

张艺霖,杜蔡瑶,郭佩雯,等. CB1R 敲除对小鼠 ASD 样行为及突触可塑性的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(4): 1-10.

Zhang YL, Du CY, Guo PW, et al. Effect of cannabinoid receptor 1 knockout on autism spectrum disorder-like behavior and synaptic plasticity in mice [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 1-10.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.001

CB1R 敲除对小鼠 ASD 样行为及突触可塑性的影响

张艺霖,杜蔡瑶,郭佩雯,程泽瑜,高雅,邹明扬,孙彩虹*

(哈尔滨医科大学公共卫生学院儿少卫生与妇幼保健学教研室,哈尔滨 150081)

【摘要】 目的 探究大麻素受体 1(cannabinoid receptor 1, CB1R)对突触可塑性的作用,以及其对小鼠孤独症谱系障碍(autism spectrum disorders, ASD)样行为的影响。**方法** 以 CB1R 敲除(knockout, KO)小鼠和丙戊酸钠(valproic acid, VPA)诱导的 ASD 模型鼠(VPA 小鼠)为研究对象。通过行为学实验评估 CB1R 对小鼠 ASD 样行为的影响;通过微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein 2, MAP2)染色实验检测神经元结构完整性及树突密度,通过蛋白免疫印迹实验检测突触相关蛋白的表达,以评估 CB1R 对突触可塑性的影响。**结果** 行为学结果显示,VPA 小鼠存在明显的 ASD 样行为;CB1R^{-/-}小鼠在旷场中心区域停留时间比值显著降低($P<0.0001$),埋珠个数及自梳时间显著增加($P<0.01$),与陌生鼠 2 社交时间及探索陌生物体时间显著减少($P<0.001$),探索旧物体时间增加($P<0.05$);CB1R^{+/-}小鼠在旷场中心区域停留时间比值明显降低($P<0.001$),埋珠个数及自梳时间明显增加($P<0.05$)。突触可塑性检测结果显示,VPA 小鼠存在明显的突触可塑性损伤;CB1R^{-/-}小鼠和 CB1R^{+/-}小鼠海马 MAP2 阳性神经元密度显著降低($P<0.05$),突触蛋白 1(synapsin 1, SYN1)表达水平显著升高($P<0.05$)。**结论** CB1R 敲除会导致小鼠出现焦虑和重复刻板行为、社交及认知障碍等 ASD 样行为,以及神经元损伤、树突发育障碍及突触蛋白表达紊乱,提示 CB1R 敲除导致突触可塑性异常是 ASD 样行为发生的病理机制。

【关键词】 孤独症谱系障碍;大麻素受体 1;突触可塑性;ASD 样行为

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0001-10

Effect of cannabinoid receptor 1 knockout on autism spectrum disorder-like behavior and synaptic plasticity in mice

ZHANG Yilin, DU Caiyao, GUO Peiwen, CHENG Zeyu, GAO Ya, ZOU Mingyang, SUN Caihong*

(Department of Child and Adolescent Health, Public Health College, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

【Abstract】 Objective To investigate the regulation of synaptic plasticity by cannabinoid receptor 1 (CB1R) and its effects on autism spectrum disorder (ASD)-like behavior. **Methods** CB1R-knockout (KO) mice and valproic acid (VPA)-induced ASD model mice (VPA mice) were used as study subjects. Behavioral experiments were used to assess the effects of CB1R on ASD-like behavior in mice, neuronal structural integrity and dendritic density were detected by microtubule-associated protein 2 (MAP2) staining experiments, and the expression of

【基金项目】 国家自然科学基金(82173535);黑龙江自然科学基金(LH2023H017)。

【作者简介】 张艺霖(1999—),女,在读硕士研究生,研究方向:儿童发育行为。E-mail:zy115025406831@163.com

【通信作者】 孙彩虹(1977—),女,博士,博士生导师,研究方向:儿童发育行为。E-mail:suncaihong2003@163.com

synapse-associated proteins was detected by Western blot, to assess the effects of CB1R on synaptic plasticity. **Results** Behavioral result showed that VPA mice demonstrated significant ASD-like behavior, while CB1R^{-/-} mice spent a significantly smaller proportion of residence time in the central region of the open field ($P < 0.0001$), showed significant increases in the number of marbles buried and self-grooming time ($P < 0.01$), significantly less time spent socializing with unfamiliar mice 2 and exploring unfamiliar objects ($P < 0.001$), and significantly more time exploring old objects ($P < 0.05$). The relative dwelling time was significantly reduced in CB1R^{+/-} mice ($P < 0.001$), and the number of marbles buried and self-grooming time were significantly increased ($P < 0.05$). Synaptic plasticity assays revealed significant synaptic plasticity impairment in VPA mice. Hippocampal MAP2-positive neuron densities were significantly reduced in CB1R^{-/-} and CB1R^{+/-} mice, and expression levels of synapsin-1 were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusions** CB1R KO leads to ASD-like behavior such as anxiety and repetitive stereotyped behavior, social and cognitive impairments, as well as neuronal damage, dendritic dysplasia and disrupted synaptic protein expression in mice, suggesting that CB1R is involved in regulating synaptic plasticity as a pathological mechanism for the development of ASD-like behavior.

【**Keywords**】 autism spectrum disorder; CB1R; synaptic plasticity; ASD-like behavior

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

孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorders, ASD) 是起病于婴幼儿早期的一种严重的神经发育障碍性疾病,其核心症状主要表现为社交交流障碍、狭隘兴趣及重复刻板行为。除此之外,部分患儿还伴有不同程度的认知障碍^[1]。目前,ASD 的发病机制不明,但已有研究证明神经系统突触可塑性异常与 ASD 发病的生理机制密切相关^[2-5]。大麻素受体 1 (cannabinoid receptor 1, CB1R) 为中枢神经系统中表达最丰富的 G 蛋白偶联受体^[6],主要在突触前末端高度集中,通过抑制突触前神经递质的释放,进而影响突触可塑性^[7-9]。此外,研究发现 CB1R 高度富集在海马、大脑皮层、小脑和基底神经节^[10],且这些大脑区域被认为与 ASD 的核心症状紧密相关^[11],但目前仍缺乏 CB1R 参与 ASD 发生发展的直接证据。因此,本研究以 CB1R 敲除 (knockout, KO) 小鼠和丙戊酸钠 (valproic acid, VPA) 诱导的 ASD 模型鼠 (VPA 小鼠) 为研究对象,探讨 CB1R 敲除对突触可塑性及 ASD 表型特征的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

30 只 SPF 级 C57BL/6J 小鼠购置于北京维通利华实验动物有限公司 [SCXK (京) 2021-0006], 20 只以 C57BL/6J 为背景的 SPF 级 CB1R 基因敲除小鼠 (CB1R KO) 购置于江苏集萃药康生物科技有限公司 [SCXK (苏) 2023-0009], 以上小鼠均

为 6 周龄,体质量为 (20±5) g,饲养于哈尔滨医科大学公共卫生学院动物实验中心 [SYXK (黑) 2022-016], 保持温度 (22±2) °C, 湿度 (50±10) %, 12 h 光照/12 h 黑暗循环,可自由摄食和饮水。本研究使用的实验动物均为雄性小鼠,实验经哈尔滨医科大学伦理委员会批准 (HMUIRB20200007)。本实验全过程遵守动物实验 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

BCA 蛋白定量试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, P0012); 抗荧光淬灭封片液 (上海碧云天生物技术有限公司, P0126); 丙戊酸钠盐 (美国 Sigma 公司, 99-67-2); MAP2 抗体 (英国 Abcam 公司, ab183830); Gephyrin 抗体 (德国 Synaptic System 公司, 147111); 突触蛋白 1 (Synapsin 1, SYN1) 抗体 (德国 Synaptic System 公司, 106011); Vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) 抗体 (德国 Synaptic System 公司, 135303); Postsynaptic Density Protein 95 (PSD95) 抗体 (武汉 proteintech 公司, 20665-1-AP); Vesicular GABA transporter (VGAT) 抗体 (武汉 proteintech 公司, 14471-1-AP) GADPH 抗体 (武汉 proteintech 公司, 60004-1-Ig)。

旷场实验系统、三箱实验系统、新物体识别系统 (瑞沃德生命科技有限公司, SMART 3.0); Morris 水迷宫实验系统 (成都泰盟科技有限公司, WMT-100); 冰冻切片机 (德国 Leica 公司, CM1950); 荧光显微镜 (德国 ZEISS 公司, HAL 100)。

1.3 实验方法

1.3.1 ASD 模型鼠的建立

成年 C57BL/6J 小鼠在夜间按照雌性和雄性 1:1 的比例合笼。第 2 天早晨检查雌鼠是否有阴栓,有阴栓即为孕鼠,并记该天为胚胎 0.5 d。孕鼠在怀孕 12.5 d 时腹腔注射 600 mg/kg VPA,产下的仔鼠即为 ASD 模型鼠(VPA 小鼠)。

1.3.2 CB1R KO 小鼠的基因型鉴定

本研究选择 CB1R 敲除小鼠(CB1R^{-/-}与 CB1R^{+/-})为研究对象,旨在探讨 CB1R 完全缺失和部分缺失对小鼠 ASD 样行为和突触可塑性影响的差异。CB1R KO 小鼠的基因型鉴定方法如下:剪取出生后 5~7 d 鼠崽约 2 mm 脚趾。使用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒提取小鼠 DNA,步骤按照说明书进行。用特定的 PCR 体系对小鼠 DNA 进行扩增,最后配制 2% 琼脂糖凝胶并进行电泳,鉴定结果图 1 所示,凝胶条带仅显示 336 bp 条带的样本基因型为纯合子,即 CB1R^{-/-}小鼠;扩增条带仅显示 317 bp 条带的样本基因型为野生型,即 WT 小鼠;当扩增条带为两条,样本基因型为杂合子,即 CB1R^{+/-}小鼠。本研究中 CB1R^{-/-}阳性率为 23.5%。

1.3.3 行为学检测

(1)旷场实验,检测小鼠焦虑样行为。测试箱为顶部开口的 450 mm×450 mm×400 mm 黑灰色箱子,场地分为中心和外周区域。使用

SMART-OF 旷场实验系统记录实验鼠 10 min 的活动轨迹。

(2)自梳实验,评估小鼠的刻板行为。记录 10 min 内小鼠在箱子(320 mm×202 mm×135 mm)里梳理自身毛发的时间。

(3)埋珠实验,评估小鼠的重复刻板行为。在厚 4 cm 的垫料上以 5×3 的方式放置 15 个一致的大理石珠,记录实验鼠 10 min 内将 2/3 体积大理石珠子掩埋入垫料的个数。

(4)三箱实验,主要检测实验鼠社交行为。实验分为两个阶段。第一阶段:社交能力检测。记录实验鼠 10 min 内停留在装有陌生鼠 1 的箱室和装有空笼的箱室所花费的时间。第二阶段:社交偏好检测。将陌生鼠 1 放置于第一阶段空笼的位置,空笼中放入陌生鼠 2,比较实验鼠 10 min 内停留在装有陌生鼠 2 的箱室和装有陌生鼠 1 的箱室所花费的时间。

(5)新物体识别实验,用于评估小鼠的短期视觉识别记忆能力。实验包含训练和测试两个阶段。在训练阶段,将小鼠放在包含两个相同物体(A1+A2)的场地中探索 10 min,1 h 后进入测试阶段,用另一个新的物体(B)替换原来一个位置的物体(A1),并测试 5 min。记录并分析小鼠嗅闻新旧物体的时间。

(6)Morris 水迷宫,用于评估小鼠长期空间记忆能力。实验分为定位巡航实验和空间探索实

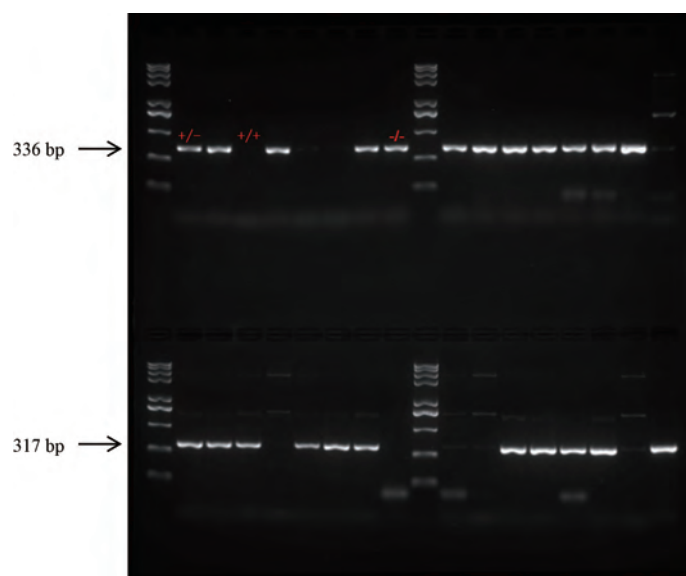


图 1 CB1R 敲除小鼠基因型鉴定的凝胶电泳结果

Figure 1 Gel electrophoresis of CB1R KO mouse genotype identification

验两个阶段,过程如下:定位巡航实验:在前 4 d 进行定位巡航实验,每天从不同象限将测试鼠放入场地,每天上下午各 1 次。记录 60 s 内实验鼠从入水到达平台所用的时间,记为逃逸潜伏期。若测试鼠在 60 s 内未找到平台,则将其引导至平台上记忆 15 s。空间探索实验:在第 5 天上午进行空间探索实验,实验时将平台撤出。待测鼠从定位巡航实验第 1 天放置的象限进入圆池,记录小鼠在 60 s 内通过原始平台的圆形区域的次数作为空间记忆的指标。

1.3.4 脑组织样本的采集与冰冻切片的制备

在行为学后采集小鼠脑组织样本。待实验鼠完全麻醉后断头,冰上分离海马组织, -80°C 保存。制备脑组织冰冻切片用 PBS 缓冲液及 4% 多聚甲醛灌注,取出脑组织后放入 4% 多聚甲醛中过夜固定,之后放入蔗糖溶液中梯度脱水,待结束后置于 OCT 包埋剂中,存入 -80°C 保存。切片时使用冰冻切片机,以冠状面获取海马及皮层区组织切片,切片厚度 $8\text{ }\mu\text{m}$,丙酮固定 20 min 后放入 -80°C 保存。

1.3.5 免疫荧光染色

免疫荧光染色检测 MAP2 的表达。稀释一抗 (1:100) 以覆盖整个脑组织, 4°C 孵育过夜;稀释二抗 (Alexa fluor 594-抗兔),比例为 1:1000,室温避光孵育 1 h;最后用含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜观察并拍照 (20 $\times$),并使用 Image J Fiji 1.2 软件分析数据,记录阳性神经元在海马 CA1 区和皮层区所占的面积。

1.3.6 蛋白免疫印迹实验

脑组织蛋白提取按照说明书进行,BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶,将各蛋白样品 (10 μL) 加至加样孔;以 200 V 电压电泳,然后 250 mA 恒流转膜 1 h,使用 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 1 h;按照说明书稀释一抗, VGAT (1:800)、PSD95 (1:4000)、VGLUT1 (1:2000)、Gephyrin (1:2000)、SYN1 (1:5000)、GAPDH (1:50 000) 4°C 冰箱摇床过夜孵育;TBST 缓冲液漂洗后,室温孵育二抗 1 h,利用超敏 ECL 化学发光显色液和凝胶成像系统显影。

1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行分析。组

间比较使用单因素方差分析, Morris 水迷宫实验运用双因素方差分析。差异显著时,则采用 Tukey 方法进行组间事后比较。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义,所有的数据以平均数 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x}\pm s\bar{x}$) 的形式呈现。

2 结果

2.1 CB1R 敲除对小鼠 ASD 样行为的影响

2.1.1 对小鼠焦虑及重复刻板行为的影响

在旷场实验中, VPA 小鼠活动距离显著多于 WT 小鼠 ($P<0.001$),且在中心区域停留时间百分比显著低于 WT 小鼠 ($P<0.05$),表现出明显的焦虑行为; CB1R^{+/−} 和 CB1R^{−/−} 小鼠在中心区域停留时间百分比也显著低于 WT 小鼠 ($P<0.001$)。同时,与 VPA 小鼠相比差异不具有统计学意义 ($P>0.05$) (图 2A~2C)。

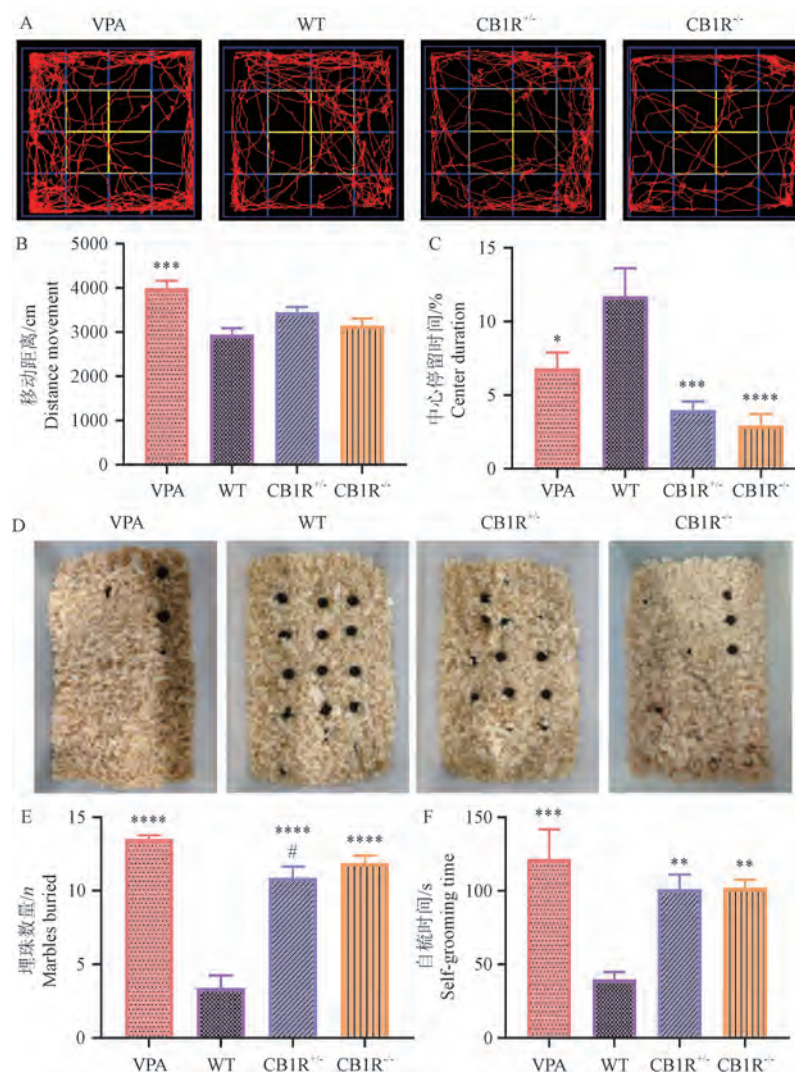
VPA 小鼠埋珠数量与自梳时间均明显高于 WT 小鼠 ($P<0.001$, 图 2D~2F),其重复刻板行为明显。 CB1R^{+/−} 和 CB1R^{−/−} 小鼠埋珠数量显著多于 WT 小鼠 ($P<0.0001$),其中 CB1R^{+/−} 小鼠埋珠数量显著低于 VPA 小鼠 ($P<0.05$, 图 2D); CB1R^{+/−} 和 CB1R^{−/−} 小鼠自梳时间显著高于 WT 小鼠 ($P<0.01$), CB1R^{+/−} 和 CB1R^{−/−} 小鼠自梳时间与 VPA 小鼠相比差异不具有统计学意义 ($P>0.05$) (图 2F)。

2.1.2 对小鼠社交功能的影响

社交能力测试结果 (图 3A~3B) 显示,与空笼柱相比, WT 小鼠更偏好探索陌生鼠 1 ($P<0.001$),其社交功能正常; VPA 小鼠探索空笼柱和陌生鼠 1 的时间无差异 ($P>0.05$),表现出明显的社交功能障碍; CB1R^{+/−} 和 CB1R^{−/−} 小鼠探索空笼柱和陌生鼠 1 的时间无差异 ($P>0.05$),出现类似于 VPA 小鼠的社交功能障碍。社交偏好测试结果 (图 3C~3D) 所示, WT 小鼠探索陌生鼠 2 的时间却显著长于探索陌生鼠 1 的时间 ($P<0.05$),其社交偏好正常; VPA 和 CB1R^{+/−} 小鼠探索陌生鼠 1 和陌生鼠 2 的时间差异不具有统计学意义 ($P>0.05$); CB1R^{−/−} 小鼠探索陌生鼠 2 的时间显著短于探索陌生鼠 1 的时间 ($P<0.001$)。

2.1.3 对小鼠认知记忆的影响

在新物体识别实验中, WT 小鼠更喜欢探索未知的新物体 ($P<0.01$),其短期认知功能正常;



注:A:小鼠运动轨迹的代表性图像;B:小鼠移动距离;C:小鼠在中心区域时间百分比;D:小鼠埋珠代表性图像;E:小鼠埋珠个数;F:小鼠自梳时间。与 WT 组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$;与 VPA 组相比,# $P<0.05$ 。

图 2 VPA 小鼠和 CB1R KO 小鼠的焦虑及重复刻板行为($n=8$)

Note. A, Representative image of the trajectory of the mice. B, Distance travelled by the mice. C, Percentage of time that the mice were in the center area. D, Representative images of mice marbles burying test. E, Number of marbles buried in mice. F, Self-grooming time in mice. Compared with WT group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. Compared with VPA group, # $P<0.05$.

Figure 2 Anxiety and repetitive stereotyped behaviors in VPA mice and CB1R KO mice($n=8$)

VPA 和 CB1R^{-/-}小鼠表现出更喜欢探索熟知的旧物体($P<0.05$);CB1R^{+/-}小鼠在探索新旧物体时间百分比上不存在统计学意义($P>0.05$)。具体见图 4A。在 Morris 水迷宫实验中,各组小鼠间训练潜伏期和测试中穿越平台次数差异均不具有统计学意义($P>0.05$,图 4B~4D)。

2.2 CB1R 敲除对小鼠突触可塑性的影响

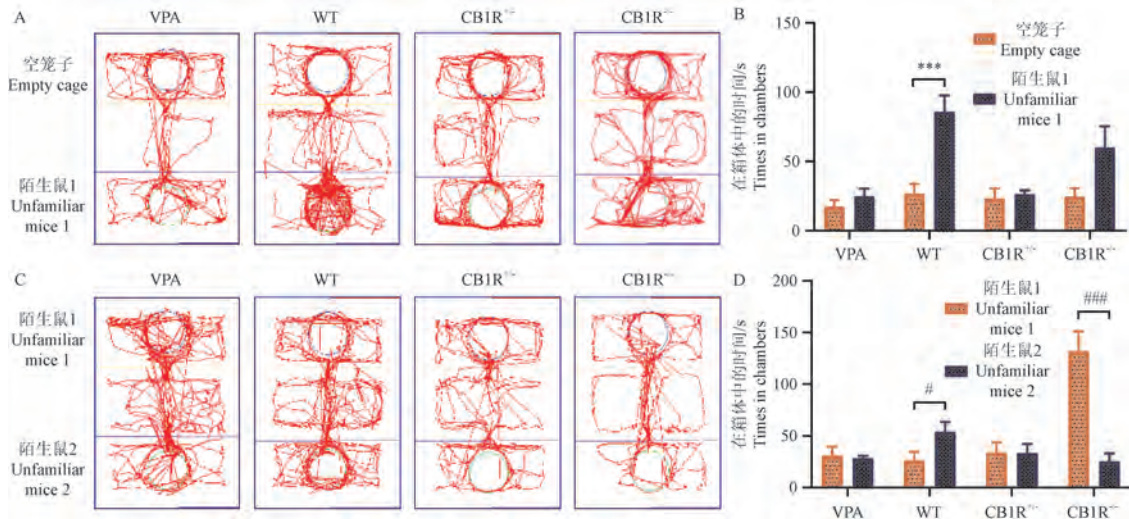
2.2.1 对小鼠神经元突触发育的影响

与 WT 小鼠相比,VPA、CB1R^{+/-}和 CB1R^{-/-}小鼠海马 CA1 区和皮层神经元树突出现不同程度

的曲折和破碎(图 5A),且 MAP2 阳性面积比均显著降低($P<0.05$);与 VPA 小鼠相比,CB1R^{+/-}、CB1R^{-/-}小鼠 MAP2 阳性面积比差异不具有统计学意义($P>0.05$)(图 5B~5C)。

2.2.2 对小鼠突触相关蛋白表达的影响

如图 6 所示,VPA 小鼠 PSD95 的表达水平显著高于 WT 小鼠($P<0.05$)。CB1R^{+/-}和 CB1R^{-/-}小鼠 SYN1 的表达水平显著高于 WT 小鼠($P<0.05$);CB1R^{+/-}和 CB1R^{-/-}小鼠 PSD95 的表达水平显著低于 VPA 小鼠($P<0.01$),其余各项指标

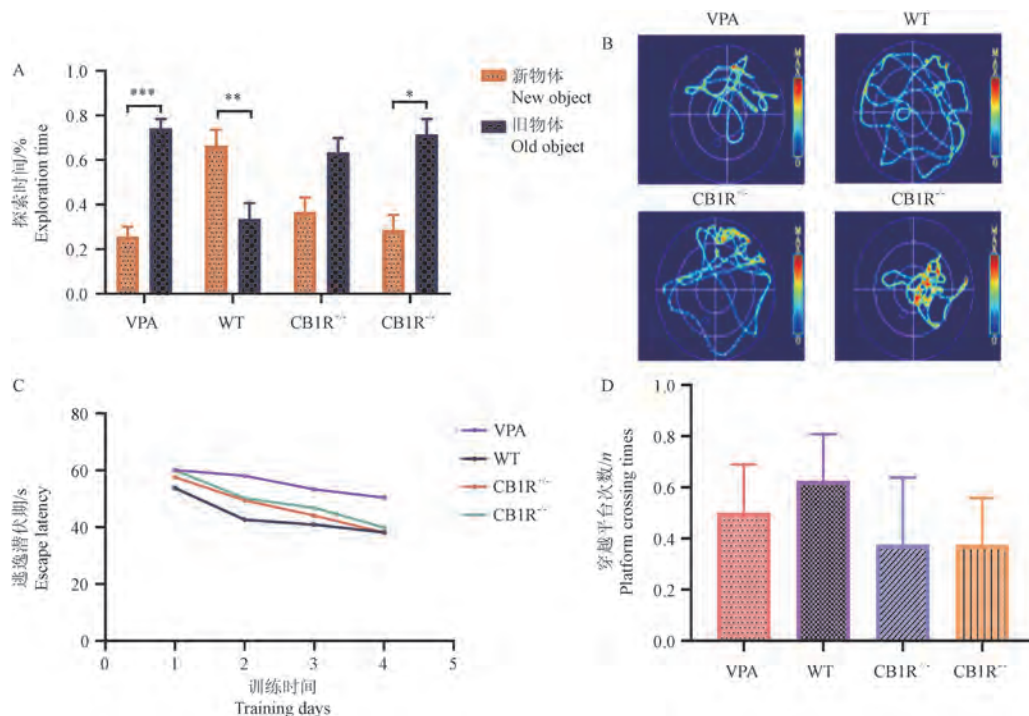


注:A:社交能力测试代表图像;B:社交能力测试中的时间占比;C:社交偏好测试的代表图;D:社交偏好测试中的时间占比。与陌生鼠1相比,*** $P<0.001$;与陌生鼠2相比,# $P<0.05$,### $P<0.001$ 。

图3 VPA小鼠和CB1R KO小鼠的三箱实验($n=8$)

Note. A, Representative image of the sociability test. B, Proportion of time in sociability test. C, Representative image of the social preference test. D, Proportion of time in social preference test. Compared with the unfamiliar mice 1, *** $P<0.001$. Compared with the unfamiliar mice 2, # $P<0.05$, ### $P<0.001$.

Figure 3 Three chamber test in VPA mice and CB1R KO mice ($n=8$)

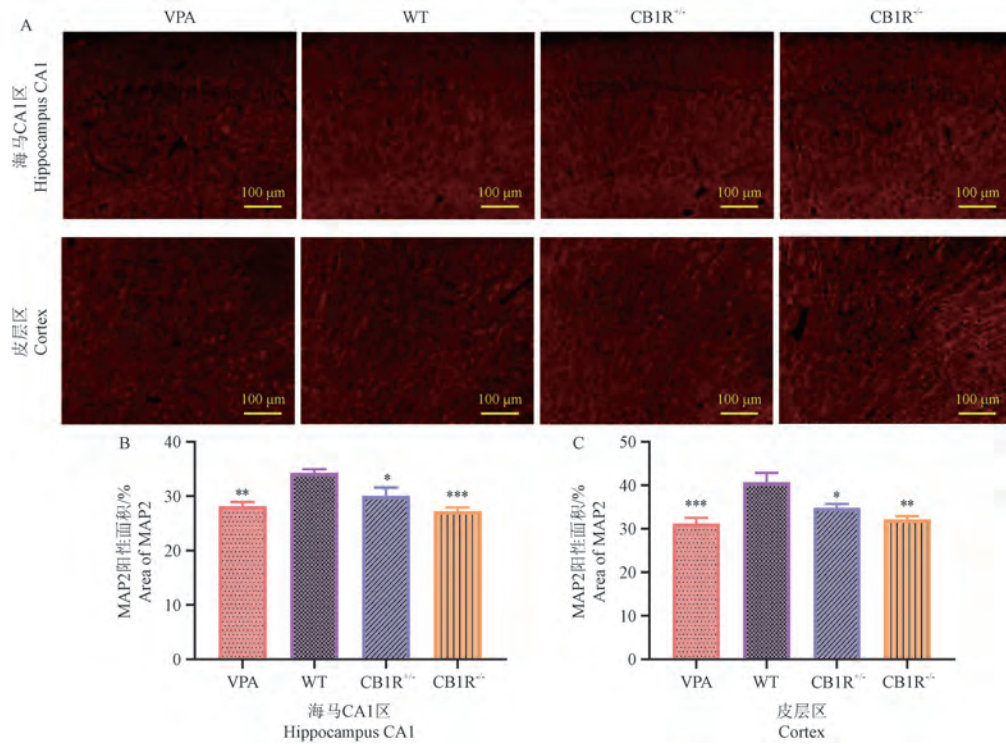


注:A:小鼠探索新旧物体的时间百分比;B:各组小鼠穿越平台追踪的代表性图像;C:各组小鼠到达平台的时间;D:各组小鼠的平台穿梭次数。与探索旧物体时间相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图4 VPA小鼠和CB1R KO小鼠的新物体识别及Morris水迷宫实验($n=8$)

Note. A, Percentage of time spent exploring new and old objects. B, Representative images of tracking across platforms in each group of mice. C, Latency time of mice to reach the platform. D, Number of platform shuttles in each group of mice. Compared with exploring old object, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 4 New object recognition and Morris water maze experiment in VPA mice and CB1R KO mice ($n=8$)

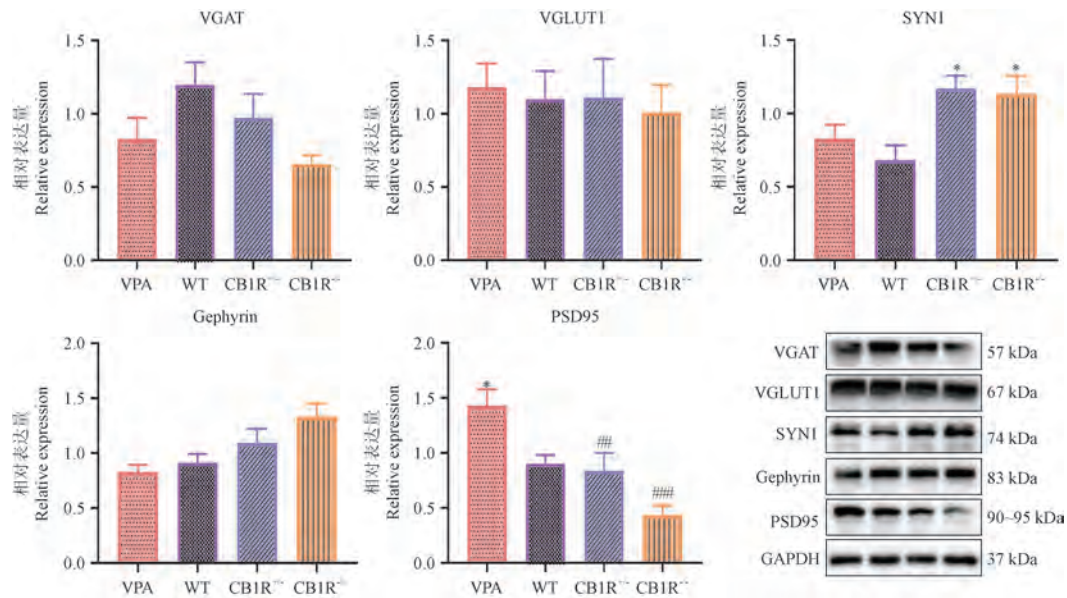


注:A:各组小鼠海马CA1区和皮层神经元MAP2的代表性图像;B:各组小鼠海马CA1区MAP2阳性面积占比;C:各组小鼠皮层区MAP2阳性面积占比。与WT组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图5 VPA小鼠和CB1R KO小鼠海马CA1区和皮层神经元中MAP2的表达($n=6$)

Note. A, Representative images of MAP2 in hippocampal CA1 area and cortical neurons in each group of mice. B, Percentage of MAP2-positive area in hippocampal CA1 area in each group of mice. C, Percentage of MAP2-positive area in cortical area in each group of mice. Compared with WT group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 5 MAP2 expression in hippocampal CA1 region and cortical neurons of VPA mice and CB1R KO mice($n=6$)



注:与WT组相比,* $P<0.05$;与VPA组相比,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

图6 VPA小鼠和CB1R KO小鼠海马中突触相关蛋白的表达水平($n=5$)

Note. Compared with WT group, * $P<0.05$. Compared with VPA group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

Figure 6 Expression levels of synapse-related proteins in the hippocampus of VPA mice and CB1R KO mice($n=5$)

在各组小鼠间两两比较差异不具有统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

ASD 是起病于婴幼儿早期的一种严重的神经发育障碍性疾病,潜在的病因机制仍不明确^[12]。研究表明突触可塑性异常可能是 ASD 发病的机制之一。CB1R 作为参与神经发生、细胞分化、神经迁移和轴突延伸的信使^[13-14],在维持突触的动态稳定中发挥重要作用。

ASD 核心症状为社交交流障碍、重复刻板行为,此外,有时也会伴有焦虑、过度活动和认知障碍^[12]。本研究诱导的 VPA 小鼠表现出明显的 ASD 样行为;CB1R^{-/-}小鼠也表现相似的 ASD 样行为,包括焦虑、重复刻板行为,社交能力和社交偏好缺陷以及短期视觉识别记忆受损。与以往研究结果一致,研究指出 CB1R^{-/-}小鼠在高架十字迷宫和明暗箱实验中表现出明显的焦虑行为^[9,15],同时,FANG 等^[16]发现激活 CB1R 可以增加急性应激大鼠在高架十字迷宫开放臂中的时间,对其焦虑有一定改善作用。CB1R 表达量在个体社会行为形成时期达到峰值^[17-18],FYKE 等^[19]通过测量超声交流发现 CB1R 敲除导致小鼠社交功能受损,在三箱实验和直接社交互动测验中也表现出了明显的社交兴趣及探索缺陷。CB1R 还参与调控认知及记忆功能,SARAVIA 等^[20]发现 CB1R^{-/-}小鼠表现出注意力及记忆功能受损;对小鼠施用 CB1R 激动剂能提升其在水迷宫中的空间记忆能力^[21]。此外,本研究表明 CB1R^{+/-}小鼠也表现出部分样的 ASD 行为,包括焦虑、重复刻板行为及社交功能缺陷,但与 VPA 小鼠相比,CB1R^{+/-}小鼠的重复刻板行为表现较轻,也并未出现短期记忆缺陷,这可能是由于保留了部分 CB1R 功能,降低了其 ASD 样行为的损伤程度。综上所述,以上研究均提示 CB1R 参与调控小鼠的 ASD 样行为。

MAP2 作为神经元树突内的主要骨架调节因子,对树突的发育形成起关键性的作用^[22-23]。已发现 ASD 患者额叶新皮层树突中 MAP2 表达缺失^[24],ASD 模型鼠中 MAP2 蛋白表达显著降低^[25]。本研究同样发现 VPA 小鼠海马 CA1 区和大脑皮层 MAP2 阳性面积显著降低,树突结构出

现明显曲折破碎,同时,CB1R KO 小鼠也表现出与 ASD 模型鼠相似的神经元树突结构受损。通过检测突触相关蛋白的表达水平,还发现 VPA 小鼠 PSD95 表达异常,CB1R^{+/-}和 CB1R^{-/-}小鼠 SYN1 表达异常。SYN1 作为突触囊泡膜的主要成分,与神经递质释放和突触发生的调节有关^[26];PSD95 是突触后膜的关键组成部分,在谷氨酸能传递、突触可塑性和树突棘形态发生中发挥了重要作用^[27],其稳定表达共同调节神经系统突触可塑性。人群和动物研究均表明 PSD95 与 SYN1 的失调是 ASD 的神经病理学基础之一^[27-28]。REXRODE 等^[29]研究发现 ASD 儿童海马组织中 SYN1 和 PSD95 蛋白表达降低,进一步导致海马体积改变引起社会记忆功能障碍;在动物研究中,LIU 等^[30]发现 VPA 大鼠前额叶皮层中 SYN1 表达增加,且其长时程增强作用受损,IJIMA 等^[31]认为 VPA 小鼠兴奋性/抑制性平衡受损是由谷氨酸能突触中 PSD95 数量增加导致的。CB1R 定位于突触前膜,研究表明 CB1R 可通过抑制 cAMP-蛋白激酶 A (PKA) 信号通路,减少 SYN1 的磷酸化水平,从而抑制突触囊泡的释放,此外,CB1R 可以通过调节 CaMKII 等激酶活性进一步作用于突触后影响 PSD95 的表达^[32]。有研究证实了激活 CB1R 可以使慢性偏头痛大鼠模型中异常升高的 PSD95 和其他突触信息素恢复至正常水平^[33]。上述研究说明 ASD 中存在树突发育异常及突触蛋白表达异常,同时,CB1R 的敲除导致小鼠也呈现出相似的突触损伤。

本研究以 CB1R KO 小鼠与 VPA 小鼠作为研究对象,初步发现 CB1R KO 小鼠出现 ASD 样行为,且突触可塑性异常,提示 CB1R 表达异常可通过影响突触的结构和功能导致 ASD 样行为的发生。但本研究使用 CB1R KO 小鼠,不能排除外周神经系统中 CB1R 的作用对研究结果的干扰,后期将采用脑靶向干预或神经元条件敲除鼠开展深入研究;同时,本研究仅观察到各组小鼠树突形态与突触蛋白水平表达的变化,未深入探究 CB1R 影响突触可塑性的潜在机制。未来将利用蛋白质组学分析及电生理技术进一步探讨 CB1R 调控突触可塑性的潜在机制。

综上所述,CB1R 敲除会导致小鼠表现出 ASD 样行为,同时伴有神经元损伤、树突发育障

碍及突触蛋白表达紊乱,提示 CB1R 敲除导致的突触可塑性异常可能是 ASD 样行为发生的病理机制,为 ASD 病因学研究提供新的方向和依据。

参考文献:

- [1] MAENNER M J, SHAW K A, BAKIAN A V, et al. Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years—autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2018 [J]. *MMWR Surveill Summ*, 2021, 70(11): 1–16.
- [2] ALSAQATI M, HEINE V M, HARWOOD A J. Pharmacological intervention to restore connectivity deficits of neuronal networks derived from ASD patient iPSC with a TSC2 mutation [J]. *Mol Autism*, 2020, 11(1): 80.
- [3] CHENG N, ALSHAMMARI F, HUGHES E, et al. Dendritic overgrowth and elevated ERK signaling during neonatal development in a mouse model of autism [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179409.
- [4] QI C, CHEN A, MAO H, et al. Excitatory and inhibitory synaptic imbalance caused by brain-derived neurotrophic factor deficits during development in a valproic acid mouse model of autism [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 860275.
- [5] GAŚSOWSKA-DOBROWOLSKA M, CIEŚLIK M, CZAPSKI G A, et al. Prenatal exposure to valproic acid affects microglia and synaptic ultrastructure in a brain-region-specific manner in young-adult male rats; relevance to autism spectrum disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10): 3576.
- [6] FLETCHER-JONES A, HILDICK K L, EVANS A J, et al. Protein interactors and trafficking pathways that regulate the cannabinoid type 1 receptor (CB1R) [J]. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13: 108.
- [7] MORENO E, CAVIC M, KRIVOKUCA A, et al. The endocannabinoid system as a target in cancer diseases: are we there yet? [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 339.
- [8] KASATKINA L A, RITTCHEN S, STURM E M. Neuroprotective and immunomodulatory action of the endocannabinoid system under neuroinflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5431.
- [9] SORIANO D, BRUSCO A, CALTANA L. Further evidence of anxiety-and depression-like behavior for total genetic ablation of cannabinoid receptor type 1 [J]. *Behav Brain Res*, 2021, 400: 113007.
- [10] ZOU S, KUMAR U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 833.
- [11] ECKER C, BOOKHEIMER S Y, MURPHY D G M. Neuroimaging in autism spectrum disorder: brain structure and function across the lifespan [J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(11): 1121–1134.
- [12] PIETROPAOLO S, BELLOCCHIO L, BOUZÓN-ARNÁIZ I, et al. The role of the endocannabinoid system in autism spectrum disorders: Evidence from mouse studies [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2020, 173: 183–208.
- [13] PARAÍSO-LUNA J, AGUARELES J, MARTÍN R, et al. Endocannabinoid signalling in stem cells and cerebral organoids drives differentiation to deep layer projection neurons *via* CB₁ receptors [J]. *Development*, 2020, 147(24): dev192161.
- [14] RUIZ-CONTRERAS H A, SANTAMARÍA A, ARELLANO-MENDOZA M G, et al. Modulatory activity of the endocannabinoid system in the development and proliferation of cells in the CNS [J]. *Neurotox Res*, 2022, 40(6): 1690–1706.
- [15] MARTIN M, LEDENT C, PARMENTIER M, et al. Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2002, 159(4): 379–387.
- [16] FANG G, WANG Y. Transcranial direct current stimulation (tDCS) produce anti-anxiety response in acute stress exposure rats *via* activation of amygdala CB1R [J]. *Behav Brain Res*, 2021, 400: 113050.
- [17] CAO W, ZHU H, LI Y, et al. The development of brain network in males with autism spectrum disorders from childhood to adolescence: evidence from fNIRS study [J]. *Brain Sci*, 2021, 11(1): 120.
- [18] CORBETT B A, VANDEKAR S, MUSCATELLO R A, et al. Pubertal timing during early adolescence: advanced pubertal onset in females with autism spectrum disorder [J]. *Autism Res*, 2020, 13(12): 2202–2215.
- [19] FYKE W, PREMOLI M, ECHEVERRY ALZATE V, et al. Communication and social interaction in the cannabinoid-type 1 receptor null mouse; Implications for autism spectrum disorder [J]. *Autism Res*, 2021, 14(9): 1854–1872.
- [20] SARAIVIA R, FLORES Á, PLAZA-ZABALA A, et al. CB₁ cannabinoid receptors mediate cognitive deficits and structural plasticity changes during nicotine withdrawal [J]. *Biol Psychiatry*, 2017, 81(7): 625–634.
- [21] PATRICIO-MARTÍNEZ A, SÁNCHEZ-ZAVALA R, ANGULO-CRUZ I, et al. The acute activation of the CB1 receptor in the hippocampus decreases neurotoxicity and prevents spatial memory impairment in rats lesioned with β -amyloid 25-35 [J]. *Neuroscience*, 2019, 416: 239–254.
- [22] SORIANO D, VACOTTO M, BRUSCO A, et al. Neuronal and synaptic morphological alterations in the hippocampus of

- cannabinoid receptor type 1 knockout mice [J]. J Neurosci Res, 2020, 98(11): 2245–2262.
- [23] DEGOSIO R A, GRUBISHA M J, MACDONALD M L, et al. More than a marker: potential pathogenic functions of MAP2 [J]. Front Mol Neurosci, 2022, 15: 974890.
- [24] MUKAETOVA-LADINSKA E B, ARNOLD H, JAROS E, et al. Depletion of MAP2 expression and laminar cytoarchitectonic changes in dorsolateral prefrontal cortex in adult autistic individuals [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2004, 30(6): 615–623.
- [25] GĄSSOWSKA-DOBROWOLSKA M, KOLASA A, BEVERSDORF D Q, et al. Alterations in cerebellar microtubule cytoskeletal network in a ValproicAcid-induced rat model of autism spectrum disorders [J]. Biomedicines, 2022, 10(12): 3031.
- [26] BALDELLI P, FASSIO A, VALTORTA F, et al. Lack of synapsin I reduces the readily releasable pool of synaptic vesicles at central inhibitory synapses [J]. J Neurosci, 2007, 27(49): 13520–13531.
- [27] COLEY A A, GAO W J. PSD95: a synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2018, 82: 187–194.
- [28] FEYDER M, KARLSSON R M, MATHUR P, et al. Association of mouse Dlg4 (*PSD-95*) gene deletion and human DLG4 gene variation with phenotypes relevant to autism spectrum disorders and Williams' syndrome [J]. Am J Psychiatry, 2010, 167(12): 1508–1517.
- [29] REXRODE L E, HARTLEY J, SHOWMAKER K C, et al. Molecular profiling of the hippocampus of children with autism spectrum disorder [J]. Mol Psychiatry, 2024, 29(7): 1968–1979.
- [30] LIU H, TAN M, CHENG B, et al. Valproic acid induces autism-like synaptic and behavioral deficits by disrupting histone acetylation of prefrontal cortex *ALDH1A1* in rats [J]. Front Neurosci, 2021, 15: 641284.
- [31] IJIMA Y, BEHR K, IJIMA T, et al. Distinct defects in synaptic differentiation of neocortical neurons in response to prenatal valproate exposure [J]. Sci Rep, 2016, 6: 27400.
- [32] PATZKE C, DAI J, BROCKMANN M M, et al. Cannabinoid receptor activation acutely increases synaptic vesicle numbers by activating synapsins in human synapses [J]. Mol Psychiatry, 2021, 26(11): 6253–6268.
- [33] ZENG X, MAI J, XIE H, et al. Activation of CB1R alleviates central sensitization by regulating HCN2-pNR2B signaling in a chronic migraine rat model [J]. J Headache Pain, 2023, 24(1): 44.

