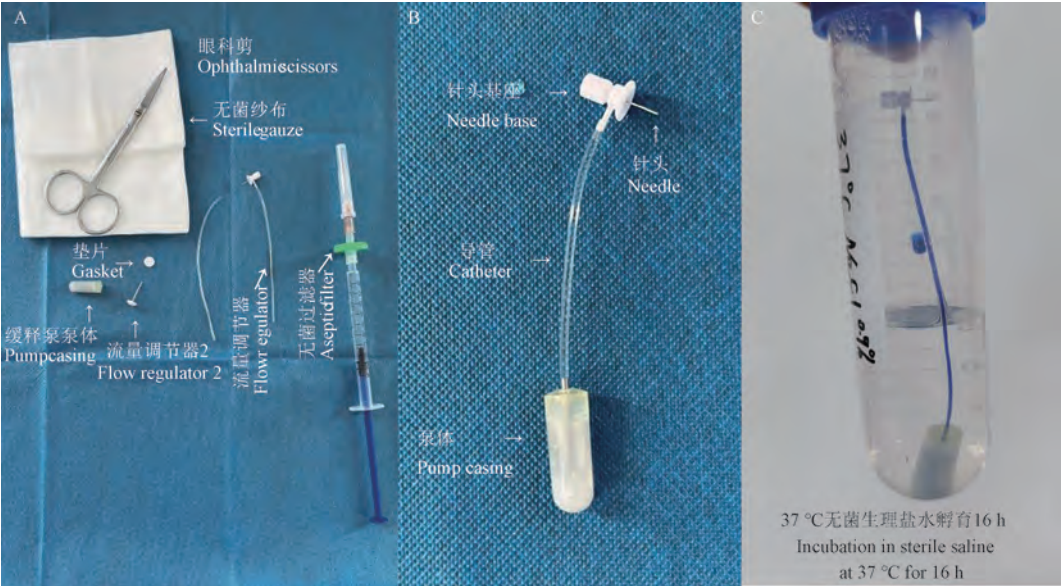
既往文献中已有使用植入式缓释泵进行实验研究的先例^[3-6],由于篇幅限制,大都在方法部分简要叙述操作流程,总结如下:准备程序包括缓释泵组装、注药及孵育。大鼠被麻醉后固定在脑立体定位仪上,于头部皮肤矢状位正中切口 1.5 cm,暴露颅骨,参考大鼠脑图谱定位脑室上方穿刺点(前囟后 1.0 mm,中线旁开 1.5 mm),使用颅钻在该点钻 1 小孔,将缓释泵给药末端插入适宜深度(硬脑膜下 4.0 mm)后用胶水固定,缓释泵埋置于背部两侧肩胛骨之间的皮下,植入完成后缝合皮肤。参考既往文献中的大致步骤,我们在穿刺点定位、导管长度设计及无菌处理 3 方面进行改进,详细操作流程如下。

1.3.2 缓释泵组装及孵育

按照瑞沃德缓释泵操作说明书进行组装(图 1A),缓释泵内注入 2% Evans Blue 溶液以显示能否成功实现脑室给药(用于示踪),缓释泵泵体与针头之间的连接管长度为 4 cm,完成效果如图 1B 所示。50 mL 离心管高压蒸汽灭菌后加入 10 mL 生理盐水,将组装好的缓释泵放入离心管中,使得缓释泵完全浸入生理盐水中,保证末端针头在水面以上(图 1C)。放入水浴箱中,37 ℃ 孵育 16 h 使缓释泵进入工作状态,然后进行植入手术操作。

1.3.3 动物麻醉与备皮

大鼠造模前禁食 8 h;称重后腹腔注射 0.3%戊



注:A:缓释泵组装过程所需材料,其中流量调节器 2 和垫片本实验不用;1 mL 注射器针头接无菌过滤器;B:缓释泵组装完成效果,导管长度以 4 cm 为宜;C:50 mL 离心管经高压蒸汽灭菌后使用,无菌生理盐水没过泵体且低于针头,37 °C 孵育 16 h 使缓释泵进入工作状态。

图 1 缓释泵组装及孵育

Note. A, Materials required for the assembly process of the osmotic pump, of which the flow regulator 2 and the gasket are not used in this experiment. 1 mL syringe needle connected to sterile filter. B, Assembly effect of the osmotic pump is completed, and the length of the catheter should be 4 cm. C, 50 mL centrifuge tube should be used after high-pressure steam sterilization. The sterile saline should cover the pump body and be lower than the needle. Incubate at 37 °C for 16 hours to put the osmotic pump into working condition.

Figure 1 Assembly and incubation process of the osmotic pump

巴比妥钠(1 mL/100 g)麻醉,实验过程中若出现动物苏醒表现,则每次追加原 1/4 麻醉剂量。用电动剃毛器剪去大鼠头顶前眦至耳后的毛发进行备皮,碘伏消毒 3 遍后铺无菌洞巾。

1. 3. 4 缓释泵植入手术操作

于矢状正中切开头皮,长约 3 cm。用刀片背侧向两侧推开皮下软组织,剥离骨外膜,暴露右侧顶骨,用纱布或棉球压迫止血。碘伏水及生理盐水序贯冲洗 3 遍保证术区无菌。

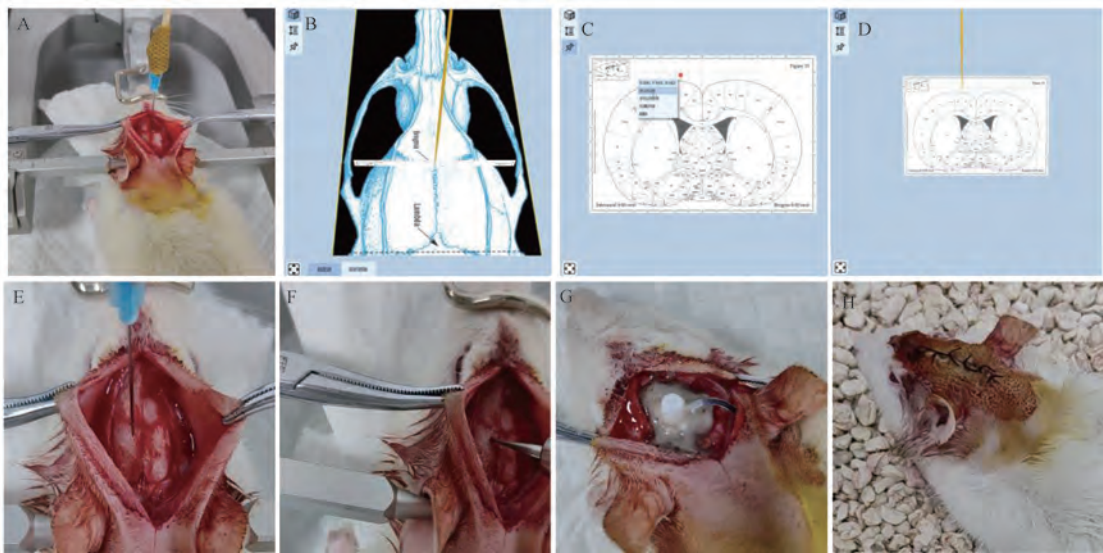
定位钻孔点:连接脑立体定位仪各组件,启动应用程序,脑图选择为大鼠(Paxinos, 第六版)。通过调节大鼠耳杆和鼻夹的高度使颅骨处于水平位置,手动调节微操控制器使针头定位至大鼠 Bregma 点,设定为“原点”(图 2A、2B)。在脑图谱中选择脑室正上方脑表面一点,点击鼠标右键弹出对话框,选择“定点位移”(图 2C),点击“移动”后脑立体定位仪机械臂自动将定位针头移动至脑室上方颅骨表面一点(图 2D、2E),多次操作显示位置在冠状缝后 1 mm,中线左侧 1.5 mm 处为宜,在该点用高速颅钻钻 1 个小孔备用(图 2F),为之后缓释泵脑室端针头植入位置。

用组织剪在大鼠项背部皮下钝性分离出一间

隙,将已孵育好的缓释泵泵体埋置于皮下;将脑室端针头插入中线左侧小孔中并用牙科水泥固定(图 2G),牙科水泥粉液配比为粉剂:液剂=0.7 g:0.8 g。根据 8 周龄大鼠大脑发育情况及针头长度,在上述坐标植入针头时无需使用垫片调节深浅,即将针头完全插入为适宜深度,待牙科水泥凝固后剪去针头基座。万古霉素(1 mg/mL)4~5 mL 冲洗术区,逐层缝合皮下软组织和头皮,碘伏消毒 3 遍,将动物放回笼内单独饲养(图 2H)。

2 结果

3 d 后,按上述方法对大鼠进行麻醉及切皮,重新暴露术区,可见针头固定完全,未见移位,导管接口未断开,泵体位于颈部皮下(图 3A)。分离颅骨表面附着的筋膜和肌肉,沿枕骨大孔剪断脊柱处死大鼠,剪开颅骨完整取出脑组织,可见穿刺点周围无明显水肿(图 3B)。于穿刺点截面横断大脑,观察到针道周围无明显水肿,脑室内及周围组织可见蓝色染料(图 3C、3D),表明给药成功。经过前期对上述手术操作流程的熟练,并合理使用麻醉药,此次实验 10 只大鼠均成功植入缓释泵并实现脑室给药,模型成功率为 100%。

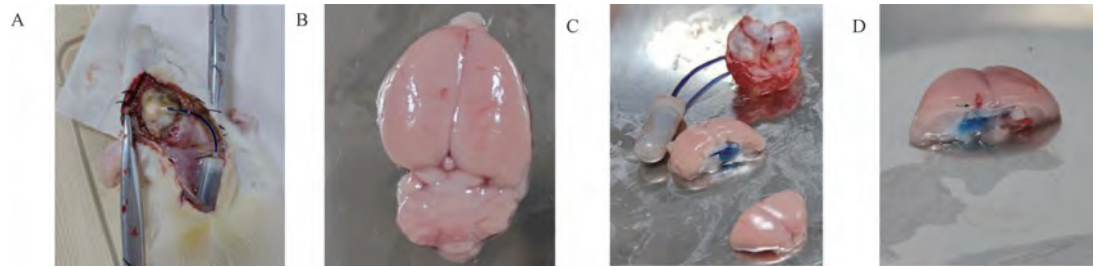


注:A:调节针头定位于大鼠颅骨 Bregma 点;B:在电脑端操作程序中将 Bregma 点设定为“原点”;C:在脑图谱中选择脑室正上方脑表面一点,点击鼠标右键弹出对话框,选择“定点位移”;D:脑立体定位仪机械臂自动将定位针头移动至该点;E:实物显示定位针头移动至脑室上方颅骨表面一点;F:在该点用高速颅钻钻 1 个小孔,即为之后缓释泵脑室端针头植入位置;G:先将泵体埋置于颈部皮下,然后将针头全部插入小孔中,并用牙科水泥固定,凝固后剪去针头基座;H:逐层缝合皮下软组织 and 头皮,颈部凸起皮肤显示缓释泵泵体轮廓。

图 2 缓释泵植入操作流程

Note. A, Adjust the needle to locate it at the Bregma point of the rat skull. B, Set the Bregma point as the “origin” in the computer operating program. C, Select a point on the brain surface just above the ventricle in the brain map, right-click the mouse to pop up a dialog box, and select “Fixed Point Displacement”. D, Robotic arm of the brain stereotaxic apparatus automatically moves the positioning needle to this point. E, On the actual object, the positioning needle is moved to a point on the surface of the skull above the ventricle. F, At this point, a small hole is drilled with a high-speed skull drill, which will be the location where the needle of the osmotic pump will be implanted. G, First bury the pump body under the skin of the neck, then insert the whole needle into the small holes, fix them with dental cement and cut off the needle base after solidification. H, Suture the subcutaneous soft tissue and scalp layer by layer, and the protruding skin of the neck shows the outline of the pump body.

Figure 2 Operation process of osmotic pump implantation



注:A:植入术后 3 天重新暴露术区,可见针头固定完全,导管接口未断开,泵体位于颈部皮下;B:取出完整脑组织,黑色箭头示穿刺点,可见穿刺点周围无明显血肿;C:完整取出缓释泵给药系统,针头牢固固定于颅骨上;脑室内及周围组织可见蓝色染料;D:黑色箭头示针道,针道周围无明显血肿,脑室内及周围组织可见蓝色染料,表明给药成功。

图 3 缓释泵植入效果与脑室给药结果

Note. A, Three days after implantation, the surgical area was re-exposed. It can be seen that the needle is firmly fixed on the skull, the catheter interface is not disconnected, and the pump body is located under the skin of the neck. B, Complete brain tissue was taken out. The black arrow indicates the puncture point. It can be seen that there is no obvious hematoma around the puncture point. C, The drug delivery system of the osmotic pump was removed completely, and the needle was firmly fixed on the skull. Blue dye can be seen in the intraventricular and surrounding tissues. D, Black arrow indicates the needle path, and there is no obvious hematoma around it. Blue dye can be seen in and around the ventricle, indicating the success of drug administration.

Figure 3 Implanted osmotic pump and successful intraventricular administration

3 讨论

3.1 植入式缓释泵的优势

血脑屏障的存在导致大部分药物难以进入脑组织,而在颅脑疾病的基础研究中又常常需要对脑组织进行直接干预。为了绕过血脑屏障实现特定脑区给药,本文详细介绍了应用植入式缓释泵进行脑室给药的实验方法。缓释泵可以绕过血脑屏障将药物输注到脑实质或脑室。此外,缓释泵能够将药物长期、持续、匀速地输送到实验动物组织或器官中。与直接反复注射相比,皮下植入的缓释泵在一次植入操作之后可持续给药,从而减少了对动物的损伤,并能降低多次给药操作导致颅内感染的风险^[7]。

目前,向实验动物的特定脑区给药主要有 3 种方式,包括使用微量注射泵控制微量注射器进行单次给药^[8],使用微量给药套管实现多次反复给药^[9],以及使用植入式缓释泵持续释放给药^[10]。我们总结了上述 3 种颅脑给药方式的优点和局限(表

1),研究者可根据实验设计需求选择合适的给药方式。

3.2 本实验对植入手术操作的改进

脑立体定位仪:本实验引入脑立体定位仪辅助定位钻孔点,能够更精准定位给药目标部位(脑室);脑立体定位仪机械臂自动定位,可减少手动测量导致的人为误差,更好地避免了由于位置偏差导致的给药失败。当实验要求对其他脑区进行给药或注射时,可在脑图谱中选择相应部位予以定位。本实验大量植入操作显示,钻孔位置在冠状缝后 1 mm,中线左侧(或右侧)1.5 mm 处为宜,在缺乏脑立体定位仪辅助的实验条件下可首先选择该坐标进行脑室给药。

导管长度:适宜的导管长度可以减少接口断开导致给药失败的可能。缓释泵泵体与末端不锈钢针头之间的导管长度以 4 cm 为宜。过短会导致泵体位于大鼠颈部,给动物造成更多不适且易导致接口断开;过长会出现导管弯曲,增加后续固定和缝合的困难,同样使得接口更容易断开。

表 1 3 种颅脑给药方式的优点和局限		
Table 1 Advantages and limitations of three kinds of craniocerebral drug administration		
名称 Names	优点 Advantages	局限 Limitations
微量注射器 Microsyringe	微量药物单次注射; Single injection of trace drugs; 实验人员可自主控制给药速率和剂量; Experimenter can independently control the rate and dose of drug administration; 给药完成后不影响后续影像学检查。 Follow-up imaging examination will not be affected after the completion of administration.	实验需要多次注射时需反复手术暴露颅骨,操作繁琐,容易导致感染。 When the experiment requires multiple injections, repeated surgery is required to expose the skull, which is tedious and easy to lead to infection.
	一次定位埋置后可实现反复多次给药; Repeated drug administration can be achieved after once positioning and embedding; 实验人员可自主控制给药速率和剂量,多次给药的速率或剂量可互不相同。 Experimenter can independently control the rate and dose of drug administration, and the rate or dose of multiple administration can be different from each other.	多次给药需反复抓取和刺激实验动物,无菌措施不当容易导致感染; Repeated administration requires repeated capture and stimulation of experimental animals, and improper aseptic measures can easily lead to infection; 实验动物自身搔抓导致破坏和感染; Damage and infection caused by self-scratching in experimental animals; 导管中含有金属细管,干扰影像学检查。 Catheter contains thin metal tubes, which will interfere with the imaging examination.
微量给药套管 Micro drug delivery cannula		
植入式缓释泵 Implantable osmotic pump	一次定位埋置后可实现长期、持续、匀速给药。 Once embedded, long-term, continuous and uniform drug delivery can be achieved.	一种型号的缓释泵具有唯一的储存容积、泵送速率及持续时间; One type of implantable osmotic pump has unique storage capacity, pumping rate and duration; 组装过程相对复杂,无菌要求高,不可产生气泡; Assembly process is relatively complex, requires high sterility, and must not produce bubbles; 金属针头干扰影像学检查,产生伪影。 Metal needles interfere with imaging examinations due to artifacts.

无菌措施:缓释泵为外来植入物,为了尽量避免感染,在植入手术操作中参考临床手术过程,使用碘伏、双氧水、万古霉素及生理盐水冲洗,术后切口再次使用碘伏消毒,动物单独饲养避免同伴争斗或舔舐造成感染。各种无菌措施的综合应用能够尽量减少植入手术操作带来的感染风险。

3.3 操作过程中容易出现的问题及解决方法

按压过久导致大鼠窒息:在使用牙科水泥固定针头的过程中,由于牙科水泥凝固需要一定的时间(约 5 min),持续按压针头可能导致大鼠窒息死亡。因此,需特别注意按压力度,可定时减轻力度给动物呼吸时间;在头颈部垫置纱布块缓冲;也可由助手捏住双颞抬高头部,避免压迫气管导致窒息。此外,有待发现更好的粘合剂,特点是凝固时间更短,具备较好的生物相容性,且不会顺着给药端针头外壁流进脑组织或堵塞针头。

导管接口断开:实验中发现,即使导管长度设置合适,仍会出现导管与针头之间的接口断开。可能原因包括接口连接不紧、动物活动及手术操作过程中的错误牵拉,这些情况均会导致泵内药物不能有效给到脑室。改进方法如下:组装过程中提前使用热水浸泡导管,使针头接口端更多地嵌入导管;使用 0 号线结扎套入接口的导管;牙科水泥除了固定针头外,可沿导管向后 1~2 cm 将导管固定于颅骨上。

3.4 本研究的局限与展望

由于本文旨在介绍应用植入式缓释泵实现脑室给药的详细操作流程,侧重方法介绍,未对缓释泵安全性问题作深入研究,缺乏分组比较的神经功能或行为学评分等统计数据证明缓释泵植入操作本身对实验动物有无损害。此外,本文介绍了技术改进,尚需进一步研究证明改进前后的方法在安全性、有效性及给药成功率等方面是否存在统计学意义。

参考文献:

[1] ZHAO Q, ZHANG F, YU Z, et al. HDAC3 inhibition prevents blood-brain barrier permeability through Nrf2 activation in type 2

diabetes male mice [J]. J Neuroinflammation, 2019, 16 (1): 103.

[2] 杨宝峰,陈建国. 药理学 第 9 版 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2018.

YANG B F, CHEN J G. Pharmacology the 9th Edition [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2018.

[3] LEE C, AGOSTON D V. Vascular endothelial growth factor is involved in mediating increased *de novo* hippocampal neurogenesis in response to traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2010, 27(3): 541-553.

[4] THAU-ZUCHMAN O, SHOHAMI E, ALEXANDROVICH A G, et al. Subacute treatment with vascular endothelial growth factor after traumatic brain injury increases angiogenesis and gliogenesis [J]. Neuroscience, 2012, 202: 334-341.

[5] VILLASANA L E, PETERS A, MCCALLUM R, et al. Diazepam inhibits post-traumatic neurogenesis and blocks aberrant dendritic development [J]. J Neurotrauma, 2019, 36 (16): 2454-2467.

[6] 包新杰,施浩,李雪元,等. 植入式胶囊渗透压泵在大鼠脑梗死模型脑室给药中的应用 [J]. 医学研究杂志, 2016, 45 (8): 20-23.

BAO X J, SHI H, LI X Y, et al. Application of intraventricular administration using osmotic pumps for middle cerebral artery occlusion models in rats [J]. J Med Res, 2016, 45 (8): 20-23.

[7] GRATHWOHL S A, JUCKER M. Replacement of osmotic minipumps to extend the intracerebral infusion time of compounds into the mouse brain [J]. Biotechniques, 2013, 55 (2): 75-78.

[8] KAGUSA H, YAMAGUCHI I, SHONO K, et al. Differences in amyloid- β and tau/p-tau deposition in blood-injected mouse brains using micro-syringe to mimic traumatic brain microhemorrhages [J]. J Chem Neuroanat, 2023, 130: 102258.

[9] MORGAN M M, FOSSUM E N, LEVINE C S, et al. Antinociceptive tolerance revealed by cumulative intracranial microinjections of morphine into the periaqueductal gray in the rat [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2006, 85(1): 214-219.

[10] JIA X Y, JIANG D L, JIA X T, et al. Capsaicin improves hypertension and cardiac hypertrophy via SIRT1/NF- κ B/MAPKs pathway in the hypothalamic paraventricular nucleus [J]. Phytomedicine, 2023, 118: 154951.

[收稿日期] 2023-11-14

马丽颖,王洪,郭萌,等. CNAS-CL06 体系良好运行对动物实验数据科学性的积极作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 95-100.

Ma LY, Wang H, Guo M, et al. Positive effect of the good operation of the CNAS-CL06 system on the scientific nature of animal experimental data [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 95-100.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.011

CNAS-CL06 体系良好运行对动物实验数据科学性的积极作用

马丽颖[#], 王洪[#], 郭萌, 梁春南, 岳秉飞, 巩薇^{*}

(中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

【摘要】 药品生物制品检验检测机构的动物实验室承担着检测和科研工作的重要支撑任务。本文梳理了中检院 CNAS-CL06 质量管理体系在运行中积累的管理经验, 为同类机构在运行中提供借鉴, 以保障动物实验数据的科学性。本实验动物机构顺利通过了 CNAS 实验动物机构认可, 并在现场监督评审中按时完成了整改, 同时依据《实验动物饲养和使用机构质量和能力认可准则》(CNAS-CL06) 开展体系定期自查。在自查过程中一边检查问题一边完善体系内容, 从动物采购、职业健康安全、动物疾病治疗与护理、设施运行突发事件演练等几方面着手, 充实了质量管理体系内容, 确保体系持续有效运行, 保障了动物实验数据的有效性和标准化, 同时在动物实验平台共享方面贡献了中检院的管理思路, 为动物实验的云平台建设提供硬件和软件支撑。本文旨在根据工作实际探索形成实验动物行业质量管理模式, 为制定和执行国家标准、行业/团体标准、认可认证标准等机构提供基础数据, 为开展动物实验的机构提供可供探讨的管理模式, 也为推动整个动物实验的规范化、科学化发展水平夯实基础。

【关键词】 动物实验; 质量管理体系; 共享平台

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0095-06

Positive effect of the good operation of the CNAS-CL06 system on the scientific nature of animal experimental data

MA Liying[#], WANG Hong[#], GUO Meng, LIANG Chunnan, YUE Bingfei, GONG Wei^{*}

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

【Abstract】 The animal laboratory of pharmaceutical and biological product inspection and testing institutions undertakes important basic support tasks for testing and scientific research work. This article summarizes the management experience accumulated in the operation of our institution's CNAS-CL06 quality management system, providing reference for similar institutions in operation to ensure the scientific nature of animal experimental data. In order to ensure the scientific nature of animal experimental data, the experimental animal institution has successfully passed the CNAS accreditation of the experimental animal institution, and has completed rectification on time during on-site supervision and evaluation. At the same time, regular self inspections of the system have been carried out in accordance with the "Quality and Capability Accreditation Guidelines for Experimental Animal Breeding and Use Institutions" (CNAS-CL06). During

【作者简介】 马丽颖(1972—), 女, 硕士, 研究方向: 医学免疫学, 质量管理。E-mail: maliyinglw@sina.com

王洪(1977—), 女, 硕士, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: wanghong@nifdc.org.cn [#]共同第一作者

【通信作者】 巩薇(1973—), 女, 副研究员, 研究方向: 实验动物标准化管理。E-mail: gongwei@nifdc.org.cn

the self inspection process, we examined issues while improving the content of the system. Starting from animal procurement, occupational health and safety, animal disease treatment and care, and facility operation emergency drills, we enriched the content of the quality management system, ensured the continuous and effective operation of the system, and ensured the effectiveness and standardization of animal experiment data. At the same time, we contributed to the management ideas of our institution in sharing animal experiment platforms, provide hardware and software support for the construction of cloud platforms for animal experiments. This article aims to explore and form a quality management model for the experimental animal industry based on practical work, being focused in the standardization strategy, continue to deepen the reform of standardization work, and give full play to the basic and strategic role of standardization in the modernization of the animal experiments system.

[Keywords] animal experiments; quality management system; shared platform

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

中国食品药品检定研究院(以下简称中检院)依法承担药品、生物制品、医疗器械、食品、保健食品、化妆品、实验动物、包装材料等多领域产品的审批准注册检验、进口检验、监督检验、安全评价及生物制品批签发等任务。以上产品中涉及实验动物检验检测的,还需要满足实验动物质量合格、实验环境控制规范、实验流程符合相应质量管理体系 3 个方面的要求。

随着生命科学、医药领域的迅速发展,相关领域研究的规范化,各大高校及科研院所对实验动物资源及实验动物屏障设施的需求越来越广泛^[1]。2019 年底发生新型冠状病毒疫情,高质量的模式实验动物和良好运行的质量管理体系共同保障了动物实验数据的科学性、有效性,为疫苗顺利上市,成功遏制疫情起到了积极推动作用。实验动物质量、实验环境的控制及其规范化管理是动物实验结果科学性和可靠性最重要的保障,也反映了机构的检测能力和水平^[2]。

中国合格评定国家认可委员会(China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS)实验动物机构认可制度从 2017 年开始施行,截止到 2021 年 8 月,通过认可的机构 12 家,这在全国近两千余家获得许可证的实验动物机构中,所占份额十分有限^[3]。中检院于 2020 年顺利通过 CNAS 认可,对管理体系、动物设施、动物饲养、动物医护和职业健康安全 5 个方面进行了系统评审^[4],为实验动物质量的标准化和动物实验数据的科学性、有效性提供了保障。本文旨在顺应我国高质量发展的前提下,通过提高质量管理体系的管理能力,以保证科研数据的高质量,为药品、生物制品等监管科学体系提供高质量的技术标准,也为同行业尽快申请质量管理体系的认可提供前车之鉴。

1 CL06 体系运行基本情况

中检院实验动物资源楼总建筑面积 8849 m²,动物实验设施 6540 m²,承担“国家啮齿类实验动物资源库”和“质量检测中心”任务。

2020~2022 年,自通过 CNAS 认可后 2 年间,为满足中检院运行所需要的管理体系文件,4 次修订部分文件维持管理手册和程序文件的权威性。组织结构清晰,部门和岗位职责分工明确,具有一定的完整性和系统性,能够服务于机构设定的管理方针和管理目标。

根据中检院检验机构能力评价研究中心的统一安排,每年进行 2 次内审和 1 次管理评审;每半年对设施设备运行情况进行检查,对设施环境进行检测;每年对实验动物质量进行 4 次检测,监督检查覆盖机构工作的全部场所和活动。针对每一年度开具的不符合项和观察项,各部门积极分析原因,并在规定限期内完成了纠正。

中检院实验动物使用与管理委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)对生产和实验活动中涉及动物福利伦理相关活动进行了审查。在实验动物福利伦理审查申请书中,明确了使用动物品种、品系及数量的合理性,并对实验案中动物使用计划从必要性、种类、数量、分组、受试品及给药途径、保定方法、手术方案、人道终点、职业安全等方面进行了全面审核,确保动物使用计划符合“3R(减少 Reduction、替代 Replacement 和优化 Refinement)”各项要求,同时对动物实验进行定期监督,保证实验人员各项操作符合方案要求。

机构严格按照 CNAS 实验动物机构认可准则要求和管理体系文件的相关规定,严格遵守 CNAS-

R01 认可标识使用和认可状态声明规则,未发生违反规则的情况。各项活动基本处于受控状态,符合认可准则的要求,机构管理体系运行良好有效。

基于管理体系良好有效的运行,确保动物实验数据科学、有效,也保障了机构检验检测数据的合理性、公平性和权威性。

2 CL06 体系运行现场监督评审的作用

2022 年 2 月,CNAS 派出评审组对中检院进行了实验动物机构监督评审。专家组通过现场考察、现场提问、查阅记录和人员座谈等方式对中检院的实验动物饲养与使用体系运行进行了评审。通过专家组的现场监督评审,可以发现质量管理体系运行中存在的问题,根据专家的经验 and 评审经历提出有意义的建议项,为质量管理体系良好运行起到了纠错修正以及正向积极的推动作用。

2022 年度专家组的现场监督评审依据为 CNAS-CL06:2018《实验动物饲养和使用机构质量和能力认可准则》、CNAS-RL08:2017《实验动物饲养和使用机构认可规则》和机构内部管理体系文件及相关标准。评审专家分别从管理体系部分、实验动物设施、实验动物饲养、实验动物医护、职业健康安全、附录 A、附录 B(包括 IACUC)进行了全部要素的评审。

2022 年度现场监督评审发现的不符合项主要集中在对工作人员生命健康存在危害风险的工作场所,如洗消间的地面湿滑从而导致工作人员作业中存在滑倒的风险;过道内堆放设备,不符合“走廊不应作为存储区”的相关要求,存在安全隐患;未制定洗消间工作人员选择个人防护装备的标准作业程序(standard operating procedure, SOP),不利于开展洗消人员防护的相关管理工作等。但未在实验动物质量及动物实验操作中发现不符合项,表明实验工作人员能够在质量体系运行中自觉按照程序文件的指导开展检验检测工作,管理人员依据相关条款进行监督,保障了 CL06 体系较好的运行,保障了中检院出具的检测报告的客观性和权威性。

2022 年度现场监督评审中发现的不符合项,中检院在规定的时间内完成了整改工作,质量负责人加强了日常管理和监督,确保纠正措施到位。一方面完善了质量管理体系,另一方面保障了质量管理体系的运行更具有效性,更好地保障人民群众饮食用药安全。

3 CL06 体系自查的作用

根据实验动物机构评审流程,CNAS 实验动物机构认可评审周期为 5 年。初次评审后第 1 年通过评审的机构进行自查,第 2 年进行 CNAS 现场监督评审,第 3、4 年通过评审的机构自查,第 5 年实施 CNAS 现场复查^[5-6]。2023 年度中检院实验动物机构开展了自查工作。

通过中检院内部人员的互查和自查建立起自我改进的管理机制,发现潜在的质量风险,获取公正、客观的质量管理信息,为决策层提供事实依据,保证质量管理体系运行的持续性、符合性、有效性。

与上一年度相比,中检院在持续改进方面的显著成效,保证了动物实验数据的可靠性、完整性和可溯源性,主要包括以下几方面。

3.1 动物采购

建立了实验动物供应商评价操作规范,主要从实验动物供应商的质量系统、动物种源及引种信息、动物繁育生产、包装、运输、人员、职业健康安全、产品价格、售后服务等 9 个方面进行全面考察,供应商名录实行动态管理,原则上每 2 年组织 1 次再评价。供应商如存在重大质量问题、引发重大事故等情况时及时终止合作。此项 SOP 确保了实验动物采购前的质量安全、可靠。

3.2 动物疾病治疗与护理

一些实验周期长的动物,实验过程中会有个别动物发生疾病的情况,例如中检院开展的动物实验,有个别实验兔出现了耳螨病例,兽医对病例及时进行了局部治疗、全身治疗,同时从饮食营养方面进行了改善,治疗周期约 1 个月,病例全部治疗痊愈,经全面评估此项疾病和治疗方案对该实验无影响。

兽医针对动物实验过程中出现的病例,如兔耳螨、兔腹泻、实验兔、实验鼠咬合不良、大小鼠外伤、实验小鼠毛稀或脱毛等,从病原学、预防、诊断、治疗、预后等方面撰写了临床病例报告。建立了动物病例档案管理操作规范,补充完善了兽医职责 SOP,建立了主治兽医月度轮岗制,可及时发现动物异常情况并进行诊治,强化动物质量内控管理。

3.3 动物实验技术

获得准确、严谨的动物实验数据当然也离不开实验操作,掌握精准的动物实验技术是对科研工作者的最基本要求。中检院兽医工作小组根据检验

检测和科研工作实际情况,编写了动物实验技术操作手册,按照难易程度,从 1 星容易级别到 4 星较难级别,难度共分为 4 档。从动物实验的基本技能^[7]、给药操作、动物取材等方面进行了规范,并根据不同难易程度对不同的实验技术人员进行分层培训和指导。

3.4 职业健康安全

对动物设施内存在的风险进行了全面评估。尤其对生物安全二级的动物实验(负压工作区)进行了全面风险防控,严格要求项目开展之前做好供试品、阳性对照品的风险评估及防控措施,并根据安全风险等级安排不同的实验区域,不同的检验品种安排在不同的饲养房间。

3.5 高度重视人员培训

改变以往宣讲的模式,让新入职的工作人员和学生全程参与到动物实验培训流程中,整个培训包括老师教学和现场实操,从动物实验管理系统的使用、人员及物品进出流程、实验器材的使用要求、实验动物安乐死的一般要求及质量管理要求等 5 个方面向新入职人员和学生们详细介绍动物实验流程、现场实操环节,考核人员对工作人员和学生们进出实验动物设施的过程进行现场打分,以巩固实验动物流程相关知识。

3.6 设施运行突发事件演练

实验动物屏障设施的良好运行也同样离不开应急预案的制定,一次自然或者人为灾害的发生,将对动物实验机构产生毁灭性的影响^[8]。中检院根据工作实际,安排了突发意外情况的应急演练,包括动物逃逸的应急处理流程、突然停电的应急处理流程、可控火势火灾和不可控火灾的处理流程,以及人员受伤情况处理,例如被动物咬伤、被注射器扎伤、手部烧烫伤等紧急情况的处置。

通过自查以及采取相应的运行措施,中检院建立了明确清晰的组织管理框架,健全了实验动物生产和使用管理体系,并严格按照《CNAS-CL06 实验动物饲养和使用机构质量和能力认可准则》的相关要求,运行和实施各项管理措施。关键岗位人员均具备相应的职业资格,满足岗位要求,设备设施运行、维护状况良好,基本满足动物饲养、动物医护、职业健康安全等方面的要求。

4 CL06 和多个认证认可体系对动物实验共享平台建设的作用

1987 年,国际标准化组织发布了第一个质量管

理系列,即 ISO9000 系列标准,随着其不断改进与发展,被用在越来越多的领域^[9]。全面质量管理理念应用于科研管理也成为广大科研管理人员探索的课题。中检院已经通过 CNAS-CL01(17025)、CL06、CL03 等多个质量体系认证,是检验检测、科研成果转化以及药品生物制品监管国际互认的基础。“质量管理体系”作为一条纽带,把不同国家和地区科研产品和管理理念链接起来,也为未来的区域共享、条块发展带来了实现的可能性。

实验动物是教学科研中的重要载体和工具,合格的实验动物是科学研究的重要前提,建立标准化、科学化、规范化的实验动物屏障设施可提供 SPF 级实验动物并为开展实验动物研究提供平台保障^[10]。纵观国际,世界各国也同样重视实验动物的管理,1966 年,美国出台了第一部由农业部主导的《实验动物福利法》,首次以联邦法律形式禁止偷窃家养或宠物犬猫作为实验用动物,经过数年修订,到其 2020 年 7 月版蓝皮书^[11],从实验动物、研究机构的定义到 IACUC 管理职责都进行了详细的论述。1971 年 NIH 颁布了完全由自己制订的实验动物政策(Care and Treatment of Laboratory Animals),同时发布《实验动物使用准则》(Principles for the Use of Laboratory Animals)。到 2011 年,也是目前最新版 NIH《实验动物管理与使用指南》着重对动物设施和专业实验研究设施的设计营造、动物环境与饲养管理、动物使用计划(animal protocol)实施监督措施、对兽医照护、人员培训等进行规范^[12]。1973 年日本颁布的《动物保护与管理法》是日本实验动物管理的基本法;1980 年由总理府颁布了关于实验动物的最高法规《实验动物饲养及保管准则》,日本实验动物管理方式呈现由政府主导、行业自律进行监督与调控的特点。日本政府颁布国家大法,在法律的约束下,下级实验动物实施机构需要建立动物实验管理委员会,制定动物实验指导方针或管理章程。大学或者科研机构的研究人员要进行动物实验,需要制定实验动物计划书,具有完善的动物实验设施,并向其上级负责的机构提出申请,在相关管理制度的规范下完成动物实验。除了完备的规章制度,日本在实验动物领域的科研项目中投入大量资金,在经费上大力支持实验动物的研究和发展,显示了对实验动物学科发展的重视^[13]。

美国卫生署和 NIH 的动物政策,已经被国际生物医学研究机构普遍借鉴采纳。发达国家成功的

管理模式和经验值得我国借鉴和模仿,但也应该结合国情,形成具有中国特色的管理模式。随着新时代中国特色社会主义思想的发展,“共享发展”是社会主义制度优越性的集中体现,也为人类共同发展提供了新思路。全民共享、全面共享、共建共享和渐进共享,4 个内涵为共享的实施提出了发展方向。从共享单车到共享充电宝,从共享大型仪器设备到共享高精尖实验室,无论生活还是科研,都充分应用了共享理念,并从共享中得到了共同促进和发展。鉴于目前我国各地区发展不均衡,管理标准的制定上可以分层考虑,从最低要求开始到一般要求,再到最高要求,既能兼顾可实施性又能兼顾平衡性。

动物实验室对外开放、资源共享,搭建动物实验平台是开展科研、检测的重要支撑条件^[14]。近年来随着动物实验室软硬条件得到进一步改善,动物实验室管理水平不断提高,对动物实验及其科学仪器开放共享的管理模式和运行机制已有相关探索和研究^[15]。各地区应提升已有的管理思路,打开管理格局,从行业、基地、区域等维度大跨度谋划实验动物屏障设施的建设和大型仪器设备的配备。经济发达城市带动经济薄弱城市,科技发达地区帮扶科技欠发达地区,一方面避免同一地区内重复建设和投入,另一方面集中经济力量、人才力量打造高品质的动物实验设施,建设成为动物实验评价与研究、实验动物设施环境与质量检测、动物实验人才技能培训、实验动物福利伦理科普等为一体的综合性高水平共享平台,并能确保在多种质量管理体系下长期、高质量、有效运行。运用区块链技术可以同时管理不同地区、不同节点的数据^[16],突破现有的实验动物管理模式,把实验动物许可管理、实验动物质量合格证管理、实验动物认证认可管理甚至动物实验数据库共享等整合为一体,既合理利用了实验室资源,又确保动物实验数据的一致性和科学性。

共享实验动物平台上,实验动物屏障设施环境是实验动物赖以生存的条件,动物实验技术是获取科研数据的灵魂,质量管理体系是确保动物实验科学可靠的明灯,认可制度则是科研、检测水平的权威、有公信力的能力评价裁判。动物实验技术也在动物实验中发挥着巨大的作用。北京市出台的《动物实验管理与技术规范》^[17]中对实验操作有了明确的要求,分别从基本的动物实验技术、仁慈终点、数

据的科学化管理等方面进行了详细描述^[18]。这也为动物实验数据的科学性、稳定性和标准化提供了必要保障。

中检院较早地通过了中国合格评定国家认可委员会的认可(<https://www.nifdc.org.cn/nifdc/jgshzh/zjynlzzh/2022040610323653581.html>),并且在 CL06 质量管理体系下持续有效运行,能确保检验检测和科研数据的公平、公正、权威。因此也一直致力于积极推动动物实验平台的共享,根据我国各地区不均衡发展特点,能够取长补短,利用现有的动物实验电子操作系统,为将来的云平台建设,贡献一己之力。为实现与其他开展实验动物机构认可的国家和地区开展双边互认的交流提供技术支撑。

参考文献:

- [1] 陈秋荷,刘晓玲. 浅谈实验动物屏障设施的建设及管理体会——以广州中医药大学中药学院实验动物屏障设施为例[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 8(5): 98-101.
CHEN Q H, LIU X L. Construction and management experience of laboratory animal barrier facilities: Case study of specific pathogen-free barrier facility for laboratory animals in the School of Pharmaceutical Sciences of Guangzhou University of Chinese Medicine [J]. Chin J Comp Med, 2022, 8(5): 98-101.
- [2] 王吉星. 作为独立第三方检测机构如何在多种认证体系下保证动物实验数据的客观性和可靠性的讨论[A]. 北京市第九届北京实验动物科学国际论坛论文集[C], 2019.
WANG J X. Discussion on how to ensure the objectivity and reliability of animal experimental data under multiple certification systems as a third-party testing institution [A]. Beijing Proceedings of the 9th Beijing International Forum on Experimental Animal Science [C], 2019.
- [3] 吴孝槐. CNAS 实验动物机构认可进展[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(5): 384-391.
WU X H. Progress on the accreditation for laboratory animal institutions of CNAS [J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(5): 384-391.
- [4] 全国认证认可标准化技术委员会. 实验动物机构 质量和能力的通用要求. 非书资料:GB/T 27416-2014 [S]. 2018.
Conformity Assessment. Laboratory animal institutions-General requirements for quality and competence: GB/T 27416-2014 [S]. 2018.
- [5] 全国认证认可标准化技术委员会. GB/T27416-2014《实验动物机构 质量和能力的通用要求》理解与实施[M]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
Conformity Assessment. GB/T27416-2014 <Laboratory animal institutions-General requirements for quality and competence> understanding and implementation [M]. Beijing: Standards Press of China, 2015.

- [6] 吴孝槐, 肖巧喆, 庞万勇, 等. CNAS 实验动物机构认可与 AAALAC 认证的比较分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(3): 237-243.
WU X H, XIAO Q Z, PANG W Y, et al. A comparative analysis of CNAS laboratory animal institutions accreditation and AAALAC certification [J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(3): 237-243.
- [7] 赵勇, 陈国强, 张璐, 等. 屏障环境《实验动物机构质量和能力的通用要求(GB/T27416-2014)》的践行与探索 [J]. 实验室研究与探索, 2017, 36(4): 248-252.
ZHAO Y, CHEN G Q, ZHANG L, et al. Practice and exploration of barrier environment “general requirements for quality and ability of laboratory animal organizations (GB/T27416-2014)” [J]. Res Explor Lab, 2017, 36(4): 248-252.
- [8] 陆嘉琦, 刘吉宏, 周艳, 等. 浅谈实验动物饲养管理和使用计划中“灾难计划”的制定和实施 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(4): 78-82.
LU J Q, LIU J H, ZHOU Y, et al. Development and implement of a disaster plan in a laboratory animal care and use program [J]. Chin J Comp Med, 2014, 24(4): 78-82.
- [9] 苏晨. ISO9001 质量管理原则在公益性科研院所管理中的应用的思考 [J]. 科学咨询(科技·管理), 2023, 11(6): 36-40.
SU C. Research on the application of ISO9001 quality management principle in the management of public scientific research institutes [J]. Sci Cons (Tech·Mgt), 2023, 11(6): 36-40.
- [10] 史光华, 贺争鸣, 李根平, 等. 我国实验动物机构认可制度的建立与实施 [J]. 实验动物科学, 2020, 37(3): 53-59.
SHI G H, HE Z M, LI G P, et al. Establishment and implementation of the accreditation system for laboratory animal institutions in China [J]. Lab Anim Sci, 2020, 37(3): 53-59.
- [11] 徐国恒. 美国农业部主导的实验动物管理政策演变和启示 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 129-133.
XU G H. U. S. federal law; animal welfare act and animal welfare regulations and enlightenment [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 129-133.
- [12] 徐国恒. 美国卫生署与国立卫生研究院 NIH 主导的实验动物管理体系的演变和启示 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 134-140.
XU G H. PHS/NIH policy on laboratory animal care and use in the United States [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 134-140.
- [13] 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.
- [14] 韩建红, 魏立雯. 医学院校实验动物资源共享平台的建设 [J]. 国际医药卫生导报, 2021, 27(19): 3050-3052.
HAN J H, WEI L W. Construction of laboratory animal resource sharing platform in medical colleges and universities [J]. Int Med Health Guid Issues, 2021, 27(19): 3050-3052.
- [15] 李会萍, 陈梅丽. 开放式动物实验室预约管理平台架构研究与实现 [J]. 科技管理研究, 2021, 41(13): 139-143.
LI H P, CHEN M L. Structural research and implementation of open animal laboratory appointment management platform [J]. Sci Technol Manag Res, 2021, 41(13): 139-143.
- [16] 陈红, 李昀泽. 区块链技术指导下的实验动物管理模式的建立 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7(67): 186, 188.
CHEN H, LI J Z. The establishment of an experimental animal management model guided by blockchain technology [J]. Electron J Clin Med Lit, 2020, 7(67): 186, 188.
- [17] 北京市科学技术委员会. 《动物实验管理与技术规范》DB11/T 1717-2020 [S]. 2020.
Beijing Municipal Science & Technology Commission. Animal, Experiment Management and Technical Specification. DB11/T 1717-2020 [S]. 2020.
- [18] 李楠, 王天奇, 张长勇, 等. 动物实验质量标准化控制及北京市新地方标准解读 [J]. 实验动物科学, 2023, 40(3): 80-83.
LI N, WANG T Q, ZHANG C Y, et al. Standardized control of animal experiment quality and interpretation of the new local standards in Beijing [J]. Lab Anim Sci, 2023, 40(3): 80-83.

[收稿日期]2023-07-27

蒋欢, 白文娅, 邵建林. 铁死亡在脑缺血再灌注损伤机制中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 101-109.
Jiang H, Bai WY, Shao JL. Research progress of ferroptosis in the mechanism of cerebral ischemia reperfusion injury [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 101-109.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.012

铁死亡在脑缺血再灌注损伤机制中的研究进展

蒋欢, 白文娅, 邵建林*

(昆明医科大学第一附属医院麻醉科, 昆明 650000)

【摘要】 铁死亡是近年来新发现的一种细胞死亡方式, 参与了多种病理生理过程, 如缺血再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤、神经退行性疾病、肿瘤等。缺血性脑卒中 (ischemia stroke, IS) 目前在世界范围内缺乏有效防治手段, 而铁死亡参与脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI) 过程, 为治疗 IS 提供了希望。文章通过检索 PubMed、万方、维普及 CNKI 等数据库近年来发表的相关文献后纳入 50 篇文章, 从铁代谢、铁死亡的概念、机制和调控、铁死亡在 CIRI 机制中的作用以及抑制铁死亡的方法等方面入手, 为探讨通过抑制铁死亡寻找潜在治疗 IS 的新策略的可能性提供参考。

【关键词】 铁死亡; 铁代谢; 缺血性脑卒中; 再灌注损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0101-09

Research progress of ferroptosis in the mechanism of cerebral ischemia reperfusion injury

JIANG Huan, BAI Wenya, SHAO Jianlin*

(Anesthesia Department, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650000, China)

【Abstract】 Ferroptosis is a newly cell death mode discovered in recent years, involving in a variety of pathophysiological processes, such as ischemia reperfusion injury, neurodegenerative diseases and tumors, etc. At present, there is a lack of effective method to prevent and treat ischemic stroke worldwide, and ferroptosis which is involved in cerebral ischemia reperfusion injury. 50 articles were included in this paper after searching the related literature, which published in databases such as PubMed, Wanfang, VIP and CNKI in recent years. Discussing the iron metabolism and the concept, mechanism and regulation of ferroptosis, the role of ferroptosis in the mechanism of cerebral ischemia reperfusion injury, and the method of inhibiting ferroptosis, this paper attempts to provide reference for finding a new potential treatment for ischemic stroke from the direction of inhibiting ferroptosis.

