

马超楠,王梦瑶,张飒,等. KHSRP 在肺腺癌中的调控作用:JAK1/STAT3 通路的关键角色 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(1): 1-12.

Ma CN, Wang MY, Zhang S, et al. Regulatory role of KH-type splicing regulatory protein in lung adenocarcinoma: key role of JAK1/STAT3 pathway [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 1-12.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.001

# KHSRP 在肺腺癌中的调控作用:JAK1/STAT3 通路的关键角色

马超楠<sup>1\*</sup>,王梦瑶<sup>2\*</sup>,张飒<sup>2</sup>,李丽<sup>2,3#</sup>,韦海涛<sup>3#</sup>

(1.河南大学淮河医院呼吸与危重症医学科,河南 开封 475099;2.河南大学护理与健康学院,河南 开封 475004;  
4.河南大学淮河医院胸外科,河南 开封 475099)

**【摘要】** 目的 探究 KHSRP 靶向调控 JAK1/STAT3 信号轴对肺腺癌(LUAD)恶性生物学行为的影响。方法 收集 2017 年 1 月至 2018 年 12 月间在淮河医院确诊的 64 例 LUAD 组织及癌旁组织标本及临床病例资料。免疫组化法对比肺腺癌组织和癌旁组织中 KHSRP 的表达情况。qRT-PCR 法检测肺腺癌细胞系(SPC-A1、H1975、CL1-5、PC-9、Calu-3、H446)与正常人支气管上皮细胞系(NHBE)中 KHSRP 的表达差异。慢病毒转染改变肺腺癌细胞系 SPC-A1、H1975、PC-9、Calu-3 中的 KHSRP 表达情况;采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)、Transwell 实验测定 KHSRP 对肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。异种移植肿瘤模型检测敲降和过表达 KHSRP 在活体动物体内的作用。Western blot 实验验证 KHSRP 靶向 JAK/STAT 信号通路。Rescue 实验验证 KHSRP 是否通过调节 JAK1/STAT3 信号通路促进 LUAD 细胞的恶性进程。结果 与癌旁组织相比,KHSRP 在 LUAD 组织中的表达显著增高( $P<0.05$ )。细胞功能实验分析显示,KHSRP 过表达在体外显著促进 LUAD 细胞增殖、迁移和侵袭( $P<0.05$ )。体内动物实验结果显示,KHSRP 在裸鼠体内具有促进 LUAD 细胞移植瘤生长与肺结节转移的作用( $P<0.01$ )。在敲降 KHSRP 后,JAK/STAT 信号通路中 JAK1、p-JAK1、STAT3 水平明显降低,过表达 KHSRP 后情况则反之( $P<0.05$ )。Rescue 实验显示,KHSRP 可以逆转敲降 JAK1/STAT3 对细胞增殖、迁移和侵袭能力的抑制作用( $P<0.05$ )。结论 KHSRP 靶向 JAK1/STAT3 信号通路在肺腺癌中发挥致癌基因的作用。

**【关键词】** 肺腺癌;KHSRP;JAK1/STAT3;恶性进展;细胞增殖;侵袭迁移

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0001-12

## Regulatory role of KH-type splicing regulatory protein in lung adenocarcinoma: key role of JAK1/STAT3 pathway

MA Chaonan<sup>1\*</sup>, WANG Mengyao<sup>2\*</sup>, ZHANG Sa<sup>2</sup>, LI Li<sup>2,3#</sup>, WEI Haitao<sup>3#</sup>

**【基金项目】**河南省教育厅资助项目(24A320002,25B320018,25B320014,25B320022);河南省科技厅科技攻关项目(252102311055,252102311053);河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20240411)。

**【作者简介】**马超楠(1982—),女,硕士,副主任医师,研究方向:胸部肿瘤的基础研究与诊疗。E-mail:544122188@qq.com

王梦瑶(2001—),女,在读硕士研究生,研究方向:肿瘤护理。E-mail:wmy18637876113@163.com \*共同第一作者

**【通信作者】**李丽(1976—),女,博士,教授,硕士生导师,研究方向:肿瘤基础研究与诊疗。E-mail:10210051@vip.henu.edu.cn

韦海涛(1976—),男,博士,主任医师,硕士生导师,研究方向:胸部肿瘤的基础研究与诊疗。

E-mail:taoge9885@163.com #共同通信作者

- (1. Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Huaihe Hospital, Henan University, Kaifeng 475099, China.
2. Institute of Nursing and Health, Henan University, Kaifeng 475004.
3. Department of Thoracic Surgery, Huaihe Hospital, Henan University, Kaifeng 475099)

**[Abstract] Objective** To investigate the effect of KH-type splicing regulatory protein (KHSRP) on the malignant biological behavior of lung adenocarcinoma (LUAD) by targeting the Janus kinase 1 (JAK1)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling axis. **Methods** Clinical data were collected for 64 patients with LUAD, diagnosed at Huaihe Hospital from January 2017 to December 2018. Expression levels of KHSRP were detected in LUAD tissues and adjacent tissues by immunohistochemical staining. KHSRP gene expression was also detected in LUAD cell lines (SPC-A1, H1975, CL1-5, PC-9, Calu-3, H446) and normal human bronchial epithelial cells using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. KHSRP expression in SPC-A1, H1975, PC-9, and Calu-3 cells was manipulated by lentivirus transfection. The effects of KHSRP on the proliferation, migration, and invasion of LUAD cells were detected by Cell Counting Kit-8 and Transwell assays. The effects of KHSRP overexpression and knockdown were also investigated in a mouse xenograft tumor model, and JAK/STAT signaling pathway proteins were detected by Western blot. Rescue experiments were conducted to verify if KHSRP promoted the malignant progression of LUAD cells by regulating the JAK1/STAT3 signaling pathway. **Results** KHSRP expression was significantly higher in LUAD tissues compared with adjacent tissues ( $P < 0.05$ ). Overexpression of KHSRP significantly promoted the proliferation, migration, and invasion of LUAD cells *in vitro* ( $P < 0.05$ ). KHSRP also promoted LUAD cell xenograft tumor growth and lung nodule metastasis in nude mice *in vivo* ( $P < 0.01$ ). KHSRP knockdown significantly decreased the levels of JAK1, phospho-JAK1, and STAT3 in the JAK/STAT signaling pathway, while the situation was reversed following KHSRP overexpression ( $P < 0.05$ ). Rescue experiments showed that KHSRP reversed the inhibitory effect of knockdown ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** KHSRP targets the JAK1/STAT3 signaling pathway and acts as an oncogene in LUAD.

**[Keywords]** lung adenocarcinoma; KHSRP; JAK1/STAT3; malignant progression; cell proliferation; invasion and migration

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

肺癌是一种生长迅速、死亡率高、预后差的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。肺腺癌 (lung adenocarcinoma, LUAD) 是非小细胞肺癌中最常见的组织学类型, 占有肺癌病例的 44.0%~55.7%<sup>[2]</sup>。尽管对肺癌的研究取得了很大进展, 但 LUAD 的发病率仍在逐年上升, 患者 5 年生存率低于 15%<sup>[3]</sup>。因此, 探索促进 LUAD 启动和进展的新生标志物, 评估潜在的分子机制, 对于开发 LUAD 恶性肿瘤的靶向治疗至关重要。KH 型剪切调节蛋白 (KH-type splicing regulatory protein, KHSRP) 是一种多功能核酸结合蛋白, 在癌症侵袭中起着重要作用, 其表达水平及蛋白结构的改变与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[4]</sup>。研究表明, KHSRP 参与各种生物过程中的信号转导<sup>[5]</sup>。Janus 激酶信号传感器和转录激活剂 (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT) 通路是一种

跨膜信号转导的进化保守机制, 使细胞能够与外部环境通信<sup>[6-7]</sup>。各种细胞因子、干扰素、生长因子和其他特定分子激活 JAK/STAT 信号, 以驱动一系列生理和病理过程, 包括增殖、新陈代谢、免疫反应、炎症和恶性肿瘤<sup>[8-9]</sup>。多数研究表明, JAK/STAT 信号转导的异常激活导致肿瘤发生和进展<sup>[10]</sup>。然而, KHSRP-JAK/STAT 信号轴与 LUAD 中的具体功能尚未得到充分阐明。

因此, 本研究基于数据库检索和以往研究经验, 将研究目标锁定在 KHSRP 和 JAK/STAT 信号通路, 并通过预实验初步验证 KHSRP 和 JAK/STAT 信号通路在 LUAD 细胞中的表达水平, 进一步探讨 KHSRP 对 LUAD 进展的影响, 以及 KHSRP 是否通过调节 JAK/STAT 信号转导促进或抑制 LUAD 发展, 从而为 LUAD 分子靶向精准治疗提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

56 只 SPF 级 BALB/c nude 雄性裸鼠, 4~6 周龄, 体重 16~22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0011], 饲养于河南大学(抗体药物开发技术国家地方联合工程实验室)[SYXK(豫)2024-0010]。饲养条件为温度 22~26 °C、日温差≤4 °C、相对湿度为 40%~60%、昼夜明暗交替时间 12 h/12 h、不锈钢分体笼具、全天候不间断通风供电的饲养环境。所用垫料、笼罩、饲料及饮水均经灭菌处理。所有相关动物实验均获河南大学生物医学科研伦理委员会批准(HUSOM2020-250), 并遵循实验动物使用的 3R 原则进行人道化处理。

#### 1.1.2 细胞

研究选用正常人类支气管上皮细胞株 NHBE(宁波明舟生物科技有限公司)和肺腺癌细胞株 SPC-A1、H1975、CL1-5、PC-9、Calu-3、H446(武汉普诺赛公司)。

#### 1.1.3 临床组织

本研究选取了 2017 年 1 月至 2018 年 12 月的在河南大学淮河医院确诊的 64 例 LUAD 组织及其癌旁组织标本。患者纳入标准:(1)影像和病理确诊的 LUAD;(2)进行根治性切除术治疗, 并有完整的临床病理记录。排除标准:(1)曾经接受手术、放化疗或辅助治疗的患者;(2)存在基础疾病及其他恶性肿瘤病史;(3)临床病理资料记录不全。本实验经河南大学生物医学科研伦理委员会批准(HUSOM2020-250)。

### 1.2 主要试剂与仪器

TRIzol 试剂(15596026CN)、CCK-8 试剂盒(96992)、10% 聚偏二氟乙烯膜(GF88170105)、10% 胎牛血清(12103C)购自美国 Sigma Aldrich 公司;HiScript® II 逆转录酶试剂盒(R211-01)、通用型高特异性染料法定量 PCR 检测试剂盒(T2210)、RIPA 缓冲液(R0010)购自北京索莱宝公司;BCA 蛋白质定量试剂盒(E112-01/02)购自南京诺唯赞公司;Transwell 小室(3428)购自美国 Corning Incorporated 公司;慢病毒试剂(G05001)购自上海吉玛公司;山羊抗兔一抗、二抗(1:

5000)(A-11008)购自中国 YEASEN 公司。

流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司;荧光显微镜购自日本 Olympus 公司;Nano Drop 2000c 分光光度计购自美国赛默飞公司;酶标仪购自北京普天新桥有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细胞培养及转染

正常人支气管上皮细胞系(NHBE)和肺腺癌细胞系(SPC-A1、H1975、CL1-5、PC-9、Calu-3、H446)在含 100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素和 10% 胎牛血清的培养基中培养, 并置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的湿化培养箱中。根据 KHSRP 序列设计 RNA, 构建到载体上进行敲降或过表达处理(SPC-A1、H1975 细胞过表达, PC-9、Calu-3 细胞敲降)。细胞接种到 6 孔板中, 达到一定密度后转染, 使用含有 polybrene 的慢病毒, 并在特定时间后更换培养基和筛选细胞。Calu-3 细胞分为 sh-NC 组(为无相关性的核苷酸序列插入慢病毒质粒)、sh-KHSRP 组(转染敲降 KHSRP 慢病毒)、sh-KHSRP+JAK1/STAT3 组(在敲降 KHSRP 时转染过表达 JAK1/STAT3 慢病毒)、sh-JAK1/STAT3+KHSRP 组(在敲降 JAK1/STAT3 时转染过表达 KHSRP 慢病毒), PC-9 细胞同 Calu-3 分组。SPC-A1 细胞分为 Vector 组(为无相关性的核苷酸序列插入慢病毒质粒)、KHSRP 组(转染过表达 KHSRP 慢病毒), H1975 细胞同 SPC-A1 分组。

#### 1.3.2 实时荧光定量逆转录 PCR (reverse transcription real time PCR, qRT-PCR) 检测

引物序列如表 1, 使用 TRIzol 试剂从肺腺癌细胞和组织中提取总 RNA, 使用 M-MLV RTase 试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA。然后通过 qRT-

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

名称 Name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
KHSRP mRNA	R: AATGACTACGGATCTCGGATTGG
	F: CCGTCATCTTGCTTGAACCTGTA
JAK1 mRNA	R: ACGCTCTGGAAATCTGCTA
	F: ATGATGGCTCGGAAGAAAGG
STAT3 mRNA	R: CTGGCCTTTGCTGTGTGAAAT
	F: AAGGCACCCACAGAAACAAC
GAPDH	R: GAAGTGAAGCTCGGAGTC
	F: GAAGATGGTGATGGGATTTTC

PCR 试剂盒对 KHSRP mRNA 的表达水平进行定量分析,设置反应条件为:95 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s 和 60 ℃ 25 s,共 40 个循环。以 GAPDH 作为内参基因,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法进行数据处理和分析。

### 1.3.3 临床组织样本的免疫组化染色 (immunohistochemistry, IHC)

将正常肺组织和 LUAD 组织石蜡标本进行烤片、二甲苯脱蜡和酒精水化处理后进行微波炉抗原修复,并用 3% 过氧化氢溶液孵育以阻断内源性过氧化物酶。KHSRP 抗体稀释后在 4 ℃ 孵育过夜。次日, PBS 清洗后加入二抗室温孵育 30 min, DAB 显色, 苏木素复染细胞核, 氨水返蓝, 最后封片。在光学显微镜下按染色强度(无染色 0 分, 浅棕色弱染色 1 分, 棕色中度染色 2 分, 深棕色强染色 3 分)和阳性范围(1 分 0%~25%, 2 分 26%~50%, 3 分 51%~75%, 4 分 76%~100%)评分。上述两项评分相加, 0~2 分为低表达, 3~7 分为高表达。

### 1.3.4 CCK-8 实验

将细胞接种在 96 孔板中, 浓度为  $1 \times 10^4$ /孔, 并在含有 10% FBS 的 100  $\mu$ L 的培养基中培养。根据说明书, 向细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 的每个孔内加入 10  $\mu$ L, 并将混合物在 37 ℃ 下孵育 2 h。最后在 450 nm 处测量吸光度, 评估细胞的生长情况。

### 1.3.5 Transwell 小室实验

选择 8  $\mu$ m 孔径的 Transwell 小室评估细胞迁移和侵袭能力。迁移测定:  $5 \times 10^4$  个细胞加入 200  $\mu$ L 无血清培养基, 接种至上腔室, 下腔室加入 800  $\mu$ L 含 10% FBS 的培养基。侵袭测定:  $1 \times 10^5$  个细胞接种到预铺基质胶的 200  $\mu$ L 无血清培养基的上腔室中, 下腔加入 800  $\mu$ L 含 10% FBS 的培养基。用甲醇固定, 结晶紫染色 30 min, 显微镜下成像计数。

### 1.3.6 Western blot 实验

使用 T-PER<sup>®</sup> 试剂和抑制剂提取细胞组织蛋白, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。经 SDS-PAGE 分离后, 蛋白转移到 PVDF 膜上。室温下用 5% 牛奶溶液封闭膜 1 h, 减少非特异性结合。随后, 4 ℃ 下分别过夜孵育膜 GAPDH 和 KHSRP 一抗(稀释比 1:5000)。清洗后, 室温孵育二抗 1.5 h (稀释比 1:5000)。最后, 用 ECL 试剂盒曝光蛋

白条带, 并使用 Image J 2 软件分析蛋白质条带的灰度值。

### 1.3.7 裸鼠异种移植实验

将 sh-KHSRP 及阴性对照的 Calu-3 细胞、过表达 KHSRP 及慢病毒载体的 SPC-A1 细胞, 按照  $5 \times 10^6$  的细胞数量, 分别皮下接种到 28 只裸鼠的右背侧(每组 7 只)。每 3 d 测量 1 次肿瘤的体积和重量, 并按以下公式计算: 体积 = (长 $\times$ 宽<sup>2</sup>)/2。3~4 周后, 处死小鼠, 在尸检时取出肿瘤并固定在 10% 中性 PBS 缓冲的福尔马林中。

### 1.3.8 裸鼠尾静脉肺转移模型实验

将 sh-KHSRP 及阴性对照的 Calu-3 细胞、过表达 KHSRP 及慢病毒载体的 SPC-A1 细胞, 按照  $1 \times 10^6$ /mL 的浓度, 尾静脉接种每只 0.1 mL, 分别注射到 28 只裸鼠的尾静脉中(每组 7 只)。将解剖后的肺组织固定在 10% 中性 PBS 缓冲的福尔马林中, 用苏木素-伊红(HE)染色固定, 观察病灶转移情况。

### 1.3.9 Rescue 实验

Rescue 实验为双向验证: 一是在含有敲降 KHSRP 的 PC-9、Calu-3 细胞加入过表达的 JAK1/STAT3, 二是在含有敲降 JAK1/STAT3 的 PC-9、Calu-3 细胞加入过表达的 KHSRP。通过 qRT-PCR 检测各组细胞中的 KHSRP mRNA 表达水平, CCK-8 和 Transwell 小室实验观察过表达 JAK1/STAT3 或 KHSRP 分别能否逆转敲降 KHSRP 或 JAK1/STAT3 对 AEG 细胞增殖、迁移和侵袭能力的抑制作用。

## 1.4 统计学方法

所有数据均以平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, GraphPad Prism 9 软件进行统计分析和绘图。采用独立样本 *t* 检验比较两组之间的差异, 并采用卡方检验分析 KHSRP 表达与临床病理特征的相关性。Kaplan-Meier 分析用于评估生存率。所有实验重复 3 次。以  $P < 0.05$  为具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 KHSRP 在 LUAD 组织和细胞系中表达水平检测结果

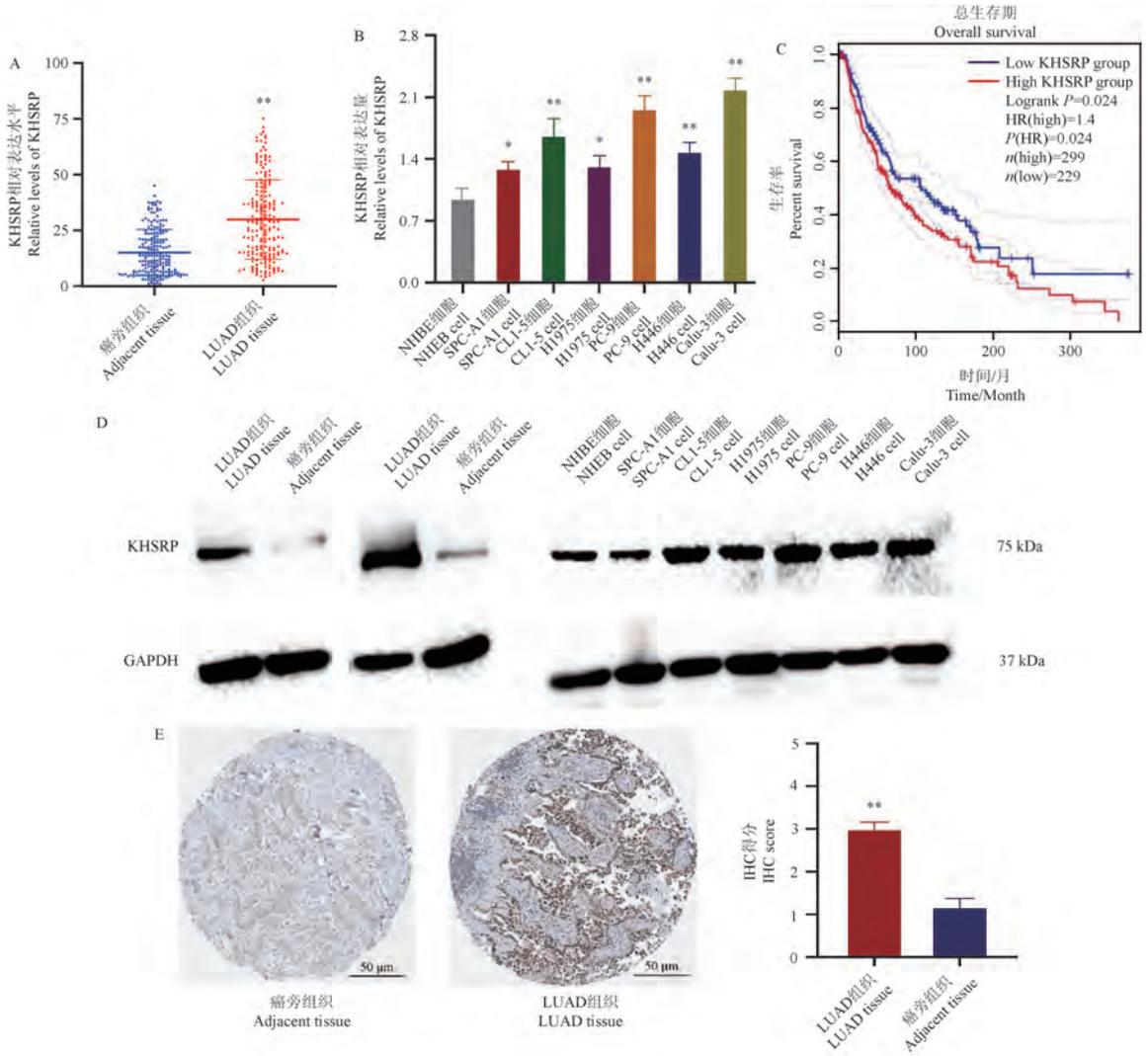
qRT-PCR 结果显示, 与癌旁组织相比, LUAD 组织中 KHSRP 表达水平显著增加(图 1A,  $P < 0.01$ ); 在肺腺癌细胞系中, KHSRP 的表达水平相

较于正常人支气管上皮细胞(NHBE 细胞)均呈现出显著增高的趋势(图 1B,  $P < 0.05$ );通过在线工具 GEPIA 对 TCGA LIHC 数据库的分析显示,高表达的 KHSRP 的总生存期较差(图 1C,  $P < 0.05$ )。Western blot 实验发现,LUAD 样品中 KHSRP 的蛋白表达水平高于蛋白质印迹法配对的癌旁组织中的蛋白表达水平(图 1D)。IHC 染色分析表明 KHSRP 在 LUAD 组织中的高表达

(图 1E,  $P < 0.01$ )。以上结果表明, KHSRP 在 LUAD 组织中呈现高表达,并且 KHSRP 表达上调与 LUAD 患者转移的恶性进程密切相关。

## 2.2 KHSRP 表达水平对体外 LUAD 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

qRT-PCR 检测过表达组和敲降组 KHSRP 的表达水平(图 2A ~ 2B,  $P < 0.01$ )。CCK-8 检测结果显示, KHSRP 敲降明显降低了 PC-9 和 Calu-3

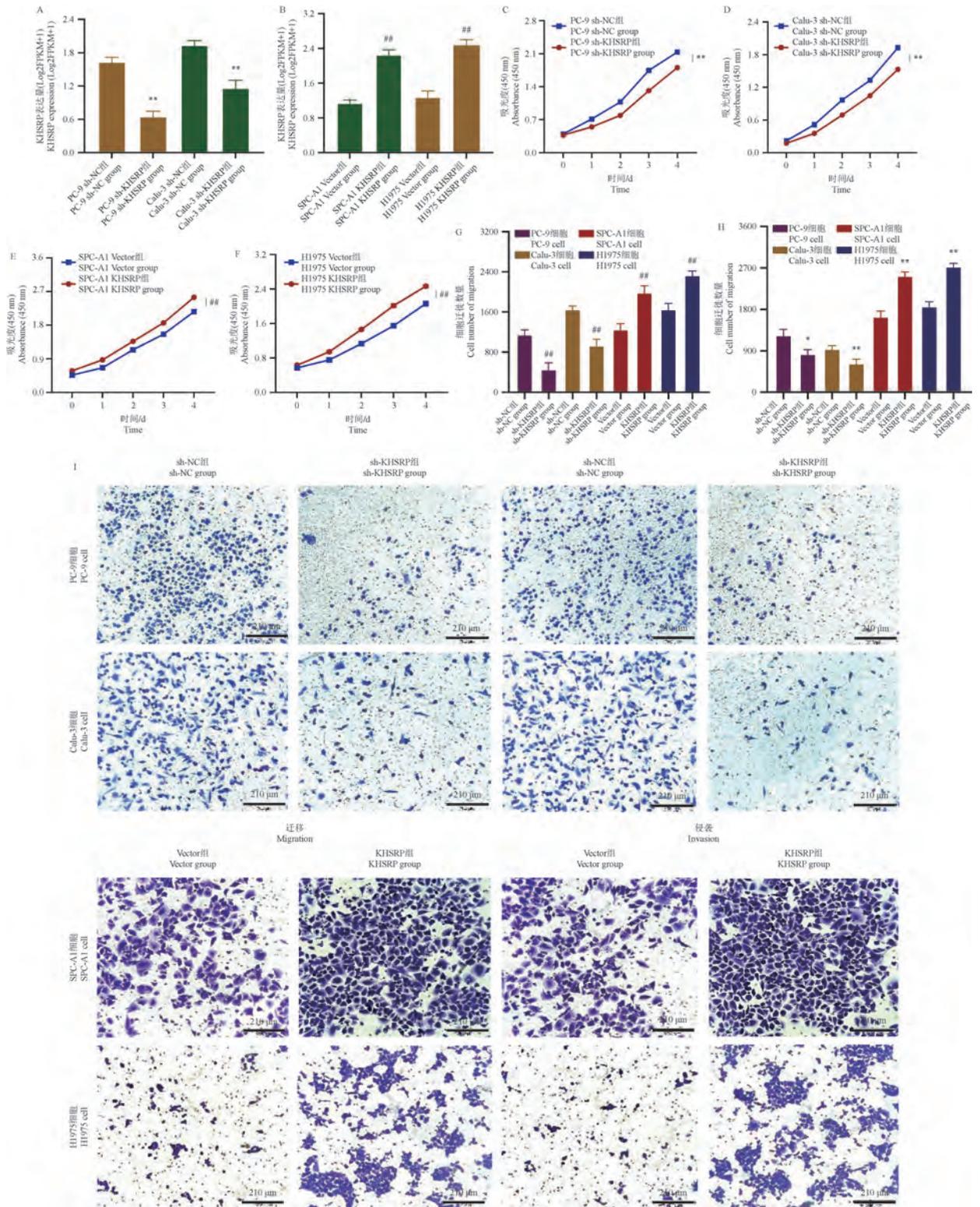


注:A:KHSRP 在 LUAD 组织中的表达高于正常组织;B:qRT-PCR 实验检测 KHSRP 在肺癌细胞系中的表达;C:GEPIA 分析数据库中 KHSRP 表达水平与总生存期的关系;D:Western blot 实验检测 KHSRP 在 LUAD 组织和正常组织、LUAD 细胞系和正常细胞系的蛋白水平;E:不同表达水平 KHSRP 的免疫组织化学染色结果对比。与癌旁组织或 NHBE 细胞相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 1 KHSRP 在 LUAD 中表达检测结果

Note. A, KHSRP in LUAD expression is higher than in normal tissue. B, qRT-PCR assay to detect the expression of KHSRP in lung adenocarcinoma cell lines. C, GEPIA analyzed the relationship between KHSRP expression level and overall survival in the database. D, Western blot assay to detect protein levels of KHSRP in LUAD tissues and normal tissues, LUAD cell lines and normal cell lines. E, Different expression level KHSRP results of immunohistochemical staining. Compared with adjacent tissue or NHBE cell, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 1 Results of KHSRP expression assay in LUAD



注: A~B: qRT-PCR 检测转染效率; C~F: CCK-8 实验检测细胞增殖能力; G~I: Transwell 小室实验检测细胞迁移和侵袭能力。与 sh-NC 组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 Vector 组相比, ###  $P < 0.01$ 。

**图 2** KHSRP 表达水平对体外 LUAD 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

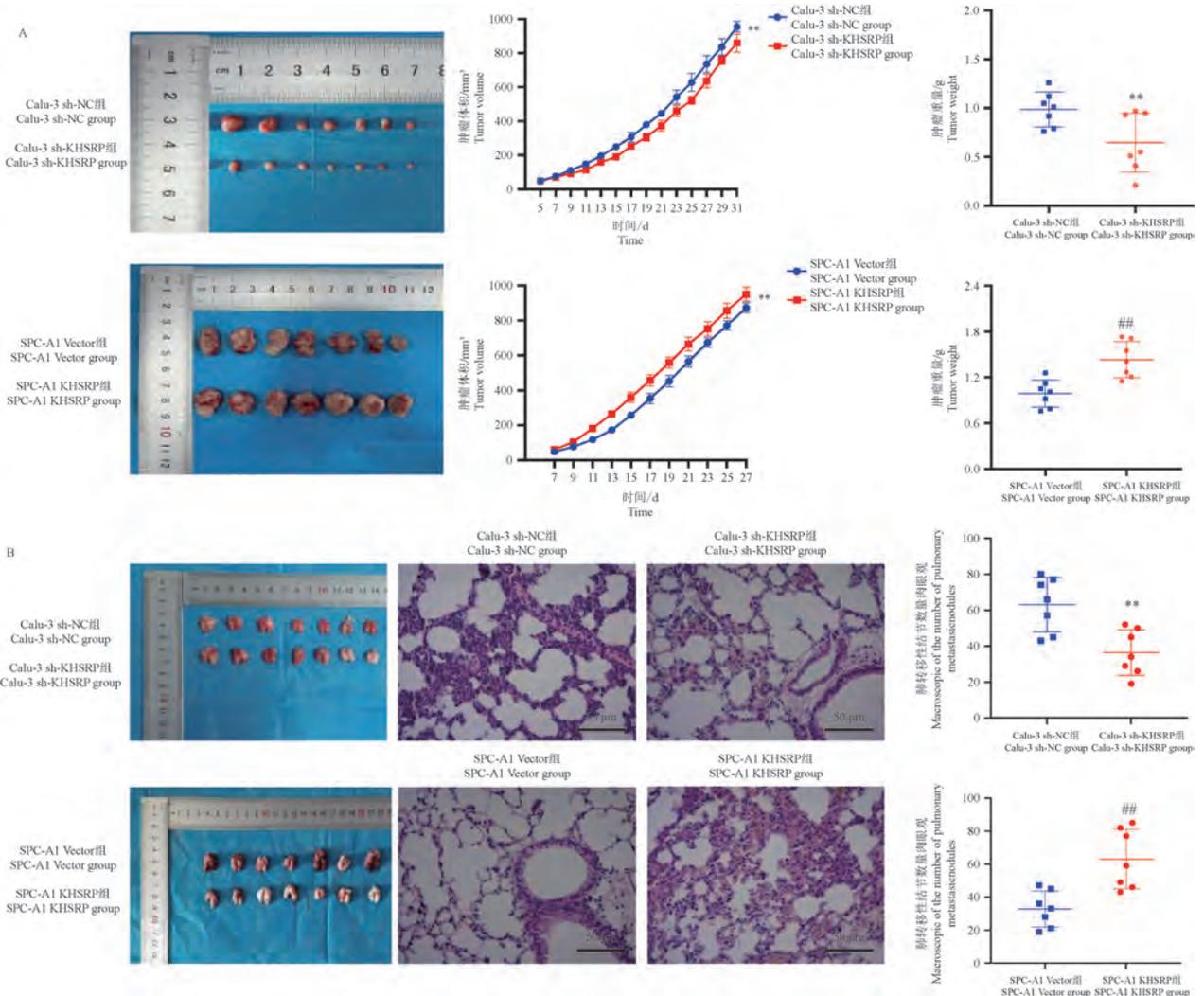
Note. A~B, qRT-PCR to detect transfection efficiency. C~F, CCK-8 experiment to detect cell proliferation ability. G~I, Transwell chamber experiment to detect cell migration and invasion ability. Compared with the sh-NC group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . Compared with the Vector group, ###  $P < 0.01$ .

**Figure 2** Effects of KHSRP expression levels on proliferation, migration, and invasion of LUAD cells *in vitro*

细胞的增殖能力,而 KHSRP 的过表达明显增强了 SPC-A1 和 H1975 细胞的增殖能力(图 2C ~ 2F,  $P < 0.01$ )。在体外对 PC-9 和 Calu-3、SPC-A1 和 H1975 细胞进行迁移和基质胶侵袭试验。结果表明,敲低 KHSRP 在 PC-9 和 Calu-3 细胞中明显抑制了细胞迁移和侵袭能力,而 KHSRP 在 SPC-A1 和 H1975 细胞中的过表达明显促进了细胞迁移和侵袭能力(图 2G ~ I,  $P < 0.01$ )。这些结果表明,敲降 KHSRP 明显抑制了 LUAD 细胞的增殖、迁移和侵袭,而 KHSRP 的过表达明显促进了 LUAD 细胞的体外增殖、迁移和侵袭。

### 2.3 KHSRP 表达水平对裸鼠体内 LUAD 细胞生长和转移的影响

皮下注射 Calu-3-NC、Calu-3-shKHSRP、SPC-A1-Vector 和 SPC-A1-KHSRP 细胞到裸鼠的右背侧,建立了异种移植肿瘤小鼠模型。每天观察测量肿瘤体积与重量,KHSRP 敲降组肿瘤体积小于对照组,KHSRP 过表达组肿瘤体积显著大于对照组(图 3A,  $P < 0.01$ )。在实验结束后,分离异种移植肿瘤,测量肿瘤重量。KHSRP 敲降组肿瘤重量小于阴性对照组,过表达组的肿瘤重量显著高于对照组( $P < 0.01$ ),与肿瘤体积变化的结果一致。



注:A:各组裸鼠体内肿瘤的大小和重量;B:各组裸鼠体内肺表面转移性结节的数量(HE染色)。与 sh-NC 组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与 Vector 组相比, ##  $P < 0.01$ 。

图 3 KHSRP 表达水平对裸鼠体内 LUAD 细胞生长和转移的影响

Note. A, Tumor size and weight were measured in nude mice. B, Number of metastatic nodules on the lung surface in nude mice (HE staining). Compared with the sh-NC, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . Compared with the Vector group, ##  $P < 0.01$ .

Figure 3 Effects of KHSRP expression levels on LUAD cell growth and metastasis in nude mice

通过尾静脉将 Calu-3 和 SPC-A1 细胞注射到裸鼠体内,通过 HE 染色确认小鼠肺表面转移性结节的数量。体内肺转移模型表明敲降 KHSRP 抑制了 LUAD 细胞的肺转移,过表达反之(图 3B,  $P < 0.01$ ),与体外研究结果一致。

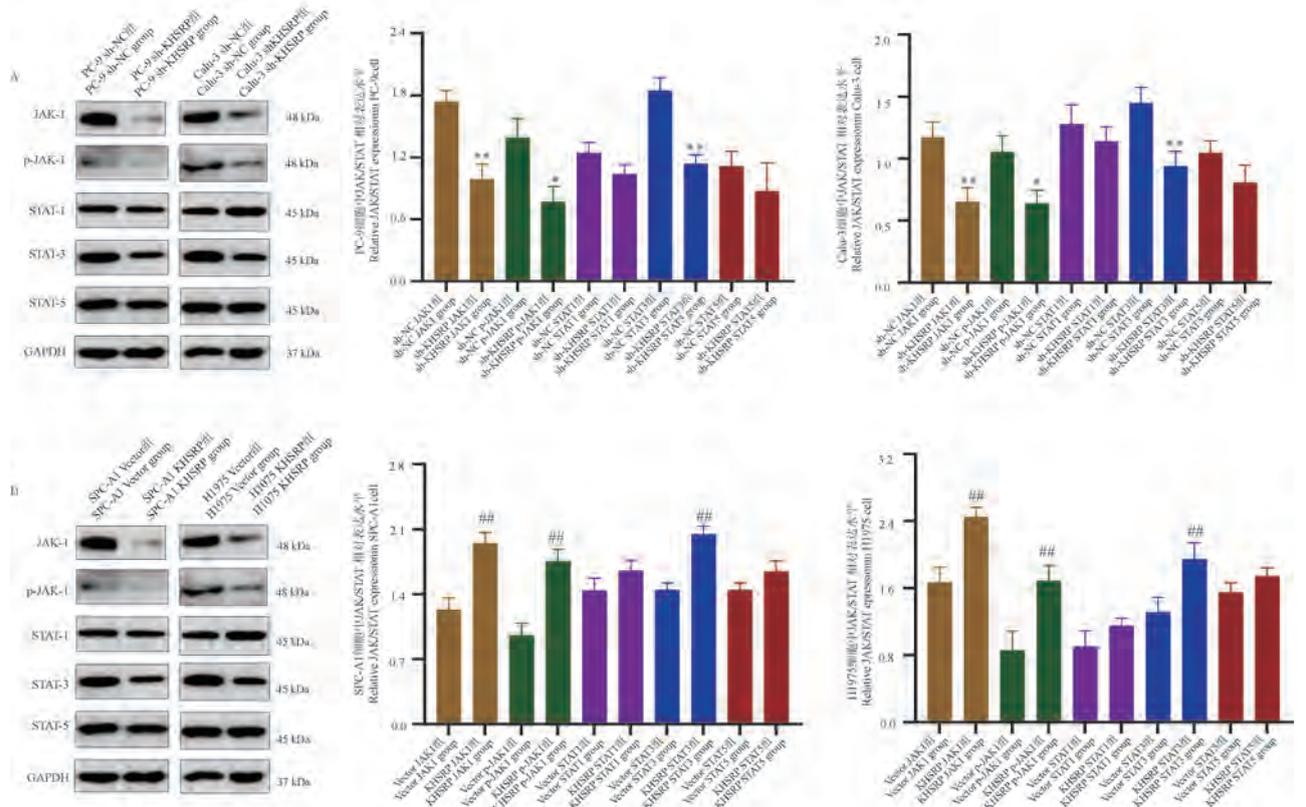
### 2.4 KHSRP 对 JAK/STAT 信号通路相关蛋白的调控作用

Western blot 实验比较了 KHSRP 敲降后的 LUAD 细胞系中与 JAK/STAT 信号通路相关的 8 个关键分子的相对表达水平,结果显示,有 3 个关键分子(JAK1、p-JAK-1、STAT3)的蛋白表达水平发生改变,其中敲降组的 JAK1、p-JAK-1、STAT3 蛋白表达明显降低(图 4A,  $P < 0.05$ ),过表达组的则明显升高(图 4B,  $P < 0.01$ )。以上结果说明 KHSRP 对 JAK1/STAT3 存在正向调控作用。

### 2.5 KHSRP 调节 JAK1/STAT3 信号通路对 LUAD 细胞的增殖、迁移和侵袭的影响

qRT-PCR 结果显示,在 mRNA 水平上, KHSRP 敲降的情况下,过表达 JAK1/STAT3 能够使 KHSRP 的表达水平重新升高(图 5A,  $P < 0.05$ )。CCK-8 和 Transwell 小室实验发现,敲降 KHSRP 可以抑制 LUAD 细胞的增殖、迁移和侵袭,但同时转染 sh-KHSRP 和过表达的 JAK1/STAT3, LUAD 细胞的增殖、迁移和侵袭能力会得到恢复(图 5B~5C,  $P < 0.01$ )。

为了进一步探究 KHSRP 和 JAK1/STAT3 之间的相互作用,我们又将 sh-JAK1/STAT3 和过表达的 KHSRP 共同转染到 LUAD 细胞中进行验证。实时荧光定量 PCR 测定各组 KHSRP 的 mRNA 蛋白表达水平(图 6A,  $P < 0.01$ );CCK-8 实验结果显示,与 sh-NC 组相比,敲降 JAK1/STAT3

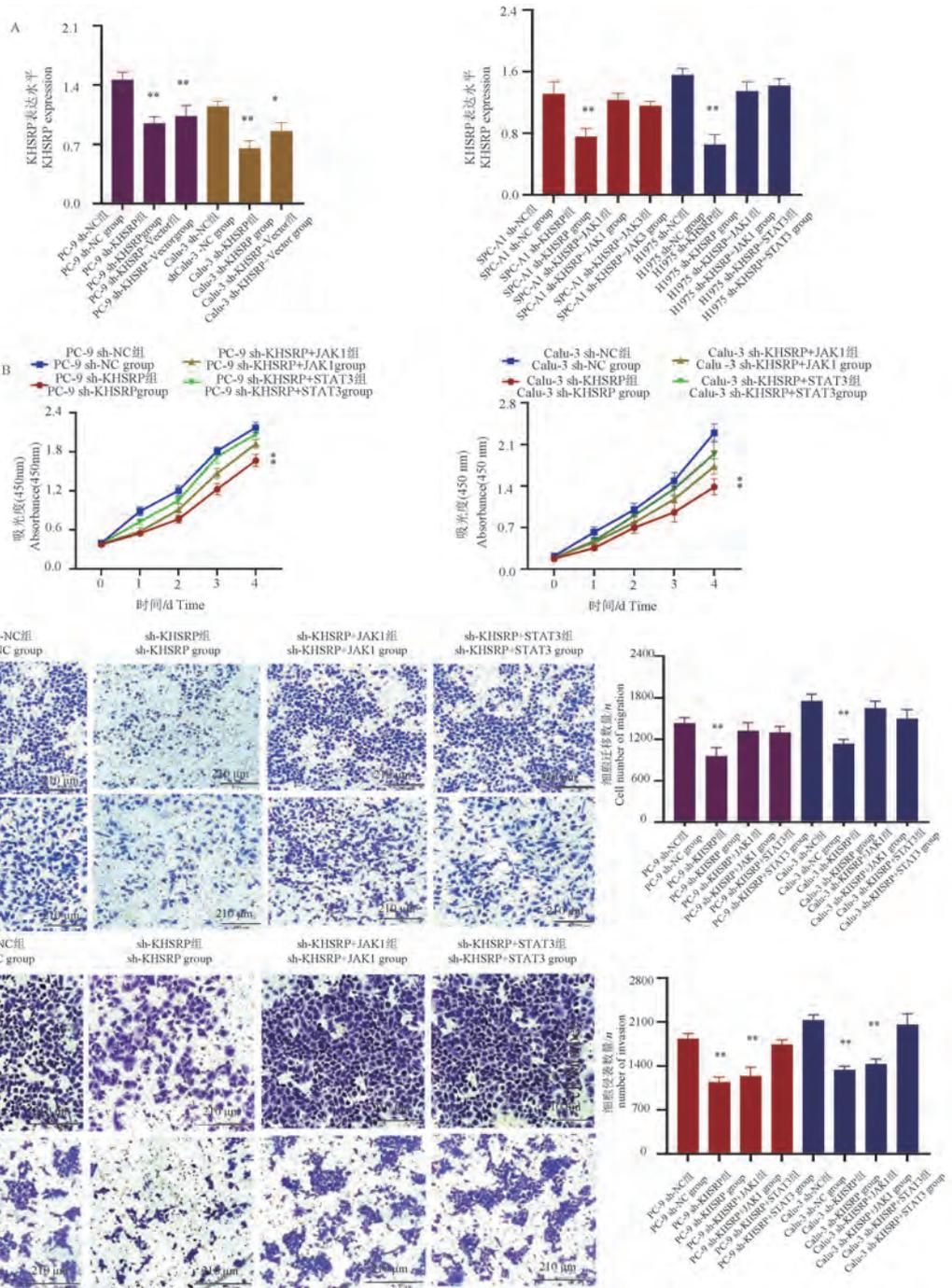


注:A:Western blot 实验测定 PC-9 和 Calu-3 细胞中 JAK/STAT 信号通路蛋白水平表达水平;B:Western blot 实验测定 SPC-A1 和 H1975 细胞中 JAK/STAT 信号通路蛋白水平表达水平。与 sh-NC 组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与 Vector 组相比, ##  $P < 0.01$ 。

图 4 Western blot 实验证实 KHSRP 靶向 JAK/STAT 信号通路

Note. A, Western blot experiments was used to determine the protein expression levels of JAK/STAT signaling pathway in PC-9 and Calu-3 cells. B, Western blot experiments was used to determine the protein expression levels of JAK/STAT signaling pathway in SPC-A1 and H1975 cells. Compared with the sh-NC group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . Compared with the Vector group, ##  $P < 0.01$ .

Figure 4 Western blot experiments confirmed that KHSRP targeted the JAK/STAT signaling pathway

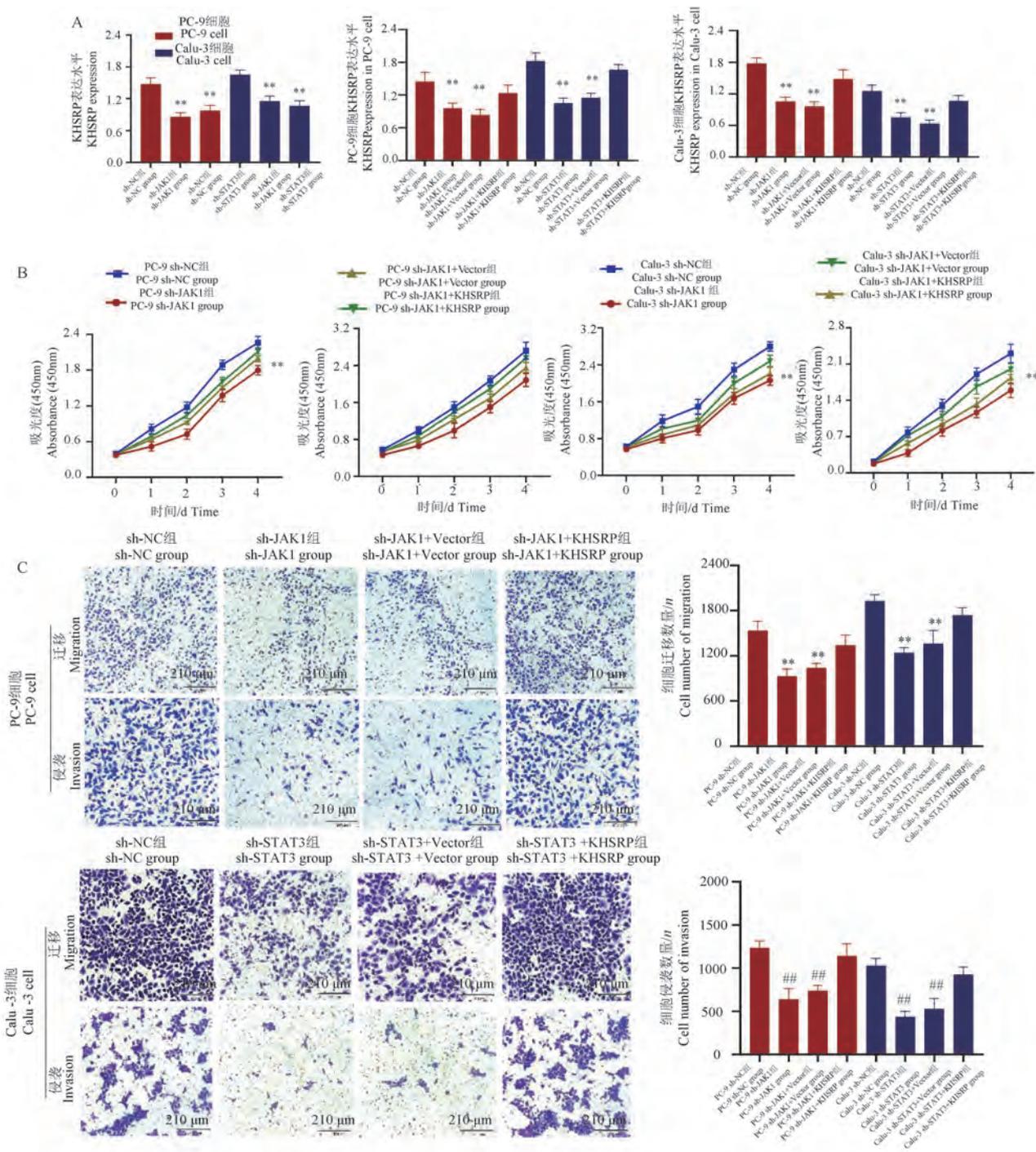


注:A:检测不同组别LUAD细胞中KHSRP的表达水平;B:CCK 8实验发现过表达的JAK1/STAT3可以恢复sh-KHSRP对细胞增殖能力的影响;C:Transwell实验发现过表达的JAK1/STAT3可以恢复sh-KHSRP对细胞迁移和侵袭能力的影响。与sh-NC组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与Vector组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

**图5** 过表达JAK1/STAT3逆转sh-KHSRP对LUAD细胞的恶性生物进程

Note. A, Experimental testing different groups LUAD cells KHSRP expression level. B, CCK-8 assay found that overexpression of JAK1/STAT3 could restore the effect of sh-KHSRP on cell proliferation ability. C, Transwell experiments found expression JAK1/STAT3 can restore sh-KHSRP effects on cell migration and invasion ability. Compared with the sh-NC groups, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Compared with the Vector group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ .

**Figure 5** Overexpression of JAK1/STAT3 reverses the effect of sh-KHSRP on the malignant biological behavior of LUAD cells



注:A:qRT-PCR 检测转染效率;B:CCK 8 检测 KHSRP 可以恢复 sh-JAK1 和 sh-STAT3 对细胞增殖能力的影响;C:Transwell 实验检测 KHSRP 可以恢复 sh-JAK1 和 sh-STAT3 细胞迁移和侵袭能力的影响。与 sh-NC 组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 Vector 组相比, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。

**图 6** 过表达 KHSRP 逆转 sh-JAK1/STAT3 对 LUAD 细胞的恶性生物学行为

Note. A, Transfection efficiency was detected by qRT-PCR assay. B, CCK-8 assay showed that KHSRP could restore the effect of sh-JAK1 and sh-STAT3 on cell proliferation. C, Transwell assay was used to detect the effect of KHSRP on the migration and invasion of sh-JAK1 and sh-STAT3 cells. Compared with the sh-NC group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . Compared with the Vector group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ .

**Figure 6** Overexpression of KHSRP reverses the effect of sh-JAK1/STAT3 on the malignant biological behavior of LUAD cells

显著抑制了 LUAD 细胞增殖,但当敲降 JAK1/STAT3,同时过表达 KHSRP 后,细胞增殖能力得到恢复(图 6B,  $P < 0.01$ );Transwell 小室实验结果显示:在没有转染 KHSRP 前,sh-JAK1 组和 sh-STAT3 组的细胞侵袭和迁移能力较 sh-NC 组明显减弱,但转染 KHSRP 之后,细胞侵袭和迁移的能力都有所提高(图 6C,  $P < 0.01$ )。以上结果 KHSRP 通过调节 JAK1/STAT3 信号通路促进 LUAD 细胞的增殖、迁移和侵袭。

### 3 讨论

癌症的发病机制是一个复杂的多因素过程,其中包括癌细胞获得生存优势及其增殖、侵袭和迁移能力<sup>[11]</sup>。已有多项研究证实 KHSRP 与多种癌症有关,包括非小细胞肺癌、乳腺癌、肾透明细胞癌、宫颈癌和胰腺癌<sup>[12-15]</sup>。LUAD 是最常见的非小细胞肺癌,且发病率稳步上升<sup>[16]</sup>。虽然手术是 LUAD 的主要治疗方法,但当癌细胞转移发生时,实现手术治愈具有挑战性<sup>[17]</sup>。因此,确定稳定的潜在生物标志物以预测 LUAD 患者的预后并指导个体化治疗至关重要。

本研究强调了 KHSRP-JAK1/STAT3 在 LUAD 发展中的重要作用,表明其上调与肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移的增加密切相关。通过体外和体内实验探讨 KHSRP 在调控 LUAD 细胞侵袭和转移中的生物学功能。首先验证了在正常人支气管上皮细胞系和 LUAD 细胞系中 KHSRP 的表达差异情况,发现 KHSRP 在 LUAD 细胞系中的表达上调,并从组织水平上得到进一步验证;GEPIA 数据库分析显示,KHSRP 表达水平的增加与患者总生存期也显著相关;此外体外细胞功能实验发现,敲降 KHSRP 在体外可以抑制 LUAD 细胞增殖、迁移和侵袭,过表达 KHSRP 则会促进 LUAD 细胞增殖、迁移和侵袭。通过在裸鼠体内构建异种移植瘤模型和肺转移模型发现,裸鼠体内肿瘤的重量、体积、肺表面转移性结节的数量受体内 KHSRP 表达水平的影响,过表达 KHSRP 会促进裸鼠体内肿瘤重量和体积增大,肺表面转移性结节的数量增多。

基于数据库检索和以往研究基础,将 KHSRP 的下游靶向通路锁定在 JAK/STAT 信号通路。JAK 是细胞因子和生长激素信号传导的介质,激

活的 JAK 磷酸化信号转导和转录激活因子(STAT)蛋白,转位到细胞核,调节参与细胞增殖、分化和凋亡的基因的转录<sup>[18-19]</sup>。多项研究表明 JAK/STAT 信号转导是癌症进展的基石,既可以作为癌症生长/转移的肿瘤内在驱动因素,也可以作为免疫监视的调节剂<sup>[20-21]</sup>。例如,WANG 等<sup>[22]</sup>发现 CircNOL10 通过调节 miR-767-5p/SOCS2 轴使 JAK2/STAT5 信号失活来抑制乳腺癌细胞的增殖;HUANG 等发现 STX6 通过激活 STAT3 信号通路在肝癌细胞发挥致癌作用<sup>[23]</sup>。研究通过敲降 KHSRP,发现 JAK1、p-JAK-1、STAT3 的 mRNA 及相关蛋白表达水平明显下降,过表达则反之,说明 KHSRP 对 JAK1/STAT3 信号通路具有正向调控作用。为了验证 KHSRP 与 JAK/STAT 之间的互作关系,又进行了 Rescue 实验,结果表明,无论是将过表达 JAK/STAT 转染到 sh-KHSRP 组,还是将过表达的 KHSRP 转染到 sh-JAK/STAT 组,都能够逆转 LUAD 细胞的增殖、侵袭和迁移能力。因此,我们得出 JAK1/STAT3 信号通路可能是 KHSRP 在 LUAD 中的发挥致癌作用的关键因素之一,KHSRP 介导的肿瘤生长和转移至少部分归因于 JAK1/STAT3 信号通路的激活,这对 LUAD 肿瘤的发生和转移至关重要。

综上所述,KHSRP 能够促进肺腺癌细胞的恶性进展。从机制上看,KHSRP 是通过激活 JAK1/STAT3 通路促进 LUAD 细胞增殖、侵袭和迁移。因此靶向 KHSRP-JAK1/STAT3 轴可能是 LUAD 临床诊疗中新的分子标志物和潜在治疗靶点。

### 参考文献:

- [1] ZOU T, GU L, YANG L, et al. Alpha-solanine anti-tumor effects in non-small cell lung cancer through regulating the energy metabolism pathway [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2022, 17(4): 396-409.
- [2] HUANG Q, TIAN R, YU J, et al. Identification of PSMD11 as a novel cuproptosis- and immune-related prognostic biomarker promoting lung adenocarcinoma progression [J]. *Cancer Med*, 2024, 13(11): e7379.
- [3] MA M, WANG W, LI L, et al. RBM15 facilitates lung adenocarcinoma cell progression by regulating RASSF8 stability through N6 Methyladenosine modification [J]. *Transl Oncol*, 2024, 46: 102018.
- [4] TANIUCHI K, OGASAWARA M. KHSRP-bound small nucleolar RNAs associate with promotion of cell invasiveness

- and metastasis of pancreatic cancer [J]. *Oncotarget*, 2020, 11(2): 131-147.
- [ 5 ] SHI S, ZHAO J, YANG L, et al. KHSRP participates in manganese-induced neurotoxicity in rat striatum and PC12 cells [J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 55(2): 454-465.
- [ 6 ] JOHNSON H M, NOON-SONG E, AHMED C M. Noncanonical IFN signaling, steroids, and STATs: a probable role of V-ATPase [J]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019: 4143604.
- [ 7 ] XUE C, YAO Q, GU X, et al. Evolving cognition of the JAK-STAT signaling pathway: autoimmune disorders and cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 204.
- [ 8 ] TANG J J H, HAO THNG D K, LIM J J, et al. JAK/STAT signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepat Oncol*, 2020, 7(1): HEP18.
- [ 9 ] LIU C, FENG H, SONG L, et al. Synergistic effects of thalidomide and cisplatin are mediated via the PI3K/AKT and JAK1/STAT3 signaling pathways in cervical cancer [J]. *Oncol Rep*, 2022, 48(4): 169.
- [ 10 ] SARAPULTSEV A, GUSEV E, KOMELKOVA M, et al. JAK-STAT signaling in inflammation and stress-related diseases: implications for therapeutic interventions [J]. *Mol Biomed*, 2023, 4(1): 40.
- [ 11 ] HANAHAN D. Hallmarks of cancer: new dimensions [J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(1): 31-46.
- [ 12 ] PAIZULA X, WULAYING A, CHEN D, et al. KHSRP has oncogenic functions and regulates the expression and alternative splicing of DNA repair genes in breast cancer MDA-MB-231 cells [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 14694.
- [ 13 ] YANG Y C, LIN Y W, LEE W J, et al. The RNA-binding protein KSRP aggravates malignant progression of clear cell renal cell carcinoma through transcriptional inhibition and post-transcriptional destabilization of the NEDD4L ubiquitin ligase [J]. *J Biomed Sci*, 2023, 30(1): 68.
- [ 14 ] HUANG X, LIU X, DU B, et al. LncRNA LINC01305 promotes cervical cancer progression through KHSRP and exosome-mediated transfer [J]. *Aging*, 2021, 13(15): 19230-19242.
- [ 15 ] YAN M, SUN L, LI J, et al. RNA-binding protein KHSRP promotes tumor growth and metastasis in non-small cell lung cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 478.
- [ 16 ] ARAGHI M, MANNANI R, HEIDARNEJAD MALEKI A, et al. Recent advances in non-small cell lung cancer targeted therapy; an update review [J]. *Cancer Cell Int*, 2023, 23(1): 162.
- [ 17 ] YU Y, WANG Z, ZHENG Q, et al. FAM72 serves as a biomarker of poor prognosis in human lung adenocarcinoma [J]. *Aging*, 2021, 13(6): 8155-8176.
- [ 18 ] LAMICHHANE S, MO J S, SHARMA G, et al. microRNA 452 regulates IL20RA-mediated JAK1/STAT3 pathway in inflammatory colitis and colorectal cancer [J]. *Inflamm Res*, 2021, 70(8): 903-914.
- [ 19 ] HE L, TIAN L. Downregulation of miR-409-3p suppresses LPS-induced inflammation in human bronchial epithelial cells through SOCS3/JAK1/STAT3 signaling: The implication for bronchopneumonia [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(3): 190.
- [ 20 ] JIANG Y, XU C H, ZHAO Y, et al. LINC00926 is involved in hypoxia-induced vascular endothelial cell dysfunction via miR-3194-5p regulating JAK1/STAT3 signaling pathway [J]. *Eur J Histochem*, 2023, 67(1): 3526.
- [ 21 ] BROOKS A J, PUTOCZKI T. JAK-STAT signalling pathway in cancer [J]. *Cancers*, 2020, 12(7): 1971.
- [ 22 ] WANG F, WANG X, LI J, et al. CircNOL10 suppresses breast cancer progression by sponging miR-767-5p to regulate SOCS2/JAK/STAT signaling [J]. *J Biomed Sci*, 2021, 28(1): 4.
- [ 23 ] HUANG L, ZHONG X, LI A, et al. Syntaxin6 contributes to hepatocellular carcinoma tumorigenesis via enhancing STAT3 phosphorylation [J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 197.

[ 收稿日期 ] 2024-07-19

杨美艳,颜峰,王雪楠,等.非手术子宫注射法建立大鼠盆腔炎模型的研究[J].中国比较医学杂志,2025,35(1):13-29.

Yang MY, Yan F, Wang XN, et al. Establishment of a rat model of pelvic inflammatory disease via non-operative uterine injection [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 13-29.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.002

# 非手术子宫注射法建立大鼠盆腔炎模型的研究

杨美艳<sup>1,2</sup>, 颜峰<sup>3</sup>, 王雪楠<sup>4</sup>, 胡凯歆<sup>2</sup>, 高鸿霞<sup>1\*</sup>, 潘晓燕<sup>2\*</sup>

(1.北华大学医学技术学院,吉林 132013;2.吉林医药学院生殖医学研究中心,吉林 132013;  
3.曲阜市人民医院,山东 曲阜 273100;4.济宁医学院附属医院生殖科,山东 济宁 272007)

**【摘要】** 目的 非手术法建立高效、稳定的大鼠盆腔炎模型,并评估验证其在药效试验中的应用。方法 雌性SD大鼠随机分为对照组、苯酚7 d模型组、苯酚10 d模型组、苯酚造模治疗组、低浓度菌液模型组、高浓度菌液模型组和菌液造模治疗组。模型组和治疗组SD大鼠以非手术法子宫腔注射25%苯酚凝胶、 $2 \times 10^7$ 个或 $2 \times 10^8$ 个大肠埃希菌和金黄色葡萄链球菌的混合菌,以构建盆腔炎模型。治疗组大鼠灌胃中成药金刚藤胶囊,对照组大鼠在相同时间给予等体积的溶剂溶液。观察大鼠的健康状况、体重变化和子宫外观;计算子宫系数;苏木素-伊红(HE)染色检测子宫和输卵管的病理变化、子宫内膜厚度和腺体数量;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测大鼠血清中白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )水平;免疫荧光染色检测巨噬细胞标志物CD68蛋白表达;Western blot检测大鼠子宫中TLR4/NF- $\kappa$ B通路相关蛋白表达。结果 模型组大鼠的死亡率只有5%;与对照组相比,造模后大鼠体重下降、子宫系数增加、子宫和输卵管出现不同程度的病理变化、内膜变薄、腺体数量减少、血清IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 的水平和子宫组织中巨噬细胞的数量显著增加,Toll样受体4/核因子- $\kappa$ B(Toll-like receptor 4/nuclear factor kappa-B, TLR4/NF- $\kappa$ B)信号通路被激活;苯酚7 d模型和低浓度菌液模型被判定为轻度盆腔炎模型,苯酚10 d模型和高浓度菌液模型被判定为重度盆腔炎模型;中成药金刚藤胶囊治疗后,子宫和输卵管的病理症状明显缓解,符合临床盆腔炎的药效评估。结论 通过非手术法利用苯酚和混合菌液建立的大鼠盆腔炎模型可以更好地模拟临床由于不同原因导致的不同程度病理状态的盆腔炎,适用于药物药效作用评价和盆腔炎病理机制的阐明。

**【关键词】** 非手术法;盆腔炎;动物模型;子宫病理

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0013-17

## Establishment of a rat model of pelvic inflammatory disease via non-operative uterine injection

YANG Meiyang<sup>1,2</sup>, YAN Feng<sup>3</sup>, WANG Xuennan<sup>4</sup>, HU Kaixin<sup>2</sup>, GAO Hongxia<sup>1\*</sup>, PAN Xiaoyan<sup>2\*</sup>

**【基金项目】** 吉林省科技厅重点攻关项目(20240305074YY);吉林省发展和改革委员会产业技术与开发项目(2023C027-8);山东省中医药科技项目(Z-2023065);吉林医药学院研究生创新计划项目(2023yyc02)。

**【作者简介】** 杨美艳(2001—),女,在读硕士研究生,研究方向:生殖药理学。E-mail:1908131784@qq.com

**【通信作者】** 潘晓燕(1979—),女,博士,教授,研究方向:生殖药理学。E-mail:pxy19790105@163.com

高鸿霞(1974—),女,博士,副教授,研究方向:生殖药理学。E-mail:gaohongxia@beihua.edu.cn \*共同通信作者

(1. School of Medical Technology, Beihua University, Jilin 132013, China. 2. Center for Reproductive Medicine, Jilin Medical University, Jilin 132013. 3. Qufu City People's Hospital, Qufu 273100. 4. Department of Reproduction, Affiliated Hospital of Jining Medical College, Jining 272007)

**【Abstract】 Objective** To establish an efficient and stable model of pelvic inflammatory disease in rats via a non-surgical method, and to evaluate its application in pharmacodynamic testing. **Methods** Female Sprague-Dawley rats were divided randomly into the following groups: control group; model group with phenol for 7 d; model group with phenol for 10 d; treatment group modeled with phenol; model group with low concentration of bacteria; model group with high concentration of bacteria; and treatment group modeled with bacteria. Rats in the model and treatment groups were injected with 25% phenol gel and  $2 \times 10^7$  or  $2 \times 10^8$  *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* mixture via a non-surgical method, to construct a rat model of pelvic inflammatory disease. Rats in the treatment groups received the Chinese patent medicine Jingangteng capsules by gavage, and rats in the control group received the same volume of solvent solution. The health status, weight changes, and uterine appearance were monitored and the uterine coefficient was calculated. Pathological changes in the uterus and fallopian tubes, endometrial thickness, and number of glands were detected by hematoxylin and eosin staining. Serum levels of interleukin (IL)- $1\beta$ , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Protein expression of the macrophage marker CD68 was detected by immunofluorescence. Expression of Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor (NF)- $\kappa$ B pathway-related proteins in the uterus was detected by Western blot. **Results** The mortality rate in the model group was only 5%. Compared with the control group, model rats showed decreased body weight, increased uterine coefficient, pathological changes in the uterus and Fallopian tubes, thinner endometrium, fewer glands, significantly higher serum levels of IL- $1\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  and more macrophages in the uterine tissue, and activation of the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. The 7 d phenol and low-concentration bacterial solution models were judged to be mild pelvic inflammatory disease models, and the 10 d phenol and high-concentration bacterial solution models were considered severe pelvic inflammatory disease models. Treatment with Jingangteng capsules relieved the pathological symptoms in the uterus and fallopian tubes, in line with the efficacy evaluation of clinical pelvic inflammatory disease. **Conclusions** We established rat models of pelvic inflammatory disease using phenol and a mixed bacterial solution via a non-surgical method, to simulate the different pathological states of pelvic inflammatory disease caused by different factors. These models will be suitable for evaluating drug efficacy and elucidating the pathological mechanism of pelvic inflammatory disease.

**【Keywords】** non-surgical method; pelvic inflammation; animal model; uterine pathology

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

盆腔炎是一种女性上生殖道感染的炎症性疾病,在各类妇科疾病中,盆腔炎的发病率占 30%~40%<sup>[1]</sup>。病原体或宫腔操作引起急性盆腔炎,若未得到及时治疗,病原体持续感染或出现耐药性,会发展为慢性盆腔炎。慢性盆腔炎病程时间长、感染率高、反复发作,容易引起盆腔粘连、异位妊娠和慢性盆腔痛<sup>[2-3]</sup>,是影响女性生育力的重要疾病。盆腔炎的治疗,西医首选抗生素,但抗生素的长期使用容易出现药物不良反应、二重感染和耐药性,影响治疗效果<sup>[4-5]</sup>。因此,对于慢性盆腔炎的治疗目前主要采取中西医结合的治疗方法<sup>[6-8]</sup>,研制开发更为有效的复方

中药,是提高慢性盆腔炎治愈率的重要途径。

理想的动物模型是盆腔炎病理机制研究和药物药效评价的良好载体。目前盆腔炎动物模型的建立主要是通过腹腔或背部手术法对大鼠进行化学烧伤、菌液感染或异物移植感染等方式引起盆腔炎症发生<sup>[9]</sup>。手术操作复杂、无菌要求严格,对动物伤害较大,死亡率较高<sup>[10]</sup>。采用非手术法将注射针通过阴道和宫颈引入宫腔,进行造模物质的注射,不仅操作流程简化、动物死亡率降低,而且减少了对动物的伤害,将成为制作盆腔炎动物模型的首选方法。本实验以大鼠为实验动物,探索了非手术法在盆腔炎动物模型制

作中的应用,通过对大鼠健康状态观察、组织病理学检查、子宫内膜发育评估、炎症因子水平和巨噬细胞浸润等指标,判断造模成功与否,并在此基础上做出了中成药的药效评价,为该方法的建立和应用奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级雌性 SD 大鼠 35 只,9~12 周龄,体重 190~210 g,购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司[SCXK(吉)2023-0002],饲养于吉林医药学院实验动物中心[SYXK(吉)2022-0003]。动物自由摄食、饮水,动物房环境温度控制在(23±2)℃,相对湿度 50%~60%,最小换气次数每小时 15 次,12 h 光照与 12 h 黑暗交替。本实验经吉林医药学院实验动物伦理委员会审批通过(2023-KJT-023)。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

黄耆树胶粉(上海麦克林生化科技有限公司,批号 G810420);苯酚(天津市致远化学试剂有限公司,批号 XK13-011-00031);大鼠白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 beta, IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(上海源桔生物科技公司,批号 YJ037373、YJ102828、YJ002859);兔源白细胞分化抗原 68(cluster of differentiation 68, CD68)单克隆抗体(爱博泰克,批号 A19014);兔源 Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)、磷酸化核转录因子  $\kappa$ B(phospho-nuclear factor kappa-B, p-NF- $\kappa$ B)和核转录因子  $\kappa$ B(nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)一抗(爱博泰克,批号 A11226、AP1294、A22331);山羊抗兔荧光标记二抗(碧云天,批号 A0206);大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌(北华大学提供,批号 ATCC25922、ATCC25923);中成药金刚藤胶囊(湖北福人药业股份有限公司,批号 Z19991031)。

轮转式切片机、烘片机(德国徕卡显微系统有限公司);全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司);光吸收型单功能酶标仪(美

谷分子仪器有限公司);荧光显微镜(日本奥林帕斯)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 模型制备及给药

将 35 只 SD 雌性大鼠随机分为 7 组:对照组、苯酚 7 d 模型组、苯酚 10 d 模型组、苯酚造模治疗组、低浓度菌液模型组、高浓度菌液模型组和菌液造模治疗组,每组 5 只大鼠。3%戊巴比妥钠腹腔注射 0.3 mL 以麻醉大鼠,利用自制的扩阴器打开阴道口,将管长 80 mm、外径 0.73 mm 的平口针头与 1 mL 注射器连接,从阴道通过宫颈进针,当有一种“落空感”,说明针头已经进入了宫腔,注入造模物质,针头刮擦子宫内膜造成机械损伤,然后慢慢撤回注射针头,将大鼠臀部垫高 10 min,防止造模物质从子宫流出(图 1)。

对照组大鼠宫腔注入 0.1 mL PBS,苯酚 7 d 模型组和苯酚 10 d 模型组大鼠宫腔注入 0.06 mL 的 25%苯酚凝胶,低浓度菌液组和高浓度菌液组大鼠分别宫腔注入浓度每毫升  $2 \times 10^7$  个、每毫升  $2 \times 10^8$  个大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌(1:1 比例)的混合菌液。从造模第 2 天开始,中药治疗组根据临床成人剂量与人鼠体表面积换算,每天每只大鼠灌胃 0.54 g/kg 的金刚藤胶囊,其余组的大鼠灌胃等体积的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS),灌胃 10 d。

#### 1.3.2 收集样本

造模或治疗大鼠 7 d 或 10 d,称量大鼠体重,观察大鼠精神状态、皮毛光泽度、进食和饮水量

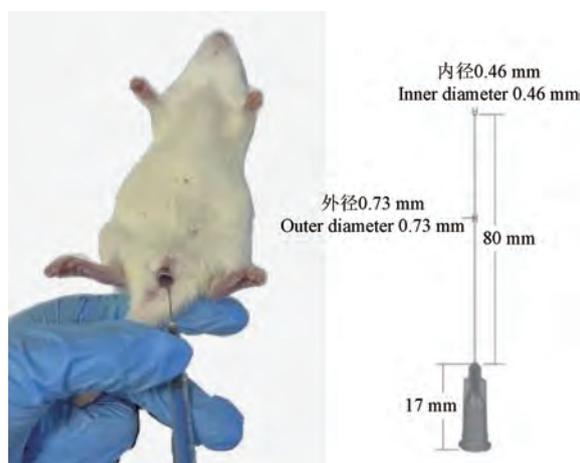


图 1 非手术法宫腔注射

Figure 1 Non-surgical intrauterine injection

情况,以及是否出现弓背、蜷缩等现象。造模或治疗结束后 3%戊巴比妥钠麻醉,心脏取血,4℃过夜,3000 r/min 离心 10 min,收集上层血清,-80℃保存。处死大鼠,剥离其子宫和输卵管周围脂肪,称重,计算大鼠的子宫系数,子宫系数/%=(子宫湿重/g/体重/g)×100%。然后将子宫和输卵管的上半部分在 10%中性福尔马林中固定,下半部分-80℃冷冻保存。

### 1.3.3 苏木精-伊红(HE)染色

子宫和输卵管在 10%中性福尔马林溶液中固定 24 h,经常规脱水、浸蜡、石蜡包埋、切片,进行 HE 染色。光学显微镜下观察记录大鼠子宫和输卵管组织腔壁结构改变、腔上皮细胞增生和炎性细胞浸润等情况,进行病理分级评分(表 1)并求得秩均数。子宫组织病理观察指标及分级标准为:(1)宫腔无扩张、无腔壁结构改变、无内膜细胞增生、无炎性细胞浸润计为正常 0 分,以“/”表示;(2)宫腔扩张 1/3、腔壁结构层次基本完整“+”、腔上皮细胞少量增生“+”、炎性细胞少量浸润散在肌层“+”计为轻度 1 分;(3)宫腔扩张 1/3~2/3、腔壁结构层次模糊不清“++”、腔上皮细胞增生“++”、炎性细胞少数浸润内膜层“++”计为中度 2 分;(4)宫腔扩张 2/3~1、腔壁结构层次混乱“+++”、腔上皮细胞增生“+++”、炎性细胞大量浸润内膜层“+++”计为重度 3 分。测定从子宫内膜肌层到腔上皮的内膜厚度,统计每个大鼠子宫组织在 5 个 200 倍镜视野下内膜中腺体平均数量。

### 1.3.4 ELISA 检测大鼠血清中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量

将获取的各组大鼠血清样本,按照 ELISA 试

剂盒使用说明,检测大鼠血清中炎性因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的含量,重复 3 次。

### 1.3.5 免疫荧光检测 CD68 表达

对大鼠子宫石蜡包埋切片后,进行免疫荧光检测。将组织切片在柠檬酸钠抗原修复液中 92℃~98℃进行抗原修复,5%牛血清蛋白(bovine serum albumin,BSA)37℃孵育 30 min 进行封闭,CD68(1:100 稀释)一抗 4℃过夜,Tris 盐缓冲液洗涤后,荧光标记二抗 37℃避光孵育 1 h,4',6-二脒基-2 苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)染核,抗荧光衰减封片剂,荧光显微镜下观察 CD68 的表达情况。200 倍镜下随机选取每个组织在靠近宫腔处的 5 个视野,利用 Image J V1.8.0 图像分析系统计算 CD68 的平均荧光强度。

### 1.3.6 蛋白质免疫印迹检测子宫组织中 TLR4、NF-κB 和 p-NF-κB 蛋白表达

每组随机选取 3 只大鼠,称取 40~50 mg 子宫组织,利用 RIPA 强裂解液(含 1%苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride,PMSF)裂解子宫组织,提取蛋白。双吡啶甲酸蛋白分析试剂盒(bicinchoninic acid protein assay,BCA)测定蛋白浓度,将等量蛋白在 10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)上进行分离,转聚偏氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜,5%脱脂奶粉封闭。对转膜蛋白进行一抗 TLR4、P65 和 p-P65 和荧光标记二抗孵育,超敏化学发光显色。采用 Image J V1.8.0 图像软件分析 TLR4、P65 和 p-P65 的相对表达水平。

表 1 子宫组织病理分级标准

Table 1 Pathological grading standard of uterine tissue

病理分级 Pathology grading	评分 Score	宫腔扩张 Uterine dilatation	腔壁结构改变 Cavity wall structure changes	腔上皮细胞增生 Hyperplasia of luminal epithelium	炎性细胞浸润 Inflammatory cell infiltration
正常 Normal	0	/	/	/	/
轻度感染 Mild infection	1	0~1/3	+	+	+
中度感染 Moderate infection	2	1/3~2/3	++	++	++
重度感染 Severe infection	3	2/3~1	+++	+++	+++

## 1.4 统计学方法

实验数据以平均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,SPSS 26.0 单因素方差分析(one-way ANOVA)的最小显著差异法(least significant difference, LSD)检验;子宫组织病理评分采用 Wilcoxon 秩和检验。 $P<0.05$ 为具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 大鼠健康状态

对照组大鼠:精神状态活跃、皮毛有光泽、正常进食、饮水。苯酚 7 d 模型组大鼠:精神状态一般,皮毛失去光泽,身体蜷缩,进食、饮水减少。苯酚 10 d 模型组大鼠:精神状态较差,皮毛毛躁、杂乱,身体蜷缩,行动缓慢,畏寒,进食、饮水明显减少。低浓度菌液模型组大鼠:精神状态一般,皮毛无光泽,进食、饮水减少。高浓度菌液模型组大鼠:精神状态较差,皮毛杂乱、失去光泽,身体瘦弱,常弓背、蜷缩、打颤,进食和饮水明显减少。

苯酚或菌液造模治疗组大鼠:精神状态较好,皮毛出现光泽、顺滑,行动正常,进食、饮水明显增多。死亡情况:在造模的 20 只大鼠中,只有 1 只大鼠死亡,死亡率为 5%。经尸体解剖发现,死亡的大鼠主要是由于自身体弱、抵抗力差造成的。

### 2.2 大鼠体重变化

使用苯酚造模,称量各组大鼠的体重,并计算了体重增重,结果如表 2 所示。实验处理 7 d 后,模型组和治疗组大鼠的增重显著低于对照组( $P<0.05$ ),苯酚 10 d 模型组和治疗组大鼠的体重增重显著低于苯酚 7 d 模型组( $P<0.05$ ),苯酚 10 d 模型组和治疗组大鼠的体重增重无显著差异;实验处理 10 d 后,苯酚 10 d 模型组和治疗组大鼠的体重增重显著低于对照组( $P<0.05$ ),苯酚 10 d 模型组和治疗组大鼠的体重增重无显著差异。苯酚造模降低了大鼠的体重增重。

使用混合菌液造模,大鼠体重和体重增重结果如表 3 所示。模型组和治疗组大鼠的 10 d 增

表 2 苯酚造模大鼠体重变化( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 2 Changes of body weight in rats treated with phenol( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别 Groups	平均体重/g Average weight	7 d 体重增重/g Weight gain for 7 d	10 d 体重增重/g Weight gain for 10 d
对照组 Control group	195.66±5.01	12.49±0.90	15.10±0.86
苯酚 7 d 模型组 Model group with phenol for 7 d	195.06±4.26	9.13±4.17*	/
苯酚 10 d 模型组 Model group with phenol for 10 d	199.78±5.12	3.49±4.17**	5.60±5.86*
苯酚造模治疗组 Treatment group modeled with phenol	202.01±4.56	3.64±5.09**	5.27±4.35*

注:与对照组相比, \* $P<0.05$ ;与苯酚 7 d 模型组相比, # $P<0.05$ 。

Note. Compared with control group, \* $P<0.05$ . Compared with model group with phenol for 7 d, # $P<0.05$ .

表 3 菌液造模大鼠体重变化( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 3 Changes of body weight in rats treated with bacteria ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别 Groups	平均体重/g Average weight	10 d 体重增重/g Weight gain for 10 d
对照组 Control group	195.66±5.01	15.10±0.86
低浓度菌液模型组 Model group with low concentration of bacteria	194.16±3.31	7.04±6.51*
高浓度菌液模型组 Model group with high concentration of bacteria	194.94±3.47	1.00±5.53**
菌液造模治疗组 Treatment group modeled with bacteria	107.72±4.57	4.66±3.99* <sup>Δ</sup>

注:与对照组相比, \* $P<0.05$ ;与低浓度菌液模型组相比, # $P<0.05$ ;与高浓度菌液模型组相比, <sup>Δ</sup> $P<0.05$ 。

Note. Compared with control group, \* $P<0.05$ . Compared with model group with low concentration of bacteria, # $P<0.05$ . Compared with model group with high concentration of bacteria, <sup>Δ</sup> $P<0.05$ .

重均显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 高浓度菌液模型组的大鼠体重增重显著低于低浓度菌液模型组 ( $P < 0.05$ ), 而治疗组大鼠的体重增重显著高于高浓度菌液模型组。菌液造模降低了大鼠的体重增重, 治疗后大鼠的体重增重增加。

### 2.3 子宫的外观状态

造模和治疗后, 获取大鼠子宫, 观察子宫外观, 结果如图 2 和图 3 所示。对照组: 子宫形态、大小正常, 无水肿和充血, 与周围组织未见粘连。苯酚 7 d 模型组: 子宫充血红肿, 组织弹性差, 偶见与周围组织粘连。苯酚 10 d 模型组: 子宫发白水肿明显, 变得粗短, 与周围肠管、结缔组织粘连不易分开。苯酚造模治疗组: 子宫充血和水肿程度明显减轻, 少见子宫与周围组织的粘连情况。低浓度菌液模型组: 子宫充血红肿, 子宫组织弹性差, 与周围组织未见粘连。高浓度菌液模型组: 子宫发白水肿明显, 变得粗短, 与周围肠管、结缔组织粘连不易分开。菌液造模治疗组: 子宫形态正常, 颜色发红、未见肿胀, 与周围组织未见粘连。

### 2.4 子宫系数

各组大鼠的子宫系数如图 4 所示。与对照组

相比, 苯酚模型组和菌液模型组大鼠子宫系数均显著增高, 子宫发生了明显水肿, 且苯酚 10 d 模型组和高浓度菌液模型组的子宫系数分别高于苯酚 7 d 模型组和低浓度菌液模型组, 子宫水肿的程度加大; 但经中药治疗后, 这 2 种方式造模的大鼠子宫系数均显著降低, 中药明显缓解了大鼠子宫的水肿程度。

### 2.5 子宫和输卵管的病理变化

#### 2.5.1 子宫和输卵管的组织结构

通过子宫和输卵管组织的 HE 染色, 观察其病理改变, 结果如图 5 和图 6 所示。对照组大鼠: 子宫和输卵管组织结构层次清晰, 单层柱状腔上皮细胞, 组织中未发现有炎性细胞浸润的情况。苯酚 7 d 模型组: 子宫壁组织结构层次基本清晰, 腔上皮增生不明显, 炎性细胞从肌层浸润到子宫内膜一半的位置; 输卵管黏膜基本正常, 少量炎性细胞浸润到浆膜层, 属于轻度炎症。苯酚 10 d 模型组: 子宫壁结构层次不清、排列紊乱, 子宫内腔腔上皮增生为多层, 内膜全层可见炎性细胞浸润; 输卵管黏膜层结构破坏, 浆膜层和肌层出现大量炎性细胞浸润, 病情蔓延到重度炎症。苯酚

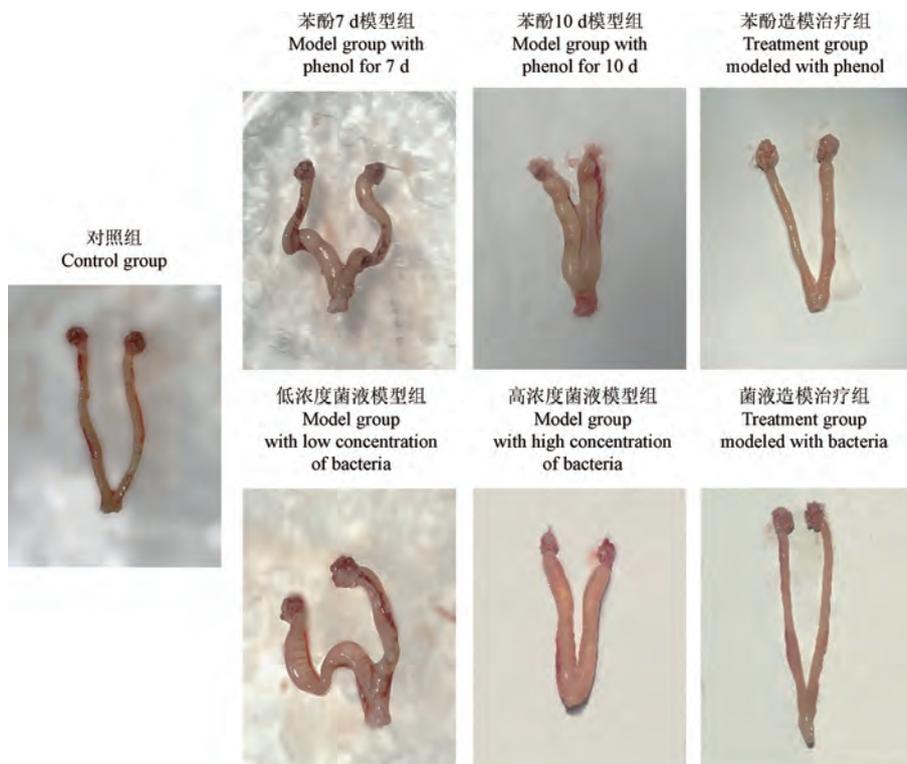
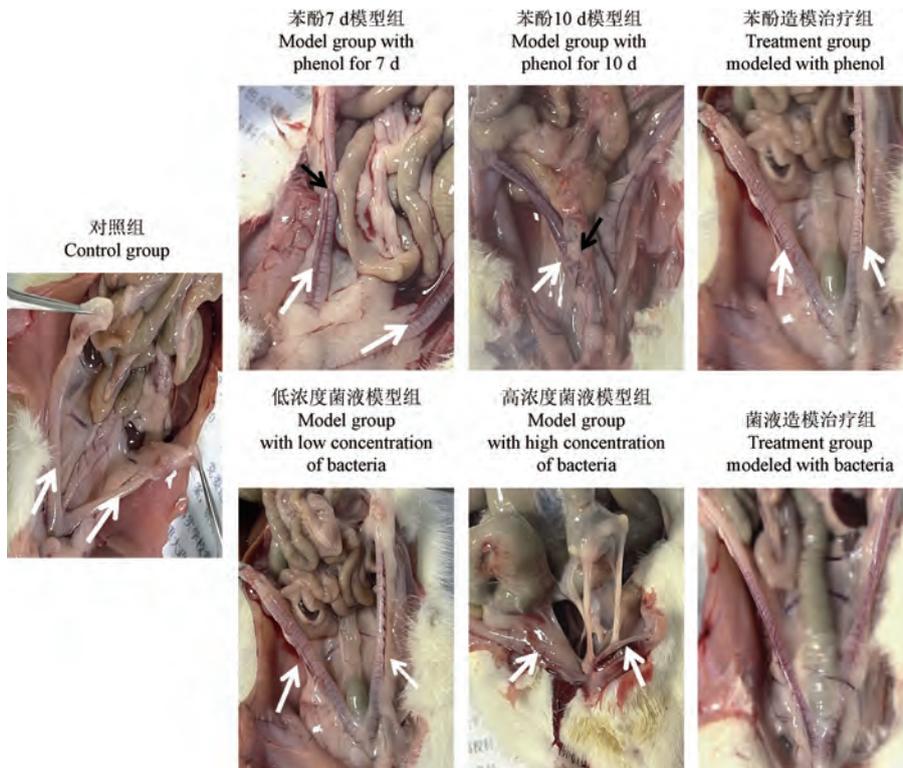


图 2 各组大鼠子宫

Figure 2 Uterus of rats in each group

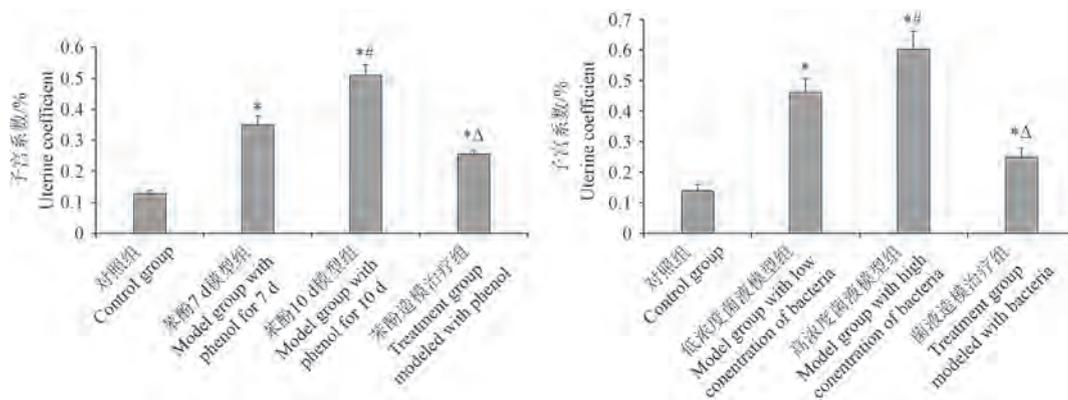


注:白色箭头:子宫;黑色箭头:组织粘连。

图 3 大鼠解剖结构

Note. White arrows, Uterus. Black arrows, Tissue adhesion.

Figure 3 Rat anatomical structure



注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ ;与苯酚 7 d 模型组和低浓度菌液模型组相比, #  $P < 0.05$ ;与苯酚 10 d 模型组和高浓度菌液模型组相比,  $\Delta P < 0.05$ 。

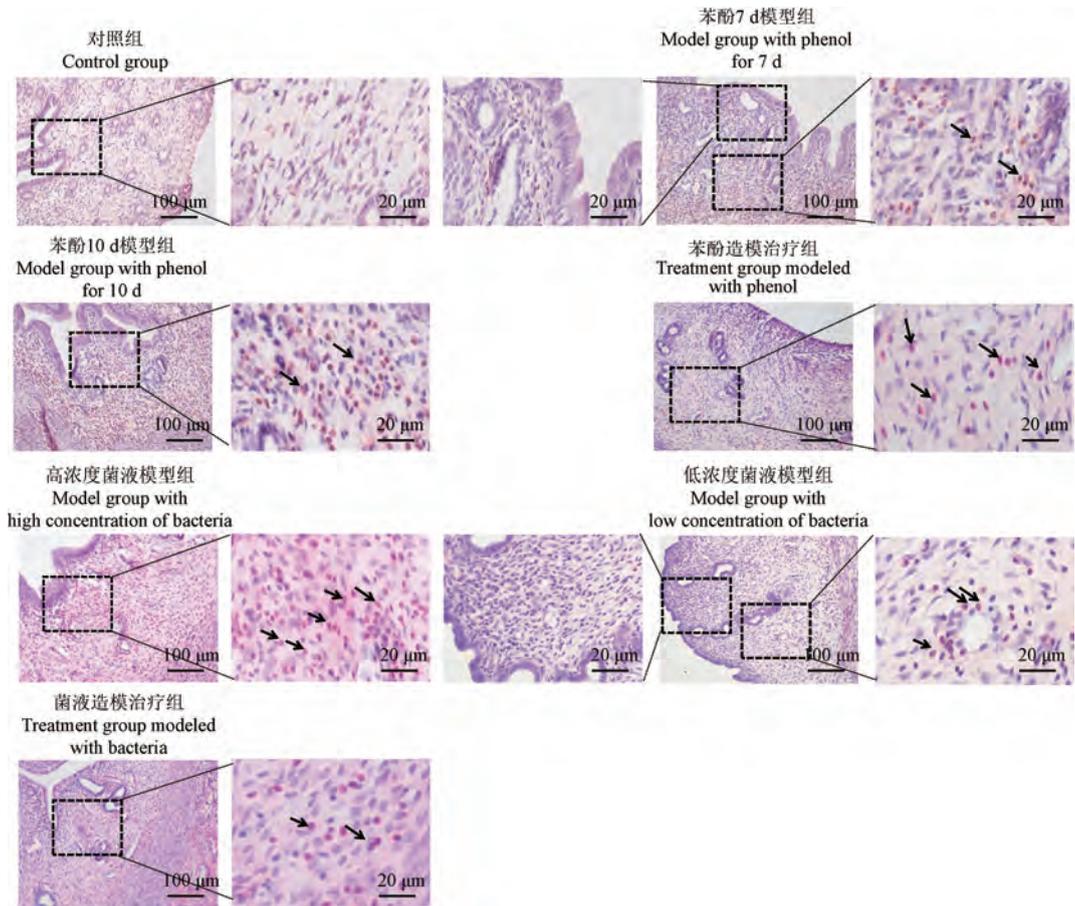
图 4 各组大鼠子宫系数

Note. Compared with control group, \*  $P < 0.05$ . Compared with model group treated with phenol for 7 d or with low concentration of bacteria, #  $P < 0.05$ . Compared with model group treated with phenol for 10 d or with high concentration of bacteria,  $\Delta P < 0.05$ .

Figure 4 Uterine coefficient of rats in each group

造模治疗组:子宫内膜炎性细胞减少,结构较清晰,腔上皮细胞排列整齐;输卵管浆膜层偶见炎性细胞浸润。低浓度菌液模型组:子宫内膜结构紊乱,腔上皮出现增生,炎性细胞浸润约一半子

宫内膜;输卵管结构基本完整,浆膜层和肌层有少量炎性细胞,属于轻度炎症。高浓度菌液模型组:子宫腔上皮的完整性被破坏,增生较为严重,整个子宫内膜出现大量炎性细胞浸润,腺体形态



注:黑色箭头:炎性细胞浸润。

图5 大鼠子宫组织

Note. Black arrows, Inflammatory cell infiltration.

Figure 5 Rat uterine tissues

不规则,腺腔边缘模糊;输卵管管腔变大,浆膜层和肌层大量炎性细胞浸润,属于重度炎症。

菌液造模治疗组:子宫结构正常,腔上皮排列整齐、平滑,子宫内膜中炎性细胞数量明显减少;输卵管组织结构正常,黏膜上皮完整,浆膜层和肌层的炎性细胞浸润明显减少。

### 2.5.2 子宫组织病理评分

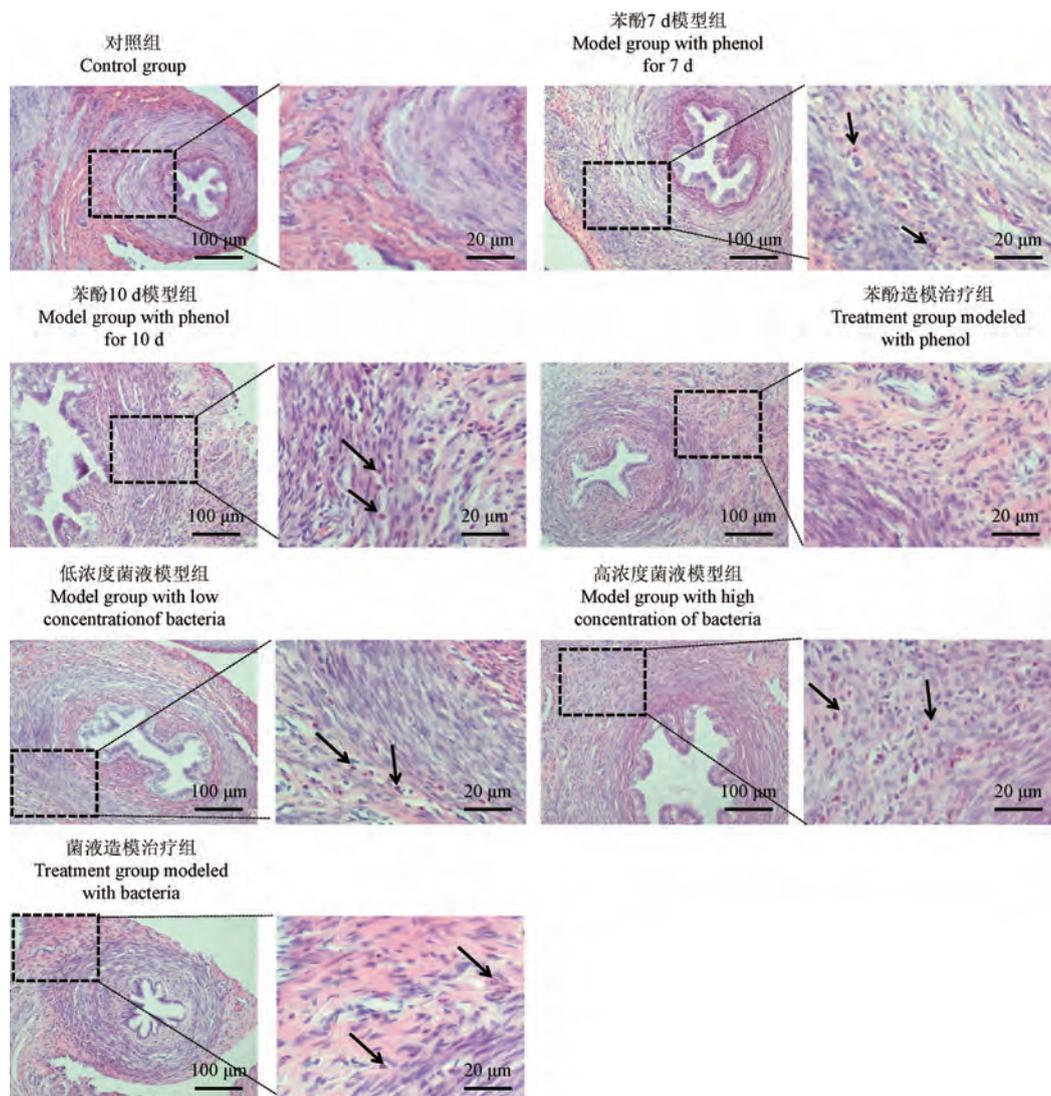
根据子宫组织病理分级标准和子宫组织病理结构(表1),将子宫病变程度进行评分,并比较各组的秩均数,如表4和表5所示。苯酚10 d模型组和高浓度菌液模型组的秩均数显著高于对照组、苯酚7 d模型组和低浓度菌液模型组( $P < 0.05$ );而中药治疗后,子宫组织的秩均数较模型组显著减小( $P < 0.05$ )。苯酚10 d模型组和高浓度菌液模型组大鼠子宫组织的病理改变较为严重,而中药治疗后,其病理状况明显好转。

### 2.6 大鼠子宫内膜厚度

各组大鼠子宫内膜的厚度如图7所示。与对照组相比,各模型组大鼠子宫内膜厚度显著变薄( $P < 0.05$ ),且苯酚10 d模型组和高浓度菌液模型组大鼠子宫内膜厚度显著薄于苯酚7 d模型组和低浓度菌液模型组( $P < 0.05$ ),经过中药治疗后,大鼠子宫内膜的厚度较苯酚10 d模型组或高浓度菌液模型组显著增厚( $P < 0.05$ )。

### 2.7 大鼠子宫内膜腺体数量

观察大鼠子宫组织腺体,统计200倍镜视野下每只大鼠5个随机区域子宫内膜中腺体的平均数量,结果如图8和图9所示。与对照组相比,各模型组大鼠子宫内膜腺体数量显著减少( $P < 0.05$ ),且苯酚10 d模型组和高浓度菌液模型组大鼠子宫内膜腺体数量显著少于苯酚7 d模型组和低浓度菌液模型组( $P < 0.05$ ),经过中药治疗后,大鼠子宫内膜的腺体数量显著增加( $P < 0.05$ )。



注:黑色箭头:炎性细胞浸润。

图 6 大鼠输卵管组织

Note. Black arrows, Inflammatory cell infiltration.

Figure 6 Rat oviduct tissues

表 4 苯酚造模大鼠子宫组织病理评分

Table 4 Histopathologic score of rats uterus modeled with phenol

组别 Groups	大鼠数量 Number of rats	病理评分 Histopathologic score				秩均数 Rank mean
		0	1	2	3	
对照组 Control group	5	4	1	0	0	4.7
苯酚 7 d 模型组 Model group with phenol for 7 d	5	0	2	3	0	12.5
苯酚 10 d 模型组 Model group with phenol for 10 d	5	0	0	1	4	17.7*
苯酚造模治疗组 Treatment group modeled with phenol	5	2	3	0	0	7.1 <sup>Δ</sup>

注:与对照组相比, \* $P < 0.05$ ; 与苯酚 10 d 模型组相比,  $\Delta P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, \* $P < 0.05$ . Compared with model group treated with phenol for 10 d,  $\Delta P < 0.05$ .

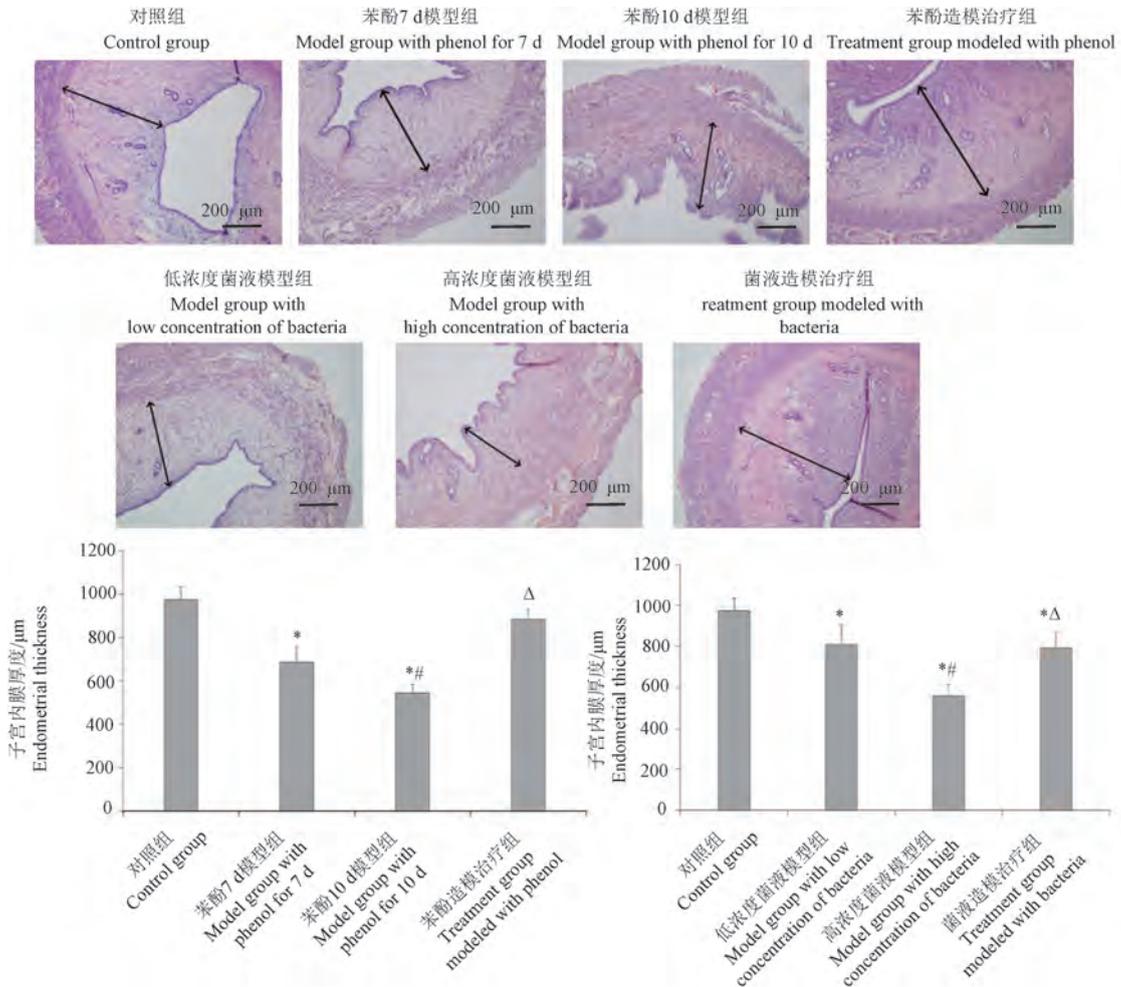
表 5 菌液造模大鼠子宫组织病理评分

Table 5 Histopathologic score of rats uterus modeled with bacteria

组别 Groups	大鼠数量 Number of rats	病理评分 Histopathologic score				秩均数 Rank mean
		0	1	2	3	
对照组 Control group	5	4	1	0	0	6.5
低浓度菌液模型组 Model group with low concentration of bacteria	5	0	2	3	0	9.5
高浓度菌液模型组 Model group with high concentration of bacteria	5	0	0	1	4	18.0*
菌液造模治疗组 Treatment group modeled with bacteria	5	2	3	0	0	8.0 <sup>Δ</sup>

注:与对照组相比, \* $P < 0.05$ ;与高浓度菌液模型组相比, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, \* $P < 0.05$ . Compared with model group with high concentration of bacteria, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ .

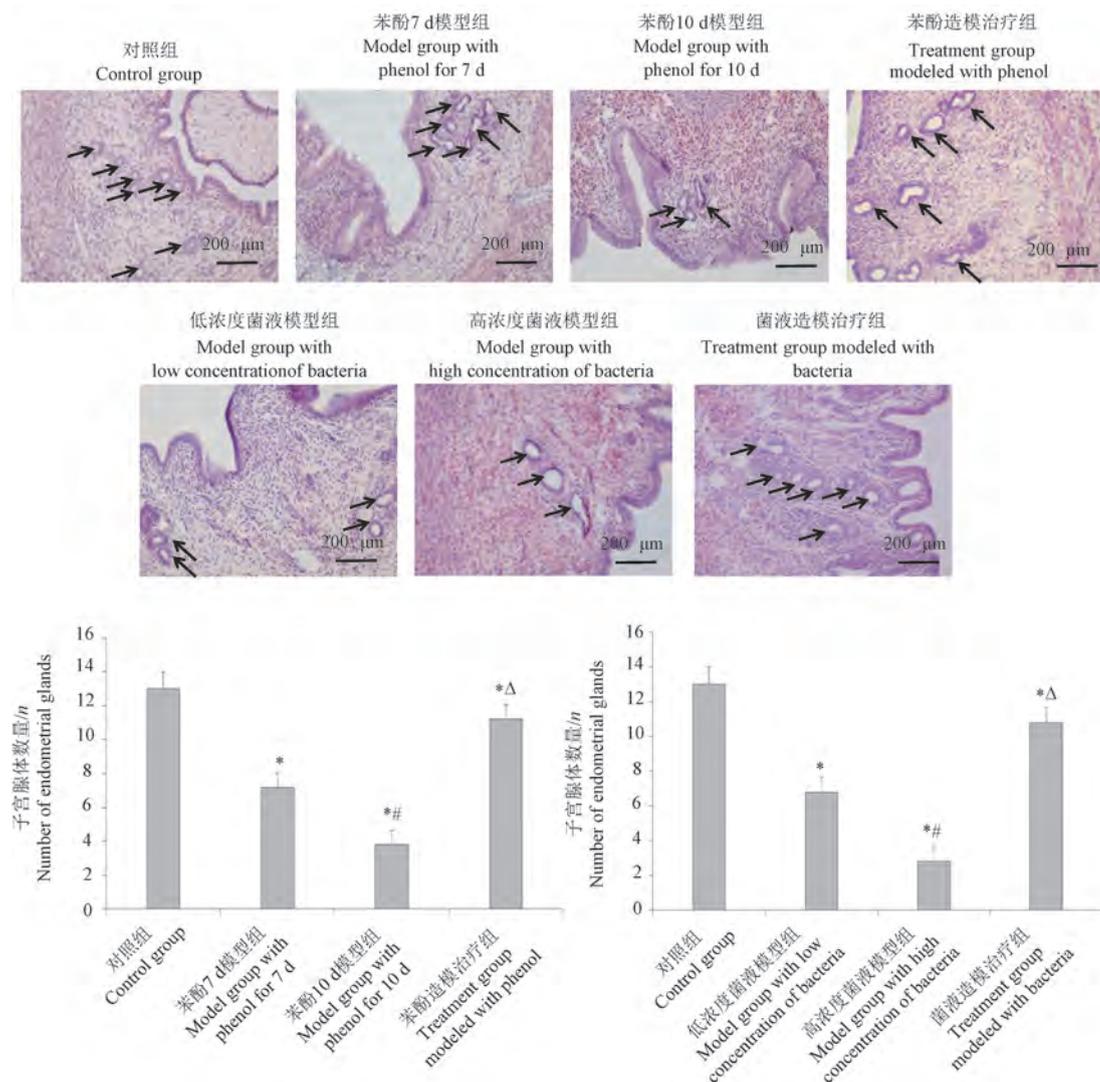


注:双箭头线段:子宫内膜厚度。与对照组相比, \* $P < 0.05$ ;与苯酚7 d模型组和低浓度菌液模型组相比, # $P < 0.05$ ;与苯酚10 d模型组和高浓度菌液模型组相比, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ 。

图 7 子宫内膜厚度

Note. Double arrow lines, Endometrial thickness. Compared with control group, \* $P < 0.05$ . Compared with model group with phenol for 7 d or with low concentration of bacteria, # $P < 0.05$ . Compared with model group with phenol for 10 d or with high concentration of bacteria, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ .

Figure 7 Endometrial thickness



注:黑色箭头:子宫腺体。对照组相比, \* $P < 0.05$ ; 与苯酚 7 d 模型组和低浓度菌液模型组相比, # $P < 0.05$ ; 与苯酚 10 d 模型组和高浓度菌液模型组相比,  $\Delta P < 0.05$ 。

图 8 大鼠子宫腺体

Note. Black arrows, uterine glands. Compared with control group, \* $P < 0.05$ . Compared with model group treated with phenol for 7 d or with low concentration of bacteria, # $P < 0.05$ . Compared with model group treated with phenol for 10 d or with high concentration of bacteria,  $\Delta P < 0.05$ .

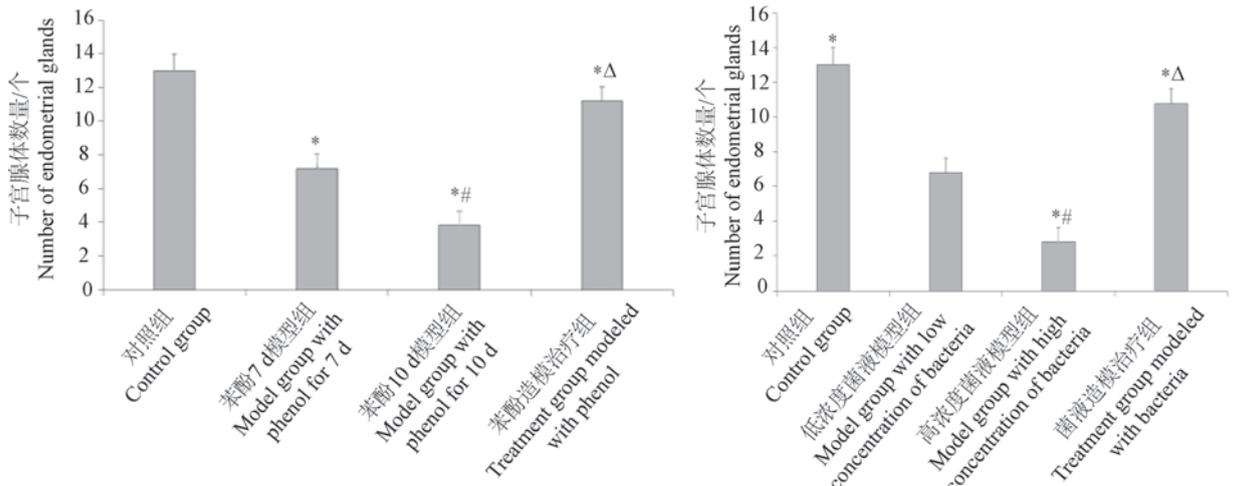
Figure 8 Rat uterine glands

### 2.8 大鼠血清中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ 含量

大鼠血清中炎症因子的表达如图 10 所示, 与对照组相比, 各模型组大鼠血清中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 且苯酚 10 d 模型组、低浓度菌液模型组和高浓度菌液模型组大鼠血清中 IL-6 的水平也升高 ( $P < 0.05$ ), 苯酚 7 d 模型组大鼠血清中 IL-6 的水平与对照组无显著差异。与模型组的大鼠比较, 中药治疗后大鼠血清中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量降低 ( $P < 0.05$ )。

### 2.9 大鼠子宫组织中巨噬细胞分布

CD68 是巨噬细胞的表面标志物, 免疫荧光检测子宫组织中 CD68 表达, 可以反映巨噬细胞的分布, 结果如图 11 所示。各模型组大鼠子宫组织中 CD68 的平均荧光强度均显著升高 ( $P < 0.05$ ), 且苯酚 10 d 模型组和高浓度菌液模型组大鼠子宫组织中 CD68 的平均荧光强度显著高于苯酚 7 d 模型组和低浓度菌液模型组, 经过中药治疗后, 大鼠子宫组织中 CD68 的平均荧光强度显著降低 ( $P < 0.05$ )。

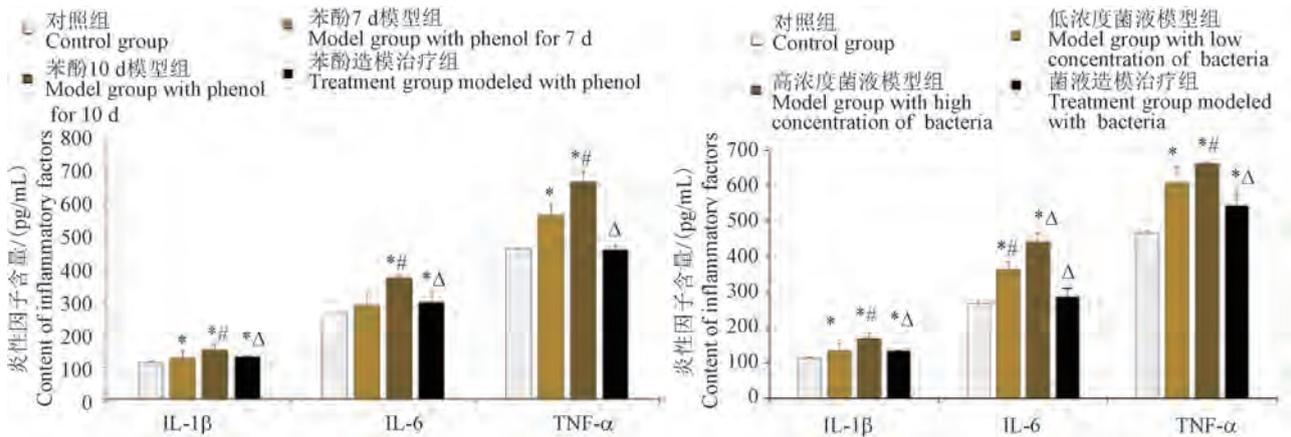


注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ ;与苯酚 7 d 模型组和低浓度菌液模型组相比, #  $P < 0.05$ ;与苯酚 10 d 模型组和高浓度菌液模型组相比, Δ  $P < 0.05$ 。

图 9 子宫内膜腺体数量

Note. Compared with control group, \*  $P < 0.05$ . Compared with model group treated with phenol for 7 d or with low concentration of bacteria, #  $P < 0.05$ . Compared with model group treated with phenol for 10 d or with high concentration of bacteria, Δ  $P < 0.05$ .

Figure 9 Number of endometrial glands



注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ ;与苯酚 7 d 模型组和低浓度菌液模型组相比, #  $P < 0.05$ ;与苯酚 10 d 模型组和高浓度菌液模型组相比, Δ  $P < 0.05$ 。

图 10 子宫组织中炎症因子表达

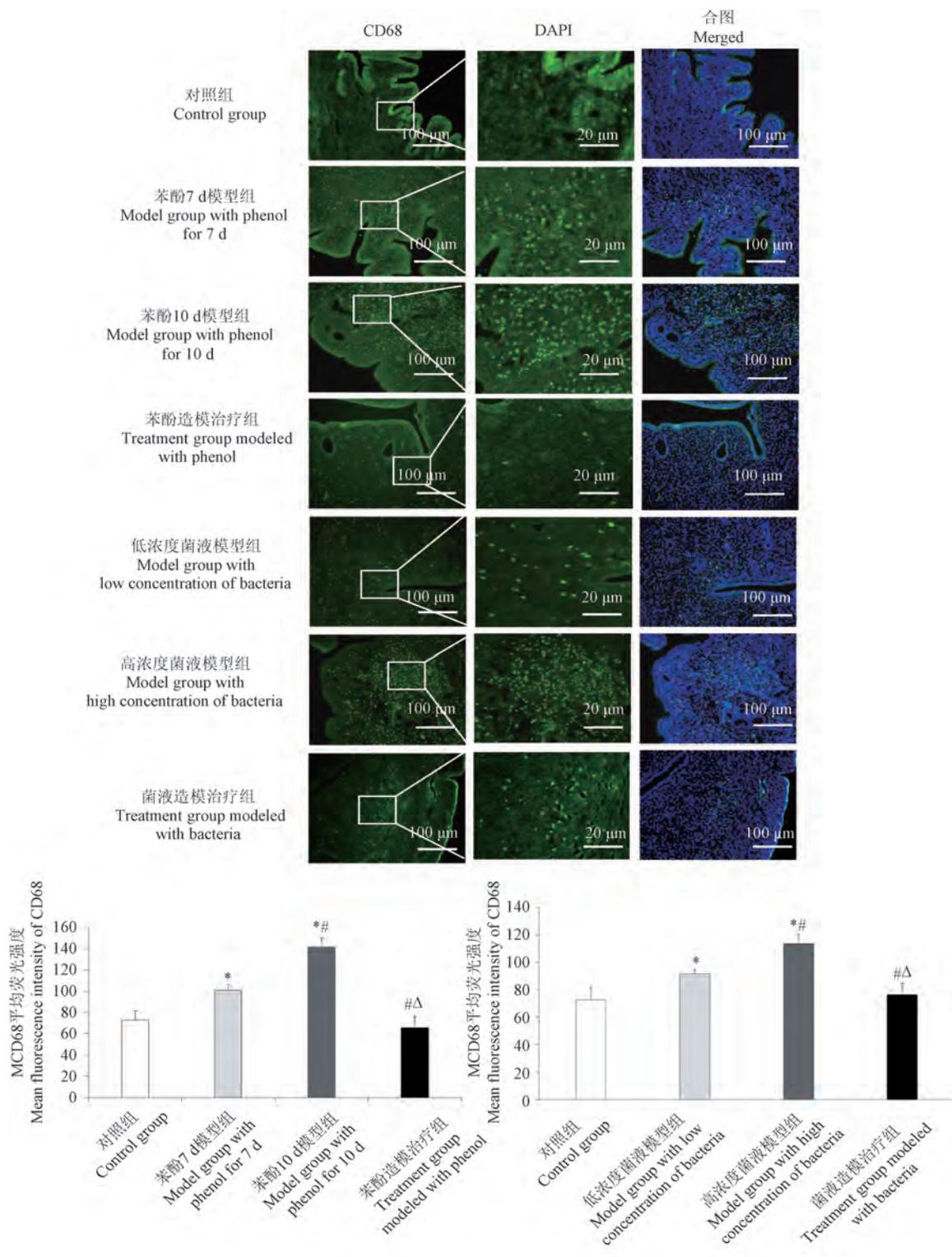
Note. Compared with control group, \*  $P < 0.05$ . Compared with model group treated with phenol for 7 d or with low concentration of bacteria, #  $P < 0.05$ . Compared with model group treated with phenol for 10 d or with high concentration of bacteria, Δ  $P < 0.05$ .

Figure 10 Expression of inflammatory factors in uterine tissue

## 2.10 子宫组织中 TLR4/NF-κB 信号通路蛋白表达

Western blot 检测了子宫组织中 TLR4、p-NF-κB 和 NF-κB 的表达,并计算了 p-NF-κB/NF-κB 的比值,结果如图 12 所示。各模型组中,TLR4、p-NF-κB 和 p-NF-κB/NF-κB 的比值显著高于对照

组 ( $P < 0.05$ ),且苯酚 10 d 模型组和高浓度菌液模型组大鼠子宫组织中 TLR4、p-NF-κB 和 p-NF-κB/NF-κB 的比值显著高于苯酚 7 d 模型组和低浓度菌液模型组 ( $P < 0.05$ ),但 NF-κB 的表达在各组间无显著差异。造模的大鼠经中药治疗后,大鼠子宫组织中 TLR4、p-NF-κB 和 p-NF-κB/NF-



注:与对照组相比, \* $P < 0.05$ ;与苯酚 7 d 模型组和低浓度菌液模型组相比, # $P < 0.05$ ;与苯酚 10 d 模型组和高浓度菌液模型组相比,  $\Delta P < 0.05$ 。

图 11 子宫组织中 CD68 表达

Note. Compared with control group, \* $P < 0.05$ . Compared with model group treated with phenol for 7 d or with low concentration of bacteria, # $P < 0.05$ . Compared with model group treated with phenol for 10 d or with high concentration of bacteria,  $\Delta P < 0.05$ .

Figure 11 Expression of CD68 in uterine tissue

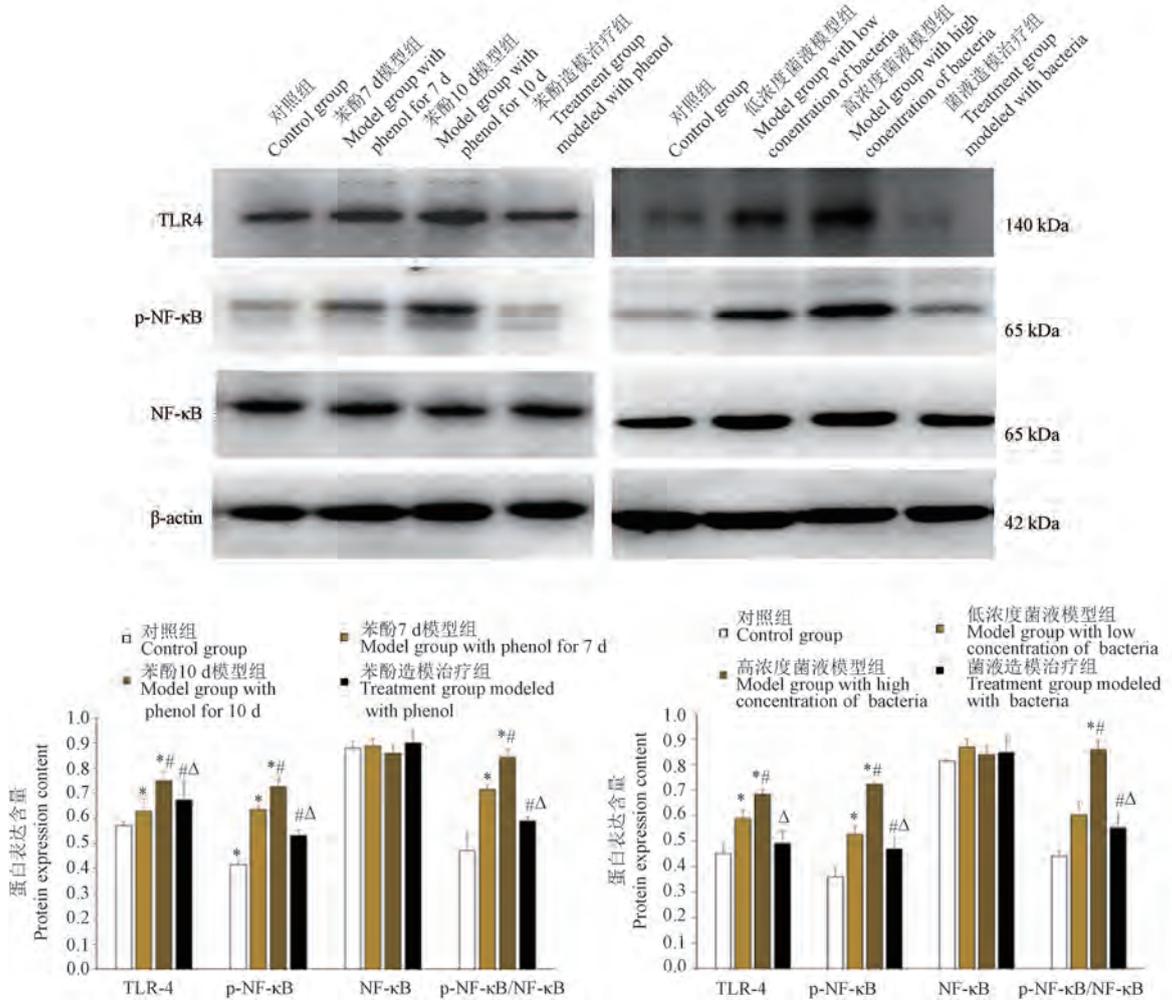


图 12 子宫组织中 TLR4/NF-κB 信号通路蛋白表达

Note. Compared with control group, \* $P < 0.05$ . Compared with model group treated with phenol for 7 d or with low concentration of bacteria, # $P < 0.05$ . Compared with model group treated with phenol for 10 d or with high concentration of bacteria,  $\Delta P < 0.05$ .

Figure 12 TLR4/NF-κB signaling pathway protein expression in uterine tissue

κB 的比值显著降低 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

盆腔炎是导致育龄期女性不育的主要原因,长期的持续感染会引发输卵管炎、异位妊娠和卵巢癌等疾病发生<sup>[11-15]</sup>。快速、有效地消除盆腔的炎症,将会避免盆腔炎后遗症的这些严重问题。制作稳定、可靠的盆腔炎动物模型,是研发治疗盆腔炎、阐明其发病和治疗机制的重要载体工具。目前盆腔炎的动物模型制备,大多采用手术法<sup>[16]</sup>,即将大鼠麻醉后,打开腹腔,找到双侧子宫位置,用注射器分别在子宫“Y”形分叉处向卵巢

方向注入造模物质,再将注射器反复抽拉 3 次造成机械损伤,分层关闭缝合腹腔。手术法对大鼠的创伤较为严重,术后出现大鼠双目无神、精神状态较差、易激惹、躁动不安、毛发枯燥、粪便溏稀、毛发脱落等现象,和由于操作不当大鼠感染等,造模后的死亡率较高<sup>[17]</sup>。手术法制作的大鼠盆腔炎模型符合盆腔炎的病理特点,但目前盆腔炎主要的发病原因是免疫功能下降或免疫系统损伤、邻近器官炎症蔓延、沙眼衣原体的上行感染或下生殖道炎症的上行感染引起,手术法采用的“腹壁-宫壁-宫腔-输卵管”的植菌方式不符合盆腔炎实际的发病过程。因此我们采用非手术

法通过“阴道-宫颈”的路径制作符合盆腔炎感染途径的动物模型,既保证符合病理特征又可降低动物死亡率。

目前非手术法建立大鼠盆腔炎模型,主要采用的是解脲支原体感染<sup>[18-19]</sup>或单一大肠杆菌感染<sup>[20-21]</sup>,通过“阴道-宫颈”途径频繁注入感染液。解脲支原体感染时,通过注射苯甲酸雌二醇降低免疫力以提高易感性,但注射外源性雌二醇药物具有一定的争议。盆腔炎主要的病理基础为炎性病变<sup>[22]</sup>,每个患者体内炎性物质、致病菌群具有多样性,主要的致病菌为大肠杆菌、乙型溶血性链球菌或金黄色葡萄球菌等,多见混合感染。单一的菌群感染并不能很好地模拟盆腔炎的发病起因,因此我们采用了混合菌群感染。现有的菌群感染方法要进行多次植菌,14 d 后才能造模成功<sup>[18,20]</sup>,在本实验中,我们只进行单次混合菌液注射,在注射时通过刮擦子宫内膜造成子宫机械损伤,提高了大鼠子宫组织易感性,感染 10 d 后造模成功,不仅缩短了造模时间,而且避免频繁植入造模物质对大鼠造成的应激和损伤<sup>[23-24]</sup>。我们改良了非手术法制作大鼠盆腔炎模型,减轻了动物痛苦,显著降低了动物死亡率,造模成功率高,符合临床盆腔炎的发病原因和病理特点(子宫和输卵管感染,出现大量炎性细胞浸润,组织结构被破坏等),遵循了实验动物保护的 3R(reducing、reusing、recycling)原则<sup>[25]</sup>,尽可能地减少了动物的痛苦和不适。

本实验采用苯酚凝胶或混合菌液制作盆腔炎大鼠模型。注射苯酚凝胶主要是模拟临床宫腔手术过程中凝血烧伤引起的炎症,注射混合菌液是模拟盆腔细菌性感染引起的炎症,可以根据不同的病症选择适宜的造模方法<sup>[26-27]</sup>。本研究利用非手术法将 25% 苯酚凝胶、 $2 \times 10^7$  或  $2 \times 10^8$  个大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的混合菌液注入宫腔,根据子宫和输卵管的炎症发生情况,苯酚凝胶法造模 7 d 可建立轻度盆腔炎模型,苯酚凝胶法造模 10 d 可建立重度盆腔炎模型, $2 \times 10^7$  个大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的混合菌液造模 10 d 可建立轻度感染盆腔炎模型, $2 \times 10^8$  个大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的混合菌液造模 10 d 可建立重度感染盆腔炎模型。该模型包括了不同途径引起的不同程度的炎症,可以更

好地模拟临床上不同原因导致的不同程度的盆腔感染。

本研究采用非手术法利用苯酚凝胶和混合菌液制备的大鼠盆腔炎模型,大鼠的子宫出现红肿,子宫系数增加,盆腔出现粘连,子宫和输卵管发生病理改变,炎性细胞浸润,炎性因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达水平显著升高,大鼠的子宫内膜变薄,腺体数量明显减少,这些均是临床子宫内膜炎的重要特征。巨噬细胞在炎症反应中承担着重要角色<sup>[28]</sup>。炎症产生后,在炎症部位会不断产生吸引单核细胞的趋化因子,将血液循环中的单核细胞不断地吸引到炎症部位,成为巨噬细胞,炎症部位出现巨噬细胞浸润现象。巨噬细胞可通过吞噬、释放炎症因子等作用清除外源微生物,同时在细胞因子的作用下,巨噬细胞会发生极化,产生具有不同功能的表型,以增强应对微环境变化的能力,对防御病原体、消除炎症、修复受损组织和维持体内平衡的稳定具有十分重要的作用<sup>[29]</sup>。本实验模型组大鼠的子宫内膜中出现了大量巨噬细胞浸润,而经中药治疗后,子宫内膜中的巨噬细胞显著减少,该动物模型的建立也很好地模拟了炎症发生时的巨噬细胞浸润情况。且发现模型组大鼠子宫组织中的 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路被激活,磷酸化的 NF- $\kappa$ B 入核后,促进了炎症因子基因的表达,使得 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达水平升高。为验证盆腔炎模型的治疗效果,我们采用临床上治疗盆腔炎的常用中成药-金刚藤胶囊对盆腔炎模型的大鼠进行治疗<sup>[30-32]</sup>,发现子宫红肿明显缓解,子宫和输卵管的炎症逐渐消减,且减少了盆腔粘连,也抑制了 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的激活,对制备的盆腔炎大鼠具有显著的治疗作用,符合临床的治疗过程。非手术法建立的盆腔炎模型为研制开发新的治疗盆腔炎的药物和探究盆腔炎的发病机制和治疗机理提供了有力保障,有望进行推广应用。

#### 参考文献:

- [1] 乔雅琴,任丽娟,吕尤. 妇女慢性宫颈炎盆腔炎的相关危险因素及发病率临床研究[J]. 实用妇科内分泌电子杂志, 2020, 7(14): 36-37.

QIAO Y Q, REN L J, LU Y. A clinical study on the risk factors associated with chronic cervicitis and pelvic

- inflammatory disease and their incidence in women [J]. *Electronic J Practical Gynecological Endocrinology*, 2020, 7(14): 36-37.
- [ 2 ] DARVILLE T. Pelvic inflammatory disease due to *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis*: immune evasion mechanisms and pathogenic disease pathways [J]. *J Infect Dis*, 2021, 224(12 Suppl 2): S39-S46.
- [ 3 ] RAVEL J, MORENO I, SIMÓN C. Bacterial vaginosis and its association with infertility, endometritis, and pelvic inflammatory disease [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2021, 224(3): 251-257.
- [ 4 ] SAVARIS R F, FUHRICH D G, MAISSIAT J, et al. Antibiotic therapy for pelvic inflammatory disease [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2020, 8(8): CD010285.
- [ 5 ] 吴丹, 陈晨, 刘树民, 等. 从“正虚邪恋”理论探讨盆腔炎性疾病后遗症的发病特点 [J]. *中国医药导报*, 2019, 16(34): 138-140, 148.
- WU D, CHEN C, LIU S M, et al. Discussion on characteristics of sequelae of pelvic inflammatory disease from the theory of “deficient vital qi leading to lingering of pathogen” [J]. *China Med Her*, 2019, 16(34): 138-140, 148.
- [ 6 ] 芦金玲, 姚升郊. 保妇康栓联合氟罗沙星治疗慢性盆腔炎的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2024, 39(6): 1539-1543.
- LU J L, YAO S J. Clinical study on Baofukang Suppository combined with fleroxacin in treatment of chronic pelvic inflammatory disease [J]. *Drugs Clin*, 2024, 39(6): 1539-1543.
- [ 7 ] 孙倩. 康妇消炎栓联合抗生素治疗慢性盆腔炎的疗效及对炎症因子和血液流变学的影响 [J]. *临床合理用药*, 2024, 17(13): 21-24.
- SUN Q. Effect of Kangfu Xiaoyan suppository combined with antibiotics in the treatment of chronic pelvic inflammatory disease and its effect on inflammatory factors and blood rheology [J]. *Chin J Clin Ration Drug Use*, 2024, 17(13): 21-24.
- [ 8 ] ZHOU Q Y. Effects of thunder-fire moxibustion combined with conventional Western medicine in treatment of patients with chronic pelvic inflammatory disease with qi stagnation and blood stasis syndrome [J]. *Med J Chin People's Health*, 2024, 36(8): 106-108.
- [ 9 ] 王玉超, 张兵, 潘静, 等. 基于数据挖掘的盆腔炎性疾病后遗症动物模型分析 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(7): 913-922.
- WANG Y C, ZHANG B, PAN J, et al. Analysis of animal models of sequelae of pelvic inflammatory disease based on data mining [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(7): 913-922.
- [ 10 ] 叶涛, 刘娅. 甲连盆腔胶囊对慢性盆腔炎性疾病大鼠血液流变学与病理形态学的影响 [J]. *右江民族医学院学报*, 2022, 44(4): 515-518.
- YE T, LIU Y. Effects of Jialian Penqiang Capsule on hemorheological and pathomorphological indices in rats with chronic pelvic inflammatory disease [J]. *J Youjiang Med Univ Natl*, 2022, 44(4): 515-518.
- [ 11 ] HUNT S, VOLLENHOVEN B. Pelvic inflammatory disease and infertility [J]. *Aust J Gen Pract*, 2023, 52(4): 215-218.
- [ 12 ] TAIRA T, BROUSSARD N, BUGG C. Pelvic inflammatory disease: diagnosis and treatment in the emergency department [J]. *Emerg Med Pract*, 2022, 24(12): 1-24.
- [ 13 ] SHROFF S. Infectious vaginitis, cervicitis, and pelvic inflammatory disease [J]. *Med Clin North Am*, 2023, 107(2): 299-315.
- [ 14 ] FROCK-WELNAK D N, TAM J. Identification and treatment of acute pelvic inflammatory disease and associated sequelae [J]. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2022, 49(3): 551-579.
- [ 15 ] JONSSON S, JONSSON H, LUNDIN E, et al. Pelvic inflammatory disease and risk of epithelial ovarian cancer: a national population-based case-control study in Sweden [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2024, 230(1): 75.
- [ 16 ] 胡伊蕾, 俞赟丰, 周曼丽, 等. 基于中西医盆腔炎性疾病后遗症临床病证特点的动物模型分析 [J]. *中药药理与临床*, 2024, 40(6): 93-98.
- HU Y L, YU Y F, ZHOU M L, et al. Animal model analysis based on clinical disease-syndrome characteristics of sequelae of pelvic inflammatory disease in traditional Chinese and western medicine [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2024, 40(6): 93-98.
- [ 17 ] 木则帕尔·太来提, 阿尼克孜·阿不都艾尼, 赛米热·艾斯拉. 当归芍药散对慢性盆腔炎模型大鼠免疫状态及 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响 [J]. *中国计划生育学杂志*, 2022, 30(3): 505-508.
- MUZEPAL TELETI, ANANIZ ABDUENI, SEMIGE LSLA. Effects of Danggui shaoyao san on immune status and NF- $\kappa$ B signal pathway of model rats with chronic pelvic inflammatory disease [J]. *Chin J Family Planning*, 2022, 30(3): 505-508.
- [ 18 ] 刘弘, 赵红, 苑贺英, 等. 解脲支原体血清 8 型感染小鼠盆腔炎炎症性疾病模型的建立 [J]. *中日友好医院学报*, 2011, 25(2): 98-100.
- LIU H, ZHAO H, YUAN H Y, et al. Mice model of pelvic inflammatory disease inoculated by ureaplasma urealyticum [J]. *J China Jpn Friendsh Hosp*, 2011, 25(2): 98-100.
- [ 19 ] 刘文娥, 张婉妮, 周意, 等. 解脲支原体感染动物模型优化方案研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(12): 38

- 44.
- LIU W E, ZHANG W N, ZHOU Y, et al. Optimization of animal models of *Ureaplasma urealyticum* infection [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(12): 38-44.
- [20] 吕姝菡. 盆腔炎性疾病后遗症大鼠非手术模型制备及证候属性评价方法研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2018.
- LYU S H. Study on the preparation of non-surgical model of rats with sequelae of pelvic inflammatory disease and the evaluation method of syndrome attributes [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2018.
- [21] 唐伟琼, 杨日普, 翟桂悦, 等. 盆腔炎动物模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(5): 305-307.
- TANG W Q, YANG R P, ZHAI G Y, et al. Establishment of an animal model of pelvic inflammation [J]. Chin J Comp Med, 2005, 15(5): 305-307.
- [22] 覃倩, 张曼, 尤剑鹏, 等. 水莲风亏方治疗盆腔炎性疾病后遗症 [J]. 吉林中医药, 2020, 40(2): 209-211, 215.
- QIN Q, ZHANG M, YOU J P, et al. Treatment of sequelae of pelvic inflammatory disease with Shuilianfengkuai recipe [J]. Jilin J Chin Med, 2020, 40(2): 209-211, 215.
- [23] 黄敬文. 朱璉抑制 II 型针法对 SPID 模型大鼠 VEGF、MMP-2 蛋白表达的影响 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2023.
- HUANG J W. Effect of Zhu Lian's inhibition of type II acupuncture on the expression of VEGF and MMP-2 protein in SPID model rats [D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2023.
- [24] 覃倩. 瑶医水莲风亏方对大鼠盆腔炎性疾病后遗症的炎症干预机制研究 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2020.
- QIN Q. Study on inflammatory intervention mechanism of Yaoyi Shuilian Fengkuai prescription on sequela of pelvic inflammatory disease in rats [D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2020.
- [25] 谢幸, 苟文丽. 妇产科学 [M]. 第 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- XIE X L, GOU W. Obstetrics and gynaecology [M]. 8th Edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2013.
- [26] FAN L, LIU Z, ZHANG Z, et al. Identifying the clinical presentations, progression, and sequela of pelvic inflammatory disease through physiological, histological and ultrastructural evaluation of a rat animal model [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(23): 1710.
- [27] ZHANG Y, LI W, ZOU L, et al. Metabonomic study of the protective effect of Fukeqianjin formula on multi-pathogen induced pelvic inflammatory disease in rats [J]. Chin Med, 2018, 13: 61.
- [28] 邹一贺, 王丽京, 邓慧君, 等. 靶向抑制巨噬细胞 Act1 表达对溃疡性结肠炎的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(6): 585-590.
- KUAI Y H, WANG L J, DENG H J, et al. Targeted suppression of Act1 in the macrophages ameliorates experimental ulcerative colitis in mice induced by dextran sodium sulfate [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2016, 24(6): 585-590.
- [29] CHENG L, RONG X. Emodin promotes the recovery of rheumatoid arthritis by regulating the crosstalk between macrophage subsets and synovial fibroblast subsets [J]. Anim Model Exp Med, 2025, 8(1): 44-56.
- [30] 陈杏梅. 妇科千金片联合金刚藤胶囊治疗慢性盆腔炎的疗效分析 [J]. 基层医学论坛, 2022, 26(10): 113-115.
- CHEN X M. Clinical analysis of Fuke Qianjin tablet combined with Jingangteng capsule in the treatment of chronic pelvic inflammatory disease [J]. Med Forum, 2022, 26(10): 113-115.
- [31] 李筠, 陈刚. 金刚藤胶囊对慢性盆腔炎大鼠盆腔粘连的作用及其药理机制 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(1): 144-149.
- LI J, CHEN G. Effect and pharmacological mechanism of Jingangteng capsule on pelvic adhesion in rats with chronic pelvic inflammation [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2020, 36(1): 144-149.
- [32] 苏英, 蔡晓锐, 陈文玉, 等. 金刚藤胶囊治疗慢性盆腔炎的疗效研究 [J]. 今日药学, 2018, 28(7): 466-468, 472.
- SU Y, CAI X R, CHEN W Y, et al. Jingangteng capsule for the treatment of pelvic inflammation: a randomized, open, controlled clinical study [J]. Pharm Today, 2018, 28(7): 466-468, 472.

[收稿日期] 2024-06-27

侯婧涵,段素琴,徐鸿界,等.柯萨奇病毒A组6型和B组1型混合感染叙利亚金黄地鼠动物模型的实验研究[J].中国比较医学杂志,2025,35(1):30-40.

Hou JH, Duan SQ, Xu HJ, et al. Coinfection with coxsackievirus A6 and B1 in a Syrian hamster animal model [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 30-40.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.003

# 柯萨奇病毒A组6型和B组1型混合感染叙利亚金黄地鼠动物模型的实验研究

侯婧涵<sup>1,2\*</sup>, 段素琴<sup>1,2\*</sup>, 徐鸿界<sup>1,2</sup>, 孙文亭<sup>1,2</sup>, 李明学<sup>1,2</sup>, 李艳艳<sup>1,2</sup>,  
靳玮华<sup>1,2</sup>, 陈丽雄<sup>1,2</sup>, 刘 权<sup>1,2</sup>, 赵 远<sup>1,2</sup>, 杨凤梅<sup>1,2#</sup>, 和占龙<sup>1,2#</sup>

(1. 中国医学科学院/北京协和医学院 医学生物学研究所, 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 昆明 650118; 2. 呼吸与共病全国重点实验室, 北京 100005)

**【摘要】** 目的 建立柯萨奇病毒A组6型(coxsackievirus A6, CVA6)和B组1型(coxsackievirus B1, CVB1)混合感染叙利亚金黄地鼠手足口病动物模型。方法 本研究将24只地鼠分为CVA6感染组、CVB1感染组、CVA6和CVB1混合感染组及对照组,采取鼻腔滴注病毒液和PBS方式造模。监测记录15d内临床指标、生理指标、排毒情况,并在感染后第7天(D7)选取动物进行组织病理学和病毒抗原与核酸检测。结果 单独和混合感染的实验组地鼠均出现类似人类手足口病的临床症状;WBC、NEUT、LYMPH结果提示病毒感染血象特征;咽拭子、粪便、血液和组织中均能检测到两种病毒核酸,粪便样品中能分离出两种病毒;脑等组织出现病理损伤表现及CVA6和CVB1病毒抗原蛋白和核酸的阳性共定位。结论 经鼻腔同时滴注CVA6和CVB1混合液能够成功感染叙利亚金黄地鼠,复制出类似人类手足口病的疱疹、造成病毒性心肌炎和脑炎病理损伤等,结果显示混合感染组相较于单独感染组病情更为严重,表现为临床症状加重、病毒复制增高以及组织病理损伤明显。本研究为开展人类肠道病毒混合感染基础和临床研究提供一定借鉴和参考。

**【关键词】** 叙利亚金黄地鼠;混合感染;动物模型;柯萨奇病毒A组6型;柯萨奇病毒B组1型;手足口病

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0030-11

## Coinfection with coxsackievirus A6 and B1 in a Syrian hamster animal model

HOU Jinghan<sup>1,2\*</sup>, DUAN Suqin<sup>1,2\*</sup>, XU Hongjie<sup>1,2</sup>, SUN Wenting<sup>1,2</sup>, LI Mingxue<sup>1,2</sup>, LI Yanyan<sup>1,2</sup>,  
JIN Weihua<sup>1,2</sup>, CHEN Lixiong<sup>1,2</sup>, LIU Quan<sup>1,2</sup>, ZHAO Yuan<sup>1,2</sup>, YANG Fengmei<sup>1,2#</sup>, HE Zhanlong<sup>1,2#</sup>

**【基金项目】**北京协和医学院中央高校基本科研业务费(3332023079);云南省基础研究专项-面上项目(202401CF070048);中国医学科学院医学生物学研究所所级重点科研专项(2022IMBCAMS002)。

**【作者简介】**侯婧涵(1998—),女,在读硕士研究生,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail:houljinghan@163.com  
段素琴(1992—),女,博士,助理研究员,研究方向:疾病动物模型研究。E-mail:duansuqin129@163.com  
\* 共同第一作者

**【通信作者】**杨凤梅(1982—),女,博士,副主任技师,研究方向:实验动物学。E-mail:yangfenmei@imbcams.com.cn  
和占龙(1972—),男,博士,研究员,研究生导师,研究方向:人类疾病动物模型建立及机制。  
E-mail:hzl@imbcams.com.cn #共同通信作者

- (1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research and Development on Severe Infectious Diseases, Kunming 650118, China.
2. State Key Laboratory of Respiratory Health and Multimorbidity, Beijing 100005)

**[Abstract] Objective** To establish an animal model of hand, foot, and mouth disease (HFMD) in Syrian hamsters coinfecting with coxsackievirus A6 (CVA6) and coxsackievirus B1 (CVB1). **Methods** 42 Syrian hamsters were divided into a CVA6 infection group, CVB1 infection group, CVA6 and CVB1 coinfection group and control group. A HFMD model was established by nasal instillation of virus solution and phosphate-buffered saline. Clinical and physiological indicators and detoxification status were monitored and recorded for 15 d, and animals were selected on day 7 (D7) after infection for histopathology and viral antigen and nucleic acid testing. **Results** Hamsters in the single-infection and coinfection groups showed clinical symptoms similar to human HFMD. White blood cell, neutrophil, and lymphocyte result were characteristic of viral infection. Both viral nucleic acids were detected in throat swabs, feces, blood, and tissues and both viruses were isolated from fecal samples. Pathological damage and positive co-localization of CVA6 and CVB1 viral antigen proteins and nucleic acids were found in brain and other tissues. **Conclusions** Nasal instillation of a CVA6 and CVB1 mixture can successfully coinfect Syrian hamsters, replicate herpes infection similar to human HFMD, and cause pathological viral myocarditis and encephalitis damage. The result showed that the coinfection group was more seriously affected than the single-infection group, with worse clinical symptoms, increased viral replication, and obvious tissue pathological damage. This study provides a reference for further basic and clinical research into human enterovirus coinfection.

**[Keywords]** Syrian hamster; coinfection; animal model; coxsackievirus A6; coxsackievirus B1; hand, foot and mouth disease

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

柯萨奇病毒 (Coxsackievirus, CAV) 是小核糖核酸病毒科、肠道病毒属的一种肠道病毒 (Enterovirus), 根据其器官嗜性、器官损伤和抗原反应又分为柯萨奇病毒 A 组和柯萨奇病毒 B 组<sup>[1]</sup>。柯萨奇病毒经呼吸道和消化道感染人体后可以引起发热、咽痛、厌食和手、足、口等特征性的部位出现皮疹或疱疹等临床症状, 大多数患者的临床症状轻微, 一般情况下均可自愈, 少部分患者可发展为重症型, 并发病毒性脑炎、病毒性心肌炎、神经源性肺水肿和急性弛缓性麻痹等严重病症, 甚至会导致死亡<sup>[2-5]</sup>。近年来, 肠道病毒呈现 CVA16、CVA6、CVA10、CVB1 等交替流行趋势<sup>[6]</sup>。相关文献报道, 在手足口病患者的临床样本中可以检测到两种或两种以上的肠道病毒混合感染情况<sup>[7-9]</sup>。但在临床工作中由于手足口病的自限性及分离和鉴定多种肠道病毒混合感染的复杂性等因素, 对肠道病毒混合感染的致病机制及其引发疾病病程变化及转归、愈后的相关研究相对较少。

叙利亚金黄地鼠 (Syrian hamster) 属于啮齿目、地鼠科、地鼠属, 目前在病毒、细菌和寄生虫

等感染模型研究中得到了广泛应用<sup>[10-13]</sup>。已有研究显示, 叙利亚金黄地鼠对 EV71、柯萨奇病毒 B1 和柯萨奇病毒 B3 具有较强的易感性, 能够较好地模拟人类手足口病的感染过程<sup>[14-16]</sup>。但至今未见有柯萨奇病毒混合感染动物模型的相关报道, 因此本研究采用叙利亚金黄地鼠进行柯萨奇病毒 A 组 6 型和柯萨奇 B 组 1 型混合感染动物模型构建, 为深入开展肠道病毒混合感染是否会引发、或者加重出现一系列手足口、病毒性心肌炎、脑炎等病理和生理特征, 为人类开展肠道病毒混合感染机制、疫苗、药物开发等研究提供基础资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

叙利亚金黄地鼠, 雌性, 3 周龄, SPF 级, 体重为 45~55 g, 24 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK(京)2021-0011]。实验鼠饲养于中国医学科学院医学生物学研究所屏障动物实验设施 [SYXK(滇)K2022-0006], 利用独立

通风笼具(individual ventilated cages, IVC)系统保证组间隔离饲养,饲养期间保证 IVC 系统温度保持在 20~25 °C,相对湿度保持在 50%~65%,提供 12 h 光照和 12 h 黑暗的昼夜光变化周期,并确保动物有充足的饲料和饮水。本动物实验经中国医学科学院医学生物学研究所动物福利伦理委员会批准(DWSP202401011),按实验动物使用的 3R 原则进行实验设计及给予人道关怀。

### 1.1.2 毒株

CVA6 病毒(GeneBank 序列号: MN184852 (RYN-A1205)) 和 CVB1 毒株(GenBank 序列号: OP917846(7V3/YN/CHN/2019)) 由中国医学科学院医学生物学研究所马绍辉课题组惠赠,保存于本实验室。

### 1.1.3 细胞

人恶性横纹肌瘤细胞(rhabdomyosarcoma cell, RD cell) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司,由本科室保存,代次为 10 代,使用含 10% 的胎牛血清,1% 100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 MEM 培养基,在含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 培养箱中传代培养。该细胞用于 CVA6 的分离和扩增。

非洲绿猴肾细胞系(vero)细胞来于欧洲认证细胞培养物收藏中心(european collection of animal cell cultures, ECACC),由本科室保存于液氮中,代次为 143 代,该细胞使用含 10% 的新生牛血清,1% 100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 MEM 培养基,在含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 培养箱中传代培养。该细胞用于 CVB1 的分离和扩增。

## 1.2 主要试剂与仪器

MEM 培养基、6.6% NaHCO<sub>3</sub>、3% 谷氨酰胺、0.125% 胰蛋白酶、4% EDTA 1 mol/L 氢氧化钠

(中国医学科学院医学生物学研究所中心供应科提供);胎牛血清、新生牛血清(10270-106、C11995500BT,澳洲 Gibco);异丙醇、无水乙醇、三氯甲烷(1030019-01-01、1030001-04-01、2004007-01-01,西陇科学股份有限公司);4% 多聚甲醛(143174, Biosharp); PrimeScript One Step RT-PCR Kit(RR064A, TaKaRa); 无菌无酶水(R1600, 北京索莱宝);异氟烷(R510-22-16, 瑞沃德生命科技有限公司);RNA-蛋白共检测辅助试剂盒(323180, ACD); Anti-Coxsackievirus B1 Antibody(MAB944, Merck);Coxsackievirus A6 VP1 抗体(GTX132346, GeneTex); Anti-Coxsackie Adenovirus Receptor(ab100811, abcam); Mouse Kremen-1 Antibody(AF1647, R&D Systems); Goat Anti-Mouse IgG H&L(ab150117, abcam); Goat Anti-Rabbit IgG H&L(ab150080, abcam); Donkey Anti-Rabbit IgG H&L(ab150075, abcam); Donkey Anti-Goat IgG H&L(ab150129, abcam)。

生物安全柜(NU-437-600S, NUATR);离心机(D1524R, DALAB);PCR 仪(T100, Bio-Rad);全自动五类动物血细胞分析仪(XT-200i, 希森美康);细胞计数仪(JIMBIO FIL, 卓微生物科技有限公司);荧光定量 PCR 检测系统(CFX96Touch, Bio-Rad);荧光共聚焦显微镜(Leica SP8, Leica);电子体温计(DT-K111A, 杭州华安医疗保健用品有限公司);电子天平(JEA1002, 上海浦春计量仪器有限公司)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 实验动物分组及感染

实验将 24 只叙利亚金黄地鼠分为 4 组,每组 6 只,具体分组和感染方法如表 1 所示。

表 1 实验分组和攻毒剂量

Table 1 Experimental groups and challenge doses

组别 Groups	感染方式 Infection method	感染剂量 Infectious dose
CVA6 感染组 CVA6 infection group	经鼻腔滴注 Drip through the nasal cavity	10 <sup>6</sup> CCID <sub>50</sub> /mL 的 CVA6 病毒液 100 μL 10 <sup>6</sup> CCID <sub>50</sub> /mL CVA6 virus solution 100 μL
CVB1 感染组 CVB1 infection group	经鼻腔滴注 Drip through the nasal cavity	2×10 <sup>6</sup> CCID <sub>50</sub> /mL 的 CVB1 病毒液 50 μL 2×10 <sup>6</sup> CCID <sub>50</sub> /mL CVB1 virus solution 50 μL
CVA6 和 CVB1 混合感染组 CVA6 and CVB1 coinfection group	经鼻腔滴注 Drip through the nasal cavity	10 <sup>6</sup> CCID <sub>50</sub> /mL 的 CVA6 和 2×10 <sup>6</sup> CCID <sub>50</sub> /mL 的 CVB1 等量混合病毒液 75 μL 10 <sup>6</sup> CCID <sub>50</sub> /mL CVA6 virus solution and 2×10 <sup>6</sup> CCID <sub>50</sub> /mL CVB1 virus solution were mixed equally, 75 μL
对照组 Control group	经鼻腔滴注 Drip through the nasal cavity	PBS 液 100 μL PBS solution 100 μL

### 1.3.2 临床观察及样品采集

实验开始前对动物进行 7 d 的适应性饲养,于 D0 采集本底数据后,对地鼠进行双侧半量滴鼻攻毒,具体操作方法:一名操作人员对地鼠进行保定,将地鼠鼻孔上仰呈 45° 的姿势,另一操作人员使用移液枪将各半量的病毒液滴注到各组地鼠的双侧鼻孔中,最后保持地鼠鼻孔上仰 45° 的姿势 1~2 min,确定病毒液全部滴入鼻腔后再放回对应的饲养笼。病毒感染后每天观察动物精神状态、皮肤、口腔黏膜变化及行为学改变等临床情况,采集粪便样品用于病毒载量检测和病毒分离。感染后 D0、D1、D3、D5、D7、D9、D11、D13 和 D15 使用体温计和天平测量地鼠的肛门温度和体重数据;D0、D1、D2、D3、D4、D5、D6、D7、D8、D9、D10 和 D15 采集咽拭子进行病毒载量检测;D0、D4、D7、D10 和 D15 采集血液样本进行血常规和病毒血症检测。感染 D1~D7 每组的咽拭子、粪便、血液各有 6 个样本重复,于感染后 D7 每组分别随机选取 3 只动物进行安乐死,采集的心脏、肝、脾、肺、肾、胰、脑、脊髓和嗅球等组织样品一式两份,各 3 个重复的样本用于病毒载量检测和组织病理学和病毒抗原和核酸检测,感染 D8~D15 每组的咽拭子、粪便、血液各有 3 个样本重复。其中,在采集地鼠血液时采用异氟烷进行麻醉。采用注射 3 倍麻醉剂量的 1% 戊巴比妥钠 (150 mg/kg) 的麻醉方式进行安乐死。

### 1.3.3 病毒载量测定

取咽拭子、粪便、血液以及组织研磨液提取 RNA,以 RNA 为模板,采用一步法逆转录实时定量聚合酶链式反应 (real-time reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR) 确定样品中病毒载量。设计的 CVA6 和 CVB1 的引物和 Taqman 探针由生工生物工程有限公司合成,引物序列信息

如表 2 所示。反应条件为:42 °C 5 min 反转录;95 °C 10 s 热启动;以 95 °C 5 s,60 °C 30 s 为一个循环,在 60 °C 进行荧光检测,共进行 40 个循环。

### 1.3.4 粪便样品病毒培养

将 D0~D15 粪便样品过滤除菌后分别接种于 RD 和 Vero 细胞中,持续观察两种细胞的细胞病变情况并做好记录。

### 1.3.5 病理检测

采集心脏、肝、脾、肺、肾、胰、脑、脊髓和嗅球组织,使用 4% 多聚甲醛固定,由武汉赛维尔生物科技有限公司进行苏木精-伊红 (HE) 病理染色。

### 1.3.6 含环状结构跨膜蛋白 1 (kringle containing transmembrane protein 1, Kremen-1) 受体和柯萨奇-腺病毒受体 (adenovirus receptor, CAR) 受体检测

采用免疫荧光 (immunofluorescence, IF) 方法对空白对照组的组织样本切片进行 Kremen-1 受体和 CAR 受体蛋白的检测。白片脱蜡水化、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、封闭、羊抗 Kremen-1 受体以及兔抗 CAR 受体单克隆一抗 1:500 稀释后 4 °C 过夜孵育加驴抗羊和驴抗兔二抗, DAB 显色,封片。

### 1.3.7 病毒核酸及抗原检测

采用 IF 方法对组织样本切片进行 CVA6、CVB1 抗原的检测,采用 RNA 原位杂交 (RNAscope *in situ* hybridization, RNAscope) 方法对切片进行 CVA6 和 CVB1 核酸的检测,通过 RNAscope 多通道二代荧光与免疫荧光的联合使用检测 CVA6 和 CVB1 的病毒核酸和蛋白的共定位情况。其中, RNAscope 检测所使用的 CVA6 和 CVB1 的核酸探针由安迪生物科技 (上海) 有限公司所设计,分别靶向 CVA6 (MF422553.1) 的 2971~3936 区域序列和 CVB1 (EU147493.1) 的 32~

表 2 引物序列  
Table 2 Primer sequences

名称 Name	基因序列 (5'-3') Gene sequence (5'-3')	长度/bp Length
CVA6-F	TACCACCGGGAGAAACGTCCACG	
CVA6-R	CGGTCACTTGCAGTGTACT	112
CVA6-P	ROX-ACGTGAGAGCTTGGGTACCTAGACCCCTTC-BHQ	
CVB1-F	GGTGTCTACACAAAAGACGGGTG	
CVB1-R	TGGGTCTTGTGTGAAATCTTGCC	139
CVB1-P	FAM-CGCATGAGACTGCTTTGACTGCCAGCG-BHQ	

6063 区域序列。RNAscope 与 IF 共检测实验步骤:白片脱蜡水化、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、封闭、兔源抗 CVA6 单克隆一抗和鼠源抗 CVB1 多克隆一抗 1:200 稀释后 4℃ 过夜孵育、一抗后固定、蛋白酶处理、滴加反应梯度增强剂、多通道核酸荧光染色、滴加羊抗兔和羊抗鼠二抗、DAB 显色、使用中树脂封片。

#### 1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行数据统计分析,数据统计结果以平均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。

## 2 结果

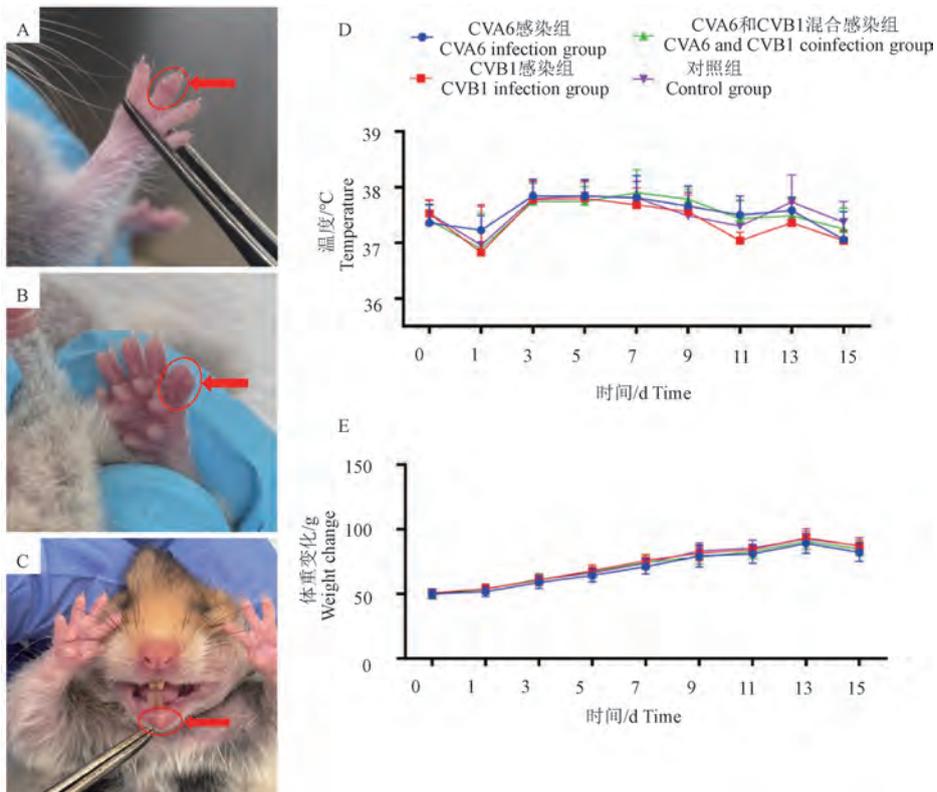
### 2.1 临床症状

从攻毒 D2 起,CVA6 和 CVB1 混合感染组动物的手足及口唇部陆续出现疱疹(图 1A~1C)。疱疹发生初期皮肤黏膜表面轻微红肿;随后出现明显红斑或疱疹,疱疹内有少量脓液;之后 2~5 d 逐渐消退结痂。CVA6 和 CVB1 混合感染组和对

照组相比体温、体重无明显变化趋势(图 1D~1E),且未见明显的行为学改变。

### 2.2 血常规指标

对动物血液样品进行血常规检测发现,CVA6 和 CVB1 混合感染组白细胞(white blood cell,WBC)在 D10 出现显著增加,最高达到  $19.65\times 10^9/L$ 。CVA6 和 CVB1 混合感染组中性粒细胞(neutrophil granulocyte,NEUT)在感染后 D4 出现小高峰,均值达到  $3.13\times 10^9/L$ ,且要高于 CVA6 感染组( $1.65\times 10^9/L$ )、CVB1 感染组( $2.71\times 10^9/L$ )和 PBS 对照组( $2.55\times 10^9/L$ )。CVA6 和 CVB1 混合感染组中淋巴细胞(lymphocyte,LYMPH)则在感染后 D4 和 D10 均表现为增高的趋势,表现为在感染后 D4 比 CVA6 感染组和 CVB1 感染组平均高  $0.73\times 10^9/L$ ,感染后 D10 比 CVA6 感染组和 CVB1 感染组平均高  $0.76\times 10^9/L$ 。结果显示 CVA6 和 CVB1 混合感染组小鼠表现出明显的病毒感染的血象特征(图 2)。

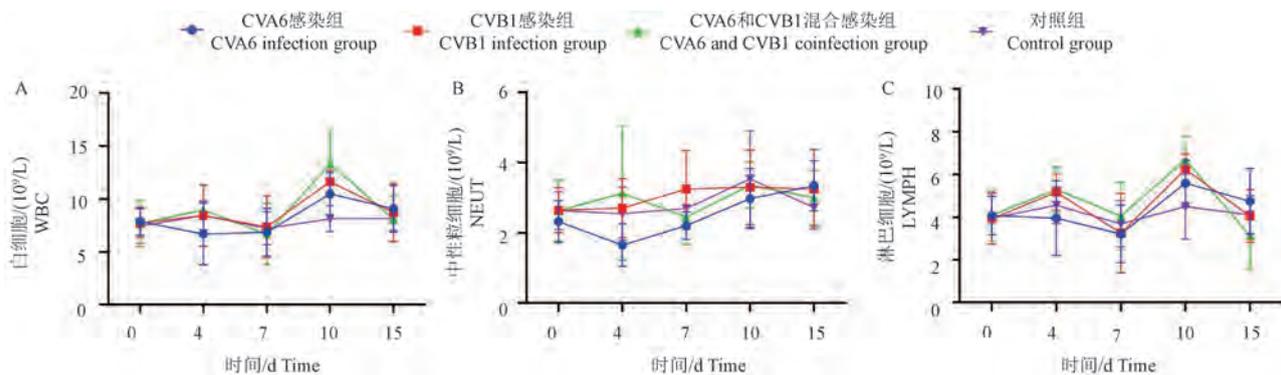


注:A:手部疱疹;B:足部疱疹;C:口部疱疹;D:体温;E:体重。

图 1 临床症状

Note. A, Herpes on hands. B, Herpes on feet. C, Herpes on mouth. D, Body temperature. E, Body weight.

Figure 1 Clinical symptoms



注:A:白细胞计数;B:中性粒细胞;C:淋巴细胞。

图2 血常规检测结果

Note. A, White blood cell count. B, Neutrophil granulocyte. C, Lymphocyte.

Figure 2 Blood routine test results

### 2.3 病毒载量

CVA6 和 CVB1 混合感染组的咽拭子在 D2~D7 均检测到 CVA6 病毒,载量总体呈现先升高后降低的趋势,在 D3 出现第 1 次排毒高峰 ( $10^{6.6}$  copies/200  $\mu$ L),随后逐渐降低,于 D7 出现第 2 次排毒高峰 ( $10^{5.6}$  copies/200  $\mu$ L)。咽拭子中 D3~D7 均检测到 CVB1 的病毒载量,载量总体呈现先升高后降低的趋势,在 D3 出现第 1 次排毒小高峰 ( $10^{5.3}$  copies/200  $\mu$ L),随后逐渐降低,于 D6 出现第 2 次排毒高峰 ( $10^{5.9}$  copies/200  $\mu$ L)。与 CVA6 感染组和 CVB1 感染组的动物相比,CVA6 和 CVB1 混合感染组的咽拭子排毒高峰提前,且载量增加(图 3A)。

CVA6 和 CVB1 混合感染组的粪便在 D1~D8 均检测到 CVA6 病毒,与 CVA6 感染组(D1~D7)相比排毒周期延长。且总体呈现先升高后降低的趋势,两次排毒高峰分别于 D1 和 D6 达到  $10^{6.7}$  copies/100 mg 和  $10^{6.6}$  copies/100 mg。粪便中 D1~D7 均检测到 CVB1 病毒,载量总体呈现先升高后降低的趋势,但在 D6 和 D7,比 CVB1 感染组地鼠的排毒量平均增高了  $10^{1.7}$  copies/100 mg 和  $10^{0.74}$  copies/100 mg。CVA6 和 CVB1 混合感染组与 CVA6 感染组和 CVB1 感染组相比,出现更长的排毒周期和更高的排毒量(图 3B)。

CVA6 和 CVB1 混合感染组在 D4 的血液中,均检测到这两种病毒的核酸,CVA6 病毒载量为  $10^{3.1}$  copies/200  $\mu$ L, CVB1 病毒载量为  $10^{5.0}$  copies/200  $\mu$ L(图 3C),提示感染后出现了典型的

病毒血症。

CVA6 和 CVB1 混合感染组在 D7 组织中肺、脑、脊髓和嗅球中检测到 CVA6 的病毒核酸;D7 组织中的心脏、肝、脾、肺、肾和脑组织等均能检测到 CVB1 病毒核酸,在嗅球中病毒载量最高 ( $10^{10.7}$  copies/100 mg)(图 3D)。

### 2.4 粪便细胞病变效应

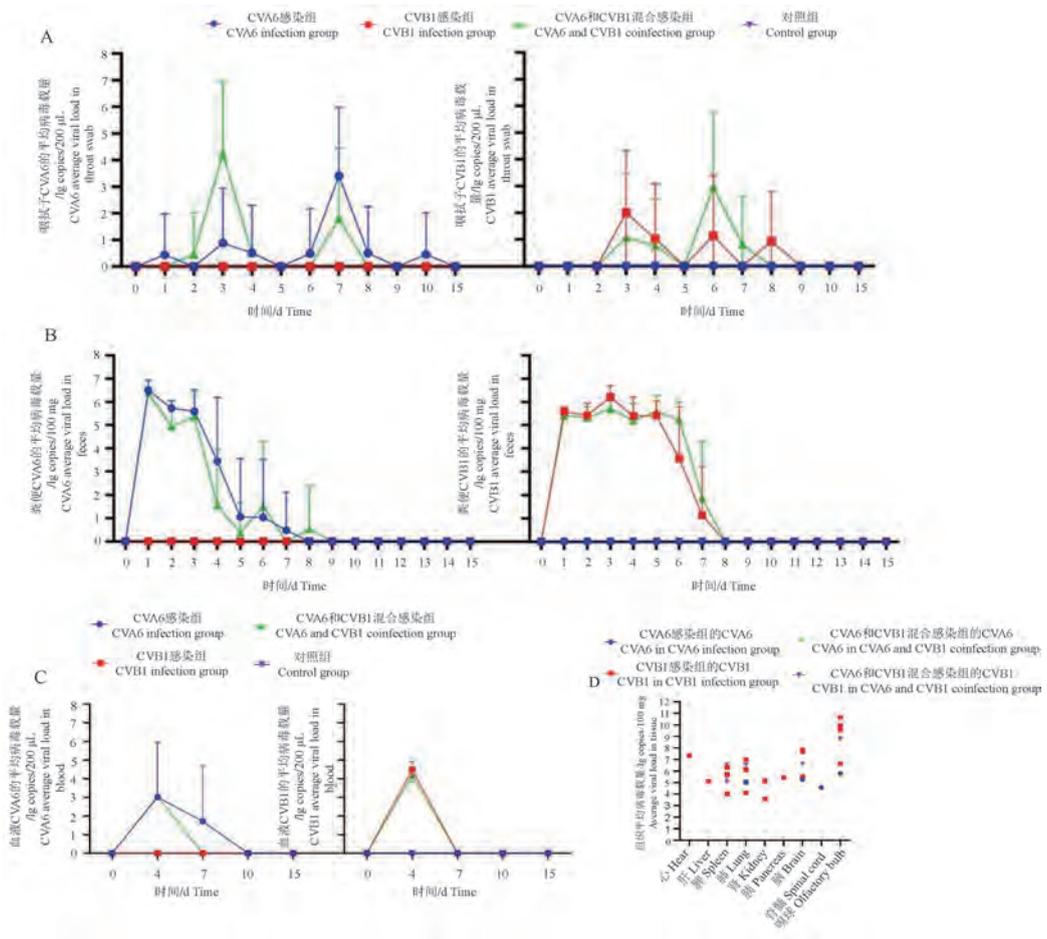
CVA6 和 CVB1 混合感染地鼠后,为验证感染过程中排出病毒是否为活病毒,将粪样的过滤除菌上清液分别接种于用于 CVA6 的分离和扩增的 RD 细胞和用于 CVB1 的分离和扩增的 Vero 细胞,观察其病变效应。发现 CVA6 和 CVB1 混合感染组细胞的粪便样本在 RD 和 Vero 细胞上均出现了细胞病变,且病变孔数明显多于单独感染组(图 4)。证明在 CVA6 和 CVB1 混合感染组动物的排出粪便样品均可以分离出这两种病毒,且排毒量要大于单独感染的情况。

### 2.5 组织学检查

CVA6 和 CVB1 混合感染组的心脏组织可见大面积心外膜中度水肿,结缔组织排列稀疏,伴多量淋巴细胞浸润,可见大面积钙化灶,显示严重的损伤,表现出明显的病毒性心肌炎的病理特征。脑组织和嗅球组织中可见大量神经元固缩,形态不规则,胞核胞质分界不清,嗜碱性增强,多量小胶质细胞浸润,多量神经细胞变性,胞质疏松淡染。与 CVA6 感染组和 CVB1 感染组相比,表现更明显的病毒性脑炎的病理变化(图 5)。

### 2.6 病毒核酸及抗原检测

对 D7 的地鼠组织样本切片进行了免疫荧光



注:A:咽拭子;B:粪便;C:血液;D:组织。

图3 咽拭子、粪便、血液和组织的病毒载量

Note. A, Throat swab. B, Feces. C, Blood. D, Tissue.

Figure 3 Viral load in throat swabs, stool, blood and tissues

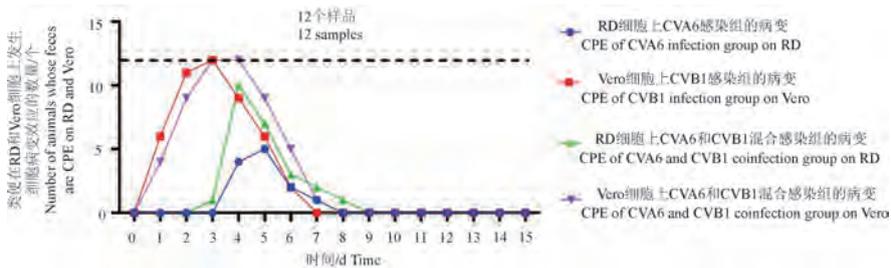


图4 粪便样品在细胞病变效应的数量

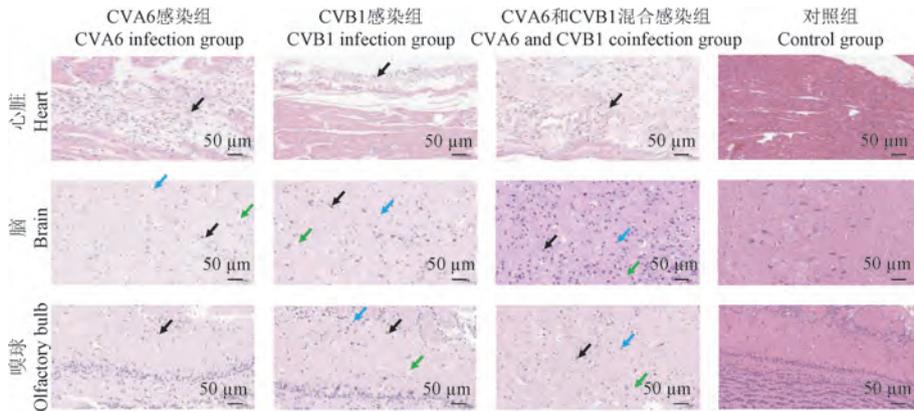
Figure 4 Number of cytopathic effects in fecal samples

和 RNAscope 共染色 (图 6),以脑组织为例,可见 CVA6 和 CVB1 混合感染组小鼠组织表现出两种病毒的抗原蛋白和核酸的共定位,CVA6 和 CVB1 的核酸信号呈红色和黄色的小点状分布,CVA6 和 CVB1 的抗原蛋白信号呈紫红色和绿色并围绕细胞核成片状分布,且抗原信号可以定位在细胞

核外的共同区域。

### 2.7 Kremen-1 受体和 CAR 受体检测

对小鼠空白的组织样本切片进行 Kremen-1 受体和 CAR 受体的免疫荧光检测发现能观察到受体的共定位,证实叙利亚金黄地鼠的脑等组织中有感染 CVA6 和 CVB1 肠道病毒的受体 (图 7)。

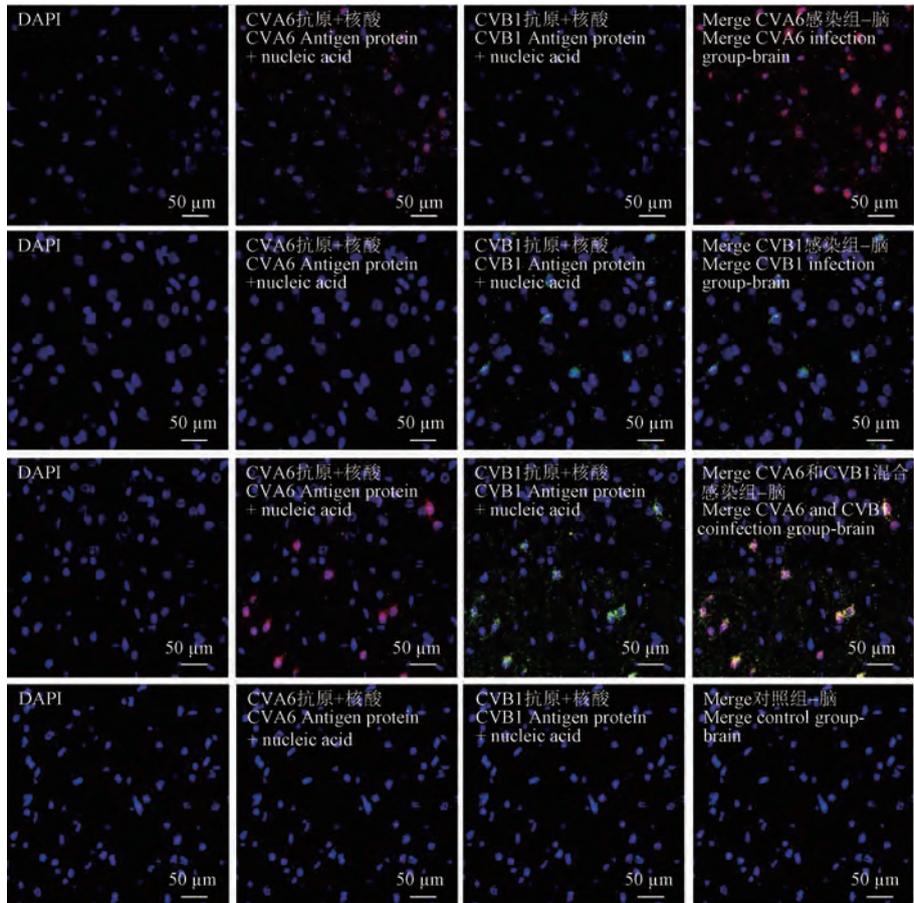


注:心脏:淋巴细胞浸润(黑色箭头);脑和嗅球:嗜碱性增强(黑色箭头),小胶质细胞浸润(蓝色箭头),胞质疏松淡染(绿色箭头)。

图 5 心脏、脑、嗅球组织 HE 染色结果

Note. Heart, Lymphocyte infiltration (black arrow). Brain and olfactory bulb, Increased basophilia (black arrow), microglial infiltration (blue arrow), loose and lightl staining of cytoplasm (green arrow).

Figure 5 HE staining results of heart, brain and olfactory bulb

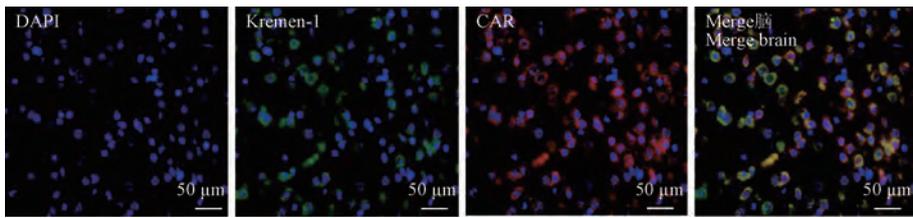


注:以脑组织为例,紫红色荧光代表 CVA6 抗原蛋白;红色荧光代表 CVA6 核酸;绿色荧光代表 CVB1 抗原蛋白;黄色荧光代表 CVB1 核酸。

图 6 脑组织 CVA6 和 CVB1 核酸及抗原共定位

Note. Taking brain tissue as an example, purple-red fluorescence represents CVA6 antigen protein. Red fluorescence represents CVA6 nucleic acid. Green fluorescence represents CVB1 antigen protein. Yellow fluorescence represents CVB1 nucleic acid.

Figure 6 Co-localization of CVA6 and CVB1 nucleic acids and antigens in brain tissue



注:以脑组织为例,绿色荧光代表 Kremen-1 受体;红色荧光代表 CAR 受体。

图 7 叙利亚金黄地鼠脑组织 Kremen-1 受体和 CAR 受体共定位

Note. Taking brain tissue as an example, green fluorescence represents Kremen-1 receptors. Red fluorescence represents CAR receptors.

Figure 7 Co-localization of Kremen-1 receptor and CAR receptor in Syrian hamster brain tissue

### 3 讨论

肠道病毒可以通过消化道、呼吸道等途径感染患者<sup>[17-18]</sup>,引起手足口等多部位皮肤黏膜出现疱疹,部分患者可能还伴有病毒性脑炎、心肌炎、肝炎、弛缓性麻痹、过敏性紫癜、腹膜炎、I 型糖尿病等严重并发症。目前已有多种构建成功的肠道病毒动物模型,如本课题组前期已成功构建 CVA6、CVB1、CVB2、CVB3 恒河猴婴猴动物模型和 CVB1、CVB3 叙利亚金黄地鼠模型等,但尚未见肠道病毒混合感染的动物模型相关报道,因此本研究通过构建 CVA6 和 CVB1 混合感染叙利亚金黄地鼠模型,对临床变化、排毒周期、血液生理、组织病理改变等进行检测,从病原学、病理生理、疾病发生和发展过程等方面进行了系统性的分析,实验结果显示经鼻腔滴注感染实验地鼠表现出了与人类手足口病相似的临床指标,以及病毒性心肌炎和病毒性脑炎相似的病理损伤。且 CVA6 和 CVB1 混合感染组在临床症状、病毒复制和组织病理损伤等方面反映病情更为复杂的变化,因此开展和构建 CVA6 和 CVB1 肠道病毒混合感染叙利亚金黄地鼠的动物模型工作具有重要意义。

#### 3.1 临床表现

本研究经临床观察发现,CVA6 和 CVB1 混合感染组地鼠手足及口唇部出现了疱疹,这与儿童手足口病的临床疱疹症状相似。PHYU 等<sup>[19]</sup>在构建 EV71 感染 2 周龄叙利亚金黄地鼠时观察到口和足出现肉眼可见的皮肤损伤,本研究出现的疱疹更典型,且手足口上均有疱疹。另外,本次实验发现动物体温整体无明显变化,这与王辉等<sup>[20]</sup>研究发现 439 例手足口病患儿约 50% 存在

不发热现象的结果类似。

#### 3.2 病毒载量

本次实验在动物的咽、粪便、血液及多组织研磨液中均检测出两种病毒核酸,与李咏洁等<sup>[15]</sup>和张伟<sup>[16]</sup>构建的 CVB1 和 CVB3 感染叙利亚金黄地鼠的动物模型中病毒载量的检测结果相一致,但排毒周期相对较短,这可能是由本次实验动物攻毒剂量较低引起的差异。在 2009 版的手足口病预防控制指南中指出手足口病病程一般为 7~10 d,在卢展鹏等<sup>[21]</sup>调查的一起东莞市肠道病毒暴发疫情中也发现其病程最短为 2 d,最长为 7 d,中位数为 4 d,提示本次实验的攻毒剂量和病程发展更符合人类感染手足口病的真实发病情况。本次实验与李咏洁等<sup>[15]</sup>和张伟<sup>[16]</sup>构建的 CVB1 和 CVB3 感染叙利亚金黄地鼠动物模型的嗅球部都检测到较高的病毒载量和较严重的组织病理损伤,进一步佐证了人类重症手足口病引起病毒性脑炎的病毒感染及入侵途径,即肠道病毒可以通过呼吸道黏膜经嗅神经和嗅球入侵脑部引起病毒性脑炎。

#### 3.3 临床血液指标

本次实验对 D0、D4、D7、D10 和 D15 采集的血液样品进行动态血常规监测,结果显示感染组动物 WBC、NEUT 和 LYMPH 相较对照组有增高的趋势,这与李咏洁等<sup>[15]</sup>构建的 CVB1 感染叙利亚金黄地鼠的动物模型中感染后 D7 血常规检测发现滴鼻组动物的 LYMPH 和 NEUT 明显增加的结果一致的,结果也表现出显著的病毒感染血象变化,且 CVA6 和 CVB1 混合感染组的血常规指标相较于单独感染组变化趋势更大,进一步提示着病毒的混合感染可能对地鼠造成了更为严重的感染炎症反应。

### 3.4 组织学检测

有研究表明,肠道病毒可通过血脑屏障和外周神经等途径侵入中枢神经系统后引发神经并发症肠道病毒性脑炎,也可通过感染心肌细胞进而引发造成心肌局灶性或弥漫性病变的病毒性心肌炎<sup>[22]</sup>。此次研究的组织病理检测结果也显示感染组的心脏和脑等组织中均存在病理损伤,且相较于单独感染组,CVA6 和 CVB1 混合感染组存在更为严重的炎性病理损伤。在此基础上,对动物感染后 D7 的组织切片进行 CVA6 和 CVB1 抗原和核酸的共定位,结果发现 CVA6 和 CVB1 混合感染组的组织上同时定位到病毒的核酸和病毒的抗原蛋白,为病毒的靶向组织器官感染情况提供了可视化结果线索,表明肠道病毒感染后引起的多器官、多组织噬性和损伤表现。

与肠道病毒受体有关的研究证实 CVA6 的受体是 Kremen-1, CVB1 的受体是 CAR 和衰变加速因子(decay accelerating factor, DAF)<sup>[23-26]</sup>。本次实验对叙利亚金黄地鼠组织进行 Kremen-1 受体和 CAR 受体的免疫荧光检测,发现地鼠的脑组织等能观察到两个受体的共定位,证实叙利亚金黄地鼠具有感染这两种肠道病毒的受体基础,进一步提示了柯萨奇病毒对脑组织的损伤倾向以及柯萨奇病毒感染的临床重症病例并发无菌性脑膜炎的原因。

综上所述,本研究成功构建出肠道病毒混合感染模型,表现出人类手足口病的疱疹病变特征,以及病毒性脑炎和心肌炎的病理损伤,CVA6 和 CVB1 混合感染组的临床症状更为明显,病毒复制更为活跃,提示混合感染的两种病毒可能互相促进病毒感染进程,本次实验结果将为后续开展相关疾病的混合感染的模型构建、发病机制、病理和生理等研究等提供一定借鉴和参考。

#### 参考文献:

[ 1 ] SIN J, MANGALE V, THIENPHRAPA W, et al. Recent progress in understanding coxsackievirus replication, dissemination, and pathogenesis [J]. *Virology*, 2015, 484: 288-304.

[ 2 ] NOOR A, KRILOV L R. Enterovirus infections [J]. *Pediatr Rev*, 2016, 37(12): 505-515.

[ 3 ] XU W, LIU C F, YAN L, et al. Distribution of enteroviruses in hospitalized children with hand, foot and

mouth disease and relationship between pathogens and nervous system complications [J]. *Virol J*, 2012, 9: 8.

- [ 4 ] HUANG H I, SHIH S R. Neurotropic enterovirus infections in the central nervous system [J]. *Viruses*, 2015, 7(11): 6051-6066.
- [ 5 ] NAYAK G, BHUYAN S K, BHUYAN R, et al. Global emergence of enterovirus 71: a systematic review [J]. *Beni Suef Univ J Basic Appl Sci*, 2022, 11(1): 78.
- [ 6 ] FU X, WAN Z, LI Y, et al. National epidemiology and evolutionary history of four hand, foot and mouth disease-related enteroviruses in China from 2008 to 2016 [J]. *Virol Sin*, 2020, 35(1): 21-33.
- [ 7 ] 梁勇彪, 屈雅川, 曹荣, 等. 手足口病感染病毒分布及感染趋势评估 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23(22): 5485-5487.
- LIANG Y B, QU Y C, CAO Q, et al. Viral infections in children with hand-foot-mouth disease and trend of infections [J]. *Chin J Nosocomiology*, 2013, 23(22): 5485-5487.
- [ 8 ] 张伟, 王玉光, 杨朝晖, 等. 肠道病毒 71 型与柯萨奇 A 组 16 型混合感染致手足口病并发中枢神经系统感染临床分析 [J]. *中国全科医学*, 2011, 14(29): 3341-3343, 3346.
- ZHANG W, WANG Y G, YANG Z H, et al. Severe hand-foot-and-mouth disease caused by mixed infection of enterovirus 71 and Coxsackie A16 [J]. *Chin Gen Pract*, 2011, 14(29): 3341-3343, 3346.
- [ 9 ] GUO W, XU D, CONG S, et al. Co-infection and enterovirus B: post EV-A71 mass vaccination scenario in China [J]. *BMC Infect Dis*, 2022, 22(1): 671.
- [ 10 ] MIAO J, CHARD L S, WANG Z, et al. Syrian Hamster as an animal model for the study on infectious diseases [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2329.
- [ 11 ] WARNER B M, SAFRONETZ D, KOBINGER G P. Syrian hamsters as a small animal model for emerging infectious diseases: advances in immunologic methods [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 972: 87-101.
- [ 12 ] CARVALHO L M, DE BRITO R C F, GUSMÃO M R, et al. Establishment of monoclonal antibodies to evaluate the cellular immunity in a hamster model of L infantum infection [J]. *Parasite Immunol*, 2021, 43(4): e12823.
- [ 13 ] HSU C J, LIN W C, CHOU Y C, et al. Dynamic changes of the blood chemistry in Syrian hamsters post-acute COVID-19 [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(1): e0236221.
- [ 14 ] SVYATCHENKO V A, LEGOSTAEV S S, LUTKOVSKIY R Y, et al. Coxsackievirus A7 and enterovirus A71 significantly reduce SARS-CoV-2 infection in cell and animal models [J]. *Viruses*, 2024, 16(6): 909.
- [ 15 ] 李咏洁, 张伟, 杨风梅, 等. 柯萨奇病毒 B 组 1 型感染叙利亚金黄地鼠动物模型建立 [J]. *中国比较医学杂志*,

- 2023, 33(4): 50-56.
- LI Y J, ZHANG W, YANG F M, et al. Establishment of an animal model of Coxsackievirus B1 infecting Syrian golden hamster [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(4): 50-56.
- [16] 张伟. 柯萨奇 B 组 3 型病毒动物模型的建立 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2022.
- ZHANG W. Establishment of animal model of Coxsackie B virus type 3 [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2022.
- [17] WELLS A I, COYNE C B. Enteroviruses: a gut-wrenching game of entry, detection, and evasion [J]. *Viruses*, 2019, 11(5): 460.
- [18] ZHANG Y, CUI W, LIU L, et al. Pathogenesis study of enterovirus 71 infection in Rhesus monkeys [J]. *Lab Invest*, 2011, 91(9): 1337-1350.
- [19] PHYU W K, ONG K C, WONG K T. A consistent orally-infected Hamster model for enterovirus A71 encephalomyelitis demonstrates squamous lesions in the paws, skin and oral cavity reminiscent of hand-foot-and-mouth disease [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147463.
- [20] 王辉, 黄水平, 陈民, 等. 439 例手足口病临床流行病学特征分析 [J]. *徐州医学院学报*, 2010, 30(4): 250-252.
- WANG H, HUANG S P, CHEN M, et al. Analysis of the clinical epidemiological characteristics of 439 cases of hand-foot-mouth disease [J]. *Acta Acad Med Xuzhou*, 2010, 30(4): 250-252.
- [21] 卢展鹏, 黄振宇, 张泽武, 等. 1 起由 Cox A2 等肠道病毒引起的发热暴发疫情的流行病学调查分析 [J]. *华南预防医学*, 2015, 41(1): 51-53.
- LU Z P, HUANG Z Y, ZHANG Z W, et al. Epidemiological investigation and analysis of an outbreak of fever caused by enteroviruses such as Cox A2 [J]. *South China J Prev Med*, 2015, 41(1): 51-53.
- [22] XING J, WANG K, WANG G, et al. Recent advances in enterovirus A71 pathogenesis: a focus on fatal human enterovirus A71 infection [J]. *Arch Virol*, 2022, 167(12): 2483-2501.
- [23] 李奇, 陈祥鹏, 谢正德. 肠道病毒受体的研究进展 [J]. *病毒学报*, 2022, 38(5): 1206-1213.
- LI Q, CHEN X P, XIE Z D. Research progress on enterovirus receptors [J]. *Chin J Virol*, 2022, 38(5): 1206-1213.
- [24] STARING J, VAN DEN HENGEL L G, RAABEN M, et al. KREMEN1 is a host entry receptor for a major group of enteroviruses [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(5): 636-643.
- [25] CUI Y, PENG R, SONG H, et al. Molecular basis of Coxsackievirus A10 entry using the two-in-one attachment and uncoating receptor KRM1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(31): 18711-18718.
- [26] BERGELSON J M, CUNNINGHAM J A, DROGUETT G, et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5 [J]. *Science*, 1997, 275(5304): 1320-1323.

[收稿日期]2024-07-22

杨渊, 鲍家成, 邓业康, 等. 香菇多糖抑制 TNF $\alpha$ -铁自噬拮抗亚砷酸钠染毒小鼠肝组织铁死亡 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(1): 41-48.

Yang Y, Bao JC, Deng YK, et al. Lentinan inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$ -ferritinophagy and antagonizes hepatic tissue ferroptosis in sodium arsenite-exposed mice [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 41-48.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.004

# 香菇多糖抑制 TNF $\alpha$ -铁自噬拮抗亚砷酸钠染毒小鼠肝组织铁死亡

杨渊<sup>1,2\*</sup>, 鲍家成<sup>1</sup>, 邓业康<sup>1</sup>, 陈秧<sup>2</sup>, 何琴<sup>2</sup>

(1. 广西环境暴露组学与全生命周期健康重点实验室, 桂林医学院公共卫生学院, 广西 桂林 541199;  
2. 侗医药研究湖南省重点实验室, 湖南医药学院民族医药研究中心, 湖南 怀化 418000)

**【摘要】** 目的 探讨香菇多糖(lentinan, LNT)对亚砷酸钠(sodium arsenite, SA)染毒小鼠肝组织铁死亡的干预效应与机制。方法 C57BL/6N 雄性小鼠经 SA 低剂量、高剂量染毒, 以及 LNT 干预 SA 高剂量染毒后, 苏木精-伊红(HE)染色评价肝组织病理损伤; 酶联免疫吸附法或免疫蛋白印迹法检测肝组织肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ )、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、铁自噬或铁死亡标志物含量或表达。结果与对照组相比, SA 染毒诱导小鼠肝组织 TNF $\alpha$  和 IL-6 水平升高, 铁自噬标志物铁蛋白重链(ferritin heavy chain 1, FTH1)和微管相关蛋白 1 轻链 3B(microtubule associated protein 1 light chain 3B, MAP1LC3B)含量升高, 铁死亡标志物谷胱甘肽过氧化酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)水平下调( $P < 0.05$ ); 与 SA 高剂量组相比, LNT 干预后显示肝组织病理损伤减轻, TNF $\alpha$ 、IL-6、FTH1 和 MAP1LC3B 水平下调, 而 GPX4 水平上调( $P < 0.05$ ); 免疫蛋白印迹实验显示, LNT 干预拮抗 SA 高剂量组 FTH1、自噬标记蛋白 LC3B/A 水平升高或拮抗 FTH1 与 LC3B 或泛素(ubiquitin, Ub)共表达( $P < 0.05$ )。结论 LNT 拮抗 SA 染毒小鼠肝组织病理损伤和铁死亡, 可能与 TNF $\alpha$ -铁自噬信号抑制有关。

**【关键词】** 亚砷酸钠; 肝毒性; 铁死亡; 香菇多糖; 铁自噬

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0041-08

## Lentinan inhibits tumor necrosis factor $\alpha$ -ferritinophagy and antagonizes hepatic tissue ferroptosis in sodium arsenite-exposed mice

YANG Yuan<sup>1,2\*</sup>, BAO Jiacheng<sup>1</sup>, DENG Yekang<sup>1</sup>, CHEN Yang<sup>2</sup>, HE Qin<sup>2</sup>

(1. Guangxi Key Laboratory of Environmental Exposure Omics and Whole Life Cycle Health, School of Public Health, Guilin Medical College, Guilin 541199, China. 2. Hunan Key Laboratory of Dong Medicine Research, Research Center of Ethnic Medicine, Hunan Medical University, Huaihua 418000)

**【Abstract】** **Objective** To explore the effect and mechanism of lentinan (LNT) on hepatic tissue ferroptosis in mice exposed to sodium arsenite (SA). **Methods** C57BL/6N male mice were exposed to SA low-dose, SA high-dose, and LNT intervention combined with SA high-dose, then, hematoxylin and eosin (HE) staining was applied to

**【基金项目】** 广西自然科学基金(2023JJA140042); 湖南省自然科学基金(2021JJ30484, 2022JJ30426); 广西大学生创新训练项目(202410601041)。

**【作者简介】** 杨渊(1977—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 环境毒理学。E-mail: yang1977yuan@126.com

assess pathological liver tissue damage; Enzyme-linked immunosorbent and Western blot were used to detect the content or expression of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), ferritinophagy or ferroptosis biomarkers. **Results** Compared with the control group, SA exposure induced the elevated levels of TNF $\alpha$ , IL-6, ferritinophagy biomarker ferritin heavy chain 1 (FTH1) and microtubule-associated protein 1 light chain 3B (MAP1LC3B) in mice liver tissue, while levels the ferroptosis biomarker GPX4 decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with SA high-dose groups, LNT intervention showed the reduced pathological liver damage and the downregulated levels of TNF $\alpha$ , IL-6, FTH1, and MAP1LC3B, while the level of GPX4 upregulated ( $P < 0.05$ ). Western blot experiment showed that LNT intervention antagonized the upregulated levels of FTH1, and autophagy biomarker LC3B/A, and antagonized the increased co-expressions of FTH1 with LC3B or Ub protein in SA high-dose group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** LNT antagonizes SA-exposed hepatic pathological injury and ferroptosis in mice, possibly associated with inhibition of TNF $\alpha$ -ferritinophagy signaling.

**【Keywords】** sodium arsenite; hepatotoxicity; ferroptosis; lentinan; ferritinophagy

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

环境化学污染毒物砷(arsenic, As)可通过污染土壤、饮用水或食物,对机体造成多器官毒性危害,其中肝是主要靶器官,研究显示砷暴露与肝脂肪变性、非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)、2型糖尿病等疾病发生密切相关<sup>[1]</sup>。既往研究发现,三氧化二砷染毒可诱导小鼠肝自噬水平升高、非酒精性脂肪性肝炎和肝细胞脂肪蓄积<sup>[2]</sup>。近来发现铁死亡、自噬与酒精诱导肝细胞脂质沉积<sup>[3]</sup>或高脂饮食诱导小鼠非酒精性脂肪肝病发生发展密切相关<sup>[4]</sup>,线粒体融合蛋白-2介导铁死亡是砷暴露大鼠发生非酒精性脂肪性肝炎的病理机制<sup>[5]</sup>。本课题组前期实验证实香菇多糖(lentinan, LNT)干预可改善亚砷酸钠(sodium arsenite, SA)暴露诱导的小鼠肝毒性或肝脂质蓄积,呈现出肝组织炎症相关肿瘤坏死因子受体超家族成员4(tumor necrosis factor receptor superfamily member 4, OX40)降低特征<sup>[6-8]</sup>, OX40可诱导CD4<sup>+</sup>T细胞分泌TNF $\alpha$ <sup>[9]</sup>, OX40水平升高与SA染毒小鼠肝组织TNF $\alpha$ 水平上调及炎性损伤有关<sup>[10]</sup>。研究还发现, TNF $\alpha$ 具有诱导人宫颈癌HeLa细胞自噬效应<sup>[11]</sup>,血清TNF $\alpha$ 水平升高与高脂饮食诱导肥胖大鼠骨组织铁死亡发生密切相关<sup>[12]</sup>,但目前TNF $\alpha$ 、铁自噬和铁死亡在砷染毒小鼠肝毒性中的作用机制不清楚。因此,本研究开展了SA染毒C57BL/6小鼠实验,应用LNT进行干预处理,检测肝组织TNF $\alpha$ 信号、自噬和铁死亡特征,从炎症因子-自噬角度探讨LNT拮抗SA染毒小鼠肝组织铁死亡的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

以C57BL/6N小鼠为实验对象,动物实验方案经桂林医学院实验动物伦理委员会(GLMC202303169)批准,所有的动物实验操作过程严格按照实验动物使用的3R原则和动物伦理的相关规定进行,给予实验动物人道关怀。20只SPF级C57BL/6N雄性小鼠购自长沙斯莱克实验动物有限公司[SCXK(湘)2021-0002],体重(26.4 $\pm$ 1.1)g,9~10周龄,实验小鼠饲养于桂林医学院公共卫生学院SPF级动物房[SYXK(桂)2021-0003],动物房内温度20~26 $^{\circ}$ C,相对湿度40%~60%,明暗交替周期为12h,动物自由摄食与饮水。

### 1.2 主要试剂与仪器

SA(CAS. 7784-46-5, Sigma-Aldrich); LNT(CAS. 37339-90-5),本实验室参考文献报道<sup>[13]</sup>,使用酶解+发酵法提取,多糖含量(90%);丙氨酸氨基转氨酶(ALT)试剂盒(C009-2, 建成生物);天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒(C010-2, 建成生物);TNF $\alpha$ (X5506, 上海笃玛生物);IL-6(X5508, 上海笃玛生物);微管相关蛋白1A/1B轻链3B(MAP1LC3B)(X6702, 上海笃玛生物);GPX4(X6703, 上海笃玛生物);二价铁离子(Fe<sup>2+</sup>)(X6704, 上海笃玛生物);FTH1(ab75972, Abcam);LC3(ab62721, Abcam);Ub(ab134953, Abcam)。光学显微镜(DMB5-2231P1, Motic公司);酶标仪(800 TS, BioTek公司);垂直电泳仪

(165-8001, Bio-Rad 公司); 红外激光扫描成像系统(Odyssey9120, LI-COR 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 实验分组

实验分 4 组( $n=5$ ), 分别为:( I )对照组: 去离子水作为饮用水常规喂养小鼠;( II )SA 低剂量组: SA 用去离子水溶解至 2.5 mg/kg, 灌胃染毒, 隔日 1 次, 共给药 6 周;( III )SA 高剂量组: SA 5.0 mg/kg, 灌胃染毒, 隔日 1 次, 共给药 6 周;( IV )LNT 干预+SA 高剂量组: LNT 与 SA 先后间隔 12 h 处理, LNT 溶于去离子水以 50.0 mg/kg 灌胃, 12 h 后 SA 5.0 mg/kg 灌胃染毒, 隔日 1 次, 共给药 6 周。实验结束后, 用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉并处死小鼠, 随后采集小鼠血清和分离小鼠肝组织, 肝组织一部分用 4% 多聚甲醛固定, 进行石蜡包埋制备病理切片, 经 HE 染色后显微镜下观察小鼠肝组织病理变化; 另一部分肝组织制备肝组织匀浆, 进行总蛋白提取, 检测肝组织铁自噬、铁死亡相关蛋白表达和含量。

#### 1.3.2 肝功能检测

小鼠全血静置后离心, 取上层血清, 按生化试剂盒说明书对血清中 AST 及 ALT 的含量进行检测。

#### 1.3.3 肝组织铁死亡及铁自噬指标检测

剥离小鼠肝组织, 用 PBS 缓冲液冲洗去残余血液, 置于 Dounce 匀浆器(10% w/v) 制备肝组织匀浆, 同时加入含有 0.05% II 型胶原酶的 RPMI 培养基, 37 °C 孵育 30 min, 经反复冻融后在 4500 r/min 条件下低温离心 10 min, 收集上清液后按 ELISA 法说明书进行  $Fe^{2+}$ 、GPX4、MAP1LC3B 和 IL-6 含量检测, 酶标仪检测的 OD 值通过标准曲线换算为  $\mu\text{mol/mL}$ 、 $\text{pg/mL}$  或  $\text{ng/mL}$  浓度。

#### 1.3.4 肝组织免疫蛋白印迹实验(Western blot)

肝组织分离后研磨成匀浆, 加入 RIPA 裂解液使肝组织细胞裂解, 然后经总蛋白提取、变性处理、SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭、一抗孵育、酶标记二抗孵育、化学发光及显影。免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP) 实验步骤: 肝组织细胞裂解与蛋白提取、蛋白浓度测定同 Western blot, 然后制备 Input 样品, 剩余的蛋白裂解液加入一抗(anti-FTH1、anti-LC3 或 anti-Ubiquitin) 进行共沉淀, 同时设立阴性对照组(加

入同源 IgG 抗体)。抗体孵育结束后, 向上清中加入磁珠进行磁珠沉淀和磁珠洗涤, 然后加入上样缓冲液后分别对实验组、阴性对照组、Input 组样品 Western blot 检测。实验结果应用条带积分吸光度(integral absorbance, IA) 进行相对定量分析, 以  $\beta$ -actin 作为内参( $IA_0$ ), 分析样品中目的蛋白(FTH1、LC3B/A) 表达, 表示为靶蛋白与内参蛋白吸光度之比(ratio of target protein IA to internal reference  $\beta$ -actin  $IA_0$ ,  $IA/IA_0$ ), 或靶蛋白 A 与 B 吸光度之比(ratio of LC3B to LC3A,  $IA_B/IA_A$ ), 或 FTH1 与 LC3 或 Ub 共表达水平( $IA/IA_0$ )。

#### 1.3.5 ZDOCK 法分子对接试验

进入 ZDOCK 在线服务网站(<https://zdock.wenglab.org/>), 分别在线导入蛋白分子 3D 结构 PDB 文件, 对其所含肽链分别进行 A 链或 B 链设置, 输入接收结果邮箱后点击运行, 5 min 左右即可得到蛋白大分子相互作用预测结果数据和两蛋白的氨基酸残基之间分子对接图。

### 1.4 统计学方法

实验数据以平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 应用统计软件 SPSS V27.0 进行数据分析。组间统计学差异通过单因素方差分析(ANOVA) 检验和最小显著性差异(LSD) 法进行比较评估, 以  $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

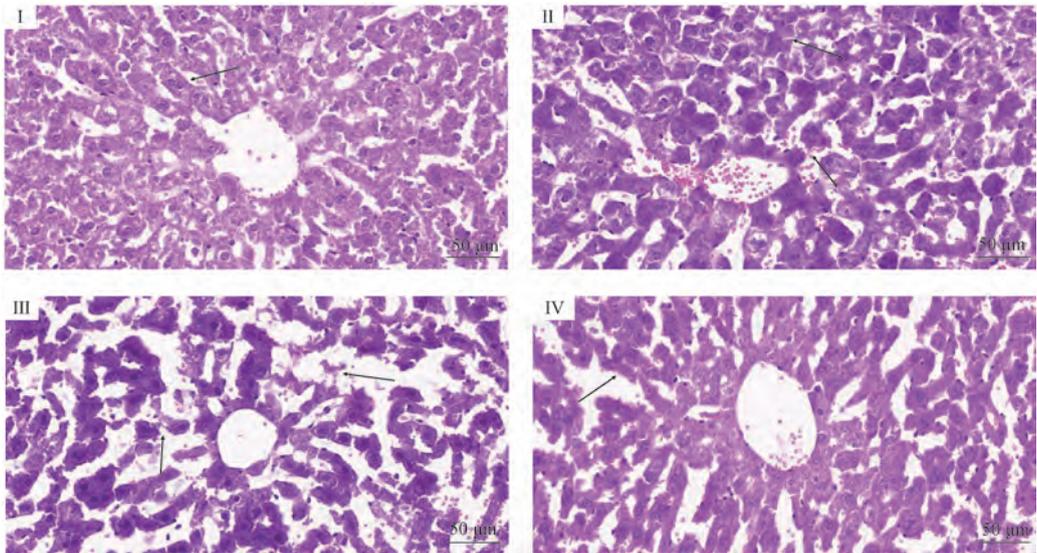
## 2 结果

### 2.1 LNT 改善 SA 染毒小鼠肝组织病理损伤

对照组肝组织显示肝细胞核居中, 细胞形态正常, 肝细胞索及细胞边界清楚。与对照组相比, SA 高剂量组或 SA 低剂量组染毒组显示肝组织细胞索离断、部分肝细胞边界不清, 呈现出水肿、变性、胞核萎缩等病理损伤特征。与 SA 低剂量组相比, SA 高剂量组肝组织细胞索离断、肝细胞水肿、变性、胞核萎缩程度进一步加重。与 SA 高剂量组相比, LNT 干预+SA 高剂量组显示肝细胞水肿变性、细胞核萎缩和肝窦扩张等病理损伤程度明显减轻(如图 1 中箭头所示)。

### 2.2 LNT 下调 SA 染毒小鼠血清 ALT、AST 和血清/肝 $TNF\alpha$ 水平

如图 2 所示, 与对照组相比, SA 高剂量组或 SA 低剂量组显示血清 ALT、AST、 $TNF\alpha$  和肝组织  $TNF\alpha$  水平升高( $P<0.05$ )。与 SA 低剂量组相



注: I:对照组,箭头所示为边界清楚的正常肝细胞核和肝细胞索; II:SA 低剂量组,箭头显示肝细胞索离断、细胞核不规则、消失; III:SA 高剂量组,箭头所示更为严重的肝细胞索离断、消失,细胞水肿变性、细胞核萎缩、不规则甚至消失; IV:LNT 干预+SA 高剂量组,箭头所示部分肝细胞索离断、细胞核不规则或消失,病理损伤程度明显减轻。

图 1 SA 染毒及 LNT 干预后小鼠肝组织 HE 染色特征

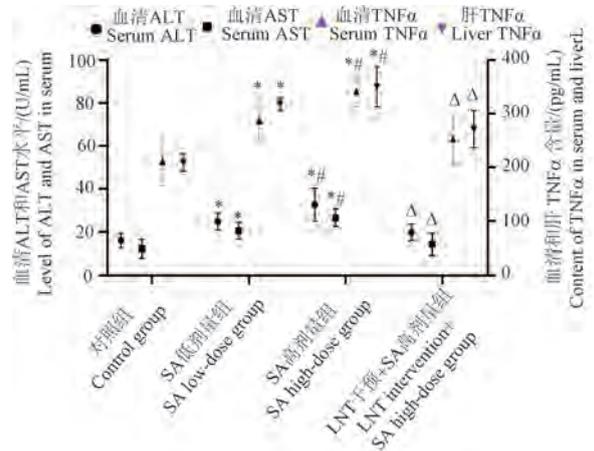
Note. I, Control group, arrow indicated clear boundary normal hepatocyte nuclei and hepatocyte cord. II, SA low-dose group, arrow displayed hepatocyte cord detachment, irregular nucleus, and disappearance. III, SA high-dose group, arrow showed more severe hepatocyte cord detachment, and disappearance, as well as cell edema and degeneration, nuclear atrophy, irregularity, and even disappearance. IV, LNT intervention+SA high-dose group, arrow showed detachment of partial hepatocyte cords, irregular or absent nuclei, and significant reduction in pathological damage.

Figure 1 HE staining characteristics of liver tissue in mice after exposure to SA and intervention with LNT

比,SA 高剂量组显示血清 ALT、AST、TNF $\alpha$  和肝组织 TNF $\alpha$  水平进一步升高( $P<0.05$ )。与 SA 高剂量组相比,LNT 干预+SA 高剂量组显示血清 ALT、AST、TNF $\alpha$  和肝组织 TNF $\alpha$  水平明显降低( $P<0.05$ )。结果提示,LNT 对 SA 诱导的肝功能损害和炎症效应产生拮抗效应。

### 2.3 LNT 拮抗 SA 染毒组 Fe $^{2+}$ 、MAP1LC3B、IL-6 和 GPX4 水平

如图 3 所示,与对照组相比,SA 高剂量组或 SA 低剂量组显示肝组织 Fe $^{2+}$ 、IL-6 和自噬标志物 MAP1LC3B 水平升高,而铁死亡标志物 GPX4 水平降低( $P<0.05$ )。与 SA 低剂量组相比,SA 高剂量组显示肝组织水平 Fe $^{2+}$  和 IL-6 进一步升高( $P<0.05$ ),而 MAP1LC3B 和 GPX4 水平变化无统计学意义( $P>0.05$ )。与 SA 高剂量组相比,LNT 干预+SA 高剂量组显示肝组织 Fe $^{2+}$ 、MAP1LC3B 和 IL-6 水平降低,而 GPX4 水平升高( $P<0.05$ )。结果提示 SA 低或高剂量染毒诱导小鼠肝组织炎症效应、铁自噬和铁死亡,LNT 干预可对此产生拮抗效应。



注:与对照组相比,\* $P<0.05$ ;与 SA 低剂量组相比,# $P<0.05$ ;与 SA 高剂量组相比, $\Delta P<0.05$ 。

图 2 血清 ALT、AST、TNF $\alpha$  和肝 TNF $\alpha$  水平特征( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Note. Compared with control group, \* $P<0.05$ . Compared with SA low-dose group, # $P<0.05$ . Compared with SA high-dose group,  $\Delta P<0.05$ .

Figure 2 Characteristics of serum ALT, AST, TNF $\alpha$ , and hepatic TNF $\alpha$  levels( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

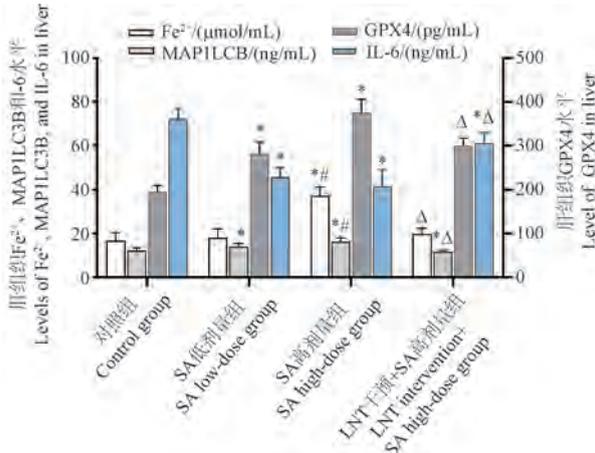
### 2.4 LNT 下调 SA 染毒组 FTH1、LC3B/A、FTH1-LC3 和 FTH1-Ub 水平

肝组织 Western blot 和 Co-IP 实验结果显示 (图 4), 与对照组相比, SA 低剂量组显示 FTH1 表达和 LC3B/A 比值升高, FTH1-LC3 蛋白或

FTH1-Ub 蛋白共表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。与 SA 低剂量组相比, SA 高剂量组 FTH1、LC3B/A 比值、FTH1-LC3 和 FTH1-Ub 水平进一步升高 ( $P < 0.05$ )。LNT 干预+SA 高剂量组与 SA 高剂量组相比, LNT 干预+SA 高剂量组显示 FTH1、LC3B/A 比值、FTH1-LC3 和 FTH1-Ub 水平降低 ( $P < 0.05$ )。结果提示, SA 暴露诱导小鼠肝组织线粒体铁蛋白 (mitochondrial ferritin, FTMT) 表达上调及其介导的铁自噬, 而 LNT 干预可抑制 SA 染毒小鼠 FTMT 表达和铁自噬。

### 2.5 FTMT 与 LC3A/B 或 Ub 之间存在互作

FTMT 主要分布在细胞线粒体中, 是一种结合铁离子的蛋白复合物, 包含铁传输蛋白结构域, 具有调节细胞铁离子平衡功能。如图 5 ZDOCK 分子对接实验结果显示, FTMT 的精氨酸 (arginine, ARG) 残基分别与自噬标志物 LC3A 或 LC3B 的蛋氨酸 (methionine, MET) 和丝氨酸 (serine, SER) 发生较稳定的氢键结合 (结合能分别为  $-11.5$  kcal/mol 和  $-8.3$  kcal/mol)。同时, FTMT 的丙氨酸 (alanine, ALA) 和苏氨酸 (threonine, THR) 残基与 Ub 的谷氨酸 (glutamate, GLU)、甘氨酸 (glycine, GLY) 和 ARG 发生较稳定的氢键结合 (结合能为  $-6.4$  kcal/mol)。结果提示, 线粒体中的 FTMT 释放进入细胞内, 与自噬相

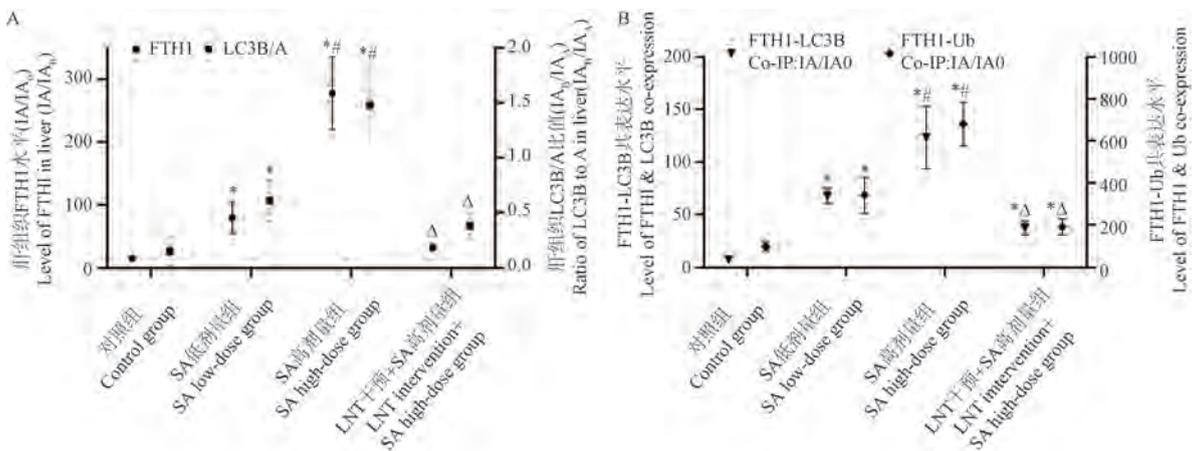


注: 与对照组相比, \*  $P < 0.05$ ; 与 SA 低剂量组相比, #  $P < 0.05$ ; 与 SA 高剂量组相比, <sup>Δ</sup>  $P < 0.05$ 。

图 3 SA 染毒或 LNT 干预后 Fe<sup>2+</sup>、MAP1LC3B、IL-6 和 GPX4 水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Note. Compared with control group, \*  $P < 0.05$ . Compared with SA low-dose group, #  $P < 0.05$ . Compared with SA high-dose group, <sup>Δ</sup>  $P < 0.05$ .