〔收稿日期〕2024-10-16

徐可欣,王丹丹,金泓宇,等. 毛兰素通过调节 HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 信号通路缓解特应性皮炎 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(4): 11-20.

Xu KX, Wang DD, Jin HY, et al. Erianin alleviates atopic dermatitis by regulating the HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 11-20.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.002

毛兰素通过调节 HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 信号通路缓解特应性皮炎

徐可欣^{1,2}, 王丹丹^{1,2}, 金泓宇^{1,2}, 杜月^{1,2}, 李莉^{1,2}, 宋艺兰^{1,2},
延光海^{1,2}, 李良昌^{1,2*}

(1.延边大学吉林常见过敏性疾病免疫与靶向研究重点实验室, 吉林 延吉 133002;
2.延边大学医学院, 吉林 延吉 133002)

【摘要】 目的 探究毛兰素(Erianin)在特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)中的作用及其在高迁移率族蛋白1(high mobility group box-1, HMGB1)/晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)-Ras 同源基因家族成员A(Ras homolog gene family member A, RhoA)/Rho 关联含卷曲螺旋结合蛋白激酶1(recombinant Rho associated coiled coil containing protein kinase 1, ROCK1)信号通路中的调控机制。**方法** 1-氯-2,4-二硝基苯(1-Chloro-2,4-dinitrobenzene, DNCB)诱导 BALB/c 小鼠作为 AD 的模型,测量小鼠的皮肤厚度、脾和淋巴结的重量。甲苯胺蓝和 HE 染色检测小鼠的背部皮肤和耳朵的病理改变;ELISA 检测炎症因子水平;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)刺激 HaCaT 细胞建立 AD 体外模型;采用流式细胞术检测细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS);免疫荧光法检测线粒体活性氧(mitochondrion reactive oxygen species, mtROS);TUNEL 检测细胞凋亡情况;免疫蛋白印迹法检测 HMGB1、RAGE、RhoA、ROCK1 蛋白表达情况。**结果** 在体内实验中毛兰素抑制皮肤厚度的增加,减轻脾和淋巴结重量,改善炎症细胞的浸润和肥大细胞脱颗粒,降低炎症因子水平($P<0.05$)。在体外实验中,毛兰素减少 TNF- α 诱导的 HaCaT 细胞 ROS、mtROS 的产生($P<0.01$)。毛兰素治疗后 HMGB1、RAGE、RhoA 及 ROCK1 的蛋白表达量下降($P<0.01$);使用 RAGE 特异性阻断剂(TFA)处理 r-HMGB1 刺激的 HaCaT 细胞后, HMGB1 的表达没有发生变化, RAGE、RhoA 及 ROCK1 表达减少($P<0.01$);在 Rho 激酶抑制剂 Y-27632+r-HMGB1 组中,除 RAGE 的表达没有降低,其余结果与 TFA+r-HMGB1 组相近。**结论** 毛兰素可能通过调节 HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 信号通路缓解特应性皮炎。

【关键词】 毛兰素;特应性皮炎;HMGB1;RAGE;RHOA;ROCK1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0011-10

Erianin alleviates atopic dermatitis by regulating the HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 signaling pathway

【基金项目】 国家自然科学基金(82060008);吉林省科技厅项目(YDZJ202201ZYTS140)。

【作者简介】 徐可欣(2000—),女,在读硕士研究生,研究方向:过敏性疾病。E-mail:1806454672@qq.com

【通信作者】 李良昌(1978—),男,博士,教授,研究方向:过敏性疾病。E-mail:lclee@ybu.edu.cn

XU Kexin^{1,2}, WANG Dandan^{1,2}, JIN Hongyu^{1,2}, DU Yue^{1,2}, LI Li^{1,2}, SONG Yilan^{1,2},
YAN Guanghai^{1,2}, LI Liangchang^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Immunology and Targeted Research on Common Allergic Diseases in Jilin, Yanbian University, Yanji 133002, China. 2. School of Medicine, Yanbian University, Yanji 133002)

【Abstract】 Objective To explore the role of Erianin in atopic dermatitis (AD) and its regulatory mechanism involving the high-mobility group box 1 (HMGB1)/receptor for advanced glycation end products (RAGE)-Ras homolog gene family member A (RhoA)/Rho-associated protein kinase 1 (ROCK1) signaling pathway. **Methods** An AD model was induced in BALB/c mice using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB). Skin thickness and spleen and lymph node weight were measured and pathological changes in the back skin and ears were detected using methyamine blue and hematoxylin and eosin staining. Inflammatory factors were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. An *in vitro* model of AD was established in HaCaT cells stimulated by tumor necrosis factor (TNF)- α . Cellular reactive oxygen species (ROS) were detected by flow cytometry and mitochondrial ROS (mtROS) were detected by immunofluorescence assay. Cell apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling. HMGB1, RAGE, RhoA, and ROCK1 proteins were detected by Western blot. **Results** Erianin inhibited the increase in skin thickness, reduced the spleen and lymph node weights, improved the infiltration of inflammatory cells and the degranulation of mast cells, and reduced the levels of inflammatory factors ($P < 0.05$). Erianin also reduced the production of cellular ROS and mtROS induced by TNF- α *in vitro* ($P < 0.01$), and decreased the protein expression of HMGB1, RAGE, RhoA, and ROCK1 ($P < 0.01$). Treatment of HMGB1-stimulated HaCaT cells with a RAGE-specific blocker (TFA) had no effect on HMGB1 expression, while expression levels of RAGE, RhoA, and ROCK1 were decreased ($P < 0.01$). Cells treated with the Rho kinase inhibitor Y-27632 + r-HMGB1 group showed similar result to the TFA + r-HMGB1 group, except for RAGE. **Conclusions** Erianin relieves AD by regulating the HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK signaling pathway.

【Keywords】 Erianin; atopic dermatitis; HMGB1; RAGE; RhoA; ROCK1

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

特应性皮炎 (atopic dermatitis, AD) 是一种常见的慢性炎症性皮肤病^[1-2], 且常合并哮喘、过敏性鼻炎等其他过敏性疾病^[3]。AD 目前还无法完全治愈, 临床上的治疗主要集中于缓解症状, 减少复发, 严重影响患者生存质量。

毛兰素 (2-methoxy-5-(2-(3, 4, 5-trimethoxyphenyl)-phenol), Erianin) 是一种从石斛中分离出来的天然产物^[4], 具有抗氧化和抗炎活性^[5-6]。DOU 等^[7]研究表明, 毛兰素通过协同调节 TLR4 和 STAT3 在葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠溃疡性结肠炎中发挥抗炎作用。也有研究表明毛兰素抑制 NF- κ B 信号通路调控肺泡巨噬细胞 M1 极化^[8]。因此, 毛兰素有望成为一种治疗 AD 的天然药物。高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box-1, HMGB1) 是一种有效的炎症调节剂, 参与机体炎症反应^[9]。有研究表明, 在 AD 中, HMGB1 蛋白表达量升高^[10]。应用 HMGB1 抑制剂或 RAGE 抑制剂可减少巨噬细胞/小胶质细胞

的数量, 同时增加抗炎细胞的数量^[11]。

目前, 关于 HMGB1/RAGE 信号通路在 AD 中的作用还不清楚, 因此, 本文旨在探究毛兰素对 AD 的作用及其在 HMGB1/RAGE 信号通路中的调控机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

40 只雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠, 6 周龄, 体重 18~25 g。购自延边大学实验动物中心 [SCXK (吉) 2022-0005], 所有小鼠饲养于延边大学实验动物中心 [SYXK (吉) 2020-0009]。所有动物实验过程均由延边大学医学院伦理委员会批准 (YD20240530003), 本实验全程遵循 3R 原则。

1.1.2 细胞

HaCaT 细胞, 即非肿瘤源性的人永生化角质形成细胞, 购自丰晖生物科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

毛兰素(货号:B20844-100 mg)购于上海源叶科技生物有限公司;HE 试剂盒(货号:G1120-100 mL)购自索莱宝科技有限公司;甲苯胺蓝(货号:G3670-100 mL)购自索莱宝科技有限公司;HMGB1(货号:ab190377)、RAGE(货号:ab216329)购自 Abcam 公司;RhoA(货号:bs-1180R)购自 BIOSS 公司;ROCK1(货号:28999)购自 CST 公司;ROS Assay 试剂盒(货号:ab186029)购自 Abcam 公司;胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP) ELISA 试剂盒(货号:CSB-RA025141A1HU)、白介素-4(interleukin-4, IL-4)(货号:CSB-RA240377A0HU)、白介素-13(interleukin-13, IL-13)(货号:CSB-E04601 h-IS)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)(货号:CSB-EP024154HUe1)购自华美生物有限公司;MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator 试剂盒(货号:M36008)购自 Invitrogen 公司。

厚度测量仪购自威海新威量量具有限公司;数字扫描显微成像系统 Slide Scanning Image System 购自强生科技有限公司;CytoFLEX 流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特有限公司;Cytation 5 购自美国博腾仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型的建立及分组

采用 1-氯-2,4-二硝基苯(1-Chloro-2,4-dinitrobenzene, DNCB)诱导 AD 模型。将 40 只 BALB/c 小鼠随机取 8 只作为对照组、剩下的 32 只小鼠建立 AD 模型。用电动剃毛刀剔除小鼠背部毛发,面积约为 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 。将 1% DNCB 溶液应用于小鼠的背部,每周 3 次,给药 1 周,进行致敏。休息 1 周后,用 0.5% DNCB 溶液,每周 3 次,连续给药 3 周进行激发,建立小鼠特异性皮炎模型。

实验分为对照(Control)组、模型(AD)组、毛兰素低剂量治疗(AD+EL)组、毛兰素高剂量治疗(AD+EH)组、地塞米松阳性对照(AD+DXM)组。对照组和模型组:腹腔注射等体积的生理盐水;毛兰素低剂量治疗组:腹腔注射毛兰素 5 mg/kg ;毛兰素高剂量治疗组:腹腔注射毛兰素 15 mg/kg ;地塞米松阳性对照组:腹腔注射地塞米

松 2.5 mg/kg 。以上各组在激发阶段第 1 天 8:00 开始给药,给药 1 d,休息 1 d,共给药 10 次。

1.3.2 样本收集

模型建立后第 2 天 8:00 进行实验,处死小鼠,取小鼠背皮、耳朵。用厚度测量仪测量小鼠背部皮肤和耳朵的厚度,进行记录。

1.3.3 苏木素-伊红(HE)染色和甲苯胺蓝染色

用 4%多聚甲醛固定小鼠背部皮肤和耳朵 4 周后,对组织进行脱水处理,用石蜡进行包埋,且切成 $3\text{ }\mu\text{m}$ 的组织切片。将组织切片分别用 HE 和甲苯胺蓝试剂盒进行染色,用载玻片扫描系统对图片进行处理分析。

1.3.4 ELISA 检测

将小鼠皮肤组织研磨成匀浆,离心 10 min。采用 ELISA 试剂盒检测 TSLP、IL-4、IL-13、TNF- α 的含量。

1.3.5 细胞模型的建立及分组

用 DMEM 培养液培养 HaCaT 细胞,置于 CO_2 培养箱培养。培养至对数生长期后,进行实验分组。实验分为对照(Control)组、细胞模型(TNF- α)组、毛兰素低剂量治疗(TNF- α +EL)组、毛兰素高剂量治疗(TNF- α +EH)组。对照组:用 DMEM 培养液培养 24 h;细胞模型组:用含 $10\text{ }\mu\text{g/L}$ TNF- α 的 DMEM 培养液培养 24 h;毛兰素低剂量治疗组:在 TNF- α 诱导前 2 h 将毛兰素 1 nmol/L 加入细胞培养基中培养 24 h;毛兰素高剂量治疗组:在 TNF- α 诱导前 2 h 将毛兰素 4 nmol/L 加入细胞培养基中培养 24 h。

为了验证毛兰素是否通过 HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 信号轴来缓解 AD,将实验分为对照(Control)组、r-HMGB1 组、TFA+r-HMGB1 组、Y-27632+r-HMGB1 组。对照组:用 DMEM 培养液培养 24 h;r-HMGB1 组:加入重组的 HMGB1(r-HMGB1)刺激后,用 DMEM 培养液培养 24 h;TFA+r-HMGB1 组:用 RAGE 的抑制剂 TFA 处理 r-HMGB1 诱导 HaCaT 细胞后,用 DMEM 培养液培养 24 h;Y-27632+r-HMGB1 组:用 RhoA/ROCK1 特异性的抑制剂 Y-27632 处理 r-HMGB1 诱导 HaCaT 细胞后,用 DMEM 培养液培养 24 h。

1.3.6 活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测

取对数生长期的 HaCaT 细胞进行消化,制备

细胞悬液,按 $3 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞浓度接种于 6 孔板内,根据各实验分组加入相应的药物作用 24 h。弃去培养液,使用 ROS Assay 试剂盒进行 ROS 检测,将 HaCaT 细胞与荧光探针在 37°C 孵育 30 min 后 PBS 清洗,离心重悬,采用流式细胞仪对各实验分组的 HaCaT 细胞进行活性氧检测。

1.3.7 线粒体活性氧 (mitochondrion reactive oxygen species, mtROS) 检测

取对数生长期的 HaCaT 细胞进行消化,制备细胞悬液,接种于 6 孔板内,根据各实验分组加入相应的药物作用 24 h。弃去培养液,PBS 清洗,使用 MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator 试剂盒检测 mtROS。将染料与细胞共同孵育 30 min 后 PBS 清洗,加入含 DAPI 的抗荧光猝灭封闭液。采用 Cytation 5 仪器对各实验分组的 HaCaT 细胞进行分析。

1.3.8 TUNEL 检测

取对数生长期的 HaCaT 细胞进行消化,制备细胞悬液,接种于 6 孔板内,根据各实验分组加入相应的药物作用 24 h。弃去培养液,PBS 清洗,使用一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒进行荧光检测。细胞固定后通透 10 min,加入 TUNEL 溶液孵育 30 min。使用 Cytaion 5 仪器对各实验分组的 HaCaT 细胞进行凋亡检测。

1.3.9 Western blot

将 HaCaT 细胞按各实验分组加入相应的药物作用 24 h 后,收集到离心管中离心,去除上清液,加入 RIPA 蛋白裂解液,静置 30 min,采用 BCA 法进行蛋白浓度的测定。用 10% SDS-PAGE 的分离胶进行电泳,转膜,奶粉封闭。一抗 4°C 孵育过夜,包括 HMGB1、RAGE、RhoA、ROCK1。二

抗室温孵育 1 h。用 ECL 进行显色处理,采用 Quantity One 1.0 软件检测,使用 Image J 2.0.0 软件分析蛋白表达水平。

1.4 统计学方法

采用 Prism 10.0 软件进行统计学分析。数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 毛兰素对 AD 小鼠背部皮肤及耳朵厚度的影响

为了探究毛兰素对 AD 的治疗作用。与对照组相比,模型组小鼠的背部皮肤和耳朵厚度显著增加,出现显著的 AD 样病变,如出血、水肿、表皮脱落等($P < 0.05$)。与模型组相比,毛兰素治疗后减轻了小鼠背侧皮肤和耳朵厚度及 AD 样病变($P < 0.05$),见图 1,表 1。以上结果表明,毛兰素治疗可以降低 AD 小鼠的皮肤厚度,有缓解 AD 的作用。

2.2 毛兰素对 AD 小鼠背部皮肤及耳朵的组织病理学影响

采用 HE 染色和甲苯胺蓝染色法观察 AD 小鼠背部皮肤及耳朵的组织病理学变化。如图 2A 所示,毛兰素治疗后,AD 小鼠的背部皮肤和耳朵的棘层厚度减少。如图 2B 所示,肥大细胞浸润减少,脱颗粒现象明显缓解。以上结果说明,毛兰素可以改善 AD 小鼠的皮肤棘层厚度,减缓 AD 小鼠中的肥大细胞脱颗粒情况。

2.3 毛兰素对 AD 小鼠炎症因子表达的影响

为研究毛兰素对小鼠血清 AD 相关炎症因子

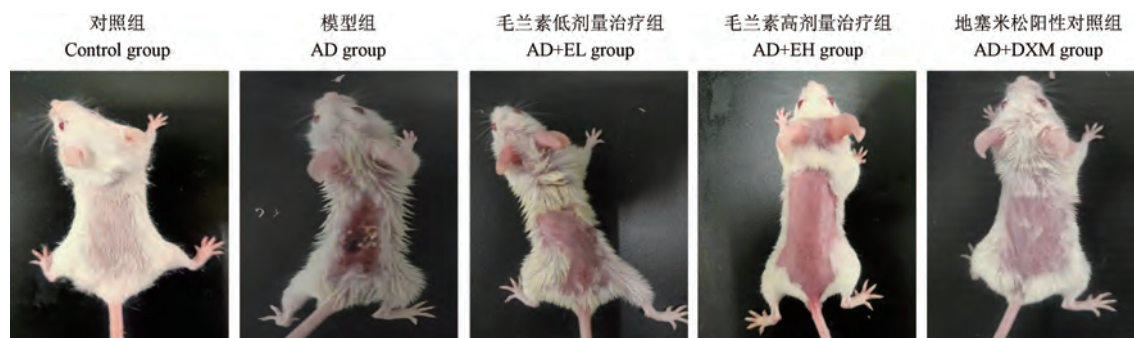


图 1 不同组 AD 小鼠皮肤和耳朵的大体形态变化

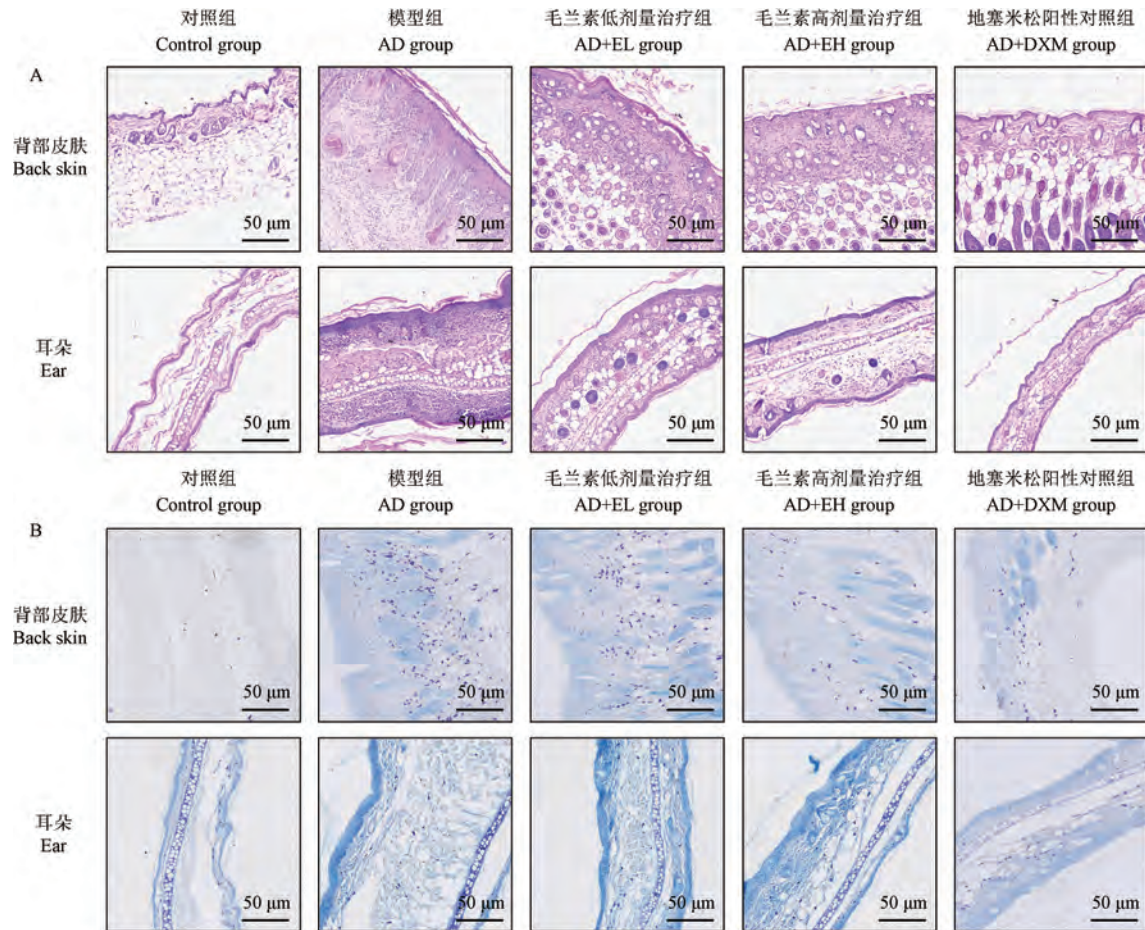
Figure 1 Gross morphological changes of skin and ears in different groups of AD mice

的影响,采用 ELISA 法检测细胞因子的表达情况。结果见表 2,与对照组相比,模型组小鼠的 TSLP、IL-4、IL-13、TNF- α 的含量显著上升 ($P < 0.05$)。经毛兰素治疗后,AD 相关炎症因子显著下降 ($P < 0.05$)。以上结果表明,毛兰素可通过下调 AD 相关炎症因子的表达来改善炎症反应。

表 1 各组小鼠背部皮肤及耳朵的厚度 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 1 Thickness of back skin and ears in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Groups	背部皮肤厚度/ μm Back skin thickness	耳朵厚度/ μm Ear thickness
对照组 Control group	56.00 $\pm$ 0.14	25.00 $\pm$ 0.17
模型组 AD group	129.00 $\pm$ 0.26 [*]	67.00 $\pm$ 0.32 [*]
毛兰素低剂量治疗组 AD+EL group	108.00 $\pm$ 0.11 ^{**#}	51.00 $\pm$ 0.36 ^{*#}
毛兰素高剂量治疗组 AD+EH group	94.00 $\pm$ 0.24 ^{**#}	46.00 $\pm$ 0.27 ^{**##}
地塞米松阳性对照组 AD+DXM group	79.00 $\pm$ 0.06 ^{**##}	32.00 $\pm$ 0.08 ^{**##}

注:与对照组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与模型组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。
Note. Compared with Control group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$. Compared with AD group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.



注:A;HE 检测棘层厚度的变化;B:甲苯胺蓝染色观察肥大细胞的数量和脱颗粒情况。

图 2 毛兰素对 AD 小鼠背部皮肤及耳朵的组织病理学影响

Note. A, HE to detect changes in spinous layer thickness. B, Observe the number and degranulation of mast cells using methylene blue staining.

Figure 2 Histopathological effects of Erianin on the back skin and ears of AD mice

2.4 毛兰素抑制 TNF-α 诱导的 HaCaT 细胞中 ROS 和 mtROS 的产生

细胞中 ROS 和 mtROS 产生的影响,采用流式细胞术检测 ROS,免疫荧光检测 mtROS。结果如图 3A 所示,与 TNF-α 组相比,毛兰素可以显著抑制

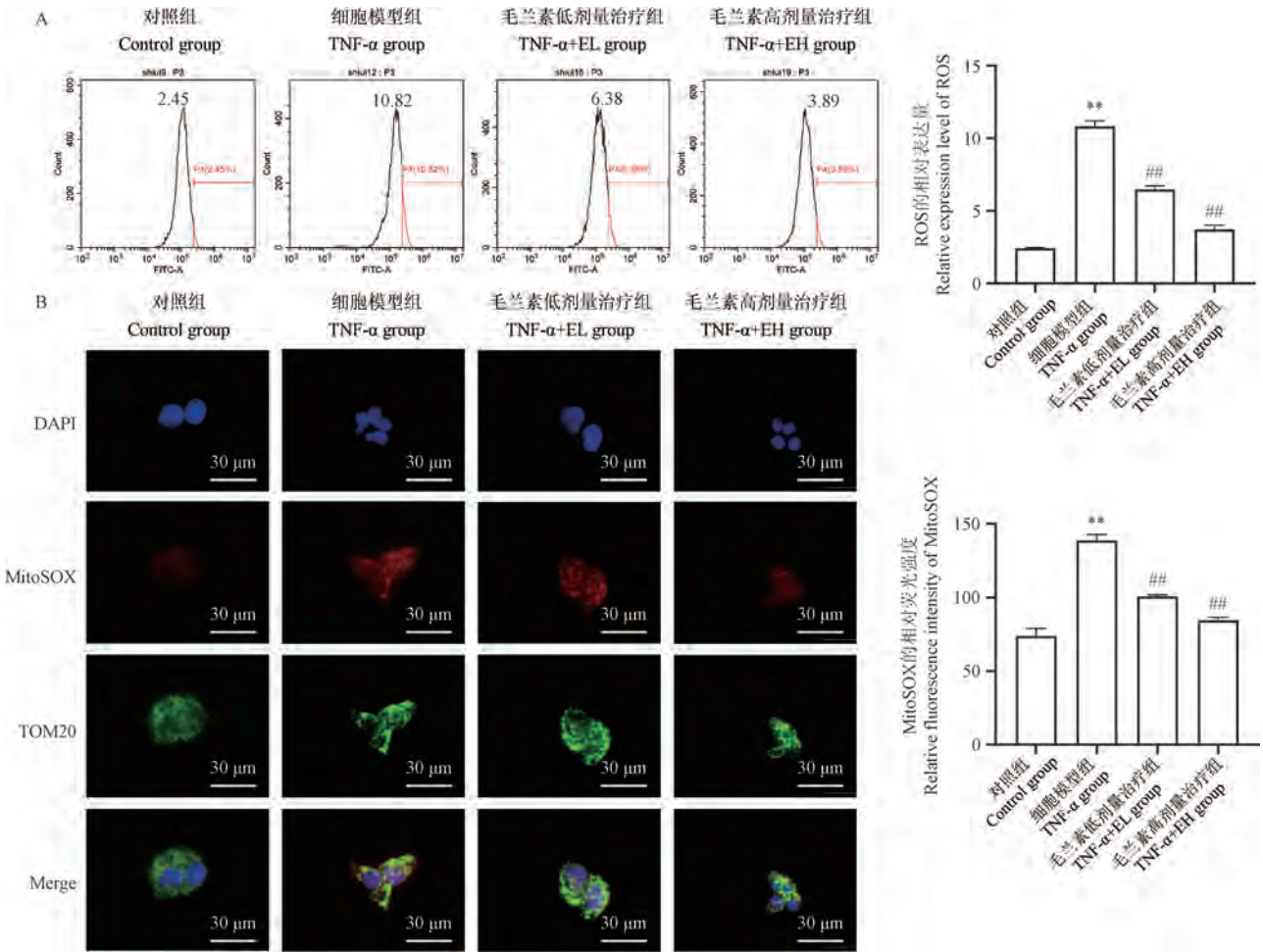
为了探究毛兰素对由 TNF-α 诱导的 HaCaT

表 2 各组炎症因子相对表达量比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Comparison of relative expression levels of inflammatory factors in different groups($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别 Groups	TSLP/(ng/mg)	IL-4/(ng/mg)	IL-13/(ng/mg)	TNF-α/(ng/mg)
对照组 Control group	0.64±0.11	0.97±0.16	1.02±0.33	0.67±0.27
模型组 AD group	8.12±0.63 [*]	7.52±0.33 [*]	4.33±0.42 [*]	8.28±0.39 [*]
毛兰素低剂量治疗组 AD+EL group	5.65±0.34 ^{*##}	6.15±0.27 ^{*##}	3.17±0.26 ^{*#}	7.42±0.51 ^{*#}
毛兰素高剂量治疗组 AD+EH group	3.71±0.26 ^{**##}	4.37±0.31 ^{**##}	2.66±0.16 ^{**#}	5.81±0.28 ^{**##}
地塞米松阳性对照组 AD+DXM group	2.96±0.22 ^{**##}	2.18±0.23 ^{**##}	1.98±0.21 ^{**##}	3.43±0.12 ^{**##}

注:与对照组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与模型组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with Control group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$. Compared with AD group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.



注:A:流式细胞术检测各组活性氧含量及量化分析;B:免疫荧光检测线粒体活性氧。与对照组相比,^{**} $P<0.01$;与细胞模型组相比,^{##} $P<0.01$ 。

图 3 毛兰素对 TNF-α 诱导的 HaCaT 细胞中 ROS 和 mtROS 产生的影响

Note. A, Flow cytometry detection and quantitative analysis of ROS content. B, Immunofluorescence detection of mitochondrial reactive oxygen species. Compared with Control group, ^{**} $P<0.01$. Compared with TNF-α group, ^{##} $P<0.01$.

Figure 3 Effect of Erianin on ROS and mtROS production in TNF-α-induced HaCaT cells

ROS 的产生 ($P < 0.01$)。免疫荧光结果如图 3B 显示,毛兰素治疗后 mtROS 的产生显著减少 ($P < 0.01$)。以上结果表明,毛兰素可以减少 ROS 和 mtROS 的积累,保护线粒体功能。

2.5 Erianin 抑制由 TNF- α 诱导的 HaCaT 细胞凋亡

为了探究毛兰素是否能减轻 HaCaT 细胞因 TNF- α 诱导的细胞凋亡,采用 TUNEL 法发现毛兰素对细胞凋亡有显著的抑制作用。图 4 结果表明,毛兰素能抑制由 TNF- α 诱导的 HaCaT 细胞凋亡。

2.6 毛兰素对 HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 信号轴调的影响

为了探究毛兰素在 AD 中 HMGB1/RAGE-

RhoA/ROCK1 信号通路的治疗作用,采用 Western blot 的方法检测相关蛋白的表达。在体内实验中,与 AD 组相比,毛兰素治疗后 HMGB1、RAGE、RhoA、ROCK1 蛋白表达量均发生了下降 ($P < 0.01$,图 5)。体外实验发现,与 TNF- α 组相比,毛兰素治疗后 HMGB1、RAGE、RhoA、ROCK1 蛋白表达量下降 ($P < 0.01$,图 6A)。为了验证毛兰素是否通过 HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 信号轴来缓解 AD,本研究选用 RAGE 的抑制剂 TFA 刺激 HaCaT 细胞后,加入重组的 HMGB1 (r-HMGB1) 刺激,发现 TFA + r-HMGB1 组的 HMGB1 蛋白表达量,与对照组相比明显增高 ($P < 0.01$),与 r-HMGB1 组相比没有明显改变,而 RAGE、RhoA 及 ROCK1 的表达量,与 r-HMGB1

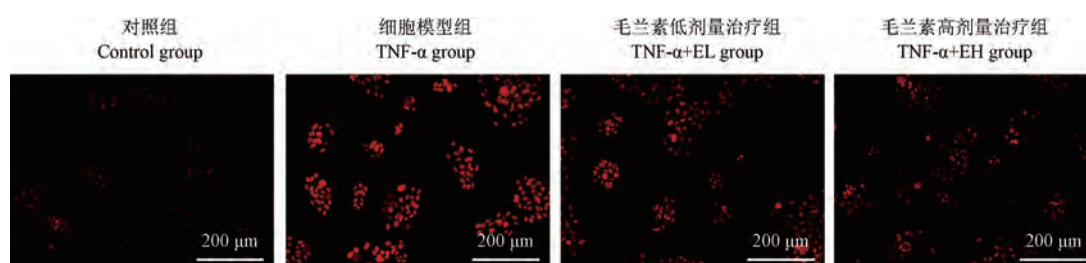
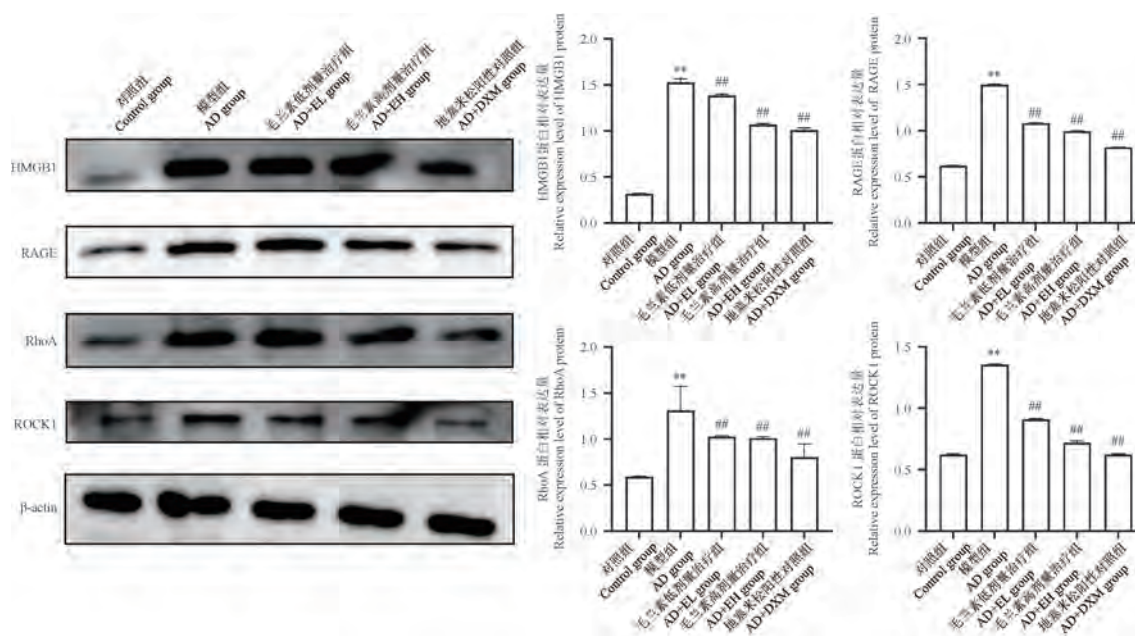


图 4 TUNEL 法检测 HaCaT 细胞凋亡情况

Figure 4 TUNEL for detecting apoptosis of HaCaT cells



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

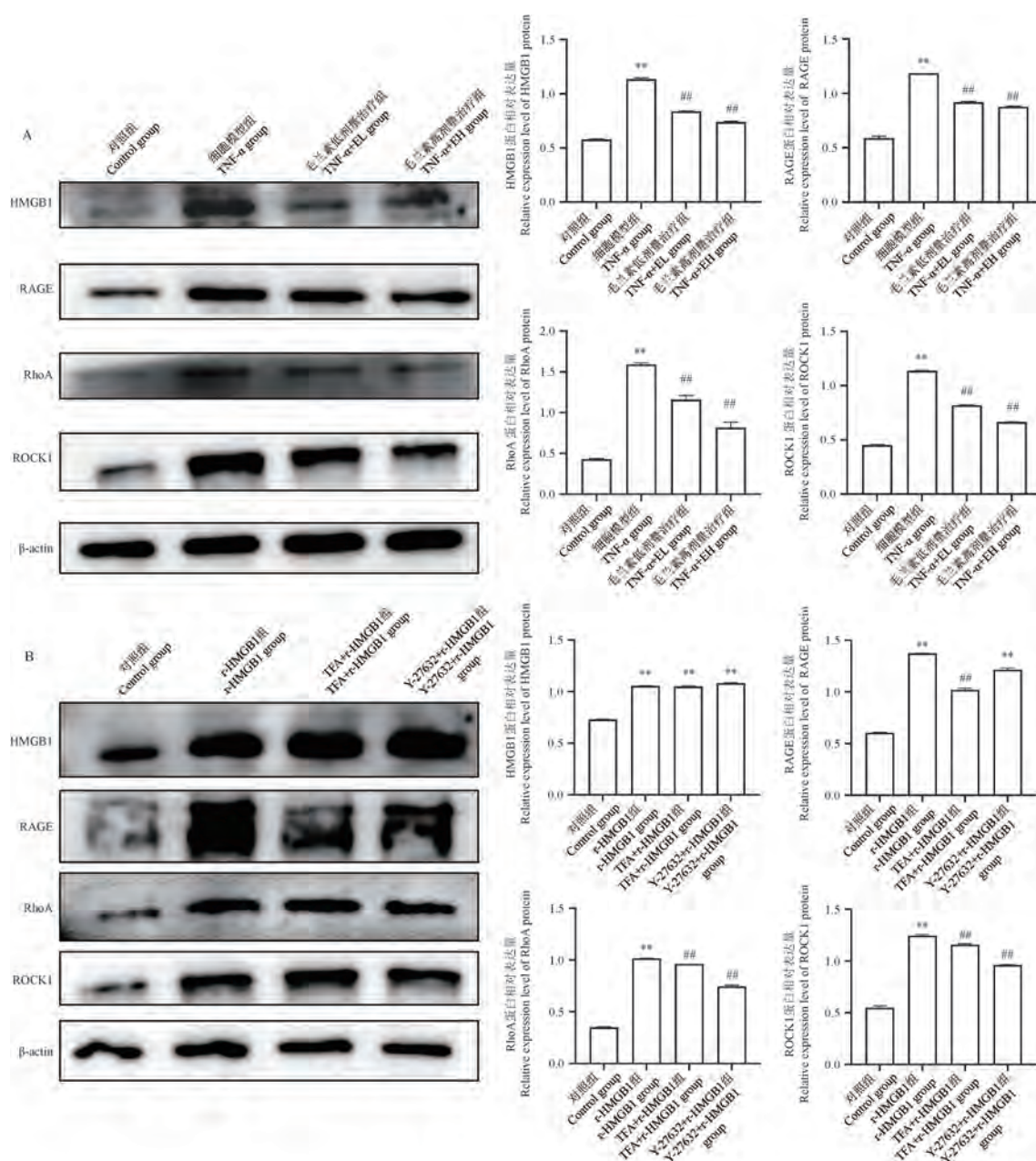
图 5 Western blot 检测体内实验中不同分组 HMGB1、RAGE、RhoA、ROCK1 的表达情况 ($n = 3$)

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

Figure 5 Western blot detection of HMGB1, RAGE, RhoA, and ROCK1 expression in different groups during *in vivo* ($n = 3$)

组相比明显降低 ($P < 0.01$); Y-27632+r-HMGB1 组的 HMGB1、RAGE 的表达量,与 r-HMGB1 组相比没有明显改变,而 RhoA 及 ROCK1 的表达量,

与 r-HMGB1 组相比明显降低 ($P < 0.01$, 图 6B)。以上结果表明,毛兰素通过调节 HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 信号轴来缓解 AD。



注:A:毛兰素对 HaCaT 细胞相关蛋白表达的 Western blot 分析。与对照组相比, $**P < 0.01$;与细胞模型组相比, $^{##}P < 0.01$;B:Western blot 检测在使用抑制剂条件下 HaCaT 细胞中相关蛋白的表达。与对照组相比, $**P < 0.01$;与 r-HMGB1 组相比, $^{##}P < 0.01$ 。

图 6 Western blot 检测体外实验中不同分组 HMGB1、RAGE、RhoA、ROCK1 的表达情况 ($n = 3$)

Note. A, Western blot assay for protein expression in HaCaT cell. Compared with Control group, $**P < 0.01$. Compared with TNF- α group, $^{##}P < 0.01$. B, Western blot assay the expression of related proteins in HaCaT cells under inhibitor conditions. Compared with Control group, $**P < 0.01$. Compared with r-HMGB1 group, $^{##}P < 0.01$.

Figure 6 Western blot detection of HMGB1, RAGE, RhoA, and ROCK1 expression in different groups during *in vitro* ($n = 3$)

3 讨论

AD 是一种常见的炎症性皮肤病。AD 的发生主要与皮肤屏障受损和免疫功能紊乱有关^[12]。Th2 细胞介导的炎症反应在 AD 急性期和慢性期损伤中均有作用,而 Th1 细胞介导的炎症反应则在 AD 的慢性损伤中扮演着重要的角色^[13]。AD 急性发作期,胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)可作用树突状细胞最终导致 Th0 细胞向 Th2 细胞分化,进而促进 Th2 细胞的增殖并分泌 Th2 型细胞因子白细胞介素(interleukin, IL)-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13 等,导致浆细胞过量释放免疫球蛋白 E(immunoglobulin E, IgE),嗜酸性粒细胞数增加^[14];在 AD 慢性期,则以产生干扰素 γ (interferon γ , IFN- γ)、TNF、IL-2、IL-12、IL-18 等细胞因子为主介导免疫反应^[15],引起机体炎症的发生。在本文的研究中发现毛兰素可以抑制 DNCB 诱导的 AD 模型小鼠皮肤增厚,减少皮肤炎症细胞的浸润,阻止肥大细胞脱颗粒,降低炎症因子 TSLP、IL-4、IL-13 的表达,具有明显抗 AD 炎症作用。近年来研究表明过量的 ROS 介导的氧化应激与 AD 的发生有关^[16]。氧化应激引发细胞内活性氧的过度累积和线粒体功能障碍,导致细胞凋亡,加剧 AD 病理进程^[17]。本研究结果表明,毛兰素可以抑制 TNF- α 诱导的 HaCaT 细胞 ROS 和 mtROS 产生,抑制细胞凋亡,进一步显示毛兰素具有抗 AD 生物活性。

HMGB1 是一种高度保守的核蛋白,作为 HMGB 家族的重要成员之一,广泛分布于哺乳动物细胞^[18]。HMGB1 核蛋白被认为是染色质结构的重要结合因子,其在核小体结构的维护及基因转录过程中发挥着关键作用,不仅有助于维持染色质的稳定性,还参与了细胞 DNA 的重组等多种生物学功能。同时,细胞外的 HMGB1 蛋白在调控细胞分化、细胞迁移与转移、细胞凋亡以及炎症反应等生物过程中也扮演着重要角色。研究揭示,细胞外 HMGB1 能够作为损伤相关分子模式(damage associated molecular patterns, DAMP)激活先天免疫系统,与 RAGE 受体结合激活细胞内信号通路,促进炎症反应的进程。近年来研究表明, HMGB1 与 RAGE 结合会激活 NF- κ B,毛兰素通过调控细胞外调节蛋白激酶 1/2

(extracellular signal-regulated kinases 1/2, ERK1/2)-NF- κ B 信号通路抑制小胶质细胞引起的炎症^[19]。同时, HMGB1 与配体 RAGE 结合能介导 RhoA/ROCK1 信号通路激活,参与氧化应激、细胞凋亡和炎症的发生和发展等重要生理病理过程^[20-21]。本研究显示,毛兰素能够降低 AD 小鼠 HMGB1 和 RAGE 表达,抑制 RhoA/ROCK1 通路激活并参与 AD 炎症的发生。体外利用 r-HMGB1 刺激 HaCaT 细胞,抑制 RAGE 后 RhoA、ROCK1 表达量会下降。而抑制 RhoA/ROCK1 后, RAGE 蛋白表达量没有发生显著改变,结果显示 HMGB1/RAGE 激活 RhoA/ROCK1 信号通路参与 AD 病理过程,毛兰素通过调控该通路发挥抗 AD 炎症作用。

综上所述,毛兰素有明显抗 AD 炎症作用,其作用机制可能是通过调控 HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 通路缓解 AD 炎症反应。

参考文献:

- [1] LANGAN S M, IRVINE A D, WEIDINGER S. Atopic dermatitis [J]. *Lancet*, 2020, 396(10247): 345-360.
- [2] ZHANG Q, WANG H, RAN C, et al. Anti-inflammatory effects of amarogentin on 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like mice and in HaCat cells [J]. *Anim Model Exp Med*, 2023, 6(3): 255-265.
- [3] YU H, LIN J, YUAN J, et al. Screening mitochondria-related biomarkers in skin and plasma of atopic dermatitis patients by bioinformatics analysis and machine learning [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1367602.
- [4] GONG Y Q, FAN Y, WU D Z, et al. *In vivo* and *in vitro* evaluation of erianin, a novel anti-angiogenic agent [J]. *Eur J Cancer*, 2004, 40(10): 1554-1565.
- [5] SU C, ZHANG P, LIU J, et al. Erianin inhibits indoleamine 2, 3-dioxygenase-induced tumor angiogenesis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 88: 521-528.
- [6] TSAI S W, WANG J H, CHANG Y K, et al. Erianin alleviates collagen-induced arthritis in mice by inhibiting Th17 cell differentiation [J]. *Open Life Sci*, 2023, 18(1): 20220703.
- [7] DOU B, HU W, SONG M, et al. Anti-inflammation of Erianin in dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis mice model *via* collaborative regulation of TLR4 and STAT3 [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 324: 109089.
- [8] PIAO X M, FENG M F, ZHAO W P, et al. Dendrocandins U from *Dendrobium officinale* kimura et migo inhibits M1 polarization in alveolar macrophage by suppressing NF- κ B

- signaling pathway [J]. Chem Biodivers, 2023, 20(11): e202300999.
- [9] LOTZE M T, DEMARCO R A. Dealing with death: HMGB1 as a novel target for cancer therapy [J]. Curr Opin Investig Drugs, 2003, 4(12): 1405–1409.
- [10] LUAN Z, HU B, WU L, et al. Unfractionated heparin alleviates human lung endothelial barrier dysfunction induced by high mobility group box 1 through regulation of P38-GSK3 β -snail signaling pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(5): 1907–1918.
- [11] FAN H, TANG H B, CHEN Z, et al. Inhibiting HMGB1-RAGE axis prevents pro-inflammatory macrophages/microglia polarization and affords neuroprotection after spinal cord injury [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 295.
- [12] PATOLI D, MIGNOTTE F, DECKERT V, et al. Inhibition of mitophagy drives macrophage activation and antibacterial defense during sepsis [J]. J Clin Invest, 2020, 130(11): 5858–5874.
- [13] DAS P, MOUNIKA P, YELLURKAR M L, et al. Keratinocytes: an enigmatic factor in atopic dermatitis [J]. Cells, 2022, 11(10): 1683.
- [14] SROKA-TOMASZEWSKA J, TRZECIAK M. Molecular mechanisms of atopic dermatitis pathogenesis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(8): 4130.
- [15] CHEN G, WARD M F, SAMA A E, et al. Extracellular HMGB1 as a proinflammatory cytokine [J]. J Interferon Cytokine Res, 2004, 24(6): 329–333.
- [16] ZHANG Y, WENG J, HUAN L, et al. Mitophagy in atherosclerosis: from mechanism to therapy [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1165507.
- [17] HERB M, SCHRAMM M. Functions of ROS in macrophages and antimicrobial immunity [J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(2): 313.
- [18] ZHANG S, HU L, JIANG J, et al. HMGB1/RAGE axis mediates stress-induced RVLM neuroinflammation in mice *via* impairing mitophagy flux in microglia [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 15.
- [19] ZHANG T, OUYANG H, MEI X, et al. Erianin alleviates diabetic retinopathy by reducing retinal inflammation initiated by microglial cells *via* inhibiting hyperglycemia-mediated ERK1/2-NF- κ B signaling pathway [J]. FASEB J, 2019, 33(11): 11776–11790.
- [20] DONG Q, LUO Y, YIN Y, et al. RhoA/ROCK1 regulates the mitochondrial dysfunction through Drp1 induced by *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells [J]. J Cell Mol Med, 2023, 27(15): 2123–2135.
- [21] 吴进福, 周晓慧, 范慧敏, 等. RhoA/ROCK 信号通路在左心疾病致大鼠肺动脉高压模型中的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(6): 612–616.
- WU J F, ZHOU X H, FAN H M, et al. The role of RhoA/ROCK pathway in the rat models of left heart disease-associated pulmonary hypertension [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2015, 23(6): 612–616.