【Keywords】 ferroptosis; iron metabolism; ischemia stroke; reperfusion injury

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

卒中在世界范围内发病率、死亡率、致残率高。2019 年世界卫生组织统计数据表明, 卒中是仅次于缺血性心脏病的第二大死因, 占总死亡人数的

11%^[1]。全球疾病负担研究数据显示: 卒中以 IS 为主, 大约占 2/3; 自 1990~2019 年, 我国 IS 发病率、患病率、死亡率均有上升趋势, 且在 2005 年以后这

【基金项目】 国家自然科学基金 (81960250); 云南省科技计划昆医联合专项重点项目 (202201AY070001-037)。

【作者简介】 蒋欢 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 脑缺血再灌注损伤。E-mail: 1251815317@qq.com

【通信作者】 邵建林 (1972—), 男, 教授, 博士, 教授, 研究方向: 脑缺血再灌注损伤。E-mail: cmushaojl@aliyun.com

种趋势更为明显;而出血性脑卒中患病率及发病率趋于平稳,死亡率有所下降^[2]。2019 年我国 IS 发病人数约为 287 万、患病人数达 2418 万、死亡人数更是高达 103 万^[2],由此可见 IS 给我国的经济和医疗带来严重负担。但截止目前为止临床上大多数 IS 患者仅接受支持性护理治疗,造成这一现象的主要原因是我们目前对 IS 的有效治疗措施极其有限:一是通过组织型纤溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator-PA)溶栓,由于该方法存在治疗时间及安全性问题限制,临床上大约只有 5%~10% 的患者接受该治疗,且接受该方案治疗的患者中只有不到一半的患者有临床症状改善^[3-4];二是通过外科手术进行血栓切除使血管再通,但是这种方法也有治疗时间^[5],加上受医疗机构设备技术条件等的限制导致能接受该方法治疗的患者更少。大多数 IS 患者残留不同程度的功能障碍,即使及时接受了血管再通治疗,随着血管的再通、脑组织灌注恢复,CIRI 也随之而来,这种打击对患者而言很可能是致命的,所以亟需探索一种新的治疗手段来改善这一现状。大量研究已经证实铁死亡参与了 CIRI 过程,因此通过对铁死亡机制以及铁死亡参与 CIRI 机制的研究从而探索新的治疗 IS 的手段是非常有必要的。

1 铁死亡

1.1 铁死亡概念

2003 年 Dolma 等^[6]发现 erastin 可导致 Ras 突变细胞死亡,在此基础上 Dixon 等^[7]于 2012 年首次提出了铁死亡的概念。铁死亡是一种高度铁依赖的细胞程序性死亡方式,并且可以通过铁螯合剂或抑制细胞铁摄取来预防。铁死亡在形态学、生物化学、遗传学、免疫学上不同于其他任何我们已知的细胞死亡方式,形态学特征表现为线粒体变小,膜密度增加,嵴减少或消失,甚至外膜破裂,细胞核大小正常但染色质发生浓缩;生物化学特点表现为细胞内铁离子过度沉积、膜脂质过氧化水平升高^[7-9]。总之铁死亡是一种不同于坏死、凋亡、焦亡、自噬的程序性细胞死亡方式。

1.2 铁死亡相关机制及其调控

铁死亡机制极其复杂,但至少目前大家公认脂质过氧化物(lipid peroxide, LPO)是铁死亡最重要的参与者,其次便是脂质氢过氧化物(lipid hydroperoxide, L-OOH)的作用,而这两者的生成与

细胞内铁、氨基酸代谢、脂肪酸代谢有着密切的关系。

1.2.1 铁代谢

人体内总铁含量约为 3~5 g,循环铁的含量非常少约 2~4 mg,人体大约每天需要获取 1~2 mg 铁^[8,10-11]。食物中的无机铁 Fe^{3+} 首先需要还原为 Fe^{2+} 才能被十二指肠吸收, Fe^{2+} 通过二价金属转运蛋白 1(divalent metal transporter 1, DMT1)吸收后与铁蛋白结合储存在肠细胞中或通过铁转运蛋白(ferroportin1, FPN1)从肠细胞输出进入血液,再通过转铁蛋白(transferrin, TF)运送至全身,但 TF 只能结合 Fe^{3+} ,所以需要具有铁氧化酶活性的物质将 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} ,最后转铁蛋白受体 1(transferrin receptor 1, TFR1)以内吞作用将 Fe^{3+} 运送进入细胞内,在内涵体的酸性环境中 Fe^{3+} 释放并被铁还原酶还原为 Fe^{2+} ,在经过 DMT1 跨膜转运至细胞质,这就是我们所说的可螯合或不稳定铁池^[10-11],也是细胞铁死亡损伤主要的铁来源。 Fe^{2+} 可以与氧发生反应并产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),如羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和过氧化氢(H_2O_2),首先部分氧在水分子介导下形成超氧自由基($\cdot\text{O}_2^-$),随后超氧歧化酶将其转化为 H_2O_2 ;然后 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ($\text{Fe}^{3+} + \cdot\text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$);其次便是通常所说的芬顿反应 $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + (\text{OH})^- + (\cdot\text{OH})$;最后 $\cdot\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow (\cdot\text{OH}) + (\text{OH})^- + \text{O}_2$ 。这些 ROS 是脂质过氧化的罪魁祸首,最终产生 LPO 导致铁死亡^[12]。细胞质中的不稳定铁去向有 3 种:(1)通过与分子伴侣结合转运至特定的靶蛋白;(2)被线粒体铁转运蛋白 1(mitochondria ferritin 1, FtMt1)或 FtMt2 转运至线粒体;(3)以铁蛋白的形式储存起来^[11]。就细胞水平而言,FPN1 是我们迄今为止知道的细胞内铁唯一输出途径,核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2 related factor 2, Nrf2)是一种转录因子,可增加 FPN1 表达,减轻细胞内铁超载^[13],铜蓝蛋白(ceruloplasmin, CP)、膜铁转运辅助蛋白(hephaestin, HP)也能直接促进 FPN1 排出细胞内铁,而淀粉样蛋白前体(amyloid protein precursor, APP)是通过 Tau 蛋白协助将其运输至细胞膜来稳定 FPN1。此外,APP 翻译反过来也受细胞质游离铁水平的影响,APP 可以调控铁调节蛋白与铁蛋白和 TFR mRNA 的结合,当细胞内游离铁水平高时,APP 和铁蛋白的翻译增加,促进铁储存和排出,而调节铁输入的 TFR1 的 RNA 被降解,铁输入减少,

最终使细胞内游离铁水平减少。铁蛋白重链 (ferritin heavy 1, FTH1)、FtMt、CP、HP、APP 均具有铁氧化酶活性,可以减少细胞内不稳定铁蓄积^[3,11,14],铁螯合剂(去铁胺和去铁酮)可以螯合不稳定铁。细胞及机体的各种铁代谢调节因素相互作用,共同维持铁稳态,一旦这种平衡被打破,细胞就有可能发生铁死亡(图 1)。

1.2.2 氨基酸代谢

SystemX_c⁻-GSH-GPX4 轴:胱氨酸/谷氨酸反向转运体 SystemX_c⁻ 由轻链 SLC7A11 和重链 SLC3A2 组成,它可将胞外胱氨酸与胞内谷氨酸进行 1:1 交换,进入胞内的胱氨酸用于谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 的合成^[8,15-16]。GSH 是体内非重要的抗氧化剂,在谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 辅助下氧化为氧化型谷胱甘肽 (glutathiol, GSSG),同时将 L-OOH 还原为脂质醇 (L-OH) 以达到解毒作用,被氧化的 GSSG 随后又通过依赖还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 的 GSH 还原酶还原为 GSH 参与下一轮的反应^[17]。胞外高浓度的谷氨酸会使 SystemX_c⁻ 系统发生转运障碍, GSH 生成受限制,导致铁死亡发生^[7]。肿瘤抑制因子 P53 在 IS 后表达水平迅速上调,可以抑制 SLC7A11 的表达促进铁死亡^[-18-19]。柳氮磺胺吡啶和 erastin 可以抑制 SLC7A11 的胱氨酸转运, RSL3 和 ML162 可以抑制

GPX4, FIN56 则是耗竭 GPX4 和辅酶 Q10 (coenzyme Q10, CoQ10) 诱导铁死亡^[20]。Nrf2 可以调节数百个基因,包括铁死亡及线粒体功能等,增强 Nrf2 表达具有强大的神经保护作用,能够增加 SLC7A11、GPX4 表达从而抑制铁死亡(图 2)^[21]。

1.2.3 脂肪酸代谢

ACSL4-LPCAT3-ALOX 轴: LPO 的形成主要由含多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 的磷脂过氧化引起,最典型的便是花生四烯酸 (arachidonic acid, AA),此外肾上腺酸 (adrenic acid, AdA) 也是铁死亡中脂质过氧化的主要底物,脂酰辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4) 是一种长链脂酰辅酶 A 连接酶,它可以增加磷脂中 PUFAs 的含量,也是 PUFA-PL 生物合成所必需的^[8,20]。哺乳动物脂氧合酶家族由 6 种亚型组成,其中 ALOX12 参与 P53 介导的铁死亡,特异性 ALOX12 抑制剂 ML-355 可以抑制 P53 介导的铁死亡^[19]。

ROS-PUFA · -L-OOH 轴: L-OOH 形成是由于 ROS 可以去除 PUFAs 中的电子形成脂酰自由基 (PUFA ·), PUFA · 随后与氧分子迅速反应生成脂质过氧自由基 (PUFA-OO ·),其可以从芬顿反应产物中获取 H ·,最终形成 L-OOH^[20]。电离辐射能上调 ACSL4 促进铁死亡^[20]; SSAT1 直接调节 ALOX15

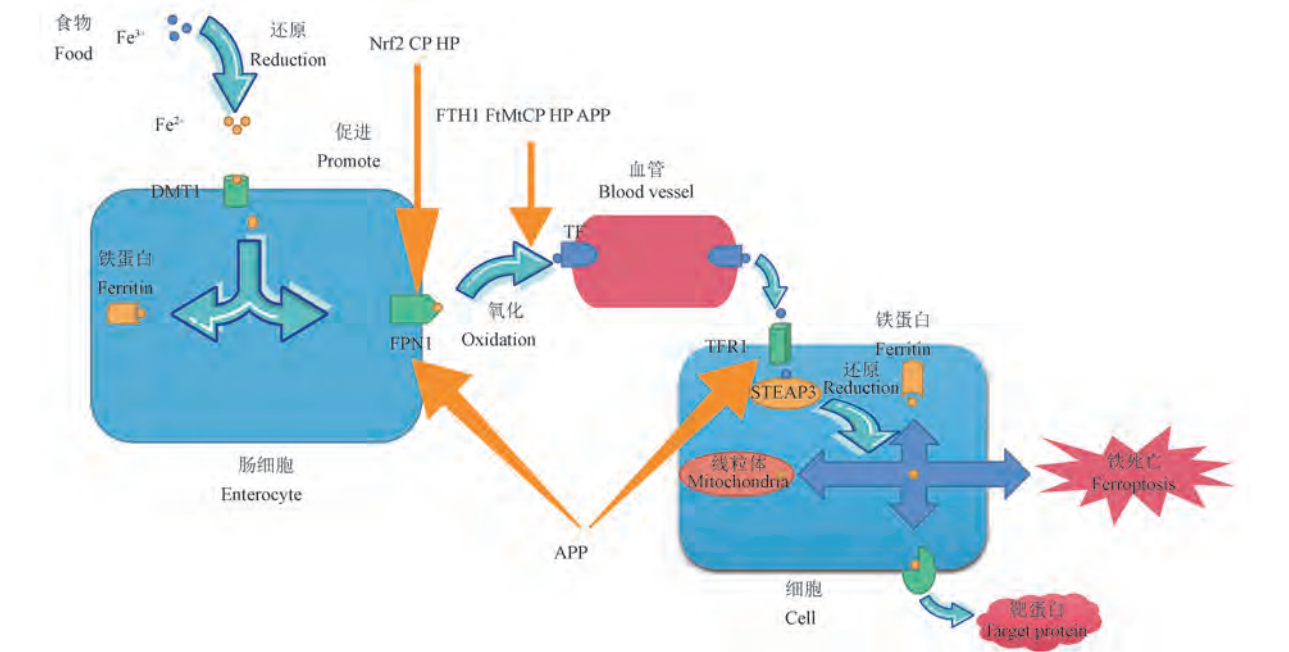


图 1 铁代谢与铁死亡及其调控

Figure 1 Iron metabolism and ferroptosis and their regulation

催化 LPO 形成诱导铁死亡(图 3)^[22]。

1.2.4 其它途径与铁死亡

除上述途径外,细胞色素 P450 氧化还原酶可以与两种辅因子黄素单核苷酸和黄素腺嘌呤二核苷酸结合,直接从 NADPH 获取电子提供给 P450 酶,以不依赖 ALOX 方式促进癌细胞中的 PUFAs 发生过氧化促进铁死亡^[20]。

2 铁死亡与脑缺血再灌注损伤

IS 的发病机制十分复杂,目前尚未完全了解清楚,I/R 损伤和缺血后血流中断导致缺氧缺糖以及随之而来能量代谢障碍、氧化应激、炎症反应、谷氨酸兴奋性毒性等都有关系,凋亡、自噬、坏死、焦亡等均可导致神经元的死亡。铁死亡作为近年来新

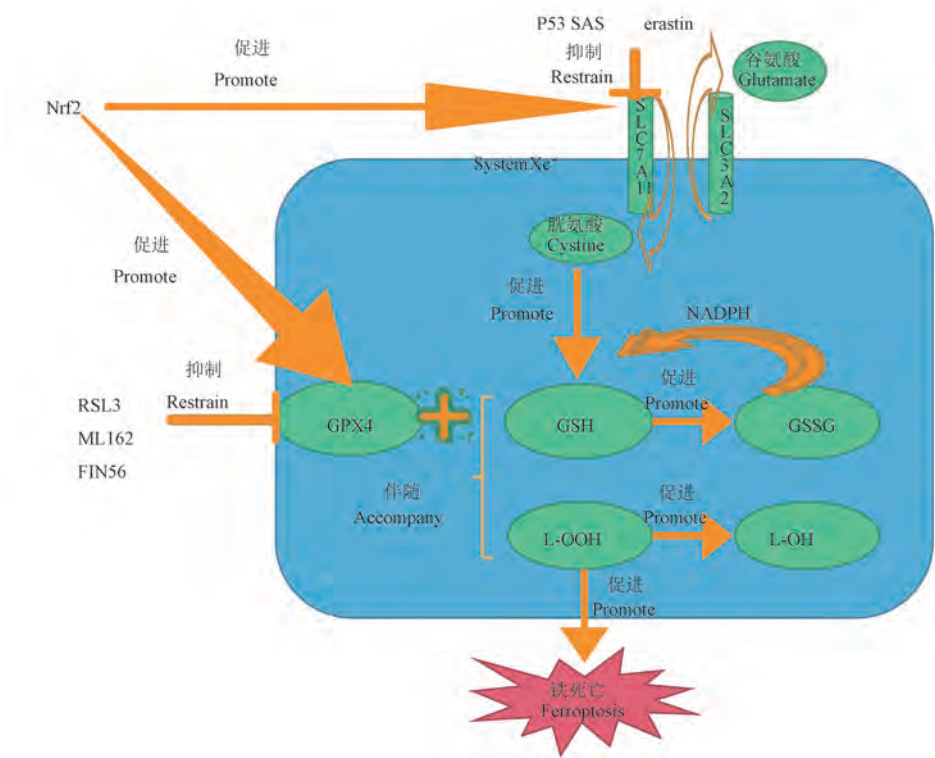


图 2 氨基酸代谢与铁死亡及其调控

Figure 2 Amino acid metabolism and ferroptosis and its regulation

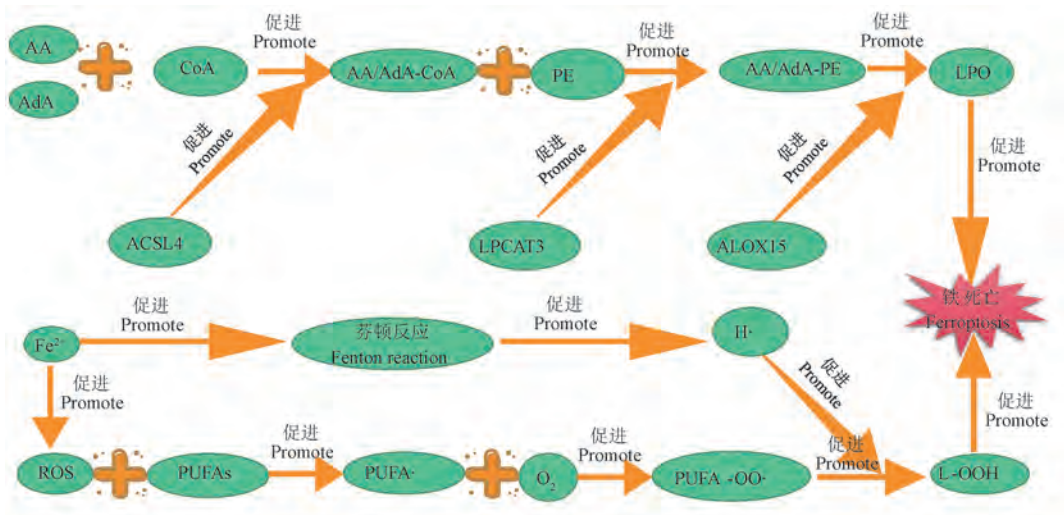


图 3 脂肪酸代谢与铁死亡及其调控

Figure 3 Fatty acid metabolism and ferroptosis and their regulation

发现的一种细胞死亡方式可能是 CIRI 的重要参与者: I/R 导致突触前谷氨酸释放增加, 再摄取减少, 自由基产生增加, 促进铁死亡; LPO 代谢产物丙二醛增加细胞膜通透性, 钠、钙超载, 加重细胞损伤; 在大脑中动脉闭塞/再灌注 (middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R) 动物模型的脑组织和细胞缺氧缺糖复氧 (oxygen glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 模型中均可观察到具有铁死亡特征的细胞^[23-24]; 缺氧可以降低细胞内铁, 增加铁蛋白和 FtMt 表达, 增加铁存储抑制铁死亡发生^[25]; 且更进一步实验提示铁死亡可能发生在再灌注阶段, 这可能与铁死亡依赖氧气有关, 在小鼠 MCAO/R 模型再灌注后立即给与亚毒性剂量 RSL3 和 erastin, 明显加重了小鼠的 CIRI, 而脂质自由基捕获剂 CoQ10、经典铁死亡抑制剂 liproxstatin-1 和铁抑素-1 (Fer-1) 不能挽救由永久性大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 引起的神经元损伤^[24]; 研究表明大脑不仅富含铁也富含不饱和脂肪酸, MCAO/R 模型脑内铁含量增加, 且使用铁螯合剂、Fer-1 可以改善 CIRI^[3,26]。急性 IS 后细胞外谷氨酸浓度显著上升, 这使得 SystemX⁻ 摄取脱氨酸发生障碍, 诱导铁死亡^[7]; 接受了 t-PA 治疗的 IS 患者, 体内铁储备增加与不良结局和严重水肿相关^[27]。这些证据都表明铁死亡参与了 CIRI, 并且极大可能在再灌注阶段发挥作用。

3 潜在治疗手段

IS 的患者根据血液供应可以将缺血脑组织分为缺血核心区 and 缺血半暗带区, 缺血核心区域的脑组织细胞几乎是无法避免地走向死亡, 而缺血半暗带区域的脑组织细胞如果治疗及时是可以挽救的, 因此挽救这部分脑组织是临床上治疗 IS 患者的重中之重。总结分析我们纳入的研究, 通过抑制铁死亡减轻 CIRI 治疗 IS 的潜在方法大致可以分为以下几个方向。

3.1 基因调控

许多基因直接或间接调控 Nrf2 和 P53 进而参与铁死亡。Nrf2 增加 FPN1 表达, 提高 SLC7A11 和 GPX4 的表达抑制铁死亡; 而 P53 减少 SLC7A11 表达, 导致 GSH 合成障碍诱导铁死亡。核糖核酸结合蛋白 (RBP) 调节转录后 mRNA 稳定性和翻译以控制蛋白质表达水平, PUM2 是 RBP 的一种, 可以降低长寿因子 1 (Sirt1) 稳定性, 而 Sirt1 增加音猬因子

(shh) 表达, 抑制 PUM2 和过表达 Sirt1 或 shh, 显著增高 Nrf2 和血红素加氧酶 1 (HO-1) 表达, 降低 ACSL4 表达抑制铁死亡改善 CIRI; 能增高 Nrf2 和 HO-1 表达的还有过表达 Cisd2 和抑制 CBX7, 它们也能降低 TFR1 表达, 此外抑制 CBX7 还能够降低 ACSL4, 增加 NADPH 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 抑制氧化应激来对抗铁死亡^[23,28-30]。微小 RNA (miRNA) 介导转录后水平的基因表达, miR-27a 能降低 Nrf2 表达, 还直接与 SLC7A11 结合降低其 mRNA 表达, 因此抑制 miR-27a 能够抑制铁死亡改善 CIRI^[31]; 抑制 PVT1、Meg3 或 miR-214 和过表达铁蛋白都能抑制 P53 表达减轻铁死亡^[32-34], 过表达铁蛋白还减少 Tau 过度磷酸化和将 Fe²⁺ 氧化, 而铁蛋白吞噬诱导铁死亡。体内体外实验表明, NCOA4 缺失显著消除了 I/R 引起的铁蛋白吞噬, 抑制 USP14 有效降低 NCOA4 水平抑制铁死亡^[34-35]。ELAVL1 能抑制 PINK1 表达, 而 PINK1 可以增加 SLC7A11 和 GPX4 表达, 所以过表达 PINK1 或者沉默 ELAVL1 可以减轻铁死亡, 抑制 SSAT1 也可以增加 GPX4 和 SLC7A11, 还减少 ALOX15 改善 CIRI^[36-37]。过表达 FtMt 不仅可以抑制缺血后脑组织铁死亡从而改善 CIRI, 还抑制缺血后脑微血管内皮细胞铁死亡从而保护血脑屏障^[38]。FtMt 可以将 Fe²⁺ 氧化并储存, 抑制 STAT3 磷酸化来降低铁调素, 从而增加 FPN1 的表达和铁输出活性; 也抑制 ACSL4 和 12/15-LOX 活性减少脂质过氧化物的产生; 还通过增加 GPX4、GSH 水平来提高抗氧化能力^[3]。抑制 Steap4 降低 DMT1 表达, 增加 GPX4、SLC7A11、FPN1 表达减轻 CIRI 造成的神经元铁死亡^[39]。另外, 下调 POU2F2 可能通过降低 Sesn2 表达加速氧化应激和铁死亡加剧 CIRI, 因此过表达 POU2F2 或者 Sesn2 可能可以改善 CIRI^[40]。

3.2 药物制剂

铁螯合剂去铁胺螯合铁离子, 减少铁蓄积, 特异性铁死亡抑制剂 Fer-1 可以预防谷氨酸诱导的神经毒性, 激活 AKT/GSK3 β 通路增加 GPX4、SLC7A11 表达, 具有保护 CIRI 的作用^[7,41]。铁死亡抑制蛋白 1, 介导还原形式 CoQ10 捕获使脂质过氧化的脂质过氧化氢自由基防止 GPX4 缺失引起的铁死亡, 还利用 NADPH 催化 CoQ10 的再生^[42]。硒可以掺入 GPX4 的催化位点, 增加其表达及活性, 硒化合物对 erastin 和 RSL3 诱导的体外铁死亡有效, 甲基硒代半胱氨酸或硒代胱氨酸进行预处理可防止体

内 CIRI 神经元损伤^[43-44]。右美托咪定、激活素 A、 γ -GC 通过上调 Nrf2 减轻 CIRI, 激活素 A 还可以降低 ACSL4, γ -GC 也作为原料参与 GSH 合成^[16,45-46]。腺苷酸活化蛋白激酶 AMPK 激动剂可以增加 SLC7A11 和 GPX4 表达^[47]。普拉洛芬抑制环氧合酶导致 PGE2 合成减少, 加重 CIRI, 侧脑室注射 PGE2 则可以缓解 CIRI^[22]。急性脑 I/R 后脑内凝血酶上调, 凝血酶诱导脑内 ACSL4 依赖的铁死亡, 研究发现达比加群作为凝血酶抑制剂可以改善脑缺血预后, 且这是我们目前了解到的唯一一个通过抑制铁死亡改善 IS 预后的已经进入三期临床试验的药物^[24]。许多传统中药也表现出抑制铁死亡改善 CIRI 的作用: β -石竹烯、牡荆素、黄芪根茎、大株红景天注射液激活 Nrf2/HO-1 通路, 白藜芦醇和依达拉奉也通过促进 Sirt1 表达激活 Nrf2, 此外, 大株红景天注射液还有下调 TF、COX2 的能力^[13,23,26,48-50]; 三七总皂苷制剂如血栓通和血塞通广泛用于心脑血管疾病预防与治疗, 不仅具有抗炎作用, 也增加 I/R 后 GSH、GPX4 的表达水平^[51]; 辛乃静注射液临床上用于治疗中风, 能上调 GPX4、FPN、HO-1 表达、下调 COX-2、TFR 和 DMT1 表达^[52]; 脑泰方对急性 IS 患者的神经系统改善有益, 动物实验表明脑泰方处理的 MCAO 大鼠降低了 TFR1 和 DMT1 的表达水平, 增加了 SLC7A11 和 GPX4 表达水平^[53]; 黄芩素是一种从传统中药黄芩的根中分离出的生物活性成分, 上调 PINK1、FTH1、FtMt 和 ACSL3, 降低 ACSL4, 还能使 NADPH/NADP⁺ 比值和总 GSH 水平显著升高^[54]; 红花黄据报道可以减轻心脏缺血和再灌注损伤, 提前两周胃内给予红花黄治疗后行 MCAO/R 手术, 皮层中 ACSL4 和 TFR1 的蛋白表达水平显著降低, 且增加了 FTH1 和 GPX4 表达水平^[55]; 角鲨烯可以下调 TFR1、ACSL4, 上调 FPN1、SLC7A11 和 GPX4 表达^[56]; 二氢杨梅素则是增加 GPX4 含量, 降低 ACSL4 表达^[57]; 高良姜增强 SLC7A11 和 GPX4 表达^[58]; 丹参酮 II A 通过调节铁稳态对 CIRI 模型中的铁死亡具有抑制作用^[59]; 香芹酚也因能增加 GPX4 表达抑制铁死亡在 CIRI 中具有显著的保护作用^[60]。

3.3 物理方法

针灸在我国有着悠久历史, 已有临床数据证实针刺可以激活脑内相关区域、调节相关分子机制和增加脑内血流量从而改善 IS 患者的康复^[61], 实验

室研究也提示无论是缺血前还是缺血后电针处理可以减少 IS 后梗死体积以及改善神经功能评分, 这可能与增加 GPX4、GSH、FPN1 有关^[62-63]。还有研究发现缺血后进行跑步机训练能上调 Nrf2 表达, 改善 MCAO 动物模型的预后^[64]。

4 讨论

研究发现许多基因、细胞因子、酶等都参与了铁死亡的调控, 也有很多药物甚至是跑步训练都表现出抑制铁死亡改善 CIRI 的作用, 包括减少脑梗死体积、线粒体损伤、减轻脑水肿程度、改善运动能力、提高学习认知记忆等大脑高级功能。尽管大量研究证实了抑制铁死亡对 CIRI 的动物和 OGD/R 的细胞有益, 但这些研究除了达比加群都仅限于动物或细胞水平; 再者, 就目前而言无论是从技术还是伦理层面来讲基因调控应用于人体是不太现实的, 但我们也能从中获得许多启发, 比如依达拉奉、脑泰方、红景天注射液等中成药用于治疗心脑血管疾病由来已久, 可以改善心脑血管意外患者预后, 上述相关文献表明这些中成药在动物和细胞水平抑制铁死亡改善 CIRI, 那么进一步探索这些药物中对铁死亡有作用的有效成分以便更加科学地应用这些药物有望为治疗 CIRI 患者带来福音。此外, 基因调控虽然不能在人体应用, 但是我们可以干预其调控的靶目标或者利用药物达到相同的效果, 比如过表达 Cisd2 和抑制 CBX7 可以提高 Nrf2 表达进而提高 SLC7A11 和 GPX4 表达抑制铁死亡改善 CIRI, 给予白藜芦醇和依达拉奉治疗以及跑步机训练同样可以达到提高 Nrf2 表达的效果, 改善 MCAO/R 动物模型的预后, 而这些措施是可以在临床实现的。虽然铁死亡和 CIRI 机制极其复杂, 但这也给我提供了更多的干预靶点, 有望为治疗 IS 带来新的希望, 正所谓道阻且长, 行则将至。

参考文献:

- [1] WHO. The top 10 cause of death [EB/OL]. [2023-04-10] <https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- [2] Global Burden of Disease. Network explore results from the 2019 Global Burden of Disease (GBD) study [EB/OL]. [2023-04-10] <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>.
- [3] WANG P, CUI Y, REN Q, et al. Mitochondrial ferritin attenuates cerebral ischaemia/reperfusion injury by inhibiting ferroptosis [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(5): 447.
- [4] IADECOLA C, ANRATHER J. Stroke research at a crossroad;

- asking the brain for directions [J]. *Nat Neurosci*, 2011, 14 (11): 1363–1368.
- [5] BU Z Q, YU H Y, WANG J, et al. Emerging role of ferroptosis in the pathogenesis of ischemic stroke: a new therapeutic target? [J]. *ASN Neuro*, 2021, 13: 17590914211037505.
- [6] DOLMA S, LESSNICK S L, HAHN W C, et al. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells [J]. *Cancer Cell*, 2003, 3(3): 285–296.
- [7] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060–1072.
- [8] TANG D, CHEN X, KANG R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications [J]. *Cell Res*, 2021, 31 (2): 107–125.
- [9] 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.
- [10] SOM D, BABITT JODIE L. Overview of iron metabolism in health and disease [J]. *Hemodial Int Int Symp Home Hemodial*, 2017, 21 Suppl 1: S6–S20.
- [11] TUO Q Z, LEI P, JACKMAN K A, et al. Tau-mediated iron export prevents ferroptotic damage after ischemic stroke [J]. *Mol Psychiatry*, 2017, 22(11): 1520–1530.
- [12] SCINDIA PHD Y, LEEDS MD J, SWAMINATHAN MD S. Iron homeostasis in healthy kidney and its role in acute kidney injury [J]. *Semin Nephrol*, 2019, 39(1): 76–84.
- [13] LIU W, WANG L, LIU C, et al. Edaravone ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by downregulating ferroptosis via the Nrf2/FPN pathway in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2022, 45(9): 1269–1275.
- [14] DUCE J A, TSATSANIS A, CATER M A, et al. Iron-export ferroxidase activity of β -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease [J]. *Cell*, 2010, 142(6): 857–867.
- [15] BRIDGES R J, NATALE N R, PATEL S A. System x_c^- cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS [J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 165(1): 20–34.
- [16] ZHANG R, LEI J, CHEN L, et al. γ -glutamylcysteine exerts neuroprotection effects against cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibiting lipid peroxidation and ferroptosis [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(9): 1653.
- [17] CONRAD M, SATO H. The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x_c^- : cystine supplier and beyond [J]. *Amino Acids*, 2012, 42(1): 231–246.
- [18] JIANG L, KON N, LI T, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression [J]. *Nature*, 2015, 520 (7545): 57–62.
- [19] CHU B, KON N, CHEN D, et al. ALOX12 is required for p53-mediated tumour suppression through a distinct ferroptosis pathway [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(5): 579–591.
- [20] LEI G, ZHANG Y, KOPPULA P, et al. The role of ferroptosis in ionizing radiation-induced cell death and tumor suppression [J]. *Cell Res*, 2020, 30(2): 146–162.
- [21] ABDALKADER M, LAMPINEN R, KANNINEN K M, et al. Targeting Nrf2 to suppress ferroptosis and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 466.
- [22] XU Y, LIU Y, LI K, et al. COX-2/PGE2 pathway inhibits the ferroptosis induced by cerebral ischemia reperfusion [J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(3): 1619–1631.
- [23] ZHU H, HUANG J, CHEN Y, et al. Resveratrol pretreatment protects neurons from oxygen-glucose deprivation/reoxygenation and ischemic injury through inhibiting ferroptosis [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2022, 86(6): 704–716.
- [24] TUO Q Z, LIU Y, XIANG Z, et al. Thrombin induces ACSL4-dependent ferroptosis during cerebral ischemia/reperfusion [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 59.
- [25] FUHRMANN D C, MONDORF A, BEIFUß J, et al. Hypoxia inhibits ferritinophagy, increases mitochondrial ferritin, and protects from ferroptosis [J]. *Redox Biol*, 2020, 36: 101670.
- [26] HU Q, ZUO T, DENG L, et al. β -Caryophyllene suppresses ferroptosis induced by cerebral ischemia reperfusion via activation of the NRF2/HO-1 signaling pathway in MCAO/R rats [J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154112.
- [27] MILLAN M, SOBRINO T, CASTELLANOS M, et al. Increased body iron stores are associated with poor outcome after thrombolytic treatment in acute stroke [J]. *Stroke*, 2007, 38 (1): 90–95.
- [28] 胡森. 基于 Nrf2/HO-1 介导的铁死亡探讨上调 Cisd2 抗小鼠脑缺血再灌注损伤的作用及机制 [D]. 安徽: 蚌埠医学院, 2022.
HU M. Exploring the role and mechanism of up-regulation of Cisd2 against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice based on Nrf2/HO-1-mediated iron death [D]. Anhui: Bengbu Medical University, 2022.
- [29] ZHANG F, LEI F, XIAO X. Knockdown of CBX7 inhibits ferroptosis in rats with cerebral ischemia and improves cognitive dysfunction by activating the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *J Biosci*, 2022, 47: 40.
- [30] LIU Q, LIU Y, LI Y, et al. PUM2 aggravates the neuroinflammation and brain damage induced by ischemia-reperfusion through the SLC7A11-dependent inhibition of ferroptosis via suppressing the SIRT1 [J]. *Mol Cell Biochem*, 2023, 478(3): 609–620.
- [31] 冯子人, 孙辉, 张婧, 等. miR-27a 通过抑制溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) 诱导铁死亡引起大鼠脑缺血再灌注损伤 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2022, 38(7): 617–624.
FENG Z, SUN H, ZHANG J, et al. MiR-27a induces ferroptosis by inhibiting solute carrier family 7 member-11 (SLC7A11) and

- causes cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2022, 38(7): 617–624.
- [32] CHEN C, HUANG Y, XIA P, et al. Long noncoding RNA Meg3 mediates ferroptosis induced by oxygen and glucose deprivation combined with hyperglycemia in rat brain microvascular endothelial cells, through modulating the p53/GPX4 axis [J]. Eur J Histochem, 2021, 65(3): 3224.
- [33] LU J, XU F, LU H. LncRNA PVT1 regulates ferroptosis through miR-214-mediated TFR1 and p53 [J]. Life Sci, 2020, 260: 118305.
- [34] CHEN W, JIANG L, HU Y, et al. Ferritin reduction is essential for cerebral ischemia-induced hippocampal neuronal death through p53/SLC7A11-mediated ferroptosis [J]. Brain Res, 2021, 1752: 147216.
- [35] LI C, SUN G, CHEN B, et al. Nuclear receptor coactivator 4-mediated ferritinophagy contributes to cerebral ischemia-induced ferroptosis in ischemic stroke [J]. Pharmacol Res, 2021, 174: 105933.
- [36] ZHAO J, WU Y, LIANG S, et al. Activation of SSAT1/ALOX15 axis aggravates cerebral ischemia/reperfusion injury via triggering neuronal ferroptosis [J]. Neuroscience, 2022, 485: 78–90.
- [37] DU Y, ZHANG R, ZHANG G, et al. Downregulation of ELAVL1 attenuates ferroptosis-induced neuronal impairment in rats with cerebral ischemia/reperfusion via reducing DNMT3B-dependent PINK1 methylation [J]. Metab Brain Dis, 2022, 37(8): 2763–2775.
- [38] WANG P, REN Q, SHI M, et al. Overexpression of mitochondrial ferritin enhances blood-brain barrier integrity following ischemic stroke in mice by maintaining iron homeostasis in endothelial cells [J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(7): 1257.
- [39] 卜忠奇. Steap4 促进脑缺血再灌注损伤中神经元铁死亡的机制研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2021.
- BU Z Q. Steap4 promotes neuronal ferroptosis in cerebral ischemiareperfusion injury via activating p38/JNK signaling pathway [D]. Shenyang: China Medical University, 2021.
- [40] YANG J, GUO Q, WANG L, et al. POU domain class 2 transcription factor 2 inhibits ferroptosis in cerebral ischemia reperfusion injury by activating Sestrin2 [J]. Neurochem Res, 2023, 48(2): 658–670.
- [41] LIU X, DU Y, LIU J, et al. Ferrostatin-1 alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury through activation of the AKT/GSK3 β signaling pathway [J]. Brain Res Bull, 2023, 193: 146–157.
- [42] DOLL S, FREITAS F P, SHAH R, et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor [J]. Nature, 2019, 575(7784): 693–698.
- [43] TUO Q Z, MASALDAN S, SOUTHON A, et al. Characterization of selenium compounds for anti-ferroptotic activity in neuronal cells and after cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Neurotherapeutics, 2021, 18(4): 2682–2691.
- [44] SHI Y, HAN L, ZHANG X, et al. Selenium alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by regulating oxidative stress, mitochondrial fusion and ferroptosis [J]. Neurochem Res, 2022, 47(10): 2992–3002.
- [45] 王凤志. Activin A 抑制铁死亡对脑缺血/再灌注损伤的神经保护作用及机制研究 [D]. 吉林: 吉林大学, 2022.
- WANG F Z. Neuroprotective effect of Activin A on cerebral ischemia/reperfusion injury and its mechanism [D]. Jilin: Jilin University, 2022.
- [46] 胡森, 门运政, 陈蕾, 等. 右美托咪定通过抑制铁死亡发挥对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中南大学学报(医学版), 2022, 47(5): 600–609.
- HU M, MEN Y Z, CHEN L, et al. Dexmedetomidine exerts its protective effect on cerebral ischemia reperfusion injury in mice by inhibiting ferroptosis [J]. J Cent South Univ Med Sci, 2022, 47(5): 600–609.
- [47] 胡森, 童旭辉, 黄杰, 等. 基于铁死亡探讨 AMPK 抗小鼠脑缺血/再灌注损伤的作用及机制 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2021, 50(4): 418–423.
- HU M, TONG X H, HUANG J, et al. Protective effects and mechanisms of AMPK activation against CerebralIschemia/reperfusion injury in mice based on ferroptosis [J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong, 2021, 50(4): 418–423.
- [48] GUO L, SHI L. Vitexin improves cerebral ischemia-reperfusion injury by attenuating oxidative injury and ferroptosis via Keap1/Nrf2/HO-1 signaling [J]. Neurochem Res, 2023, 48(3): 980–995.
- [49] CHEN J, MA D, BAO J, et al. Roots of *Astragalus propinquus* schischkin regulate transmembrane iron transport and ferroptosis to improve cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 7410865.
- [50] 黄肖玲. 基于 Nrf2/HO-1 通路探讨大株红景天注射液抑制铁死亡改善小鼠 HT22 海马神经元缺氧复氧损伤 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- HUANG X L. Sofren injection protects against ferroptosis in HT22 cells after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation based on Nrf2/HO-1 signaling pathway [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2021.
- [51] KANG Z, XIAO Q, WANG L, et al. The combination of astragaloside IV and *Panax notoginseng* saponins attenuates cerebral ischaemia-reperfusion injury in rats through ferroptosis and inflammation inhibition via activating Nrf2 [J]. J Pharm Pharmacol, 2023, 75(5): 666–676.
- [52] LIU H, AN N, WANG L, et al. Protective effect of Xingnaojing injection on ferroptosis after cerebral ischemia injury in MCAO rats and SH-SY5Y cells [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 301: 115836.
- [53] LAN B, GE J W, CHENG S W, et al. Extract of Naotiaifang, a compound Chinese herbal medicine, protects neuron ferroptosis induced by acute cerebral ischemia in rats [J]. J Integr Med, 2020, 18(4): 344–350.
- [54] LI M, MENG Z, YU S, et al. Baicalein ameliorates cerebral

- ischemia-reperfusion injury by inhibiting ferroptosis via regulating GPX4/ACSL4/ACSL3 axis [J]. Chem Biol Interact, 2022, 366: 110137.
- [55] GUO H, ZHU L, TANG P, et al. Carthamin yellow improves cerebral ischemia-reperfusion injury by attenuating inflammation and ferroptosis in rats [J]. Int J Mol Med, 2021, 47(4): 52.
- [56] 蒋霞, 袁钰萍, 陈舒怀, 等. 角鲨烯通过调节细胞铁死亡减轻脑缺血再灌注损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(10): 1784-1793.
- JIANG X, YUAN Y P, CHEN S H, et al. Squalene attenuates cerebral ischemia-reperfusion induced brain tissue injury by regulating ferroptosis [J]. Chin J Pathophysiol, 2021, 37(10): 1784-1793.
- [57] XIE J, ZHANG T, LI P, et al. Dihydromyricetin attenuates cerebral ischemia reperfusion injury by inhibiting SPHK1/mTOR signaling and targeting ferroptosis [J]. Drug Des Devel Ther, 2022, 16: 3071-3085.
- [58] GUAN X, LI Z, ZHU S, et al. Galangin attenuated cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibition of ferroptosis through activating the SLC7A11/GPX4 axis in gerbils [J]. Life Sci, 2021, 264: 118660.
- [59] 许璐. 丹参酮 II A 通过调节铁稳态抑制脑缺血模型中铁死亡的机制研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2019.
- XU L. Research on the mechanism of tanshinone II A inhibiting ferroptosis by regulating iron homeostasis in the model of cerebral ischemia [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2019.
- [60] GUAN X, LI X, YANG X, et al. The neuroprotective effects of carvacrol on ischemia/reperfusion-induced hippocampal neuronal impairment by ferroptosis mitigation [J]. Life Sci, 2019, 235: 116795.
- [61] ZHU W, YE Y, LIU Y, et al. Mechanisms of acupuncture therapy for cerebral ischemia: an evidence-based review of clinical and animal studies on cerebral ischemia [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2017, 12(4): 575-592.
- [62] LIANG R, TANG Q, SONG W, et al. Electroacupuncture preconditioning reduces oxidative stress in the acute phase of cerebral ischemia-reperfusion in rats by regulating iron metabolism pathways [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 3056963.
- [63] 汪红娟, 唐红, 江姗姗, 等. 针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠海马组织铁死亡的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(10): 1683-1687.
- WANG H J, TANG H, JIANG S S, et al. Effects of acupuncture on ferroptosis of hippocampal tissues in rats with cerebral ischemia reperfusion injury [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2022, 42(10): 1683-1687.
- [64] LIU T, CUI Y, DONG S, et al. Treadmill training reduces cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting ferroptosis through activation of SLC7A11/GPX4 [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 8693664.

[收稿日期]2023-05-11

吴志航,唐明政,李晓凤,等. CAV1 在消化道肿瘤中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 110-120.

Wu ZH, Tang MZ, Li XF, et al. Advances in the study of CAV1 in digestive tract tumors [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 110-120.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.013

CAV1 在消化道肿瘤中的研究进展

吴志航,唐明政,李晓凤,荣耀,崔岩,潘海邦*

(甘肃中医药大学第一临床医学院,甘肃省中药新产品创制工程实验室,甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室,兰州 730000)

【摘要】 消化道肿瘤是目前全球最常见的癌症之一,包括食管癌、胃癌、肝癌、胰腺癌和结直肠癌等,其预后不佳,治疗方法仍需进一步改进。小窝蛋白-1(caveolin-1,CAV1)在消化道肿瘤中具有双重调节作用,既是肿瘤抑制因子又是致癌因子。CAV1 对消化道肿瘤的细胞增殖、侵袭、转移、血管生成和药物耐受性等方面具有重要作用,调节 CAV1 蛋白及其相关信号通路可能成为治疗消化道肿瘤的策略之一。因此,本综述就 CAV1 的结构、功能、表达调控以及调节消化道肿瘤上皮-间充质转换(epithelial-mesenchymal transition,EMT)及其耐药性等方面分析 CAV1 与消化道肿瘤的关系,以期为临床消化道肿瘤的诊疗提供新的思路。

【关键词】 CAV1;消化道肿瘤;EMT;耐药

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0110-11

Advances in the study of CAV1 in digestive tract tumors

WU Zhihang, TANG Mingzheng, LI Xiaofeng, RONG Yao, CUI Yan, PAN Haibang*

(the First College of Clinical Medicine, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Gansu Provincial Engineering Laboratory for the Creation of New Traditional Chinese Medicine Products, Gansu Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Formulas Excavation and Innovative Transformation, Lanzhou 730000, China)

【Abstract】 Digestive tract tumors are currently one of the most common types of cancer, including esophageal cancer, gastric cancer, hepatocellular carcinoma, pancreatic cancer, and colorectal cancer. Their prognoses are poor and the treatments require further improvement. Caveolin-1 (CAV1) has a dual regulatory effect on digestive tract tumors as a tumor suppressor and cancer promoter. CAV1 plays a major role in cell proliferation, invasion, metastasis, angiogenesis, and drug tolerance of digestive tract tumors. The regulation of CAV1 protein and its related signaling pathways may be a strategy for the treatment of digestive tract tumors. This review analyzes the relationship between CAV1 and digestive tract tumors in terms of structure, function, expression regulation, regulation of epithelial-mesenchymal transition, and drug resistance in digestive tract tumors to provide new ideas for the diagnosis and treatment of digestive tract tumors.

【Keywords】 CAV1; digestive tract tumor; EMT; drug resistance

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

消化道恶性肿瘤的发病率在世界范围内位居各种恶性肿瘤前列,并且相对病死率近年来有所增

加^[1-2]。尽管目前的治疗方法(包括手术、放疗和免疫治疗)正在不断改善,但由于消化道肿瘤症状隐

【基金项目】 国家自然科学基金(81860850);甘肃省高等学校创新基金(2023A-076)。

【作者简介】 吴志航(1996—),男,硕士,研究方向:临床消化道肿瘤和外科感染研究。E-mail:466218270@qq.com

【通信作者】 潘海邦(1975—),男,副主任医师,副教授,硕士生导师,研究方向:临床消化道肿瘤和外科感染研究。

E-mail:phbwbb@126.com

秘、侵袭性强、发展迅速,因此消化道恶性肿瘤患者的平均生存率仍然较低^[3]。

小窝蛋白-1(caveolin-1, CAV1)长期以来一直与肿瘤进展相关,被广泛认为是肿瘤相关蛋白,可以参与肿瘤细胞黏附、侵袭、迁移、上皮-间充质转换等多种肿瘤形成过程^[4-5]。研究发现 CAV1 作用肿瘤细胞具有分期依赖性,CAV1 在早期下调并执行肿瘤抑制功能,然而在发展晚期 CAV1 促进肿瘤细胞生长和迁移导致肿瘤恶化^[6]。目前为止,CAV1 在消化道肿瘤中的作用尚未得到清晰的认识,为了明确 CAV1 与消化道肿瘤之间的相互作用,本文涵盖了 CAV1 和消化道肿瘤的最新研究成果,描述 CAV1 干预肿瘤细胞增殖、侵袭、迁移等作用,从而影响消化道肿瘤进展;此外,通过探讨 CAV1 在临床治疗中与耐药性的关系,为 CAV1 和消化道肿瘤的进一步研究提供方向和思路,促进 CAV1 的临床应用。

1 CAV1 的介绍

1.1 CAV1 的结构

小窝蛋白最初被发现为内皮细胞和上皮细胞中质膜的烧瓶状内陷结构,呈 50~100 nm Ω 形(见图 1),具有膜运输、脂质代谢和细胞信号转导等作用,与各种疾病的发生发展相关^[4,7]。研究表明,小窝蛋白主要成分小窝蛋白家族(CAVs)含有 3 种亚型 CAV1、CAV2 和 CAV3^[8]。CAV1 和 CAV2 在除骨

骼肌以外的所有组织中均表达,而 CAV3 主要在横纹肌中表达;有趣的是,在一些特定的细胞或组织中(如心肌和平滑肌)可以同时表达 CAV1、CAV2 和 CAV3 这 3 种 CAVs^[6]。小窝蛋白的主要成员——CAV1,是一种微小的寡聚支架蛋白,其基因位于人类染色体 7q31.1 上,含有 15 个外显子^[4]。CAV1 以两种亚型 α 和 β 存在,每种亚型都具有能够二聚化的发夹构象,CAV1 α 含有 24 kDa 残基,而 CAV1 β 含有 21 kDa 残基。研究表明,这两种单体由不同的 mRNA 编码^[9]。CAV1 蛋白序列由 4 个不同结构域组成:N 末端结构域、支架蛋白结构域、膜内结构域和 C 末端结构域^[10-12]。CAV1 的 C 末端和 N 末端都暴露于细胞质中,C 末端结构域包含 3 个棕榈酰化位点,棕榈酰化位点和膜内结构域以 U 形构象的形式嵌入到细胞脂质双分子层中^[11,13-14]。而其 N 末端结构域包含两个磷酸化位点:酪氨酸位点和丝氨酸位点。酪氨酸位点 Y14 可以被酪氨酸蛋白激酶磷酸化调节信号蛋白,丝氨酸位点 S80 磷酸化的 CAV1 可以靶向内质网参与 CAV1 的合成分泌^[12,15](见图 1)。

1.2 CAV1 的功能

CAV1 能够与多种蛋白质结合,控制胆固醇稳态,调节多种细胞功能,如内吞作用、胆固醇积累以及细胞的信号传导、增殖和死亡。CAV1 不仅是肿瘤抑制因子,也是致癌因子^[4]。这种双重调节作用具有分期依赖性,一方面,CAV1 能够延缓癌前病变

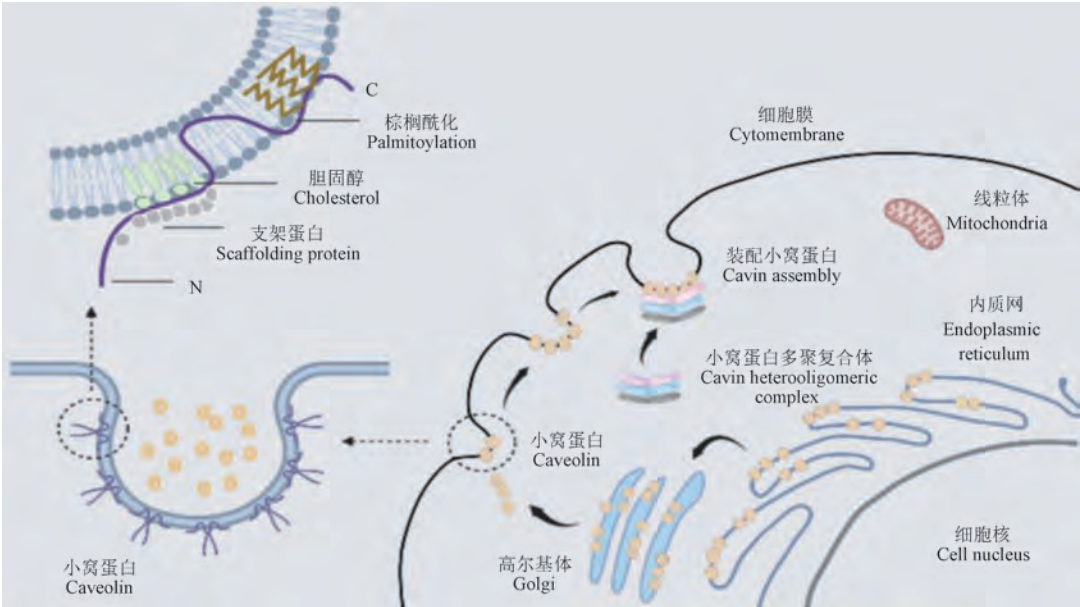


图 1 小窝蛋白合成机制图

Figure 1 Diagram of the mechanism of caveolin synthesis

向癌症转化^[16]。另一方面,在癌症晚期观察到 CAV1 过表达与癌症进展、多重耐药性和转移有关^[17]。CAV1 的双重调节性在一定程度上与 CAV1 在细胞内定位及信号传导相关^[18]。CAV1 已经被证实多种消化道肿瘤中存在差异性表达,在食管癌、胃癌、肝癌、胰腺癌中 CAV1 呈现出高表达。然而,在结直肠癌中 CAV1 呈现表达下调^[19-23](见表 1,图 2)。

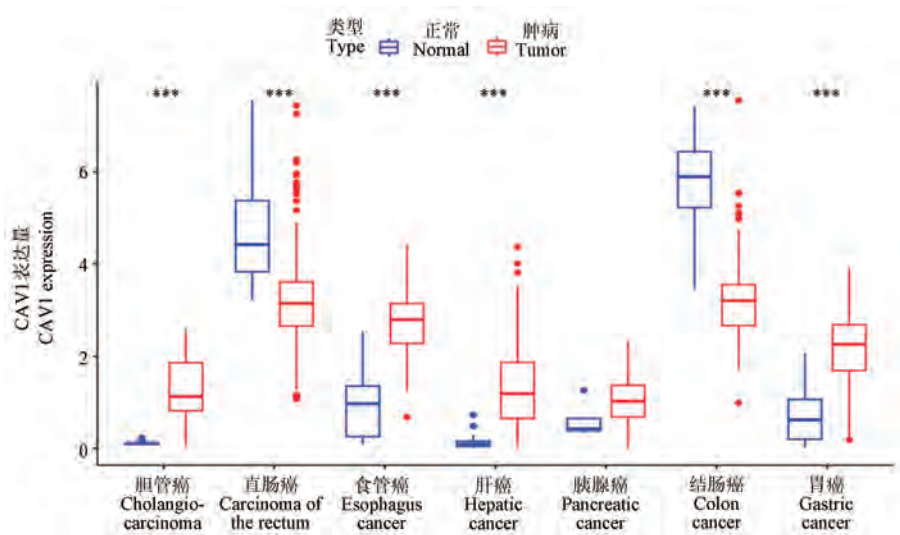
1.3 CAV1 的表达调控

CAV1 的表达受 3 种方式调控:基因组表观遗

传修饰、转录和转录后调控机制。CAV1 的基因组表观遗传修饰可分为 DNA 甲基化修饰和组蛋白修饰(如磷酸化、乙酰化和泛素化等)^[54]。雌激素受体的异位表达能够引起神经细胞中 CAV1 的 DNA 甲基化或组蛋白去乙酰化,从而调节其 mRNA 表达^[55]。Sanders 等^[56]发现应用转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 处理正常成纤维细胞后,CAV1 mRNA 表达受到组蛋白修饰作用而下调,这可能与特发性肺纤维化有关。此外, Yan 等^[54]研究 CAV1 DNA 甲基化在慢性肺病中的

表 1 CAV1 在恶性肿瘤中的表达情况
Table 1 Expression of CAV1 in malignant tumors

肿瘤 Tumour	意义 Significance	调控通路 Regulatory pathway
食管癌 ^[19] Esophagus cancer	促肿瘤 Promote tumor	线粒体凋亡途径 Mitochondria apoptosis pathway
胃癌 ^[21, 24-25] Gastric cancer	促肿瘤 Promote tumor	EGFR/ITGB1; c-Src/CAV1; Wnt/ β -catenin Wnt/ β -catenin; Notch; PI3K/AKT/mTOR; CAV1/SREBP1/ACADM; 整合素 α /CAV1; Integrin α /CAV1; Erk/Jnk/p38
肝癌 ^[26-32] Hepatic cancer	促肿瘤 Promote tumor	CAV1-ROS; shh/MMP2/bFGF/IL-6
胰腺癌 ^[22, 33] Pancreatic cancer	抗肿瘤 Anti tumor	CAV1/STAT; CAV1/MMP1
结直肠癌 ^[34-35] Colorectal cancer	抗肿瘤 Anti tumor	
膀胱癌 ^[36] Bladder cancer	促肿瘤 Promote tumor	不详 Unknown
肺癌 ^[37] Lung cancer	促肿瘤 Promote tumor	CAV1/AKT/Bad
宫颈癌 ^[38] Cervical cancer	促肿瘤 Promote tumor	AKT/mTOR
骨癌 ^[39] Osteocarcinoma	抗肿瘤 Anti tumor	不详 Unknown
胶质瘤 ^[5, 40-41] Glioma	促肿瘤 Promote tumor	Wnt/ β -catenin; PTEN/PI3K/PKB/Src/CAV1; TRAF4/CAV1
卵巢癌 ^[42-43] Ovarian cancer	抗肿瘤 Anti tumor	CAV1/p-gp/M2 型巨噬细胞; CAV1/p-gp/M2 Macrophage; CAV1/ACE2
皮肤癌 ^[44-45] Skin cancer	促肿瘤 Promote tumor	不详 Unknown
前列腺癌 ^[46-48] Prostate cancer	促肿瘤 Promote tumor	Wnt/ β -catenin
乳腺癌 ^[49-50] Breast cancer	抗肿瘤 Anti tumor	CAV1/NF- κ B/c-Myc; TGF- $\beta 1$ /Smad
肾癌 ^[51] Renal cell carcinoma	促肿瘤 Promote tumor	PI3K/AKT
头颈癌 ^[52-53] Head and neck cancer	促肿瘤 Promote tumor	CAV1/EREG/YAP; TGF- β /SMAD



注:与正常组比较,*** $P<0.001$;在胆管癌、食管癌、肝癌、胃癌组织中 CAV1 高表达,在直肠癌、结肠癌组织中 CAV1 低表达,其差异具有统计学意义。

图 2 CAV1 在消化道肿瘤中的表达情况

Note. Compared with normal group, *** $P<0.001$. In the cholangiocarcinoma, esophagus cancer, hepatic cancer, gastric cancer tissues CAV1 high expression, CAV1 low expression in carcinoma of the rectum, colon cancer tissue, and the difference was statistically significant.