Figure 3 Levels of Fe<sup>2+</sup>, MAP1LC3B, IL-6 and GPX4 after SA exposure or LNT intervention ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

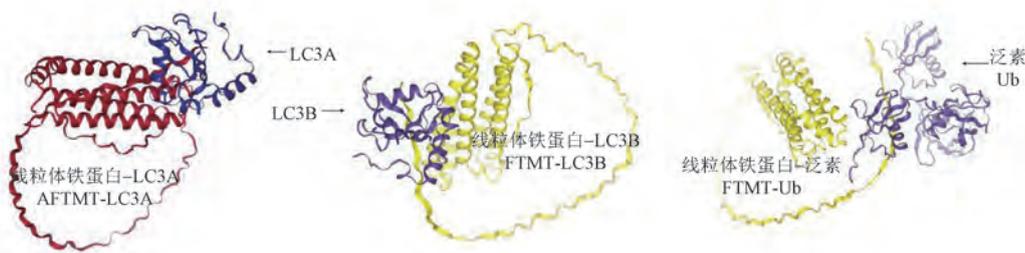


注: A: Western blot 实验结果; B: Co-IP 实验结果。与对照组相比, \*  $P < 0.05$ ; 与 SA 低剂量组相比, #  $P < 0.05$ ; 与 SA 高剂量组相比, <sup>Δ</sup>  $P < 0.05$ 。

图 4 肝组织 FTH1、LC3B/A 水平与 FTH1-LC3B、FTH1-Ub 共表达特征 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Note. A, Experimental results of Western blot. B, Experimental results of Co-IP. Compared with control group, \*  $P < 0.05$ . Compared with SA low-dose group, #  $P < 0.05$ . Compared with SA high-dose group, <sup>Δ</sup>  $P < 0.05$ .

Figure 4 FTH1 or LC3B/A levels and co-expressions of FTH1-LC3B, FTH1-Ub in liver tissue ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



注:A:对接位点:FTMT( ARG)≡LC3A(MET/SER),结合能-11.5 kcal/mol;B:对接位点:FTMT( ARG)≡LC3B(MET/SER),结合能-8.3 kcal/mol;C:对接位点:FTMT( ALA/THR)≡Ub( GLU/GLY/ARG),结合能-6.4 kcal/mol。

图5 FTMT与LC3A、LC3B及Ub分子对接ZDOCK实验

Note. A, Docking site, FTMT( ARG)≡LC3A(MET/SER), binding energy-11.5 kcal/mol. B, Docking site, FTMT( ARG)≡LC3B(MET/SER), binding energy -8.3 kcal/mol. C, Docking site, FTMT( ALA/THR)and Ub( GLU/GLY/ARG), binding energy -6.4 kcal/mol.

Figure 5 ZDOCK experiment on the docking of FTMT with LC3A, LC3B and ubiquitin

关蛋白 LC3A/B 或 Ub 发生相互作用,从而诱发 FTMT 依赖的铁自噬。

### 3 讨论

铁死亡是一种近年来发现的体内铁超载介导脂质过氧化物和脂质活性氧蓄积一种新型细胞死亡模式,其特征性表现是  $Fe^{2+}$  水平升高和 GPX4 水平降低<sup>[14]</sup>。研究发现,铁死亡是砷、镉、铜等非铁金属/类金属的毒性特征,其潜在机制为线粒体功能障碍、线粒体活性氧释放,进一步诱发铁自噬和细胞铁死亡<sup>[15-16]</sup>。例如,砷染毒鸡肝细胞发生线粒体功能障碍和 AMP 活化蛋白激酶(AMPK)-Unc-51 样激酶 1 自噬通路激活,诱导铁自噬介导肝细胞铁死亡<sup>[17]</sup>。目前认为,铁自噬是细胞铁超载及铁死亡发生的上游机制,当细胞内线粒体功能障碍发生后,受损的线粒体释放 FTMT 和核受体辅激活因子 4 构成复合物并与自噬体融合,可靶向溶酶体降解 FTMT 而释放出游离铁,从而诱发铁超载、铁自噬及铁死亡发生<sup>[18]</sup>。在本次研究中发现 SA 低剂量或高剂量染毒组小鼠肝组织自噬标志物 MAP1LC3B 升高而铁死亡标志物 GPX4 水平降低,提示肝组织发生自噬和铁死亡。进一步发现,肝组织  $Fe^{2+}$  和炎症因子  $TNF\alpha$ 、IL-6 水平呈 SA 低剂量→高剂量升高的正向剂量-效应关系,且肝组织 FTH1 表达、LC3B/A 比值、FTH1-LC3 和 FTH1-Ub 共表达亦呈随剂量增加而增加的升高趋势。而且,ZDOCK 分子对接实验亦显示 FTMT 具有结合自噬相关蛋白 LC3 和泛素蛋白 Ub 的生物学活性。结果提示 SA 诱导

小鼠肝组织细胞发生剂量依赖的炎症和铁自噬激活,导致肝细胞铁死亡。

食用菌香菇属于蘑菇科真菌类植物,具有较高的营养和药用价值,其富含的 LNT 是一种主链  $\beta$ -(1,3),侧链  $\beta$ -(1,6)-葡聚糖结构为主链的活性多糖,具有较高的抗氧化能力<sup>[19]</sup>和免疫调节活性<sup>[20]</sup>。本课题组前期发现 LNT 具有抑制砷染毒小鼠肝组织炎症因子 IL-17A 或 IL-1 $\beta$  水平和拮抗肝脂质蓄积效应<sup>[6-7]</sup>。本研究发现,LNT 干预可降低砷染毒小鼠肝组织炎症因子  $TNF\alpha$ /IL-6 水平,相应的,铁自噬标志物 FTH1、LC3B/A 水平亦降低,而铁死亡标志物水平 GPX4 升高,结果提示 LNT 可能通过抑制炎症因子  $TNF\alpha$ /IL-6 相关的铁自噬通路,对砷染毒小鼠肝组织铁死亡产生拮抗效应。

自噬是真核生物细胞维持内环境稳态的保守机制,自噬过程主要依赖于溶酶体对受损的细胞结构或线粒体等启动泛素化-蛋白酶体水解的自我降解过程,可分为大自噬、小自噬和分子伴侣介导的自噬 3 种形式<sup>[21]</sup>。 $TNF\alpha$  是一种由活化的巨噬细胞、单核细胞、T 淋巴细胞、自然杀伤细胞、内皮细胞和成纤维细胞多效炎症因子,具有诱导炎症、自噬和细胞凋亡效应<sup>[11]</sup>。研究发现,过表达  $TNF\alpha$  可通过肿瘤坏死因子受体 1( $TNF$  receptor 1,  $TNFR1$ ) 信号介导促炎症因子 IL-6 和  $TNF$  相关促凋亡配体( $TNF$ -related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)上调,诱导细胞线粒体功能障碍、自噬水平上调和早期细胞凋亡<sup>[22]</sup>。研究还发现,内皮细胞炎症因子  $TNF\alpha$ /IL-6 上调与铁

自噬激活和铁死亡有关<sup>[23]</sup>。而动物实验亦证实, 饮水亚砷酸钠暴露通过激活铁自噬诱导 C57BL/6J 雄性小鼠神经细胞铁死亡<sup>[24]</sup>。在本次研究中, 我们发现 LNT 干预后小鼠肝组织炎症因子 TNF $\alpha$  和 IL-6 水平降低, Fe<sup>2+</sup>、FTH1、LC3B/A 比值以及 FTH1-LC3 和 FTH1-Ub 共表达水平亦降低, 因此推测 LNT 可能通过抑制肝组织 TNF $\alpha$ /IL-6 炎症信号, 进而拮抗肝细胞线粒体损伤相关的铁自噬通路, 从而改善肝组织细胞铁死亡。由于本次研究仅从体内实验发现香菇多糖抑制 TNF $\alpha$ -铁自噬和拮抗 SA 染毒小鼠肝组织细胞铁死亡, 体外实验的相应证据尚显不足, 在未来的工作中应增加体外肝细胞 SA 染毒及 LNT 干预模型, 通过铁自噬或铁死亡靶向干预, 进一步从炎症-铁自噬角度探索 LNT 改善砷诱导肝毒性的生物学机制。

#### 参考文献:

[ 1 ] FREDIANI J K, NAIOTI E A, VOS M B, et al. Arsenic exposure and risk of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) among U. S. adolescents and adults: an association modified by race/ethnicity, NHANES 2005-2014 [J]. *Environ Health*, 2018, 17(1): 6.

[ 2 ] QIU T, PEI P, YAO X, et al. Taurine attenuates arsenic-induced pyroptosis and nonalcoholic steatohepatitis by inhibiting the autophagic-inflammasomal pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10): 946.

[ 3 ] 祝子鹤, 张茜茜, 张骞骞, 等. 基于铁死亡和自噬研究酒精的致肝脏细胞损伤作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(7): 1265-1272.

ZHU Z H, ZHANG Q Q, ZHANG Q Q, et al. Roles of ferroptosis and autophagy in ethanol-induced liver cell injury [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2023, 39(7): 1265-1272.

[ 4 ] 张新. 铁死亡引发小鼠非酒精性脂肪肝病的分子机制及黄芪甲苷的调控作用研究 [D]. 辽宁: 辽宁中医药大学, 2022.

ZHANG X. The molecular mechanism of ferroptosis induced non-alcoholic fatty liver disease in mice and the regulatory effect of astragaloside IV [D]. Liaoning: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2022.

[ 5 ] WEI S, QIU T, WANG N, et al. Ferroptosis mediated by the interaction between Mfn2 and IRE $\alpha$  promotes arsenic-induced nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Environ Res*, 2020, 188: 109824.

[ 6 ] 杨渊, 宋爽, 刘永莲, 等. 香菇多糖拮抗亚砷酸钠诱导小鼠肝毒性作用研究 [J]. *公共卫生与预防医学*, 2023, 34(1): 1-5.

YANG Y, SONG S, LIU Y L, et al. Antagonism of Lentinan on sodium arsenite induced hepatotoxicity in mice [J]. *J Public Health Prev Med*, 2023, 34(1): 1-5.

[ 7 ] 戴宗英, 伍纤纤, 杨渊. 香菇多糖拮抗亚砷酸钠诱导小鼠肝脏脂质沉积的实验研究 [J]. *公共卫生与预防医学*, 2024, 35(1): 20-23.

DAI Z Y, WU Q Q, YANG Y. Experimental study of Lentinan antagonizes against hepatic lipid deposition induced by sodium arsenite in mice [J]. *J Public Health Prev Med*, 2024, 35(1): 20-23.

[ 8 ] YANG Y, SONG S, NIE Y, et al. Lentinan alleviates arsenic-induced hepatotoxicity in mice via downregulation of OX40/IL-17A and activation of Nrf2 signaling [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2022, 23(1): 16.

[ 9 ] KUMARI R, CHAKRABORTY S, JAIN R, et al. Inhibiting OX40 restores regulatory T-cell function and suppresses inflammation in pulmonary sarcoidosis [J]. *Chest*, 2021, 160(3): 969-982.

[ 10 ] RENU K, SARAVANAN A, ELANGOVA N, et al. An appraisal on molecular and biochemical signalling cascades during arsenic-induced hepatotoxicity [J]. *Life Sci*, 2020, 260: 118438.

[ 11 ] NAJAFI S, ABO-ALI E M, DUKHANDE V V. Methods for studying TNF $\alpha$ -induced autophagy [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2108: 131-146.

[ 12 ] CHEN X, LIU C, YU R, et al. Interaction between ferroptosis and TNF- $\alpha$ : Impact in obesity-related osteoporosis [J]. *FASEB J*, 2023, 37(6): e22947.

[ 13 ] 敖珍, 罗迎春, 刘杨, 等. 香菇多糖提取技术研究进展 [J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(8): 202-208.

AO Z, LUO Y C, LIU Y, et al. Extraction technology of lentinan: a review [J]. *Food Res Dev*, 2022, 43(8): 202-208.

[ 14 ] 马明和, 刘川川. 铁死亡与急性肝损伤研究进展 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2023, 30(12): 1501-1506.

MA M H, LIU C C. Research progress of iron death and acute liver injury [J]. *Chin J Bases Clin Gen Surg*, 2023, 30(12): 1501-1506.

[ 15 ] ASCHNER M, SKALNY A V, MARTINS A C, et al. Ferroptosis as a mechanism of non-ferrous metal toxicity [J]. *Arch Toxicol*, 2022, 96(9): 2391-2417.

[ 16 ] QIN X, ZHANG J, WANG B, et al. Ferritinophagy is involved in the zinc oxide nanoparticles-induced ferroptosis of vascular endothelial cells [J]. *Autophagy*, 2021, 17(12): 4266-4285.

[ 17 ] YU L, LV Z, LI S, et al. Chronic arsenic exposure induces ferroptosis via enhancing ferritinophagy in chicken livers [J]. *Sci Total Environ*, 2023, 890: 164172.

[ 18 ] 张鹏宇, 李彦青, 张筱晨, 等. 铁自噬与铁死亡的关系及

- 铁自噬相关疾病 [J]. 生命的化学, 2023, 43(8): 1221-1228.
- ZHANG P Y, LI Y Q, ZHANG X C, et al. The relationship between ferritinophagy and Ferroptosis, as well as ferritinophagy related diseases [J]. Chem Life, 2023, 43(8): 1221-1228.
- [19] ZI Y, ZHANG B, JIANG B, et al. Antioxidant action and protective and reparative effects of lentinan on oxidative damage in HaCaT cells [J]. J Cosmet Dermatol, 2018, 17(6): 1108-1114.
- [20] XU X, YAN H, TANG J, et al. Polysaccharides in *Lentinus edodes*: isolation, structure, immunomodulating activity and future prospective [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2014, 54(4): 474-487.
- [21] RAVIKUMAR B, SARKAR S, DAVIES J E, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology [J]. Physiol Rev, 2010, 90(4): 1383-1435.
- [22] TYCIAKOVA S, VALOVA V, SVITKOVA B, et al. Overexpression of TNF $\alpha$  induces senescence, autophagy and mitochondrial dysfunctions in melanoma cells [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 507.
- [23] HOU H, QIN X, LI G, et al. Nrf2-mediated redox balance alleviates LPS-induced vascular endothelial cell inflammation by inhibiting endothelial cell ferroptosis [J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 3335.
- [24] 肖钧霆. 亚砷酸钠通过激活铁自噬诱导神经细胞铁死亡 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2021.
- XIAO J T. Arsenite induces ferroptosis in the neuronal cells via activation of ferritinophagy [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2021.

[收稿日期]2024-06-14

编者·读者·作者

## 《中国比较医学杂志》稿约

国内刊号 CN 11-4822/R

国际刊号 ISSN 1671-7856

邮局代号 82-917

### 一、杂志介绍

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

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

### 二、投稿要求及注意事项

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

投稿网址: <http://zgsydw.cnjournals.com>

期待您的来稿!

王静雅, 闫康, 李继安, 等. 益肾逐瘀通络汤对膝骨关节炎大鼠软骨细胞焦亡和铁死亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(1): 49-58.

Wang JY, Yan K, Li JA, et al. Effect of Yishen Zhuyu Tongluo Decoction on chondrocyte pyroptosis and ferroptosis in rats with knee osteoarthritis [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 49-58.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.005

# 益肾逐瘀通络汤对膝骨关节炎大鼠软骨细胞焦亡和铁死亡的影响

王静雅<sup>1,2</sup>, 闫康<sup>3</sup>, 李继安<sup>1,2</sup>, 王萌<sup>1,2\*</sup>, 杨雨暘<sup>1,2</sup>, 虞跃跃<sup>1,2</sup>

(1.华北理工大学中医学院,河北唐山 063210;2.河北省中西医结合重点实验室,河北唐山 063210;  
3.河北大学中医学院,河北保定 071000)

**【摘要】** 目的 探究益肾逐瘀通络汤对膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)大鼠软骨细胞焦亡和铁死亡的影响。方法 40只SD大鼠随机分为假手术组(10只)和造模组(30只);造模组大鼠右后肢膝关节均采用前交叉韧带离断术(anterior cruciate ligament-transection, ACLT)制作KOA模型,抽屉试验检测是否到位,造模操作后,驱赶大鼠每天强制活动30 min以诱导KOA模型,造模4周后大鼠出现跛行、跳跃动作,且苏木素-伊红(HE)染色出现软骨表层缺损变形和炎细胞浸润确认造模成功,造模成功后,大鼠随机分为模型组( $n=8$ )、塞来昔布组( $n=8$ )和益肾逐瘀通络汤组( $n=8$ )。各组大鼠给予生理盐水或药物灌胃干预,其中,假手术组和模型组大鼠灌胃10 mL/kg的生理盐水,塞来昔布组大鼠灌胃12 mg/kg的塞来昔布水溶液,益肾逐瘀通络汤组大鼠灌胃5.4 g/kg的中药水煎液,每天1次,连续8周。干预完成后,麻醉大鼠,腹主动脉采血分离血清,分离膝关节,每组取3份膝关节固定于多聚甲醛,其他分离关节软骨组织备用。使用HE、番红固绿染色观察大鼠关节面软骨病理改变;micro-CT分析骨微结构;ELISA检测血清白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-18的蛋白表达量;逆转录定量PCR(reverse transcription quantitative real-time PCR, RT-qPCR)检测细胞焦亡和铁死亡相关基因 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-1 $\beta$* 、*IL-18*、*ACSL-4*、*FTH-1*、*GPX-4* 和 *COX-2* 的 mRNA 相对表达水平。免疫组化检测 *NLRP3*、*Caspase-1*、*COX-2* 蛋白表达情况。结果 与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织表层缺损变形,整体各层细胞排列紊乱,番红固绿染色丢失较多,骨小梁稀疏、分布紊乱;血清炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 升高( $P<0.01$ );软骨组织 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-1 $\beta$* 、*IL-18*、*ACSL-4* 和 *COX-2* mRNA 表达量均升高(均  $P<0.01$ ), *FTH-1* 和 *GPX-4* mRNA 表达量均下降( $P<0.01$ )。与模型组比较,塞来昔布和益肾逐瘀通络汤组大鼠软骨表面较完整且平滑,细胞数量显著增多,番红固绿染色丢失较少,骨小梁致密、骨皮质丰厚,骨微结构均改善;血清炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 表达量下降( $P<0.01$ );软骨组织 *NLRP3* ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ )、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-1 $\beta$*  和 *IL-18*、*ACSL-4* 和 *COX-2* mRNA (均  $P<0.01$ ) mRNA 表达量下降; *FTH-1* 和 *GPX-4* mRNA 相对表达量显著升高( $P<0.01$ )。结论 益肾逐瘀通络汤可通过抑制 KOA 大鼠软骨细胞焦亡和铁死亡,降低血清 IL-1 $\beta$ 、IL-18 的水平,改善骨微结构,治疗 KOA。

**【关键词】** 逐瘀通络汤;骨关节炎;细胞焦亡;铁死亡

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0049-10

**【基金项目】** 河北省国际科技合作基地建设专项(19392507D);国家科技部对发展中国家科技援助项目(KY201904005)。

**【作者简介】** 王静雅(1992—),女,在读硕士研究生,研究方向:骨关节疾病发生机制与防治。E-mail:1399426535@qq.com

**【通信作者】** 王萌(1989—),女,博士,副教授,研究方向:骨关节疾病发生机制与防治。E-mail:wmedtcm@163.com

## Effect of Yishen Zhuyu Tongluo Decoction on chondrocyte pyroptosis and ferroptosis in rats with knee osteoarthritis

WANG Jingya<sup>1,2</sup>, YAN Kang<sup>3</sup>, LI Jian<sup>1,2</sup>, WANG Meng<sup>1,2\*</sup>, YANG Yuyang<sup>1,2</sup>, YU Yueyue<sup>1,2</sup>

(1. College of Traditional Chinese Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China. 2. Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hebei Province, Tangshan 063210. 3. College of Traditional Chinese Medicine, Hebei University, Baoding 071000)

**【 Abstract 】 Objective** To investigate the effects of Yishen Zhuyu Tongluo Decoction on chondrocyte pyroptosis and ferroptosis in rats with knee osteoarthritis (KOA). **Methods** Forty SD were divided randomly into a sham operation group ( $n=10$ ) and a modeling group ( $n=30$ ). A KOA model was established in the modeling group by anterior cruciate ligament transection of the right hind limb knee joint. The drawer test was used to confirm the successful establishment of the model. Post-surgery, the rats were subjected to 30 min of forced activity daily to induce KOA. Lameness and hopping movements were observed after 4 weeks, and hematoxylin and eosin staining confirmed cartilage surface damage, deformation, and inflammatory cell infiltration, indicating successful modeling. The model rats were then assigned randomly to a model group ( $n=8$ ), celecoxib group ( $n=8$ ), and Yishen Zhuyu Tongluo Decoction group ( $n=8$ ). The sham operation and model groups received 10 mL/kg of saline by gavage, the celecoxib group received 12 mg/kg of celecoxib solution, and the Yishen Zhuyu Tongluo Decoction group received 5.4 g/kg of the herbal decoction, once daily for 8 weeks. After the interventions, the rats were anesthetized, blood was collected from the abdominal aorta and serum was separated, and the knee joints were isolated. Three samples were fixed in paraformaldehyde, while the remaining cartilage tissue was reserved. Pathological changes in joint cartilage were observed by hematoxylin and eosin and Safranin O-Fast Green staining. Bone microstructure was analyzed using micro-computed tomography. Serum interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-18 protein levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Relative mRNA expression levels of *NLRP3*, *ASC*, *Caspase-1*, *GSDMD*, *IL-1 $\beta$* , *IL-18*, *ACSL-4*, *FTH-1*, *GPX-4*, and cyclooxygenase (COX)-2 were detected by reverse transcription quantitative real-time PCR, and protein expression of *NLRP3*, *Caspase-1*, and *COX-2* were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the sham operation group, model rats showed surface damage and deformation of cartilage tissue, disordered cell arrangement in all layers, significant loss of Safranin O-Fast Green staining, and sparse and irregular trabecular bone distribution. Serum levels of the inflammatory factors IL-1 $\beta$  and IL-18 were elevated ( $P<0.01$ ). mRNA expression levels of *NLRP3*, *ASC*, *Caspase-1*, *GSDMD*, *IL-1 $\beta$* , *IL-18*, *ACSL-4*, and *COX-2* were also significantly increased (all  $P<0.01$ ), while *FTH-1* and *GPX-4* mRNA expression levels were decreased ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, rats in the celecoxib and Yishen Zhuyu Tongluo Decoction groups showed smoother and more intact cartilage surfaces, significantly increased cell counts, less loss of Safranin O-Fast Green staining, denser trabecular bone, and thicker cortical bone, with improved bone microstructure. Serum IL-1 $\beta$  and IL-18 levels were reduced ( $P<0.01$ ), *NLRP3* ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), *ASC*, *Capase-1*, *GSDMD*, *IL-1 $\beta$* , *IL-18*, *ACSL-4*, and *COX-2* mRNA levels were decreased (all  $P<0.01$ ), and relative expression levels of *FTH-1* and *GPX-4* mRNA were significantly increased ( $P<0.01$ ). **Conclusions** Yishen Zhuyu Tongluo Decoction can treat KOA by inhibiting chondroptosis and ferroptosis in chondrocytes, reducing serum IL-1 $\beta$  and IL-18 levels, and improving bone microstructure.

**【 Keywords 】** Zhuyu Tongluo Decoction; osteoarthritis; cell pyroptosis; ferroptosis

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

膝关节骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种以关节软骨破坏、软骨下骨硬化等为主要病理表现的一种关节软骨退行性病变<sup>[1]</sup>。KOA 总体发病率较高,数据调查显示,我国 8.1%的人群患有 KOA 症状<sup>[2]</sup>。KOA 临床常见膝关节疼痛以及活动受限,严重影响患者的健康水平及生活质量。传统中医理论并未有“膝骨关节炎”的病名,根据其患处在膝关节且以疼痛为主诉的特征,将之归于“骨痹”“膝痹”的范畴<sup>[3]</sup>。中医理论认为,该病与肾精亏虚、元气不足、久病入络、瘀血阻滞密切相关,因此用药多选滋补肝肾、活血化瘀之品。益肾逐瘀通络汤由身痛逐瘀汤加味益气强肾、活血化瘀之品而来,常用于治疗颈椎病、肩周炎、肘关节炎、腰椎病、膝关节炎等疾病,临床效果显著。

细胞焦亡是一种细胞的裂解性死亡方式,表现为细胞胀大至细胞膜破裂,使细胞内炎性物质等细胞内容物释放至胞外,导致一系列炎症反应<sup>[4]</sup>。铁死亡是新发现的一种新型程序性细胞死亡方式,与铁超载、氨基酸代谢异常、脂质过氧化等密切相关<sup>[5]</sup>。现代研究发现,KOA 发病进程中存在滑膜巨噬细胞焦亡<sup>[6]</sup>和铁死亡的现象<sup>[7]</sup>,益肾逐瘀通络汤在实际临床应用与前期动物实验当中有缓解 KOA 的作用<sup>[8]</sup>,但其起效机制尚未知。因此,本研究旨在通过动物实验观察益肾逐瘀通络汤对 KOA 大鼠关节软骨细胞焦亡和铁死亡的影响,进一步探讨其治疗 KOA 的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

40 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,6 周龄,体重 200~230 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2020-0004]。大鼠在华北理工大学动物实验中心进行 7 d 适应性饲养[SYXK(冀)2020-0007],饲养环境符合国家标准(GB 14925-2023)。动物实验方案由华北理工大学动物伦理委员会审批通过(2021-SY-0070)。实验动物饲养和实验过程中遵循减少(reduction)、替代(replacement)和优化(refinement)的 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

益肾逐瘀通络汤全方共 17 味中药,其中包含黄芪 30 g、牛膝 12 g、杜仲 6 g、秦艽 3 g、当归 9 g、

桃仁 9 g、红花 9 g、川芎 6 g、制没药 6 g、香附 5 g、羌活 3 g、地龙 6 g、生甘草 6 g、片姜黄 6 g、全蝎 1 g、蜈蚣 1 g、鹿茸 1 g。中药饮片购于河北明珠药业有限公司,药物水煎后浓缩药液至 0.6 g/mL,4℃保存备用。白细胞介素-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )ELISA 检测试剂盒购自南京建成生物工程有限公司,货号:A0172;白细胞介素-18(Interleukin-18, IL-18)检测试剂盒购自南京博研生物科技有限公司,货号:BY-ER330204;核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 基因(NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, *NLRP3*)、凋亡相关颗粒样蛋白基因(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, *ASC*)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶基因(cysteiny aspartate specific proteinase, *Caspase-1*)、Gasdermin-D(*GSDMD*)、*IL-1 $\beta$* 、*IL-18*、长链酰基辅酶 A 合成酶 4 基因(long-chain acyl-coenzyme A synthase 4, *ACSL-4*)、重铁蛋白基因(ferritin heavy chain 1, *FTH-1*)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, *GPX4*)和环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, *COX-2*)的引物序列(见表 1)

表 1 引物序列

Table 1 Primer Sequence

名称 Name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
<i>GAPDH</i>	F: ACAGCAACAGGCTGCTGGAC R: TTTGAGGGTGCACGCAACTT
<i>NLRP3</i>	F: CTGCTGAAGTGGATCGAAGTG R: TGCAAAAGGAAGAAACCACGT
<i>ASC</i>	F: TCATTGCCAGGCTCACAAAAG R: CAACTTCTTGCAGGTCAGGTT
<i>Caspase-1</i>	F: AACTGAACAAAGAAGCTGGCC R: GCAGATAATGAGGGCAAGACG
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	F: CCTGTGTGATGAAAGACGGC R: TATGTCCCGACCATTGCTGT
<i>IL-18</i>	F: GGAATCAGACCACTTTGGCAGA R: CACAGATAGGGTCACAGCCAGT
<i>GSDMD</i>	F: ACCAGAACCGGAGTGTTTTG R: TGACTCACACGCAGCATACA
<i>ACSL4</i>	F: AAATGCAGCCAAATGGAAG R: CACAGAAAATGGCAATGGTG
<i>FTH1</i>	F: ATGATGTGGCCCTGAAGAAC R: GCACACTCCATTGCATTTCAG
<i>GPX4</i>	F: CCGGCTACAATGTCAGGTTT R: ACCGACGGCTTCTTATCAAT
<i>COX-2</i>	F: ACTACGCCTGAGTTTCTGACA R: GGTGGGCTGTCAATCAAATGT

由大连宝生物有限公司合成。EDTA 购自北京酷来搏科技有限公司,货号:CE4971;NLRP3 一抗购自华安生物,货号:ET1610-93;Caspase-1 一抗购自 Proteintech 公司,货号:22915-1-AP;COX-2 一抗购自 Proteintech 公司,货号:66351-1-Ig。

生物组织摊片机购自上海精学科学仪器有限公司,型号:JK-TBP-3A;切片机购自德国 Leica 公司,型号:TP1020;倒置生物显微镜购自麦克奥迪实业集团有限公司,型号:AE2000;FlexStation 3 多功能酶标仪购自 Molecular Devices, 型号:Flexstation 3;组织脱水机、包埋机、摊烤片机均购自武汉俊杰电子有限公司,型号:JT-12J、JB-L6、JK-6。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 分组、造模和给药

应用随机数字表法将大鼠随机分为假手术组( $n=10$ )和造模组( $n=30$ ),除假手术组,其他大鼠右侧后肢接受前交叉韧带离断术(anterior cruciate ligament-transection, ACLT),造模 KOA 模型。麻醉后将大鼠仰卧位固定于操作台,沿髌骨内缘行纵向切口打开关节腔,屈曲大鼠膝关节,侧推髌骨,暴露前交叉韧带,离断韧带后使髌骨复位,逐层缝合。抽屈试验检验造模操作是否到位。予青霉素 3 d,待伤口痊愈后,驱赶大鼠强制活动,令其每天活动不少于 30 min,持续 3 周,以诱导 KOA 模型。如大鼠出现跛行、跳跃动作,苏木素-伊红(HE)染色出现软骨表层缺损变形和炎细胞浸润则表明造模成功<sup>[9-12]</sup>。假手术组大鼠仅剪开局部皮肤后即缝合,每日活动方式、活动时长与其他组相同。造模 4 周后,造模成功的大鼠随机分为模型组( $n=8$ )、塞来昔布组( $n=8$ )和益肾逐瘀通络汤组( $n=8$ )。大鼠接受药物干预,假手术组和模型组大鼠灌胃 10 mL/(kg·d)的生理盐水;各给药组大鼠按人体剂量的 3.15 倍(低剂量)给药,塞来昔布组大鼠按照 12 mg/(kg·d)灌胃的塞来昔布水溶液;益肾逐瘀通络汤组大鼠灌胃 5.4 g/(kg·d)中药水煎液,各干预 8 周。

#### 1.3.2 HE 染色、番红固绿染色

大鼠膝关节脱钙、脱水浸蜡、包埋、切片。HE 染色:石蜡切片脱蜡至水后分别进行苏木素染色和伊红染色,脱水封片后镜下观察膝关节软骨细胞形态。番红固绿染色:石蜡切片脱蜡至水后分

别进行固绿染色和番红染色,二甲苯透明,封片后镜下观察软骨组织形态。

#### 1.3.3 ELISA 检测血清 IL-1 $\beta$ 、IL-18 的表达

应用 ELISA 试剂盒检测血清 IL-1 $\beta$ 、IL-18 的水平。实验操作方法按试剂盒说明书执行。

#### 1.3.4 micro-CT 分析

应用 4%多聚甲醛将大鼠右膝关节固定后送至上海市第六人民医院进行 micro-CT 扫描,观察大鼠膝关节骨微结构。

#### 1.3.5 逆转录定量 PCR (reverse transcription quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 检测 mRNA 的表达

用 TRIzol 试剂从右膝关节软骨中提取总 RNA,逆转录成 cDNA,使用实时定量 PCR 检测基因 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$ 、IL-18、ACSL-4、FTH-1、GPX-4 和 COX-2 的表达水平。

#### 1.3.6 免疫组化检测蛋白的表达

按照免疫组化试剂盒说明书进行操作。石蜡切片脱蜡水化后进行抗原修复,加入内源性过氧化物酶抑制剂,一抗 4℃过夜,加入二抗,37℃孵育,DAB 显色。观察关节软骨中 NLRP3、ASC、Caspase-1 和 COX-2 的表达。

### 1.4 统计学方法

应用 SPSS 22.0 软件对数据进行处理,检测结果用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较应用 One-Way ANOVA。事后比较方差齐时用 Bonferroni 检验,方差不齐用 Tamhane  $T_2$  检验。以  $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 益肾逐瘀通络汤对软骨组织形态学的影响

HE 染色主要用于观察软骨细胞形态学的情况,其中细胞核呈蓝色,细胞质呈红色。如图 1 所示,假手术组关节软骨表面光滑且完整,各层细胞排列整齐;而模型组关节软骨表层缺损变形,整体各层细胞排列紊乱;塞来昔布组和益肾逐瘀通络汤组软骨表面较完整且平滑,细胞数量显著增多。

番红固绿染色主要用于观察关节软骨、软骨下的骨组织结构,其中关节软骨呈红色或橙红色,成骨呈绿色。如图 2 所示,假手术组软骨表面光滑,结构正常,关节面整齐,无番红固绿丢失;

模型组软骨组织关节面结构破坏,表面粗糙,番红固绿染色丢失;塞来昔布组和益肾逐瘀通络汤组大鼠骨组织关节面结构明显改善,表面略微粗糙番红固绿染色丢失较少。

### 2.2 益肾逐瘀通络汤对骨微结构的影响

micro-CT 检测结果见图 3。软骨下骨二维成像所示,与假手术组比较,模型组骨小梁变得稀疏、分布紊乱,骨皮质变薄;与模型组比较,塞来昔布组与益肾逐瘀通络汤组骨小梁致密、骨皮质丰厚,骨微结构均改善。

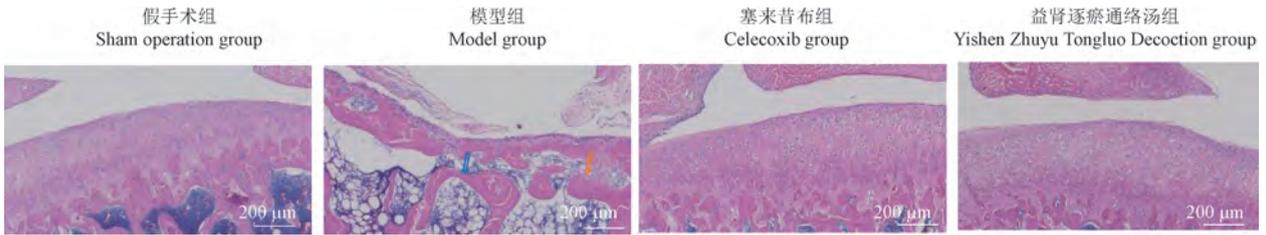
### 2.3 益肾逐瘀通络汤对血清炎症因子的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血清细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 显著升高 ( $P < 0.01$ ),存在明显的炎症反应;与模型组比较,塞来昔布组和益肾逐

瘀通络汤组均显著下调了大鼠的血清炎症因子表达 ( $P < 0.01$ ),提示二者均具有抗炎作用。见表 2。

### 2.4 益肾逐瘀通络汤对软骨细胞焦亡的影响

与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-1 $\beta$*  和 *IL-18* mRNA 相对表达量均显著升高 ( $P < 0.01$ ),KOA 模型大鼠软骨组织中存在炎症和细胞焦亡相关基因表达上调;与模型组比较,塞来昔布组和益肾逐瘀通络汤组大鼠软骨组织 *NLRP3* ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-1 $\beta$*  和 *IL-18* (均  $P < 0.01$ ) mRNA 表达量下降,益肾逐瘀通络汤能够显著降低炎性与细胞焦亡基因表达。见表 3,图 4。

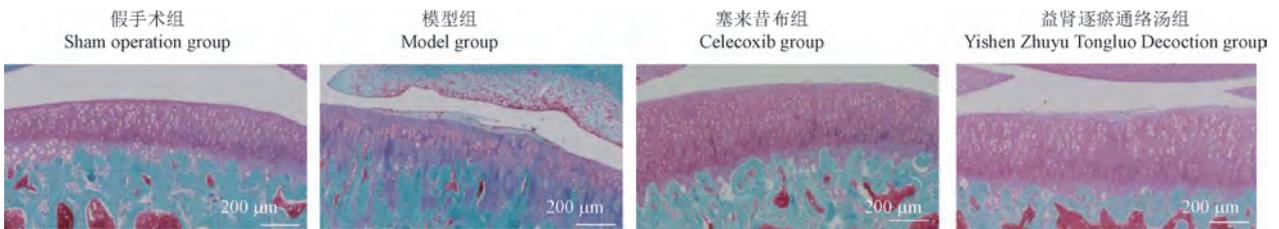


注:蓝色箭头:软骨表层缺损变形;黄色箭头:软骨细胞增生。

图 1 软骨 HE 染色

Note. Blue arrow, Surface layer of cartilage was defective and deformed. Yellow arrow, Chondrocyte proliferation.

Figure 1 HE staining of cartilage



注:蓝色箭头:软骨表层缺损变形,黄色箭头:染色缺失。

图 2 软骨番红固绿染色

Note. Blue arrow, Surface layer of cartilage was defective and deformed. Yellow arrow, Staining deficiency.

Figure 2 cartilage safranin and solid green staining

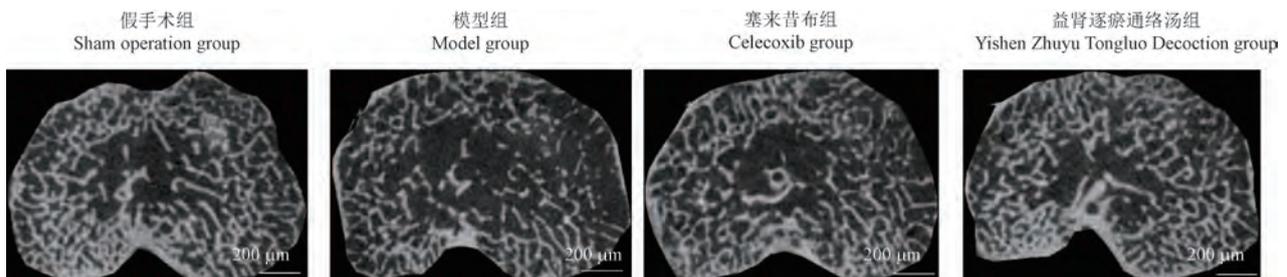


图 3 软骨下骨 2D 成像图像

Figure 3 2D imaging image of subchondral bone

### 2.5 益肾逐瘀通络汤对软骨细胞铁死亡的影响

与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织 *ACSL-4* 和 *COX-2* mRNA 表达量显著升高 ( $P < 0.01$ ), *FTH-1* 和 *GPX-4* mRNA 表达量显著下降 ( $P < 0.01$ ), *KOA* 模型大鼠的软骨组织中存在铁死亡相关基因表达的显著变化,这可能与软骨细

胞的损伤和 *KOA* 的进展有关;与模型组比较,塞来昔布组和益肾逐瘀通络汤组大鼠软骨组织 *ACSL-4* 和 *COX-2* mRNA 表达量显著下降 ( $P < 0.01$ ), *FTH-1* 和 *GPX-4* mRNA 表达量显著升高 ( $P < 0.01$ ),益肾逐瘀通络汤能够显著降低铁死亡相关基因的表达,提高铁稳态和抗氧化相关基因的表达。见表 4,图 5。

表 2 益肾逐瘀通络汤对血清炎症因子的影响 ( $n=6$ )

Table 2 Effect of Yishen Zhuyu Tongluo Decoction on serum inflammatory factors ( $n=6$ )

组别 Group	白介素-1 $\beta$ /(pg/mL) IL-1 $\beta$	白介素-18/(ng/L) IL-18
假手术组 Sham operation group	56.21 $\pm$ 3.00	9.11 $\pm$ 1.49
模型组 Model group	106.43 $\pm$ 3.99**	32.76 $\pm$ 0.99**
塞来昔布组 Celecoxib group	66.73 $\pm$ 4.90 $\Delta\Delta$	18.51 $\pm$ 1.63 $\Delta\Delta$
益肾逐瘀通络汤组 Yishen Zhuyu Tongluo Decoction group	59.50 $\pm$ 3.73 $\Delta\Delta$	27.30 $\pm$ 1.04 $\Delta\Delta$

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

Note. Compared with sham operation group, \*\*  $P < 0.01$ . Compared with model group,  $\Delta\Delta$   $P < 0.01$ .

表 3 益肾逐瘀通络汤对软骨细胞 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-1 $\beta$*  和 *IL-18* mRNA 的影响 ( $n=3$ )

Table 3 Effects of Yishen Zhuyu Tongluo Decoction on *NLRP3*, *ASC*, *Caspase-1*, *GSDMD*, *IL-1 $\beta$*  and *IL-18* mRNA in chondrocytes ( $n=3$ )

组别 Groups	<i>NLRP3</i>	<i>ASC</i>	<i>Caspase-1</i>	<i>GSDMD</i>	<i>IL-1<math>\beta</math></i>	<i>IL-18</i>
假手术组 Sham operation group	1	1	1	1	1	1
模型组 Model group	4.16 $\pm$ 0.08**	3.53 $\pm$ 0.20**	4.59 $\pm$ 0.17**	3.95 $\pm$ 0.05**	3.47 $\pm$ 0.20**	3.19 $\pm$ 0.43**
塞来昔布组 Celecoxib group	1.10 $\pm$ 0.01 $\Delta\Delta$	1.04 $\pm$ 0.02 $\Delta\Delta$	1.30 $\pm$ 0.08 $\Delta\Delta$	1.25 $\pm$ 0.07 $\Delta\Delta$	1.22 $\pm$ 0.19 $\Delta\Delta$	1.32 $\pm$ 0.21 $\Delta\Delta$
益肾逐瘀通络汤组 Yishen Zhuyu Tongluo Decoction group	2.51 $\pm$ 0.25 $\Delta$	2.66 $\pm$ 0.22 $\Delta\Delta$	2.01 $\pm$ 0.18 $\Delta\Delta$	2.43 $\pm$ 0.17 $\Delta\Delta$	2.23 $\pm$ 0.24 $\Delta\Delta$	1.91 $\pm$ 0.27 $\Delta\Delta$

注:与假手术组相比, \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组相比,  $\Delta$   $P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta$   $P < 0.01$ 。

Note. Compared with sham operation group, \*\*  $P < 0.01$ . Compared with model group,  $\Delta$   $P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta$   $P < 0.01$ .

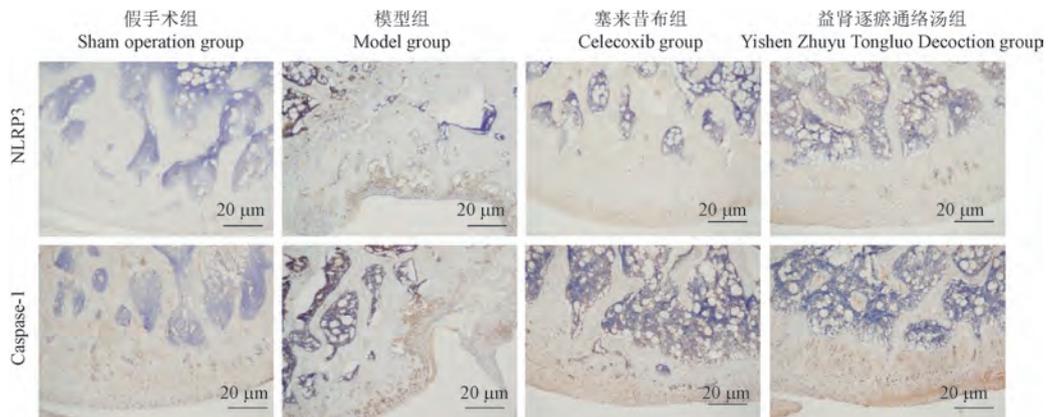


图 4 各组大鼠膝关节软骨组织中 *NLRP3*、*Caspase-1* 蛋白表达

Figure 4 Expression of *NLRP3* and *Caspase-1* proteins in knee joint cartilage tissue of rats in each group

表 4 益肾逐瘀通络汤对软骨细胞 *ACSL-4*、*COX-2*、*FTH-1*、*GPX-4* mRNA 的影响 ( $n=3$ )Table 4 Effects of Yishen Zhuyu Tongluo Decoction on *ACSL-4*, *COX-2*, *FTH-1*, and *GPX-4* mRNA in chondrocytes ( $n=3$ )

组别 Groups	<i>ACSL-4</i>	<i>COX-2</i>	<i>FTH-1</i>	<i>GPX-4</i>
假手术组 Sham operation group	1	1	1	1
模型组 Model group	3.77±0.48**	2.53±0.07**	0.26±0.03**	0.20±0.03**
塞来昔布组 Celecoxib group	1.02±0.08 $\Delta\Delta$	1.31±0.13 $\Delta\Delta$	0.89±0.08 $\Delta\Delta$	0.88±0.06 $\Delta\Delta$
益肾逐瘀通络汤组 Yishen Zhuyu Tongluo Decoction group	1.96±0.10 $\Delta\Delta$	1.41±0.13 $\Delta\Delta$	0.67±0.03 $\Delta\Delta$	0.60±0.07 $\Delta\Delta$

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

Note. Compared with sham operation group, \*\* $P<0.01$ . Compared with model group,  $\Delta\Delta P<0.01$ .

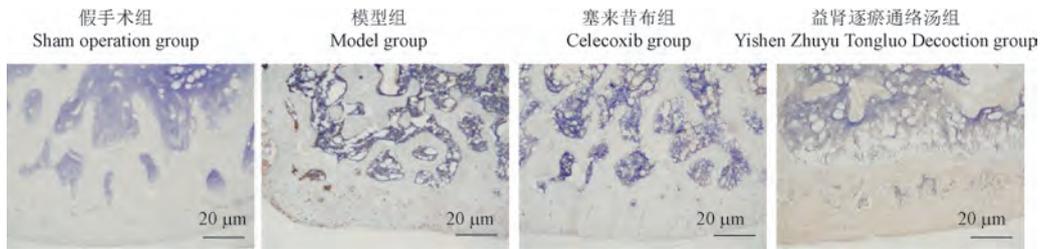


图 5 大鼠膝关节软骨组织 COX-2 表达

Figure 5 COX-2 expression in rat knee joint cartilage tissue

### 3 讨论

内经指出“年四十,而阴气自半,起居衰矣”,强调了肾精不足是机体衰老的主导因素<sup>[10-12]</sup>,而 KOA 的主要发病机制在于软骨发生退行性变化,软骨成分发生改变,最终导致关节疼痛和功能丧失,与肾虚精亏所致经脉痹阻密切相关。益肾逐瘀通络汤由身痛逐瘀汤去掉五灵脂加黄芪、鹿茸、杜仲、全蝎、蜈蚣、片姜黄化裁而来,在原方活血通络的基础上,加黄芪补气以活血,杜仲、鹿茸补肝肾、壮筋骨;全蝎、蜈蚣、片姜黄通络化瘀,使全方具有益气强肾、活血祛瘀、通痹止痛之功,符合中老年人 KOA 肾精亏虚、络脉不畅的基本病机。本方临床常用于治疗瘀血痹阻、肾精不充、筋骨失荣导致的各种退行性关节病经久不愈者。

细胞焦亡、铁死亡是区别于传统细胞凋亡、坏死和自噬的两种新型细胞程序性死亡,具有不同的生物学特征,对 KOA 软骨基质稳态具有调控作用,是引起软骨成分改变的重要因素,这同时也是 KOA 瘀血痹阻、肾精不充、筋骨失荣的具体体现。塞来昔布是非甾体类抗炎药,是临床治疗 KOA 的常规药物,本品通过抑制环氧化酶-2

(COX-2)来抑制前列腺素生成,可以减少局部组织的水肿和疼痛。因此,本实验以塞来昔布为阳性对照药。

近年来,部分研究证明细胞焦亡可能与 KOA 的软骨破坏有关<sup>[13-14]</sup>。具体来说, NLRP3 (NOD 样受体蛋白 3) 炎症小体的激活可以介导 Caspase-1,促使 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的前体加工裂解,促进细胞焦亡,破坏膝关节软骨<sup>[15]</sup>。研究表明,IL-1 $\beta$  在 KOA 的发病过程中起重要作用,包括加速关节软骨破坏,促进软骨纤维化等<sup>[16-17]</sup>。IL-18 可刺激 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的释放,进而协调促进基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)生成,并加速降解 II 型胶原和蛋白聚糖,破坏软骨细胞基质稳态<sup>[18]</sup>。因此,调控 NLRP3 炎症小体介导依赖 Caspase-1 的细胞焦亡是抑制 KOA 的炎症损伤的重要方法。本实验结果表明与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-1 $\beta$*  和 *IL-18* 表达量均显著升高,与模型组比较,益肾逐瘀通络汤组大鼠软骨组织 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-1 $\beta$*  和 *IL-18* 表达量下降。说明 KOA 大鼠软骨细胞出现 NLRP3 炎症小体活化和细胞焦亡,而益肾逐瘀通络汤可

以抑制软骨细胞焦亡,治疗 KOA。

铁死亡被发现与 KOA 的发生发展有着密切的联系<sup>[19]</sup>。铁死亡与传统的细胞死亡方式不同,其主要是由于铁含量的增高引起细胞内脂质活性氧生成与降解的平衡失调而引起的细胞死亡<sup>[20]</sup>。铁死亡具有典型的生物化学特征,如谷胱甘肽耗竭以及 GPX4 被抑制,使得细胞内活性氧浓度上升、细胞内 Fe<sup>2+</sup> 水平升高,同时还会出现线粒体膜电位的下降、发生炎症反应等现象,进而促进骨关节炎的发生<sup>[21]</sup>。骨关节炎患者滑液中铁的浓度明显高于健康人,此外,关节损伤程度与血清铁蛋白升高呈正相关。ACSL4 是多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFAs) 代谢的重要同工酶,决定细胞铁死亡的敏感性<sup>[22]</sup>。COX-2 是催化体内 AA 合成前列腺素 (PG) 步骤中的限速酶,是脂质过氧化和铁死亡的标志物<sup>[23]</sup>, GPX4 蛋白是人体内一类能够将脂质过氧化物还原为醇类的酶,可以减少细胞中的脂质过氧化物的积累并且帮助细胞存活,GPX4 蛋白丧失活性可以促进铁死亡的发生<sup>[24]</sup>。铁蛋白 (ferritin) 由重链 (ferritin heavy chain, FTH) 和轻链 (ferritin light chain, FTL) 两种亚基构成球壳空腔结构,是细胞内最主要的储铁蛋白,维持细胞内铁稳态,减少 Fenton 反应导致的氧化应激,达到保护细胞的目的,铁输入和 ferritin 降解等过程都促进铁死亡<sup>[25]</sup>。本研究发现与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织 ACSL-4 和 COX-2 表达量均显著升高, FTH-1 和 GPX-4 表达量均显著下降;与模型组比较,益肾逐瘀通络汤组大鼠软骨组织 ACSL-4 和 COX-2 表达量下降, FTH-1 和 GPX-4 表达量升高。说明除细胞焦亡外, KOA 大鼠软骨细胞出现铁死亡现象,而益肾逐瘀通络汤可以抑制软骨铁死亡。

KOA 是一种退行性疾病,这与老年人年老体衰,肾精亏虚,筋骨失荣;久病入络,瘀血阻滞,经脉痹阻密切相关。肾精亏虚,筋骨失荣则关节软骨组织不能得到精血荣养,细胞出现各种异常死亡,如细胞焦亡、铁死亡等。瘀血阻滞,经脉痹阻,使得关节软骨组织出现炎症反应。本研究表明益肾逐瘀通络汤既可益气强肾又可活血祛瘀、通痹止痛,是治疗 KOA 的有效方剂,其作用机制可能与抑制 KOA 大鼠软骨细胞焦亡和铁死亡,降低

血清 IL-1 $\beta$ 、IL-18 的水平,改善骨微结构有关。

#### 参考文献:

- [1] 廖太阳,王培民,张农山,等. NLRP3 炎症小体在 KOA 发病机制中的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(12): 91-96.  
LIAO T Y, WANG P M, ZHANG N S, et al. Role of the NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of knee osteoarthritis [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 91-96.
- [2] 王斌,邢丹,董圣杰,等. 中国膝关节炎流行病学和疾病负担的系统评价 [J]. 中国循证医学杂志, 2018, 18(2): 134-142.  
WANG B, XING D, DONG S J, et al. Prevalence and disease burden of knee osteoarthritis in China: a systematic review [J]. Chin J Evid Based Med, 2018, 18(2): 134-142.
- [3] 余皓,张洸,李雪萍,等. 独活寄生汤对膝关节骨性关节炎患者膝关节功能、疼痛及血清炎症因子的影响 [EB/OL]. [2024-08-29]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.r.20240828.1623.019.html>.  
YU H, ZHANG X, LI X P, et al. Effect of Duhuo Jisheng decoction on knee joint function, pain and serum inflammatory factors in patients with knee osteoarthritis [EB/OL]. [2024-08-29]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.r.20240828.1623.019.html>.
- [4] 王秋苑,刘又文,岳辰,等. 细胞焦亡相关因子在类风湿关节炎患者中的表达及意义 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(32): 5209-5213.  
WANG Q Y, LIU Y W, YUE C, et al. Expression and significance of pyroptosis-related factors in patients with rheumatoid arthritis [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2023, 27(32): 5209-5213.
- [5] YAO X, SUN K, YU S, et al. Chondrocyte ferroptosis contribute to the progression of osteoarthritis [J]. J Orthop Translat, 2021, 27: 33-43.
- [6] 譙童茜,唐成林,邱丽,等. 基于 NLRP3 炎症小体通路探讨电针对急性痛风性关节炎大鼠组织蛋白酶 B 的影响 [J]. 针刺研究, 2021, 46(4): 295-300.  
QIAO T X, TANG C L, QIU L, et al. Cathepsin-B involved in effect of electroacupuncture by inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome in rats with acute gouty arthritis [J]. Acupunct Res, 2021, 46(4): 295-300.
- [7] WANG Z, EFFERTH T, HUA X, et al. Medicinal plants and their secondary metabolites in alleviating knee osteoarthritis: a systematic review [J]. Phytomedicine, 2022, 105: 154347.
- [8] 杨清林,杨雨暘,王萌,等. 益肾活络逐痛汤对膝关节炎大鼠软骨损伤及骨微结构的影响 [J]. 中成药, 2023,

- 45(7): 2158-2166.
- YANG Q L, YANG Y Y, WANG M, et al. Effects of Yishen Huoluo Zhutong Decoction on cartilage injury and bone microstructure in rats with knee osteoarthritis [J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(7): 2158-2166.
- [9] 吴强, 郑倩华, 蒋一璐, 等. 膝骨性关节炎动物模型选择与制备的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 125-130.
- WU Q, ZHENG Q H, JIANG Y L, et al. A comparative study of animal model selection and preparation for knee osteoarthritis [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 125-130.
- [10] 金晓飞, 杨郁鹏, 赵季宇, 等. 运用制动法建兔 KOA 分期模型的合理性分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(5): 78-82.
- JIN X F, YANG Y P, ZHAO J Y, et al. Analysis of the rabbit knee osteoarthritis staging model using the braking method [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(5): 78-82.
- [11] 黄俊杰, 陈民利, 朱科燕, 等. WHBE 兔膝关节关节炎模型的建立与 PRFr 的干预研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 65-73.
- HUANG J J, CHEN M L, ZHU K Y, et al. Establishment of a WHBE rabbit knee osteoarthritis model and therapeutic effect of platelet-rich fibrin releasates [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 65-73.
- [12] 欧宝芳, 别亚男, 陈千晴, 等. 改良后 Hulth 法和 II 型胶原酶注射法建立兔膝关节关节炎模型的比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 29-37.
- OU B F, BIE Y N, CHEN Q Q, et al. Comparison of the modified Hulth model and intra-articular type II collagenase injection as established rabbit models of knee osteoarthritis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 29-37.
- [13] XIAO Y, DING L, YIN S, et al. Relationship between the pyroptosis of fibroblast-like synoviocytes and HMGB1 secretion in knee osteoarthritis [J]. Mol Med Rep, 2021, 23(2): 97.
- [14] AN F, SUN B, LIU Y, et al. Advances in understanding effects of miRNAs on apoptosis, autophagy, and pyroptosis in knee osteoarthritis [J]. Mol Genet Genomics, 2023, 298(6): 1261-1278.
- [15] 高飞, 于博睿, 谢惠迪, 等. 芪地糖肾方对糖尿病肾病足细胞焦亡及 MAPK14/RELA/Caspase-8 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(13): 67-75.
- GAO F, YU B R, XIE H D, et al. Implication of qidi Tangshen prescription (QDTS) on podocyte pyroptosis in diabetes nephropathy by regulating MAPK14/RELA/Caspase-8 signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2024, 30(13): 67-75.
- [16] 付长龙, 叶锦霞, 林洁, 等. 新型程序性细胞死亡对骨关节炎软骨基质稳态影响之初探 [J]. 风湿病与关节炎, 2020, 9(5): 55-57, 80.
- FU C L, YE J X, LIN J, et al. On the effect of new programmed cell death on cartilage matrix homeostasis in osteoarthritis [J]. Rheum Arthritis, 2020, 9(5): 55-57, 80.
- [17] ZHAO L R, XING R L, WANG P M, et al. NLRP1 and NLRP3 inflammasomes mediate LPS/ATP-induced pyroptosis in knee osteoarthritis [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4): 5463-5469.
- [18] 柴居堂, 宁红霞, 李永章, 等. 中药干预细胞焦亡防治骨关节相关疾病机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(6): 289-298.
- CHAI J T, NING H X, LI Y Z, et al. Mechanism of traditional Chinese medicine intervening in pyroptosis to prevent and treat bone and joint related diseases; a review [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2024, 30(6): 289-298.
- [19] BAO T, LIAO T, CAI X, et al. METTL3 mediated ferroptosis in chondrocytes and promoted pain in KOA via HMGB1 m6A modification [J]. Cell Biol Int, 2024, 48(11): 1755-1765.
- [20] 刘祥辉, 彭国璇, 彭洪成, 等. 成骨分化中的铁死亡在骨质疏松发病机制中的研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2024, 30(2): 305-312.
- LIU X H, PENG G X, PENG H C, et al. Research in ferroptosis in osteogenic differentiation and its role in the pathogenesis of osteoporosis [J]. Chin J Osteoporos, 2024, 30(2): 305-312.
- [21] 高振罡, 章晓云, 蒋文. 铁死亡在骨关节炎中的作用机制及其中医药干预研究进展 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(14): 2242-2247.
- GAO Z G, ZHANG X Y, JIANG W. Mechanism of ferroptosis in osteoarthritis and its traditional Chinese medicine interventions [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2024, 28(14): 2242-2247.
- [22] 邓怡然, 马丽芳, 王佳谊. 铁死亡在肿瘤诊断和治疗中的研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 2023, 45(12): 1920-1930.
- DENG Y R, MA L F, WANG J Y. Research progress on ferroptosis in tumor diagnosis and treatment [J]. Chin J Cell Biol, 2023, 45(12): 1920-1930.
- [23] 牛媛媛, 樊泽坤, 汪龙德, 等. 诱导肝星状细胞铁死亡在肝纤维化防治中的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(9): 2281-2289.
- NIU Y Y, FAN Z K, WANG L D, et al. Research progress on induced hepatic stellate cell ferroptosis in prevention and treatment of liver fibrosis [J]. China J Chin Mater Med, 2024, 49(9): 2281-2289.

[24] 王芹, 何梦婕, 龙方懿. 铁死亡相关的环状 RNA 在疾病中的作用及机制 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2024, 40(3): 295-311.

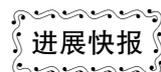
WANG Q, HE M J, LONG F Y. Role and mechanism of iron death-related circular RNA in diseases [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2024, 40(3): 295-311.

[25] 方学贤, 蔡昭贤, 王浩, 等. 铁过载及铁死亡在心脏疾病

中的研究进展 [J]. 科学通报, 2019, 64(S2): 2974-2987.

FANG X X, CAI Z X, WANG H, et al. Research progress of iron overload and iron death in heart diseases [J]. Chin Sci Bull, 2019, 64(S2): 2974-2987.

[收稿日期] 2024-07-07



## 创伤后脑损伤修复中的神经营养素和神经干细胞

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是导致残疾、精神障碍甚至死亡的主要原因, 其发病率和社会成本不断上升。尽管人们已经开发并测试了不同的治疗策略来缓解神经功能衰退, 但仍无法彻底治愈这些疾病。研究发现, 以脑源性神经营养因子为代表的各种神经营养素是神经炎症、细胞凋亡、血脑屏障通透性、神经元再生和记忆功能的关键调节因子。这些因子在缓解神经炎症和促进神经再生方面发挥着重要作用。此外, 神经干细胞 (neural stem cell, NSCs) 通过其固有的神经保护和免疫调节特性、神经营养素的释放、内源性 NSCs 的激活以及细胞间信号传导, 促进神经修复。值得注意的是, 创新性的研究建议正在出现, 即结合脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 和 NSCs, 使它们在促进损伤修复和改善创伤后神经元分化方面协同互补、相互促进。在这篇综述中, 我们总结了神经营养素在创伤性脑损伤后促进神经发生和恢复神经功能的机制, 全面探讨了各种神经营养素在创伤性脑损伤基础研究中的潜在治疗作用, 并研究了它们与 NSCs 的相互作用。这项工作旨在为神经营养素在创伤性脑损伤中的临床治疗和转化提供有价值的见解, 从而促进创伤性脑损伤治疗学的进步。

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*, 2024, 7(1): 12-23. doi: 10.1002/ame2.12363)。

唐婧,徐韦琳,刘蓉,等. AKT/mTOR 通路介导自噬参与肩袖撕裂相关肌肉萎缩运动康复的分子机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(1): 59-66, 126.

Tang J, Xu WL, Liu R, et al. Molecular mechanisms of autophagy mediated by AKT/mTOR pathway in exercise rehabilitation of rotator cuff tear-related muscle atrophy [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 59-66, 126.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.006

# AKT/mTOR 通路介导自噬参与肩袖撕裂相关肌肉萎缩运动康复的分子机制

唐婧,徐韦琳,刘蓉,王洪涛\*

(武汉市东西湖区人民医院康复医学科,武汉 430040)

**【摘要】** 目的 探讨蛋白激酶 B (AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路介导自噬参与肩袖撕裂 (RCTs) 相关肌肉萎缩运动康复的分子机制。方法 40 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分配到假手术组、RCTs 组、RCTs+运动组和 RCTs+运动+雷帕霉素组,每组 10 只。在分组处理后第 8 周,通过组织学分析骨-肌腱界面愈合和肌肉细胞萎缩情况。通过实时定量逆转录聚合酶链反应测量网上肌肉组织中肌肉萎缩相关基因 (*Atrogin-1*、*Bnip 3*、*MuRF-1*) 的 mRNA 表达水平。通过免疫蛋白印迹检测不同组网上肌组织中 LC3、AKT/mTOR 信号通路表达,通过透射电子显微镜分析各组中自噬体的产生。结果 与假手术组相比,RCTs 组网上肌腱止点骨-肌腱界面成熟评分、网上肌纤维横截面积显著降低 ( $P<0.001$ ),肌肉损失以及 *Atrogin-1*、*Bnip 3*、*MuRF-1* 基因表达显著增加 ( $P<0.001$ )。与 RCTs 组相比,RCTs+运动组网上肌腱止点骨-肌腱界面成熟评分、网上肌纤维横截面积显著增加 ( $P<0.01$ ),肌肉损失以及 *Atrogin-1*、*Bnip 3*、*MuRF-1* 基因表达显著降低 ( $P<0.01$ )。与假手术组相比,RCTs 组网上肌组织中 LC3 I/LC3 II、自噬体的数量显著增加 ( $P<0.001$ ),p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 显著降低 ( $P<0.01$ )。与 RCTs 组相比,RCTs+运动组 LC3 I/LC3 II、自噬体的数量显著降低 ( $P<0.01$ ),p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 显著增加 ( $P<0.001$ )。雷帕霉素的加入显著逆转了 RCTs+运动组的康复效果。结论 本研究确定了运动康复在 RCTs 疾病中抗萎缩作用,其作用机制与激活 AKT/mTOR 信号抑制自噬有关。

**【关键词】** 蛋白激酶 B;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;肩袖撕裂;小鼠;肌肉萎缩;自噬

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0059-08

## Molecular mechanisms of autophagy mediated by AKT/mTOR pathway in exercise rehabilitation of rotator cuff tear-related muscle atrophy

TANG Jing, XU Weilin, LIU Rong, WANG Hongtao\*

(Department of Rehabilitation Medicine, Wuhan Dongxihu District People's Hospital, Wuhan 430040, China)

**【基金项目】** 湖北省卫生健康委员会科研项目 (WJ2021M039);武汉市医学科研项目 (WX20D12)。

**【作者简介】** 唐婧 (1987—),女,主治医师,研究方向:骨科康复治疗。E-mail: spwm840@163.com

**【通信作者】** 王洪涛 (1974—),男,副主任医师,研究方向:颈椎病、腰椎间盘突出、骨性关节炎等骨骼肌肉疾病的康复治疗。

E-mail: kangfu2023@126.com

**【Abstract】 Objective** To explore the molecular mechanism of autophagy mediated by the protein kinase B (AKT)/mammalian target protein of rapamycin (mTOR) pathway in the rehabilitation of muscle atrophy associated with rotator cuff tears (RCTs). **Methods** Forty male C57BL/6J mice were randomly assigned to the following four groups: sham group, RCTs group, RCTs + exercise group, and RCTs + exercise + rapamycin group, with 10 mice in each group. On the eighth week after grouping, healing of the bone-tendon interface and muscle cell atrophy were analyzed by histology. The mRNA expression levels of muscle-atrophy-related genes (*Atrogin-1*, *Bnip 3*, *MuRF-1*) in supraspinatus muscle tissue were measured by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. The expression of LC3 and AKT/mTOR signal pathway proteins in the supraspinatus muscle tissue of the groups was detected by Western blot, and the degree of autophagy in each group was analyzed by transmission electron microscope. **Results** Compared with the sham operation group, in RCTs group's maturity score for the bone-tendon interface at the supraspinatus tendon anchorage and the cross-sectional area of the supraspinatus muscle fibers decreased significantly ( $P < 0.001$ ), while muscle loss and the expression of *Atrogin-1*, *Bnip 3*, and *MuRF-1* increased significantly ( $P < 0.001$ ). Compared with the RCTs group, the RCTs + exercise group showed a significant increase in bone-tendon interface maturity score and cross-sectional area of the supraspinatus muscle fibers ( $P < 0.01$ ) and a decrease in muscle loss and the expression of *Atrogin-1*, *Bnip 3*, and *MuRF-1* ( $P < 0.01$ ). Compared with the sham group, the RCTs group's LC3 I/LC3 II and degree of autophagy in the supraspinatus muscle increased significantly ( $P < 0.001$ ), while p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR expression decreased significantly ( $P < 0.01$ ). Compared with RCTs group, the RCTs + exercise group's LC3 I/LC3 II and degree of autophagy decreased significantly ( $P < 0.01$ ) and p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR expression increased significantly ( $P < 0.001$ ). The addition of rapamycin significantly reversed the rehabilitation effect of exercise in the RCTs group. **Conclusions** This study confirmed the anti-atrophy effect of exercise rehabilitation in RCT diseases and showed that its mechanism is related to AKT/mTOR signal activation, which inhibits autophagy.

**【Keywords】** protein kinase B; mammalian target protein of rapamycin; rotator cuff tears; mice; muscle atrophy; autophagy

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

肩袖撕裂(rotator cuff tears, RCTs)是最常见的导致肩部疼痛、肌肉萎缩和肌腱断裂的原因<sup>[1]</sup>。在小鼠肩袖撕裂模型中,肩袖肌肉上的撕裂大小和伴随的神经损伤会导致肌肉萎缩<sup>[2]</sup>。肌肉萎缩可导致肌肉重量和肌肉长度减少,它是影响肩袖修复效果的决定性因素,即使在成功修复的微环境中也是不可逆的<sup>[3]</sup>。肌肉萎缩的特征是蛋白质降解增强和蛋白质合成减少,过度的肌肉蛋白质降解可能导致肌肉坏死<sup>[4]</sup>。自噬-溶酶体系统是细胞的主要蛋白水解途径,在肌肉萎缩过程中被协同激活。研究表明,一些指定的萎缩相关基因也属于自噬-溶酶体系统,如 LC3,表明自噬参与萎缩过程<sup>[5-6]</sup>。研究发现,在自噬体形成和自噬中至关重要的蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路在萎缩的肌肉中被阻断<sup>[7]</sup>。此外,肌肉细胞中 AKT/mTOR 通路的激活也抑制了禁食期间自噬体形成和蛋白质降

解<sup>[8]</sup>。众所周知,禁食可诱导肌肉萎缩,提示激活 AKT/mTOR 信号通路可能通过抑制自噬来改善肌肉萎缩。值得注意的是,多项研究显示,运动康复能激活肌肉细胞中 AKT/mTOR 通路,并有助于改善肌肉萎缩<sup>[9-10]</sup>。由于术后运动是影响 RCTs 愈合过程的重要因素,有必要探索适当的运动康复计划是否有助于改善 RCTs 相关肌肉萎缩。本研究评估了运动康复在小鼠 RCTs 模型中的抗肌肉萎缩作用,并深入探讨其作用机制是否与 AKT/mTOR 通路介导的自噬抑制有关。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

40 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,8 周龄,体重(22±1)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0011]。动物饲养在华中科技大学实验动物中心[SYXK(鄂)2023-1075]。饲养环境为:12 h/12 h 光/暗循环,湿度、

温度保持在 $(55\pm 5)\%$ 、 $(25\pm 2)^\circ\text{C}$ ,自由获取食物和水。食物由碳水化合物、水、蛋白质、脂肪和粗纤维的混合物组成,比例分别为 50%、9%、18%、6%和 4%。实验方案由武汉市东西湖区人民医院伦理研究委员会批准(SC2021-1024),按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

## 1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠(批号:WS201101)、苏木精-伊红(HE)(批号:C1005)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;PDS 缝线购自美国 Ethicon 公司;雷帕霉素(mTOR 抑制剂,批号:P130825)购自美国 MCE 公司;RNeasy 试剂盒(批号:227047290)购自德国 Qiagen 公司;逆转录酶试剂盒(批号:2707A)、qPCR 试剂盒(批号:T210127Y)购自美国 Promega 公司;乙酸铀酰(批号:20190-605)购自美国 Merck 公司;BCA 试剂盒(批号:MSTr100T)购自北京沃比森科技有限公司;聚偏二氟乙烯膜购自美国 Millipore 公司;抗-LC3(批号:2059)、mTOR(批号:2559)、DAPDH(批号:3561)均购自美国 Proteintech 公司;抗 p-mTOR(批号:2448)、AKT(批号:1059)、p-AKT(批号:3021)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

ABI PRISM 7900HT 系统购自美国 Applied Biosystems 公司;15 号刀片购自杭州华威医疗用品有限公司;RM2125 切片机购自德国 Leica 公司;CX31 透射光显微镜购自日本 Olympus 公司;DigiGait 系统购自美国 Mouse Specifics 公司;超灵敏荧光/化学发光成像系统 chemiscope 6300 购自上海勤翔科学仪器有限公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 动物分组

将动物随机分配为假手术组、RCTs 组、RCTs+运动组和 RCTs+运动+雷帕霉素组,每组 10 只。在手术前 1 周,RCTs+运动组和 RCTs+运动+雷帕霉素组小鼠在跑步机接受适应训练计划:5 m/min(第 1 天)、10 m/min(第 2 天)、15 m/min(第 3 天)、20 m/min(第 4~5 天),每天运动 20 min,第 6 天休息,第 7 天手术。

根据文献报道<sup>[11]</sup>,小鼠接受了单侧冈上肌腱脱离和左肩修复。手术后 3 d,RCTs+运动组和 RCTs+运动+雷帕霉素组中的所有小鼠按指定的跑步机速度,5 m/min(第 0~2 周)、10 m/min(第

3~4 周)、15 m/min(第 5~8 周),运动 20 min/d,每周运动 5 d。此外,RCTs+运动+雷帕霉素组在术后用雷帕霉素(0.1 mg/100 g,mTOR 抑制剂)经尾静脉注射治疗 2 周。雷帕霉素用 PBS 稀释,其余 3 组用等容载体(PBS)尾静脉注射处理。在手术后第 8 周采集冈上肌腱-肱骨复合体标本,在去除肌腱和疤痕组织后立即分析冈上肌的湿重。

### 1.3.2 组织学分析

将冈上肌腱-肱骨复合体标本用 HE 染色。使用透射光显微镜捕获所有组织学图像。使用先前研究的改良腱骨成熟评分对组织学图像进行半定量评分<sup>[12]</sup>,该评分包括细胞性、血管性、连续性、纤维软骨细胞和疤痕组织,按 1~4 的等级进行评分。得分越高表示骨-肌腱界面愈合越好,得分为 20 分表示接近健康或成熟良好。

对于肌肉组织分析,将肌肉组织切割成合理大小(0.5~1 cm),并在 4%多聚甲醛中固定超过 24 h,用 HE 染色。通过显微镜鉴定冈上肌的形态和组织学,并使用 Image J 1.8.0 软件进行分析。

### 1.3.3 实时定量逆转录聚合酶链式反应(real-time quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR)检测

使用显微镜收集每组麻醉小鼠的再生骨-肌腱界面愈合组织。暴露冈上肌腱和肱骨后,小心地剥离不相关的组织,如疤痕组织,并在大结节上的插入位置分离冈上肌腱。用 15 号刀片收集愈合的骨-肌腱界面愈合组织(直到海绵骨暴露出来)。使用 RNeasy 试剂盒提取愈合组织总 RNA。然后,使用 1  $\mu\text{g}$  总 RNA 和逆转录酶试剂盒合成互补 DNA。使用 qPCR 试剂盒进行 qRT-PCR,然后在 ABI PRISM 7900HT 系统上扩增。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法分析基因表达值。用于扩增的引物序列如下: *Atrogin-1*: F-5'-CCCTGAACTCTGCACCAAGT-3', R-5'-TGGAGTGGATGGATGGGGA T-3'; *Bnip 3*: F-5'-GAGCCGATCTGAAGAGGG A-3', R-5'-GCTTGACGTGTGGCTTGTTC-3'; *MuRF-1*: F-5'-GGACCCGCTTTCTTCCACAG-3'; R-5'-TCGAATCGCCGTCTTTCTGT-3'; *GAPDH*: F-5'-TGCTCCTCAGTGTAGCCCAAG-3', R-5'-CTGCCAGAACATCATCCCT-3'。

### 1.3.4 步态数据分析

在手术后 8 周,使用 DigiGait 系统进行步态数据分析以测量的前肢功能。所有小鼠在 DigiGait 系统上以 10 cm/s 的速度行走 10 s。选择步幅长度、站立宽度、最大站立时的爪子面积、步幅频率和站立时间作为评估前肢功能的参数。

### 1.3.5 自噬体测量

在 4 °C 下将冈上肌切成 1 mm<sup>3</sup> 的组织块,并用固定液在 4 °C 下固定 24 h。然后,在 1% 锇酸中再固定 2 h。采用乙酸铀酰染色 3 h,包埋、切片,用乙酸铀酰和柠檬酸铅对切片进行染色,并进行自噬体染色,在透射电子显微镜下观察自噬体并拍照。

### 1.3.6 免疫蛋白印迹法

对冈上肌总蛋白提取和免疫印迹。在含蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟的 RIPA 裂解液中对冈上肌样品匀浆。将匀浆在 4 °C 下以 15 000 r/min 离心 10 min。将上清液在 95 °C 水浴中煮沸 5 min。使用 10%~12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶分离可溶性蛋白质,然后转移到聚偏二氟乙烯膜上。分别使用针对 LC3、AKT、p-AKT、

mTOR、p-mTOR 和 GAPDH(1 : 1000) 的一级抗体检测蛋白质水平。GAPDH 用于内部控制。将膜与 HRP 偶联的第二抗体(1 : 3000)一起孵育 2 h。使用增强化学发光试剂显现蛋白质条带,并使用超灵敏荧光/化学发光成像系统 chemiscope 6300 成像。基于 Quantity One 4.6.2 软件对蛋白质表达进行相对定量分析。

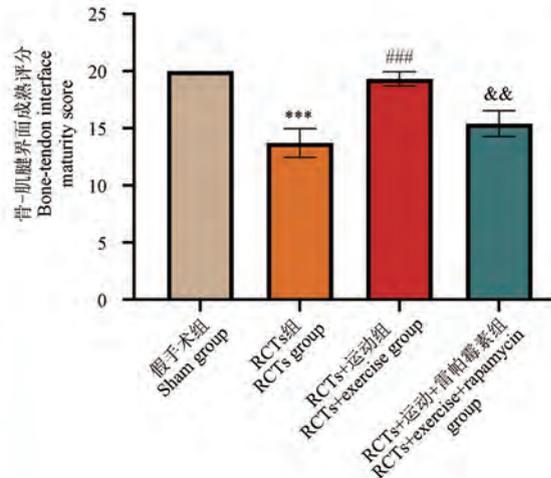
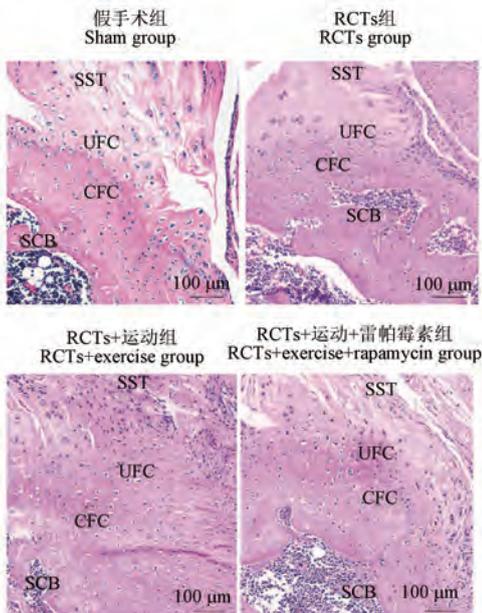
### 1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 9.0.0 软件对数据进行统计分析。所有数据均以平均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。然后,对于参数数据,使用单因素方差分析(ANOVA)来分析多组之间差异显著性。对于所有测试, $P<0.05$  表示具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 组织学评估小鼠骨-肌腱界面愈合情况

本实验中没有动物意外死亡。如图 1 所示,在术后 8 周,RCTs 组、RCTs+运动组、RCTs+运动+雷帕霉素组在冈上肌腱和肱骨之间的损伤界面出现明显的纤维软骨层。其中,RCTs+运动组纤维软骨细胞成熟,呈串珠状分布,与应力方向一



注:CFC:钙化纤维软骨;SCB:软骨下骨;SST:冈上肌腱;UFC:未钙化纤维软骨。与假手术组相比,\*\*\* $P<0.001$ ;与 RCTs 组相比,### $P<0.001$ ;与 RCTs+运动组相比,&& $P<0.01$ 。

图 1 各组冈上肌腱-肱骨复合体标本的 HE 染色代表图及评分

Note. CFC, Calcified fibrocartilage. SCB, Subchondral bone. SST, Supraspinatus tendon. UFC, Uncalcified fibrocartilage. Compared with sham group, \*\*\* $P<0.001$ . Compared with RCTs group, ### $P<0.001$ . Compared with RCTs+ exercise group, && $P<0.01$ .

Figure 1 HE staining representative diagram and score of supraspinatus tendon-humerus complex specimens in each group

致。与假手术组相比, RCTs 组冈上肌腱止点骨-肌腱界面成熟评分显著降低 ( $P < 0.001$ )。与 RCTs 组相比, RCTs+运动组冈上肌腱止点骨-肌腱界面成熟评分显著增加 ( $P < 0.001$ ), 而 RCTs+运动+雷帕霉素组冈上肌腱止点骨-肌腱界面成熟评分较 RCTs+运动组显著降低 ( $P < 0.01$ )。

## 2.2 运动减轻肌腱横断诱导的 RCTs 冈上肌萎缩

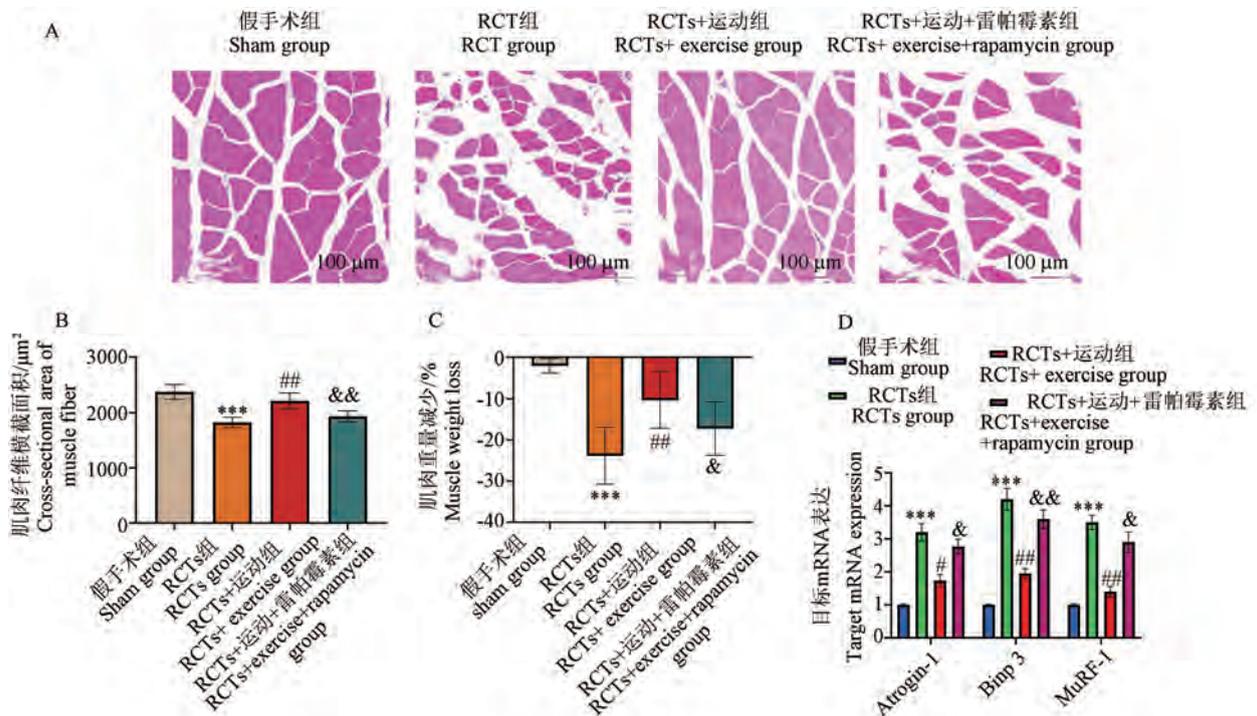
HE 染色评价肌肉病理变(图 2)。在术后 8 周, 与假手术组相比, RCTs 组冈上肌纤维横截面积显著降低 ( $P < 0.001$ ), 和肌肉损失以及 *Atrogin-1*、*Bnip 3*、*MuRF-1* 基因表达显著增加 ( $P < 0.001$ )。与 RCTs 组相比, RCTs+运动组冈上肌纤维横截面积显著增加 ( $P < 0.01$ ), 和肌肉损失以及 *Atrogin-1*、*Bnip 3*、*MuRF-1* 基因表达显著降低 ( $P < 0.01$ )。而雷帕霉素的加入显著抑制了运动对 RCTs 诱导肌肉萎缩和损失的改善作用 ( $P < 0.05$ )。

## 2.3 运动步态分析

各组运动步态分析结果见表 1 所示。在术后 8 周, 与假手术组相比, RCTs 组步幅长度、触地宽度、最高站立爪面积、站立时间显著降低 ( $P < 0.001$  或  $P < 0.01$ ), 步频显著增加 ( $P < 0.001$ )。与 RCTs 组相比, RCTs+运动组步幅长度、触地宽度、最高站立爪面积、站立时间显著增加 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 步频显著降低 ( $P < 0.05$ )。而雷帕霉素的加入显著抑制了运动对 RCTs 诱导运动步态的改善作用 ( $P < 0.05$ )。

## 2.4 运动对 AKT/mTOR 信号通路介导的自噬影响

在术后 8 周, 如图 3 所示与假手术组相比, RCTs 组冈上肌组织中 LC3 I/LC3 II 显著增加 ( $P < 0.001$ ), p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 显著降低 ( $P < 0.01$ )。与 RCTs 组相比, RCTs+运动组 LC3 I/LC3 II 显著降低 ( $P < 0.05$ ), p-AKT/AKT、p-



注: A、B: 术后 8 周各组冈上肌切片的 HE 染色及纤维横截面积的定量分析; C: 肌肉重量损失情况的定量分析; D: 各组冈上肌组织中 *Atrogin-1*、*Bnip 3*、*MuRF-1* 基因表达。与假手术组相比, \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 RCTs 组相比, #  $P < 0.05$ , #  $P < 0.01$ ; 与 RCTs+运动组相比, &  $P < 0.05$ , &&  $P < 0.01$ 。

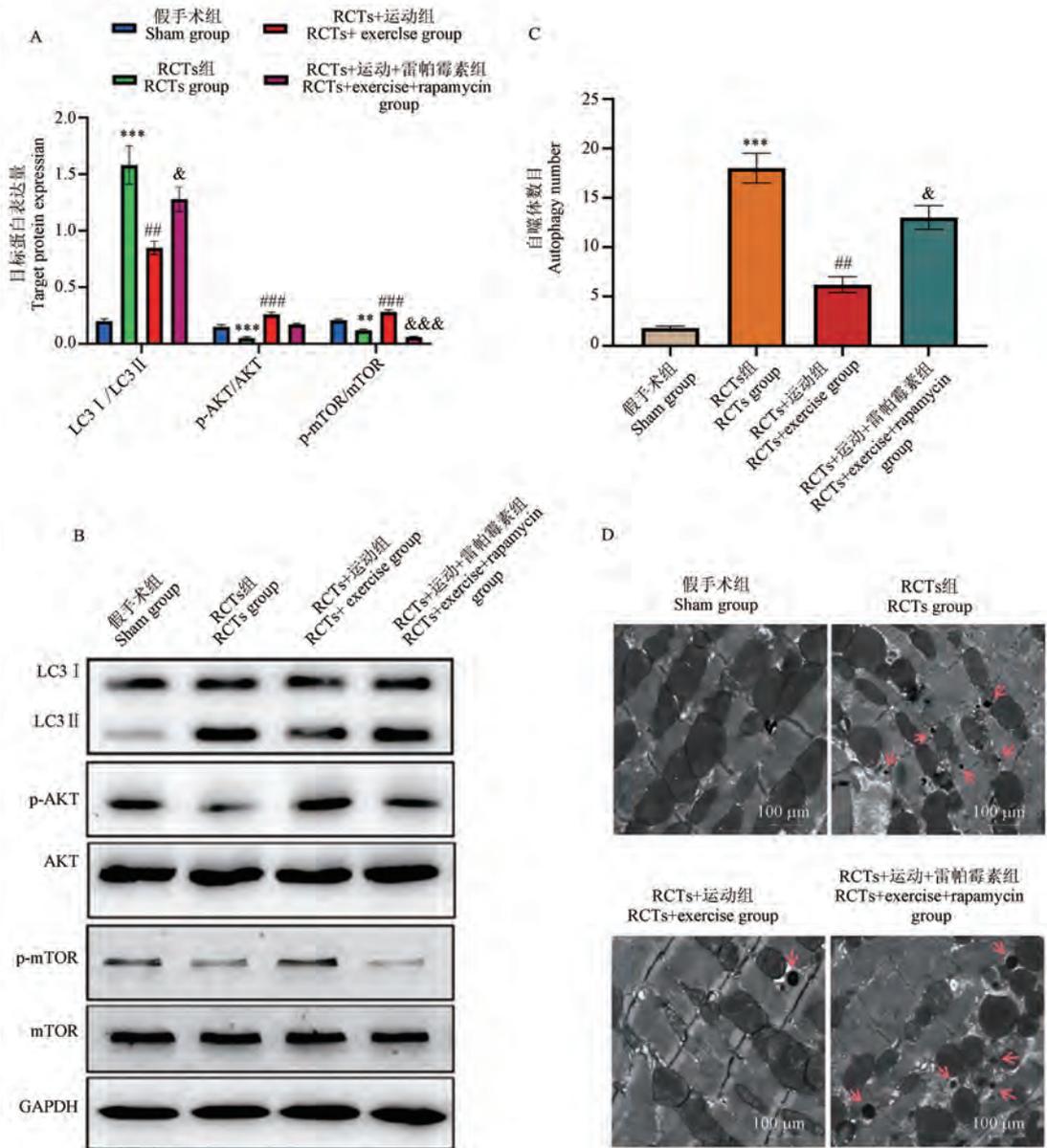
图 2 运动减轻肌腱横断诱导的 RCTs 冈上肌萎缩

Note. A, B, 8 weeks after operation, HE staining of supraspinatus muscle sections in each group and quantitative analysis of fiber cross-sectional area. C, Quantitative analysis of muscle weight loss. D, *Atrogin-1*, *Bnip 3* and *MuRF-1* gene expression in supraspinatus muscle tissue of each group. Compared with sham group, \*\*\*  $P < 0.001$ . Compared with RCTs group, #  $P < 0.05$ , #  $P < 0.01$ . Compared with RCTs+exercise group, &  $P < 0.05$ , &&  $P < 0.01$ .

Figure 2 Exercise relieves RCTs supraspinatus muscular atrophy induced by tendon transection

mTOR/mTOR 显著增加 ( $P < 0.001$ )。而雷帕霉素的加入显著抑制了运动对 RCTs 诱导 AKT/mTOR 信号通路的改善作用 ( $P < 0.001$ ) (图 3A、3B)。随后研究进行了透射电子显微镜分析以评估各组中自噬体的产生。与假手术组相比, RCTs 组冈

上肌组织中自噬体的数量显著增加 ( $P < 0.001$ )。与 RCTs 组相比, RCTs+运动组冈上肌组织中自噬体的数量显著减少 ( $P < 0.01$ )。而雷帕霉素的加入显著抑制了运动对 RCTs 诱导自噬体数目的改善作用 ( $P < 0.05$ ) (图 3C、3D)。



注: A、B: 通过免疫蛋白印迹评估不同组小鼠冈上肌组织中 LC3 和 AKT/mTOR 信号通路蛋白表达及定量分析; C、D: 通过透射电镜扫描冈上肌中自噬体囊泡及囊泡数量的定量分析, 红色箭头表示自噬体。与假手术组相比, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 RCTs 组相比, ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ ; 与 RCTs+运动组相比, &  $P < 0.05$ , &&&  $P < 0.001$ 。

图 3 运动对 AKT/mTOR 信号通路介导的自噬影响

Note. A, B. Expression and quantitative analysis of LC3 and AKT/mTOR signaling pathway proteins in supraspinatus muscle of different groups of mice were evaluated by Western blot. C, D. Quantitative analysis of autophagy vesicles and vesicles in supraspinatus muscle by transmission electron microscope scanning. The red arrow indicates autophagy. Compared with sham group, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Compared with RCTs group, ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ . Compared with RCTs+exercise group, &  $P < 0.05$ , &&&  $P < 0.001$ .

Figure 3 Effects of exercise on autophagy mediated by AKT/mTOR signaling pathway

表 1 各组运动步态分析

Table 1 Analysis of gait of mice in each group

组别 Groups	步幅长度/cm Stride length	触地宽度/cm Stance width	最高站立爪面积/cm <sup>2</sup> Paw area peak stance	步频/(steps/s) Stride frequency	站立时间/s Stance time
假手术组 Sham group	2.98±0.83	2.41±0.86	0.29±0.13	3.42±0.40	0.25±0.01
RCTs 组 RCTs group	1.67±0.48 <sup>***</sup>	1.27±0.27 <sup>***</sup>	0.15±0.01 <sup>***</sup>	5.61±0.26 <sup>***</sup>	0.11±0.01 <sup>***</sup>
RCTs+运动组 RCTs+exercise group	2.66±0.55 <sup>##</sup>	2.07±0.32 <sup>##</sup>	0.26±0.04 <sup>##</sup>	4.08±0.62 <sup>#</sup>	0.20±0.04 <sup>#</sup>
RCTs+运动+雷帕霉素组 RCTs+exercise+rapamycin group	1.82±0.53 <sup>&amp;</sup>	1.38±0.42 <sup>&amp;</sup>	0.16±0.03 <sup>&amp;</sup>	5.62±0.25 <sup>&amp;</sup>	0.12±0.01 <sup>&amp;</sup>
<i>F</i>	13.97	22.56	16.84	11.42	14.58
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与假手术组相比, \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ;与 RCTs 组相比, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ ;与 RCTs+运动组相比, & $P<0.05$ 。

Note. Compared with sham group, \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ . Compared with RCTs group, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ . Compared with RCTs+exercise group, & $P<0.05$ .

### 3 讨论

目前认为 RCTs 是不可自行修复的,需要通过手术治疗为 RCTs 提供了愈合的机会。术后康复对于实现高水平的功能恢复非常重要<sup>[13]</sup>。肌肉萎缩是导致手术修复后临床效果不佳的主要障碍之一。因此,肌肉萎缩的改善可能为手术修复后的 RCTs 患者带来良好的结局。在本研究中发现小鼠 RCTs 模型中,运动康复能通过激活 AKT/mTOR 信号通路和调节肌细胞自噬来改善冈上肌萎缩。由于成本高且管理复杂,很少使用大型动物模型,例如牛、山羊和绵羊等,来模拟 RCTs 损伤。兔子性情温和且相对容易控制,常用于模拟 RCTs 损伤,但它们不能像啮齿动物一样耐受手术和传染病的压力<sup>[14]</sup>。小鼠模型可用于各种 RCTs 病理学研究,因为它们的细胞和组织生理学与人类相似;此外,小鼠模型比大鼠模型更有优势,因为可以利用基因改造的菌株来测试特定信号通路和分子变化对骨-肌腱界面发育和修复的影响<sup>[15]</sup>。

RCTs 模型中的肌肉萎缩涉及复杂的蛋白质网络和分子机制。肌肉萎缩盒 Fbox-1 蛋白 (muscle atrophy Fbox, Atrogin-1)、BCL2/腺病毒 E1B 19 kDa 蛋白相互作用蛋白 3 (BCL2/Adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3, Bnip3) 和肌环指蛋白-1 (muscle ring finger protein-1, MuRF-1) 已被证明与骨骼肌萎缩的调节过程有关<sup>[16]</sup>。LC3-II 是自噬体形成的最广泛使

用的标志,被确定参与肩袖肌腱疾病的进展<sup>[17]</sup>。这些基因受 AKT/mTOR 信号通路调节,该通路是泛素-蛋白酶体和自噬-溶酶体系统中的关键控制器,提示自噬系统在骨骼肌萎缩的进展中发挥重要作用<sup>[18]</sup>。新的研究已经证实,自噬是肩袖损伤发展中的一个重要过程<sup>[4]</sup>。同样,本研究在 RCTs 组萎缩的冈上肌中发现 *Atrogin-1*、*Bnip 3*、*MuRF-1* 基因表达、LC3-II 蛋白表达和自噬体的产生数量较假手术组显著增加。然而,在接受运动干预的 RCTs 小鼠中,RCTs 诱导的这些变化均得到显著改善,表明运动干预可能通过抑制过度自噬减轻肌肉萎缩。骨骼肌中的蛋白质合成主要受 AKT/mTOR 途径的调节<sup>[19]</sup>。此外,AKT/mTOR 途径是骨骼肌自噬的关键负调节因子。因此,AKT 及其下游信号 mTOR 的快速激活有助于成年小鼠或肌肉细胞培养物中的蛋白质合成、自噬体抑制和细胞生长<sup>[20]</sup>。这些数据表明 AKT/mTOR 信号通路负调节肌细胞中自噬体形成和蛋白质的降解过程。本研究发现运动干预上调了 RCTs 受损骨骼肌中 AKT/mTOR 信号。此外,mTOR 抑制剂减弱了运动对骨骼肌的抗萎缩作用,提示在肩袖撕裂疾病期间,运动通过激活 AKT/mTOR 信号抑制自噬,进而改善了肌肉萎缩。

先前的研究证实,骨-肌腱界面愈合过程包括“骨折”界面和肌腱界面之间的病理和生理相互作用,通常包括初始反应期的炎症、新骨和纤维软骨形成以及骨重塑和纤维软骨成熟<sup>[21]</sup>。机

械刺激是影响骨-肌腱界面愈合的重要因素<sup>[22]</sup>。研究表明,通过使用肉毒杆菌毒素注射麻痹冈上肌来减少机械刺激有利于骨-肌腱界面的早期愈合<sup>[23]</sup>。然而,完全去除负荷是有害的,会导致修复效果不佳<sup>[24]</sup>。最近一项研究比较了不同运动强度对 RCTs 骨-肌腱界面愈合的影响,结果强调了适当的机械刺激对骨-肌腱界面愈合的重要性,其中高强度机械刺激是最有害的术后康复计划,相比之下,递增强度运动对骨-肌腱界面愈合的修复效果最好<sup>[25]</sup>。本研究借鉴先前的递增强度运动康复方案,并证实了该方案有效促进了骨-肌腱界面愈合过程。我们认为,早期的低强度运动不仅保持了手术治疗所确定的愈合界面的解剖连续性,而且提供了适当低的机械刺激以促进早期骨-肌腱界面修复过程。随着机械刺激强度的增加,新形成骨的性质逐渐改善。在骨-肌腱界面愈合的中期和晚期,有必要加强机械刺激,以促进骨和纤维软骨的愈合、重建和成熟。本研究通过步态分析证实了递增强度运动康复改善了小鼠的前肢功能。因此,在临床 RCTs 康复中选择递增强度的运动康复方案可能有助于促进患者康复。

综上,本研究确定了递增强度运动康复在 RCTs 疾病中抗萎缩作用,其作用机制与激活 AKT/mTOR 信号抑制自噬有关。本研究结果支持在 RCTs 手术后使用一个简单渐进的运动康复计划促进患者康复。

#### 参考文献:

[ 1 ] LIU Y, FU S C, LEONG H T, et al. Evaluation of animal models and methods for assessing shoulder function after rotator cuff tear: a systematic review [J]. *J Orthop Translat*, 2021, 26: 31-38.

[ 2 ] CHEN C, ZHOU H, YIN Y, et al. Rotator cuff muscle degeneration in a mouse model of glenohumeral osteoarthritis induced by monoiodoacetic acid [J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2023, 32(3): 500-511.

[ 3 ] SCHANDA J E, HEHER P, WEIGL M, et al. Muscle-specific micro-ribonucleic acids miR-1-3p, miR-133a-3p, and miR-133b reflect muscle regeneration after single-dose zoledronic acid following rotator cuff repair in a rodent chronic defect model [J]. *Am J Sports Med*, 2022, 50(12): 3355-3367.

[ 4 ] PRASETIA R, PURWANA S Z B, LESMANA R, et al. The pathology of oxidative stress-induced autophagy in a chronic rotator cuff enthesis tear [J]. *Front Physiol*, 2023,

14: 1222099.

[ 5 ] LAUTHERBACH N, GONÇALVES D A P, SILVEIRA W A, et al. Urocortin 2 promotes hypertrophy and enhances skeletal muscle function through cAMP and insulin/IGF-1 signaling pathways [J]. *Mol Metab*, 2022, 60: 101492.

[ 6 ] AOYAMA S, NISHIDA Y, UZAWA H, et al. Monitoring autophagic flux *in vivo* revealed its physiological response and significance of heterogeneity in pancreatic beta cells [J]. *Cell Chem Biol*, 2023, 30(6): 658-671.

[ 7 ] YIN D, LIN D, XIE Y, et al. Neuregulin-1 $\beta$  alleviates sepsis-induced skeletal muscle atrophy by inhibiting autophagy via AKT/mTOR signaling pathway in rats [J]. *Shock*, 2022, 57(3): 397-407.

[ 8 ] DETHLEFSEN M M, BERTHOLDT L, GUDIENSEN A, et al. Training state and skeletal muscle autophagy in response to 36 h of fasting [J]. *J Appl Physiol*, 2018, 125(5): 1609-1619.

[ 9 ] HORII N, HASEGAWA N, FUJIE S, et al. Resistance exercise-induced increase in muscle 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone contributes to the activation of muscle Akt/mTOR/p70S6K- and Akt/AS160/GLUT4-signaling pathways in type 2 diabetic rats [J]. *FASEB J*, 2020, 34(8): 11047-11057.

[ 10 ] YIN L, LU L, LIN X, et al. Crucial role of androgen receptor in resistance and endurance trainings-induced muscle hypertrophy through IGF-1/IGF-1R-PI3K/Akt-mTOR pathway [J]. *Nutr Metab*, 2020, 17: 26.

[ 11 ] LIU Y, WANG L, LI S, et al. Mechanical stimulation improves rotator cuff tendon-bone healing via activating IL-4/JAK/STAT signaling pathway mediated macrophage M2 polarization [J]. *J Orthop Translat*, 2022, 37: 78-88.

[ 12 ] YOUNG B L, SHEPPARD E D, PHILLIPS S, et al. Caffeine intake does not appear to impair tendon-to-bone healing strength in a rat rotator cuff repair model [J]. *JSES Int*, 2022, 6(3): 463-467.

[ 13 ] PIERRE P S, MILLETT P J, ABBOUD J A, et al. Consensus statement on the treatment of massive irreparable rotator cuff tears: a Delphi approach by the near Circle of the American shoulder and elbow surgeons [J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2021, 30(9): 1977-1989.

[ 14 ] 许博洋, 庞小娟, 曾禹铭, 等. 肩袖肌腱损伤诱导性动物模型构建评价及研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(4): 545-550.

XU B Y, PANG X J, ZENG Y M, et al. Evaluation and progress of the construction of a rotator cuff tendon injury-induced animal model [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(4): 545-550.

[ 15 ] MOSER H L, ABRAHAM A C, HOWELL K, et al. Cell lineage tracing and functional assessment of supraspinatus tendon healing in an acute repair murine model [J]. *J Orthop Res*, 2021, 39(8): 1789-1799.

张建军,吴双,薛冰,等. 大鼠动机缺乏行为及伏隔核多巴胺受体的作用[J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(1): 67-78.  
Zhang JJ, Wu S, Xue B, et al. Behavioral model of motivation deficiency in rats and role of dopamine receptors in the nucleus accumbens [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 67-78.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.007

# 大鼠动机缺乏行为及伏隔核多巴胺受体的作用

张建军<sup>1,3#\*</sup>, 吴双<sup>2#</sup>, 薛冰<sup>3</sup>, 张潞潞<sup>1</sup>, 于萍<sup>2\*</sup>

(1.山西中医药大学,分子中医药学国家国际联合研究中心,中医脑病学山西省重点实验室,山西 晋中 030619;  
2.北京市“学习与认知”重点实验室,首都师范大学心理学院,北京 100048;  
3.中国科学院心理健康重点实验室,中国科学院心理研究所,北京 100101)

**【摘要】** 目的 “躺平”作为现代流行词汇,描述部分人群的心理状态,但其心理学含义仍未明确。一定条件下的动机缺乏可能是关键心理特征之一。**方法** 将16只雄性SD大鼠随机分配到两种限食水平(分别为基线体重的90%和80%),并进行蔗糖颗粒自我给药任务,尝试建立“躺平”的动机缺乏动物行为模型,模型的建立分为3个阶段,第一阶段学习鼻触一次高回报侧获得一粒糖丸,第二阶段学习多次鼻触低回报侧获得一颗糖丸,第三阶段观察大鼠在高回报侧可以获得不同程度奖励的情况下,是否愿意多付出努力在低回报侧获得糖丸。**结果** 结合自给食训练和免疫印迹,结果显示:(1)大鼠在第三阶段出现“躺平”现象,即在高回报侧获得最大奖励的90%及以上,且低回报侧努力程度增大到断点时,大鼠放弃努力获得更多糖丸奖励。(2)与“未躺平”组的大鼠相比,“躺平”组大鼠伏隔核内的多巴胺D1受体表达显著升高,而D2受体表达没有显著差异。**结论** 大鼠可表现出“躺平”样行为,伏隔核中D1受体表达上调可能是“躺平”动机缺乏的重要分子基础,该模型的建立扩展了对“躺平”的理解,并为其机制研究提供了新范式。

**【关键词】** 动机缺乏;伏隔核;“躺平”;多巴胺D1受体

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2025)01-0067-12

## Behavioral model of motivation deficiency in rats and role of dopamine receptors in the nucleus accumbens

ZHANG Jianjun<sup>1,3#\*</sup>, WU Shuang<sup>2#</sup>, XUE Bing<sup>3</sup>, ZHANG Lulu<sup>1</sup>, YU Ping<sup>2\*</sup>

(1. Shanxi Key Laboratory of Chinese Medicine Encephalopathy, National International Joint Research Center for Molecular Chinese Medicine, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China. 2. Beijing Key Laboratory of Learning and Cognition, School of Psychology, Capital Normal University, Beijing 100048.  
3. Key Laboratory of Mental Health, Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

**【Abstract】 Objective** “Lie flat” has recently become a buzz word describing a specific psychological state in some individuals. However, its psychological meaning and mechanisms remain unclear. Lack of motivation under

**【基金项目】** 山西省基础研究计划资助项目(202303021221159);山西省高等学校青年学术带头人项目(2024Q028);山西中医药大学优秀博士毕业生来晋工作奖励经费科研启动基金项目(2023BKSO7);首都师范大学横向课题基金项目(KJ20210110);中国科学院心理健康重点实验室开放课题(KLMH2020K06)。

**【作者简介】** 张建军(1984—),男,博士,教授,研究方向:情绪和记忆的生物学基础。E-mail: zhangjianjun@sxtcm.edu.cn

吴双(2001—),女,在读硕士研究生,研究方向:认知神经科学。E-mail: shuang0119w@163.com。\*共同第一作者

**【通信作者】** 张建军(1984—),男,博士,教授,研究方向:情绪和记忆的生物学基础。E-mail: zhangjianjun@sxtcm.edu.cn

于萍(1966—),女,博士,副教授,研究方向:认知神经科学。Email: pingyu@cnu.edu.cn。\*共同通信作者

certain conditions may be one of the key psychological characteristics of this condition. **Methods** Sixteen male SD rats were randomly assigned to two food-restriction levels (90% and 80% of baseline weight, respectively), and subjected to a sucrose-pellet self-administration task. The establishment of the model is divided into three stages. The rats were trained to self-administer sucrose pellets in a high-reward learning stage and in a low-reward learning stage. We then assessed “lie flat” behavior in a preference-test stage, in which rats could choose between high-reward- and low-reward-paired nose-pokes in a discrete choice procedure. **Results** Combining self-feeding training with Western blot, the results showed that: (1) rats showed significantly decreased nose-poke behavior for low-reward, i. e. “lie flat” behavior, but not for high-reward, when  $\geq 90\%$  of the maximal reward was obtained in the high-reward task and the effort (X) in the low-reward task increased to the breaking point. (2) Dopamine D1R expression in the NAc was significantly higher in the “lie flat” group compared with the “not lie flat” rats, while D2R expression was similar in both groups. **Conclusions** Rats can show “lie flat” behavior, and up-regulation of D1R expression in the NAc may be a key part of the molecular basis responsible for this motivation deficiency in “lie flat” behavior. These results extend our understanding of “lie flat” behavior, and provide a new paradigm for the study of its mechanism.