〔收稿日期〕2024–10–15

宋金婉,任献青,邢琼琼,等. 基于 ROS 介导 NLRP3 炎症小体活化探讨凉血退紫方治疗过敏性紫癜大鼠作用机制研究[J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(4): 21-30.

Song JW, Ren XQ, Xing QQ, et al. Mechanism of Liangxue Tuizi Formula in the treatment of Henoch-Schönlein purpura rats via reactive oxygen species-mediated activation of NLRP3 inflammasome [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 21-30.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.003

基于 ROS 介导 NLRP3 炎症小体活化探讨凉血退紫方治疗过敏性紫癜大鼠作用机制研究

宋金婉^{1,2}, 任献青^{1,2*}, 邢琼琼^{1,2}, 李一凡^{1,2}, 杨满翔^{1,2}

(1.河南中医药大学第一附属医院儿科医院,郑州 450000;2.河南中医药大学儿科医学院,郑州 450046)

【摘要】 目的 研究凉血退紫方(Liangxue Tuizi Formula, LXTZF)对过敏性紫癜大鼠活性氧(reactive oxygen species, ROS)介导的核苷酸结构寡聚化域(nucleotide-binding oligomerization domain, NOD)样受体热蛋白结构域相关蛋白3(nod-like receptor protein 3, NLRP3)炎症小体活化的影响,探讨其治疗过敏性紫癜的可能作用机制。**方法** 将 24 只大鼠随机分为 4 组:空白组、模型组、LXTZF 组、复方甘草酸苷(compound glycyrrhizin, CG)组,除空白组外,其余各组采用热性药物联合卵白蛋白(ovalbumin, OVA)建立过敏性紫癜大鼠模型。造模成功后,LXTZF 组予 LXTZF 溶液 7.47 g/kg 灌胃,CG 组予 CG 溶液 13.5 mg/kg 灌胃,空白组和模型组给予生理盐水灌胃,每天 1 次,连续 4 周。末次灌胃 8 h 后取材,苏木素-伊红(HE)染色法观察各组大鼠皮肤组织形态学变化;酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清中白介素-18(interleukin-18, IL-18)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)水平;免疫荧光检测大鼠皮肤组织中 ROS 水平变化;逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)法、免疫组化法及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠皮肤组织中凋亡相关点样蛋白(apoptosis-associated speckle-like protein, ASC)、NLRP3、半胱氨酸蛋白酶-1(cysteine-specific protease-1, Caspase-1)基因信使核糖核酸(messenger RNA, mRNA)及蛋白表达。**结果** 与空白组相比,模型组大鼠皮肤组织病理可见明显炎症细胞浸润;血清中 IL-18、IL-1 β 含量均明显升高($P<0.05$),皮肤组织中 ROS 水平显著升高($P<0.05$),皮肤组织中 ASC、NLRP3、Caspase-1 mRNA 及蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。与模型组相比,LXTZF 组和 CG 组大鼠皮肤组织病理可见炎症细胞浸润减轻;血清中 IL-18、IL-1 β 水平显著降低($P<0.05$);皮肤组织中 ROS 水平显著降低($P<0.05$),皮肤组织中 ASC、NLRP3、Caspase-1 mRNA 及蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。**结论** 凉血退紫方治疗过敏性紫癜发挥作用的机制可能与抑制 ROS 介导的 NLRP3 炎症小体活化相关。

【关键词】 过敏性紫癜;凉血退紫方;ROS;NLRP3 炎症小体

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0021-10

【基金项目】 国家自然科学基金(82374519);河南省省级科技研发计划联合基金项目(222301420022);2023 年度河南省中医学“双一流”创建科学研究专项课题(HSRP-DFCTCM-2023-8-41);河南中医药大学 2023 年度研究生科研创新类项目(2023KYCX005)。

【作者简介】 宋金婉(1991—),女,在读硕士研究生,主治医师,研究方向:中医药防治小儿肾病及风湿免疫性疾病。

E-mail:1126568611@qq.com

【通信作者】 任献青(1973—),男,博士,主任医师,教授,研究方向:中医药防治小儿肾病及风湿免疫性疾病。

E-mail:renxq723@163.com

Mechanism of Liangxue Tuizi Formula in the treatment of Henoch-Schönlein purpura rats via reactive oxygen species-mediated activation of NLRP3 inflammasome

SONG Jinwan^{1,2}, REN Xianqing^{1,2*}, XING Qiongqiong^{1,2}, LI Yifan^{1,2}, YANG Manxiang^{1,2}

(1. Pediatrics Hospital, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China.

2. College of Pediatrics, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

【Abstract】 Objective To study the effect of Liangxue Tuizi Formula (LXTZF) on reactive oxygen species (ROS)-mediated NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) inflammasome activation in Henoch-Schönlein purpura (HSP) rats, and to explore its possible mechanism in the treatment of HSP. **Methods** Twenty-four rats were divided randomly into four groups: control, model, LXTZF, and compound glycyrrhizin (CG) groups. Except for the control group, a model of HSP was established in the other groups by heat drugs combined with egg albumin. After successful modeling, rats in the LXTZF group were given LXTZF solution 7.47 g/kg, rats in the CG group were given CG solution 13.5 mg/kg by gavage, and rats in the control and model groups were given normal saline solution by gavage once a day for 4 weeks. Samples were collected 8 hours after the last gavage. Skin histopathology changes were observed by hematoxylin and eosin (HE) staining. Serum interleukin (IL)-18 and IL-1 β levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Changes in ROS levels in the skin were detected by immunofluorescence. Apoptosis-associated speckle-like protein (ASC), NLRP3, cysteinyl aspartate-specific protease-1 (Caspase-1) mRNA and protein expression levels in rat skin were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry and Western blot, respectively. **Results** The skin pathology in the model group showed obvious inflammatory cell infiltration compared with the control group. Serum IL-18 and IL-1 β levels were significantly increased ($P < 0.05$), skin ROS levels were significantly increased ($P < 0.05$), and skin ASC, NLRP3, Caspase-1 mRNA and protein expression levels were significantly increased ($P < 0.05$). Inflammatory cell infiltration in the skin tissues of rats was alleviated in the LXTZF and CG groups compared with the model group, while serum levels of IL-18 and IL-1 β were significantly decreased ($P < 0.05$). ROS levels in the skin were significantly decreased ($P < 0.05$), and mRNA and protein levels of ASC, NLRP3, and Caspase-1 in the skin were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** The mechanism of LXTZF in HSP may be related to the inhibition of ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation.

【Keywords】 Henoch-Schönlein purpura; Liangxue Tuizi Formula; ROS; NLRP3 inflammasome

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

过敏性紫癜 (Henoch-Schönlein purpura, HSP), 临床定义为免疫球蛋白 A 相关性血管炎 (immunoglobulin A-associated vasculitis, IgAV), 是儿童期高发的急性小血管炎症性疾病, 其典型临床特征包括皮肤紫癜、关节肿痛、消化道症状 (腹痛) 及肾受累 (肾炎), 病理表现为白细胞碎裂性血管炎^[1]。HSP 的发病率为 8~22 例每 10 万儿童, 呈逐年上升趋势^[2]。本病在中医学中归属于“紫癜”“血证”“肌衄”“紫斑”等范畴。HSP 病程较长, 易反复发作, 病邪可由表入里损伤肾^[3]。西医治疗除了对症治疗外, 常首选激素及免疫抑制剂, 可以缓解临床症状, 但不能降低复发率及

肾损伤率^[4]。中医药在提高 HSP 缓解率、降低复发率、预防肾损伤、副作用少等方面具有明显的优势^[2]。任献青教授在传承国医大师丁樱教授经验的基础上, 创制了治疗 HSP 血热妄行证的基础方—凉血退紫方^[5]。该方具清热凉血、活血消斑功效, 经临床长期实践证实该方疗效确切, 能够明显降低 HSP 复发率。

HSP 是一种全身血管炎症性疾病^[6], 研究提示 NLRP3 炎症小体激活存在于肾型 HSP 大鼠模型中^[7]。NLRP3 炎症小体普遍存在于免疫细胞中, 由 NOD 样受体家族中 NLRP3、接头蛋白 ASC 和效应蛋白 Caspase-1 前体组成的一类多聚蛋白

复合物,ROS 能够激活 NLRP3 炎症小体,促进炎症细胞因子 IL-18、IL-1 β 的分泌,从而介导炎症反应^[8]。前期课题组研究发现凉血退紫合剂能减少 HSP 模型大鼠血清中炎症因子如白介素 6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等表达,另外通过网络药理学技术预测该方可能通过调节 NOD 样受体信号通路发挥治疗 HSP 的作用^[9]。因此本研究通过建立 HSP 大鼠模型,拟从 ROS 介导的 NLRP3 炎症小体活化探究凉血退紫方治疗 HSP 的作用机制,为其临床应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 (*Rattus norvegicus*) 24 只,周龄 3~5 周,体质量 75~95 g,由浙江维通利华实验动物技术有限公司桐乡分公司提供[SCXK(浙)2021-0006]。动物实验在河南中医药大学屏障环境动物实验中心进行标准化饲养管理[SYXK(豫)2021-0015]。环境参数:温度(26 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度(65 ± 5)%、12 h/12 h 明暗周期循环,全程自由摄食饮水并定期更换垫料。本研究严格遵循实验动物伦理要求,实验方案经河南中医药大学实验动物福利伦理审查委员会审核批准(IACUC-202311029)。本实验全过程遵守动物实验 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

萆薢饮片(安徽普仁中药饮片有限公司,批号:2210271);干姜饮片(云南民顺堂中药饮片有限公司,批号:220401);胡椒饮片(安徽普仁中药饮片有限公司,批号:2210251);复方甘草酸苷片(乐普药业股份有限公司,批号:211001B1);凉血退紫方(颗粒剂):生地 10 g、丹皮 10 g、紫草 10 g、白芍 10 g、络石藤 12 g、忍冬藤 15 g、川芎 10 g、炙甘草 6 g(四川新绿色药业科技发展有限公司)。卵白蛋白、完全弗氏佐剂(美国 Sigma 公司,货号:A5503-10 g、F5881-10 mL);TRIzolTM Reagent(美国 Invitrogen 公司,货号:15596-026);逆转录试剂盒(莫纳生物,货号:MR05001);IL-18、IL-1 β ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号:E-EL-R0567c、E-EL-R0012c);ASC 抗体(Immunoway,货号:YT0365);Caspase-1 抗体

(proteintech, 货号:22915-1-AP);NLRP3 抗体(Affinity, 货号:DF7438);HRP 标记的山羊抗兔 IgG(Servicebio, 货号:GB23303);高效 RIPA 裂解液(北京索莱宝,货号:R0010);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝,货号:PC0020);SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(上海雅酶,货号:PG112);彩虹 245plus 广谱蛋白 Marker(北京索莱宝,货号:PR1930);ECL Plus 超敏发光液(北京索莱宝,货号:PE0010)。

电热恒温培养箱(CIMO, GNP-9080BS-III);核酸蛋白浓度微量测定仪(Thermo, Nanodrop 2000);荧光定量 PCR 仪(TIANLONG, TL-988);高速低温组织研磨仪(Servicebio, KZ-III-FP);高速离心机(DLAB, D3024);全波长酶标仪(Thermo, Multiskan GO);组化笔(武汉赛维尔生物科技有限公司, G6100);显微镜(尼康仪器有限公司, E100);正置荧光显微镜(日本尼康, NIKON ECLIPSE C1);扫描仪(3DHISTECH, Panoramic MIDI);电泳转印仪(Bio-Rad, Mini Trans-Blot);化学发光成像系统(武汉莫纳, QuickChemi 5200)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型建立及分组给药

24 只 Wistar 大鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、LXTZF 组、CG 组,参考李彦红等^[10]造模方法复制过敏性紫癜大鼠模型。预处理阶段:适应性饲养 7 d 后,除空白组外,其余各组经胃灌注含胡椒、萆薢、干姜(质量比 1:1:1)的水煎剂(0.15 g/mL),剂量为 1 mL/100 g 体质量,每天 1 次 $\times$ 3 周。免疫诱导:继以卵白蛋白-完全弗氏佐剂乳化液(每只 0.5 mL),每周 1 次 $\times$ 3 周。强化激发:第 7 周尾静脉注射 10 g/L 的卵白蛋白(1 次,每只 0.5 mL),同时背部皮肤脱毛区域 5 点皮内/皮下注射 0.3% 卵白蛋白生理盐水溶液 2 mL(每点 0.4 mL),每 3 d 1 次,共进行 5 次,空白组同步给予等体积生理盐水。药物干预:模型验证成功后,按体表面积法换算临床等效剂量给药, LXTZF 组:凉血退紫方 7.47 g/kg、CG 组:复方甘草酸苷 13.5 mg/kg,空白组及模型组:等体积生理盐水灌胃,每天 1 次,共进行 4 周。样本采集:末次给药后禁食 12 h(自由饮水),2% 戊巴比妥钠腹腔麻醉,腹主动脉采血分离血清,处死后背部皮肤组织冻存待检。

1.3.2 ELISA 法检测大鼠血清中 IL-18 及 IL-1 β 表达

取大鼠血清,解冻,根据试剂盒说明书步骤进行测定。

1.3.3 ROS 染色检测大鼠皮肤组织中 ROS 的表达

用最佳切割温度复合物(optimal cutting temperature compound, OCT)将组织包埋后冰冻切片机切片,画圈,淬灭组织自发荧光后 ROS 染液染色,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)复染细胞核后用抗荧光淬灭封片剂封片,采集图像。用 Image Pro Plus 6.0 软件测定免疫荧光强度值,以免疫荧光强度值来表述 ROS 的表达量。

1.3.4 RT-PCR 法检测大鼠皮肤组织中 ASC、NLRP3、Caspase-1 mRNA 表达

取 90 mg 大鼠皮肤组织研磨,按照试剂盒说明书提取皮肤组织总 RNA,检测其纯度及浓度后将 RNA 逆转录合成 cDNA,选择 ASC、NLRP3、Caspase-1 对应的引物,以 β -actin 为内参,扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min 预变性;95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环。数据采用 $\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对表达量。具体引物序列如表 1。

1.3.5 免疫组化法检测大鼠皮肤组织中 ASC、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达

取各组大鼠皮肤组织石蜡,脱蜡及水化后柠檬酸高压热修复抗原;3% H_2O_2 孵育阻断内源性过氧化物酶,常规洗涤吸干后,加入兔血清封闭 30 min;甩干封闭液后滴加 ASC、NLRP3、Caspase-1 抗体(稀释比例均为 1:200),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;常规洗涤后滴加二抗(稀释比例为 1:200)室温孵

育 50 min;常规洗涤吸干后滴加 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)工作液显色,阳性为棕黄色,终止显色后复染细胞核,脱水封片。置于白光显微镜下进行结果判读。

1.3.6 蛋白免疫印迹法测大鼠皮肤组织中 ASC、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达

组织裂解后 BCA 法测蛋白浓度;制胶后每孔上样蛋白样品 30 μg ;200 V 电泳 30 min;电泳后 300 mA 电转 30 min;转膜后无蛋白快速封闭液室温振摇封闭 10 min;一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜(GAPDH 抗体浓度为 1:10 000,指标抗体浓度为 1:1000);次日洗膜后二抗室温震荡孵育 30 min(二抗浓度均为 1:10 000)洗膜后发光液浸泡曝光照相。使用 Image Pro Plus 6.0 软件进行灰度值比值分析。

1.4 统计学方法

本研究采用 SPSS Statistics 26.0 软件进行数据处理。计量数据资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)描述,多组间差异的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),若方差齐性满足时采用 LSD 法进行事后比较,方差不齐时采用 Kruskal-Wallis 非参数检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠皮肤病理改变

病理结果显示,与空白组相比,模型组大鼠皮肤皮层呈小血管周围中性粒细胞破碎性炎症表现,符合临床皮肤型 HSP 表现,提示 HSP 造模成功。与模型组相比,LXTZF 组及 CG 组大鼠皮肤病理显示真皮层小血管周围中性粒细胞明显减少。见图 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primers sequence

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	基因 ID Gene ID	扩增子长度/bp Amplicon length
ASC	F:CTGCAGATGGACCCCATAGAC R:GTGAGCTCCAAGCCATACCC	282 817	74
NLRP3	F:CTCACCTCACACTCCTGCTG R:AGAACCTCACAGAGCGTCAC	287 362	122
Caspase-1	F:GACCGAGTGGTTCCTCAAG R:GACGTGTACGACTGGGTGTT	25 166	108
β -actin	F:ACCCGCGACTACAACCTTCTT R:TCGTCATCCATGCGGAAGTGG	81 822	74

2.2 各组大鼠血清中 IL-18、IL-1β 表达量

模型组炎症因子水平:模型组大鼠血清 IL-18 及 IL-1β 表达量较空白组显著上调($P<0.05$);药物干预效应:LXTZF 组与 CG 组干预后,上述指标均较模型组呈现统计学意义的下调($P<0.05$)。见表 2。

2.3 各组大鼠皮肤组织中 ROS 表达水平

如图 2 所示,模型组 ROS 的水平变化:模型组大鼠皮肤组织 ROS 的表达水平较空白组均呈显著性上调($P<0.05$)。药物干预效应:LXTZF 组与 CG 组干预后,两组 ROS 的表达水平均显著下调($P<0.05$)。

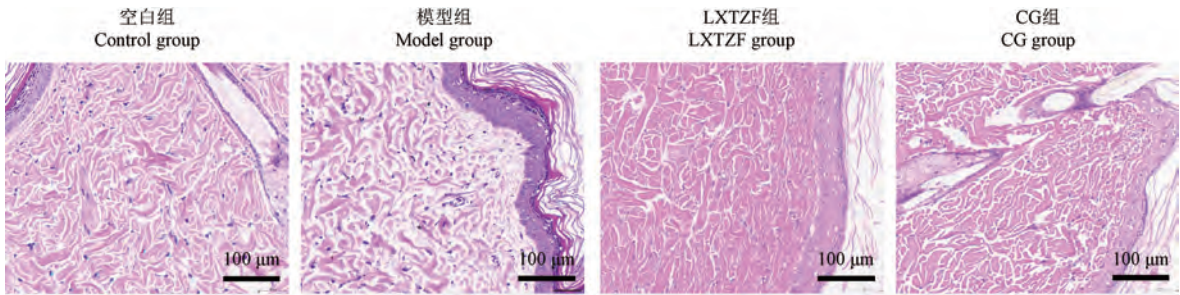
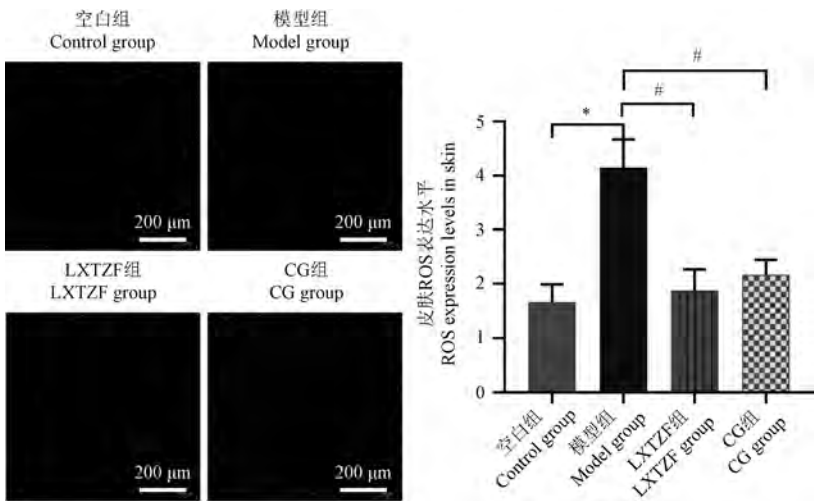


图 1 各组大鼠皮肤病理图(HE)
Figure 1 Skin pathology of rats in each group (HE)

表 2 各组大鼠血清中 IL-18、IL-1β 表达量($\bar{x}\pm s, n=6, \text{pg/mL}$)
Table 2 Expression levels of IL-18 and IL-1β in the serum of each group of rats($\bar{x}\pm s, n=6, \text{pg/mL}$)

分组 Groups	IL-18	IL-1β
空白组 Control group	122.48±10.29	22.59±6.56
模型组 Model group	142.51±12.45*	61.66±14.21*
LXTZF 组 LXTZF group	127.75±14.63 [#]	26.54±7.05 [#]
CG 组 CG group	123.79±6.81 [#]	25.11±7.27 [#]

注:与空白组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group,* $P<0.05$. Compared with model group,[#] $P<0.05$.



注:与空白组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$ 。
图 2 各组大鼠皮肤组织 ROS 表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

Note. Compared with control group,* $P<0.05$. Compared with model group,[#] $P<0.05$.
Figure 2 Comparison of ROS expression levels in skin tissues of rats in each group($\bar{x}\pm s, n=5$)

2.4 各组大鼠皮肤组织中 ASC、NLRP3、Caspase-1 mRNA 表达水平

模型组基因转录水平:模型组大鼠皮肤组织中 ASC、NLRP3 及 Caspase-1 mRNA 相对表达量较空白组显著上调($P<0.05$)。药物干预效果:LXTZF 组与 CG 组干预后,炎症小体 ASC、NLRP3、Caspase-1 mRNA 丰度较模型组均显著下调($P<0.05$)。见图 3。

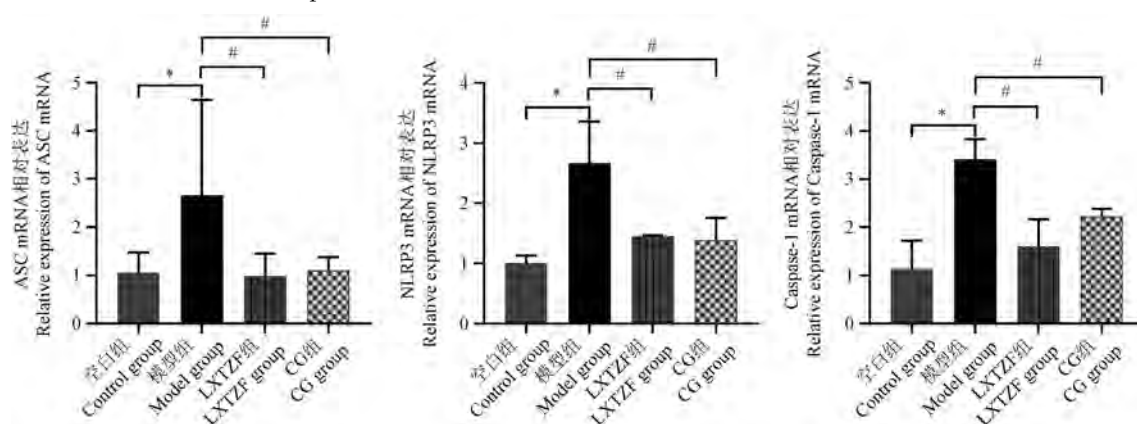
2.5 免疫组化检测皮肤组织中 ASC、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平

模型组蛋白表达特征:模型组大鼠皮肤组织中炎症小体 ASC、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达较

空白组升高。药物干预效应:LXTZF 组与 CG 组干预后,上述蛋白在皮肤组织中的表达丰度较模型组均降低。见图 4。

2.6 Western blot 检测皮肤组织中 ASC、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平

模型组蛋白表达特征:模型组大鼠的皮肤组织中炎症小体 ASC、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平较空白组均呈现显著性上调($P<0.05$)。药物干预效应:LXTZF 组与 CG 组干预后,ASC、NLRP3、Caspase-1 蛋白在皮肤组织中的表达丰度较模型组均呈现显著性下调($P<0.05$)。见图 5。



注:与空白组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图 3 各组大鼠皮肤 ASC、NLRP3、Caspase-1 mRNA 表达水平($\bar{x}\pm s, n=3$)

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

Figure 3 Expression levels of ASC, NLRP3 and Caspase-1 mRNA in the skin of rats in each group($\bar{x}\pm s, n=3$)

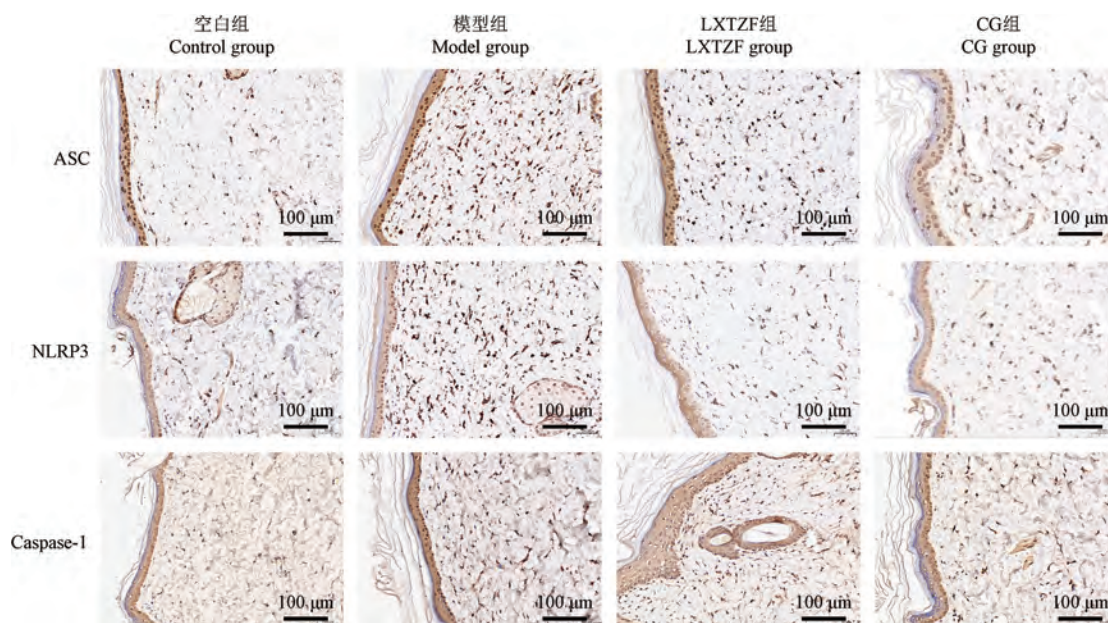
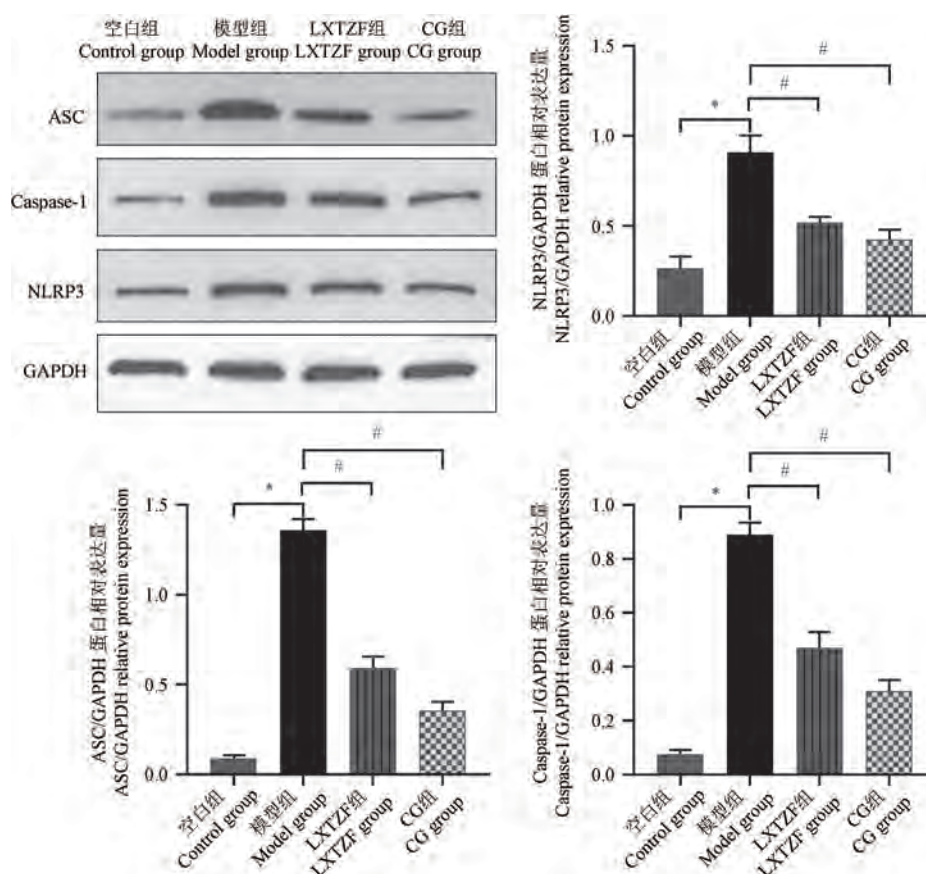


图 4 各组大鼠皮肤组织中 ASC、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达

Figure 4 Expression of ASC, NLRP3, Caspase-1 protein in skin tissue of rats in each group



注:与空白组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图5 各组大鼠皮肤组织中ASC、NLRP3、Caspase-1蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

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

Figure 5 Expression levels of ASC, NLRP3 and Caspase-1 in skin tissues of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

HSP 是最常见的儿童血管炎^[11],通常以可触及紫癜(100%)、关节炎或关节痛(66%~74%)、胃肠道受累(51%~56%)和肾受累(30%~54%)为主要症状表现^[12]。西医治疗以休息调养、抗感染、抗过敏、激素干预、免疫调节及对症支持等为主^[13]。激素及免疫调节剂长期应用会增加感染风险、影响代谢等。中医药治疗 HSP 具有明显优势,如能够明显减少复发率、减轻肾损伤等,并且尚未发现有明显的副作用。因此,越来越多的学者聚焦中医药治疗 HSP 的临床与基础研究^[14]。国医大师丁樱教授认为伏热之邪是儿童 HSP 的发病基础,HSP 病机主要包括热、虚、瘀,疾病早期尤以热、瘀为重^[3]。任献青教授基于此理论创制了凉血退紫方,方中生地黄和牡丹皮清热凉血,活血化瘀共为君药,紫草、络石藤、

忍冬藤清热凉血,活血通络共为臣药,白芍、川芎为佐药,炙甘草调和诸药为使药,诸药共奏清热凉血,活血消斑的功效,临床应用多年,效果显著。

HSP 是免疫复合物介导的系统性小血管炎,发病机制与炎症反应、氧化应激反应有关^[15]。NLRP3 炎症小体,由 NLRP3、ASC 和 pro-Caspase-1 组成,其激活是炎症反应的发生和发展的重要环节^[16-17]。激活的 NLRP3 炎症小体促使 pro-Caspase-1 自剪切和活化,进而剪切 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18,生成成熟的 IL-1 β 和 IL-18^[18]。这些细胞因子能促进炎症反应。ROS 是生物体内一类重要的氧分子^[19]。在病理条件下,ROS 的产生和清除失衡会导致氧化应激,进而损伤细胞和组织^[20]。此外,过高的 ROS 水平会导致持续性炎症^[21]。研究表明,ROS 可直接或间接参与 NLRP3 的激活过程^[17-18,22],因此,调节 ROS 的产生和清除,可能为治疗 NLRP3 相关疾病提供新的

治疗策略^[22-25]。多项研究表明,中医药可能通过抑制 ROS/NLRP3 相关通路改善心血管系统疾病、关节炎、糖尿病等多种炎症性疾病的病理状态^[26-32]。此外,有研究指出,NLRP3 炎症小体在调控 HSP 血管炎症反应中发挥重要作用,可能是中医药治疗 HSP 的潜在靶点^[33]。

本研究以 HSP 大鼠为研究对象,结果显示,与空白组相比,HSP 大鼠皮肤病理炎症反应明显;血清中细胞因子 IL-18、IL-1 β 水平显著升高;皮肤组织中 ROS 表达水平、NLRP3、Caspase-1、ASC 基因及蛋白表达水平均显著增加,提示 HSP 大鼠体内存在 ROS 介导的 NLRP3 炎症小体激活。既往研究表明,生地黄可以降低 ROS 及 NLRP3 炎症小体活化相关基因和蛋白表达水平^[34]。紫草的提取物紫草素可以降低 ROS、IL-1 β 、NLRP3 水平^[35]。白芍提取物可以降低炎症细胞中 ROS 水平及 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 表达^[36-37]。川芎也可以降低 ROS 水平^[38]。药理学研究发现,复方甘草酸苷具有抗炎作用^[39],临床上用于治疗 HSP^[40]。本研究结果显示,经凉血退紫方及复方甘草酸苷干预后,与模型组相比,LXTZF 组及 CG 组大鼠皮肤病理炎症反应明显减轻;血清中细胞因子 IL-18、IL-1 β 水平显著降低;皮肤组织中 ROS 表达水平、NLRP3、Caspase-1、ASC 基因及蛋白表达均水平显著降低。以上结果提示凉血退紫方可减轻 HSP 大鼠皮肤炎症反应,降低血清中 IL-18、IL-1 β 水平,抑制皮肤中 ROS 的表达及 NLRP3 炎症小体活化相关蛋白的基因和表达水平。这些数据表明,凉血退紫方可能通过抑制 ROS 介导 NLRP3 炎症小体活化,有效减轻 HSP 的皮肤炎症。

本研究探讨了凉血退紫方对 ROS 介导 NLRP3 炎症小体活化的调控治疗 HSP 的潜在机制。然而,本研究仍存在一定的局限性,未设置不同中药剂量组及抑制剂组。未来研究将增加中药组的不同剂量梯度及抑制剂组,体内、体外实验进一步围绕 ROS 介导的 NLRP3 炎症小体活化验证凉血退紫方的作用机制。尽管存在上述不足,但本研究仍为中医药治疗 HSP 的机制研究提供了新的思路和实验依据。

参考文献:

[1] NIKOLAISHVILI M, PAZHAVA A, DI LERNIA V. Viral

infections may be associated with henoch-schönlein *Purpura* [J]. *J Clin Med*, 2023, 12(2): 697.

[2] 苏杭,张淑孜,任献青. 中医药治疗过敏性紫癜的动物实验研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(6): 135-143.

SU H, ZHANG S Z, REN X Q. Progress of animal experimental research into treatment of Henoch-Schonlein *Purpura* with traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Comp Med*, 2024, 34(6): 135-143.

[3] 张博,高敏,任献青,等. 国医大师丁樱治疗过敏性紫癜用药规律研究 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2024, 31(6): 47-53.

ZHANG B, GAO M, REN X Q, et al. Study on the medication law of national TCM master ding Ying in the treatment of henoch-schönlein *Purpura* [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2024, 31(6): 47-53.

[4] CASTAÑEDA S, QUIROGA-COLINA P, FLORANES P, et al. IgA vasculitis (henoch-schönlein *Purpura*): an update on treatment [J]. *J Clin Med*, 2024, 13(21): 6621.

[5] 蔡明阳,苏杭,张博,等. 基于 DNA 甲基化探讨凉血退紫方治疗过敏性紫癜血热妄行证的作用机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(8): 3795-3798.

CAI M Y, SU H, ZHANG B, et al. Exploring the mechanism of Liangxue Tuizi Decoction in treating allergic purpura with blood heat and excessive flow syndrome based on DNA methylation [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2023, 38(8): 3795-3798.

[6] 蔡浩,王强,赵风云. 过敏性紫癜患儿血浆 C₃、C₄、IgA 水平变化及其与肾损伤的关系 [J]. *山东医药*, 2021, 61(14): 82-84.

CAI H, WANG Q, ZHAO F Y. Changes of plasma C₃, C₄ and IgA levels in children with henoch-schonlein *Purpura* and their relationship with renal injury [J]. *Shandong Med J*, 2021, 61(14): 82-84.

[7] 王龙,丁樱,徐闪闪,等. 基于 PERK/eIF2 α 通路探讨清热止血方联合雷公藤多苷治疗紫癜性肾炎大鼠的疗效机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(7): 3424-3429.

WANG L, DING Y, XU S S, et al. Therapeutic mechanism of Qingre Zhixue Formula combined with *Tripterygium wilfordii* polyglycosides in the treatment of Henoch-Schönlein *Purpura* nephritis rats based on PERK/eIF2 α pathway [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2024, 39(7): 3424-3429.

[8] WANG L, HAUENSTEIN A V. The NLRP3 inflammasome: Mechanism of action, role in disease and therapies [J]. *Mol Aspects Med*, 2020, 76: 100889.

[9] 吴静静,任献青,唐进法,等. 基于网络药理学和实验验证探究凉血退紫合剂治疗过敏性紫癜的机制 [J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(5): 92-101.

- WU J J, REN X Q, TANG J F, et al. Mechanism of Liangxue tuizi mixture in treating henoch-schönlein *Purpura* based on network pharmacology and experimental verification [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2022, 38(5): 92–101.
- [10] 李彦红, 朱华, 徐艳峰, 等. 过敏性紫癜兔模型的免疫学改变及机制初探 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(6): 65–69, 11–12.
- LI Y H, ZHU H, XU Y F, et al. Preliminary observation of immunological changes and mechanism in the rabbit models of Henoch-Schönlein *Purpura* [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2013, 21(6): 65–69, 11–12.
- [11] 周伟, 张晨星, 吴凤岐, 等. 中国儿童血管炎诊断与治疗系列专家共识之一——总论 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2023, 38(4): 241–247.
- ZHOU W, ZHANG C X, WU F Q, et al. Consensus on diagnosis and treatment of childhood vasculitis in China: General [J]. *Chin J Pract Pediatr*, 2023, 38(4): 241–247.
- [12] 傅桐, 杜悦. 儿童 IgA 血管炎诊断与治疗 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2022, 37(1): 17–21.
- FU T, DU Y. Diagnosis and treatment of IgA vasculitis in children [J]. *Chin J Pract Pediatr*, 2022, 37(1): 17–21.
- [13] 胡艳, 袁昕, 曹童童, 等. 儿童过敏性紫癜、紫癜性肾炎的中西医结合诊疗方案 [J]. *北京中医药*, 2024, 43(2): 109–113.
- HU Y, YUAN X, CAO T T, et al. Diagnosis and treatment plan of integrated Chinese and western medicine for children with allergic *Purpura* and *Purpura* nephritis [J]. *Beijing J Tradit Chin Med*, 2024, 43(2): 109–113.
- [14] 杨文, 宋纯东, 宋丹, 等. 不同疗程中医干预对皮肤型过敏性紫癜患儿皮疹反复及肾损害的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2024, 35(4): 917–920.
- YANG W, SONG C D, SONG D, et al. Effects of different courses of TCM intervention on skin rash recurrence and renal damage in children with cutaneous allergic *Purpura* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2024, 35(4): 917–920.
- [15] 赵亚格, 丁樱, 徐闪闪, 等. 犀角地黄汤治疗过敏性紫癜研究进展 [J/OL]. *中华中医药学刊*, 2025: 1–11. (2025–01–10). <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=ZYHS20250109006&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
- ZHAO Y G, DING Y, XU S S, et al. Research progress of Xijiao Dihuang decoction in treating allergic *Purpura* [J/OL]. *China Ind Econ*, 2025: 1–11. (2025–01–10). <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=ZYHS20250109006&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
- [16] FEI Q, MA H, ZOU J, et al. Metformin protects against ischaemic myocardial injury by alleviating autophagy-ROS-NLRP3-mediated inflammatory response in macrophages [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 145: 1–13.
- [17] SHO T, XU J. Role and mechanism of ROS scavengers in alleviating NLRP3-mediated inflammation [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2019, 66(1): 4–13.
- [18] PAIK S, KIM J K, SILWAL P, et al. An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(5): 1141–1160.
- [19] ZOROV D B, JUHASZOVA M, SOLLOTT S J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release [J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(3): 909–950.
- [20] GONG G, WAN W, ZHANG X, et al. Management of ROS and regulatory cell death in myocardial ischemia-reperfusion injury [EB/OL]. (2024–06–09) [2024–10–22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38852121/>.
- [21] YU Y, LIU S, YANG L, et al. Roles of reactive oxygen species in inflammation and cancer [J]. *MedComm* (2020), 2024, 5(4): e519.
- [22] ZENG Y, LUO M, YAO Z, et al. Adiponectin inhibits ROS/NLRP3 inflammatory pathway through FOXO3A to ameliorate oral submucosal fibrosis [J]. *Odontology*, 2024, 112(3): 811–825.
- [23] TANG Y S, ZHAO Y H, ZHONG Y, et al. Neferine inhibits LPS-ATP-induced endothelial cell pyroptosis *via* regulation of ROS/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway [J]. *Inflamm Res*, 2019, 68(9): 727–738.
- [24] JIANG L, YANG F, LIAO H, et al. Molybdenum and cadmium cause blood-testis barrier dysfunction through ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation in sheep [J]. *Sci Total Environ*, 2024, 906: 167267.
- [25] DU G, YANG Z, WEN Y, et al. Heat stress induces IL-1 β and IL-18 overproduction *via* ROS-activated NLRP3 inflammasome: implication in neuroinflammation in mice with heat stroke [J]. *Neuroreport*, 2024, 35(9): 558–567.
- [26] 徐富梅, 曾俊媛, 赵磊, 等. 基于 NLRP3 炎症小体探讨中药抗炎作用的研究现状 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(6): 923–927.
- XU F M, ZENG J Y, ZHAO L, et al. Research status of anti-inflammatory effect of traditional Chinese medicine based on NLRP3 inflammatory body [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2024, 40(6): 923–927.
- [27] JIANG X, MA C, GAO Y, et al. Tongxinluo attenuates atherosclerosis by inhibiting ROS/NLRP3/caspase-1-mediated endothelial cell pyroptosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 304: 116011.
- [28] DENG D, ZHAO M, LIU H, et al. Xijiao Dihuang

- decoction combined with Yinqiao powder promotes autophagy-dependent ROS decrease to inhibit ROS/NLRP3/pyroptosis regulation axis in influenza virus infection [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155446.
- [29] TAN J J, DAI Y F, WANG F, et al. Pepsin-mediated inflammation in laryngopharyngeal reflux *via* the ROS/NLRP3/IL-1 β signaling pathway [J]. *Cytokine*, 2024, 178: 156568.
- [30] 赵哲, 陈光顺, 白敏, 等. 基于 NLRP3/ASC/Caspase-1 通路探讨真武汤改善脾肾阳虚型糖尿病肾病炎症损伤的机制 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(7): 853-863.
- ZHAO Z, CHEN G S, BAI M, et al. Mechanism of Zhenwu Decoction in improving renal inflammatory injury in diabetes with spleen-kidney Yang deficiency based on NLRP3/ASC/Caspase-1 pathway [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(7): 853-863.
- [31] 江彬, 高梓珊, 余芝, 等. 基于 ROS-NLRP3 通路探讨麦粒灸治疗佐剂性关节炎大鼠的作用及机制 [J]. *南京中医药大学学报*, 2023, 39(6): 548-556.
- JIANG B, GAO Z S, YU Z, et al. Study on the effect and mechanism of wheat-grain moxibustion on adjuvant arthritis rats based on ROS-NLRP3 pathway [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2023, 39(6): 548-556.
- [32] 富丹婷, 施佳君, 杨钦钦, 等. 土茯苓总黄酮改善 ISO 诱导的小鼠心肌肥大和心炎症的预防作用及机制 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(8): 1023-1031.
- FU D T, SHI J J, YANG Q Q, et al. Mechanism of *Smilax glabra* flavonoids amelioration of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and cardiac inflammation in mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(8): 1023-1031.
- [33] 高烁烁. 基于 NLRP3 炎症小体研究消癥汤治疗儿童过敏性紫癜的相关机制 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2022.
- GAO S S. Study on the related mechanism of Xiaodian Decoction in the treatment of children with Henoch-Schonlein purpura based on NLRP3 in inflammasome [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2022.
- [34] 张贝贝, 曾梦楠, 阚玉璇, 等. 地黄通过雌激素受体干预脂多糖诱导的脓毒症急性肾损伤 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2023, 42(4): 240-248.
- ZHANG B B, ZENG M N, KAN Y X, et al. Effects of *Rehmannia glutinosa* on LPS-induced septic acute kidney injury through estrogen receptors [J]. *Chin J New Drugs Clin Remedies*, 2023, 42(4): 240-248.
- [35] 李凡凡, 徐阳, 王晓旭. 紫草素调节 Nrf2/HO-1 信号通路对实验性大鼠肉芽肿性小叶性乳腺炎的治疗作用研究 [J]. *中国临床解剖学杂志*, 2024, 42(1): 26-32.
- LI F F, XU Y, WANG X X. Therapeutic effect of shikonin on the treatment of granuloma lobular mastitis in model rats by regulating Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Chin J Clin Anat*, 2024, 42(1): 26-32.
- [36] 廖太阳, 李晓辰, 杨楠, 等. 白芍总苷经活性氧-线粒体途径改善骨关节炎软骨细胞自噬性死亡 [J]. *医学研究与战创伤救治*, 2023, 36(4): 337-342.
- LIAO T Y, LI X C, YANG N, et al. Total glucosides of paeony ameliorated autophagic death of osteoarthritis chondrocytes by reactive oxygen species-mitochondria pathway [J]. *J Med Res Combat Trauma Care*, 2023, 36(4): 337-342.
- [37] 吴苏豫, 王海涛, 张杨, 等. 基于 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路探究白芍总苷对自身免疫性甲状腺炎大鼠炎症损伤的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(8): 1495-1500.
- WU S Y, WANG H T, ZHANG Y, et al. Effects of total glucosides of paeony on inflammatory injury in autoimmune thyroiditis rats based on TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2024, 40(8): 1495-1500.
- [38] 管咏梅, 王志艳, 王舒慧, 等. 基于 NF- κ B/Nrf2/HO-1 信号通路及 Bcl-2/Caspase-3 凋亡蛋白表达探讨雷公藤-川芎组分配伍对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(2): 17-26.
- GUAN Y M, WAN Z Y, WANG S H, et al. Combination of components from *Tripterygium Radix* et rhizoma-Chuanxiong rhizoma affects RA-FLSs by regulating NF- κ B, Nrf2/HO-1 signaling pathways and Bcl-2/Caspase-3 expression [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2025, 31(2): 17-26.
- [39] 张金霞. 复方甘草酸苷的药理作用及临床应用和不良反应 [J]. *中国医药指南*, 2011, 9(27): 198-199.
- ZHANG J X. Pharmacological Actions, Clinical Applications and Adverse Reactions of Compound Glycyrrhizin [J]. *China Medical Guide*, 2011, 9(27): 198-199.
- [40] LI C, WANG Z B. Clinical application of compound Glycyrrhizin tablets in the treatment of patients with Simplex Henoch-Schonlein *Purpura* and its effect on immune function [J]. *Pak J Med Sci*, 2022, 38(1): 271-275.