Figure 2 Expression of CAV1 in GI tumors

可能机制,并将其视为慢性肺病早期诊断和治疗的
可能靶点。然而,它是否能够作为生物标志物应用
还有待进一步研究。

CAV1 的启动子序列包括 3 个富含 G+C 的固醇
调节元件,包括 CAAT 序列、Sp1 共识序列和过氧化
物酶增殖反应元件^[57-59]。细胞内游离胆固醇的增
加可以刺激 SRE 结合蛋白 1 (sterol regulatory
element binding protein 1, SREBP 1) 与 CAV1 启动子
中的胆固醇调节元件结合,调节 CAV1 mRNA 表达。
此外,其他转录因子 GAT 结合因子 6、NF- κ B 也可以
与 CAV1 启动子相结合,调节其转录水平^[60-61]。

许多因素能够影响 CAV1 的转录后调节,例如
微小 RNA (microRNA, miRNA)、长链非编码 RNA
(long non-coding RNA, lncRNA)、环状 RNA (circular
RNA, circRNA) 以及其他蛋白质可以对 CAV1 的转录
后水平进行调节。其中 miRNA 包括 miR-199a-
5p^[62]、miR-96^[38]、miR-124^[23]、miR-103/107^[63]、miR-
204^[37]、miR-130a^[64] 和 miR-103-3p^[65] 已被证明可以
识别同源 CAV1 mRNA 导致 CAV1 mRNA 降解、抑制
其翻译。lncRNA 包括 lncRNA ANRIL^[62]、lnc-BMP1-
1^[66] 和 lncRNA IMFLNC1^[67], 可以调节 CAV1 蛋白
表达及其功能。最近的研究表明, circRNA 在 CAV1
的转录后调控中起关键作用^[68-69]。Li 等^[70] 研究发
现 circRNA TADA2A 含有丰富的 miR-526b 结合位

点,具有 miR-526b 和 miR-203 的海绵功能,能够促
进 CAV1 表达。一些蛋白质如聚合酶 I 和转录本释
放因子 (polymerase-1 and transcript release factor,
PTRF/Cavin-1)、浮舰蛋白 1 和 RNA 结合蛋白 HuR
也可以影响 CAV1 的蛋白表达和稳定性^[71-74]; E3
泛素连接酶 ZNRF1 和过氧化氢酶诱导 CAV1 泛素
化^[75-77]; 酪氨酸蛋白激酶 (tyrosine protein kinase,
TPK) 可以与 CAV1 的酪氨酸 14 位点结合,诱导其
磷酸化,导致 CAV1 不稳定、降解^[78]。此外, CAV1
是星形胶质细胞存活的必需蛋白质,可以通过自噬
降解。研究发现 CAV1 的自噬降解可以促进棕榈酸
(palmitic acid, PA) 诱导的星形胶质细胞凋亡和炎
症反应, CAV1 可能是 PA 积累引起中枢神经系统损
伤的潜在治疗靶点^[79]。综上所述, CAV1 的表达不
仅受非编码 RNA 的调控,而且还受到蛋白酶的
干预。

2 CAV1 对肿瘤 EMT 的影响

CAV1 与多种肿瘤上皮-间充质转换 (EMT) 相
关^[80]。在肝癌中, CAV1 的上调会导致 ST6GAL1 表
达增加,从而促进 EMT、癌细胞迁移、侵袭,并与不
良预后相关^[29]。铁死亡标志物 CAV1 与 EMT 之
间存在很强的相关性,可以促进 EMT 过程^[81]。
miRNA-203 通过抑制 CAV1 使 PI3K/AKT 信号通路

失活,增加 E-钙粘蛋白的表达和诱导细胞凋亡,从而抑制肾癌细胞 EMT、迁移和侵袭^[51]。与 EMT 和甲状腺癌干细胞样特性相关的基因 CAV1 在甲状腺微小癌的早期广泛淋巴结扩散中表达上调^[82]。CAV1 作为前列腺癌进展的关键驱动因素,能够诱导肿瘤 EMT^[46]。对于恶性周围神经鞘肿瘤,低表达武藏蛋白 2 (musashi 2, MSI2) 能增加 CAV1 蛋白表达,然而敲低 MSI1 可以抑制 CAV1 介导的细胞 EMT 和转移^[83]。在乳腺癌中,CAV1 与 EMT 相关,缺乏 CAV1 的成纤维细胞可通过介导 TGF- β 1/Smad 信号通路促进乳腺癌 EMT 进程^[84-85]。此外,中草药地榆能抑制小鼠乳腺癌的生长、EMT、晚期自噬和缺氧诱导因子-1 α /CAV1 信号传导^[86]。CAV1 沉默可能会增强自我更新调节因子 BMI1 表达并促进 EMT^[87]。CAV1 在多种肿瘤中与迁移和侵袭密切相关,其上调或沉默对肿瘤细胞的 EMT 具有重要影响。

3 CAV1 与肿瘤耐药的关系

3.1 CAV1 与消化道肿瘤耐药的关系

针对不同水平 CAV1 的异种胃癌移植模型, Pereira 等^[88]发现帕妥珠单抗与洛伐他汀联合应用优于单独使用,可显著提高抗体-肿瘤结合率和反应率。最近的研究表明 CAV1 通过激活 Wnt/ β -catenin 通路来参与胃癌细胞对顺铂耐药性的形成^[25]。在缺乏 CAV1 的条件下,使用 8 μ g/mL 顺铂处理胃癌细胞 24 h 后,胃癌细胞凋亡率显著升高。CAV1 可能是间质-上皮细胞转化因子 (mesenchymal epithelial transition factor, MET) 和人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 信号通路之间正串扰的关键连接体,通过酪氨酸 1221 和 1222 位点的 HER2 磷酸化来抑制顺铂诱导的胃癌细胞凋亡。CXCR4 过表达可以激活 CAV1 信号通路,促进肝癌细胞对吉非替尼的耐药性^[89]。CAV1 表达水平较高与显著较差的总生存期 (overall survival, OS) 相关。然而,在癌细胞中 CAV1 下调可能也会导致细胞增殖, Kamposioras 等^[90]研究表明当 CAV1 在成纤维细胞中共同注射到免疫缺陷小鼠体内以产生混合成纤维细胞/癌细胞异种移植时,CAV1 的表达降低导致癌细胞的生长和化学耐药性。在接受吉西他滨+nab-紫杉醇治疗的患者中,用吉西他滨预处理可增加 CAV1 和白蛋白的摄取,显著降低胰腺癌细胞的

增殖和克隆原性,并增强胰腺癌细胞对 nab-紫杉醇的敏感性,使癌细胞凋亡水平升高^[91]。

3.2 CAV1 与非消化道肿瘤耐药的关系

研究发现外泌体 miR-1246 通过靶向卵巢透明细胞癌中的 CAV1/p-gp/M2 型巨噬细胞轴赋予紫杉醇耐药性^[42]。使用金托联苄基治疗可通过抑制 CAV1 以及 EMT,抑制肺癌细胞迁移并使得肺癌细胞对顺铂介导的细胞凋亡变得敏感^[92]。另一项研究表明 miR-204 过表达可通过抑制 CAV1/AKT/Bad 途径使得肺癌细胞对顺铂诱导的线粒体细胞凋亡敏感。CAV1 和 CRAF/BRAF 蛋白异二聚化相结合与达沙替尼靶向 EphA2 的耐药性相关;达沙替尼、紫杉醇和卡铂三联组合使用在子宫内膜癌中显示出临床活性,具有一定的细胞毒性^[93]。然而,高表达的 CAV1 与卵巢癌患者的良好预后呈正相关,过表达 CAV1 可增强顺铂治疗的敏感性,CAV1 缺乏能够促进卵巢癌细胞的化学耐药性^[43]。在乳腺癌研究中,CAV1 水平高与 nab-紫杉醇和吉西他滨治疗的无进展生存期较长有显著关联;低剪切应力通过抑制 CAV1 依赖性外在和内在凋亡途径诱导乳腺癌细胞耐药性的形成^[94-95]。

4 CAV1 对消化道恶性肿瘤的影响

4.1 食管癌

CAV1 在食管癌 (esophageal cancer, ECC) 中扮演着诊断和预后标志物的角色。Wang 等^[19]研究表明 CAV1 高表达会抑制细胞信号传递并降低活性氧 ROS 水平,而 CAV1 敲低则能够加速 G₀/G₁ 期 ECC 细胞凋亡、细胞活性氧 ROS 形成并停滞细胞周期。此外,CAV1 的表达与肿瘤浸润免疫细胞、肿瘤发炎指数等免疫系统相关的因素呈正相关,CAV1 可能成为 ECC 免疫治疗的新靶点^[96]。CAV1 基因的高甲基化及其基因沉默通常出现在食管腺癌中,与 Barrett 食管早期肿瘤进展有关;CAV1 基因的多态性与个体发展为食管癌的易感性相关^[97-98]。Jia 等^[99]多变量分析研究表明,无论何时对 CAV1 的表达进行分析,其在 ECC 组织中的表达水平始终高于邻近或远处的正常组织。另外,抑制 Rho/ROCK 通路可以明显抑制 CAV1 和磷酸化小窝蛋白-1 (pY14 caveolin-1, pY14CAV1) 的表达,并显著减少 ECC 细胞的迁移和侵袭;CAV1、pY14CAV1 与 ECC 癌变及淋巴转移呈正相关^[100]。

4.2 胃癌

CAV1 是胃癌 (gastric cancer, GC) 的一种新型

预后标志物, Bertero 等^[101]通过临床、组织病理学和分子特征的相关性分析发现了这一结论, 同时与血小板衍生生长因子受体 α (platelet derived growth factor receptor α , PDGFRA) 突变相关。敲低 CAV1 阻断表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 的激活并降低 GC 细胞迁移^[102]; 选择性剪接调控蛋白 PTBP3 能够选择性剪接 CAV1, 调节 GC 转移^[20]; 脂肪质量与肥胖相关蛋白 (fat mass and obesity associated protein, FTO) 抑制 CAV1 表达从而抑制 GC 细胞增殖、迁移和侵袭^[103]。Circ CCDC9 作为肿瘤抑制因子, 抑制 miR-6792-3p/CAV1 信号轴, 减少 CAV1 表达, 进而抑制 GC 肿瘤发生^[104]。研究发现, 增加胃癌细胞中 miR-451a 的表达会抑制细胞生长、迁移和侵袭性, 并促进细胞凋亡; 高表达 CAV1 后, 这些生物过程恢复^[105]。Wang 等^[21]发现 CAV1 的肿瘤表达增加与明显恶化的总生存期 OS 相关。Sun 等^[106]指出 CAV1 在非原发肿瘤淋巴结中的表达可以预测较差的生存结果, 具有新的肿瘤预后标志物的潜力。此外, CAV1 基因甲基化可能在胃贲门腺癌 (gastric cardia adenocarcinoma, GCA) 的进展中起重要作用, 可以作为 GCA 患者的预后甲基化生物标志物^[107]。许多研究结果表明 CAV1 与 GC 癌症病情和生存预后之间相关联。然而, CAV1 在 GC 中受到种属差异性、个体差异性的影响, 其调控作用尚不明确。

4.3 肝癌

CAV1 在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的发展中扮演着重要的角色, CAV1 表达可预测肝细胞癌发展, 是潜在的生物标志物和预防性治疗靶标^[108]。高表达的 CAV1 促进 O-GlcNAc 转移酶 (O-GlcNAc transferase, OGT) 的表达, 催化 O-GlcNAc 残基添加到多种核蛋白和细胞质蛋白中, 促进 HCC 细胞的迁移、侵袭^[109]。过表达的 CAV1 可以通过 Wnt/ β -catenin 信号途径促进乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 相关的 HCC 细胞转移。CAV1 诱导的岩藻糖基转移酶 8 表达上调增强了小鼠 HCC 细胞在体外的增殖、侵袭, CAV1 也在 Wnt/ β -catenin 信号途径、调节糖基转移酶表达和参与异常糖基化等方面介导 HCC 的增殖、侵袭^[26]。另一项研究发现, 肝硬化 HCC 的 CAV1 蛋白过表达率显著高于无肝硬化的 HCC, 这表明 CAV1 蛋白过表达可能引发肝硬化肝癌变, 促进肝细胞癌的发生^[110-111]。CAV1 可以上调蛋白 O-岩藻糖基转移酶

1 表达来激活 Notch 通路, 增强小鼠 HCC 细胞在体内、体外的侵袭和转移^[28]。CAV1 的表达能够激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 促进转录因子 NR4A2 和磷酸化 RXR α 形成, 并与 ST6GAL1 启动子结合诱导转录^[29]。Chai 等^[112]发现 HCC 的进展与异常的细胞代谢有关, HCC 细胞中 CAV1 或己糖激酶 2 (hexokinase 2, HK2) 的过表达能够增强葡萄糖和乳酸代谢, 导致 HCC 细胞迁移、侵袭。此外, 由 CAV1/SREBP1/ACADM 轴介导的脂肪酸氧化失调可以促进 HCC 发展^[30]。多因素分析显示, 内质网整合膜蛋白 Sec62 是肝癌术后早期复发的独立预后因素。Sec62 通过整合素 α /CAV1 信号传导促进 HCC 转移^[31]。Takeda 等^[113]发现 CAV1 在 HCC 患者的临床标本中过表达; 细胞实验表明 CAV1 通过降低含油酸 (oleic acid, OA) 的促凋亡因子神经酰胺水平来抑制 HCC 细胞凋亡。Zhang 等^[32]研究表明 CAV1 可以通过 MAPK 信号通路促进转录因子 HNF4A 和 Sp1 的磷酸化, 这些转录因子与 O-岩藻糖肽 3- β -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 (recombinant O-fucosylpeptide-3- β -N-acetylglucosaminyltransferase, RFNG) 启动子区域结合, 诱导 RFNG 转录; CAV1 在调节糖基转移酶表达中起重要作用, 参与 HCC 异常蛋白质糖基化, 促进细胞侵袭转移。

4.4 胰腺癌

CAV1 是胰腺癌 (pancreatic cancer, PC) 发展过程中一个重要调节因子, 在 PC 基质中低表达, 基质 CAV1 的缺失与生存率低有关。在胰腺星状细胞 (pancreatic stellate cells, PSCs) 中, 敲低 CAV1 促进活性氧 ROS 的产生, ROS 的产生进一步降低 CAV1 表达。PSCs 中的 CAV1-ROS 信号传导发生正反馈, 促进 PC 生长并诱导 PC 基质-肿瘤代谢耦合^[22]。CAV1 沉默的 PSCs 表现出 shh 表达增加, 激活胰腺癌细胞中 shh 信号通路。同时, PSCs 积累的 ROS 促进胰腺癌细胞血管生成^[33]。CAV1 在 PC 癌症相关成纤维细胞 (cancer-associated fibroblasts, CAFs) 中的表达与患者预后不良相关, CAFs 中 CAV1 的下调降低了 PC 细胞的侵袭性^[114]。另外, 通过洛伐他汀或消耗 CAV1 可以抑制甲羟戊酸途径, 降低 CD133⁺ PC 细胞的转移潜力和化学耐药性^[115]。

4.5 结直肠癌

CAV1 是 STAT 信号传导的枢纽, 与肿瘤免疫微环境相关。CAV1 抑制结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 细胞增殖并诱导细胞凋亡和衰老; 过表达

CAV1 可抑制 CRC 的肿瘤血管生成^[34]。在对 76 名表达 EGFR 的结直肠肿瘤患者进行研究, Yang 等^[116]发现 CAV1 的表达与淋巴结及远处转移呈负相关。CAV1 过表达可能抑制肿瘤进展, 高水平的 CAV1 可能是一个良好的预后因素。Lin 等^[117]发现通过补体与凝血级联反应以及局灶性粘附途径可以干预结直肠癌肝转移, CAV1 可能是 CRC 肝转移早期标志物。CD26 是结直肠癌干细胞的肿瘤标志物, CD26⁺结直肠癌干细胞具有肿瘤增殖特性并能够进行 CRC 转移。CD26 通过抑制 CAV1, 诱导基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase 1, MMP1) 表达, 引起 CRC 的迁移、侵袭和血管生成^[35]。

5 结语

综上所述, CAV1 既能够作为肿瘤抑制因子又可以作为致癌因子参与肿瘤形成过程, 各方面都已经证实 CAV1 与 ECC、GC、HCC、PC 等消化道肿瘤密切相关。CAV1 可能成为消化道肿瘤的一种重要早期预测和预后生物标志物, 这有助于肿瘤的治疗。然而, 目前仍存在一些问题: (1) 消化道肿瘤的发生机制具有多样性与复杂性, 生理、生化等诸多不清楚问题有待进一步研究; (2) CAV1 与肿瘤相关的关键信号分子改变目前还是未知的, 在肿瘤的发生发展及治疗反应中的病理意义研究较少; (3) CAV1 阳性或阴性预后标志物的参考临界值目前没有明确指标; (4) 目前还没有临床药物试验前瞻性地探讨 CAV1 在消化道恶性肿瘤中的作用。上述这些存在的问题需要更多关于 CAV1 的试验研究来阐明。在回顾关于消化道肿瘤中 CAV1 的文献时, 我们更加相信 CAV1 在肿瘤形成和发展中的作用具有重要研究前景, 应用更多新药干预肿瘤细胞 CAV1 的蛋白表达可以作为未来肿瘤治疗的新方向。

参考文献:

[1] TANG J, CHEN J, WANG Y, et al. The role of miRNA-433 in malignant tumors of digestive tract as tumor suppressor [J]. Cancer Rep, 2022, 5(9): e1694.

[2] REITANO E, DEANGELIS N, GAVRILIDIS P, et al. Oral bacterial microbiota in digestive cancer patients; a systematic review [J]. Microorganisms, 2021, 9(12): 2585.

[3] WANG J, MA X, SI H, et al. Role of long noncoding RNA H19 in therapy resistance of digestive system cancers [J]. Mol Med, 2021, 27(1): 1.

[4] PARTON R G. Caveolae: structure, function, and relationship to disease [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2018, 34: 111-136.

[5] GU Y, CAI R, ZHANG C, et al. MiR-132-3p boosts caveolae-mediated transcellular transport in glioma endothelial cells by targeting PTEN/PI3K/PKB/Src/Cav1 signaling pathway [J]. FASEB J, 2019, 33(1): 441-454.

[6] SHI Y B, LI J, LAI X N, et al. Multifaceted roles of caveolin-1 in lung cancer: a new investigation focused on tumor occurrence, development and therapy [J]. Cancers, 2020, 12(2): 291.

[7] ZHOU Y, ARIOTTI N, RAE J, et al. Caveolin-1 and cavin1 act synergistically to generate a unique lipid environment in caveolae [J]. J Cell Biol, 2021, 220(3): e202005138.

[8] NADARAJAPILLAI K, LIM C, LIYANAGE D S, et al. Molecular characterization and expression profiling of caveolin-1 from *amphiprion clarkii* and elucidation of its involvement in antiviral response and redox homeostasis [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2022, 262: 110775.

[9] SOHN J, BRICK R M, TUAN R S. From embryonic development to human diseases; the functional role of caveolae/caveolin [J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2016, 108(1): 45-64.

[10] FILIPPINI A, DALESSIO A. Caveolae and lipid rafts in endothelium; valuable organelles for multiple functions [J]. Biomolecules, 2020, 10(9): 1218.

[11] ROOT K T, PLUCINSKY S M, GLOVER K J. Recent progress in the topology, structure and oligomerization of caveolin: a building block of caveolae [J]. Curr Top Membr, 2015, 75: 305-336.

[12] WONG T H, DICKSON F H, TIMMINS L R, et al. Tyrosine phosphorylation of tumor cell caveolin-1: impact on cancer progression [J]. Cancer Metastasis Rev, 2020, 39(2): 455-469.

[13] HOOP C L, SIVANANDAM V N, KODALI R, et al. Structural characterization of the caveolin scaffolding domain in association with cholesterol-rich membranes [J]. Biochemistry, 2012, 51(1): 90-99.

[14] PARK S, GLOVER K J, IM W. U-shaped caveolin-1 conformations are tightly regulated by hydrogen bonds with lipids [J]. J Comput Chem, 2019, 40(16): 1570-1577.

[15] SCHLEGEL A, ARVAN P, LISANTI M P. Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine phosphorylation. Protein sorting at the level of the endoplasmic reticulum [J]. J Biol Chem, 2001, 276(6): 4398-4408.

[16] VOLONTE D, VYAS A R, CHEN C, et al. Caveolin-1 promotes the tumor suppressor properties of oncogene-induced cellular senescence [J]. J Biol Chem, 2018, 293(5): 1794-1809.

[17] LIANG Y N, LIU Y, WANG L, et al. Combined caveolin-1 and epidermal growth factor receptor expression as a prognostic marker for breast cancer [J]. Oncol Lett, 2018, 15(6): 9271-9282.

[18] SIMÓN L, CAMPOS A, LEYTON L, et al. Caveolin-1 function at the plasma membrane and in intracellular compartments in cancer [J]. Cancer Metastasis Rev, 2020, 39(2): 435-453.

[19] WANG J, LUO Q, LIU M, et al. TBRC4 silencing promotes

- progression of squamous cell carcinoma via regulation of CAV1 expression and ROS formation [J]. Cell Mol Biol, 2020, 66 (2): 157-164.
- [20] LIANG X, CHEN W, SHI H, et al. PTBP3 contributes to the metastasis of gastric cancer by mediating CAV1 alternative splicing [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(5): 569.
- [21] WANG Y, SONG Y, CHE X, et al. Caveolin-1 enhances RANKL-induced gastric cancer cell migration [J]. Oncol Rep, 2018, 40(3): 1287-1296.
- [22] SHAO S, QIN T, QIAN W, et al. Positive feedback in CAV1-ROS signalling in PSCs mediates metabolic coupling between PSCs and tumour cells [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(16): 9397-9408.
- [23] TORREJÓN B, CRISTÓBAL I, ROJO F, et al. Caveolin-1 is markedly downregulated in patients with early stage colorectal cancer [J]. World J Surg, 2017, 41(10): 2625-2630.
- [24] WANG K, ZHU X, MEI D, et al. Caveolin-1 contributes to anoikis resistance in human gastric cancer SGC-7901 cells via regulating Src-dependent EGFR-ITGB1 signaling [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2018, 32(10): e22202.
- [25] WANG X, LU B, DAI C, et al. Caveolin-1 promotes chemoresistance of gastric cancer cells to cisplatin by activating Wnt/ β -catenin pathway [J]. Front Oncol, 2020, 10: 46.
- [26] ZHANG C, WU Q, HUANG H, et al. Caveolin-1 upregulates Fut8 expression by activating the Wnt/ β -catenin pathway to enhance HCC cell proliferative and invasive ability [J]. Cell Biol Int, 2020, 44(11): 2202-2212.
- [27] HUANG D, YANG B, YAO Y, et al. Autophagic inhibition of caveolin-1 by compound *phyllanthus urinaria* L activates ubiquitination and proteasome degradation of β -catenin to suppress metastasis of hepatitis B-associated hepatocellular carcinoma [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 659325.
- [28] ZHANG C, HUANG H, ZHANG J, et al. Caveolin-1 promotes invasion and metastasis by upregulating Pofut1 expression in mouse hepatocellular carcinoma [J]. Cell Death Dis, 2019, 10 (7): 477.
- [29] CHEN X, WANG L, YU X, et al. Caveolin-1 facilitates cell migration by upregulating nuclear receptor 4A2/retinoid X receptor α -mediated β -galactoside α 2, 6-sialyltransferase I expression in human hepatocarcinoma cells [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2021, 137: 106027.
- [30] MA A P Y, YEUNG C L S, TEY S K, et al. Suppression of ACADM-mediated fatty acid oxidation promotes hepatocellular carcinoma via aberrant CAV1/SREBP1 signaling [J]. Cancer Res, 2021, 81(13): 3679-3692.
- [31] DU J, ZHAO Z, ZHAO H, et al. Sec62 promotes early recurrence of hepatocellular carcinoma through activating integrin α /CAV1 signalling [J]. Oncogenesis, 2019, 8 (12): 74.
- [32] ZHANG C, WU Q, HUANG H, et al. Caveolin-1 promotes Rfng expression via Erk-Jnk-p38 signaling pathway in mouse hepatocarcinoma cells [J]. J Physiol Biochem, 2019, 75(4): 549-559.
- [33] SHAO S, QIN T, QIAN W, et al. Cav-1 ablation in pancreatic stellate cells promotes pancreatic cancer growth through Nrf2-induced shh signaling [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 1868764.
- [34] ZENG R, WU H, QIU X, et al. Predicting survival and immune microenvironment in colorectal cancer: a STAT signaling-related signature [J]. QJM, 2022, 115(9): 596-604.
- [35] NG L, WONG S K, HUANG Z, et al. CD26 induces colorectal cancer angiogenesis and metastasis through CAV1/MMP1 signaling [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 1181.
- [36] HAU A M, GUPTA S, LEIVO M Z, et al. Dynamic regulation of caveolin-1 phosphorylation and caveolae formation by mammalian target of rapamycin complex 2 in bladder cancer cells [J]. Am J Pathol, 2019, 189(9): 1846-1862.
- [37] HUANG G, LOU T, PAN J, et al. MiR-204 reduces cisplatin resistance in non-small cell lung cancer through suppression of the caveolin-1/AKT/Bad pathway [J]. Aging, 2019, 11(7): 2138-2150.
- [38] CHEN Y, LIU C, XIE B, et al. MiR-96 exerts an oncogenic role in the progression of cervical cancer by targeting CAV1 [J]. Mol Med Rep, 2020, 22(1): 543-550.
- [39] GAO C, GAO J, ZENG G, et al. MicroRNA-629-5p promotes osteosarcoma proliferation and migration by targeting caveolin 1 [J]. Braz J Med Biol Res, 2021, 54(6): e10474.
- [40] XIE Y, HE L, ZHANG Y, et al. Wnt signaling regulates MFSD2A-dependent drug delivery through endothelial transcytosis in glioma [J]. Neuro Oncol, 2023, 25(6): 1073-1084.
- [41] LI Y, WANG T, WAN Q, et al. TRAF4 maintains deubiquitination of caveolin-1 to drive glioblastoma stemness and temozolomide resistance [J]. Cancer Res, 2022, 82(19): 3573-3587.
- [42] KANLIKILICER P, BAYRAKTAR R, DENIZLI M, et al. Exosomal miRNA confers chemo resistance via targeting Cav1/p-gp/M2-type macrophage axis in ovarian cancer [J]. EBiomedicine, 2018, 38: 100-112.
- [43] NAGAPPAN A, KIM K H, MOON Y. Caveolin 1-ACE2 axis modulates xenobiotic metabolism-linked chemoresistance in ovarian clear cell carcinoma [J]. Cell Biol Toxicol, 2023, 39 (4): 1181-1201.
- [44] ORTIZ R, DÍAZ J, DÍAZVALDIVIA N, et al. Src-family kinase inhibitors block early steps of caveolin-1-enhanced lung metastasis by melanoma cells [J]. Biochem Pharmacol, 2020, 177: 113941.
- [45] TAKAMURA N, YAMAGUCHI Y. Involvement of caveolin-1 in skin diseases [J]. Front Immunol, 2022, 13: 1035451.
- [46] LIN C J, YUN E J, LO U G, et al. The paracrine induction of prostate cancer progression by caveolin-1 [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(11): 834.
- [47] KOBAYASHI P E, FONSECAALVES C E, RIVERACALDERÓN L G, et al. Deregulation of Ecadherin, β -catenin, APC and Caveolin-1 expression occurs in canine prostate

- cancer and metastatic processes [J]. *Res Vet Sci*, 2018, 118: 254–261.
- [48] VYKOUKAL J, FAHRMANN J F, GREGG J R, et al. Caveolin-1-mediated sphingolipid oncometabolism underlies a metabolic vulnerability of prostate cancer [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 4279.
- [49] JIAO L, WANG S, ZHENG Y, et al. Betulinic acid suppresses breast cancer aerobic glycolysis via caveolin-1/NF- κ B/c-Myc pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 161: 149–162.
- [50] HUANG Q, WU L, WANG Y, et al. Caveolin-1-deficient fibroblasts promote migration, invasion, and stemness via activating the TGF- β /Smad signaling pathway in breast cancer cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2022, 54 (11): 1587–1598.
- [51] HAN N, LI H, WANG H. MicroRNA-203 inhibits epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion of renal cell carcinoma cells via the inactivation of the PI3K/AKT signaling pathway by inhibiting CAV1 [J]. *Cell Adh Migr*, 2020, 14 (1): 227–241.
- [52] BURG Y M, JEHL A, CONRAD O, et al. CAV1/EREG/YAP axis in the treatment resistance of CAV1 expressing head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Cancers*, 2021, 13 (12): 3038.
- [53] ZHU G, CAO B, LIANG X, et al. Small extracellular vesicles containing miR-192/215 mediate hypoxia-induced cancer-associated fibroblast development in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2021, 506: 11–22.
- [54] YAN F, SU L, CHEN X, et al. Molecular regulation and clinical significance of caveolin-1 methylation in chronic lung diseases [J]. *Clin Transl Med*, 2020, 10(1): 151–160.
- [55] BOULWARE M I, KORDASIEWICZ H, MERMELSTEIN P G. Caveolin proteins are essential for distinct effects of membrane estrogen receptors in neurons [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(37): 9941–9950.
- [56] SANDERS Y Y, LIU H, SCRUGGS A M, et al. Epigenetic regulation of caveolin-1 gene expression in lung fibroblasts [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017, 56(1): 50–61.
- [57] MEHTA N, ZHANG D, LI R, et al. Caveolin-1 regulation of Sp1 controls production of the antifibrotic protein follistatin in kidney mesangial cells [J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17 (1): 37.
- [58] CHEN W, CHEN Y, QIN L, et al. Transcription factor Sp1 is essential for the regulation of the porcine caveolin-1 gene [J]. *DNA Cell Biol*, 2011, 30(7): 491–497.
- [59] ZHAO Y, WEI X, SONG J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist rosiglitazone protects blood-brain barrier integrity following diffuse axonal injury by decreasing the levels of inflammatory mediators through a caveolin-1-dependent pathway [J]. *Inflammation*, 2019, 42(3): 841–856.
- [60] BOOPATHI E, GOMES C M, GOLDFARB R, et al. Transcriptional repression of Caveolin-1 gene expression by GATA-6 in bladder smooth muscle hypertrophy in mice and human beings [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(5): 2236–2251.
- [61] THANGAVEL C, GOMES C M, ZDERIC S A, et al. NF- κ B and GATA-binding factor 6 repress transcription of caveolins in bladder smooth muscle hypertrophy [J]. *Am J Pathol*, 2019, 189(4): 847–867.
- [62] ZHONG W, LI Y C, HUANG Q Y, et al. lncRNA ANRIL ameliorates oxygen and glucose deprivation induced injury in neuron cells via miR-199a-5p/CAV1 axis [J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(4): 772–782.
- [63] ZHANG Y, QU X, LI C, et al. MiR-103/107 modulates multidrug resistance in human gastric carcinoma by downregulating Cav-1 [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(4): 2277–2285.
- [64] WANG M D, WANG Y, XIA Y P, et al. High serum miR-130a levels are associated with severe perihematomal edema and predict adverse outcome in acute ICH [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53 (2): 1310–1321.
- [65] WANG L, ZHAO Y, GANG S, et al. Inhibition of miR-103-3p preserves neurovascular integrity through caveolin-1 in experimental subarachnoid hemorrhage [J]. *Neuroscience*, 2021, 461: 91–101.
- [66] LING X, LI Y, QIU F, et al. Down expression of *lnc-BMP1-1* decreases that of *Caveolin-1* is associated with the lung cancer susceptibility and cigarette smoking history [J]. *Aging*, 2020, 12(1): 462–480.
- [67] WANG J, CHEN M Y, CHEN J F, et al. lncRNA IMF1nc1 promotes porcine intramuscular adipocyte adipogenesis by sponging miR-199a-5p to up-regulate CAV1 [J]. *BMC Mol Cell Biol*, 2020, 21(1): 77.
- [68] HU C, XIA R, ZHANG X, et al. CircFARP1 enables cancer-associated fibroblasts to promote gemcitabine resistance in pancreatic cancer via the LIF/STAT3 axis [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 24.
- [69] ZHU Q, ZHAN D, ZHU P, et al. CircAKT1 acts as a sponge of miR-338-3p to facilitate clear cell renal cell carcinoma progression by up-regulating CAV1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 532(4): 584–590.
- [70] LI J, LI P, ZHANG G, et al. CircRNA TADA2A relieves idiopathic pulmonary fibrosis by inhibiting proliferation and activation of fibroblasts [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (7): 553.
- [71] HANSEN C G, NICHOLS B J. Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae [J]. *Trends Cell Biol*, 2010, 20(4): 177–186.
- [72] LIU L, XU H X, WANG W Q, et al. Cavin-1 is essential for the tumor-promoting effect of caveolin-1 and enhances its prognostic potency in pancreatic cancer [J]. *Oncogene*, 2014, 33(21): 2728–2736.
- [73] KWIATKOWSKA K, MATVEICHUK O V, FRONK J, et al. Flotillins: At the intersection of protein S-Palmitoylation and lipid-mediated signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (7): 2283.

- [74] CAO S, XIAO L, WANG J, et al. The RNA-binding protein HuR regulates intestinal epithelial restitution by modulating Caveolin-1 gene expression [J]. *Biochem J*, 2021, 478(1): 247–260.
- [75] RUNGTABNAPA P, NIMMANNIT U, HALIM H, et al. Hydrogen peroxide inhibits non-small cell lung cancer cell anoikis through the inhibition of caveolin-1 degradation [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 300(2): C235–C245.
- [76] BURANA D, YOSHIHARA H, TANNO H, et al. The Ankrd13 family of ubiquitin-interacting motif-bearing proteins regulates valosin-containing protein/p97 protein-mediated lysosomal trafficking of caveolin 1 [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(12): 6218–6231.
- [77] LEE C Y, LAI T Y, TSAI M K, et al. The ubiquitin ligase ZNRF1 promotes caveolin-1 ubiquitination and degradation to modulate inflammation [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15502.
- [78] JOSHI B, PAWLING J, SHANKAR J, et al. Caveolin-1 Y14 phosphorylation suppresses tumor growth while promoting invasion [J]. *Oncotarget*, 2019, 10(62): 6668–6677.
- [79] CHEN Z, NIE S D, QU M L, et al. The autophagic degradation of CAV1 contributes to PA-induced apoptosis and inflammation of astrocytes [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(7): 771.
- [80] YOON H J, SURH Y J. Modulation of cancer cell growth and progression by caveolin-1 in the tumor microenvironment [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1277: 63–74.
- [81] YAO J, ZHANG Y, LI M, et al. Single-cell RNA-seq reveals the promoting role of ferroptosis tendency during lung adenocarcinoma EMT progression [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 822315.
- [82] LEE S, BAE J S, JUNG C K, et al. Extensive lymphatic spread of papillary thyroid microcarcinoma is associated with an increase in expression of genes involved in epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(15): 6528–6537.
- [83] YANG K, DU J, SHI D, et al. Knockdown of MSI2 inhibits metastasis by interacting with caveolin-1 and inhibiting its ubiquitylation in human NF1-MPNST cells [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(6): 489.
- [84] GODINA C, INDIRACHANDRAN V, BARBACHOWSKA M, et al. Interplay between Caveolin-1 and body and tumor size affects clinical outcomes in breast cancer [J]. *Transl Oncol*, 2022, 22: 101464.
- [85] GUIDO C, WHITAKERMENEZES D, CAPPARELLI C, et al. Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by TGF- β drives tumor growth: connecting TGF- β signaling with Warburg-like cancer metabolism and L-lactate production [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(16): 3019–3035.
- [86] WANG N, MUHETAER G, ZHANG X, et al. *Sanguisorba officinalis* L suppresses triple-negative breast cancer metastasis by inhibiting late-phase autophagy via Hif-1 α /Caveolin-1 signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 591400.
- [87] YOON H J, KIM D H, KIM S J, et al. Src-mediated phosphorylation, ubiquitination and degradation of Caveolin-1 promotes breast cancer cell stemness [J]. *Cancer Lett*, 2019, 449: 8–19.
- [88] PEREIRA P M R, MANDLEYWALA K, MONETTE S, et al. Caveolin-1 temporal modulation enhances antibody drug efficacy in heterogeneous gastric cancer [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2526.
- [89] ZHAO D, YANG Z, CHEN C, et al. CXCR4 promotes gefitinib resistance of Huh7 cells by activating the c-Met signaling pathway [J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(11): 3115–3125.
- [90] KAMPOSIORAS K, TSIMPOULI C, VERBEKE C, et al. Silencing of caveolin-1 in fibroblasts as opposed to epithelial tumor cells results in increased tumor growth rate and chemoresistance in a human pancreatic cancer model [J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(2): 537–549.
- [91] WOLFE A R, ROBB R, HEGAZI A, et al. Altered gemcitabine and nab-paclitaxel scheduling improves therapeutic efficacy compared with standard concurrent treatment in preclinical models of pancreatic cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(2): 554–565.
- [92] PETPIROON N, BHUMMAPHAN N, TUNGSUKRUTHAI S, et al. Chrysotolibenzylinhibition of lung cancer cell migration through Caveolin-1 dependent mediation of the integrin switch and the sensitization of lung cancer cells to cisplatin-mediated apoptosis [J]. *Phytomedicine*, 2019, 58: 152888.
- [93] COLEMAN R L, HU W, SOLIMAN P, et al. Dasatinib, paclitaxel and carboplatin in women with advanced stage or recurrent endometrial cancer: a pilot clinical and translational study [J]. *Gynecol Oncol*, 2021, 161(1): 104–112.
- [94] ZHAO Y, LV F, CHEN S, et al. Caveolin-1 expression predicts efficacy of weekly nab-paclitaxel plus gemcitabine for metastatic breast cancer in the phase II clinical trial [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 1019.
- [95] LI S, CHEN Y, ZHANG Y, et al. Shear stress promotes anoikis resistance of cancer cells via caveolin-1-dependent extrinsic and intrinsic apoptotic pathways [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 3730–3743.
- [96] ZHANG R, WANG H, XIAO J, et al. CAV1 impacts the tumor immune microenvironment and has potential value of predicting response to immunotherapy in esophageal cancer [J]. *DNA Cell Biol*, 2023, 42(1): 27–42.
- [97] JIN Z, WANG L, CAO Z, et al. Temporal evolution in caveolin 1 methylation levels during human esophageal carcinogenesis [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 345.
- [98] WANG S, ZHANG C, LIU Y, et al. Functional polymorphisms of caveolin-1 variants as potential biomarkers of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Biomarkers*, 2014, 19(8): 652–659.
- [99] JIA Y, WANG N, WANG J, et al. Down-regulation of stromal caveolin-1 expression in esophageal squamous cell carcinoma: a potent predictor of lymph node metastases, early tumor recurrence, and poor prognosis [J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21

(1): 329–336.

[100] LIU Z, YU J, WU R, et al. Rho/ROCK pathway regulates migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma by regulating caveolin-1 [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 6174–6185.

[101] BERTERO L, GAMBELLA A, BARRECA A, et al. Caveolin-1 expression predicts favourable outcome and correlates with *PDGFRA* mutations in gastrointestinal stromal tumours [J]. *J Clin Pathol*, 2022, 75(12): 825–831.

[102] WAN X, SONG Y, FANG H, et al. RANKL/RANK promotes the migration of gastric cancer cells by interacting with EGFR [J]. *Clin Transl Med*, 2020, 9(1): 3.

[103] ZHOU Y, WANG Q, DENG H, et al. N6-methyladenosine demethylase FTO promotes growth and metastasis of gastric cancer via m⁶A modification of caveolin-1 and metabolic regulation of mitochondrial dynamics [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(1): 72.

[104] LUO Z, RONG Z, ZHANG J, et al. Circular RNA circCCDC9 acts as a miR-6792-3p sponge to suppress the progression of gastric cancer through regulating CAV1 expression [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 86.

[105] WANG Y, LIN Z, SONG J, et al. MicroRNA-451a targets caveolin-1 in stomach cancer cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(10): 2524–2533.

[106] SUN S, HONG S A, WON H S, et al. Prognostic value of metastatic tumoral caveolin-1 expression in patients with resected gastric cancer [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2017, 2017: 5905173.

[107] GUO Y L, ZHU T N, GUO W, et al. Aberrant CpG island shore region methylation of CAV1 is associated with tumor progression and poor prognosis in gastric cardia adenocarcinoma [J]. *Arch Med Res*, 2016, 47(6): 460–470.

[108] YIM S Y, HAE N J, SHIN J H, et al. Identification of prognostic biomarker in predicting hepatocarcinogenesis from cirrhotic liver using protein and gene signatures [J]. *Exp Mol Pathol*, 2019, 111: 104319.

[109] WANG L, FENG Y, ZHANG C, et al. Upregulation of OGT by Caveolin-1 promotes hepatocellular carcinoma cell migration and invasion [J]. *Cell Biol Int*, 2021, 45(11): 2251–2263.

[110] ZHANG Y, FAN W, WU J, et al. Association of caveolin-1 protein expression with hepatocellular carcinoma: a meta-analysis and literature review [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 5113–5122.

[111] LACHOWSKI D, MATELLAN C, GOPAL S, et al. Substrate stiffness-driven membrane tension modulates vesicular trafficking *via* caveolin-1 [J]. *ACS Nano*, 2022, 16(3): 4322–4337.

[112] CHAI F, LI Y, LIU K, et al. Caveolin enhances hepatocellular carcinoma cell metabolism, migration and invasion *in vitro* via a hexokinase 2-dependent mechanism [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2): 1937–1946.

[113] TAKEDA M, SAKAGUCHI T, HIRAIDE T, et al. Role of caveolin-1 in hepatocellular carcinoma arising from non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(8): 2401–2411.

[114] YAMAO T, YAMASHITA YI, YAMAMURA K, et al. Cellular senescence, represented by expression of caveolin-1, in cancer-associated fibroblasts promotes tumor invasion in pancreatic cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2019, 26(5): 1552–1559.

[115] GUPTA V K, SHARMA N S, KESH K, et al. Metastasis and chemoresistance in CD133 expressing pancreatic cancer cells are dependent on their lipid raft integrity [J]. *Cancer Lett*, 2018, 439: 101–112.

[116] YANG J, ZHU T, ZHAO R, et al. Caveolin-1 inhibits proliferation, migration and invasion of human colorectal cancer cells by suppressing phosphorylation of epidermal growth factor receptor [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 332–341.

[117] LIN L, ZENG X, LIANG S, et al. Construction of a co-expression network and prediction of metastasis markers in colorectal cancer patients with liver metastasis [J]. *J Gastrointest Oncol*, 2022, 13(5): 2426–2438.

[收稿日期] 2023–07–13

刘诗雨, 许玉珉, 徐红彩, 等. 线粒体-内质网结构偶联(MAMs)在阿尔茨海默病发病机制中的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 121-130.

Liu SY, Xu YM, Xu HC, et al. Research progress on the role of mitochondria-associated membranes in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 121-130.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.014

线粒体-内质网结构偶联(MAMs)在阿尔茨海默病发病机制中的研究进展

刘诗雨^{1,2}, 许玉珉^{1*}, 徐红彩^{1,2}, 路芳梅^{1,2}

(1.河南中医药大学第一附属医院脑病科, 郑州 450000; 2.河南中医药大学第一临床医学院, 郑州 450000)

【摘要】 线粒体-内质网结构偶联(mitochondria-associated membranes, MAMs)是线粒体外膜和内质网膜之间进行通讯交流及物质交换的特殊结构域, 执行不同条件下细胞生命活动的多种生物学过程。MAMs 功能障碍介导的Ca²⁺稳态失衡、内质网应激、线粒体自噬缺陷、线粒体分裂-融合平衡障碍、脂质代谢紊乱、炎症反应是阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)关键的发病机制。本文围绕MAMs结构与功能、参与AD病理环节、药物干预靶点等方面进行综述, 探讨MAMs在AD发病中的作用及最新机制研究进展, 以期对AD的防治提供新思路。

【关键词】 阿尔茨海默病; 线粒体-内质网结构偶联; 钙稳态; 内质网应激; 线粒体自噬; 线粒体分裂-融合动力学; 脂质代谢; 炎症

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0121-10

Research progress on the role of mitochondria-associated membranes in the pathogenesis of Alzheimer's disease

LIU Shiyu^{1,2}, XU Yumin^{1*}, XU Hongcai^{1,2}, LU Fangmei^{1,2}

(1. Department of Encephalopathy, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China.

2. Henan University of Chinese Medicine, the First Clinical Medical College, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Mitochondria-associated membranes (MAMs) are a subcellular compartment involved in the communication and material exchange between the mitochondrial outer membrane and endoplasmic reticulum membrane. MAMs perform various biological processes in cells under different conditions. MAM-dysfunction-mediated calcium homeostasis imbalance, endoplasmic reticulum stress, mitophagy defects, mitochondrial fission/fusion dynamics imbalance, lipid metabolism disorders, and inflammatory responses are key pathogenic factors in Alzheimer's disease (AD). This article reviews the structure and function of MAMs, their involvement in AD pathology, and drug intervention targets, and discusses the role of MAMs in the pathogenesis of AD and the latest research into their mechanisms, to provide new ideas for the prevention and treatment of AD.

【基金项目】 国家自然科学基金(81904265); 河南省科技攻关项目(242102311255); 河南省博士后基金项目(HN2022083); 河南省医学科技攻关计划省部共建重点项目(SBGJ202302101); 2023年度河南省卫生健康委员会国家中医药传承创新中心科研专项(2023XXZX1004)。

【作者简介】 刘诗雨(2000—), 女, 硕士, 研究方向: 中医药防治脑病。E-mail: lsyyyy0816@163.com

【通信作者】 许玉珉(1989—), 女, 博士, 副主任医师, 研究方向: 中医药防治脑病。E-mail: xuyumin6688@163.com

【 Keywords 】 Alzheimer's disease; mitochondria-associated membranes; calcium homeostasis; endoplasmic reticulum stress; mitophagy; mitochondrial fusion/fission dynamics; lipid metabolism; inflammation

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

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是老年期最常见的痴呆类型, 主要病理特征为细胞外 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid protein, A β) 沉积和细胞内 tau 蛋白过度磷酸化产生的神经纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs)。根据 2023 年世界阿尔茨海默病报告显示^[1], 全球痴呆症患者预计从 2019 年的 5500 万到 2050 年将攀升至 1.39 亿, AD 已成为全球第 7 大死亡原因^[2]。目前我国已步入深度老龄化社会, AD 患者人数居全球首位, 且随着人口平均寿命的延长, AD 已成为严重危害我国人民健康的重大疾病和社会问题。

但过去十几年内, 研究者针对 A β 和 tau 蛋白研发的靶向治疗多收效甚微, 对病情发展结局影响不大^[3-4], 尚不能解释 AD 模型 A β 沉积和 NFTs 形成之前的某些病理特征, 如钙稳态失衡、脂质代谢异常、线粒体功能障碍和自噬、内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ER stress), 而这些病理特征均与线粒体-内质网结构偶联 (即线粒体相关内质网膜, mitochondria-associated membranes, MAMs) 功能障碍密切相关^[5]。MAMs 是内质网和线粒体之间的膜性接触点, 介导两个细胞器之间的互相通信, 在功能上有别于内质网和线粒体, 主要参与调控细胞能量代谢、线粒体和内质网之间 Ca^{2+} 运输、线粒体形态维持、脂质代谢和运输、ER stress、未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 等过程^[6]。A β 神经毒性是 AD 学习记忆障碍的重要因素, 催化淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 产生 A β 的 γ -分泌酶以及早老素 1/2 在 MAMs 上高度富集, 内质网-线粒体共定位及 MAMs 功能活性在 AD 患者、动物及细胞模型中显著增加, 提示 MAMs 功能障碍可能是 AD 发病的核心病机之一^[7]。

因此, 本文围绕 Ca^{2+} 稳态、ER stress、线粒体自噬、线粒体分裂-融合平衡、脂质代谢、炎症等方面, 探讨 MAMs 功能障碍在 AD 发病机制中的相关性, 以期治疗 AD 的药物研发提供新思路, 发现治疗新靶点。

1 MAMs 的基本结构和功能

MAMs 是线粒体外膜和内质网膜之间的类突触

样的动态结构域, 其结构最早由 Vance JE 于 1990 年在大鼠肝组织中分离并命名^[8], 后经证实线粒体外膜和内质网膜二者的间距约在 5~25 nm 之间, 虽近但未重叠。真核细胞具有多种功能各异的膜结构细胞器, 其信号传递与物质交换依赖细胞器之间的特殊连接, 而 MAMs 就是介于线粒体与内质网之间相互通信的膜结构^[9]。

MAMs 基本结构由内质网膜、线粒体外膜和 MAMs 蛋白组成。内质网是细胞内最大的细胞器, 是蛋白质合成、转运与折叠、脂质和类固醇合成、碳水化合物代谢和钙储存的主要场所^[10], 其功能运行需要 MAMs 相关蛋白、独特的物理结构以及细胞内环境变化的相互协调。内质网膜与线粒体紧密结合, 形成 MAMs 的结构基础。线粒体是真核细胞中重要的细胞器, 主要参与细胞的有氧呼吸和能量产生及代谢过程, 又称为细胞的“能量工厂”^[11]。线粒体由内膜、外膜和基质组成, 外膜上具有许多孔道蛋白质, 称为线粒体外膜通道 (mitochondrial outer membrane channels, MOMCs)。线粒体外膜除了维持线粒体结构完整性之外, 其膜上蛋白还参与了能量转运、细胞内通信和细胞凋亡调控等功能。研究发现, MAMs 上富集的蛋白质多达 1300 多种, 种类繁多且功能复杂^[12], 如电压依赖性阴离子通道 (voltage-dependent anion channels, VDACs)、线粒体融合蛋白 1/2 (mitofusin 1/2, Mfn1/2)、内质网膜上的肌醇 1, 4, 5-三磷酸受体 (inositol-1, 4, 5-triphosphate receptor, IP3R)、葡萄糖调节蛋白 75 (glucose regulatory protein 75, Grp75)、蛋白酪氨酸激酶相互作用蛋白 51 (protein tyrosine phosphatase interacting protein 51, PTPIP51)、肌醇需求激酶-1 (inositolrequiringenzyme-1, IRE1)、囊泡相关膜蛋白 B (vesicle associated membrane protein, VAPB) 等^[13-14]。这些蛋白质在 MAMs 中主要参与调节钙转运、脂质代谢、线粒体分裂与融合等功能, 共同维持和调节 MAMs 的功能运转。因此 MAMs 不仅介导细胞器之间的蛋白质联系, 同时参与信号转导通路中蛋白分子的快速交换及细胞间的多种生命活动^[15]。

2 MAMs 参与 AD 发病的病理机制

2.1 调节 Ca^{2+} 稳态

Ca^{2+} 作为细胞内信号转导的第二信使,参与神经元的发育、增殖及分化,在维持神经元兴奋性、线粒体及内质网 Ca^{2+} 稳态、神经递质释放、突触可塑性方面发挥关键作用。 Ca^{2+} 稳态失衡是神经元死亡的共同通路,也是引起 $\text{A}\beta$ 神经毒性的关键因素,其代谢紊乱与 $\text{A}\beta$ 过度沉积、tau 蛋白过度磷酸化、活性氧自由基生成增多、神经免疫炎症等相关,是诱导 AD 发病的重要原因之一^[16]。MAMs 作为特殊的 Ca^{2+} 转运微结构域,在维持正常神经元功能方面起着重要作用。位于 MAMs 的 IP3R-Grp75-VDAC 复合体参与调控内质网-线粒体之间的 Ca^{2+} 转运,在机体衰老的病理条件下,通过增强 IP3R-Grp75-VDAC 复合体相互作用,引起内质网向线粒体 Ca^{2+} 转运增加,导致线粒体 Ca^{2+} 超载。研究发现,应用 RNA 干扰技术可特异性下调星形胶质细胞 IP3R 表达,降低细胞内 Ca^{2+} 水平,有效拮抗 $\text{A}\beta_{1-42}$ 引发的细胞 ER stress 水平,并改善 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆障碍、突触结构紊乱及功能异常^[17]。一项基础实验显示,脑还丹通过下调 APP/PS1 小鼠海马细胞内 Ca^{2+} 浓度,减轻下游的细胞功能损害,改善 AD 小鼠学习记忆损伤,进一步证实了 Ca^{2+} 超载与 AD 发病之间的关联性^[18]。Liang 等^[19] 运用小鼠神经母细胞瘤 N2a 细胞为载体,证实过表达 ApoE4 ($\Delta 272-299$) 可增强 Grp75 释放,增加 MAMs 形成,促进内质网-线粒体 Ca^{2+} 转运和线粒体 Ca^{2+} 超载,进而触发 ER stress,加剧神经元线粒体功能障碍。Wang 等^[20] 研究发现,MAMs 上的 APP 和 α -突触核蛋白通过 IP3R-Grp75-VDAC 轴协同调节线粒体 Ca^{2+} 摄取和转运,促进线粒体 Ca^{2+} 释放。当敲除 APP 或 α -突触核蛋白基因时,会导致海马神经元变性,线粒体 Ca^{2+} 超载、线粒体有氧呼吸增强和 ER stress,最终导致 AD 大鼠海马神经元过度凋亡和空间记忆障碍。内质网是神经元内 Ca^{2+} 的主要储存场所,肌浆网上的 Ca^{2+} -ATP 酶 (SERCA) 不仅是细胞内 Ca^{2+} 水平的关键调节者^[21],同时 MAMs 中多种蛋白质调节其功能,负责调控内质网中的 Ca^{2+} 摄取^[22]。Krajnak 等^[23] 使用 SERCA 激动剂 CDN1163 可显著增加 HeLa 细胞内质网 Ca^{2+} 水平,提高 APP/PS1 小鼠学习记忆能力,减少抑郁或绝望行为。上述研究表明, Ca^{2+} 超载和神经元凋亡是 AD 的主要

病理进程之一,可以通过调控 MAMs 募集的蛋白以及相关通路靶向调节线粒体和内质网 Ca^{2+} 的摄取与转运,避免线粒体 Ca^{2+} 的超载、维持 Ca^{2+} 稳态,维持线粒体功能,抵抗细胞凋亡,从而达到防治 AD 的目的。

2.2 调节内质网应激

当细胞面临环境压力或遗传等因素时,内质网稳态遭到破坏,导致蛋白质加工运输受阻,未折叠蛋白或错误折叠蛋白在内质网内聚集,导致 ER stress^[24]。机体在应对 ER stress 时,UPR 被激活,以重建内质网稳态;若 ER stress 过度并持续存在时,可启动凋亡级联反应诱导细胞死亡。UPR 主要通过 3 个跨膜蛋白,即 IRE1、蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) 和激活转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6) 来调节 ER stress,并通过与 MAMs 结合来调控内质网和线粒体之间的相互作用和通信^[25]。在 PERK 和 ATF6 双基因敲除小鼠模型中,海马区磷酸化 tau 蛋白 (p-tau) 和 $\text{A}\beta_{42}$ 积累增加,空间记忆功能障碍^[26]。在 AD 发病过程中, $\text{A}\beta$ 或 p-tau 持续积累导致内质网 Ca^{2+} 稳态急剧变化,从而发生蛋白质折叠异常和 ER stress^[27]。研究发现,开心散可调控 APP/PS1 小鼠海马内质网相关的 IRE1/剪切型 X-box 结合蛋白 1 (X-box binding protein 1, XBP1s) 通路,减轻 ER stress 损伤,抗海马神经元凋亡,提高 AD 小鼠学习记忆能力^[28]。Sharma 等^[29] 通过抑制雄性 C57BL/6 小鼠 CA1 区 PERK 表达水平以增强神经元的兴奋性,提高海马依赖性记忆,PERK 有望成为治疗年龄依赖性脑功能障碍的潜在靶点。内质网跨膜蛋白介导的 3 种信号通路并非独立存在,而是相互渗透相互影响,最终通过去除错误折叠的蛋白质来减少内质网负载使得蛋白质合成和转运减弱^[30]。由此可见,UPR 在维持海马神经元的蛋白质稳态、预防内质网过度应激以及保持 MAMs 结构和功能稳定方面起着至关重要的作用。基于此,调控 MAMs 相关蛋白介导的 UPR,避免过度持续地 ER stress,有望为 AD 治疗提供新靶点。

2.3 调节线粒体自噬

线粒体自噬是一种通过特异性清除细胞质中功能失调的线粒体,从而维持线粒体功能的完整性和细胞稳态的选择性自噬。在细胞遭受饥饿诱导时,自噬体的前体标记物和自噬相关基因会重新定

位到 MAMs 上,并保持在此位置直至自噬小体的形成过程完成。这一发现突显了 MAMs 在自噬体形成中的关键作用^[31]。在 AD 模型中,沉积的 A β 和病理性的 tau 蛋白会诱导活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生,增加自由基含量,导致线粒体功能障碍,引发线粒体自噬缺陷^[32]。PTEN 诱导激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)/Parkin 通路为调控线粒体自噬的重要信号通路,其通路相关蛋白如 VDAC1、自噬衔接蛋白 p62 (sequestosome-1, SQSTM1)、E3 泛素连接酶 gp78 均位于 MAMs 上,过表达 Parkin 能增强 MAMs 的结构和功能,促进 Ca²⁺ 从内质网向线粒体转移,增加线粒体中 ATP 的产生。Wang 等^[33]通过体外实验证实, Parkin 过表达可减轻 A β 诱导的人胚肾 293 细胞 (HEK293) 线粒体功能障碍,从而逆转线粒体异常并促进线粒体自噬。当 APP 转基因小鼠脑内神经元线粒体膜电位发生去极化时,募集至线粒体表面的 Parkin 增加,线粒体自噬增强^[34]。随着对 MAMs 研究领域的不断深入, MAMs 相关蛋白对线粒体自噬的影响在临床上也得到了证实。Castellazzi 等^[35]在一项临床研究发现, AD、轻度认知障碍及混合型痴呆患者血清样本中特定的自噬标记物自噬蛋白 5 (autophagy protein 5, ATG5) 和线粒体自噬标记物 Parkin 含量较对照组降低,由此可将血清中 ATG5 和 Parkin 水平作为早期诊断认知功能下降的生物标记物。另外,线粒体外膜 FUN14 结构域包含蛋白 1 (FUN14 domain containing 1, FUNDC1)^[36]、MAMs 上 VAPB-PTPIP51 复合物^[37]以及寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体^[38]均在线粒体自噬中起着关键作用,因此通过这些靶点来影响 AD 进程已成为科研工作者研究新思路。

2.4 调节线粒体分裂-融合动力学平衡

线粒体通过不断的分裂和融合以调控细胞能量稳态,而线粒体动力学紊乱引起过度碎片化是多种神经退行性疾病发生进展的中心环节,其中 MAMs 为线粒体分裂的初始场所^[39]。线粒体动力相关蛋白 (dynamin-related protein 1, Drp1) 是一种为线粒体提供分裂所需能量的 GTP 水解酶,史洛等^[40]认为 Drp1 水平过表达时,会导致线粒体分裂增多以及碎片化。Manczak 等^[41]通过 AD 患者以及 AD 小鼠脑组织病理实验得出, Drp1 与 A β 、p-tau 相互作用,导致线粒体过度碎裂,线粒体和突触功能

缺陷,最终导致神经元损伤和认知功能下降。Joshi 等^[42]在 A β 处理的神经元和 AD 患者来源的成纤维细胞中发现, Drp1 通过与线粒体分裂蛋白 1 (fission 1 protein, Fis1) 结合促使线粒体碎片化及功能障碍,而 Fis1 抑制剂 P110 可特异性地抑制 Drp1/Fis1 相互作用,减弱 A β ₄₂ 诱导的 Drp1 线粒体募集,改善线粒体结构异常和认知障碍。

与此相反,线粒体融合由 3 个 GTP 酶蛋白控制,分别是位于线粒体外膜的 Mfn1、Mfn2 以及位于线粒体内膜的视神经萎缩蛋白 1 (optic atrophy 1, OPA1)。其中, Mfn1 的 C-末端部分介导相邻线粒体的 Mfn 分子之间的寡聚,促进线粒体融合^[43]。sigma-1 受体 (sigma-1 receptor, Sig-1R) 是位于 MAMs 上的伴侣蛋白,通过调节线粒体动力学参与 AD 的内源性防御。与健康个体相比, AD 患者脑组织内 Sig-1R 含量较少^[44],而激活 Sig-1R 可抑制线粒体分裂,使线粒体复合物活性恢复正常,并降低线粒体 ROS 的水平^[45]。李泽惠等^[46]通过实验证明,益智清心方通过激活 MAMs 上 Sig-1R 受体,抑制 Drp1 活性和 Fis1 表达,促进 Mfn2 和 OPA1 的表达,恢复海马神经元线粒体分裂和融合的平衡,最终改善 APP/PS1 小鼠认知功能。由此可知, MAMs 是调节线粒体动力学的重要结构,线粒体分裂/融合平衡影响 AD 的预后及转归。

2.5 调节脂质代谢

脑组织中脂质含量丰富,脂质中甘油磷脂、鞘脂和胆固醇是构成神经元细胞膜的主要成分,参与突触形成、神经元发生和信息传递等功能。研究发现, AD 患者脑内老年斑周边胆固醇过多沉积^[47],神经元数目减少,突触丢失,而高胆固醇血症会导致胆碱能系统功能障碍、认知功能障碍,加重 A β 和 tau 蛋白病理^[48-49]。