**【Keywords】** lack of motivation; nucleus accumbens; “lie flat”; dopamine D1 receptor

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

“躺平”通常指以一种安定的状态、平和的想法面对生存和社会挑战,不回应外部事物,且对外部所发生的事无反应或者反抗<sup>[1]</sup>。当人们多次努力但对结果不满意时,往往容易进入“躺平”的状态,即一种动机缺乏的状态,也是选择放弃努力接受目前缺乏动力的现状<sup>[1]</sup>。虽然“躺平”现象逐渐引起关注,但其动物模型尚未见报道。

摄食动机与脑内多巴胺系统密切相关,食物属于天然奖赏物,摄食行为属于奖赏行为并且可以作用于脑内的奖赏通路。与摄食相关的奖励和满足会促进多巴胺的产生,从而激活大脑中的奖励中心,影响情绪以及摄食的程度<sup>[2]</sup>。已有实验证明,在以食物作为奖励刺激时,多巴胺神经元的放电活动会增强,并且此增加更可能与摄食动机相关,而非奖励物本身<sup>[3-4]</sup>。

伏隔核(nucleus accumbens, NAc)是腹侧纹状体的主要组成部分,是中脑腹侧被盖区(ventral tegmental area, VTA)多巴胺能神经元的重要下游投射脑区<sup>[5]</sup>,VTA 内的多巴胺神经元与 NAc 内的多棘神经元形成突触,共同参与处理动机与目标导向,建立奖励机制<sup>[6]</sup>。随着奖励刺激的增加,NAc 中多巴胺的释放量也增加,表明 NAc 中多巴胺系统在分辨奖赏结果的价值时发挥重要作用,且 NAc 与目标导向动作的完成以及选择不同价值的物品密切相关<sup>[7]</sup>。同时 NAc 还在价值决策中具有重要的作用。当灭活 NAc 脑区内的神经元后,在同样的回报率下,选择少量或多量(4 颗

及以上)食物时,动物对不同食物量反馈的决策敏感度降低<sup>[8]</sup>。与 NAc 邻近的尾状核则没有发现在动机、决策等行为中发挥作用。NAc 中的神经元主要分为两类,一类表达 D1 受体,另一类表达 D2 受体。大量研究表明这两类神经元会产生相反的效应,比如多巴胺 D1 类受体通路会增加树突兴奋性,D2 类受体则是会降低树突兴奋性<sup>[9]</sup>,D1 受体阳性神经元启动行为,而 D2 受体阳性神经元抑制行为启动。

结合行为学和免疫印迹方法,本研究将大鼠进行不同程度的限食,以保证其处于较强且不同的摄食动机的状态,并尝试应用一种新的大鼠自我给糖丸的程序,在高回报和低回报两种回报强度,训练并检测大鼠在能保持基础饱腹感的情况下,是否还愿意通过努力来寻求获取更多的糖丸,并进行伏隔核中的 D1 和 D2 受体表达水平的检测,以探究动机缺乏(“躺平”)行为对应的多巴胺受体调控机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠(5 周龄,体重为 140~160 g)16 只,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2024-0001]。动物到达后饲养于中国科学院心理研究所 SPF 级动物房内[SYXK(京)2021-0018],适应环境一周,期间自由进食进水,单笼饲养,环境温度(24±1)℃,12 h/12 h

光照/黑暗周期,实验在光周期内完成。首先将大鼠自由喂食喂水至体重达到(330±10)g,随后将大鼠按体重平衡分配到两个组。在随后的限食阶段,一组大鼠将体重下降至自由喂食体重的90%,另一组下降到80%,期间可以自由饮水。所有实验程序均经过中国科学院心理研究所伦理委员会的审核(A22078),实验程序的执行符合有关动物保护和使用条例,按实验动物3R原则给予人道的关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

45 mg 纯蔗糖糖丸(上海金畔生物科技有限公司,货号:F0021);抗 D1、D2 受体抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,货号:sc-33660、sc-5303);甘油醛 3 磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号:AC033);辣根过氧化物酶(horseradish Peroxidase,HRP)标记二抗、广谱彩虹预染蛋白 Marker(multicolor protein marker)、SDS-PAGE 凝胶制备(SDS-PAGE gel kit)试剂盒、BCA 蛋白定量(BCA protein assay kit)试剂盒(江苏康为世纪生物科技股份有限公司,货号:CW0102、CW2841M、CW2384S、CW0014S)。

行为学操作箱(305 mm×240 mm×210 mm),(MED Associates, Inc.,美国);电泳仪(美国伯乐 Bio-Rad PowerPac Basic Power,300 V,400 mA,75 W)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 实验程序

整个实验程序如图 1 所示,研究采用 2(限食程度)×7(需要努力程度)两因素组间设计,以获得糖丸数、鼻触次数为量化指标。为探索不同努力程度下动物的动机大小,设置 3 个阶段,前两阶段为学习阶段,第三阶段为测试阶段。动物训练在行为学操作箱中完成。操作箱置于隔音箱内,隔音箱配有风扇保持通风并提供背景噪音。操作箱内有两个可鼻触的孔,孔内侧有一个线索灯,孔上方有一个房灯和声音发生器。MED 行为学操作箱系统和计算机连接进行线索的呈现、糖丸的提供和数据的收集。

#### 1.3.2 行为学实验程序

- (1) 自由喂食阶段:每天给予大鼠不限量的食物和水,并记录大鼠每天体重变化,直到体重最轻的大鼠体重上升至 330 g 左右。
- (2) 限食阶段:限食至自由喂食阶段体重 90% 组的大鼠,平均每天喂食约 13 g(根据其体重

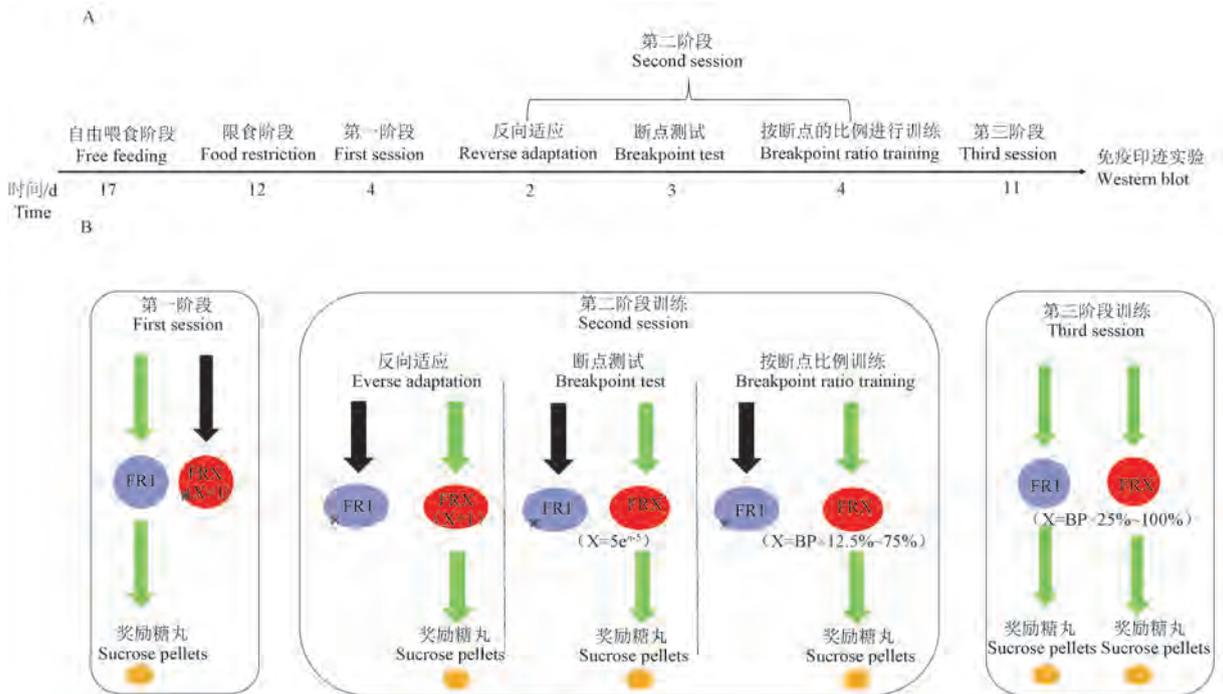


图 1 实验流程

Figure 1 Flow chart of experiment

变化从多到少逐渐下降),限食至自由喂食阶段体重 80%组的大鼠,平均每天喂食约 11 g。两组限食天数相同。

(3) 第一阶段训练: 简易获取糖丸奖励任务, 训练时间为 90 min, 不应期(time-out)为 20 s。对大鼠进行固定比率为 1 (fixed ratio 1, FR1) 的训练, MED 箱房灯亮起作为反应期的提示, 此时(反应期内)大鼠鼻触固定一侧的鼻触孔(左右平衡设计, 使用黑色的胶带贴住另一侧孔使大鼠无法触碰)1 次即可获得 1 颗糖丸, 同时伴随鼻触孔内线索灯亮 5 s, 房灯熄灭, 进入不应期, 不应期内鼻触只记录数据, 不会获得糖丸。不应期后房灯亮起, 进入下一个周期。以连续 3 d 在实验时间内获得 100 颗糖丸为达到标准。记录大鼠的鼻触数和获得糖丸的数量。

(4) 第二阶段训练: 可变难度获取糖丸奖励任务, 训练时间为 90 min, 不应期为 20 s。训练大鼠逐步学会另一侧鼻触孔需鼻触多次才可以获得糖丸。第一步使用 FR1 程序训练 2 d (同第一阶段), 第二步使用累进比率 (progressive-ratio, PR) 程序测试 3 d, 递进通过公式  $y = 5e^{0.2n} - 5$  ( $e$  为常数 2.718,  $n$  为累进比率中比率的次序数,  $y$  为累进比率中设置的比率) 计算获得(四舍五入后取整数), 连续获得 5 颗糖丸, 鼻触数变为下一个等级, 大鼠能获得糖丸对应的最大比率称为断点 (breaking point, BP), 并将 3 d 断点的结果取重复的值或中间值作为该大鼠的断点值。第三步用断点的 12.5%、25.0%、50.0%、75.0% 数值(四舍五入取整) 分别作为固定比率值进行 FR 训练各 1 d (比如第一天使用的程序为 FR (BP × 12.5%)), 使大鼠学会第二阶段侧的鼻触孔需要进行多次鼻触才可以获得 1 颗糖丸。记录大鼠的鼻触数和获得糖丸的数量。

(5) 第三阶段测试: 去掉鼻触孔的遮挡, 大鼠可以在两侧的鼻触孔中选择一侧进行鼻触, 即可选择进行简易获取糖丸奖励任务或者可变难度获取糖丸奖励任务, 测试大鼠的各行反应数。训练时间为 90 min, 不应期为 20 s。第一阶段学习的一侧称为 FR1 侧, 第二阶段学习的一侧称为 FRX 侧。与第一阶段不同的是, 大鼠在 FR1 侧鼻触, 最多只能获得最大糖丸奖励数的 50%~95%, 与第二阶段不同的是, 大鼠在 FRX 侧鼻触, X 设

定为 BP 的 12.5%、25.0%、50.0%、75.0% 和 100.0%。开始的两天当 FR1 侧获得的糖丸总数(最大值)等于第一阶段糖丸数平均值的 50%后, 鼻触 FR1 侧只会会计入鼻触数, 但是不会获得糖丸, 只能从 FRX 侧鼻触获取糖丸, 设定  $X = BP \times 12.5\%$ 。之后的 4 d, FR1 侧的最大值设为平均值的 70%, 不断上调 FRX 侧的 X 值(分别为 BP 的 25%、50%、75%、100%, 每天设定 1 次), 当 FRX 侧上升到 100%后, 则上升 FR1 侧最大值(平均值的 80%、90%、95%, 每天设定 1 次)。“躺平”的标准设为鼻触数小于 200 次。记录总的鼻触数、FR1 侧的鼻触数、FRX 侧的鼻触数, 以及获得的总糖丸数、FR1 侧获得的糖丸数、FRX 侧获得的糖丸数。

### 1.3.3 免疫印迹实验

(1) 大鼠脑分区组织全蛋白提取: 在行为学实验结束后, 用戊巴比妥钠将大鼠深度麻醉, 在冰上直接断头取脑, 包埋后存入  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱。解冻后取出 NAc 脑区的总蛋白。加入 RIPA 裂解液超声破碎。冰浴 10 min 充分裂解后,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  离心, 取上清液。

(2) 蛋白浓度的测定: 配置 BCA 工作液: 按照 50 : 1 的比例配置适量 BCA 工作液; 将蛋白标准品稀释成浓度为 2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625 和  $0\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 按顺序分别加入  $10\text{ }\mu\text{L}$  到 96 孔板的标准品孔中; 取待测的蛋白样品, 将其稀释到合适的浓度; 加入  $10\text{ }\mu\text{L}$  稀释好的蛋白样品, 然后各孔加入  $200\text{ }\mu\text{L}$  BCA 工作液, 在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  金属浴 30 min。在  $562\text{ nm}$  下比色测定, 作出标准曲线后计算多巴胺 D1 受体的上样浓度为  $50\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 多巴胺 D2 受体的上样浓度为  $30\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 根据上样体积计算并加入 buffer 后, 金属浴  $95\sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min 使蛋白失活。

(3) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳: 根据分子量确定多巴胺 D1 的分离胶浓度为 10%, 多巴胺 D2 的分离胶浓度为 12%。清洗玻璃板并烘干。灌胶: 将玻璃板固定于灌胶器, 从一侧缓慢注入分离胶, 至插入梳子后距梳子底部还有 1 cm 时停止, 然后缓慢加入无水乙醇。室温放置 30 min 凝固后, 倒出无水乙醇。配置浓缩胶注入玻璃板, 直到顶端, 插入梳子, 避免产生气泡, 室温放置 20 min 凝固。电泳: 将玻璃板放在电泳槽内, 加入电泳液, 拔出梳子加样。电泳时先恒压 80 V,

30 min 后增加电压到 120 V 直至结束。转膜:用切胶器将分离胶放在转膜夹的滤纸上,盖上甲醇激活过的 PVDF 膜,夹好转膜夹放入转模槽中,冰浴恒流 300 mA 转膜 90 min。封闭:转膜后将目的蛋白和内参蛋白剪下放入孵育盒内,用 TBST 溶液清洗,然后 5% 脱脂奶粉室温摇床封闭 2 h。

(4) 孵育显影:一抗孵育:倒掉封闭液,用 TBST 溶液洗膜,再用 TBST 按比例配置一抗:D1 (1:100)、D2 (1:100)、GAPDH (1:5000), 4 °C 摇床孵育过夜。二抗孵育:倒掉一抗,用 TBST 溶液洗膜,在 HRP 标记的二抗溶液 (1:3000) 中室温摇床孵育 2 h。化学发光和显影:倒掉二抗,用 TBST 溶液洗膜,配置 ECL 显影液,孵育 90 s 后,使用超灵敏全自动成像分析系统进行分析。用 Image J 1.8.0 软件进行灰度分析。

#### 1.4 统计学方法

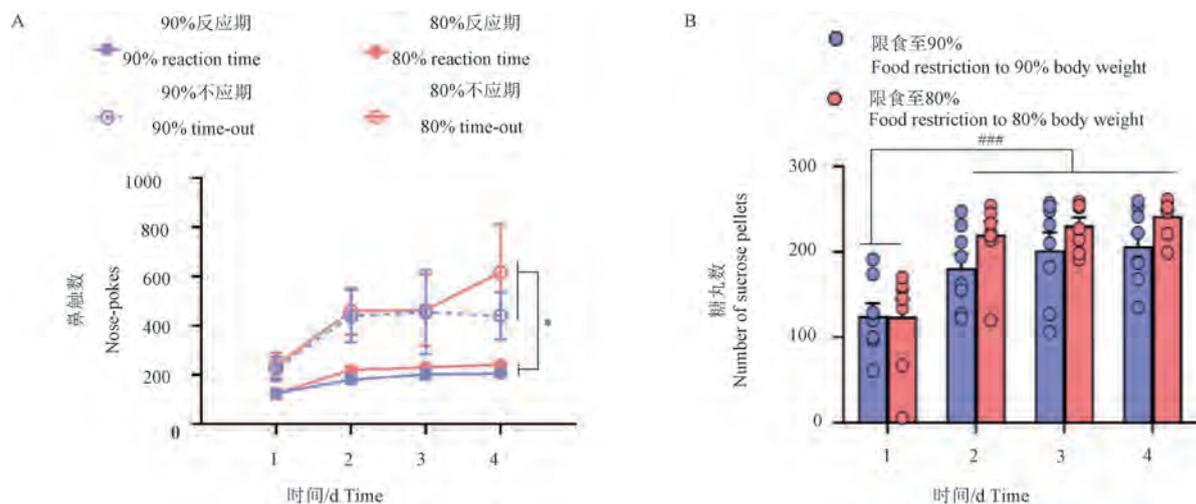
使用 MED-PC 和 MED-PC To Excel 进行数据的记录和转化,并使用 Microsoft Excel 2016、SPSS 20.0、GraphPad Prism 8.0 等软件进行数据分析和图表制作。利用重复测量多因素方差分析比较两组大鼠鼻触次数以及获取奖赏数量的差异,

$t$  检验对免疫印迹的结果进行差异分析。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同动机条件下大鼠在完成简易奖励获取任务中的表现

第一阶段训练大鼠完成简易奖励获取任务 (高回报), 建立一侧鼻触与糖丸之间的联系 (FR1)。连续 3 d 获得 100 颗糖丸为达到标准。运用三因素方差分析 (图 2A), 发现鼻触有效性主效应显著 ( $F(1, 98) = 26.18, P < 0.001, \eta^2 = 0.189$ ), 反应期内的鼻触是有效鼻触, 不应期内的鼻触是无效鼻触。限食程度主效应不显著 ( $F(1, 14) = 0.83, P = 0.365, \eta^2 = 0.007$ ), 时间的主效应显著 ( $F(3, 98) = 3.86, P = 0.011, \eta^2 = 0.094$ )。事后比较显示从训练的第 2 天起, 限食至 90% 和限食至 80% 组的大鼠能显著区分有效鼻触和无效鼻触 ( $P = 0.021, 95\% \text{ CI} = [-270.177, -22.823]$ )。各个因素之间均不存在交互作用 (限食程度  $\times$  鼻触有效性:  $F(1, 98) = 0.11, P = 0.744, \eta^2 = 0.001$ ; 限食程度  $\times$  时间:  $F(3, 98) = 0.26, P = 0.857, \eta^2 =$



注:A: 不同限食条件下大鼠在简易奖励获取任务中的鼻触数。反应期内的鼻触:鼻触后获得糖丸;不应期的鼻触:在不进行鼻触,不会获得糖丸。B: 不同限食条件下大鼠在简易奖励获取任务中的获得糖丸数。与不应期鼻触相比, \*  $P < 0.05$ ; 与第 1 天的糖丸数相比, ###  $P < 0.001$ 。

图 2 不同动机条件下大鼠在完成简易奖励获取任务中的表现

Note. A, Nose pokes of rats under different food restriction conditions in simple reward acquisition tasks. The nose pokes during the response period, Obtain sucrose pellets after nose pokes. The nose pokes during the refractory period, No sucrose pellets will be obtained after nose pokes during the refractory period. B, Number of sucrose pellets of rats under different food restriction conditions in simple reward acquisition tasks. Compared with nose-pokes in time-out, \*  $P < 0.05$ . Compared with number of sucrose pellets in Day 1, ###  $P < 0.001$ .

Figure 2 Performance of rats under different motivational conditions in simple reward acquisition tasks

16,  $\eta^2 = 0.007$ ; 时间 $\times$ 鼻触有效性:  $F(3, 98) = 0.89, P = 0.448, n = 16, \eta^2 = 0.023$ ; 限食程度 $\times$ 时间 $\times$ 鼻触有效性:  $F(3, 98) = 0.19, P = 0.906, n = 16, \eta^2 = 0.005$ )。运用双因素方差分析考察时间和限食程度对大鼠获得糖丸数量的影响(图 2B), 发现时间的主效应显著( $F(3, 42) = 16.99, P < 0.001, n = 16, \eta^2 = 0.477$ ), 事后比较结果显示从训练的第 2 天起限食至 90% 和限食至 80% 组的大鼠获得的糖丸数量显著增加( $P < 0.001, 95\% CI = [-313.265, -138.360]$ )。限食程度的主效应显著( $F(1, 14) = 5.40, P = 0.024, n = 16, \eta^2 = 0.088$ )。时间和限食程度之间不存在交互作用( $F(3, 42) = 0.67, P = 0.573, n = 16, \eta^2 = 0.035$ )。

## 2.2 不同动机条件下大鼠在完成可变难度获取糖丸奖励任务中的表现

第二阶段的任务是训练大鼠学会另一侧鼻触孔需鼻触多下才可以获得食物(低回报)。用双因素重复测量方差分析来考察不同限食程度对大鼠 BP 测试中动机的影响(图 3A), 发现限食程度的主效应显著( $F(1, 14) = 11.19, P = 0.003, n = 16, \eta^2 = 0.327$ )。

运用三因素方差分析考察 FRX ( $X = BP \times 12.5\%、BP \times 25\%、BP \times 50\%、BP \times 75\%$ ) 程序连续 4 d 的训练结果(图 3B), 发现鼻触有效性主效应显著( $F(1, 98) = 105.34, P < 0.001, n = 16, \eta^2 = 0.485$ ); 限食程度的主效应显著( $F(1, 14) = 33.85, P < 0.001, n = 16, \eta^2 = 0.232$ ); BP 比例主效应不显著( $F(3, 98) = 2.36, P = 0.075, n = 16, \eta^2 = 0.060$ )。鼻触有效性和限食程度之间存在交互作用( $F(1, 98) = 12.19, P < 0.001, n = 16, \eta^2 = 0.098$ ), 进一步进行简单效应分析, 发现在不应期, 限食程度的简单效应不显著( $F(1, 98) = 1.96, P = 0.164$ ); 在反应期, 限食程度的简单效应显著( $F(1, 98) = 31.45, P < 0.001$ )。鼻触有效性和 BP 比例之间也存在交互作用( $F(3, 98) = 14.82, P < 0.001, n = 16, \eta^2 = 0.284$ ), 进一步进行简单效应分析, 在 X 为  $BP \times 12.5\%$  时, 鼻触的有效性的简单效应不显著( $F(3, 98) = 0.009, P = 0.925$ ), 但是在其他 X 值下鼻触的有效性的简单效应均显著( $25\%: F(3, 98) = 12.57, P = 0.001; 50\%: F(3, 98) = 43.13, P <$

$0.001; 75\%: F(3, 98) = 52.98, P < 0.001$ )。限食程度和 BP 比例之间不存在交互作用(限食程度 $\times$ BP 比例:  $F(3, 98) = 0.46, P = 0.708, n = 16, \eta^2 = 0.012$ ), 鼻触有效性、限食程度和断点比例之间也不存在交互作用(鼻触有效性 $\times$ 限食程度 $\times$ BP 比例:  $F(3, 98) = 0.98, P = 0.121, n = 16, \eta^2 = 0.050$ )。这些结果共同说明限食程度较大的大鼠、在 BP 比例较大时更容易建立多次鼻触和获得糖丸之间的联系。

运用双因素方差分析断点比例和限食程度对大鼠获得糖丸数量的影响(图 3C), 发现 BP 比例的主效应显著( $F(3, 42) = 51.54, P < 0.001, n = 16, \eta^2 = 0.734$ ), BP 比例和限食程度之间存在交互作用( $F(3, 42) = 2.77, P = 0.050, n = 16, \eta^2 = 0.129$ )。事后比较显示两个限食程度下的大鼠在每一个不同的 BP 比例所获得的糖丸数量之间都不存在显著差异。

## 2.3 不同动机条件下大鼠在完成可选难度获取糖丸奖励任务中的表现

第三阶段测试阶段, 运用三因素方差分析考察努力程度(BP 比例)、鼻触有效性和限食程度对大鼠鼻触 FR1 侧鼻触孔的影响(图 4A), 发现鼻触有效性的主效应显著( $F(1, 182) = 224.52, P < 0.001, n = 16, \eta^2 = 0.471$ ); 限食程度的主效应显著( $F(1, 14) = 4.763, P = 0.03, n = 16, \eta^2 = 0.024$ ); 努力程度主效应不显著( $F(6, 182) = 1.12, P = 0.352, n = 16, \eta^2 = 0.033$ )。限食程度和鼻触的有效性之间存在交互作用( $F(1, 182) = 4.226, P = 0.041, n = 16, \eta^2 = 0.021$ ), 进一步进行简单效应分析, 发现在不应期, 限食程度的简单效应显著( $F(1, 182) = 9.59, P = 0.002$ ); 在反应期, 限食程度的简单效应不显著( $F(1, 182) = 0.01, P = 0.921$ )。努力程度与限食或鼻触有效性之间不存在交互作用, 且三者之间也不存在交互作用(努力程度 $\times$ 限食程度:  $F(6, 182) = 0.046, P = 1.00, n = 16, \eta^2 = 0.001$ ; 努力程度 $\times$ 鼻触有效性:  $F(6, 182) = 0.960, P = 0.454, n = 16, \eta^2 = 0.029$ ; 努力程度 $\times$ 鼻触有效性 $\times$ 限食程度:  $F(6, 182) = 0.042, P = 1.000, n = 16, \eta^2 = 0.001$ )。运用双因素方差分析考察努力程度和限食程度对大鼠在 FR1 侧获得糖丸数量的影响(图 4B), 发现限食程度的主效应显著( $F(1, 14) = 10.808,$

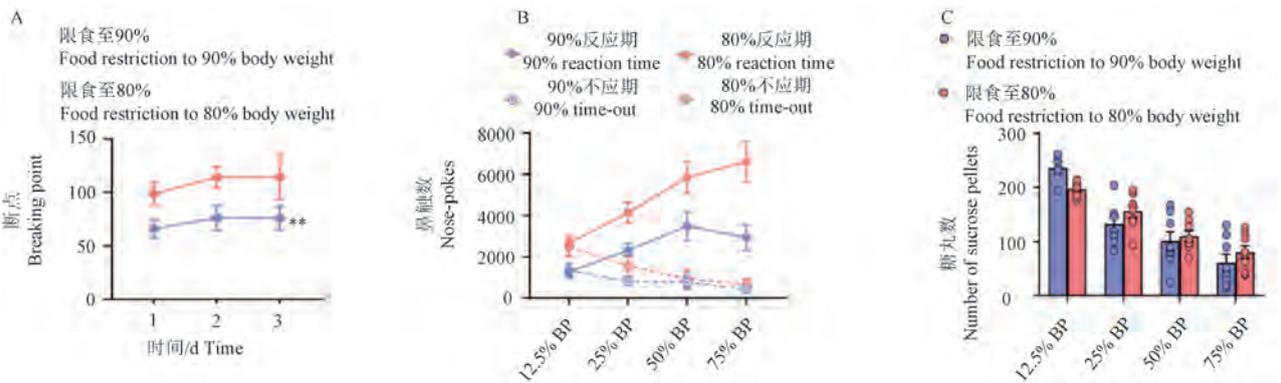
$P=0.001, n=16, \eta^2=0.099$ ); 努力程度的主效应显著 ( $F(6, 84) = 5.699, P < 0.001, n=16, \eta^2=0.259$ )。在事后比较中发现当 FR1 可以获得的糖丸数保持为平均值的 70%, FRX ( $X = BP \times 25%$ ) 时, 和 FRX ( $X = BP \times 50%、75%、100%$ ) 之间存在显著差异 ( $P < 0.05, 95\% \text{ CI}$  分别为 [ 5.949, 46.926 ] [ 20.387, 61.363 ] [ 26.074, 67.051 ] )。努力程度和限食程度之间不存在交互作用 ( $F(6, 84) = 0.490, P = 0.815, n=16, \eta^2=0.029$ )。

运用三因素方差分析考察努力程度、鼻触有效性和限食程度对大鼠在 FRX 侧鼻触行为的影响 (图 4C), 发现鼻触有效性的主效应显著 ( $F(1, 182) = 110.619, P < 0.001, n=16, \eta^2=0.361$ ), 努力程度的主效应显著 ( $F(6, 182) = 12.697, P < 0.001, n=16, \eta^2=0.280$ )。事后比较显示当 FRX 侧需要的鼻触数保持在 BP 的 100% 后, 提升 FR1 侧可以获得糖丸的最大值为第一阶段的鼻触数的平均值的 70% 与 80%、90% 和 95% 之间, 后面 3 个的 FRX 侧的鼻触数有显著的降低 ( $P = 0.045$ )。提示大鼠在需要的努力程度越高时, 在 FRX 侧的鼻触数显著下降。限食程度没有主效应 ( $F(1, 14) = 0.480, P = 0.489, n=16, \eta^2=0.002$ ), 限食至 80% 组的大鼠的鼻触数与限食至 90% 组的大鼠之间没有差异。努力程度和鼻触有效性之间存在交互作用 ( $F(6, 182) = 5.422, P < 0.001, n=16, \eta^2=0.142$ ), 进一步进行简单效应分析, 当努力程度为 FR1 = 70%, FRX = 25%、FR1 = 95%, FRX

= 100% 时, 鼻触有效性的简单效应不显著 (FR1 = 70%, FRX = 25%:  $F(6, 182) = 1.28, P = 0.259$ ; FR1 = 95%, FRX = 100%:  $F(6, 182) = 2.47, P = 0.117$ ), 其他努力程度下, 鼻触有效性的简单效应均显著, 说明当高回报侧可以获得更多的糖丸时 (FR1 = 95%), 大鼠趋于“躺平”状态, 因而无效鼻触减少, 有效鼻触和无效鼻触间差异减小。

运用双因素方差分析考察努力程度和限食程度对大鼠在 FRX 侧获得糖丸数量的影响 (图 4D), 发现限食程度的主效应显著 ( $F(1, 14) = 8.380, P = 0.005, n=16, \eta^2=0.079$ ), 努力程度的主效应显著 ( $F(6, 84) = 21.674, P < 0.001, n=16, \eta^2=0.570$ )。事后比较显示当 FR1 可以获得的糖丸数保持为平均值的 70%, FRX ( $X = BP \times 25%$ ) 和 FRX ( $X = BP \times 50%、75%、100%$ ) 存在显著差异 ( $P < 0.001, 95\% \text{ CI}$  分别为 [ 16.878, 45.872 ], [ 33.440, 62.435 ], [ 39.128, 68.122 ]), 说明当 FR1 侧可以获得的糖丸保持不变时, 随着 FRX 侧需要的鼻触数的增加, 大鼠在 FRX 侧获取糖丸的数量减少。努力程度和限食程度之间不存在交互作用 ( $F(6, 84) = 1.808, P = 0.105, n=16, \eta^2=0.100$ ), 说明无论是限食至 90% 还是限食至 80% 组的大鼠, 在不同的努力程度下获得的糖丸数之间没有显著差异。

运用双因素方差分析考察努力程度和限食程度对大鼠在 FRX 侧鼻触数量的影响 (图 4E), 发现限食程度的主效应不显著 ( $F(1, 14) =$



注: A: 第二阶段断点训练的结果; B: 第二阶段训练的鼻触数; C: 第二阶段训练获得的糖丸数。与限食至 80% 组相比, \*\*  $P < 0.01$ 。

图 3 不同动机条件下大鼠在完成可变难度获取糖丸奖励任务中的表现

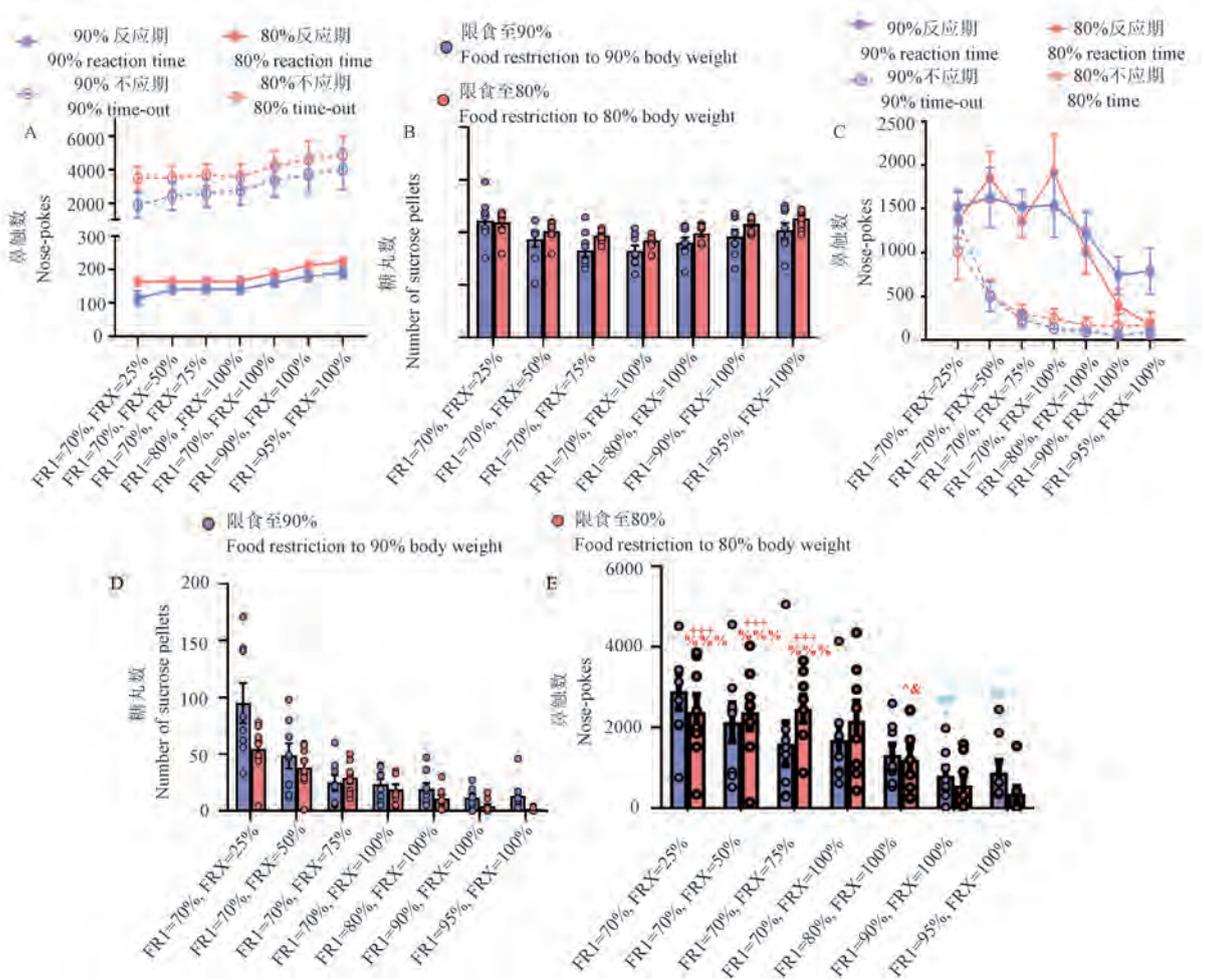
Note. A, Results of the second phase of breaking point training. B, Nose pokes of the second phase training. C, Number of sucrose pellets in the second phase training. Compared with food restriction to 80% body weight, \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 3 Performance of rats under different motivational conditions in variable difficulty reward acquisition tasks

0.003,  $P = 0.9532, n = 16$ ), 努力程度的主效应显著 ( $F(3, 43) = 21.27, P < 0.001, \eta^2 = 0.6031, n = 16$ ), 交互作用显著 ( $F(6, 84) = 2.387, P = 0.0353, \eta^2 = 0.1457, n = 16$ )。

运用单因素重复测量方差分析考察不同努力程度对限食至 90% 的大鼠在 FRX 侧鼻触数的影响 (图 4E), 发现努力程度的主效应显著 ( $F(6,$

$42) = 10.24, P < 0.001, n = 8, \eta^2 = 0.5941$ )。多重比较发现当 FRX 侧的值均为 BP 的 100% 后, FRX 侧鼻触数显著降低 (FR1 = 70% 且 FRX = 100% vs FR1 = 70% 且 FRX = 25%:  $P = 0.0107, 95\% \text{ CI} = [171.4, 2259]$ ; FR1 = 80% 且 FRX = 100% vs FR1 = 70% 且 FRX = 25%:  $P < 0.001, 95\% \text{ CI} = [532.9, 2620]$ ; FR1 = 90% 且 FRX = 100% vs FR1 = 70% 且



注: A: 不同选择程序下 FR1 侧的鼻触数; B: 不同选择程序下 FR1 侧获得糖丸的数量; C: 不同选择程序下 FRX 侧的鼻触数。D: 不同选择程序下 FRX 获得糖丸的数量; E: 不同选择程序下 FRX 侧的总鼻触数。限食至 80% 组 (红色标注), 与 FR1 = 90%, FRX = 100% 相比,  $^{***}P < 0.001$ ; 与 FR1 = 95%, FRX = 100% 相比,  $^{+++}P < 0.001$ ; 与 FR1 = 70%, FRX = 25% 相比,  $^{\wedge}P < 0.05$ ; 与 FR1 = 70%, FRX = 50% 相比,  $^{\&}P < 0.05$ ; 限食至 90% 组 (蓝色标注), 与 FR1 = 70%, FRX = 25% 相比,  $^*P < 0.05$ ; 与 FR1 = 70%, FRX = 50% 相比,  $^{##}P < 0.01$ 。

图 4 不同动机条件下大鼠在完成可选难度获取糖丸奖励任务中的表现

Note. A, Nose pokes during the response period and the refractory period of rats under different programs on FR1. B, Number of sucrose pellets under different programs on FR1. C, Nose pokes during the response period and the refractory period of rats under different programs on FRX. D, Number of sucrose pellets under different programs on FRX. E, Total nose pokes of rats under different programs on FRX. For food restriction to 80% body weight group (red label). Compared with FR1 = 90%, FRX = 100%,  $^{***}P < 0.001$ . Compared with FR1 = 95%, FRX = 100%,  $^{+++}P < 0.001$ . Compared with FR1 = 70%, FRX = 25%,  $^{\wedge}P < 0.05$ . Compared with FR1 = 70%, FRX = 50%,  $^{\&}P < 0.05$ . For food restriction to 90% body weight group (blue label). Compared with FR1 = 70%, FRX = 25%,  $^*P < 0.05$ . Compared with FR1 = 70%, FRX = 50%,  $^{##}P < 0.01$ .

Figure 4 Performance of rats under different motivational conditions in optional difficulty reward acquisition tasks

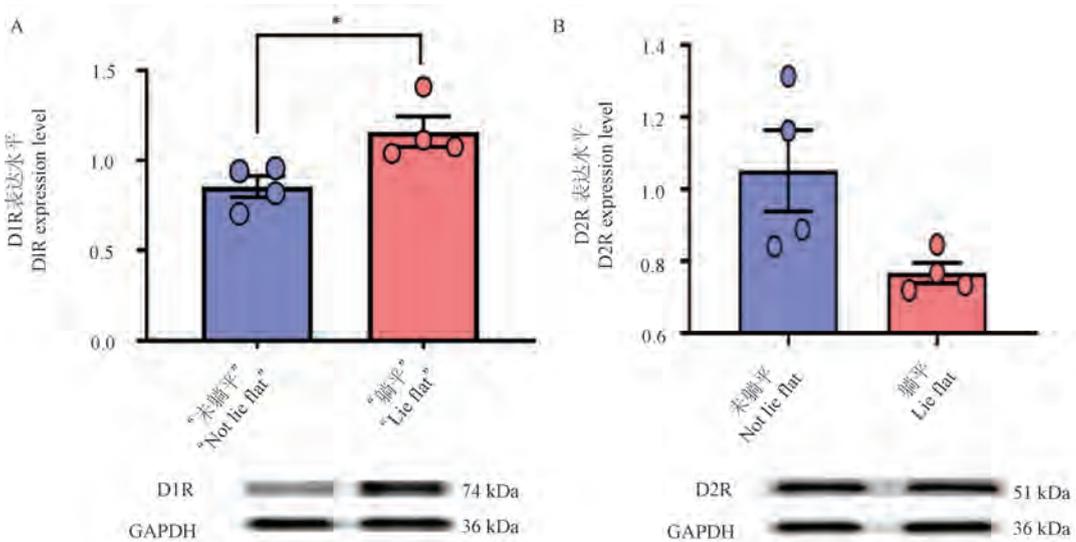
FRX = 25% :  $P < 0.001$ , 95% CI = [ 1050, 3137 ]; FR1 = 95% 且 FRX = 100% vs FR1 = 70% 且 FRX = 25% :  $P < 0.001$ , 95% CI = [ 973.5, 3061 ]; FR1 = 90% 且 FRX = 100% vs FR1 = 70% 且 FRX = 50% :  $P = 0.0037$ , 95% CI = [ 284.7, 2372 ]; FR1 = 95% 且 FRX = 100% vs FR1 = 70% 且 FRX = 50% :  $P = 0.0076$ , 95% CI = [ 208.5, 2296 ] )。

运用单因素重复测量方差分析来限食至 80% 的大鼠在不同努力程度下对 FRX 侧鼻触数的影响(图 4E), 努力程度的主效应显著 ( $F(6, 42) = 13.11$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 8$ ,  $\eta^2 = 0.6518$ )。多重比较发现当 FRX 侧的值均为 BP 的 100% 后, FRX 侧鼻触数显著降低 (FR1 = 80% 且 FRX = 100% vs FR1 = 70% 且 FRX = 25% :  $P = 0.0423$ , 95% CI = [ 21.54, 2347 ]; FR1 = 90% 且 FRX = 100% vs FR1 = 70% 且 FRX = 25% :  $P < 0.001$ , 95% CI = [ 661.3, 2987 ]; FR1 = 95% 且 FRX = 100% vs FR1 = 70% 且 FRX = 25% :  $P < 0.001$ , 95% CI = [ 870.8, 3196 ]; FR1 = 80% 且 FRX = 100% vs FR1 = 70% 且 FRX = 50% :  $P = 0.0459$ , 95% CI = [ 11.04, 2337 ]; FR1 = 90% 且 FRX = 100% vs FR1 = 70% 且 FRX = 50% :  $P < 0.001$ , 95% CI = [ 650.8, 2976 ]; FR1 = 95% 且

FRX = 100% vs FR1 = 70% 且 FRX = 50% :  $P < 0.001$ , 95% CI = [ 860.3, 3186 ]; FR1 = 80% 且 FRX = 100% vs FR1 = 70% 且 FRX = 75% :  $P = 0.0213$ , 95% CI = [ 107.4, 2433 ]; FR1 = 90% 且 FRX = 100% vs FR1 = 70% 且 FRX = 75% :  $P < 0.001$ , 95% CI = [ 747.2, 3073 ]; FR1 = 95% 且 FRX = 100% vs FR1 = 70% 且 FRX = 75% :  $P < 0.001$ , 95% CI = [ 956.7, 3282 ]), 特别的是, 当 FRX 侧的值维持断点的 100% 不变, 单独将 FR1 侧的停止值从 70% 改变为 90% 以及 95% 后, FRX 一侧鼻触值也有显著的降低 (FR1 = 90% vs FR1 = 70% :  $P < 0.001$ , 95% CI = [ 446.3, 2772 ]; FR1 = 95% vs FR1 = 70% :  $P < 0.001$ , 95% CI = [ 655.8, 2981 ] )。

## 2.4 伏隔核多巴胺受体表达差异

为检验“躺平”与“未躺平”的大鼠脑功能的差异, 运用独立样本  $t$  检验考察“躺平”和“未躺平”组大鼠 NAc 脑区多巴胺 D1、D2 受体表达的差异(图 5), 发现躺平组大鼠 D1 受体的表达显著高于未躺平组 ( $t = 2.951$ ,  $P = 0.026$ ,  $n = 8$ ), 但是 D2 受体的表达不存在显著差异 ( $t = 2.275$ ,  $P = 0.0633$ ,  $n = 8$ )。说明“躺平”的大鼠可能是因为 NAc 区的 D1 受体表达更高。



注: A:“躺平”与“未躺平”组之间 NAc 脑区 D1 受体表达的差异。B:“躺平”与“未躺平”组之间 NAc 脑区 D2 受体表达的差异。与“未躺平”组相比, \*  $P < 0.05$ 。

图 5 “躺平”与“未躺平”组大鼠 NAc 脑区多巴胺受体表达的差异

Note. A, Differences of dopamine receptor D1 expression in rat NAc between the “lie flat” and “no lie flat” groups. B, Differences of dopamine receptor D2 expression in rat NAc between the “lie flat” and “no lie flat” groups. Compared with “no lie flat” group, \*  $P < 0.05$ .

Figure 5 Differences of dopamine receptor expression in rat NAc between the “lie flat” and “no lie flat” groups

### 3 讨论

#### 3.1 “躺平”样动机缺乏行为

本研究通过一方面设置最大奖励次数使得大鼠在简易奖励获取任务(FR1)中只能满足部分食物需求,另一方面改变可变难度获取糖丸奖励任务(FRX)中的任务强度,发现在FR1能基本满足大鼠食物需求( $\geq 90\%$ ),且FRX达到最大强度( $X=BP \times 100\%$ )时,大鼠表现出“躺平”样行为,即在FRX侧鼻触行为显著降低,但是在FR1侧鼻触数没有明显改变。这可能是一种新的动机缺乏的动物行为模型。

动机在日常生活中非常重要,动机障碍被认为是多种精神疾病(比如重度抑郁和精神分裂症)患者功能缺陷和生活质量下降的关键原因。因此,许多临床前研究都集中在识别动机的心理和神经生物学过程上。然而,从动物行为反应的变化推断动机是复杂的,须要排除任务相关的其他过程。动机包括许多相关的心理过程,但通常可以定义为追求理想目标的行为激励。动机缺陷本质上与行为反应的缺少有关。动物在任务中反应较少,除了动力较弱之外,还可能与疲劳或运动障碍等原因有关。本研究排除了这些可能性,因为大鼠在FR1侧的鼻触数以及获取糖丸数并没有显著降低。

大鼠鼻触获得糖丸的动机行为中涉及多个心理过程<sup>[10]</sup>。大鼠除了需要付出体力外,鼻触行为也有享乐成分,因为大鼠“喜欢”糖丸奖励才会去鼻触。大鼠还必须通过某种类型的成本/收益计算,来比较行为(比如鼻触行为所花费的努力)的预期成本与行为结束后获得奖赏的预期收益。如果努力的结果超过了相关的成本,大鼠会选择付出鼻触的努力。因此,本研究发现在FR1能基本满足大鼠食物需求时,FRX侧鼻触行为显著降低,可能是因为大鼠进行了某种成本/收益计算,认为付出的成本超过了可能获得的奖赏。这也符合以往的发现,即如果动物不饿,他们就不会为食物而完成任务。

已有多种实验心理学的行为程序可以用来剖析动机过程。测试动机最简单的是固定比例(FR)训练程序。在这个程序中,动物在完成指定数量的鼻触后就会得到奖励,奖励所需的鼻触次

数可以增加(例如FR1、FR5、FR25),动物在面对不断增加的工作需求时愿意继续鼻触的程度可以反映动物在面对日益增加的努力需求时获得奖励的动机<sup>[11]</sup>。FR程序的一种变体是累进比率(PR)程序<sup>[12]</sup>,奖励对完成行为的要求会随着奖励的提供而增加,变得越来越困难,直到在某个时候动物拒绝完成行为。动物停止反应或训练结束前完成的最后1个比率被称作断点,常被视为动机的指标,其他指标还包括鼻触数和获得的奖励的数量。动物通常在FR程序下成功习得鼻触行为后,会进行PR程序训练。本研究在训练过程中也使用了这两种程序,但是并没有简单作为动机的测试,而是用于训练不同难度获得奖励的任务,并在第三阶段训练中让大鼠进行选择。

与本研究所用任务范式类似,与努力相关的选择任务也被用来检测奖励动机行为<sup>[13]</sup>。动物需要在努力获得更喜欢的奖励与自由获得不太喜欢的奖励之间进行权衡。动物按照FR程序进行训练,逐渐增加比率值,直到达到适度的要求。FR程序对应的行为会得到更喜欢的奖励。同时,动物可以自由获得一种不太喜欢的奖励(通常是在饲养笼中进食)。因此,在整个过程中,动物可以在工作以获得更好的奖励或食用不太喜欢的食物之间做出选择。这项任务被认为是专门分析奖励动机的行为。通常情况下,动物会更多地为自己喜欢的奖励工作,而消耗更少的免费食物。通过增加需要的FR,研究人员可以确定各种条件或操纵如何影响为获得首选奖励而付出努力的意愿<sup>[14]</sup>。该模型与本研究也有明显的不同,该模型的发现提示在所需努力程度不太高的时候,动物更倾向于努力获取更喜欢的奖励,而本研究发现所需努力程度过高时,动物更倾向于放弃获取一个较小的收益。

#### 3.2 不同限食程度对“躺平”的影响

本研究使用了两个不同的限食程度,两组大鼠均出现“躺平”现象,且两组之间没有显著差异。可能是因为高回报侧已经基本满足需求,所以对于低回报侧动机降低导致的。有研究表明,自给药行为以及动机,受到动物饥饿程度/饱腹水平的影响,比如吃饱或者部分吃饱的动物觅食行为和动机显著降低<sup>[15-17]</sup>,相反,饥饿会引起更多的觅食行为和更高的觅食动机<sup>[18-20]</sup>。并且

在当难度提高到一定程度的条件下,动物更倾向于近期的小的奖励而非远期的大的奖励<sup>[21-23]</sup>。

有趣的是,与限食至原体重 90% 的大鼠相比,限食至原体重 80% 组的大鼠在第三阶段,在低回报(FRX)侧获得糖丸的数量显著更低,当在高回报(FR1)侧可以获得的糖丸达到第一阶段的 90% 及以上时,限食至 80% 组大鼠几乎不再从低回报侧获取糖丸,且在第一、二训练阶段限食至 80% 组的大鼠所获取的糖丸一直显著高于限食至 90% 组,表明限食至 80% 的大鼠在高回报侧获得较多糖丸后,不倾向于再继续从低回报侧获得糖丸。可能有如下两个原因:(1)限食至 80% 组经过比较长时间更为饥饿的状态,已经适应了当前的限食以及代谢状态,对糖丸的寻求动机比限食至 90% 组更低;(2)限食至 80% 组的大鼠,与限食至 90% 组的大鼠相比,虽然处于更为饥饿、糖丸寻求动机更强的状态,但是这导致了该组大鼠更快地摄入糖丸,导致更快的饱腹感,从而使得在测试期间糖丸寻求动机反而更低。后一种可能性应该可以通过检测两组大鼠摄食的频率来验证,遗憾的是,本研究并未采集该数据,这也是本研究的不足之处,具体机制有待进一步的深入研究。

### 3.3 “躺平”与“未躺平”组之间受体表达的差异

限食可以使与激励动机过程相关的神经系统敏化,其中包括多巴胺系统<sup>[24]</sup>,而 D1 受体对于环境和识别线索诱导的自然奖励(食物等)寻求的恢复非常重要<sup>[25]</sup>,蔗糖等适口性食物会提高 D1 受体 mRNA 的水平<sup>[25]</sup>,对食物的渴求会导致 NAc 内 D1 受体的增加<sup>[26]</sup>,而慢性限食会增加 D1 受体阳性神经元而非 D2 受体阳性神经元的突触可塑性<sup>[27-28]</sup>。本研究在 16 只大鼠中选取 4 只“躺平”和 4 只“未躺平”的大鼠进行免疫印迹检测,发现与“未躺平”的大鼠相比,“躺平”的大鼠其 NAc 中 D1R 表达水平显著更高,而 D2 受体表达水平未发现显著差异。可能原因是“躺平”与否可能与 NAc 中的 D2 受体表达水平高低无关。相比于 D2 受体,NAc 表达 D1 受体的神经元兴奋支持小鼠的积极自刺激行为,表明 NAc 表达 D1 受体的神经元特异性参与调节动机和奖励行为<sup>[29]</sup>。在调节食物动机中,有研究表明小鼠 NAc 核表达 D1 受体而非表达 D2 受体的神经元在诱

发食物动机中的重要作用<sup>[30]</sup>,提示 D1 受体更与食物奖励诱发的动机密切相关。“躺平”与“未躺平”的大鼠 NAc 脑区的 D1 受体表达水平虽然有显著差异,但是与先前的假设相反,“躺平”组的 D1 受体的表达反而高于“未躺平”组,推测其可能的原因,“躺平”组的行为确实已经躺平(低回报侧鼻触小于 200,几乎不从低回报侧获得糖丸),但是对于食物的渴求甚至大于“未躺平”组,只是不愿再付出更多的努力去获得食物,所以 NAc 内 D1 受体表达增加,也可能与实验的其他影响因素有关,需要重复实验进行排除后得到原因。

## 4 结论

“躺平”可能是由于基本生存条件得到满足后的动机减弱,在低难度获取奖励能有较高满足度的情况下,大鼠完成高难度获取奖赏任务的动机会显著降低,呈现“躺平”样行为。伏隔核 D1 受体表达升高可能是躺平的生物学基础之一。上述发现扩展和加深了对于躺平及动机减弱机制的认识,为研究躺平的生物学基础提供了一种新的行为学范式。

### 参考文献:

- [1] 宋德孝, 别杨杨. “低欲望躺平主义”的本质、危害及其超越——基于当代青年多元需求的分析视角 [J]. 中国青年研究, 2022, 312(2): 22-29.  
SONG D X, BIE Y Y. The essence, harm and transcendence of “low desire levelling” —— based on the analysis of the diverse needs of contemporary youth [J]. Chin Youth Study, 2022, 312(2): 22-29.
- [2] CAWLEY E I, PARK S, AAN HET ROT M, et al. Dopamine and light: dissecting effects on mood and motivational states in women with subsyndromal seasonal affective disorder [J]. J Psychiatry Neurosci, 2013, 38(6): 388-397.
- [3] BAYER H M, GLIMCHER P W. Midbrain dopamine neurons encode a quantitative reward prediction error signal [J]. Neuron, 2005, 47(1): 129-141.
- [4] JOSHUA M, ADLER A, MITELMAN R, et al. Midbrain dopaminergic neurons and striatal cholinergic interneurons encode the difference between reward and aversive events at different epochs of probabilistic classical conditioning trials [J]. J Neurosci, 2008, 28(45): 11673-11684.
- [5] NAIR-ROBERTS R G, CHATELAIN-BADIE S D, BENSON E, et al. Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral

- tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat [J]. *Neuroscience*, 2008, 152(4): 1024–1031.
- [6] SPANAGEL R, WEISS F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status [J]. *Trends Neurosci*, 1999, 22(11): 521–527.
- [7] GHODS-SHARIFI S, FLORESCO S B. Differential effects on effort discounting induced by inactivations of the nucleus accumbens core or shell [J]. *Behav Neurosci*, 2010, 124(2): 179–191.
- [8] STOPPER C M, FLORESCO S B. Contributions of the nucleus accumbens and its subregions to different aspects of risk-based decision making [J]. *Cogn Affect Behav Neurosci*, 2011, 11(1): 97–112.
- [9] GERFEN C R, SURMEIER D J. Modulation of striatal projection systems by dopamine [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2011, 34: 441–466.
- [10] 石哲, 陈善广, 陈玲玲, 等. 奖励性操作式条件反射任务在大鼠学习记忆研究中的应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(4): 9–15.
- SHI Z, CHEN S G, CHEN L L, et al. Evaluation of reward-relevant learning and memory behavior with operant conditioning task in rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2012, 20(4): 9–15.
- [11] SALAMONE J D, CORREA M, MINGOTE S, et al. Nucleus accumbens dopamine and the regulation of effort in food-seeking behavior: implications for studies of natural motivation, psychiatry, and drug abuse [J]. 2003, 305(1): 1–8.
- [12] HODOS W. Progressive ratio as a measure of reward strength [J]. *Science*, 1961, 134(3483): 943–944.
- [13] SALAMONE J D, STEINPREIS R E, MCCULLOUGH L D, et al. Haloperidol and nucleus accumbens dopamine depletion suppress lever pressing for food but increase free food consumption in a novel food choice procedure [J]. *Psychopharmacology*, 1991, 104(4): 515–521.
- [14] SALAMONE J D, CORREA M, FARRAR A, et al. Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits [J]. *Psychopharmacology*, 2007, 191(3): 461–482.
- [15] PANAYI M C, KILLCROSS S. Outcome devaluation by specific satiety disrupts sensory-specific Pavlovian-to-instrumental transfer [J]. *Front Behav Neurosci*, 2022, 16: 983480.
- [16] SIEBURG M C, ZIMINSKI J J, MARGETTS-SMITH G, et al. Reward devaluation attenuates cue-evoked sucrose seeking and is associated with the elimination of excitability differences between ensemble and non-ensemble neurons in the nucleus accumbens [J]. *eNeuro*, 2019, 6(6): ENEURO.0338–19.
- [17] SOOD A, RICHARD J M. Sex-biased effects of outcome devaluation by sensory-specific satiety on pavlovian-conditioned behavior [J]. *Front Behav Neurosci*, 2023, 17: 1259003.
- [18] BURNETT C J, LI C, WEBBER E, et al. Hunger-driven motivational state competition [J]. *Neuron*, 2016, 92(1): 187–201.
- [19] CHEN Y, LIN Y C, ZIMMERMAN C A, et al. Hunger neurons drive feeding through a sustained, positive reinforcement signal [J]. *eLife*, 2016, 5: e18640.
- [20] STERNSON S M, NICHOLAS BETLEY J, CAO Z F. Neural circuits and motivational processes for hunger [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2013, 23(3): 353–360.
- [21] FOBBS W C, MIZUMORI S J. A framework for understanding and advancing intertemporal choice research using rodent models [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2017, 139: 89–97.
- [22] KANE G A, BORNSTEIN A M, SHENHAV A, et al. Rats exhibit similar biases in foraging and intertemporal choice tasks [J]. *eLife*, 2019, 8: e48429.
- [23] SACKETT D A, MOSCHAK T M, CARELLI R M. Prelimbic cortical neurons track preferred reward value and reflect impulsive choice during delay discounting behavior [J]. *J Neurosci*, 2019, 39(16): 3108–3118.
- [24] BERRIDGE K C, ROBINSON T E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 1998, 28(3): 309–369.
- [25] MARCHANT N J, KAGANOVSKY K, SHAHAM Y, et al. Role of corticostriatal circuits in context-induced reinstatement of drug seeking [J]. *Brain Res*, 2015, 1628(Pt A): 219–232.
- [26] D’CUNHA T M, DAOUD E, RIZZO D, et al. Augmentation of heroin seeking following chronic food restriction in the rat: differential role for dopamine transmission in the nucleus accumbens shell and core [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2017, 42(5): 1136–1145.
- [27] CARR K D, CHAU L S, CABEZA DE VACA S, et al. AMPA receptor subunit GluR1 downstream of D-1 dopamine receptor stimulation in nucleus accumbens shell mediates increased drug reward magnitude in food-restricted rats [J]. *Neuroscience*, 2010, 165(4): 1074–1086.
- [28] CARR K D, TSMIBERG Y, BERMAN Y, et al. Evidence of increased dopamine receptor signaling in food-restricted rats [J]. *Neuroscience*, 2003, 119(4): 1157–1167.
- [29] COLE S L, ROBINSON M J F, BERRIDGE K C. Optogenetic self-stimulation in the nucleus accumbens: D1 reward versus D2 ambivalence [J]. *PLoS One*, 2018, 13(11): e0207694.
- [30] MATIKAINEN-ANKNEY B A, LEGARIA A A, PAN Y, et al. Nucleus accumbens D1 receptor-expressing spiny projection neurons control food motivation and obesity [J]. *Biol Psychiatry*, 2023, 93(6): 512–523.

袁玲,王蕾,程鹏,等. 5-Aza-CdR 通过抑制大鼠原代肾肌成纤维细胞 *Epo* 基因启动子高甲基化逆转 PMT [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(1): 79-85.

Yuan L, Wang L, Cheng P, et al. 5-Aza-CdR reverses pericyte-myofibroblast transition by inhibiting *Epo* gene promoter hypermethylation in rat primary renal myofibroblasts [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 79-85.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.008

## 5-Aza-CdR 通过抑制大鼠原代肾肌成纤维细胞 *Epo* 基因启动子高甲基化逆转 PMT

袁玲\*,王蕾,程鹏,江茜,崔晓雪

(天津市医药科学研究所,天津 300020)

**【摘要】** 目的 观察去甲基化剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)对大鼠原代肾肌成纤维细胞的周细胞肌成纤维细胞转化(pericyte-myofibroblast transition, PMT)的影响。方法 取 5-Aza-CdR 250 ng/mL 处理大鼠原代肾肌成纤维细胞 72 h, 采用焦磷酸测序方法检测促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)基因启动子甲基化程度, 采用免疫荧光与 Western blot 检测  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、血小板源性生长因子受体  $\beta$ (platelet-derived growth factor receptor  $\beta$ , PDGFR $\beta$ )和 DNA 甲基转移酶 3a(DNA methyltransferase 3a, Dnmt3a)的蛋白表达水平, 并检测细胞上清液 EPO 水平。结果 与对照组相比, 5-Aza-CdR 处理能显著降低 Dnmt3a 的表达和 *Epo* 启动子高甲基化水平, 并随之降低了肌成纤维细胞中  $\alpha$ -SMA 的表达及  $\alpha$ -SMA 与 PDGFR $\beta$  的表达比例, 同时, 5-Aza-CdR 处理提高了细胞上清液中 EPO 的水平。结论 5-Aza-CdR 可通过抑制大鼠原代肾肌成纤维细胞 *Epo* 启动子高甲基化逆转 PMT。

**【关键词】** 周细胞-肌成纤维细胞转化; EPO; DNA 甲基化; 5-氮杂-2'-脱氧胞苷; DNA 甲基转移酶

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0079-07

### 5-Aza-CdR reverses pericyte-myofibroblast transition by inhibiting *Epo* gene promoter hypermethylation in rat primary renal myofibroblasts

YUAN Ling\*, WANG Lei, CHENG Peng, JIANG Qian, CUI Xiaoxue

(Tianjin Institute of Medical and pharmaceutical Science, Tianjin 300020, China)

**【Abstract】 Objective** To examine the effect of the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) on pericyte-myofibroblast transition (PMT) in primary rat renal myofibroblasts. **Methods** Rat primary renal myofibroblasts were treated with 5-Aza-CdR 250 ng/mL for 72 h, and the degree of *Epo* promoter methylation was detected by pyrosequencing. Protein expression levels of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  (PDGFR $\beta$ ) and DNA methyltransferase (Dnmt3a) were detected by immunofluorescence and Western blot, and erythropoietin (EPO) levels in the supernatant were detected. **Results** Compared with the control group, 5-Aza-CdR treatment significantly decreased the expression of Dnmt3a and hypermethylation of the *Epo* promoter, and subsequently decreased the expression of  $\alpha$ -SMA and the expression ratio of  $\alpha$ -SMA to PDGFR $\beta$  in myofibroblasts. Meanwhile, 5-Aza-CdR treatment increased the level of EPO in the cell supernatant. **Conclusions** 5-Aza-CdR can reverse PMT by inhibiting *Epo* promoter hypermethylation in primary renal myofibroblasts.

**【基金项目】**天津市卫生健康科技项目(TJWJ2022MS050)。

**【作者简介】**袁玲(1979—),女,硕士,副研究员,研究方向:慢性肾病及其并发症。E-mail:1128sun@163.com

**【 Keywords 】** pericyte-myofibroblast transition; EPO; DNA methylation; 5-aza-2'-deoxycytidine; DNA methyltransferase

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

肾性贫血是慢性肾疾病 (chronic kidney disease, CKD) 的主要并发症之一, 随肾功能下降其发生率逐渐增加, 对患者的生存质量及长期存活均有重要影响。肾周细胞 (renal EPO-producing cells, REPCs) 是正常肾产生促红细胞生成素的细胞<sup>[1]</sup>。它是起源于间充质的高度分枝的间质细胞, 包裹在微血管基底膜内, 通过不同的信号通路与内皮细胞相互作用。在正常情况下, 这些细胞位于皮髓质交界 O<sub>2</sub> 利用率急剧下降的区域, 表达 CD73 和血小板源性生长因子受体  $\beta$  (platelet-derived growth factor receptor  $\beta$ , PDGFR $\beta$ )<sup>[2]</sup>。在 CKD 进展过程中, 周细胞分化为表达  $\alpha$ -SMA 的肌成纤维细胞 (PDGFR $\beta^+$ 、CD73<sup>+</sup>、 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>) 即发生周细胞肌成纤维细胞转化 (pericyte-myofibroblast transition, PMT), 其促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 表达明显降低<sup>[3-5]</sup>。PDGFR $\beta^+$  周细胞和  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> PDGFR $\beta^+$  肌成纤维细胞可以作为研究正常或 CKD 肾周细胞肌成纤维细胞转化 (pericyte-myofibroblast transition, PMT) 的标记物<sup>[5-6]</sup>。PMT 已被证明是 CKD 慢性进展的关键<sup>[5,7]</sup>。然而, 目前 CKD 中 REPCs 发生 PMT 的具体机制仍不是很清楚。新近研究表明该过程与 *Epo* 5' 的 DNA 高甲基化密切相关<sup>[7-8]</sup>。5-氮杂-2' 脱氧胞苷 (5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR) 是一种去甲基化剂, 已被食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准直接或间接用于影响基因的疾病治疗<sup>[9]</sup>。在表观遗传学研究中, 5-Aza-CdR 也被广泛用作抑制 DNA 甲基转移酶<sup>[10-11]</sup>。本研究采用 5-Aza-CdR 处理大鼠原代肾肌成纤维细胞通过调控 *Epo* 的 DNA 高甲基化状态研究 PMT 可逆性。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞

原代大鼠肾肌成纤维细胞 (rat-icell-u017) 购自 iCell 生物科技股份有限公司。

### 1.2 主要试剂与仪器

原代细胞培养体系 (iCell 生物科技股份有限公司, 货号 PriMed-iCell-015); 5-Aza-CdR (北京索莱宝科技有限公司, 货号 D9010); 二甲基亚砜 (美国 Sigma 公司, 货号 276855); Rat EPO ELISA Kit (武汉博士德生物公司, 货号 EK1351); 小鼠抗  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) (美国 Novus Biologicals 公司, 货号 NBP2-33006); 小鼠抗 DNA 甲基转移酶 3a (DNA methyltransferase 3a, Dnmt3a) (美国 Santa Cruz 公司, 货号 sc-373905); 兔抗血小板源性生长因子受体  $\beta$  (platelet-derived growth factor receptor  $\beta$ , PDGFR $\beta$ ) (英国 Abcam 公司, 货号 ab32570); 兔抗 CD73 (美国 CST 公司, 货号 13160); 特异性荧光标记二抗 (美国 CST 公司, 货号 4412); 小鼠抗  $\beta$ -actin (北京中杉金桥生物技术有限公司, 货号 TA-09); DNA Marker (天根生化科技 (北京) 有限公司, 货号 MD114-02); EpiTaq<sup>TM</sup> HS (宝生物工程 (大连) 有限公司, 货号 R110A); EZ DNA Methylation-GoldKit (美国 ZYMO RESEARCH 公司, 货号 D5005); PyroMark Q48 Advanced CpG Reagents (德国 QIAGEN 公司, 货号 974002); PyroMark Q48 Magnetic Beads (德国 QIAGEN 公司, 货号 974203); PyroMark Q48 Discs (德国 QIAGEN 公司, 货号 974901); PyroMark Q48 Absorber Strips (德国 QIAGEN 公司, 货号 974912)。焦磷酸测序仪 (德国 QIAGEN, 货号 PyroMark Q48); 一体化成像仪 (美国 GE 公司 Image, 货号 QuantLAS500); PCR 仪 (德国赛默飞世尔科技公司, 货号 QuantStudio5); 酶标仪 (德国赛默飞世尔科技公司, 货号 Multiskan FC); 荧光显微镜 (日本尼康公司, 货号 Ni-U); 引物由上海生工生物技术有限公司合成。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细胞培养

于培养瓶中培养原代大鼠肾肌成纤维细胞, 待细胞覆盖培养瓶壁 80%~90% 后传代, 将细胞接种于 6 孔板进行后续实验。

### 1.3.2 分组及药物处理

实验分对照组和 5-Aza-CdR 组,5-Aza-CdR 剂量依据文献<sup>[12]</sup>和噻唑蓝(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)测试结果判定。MTT 测定方法为:REPCs( $1 \times 10^5$ /mL)分别用不同浓度的 5-Aza-CdR 在 37 °C 条件下处理 24 h,处理后每孔加 20  $\mu$ L MTT 孵育 4 h,用 150  $\mu$ L 二甲基亚砷溶解紫色甲瓚晶体,用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度。将细胞接种于 6 孔板中,并在标准 CO<sub>2</sub> 培养箱(95%空气,5% CO<sub>2</sub>)中于 37 °C 的上述培养基中孵育。2 d 后,细胞用 250 ng/mL 5-Aza-CdR 或二甲基亚砷溶剂处理 24 h,处理结束后收集各组细胞或细胞上清液用于后续实验。

### 1.3.3 细胞培养上清中 EPO 水平分析

取 1.3.2 中处理 72 h 后的各组细胞悬液 200  $\mu$ L,3000 r/min 离心 15 min 收集上清液,严格按照试剂盒说明采用 R. EPO ELISA 试剂盒检测细胞培养上清中 EPO 水平。

### 1.3.4 免疫荧光染色检测

免疫荧光染色检测原代大鼠肾肌成纤维细胞 Dnmt3a 的表达,并分别检测  $\alpha$ -SMA/PDGFR $\beta$  和  $\alpha$ -SMA/CD 73 共定位表达。5-Aza-CdR 处理 72 h 后,6 孔板中的细胞爬片经 4%多聚甲醛固定 15 min,TBS 冲洗 3 次,采用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭过氧化物酶 10 min,TBS 冲洗 3 次,血清封闭 20 min,加入浓度为 1:200 的相应一抗,4 °C 孵育过夜后,TBS 冲洗 3 次,荧光二抗 37 °C 孵育 1 h,TBS 冲洗 3 次,DAPI 复染后滴入防荧光淬灭剂封片。以 TBS 代替一抗设立阴性对照。

### 1.3.5 Western blot 法检测肾肌成纤维细胞 $\alpha$ -SMA、PDGFR $\beta$ 和 Dnmt3a 蛋白表达水平

5-Aza-CdR 处理 72 h 后,将细胞匀浆后加入适量含有 PMSF 的蛋白裂解液,提取组织蛋白,并用 BCA 法进行蛋白定量。将蛋白样本进行凝胶电泳,电转至 PVDF 膜上,经漂洗、封闭后加入稀释一抗  $\alpha$ -SMA(1:1000)、PDGFR $\beta$ (1:1000)、Dnmt3a(1:1000)和  $\beta$ -actin(1:1000),4 °C 孵育过夜,然后加入相应二抗(1:5000)37 °C 孵育 1 h,使用凝胶成像仪进行观察,随后用 Image J 1.4.3.67 测定条带灰度值,以目的蛋白与内参  $\beta$ -actin 的灰度比值表示。

### 1.3.6 焦磷酸测序

使用焦磷酸测序检测 *Epo* 启动子内 3 个 CpG 位点(转录起始位点的+219、+221 和+232 碱基对)的甲基化。待分析序列为:TTYGYGTTTT TTGGAYGGTGATTATTTTTTTTTTAGGTTATT,其中 Y 代表 CpG 位点。5-Aza-CdR 处理 72 h 后,从各组细胞样本中提取基因组 DNA。根据试剂盒说明书,使用 EZ DNA 甲基化试剂盒进行亚硫酸氢钠基因组 DNA 的转化。使用引物(正向 PCR 引物 5'-GTGTTTTAGAATAGATTTTGGTTA GG-3';反向 PCR 引物 5'-biotin-ACCAAATCACC CCAATAACCTAA-3'和测序引物 5'-AGGGTTAT AGAGTTTTTTTG-3')对含有亚硫酸转化 DNA 启动子的基因组 DNA 片段扩增,PCR 产物经 PyroMark Q48 Autoprep(Qiagen)按照使用说明书进行 CpG 定量。该分析包括 *Epo* 转录起始位点的+219、+221 和+232 碱基对甲基化位点。在本研究中,这些位点被指定为 CpG15~CpG17 进行数据分析。在软件(PyroMark Q48 Autoprep 2.4.1 software, Qiagen)中计算 3 个 CpG 位点的甲基化百分比。

## 1.4 统计学分析

实验数据采用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,应用 SPSS 19.0 进行统计分析,采 *t* 检验进行组间比较。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MTT 检测 5-Aza-CdR 对肾肌成纤维细胞存活率的影响

125~250 ng/mL 5-Aza-CdR 处理后,肾原代肌成纤维细胞 OD 值稳定,对细胞无毒性作用。然而,当 5-Aza-CdR 浓度大于 250 ng/mL 时,OD 值下降,表明细胞毒性限制了细胞活力(图 1)。因此,选择 5-Aza-CdR 250 ng/mL 作为给药浓度。

### 2.2 5-Aza-CdR 处理对肌成纤维细胞培养上清中 EPO 水平的影响

与对照组相比,5-Aza-CdR 组培养上清中 EPO 水平显著升高,具有统计学意义( $P < 0.001$ ),见图 2。

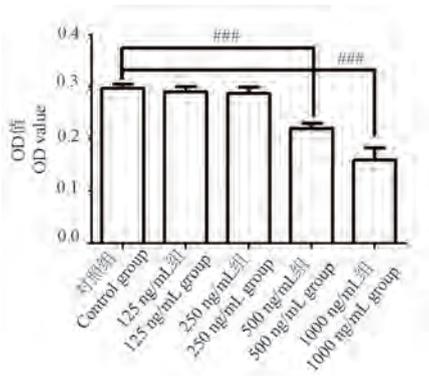
### 2.3 5-Aza-CdR 处理 72 h 对肌成纤维细胞 Dnmt3a 表达的影响

IF 结果显示,与对照组相比,5-Aza-CdR 组

Dnmt3a 表达显著减少,见图 3A。Western blot 检测结果显示,与对照组相比,5-Aza-CdR 组 Dnmt3a 表达显著下降,具有统计学意义( $P<0.001$ ),见图 3B。

## 2.4 5-Aza-CdR 处理 72 h 对肌成纤维细胞 $\alpha$ -SMA/PDGFR $\beta$ 和 $\alpha$ -SMA/CD73 共定位表达的影响

如图 4A,IF 结果显示,与对照组相比,5-Aza-CdR 处理后,表达  $\alpha$ -SMA 的肌成纤维细胞数量明显减少,一部分肌成纤维细胞(PDGFR $\beta^+$ ;CD73 $^+$ ;  $\alpha$ -SMA $^+$ )转分化为周细胞(PDGFR $\beta^+$ ;CD73 $^+$ ;  $\alpha$ -SMA $^-$ ;如白色箭头所示),Western blot 检测结果

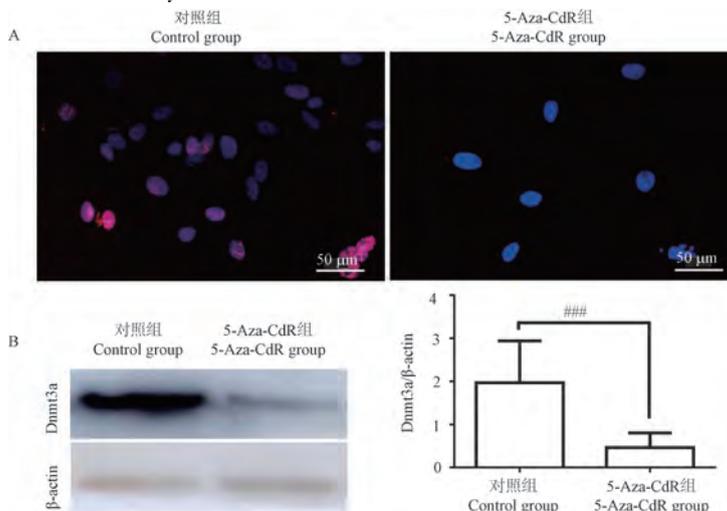


注:与对照组相比,### $P<0.001$ 。

图 1 不同浓度 5-Aza-CdR 对肾肌成纤维细胞存活率的影响

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

Figure 1 Effects of different concentrations 5-Aza-CdR on myofibroblast cells viability



注:A:免疫荧光检测 Dnmt3a 的表达;B:Western blot 检测 Dnmt3a 的表达。与对照组相比,### $P<0.001$ 。

图 3 5-Aza-CdR 处理对肌成纤维细胞甲基转移酶 Dnmt3a 表达的影响

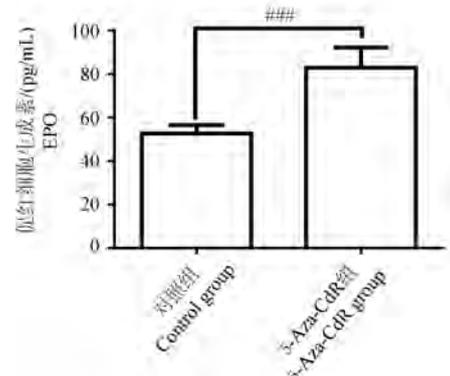
Note. A, Immunofluorescence analysis of Dnmt3a protein expression. B, Western blot analysis of Dnmt3a protein expression. Compared with control group, ### $P<0.001$ .

Figure 3 Effects of 5-Aza-CdR on the expression of methyltransferase Dnmt3a in myofibroblasts

显示,与对照组相比,5-Aza-CdR 组  $\alpha$ -SMA 表达显著下降,差异有统计学意义( $P<0.001$ ),PDGFR $\beta$  表达差异不明显, $\alpha$ -SMA 与 PDGFR $\beta$  的表达比值( $\alpha$ -SMA/PDGFR $\beta$ )降低( $P<0.01$ ,见图 4B、4C),证实肌成纤维细胞数量减少及相应的周细胞数量的增加,亦提示大部分原代大鼠肌成纤维细胞转分化为周细胞。

## 2.5 5-Aza-CdR 处理 72 h 对肌成纤维细胞 Epo 启动子甲基化的影响

如图 5 所示,灰色区域为 CpG 位点,其甲基化百分比为胞嘧啶的数目与胞嘧啶和胸腺嘧啶

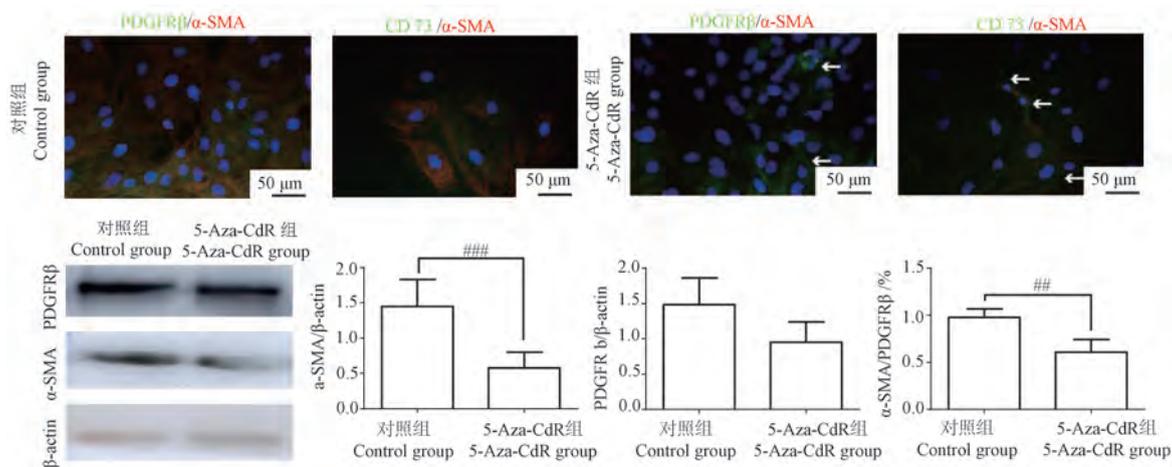


注:与对照组相比,### $P<0.001$ 。

图 2 5-Aza-CdR 对肌成纤维细胞上清中 EPO 水平的影响

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

Figure 2 Effects of 5-Aza-CdR on EPO level in myofibroblast culture supernatant

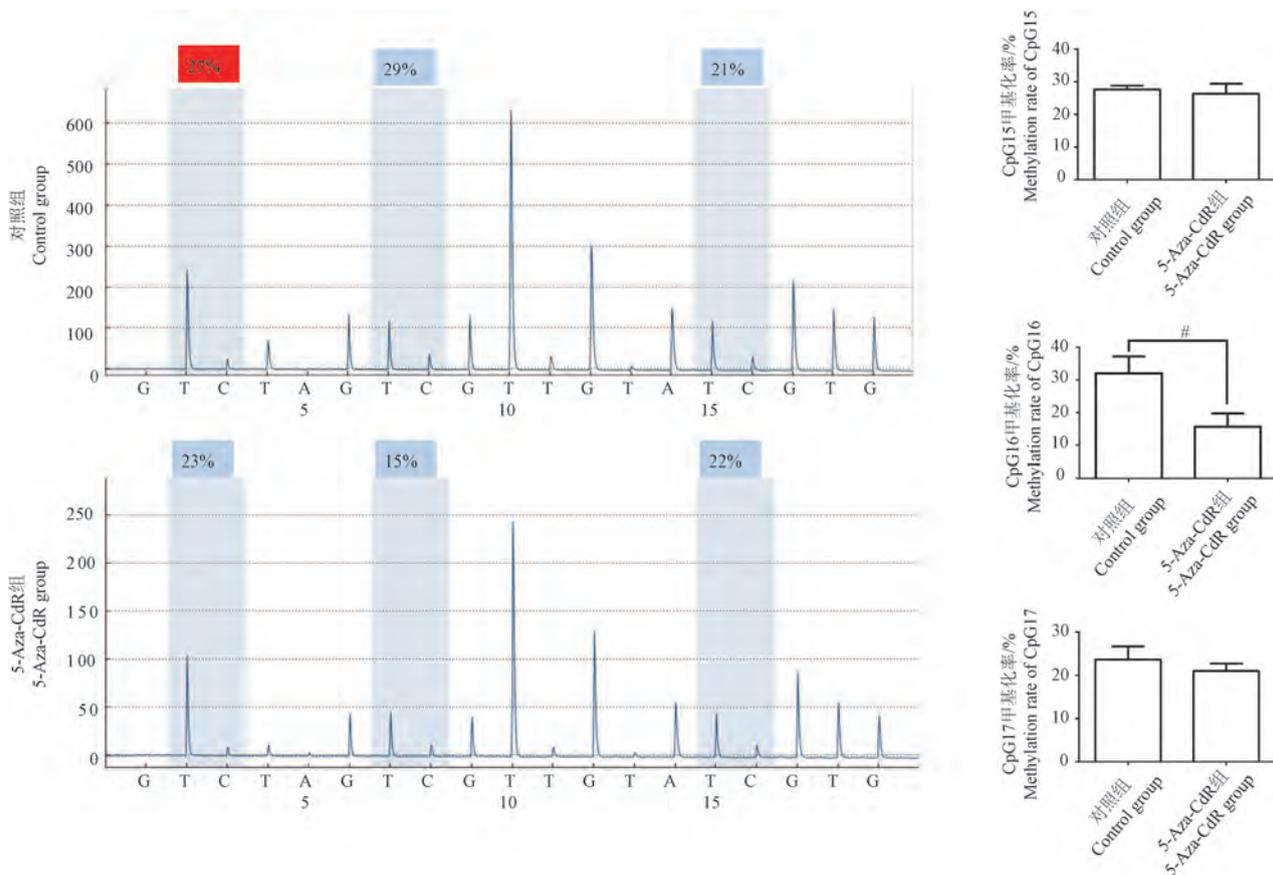


注:A:免疫荧光检测 α-SMA/PDGFRβ 和 α-SMA/CD73 共定位表达;B:Western blot 检测 α-SMA 和 PDGFRβ 的表达;C:α-SMA 和 PDGFRβ 的表达量分析,白色箭头:周细胞(α-SMA<sup>-</sup>/PDGFRβ<sup>+</sup>)。与对照组相比,##*P*<0.01,###*P*<0.001。

图 4 5-Aza-CdR 处理对肌成纤维细胞 PMT 的影响

Note. A, Immunofluorescence analysis the co-localized expressions of α-SMA/PDGFRβ and α-SMA/CD73. B, Western blot analysis the protein expression of α-SMA and PDGFRβ. C, Expression analysis of α-SMA and PDGFRβ. White arrows, Pericytes (α-SMA<sup>-</sup>/PDGFRβ<sup>+</sup>). Compared with control group, ## *P*<0.01, ### *P*<0.001.

Figure 4 Effects of 5-Aza-CdR on PMT of myfibroblasts



注:与对照组相比, #*P*<0.05。

图 5 5-Aza-CdR 处理对肌成纤维细胞 *Epo* 启动子甲基化的影响

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

Figure 5 Effect of 5-Aza-CdR on methylation of *Epo* promoter in myfibroblasts

之和的数目比值。该比值由仪器自动计算并显示于 CpG 位点顶部的阴影区域。使用焦磷酸测序法对肌成纤维细胞 *Epo* 启动子甲基化水平进行检测,结果显示,5-Aza-CdR 处理后,与对照组相比,肌成纤维细胞 *Epo* 启动子 CpG16 的甲基化水平降低 ( $P < 0.05$ ), CpG15 和 CpG17 甲基化水平差异不明显。

### 3 讨论

肾周细胞能够通过 HIF-2 $\alpha$  依赖性基因转录过程产生 EPO,以应对贫血或缺氧。然而,在肾纤维化过程中,周细胞向肌成纤维细胞的转变阻碍了 *Epo* 的转录。在 CKD 肾中,肾周细胞分化为高水平表达  $\alpha$ -SMA 的肌成纤维细胞,其 EPO 产生减少<sup>[7,13]</sup>。肾性贫血的原因不是产生 EPO 的细胞的损失,而是这些细胞发生 PMT 转分化为产生 EPO 能力较低的肌成纤维细胞<sup>[14]</sup>。据报道该过程与 DNA 高甲基化密切相关,去除触发损伤的刺激后,这些肌成纤维细胞保持可塑性,恢复 EPO 的产生<sup>[8,13]</sup>。5-氮杂胞苷 (5-azacytidine, 5-Aza) 是近 40 年首次合成的,其用于处理培养的癌细胞时,被发现具有广泛的抗代谢活性,并且是一种有效的急性髓性白血病化疗药物<sup>[15-16]</sup>。研究发现,5-Aza 被摄入 DNA,其一方面直接与 DNA 单链结合,另一方面可催化蛋白酶体依赖的 Dnmt 的降解,发挥去甲基化的生物活性<sup>[17]</sup>。基于逆转表观遗传的作用,5-Aza 和 5-Aza-CdR 被广泛用于证明特定基因区域甲基化的缺失与相关基因的激活之间的相关性<sup>[18]</sup>。此外,也有研究报道,在癌症治疗中,低剂量的去甲基化药物可以有效地消耗 Dnmt,而高剂量会导致细胞周期阻滞和细胞毒性<sup>[19-20]</sup>。为了研究恢复 EPO 产生的可能性,我们将肌成纤维细胞暴露于低浓度的去甲基化剂 5-Aza-CdR 中,发现 5-Aza-CdR 处理降低了肾肌成纤维细胞 Dnmt3a 的表达,焦磷酸测序同时证实 *Epo* 启动子的高甲基化被降低,证实 5-Aza-CdR 处理能逆转 *Epo* 基因的高甲基化,与文献报道一致<sup>[6]</sup>。已有研究证明肾 REPCs 的周细胞-肌成纤维细胞转化与 *Epo* 的高甲基化密切相关<sup>[6-8]</sup>。本研究进一步采用 IF 分别检测 PDGFR $\beta$ / $\alpha$ -SMA 和 CD73/ $\alpha$ -SMA 的共定位表达及 Western blot 检测  $\alpha$ -SMA 与 PDGFR $\beta$  的表达比

值( $\alpha$ -SMA/PDGFR $\beta$ )的变化分析 REPCs 中周细胞和肌成纤维细胞两种细胞状态的相互转化情况,本研究观察到 5-Aza-CdR 处理后肌成纤维细胞数量减少及相应的周细胞数量增加,提示大部分原代大鼠肌成纤维细胞转分化为周细胞。检测细胞上清液中 EPO 的水平发现 5-Aza-CdR 处理后随肌成纤维细胞转分化为周细胞的数量增加,EPO 水平也相应升高。由此表明 5-Aza-CdR 可以通过抑制 *Epo* 基因的高甲基化逆转周细胞向肌成纤维细胞的转变,促进大部分肌成纤维细胞向周细胞分化,恢复 EPO 的产生。CHOU 等<sup>[5]</sup>对缺血再灌注导致的急性肾损伤 (ischemia/reperfusion injury-induced acute kidney injury, IRI-AKI) 期间周细胞表观遗传改变的研究中提出肌成纤维细胞起源于静止周细胞,其数量在 IRI-AKI 后增加,被称为活化周细胞,后者在肾恢复过程中发生凋亡,少数存活的周细胞被分类为失活周细胞,这几种周细胞有包括 DNA 高甲基化在内的不同的表观遗传修饰,这些表观遗传修饰导致了 CKD 的进展,5-Aza 处理能逆转活化周细胞的特征,使它们更类似于静止周细胞<sup>[5]</sup>,与本研究结果相一致。

总之,肾周细胞产生 EPO,但在 CKD 进展过程中,由于 *Epo* 基因的高甲基化,周细胞转分化为肌成纤维细胞时,EPO 产生被抑制。本研究在体外实验证实低浓度去甲基化剂 5-Aza-CdR 能较好地抑制 *Epo* 启动子高甲基化发挥调控 PMT 的作用从而恢复产生 EPO,但需要更进一步在体内实验结合其给药效应确定具体给药浓度。此外,这些发现也提示我们可以探索其他具有抑制 *Epo* 高甲基化或逆转 PMT 功能的药物用于防治 CKD 患者肾性贫血。

### 参考文献:

- [1] PAN S Y, TSAI P Z, CHOU Y H, et al. Kidney pericyte hypoxia-inducible factor regulates erythropoiesis but not kidney fibrosis [J]. *Kidney Int*, 2021, 99 (6): 1354-1368.
- [2] STASI A, FRANZIN R, DIVELLA C, et al. Double labeling of PDGFR- $\beta$  and  $\alpha$ -SMA in swine models of acute kidney injury to detect pericyte-to-myofibroblast transdifferentiation as early marker of fibrosis [J]. *Bio Protoc*, 2020, 10(19): e3779.

- [ 3 ] BAPST A M, KNÖPFEL T, NOLAN K A, et al. Neurogenic and pericytic plasticity of conditionally immortalized cells derived from renal erythropoietin-producing cells [J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(5): 2420-2433.
- [ 4 ] LIM J H, YOON J M, OH S H, et al. Paricalcitol improves hypoxia-induced and TGF- $\beta$ 1-induced injury in kidney pericytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 9751.
- [ 5 ] CHOU Y H, PAN S Y, SHAO Y H, et al. Methylation in pericytes after acute injury promotes chronic kidney disease [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(9): 4845-4857.
- [ 6 ] SHIH H M, WU C J, LIN S L. Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells [J]. *J Formos Med Assoc*, 2018, 117(11): 955-963.
- [ 7 ] CHOU Y H, PAN S Y, SHIH H M, et al. Update of pericytes function and their roles in kidney diseases [J]. *J Formos Med Assoc*, 2024, 123(3): 307-317.
- [ 8 ] DEWI F R, FATCIIYAH F. Methylation impact analysis of erythropoietin (EPO) Gene to hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) activity [J]. *Bioinformatics*, 2013, 9(15): 782-787.
- [ 9 ] YANG X, LAY F, HAN H, et al. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2010, 31(11): 536-546.
- [ 10 ] 王报捷, 苏丽晴, 张志勇, 等. 5-Aza-CdR 通过 Notch1 通路对小鼠海马神经发生的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(1): 34-39.
- WANG B J, SU L Q, ZHANG Z Y, et al. Effects of 5-Aza-CdR on hippocampal neurogenesis in mice via the Notch1 pathway [J]. *Chin J Comp Med*, 2024, 34(1): 34-39.
- [ 11 ] 杜静, 宫凯凯, 杨丽娟, 等. 全反式维甲酸诱导经典霍奇金淋巴瘤 B 细胞表型 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(2): 46-52.
- DU J, GONG K K, YANG L J, et al. Restoration of the lost B-cell phenotype in classical Hodgkin lymphoma cells by all trans-retinoic acid treatment [J]. *Chin J Comp Med*, 2018, 28(2): 46-52.
- [ 12 ] ADOMAKO A, CALVO V, BIRAN N, et al. Identification of markers that functionally define a quiescent multiple myeloma cell sub-population surviving bortezomib treatment [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 444.
- [ 13 ] SOUMA T, YAMAZAKI S, MORIGUCHI T, et al. Plasticity of renal erythropoietin-producing cells governs fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(10): 1599-1616.
- [ 14 ] ASADA N, TAKASE M, NAKAMURA J, et al. Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal Anemia in mice [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(10): 3981-3990.
- [ 15 ] MONTESINOS P, RECHER C, VIVES S, et al. Ivosidenib and azacitidine in IDH1-mutated acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(16): 1519-1531.
- [ 16 ] 郭怀鹏, 康蕾, 刘聪, 等. 去甲基化药物治疗老年急性髓系白血病的 Meta 分析 [J]. *临床血液学杂志*, 2021, 34(5): 347-352.
- GUO HP, KANG L, LIU C, et al. Hypomethylating agents in elderly patients with acute myeloid leukemia: a Meta-analysis of randomised trials [J]. *J Clin Hemato*, 2021, 34(5): 347-352.
- [ 17 ] SANTI D V, GARRETT C E, BARR P J. On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs [J]. *Cell*, 1983, 33(1): 9-10.
- [ 18 ] CHRISTMAN J K. 5-Azacitidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy [J]. *Oncogene*, 2002, 21(35): 5483-5495.
- [ 19 ] TSAI H C, LI H, VAN NESTE L, et al. Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells [J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(3): 430-446.
- [ 20 ] ISSA J P J, GARCIA-MANERO G, GILES F J, et al. Phase I study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies [J]. *Blood*, 2004, 103(5): 1635-1640.

[ 收稿日期 ] 2024-05-08

金悠,倪岚,魏琦,等. 模式小鼠批量鉴定方法的探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(1): 86-91.

Jin Y, Ni L, Wei Q, et al. Batch identification methods for model mice [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 86-91.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.009

## 模式小鼠批量鉴定方法的探讨

金悠<sup>1</sup>,倪岚<sup>1</sup>,魏琦<sup>2</sup>,赵欢<sup>2</sup>,何金钢<sup>2\*</sup>

(1.华中科技大学基础医学国家级实验教学示范中心,武汉 430030;

2.华中科技大学同济医学院基础医学院药理学系,武汉 430030)

**【摘要】** 目的 为模式小鼠基因型批量鉴定工作建立高效的DNA提取方法。方法 以鼠尾组织为实验材料,采用碱煮简化法、碱煮常规法、蛋白酶K裂解法和DNA提取试剂盒4种方法提取模式小鼠DNA,测定DNA模板纯度、浓度,评价凝胶电泳图的优劣,并比较4种方法所耗时长及实验成本。结果 蛋白酶K裂解法提取的DNA浓度最高,碱煮简化法和常规法次之;试剂盒处理所得的DNA纯度较高,碱煮简化法次之。4种方法处理所得的DNA模板通过聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增、凝胶电泳后均可得到清晰的DNA目的条带。此外,碱煮简化法提取的DNA模板在-20℃保存1个月后仍可用于基因鉴定,且耗时最少、成本最低。结论 模式小鼠批量鉴定基因型时,碱煮简化法是目前最简便、最快捷、最经济的DNA模板提取方法。

**【关键词】** 基因型鉴定;DNA提取;聚合酶链反应;模式小鼠

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0086-06

## Batch identification methods for model mice

JIN You<sup>1</sup>, NI Lan<sup>1</sup>, WEI Qi<sup>2</sup>, ZHAO Huan<sup>2</sup>, HE Jingang<sup>2\*</sup>

(1. National Demonstration Center for Experimental Basic Medical Education, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China. 2. Department of Pharmacology, School of Basic Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030)

**【Abstract】** **Objective** To establish an efficient DNA extraction method for the batch identification of genotypes in model mice. **Methods** We extracted total DNA from transgenic mouse tails using four methods: alkaline simplified group, alkaline routine group, protease K cleavage group and DNA extraction kit group. The purity and concentration of DNA obtained by the four methods were measured, the effects of gel electrophoresis were evaluated, and the time and experimental costs of the four methods were compared. **Results** The protease K cleavage method produced the highest concentration of DNA, followed by the simplified alkaline boiling and routine alkaline boiling method. The reagent kit produced the highest DNA purity, followed by the simplified alkaline boiling method. The DNA templates obtained by the four method could be amplified by polymerase chain reaction and gel electrophoresis to obtain clear DNA target bands. In addition, the DNA template extracted by the simplified alkaline boiling method could be used for gene identification after storage at -20℃ for 1 month, as well as requiring the least

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(82273911)。

**【作者简介】** 金悠(1972—),女,硕士,高级工程师,研究方向:神经精神药理。E-mail:jinyou81@163.com

**【通信作者】** 何金钢(1988—),男,博士,副教授,研究方向:神经精神药理。E-mail:hjg1988@163.com

time and lowest costs. **Conclusions** The simplified alkaline boiling method is currently the simplest, fastest, and most economical DNA template-extraction method for batch identification of genotypes in model mice.

**【Keywords】** genotype identification; DNA extraction; PCR; model mice

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

随着基因工程技术的不断发展和完善,越来越多的模式小鼠在生命科学领域中受到众多科研人员的青睐,在人类疾病致病分子机制及临床研究中发挥着重要的作用。模式小鼠在繁殖过程中,需要不断对其子代进行基因型鉴定,因而建立快速、稳定、准确、经济的基因型鉴定方法具有非常重要的实际应用价值。在 CNKI 中国知网学术文献总库上以“基因鉴定、小鼠”为关键词搜索 2023 年 2 月至 2024 年 1 月间已在刊物上发表的模式小鼠鉴定方法,共有 6 篇文献采用 DNA 提取试剂盒<sup>[1-6]</sup>、4 篇采用蛋白酶 K 裂解法<sup>[7-10]</sup>、1 篇采用碱煮常规法<sup>[11]</sup>。这表明曾经广泛使用的 DNA 提取法苯酚-氯仿法<sup>[12-13]</sup>(氯仿有神经毒性)已被淘汰。然而,目前使用最多的商业试剂盒成本昂贵,耗时费力,为了快速、经济地进行模式小鼠的基因型鉴定,本研究针对碱煮简化法、碱煮常规法、蛋白酶 K 裂解法和 DNA 提取试剂盒法 4 种不同方法进行比较,检测所提取 DNA 模板的纯度、浓度,评价凝胶电泳图的优劣,对比 4 种方法所耗时长及实验成本,以期为模式小鼠基因型鉴定建立一个稳定、快速、经济的提取技术。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

本研究选用了 32 只 4 周 SPF 级雄性 MC4R-loxp 小鼠,体重 13~16 g,为基因鉴定实验对象。MC4R-loxp 小鼠最初购买于美国 JACKSON 实验室,在华中科技大学同济医学院 SPF 级屏障系统动物实验室[SCXK(鄂)2021-0009]进行繁殖和扩增[SYXK(鄂)2021-0057]。该屏障系统的洁净度为 7 级标准,控制温度在(24±2)℃之间,相对湿度在(50±10)%之间,换气次数每小时 15 次,12 h/12 h 明/暗循环,动物自由进食水。本实验在华中科技大学实验动物伦理委员会监督下进行,确认符合动物伦理学要求(IACUC-20233877)和实验动物保护的相关规定。在实验中,动物繁殖饲养及实验过程均按照实验动物使

用的 3R 原则给予了人道主义关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

NaOH(天津市天为化学试剂有限公司, F20111020);EDTA(国药集团化学试剂有限公司,20230817);琼脂糖(西班牙 Hispanagar 公司, 212415);DNA marker(北京天根生化科技有限公司, Y1626、Y1721);2×Taq PCR Mastermix(北京天根生化科技有限公司, 01031、17723);核酸染料(北京天根生化科技有限公司, X1031);组织基因 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司, Y2113);蛋白酶 K(美国 cell signaling technology 公司, 10012),其他试剂均为分析纯国产试剂。引物(HG240 1110008)由武汉英骏科技有限公司合成。

高压灭菌锅(日本 Hirayama 公司, HVE-50);迷你金属恒温加热器(杭州米欧仪器有限公司, MINIB-100I);高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司, 5424R);微量分光光度计(德国 Implen 公司, P-360-DEMO);PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司, T100™);电泳仪(美国 E-C Apparatus 公司, EC250-90);琼脂糖水平电泳槽(北京六一仪器厂, DYCP-31CN);凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司, GelDoc XR+)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 样本制备

准备手术剪、酒精棉球、消毒干棉球及 1.5 mL EP 管。剪取 2~4 mm 左右鼠尾,置于 EP 管中。

#### 1.3.2 DNA 提取

##### (1) 碱煮简化法

向有鼠尾的 EP 管中加入 180 μL NaOH 溶液(50 mmol/L),95℃孵浴 90 min,12 000 r/min 常温离心 10 min,上清即为 DNA 模板。

##### (2) 碱煮常规法

按如下比例配置 DNA 裂解液:EDTA(0.5 mol/L):NaOH(50 mmol/L)=1:450 取装有鼠尾的印管,向每个鼠尾样本 EP 管中加入 180 μL

DNA 裂解液, 95 °C 孵浴 90 min, 加入 20  $\mu\text{L}$  Tris-HCl (1 mol/L, pH=8.0) 混匀最后 12 000 r/min 常温离心 10 min, 上清即为 DNA 模板。

### (3) 蛋白酶 K 裂解法

按照下列配方配置裂解液: 硫酸铵 0.110 g、氯化镁 0.032 g、Tris 0.406 g、Triton X-100 2.5 mL, 双蒸水定容至 500 mL, 高压灭菌后待用, 临用前将裂解液与  $\beta$ -巯基乙醇 ( $\beta$ -mercaptoethanol,  $\beta$ -ME) 按 100:1 配制成混合液, 向有鼠尾的 Ep 管中加入 180  $\mu\text{L}$  混合液, 95 °C 反应 10 min, 离心并冷却至室温, 每管加入 10  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K (10 mg/mL), 55 °C 孵育 12 h 最后样本 12 000 r/min 离心 5 min, 上清即为 DNA 模板。

### (4) DNA 提取试剂盒法

使用 TIANGEN 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒, 依据说明书 (版本号: DP210831) 进行操作。最后取 50  $\mu\text{L}$  洗脱缓冲液 (DNA 模板) 置于 4 °C 备用, 长期保存放于 -20 °C 冷冻。

#### 1.3.3 DNA 质量和浓度测定

利用微量分光光度计, 取 1  $\mu\text{L}$  按照各种方法提取的 DNA 模板, 在 260 nm 和 280 nm 测定其吸光度值, 仪器自动计算 260 nm/280 nm 的吸光度比值和 DNA 浓度。吸光度 (A260/A280) 的比值在 1.8~2.0 的范围内表示所获得的 DNA 较为纯净, 而低于 1.0 则说明有蛋白质污染<sup>[14-15]</sup>。

#### 1.3.4 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳检测

以上 4 种方法提取的总 DNA, 通过 PCR 反应进行基因扩增。MC4R-loxp 小鼠的上游引物为 GACA TGAAAGAAAACAGACACC, 下游引物为 GAGTC TCGGGCAATGAACC (5'-3')。PCR 扩增反应体系总体积为 10  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应前体系组成: Mix 5  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 0.3  $\mu\text{L}$ , 无酶水补足 9.5  $\mu\text{L}$ 。按样本数 N+1 配制 PCR 反应前体系, 并在漩涡振荡器上混匀, 微型离心机离心 1 min。取 9.5  $\mu\text{L}$  反应前体系混合物, 加入 DNA 模板 0.5  $\mu\text{L}$ , 进行 PCR 扩增。PCR 反应程序如下: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 15 s, 65 °C 退火 30 s (每个循环降温 0.5 °C), 72 °C 延伸 40 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 12 °C 保存。扩增反应结束后, PCR 产物放置于 4 °C 冷藏。

取 7  $\mu\text{L}$  扩增产物, 进行 1.2% 琼脂糖凝胶

(150 V, 35 min) 电泳, 在凝胶成像系统中观察电泳结果。MC4R-loxp 小鼠的基因型目的条带为 500 bp (突变型) 和 411 bp (野生型)。

### 1.4 统计学方法

检测结果用平均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示。

## 2 结果

### 2.1 DNA 模板的质量与浓度

MC4R-loxp 小鼠尾分别按照 4 种方法处理所得上清液即为 DNA 模板。取 1  $\mu\text{L}$  模板, 使用微量分光光度计检测模板的 DNA 浓度和纯度, 结果见表 1。表中可见 DNA 提取试剂盒法处理的 DNA 模板最纯净, 其次是碱煮简化法。而碱煮常规法和蛋白酶 K 裂解法处理的 DNA 模板吸光度 A260/A280 比值均在 1.30 左右, 表明这两种方法提取的 DNA 模板含杂质较多, 残留了部分蛋白质。此外, 在总 DNA 得率方面, 蛋白酶 K 裂解法最优, 最高可达到 2805  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 平均得率为 (1703.88 $\pm$ 616.00)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 几乎是试剂盒法处理模板 (43.91 $\pm$ 15.64)  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 39 倍; 其次为碱煮简化法和碱煮常规法。

### 2.2 琼脂糖凝胶电泳结果

MC4R-loxp 小鼠的鼠尾经 4 种方法处理后所得 DNA 模板在 PCR 扩增和凝胶电泳后结果见图 1。图中可见 4 种方法处理的 DNA 模板 PCR 扩增后均可得到清晰的 DNA 目的条带, 能够达到筛选转基因阳性鼠的实验目的。

### 2.3 提取方法耗时及费用比较

配制完所有试剂后, 按照 4 种方法提取 8 个样本 DNA 模板的时间依次为 1.65、1.98、13.5 和 12.5 h。在试剂消耗上, 碱煮简化法只需用 NaOH, 碱煮常规法除 NaOH 外, 还需消耗 EDTA 和 Tris-HCl; 蛋白酶 K 裂解法中需使用 Tris、Triton X-100、 $\beta$ -ME 和蛋白酶 K 等。从实验成本上看费用从低到高依次是: 碱煮简化法、常规法、蛋白酶 K 裂解法和 DNA 提取试剂盒法。

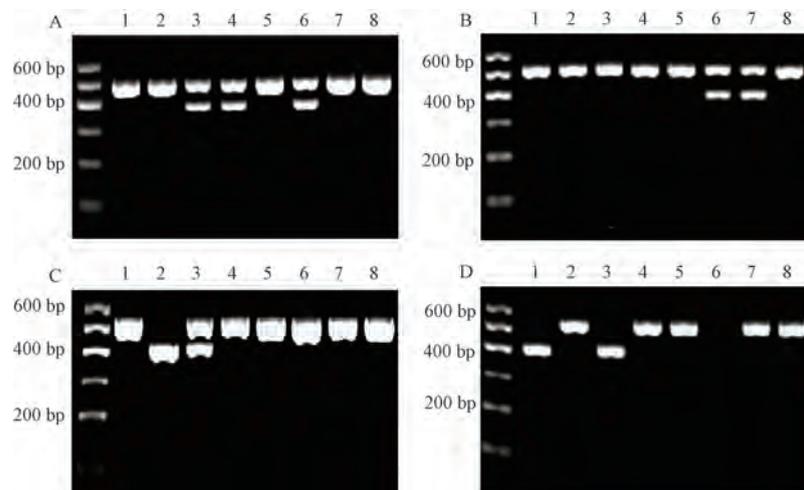
### 2.4 碱煮简化法 DNA 模板保存时间

碱煮简化法处理后所得的 DNA 模板采用常规 -20 °C 保存 10 d、20 d 和 30 d 后重复 PCR 扩增、凝胶电泳, 依然能够呈现清晰的目的条带 (见图 2), 说明该法所提取的 DNA 模板保存 30 d 后依然可用于基因型分析。

表 1 各组提取的 DNA 模板结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of total DNA isolated for each groups ( $\bar{x} \pm s$ )

分组 Groups	项目 Item	小鼠编号 Number of mice								平均值 Mean value
		1	2	3	4	5	6	7	8	
碱煮简化法 Alkaline simplified group	吸光度比值 OD ratio	1.67	1.59	1.73	1.70	1.63	1.65	1.66	1.76	1.67±0.05
	DNA 浓度/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) DNA concentration	468	527	463	468	281	414	421	389	428.88±73.29
碱煮常规法 Alkaline routine group	吸光度比值 OD ratio	1.27	1.37	1.38	1.28	1.31	1.28	1.33	1.30	1.31±0.04
	DNA 浓度/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) DNA concentration	451	306	500	444	427	308	273	516	403.13±94.17
蛋白酶 K 裂解法 Protease K cleavage group	吸光度比值 OD ratio	1.32	1.21	1.18	1.26	1.36	1.29	1.31	1.49	1.30±0.10
	DNA 浓度/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) DNA concentration	1256	2355	2044	1382	2805	1227	1195	1367	1703.88±616.00
DNA 提取试剂盒法 DNA extraction kit group	吸光度比值 OD ratio	1.79	1.85	1.95	1.78	1.9	1.96	2.07	2.11	1.93±0.12
	DNA 浓度/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) DNA concentration	51.00	44.40	60.40	64.90	37.90	18.40	27.90	46.40	43.91±15.64



注: A: 碱煮简化组; B: 碱煮常规组; C: 蛋白酶 K 裂解组; D: DNA 提取试剂盒组; 1~8: 小鼠编号。

图 1 4 种不同提取方法所得 DNA 模板的琼脂糖凝胶电泳检测结果

Note. A, Alkali simplified group. B, Alkaline routine group. C, Protease K cleavage group. D, DNA extraction kit group. 1~8, Number of mice.