[收稿日期] 2024-10-22

范欣悦,何汶璐,董丽,等. 金钗石斛提取物对秀丽隐杆线虫帕金森病模型的神经保护作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(4): 31-42.

Fan XY, He WL, Dong L, et al. Neuroprotective effect of *Dendrobium nobile* Lindl extract on *Caenorhabditis elegans* model of Parkinson's disease [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 31-42.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.004

金钗石斛提取物对秀丽隐杆线虫帕金森病模型的神经保护作用研究

范欣悦¹,何汶璐¹,董 丽¹,侯志颖²,郑涵文³,
Alberto Carlos Pires Dias⁴,王 琼^{1,2*}

(1.西南医科大学附属中医医院中葡中医药国际合作中心,四川 泸州 646000;2.中国农业科学院农产品加工研究所,北京 100193;3.山东大学齐鲁医学院基础医学院生理教研室,济南 250012;4.葡萄牙米尼奥大学分子和环境生物学中心生物系中葡食药资源研究中心,葡萄牙 布拉加,4710-057)

【摘要】 目的 探究金钗石斛(*Dendrobium nobile* Lindl, DNL)提取物在帕金森病(Parkinson's disease, PD)线虫模型中的神经保护作用。**方法** 分别用 7.5、15 和 30 mg/L 的 DNL 提取物对转基因模型秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*) NL5901 和经 6-羟基多巴胺(6-Hydroxydopamine, 6-OHDA)诱导的 N2、BZ555、PD4521 及 CB7272 线虫进行处理,分别观测线虫生存率、基础减慢反应率、 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)聚集情况、多巴胺能神经元(dopaminergic neurons, DN)情况、体壁肌肉细胞线粒体分布密度及膜内蛋白水平。检测经 6-OHDA 诱导的 N2 线虫体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)活性,探究 DNL 对 PD 线虫模型的抗氧化应激能力的作用。**结果** 与模型组相比,线虫经 DNL 及左旋多巴(levodopa, L-DOPA)处理后 DN 荧光强度明显增强($P < 0.05$, $P < 0.001$), α -syn 聚集明显减少($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$),基础减慢率均增加($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.0001$),线粒体密度增大($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$),线粒体内膜蛋白含量增加($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$),并且 SOD 含量增加($P < 0.05$),GSH 含量也呈上升趋势;线虫体内 ROS 含量减少($P < 0.01$)。在寿命试验中,N2 野生型线虫和两种 PD 线虫经 DNL 处理后寿命均延长($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。**结论** DNL 能有效改善 *C. elegans* PD 模型的运动麻痹,改善 DN 退化,抑制 α -syn 的聚集和神经元的损伤,增加抗氧化应激能力,减缓线虫衰老过程。

【关键词】 金钗石斛;帕金森病;秀丽隐杆线虫;神经保护

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0031-12

Neuroprotective effect of *Dendrobium nobile* Lindl extract on *Caenorhabditis elegans* model of Parkinson's disease

【基金项目】 国家重点研发计划(2024YFD1600603)。

【作者简介】 范欣悦(1999—),女,在读硕士研究生,研究方向:中药神经药理与航天医学。E-mail:819242595@qq.com

【通信作者】 王琼(1975—),女,博士,研究员,博士生导师,研究方向:中药神经药理与航天医学。E-mail:luyiwangqiong@163.com

FAN Xinyue¹, HE Wenlu¹, DONG Li¹, HOU Zhiying², ZHENG Hanwen³, Alberto Carlos Pires Dias⁴, WANG Qiong^{1,2*}
(1. Sino-Portugal TCM International Cooperation Center, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China. 2. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193. 3. Department of Physiology, School of Basic Medical Sciences, Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan 250012. 4. Center of Molecular and Environmental Biology (CBMA), Department of Biology, SINO-PT Research Center For Food and Medicinal Plant Resources, University of Minho, Braga 4710-057, Portugal)

【Abstract】 Objective To investigate the neuroprotective effect of *Dendrobium nobile* Lindl (DNL) extract in a *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) model of Parkinson's disease (PD). **Methods** *C. elegans* NL5901 and 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced N2, BZ555, PD4521, and CB7272 *C. elegans* strains were treated with DNL 7.5, 15, and 30 mg/L. The survival rate, basal slowing response rate, α -synuclein (α -syn) aggregation, dopaminergic neurons (DNs), mitochondrial distribution density of body wall muscle cells, and protein levels in the membrane were observed. In addition, reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) in 6-OHDA induced N2 was detected to explore the effect of DNL on the antioxidative stress ability of PD *C. elegans* models. **Results** Compared with that in the model group, the DN fluorescence intensity was significantly increased in nematodes treated with DNL and levodopa (L-DOPA) ($P < 0.05$, $P < 0.0001$), α -syn aggregation was significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$), the basal slowing rate ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), mitochondrial density ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), mitochondrial intima protein content ($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$), SOD content ($P < 0.05$), and GSH content were all increased. The ROS content was reduced in nematodes ($P < 0.01$). The lifespans of N2 wild-type and PD *C. elegans* models were prolonged after DNL treatment ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusions** DNL can effectively improve motor paralysis in a *C. elegans* PD model, improve DN degradation, inhibit α -syn aggregation and neuronal damage, increase the antioxidative stress ability, and slow the aging process in *C. elegans*.

【Keywords】 *Dendrobium nobile* Lindl; Parkinson's disease; *Caenorhabditis elegans*; neuroprotection

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

神经退行性疾病严重危害全球老年人的健康,帕金森病(Parkinson's disease, PD)是这类疾病中常见的一种^[1]。PD与黑质多巴胺能神经元(dopaminergic neurons, DNs)损伤有关,导致静止性震颤、运动迟缓和自主神经功能紊乱等。其病理特征是 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)和泛素化蛋白聚集成路易小体^[2-3]。目前PD的标准临床治疗方法旨在缓解症状,并不能有效阻止病情的发展,现美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准用于治疗PD的几类药物如长期使用可能造成运动障碍、恶心、低血压等并发症^[3]。所以寻找合适的治疗策略以改善或者延缓疾病进展具有重要意义。虽然PD具体病因不明,但是丰富的资料表明氧化应激和线粒体功能障碍在DNs变性中发挥重要作用^[4]。

在神经系统、信号转导和衰老相关基因通路等研究领域中,秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis*

elegans, *C. elegans*)已然成为重要的模式生物。*C. elegans*因生命周期短、通体透明、可大量同步、培养环境简易等特点,而具有很多其他模式动物都无法与之相较的优点,使其非常便于研究^[5]。此外,*C. elegans*神经递质合成和释放通路与哺乳动物有着较高的保守性,有包含DNs在内的完整的神经元系统,且与哺乳动物(包括人类)的部分基因在遗传学上高度保守,可从行为和遗传水平探究其神经保护的机制^[5-8]。*C. elegans*具有许多与PD相关的同源基因,是研究PD的良好模式生物^[9]。在以往的线虫研究中, α -syn聚集情况、DNs损伤程度、抗氧化应激能力、线粒体损伤情况等是常用于研究PD的考察指标^[10-11]。

金钗石斛(*Dendrobium nobile* Lindl, DNL)是一种兰科属多年附生草本植物,又名金钗石、扁金钗等,主要在云南、贵州、四川等地生长^[12]。古医书《神农本草经》记载了DNL具有“主伤中,除痹,下气,补五脏虚劳、羸瘦、强阴”之功效,可用

于热病伤津、口渴舌燥、病后虚热等^[13-14]。DNL 含多糖、生物碱、酚类和黄酮等多种化学成分^[15-16],已有研究报道石斛多糖在生物体中可以调节免疫和抗氧化^[17],石斛碱可改善阿尔茨海默病^[18]。研究表明,金钗石斛在动物体内具有确切的氧化损伤保护和线粒体功能障碍的作用^[19-20]。本研究选用产自四川泸州地区的 DNL,用水溶醇提法提取并制成干燥粉末,二甲基亚砜作为溶剂配制成 60 g/L 的母液,作用于线虫 PD 模型,探究 DNL 对 PD 线虫是否具有神经保护作用,为 DNL 的临床应用提供科研依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

C. elegans 品系:野生型 N2,标记 α -syn 的转基因线虫 NL5901 (pkIs2386 [unc-54p:: α -synuclein::YFP+unc-119]),标记 DN 的转基因线虫 BZ555 (egl-1 [dat-1p::GFP]),标记体壁肌肉细胞中的线粒体的转基因线虫 PD4251 [(pSAK2) myo-3p::GFP::LacZ::NLS + (pSAK4 myo-3p::mitochondrial) GFP + dpy-20(+)],由绿、红两种荧光分别标记咽肌及体壁中的复合物 I、II、III 和咽肌及表皮中的复合物 IV、V 的转基因线虫 CB7272,均由西南医科大学衰老与再生医学实验室罗怀容团队惠赠。

1.2 主要试剂与仪器

金钗石斛来自泸州市合江县。取金钗石斛干茎,粉碎,与 80%乙醇按 w:v=1:10 料液比混合,室温浸泡 12 h,煮沸状态下回流 3 次,每次 2 h,过滤、弃渣;将滤液进行旋蒸浓缩、冷冻干燥,碾磨制成粉末备用^[21]。

二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 碧云天);胰蛋白胨 (北京索莱宝科技有限公司);酵母粉 (北京索莱宝科技有限公司);琼脂粉 (北京索莱宝科技有限公司);胆固醇 (北京索莱宝科技有限公司);氟尿脱氧核苷 (FUDR, 阿拉丁);左旋多巴胺 (levodopa, L-DOPA, 阿拉丁);6-羟多巴胺 (6-OHDA, 源叶生物);抗坏血酸 (阿拉丁);盐酸左旋咪唑 (阿拉丁);H2DCF-DA 探针 (碧云天);SOD 试剂盒 (碧云天);GSH 试剂盒 (南京建成);BCA 试剂盒 (南京建成)。NGM 培养基 (400 mL) 由 1.2 g 氯化钠、1.0 g 蛋白胨、7.0 g 琼脂粉和

5 mg/mL 胆固醇 400 μ L 配制,经高压蒸气灭菌,温度降至 60 $^{\circ}$ C 后依次加入 1 mol/L PB 缓冲液 10 mL、1 mol/L 硫酸镁溶液 400 μ L、1 mol/L 氯化钙溶液 400 μ L。分别将 DNL 与 L-DOPA 加入线虫生长培养基 (nematode growth media, NGM) 中,配制成 7.5、15、30 mg/L DNL 及 2 mmol/L L-DOPA 的药物培养基。

生化培养箱 (上海一恒仪器有限公司);体视显微镜 (桂光仪器有限公司);倒置荧光显微镜 (尼康株式会社);离心机 (湖南湘仪仪器有限公司);高压灭菌锅 (上海申安医疗器械公司);多功能酶标仪 (Tecan Spark)。

1.3 实验方法

1.3.1 线虫培养及同步化

把大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) OP50 涂布于接种线虫的 NGM 培养基表面,将线虫接种后置于 20 $^{\circ}$ C 恒温培养。将产卵期线虫用 M9 缓冲液冲洗收集至离心管,添加线虫裂解液轻微摇动 3 min,待虫体完全裂解,2000 r/min 离心 1 min,丢弃上层清液,以上操作重复两次,随后添加 M9 缓冲液于 20 $^{\circ}$ C 过夜培养,次日将其离心后去上清,将沉淀的虫体置于涂有 *E. coli* OP50 的 NGM 培养基平板上,获得同步后的 L1 期秀丽隐杆线虫。

1.3.2 使用 6-OHDA 诱导 DN 变性

6-OHDA 可选择性地损伤线虫 DN,构建 PD 模型。按照之前的报道用 6-OHDA 处理线虫,造成 DN 损伤的 PD 线虫模型^[22-23]。将同步化得到的 L1 时期线虫,转移至 NGM 平板,20 $^{\circ}$ C 恒温培养至 L3~L4 时期,用含有 50 mmol/L 6-OHDA 和 10 mmol/L 抗坏血酸的 M9 缓冲液处理线虫 1 h,每 10 min 轻柔上下颠倒混匀,以诱导 DN 损伤。待线虫自然沉淀后弃上清,加 M9 缓冲液洗涤,重复洗涤 3 遍。虫体分为 6 组,其中 5 组用 6-OHDA 处理,另外一组用相同体积的 ddH₂O 作为对照 (Control) 组;经 6-OHDA 处理的线虫分为 5 组,分别为模型 (Model) 组、阳性药物 (L-DOPA) 组及 7.5、15 和 30 mg/L DNL 组。

1.3.3 运动能力测定

将同步后的 L4 时期的 N2 线虫按照“1.3.2”中的方法进行处理。分组培养 3 d 后,将线虫挑取在加有 M9 缓冲液的 96 孔板中,线虫适应 1 min 后,记录在 20 s 中线虫身体弯曲的次数,作

为运动能力的指标。每组不少于 30 条线虫。

1.3.4 多巴胺能神经元退化分析

将同步后的 L4 时期的 BZ555 线虫按照“1.3.2”中的方法进行处理并分为 6 组。分组培养处理 3 d 后将线虫挑至含琼脂糖的载玻片上固定,在荧光显微镜下进行拍摄。用 Image J 1.54k 软件用于分析荧光强度^[24]。每组不少于 30 条线虫。

1.3.5 α -syn 聚集分析

将同步后的 L4 时期的 NL5901 线虫分为 5 组,其中一组为对照组,另外 4 组分别用 7.5、15 和 30 mg/L 3 种浓度 DNL 和 2 mmol/L L-DOPA 进行处理,设置为 7.5、15 和 30 mg/L DNL 组及阳性药物(L-DOPA)组。20 °C 培养 3 d 后再将线虫挑至含琼脂糖的载玻片上固定,在荧光显微镜下进行拍摄。Image J 1.54k 软件用于分析荧光强度^[25]。每组不少于 30 条线虫。

1.3.6 食物感知行为分析

将同步后的 L4 时期 N2 线虫用 6-OHDA 造模。分组培养 3 d 后,用 M9 收集线虫,并洗涤除去线虫身上的细菌,分别放于有或无细菌的平板上,静置 5 min 后开始。记录每条线虫在 20 s 内身体弯曲频率,每组设置 3 个平行,每个平行 10 条线虫。基础减慢率=(食物缺失的移动速率-食物存在的移动速率)/食物存在的移动速率^[9]。

1.3.7 寿命分析

分别将同步后的 L4 时期 N2 线虫分为对照组、7.5、15、30 mg/L DNL 共 4 组;L4 时期 N2 线虫按照“1.3.2”中的方法进行处理后分 6 组;L4 时期 NL5901 线虫按照“1.3.5”中的方法分为 5 组。所有的培养基中均加入 FUDR 以抑制线虫妊娠,以排除线虫子代的干扰。每组设置 3 个平行,每个平行 50 条线虫。线虫被转移至药板的时间记为第 0 天,每天用铂丝轻触虫体,若无任何反应,则记录为线虫死亡,剔除因爬至皿壁死亡的线虫,观察记录各组线虫的存活和死亡情况,直到线虫全部死亡。

1.3.8 荧光标记线粒体密度分析

转基因线虫 PD4251 体壁肌肉细胞中的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)荧光标记物质可以用于分析 DNL 对线虫的线粒体表达变化情况^[26]。将同步后的 L4 时期的 PD4251 线

虫按照“1.3.2”中的方法进行处理。分组处理 3 d 后在荧光显微镜下进行拍摄,用 Image J 1.54k 软件分析荧光强度。

1.3.9 荧光标记线粒体呼吸链复合物分析

在转基因线虫 CB7272 的咽肌和体壁中, GFP 标记了复合物 I ~ III;在咽肌和表皮中,红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)标记了复合物 IV、V。分析 CB7272 荧光强度可以确定线粒体呼吸链中复合物的变化情况^[27]。将同步后的 L4 时期的 CB7272 线虫按照“1.3.2”中的方法进行处理 3 d 后在荧光显微镜下进行拍摄,用 Image J 1.54k 软件分析荧光强度。

1.3.10 体内 ROS 测定

将同步后的 L4 时期的 N2 线虫按照 1.3.2 中的方法处理 3 d 后,用 M9 缓冲液冲洗收集线虫,离心后加入 1 mL 浓度为 50 μ mol/L 的 H2DCFDA 探针,20 °C 避光放置 1 h,用 M9 缓冲液清洗 3 次,将线虫挑至含琼脂糖的载玻片上固定,荧光显微镜下测定 488 nm 的荧光强度^[28]。用 Image J 1.54k 软件分析荧光强度。每组至少 30 只线虫。

1.3.11 体内 GSH 和 SOD 测定

抗氧化防御系统是抗氧化能力的重要组成部分,其中 SOD 负责清除活性氧, GSH 可以与自由基结合加速自由基排泄。为了研究 DNL 对 PD 线虫模型抗氧化防御系统的影响,检测线虫体内 SOD 与 GSH 的含量。将同步后的 L4 时期 N2 线虫分为对照组、模型组和 15 mg/L DNL 组,分组培养 3 d 后,用 M9 缓冲液收集线虫,加入裂解液,用预冷的玻璃匀浆器进行碾磨,12 000 r/min 离心 5 min,收集上清液,分别按照试剂盒的方法进行 SOD 活性、GSH 含量测定^[23]。蛋白浓度测定使用 BCA 方法测定。

1.4 统计学方法

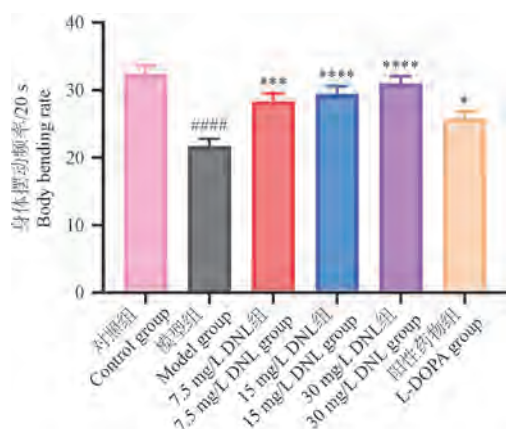
本研究的数据用 GraphPad Prism 8.4 软件进行处理,数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用单因素方差分析方法,多重比较方差齐时,寿命实验采用 Kaplan-Meier 和 log-rank 检验法分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DNL 改善 PD 线虫的运动能力

PD 线虫模型的主要特点是运动障碍。正常

情况下, N2 线虫在 M9 缓冲液中会左右弯曲摆动, 线虫在液体中的移动速率, 也称为摆动速率, 即单位时间内身体弯曲的次数。通过观察线虫身体摆动情况判断其运动能力。与对照组相比, 模型组运动能力明显降低 ($P < 0.0001$); 7.5、15 和 30 mg/L DNL 组和阳性药物组与模型组相比, 运动能力均显著增强 ($P < 0.05$)。因此可以明确 DNL 具有改善 PD 线虫运动能力的作用(图 1)。

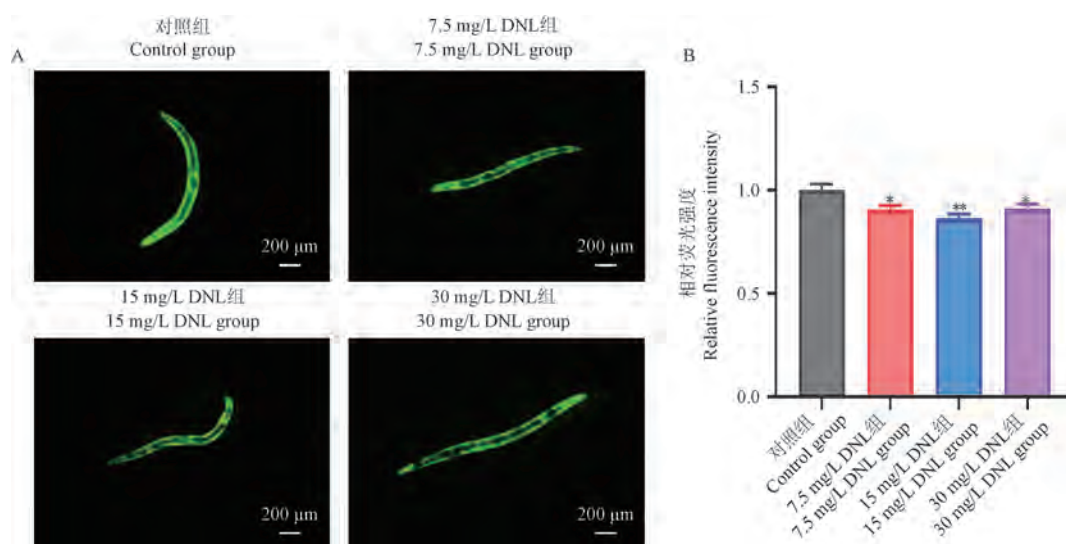


注:与对照组相比,#### $P < 0.0001$;与模型组相比,* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 1 DNL 改善 PD 线虫的运动能力

Note. Compared with Control group,#### $P < 0.0001$. Compared with Model group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Figure 1 DNL improved the motor capacity of PD *C. elegans*



注:A:各组荧光显微镜下 α -syn 聚集图像;B: α -syn 相对荧光强度。与对照组相比,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 DNL 改善 NL5901 线虫 α -syn 聚集

Note. A, Image of α -syn aggregation in each group under fluorescence microscope. B, Relative fluorescence intensity of α -syn. Compared with Control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

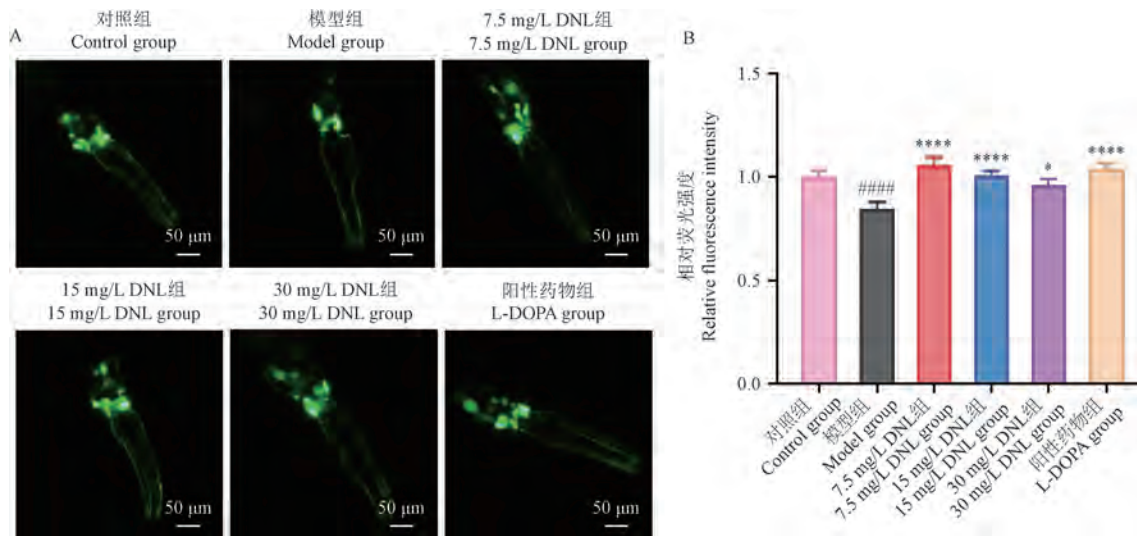
Figure 2 DNL decreased α -synuclein aggregation in NL5901 *C. elegans*

2.2 DNL 改善 NL5901 线虫 α -syn 聚集

当 α -syn 在 NL5901 线虫体内聚集时,可通过荧光显微镜观察 GFP。通过分析 α -syn 聚集情况,可确定 DNL 是否有抑制 α -syn 聚集的作用。与对照组相比,DNL 3 个浓度组 α -syn 聚集均减少 ($P < 0.05$)。提示 DNL 有效改善 NL5901 线虫体内的 α -syn 聚集(图 2)。

2.3 DNL 改善 6-OHDA 诱导的 BZ555 线虫多巴胺能神经元损伤

雌雄同体的 *C. elegans* 具有 8 个多巴胺能神经元,包括多巴胺能神经元前斜角神经元、头感觉神经元和后斜角神经元^[28]。*C. elegans* 的 DNs 胞体丢失,以及神经元轴突消失、突起断裂、树突末梢退缩等都可以反映出线虫 DNs 的损伤。BZ555 线虫的 DNs 特异性表达 GFP,经 6-OHDA 暴露后可在线虫头部区域观察到 DNs 形态异常。对 BZ555 DNs 分析可确定 DNL 是否对线虫 DNs 具有保护作用。如图 3 所示,与对照组相比,模型组 DNs 荧光强度降低 14.86% ($P < 0.0001$),并且有神经元完整性的丧失,出现树突形状改变和缺失。与模型组相比,经 7.5、15 和 30 mg/L DNL 及阳性药物处理的线虫 DNs 荧光强度分别增强 24.59%、18.70%、13.86%、22.47% ($P < 0.05$)。提示 DNL 能有效改善 6-OHDA 对线虫造成的



注:A:各组荧光显微镜下多巴胺能神经元图像;B:多巴胺能神经元相对荧光强度。与对照组相比,#### $P<0.0001$;与模型组相比,* $P<0.05$,**** $P<0.0001$ 。

图3 DNL改善6-OHDA诱导的BZ555线虫多巴胺能神经元损伤

Note. A, DNs images under fluorescence microscope in each group. B, Relative fluorescence intensity of dopaminergic neurons. Compared with Control group,#### $P<0.0001$. Compared with Model group,* $P<0.05$,**** $P<0.0001$.

Figure 3 Protection of DNL against 6-OHDA-induced DNs degeneration in BZ555 *C. elegans*

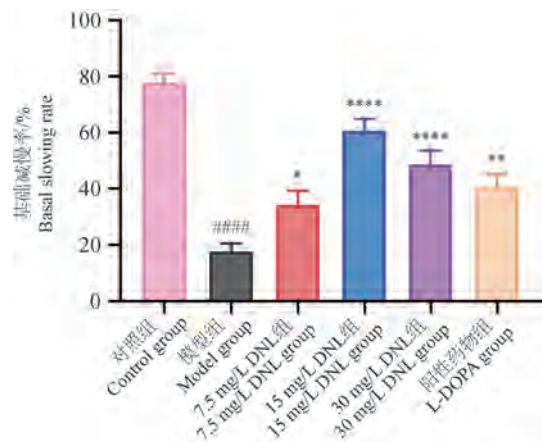
DNs损伤,对其具有保护作用。

2.4 DNL提高PD线虫基础减慢率

DNs的感知食物功能可以直接影响*C. elegans*的行为。正常摄食的线虫在有食物存在的平板中运动缓慢,在没有细菌的培养板中运动较快。如果DNs破坏,会降低在有食物存在的情况下线虫减慢运动速度的能力,导致爬行速度加快^[22]。所以进行食物感知行为分析可以确定DNL是否对于DNs具有保护作用。经6-OHDA处理后,与对照组相比,模型组线虫基础减慢率下降了77.20% ($P<0.0001$),7.5 mg/L DNL组与模型组相比基础减慢率增加 ($P<0.05$),15 mg/L DNL组和30 mg/L DNL组与模型组相比基础减慢率增加了240.33%和173.19% ($P<0.0001$),阳性药物组与模型组相比基础减慢率增加了127.87% ($P<0.01$)。提示DNL有效改善PD线虫模型的食物感知行为,具有保护其DNs的作用(图4)。

2.5 DNL提高线虫寿命

在N2线虫中,15 mg/L DNL ($P<0.001$)和30 mg/L DNL ($P<0.0001$)均有效延长线虫寿命;在经6-OHDA诱导的PD线虫中,DNL各浓度组及



注:与对照组相比,#### $P<0.0001$;与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,**** $P<0.0001$ 。

图4 DNL提高线虫基础减慢率

Note. Compared with Control group,#### $P<0.0001$. Compared with Model group,* $P<0.05$,** $P<0.01$,**** $P<0.0001$.

Figure 4 DNL improved slowing rate of *C. elegans*

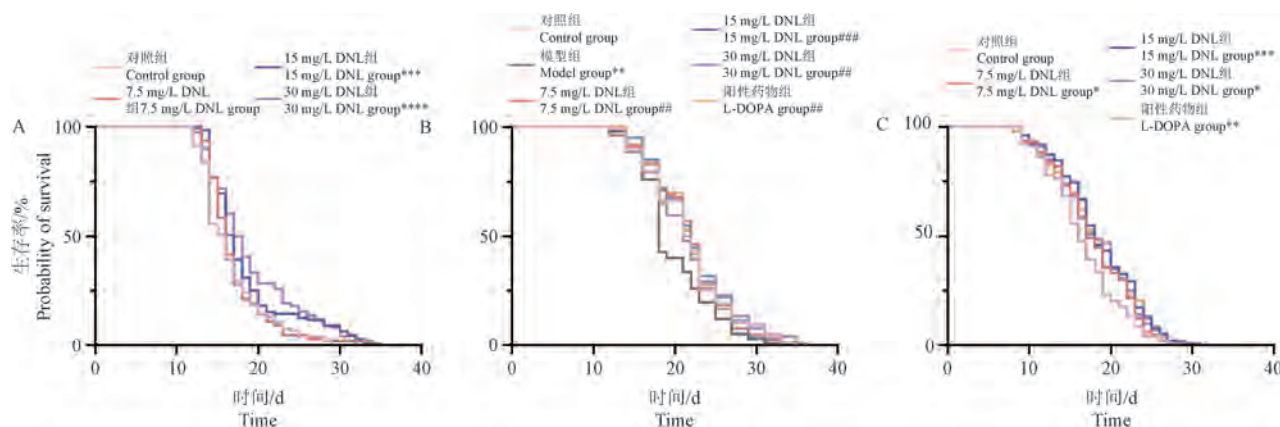
阳性药物组均有效提高线虫寿命 ($P<0.01$),其中15 mg/L DNL组效果最为明显 ($P<0.001$);在NL5901线虫中DNL各组及阳性药物组均有效提高线虫寿命 ($P<0.05$),其中15 mg/L DNL组效果最为明显 ($P<0.001$)。说明DNL具有提高N2线

虫和 PD 线虫模型寿命的作用(图 5)。

2.6 DNL 提高经 6-OHDA 诱导的 PD4251 线虫线粒体密度

如图 6 所示,6-OHDA 导致 PD4251 线虫的线粒体密度降低。PD4251 线虫体壁和外阴肌肉中表达的荧光标记物的变化情况可以反映线粒体

表达变化情况。7.5 mg/L DNL 组与模型组相比,平均荧光强度提高 36.17% ($P < 0.001$), 15 mg/L、30 mg/L DNL 和 L-DOPA 处理后的线虫平均荧光强度分别提高 32.78%、28.36% 和 33.03% ($P < 0.01$)。提示 DNL 可以改善 6-OHDA 引起的线粒体减少。

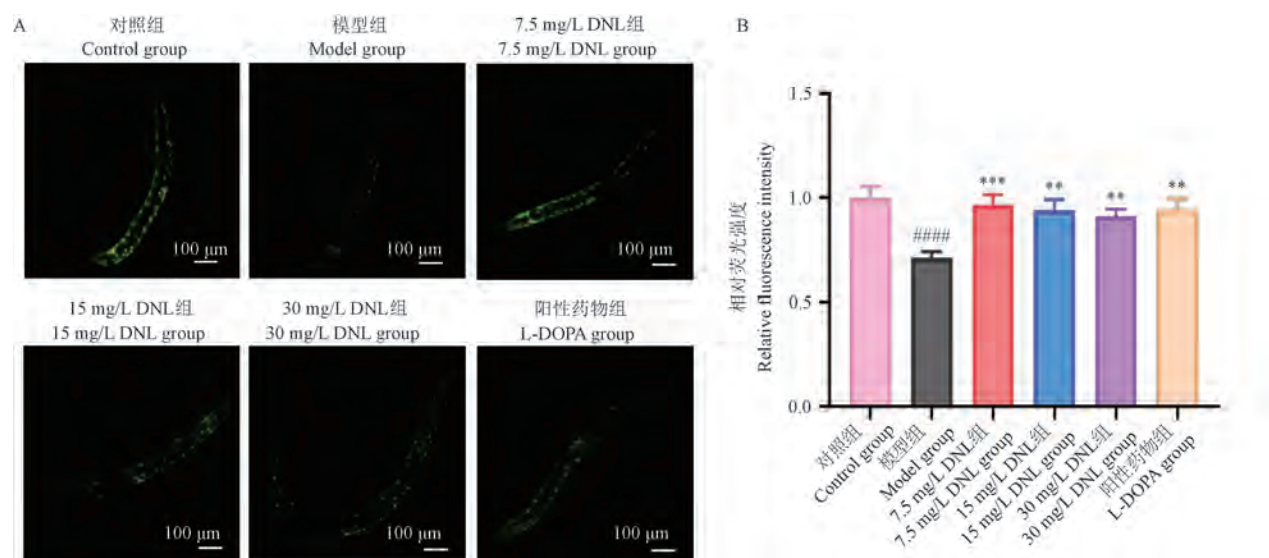


注:A:N2 野生型线虫生存率;B:6-OHDA 诱导的 PD 模型线虫生存率;C:NL5901 线虫生存率。与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$;与模型组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图 5 DNL 提高线虫寿命

Note. A, Survival rate of N2 wild-type nematodes. B, Survival rate of 6-OHDA-induced PD model nematodes. C, Survival rate of the NL5901 model nematodes. Compared with Control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Compared with Model group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 5 DNL extended the lifespan of *C. elegans*



注:A:线粒体密度;B:相对荧光强度。与对照组相比,**** $P < 0.0001$;与模型组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图 6 DNL 提高经 6-OHDA 诱导的 PD4251 线虫线粒体密度

Note. A, Mitochondrial density. B, Relative fluorescence intensity. Compared with Control group, **** $P < 0.0001$. Compared with Model group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 6 DNL increased mitochondrial density in PD4251 *C. elegans* induced by 6-OHDA

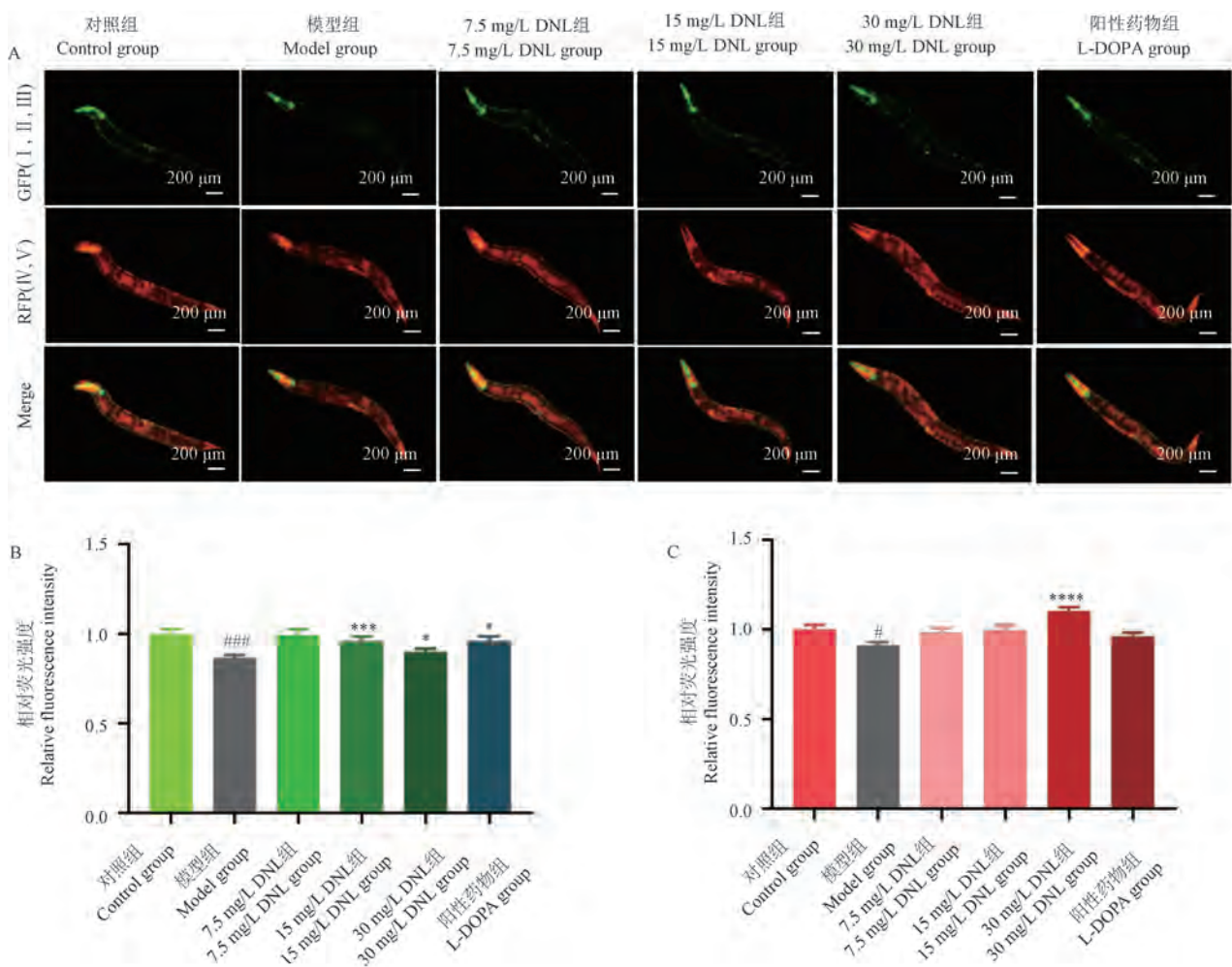
2.7 DNL 影响经 6-OHDA 诱导的 CB7272 线虫内膜蛋白水平

呼吸链复合物 I ~ V 是线粒体氧化还原反应与电子传递过程中重要的内膜蛋白,在线粒体的生理活动中发挥关键作用^[29]。在荧光显微镜下,CB7272 线虫的咽部和体壁可观察到由 GFP 标记的复合物 I、II、III,咽部和表皮可观察到由 RFP 标记的复合物 IV 和 V^[27]。与对照组相比,模型组 GFP ($P<0.001$) 和 RFP ($P<0.05$) 表达均减少。经 15、30 mg/L DNL 和 L-DOPA 处理后,GFP 平均荧光强度分别增加 14.86% ($P<0.001$)、10.70%

($P<0.05$)、10.83% ($P<0.05$);经 30 mg/L DNL 处理后,RFP 平均荧光强度增加 20.74% ($P<0.0001$),表明经 DNL 处理,增加了经 6-OHDA 诱导 CB7272 线虫线粒体复合物 I~V 的表达(图 7)。

2.8 DNL 影响 6-OHDA 诱导的 N2 线虫 ROS、SOD 和 GSH 水平

结果如图 8 所示,在 15 mg/L DNL 处理后,SOD 活性增加 47.02% ($P<0.05$),GSH 含量呈上升趋势。表明 DNL 可能通过提高线虫体内抗氧化酶水平和参与氧化还原反应,间接改善 PD 模型线虫的神经运动症状。

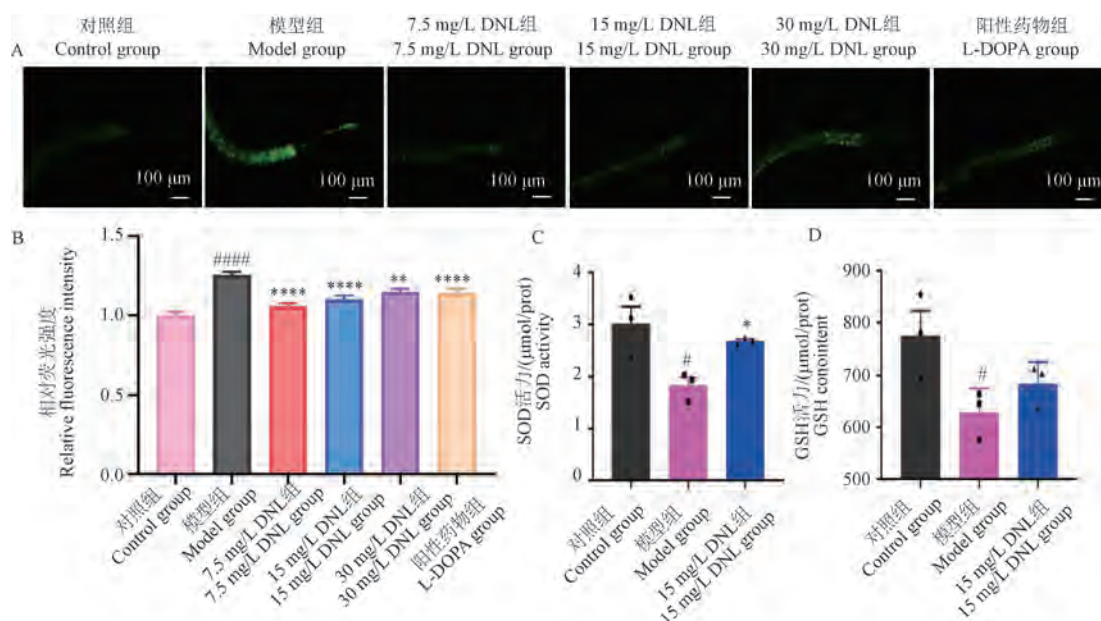


注:A:CB7272 线虫 GFP、RFP 通道下线粒体呼吸链复合物 I ~ V 表达情况;B:GFP 相对荧光强度;C:RFP 相对荧光强度。与对照组相比,* $P<0.05$,*** $P<0.001$;与模型组相比,* $P<0.05$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$ 。

图 7 DNL 影响经 6-OHDA 诱导的 CB7272 线虫内膜蛋白水平

Note. A, Expression of mitochondrial respiratory chain complex I to V in GFP and RFP channels of CB7272. B, Relative fluorescence intensity of GFP. C, Relative fluorescence intensity of RFP. Compared with Control group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$. Compared with Model group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

Figure 7 DNL affected the protein levels of CB7272 *C. elegans* induced by 6-OHDA



注:A:ROS 荧光图像;B:ROS 相对荧光强度;C:SOD 活力;D:GSH 含量。与对照组相比,[#] $P<0.05$,^{####} $P<0.0001$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$,^{****} $P<0.0001$ 。

图 8 DNL 影响 6-OHDA 诱导的 N2 线虫 ROS、SOD 和 GSH 水平

Note. A, ROS fluorescence image. B, Relative fluorescence intensity of ROS. C, SOD activity. D, GSH content. Compared with Control group, [#] $P<0.05$, ^{####} $P<0.0001$. Compared with Model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$, ^{****} $P<0.0001$.