在结构上, MAMs 类似于脂筏,参与脂质合成和运输、A β 代谢等生理过程,是促进脂质正常转运的一个关键平台^[50]。在 MAMs 中富集多种脂质转移蛋白和生物合成酶^[51],如胆固醇酰基转移酶-1 (acyl-coenzyme A: cholesterolacyltransferase-1, ACAT1)、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase, HMGCR)、三磷酸腺苷酶家族蛋白 3A (ATPase family AAA-domain containing protein 3A, ATAD3A)、 γ -分泌酶激活蛋白 (γ -secretase activating protein, GSAP)、磷脂酰丝氨酸合成酶 (phosphatidyl serine

synthetase, PSS) 等。Bryleva 等^[52]发现, ACAT1 基因敲除可增加 3×Tg-AD 小鼠脑内 24(S)-羟基胆固醇含量, 降低 A β 的异常沉积。将人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y 细胞) 的 ACAT1 基因位点沉默可减轻 A β ₂₅₋₃₅ 诱导的神经毒性^[53]。HMGCR 为内质网上的胆固醇合成限速酶, Cao 等^[54]对汉族人群 HMGCR 基因多态性和晚发型 AD 的相关性研究中发现, HMGCR 基因通过影响脑组织结构和葡萄糖代谢, 延缓右侧内嗅皮层和左侧海马萎缩。在 AD 细胞模型中, 未剪切的 APP-C99 片段在 MAMs 处聚集增加, 通过上调鞘脂周转率和 MAMs 活性, 破坏细胞脂质稳态, 导致 AD 细胞模型的膜脂质组成发生变化^[55-56]。ATAD3A 是定位于线粒体内膜的 ATP 酶, 其 C 端是位于线粒体基质中保守的 ATP 酶序列, 其 N 端通过脯氨酸序列与 MAMs 相互作用, Zhao 等^[57]运用多种 AD 模型发现, ATAD3A 寡聚化并聚集在 MAMs 上, 通过抑制 CYP46A1 基因表达诱导胆固醇在脑内蓄积, 促进 APP 剪切, 过量产生 A β 加速 AD 病理, 而抑制 ATAD3A 寡聚化有助于减轻 MAMs 结构紊乱, 减少胆固醇沉积, 延缓淀粉样病变, 改善 AD 神经炎症。GSAP 是一种选择性 γ 分泌酶调节蛋白, Xu 等^[58]通过高通量数据以及体内外实验得出, 在神经元中 GSAP 与 Fe65-PP1-APP 形成复合物, 调节 APP 磷酸化; GSAP 缺失降低了 APP-CTF 在 MAMs 中的分布和 γ -分泌酶活性, 通过上调细胞内磷脂酰乙醇胺含量、抑制酯酸鞘脂水平以维持脂质稳态平衡, 进而改善线粒体的结构与功能。在 GSAP 基因敲除的 AD 小鼠模型中认知功能得到了一定程度的改善。研究者在 AD 患者大脑中发现 GSAP 水平显著升高^[59], 当 GSAP 表达降低会引起 AD 小鼠模型和细胞中 A β 产生减少^[60-61]。这些结果表明, GSAP 通过其在 MAMs 定位以损伤线粒体功能, 其表达水平可能与 AD 易感性和严重程度相关。

2.6 调节炎症反应

神经炎症是继 A β 沉积、NFTs 之后的 AD 第三大病理特征, 其中炎症小体作为一种多蛋白复合体, 可介导炎症级联反应、细胞焦亡, 促进 AD 发病和进展。MAMs 是 NLRP3 炎症小体活化的重要场所^[62], 该复合物由 NLRP3 支架、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 (cystein-aspartate protease-1, caspase-1) 组成。在目

前的研究中, NLRP3 炎症小体被认为是与 MAMs 紧密相关的炎症小体复合物之一^[63]。未激活条件下, NLRP3 炎症小体多位于胞质中。ATP、成孔毒素、病毒 RNA 或颗粒物质的刺激导致溶酶体裂解, 触发 ROS 产生, 激活 NLRP3。活化的 NLRP3 招募 ASC 并重新分布到 MAMs 上, 在促炎刺激下 NLRP3 寡聚化并暴露其效应结构域与 ASC 相互作用, 招募 caspase-1 前体 (pro caspase-1), 生成成熟的白介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和白介素 18 (interleukin-18, IL-18)^[62]。IL-1 β 、IL-18 作为 NLRP3 炎症小体的下游蛋白在 AD 神经炎症方面起到推波助澜的作用。在 APP/PS1 小鼠模型中, NLRP3 炎症小体缺失促使小胶质细胞 M1 型向 M2 型极化, 脑内 A β 沉积减少^[64]。研究者在 tau22 转基因小鼠的海马中注射 APP/PS1 小鼠脑匀浆液后发现, tau 蛋白在该小鼠脑内出现高度磷酸化现象。而在 ASC 或 NLRP3 基因敲除的小鼠中, tau 蛋白磷酸化保持在正常水平^[65]。这一发现表明, NLRP3 炎症小体在 A β 诱导的 tau 蛋白病变过程中扮演了一定的角色, AD 患者可能从 NLRP3 为靶点的治疗策略中获益。朱琳琳等^[66]从临床研究发现, 与健康人群相比, AD 患者血清 NLRP3 水平明显升高, 且与病情的严重程度呈正相关。该研究进一步证实血清 NLRP3 可以加剧炎症反应并对 AD 患者病情发展带来诸多不利影响, NLRP3 可能成为早期诊断 AD 重要的生物标记物。

3 靶向 MAMs 治疗 AD 的策略

MAMs 参与了 AD 诸多病理级联反应, 靶向调控 MAMs 结构及功能来改善相应的表型, 可能是预防或治疗 AD 的一种潜在的治疗策略。Xestospongins 为高度选择性、可逆的 IP3R 抑制剂, 靶向 IP3R 介导的 Ca²⁺ 超载, 减轻海马区 A β 斑块沉积, 抑制 A β ₁₋₄₂ 诱导的 Ca²⁺ 内流, 下调 ER stress 相关蛋白表达, 改善 APP/PS1 小鼠的学习记忆障碍^[67]; 锂是第一个治疗双相情感障碍的情绪稳定剂, 具有广泛的神经保护及改善认知的作用。在 3×Tg-AD 小鼠中, 氯化锂可降低 IP3R 依赖的内质网 Ca²⁺ 信号异常, 抑制 tau 蛋白过度磷酸化水平, 增强突触可塑性^[68]。可溶性环氧化物水解酶 (soluble epoxide hydrolase, sEH, EPHX2 基因编码) 是一种环氧脂肪酸代谢的关键酶, 在衰老及 AD 模型中水平显著增高, 敲除 EPHX2 或抑制 EPHX2 活性可减弱炎症反

应。Grinán-Ferré 等^[69]证实,中枢性 sEH 抑制剂可抑制 AD 动物模型脑内炎症因子、氧化应激和 ER stress 标记物的表达,抑制 tau 过度磷酸化,减少淀粉样斑块数量,减轻 AD 模型认知障碍。美国食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA)批准用于治疗 AD 的药物乙酰胆碱酯酶抑制剂加兰他敏、利斯的明,经研究证实可降低 $A\beta_{25-35}$ 诱导的大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞株 PC12 细胞模型、链脲佐菌素诱导的认知障碍动物模型脑内 ER stress 标记物水平^[70-71]。小檗碱作为一种生物碱类天然化合物,已被证实可有效降低 ER stress,改善 UPR 功能障碍^[72]。2021 年, Liang 等^[73]通过运用 3×Tg-AD 小鼠模型发现小檗碱能够通过 PERK/真核细胞起始因子 2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF2 α) 信号抑制 β -分泌酶 1 (β -secretase 1, BACE1) 转录,进而减少 $A\beta$ 产生,减轻氧化应激损伤,抗神经元凋亡。

近年来中药复方作用于 MAMs 上 ER stress 相关通路已成为研究热点。地黄饮子通过调控 PERK/eIF2 α 通路,抑制能量代谢障碍导致的 ER stress,减少 $A\beta$ 累积,改善能量代谢损伤导致的认知功能下降,发挥抗 AD 作用^[74]。黄连解毒汤可有效抑制 APP/PS1 小鼠海马 XBP1 和 IRE1 蛋白表达,减轻神经元损伤,抑制神经元凋亡,促进 AD 小鼠认知功能恢复^[75]。补肾益智方及其 5 种主要活性成分通过靶向 ER stress 通路改善 AD 模型的学习记忆损伤;其中五味子酯乙和蛇床子素联合给药组在减轻 ER stress、抑制脑内淀粉样斑块沉积方面具有协同效应^[76]。

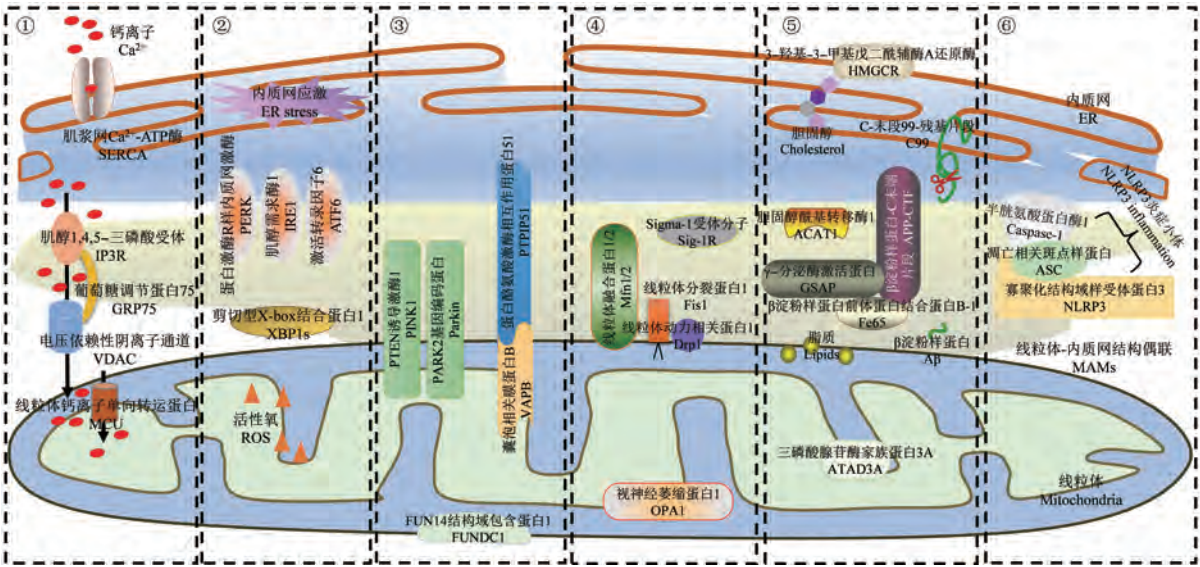
研究发现, Drp1 抑制剂 Mdivi-1 可抑制缺氧诱导的线粒体分裂、 $A\beta$ 生成^[77]。青蒿琥酯 (Artesunate, ART) 是青蒿素的一种水溶性衍生物,可穿过血脑屏障,通常用于脑型疟疾及各种危重症疾的抢救。实验表明 ART 可维持线粒体分裂-融合动力学平衡(特别是控制线粒体分裂蛋白 Drp1 和线粒体融合蛋白 OPA1 的表达)以减轻 AD 模型中的神经元损伤^[78]。在细胞模型中,过表达 Drp1 或

下调 OPA1 可显著消除 ART 对炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6 和 IL-1 β 的抑制作用。动物实验也证实, ART 通过减轻脑内神经炎症,维持线粒体分裂-融合动力学平衡和线粒体自噬,降低脑组织中可溶性和不可溶性 $A\beta_{1-42}$ 水平,减少 $A\beta$ 沉积,改善 AD 模型的认知功能。GSAP 在 $A\beta$ 生成、脂质代谢方面对 AD 病机演变起关键作用^[58,79], 研究发现伊马替尼通过抑制 GSAP 活性以减少 $A\beta$ 形成^[80]。Gupta 等^[81]运用计算机建模预测 GSAP 天然产物抑制剂的三维结构并验证其功能,发现两种天然化合物可显著破坏 GSAP 的原有性质,是 AD 治疗的潜在靶点。黄体酮通过抑制 AD 模型神经元 ACAT1 表达降低 MAMs 的长度和减少胆固醇酯在细胞内聚集,为从胆固醇代谢功能障碍治疗 AD 提供治疗新策略^[82]。Zhao 等^[57]将 ATAD3A 杂合基因敲除或应用抑制剂 DA1 阻断 ATAD3A 寡聚化,进而使 MAMs 结构及胆固醇转运正常化,抑制 APP 异常剪切和突触丢失,改善 AD 小鼠的认知功能及神经病理学改变。

4 讨论

MAMs 作为线粒体和内质网之间密切接触的特殊结构域,通过调节 Ca^{2+} 稳态、ER stress、线粒体自噬、线粒体分裂-融合平衡、脂质代谢、炎症反应等多个方面,维持细胞器之间结构和功能的稳定。近年来, MAMs 功能障碍在 AD 病理研究方面受到了广泛关注,也进一步证实了异常 Ca^{2+} 稳态、脂质代谢紊乱、线粒体功能障碍、自噬、氧化应激及炎症等病理特征早于 $A\beta$ 斑块沉积和 NFTs,通过干预 MAMs 参与的相关病理机制可能是治疗 AD 的潜在靶点和有效策略。但目前,对于 MAMs 的研究还处于不断探索阶段,以 MAMs 蛋白为靶点的 AD 药物研发的疗效有待进一步证实。我们期待更多的研究来探讨 MAMs 介导的相关机制在 AD 发病和治疗中的确切干预作用。

MAMs 在 AD 防治中的潜在作用靶点总结如图 1 所示。



注:线粒体-内质网结构偶联参与阿尔茨海默病发病的病理机制主要包括调节:①钙稳态;②内质网应激;③线粒体自噬;④线粒体分裂-融合动力学;⑤脂质代谢;⑥炎症反应。

图 1 MAMs 在 AD 防治中的潜在作用靶点

Note. The relationship between AD and MAMs function includes: ①Calcium homeostasis. ②Endoplasmic reticulum stress (ER stress). ③Mitophagy. ④ Mitochondrial fusion/fission dynamics. ⑤ Lipid metabolism. ⑥ Inflammation.

Figure 1 Potential targets of mitochondrial-associated membranes (MAMs) in the prevention and treatment of Alzheimer’s disease (AD)

参考文献:

[1] Alzheimer’s Disease International. World Alzheimer Report 2023 [EB/OL]. [2023 - 09 - 21]. <https://www.alzint.org/u/World-Alzheimer-Report-2023.pdf>.

[2] 2023 Alzheimer’s disease facts and figures [J]. Alzheimers Dement, 2023, 19(4): 1598-1695.

[3] ZHANG Y, CHEN H, LI R, et al. Amyloid β -based therapy for Alzheimer’s disease: challenges, successes and future [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 248.

[4] CONGDON E E, SIGURDSSON E M. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease [J]. Nat Rev Neurol, 2018, 14(7): 399-415.

[5] YU W, JIN H, HUANG Y. Mitochondria-associated membranes (MAMs): a potential therapeutic target for treating Alzheimer’s disease [J]. Clin Sci, 2021, 135(1): 109-126.

[6] LIU J, YANG J. Mitochondria-associated membranes: a hub for neurodegenerative diseases [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 149: 112890.

[7] AREA-GOMEZ E, SCHON E A. On the pathogenesis of Alzheimer’s disease: the MAM hypothesis [J]. FASEB J, 2017, 31(3): 864-867.

[8] VANCE J E. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria [J]. J Biol Chem, 1990, 265(13): 7248-7256.

[9] 王一昫, 曾炼, 丁旭东, 等. 线粒体相关内质网膜调节神经元自噬的研究进展 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(10): 1889-1894.

[10] WANG Y D, ZENG L, DING X D, et al. Progress in role of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes in regulating neuronal autophagy [J]. Chin J Pathophysiol, 2022, 38(10): 1889-1894.

[11] SCHWARZ D S, BLOWER M D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling [J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(1): 79-94.

[12] ANNESLEY S J, FISHER P R. Mitochondria in health and disease [J]. Cells, 2019, 8(7): 680.

[13] WANG X, WEN Y, DONG J, et al. Systematic In-depth proteomic analysis of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes in mouse and human testes [J]. Proteomics, 2018, 18(14): e1700478.

[14] LEE S, MIN K T. The interface between ER and mitochondria: molecular compositions and functions [J]. Mol Cells, 2018, 41(12): 1000-1007.

[15] PHAM J H, STANKOWSKA D L. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAMs) and their role in glaucomatous retinal ganglion cell degeneration-a mini review [J]. Front Neurosci, 2023, 17: 1198343.

[16] VAN VLIET A R, AGOSTINIS P. Mitochondria-associated membranes and ER stress [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2018, 414: 73-102.

[17] 姚辛敏, 李新新, 周佳, 等. 中药对阿尔茨海默病钙离子稳态干预的实验研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(1): 49-52.

[18] YAO X M, LI X X, ZHOU J, et al. Experimental research

- progress on traditional Chinese medicine in treatment of Alzheimer's disease by regulating and controlling calcium ions in steady state [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2018, 36(1): 49–52.
- [17] 李蔚然. 星形胶质细胞 IP3R 在阿尔茨海默病神经元突触功能障碍中的作用研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2022.
- LI W R. Study on the role of astrocyte IP3R in synaptic dysfunction of neurons in Alzheimer's disease [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2022.
- [18] 李进营, 黄启辉, 陶彦谷. 脑还丹对 APP/PS1 双转基因小鼠海马区学习记忆能力及细胞内钙离子浓度的影响 [J]. *新中医*, 2014, 46(6): 213–216.
- LI J Y, HUANG Q H, TAO Y G. Effects of cerebrotetrol on learning memory function and intracellular calcium ion concentration in the hippocampus of APP/PS1 double transgenic mice [J]. *J N Chin Med*, 2014, 46(6): 213–216.
- [19] LIANG T, HANG W, CHEN J, et al. ApoE4 (Δ 272-299) induces mitochondrial-associated membrane formation and mitochondrial impairment by enhancing GRP75-modulated mitochondrial calcium overload in neuron [J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 50.
- [20] WANG Y, MIAO Z, XU C, et al. Pathological convergence of APP and SNCA deficiency in hippocampal degeneration of young rats [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(5): 325.
- [21] BRITZOLAKI A, CRONIN C C, FLAHERTY P R, et al. Chronic but not acute pharmacological activation of SERCA induces behavioral and neurochemical effects in male and female mice [J]. *Behav Brain Res*, 2021, 399: 112984.
- [22] LI Y E, SOWERS J R, HETZ C, et al. Cell death regulation by MAMs: from molecular mechanisms to therapeutic implications in cardiovascular diseases [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(5): 504.
- [23] KRAJNAK K, DAHL R. A new target for Alzheimer's disease: a small molecule SERCA activator is neuroprotective *in vitro* and improves memory and cognition in APP/PS1 mice [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28(9): 1591–1594.
- [24] OAKES S A, PAPA F R. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology [J]. *Annu Rev Pathol*, 2015, 10: 173–194.
- [25] CARRERAS-SUREDA A, PIHÁN P, HETZ C. The unfolded protein response: At the intersection between endoplasmic reticulum function and mitochondrial bioenergetics [J]. *Front Oncol*, 2017, 7: 55.
- [26] LIU P, KARIM M R, COVELO A, et al. The UPR maintains proteostasis and the viability and function of hippocampal neurons in adult mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(14): 11542.
- [27] GHEMRRAWI R, KHAIR M. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): 6127.
- [28] XU Y M, LU F M, XU H C, et al. Kai-Xin-San improves cognitive impairment via Wnt/ β -catenin and IRE1/XBP1s signalings in APP/PS1 mice [J]. *Rejuvenation Res*, 2023, 26(3): 105–115.
- [29] SHARMA V, OUNALLAH-SAAD H, CHAKRABORTY D, et al. Local inhibition of PERK enhances memory and reverses age-related deterioration of cognitive and neuronal properties [J]. *J Neurosci*, 2018, 38(3): 648–658.
- [30] NAGAR P, SHARMA P, DHAPOLA R, et al. Endoplasmic reticulum stress in Alzheimer's disease: Molecular mechanisms and therapeutic prospects [J]. *Life Sci*, 2023, 330: 121983.
- [31] HAMASAKI M, FURUTA N, MATSUDA A, et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 389–393.
- [32] MARY A, EYSERT F, CHECLER F, et al. Mitophagy in Alzheimer's disease: Molecular defects and therapeutic approaches [J]. *Mol Psychiatry*, 2023, 28(1): 202–216.
- [33] WANG H, ZHANG T, GE X, et al. Parkin overexpression attenuates A β -induced mitochondrial dysfunction in HEK293 cells by restoring impaired mitophagy [J]. *Life Sci*, 2020, 244: 117322.
- [34] YE X, SUN X, STAROVOYTOV V, et al. Parkin-mediated mitophagy in mutant hAPP neurons and Alzheimer's disease patient brains [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(10): 2938–2951.
- [35] CASTELLAZZI M, PATERGNANI S, DONADIO M, et al. Autophagy and mitophagy biomarkers are reduced in sera of patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 20009.
- [36] WANG C, DAI X, WU S, et al. FUNDC1-dependent mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes are involved in angiogenesis and neoangiogenesis [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2616.
- [37] LAU D H W, PAILLUSSON S, HARTOPP N, et al. Disruption of endoplasmic reticulum-mitochondria tethering proteins in post-mortem Alzheimer's disease brain [J]. *Neurobiol Dis*, 2020, 143: 105020.
- [38] 马倩, 石胜良. 线粒体自噬与核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 炎性体在阿尔茨海默病中的关系研究进展 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2021, 23(6): 667–669.
- MA Q, SHI S L. Research progress on the relationship between mitochondrial autophagy and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammasome in Alzheimer's disease [J]. *Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis*, 2021, 23(6): 667–669.
- [39] FRIEDMAN J R, LACKNER L L, WEST M, et al. ER tubules mark sites of mitochondrial division [J]. *Science*, 2011, 334(6054): 358–362.
- [40] 史沼, 邵思迈, 余姊阳, 等. 线粒体动力相关蛋白 1 与阿尔茨海默病 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(2): 114–119.
- SHI M, SHAO S M, YU Z Y, et al. Mitochondrial dynamin-related protein 1 and Alzheimer's disease [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(2): 114–119.
- [41] MANCZAK M, REDDY P H. Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein Drp1 and hyperphosphorylated tau in

- Alzheimer's disease neurons; implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage [J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(11): 2538-2547.
- [42] JOSHI A U, SAW N L, SHAMLOO M, et al. Drp1/Fis1 interaction mediates mitochondrial dysfunction, bioenergetic failure and cognitive decline in Alzheimer's disease [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(5): 6128-6143.
- [43] PRADEEPKIRAN J A, REDDY P H. Defective mitophagy in Alzheimer's disease [J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 64: 101191.
- [44] PENKE B, FULOP L, SZUCS M, et al. The role of sigma-1 receptor, an intracellular chaperone in neurodegenerative diseases [J]. *Curr Neuroparmacol*, 2018, 16(1): 97-116.
- [45] NAIJA, LY P, MOTA S I, et al. The sigma-1 receptor mediates pridopidine rescue of mitochondrial function in Huntington disease models [J]. *Neurotherapeutics*, 2021, 18(2): 1017-1038.
- [46] 李泽惠, 张业昊, 曹宇, 等. 益智清心方调控线粒体分裂融合改善阿尔茨海默病小鼠认知功能的机制研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2023, 29(7): 1096-1102.
LI Z H, ZHANG Y H, CAO Y, et al. Study on mechanism of Yizhi Qingxin formula regulating mitochondrial fission fusion on improving cognitive function of Alzheimer's disease mice [J]. *J Basic Chin Med*, 2023, 29(7): 1096-1102.
- [47] XIONG H, CALLAGHAN D, JONES A, et al. Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Abeta production [J]. *Neurobiol Dis*, 2008, 29(3): 422-437.
- [48] CHANG T Y, YAMAUCHI Y, HASAN M T, et al. Cellular cholesterol homeostasis and Alzheimer's disease [J]. *J Lipid Res*, 2017, 58(12): 2239-2254.
- [49] SCALA C D, CHAHINIAN H, YAHN N, et al. Interaction of Alzheimer's β -amyloid peptides with cholesterol: mechanistic insights into amyloid pore formation [J]. *Biochemistry*, 2014, 53(28): 4489-4502.
- [50] FERNANDES T, DOMINGUES M R, MOREIRA P I, et al. A perspective on the link between mitochondria-associated membranes (MAMs) and lipid droplets metabolism in neurodegenerative diseases [J]. *Biology*, 2023, 12(3): 414.
- [51] AREA-GOMEZ E, SCHON E A. Mitochondria-associated ER membranes and Alzheimer disease [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2016, 38: 90-96.
- [52] BRYLEVA E Y, ROGERS M A, CHANG C C Y, et al. *ACAT1* gene ablation increases 24(S)-hydroxycholesterol content in the brain and ameliorates amyloid pathology in mice with AD [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(7): 3081-3086.
- [53] CHEN Y, ZHU L, JI L, et al. Silencing the *ACAT1* gene in human SH-SY5Y neuroblastoma cells inhibits the expression of cyclo-oxygenase 2 (COX2) and reduces β -amyloid-induced toxicity due to activation of protein kinase C (PKC) and ERK [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 9007-9018.
- [54] CAO L, WANG H F, TAN L, et al. Effect of HMGCR genetic variation on neuroimaging biomarkers in healthy, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease cohorts [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(12): 13319-13327.
- [55] PERA M, LARREA D, GUARDIA-LAGUARTA C, et al. Increased localization of APP-C99 in mitochondria-associated ER membranes causes mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease [J]. *EMBO J*, 2017, 36(22): 3356-3371.
- [56] MONTESINOS J, PERA M, LARREA D, et al. The Alzheimer's disease-associated C99 fragment of APP regulates cellular cholesterol trafficking [J]. *EMBO J*, 2020, 39(20): e103791.
- [57] ZHAO Y, HU D, WANG R, et al. ATAD3A oligomerization promotes neuropathology and cognitive deficits in Alzheimer's disease models [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1121.
- [58] XU P, CHANG J C, ZHOU X, et al. GSAP regulates lipid homeostasis and mitochondrial function associated with Alzheimer's disease [J]. *J Exp Med*, 2021, 218(8): e20202446.
- [59] SATOH J, TABUNOKI H, ISHIDA T, et al. Immunohistochemical characterization of γ -secretase activating protein expression in Alzheimer's disease brains [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2012, 38(2): 132-141.
- [60] HE G, LUO W, LI P, et al. Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2010, 467(7311): 95-98.
- [61] WONG E, LIAO G P, CHANG J C, et al. GSAP modulates γ -secretase specificity by inducing conformational change in PS1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(13): 6385-6390.
- [62] MISSIROLI S, PATERGNANI S, CAROCCIA N, et al. Mitochondria-associated membranes (MAMs) and inflammation [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 329.
- [63] ZHOU R, YAZDI A S, MENU P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation [J]. *Nature*, 2011, 469(7329): 221-225.
- [64] HENEKA M T, KUMMER M P, STUTZ A, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice [J]. *Nature*, 2013, 493(7434): 674-678.
- [65] ISING C, VENEGAS C, ZHANG S, et al. NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology [J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 669-673.
- [66] 朱琳琳, 季晶, 朱婷, 等. 血液 NLRP3 Lp-PLA2 联合 CER 对阿尔茨海默病的诊断价值及与 UPDRS 功能的相关性 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2022, 25(11): 1336-1341.
ZHU L L, JI J, ZHU T, et al. Diagnostic value of serum NLRP3, Lp-PLA2 combined with CER in Alzheimer's disease and its correlation with UPDRS function [J]. *Chin J Pract Nerv Dis*, 2022, 25(11): 1336-1341.
- [67] WANG Z J, ZHAO F, WANG C F, et al. Xestospongins C, a reversible IP3 receptor antagonist, alleviates the cognitive and pathological impairments in APP/PS1 mice of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2019, 72(4): 1217-1231.
- [68] WISEMAN A L, BRIGGS C A, PERITT A, et al. Lithium provides broad therapeutic benefits in an Alzheimer's disease mouse model [J]. *J Alzheimers Dis*, 2023, 91(1): 273-290.

[69] GRIÑÁN-FERRÉ C, CODONY S, PUJOL E, et al. Pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase as a new therapy for Alzheimer's disease [J]. *Neurotherapeutics*, 2020, 17(4): 1825–1835.

[70] LIU X, XU K, YAN M, et al. Protective effects of galantamine against Abeta-induced PC12 cell apoptosis by preventing mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress [J]. *Neurochem Int*, 2010, 57(5): 588–599.

[71] GUPTA P, TIWARI S, SINGH A, et al. Rivastigmine attenuates the Alzheimer's disease related protein degradation and apoptotic neuronal death signalling [J]. *Biochem J*, 2021, 478(7): 1435–1451.

[72] XUAN W T, WANG H, ZHOU P, et al. Berberine ameliorates rats model of combined Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus via the suppression of endoplasmic reticulum stress [J]. *3 Biotech*, 2020, 10(8): 359.

[73] LIANG Y, YE C, CHEN Y, et al. Berberine improves behavioral and cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease via regulation of β -amyloid production and endoplasmic reticulum stress [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12(11): 1894–1904.

[74] 张志辰, 温彬宇, 高俊峰, 等. 地黄饮子调节 PERK/eIF2 α 通路抑制能量代谢障碍 AD 小鼠脑内 β 淀粉样蛋白累积的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(21): 91–98.

ZHANG Z C, WEN B Y, GAO J F, et al. Effect and mechanism of Dihuang Yinzi on cerebral β -amyloid accumulation by depressing PERK/eIF2 α pathway in energy inhibited AD mice [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2018, 24(21): 91–98.

[75] 柴学森, 王振川, 李莹, 等. 黄连解毒汤抑制 APP/PS1 小鼠内质网应激改善海马神经元损伤 [J]. *解剖科学进展*, 2022, 28(6): 657–661.

CHAI X S, WANG Z C, LI Y, et al. HuanglianJiedu Decoction inhibits endoplasmic reticulum stress to improve hippocampal neuron damage in APP/PS1 mice [J]. *Prog Anat Sci*, 2022, 28(6): 657–661.

[76] LIU J, WU Q, WU Q, et al. Modulating endoplasmic reticulum stress in APP/PS1 mice by Gomisin B and Osthole in Bushen-Yizhi formula: Synergistic effects and therapeutic implications for Alzheimer's disease [J]. *Phytomedicine*, 2023, 119: 155023.

[77] YUAN Y, CHEN J, GE X, et al. Activation of ERK-Drp1 signaling promotes hypoxia-induced A β accumulation by upregulating mitochondrial fission and BACE1 activity [J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(10): 2740–2755.

[78] QIN Y R, MA C Q, JIANG J H, et al. Artesunate restores mitochondrial fusion-fission dynamics and alleviates neuronal injury in Alzheimer's disease models [J]. *J Neurochem*, 2022, 162(3): 290–304.

[79] JIN C, WANG J, WANG Y, et al. Modulation of amyloid precursor protein cleavage by γ -secretase activating protein through phase separation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(12): e2122292119.

[80] CHU J, LAURETTI E, CRAIGE C P, et al. Pharmacological modulation of GSAP reduces amyloid- β levels and tau phosphorylation in a mouse model of Alzheimer's disease with plaques and tangles [J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 41(3): 729–737.

[81] GUPTA M K, VADDE R. In silico identification of natural product inhibitors for γ -secretase activating protein, a therapeutic target for Alzheimer's disease [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 10323–10336.

[82] SHI W, WU H, LIU S, et al. Progesterone suppresses cholesterol esterification in APP/PS1 mice and a cell model of Alzheimer's Disease [J]. *Brain Res Bull*, 2021, 173: 162–173.

[收稿日期]2024-01-17

张昂,杜燕,谢洋,等. 脂质组学在慢性肺部疾病生物标志物发现中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 131-141.
Zhang A, Du Y, Xie Y, et al. Lipidomics driven biomarker discovery in chronic lung disease [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 131-141.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.015

脂质组学在慢性肺部疾病生物标志物发现中的应用

张 昂^{1,2}, 杜 燕^{1,2,3}, 谢 洋^{1,2,4}, 刘新光^{1,2,3*}

(1.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;
2.河南省中医药防治呼吸病重点实验室,郑州 450046;3.河南中医药大学中医药科学院,郑州 450046;
4.河南中医药大学第一附属医院,郑州 450000)

【摘要】 慢性肺部疾病(CLD)通常包括慢性阻塞性肺疾病、哮喘、特发性肺纤维化等。研究表明,CLD 与脂质代谢紊乱密切相关,因此脂质作为 CLD 的生物标志物,对于疾病的诊断、预防及治疗过程中的监控可能有着重要价值。本文从脂质组学技术方法、脂质组学临床样本选择、CLD 生物标志物发现和 CLD 不同中医证候区分 4 个方面讨论脂质组学在 CLD 生物标志物研究中的应用。

【关键词】 脂质组学;慢性阻塞性肺疾病;哮喘;特发性肺纤维化;生物标志物;中医

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0131-11

Lipidomics driven biomarker discovery in chronic lung disease

ZHANG Ang^{1,2}, DU Yan^{1,2,3}, XIE Yang^{1,2,4}, LIU Xinguang^{1,2,3*}

(1. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Disease Co-constructed by Henan Province & Education Ministry of P. R. China, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.
2. Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease, Zhengzhou 450046. 3. Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046. 4. the First Affiliated Hospital of Henan University of CM Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Chronic lung diseases (CLD) include chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and idiopathic pulmonary fibrosis. Studies have shown that CLD are closely related to disorders in lipid metabolism. Therefore, lipids, as biomarkers of CLD, may be of great value in the diagnosis, prevention, and monitoring of disease treatment. This review discusses lipidomics from four major aspects: the technical methods of lipidomics, the selection of clinical samples for lipidomics, the discovery of biomarkers for CLD, and the differentiation of traditional Chinese medicine syndromes from CLD.

【Keywords】 lipidomics; chronic obstructive pulmonary disease; asthma; idiopathic pulmonary fibrosis; biomarkers; traditional Chinese medicine

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

慢性肺部疾病(chronic lung diseases,CLD)是一类复杂性、进展性肺部疾病,以慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)、哮喘和特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis,

【基金项目】国家重点研发计划(2018YFC1704806);国家自然科学基金面上项目(82274274);国家重点研发计划中医药现代化重点专项 2023 年度“揭榜挂帅”项目(2023YFC3502605);河南省省级科技研发计划联合基金(优势学科培育类)(222301420020)。

【作者简介】张昂(1994—),女,硕士,研究方向:中医药防治呼吸病基础研究。E-mail:zhangang2019@163.com

【通信作者】刘新光(1987—),男,博士,硕士生导师,研究方向:中医药防治呼吸病基础研究。E-mail:xgliu2016@126.com

IPF)临床上最为常见。由于症状复杂、特征性低,CLD 的诊断在临床上均存在着一定困难。COPD 以不可逆的气流受限、黏液分泌过多和慢性气道炎症为特征,病情多呈进展性,其发生与吸烟、环境因素及有害颗粒或气体的吸入、呼吸道病史等因素有关^[1],会出现肺气肿、小气道重塑、支气管炎等多种病理表现^[2]。肺活量测定法是目前 COPD 临床诊断的主要方法,即采用肺活量法测量 1 秒钟用力呼气量(forced expiratory volume in one second, FEV1)和用力肺活量(forced vital capacity, FVC)的比值(FEV1/FVC)作为阻塞性或限制性通气缺陷^[3]的指标。然而,由于 FEV1 等指标也会随着年龄增长而自然下降,依据肺活量测定法常常会将正常的老年人误诊为 COPD^[4-5]。哮喘以气道炎症和可变的呼气气流受限为特征,主要表现为气喘、呼吸短促、胸闷等症状^[6]。哮喘早期诊断主要通过临床评估、病史和肺功能检查来确诊^[7]。临床上,哮喘和 COPD 患者均可表现呼吸困难、气喘等症状,往往难以区分^[8-9]。特发性肺纤维化(IPF)也是一种慢性、进行性肺部疾病^[10],其特征是肺泡上皮细胞损伤、成纤维细胞增殖和细胞外基质积累,导致肺结构的不可逆扭曲^[11]。IPF 临床症状缺乏特异性,确诊时患者往往已处于疾病终末期,除肺移植外尚缺乏有效的治疗手段,预后极差,因此早期诊断和治疗干预对改善预后有重要意义^[12]。IPF 的诊断金标准是肺组织病理检查,但属于有创操作,临床操作困难^[13-14]。

生物标志物是指可以标记系统、器官、组织、细

胞及亚细胞结构或功能发生改变的生化指标^[15]。一些研究表明,CLD 与脂质代谢紊乱密切相关,提示脂质作为 CLD 的生物标志物,对于疾病的早期诊断、预防及治疗过程中的监控可能有着重要价值。脂质组学作为一种“组学”方法,基于系统平台全面测量细胞、组织和生物体^[16]的脂质成分,并通过统计分析来确定差异脂质代谢物,是寻找诊断 CLD 的脂质生物标志物的有效方法。在这篇综述中,我们讨论了脂质组学作为 COPD、IPF 和哮喘脂质生物标志物发现方法的研究现状,为相关科研人员提供参考。

1 脂质组学

脂质组学是代谢组学的一个分支,是系统研究细胞、组织或生物体内所有脂质的学科,是研究机体脂质代谢的主要分析手段^[17]。质谱(mass spectrometry, MS)以高灵敏度、高分辨率优势成为目前脂质组学研究的主流技术,已应用于许多疾病的生物标志物筛选^[18-20]。基于质谱的脂质组学分析策略主要有 3 种:非靶向脂质组学、靶向脂质组学和拟靶向脂质组学,其工作流程见图 1^[21]。非靶向脂质组学是在没有目标脂质分子信息的情况下,对提取的样品中所有脂类(或某种脂类)进行全面和无偏的分析^[20]。该方法首先检测样本中“所有”离子的特征信息,包括精确的质量(m/z)、保留时间及峰面积等,并通过多变量统计等方法筛选差异离子,再利用人类代谢组数据库(human metabolome database, HMDB)、Lipid Maps 及 LipidBlast 等数据库

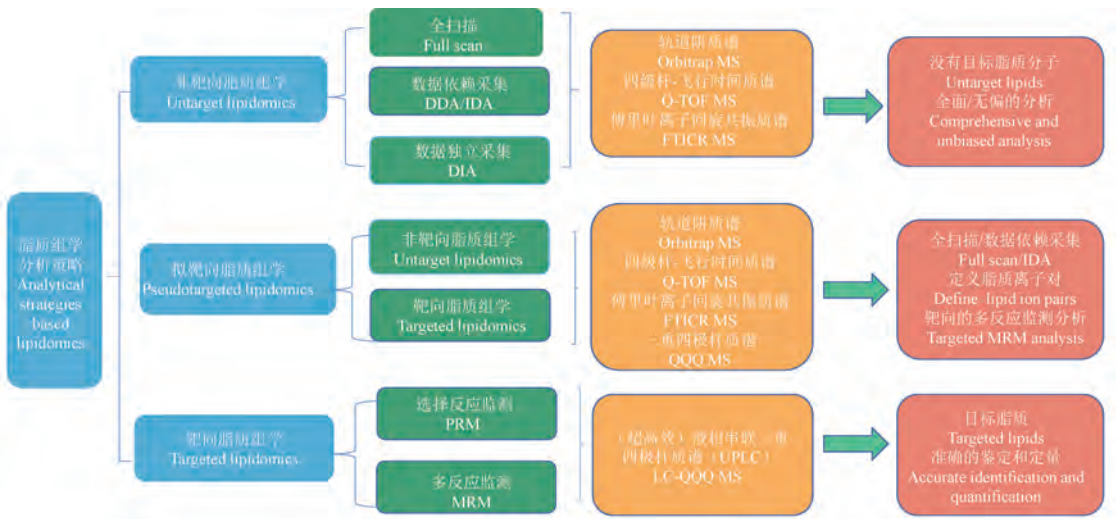


图 1 脂质组学分析策略
Figure 1 Analytical strategies based lipidomics

搜索离子的精确质量信息或二级谱图进行鉴定,获得脂质生物标志物^[22]。高分辨质谱(high resolution mass spectrum, HRMS)由于其强大的质量分辨率和高质量精度,特别适合阐明脂质结构组成,是非靶向脂质组学分析的首选,如四级杆-飞行时间质谱((quadrupole) time-of-flight mass spectrometry, Q-TOF MS)、轨道阱质谱(orbitrap mass spectrometry, Orbitrap MS)和傅里叶离子回旋共振质谱(fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, FTICR MS)^[21]。数据依赖采集(data-dependent acquisition, DDA/information-dependent acquisition, IDA)和数据独立采集(data-independent acquisition, DIA)模式是非靶向脂质组学中两种主要的 MS/MS 扫描模式^[22], DDA/IDA 是一种经典的用于非靶向分析的质谱数据采集模式,该模式能自动挑选丰度较高的前体离子为目标离子,使其依次进入碰撞池解离并得到子离子谱图,但容易忽略强度较低的离子^[23]。与 DDA/IDA 相比较, DIA 具有更高的灵敏度、动态范围和分析通量。DIA 技术可以在监测窗口内获取所有前体离子的 MS/MS 光谱,以获得全质量范围内完整的 MS/MS 数据。但 DIA 数据分析比较复杂,随着多种数据分析方法的提出, DIA 技术非靶向脂质组分析中会得到更广泛的应用^[21,24]。靶向脂质组学是对可获得标准物质的目标脂质进行准确的鉴定和定量^[25],具有更高的准确性和敏感性。多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)或选择性反应监测(parallel-reaction monitoring, PRM)模式是靶向脂质组学中主要的定量模式,(超高效)液相串联三重四极杆质谱((ultra performance) liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, (UPLC) LC-QQQ MS)为靶向脂质组学常用的仪器^[26],其优势在于对生物样品中大多数脂类的分析具有线性范围宽、灵敏度和稳定性高等特点^[27]。在靶向脂质组学分析策略中, MRM 模式可以选择性监测与结构密切相关的前体离子和相应的产物离子,有助于异构体的鉴别。同时,基于 QQQ 的 MRM 模式的高灵敏度特性在低丰度分析物的定量方面具有显著优势^[28],可以被认为是脂质定量的金标准。在 HRMS 上实现的 PRM 模式可以被认为是一种 MRM 的替代技术。PRM 可以在四极杆中选择感兴趣的前体离子,检测生成的特征片段,增加脂质组的覆盖范围^[29-31]。由于 HRMS 高质量的精度和 m/z , PRM 模式可以更准确地识别前体

离子和碎片,消除假阳性,弥补了 MRM 模式的不足。此外, PRM 可以在不预选离子对的情况下收集特定前体离子对应的整个 MS/MS 信息,而不是在实验前提供优化碰撞能量的前体离子-产物离子列表,这使我们有更多的量子离子选择^[21]。但 PRM 扫描速率相对较低,无法同时定量大量脂质分子。拟靶向脂质组学融合了非靶向脂质组学和靶向脂质组学策略,即基于非靶向脂质组学方法的信息,利用靶向技术实现高覆盖率的脂质组学数据采集^[20]。完整的拟靶向脂质组学分析程序包括^[21]:(1)基于 HRMS 的非靶向脂质组学技术分析感兴趣的混合生物基质,进行全扫描或基于 IDA 扫描,以收集丰富的 MS/MS 片段离子;(2)基于非靶向脂质组学分析产生的特征片段离子和对应的母离子定义脂质离子对;(3)利用 QQQ-MS 对构建的脂质离子对进行高覆盖的动态 MRM 分析。综上,非靶向脂质组学策略通过全面的脂质分析,可筛选出的化合物数量最多,并在发现新的差异脂质或脂质类别方面具有优势,非常适合筛选与疾病相关的新型脂质生物标志物,但使用的全扫描分析模式灵敏度较低,背景离子同时也会干扰统计分析^[21]。相比之下,靶向脂质组学适合对少数目标脂质进行分析,优化的 MRM 模式可以提供高灵敏度的定量分析^[32]。而拟靶向策略介于两者之间,结合了非靶向脂质组学和靶向脂质组学的优点,具有灵敏度高、可靠性好、线性范围宽、覆盖率高、数据处理方便等优势^[21]。

2 脂质组学研究的临床样本选择

血浆和血清是从血液中获得两种不同基质^[33-34],由于其易获得性,通常作为临床首选的脂质组学样本来源^[35]。采集血清时采血管含有促凝剂或不含添加剂,血液采集后放置于室温下 30~60 min^[36-38],凝血后离心取上清,储存于-80℃备用。在血浆采集中,应放入含有抗凝剂的采集管中制备,以尽量减少凝血。乙二胺四乙酸 K_2EDTA 是临床常用的抗凝剂,也是目前脂质组学研究中最常用的抗凝剂,其他常见的抗凝血剂包括肝素和枸橼酸钠^[35]。其中, EDTA 与枸橼酸钠可以与钙离子结合成螯合物,从而阻止血液凝固,而肝素主要通过阻止凝血酶形成,而起到抗凝的作用。因此,以钙依赖方式产生或降解的脂类应尽量避免选用 EDTA 与枸橼酸钠抗凝^[39-40]。在整个研究过程中应当使用

相同的抗凝剂,并保证进行比较研究的实验中抗凝剂选用的一致性^[35]。在凝血过程中,细胞外囊泡或血小板、白细胞和红细胞会释放各种脂质和脂质修饰酶,从而影响脂质检测^[35],另一方面,凝血的时间和环境在实际操作过程中常常难以保持一致。因此,从抗凝全血中获得的血浆比血清更适合进行脂质组分析^[34-35,40-42]。

呼出气冷凝液(exhaled breath condensate, EBC)、痰液和支气管肺泡灌洗液等与呼吸疾病高度相关的样品基质也可以用于 CLD 的风险评估^[43]。相比于反应机体全系统状态的血液,这些样本更能体现出肺部的病理变化。呼出气冷凝液、诱导痰液属于非损伤采样,获取方便,缺点在于采集过程容易受到口腔环境污染,且采集的呼出气冷凝液样本来源于整个气道,难以定位变化,而诱导痰液不能短时间重复采样^[44-53]。呼出气冷凝液主要通过定制的收集装置进行采集。受试者用纯净水漱口后进行采样,采样过程中深吸气至肺部充满气体后,通过吹气口均匀呼出,采集到设定体积,并根据呼气时间与采样体积计算平均采集流量。与其他的采样方法相比,通过冷却呼出气体来收集 EBC 操作简单,无创,易于重复,不会引起气道炎症,影响气道功能,使重复采样成为可能,但主要的缺点是唾液污染^[43]。痰液通过诱导方式进行收集,在收集前让受试者吸入 200~400 μg 沙丁胺醇,然后通过雾化高渗盐水,诱导咳出痰,并收集于无菌干燥培养皿中,挑选出黏液部分,使用 0.1% 二硫苏糖醇和磷酸盐缓冲盐水稀释,取上清液,储存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 环境中^[45]。痰液诱导可能诱发受试者气道炎症反应,并在收集后需要立即处理,因此痰液诱导不能在短时间内重复进行,限制了其在常规临床实践中的使用^[45]。支气管肺泡灌洗液和肺组织的组织特异性最强,最适宜于肺病理标记物的发现研究,但二者均需手术进行采集,采集过程创伤性大,样本获取困难,未来难以实现临床转化^[43,54-57]。

3 脂质组学在 CLD 生物标志物发现中的应用

对于 COPD, Liu 等^[17]选取 5 例健康受试者和 20 例 COPD 不同分级(GOPD I 级~IV 级,每级 5 例)患者血清进行脂质组学研究。首先,使用氯仿-甲醇-水体系提取血清样本中的脂质部分,利用 LC-QQQ MS 对样品进行靶向脂质组学分析。之后,将对照组和 COPD 患者脂质及脂质之间的比值进行比

较,通过统计学分析发现 10 种脂质($P<0.05$, fold change >2)和 10 种脂质比($P<0.001$, fold change >2)在 COPD 患者和健康人之间具有显著差异。进一步的正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)、受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)分析得出,磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)、胆固醇酯(cholesterol ester, CE)、磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)、醚链磷脂酰胆碱(ether-linked phosphatidylcholine, ePC)、溶血磷脂酰胆碱(lyso-phosphatidylcholine, LPC)等脂质类别变化显著,其中 PI(36:6)及 PI(38:4)/C16:1 CE、PI(36:2)/C16:1 CE 等 10 种脂质比可能是诊断 COPD 的潜在生物标志物,其 ROC 曲线下面积(area under curve, AUC)均在 0.9 以上(表 1)。本课题组利用脂质组学分析了 COPD 不同阶段的脂质代谢变化^[25]。首先使用水-甲醇-MTBE 系统从血清中提取出非极性的脂质部分,之后在色谱分析中,采用 C8 反相色谱柱作为固定相,水-乙腈-异丙醇作为流动相。使用超高效液相(Ultimate 3000 UHPLC system)串联质谱(Q-Exactive Orbitrap mass)进行分析。结果发现相较于健康人,稳定期 COPD(stable chronic obstructive pulmonary disease, SCOPD)患者总体脂质水平下降。进一步,较于稳定期, COPD 急性加重期(acute exacerbation of COPD, AECOPD)患者血清中鞘脂在总脂质中的比例增加,而磷脂酰甘油(phosphatidylglycero, PG)、烷基和烯基取代的磷脂酰乙醇胺(alkyl-and alkenyl-substituted phosphatidylethanolamine, PE-O)、烷基和烯基取代的磷脂酰胆碱(alkyl- and alkenyl-substituted phosphatidylcholine, PC-O)显著降低。鞘脂中神经酰胺类的增加可能与细胞凋亡有关,它可以通过激活 caspase-8、蛋白质磷酸酶-1/2、直接影响线粒体膜通透性等多种机制调节肺内皮细胞的凋亡^[65]。PG 是肺泡表面活性物质的主要组成部分,对气体交换和机体呼吸功能非常重要,它可以参与降低肺泡表面张力,防止肺泡塌陷,维持气道通畅,并参与免疫调节和宿主防御^[25],因此其降低与更严重的肺部损伤相关,而 PE-Os、PC-Os 的水平降低反应了机体氧化应激水平的升高,含醚类甘油磷脂(PE-Os、PC-Os)是细胞膜的重要组成部分,过氧化物酶体参与醚类脂质的合成,过氧化物酶体功能障碍、氧化应激可能使醚类脂质含量降低^[24-25,66]。通过

表 1 慢性肺部疾病生物标志物的主要发现总结

Table 1 Summary of key findings on biomarkers for chronic lung disease

序号 Number	疾病 Disease	生物标志物 Biomarker	参考文献 Reference
1	慢性阻塞性肺疾病 Chronic obstructive pulmonary disease	PI(36;6) (AUC = 0.95)	[17]
		PI(38;4)/C16;1 CE(AUC = 1)	
		PI(36;2)/C16;1 CE(AUC = 0.98)	
		C16;1 CE/C19;0 CE(AUC = 0.98)	
		ePC(38;2)/C16;1 CE(AUC = 0.97)	
		LPC(18;0)/C20;3 CE(AUC = 0.95)	
		LPC(16;1)/C16;1 CE(AUC = 0.94)	
		PC(32;0)/C16;1 CE(AUC = 0.94)	
		PC(34;3)/C16;1 CE(AUC = 0.94)	
		PC(38;1)/C16;1 CE(AUC = 0.94)	
2	稳定期慢性阻塞性肺疾病 Stable COPD 急性加重期 Acute exacerbation of COPD 痰热雍肺证 Phlegm-heat congesting lung 痰湿阻肺证 Phlegm-damp obstructing lung	PC(40;4)/ePC(38;2) (AUC = 0.94)	[25]
		TG、LPE、PE-O、PC、CE、FA、PC-O vs SCOPD;	
		SM、TG、PC、PC-O、DG、PE-O、Cer vs SCOPD;	
		PC-O、TG、CE、DG、LPC、PE-O vs SCOPD;	
		PC-O、DG、LPE、LPC-O、SM、TG、Cer、PG、LPC、SM	
		PE(38;1) (AUC = 0.746) ;	
		PE(18;1p/22;6) (AUC = 0.731) ;	
		PE(20;0/18;1) (AUC = 0.71)	
		PI(16;0/20;4) (AUC = 0.723)	
		TG(17;0/18;1/18;1) (AUC = 0.714)	
3	哮喘 Asthma	SM(d18;1/18;1) (AUC = 0.731)	[58]
		Cer(d16;0/27;2) (AUC = 0.69)	
		LPC(22;4) (AUC = 0.689)	
		PG(44;0) (AUC = 0.675)	
		TG(16;0/16;0/18;1) (AUC = 0.661)	
		PA(15;1/20;4) (AUC = 0.9239) ;	[59]
		PA(15;1/22;2) (AUC = 0.9236) ;	
		PA(16;1/22;2) (AUC = 0.9370) ;	
		PA(17;0/22;4) (AUC = 0.8261) ;	
		PA(17;1/22;2) (AUC = 0.887)	
		LPC(14;1/0;0) (AUC = 0.8688)	
		PC(18;0/22;6) (AUC = 0.8083)	
		PE(18;1/18;2) (AUC = 0.8217)	
		PG(12;0/20;3) (AUC = 0.8457) ;	
		PG(13;0/0;0) (AUC = 0.9667) ;	
		PG(19;0/22;0) (AUC = 0.95) ;	
		PG(19;1/20;0) (AUC = 0.8217) ;	
		PG(P-18;0/18;4) (AUC = 0.8848)	
		PI(16;0/18;2) (AUC = 0.8087) ;	
		PI(18;1/18;1) (AUC = 0.8283)	
		PS(18;3/22;4) (AUC = 0.8761)	
		PC(18;1p/18;2) (AUC = 0.687) ;	
		PC(16;0/18;1) (AUC = 0.685) ;	
		PC(18;0/22;5) (AUC = 0.677) ;	
		PC(18;0e/20;4) (AUC = 0.676) ;	[60]
		PC(18;1p/20;3) (AUC = 0.675) ;	
		PC(40;4) (AUC = 0.664) ;	
		PC(32;1) (AUC = 0.655) ;	
		PC(18;1/22;5) (AUC = 0.641)	

续表1

序号 Number	疾病 Disease	生物标志物 Biomarker	参考文献 Reference
3	哮喘 Asthma	SM(d18:2/24:1) (AUC = 0.923)	[61]
		TG(10:0/18:2/18:2) (AUC = 0.92) ;	
		TG(16:1/16:1/17:1) (AUC = 0.911) ;	
		TG(18:0/18:0/22:6) (AUC = 0.929) ;	
		TG(18:1/18:2/22:5) (AUC = 0.902) ;	
		TG(18:1/18:2/23:1) (AUC = 0.946) ;	
4	重症哮喘 Severe asthma	TG(18:1/18:2/24:1) (AUC = 0.964)	[62]
		PE(47:10) (AUC = 0.928)	
5	阿司匹林加重性呼吸系统疾病 Aspirin exacerbated respiratory disease	PS(40:2) (AUC = 0.923)	[63]
		鞘氨醇-1-磷酸(Sphingosine-1-phosphate) (AUC = 0.705) ;	
6	特发性肺纤维化 Idiopathic pulmonary fibrosis	鞘氨醇(Sphingosine) (AUC = 0.816)	[64]
		StE(16:1) (AUC = 1)	
		(E,E)-3,7,11-Trimethyl-2, 6, 10-dodecatrienyl dodecanoate (AUC = 1)	
		DG(O-16:0/18:1) (AUC = 1)	
		3-Deoxyvitamin D3 (AUC = 1)	
		TG(18:4/20:3/22:0) [iso6] (AUC = 1)	
		DG(18:0/18:2/0:0) [iso2] (AUC = 1)	
		TG(53:7) (AUC = 0.656) ;	
		TG(54:2) (AUC = 0.92) ;	
		TG(14:0/18:0/14:0) (AUC = 0.835) ;	
		TG(16:1(9Z)/18:0/20:0) (AUC = 0.97)	
		PC(36:3) (AUC = 0.94) ;	
		PC(15:0/15:0) (AUC = 0.973)	
		PC(14:0/22:0) (AUC = 0.646) ;	
		PC(15:0/22:0) (AUC = 0.623) ;	
		PC(14:0/22:1(13Z)) (AUC = 0.752) ;	
		PC(14:0/18:1(9Z)) (AUC = 0.661)	