Figure 1 Agarose electrophoresis results of the DNA model extracted by 4 different methods



注: A: 10 d; B: 20 d; C: 30 d; 1~8: 小鼠编号。

图 2 碱煮简化法所得 DNA 模板不同保存时间的琼脂糖凝胶电泳检测结果

Note. A, 10 d. B, 20 d. C, 30 d. 1~8, Number of mice.

Figure 2 Agarose electrophoresis results of the DNA model extracted by alkali simplified method and stored for different preservation times

### 3 讨论

人类探索生命特征往往需要大量的基因小鼠,如刘畅等<sup>[16]</sup>曾经使用了 69 只 PV-cre 小鼠才完成了小白蛋白阳性抑制性神经元作用机制研究,LIU 等<sup>[17]</sup>用了 80 余只 SARM1<sup>GFAP</sup>-CKO 双基因小鼠才完成 SARM1 通过 NF- $\kappa$ B 信号促进神经炎症并抑制脊髓损伤后的神经再生研究。因此在基因小鼠的繁育过程中常常必须进行大量模式小鼠基因型鉴定工作。故建立稳定、可靠、快捷、经济的鉴定方法可有效提高模式小鼠基因型鉴定工作效率、降低实验成本。

从表 1 中可以看出,DNA 提取试剂盒法处理所得的 DNA 模板纯度最好,且凝胶电泳后无杂带干扰,鉴定结果可靠。这主要是因为 DNA 提取试剂盒法中吸附柱可以吸附部分杂质,且漂洗液中乙醇也可除去部分杂质。但该法操作复杂、耗时长,且漂洗后模板中 DNA 浓度非常低。故有时条带较弱,甚至无条带出现。蛋白酶 K 裂解法处理所得的模板中 DNA 浓度最高,凝胶电泳后所有的样本基本都有目的条带出现,可有效鉴定出模式小鼠的基因型,但该法不仅操作复杂、耗时长,而且使用的无色挥发性液体  $\beta$ -巯基乙醇具有较强烈的刺激性气味,需要在通风橱中进行操作,噪声较大。碱煮常规法中的 EDTA 是一种重要的螯合剂,可在一定程度上除去部分杂质,其 DNA 模板凝胶电泳结果与碱煮简化法基本相同。

综合比较 4 种基因鉴定方法的效果、效率及成本后发现碱煮简化法有以下优点:(1)操作步骤精简,污染少;碱煮简化法只需消化、离心,2 步即可完成 DNA 提取,操作非常简便快捷,无毒无味,减少了样本间的交叉污染。(2)实验周期短,效率高;碱煮简化法处理时间不足 2 h,当天即可快速筛选出基因型结果,便于模式小鼠后续研究工作的开展。(3)成本低廉,效果好;碱煮简化法只使用了最便宜的 NaOH,样本处理成本几近于 0,且在凝胶中可电泳出清晰的目的条带,能够满足模式小鼠基因型鉴定工作。

当然碱煮简化法也有缺陷。在模式小鼠的鉴定工作中发现当目的条带在 800 bp 以上时,碱煮简化法提取的模板无 800 bp 以上的条带,如 Nix-ko 小鼠,其目的条带为 870 bp(突变型)和

368 bp(野生型),碱煮简化法提取的 DNA 模板均只有 368 bp 的条带。故碱煮简化法多用于目的条带在 500 bp 以下的小鼠基因型鉴定工作。在美国 JAX 公司的模式小鼠供货单上适用于心血管研究、可用 PCR 程序鉴定出基因型的前 50 种中共有 42 种目的条带在 400 bp 以下,故绝大多数模式小鼠的基因鉴定均可使用碱煮简化法提取 DNA。

综上所述,碱煮简化法所得 DNA 模板在 -20 °C 冷冻保存 1 个月后仍可用于基因鉴定,且费用低廉,耗时较少,电泳条带较清晰,是目前最简便、最快捷、最经济的 DNA 提取方法。

#### 参考文献:

- [1] 李晓娟,孙岩峰,修叶,等. PD-1 人源化小鼠构建繁殖与基因型鉴定 [J]. 实验动物科学, 2023, 40(4): 34-38.  
LI X J, SUN Y F, XIU Y, et al. Breeding and genotype identification of PD-1 humanized mice [J]. Lab Anim Sci, 2023, 40(4): 34-38.
- [2] 王存连,李龙飞,张瑞华,等. TRPM2 基因敲除小鼠的建立与鉴定 [J]. 生物学杂志, 2023, 40(4): 114-118.  
WANG C L, LI L F, ZHANG R H, et al. Establishment and identification of TRPM2 gene knockout mice [J]. J Biol, 2023, 40(4): 114-118.
- [3] 李梦茹,张文,段辰星,等. 鼠源 Eif4A1 基因克隆及其原核/真核表达构建与鉴定 [J]. 南方农业学报, 2023, 54(10): 3073-3082.  
LI M R, ZHANG W, DUAN C X, et al. Cloning of mouse eIF4A1 gene and its prokaryotic/eukaryotic expression identification [J]. J South Agri, 2023, 54(10): 3073-3082.
- [4] 王辞岚,李劲频,傅金凤,等. MiR-125a-5p 基因敲除 C57BL/6J 小鼠的构建 [J]. 广西医科大学学报, 2023, 40(5): 838-842.  
WANG C L, LI J P, FU J F, et al. Construction of miR-125a-5p knockout C57BL/6J mice [J]. J Guangxi Med Univ, 2023, 40(5): 838-842.
- [5] 薛康宁,张名媛,杨丽超,等. VASN 基因敲除小鼠的基因型的鉴定方法研究 [A]. 第十六届中国实验动物科学年会论文集 [C]; 2023.  
XUE K N, ZHANG M Y, YANG L C, et al. Study on the identification method of genotype of VASN gene knockout mice [A]. Proceedings of the 16th China Annual Conference on Experimental Animal Science [C]; 2023.
- [6] 王闯蓉,张峰,鲁利群. Nr2 敲除小鼠模型的构建与基因型鉴定 [J]. 基础医学与临床, 2023, 43(3): 415

- 418.
- WANG M R, ZHANG F, LU L Q. Construction and genotype identification of Nrf2 knockout mouse model [J]. *Basic Clin Med*, 2023, 43(3): 415-418.
- [ 7 ] 李喜, 曾艳, 陈昌蓉, 等. 胸腺上皮细胞特异性敲除 GSK-3 $\beta$  基因小鼠模型的鉴定及免疫学特征观察 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(3): 279-286.
- LI X, ZENG Y, CHEN C R, et al. Characterization and immunological characteristics of GSK-3 $\beta$  gene knockout thymic epithelial cells in mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(3): 279-286.
- [ 8 ] 赵晓杰, 闫冰, 刘丹, 等. 载脂蛋白 E 背景 E1A 激活基因阻遏子模式小鼠建立及鉴定 [J]. *临床军医杂志*, 2023, 51(05): 510-513.
- ZHAO X J, YAN B, LIU D, et al. Establishment and identification of apolipoprotein E background cellular repressor of E1A-stimulated genes transgenic mice [J]. *Clin J Med Office*, 2023, 51(5): 510 - 513.
- [ 9 ] 扈腊英, 黄亚莉, 刘露, 等. 胰岛  $\beta$  细胞 Metrn1 基因敲除小鼠的鉴定及初步表型分析 [J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(11): 2034-2043.
- HU L Y, HUANG Y L, LIU L, et al. Identification and preliminary phenotypic analysis of mice with Metrn1 knockout in islet  $\beta$  cells [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2023, 39(11): 2034-2043.
- [ 10 ] 王语涵, 许雅萍, 李南, 等. 肝星状细胞特异性 Grk2 基因敲除小鼠模型的制备及鉴定 [J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(1): 189-194.
- WANG Y H, XU Y P, LI N, et al. Establishment and genotype identification of hepatic stellate cell-specific Grk2 gene knockout mouse model [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2024, 40(1): 189-194.
- [ 11 ] 余钢, 陈锡坚, 郭锦伟, 等. 通过骨髓移植建立骨髓源性细胞特异性基因修饰小鼠模型 [J]. *汕头大学医学院学报*, 2023, 36(4): 193-196, 204.
- YU G, CHEN X J, GUO J W, et al. Establishment of a bone marrow-derived cell-specific gene-modified mouse model by bone marrow transplantation [J]. *J Shantou Univ Med Coll*, 2023, 36(4): 193-196, 204.
- [ 12 ] 陈雪婷, 郎雪楠, 李兆阳, 等. 大/小鼠组织 DNA 两种提取方法的比较 [J]. *实验动物与比较医学*, 2015, 35(4): 311-315.
- CHEN X T, LANG X N, LI Z Y, et al. Comparison of two methods for extracting DNA from rat/mouse tissues [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2015, 35(4): 311-315.
- [ 13 ] 刘魁苏, 左琴, 周舒雅, 等. 模式小鼠总 DNA 三种提取方法比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(7): 45-50.
- LIU S S, ZUO Q, ZHOU S Y, et al. Comparison of three methods for total DNA extraction from mouse models [J]. *Chin J Comp Med*, 2014, 24(7): 45-50.
- [ 14 ] 卢一凡, 田毅, 邓继先. 转基因动物鉴定技术的研究进展 [J]. *生物工程进展*, 2000, 20(3): 60-61, 54.
- LU Y F, TIAN C, DENG J X. Progress of identifying transgenic animal in technology [J]. *Prog Biotechnol*, 2000, 20(3): 60-61, 54.
- [ 15 ] KALENDAR R, BORONNIKOVA S, SEPPÄNEN M. Isolation and purification of DNA from complicated biological samples [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2222: 57-67.
- [ 16 ] 刘畅, 王若兰, 胡俊, 等. 激活 PV 阳性抑制性神经元对脑缺血引起记忆障碍的改善作用 [J]. *陆军军医大学学报*, 2022, 44(10): 984-990.
- LIU C, WANG R L, HU J, et al. Improvement of activation of parvalbumin positive inhibitory neurons to memory impairment caused by frontal cortex ischemia [J]. *J Army Med Univ*, 2022, 44(10): 984-990.
- [ 17 ] LIU H, ZHANG J, XU X, et al. SARM1 promotes neuroinflammation and inhibits neural regeneration after spinal cord injury through NF- $\kappa$ B signaling [J]. *Theranostics*, 2021, 11(9): 4187-4206.

[ 收稿日期 ] 2024-06-13

徐丹,李姗姗,王毅力,等.花粉诱导的过敏性鼻炎动物模型研究进展[J].中国比较医学杂志,2025,35(1):92-110.  
Xu D, Li SS, Wang YL, et al. Progress in animal models of pollen-induced allergic rhinitis [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 92-110.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.010

# 花粉诱导的过敏性鼻炎动物模型研究进展

徐丹,李姗姗,王毅力,高斐宏\*

(天津中医药大学,天津 301617)

**【摘要】** 花粉变应原诱导的过敏性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 又称季节性过敏性鼻炎 (seasonal allergic rhinitis, SAR), 通常发生在风媒植物的花粉散播期。在过去的 30 年里, SAR 的发病率已增加了一倍多。SAR 的病因复杂, 涉及多种因素, 包括花粉变应原的种类、环境气候因素、遗传因素、人体免疫状态等。动物模型是理解 AR 发病机制和推动有效防治策略发展的重要工具, 本文通过总结近年来国内外关于花粉诱导 AR 动物试验的文献, 系统阐述了影响模型效果的因素, 包括动物品系、致敏材料 (花粉抗原的制作及存在问题、佐剂的使用及存在问题)、造模的步骤和效果评价。这些内容旨在为建立合适的花粉诱导 AR 动物模型及其相关的基础研究和应用研究提供参考和支持。

**【关键词】** 季节性过敏性鼻炎; 过敏性鼻炎; 花粉变应原; 动物模型

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0092-19

## Progress in animal models of pollen-induced allergic rhinitis

XU Dan, LI Shanshan, WANG Yili, GAO Feihong\*

(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

**【Abstract】** Pollen allergen-induced allergic rhinitis (AR), also known as seasonal allergic rhinitis (SAR), typically manifests during the period of pollen dissemination by anemophilous plants. The prevalence of SAR has more than doubled over the past three decades. The etiology of SAR is multifaceted, involving factors such as pollen allergens, environmental and climatic conditions, genetic predispositions, and the immunological status of the individual. Animal models provide a critical tool for elucidating the mechanisms underlying AR and advancing the development of effective preventive and therapeutic strategies. This review synthesizes the recent pertinent domestic and international literature on pollen-sensitized AR animal experiments. It systematically delineates the factors influencing the efficacy of these models, including the selection of animal strains, the production and associated challenges of sensitizing agents, specifically pollen antigens, the utilization and limitations of adjuvants, the procedural steps involved in model creation, and the method ologies for evaluating model effectiveness. The insights provided are intended to offer guidance and support for the development of appropriate animal models of pollen-induced AR, thereby facilitating both fundamental and applied research in this area.

**【Keywords】** seasonal allergic rhinitis; allergic rhinitis; pollen allergens; animal model

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

**【基金项目】** 国家自然科学基金 (82105045)。

**【作者简介】** 徐丹 (1997—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 蒙药治疗过敏性鼻炎的作用机制。E-mail: xudan4040@163.com

**【通信作者】** 高斐宏 (1987—), 女, 医学博士, 硕士生导师, 研究方向: 蒙药治疗过敏性鼻炎的作用机制。

E-mail: fayehom@tjucm.edu.cn

过敏性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 是由免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE) 介导的、涉及多种细胞因子和免疫细胞介入的慢性非感染性鼻黏膜炎性疾病<sup>[1-2]</sup>。其临床表现通常为阵发性打喷嚏、流清水样鼻涕、鼻部瘙痒和鼻塞等<sup>[3]</sup>。并且由于上下气道相互影响,临床上 40%~50% 的 AR 患者同时并发支气管哮喘<sup>[4]</sup>,严重影响患者生活质量<sup>[5]</sup>。AR 主要分为常年性和季节性两种类型,其中季节性过敏性鼻炎 (seasonal allergic rhinitis, SAR) 是最常见的形式。SAR 曾被称为花粉热,其特点是季节性发病明显,与特定花粉的散播期相吻合,患者血清中可发现特异性 IgE 抗体<sup>[6]</sup>。该病的病理机制非常复杂,这也引起了该领域学者的广泛关注。

根据世界卫生组织的数据,全球至少有 4 亿人患有 AR,预计到 2050 年,全球有一半的人口可能患有过敏性疾病<sup>[7]</sup>。在过去的 30 年里,SAR 的发病率增加了一倍多,影响到了全球 10%~25% 的人口<sup>[8]</sup>。研究表明,季节性花粉浓度的增加与过敏性疾病的发生密切相关<sup>[9-10]</sup>。随着现代化和工业化的快速发展,人们的生活环境不断变化,空气污染越来越严重,SAR 的流行率逐年上升<sup>[11-12]</sup>。

因此,我们迫切需要对花粉诱导的 AR 进行更为深入的研究,特别是在发病机制、有效的治疗方法和预防措施等方面。建立花粉诱导 AR 动物模型被认为是至关重要的一步。本文综述了近年来关于花粉诱导 AR 动物模型的研究进展,重点讨论了动物品系、致敏材料(花粉抗原的制作及存在问题、佐剂的使用及存在问题)、造模的步骤、效果评价等内容。这些研究不仅增强了我们对花粉过敏机制的理解,也为探索有效的治疗策略和促进新药研发提供了重要的理论依据与实践指导。

## 1 花粉过敏原的致敏特性

### 1.1 花粉过敏原的类型及分布特征

花粉过敏的发生很大程度上受到环境因素的影响,其中最重要的是花粉浓度和气候条件。气候条件对花粉的传播有重要影响,例如风速。引起 AR 的花粉主要是风媒花粉(如空气传播的树木和草花粉),由于其重量轻,可随风飘散到数

千公里外的大气中<sup>[13]</sup>,进而增加了过敏原的暴露风险。不同的地理位置也会影响植物的分布,进而导致不同类型的花粉过敏原出现<sup>[14]</sup>。花粉浓度是导致过敏反应的关键外部因素之一。不同类型的植物在不同的季节释放花粉,例如春季和秋季是常见的花粉高峰期。根据对风媒花粉植物的调查结果显示,我国的主要气传致敏花粉植物包括松科(如松树)、蒿属(如艾蒿)、杨属(如白杨)、禾本科(如禾草)、柳属(如垂柳)、柏属(如侧柏)、藜科(如灰藜)、葎草属(如葎草)、苋科(如苋菜)和悬铃木属(如法国梧桐)等。在我国,春季(3月~5月)以松树科(如松树)、柏科(如侧柏)、杨树(如白杨)和柳树(如垂柳)的花粉为主,而夏季和秋季(6月~10月)则以蒿草(如艾蒿)、葎草和豚草的花粉为主要过敏原<sup>[15]</sup>。

### 1.2 花粉过敏原的结构组成

大多数花粉由花粉外壁、花粉内壁、营养细胞核和精细胞等成分组成。花粉颗粒具有独特的表面结构,为了完成授粉过程,花粉的表面通常是粗糙的,常常带有尖刺状结构,这种表面形态有时与一些寄生虫卵相似,甚至在某些情况下在显微镜下也会与之混淆<sup>[16]</sup>。花粉的表面结构(如尖刺)有助于其附着在鼻黏膜上,并可能破坏紧密连接蛋白,从而增加上皮细胞的通透性,导致过敏原进入免疫系统从而引起致敏作用<sup>[17-19]</sup>(见图 1)。

研究调查显示,花粉中的一些高表达的蛋白质(通常是糖蛋白)是花粉主要致敏成分。近年来研究发现蛋白质本身并不是敏化的驱动力。敏化不仅与单个蛋白质的内在特性有关,而且与花粉中具有不同特征的其他成分有关(见图 1)。AGLAS 等<sup>[20]</sup>的研究表明,桦树花粉主要的过敏原 Betv1 本身既不能刺激树突状细胞,也不能诱导 2 型辅助性 T 细胞(type 2 helper t cells, Th2)极化,而是桦树花粉提取物全部成分。除了蛋白质过敏原,暴露于花粉中的气道上皮细胞还会接触到脂质,这些脂质同样会干扰人体免疫。当花粉粒被呼吸道上皮细胞水合时,过敏原和类二十烷被释放,即花粉相关脂质介质(pollen-associated lipid mediators, PALMs),随后进一步激活先天免疫细胞,如中性粒细胞和嗜酸性粒细胞,从而促进气道中的过敏性炎症<sup>[21-22]</sup>。花粉表面负载空

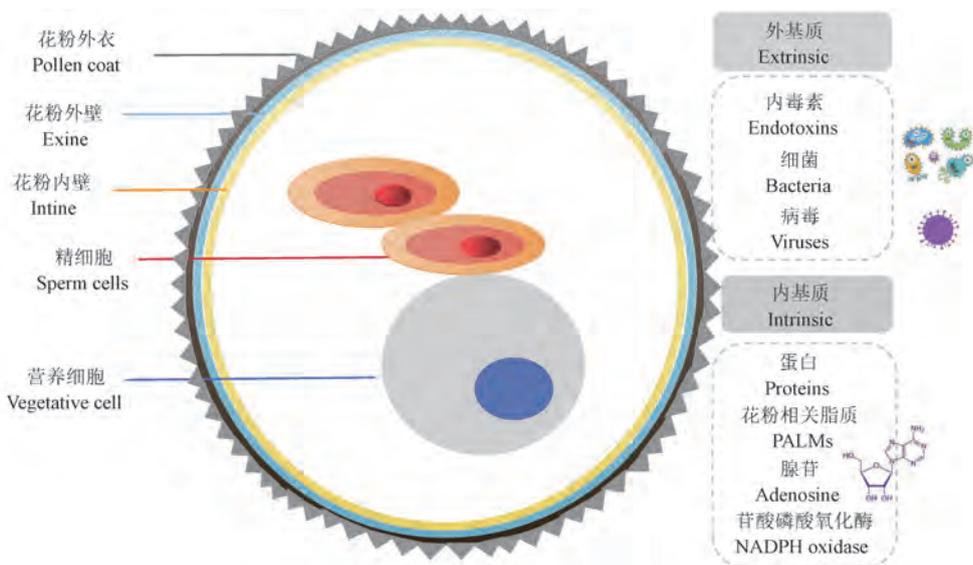


图 1 花粉粒结构示意图

Figure 1 Schematic diagram of pollen grain structure

气中的微生物成分也有助于致敏过程。OTEROS 等<sup>[23]</sup>发现,艾蒿花粉在空气中携带的内毒素含量最高,与其他内毒素水平较低的花粉相比,会导致更强的气道过敏反应。腺苷是一种重要的组织激素,最初因其在炎症中的作用而闻名,但它在免疫抑制和调节中也起着关键作用。在最近对桦树花粉代谢组的分析中,腺苷被确定为另一种有助于过敏敏感的花粉衍生物。桦树花粉提取物已被证明通过腺苷 A2 受体刺激树突状细胞中的环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, CAMP),从而抑制白介素-12 (interleukin-12, IL-12) 的分泌<sup>[24]</sup>。同样,在豚草提取物对动物致敏的研究中,嗜酸性粒细胞的招募和气道对挑战的抵抗依赖于提取物的腺苷消耗<sup>[25]</sup>。这些研究为支持腺苷可能在过敏反应中发挥关键作用这一说法提供了令人信服的证据体系。此外,大量的研究表明,花粉中含有 NADPH 氧化酶,可产生氧化应激 (reactive oxygen species, ROS),并诱导由抗原引起的过敏性炎症反应<sup>[26]</sup>。

越来越多的研究表明,空气污染与 SAR 的发病率密切相关<sup>[27-28]</sup>。空气污染物浓度的增加不仅会直接引发呼吸道的炎症反应,还会导致鼻黏膜对花粉过敏原的敏感性增加。这种敏感性增加导致花粉致敏现象愈发严重,从而使 SAR 患者

的症状更加明显。WAYNE 等<sup>[29]</sup>发现,大气中二氧化碳浓度使豚草花粉产量增加 61%,从繁忙的道路采集的花粉比从植被地区采集的花粉更容易过敏。综上,花粉致敏机制的复杂性与其结构形态、成分及负载物均有密切关系(见图 2)。

## 2 花粉致敏 AR 动物模型

近年来,国内外啮齿动物模型已被用于建立 AR 动物模型,使用非啮齿动物模型的研究较少。由于花粉致过敏性鼻炎发病机制的复杂性,目前还没有单一的动物模型能够完全复制过敏性鼻炎患者的所有典型临床表现,本文总结国内外近年来利用花粉致敏动物诱导 AR(22 例)的研究,从动物品系、性别、花粉品种、造模方案、致敏效果评估及检测指标等方面进行归纳和比较分析,见表 1。

### 2.1 小鼠

小鼠因其清晰的免疫遗传背景、快速的繁殖能力以及广泛的来源而受到广泛应用。不同品系的小鼠各具特色,适应不同的研究需求。近年来,利用小鼠建立过敏模型的应用呈逐年上升的趋势,其中常用的品系包括 BALB/c、BDF-1、C57BL/6 和 B10.S 等。其中,BALB/c 小鼠是一种近交高 IgE 应答系,主要倾向于产生 Th2 型免疫应答以及 IgE 抗体<sup>[52-53]</sup>。由于其在细胞因子水平研究中的优越性,BALB/c 小鼠常被用作筛选潜在蛋白致敏作用

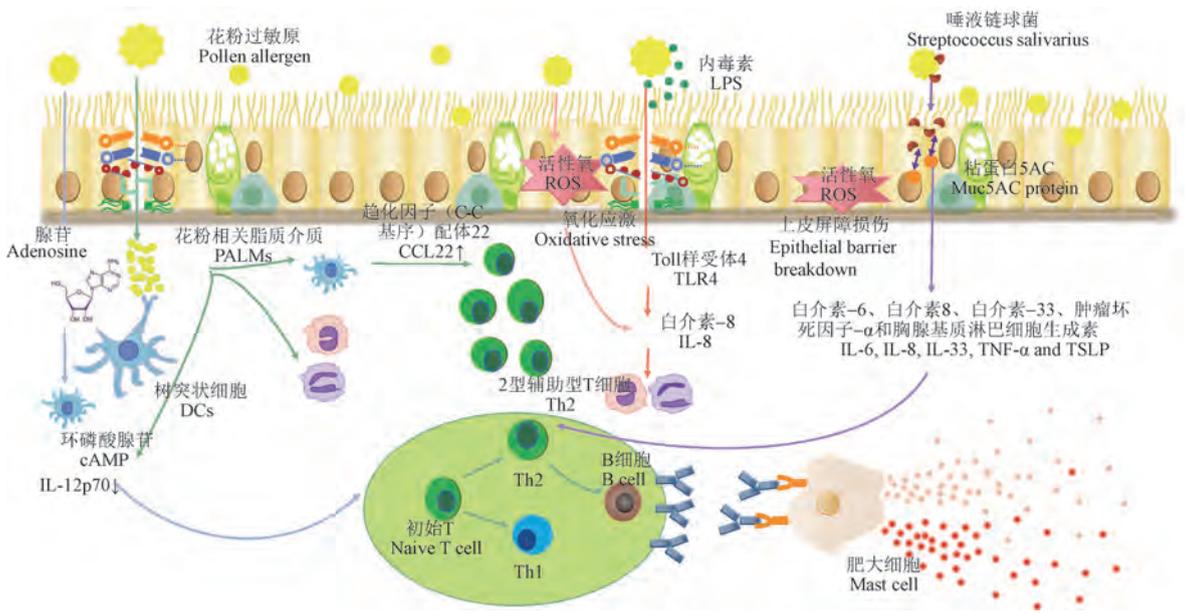


图 2 花粉致过敏性鼻炎的机制图

Figure 2 Mechanisms of pollen-induced allergic rhinitis

的有效模型。与 BALB/c 小鼠不同, C57BL/6 小鼠主要触发 Th1 免疫应答和(interferon- $\gamma$ , INF- $\gamma$ )的产生<sup>[54]</sup>。此外,有报道称,在 Cry j 1 致敏的 B10.S 小鼠中发现了一个主要的 T 细胞表位,该表位序列与患者中最普遍的表位一致<sup>[55-56]</sup>。因此, B10.S 小鼠是日本雪松花粉相关疾病的合适品系。

## 2.2 大鼠

大鼠作为实验动物,因其广泛的来源和相对稳定的遗传特征而备受青睐。这些动物具备有敏锐的嗅觉,能够对环境中的粉尘、气体等刺激表现出高敏感性,这一特性使得它们在研究过敏性鼻炎、哮喘等过敏性疾病症状时显得尤为重要。大鼠在接触各种过敏原时,常常会产生特异性 IgE 抗体,这些抗体在免疫反应中起着关键作用,使得对抗原的反应呈现出相对一致的模式。另外,相较于小鼠和豚鼠,大鼠体型较大,这为科研人员在进行多种实验操作以及样本采集提供了更为便利的条件。因此,大鼠在评估和研究过敏性疾病的典型特征时显得更为适宜,从而使其成为一种理想的实验模型。目前, Wistar 大鼠<sup>[57]</sup>、SD 大鼠和 BN 大鼠<sup>[58]</sup>是最常用的过敏模型品系。

## 2.3 豚鼠

豚鼠对多种过敏原表现出高度敏感性,因此

它们常被用作研究过敏性反应的良好动物模型。这些动物在遇到不同过敏原时,可能会迅速引发过敏性呼吸道疾病和过敏性休克等急性反应。与其他动物相比,它们更容易发生鼻过敏或气管过敏,研究人员经常使用豚鼠来诱导鼻塞模型。通常用来模拟花粉过敏的豚鼠品种是哈特利豚鼠。然而,与常用的实验动物如小鼠和大鼠相比豚鼠对外界刺激的敏感性更高,这种较强的敏感性使得豚鼠在实验过程中容易出现明显的过敏反应,甚至在极端情况下可能导致死亡。此外,豚鼠的个体差异也较为明显,导致在进行花粉过敏原建模时,个体之间的反应可能会有所不同。最后,由于对豚鼠基因和免疫系统的了解相对不足,这限制了豚鼠在进一步研究免疫机制和基因水平上的应用<sup>[59-61]</sup>。

## 2.4 非啮齿动物

目前,花粉诱导的非啮齿动物过敏模型主要包括艾蒿花粉诱导的兔过敏模型<sup>[51]</sup>,日本雪松花粉诱导的猴过敏反应模型<sup>[50]</sup>以及豚草诱导的狗类过敏反应模型<sup>[49]</sup>。这些模型虽然能够更接近地模拟人类的过敏反应,但在常规检测过程中,用于花粉致敏和潜在安全性评估时面临较大的困难。所以由于伦理考量、高昂的成本以及技术难度等因素,它们的应用受到限制。

表 1 花粉致敏 AR 动物模型一览表

Table 1 List of animal models of pollen-sensitized AR

动物品系 Animal strain	花粉过敏原 Pollen allergen	模型构建方法 Model construction method	佐剂 Adjuvant	评价指标 Evaluation indicators
昆明小鼠 <sup>[30]</sup> Kunming mice	柳树花粉 Willow pollen	将柳树花粉蛋白提取液混悬于含有 5% 氢氧化铝的生理盐水中, 配置成 4 种不同浓度的溶液: 1.5 mg/mL, 2.0 mg/mL, 2.5 mg/mL 和 3.0 mg/mL。给小鼠腹腔注射上述溶液 (每只 0.4 mL), 每 3 d 重复 1 次, 共 7 次。第 7 次注射后的第 6 天起, 采用浓度为 10.6 mg/mL 的溶液进行滴鼻激发 (每只 10 $\mu$ L), 连续 6 d, 每天 1 次。 Mix willow pollen protein extract in a suspension containing 5% aluminum hydroxide in saline, preparing four different concentrations of solutions: 1.5 mg/mL, 2.0 mg/mL, 2.5 mg/mL, and 3.0 mg/mL. Administer intraperitoneal injections of these solutions (0.4 mL/mouse) every 3 d for a total of 7 times. Starting 6 d after the last injection, administer intranasal challenges using a 10.6 mg/mL solution (10 $\mu$ L/mouse) daily for 6 consecutive days.	氢氧化铝佐剂 Aluminum hydroxide adjuvant	行为学评分; 血清 sIgE 水平; 鼻黏膜病理学检测 Behavioral scoring; serum sIgE levels; nasal mucosa histopathology
雌性 C57BL/6J 小鼠 <sup>[31]</sup> Female C57BL/6J mice	豚草花粉 Ragweed pollen	将 50 $\mu$ L 的豚草花粉变应原与等量的弗氏佐剂混合。在第 1、8 和 15 天, 向小鼠腹腔内注射 200 $\mu$ L 的混合物。从第 21 天至第 28 天, 每天使用 0.5% 浓度的豚草花粉变应原溶液 (每侧鼻腔 10 $\mu$ L) 进行滴鼻激发。 Mix 50 $\mu$ L of ragweed pollen allergen with an equal volume of Freund's adjuvant. Inject 200 $\mu$ L of the mixture intraperitoneally on days 1, 8 and 15. From day 21 to day 28, administer intranasal challenges using a 0.5% concentration of ragweed pollen allergen solution (10 $\mu$ L per nostril).	弗氏佐剂 Freund's adjuvant	行为学评分; 血清 IgE、IL-1 $\beta$ 、IL-18; 鼻腔灌洗液中 IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平; Western blot 检测 NLRP3、Caspase-1、IL-18 及 IL-1 $\beta$ Behavioral scoring; serum IgE, IL-1 $\beta$ , IL-18; levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-18 in nasal lavage fluid; Western blot detection of NLRP3, Caspase-1, IL-18, and IL-1 $\beta$
雌性 B10.S 小鼠 <sup>[32]</sup> Female B10.S mice	日本雪松花粉/Cry j 1 Japanese cedar pollen/Cry j 1	将 10 $\mu$ g Cry j 1 与 4 mg 氢氧化铝凝胶混合。给小鼠皮下注射, 每周 1 次, 连续 3 周。暂停 1 周后, 给小鼠鼻内灌注 Cry j 1 (200 $\mu$ g/mL PBS), 每鼻孔 10 $\mu$ L, 连续 5 d。 Mix 10 $\mu$ g of Cry j 1 with 4 mg of aluminum hydroxide gel. Administer subcutaneous injections once a week for 3 weeks. After a one-week pause, instill Cry j 1 (200 $\mu$ g/mL PBS) intranasally, 10 $\mu$ L per nostril, for 5 consecutive days.	氢氧化铝佐剂 Aluminum hydroxide adjuvant	行为学评分; 血清特异性 IgE、IgG1、IgG2a; 鼻黏膜单核细胞和嗜酸性粒细胞表达; 鼻黏膜 EPO 活性 Behavioral scoring; serum-specific IgE, IgG1, IgG2a; expression of monocytes and eosinophils in nasal mucosa; EPO activity in nasal mucosa
雄性 C57BL/6J 小鼠 <sup>[33]</sup> Male C57BL/6J mice	日本雪松花粉/Cry j 1 Japanese cedar pollen/Cry j 1	将 10 $\mu$ g Cry j 1 与 4 mg 氢氧化铝凝胶混合。对小鼠进行皮下注射, 每天 1 次, 连续 3 次。暂停 1 周后, 对小鼠进行鼻内灌注, 连续 7 d。 Mix 10 $\mu$ g of Cry j 1 with 4 mg of aluminum hydroxide gel. Administer subcutaneous injections every day for 3 times. After a one-week pause, instill intranasally for 7 consecutive days.	氢氧化铝佐剂 Aluminum hydroxide adjuvant	行为学评分; 血清神经元激素、IgE 和 NOx 水平; 气管组织 iNOS、IgA 和肥大细胞胰蛋白酶表达 Behavioral scoring; serum neuronal hormones, IgE, and NOx levels; tracheal tissue iNOS, IgA, and mast cell tryptase expression

续表 1

动物品系 Animal strain	花粉过敏原 Pollen allergen	模型构建方法 Model construction method	佐剂 Adjuvant	评价指标 Evaluation indicators
雄性 BDF-1 小鼠 <sup>[34]</sup> Male BDF-1 mice	日本雪松花粉/Cry j 1 Japanese cedar pollen/Cry j 1	将 10 $\mu\text{g}$ Cry j 1 与 4 mg 氢氧化铝凝胶混合。对小鼠进行皮下注射,每天 1 次,连续 3 次。暂停 1 周后,对小鼠进行鼻内灌注,连续 7 d。 Mix 10 $\mu\text{g}$ Cry j 1 with 4 mg aluminum hydroxide gel. Administer subcutaneous injections every day for 3 consecutive times. After a one-week pause, instill intranasally for 7 consecutive days.	氢氧化铝佐剂 Aluminum hydroxide adjuvant	行为学评分;血清 IgE 水平和神经元激素水平;气管中 IgA、MC1R 和 MCSR 表达 Behavioral scoring; serum IgE levels and neuronal hormone levels; tracheal IgA, MC1R, and MCSR expression
雌性 BALB/c 小鼠 <sup>[35]</sup> Female BALB/c mice	黄花蒿花粉 Artemisia annua pollen	在第 1、4、7 天,对小鼠皮下注射 0.1 mL 的 Art a1 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的黄花蒿花粉提取液)。暂停 1 周后,对小鼠进行鼻内灌注 (滴鼻) 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的黄花蒿花粉提取液 (每孔 10 $\mu\text{L}$ ), 连续 10 d。在第 4 周结束后,再进行 2 次鼻内灌注激发。 On days 1, 4, and 7, administer subcutaneous injections of 0.1 mL Art a1 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ artemisia annua pollen extract). After a one-week pause, instill intranasally (drop nose) with 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ artemisia annua pollen pollen extract (10 $\mu\text{L}/\text{nostril}$ ) for 10 consecutive days. At the end of the fourth week, perform two more intranasal instillations.	/	行为学评分;鼻黏膜病理学检测;血清 IgE 和 IgG2a 水平;脾抗原特异性淋巴细胞数量检测 Behavioral scoring; nasal mucosa histopathology; serum IgE and IgG2a levels; detection of antigen-specific lymphocyte numbers in the spleen
雌性 BALB/c 小鼠 <sup>[36]</sup> Female BALB/c mice	豚草花粉 Ragweed pollen	第 0 天,对小鼠进行腹腔注射豚草花粉 (0.1 mg/200 $\mu\text{L}$ ) 与明矾佐剂 (1 mg/200 $\mu\text{L}$ ) 的混合物进行基本致敏。第 7 天,再次对小鼠进行腹腔注射豚草花粉 (0.1 mg/200 $\mu\text{L}$ ) 以增强致敏作用。从第 14 天开始,连续 4 d 对小鼠进行鼻内灌注豚草花粉 (0.1 mg/20 $\mu\text{L}$ )。 On day 0, sensitize mice with an intraperitoneal injection of a mixture of ragweed pollen (0.1 mg/200 $\mu\text{L}$ ) and alum adjuvant (1 mg/200 $\mu\text{L}$ ). On day 7, re-sensitize mice with an intraperitoneal injection of ragweed pollen (0.1 mg/200 $\mu\text{L}$ ). From day 14, instill intranasally with ragweed pollen (0.1 mg/20 $\mu\text{L}$ ) for 4 consecutive days.	明矾佐剂 Alum adjuvant	行为学评分;紧密连接蛋白 (tight junction proteins, TJ) 和 (zonula occludens-1, ZO-1) 表达;细胞旁通透性检测 Behavioral scoring; tight junction proteins and zonula occludens-1 expression; paracellular permeability testing
雌性 BALB/c 小鼠 <sup>[37]</sup> Female BALB/c mice	桦树花粉/rBet v 1 Birch pollen/rBet v 1	在第 0、14 和 28 天,对小鼠进行皮下注射,每次注射 10 $\mu\text{g}$ rBet v 1 加氢氧化铝佐剂。 On days 0, 14, and 28, administer subcutaneous injections of 10 $\mu\text{g}$ rBet v 1 plus aluminum hydroxide adjuvant.	氢氧化铝佐剂 Aluminum hydroxide adjuvant	脾 CD4 <sup>+</sup> 细胞增殖;血清特异性 IgE、IgG1、IgG2a 水平 Spleen CD4 <sup>+</sup> cell proliferation; serum-specific IgE, IgG1, and IgG2a levels
雌性 BALB/c 小鼠 <sup>[38]</sup> Female BALB/c mice	黄花蒿花粉/艾蒿花粉/大籽蒿花粉 Artemisia annua pollen/Mugwort pollen/Artemisia macrosperma pollen	在第 7 天和第 14 天,对小鼠进行腹腔注射,每次注射 1 mg/mL 的蒿花粉提取物与 2 mg/mL 的氢氧化铝佐剂混合物 (总体积为 200 $\mu\text{L}$ ), 以进行基础致敏。从第 14 天至第 23 天,对小鼠进行鼻内灌注,每天连续灌注 200 $\mu\text{g}$ 蒿花粉溶于 100 $\mu\text{L}$ 1 mg/mL 的氢氧化铝溶液,以诱导变应性鼻炎。 On days 7 and 14, administer intraperitoneal injections of a mixture of 1 mg/mL Artemisia pollen extract with 2 mg/mL aluminum hydroxide adjuvant (total volume of 200 $\mu\text{L}$ ) for primary sensitization. From day 14 to day 23, instill intranasally with 200 $\mu\text{g}$ Artemisia pollen dissolved in 100 $\mu\text{L}$ of 1 mg/mL aluminum hydroxide solution daily to induce allergic rhinitis.	氢氧化铝佐剂 Aluminum hydroxide adjuvant	行为学评分;鼻黏膜 TLR4、MyD88 和 NF- $\kappa\text{B}$ p65 表达水平 Behavioral scoring; nasal mucosa TLR4, MyD88, and NF- $\kappa\text{B}$ p65 expression levels

续表 1

动物品系 Animal strain	花粉过敏原 Pollen allergen	模型构建方法 Model construction method	佐剂 Adjuvant	评价指标 Evaluation indicators
雌性 BALB/c 小鼠 <sup>[39]</sup> Female BALB/c mice	侧柏花粉 Cedar pollen	在第 0、7、14 天,对小鼠进行皮下注射,每次注射 10 μg 侧柏花粉提取物与 2 mg 氢氧化铝的混合物。在第 21 天至第 24 天,每天用 1% 侧柏花粉提取物雾化激发,每天 1 次,每次 20 min。 On days 0, 7, and 14, administer subcutaneous injections of 10 μg juniper pollen extract mixed with 2 mg aluminum hydroxide. From day 21 to day 24, aerosolize 1% juniper pollen extract once daily for 20 min each time.	氢氧化铝佐剂 Aluminum hydroxide adjuvant	血清特异性 IgE 水平 (sIgE) 和总 IgE 抗体水平 (tIgE); 脾 T 细胞增殖试验; 鼻灌洗液中嗜酸性粒细胞计数; 肺组织病理形态 Serum-specific IgE levels (sIgE) and total IgE antibody levels (tIgE); splenic T-cell proliferation test; eosinophil count in nasal wash fluid; lung tissue histomorphology
雄性 BALB/c 小鼠 <sup>[40]</sup> Male BALB/c mice	日本雪松花粉 Japanese cedar pollen	在第 0 天和第 14 天,对小鼠进行腹腔注射 50 μg 日本雪松花粉提取物加氢氧化铝佐剂(2.5 mg/0.5 mL)的混合物。在第 28、29、30 和 35 天,对小鼠进行鼻内灌注,每次灌注 100 μg 日本雪松花粉提取物(每只 20 μL)。 On days 0 and 14, administer intraperitoneal injections of a mixture of 50 μg Japanese cedar pollen extract with aluminum hydroxide adjuvant (2.5 mg/0.5 mL). On days 28, 29, 30, and 35, instill intranasally with 100 μg Japanese cedar pollen extract (20 μL per mouse).	氢氧化铝佐剂 Aluminum hydroxide adjuvant	血清特异性 IgG1 水平; 鼻黏膜肥大细胞、嗜酸性粒细胞和杯状细胞检测 Serum-specific IgG1 levels; detection of mast cells, eosinophils, and goblet cells in nasal mucosa
雄性 BALB/c 小鼠 <sup>[41]</sup> Male BALB/c mice	臭椿花粉 Ailanthus pollen	第 0、10、20 天,小鼠腹腔注射以基础致敏(臭椿花粉提取物 130 μg 吸附在 PBS 溶液稀释的氢氧化铝 130 μg 上,总体积为 200 μL); 第 10、20 天不加佐剂注射。 On days 0, 10, and 20, administer intraperitoneal injections for basic sensitization (130 μg Ailanthus pollen extract adsorbed onto 130 μg aluminum hydroxide diluted in PBS, total volume of 200 μL); on days 10 and 20, inject without adjuvant.	氢氧化铝佐剂 Aluminum hydroxide adjuvant	血清 IgE 结合位点检测 Detection of serum IgE binding sites
野生型 BALB/c 小鼠 <sup>[42]</sup> Wild-type BALB/c mice	豚草花粉 Ragweed pollen	急性 AR 模型: 第 0 天,小鼠腹腔注射豚草花粉(100 μg+氢氧化铝凝胶 1 mg+200 μL PBS); 第 7 天,小鼠腹腔注射豚草花粉(100 μg+200 μL PBS); 第 14~17 天,小鼠鼻内注射豚草花粉(每只小鼠 1 mg/20 μL PBS)。慢性 AR 模型: 小鼠在第 1 周和第 2 周(第 0~5 天)和(第 7~12 天)鼻内灌注豚草花粉(1 mg+200 μL PBS); 在第 3 周(第 14~17 天继续鼻内灌注豚草花粉)。 Acute AR model: On day 0, administer intraperitoneal injection of ragweed pollen (100 μg + 1 mg aluminum hydroxide gel + 200 μL PBS); on day 7, administer intraperitoneal injection of ragweed pollen (100 μg + 200 μL PBS); from day 14 to day 17, instill intranasally with ragweed pollen (1 mg/20 μL PBS per mouse). Chronic AR model: Mice receive intranasal instillations of ragweed pollen (1 mg + 200 μL PBS) on days 0~5 and 7~12; continue intranasal instillations on days 14~17.	氢氧化铝佐剂 Aluminum hydroxide adjuvant	行为学评分; 血清细胞因子 IL4、IL5 和 IL13 水平; 鼻细胞中嗜酸性粒细胞数量; 血清特异性 IgE 水平 (sIgE); 鼻部 mRNA 表达水平 Behavioral scoring; serum cytokine levels of IL-4, IL-5, and IL-13; number of eosinophils in nasal cells; serum-specific IgE levels (sIgE); nasal mRNA expression levels
雌性 B10.S 小鼠 <sup>[43]</sup> Female B10.S mice	日本雪松花粉 Japanese cedar pollen	日本雪松花粉提取物(0.02 μg 花粉蛋白+0.02 mg 氢氧化铝/2 μL/鼻孔)鼻内滴注,每天 2 次,连续 7 d。暂停一周; 然后每周滴鼻刺激动物 1 次,直到第 15 次。 Instill intranasally with Japanese cedar pollen extract (0.02 μg pollen protein + 0.02 mg aluminum hydroxide/2 μL/nostril), twice daily for 7 consecutive days. Pause for one week; then instill intranasally once weekly until the 15th stimulation.	氢氧化铝佐剂 Aluminum hydroxide adjuvant	行为学评分; 气道阻力测量; 血清特异性 IgE 水平 (sIgE) Behavioral scoring; airway resistance measurement; serum-specific IgE levels (sIgE)

续表 1

动物品系 Animal strain	花粉过敏原 Pollen allergen	模型构建方法 Model construction method	佐剂 Adjuvant	评价指标 Evaluation indicators
雄性 BALB/c 小鼠 <sup>[44]</sup> Male BALB/c mice	艾蒿花粉/Art v1 Mugwort pollen/ Art v1	在第 0 天和第 14 天,给小鼠腹腔注射艾蒿花粉提取物(1000 PNU/200 $\mu$ L)与氢氧化铝佐剂(每只小鼠 1 mg)的混合物为基础致敏。暂停 1 周后,在第 21、23 和 25 天对小鼠进行滴鼻激发,给予小鼠艾蒿花粉提取物(每只小鼠 200 PNU/20 $\mu$ L)。On days 0 and 14, administer intraperitoneal injections of a mixture of mugwort pollen extract (1000 PNU/200 $\mu$ L) with aluminum hydroxide adjuvant (1 mg/mouse) for primary sensitization. After a one-week pause, instill intranasally on days 21, 23, and 25 with mugwort pollen extract (200 PNU/20 $\mu$ L/mouse).	氢氧化铝佐剂 Aluminum hydroxide adjuvant	血清特异性 IgE、总 IgE 抗体、特异性 IgG、IgG1 和 IgG2a;耳过敏性肿胀试验;细胞因子水平;肺组织病理形态 Serum-specific IgE, total IgE antibodies, specific IgG, IgG1, and IgG2a; ear allergic edema test; cytokine levels; lung tissue histomorphology
雄性哈特利豚鼠 <sup>[45]</sup> Male Hartley guinea pigs	日本雪松花粉 Japanese cedar pollen	在第 0 天开始,连续 7 d 每天两次每鼻孔鼻内给予雪松花粉提取物 3 $\mu$ L(0.3 mg 花粉蛋白溶于 0.3 mg 氢氧化铝)。暂停 1 周后,从第 14 天开始,每周一次,通过吸入器给予小鼠 3 mg 雪松花粉,持续 30 周。 Starting on day 0, Cedar pollen extract 3 $\mu$ L (0.3 mg pollen protein dissolved in 0.3 mg aluminum hydroxide) was given intranasal twice a day for 7 consecutive days. After a one-week pause, starting from day 14, administer via inhaler 3 mg of cedar pollen once weekly for 30 weeks.	氢氧化铝佐剂 Aluminum hydroxide adjuvant	特异性气道阻力 (sRaw);行为学评分;被动性皮肤过敏反应(PCA);血清 $\gamma$ 1 和 IgE 抗体水平 Specific airway resistance (sRaw); behavioral scoring; passive cutaneous anaphylaxis (PCA); serum $\gamma$ 1 and IgE antibody levels
雄性哈特利豚鼠 <sup>[46]</sup> Male Hartley guinea pigs	日本雪松花粉 Japanese cedar pollen	在第 0 天开始,连续 7 d 每天两次每鼻孔鼻内给予雪松花粉提取物 3 $\mu$ L(0.3 mg 花粉蛋白溶于 0.3 mg 氢氧化铝)。暂停 1 周后,从第 14 天开始,每周 1 次,通过吸入器给予小鼠雪松花粉(3 mg/孔),持续 13 周。 Starting on day 0, Cedar pollen extract 3 $\mu$ L (0.3 mg pollen protein dissolved in 0.3 mg aluminum hydroxide) was given intranasal twice a day for 7 consecutive days. After a one-week pause, starting from day 14, administer via inhaler 3 mg of cedar pollen once weekly for 13 weeks.	氢氧化铝佐剂 Aluminum hydroxide adjuvant	行为学评分;特异性气道阻力(sRaw);鼻腔灌洗液中 TXB2、p-I $\kappa$ B 和组胺水平 Behavioral scoring; specific airway resistance (sRaw); TXB2, p-I $\kappa$ B, and histamine levels in nasal lavage fluid
雄性哈特利豚鼠 <sup>[47]</sup> Male Hartley guinea pigs	日本雪松花粉 Japanese cedar pollen	在第 0 天开始,连续 7 d 每天两次每鼻孔鼻内给予雪松花粉提取物 3 $\mu$ L(0.3 mg 花粉蛋白溶于 0.3 mg 氢氧化铝)。暂停 1 周后,从第 14 天开始,每周 1 次,通过吸入器给予小鼠 3.6 mg 雪松花粉,持续 48 周。 Starting on day 0, Cedar pollen extract 3 $\mu$ L (0.3 mg pollen protein dissolved in 0.3 mg aluminum hydroxide) was given intranasal twice a day for 7 consecutive days. After a one-week pause, starting from day 14, administer via inhaler 3.6 mg of cedar pollen once weekly for 48 weeks.	氢氧化铝佐剂 Aluminum hydroxide adjuvant	特异性气道阻力 (sRaw);行为学评分;血清特异性 IgE 和 IgG1 抗体水平;鼻灌洗液中的白细胞计数;鼻灌洗液中组胺和半胱氨酸白三烯含量;肺组织病理形态 Specific airway resistance (sRaw); behavioral scoring; serum-specific IgE and IgG1 antibody levels; white blood cell count in nasal lavage fluid; histamine and cysteinyl leukotriene content in nasal lavage fluid; lung tissue histomorphology

续表 1

动物品系 Animal strain	花粉过敏原 Pollen allergen	模型构建方法 Model construction method	佐剂 Adjuvant	评价指标 Evaluation indicators
雄性哈特利豚鼠 <sup>[48]</sup> Male Hartley guinea pigs	日本雪松花粉 Japanese cedar pollen	在第 0 天开始,连续 7 d 每天两次每鼻孔鼻内给予雪松花粉提取物 3 $\mu$ L(0.3 mg 花粉蛋白溶于 0.3 mg 氢氧化铝)。暂停 1 周后,从第 14 天开始,每周 1 次,通过吸入器给予小鼠 3.6 mg 雪松花粉,持续 11 周。 Starting on day 0, Cedar pollen extract 3 $\mu$ L (0.3 mg pollen protein dissolved in 0.3 mg aluminum hydroxide) was given intranasal twice a day for 7 consecutive days. After a one-week pause, starting from day 14, administer via inhaler 3.6 mg of cedar pollen once weekly for 11 weeks.	氢氧化铝佐剂 Aluminum hydroxide adjuvant	气流阻力测量;鼻气道容积测量;血清特异性 IgE 水平 Airflow resistance measurement; nasal airway volume measurement; serum-specific IgE levels
成年比格犬 (9.5~14.5 kg) <sup>[49]</sup> Adult Beagle dogs (9.5~14.5 kg)	豚草花粉 Ragweed pollen	出生后 24 h 内,给犬腹腔注射豚草提取物(200 $\mu$ g)、0.9%生理盐水(0.5 mL)与氢氧化铝凝胶(30 mg)的混合物。每两周重复上述注射 1 次,直到犬达到 16 周龄。16 周龄后,通过雾化吸入的方式诱发犬鼻部过敏反应。 Within 24 hours of birth, administer intraperitoneal injections of a mixture of ragweed extract (200 $\mu$ g), 0.9% saline (0.5 mL), and aluminum hydroxide gel (30 mg). Repeat this injection every two weeks until the dogs reach 16 weeks of age. After 16 weeks of age, induce nasal allergic reactions via aerosol inhalation.	氢氧化铝佐剂 Aluminum hydroxide adjuvant	气流阻力测量;鼻气道容积测量 Airflow resistance measurement; nasal airway volume measurement
绒猴 <sup>[50]</sup> Common marmosets	豚草花粉 Ragweed pollen	给猕猴腹腔注射豚草花粉提取物(每只 100 $\mu$ g)与明矾佐剂(每只 5 mg)的混合物以基础致敏,每周 1 次,连续 70 周。而后给猕猴滴鼻激发以诱导过敏反应。 Administer intraperitoneal injections of a mixture of ragweed pollen extract (100 $\mu$ g per animal) and alum adjuvant (5 mg per animal) for primary sensitization, once a week for 70 consecutive weeks. Thereafter, instill intranasally to induce allergic reactions.	明矾佐剂 Alum adjuvant	行为学评分;外周血 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 细胞比例;外周血中 Th1/Th2/Th17 细胞因子 mRNA 水平 Behavioral scoring; proportion of peripheral blood CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> cells; Th1/Th2/Th17 cytokine mRNA levels in peripheral blood
新西兰白兔 <sup>[51]</sup> New Zealand White rabbits	艾蒿花粉/rArt v1 Mugwort pollen/rArt v1	每隔 4 周刺激白兔以诱导过敏反应。 Stimulate the rabbits every 4 weeks to induce allergic reactions.	弗氏佐剂 Freund's adjuvant	特异性 IgE 水平 Specific IgE levels

### 3 花粉致敏 AR 模型构建方法

#### 3.1 花粉致敏 AR 材料:抗原

花粉过敏原在致敏前需要进行处理,以获得标准的抗原物质。一种豚草提取物的生产工艺已被公认为国际参考标准,它包括收集花粉、脱脂,利用有效的缓冲液提取花粉颗粒 22 h。然后进行离心过滤以去除杂质,连续通过 0.45  $\mu$ m 和 0.22  $\mu$ m 的过滤膜以除菌。提取液经过进一步的冻干处理,最后进行氮气密封<sup>[62]</sup>。用于建模的花粉过敏原提取物需要蛋白质定量来确定剂量。

脱脂包括利用有机溶剂来消除油、树脂、挥发性油、脂溶性毒素,以及该物质中的其他刺激性物

质。大多数过敏原材料应脱脂,使水溶性活性成分更容易在水溶液中浸出。二乙醚和石油醚是最常用的有机溶剂,其优点是脱脂效果好、挥发速度快。与其他有机溶剂相比,氯仿能够在较低的水化速率下脱去更高的总脂肪含量,而环己烷的高蛋白质提取性能和花粉水化率低,是目前的最佳溶剂<sup>[63]</sup>。然而脱脂是否影响致敏效果是一个有趣的问题,目前已有使用未脱脂花粉提取物的实验研究,也成功诱导出过敏性鼻炎模型<sup>[23,43,64]</sup>。

所谓提取是将花粉的水溶性活性抗原部分浸入溶液中的方法。不同的缓冲液对花粉提取物的抗原活性影响较大。最常用的缓冲液包括磷酸盐缓冲液和碳酸氢铵缓冲液,它们可将提取的花

粉过敏原物质的 pH 值保持为中性<sup>[65]</sup>。

此外,花粉重组蛋白是过敏性鼻炎动物模型中常用的变应原。在过去的 20 年里,花粉来源的过敏原蛋白的分子特征取得了巨大的进展。在不同的植物物种中已经发现了属于不同蛋白质家族的花粉过敏原<sup>[66]</sup>。与花粉粗提物相比,花粉重组蛋白具有较好的安全性和稳定性,易于吸收。然而,AR 的作用机制受到多种因素的影响,包括主要的致敏蛋白、与花粉相关的脂质介质、花粉腺苷、细菌内毒素附着、病毒和环境污染等。因此,在制备花粉提取物时,必须考虑到这些因素。

### 3.2 花粉致敏 AR 材料:佐剂

佐剂是非特异性免疫增强剂,通常与花粉抗原一起或在花粉抗原之前注射到动物体内。应用佐剂的目的是提高抗原对机体的免疫原性,从而提高抗体的效力。目前,在过敏性鼻炎动物模型中最常用的佐剂是氢氧化铝佐剂(也称为明矾佐剂)<sup>[67]</sup>,也有部分研究使用的佐剂是弗氏佐剂。总体而言,两者的主要功能都是帮助免疫系统更有效地识别和对抗原。然而,它们之间存在显著差异。弗氏佐剂的炎症刺激效应更为强烈,容易导致局部炎症反应及组织损伤。此外,使用弗氏佐剂的过程较为繁琐,需要将其完全乳化后才能达到使用效果。因此,氢氧化铝佐剂通常被视为弗氏佐剂的便捷替代方案,因其操作更为简便。

目前的研究进展表明,铝佐剂引起的体液免疫力的增加可以用 3 种机制来解释<sup>[68-69]</sup>。第一种机制是在注射部位发挥缓慢释放作用(氢氧化铝在体内的生物降解性较低),形成一个连续的抗原释放库,促进抗原对免疫系统的长期刺激,最终增强抗原的可用性。第二种机制涉及将可溶性抗原转化为颗粒状形式,随后这些颗粒被抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APCs)吞噬,从而加强机体对抗原的免疫反应。这一过程有助于提高抗原的生物利用度,使其更容易被免疫系统识别并加以处理。第三种机制则表明,铝佐剂能够通过增强 APCs 的招募和激活来诱导 Th2 免疫应答。通过这种方式,铝佐剂不仅提高了免疫细胞的数量,也促进了它们的功能活性,从而增强了整体的免疫反应。

但是,也有报道指出由氢氧化铝引起的不良反应也有报道。一些研究认为,使用氢氧化铝凝胶作为佐剂会在小鼠的腹部器官中产生异物肉芽肿<sup>[70]</sup>。在过敏性鼻炎的动物模型中,氢氧化铝粉末常用量为每只动物 1~5 mg,氢氧化铝凝胶常用量为每只动物 0.1~0.3 mL<sup>[71]</sup>。不同剂量的佐剂可能会对 AR 模型的制作效果产生影响,但其使用的有效范围和最佳浓度尚不清楚。且目前已有使用无佐剂的实验研究,也成功诱导出过敏炎症模型<sup>[25,35,72-74]</sup>。

### 3.3 花粉致敏 AR 模型的过程

目前已发表的 AR 模型的实验设置可以分为两部分:(1)过敏原基础致敏;(2)过敏原激发。过敏原基础致敏是指使动物反复暴露于少量抗原后产生的特异性抗体,其中可能包括花粉提取物或重组蛋白。这种暴露方式包括腹腔注射、皮下注射、足垫注射或鼻内灌注。从模拟实际起病情况的角度来看,鼻内灌注比腹腔注射和皮下注射更接近现实<sup>[75-76]</sup>。但后两种方法因其能够更快地诱发炎症而广受欢迎。过敏原激发阶段是使动物再次暴露于加大剂量的同一过敏原,通过与致敏肥大细胞和嗜酸性粒细胞表面的抗体特异性结合,诱导强烈过敏反应的阶段。通常,从初次致敏到出现明显的过敏性鼻炎症状通常需要几周的时间。具体的周期可能会根据实验设计和目的有所不同,但大致可以认为基础致敏周期需要大约 2~4 周的时间来完成。在完成全身致敏后的一段时间内(如 1 周后),通过局部给予抗原(如滴鼻)来激发过敏性鼻炎的症状,激发期可以持续几天到几周不等。

在现有的花粉致敏 AR 模型中,刺激途径、刺激时间和佐剂是更重要的影响因素。鼻内灌注给药比腹腔注射更符合实际发病场景。皮下注射致敏的过敏原很容易导致 Th2 引起的炎症反应。然而,很少有研究比较这两种不同类型的致敏作用对过敏模型的影响。对于过敏性气道慢性炎症模型,可以通过控制过敏原激发阶段的时间得到。过敏性气道慢性炎症模型的激发时间通常不小于 10 周。然而,目前还没有统一的标准化时间标准和相应的评价标准来区分急性和慢性气道炎症模型。

## 4 模型评价指标

花粉致敏 AR 动物模型评价通常基于动物整体反应的特征及相关生理指标的测定来进行综合判断(见表 1)。这一过程通常包括 4 个关键步骤:首先,通过行为学评分来评估动物的活动状态及其对环境刺激的反应;其次,通过检测特异性抗体的水平来了解动物体内的免疫反应;此外,组织病理形态的分析则能提供有关细胞和组织损伤情况的直接证据;最后,针对不同的研究目的应用辅助检测相关细胞因子和蛋白进一步验证和补充上述评估结果,从而形成一个全面的评价体系。除此之外我们还补充了通过评估鼻黏膜上皮屏障损伤验证造模效果的研究,这样的综合评估能够更准确地反映花粉引起的过敏反应特征。

### 4.1 行为学评分

行为评分通常在最后一次抗原激发后 30 min 内进行。主要观察花粉致敏模型动物的体征和症状,特别是挠鼻、打喷嚏、流鼻涕和鼻塞。打喷嚏和抓挠是最明显的症状,其严重程度可以取决于它发生的频率。流鼻涕量可以用荧光素染色的棉线来测量,将棉线插入豚鼠鼻孔约 15 mm,并保持 60 s,流鼻涕的程度由鼻分泌物引起的棉线的颜色长度变化来表示<sup>[77]</sup>。全身体积描记术(whole body plethysmography, WBP)是评估动物鼻塞的一种常用技术。通过 WBP 测量呼吸频率变化可作为评估鼻塞的相关生理参数<sup>[78]</sup>。

### 4.2 血清特异性抗体水平检测

花粉致敏 AR 动物模型评价还需要对动物进行全面的评估,以确定是否存在全身性过敏反应。该评价主要涉及血清 IgE 和被动性皮肤过敏反应(passive cutaneous anaphylaxis, PCA)的检测。PCA 检测是一种非常灵敏的方法,它依靠抗体与同类型或不同类型动物的组织相结合所引发的局部过敏反应,来实现对抗体或抗原的检测<sup>[79]</sup>。然而,进行 PCA 测试的过程是复杂的,其结果可能会受到多种因素的影响。通过 PCA 鉴定抗体的主要挑战在于对染料反应的准确定量。随着 IgE 抗体的发现,这种方法逐渐被取代。在 I 型过敏反应中,花粉作为过敏原进入体内后,会触发一系列免疫反应。具体而言,花粉特异性 IgE 会与肥

大细胞结合,这一结合过程是引发过敏的关键步骤,客观且定量地测定血清中花粉特异性 IgE 的浓度,成为了评估个体对花粉过敏反应的主要科学指标<sup>[80]</sup>。

在过敏性鼻炎的病例中,Th1 和 Th2 型细胞因子的异常分泌可导致促炎/抗炎平衡的异常。研究表明,Th2 细胞因子能够有效促进 IgG1 抗体的合成,而 Th1 细胞因子则主要诱导 IgG2a 抗体的生成<sup>[81]</sup>。因此,通过比较血清中 IgG2a 和 IgG1 水平的变化,可以间接揭示 Th1 与 Th2 细胞之间调控机制的潜在变化<sup>[82]</sup>。这种比较方法已经在多项实验性研究中得到了广泛应用,成为研究免疫响应和细胞信号调节的重要工具。在 AR 动物实验中,特定花粉的特异性 IgE、IgG1 和 IgG2a 水平往往比总 IgE 水平的变化更有说服力。

### 4.3 鼻黏膜组织病理形态学检测

动物鼻黏膜组织材料可用于检测 IgE 依赖的过敏反应的局部组织病理学变化。如果模型有效,可以观察到鼻黏膜脱落和损伤,间质组织有炎性细胞浸润,炎性病变主要由淋巴细胞、嗜酸性粒细胞或中性粒细胞组成,在光学显微镜下可观察到水肿渗出,组织间隔增厚<sup>[81]</sup>。客观且定量地评估花粉过敏反应所引发的组织炎症性病变及其相关病理特征尤为重要。此外,花粉作为一种常见的过敏原,除了引发鼻腔疾病外,其影响范围还扩展至下呼吸道,可能引起一系列支气管和肺部疾病的发生。因此,关注支气管及肺组织的病理状况显得十分关键<sup>[83]</sup>。对花粉引发的呼吸系统疾病进行深入研究,有助于我们更好地理解其对整个呼吸系统的影响及相关机制,从而为相关疾病的预防和治疗提供理论依据。

### 4.4 细胞因子检测

除上述评价指标外,还可以进行细胞因子检测来确认过敏反应。研究表明,鼻腔微环境中细胞因子的释放不仅影响免疫反应,还可能改变鼻上皮细胞内紧密连接蛋白的组成结构。这种改变可导致紧密屏障特性向渗漏型屏障特性的转变,从而对鼻上皮的完整性和功能产生负面影响<sup>[84]</sup>。过敏性鼻炎的发生与维持主要由 2 型先天性淋巴细胞(type 2 innate lymphoid cells ILC2s)和 Th2 细胞所介导,这种机制是通过诱导 2 型免疫反应实

现的。这些特定类型的免疫细胞能够释放多种细胞炎性因子,从而有效地激活其他免疫细胞,促使病理状态的持续,引发了更为明显的临床症状。涉及到的细胞因子检测方法主要根据样本量、样本种属及仪器平台等情况选择合适的检测方法,常用的检测方法有流式检测、ELISA、ELISpot、Luminex 等。涉及到的细胞及细胞因子主要包括如下几种。

#### 4.4.1 Th2 细胞

AR 与 Th0 细胞向 Th2 细胞的分化和大量 Th2 型细胞因子的释放有关。Th2 细胞能够分泌多种细胞因子,主要包括 IL-4、IL-5、IL-10 和 IL-13 等<sup>[81,85]</sup>,进一步破坏鼻黏膜上皮屏障<sup>[86]</sup>,加强炎症细胞的浸润,诱发并维持鼻黏膜的炎症。因此,检测上述因子的表达水平可以有效反映 Th2 细胞的活化程度。值得注意的是,IL-25(又称 IL-17E)是一种由 Th2 细胞产生的关键细胞因子。它通过与 IL-17RA/B 的相互作用,能够有效激活并增强多个转录因子的表达,例如 NF $\kappa$ B、STAT6、GATA3 和 NFATC1。这一过程促使 Th2 记忆细胞的有效激活和极化,最终促进 Th2 细胞因子(尤其是 IL-4、IL-5 和 IL-13 等)的大量产生<sup>[87]</sup>。

#### 4.4.2 ILC2s

ILC2s 在 AR 的免疫反应中发挥核心作用<sup>[88]</sup>。当过敏原如花粉接触鼻黏膜时,上皮细胞释放多种物质,包括过敏原蛋白和生物活性分子,导致细胞因子 IL-25、IL-33 和胸腺基质淋巴生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)的分泌,进而激活 ILC2s 并促进 2 型树突细胞(type 2 dendritic cells, DC2)的成熟。激活的 ILC2s 分泌多种细胞因子(如 IL-25、IL-33 和 IL-9),直接影响鼻黏膜和神经,引发气道高反应性和局部炎症,进而加剧过敏反应<sup>[89]</sup>。

其中,IL-33 作为一种关键细胞因子,主要在组织损伤时被释放,并通过与 ST2 受体结合来调控免疫细胞活动,调控免疫反应和炎症。此外,IL-33 还能激活 Th2 细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、M2 巨噬细胞和树突状细胞,参与到 2 型和 1 型免疫、过敏与非过敏性鼻炎的过程中。

TSLP 是一种重要的促 Th2 反应因子,主要由鼻上皮细胞产生。它不仅能激活树突状细胞,还通过上调紧密连接蛋白的表达维持上皮屏障的完整性,特别是在过敏性鼻炎的早期阶段。在过敏性鼻炎小鼠模型中,TSLP 的表达显著上调,表明其在过敏反应和炎症调节中发挥关键作用。因此,检测 TSLP 的表达水平于理解 AR 的发病机制具有重要意义<sup>[90]</sup>。

#### 4.4.3 Th17 细胞

Th17 细胞是一类 T 辅助细胞(Th 细胞),主要负责分泌 IL-17,在多种生理和病理过程中均发挥着关键作用,主要能够促进炎症反应和增强局部免疫,应对感染和病原体的入侵。在过敏性鼻炎反应的早期阶段,IL-17 作为一种促炎因子,促进炎症物质的释放,增强鼻黏膜的敏感性<sup>[91]</sup>。因此,检测 IL-17 的表达水平对于了解 Th17 细胞数量的表达具有重要意义。

### 4.5 上皮屏障功能关键指标检测

目前,很多研究会评估鼻黏膜上皮屏障的损伤情况。鼻黏膜作为呼吸道重要的防御屏障,其完整性直接关系到呼吸道的健康和免疫状态。通常会考察一系列指标和分子变化,这些指标为我们提供了评估鼻黏膜功能的重要依据(表 2)。紧密连接蛋白如 occludin 和 claudin,是维持上皮细胞间屏障功能的关键成分。当其表达水平降低时,上皮屏障的通透性可能增加,导致病原体及过敏原更容易侵入。而细胞因子在炎症反应中具有重要作用,某些细胞因子的过度释放可能指示鼻黏膜受到过度刺激或损伤。例如,肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)等细胞因子,常常在过敏性鼻炎和其他上呼吸道疾病中升高,表明存在明显的炎症反应。此外,趋化因子作为一种信号分子,能吸引免疫细胞至损伤部位,帮助清除外来病原体,但其过量表达也可能引发慢性炎症<sup>[92]</sup>,导致鼻黏膜屏障的进一步损害。综合来看,这些指标和分子变化为评估和理解鼻黏膜上皮屏障的损伤提供了基础,有助于推动相应治疗策略的研发,以改善患者的生活质量和健康状况<sup>[93-94]</sup>。

表 2 影响鼻上皮屏障功能的关键成分

Table 2 Key components affecting the nasal epithelial barrier function

检测名称 Detection name	对鼻上皮屏障功能的影响 Effect on the nasal epithelial barrier function
紧密连接蛋白-1 Zonula occludens-1	维持紧密连接的结构完整性,调节离子和溶质的通透性。 Maintain the structural integrity of the tight junctions and regulate the permeability of ions and solutes.
闭塞蛋白 Occludin	参与紧密连接的形成,调节跨细胞间隙的通透性。 Involved in the formation of tight junctions and regulating permeability across intercellular spaces.
封闭蛋白 Claudins	调控紧密连接的通透性和选择性,影响离子和分子的运输。 Regulating the permeability and selectivity of tight junctions, affecting the transport of ions and molecules.
接头黏附分子 Junctional adhesion molecules	影响紧密连接的稳定性,参与免疫细胞的迁移过程。 Affect the stability of tight junctions and participate in the migration process of immune cells.
E-钙黏蛋白 E-cadherin	保持上皮细胞间的黏附,对维持上皮屏障完整性至关重要。 Maintaining adhesion between epithelial cells is essential for maintaining epithelial barrier integrity.
原钙黏蛋白 9 Proto-cadherin 9	通过参与维持正常的上皮屏障功能、调节炎症反应、影响免疫细胞的迁移等来影响鼻黏膜上皮屏障。 It affects the nasal mucosal epithelial barrier by participating in maintaining the normal epithelial barrier function, regulating the inflammatory response, and affecting the migration of immune cells.
白介素-4 IL-4	促进 Th2 细胞分化,增加 IgE 介导的炎症反应,可能通过改变紧密连接蛋白表达而影响上皮屏障的完整性。 Promoting Th2 cell differentiation and increasing the IgE-mediated inflammatory responses may affect the integrity of the epithelial barrier by altering tight junction protein expression.
白介素-5 IL-5	促进嗜酸性粒细胞的增殖和存活,参与鼻黏膜炎症反应,导致上皮屏障功能受损。 Promote the proliferation and survival of eosinophils, and participate in the inflammatory response of the nasal mucosa, leading to an impaired epithelial barrier function.
白介素-6 IL-6	通过促进炎症介质的产生,可能间接损害上皮屏障功能,导致屏障功能障碍。 By promoting the production of inflammatory mediators, it may indirectly impair the epithelial barrier function, leading to the barrier dysfunction.
白介素-8 IL-8	通过促进中性粒细胞的募集和活化,可能通过诱导炎症反应间接损害上皮屏障。 By promoting the recruitment and activation of neutrophils, it may damage the epithelial barrier indirectly by inducing an inflammatory response.
白介素-9 IL-9	可能通过 Th2 应答参与炎症过程,间接影响上皮屏障功能。 May participate in inflammatory processes through the Th2 response and indirectly affect epithelial barrier function.
白介素-12 IL-12	IL-12 参与免疫细胞的活化,特别是促进 Th1 细胞的分化,这可能间接影响上皮屏障功能。 IL-12 is involved in the activation of immune cells, especially in promoting the differentiation of Th1 cells, which may indirectly affect the epithelial barrier function.
白介素-10 IL-10	具有抗炎作用,可能有助于维持上皮屏障的完整性和减少炎症反应。 Have anti-inflammatory effects and may help to maintain the epithelial barrier integrity and reduce inflammatory responses.
白介素-13 IL-13	通过改变紧密连接蛋白的表达,可能直接影响上皮屏障的通透性和完整性。 By changing the expression of tight junction proteins, it may directly affect the epithelial permeability and integrity of the barrier.
白介素-17 IL-17	促进炎症介质释放,可能通过诱导炎症间接损害上皮屏障。 Facilitating inflammatory mediator release, possibly impairing the epithelial barrier indirectly by inducing inflammation.
白介素-18 IL-18	能够吸引中性粒细胞等免疫细胞到炎症部位,加剧炎症反应,从而影响上皮屏障的完整性。 Ability to attract immune cells such as neutrophils to sites of inflammation, exacerbating the inflammatory response and thus affecting the integrity of the epithelial barrier.

续表2

检测名称 Detection name	对鼻上皮屏障功能的影响 Effect on the nasal epithelial barrier function
白介素-25 IL-25	参与 Th2 细胞的活化,可能通过促进 IL-5 和 IL-13 的产生而影响上皮屏障。 Involved in the activation of Th2 cells, possibly affecting the epithelial barrier by promoting the production of IL-5 and IL-13.
白介素-33 IL-33	通过激活 Th2 细胞和肥大细胞,可能通过炎症介质的释放间接影响上皮屏障功能。 By activating Th2 cells and mast cells, epithelial barrier function may indirectly through the release of inflammatory mediators.
胸腺基质淋巴生成素 Thymic stromal lymphopoietin	通过激活 Th2 细胞和树突状细胞,可能通过炎症介质的释放间接影响上皮屏障功能。 By activating Th2 cells and DCs, possibly affecting epithelial barrier function indirectly through the release of inflammatory mediators.
干扰素- $\gamma$ INF- $\gamma$	抑制 Th2 应答,可能通过影响紧密连接蛋白来调节上皮屏障功能。 Inhibition of Th2 responses, possibly by regulating epithelial barrier function by affecting tight junction proteins.
肿瘤坏死因子- $\alpha$ TNF- $\alpha$	引发炎症反应,可能导致紧密连接蛋白表达水平下降,从而损害上皮屏障。 Initiate an inflammatory response, which may lead to a decreased level of tight junction protein expression and thereby damage the epithelial barrier.
白介素-1 $\beta$ IL-1 $\beta$	IL-1 $\beta$ 是一种强大的促炎细胞因子,能够促进炎症介质的产生,并可能影响上皮屏障的通透性。 IL-1 $\beta$ is a powerful pro-inflammatory cytokine that promotes the production of inflammatory mediators and may affect the permeability of the epithelial barrier.
单核细胞趋化蛋白-1(C-C 基序趋化因子配体 2) Monocyte chemoattractant protein-1 (C-C motif chemokine ligand 2)	能够吸引单核细胞等免疫细胞到炎症部位,加剧炎症反应,进而影响鼻上皮屏障功能。 It can attract immune cells such as monocytes to the inflammatory sites, exacerbate the inflammatory response, and then affect the nasal epithelial barrier function.
调节激活正常 T 细胞表达和分泌的趋化因子(C-C 基序趋化因子配体 5) Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted (C-C motif chemokine ligand 5)	能够吸引多种免疫细胞,包括 T 细胞、嗜酸性粒细胞和巨噬细胞等,它可能通过促进这些细胞的募集而加剧炎症反应,间接影响鼻上皮屏障。 Ability to attract a variety of immune cells, including T cells, eosinophils, and macrophages, it may aggravate the inflammatory response by promoting the recruitment of these cells, indirectly affecting the nasal epithelial barrier.
C-C 基序趋化因子配体 11 C-C motif chemokine ligand 11	可能通过吸引嗜酸性粒细胞的增多导致鼻上皮屏障受损。 Probably causing damage to the nasal epithelial barrier by attracting more eosinophils.
干扰素诱导蛋白 10(C-X-C 基序趋化因子配体 10) Interferon gamma-inducible protein 10 (C-X-C motif chemokine ligand 10)	可能通过调节免疫细胞的募集而影响鼻上皮屏障功能。 May affect the nasal epithelial barrier function by regulating the recruitment of immune cells.
巨噬细胞炎症蛋白-1(C-C 基序趋化因子配体 3)/巨噬细胞炎症蛋白-1(C-C 基序趋化因子配体 4) Macrophage inflammatory protein-1 alpha(C-C motif chemokine ligand 3)/macrophage inflammatory protein-1 beta(C-C motif chemokine ligand 4)	可能通过促进单核细胞、嗜酸性粒细胞等的募集而加剧炎症反应,进而影响鼻上皮屏障功能。 May exacerbate the inflammatory response by promoting the recruitment of monocytes, eosinophils, and subsequently affect nasal epithelial barrier function.
肿瘤裂解激肽片段(C-X3-C Motif 趋化因子配体 1) Fragment of tumor-lysis kinase (C-X3-C motif chemokine ligand 1)	可能通过调节免疫细胞的募集而影响鼻上皮屏障功能。 May affect the nasal epithelial barrier function by regulating the recruitment of immune cells.

## 5 结语

本文系统地总结了对过敏性鼻炎相关动物模型的研究,讨论了影响模型效果的因素,包括动物品系、致敏材料即花粉抗原的制作及存在问题、佐剂的使用及存在问题、造模的步骤、效果评价。动物品系的选择需考虑致敏效果、伦理,大多数的研究选择 BALB/c 小鼠因其较好的抗原敏感性,但是该小鼠形态小,鼻黏膜取材量稀少,在研究中应结合需要检测的目标合理设置分组及动物数目。花粉抗原的制作最初专为脱敏治疗所用,引用到动物造模中其制作流程、剂量目前还没有统一标准,研究者需要在参考相近的文献基础上,根据自己的实验目标做预实验来设计合理的过程和剂量,已达到理想效果。佐剂的使用可以增强抗原被免疫细胞识别捕捉的机会,但是也干扰了研究花粉抗原致敏机制的研究。模型成功的评价标准相对比较统一,行为评分中的各种症状的判定需要制定标准并进行量化,需要开发相应的检测设备,已有的测量鼻涕流量、鼻塞程度的设备需要更多的实验验证和优化,能实现在抗原刺激后同时在一定时间段内对所有致敏小鼠症状进行客观量化的评估势在必行。

动物模型对于疾病研究至关重要,现有的花粉致敏模型中没有一种动物模型能够完全重现 AR 的所有典型症状,研究者有必要进一步完善各种花粉诱导 AR 动物模型的构建以及评价方法,尤其关注它们的重复性验证与标准化研究。这将为花粉致敏性 AR 的机制研究提供更加可靠的支持,为深入理解过敏性鼻炎的机制提供坚实的理论基础。

### 参考文献:

- [ 1 ] BOUSQUET J, ANTO J M, BACHERT C, et al. Allergic rhinitis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1): 95.
- [ 2 ] TRINCIANTI C, TOSCA M A, CIPRANDI G. Updates in the diagnosis and practical management of allergic rhinitis [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2023, 16(7): 669-676.
- [ 3 ] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会鼻科组,中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会鼻科学组. 中国变应性鼻炎诊断和治疗指南(2022 年,修订版) [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2022, 57(2): 106-129.
- BOARD OF CHINESE JOURNAL OF OTOLARYNGOLOGY HEAD AND NECK SURGERY, SUBSPECIALTY GROUP OF RHINOLOGY, SOCIETY OF OTORHINOLARYNGOLOGY HEAD AND NECK SURGERY, CHINESE MEDICAL ASSOCIATION. Chinese Guidelines for diagnosis and treatment of allergic rhinitis (2022, revised edition) [J]. *Chin J Otolaryngology Head Neck Surg*, 2022, 57(2): 106-129.
- [ 4 ] BOUSQUET J, SCHÜNEMANN H J, SAMOLINSKI B, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA): achievements in 10 years and future needs [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 130(5): 1049-1062.
- [ 5 ] KRSMANOVIĆ L, ARSOVIĆ N, BOKONJIĆ D, et al. The impact of cytokines on health-related quality of life in adolescents with allergic rhinitis [J]. *Biomedicines*, 2024, 12(2): 428.
- [ 6 ] SCHÄFER T, HOELSCHER B, ADAM H, et al. Hay fever and predictive value of prick test and specific IgE antibodies: a prospective study in children [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2003, 14(2): 120-129.
- [ 7 ] LAKE I R, JONES N R, AGNEW M, et al. Climate change and future pollen allergy in Europe [J]. *Environ Health Perspect*, 2017, 125(3): 385-391.
- [ 8 ] ASAM C, HOFER H, WOLF M, et al. Tree pollen allergens-an update from a molecular perspective [J]. *Allergy*, 2015, 70(10): 1201-1211.
- [ 9 ] BOUSQUET J, ONORATO G L, OLIVER G, et al. Google trends and pollen concentrations in allergy and airway diseases in France [J]. *Allergy*, 2019, 74(10): 1910-1919.
- [ 10 ] ANNESI-MAESANO I, CECCHI L, BIAGIONI B, et al. Is exposure to pollen a risk factor for moderate and severe asthma exacerbations? [J]. *Allergy*, 2023, 78(8): 2121-2147.
- [ 11 ] XU H, OHGAMI N, SAKASHITA M, et al. Intranasal levels of lead as an exacerbation factor for allergic rhinitis in humans and mice [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2021, 148(1): 139-147.
- [ 12 ] XING Y H, GARY W. Environmental influences and allergic diseases in the asia-pacific region: what will happen in next 30 years? [J]. *J Allergy Asthma Immunol Res*, 2022, 14(01): 21-39.
- [ 13 ] TIMERMAN D, BARRETT S C H. The biomechanics of pollen release: new perspectives on the evolution of wind pollination in angiosperms [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2021, 96(5): 2146-2163.
- [ 14 ] PASCHALIDOU A K, PSISTAKI K, CHARALAMPOPOULOS A, et al. Identifying patterns of airborne pollen distribution using a synoptic climatology

- approach [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 714: 136625.
- [15] LIU Z G, SONG J J, KONG X L. A study on pollen allergens in China [J]. *Biomed Environ Sci*, 2010, 23(4): 319-322.
- [16] CAMACHO M, REINHARD K J. Confusing a pollen grain with a parasite egg: an appraisal of "paleoparasitological evidence of pinworm (*Enterobius vermicularis*) infection in a female adolescent residing in ancient Tehran" [J]. *Korean J Parasitol*, 2019, 57(6): 621-625.
- [17] AKDIS C A. Does the epithelial barrier hypothesis explain the increase in allergy, autoimmunity and other chronic conditions? [J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(11): 739-751.
- [18] PUREVSUREN L, MILENA S, YU-KYOUNG H, et al. Epithelial Barrier Theory: the role of exposome, microbiome, and barrier function in allergic diseases [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2023, 14(6): 705-724.
- [19] MAOLIN YANG, LIWEI SUN, DONGDONG ZHU, et al. Recent advances in understanding the effects of Tlymphocytes on mucosal barrier function in allergic rhinitis [J]. *Front Immunol*, 2023, 9: 1224129.
- [20] AGLAS L, GILLES S, BAUER R, et al. Context matters; TH2 polarization resulting from pollen composition and not from protein-intrinsic allergenicity [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142(3): 984-987.
- [21] HOPKINS G V, COCHRANE S, ONION D, et al. The role of lipids in allergic sensitization: a systematic review [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 832330.
- [22] GILLES S, MARIANI V, BRYCE M, et al. Pollen allergens do not come alone: pollen associated lipid mediators (PALMS) shift the human immune systems towards a T(H) 2-dominated response [J]. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2009, 5(1): 3.
- [23] OTEROS J, BARTUSEL E, ALESSANDRINI F, et al. *Artemisia* pollen is the main vector for airborne endotoxin [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 143(1): 369-377.
- [24] GILLES S, FEKETE A, ZHANG X, et al. Pollen metabolome analysis reveals adenosine as a major regulator of dendritic cell-primed T(H) cell responses [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, 127(2): 454-461.
- [25] WIMMER M, ALESSANDRINI F, GILLES S, et al. Pollen-derived adenosine is a necessary cofactor for ragweed allergy [J]. *Allergy*, 2015, 70(8): 944-954.
- [26] O'GRADY S M, KITA H. ATP functions as a primary alarmin in allergen-induced type 2 immunity [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2023, 325(5): C1369-C1386.
- [27] 卢琪, 吴越, 张启航, 等. 空气污染对花粉症的影响及其机制研究进展 [J]. *环境与职业医学*, 2024, 41(1): 103-109.
- LU Q, WU Y, ZHANG Q H, et al. Research progress on effects of air pollution on pollinosis and its mechanisms [J]. *J Environ Occup Med*, 2024, 41(1): 103-109.
- [28] STAWOSKA I, MYSZKOWSKA D, OLIWA J, et al. Air pollution in the places of *betula pendula* growth and development changes the physicochemical properties and the main allergen content of its pollen [J]. *PLoS One*, 2023, 18(1): e0279826.
- [29] WAYNE P, FOSTER S, CONNOLLY J, et al. Production of allergenic pollen by ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) is increased in CO<sub>2</sub>-enriched atmospheres [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2002, 88(3): 279-282.
- [30] 罗兆莉, 轩冉, 莘琳琳, 等. 特异性脱敏法治疗柳树花粉引起的过敏性鼻炎的实验研究 [J]. *实验动物科学*, 2020, 37(4): 10-14.
- LUO Z L, XUAN R, SHEN L L, et al. Specific desensitization therapy for allergic rhinitis caused by willow pollen [J]. *Lab Anim Sci*, 2020, 37(4): 10-14.
- [31] 赵晶晶, 包海鹰. 香栓菌抑制 NLRP3 炎症小体活化改善过敏性鼻炎 [J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(14): 1711-1715.
- ZHAO J J, BAO H Y. *Trametes suaveolens* fruiting body extract alleviates allergic rhinitis by suppressing of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Chin J Immunol*, 2022, 38(14): 1711-1715.
- [32] TSUNEMATSU M, YAMAJI T, KOZUTSUMI D, et al. Effect of Cry-consensus peptide, a novel recombinant peptide for immunotherapy of Japanese cedar pollinosis, on an experimental allergic rhinitis model in B10. S mice [J]. *Allergol Int*, 2007, 56(4): 465-472.
- [33] HIRAMOTO K, KOBAYASHI H, ORITA K, et al. Inducible nitric oxide synthase plays important roles in allergic reactions of pollinosis in mice sensitized with pollen allergy [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2013, 52(1): 17-21.
- [34] HIRAMOTO K, HASHIMOTO M, ORITA K, et al. Alpha-melanocyte-stimulating hormone plays an important role in the onset of pollinosis in a pollen allergy mouse model [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2010, 153(1): 13-18.
- [35] 周晨昱, 张影, 杨蕾, 等. 黄花蒿花粉过敏小鼠鼻炎模型的优化与稳定性研究 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2022, 42(5): 351-359.
- ZHOU C Y, ZHANG Y, YANG L, et al. Study on optimization and stability of *Artemisia annua* pollen-induced allergic rhinitis model in mice [J]. *Chin J Microbiol Immunol*, 2022, 42(5): 351-359.
- [36] FUKUOKA A, MATSUSHITA K, MORIKAWA T, et al. Diesel exhaust particles exacerbate allergic rhinitis in mice by disrupting the nasal epithelial barrier [J]. *Clin Exp Allergy*, 2016, 46(1): 142-152.

- [37] AKINFENWA O, HUANG H J, LINHART B, et al. Preventive administration of non-allergenic bet v 1 peptides reduces allergic sensitization to major birch pollen allergen, bet v 1 [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 744544.
- [38] ZHANG J, GAO L, YU D, et al. Three *Artemisia pollens* trigger the onset of allergic rhinitis via TLR4/MyD88 signaling pathway [J]. *Mol Biol Rep*, 2024, 51(1): 319.
- [39] PORDEL S, HAGHNAVAZ N, REZAEI M, et al. An epicutaneous therapeutic pollen-allergen extract delivery system in an allergic rhinitis mouse model; based on allergen loading on DC-specific aptamers conjugated nanogolds [J]. *Immunol Res*, 2024, 72(3): 460-475.
- [40] YOSHINO S, MIZUTANI N. Intranasal exposure to monoclonal antibody Fab fragments to Japanese cedar pollen Cry j1 suppresses Japanese cedar pollen-induced allergic rhinitis [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(10): 1629-1638.
- [41] MOUSAVI F, KARDAR G A, POURPAK Z. IgE-mediated allergic responses associated to *Ailanthus altissima* pollen using an animal model [J]. *Allergol Immunopathol*, 2019, 47(3): 272-276.
- [42] AKASAKI S, MATSUSHITA K, KATO Y, et al. Murine allergic rhinitis and nasal Th2 activation are mediated via TSLP- and IL-33-signaling pathways [J]. *Int Immunol*, 2016, 28(2): 65-76.
- [43] OGITA-NAKANISHI H, NABE T, MIZUTANI N, et al. Absence of nasal blockage in a Japanese cedar pollen-induced allergic rhinitis model mouse [J]. *Allergol Int*, 2009, 58(2): 171-178.
- [44] TABYNOV K, BABAYEVA M, NURPEISOV T, et al. Evaluation of a novel adjuvanted vaccine for ultrashort regimen therapy of artemisia pollen-induced allergic bronchial asthma in a mouse model [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 828690.
- [45] NABE T, MIZUTANI N, SHIMIZU K, et al. Development of pollen-induced allergic rhinitis with early and late phase nasal blockage in guinea pigs [J]. *Inflamm Res*, 1998, 47(9): 369-374.
- [46] YAMASAKI M, MIZUTANI N, SASAKI K, et al. Involvement of thromboxane A2 and peptide leukotrienes in early and late phase nasal blockage in a guinea pig model of allergic rhinitis [J]. *Inflamm Res*, 2001, 50(9): 466-473.
- [47] TSUNEMINE S, ISA Y, OHNO H, et al. Longitudinal study of effects of oral dosage of *Bifidobacterium bifidum* G9-1 on Japanese cedar pollen-induced allergic nasal symptoms in guinea pigs [J]. *Microbiol Immunol*, 2015, 59(11): 690-699.
- [48] MIZUTANI N, NABE T, SHIMAZU M, et al. Effect of *Ganoderma lucidum* on pollen-induced biphasic nasal blockage in a guinea pig model of allergic rhinitis [J]. *Phytother Res*, 2012, 26(3): 325-332.
- [49] TINIAKOV R L, TINIAKOVA O P, MCLEOD R L, et al. Canine model of nasal congestion and allergic rhinitis [J]. *J Appl Physiol*, 2003, 94(5): 1821-1828.
- [50] KAMETANI Y, YAMADA Y, TAKABAYASHI S, et al. The response of common marmoset immunity against cedar pollen extract [J]. *Biosci Trends*, 2018, 12(1): 94-101.
- [51] HIMLY M, JAHN-SCHMID B, DEDIC A, et al. Art v 1, the major allergen of mugwort pollen, is a modular glycoprotein with a defensin-like and a hydroxyproline-rich domain [J]. *FASEB J*, 2003, 17(1): 106-108.
- [52] HUANG M, SHAO H, ZHANG X, et al. Comparison of cow's milk allergy models highlighted higher humoral and Th2 immune responses in BALB/c than C3H/HeNcrI mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2024, 184: 114315.
- [53] 宋天园, 肖兰, 王甜, 等. 花粉过敏动物模型的研究进展 [J]. *黑龙江动物繁殖*, 2022, 30(3): 23-31.
- [53] SONG T Y, XIAO L, WANG T, et al. Progress in experimental models on pollen allergenicity [J]. *Heilongjiang J Anim Reprod*, 2022, 30(3): 23-31.
- [54] BYRNE A B, GARCÍA A G, BRAHAMIAN J M, et al. A murine model of dengue virus infection in suckling C57BL/6 and BALB/c mice [J]. *Anim Model Exp Med*, 2021, 4(1): 16-26.
- [55] KINGETSU I, OHNO N, HAYASHI N, et al. Common antigenicity between Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen and Japanese cypress (*Chamaecyparis obtusa*) pollen, I. H-2 complex affects cross responsiveness to Cry j 1 and Cha o 1 at the T- and B-cell level in mice [J]. *Immunology*, 2000, 99(4): 625-629.
- [56] SONE T, DAIRIKI K, MORIKUBO K, et al. Identification of human T cell epitopes in Japanese cypress pollen allergen, Cha o 1, elucidates the intrinsic mechanism of cross-allergenicity between Cha o 1 and Cry j 1, the major allergen of Japanese cedar pollen, at the T cell level [J]. *Clin Exp Allergy*, 2005, 35(5): 664-671.
- [57] DATTA A, MOITRA S, HAZRA I, et al. Specific allergen immunotherapy attenuates allergic airway inflammation in a rat model of *Alstonia scholaris* pollen induced airway allergy [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 30: 111-120.
- [58] KUCHARWICZ I, BODZENTA-LUKASZYK A, BUCZKO W. Experimental asthma in rats [J]. *Pharmacol Rep*, 2008, 60(6): 783-788.
- [59] KALLÓS P, KALLÓS L. Experimental asthma in guinea pigs revisited [J]. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1984, 73(1): 77-85.
- [60] KAR M, BAYAR MULUK N, BAFAQEEH S A, et al.

- Consensus on the methodology for experimental studies in allergic rhinitis [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2019, 121: 68–71.
- [61] LI D, WEI Y, WANG J, et al. Anim models of eosinophilic esophagitis, review and perspectives [J]. *Anim Model Exp Med*, 2024, 7(2): 127–135.
- [62] HELM R M, GAUERKE M B, BAER H, et al. Production and testing of an international reference standard of short ragweed pollen extract [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1984, 73(6): 790–800.
- [63] BASHIR M E H, LUI J H, PALNIVELU R, et al. Pollen lipidomics: lipid profiling exposes a notable diversity in 22 allergenic pollen and potential biomarkers of the allergic immune response [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57566.
- [64] ZHAO L, FU W, GAO B, et al. Variation in IgE binding potencies of seven *Artemisia* species depending on content of major allergens [J]. *Clin Transl Allergy*, 2020, 10(1): 50.
- [65] MANSOURITORGHABEH H, JABBARI-AZAD F, VARASTEHE A, et al. Common solvents for making extraction of allergenic proteins from plants' pollens for prick tests and related factors; a technical review [J]. *Electron Physician*, 2017, 9(5): 4440–4446.
- [66] RADAUER C, BREITENEDER H. Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117(1): 141–147.
- [67] JENSEN-JAROLIM E. Aluminium in allergies and allergen immunotherapy [J]. *World Allergy Organ J*, 2015, 8(1): 7.
- [68] LIN Y J, ZIMMERMANN J, SCHÜLKE S. Novel adjuvants in allergen-specific immunotherapy: where do we stand? [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1348305.
- [69] ZHANG T, HE P, GUO D J, et al. Research progress of aluminum phosphate adjuvants and their action mechanisms [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(6): 15061756.
- [70] XI L, FAN E, ZHAO Y, et al. Role of aluminum adjuvant in producing an allergic rhinitis animal model [J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(3): 5173–5181.
- [71] 高洪娇, 李昕蓉, 刘洋, 等. 精析氢氧化铝在变应性鼻炎动物模型造模中的使用 [J]. *中国医学文摘(耳鼻咽喉科学)*, 2018, 33(4): 323–327.
- GAO H J, LI X R, LIU Y, et al. The application of aluminum hydroxide on animal model of allergic rhinitis [J]. *Chin Med Dig Otorhinolaryngol*, 2018, 33(4): 323–327.
- [72] LIU B, ZHANG L, LIU J, et al. A prophylactic effect of an oligodeoxynucleotide containing a cytidine-guanosine motif against Japanese cedar pollen-induced T-helper type 2 allergic response [J]. *J Asthma*, 2011, 48(9): 974–978.
- [73] SPACOVA I, PETROVA M I, FREMAU A, et al. Intranasal administration of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents birch pollen-induced allergic asthma in a murine model [J]. *Allergy*, 2019, 74(1): 100–110.
- [74] MOTTA A C, DORMANS J A, PELTRE G, et al. Intratracheal instillation of cytoplasmic granules from *Phleum pratense* pollen induces IgE- and cell-mediated responses in the Brown Norway rat [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2004, 135(1): 24–29.
- [75] LEHTO M, WOLFF H, LEINO R, et al. A novel glycocluster molecule prevents timothy-induced allergic airway inflammation in mice [J]. *Allergy*, 2018, 73(8): 1700–1706.
- [76] 蔺林, 严文洪, 赵霞. 氢氧化铝佐剂对变应性鼻炎小鼠模型的影响 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2014, 28(11): 780–784.
- LIN L, YAN W H, ZHAO X. Influence of aluminum hydroxide adjuvant on a murine model of allergic rhinitis [J]. *J Clin Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 2014, 28(11): 780–784.
- [77] NAMIMATSU A, YAMAURA S, GO K, et al. A new method of the measurement of nasal secretion in guinea pigs [J]. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1991, 95(1): 29–34.
- [78] WAGNER J G, HARKEMA J R. Rodent models of allergic rhinitis: relevance to human pathophysiology [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2007, 7(2): 134–140.
- [79] 孟昭影, 赵自刚, 杜会博, 等. 建立特异性皮炎动物模型的方法学进展 [J]. *医学研究杂志*, 2010, 39(4): 124–125, 101.
- MENG Z Y, ZHAO Z G, DU H B, et al. Methodological progress in establishing animal model of atopic dermatitis [J]. *J Med Res*, 2010, 39(4): 124–125, 101.
- [80] SKONER D P. Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 108(1 Suppl): S2–S8.
- [81] NGUYEN T V, PIAO C H, FAN Y J, et al. *Artemisia gmelinii* extract alleviates allergic airway inflammation via balancing TH1/TH2 homeostasis and inhibiting mast cell degranulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23): 15377.
- [82] 黄绮凌, 宋宁, 李东健, 等. 黄芩对小鼠实验性牙周炎血清 IgG1 和 IgG2a 水平影响的研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(1): 171–174.
- HUANG Q L, SONG N, LI D J, et al. Effect of *Scutellaria baicalensis* Georgi on serum levels of IgG1 and IgG2a in mouse model of periodontitis [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2011, 27(1): 171–174.
- [83] HELLINGS P W, CEUPPENS J L. Mouse models of global

- airway allergy: what have we learned and what should we do next? [J]. *Allergy*, 2004, 59(9): 914-919.
- [84] LONDON N R Jr, THARAKAN A, RAMANATHAN M Jr. The role of innate immunity and aeroallergens in chronic rhinosinusitis [J]. *Adv Otorhinolaryngol*, 2016, 79: 69-77.
- [85] NUR HUSNA S M, SHUKRI N M, MOHD ASHARI N S, et al. IL-4/IL-13 axis as therapeutic targets in allergic rhinitis and asthma [J]. *PeerJ*, 2022, 10: e13444.
- [86] 郑少川, 瞿申红, 张少杰, 等. 紧密连接相关蛋白在变应性鼻炎小鼠模型中的表达研究 [J]. *右江民族医学院学报*, 2023, 45(2): 237-241.
- ZHENG S C, QU S H, ZHANG S J, et al. Expression of tight junction proteins in mice with allergic rhinitis [J]. *J Youjiang Med Univ Natl*, 2023, 45(2): 237-241.
- [87] 韩江南, 徐艳红, 姜霞, 等. 腺样体肥大伴变应性鼻炎患儿致敏原谱及腺样体组织中 IL-25 IL-32 EOS 表达分析及诊断价值 [J]. *河北医学*, 2021, 27(9): 1517-1522.
- HAN J N, XU Y H, JIANG X, et al. An analysis of allergen spectrum and expression of IL-25 IL-32 EOS in adenoid tissue in children with adenoid hypertrophy and allergic rhinitis and the diagnostic value [J]. *Hebei Med*, 2021, 27(9): 1517-1522.
- [88] 徐心悦, 景秀丽, 唐华. II 型固有淋巴细胞的研究进展 [J]. *山东第一医科大学(山东省医学科学院)学报*, 2022, 43(9): 666-673.
- XU X Y, JING X L, TANG H. Research progress of type II innate lymphocytes [J]. *J Shandong First Med Univ Shandong Acad Med Sci*, 2022, 43(9): 666-673.
- [89] 张玮, 初晓艺, 王甜, 等. 季节性过敏性鼻炎(SAR)病理机制和防治策略研究进展 [J]. *中国医药导刊*, 2023, 25(9): 891-897.
- ZHANG W, CHU X Y, WANG T, et al. Research progress on pathological mechanism and intervention strategies of seasonal allergic rhinitis(SAR) [J]. *Chin J Med Guide*, 2023, 25(9): 891-897.
- [90] BERNI CANANI R, CAMINATI M, CARUCCI L, et al. Skin, gut, and lung barrier: physiological interface and target of intervention for preventing and treating allergic diseases [J]. *Allergy*, 2024, 79(6): 1485-1500.
- [91] PIAO C H, SONG C H, LEE E J, et al. Saikosaponin A ameliorates nasal inflammation by suppressing IL-6/ROR- $\gamma$ t/STAT3/IL-17/NF- $\kappa$ B pathway in OVA-induced allergic rhinitis [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 315: 108874.
- [92] 白梦天, 李韵, 胡竹林, 不同条件下建立过敏性结膜炎小鼠模型的比较研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(3): 330-337.
- BAI M T, LI Y, HU Z L. Comparison of mouse models of allergic conjunctivitis under different conditions [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(3): 330-337.
- [93] BERGOUGNAN C, DITTLEIN D C, HÜMMER E, et al. Physical and immunological barrier of human primary nasal epithelial cells from non-allergic and allergic donors [J]. *World Allergy Organ J*, 2020, 13(3): 100109.
- [94] XU C, SU W. Hyperforin modulates MAPK/CCL11 signaling to reduce the inflammatory response of nasal mucosal epithelial cells caused by allergic rhinitis by targeting BCL6 [J]. *Exp Ther Med*, 2023, 26(6): 579.

[收稿日期]2024-09-02

李博阳, 兰瑞, 杨慧捷, 等. 生酮饮食在帕金森病领域的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(1): 111-118.  
Li BY, Lan R, Yang HJ, et al. Research progress on the role of a ketogenic diet in Parkinson's disease [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 111-118.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.011

## 生酮饮食在帕金森病领域的研究进展

李博阳<sup>1</sup>, 兰瑞<sup>2,3\*</sup>, 杨慧捷<sup>1</sup>, 李泓宇<sup>1</sup>, 李驰阳<sup>1</sup>, 沈晓明<sup>2,3</sup>

(1.河南中医药大学第一临床医学院, 郑州 450000; 2.河南中医药大学第一附属医院脑病科, 郑州 450000;  
3.河南中医药大学第一附属医院脑病诊疗中心, 郑州 450000)

**【摘要】** 生酮饮食(ketogenic diet, KD)是指一种饮食模式,旨在促进个体达到低卡路里含量、最低碳水化合物摄入量、高脂肪消耗和标准蛋白质水平。生酮饮食在临床实践应用治疗包括心脏病、糖尿病、肥胖、自闭症、胶质母细胞瘤和其他癌症等。然而,除了癫痫,生酮饮食尚未被推荐用于任何神经系统疾病。近年来随着对生酮饮食的深入研究,越来越多证据证明,生酮饮食对帕金森病(Parkinson's disease, PD)具有神经保护作用,是治疗PD的饮食新疗法。本综述详细论述生酮饮食在帕金森病中不同机制的神经保护作用,旨在对本领域的临床和实验研究提供一定的参考。

**【关键词】** 生酮饮食; 帕金森病; 酮体; 神经保护

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0111-08

## Research progress on the role of a ketogenic diet in Parkinson's disease

LI Boyang<sup>1</sup>, LAN Rui<sup>2,3\*</sup>, YANG Huijie<sup>1</sup>, LI Hongyu<sup>1</sup>, LI Chiyang<sup>1</sup>, SHEN Xiaoming<sup>2,3</sup>

(1. the First Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China.  
2. Encephalopathy Department, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000.  
3. Encephalopathy Center, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

**【Abstract】** A ketogenic diet (KD) refers to an eating pattern designed to achieve a low-calorie content, minimum carbohydrate intake, high-fat consumption, and standard protein levels. A ketogenic diet is used in clinical practice to treat conditions including heart disease, diabetes, obesity, autism, glioblastoma, and other cancers. Although a ketogenic diet has not been recommended for any neurological disorders except epilepsy, extensive recent research suggests that such a diet may have a neuroprotective effect and may thus represent a new dietary therapy for the treatment of Parkinson's disease (PD). In this review, we discuss in detail the mechanisms responsible for the neuroprotective effects of a ketogenic diet in Parkinson's disease, with the aim of providing references for future clinical and experimental studies.