Figure 8 DNL affected levels of ROS, SOD and GSH in 6-OHDA-induced N2 *C. elegans*

3 讨论

将 DNL 作用于 PD 模型动物 *C. elegans*, 得到的结果展现了 DNL 对其的保护作用, 包括抑制 α -syn 的聚集、减少线虫神经元的破坏程度和延长线虫的寿命等。

PD 患者的临床症状表现为动作迟缓、强直、震颤和姿势稳定性降低, 患者脑神经元内形成路易小体和缺失黑质 DN 是主要病理特征。研究发现当至少 50% 的黑质 DN 和 70% 壳核多巴胺能组织内容物缺失时, 就会出现典型的运动迟缓特征^[30]。 α -syn 基因是最早发现与帕金森病相关的基因^[31], 也是研究最广泛的 PD 相关常染色体显性遗传基因^[2,31]。 α -syn 作为 PD 的病理学标志物, 是路易小体的主要成分, 也是导致发病的重要因素。PD 的发病机制与线粒体功能的缺失与否有关。6-OHDA 会诱导细胞的线粒体自噬^[32], 引起线粒体断裂^[33]。经 6-OHDA 诱导, *C. elegans* 体内引起氧化应激, α -syn 聚集, ROS 急剧增加, ROS 作用于脂肪酸产生过氧化脂质, 并通过干扰线粒体呼吸链降低 ATP 水平导致细

胞死亡^[34]。ROS 受到多种内源性氧化酶的严密调控, 如 SOD 和 GSH 等, 若机体的抗氧化能力降低与 ROS 的产生不平衡, 也会导致细胞损伤引起细胞凋亡^[35]。

目前 PD 的药物治疗方法是用 L-DOPA 来替代多巴胺, 但是随着疾病的发展, 多巴胺能神经元损耗逐渐增加, 需要的药物剂量也越大, 并且较多的 DN 缺失和高剂量的 L-DOPA 组合会导致 PD 患者出现各种运动障碍的并发症^[36-37]。研究发现, DNL 具有生物碱、倍半萜、菲和联苄类等高活性药物成分^[38], 已有报道其在抗肿瘤^[39]、抗衰老^[38,40]等疾病方面的作用。网络药理学研究表明 DNL 具有 PD 相关靶点^[41], 对 PD 小鼠有一定的神经保护作用, 具有缓解运动障碍和降低炎症因子的作用^[21]。

本实验探究了 DNL 对秀丽隐杆线虫 PD 模型 NL5901 体内 α -syn 沉积的影响, 结果显示给药组线虫体内荧光蛋白和 unc-119 融合蛋白的荧光减弱, 证明 DNL 可以有效抑制 α -syn 的聚集。DN 减少也是帕金森病重要的病理特征之一, 它的缺损能导致发病体产生渐进性运动缺陷^[42]。

本研究选择了能很好观测多巴胺能神经元变化的 BZ555 线虫。DNs 的感知食物功能可以直接影响秀丽隐杆线虫的行为。如果线虫 DNs 破坏,有食物存在的情况下线虫减慢运动速度的能力会降低。对线虫进行食物感知行为分析,结果显示 DNL 可以抑制由 6-OHDA 诱导的线虫体内 DNs 的破坏,体现了其对线虫的神经保护作用。秀丽隐杆线虫的运动方式是一种类似于正弦波动的身体摆动,利用与运动方向相反的背腹身体弯曲来产生反向推力,通过检测线虫的身体弯曲频率可以直观判断药物是否对线虫运动能力产生影响^[34]。运动测试结果表明 DNL 对身体弯曲频率有一定的提高作用,表明其可以改善 PD 进程中线虫的运动能力。

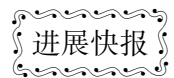
线粒体密度和线粒体呼吸链复合物检测结果显示 DNL 增加 PD 线虫线粒体密度和线粒体复合物的表达。ROS、SOD 和 GSH 检测结果提示 DNL 可能通过提高 PD 线虫的氧化酶水平,增加抗氧化应激能力,从而减少 ROS 生成,减少细胞损伤,改善 PD 相关的神经行为。综上,本研究以秀丽隐杆线虫为模式生物,通过考察线虫的 α -syn 聚集 DNs 损伤、运动能力、寿命及线粒体、活性氧、氧化酶等指标,证明 DNL 对帕金森病模型线虫具有抗氧化应激,保护神经、延长寿命的作用。本实验为后续的研究工作储备了重要铺垫。

参考文献:

- [1] RAY DORSEY E, SHERER T, OKUN M S, et al. The emerging evidence of the parkinson pandemic [J]. J Parkinsons Dis, 2018, 8(s1): S3-S8.
- [2] TOLOSA E, GARRIDO A, SCHOLZ S W, et al. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease [J]. Lancet Neurol, 2021, 20(5): 385-397.
- [3] TANNER C M, OSTREM J L. Parkinson's disease [J]. N Engl J Med, 2024, 391(5): 442-452.
- [4] MONZIO COMPAGNONI G, DI FONZO A, CORTI S, et al. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases: the lesson from Alzheimer's disease and Parkinson's disease [J]. Mol Neurobiol, 2020, 57(7): 2959-2980.
- [5] CORSI A K, WIGHTMAN B, CHALFIE M. A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans* [J]. Genetics, 2015, 200(2): 387-407.
- [6] SCHAFER W R. Neurophysiological methods in *C. elegans*: an introduction [EB/OL]. (2006-06-02) [2024-11-28]. http://www.wormbook.org/chapters/www_intromethodsneurophys/intromethodsneurophys.html.
- [7] YE H Y, YE B P, WANG D Y. Molecular control of memory in nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Neurosci Bull, 2008, 24(1): 49-55.
- [8] MICHALSKI A I, JOHNSON T E, CYPSEK J R, et al. Heating stress patterns in *Caenorhabditis elegans* longevity and survivorship [J]. Biogerontology, 2001, 2(1): 35-44.
- [9] COOPER J F, VAN RAAMSDONK J M. Modeling Parkinson's disease in *C. elegans* [J]. J Parkinsons Dis, 2018, 8(1): 17-32.
- [10] BRUCKER NOURSE J Jr, RUSSELL S N, MONIZ N A, et al. Integrated regulation of dopaminergic and epigenetic effectors of neuroprotection in Parkinson's disease models [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023, 120(7): e2210712120.
- [11] WANG C, YANG M, LIU D. Metabolic rescue of α -synuclein-induced neurodegeneration through propionate supplementation and intestine-neuron signaling in *C. elegans* [J]. Cell Rep, 2024, 43(3): 113865.
- [12] 张晓敏, 孙志蓉, 陈龙, 等. 金钗石斛的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(7): 895-899.
- [13] 汪家文, 吴君, 王承飞, 等. 金钗石斛水提物通过调节 APP/PS1 小鼠突触可塑性及胶质细胞激活缓解学习记忆损伤 [J]. 重庆医科大学学报, 2023, 48(10): 1208-1214.
- [14] 李菲, 刘波, 石京山, 等. 金钗石斛总生物碱抑制海马 tau 蛋白的过度磷酸化 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(9): 752.
- [15] LI F, LIU B, SHI J S, et al. Total alkaloids of *Dendrobium nobile* inhibit hyperphosphorylation of tau protein in hippocampus [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2019, 33(9): 752.
- [16] FAN C, SUN X, WANG X, et al. Therapeutic potential of the chemical composition of *Dendrobium nobile* Lindl [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1163830.
- [17] 曾艺芸, 聂雪婷, 李振坚, 等. 中药石斛黄酮活性成分研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6): 197

- 206.
- ZENG Y Y, NIE X T, LI Z J, et al. Research progress on active ingredients of flavonoids in traditional Chinese medicine *Dendrobium* [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(6): 197-206.
- [17] LUO A, HE X, ZHOU S, et al. Purification, composition analysis and antioxidant activity of the polysaccharides from *Dendrobium nobile* Lindl [J]. Carbohydr Polym, 2010, 79(4): 1014-1019.
- [18] LI D D, ZHENG C Q, ZHANG F, et al. Potential neuroprotection by *Dendrobium Nobile* Lindl alkaloid in Alzheimer's disease models [J]. Neural Regen Res, 2022, 17(5): 972-977.
- [19] ZHOU J, ZHANG Y, LI S, et al. *Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids-mediated protection against CCl₄-induced liver mitochondrial oxidative damage is dependent on the activation of Nrf2 signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110351.
- [20] XIAN S, YANG Y, NAN N, et al. Inhibition of mitochondrial ROS-mediated necroptosis by *Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids in carbon tetrachloride induced acute liver injury [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 330: 118253.
- [21] 王孟迪, 魏山山, 姜宁, 等. 金钗石斛对 MPTP 诱导 PD 小鼠的神经保护作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 48-56.
- WANG M D, WEI S S, JIANG N, et al. Neuroprotective effects of *Dendrobium nobile* lindl on MPTP-induced PD mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 48-56.
- [22] CHALORAK P, SANGUANPHUN T, LIMBOONREUNG T, et al. Neurorescue effects of frondoside A and ginsenoside Rg3 in *C. elegans* model of Parkinson's disease [J]. Molecules, 2021, 26(16): 4843.
- [23] MA C, FENG Y, LI X, et al. Potential therapeutic effects of policosanol from insect wax on *Caenorhabditis elegans* models of Parkinson's disease [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2023, 18(1/2): 127-144.
- [24] CHANG C H, WEI C C, HO C T, et al. N-γ-(L-glutamyl)-L-selenomethionine shows neuroprotective effects against Parkinson's disease associated with SKN-1/Nrf2 and TRXR-1 in *Caenorhabditis elegans* [J]. Phytomedicine, 2021, 92: 153733.
- [25] HE C L, TANG Y, WU J M, et al. Chlorogenic acid delays the progression of Parkinson's disease via autophagy induction in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nutr Neurosci, 2023, 26(1): 11-24.
- [26] CAO Z, WU Y, CURRY K, et al. *Ginkgo Biloba* extract EGb 761 and Wisconsin Ginseng delay sarcopenia in *Caenorhabditis elegans* [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2007, 62(12): 1337-1345.
- [27] 叶永丽, 张晓娟, 唐莉莉, 等. 基于氧化应激和线粒体功能障碍的伏马毒素 B1 诱导线虫神经毒性机制 [J]. 食品与生物技术学报, 2024, 43(3): 26-35.
- YE Y L, ZHANG X J, TANG L L, et al. Mechanism investigation of neurotoxicity of *Caenorhabditis elegans* induced by fumonaxin B1-mediated oxidative stress and mitochondrial dysfunction [J]. J Food Sci Biotechnol, 2024, 43(3): 26-35.
- [28] LIMKE A, SCHARPF I, BLESING F, et al. Tire components, age and temperature accelerate neurodegeneration in *C. elegans* models of Alzheimer's and Parkinson's disease [J]. Environ Pollut, 2023, 328: 121660.
- [29] YANG R, LI Y, WANG Y, et al. NHR-80 senses the mitochondrial UPR to rewire citrate metabolism for lipid accumulation in *Caenorhabditis elegans* [J]. Cell Rep, 2022, 38(2): 110206.
- [30] WINSLOW A R, CHEN C W, CORROCHANO S, et al. α-synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease [J]. J Cell Biol, 2010, 190(6): 1023-1037.
- [31] SIDRANSKY E, LOPEZ G. The link between the GBA gene and Parkinsonism [J]. Lancet Neurol, 2012, 11(11): 986-998.
- [32] DAGDA R K, ZHU J, KULICH S M, et al. Mitochondrially localized ERK2 regulates mitophagy and autophagic cell stress: implications for Parkinson's disease [J]. Autophagy, 2008, 4(6): 770-782.
- [33] GOMEZ-LAZARO M, BONEKAMP N A, GALINDO M F, et al. 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) induces Drp1-dependent mitochondrial fragmentation in SH-SY5Y cells [J]. Free Radic Biol Med, 2008, 44(11): 1960-1969.
- [34] TSALIK E L, HOBERT O. Functional mapping of neurons that control locomotory behavior in *Caenorhabditis elegans* [J]. J Neurobiol, 2003, 56(2): 178-197.
- [35] SINGLETON A B, FARRER M, JOHNSON J, et al. Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease [J]. Science, 2003, 302(5646): 841.
- [36] THANVI B, LO N, ROBINSON T. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: clinical features, pathogenesis, prevention and treatment [J]. Postgrad Med J, 2007, 83(980): 384-388.
- [37] SEPPI K, RAY CHAUDHURI K, COELHO M, et al. Update on treatments for nonmotor symptoms of Parkinson's disease-an evidence-based medicine review [J]. Mov Disord, 2019, 34(2): 180-198.
- [38] NIE X, CHEN Y, LI W, et al. Anti-aging properties of *Dendrobium nobile* lindl. from molecular mechanisms to potential treatments [J]. J Ethnopharmacol, 2020,

- 257: 112839.
- [39] 刘杰, 刘绍欢, 陈岩勤, 等. 基于糖酵解的金钗石斛乙醇提取物抗肺癌的药理机制研究 [J]. 中国新药与临床杂志, 2022, 41(9): 566-572.
- LIU J, LIU S H, CHEN Y Q, et al. Pharmacological mechanism of anti-lung cancer of *Dendrobium nobile* ethanol extract through glycolysis [J]. Chin J New Drugs Clin Remedies, 2022, 41(9): 566-572.
- [40] LI L S, LU Y L, NIE J, et al. *Dendrobium nobile* Lindl alkaloid, a novel autophagy inducer, protects against axonal degeneration induced by A β 25-35 in hippocampus neurons *in vitro* [J]. CNS Neurosci Ther, 2017, 23(4): 329-340.
- [41] 段灿灿, 王清纯, 赵泽粉, 等. 基于网络药理学分析金钗石斛治疗神经系统疾病的药效物质基础及作用机制 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(13): 1-10.
- DUAN C C, WANG Q C, ZHAO Z F, et al. Analysis of the pharmacodynamic material basis and mechanism of *Dendrobium nobile* in the treatment of nervous system diseases using integrative network pharmacology [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(13): 1-10.
- [42] LAKSO M, VARTIAINEN S, MOILANEN A M, et al. Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein [J]. J Neurochem, 2003, 86(1): 165-172.
- [收稿日期] 2024-11-28



用丝状穿孔法成功评估小鼠弥漫性蛛网膜下腔出血的简单程序

蛛网膜下腔出血(SAH)小鼠模型是研究分子和细胞机制的重要实验工具,血管内丝穿孔技术可用于模拟人类SAH后观察到的突出病理生理特征;然而,目前评估合适SAH模型的验证方法有限。在此,我们介绍一种选择弥漫性SAH小鼠模型的简单程序。采用标准的丝状穿孔法诱导24只小鼠发生SAH。在确认小鼠存活24 h后,根据全脑磁共振成像(MRI)的T2*加权图像和透过硬脑膜对尾状脑室(CM)的肉眼观察,将SAH评为0-1。基于CM的SAH分级与提取脑定义的参考参数有很好的相关性($r^2=0.53$, $P<0.0001$)。接收器操作特征曲线显示,检测弥漫性SAH的灵敏度为85%,特异性为91%,曲线下面积(0.89 ± 0.06 (平均标准误差))与基于MRI的分级(0.72 ± 0.10 , $P=0.12$)相似。我们的数据表明,在CM中确认SAH血栓是选择与临床相关的弥漫性SAH模型的重要方法,可用于未来的实验研究。

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): 77-81. doi: 10.1002/ame2.12372)。

高冉冉,韩聪,连梦慧,等.气虚湿瘀肾纤维化动物模型建立与评价[J].中国比较医学杂志,2025,35(4):43-57.

Gao RR, Han C, Lian MH, et al. Construction and evaluation of mouse model of renal fibrosis with Qi deficiency and dampness stasis [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 43-57.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.005

气虚湿瘀肾纤维化动物模型建立与评价

高冉冉¹,韩 聪^{2,3},连梦慧¹,李 伟^{2*}

(1.山东中医药大学第一临床医学院,济南 250014;2.山东中医药大学附属医院,济南 250014;
3.山东中医药大学,济南 250014)

【摘要】 目的 构建气虚湿瘀肾纤维化病证结合小鼠模型并对模型进行评价,运用多组学阐释其蛋白和代谢通路变化。**方法** 24 只 C57BL/6J 小鼠随机分为正常(N)组、模型(M)组、气虚湿瘀肾纤维化病证结合(BZ)组,每组 8 只,实验周期 6 周。采用“环孢素+高脂饮食+游泳力竭+恒温恒湿”建立气虚湿瘀肾纤维化小鼠模型,通过观察一般体征,测定肾功能、舌象 RGB(红、绿、蓝)值、血液流变学指标、血脂、炎症和氧化指标,结合肾组织 HE、Masson、PAS、油红 O 染色、TUNEL 细胞凋亡和 TGF- β 免疫荧光对该模型进行评价;肾蛋白质组学联合血清代谢组学筛选出差异蛋白和代谢物并进行通路富集分析。**结果** BZ 组小鼠第 3 周开始出现体重下降($P<0.05$),第 4 周体重显著下降($P<0.01$),同时出现进食及饮水量减少,毛发杂乱光泽度下降,精神萎靡,活动度下降,大便质稀。BZ 组 Scr、BUN、UACR、NAG 均较 N 组升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),Scr、NAG 水平与 M 组比较有统计学意义。BZ 组小鼠舌象 R 值显著低于 N 组($P<0.01$),B 值高于 N 组,且均与 M 组有显著性差异($P<0.05$)。BZ 组小鼠全血多切变率黏度、HCT 较 N 组和 M 组均升高,PV 较 N 组升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。BZ 组 TC、LDL-C、CRP、IL-6、MDA 水平较 N 组和 M 组均显著升高($P<0.01$),SOD 活性较 N 组下降($P<0.05$)。BZ 组小鼠可见肾小管胞质空泡化明显,炎性细胞浸润、肾小球基底膜增厚、胶原纤维增生和脂质累积显著。BZ 组肾组织细胞凋亡及 TGF- β 沉积增加。BZ 组和 N 组共有 299 个差异蛋白,其中 180 个上调,119 个下调;323 个差异代谢物,其中 205 个上调,118 个下调;初级胆汁酸生物合成、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成通路被差异蛋白和差异代谢物共同富集到,共涉及 3 个差异蛋白,9 个差异代谢物,其中二十二碳五烯酸、二十碳五烯酸、牛磺酸、3-亚磺酰基丙氨酸、牛磺胆酸、酰基辅酶 A 氨基酸 N-酰基转移酶 1 和酰基辅酶 A 氨基酸 N-酰基转移酶 2、超长链 3-氧酰辅酶 A 还原酶表现出较高的预测准确性。**结论** 通过“环孢素+高脂饮食+游泳力竭+恒温恒湿”法构建气虚湿瘀肾纤维化(RF)动物模型具有可行性。气虚湿瘀肾纤维化中不饱和脂肪酸生物合成与牛磺酸和亚牛磺酸代谢通路可能发挥重要作用。

【关键词】 气虚湿瘀;肾纤维化;病证结合;动物模型;多组学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0043-15

Construction and evaluation of mouse model of renal fibrosis with Qi deficiency and dampness stasis

【基金项目】 山东省自然科学基金(ZR2021LZY041,ZR2022QH133);国家自然科学基金项目(82174179,82204886);中国博士后科学基金特别资助(2023T160398);中国博士后科学基金(2021M702039)。

【作者简介】 高冉冉(1998—),女,在读博士研究生,研究方向:中西医结合治疗肾系疾病的临床研究。

E-mail:1377142543@qq.com

【通信作者】 李伟(1962—),女,博士,主任医师,研究方向:中西医结合治疗肾系疾病的临床研究。E-mail:lweidw@163.com

GAO Ranran¹, HAN Cong^{2,3}, LIAN Menghui¹, LI Wei^{2*}

(1. First Clinical Medical School, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China.

2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014.

3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014)

【Abstract】 Objective To construct and evaluate a mouse model of renal fibrosis (RF) combined with Qi deficiency and dampness stasis, and investigate the changes in protein and metabolic pathways using multiomics. **Methods** Twenty-four C57BL/6J mice were divided randomly into normal (N), model (M), and RF and syndrome combined groups (BZ) ($n=8/\text{group}$). The experiment lasted 6 weeks. A mouse model of RF with Qi deficiency and dampness stasis was established by “cyclosporine A+high-fat diet+swimming exhaustion+constant temperature and humidity”. The model was evaluated by detecting general signs, renal function, tongue RGB (red, green, blue) values, hemorheology indexes, blood lipids, and inflammation and oxidation indexes, combined with hematoxylin and eosin, Masson, periodic acid-Schiff, and Oil red O staining, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling apoptosis, and transforming growth factor- β immunofluorescence analysis of renal tissue. Differential proteins and metabolites were screened by renal proteomics combined with serum metabolomics and subjected to pathway enrichment analysis. **Results** Body mass of mice in the BZ group began to decline at week 3 ($P<0.05$) and decreased significantly at week 4 ($P<0.01$), while food and water consumption decreased, the fur became messy and less glossy, mood and activity decreased, and stools became watery. Serum creatinine, blood urea nitrogen, urine albumin-creatinine ratio, and N-acetyl-beta-glucosaminidase (NAG) were significantly higher in the BZ group compared with those in the N group ($P<0.05$, $P<0.01$), and serum creatinine and NAG levels were significantly different compared with those in the M group. The R value of tongue images was significantly lower in the BZ group compared with that in the N group ($P<0.01$), while the B value was significantly higher ($P<0.05$). The viscosity of the whole blood multi-shear rate and the hematocrit were higher in the BZ group compared with those in the N and M groups, and the platelet volume was higher than in the N group ($P<0.05$, $P<0.01$). Total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, C-reactive protein, interleukin-6, and malondialdehyde levels were significantly increased in the BZ group compared with those in the N and M groups ($P<0.01$), and superoxide dismutase activity was significantly decreased compared with that in the N group ($P<0.05$). Renal tubule vacuolation, inflammatory cell infiltration, glomerular basement membrane thickening, collagen fiber hyperplasia, and lipid accumulation were evident, and renal cell apoptosis and transforming growth factor- β deposition were increased in the BZ group. There were 299 differential proteins in the BZ and N groups, including 180 up-regulated and 119 down-regulated proteins, and 323 differential metabolites, including 205 up-regulated and 118 down-regulated. Primary bile acid biosynthesis, taurine and hypotaurine metabolism, and biosynthesis of unsaturated fatty acids were co-enriched in differential proteins and differential metabolites, involving three differential proteins and nine differential metabolites. Among these, docosapentaenoic acid (22n-3), eicosapentaenoic acid, taurine, 3-sulfinoalanine, taurocholic acid, Acnat1, Acnat2, and Hsd17b12 showed high prediction accuracy. **Conclusions** We successfully constructed an RF animal model of Qi deficiency and dampness stasis using the “cyclosporine A +high-fat diet+exhaustion of swimming+constant temperature and humidity” method. Biosynthesis of unsaturated fatty acids and taurine and hypotaurine metabolism may play important roles in this RF mouse model of Qi deficiency and dampness stasis.

【Keywords】 Qi deficiency and dampness stasis; renal fibrosis; combination of disease and syndrome; animal model; multiomics

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

肾纤维化 (renal fibrosis, RF) 是慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 进展为终末期肾病 (end stage renal disease, ESRD) 的病理基础, 在

CKD 进展中常会伴随 RF。全球约 10% 以上的人口患有 CKD, 现已成为重要的公共卫生问题^[1]。一旦进入 ESRD 阶段常需肾代替治疗, 将带来巨

大的经济及社会负担。研究 RF 发病机制、寻求其有效干预方法,对于延缓 CKD 进展及降低 ESRD 发病率具有重要意义。通过动物模型调控变量开展基础研究是现代医学研究的重要手段,同时可体现疾病与证候特征的病证结合动物模型对研究疾病本质及中医药作用机理具有重要意义。RF 根据其临床表现可属“水肿”“关格”“虚劳”等类,其病机以气虚为本、气虚转输无力、水液内停、滋生湿热、病久入络、湿瘀互结、气虚湿瘀为其主要证候特征^[2-4]。本研究根据中医“劳则耗气”与“元气既虚,必不能达于血管,血管无气,必停留而瘀”以及“肥甘厚腻,酿湿生热”“湿热胶着,内外相引”理论,通过“高脂饮食+游泳力竭+恒温恒湿”方式对 RF 动物模型进行“气虚湿瘀”证候造模,从气虚湿瘀宏观表征、实验室指标、肾功能评估、病理改变等多维度进行全面、客观的模型评价,以期为 RF 的中医药研究提供有效的实验载体。此外,本研究还进一步联合蛋白质组学和代谢组学明确气虚湿瘀肾纤维化小鼠相关蛋白和代谢物的表达变化,寻找特异性靶标,以期为 RF 研究提供新的方向。

1 材料和方法

1.1 实验动物

5 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 24 只,小鼠体质量 19~25 g,均购买自北京唯尚立德生物科技有限公司[SCXK(京)2021-0010]。饲养于山东中医药大学附属医院 SPF 级动物实验中心[SYXK(鲁)2023-0031],所有动物自由进食,保证充分饮水,动物实验室 12 h 交替照明。本实验经山东中医药大学附属医院动物实验伦理审查委员会批准(AWE-2022-048),并按 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

环孢素软胶囊(杭州中美华东制药有限公司,批号 H10960123);小鼠白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)ELISA 试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司,批号 230321KE3);小鼠 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)ELISA 试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司,批号 230321KE4);小鼠 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl- β -D-glucosaminidase, NAG)ELISA 试剂盒(江苏晶美

生物科技有限公司,批号 230321KE5);丙二醛(malonaldehyde, MDA)测试盒(南京建成生物工程研究所,批号 20221227);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测试盒(南京建成生物工程研究所,批号 20221229);尿白蛋白测定试剂盒(深圳雷杜生命科技,批号 20221121);尿肌酐测定试剂盒(深圳雷杜生命科技,批号 20221222);尿素测定试剂盒(深圳雷杜生命科技,批号 20221020);肌酐测定试剂盒(深圳雷杜生命科技,批号 20221019);总胆固醇(total cholesterol, TC)测定试剂盒(深圳雷杜生命科技,批号 20220908);苏木素-伊红(HE)染液套装(Serviebio,货号 G1076);Masson 染液套装(Serviebio,货号 G1006);PAS 染液套装(Serviebio,货号 G1008);油红染液(Serviebio,货号 G1015);Tunel 试剂盒(Serviebio,货号 G1507)。

South990JS3 血流变分析仪(重庆南方数控设备股份有限公司);Chemray 240 全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科技);352 型酶标仪(Labsystems Multiskan MS);Sorvall ST 40 生化分析仪(赛默飞世尔科技有限公司);Donatello 脱水机(Germany DIAPATH);JB-P5 包埋机(武汉俊杰电子有限公司);JB-L5 冻台(武汉俊杰电子有限公司);RM2016 病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);ORBITRAP ECLIPSE 质谱仪(美国赛默飞世尔科技有限公司);ACQUITY UPLC I-Class plus 超高效液相串联 QE plus 高分辨质谱仪(Waters);Progenesis QI v3.0 软件(Nonlinear Dynamics)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组

24 只 C57BL/6J 小鼠适应性喂养 1 周后,随机分为正常(N)组、模型(M)组、气虚湿瘀肾纤维化病证结合(BZ)组,每组 8 只。

1.3.2 造模

前 4 周 M 组和 BZ 组均以低盐饮食(钠质量分数 0.05%)饲养,M 组用橄榄油溶解的环孢素(cyclosporine A, CsA) 30 mg/(kg·d)经口灌服。第 5 周开始 BZ 组将低盐饮食改为高脂饲料(2.5%胆固醇)喂养,每天以 CsA 30 mg/(kg·d)灌胃 2 h 后,将小鼠放入水箱中游泳,当全组 50%

的小鼠出现自然沉降时停止游泳。小鼠自然风干后放入控制温度及湿度的环境中(温度(30 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 80%~90%),每天最少持续 4 h,持续 2 周(图 1)。N 组普通饮食,经口灌服等容量橄榄油。

1.3.3 一般体征

实验过程中对小鼠的一般体征如精神、活动、毛发等进行观察。每周测小鼠体质量。

1.3.4 肾功能指标

6 周后收集小鼠随机尿液。末次给药后麻醉眼眶取血,静置 2 h 后 3000 r/min 离心 10 min 分离血清。全自动生化分析仪检测血肌酐(serum creatinine, Scr)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、尿白蛋白/肌酐(urine albumin creatine ratio, UACR)。ELISA 法检测小鼠尿 NAG。

1.3.5 小鼠舌象采集和分析

所有小鼠舌象拍摄环境保持一致,拍摄过程中用镊子轻轻将小鼠舌部伸展,拍摄尽量保持同一角度,整个过程迅速完成。采用 Adobe Photoshop 2021 对采集的图像进行分析,将舌面分为前、中、后 3 个区域,测各区域的平均 RGB(红、绿、蓝)值,最后选用平均值^[5]。

1.3.6 气虚湿瘀相关指标

所有指标均按照试剂盒中提供的相应说明进行检测。ELISA 法检测小鼠血清 CRP、IL-6,全自动生化分析仪全血多切变率黏度、血浆黏度

(plasma volume, PV)、红细胞压积(hematocrit, HCT)、TC、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein, LDL-C)、SOD 活性、MDA。

1.3.7 HE、Masson、PAS、油红 O 染色

肾组织在室温下用中性多聚甲醛固定 48 h, 4 μm 切片,石蜡包埋,进行 HE、Masson、PAS 染色,中性树胶封片,光镜观察。冰冻切片,油红染液染,甘油明胶封片剂封片,显微镜下观察。

1.3.8 免疫荧光

肾组织在室温下用中性多聚甲醛固定 48 h, 4 μm 切片,石蜡包埋,抗原修复、自发荧光淬灭及血清封闭后加 TGF- β 一抗及二抗,DAPI 复染细胞核,抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜观察,Image J 1.53k 检测平均荧光强度,平均荧光强度=每一个标本的平均荧光强度/正常组平均值。

1.3.9 TUNEL 细胞凋亡

石蜡切片脱蜡至水,蛋白酶 K 修复并使用破膜工作液破膜。将试剂 1(TdT)和试剂 2(dUTP)按比例混合并添加到组织切片中,加入 DAPI 染色液,用抗荧光淬灭剂密封细胞,并用荧光显微镜观察,红色代表阳性凋亡细胞核,Image J 1.53k 检测细胞数量,凋亡指数=凋亡细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.3.10 肾蛋白质组学

提取肾组织蛋白质,Bradford 法测定浓度,酶解脱盐,混合标记后的肽段用 100 μL 流动相 A

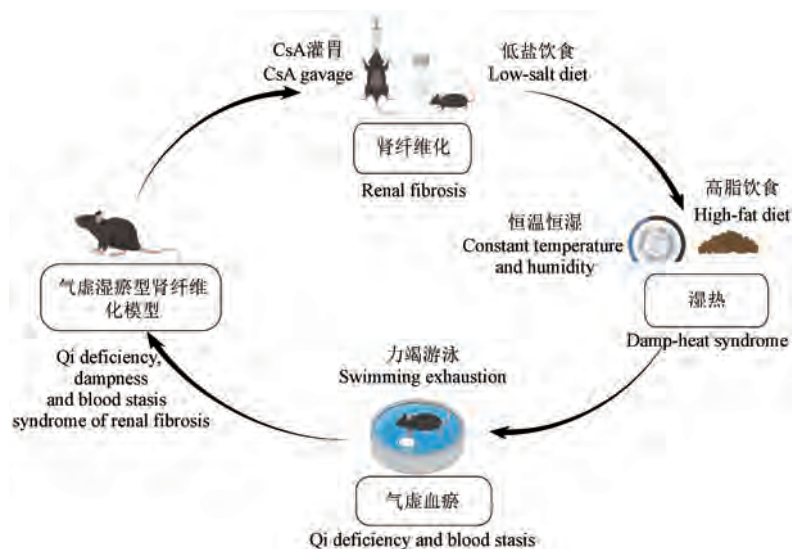


图 1 气虚湿瘀肾纤维化造模示意图(由 Figdraw 绘制)

Figure 1 Schematic diagram of kidney fibrosis modeling with Qi deficiency and dampness stasis(by Figdraw)

溶解,使用高效液相进行分级处理。液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)质谱分析:使用 DDA 联合 DIA 的采集模式。对于 DDA,使用 ORBITRAP ECLIPSE 质谱仪进行分析,质谱采用数据依赖型采集模式,质谱全扫描范围为 350~1500 m/z ,一级质谱分辨率设为 120 000 (m/z),AGC 为 4×10^5 ,C-trap 最大注入时间为 50 ms。二级质谱分辨率设为 15 000 (200 m/z),AGC 为 5×10^4 ,最大注入时间为 22 ms。对于 DIA,一级质谱分辨率设为 120 000 (200 m/z),AGC 为 300%,C-trap 最大注入时间为 50 ms;二级质谱分辨率设为 30 000 (200 m/z),AGC 为 100%,最大注入时间为 54 ms,肽段碎裂碰撞能量设为 33%,生成质谱检测原始数据。使用 Spectronaut 软件针对原始数据进行 uniprot Mus musculus 库搜库,然后进行蛋白质的鉴定并归一化定量。采用 T -test 检验、 P -value<0.05、Fold change>1.5 倍得到差异蛋白。对差异蛋白进行聚类分析,火山图展示,分析差异蛋白的受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC)预测性。通过 KEGG 富集差异蛋白的作用通路。

1.3.11 血清代谢组学

LC-MS 分析使用 ACQUITY UPLC I-Class plus 超高效液相串联 QE plus 高分辨质谱仪,色谱柱:ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m);柱温:45 $^{\circ}$ C;流动相:流动相 A:水(含 0.1%甲酸),B:乙腈;流速:0.35 mL/min;进样体积:3 μ L。洗脱梯度为 0~2 min,95% A,5% B;2~4 min,95%~70% A,5%~30% B;4~8 min,70%~50% A,30%~50% B;8~10 min,50%~20% A,50%~80% B;10~15 min,100% B;15.1~16 min,95% A,5% B。采用正负离子扫描模式,喷射电压:正离子 3800 V、负离子-3000 V,鞘层气体流量 35 Arb,辅助气体流量 8 Arb,毛细管温度 320 $^{\circ}$ C,质量范围 m/z :100~1200 Hz,全质谱分辨率:70 000,MS/MS 分辨率:17 500。

原始数据导入 Progenesis QI v3.0 软件进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐和归一化。使用 The Human Metabolome Database (HMDB)、Lipidmaps(v2.3)和 METLIN 数据库以及 EMDB 2.0 进行定性。代谢差异比较分析将通

过多元统计分析和单变量统计分析,以 OPLS-DA 模型第一主成分的 VIP>1, T 检验的 P -value<0.05 为标准筛选差异代谢物,通过聚类热图和火山图展示,然后利用差异代谢物的 KEGG ID 进行通路富集分析,选择具有显著性的($P<0.05$)富集 pathway 进行气泡图绘制。通过 ROC 线分析已识别的潜在生物标志物的特异性和敏感性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 对数据进行统计分析,以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,正态分布时进行方差齐性检验,若方差齐选取单因素方差分析,多重比较选择 LSD 法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

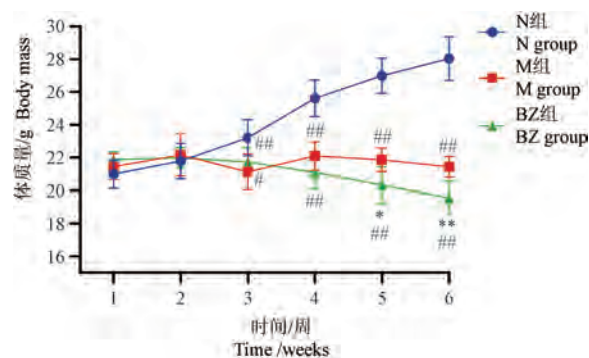
2 结果

2.1 一般体征

实验过程中,每周监测体质量,每天观察小鼠的生活状态。N 组小鼠进食量、饮水量及尿量、精神、毛发、大便未见异常,体质量持续增长。与 N 组比较,M 组小鼠自第 3 周开始体质量下降($P<0.01$),BZ 组小鼠第 3 周开始出现体质量下降($P<0.05$),第 4 周出现体质量显著下降($P<0.01$),同时出现进食及饮水量减少,毛发杂乱光泽度下降,精神萎靡,活动度下降,大便质稀。此外,BZ 组小鼠第 5 周开始与 M 组小鼠相比体质量出现差异($P<0.05$)。结果见图 2。

2.2 肾功能评价

与 N 组比较,M 组和 BZ 组肾功能指标 Scr、



注:与 M 组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 N 组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 2 小鼠体质量($n=8$)

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

Compared with the N group,* $P<0.05$,** $P<0.01$.

Figure 2 Body mass of mice($n=8$)

BUN、UACR、NAG 均出现升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),提示肾功能受损。与 M 组比较,BZ 组 Scr、NAG 水平升高 ($P<0.05$),BUN 及 UACR 虽均有升高,但无统计学意义。结果见表 1。

2.3 舌象

小鼠舌象结果显示,M 组小鼠舌象 Red 值低于 N 组 ($P<0.05$),色泽偏淡。BZ 组小鼠舌象 Red 值显著低于 N 组 ($P<0.01$),舌象 Blue 值高

于 N 组 ($P<0.05$),且均与 M 组有差异 ($P<0.05$),提示色泽偏紫暗。结果见图 3,表 2。

2.4 血液流变学检测结果

与 N 组相比,M 组小鼠全血多切变率黏度、PV、HCT 有所升高,但差异无统计学意义。BZ 组小鼠全血多切变率黏度、HCT 较 N 组和 M 组均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),PV 较 N 组显著升高 ($P<0.01$)。结果见表 3。

表 1 肾功能指标 ($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 1 Index of renal function ($\bar{x}\pm s, n=8$)

分组 Groups	Scr/($\mu\text{mol/L}$)	BUN/(mg/dL)	UACR/(mg/g)	NAG/(U/L)
N 组 N group	46.70 $\pm$ 3.55	22.46 $\pm$ 4.17	27.06 $\pm$ 6.81	89.02 $\pm$ 2.97
M 组 M group	94.92 $\pm$ 7.04 [#]	27.76 $\pm$ 2.80 [#]	60.45 $\pm$ 7.92 [#]	107.50 $\pm$ 2.27 [#] ^{**}
BZ 组 BZ group	102.75 $\pm$ 5.93 [#] ^{**}	28.58 $\pm$ 3.65 [#]	90.83 $\pm$ 37.36 [#]	137.05 $\pm$ 3.02 [#] ^{**}

注:与 M 组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与 N 组相比,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。
Note. Compared with the M group,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$. Compared with the N group,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$.

表 2 小鼠舌象 RGB 值比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 2 Comparison of RGB values of mouse tongue image ($\bar{x}\pm s, n=3$)

分组 Groups	红色 Red	绿色 Green	蓝色 Blue
N 组 N group	121.00 $\pm$ 4.00	77.00 $\pm$ 14.73	85.00 $\pm$ 4.58
M 组 M group	110.00 $\pm$ 2.65 [#]	79.00 $\pm$ 1.53	86.70 $\pm$ 1.53
BZ 组 BZ group	99.00 $\pm$ 4.51 [#] ^{**}	84.00 $\pm$ 5.13	97.00 $\pm$ 3.61 [#] ^{**}

注:与 N 组相比,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$;与 M 组相比,^{*} $P<0.05$ 。
Note. Compared with the N group,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$. Compared with the M group,^{*} $P<0.05$.

表 3 小鼠血液流变学指标 ($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 3 Blood rheological indexes of mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

分组 Groups	全血多切变率黏度/($\text{mPa}\cdot\text{s}$) Whole blood multi shear viscosity			血浆黏度/($\text{mPa}\cdot\text{s}$) PV	红细胞压积/% HCT
	10/s	40/s	200/s		
N 组 N group	11.97 $\pm$ 0.72	7.36 $\pm$ 0.36	3.84 $\pm$ 0.38	1.27 $\pm$ 0.07	39.69 $\pm$ 2.63
M 组 M group	13.28 $\pm$ 1.21	7.61 $\pm$ 0.41	4.20 $\pm$ 0.69	1.46 $\pm$ 0.17	40.55 $\pm$ 2.37
BZ 组 BZ group	17.99 $\pm$ 1.21 [#] ^{**}	8.63 $\pm$ 0.29 [#] ^{**}	5.28 $\pm$ 0.80 [#] ^{**}	1.52 $\pm$ 0.10 [#]	44.91 $\pm$ 2.61 [#] ^{**}

注:与 N 组相比,[#] $P<0.01$;与 M 组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the N group,[#] $P<0.01$. Compared with the M group,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$.



图 3 小鼠舌象图像比较
Figure 3 Comparison of mouse tongue images

2.5 血脂、炎症和氧化指标检测结果

与 N 组比较, M 组 TC、LDL-C、MDA 升高, SOD 活性降低, 但差异无统计学意义, CRP 和 IL-6 水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); BZ 组 TC、LDL-C、CRP、IL-6、MDA 水平均显著升高 ($P<0.01$), 且与 M 组有统计学差异 ($P<0.01$), SOD 活性较 N 组下降 ($P<0.05$)。结果见表 4。

2.6 肾组织病理改变

与 N 组比较, M 组小鼠肾组织 HE 染色示肾小球玻璃样变、肾小管水肿、炎细胞浸润; PAS 染色示肾小球基底膜增厚、系膜细胞增生; Masson 染色示胶原纤维增生明显; 油红 O 染色示少量脂

质积累。BZ 组小鼠可见肾小管胞质空泡化明显, 炎性细胞浸润、肾小球基底膜增厚、胶原纤维增生和脂质累积显著 (图 4)。如图 5 所示, 与 N 组比较, M 组和 BZ 组肾组织细胞凋亡及 TGF- β 沉积增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), BZ 组与 M 组相比有统计学意义 ($P<0.01$)。

2.7 肾蛋白质组学和血清代谢组学分析

进一步对 N 组和 BZ 组小鼠进行组织蛋白质组学和血液代谢组学分析, 明确气虚湿瘀肾纤维化小鼠相关蛋白和代谢物的表达变化。如图 6 蛋白质组学结果表明, BZ 组与 N 组比较共有 299 个差异蛋白, 其中 180 个上调, 119 个下调, 分别见

表 4 小鼠血脂、炎症和氧化指标 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Blood lipid, inflammation and oxidative indicators in mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

分组 Groups	N 组 N group	M 组 M group	BZ 组 BZ group
总胆固醇/(mmol/L) TC	2.76 $\pm$ 0.61	3.73 $\pm$ 0.76	5.76 $\pm$ 1.37 ^{##**}
低密度脂蛋白胆固醇/(mmol/L) LDL-C	0.98 $\pm$ 0.13	1.13 $\pm$ 0.21	1.96 $\pm$ 0.17 ^{##**}
C 反应蛋白/(mg/L) CRP	2.35 $\pm$ 0.37	2.82 $\pm$ 0.25 [#]	3.59 $\pm$ 0.36 ^{##**}
白介素 6/(pg/mL) IL-6	80.65 $\pm$ 6.60	118.09 $\pm$ 10.27 ^{##}	138.63 $\pm$ 9.74 ^{##**}
超氧化物歧化酶活性/(U/mL) SOD	275.78 $\pm$ 25.47	241.96 $\pm$ 32.08	219.16 $\pm$ 42.29 [#]
丙二醛/(nmol/mL) MDA	4.51 $\pm$ 1.01	5.03 $\pm$ 1.06	6.86 $\pm$ 1.21 ^{##**}

注: 与 N 组相比, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; 与 M 组相比, ^{**} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the N group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$. Compared with the M group, ^{**} $P<0.01$.

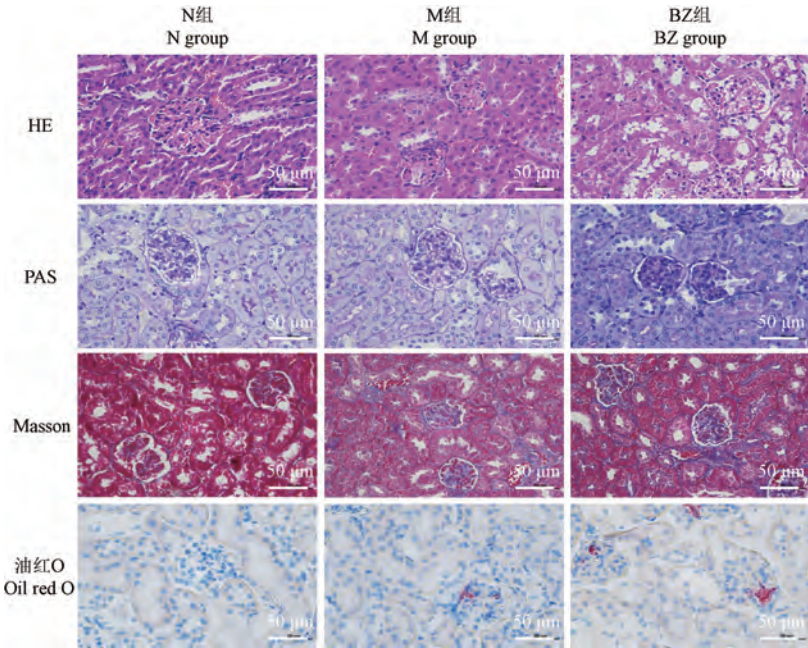
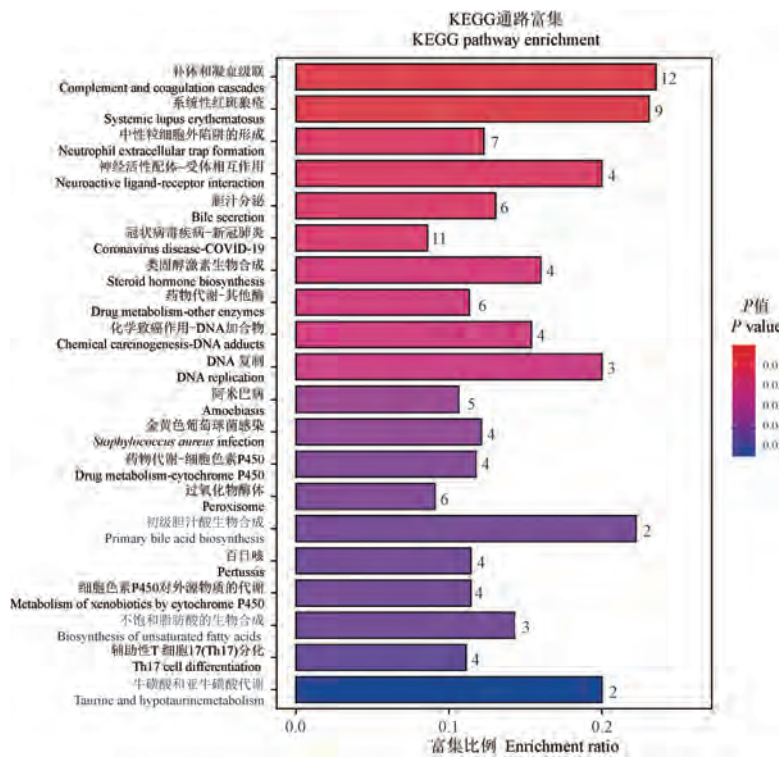


图 4 小鼠肾组织病理变化
Figure 4 Kidney histopathological changes in mice

差异蛋白火山图及聚类图。对差异蛋白进行 KEGG 富集分析,可见差异蛋白主要涉及补体和凝血级联、系统性红斑狼疮、中性粒细胞外陷阱的形成、神经活性配体-受体相互作用、胆汁分泌、冠状病毒疾病-新冠肺炎、类固醇激素生物合成、药物代谢-其他酶、化学致癌作用-DNA 加合物等通路(图 7)。

血清代谢组学通过正交偏最小二乘方-判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 见 BZ 组和 N 组血清代谢物出现明显分离,表明二组小鼠体内代谢物发生变化(图 8)。如图 9 所示,根据 $VIP>1$,且 $P<0.05$ 筛选差异代谢物,BZ 组与 N 组比较共有 323 个差异代谢物,其中 205 个上调,118 个下调,分别见



注:标红通路表示与血清差异代谢物共同富集到的通路。

图 7 肾差异蛋白富集通路图

Note. Standard red pathway indicates pathways that are enriched with serum differential metabolites.