多元统计分析和 ROC 曲线发现,在 TG、PC、PE、脂肪酸(fatty acid,FA)、烷基取代基的溶血磷脂酰胆碱(lyso-phosphatidylcholine with alkyl substituents, LPC-O)、溶血磷脂酰乙醇胺(lyso-phosphatidylethanolamine, LPE)等脂质类别中,15 个脂质分子能够较好区分 SCOPD 与健康人,21 个脂质分子能够较好区分 SCOPD 与 AECOPD,详细结果见表 1。

对于哮喘,Jiang 等^[58]对 28 例健康受试者和 33 例哮喘患者(18 例轻度,15 例中度)的血浆进行了脂质组学分析。首先利用水-冰甲醇-甲基叔丁基醚(methyl-tert-butylether, MTBE)体系提取血浆样本中的脂质部分。之后,基于 UHPLC-Orbitrap MS 对样品进行非靶向脂质组学分析。最后,使用 LipidSearch 软件对正负离子模式下获得的数据进行定性和定量分析。结果表明,磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PE)、鞘磷脂(sphingomyelin, SM)、二酰甘油(diacylglycerol, DG)、三酰甘油(triacylglycerol, TG)、神经酰胺(ceramide,

Cer)等脂质类别变化显著,其中 PE(38:1)、PE(18:1p/22:6)、SM(d18:1/18:1)等 10 种脂质分子与哮喘密切相关,可能成为区分哮喘患者和健康者的生物标志物。PE(18:1p/22:6)、PE(20:0/18:1)、PE(38:1)、三酰甘油(triacylglycerol, TG)TG(16:0/16:0/18:1)和 SM(d18:1/18:1)水平变化与疾病严重程度呈正相关。磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)PI(16:0/20:4)、TG(17:0/18:1/18:1)、Cer(d16:0/27:2)、LPC(22:4)、PG(44:0)水平变化与哮喘的严重程度呈负相关,其 AUC 值在 0.6 以上(表 1)。Wang 等^[59]利用非靶向脂质组学策略分析了 20 例健康受试者和 24 例哮喘患者的血浆样本,全面探讨甘油磷脂代谢物与哮喘的关系。该方法用甲醇提取血浆中脂质部分,因此,其结果更关注于中等以上极性的脂质分子。之后使用 Waters XBridge UPLC® BEH T3 和 Amide 色谱柱作为固定相,使用 UHPLC-Q-TOF MS 对脂质进行分离鉴定。最后,通过 PCA、OPLS-DA 对差异脂质进行筛选,通过 Metlin 在线数据库对差异分析代谢物进行

注释,并根据 ROC 分析及临床相关性,得出血浆中磷脂酸 (phosphatidic acid, PA)、磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS)、PG、PE、PC、PI 等脂质水平发生显著改变,其中 PA(15:1/20:4)、PA(15:1/22:2)及 PG(12:0/20:3)等 16 种差异脂质与哮喘的诊断和预后指标有很强的相关性,可作为诊断哮喘的生物标志物。其 AUC 在 0.8 以上,见表 1。阿司匹林加重性呼吸系统疾病 (aspirin exacerbated respiratory disease, AERD) 也被称为阿司匹林敏感性哮喘,以白三烯的产生增强、嗜酸性炎症和气道肥大细胞的活化为特征^[63,67-68]。Trinh 等^[63] 分析了 44 例 AERD 患者和 45 例阿司匹林耐受性哮喘患者 (aspirin-tolerant asthma, ATA) 的血清和尿液样本中的鞘脂类代谢物。首先将血清和尿液用水和甲醇稀释后,使用 20 mmol/L 甲酸铵甲酸水 (甲酸:水=1:1000, v/v) 和 20 mmol/L 甲酸铵甲酸甲醇溶液 (甲酸:甲醇=1:1000, v/v) 作为流动相, ACQUITY UPLC BEH C18 为色谱柱,利用 UHPLC-Q-TOF MS 对样品进行分离、鉴定。之后使用 Mass Hunter Quantitative Analysis 系统对 SIP 和鞘氨醇进行定量及统计分析,结果得出鞘氨醇-1-磷酸 (Sphingosine-1-phosphate, SIP, AUC=0.705)、尿鞘氨醇 (AUC=0.816) 可作为区分 AERD 和 ATA 的潜在生物标志物。鞘氨醇-1-磷酸和鞘氨醇是神经鞘磷脂经过多步酶促反应生成的。鞘氨醇-1-磷酸和鞘氨醇的变化反映了鞘脂代谢改变^[69]。杨梦^[60] 利用非靶向脂质组学技术对 35 例支气管哮喘患者 (哮喘组) 以及 32 例健康对照者血浆进行分析,首先通过水-甲醇-MTBE 体系提取血浆样本中脂质部分,进行 UHPLC-Q-Exactive plus-MS 检测。色谱分析中,选用 ACQUITY UPLC CSH C18 色谱柱为固定相,10 mmol/L 甲酸铵乙腈水溶液 (乙腈:水=6:4, v/v), 10 mmol/L 甲酸铵乙腈异丙醇溶液 (乙腈:异丙醇=1:9, v/v) 为流动相对分析样品进行洗脱,结果表明 PC(18:1p/18:2)、PC(16:0/18:1)、PC(18:0/22:5) 等 8 种 PC 类脂质分子可能作为哮喘的潜在生物标志物,说明 PC 代谢在哮喘发病中可能存在显著变化,其 AUC 在 0.6 以上 (表 1)。李婉芳^[61] 使用 MTBE 提取小鼠过敏性哮喘模型肺组织中脂质,在色谱质谱分析中,使用 ACQUITY UPLC® BEH C18 色谱柱为固定相,10 mmol/L 甲酸铵甲酸水溶液 (甲酸:水=1:1000, v/v)、10 mmol/L 甲酸铵甲酸异丙醇乙腈溶液 (异丙醇:乙腈=2:5, v/v

v, 甲酸:异丙醇乙腈溶液=1:1000) 为流动相, UHPLC-Q-Exactive-Focus-MS 系统对样品进行非靶向分析。结果表明 SM(d18:2/24:1)、TG(10:0/18:2/18:2) 等 7 种脂质分子的 AUC 在 0.9 以上,可能成为哮喘诊断的脂质生物标志物 (表 1)。郑红梅等^[62] 通过脂质组学技术分析重症哮喘与轻中度哮喘儿童的血浆脂质分子差异,寻找重症哮喘潜在的新型血浆生物标志物。该研究使用氯仿-甲醇(2:1, v/v) 提取脂质,之后,以 10 mmol/L 乙酸铵乙腈水溶液 (乙腈:水=6:4, v/v), 10 mmol/L 乙酸铵乙腈异丙醇溶液 (乙腈:异丙醇=1:9, v/v) 为流动相,通过质谱分析检测血浆中脂质分子。多元统计分析筛选显著差异的脂质分子,并利用 ROC 明确显著差异脂质分子对重症哮喘的诊断价值。共筛选出 39 种差异脂质分子,其中 PE(47:10) 和 PS(40:2) 可能是诊断重症哮喘的潜在生物标志物,其 AUC 值分别达到 0.928 和 0.923。

对于 IPF, Yan 等^[10] 在脂质组学研究中使用缓冲液 (25% 乙腈、40% 甲醇和 35% 水) 提取血浆样本中的脂质部分。在色谱分析中,使用 Acquity UPLCTM BEH C18 色谱柱为固定相,10 mmol/L 乙酸铵水溶液、10 mmol/L 乙酸铵乙腈异丙醇溶液 (乙腈:异丙醇=1:1, v/v, 甲酸:乙腈异丙醇溶液=1:1000) 为流动相,利用 UHPLC-Q TOF MS 对预处理的样品进行非靶向分析。结果表明,豆甾醇酯 (stigmasteryl ester, StE) (16:1)、DG(18:0/18:2) 等 6 种脂质分子可能作为未来诊断 IPF 疾病的潜在生物标志物,其 AUC 值等于 1,见表 1。蔡萧君等^[64] 将 1 mL 血清与等体积 3% 磷酸溶液混合,通过 OASIS 固相萃取柱,使用 UHPLC-Q-Exactive MS 在全扫描的模式下对血清中的脂质进行非靶向分析,色谱柱为 ACQUITY UPLC TM C18 柱,甲酸水 (甲酸:水=1:1000, v/v) 和甲酸乙腈溶液 (甲酸:乙腈=1:1000, v/v), 结果得出 TG(53:7)、TG(54:2) 等 11 个脂质分子可能作为未来诊断 IPF 疾病的潜在生物标志物,其中 6 个脂质分子 AUC 在 0.9 以上,具体见表 1。

4 脂质组学用于区分不同 CLD 中医证候的研究

中医证候是指在疾病过程中机体整体的动态、病理反应,包含了疾病的病因、病位、病性,以及机体正气对邪气的相互抗争,是疾病表现于外的具体体现^[70]。中医证候具有多变性、模糊性、复杂性等

特点,因此,用现代医学概念理解中医证候困难极大,为客观量化标准、说明中医证候特点提出了挑战。在一些研究中,脂质组学也被应用于诊断 CLD 中的不同中医症候。脂质组学可以分析出某些特异性的脂质生物标记物与部分“证”之间的关系^[70-71],揭示证本质的生物标志物^[72]。如 COPD 急性加重期以实为主,常见风寒袭肺、外寒内饮、痰热壅肺、痰湿阻肺、痰蒙神窍等证,稳定期以虚为主,常见肺气虚、肺脾气虚、肺肾气虚、肺肾气阴两虚等证^[73]。本课题组通过脂质组学技术对脂质在 COPD 证候中的影响进行探索研究,分析发现 AECOPD 痰热壅肺证和痰湿阻肺证患者体内脂质代谢差异,并确定了 6 类痰热壅肺证、10 类痰湿阻肺证特异性生物标志物^[25]。因此,可以借鉴脂质组学对中医证候研究的成功方法,开展其他 CLD 证候疾病模式下的脂质组学研究,形成中医证候脂质组学研究方法^[74],阐明 CLD 中证候的脂质代谢轮廓差异,寻找不同证型的物质基础,可以为中医 CLD 的证候客观化、量化、证本质研究提供依据^[75]。但目前脂质组学对中医证候的研究还处于探索阶段,缺乏大规模的实验研究和临床验证。

5 结论和展望

脂质代谢在结构和信号转导方面具有重要生物学意义,其作为生物标记物用于 CLD 的诊断和药物疗效评价的可能也已被广泛研究。脂质组学能够全面地表征系统的脂质代谢扰动,可以作为脂质生物标记物发现的主要技术手段。目前,通过脂质组学技术已经证实一些氧化脂肪酸、鞘磷脂等与 CLD 的发生发展相关,但是距离应用于临床诊断还有许多问题需要解决,如目前的 CLD 相关临床脂质组学研究样本量较小,缺乏多中心研究验证和标准化实验流程及临床评估体系,也需要将脂质组学数据与多组学研究相结合,系统的分析疾病过程,以期得到更具临床转化价值的生物标记物(组合)。同时,在未来的研究中,仍需要基于差异的脂质代谢酶设计酶联免疫试剂盒,或者靶向某些脂质标记物分子建立方法进行质谱的快速监测,以实现基于脂质生物标记物的 CLD 临床诊断。

参考文献:

[1] WANG C, XU J, YANG L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health[CPH] study): a national cross-sectional study

[J]. *Lancet*, 2018, 391(10131): 1706-1717.

[2] 李静, 张利英, 雍文兴, 等. 慢性阻塞性肺疾病啮齿类动物模型与评估方法的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(5): 692-697.

LI J, ZHANG L Y, YONG W X, et al. Progress in the evaluation for chronic obstructive pulmonary disease using a rodent model [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(5): 692-697.

[3] VOGELMEIER C F, CRINER G J, MARTINEZ F J, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report. GOLD executive summary [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 195(5): 557-582.

[4] MANNINO D M, GAGNON R C, PETTY T L, et al. Obstructive lung disease and low lung function in adults in the United States: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994 [J]. *Arch Intern Med*, 2000, 160(11): 1683-1689.

[5] JOHNS D P, WALTERS J A, WALTERS E H. Diagnosis and early detection of COPD using spirometry [J]. *J Thorac Dis*, 2014, 6(11): 1557-1569.

[6] BATEMAN E D, HURD S S, BARNES P J, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary [J]. *Eur Respir J*, 2008, 31(1): 143-178.

[7] ALMESHARI M A, STOCKLEY J, SAPEY E. The diagnosis of asthma. Can physiological tests of small airways function help? [J]. *Chron Respir Dis*, 2021, 18: 14799731211053332.

[8] 代先慧, 郝月琴. 支气管哮喘-慢性阻塞性肺疾病重叠、哮喘、慢性阻塞性肺疾病临床特征的对比研究 [J]. *临床肺科杂志*, 2018, 23(7): 1306-1310.

DAI X H, HAO Y Q. Comparative study of clinical features of ACO, asthma and COPD [J]. *J Clin Pulm Med*, 2018, 23(7): 1306-1310.

[9] 程梦真, 顾宇彤, 宋元林. 支气管哮喘-慢性阻塞性肺疾病重叠的治疗现状 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2019, 5(12): 958-960.

CHENG M Z, GU Y T, SONG Y L. Current status of treatment of bronchial asthma-COPD overlap [J]. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 2019, 5(12): 958-960.

[10] YAN F, WEN Z, WANG R, et al. Identification of the lipid biomarkers from plasma in idiopathic pulmonary fibrosis by Lipidomics [J]. *BMC Pulm Med*, 2017, 17(1): 174.

[11] KANG Y P, LEE S B, LEE J M, et al. Metabolic profiling regarding pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *J Proteome Res*, 2016, 15(5): 1717-1724.

[12] 杨红娇, 董昭兴, 王颖. 特发性肺纤维化生物标志物的研究进展 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2019, 18(2): 204-208.

YANG H J, DONG Z X, WANG Y. Research progress in the biomarkers for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Chin J Respir Crit Care Med*, 2019, 18(2): 204-208.

[13] 马磊. HRCT 对特发性肺间质纤维化的鉴别诊断价值临床研究

- 究 [J]. 罕少疾病杂志, 2019, 26(2): 41-42, 45.
- MA L. Clinical study of differential diagnosis value of HRCT on idiopathic pulmonary interstitial fibrosis [J]. J Rare Uncommon Dis, 2019, 26(2): 41-42, 45.
- [14] 范宇斌, 何荣伶, 邹丽君, 等. 生物标志物在特发性肺纤维化中的临床价值 [J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(7): 1062-1065.
- FAN Y B, HE R L, ZOU L J, et al. Clinical value of biomarkers in diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. J South Med Univ, 2020, 40(7): 1062-1065.
- [15] STOCKLEY R A, HALPIN D M G, CELLI B R, et al. Chronic obstructive pulmonary disease biomarkers and their interpretation [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2019, 199(10): 1195-1204.
- [16] DENNIS E A. Lipidomics joins the omics evolution [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(7): 2089-2090.
- [17] LIU D, MEISTER M, ZHANG S, et al. Identification of lipid biomarker from serum in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Respir Res, 2020, 21(1): 242.
- [18] LIU X, XU G. Recent advances in using mass spectrometry for mitochondrial metabolomics and lipidomics-A review [J]. Anal Chim Acta, 2018, 1037: 3-12.
- [19] LEE C W, LEE D, LEE E M, et al. Lipidomic profiles disturbed by the Internet gaming disorder in young Korean males [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2019, 1114/1115: 119-124.
- [20] EUM J Y, LEE G B, YI S S, et al. Lipid alterations in the skeletal muscle tissues of mice after weight regain by feeding a high-fat diet using nanoflow ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2020, 1141: 122022.
- [21] XU T, HU C, XUAN Q, et al. Recent advances in analytical strategies for mass spectrometry-based lipidomics [J]. Anal Chim Acta, 2020, 1137: 156-169.
- [22] ZHOU J, YIN Y. Strategies for large-scale targeted metabolomics quantification by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Analyst, 2016, 141(23): 6362-6373.
- [23] ZHU X, CHEN Y, SUBRAMANIAN R. Comparison of information-dependent acquisition, SWATH, and MS (All) techniques in metabolite identification study employing ultrahigh-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2014, 86(2): 1202-1209.
- [24] SCHLOTTERBECK J, CHATTERJEE M, GAWAZ M, et al. Comprehensive MS/MS profiling by UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS using SWATH data-independent acquisition for the study of platelet lipidomes in coronary artery disease [J]. Anal Chim Acta, 2019, 1046: 1-15.
- [25] LIU X, ZHANG H, SI Y, et al. High-coverage lipidomics analysis reveals biomarkers for diagnosis of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2022, 1201/1202: 123278.
- [26] RAINVILLE P D, STUMPF C L, SHOCKCOR J P, et al. Novel application of reversed-phase UPLC-oeTOF-MS for lipid analysis in complex biological mixtures: a new tool for lipidomics [J]. J Proteome Res, 2007, 6(2): 552-558.
- [27] MASSEY K A, NICOLAOU A. Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 59(100): 45-55.
- [28] WANG Y, ARMANDO A M, QUEHENBERGER O, et al. Comprehensive ultra-performance liquid chromatographic separation and mass spectrometric analysis of eicosanoid metabolites in human samples [J]. J Chromatogr A, 2014, 1359: 60-69.
- [29] GALLIEN S, BOURMAUD A, KIM S Y, et al. Technical considerations for large-scale parallel reaction monitoring analysis [J]. J Proteomics, 2014, 100: 147-159.
- [30] BOURMAUD A, GALLIEN S, DOMON B. Parallel reaction monitoring using quadrupole-Orbitrap mass spectrometer: Principle and applications [J]. Proteomics, 2016, 16(15/16): 2146-2159.
- [31] TAGUE E D, WOODALL B M, HARP J R, et al. Expanding lipidomics coverage: effective ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometer methods for detection and quantitation of cardiolipin, phosphatidylglycerol, and lysyl-phosphatidylglycerol [J]. Metabolomics, 2019, 15(4): 53.
- [32] NAVAS-IGLESIAS N, CARRASCO-PANCORBO A, CUADROS-RODRÍGUEZ L. From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics [J]. Trends Anal Chem, 2008, 28(4): 393-403.
- [33] YU Z, KASTENMÜLLER G, HE Y, et al. Differences between human plasma and serum metabolite profiles [J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21230.
- [34] LIU X, HOENE M, WANG X, et al. Serum or plasma, what is the difference? Investigations to facilitate the sample material selection decision making process for metabolomics studies and beyond [J]. Anal Chim Acta, 2018, 1037: 293-300.
- [35] BURLA B, ARITA M, ARITA M, et al. MS-based lipidomics of human blood plasma: a community-initiated position paper to develop accepted guidelines [J]. J Lipid Res, 2018, 59(10): 2001-2017.
- [36] BOWDEN J A, HECKERT A, ULMER C Z, et al. Harmonizing lipidomics: NIST interlaboratory comparison exercise for lipidomics using SRM 1950-Metabolites in Frozen Human Plasma [J]. J Lipid Res, 2017, 58(12): 2275-2288.
- [37] BEGUM H, LI B, SHUI G, et al. Discovering and validating between-subject variations in plasma lipids in healthy subjects [J]. Sci Rep, 2016, 6: 19139.
- [38] SAW W Y, TANTOSO E, BEGUM H, et al. Establishing multiple omics baselines for three Southeast Asian populations in the Singapore Integrative Omics Study [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 653.
- [39] HAMMOND V J, O'DONNELL V B. Esterified eicosanoids:

- generation, characterization and function [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1818(10): 2403–2412.
- [40] DOROW J, BECKER S, KORTZ L, et al. Preanalytical investigation of polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Biopreserv Biobank*, 2016, 14(2): 107–113.
- [41] ONO Y, KURANO M, OHKAWA R, et al. Sphingosine 1-phosphate release from platelets during clot formation: close correlation between platelet count and serum sphingosine 1-phosphate concentration [J]. *Lipids Health Dis*, 2013, 12: 20.
- [42] COLAS R A, SHINOHARA M, DALLI J, et al. Identification and signature profiles for pro-resolving and inflammatory lipid mediators in human tissue [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014, 307(1): C39–C54.
- [43] WHEELOCK C E, GOSS V M, BALGOMA D, et al. Application of omics technologies to biomarker discovery in inflammatory lung diseases [J]. *Eur Respir J*, 2013, 42(3): 802–825.
- [44] WARD R, WOLTMANN G, WARDLAW A J, et al. Between-observer repeatability of sputum differential cell counts. Influence of cell viability and squamous cell contamination [J]. *Clin Exp Allergy*, 1999, 29(2): 248–252.
- [45] PIZZICHINI E, PIZZICHINI M M, EFTHIMIADIS A, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 154(2 Pt 1): 308–317.
- [46] VLACHOS-MAYER H, LEIGH R, SHARON R F, et al. Success and safety of sputum induction in the clinical setting [J]. *Eur Respir J*, 2000, 16(5): 997–1000.
- [47] FAHY J V, BOUSHEY H A, LAZARUS S C, et al. Safety and reproducibility of sputum induction in asthmatic subjects in a multicenter study [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(6): 1470–1475.
- [48] WARK P A, SIMPSON J L, HENSLEY M J, et al. Safety of sputum induction with isotonic saline in adults with acute severe asthma [J]. *Clin Exp Allergy*, 2001, 31(11): 1745–1753.
- [49] DJUKANOVIĆ R, STERK P J, FAHY J V, et al. Standardised methodology of sputum induction and processing [J]. *Eur Respir J Suppl*, 2002, 37: 1s–2s.
- [50] SIMPSON J L, WOOD L G, GIBSON P G. Inflammatory mediators in exhaled breath, induced sputum and saliva [J]. *Clin Exp Allergy*, 2005, 35(9): 1180–1185.
- [51] KHARITONOV S A, BARNES P J. Exhaled markers of pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(7): 1693–1722.
- [52] KHARITONOV S A, BARNES P J. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath [J]. *Biomarkers*, 2002, 7(1): 1–32.
- [53] LUNDSTRÖM S L, BALGOMA D, WHEELOCK Å M, et al. Lipid mediator profiling in pulmonary disease [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, 12(7): 1026–1052.
- [54] KELLY C A, KOTRE C J, WARD C, et al. Anatomical distribution of bronchoalveolar lavage fluid as assessed by digital subtraction radiography [J]. *Thorax*, 1987, 42(8): 624–628.
- [55] HASLAM P L, BAUGHMAN R P. Report of ERS Task Force: guidelines for measurement of acellular components and standardization of BAL [J]. *Eur Respir J*, 1999, 14(2): 245–248.
- [56] BARNES P J, CHOWDHURY B, KHARITONOV S A, et al. Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 174(1): 6–14.
- [57] SERBAN K A, PRATTE K A, BOWLER R P. Protein biomarkers for COPD outcomes [J]. *Chest*, 2021, 159(6): 2244–2253.
- [58] JIANG T, DAI L, LI P, et al. Lipid metabolism and identification of biomarkers in asthma by lipidomic analysis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2021, 1866(2): 158853.
- [59] WANG S, TANG K, LU Y, et al. Revealing the role of glycerophospholipid metabolism in asthma through plasma lipidomics [J]. *Clin Chim Acta*, 2021, 513: 34–42.
- [60] 杨梦. 基于脂质组学方法的哮喘脂质生物标志物筛选 [D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- YANG M. Screening of asthma lipid biomarkers based on lipidomics [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2019.
- [61] 李婉芳. 卵清白蛋白诱导的 BALB/c 小鼠哮喘模型肺组织脂质组学分析 [D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- LI W F. Lipomics analysis of lung tissue in BALB/c mouse asthma model induced by ovalbumin [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2019.
- [62] 郑红梅, 温亚锦, 韩晓, 等. 重症哮喘儿童血浆脂质代谢特征与潜在生物标志物研究 [J]. *复旦学报(医学版)*, 2023, 50(5): 683–691.
- ZHENG H M, WEN Y J, HAN X, et al. Characterization of plasma lipidomics and potential biomarkers in children with severe asthma [J]. *Fudan Univ J Med Sci*, 2023, 50(5): 683–691.
- [63] TRINH H K, KIM S C, CHO K, et al. Exploration of the sphingolipid metabolite, Sphingosine-1-phosphate and sphingosine, as novel biomarkers for Aspirin-exacerbated respiratory disease [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36599.
- [64] 蔡萧君, 江柏华, 刘松, 等. 基于脂质组学技术探讨丹贝益肺方对特发性纤维化大鼠的作用机制 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2022, 22(10): 1175–1180.
- CAI X J, JIANG B H, LIU S, et al. Mechanism of Danbei yifei decoction on idiopathic pulmonary fibrosis rats based on lipidomic technology [J]. *Eval Anal Drug Use Hosp China*, 2022, 22(10): 1175–1180.
- [65] PETRACHE I, PETRUSCA D N, BOWLER R P, et al. Involvement of ceramide in cell death responses in the pulmonary circulation [J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2011, 8(6): 492–496.
- [66] ENGELMANN B. Plasmalogens: targets for oxidants and major lipophilic antioxidants [J]. *Biochem Soc Trans*, 2004, 32(Pt

- 1): 147-150.
- [67] LIU T, KANAOKA Y, BARRETT N A, et al. Aspirin-exacerbated respiratory disease involves a cysteinyl leukotriene-driven IL-33-mediated mast cell activation pathway [J]. J Immunol, 2015, 195(8): 3537-3545.
- [68] LAIDLAW T M, BOYCE J A. Aspirin-exacerbated respiratory disease—new prime suspects [J]. N Engl J Med, 2016, 374(5): 484-488.
- [69] 汤喜兰, 徐国良, 董伟, 等. 异丙肾上腺素诱导心脏肥大大鼠的血清代谢组学研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 486-493.
TANG X L, XU G L, DONG W, et al. Serum metabolomics study of cardiac hypertrophy in an isoproterenol-induced rat model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 486-493.
- [70] 董振飞, 陈宇, 任健, 等. 多囊卵巢综合征中医“证”的组学研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 1018-1020.
DONG Z F, CHEN Y, REN J, et al. Research progress on the omics of traditional Chinese medicine syndrome of polycystic ovarian syndrome [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(3): 1018-1020.
- [71] 董宇, 胡元会, 何健, 等. 脂质组学在心脑血管疾病研究中的应用及对中医药研究的启示 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(6): 2487-2494.
DONG Y, HU Y H, HE J, et al. Application of lipidomics in the study of cardiovascular and cerebrovascular diseases and its enlightenment to the research of traditional Chinese medicine [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2022, 24(6): 2487-2494.
- [72] 李思汉, 黄铭涵, 林平. 中医状态与脂质组学相关性探讨 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(1): 129-131.
LI S H, HUANG M H, LIN P. Discussion on the relationship between traditional Chinese medicine state and lipidomics [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(1): 129-131.
- [73] 李建生, 李素云, 余学庆. 慢性阻塞性肺疾病中医诊疗指南(2011 版) [J]. 中医杂志, 2012, 58(1): 80-84.
LI J S, LI S Y, YU X Q. Guidelines on chinese medicine for chronic obstructive pulmonary disease (2011 Edition) [J]. J Tradit Chin Med, 2012, 58(1): 80-84.
- [74] 刘思美, 强喆, 吴思澜, 等. 痰湿阻肺型 COPD 大鼠模型的构建及代谢组学分析 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 51-63.
LIU S M, QIANG Z, WU S L, et al. Establishment and metabolomics analysis of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease with phlegm-dampness syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 51-63.
- [75] 朱黎霞. 基于比较脂质组学探讨冠心病中医证候的研究思路 [J]. 中医杂志, 2014, 55(8): 650-653.
ZHU L X. Research ideas of TCM syndroms of coronary heart disease based on comparative lipidomics [J]. J Tradit Chin Med, 2014, 55(8): 650-653.

[收稿日期]2023-07-09

吴凉彬, 翁鉴, 李艾康, 等. miR-138-5p 在骨关节炎中作用机制的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 142-149.
Wu LB, Weng J, Li AK, et al. Research progress on the mechanism of miR-138-5p in osteoarthritis [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 142-149.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.016

miR-138-5p 在骨关节炎中作用机制的研究进展

吴凉彬^{1,2,3}, 翁 鉴^{1,2,3}, 李艾康^{1,2,3}, 齐天天^{1,2,3}, 张 耕^{1,2,3}, 曾 晖^{2,3,4}, 于 斐^{1,2,3*}

(1. 北京大学深圳医院骨关节科, 广东 深圳 518036; 2. 骨科生物材料国家地方联合工程研究中心, 广东 深圳 518036;
3. 深圳市骨科疾病与生物材料研究重点实验室, 广东 深圳 518036;
4. 深圳市第二人民医院骨科, 广东 深圳 518000)

【摘要】 miR-138-5p 作为一种微小 RNA, 在骨关节炎发病中起重要调节作用, 其可通过 NF- κ B、Wnt/ β -catenin、PI3K/AKT 等信号通路作用调节细胞的炎症、细胞凋亡与增殖、基质降解等生物学过程进而影响骨关节炎的发生和发展。笔者就 miR-138-5p 对骨关节炎作用机制的研究进展作一综述。

【关键词】 miR-138-5p; 骨关节炎; 发病机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0142-08

Research progress on the mechanism of miR-138-5p in osteoarthritis

WU Liangbin^{1,2,3}, WENG Jian^{1,2,3}, LI Aikang^{1,2,3}, QI Tiantian^{1,2,3}, ZHANG Geng^{1,2,3}, ZENG Hui^{2,3,4}, YU Fei^{1,2,3*}

(1. Department of Bone & Joint Surgery, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, China.
2. National & Local Joint Engineering Research Center of Orthopaedic Biomaterials, Shenzhen 518036.
3. Shenzhen Key Laboratory of Orthopaedic Diseases and Biomaterials Research, Shenzhen 518036.
4. Department of Osteology, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518000)

【Abstract】 MiR-138-5p is a microRNA that plays an important regulatory role in the pathogenesis of osteoarthritis. MiR-138-5p regulates various biological processes, including inflammation, cell apoptosis and proliferation, and matrix degradation in osteoarthritis, by modulating signaling pathways including nuclear factor- κ B, Wnt/ β -catenin, and phosphoinositide 3-kinase/AKT. This review summarizes the research progress regarding the mechanism of miR-138-5p in osteoarthritis.

【Keywords】 miR-138-5p; osteoarthritis; pathogenesis

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

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种以关节软骨的退变为特征, 在年龄^[1]、性别^[2]、肥胖^[3]、生活方式^[4]等因素作用下发生的慢性退行性疾病, 其发

病率随年龄增加而升高^[5]。OA 的发病机制尚不明确, 近期研究发现, 一些分子如 miR-138-5p^[6]、II 型胶原 α 1 (recombinant collagen type II alpha 1,

【基金项目】 国家自然科学基金 (82102568, 82172432); 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2022B1515120046, 2022A1515220111); 深圳“医疗卫生三名工程”项目 (SZSM202211038); 深圳市科技计划项目 (JCYJ20220818102815033, KCXFZ20201221173411031, JCYJ20210324110214040, ZDSYS20220606100602005); 北京大学深圳医院科研启动金项目 (KYQD2021099); 深圳市高水平医院建设专项经费资助。

【作者简介】 吴凉彬 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 骨关节炎。E-mail: 15260527477@163.com

【通信作者】 于斐 (1989—), 男, 博士, 研究方向: 骨关节炎, 骨科生物材料, 骨、软骨、周围神经损伤修复。E-mail: oscarfyu@163.com

COL2A1)^[7]、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs)^[8]、沉默信息调节因子 1 (silent mating type information regulation 2 homolog-1, SIRT1)^[9]等在 OA 的发生发展过程中起到重要作用,这为研究 OA 的预防及治疗提供了新靶点。miRNA (microRNA) 广泛存在于真核生物细胞中,可以调节具有互补结构的 mRNA 和基因组 DNA,从而影响基因表达和细胞活动^[10]。近年研究显示,miRNA 中的 miR-138-5p 在人类疾病中起重要作用,其可参与神经退行性疾病^[11]、炎症性疾病^[12]和癌症^[13]等疾病的病理生理过程,并可通过调控生长因子及细胞因子、调控炎症和细胞凋亡及增殖、影响代谢等多种途径影响 OA 的进程。本文就 miR-138-5p 在 OA 中的作用机制作一综述,为相关研究提供理论支撑。

1 miR-138-5p 介绍

不同物种中 miR-138 的核心结构相似,其两个主要转录物为 pri-miR-138-1 和 pri-miR-138-2,前者位于第 3 号染色体 (3p21) 上,后者位于第 16 号染色体 (16q13) 上,两者合为成熟的 miR-138,miR-138-5p 则是 miR-138 家族中的一员^[14]。miR-138-5p 是长度为 23 个核苷酸的非编码 RNA,位于染色体 Xq38.13,它通过与靶基因 mRNA 上具有互补序列的部分结合以调控某些基因的表达。miR-138-5p 已被证实多种疾病和生物学过程中起重要作用,如肿瘤^[13]、神经病变^[11]、免疫疾病^[15]以及一些炎

症性和代谢性疾病^[12]。也有研究证实,miR-138-5p 在 OA 的进程中起重要作用。

2 miR-138-5p 对 OA 的影响

OA 是一种慢性、渐进性的疾病,其发病涉及多种因素。其中,miR-138-5p 在 OA 的发展中扮演重要角色,与多种发病因素密切相关。该 miRNA 不仅自身对 OA 的进展产生影响,还通过调控炎症、细胞凋亡与增殖、基质降解等过程,参与了 OA 疾病过程^[16](见图 1)。

2.1 miR-138-5p 通过调控炎症参与 OA 的病程

OA 的炎症反应主要表现在关节软骨和关节周围组织中,受损的关节组织会释放炎症介质,包括前列腺素 (prostaglandin, PG)、白细胞介素 (interleukin, IL)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等^[17],这些炎症介质激活附着在软骨细胞上的酶类,破坏软骨基质,导致软骨的退化和损伤^[18]。同时,关节滑液及关节滑膜中炎症介质的增加,使得滑液失去正常的润滑及缓冲作用,关节滑膜肿胀,增加关节内的压力,导致疼痛和僵硬^[19]。近年来,有学者对 IL-1 和 TNF 在 OA 发病中的作用进行了广泛研究。实验发现,在 OA 患者的软骨细胞和滑膜细胞中大量表达 IL-1 和 TNF^[20]。IL-1 和 TNF 的合成和释放是相互影响的,IL-1 能够诱导靶细胞合成和释放 TNF,而 TNF 同样也能刺激靶细胞产生 IL-1。此外,受到 IL-1 刺激的靶细胞还能自主作用,再次释放 IL-1,形成自我刺激循环,这也导致

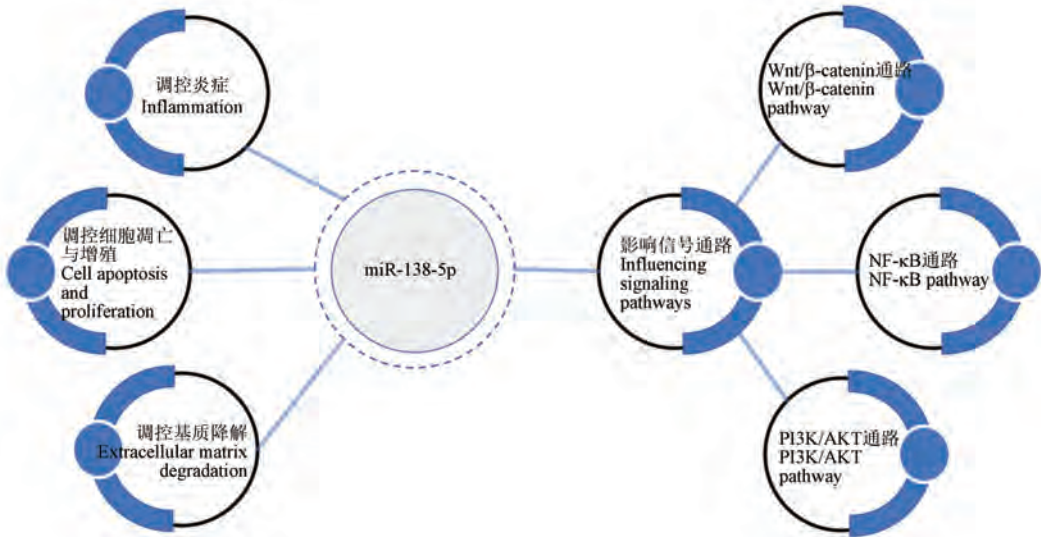


图 1 miR-138-5p 对 OA 的影响机制

Figure 1 Impact mechanism of miR-138-5p on osteoarthritis (OA)

OA 的炎症反应不断进展加重。何春来^[21]发现, miR-138-5p 抑制物能够抑制软骨细胞系 CHON-001 和 ATDC5 的炎症因子表达,减轻细胞的炎症反应。环氧化酶(cyclooxygenase, COX)是合成前列腺素的重要酶类,它存在两个亚型,二者具有不同的生物功能。COX-1 正常生理条件下在人体内起维持代谢平衡和保护作用,相反,COX-2 在炎症反应中发挥重要作用,其特异表达不仅扰乱正常细胞功能,还协助炎症细胞因子诱发软骨蛋白多糖代谢失衡,进而不可逆地推动 OA 的发展^[22]。胡显腾^[23]提出在 IL-1 β 干预下,软骨细胞中的 CircRNA_Atp9b 作为 miR-138-5p 海绵调节 II 型胶原、MMP-13、IL-6 和 COX-2 的表达,下调 CircRNA_Atp9b 对软骨细胞起保护性作用,此过程中 CircRNA_Atp9b 本身并不能直接发挥作用,而是通过 miR-138-5p 发挥作用。MCM3AP-AS1 是一种竞争性内源性 RNA(ceRNA),在 OA 患者软骨组织中表达显著降低,其通过调节 miR-138-5p/SIRT1 轴,激活胰岛素样生长因子受体(insulin-like growth factor receptor, IGF1R)和下游的磷酸肌醇-3-激酶(phosphoinositol 3-kinase, PI3K)、磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1(phosphate inositol dependent protein kinase-1, PDK1)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)和蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt),从而磷酸化 MDM2 基因,抑制 p53 基因,提高软骨细胞的活力,并抑制细胞凋亡和炎症反应^[24]。SOX 基因广泛分布于人体组织中,并在性别决定、早期胚胎发育、神经发育、造血、晶状体发育、骨组织形成和肿瘤发生中发挥着重要作用^[25]。SOX-9 激活软骨特异性分子如 II 型胶原 α 1、聚集蛋白聚糖和 I 型胶原 α 2 的转录,从而加速间充质干细胞向软骨细胞的分化^[26]。低表达的 miR-138-5p 可通过上调 SOX-9,促进软骨修复,减少炎症损伤^[6]。OA 炎症反应主要表现在软骨和关节周围组织,受损组织释放炎症介质,如 PG、IL、TNF,激活附着酶类导致软骨退化。SOX-9 和 COX-2 在调节炎症反应中也发挥作用。miR-138-5p 可通过调控以上因子来影响 OA 的进程。

2.2 miR-138-5p 调控细胞凋亡与增殖对 OA 的影响

OA 中细胞的凋亡与增殖是两个重要的生物学过程^[27],细胞增殖和凋亡的平衡是细胞维持健康的基础,软骨细胞的凋亡导致细胞数量减少、质量下

降,使得软骨无法自我修复;同时,炎症细胞、滑膜细胞及骨细胞的增殖加重炎症反应,导致滑膜变性及骨赘生长^[28]。在 OA 早期阶段,细胞凋亡通常占主导地位,导致软骨和其他组织的损伤。然而,随着 OA 的发展,一些细胞会尝试通过增殖以应对损伤,但通常作用是有限的,并不足以恢复受损的组织。何春来^[21]发现,下调 miR-138-5p 能促进软骨细胞的增殖和迁移,并抑制细胞凋亡,对 OA 的进程产生影响。另有研究证明,软骨细胞增殖及自噬相关因子的活性能够被过表达的 miR-138-5p 所抑制,细胞中点状定位的内源性 LC3 蛋白明显减少,转变为细胞质弥散定位^[29]。许多通路参与细胞的凋亡^[30],其中 B 淋巴细胞瘤家族(BCLs)以及含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase)在线粒体通路调控细胞凋亡的过程中扮演重要角色^[31]。栾依霖^[32]的实验结果发现缺硒导致鸡软骨细胞中 miR-138-5p 的表达上调,抑制硒代蛋氨酸载体蛋白(selenomethionine, SelM)的表达,使得细胞抗氧化能力降低,线粒体凋亡信号通路被激活,进而诱导软骨细胞异常凋亡。MCF2L 基因可增加滑膜成纤维细胞凋亡从而促进 OA 的发生^[33], lncRNA MCF2L-AS1 作为 MCF2L 的反义 RNA,其高表达通过调控 miR-138-5p 使成骨相关因子碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、矮小相关转录因子(runt-related transcription factor, RUNX)2、骨钙素(osteocalcin, OCN)的表达水平升高,促进人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, hBMSCs)增殖和成骨分化,加速骨赘的形成^[34]。miR-138-5p 可直接靶向 SIRT1 抑制成骨细胞分化^[35],其也可靶向调节 MACF1 抑制成骨细胞分化^[36]。细胞分裂蛋白激酶 6(cyclin-dependent kinase 6, CDK6)是蛋白激酶复合物的催化亚基,在细胞周期 G1 期进展和 G1/S 期过渡中必不可少^[37]。通过同时驱动 mTORC1 和 E2F 家族, CyclinD-CDK6 能够调节细胞生长和细胞周期进程。下调 Circ_101238 通过调节 miR-138-5p/CDK6 轴抑制细胞增殖,促进成纤维细胞凋亡^[38]。OA 中细胞凋亡与增殖的平衡对维持软骨健康至关重要。BCLs 和 caspase 在调控细胞凋亡中起重要作用。缺硒导致软骨细胞异常凋亡。MCF2L、SelM、MCF2L-AS1 和 MACF1 参与调控细胞凋亡和增殖。SIRT1、CDK6 和 MACF1 影响细胞分化、增殖和凋亡。Circ_101238 抑制细胞增殖,促进成纤维细胞凋亡。这些

过程都与 miR-138-5p 密不可分。

2.3 miR-138-5p 调控基质降解对 OA 的影响

OA 中基质降解是一个重要的病理生理过程,它是疾病进展的重要因素之一^[39]。关节组织中的细胞产生酶类,如金属蛋白酶、组织蛋白酶、脯氨酰内肽酶及酪氨酸酶等,分解 II 型胶原蛋白和聚集蛋白聚糖,引起软骨和其他关节组织的退行性病变。马泽涛等^[29]的实验结果显示,转染 miR-138-5p 模拟物的细胞中 MMP1、MMP3 和 MMP13 miRNA 的表达水平均上升,其中 MMP1 上调最为明显,MMP 降解细胞外基质 (extracellular matrix degradation, ECM),进而引发软骨退化。Zhou 等^[40]实验证明了 circRNA_Atp9b 在 IL-1 β 诱导的软骨细胞中表达上调,其直接靶向 miR-138-5p,其表达模式与 miR-138-5p 的表达模式呈负相关,下调 miR-138-5p 部分逆转了 circRNA_Atp9b 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞 ECM 分解代谢和炎症反应的保护作用。Seidl 等^[41]认为 miR-138-5p 能够通过靶向特异性蛋白 (specific protein, Sp)-1 和缺氧诱导因子 2 α (hypoxia-inducible factor 2 α , HIF-2 α) 来抑制软骨 ECM 主要成分 COL2A1 的表达。miR-138-5p 的调节可以有效地影响 IL-1 β 诱导的 OA 软骨细胞 ECM 降解。抑制 miR-138-5p 可以逆转 IL-1 β 诱导的 COL2A1 的降低以及逆转 IL-1 β 诱导的 MMP-13 升高^[42]。OA 中基质降解是疾病进展的重要因素之一,miR-138-5p 调节 MMP1、MMP3、MMP13 以及 COL2A1 的表达,影响软骨细胞 ECM 降解和炎症反应,还通过靶向 Sp-1 和 HIF-2 α 抑制 COL2A1 的表达,具体的机制和治疗策略仍需要进一步的研究和验证。

3 miR-138-5p 激活或抑制 OA 相关信号通路

有多条信号通路参与 OA 的疾病进程,如 NF- κ B、Wnt/ β -catenin、PI3K/AKT、TGF- β 及 MAPK 等,miR-138-5p 可以通过激活或抑制这些通路中相关因子的表达,参与 OA 病程中。

3.1 miR-138-5p 与 NF- κ B 通路

miR-138-5p 与核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路之间的关系在炎症性疾病、肿瘤和免疫调节中都有广泛的研究^[43]。NF- κ B 通路是一个重要的细胞信号通路,对于炎症、免疫反应和细胞生存等多种生物学过程都起着关键作用。其经典途径 (canonical pathway)^[44]由细菌脂多糖、病毒、炎症因子等激活,涉及核因子 κ B 抑制蛋白 α 抗体

(inhibitor of NF- κ B α , I κ B α) 的磷酸化和降解;非经典途径 (non-canonical pathway)^[45]由肿瘤坏死因子相关激活蛋白 (TNF associated activation protein, TRAP)、激素等激活,涉及 I κ B 蛋白家族成员的磷酸化和降解。该通路的激活包括以下步骤:机体内 NF- κ B 通路通常处于非激活状态,I κ B 蛋白结合 NF- κ B 并抑制其活性^[46];I κ B 蛋白将 NF- κ B 锚定在胞质中,阻止其进入细胞核;当细胞受到炎症因子、病毒感染、细胞应激等刺激时,I κ B 蛋白磷酸化,导致其与 NF- κ B 的结合减弱^[47];随后,磷酸化的 I κ B 被泛素化并降解,释放出 NF- κ B;I κ B 降解时,NF- κ B 进入细胞核,与 DNA 结合,激活下游基因的转录。这些下游基因编码多种炎症介质、抗凋亡蛋白和免疫调节因子。有研究发现,miR-138-5p 可以抑制 SIRT1 的表达并间接激活 NF- κ B 信号通路,加重组织损伤程度、氧化应激反应和炎症反应,并抑制细胞增殖,促进细胞凋亡^[48]。但也有不同观点认为,降低 miR-138-5p 的表达可能导致下游直接靶基因 h-NFKB1、h-RELA 和 h-RELB 的表达上调,从而增加 NF- κ B 蛋白的形成^[49]。NF- κ B 蛋白作为细胞质中 NF- κ B 通路的下游信号分子,被转运到细胞核内,有效激活 NF- κ B 通路中靶基因的转录,NF- κ B 与 I κ B 分离并易位到核内,调节炎症细胞因子的表达,增加了 MMP-3 和 MMP-13 蛋白的表达水平,诱导软骨分解、关节破坏,导致 OA 的发生^[50]。Liu 等^[51]同样证明了 miR-138-5p 可以直接靶向 NF- κ B p65 转录物,而花青素通过 miR-138-5p/SIRT1 轴抑制 NF- κ B 通路的激活,减缓 OA 进程。

3.2 miR-138-5p 与 Wnt/ β -catenin 通路

miR-138-5p 通过 Wnt/ β -catenin (Wnt/ β -连环蛋白) 通路调控肿瘤和组织再生等生物学过程^[52]。该通路的激活始于 Wnt 蛋白与细胞膜上的卷曲蛋白 (Frizzled) 家族受体结合。此过程由 Wnt 蛋白的分泌和受体的选择性结合触发^[53]。Frizzled 受体激活导致低密度脂蛋白受体相关蛋白 (low-density lipoprotein receptor-related protein, LRP) 家族成员与其形成复合物,此为 Wnt 信号传导的关键步骤^[54]。Frizzled-LRP 复合物形成会导致 Disheveled 蛋白激活,进一步阻止 Axin-GSK3 β -APC 复合物形成,减少 β -catenin 降解。Wnt/ β -catenin 受抑制时,Axin-GSK3 β -APC 复合物促使 β -catenin 磷酸化和降解。Wnt 信号激活导致 Disheveled 激活,阻止 Axin-GSK3 β -APC 复合物形成,减少 β -catenin 降解。当

Axin-GSK3 β -APC 复合物解离后, β -catenin 无法磷酸化、降解。稳定的 β -catenin 会进入细胞核, 并与 T 细胞因子/淋巴增强因子 (T-cell factor/lymphoid enhancer factor, TCF/LEF) 家族的转录因子结合。这一复合物的形成激活了 Wnt/ β -catenin 响应基因的转录, 从而影响细胞命运和功能^[55]。研究表明, miR-138-5p 可以与 Wnt 通路成员 (如 Wnt1、Wnt3a) 或 β -catenin 相互作用, 导致这些因子的 mRNA 降解或抑制其翻译, 从而抑制 Wnt/ β -catenin 通路激活。Wnt/ β -catenin 通路异常活化与肿瘤的发生发展相关, miR-138-5p 的上调抑制 Wnt/ β -catenin 通路激活, 进而抑制肿瘤细胞增殖和侵袭^[56]。miR-138-5p 还可以调控 Wnt/ β -catenin 通路参与骨组织等再生修复^[57]。miR-138-5p 过表达显著抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达, 而 miR-138-5p 和 RUNX2 同时过表达则逆转了这种作用, 提示 Wnt/ β -catenin 信号通路参与了 miR-138-5p/RUNX2 对成骨分化的调控^[56]。在 OA 小鼠模型中, Wnt/ β -Catenin 通路被激活, 促进增殖软骨细胞向肥大软骨细胞分化, 防止软骨退化^[58], 但此作用有限, Wnt/ β -catenin 信号的持续激活可能促进软骨降解和加重 OA^[59]。miR-138-5p 可以使 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白 (β -catenin、Cyclin D1 和 cMyc) 表达减少^[52], 降低软骨细胞凋亡^[60]。

3.3 miR-138-5p 与 PI3K/AKT 通路

miR-138-5p 可负调控 PI3K/AKT 通路。PI3K/AKT 通路的激活是由细胞外生长因子或细胞因子与其相应的受体 (如酪氨酸激酶受体) 结合触发的^[61]。这一细胞外刺激会触发受体的磷酸化, 从而激活下游信号传导。激活的受体与磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 作用进一步激活 PI3K。PI3K 是 PI3K/AKT 通路的关键酶, 它将细胞膜上的磷脂酰肌醇-4,5-双磷酸 (phosphatidylinositol-bis-4,5-phosphate, PIP2) 转化为磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 (phosphatidylinositol-bis3,4,5-phosphate, PIP3)^[62]。PIP3 的积累是 PI3K/AKT 通路激活的关键标志。PIP3 是一个次要信号分子, 它在细胞膜上的积聚引发了后续信号传导级联。PIP3 作为第二信使, 会招募磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1 (phosphate inositol dependent protein kinase-1, PDK1) 和丙酮酸脱氢酶激酶同工酶 2/3 (pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme-2/3, PDK2/3), 这些蛋白激酶共同参与 AKT 的激活。AKT 是 PI3K/AKT 通路的核心效应

蛋白, 其激活后可以调控细胞增殖、存活、周期进程及蛋白质合成等^[63]。这对细胞的正常功能和生理状态至关重要。PI3K/AKT 通路中还存在一些负反馈机制, 有助于控制通路过度激活^[64]。例如, PDK1 可磷酸化 PTEN 基因来减少 PIP3 表达, 进而降低该通路信号传导。SIRT1 被认为是肿瘤抑制因子 PTEN 的一种去乙酰化酶^[65], 而后者是 PI3K/AKT 通路的负调节因子, 并因此影响细胞生长和存活^[66]。已有实验证明, miR-138-5p 的缺失会降低 PTEN 表达, 并通过 SIRT1 激活 PI3K/AKT 通路^[67], 进一步促进 ECM 降解, 抑制软骨细胞增殖^[68], Jiang 等^[69]也得出了同样的结论, 而 Nintedanib 可抑制 OA 滑膜巨噬细胞的 M1 极化、抑制滑膜炎症和纤维化以及通过 MAPK/PI3K-AKT 通路减少关节软骨退变来减轻 OA 病理过程^[70]。lncRNA TRPM2-AS 是一种可以调控 miRNA 的致癌基因^[71], Cui 等^[72]通过荧光素酶报告基因系统证明了 miR-138-5p 与 TRPM2-AS 之间存在适度但明显的负相关, miR-138-5p 可灭活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的关键调控分子, 导致 OA 小鼠软骨组织中 II 型胶原、聚蛋白聚糖升高, I 型胶原和 X 型胶原降低, 抑制 OA 组织炎症和软骨细胞凋亡^[73]。

miR-138-5p 可以既激活又抑制与 OA 相关的信号通路, 其在 OA 的发病机制中具有复杂的调节功能, 影响机理是多样且多因素的, 仍有许多未知领域等待进一步深入研究。

4 结语与展望

骨关节炎的病因和治疗研究依然是一个复杂而充满挑战的领域, 科学界对其发病机制尚未完全阐明, 现有的治疗方法疗效不佳, 亟需找到新的治疗策略。miR-138-5p 已在肿瘤学、神经科学、免疫学、心血管病学等领域有较为广泛的研究, 而其在慢性疾病、组织工程和再生医学等领域的作用还需学者们深入探索。越来越多的研究证实, miR-138-5p 在 OA 的疾病进程中起重要作用, 它可以通过调控炎症、细胞凋亡与增殖、基质降解等过程, 影响滑膜炎症及软骨退变, 这一过程中 NF- κ B、Wnt/ β -catenin、PI3K/AKT 等信号通路参与其中。鉴于 miR-138-5p 影响 OA 机制的复杂性, 只有深入对其研究才能够为临床治疗 OA 提供潜在靶点及思路。

参考文献:

[1] MARTEL-PELLETIER J, BARR A J, CICUTTINI F M, et al.