**【Keywords】** ketogenic diet; Parkinson's disease; ketone bodies; neuroprotection

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

**【基金项目】** 国家自然科学基金(81973618, 81503422); 河南省中医药科学研究专项课题(2022JDZX090); 河南省自然科学基金(202300410399)。

**【作者简介】** 李博阳(2002—), 男, 在读本科生, 研究方向: 中西医结合神经病学相关临床及实验。E-mail: 16638621228@163.com

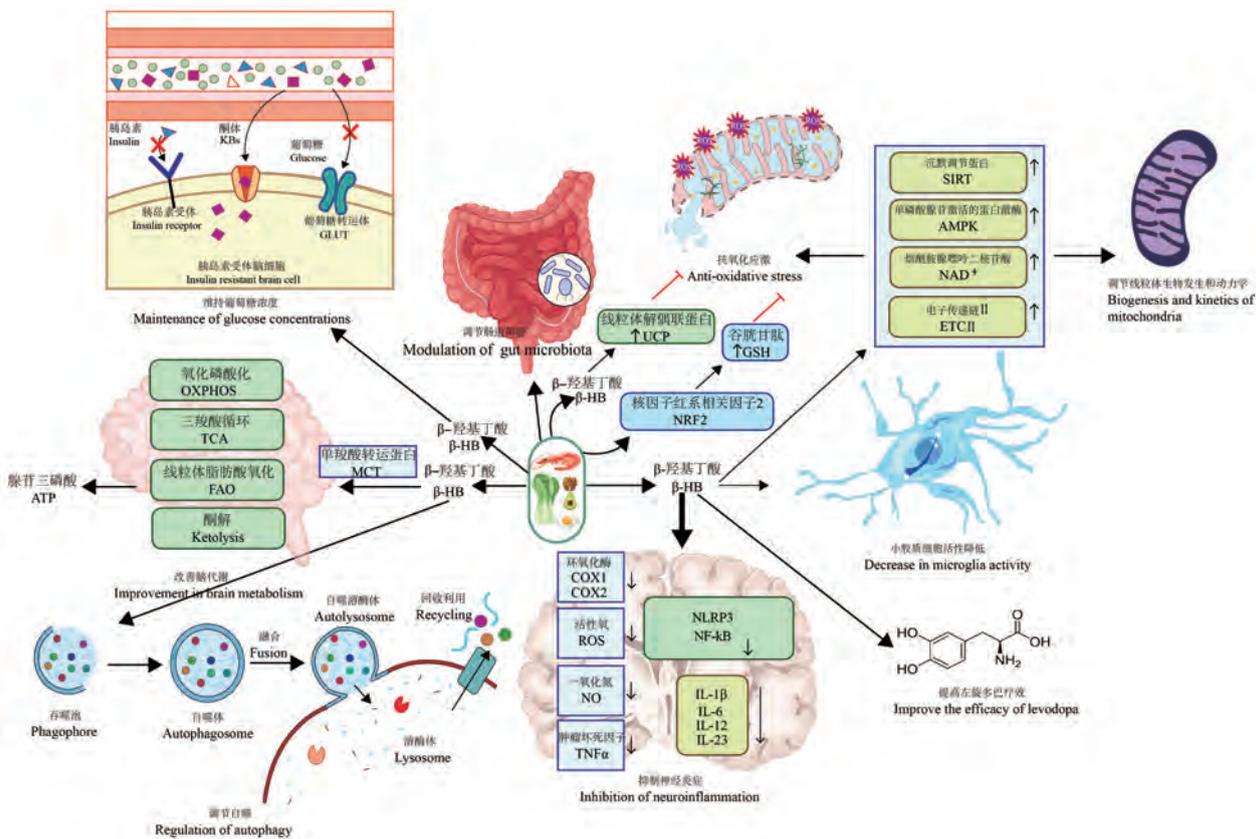
**【通信作者】** 兰瑞(1984—), 女, 博士, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合神经病学相关临床及实验。

E-mail: lanrui2121@163.com

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种以中枢神经系统黑质和其他神经结构中  $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -synuclein,  $\alpha$ -syn)增多为特征的多中心神经退行性疾病。患者多表现为典型的运动症状,如运动迟缓、静息性震颤、肌肉僵直和晚期姿势不稳定。此外,还有广泛的非运动症状,如嗅觉丧失、胃肠道反应(如口干、流口水、吞咽困难、便秘和排便功能障碍)、睡眠障碍、情绪变化、认知障碍和泌尿系统症状(如膀胱反射亢进)<sup>[1]</sup>。目前,关于 PD 发病机制的研究主要集中在  $\alpha$ -syn 的聚集、内质网应激、钙稳态和线粒体功能障碍、神经炎症和遗传等因素,且均在不同程度上与生酮饮食有关。但其确切的病因和病理机制仍有待进一步研究<sup>[2]</sup>,因此本文综述了生酮饮食在帕金森病神经保护领域的现有证据(图 1),从而为本领域的临床和基础研究提供一定的参考。

### 1 生酮饮食的概述

生酮饮食(ketogenic diet, KD)指一种饮食模式,旨在促进个体达到生酮状态,特点包括低卡路里含量、最低碳水化合物摄入量、高脂肪消耗和标准蛋白质水平<sup>[3]</sup>。从生理学上来看,该疗法通过极低碳水化合物饮食限制葡萄糖供应,促使代谢从利用葡萄糖作为主要燃料转向脂肪酸,导致脂肪酸分解产生酮体(ketone bodies, KBs)、 $\beta$ -羟基丁酸( $\beta$ -hydroxybutyric,  $\beta$ -HB)和乙酰乙酸(acetoacetate, AcAc)。此过程中,身体维持正常葡萄糖水平,并通过糖异生途径从氨基酸或甘油合成葡萄糖,使身体进入酮症状态<sup>[4]</sup>。越来越多的证据表明 KD 可通过多种机制对 PD 发挥神经保护作用,包括抑制神经炎症、抗氧化应激、调节肠道菌群、提高左旋多巴疗效、改善线粒体功能、改善脑代谢、维持葡萄糖浓度、调节自噬等。



注: ↑:促进; ↓:抑制。

图 1 KD 在 PD 中神经保护的作用机制

Note. ↑, Promote. ↓, Inhibition.

Figure 1 Mechanisma of neuroprotection by the KD in PD

## 2 KD 治疗 PD 的理论支持

针对 PD 的发病机制, KD 通过神经、体液和免疫调节协调各种细胞从而减少神经元的损伤、功能障碍和死亡, 有强大的神经保护作用。PD 神经元死亡和脑损伤增加可导致糖代谢降低和线粒体功能障碍, 与此同时肝源性血酮体通过位于微血管内皮细胞和星形胶质细胞的血脑屏障上的单羧酸转运蛋白 (monocarboxylate transporter, MCT) 介导的扩散, 穿过血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 到达大脑。在脑神经元线粒体内, 由肝和星形胶质细胞提供的  $\beta$ -HB 通过脑线粒体 3-羟丁酸脱氢酶抗体 (anti-bdh1 antibody, BDH1) 氧化为 AcAc。随后, AcAc 通过 3-氧酸辅酶 a 转移酶 1 基因 (3-oxoacid coa-transferase, Oxt1) 的产物琥珀酰辅酶 a 转移酶 (3-oxoacid coa-transferase, SCOT) 转化为 AcAc-Coa。ACAT1 催化 AcAc-Coa 生成两个乙酰辅酶 A (acetyl coenzyme A, Acetyl-CoA) 通过电子传递链 (electron transfer chain, ETC) 进入三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle, TCA) 产生三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP)<sup>[1]</sup>。KD 的另一个生化特征是糖酵解通量与能量值的降低。氧化应激在 PD 的病理生理中起着至关重要的作用, 而 KD 减少糖酵解通量作为热量限制的一个基本特征已被证明可以通过改善线粒体功能、抗氧化应激和抑制神经炎症等途径发挥神经保护作用。这表明 KD 的神经保护作用与糖酵解抑制和酮体形成、浓度增加引起的体内变化有关。综上所述, KD 通过多种途径协调各种细胞减少神经元的损伤、功能障碍和死亡, 有强大的神经保护作用, 并且这种作用与糖酵解抑制和酮体形成、浓度增加有关。因此, KD 是影响 PD 治疗效果的关键因素<sup>[2]</sup>。

## 3 KD 在 PD 中神经保护的作用机制

### 3.1 调节肠道菌群

肠道菌群 (gut microbiota) 是定居在人类胃肠道中的各种微生物群落, 包括细菌、真菌、古生菌、病毒和原生动物, 受环境和营养行为的影响<sup>[5]</sup>。肠道菌群与大脑之间存在一种双向交流系统, 即“脑-肠轴”。许多研究表明, 肠道菌群失

调与 PD 密切相关<sup>[6]</sup>。健康的肠道维持共生菌和致病菌的正平衡, 并保持完整的上皮屏障<sup>[2,5]</sup>, 这些过程与短链脂肪酸 (short chain fatty acids, SCFA) 有关<sup>[7]</sup>。肠道菌群的任何紊乱都可能导致生态失调, 减少 SCFA 和神经递质的产生, 提高脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 水平, 最终影响肠道和中枢神经系统的双向通讯<sup>[6]</sup>。研究人员为了解无微生物环境对大脑发育的影响, 对无菌小鼠进行研究。结果显示, 无菌小鼠在大脑结构上存在缺陷, 并表现出异常的心理发育, 包括社会认知行为受损、运动增加和焦虑行为减少。HILLESTAD 等<sup>[8]</sup>研究显示, 在无特定病原体小鼠中口服抗生素会改变肠道菌群的组成, 并影响海马中脑源性神经营养因子的表达。肠道菌群的异常改变会导致多种全身性炎症因子的产生, 增加肠道中  $\alpha$ -syn 错误折叠沉积, 并通过迷走神经传输到大脑造成病理损伤。

KD 通过改变肠道菌群代谢物转基因成分和转基因衍生代谢物来影响 PD<sup>[7]</sup>。有研究对 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6 四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine, MPTP) 诱导的 PD 模型小鼠灌胃 KD 8 周以评估运动和多巴胺能神经元功能。结果显示, KD 显著降低了肠道菌群群落丰富度和  $\alpha$  多样性 (减少了枸橼酸杆菌, 脱硫菌和瘤胃球菌, 并增加了纽约杜博西氏菌), 同时调节组胺、n-乙酰腐胺、d-天冬氨酸等代谢产物来减轻 MPTP 诱导的 PD 模型雄性小鼠的运动功能障碍和多巴胺能神经元损伤。因此, KD 可以通过改变肠道菌群组成和代谢物来发挥对 PD 的神经保护作用<sup>[8]</sup>。

### 3.2 改善脑代谢

与葡萄糖的运输方式不同, 酮体通过 MCT 进入大脑, 其摄取不受神经元活动影响, 而受循环中酮体浓度的调节。MCT 是目前已知的唯一酮体转运体, 在整个大脑中广泛分布<sup>[9]</sup>。KD 能够上调生物能量途径<sup>[10]</sup>: (1) 氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 体系 (琥珀酸脱氢酶、细胞色素 c 氧化酶等); (2) TCA (柠檬酸合成酶、异柠檬酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶); (3) 线粒体脂肪酸氧化 (fatty acid oxidation, FAO) (肉碱棕榈酰基转移酶、中链酰基辅酶  $\alpha$  脱氢酶、长链酰基辅酶  $\alpha$  脱氢酶、超长链酰基辅酶  $\alpha$  脱氢酶和  $\beta$ -羟

基酰基辅酶  $\alpha$  脱氢酶);(4) 酮解 ( $\beta$ -羟基丁酸脱氢酶)。在神经元环境中,中链脂肪酸型生酮饮食 (medium chain triglyceride-ketogenic diet, MCT-KD) (即十一酸或癸酸) 刺激星形胶质细胞-神经元-乳酸穿梭<sup>[11]</sup>。后者在星形胶质细胞中介导神经元乳酸进口,以驱动丙酮酸的生成,用于生成线粒体 ATP<sup>[12]</sup>。而且, MCT-KD 可显著减少 MPTP 诱导的多巴胺能神经元损伤<sup>[13]</sup>。另外,  $\beta$ -HB 和 AcAc 进入大脑会被转化为 Acetyl-CoA, Acetyl-CoA 进入 TCA 生成 ATP。这种转化发生在线粒体内,  $\beta$ -HB 通过  $\beta$ -羟基丁酸脱氢酶并在烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD<sup>+</sup>) 的作用下可逆转化为 AcAc, 随后形成还原型辅酶 I (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)。AcAc 则通过琥珀酰辅酶 A 转移酶 (succinyl-CoA transferase, SCOT) 分解为乙酰乙酰辅酶 A (acetoacetyl coenzyme A, Acetoacetyl-CoA)<sup>[14]</sup>。  $\beta$ -HB 也被证明可以抑制小胶质细胞的激活,这是脑部病理的一个标志<sup>[15]</sup>。综上所述, KD 可以上调氧化磷酸化、TCA、线粒体脂肪酸氧化、酮解等途径产生 ATP 改善大脑代谢,从而发挥神经保护作用。

### 3.3 抗氧化应激

细胞呼吸过程中产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 过度积累导致氧化剂和抗氧化剂失衡被称为氧化应激。从机制上看, KD 通过增加解耦联蛋白 (uncoupling protein, UCP) 的表达和活性来减少 ROS 的产生<sup>[16]</sup>。SULLIVAN 等<sup>[17]</sup> 研究表明相较于标准饮食的小鼠,接受 KD 饮食的小鼠生成较少的 ROS。同时, UCP 2、4 和 5 的水平上升,导致最大线粒体呼吸速率增加。HASAN-OLIVE 等<sup>[18]</sup> 发现,患有尿嘧啶-DNA-糖酵素 1 酶突变引起线粒体毒性的小鼠,在接受 KD 饮食后,  $\beta$ -HB 可以上调过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  共激活因子 1 $\alpha$ -沉默调节蛋白 3-解耦联蛋白 2 轴 (peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ -silent information regulators 3-uncoupling protein 2, PGC1 $\alpha$ -SIRT3-UCP2), 导致海马 CA1 神经元中 UCP2 水平上升。因此, KD 可以增加 UCP 的表达和活性使 ROS 保持平衡而发挥神经保护作用。

此外, GSH 是一种存在于几乎所有细胞中的

三肽硫醇,能够参与氧化还原反应,作为酶辅助因子,并且具有抗氧化应激的作用。GSH 的水平通过上调核因子红系相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2 related factor 2, NRF2) 转录因子得到提高。NRF2 是细胞应激的主要反应因子,大鼠实验已经证实其能够促进 GSH 的生物合成。而 NRF2 的上调与 KD 诱导的轻度氧化和亲电应激有关,这些应激导致细胞慢性适应,诱导保护蛋白的产生,并改善氧化还原状态。一项研究利用磁共振波谱评估接受 KD 辅助治疗的患者脑 GSH 水平,结果显示 KD 促进 GSH 的新生合成并改善大脑的氧化还原状态<sup>[2]</sup>。还有研究在 PD 大鼠模型中检测到 KD 通过增加纹状体 GSH 的水平保护黑质多巴胺能神经元免受 6-羟多巴胺 (6-hydroxydopamine hydrobromide, 6-OHDA) 的神经毒性。GSH 在体内和体外都能与 6-OHDA 发生反应,一方面通过对 6-OHDA 的亲核攻击形成 2-S (谷胱甘肽基)-6-OHDA,另一方面作为巯基抗氧化剂显著减少 6-OHDA 的自氧化来发挥保护作用<sup>[19]</sup>。这表明 KD 可以通过诱导轻度氧化和亲电应激上调 NRF2 从而提高 GSH 的水平来发挥神经保护作用。

### 3.4 抑制神经炎症

神经炎症与小胶质细胞的激活以及炎症因子如肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor, TNF $\alpha$ )、白细胞介素 (interleukin, IL) (IL-1 $\beta$ 、IL-6) 和自由基释放的增加密切相关,可导致脑内进行性功能障碍或细胞死亡。小胶质细胞在中枢神经系统中具有促炎、抗炎双重作用 (促炎 M1 表型和抗炎 M2 表型)。M1 型小胶质细胞通过核因子- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B) 以及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription, STAT3) 信号通路被激活,产生炎症因子,如 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12、IL-23、环氧化酶 (cyclooxygenase, COX) (COX-1、COX-2)、ROS 和一氧化氮 (NO)。相反, M2 型小胶质细胞被激活后会释放神经营养因子,如 IL-4、IL-10、IL-13 和转化生长因子<sup>[20]</sup>。在 PD 动物模型中, KD 通过降低小胶质细胞的激活程度和炎症因子的表达,减轻中枢神经系统的炎症<sup>[21]</sup>。实验研究表明,  $\beta$ -HB 通过阻断 K<sup>+</sup> 外排、减少与凋亡相关的含 caspase 募集结构域 (caspase recruitment domain,

CARD) 的斑点样蛋白的寡聚化和斑点形成,抑制核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 炎性小体 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 的激活从而减少 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的产生<sup>[22]</sup>。由此可见, KD 可以降低 M1 型小胶质细胞的激活程度和炎症因子的表达,从而抑制神经炎症发挥神经保护作用。

### 3.5 维持葡萄糖浓度

在 KD 期间,脂肪细胞中的游离脂肪酸被运输到肝,从而促进酮体合成的过程受低胰岛素水平的调控<sup>[16]</sup>。低水平胰岛素通过增强关键酶(如激素敏感脂肪酶和脂肪甘油三酯脂肪酶)的活性来诱导脂肪分解,并将游离脂肪酸 (free fatty acids, FFAs) 释放到血液中。FFAs 经酶转化为脂肪酰基辅酶 A, 随后通过肉毒碱棕榈酰转移酶转运至肝细胞线粒体<sup>[23]</sup>。在肝线粒体基质中,由于  $\beta$  氧化而增加的 Acetyl-CoA 水平远远超出了 TCA 的代谢能力,因此 TCA 随后启动生酮<sup>[24]</sup>。Acetyl-CoA 通过巯基酶、3-羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 2 和 3-羟甲基戊二酰辅酶 A 裂解酶分解成 AcAc<sup>[25]</sup>。AcAc 经由  $\beta$ -羟基丁酸脱氢酶还原为  $\beta$ -HB, 最后,  $\beta$ -HB 和 AcAc 均通过 MCT 传递至血液或靶器官。在大脑中,葡萄糖通过内皮细胞表达的 55 kDa 葡萄糖转运蛋白异构体 (glucose transporters, GLUT) 1, 星形胶质细胞表达的 45 kDa GLUT1 和神经元表达的 GLUT3, 3 种 GLUT 进行转运从而发挥一系列功能,如其他化合物的生物合成,包括丙氨酸和谷氨酸、糖的生成以及抗氧化保护等。有研究发现,与对照组相比,处于酮症状态的大鼠内皮细胞和神经细胞中的 GLUT1 水平较高<sup>[26]</sup>。综上所述, KD 可以通过一系列的循环保留维持葡萄糖浓度进行生物合成和抗氧化等过程从而发挥神经保护作用。

### 3.6 改善线粒体功能

PD 的主要病理机制是由于 ETC 复合物 I 的缺陷而产生兴奋性毒性导致细胞死亡<sup>[27]</sup>。而 KBs 通过增强 ETC 复合物 II 的活性有助于规避这种缺陷,并促使氧化磷酸化的进行<sup>[28]</sup>。这一观点在体外分离的小鼠脑线粒体中得到验证<sup>[29]</sup>。研究表明,  $\beta$ -HB 改善 1-甲基-4-苯基吡啶和鱼藤酮对氧消耗和 ATP 产生的影响分别被复合物 II 和 III 的抑制剂如 3-硝基丙酸和抗霉素 A 所阻

断。另外, KBs 分解代谢增加 NADH 氧化<sup>[21]</sup>。升高的 NAD<sup>+</sup> 作为细胞信号传导过程中 NAD<sup>+</sup> 依赖性酶的辅助因子,能够刺激线粒体的生物发生和呼吸<sup>[30]</sup>。 $\beta$ -HB 还可以通过激活单磷酸腺苷激活的蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK) 和沉默调节蛋白 (silent information regulators, SIRT) 而影响过氧化物酶体增植物激活受体  $\gamma$  共激活因子-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ ) 的活性<sup>[31]</sup>,从而调节线粒体动力学、生物发生和氧化磷酸化<sup>[32]</sup>。因此, KD 可以通过增强 ETC 复合物 II 的活性、增加 NADH 氧化、激活 AMPK 和 SIRT 来改善线粒体功能从而发挥神经保护作用。

### 3.7 调节自噬

自噬是由溶酶体介导的,降解和消除细胞内源性成分(错误折叠或聚集的蛋白质和受损的细胞器)和外源性刺激(细菌、病毒和寄生虫)的细胞过程<sup>[33]</sup>。根据运送的不同方式,自噬可分为 3 种主要类型:巨噬、微自噬和伴随介导的自噬<sup>[34]</sup>。自噬限制炎症的病理过程,减轻炎症因子的危害,发挥神经保护作用<sup>[35]</sup>,与 PD 的发生和进展密切相关<sup>[36]</sup>。KD 可通过抑制雷帕霉素复合物 1 (mechanistic target of rapamycin complex 1, mTORC1) 的机制靶点以及 SIRT1 和缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 的激活,从而上调脑内巨噬细胞<sup>[37]</sup>。 $\beta$ -HB 在葡萄糖剥夺过程刺激自噬,提高皮层神经元的存活率<sup>[38]</sup>,有助于缓解 PD 中自噬介导的炎症反应。此外,  $\beta$ -HB 通过增加蛋白质氧化直接促进 CMA 的活化,最终导致氧化损伤蛋白的清除。 $\beta$ -HB 还可减轻大鼠纹状体中 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartic acid, NMDA) 诱导的自噬降解,改善神经元损伤<sup>[39]</sup>。转录因子 EB (transcription factor EB, TFEB) 是溶酶体生物发生的关键调节因子, KD 通过 TFEB 增强自噬<sup>[32]</sup>。虽然 TFEB 调控的机制尚不清楚,但已提出类视黄酮 X 受体  $\alpha$  (retinoid X receptor  $\alpha$ , RXR $\alpha$ )、过氧化物酶体增植物激活受体  $\alpha$  (peroxisome proliferators-activated receptor  $\alpha$ , PPAR $\alpha$ ) 和过氧化物酶体增殖受体  $\gamma$  辅激活因子  $\alpha$  (peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ , PGC1 $\alpha$ ) 募集到 TFEB 基

因启动子的 PPAR 结合位点可上调脑细胞中的 TFEB<sup>[40]</sup>。综上所述, KD 可以通过抑制 mTORC1 的机制靶点以及 SIRT1 和 HIF-1 $\alpha$  的激活, 增加蛋白质氧化、减轻大鼠纹状体中 NMDA 诱导的自噬降解、通过 TFEB 增强自噬从而发挥神经保护的作用。

### 3.8 提高左旋多巴疗效

目前治疗 PD 的主要药物是左旋多巴<sup>[41]</sup>。与外周多巴胺不同, 左旋多巴可通过 BBB 中的转运蛋白到达大脑转化为多巴胺<sup>[42]</sup>。左旋多巴的副作用与疾病早期的多巴胺受体脱敏和多巴胺能细胞死亡(表现为不可预测的波动和长时间的磨损现象即非相位, 包括下一次剂量前的僵硬、不动和震颤)以及疾病晚期儿茶酚 o-甲基转移酶(catechol o-methyltransferase, COMT)介导的左旋多巴代谢(其特征是肢体不自主的舞蹈和张力障碍运动)有关。左旋多巴通过代谢产物 5-s-半胱氨酸多巴胺(5-s-cysteine dopamine, 5-S-Cys-DA)促使  $\alpha$ -syn 聚集, 从而诱导体内氧化应激和增加多巴胺的消耗<sup>[43]</sup>。KD 通过减少摄入膳食蛋白显著提高左旋多巴的生物利用度。另外, KD 对许多残疾、对左旋多巴反应较差的非运动症状有更显著的改善效果。KD 在帕金森病治疗中与左旋多巴相辅相成<sup>[44]</sup>, 然而 KD 对运动症状的影响需要更多的研究来验证<sup>[45]</sup>。由此可见, KD 在提高左旋多巴的生物利用度, 控制副作用方面具有广阔的治疗空间。

此外, 还有神经元髓鞘的重建、通过作用于电压依赖性 Ca<sup>2+</sup> 通道减少兴奋性突触后电流等机制。长期使用 KD 可能会面临包括恶心、呕吐、便秘和食欲下降等症状, 进一步的研究将有助于更深入地了解<sup>[46-47]</sup>。

## 4 展望

KD 作为一种新兴的饮食模式, 近年来广泛被年轻人接受。已有研究发现 KD 可通过多种机制对 PD 发挥神经保护作用, 包括抑制神经炎症、抗氧化应激、调节肠道菌群、改善线粒体功能、改善大脑代谢、维持葡萄糖浓度、调节自噬等, 但长期使用 KD 饮食具有低血糖、血脂异常、胃肠道症状、骨病、肾结石和生长衰竭等副作用, 要注意患者对饮食建议的依从性问题, 尽早控制具有很好

的效果。目前关于 KD 的研究具有一定的局限性, 如现有 KD 对 PD 神经保护作用的实验研究并不全面, 涉及的观察指标和通路比较单一, 且大多数实验研究仅停留在验证 KD 是否具有神经保护效果, 没有深入至分子层面。总之, KD 干预在治疗 PD 中极具潜力, 其在 PD 中的神经保护作用值得进一步探索和研究。下一步应以临床与基础相结合为导向, 通过更严谨的临床和基础实验, 探索 KD 的治疗靶点以及对患者症状、病程和总体健康的长期预后的影响, 为治疗 PD 寻找新的途径和治疗手段。

### 参考文献:

- [1] JANG J, KIM S R, LEE J E, et al. Molecular mechanisms of neuroprotection by ketone bodies and ketogenic diet in cerebral ischemia and neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 25(1): 124.
- [2] NAPOLITANO A, LONGO D, LUCIGNANI M, et al. The ketogenic diet increases *in vivo* glutathione levels in patients with epilepsy [J]. *Metabolites*, 2020, 10(12): 504.
- [3] MAZANDARANI M, LASHKARBOLOUK N, EJTAHED H S, et al. Does the ketogenic diet improve neurological disorders by influencing gut microbiota? A systematic review [J]. *Nutr J*, 2023, 22(1): 61.
- [4] GUBERT C, KONG G, RENOIR T, et al. Exercise, diet and stress as modulators of gut microbiota: implications for neurodegenerative diseases [J]. *Neurobiol Dis*, 2020, 134: 104621.
- [5] JIANG Z, WANG X, ZHANG H, et al. Ketogenic diet protects MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease via altering gut microbiota and metabolites [J]. *MedComm*, 2023, 4(3): e268.
- [6] KLANN E M, DISSANAYAKE U, GURRALA A, et al. The gut-brain axis and its relation to Parkinson's disease: a review [J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 782082.
- [7] DUNN E, ZHANG B, SAHOTA V K, et al. Potential benefits of medium chain fatty acids in aging and neurodegenerative disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2023, 15: 1230467.
- [8] HILLESTAD E M R, VAN DER MEEREN A, NAGARAJA B H, et al. Gut bless you: The microbiota-gut-brain axis in irritable bowel syndrome [J]. *World J Gastroenterol*, 2022, 28(4): 412-431.
- [9] JENSEN N J, WODSCHOW H Z, NILSSON M, et al. Effects of ketone bodies on brain metabolism and function in neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8767.

- [10] MILLER V J, VILLAMENA F A, VOLEK J S. Nutritional ketosis and mitohormesis: potential implications for mitochondrial function and human health [J]. *J Nutr Metab*, 2018, 2018: 5157645.
- [11] AUGUSTIN K, KHABBUSH A, WILLIAMS S, et al. Mechanisms of action for the medium-chain triglyceride ketogenic diet in neurological and metabolic disorders [J]. *Lancet Neurol*, 2018, 17(1): 84–93.
- [12] MAGISTRETTI P J, ALLAMAN I. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2018, 19(4): 235–249.
- [13] ZHANG W, CHEN S, HUANG X, et al. Neuroprotective effect of a medium-chain triglyceride ketogenic diet on MPTP-induced Parkinson's disease mice: a combination of transcriptomics and metabolomics in the substantia nigra and fecal microbiome [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 251.
- [14] GHOSH S, CASTILLO E, FRIAS E S, et al. Bioenergetic regulation of microglia [J]. *Glia*, 2018, 66(6): 1200–1212.
- [15] QU C, KEIJER J, ADJOBHO-HERMANS M J W, et al. The ketogenic diet as a therapeutic intervention strategy in mitochondrial disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2021, 138: 106050.
- [16] MAJRASHI M, ALTUKRI M, RAMESH S, et al.  $\beta$ -hydroxybutyric acid attenuates oxidative stress and improves markers of mitochondrial function in the HT-22 hippocampal cell line [J]. *J Integr Neurosci*, 2021, 20(2): 321–329.
- [17] SULLIVAN P G, RIPPY N A, DORENBOS K, et al. The ketogenic diet increases mitochondrial uncoupling protein levels and activity [J]. *Ann Neurol*, 2004, 55(4): 576–580.
- [18] HASAN-OLIVE M M, LAURITZEN K H, ALI M, et al. A ketogenic diet improves mitochondrial biogenesis and bioenergetics via the PGC1 $\alpha$ -SIRT3-UCP2 axis [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(1): 22–37.
- [19] ISIK S, YEMAN KIYAK B, AKBAYIR R, et al. Microglia mediated neuroinflammation in Parkinson's disease [J]. *Cells*, 2023, 12(7): 1012.
- [20] MORRIS G, MAES M, BERK M, et al. Nutritional ketosis as an intervention to relieve astrogliosis: possible therapeutic applications in the treatment of neurodegenerative and neuroprogressive disorders [J]. *Eur Psychiatry*, 2020, 63(1): e8.
- [21] RUIZ-POZO V A, TAMAYO-TRUJILLO R, CADENA-ULLAURI S, et al. The molecular mechanisms of the relationship between insulin resistance and Parkinson's disease pathogenesis [J]. *Nutrients*, 2023, 15(16): 3585.
- [22] CHENG B, YANG X, AN L, et al. Ketogenic diet protects dopaminergic neurons against 6-OHDA neurotoxicity via up-regulating glutathione in a rat model of Parkinson's disease [J]. *Brain Res*, 2009, 1286: 25–31.
- [23] MUYYARIKKANDY M S, MCLEOD M, MAGUIRE M, et al. Branched chain amino acids and carbohydrate restriction exacerbate ketogenesis and hepatic mitochondrial oxidative dysfunction during NAFLD [J]. *FASEB J*, 2020, 34(11): 14832–14849.
- [24] HWANG C Y, CHOE W, YOON K S, et al. Molecular mechanisms for ketone body metabolism, signaling functions, and therapeutic potential in cancer [J]. *Nutrients*, 2022, 14(22): 4932.
- [25] GAO L, CAO M, DU G H, et al. Huangqin decoction exerts beneficial effects on rotenone-induced rat model of Parkinson's disease by improving mitochondrial dysfunction and alleviating metabolic abnormality of mitochondria [J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 911924.
- [26] THICKBROOM G W. The therapeutic potential of ketone bodies in Parkinson's disease [J]. *Expert Rev Neurother*, 2021, 21(3): 255–257.
- [27] GARCÍA-VELÁZQUEZ L, MASSIEU L. The proteomic effects of ketone bodies: implications for proteostasis and brain proteinopathies [J]. *Front Mol Neurosci*, 2023, 16: 1214092.
- [28] ELAMIN M, RUSKIN D N, SACCHETTI P, et al. A unifying mechanism of ketogenic diet action: The multiple roles of nicotinamide adenine dinucleotide [J]. *Epilepsy Res*, 2020, 167: 106469.
- [29] LI J L, LIN T Y, CHEN P L, et al. Mitochondrial function and Parkinson's disease: from the perspective of the electron transport chain [J]. *Front Mol Neurosci*, 2021, 14: 797833.
- [30] CANTÓ C, AUWERX J. PGC-1 $\alpha$ , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2009, 20(2): 98–105.
- [31] GÓMORA-GARCÍA J C, MONTIEL T, HÜTTENRAUCH M, et al. Effect of the ketone body, D- $\beta$ -hydroxybutyrate, on Sirtuin2-mediated regulation of mitochondrial quality control and the autophagy-lysosomal pathway [J]. *Cells*, 2023, 12(3): 486.
- [32] JIANG Z, YIN X, WANG M, et al. Effects of ketogenic diet on neuroinflammation in neurodegenerative diseases [J]. *Aging Dis*, 2022, 13(4): 1146–1165.
- [33] BOURDENX M, MARTÍN-SEGURA A, SCRIVO A, et al. Chaperone-mediated autophagy prevents collapse of the neuronal metastable proteome [J]. *Cell*, 2021, 184(10): 2696–2714.
- [34] ÜNAL İ, CANSIZ D, BELER M, et al. Sodium-dependent glucose co-transporter-2 inhibitor empagliflozin exerts

- neuroprotective effects in rotenone-induced Parkinson's disease model in zebrafish; mechanism involving ketogenesis and autophagy [J]. *Brain Res*, 2023, 1820: 148536.
- [35] LIZAMA B N, CHU C T. Neuronal autophagy and mitophagy in Parkinson's disease [J]. *Mol Aspects Med*, 2021, 82: 100972.
- [36] LOOS B, KLIONSKY D J, WONG E. Augmenting brain metabolism to increase macro- and chaperone-mediated autophagy for decreasing neuronal proteotoxicity and aging [J]. *Prog Neurobiol*, 2017, 156: 90–106.
- [37] NOWELL J, BLUNT E, GUPTA D, et al. Antidiabetic agents as a novel treatment for Alzheimer's and Parkinson's disease [J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 89: 101979.
- [38] MONTIEL T, MONTES-ORTEGA L A, FLORES-YÁÑEZ S, et al. Treatment with the ketone body D-β-hydroxybutyrate attenuates autophagy activated by NMDA and reduces excitotoxic neuronal damage in the rat Striatum *in vivo* [J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(12): 1377–1387.
- [39] GHOSH A, JANA M, MODI K, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor α induces lysosomal biogenesis in brain cells: implications for lysosomal storage disorders [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(16): 10309–10324.
- [40] CAPUTI V, GIRON M C. Microbiome-gut-brain axis and toll-like receptors in Parkinson's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1689.
- [41] KAHANA M, WEIZMAN A, GABAY M, et al. Liposome-based targeting of dopamine to the brain: a novel approach for the treatment of Parkinson's disease [J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(6): 2626–2632.
- [42] BOELENS KEUN J T, ARNOLDUSSEN I A, VRIEND C, et al. Dietary approaches to improve efficacy and control side effects of levodopa therapy in Parkinson's disease: a systematic review [J]. *Adv Nutr*, 2021, 12(6): 2265–2287.
- [43] PHILLIPS M C L, MURTAGH D K J, GILBERTSON L J, et al. Low-fat versus ketogenic diet in Parkinson's disease: a pilot randomized controlled trial [J]. *Mov Disord*, 2018, 33(8): 1306–1314.
- [44] KNIGHT E, GEETHA T, BURNETT D, et al. The role of diet and dietary patterns in Parkinson's disease [J]. *Nutrients*, 2022, 14(21): 4472.
- [45] DYŃKA D, KOWALCZE K, PAZIEWSKA A. The role of ketogenic diet in the treatment of neurological diseases [J]. *Nutrients*, 2022, 14(23): 5003.
- [46] O'NEILL B, RAGGI P. The ketogenic diet: pros and cons [J]. *Atherosclerosis*, 2020, 292: 119–126.
- [47] MAMELAK M. Parkinson's disease, the dopaminergic neuron and gamma-hydroxybutyrate [J]. *Neurol Ther*, 2018, 7(1): 5–11.

〔收稿日期〕2024-07-01

范爱雪,柳美兰. 线粒体损伤对于心肌细胞的影响最新研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(1): 119-126.  
Fan AX, Liu ML. Recent research on the effects of mitochondrial damage on cardiomyocytes [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 119-126.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.012

# 线粒体损伤对于心肌细胞的影响最新研究进展

范爱雪,柳美兰\*

(延边大学附属医院(延边医院)心血管内科,吉林 延吉 133000)

**【摘要】** 线粒体作为心肌细胞的主要能量供应站,在维持心脏正常运作中占据核心地位。线粒体自噬在维持心肌细胞稳态与应对应激方面扮演着极其重要的正面角色。随着心血管疾病的逐渐加剧,线粒体自噬的平衡状态正受到一系列尚未明确病理机制的显著挑战,导致线粒体受损,进而可能引发心肌细胞的损伤。此外,当线粒体自噬的功能无法满足机体的生理需求时,可能会触发线粒体功能障碍,进而加速心力衰竭的进程。本综述将探讨线粒体自噬及线粒体动力学在心脏中的具体作用方式,并结合主要心血管疾病探讨其机制,聚焦该领域最新的科研进展与重要发现。

**【关键词】** 心肌细胞;心血管疾病;线粒体自噬

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0119-08

## Recent research on the effects of mitochondrial damage on cardiomyocytes

FAN Aixue, LIU Meilan\*

(Department of Cardiovascular Medicine, Affiliated Hospital of Yanbian University  
(Yanbian Hospital), Yanji 133000, China)

**【Abstract】** Mitochondria act as the main energy supply station for cardiomyocytes and are thus crucial for maintaining normal cardiac function. Mitochondrial autophagy plays an important positive role in maintaining cardiomyocyte homeostasis and coping with stress. The progressive exacerbation of cardiovascular diseases presents a challenge to the homeostasis of mitochondrial autophagy through as-yet-unidentified pathological mechanisms, leading to mitochondrial damage, which may in turn trigger damage to cardiomyocytes. In addition, when mitochondrial autophagy fails to meet the physiological needs of the body, mitochondrial dysfunction may be triggered, which may in turn accelerate the progression of heart failure. In this review, we explore the specific roles of mitochondrial autophagy and mitochondrial dynamics in the heart, and discuss the mechanisms in the context of major cardiovascular diseases, focusing on the latest advances and important discoveries in this field.

**【Keywords】** cardiomyocytes; cardiovascular disease; mitochondrial autophagy

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

**【基金项目】** 国家自然科学基金(8196020325)。

**【作者简介】** 范爱雪(1995—),女,在读硕士研究生,研究方向:冠心病缺血再灌注损伤及保护机制。E-mail:fan9533@163.com

**【通信作者】** 柳美兰(1980—),女,医学博士,副主任医师,硕士生导师,研究方向:干细胞治疗心梗、心衰及再生医学相关课题。  
E-mail:lan73180@163.com

线粒体作为细胞生命活动的动力源泉与调控细胞命运及功能的关键信号中心,其形态结构、大小及功能状态均至关重要。各类应激条件一旦对线粒体造成损伤,便会引发线粒体蛋白的泄露,进而威胁到细胞的生存。因此,对受损线粒体的及时修复与功能失调线粒体的有效清除,对于维持机体内环境的稳定及防止细胞死亡具有极其重要的意义。

线粒体动力学参与调节能量代谢、线粒体合成发生、细胞凋亡、细胞衰老和活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)稳态等功能。线粒体自噬是一种通过特定自噬机制实现的细胞过程,它涉及 3 种主要途径以进行线粒体的清除,具体包括:(1) PTEN 诱导的激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1)/E3 泛素连接酶 Parkin 途径;(2) BCL-2/E1B 腺病毒相互作用蛋白 3 (BCL-2/adenovirus E1B interacting protein 3, BNIP3)/Nip 样蛋白 X (Nip-like protein X, NIX) 途径;(3) 线粒体外膜蛋白 (FUN14 domain containing 1, FUNDC1) 途径<sup>[1-2]</sup>。这些途径共同遵循 4 个核心步骤以达成目标:首先需精准检测并识别出功能障碍的线粒体,随后将识别出的功能障碍线粒体与健康线粒体网络进行有效分离,接着通过自噬体的形成与功能,实现对缺陷线粒体的特异性识别与隔离,最终这些被隔离的线粒体将在溶酶体内被酶解、降解。线粒体自噬目的在于清除受损或多余的线粒体,这一领域的研究正日益深化,并已成为选择性自噬科学探索中的一个重要且独特的分支<sup>[3]</sup>。本综述将结合心血管疾病的病理机制深入分析线粒体自噬与线粒体动力学在心脏生理过程中的作用机制。

## 1 线粒体损伤对心肌细胞的影响

当线粒体呼吸链受到损伤,并伴有 ATP 耗竭,导致线粒体产生 ROS 以及线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 或蛋白质的氧化损伤,ROS 过量引起的氧化应激损害细胞功能和活力,最终导致心肌细胞死亡<sup>[4]</sup>。线粒体动力学和线粒体自噬是在生理和病理环境中控制心肌细胞线粒体健康的基本机制。线粒体自噬是一种线粒体特异性的自噬形式,是靶向和消除受损或不必要的线粒体的主要机制<sup>[5]</sup>。

### 1.1 线粒体自噬

“自噬”始于吞噬团,来源于内质网和(或)反式高尔基体和内体提供的脂质双层,具有多种类型:微自噬、巨自噬、伴侣介导的自噬,这些都促进溶酶体中胞质成分的蛋白水解。研究发现自噬可以负责去除蛋白质聚集体和功能失调的细胞器,如线粒体。因此,自噬在有丝分裂后细胞(心肌细胞)中构成了一个非常重要的质量控制机制<sup>[6]</sup>。

这期间在不同的背景下细胞和生物体水平都已经证实了自噬的促生存能力,包括在营养和生长因子剥夺、内质网应激、发育、微生物感染和以蛋白质聚集体积累为特征的疾病期间。这一发现代表自噬体不再是以往认为的随机吞噬细胞胞质物质,而是有选择性的过程<sup>[7]</sup>。如今已知线粒体已开发出两种不同的机制来保持健康状态并保证积极的质量控制系统。第一种机制中,生物发生、裂变和聚变相互配合,在高能量需求条件下增加线粒体种群,或允许受损细胞器与健康线粒体融合并替换其受损或丢失的成分。第二种机制有望去除受损的细胞器,目前研究中发现的机制通常可分为两类:泛素(ubiquitin, Ub)依赖性通路:依赖于线粒体表面蛋白的广泛泛素化来促进线粒体自噬(例如:PINK1/Parkin 通路)和 Ub 非依赖性通路<sup>[1]</sup>。

#### 1.1.1 泛素依赖性通路途径

PINK1/Parkin 通路包含 3 个关键元素:PINK1、Parkin 和线粒体促融合蛋白线粒体融合蛋白 (Mitofusin 1、Mitofusin 2)。当线粒体膜电位( $\Delta\Psi_m$ )丧失,PINK1 进入线粒体内膜的途径受阻,导致 PINK1 在线粒体外膜的胞质面上稳定聚集,而 PINK1 反过来招募 RING-IBR-RING (RBR) E3 泛素连接酶 Parkin, Parkin 蛋白酶的空间构象发生改变,PINK1 磷酸化泛素和 Parkin,从而清除受损的线粒体<sup>[8]</sup>。

#### 1.1.2 泛素非依赖性通路途径

线粒体外膜(outer mitochondrial membrane, OMM)上有许多自噬的受体,这些受体主要是 BNIP3、FUNDC1、抗增殖蛋白 2 (prohibitin 2, PHB2)、微管相关蛋白 1 的轻链 3 (microtubule-associated-proteinlight-chain-3, LC3) 相互作用区基序直接与自噬相关蛋白结合,从而启动线粒体自

噬。BNIP3L 最初被认为是一种促凋亡蛋白,此后在某些类型的肿瘤细胞中发现了 BNIP3L 诱导的线粒体自噬<sup>[9]</sup>。BNIP3L 将自噬体募集到靶向线粒体,线粒体自噬需要两个 BNIP3L 结构域:一个 LIR 结构域和一个跨膜(transmembrane domain, TM)结构域。LIR 结构域由 4 个氨基酸基序组成,这些基序对与 LC3 的相互作用至关重要,而 MER 基序(而非 LIR 基序)对于 BNIP3L 诱导的线粒体自噬至关重要。TM 结构域不参与 Atg8 蛋白与 LIR 基序之间的相互作用, TM(跨膜结构域)结构域促进 BNIP3L 线粒体定位。TM 结构域上的点突变会破坏 BNIP3L 二聚体的形成,而不会影响其线粒体定位<sup>[10]</sup>。心磷脂(一种线粒体特异性锥形磷脂)对于维持线粒体膜的结构组织和功能至关重要,在细胞应激的情况下,ΔΨM 损失可以迅速发生并被 PRKN/PARK2 感应,从而实现线粒体自噬过程<sup>[11]</sup>,最终导致受损线粒体的去除<sup>[12]</sup>。线粒体裂变的抑制降低了线粒体自噬的水平,两种 CL 依赖性动力相关蛋白 1(dynamamin-related protein 1, DRP1)和视神经萎缩蛋白 1(optic atrophy type 1)活性介导线粒体的平衡融合和裂变,线粒体自噬在心脏发育过程中起着至关重要的作用,维持心脏的基本功能<sup>[13]</sup>,细胞色素 c(cytochrome c, Cyt c)充当 CL 过氧化的催化剂,过氧化的 CL 是线粒体通透性过渡孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)开放的主要贡献者。细胞凋亡是细胞死亡的受控过程,维持组织中细胞群的稳态,并作为免疫反应或受损细胞的防御机制发生。细胞凋亡分为外源性途径和内源性途径,属于 BCL-2 家族的蛋白质是线粒体外膜通透化的关键调节因子<sup>[14]</sup>。BCL-2 蛋白参与外膜的通透性调节和促凋亡因子的释放,包括 Cyt c 和 SMAC/DIABLO。BCL-2 家族蛋白在细胞凋亡的调控中起关键作用,可分为促凋亡蛋白(BAX 和 BAK)、抗凋亡蛋白(BCL-2、BCL-XL、BCL-W、MCL-1、BFL-1)、促凋亡多 BH 结构域 BAX/BAK 蛋白和促凋亡的仅 BH3 蛋白(BIM、PUMA、BID、BAD、BIK、BMF、NOXA、HRK)<sup>[15]</sup>, BCL-2 家族蛋白的平衡稳态是细胞凋亡的重要调节因子。当不同的刺激在线粒体汇聚并诱导 BCL-2 家族蛋白时,就会触发内在的细胞凋亡途径<sup>[16]</sup>。

## 1.2 线粒体自噬与心肌细胞的关系

线粒体自噬在心脏中被激活,在缺血再灌注期间通过减轻受损线粒体的损伤和促进线粒体生物发生以促进恢复而发挥保护作用<sup>[17]</sup>。现阶段发现通过刺激心肌细胞线粒体自噬直接调节因子的干预措施可以通过预处理心脏和促进线粒体质量控制机制来减轻 I/R 损伤(myocardial I/R injury, MIRI)。CAI 等<sup>[18]</sup>的研究表明在缺氧再灌注处理的 H9c2 细胞或心肌 I/R 损伤大鼠中,通过过表达 RNA 甲基化阅读蛋白 YTHDF2 在 I/R 期间下调线粒体自噬来缓解心肌 I/R 损伤。ZHOU 等<sup>[19]</sup>证明心肌缺血再灌注触发 RIPK3 上调,促进 FUNDC1 磷酸化失活,导致 FUNDC1 介导的线粒体自噬功能障碍和 I/R 损伤小鼠模型中显著的细胞凋亡。在缺血性损伤后的心肌再灌注期间,ROS 生成增加会导致 mPTP 开放,从而导致心肌细胞凋亡和坏死,心肌细胞中 PINK1/Parkin 线粒体自噬的诱导性轻度激活可以防止心衰发展并减轻心脏损伤<sup>[20]</sup>。此外,通过 ZHU 等<sup>[21]</sup>的研究发现 AMPK 可能是另一个治疗靶点,其激活可能会重新激活适应性线粒体自噬,以挽救心肌细胞免受心肌梗死损伤。

## 2 线粒体损伤与心血管疾病

### 2.1 肥厚性心肌病(hypertrophic cardiomyopathy, HCM)

心脏肥厚是多种刺激因素的结果,包括血流动力学超负荷、神经激素激活和缺血。HCM 是一种遗传性心血管疾病,其特征为左心室非对称性增厚、纤维化以及舒张功能的减退<sup>[22]</sup>。在 HCM 患者中,心肌细胞需大量能量以维持其收缩功能,心脏表现出脂肪酸氧化功能受损和葡萄糖代谢显著降低的病理特征,这些变化可导致代谢异常。由于过度收缩导致的能量需求增加,会进一步促进 ROS 的生成,限制脂肪酸氧化并促使厌氧底物进入三羧酸循环。这一系列反应伴随着磷酸肌酸-肌酸激酶系统和 ATP 合成的减少,导致心肌耗氧量增加和心脏收缩功能下降。

抗氧化水平失调导致线粒体关键位点受损,包括 mtDNA、CL 及线粒体嵴结构。线粒体动态平衡受影响,裂变和融合过程异常,PGC-1α 下调。线粒体呼吸复合物 II 及 V 活性降低,AMPK

通路激活。

线粒体功能障碍导致其呼吸功能减弱,心肌能量消耗增加。在线粒体自噬中,相关基因(*BNIP3*、*FUNDC2*、*ATG9*、*PINK1*、*MAP1LC3*)未上调,*Parkin* 及 *P62/SQSTM1* 表达无显著变化<sup>[23]</sup>。这可能表明未上调的自噬基因与 HCM 线粒体异常有关,揭示了 HCM 病理机制的一个方面。

## 2.2 心肌缺血再灌注

I/R 中,心肌细胞氧气和营养(葡萄糖、脂肪酸)减少,代谢从有氧氧化磷酸化转为无氧糖酵解,心肌 ATP 酶活性受损,ETC 链功能异常<sup>[24]</sup>。I/R 诱发的 ETC 复合物缺陷及 Cyt c 耗竭,导致再灌注期间缺血心肌线粒体膜超极化,ROS 过度产生,线粒体外膜破坏,mPTP 开放,形成 RIRR 现象。

心肌细胞中线粒体的紧密排列使得 I/R 后的膜电位下降和 ROS 生成迅速扩散至邻近线粒体。RIRR 可能是由活性氧触发反向电子传递(reversed electron transfer, RET)过程中 ROS 过度生成的结果,而非与 RET 同步发生。然而在特定条件下,如线粒体功能障碍的空间异质性,这两种机制可能在同一心脏组织中同时激活,分别导致 RET 相关的 ROS 生成或 RIRR 的发生<sup>[25]</sup>。ATP 耗竭干扰离子交换,导致钠钙交换器反向作用,细胞质  $Ca^{2+}$  增加,同时 MCU 介导的线粒体  $Ca^{2+}$  也上升。在再灌注期间,线粒体  $Ca^{2+}$  可能持续累积,造成 mPTP 开放并增加内膜通透性。FOF1-ATP 酶是 mPTP 的关键部分,受蛋白亲环素 D 调控。mPTP 过度开放导致线粒体膜电位去极化、ATP 分解、 $NAD^+$  和  $Ca^{2+}$  释放,线粒体肿胀和外膜破裂,加速细胞死亡。ROS 诱导的 ROS 释放也加剧了细胞损伤<sup>[26]</sup>。ROS 与 ETC 之间形成恶性循环,能量耗竭促进坏死性细胞死亡,而 ROS 可能刺激线粒体分裂,进一步增加 ROS 产生。线粒体 ROS 与 mPTP 开放之间的相互作用是 I/R 损伤的关键有害机制<sup>[27]</sup>。线粒体作为 ROS 主要来源,在 I/R 事件中是组织损伤的核心,其强调线粒体动力学在再灌注损伤中的关键作用。

## 2.3 病毒性心肌炎

在促炎通路中,先天免疫系统作为抗病毒的首要防御机制,其过度激活状态会直接导致慢性炎症的发生以及心脏损伤。病原体相关分

子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)在识别病毒 RNA 后,会触发 I 型干扰素(interferon I, IFN-I)和促炎细胞因子的产生。其中,IFN- $\beta$  在病毒感染的急性期阶段具有显著降低病毒载量并改善心肌炎症状的效果,然而,在疾病晚期阶段,其抑制作用则有助于减缓疾病的进一步恶化。另一方面,NLRP3 炎症小体在感染初期扮演了重要的防御角色,但其持续激活状态则会对机体产生有害影响。值得注意的是,mtDNA 因其结构与细菌 DNA 的相似性,能够直接激活 Toll 样受体 9,进而引发心肌炎和扩张型心肌病的发生。cGAS-STING 通路作为 mtDNA 的关键传感器,在炎症基因表达中起着重要作用,其异常激活可能导致心脏炎症和功能障碍<sup>[28]</sup>。心肌炎病理过程中,程序性细胞死亡机制显著增强,尤其是由嗜心肌病毒(coxsackievirus B3, CVB3)感染引发。CVB3 感染促进 ROS 生成,导致 Cyt c 释放,进而诱导心肌细胞凋亡。同时 CVB3 通过诱导炎症细胞焦亡过程,释放促炎性细胞因子如 IL-1 $\beta$  和 IL-18,加剧炎症反应,通过其病毒蛋白酶介导的 NLR(如 NLRP1、NLRP3 和 CARD8)裂解过程,直接激活细胞焦亡机制<sup>[29-30]</sup>。

在线粒体质量控制方面,UNC-51 样激酶 1(UNC-51-like kinase 1, ULK1)在心肌细胞受损后,通过 AMPK 的磷酸化和激活,从而在上游阶段发挥关键作用。ULK1 在特定残基(如 Q524)的裂解会导致其结构域分离,损害自噬功能,当 PINK1/Parkin 通路激活后,线粒体衍生囊泡与溶酶体融合,但可能引起线粒体错位、聚集和心肌细胞功能障碍。CVB3 诱导的心肌病小鼠模型中,观察到线粒体相关能量代谢基因表达变化和减少,以及线粒体中 Cyt c 活性降低。此外, CVB3 感染心肌细胞会导致细胞内  $Ca^{2+}$  过载,可能引起心肌细胞凋亡和致命心律失常,硫氧化还原蛋白 2 作为通过清除 ROS 和抑制其生成来维持心脏的正常功能的关键酶,在扩张型心肌病患者中变现出减少趋势<sup>[31]</sup>。

## 3 线粒体在心血管疾病中治疗方向

### 3.1 运动训练

线粒体的生命周期是由生物发生与融合之间精细平衡的微调来调控的,而非依赖于裂变或

线粒体自噬。这些过程始终处于动态之中,根据细胞的具体状态被诱导或抑制。运动,作为一种积极的干预手段,能够有效优化细胞器的数量与质量,增强线粒体氧化磷酸化过程及呼吸能力,并刺激线粒体生物合成。长期训练不仅减少 ROS 的生成,还强化了 ETC 酶的活性。

此外,耐力训练通过激活过氧化物酶体增殖物激活 PGC-1 $\alpha$ ,进一步促进线粒体的合成,从而减少线粒体 ROS 的积累,并缓解肌肉细胞的凋亡现象。所以运动无疑是一种值得信赖的非药理学方法,它在生命后期对于维持代谢健康具有显著作用<sup>[32]</sup>。

### 3.2 基因治疗与线粒体 PINK1/Parkin 途径

PINK1/Parkin 介导的吞噬被证明是许多心血管疾病中心肌细胞修复的关键。在医学领域,针对心血管疾病的现行治疗策略主要依赖于药物治疗,具体药物种类涵盖了茛菪强心、达格列净、通心络、利拉鲁肽、氢盐水制剂、褪黑素及二甲双胍等<sup>[33]</sup>。这些药物的核心机制在于通过增强 PINK1/Parkin 通路的吞噬活动,进而促进线粒体功能的恢复,以此作为治疗心血管疾病的有效手段。然而,随着医学技术的日新月异,我们正逐步将研究重心转向探讨基因治疗在心血管疾病领域的潜在应用前景。

线粒体自噬功能的障碍,尤其是 PINK1/Parkin 途径的异常,与心肌病的发病机制具有密切关联,重新激活线粒体自噬可能在心肌病的管理或缓解中具有潜在价值<sup>[34]</sup>。因此,开发基因治疗方法或药物以调节基因的表达或活性,有望显著提升心肌细胞中适应性线粒体自噬的水平。PRKAA2/AMPK $\alpha$ 2 已被确认为治疗心肌细胞线粒体功能障碍的潜在靶点<sup>[35]</sup>。在分子层面,PRKAA2/AMPK $\alpha$ 2 与 PINK1 蛋白相互作用,激活 PINK1/Parkin-SQSTM1 线粒体自噬途径,有助于清除 ROS 并抑制心肌细胞凋亡<sup>[36]</sup>。RIPK3 能触发坏死和凋亡这两种细胞死亡途径。通过抑制 RIPK3-FUNDC1 信号轴,可能促进 FUNDC1 介导的线粒体自噬,减轻心肌缺血再灌注损伤。当前研究表明,过表达 PLK1 可上调 FUNDC1,激活自噬,进而抑制心肌细胞凋亡。在糖尿病心肌病的实验鼠模型中, MST1 通过抑制去乙酰化酶 3 (sirtuin-3, SIRT3) 干扰了 PINK1/Parkin 介导的线

粒体自噬,而 MST1 基因的缺失有助于减少糖尿病小鼠的线粒体分裂和心脏重塑,同时改善心脏收缩功能<sup>[37]</sup>。SIRT3 的重新激活促进了 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬,并在小鼠模型中展现出心脏保护作用。Sestrin2 (SESN2) 的上调有助于促进 PRKN 在线粒体上的积累,重新激活 PINK1/Parkin 减轻心肌病。据报道,在老年小鼠中,通过 PRKN 过表达诱导线粒体自噬可以有效地逆转心脏衰老,诱导 PINK1/Parkin 线粒体自噬可能是对抗心血管衰老的潜在抗衰老策略。此外, DNMI1 通过抑制老年心肌细胞中的 PINK1/Parkin 线粒体自噬,从而防止心脏衰老中的心肌细胞凋亡<sup>[38]</sup>。脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶 1 的过表达上调了 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬,并减弱了心肌缺血再灌注损伤。利用慢病毒或腺相关病毒 (adeno-associated viruses, AAV) 介导的 PINK1/Parkin 基因疗法来增强治疗效果,以改善线粒体功能障碍。在小鼠模型中,注射 AAV-PINK1 或 AAV-Parkin 能够提升 PINK1/Parkin 的表达水平,并有助于保持线粒体的完整性和功能<sup>[39]</sup>。

经过对 PINK1/Parkin 途径的深入研究与探讨,我们认识到将其视为一种保护机制并不准确,而更应将其定义为一种适应性损伤反应机制。适度的线粒体自噬似乎具有积极的保护作用,然而,过度或持续的激活可能对血管和心肌细胞造成损害。因此,调节其活性水平将是未来研究的关键所在。

### 3.3 线粒体移植治疗

线粒体移植被视为治疗冠状动脉性心脏病的潜在有效方法,可融合受损线粒体,恢复其功能。移植的线粒体能够被整合至宿主细胞内,其效果在于促进细胞能量代谢、线粒体功能恢复,并预防细胞凋亡<sup>[40]</sup>。近期科研探索揭示,线粒体不仅限于单一细胞内,还能够在生理及病理情境下实现细胞间的迁移。当细胞遭遇损伤或线粒体功能出现障碍时,邻近的健康细胞能够主动将功能健全的线粒体输送至受损细胞,以提供必要的能量支持<sup>[41]</sup>。

线粒体转移主要通过隧道纳米管 (2, 4, 6-trinitrotoluene, TNT) 和细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EV) 产生。TNT 在细胞间是通过交换各

种成分,如蛋白质、脂质等,来实现细胞间的信息传递与交互。另一方面, EV 提供各种细胞成分,包括蛋白质、RNA、miRNA、脂质,甚至线粒体等细胞器。EV 在细胞间传递主要分为 3 种类型:外泌体(30~150 nm)、微泡(0.1~1 μm)和凋亡小体(>1 μm)。微泡是相对较大的 EV,可以携带线粒体等细胞器。当线粒体受损时通过移植健康线粒体,来改善线粒体呼吸功能及细胞死亡<sup>[42]</sup>。值得注意的是,人为诱导的线粒体功能障碍往往伴随着线粒体氧化的加剧与膜电位的显著降低。然而,通过线粒体预处理这一策略可以有效抵御这种功能障碍带来的负面效应从而保护心肌细胞。例如,利用与线粒体紧密结合的磷酸烯醇丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)与三苯基磷亲脂性阳离子(triphenyl phosphonium, TPP)组成的复合物进行线粒体移植,这种复合物中的 PEP 不仅具备缺血感应特性,还能在特定条件下与 PEP-TPP-线粒体复合物解离,从而实现线粒体的有效内化与移植<sup>[43]</sup>。这一技术的应用,使得移植的线粒体能够精准地到达需要修复的区域,显著改善了心肌细胞的能量代谢状况,降低了促炎反应,并有效减少了细胞凋亡的发生。在临床实践中,EMANI 等<sup>[44]</sup>通过从患者的腹直肌中分离线粒体,并直接注射到因 I/R 损伤的心肌组织中,从而使心室功能均在短期内得到了显著改善。更为重要的是,在注射前后均未观察到全身炎症反应升高,这进一步证实了自体线粒体移植在安全性与有效性方面的卓越表现。WU 等<sup>[45]</sup>开发了口服纳米马达化线粒体(NM/Mito)技术,该线粒体释放 NO 并趋化至心脏损伤部位。NM/Mito 经心肌细胞膜片段修饰后形成 CM/NM/Mito,装载于肠溶胶囊中口服给药。该技术保持线粒体活性,靶向受损心脏组织,显著提高心脏功能恢复率。

总体而言,虽然线粒体移植前景广阔,但仍需要持续的研究和开发来克服现有挑战、优化技术并确定这种治疗方法治疗线粒体疾病的安全性和有效性。

#### 4 结论

线粒体自噬功能的障碍与受损线粒体的累积,不仅直接关系到细胞与组织的健康状态,还与多种病理过程紧密相连。特别在心血管系统

中,线粒体自噬和线粒体动力学的作用尤为显著,对于维护心血管稳态、保护心肌细胞免受损伤具有重要意义。线粒体自噬功能障碍与受损线粒体累积影响细胞组织健康,并与多种病理过程相关。在心血管系统中,线粒体自噬和动力学对维护稳态和保护心肌细胞至关重要。PINK1/Parkin 通路作为线粒体吞噬的关键,在心血管疾病治疗中作用显著。但调控心脏自噬的机制尚不完全清楚,主要问题有过度增强自噬会导致线粒体不足,影响心脏功能以及 PINK1/Parkin 与其他自噬信号通路的相互作用不清。因此,需深入研究线粒体自噬机制及其对心脏的影响,发现 PINK1/Parkin 信号通路的特异性调控因子,发掘其治疗潜力。

#### 参考文献:

- [1] LU Y, LI Z, ZHANG S, et al. Cellular mitophagy: mechanism, roles in diseases and small molecule pharmacological regulation [J]. *Theranostics*, 2023, 13(2): 736-766.
- [2] WANG L, LU G, SHEN H M. The long and the short of PTEN in the regulation of mitophagy [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 299.
- [3] DU F, YU Q, YAN S, et al. PINK1 signalling rescues amyloid pathology and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease [J]. *Brain*, 2017, 140(12): 3233-3251.
- [4] MENENDEZ-MONTES I, ABDISALAAM S, XIAO F, et al. Mitochondrial fatty acid utilization increases chromatin oxidative stress in cardiomyocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(34): e2101674118.
- [5] AJOOLABADY A, CHIONG M, LAVANDERO S, et al. Mitophagy in cardiovascular diseases: molecular mechanisms, pathogenesis, and treatment [J]. *Trends Mol Med*, 2022, 28(10): 836-849.
- [6] VÁSQUEZ-TRINCADO C, GARCÍA-CARVAJAL I, PENNANEN C, et al. Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease [J]. *J Physiol*, 2016, 594(3): 509-525.
- [7] TITUS A S, SUNG E A, ZABLOCKI D, et al. Mitophagy for cardioprotection [J]. *Basic Res Cardiol*, 2023, 118(1): 42.
- [8] MCWILLIAMS T G, MUQIT M M. PINK1 and Parkin: emerging themes in mitochondrial homeostasis [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 45: 83-91.
- [9] LI Y, ZHENG W, LU Y, et al. BNIP3L/NIX-mediated

- mitophagy: molecular mechanisms and implications for human disease [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 13(1): 14.
- [10] MARINKOVIĆ M, ŠPRUNG M, NOVAK I. Dimerization of mitophagy receptor BNIP3L/NIX is essential for recruitment of autophagic machinery [J]. *Autophagy*, 2021, 17(5): 1232–1243.
- [11] GASANOFF E S, YAGUZHINSKY L S, GARAB G. Cardiolipin, non-bilayer structures and mitochondrial bioenergetics: relevance to cardiovascular disease [J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1721.
- [12] IRIONDO M N, ETXANIZ A, VARELA Y R, et al. LC3 subfamily in cardiolipin-mediated mitophagy: a comparison of the LC3A, LC3B and LC3C homologs [J]. *Autophagy*, 2022, 18(12): 2985–3003.
- [13] GONG G, SONG M, CSORDAS G, et al. Parkin-mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolic maturation in mice [J]. *Science*, 2015, 350(6265): aad2459.
- [14] VILLANOVA L, CARECCIA S, DE MARIA R, et al. Micro-economics of apoptosis in cancer: ncRNAs modulation of BCL-2 family members [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 958.
- [15] HAO Q, CHEN J, LU H, et al. The ARTS of p53-dependent mitochondrial apoptosis [J]. *J Mol Cell Biol*, 2023, 14(10): mjac074.
- [16] DUDEK J. Role of cardiolipin in mitochondrial signaling pathways [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2017, 5: 90.
- [17] KUBLI D A, ZHANG X, LEE Y, et al. Parkin protein deficiency exacerbates cardiac injury and reduces survival following myocardial infarction [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(2): 915–926.
- [18] CAI X, ZOU P, HONG L, et al. RNA methylation reading protein YTHDF2 relieves myocardial ischemia-reperfusion injury by downregulating BNIP3 via m6A modification [J]. *Hum Cell*, 2023, 36(6): 1948–1964.
- [19] ZHOU H, ZHU P, GUO J, et al. Ripk3 induces mitochondrial apoptosis via inhibition of FUNDC1 mitophagy in cardiac IR injury [J]. *Redox Biol*, 2017, 13: 498–507.
- [20] HOSHINO A, MITA Y, OKAWA Y, et al. Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2308.
- [21] ZHU P, WAN K, YIN M, et al. RIPK3 induces cardiomyocyte necroptosis via inhibition of AMPK-parkin-mitophagy in cardiac remodelling after myocardial infarction [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6635955.
- [22] DORSCH L M, SCHULD T M, DOS REMEDIOS C G, et al. Protein quality control activation and microtubule remodeling in hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Cells*, 2019, 8(7): 741.
- [23] RANJBARVAZIRI S, KOOIKER K B, ELLENBERGER M, et al. Altered cardiac energetics and mitochondrial dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2021, 144(21): 1714–1731.
- [24] CAI W, LIU L, SHI X, et al. Alox15/15-HpETE aggravates myocardial ischemia-reperfusion injury by promoting cardiomyocyte ferroptosis [J]. *Circulation*, 2023, 147(19): 1444–1460.
- [25] YANG L, KORGE P, WEISS J N, et al. Mitochondrial oscillations and waves in cardiac myocytes: insights from computational models [J]. *Biophys J*, 2010, 98(8): 1428–1438.
- [26] XIANG Q, YI X, ZHU X H, et al. Regulated cell death in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2024, 35(3): 219–234.
- [27] PENG Y, TAO Y, LIU L, et al. Crosstalk among reactive oxygen species, autophagy and metabolism in myocardial ischemia and reperfusion stages [J]. *Aging Dis*, 2024, 15(3): 1075–1107.
- [28] FAN Y M, ZHANG Y L, LUO H, et al. Crosstalk between RNA viruses and DNA sensors: role of the cGAS-STING signalling pathway [J]. *Rev Med Virol*, 2022, 32(5): e2343.
- [29] OLEJNICZAK M, SCHWARTZ M, WEBBER E, et al. Viral myocarditis-incidence, diagnosis and management [J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2020, 34(6): 1591–1601.
- [30] NADKARNI R, CHU W C, LEE C Q E, et al. Viral proteases activate the CARD8 inflammasome in the human cardiovascular system [J]. *J Exp Med*, 2022, 219(10): e20212117.
- [31] HUANG Q, ZHOU H J, ZHANG H, et al. Thioredoxin-2 inhibits mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis stress kinase-1 activity to maintain cardiac function [J]. *Circulation*, 2015, 131(12): 1082–1097.
- [32] MEMME J M, ERLICH A T, PHUKAN G, et al. Exercise and mitochondrial health [J]. *J Physiol*, 2021, 599(3): 803–817.
- [33] WU Y, JIANG T, HUA J, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in cardiovascular disease: from pathogenesis to novel therapy [J]. *Int J Cardiol*, 2022, 361: 61–69.
- [34] HAN R, LIU Y, LI S, et al. PINK1-PRKN mediated mitophagy: differences between *in vitro* and *in vivo* models [J]. *Autophagy*, 2023, 19(5): 1396–1405.
- [35] WU S, ZOU M H. AMPK, mitochondrial function, and cardiovascular disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(14): 4987.
- [36] WANG B, NIE J, WU L, et al. AMPK $\alpha$ 2 protects against the development of heart failure by enhancing mitophagy via

- PINK1 phosphorylation [J]. *Circ Res*, 2018, 122(5): 712-729.
- [37] FENG X, WANG S, YANG X, et al. Mst1 knockout alleviates mitochondrial fission and mitigates left ventricular remodeling in the development of diabetic cardiomyopathy [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 628842.
- [38] GAO B, YU W, LV P, et al. Parkin overexpression alleviates cardiac aging through facilitating K63-polyubiquitination of TBK1 to facilitate mitophagy [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867(1): 165997.
- [39] PATERNA J C, LENG A, WEBER E, et al. DJ-1 and Parkin modulate dopamine-dependent behavior and inhibit MPTP-induced nigral dopamine neuron loss in mice [J]. *Mol Ther*, 2007, 15(4): 698-704.
- [40] LI C J, CHEN P K, SUN L Y, et al. Enhancement of mitochondrial transfer by antioxidants in human mesenchymal stem cells [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 8510805.
- [41] SINCLAIR K A, YERKOVICH S T, HOPKINS P M, et al. Characterization of intercellular communication and mitochondrial donation by mesenchymal stromal cells derived from the human lung [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 91.
- [42] ULGER O, KUBAT G B. Therapeutic applications of mitochondrial transplantation [J]. *Biochimie*, 2022, 195: 1-15.
- [43] SUN X, CHEN H, GAO R, et al. Intravenous transplantation of an ischemic-specific peptide-TPP-mitochondrial compound alleviates myocardial ischemic reperfusion injury [J]. *ACS Nano*, 2023, 17(2): 896-909.
- [44] EMANI S M, PIEKARSKI B L, HARRILD D, et al. Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury [J]. 2017, 154(1): 286-289.
- [45] WU Z, CHEN L, GUO W, et al. Oral mitochondrial transplantation using nanomotors to treat ischaemic heart disease [J]. *Nat Nanotechnol*, 2024, 19(9): 1375-1385.

[收稿日期]2024-06-17

## (上接第 66 页)

- [16] HABERECHE-MÜLLER S, KRÜGER E, FIELITZ J. Out of control: the role of the ubiquitin proteasome system in skeletal muscle during inflammation [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(9): 1327.
- [17] CLAUDE-TAUPIN A, CODOGNO P, DUPONT N. Links between autophagy and tissue mechanics [J]. *J Cell Sci*, 2021, 134(17): jcs258589.
- [18] CHEN X, JI Y, LIU R, et al. Mitochondrial dysfunction: roles in skeletal muscle atrophy [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 503.
- [19] JAISWAL N, GAVIN M, LORO E, et al. AKT controls protein synthesis and oxidative metabolism via combined mTORC1 and FOXO1 signalling to govern muscle physiology [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2022, 13(1): 495-514.
- [20] ARIAS-CALDERÓN M, CASAS M, BALANTA-MELO J, et al. Fibroblast growth factor 21 is expressed and secreted from skeletal muscle following electrical stimulation via extracellular ATP activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1059020.
- [21] LIU X, SUN K, XU P, et al. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on the graft-bone healing of artificial ligaments: an in vitro and in vivo study [J]. *Am J Sports Med*, 2022, 50(3): 801-813.
- [22] JI W, HAN F, FENG X, et al. Cocktail-like gradient gelatin/hyaluronic acid bioimplant for enhancing tendon-bone healing in fatty-infiltrated rotator cuff injury models [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 244: 125421.
- [23] WADA S, LEBASCHI A H, NAKAGAWA Y, et al. Postoperative tendon loading with treadmill running delays tendon-to-bone healing: immunohistochemical evaluation in a murine rotator cuff repair model [J]. *J Orthop Res*, 2019, 37(7): 1628-1637.
- [24] ABRAHAM A C, FANG F, GOLMAN M, et al. The role of loading in murine models of rotator cuff disease [J]. *J Orthop Res*, 2022, 40(4): 977-986.
- [25] CHEN H, LI S, XIAO H, et al. Effect of exercise intensity on the healing of the bone-tendon interface: a mouse rotator cuff injury model study [J]. *Am J Sports Med*, 2021, 49(8): 2064-2073.

[收稿日期]2024-05-08

王紫婷, 杨贯彤, 樊建春, 等. 癌症相关成纤维细胞在转移前生态位形成中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(1): 127-138.

Wang ZT, Yang GT, Fan JC, et al. Role of cancer-associated fibroblasts in the formation of the pre-metastatic niche [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 127-138.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.013

# 癌症相关成纤维细胞在转移前生态位形成中的作用

王紫婷<sup>1</sup>, 杨贯彤<sup>1</sup>, 樊建春<sup>2</sup>, 郜思齐<sup>1</sup>, 郭睿<sup>1</sup>, 蒋丽娜<sup>1</sup>, 郭亚雄<sup>1\*</sup>

(1. 河北北方学院基础医学院/微循环研究所, 河北 张家口 075000; 2. 河北北方学院附属第一医院肿瘤研究所, 河北 张家口 075000)

**【摘要】** 随着全球癌症发病率的不断上升, 肿瘤转移已成为导致大多数癌症患者死亡的主要原因。转移前生态位(pre-metastatic niche, PMN)的形成成为肿瘤细胞的定植和转移提供了理想的微环境, 极大地促进了肿瘤的扩散。在这一过程中, 癌症相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)因其在肿瘤进展中的多重作用而备受关注。CAF通过重塑细胞外基质、诱导上皮间质转化、刺激新生血管生成以及调控肿瘤免疫微环境, 推动了PMN的建立和肿瘤细胞的侵袭性行为。这些作用不仅加速了肿瘤的转移进程, 还为肿瘤的免疫逃逸创造了条件。本文综述了CAF在肿瘤转移中的核心机制和功能, 探讨了其在癌症研究和治疗中的潜在应用, 为抗肿瘤转移策略的开发提供了新的视角与方向。

**【关键词】** 癌症相关成纤维细胞; 转移前生态位; 细胞外基质; 上皮间质转化; 肿瘤免疫

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0127-12

## Role of cancer-associated fibroblasts in the formation of the pre-metastatic niche

WANG Ziting<sup>1</sup>, YANG Guantong<sup>1</sup>, FAN Jianchun<sup>2</sup>, GAO Siqi<sup>1</sup>, GUO Rui<sup>1</sup>, JIANG Lina<sup>1</sup>, GUO Yaxiong<sup>1\*</sup>

(1. Basic Medical College & Institute of Microcirculation, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China.  
2. the Cancer Research Institute of the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

**【Abstract】** In line with the rising global incidence of cancer, tumor metastasis has become the leading cause of mortality among cancer patients. Formation of the pre-metastatic niche (PMN) creates an optimal microenvironment for tumor cell colonization and metastasis, thus facilitating tumor dissemination. In this context, cancer-associated fibroblasts (CAFs) have garnered significant attention as a result of their multifaceted roles in tumor progression. CAFs enhance the formation of the PMN and promote the invasive behavior of tumor cells by remodeling the extracellular matrix, inducing epithelial-mesenchymal transition, stimulating angiogenesis and modulating the tumor immune microenvironment. These processes not only expedite metastasis but also enable tumor immune evasion. This paper reviews the fundamental mechanisms and functions of CAFs in tumor metastasis, examines their potential

**【基金项目】** 河北省自然科学基金(H2021405030); 河北省高等学校科学技术研究重点项目(ZD2021006)。

**【作者简介】** 王紫婷(1997—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 肿瘤微循环。E-mail: wztzdoc@163.com

**【通信作者】** 郭亚雄(1980—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 肿瘤微循环。E-mail: yxguo2022@163.com

applications in cancer research and therapy, and offers new perspectives and directions for the development of anti-tumor metastasis strategies.

**[Keywords]** cancer-associated fibroblasts; pre-metastatic niche; extracellular matrix; epithelial-mesenchymal transition; tumor immunity

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

肿瘤转移是一个复杂的生物学过程,它不仅会破坏多个器官的正常功能,还会引发诸如癌性积液、血栓形成等一系列严重的并发症。这些并发症不仅增加了治疗的难度和可能的副作用,还会给患者带来慢性疼痛、身体虚弱以及沉重的心理压力,从而极大地降低了患者的生活质量,甚至显著缩短了他们的生存期。因此,防止癌症的转移,并在早期进行有效治疗,对于提高患者的生存率和生活质量具有至关重要的意义。目前,科研人员正不懈努力,寻找新的治疗策略,以期改善转移性癌症患者的预后。在这一过程中,探索肿瘤转移前生态位(pre-metastatic niche, PMN)的形成和作用机制显得尤为重要,因为这有助于更深入地理解肿瘤转移的过程,并可能为患者肿瘤转移后所面临的不利影响找到新的解决之道。特别是癌症相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)在肿瘤转移前微环境的形成中扮演着举足轻重的角色。研究 CAFs 的作用,不仅有助于识别转移前的标志物,还可能为开发新型的治疗靶点提供线索。本文系统总结 CAFs 在转移前微环境形成中的多方面作用,期望能为今后开发针对 CAFs 及其相关通路的治疗策略提供坚实的理论依据。相信随着对 CAFs 研究的不断深入,我们将有望找到更为有效的抗癌方法,从而为广大癌症患者带来新的希望。

## 1 CAFs 的概述

CAFs 是肿瘤微环境中的重要组成部分,主要由正常成纤维细胞在癌细胞或肿瘤微环境的刺激下转化而来。近年来的研究表明,乳腺癌细胞分泌的细胞外基质能够有效诱导正常成纤维细胞转化为 CAFs,并显著增强其特征标志物的表达<sup>[1]</sup>。此外,癌细胞分泌的细胞外囊泡中携带特定的微小 RNA(microRNA, miRNA),这些 miRNA 能够被成纤维细胞吸收,从而进一步诱导 CAFs 的形成<sup>[2]</sup>。这种转化过程凸显了 CAFs 在肿瘤发

展中的关键作用。随着对 CAFs 研究的深入,越来越多的证据表明,CAFs 不仅具有单一的来源或功能,其在肿瘤微环境中的表现也呈现高度异质化。CAFs 的异质性主要体现在其多种来源(如局部成纤维细胞、间充质干细胞、内皮细胞等)、多样的表型(如肌成纤维样 CAFs、炎症相关 CAFs 等)以及功能的多样性。不同来源和亚群的 CAFs 在肿瘤微环境中发挥着重要作用,例如通过代谢重编程为肿瘤细胞提供能量、重塑细胞外基质使肿瘤基质变得更加致密和硬化,从而形成肿瘤细胞迁移的“通道”。这种致密的基质不仅增强了肿瘤细胞的侵袭能力,还能保护它们免受免疫系统或抗癌药物的攻击,进而改变癌细胞的行为和信号传导<sup>[3]</sup>。此外,CAFs 不仅通过物理方式改变肿瘤微环境,其分泌的多种生长因子和细胞因子在调控癌细胞行为方面也发挥了重要作用。CAFs 分泌的生长因子和细胞因子能够与癌细胞表面的受体结合,激活下游信号通路,诱导上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),使癌细胞失去上皮特性的黏附性,获得更强的迁移和侵袭能力<sup>[4]</sup>。这使肿瘤细胞能够突破基底膜,侵入邻近组织,最终通过血液或淋巴系统扩散至远处器官,加速了肿瘤的侵袭和转移。除了调控癌细胞的侵袭性,CAFs 还在肿瘤血管生成过程中发挥关键作用。尤其是在依赖血管供应的高度血管化肿瘤中。CAFs 通过与血管内皮细胞的相互作用,促进肿瘤血管异常化和缺氧环境的形成,确保转移灶能够获得充足的营养和氧气供应,并清除代谢废物,从而支持其在新的微环境中持续生长。除了影响血管生成,CAFs 在调节肿瘤免疫微环境中的作用同样不可忽视。在肿瘤免疫微环境的复杂生态系统中,CAFs 作为关键的间质成分,不仅通过支持肿瘤组织的血液供应和形成药物渗透屏障来抵抗治疗作用,还通过与多种免疫细胞的深入互动,对肿瘤的免疫逃逸机制产生重大影响<sup>[5]</sup>。这些互动涉及骨髓源

性抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)、自然杀伤 (natural killer, NK)、细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CD8<sup>+</sup>T) 细胞和调节性 T (regulatory T, Tregs) 细胞,共同构成了一个抑制抗肿瘤免疫反应的复杂网络<sup>[6-7]</sup>。CAF 通过调控肿瘤中的氧化代谢状态,进一步促进 MDSCs 的招募和功能增强,形成一个免疫抑制的“栖息地”,阻止免疫细胞对肿瘤的有效攻击。CAF 通过分泌免疫抑制性细胞因子和重塑肿瘤微环境的物理特性,阻碍了 CD8<sup>+</sup>T 细胞进入肿瘤核心区域,限制了其对肿瘤细胞的直接杀伤作用。同时,CAF 还与 Tregs 形成免疫突触,通过抗原特异性方式激活并促进 Treg 细胞增殖,从而增强了 Tregs 的免疫抑制功能。尽管 NK 细胞具有强大的肿瘤杀伤能力,但其功能却受到 CAFs 的抑制<sup>[8]</sup>。不仅如此,CAF 在肿瘤转移的早期阶段也发挥着重要作用。在 PMN 的形成过程中,CAF 通过传递致癌信号、提供结构支持以及增强肿瘤细胞的耐药性,全面支持了肿瘤的转移过程<sup>[9]</sup>。这一机制表明,CAF 不仅仅是肿瘤微环境中的被动成分,还是积极的肿瘤进展的“参与者”。它们通过复杂的信号传递和细胞间相互作用,塑造了肿瘤微环境的特征,影响了肿瘤细胞的生物学行为<sup>[10]</sup>。促进肿瘤细胞的增殖和生存,增强其侵袭和转移能力,并提升肿瘤细胞对化疗、放疗及靶向治疗的抵抗性。CAF 还通过与肿瘤免疫微环境中的关键免疫细胞相互作用,抑制免疫系统对肿瘤细胞的监视和清除,从而进一步推动肿瘤的免疫逃逸和进展<sup>[11]</sup>。CAF 的多样性和复杂性为

肿瘤微环境的塑造提供了丰富的可能性,也为癌症治疗开辟了新的干预靶点<sup>[12]</sup>。深入研究 CAFs 在肿瘤微环境中的作用机制,将有助于开发针对肿瘤的创新治疗策略,并为临床治疗提供新的思路。

## 2 细胞外基质重塑

细胞外基质的刚性对细胞行为有重要影响,影响细胞的形态、迁移和生长<sup>[13]</sup>。CAF 与 ECM 成分相互作用,通过分泌基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 来重塑 ECM,从而促进肿瘤细胞的侵袭。在胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 中,这一过程调控着实质细胞和癌症干细胞的表型和行为,推动肿瘤的转移<sup>[14]</sup>。此外,CAF 分泌的小细胞外囊泡 (cancer-associated fibroblasts-derived small extracellular vesicles, CAFs-sEVs) 富含活性赖氨酰氧化酶 (lysyl oxidase alpha,  $\alpha$ LOX), 这些囊泡倾向于与 ECM 结合,促进胶原交联,增加 ECM 的刚度<sup>[15]</sup>。同时,相关蛋白的核定位也会影响基质刚度和胶原收缩性,从而调节肿瘤进展<sup>[16]</sup>。CAF-sEVs 表面的特定成分也发挥着共同作用,促进 LOX 的催化活性<sup>[17]</sup>。特别是在早期肿瘤微环境中,ECM 成分的变化还会影响 CAF 分泌的条件培养基对肿瘤细胞的调控作用<sup>[18-19]</sup>。这些发现揭示了 CAFs、ECM 和肿瘤细胞之间的相互作用是一个复杂的双向过程,通过物理力学信号与分子信号共同作用推动肿瘤进展。为抗癌治疗提供了新的思路 (图 1)。

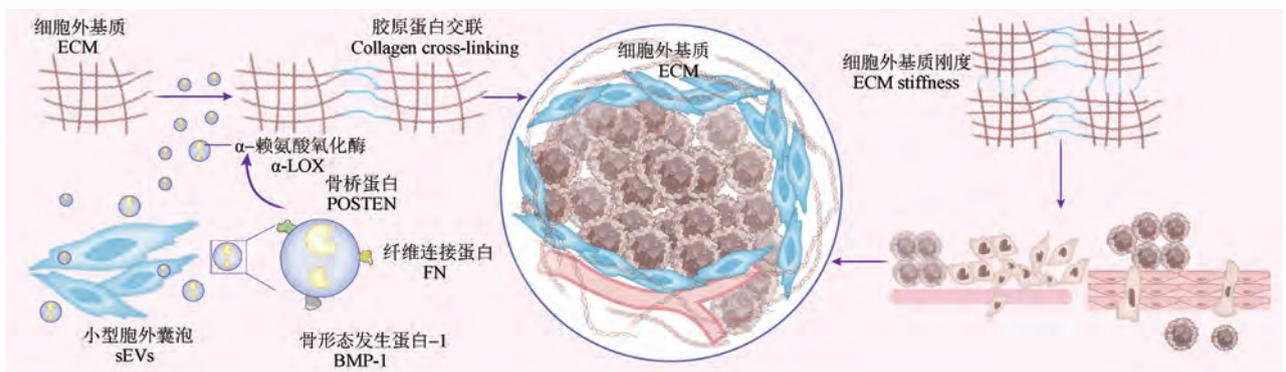


图 1 细胞外基质重塑

Figure 1 Extracellular matrix remodeling

### 3 诱导 EMT

EMT 是上皮细胞转变为间充质表型的过程,对肿瘤转移至关重要,表现为细胞粘附分子变化和侵袭性增强。在这一转变中,CAF 发挥着举足轻重的作用。研究显示,CAF 能够通过条件培养基和共培养方法诱导非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 和卵巢癌细胞发生 EMT,导致细胞形态发生梭形变化,并伴随着间质标志物上调和上皮标志物下调。该过程还增强了药物的耐药性,这是由于药物外排泵的增加、DNA 修复机制的强化及生存途径的激活<sup>[20]</sup>。在膀胱癌中,CAF 通过转化生长因子  $\beta 1$ /成纤维细胞特异性抗原 (transforming growth factor beta 1/fibroblast activation protein, TGF- $\beta 1$ /FAP) 轴促进 EMT,其中 TGF- $\beta 1$  上调 FAP 和其下游分子韧带蛋白 (versican, VCAN) 的表达,后者通过磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 信号通路发挥作用<sup>[21-22]</sup>。此外,CAF 分泌的促炎细胞因子,如白介素 6 (interleukin-6, IL-6) 可以通过激活特定信号通路,进一步提升了 EMT 标志物的表达<sup>[23]</sup>。CAF 分泌的外泌体中含有的特定分子也能影响卵巢癌细胞的增殖和转移行为。CAF 所介导的一系列过程协同作用,驱动肿瘤细胞从上皮表型转变为更具侵袭性的间质表型,加速其转移性特征的形成。这一发现为针对 CAF 诱导 EMT 过程的治疗干预提供了潜在的靶点 (图 2)。

### 4 促进新生血管生成

CAF 在肿瘤微环境中具有决定性影响,特别是在肿瘤 PMN 中。它们通过分泌多种生长因子,如成纤维生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)、血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF),对肿瘤的生长、侵袭和转移起到关键的推动作用。通过对不同癌症类型的研究,逐渐揭示了 CAF 与这些生长因子之间复杂的相互作用,以及它们在肿瘤微环境中的精细调控功能。这些发现不仅加深了我们对肿瘤发生和发展机制的理解,还强调了 CAF 及其分泌的生长因子作为潜在治疗靶点的重要性 (图 3)。

#### 4.1 成纤维细胞生长因子

CAF 和 FGF 在众多癌症中都显示出了其核心的调节作用,当 FGF 与 CAF 表面的 FGF 受体 (fibroblast growth factor receptor, FGFR) 相结合,会触发 CAF 的分泌及迁移功能的激活。这种激活进一步刺激 CAF 分泌更多的 FGF 和其他生长因子,从而形成一个正反馈循环,大大加强了肿瘤微环境对肿瘤生长的促进作用。在多种癌症中都可以观察到这种机制的存在。例如,在头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 中,CAF 会分泌肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 来促进肿瘤细胞的糖酵解过程。而 HNSCC 细胞则会通过分泌碱性成纤维细胞生长因子-2 (fibroblast growth

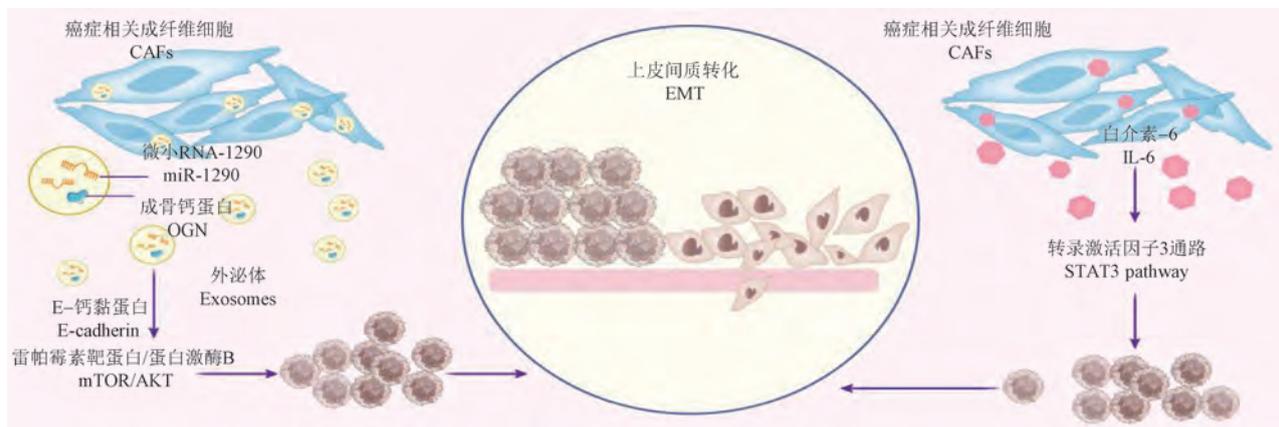


图 2 诱导上皮-间质转化

Figure 2 Epithelial-mesenchymal transition

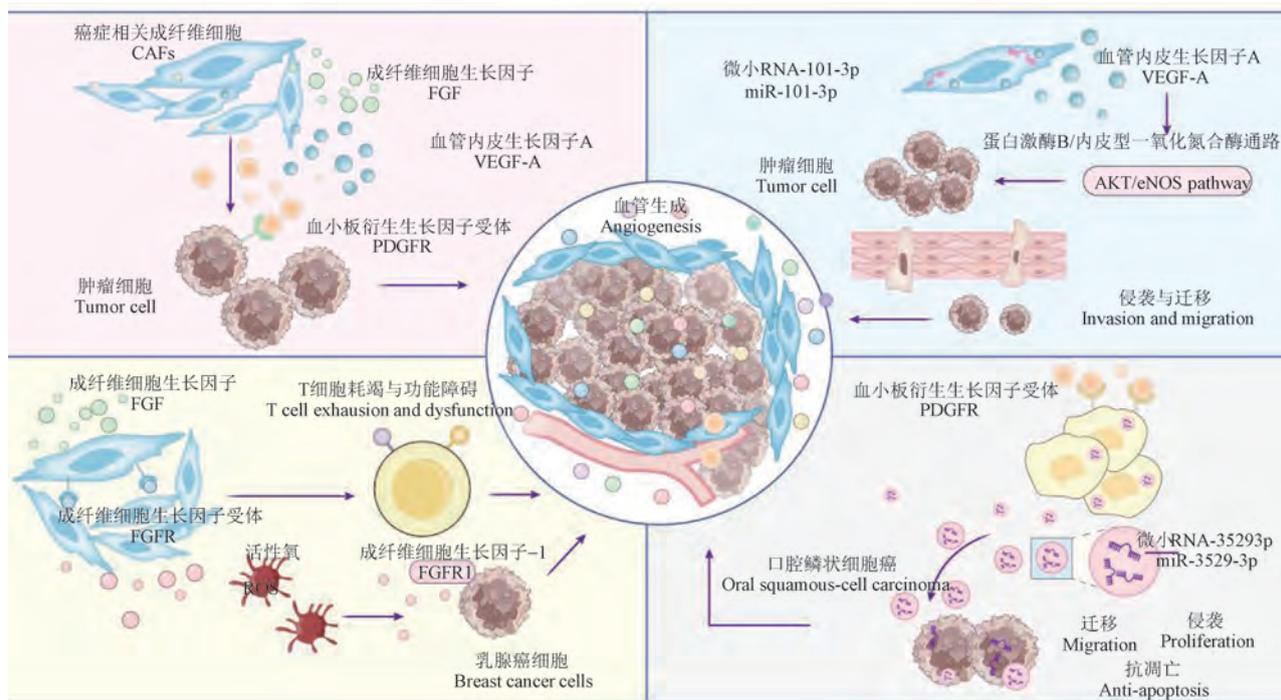


图 3 癌症相关成纤维细胞与生长因子关系

Figure 3 Relationship between cancer-associated fibroblasts and growth factors

factor, FGF2) 来激活 FGFR, 进而增强 CAFs 的线粒体氧化磷酸化和 ATP 的产生, 形成可靶向的信号循环<sup>[24]</sup>。在更具侵袭性的胰腺癌中, CAFs 会分泌 FGF-2 和趋化因子配体 8 (C-X-C motif chemokine ligand 8, CXCL8), 这两种因子能够显著提高肿瘤细胞的生存和侵袭能力。值得注意的是, FGF-2 还能诱导肿瘤细胞分泌更多的 CXCL8, 进一步加强了这种相互作用<sup>[25]</sup>。在皮肤鳞状细胞癌中, FGF 和 TGF- $\beta$  对 CAFs 的效应基因具有截然相反的调控效果。其中, ETS 变异转录因子 1 (ETS variant 1, ETV1) 在 FGF 信号中扮演着核心角色, 它不仅能够抑制 TGF- $\beta$  信号, 还能调控 CAFs 的异质性和功能<sup>[26]</sup>。食管胃交界腺癌 (adenocarcinoma of the esophagogastric junction, AEG) 的研究也揭示了 CAFs 在肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 中的显著富集现象。通过 FGF-FGFR 轴, CAFs 得以在 TME 中积累, 并在细胞间的通信网络中发挥关键的调控作用, 这可能导致 T 细胞的免疫耗竭和功能障碍<sup>[27]</sup>。在乳腺癌的研究中, 当 FGF2 刺激乳腺癌细胞时, FGFR 会转移到细胞核内, 进而促进下游信号通路的激活。这一过程高度依赖于活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生, 并通过与

转录共激活因子 p300/CREB 结合蛋白 (p300/CREB-binding protein, p300/CBP) 和核因子红细胞 2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 的相互作用来调控致癌基因的表达。而高 FGFR 和 Nrf2 基因表达的三阴性乳腺癌患者的生存率明显较低, 强调了 FGFR 和 Nrf2 在乳腺癌进展中的控制作用。与此同时, CAFs 中的 FGF2 水平明显高于正常成纤维细胞。FGF2 通过 FGFR 信号传导显著增加了肿瘤细胞 G<sub>1</sub>/S 期特异性周期蛋白 D1 (G<sub>1</sub>/S-specific cyclin D1, cyclin D1) 的表达, 并通过蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 磷酸化和细胞迁移来促进乳腺癌细胞的生长<sup>[28]</sup>。通过研究不同的信号通路, 揭示其对癌症中能量代谢途径的影响, 以及在调控免疫微环境中导致 T 细胞功能障碍和免疫耗竭的作用机制, 共同调控致癌基因的表达, 这无疑为未来开发靶向 CAFs 和 FGF 信号的新型癌症治疗策略奠定了坚实的理论基础。

#### 4.2 血小板衍生生长因子

PDGF 通过激活 CAFs 表面的 PDGF 受体 (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR), 诱导 CAFs 分泌 MMPs 和 TGF- $\beta$ , 从而促进细胞外基质降解和免疫抑制微环境的形成。CAF 分泌

的 PDGF 通过自分泌和旁分泌作用,增强自身和周围细胞的促肿瘤活性。例如, CAFs 分泌的血小板衍生生长因子 - BB (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB) 可以通过激活肿瘤细胞和内皮细胞表面的 PDGFR, 促进细胞增殖和血管生成<sup>[29]</sup>。在口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 中 PDGF-BB 通过与血小板衍生生长因子受体  $\beta$  (platelet-derived growth factor receptor beta, PDGFR- $\beta$ ) 结合, 上调 CAFs 标志物的表达, 并通过长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA), LURAP1L 反义 RNA1/富含亮氨酸的适配蛋白 1 类似物/I $\kappa$ B 激酶 NF- $\kappa$ B/抑制蛋白核因子  $\kappa$ B 信号通路诱导成纤维细胞 (normal fibroblasts, NFs) 转化为 CAFs。lncRNAs 在细胞核中通过调节转录过程, 在细胞质中通过调节转录后基因表达和信号转导发挥作用<sup>[30]</sup>。lncRNA 芯片分析显示, PDGF-BB 诱导的 CAFs 中有 370 种 lncRNA 表达显著变化, 其中包括 240 种上调和 130 种下调的 lncRNA。LURAP1L-AS1 通过正调控 LURAP1L 的表达, 激活 IKK/NF- $\kappa$ B 信号通路, 而敲低 LURAP1L-AS1 则抑制了 PDGF-BB 诱导的 CAFs 标志物和信号通路蛋白的表达<sup>[31]</sup>。此外, PDGF-BB 通过 PDGFR- $\beta$  激活人类口腔黏膜成纤维细胞 (human oral mucosa fibroblasts, hOMFs), 并通过外泌体传递微小 RNA-3529-3p (microRNA-3529-3p, miR-3529-3p) 促进口腔鳞状细胞癌细胞的增殖、迁移、侵袭和抗凋亡能力<sup>[32]</sup>。在胆管癌 (cholangiocarcinoma, CCA) 中, CAFs 通过 PDGF-BB/PDGFR- $\beta$  信号网络明显提升淋巴管生成和肿瘤细胞迁移, 导致淋巴结转移和预后不良<sup>[33]</sup>。CAFs 分泌的 PDGF-BB 通过激活 PDGFR- $\beta$  及其下游的细胞外信号调节激酶 1/2/c-Jun 氨基末端激酶和血小板衍生生长因子受体  $\beta$ -糖原合酶激酶-p65 信号通路, 促进淋巴管生成<sup>[34]</sup>。PDGF 信号在 CAFs 的活化和肿瘤进展中通过多种机制和信号通路发挥作用, 特定的外泌体调控网络功能。靶向 PDGF 信号的癌症治疗策略应根据不同肿瘤类型进行针对性的调整。

#### 4.3 血管内皮生长因子

CAFs 通过分泌 VEGF 推动血管生成, 增加肿瘤的血液供应。研究表明, CAFs 在不同癌症类型中通过多种信号通路和机制调控 VEGF 表达和血

管生成, 这些机制增强了肿瘤细胞的迁移、侵袭和化疗耐药性。例如, 头颈部癌症研究发现, CAFs 通过分泌高水平的血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGF-A) 增强血管生成能力<sup>[35]</sup>; 在非小细胞肺癌研究中, CAFs 通过下调微小 RNA-101-3p (microRNA-101-3p, miR-101-3p) 来增加 VEGFA 的分泌, 激活蛋白激酶 B/内皮型一氧化氮合酶 (protein kinase B/endothelial nitric oxide synthase, AKT/eNOS) 信号通路, 从而促进肿瘤细胞的迁移和侵袭<sup>[36]</sup>; 胃癌研究发现, CAFs 通过神经纤毛蛋白 2 (neuropilin-2, NRP2) 和 VEGF 信号通路调控基质细胞衍生因子 1 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1) 的分泌, 增强化疗耐药性<sup>[37]</sup>; 在肾透明细胞癌研究, CXC 基序趋化因子配体 5 (C-X-C motif chemokine ligand 5, CXCL5) 通过趋化因子受体 2/酪氨酸激酶 Janus/信号转导及转录激活因子 3 (C-X-C chemokine receptor type 2/Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3, CXCR2/JAK/STAT3) 通路增加 VEGF 的表达, 促进 CAFs 的形成<sup>[38]</sup>。而乳腺癌研究显示, Fos 样抗原 2 (fos-like antigen 2, FOSL2) 在 CAFs 中通过激活无翼型整合位点家族成员 5A (wingless-type MMTV integration site family member 5A, Wnt5a) 促进非 VEGF 依赖的血管生成<sup>[39]</sup>。典型的 VEGF 依赖通路首先通过 VEGF 与其受体结合, 激活内皮细胞的增殖、迁移及新血管形成, 从而直接影响肿瘤细胞获取营养和氧气。相对而言, 非 VEGF 依赖机制可能通过其他生长因子或信号通路促进血管生成。为了实现更精准的干预效果, 靶向 CAF 和 VEGF 的治疗策略需要结合其特异性的调控路径, 来应对增强化疗耐药性的机制。

#### 5 促进免疫逃逸

除了支持肿瘤组织的血液供应和抵抗药物作用, CAFs 还通过与免疫细胞的复杂互动, 深刻影响着肿瘤的免疫逃逸机制, 尤其是骨髓源性抑制细胞、自然杀伤细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞和调节性 T 细胞相互作用, 有效抑制了抗肿瘤免疫反应, 从而促进肿瘤的进展和转移。具体而言, CAFs 不仅通过分泌趋化因子、调控铁死亡机制抑制 NK 细胞的功能, 还通过阻碍 CD8<sup>+</sup>T 细胞进入肿瘤微环

境,并与 Tregs 形成免疫突触,增强 Tregs 的抑制功能。这些复杂的细胞间互动为肿瘤的免疫逃逸创造了有利条件(图 4)。

### 5.1 骨髓源性抑制细胞

MDSCs 最初在晚期癌症患者中发现,现在被认为是许多病理环境和正常生理条件下的调节细胞。在癌症中,MDSCs 促进肿瘤进展,是天然抗肿瘤免疫的有效抑制剂,也是癌症免疫治疗的障碍<sup>[40]</sup>。MDSCs 和 CAFs 共同调控着肿瘤转移前微环境。研究表明,CAFs 在多种癌症(如膀胱癌和乳腺癌)复发和转移中起关键作用。在膀胱癌研究中,通过单细胞 RNA 测序识别出与复发相关的炎性 CAF 亚型,通过分泌单核细胞趋化蛋白-1 (C-C motif chemokine ligand, CCL2) 招募 MDSCs,形成免疫抑制微环境,促进肿瘤进展和化疗耐药性<sup>[41]</sup>。另有研究显示,聚腺苷二磷酸核糖聚合酶抑制剂(Olaparib, PARPi)通过抑制基质细胞衍生因子 1 $\alpha$ /CXC 趋化因子受体 4 轴(stromal cell-derived factor 1 alpha/ CXC chemokine receptor 4, SDF1 $\alpha$ /CXCR4)减少 MDSCs 的迁移,从而改善乳腺癌肿瘤微环境并增强嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T)细胞的

抗肿瘤效应。Olaparib 通过减少 CAFs 分泌的 SDF1 $\alpha$  和下调 CAFs 中的缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 alpha, HIF1 $\alpha$ ) 表达,抑制 MDSCs 迁移,促进 CD8<sup>+</sup>T 细胞在肿瘤组织中的存活<sup>[42]</sup>。此外,化疗药物如阿霉素通过诱导肺成纤维细胞中的补体因子表达,促进免疫抑制性转移环境的形成,从而支持肺转移。补体信号通过 CAFs 介导 MDSCs 向转移位点的募集,导致 T 细胞功能障碍。阻断补体信号可以缓解化疗引起的免疫失调,减轻肺转移<sup>[43]</sup>。CAF 通过分泌趋化因子来招募 MDSCs,后者在肿瘤微环境中的功能是抑制效应 T 细胞和其他抗肿瘤免疫细胞的活性。这种协同作用实际上是一种“免疫抑制循环”——CAF 吸引 MDSCs,MDSCs 进一步强化 CAF 的免疫抑制作用。这种机制为肿瘤细胞提供了双重保护,使得肿瘤对治疗产生更强的抵抗力,并增加了复发和转移的风险。靶向 CAF 和 MDSCs 的治疗策略应依据肿瘤的特异性特征及其分泌因子的差异进行个性化设计,而非采用统一的治疗方案,以实现更精准和有效的干预。

### 5.2 NK 细胞

NK 细胞对原发肿瘤细胞表现出天然的细胞

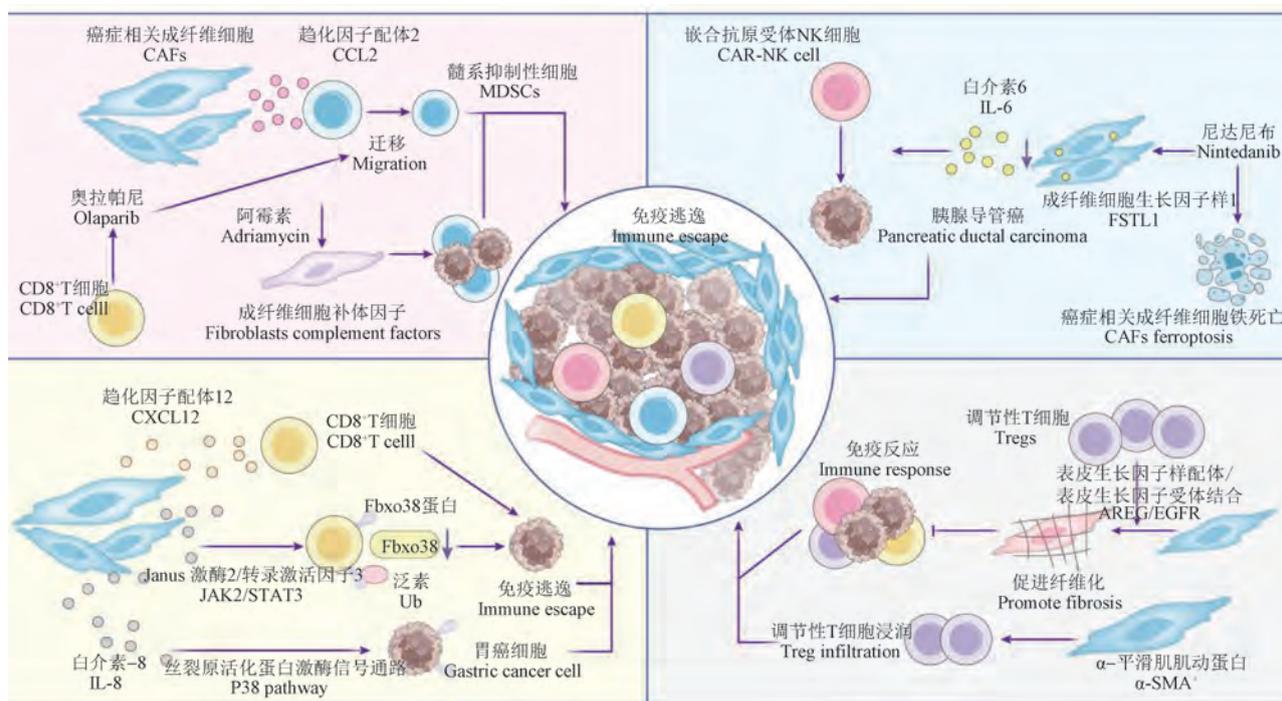


图 4 癌症相关成纤维细胞促进免疫逃逸

Figure 4 CAFs promote the occurrence of immune escape

毒性,并通过抑制癌细胞增殖、迁移和向远器官定植来抑制转移。然而,NK 细胞功能在肿瘤微环境普遍受到抑制,这为肿瘤进展提供了有利条件<sup>[44]</sup>。CAFs 通过多种机制抑制 NK 细胞功能,削弱其抗肿瘤能力,从而促进肿瘤进展和转移。研究发现,高表达的铁氧还蛋白 1(ferredoxin 1,FDX1)与结肠腺癌中 CD8<sup>+</sup>T 细胞和 NK 细胞的浸润正相关,而与 CAFs 的浸润负相关<sup>[45]</sup>。此外,白介素 15(interleukin 15,IL-15)分泌的 CD70 嵌合抗原受体自然杀伤(CD70 chimeric antigen receptor natural killer,CD70-CAR-NK)细胞对 CD70 高表达的肿瘤细胞和 CAFs 表现出强大的杀伤能力,并在小鼠模型中显著降低肿瘤负荷,揭示了 CD70 作为治疗靶点的潜力<sup>[46]</sup>。尼达尼布通过减少 CAFs 分泌的 IL-6,恢复 NK 细胞功能,显著增强了 CAR-NK 细胞对胰腺导管癌的杀伤效果<sup>[47]</sup>。CAFs 通过铁调控和铁死亡机制抑制 NK 细胞功能,研究显示,CAFs 上调铁输出蛋白和 Follistatin 样蛋白 1(Follistatin-like1,FSTL1),诱导 NK 细胞铁死亡,削弱其抗肿瘤能力<sup>[48]</sup>。此外,空间转录组学分析揭示了 CAFs 与肿瘤微环境成分之间的广泛相互作用,特别是其通过减少抗肿瘤免疫细胞如 NK 细胞,促进肿瘤进展和转移<sup>[49]</sup>。NK 细胞作为天然免疫系统的第一道防线,能够通过识别异常的细胞表面标志来杀伤肿瘤细胞。然而,在肿瘤微环境中,CAFs 通过分泌抑制性因子形成物理屏障,显著削弱了 NK 细胞的抗肿瘤活性。CAFs 的免疫抑制作用高度保守,成为 NK 细胞抗肿瘤作用的主要障碍。在某些情况下,直接靶向 CAFs 可能比单纯增强 NK 细胞功能更为有效,尤其是在 CAFs 强烈抑制 NK 细胞的情形下。而如尼达尼布等药物则可以通过改善肿瘤微环境来恢复 NK 细胞活性,表明靶向 CAFs 的治疗策略应依据肿瘤微环境的具体特征进行优化选择。