Figure 7 Renal differential proteins enrichment pathway

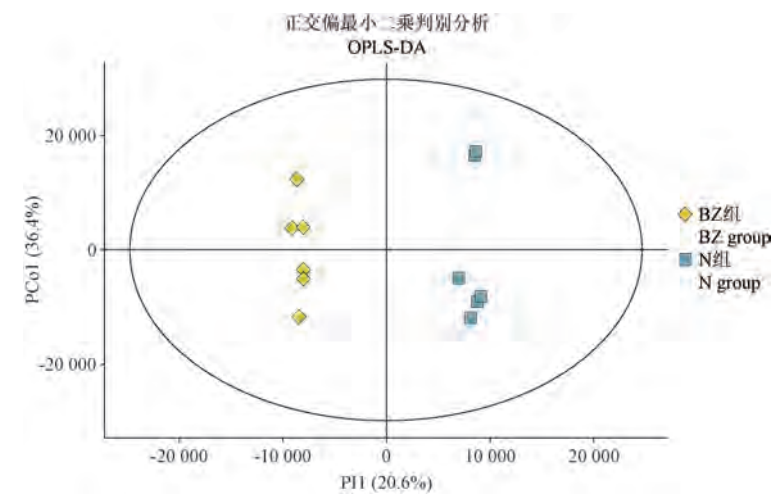
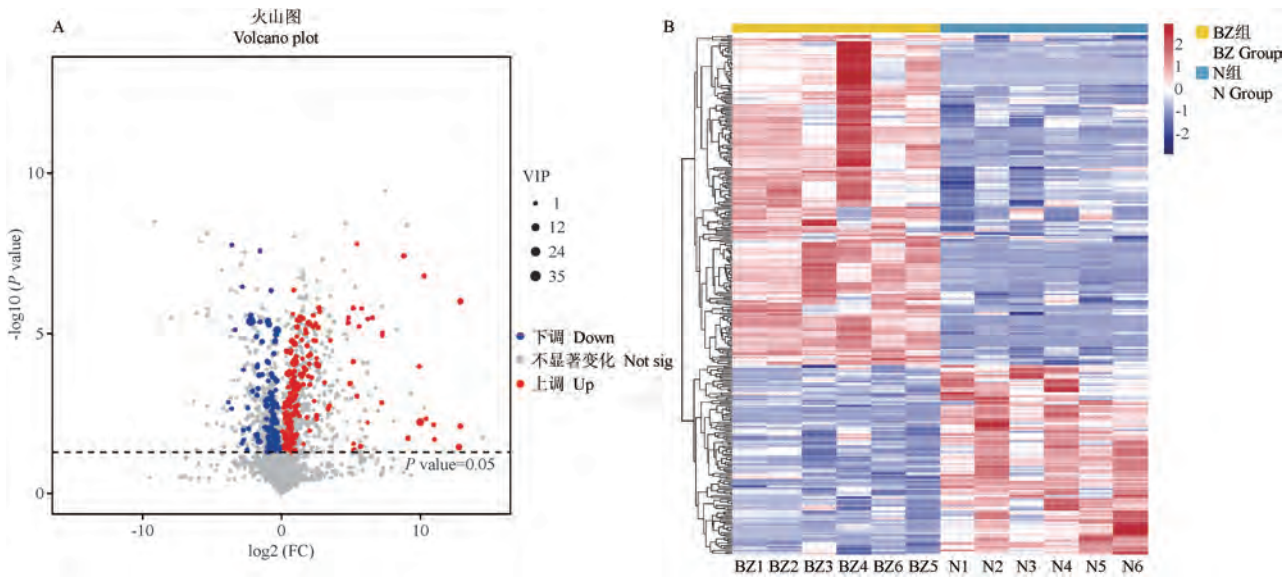


图 8 OPLS-DA 图

Figure 8 OPLS-DA

差异代谢物火山图及聚类图。

如图 10 对差异代谢物进行通路富集分析,选取 P 值排名前 20 的通路可见 N 组和 BZ 组差异代谢物主要涉及初级胆汁酸生物合成、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、癌症的胆碱代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、精氨酸生

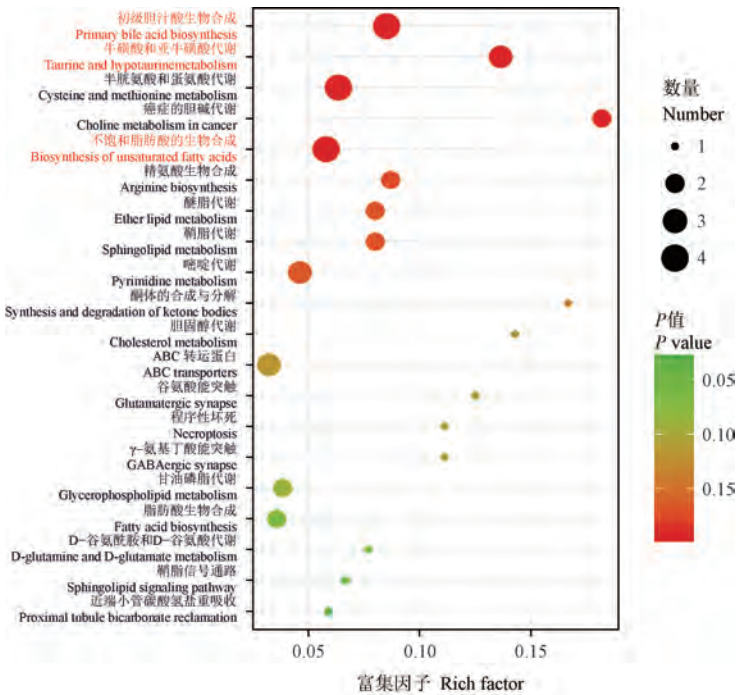


注:A:差异代谢物火山图;B:差异代谢物聚类图。

图 9 血清差异代谢物火山及聚类分析图

Note. A, Volcano plot of differential metabolite. B, Cluster plot of differential metabolite.

Figure 9 Serum differential metabolites volcano and cluster analysis



注:标红通路表示与肾差异蛋白共同富集到的通路。

图 10 血清差异代谢物富集通路图

Note. Standard red pathway indicates pathways that are enriched with Renal differential proteins.

Figure 10 Serum differential metabolites enrichment pathway

物合成、醚脂代谢、鞘脂代谢、嘧啶代谢等通路。

对蛋白质组学和代谢组学结果进行联合分析可见有 3 条通路被差异蛋白和差异代谢物共同富集到,分别为初级胆汁酸生物合成(primary bile acid biosynthesis)、牛磺酸和亚牛磺酸代谢(taurine and hypotaurine metabolism)、不饱和脂肪酸的生物合成(biosynthesis of unsaturated fatty acids),其中共涉及 3 个差异蛋白,9 个差异代谢物(表 5)。对 3 个差异蛋白测序结果进行了 ROC 曲线分析,结果表明 3 个差异蛋白 AUC 均是 1,表

明测序精准,具有很好的预测性(图 11)。对 9 个差异代谢物结果进行了 ROC 曲线分析,其中二十二碳五烯酸(docosapentaenoic acid (22n-3))、二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid)、牛磺酸(taurine)、3-亚磺酰基丙氨酸(3-sulfinioalanine)、牛磺胆酸(taurocholic acid)表现出较高的预测准确性(图 12)。进一步对筛选出的差异蛋白和代谢物进行共表达相关性分析可见差异蛋白和代谢物之间呈负相关性,其中差异蛋白 Hsd17b12 与代谢物之间相关性高(图 13)。

表 5 共同通路及涉及差异蛋白和代谢物信息

Table 5 Common pathways and information involving differential proteins and metabolites

通路 Pathway	差异蛋白及变化趋势 Differential proteins and changing trends	差异代谢物及变化趋势 Differential metabolites and changing trends
初级胆汁酸生物合成 Primary bile acid biosynthesis	酰基辅酶 A 氨基酸 N-酰基转移酶 1 ↑, 酰基辅酶 A 氨基酸 N-酰基转移酶 2 ↑ Acnat1 ↑, Acnat2 ↑	牛磺酸 ↓, 鹅去氧胆酸 ↑, 牛磺胆酸 ↓, 鹅脱氧胆酰牛磺酸 ↑ Taurine ↓, chenodeoxycholic acid ↑, taurocholic acid ↓, chenodeoxycholytaurine ↑
牛磺酸和亚牛磺酸代谢 Taurine and hypotaurine metabolism	酰基辅酶 A 氨基酸 N-酰基转移酶 1 ↑, 酰基辅酶 A 氨基酸 N-酰基转移酶 2 ↑ Acnat1 ↑, Acnat2 ↑	牛磺酸 ↓, 3-亚磺酰基丙氨酸 ↓, 牛磺胆酸 ↓ Taurine ↓, 3-sulfinioalanine ↓, taurocholic acid ↓
不饱和脂肪酸的生物合成 Biosynthesis of unsaturated fatty acids	酰基辅酶 A 氨基酸 N-酰基转移酶 1 ↑, 超长链 3-氧酰辅酶 A 还原酶 ↑, 酰基辅酶 A 氨基酸 N-酰基转移酶 2 ↑ Acnat1 ↑, Hsd17b12 ↑, Acnat2 ↑	棕榈酸 ↑, 十八烯酸 ↑, 二十碳五烯酸 ↓, 二十二碳五烯酸 ↓ Palmitic acid ↑, oleic acid ↑, eicosapentaenoic acid ↓, docosapentaenoic acid (22n-3) ↓

注: ↓: 与 N 组相比下调; ↑: 与 N 组比较上调。
Note. ↓, Downregulated compared with group N. ↑, Upregulated compared with group N.

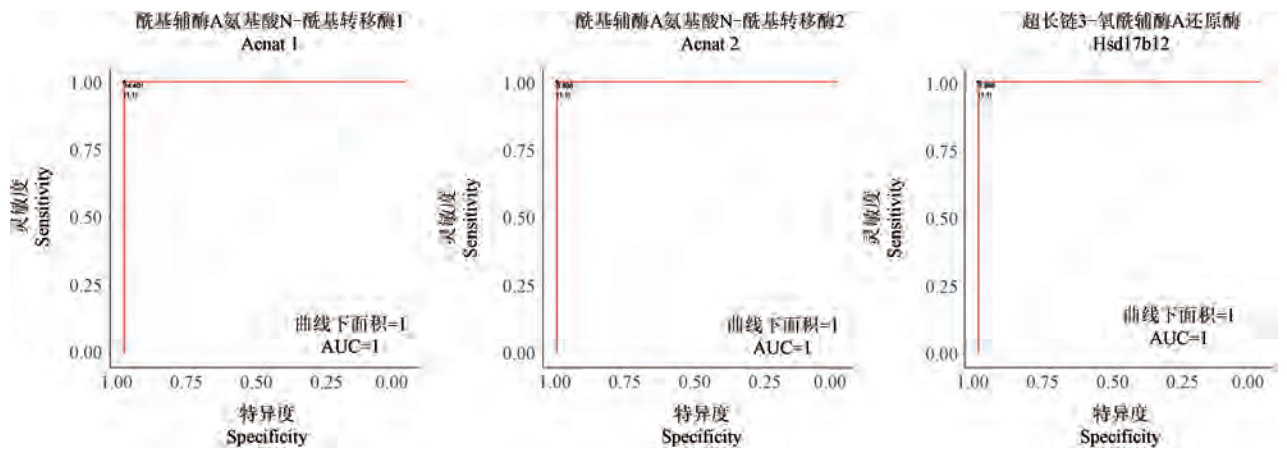


图 11 差异蛋白的 ROC 曲线分析

Figure 11 ROC curve analysis of the differential proteins

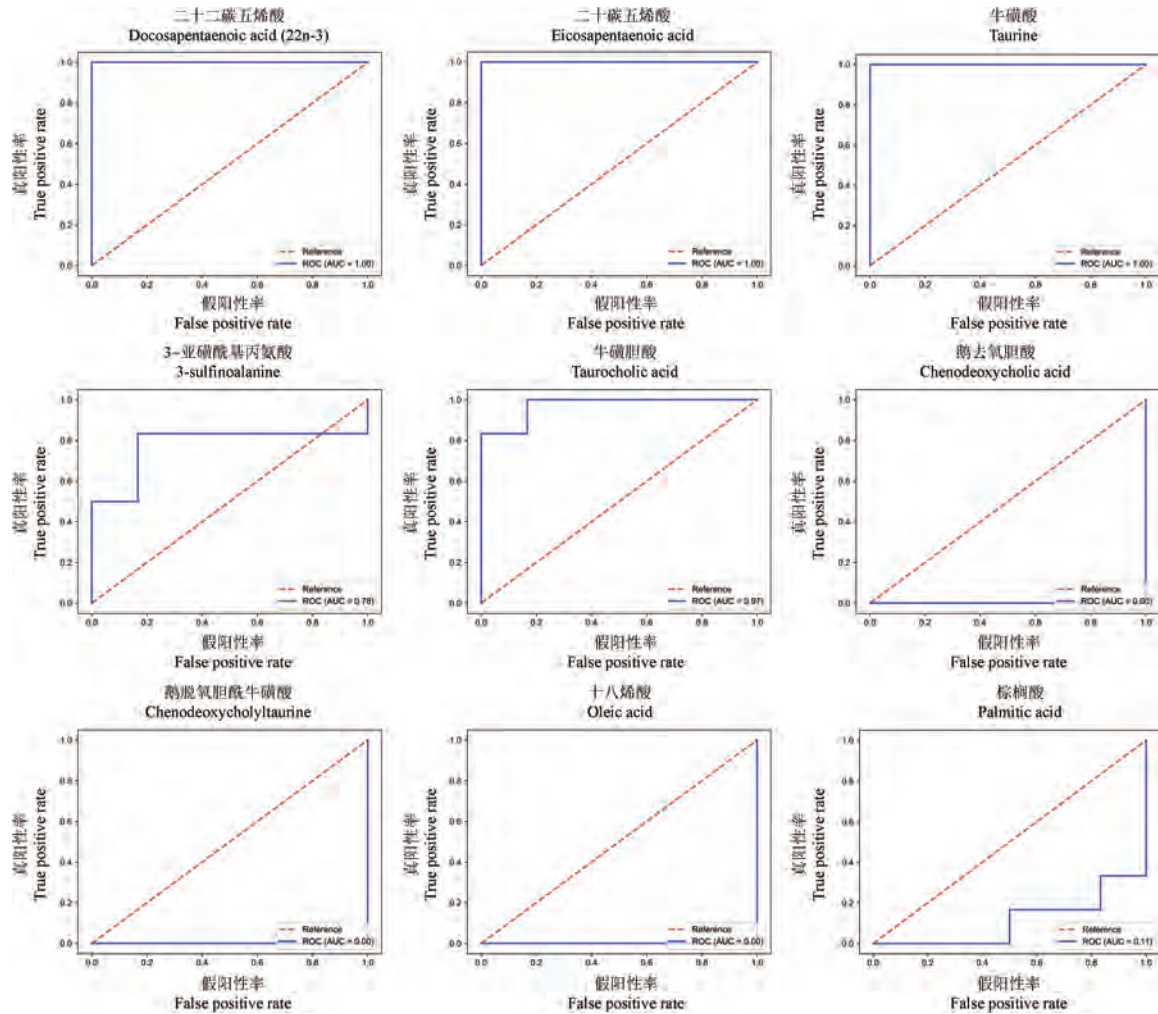
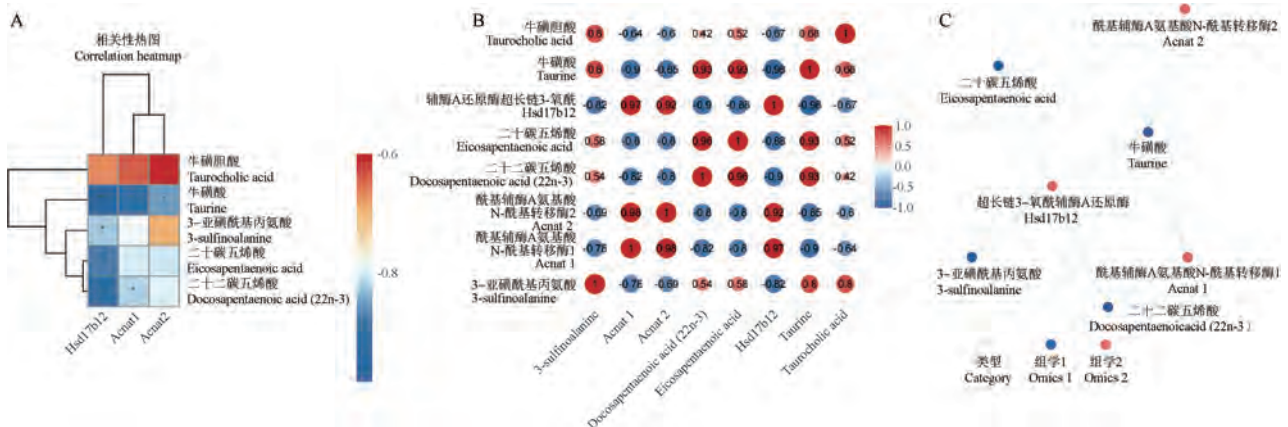


图 12 差异代谢物的 ROC 曲线分析

Figure 12 ROC curve analysis of the differential metabolites



注:A:聚类热图;B:相关性矩阵图,图中红色为正相关,蓝色为负相关,颜色越深相关性越大,圆圈大小代表相关性的大小,圆圈越大相关性越大;C:关联网络图,绿色线代表负相关,红色线代表正相关,线的粗细代表相关性系数的高低。

图 13 蛋白与代谢的共表达相关性分析

Note. A, Cluster heatmap. B, Correlation matrix diagram, where red represents positive correlation and blue represents negative correlation. The darker the color, the greater the correlation. The size of the circle represents the magnitude of the correlation, and the larger the circle, the greater the correlation. C, Correlation network diagram shows that the green line represents negative correlation, the red line represents positive correlation, and the thickness of the line represents the level of correlation coefficient.

Figure 13 Correlation analysis of co-expression between protein and metabolism

3 讨论

RF 多为慢性肾病进展至 ESRD 的共同最终结局,被认为是发生在最初各种损伤之后肾自身损伤修复失败的结果,多见脏腑之气耗伤。气虚无力行血而致血瘀,“气不行水”或“气不化水”则可引起津液输布排泄障碍而发生停聚,郁久化热,形成湿热浊毒。RF 以气虚湿瘀为核心证候,临床病证结合、辨证论治疗效明显。本研究基于 RF 证候特征、病因病机、前期文献梳理及课题组多年来 RF 模型经验^[6-7],通过游泳力竭法诱导小鼠气虚血瘀模型,“高脂饮食+游泳力竭”以及控制恒温恒湿的外界环境以内外相引诱导湿热证小鼠模型,CsA 诱导小鼠 RF 模型,三者联合建立“气虚湿瘀”RF 小鼠模型,从临床出发为基础实验研究提供模型基础。

BZ 组小鼠见 Scr、BUN、UACR 升高提示肾功能受损。气虚运化失常、机体功能衰退可见饮食减少、体质量下降;脾气亏虚,肌肉毛发失于濡养可见皮毛无光;脾气亏虚,清浊不分可见大便稀;气为“神之母”,气虚则神衰,气虚可见精神倦怠、活动性差。BZ 组小鼠出现体质量减轻、进食及饮水量减少,毛发杂乱光泽度下降,精神萎靡,活动度下降,大便质稀符合中医气虚证表现。血瘀多表现为血流动力学上的改变、血浆黏度增加,肾组织胶原纤维的增生^[8]。本实验中 BZ 组小鼠全血多切变率黏度、HCT 较 N 组和 M 组均升高,血浆黏度较 N 组也显著升高,同时可见舌象色泽偏紫暗符合中医血瘀证舌象特点,可见 BZ 组小鼠血瘀证明显。有研究表明湿热证与感染之间存在关联,湿热证可见 IL-6、CRP 水平的升高,此外还可见血脂异常,以及 SOD、MDA 等氧化指标的异常^[9-11]。肾病理上表现为系膜细胞增生、基质增多及炎性细胞的浸润^[10]。本研究中 BZ 组小鼠 TC、LDL-C、CRP、IL-6、MDA 水平较 N 组和 M 组均显著升高,SOD 活性较 N 组下降,可见 BZ 组小鼠湿热征象明显。在肾病理上,BZ 组小鼠可见肾小管胞质空泡化明显,炎性细胞浸润、肾小球基底膜增厚、胶原纤维增生和脂质累积显著,BZ 组较 N 组和 M 组肾组织细胞凋亡及 TGF- β 沉积也显著增加,提示 BZ 组出现 RF 病理改变并可见湿热、血瘀证特点。综上,BZ 组小鼠在体征上表现

出气虚体征,血尿指标体现了血流动力学、炎症、血脂和氧化指标的紊乱以及肾功能的下降,肾组织病理上体现了湿热证、血瘀证的病理表现,符合气虚湿瘀 RF 模型评价标准^[6],提示“气虚湿瘀”肾纤维化小鼠模型造模成功,通过“环孢素+高脂饮食+游泳力竭+恒温恒湿”法构建气虚湿瘀 RF 动物模型具有可行性。但病证结合模型中不可控因素较多,模型评价标准目前缺乏统一认识,仍需进一步研究。

运用肾蛋白质组学和血清代谢组学联合分析体内蛋白和代谢物的变化情况,预测气虚湿瘀 RF 发生的关键靶蛋白,明确相关代谢物的变化,符合中医整体观特点,更贴切于疾病病证变化,有助于其机制的明确。研究结果显示初级胆汁酸生物合成、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成被同时富集,共涉及 3 个差异蛋白和 9 个差异代谢物,其中二十二碳五烯酸、二十碳五烯酸、牛磺酸、3-亚磺酰基丙氨酸、牛磺胆酸、酰基辅酶 A 氨基酸 N-酰基转移酶 1 和酰基辅酶 A 氨基酸 N-酰基转移酶 2、超长链 3-氧酰辅酶 A 还原酶(Hsd17b12)具有较高的预测准确性,Hsd17b12 与其他代谢物之间有较高的相关性。

在气虚湿瘀 RF 小鼠中牛磺酸和亚牛磺酸代谢通路里的 Acnat1 和 Acnat2 上调,牛磺酸、3-亚磺酰基丙氨酸、牛磺胆酸下调。Acnat1 主要表达于肾,是一种特异性牛磺酸结合酶,可参与过氧化物酶体中脂肪酸与牛磺酸的偶联,Acnat2 可能将不饱和脂肪酸与牛磺酸结合^[12-13]。重组 ACNAT1 催化长链和超长链饱和酰基辅酶 A 酯(C16-C24-CoAs)转化为牛磺酸,产生 N-酰基牛磺酸(NATs)^[14],NATs 与各种生理过程有关,包括胰岛素信号传导和 TRP 离子通道、钙通道激活等,参与调节能量平衡,对肾功能有潜在影响^[15]。3-亚磺酰基丙氨酸是牛磺酸的前体,牛磺酸是一种含硫氨基酸,可形成牛磺胆酸参与胆固醇代谢和线粒体能量代谢,维持线粒体稳态,减少细胞凋亡^[16],还具有抗氧化应激的作用,能够提高 SOD 活性、降低 MDA 水平^[17]。牛磺酸缺乏可导致高脂血症、高血压以及蛋白尿^[18],升高 TC 和 LDL-C 水平^[19]。本研究中气虚湿瘀 RF 小鼠肾组织 TUNEL 凋亡增加,血脂、UACR 及 MDA 水平升

高, SOD 降低, 可见牛磺酸与亚牛磺酸代谢通路在气虚湿瘀型 RF 小鼠模型中发挥重要作用。

在不饱和脂肪酸的生物合成中 *Acnat1* 和 *Acnat2* 以及 *Hsd17b12* 上调, 二十二碳五烯酸、二十碳五烯酸下调。*Hsd17b12* 参与脂肪酸代谢, 在非常长链脂肪酸的延长中起着关键作用, 参与调节小鼠的代谢稳态^[20], 其上调可促进脂质沉积^[21], 在 BZ 组小鼠中油红 O 染色示脂质沉积, 与之符合。二十二碳五烯酸、二十碳五烯酸都是 Omega-3 长链多不饱和脂肪酸, Omega-3 脂肪酸可通过 AMPK 介导的自噬通量激活减轻肾纤维化^[22], 具有改善血脂、调节免疫、抗炎的作用^[23]。二十碳五烯酸还可降低 TGF- β 1 水平、抑制肾局部炎症, 减少细胞外基质沉积, 减轻 RF^[24]。此外, Omega-3 脂肪酸也可参与 NATs 的合成, 降低血脂水平^[25-26]。可见 BZ 组小鼠 TC、LDL-C 血脂指标升高, CRP、IL-6 炎症指标上升, 肾病理示 TGF- β 沉积增多、炎细胞浸润明显与二十二碳五烯酸、二十碳五烯酸的下调密切相关。

综上, 在气虚湿瘀 RF 小鼠中 *Acnat1*、*Acnat2* 和 *Hsd17b12* 上调参与不饱和脂肪酸生物合成与牛磺酸和亚牛磺酸代谢途径, 血清中表现为牛磺酸、3-亚磺酰基丙氨酸、牛磺胆酸、二十二碳五烯酸、二十碳五烯酸代谢物的下调。因此, 推测在小鼠气虚湿瘀 RF 形成机制可能与 *Acnat1*、*Acnat2* 以及 *Hsd17b12* 参与下 Omega-3 脂肪酸与牛磺酸的偶联影响脂质代谢相关, 气虚湿瘀肾纤维化中不饱和脂肪酸生物合成与牛磺酸和亚牛磺酸代谢通路可能发挥重要作用, *Hsd17b12* 可能为重要靶点。这为后续气虚湿瘀肾纤维化的机制研究及治疗提供新的思路和方向。

参考文献:

- [1] DJUDJAJ S, BOOR P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis [J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 16-36.
- [2] 高国栋, 孙伟. “肾虚湿瘀”理论下的慢性肾病中医证候学研究 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2021, 23(10): 3474-3482.
GAO G D, SUN W. TCM syndrome research of chronic kidney disease based on the theory of “kidney deficiency and damp-blood stasis” [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2021, 23(10): 3474-3482.
- [3] 胡洪贞, 齐振强, 李伟. 李伟中西医结合治疗慢性肾病经验撷菁 [J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(2): 260-262.
HU H Z, QI Z Q, LI W. LI Wei's experience of treating chronic kidney disease with traditional Chinese and western medicine [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2019, 46(2): 260-262.
- [4] 陈香美, 倪兆慧, 刘玉宁, 等. 慢性肾衰竭中西医结合诊疗指南 [J]. *河北中医*, 2016, 38(2): 313-317.
CHEN X M, NI Z H, LIU Y N, et al. Guide to diagnosis and treatment of chronic renal failure with integrated traditional Chinese and western medicine [J]. *Hebei J Tradit Chin Med*, 2016, 38(2): 313-317.
- [5] 赵辉, 曹洪欣, 李想, 等. 冠心病心阳虚痰瘀互结证大鼠模型的代谢组学特征分析 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2023, 29(5): 734-741.
ZHAO H, CAO H X, LI X, et al. Analysis on metabonomic characteristics of rat model of coronary heart disease with heart Yang deficiency, phlegm and blood stasis syndrome [J]. *J Basic Chin Med*, 2023, 29(5): 734-741.
- [6] 高冉冉, 申振, 连梦慧, 等. 气虚湿瘀型肾纤维化动物模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(10): 91-99.
GAO R R, SHEN Z, LIAN M H, et al. Research progress on kidney fibrosis animal models of qi deficiency and dampness stasis syndrome [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(10): 91-99.
- [7] HAN C, JIANG Y H, LI W, et al. *Astragalus membranaceus* and *Salvia miltiorrhiza* ameliorates cyclosporin A-induced chronic nephrotoxicity through the “gut-kidney axis” [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 269: 113768.
- [8] 庞欣欣, 彭紫凝, 邢玉凤, 等. 基于病证结合探讨血瘀证糖尿病肾病大鼠肾损害与内质网应激的关系 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(20): 74-81.
PANG X X, PENG Z N, XING Y F, et al. Investigating relationship between renal damage and endoplasmic reticulum stress in diabetic kidney disease rats with blood stasis syndrome based on combination of disease and syndrome [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2020, 26(20): 74-81.
- [9] 钟云良, 谢桂权. 原发性肾病综合征湿热证与炎症因子相关性的探讨 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2008, 10(5): 25-26.
ZHONG Y L, XIE G Q. Correlation between damp-heat syndrome and inflammatory factors in primary nephrotic syndrome [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2008, 10(5): 25-26.
- [10] 李春庆, 孙伟, 周栋. 慢性肾病湿热证实验研究进展 [J]. *中医药导报*, 2010, 16(11): 117-119.
LI C Q, SUN W, ZHOU D. Experimental study of chronic

- kidney disease progress Damp [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2010, 16(11): 117-119.
- [11] 陈佳美, 朱青, 朴胜华, 等. 湿热证动物模型造模方法的文献挖掘研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(9): 1399-1404.
- CHEN J M, ZHU Q, PIAO S H, et al. Research on literature mining of animal models with damp-heat syndrome [J]. J Basic Chin Med, 2021, 27(9): 1399-1404.
- [12] HUNT M C, SIPONEN M I, ALEXSON S E H. The emerging role of acyl-CoA thioesterases and acyltransferases in regulating peroxisomal lipid metabolism [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1822(9): 1397-1410.
- [13] NEUGEBAUER K A, OKROS M, GUZIOR D V, et al. Baat gene knockout alters post-natal development, the gut microbiome, and reveals unusual bile acids in mice [J]. J Lipid Res, 2022, 63(12): 100297.
- [14] REILLY S J, O'SHEA E M, ANDERSSON U, et al. A peroxisomal acyltransferase in mouse identifies a novel pathway for taurine conjugation of fatty acids [J]. FASEB J, 2007, 21(1): 99-107.
- [15] SAGHATELIAN A, MCKINNEY M K, BANDELL M, et al. A FAAH-regulated class of N-acyl taurines that activates TRP ion channels [J]. Biochemistry, 2006, 45(30): 9007-9015.
- [16] 陈哲晖, 陆妹, 杨艳玲. 牛磺酸在遗传代谢病治疗中的应用 [J]. 中国实用儿科杂志, 2023, 38(10): 758-761.
- CHEN Z H, LU M, YANG Y L. Use of taurine in the treatment of inherited metabolic disorders [J]. Chin J Pract Pediatr, 2023, 38(10): 758-761.
- [17] 陈军平, 王德伟, 谭伟源, 等. GYY4137 通过提高自噬水平和降低氧化应激来保护老年雌性大鼠骨量流失 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(3): 324-328.
- CHEN J P, WANG D W, TAN W Y, et al. GYY4137 protects bone loss in elderly female rats by increasing autophagy levels and reducing oxidative stress [J]. Chin J Osteoporos, 2021, 27(3): 324-328.
- [18] BALIOU S, ADAMAKI M, IOANNOU P, et al. Ameliorative effect of taurine against diabetes and renal-associated disorders (Review) [J]. Med Int (Lond), 2021, 1(2): 3.
- [19] LI Y, ZHAO D, QIAN M, et al. Amlodipine, an anti-hypertensive drug, alleviates non-alcoholic fatty liver disease by modulating gut microbiota [J]. Br J Pharmacol, 2022, 179(9): 2054-2077.
- [20] HEIKELÄ H, RUOHONEN S T, ADAM M, et al. Hydroxysteroid (17 β) dehydrogenase 12 is essential for metabolic homeostasis in adult mice [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2020, 319(3): E494-E508.
- [21] LIU J, CHE Y, CAI K, et al. miR-136 regulates the proliferation and adipogenic differentiation of adipose-derived stromal vascular fractions by targeting *HSD17B12* [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(19): 14892.
- [22] HAN S, CHOI H, PARK H, et al. Omega-3 fatty acids attenuate renal fibrosis via AMPK-mediated autophagy flux activation [J]. Biomedicines, 2023, 11(9): 2553.
- [23] POGGIOLI R, HIRANI K, JOGANI V G, et al. Modulation of inflammation and immunity by omega-3 fatty acids: a possible role for prevention and to halt disease progression in autoimmune, viral, and age-related disorders [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2023, 27(15): 7380-7400.
- [24] 危志强. 二十碳五烯酸抑制肾小管上皮细胞间质转化及纤维化的机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2020.
- WEI Z Q. Mechanism of eicosapentaenoic acid inhibiting interstitial transformation and fibrosis of renal tubular epithelial cells [D]. Suzhou: Soochow University, 2020.
- [25] TRAMMELL S A J, GAMON L F, GOTFRYD K, et al. Identification of bile acid-CoA: amino acid N-acyltransferase as the hepatic N-acyl taurine synthase for polyunsaturated fatty acids [J]. J Lipid Res, 2023, 64(9): 100361.
- [26] BORNFELDT K E. Triglyceride lowering by omega-3 fatty acids: a mechanism mediated by N-acyl taurines [J]. J Clin Invest, 2021, 131(6): e147558.

[收稿日期]2024-08-17

张颖,谢璐璐,张兆鹏,等. 黄精多糖通过抑制心肌细胞焦亡改善糖尿病心肌病[J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(4): 58-68.

Zhang Y, Xie LL, Zhang ZP, et al. *Polygonatum sibiricum* polysaccharides may improve diabetic cardiomyopathy by inhibiting pyroptosis [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 58-68.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.006

黄精多糖通过抑制心肌细胞焦亡改善糖尿病心肌病

张颖¹, 谢璐璐², 张兆鹏³, 高睿¹, 魏旭阳¹, 金美英⁴, 郭军鹏^{5*}

(1. 长春中医药大学中西医结合学院, 长春 130117; 2. 长春中医药大学中医学院, 长春 130117; 3. 长春中医药大学药学院, 长春 130117; 4. 长春中医药大学附属第三临床医院, 长春 130117; 5. 长春中医药大学临床医学院, 长春 130117)

【摘要】 目的 探究黄精多糖(*Polygonatum sibiricum* polysaccharides, PSP)对糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathies, DCM)的保护作用及机制。**方法** 40只SPF级雄性SD大鼠随机分为正常组、模型组、PSP组和二甲双胍组,高脂喂养4周后腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)建立糖尿病动物模型,灌胃给药12周,每两周记录体质量、血糖。第16周时通过无创超声心动仪检测心功能;HE、Masson染色评估大鼠心肌组织病理变化及心肌纤维化程度;酶联免疫吸附实验(ELISA)检测大鼠血清白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-18(interleukin-18, IL-18)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL)及高密度脂蛋白(HDL)水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠心肌组织中纤维化相关蛋白TGF- β 1、Smad2、Collagen-I、Collagen-III及焦亡相关蛋白NLRP3、ASC、Caspase-1的表达水平。细胞实验通过将H9c2细胞暴露于高糖(40 mmol/L)环境以模拟体外DCM模型,CCK-8法检测细胞活力;流式细胞术检测凋亡细胞比率。**结果** 与模型组比较,治疗组大鼠血糖、血脂及血清炎症因子水平显著降低($P<0.05$),左室射血分数(EF%)和短轴缩短率(FS%)显著升高($P<0.05$),心功能得到改善;心肌纤维排列较整齐,胶原纤维堆积减少;心肌组织NLRP3、ASC、Caspase-1、Collagen-I、Collagen-III、TGF- β 1及Smad2蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。细胞实验中PSP组提高了高糖诱导的H9c2心肌细胞活力、降低凋亡细胞比例。**结论** PSP能改善糖尿病大鼠糖脂代谢,保护心功能,延缓心肌纤维化的发生,同时可以提高心肌细胞活力,其作用机制可能与抑制细胞焦亡从而延缓心室重构有关。

【关键词】 黄精多糖;糖尿病心肌病;焦亡;心肌纤维化;炎症反应

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2025)04-0058-11

Polygonatum sibiricum polysaccharides may improve diabetic cardiomyopathy by inhibiting pyroptosis

ZHANG Ying¹, XIE Lulu², ZHANG Zhaopeng³, GAO Rui¹, WEI Xuyang¹, JIN Meiyang⁴, GUO Junpeng^{5*}

(1. College of Integrative Chinese and Western Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China. 2. School of Traditional Chinese Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117. 3. Pharmaceutical College, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117. 4. the Third Affiliated Clinical Hospital of Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117. 5. School of Clinical Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117)

【基金项目】 吉林省中医药管理局科技计划项目(2022056)。

【作者简介】 张颖(1994—),女,在读硕士研究生,研究方向:重大慢病的中西医结合基础研究。E-mail:zy07311246@163.com

【通信作者】 郭军鹏(1973—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:中医药防治老年病。E-mail:Guojp1228@163.com

【 Abstract 】 Objective To investigate the protective effect and mechanism of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides (PSP) on diabetic cardiomyopathy (DCM). **Methods** Forty SPF-grade male Sprague-Dawley rats were divided randomly into Control, Model, PSP, and metformin groups. After 4 weeks of feeding a high-fat diet, streptozotocin was injected intraperitoneally to establish a rat model of diabetes mellitus. The drug was administered by gavage for 12 weeks, and body mass and blood glucose were recorded every 2 weeks. Cardiac function was detected by non-invasive echocardiography at week 16. Myocardial histopathological changes and the degree of myocardial fibrosis were assessed by hematoxylin and eosin and Masson staining. Serum interleukin (IL)-6, IL-1 β , IL-18, tumor necrosis factor- α (TNF- α), triglycerides, total cholesterol, low-density lipoprotein, and high-density lipoprotein were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Expression levels of the fibrosis-related proteins transforming growth factor (TGF)- β 1, Smad2, Collagen-I, Collagen-III, and the pyroptosis-related proteins NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC), and Caspase-1 were detected in rat myocardial tissues by Western blot. Cellular experiments were performed by exposing H9c2 cells to high glucose (40 mmol/L) to mimic the *in vitro* DCM model, cell viability was detected by Cell Counting Kit-8 assay, and the apoptotic cell ratio was detected by flow cytometry. **Results** Rats in the treatment group had significantly lower blood glucose, lipid, and serum inflammatory factor levels compared with the model group ($P < 0.05$), significantly higher ejection fraction and fractional shortening values ($P < 0.05$), and improved cardiac function. Myocardial fibers were better aligned and collagen fiber accumulation was reduced, and myocardial tissue levels of NLRP3, ASC, Caspase-1, Collagen-I, Collagen-III, TGF- β 1, and Smad2 were significantly reduced ($P < 0.05$). In the cellular assay, PSP increased the viability and decreased the proportion of apoptotic cells in high glucose-induced H9c2 cardiomyocytes. **Conclusions** PSP can improve glucose-lipid metabolism, protect cardiac function, and delay the occurrence of myocardial fibrosis in diabetic rats, and can also improve the viability of cardiomyocytes. Its mechanism of action may be related to the inhibition of cellular pyroptosis and delayed occurrence of ventricular remodeling.

【 Keywords 】 *Polygonatum sibiricum* polysaccharides; diabetic cardiomyopathy; pyroptosis; myocardial fibrosis; inflammation response

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

糖尿病是临床常见的代谢性疾病,常伴随心脏、肾及眼部等多种组织器官并发症^[1]。近年来,随着人们生活方式的变化,糖尿病患者的数量呈逐年上升趋势,与此同时,其相关并发症的发病率也呈现出不断攀升的态势^[2]。目前全球约有 5.37 亿糖尿病患者,早期发现并发症以及主动管理血糖对于预防和减轻微血管和大血管并发症以及死亡负担至关重要^[3]。糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathies, DCM)是糖尿病患者晚期常见的一种心脏并发症及主要致死原因之一,其特征在早期阶段主要表现为左心室肥厚及舒张功能障碍,进展至晚期,则体现为心脏纤维化及收缩能力下降,这一过程最终导致临床心力衰竭的发生。临床中主要是通过对症治疗来缓解症状,值得注意的是,糖尿病患者面临相对较高的心功能不全风险,这是长期高血糖的结果。心脏结构、功能及代谢改变贯穿其中,成为这一

系列病理演变的显著标志^[4-5]。

DCM 的病理生理学很复杂,包括心肌纤维化、氧化应激、心肌炎症、细胞自噬等。近年来,焦亡这一程序性细胞死亡方式得到关注。研究表明,糖尿病导致的心肌损伤过程中存在细胞焦亡,并且可能是这一病理状态下心肌细胞死亡的主导机制^[6-7]。糖尿病所导致的糖脂代谢紊乱、糖基化终末产物积累、炎症细胞因子释放以及活性氧的产生,共同促进了体内的炎症反应和氧化应激状态的激活,是 DCM 发病的主要驱动因素^[8]。NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 炎症小体作为焦亡的经典途径,能够触发炎症级联反应,导致大量促炎细胞因子释放,进而介导细胞焦亡过程,加剧心肌损伤^[9-10]。

黄精是传统药食两用中药材,有益气滋阴、

健脾养血、补肾润肺等功效,常用于消渴症,也就是现代医学中的糖尿病^[11-12],其中黄精多糖(*Polygonatum sibiricum* polysaccharides, PSP)是其最重要的活性成分。研究发现,PSP 具有调节血脂、降血糖、抗炎、抗氧化、抗细胞凋亡等作用^[13]。PSP 可以通过调节氧化应激、炎症反应和凋亡指数保护视网膜色素上皮细胞免受高糖诱导的损伤^[14]。在 LPS 诱导的脓毒症模型中,PSP 通过 NLRP3/GSDMD 信号抑制肝细胞凋亡减轻肝损伤^[15]。此外,PSP 通过调节脑内氧化应激水平、HPA 轴和胆碱能系统功能改善航天狭小空间诱导的认知功能损伤^[16]。但 PSP 改善 DCM 的研究较少,由于 DCM 发生发展过程中的复杂性,PSP 改善 DCM 的药理机制尚不明确。因此,本文旨在探讨 PSP 通过调控 NLRP3 炎症小体相关通路抑制细胞焦亡、减轻炎症反应,改善心功能及心肌纤维化,延缓 DCM 进程。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

选用 40 只 6~8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量(220 ± 20)g,购自辽宁长生生物科技有限公司[SCXK(辽)2020-0001]。所有实验动物均饲养于长春中医药大学 SPF 级动物实验中心[SYXK(吉)2023-0015],实验环境温度维持在 21~25℃,相对湿度控制在 42%~70%。本研究方案已通过长春中医药大学实验动物伦理审查委员会的批准(2024414),符合 3R 原则。

1.1.2 细胞

H9c2 大鼠心肌细胞购自武汉塞维尔公司(STCC30008G)。

1.2 主要试剂与仪器

PSP(成都埃法生物科技有限公司,批号 AFCB1702);盐酸二甲双胍(每片 0.5 g,江苏默克制药有限公司,批号 H20023370);链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(北京索莱宝科技有限公司,批号 S8050),异氟烷(河北金达福药业有限公司,2018 兽药生产证字 03121 号);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(Solarbio,批号 G1120);Masson 三色染色试剂盒(Solarbio,批号 G1340);IL-6 试剂盒(批号 HY-H0007)、IL-18 试剂盒(批号 HY-

10288)、IL-1 β 试剂盒(批号 bs-0812P)、TNF- α 试剂盒(批号 HY-H0019)购于北京华英;BCA 蛋白浓度试剂盒(上海碧云天,批号 P0009);NLRP3 抗体(批号 27458-1-AP)、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)抗体(批号 10500-1-AP)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)抗体(批号 22915-1-AP)、I 型胶原蛋白(Collagen-I)抗体(批号 14695-1-AP)、III 型胶原蛋白(Collagen-III)抗体(批号 22734-1-AP)、Smad2 蛋白抗体(批号 12570-1-AP)、转化生长因子 β 蛋白(TGF- β 1)抗体(批号 81746-2-RR)购于武汉三鹰;H9c2 细胞专用培养基(武汉塞维尔,批号 GZ30008);CCK-8 试剂盒(NCM Biotech,批号 C6005);Annexin V-FITC/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒(Elabscience,批号 AK13200)。超声仪器(苏州珂纳医疗科技有限公司);血糖仪(瑞士罗氏公司);生物显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司);酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);DYY-7C 型电泳仪(北京六一仪器厂);VE-186 型转移电泳槽(Tanon 公司);VDS 凝胶成像仪(Pharmacia Biotech 公司);流式细胞仪(BD Biosciences)。

1.3 实验方法

1.3.1 糖尿病大鼠模型制备、分组、给药

40 只 6~8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,适应性饲养一周后随机分为正常(Control)组和糖尿病组。正常组给予普通饲料喂养,糖尿病组高脂高糖喂养 4 周后腹腔注射 40 mg/kg STZ 建立糖尿病动物模型,连续 5 d 空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 视为糖尿病模型建立成功。将建模成功动物随机分为模型(Model)组、黄精多糖(PSP)组、二甲双胍(Met)组,每组 10 只。正常组和模型组给予等体积生理盐水,PSP 组给予 PSP 120 mg/(kg·d),二甲双胍组给予二甲双胍 67.5 mg/(kg·d),连续灌胃 12 周。每 2 周检测大鼠体质量和空腹血糖。

1.3.2 超声检测大鼠心脏功能及标本收集

最后一次给药后,禁食不禁水 12 h,异氟烷麻醉,进行心脏超声检查,检测左室射血分数(EF%)、短轴缩短率(FS%)等心功能指标;腹主动脉采血,3500 r/min 离心提取上清,-80℃冻存备用;取出心脏,部分心肌组织-80℃冻存,其余浸入 4%多聚甲醛固定。

1.3.3 心肌组织病理学检测

将组织样本置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h, 经乙醇梯度脱水、透明、浸蜡、包埋和切片制备后, 进行 HE 染色和 Masson 染色, 光学显微镜下仔细观察并记录各组心肌组织的病理形态学改变。

1.3.4 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测血清中炎症因子表达

完成腹主动脉采血后, 将样本静置 30 min, 随后使用离心机 3500 r/min 离心 15 min。分离并获取上清液部分, 并严格遵循 ELISA 检测试剂盒的操作说明, 测定血清中 IL-6、IL-18、IL-1 β 、TNF- α 、TG、TC、LDL 及 HDL 的含量。