- Osteoarthritis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2: 16072.
- [2] PALAZZO C, NGUYEN C, LEFEVRE-COLAU M M, et al. Risk factors and burden of osteoarthritis [J]. Ann Phys Rehabil Med, 2016, 59(3): 134–138.
- [3] NEOGI T, ZHANG Y. Epidemiology of osteoarthritis [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2013, 39(1): 1–19.
- [4] VERONESE N, STUBBS B, NOALE M, et al. Adherence to the Mediterranean diet is associated with better quality of life: data from the Osteoarthritis Initiative [J]. Am J Clin Nutr, 2016, 104(5): 1403–1409.
- [5] SACITHARAN P K. Ageing and osteoarthritis [J]. Subcell Biochem, 2019, 91: 123–159.
- [6] HE C, ZHAO C, LIU S, et al. Down-regulation of miR-138-5p protects chondrocytes atdc5 and CHON-001 from IL-1 β -induced inflammation via Up-regulating sox9 [J]. Curr Pharm Des, 2020, 25(43): 4613–4621.
- [7] ZHANG H, SHAO Y, YAO Z, et al. Mechanical overloading promotes chondrocyte senescence and osteoarthritis development through downregulating FBXW7 [J]. Ann Rheum Dis, 2022, 81(5): 676–686.
- [8] ZHANG H, CAI D, BAI X. Macrophages regulate the progression of osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2020, 28(5): 555–561.
- [9] YU F, ZENG H, LEI M, et al. Effects of *SIRT1* gene knock-out via activation of SREBP2 protein-mediated PI3K/AKT signaling on osteoarthritis in mice [J]. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2016, 36(5): 683–690.
- [10] CHEN L, HEIKKINEN L, WANG C, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools [J]. Brief Bioinform, 2019, 20(5): 1836–1852.
- [11] LU Y, TAN L, WANG X. Circular HDAC9/microRNA-138/sirtuin-1 pathway mediates synaptic and amyloid precursor protein processing deficits in Alzheimer’s disease [J]. Neurosci Bull, 2019, 35(5): 877–888.
- [12] YANG Y N, LUO Y B, XU G, et al. CircHECTD1 promoted MIRI-associated inflammation via inhibiting miR-138-5p and upregulating ROCK2 [J]. Kaohsiung J Med Sci, 2023, 39(7): 675–687.
- [13] XUN J, DU L, GAO R, et al. Cancer-derived exosomal miR-138-5p modulates polarization of tumor-associated macrophages through inhibition of KDM6B [J]. Theranostics, 2021, 11(14): 6847–6859.
- [14] DA CRUZ A T, HUNGER A, DE MELO F H M, et al. MiR-138-5p induces aggressive traits by targeting Trp53 expression in murine melanoma cells, and correlates with poor prognosis of melanoma patients [J]. Neoplasia, 2021, 23(8): 823–834.
- [15] SHAO L, HOU C. MiR-138 activates NF- κ B signaling and PGRN to promote rheumatoid arthritis via regulating HDAC4 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 519(1): 166–171.
- [16] KOPAŃSKA M, SZALA D, CZECH J, et al. MiRNA expression in the cartilage of patients with osteoarthritis [J]. J Orthop Surg Res, 2017, 12(1): 51.
- [17] WANG T, HE C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2018, 44: 38–50.
- [18] MEHANA E S E, KHAFAGA A F, EL-BLEHI S S. The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: an updated review [J]. Life Sci, 2019, 234: 116786.
- [19] HOFF P, BUTTGEREIT F, BURMESTER G R, et al. Osteoarthritis synovial fluid activates pro-inflammatory cytokines in primary human chondrocytes [J]. Int Orthop, 2013, 37(1): 145–151.
- [20] BERENBAUM F. Signaling transduction; target in osteoarthritis [J]. Curr Opin Rheumatol, 2004, 16(5): 616–622.
- [21] 何春来. 低表达的 miR-138-5p 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞 ATDC5 和 CHON-001 炎症的保护作用及机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2020.
- HE C L. The protective effects and mechanism of Down-regulation miR-138-5p on the chondrocyte atdc5 and CHON-001 of the inflammation induced by IL-1 β [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2020.
- [22] FAN H W, LIU G Y, ZHAO C F, et al. Differential expression of COX-2 in osteoarthritis and rheumatoid arthritis [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4): 12872–12879.
- [23] 胡显腾. circRNA_Atp9b 对 miR-138-5p 的调控在骨关节炎中的作用及机制研究 [D]. 上海: 海军军医大学, 2019.
- HU X T. Role and mechanism of circRNA_Atp9b in regulating mir-138-5p in osteoarthritis [D]. Shanghai: Naval Medical University, 2019.
- [24] SHI J, CAO F, CHANG Y, et al. Long non-coding RNA MCM3AP-AS1 protects chondrocytes ATDC5 and CHON-001 from IL-1 β -induced inflammation via regulating miR-138-5p/SIRT1 [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 1445–1456.
- [25] JIANG T, HOU C C, SHE Z Y, et al. The *SOX* gene family: function and regulation in testis determination and male fertility maintenance [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(3): 2187–2194.
- [26] HAN Y, LEFEBVRE V. L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer [J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(16): 4999–5013.
- [27] KERR J F, WYLLIE A H, CURRIE A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. Br J Cancer, 1972, 26(4): 239–257.
- [28] WONG S H J, CHIU K Y, YAN C H. Review article: osteophytes [J]. J Orthop Surg, 2016, 24(3): 403–410.
- [29] 马泽涛, 曾晖, 王德利, 等. 微小 RNA-138-5p 与软骨细胞增殖和自噬的关系 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(5): 674–678.
- MA Z T, ZENG H, WANG D L, et al. MicroRNA-138-5p regulates chondrocyte proliferation and autophagy [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2021, 25(5): 674–678.
- [30] 王力俭, 田可川, 吴伟伟, 等. 细胞凋亡信号传导通路的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(10): 132–135.

- WANG L J, TIAN K C, WU W W, et al. Recent advances on the signal transduction pathways of apoptosis [J]. China Anim Husb Vet Med, 2011, 38(10): 132–135.
- [31] LI J, YUAN J. Caspases in apoptosis and beyond [J]. Oncogene, 2008, 27(48): 6194–6206.
- [32] 栾依霖. 缺硒通过 gga-miR-138-5p 靶向 SelM 激活的线粒体通路诱导软骨细胞凋亡 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017.
- LUAN Y L. Selenium deficiency induce chondrocyte apoptosis through gga-miR-138-5p targeting SelM-activated mitochondrial pathway [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2017.
- [33] 许永权, 张金山, 施纯南, 等. 骨性关节炎相关基因 MCF2L 可增加滑膜成纤维细胞凋亡及诱导炎症反应 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(6): 2137–2142.
- XU Y Q, ZHANG J S, SHI C N, et al. Osteoarthritis related genes *MCF2L* could increase apoptosis of synovial fibroblasts and induce inflammatory response [J]. Genom Appl Biol, 2017, 36(6): 2137–2142.
- [34] 徐梅玲, 张育珠, 申大年. LncRNA MCF2L-AS1 靶向调控 miR-138-5p 对人骨髓间充质干细胞增殖、凋亡和成骨分化的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 9(1): 188–192.
- XU M L, ZHANG Y Z, SHEN D N. Effect of LncRNA MCF2L-AS1-targeted regulation of miR-138-5p on proliferation, apoptosis and osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Chin J Gerontol, 2023, 9(1): 188–192.
- [35] 徐丽群, 张丽君, 李高志, 等. 模拟失重下 miR-138-5p 靶向 SIRT1 负调控成骨细胞分化的研究 [J]. 解放军医学院学报, 2021, 42(10): 1074–1080.
- XU L Q, ZHANG L J, LI G Z, et al. MiR-138-5p inhibits osteoblast differentiation by downregulating SIRT1 expression under simulated weightlessness [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2021, 42(10): 1074–1080.
- [36] CHEN Z, HUAI Y, CHEN G, et al. MiR-138-5p targets MACF1 to aggravate aging-related bone loss [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(13): 4837–4852.
- [37] ROMERO-POZUELO J, FIGLIA G, KAYA O, et al. Cdk4 and Cdk6 couple the cell-cycle machinery to cell growth via mTORC1 [J]. Cell Rep, 2020, 31(2): 107504.
- [38] YANG D, LI M, DU N. Effects of the circ_101238/miR-138-5p/CDK6 axis on proliferation and apoptosis keloid fibroblasts [J]. Exp Ther Med, 2020, 20(3): 1995–2002.
- [39] HODGKINSON T, KELLY D C, CURTIN C M, et al. Mechanosignalling in cartilage: an emerging target for the treatment of osteoarthritis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2022, 18(2): 67–84.
- [40] ZHOU Z B, DU D, HUANG G X, et al. Circular RNA Atp9b, a competing endogenous RNA, regulates the progression of osteoarthritis by targeting miR-138-5p [J]. Gene, 2018, 646: 203–209.
- [41] SEIDL C I, MARTINEZ-SANCHEZ A, MURPHY C L. Derepression of microRNA-138 contributes to loss of the human articular chondrocyte phenotype [J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 68(2): 398–409.
- [42] YUAN Y, ZHANG G Q, CHAI W, et al. Silencing of microRNA-138-5p promotes IL-1 β -induced cartilage degradation in human chondrocytes by targeting FOXC1: miR-138 promotes cartilage degradation [J]. Bone Joint Res, 2016, 5(10): 523–530.
- [43] POMA P. NF- κ B and disease [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(23): 9181.
- [44] YU H, LIN L, ZHANG Z, et al. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 209.
- [45] SUN S C. Non-canonical NF- κ B signaling pathway [J]. Cell Res, 2011, 21(1): 71–85.
- [46] HAYDEN M S, GHOSH S. Shared principles in NF- κ B signaling [J]. Cell, 2008, 132(3): 344–362.
- [47] LAWRENCE T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6): a001651.
- [48] WU Y, JIANG W, LU Z, et al. MiR-138-5p targets sirtuin1 to regulate acute lung injury by regulation of the NF- κ B signaling pathway [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2020, 98(8): 522–530.
- [49] CHEN Y, LI Q, TAN Z, et al. MicroRNA-mediated regulation of BM-MSCs differentiation into sweat gland-like cells: targeting NF- κ B [J]. J Mol Histol, 2019, 50(2): 155–166.
- [50] ZHAO P, MA G, MA L. MiR-181a-5p targets DDX3X to inhibit the progression of osteoarthritis via NF- κ B signaling pathway [J]. J Orthop Surg Res, 2023, 18(1): 606.
- [51] LIU Y, ZHANG M, ZHANG H, et al. Anthocyanins inhibit airway inflammation by downregulating the NF- κ B pathway via the miR-138-5p/SIRT1 axis in asthmatic mice [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2022, 183(5): 539–551.
- [52] HUANG B, ZHANG Y, SUN P, et al. MiR-138-5p inhibits thyroid cancer cell growth and stemness by targeting TRPC5/wnt/ β -catenin pathway [J]. Mol Biotechnol, 2024, 66(3): 544–553.
- [53] HAYAT R, MANZOOR M, HUSSAIN A. Wnt signaling pathway: a comprehensive review [J]. Cell Biol Int, 2022, 46(6): 863–877.
- [54] MACDONALD B T, TAMAI K, HE X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases [J]. Dev Cell, 2009, 17(1): 9–26.
- [55] LIU J, XIAO Q, XIAO J, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 3.
- [56] YAN F, HUO Q, ZHANG W, et al. MiR-138-5p targets RUNX2 to inhibit osteogenic differentiation of aortic valve interstitial cells via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2022, 22(1): 24.
- [57] ZENG Q, SONG R, AO L, et al. Notch1 promotes the pro-osteogenic response of human aortic valve interstitial cells via

- modulation of ERK1/2 and nuclear factor- κ B activation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(7): 1580–1590.
- [58] YE P, MI Z, WEI D, et al. MiR-3960 from mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles inactivates SDC1/wnt/ β -catenin axis to relieve chondrocyte injury in osteoarthritis by targeting PHLDA2 [J]. *Stem Cells Int*, 2022, 2022: 9455152.
- [59] DONG Y F, SOUNG D O Y, SCHWARZ E M, et al. Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor [J]. *J Cell Physiol*, 2006, 208(1): 77–86.
- [60] LI W, XIONG Y, CHEN W, et al. Wnt/ β -catenin signaling may induce senescence of chondrocytes in osteoarthritis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(3): 2631–2638.
- [61] VISWANATHAN A, KUTE D, MUSA A, et al. 2-(2-(2, 4-dioxopentan-3-ylidene)hydrazineyl)benzonitrile as novel inhibitor of receptor tyrosine kinase and PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in glioblastoma [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 166: 291–303.
- [62] ERSAHIN T, TUNCBAG N, CETIN-ATALAY R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway [J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11(7): 1946–1954.
- [63] TEWARI D, PATNI P, BISHAYEE A, et al. Natural products targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in cancer: a novel therapeutic strategy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 80: 1–17.
- [64] NI Y, SINNETT-SMITH J, YOUNG S H, et al. PKD1 mediates negative feedback of PI3K/Akt activation in response to G protein-coupled receptors [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73149.
- [65] IKENOUE T, INOKI K, ZHAO B, et al. PTEN acetylation modulates its interaction with PDZ domain [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(17): 6908–6912.
- [66] DATTA S R, BRUNET A, GREENBERG M E. Cellular survival: a play in three Akts [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(22): 2905–2927.
- [67] WANG B, WANG D, YAN T, et al. MiR-138-5p promotes TNF- α -induced apoptosis in human intervertebral disc degeneration by targeting SIRT1 through PTEN/PI3K/Akt signaling [J]. *Exp Cell Res*, 2016, 345(2): 199–205.
- [68] ZHANG H, ZHENG W, LI D, et al. MiR-379-5p promotes chondrocyte proliferation via inhibition of PI3K/akt pathway by targeting YBX1 in osteoarthritis [J]. *Cartilage*, 2022, 13(1): 19476035221074024.
- [69] JIANG L, ZHOU X, XU K, et al. MiR-7/EGFR/MEGF9 axis regulates cartilage degradation in osteoarthritis via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 8622–8634.
- [70] YAN J, FENG G, YANG Y, et al. Nintedanib ameliorates osteoarthritis in mice by inhibiting synovial inflammation and fibrosis caused by M1 polarization of synovial macrophages via the MAPK/PI3K-AKT pathway [J]. *FASEB J*, 2023, 37(10): e23177.
- [71] HU J, XU L, SHOU T, et al. Systematic analysis identifies three-lncRNA signature as a potentially prognostic biomarker for lung squamous cell carcinoma using bioinformatics strategy [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2019, 8(5): 614–635.
- [72] CUI D, FENG Y, SHI K, et al. Long non-coding RNA TRPM2-AS sponges microRNA-138-5p to activate epidermal growth factor receptor and PI3K/AKT signaling in non-small cell lung cancer [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(20): 1313.
- [73] JIANG Y, ZHANG L, TIAN H. MicroRNA-149 improves osteoarthritis via repression of VCAM-1 and inactivation of PI3K/AKT pathway [J]. *Exp Gerontol*, 2023, 174: 112103.

[收稿日期]2023-11-28

王朋,朱宏伟,姜树原,等. Ezrin 蛋白在幽门螺杆菌感染的结节性胃炎中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 150-156.

Wang P, Zhu HW, Jiang SY, et al. Effects of ezrin protein on *Helicobacter pylori*-induced nodular gastritis [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 150-156.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.017

Ezrin 蛋白在幽门螺杆菌感染的结节性胃炎中的研究进展

王 朋^{1,2},朱宏伟²,姜树原²,刘晓蕾²,高 冰²,邵 国^{2,3,4*}

(1.包头医学院第二附属医院医学检验科,内蒙古 包头 014030;2.格乐大学国际学院公共卫生系,泰国 曼谷 10220;
3.深圳市龙岗区第三人民医院转化医学中心,深圳 518100;4.内蒙古低氧转化医学重点实验室,包头医学院,
内蒙古 包头 014060)

【摘要】 ERM 蛋白家族(包括 ezrin、radixin、moesin)在细胞形态、迁移和信号转导中发挥着至关重要的作用。Ezrin 是 ERM 蛋白家族的成员之一,是幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)感染宿主所致细胞毒性的重要介质,通过 ezrin 磷酸化可以调节其与肌动蛋白细胞骨架的相互作用,进而对细胞形态产生显著影响。本文综述了 ezrin 蛋白在 *H. pylori* 感染引发的结节性胃炎中的重要性,探讨了 ezrin 蛋白的结构及其功能、信号通路及磷酸化与结节性胃炎的关系,为以 ezrin 蛋白作为潜在的治疗靶点对结节性胃炎的防治提供新思路。

【关键词】 幽门螺杆菌;结节性胃炎;ERM 蛋白;ezrin

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0150-07

Effects of ezrin protein on *Helicobacter pylori*-induced nodular gastritis

WANG Peng^{1,2}, ZHU Hongwei², JIANG Shuyuan², LIU Xiaolei², GAO Bing², SHAO Guo^{2,3,4*}

(1. Department of Medical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 104030, China.
2. Department of Public Health, International College, Krirk University, Bangkok 10220, Thailand. 3. Center for Translational
Medicine, the Third People's Hospital of Longgang District, Shenzhen 518100. 4. Inner Mongolia Key
Laboratory of Hypoxic Translational Medicine, Baotou Medical College, Baotou 014060)

【Abstract】 The ezrin, radixin, moesin (ERM) protein family plays a pivotal role in cell morphology, migration, and signal transduction. Ezrin, as a prominent member of this family, is highly involved in these processes. Ezrin phosphorylation is particularly crucial, by regulating the interaction between ezrin and the actin cytoskeleton. This interaction is a key mediator of cytotoxicity in host cells infected with *Helicobacter pylori*, significantly impacting cell morphology. In this review, we comprehensively summarize the multifaceted role of ezrin protein in *H. pylori*-induced nodular gastritis. We consider the relationships between ezrin's structure, function, signaling pathways, and phosphorylation in the context of nodular gastritis. Moreover, this review highlights the role of ezrin protein as a potential therapeutic target, offering novel insights for the prevention and treatment of nodular gastritis.

【基金项目】 国家自然科学基金(82060337);深圳市龙岗区医疗卫生科技计划项目(LGKCYLWS2021000033, LGKCYLWS2023025);深圳市科技计划项目基础研究面上项目(JCYJ20220531092412028, JCYJ20230807121306012);包头医学院临床医学+X 多学科联合科研基金(BYJJ-DXK 2022047);包头医学院科学研究基金(BYJJ-QWB 202212)。

【作者简介】 王朋(1982—),男,硕士,研究方向:消化系统疾病的分子机制研究。E-mail:happyhours135@163.com;

【通信作者】 邵国(1972—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:低氧神经保护研究。E-mail:shao.guo.china@gmail.com

[Keywords] *Helicobacter pylori*; nodular gastritis; ERM proteins; ezrin

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

ERM 蛋白家族是细胞骨架与质膜相互作用的关键调节器,包括 ezrin、radixin 和 moesin 蛋白,这些蛋白含有两个主要的结构域:NH₂-末端结构域负责与质膜蛋白结合,而-COOH 末端结构域则与丝状肌动蛋白(F-肌动蛋白)结合^[1-2]。在非活性状态下,这两个结构域相互作用,保持蛋白处于“休眠”状态^[2-4]。特别是 ezrin 蛋白,在儿童癌症转移中扮演了关键启动子角色,并且属于肠上皮细胞微绒毛核心蛋白的成分,表面结构富含肌动蛋白^[5]。它控制胃酸分泌,发挥多种生理作用,包括维持细胞极性、调节细胞粘附、细胞运动和形态^[6]。Ezrin 蛋白的-COOH 末端含有苏氨酸和丝氨酸残基,是比较敏感的磷酸化位点。Thr567 被 Rho 激酶或蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 磷酸化,以及与其蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 介导的末端 Ser66 的磷酸化使其从休眠状态变为活化状态。在这个过程中,ezrin 蛋白从细胞质富集到细胞膜上,并高度集中在胃壁细胞的顶端^[7],促进胃黏膜炎性浸润^[8]。磷酸化调控 ezrin 对钙蛋白酶 I 的敏感性提供了结构和功能证据,进一步支持 ezrin 作为顶端膜和肌动蛋白细胞骨架之间联系的关键作用,进而导致胃壁细胞形成多个“鸡皮样”突起。Ezrin 不仅在胃底的壁细胞中表达,也表达于表面的黏液细胞^[9]。近期研究发现,ezrin 蛋白在细胞内应对幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 感染时可能参与了调控细胞的粘附、形态及信号传导^[10]。由于 *H. pylori* 引起的胃部疾病与 ezrin 蛋白的作用关系复杂,还需要更多的研究来阐明。因此,本文对近年来 ezrin 蛋白的结构和相关功能、信号通路和 ezrin 蛋白磷酸化在 *H. pylori* 感染的结节性胃炎的作用进行简要的综述。

1 Ezrin 蛋白的结构和相关功能

Ezrin 是 ERM 蛋白家族的成员之一,由 *EZR* 基因编码,是微绒毛核心蛋白,分子量 80 kDa,是蛋白酪氨酸激酶底物^[11],可以调节细胞皮层特定区域结构和功能的膜相关蛋白^[12]。Ezrin 由 3 个主要结构域组成:NH₂-末端 FERM (N-terminal 4.1-ezrin-radixin-moesin, FERM) 结构域、中心 α -螺旋结构域和-COOH 末端肌动蛋白结合结构域^[4]。Ezrin 蛋白的核心是 FERM 结构,这些结构域是结合其他蛋白

质和膜必不可少的,他们的相互作用对于将质膜连接到肌动蛋白细胞骨架和蛋白激活至关重要^[3]。中心区域由 α -螺旋结构域组成,该结构域在分子内相互作用中起着关键作用。-COOH 末端结构域包含一个与 F-肌动蛋白相互连接的结合位点。另外富含脯氨酸的接头区域位于 α -螺旋结构域和-COOH 末端结构域之间^[3]。在无活性状态下, α -螺旋结构域负责使 ezrin 蛋白保持封闭状态,防止-COOH 末端结构域上的肌动蛋白结合位点暴露。其封闭状态时 ezrin 位于细胞质中,当 ezrin 被富集到富含磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 (phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate, PIP₂) 的质膜区域时,PIP₂ 与 FERM 结构域结合并暴露封闭的-COOH 末端 Thr567。随后 PKC 和 Rho 激酶等激酶磷酸化 ezrin 的 Thr567,破坏 ezrin 分子头尾的相互作用,肌动蛋白结合位点暴露出来与肌动蛋白丝相互作用,从而将质膜连接到底层的肌动蛋白细胞骨架上,进而通过介导膜动力学参与信号通路^[13]。

Ezrin 是参与微丝细胞骨架与质膜相互作用的蛋白质家族的成员,在胃壁细胞的膜易位中发挥作用。壁细胞胃酸分泌的刺激涉及质子泵 (H⁺, K⁺-ATP 酶) 从细胞质管泡到顶膜的易位,形成长的、含有 F-肌动蛋白的微绒毛^[14],ezrin 蛋白参与 H⁺, K⁺-ATP 酶膜运输^[15]。缺乏 ezrin 不仅会导致胃酸缺乏和高胃泌素血症,还会改变胃腺的结构,严重扰乱壁细胞的分泌^[7,16]。

2 Ezrin 蛋白在 *H. pylori* 感染的结节性胃炎的作用

结节性胃炎是胃炎的一种独特模式,病理表现为淋巴滤泡和单核细胞浸润^[17]。以 *H. pylori* 感染引起的炎症为主^[18],结节性胃炎的主要特征是在内窥镜检查时可观察到小结节样或颗粒样病变,可以是单发或多发的,这些病变最常见于胃窦^[19-21]。当 *H. pylori* 植入宿主后引发持续感染,高毒力 *H. pylori* 菌株通过编码 IV 型分泌系统和整合素将细胞毒素相关基因 A (cytotoxin-associated gene A, CagA) 致病岛植入到胃上皮靶细胞中^[22]。CagA 以磷酸化依赖性和磷酸化非依赖性方式结合并激活或灭活信号蛋白^[23]。Ezrin 蛋白是 CagA 细胞毒性的重要介质^[24],在感染 *H. pylori* 的早期,Src 家族激酶 (如 c-Src、Fyn 和 Lyn) 和 c-Abl 家族激酶可以被菌毛相

关蛋白 CagL 激活,触发 Y-418 位点 c-Src 的磷酸化^[25]。一旦被激活,c-Src 和 c-Abl 可以快速磷酸化谷氨酸-脯氨酸-异亮氨酸-酪氨酸-丙氨酸(Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala, EPIYA)序列中的 CagA^[26],然后,磷酸化的 CagA 通过负反馈机制使 c-Src 失活^[27],该负反馈机制包括磷酸化的 CagA 与 Src 的直接结合、下调位点 Y-527 的磷酸化和 Y-418 的去磷酸化。Y-527 的磷酸化过程是 CagA 磷酸化并激活羧基末端 Src 激酶(carboxy-terminal Src kinase, Csk)来完成。Csk 作为 Src 家族激酶的下调因子,使 Src 的靶向 ezrin 蛋白去磷酸化,并减少 CagA 的磷酸化^[24]。因此,在宿主细胞中,CagA 在酪氨酸残基上被磷酸化并诱导肌动蛋白细胞骨架的重排。酪氨酸磷酸化的 CagA 抑制 Src 家族激酶的催化活性,并诱导宿主细胞蛋白的酪氨酸去磷酸化,由 CagA 介导的 ezrin 去磷酸化是 Src 失活的诱因^[28],这种依赖性负反馈机制使宿主细胞抵抗 *H. pylori* 感染起到很好的保护作用^[29]。CagA 阳性菌株可引起宿主慢性持续感染,从而引起胃黏膜的损伤。*H. pylori* 通过 CagA 蛋白的易位和磷酸化引起宿主细胞形态的显著变化,尤其是“蜂鸟”表型的诱导。CagA 蛋白在宿主细胞内的 EPIYA-C 或-D 基序被 Src 家族激酶和 c-Abl 激酶磷酸化后,与 Src 同源磷酸酶-2(SHP-2)形成复合物。SHP-2 的非典型激活 MEK-ERK 和粘附斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)信号通路,导致细胞形态的改变和运动性的增加。磷酸化的 CagA 与 SHP-2 形成的复合物影响 FAK 的活性,进一步触发 Ras/MAPK/ERK 信号通路,促进细胞增殖和分化。此外,磷酸化 CagA 的 EPIYA-A 和 EPIYA-B 与 Csk 特异性相互作用并触发 Csk 的激活。Csk 使 Src 靶标 ezrin 去磷酸化,并减少 CagA 的磷酸化,ezrin 酪氨酸去磷酸化时,促进 CagA 磷酸化依赖的细胞拉长^[30],这种表型可能反映了结节性胃炎宿主细胞的运动性及上皮细胞增生,进而表现为结节状^[31]。

H. pylori 可以长期寄居在感染者的胃中,其毒力因子空泡毒素 A(vacuating cytotoxin A, VacA)渗透到胃壁细胞的顶膜并导致胃酸过少。VacA 可诱导胃壁细胞外 Ca^{2+} 内流,并激活钙蛋白酶,随后 ezrin 在蛋氨酸 469-苏氨酸 470 处发生蛋白水解,导致 ezrin 从壁细胞顶膜释放^[32]。在体外胃上皮细胞中,分泌的 VacA 与胃上皮细胞脂筏受体结合,诱导细胞外 Ca^{2+} 内流,激活 p38 MAPK 信号通路和钙蛋白酶并水解 ezrin,进而破坏顶端膜的细胞骨架肌动

蛋白基础结构,阻止 H,K-ATP 酶向分泌小管募集,由于壁细胞中 ezrin 完整性的丧失,VacA 破坏了顶端微绒毛中肌动蛋白丝的径向排列^[33]。这表明 VacA 破坏了胃壁细胞的顶端膜-细胞骨架间的相互作用^[34]。

Ezrin 是质膜相关蛋白与肌动蛋白细胞骨架交联的衔接蛋白,它集中在上皮细胞的顶端表面,尤其是小肠和胃的微绒毛^[35]。*H. pylori* 与胃上皮细胞的微绒毛密切相关,研究表明,*H. pylori* 与胃腺癌细胞和胃原代细胞的最初接触是由微绒毛介导的。*H. pylori* 被微绒毛紧密包裹,并通过拉链样机制进入细胞。在 *H. pylori* 感染患者的活检中发现细菌被微绒毛包裹,在细菌可见的部位微绒毛减少^[36]。在 *H. pylori* 感染患者的活组织检查中,胃细胞直接在细菌附近形成突起^[37]。因此,*H. pylori* 似乎在调节宿主细胞的微绒毛。Ezrin 蛋白可能在这一过程中发挥了关键作用。在胃中,ezrin 主要在顶叶细胞的顶端小管膜上表达。研究表明在敲低小鼠的顶叶细胞内含有扩张的微管,这些细胞的亚群含有多层结构,而 ezrin 的缺乏会改变胃腺的结构^[7]。由于 ezrin 是微绒毛的一种成分,也是肌动蛋白丝和膜蛋白之间的连接蛋白^[38],这可能对 *H. pylori* 引起的结节性胃炎发病机制具有重要意义。

3 Ezrin 的磷酸化和激活途径影响结节性胃炎粘膜表面形态

3.1 苏氨酸磷酸化调控细胞形态变化

Ezrin 的连接和调控功能被认为是通过其 300 多个氨基酸上的一个或几个潜在位点的磷酸化而发生的。一些磷酸化位点特定于不同的细胞上并最终导致不同的细胞反应。丝氨酸和(或)苏氨酸的磷酸化对 ezrin 的功能活性有直接影响。Ezrin 的功能活性表现在细胞膜上,其参与各种膜表面突起的形成,包括微棘、微绒毛、丝状伪足、褶皱和片状伪足。Ezrin 蛋白的激活涉及两个末端区域的解离,包括质膜结合的 NH₂-末端区域和仅在通过磷酸化激活后才能与 F-肌动蛋白结合的-COOH 末端区域。Ezrin 的-COOH 末端区域含有 Thr567 磷酸化位点,通过 Thr567 磷酸化可消除 N-C 结合构象,进而促进 ezrin 活化^[39]。对于静息状态的胃壁细胞,Thr567 上的 ezrin 磷酸化水平较低,通过刺激环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)途径也不能较大程度的增加(约 40%)。用蛋白磷酸酶抑制剂处理细胞导致 Thr567 磷酸化水平比静息时增

加 400%^[40]。在胃壁细胞中, -COOH 末端苏氨酸磷酸化是其活化和细胞骨架与膜相互作用的重要步骤^[41]。当胃壁细胞在表皮生长因子刺激下, 壁细胞通过 cAMP 途径分泌胃酸, 掺入 ezrin 蛋白的³²P 与磷酸丝氨酸结合, 形成表面折叠^[14]。活化的壁细胞中的 ezrin 在丝氨酸残基中含有³²P, 但在苏氨酸残基中没有³²P, 表明 Thr567 磷酸化在 ezrin 的顶端靶向或与壁细胞分泌活性相关的激活中作用不大。Ezrin 的活性受到多种蛋白激酶的调节, 通过激活 PKA, ezrin 在 Thr567 发生磷酸化。同时, cAMP 也促进了人胚胎肾细胞 293 中 PKA 依赖的 ezrin 磷酸化。因此, ezrin 可能会协调 cAMP 激活的交换蛋白和 PKA 的作用, 调节细胞的扩散和形态变化^[42]。Ezrin 在 Thr567 的磷酸化涉及 Rho 激活途径, Rho 激酶磷酸化会干扰 ezrin 蛋白的分子内和(或)分子间头尾结合。抑制 Rho 活性可增加酸分泌, 而激活 Rho 则抑制酸分泌。Rho 激活途径对壁细胞分泌活性有负面影响。Rho 激活的下游效应之一是 Thr567 对 ezrin 的磷酸化, 引入 Thr567D ezrin 突变体后, 导致 ezrin 的靶向错误和分泌表型的丧失。Rho 激活通常与肌动蛋白纤维的形成和局灶粘连有关。在壁细胞中, 这可能表现为基底外侧表面“挥发性”肌动蛋白池内的细胞骨架活动。在 Thr567D 突变形式的 ezrin 稳定转染的猪肾上皮细胞中, 观察到从无活性的 ezrin 寡聚体向活性单体的转变, 这与表面片状伪足、膜皱褶和微绒毛簇的形成有关^[43]。表达 Thr567D 突变 ezrin 的细胞主要表现出 CFP-Thr567D ezrin (cyan fluorescent protein, CFP) 在基底外侧膜的定位, 改变了壁细胞的极性。这种“基底外侧”的 ezrin 通常与表面的长丝状延伸有关。Thr567 磷酸化模拟物导致 ezrin 的靶向错误, 并改变了壁细胞的分泌表型, 在突变型 Thr567D ezrin 几乎完全在基底外侧膜表达, 通常以致密的、长的和微绒毛突起的形式表达, 细胞极性的这种变化涉及膜和转运蛋白(例如 H, K-ATP 酶)重新分布^[44]。有研究使用荧光活细胞成像、图像量化和原子力显微镜技术发现, 转染 ezrin Thr567D 改变了细胞的整体形态, 并降低了皮层刚性。Ezrin Thr567D 的细胞迁移速度更快, 特别是当 ezrin 在细胞底部积聚时, 迁移方向性更明显^[45]。Thr567D 首先进入根尖膜, 表达水平低, 在 24 h 后主要在基底表面积累, Thr567D 的过表达导致根尖和细胞内膜(包括 H, K-ATP 酶)大量掺入基底表面^[39]。因此抑制 ezrin 在 PKA 靶位点

Thr567 的磷酸化或抑制 ezrin 与肌动蛋白细胞骨架的相互作用对细胞形态产生了显著影响, 进而导致基底周长大幅增加, 胃壁细胞形成多个突起, 这可能是结节性胃炎形成“鸡皮样”突起的主要原因之一。

对于外源表达的 CFP 标记的 Thr567 A ezrin 蛋白, 在适当的分泌物刺激后在形态和功能上有所变化^[45]。壁细胞的主要膜蛋白, 特别是 H, K-ATP 酶发生了重新定位。在 Thr567 A 突变体的细胞中, H, K-ATP 酶从其典型的细胞质小管泡分布转移到根尖膜液泡。然而, 在表达 Thr567D 突变 ezrin 的细胞中, H, K-ATP 酶倾向于在基底外侧膜上与 Thr567D 共定位, 表明这种膜蛋白与体内所见的表面完全不同。在正常的静息细胞中, ezrin 蛋白主要存在于顶端膜的微绒毛中, 而在基底外侧膜上较少。在 ezrin 敲除小鼠中, ezrin 的表达显著降低, 壁细胞充满了富含 H, K-ATP 酶的小管泡, 但根尖小管表面和微绒毛大大减少。Ezrin 的过度表达可能导致与 ezrin 敲低相反的反应, 即过量的 ezrin 固定到质膜上, 促进富含肌动素的微绒毛结构的产生^[46]。Thr567 磷酸化对于靶向 ezrin 蛋白极性功能至关重要。在 Rho 活性较低的壁细胞中, ezrin 定位于顶部表面, 而 Thr567 磷酸化时, 基底外侧膜微绒毛发生扩张。当小管囊泡被富集到根尖膜液泡时, Thr567 A 突变细胞倾向于维持较小的根尖膜液泡, 而非通常与质子分泌状态相关的大根尖膜液泡, 这可能是由于 K⁺ 和 Cl⁻ 通道没有被激活^[39]。非活性的 ezrin-Thr567A 在细胞核周围积聚, 虽然不影响细胞迁移, 但会导致肌动蛋白纤维显著增加、核体积减小和细胞骨架刚性增加, 表达 ezrin-Thr567A 的细胞可能无法形成稳定的膜与肌动蛋白连接。

3.2 丝氨酸磷酸化调控胃壁细胞极化

丝氨酸的磷酸化对胃壁细胞顶端膜和肌动蛋白细胞骨架起到关键作用。通过组胺触发胃酸分泌发现 ezrin 蛋白 Ser66 位点被磷酸化。将重组的 ezrin 蛋白与 PKA 催化的亚单位一起孵育, 结果在 ezrin 上定位了 PKA 介导的磷酸化位点 Ser66。Ezrin 上 Ser66 的突变改变了与组胺刺激相关的根尖膜动力学^[47], 这表明 ezrin 上 Ser66 的磷酸化是胃壁细胞质子泵动员和极化分泌所必需的^[48]。研究表明 ezrin 的磷酸化是动态的, 并且与组胺刺激的壁细胞分泌相关。Ser66 磷酸化的改变并没有改变 ezrin 与细胞骨架的结合, 但却调节了顶端膜扩张的

活性,进而表明 ezrin 的 -COOH 末端结构与肌动蛋白结合,而它的 NH₂-末端结构与质膜近端其他蛋白质结合。有研究表明,在参与 NH₂-末端结构与质膜近端结合蛋白在人胎盘细胞分离出来,是 50 kDa 磷酸化蛋白的 EBP50 (ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50, EBP50)^[49]。然而,在胃壁细胞中 EBP50 表现的结果为阴性。因此,ezrin 很可能与 EBP50 的相似蛋白结合,EBP50 介导 ezrin 与顶壁细胞的顶质膜相关联。由于壁细胞激活涉及到 H, K-ATP 酶的易位,而突变体 ezrin S66 A 却阻断顶质膜动力学过程和 H, K-ATP 酶易位过程^[50]。在组胺刺激大约 15 min 后,在胃壁细胞中磷酸化的 S66D 突变体胃酸分泌达到峰值,这表明丝氨酸磷酸化是激活过程的前提条件。实际上, Ser66 磷酸化的 ezrin 突变体 S66D 会导致壁细胞呈现部分激活的表型,这表明单独磷酸化 Ser66 并不足以实现完全激活。完全激活可能需要一个与 Ser66 磷酸化的其他通路。有研究发现 Ser66 的磷酸化诱导 ezrin 的构象变化,使其能够与突触合蛋白 3 结合,并为 H, K-ATP 酶的运输提供依据^[50]。同时 PKA 介导的 Ser66 磷酸化调节 ezrin 与 WWOX 基因的相互作用,确定了其在顶叶细胞活化中的功能作用^[51]。此外,ezrin 在 Ser366 和 Ser412 的磷酸化对激活过程有协同作用。PKA 介导的 ezrin 磷酸化在胃壁细胞分泌中具有相关性。当 PKA 被激活时,它可以保护 ezrin 免受钙蛋白酶 I 介导的蛋白水解。钙蛋白酶 I 的激活能够切割 ezrin,并使其从胃壁细胞顶膜释放,PKA 可以保护 ezrin 免受钙蛋白酶介导的蛋白水解。S66D 突变体 ezrin 对钙蛋白酶 I 介导的蛋白水解有抵抗力,而野生型和 S66 A 突变体则表现敏感。特别是在胃壁细胞中,表达模拟磷酸化的 S66D 突变体可以使 ezrin 对钙蛋白酶 I 介导的蛋白水解具有抵抗力。这些发现表明,PKA 对 ezrin 的磷酸化在决定其对钙蛋白酶 I 切割的敏感性方面起着重要作用^[52]。磷酸化 ezrin 对钙蛋白酶 I 的敏感性的调解提供了结构性和功能性的证据,进一步支持 ezrin 作为顶端膜和肌动蛋白细胞骨架间联系的关键作用。

4 结论

本篇综述对 ezrin 蛋白的功能及其磷酸化在 *H. pylori* 感染引发的结节性胃炎中的作用机制进行了深入探讨。Ezrin 蛋白负责调节细胞皮层特定区域

结构和功能,其苏氨酸的磷酸化抑制 ezrin 与肌动蛋白细胞骨架的相互作用,影响胃壁细胞形态;丝氨酸的磷酸化影响胃壁细胞顶端膜和肌动蛋白细胞骨架的关联。随着对 ezrin 蛋白的功能及磷酸化的进一步研究,将有助于揭示 ezrin 蛋白在 *H. pylori* 感染的结节性胃炎的发生和发展中的生物学机制,为 ezrin 蛋白作为结节性胃炎潜在的治疗靶点提供新思路。

参考文献:

- [1] ALI M, KHRAMUSHIN A, YADAV V K, et al. Elucidation of short linear motif-based interactions of the FERM domains of ezrin, radixin, moesin, and merlin [J]. *Biochemistry*, 2023, 62(11): 1594-1607.
- [2] AGBOR T A, DEMMA Z C, MUMY K L, et al. The ERM protein, ezrin, regulates neutrophil transmigration by modulating the apical localization of MRP2 in response to the SipA effector protein during *Salmonella* Typhimurium infection [J]. *Cell Microbiol*, 2011, 13(12): 2007-2021.
- [3] SENJU Y, TSAI F C. A biophysical perspective of the regulatory mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins [J]. *Biophys Rev*, 2022, 14(1): 199-208.
- [4] PONUWEI G A. A glimpse of the ERM proteins [J]. *J Biomed Sci*, 2016, 23: 35.
- [5] KAWAGUCHI K, ASANO S. Pathophysiological roles of actin-binding scaffold protein, ezrin [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(6): 3246.
- [6] LIANG F, WANG Y, SHI L, et al. Association of Ezrin expression with the progression and prognosis of gastrointestinal cancer: a meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(54): 93186-93195.
- [7] YOSHIDA S, YAMAMOTO H, TETSUI T, et al. Effects of ezrin knockdown on the structure of gastric glandular epithelia [J]. *J Physiol Sci*, 2016, 66(1): 53-65.
- [8] SOUSA D A, SILVA K V G C, PARANHOS J E S, et al. Ezrin immunoexpression in gastric cells of domestic cats infected with *Helicobacter* spp [J]. *Res Vet Sci*, 2023, 154: 84-88.
- [9] KANG H S, HONG S N, PARK H R, et al. Proteomics analysis for *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa [J]. *Taehan Sohwagi Hakhoe Chi*, 2014, 64(1): 10-17.
- [10] LOUVET-VALLÉE S. ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling [J]. *Biol Cell*, 2000, 92(5): 305-316.
- [11] GOULD K L, COOPER J A, BRETSCHER A, et al. The protein-tyrosine kinase substrate, p81, is homologous to a chicken microvillar core protein [J]. *J Cell Biol*, 1986, 102(2): 660-669.
- [12] BRETSCHER A, EDWARDS K, FEHON R G. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(8): 586-599.
- [13] LUU A K, VILORIA-PETIT A M. Targeting

- mechanotransduction in osteosarcoma: a comparative oncology perspective [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7595.
- [14] HANZEL D, REGGIO H, BRETSCHER A, et al. The secretion-stimulated 80K phosphoprotein of parietal cells is ezrin, and has properties of a membrane cytoskeletal linker in the induced apical microvilli [J]. *EMBO J*, 1991, 10(9): 2363–2373.
 - [15] SCHUBERT M L. Gastric secretion [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2014, 30(6): 578–582.
 - [16] YANG S, GUO X, DEBNATH G, et al. Protein 4.1R links E-cadherin/beta-catenin complex to the cytoskeleton through its direct interaction with beta-catenin and modulates adherens junction integrity [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1788(7): 1458–1465.
 - [17] Kamada T, Tanaka A, Yamanaka Y, et al. Nodular gastritis with *Helicobacter pylori* infection is strongly associated with diffuse-type gastric cancer in young patients [J]. *Digest Endosc*, 2007, 19(4): 180–184.
 - [18] 年媛媛, 张红杨, 孟宪梅, 等. 结节性胃炎患者难治性幽门螺杆菌感染的耐药分析和治疗 [J]. *胃肠病学*, 2021, 26(1): 35–38.
NIAN Y Y, ZHANG H Y, MENG X M, et al. Analysis of drug resistance and treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection in patients with nodular gastritis [J]. *Chin J Gastroenterol*, 2021, 26(1): 35–38.
 - [19] KAMADA T, SHIOTANI A, HARUMA K. Nodular gastritis and gastric cancer in young adult [J]. *Nihon Rinsho*, 2012, 70(10): 1807–1811.
 - [20] ONAL E D. Is nodular gastritis a precancerous condition? [J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(8): 2241.
 - [21] NAKAMURA S, MITSUNAGA A, IMAI R, et al. Clinical evaluation of nodular gastritis in adults [J]. *Digest Endosc*, 2007, 19(2): 74–79.
 - [22] BACKERT S, SELBACH M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis [J]. *Cell Microbiol*, 2008, 10(8): 1573–1581.
 - [23] Tammer I, Brandt S, Hartig R, et al. Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(4): 1309–1319.
 - [24] ZEAITER Z, HUYNH H Q, KANYO R, et al. CagA of *Helicobacter pylori* alters the expression and cellular distribution of host proteins involved in cell signaling [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, 288(2): 227–234.
 - [25] SELBACH M, MOESE S, HURWITZ R, et al. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation [J]. *EMBO J*, 2003, 22(3): 515–528.
 - [26] TEGTMEYER N, BACKERT S. Role of Abl and Src family kinases in actin-cytoskeletal rearrangements induced by the *Helicobacter pylori* CagA protein [J]. *Eur J Cell Biol*, 2011, 90(11): 880–890.
 - [27] CHICHIRAU B E, DIECHLER S, POSSELT G, et al. Tyrosine kinases in *Helicobacter pylori* infections and gastric cancer [J]. *Toxins*, 2019, 11(10): 591.
 - [28] SELBACH M, MOESE S, BACKERT S, et al. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin [J]. *Proteomics*, 2004, 4(10): 2961–2968.
 - [29] Bansala R, Kumar N. The pro-oncogenic role of CagA in *Helicobacter pylori* infected patients [J]. *Int J Res Anal Rev*, 2021, 8(3): 764–773.
 - [30] JONES K R, WHITMIRE J M, MERRELL D S. A tale of two toxins: *Helicobacter pylori* CagA and VacA modulate host pathways that impact disease [J]. *Front Microbiol*, 2010, 1: 115.
 - [31] NGOYI E O, GUILLOTEAU C, BENEJAT L, et al. CagA and VacA *Helicobacter pylori* pathogenicity factors in Brazzaville, Congo [J]. *J Med Microbiol*, 2019, 9(4): 186.
 - [32] ZHANG Q Q, XIE M, GUO R X, et al. The effects of *Helicobacter pylori* eradication therapy on salivary pepsin concentration in patients with laryngopharyngeal reflux [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2022, 279(11): 5289–5297.
 - [33] SMOLKA A J, BACKERT S. How *Helicobacter pylori* infection controls gastric acid secretion [J]. *J Gastroenterol*, 2012, 47(6): 609–618.
 - [34] WANG F, XIA P, WU F, et al. *Helicobacter pylori* VacA disrupts apical membrane-cytoskeletal interactions in gastric parietal cells [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(39): 26714–26725.
 - [35] ANDRÉOLI C, MARTIN M, BORGNE R L, et al. Ezrin has properties to self-associate at the plasma membrane [J]. *J Cell Sci*, 1994, 107(Pt 9): 2509–2521.
 - [36] GASBARRINI G, BONVICINI F. Interaction between *Helicobacter pylori* and human gastric mucosa revisited by electron microscopy: still something new to debate? [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(16): 5312–5316.
 - [37] DIESING A K, NOSSOL C, FABER-ZUSCHRATTER H, et al. Rapid interaction of *Helicobacter pylori* with microvilli of the polar human gastric epithelial cell line NCI-N87 [J]. *Anat Rec*, 2013, 296(12): 1800–1805.
 - [38] LIM J W, KIM H, KIM J M, et al. Cellular stress-related protein expression in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial AGS cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(8): 1624–1634.
 - [39] ZHU L, CROTHERS J Jr, ZHOU R, et al. A possible mechanism for ezrin to establish epithelial cell polarity [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 299(2): C431–C443.
 - [40] TACHIBANA K, HAGHPARAST S M, MIYAKE J. Inhibition of cell adhesion by phosphorylated Ezrin/Radixin/Moesin [J]. *Cell Adh Migr*, 2015, 9(6): 502–512.
 - [41] ZHU L, ZHOU R, METTLER S, et al. High turnover of ezrin T567 phosphorylation: conformation, activity, and cellular function [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 293(3): C874–C884.
 - [42] PARNELL E, KOSCHINSKI A, ZACCOLO M, et al.

Phosphorylation of ezrin on Thr567 is required for the synergistic activation of cell spreading by EPAC1 and protein kinase A in HEK293T cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853(7): 1749–1758.

[43] ZHU L, HATAKEYAMA J, CHEN C, et al. Comparative study of ezrin phosphorylation among different tissues; more is good; too much is bad [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 295(1): C192–C202.

[44] ZHOU R, ZHU L, KODANI A, et al. Phosphorylation of ezrin on threonine 567 produces a change in secretory phenotype and repolarizes the gastric parietal cell [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt 19): 4381–4391.

[45] ZHANG X, FLORES L R, KEELING M C, et al. Ezrin phosphorylation at T567 modulates cell migration, mechanical properties, and cytoskeletal organization [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(2): 435.

[46] TIAN T, LINDELL S L, LAM M, et al. Ezrin functionality and hypothermic preservation injury in LLC-PK1 cells [J]. *Cryobiology*, 2012, 65(1): 60–67.

[47] JIANG H, WANG W, ZHANG Y, et al. Cell polarity kinase MST4 cooperates with cAMP-dependent kinase to orchestrate

Histamine-stimulated acid secretion in gastric parietal cells [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(47): 28272–28285.

[48] ZHOU R, CAO X, WATSON C, et al. Characterization of protein kinase A-mediated phosphorylation of ezrin in gastric parietal cell activation [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(37): 35651–35659.

[49] LV X G, LEI X F, JI M Y, et al. Clinical significance of EBP50 overexpression assessed by quantum dot analysis in gastric cancer [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(6): 1844–1848.

[50] YU H, ZHOU J, TAKAHASHI H, et al. Spatial control of proton pump H, K-ATPase docking at the apical membrane by phosphorylation-coupled ezrin-syntaxin 3 interaction [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(48): 33333–33342.

[51] JIN C, GE L, DING X, et al. PKA-mediated protein phosphorylation regulates ezrin-WWOX interaction [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(3): 784–791.

[52] WANG H, GUO Z, WU F, et al. PKA-mediated protein phosphorylation protects ezrin from calpain I cleavage [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333(2): 496–501.

[收稿日期]2024-01-11

(上接第 67 页)

[24] BELL H N, HUBER A K, SINGHAL R, et al. Microenvironmental ammonia enhances T cell exhaustion in colorectal cancer [J]. *Cell Metab*, 2023, 35(1): 134–149, e6.

[25] 孙燕. 临床肿瘤学高级教程 [M]. 北京:人民军医出版社, 2011.

SUN Y. Advanced course in clinical oncology [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 2011.

[26] FU B, YACHIDA S, MORGAN R, et al. Clinicopathologic and genetic characterization of traditional serrated adenomas of the colon [J]. *Am J Clin Pathol*, 2012, 138(3): 356–366.

[27] TSAI J H, LIAU J Y, LIN Y L, et al. Traditional serrated adenoma has two pathways of neoplastic progression that are distinct from the sessile serrated pathway of colorectal carcinogenesis [J]. *Mod Pathol*, 2014, 27(10): 1375–1385.

[28] KIM K H, KIM K O, JUNG Y, et al. Clinical and endoscopic characteristics of sessile serrated adenomas/polyps with dysplasia/adenocarcinoma in a Korean population: a Korean Association for the Study of Intestinal Diseases (KASID) multicenter study [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 3946.

[29] JARAVAZA D R, RIGBY J M. Hyperplastic polyp or sessile serrated lesion? The contribution of serial sections to reclassification [J]. *Diagn Pathol*, 2020, 15(1): 140.

[30] MURAKAMI T, KUROSAWA T, FUKUSHIMA H, et al. Sessile serrated lesions: Clinicopathological characteristics, endoscopic diagnosis, and management [J]. *Dig Endosc*, 2022, 34(6): 1096–1109.

[收稿日期]2023-11-01

安丽娟,郝征. 铁死亡在白血病耐药中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 157-167.

An LJ, Hao Z. Research progress on roles of ferroptosis in chemotherapy resistance in leukemia [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 157-167.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.018

铁死亡在白血病耐药中的研究进展

安丽娟¹, 郝 征^{2*}

(1.天津中医药大学研究生院,天津 301617;2.天津中医药大学中医学院,天津 301617)

【摘要】 白血病的化疗耐药是临床亟待解决的治疗难题。铁死亡是铁依赖性的磷脂过氧化作用驱动的一种独特的细胞死亡方式。由于白血病的特征是氧化应激增加和铁超负荷,因此可以推测白血病细胞容易受到铁死亡的影响,这表明铁死亡具有治疗潜力。近年来,铁死亡已被广泛研究并应用于各类白血病的治疗中。目前已有多项研究表明铁死亡的调控途径与白血病耐药机制之间存在关联,通过不同途径诱导铁死亡可有效降低各类白血病细胞对化疗药物的耐药性,进而提高临床疗效。本文总结了铁死亡的调控机制,详细分析了铁死亡相关氧化应激通路及铁代谢途径与白血病耐药机制之间的关联,并梳理了铁死亡在各类白血病治疗耐药中的实验研究与临床应用,旨在为研究铁死亡与耐药性白血病的治疗提供新的思路 and 方向。

【关键词】 铁死亡;白血病;化疗耐药

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0157-11

Research progress on roles of ferroptosis in chemotherapy resistance in leukemia

AN Lijuan¹, HAO Zheng^{2*}

(1. Graduate School of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China.

2. Traditional Chinese Medicine School of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617)

【Abstract】 Chemotherapy resistance in leukemia is an urgent clinical therapeutic challenge. Ferroptosis is a unique mode of cell death driven by iron-dependent phospholipid peroxidation. Leukemia is characterized by increased oxidative stress and iron overload, suggesting that leukemia cells might be susceptible to ferroptosis and indicating a possible therapeutic approach. Ferroptosis has been extensively studied in recent years and used in the treatment of various types of leukemia. Several studies have demonstrated an association between the regulatory pathways of ferroptosis and the mechanisms of leukemia drug resistance. The induction of ferroptosis through different pathways can effectively reduce the resistance of various types of leukemia cells to chemotherapeutic drugs, and thus improve their clinical efficacy. In this article, we review the regulatory mechanisms of ferroptosis and analyze the association between oxidative stress and iron metabolism pathways of ferroptosis and the mechanism of leukemia drug resistance. We also summarize the experimental studies and clinical applications of ferroptosis for the treatment of various types of drug-resistant leukemias, with the aim of providing new ideas and directions for the study of ferroptosis and a new strategy to reverse chemotherapy resistance in patients with leukemia in the future.