### 5.3 CD8<sup>+</sup>T 细胞

CD8<sup>+</sup>T 细胞,又称细胞毒性 T 淋巴细胞,在识别肿瘤细胞相关的特异性抗原和 I 类主要组织相容性复合体分子后,通过分泌各种细胞因子参与免疫功能,在抗肿瘤免疫中起关键作用<sup>[50]</sup>。连接素 2(nectin cell adhesion molecule 2,NECTIN2)是 CAFs 抑制 T 细胞的关键因子,阻断

NECTIN2 信号通路可部分恢复 T 细胞功能<sup>[51]</sup>。CAFs 分泌的趋化因子如 CXC 基序趋化因子配体 12(CXC motif chemokine ligand 12,CXCL12)增强了 CD8<sup>+</sup>T 细胞向 CAFs 的趋化作用,从而阻止其到达肿瘤细胞<sup>[52]</sup>。CAFs 衍生的 IL-8 通过 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase,p38 MAPK)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase,JNK)和核因子  $\kappa$ B(nuclear factor kappa B,NF- $\kappa$ B)通路促进了胃癌细胞中程序性死亡配体 1(programmed death-ligand 1,PD-L1)的表达,导致 T 细胞功能抑制或失效,从而促进肿瘤免疫逃逸。CAFs 共培养的胃癌细胞对 CD8<sup>+</sup>T 细胞细胞毒性的抵抗力减弱<sup>[53]</sup>。此外,一项针对 146 例原发性胃癌患者的研究发现,血清 IL-8 水平升高和淋巴结转移与胃癌不良预后之间存在关联。研究发现,肿瘤来源的 IL-8 主要由胃癌 CAFs 产生。IL-8 通过 Janus 激酶 2/信号转导及转录激活因子 3(Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3,JAK2/STAT3)信号通路上调 CD8<sup>+</sup>T 细胞中的 PD-1 表达,并通过下调 F-box 蛋白 38(F-box protein 38,Fbxo38)抑制 PD-1 的泛素化,导致免疫抑制,从而促进胃癌的淋巴结转移。在体内小鼠模型中,IL-8 通过上调 CD8<sup>+</sup>T 细胞中的 PD-1 促进淋巴结转移,而抗 PD-1 治疗可以减少其发生<sup>[54]</sup>。CAFs 通过分泌趋化因子、细胞因子以及调控 PD-1/PD-L1 通路,显著削弱 CD8<sup>+</sup>T 细胞的杀伤功能。这种对 T 细胞的抑制作用在多种癌症中具有高度一致性。此外,CAFs 通过重塑肿瘤微环境,减少 T 细胞的浸润并抑制其活性,成为肿瘤免疫逃逸的关键因素。这种多层次的调控机制,使 CAFs 在肿瘤进展和免疫抑制中发挥了核心作用。

### 5.4 调节性 T 细胞

调节性 T 细胞可以抑制 CD8<sup>+</sup>T 细胞、NK 细胞的抗肿瘤细胞毒活性,从而导致抗肿瘤细胞的衰竭、免疫逃逸和肿瘤进展。这些变化促进了 Tregs 在 TME 中的生存、稳定和数量增加<sup>[55]</sup>。研究者探讨了 Tregs 和 CAFs 在肿瘤转移前微环境中的相互作用机制。研究发现, $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白的癌相关成纤维细胞( $\alpha$ -smooth muscle actin-cancer-associated fibroblasts, $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>CAFs)能够与叉头蛋白 P3 阳性(forkhead box P3 positive,

Foxp3<sup>+</sup>Tregs)形成免疫突触,通过自噬途径处理和呈递肿瘤抗原,促进 Tregs 的运动停止、激活和增殖,从而支持肿瘤发展。条件性敲除  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白阳性( $\alpha$ -smooth muscle actin positive,  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>)中的自噬相关基因 5 (autophagy-related gene 5, Atg5)可以减少 Tregs 的浸润,减缓肿瘤进展,并增强抗肿瘤免疫反应<sup>[56]</sup>。此外,研究还发现, Tregs 通过双调蛋白/表皮生长因子受体轴 (amphiregulin/epidermal growth factor receptor, AREG/EGFR)与 CAFs 交互,促进 CAFs 的促纤维化状态,进而抑制抗肿瘤免疫反应。阻断 AREG 显著减少了 CAFs 中促进纤维化和抗原呈递的基因表达,同时增加了炎症相关基因的表达<sup>[57]</sup>。通过深入了解 CAFs 与 Tregs 的相互作用,研究为开发新的免疫治疗策略提供了新的思路,特别是针对 CAFs 和 Tregs 的相互作用,可能有助于改善肿瘤患者的预后。CAFs 与 Tregs 在肿瘤微环境中的相互作用是推动肿瘤免疫逃逸的关键因素。通过破坏两者之间的相互作用,可以有效减弱肿瘤微环境中的免疫抑制,进而增强抗肿瘤免疫反应。靶向自噬和纤维化分别代表了不同的治疗策略。阻断自噬途径可以直接减少 Tregs 的活性和数量,而阻断纤维化则通过重塑肿瘤微环境,降低免疫抑制状态,从而提升抗肿瘤免疫效果。

## 6 总结与展望

本文系统地总结了 CAF 在肿瘤 PMN 形成中的多方面作用。CAFs 通过分泌多种生长因子(如 FGF、PDGF、VEGF)和细胞因子(如 IL-6、IL-8、CXCL12),在肿瘤发生、进展、转移及耐药性中扮演关键角色<sup>[58]</sup>。CAFs 通过调控肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭及免疫逃逸,促进新生血管生成、免疫抑制和细胞外基质重塑<sup>[59]</sup>。靶向 CAFs 及其相关通路的靶向治疗策略具有巨大潜力,通过干扰 CAFs 信号传导和抑制 CAFs 与肿瘤细胞及其他微环境成分的相互作用,可能有效阻止肿瘤细胞在新部位的定植和生长,从而改善转移性癌症患者的预后<sup>[60]</sup>。此外,将免疫治疗和 CAFs 靶向疗法结合,可能显著增强抗肿瘤免疫反应,减少肿瘤复发和转移<sup>[61]</sup>。尽管已知 CAFs 与其他微环境成分(如免疫细胞、内皮细胞)的相互作用对肿瘤进展具有重要影响,但这些交互作用的具体机

制仍未完全阐明。目前,许多关于 CAFs 作用机制的研究主要依赖于动物模型。然而,动物模型中的肿瘤微环境与人类肿瘤微环境可能存在显著差异,这可能影响研究结果的外推性和临床转化<sup>[62]</sup>。除此之外,现有动物模型难以完全模拟人类癌症的异质性和复杂性<sup>[63]</sup>。尽管实验室研究揭示了 CAFs 在肿瘤进展中的关键作用,但针对 CAFs 靶向治疗的临床研究仍较少。缺乏大规模临床试验的数据支持,使得 CAFs 靶向治疗策略的实际效果和安全性尚未得到充分验证。

展望未来,针对 CAFs 及其相关通路的靶向治疗策略具有巨大的潜力。通过干扰 CAFs 信号传导、抑制 CAFs 与肿瘤细胞及其他微环境成分的相互作用,可能有效阻止肿瘤细胞在新部位的定植和生长,改善转移性癌症患者的预后。此外,结合免疫治疗和 CAFs 靶向疗法,可能显著增强抗肿瘤免疫反应,减少肿瘤复发和转移。未来的研究需进一步探索 CAFs 的异质性及其在不同癌症类型中的具体机制,为开发更精准、高效的治疗策略提供理论基础和实验支持。

## 参考文献:

- [1] BARBAZAN J, VIGNJEVIC D M. Cancer associated fibroblasts: is the force the path to the dark side? [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2019, 56: 71-79.
- [2] NAGAO Y, YOKOI A, YOSHIDA K, et al. Uterine leiomyosarcoma cell-derived extracellular vesicles induce the formation of cancer-associated fibroblasts [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1870(4): 167103.
- [3] JANG I, BENINGO K A. Integrins, CAFs and mechanical forces in the progression of cancer [J]. *Cancers*, 2019, 11(5): 721.
- [4] LOH J J, MA S. The role of cancer-associated fibroblast as a dynamic player in mediating cancer stemness in the tumor microenvironment [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 727640.
- [5] MILOSEVIC V, ÖSTMAN A. Interactions between cancer-associated fibroblasts and T-cells; functional crosstalk with targeting and biomarker potential [J]. *Ups J Med Sci*, 2024, 129: 129.
- [6] RIZZOLIO S, GIORDANO S, CORSO S. The importance of being CAFs (in cancer resistance to targeted therapies) [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 319.
- [7] TSOUMAKIDOU M. The advent of immune stimulating CAFs in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23(4): 258-

- 269.
- [ 8 ] GUO T, XU J. Cancer-associated fibroblasts: a versatile mediator in tumor progression, metastasis, and targeted therapy [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2024, 43(3): 1095–1116.
- [ 9 ] CHENG J N, YUAN Y X, ZHU B, et al. Myeloid-derived suppressor cells: a multifaceted accomplice in tumor progression [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 740827.
- [10] LIU H, ZHANG G, GAO R. Cellular and molecular characteristics of the premetastatic niches [J]. *Anim Model Exp Med*, 2023, 6(5): 399–408.
- [11] BARBAZAN J, PÉREZ-GONZÁLEZ C, GÓMEZ-GONZÁLEZ M, et al. Cancer-associated fibroblasts actively compress cancer cells and modulate mechanotransduction [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6966.
- [12] PAPAÏT A, ROMOLI J, STEFANI F R, et al. Fight the cancer, hit the CAF! [J]. *Cancers*, 2022, 14(15): 3570.
- [13] WRIGHT K, LY T, KRIET M, et al. Cancer-associated fibroblasts: master tumor microenvironment modifiers [J]. *Cancers*, 2023, 15(6): 1899.
- [14] CANNONE S, GRECO M R, CARVALHO T M A, et al. Cancer associated fibroblast (CAF) regulation of PDAC parenchymal (CPC) and CSC phenotypes is modulated by ECM composition [J]. *Cancers*, 2022, 14(15): 3737.
- [15] LIU X, LI J, YANG X, et al. Carcinoma-associated fibroblast-derived lysyl oxidase-rich extracellular vesicles mediate collagen crosslinking and promote epithelial-mesenchymal transition via p-FAK/p-paxillin/YAP signaling [J]. *Int J Oral Sci*, 2023, 15(1): 32.
- [16] KIM D K, KIM E K, JUNG D W, et al. Cytoskeletal alteration modulates cancer cell invasion through RhoA-YAP signaling in stromal fibroblasts [J]. *PLoS One*, 2019, 14(3): e0214553.
- [17] WINKLER J, ABISOYE-OGUNNIYAN A, METCALF K J, et al. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5120.
- [18] LIU T, ZHOU L, YANG K, et al. The  $\beta$ -catenin/YAP signaling axis is a key regulator of melanoma-associated fibroblasts [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2019, 4: 63.
- [19] FATTET L, JUNG H Y, MATSUMOTO M W, et al. Matrix rigidity controls epithelial-mesenchymal plasticity and tumor metastasis via a mechanoresponsive EPHA2/LYN complex [J]. *Dev Cell*, 2020, 54(3): 302–316.
- [20] TAKATSU F, SUZAWA K, TOMIDA S, et al. Periostin secreted by cancer-associated fibroblasts promotes cancer progression and drug resistance in non-small cell lung cancer [J]. *J Mol Med*, 2023, 101(12): 1603–1614.
- [21] ZHANG Y, SUN S, QI Y, et al. Characterization of tumour microenvironment reprogramming reveals invasion in epithelial ovarian carcinoma [J]. *J Ovarian Res*, 2023, 16(1): 200.
- [22] GHOFRANI-SHAHPAR M, PAKRAVAN K, RAZMARA E, et al. Cancer-associated fibroblasts drive colorectal cancer cell progression through exosomal miR-20a-5p-mediated targeting of PTEN and stimulating interleukin-6 production [J]. *BMC Cancer*, 2024, 24(1): 400.
- [23] JIANG B, XIAO S, ZHANG S, et al. The miR-1290/OGN axis in ovarian cancer-associated fibroblasts modulates cancer cell proliferation and invasion [J]. *J Ovarian Res*, 2024, 17(1): 52.
- [24] KUMAR D, NEW J, VISHWAKARMA V, et al. Cancer-associated fibroblasts drive glycolysis in a targetable signaling loop implicated in head and neck squamous cell carcinoma progression [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(14): 3769–3782.
- [25] AWAJI M, FUTAKUCHI M, HEAVICAN T, et al. Cancer-associated fibroblasts enhance survival and progression of the aggressive pancreatic tumor via FGF-2 and CXCL8 [J]. *Cancer Microenviron*, 2019, 12(1): 37–46.
- [26] BORDIGNON P, BOTTONI G, XU X, et al. Dualism of FGF and TGF- $\beta$  signaling in heterogeneous cancer-associated fibroblast activation with ETV1 as a critical determinant [J]. *Cell Rep*, 2019, 28(9): 2358–2372.
- [27] CHEN J, HUANG Q, LI Y Q, et al. Comparative single-cell analysis reveals heterogeneous immune landscapes in adenocarcinoma of the esophagogastric junction and gastric adenocarcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(1): 15.
- [28] SOONGSATHITANON J, JAMJUNTRA P, SUMRANSUB N, et al. Crosstalk between tumor-infiltrating immune cells and cancer-associated fibroblasts in tumor growth and immunosuppression of breast cancer [J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021: 8840066.
- [29] LIANG X, WANG X. LncRNAs: Current understanding, future directions, and challenges [J]. *Anim Model Exp Med*, 2023, 6(6): 505–507.
- [30] MORI Y, OKIMOTO Y, SAKAI H, et al. Targeting PDGF signaling of cancer-associated fibroblasts blocks feedback activation of HIF-1 $\alpha$  and tumor progression of clear cell ovarian cancer [J]. *Cell Rep Med*, 2024, 5(5): 101532.
- [31] REN X, LI L, WU J, et al. PDGF-BB regulates the transformation of fibroblasts into cancer-associated fibroblasts via the lncRNA LURAP1L-AS1/LURAP1L/IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2021, 22(1): 537.
- [32] YOU D, WANG Y, XU J, et al. miR-3529-3p from PDGF-BB-induced cancer-associated fibroblast-derived exosomes promotes the malignancy of oral squamous cell carcinoma [J]. *Discov Oncol*, 2023, 14(1): 166.
- [33] CADAMURO M, BRIVIO S, MERTENS J, et al. Platelet-

- derived growth factor-D enables liver myofibroblasts to promote tumor lymphangiogenesis in cholangiocarcinoma [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(4): 700–709.
- [34] YAN J, XIAO G, YANG C, et al. Cancer-associated fibroblasts promote lymphatic metastasis in cholangiocarcinoma via the PDGF-BB/PDGFR- $\beta$  mediated paracrine signaling network [J]. *Aging Dis*, 2024, 15(1): 369–389.
- [35] ZHOU J, SCHWENK-ZIEGER S, KRANZ G, et al. Isolation and characterization of head and neck cancer-derived peritumoral and cancer-associated fibroblasts [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 984138.
- [36] GUO X, CHEN M, CAO L, et al. Cancer-associated fibroblasts promote migration and invasion of non-small cell lung cancer cells via miR-101-3p mediated VEGFA secretion and AKT/ENOS pathway [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 764151.
- [37] LIU Y, QU H C, HUANG Y. Renal clear cell carcinoma-derived CXCL5 drives tumor-associated fibroblast formation and facilitates cancer progression [J]. *Pathol Res Pract*, 2023, 244: 154319.
- [38] WAN X, GUAN S, HOU Y, et al. FOSL2 promotes VEGF-independent angiogenesis by transcriptionally activating Wnt5a in breast cancer-associated fibroblasts [J]. *Theranostics*, 2021, 11(10): 4975–4991.
- [39] YANG Y, MA Y, YAN S, et al. CAF promotes chemoresistance through NRP2 in gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2022, 25(3): 503–514.
- [40] OSTRAND-ROSENBERG S, LAMB T J, PAWELEC G. Here, there, and everywhere: myeloid-derived suppressor cells in immunology [J]. *J Immunol*, 2023, 210(9): 1183–1197.
- [41] LIANG T, TAO T, WU K, et al. Cancer-associated fibroblast-induced remodeling of tumor microenvironment in recurrent bladder cancer [J]. *Adv Sci*, 2023, 10(31): e2303230.
- [42] SUN R, LUO H, SU J, et al. Olaparib suppresses MDSC recruitment via SDF1 $\alpha$ /CXCR4 axis to improve the anti-tumor efficacy of CAR-T cells on breast cancer in mice [J]. *Mol Ther*, 2021, 29(1): 60–74.
- [43] MONTERAN L, ERSHAID N, DORON H, et al. Chemotherapy-induced complement signaling modulates immunosuppression and metastatic relapse in breast cancer [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 5797.
- [44] JIN H, KIM H J. NK cells lose their cytotoxicity function against cancer stem cell-rich radiotherapy-resistant breast cancer cell populations [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9639.
- [45] WANG L, CAO Y, GUO W, et al. High expression of cuproptosis-related gene FDX1 in relation to good prognosis and immune cells infiltration in colon adenocarcinoma (COAD) [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023, 149(1): 15–24.
- [46] VAN DEN EYNDE A, GEHRCKEN L, VERHEZEN T, et al. IL-15-secreting CAR natural killer cells directed toward the pan-cancer target CD70 eliminate both cancer cells and cancer-associated fibroblasts [J]. *J Hematol Oncol*, 2024, 17(1): 8.
- [47] LEE Y E, GO G Y, KOH E Y, et al. Synergistic therapeutic combination with a CAF inhibitor enhances CAR-NK-mediated cytotoxicity via reduction of CAF-released IL-6 [J]. *J Immunother Cancer*, 2023, 11(2): e006130.
- [48] YAO L, HOU J, WU X, et al. Cancer-associated fibroblasts impair the cytotoxic function of NK cells in gastric cancer by inducing ferroptosis via iron regulation [J]. *Redox Biol*, 2023, 67: 102923.
- [49] PENG Z, YE M, DING H, et al. Spatial transcriptomics atlas reveals the crosstalk between cancer-associated fibroblasts and tumor microenvironment components in colorectal cancer [J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 302.
- [50] LUAN J, LIU Y, CAO M, et al. The pathogenic response of cytotoxic T-lymphocytes, a common therapeutic target for cancer, has a direct impact on treatment outcomes (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2024, 52(1): 98.
- [51] AGORKU D J, BOSIO A, ALVES F, et al. Colorectal cancer-associated fibroblasts inhibit effector T cells via NECTIN2 signaling [J]. *Cancer Lett*, 2024, 595: 216985.
- [52] GORCHS L, KAIPE H. Interactions between cancer-associated fibroblasts and T cells in the pancreatic tumor microenvironment and the role of chemokines [J]. *Cancers*, 2021, 13(12): 2995.
- [53] LOU M, IWATSUKI M, WU X, et al. Cancer-associated fibroblast-derived IL-8 upregulates PD-L1 expression in gastric cancer through the NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Ann Surg Oncol*, 2024, 31(5): 2983–2995.
- [54] LI X, ZHAI J, SHEN Y, et al. Tumor-derived IL-8 facilitates lymph node metastasis of gastric cancer via PD-1 up-regulation in CD8<sup>+</sup> T cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2022, 71(12): 3057–3070.
- [55] BLINOVA V G, ZHDANOV D D. Many faces of regulatory T cells: heterogeneity or plasticity? [J]. *Cells*, 2024, 13(11): 959.
- [56] VARVERI A, PAPADOPOULOU M, PAPADOVASILAKIS Z, et al. Immunological synapse formation between T regulatory cells and cancer-associated fibroblasts promotes tumour development [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 4988.
- [57] SUN R, ZHAO H, GAO D S, et al. Amphiregulin couples

- IL1RL1<sup>+</sup> regulatory T cells and cancer-associated fibroblasts to impede antitumor immunity [J]. *Sci Adv*, 2023, 9(34): eadd7399.
- [58] DONG G, CHEN P, XU Y, et al. Cancer-associated fibroblasts: Key criminals of tumor pre-metastatic niche [J]. *Cancer Lett*, 2023, 566: 216234.
- [59] DHUNGEL N, DRAGOI A M. Exploring the multifaceted role of direct interaction between cancer cells and fibroblasts in cancer progression [J]. *Front Mol Biosci*, 2024, 11: 1379971.
- [60] LU S, HUA J, XU J, et al. Turning towards nonimmunoreactive tumors: Evaluation of cancer-associated fibroblasts enables prediction of the immune microenvironment and treatment sensitivity in pancreatic cancer [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2022, 20: 3911-3923.
- [61] GENG X, CHEN H, ZHAO L, et al. Cancer-associated fibroblast (CAF) heterogeneity and targeting therapy of CAFs in pancreatic cancer [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 655152.
- [62] OLIVEIRA R C, ABRANTES A M, TRALHÃO J G, et al. The role of mouse models in colorectal cancer research-the need and the importance of the orthotopic models [J]. *Anim Model Exp Med*, 2020, 3(1): 1-8.
- [63] SAJJAD H, IMTIAZ S, NOOR T, et al. Cancer models in preclinical research: a chronicle review of advancement in effective cancer research [J]. *Anim Model Exp Med*, 2021, 4(2): 87-103.

[收稿日期]2024-09-02

编者·读者·作者

## 《中国比较医学杂志》不接收使用水合氯醛进行动物麻醉文章的说明

本刊严格遵守我国实验动物相关法规和标准,为保障实验动物的福利权益,不断提升动物实验研究的水平并获得国际学术界同行的认可,根据国际和国内实验动物有关法规和标准,规定实验动物麻醉镇痛用药必须优先使用药用级麻醉剂,特别是当涉及存活手术的动物实验时。

鉴于水合氯醛属于镇静、催眠以及抗惊厥药物,其作为麻醉剂效果较差,只作用于中枢神经系统,无法阻断痛觉感受器达到镇痛效果,且刺激性强、毒副作用较大,存在干扰实验结果且有悖于实验动物伦理审查原则等问题,国际期刊普遍建议不再使用水合氯醛作为实验动物的麻醉剂。

本刊亦不接收使用水合氯醛作为实验动物麻醉剂的文章,特此告知广大作者及读者。

《中国比较医学杂志》编辑部

彭佳华,梁瑞宁,宋鑫,等. 铁死亡在子宫内膜异位症中的研究现状 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(1): 139-146.  
Peng JH, Liang RN, Song X, et al. Current research status of ferroptosis in endometriosis [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 139-146.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.014

# 铁死亡在子宫内膜异位症中的研究现状

彭佳华,梁瑞宁,宋鑫,孙宇,简晖\*,罗小泉\*

(江西中医药大学,南昌 330004)

**【摘要】** 子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)是全球女性健康面临的常见挑战。近年来,铁死亡作为一种新兴的细胞程序性死亡方式,在EMs研究中备受瞩目。在疾病机制方面,铁死亡通过铁过载诱导,推动卵巢EMs的纤维化,同时通过调控多条信号通路如p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)/信号转导子和转录激活子6(signal transducer and activator of transcription 6, STAT6),促进血管生成、自噬等,加剧病情进展。在不孕问题上,铁死亡影响胚胎发育和卵巢功能,显著降低生育能力。诊断方面,铁死亡相关基因高表达为EMs的早期诊断提供了潜在的标志物,有效区分患者和健康个体,具有重要的临床应用价值。治疗策略上,Erastin等非天然化合物及白藜芦醇、熊果酸和汉黄芩素等天然化合物,展现出潜在的治疗效果,可缓解EMs的病理进程和相关症状。因此,本文通过综述铁死亡在EMs发病机制、不孕问题、诊断和治疗中的多重作用,全面阐述了铁死亡在子宫内膜异位症中的关键作用,探索其作为诊断标志物和治疗靶点的潜力,为EMs的管理提供新的理论支持和治疗策略。

**【关键词】** 铁死亡;子宫内膜异位症;发病机制

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2025)01-0139-08

## Current research status of ferroptosis in endometriosis

PENG Jiahua, LIANG Ruining, SONG Xin, SUN Yu, JIAN Hui\*, LUO Xiaoquan\*

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

**【Abstract】** Endometriosis presents a common challenge in global women's health. Ferroptosis, as an emerging form of regulated cell death, has recently attracted attention in relation to endometriosis. In terms of disease mechanisms, ferroptosis drives ovarian endometrial fibrosis via the induction of iron overload, and promotes disease progression by regulating multiple signaling pathways, such as p38 mitogen-activated protein kinase/signal transducer and activator of transcription 6 (p38MAPK/STAT6), promote angiogenesis, autophagy, etc, fueling disease progression. In terms of infertility, ferroptosis affects embryo development and ovarian function, thereby reducing fertility. From a diagnostic perspective, high expression of ferroptosis-related genes provides potential biomarkers for

**【基金项目】** 江西省自然科学基金(20232BAB216115);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ2200915);江西省中医药管理局科技计划项目(2019A085);江西省研究生创新专项资金(YC2023-B220);中医女性生殖健康及相关疾病研究与转化江西省重点实验室(2024SSY06311);江西中医药大学校级科技创新团队发展计划(CXTD22013)。

**【作者简介】** 彭佳华(1992—),女,博士,讲师,研究方向:中医药防治妇科疾病。E-mail:397090311@qq.com

**【通信作者】** 简晖(1961—),男,博士,教授,研究方向:中医学。E-mail:jianhui126@126.com

罗小泉(1966—),男,博士,教授,研究方向:实验动物学。E-mail:lxqdl@126.com \*共同通信作者

the early diagnosis of endometriosis, effectively distinguishing patients from healthy individuals, and showing important clinical value. In terms of treatment strategies, non-natural compounds such as Erastin, as well as natural compounds such as resveratrol, ursolic acid, and baicalein, have shown potential therapeutic effects in relieving the pathological process and related symptoms of endometriosis. This review comprehensively elucidates the key role of ferroptosis in endometriosis in terms of the disease mechanisms, infertility, diagnosis, and treatment, and explores its potential as a diagnostic biomarker and therapeutic target, thus providing new theoretical support and treatment strategies for the management of endometriosis.

**【Keywords】** ferroptosis; endometriosis; pathogenesis

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

子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)是慢性疾病,长期影响着育龄期女性的生殖系统健康,患病率约为 10%~15%<sup>[1]</sup>。其特征是子宫内膜组织在子宫以外的区域生长,如盆腔、卵巢、膀胱和肠道等处。这些异位组织在月经周期中会经历与正常子宫内膜相似的变化,包括出血、脱落和引起炎症反应。然而,由于无法通过正常的生理途径排出体外,患者出现慢性盆腔疼痛、不孕、性交困难以及月经异常等一系列症状,严重影响患者的身心健康和生活质量<sup>[2]</sup>。至今,EMs 的发病机制尚未完全阐明,主要涉及激素、经血逆流、免疫系统异常、遗传以及生活方式和环境等多个因素的综合影响<sup>[3]</sup>。治疗方法包括药物治疗、手术干预和辅助生殖技术等多种手段。然而,当前尚未有一种能够完全治愈该疾病的方法,因此管理 EMs 是一项长期而复杂的任务<sup>[4]</sup>。

铁死亡是一种特殊的细胞死亡方式,由于细胞内铁离子过度积聚而发生。相比于传统的凋亡、自噬和坏死,铁死亡是近期才发现的一种细胞死亡类型,具有独特的特征和调控机制,主要特征包括脂质过氧化、胞内铁积聚、胞外泡囊生成和线粒体损伤<sup>[5]</sup>。铁离子在细胞内的过度积聚导致氧化应激,尤其是引发脂质过氧化。调控铁死亡涉及多个分子机制,其中谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 和铁死亡抑制蛋白 1 (ferroptosis suppressor protein 1, FSP1) 是关键的调控蛋白,分别通过抑制脂质过氧化和调节氧化还原反应来防止铁死亡的发生<sup>[6]</sup>。

周期性出血引起 EMs 可能导致机体内铁过载,而局部铁过载则可能通过氧化应激和对细胞死亡的调节影响异位子宫内膜组织的生理功

能<sup>[7]</sup>。这些内在联系可能对 EMs 的病理生理过程产生影响。近年来,铁死亡在 EMs 发生和发展中的作用被广泛报道,相关研究在迅速发展。未来的工作将更深入地揭示其在 EMs 生理和病理过程中的作用,为新的治疗策略提供理论基础。本文将对铁死亡在 EMs 中的研究进行综述,以期 EMs 开辟新的认识途径,为开发更好的治疗方案提供潜在的突破口。

## 1 铁死亡在 EMs 发病机制中的作用

铁死亡在子宫内膜异位症发病机制中的作用正逐渐受到关注。EMs 是一种引发复杂免疫与炎症反应的女性生殖系统疾病,其核心病理过程包括异常免疫激活、炎症引发的组织增殖和迁移,以及异常神经-血管网络的形成。这一过程导致盆腔内异位组织的不断扩张,形成粘连和瘢痕,进而引发疼痛、月经不规律和生育问题<sup>[8]</sup>。有学者在微阵列数据中筛选 EMs 相关差异表达基因时发现,其差异表达基因与铁死亡相关基因存在高度的相关性<sup>[9]</sup>。这提示铁死亡在 EMs 的发病过程中扮演了重要角色<sup>[10]</sup>。

研究发现卵巢 EMs 异位组织比在位组织中 铁的含量显著增加,体内药物筛选发现柠檬酸铁铵可加重异位子宫内膜间质中肌成纤维细胞比例并降低间充质基质细胞比例。然而,通过螯合细胞内甲磺酸去铁胺或应用铁死亡抑制剂来破坏细胞内铁水平可以逆转这一过程<sup>[11]</sup>。这些结果表明,因铁过载诱导的铁死亡,在卵巢 EMs 纤维化中起着至关重要的作用。另一方面,卵巢 EMs 囊肿壁基质细胞发生铁死亡后,可促进血管生成、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 和白细胞介素 8 (interleukin 8, IL8) 分泌。抑制 p38 丝裂原活化

蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)/信号转导子和转录激活子 6 (signal transducer and activator of transcription 6, STAT6) 信号通路可下调 VEGFA 和 IL8 表达<sup>[12]</sup>。这提示卵巢 EMs 中的铁死亡可能通过 p38 MAPK/STAT6 信号轴调控细胞因子分泌促进血管生成,从而推动 EMs 的发展。此外,研究人员应用免疫组织化学染色和蛋白质印迹技术检测了 EMs 患者异位组织中蛋白质的表达情况,发现苜蓿素 1 (BECN1) 重组蛋白 (recombinant beclin 1, Beclin1) 和微管相关蛋白 1A/1B - 轻链 3 (MAP1LC3, LC3) 高表达,动力蛋白激活蛋白 4 (dynactin 4, p62)、GPX4 和肿瘤蛋白 53 (tumor protein 53, p53) 低表达。在 EMs 大鼠模型和细胞培养实验中发现自噬诱导剂雷帕霉素可增加 EMs 细胞中的铁含量、活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、脂质过氧化物和自噬蛋白表达,自噬抑制剂 SignalSilence (R) Atg5 siRNA (si-Atg5) 则表现出相反效果。使用铁死亡诱导剂 Erastin 能够逆转 si-Atg5 对 EMs 细胞的影响<sup>[13]</sup>。这些结果表明自噬依赖性铁死亡在 EMs 的进展中发挥一定作用 (见图 1)。

以上研究显示铁死亡在 EMs 发生和发展中的重要推动作用,未来的研究应进一步探讨铁死亡与 EMs 病理过程之间的分子机制,特别是其在纤维化、血管生成和炎症中的具体作用机制;以及铁死亡如何与其他细胞死亡方式 (如凋亡、焦亡等) 相互作用,以及在不同类型的 EMs 中是否存在差异等。这些都是未来研究的重要方向,可为开发基于铁死亡的 EMs 治疗策略提供新的思路和理论基础。

## 2 铁死亡在 EMs 相关不孕中的作用

有研究指出,铁死亡可能通过铁依赖性脂质过氧化膜损伤,对卵巢颗粒细胞、卵母细胞等生殖系统细胞,以及胚胎产生有害影响,进而影响生育能力,可引发与 EMs 相关的不孕问题<sup>[14]</sup>。LI 等<sup>[15]</sup>在 EMs 小鼠模型中发现,腹膜液中的铁过载可破坏胚泡形成,降低 GPX4 表达并诱导脂质过氧化;而铁过载引发的细胞毒性可被铁死亡抑制剂 Ferrostatin1 (Fer-1) 减弱。单细胞转录组测序分析显示,血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HMOX1) 在胚胎铁死亡中上调,通过维持线粒体功能来抑制铁死亡。这项研究为 EMs 相关不孕

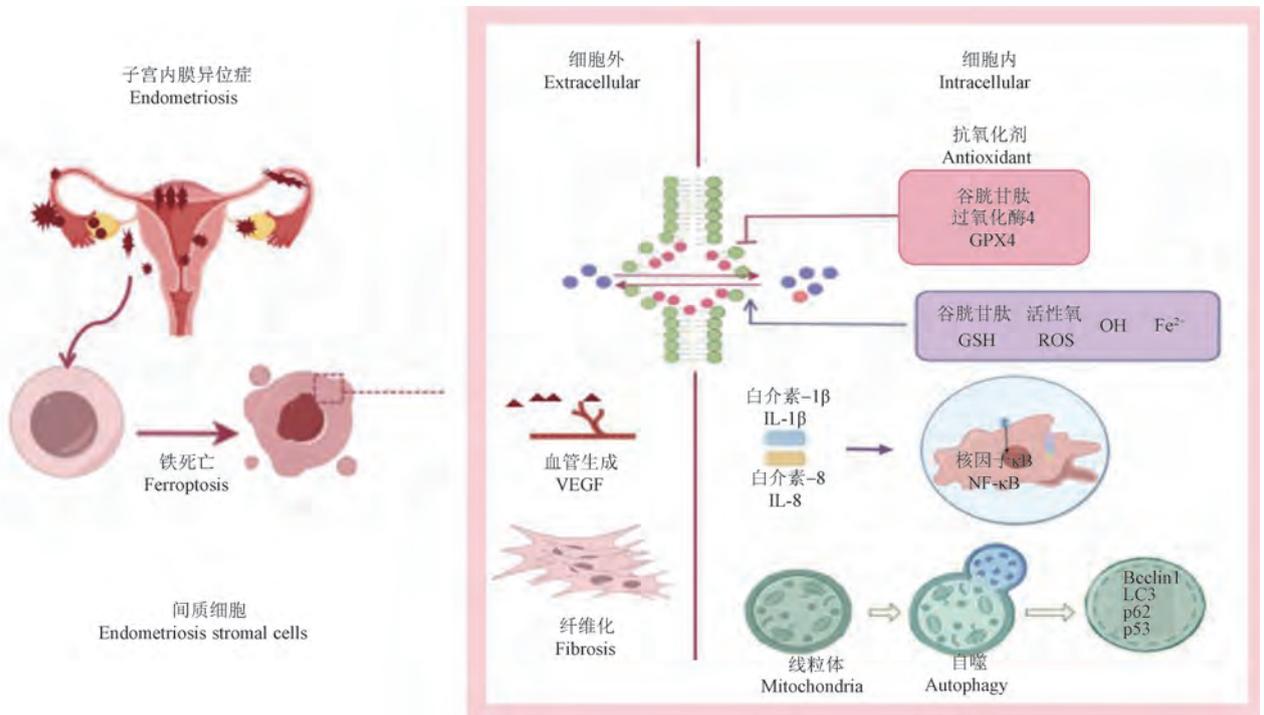


图 1 EMs 铁死亡发生的机制

Figure 1 Mechanisms underlying ferroptosis cell death in EMs

的机制提供了新的见解,并为未来治疗工作提供了潜在的靶点。CHEN 等<sup>[16]</sup>观察到长期处于铁过载环境可显著阻碍小鼠胚泡的形成,铁螯合剂可够部分恢复胚泡的发育。进一步研究还发现,铁的暴露可损伤线粒体并增加胚泡期 ROS 的积累,同时在胚泡期表现出更高的凋亡率和铁死亡率。这些发现强调了铁过载可能通过破坏线粒体功能、引发细胞凋亡和铁死亡来损害胚胎发育,进而参与 EMs 相关的生殖障碍。值得一提的是,研究人员应用卵巢 EMs 患者的卵泡液处理小鼠颗粒细胞时能够使细胞发生铁死亡并减弱卵母细胞的生育能力。透射电子显微镜和纳米粒子追踪分析技术观察到颗粒细胞可释放外泌体抑制卵母细胞成熟。维生素 E 和铁螯合剂在 EMs 相关不孕模型中显示出有效的体内治疗效果<sup>[17]</sup>。以上研究提示铁过载引发的铁死亡可能通过多种机制参与 EMs 相关的不孕问题。它不仅直接影响卵巢颗粒细胞和卵母细胞的健康,还通过影响胚泡形成和胚胎发育,进一步加剧不孕问题。这些发现为理解 EMs 相关不孕的病理机制提供了新的视角,同时也为未来的治疗策略开发提供了重要的靶点。

### 3 铁死亡在 EMs 诊断中的作用

为了探索铁死亡在 EMs 诊断中可能发挥的作用,研究人员通过分析 164 个 EMs 病例的基因表达数据集,发现在 EMs 患者中,铁死亡相关基因的表达呈逐渐增加的趋势,特别是在子宫内膜从在位发育到异位的过程中。进一步的回归选择分析确认了 9 个铁死亡相关基因在大多数情况下能够有效区分 EMs 患者和健康志愿者,这些基因成为了 EMs 独立诊断的重要因素。通过建立列线图模型,使用这些铁死亡相关基因作为分子标记,在受试者操作特性曲线下的面积达到 0.979,显示其在 EMs 诊断中具有极好的临床价值<sup>[18]</sup>。此外,另一组学者利用生物信息学方法发现了 31 个与 EMs 铁死亡相关的差异基因,并进一步筛选出了 8 个与 EMs 铁死亡相关的诊断基因,包括双氧化酶 2 (recombinant dual oxidase 2, DUOX2)、溶质载体家族 38 成员 1 (solute carrier family 38 member 1, SLC38A1)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase, MAPK1)、

泛连接蛋白 1 (recombinant pannexin 1, PANX1)、热休克蛋白 1 (heat shock protein beta-1, HSPB1)、AP-1 转录因子 (jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit, JUN)、脯氨酰基-4-羟化酶  $\beta$  (prolyl 4-hydroxylase subunit beta, P4HB) 和丙酮酸脱氢酶激酶同工酶 4 (pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4, PDK4)。这些基因不仅涉及自噬、免疫细胞、细胞因子的调节,还与多种激酶的活性相关,可能在 EMs 的发病机制中发挥重要作用。并通过 DGIdb 数据库检索到与这些基因相关的 245 种药物,且构建了它们之间的 ceRNA 网络。此外, ciphersort 免疫浸润分析表明, EMs 的免疫微环境的变化可能与 SLC38A1 和 P4HB 密切相关<sup>[19]</sup>。这些研究结果为 EMs 的分子机制研究、临床诊断以及治疗策略提供了新的方向。特别是,铁死亡相关基因在 EMs 中的表达变化不仅揭示了该疾病的潜在发病机制,还为早期诊断和靶向治疗提供了重要的分子标记。然而,尽管这些基因显示出显著的诊断价值,但在实际临床应用中仍需通过更大规模的研究验证其可靠性和特异性。此外,还需进一步研究这些基因与 EMs 不同分期、病变类型以及患者预后的关联,从而全面了解其在 EMs 诊断和治疗中的应用潜力。未来的研究可以探索铁死亡与 EMs 相关的免疫微环境、细胞信号通路之间的相互作用,这可能为开发个性化治疗方案提供新的思路。

### 4 铁死亡在 EMs 治疗中的作用

#### 4.1 非天然化合物

非天然化合物是指在自然界中并不存在,主要通过人工合成、化学修饰或其他人为手段而获得的化合物。研究人员应用非天然化合物对铁死亡在 EMs 中的治疗开展了诸多探索性研究。Erastin 是一种小分子化合物,最初在抗癌药物高通量筛选中被发现。它是一种通过促使细胞发生铁依赖性非典型的凋亡而引起细胞死亡的药物,即铁死亡诱导剂。异位子宫内膜基质细胞相较于正常子宫内膜基质细胞更容易受到 Erastin 影响。Erastin 处理的异位基质细胞显示出铁死亡的特征,包括 ROS 水平增加,细胞内铁积累以及线粒体形态的改变。此过程伴随膜铁转运蛋白 (ferroportin, FPN) 表达降低。进一步研究发现,

过表达 FPN 可抑制 Erastin 诱导异位基质细胞铁死亡,而 FPN 的敲除则可加速这一过程。体内实验显示在 C57BL/6 小鼠 EMs 模型中,给予 Erastin 后异位病变消退,暗示 Erastin 可能作为 EMs 的潜在治疗方法<sup>[20]</sup>。另一方面,纤维蛋白-1 (fibulin-1, FBLN1) 是一个在子宫内蜕膜过程中受孕酮调控的靶点分子蛋白。研究发现抑制 FBLN1 可降低异位子宫内蜕膜基质细胞活力和迁移并能促进细胞发生铁死亡<sup>[21]</sup>。研究结果提示沉默 FBLN1 可能是治疗 EMs 的有效策略。

基因测序的数据分析显示,在 EMs 患者和 EMs 小鼠模型样本,异位内膜组织中长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) ADAMTS9-AS1 均较在位内膜组织表达水平显著升高。功能实验表明,敲低 ADAMTS9-AS1 后减弱异位子宫内蜕膜基质细胞活力和迁移,而在正常基质细胞中 ADAMTS9-AS1 过表达能够增强这些过程。进一步研究发现 ADAMTS9-AS1 通过调节 miR-6516-5p/GPX4 依赖性铁死亡加速基质细胞的增殖和迁移,这一作用在铁死亡抑制剂 Fer-1 和诱导剂 Erastin 的回复实验中得到验证<sup>[22]</sup>。该研究结果提示 ADAMTS9-AS1 可能是治疗 EMs 的潜在靶点,为深入理解 EMs 的发病机制提供了新的信息。与之类似地,LIANG 等<sup>[23]</sup> 发现应用 Erastin 诱导异位子宫内蜕膜基质细胞发生铁死亡过程中 lncRNA MALAT1 表达降低。敲除 MALAT1 可显著增强 Erastin 对细胞活力的抑制,同时增加细胞内铁和脂质过氧化物水平。机制研究揭示了 MALAT1 通过调节小分子 RNA (microRNAs, miRNA) 如:miR-145-5p/肿瘤相关抗原黏蛋白-1 (cell surface associated mucin 1, MUC1) 信号通路来介导铁死亡的发生。这项研究表明,MALAT1 敲除和 Erastin 诱导在铁死亡中具有协同作用,可能为 EMs 的新治疗策略提供理论基础。最近,有学者观察到与巨噬细胞共培养或用白介素 33 (interleukin 33, IL-33)/生长刺激表达基因 2 蛋白 (growth stimulation expressed gene 2, ST2) 刺激异位子宫内蜕膜基质细胞可增加细胞活力和迁移。IL-33/ST2 处理能够降低 Erastin 作用细胞后胞内铁离子和脂质过氧化物水平。进一步实验表明巨噬细胞衍生的 IL-33 可通过 p38/JNK/ATF3 途径上调异位基质细胞中的溶质载体家族 7 (solute

carrier family 7 member 11, SLC7A11), 最终发挥对细胞铁死亡的保护作用。有趣的是,IL-33 抗体和 Erastin 治疗的组合在 EMs 模型小鼠中减轻了疾病症状<sup>[24]</sup>。这项研究为免疫疗法和铁死亡治疗结合提供了前景和新思路。在未来的研究中,通过整合铁死亡与免疫治疗、基因治疗等手段,可能会为 EMs 患者带来更加个性化和有效的治疗策略。同时,由于这些研究多集中于体外实验和动物模型,未来需要进一步临床研究验证其疗效与安全性。

## 4.2 天然化合物

天然化合物是指存在于自然界中并由生物合成的化合物。近年来研究人员应用天然化合物对铁死亡在 EMs 中的治疗作用进行了临床前期的基础研究。白藜芦醇是一种天然存在的多酚化合物,具有抗氧化、抗炎、抗癌等多种生物活性。在 EMs 小鼠模型中,白藜芦醇可降低 GPX4 的表达并减少 Fe<sup>3+</sup> 沉积,具有防止 EMs 发展的作用<sup>[25]</sup>。值得一提的是,DING 等<sup>[26]</sup> 通过子宫内膜碎片腹膜内注射和周期性腹膜内血液注射构建了铁过载的小鼠模型,成功模拟了 EMs 的真实病因和疾病状态。铁过载小鼠模型展示了显著增加的 EMs 病变数量、大小和黏附程度,同时腹腔液和卵巢中的铁离子浓度升高,丙二醛水平也升高,表明了铁死亡的发生。而中医化瘀解毒方对铁过载小鼠模型具有显著的治疗效果,可降低 EMs 病变体积和黏附程度,减少腹腔液和卵巢中的总铁离子浓度,并上调卵巢中 GPX4 的表达,降低丙二醛水平,促进卵泡发育。通过超高效液相色谱技术和网络药理学分析,揭示了 HYJDF 中的天然化合物成分,发现其主要通过 IL-6/铁调素途径对 EMs 铁死亡发挥调节作用。这些结果为 HYJDF 作为潜在治疗 EMs 的药物提供了实验基础。

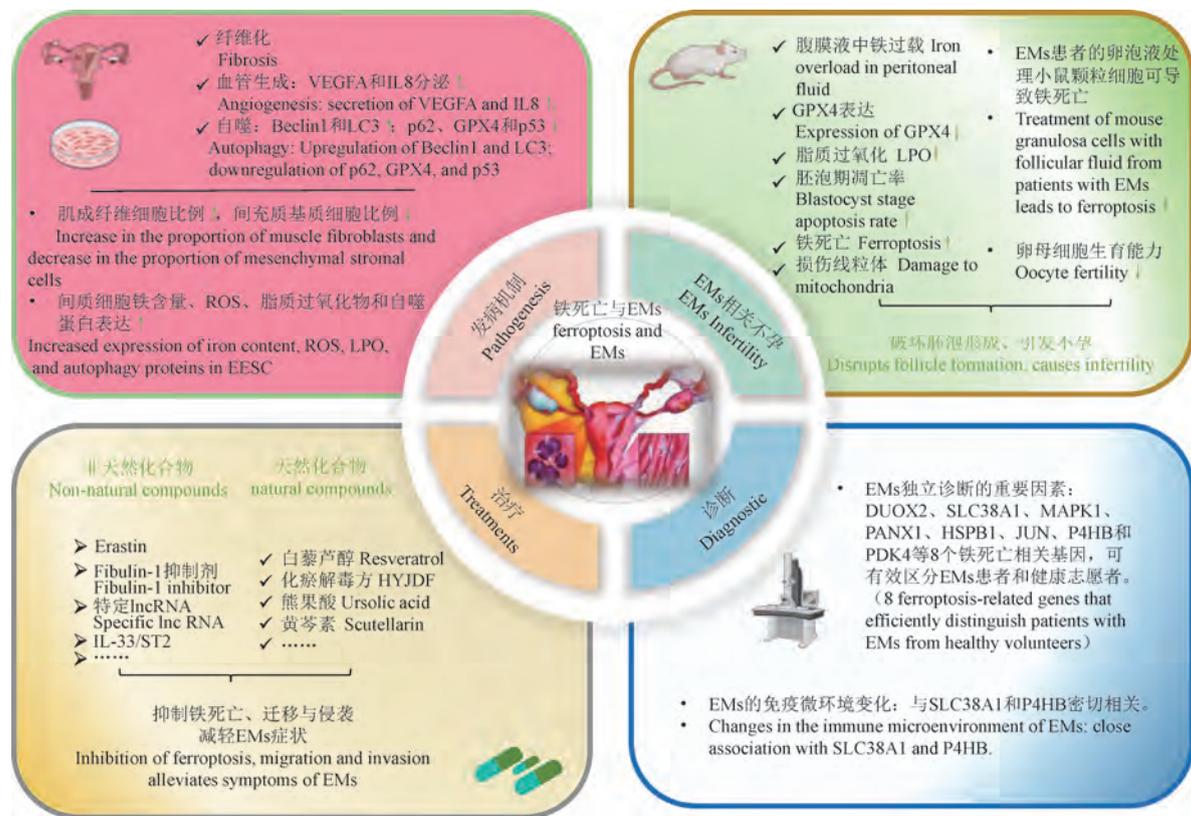
熊果酸(ursolic acid, UA) 是一种天然的四萜类化合物。UA 可通过抑制增殖、血管生成和促进细胞凋亡来控制人子宫内蜕膜异位基质细胞的存活<sup>[27]</sup>。王聪等<sup>[28]</sup> 发现熊果酸可降低异位子宫内蜕膜基质细胞内 Fe<sup>2+</sup> 水平,增加 ROS 含量,同时降低超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 含量并最终诱导基质细胞发生铁死亡。进一步的实验显示, JAK2/STAT3 信号通路激活剂

DUSP19 可显著逆转熊果酸对基质细胞增殖的抑制作用。这些结果提示熊果酸通过调控 JAK2/STAT3 信号通路,抑制基质细胞的增殖和迁移,诱导铁死亡,可能对 EMs 有保护效果。另一方面,黄芩是一种中草药植物,主要活性成分包括黄酮类化合物,其中以黄芩素和汉黄芩素为代表。这些成分赋予黄芩抗氧化、抗炎、抗菌等多种药理活性。黄芩素是一种潜在的抗铁死亡化合物,能够增加 GPX4 的表达,显著抑制铁死亡作用。有研究显示由卵巢囊肿液中铁过载引发的铁死亡可通过损害巨噬细胞吞噬作用和增加血管生长因子表达,促进 EMs 的发展,而黄芩素则可在其中显示出治疗潜力<sup>[29]</sup>。此外,在 EMs 大鼠模型中,汉黄芩素可显著减少异位病灶体积、改善组织病理损伤,并降低血清雌二醇和孕激素水平。进一步研究表明汉黄芩素可减少组织中炎性细胞浸润和铁离子沉积,同时抑制铁离子水平的升高,而沉默信息调节因子(silent mating type information regulation 2 homolog-1, SIRT1)抑制剂

能够逆转汉黄芩素的保护作用<sup>[30]</sup>。这些结果提示汉黄芩素可能通过激活 SIRT1 信号通路来抑制 EMs 大鼠的铁死亡,为其治疗提供了潜在的机制。以上研究表明天然化合物在调控铁死亡的过程中,既可以通过抑制铁死亡来保护组织细胞,也可以通过诱导铁死亡来消除病变细胞。因此,在 EMs 的治疗中,合理掌握药物的作用时机和靶组织选择,将是未来发展的关键。进一步深入的临床研究有望将这些天然化合物转化为实际的治疗手段,为 EMs 患者提供新的治疗选择(图 2)。

## 5 挑战与展望

当前对于铁死亡在 EMs 中的确切作用机制了解尚不够深入,需要更为细致入微的分子水平研究,以揭示其中的复杂交互关系。研究中存在的异质性和样本有限的问题可能导致结果的不一致性,因此,未来的研究需要采用更大样本规模和全面的分析,以更准确地描述铁死亡在 EMs



注: ↑: 促进; ↓: 抑制。

图 2 铁死亡在 EMs 的作用

Note. ↑, Promote. ↓, Inhibition.

Figure 2 Role of ferroptosis in EMs

患者中的表现。同时,针对该领域的技术手段和实验方法也需要进一步优化,以提高研究的准确性和可重复性。

未来的研究可侧重于深入挖掘铁死亡途径的生物学特性,尤其是其与 EMs 相关的分子标志物和信号通路。通过结合多学科的研究方法,可以更全面地理解铁死亡在疾病发展中的关键作用<sup>[31]</sup>。此外,为了更好地指导临床实践,还需将研究成果转化为切实可行的治疗策略,为患者提供更为个性化和有效的医疗服务。总体而言,虽然面临挑战,但对铁死亡在 EMs 中的深入研究具有巨大潜力。克服这些挑战将为未来的医学研究提供新的方向,有望为治疗 EMs 的新策略提供重要的科学支持。

## 6 结语

铁死亡在 EMs 的发病机制、EMs 性不孕、诊断及治疗中扮演着重要而复杂的角色。而铁死亡现象从发现至今不过短短十年时间,尚有诸多未知的领域亟待探索和发掘。今后的研究可能需要打破技术和方法上的限制,提高实验结果的可重复性和准确性。开展大规模和全面的研究可为这一领域提供更为详实的数据支持,使我们能够更好地理解铁死亡在该疾病中的具体作用。在不远的将来,期待开展更多深层次的分子水平研究、更全面系统的实验设计以及更创新的技术手段,这不仅有助于解开铁死亡在 EMs 中的奥秘,还能为患者提供更为个性化和有效的治疗方案奠定基础。通过多学科的协同合作,我们或将在未来迎来对于 EMs 更精准的认识,为 EMs 患者的健康带来福音。

## 参考文献:

[ 1 ] HORNE A W, MISSMER S A. Pathophysiology, diagnosis, and management of endometriosis [ J ]. *BMJ*, 2022, 379: e070750.

[ 2 ] DELLA CORTE L, DI FILIPPO C, GABRIELLI O, et al. The burden of endometriosis on women's lifespan: a narrative overview on quality of life and psychosocial wellbeing [ J ]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17 ( 13 ): 4683.

[ 3 ] 郎景和. 对子宫内膜异位症认识的历史、现状与发展 [ J ]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2020, 36 ( 3 ): 193-196.

LANG J H. Past history, current situation and progress in the knowledge of endometriosis [ J ]. *Chin J Pract Gynecol Obstet*, 2020, 36 ( 3 ): 193-196.

[ 4 ] 俞超芹. 子宫内位异位症诊治困局与思考 [ J ]. *海军军医大学学报*, 2023, 44 ( 1 ): 1-6.

YU C Q. Diagnosis and treatment of endometriosis: difficulties and thinking [ J ]. *Acad J Nav Med Univ*, 2023, 44 ( 1 ): 1-6.

[ 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 ] LI W, LIANG L, LIU S, et al. FSP1: a key regulator of ferroptosis [ J ]. *Trends Mol Med*, 2023, 29 ( 9 ): 753-764.

[ 7 ] NG S W, NORWITZ S G, TAYLOR H S, et al. Endometriosis: the role of iron overload and ferroptosis [ J ]. *Reprod Sci*, 2020, 27 ( 7 ): 1383-1390.

[ 8 ] CLOWER L, FLESHMAN T, GELDENHUYS W J, et al. Targeting oxidative stress involved in endometriosis and its pain [ J ]. *Biomolecules*, 2022, 12 ( 8 ): 1055.

[ 9 ] LAN S, ZHANG Z, LI Q. FZD7: a potential biomarker for endometriosis [ J ]. *Medicine*, 2023, 102 ( 40 ): e35406.

[ 10 ] WYATT J, FERNANDO S M, POWELL S G, et al. The role of iron in the pathogenesis of endometriosis: a systematic review [ J ]. *Hum Reprod Open*, 2023, 2023 ( 3 ): hoad033.

[ 11 ] ZHANG Y, LIU X, DENG M, et al. Ferroptosis induced by iron overload promotes fibrosis in ovarian endometriosis and is related to subpopulations of endometrial stromal cells [ J ]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 930614.

[ 12 ] LI G, LIN Y, ZHANG Y, et al. Endometrial stromal cell ferroptosis promotes angiogenesis in endometriosis [ J ]. *Cell Death Discov*, 2022, 8 ( 1 ): 29.

[ 13 ] LI H, YANG H, LU S, et al. Autophagy-dependent ferroptosis is involved in the development of endometriosis [ J ]. *Gynecol Endocrinol*, 2023, 39 ( 1 ): 2242962.

[ 14 ] LI Y, HE Y, CHENG W, et al. Double-edged roles of ferroptosis in endometriosis and endometriosis-related infertility [ J ]. *Cell Death Discov*, 2023, 9 ( 1 ): 306.

[ 15 ] LI S, ZHOU Y, HUANG Q, et al. Iron overload in endometriosis peritoneal fluid induces early embryo ferroptosis mediated by HMOX1 [ J ]. *Cell Death Discov*, 2021, 7 ( 1 ): 355.

[ 16 ] CHEN X, ZHOU Y, WU D, et al. Iron overload compromises preimplantation mouse embryo development [ J ]. *Reprod Toxicol*, 2021, 105: 156-165.

[ 17 ] NI Z, LI Y, SONG D, et al. Iron-overloaded follicular fluid increases the risk of endometriosis-related infertility by triggering granulosa cell ferroptosis and oocyte dysmaturity [ J ]. *Cell Death Dis*, 2022, 13 ( 7 ): 579.

[ 18 ] LI B, DUAN H, WANG S, et al. Ferroptosis resistance mechanisms in endometriosis for diagnostic model

- establishment [J]. *Reprod Biomed Online*, 2021, 43(1): 127-138.
- [19] 刘畅, 谢成茂, 魏薇. 子宫内膜异位症铁死亡相关诊断基因及治疗靶点的遗传分析 [J]. *现代妇产科进展*, 2023, 32(3): 188-195.
- LU C, XIE C M, WEI W. Genetic analysis of potential biomarkers and therapeutic targets in ferroptosis from endometriosis [J]. *Prog Obstet Gynecol*, 2023, 32(3): 188-195.
- [20] LI Y, ZENG X, LU D, et al. Erastin induces ferroptosis via ferroportin-mediated iron accumulation in endometriosis [J]. *Hum Reprod*, 2021, 36(4): 951-964.
- [21] WAN Y, SONG Y, CHEN J, et al. Upregulated fibulin-1 increased endometrial stromal cell viability and migration by repressing EFEMP1-dependent ferroptosis in endometriosis [J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 4809415.
- [22] WAN Y, GU C, KONG J, et al. Long noncoding RNA ADAMTS9-AS1 represses ferroptosis of endometrial stromal cells by regulating the miR-6516-5p/GPX4 axis in endometriosis [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 2618.
- [23] LIANG Z, WU Q, WANG H, et al. Silencing of lncRNA MALAT1 facilitates erastin-induced ferroptosis in endometriosis through miR-145-5p/MUC1 signaling [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 190.
- [24] WU Q, LIANG Z, JIANG J, et al. Macrophages originated IL-33/ST2 inhibits ferroptosis in endometriosis via the ATF3/SLC7A11 axis [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(10): 668.
- [25] ZOU W, WANG X, XIA X, et al. Resveratrol protected against the development of endometriosis by promoting ferroptosis through miR-21-3p/p53/SLC7A11 signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 692: 149338.
- [26] DING J, ZHAO Q, ZHOU Z, et al. Huayu Jiedu Fang protects ovarian function in mouse with endometriosis iron overload by inhibiting ferroptosis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 1406820.
- [27] LI J, ZENG Z, CHANG Y, et al. Suppressive effects of ursolic acid on human endometriotic stromal cells survival [J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2020, 85(1): 72-81.
- [28] 王聪, 门贵香, 邵帅, 等. 熊果酸通过 JAK2/STAT3 信号通路对子宫内膜基质细胞铁死亡的影响 [J]. *中华内分泌外科杂志*, 2023, 17(3): 317-322.
- WANG C, MEN G X, SHAO S, et al. Effects of ursolic acid on iron death in endometrial stromal cells via JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Chin J Endocr Surg*, 2023, 17(3): 317-322.
- [29] YI Z H, LI S Q, KE J Y, et al. Baicalein relieves ferroptosis-mediated phagocytosis inhibition of macrophages in ovarian endometriosis [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2022, 44(12): 6189-6204.
- [30] 胡晓英, 吴建发, 王鹰, 等. 汉黄芩素调节 SIRT1/Nrf2 信号通路对子宫内膜异位症大鼠铁死亡的影响 [J]. *遵义医科大学学报*, 2023, 46(10): 943-949.
- HU X Y, WU J F, WANG Y, et al. Impact of wogonin on ferroptosis in endometriosis rats by regulating SIRT1/Nrf2 signaling pathway [J]. *J Zunyi Med Univ*, 2023, 46(10): 943-949.
- [31] KOBAYASHI H, YOSHIMOTO C, MATSUBARA S, et al. Current understanding of and future directions for endometriosis-related infertility research with a focus on ferroptosis [J]. *Diagnostics*, 2023, 13(11): 1926.

[收稿日期]2024-07-02

吴道雄,李妍锦,胡莹,等. lncRNA 在肺动脉高压分子机制中的最新研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(1): 147-154.

Wu DX, Li YJ, Hu Y, et al. Recent research progress into the role of long non-coding RNAs in the molecular mechanism of pulmonary hypertension [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 147-154.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.015

# lncRNA 在肺动脉高压分子机制中的最新研究进展

吴道雄<sup>1</sup>, 李妍锦<sup>2</sup>, 胡莹<sup>1</sup>, 王玉明<sup>1</sup>, 胡伟<sup>3</sup>, 马润<sup>1\*</sup>

(1.昆明医科大学第二附属医院 检验科,昆明 650106;2.昆明医科大学第二附属医院 呼吸与危重症医学科,昆明 650106;  
3.昆明医科大学第一附属医院 心血管内科,昆明 650032)

**【摘要】** 肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)是一种致命性的疾病,其特征是肺血管重构,最终导致右心衰竭和死亡。目前 PH 治疗并不理想,晚期 PH 患者的总生存率没有实质性改善。尽管目前在 PH 发病机制方面取得了部分进展,但仍需在分子水平上进行更多探索,以开发更有效的 PH 治疗方法。近年来研究表明长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)在 PH 病理生理过程中发挥重要的调节功能,并成为潜在的疾病生物标志物和治疗靶点。本文就近年来 lncRNA 在 PH 中的分子机制进行综述。

**【关键词】** 长链非编码 RNA;肺动脉高压;分子机制

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0147-08

## Recent research progress into the role of long non-coding RNAs in the molecular mechanism of pulmonary hypertension

WU Daoxiong<sup>1</sup>, LI Yanjin<sup>2</sup>, HU Ying<sup>1</sup>, WANG Yuming<sup>1</sup>, HU Wei<sup>3</sup>, MA Run<sup>1\*</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650106, China. 2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650106. 3. Department of Cardiovascular Medicine, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032)

**【Abstract】** Pulmonary hypertension (PH) is a fatal disease characterized by pulmonary vascular remodeling, ultimately leading to right heart failure and death. Current treatments for PH are suboptimal, with no substantial improvement in overall survival among patients with advanced PH. Despite some progress in understanding the pathogenesis of PH, further studies at the molecular level are needed to develop more effective treatments for PH. Recent research has shown that long non-coding RNAs (lncRNAs) have an important regulatory function in the pathophysiological process of PH, and may thus be potential disease biomarkers and therapeutic targets. In this paper, we review recent progress in our understanding of the molecular mechanisms of lncRNAs in PH.

**【Keywords】** lncRNA; pulmonary hypertension; molecular mechanism

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

**【基金项目】** 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金面上项目(202101AY070001-130);云南省心脑血管临床医学研究中心子课题项目(ZX2019-03-01);昆明医科大学研究生创新基金(2024S311);昆明医科大学研究生创新基金(2024S287)。

**【作者简介】** 吴道雄(1995—),男,在读硕士研究生,住院医师,研究方向:临床生物化学与分子生物学。

E-mail:1761851741@qq.com

**【通信作者】** 马润(1980—),女,硕士,硕士生导师,研究方向:肺动脉高压和临床生物化学。E-mail:467161115@qq.com

肺动脉高压 (pulmonary hypertension, PH) 是一种以肺血管重塑、肺血管阻力增加为特征的临床病理生理综合征,随着病情的进展,最终发展成右心衰竭甚至死亡。根据流行病学统计,PH 全球患病率约 1%<sup>[1]</sup>,在年龄 65 岁以上的个体中患病率高达 10%<sup>[2]</sup>。该病预后欠佳,严重影响患者的生活质量。肺动脉收缩和肺血管重构是 PH 的主要病理生理基础,目前比较成熟的 PH 的治疗药物主要为血管舒张剂,如前列环类、内皮素拮抗剂类、磷酸二酯酶-5 抑制剂类<sup>[1]</sup>,但只能改善症状,减缓病情进展,难以治愈。PH 的治疗效果不理想,部分原因是 PH 的潜在分子机制缺乏了解<sup>[3]</sup>。因此,需要深入研究 PH 的分子机制,寻找新的生物标志物和治疗靶点。

## 1 lncRNA 与 PH

长链非编码 RNA (long non-coding RNAs, lncRNA) 是一类由 RNA 聚合酶 II 转录的转录本长度大于 200 个核苷酸的 RNA,缺乏明显的开放阅读框,不编码蛋白质<sup>[4]</sup>,但可通过表观遗传调控、转录调控、转录后调控、miRNA 调控等过程发挥作用<sup>[5]</sup>。lncRNA 广泛分布于人体各组织和器官,参与疾病的发生和发展。在 PH 患者和 PH 动物模型中存在多种 lncRNA 的异常表达。近年来,越来越多的研究发现 lncRNA 可以作为重要的表观遗传调节因子在 PH 发病机制中发挥作用,包括内皮-间充质转化 (endothelial-mesenchymal transition, EndMT)、细胞增殖、细胞迁移、细胞凋亡、血管再生、氧化应激、血管炎症等方面<sup>[6]</sup>。下面就近年来 lncRNA 在 PH 发病机制中的研究进展进行综述。

### 1.1 lncRNA 参与 EndMT

EndMT 是内皮细胞 (endothelial cell, EC) 为了响应特定的内部和环境触发因素,转分化为间充质样细胞的过程。EC 中血管内皮钙黏蛋白和血小板内皮细胞黏附分子-1 等内皮连接标志物的缺失可导致血管通透性增加,从而导致免疫细胞浸润增加,而间充质表型的获得导致细胞外基质蛋白的产生和沉积增加<sup>[7]</sup>。MONTEIRO 等<sup>[8]</sup>用转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 和白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1) 处理原代 EC 并进行测序,发现 lncRNA MIR 503 HG

的下调是体外 EC 经历 EndMT 的共同特征。MIR 503 HG 下调的病理学相关性在使用 Sugen/低氧 (SU5416 combined with hypoxia, SuHx) 诱导的 PH 小鼠模型、人临床样品、动脉性 PH (pulmonary artery hypertension, PAH) 患者的肺组织和血液生长内皮细胞中得到证实<sup>[8]</sup>。MIR 503 HG 在 SuHx 小鼠中的过表达导致间充质标志物表达减少。这些结果表明 lncRNA MIR 503 HG 可能是 PH 的一个治疗靶点。另外一项研究发现肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 可诱导人多种血管内皮细胞中 lncRNA H19 的表达, H19 通过 10-11 转位蛋白 1 (ten-eleven translocation-1, TET1) 依赖的表观遗传机制激活 TGF- $\beta$  信号传导和 EndMT,这一结果也在持续性高血糖症小鼠肺微血管内皮细胞中得到证实,表明 lncRNA H19/TET1 轴促进 TGF- $\beta$  信号转导与 EndMT 过程<sup>[9]</sup>。但在另外一项研究中出现了不一样的结果, H19 在高糖条件下人视网膜内皮细胞中表达下调, H19 过表达通过 Smad 非依赖性丝裂原活化蛋白激酶-细胞外信号调节激酶 1/2 途径阻碍葡萄糖诱导的 EndMT<sup>[10]</sup>。在一项氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 诱导血管内皮细胞 EndMT 的实验中,发现 lncRNA 肺腺癌转移相关转录本 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT 1) 表达水平上调, MALAT 1 可通过上调  $\beta$ -连环蛋白激活 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白 (Wnt/ $\beta$ -catenin) 途径调节 EndMT 过程。当 MALAT 1 敲低时又可抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的激活从而减轻 EndMT<sup>[11]</sup>。以上证据表明 lncRNA 可能是 EndMT 潜在的表观遗传介质,有可能成为 PH 的生物标志物和治疗靶点。

### 1.2 lncRNA 调控细胞增殖

肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary artery smooth muscle cell, PASMC) 和肺动脉内皮细胞 (pulmonary artery endothelial cell, PAEC) 增殖是 PH 的重要病理过程,预防细胞过度增殖可有效降低 PH 死亡率。研究表明, lncRNA 参与了 PH 的细胞增殖过程。QIN 等<sup>[12]</sup>发现 lncRNA AC068039.4 在低氧诱导的 PASMC 中表达上调, AC068039.4 通过与 miR-26a-5p 结合,导致其下游靶基因瞬时受体电位阳离子通道 6 (transient

receptor potential canonical 6, TRPC 6) 降解减少, 促进 PASM C 增殖, 说明 lncRNA AC068039.4/miR-26a-5p/TRPC 6 轴在低氧诱导的 PASM C 增殖的调节中起重要作用。其次, 在低氧大鼠模型和低氧人 PASM C 中 lncRNA 生长停滞特异性转录因子 5 (growth-arrest specific transcript 5, GAS 5) 的表达下调, GAS 5 作为一种竞争性内源性 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 与 miR-23b-3p 相互作用来调节 KCNK 3 基因的表达, GAS 5 的沉默显著促进了正常和低氧条件下人 PASM C 的增殖和迁移, lncRNA GAS 5/miR-23b-3p/KCNK 3 轴可能是低氧诱导 PASM C 增殖和迁移的机制之一<sup>[13]</sup>。WANG 等<sup>[14]</sup>发现与正常的肺动脉组织和 PASM C 相比, PAH 患者的肺动脉和 PASM C 中 lncRNA MALAT1 的表达显著上调。MALAT 1 基因敲低可降低 PASM C 的增殖, 而 MALAT 1 的过表达则表现出相反的细胞表型。体外机制分析显示 lncRNA MALAT 1/hsa-miR-124-3p.1/KLF 5 轴在 PASM C 增殖中起重要作用。另一项研究发现, lncRNA 牛磺酸上调基因 1 (taurine upregulated gene1, TUG 1) 在低氧处理小鼠的肺动脉和 PAH 患者中显著上调, TUG 1 通过 miR-328 促进 PASM C 中增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的表达, 促进细胞增殖和肺血管重塑<sup>[15]</sup>。CARMAN 等<sup>[16]</sup>发现 PAH 男性患者的 PAEC 中 lncRNA X 染色体失活特异转录本 (X-inactive specific transcript, Xist) 表达增加, Xist 表达水平与 PAEC 增殖能力之间存在显著相关性。ZHENG 等<sup>[17]</sup>在 PH 小鼠模型的肺组织和人 PAEC 中发现 YTH 结构域蛋白 1 (一种 RNA 甲基化阅读蛋白) 下调, 体外实验表明 YTH 结构域蛋白 1 参与了 PAEC 增殖和内皮功能障碍过程, 通过构建 ceRNA 网络发现这一过程可能是通过 lncRNA Entr1-202 与 miR-125-3p 相互作用实现的。由此可见, lncRNA 是 PASM C 和 PAEC 增殖的重要调节因子, 参与肺血管重塑, 促进 PH 的发生发展, 可能作为 PH 潜在的治疗靶点。

### 1.3 lncRNA 调控细胞迁移

细胞迁移是由于感受到外部信号而通过细胞体变形的定向运动。目前, 许多研究表明细胞迁移与 lncRNA 有关。HAN 等<sup>[18]</sup>发现在低氧诱

导的 PASM C 中 lncRNA 癌易感性候选基因 2 (cancer susceptibility candidate 2, CASC2) 表达下调, 过表达 CASC2 可作为 miR-222 的竞争性内源 RNA, 调节 PASM C 中 miR-222 下游靶标生长抑制因子家族成员 5 (inhibitor of growth 5, ING5) 的表达从而减弱低氧诱导的 PASM C 增殖和迁移, 以防止血管重塑和 PH 的发展。另外有研究显示 lncRNA PAXIP 1-AS1 和 RAS 同源基因家族成员 A (recombinant ras homolog gene family, member A, RhoA) 在野百合碱 (monocrotaline, MCT) 诱导的大鼠肺组织和血清中的表达均明显增高, 在低氧诱导的人 PASM C 中也明显增高。细胞实验和动物实验结果显示 PAXIP 1-AS 1 通过募集转录因子 (E26 transformation specific-1, ETS 1) 正向调节 WAS/WASL 相互作用蛋白家族成员 1 (WAS/WASL interacting protein family member 1, WIPF 1), 而 WIPF 1 调节 RhoA 的翻译后水平从而促进低氧诱导的 PASM C 的迁移。这些结果显示 lncRNA PAXIP 1-AS1 通过 ETS 1/WIPF 1/RhoA 轴促进 PASM C 的迁移<sup>[19]</sup>。此外, lncRNA INK4 位点中的反义非编码 RNA (antisense noncoding RNA in the INK4 locus, ANRIL) 在缺氧诱导的人 PASM C 中的表达显著下调。ANRIL 的下调影响了细胞周期, 使更多的 PASM C 从 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期进入 G<sub>2</sub>/M+S 期, 增加缺氧条件下 PASM C 的迁移<sup>[20]</sup>。lncRNA MALAT 1 在 PH 患者血浆和缺氧诱导的人 PASM C 中呈高表达, MALAT 1 是 miR-503 的“分子海绵”, 通过 miR-503 调控下游靶基因 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR 4) 的表达促进 PASM C 的增殖和迁移<sup>[21]</sup>。DOU 等<sup>[22]</sup>在低氧处理的 PASM C 和 PH 患者的血清中观察到 lncRNA 核副啄木鸟组装转录本 1 (nuclear paraspeckle assembly transcript 1, NEAT 1) 表达水平升高, 通过沉默 NEAT 1 的表达可通过 miR-34a-5p 调控 Krüppel 样因子 4 (Krüppel-like factor 4, KLF4) 的表达来缓解 PH 的进展。综上, lncRNA 通过促进细胞迁移参与 PH 的发生和发展。

### 1.4 lncRNA 调控细胞凋亡

PASM C 和 PAEC 对凋亡的抵抗是 PH 血管重塑的关键因素之一, 其直接导致细胞不受控制的增殖。研究显示在 PAH 患者的肺组织和缺氧的人 PASM C 中, lncRNA Ang 362、miR-221 和

miR-222 的表达显著增加。Ang 362 上调 PASC 中 miR-221 和 miR-222 的表达,激活核转录因子- $\kappa$ B(nuclear transcription factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 信号通路,使 PASC 凋亡减少<sup>[23]</sup>。YANG 等<sup>[24]</sup>证实了 lncRNA 牛磺酸上调基因 1(taurine up-regulated gene1, Tug 1) 在低氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension, HPH)小鼠和 HPH-PASC 中高表达,Tug 1 的沉默通过与 miR-374 c 结合而下调叉头框蛋白 C1(forkhead box C1, Foxc 1) 的表达,从而抑制 PASC 的增殖和迁移,同时促进 PASC 的凋亡,并通过 Notch 信号通路阻止 HPH 中的肺血管重构。lncRNA Tug 1/miR-374 c/Foxc 1 信号轴可作为基于减弱肺血管重构的 HPH 潜在的治疗靶点。此外,HP 患者肺动脉和低氧诱导的人 PASC 中 lncRNA 肺动脉高压相关因子(pulmonary arterial hypertension related factor, PAHRF) 表达下调,PAHRF 作为 miR-23a-3p 海绵,沉默 PAHRF 可上调 miR-23a-3p 的表达,通过下调 MST 1 基因的表达从而减少 PASC 凋亡。因此,lncRNA PAHRF/miR-23a-3p/MST 1 轴是 PH 治疗的一个潜在靶点<sup>[25]</sup>。此外,GONG 等<sup>[26]</sup>发现低氧诱导的大鼠肺动脉组织和 PASC 中 lncRNA CASC 2 的表达降低,通过流式细胞术检测证实了 CASC 2 的上调可促进 PASC 的凋亡,但 CASC 2 促进 PASC 凋亡的机制有待进一步研究。综上可知,lncRNA 参与了 PASC 细胞凋亡的过程,这对探索 PH 的分子机制和治疗靶点具有重要意义。但近年来 lncRNA 在 PAEC 中的资料较少,值得进一步关注和研究。

### 1.5 lncRNA 影响内皮细胞血管再生

血管再生指在原有血管基础上重建形成新血管的过程,血管新生引起的血管壁结构和功能的病理变化,是肺动脉高压的病理特征之一。lncRNA 参与调控内皮细胞、血管内皮生成因子、miRNA 等生物分子的表达对血管再生有调控作用<sup>[4]</sup>。FENG 等<sup>[27]</sup>证实了 miR-382-3p 的过表达可促进慢性血栓栓塞性肺动脉高压(chronic thromboembolic pulmonary hypertension, CTEPH)大鼠模型中的肺血管重塑。作者在研究其上游调控机制时发现 CTEPH 大鼠模型肺组织和 PASC 中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升

高,而通过上调 lncRNA GAS 5 的表达水平可靶向 miR-382-3p 降低 CTEPH 大鼠肺组织和 PASC 中 VEGF 的表达,表明 lncRNA GAS 5/miR-382-3p 轴参与了 CTEPH 血管再生过程<sup>[28]</sup>。LEISEGANG 等<sup>[29]</sup>发现在终末期特发性肺动脉高压患者肺组织和 PAEC 中 lncRNA MANTIS 表达降低,血管形成试验证实了 MANTIS 的沉默可抑制 PAEC 血管生成。MANTIS 通过稳定 Brahma 相关基因-1(Brahma related gene-1, BRG 1) 与染色质重塑复合物因子 BAF 155(brg-1-associated factor 155, BAF155) 的相互作用来提高 BRG 1 的 ATP 酶活性,使 RNA 聚合酶 II 结合到转录起始位点来促进性别决定区 Y 框蛋白 18(sex determining region Y-box 18, SOX 18)、SMAD 同源物 6(SMAD family member 6, SMAD 6) 和鸡卵白蛋白上游启动子转录因子 II(chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II, COUP-TF II) 的转录从而影响内皮细胞血管再生过程。此外,JOŠIPOVIĆ 等<sup>[30]</sup>发现 CTEPH 患者的肺血管样本中 lncRNA NONHSAT073641 表达明显上调,以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 作细胞模型研究其与内皮细胞血管生成的相关性,对 HUVEC 进行 NONHSAT073641 敲低后,发现 HUVEC 的管形成能力降低,但具体机制待进一步探索。因此,lncRNA 参与了 PH 血管再生过程,可通过 lncRNA 调控肺血管再生来缓解 PH。

### 1.6 lncRNA 参与氧化应激

氧化应激在 PH 病理生理学中起关键作用。氧化还原稳态的改变会产生过量的活性氧,诱导氧化应激和随后的生物分子改变,促进肺动脉内皮细胞和平滑肌细胞的增殖,诱导 PH 的发生<sup>[31]</sup>。LI 等<sup>[32]</sup>采用低氧诱导建立 HPH 大鼠动物模型以及低氧诱导的人 PAEC 建立体外 HPH 模型,发现 lncRNA 心肌梗死相关转录本(myocardial infarction association transcript, MIAT) 在体内和体外 HPH 模型中均上调,miR-29a-5p 和核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf 2) 蛋白下调。通过敲低 MIAT 可上调 Nrf 2 蛋白,并使氧化应激指标活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS) 和丙二醛(malondialdehyde, MDA) 的活性降低,抑制了缺氧

诱导的 PAEC 的氧化应激。因此, lncRNA MIAT 可能通过海绵样作用于 miR-29a-5p, 抑制 Nrf 2 通路, 加重 HPH 模型的氧化应激, 从而促进 HPH 的发展。此外, lncRNA MALAT1 在 PAH 患者的血浆和低氧诱导的人 PASMCM 中表达上调<sup>[33]</sup>。动物实验结果显示下调 MALAT1 可降低 MDA 和 ROS 的表达从而减轻氧化应激反应, 其机制可能与 Notch 信号通路激活受抑制有关<sup>[34]</sup>。有研究报道, lncRNA H19 在失代偿性右心衰竭的 PAH 患者中表达上调, 在 MCT 和肺动脉带处理的大鼠模型中也观察到类似的结果<sup>[35]</sup>。在另一项研究中, 使用氧化低密度脂蛋白诱导血管内皮细胞功能障碍的细胞模型中同样证实了 H19 表达上调, 通过 H19 敲低使血管内皮细胞中 ROS 和 MDA 水平降低, 从而减轻内皮细胞的氧化应激<sup>[36]</sup>。综上, lncRNA 参与了 PH 的氧化应激过程, 靶向 lncRNA 将为缓解 PH 的进展提供新思路。

### 1.7 lncRNA 参与免疫炎症

在生理状态下, 血管的收缩和松弛保持平衡状态, 当免疫炎症反应发生时, 会产生各种炎症因子和氧自由基来破坏内皮细胞, 导致其功能障碍。血管舒张物质和血管收缩物质之间的平衡被打破, 使肺血管压力异常增加<sup>[37]</sup>。YANG 等<sup>[38]</sup>在低氧条件下培养人胚肺成纤维-1 (human fetal lung fibroblast-1, HFL-1) 细胞, 模拟 HPH 的病理过程。与常氧组相比, lncRNA HAS 2-AS 1 在缺氧组 HFL-1 细胞中表达显著增加。同时, TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  的表达也增加。当 HAS 2-AS 1 敲低后, TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  的表达水平随之降低。因此, 缺氧条件下 lncRNA HAS 2-AS 1 促进了 HFL-1 细胞炎症反应, 这为 HPH, 特别是 HPH 合并特发性肺纤维化提供了潜在的治疗靶点。CAI 等<sup>[39]</sup>基于生物信息学的方法筛选出 PAH 患者的差异表达基因, 发现这些基因主要富集在炎症相关通路中, 进一步构建 lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA 网络, 将 mRNA C-C 趋化因子受体 7 (C-C chemokine receptor type 7, CCR 7) 及其相关分子, 包括 hsa-let-7 e-5 p 和 lncRNA 小核仁 RNA 宿主基因 12 (small nucleolar RNA host gene 12, SNHG 12) 确定为 PAH 可能的靶点, 并在

PH 小鼠模型和人 PASMCM 中进行体内和体外实验, 验证了 SNHG 12 可通过与 hsa-let-7e-5p 结合在调节 CCR 7 表达中发挥 ceRNA 的作用, 参与 PH 的发病机制。JIANG 等<sup>[40]</sup>发现 PAH 患者血清和低氧诱导人 PASMCM 中 lncRNA SRY 盒转录因子 2 重叠转录本 (SRY-box transcription factor 2 overlapping transcript, SOX 2-OT) 表达增加。通过沉默 SOX 2-OT 可降低 PASMCM 中炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的水平和小泛素相关修饰物 1 (small ubiquitin-related modifier 1, SUMO 1) 水平, 而下调 miR-455-3p 的表达则出现相反的结果, 这些结果表明沉默 SOX 2-OT 可能通过调节 miR-455-3p/SUMO 1 轴来减弱缺氧诱导的炎症反应, 从而防止血管重塑和 PAH 进展, 抑制 lncRNA SOX 2-OT 可能成为 PAH 的治疗靶点。因此, lncRNA 参与了免疫炎症相关 PH 进展, 免疫疗法和抗炎治疗等新方法可能是延缓 PH 进展的潜在策略。

## 2 总结与展望

PH 是一种起病隐匿的慢性进展性疾病, 其发病率和死亡率较高, 尚缺乏有效治疗措施。随着高通量测序技术的发展, 发现 lncRNA 与 PH 的发生和发展密切相关。lncRNA 对 PH 的 EndMT、细胞增殖、细胞迁移、细胞凋亡、血管再生、氧化应激、血管炎症方面具有调控作用, 参与 PH 肺血管重构过程, 为 PH 的治疗提供了新思路。目前, 虽然研究发现 PH 患者和动物模型中差异表达的 lncRNA 不在少数, 但只有少部分 lncRNA 的功能和作用靶点得到深入研究 (表 1), 很多 lncRNA 在 PH 中的作用机制仍不清楚。且 lncRNA 的研究主要集中在调控 PASMCM 功能中, 在其他细胞中调控的研究相对较少。此外, lncRNA 作为治疗靶点的开发仍局限于临床前研究, 尽管部分 lncRNA 在 PH 细胞实验和动物模型中显示出一定的治疗潜力, 但由于动物和人类之间部分 lncRNA 进化保守性的问题对药物开发和临床治疗也带来了挑战, 且 lncRNA 在不同细胞类型和组织中的多种通路以及基于 lncRNA 治疗的脱靶效应, 应谨慎考虑在临床研究中的应用, 值得国内外相关领域研究者进一步深入研究。

表 1 lncRNA 在 PH 中的表达及其功能  
Table 1 Expression of lncRNA in PH and their functions

长链非编码 RNA lncRNA	在 PH 中的表达 Expression in PH	相互作用的 miRNA Interacting miRNA	功能 Functions	靶点/通路 Target/Pathway
H19	↑	/	内皮-间充质转化 ↑ EndMT	TET 1 <sup>[9]</sup>
MALAT 1	↑	/	内皮-间充质转化 ↑ EndMT	Wnt/ $\beta$ -catenin <sup>[11]</sup>
AC068039.4	↑	miR-26a-5p	细胞增殖 ↑ Proliferation ↑	TRPC 6 <sup>[12]</sup>
GAS 5	↓	miR-23b-3p	细胞增殖 ↓ Proliferation ↓	KCNK 3 <sup>[13]</sup>
MALAT 1	↑	hsa-miR-124-3p.1	细胞增殖 ↑ Proliferation ↑	KLF 5 <sup>[14]</sup>
TUG 1	↑	miR-328-3p	细胞增殖 ↑ Proliferation ↑	PCNA <sup>[15]</sup>
CASC 2	↓	miR-222	细胞迁移 ↓ Migration ↓	ING 5 <sup>[18]</sup>
PAXIP 1-AS1	↑	/	细胞迁移 ↑ Migration ↑	ETS 1/WIPF 1/RhoA <sup>[19]</sup>
MALAT1	↑	miR-503	细胞迁移 ↑ Migration ↑	TLR 4 <sup>[21]</sup>
NEAT1	↑	miR-34a-5p	细胞迁移 ↑ Migration ↑	KLF4 <sup>[22]</sup>
Ang 362	↑	miR-221, miR-222	细胞凋亡 ↓ Apoptosis ↓	NF- $\kappa$ B <sup>[23]</sup>
Tug 1	↑	miR-374 c	细胞凋亡 ↑ Apoptosis ↑	Foxc 1 <sup>[24]</sup>
PAHRF	↓	miR-23a-3p	细胞凋亡 ↑ Apoptosis ↑	MST 1 <sup>[25]</sup>
GAS 5	↓	miR-382-3p	血管再生 ↓ Angiogenesis ↓	VEGF <sup>[28]</sup>
MANTIS	↓	/	血管再生 ↑ Angiogenesis ↑	BRG 1 <sup>[29]</sup>
MIAT	↑	miR-29a-5p	氧化应激 ↑ Oxidative stress ↑	Nrf 2 <sup>[32]</sup>
MALAT1	↑	/	氧化应激 ↑ Oxidative stress ↑	Notch <sup>[34]</sup>
SNHG 12	↓	hsa-let-7e-5p	血管炎症 ↓ Inflammation ↓	CCR 7 <sup>[39]</sup>
SOX 2-OT	↑	miR-455-3p	血管炎症 ↑ Inflammation ↑	SUMO 1 <sup>[40]</sup>

注: ↑: 上调; ↓: 下调。

Note. ↑, Up-regulation. ↓, Down-regulation.

#### 参考文献:

- [ 1 ] HUMBERT M, KOVACS G, HOEPER M M, et al. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension [J]. G Ital Cardiol, 2023, 24(4 Suppl 1): e1-e116.
- [ 2 ] HOEPER M M, HUMBERT M, SOUZA R, et al. A global view of pulmonary hypertension [J]. Lancet Respir Med, 2016, 4(4): 306-322.

- [ 3 ] DENG L, HAN X, WANG Z, et al. The landscape of noncoding RNA in pulmonary hypertension [J]. Biomolecules, 2022, 12(6): 796.
- [ 4 ] 刘浪, 王海存, 刘广麟, 等. 肿瘤中 HAGLR 反义长链非编码 RNA 的表达与机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 102-106.
- LIU L, WANG H C, LIU G L, et al. Expression and regulatory mechanisms of HAGLR opposite-strand long non-coding RNA in tumors [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32

- (5): 102–106.
- [ 5 ] 贡时雨, 范慧敏, 张旭敏, 等. LncRNA 在心力衰竭预后判断和治疗中的潜力研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(2): 102–105.
- GONG S Y, FAN H M, ZHANG X M, et al. Research progress of LncRNA in prognosis and treatment of heart failure [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(2): 102–105.
- [ 6 ] JIN Q, ZHAO Z, ZHAO Q, et al. Long noncoding RNAs: emerging roles in pulmonary hypertension [J]. Heart Fail Rev, 2020, 25(5): 795–815.
- [ 7 ] WANG E, WANG H, CHAKRABARTI S. Endothelial-to-mesenchymal transition: an underappreciated mediator of diabetic complications [J]. Front Endocrinol, 2023, 14: 1050540.
- [ 8 ] MONTEIRO J P, RODOR J, CAUDRILLIER A, et al. MIR503HG loss promotes endothelial-to-mesenchymal transition in vascular disease [J]. Circ Res, 2021, 128(8): 1173–1190.
- [ 9 ] CAO T, JIANG Y, LI D, et al. H19/TET1 axis promotes TGF- $\beta$  signaling linked to endothelial-to-mesenchymal transition [J]. FASEB J, 2020, 34(6): 8625–8640.
- [ 10 ] THOMAS A A, BISWAS S, FENG B, et al. lncRNA H19 prevents endothelial-mesenchymal transition in diabetic retinopathy [J]. Diabetologia, 2019, 62(3): 517–530.
- [ 11 ] LI H, ZHAO Q, CHANG L, et al. LncRNA MALAT1 modulates ox-LDL induced EndMT through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. Lipids Health Dis, 2019, 18(1): 62.
- [ 12 ] QIN Y, ZHU B, LI L, et al. Overexpressed lncRNA AC068039.4 contributes to proliferation and cell cycle progression of pulmonary artery smooth muscle cells via sponging miR-26a-5p/TRPC6 in hypoxic pulmonary arterial hypertension [J]. Shock, 2021, 55(2): 244–255.
- [ 13 ] HAO X, LI H, ZHANG P, et al. Down-regulation of lncRNA Gas5 promotes hypoxia-induced pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation by regulating KCNK3 expression [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 889: 173618.
- [ 14 ] WANG D, XU H, WU B, et al. Long non-coding RNA MALAT1 sponges miR-124-3p.1/KLF5 to promote pulmonary vascular remodeling and cell cycle progression of pulmonary artery hypertension [J]. Int J Mol Med, 2019, 44(3): 871–884.
- [ 15 ] WANG S, CAO W, GAO S, et al. TUG1 regulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension [J]. Can J Cardiol, 2019, 35(11): 1534–1545.
- [ 16 ] CARMAN B L, QIN S, PREDESCU D N, et al. Dysregulation of the long noncoding RNA X-inactive-specific transcript expression in male patients with pulmonary arterial hypertension [J]. Am J Pathol, 2024, 194(8): 1592–1606.
- [ 17 ] ZHENG H, WU D, CHEN X, et al. Endothelial downregulation of nuclear m6A reader YTHDC1 promotes pulmonary vascular remodeling in sugen hypoxia model of pulmonary hypertension [J]. Heliyon, 2024, 10(3): e24963.
- [ 18 ] HAN Y, LIU Y, YANG C, et al. LncRNA CASC2 inhibits hypoxia-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and migration by regulating the miR-222/ING5 axis [J]. Cell Mol Biol Lett, 2020, 25: 21.
- [ 19 ] SONG R, LEI S, YANG S, et al. LncRNA PAXIP1-AS1 fosters the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension via ETS1/WIPF1/RhoA axis [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(15): 7321–7334.
- [ 20 ] WANG S, ZHANG C, ZHANG X. Downregulation of long non-coding RNA ANRIL promotes proliferation and migration in hypoxic human pulmonary artery smooth muscle cells [J]. Mol Med Rep, 2020, 21(2): 589–596.
- [ 21 ] HE M, SHEN J, ZHANG C, et al. Long-chain non-coding RNA metastasis-related lung adenocarcinoma transcript 1 (malat1) promotes the proliferation and migration of human pulmonary artery smooth muscle cells (hPASMCs) by regulating the microRNA-503 (miR-503)/toll-like receptor 4 (TLR4) signal axis [J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e923123.
- [ 22 ] DOU X, MA Y, QIN Y, et al. NEAT1 silencing alleviates pulmonary arterial smooth muscle cell migration and proliferation under hypoxia through regulation of miR-34a-5p/KLF4 *in vitro* [J]. Mol Med Rep, 2021, 24(5): 749.
- [ 23 ] WANG H, QIN R, CHENG Y. LncRNA-Ang362 promotes pulmonary arterial hypertension by regulating miR-221 and miR-222 [J]. Shock, 2020, 53(6): 723–729.
- [ 24 ] YANG L, LIANG H, SHEN L, et al. LncRNA Tug1 involves in the pulmonary vascular remodeling in mice with hypoxic pulmonary hypertension via the microRNA-374c-mediated Foxc1 [J]. Life Sci, 2019, 237: 116769.
- [ 25 ] LIU Y, HU R, ZHU J, et al. The lncRNA PAHRF functions as a competing endogenous RNA to regulate MST1 expression by sponging miR-23a-3p in pulmonary arterial hypertension [J]. Vascul Pharmacol, 2021, 139: 106886.
- [ 26 ] GONG J, CHEN Z, CHEN Y, et al. Long non-coding RNA CASC2 suppresses pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and phenotypic switch in hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. Respir Res, 2019, 20(1): 53.
- [ 27 ] FENG X, WANG K, YANG T, et al. Overexpressed microRNA (miR)-382-3p promoted vascular remodeling via suppressing autophagy-related protein 7 (ATG7) in chronic

- thromboembolic pulmonary hypertension [EB/OL]. [2023-08-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37608664/>.
- [28] FENG X, WANG K, YANG T, et al. LncRNA-GAS5/miR-382-3p axis inhibits pulmonary artery remodeling and promotes autophagy in chronic thromboembolic pulmonary hypertension [J]. *Genes Genomics*, 2022, 44(4): 395-404.
- [29] LEISEGANG M S, FORK C, JOSIPOVIC I, et al. Long noncoding RNA MANTIS facilitates endothelial angiogenic function [J]. *Circulation*, 2017, 136(1): 65-79.
- [30] JOSIPOVIC I, FORK C, PREUSSNER J, et al. PFAFH1B1 and the lncRNA NONHSAT073641 maintain an angiogenic phenotype in human endothelial cells [J]. *Acta Physiol*, 2016, 218(1): 13-27.
- [31] POYATOS P, GRATACÓS M, SAMUEL K, et al. Oxidative stress and antioxidant therapy in pulmonary hypertension [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(5): 1006.
- [32] LI W W, CAO A H, SUN F Y. LncRNA MIAT stimulates oxidative stress in the hypoxic pulmonary hypertension model by sponging miR-29a-5p and inhibiting Nrf2 pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(17): 9022-9029.
- [33] LIU J, ALI M K, MAO Y. Emerging role of long non-coding RNA MALAT1 related signaling pathways in the pathogenesis of lung disease [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1149499.
- [34] XUE Y Z, LI Z J, LIU W T, et al. Down-regulation of lncRNA MALAT1 alleviates vascular lesion and vascular remodeling of rats with hypertension [J]. *Aging*, 2019, 11(14): 5192-5205.
- [35] OMURA J, HABBOUT K, SHIMAUCHI T, et al. Identification of long noncoding RNA H19 as a new biomarker and therapeutic target in right ventricular failure in pulmonary arterial hypertension [J]. *Circulation*, 2020, 142(15): 1464-1484.
- [36] CAO L, ZHANG Z, LI Y, et al. LncRNA H19/miR-let-7 axis participates in the regulation of ox-LDL-induced endothelial cell injury via targeting periostin [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 72: 496-503.
- [37] ZHAO H, SONG J, LI X, et al. The role of immune cells and inflammation in pulmonary hypertension: mechanisms and implications [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1374506.
- [38] YANG X, QI F, WEI S, et al. The transcription factor C/EBP $\beta$  promotes HFL-1 cell migration, proliferation, and inflammation by activating lncRNA HAS2-AS1 in hypoxia [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 651913.
- [39] CAI M, LI X, DONG H, et al. CCR7 and its related molecules may be potential biomarkers of pulmonary arterial hypertension [J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(6): 1565-1578.
- [40] JIANG Y, HEI B, HAO W, et al. Clinical value of lncRNA SOX2-OT in pulmonary arterial hypertension and its role in pulmonary artery smooth muscle cell proliferation, migration, apoptosis, and inflammatory [J]. *Heart Lung*, 2022, 55: 16-23.

[收稿日期]2024-07-02

苏丹阳, 马渊博, 刘金龙, 等. 双能量 CT 成像在动物骨修复评估中的应用价值 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(1): 155-162.

Su DY, Ma YB, Liu JL, et al. Application of dual-energy computed tomography imaging for evaluation of bone repair [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 155-162.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.016

# 双能量 CT 成像在动物骨修复评估中的应用价值

苏丹阳<sup>1</sup>, 马渊博<sup>1</sup>, 刘金龙<sup>1</sup>, 张浩然<sup>1</sup>, 杨慎宇<sup>2</sup>, 苗秋菊<sup>3</sup>, 白臻<sup>3</sup>, 杨晓鹏<sup>3\*</sup>

(1. 郑州大学第一附属医院放射科, 郑州 450000; 2. 郑州大学第一附属医院 3D 打印中心, 郑州 450000;  
3. 郑州大学第一附属医院医学装备部, 郑州 450000)

**【摘要】** 骨缺损修复是骨科领域亟待解决的难题, 众多研究者致力于探索更为高效的治疗策略。然而, 术后精准的骨修复效果评估也是一个重要环节。随着计算机断层扫描 (computed tomography, CT) 成像的发展, 双能量 CT 成像在分析骨组织成分以及减少金属伪影方面展现出显著优势。本文就双能量 CT 成像在动物骨修复评估中的应用价值进行综述。

**【关键词】** 双能量 CT; 骨修复; 物质分离; 金属伪影

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0155-08

## Application of dual-energy computed tomography imaging for evaluation of bone repair

SU Danyang<sup>1</sup>, MA Yuanbo<sup>1</sup>, LIU Jinlong<sup>1</sup>, ZHANG Haoran<sup>1</sup>, YANG Shenyu<sup>2</sup>, MIAO Qiuju<sup>3</sup>, BAI Zhen<sup>3</sup>,  
YANG Xiaopeng<sup>3\*</sup>

(1. Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China.  
2. 3D Printing Center of the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000. 3. Department of  
Medical Equipment, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000)

**【Abstract】** Bone defect repair is an urgent problem in the field of orthopedics, and numerous researchers are working to develop more effective treatment plans. The accurate evaluation of bone repair after surgery is a crucial step. In line with the development of computed tomography (CT) imaging, dual-energy CT imaging has shown significant advantages in analyzing bone composition and reducing metal artifacts. This article reviews the application of dual-energy CT imaging for the evaluation of bone repair in animals.