1.3.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 分析

用 RIPA 裂解冷冻的大鼠心肌组织以提取总蛋白, 使用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转移到 PVDF 膜上。5% 的脱脂奶粉封闭 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗过夜, 次日二抗孵育 1 h, 全自动化学发光凝胶成像仪显影, Image J 2.14.0 计算检测结果。

1.3.6 CCK-8 法检测 H9c2 心肌细胞活力

将对数生长的 H9c2 细胞以 3000/孔种植于 96 孔板。细胞贴壁后使用不同浓度 (0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/mL) 的 PSP 在 40 mmol/L 高糖条件下分别干预 H9c2 细胞 12 h、24 h、48 h, 加入 10 μL CCK-8, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h; 酶标仪测定 450 nm 处吸光度 (A_{450})。计算细胞活力/% = (实验组 A_{450} - 空白组 A_{450}) / (对照组 A_{450} - 空白组 A_{450}) $\times 100\%$ 。

1.3.7 细胞培养及分组

当 H9c2 细胞达到 80% ~ 90% 融合时传代或给药处理。将细胞以 1×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后进行干预: 正常 (Control, 完全培养基) 组、高糖 (HG, 葡萄糖浓度 40 mmol/L) 组、PSP 低剂量 (PSP-L, 40 mmol/L 葡萄糖和 0.5 mg/mL PSP) 组、PSP 高剂量 (PSP-H, 40 mmol/L 葡萄糖和 1.0 mg/mL PSP) 组。干预 24 h 后进行后续检测。

1.3.8 流式细胞术检测 H9c2 心肌细胞凋亡

H9c2 细胞接种于 6 孔板中, 药物处理 24 h, 从培养皿中抽取细胞培养液备用, 加入适量不含 EDTA 的胰酶对细胞进行消化。将先前提取的细胞培养液加入, 轻轻吹打后将悬液转移至离心管

内, 以 1000 r/min 的速率离心 5 min, 使用 PBS 对细胞进行两次洗涤并计数, 收集细胞数量介于 $1 \sim 5 \times 10^5$ 之间, 再以 2000 r/min 的速率离心 5 min。加入 100 μL 的 Binding Buffer 重悬细胞, 再向细胞悬液中加入 Annexin V-FITC 和 PI 染液各 5 μL , 室温下避光孵育 15 min。最后加入 400 μL 的 Binding Buffer, 使用流式细胞仪进行检测。

1.3.9 Western blot 检测 H9c2 心肌细胞蛋白表达

H9c2 细胞以 1×10^6 的密度接种于 6 孔板中, 给药 24 h, 冰浴裂解 20 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心提取总蛋白。电泳后转移至 PVDF 膜, 封闭 1 h, 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。二抗室温下孵育 1 h, 化学发光试剂盒和成像系统检测蛋白条带, Image J 2.14.0 分析蛋白水平。

1.4 统计学方法

利用 SPSS 26.0 统计软件对数据进行深入分析, 计量数据均表示为平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式。符合正态分布的数据, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 方法; 方差齐性的数据, 两两比较运用最小显著差异法 (LSD)。当 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PSP 对大鼠糖脂代谢影响

PSP 对糖尿病大鼠具有显著的降血糖效果。与正常组比较, 模型组大鼠空腹血糖明显上升 ($P < 0.01$), 而 PSP 组与二甲双胍组则显著降低这一水平 ($P < 0.05$)。此外, 模型组大鼠体质量相较于正常组显著下降, PSP 组与二甲双胍组大鼠体质量较模型组有所提升 ($P < 0.05$)。进一步分析血脂指标发现, 模型组大鼠 TG、TC、LDL 水平显著高于正常组 ($P < 0.01$), 而 HDL 水平则显著降低 ($P < 0.01$)。相比之下, PSP 组与二甲双胍组大鼠的 TG、TC 及 LDL 水平显著降低 ($P < 0.05$), HDL 水平显著升高 ($P < 0.01$)。综上所述, PSP 能有效降低糖尿病大鼠的血糖及血脂水平 (图 1)。

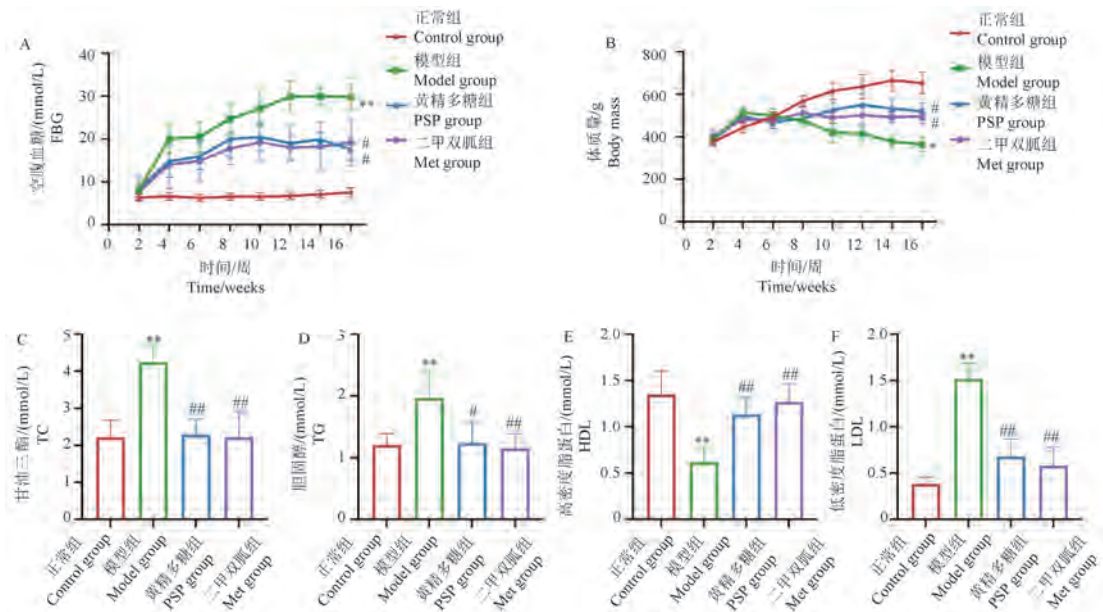
2.2 PSP 对大鼠心功能的影响

如图 2 所示, 治疗 12 周后, 通过超声心动图检查大鼠心功能, 与正常组比较, 模型组大鼠 EF、FS 均降低 ($P < 0.01$), PSP 组、二甲双胍组心功能明显改善 ($P < 0.05$)。

2.3 PSP 对 DCM 大鼠心肌炎症的影响

与正常组相比,模型组 IL-6、IL-18、IL-1 β 和 TNF- α 含量增加,差异具有统计学意义 ($P <$

0.01);与模型组相比,PSP 组及二甲双胍组 IL-6、IL-18、IL-1 β 和 TNF- α 均降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$,表 1)。

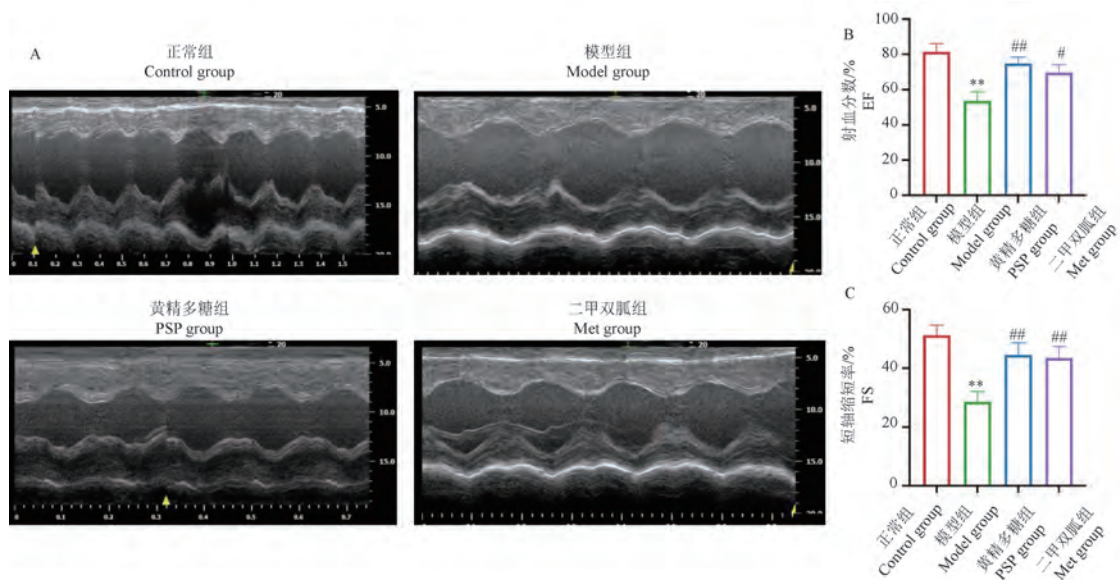


注:A:大鼠空腹血糖水平;B:大鼠体质量;C~F:血清甘油三酯、胆固醇、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白水平。与正常组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图 1 PSP 对 DCM 大鼠糖脂代谢的影响

Note. A, Fasting blood glucose levels of rats. B, Body mass of rats. C~F, Serum TC, TG, HDL, and LDL levels. Compared with Control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with Model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 1 Effect of PSP on glycolipid metabolism in DCM rats



注:A:代表性 M 型多普勒超声心动图;B~C:射血分数和短轴缩短率($n=3$)。与正常组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图 2 PSP 改善 DCM 大鼠的心功能

Note. A, Representative M-mode Doppler echocardiograms. B~C, Ejection fraction and fractional shortening ($n=3$). Compared with Control group, ** $P < 0.01$. Compared with Model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 2 PSP improves cardiac function in DCM rats

2.4 PSP 减轻 DCM 大鼠心肌纤维化

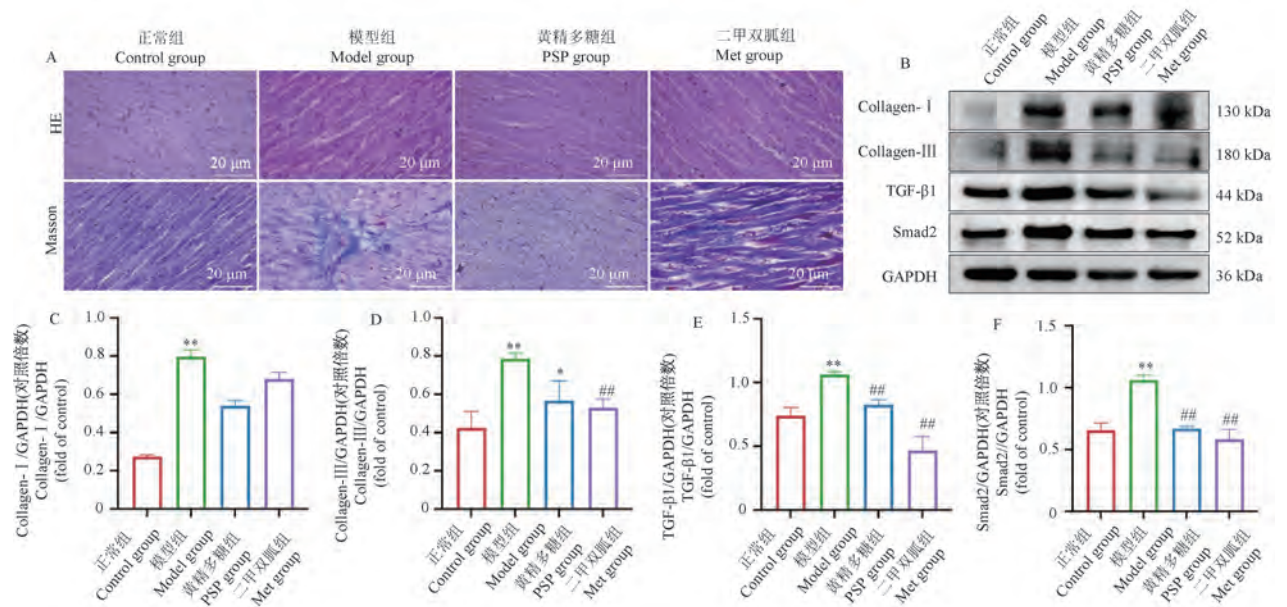
如图 3 所示,采用 HE 及 Masson 染色评估 DCM 大鼠心肌组织病理形态变化。HE 染色可见,正常组中,大鼠心肌结构保持良好完整性,肌纤维排列整齐有序,心肌间质中未见明显炎性细胞浸润。相比之下,模型组大鼠的心肌纤维排列呈现出显著的紊乱状态,肌间隔明显增宽,伴有灶性水肿,间质可见充血及中等量炎性细胞浸润。而在 PSP 组与二甲双胍组中,大鼠心肌纤维

排列相对较规整,纤维束间隔增宽不明显,心肌细胞水肿变性较为罕见,间质仅呈现轻度充血与水肿,且炎性细胞浸润较少。Masson 染色结果显示,正常组大鼠心肌纤维被均匀染成红色,且未观察到胶原纤维沉积。模型组大鼠的心肌纤维排列疏松紊乱,伴有大量蓝色胶原纤维堆积。而在 PSP 组中,胶原纤维堆积显著减少,心肌纤维排列趋于整齐。二甲双胍组同样表现出胶原纤维堆积减少,但相较于 PSP 组,其心肌纤维排列

表 1 PSP 对 DCM 大鼠 IL-6、IL-18、IL-1β 和 TNF-α 含量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 1 Effects of PSP on IL-6, IL-18, IL-1β and TNF-α levels in DCM rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别 Groups	白介素-1β/(pg/mL) IL-1β	白介素-6/(pg/mL) IL-6	白介素-18/(pg/mL) IL-18	肿瘤坏死因子-α/(pg/mL) TNF-α
正常组 Control group	16.91±2.59	107.69±4.77	53.21±4.86	32.21±3.88
模型组 DCM group	30.72±5.16**	119.40±2.57**	91.12±16.38**	47.83±3.36**
黄精多糖组 PSP group	22.60±2.10##	160.45±8.88##	65.12±8.51##	35.28±3.44##
二甲双胍组 Met group	23.66±3.27#	126.74±7.70#	64.32±8.95##	33.88±4.22#

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



注:A:HE、Masson 染色检测大鼠心肌组织病理形态变化;B:Western blot 检测大鼠心肌组织中 Collagen-I、Collagen-III、TGF-β1、Smad2 蛋白的表达;C~F:蛋白表达定量。与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图 3 PSP 对 DCM 大鼠心肌纤维化的影响

Note. A, HE and Masson staining was used to detect the histopathological and morphological changes in rats' myocardial tissue. B, Western blot was used to detect the expression of Collagen-I, Collagen-III, TGF-β and Smad2 proteins in rat myocardial tissue. C~F, Quantification of protein expression. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 3 Effect of PSP on myocardial fibrosis in rats with DCM

仍存在一定的疏松紊乱。通过 Western blot 法进一步检测发现,与正常组相比,模型组大鼠心肌组织中 Collagen- I、Collagen- III、TGF- β 1 及 Smad2 蛋白的表达水平均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组相比,PSP 组与二甲双胍组大鼠心肌组织中上述蛋白的表达水平均有所下降 ($P < 0.05$)。这一结果进一步证实了 PSP 在缓解糖尿病大鼠心脏纤维化方面具有积极作用。

2.5 PSP 对大鼠心肌组织 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达的影响

相较于正常组,模型组大鼠心肌组织中 NLRP3、ASC 以及 Caspase-1 蛋白表达水平均呈现出显著上升的趋势 ($P < 0.01$)。与模型组相比,PSP 组与二甲双胍组大鼠心肌组织中的 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 蛋白表达水平均有显著下降 (P

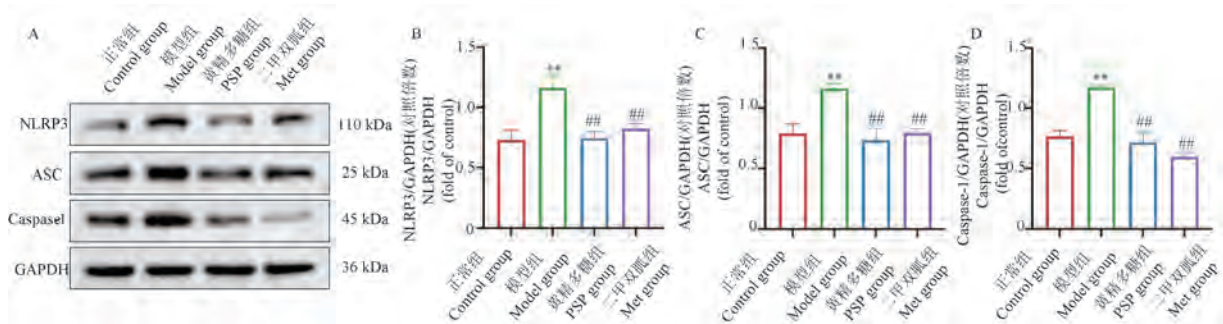
< 0.01)。结果表明,PSP 能有效抑制焦亡相关蛋白在糖尿病大鼠心肌组织中的高表达(图 4)。

2.6 PSP 对高糖诱导的 H9c2 心肌细胞活力的影响

通过 CCK-8 法检测不同浓度 PSP 在不同时间对暴露于高糖环境的 H9c2 细胞生存能力的影响。如图 5 所示,在 12 h 和 24 h 时,0.5 mg/mL 和 1.0 mg/mL 的 PSP 均可提高高糖条件下的细胞活力 ($P < 0.05$),且 24 h 时作用更明显。因此,本研究选取 0.5 mg/mL 和 1.0 mg/mL PSP 作用 24 h 进行体外实验。

2.7 PSP 对高糖诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡的影响

如图 6 所示,使用 Annexin V-FITC、PI 标记细胞,采用流式细胞术检测凋亡细胞比例。高糖

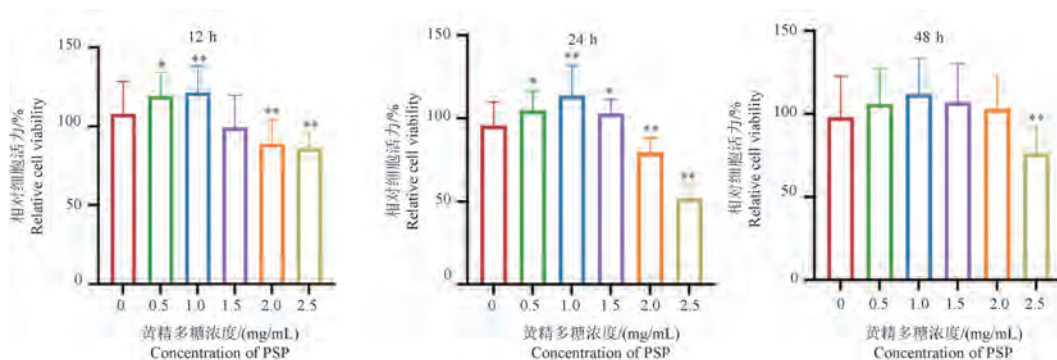


注:A:Western blot 检测大鼠心肌组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达;B~D:蛋白表达定量。与正常组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比,## $P < 0.01$ 。

图 4 PSP 对 DCM 大鼠 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达水平的影响

Note. A, Western blot was used to detect the expression of NLRP3, ASC and Caspase-1 in the myocardium of rats. B~D, Quantification of protein expression. Compared with Control group, ** $P < 0.01$. Compared with Model group, ## $P < 0.01$.

Figure 4 Effects of PSP on NLRP3, ASC and Caspase-1 protein expression levels in rats with DCM



注:与正常组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 5 PSP 对高糖诱导的 H9c2 心肌细胞活力的影响

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

Figure 5 Effect of polysaccharides from PSP on the viability of high glucose-induced H9c2 cardiomyocytes

组的细胞凋亡比例与正常组相比明显升高 (22.96% vs 4.52%)。PSP 低剂量组的细胞凋亡比例下降至 8.4%;PSP 高剂量组的细胞凋亡比例下降至 6.21%。

2.8 PSP 对 H9c2 心肌细胞 Collagen-I、Collagen-III、TGF- β 1 和 Smad2 蛋白表达的影响

Western blot 法检测 H9c2 心肌细胞中

Collagen-I、Collagen-III、TGF- β 1 和 Smad2 蛋白表达情况,图 7 结果显示,与正常组相比,高糖组 Collagen-I、Collagen-III、TGF- β 1 及 Smad2 蛋白的表达水平均显著升高 ($P<0.01$);与高糖组相比,PSP 低剂量组、高剂量组上述蛋白的表达水平均有所下降 ($P<0.01$)。这一结果证实了 PSP 可以减轻高糖诱导的心肌细胞纤维化。

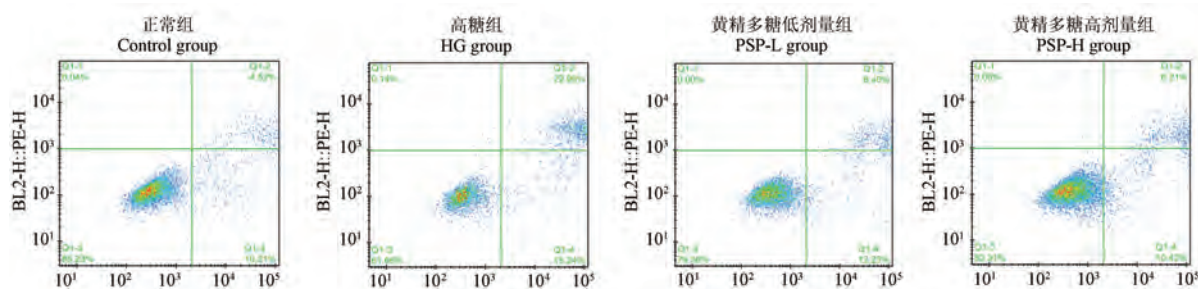
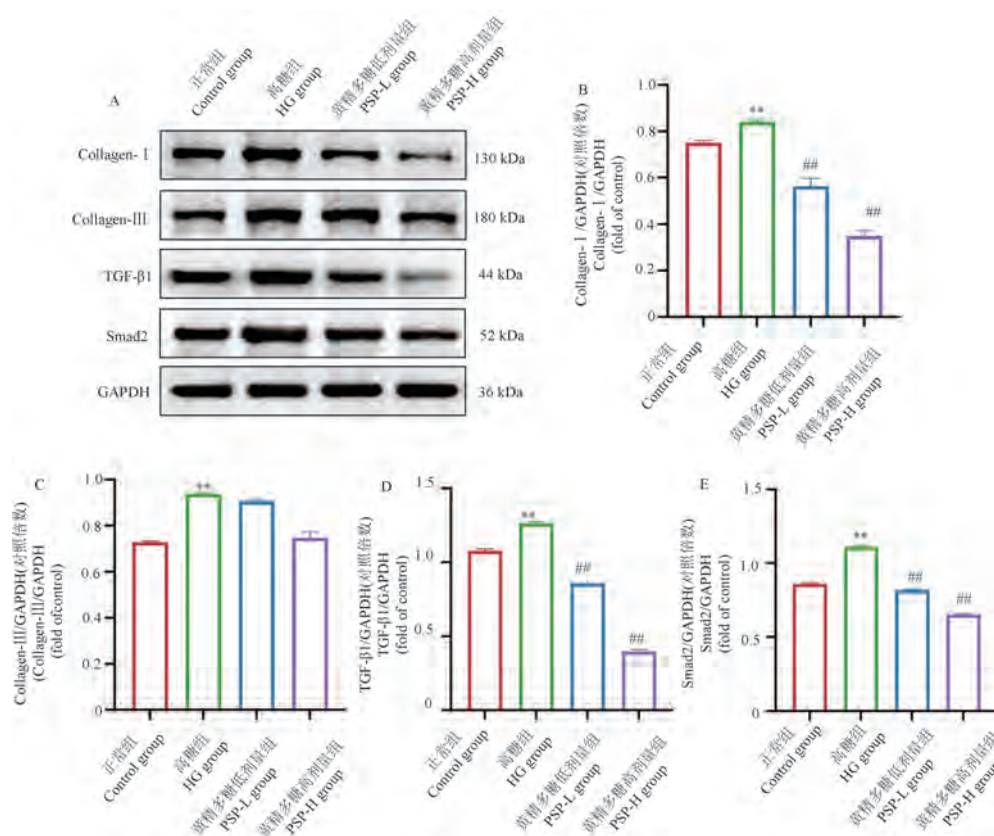


图 6 PSP 对高糖诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡的影响

Figure 6 Effect of polysaccharides from PSP on high glucose-induced apoptosis in H9c2 cardiomyocytes



注:A:Western blot 检测 H9c2 细胞中 Collagen-I、Collagen-III、TGF- β 1 和 Smad2 蛋白的表达;B~E:蛋白表达定量。与正常组相比,** $P<0.01$;与高糖组相比,## $P<0.01$ 。

图 7 PSP 对 H9c2 心肌细胞 Collagen-I、Collagen-III、TGF- β 1、Smad2 蛋白表达的影响

Note. A, Western blot was used to detect the expression of Collagen-I、Collagen-III、TGF- β 1 and Smad2 protein expression levels in H9c2 cell. B~E, Quantification of protein expression. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with HG group, ## $P<0.01$.

Figure 7 Effects of PSP on Collagen-I、Collagen-III、TGF- β 1 and Smad2 protein expression levels in H9c2 cardiomyocytes

3 讨论

根据国际糖尿病联盟 (IDF) 最新发布的统计数据,2021 年全球范围内 20~79 岁年龄段人群的糖尿病患病率估算达到了 10.5%。预计至 2045 年,这一比例将攀升至 12.2%^[17]。随着糖尿病患者人数逐年攀升,DCM 发病率呈上升趋势,是糖尿病患者发生心力衰竭死亡的主要原因^[18]。其致病机制复杂,目前尚未研发出针对 DCM 的治疗用药,因而仍需探索更有效的治疗手段延缓 DCM 发展。

DCM 的临床表现归属于中医学“消渴”并发“胸痹”“心痛”等范畴^[19]。中医学认为,气阴两虚、血气不和是 DCM 的重要病机。脏腑气血阴阳失调,导致气滞、血瘀、痰浊闭阻心脉,久而久之,损及心阳,可成心衰^[20-21]。长期高血糖可在心肌细胞中引发炎症刺激,诱导胶原蛋白释放到心肌中,加剧心肌纤维化。晚期 DCM 可导致心肌结构和功能紊乱,进而导致重度心力衰竭^[22]。研究表明,中药在治疗糖尿病方面具有独特的优势。不仅能降低血糖,还可以调节人体功能,预防和治疗并发症^[23]。在本研究中,PSP 通过改善 DCM 大鼠糖脂代谢及心功能、减轻心肌纤维化和炎症

反应展现出治疗潜力。高糖环境诱导心肌细胞释放炎症介质,进而激发炎症因子生成,这一过程加速了心脏纤维化的进程,并损害了心功能^[24],PSP 干预有效地逆转了这些病理变化。同时,PSP 还能改善 DCM 大鼠的舒张功能和收缩功能,显著提升 EF% 和 FS%。此外,PSP 降低了心肌损伤标志物 CK-MB 和 LDH 水平。Western blot 的进一步分析从分子层面验证了 PSP 在减轻心肌纤维化方面的积极作用。细胞焦亡是一种新型的程序性细胞死亡方式,与炎症反应之间存在着紧密的关联性^[25]。NLRP3 蛋白、胱天蛋白酶-1 前体 (pro-Caspase-1) 以及 ASC 构成了 NLRP3 炎症小体,三者通过彼此间的相互作用与紧密协作,共同调节机体的免疫反应。焦亡主要由 NLRP3 炎症小体促进 Caspase-1 激活,诱导 IL-1 β 、IL-18 炎症因子释放,导致心肌细胞穿孔、细胞膜破裂、细胞内容物释放和细胞死亡,从而引起胶原纤维沉积,心肌纤维化发生 (图 8),进一步导致心室重构及心功能障碍^[26-27]。先前的研究已揭示,在 DCM 动物模型中焦亡相关蛋白的表达量显著上调^[28-29],本研究进一步验证,DCM 心脏组织中 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 蛋白的表达水平均有明显升高,而 PSP 的治疗则有效遏制了这

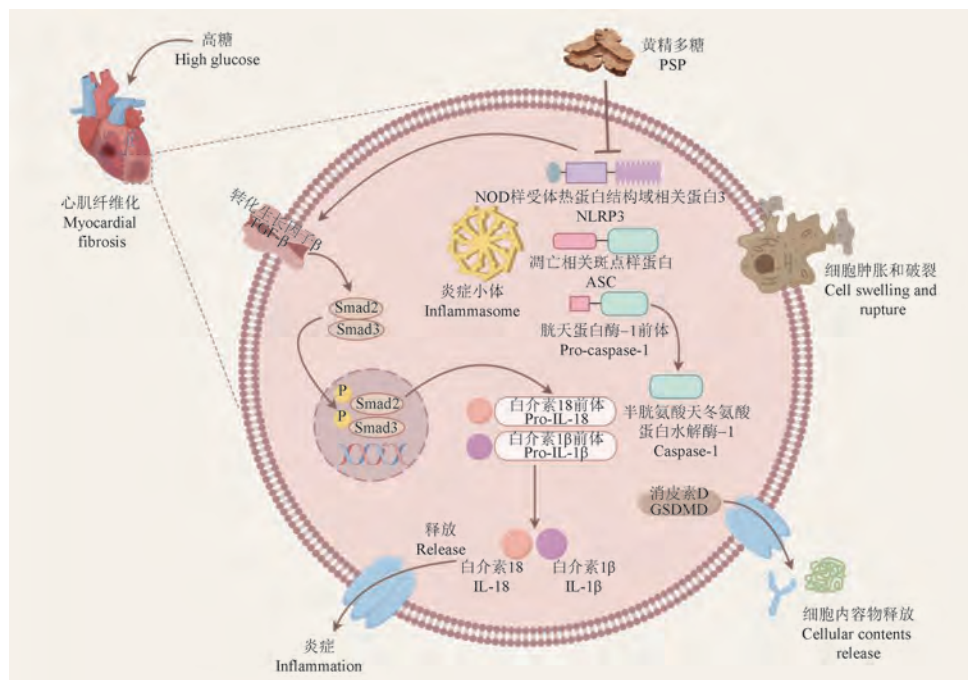


图 8 PSP 减轻 DCM 机制图 (由 Figdraw 绘制)

Figure 8 Mechanism by which PSP attenuates DCM (by Figdraw)

些蛋白的过度表达。通过高糖诱导 H9c2 细胞模拟体外 DCM 模型,发现高糖处理组的细胞活力显著降低、细胞凋亡比例大幅上升,PSP 处理后则有效改善上述变化,同时 Western blot 结果显示, Collagen- I、Collagen-III、TGF- β 1、Smad2 蛋白表达下降,表明 PSP 抑制 TGF- β /Smad 信号通路,减少了细胞死亡,进而减轻心肌纤维化。据此,本研究认为抑制细胞焦亡是针对 DCM 治疗的一个关键策略。

本研究认为,PSP 对 DCM 具备潜在的治疗效应,其可能的作用机制在于通过抑制 NLRP3 炎症小体触发的细胞焦亡过程,从而实现对心脏的保护作用,这为 DCM 的临床预防与治疗提供了新的理论依据和策略方向。然而,关于 PSP 在治疗 DCM 过程中是否涉及其他信号通路的协同作用,目前尚属未知,需更为深入的探索与研究。

参考文献:

- [1] GIRARD D, VANDIEDONCK C. How dysregulation of the immune system promotes diabetes mellitus and cardiovascular risk complications [J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 991716.
- [2] TAYANLOO-BEIK A, ROUDSARI P P, REZAEI-TAVIRANI M, et al. Diabetes and heart failure: multi-omics approaches [J]. Front Physiol, 2021, 12: 705424.
- [3] AHMAD E, LIM S, LAMPTEY R, et al. Type 2 diabetes [J]. Lancet, 2022, 400(10365): 1803–1820.
- [4] RITCHIE R H, DALE ABEL E. Basic mechanisms of diabetic heart disease [J]. Circ Res, 2020, 126(11): 1501–1525.
- [5] LINDMAN B R. The diabetic heart failure with preserved ejection fraction phenotype: is it real and is it worth targeting therapeutically? [J]. Circulation, 2017, 135(8): 736–740.
- [6] BEDOUI S, HEROLD M J, STRASSER A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(11): 678–695.
- [7] 张楠,贾云柱,田纪祥,等. 中医药调控糖尿病心脏病中细胞焦亡的研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(9): 813–820, 828.
- ZHANG N, JIA Y Z, TIAN J X, et al. The research progress of Traditional Chinese Medicine regulating pyroptosis in diabetes cardiomyopathy [J]. Chin J Arterioscler, 2024, 32(9): 813–820, 828.
- [8] SALVATORE T, PAFUNDI P C, GALIERO R, et al. The diabetic cardiomyopathy: the contributing pathophysiological mechanisms [J]. Front Med (Lausanne), 2021, 8: 695792.
- [9] WEI Y, YANG L, PANDEYA A, et al. Pyroptosis-induced inflammation and tissue damage [J]. J Mol Biol, 2022, 434(4): 167301.
- [10] ZHANG L, AI C, BAI M, et al. NLRP3 inflammasome/pyroptosis: a key driving force in diabetic cardiomyopathy [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(18): 10632.
- [11] 陈宇,周芸涓,李丹,等. 黄精的现代药理作用研究进展 [J]. 中药材, 2021, 44(1): 240–244.
- CHEN Y, ZHOU Y M, LI D, et al. Research progress on modern pharmacological effects of *Polygonatum sibiricum* [J]. J Chin Med Mater, 2021, 44(1): 240–244.
- [12] 张美珍,史丽伟,杨亚男,等. 糖尿病中医治疗思路新探 [J]. 世界中医药, 2022, 17(14): 2071–2074.
- ZHANG M Z, SHI L W, YANG Y N, et al. New approaches to TCM treatment of diabetes mellitus [J]. World Chin Med, 2022, 17(14): 2071–2074.
- [13] LIU D, TANG W, HAN C, et al. Advances in *Polygonatum sibiricum* polysaccharides: extraction, purification, structure, biosynthesis, and bioactivity [J]. Front Nutr, 2022, 9: 1074671.
- [14] WANG W, LI S, SONG M. *Polygonatum sibiricum* polysaccharide inhibits high glucose-induced oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis in RPE cells [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2022, 42(2): 189–196.
- [15] XIAO L, QI L, ZHANG G, et al. *Polygonatum sibiricum* polysaccharides attenuate lipopoly-saccharide-induced septic liver injury by suppression of pyroptosis via NLRP3/GSDMD signals [J]. Molecules, 2022, 27(18): 5999.
- [16] 刘雨培,张瑛毓,范蓓,等. 黄精多糖对模拟航天狭小空间诱导认知功能损伤的改善作用及机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4): 494–503.
- LIU Y P, ZHANG Y Y, FAN B, et al. Protective effect and mechanism of action of *Polygonati rhizoma* polysaccharide on the cognitive impairment induced by simulating an enclosed space in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 494–503.
- [17] SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2022, 183: 109119.
- [18] MATSUSHITA K, HARADA K, KOHNO T, et al. Prevalence and clinical characteristics of diabetic cardiomyopathy in patients with acute heart failure [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2024, 34(5): 1325–1333.
- [19] 刘峰兆,赵丽娟,李纪新,等. 中药调控自噬干预糖尿病

- 心肌病的研究进展 [J/OL]. 中国中药杂志, 2024; 1-12. (2024-04-10). <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=ZGZY20240407006&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
- LIU F Z, ZHAO L J, LI J X, et al. Research progress of traditional Chinese medicine regulating autophagy in diabetic cardiomyopathy [J/OL]. China Ind Econ, 2024; 1-12. (2024-04-10). <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=ZGZY20240407006&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
- [20] 王红芹, 徐凤芹, 周庆兵, 等. 从“血气不和”理论探讨“代谢灵活性”失衡在糖尿病心脏病的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(1): 194-201.
- WANG H Q, XU F Q, ZHOU Q B, et al. Role of imbalance of “metabolic flexibility” in diabetic cardiomyopathy: based on theory of “blood-qi disharmony” [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(1): 194-201.
- [21] 漆仲文, 赵俊男, 张艳虹, 等. 从细胞衰老视角论中医药防治糖尿病心脏病 [J]. 中国中西医结合杂志, 2024, 44(2): 222-227.
- QI Z W, ZHAO J N, ZHANG Y H, et al. Prevention and treatment of diabetic cardiomyopathy by Chinese medicine from the cellular senescence perspective [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2024, 44(2): 222-227.
- [22] GUO Z, TUO H, TANG N, et al. Neuraminidase 1 deficiency attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, fibrosis, inflammatory *via* AMPK-SIRT3 pathway in diabetic cardiomyopathy mice [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(2): 826-840.
- [23] LIU X Y, ZHENG H W, WANG F Z, et al. Developments in the study of Chinese herbal medicine's assessment index and action mechanism for diabetes mellitus [J]. Anim Model Exp Med, 2024, 7(4): 433-443.
- [24] LIU C, YAO Q, HU T, et al. Cathepsin B deteriorates diabetic cardiomyopathy induced by streptozotocin *via* promoting NLRP3-mediated pyroptosis [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2022, 30: 198-207.
- [25] CAI Z, YUAN S, LUAN X, et al. Pyroptosis-related inflammasome pathway: a new therapeutic target for diabetic cardiomyopathy [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 842313.
- [26] ZHAN X, LI Q, XU G, et al. The mechanism of NLRP3 inflammasome activation and its pharmacological inhibitors [J]. Front Immunol, 2023, 13: 1109938.
- [27] ZHANG X, QU H, YANG T, et al. Astragaloside IV attenuate MI-induced myocardial fibrosis and cardiac remodeling by inhibiting ROS/caspase-1/GSDMD signaling pathway [J]. Cell Cycle, 2022, 21(21): 2309-2322.
- [28] 尤越, 李玲美, 李磊, 等. 细胞焦亡与心血管疾病的关系及中医药干预研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 97-108.
- YOU Y, LI L M, LI L, et al. Relationship and Traditional Chinese Medicine intervention of pyroptosis and cardiovascular diseases [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 97-108.
- [29] ZHANG W, KANG P, ZHOU J, et al. Curcumin improves diabetic cardiomyopathy by inhibiting pyroptosis through AKT/Nrf2/ARE pathway [J]. Mediators Inflamm, 2023, 2023: 3906043.

[收稿日期]2024-10-24

陈志达,付彬,李思迪,等. Chrm3 通过 MAPK/ERK 途径调节 LPS 诱导的 *Lbp*^{-/-} 小鼠腹腔巨噬细胞炎症 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(4): 69–78.

Chen ZD, Fu B, Li SD, et al. Chrm3 regulates LPS-induced inflammation in peritoneal macrophages in *Lbp*^{-/-} mice via the MAPK/ERK signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 69–78.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.007

Chrm3 通过 MAPK/ERK 途径调节 LPS 诱导的 *Lbp*^{-/-} 小鼠腹腔巨噬细胞炎症

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

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

2. 济南朋悦实验动物繁育有限公司, 济南 250000)

【摘要】 目的 基于 LBP 敲除小鼠(*Lbp*^{-/-}小鼠)探讨 LBP 缺失后 Chrm3 在 LPS 诱导的腹腔巨噬细胞炎症中的作用。**方法** 提取 WT 型、*Lbp*^{-/-}型小鼠腹腔巨噬细胞,构建 LPS 诱导的腹腔巨噬细胞炎症模型。分别采取加入抑制剂 4-damp、转染 siRNA 两种方法抑制 *Lbp*^{-/-}小鼠腹腔巨噬细胞中 Chrm3 的表达;通过转染慢病毒的方法使 *Lbp*^{-/-}小鼠腹腔巨噬细胞中的 Chrm3 过表达;抑制剂法将细胞分为对照组 A、LPS 组 A、抑制剂组,转染 siRNA 法将细胞分为对照组 B、LPS 组 B、si-NC 组、si-Chrm3 组,过表达法将细胞分为对照组 C、LPS 组 C、阴性对照组、过表达组。本研究以 WT 型、*Lbp*^{-/-}型小鼠腹腔巨噬细胞为研究对象利用 Western blot 方法验证 Chrm3 在 LPS 刺激下的变化情况,采用 CCK-8、RT-PCR、Western blot 等实验方法探讨 4-damp、si-Chrm3 及过表达慢病毒对 *Lbp*^{-/-}小鼠腹腔巨噬细胞的存活率及炎症的影响。**结果** 在 LPS 刺激下 *Lbp*^{-/-}小鼠的腹腔巨噬细胞 Chrm3 蛋白表达显著升高($P<0.001$),而野生型变化并不明显;抑制剂组及 si-Chrm3 组的细胞存活率显著升高($P<0.05, P<0.01$)、过表达组细胞存活率显著下降($P<0.01$);抑制剂组及 si-Chrm3 组的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 炎症因子表达情况显著降低($P<0.01, P<0.001$),与细胞损伤及炎症相关的蛋白 p-ERK 的表达量也显著降低($P<0.01, P<0.001$),而过表达组则与之相反,其炎症因子($P<0.001$)和 p-ERK 蛋白的磷酸化水平显著升高($P<0.001$)。**结论** LPS 刺激 *Lbp*^{-/-}小鼠腹腔巨噬细胞后 Chrm3 的表达上调、炎症因子表达上调,使用 4-damp 与 si-Chrm3 特异性降低 Chrm3 表达后使 LPS 导致的相关的 *Lbp*^{-/-}小鼠细胞炎症因子明显下降,使用过表达慢病毒上调 Chrm3 后使相关炎症因子显著升高。由此可验证敲除 LBP 后 Chrm3 调控 LPS 诱导的炎症反应。

【关键词】 毒蕈碱受体; *Lbp*^{-/-}小鼠;腹腔巨噬细胞;4-damp;干扰 RNA;过表达;MAPK 信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0069-10

Chrm3 regulates LPS-induced inflammation in peritoneal macrophages in *Lbp*^{-/-} mice via the MAPK/ERK signaling pathway

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

【作者简介】 陈志达(1999—),男,在读硕士研究生,研究方向:免疫药理学。E-mail:1034743147@qq.com

【通信作者】 王可洲(1974—),男,博士,研究员,研究方向:药理毒理学研究。E-mail:wangkezhou_cn@163.com

付彬(1991—),男,硕士,助理研究员,研究方向:基因工程模式动物研究。E-mail:fubin@sdfmu.edu.cn

* 共同通信作者

CHEN Zhida¹, FU Bin^{1*}, LI Sidi^{1,2}, LIU Sai¹, GUO Zhongkun¹, ZHANG Yue¹, WANG Kezhou^{1*}

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

【Abstract】 Objective To investigate the role of cholinergic receptor muscarinic 3 (Chrm3) in regulating lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in peritoneal macrophages in lipopolysaccharide binding protein (LBP)-knockout (*Lbp*^{-/-}) mice. **Methods** Peritoneal macrophages were isolated from wild-type and *Lbp*^{-/-} mice to establish an LPS-induced inflammation model. Chrm3 expression in *Lbp*^{-/-} mouse peritoneal macrophages was inhibited by 1,1-dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidinium iodide (4-damp) and small interfering (siRNA) and Chrm3 overexpression was achieved by lentivirus transfection. For 4-damp inhibition, cells were divided into control, LPS, and inhibitor groups, and for siRNA transfection, cells were divided into control, LPS, si-normal control group, and si-Chrm3 groups. For overexpression, cells were divided into control, LPS, negative control, and overexpression groups. Changes in Chrm3 in response to LPS stimulation were verified by Western blot. The effects of 4-damp, si-Chrm3, and lentivirus on cell inflammation and survival were confirmed by Cell Counting Kit-8, quantitative polymerase chain reaction, and Western blot assays. **Results** Chrm3 protein expression was significantly elevated in *Lbp*^{-/-} peritoneal macrophages post-LPS stimulation ($P < 0.001$), whereas there was no notable change in wild-type cells. The cell survival rate was significantly increased in the 4-damp and si-Chrm3 groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and cell survival was significantly reduced in the overexpression group ($P < 0.01$). Furthermore, 4-damp and si-Chrm3 significantly reduced expression levels of the inflammatory factors tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), and phospho-extracellular signal-regulated kinase (p-ERK) ($P < 0.01$, $P < 0.001$), which are associated with cell damage and inflammation. In contrast, TNF- α , IL-1 β , IL-6 ($P < 0.001$), and p-ERK protein ($P < 0.001$) were significantly elevated in the overexpression group. **Conclusions** LPS stimulation upregulated the expression of Chrm3 and proinflammatory cytokines in *Lbp*^{-/-} peritoneal macrophages. Specific downregulation of Chrm3 by 4-damp and si-Chrm3 significantly decreased LPS-induced proinflammatory cytokines in *Lbp*^{-/-} peritoneal macrophages, while upregulation of Chrm3 using overexpressing lentivirus significantly elevated the expression of related inflammatory factors. Chrm3 is implicated in the regulation of the LPS-induced inflammation response in peritoneal macrophages in *Lbp*^{-/-} mice.