【Keywords】 ferroptosis; leukemia; chemotherapy resistance

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

【基金项目】 国家中医药管理局 2020 年度中医药古籍文献和特色技术传承专项项目 (GZY-KJS-2020-037)。

【作者简介】 安丽娟 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中医临床基础。E-mail: 1341990249@qq.com

【通信作者】 郝征 (1977—), 男, 副教授, 医学博士, 研究方向: 中西医结合治疗血液病机制研究。E-mail: 1060256010@qq.com

白血病是一类源自异常造血干/祖细胞的恶性克隆性疾病,其发病率及死亡率一直居高不下。2020 年,美国癌症协会报告,全球白血病新发病例 474 519 例,死亡病例 311 594 例^[1]。白血病的临床治疗包括化疗、放疗、免疫治疗、骨髓移植,甚至中药^[2-3]。其中,化疗诱导缓解率较高,是白血病治疗的首选^[4]。白血病耐药性是指白血病细胞对化疗药物不敏感或产生抗药性,即当患者接受了几个疗程的化疗后,骨髓中白血病细胞的比例没有明显下降,或短期停药后很快恢复到治疗前的水平,这种情况就被认为是白血病耐药。随着治疗进程的不断推进,治疗耐药性已成为临床治疗难、治疗失败、复发、影响长期无病生存的首要原因。因此,介导白血病细胞耐药的机制与临床研究已成为临床关注的热点。大量文献支持和具体实例证实,铁死亡可以影响多种癌症治疗的疗效和逆转治疗耐药性^[5-7]。耐药性癌细胞因其自身氧化还原系统高代谢,较之普通癌细胞对铁死亡更加敏感^[8],故具有多重药物耐药性的癌细胞,尤其是处于间充质状态且易于转移的癌细胞容易发生铁死亡^[9-10]。这些数据表明,诱导铁死亡是克服白血病细胞耐药性的一种很有前景的策略。

1 铁死亡及其调控机制

铁死亡是铁依赖性的磷脂过氧化作用驱动的一种独特的细胞死亡方式,于 2012 年首次被定义^[11]。铁死亡受到多种细胞代谢途径的调控,其中包括氧化还原稳态、铁代谢、线粒体活性、氨基酸、脂质、糖的代谢,以及各种与疾病相关的信号途径^[6]。其中,细胞内铁离子积累和活性氧(reactive oxygen species, ROS)介导的脂质过氧化是铁死亡最主要的两个标志^[12]。

1.1 脂质过氧化

大多数生物体的健康和生存取决于细胞 ROS

的严格调节,ROS 是涉及氧气代谢过程的高度反应性副产物^[13]。过量的 ROS 会影响各种细胞成分,包括膜磷脂,导致脂质过氧化和膜损伤。脂质过氧化物的积累会压倒细胞的抗氧化防御机制,导致铁死亡^[14]。因此,阻断细胞内抗氧化系统是诱导铁死亡的重要途径。氧化损伤和抗氧化防御之间平衡的破坏塑造了铁死亡的过程。含有多不饱和脂肪酸(PUFA)的磷脂是脂质过氧化的主要底物,比饱和脂肪酸(SAs)或单不饱和脂肪酸(MUFAs)更容易受到脂质过氧化的影响。因此,磷脂代谢在铁死亡调节中起关键作用。

1.1.1 System Xc(-)/GSH/GPX4 通路(经典的铁死亡调控通路)

胱氨酸/谷氨酸反向转运体(cystine/glutamate transporter, system Xc(-))是 SLC3A2 和 SLC7A11 二聚体组成的异二聚质膜胱氨酸/谷氨酸反转运蛋白^[15],SLC7A11 是发挥功能的主要亚基。System Xc(-)是细胞内重要的抗氧化体系,可以 1:1 的比例将胞外胱氨酸摄入和胞内谷氨酸排出。输入的胱氨酸被还原成半胱氨酸,在 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -GCS)和谷胱甘肽合成酶(GSS)^[16]等催化下,半胱氨酸、谷氨酸以及甘氨酸结合生成谷胱甘肽(glutathione, GSH)。GSH 是哺乳动物细胞中最丰富的还原剂,可作为谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)的辅助因子,在细胞内促进磷脂氢过氧化物(PLOOHs)还原为 PLOOHs 相应的醇(PLOHs)。谷胱甘肽-二硫化物还原酶(GSR)利用 NADPH/H⁺提供的电子催化氧化型谷胱甘肽(GSSG)亦可重新生成 GSH(图 1)。GSH 耗竭则会导致 GPX4 失活,使脂质过氧化物累积触发铁死亡。

遗传学上已经证明,GSH 合成、system Xc(-)和 GPX4 都可以保护细胞免受各种氧化应激条件引起的死亡。据此,system Xc(-)/GSH/GPX4 通路系统



图 1 System Xc(-)/GSH/GPX4 通路(经典的铁死亡调控通路)

Figure 1 System Xc(-)/GSH/GPX4 pathway(classical ferroptosis regulatory pathway)

首先被确立为铁死亡的核心防御机制,并将 GPX4 作为铁死亡的中枢抑制因子^[17-20]。据报道,system Xc(-)失活或培养基中胱氨酸的消耗可在多种癌症模型中诱导铁死亡^[21-23]。常见的铁死亡诱导剂如 RAS 选择性致死小分子 erastin 和 RSL3 等均是间接或直接影响了 GPX4 的活性和脂质过氧化的积累,而诱发细胞死亡^[11]。

1.1.2 FSP1-CoQ10 轴

2019 年,Conrad 团队和 Olzmann 团队分别利用基因抑制剂和 CRISPR-Cas9 筛选技术,发现铁死亡抑制蛋白 1(FSP1,以前称为凋亡诱导因子线粒体相关 2,即 AIFM2)/泛醌-10(CoQ10)系统可以保护细胞免受由药物抑制 GPX4 或 GPX4 基因缺失引起的铁死亡^[24-25]。与 GPX4/GSH 不同,FSP1 通过降低脂基水平上的泛醌或辅酶 Q(CoQ)/ α -生育酚来防止脂质过氧化和与之相关的铁死亡。FSP1 被肉豆蔻酰化修饰,并与包括细胞质膜、高尔基体和细胞核周结构在内的多种细胞膜结构相联系。突变 FSP1 的肉豆蔻酰修饰位点会使它丧失抗铁死亡功能。FSP1 具有还原型辅酶(NADPH),可将 CoQ10 的不完全氧化产物半氢醌还原为泛醇(CoQH2)。CoQ/CoQH2 不仅作为线粒体电子传递链复合物中的电子载体,而且作为一种主要的内源性亲脂性自由基捕获抗氧化剂(RTA),可以催化 PLOOH 的解毒,进而抑制铁死亡^[26]。在这个反应中,CoQH2 减少脂质过氧化物并被氧化为 CoQ,然后通过 FSP1 利用 NADPH 再循环回 CoQH2。

此外,FSP1 亦可间接的通过促进氧化型 α -生育酚自由基(维生素 E)再生,后者是脂类中最强大的天然断链抗氧化剂。利用 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Keap1)突变肺癌模型,Koppula 等^[27]证明 FSP1-CoQ 轴受 Keap1-核因子红系 2 相关因子 2(Nrf2)通路调控。最近,Mishima 等^[28]发现维生素 K 是 FSP1 的另一种底物,其还原形式是一种有效的 RTA,可以抑制脂质过氧化与铁死亡。

1.1.3 其他通路

2020 年,Soula 等^[29]和 Kraft 等^[30]发现 GTP 环水解酶 1(GCH1)是另一种与 GPX4 无关的铁死亡调节因子,其代谢产物四氢生物蝶呤(BH4)和二氢生物蝶呤(BH2)作为捕获自由基的抗氧化剂,与 CoQ10 和 PUFA-PLs 协同抑制铁死亡。此外,2022 年的两项研究发现了线粒体特异性铁死亡防御机制:Mao 等^[31]发现二氢酸脱氢酶(DHODH)是合成

嘧啶所需的酶,可将 CoQ 还原为 CoQH2 在线粒体内膜中保护细胞免受铁死亡;同一研究小组还发现,甘油-3-磷酸脱氢酶 2(GPD2)是另一种将甘油-3-磷酸氧化与线粒体 CoQ 还原偶联以抑制铁死亡的酶^[32]。2023 年,Liang 等^[33]的最新研究通过全基因组 CRISPR 激活筛选,发现膜结合 O-酰基转移酶 MBOAT1 和 MBOAT2 是新的铁死亡抑制因子,它们通过重塑磷脂来抑制铁死亡。Tang 等^[34]报道了一种涉及 TXNDC12(一种位于内质网中的硫氧还蛋白结构域蛋白)上调的铁死亡抑制机制,当 TXNDC12 过表达时,它恢复 ATF4 敲低细胞对铁死亡的敏感性,TXNDC12 的缺失可增强细胞培养和动物模型中诱导铁死亡的肿瘤抑制作用。另外,铁死亡也受到肿瘤抑制因子 P53 在细胞代谢中的非规范活性的调节,这种调节是以特定的方式进行的^[35]。P53 通过抑制 SLC7A11 的表达或增加亚精胺/亚精胺 N1 乙酰转移酶 1(SAT1)和谷氨酰胺酶 2(GLS2)的表达来促进铁死亡。同样,P53 可以通过降低二肽基肽酶 4(DPP4)活性或诱导细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A(CDKN1A/p21)表达来抑制铁死亡^[36]。

1.2 铁积累

铁是一种基本的无机营养素,在多种生物过程中起着关键作用,例如 DNA 和 RNA 合成、细胞呼吸、免疫反应和解毒过程等,机体通过严格调节其细胞吸收、回收和排出来维持其平衡^[37]。细胞质铁形成的不稳定铁池(labile iron pool, LIP)是一个氧化还原活性铁的动态池,对脂质过氧化和铁死亡至关重要^[38]。铁离子的积累是铁死亡发生的前提;其一,参与脂质过氧化的代谢酶,如脂氧合酶(LOX)和细胞色素 p450 氧化还原酶(POR)等发挥催化活性需要铁的参与;其二,非酶催化的、铁依赖的 Fenton 链式反应是铁死亡的关键环节,增加的细胞内 LIP 可以通过 Fenton 反应催化羟基自由基的形成,使得 PLOOHs 在 GPX4 被抑制时持续存在更长时间,PLOOHs 能够与 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 反应,分别产生自由基 PLO 和 PLOO,这些自由基与 PUFA-PLs 反应,进一步促进 PLOOH 的生成,从而诱导脂质过氧化和质膜破裂^[39-40]。

因此,许多细胞过程通过改变细胞内的不稳定铁含量而改变细胞对铁死亡的敏感性。例如,多种关键蛋白通过调节铁的代谢导致铁死亡,包括转铁蛋白及其受体(TFR1),其被认为参与 Fe^{3+} 的摄

取^[41];铁蛋白重链 1 (FTH1) 参与铁的储存和流出;铁调节蛋白 (IRPs、IRP1 和 IRP2) 参与了与细胞内铁储存/释放和摄入/排出相关基因的转录后调节。通过上述多种蛋白质水平的干预增加铁的吸收、减少铁的储存和限制铁的流出可以增加铁的积累。此外,2016 年,Hou 等^[42]证明自噬可通过降解成纤维细胞和癌细胞中的铁蛋白来促进铁死亡。Soula 等^[29]使用 Jurkat 白血病细胞进行的以代谢为重点的 CRISPR 筛查显示,两种线粒体铁蛋白亚型 MFRN-1 (SLC25A37) 或 MFRN-2 (SLC25A28) 的缺失使细胞对 GPX4 抑制诱导的铁死亡敏感。

总的来说,铁死亡的生态学特征主要表现为 ROS 过量产生、GSH 减少、system Xc(-) 抑制和亚铁离子聚集等。铁死亡的调控机制主要有两种:一种是由 GPX4 介导的 system Xc(-)/GSH/GPX4 通路,它催化磷脂过氧化物的还原;另一种是由 FSP1 介导的,它产生具有自由基捕获抗氧化活性的代谢物 RTA。

2 铁死亡与白血病耐药的相关机制研究

国内外研究表明,白血病耐药的形成机制异常复杂,是多基因、多靶点、多步骤共同作用的结果^[43-45]。目前有关白血病的耐药发生机制涉及多个层面,基因突变和损伤、非编码 RNA (microRNA、lncRNA) 的调控、肿瘤耐药相关蛋白 (P-gp、MDR 相关蛋白等) 的表达、骨髓微环境以及白血病干细胞 (LSCs) 等均发挥着重要作用。其涉及的信号通路亦广泛,如 NF- κ B 通路、PI3k/Akt/mTOR 通路、BMP 通路、Wnt/ β -catenin 通路、Notch 通路、MAPK 通路等,各通路之间还存在着相互关联性,错综复杂。越来越多的证据表明,铁死亡在白血病及其耐药中具有重要作用,铁死亡的调控机制与白血病耐药机制之间联系密切^[34,46-47]。据此,本综述从活性氧失衡诱导的氧化应激与铁积累两方面分析铁死亡与白血病耐药机制间的联系。

2.1 铁死亡相关氧化应激通路 with 白血病耐药

化疗耐药性的出现与活性氧失衡诱导的氧化应激防御密切相关,是白血病治疗失败的重要原因之一,也是铁死亡的关键环节。随着氧化应激防御的破坏,可以有效地阻止化疗耐药性的形成。

2.1.1 GSH、GSTs 相关通路

GSH 是存在于生物细胞内最重要的非蛋白巯基化合物,具有抗氧化和整合解毒作用^[48],可与抗

肿瘤药物的自由基和过氧化物结合,从而降低抗肿瘤药物的细胞毒性,使肿瘤细胞产生耐药性。吡啶美辛,一种环加氧酶抑制剂,可通过降低 GSH 来克服阿霉素耐药性^[49]。双氢青蒿素亦通过降低 GSH、增加 ROS 和下调 Akt/mTOR 途径,明确触发 K562/ADM 细胞的铁死亡,并增强其对化疗药物的敏感性^[47]。谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione-S-transferases, GSTs) 是目前关于白血病多药耐药研究机制较多的酶。GSTs 可以与化疗药物相结合来降低化疗药物的活性,并通过催化化疗药物与 GSH 结合,从而加快化疗药物的代谢和转化,在此过程中 GSTs 亦通过非酶结合的方式参与肿瘤细胞内氧自由基和过氧化物的清除^[50]。此外,多药耐药相关蛋白 (multidrug resistance protein, MRP1) 具有调节细胞氧化还原平衡的内源性功能,可通过输出过量的 GSSG 来维持氧化应激下细胞的氧化还原平衡和最佳的 GSH/GSSG 比值,因此,可以利用靶向 MRP1 和氧化还原途径的协同转录调控,提供更有效的逆转耐药性的机会^[51]。

2.1.2 P53-ROS 反馈回路

P53 是一种肿瘤抑制基因,具有独特的肿瘤抑制功能,可以调节衰老、细胞凋亡和铁死亡,与白血病耐药机制密切相关。研究表明,P53 能够抑制 MDR1 转录作用,减少 P-gp 的生成,而 P53 基因突变的肿瘤细胞,会诱导激活 MDR1 启动子,并通过抗细胞凋亡机制使肿瘤细胞产生耐药性^[52]。与此同时,P53 及其下游信号通路参与 ROS 诱导的细胞凋亡。ROS 可以在基础 P53 介导的 DNA 损伤反应 (DDR) 途径中引发基因组应激、继发性基因组不稳定和基因突变的潜在积累。

基于 ROS 和 P53 之间的反馈回路,许多研究报道了正常生理条件下 P53 信号传导和 ROS 代谢之间的串扰,线粒体产生的 ROS 促进 P53 易位,进而引发氧化应激。例如,萜萜酰胺已被证实可经 PI3k/Akt 通路,使 P53、P27 表达水平增强,促进 ROS 水平升高,逆转白血病细胞对阿霉素的耐药^[53]。此外,Pitts 等^[54]通过对 AML 中 LSC 相关基因丝氨酸蛋白酶抑制剂 Kazal 2 型 (SPINK2) 的详细临床病理研究和功能评估发现,SPINK2 蛋白高表达与对柔红霉素和 Ara-C 标准诱导的耐药性相关,并且 SPINK2 可以调节某些 P53 靶点和凋亡相关基因的表达,包括 SLC7A11 和 STEAP3,并影响胱氨酸摄取、细胞内铁水平和对 erastin 的敏感性。

2.1.3 STAT5 调节通路

信号转导子和转录激活子 5 (STAT5) 作用于慢性粒细胞白血病 (CML) 的 BCR-ABL1^[55], 与酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼的耐药性有关, 并被认为是伊马替尼反应性的关键调节剂^[56]。与此同时, ROS 的产生受 STAT5 转录因子的调节。Cheng 等^[57]的研究表明 CML 对伊马替尼的耐药性可能与 STAT5 介导的 ROS 的持续产生和 P53 通路的异常有关。另一研究证明高迁移率族盒 1 (HMGB1) 在白血病的发病机制和化疗耐药性中起着重要作用, Ye 等^[58]发现在 HL-60/NRASQ61L 细胞中, HMGB1 的敲除可降低铁介导的溶酶体途径中 erastin 诱导的 ROS 产生和细胞死亡。

2.1.4 Keap1-Nrf2 通路

Nrf2 是最早发现参与氧化应激的适应性调节因子, 在活性氧的解毒和影响化疗敏感性方面发挥着关键作用。Nrf2 的信号通路主要受 Keap1 负性调控。Nrf2 诱导多种抗氧化基因, 包括 GPX4 等^[59]。有研究证实, AML 的化疗耐药性与 Nrf2 的激活有关, 化疗增加了 AML 细胞中 Nrf2 的水平, 导致化疗耐药性^[60]。因此靶向 Nrf2/GPX4 通路诱导铁死亡是提高 AML 患者化疗敏感性的有效策略^[61], 雷公藤甲素即是通过抑制 Nrf2 促进铁死亡以克服阿霉素耐药性^[62]。

2.1.5 LSCs

如前所述, 白血病干细胞 (LSCs) 已被确定为复发和治疗耐药性的有力驱动因素, LSCs 频率和基因表达特征可独立预测临床结果^[63-64]。近日有研究发现, 在维奈克拉 (venetoclax, Ven) 耐药的 LSC 中, 呼吸链被干扰、脂肪酸氧化及氨基酸代谢受 Mcl-1 调节升高, 氨基酸因此被消耗^[65], 即铁死亡各抑制通路被阻断, 若铁死亡激活, 可促进肿瘤细胞死亡。因此铁死亡可能成为维奈克拉耐药的下位靶点^[66]。

综上, 细胞内活性氧失衡诱导的氧化应激防御通路激活与白血病化疗耐药性的出现密切相关。因此, 降低耐药性白血病细胞对氧化应激的耐受能力, 甚至破坏其氧化应激防御体系, 可以有效阻止化疗耐药性的形成。GSH、GSTs 相关通路、P53-ROS 反馈通路、STAT5 调节通路、Keap1-Nrf2 通路等均可作为触发耐药性白血病细胞铁死亡的靶点。

2.2 铁积累与白血病耐药

细胞中铁的升高与白血病化疗耐药相关。铁蛋白是细胞内活性铁储存的主要蛋白质, 在多重耐

药肿瘤细胞中可观察到铁蛋白或铁蛋白受体的上调。因此可将铁蛋白或转铁蛋白作为靶点逆转白血病化疗耐药。Gasparetto 等^[67]发现铁输出剂 FPN1 在 AML 细胞中的低表达水平与化疗敏感性和更好的患者结局有关。在另一项研究中, Zhang 等^[47]发现多药耐药 K562/阿霉素白血病细胞比亲代药物敏感的 K562 白血病细胞具有更高的 GSH 水平和 IRP2、TFRC、FTH1、GPX4 表达。这些水平的升高可能增加了 K562/ADM 细胞的抗氧化能力, 并赋予它们对铁紊乱的缓冲能力, 保护它们免受铁死亡的影响, 并有利于减缓耐药性的产生。如前所述, DHA 可提高白血病细胞化疗敏感性。据报道, DHA 还能诱导铁蛋白的自噬降解^[68], 也能以不依赖于自噬的方式诱导铁蛋白的溶酶体降解, 从而增加细胞游离铁水平, 使细胞对铁死亡敏感^[69]。齐墩果酸 N-乙酰糖苷 (aridanin) 亦被发现可通过铁代谢途径诱导 CCRF-CEM 白血病细胞的坏死和铁死亡^[70]。

3 铁死亡在白血病耐药中的临床应用与实验研究

阿霉素是一种广泛应用于治疗各类白血病的化疗药物, 其耐药性仍然是一个关键的临床问题。据报道, 铁死亡诱导剂 erastin 可以增强阿糖胞苷 (Ara-C) 和阿霉素的抗癌活性^[71]。一些天然化合物衍生物和其他小分子物质也被证明可通过不同机制诱导铁死亡以对抗其耐药性 (表 1)。此外, 黄藤酮^[72]、天然三萜皂苷百两金皂苷 B^[73] 等亦被证实可通过线粒体膜电位改变和增加 ROS 的产生诱导 CCRF-CEM 细胞凋亡, 耐多药的 P-gp 过度表达亚系 CEM/ADR5000 白血病细胞亦对其十分敏感。

3.1 铁死亡与急性髓系白血病 (AML) 耐药

AML 的特征是髓系原始细胞大于 20%, 是成人中最常见的急性白血病。它是最具侵袭性的癌症, 预后因分子亚型而异^[74]。Ara-C 和蒽环类药物 (柔红霉素 (IDA) 或伊达比星等) 的“7+3”联合化疗是 AML 治疗的标准方案^[75], 但这种方法仅对小部分患者起效, 对其他尤其是老年患者的治疗效果很差, 耐药性是其主要原因。据报道, 铁死亡诱导剂 RSL3 可通过抑制 GPX4 活性诱导急性白血病耐药细胞株 MOLM13/IDA、MOLM13/Ara-C 铁死亡^[76]。

对于不适合强化化疗或复发/难治的 AML 患者, BCL-2 抑制剂维奈克拉与低甲基化剂 (HMA) 地西他滨和氮杂胞苷 (AZA) 联合治疗作为新标准治

疗方案,亦表现出一定程度的耐药性^[77]。研究表明 Eprenetapopt 可通过铁死亡诱导 AML 早期细胞死亡^[78],一些 II 期和 III 期临床试验将 Eprenetapopt 与 AZA 联用治疗 AML 或骨髓增生异常综合征(MDS)和 P53 突变患者,结果显示其药物耐受性良好,并且 Eprenetapopt 增强了 AZA 的抗肿瘤作用^[79-80]。

现普遍认为,Fms 样酪氨酸激酶 3 (FLT3) 基因编码受体酪氨酸激酶的突变是 AML 中最常见的遗传改变之一。FLT3 抑制剂的耐药性是治疗 FLT3 突变型 AML 的一个普遍挑战。Sabatier 等^[81]最近的一项研究中指出可通过结合 FLT3 抑制剂和 GPX4 抑制剂来触发脂质氧化应激,诱导 FLT3 突变 AML 细胞铁死亡来进行治疗。铁死亡相关基因 (FRG) 亦是铁死亡中重要的调节因子。Wei 等^[82]基于癌症基因组图谱 (TCGA) 和基因组-组织表达 (GTEX) 数据库,分析 AML 和正常样本之间铁蛋白相关基因 (FRG) 的表达水平,发现二肽基肽酶-4 (DPP4) 和转铁蛋白受体 (TFRC) 是预测和诊断 AML 的生物标志物,它们的表达水平也与 AML 的耐药性有显著相关性。Yin 等^[83]发现,若阻止铁死亡相关基因 ARNTL 的表达,可抑制 AML 细胞中的集落形成并诱导铁死亡。

3.2 铁死亡与急性淋巴细胞白血病 (ALL) 耐药

ALL 的表现骨髓中淋巴细胞 B 或 T 细胞异常增殖并聚集,从而抑制正常的造血功能。在 ALL 中,染色体易位或染色体数目异常可导致淋巴前体细胞发生突变,从而形成淋巴母细胞,最常见的突变为 t (12; 21) 和 t (9; 22)。22 号染色体 (Philadelphia (Ph) 染色体) 的存在与否是最重要的分子标记,对治疗 ALL 具有重要意义。ALL 是儿科人群中最常见的白血病,占该组病例的 80%,而成

人占 20%。青少年和成人的治疗主要受到生存率更高的儿科治疗方案的启发^[74]。ALL 的治疗主要是化疗与口服酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 的组合,以第二代及以后的 TKI (如达沙替尼、泊纳替尼、博苏替尼、尼洛替尼和伊马替尼) 为佳。总体疗效取决于患者对诱导治疗的反应。

Probst 等^[84]报道了 LOX 抑制剂 (包括选择性 12/15-LOX 抑制剂 Baicalein 和泛 LOX 抑制剂去甲二氢愈创木酸 (NDGA)) 能够保护 ALL 细胞免受 RSL3 刺激的脂质过氧化、ROS 产生和细胞死亡的影响,表明 LOX 有助于调节 ALL 细胞中 RSL3 诱导的铁死亡。Ishikawa 等^[85]在青蒿琥酯 (ART) 治疗成人 T 细胞白血病/淋巴瘤的疗效观察中发现,ART 可增加细胞内活性氧、激活 DNA 损伤标记物 γ -H2AX,此外,ART 诱导的细胞毒性可通过活性氧清除剂、铁螯合剂和坏死或铁死亡抑制剂的处理而部分逆转,这表明 ART 可通过铁死亡途径杀死 T 细胞白血病 1 型病毒 (HTLV-1) 感染的 T 细胞系。Wang 等^[86]利用数据集 GSE33615,通过生物信息学分析发现了成人 T 细胞白血病/淋巴瘤患者外周血淋巴细胞基因表达谱与铁死亡易感性存在新的联系。Lou 等^[87]亦发现,hydnocarpin D (HD) 作为一种具有良好的抗肿瘤活性的黄酮类化合物,可以通过诱导自噬依赖性铁死亡在体外抑制 T-ALL 的增殖。朱婷等^[88]研究发现,自噬可通过影响铁蛋白的表达和细胞内 LIP 水平来调节细胞铁稳态,进而改变 ALL 细胞对铁死亡诱导剂 erastin 的敏感性,且自噬激活剂雷帕霉素使所有的 ALL 细胞在体内和体外都对 erastin 诱导的铁死亡敏感。这表明联合使用自噬激活剂与铁死亡诱导剂可为耐药 ALL 的治疗提供一种新策略。

表 1 不同化合物通过诱导铁死亡克服阿霉素耐药
Table 1 Different compounds counteract doxorubicin resistance by inducing ferroptosis

化合物 Compound	机制 Mechanism	引用 Reference
双氢青蒿素 Dihydroartemisinin	降低 GSH 含量,增加 ROS 水平和下调 Akt/mTOR 途径 Decreasing GSH, increasing ROS levels and down-regulating the Akt/mTOR pathway	[47]
吲哚美辛 Indomethacin	降低 GSH 及其偶联物的细胞内含量,通过启动子活性降低 γ -GCS 的表达 Reducing intracellular levels of GSH and its couplings, reducing γ -GCS expression	[49]
茛菪酰胺 Piperlongumine	通过调节 PI3k/Akt 信号通路,P53、P27 表达水平增强;ROS 水平升高 Enhancing the expression levels of P53 and P27 by regulating the PI3k/Akt signaling pathway; increasing ROS levels	[53]
雷公藤甲素 Triptolide	抑制 Nrf2,ROS 水平和脂质过氧化增加,GPX4 表达减少 Suppressing Nrf2, as evidenced by increased ROS levels and lipid oxidation as well as decreased glutathione peroxidase 4 expression	[62]

3.3 铁死亡与慢性粒细胞白血病 (CML) 耐药

作为白细胞前体的造血干细胞染色体异常是慢性白血病最常见的病因。染色体异常的例子包括缺失、易位或额外染色体。CML 通常源于 22 号染色体上的 BCR 和 9 号染色体上 ABL1 的相互易位和融合,导致 Ph 染色体上的酪氨酸激酶失调^[74]。因此 TKIs 靶向治疗能显著改善 CML 患者的生存期。然而,耐药性的存在仍然是一个重大的临床挑战。治疗过程中需要监测患者的耐药突变,主要是 T315I 突变。TKIs 不能完全清除残余的白血病干细胞,从而形成微小的残留病灶,最终会导致疾病的耐药和复发。

目前研究表明铁死亡可以影响 TKIs 对 CML 的治疗敏感性,其中半胱氨酸耗竭是克服 CML 化疗耐药性的潜在治疗策略。Liu 等^[89]的研究表明伊马替尼耐药 CML 细胞系 (K562/G01) 的半胱氨酸耗竭可诱导铁死亡,并提出硫氧还蛋白还原酶 1 (TXNRD1) 是参与半胱氨酸耗竭诱导 CML 细胞铁死亡的关键调控因子。此外,早期研究发现柠檬酸粉防己碱可在体外杀死 CML 细胞,并在伊马替尼耐药的小鼠异种移植模型中减少肿瘤生长^[90]。虽然未证实铁死亡是其细胞死亡的机制,但随后的研究表明柠檬酸粉防己碱诱导了乳腺癌细胞的铁死亡^[91]。

3.4 铁死亡与慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 耐药

与其他所有白血病亚型相比,CLL 的病程较为缓慢,对患者寿命的影响小。大多数病例发生在 60~70 岁的人群中。CLL 的特征是在外周血、骨髓和次级淋巴器官中蓄积功能缺陷的 B 淋巴细胞,导致免疫系统衰竭^[92]。与正常淋巴细胞相比,CLL 细胞本质上具有更高水平的 ROS,并依赖于 GSH 等细胞抗氧化剂来维持氧化还原平衡。Zhang 等^[93]的研究发现骨髓基质细胞能促进 CLL 细胞的 GSH 代谢,进而提高白血病细胞的存活率和耐药性;并进一步提出可以通过削弱 GSH 系统来克服这种基质 CLL 细胞的保护作用。

目前对于 CLL 的治疗取决于 IGVH、del17p 和 TP53 基因突变情况。对于预后相对较好的 IGVH 突变患者,通常开出的治疗方法是联合使用氟达拉滨-环磷酰胺-利妥昔单抗 (FCR) 或 B 细胞受体信号抑制剂;对于有 del17p/TP53 突变的高危患者,常使用维奈克拉或布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK) 抑制剂 (依鲁替尼等) 进行靶向治疗^[74]。不幸的是,这些

疗法通常伴随着与耐药性相关的不良反应或有利突变 (如 BTK、PLC γ 2 或 Bcl-2 中的蛋白质)^[94-96]。因此,CLL 的医疗需求仍未得到满足,开发替代治疗方法至关重要。

通过归纳近年来铁死亡在 AML、ALL、CML、CLL 治疗耐药中的实验研究与临床应用,可以得知铁死亡诱导已被证明在各种白血病模型中发挥抗肿瘤作用。不仅是经典的铁死亡诱导剂,一些天然化合物衍生物和其他小分子也被证明可以通过靶向诱导铁死亡有效降低各类白血病细胞对化疗药物的耐药性。因此,此类药物与化疗药物、靶向药物及免疫治疗药物等的联合使用,可以成为白血病治疗和克服耐药性的新策略,经研究后可在临床进一步推广。

4 总结与展望

铁死亡是不同于细胞自噬、凋亡和坏死的一种新的调节性细胞死亡方式,主要表现为细胞抗氧化能力下降,致使细胞内游离铁增加和 ROS 依赖的脂质过氧化物累积,与各种人类疾病密切相关。白血病是对化疗诱导缓解率较高的恶性肿瘤,化疗耐药则是导致治疗失败、白血病复发、影响长期无病生存的重要原因。随着铁死亡与耐药性白血病的研究不断涌现,本文从作用与调控机制、信号传导通路、实验研究、临床应用多方面进行综述,介绍了铁死亡在白血病耐药中的研究进展,证实了铁死亡在耐药性白血病的治疗中存在优势,触发耐药性白血病细胞铁死亡可作为新的治疗策略和抗白血病治疗靶点。活性氧失衡诱导的氧化应激通路激活与白血病化疗耐药性的出现密切相关,GSH、GSTs 相关通路、P53-ROS 反馈通路、STAT5 通路、Keap1-Nrf2 通路可作为触发耐药性白血病细胞铁死亡的具体抓手。靶向诱导铁死亡药物与化疗药物、靶向药物、免疫治疗药物等的联合使用,可作为各类耐药性白血病患者新的治疗策略。

目前研究的不足之处在于,其一,现有的关于铁死亡作用与调控机制的证据大多基于实体瘤研究,其在血液系统恶性肿瘤中的作用尚未得到充分的阐明;其二,铁死亡诱导已被证明在各种白血病模型中发挥抗肿瘤作用,但大多数证据是基于使用细胞系或患者来源的原代细胞的体外实验。体外发现的结果须要在体内验证,为此迫切需要进一步开发特异性和稳定的体内药物来诱导耐药性白血

病细胞铁死亡,以期为白血病的治疗带来更好的临床疗效。

参考文献:

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209–249.

[2] KAYSER S, LEVIS M J. Updates on targeted therapies for acute myeloid leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 2022, 196(2): 316–328.

[3] WANG X, HUANG R, ZHANG X, et al. Current status and prospects of hematopoietic stem cell transplantation in China [J]. *Chin Med J*, 2022, 135(12): 1394–1403.

[4] WANG H W, MA K L, LIU H, et al. Reversal of multidrug resistance in leukemia cells using a transferrin-modified nanomicelle encapsulating both doxorubicin and psoralen [J]. *Aging*, 2020, 12(7): 6018–6029.

[5] LIANG Q, WANG Y, LI Y, et al. Ferroptosis: emerging roles in lung cancer and potential implications in biological compounds [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1374182.

[6] 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.

[7] ZHAO L, ZHOU X, XIE F, et al. Ferroptosis in cancer and cancer immunotherapy [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2022, 42(2): 88–116.

[8] ROBINSON A J, HOPKINS G L, RASTOGI N, et al. Reactive oxygen species drive proliferation in acute myeloid leukemia via the glycolytic regulator PFKFB3 [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(5): 937–949.

[9] ZHANG C, LIU X, JIN S, et al. Ferroptosis in cancer therapy: a novel approach to reversing drug resistance [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 47.

[10] ZHANG J, LIU Y, LI Q, et al. Ferroptosis in hematological malignancies and its potential network with abnormal tumor metabolism [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 148: 112747.

[11] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060–1072.

[12] BEBBER C M, MÜLLER F, PRIETO CLEMENTE L, et al. Ferroptosis in cancer cell biology [J]. *Cancers*, 2020, 12(1): 164.

[13] SIES H, JONES D P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(7): 363–383.

[14] STOCKWELL B R, JIANG X. The chemistry and biology of ferroptosis [J]. *Cell Chem Biol*, 2020, 27(4): 365–375.

[15] STOCKWELL B R. Ferroptosis turns 10: Emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications [J]. *Cell*, 2022, 185(14): 2401–2421.

[16] URSINI F, MAIORINO M. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 152: 175–185.

[17] SHIMADA K, SKOUTA R, KAPLAN A, et al. Global survey of cell death mechanisms reveals metabolic regulation of ferroptosis [J]. *Nat Chem Biol*, 2016, 12(7): 497–503.

[18] ZOU Y, PALTE M J, DEIK A A, et al. A GPX4-dependent cancer cell state underlies the clear-cell morphology and confers sensitivity to ferroptosis [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1617.

[19] EATON J K, FURST L, RUBERTO R A, et al. Selective covalent targeting of GPX4 using masked nitrile-oxide electrophiles [J]. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(5): 497–506.

[20] ZHANG Y, SWANDA R V, NIE L, et al. mTORC1 couples cystine availability with GPX4 protein synthesis and ferroptosis regulation [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1589.

[21] ZHANG Y, TAN H, DANIELS J D, et al. Imidazole ketone erastin induces ferroptosis and slows tumor growth in a mouse lymphoma model [J]. *Cell Chem Biol*, 2019, 26(5): 623–633.

[22] BADGLEY M A, KREMER D M, MAURER H C, et al. Cysteine depletion induces pancreatic tumor ferroptosis in mice [J]. *Science*, 2020, 368(6486): 85–89.

[23] KOPPULA P, ZHUANG L, GAN B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy [J]. *Protein Cell*, 2021, 12(8): 599–620.

[24] DOLL S, FREITAS F P, SHAH R, et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor [J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 693–698.

[25] BERSUKER K, HENDRICKS J M, LI Z, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis [J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 688–692.

[26] WANG Y, HEKIMI S. Understanding ubiquinone [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(5): 367–378.

[27] KOPPULA P, LEI G, ZHANG Y, et al. A targetable CoQ-FSP1 axis drives ferroptosis- and radiation-resistance in KEAP1 inactive lung cancers [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2206.

[28] MISHIMA E, ITO J, WU Z, et al. A non-canonical vitamin K cycle is a potent ferroptosis suppressor [J]. *Nature*, 2022, 608(7924): 778–783.

[29] SOULA M, WEBER R A, ZILKA O, et al. Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to canonical ferroptosis inducers [J]. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(12): 1351–1360.

[30] KRAFT V A N, BEZJIAN C T, PFEIFFER S, et al. GTP cyclohydrolase 1/tetrahydrobiopterin counteract ferroptosis through lipid remodeling [J]. *ACS Cent Sci*, 2020, 6(1): 41–53.

[31] MAO C, LIU X, ZHANG Y, et al. DHODH-mediated ferroptosis defence is a targetable vulnerability in cancer [J]. *Nature*, 2021, 593(7860): 586–590.

[32] WU S, MAO C, KONDIPARTHI L, et al. A ferroptosis defense mechanism mediated by glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 in

- mitochondria [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(26): e2121987119.
- [33] LIANG D, FENG Y, ZANDKARIMI F, et al. Ferroptosis surveillance independent of GPX4 and differentially regulated by sex hormones [J]. *Cell*, 2023, 186(13): 2748–2764.
- [34] TANG L, YU Y, DENG W, et al. TXNDC12 inhibits lipid peroxidation and ferroptosis [J]. *iScience*, 2023, 26(12): 108393.
- [35] KANG R, KROEMER G, TANG D. The tumor suppressor protein p53 and the ferroptosis network [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 133: 162–168.
- [36] GARCIAZ S, MILLER T, COLLETTE Y, et al. Targeting regulated cell death pathways in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Drug Resist*, 2023, 6(1): 151–168.
- [37] MUCKENTHALER M U, RIVELLA S, HENTZE M W, et al. A red carpet for iron metabolism [J]. *Cell*, 2017, 168(3): 344–361.
- [38] NAKAMURA T, NAGURO I, ICHIJO H. Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2019, 1863(9): 1398–1409.
- [39] O'DONNELL V B, ALDROVANDI M, MURPHY R C, et al. Enzymatically oxidized phospholipids assume center stage as essential regulators of innate immunity and cell death [J]. *Sci Signal*, 2019, 12(574): eaau2293.
- [40] CONRAD M, PRATT D A. The chemical basis of ferroptosis [J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(12): 1137–1147.
- [41] GAMMELLA E, BURATTI P, CAIRO G, et al. The transferrin receptor: the cellular iron gate [J]. *Metalomics*, 2017, 9(10): 1367–1375.
- [42] HOU W, XIE Y, SONG X, et al. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin [J]. *Autophagy*, 2016, 12(8): 1425–1428.
- [43] STELMACH P, TRUMPP A. Leukemic stem cells and therapy resistance in acute myeloid leukemia [J]. *Haematologica*, 2023, 108(2): 353–366.
- [44] ZHANG LP, ZHANG MY, LIU WJ. Mechanism of resistance and therapeutic prospect of leukemia mediated by signaling pathway in bone marrow microenvironment [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(15): 6419–6428.
- [45] DU Y, CHEN B. Detection approaches for multidrug resistance genes of leukemia [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11: 1255–1261.
- [46] AKIYAMA H, CARTER BZ, ANDREEFF M, et al. Molecular Mechanisms of Ferroptosis and Updates of Ferroptosis Studies in Cancers and Leukemia [J]. *Cells*, 2023, 12(8): 1128.
- [47] ZHANG X, AI Z, ZHANG Z, et al. Dihydroartemisinin triggers ferroptosis in multidrug-resistant leukemia cells [J]. *DNA Cell Biol*, 2022, 41(8): 705–715.
- [48] 王丽红. 靶向谷胱甘肽的小分子化合物通过促进 Keap1 蛋白的 S-谷胱甘肽化和诱导细胞凋亡来抑制肿瘤生长 [D]. 济南: 山东大学, 2018.
- WANG L H. A small molecule targeting glutathione activates Nrf2 and inhibits cancer cell growth through promoting Keap1 S-glutathionylation and inducing apoptosis [D]. Jinan: Shandong University, 2018.
- [49] ASANO T, TSUTSUDA-ASANO A, FUKUNAGA Y. Indomethacin overcomes doxorubicin resistance by decreasing intracellular content of glutathione and its conjugates with decreasing expression of gamma-glutamylcysteine synthetase via promoter activity in doxorubicin-resistant leukemia cells [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009, 64(4): 715–721.
- [50] 闫理想, 姜静, 史哲新, 等. 中药单体逆转白血病多药耐药研究进展 [J]. *山西中医*, 2023, 39(1): 67–70.
- YAN L X, JIANG J, SHI Z X, et al. Research progress on reversal of multidrug resistance in leukemia by traditional Chinese medicine monomer [J]. *Shanxi J Tradit Chin Med*, 2023, 39(1): 67–70.
- [51] HANSSEN K M, HABER M, FLETCHER J I. Targeting multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)-expressing cancers: Beyond pharmacological inhibition [J]. *Drug Resist Updat*, 2021, 59: 100795.
- [52] CHEN J, TIAN B, ZHOU C, et al. A novel resveratrol-arsenic trioxide combination treatment synergistically induces apoptosis of adriamycin-selected drug-resistant leukemia K562 cells [J]. *J Cancer*, 2019, 10(22): 5483–5493.
- [53] KANG Q, YAN S. Piperlongumine reverses doxorubicin resistance through the PI3K/Akt signaling pathway in K562/A02 human leukemia cells [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(4): 1345–1350.
- [54] PITTS H A, CHENG C K, CHEUNG J S, et al. SPINK2 protein expression is an independent adverse prognostic marker in AML and is potentially implicated in the regulation of ferroptosis and immune response [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9696.
- [55] LIONGUE C, WARD A C. Myeloproliferative neoplasms: diseases mediated by chronic activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) proteins [J]. *Cancers*, 2024, 16(2): 313.
- [56] PELAYO R. A new hope for early T cell precursor acute lymphoblastic leukemia therapy based on STAT5+ leukemic stem cell targeting [J]. *J Leukoc Biol*, 2023, 114(5): 381–383.
- [57] CHENG Y, HAO Y, ZHANG A, et al. Persistent STAT5-mediated ROS production and involvement of aberrant p53 apoptotic signaling in the resistance of chronic myeloid leukemia to imatinib [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(1): 455–463.
- [58] YE F, CHAI W, XIE M, et al. HMGB1 regulates erastin-induced ferroptosis via RAS-JNK/p38 signaling in HL-60/NRAS^{Q61L} cells [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(4): 730–739.
- [59] WANG Q, BIN C, XUE Q, et al. GSTZ1 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib-induced ferroptosis via inhibition of NRF2/GPX4 axis [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(5): 426.
- [60] YU X, MANSOURI A, LIU Z, et al. NRF2 activation induced

- by PML-RAR α promotes microRNA 125b-1 expression and confers resistance to chemotherapy in acute promyelocytic leukemia [J]. Clin Transl Med, 2021, 11(5): e418.
- [61] LIU X, ZHONG S, QIU K, et al. Targeting NRF2 uncovered an intrinsic susceptibility of acute myeloid leukemia cells to ferroptosis [J]. Exp Hematol Oncol, 2023, 12(1): 47.
- [62] WU X, CHEN S, HUANG K, et al. Triptolide promotes ferroptosis by suppressing Nrf2 to overcome leukemia cell resistance to doxorubicin [J]. Mol Med Rep, 2023, 27(1): 17.
- [63] VELASCO-HERNANDEZ T, TRINCADO J L, VINYOLES M, et al. Integrative single-cell expression and functional studies unravels a sensitization to cytarabine-based chemotherapy through HIF pathway inhibition in AML leukemia stem cells [J]. Hemasphere, 2024, 8(2): e45.
- [64] KNORR K L B, GOLDBERG A D. Leukemia stem cell gene expression signatures contribute to acute myeloid leukemia risk stratification [J]. Haematologica, 2020, 105(3): 533-536.
- [65] ZHANG Q, RILEY-GILLIS B, HAN L, et al. Activation of RAS/MAPK pathway confers MCL-1 mediated acquired resistance to BCL-2 inhibitor venetoclax in acute myeloid leukemia [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 51.
- [66] 向彩霞, 黄彬涛, 郝建. 抗凋亡抑制剂维奈克拉在治疗髓系白血病的进展 [J]. 基础医学与临床, 2023, 43(5): 833-836.
XIANG C X, HUANG B T, HAO J. Research progress of anti-apoptotic inhibitor venetoclax in treatment of myeloid leukemia [J]. Basic Clin Med, 2023, 43(5): 833-836.
- [67] GASPARETTO M, PEI S, MINHAJUDDIN M, et al. Low ferroportin expression in AML is correlated with good risk cytogenetics, improved outcomes and increased sensitivity to chemotherapy [J]. Leuk Res, 2019, 80: 1-10.
- [68] DU J, WANG T, LI Y, et al. DHA inhibits proliferation and induces ferroptosis of leukemia cells through autophagy dependent degradation of ferritin [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 131: 356-369.
- [69] CHEN G Q, BENTHANI F A, WU J, et al. Artemisinin compounds sensitize cancer cells to ferroptosis by regulating iron homeostasis [J]. Cell Death Differ, 2020, 27(1): 242-254.
- [70] MBAVENG A T, CHI G F, BONSOU I N, et al. N-acetylglycoside of oleanolic acid (aridanin) displays promising cytotoxicity towards human and animal cancer cells, inducing apoptotic, ferroptotic and necroptotic cell death [J]. Phytomedicine, 2020, 76: 153261.
- [71] YU Y, XIE Y, CAO L, et al. The ferroptosis inducer erastin enhances sensitivity of acute myeloid leukemia cells to chemotherapeutic agents [J]. Mol Cell Oncol, 2015, 2(4): e1054549.
- [72] MBAVENG A T, FOTSO G W, NGNINTEDO D, et al. Cytotoxicity of epunctanone and four other phytochemicals isolated from the medicinal plants *Garcinia epunctata* and *Ptychobolium contortum* towards multi-factorial drug resistant cancer cells [J]. Phytomedicine, 2018, 48: 112-119.
- [73] MBAVENG A T, NDONTSA B L, KUETE V, et al. A naturally occurring triterpene saponin ardisiacrispin B displayed cytotoxic effects in multi-factorial drug resistant cancer cells via ferroptotic and apoptotic cell death [J]. Phytomedicine, 2018, 43: 78-85.
- [74] CHENNAMADHAVUNI A, LYENGAR V, MUKKAMALLA S K R, et al. Leukemia [M]. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2023.
- [75] DÖHNER H, WEISDORF D J, BLOOMFIELD C D. Acute myeloid leukemia [J]. N Engl J Med, 2015, 373(12): 1136-1152.
- [76] 程霖, 金鑫, 卢文艺, 等. RSL3 诱导急性白血细胞株 MOLM13 及其耐药细胞株发生铁死亡的作用及相关机制研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2021, 29(4): 1109-1118.
CHENG L, JIN X, LU W Y, et al. Effect and involved mechanism of RSL3-induced ferroptosis in acute leukemia cells MOLM13 and Drug-resistant cell lines [J]. J Exp Hematol, 2021, 29(4): 1109-1118.
- [77] MAITI A, RAUSCH C R, CORTES J E, et al. Outcomes of relapsed or refractory acute myeloid leukemia after frontline hypomethylating agent and venetoclax regimens [J]. Haematologica, 2021, 106(3): 894-898.
- [78] BIRSEN R, LARRUE C, DECROOCQ J, et al. APR-246 induces early cell death by ferroptosis in acute myeloid leukemia [J]. Haematologica, 2022, 107(2): 403-416.
- [79] CLUZEAU T, SEBERT M, RAHMÉ R, et al. Eprexapopt plus azacitidine in TP53-mutated myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia; a phase II study by the groupe francophone des myélodysplasies (GFM) [J]. J Clin Oncol, 2021, 39(14): 1575-1583.
- [80] SALLMAN D A, DEZERN A E, GARCIA-MANERO G, et al. Eprexapopt (APR-246) and azacitidine in TP53-mutant myelodysplastic syndromes [J]. J Clin Oncol, 2021, 39(14): 1584-1594.
- [81] SABATIER M, BIRSEN R, LAUTURE L, et al. C/EBP α confers dependence to fatty acid anabolic pathways and vulnerability to lipid oxidative stress-induced ferroptosis in FLT3-mutant leukemia [J]. Cancer Discov, 2023, 13(7): 1720-1747.
- [82] WEI J, NAI G Y, DAI Y, et al. Dipetidyl peptidase-4 and transferrin receptor serve as prognostic biomarkers for acute myeloid leukemia [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(17): 1381.
- [83] YIN Z, LI F, ZHOU Q, et al. A ferroptosis-related gene signature and immune infiltration patterns predict the overall survival in acute myeloid leukemia patients [J]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 959738.
- [84] PROBST L, DÄCHERT J, SCHENK B, et al. Lipoxigenase inhibitors protect acute lymphoblastic leukemia cells from ferroptotic cell death [J]. Biochem Pharmacol, 2017, 140: 41-52.
- [85] ISHIKAWA C, SENBA M, MORI N. Evaluation of artesunate

for the treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 872: 172953.

[86] WANG Y, IHA H. The novel link between gene expression profiles of adult T-cell leukemia/lymphoma patients' peripheral blood lymphocytes and ferroptosis susceptibility [J]. Genes, 2023, 14(11): 2005.

[87] LOU S, HONG H, MAIHESUTI L, et al. Inhibitory effect of hydnocarpin D on T-cell acute lymphoblastic leukemia via induction of autophagy-dependent ferroptosis [J]. Exp Biol Med, 2021, 246(13): 1541-1553.

[88] 朱婷, 范洋. 自噬通过影响铁稳态调节急性淋巴细胞白血病细胞对铁死亡激活剂的敏感性 [J]. 中国实验血液学杂志, 2021, 29(5): 1380-1386.

ZHU T, FAN Y. Autophagy regulates the sensitivity of acute lymphoblastic leukemia cells to ferroptosis activator by influencing iron homeostasis [J]. J Exp Hematol, 2021, 29(5): 1380-1386.

[89] LIU S, WU W, CHEN Q, et al. TXNRD1: a key regulator involved in the ferroptosis of CML cells induced by cysteine depletion *in vitro* [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 7674565.

[90] XU X H, GAN Y C, XU G B, et al. Tetrandrine citrate eliminates imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells *in vitro* and *in vivo* by inhibiting Ber-Abl/ β -catenin axis [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2012, 13(11): 867-874.

[91] YIN J, LIN Y, FANG W, et al. Tetrandrine citrate suppresses breast cancer *via* depletion of glutathione peroxidase 4 and activation of nuclear receptor coactivator 4-mediated ferritinophagy [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 820593.

[92] HALLEK M, CHESON B D, CATOVSKY D, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL [J]. Blood, 2018, 131(25): 2745-2760.

[93] ZHANG W, TRACHOOTHAM D, LIU J, et al. Stromal control of cystine metabolism promotes cancer cell survival in chronic lymphocytic leukaemia [J]. Nat Cell Biol, 2012, 14(3): 276-286.

[94] BLOMBERG P, ANDERSON M A, GONG J N, et al. Acquisition of the recurrent Gly101Val mutation in BCL2 confers resistance to venetoclax in patients with progressive chronic lymphocytic leukemia [J]. Cancer Discov, 2019, 9(3): 342-353.

[95] JONES D, WOYACH J A, ZHAO W, et al. PLCG2 C2 domain mutations co-occur with BTK and PLCG2 resistance mutations in chronic lymphocytic leukemia undergoing ibrutinib treatment [J]. Leukemia, 2017, 31(7): 1645-1647.

[96] WOYACH J A, RUPPERT A S, GUINN D, et al. BTK^{C481S}-mediated resistance to ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia [J]. J Clin Oncol, 2017, 35(13): 1437-1443.

[收稿日期] 2024-01-03



《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!

刘泽涵,刘双晴,武雪亮,等. 胆管癌免疫微环境特征与免疫治疗:机制、挑战与前景 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 168-174.

Liu ZH, Liu SQ, Wu XL, et al. Characterization of the immune microenvironment and immunotherapy for cholangiocarcinoma: mechanisms, challenges, and prospects [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 168-174.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.019

胆管癌免疫微环境特征与免疫治疗:机制、挑战与前景

刘泽涵^{1,2}, 刘双晴², 武雪亮³, 杨 琴¹, 隋晓军^{2*}

(1.成都市第三人民医院普外科肝胆胰病区,西南交通大学附属医院 & 重庆医科大学附属成都第二临床医学院,成都 610031;

2.天津医科大学南开临床学院,天津 300100;3.河北北方学院附属第一医院,河北 张家口 075000)

【摘要】 胆管癌是一种具有胆道上皮特征的恶性肿瘤。目前胆管癌早期诊断困难、治疗效果欠佳。其微环境包括丰富的纤维化间质和多种细胞类型,这些成分通过促进迁移、抑制免疫反应、诱导血管和淋巴管生成等机制与肿瘤细胞相互作用,促进胆管癌的发展和转移。免疫治疗是当前肿瘤治疗的重要手段之一,而胆管癌的免疫治疗也取得了一定的进展。本文综述了胆管癌免疫微环境的特征、与免疫治疗的关系及前沿的治疗策略。

【关键词】 胆管癌;免疫微环境;免疫治疗;临床研究

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0168-07

Characterization of the immune microenvironment and immunotherapy for cholangiocarcinoma: mechanisms, challenges, and prospects

LIU Zehan^{1,2}, LIU Shuangqing², WU Xueliang³, YANG Qin¹, SUI Xiaojun^{2*}

(1. Section for Hepato Pancreato Biliary Surgery, Department of General Surgery, the Third People's Hospital of Chengdu, Affiliated Hospital of Southwest Jiaotong University & the Second Affiliated Hospital of Chengdu, Chongqing Medical University, Chengdu 610031, China. 2. Tianjin Medical University Nankai Hospital, Tianjin 300100. 3. the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

【Abstract】 Cholangiocarcinoma is a malignant tumor with biliary epithelial features. The early diagnosis of cholangiocarcinoma is currently difficult and the treatment outcomes are poor. Its microenvironment includes abundant fibrotic mesenchyme and a variety of cell types, which promote the development and metastasis of cholangiocarcinoma by interacting with tumor cells through mechanisms such as facilitating migration, suppressing the immune response, and inducing angiogenesis and lymphangiogenesis. Immunotherapy is an important tumor treatment approach, and immunotherapy for cholangiocarcinoma has made some progress. This article reviews the characteristics of the immune microenvironment of cholangiocarcinoma, its relationship with immunotherapy, and cutting-edge therapeutic strategies.