**【Keywords】** dual-energy CT; bone repair; material decomposition; metal artifacts

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

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划项目 (SBGJ202102089)。

[作者简介] 苏丹阳 (1999—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 骨修复影像评估。E-mail: s839671366@163.com

[通信作者] 杨晓鹏 (1975—), 男, 博士, 高级工程师, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 影像和骨组织工程。

E-mail: 13837141925@163.com

骨缺损通常是指由感染、创伤、肿瘤、炎症、骨质疏松等导致的骨结构完整性被破坏的状况, 这些原因可能单独或共同作用, 导致骨质损失。较小的骨缺损有时可以通过身体的自然修复机制促进愈合, 但骨缺损过大超出了身体自然修复能力的范围时难以自行愈合<sup>[1-4]</sup>。常见的骨缺损的治疗方法包括自体骨移植、异体骨移植以及人工骨修复材料。自体骨移植虽然是治疗骨缺损的金标准, 但这种方法也存在对动物造成二次伤害的危险。异体骨移植由于存在免疫排斥和病毒传播的风险, 其应用受到限制。随着骨组织工程的发展, 为骨缺损的修复提供了诸多可能。人工骨修复材料作为骨组织再生的替代选择应运而生, 尤其是各种合成高分子聚合物以及复合材料, 在骨修复治疗应用研究中日益广泛<sup>[5-7]</sup>。众多研究者从多方面、多角度开展动物骨修复的相关研究, 以期最大程度促进骨组织的再生和修复<sup>[8-11]</sup>。但骨修复是一个复杂、多阶段的过程, 因此, 在追求精准有效治疗的同时, 寻找一种非侵袭性且快速精准的术后评估方法对于判断动物骨修复的疗效具有至关重要的意义。

影像学检查方法逐渐成为骨缺损修复评估的重要手段, 包括 X 线、超声、磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI)、核医学检查、显微计算机断层扫描 (micro computed tomography, Micro-CT) 和计算机断层扫描 (computed tomography, CT) 等。CT 检查因扫描速度快、图像采集时间短、高空间分辨率以及可横断面显像等而成为骨修复常用的影像学检查方法<sup>[12-13]</sup>。而且随着 CT 设备及技术的更新发展, 双能量 CT 利用不同物质在不同 X 射线能量下的差异化吸收特性, 扩展了常规 CT 的功能界限, 为医疗诊断提供更丰富的信息和参数<sup>[14-15]</sup>。本文结合常见的影像学评估方法, 就双能量 CT 成像及其在动物骨修复方面的应用价值综述如下。

## 1 动物骨修复常见的影像学评估方法

### 1.1 X 线评估

X 线操作简单、检查成本低, 在骨科应用广泛<sup>[16]</sup>。起初多数学者使用 X 线进行骨缺损修复的二维观察, 有助于明确骨缺损的位置、大小、形状以及与周围组织的关系, 为判断受检部位的恢

复情况提供重要的参考依据。QIN 等<sup>[17]</sup>研究发现, X 线照片能显示新西兰兔自体移植牙与正常骨组织在不同骨缺损修复阶段的透光性变化。姚彪等<sup>[18]</sup>通过 X 线及评分发现  $\alpha$ -半水硫酸钙/双相生物陶瓷复合材料促进兔桡骨骨修复的效果优于两种单独的材料。阳懿等<sup>[19]</sup>应用 X 线并结合图像分析软件发现生物源性骨粉修复新西兰兔骨缺损效果优于无机源性骨粉。牛恒立等<sup>[20]</sup>应用 X 线及其评分发现接受接骨丹治疗的大鼠较未接受接骨丹治疗的大鼠骨缺损区域明显减小。然而, X 线因其平面成像的特性, 无法精确显示细微的骨结构变化。此外, X 线检查多依赖于主观评估, 导致其在定量化评估, 特别是骨修复早期阶段的效果评估上价值受限。因此, X 线检查虽然在骨缺损修复评估中具有一定的优势, 但早期诊断骨缺损通常需要结合其他影像学检查方法以提高诊断的准确性。

### 1.2 超声评估

超声检查凭借其无辐射、无创伤、测量快速方便等优点在医学领域受到广泛应用<sup>[21]</sup>。在骨修复评估中, PROTOPAPPAS 等<sup>[22]</sup>提出了通过超声导波头波速检测骨愈合的创新方法, XU 等<sup>[23]</sup>研究也表明超声导波具有评价骨愈合的能力, 而且不同模态导波参数对骨愈合组织的力学性质和骨折结构的敏感性存在差异。尽管超声技术在骨愈合评估中展现出潜力, 但目前相关检测技术仍处于机理探索阶段, 而且超声也存在对骨质穿透能力有限、对操作者依赖性大等不足。因此, 在进一步的研究和应用中, 需要不断优化超声检测技术, 提高其在骨修复评估中的准确性和可靠性。

### 1.3 MRI 评估

MRI 检查无电离辐射, 具备卓越的图像分辨率和出色的组织对比度, 有望在骨生长初期阶段提供更详细的图像信息<sup>[24]</sup>。WASHBURN 等<sup>[25]</sup>发现磁共振显微镜 (magnetic resonance microscopy, MRM) 测得的弛豫时间和 Micro-CT 测量的矿物质浓度呈反比关系, 这一发现为评估多孔聚甲基丙烯酸乙酯支架的新生骨形成提供了新视角。HARTMAN 等<sup>[26]</sup>通过 MRI 来评估大鼠骨骼的生长和发育, 揭示了 MRI 相比传统 X 线在检测骨形成方面的早期性和敏感性。然而, MRI 价

格相对昂贵,成像时间长以及对特定植入材料有限制,使其在骨修复评估中的应用受到一定的限制。

#### 1.4 核医学评估

核医学包括正电子发射断层显像 (positron emission tomography, PET) 和单光子发射计算机断层显像 (single photon emission computed tomography, SPECT), 已成为评估显像靶点功能的有力诊断工具<sup>[27]</sup>。LIN 等<sup>[28]</sup>通过 PET/CT 分析发现, 与短暂表达骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2)/血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的骨髓间充质干细胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs) 移植组相比, 持续表达移植组在颅骨缺损的再生方面展现出了显著的改善。VAN DE WATERING 等<sup>[29]</sup>通过 SPECT 成像观察生长因子从聚合物支架的释放动力学评估不同 BMP-2 加载方法在大鼠身上产生的骨诱导能力。虽然核医学在评估骨修复方面具有独特的优势, 但其也存在潜在的辐射危害、相对较高的成本、操作过程的复杂性以及评估标准的非一致性等问题。这些挑战需要大家在未来的研究和应用中加以克服, 以更好地发挥核医学在骨修复评估中的潜力。

#### 1.5 Micro-CT 评估

Micro-CT 具备极高的分辨率使其在动物骨修复评估方面能够提供多样性、科学性和可靠性的影像数据, 已经成为动物实验中必不可少的无创性工具之一<sup>[30-33]</sup>。研究者们通过 Micro-CT 精确测量不同时间点和不同实验条件下的组织体积 (tissue volume, TV)、骨体积 (bone volume, BV)、骨体积分数 (bone volume fraction, BV/TV)、组织矿物密度 (tissue mineral density, TMD)、骨矿物密度 (bone mineral density, BMD) 等关键参数, 从而实现了骨缺损修复的量化评估<sup>[34-35]</sup>。研究进一步发现 Micro-CT 与组织学切片之间具有良好的相关性, 这使得其成为实验室三维评估骨缺损修复的有效替代方法<sup>[36-37]</sup>。例如, ÖZER 等<sup>[38]</sup>借助 Micro-CT 技术评价利塞膦酸盐对颅骨骨缺失的治疗作用, 发现利塞膦酸盐可进一步促进骨修复。这些研究表明 Micro-CT 技术可辅助完成动物骨修复模型的数据检测和监测, 对临床前研究具有重要意义。然而, 扫描分辨率的提高

相应的伴随着扫描时间的增长和辐射剂量的提高, 极大地限制了 Micro-CT 的广泛应用。因此, 如何在保证成像质量的同时, 降低扫描时间和辐射剂量, 是未来 Micro-CT 技术发展中需要解决的重要问题。

#### 1.6 CT 评估

CT 可以在保证低辐射剂量和短扫描时间的前提下实现快速的横断面成像, 为观察和监控骨缺损修复的连续过程提供了一种潜在且高效的选择<sup>[12, 35]</sup>。耿海霞等<sup>[39]</sup>通过 CT 三维重建观察分析发现羟基磷灰石/凝胶新型复合物在兔颅骨缺损中取得了较好的修复效果。BISSINGER 等<sup>[35]</sup>发现多排探测器 CT (multirow detector CT, MDCT) 在评估小鼠下颌角骨缺损修复中的骨矿物含量时, 其准确性与 Micro-CT 一致。CHENG 等<sup>[40]</sup>研究发现常规 CT 对同一密度的纯物质进行测量时所得到的 CT 值差异较大, 这限制了其在评估 BMD 方面的应用。这一局限性主要源于常规 CT 所采用的混合能量的 X 射线, 对骨组织的定量分析价值有限。相比之下, 双能量 CT 凭借其独特的后处理技术, 能够提供比常规 CT 更加精确的测量结果<sup>[41]</sup>。通过应用双能量 CT 的后处理技术可以在保持常规 CT 快速、重复以及不损伤动物或者其标本的基础上, 更准确地反映骨组织中实际物质的含量, 对骨修复术后的复查具有重要价值。

本综述系统地梳理并呈现了常见影像学方法在动物骨修复评估中的优势和不足, 见表 1。

## 2 双能量 CT 成像

### 2.1 成像原理

双能量 CT 的成像原理概括如下: 当 X 射线通过物质时, 两者会发生相互作用导致 X 射线能量衰减, 衰减程度与 X 射线的能量与物质密度有确定的函数关系。不同的物质对 X 射线的吸收和衰减特性各不相同, 这为通过双能量 CT 区分不同的组织类型提供了基础。最重要的是, 双能量 CT 技术基于一个核心原理: 即任何一种特定组织的 X 射线吸收效应, 都可以通过选择两种特定的基物质对 (如碘和水) 并按照一定比例进行组合来等效表示。这种等效表示方法取决于所研究的对象<sup>[42]</sup>。

表 1 动物骨修复常见的影像学评估方法的优点和缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of traditional imaging evaluation methods for animal bone repair

检查方法 Examination method	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
X 线 X-rays	操作简便;价格低廉;骨性结构成像清晰 Easy operation;Low price; Clear imaging of the bone structure	细微结构显示不清;主观判断差异 Fine structures not clearly depicted;Variability in subjective judgment
超声 Ultrasound	无电离辐射;价格低廉;测量快速方便 No ionizing radiation;Low price; Quick and easy measurement	穿透力有限;骨性结构显示有限 Limited penetration;Limited bony structures were shown
磁共振成像 MRI	无电离辐射;软组织分辨率高;功能性成像 No ionizing radiation;High soft tissue resolution; Functional imaging	扫描时间长;成本高;植入物评估受限 Long scan times;High costs; Limited evaluation of implants
核医学 Nuclear medicine	高灵敏度;高特异性;定量分析 High sensitivity;High specificity; Quantitative analysis	成本高;技术复杂;评估标准不一致 High costs;Complex technology; Inconsistent assessment criteria
显微计算机断层扫描 Cicro-CT	高分辨率;精确的定量分析;三维重建 High resolution;Precise quantitative analysis; Three dimensional reconstruction	样本尺寸受限;扫描时间长;辐射剂量高 Limitations in sample size;Prolonged scan times; High radiation doses
计算机断层扫描 CT	高分辨率;三维重建;双能量 CT 的应用 High resolution;3D reconstruction; Use of dual-energy CT technology	软组织对比度有限;金属伪影干扰;精确度受限 Limited soft tissue contrast; Interference from metal artifacts; Limited accuracy

## 2.2 成像类型

目前双能量 CT 主要有以下 3 种类型:一是通过单球管高低双能瞬时 kVp 切换来获得双能量成像数据的 CT(GE 医疗);二是在扫描时通过表层收集低能数据,深层收集高能数据的双层探测器 CT(飞利浦医疗);三是配备有两套 X 射线球管和两个相应匹配探测器的可产生高低能量的双源 CT(西门子医疗)。这 3 种技术通过不同的扫描方式和物理学原理均能同时或者几乎同时获取高低能数据集<sup>[14]</sup>。

## 2.3 主要技术

双能量 CT 成像主要技术包含物质分离、虚拟单能量图像、能谱曲线以及有效原子序数等。物质分离假设整个体素以两种或多种预选的材料以不同的比例组成,常见的基物质对包括碘(水)、钙(水)、羟基磷灰石(水)等<sup>[14]</sup>。在应用过程中可根据研究对象选择合适的基物质对,彩色编码图像相比于灰度图像可进一步增加不同密度间的可辨别性。虚拟单能量图像是通过双能量扫描后虚拟计算出某一物质在各个单能量下的 CT 值生成的图像<sup>[43]</sup>。这一技术能够有效解决常规 CT 扫描中常见的硬化伪影和金属伪影问

题,显著提升图像质量。在实际应用中,虚拟单能量图像常与去金属伪影技术相结合以进一步提高图像清晰度和诊断准确性。能谱曲线是采集感兴趣区(region of interest, ROI)内的物质或者结构在不同单能量下的 CT 值连接而成的曲线,用于反映物质的能量衰减特性。有效原子序数通常用于反映 ROI 内无机物的原子序数以及确定其性质的指标,它能够帮助确定无机物的性质,是双能量 CT 在能谱分析中精确分析无机物的一种重要方法。近年来,逐渐有学者使用双能 CT 开展骨修复的评估。

## 3 双能量 CT 成像在动物骨修复评估中的应用

### 3.1 物质分离技术

物质分离技术假设整个体素都以两种或多种预选的材料以不同的比例组成<sup>[14]</sup>。研究者常利用双能 CT 物质分离技术中的基物质对进行 BMD 的评估,特别是钙(水)、羟基磷灰石(水)基物质对,这些基物质对的测量值与定量 CT 的测量结果展现出良好的相关性<sup>[44]</sup>。基于此, SU 等<sup>[45]</sup>使用双能量 CT 的物质分离技术中的钙(水)、羟基磷灰石(水)基物质对定量评估骨缺损

修复,发现钙(水)、羟基磷灰石(水)密度值与 Micro-CT 测量的密度值有较高的相关性,这意味着使用双能量 CT 定量评估骨缺损修复具备应用价值。WAN 等<sup>[46]</sup>首次利用双能量 CT 技术实现了对兔骨缺损模型中干细胞的无创、实时地追踪。观察结果显示,经过金纳米颗粒标记的干细胞明显地向骨皮质缺损部位迁移,这一发现充分证明了双能量 CT 在骨缺损修复过程中进行体内示踪的可行性和有效性,为科学界提供了一种新颖且直观的方法来观察和研究骨缺损修复过程。此外,双能量 CT 具有校准脂肪的优势,能够有效地消除这种影响,使得测量结果更加精确可靠<sup>[47-48]</sup>。而且扫描参数的优化有助于进一步提高双能量 CT 物质分离技术的测量结果的准确性<sup>[49]</sup>。未来,随着对双能量 CT 物质分离技术的深入了解、广泛应用以及不断发展完善,无疑将极大地推动骨缺损修复领域的研究进展,对于动物骨修复的术后精准评估以判断最优的骨修复方案具有积极意义。

### 3.2 虚拟单能量图像

虚拟单能量图像等同于实现了不同物质在单色 X 线源的情况下获得的图像,具有更高的图像质量、信噪比(signal to noise ratio, SNR)及对比噪声比(contrast noise ratio, CNR),可以解决常规 CT 出现的硬化伪影和金属伪影等问题<sup>[50-52]</sup>。MUSSMANN 等<sup>[12]</sup>使用双能 CT 对新鲜冷冻的猪股骨头样本的髓关节金属植入物进行扫描发现,随着 keV 水平的增加,扫描平面金属对周围骨组织测量值的影响更小,这表明较高 keV 的虚拟单能量图像能更有效地减少金属伪影。此外,相比于双能 CT 的虚拟单能量图像,去金属伪影技术结合虚拟单能量图像在猪股骨标本金属植入物显示了更好的去金属伪影的效果<sup>[53]</sup>。这意味着当去金属伪影技术与不同虚拟单能级图像相结合时,能进一步改善金属植入物产生的伪影,进而更加精准地揭示金属植入物附近的解剖细节,极大提升图像的整体质量,对于精确诊断和持续跟踪金属植入物术后的疗效具有举足轻重的价值<sup>[53-55]</sup>。因此,双能量 CT 所生成的虚拟单能量图像,在结合去金属伪影技术后,为动物骨修复术后植入物及其周边组织的细致评估提供了强有力的支持。它能够清晰呈现骨修复区域及周

围组织的解剖结构,提供可靠的诊断依据,进一步辅助治疗决策的制定。

## 4 结语

综上所述,双能量 CT 作为 CT 成像的新兴领域,通过结合多种后处理技术,显著提高了测量结果的准确性,在骨缺损修复的早期定位、定性提供了强有力的支持。双能量 CT 的应用不仅弥补了侵入性测量方法的不足,还有助于节省实验动物的数量和成本,简化实验流程,对探索最佳或新的骨修复材料应用于不同骨缺损部位并进行观察具有积极意义。目前,双能量 CT 还在不断研发和完善中,随着扫描参数的持续优化,未来的双能量 CT 将能够借助更为精准的后处理技术,更全面地评估各种骨缺损修复材料在动物骨修复中的效果,为骨缺损治疗提供更精确、更有力的支持。与此同时,光子计数 CT 作为新兴技术代表,其超高清成像优势显著提升了骨细节以及骨骼病变的显示,在精准评估骨缺损修复材料于动物骨修复中的效果方面具备潜在价值。双能量 CT 侧重于利用后处理技术在骨缺损修复的综合评估方面发挥重要作用;而光子计数 CT 则以超高清成像为核心竞争力,在骨骼的精细显示方面展现出卓越潜力。二者定位不同,价值各异,应在实际应用中根据具体需求进行选择。

### 参考文献:

- [1] SALHOTRA A, SHAH H N, LEVI B, et al. Mechanisms of bone development and repair [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(11): 696-711.
- [2] ZHANG J, JIA J, KIM J P, et al. Ionic colloidal molding as a biomimetic scaffolding strategy for uniform bone tissue regeneration. [EB/OL]. [2017-02-21]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/adma.201605546>.
- [3] 汤译博, 赵亮, 苏佳灿. 骨折动物模型的研究进展 [J]. 中国骨伤, 2011, 24(1): 91-93.  
TANG Y B, ZHAO L, SU J C. Research progress of animal model of fracture [J]. China J Orthop Traumatol, 2011, 24(1): 91-93.
- [4] 姚广源, 董平, 吴昊, 等. 长骨骨折动物模型的研究进展 [J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(3): 289-296.  
YAO G Y, DONG P, WU H, et al. Research progress on animal models of long bone fracture [J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(3): 289-296.

- [ 5 ] KLAR R M, COX J C, HOUCHEM C J, et al. The induction of bone formation by 3D-printed PLGA microsphere scaffolds in a calvarial orthotopic mouse model; a pilot study [ J ]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2024, 12: 1425469.
- [ 6 ] BALDWIN P, LI D J, AUSTON D A, et al. Autograft, allograft, and bone graft substitutes; clinical evidence and indications for use in the setting of orthopaedic trauma surgery [ J ]. *J Orthop Trauma*, 2019, 33(4): 203-213.
- [ 7 ] 朱力鸣, 焦昆, 刘伟, 等. 新型同种异体骨修复骨缺损动物实验研究 [ J ]. *实验动物科学*, 2023, 40(6): 73-77.  
ZHU L M, JIAO K, LIU W, et al. Experimental study on the repair of bone defect with a new type of allogeneic bone [ J ]. *Lab Anim Sci*, 2023, 40(6): 73-77.
- [ 8 ] 郭瑛, 吴维敏, 张力军, 等. 一种羊椎体骨缺损动物模型的改良及应用效果观察 [ J ]. *实验动物科学*, 2018, 35(5): 24-29.  
GUO Y, WU W M, ZHANG L J, et al. The effect of an improved sheep vertebral bone defect model for bioactive vertebral augmentation materials [ J ]. *Lab Anim Sci*, 2018, 35(5): 24-29.
- [ 9 ] 吴西, 王中琪, 宋慕格, 等. 外泌体对骨组织细胞的影响及应用的研究进展 [ J ]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(6): 108-113.  
WU X, WANG Z Q, SONG M G, et al. Research progress on the effect of exosomes on bone histocytes and its application [ J ]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(6): 108-113.
- [ 10 ] YANG X, GAO J, YANG S, et al. Pore size-mediated macrophage M1 to M2 transition affects osseointegration of 3D-printed PEEK scaffolds [ J ]. *Int J Bioprint*, 2023, 9(5): 755.
- [ 11 ] WANG Y, WANG Z, YU X, et al. 3D-Printing of succulent plant-like scaffolds with beneficial cell microenvironments for bone regeneration [ J ]. *J Mater Chem B*, 2023, 11(24): 5523-5536.
- [ 12 ] MUSSMANN B, OVERGAARD S, TORFING T, et al. Agreement and precision of periprosthetic bone density measurements in micro-CT, single and dual energy CT [ J ]. *J Orthop Res*, 2017, 35(7): 1470-1477.
- [ 13 ] MCCOLLOUGH C H, RAJIAH P S. Milestones in CT: past, present, and future [ J ]. *Radiology*, 2023, 309(1): e230803.
- [ 14 ] MCCOLLOUGH C H, LENG S, YU L, et al. Dual- and multi-energy CT: principles, technical approaches, and clinical applications [ J ]. *Radiology*, 2015, 276(3): 637-653.
- [ 15 ] GREFFIER J, VILLANI N, DEFEZ D, et al. Spectral CT imaging: Technical principles of dual-energy CT and multi-energy photon-counting CT [ J ]. *Diagn Interv Imaging*, 2023, 104(4): 167-177.
- [ 16 ] 阎晓斌, 刘伟, 吕杰. X 线检查临床应用的研究 [ J ]. *医学信息*, 2019, 32(17): 50-52.  
YAN X B, LIU W, LYU J. X-ray examination clinical application research [ J ]. *Med Inf*, 2019, 32(17): 50-52.
- [ 17 ] QIN X, RAJ R M, LIAO X F, et al. Using rigidly fixed autogenous tooth graft to repair bone defect; an animal model [ J ]. *Dent Traumatol*, 2014, 30(5): 380-384.
- [ 18 ] 姚彪, 钱卫庆, 尹宏. 新型  $\alpha$ -半水硫酸钙/双相生物陶瓷人工骨修复兔桡骨骨缺损的 X 射线评估 [ J ]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(47): 7550-7555.  
YAO B, QIAN W Q, YI H. X-ray evaluation of alpha-calcium sulfate hemihydrate/biphasic bioceramics bone for repairing bone defects of rabbit radius [ J ]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2014, 18(47): 7550-7555.
- [ 19 ] 阳懿, 赵承初, 马征, 等. 两种骨修复材料修复兔颅骨骨缺损: X 射线评估效果 [ J ]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(34): 6283-6286.  
YANG Y, ZHAO C C, MA Z, et al. Two kinds of bone materials for repairing rabbit calvarial bone defects: X-ray assessment [ J ]. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res*, 2010, 14(34): 6283-6286.
- [ 20 ] 牛恒立, 赵国彪, 马中兴, 等. 接骨丹对大鼠骨缺损愈合疗效的影像学研究 [ J ]. *西部中医药*, 2016, 29(5): 124-126.  
NIU H L, ZHAO G B, MA Z X, et al. Imaging study on curative effects of JieGu pills in healing the rats with bone defect [ J ]. *West J Tradit Chin Med*, 2016, 29(5): 124-126.
- [ 21 ] 赵泽庆, 潘慧, 张莉, 等. 超声评估骨龄研究现状及临床应用前景 [ J ]. *协和医学杂志*, 2024, 15(2): 400-405.  
ZHAO Z Q, PAN H, ZHANG L, et al. Research status and application prospect of bone age assessment by ultrasonography [ J ]. *Med J Peking Union Med Coll Hosp*, 2024, 15(2): 400-405.
- [ 22 ] PROTOPAPPAS V C, VAVVA M G, FOTIADIS D I, et al. Ultrasonic monitoring of bone fracture healing [ J ]. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 2008, 55(6): 1243-1255.
- [ 23 ] XU K, TA D, HE R, et al. Axial transmission method for long bone fracture evaluation by ultrasonic guided waves: simulation, phantom and *in vitro* experiments [ J ]. *Ultrasound Med Biol*, 2014, 40(4): 817-827.
- [ 24 ] XU H, OTHMAN S F, MAGIN R L. Monitoring tissue engineering using magnetic resonance imaging [ J ]. *J Biosci Bioeng*, 2008, 106(6): 515-527.
- [ 25 ] WASHBURN N R, WEIR M, ANDERSON P, et al. Bone formation in polymeric scaffolds evaluated by proton magnetic

- resonance microscopy and X-ray microtomography [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2004, 69(4): 738-747.
- [26] HARTMAN E H, PIKKEMAAT J A, VEHOF J W, et al. In vivo magnetic resonance imaging explorative study of ectopic bone formation in the rat [J]. *Tissue Eng*, 2002, 8(6): 1029-1036.
- [27] RAHMIM A, ZAIDI H. PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges [J]. *Nucl Med Commun*, 2008, 29(3): 193-207.
- [28] LIN C Y, CHANG Y H, KAO C Y, et al. Augmented healing of critical-size calvarial defects by baculovirus-engineered MSCs that persistently express growth factors [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(14): 3682-3692.
- [29] VAN DE WATERING F C, MOLKENBOER-KUENEN J D, BOERMAN O C, et al. Differential loading methods for BMP-2 within injectable calcium phosphate cement [J]. *J Control Release*, 2012, 164(3): 283-290.
- [30] RITMAN E L. Small-animal CT-its difference from, and impact on, clinical CT [J]. *Nucl Instrum Methods Phys Res A*, 2007, 580(2): 968-970.
- [31] 李淑楨, 戴文敬, 喻青青, 等. Micro-CT 在实验动物疾病模型中的应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(5): 676-682.
- LI S Z, DAI W J, YU Q Q, et al. Application of Micro-CT in experimental animal disease models [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(5): 676-682.
- [32] KAUR A, MOHAN S, RUNDLE C H. A segmental defect adaptation of the mouse closed femur fracture model for the analysis of severely impaired bone healing [J]. *Anim Model Exp Med*, 2020, 3(2): 130-139.
- [33] TAN J, LABRINIDIS A, WILLIAMS R, et al. Micro-CT-based bone microarchitecture analysis of the murine skull [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2403: 129-145.
- [34] MORGAN E F, MASON Z D, CHIEN K B, et al. Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function [J]. *Bone*, 2009, 44(2): 335-344.
- [35] BISSINGER O, KIRSCHKE J S, PROBST F A, et al. Micro-CT vs. whole body multirow detector CT for analysing bone regeneration in an animal model [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166540.
- [36] BECKER K, STAUBER M, SCHWARZ F, et al. Automated 3D-2D registration of X-ray microcomputed tomography with histological sections for dental implants in bone using chamfer matching and simulated annealing [J]. *Comput Med Imag Graph*, 2015, 44: 62-68.
- [37] 孙莲莲, 刘永超, 王志兴. 同步辐射成像比较两种不同骨修复材料修复兔股骨缺损的效果 [J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(21): 3343-3348.
- SUN L L, LIU Y C, WANG Z X. Repair effects of two kinds of bone repair materials on rabbit femoral defects compared using synchrotron-radiation-based micro-computed tomography [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2023, 27(21): 3343-3348.
- [38] ÖZER T, GULIYEVA V, AKTAS A, et al. Effects of a locally administered risedronate/autogenous bone graft combination on bone healing in a critical-size rabbit defect model [J]. *J Orthop Surg Res*, 2023, 18(1): 88.
- [39] 耿海霞, 郭秀娟, 钱君荣, 等. 羟基磷灰石/凝胶纳米复合物修复兔颅骨缺损的影像学评估 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(34): 5413-5417.
- GENG H X, GUO X J, QIAN J R, et al. Imaging evaluation of hydroxyapatite/gel nano-composite in rabbit skull defect repair [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2014, 18(34): 5413-5417.
- [40] CHENG X, YUAN H, CHENG J, et al. Chinese expert consensus on the diagnosis of osteoporosis by imaging and bone mineral density [J]. *Quant Imaging Med Surg*, 2020, 10(10): 2066-2077.
- [41] WICHMANN J L, BOOZ C, WESARG S, et al. Dual-energy CT-based phantomless *in vivo* three-dimensional bone mineral density assessment of the lumbar spine [J]. *Radiology*, 2014, 271(3): 778-784.
- [42] HAN D, SIEBERS J V, WILLIAMSON J F. A linear, separable two-parameter model for dual energy CT imaging of proton stopping power computation [J]. *Med Phys*, 2016, 43(1): 600.
- [43] PESSIS E, SVERZUT J M, CAMPAGNA R, et al. Reduction of metal artifact with dual-energy CT: virtual monospectral imaging with fast kilovoltage switching and metal artifact reduction software [J]. *Semin Musculoskelet Radiol*, 2015, 19(5): 446-455.
- [44] WANG M, WU Y, ZHOU Y, et al. The new fast kilovoltage-switching dual-energy computed tomography for measuring bone mineral density [J]. *Quant Imaging Med Surg*, 2023, 13(2): 801-811.
- [45] SU D, WU Y, YANG S, et al. Dual-energy computed tomography and micro-computed tomography for assessing bone regeneration in a rabbit Tibia model [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 5967.
- [46] WAN D, CHEN D, LI K, et al. Gold nanoparticles as a potential cellular probe for tracking of stem cells in bone regeneration using dual-energy computed tomography [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(47): 32241-32249.
- [47] BREDELLA M A, DALEY S M, KALRA M K, et al. Marrow adipose tissue quantification of the lumbar spine by using dual-energy CT and single-voxel (1)H MR spectroscopy: a feasibility study [J]. *Radiology*, 2015, 277

- (1): 230-235.
- [48] ARENTSEN L, HANSEN K E, YAGI M, et al. Use of dual-energy computed tomography to measure skeletal-wide marrow composition and cancellous bone mineral density [J]. *J Bone Miner Metab*, 2017, 35(4): 428-436.
- [49] 张源, 高冰, 黄世豪, 等. 优化扫描参数宝石能谱 CT 测量腰椎骨密度临床效果评价 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(3): 333-336.
- ZHANG Y, GAO B, HUANG S H, et al. Evaluation of clinical effect of optimized scanning parameters gem energy spectrum CT in the measurement of bone mineral density of the lumbar vertebrae [J]. *Chin J Osteoporos*, 2021, 27(3): 333-336.
- [50] 胡志, 余晓镔, 康立丽, 等. 基于一种体模对 CT 能谱技术的质量检测 [J]. *中国医学物理学杂志*, 2018, 35(1): 54-59.
- HU Z, YU X E, KANG L L, et al. Phantom-based quality testing for spectral computed tomography technology [J]. *Chin J Med Phys*, 2018, 35(1): 54-59.
- [51] ARAN, DAFTARI BESHELI L, KARCAALTINCABA M, et al. Applications of dual-energy CT in emergency radiology [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2014, 202(4): W314-W324.
- [52] HAKVOORT E T, WELLENBERG R H H, STREEKSTRA G J. Quantifying near metal visibility using dual energy computed tomography and iterative metal artifact reduction in a fracture phantom [J]. *Phys Med*, 2020, 69: 9-18.
- [53] 张冉旭. 骨科金属伪影减少算法及虚拟单能量成像技术在 CT 检查中的应用价值研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2022.
- ZHAO R X. Application value of orthopedic metal artifact reduction algorithm and virtual monoenergetic image technology in CT examination [D]. SHIJIAZHUANG: Hebei Medical University, 2022.
- [54] 孙彤彤, 黄熙菀, 罗腾龙, 等. 双层探测器光谱 CT 虚拟单能量成像联合去除植入物金属伪影用于减少置换髋关节假体金属伪影 [J]. *中国医学影像技术*, 2023, 39(7): 1084-1088.
- SUN T T, HUANG X K, LUO T L, et al. Virtual monoenergetic image combined with orthopedic metal artifact reduction for reducing metal artifacts of hip prosthesis based on dual-layer detector spectral CT [J]. *Chin J Med Imag Technol*, 2023, 39(7): 1084-1088.
- [55] 朱小忠, 朱自淘, 董馥闻. 宝石能谱 CT 单能量结合 MARs 在去金属伪影中的应用 [J]. *影像研究与医学应用*, 2023, 7(5): 27-29.
- ZHU X Z, ZHU Z T, DONG F W. Application of gemstone energy spectrum CT single energy combined with MARs technique in metal artifact removal [J]. *J Imag Res Med Appl*, 2023, 7(5): 27-29.

[收稿日期]2024-06-17

张昊,刁庆飞,樊建春,等. SHP2在结肠炎相关性结肠癌与结直肠癌发展中的作用及其作为治疗靶点的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(1): 163-171.

Zhang H, Diao QF, Fan JC, et al. Role of SHP2 in development of colitis-associated colon cancer and colorectal cancer and its potential as a therapeutic target [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 163-171.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.017

# SHP2在结肠炎相关性结肠癌与结直肠癌发展中的作用及其作为治疗靶点的研究进展

张昊<sup>1</sup>, 刁庆飞<sup>1</sup>, 樊建春<sup>1</sup>, 李萌<sup>1</sup>, 贾举名<sup>1</sup>, 杨春白雪<sup>1</sup>, 武雪亮<sup>2,3\*</sup>

(1.河北北方学院,河北张家口 075000;2.河北北方学院附属第一医院普通外科,河北张家口 075000;  
3.河北北方学院附属第一医院肿瘤研究所,河北张家口 075000)

**【摘要】** 结直肠癌(colorectal cancer, CRC)作为威胁人类生命最常见的恶性肿瘤之一,其严重影响着患者的生活质量。近年来,SHP2(src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase, SHP2)成为癌症领域中备受关注的焦点,已经被证实与CRC有着密切的关系。SHP2,由PTPN11基因编码,是一种非受体酪氨酸激酶,在人体各组织和细胞中普遍存在。现有研究显示,SHP2在调控CRC及结肠炎相关性结肠癌(colitis-associated colon cancer, CAC)中扮演关键角色,并随着SHP2变构抑制剂的出现,SHP2成为了CRC患者新的潜在的治疗靶点。本文主要针对SHP2的结构及其在CRC和CAC中的影响进行综述。

**【关键词】** 酪氨酸磷酸酶;SHP2;PTPN11;结直肠癌;结肠炎相关性结肠癌

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0163-09

## Role of SHP2 in development of colitis-associated colon cancer and colorectal cancer and its potential as a therapeutic target

ZHANG Hao<sup>1</sup>, DIAO Qingfei<sup>1</sup>, FAN Jianchun<sup>1</sup>, LI Meng<sup>1</sup>, JIA Juming<sup>1</sup>, YANG Chunbaixue<sup>1</sup>, Wu Xueliang<sup>2,3\*</sup>

(1. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China. 2. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000. 3. Cancer Research Institute, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

**【Abstract】** Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignant life-threatening tumors, with serious impacts on patient quality of life. Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase (SHP2) has recently become a hot topic in the field of cancer research, and has demonstrated a close relationship with CRC. SHP2, encoded by the PTPN11 gene, is a non-receptor tyrosine kinase commonly present in various tissues and cells of the human body. Existing research shows that SHP2 plays a crucial role in regulating CRC and colitis-associated colon cancer (CAC), and the emergence of SHP2 allosteric inhibitors has identified SHP2 as a potential new therapeutic target for patients with CRC. Here we review the structure of SHP2 and its roles in CRC and CAC.

**【基金项目】**2022年河北省自然科学基金精准医学联合基金培育项目(H2022405033)。

**【作者简介】**张昊(1998—),男,在读硕士研究生,研究方向:消化道恶性肿瘤的基础与临床。E-mail:18464268092@163.com

**【通信作者】**武雪亮(1984—),男,博士,副主任医师,研究方向:消化道恶性肿瘤的基础与临床。E-mail:wxlwk@163.com

**[Keywords]** tyrosine phosphatase; SHP2, *PTPN11*; colorectal cancer; colitis-associated colon cancer

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

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC), 一种普遍的消化系统恶性肿瘤, 近年来在全球范围内显著增长, 呈现出严峻的上升态势。CRC 的发生被认为是一个多层次、多基因突变积累的动态发展的过程, 涉及众多因素的交互作用<sup>[1]</sup>。CRC 通常在中晚期才被诊断出来, 导致生存期短, 预后差, 严重威胁着人类的生命健康<sup>[2]</sup>。现阶段尽管对 CRC 的发生机制已经有了很大的进展, 但其相关分子机制仍有待阐明。众所周知, 炎症对癌症的进展有着较大的影响, 长期慢性炎症的存在是肿瘤进展的驱动因素。除了已知的原发性 CRC 发病原因外, 结肠慢性炎症已代表一种独特的肿瘤发生途径, 在肿瘤的发生、发展和转移中起着重要作用<sup>[3-4]</sup>。炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 包括溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 和克罗恩病 (crohn's disease, CD) 两种主要形式, 疾病持续时间越长, 癌变的风险越高, 最终可因为“慢性炎症-增生异常-癌”的致癌途径导致结肠炎相关性结肠癌 (colitis-associated colon cancer, CAC) 的发生。并且与原发性 CRC 相比, CAC 意味着病灶更多、病理类型更差、预后更差<sup>[5-6]</sup>。目前 IBD 的癌变机制尚不清楚, 临床上也缺乏有效的监测和预防手段。因此, 阐明结肠炎-癌的发病机制, 制定以炎症为靶点的防治措施或许是预防和治疗结直肠癌的潜在策略。

随着对 Src 同源 2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶 (src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase, SHP2) 的研究越来越深入, 目前已有证据表明 SHP2 在乳腺癌、肺癌、前列腺癌等许多恶性肿瘤的发生和发展中发挥着重要的作用, 这表明 SHP2 或许可以作为治疗恶性肿瘤的一个有效治疗靶点<sup>[7-9]</sup>。目前对于 CRC 的治疗主要以手术、化疗、生物靶向治疗等手段为主。因此探索相关生物标志物, 进行早期诊断, 合理评估预后, 及时干预这对 CRC 的临床治疗非常重要。根据目前已有的研究表明, SHP2 对于 CRC 细胞的增殖、分化和转移的机制还尚未明确, 因此阐明 SHP2 在 CRC 中的作用机制, 或许可以为 CRC 的治疗提供新的思路。因此本文将主要从 SHP2 在

CRC 以及 CAC 中的影响机制进行综述。

## 1 SHP2 蛋白的基本结构与功能

SHP2 是蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatase, PTP) 家族的一员<sup>[10]</sup>。由 *PTPN11* 基因编码, 该蛋白的分子量为 72 kDa<sup>[2]</sup>。其含有两个 N 端 Src 同源 2 构域 (Src homology 2 domain, SH2) 其分别称为 N-SH2 和 C-SH2, 而 C 端包含两个酪氨酸磷酸化位点, 且具有一段富含脯氨酸区段, 以及 1 个功能性的酪氨酸磷酸酶催化域。当 SHP2 蛋白处于非活性状态时, 其受到 PTP 结构域和 N-SH2 结构域的作用, 通过自催化机制使表面特定残基发生改变, 从而实现了对自身活性的抑制, 防止底物进入其活性位点。在生长因子或细胞因子的作用下, SHP2 通过 SH2 区域与磷酸酪氨酸结合, 引发构象改变, 进而揭露其催化部位, 实现了 SHP2 的精准激活过程<sup>[11]</sup>。SHP2, 作为一种磷酸酶, 与蛋白酪氨酸激酶 (protein tyrosine kinase, PTK) 紧密协作, 调控酪氨酸蛋白的磷酸化状态, 保持动态平衡。酪氨酸磷酸化失衡已被广泛证实与多种病症相关, 包括癌症、炎症和糖尿病等<sup>[12-14]</sup>。作为一种高度保守的酶, SHP2 广泛存在于从单细胞原生生物到哺乳动物的各种生物体内。因此, 探索 SHP2 所发挥的生理功能对各种实体瘤的诊治至关重要。

在 2007 年, *PTPN11* (SHP2 编码基因) 被认为是第一个编码酪氨酸磷酸酶的原癌基因<sup>[15]</sup>。同时它的激活突变也在发育障碍 Noonan 综合征 (Noonan syndrome, NS) 和儿童白血病中被描述<sup>[16]</sup>。越来越多的研究已经能够得出结论, SHP2 在几乎所有的恶性肿瘤中发挥重要作用。它们基于肿瘤组织的特异性和多种信号通路的调控来影响不同实体瘤的发生和发展, 如 Janus 激酶/信号转导与转录激活因子 (Janus tyrosine kinase/signal transducer and activator of tranion, JAK/STAT) 通路、鼠肉瘤病毒/丝裂原活蛋白激酶 (rat sarcoma virus/mitogen activated protein kinase, RAS/MARK) 通路、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein

kinase B, PI3K/AKT) 通路、程序性死亡受体 1/程序性死亡配体 1 (programmed death 1/programmed death ligand 1, PD-1/PDL-1) 通路、Wnt/ $\beta$ -连环蛋白 (Wnt/ $\beta$ -catenin) 通路、核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B) 通路等<sup>[7,9,14,17-18]</sup>。近年来,大量的研究表明,SH2 既可能发挥促肿瘤作用,也可能发挥抑制肿瘤发生发展作用,甚至可能在同一种癌症中发挥双重作用。因此,SH2 有望成为多种癌症治疗的潜在靶点,这也促使我们要尽快阐明 SH2 的多功能和复杂的调节机制以更好地理解其在肿瘤发生发展中的确切功能。

## 2 SH2 在炎症性肠炎中的影响

IBD 是一种以腹痛、腹泻或消化不良为症状的慢性肠道炎症为特征的疾病。IBD 的发生是由多种因素共同决定的,包括遗传易感性、环境和饮食因素以及肠道微生物群<sup>[13]</sup>。在 UC 和 CD 等 IBD 患者中,发展为 CRC 的风险要高得多。尤其是 UC 的存在是增加 CRC 风险的一个主要因素<sup>[3]</sup>。目前关于 SH2 对肠道炎症的影响已经有了初步的研究,因此关注于 SH2 对肠道炎症的影响或许可为预防和治疗结肠癌提供新的思路。

### 2.1 维持肠上皮细胞稳态

肠道上皮细胞 (intestinal epithelial cells, IECs) 包括肠吸收细胞、杯状细胞、潘氏细胞和内分泌细胞,其中潘氏细胞专门分泌如溶菌酶和防御素等物质,这些物质直接对肠道微生物进行消灭,以保持肠道微生态平衡;杯状细胞则负责合成并分泌黏液蛋白,形成保护层,保护肠上皮细胞免受侵害,这是其黏膜屏障功能的体现<sup>[19]</sup>。COULOMBE 等<sup>[20]</sup>的研究揭示,小鼠肠上皮细胞中 SH2 基因的缺失会导致中间细胞,即杯状细胞和潘氏细胞谱系的共同祖先细胞显著减少,直接推动了结肠炎症的加速进程,并随着年龄的增长发生结肠炎相关腺癌的风险也会随之增大。该研究揭示了 SH2 在结肠上皮细胞中的细胞作用,其可能通过激活促进杯状细胞扩增的 B-RAF 激酶/丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号激酶调节 (B-RAF kinase/mitogen activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase, BRAF/MEK/ERK) 信号传导通路,维持适当结肠黏膜屏障功能来抑制炎症的发展,从而在结肠中发挥肿瘤抑

制的作用<sup>[20-21]</sup>。

在 IECs 中 SH2 条件性缺失的小鼠随着年龄增长而发生结肠炎相关腺癌中,促炎转录因子占据了中心地位,可能与结肠黏膜中 Wnt/ $\beta$ -catenin、NF- $\kappa$ B 和信号转导及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号的持续激活有关。其中 STAT3 可能是特别相关的,因为它可以被 IECs 中的 SH2 灭活,并且它是肠中黏膜伤口愈合的重要调节剂<sup>[22-23]</sup>。所以,SH2 可以调节结肠上皮细胞稳态的多个方面,包括增殖、分化、屏障功能和伤口闭合,以优化肠上皮细胞的功能<sup>[24]</sup>。

### 2.2 防止肠道炎症的发生

SH2 在 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞中有两个主要磷酸酶靶点分别是信号转导和转录激活因子 1 (signal transducer and activator of transcription 1, STAT1) 和 STAT3,其中 STAT1 触发干扰素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 分泌,STAT3 导致白细胞介素-17a (interleukin-17a, IL-17a) 产生<sup>[25]</sup>。LIU 等<sup>[26]</sup>在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中敲除 SH2,发现 SH2 的缺失导致对 STAT1 和 STAT3 的去磷酸化抑制作用减弱,从而引起 IFN- $\gamma$  和 IL-17a 等促炎细胞因子水平升高加重结肠炎。另外,该研究还发现除了这些炎症介质外,CD4<sup>+</sup>T 细胞中 SH2 的缺乏也会导致 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 表达的缺失,这是上皮恶化的征兆表现。巨噬细胞是表达白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 受体水平最高的细胞之一,而 IL-10 是肠内主要的抗炎细胞因子,其治疗 IBD 的疗效已得到临床验证。XIAO 等<sup>[13]</sup>发现炎症性肠病患者的结肠巨噬细胞和血液单核细胞中 SH2 的表达增加。从机制上讲,SH2 会破坏人和小鼠巨噬细胞中的 IL-10-STAT3 (STAT3 是 IL-10 受体下游的中枢转录因子) 信号转导及其依赖性抗炎反应。证明了巨噬细胞中的 SH2 显著影响了 IL-10 诱导的 STAT3 磷酸化水平,从而保护小鼠免受结肠炎和结肠炎驱动的结肠癌。

因此,基于以上的结果表明,通过控制肠道炎症可以有效地防止结肠癌的发生。CRC 的发生和发展深受肠道炎症微环境的直接影响,其中炎症细胞和炎症因子扮演着关键角色,它们对癌变进程起到显著促进作用 (见图 1)。此外,SH2 对炎症有着重要的调节作用,且长期慢性肠道炎

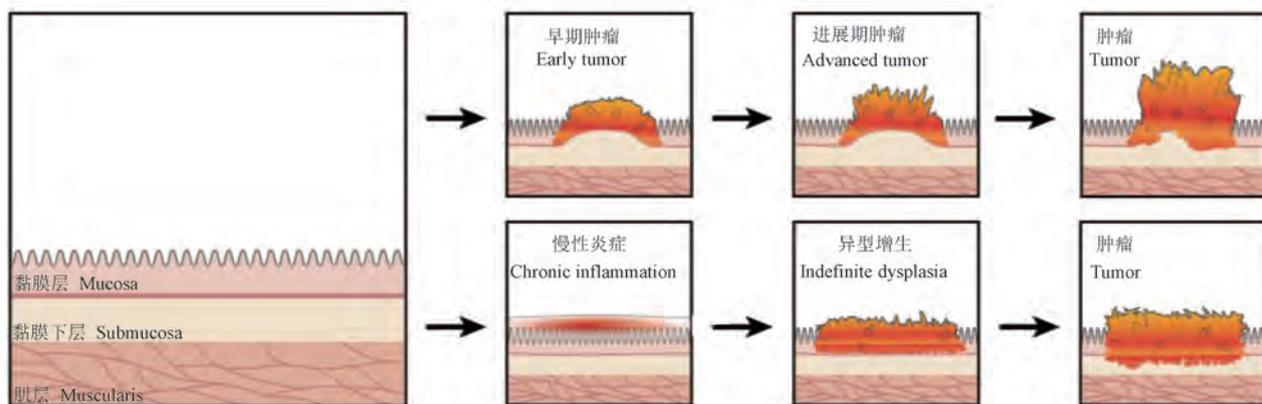


图 1 原发性直肠癌与结肠炎相关性结肠癌发展示意图

Figure 1 Primary CRC and CAC development diagram

症的存在是结肠癌的主要危险因素,所以,作用于炎症靶点或许是预防和治疗结肠癌的潜在治疗策略。

### 3 SHP2 在结直肠癌中的影响

众所周知,肿瘤的炎症微环境对肿瘤的治疗和预后有着较大的影响,因此,把肠道炎症与肠道肿瘤相结合,或许可以为 CRC 提供新的潜在治疗措施。因此深入探索 SHP2 调控 CRC 的作用机制,是决定其作为治疗靶点的关键。

#### 3.1 SHP2 在肿瘤侵袭和迁移方面的影响

近年来,研究关注 SHP2 在 CRC 中的影响已经成为热点之一。由于 SHP2 在 RAS/RAF/MEK/ERK 通路激活中也起到关键作用,因此研究 SHP2 是否参与了致癌性 Kirsten 鼠肉瘤病毒同源物(Kirsten rat sarcoma viral homolog, KRAS)信号转导的肠上皮转化是有必要的。已有研究结果表明 SHP2 沉默抑制了致癌 KRAS 通路,也抑制了 CRC 细胞中 IECs 的增殖、侵袭和肿瘤特性<sup>[27]</sup>。STAT3 是 STAT 蛋白家族重要的一员,包括 CRC 在内的多种肿瘤都与其相关,并在肿瘤的增殖、生存、转移和血管生成中发挥了重要的作用<sup>[9,13]</sup>。在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中,SH2 抑制 JAK2/STAT3 通路的激活,通过诱导细胞衰老而抑制 HCC<sup>[28]</sup>。同样的,与 HCC 相似,在 CRC 中,STAT3 磷酸化受 SHP2 的负向调控,表明 SHP2 能抑制 CRC 细胞的生长和侵袭<sup>[29]</sup>。在 CRC 的各类细胞系中,HCT-116 细胞是研究最广泛的癌细胞系之一。CHEN 等<sup>[30]</sup>

表明 SHP2 活性的丧失会促进 HCT-116 大肠癌细胞的生长。在 WU 等<sup>[14]</sup>的研究中发现条件性敲除 SHP2 基因并去除 SHP2 的去磷酸化活性,可激活血管生成素/酪氨酸激酶受体 2-PI3K/AKT/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(angiotensin/tyrosine kinase receptor-PI3K/AKT/mammalian target of rapamycin, Ang/Tie2-PI3K/AKT/mTOR)通路,从而增强肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中肿瘤微血管生成,促进 CRC 的肝转移。

此外,外泌体是来自细胞的细胞外囊泡,直径 30~200 nm,可以调节转移、血管生成和耐药性<sup>[31]</sup>。在 LI 等<sup>[32]</sup>的研究中发现使用一种选择性 SHP2 抑制剂,苯胍基吡唑啉酮磺酸盐 1(phenylhydrazonopyrazolonesulfonate1, PHPS1)诱导 SHP2 低表达后,低表达的 SHP2 可能会通过 PI3K/Akt 通路调节肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)的 M2 极化并促进肿瘤源性外泌体的释放,当加入 LY294002(一种广谱 PI3K/AKT 抑制剂)后外泌体的释放被抑制。该研究表明 SHP2 低表达也可以通过 PI3K/AKT 通路促进 M2 型巨噬细胞外泌体的释放,从而增强 CRC 细胞的迁移和侵袭能力。

#### 3.2 SHP2 在肿瘤血管生成方面的影响

肿瘤的生长在很大程度上依赖于血管的生长,形成新生血管,从而为肿瘤细胞的新陈代谢提供原料<sup>[33]</sup>。SHP2,一种由 PTPN11 基因编码的蛋白酪氨酸磷酸酶,在血管细胞中普遍存在。SHP2,作为细胞信号转导的关键因子,在各种肿瘤中异常表达的现象已得到广泛证实,它与肿瘤

发生发展有着密切的关系<sup>[33]</sup>。

众所周知血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是新生血管和血管通透性的主要诱导因子,因此靶向 VEGF 抑制剂已成为了一个有希望的治疗癌症的方法<sup>[34]</sup>。根据以前的报道,SH2P2 可以与血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 直接作用,因此它也成为 VEGF-VEGFR2 信号途径的一个重要调节因子<sup>[35-36]</sup>。先前已有研究表明,小鼠内皮细胞中促血管生成转录因子 7 (SRY-box transcription factor 7, SOX7) 的表达缺失会诱发血管发育缺陷,最终导致胚胎死亡<sup>[37]</sup>。在 XU 等<sup>[33]</sup>的研究中得以证明 SOX7 在缺氧诱导的血管生成中起着调节作用,并证实 SH2P2 可调节凋亡信号调节激酶 1-c-Jun 氨基端激酶 (apoptosis signal-regulating kinase 1-c-Jun N-terminal kinase, ASK1-c-Jun) 信号传导,而 ASK1-c-Jun 信号传导调控 SOX7 的表达和病理性血管生成,进而影响肿瘤血管生成和血管异常的形成。缝隙连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43) 已被反复证实参与血管生成,MANSELL 等<sup>[38]</sup>则证明 Cx43 与 SH2P2 相互作用促进内皮细胞迁移,这使得 SH2P2 再次被证明是血管生成过程中的重要调节因子。

SH2P2 参与多种细胞的增殖、分化,以及在癌症中的血管信号传导和血管生成中发挥重要作用。同时 TME 中微血管的生成也为肿瘤发生远处转移提供了丰富的营养支持。由于 SH2P2 作为诱导肿瘤血管生成的关键因子,因此它有望成为抗肿瘤血管治疗成功的新的治疗靶点。

### 3.3 SH2P2 在肿瘤免疫微环境方面的影响

肠道,作为人体最大的外周免疫系统中心,包含着大量的免疫细胞,包括巨噬细胞、T 细胞、树突状细胞及固有淋巴细胞等,发挥着关键的免疫功能<sup>[39]</sup>。肿瘤进展不仅源于肿瘤细胞的遗传学和表观遗传的变化,更是与 TME 动态交互影响的产物。TME 主要由癌细胞、癌相关成纤维细胞、免疫细胞 (包括活跃的巨噬细胞和 T 淋巴细胞) 以及非细胞成分共同构成。其中,免疫细胞的作用尤其显著,特别是它们的积极作用备受关注<sup>[40]</sup>。

随着深入研究发现,TAMs 是肿瘤免疫抑制

微环境的重要组成部分,也是浸润 TME 的主要基质细胞。在 TME 中,巨噬细胞展现出动态的分化能力,具体可分为两种截然不同的功能类别:一是 M1 型 (经典激活) 的巨噬细胞,二是 M2 型 (交替激活) 的巨噬细胞,这两种表型对肿瘤的发展具有显著影响。M1 型 TAMs 被认定为具备抗癌作用的抑制因子,相反,M2 型 TAMs 普遍被视为有利于肿瘤生长的促进因子<sup>[41]</sup>。因此,目前癌症治疗的一大关键焦点在于调控 TAMs 的极化,倾向于抑制其 M2 类型的发展,同时推动其转向更具抗癌性的 M1 类型。WANG 等<sup>[42]</sup>研究发现,通过 SH2P2 的激活可以促进 TAMs 向 M1 表型极化。LI 等<sup>[32]</sup>研究发现 TAMs 中 SH2P2 缺失会进一步刺激 M2 型巨噬细胞通过 PI3K/AKT 产生 P-PI3K、P-AKT、IL-10、精氨酸酶-1 (arginase-1),从而进一步加重巨噬细胞 M2 极化,最终导致小鼠 CRC 肿瘤的侵袭和转移。值得注意的是,当加入 LY294002 时,上述被刺激的蛋白表达显著降低,进一步证实了 SH2P2 的低表达可能通过 PI3K/AKT 通路促进 TAMs 向 M2 表型极化。因此,在 TAMs 中 SH2P2 低表达的 CRC 患者的预后情况较 TAMs 中 SH2P2 高表达的 CRC 患者要差,且 TAMs 中 SH2P2 的表达量与 CRC 肝转移呈负相关<sup>[42]</sup>。

肿瘤微环境中的 T 淋巴细胞因其突出的作用也受到广泛的关注。在免疫系统中,CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞根据其独特功能被细分为四个关键亚群:Th1 细胞、Th2 细胞、Th17 细胞以及 Treg,它们各自在免疫应答中扮演着至关重要的角色。在肿瘤的发生和发展过程中,4 种亚群各司其职:TH1 细胞尤为关键,它通过释放 IFN- $\gamma$  并增强细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 的功能,从而有效遏制肿瘤的生长<sup>[43]</sup>。在 LIU 等<sup>[26]</sup>的一项 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞敲除 SH2P2 的研究中发现 STAT1 被过度激活,导致 Th1 分化和 IFN- $\gamma$  产生增加,并且 IFN- $\gamma$  的增加可以激活 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTLs),从而进一步抑制 CRC 的发生。

此外,SH2P2 也参与调控 T 细胞中免疫检查点通路,如程序性死亡受体-1 (programmed death-1, PD-1) 轴和 CD47/信号调节蛋白  $\alpha$  (CD47/signal regulatory protein  $\alpha$ , CD47SIRP $\alpha$ ) 轴<sup>[44]</sup>。总之,SH2P2 在肿瘤微环境中通过结合不同的信号

通路发挥着重要的作用,这为克服 CRC 的免疫抑制微环境提供了新的思路。

### 3.4 SHP2 介导的肿瘤耐药性

综上所述,SH2P2 广泛表达并主要通过激活 RAS-ERK 和 PI3K-AKT 信号通路调节细胞存活和增殖<sup>[32,45]</sup>。另外,SH2P2 在 PD-1 途径中扮演了核心角色,它对于 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的免疫抑制效应调节至关重要<sup>[18,46]</sup>。研究表明,SH2P2 过表达或异常激活介导了多种癌症的耐药性,包括转移性乳腺癌细胞、非小细胞肺癌和 CRC<sup>[45,47]</sup>。SH2P2 可以通过上调多个受体酪氨酸蛋白激酶 (receptor tyrosine kinase, RTKs) 下游的 AKT 和 ERK 通路,降低癌细胞对临床使用的抗癌药物的敏感性<sup>[17,48]</sup>。先前已有研究证明 SH2P2 蛋白序列中第 62 位的酪氨酸残基 (tyrosine-62, Tyr-62) 是 SH2P2 的 N-SH2 结构域的一部分,该结构域是多种疾病中已知的突变热点,包括 NS 和幼年型粒-单核细胞白血病 (juvenile myelomonocytic leukemia, JMML)。该区域的突变通常通过稳定 SH2P2 的开放构象而导致组成性活性 SH2P2 突变体,从而拮抗 SH2P099 (一种高效选择性的 SH2P2 抑制剂) 和其他通过维持自抑构象而起作用的变构抑制剂对 SH2P2 的抑制,这证明了 Tyr-62 是 SH2P099 抑制 SH2P2 活性的无效原因<sup>[49-50]</sup>。

KRAS 和神经母细胞瘤 RAS 病毒同源物 (neuroblastoma RAS viral oncogene homolog, NRAS) 突变发生在约 45% 的 CRC 中,且致癌性 RAS 可以诱导细胞增殖,增加运动能力,减少接触抑制,改变代谢,并降低基因组完整性<sup>[48]</sup>。先前有研究报道,联合使用 MEK 抑制剂 (曲米替尼) 和 CDK4/6 抑制剂 (帕博西利布) 在抑制 KRAS 介导的 CRC 生长方面产生了显著的协同效应<sup>[48,51]</sup>。SH2P2 抑制最近已被证明可以防止对 MAPK 途径抑制剂的适应性耐药性,这可能是由通过受体酪氨酸激酶的多因素信号传导和 MAPK 途径控制下的抑制性磷酸酶的减少介导的<sup>[52-53]</sup>。同时还有其他研究发现,在机制上 *PTPN11* 的抑制阻断了 RTKs 向 RAS-MEK-ERK 通路的信号传递<sup>[46]</sup>。因此,SH2P2 是一个很有希望的靶点,尤其是在 RAS 突变型癌症的联合治疗中,可以对抗几种靶向癌症药物的内在耐药性和获得性耐

药性<sup>[17]</sup>。

在 CRC 中,PI3K/AKT 通路的激活水平高于其他癌症,表明 PI3K/AKT 通路在癌症中的关键作用<sup>[17,54]</sup>。在 LI 等<sup>[17]</sup>的一项实验中,通过靶向 AKT 后,观察到通过敲除 AKT,SH2P099 会显著降低 CRC 细胞的增殖和集落形成。同样这也证明了先前的一个结论,AKT 信号转导通路的抑制可使 SH2P099 的作用变得敏感,且 AKT 通路的激活通常与耐药性相关<sup>[55-56]</sup>。此外他们还评估了 SH2P099 和 MK-2206 (一种特异性 AKT 抑制剂) 对 CRC 的联合作用,表明 SH2P099 和 MK-2206 之间存在协同作用,显示出有一个有希望的治疗策略<sup>[17]</sup>。CHEN 等<sup>[57]</sup> 和 SUN 等<sup>[58]</sup> 也证明了 SH2P099 在与 PI3K 抑制剂 (如 Pictilisib) 联合应用时显示出协同潜能。所以表明了 SH2P2 抑制后 AKT 通路的快速反馈再激活,可能是 CRC 抵抗 SH2P2 抑制的关键机制<sup>[17]</sup>,这些研究表明了 SH2P2 和 AKT 信号转导通路之间存在复杂的相互作用。

SH2P2 是一个潜在的肿瘤治疗靶点,特别是对许多依赖它生存的 RTKs 驱动的肿瘤。因此,将 RTKs 与 RAS-RAF-MEK-ERK 和 RAS-PI3K-Akt-mTOR 通路联系起来的 SH2P2 抑制对 RAS 突变或 Braf 突变的癌细胞株是有效的<sup>[17]</sup>。SH2P2 抑制剂与 PD-1 抑制剂联合使用也产生了协同效应,并克服了对 PD-1 抑制剂的耐药性。因此,靶向 SH2P2 磷酸酶对于预防化疗和免疫治疗的内在和获得性耐药性以及消除其致癌功能,最终改善患者预后至关重要。

## 4 讨论与展望

结直肠癌的发病率和病死率在所有实体瘤中始终占据显著高位,严重威胁着人类的生命健康,堪称常见恶性肿瘤中的主要杀手。在当前快速发展的科研背景下,特别是在结直肠癌及结肠炎相关性结肠癌中,SH2P2 的潜在功能逐渐被人们所发现,引发了广泛且深入的研究兴趣。SH2P2 在保持肠上皮细胞生态平衡、精细调控炎症反应中扮演着至关重要的角色,特别是在结直肠癌的发展和进程中展现出显著的影响作用。当前的科研研究表明,SH2P2 分子在癌症治疗领域展现出了广阔的潜力和前景。基于以上的分析,SH2P2 在不同类型的肿瘤中既可以发挥促进肿瘤的作

用,又可以发挥抑制肿瘤的作用,甚至可以在一个肿瘤中同时发挥促进和抑制的双重作用。对于 SHP2 功能的多样性,还需要进一步的实验来探索。SHP2 参与了多种肿瘤的调控,但似乎扮演着矛盾的角色。上述有趣的现象可能归因于肿瘤的异质性,即不同肿瘤细胞、肿瘤细胞和肿瘤循环细胞之间的相互作用影响患者的预后。众所周知,在临床上应用抑制剂治疗肿瘤必须使其具有较高的特异性,因此对于开发针对结直肠癌的 SHP2 抑制剂仍然是有希望且具有挑战性的。目前,尽管已有文献探讨了 SHP2 抑制剂在临床研究中的潜力,但大多仍处于初级阶段。因此,深入探究 SHP2 在结直肠癌中的具体作用机制至关重要。一旦揭示其奥秘,SHP2 抑制剂有可能从理论走向实际,发展为一种具有前景的临床治疗药物,并广泛应用于多种人类肿瘤的治疗中。

#### 参考文献:

- [ 1 ] YING J, ZHOU H Y, LIU P, et al. Aspirin inhibited the metastasis of colon cancer cells by inhibiting the expression of toll-like receptor 4 [J]. *Cell Biosci*, 2018, 8: 1.
- [ 2 ] YUAN H, ZHAO J, YANG Y, et al. SHP-2 interacts with CD81 and regulates the malignant evolution of colorectal cancer by inhibiting epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 13273–13284.
- [ 3 ] SHAH S C, ITZKOWITZ S H. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: mechanisms and management [J]. *Gastroenterology*, 2022, 162(3): 715–730.
- [ 4 ] RAJAMÄKI K, TAIRA A, KATAINEN R, et al. Genetic and epigenetic characteristics of inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer [J]. *Gastroenterology*, 2021, 161(2): 592–607.
- [ 5 ] GENÉ M, CUATRECASAS M, AMAT I, et al. Alterations in p53, microsatellite stability and lack of MUC5AC expression as molecular features of colorectal carcinoma associated with inflammatory bowel disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(10): 8655.
- [ 6 ] QUAGLIO A E V, GRILLO T G, DE OLIVEIRA E C S, et al. Gut microbiota, inflammatory bowel disease and colorectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2022, 28(30): 4053–4060.
- [ 7 ] MARTIN E, AGAZIE Y M. SHP2 potentiates the oncogenic activity of  $\beta$ -catenin to promote triple-negative breast cancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2021, 19(11): 1946–1956.
- [ 8 ] MAINARDI S, MULERO-SÁNCHEZ A, PRAHALLAD A, et al. SHP2 is required for growth of KRAS-mutant non-small-cell lung cancer *in vivo* [J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 961–967.
- [ 9 ] LEE Y J, SONG H, YOON Y J, et al. Ethacrynic acid inhibits STAT3 activity through the modulation of SHP2 and PTP1B tyrosine phosphatases in DU145 prostate carcinoma cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 175: 113920.
- [ 10 ] WANG Q, ZHAO W C, FU X Q, et al. Exploring the distinct binding and activation mechanisms for different CagA oncoproteins and SHP2 by molecular dynamics simulations [J]. *Molecules*, 2021, 26(4): 837.
- [ 11 ] SONG Y, ZHAO M, ZHANG H, et al. Double-edged roles of protein tyrosine phosphatase SHP2 in cancer and its inhibitors in clinical trials [J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 230: 107966.
- [ 12 ] PACCOUD R, SAINT-LAURENT C, PICCOLO E, et al. SHP2 drives inflammation-triggered insulin resistance by reshaping tissue macrophage populations [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(591): eabe2587.
- [ 13 ] XIAO P, ZHANG H, ZHANG Y, et al. Phosphatase SHP2 exacerbates intestinal inflammation by disrupting macrophage responsiveness to interleukin-10 [J]. *J Exp Med*, 2019, 216(2): 337–349.
- [ 14 ] WU X, GUAN S, LU Y, et al. Macrophage-derived SHP-2 inhibits the metastasis of colorectal cancer via Tie2-PI3K signals [J]. *Oncol Res*, 2023, 31(2): 125–139.
- [ 15 ] CHAN R J, FENG G S. PTPN11 is the first identified proto-oncogene that encodes a tyrosine phosphatase [J]. *Blood*, 2007, 109(3): 862–867.
- [ 16 ] KANUMURI R, KUMAR PASUPULETI S, BURNS S S, et al. Targeting SHP2 phosphatase in hematological malignancies [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2022, 26(4): 319–332.
- [ 17 ] LI Y, YUAN Y, ZHANG F, et al. Therapeutic suppression of FAK-AKT signaling overcomes resistance to SHP2 inhibition in colorectal carcinoma [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 739501.
- [ 18 ] ZHAO M, GUO W, WU Y, et al. SHP2 inhibition triggers anti-tumor immunity and synergizes with PD-1 blockade [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(2): 304–315.
- [ 19 ] ZHOU B, YUAN Y, ZHANG S, et al. Intestinal flora and disease mutually shape the regional immune system in the intestinal tract [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 575.
- [ 20 ] COULOMBE G, LANGLOIS A, DE PALMA G, et al. SHP-2 phosphatase prevents colonic inflammation by controlling secretory cell differentiation and maintaining host-microbiota homeostasis [J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(11): 2529–2540.
- [ 21 ] COULOMBE G, LEBLANC C, CAGNOL S, et al.

- Epithelial tyrosine phosphatase SHP-2 protects against intestinal inflammation in mice [J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(11): 2275–2284.
- [22] XU D, QU C K. Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway [J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 4925–4932.
- [23] ZHANG W, CHAN R J, CHEN H, et al. Negative regulation of Stat3 by activating PTPN11 mutants contributes to the pathogenesis of Noonan syndrome and juvenile myelomonocytic leukemia [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(33): 22353–22363.
- [24] GAGNÉ-SANSFACON J, LANGLOIS A, LANGLOIS M J, et al. The tyrosine phosphatase SHP-2 confers resistance to colonic inflammation by driving goblet cell function and crypt regeneration [J]. *J Pathol*, 2019, 247(1): 135–146.
- [25] CHANG C J, LIN C F, LEE C H, et al. Overcoming interferon (IFN)- $\gamma$  resistance ameliorates transforming growth factor (TGF)- $\beta$ -mediated lung fibroblast-to-myofibroblast transition and bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 183: 114356.
- [26] LIU W, GUO W, SHEN L, et al. T lymphocyte SHP2-deficiency triggers anti-tumor immunity to inhibit colitis-associated cancer in mice [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(5): 7586–7597.
- [27] KERR D L, HADERK F, BIVONA T G. Allosteric SHP2 inhibitors in cancer: Targeting the intersection of RAS, resistance, and the immune microenvironment [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2021, 62: 1–12.
- [28] ZHANG L, YANG Z, MA A, et al. Growth arrest and DNA damage 45G down-regulation contributes to Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 activation and cellular senescence evasion in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2014, 59(1): 178–189.
- [29] HUANG Y, WANG J, CAO F, et al. SHP2 associates with nuclear localization of STAT3: significance in progression and prognosis of colorectal cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17597.
- [30] CHEN X, FU X, ZHAO W, et al. Loss of tyrosine phosphatase SHP2 activity promotes growth of colorectal carcinoma HCT-116 cells [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 83.
- [31] PEGTEL D M, GOULD S J. Exosomes [J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 487–514.
- [32] LI Z, XI J, LI B, et al. SHP-2-induced M2 polarization of tumor associated macrophages via IL-4 regulate colorectal cancer progression [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1027575.
- [33] XU Z, GUO C, YE Q, et al. Endothelial deletion of SHP2 suppresses tumor angiogenesis and promotes vascular normalization [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6310.
- [34] PATEL S A, NILSSON M B, LE X, et al. Molecular mechanisms and future implications of VEGF/VEGFR in cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2023, 29(1): 30–39.
- [35] KROLL J, WALTENBERGER J. The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(51): 32521–32527.
- [36] MANNELL H, KROTZ F. SHP-2 regulates growth factor dependent vascular signalling and function [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2014, 14(6): 471–483.
- [37] KIM K, KIM I K, YANG J M, et al. SoxF transcription factors are positive feedback regulators of VEGF signaling [J]. *Circ Res*, 2016, 119(7): 839–852.
- [38] MANNELL H, KAMERITSCH P, BECK H, et al. Cx43 promotes endothelial cell migration and angiogenesis via the tyrosine phosphatase SHP-2 [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 294.
- [39] HOU Q, HUANG J, AYANSOLA H, et al. Intestinal stem cells and immune cell relationships: potential therapeutic targets for inflammatory bowel diseases [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 623691.
- [40] ZHAO S, MI Y, GUAN B, et al. Tumor-derived exosomal miR-934 induces macrophage M2 polarization to promote liver metastasis of colorectal cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 156.
- [41] CAI J, HUANG L, TANG H, et al. Macrophage migration inhibitory factor of *Thelazia callipaeda* induces M2-like macrophage polarization through TLR4-mediated activation of the PI3K-Akt pathway [J]. *FASEB J*, 2021, 35(9): e21866.
- [42] WANG S, YAO Y, LI H, et al. Tumor-associated macrophages (TAMs) depend on Shp2 for their anti-tumor roles in colorectal cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(9): 1957–1969.
- [43] PAL R, RAKSHIT S, SHANMUGAM G, et al. Involvement of Xeroderma Pigmentosum Complementation Group G (XPG) in epigenetic regulation of T-Helper (TH) cell differentiation during breast cancer [J]. *Immunobiology*, 2022, 227(5): 152259.
- [44] LI Y, ZHOU H, LIU P, et al. SHP2 deneddylation mediates tumor immunosuppression in colon cancer via the CD47/SIRP $\alpha$  axis [J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(4): e162870.
- [45] TANG C, LUO H, LUO D, et al. Src homology phosphotyrosyl phosphatase 2 mediates cisplatin-related drug resistance by inhibiting apoptosis and activating the Ras/PI3K/Akt1/survivin pathway in lung cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(2): 611–618.
- [46] PRAHALLAD A, HEYNEN G J, GERMANO G, et al.

- PTPN11 is a central node in intrinsic and acquired resistance to targeted cancer drugs [J]. *Cell Rep*, 2015, 12(12): 1978–1985.
- [47] CHEN H, LIBRING S, RUDDRARAJU K V, et al. SHP2 is a multifunctional therapeutic target in drug resistant metastatic breast cancer [J]. *Oncogene*, 2020, 39(49): 7166–7180.
- [48] SOROKIN A V, KANIKARLA MARIE P, BITNER L, et al. Targeting RAS mutant colorectal cancer with dual inhibition of MEK and CDK4/6 [J]. *Cancer Res*, 2022, 82(18): 3335–3344.
- [49] LAROCHELLE J R, FODOR M, VEMULAPALLI V, et al. Structural reorganization of SHP2 by oncogenic mutations and implications for oncoprotein resistance to allosteric inhibition [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4508.
- [50] PFEIFFER A, FRANCIOSA G, LOCARD-PAULET M, et al. Phosphorylation of SHP2 at Tyr62 enables acquired resistance to SHP2 allosteric inhibitors in FLT3-ITD-driven AML [J]. *Cancer Res*, 2022, 82(11): 2141–2155.
- [51] ZIEMKE E K, DOSCH J S, MAUST J D, et al. Sensitivity of KRAS-mutant colorectal cancers to combination therapy that cotargets MEK and CDK4/6 [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(2): 405–414.
- [52] FEDELE C, RAN H, DISKIN B, et al. SHP2 inhibition prevents adaptive resistance to MEK inhibitors in multiple cancer models [J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(10): 1237–1249.
- [53] SUN Y, MEYERS B A, CZAKO B, et al. Allosteric SHP2 inhibitor, IACS-13909, overcomes EGFR-dependent and EGFR-independent resistance mechanisms toward osimertinib [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(21): 4840–4853.
- [54] EBI H, CORCORAN R B, SINGH A, et al. Receptor tyrosine kinases exert dominant control over PI3K signaling in human KRAS mutant colorectal cancers [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(11): 4311–4321.
- [55] VITIELLO P P, CARDONE C, MARTINI G, et al. Receptor tyrosine kinase-dependent PI3K activation is an escape mechanism to vertical suppression of the EGFR/RAS/MAPK pathway in KRAS-mutated human colorectal cancer cell lines [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 41.
- [56] DATTA J, DAMODARAN S, PARKS H, et al. Akt activation mediates acquired resistance to fibroblast growth factor receptor inhibitor BGJ398 [J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16(4): 614–624.
- [57] CHEN Y N, LAMARCHE M J, CHAN H M, et al. Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases [J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 148–152.
- [58] SUN B, JENSEN N R, CHUNG D, et al. Synergistic effects of SHP2 and PI3K pathway inhibitors in GAB2-overexpressing ovarian cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(1): 145–159.

[收稿日期]2024-06-01

孙豪杰,刘宪勤,王锁刚.巨噬细胞极化在肾缺血再灌注损伤中的研究进展[J].中国比较医学杂志,2025,35(1):172-180.

Sun HJ, Liu XQ, Wang SG. Research developments in macrophage polarization in renal ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 172-180.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.018

# 巨噬细胞极化在肾缺血再灌注损伤中的研究进展

孙豪杰<sup>1,2</sup>,刘宪勤<sup>1,2</sup>,王锁刚<sup>1\*</sup>

(1.河南中医药大学第一附属医院泌尿外科,郑州 450003;2.河南中医药大学第一临床医学院,郑州 450003)

**【摘要】** 巨噬细胞是先天免疫中重要的免疫细胞,具有显著的异质性和极化性。在微环境中各种因子的刺激下可极化为各种表型(主要是M1和M2),从而发挥不同的作用和功能,在肾缺血再灌注损伤(renal ischemia-reperfusion injury, RIRI)的病理生理机制中发挥重要作用。过度的免疫反应必然会导致组织损伤,M1型巨噬细胞是促炎细胞,参与病原体的清除;而M2型巨噬细胞具有抗炎作用,参与RIRI后肾组织修复和重塑。巨噬细胞表型之间的平衡对于RIRI的结局和治疗十分重要。故本文从巨噬细胞极化角度切入,对巨噬细胞在RIRI中的病理生理机制和最新的治疗方案进行阐述,旨在为进一步研究巨噬细胞极化在RIRI中的作用提供参考,为通过调节巨噬细胞极化来改善RIRI的治疗策略提供思路。

**【关键词】** 肾缺血再灌注损伤;炎症反应;巨噬细胞;干预手段

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0172-09

## Research developments in macrophage polarization in renal ischemia-reperfusion injury

SUN Haojie<sup>1,2</sup>, LIU Xianqin<sup>1,2</sup>, WANG Suogang<sup>1\*</sup>

(1. Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China.

2. the First Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003)

**【Abstract】** Macrophages are important immune cells involved in innate immunity, with significant heterogeneity and polarization. Macrophages can polarize into different phenotypes (mainly M1 and M2) under stimulation by various factors in the microenvironment, leading to different roles and functions. Macrophages play an important role in the pathophysiological mechanism of renal ischemia-reperfusion injury (RIRI). An excessive immune response will inevitably lead to tissue damage. M1 macrophages are pro-inflammatory cells involved in the clearance of pathogens, while M2-type macrophages have anti-inflammatory effects and participate in the repair and remodeling of renal tissue after RIRI. The balance between these macrophage phenotypes is thus an important factor affecting the outcome and treatment of RIRI. This review considers the pathophysiologic mechanism of macrophages in

**【基金项目】**河南省中医药科学研究专项课题(20-21ZY2188)。

**【作者简介】**孙豪杰(1999—),男,在读硕士研究生,研究方向:泌尿外科疾病基础与临床。E-mail:hjiesun@163.com

**【通信作者】**王锁刚(1981—),男,博士,副主任医师,副教授,硕士生导师,研究方向:泌尿外科疾病基础与临床。

E-mail:wangsuogang2005@126.com

RIRI and the latest treatments from the perspective of macrophage polarization, with the aim of supporting further studies of the function of macrophage polarization in RIRI and adjusting the macrophage polarization process to improve RIRI treatment strategies.

**[Keywords]** renal ischemia-reperfusion injury; inflammatory response; macrophage; intervention means

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

肾缺血再灌注损伤是肾手术、心脏手术、肾移植及肾血供中断所致的一种常见肾疾病。肾缺血时,肾组织受供氧不足和代谢物积累的影响,导致细胞损伤和死亡。再灌注过程使血液重新流入肾,引起一系列炎症反应和细胞损伤,进一步加重肾损伤<sup>[1]</sup>。肾缺血再灌注损伤的机制包括钙超载、炎症反应、活性氧损伤和细胞凋亡,其中免疫细胞介导的炎症反应也起着重要作用。

巨噬细胞是一类重要的免疫细胞,参与机体多种病理生理活动,如炎症反应、凋亡细胞的清除、进行免疫调节等,巨噬细胞在不同的细胞因子作用下可分化出具有不同功能的亚型,主要包括 M1 型巨噬细胞和 M2 型巨噬细胞。越来越多的研究表明,M1/M2 极化在肾的组织损伤和修复中起到重要作用<sup>[2]</sup>。目前 RIRI 仍欠缺廉价高效

的治疗手段,究其原因,RIRI 的发病机制仍未完全探明<sup>[3]</sup>。本文结合了国内外学者的最新研究成果,分析了巨噬细胞极化在 RIRI 发病进程中的作用机制和相关的靶向药物,探讨了未来基于巨噬细胞极化治疗 RIRI 的研究方向,为临床上探索廉价高效的治疗方案提供理论参考。

### 1 巨噬细胞的起源及分型

巨噬细胞可来源于红髓系祖细胞、造血干细胞或循环单核细胞,是一类高度异质性的细胞<sup>[4]</sup>,它们通过抗原呈递、极化和吞噬作用调节炎症并清除感染,参与免疫和炎症修复的生理和病理过程。巨噬细胞极化是指巨噬细胞通过适应周围环境而改变表型并表现出不同功能的过程<sup>[5]</sup>(图 1)。在复杂的 RIRI 微环境中,巨噬细胞

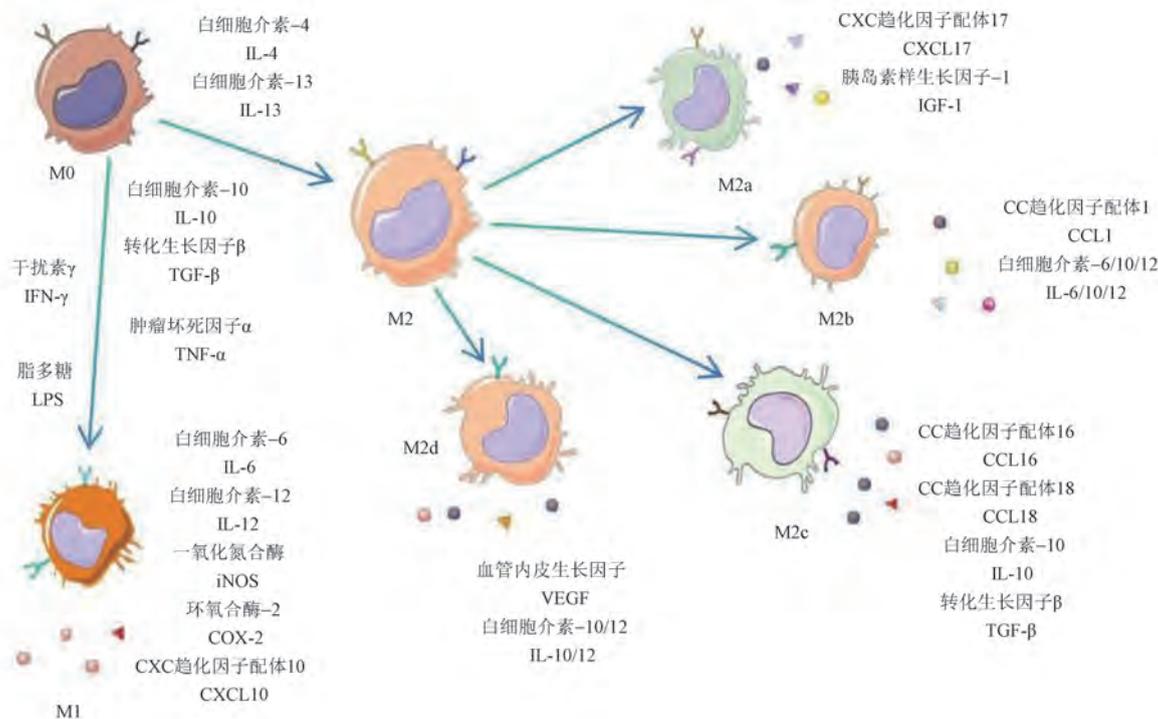


图 1 巨噬细胞的分型

Figure 1 Classification of macrophages

同时受到多种信号的刺激,并相应地极化成不同的亚型,主要包括 M1 型巨噬细胞和 M2 型巨噬细胞,这些亚型在 RIRI 的进展中起着不同的作用<sup>[6]</sup>。此外,巨噬细胞也是一类极具可塑性的细胞,其在炎症和肿瘤等的发生发展过程中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。M1 型巨噬细胞能被干扰素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 以及脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 等活化并释放多种促炎因子,发挥抗肿瘤、杀灭胞内病原菌的作用。体外实验显示,LPS 刺激后,小鼠巨噬细胞呈现树突状变化,形状不规则。M2 型巨噬细胞在白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)、白细胞介素-13 (interleukin-13, IL-13) 等刺激下表达甘露糖受体等,并分泌 IL-10 及转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 等,发挥抗炎、促进组织修复、血管再生、纤维化及免疫调控等功能<sup>[8]</sup>。而 IL-4/13 可诱导巨噬细胞向 M2 型极化。IL-4 作为一种多功能的细胞因子,能够降低炎症因子的释放,对机体的免疫及炎症反应具有重要的调节作用。高表达 IL-4 可缓解慢性肾损伤 (chronic kidney injury, CKD) 的炎症反应<sup>[9]</sup>。同时,IL-4 诱导的 M2 型巨噬细胞能够明显减轻慢性炎症肾病小鼠的肾组织及功能损害<sup>[10]</sup>。根据体外刺激因子的不同,M2 型巨噬细胞可分为 M2a、M2b、M2c、M2d 四种亚型。M2a 亚型可被 IL-4 和 IL-13 诱导,表达高水平的糖皮质激素受体,该亚型还分泌纤维连接蛋白 (fibronectin, FN)、胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1)、CXC 趋化因子配体 17 (CXC chemokine ligand, CXCL17) 和 TGF- $\beta$  等抑制炎症、促进纤维化,从而促进组织修复,因此,通常被称为伤口愈合巨噬细胞;M2b 亚型可由免疫复合物、toll 样受体激动剂或 IL-1 受体配体诱导,该亚型既能产生抗炎因子,如 IL-10 和 IL-12,也能产生促炎因子,如 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ ,还可产生 CC 趋化因子配体 1 (CC chemokine ligand, CCL1) 等拮抗炎症反应;M2c 巨噬细胞受糖皮质激素和 IL-10 诱导,通过释放大量 IL-10 和 TGF- $\beta$ ,还可产生 CC 趋化因子配体 16 (CC chemokine ligand, CCL16)、CC 趋化因子配体 18 (CC chemokine ligand, CCL18) 等,对凋亡细胞具有较强的抗炎活性;由于 M2b 和 M2c 巨

噬细胞均高表达酪氨酸激酶并具有高效的吞噬能力,因此也被称为调节性巨噬细胞;第四种亚型,M2d 巨噬细胞,可由 toll 样受体激动剂通过腺苷 A2A 受体刺激诱导。这种类型的巨噬细胞抑制促炎细胞因子的产生,诱导抗炎细胞因子如 IL-10 和 IL-12 的分泌,还可产生血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 促进血管内皮细胞生长和修复。M1 型巨噬细胞和这四种不同亚型的 M2 型巨噬细胞都参与了炎症反应,在 RIRI 发病进程中的数量和分泌的相关细胞因子始终处于动态地变化过程,在 RIRI 的病理生理机制中发挥重要作用,但目前主要的研究集中在巨噬细胞的亚型和细胞因子的分泌调控和作用方面,而相关基因的表达调控机制的探索和基于基因调控层面的相应治疗手段的开发尚有欠缺,需增加相关的投入和关注,此外,其在人体内的确切作用及微观机制需进一步研究阐明<sup>[11]</sup>。

## 2 RIRI 的病理生理机制及巨噬细胞动力学

RIRI 是指肾血供暂时减少,随后血流量恢复导致肾损伤加重的病理生理现象<sup>[12-13]</sup>。这导致危险相关分子模式 (danger-associated molecular patterns, DAMPs)、缺氧诱导因子的释放、粘附分子的表达增加、趋化因子和细胞因子的产生、补体系统和缺氧诱导因子的激活以及肾血管内皮的通透性功能障碍<sup>[14]</sup>,进而激活和招募免疫细胞到损伤部位<sup>[15]</sup>。DAMPs 通常存在于细胞内区域,但在缺氧或缺氧引起的细胞损伤下暴露或释放。缺氧诱导因子是在缺氧的细胞和组织中调节适应性反应的蛋白质。这些分子负责将循环免疫细胞招募到损伤部位。细胞因子主要由免疫细胞和肾小管细胞释放,是损伤部位炎症发生和扩展的重要介质,而趋化因子是免疫细胞趋化和活化的直接介质。调节细胞间粘附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、p-选择素、e-选择素的表达或 IL-6、IL-1、CXCL8、CXCR3 的产生,进而影响免疫细胞向缺血后肾的募集,补体系统和缺氧诱导因子也是免疫细胞募集的重要贡献者。调控替代通路、TLR2 或 TLR4 的表达影响缺血后肾免疫细胞的浸润。肾血管

功能障碍是参与免疫细胞募集的另一个重要因素;RIRI 会导致肾血管内皮完整性的机械中断,从而增加血管通透性。中性粒细胞与血管内皮的粘附是细胞向损伤部位外渗的第一步。在粘附和趋化过程中,浸润的中性粒细胞释放各种因子,如活性氧等,损伤小管上皮细胞<sup>[16]</sup>。但中性粒细胞在 RIRI 中的作用仍有待进一步阐明。RIRI 中的巨噬细胞是一种吞噬性先天免疫细胞,也参与引起肾损伤并促进 RIRI 后的肾修复<sup>[17]</sup>。这些细胞在肾损伤后急剧增加,而在正常肾中它们的数量很少。

单核细胞被募集到损伤的肾后,分化为巨噬细胞,巨噬细胞在时间和功能上是动态的,经历了从促炎表型向修复表型转变的过程(图 2)。M1 型巨噬细胞通过 DAMPs 和病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 与模式识别受体的结合或 T 辅助细胞和 NKT 细胞释放的 IFN- $\gamma$  激活,具有促进炎症的重要功能。它们可表达诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide, i-NOS) 和多种促炎因子,如

TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-12,作为效应细胞和抗原呈递细胞,介导肾损伤。IL-4/IL-13 诱导的 M2 型巨噬细胞具有抗炎作用,并倾向于促进伤口愈合和炎症消退。它们表达伤口愈合相关基因,包括胰岛素样生长因子-1、甘露糖受体-1 和精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1)。M1 和 M2 巨噬细胞均参与 RIRI,其中 M1 型巨噬细胞主要聚集在 RIRI 早期,M2 主要聚集在 RIRI 晚期<sup>[18]</sup>。研究发现,在 RIRI 发生 24 h 内,来自血液中的单核细胞和肾组织中的原有巨噬细胞数量快速增多并在受损部位聚集<sup>[19]</sup>。聚集的中性粒细胞可产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 与 DAMPs、PAMPs 和 T 细胞等共同作用下刺激募集的单核细胞在受损部位转化为巨噬细胞<sup>[20]</sup>。研究发现,未分化的巨噬细胞主要表达 CD68。RIRI 的早期 24~48 h 内,在 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、外泌体 RNA、LPS 和微小 RNA (microRNAs, miRNA) 等作用产生的炎症环境下,未分化巨噬细胞主要被诱导分化为 M1 型巨噬细胞,RIRI 早期触发炎症反应,大量释放 DAMPs,DAMPs 识别 M1 型巨噬细胞表面受体,

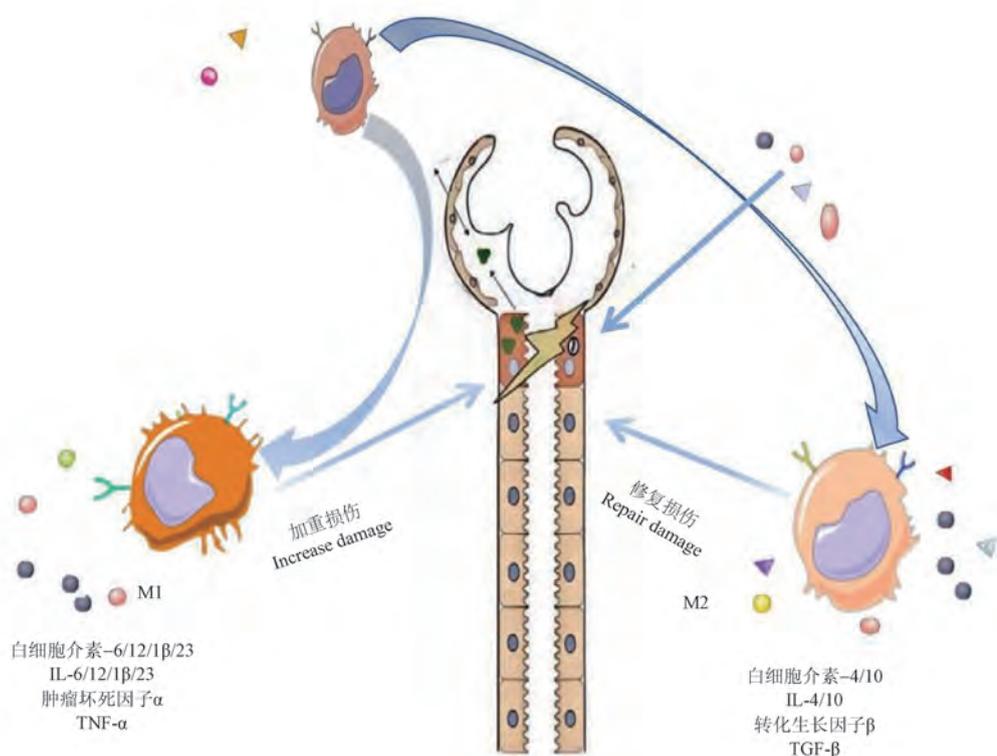


图 2 肾缺血再灌注损伤中巨噬细胞的动力学变化

Figure 2 Renal ischemia-reperfusion injury in the dynamic changes of macrophage

进而激活 TLR 信号通路,促进 NF- $\kappa$ B 通路激活,释放 IL-6、IL-12、IL-1 $\beta$ 、IL-23 和 TNF- $\alpha$  等促炎因子,加重肾组织结构和功能损伤<sup>[21-22]</sup>。随着 RIRI 的进展,5~7 d 后,受损的肾小管上皮细胞会释放粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF),在 GM-CSF 的作用下,诱导 M2 型巨噬细胞的不断产生,并逐渐占据主导地位,M2 型巨噬细胞会高效表达并不断释放 IL-4、IL-10 和 TGF- $\beta$  等抑炎因子,进而抑制炎症反应,促进肾组织和功能修复<sup>[23]</sup>。随着国内外学者的不断探索,巨噬细胞极化在肾缺血再灌注损伤中的作用机制不断清晰,因此,探寻一个廉价高效的基于促进 M2 型巨噬细胞极化并抑制 M1 型巨噬细胞极化进而治疗 RIRI 的治疗方案近年来逐渐火热起来<sup>[24]</sup>。

### 3 基于调控巨噬细胞极化改善肾缺血再灌注损伤的药物

近年来,随着研究的不断深入,巨噬细胞极化在 RIRI 病理生理进程中的作用机制逐渐明确,使得相关抑制剂和靶向药物的研发成为可能,经过大量科研人员的不断努力,涌现出了大量的治疗方案和相关的治疗药物,其中内源性物质、干细胞、外泌体、细胞外囊泡和天然产物的开发都是目前的研究热点,但大部分的研究仍处于动物实验阶段,大规模应用于临床尚需一段时间,且其在人体内的确切作用及机制和相关干预药物的有效剂量和安全性仍需进行多中心、大样本的研究以进一步明确。

#### 3.1 内源性物质

硫化氢( $H_2S$ )是一种气体信号分子,在体内具有多种生理和病理生理作用。研究发现, $H_2S$ 是一种有效的血管扩张剂和抗炎剂, $H_2S$ 在转硫途径中由胱硫醚  $\beta$ -合成酶(cystathionine  $\beta$ -synthase, CBS)、胱硫醚  $\gamma$ -裂解酶(cystathionine  $\gamma$ -lyase, CSE)和 3-巯基丙酮酸硫转移酶(3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, 3-MST)合成,它们都在肾中高度表达。在其他涉及 RIRI 的研究中,CBS 和 CSE 的表达以及  $H_2S$  的生成显著降低,导致氧化应激和肾损害。 $H_2S$ 可在老年小鼠 RIRI 后减少 M1 细胞,促进 M2 细胞浸润,进而抑制炎症反应,从而改善叶间、弓形和小叶间分支

的肾血管,进而改善肾血流量<sup>[25]</sup>。除此之外,研究发现,异丙酚(propofol, Pro)对 RIRI 的保护亦有积极作用,大鼠接受 45 min 的 RIRI 手术或假手术,并在缺血阶段给予 PBS(载药)或 Pro,预给药可减轻 RIRI 诱导的肾损伤和肾 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 CXCL-10 的表达<sup>[26]</sup>。巨噬细胞 M2 极化增强,表现为诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide, i-NOS)减少,Arg-1 和甘露糖受体 C1 型基因(mannose receptor C-type 1, MRC1)mRNA 水平升高。Pro 也抑制了磷酸化的信号转导和转录激活因子(phosphorylated signal transducer and activator of transcription, p-STAT)1,并增加了 p-STAT3、p-STAT6 和过氧化物酶体增殖物激活受体- $\gamma$ (peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )mRNA 水平。重要的是,SIRNA 介导的 PPAR $\gamma$  沉默抑制了 Pro 介导的 STAT3 的激活,恢复了促炎细胞因子水平,并阻止了 RIRI 处理大鼠中巨噬细胞 M2 标记物的表达。这些发现表明,Pro 通过刺激 PPAR $\gamma$ /STAT3 依赖性巨噬细胞向 M2 表型的转化,进而保护 RIRI 大鼠肾的结构和功能。P144 是一种 TGF- $\beta$ 1 肽抑制剂,研究发现,P144 可改善单侧缺血再灌注损伤加对侧肾切除术模型肾细胞外基质的积累,进而改善肾功能<sup>[27]</sup>。在机制上,P144 可在转录和翻译水平下调 TGF- $\beta$ 1-Smad3 信号,进一步减少 TGF- $\beta$ 1 依赖性巨噬细胞对损伤肾的浸润。此外,P144 还在体外阻断 TGF- $\beta$ 1 诱导巨噬细胞向 M2 样表型极化,但对其增殖无影响。减少 RIRI 后的肾纤维化,这表明其在 RIRI 中具有潜在的治疗价值,内源性药物具有起效快、副作用小的特点,但提取、纯化、合成和大规模应用较为困难,需进一步探索和研发,解决相关的技术性难题。

#### 3.2 间充质干细胞和外泌体

近年来,间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSCs)和外泌体(exosome, Exo)逐渐进入研究人员视野,研究发现,与假手术小鼠相比,RIRI 小鼠血清血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和血肌酐(serum creatinine, SCr)含量较高,第 1 天和第 3 天肾组织损伤较严重,且随时间逐渐下降,损伤后第 7 天最低<sup>[28-30]</sup>。使用可直接转移到肾小管细胞的骨髓间充质干细胞源性外泌体(mesenchymal stem cell-exosome, MSCs-Exo)处理

后,与 RIRI 小鼠相比,肾功能的恢复明显加快,且在吡啶胺 2,3-双加氧酶过表达的 MSCs-Exo (MSCs-Exo-IDO) 处理的 RIRI 小鼠中,其促进作用更为明显。此外,与 IRI 小鼠相比, MSCs-Exo-IDO 还能加速肾小管细胞增殖,抑制小管细胞凋亡、纤维化和自我修复过程中的炎症因子分泌。机制上, MSCs-Exo-IDO 可促进 M1 巨噬细胞向 M2 巨噬细胞极化,产生更多抗炎因子,从而改变肾小管细胞的炎症微环境,促进小鼠 RIRI 后的自我修复过程。此外,用于治疗目的的间充质干细胞可以被损伤组织中自然杀伤细胞分泌的 IFN- $\gamma$  激活,并发挥抗炎作用。这些过程需要相当长的一段时间,导致 MSCs 的治疗效果延迟发作。KANAI 等<sup>[31]</sup> 研究发现 IFN- $\gamma$  预处理可显著增强缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, IRI) 和单侧输尿管梗阻大鼠间充质干细胞的抗纤维化能力。与未经 IFN- $\gamma$  处理的对照 MSCs 相比,经 IFN- $\gamma$  处理的 MSCs 可显著减少炎症细胞的浸润并改善间质纤维化。此外,从 IFN- $\gamma$  处理的 MSCs 中获得的条件培养基比从对照 MSCs 中获得的条件培养基更有效地降低了 TGF- $\beta$ 1 诱导的培养细胞的纤维化变化。并且, IFN- $\gamma$  显著增加了 MSCs 分泌的前列腺素 E2。从 IFN- $\gamma$  处理的 MSCs 中获得的条件培养基中前列腺素 E2 增加,诱导免疫抑制性 CD163 和 CD206 阳性巨噬细胞极化。此外,在 IRI 大鼠中,前列腺素 E 合酶的下调削弱了 IFN- $\gamma$  处理的 MSCs 的抗纤维化作用,提示前列腺素 E2 参与了 IFN- $\gamma$  的有益作用。因此,用 IFN- $\gamma$  处理的间充质干细胞可能是一种很有前景的治疗方法,可有效延缓 RIRI 的进展。干细胞的研究在多种疾病的治疗方面都展现了诱人的效果,值得进一步探索。

### 3.3 细胞外囊泡

细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 作为一种天然药物传递系统,近年来,细胞外囊泡包膜 IL-10 作为缺血性急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 的新型纳米疗法受到广泛关注<sup>[32]</sup>。研究表明,通过工程巨噬细胞制造 IL-10 负载 EV (IL-10+EV) 的方法,用于治疗 RIRI。通过 EV 传递 IL-10 不仅增强了 IL-10 的稳定性,而且由于 EV 表面的粘附成分,IL-10 可以靶向到肾。IL-10+EV 治疗可显著改善肾小管损伤和 IRI 引起的炎

症,并有效防止向慢性肾疾病的过渡。从机制上讲,IL-10+EV 靶向肾小管上皮细胞,可抑制哺乳动物雷帕霉素信号靶点,进而促进线粒体自噬,维持线粒体健康。此外,IL-10+EV 还可通过靶向肾小管间质巨噬细胞,有效驱动 M2 型巨噬细胞极化。因此, EV 可作为一种药物递送平台来操纵 IL-10 靶向治疗受损的肾,从而有效治疗 RIRI。另有研究发现, M1 巨噬细胞来源的纳米囊泡可有效地将 M2 巨噬细胞重新编码为 M1 巨噬细胞,抑制子宫内膜基质细胞的侵袭、迁移并阻碍血管形成,进而阻碍子宫内膜异位症的发生和发展<sup>[33]</sup>。虽然目前细胞外囊泡在 RIRI 治疗方面的研究较少,但仍展现出了巨大的研究前景,值得进一步地挖掘和开发,探寻一条精准、高效、可控的靶向治疗路径。

### 3.4 天然产物治疗 RIRI

雷公藤多苷能够抑制丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和 NF- $\kappa$ B 信号通路,并能诱导 STAT3 磷酸化,减少 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体的激活,降低 M1 型巨噬细胞分泌 CXCL-9 和 ROS 等趋化因子以及 IL-6、IL-1 $\beta$  和 IL-18 等炎症因子,进而缓解高血压肾损害<sup>[34]</sup>。除此之外,黄酮类化合物是植物界中广泛存在的化合物,人们的日常膳食中也含有多种黄酮类化合物,其不仅可以保护人体的脏器,维持血糖、血压稳定,还具有良好的抗氧化、抗衰老、抗炎、抗癌等多种生物活性<sup>[35]</sup>,近年来,出现了不少关于黄酮类化合物治疗 AKI 的研究报道,如漆黄素、橙皮素等<sup>[36]</sup>,表明黄酮类化合物在 AKI 方面具有良好的治疗和肾保护作用。在 LPS 诱导的小鼠 AKI 模型中,槲皮素 25 和 40 mg/(kg·d) 灌胃 3 和 2 d<sup>[37]</sup>;相当于成人剂量 (2.0 和 3.2 mg/kg) 可以剂量依赖性抑制炎症因子,降低肾小管损伤,抑制 TLR4,使其无法与肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor associated factor 6, TRAF6) 共同激活 NF- $\kappa$ B 通路,从而修复 LPS 诱导模型中的损伤<sup>[38]</sup>。CD38 是 LPS 模型中 M1 型巨噬细胞极化重要的糖蛋白,CD38 可以激活 NF- $\kappa$ B 通路,而槲皮素抑制 CD38 表达,阻断 LPS 模型中 NF- $\kappa$ B 信号通路,抑制 M1 极化<sup>[39]</sup>。另

外,在经典中也发现了相关的治疗药物,当归芍药散出自张仲景所著《金匮要略》,由当归、白芍、川芎、白术、泽泻、茯苓组成,具有养血和血、活血化瘀功效<sup>[40]</sup>,刘岳轩等<sup>[41]</sup>研究发现当归芍药散可调控巨噬细胞活化,减少 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等促炎因子的释放,明显增加 NRK52E 细胞表达水平,改善肾小管上皮细胞损伤,从而对肾缺血再灌注损伤起到治疗作用。另外,研究表明,白扁豆预处理对抑制免疫细胞浸润、细胞因子和炎症也有积极作用,通过分析巨噬细胞(F4/80<sup>+</sup>)和 T 细胞(CD4<sup>+</sup>)浸润及促炎细胞因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ )释放情况,评价凋亡诱导的炎症反应<sup>[42]</sup>。免疫组化分析显示,预处理组的 F4/80<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>浸润性免疫细胞少于未处理组。RT-qPCR 分析显示,与未治疗组相比,预处理组肾促炎细胞因子(IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和 IL-6)mRNA 水平下降。但除 IL-10 外,预处理组抗炎细胞因子(TGF- $\beta$ 和 IL-22)mRNA 水平均高于未处理组。这些结果表明,虽然 IL-10 不受影响,但白扁豆预处理可能具有抗炎作用,可以预防 IRI 诱导的肾炎症损伤。多种研究表明,天然药物是一个巨大宝库,值得进一步探索挖掘,为 RIRI 的治疗提供一个廉价高效的治疗方案。

#### 4 总结与展望

近年来,医学研究和医疗技术不断进展,同种异体器官移植、异种器官移植和肾肿瘤切除等多种需要进行肾血管阻断的手术不断增多,然而,各种手术患者、移植肾受者和移植器官受损率仍较高。因此,不断探索 RIRI 的病理生理机制并研发相关的靶向药物具有重大意义。RIRI 的发病机制是一个复杂的过程,巨噬细胞在其中扮演着关键角色,巨噬细胞的不同活化状态和亚型在 RIRI 发病过程中的病理生理机制及随后的肾组织损伤和修复中发挥重要作用,精准调控巨噬细胞极化可有效抑制 RIRI 中肾组织和功能的损伤并促进肾小管上皮细胞损伤的修复,改善患者预后。因此,进一步探索 RIRI 的发病机制、巨噬细胞极化在其中的作用和相关的治疗靶点,并以此为基础积极进行大量靶向药物的研发,将会为 RIRI 的治疗探索一条精准高效的治疗路径。目前,巨噬细胞极化在 RIRI 中的作用机制未完全明

晰,仍需进一步研究。此外,经过国内外学者的不断研究,虽然研发出了多种靶向药物,但极少能应用于临床实践,探明众多靶向药物临床上的有效性及安全剂量需进行多中心和大样本的研究。尽管如此,随着巨噬细胞极化在 RIRI 中作用机制研究的不断深入,基于巨噬细胞极化分子机制的靶向药物有望成为治疗 RIRI 的有效方法。

#### 参考文献:

- [1] QUADER M, CHOLYWAY R, WICKRAMARATNE N, et al. Refining murine heterotopic heart transplantation: a model to study ischemia and reperfusion injury in donation after circulatory death hearts [J]. *Anim Model Exp Med*, 2021, 4(3): 283-296.
- [2] WANG H, XI Z, DENG L, et al. Macrophage polarization and liver ischemia-reperfusion injury [J]. *Int J Med Sci*, 2021, 18(5): 1104-1113.
- [3] 章林明, 许珍珍, 常越辰, 等. G 蛋白偶联雌激素受体可通过抑制氧化应激反应减轻肾缺血再灌注损伤 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(6): 10-16, 24. ZHANG L M, XU Z Z, CHANG Y C, et al. G protein-coupled estrogen receptor alleviates renal ischemia reperfusion injury by inhibiting oxidative stress [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(6): 10-16, 24.
- [4] GAI X, LIU F, WU Y, et al. Overexpressed PKM2 promotes macrophage phagocytosis and atherosclerosis [J]. *Anim Model Exp Med*, 2023, 6(2): 92-102.
- [5] ZHANG W, WANG Y, LI C, et al. Extracellular CIRP-impaired Rab26 restrains EPOR-mediated macrophage polarization in acute lung injury [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 768435.
- [6] WANG C, MA C, GONG L, et al. Macrophage polarization and its role in liver disease [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 803037.
- [7] 秦琪, 李娟, 杨柳, 等. 巨噬细胞条件性 Cd226 基因敲除小鼠的构建及功能分析 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(4): 428-436. QIN Q, LI J, YANG L, et al. Construction and functional analysis of macrophage-conditional Cd226 gene knockout mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(4): 428-436.
- [8] APEKU E, TANTUOYIR M M, ZHENG R, et al. Exploring the polarization of M1 and M2 macrophages in the context of skin diseases [J]. *Mol Biol Rep*, 2024, 51(1): 269.
- [9] MAZZETTO R, MICELI P, TARTAGLIA J, et al. Role of IL-4 and IL-13 in cutaneous T cell lymphoma [J]. *Life (Basel)*, 2024, 14(2): 245.
- [10] CHEN M, WEN X, GAO Y, et al. IRF-4 deficiency

- reduces inflammation and kidney fibrosis after folic acid-induced acute kidney injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 100: 108142.
- [11] PAN X, ZHU Q, PAN L L, et al. Macrophage immunometabolism in inflammatory bowel diseases: from pathogenesis to therapy [J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 238: 108176.
- [12] GRANATA S, VOTRICO V, SPADACCINO F, et al. Oxidative stress and ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: focus on ferroptosis, mitophagy and new antioxidants [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(4): 769.
- [13] MAEDA A, HAYASE N, DOI K. Acute kidney injury induces innate immune response and neutrophil activation in the lung [J]. *Front Med*, 2020, 7: 565010.
- [14] VONBRUNN E, BÜTTNER-HEROLD M, AMANN K, et al. Complement inhibition in kidney transplantation: where are we now? [J]. *BioDrugs*, 2023, 37(1): 5–19.
- [15] CUTOLO M, CAMPITIELLO R, GOTELLI E, et al. The role of M1/M2 macrophage polarization in rheumatoid arthritis synovitis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 867260.
- [16] MORRIS G, GEVEZOVA M, SARAFIAN V, et al. Redox regulation of the immune response [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(10): 1079–1101.
- [17] WU Y, ZWAINI Z D, BRUNSKILL N J, et al. Properdin deficiency impairs phagocytosis and enhances injury at kidney repair phase post ischemia-reperfusion [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 697760.
- [18] LIU B, JIANG Q, CHEN R, et al. Tacrolimus ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting M2 macrophage polarization via JAK2/STAT3 signaling [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 113(Pt A): 109424.
- [19] WENG X, ZHAO H, GUAN Q, et al. Clusterin regulates macrophage expansion, polarization and phagocytic activity in response to inflammation in the kidneys [J]. *Immunol Cell Biol*, 2021, 99(3): 274–287.
- [20] WANG L, HONG W, ZHU H, et al. Macrophage senescence in health and diseases [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2024, 14(4): 1508–1524.
- [21] LV L L, FENG Y, WU M, et al. Exosomal miRNA-19b-3p of tubular epithelial cells promotes M1 macrophage activation in kidney injury [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(1): 210–226.
- [22] YANG Y, ZHAN X, ZHANG C, et al. USP25-PKM2-glycolysis axis contributes to ischemia reperfusion-induced acute kidney injury by promoting M1-like macrophage polarization and proinflammatory response [J]. *Clin Immunol*, 2023, 251: 109279.
- [23] LV S, CAO M, LUO J, et al. Search progress of pyruvate kinase M2 (PKM2) in organ fibrosis [J]. *Mol Biol Rep*, 2024, 51(1): 389.
- [24] 刁佳雯, 徐慧, 马新月, 等. 没食子酸对脂多糖诱导的人 THP1 巨噬细胞炎症反应的抑制作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(4): 41–53.
- DIAO J W, XU H, MA X Y, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory response by Gallic acid in human THP1 macrophages [J]. *Chin J Comp Med*, 2024, 34(4): 41–53.
- [25] PUSHPAKUMAR S, KUNDU S, WEBER G, et al. Exogenous hydrogen sulfide and miR-21 antagonism attenuates macrophage-mediated inflammation in ischemia reperfusion injury of the aged kidney [J]. *Geroscience*, 2021, 43(3): 1349–1367.
- [26] LIU Z, MENG Y, MIAO Y, et al. Propofol ameliorates renal ischemia/reperfusion injury by enhancing macrophage M2 polarization through PPAR $\gamma$ /STAT3 signaling [J]. *Aging*, 2021, 13(11): 15511–15522.
- [27] LI D, ZHANG J, YUAN S, et al. TGF- $\beta$ 1 peptide-based inhibitor P144 ameliorates renal fibrosis after ischemia-reperfusion injury by modulating alternatively activated macrophages [J]. *Cell Prolif*, 2022, 55(10): e13299.
- [28] ISHIUCHI N, NAKASHIMA A, MAEDA S, et al. Comparison of therapeutic effects of mesenchymal stem cells derived from superficial and deep subcutaneous adipose tissues [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 121.
- [29] XIE X, YANG X, WU J, et al. Exosome from indoleamine 2, 3-dioxygenase-overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells accelerates repair process of ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury by regulating macrophages polarization [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 367.
- [30] LIN C, CHEN W, HAN Y, et al. Correction: PTEN-induced kinase 1 enhances the reparative effects of bone marrow mesenchymal stromal cells on mice with renal ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury [J]. *Hum Cell*, 2023, 36(4): 1579.
- [31] KANAI R, NAKASHIMA A, DOI S, et al. Interferon- $\gamma$  enhances the therapeutic effect of mesenchymal stem cells on experimental renal fibrosis [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 850.
- [32] TANG T T, WANG B, WU M, et al. Extracellular vesicle-encapsulated IL-10 as novel nanotherapeutics against ischemic AKI [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(33): eaaz0748.
- [33] CHU X, HOU M, LI Y, et al. Extracellular vesicles in endometriosis: role and potential [J]. *Front Endocrinol*, 2024, 15: 1365327.
- [34] 刘素晓, 宋纯东, 崔琳, 等. 雷公藤多苷对盐敏感性高血压小鼠肾损害的保护作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(19): 2302–2305.

- LIU S X, SONG C D, CUI L, et al. Protective effect of multi-glycoside of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. on salt-sensitive hypertension-induced renal injury in mice [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2018, 34(19): 2302-2305.
- [35] 李淑珍, 杨巍巍, 康爱娟, 等. 柑橘多甲氧基黄酮饼干对高血脂症小鼠的降脂效应 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(1): 63-70.
- LI S Z, YANG W W, KANG A J, et al. Lipid-lowering effect of Citrus polymethoxyflavonoid cookies on hyperlipidemia mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(1): 63-70.
- [36] REN Q, GUO F, TAO S, et al. Flavonoid fisetin alleviates kidney inflammation and apoptosis via inhibiting Src-mediated NF- $\kappa$ B p65 and MAPK signaling pathways in septic AKI mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 122: 109772.
- [37] SHU B, FENG Y, GUI Y, et al. Blockade of CD38 diminishes lipopolysaccharide-induced macrophage classical activation and acute kidney injury involving NF- $\kappa$ B signaling suppression [J]. *Cell Signal*, 2018, 42: 249-258.
- [38] 谭继翔, 何进, 秦文熠, 等. 槲皮素通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路缓解脂多糖诱导的急性肾损伤 [J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(5): 598-602.
- TAN J X, HE J, QIN W Y, et al. Quercetin alleviates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in mice by suppressing TLR4/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *J South Med Univ*, 2019, 39(5): 598-602.
- [39] DEVI V J, RADHIKA A, BIJU P G. Adenosine receptor activation promotes macrophage class switching from LPS-induced acute inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 phenotype [J]. *Immunobiology*, 2023, 228(3): 152362.
- [40] 姜林, 李彬, 臧运华, 等. 当归芍药散对血管性痴呆大鼠炎症因子及神经细胞凋亡的影响 [J]. *陕西中医*, 2023, 44(11): 1532-1536.
- JIANG L, LI B, ZANG Y H, et al. Effects of Danggui Shaoyao powder on inflammatory response and nerve cell apoptosis in rats with vascular dementia [J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med*, 2023, 44(11): 1532-1536.
- [41] 刘岳轩, 陈文钰, 刘湘花, 等. 当归芍药散含药血清通过调节巨噬细胞活化诱导的肾小管上皮细胞转分化发挥肾保护作用 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(6): 1281-1283.
- LIU Y X, CHEN W Y, LIU X H, et al. Danggui Shaoyao San drug-containing serum plays a protective role by regulating the transdifferentiation of renal tubular epithelial cells induced by macrophage activation [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2022, 33(6): 1281-1283.
- [42] LEE S O, CHUN S Y, LEE E, et al. Renal protective effect of Beluga lentil pretreatment for ischemia-reperfusion injury [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 6890679.

[收稿日期]2024-06-16