【Keywords】 cholangiocarcinoma; immune microenvironment; immunotherapy; clinical study

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

【基金项目】 四川省自然科学基金项目 (2023NSFSC1621)。

【作者简介】 刘泽涵 (1992—), 男, 博士, 主治医师, 研究方向: 肝胆胰恶性肿瘤临床与基础。E-mail: zehanliu92@163.com

【通信作者】 隋晓军 (1986—), 男, 博士, 主治医师, 研究方向: 肝胆胰恶性肿瘤的综合治疗及基础。E-mail: suixiaojun126@126.com

胆管癌 (cholangiocarcinoma, CCA) 是一种具有胆道上皮特征的恶性肿瘤。它是原发性肝恶性肿瘤中的第二大类型,仅次于肝细胞癌,约占肝胆恶性肿瘤死亡人数的 15%^[1]。根据解剖来源,CCA 可分为肝内 CCA (intrahepatic cholangiocarcinoma, iCCA)、肝门 CCA (perihilar cholangiocarcinoma, pCCA) 和肝外 CCA (extrahepatic cholangiocarcinoma, eCCA) 三类^[2]。这些类型的 CCA 在临床表现、危险因素、自然病史、基因组学存在差异,且总体对药物治疗的反应性低。CCA 早期诊断具有挑战性,多数患者就诊时已处于局部进展期或出现远处转移^[3]。即使是接受潜在治愈性手术切除的患者,也有很高的复发率和早期局部或远处转移,CCA 的治疗难度大,仅有 30% 的患者有机会接受根治性手术切除,而 5 年生存率不足 10%,1 年复发率高达 50%^[4]。在 CCA 的微环境中,有多种细胞类型,如癌症相关成纤维细胞 (cancer-associated fibroblasts, CAFs)、内皮细胞、各类淋巴细胞、肿瘤相关巨噬细胞 (tumour-associated macrophages, TAMs)、肿瘤相关中性粒细胞 (tumour-associated neutrophils, TANs)、调节性 T 淋巴细胞 (regulatory T-cell, Tregs) 和自然杀伤细胞 (natural killer cells, NKs)。这些细胞通过促进迁移、抑制免疫反应、诱导血管和淋巴管生成等机制,促进 CCA 的发展和转移^[5]。本文对 CCA 免疫微环境的特性、其与免疫治疗的关系,以及前沿的潜在治疗策略进行了全面的综述。

1 CCA 微环境成分和功能

1.1 癌症相关成纤维细胞 (CAFs)

癌症相关成纤维细胞是一类特殊的肌成纤维细胞,它们在癌症的发展和进展中起着关键作用。CAFs 通过分泌细胞因子、生长因子和细胞外基质蛋白等,与 CCA 细胞相互作用,促进其增殖、侵袭和迁移,并影响免疫逃逸和化疗耐药^[6]。这些细胞表达多种蛋白质,其中最显著的是 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)。值得注意的是,高水平的 α -SMA 表达与患者的低生存率之间存在明显的相关性。CAFs 释放多种旁分泌介质,包括转化生长因子 β 1、肝细胞生长因子、表皮生长因子、结缔组织生长因子、基质细胞衍生因子 1、细胞外基质成分,以及各种基质金属酶^[7]。这些介质塑造微环境,促进肿瘤的生长和侵袭性。CCA 细胞和 CAFs 参与了一个广泛的相互通信网络,这维持和增强了

肿瘤细胞的恶性特性。

1.2 肿瘤相关巨噬细胞 (TAMs)

肝巨噬细胞主要有两种类型:驻留型 (Kupffer 细胞) 和骨髓源性巨噬细胞。在特定损伤如胆汁淤积性肝损伤时,这些巨噬细胞能表现出抗瘤 (促炎性) 的 M1 或促瘤 (抗炎性) 的 M2 表型。活化巨噬细胞可分泌白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF α) 和转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 等细胞因子,这些因子能诱导胆管细胞增殖、纤维生成,并可能促进胆道致癌物的产生^[8]。在 CCA 肿瘤组织中,高浸润性肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs) 一直与不良预后相关^[9]。研究显示,在 iCCA 患者中,浸润的巨噬细胞主要激活为 M2 表型并发挥免疫抑制作用。而 CCA 细胞能够诱导 TAMs 向 M2 型转化,对该生物学行为的干预可能作为延缓 CCA 进展的潜在治疗靶点^[10]。

1.3 肿瘤相关中性粒细胞 (TANs)

肿瘤相关中性粒细胞 (tumor-associated neutrophils, TANs) 在癌症的发生发展中起着重要作用。已有研究证明,浸润性 Tregs 和 TANs 在 eCCA 组织的数量增加与患者的生存率降低有关联^[11]。另一项研究显示,在 CCA 患者的微环境中,TANs 的浸润数量与 CD8⁺T 细胞的数量呈现负相关关系,而与 Treg 细胞数量则呈现正相关关系^[12]。此外,不仅肿瘤周围 TANs 的积累与 iCCA 侵袭性的增加有关^[13],而且外周血中中性粒细胞/淋巴细胞比率的增加也与 eCCA 和 iCCA 患者的生存率相关^[14-15]。有研究表明,TANs 和 TAMs 通过激活 STAT3 信号通路相互作用,共同促进 CCA 的进展^[16]。尽管 TANs 是一个潜在的研究热点,但目前对 CCA 中 TANs 的研究仍然有限。为了更深入地理解其在 CCA 微环境中的功能,需要更多的证据支持。

1.4 自然杀伤细胞 (NKs)

自然杀伤细胞 (natural killer cell, NKs) 是重要的淋巴细胞,和细胞毒性 T 细胞一样具有识别和清除肿瘤细胞的能力。然而,肿瘤细胞可能采取策略来逃避 NK 细胞的杀肿瘤活性 (即免疫逃逸)。这些策略包括暴露主要组织相容性复合体 I 类抗原、脱落激活 NK 受体 (NKG2DLs) 的配体,或分泌拮抗 NK 细胞活性的免疫调节分子 (TGF- β 、前列腺素 E2)^[17]。虽然 NK 在 CCA 的研究有限,但有研究显示,使用异种移植小鼠模型与人类 CCA 细胞系

HuCCT-1 表明,移植的人类 NK 细胞能够诱导 NK 细胞的体内细胞毒性活性,从而抑制肿瘤生长。这表明增加 NK 细胞的数量和功能可能成为治疗 CCA 的有前景的方法^[18]。

1.5 肿瘤浸润淋巴细胞(TILs)

肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes, TILs)是一组异质性的免疫细胞,包括 CD20⁺B 淋巴细胞、CD8⁺细胞毒性 T 细胞和 CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺的 Treg 细胞。研究表明,CD8⁺T 细胞的扩增、招募和活化受到多种因子的调控。当抗原被抗原呈递细胞呈递并与主要组织相容性抗原 I 类分子(major histocompatibility complex class I, MHC-I)复合的肽结合时,肿瘤激活的特异性 CD8⁺T 淋巴细胞诱导免疫反应。T 细胞上的正调节因子 CD28 与 CD80(B-7 或 B7-1)或树突状细胞的 CD86(B7-2)结合。反之,细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)的表达由 TCR 信号传导诱导,允许与 CD86 和 CD80 相互作用以抵消 CD28 的作用。程序性细胞死亡 1(PD-1)受体则是另一种重要的抑制性 T 细胞受体,其配体包括 PD-L1(也称为 B7-H1 或 CD274)和 PD-L2(也称为 B7-DC 或 CD273)。这些配体在肿瘤微环境中表达,与 PD-1 受体结合后可抑制 T 细胞的活化、增殖和效应功能,形成一个抑制性的信号通路从而促进肿瘤的免疫逃逸。PD-1 主要存在于活化的 T 细胞、肿瘤浸润性 T 细胞、B 细胞、单核细胞和 NKT 细胞中^[19]。不仅如此,PD-1 还会诱导肿瘤浸润性 T 细胞的凋亡,并促进 CD4⁺T 细胞向表达 FOXP3 的调节性 T 细胞(Tregs)分化^[20]。因此,PD-1 及其配体在肿瘤免疫中具有重要作用,是当前免疫治疗研究的热点之一。在 ICC 患者中,Treg 细胞作为主要的 CD4⁺T 细胞亚型,对患者的预后具有重要影响。在非肿瘤和肿瘤组织之间,FOXP3⁺Treg 细胞的增加以及高 FOXP3⁺/CD8⁺比值与低生存率相关^[21]。Treg 细胞可以诱导 NK 细胞和细胞毒性 T 细胞的抑制性免疫反应,这主要通过分泌 IL-10 和 TGF- β 1 实现^[22]。虽然大量 T 淋巴细胞浸润的病例可能对免疫治疗更敏感,但目前这仍是一个推测性的议题,需要更多的临床和实验室证据来支持。因此,了解肿瘤微环境中不同免疫亚型的特征和功能,对于开发更有效的免疫治疗方法具有重要意义。

1.6 细胞外基质(ECM)

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在结直

肠癌中,由 CAFs 产生的腱素-c 在 ECM 中积累,形成特殊的途径,通过细胞间质上皮转换因子依赖和表皮生长因子受体依赖的机制引导癌细胞的侵袭和扩散^[23]。骨桥蛋白在 CCA 中的功能作用一直是有争议的。在 iCCA 组织中,低水平的骨桥蛋白表达与淋巴结转移和低生存率相关,而低水平的循环骨桥蛋白与多种肿瘤相关^[24]。有研究表明,在 CCA 患者中,间质中骨桥蛋白表达升高与肿瘤大小、侵袭、转移和晚期分期显著相关^[25]。虽然 CAFs 表达的骨桥蛋白可能局部影响 CCA 微环境,其功能可能与循环骨桥蛋白不同,但需要进一步研究阐明骨桥蛋白及其在 CCA 进展中的作用和治疗潜力。

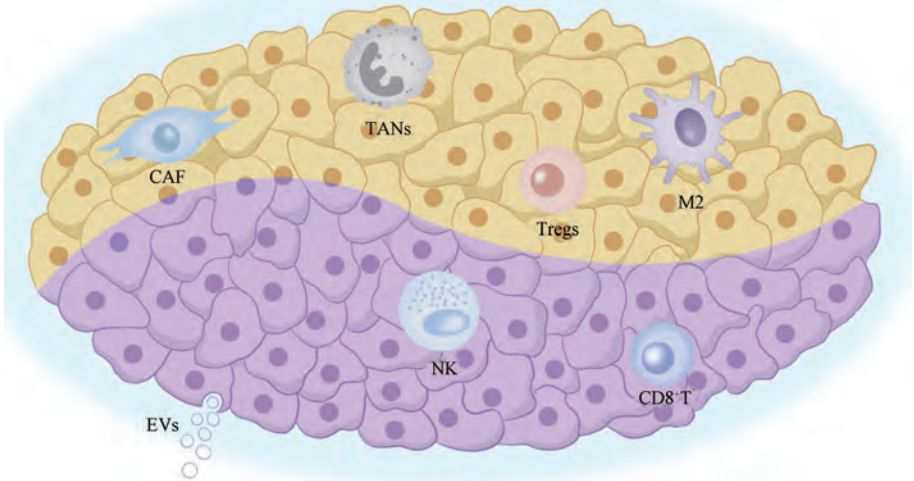
1.7 其他

细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs),作为 microRNAs(miRNAs)的载体,在肝疾病期间的细胞间串扰中起着至关重要的作用^[26]。这些囊泡是由细胞分泌的小囊泡,它们与细胞膜结合,并可作为细胞间通信的媒介。根据其生物发生可分为 3 类:(1)外泌体(exosomes,直径 50~100 nm);(2)微囊泡(microvesicles,直径 0.1~1 μ m);(3)凋亡小体(apoptotic bodies,直径>1 μ m)^[27]。这些较小的 EVs、外泌体和微囊泡可以作为蛋白质、DNA 和 RNA 的运输工具,将这些介质从供体传递到受体细胞,从而调节细胞生物学过程。在 CCA 中,这种 EV 介导的细胞间通信可能是必不可少的。因此,进一步研究 EVs 在 CCA 中的作用和功能,可以为开发新的治疗策略提供潜在的靶点。非编码 RNA,如 miRNAs 和长链非编码 RNA(lncRNAs),可以调节基因表达,并在多种癌症类型的增殖和转移中发挥关键作用。先前的研究已经在 CCA 组织中确定了一些候选 miRNAs 和 lncRNAs,它们可能对肿瘤细胞的增殖和转移具有调控作用^[28]。除了直接调控 CCA 细胞外,非编码 RNA 还可能影响肿瘤微环境中的其他细胞。因此,深入研究非编码 RNA 在 CCA 中的作用和机制,可以为开发新的治疗策略提供潜在的靶点^[29]。综上,CCA 是一种免疫抑制性微环境为主的广泛纤维增生性肿瘤,肿瘤细胞与不同细胞类型之间存在串扰介导,包括 CAFs、TAMs、Treg、NK、CD8⁺T 细胞,以及 ECM 产生的屏障等(图 1)。

2 CCA 免疫治疗的前沿临床研究

2.1 CCA 免疫治疗临床药理机制

尽管目前对 CCA 的免疫治疗临床研究仍有限,



注:CCA 的肿瘤免疫微环境涉及多种免疫细胞,它们或抗击肿瘤,或为其提供免疫抑制环境。CD8⁺T 细胞和自然杀伤性细胞(NKs)等发挥抗肿瘤功能,而肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)、肿瘤相关中性粒细胞(TANs)、调节性 T 细胞(Tregs)和癌症相关成纤维细胞(CAFs)等则发挥免疫抑制作用。

图 1 肿瘤免疫微环境的复杂性:CCA 中免疫细胞的双重作用

Note. The tumour immune microenvironment in cholangiocarcinoma involves a wide range of immune cells that either fight the tumour or provide an immunosuppressive environment. Cells such as CD8⁺T cells and natural killer cells (NKs) exert an anti-tumour function, whereas cells such as tumour-associated macrophages (TAMs), tumour-associated neutrophils (TANs), regulatory T-cell (Tregs) and cancer-associated fibroblasts (CAFs) exert an immunosuppressive role.

Figure 1 Complexity of tumor immune microenvironment: the dual role of immune cells in CCA

但该疗法具有巨大潜力。CCA 微环境具有明显的异质性,免疫逃逸在 CCA 发生发展中的作用不容忽视。虽然 CCA 表达免疫原性肿瘤相关抗原,但免疫抑制性信号会抑制机体对肿瘤的细胞毒效应。目前,肿瘤免疫治疗主要包括多种手段,如免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitors,ICIs)、肿瘤疫苗、树突状细胞疫苗、过继性治疗、免疫调节剂、细胞治疗以及小分子抑制剂等。这些方法各有特点,为治疗 CCA 提供了多元化途径。TAMs、TANs、Tregs 和 CAFs,这些细胞通过释放多种细胞因子和趋化因子,并与肿瘤细胞相互作用,形成抑制性免疫微环境,进而促进肿瘤的发生、发展和转移,针对这些免疫抑制细胞的靶向治疗也将为治疗 CCA 提供新的策略^[5]。

目前的免疫治疗方法另一个思路是侧重于靶向提高肿瘤免疫微环境中 CD8⁺T 细胞杀伤力或数量的治疗策略。大多数 CCA 属于缺乏 T 细胞浸润的免疫“冷”肿瘤,对 ICIs 治疗的反应率较低。这可能与 IDH1(异柠檬酸脱氢酶 1)的突变有关^[30-31]。尽管目前关于 CCA 免疫治疗的研究尚有限,但派姆单抗作为一款抗 PD-1 抗体药物,在晚期 CCA 患者中表现出了良好的治疗效果^[32]。这些研究表明,诸

如 PD-1 抗体等免疫疗法的作用可能仅限于有一定比例的 CCA 患者,因此需要进一步的研究来确定哪些亚组患者可以从中获益^[33]。总体而言,高 PD-L1 表达与 CCA 患者的较差总体生存时间、低分化和较高 pN 分期相关^[34]。最近的研究结果显示,从高表达 CTLA-4 的 CCA 中分离的 TILs,暴露于抗 CTLA-4 抗体后可以促进 T 细胞的成熟和激活^[35]。综上,这些不同的研究结果进一步表明,CCA 的微环境具有高度异质性且意义重大,在临床实践中需要综合考虑患者的具体情况和生物标志物的表达情况,以制定更加有效的治疗方案。以下是临床常见的免疫治疗策略和思路。

2.2 免疫检查点抑制剂与其他疗法的联合应用

联合疗法在 CCA 免疫治疗中的重要性不言而喻。通过多种治疗手段的结合,可以增强免疫应答更全面地攻击肿瘤细胞,提高治疗效果。例如,ICIs 与化疗药物的联合应用,可以发挥化疗药物的直接细胞毒性作用和 ICIs 的免疫调节作用,实现“1+1>2”的治疗效果。此外,ICIs 与针对 CCA 的分子靶向药物、ICIs 与针对肿瘤免疫微环境的靶向治疗以及 ICIs 与局部治疗的联合应用等,也可以通过不同机制的协同作用,提高肿瘤治疗的疗效和患者的生存

率。常见的组合方式如下。

2.2.1 多种 ICI 联合

对于一线治疗失败或不能耐受一线治疗的进展期 CCA 患者,多项 ICI 单药治疗的临床研究发现,虽然少部分患者可获得部分缓解,但也暴露出低应答率的缺点。CTLA-4 参与早期免疫反应的调节,而 PD-L1 主要调节晚期外周组织的免疫反应。基于这种调节机制,将 PD-1、PD-L1 和 CTLA-4 的免疫抑制剂组合可以发挥协同效应,达到抗肿瘤治疗的目的。此外,已有临床研究表明,联合纳武利尤单抗和伊匹单抗与单药抗 PD-1 治疗相比,更能改善患者预后,其联合治疗不良反应也小于其他双 ICI^[36]。与单一抗体治疗相比,联合应用多种 ICI (如 PD-1 抗体和 CTLA-4 抗体) 在 CCA 治疗中也被广泛研究^[37-38]。这些抗体的联合应用可以通过不同的免疫途径提高免疫活性,并可能改善治疗效果。

2.2.2 ICI 与分子靶向药物联合

靶免联合是包括 CCA 在内实体瘤研究的热点。仑伐替尼联合派姆单抗在 CCA 治疗中有良好效果,患者客观缓解率为 42.1%,疾病控制率为 76.3%。13 例患者实现降期并手术,提示该组合在 CCA 转化治疗中有进一步探索空间^[39]。索凡替尼联合特瑞普利单抗在治疗晚期实体瘤中取得显著成果,疾病控制率和客观缓解率均较高^[40]。Polo 样激酶 1 (PLK1) 作为关键调控因子,在 CAFs 的活化以及 CCA 纤维基质屏障的形成过程中发挥核心作用。针对这一机制,有学者成功构建了双靶向给药系统 (AA-HA-ODA),该系统能够精准递送 PLK1 抑制剂 (Ro3280)。该系统能够优先识别并作用于 CAFs,有效打破环绕在肿瘤周围的坚固纤维基质屏障,实现药物向肿瘤组织内部的高效渗透,进而显著抑制肿瘤的生长。这一研究成果是靶向肿瘤微环境中 CAF 的免疫治疗方法,有可能是优化 CCA 治疗的重要方向^[41]。近年胆道癌患者的临床试验探索了 MEK 抑制剂 cobimetinib 与 PD-L1 抑制剂 atezolizumab 联合使用的疗效。尽管胆道癌对免疫治疗的反应性有限,但试验结果显示,联合使用这两种药物可以显著延长患者的无进展生存期,探索性分析揭示了联合治疗对免疫机制的潜在影响,如增强抗原加工和呈递、增加 CD8/FoxP3 比率等,为进一步优化免疫治疗提供了依据^[42]。

2.2.3 ICI 联合化疗药物

吉西他滨与顺铂的全身化疗,在晚期 CCA 治疗

中,被公认为标准方案。单臂研究显示,抗 PD-1 抗体 SHR-1210 联合吉西他滨 (Gemcitabine) 和奥沙利铂 (Oxaliplatin) 的 GEMOX 方案治疗晚期 CCA 有一定的疗效,但在可评估患者中,仍有约 40% 的患者病情未得到控制。在 TOPAZ-1 试验中,与单纯化疗方案相比,该方案联合 PD-L1 抑制剂 durvalumab 的生存率更好,使得 3 药联合方案成为该疾病的另一种一线治疗标准^[43]。这是首个在 CCA 中相较于标准疗法显示出临床获益的免疫组合疗法,临床医生需要思考未来将基石化疗方案如何更好地与免疫治疗相结合。

2.3 其他免疫疗法在 CCA 中的应用

嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR) 是一种经过改造的 T 细胞受体,可以结合特定的抗原并激活 T 细胞。在 CAR-T 细胞疗法中,患者的 T 细胞被取出并经过基因改造,以表达能够识别肿瘤细胞表面抗原。这些改造后的 T 细胞被重新输回患者体内,以攻击肿瘤细胞。有研究表明,输注的 CART-EGFR 细胞对晚期 CCA 安全且有效,并出现中央记忆 T 细胞的富集可改善的临床结果,这表明该疗法也具有优化 CCA 免疫微环境的作用^[44]。

细胞外囊泡 (EVs) 是一种有潜力的 CCA 免疫治疗工具,可以将介质或药物递送到 CCA 或肿瘤微环境中的细胞。近年来国内有研究新技术主要利用载药囊泡传递化疗药物至肿瘤部位,有效缓解 CCA 患者的梗阻症状,并改善生活质量,具有较高的安全性和有效性。其作用机理涉及细胞焦亡和免疫细胞杀伤肿瘤细胞,可克服 CCA 细胞外基质的阻碍,使药物有效到达肿瘤细胞,实现精准治疗。此外,EVs 包含尿苷二磷酸葡萄糖和补体 C5,能够直接趋化中性粒细胞,同时 CCA 细胞焦亡时释放的致炎因子也能有效吸引中性粒细胞,从而动员机体免疫大军进行二次杀伤。因此,该技术具有独特的作用机制和显著的治疗效果并得到了临床应用^[45]。

尽管免疫疗法在临床试验中已经取得了显著的进展,但是它依然面临着重重挑战。特别是过多的冗余免疫抑制信号以及缺乏可靠的分层生物标志物,这两者已成为开发高效免疫疗法的最主要障碍。为了攻克这些难题,我们必须深化对免疫系统复杂性和肿瘤微环境异质性的研究和探索,同时推动更精确的免疫分析技术的发展。

3 总结与展望

尽管 CCA 的免疫微环境复杂多变,为免疫治疗

带来挑战,但针对其潜在靶点的免疫治疗已成为研究焦点。目前,CCA 在免疫治疗领域的研究相对于其他消化道肿瘤稍显缓慢,主要集中在 ICI 的单药或联合靶向、化疗等策略。然而,免疫治疗在 CCA 中仍面临疗效预测和耐药性等难题。

展望未来,随着免疫学研究的深入,更多与肿瘤免疫相关的生物标志物被发现,为个性化治疗提供了基础。免疫治疗与其他疗法的联合应用将是未来研究的关键,而多学科、多手段的综合治疗将成为发展趋势。相信随着技术的不断进步和研究的深入,未来将有更多免疫治疗策略应用于 CCA 治疗,为患者带来更好的生存质量和更长的生存期。同时,我们也需认识到免疫治疗的复杂性,需进一步探索患者个体差异和肿瘤生物学特性,以实现更精准、个性化的治疗。

参考文献:

- [1] BANALES J M, MARIN J J G, LAMARCA A, et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17 (9): 557-588.
- [2] SATO K, GLASER S, ALVARO D, et al. Cholangiocarcinoma: novel therapeutic targets [J]. Expert Opin Ther Targets, 2020, 24(4): 345-357.
- [3] RAMÍREZ-MERINO N, AIX S P, CORTÉS-FUNES H. Chemotherapy for cholangiocarcinoma: an update [J]. World J Gastrointest Oncol, 2013, 5(7): 171-176.
- [4] BANALES J M, CARDINALE V, CARPINO G, et al. Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA) [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 13(5): 261-280.
- [5] FABRIS L, PERUGORRIA M J, MERTENS J, et al. The tumour microenvironment and immune milieu of cholangiocarcinoma [J]. Liver Int, 2019, 39 (Suppl 1): 63-78.
- [6] 刘浩然, 张金铎, 何玉龙, 等. 肿瘤相关成纤维细胞在胆管癌中作用的研究进展 [J]. 山东医药, 2023, 63(1): 88-91. LIU H R, ZHANG J D, HE Y L, et al. Research progress on the role of tumor-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma [J]. Shandong Med J, 2023, 63(1): 88-91.
- [6] 刘浩然, 张金铎, 何玉龙, 等. 肿瘤相关成纤维细胞在胆管癌中作用的研究进展 [J]. 山东医药, 2023, 9(1): 88-91. LIU H R, ZHANG J D, HE Y L, et al. Advances in the role of tumor-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma [J]. Shandong Med J, 2023, 9(1): 88-91.
- [7] SIRICA A E. The role of cancer-associated myofibroblasts in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 9(1): 44-54.

- [8] SATO K, MENG F, GIAN T, et al. Mechanisms of cholangiocyte responses to injury [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(4 Pt B): 1262-1269.
- [9] XIA T, LI K, NIU N, et al. Immune cell atlas of cholangiocarcinomas reveals distinct tumor microenvironments and associated prognoses [J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 37.
- [10] ZHOU M, YU H, BAI M, et al. IRG1 restrains M2 macrophage polarization and suppresses intrahepatic cholangiocarcinoma progression via the CCL18/STAT3 pathway [J]. Cancer Sci, 2024, 115(3): 777-790.
- [11] SHAUL M E, FRIDLENDER Z G. Tumour-associated neutrophils in patients with cancer [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2019, 16(10): 601-620.
- [12] KITANO Y, OKABE H, YAMASHITA Y I, et al. Tumour-infiltrating inflammatory and immune cells in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma [J]. Br J Cancer, 2018, 118 (2): 171-180.
- [13] MAO Z Y, ZHU G Q, XIONG M, et al. Prognostic value of neutrophil distribution in cholangiocarcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(16): 4961-4968.
- [14] BUETTNER S, SPOLVERATO G, KIMBROUGH C W, et al. The impact of neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio among patients with intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. Surgery, 2018, 164(3): 411-418.
- [15] KITANO Y, YAMASHITA Y I, YAMAMURA K, et al. Effects of preoperative neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios on survival in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma [J]. Anticancer Res, 2017, 37(6): 3229-3237.
- [16] ZHOU Z, WANG P, SUN R, et al. Tumor-associated neutrophils and macrophages interaction contributes to intrahepatic cholangiocarcinoma progression by activating STAT3 [J]. J Immunother Cancer, 2021, 9(3): e001946.
- [17] MORVAN M G, LANIER L L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks [J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16 (1): 7-19.
- [18] JUNG I H, KIM D H, YOO D K, et al. *In vivo* study of natural killer (NK) cell cytotoxicity against cholangiocarcinoma in a nude mouse model [J]. In Vivo, 2018, 32(4): 771-781.
- [19] ZHENG L, QIN S, SI W, et al. Pan-cancer single-cell landscape of tumor-infiltrating T cells [J]. Science, 2021, 374 (6574): abe6474.
- [20] GONZÁLEZ-CAO M, KARACHALIOU N, VITERI S, et al. Targeting PD-1/PD-L1 in lung cancer: current perspectives [J]. Lung Cancer, 2015, 6: 55-70.
- [21] KONISHI D, UMEDA Y, YOSHIDA K, et al. Regulatory T cells induce a suppressive immune milieu and promote lymph node metastasis in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. Br J Cancer, 2022, 127(4): 757-765.
- [22] TOGASHI Y, SHITARA K, NISHIKAWA H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression-implications for anticancer therapy [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2019, 16(6): 356-371.

- [23] WEVER O D, NGUYEN Q D, VAN HOORDE L, et al. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts *in vitro* provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac [J]. *FASEB J*, 2004, 18(9): 1016–1018.
- [24] ZHOU K Q, LIU W F, YANG L X, et al. Circulating osteopontin per tumor volume as a prognostic biomarker for resectable intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2019, 8(6): 582–596.
- [25] LAOHAIVIROJ M, CHAMGRAMOL Y, PAIROJKUL C, et al. Clinicopathological significance of osteopontin in cholangiocarcinoma cases [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(1): 201–205.
- [26] SATO K, MENG F, GLASER S, et al. Exosomes in liver pathology [J]. *J Hepatol*, 2016, 65(1): 213–221.
- [27] YÁÑEZ-MÓ M, SILJANDER P R M, ANDREU Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions [J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 27066.
- [28] SONG W, MIAO D L, CHEN L. Comprehensive analysis of long noncoding RNA-associated competing endogenous RNA network in cholangiocarcinoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 506(4): 1004–1012.
- [29] UTAIJARATRASMI P, VAETEEWOOTTACHARN K, TSUNEMATSU T, et al. The microRNA-15a-PAI-2 axis in cholangiocarcinoma-associated fibroblasts promotes migration of cancer cells [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 10.
- [30] MATHEWSON N D, ASHENBERG O, TIROSH I, et al. Inhibitory CD161 receptor identified in glioma-infiltrating T cells by single-cell analysis [J]. *Cell*, 2021, 184(5): 1281–1298, e26.
- [31] GRETEN T F, SCHWABE R, BARDEESY N, et al. Immunology and immunotherapy of cholangiocarcinoma [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20(6): 349–365.
- [32] MARABELLE A, CHAMPIAT S, GARRALDA E, et al. 807 A multicenter open-label phase I/Ib study of SO-C101 as monotherapy and in combination with pembrolizumab in patients with selected advanced/metastatic solid tumors [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(Suppl 3): A483.
- [33] JOB S, RAPOUD D, DOS SANTOS A, et al. Identification of four immune subtypes characterized by distinct composition and functions of tumor microenvironment in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Hepatology*, 2020, 72(3): 965–981.
- [34] XIE Q, WANG L, ZHENG S. Prognostic and clinicopathological significance of PD-L1 in patients with cholangiocarcinoma: a meta-analysis [J]. *Dis Markers*, 2020, 2020: 1817931.
- [35] ZHOU G, SPRENGERS D, MANCHAM S, et al. Reduction of immunosuppressive tumor microenvironment in cholangiocarcinoma by *ex vivo* targeting immune checkpoint molecules [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(4): 753–762.
- [36] FRIEDRICH M, SANKOWSKI R, BUNSE L, et al. Tryptophan metabolism drives dynamic immunosuppressive myeloid states in IDH-mutant gliomas [J]. *Nat Cancer*, 2021, 2(7): 723–740.
- [37] VATANKHAH F, SALIMI N, KHALAJI A, et al. Immune checkpoints and their promising prospect in cholangiocarcinoma treatment in combination with other therapeutic approaches [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 114: 109526.
- [38] GUO X J, LU J C, ZENG H Y, et al. CTLA-4 synergizes with PD1/PD-L1 in the inhibitory tumor microenvironment of intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 705378.
- [39] LIN J, YANG X, LONG J, et al. Pembrolizumab combined with lenvatinib as non-first-line therapy in patients with refractory biliary tract carcinoma [J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2020, 9(4): 414–424.
- [40] CAO Y, LU M, SUN Y, et al. Surufatinib plus toripalimab in patients with advanced solid tumors: a single-arm, open-label, phase I trial [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023, 149(2): 779–789.
- [41] ZHOU Y, XU L, WANG Z, et al. Sequentially targeting and intervening mutual Polo-like Kinase 1 on CAFs and tumor cells by dual targeting nano-platform for cholangiocarcinoma treatment [J]. *Theranostics*, 2022, 12(8): 3911–3927.
- [42] YARCHOAN M, COPE L, RUGGIERI A N, et al. Multicenter randomized phase II trial of atezolizumab with or without cobimetinib in biliary tract cancers [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(24): e152670.
- [43] RIMINI M, FORNARO L, LONARDI S, et al. Durvalumab plus gemcitabine and cisplatin in advanced biliary tract cancer: an early exploratory analysis of real-world data [J]. *Liver Int*, 2023, 43(8): 1803–1812.
- [44] GUO Y, FENG K, LIU Y, et al. Phase I study of chimeric antigen receptor-modified T cells in patients with EGFR-positive advanced biliary tract cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(6): 1277–1286.
- [45] GAO Y, ZHANG H, ZHOU N, et al. Methotrexate-loaded tumour-cell-derived microvesicles can relieve biliary obstruction in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4(7): 743–753.

[收稿日期]2024-01-14

乐林芝,马涛,代禹美,等.铁死亡在感染性疾病中的作用研究进展[J].中国比较医学杂志,2024,34(7):175-180.
Yue LZ, Ma T, Dai YM, et al. Research progress on the role of ferroptosis in infectious diseases [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 175-180.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.020

铁死亡在感染性疾病中的作用研究进展

乐林芝,马涛,代禹美,杜文雅,王国富,吴利先*

(大理大学基础医学院微生物与免疫教研室,云南大理 671000)

【摘要】 铁死亡是一种新发现的程序性细胞死亡方式,主要以细胞内铁依赖的脂质过氧化累积为主要特征。目前对铁死亡的研究主要集中在癌症领域,但越来越多的证据表明铁死亡与感染性疾病的发生有关,在新型冠状病毒肺炎、结核病及隐球菌性脑膜炎等疾病中均发现铁死亡参与。本文就铁死亡在感染性疾病中的作用作一综述,以期对铁死亡相关感染性疾病的防治提供新思路。

【关键词】 铁死亡;病毒;细菌;真菌

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0175-06

Research progress on the role of ferroptosis in infectious diseases

YUE Linzhi, MA Tao, DAI Yumei, DU Wenya, WANG Guofu, WU Lixian*

(Department of Microbiology and Immunology, School of Basic Medical Sciences, Dali University, Dali 671000, China)

【Abstract】 Ferroptosis is a newly discovered mode of programmed cell death characterized by the accumulation of intracellular iron-dependent lipid peroxidation. Current research has mainly focused on the role of ferroptosis in the field of cancer, but increasing evidence shows that ferroptosis is also related to the occurrence of infectious diseases. Ferroptosis has accordingly been detected in cases of COVID-19, tuberculosis, and cryptococcal meningitis, as well as other diseases. This article reviews the role of ferroptosis in infectious diseases, to provide new ideas for the prevention and treatment of ferroptosis-related infectious diseases.

【Keywords】 ferroptosis; virus; bacteria; fungi

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

感染性疾病是指由病原体侵害或寄生人体所引发的疾病。铁死亡是一种相对较新的调节性细胞死亡,虽然它是癌症、神经系统疾病的热门话题,但它在感染性疾病中的作用被低估^[1]。铁死亡是病理性感染的一种可能结局,被各种病原体以不同的方式操控,促进发病或传播^[2]。铁死亡的发现为感染性疾病的研究和治疗提供了新的思路。本文综述了病原体感染与宿主铁死亡过程相互作用的

研究进展,旨在为铁死亡相关感染性疾病的防治提供依据。

1 铁死亡的概述

2003 年,Dolma 等^[3]研究发现了一种新的化合物 erastin,它对表达 RAS 的癌细胞具有选择性致死作用,诱导的细胞死亡是非凋亡性的。随后,Yagoda 等^[4]发现铁螯合剂可以抑制这种细胞死亡模式,并

【基金项目】 云南省地方本科高校基础研究重点项目(202101BA070001-038,202101A0070196)。

【作者简介】 乐林芝(2000—),女,硕士研究生,研究方向:感染与免疫。E-mail:2963472503@qq.com

【通信作者】 吴利先(1972—),女,博士,教授,研究方向:感染与免疫。E-mail:w_lxian@163.com

发现了另一种可能导致这种细胞死亡模式的化合物 RSL3。2012 年, Dixon 等^[5]等正式提出了“铁死亡”这个专业术语, 定义为一种铁依赖的非凋亡性细胞死亡形式。铁死亡依赖于细胞内铁, 不依赖于其他物质, 在形态、生化和遗传上区别于细胞凋亡、坏死和自噬。

铁死亡是一种活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 依赖性细胞死亡形式, 其主要特征是铁积累和脂质过氧化^[6]。其潜在机制与氨基酸、铁和脂质代谢有关。形态学特征为细胞肿胀, 线粒体变小, 膜密度增高, 嵴减少或消失^[7]。3 个基本特征定义了铁死亡: 脂质过氧化物清除功能障碍、氧化还原活性铁的存在和含有多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 的磷脂的氧化^[6,8-9]。铁死亡的分子基础包括谷氨酸/胱氨酸反转运体、抗氧化系统-谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、铁代谢、不饱和脂肪酸代谢和铁死亡抑制蛋白 1 (FSP1)-泛醌系统等。当细胞内脂质 ROS 的产生速度超过细胞的解毒能力时, 就会发生铁死亡。当脂质 ROS 通过各种机制产生时, 宿主通过各种抗氧化系统维持体内稳态。GPX4 依赖性系统是第一个发现的抗铁死亡的抗氧化系统, 被认为是经典的、占主导地位的^[10]。GPX4 失活或表达下调会导致脂质 ROS 积累, 引发铁死亡^[11]。因此 GPX4 被认为是铁死亡的核心调控因子。

2 铁死亡在病毒感染性疾病中的作用

铁死亡的过程受一系列细胞代谢途径的调控, 包括抗氧化调节系统、铁稳态、脂质过载及其他相关信号通路。所有的途径都被证明在病毒感染中起着至关重要的作用。许多研究已经证明了病毒如何调节铁死亡来影响复制、传播和致病。关注病毒感染中铁死亡的发生方式, 可能会发现新的治疗靶点。此外, 揭示病毒感染利用铁死亡的发展机制将促进新的抗病毒药物的开发。

2.1 铁死亡在 SARS-CoV-2 感染中的作用

新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 由严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2) 引起, 其爆发和全球传播已对全球公共卫生构成威胁。一些研究报道了 COVID-19 患者的铁死亡特征, 这说明 SARS-CoV-2 感染涉及铁死亡^[12]。Liu 等^[13]认为, COVID-19 的关键致病分子步骤是攻击血红蛋白, 导致卟啉从铁中解离, 并将铁释放到循环中。释放到循环中

的游离铁可能导致铁过载, 导致肺和其他器官的氧化损伤。因此, 我们可以考虑将铁螯合作为治疗 COVID-19 的有益辅助疗法。铁螯合剂可能发挥作用, 不仅可以隔离铁和减轻炎症, 还可以阻止冠状病毒与受体结合, 从而进入宿主细胞^[14]。

在另一项研究中, 感染 SARS-CoV-2 的仓鼠肺组织表现出细胞凋亡和铁死亡增加, 表明 SARS-CoV-2 可能对铁死亡有直接影响^[15]。最近, Han 等^[12]发现 SARS-CoV-2 感染了人类胚胎干细胞衍生的 SAN 样起搏细胞, 并强调了铁死亡是 COVID-19 患者心律失常的潜在机制, 去铁胺 (一种铁螯合剂) 可能是阻断 SARS-CoV-2 感染的候选药物。

Liu 等^[16]研究发现 SARS-CoV-2 编码的辅助蛋白 ORF3a 参与了铁死亡的诱导。SARS-CoV-2 ORF3a 是铁死亡的正调节因子, 它通过 Keap1-NRF2 轴使细胞对铁死亡敏感。SARS-CoV-2 ORF3a 通过募集 Keap1 促进 NRF2 的降解, 从而减弱细胞对氧化应激的抵抗力, 并促进细胞铁死亡。该研究为特异性靶向 ORF3a 抗氧化途径受损的抗病毒药物的开发提供了新的证据, 从而提高 SARS-CoV-2 感染的治疗效果, 减轻不良反应。总之, 靶向铁死亡可以成为治疗 SARS-CoV-2 感染的重要疗法, 为临床管理 COVID-19 提供了新的可能性。

2.2 铁死亡在其他病毒感染性疾病中的作用

除了 SARS-CoV-2 外, 铁死亡在其他病毒感染性疾病中的作用引发了研究者的关注。据报道, 越来越多的病毒引起铁死亡。甲型肝炎病毒 3C 根据其蛋白酶活性诱导人细胞中的铁死亡^[17]。此外, 许多人肠道病毒和冠状病毒通过酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4) 诱导铁死亡^[18], 小鼠冠状病毒可通过 ACSL1 引发铁死亡^[19]。

EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 每年导致 20 万例癌症。最近, Burton 等^[20]研究发现硒代半胱氨酸生物合成激酶 PSTK 是包括伯基特细胞在内的诱导铁死亡的细胞靶点, 可能是因为它在 GPX4 生物合成中发挥作用。这些结果突出了铁死亡能够作为预防或治疗特定 EBV 驱动的 B 细胞恶性肿瘤的治疗靶点。新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 可在肿瘤细胞中选择性复制。Kan 等^[21]发现 NDV 诱导的铁死亡通过 p53-SLC7A11-GPX4 途径起作用, 通过释放亚铁和增强芬顿反应促进铁死亡。总的来说, 这些观察结果表明, NDV 可以通过

铁死亡杀死肿瘤细胞,为耐药性癌症的新疗法提供新的见解。此外,Xu 等^[22]发现单纯疱疹病毒 1 型(Herpes simplex virus type 1, HSV-1)诱导铁死亡会导致病毒性脑炎。通过铁死亡抑制剂或蛋白酶体抑制剂来抑制铁死亡,可以有效地减轻感染小鼠中 HSV-1 引起的神经损伤和炎症。HSV-1 诱导的铁死亡在病毒发病机制中起着重要作用,抑制铁死亡是一种有前途的免疫策略,以治疗 HSV-1 感染和脑炎。

3 铁死亡在细菌感染性疾病中的作用

细菌感染是对公共卫生的主要全球威胁,并且由于病原菌的快速进化而持续恶化,病原菌可以产生抗生素抗性,形成基质保护性生物膜,并在细胞内条件下存活。目前,抗生素疗法是最常规的临床治疗策略,但生物膜的形成大大削弱了细菌杀菌效果。因此迫切需要找到有效的抗菌靶标,铁死亡相关的细菌感染性疾病疗法显示出极大的潜力。

3.1 铁死亡在结核分枝杆菌感染中的作用

铁死亡是由脂质过氧化反应引起的调节性细胞死亡,是结核分枝杆菌感染后传播的机制之一。结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)是导致结核病的主要病原体之一。结核病(tuberculosis, TB)是一种影响肺和全身多处组织的传染病,是一种长期严重危害人类健康的慢性传染病。

谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)是一种在预防铁死亡中起关键作用的酶。结核分枝杆菌感染的 GPX4 缺陷型巨噬细胞的死亡增加伴随着脂质过氧化的升高,并受到铁死亡抑制剂 Fer-1 的抑制^[23]。这些发现表明了 GPX4 在结核分枝杆菌诱导的细胞死亡调节中的主要作用,因此 GPX4/GSH 轴可能是结核病患者导向治疗的靶点。Amaral 等^[24]研究也发现,结核分枝杆菌诱导的宿主细胞铁死亡的特征是 GSH 耗竭和 GPX4 抑制。结核分枝杆菌会引发巨噬细胞中的铁死亡,伴随 GPX4 表达降低、铁含量增加和膜脂质过氧化水平升高。该研究中另外的体内实验表明,在急性结核分枝杆菌感染的小鼠中也得到了类似的结果。鉴于这些发现,靶向铁死亡可能是结核病治疗的一个很好选择。

此外,Qiang 等^[25]发现一种由结核分枝杆菌所分泌的效应物蛋白酪氨酸磷酸酶 A(protein tyrosine phosphatase A, PtpA),通过触发铁死亡,从而促进结

核分枝杆菌的致病性和传播。该研究揭示了 PtpA 进入宿主细胞核诱导宿主铁死亡的详细分子机制。具体而言,PtpA 通过一个保守的 Cys 位点进入宿主细胞核,该位点负责与 RanGDP 相互作用。然后,核 PtpA 直接与 PRMT6 相互作用,增加 H3R2 的不对称二甲基化,从而抑制 GPX4 的表达,最终引起铁死亡诱导的 Mtb 致病性和传播性。总的来说,此研究为病原体诱导的铁死亡的分子机制提供了新见解,表明通过阻断 Mtb PtpA-宿主 PRMT6 界面来靶向 GPX4 依赖性铁死亡的潜在结核病治疗方法。另一项研究表明,血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)是结核分枝杆菌诱导铁死亡的重要调节因子,其调节 ROS 产生并改变结核分枝杆菌感染的巨噬细胞死亡^[26],这表明 HO-1 是 TB 治疗中的潜在靶点。

3.2 铁死亡在铜绿假单胞菌感染中的作用

需氧革兰氏阴性杆菌铜绿假单胞菌既能感染免疫功能正常宿主,又能感染免疫功能低下的宿主。铁死亡是通过 15-脂氧合酶选择性氧化花生四烯酸-磷脂酰乙醇胺(arachidonic acid-phosphatidylethanolamines, AA-PE)而执行的死亡程序。铜绿假单胞菌表达脂氧合酶(lipoxygenase, pLoxA),在宿主细胞中将 AA-PE 氧化为 15-氢过氧化物-AA-PE(15-HOO-AA-PE);并在人的支气管上皮细胞以及持续下呼吸道感染患者的临床分离细胞中驱动铁死亡^[27]。由于铜绿假单胞菌不单独产生 AA-PE,这种铁死亡被称为偷窃性铁死亡。另一项研究表明,铜绿假单胞菌还利用 pLoxA 产生 15-HOO-AA-PE,并通过铁死亡增强辐射损伤的肠上皮细胞的死亡^[28]。pLoxA 驱动的铁死亡机制,对铜绿假单胞菌相关的疾病如囊性纤维化和持续性下呼吸道感染,可能是一个潜在的治疗靶点。因此,控制铁死亡可能是控制铜绿假单胞菌感染的可行策略。

3.3 铁死亡在其他细菌感染性疾病中的作用

除了 Mtb 和铜绿假单胞菌外,铁死亡在其他细菌感染性疾病方面的研究越来越多。Dai 等^[29]研究发现 IFP35 通过促进 Nrf2 的泛素化和降解来促进铁死亡,从而加重金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)感染。靶向 IFP35 可能是治疗 SA 引起的感染性疾病的一种有前景的方法。幽门螺杆菌是胃腺癌(stomach adenocarcinoma, STAD)的主要危险因素。Yan 等^[30]确定了一个幽门螺杆菌感染中

与铁死亡相关的基因 SOCS1。细胞因子信号抑制物 1 (suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1) 有可能成为揭示胃癌发病机制的潜在生物标志物。靶向 SOCS1 可能是一种很有希望的抗 STAD 策略。此外,鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, AB)是一种高度机会性和医院获得性的病原体,具有高度的抗生素耐药性,对人类健康构成重大威胁,需要及时发现和治疗。在 AB 感染模型中,使用一种新的高通量宿主-微生物双重单细胞 RNA 测序技术 scRandom-seq 观察到 THP-1 源性巨噬细胞的极化和宿主细胞内 AB 诱导的铁死亡,提示铁死亡可能成为抗 AB 感染的新的临床靶点。铁抑素-1 (ferrostatin-1, Fer-1) 对铁死亡的抑制作用可提高细胞活力和抗 AB 感染的能力,表明其具有抗相关感染的潜力^[31]。

细菌性角膜炎(bacterial keratitis, BK)是一种流行的感染性角膜疾病,是导致角膜失明的主要原因。引起细菌性角膜炎的细菌种类很多,主要是表皮葡萄球菌、肺炎链球菌等^[32]。Chen 等^[33]以 BK 小鼠为研究对象,证实了 BK 小鼠发生了铁死亡,铁死亡抑制剂 Fer-1 联合左氧氟沙星对 BK 小鼠有积极的治疗作用,包括改善临床表现,减少角膜瘢痕形成、炎症因子和铁死亡。BK 中的铁死亡是由 GPX4/SLC7A11 轴的下调引发的,并且 Fer-1 作用于该轴以减轻 BK 中的炎症和减少角膜瘢痕形成。铁死亡在 BK 的发病机制中起着至关重要的作用。铁死亡为有效治疗 BK 患者的炎症和角膜瘢痕形成提供了一种新的治疗靶点。细胞内细菌存活是引起慢性或复发性感染的主要因素,导致宿主防御和抗生素治疗失败。然而,由于受到抗生素和宿主免疫攻击的保护,细胞内细菌的清除是具有挑战性的。Ma 等^[34]研究发现铁死亡压力有利于巨噬细胞对抗细胞内细菌,因为压力可以通过铁转运蛋白运输从细胞质转移到细胞内含有细菌的液泡。这种机制确保有效抑制细胞内细菌的生长,但对巨噬细胞无害。调节巨噬细胞中的铁死亡活性可能是在感染早期对抗细胞内细菌的有效策略。因此,靶向铁死亡可能是细胞内病原体感染的治疗靶点。

4 铁死亡在真菌感染性疾病中的作用

很少有已发表的研究揭示铁死亡和真菌感染之间的联系,对这一未知领域的进一步探索还需要做更多的工作。Hou 等^[35]研究发现棒曲霉素

(patulin, PAT)通过自噬-铁死亡途径诱导小鼠急性肾损伤。PAT 是由至少 60 种不同真菌分泌的一种次级代谢产物,例如青霉菌和曲霉菌。PAT 以自噬依赖的方式诱导人肾小管上皮细胞(human renal tubular epithelial cell, HKC)的铁死亡,经铁螯合剂去铁胺(desferrioxamine, DFO)和 Fer-1 两种特异性铁死亡抑制剂预处理后, HKC 细胞的铁死亡水平明显降低。因此本研究为探索 PAT 导致的急性肾损伤的机制提供了新的视角。此外, Li 等^[36]研究发现布拉氏酵母菌通过抑制铁死亡减轻体外循环术(cardiopulmonary bypass, CPB)后诱导的急性肺损伤。急性肺损伤是 CPB 后最常见、最致命的并发症之一。布拉氏酵母菌 CNCM I-745 通过抑制 CPB 后肺组织的铁死亡和上调肠道经典树突状细胞的比例和成熟度,减轻 CPB 所致的肺损伤。该研究表明,布拉氏酵母菌 CNCM I-745 治疗可能是一种有前途的干预策略,可以改善 CPB 后的急性肺损伤。

Teng 等^[37]应用生物信息学方法鉴定镰刀菌性角膜炎中铁死亡的中心基因和途径,发现 *HMOX1*、*CYBB*、*ALOX5* 和 *GPX2* 可能是镰刀菌性角膜炎发病机制中与铁死亡相关的关键基因。该研究解释了铁死亡在镰刀菌角膜炎中的潜在作用,并为该病治疗提供了新的方向。一项回顾性研究提示铁超负荷是肝移植后真菌感染的独立危险因素,移植前控制铁含量可降低真菌感染的风险^[38]。隐球菌性脑膜炎(cryptococcal meningitis, CM)是临床上最常见的真菌感染之一,尤其见于免疫缺陷的艾滋病患者。在 CM 患者的脑中发生铁积累和脂质过氧化,并且脑脊液中的铁蛋白水平显著升高^[39]。迄今为止,没有研究直接指出隐球菌感染中铁积累和脂质过氧化的作用。然而,考虑到过量的铁可以诱导脂质过氧化,可以假设铁积累、ROS 积累、铁死亡和隐球菌感染之间可能存在潜在的联系,这需要进一步探索。Ji 等^[40]研究发现,辐射诱导的铁死亡可能有助于肠道损伤。肠道真菌是导致铁死亡的重要因素,其机制可能与 *ACSL4* 表达增加有关。提示 *ACSL4* 可能是治疗放射性肠炎的一个潜在靶点,进一步研究发现特异性 *ACSL4* 抑制剂可能有助于放射性肠炎的治疗。

5 总结与展望

感染性疾病是人类健康面临的重大挑战。虽然目前的治疗方法有很多,但它们往往无法达到预

期的治疗效果。与其他致病性感染中的调节性细胞死亡相比,对铁死亡-病原体相互作用的研究仍然不够深入。此外,病原体调节的铁死亡中涉及机制的一些领域仍然未被充分探索;特定病原体感染需要深入研究,以提供更多的细节,用于在抗病原体药物或疫苗中创建新的治疗策略。我们需要思考如何调节铁死亡的程度,既帮助宿主消灭病原体,又可以最大限度地减少铁死亡引起的对宿主的生理损害。目前,对铁死亡与感染性疾病的研究还处于起步阶段。探讨铁死亡与感染性疾病的相互作用,提出有效的治疗方法,具有重要的价值,这也是今后感染性疾病治疗研究的方向。

参考文献:

- [1] LEI G, ZHUANG L, GAN B. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(7): 381-396.
- [2] XIAO L, HUANG H, FAN S, et al. Ferroptosis: a mixed blessing for infectious diseases [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 992734.
- [3] DOLMA S, LESSNICK S L, HAHN W C, et al. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells [J]. *Cancer Cell*, 2003, 3(3): 285-296.
- [4] YAGODA N, VON RECHENBERG M, ZAGANJOR E, et al. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels [J]. *Nature*, 2007, 447(7146): 864-868.
- [5] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [6] TANG D, CHEN X, KANG R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications [J]. *Cell Res*, 2021, 31(2): 107-125.
- [7] VANDEN BERGHE T, LINKERMANN A, JOUAN-LANHOUE T S, et al. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(2): 135-147.
- [8] MARTIN-SANCHEZ D, RUIZ-ANDRES O, POVEDA J, et al. Ferroptosis, but not necroptosis, is important in nephrotoxic folic acid-induced AKI [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(1): 218-229.
- [9] MAYR L, GRABHERR F, SCHWÄRZLER J, et al. Dietary lipids fuel GPX4-restricted enteritis resembling Crohn's disease [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1775.
- [10] YANG W S, SRIRAMARATNAM R, WELSCH M E, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4 [J]. *Cell*, 2014, 156(1/2): 317-331.
- [11] FRIEDMANN ANGELI J P, SCHNEIDER M, PRONETH B, et

- al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(12): 1180-1191.
- [12] HAN Y, ZHU J, YANG L, et al. SARS-CoV-2 infection induces ferroptosis of sinoatrial node pacemaker cells [J]. *Circ Res*, 2022, 130(7): 963-977.
- [13] LIU W, LI H. COVID-19: attacks the 1-beta chain of hemoglobin and captures the porphyrin to inhibit human heme metabolism [J]. *ChemRxiv*, 2020, 12: 105.
- [14] CHANG R, NG T B, SUN W Z. Lactoferrin as potential preventative and adjunct treatment for COVID-19 [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2020, 56(3): 106118.
- [15] BEDNASH J S, KAGAN V E, ENGLERT J A, et al. Syrian hamsters as a model of lung injury with SARS-CoV-2 infection: Pathologic, physiologic, and detailed molecular profiling [J]. *Transl Res*, 2022, 240: 1-16.
- [16] LIU L, DU J, YANG S, et al. SARS-CoV-2 ORF3a sensitizes cells to ferroptosis via Keap1-NRF2 axis [J]. *Redox Biol*, 2023, 63: 102752.
- [17] KOMISSAROV A A, KARASEVA M A, ROSCHINA M P, et al. Individual expression of hepatitis A virus 3C protease induces ferroptosis in human cells *in vitro* [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 7906.
- [18] KUNG Y A, CHIANG H J, LI M L, et al. Acyl-coenzyme A synthetase long-chain family member 4 is involved in viral replication organelle formation and facilitates virus replication via ferroptosis [J]. *mBio*, 2022, 13(1): e0271721.
- [19] XIA H, ZHANG Z, YOU F. Inhibiting ACSL1-related ferroptosis restrains murine coronavirus infection [J]. *Viruses*, 2021, 13(12): 2383.
- [20] BURTON E M, VOYER J, GEWURZ B E. Epstein-Barr virus latency programs dynamically sensitize B cells to ferroptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(11): e2118300119.
- [21] KAN X, YIN Y, SONG C, et al. Newcastle-disease-virus-induced ferroptosis through nutrient deprivation and ferritinophagy in tumor cells [J]. *iScience*, 2021, 24(8): 102837.
- [22] XU X Q, XU T, JI W, et al. Herpes simplex virus 1-induced ferroptosis contributes to viral encephalitis [J]. *mBio*, 2023, 14(1): e0237022.
- [23] AMARAL E P, FOREMAN T W, NAMASIVAYAM S, et al. GPX4 regulates cellular necrosis and host resistance in *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *J Exp Med*, 2022, 219(11): e20220504.
- [24] AMARAL E P, COSTA D L, NAMASIVAYAM S, et al. A major role for ferroptosis in *Mycobacterium tuberculosis*-induced cell death and tissue necrosis [J]. *J Exp Med*, 2019, 216(3): 556-570.
- [25] QIANG L, ZHANG Y, LEI Z, et al. A mycobacterial effector promotes ferroptosis-dependent pathogenicity and dissemination [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 1430.
- [26] MA C, WU X, ZHANG X, et al. Heme oxygenase-1 modulates ferroptosis by fine-tuning levels of intracellular iron and reactive

oxygen species of macrophages in response to *Bacillus Calmette-Guerin* infection [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 1004148.

[27] DAR H H, TYURINA Y Y, MIKULSKA-RUMINSKA K, et al. *Pseudomonas aeruginosa* utilizes host polyunsaturated phosphatidylethanolamines to trigger theft-ferroptosis in bronchial epithelium [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(10): 4639–4653.

[28] DAR H H, EPPERLY M W, TYURIN V A, et al. *P. aeruginosa* augments irradiation injury via 15-lipoxygenase-catalyzed generation of 15-HpETE-PE and induction of theft-ferroptosis [J]. *JCI Insight*, 2022, 7(4): e156013.

[29] DAI M, OUYANG W, YU Y, et al. IFP35 aggravates *Staphylococcus aureus* infection by promoting Nrf2-regulated ferroptosis [J]. *J Adv Res*, 2023, 23: S2090–S1232.

[30] YAN P, CHENG M, WANG L, et al. A ferroptosis-related gene in *Helicobacter pylori* infection, SOCS1, serves as a potential prognostic biomarker and corresponds with tumor immune infiltration in stomach adenocarcinoma; in silico approach [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 119: 110263.

[31] MENG H, ZHANG T, WANG Z, et al. High-throughput host-microbe single-cell RNA sequencing reveals ferroptosis-associated heterogeneity during *Acinetobacter baumannii* infection [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2024, 63(18): e202400538.

[32] OMATSU Y, SHIMIZU Y, HARUKI T, et al. Effect of atopic conditions on development and recurrences of infectious keratitis [J]. *Allergol Int*, 2024, 24: S1323–S8930.

[33] CHEN Q, WANG L, WEI Y, et al. Ferroptosis as a potential therapeutic target for reducing inflammation and corneal scarring in bacterial keratitis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2024, 65(2): 29.

[34] MA R, FANG L, CHEN L, et al. Ferroptotic stress promotes macrophages against intracellular bacteria [J]. *Theranostics*, 2022, 12(5): 2266–2289.

[35] HOU Y, WANG S, JIANG L, et al. Patulin induces acute kidney injury in mice through autophagy-ferroptosis pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(20): 6213–6223.

[36] LI J, GAO P F, XU Y X, et al. Probiotic *Saccharomyces boulardii* attenuates cardiopulmonary bypass-induced acute lung injury by inhibiting ferroptosis [J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(7): 5003–5013.

[37] TENG X, XIONG X, SHA X, et al. Identification of hub genes and pathways of ferroptosis in *Fusarium* keratitis by bioinformatics methods [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1103471.

[38] ALEXANDER J, LIMAYE A P, KO C W, et al. Association of hepatic iron overload with invasive fungal infection in liver transplant recipients [J]. *Liver Transpl*, 2006, 12(12): 1799–1804.

[39] XU X, LIN D, TU S, et al. Is ferroptosis a future direction in exploring cryptococcal meningitis? [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 598601.

[40] JI Q, FU S, ZUO H, et al. ACSL4 is essential for radiation-induced intestinal injury by initiating ferroptosis [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 332.

[收稿日期] 2024-01-19