【Keywords】 Chrm3; *Lbp*^{-/-} mice; peritoneal macrophages; 4-damp; RNAi; overexpression; MAPK signaling pathway

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

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 作为内毒素中的毒性成分, 主要存在于革兰氏阴性菌 (gram-negative bacteria, GNB) 的细胞外膜中。当革兰氏阴性菌死亡并裂解时, LPS 会从细胞外膜释放出来^[1], LPS 一旦进入机体内, 就可能引发全身性的炎症反应。LPS 进入机体后主要通过与其结合蛋白 (lipopolysaccharide-binding protein, LBP) 结合来发挥作用^[2]。LBP 作为一种急性反应期蛋白, 主要功能是结合细菌内毒素 LPS^[3]。它能够将 LPS 转运至细胞表面的 CD14 受体, 形成 LPS-LBP-CD14 三元复合体, 从而激活炎症反应^[4]。巨噬细胞是一种多功能免疫细胞^[5], 主要负责清

除入侵的病原体和死亡细胞^[6]。活化的巨噬细胞通过触发不同的信号通路。当巨噬细胞被激活时, 它们可以表达表面识别受体, 如 Toll 样受体 TLR2/TLR4, 触发信号通路, 如丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen activated protein kinases, MAPK) 和促炎细胞因子 (如白细胞介素 IL-6、IL-1 β 和肿瘤坏死因子 TNF- α)^[7], 从而有效地降低疾病的严重程度。

有研究表明敲除 LBP 基因可改善由 LPS 刺激所导致的细胞损伤^[8], 在前期研究中, 我们以 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞为模型, 揭示了血管紧张素 II 受体 1a 型 (angiotensin II receptor type 1a,

Agtr1a) 和肾上腺素受体 $\alpha 1A$ 型受体(adrenoceptor $\alpha 1a$, Adra1a) 在 LPS 诱导的炎症信号传递中发挥着关键作用。然而通过抑制剂与 siRNA 特异性抑制它们的表达后, LPS 引发的炎症反应仅被部分阻断, 且肝细胞损伤的缓解程度仍有限^[9-10], 这提示在 LBP 基因缺失的背景下, LPS 的炎症信号可能通过其他未知途径传递。基于此, 本研究旨在进一步探索 *Lbp*^{-/-} 小鼠体内潜在的代偿性炎症信号传递机制, 以期深入阐明 LPS 致病过程中的分子调控网络, 并为临床治疗内毒素血症及相关重症炎症反应提供新型干预靶点和理论依据。

胆碱能受体毒蕈碱 3 (cholinergic receptor muscarinic 3, Chrm3) 是 G 蛋白偶联受体家族的一员, 可以选择性地结合 Gq 蛋白并激活 Gq-PLC-DAG/IP3 信号传导途径以释放 Ca^{2+} 。其还可以将 MAPK 信号通路激活。有研究表明发现, 阻断 M3R 可以抑制炎症因子、增强抗肿瘤免疫反应从而减少肿瘤的生长, 改善对癌症的免疫反应^[11]。此外许多研究也观察到通过毒蕈碱受体给药可以减轻体内炎症, 这也表明毒蕈碱受体具有促炎作用^[12-13]。本文通过抑制剂 4-damp、si-Chrm3 特异性降低 Chrm3 的表达, 有效地降低了 LPS 引起的细胞炎症, 并通过过表达慢病毒反向验证了 Chrm3 在 LPS 诱导细胞炎症中的作用, 为 LPS 所致的炎症提供新靶点和新机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取济南朋悦实验动物繁育有限公司构建保存^[14]的 20 只 SPF 级 *Lbp*^{-/-} 雌性 6 周龄、体质量 20~22 g 的小鼠, 5 只 SPF 级 C57BL/6J 雌性 6 周龄、体质量 20~22 g 的小鼠 [SCXK (鲁) 2023-0002], 实验用鼠饲养于山东第一医科大学实验动物学院 [SYXK (鲁) 2023-0012], 光照/黑暗循环 12 h/12 h、温度 22~25 °C、湿度 55%~60%, 实验经山东省实验动物中心伦理审批通过 (LS002024056), 实验小鼠的使用遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

硫代乙醇酸钠 (上海生工生物工程有限公司, 367-51-1); LPS (美国 Sigma-Aldrich, L5418); 4-damp (美国 MCE; HY-100958); 干扰 RNA (北京

擎科生物公司合成); Lipofectamine™ RNAiMAX 转染试剂 (美国 Invitrogen, 13778-150); RNA 提取试剂盒 (美国 Omega, R6934-02); 逆转录试剂盒 (日本 TaKaRa, RR047A); 蛋白酶抑制剂混合液 (上海雅酶生物医药科技有限公司, GRF101); 磷酸酶抑制剂混合液 (上海雅酶生物医药科技有限公司, GRF102); 高效 RIPA 组织/细胞快速裂解液 (上海雅酶生物医药科技有限公司, PC101); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海雅酶生物医药科技有限公司, ZJ102); Chrm3、 β -actin、ERK1/2、p-ERK (中国 Cohensionn, CQA4080、CPA9066、CPA1944、CPA4924); 山羊抗兔二抗 (上海雅酶生物医药科技有限公司, LF102)。倒置显微镜 (德国 ZEISS, 型号: 382011386); 细胞培养箱 (德国 Thermo, 型号: i160); Light Cycle 480 II 实时荧光定量 PCR 仪 (德国 Thermo, 型号: Light Cycle 480 II); 超高灵敏度化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad, 型号: BR17952); 蛋白电泳印迹系统 (美国 Bio-Rad, 型号: Mini protean); 高通量三通道读板仪 (美国 Spectra Max, 型号: i3x)。

1.3 实验方法

1.3.1 腹腔巨噬细胞的提取

参照文献^[15]的方法提取腹腔巨噬细胞, 对小鼠腹腔注射 0.1 mL 的 3% 巯基乙醇酸钠溶液, 3 d 后处死小鼠然后在 75% 乙醇中浸泡 3 min。取出, 以掌心抓持小鼠颈背部皮肤, 使其呈头高位直立姿势, 于胸骨右外侧约 0.5 cm 处 (避开肝区域), 以 30° 进针角度将注射器针尖斜面朝向腹侧缓慢刺入, 感知针尖突破横膈膜阻力后匀速推注 10 mL 的生理盐水, 拔针后立即以指腹沿小鼠腹部顺时针环形按摩 3 min。将小鼠固定于仰卧位, 无菌条件下, 用镊子微微提起腹膜, 用注射器小心吸出腹腔内液体, 可回收约 9 mL 的灌洗液。用 2000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 重悬, 细胞计数。

1.3.2 细胞分组

抑制剂法将细胞分为对照组 A (空白对照)、LPS 组 A (LPS 处理 12 h)、抑制剂组 (4-damp 干预 30 min 后加入 LPS 共同孵育 12 h); 转染 siRNA 法将细胞分为对照组 B (空白对照)、LPS 组 B (LPS 暴露 12 h)、si-NC 组 (si-NC 转染 12 h 后再加入 LPS 孵育 12 h)、si-Chrm3 组 (si-Chrm3

敲低 12 h 后再加入 LPS 处理 12 h);过表达法将细胞分为对照组 C(空白对照)、LPS 组 C(LPS 暴露 12 h)、阴性对照组(转染 Lentivirus(ZsGreen-Puro)/CMV-NC 12 h 后再加入 LPS 处理 12 h)、过表达组(转染 Lentivirus(ZsGreen-Puro)/CMV-Chrm3 12 h 后再加入 LPS 共同孵育 12 h)。WT 型小鼠腹腔巨噬细胞则只分为对照组(空白对照)和 LPS 组(LPS 处理 12 h)。

1.3.3 LPS 处理构建细胞炎症模型

将提取的巨噬细胞按 80% 细胞密度铺板,培养过夜贴壁后加入 LPS 使其终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,刺激 12 h 后再做后续实验。

1.3.4 抑制剂 4-damp 处理巨噬细胞

将腹腔来源的巨噬细胞按上述密度接种于十二孔板,向抑制剂 4-damp 组中加入 5 nmol/L 的 4-damp,孵育 1 h 后加入 LPS 至 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 并共处理 12 h,收集样本备用。

1.3.5 干扰 RNA 转染

在巨噬细胞的 si-NC 组和 si-Chrm3 组分别转染 50 nmol/L 的 siRNA 复合物,经过 12 h 转染后,将 LPS 加入其中,刺激 12 h 后,收集细胞,备用, si-Chrm3 的序列为 GGATCTATAAGGAACTGA,正向为: 5'-GGAUCUAUAAGGAAACUGA (dT) (dT)-3';反向为: 5'-UCAGUUCCUUAUAGAUCC(dT)(dT)-3'。

1.3.6 慢病毒过表达

取完全贴壁后的腹腔巨噬细胞,根据病毒感染复数(MOI=5)在阴性对照组(转染 Lentivirus(ZsGreen-Puro)/CMV-NC)和过表达组(转染 Lentivirus(ZsGreen-Puro)/CMV-Chrm3)中加入适量病毒进行转染,转染 12 h 后,进行换液,然后继续培养 12 h,之后加入 LPS 进行刺激,12 h 后收

集细胞,备用。

1.3.7 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)

RT-PCR 对 Chrm3、 β -actin、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的 mRNA 表达水平进行检测。采用 TRIzol 试剂裂解巨噬细胞,氯仿-异丙醇法分离总 RNA 并测定浓度,之后按照逆转录试剂盒合成 cDNA,然后以 cDNA 为模板通过 SYBR 构建反应体系并进行扩增,反应结束后进行熔解曲线分析,验证扩增特异性,将 β -actin 作为内参,最后采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对数据进行相对表达量分析(表 1)。

1.3.8 CCK-8 检测细胞存活率

在 96 孔板中接种细胞(6×10^3 /孔),每组设 3 个平行复孔,常规培养条件(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2)下进行干预处理(抑制剂、干扰 RNA 及慢病毒过表达),往 LPS 各组细胞中加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 刺激 12 h。之后向每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,充分混合后继续于培养箱中避光孵育 3 h,随后用酶标仪测定 450 nm 处吸光度(OD 值),设置标准曲线,计算细胞存活率。

1.3.9 Western blot 检测相关蛋白的表达情况

用含 1% 蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液在冰上裂解细胞 20 min,用 BCA 蛋白浓度定量试剂盒检测蛋白浓度。取约 10 μg 的蛋白样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),然后半干转法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。用无蛋白快速封闭液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 PVDF 膜 15 min,1 $\times$ TBST 清洗 3 遍后将一抗 β -actin (1:2000~1:10 000)、Chrm3(1:500~1:2000)、ERK、p-ERK (1:750)与 PVDF 膜一起在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜,1 $\times$ TBST 清洗 3 遍,每次 10 min;HRP 标记兔源二抗(1:2000~1:10 000)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5~

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	正向引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')
Chrm3	CCTCGCCTTTGTTTCCCAAC	TTGAGGAGAAATTTCCAGAGGT
β -actin	GGCTGTATTCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
IL-6	TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
IL-1 β	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
TNF- α	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG

2 h, 1×TBST 清洗 3 遍后滴加 ECL 显影液显影拍照, 以 β -actin 作为内参蛋白, 利用 Image lab 6.0 分析蛋白条带, 计算出每种蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

实验数据用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 并采用 GraphPad Prism 8.4.2 软件进行统计学分析, 两组之间采用非配对 t 检验法进行差异分析, 认为 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LBP 蛋白的表达情况

Western blot 实验结果显示, $Lbp^{-/-}$ 小鼠腹腔巨噬细胞中的 LBP 蛋白已完全敲除不再进行表达(图 1)。

2.2 LBP 基因敲除对 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞炎症的影响

由 RT-PCR 的结果可知, 在 LPS 的刺激下, WT 小鼠腹腔巨噬细胞炎症因子显著升高, 而 $Lbp^{-/-}$ 小鼠腹腔巨噬细胞的炎症因子水平相比 WT 小鼠虽有明显的下降但仍然存在($P<0.01$), 如图 2。由此可说明 LPS 刺激信号在 LBP 基因敲除后还存在其它传递途径。

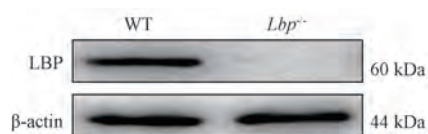
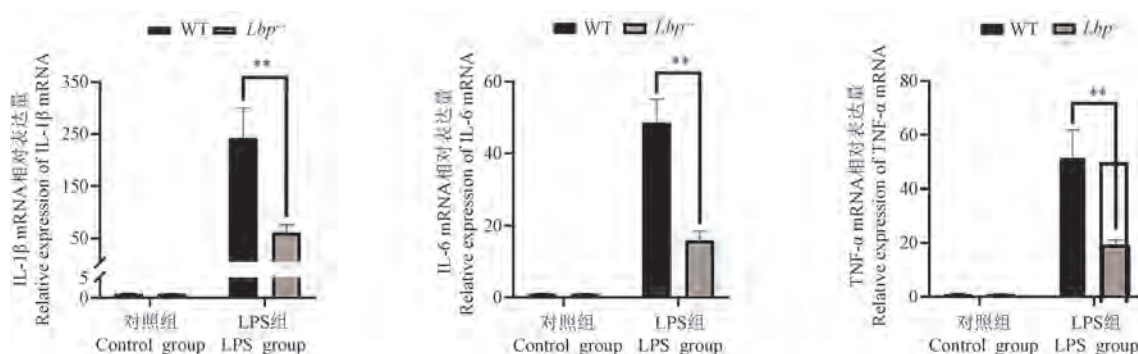


图 1 腹腔巨噬细胞中 LBP 蛋白的表达图

Figure 1 LBP protein expression map in peritoneal macrophages



注: 与 WT 小鼠相比, ** $P<0.01$ 。

图 2 WT 小鼠和 $Lbp^{-/-}$ 小鼠腹腔巨噬细胞对 LPS 刺激的炎症反应

Note. Compared with the WT mice, ** $P<0.01$.

Figure 2 Inflammatory response of peritoneal macrophages to LPS stimulation in WT mice and $Lbp^{-/-}$ mice

2.3 LPS 刺激下 Chrm3 蛋白表达变化情况

由 Western blot 实验结果可以看出, 野生型小鼠腹腔巨噬细胞在 LPS 刺激下 Chrm3 的蛋白表达量虽有变化, 但与对照组的差异并不明显($P>0.05$), 如图 3A; 而 $Lbp^{-/-}$ 小鼠腹腔巨噬细胞在 LPS 刺激后其蛋白表达量显著升高($P<0.001$), 经抑制剂 4-damp 处理后, 该组 Chrm3 蛋白水平较 LPS 组呈现明显下降趋势($P<0.05$), 如图 3B; 当采用特异性 siRNA 进行基因沉默干预时, Chrm3 蛋白的表达受到更为显著地抑制($P<0.01$), 如图 3C; 相反, 在加入过表达慢病毒后, Chrm3 蛋白表达量显著升高($P<0.001$), 如图 3D。

2.4 Chrm3 的改变对细胞存活率的影响

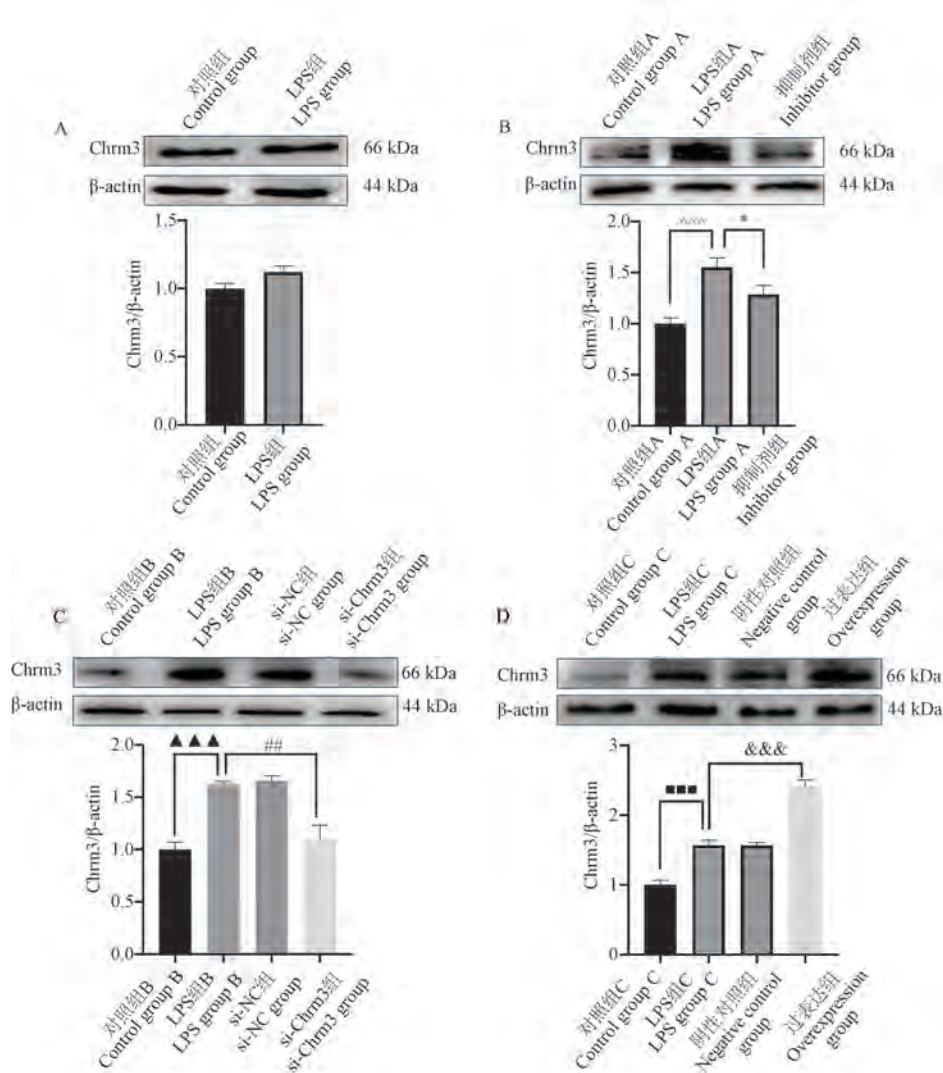
基于 CCK8 的检测数据可知, 相较于 LPS 组, 抑制剂组的细胞存活率得到显著改善($P<0.05$), 如图 4A; 同样, si-Chrm3 组的细胞活力也有明显增强($P<0.05$), 如图 4B; 而过表达组的细胞存活率则明显下降($P<0.05$), 如图 4C。

2.5 抑制和干扰 Chrm3 表达对炎症因子的影响

基于 RT-PCR 的分析结果可知, $Lbp^{-/-}$ 小鼠腹腔巨噬细胞在 LPS 的刺激下炎症因子显著升高, 而在经抑制剂 4-damp 处理后, IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子的 mRNA 水平显著降低($P<0.001$, $P<0.0001$), 如图 5A。在对 Chrm3 进行干扰后 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达量显著降低($P<0.001$, $P<0.0001$), 如图 5B。

2.6 过表达 Chrm3 对炎症因子的影响

根据 RT-PCR 的结果可知, 在 LPS 的刺激下



注:A:野生型小鼠 Chrm3 蛋白的变化;B:抑制剂处理后 $Lbp^{-/-}$ 小鼠 Chrm3 蛋白的变化;C:干扰 RNA 处理后 $Lbp^{-/-}$ 小鼠 Chrm3 蛋白的变化;D:过表达后处理后 $Lbp^{-/-}$ 小鼠 Chrm3 蛋白的变化。与对照组 A 相比,~ $P<0.001$;与抑制剂组相比,* $P<0.05$;与对照组 B 相比,▲▲▲ $P<0.001$;与 si-Chrm3 组相比,## $P<0.01$;与对照组 C 相比,■■■ $P<0.001$;与过表达组相比,&&& $P<0.001$ 。

图 3 LPS 刺激条件下 Chrm3 表达的变化

Note. A, Changes in Chrm3 protein in WT mice. B, Changes in Chrm3 protein after inhibitor treatment in $Lbp^{-/-}$ mice. C, Changes in Chrm3 protein after siRNA treatment in $Lbp^{-/-}$ mice. D, Changes in Chrm3 protein after overexpression treatment in $Lbp^{-/-}$ mice. Compared with Control group A, ~ $P<0.001$. Compared with Inhibitor group, * $P<0.05$. Compared with Control group B, ▲▲▲ $P<0.001$. Compared with si-Chrm3 group, ## $P<0.01$. Compared with Control group C, ■■■ $P<0.001$. Compared with Overexpression group, &&& $P<0.001$.

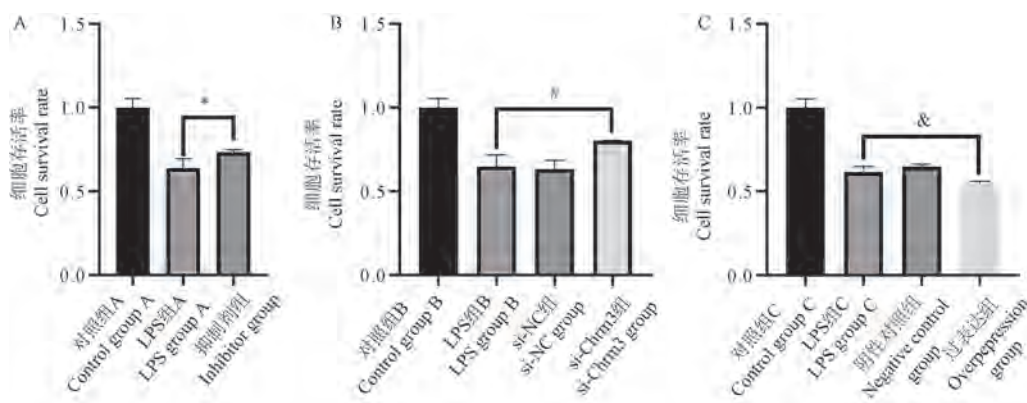
Figure 3 Changes in Chrm3 expression under LPS stimulation

$Lbp^{-/-}$ 小鼠腹腔巨噬细胞的炎症因子升高,而在加入过表达慢病毒后,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子的表达水平显著升高($P<0.01$, $P<0.001$),如图 6。

2.7 抑制、干扰和过表达 Chrm3 的表达对 p-ERK 蛋白的影响

Western blot 结果显示,在 LPS 刺激下,ERK

蛋白磷酸化显著升高($P<0.001$),当加入抑制剂 4-damp 后 ERK 的磷酸化进程受到显著性抑制($P<0.01$),如图 7A。同样,对腹腔巨噬细胞进行转染 si-Chrm3 敲低 Chrm3 基因后,ERK 磷酸化水平也显著性降低($P<0.01$),如图 7B,而对其进行慢病毒过表达时,ERK 的磷酸化则显著升高($P<0.01$),如图 7C。

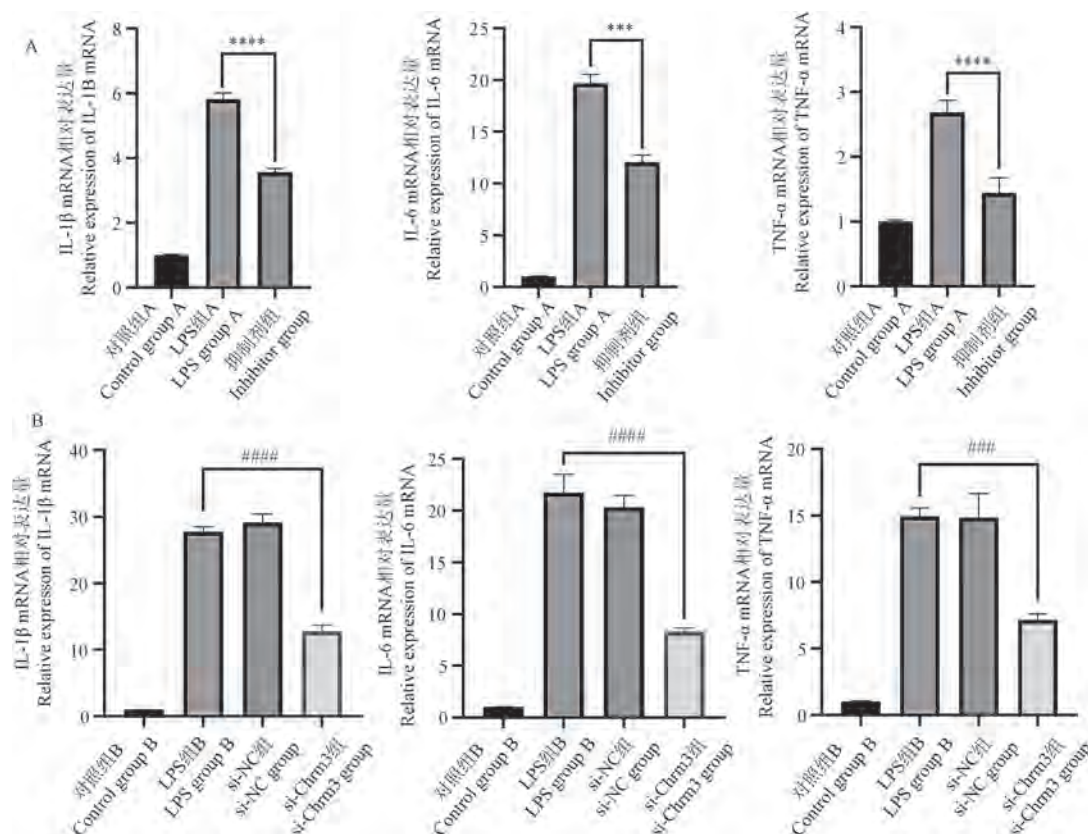


注:A:抑制 Chrm3 后细胞存活率的变化;B:干扰 Chrm3 后细胞存活率的变化;C:过表达 Chrm3 后细胞存活率的变化。与抑制剂组相比, * $P < 0.05$; 与 si-Chrm3 组相比, # $P < 0.05$; 与过表达组相比, & $P < 0.05$ 。

图 4 抑制 Chrm3 和过表达 Chrm3 对 $Lbp^{-/-}$ 小鼠腹腔巨噬细胞存活率的影响

Note. A, Changes in cell viability after Chrm3 inhibition. B, Changes in cell viability after Chrm3 knockdown. C, Changes in cell viability after Chrm3 overexpression. Compared with Inhibitor group, * $P < 0.05$. Compared with si-Chrm3 group, # $P < 0.05$. Compared with Overexpression group, & $P < 0.05$.

Figure 4 Effect of inhibition of Chrm3 expression and overexpression of Chrm3 on peritoneal macrophages viability in $Lbp^{-/-}$ mice

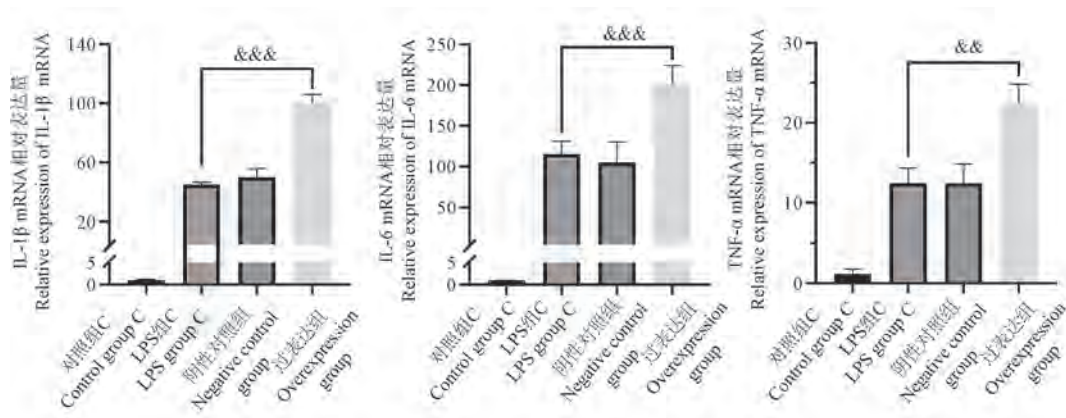


注:A:抑制 Chrm3 后细胞炎症因子的变化;B:干扰 Chrm3 后细胞炎症因子的变化。与抑制剂组相比, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; 与 si-Chrm3 组相比, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ 。

图 5 抑制 Chrm3 的表达对 $Lbp^{-/-}$ 小鼠腹腔巨噬细胞 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响

Note. A, Changes in inflammatory factors after Chrm3 inhibition. B, Changes in inflammatory factors after Chrm3 knockdown. Compared with Inhibitor group, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Compared with si-Chrm3 group, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$.

Figure 5 Inhibition of Chrm3 expression on IL-1 β , IL-6 and TNF- α in peritoneal macrophages of $Lbp^{-/-}$ mice

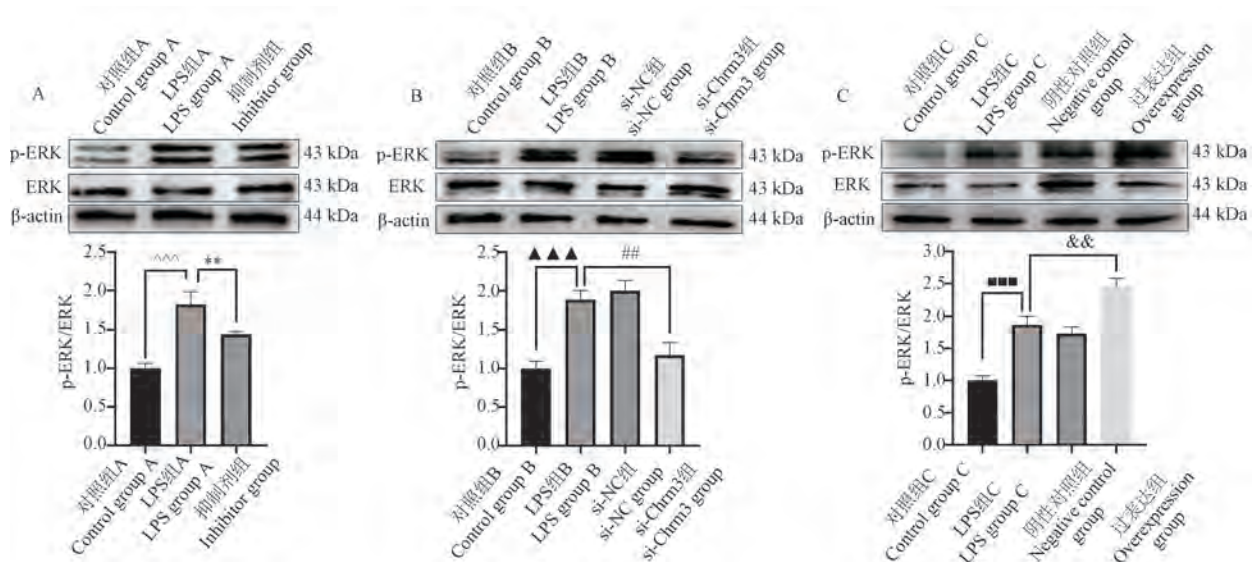


注:与过表达组相比, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。

图 6 过表达 Chrm3 对 *Lbp*^{-/-} 小鼠腹腔巨噬细胞 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响

Note. Compared with Overexpression group, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

Figure 6 Overexpress of Chrm3 expression on IL-1 β , IL-6 and TNF- α in peritoneal macrophages of *Lbp*^{-/-} mice



注:A:抑制 Chrm3 后 p-ERK 蛋白的变化;B:干扰 Chrm3 后 p-ERK 蛋白的变化;C:过表达 Chrm3 后 p-ERK 蛋白的变化。与对照组 A 相比, $^{***}P < 0.001$;与抑制剂组相比, $^{**}P < 0.01$;与对照组 B 相比, $^{***}P < 0.001$;与 si-Chrm3 组相比, $^{##}P < 0.01$;与对照组 C 相比, $^{***}P < 0.001$;与过表达组相比, $^{**}P < 0.01$ 。

图 7 抑制、干扰和过表达 Chrm3 的表达对 p-ERK 蛋白的影响

Note. A, Changes in p-ERK protein after Chrm3 inhibition. B, Changes in p-ERK protein after Chrm3 knockdown. C, Changes in p-ERK protein after Chrm3 overexpression. Compared with the Control group, $^{***}P < 0.001$. Compared with Inhibitor group, $^{**}P < 0.01$. Compared with Control group B, $^{***}P < 0.001$. Compared with si-Chrm3 group, $^{##}P < 0.01$. Compared with Control group C, $^{***}P < 0.001$. Compared with Overexpression group, $^{**}P < 0.01$.

Figure 7 Effect of inhibiting and overexpressing the expression of Chrm3 protein on the expression of p-ERK protein

3 讨论

LPS 是在大多数革兰氏阴性菌的外膜中发现的一种特征明确的病原体分子,可以引发强烈的免疫反应,而 LBP 作为一种 I 类急性期蛋白^[16],

在免疫系统中起到了重要的预警作用。JIN 等^[17]通过敲除 LBP 破坏了 LPS 与其受体复合物 TLR4/MD-2 的结合,从而减轻了小鼠因饮食诱导产生的非酒精性脂肪肝炎。BRASS 等^[18]研究发现 LBP 的敲除会减轻小鼠下呼吸道的炎症及皮

下黏膜的纤维化,但 MINTER 等^[19]研究表明,在注射 LPS 刺激后, *Lbp*^{-/-} 小鼠和 WT 小鼠的 Kupffer 细胞上,TLR4、CD14 和 CD18 的细胞因子表达相差并不大。此外,BELCHER 等^[20]报道了一例注射特异性小分子抑制剂 TAK-242 恢复内皮功能的案例,该抑制剂能够选择性地结合 TLR4 的胞内结构域并关闭细胞内信号传导。然而,在日本进行的一项为期 28 d 的严重脓毒症患者全因死亡率研究中发现,TAK-242 未能有效抑制脓毒症及呼吸衰竭患者的炎症因子水平,不符合继续研发的标准^[21]。这些结果表明阻断 TLR4 的信号传导不能有效阻断 LPS 诱导的炎症反应,需要寻找其他的代偿途径。

本研究通过对 WT 小鼠和 *Lbp*^{-/-} 小鼠进行 LPS 刺激后,发现 *Lbp*^{-/-} 小鼠的炎症因子 mRNA 水平显著下降,但仍然大量表达,之后便对 *Lbp*^{-/-} 小鼠腹腔巨噬细胞进行 LPS 刺激,发现 Chrm3 蛋白的表达量显著升高,故猜测 Chrm3 蛋白在传导 LPS 通路中起关键作用。在分别加入 4-damp 和 si-Chrm3 特异性抑制 Chrm3 蛋白的表达后,发现 *Lbp*^{-/-} 小鼠腹腔巨噬细胞的存活率明显升高,且 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等炎症因子的 mRNA 水平显著下降;而在使用过表达慢病毒提高 Chrm3 的蛋白表达后,炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的 mRNA 表达量显著升高,细胞存活率则显著降低。

Chrm3 属于 G 蛋白偶联受体之一,活化的 Chrm3 将通过激活 MAPK 信号通路(ERK、p38、JNK)调节 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子的表达^[22-23],并对细胞的重要反应,如炎症、氧化应激、增殖和衰亡等均存在介导作用^[24]。Chrm3 可以通过上调磷脂酶 C(PLC)的活性,从而产生二酰甘油(DAG)和肌醇三磷酸(IP3),并增加细胞内钙离子的水平。而 DAG 和钙离子的增加会激活蛋白激酶 C(PKC),并经 MAPK 途径改变基因转录,其中关键的因子包括细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)。因此 Chrm3 的激活可能通过 MAPK 信号通路,对巨噬细胞造成损伤。随即对 MAPK 信号通路的相关蛋白 ERK 的磷酸化表达进行实验验证,结果表明,在 LPS 刺激下,MAPK 通路中 ERK 蛋白磷酸化显著升高,而在抑制了 Chrm3 的表达后,ERK 的蛋白磷酸化水平显著降低;在过表达 Chrm3 后,MAPK 通路的 p-ERK 则

显著升高,由此可以得出 Chrm3 通过 MAPK 通路调控细胞炎症。

综上所述,本研究通过 LPS 刺激的细胞炎症模型,发现在 *Lbp*^{-/-} 小鼠中 Chrm3 蛋白的上调可能起到代偿 LBP 蛋白的作用,通过 MAPK/ERK 信号通路引起炎症因子的产生,从而导致细胞损伤和存活率下降。目前该实验的对象为小鼠腹腔巨噬细胞,后续将在 *Lbp*^{-/-} 小鼠其他细胞和体内进行验证,希望可以在小鼠体内找到传递 LPS 诱导炎症信号的有效代偿途径。

参考文献:

- [1] WHITFIELD C, STEPHEN TRENT M. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides [J]. Annu Rev Biochem, 2014, 83: 99-128.
- [2] SCHUMANN R R, LATZ E. Lipopolysaccharide-binding protein [J]. Chem Immunol, 2000, 74: 42-60.
- [3] ZWEIGNER J, SCHUMANN R R, WEBER J R. The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response [J]. Microbes Infect, 2006, 8(3): 946-952.
- [4] ZELDIN D C, EGGLESTON P, CHAPMAN M, et al. How exposures to biologics influence the induction and incidence of asthma [J]. Environ Health Perspect, 2006, 114(4): 620-626.
- [5] 陈婷婷, 单杉, 李南, 等. β -arrestin2 基因敲除对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 40-46.
CHEN T T, SHAN S, LI N, et al. Effect of β -arrestin2 deficiency on the function of mouse peritoneal macrophages [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 40-46.
- [6] SASAGAWA T, TAKAGI H, MAKINODA S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer [J]. J Infect Chemother, 2012, 18(6): 807-815.
- [7] TAPPING R I. Innate immune sensing and activation of cell surface Toll-like receptors [J]. Semin Immunol, 2009, 21(4): 175-184.
- [8] SONG Z, MENG L, HE Z, et al. LBP protects hepatocyte mitochondrial function via the PPAR-CYP4A2 signaling pathway in a rat sepsis model [J]. Shock, 2021, 56(6): 1066-1079.
- [9] 米传靓, 付彬, 李思迪, 等. Agtr1a 调节 LPS 诱导的 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞炎症 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(8): 1021-1027.
MI C L, FU B, LI S D, et al. Agtr1a regulates LPS-induced inflammation in primary hepatocytes of *Lbp*^{-/-} mice [J].

- Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(8): 1021–1027.
- [10] 米传靓, 付彬, 李思迪, 等. Adra1a 调节 LPS 诱导的 Lbp^{-/-}小鼠原代肝细胞炎症反应 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 84–91.
- MI C L, FU B, LI S D, et al. Adra1a regulates LPS-induced inflammation in primary hepatocytes of Lbp^{-/-} mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 84–91.
- [11] KUOL N, DAVIDSON M, KARAKKAT J, et al. Blocking muscarinic receptor 3 attenuates tumor growth and decreases immunosuppressive and cholinergic markers in an orthotopic mouse model of colorectal cancer [J]. Int J Mol Sci, 2022, 24(1): 596.
- [12] BOS I T, GOSENS R, ZUIDHOF A B, et al. Inhibition of allergen-induced airway remodelling by tiotropium and budesonide: a comparison [J]. Eur Respir J, 2007, 30(4): 653–661.
- [13] RAZANI-BOROUJERDI S, BEHL M, HAHN F F, et al. Role of muscarinic receptors in the regulation of immune and inflammatory responses [J]. J Neuroimmunol, 2008, 194(1/2): 83–88.
- [14] 李思迪, 付彬, 郭中坤, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建脂多糖结合蛋白基因敲除小鼠 [J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(4): 294–300.
- LI S D, FU B, GUO Z K, et al. Construction of lipopolysaccharide binding protein knockout mice using CRISPR/Cas9 technology [J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(4): 294–300.
- [15] 耿田欣, 臧光耀, 严金川. 3% 巯基乙酸盐肉汤诱导法高效提取小鼠腹腔巨噬细胞 [J]. 江苏大学学报(医学版), 2019, 29(1): 45–48, 53.
- GENG T X, ZANG G Y, YAN J C. Efficient extraction of primary peritoneal macrophages in mice induced by 3% thioglycollate broth [J]. J Jiangsu Univ Med Ed, 2019, 29(1): 45–48, 53.
- [16] HE Z, SONG Z, MENG L, et al. Lipopolysaccharide-induced transcriptional changes in LBP-deficient rat and its possible implications for liver dysregulation during sepsis [J]. J Immunol Res, 2021, 2021: 8356645.
- [17] JIN C J, ENGSTLER A J, ZIEGENHARDT D, et al. Loss of lipopolysaccharide-binding protein attenuates the development of diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2017, 32(3): 708–715.
- [18] BRASS D M, SAVOV J D, WHITEHEAD G S, et al. LPS binding protein is important in the airway response to inhaled endotoxin [J]. J Allergy Clin Immunol, 2004, 114(3): 586–592.
- [19] MINTER R M, BI X, BEN-JOSEF G, et al. LPS-binding protein mediates LPS-induced liver injury and mortality in the setting of biliary obstruction [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 296(1): G45–G54.
- [20] BELCHER J D, CHEN C, NGUYEN J, et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease [J]. Blood, 2014, 123(3): 377–390.
- [21] RICE T W, WHEELER A P, BERNARD G R, et al. A randomized, double-blind, placebo-Controlled trial of TAK-242 for the treatment of severe sepsis [J]. Crit Care Med, 2010, 38(8): 1685–1694.
- [22] LUO L, XI C, XU T, et al. Muscarinic receptor mediated signaling pathways in hepatocytes from CCL4-induced liver fibrotic rat [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 807: 109–116.
- [23] 尹嘉玉. 海参岩藻聚糖改善 LPS 诱导的 C57BL/6J 小鼠急性肝损伤的机制 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2020.
- YIN J Y. The mechanisms of the fucoidan from seacucumber *Apostichopus japonicus* on attenuating lipopolysaccharide-challenged liver injury in C57BL/6J mice [D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2020.
- [24] 董琳琳, 芦永良, 鄂维建, 等. MAPK 信号通路——肝棘球蚴病治疗新靶点 [J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(3): 714–718.
- DONG L L, LU Y L, E W J, et al. The MAPK signaling pathway: a new target for the treatment of hepatic echinococcosis [J]. J Clin Hepatol, 2022, 38(3): 714–718.

〔收稿日期〕2024-09-18

贾萌,曲珍吉姆,索朗德吉,等.由平原进入高原低压低氧环境后大鼠肾损伤的研究[J].中国比较医学杂志,2025,35(4):79-87.

Jia M, Quzhen JM, Suolang DJ, et al. Renal injury in rats induced by a low-pressure and low-oxygen environment simulating movement from the plains to the plateau [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 79-87.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.008

由平原进入高原低压低氧环境后大鼠肾损伤的研究

贾萌^{1,2*}, 曲珍吉姆², 索朗德吉², 郭一丹¹, 郭世坤³, 魏华英³, 周晓玲¹, 王瑞吉²

(1.首都医科大学附属北京世纪坛医院肾内科,北京 100038;2.拉萨市人民医院肾内科,拉萨 850000;

3.首都医科大学附属北京世纪坛医院呼吸与危重症医学科,北京 100038)

【摘要】 目的 模拟由平原进入高原低压低氧环境后,大鼠肾功能、肾损伤指标及肾病理随时间的变化特点。**方法** 30只雄性 Sprague-Dawley 大鼠随机分成5组,每组6只,对照组置于舱外常压常氧环境,实验组置于低压低氧舱内模拟海拔5000 m 低压低氧(low-pressure and low-oxygen, LPLO)环境,分别在舱内生活3 d、7 d、14 d、28 d。观察各组大鼠肾损伤及肾功能指标:血清肌酐(creatinine, CRE)、血清胱抑素 C(cystatin C, CysC)、血清中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)、血清肾损伤因子1(kidney injury molecule-1, KIM-1)及血清白细胞介素18(interleukin-18, IL-18)水平。HE染色及PAS染色观察肾病理变化并评价:肾小球平均直径、肾小管周毛细血管(peritubular capillary, PTC)数/肾小管(tubule)数、肾小管损伤评分、肾外髓质(outer medulla, OM)充血评分。**结果** 与对照组比较,实验组 NGAL、KIM-1、CysC 及 CRE 水平均显著升高(均 $P < 0.05$)。肾小球平均直径:LPLO 3 天组显著缩小,LPLO 14 天组显著增大(均 $P < 0.05$)。PTC/tubule 显著降低,肾小管损伤评分、OM 充血评分显著升高(均 $P < 0.05$)。回归分析:PTC/tubule 与低压低氧时间呈线性负相关,CRE、CysC 及病理指标(肾小球平均直径、OM 充血评分及肾小管损伤评分)与低压低氧持续时间呈曲线相关(均 $P < 0.05$)。对呈曲线相关变量使用限制性立方样条(restricted cubic splines, RCS)分析:各曲线呈“倒L”形,拐点均在第7天,提示各项指标在低压低氧7 d内增高速率最大,7~28 d增高速率减缓。**结论** 模拟由平原进入高原低压低氧环境后肾从结构到功能多方面均存在显著的损伤,肾对高原环境存在自适应及调整过程。

【关键词】 高原缺氧;肾损害;肾损伤标记物;肾病理改变

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0079-09

Renal injury in rats induced by a low-pressure and low-oxygen environment simulating movement from the plains to the plateau

JIA Meng^{1,2*}, QUZHEN Jimu², SUOLANG Deji², GUO Yidan¹, GUO Shikun³, WEI Huaying³,
ZHOU Xiaoling¹, WANG Ruiji²

(1. Department of Nephrology, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China.

2. Department of Nephrology, Lhasa People's Hospital, Lhasa 850000. 3. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038)

【基金项目】 西藏自治区自然科学基金组团式援藏医疗项目(XZ2020ZR-ZY26(Z))。

【作者简介】 贾萌(1981—),男,博士,副主任医师,研究方向:急性肾损伤、慢性肾脏病、IgA 肾病。E-mail: jiameng0530@163.com

【Abstract】 Objective To explore time-related changes in renal function, renal injury biomarkers, and renal pathology in rats entering a low-pressure and low-oxygen (LPLO) environment simulating moving from the plains to a plateau. **Methods** Thirty male Sprague-Dawley rats were divided randomly into five groups ($n=6$ rats per group). Rats in the Control group were placed outside the chamber under normal pressure and oxygen conditions. Rats in the experimental groups were placed in an LPLO chamber to simulate a plateau environment at 5000 m above sea level, and were maintained in the chamber for 3, 7, 14, and 28 days, respectively. Serum levels of creatinine (CRE), cystatin C (CysC), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), kidney injury molecule-1 (KIM-1), and interleukin-18 (IL-18) were measured as biomarkers of renal injury. Pathological changes in the kidney were observed by hematoxylin and eosin and periodic acid-Schiff staining, with quantitative assessment of the following parameters: average glomerular diameter, peritubular capillary (PTC) density per tubule, tubular injury score, and outer medulla (OM) congestion score. **Results** NGAL, KIM-1, CysC, and CRE were significantly increased in the experimental compared with the Control group (all $P<0.05$). The average glomerulus diameter was significantly reduced in the LPLO 3 d group and significantly increased in the LPLO 14 d group (both $P<0.05$). The peritubular capillary (PTC)/tubule ratio was significantly decreased. The renal tubular injury and OM congestion scores were significantly increased (both $P<0.05$). Regression analysis showed that PTC/tubule was linearly negatively correlated with the LPLO duration, while CRE, CysC, and pathological indicators (mean glomerular diameter, OM congestion score, renal tubular injury score) were curvilinearly correlated with the duration of LPLO (all $P<0.05$). Variables with a curvilinear correlation were analyzed using restricted cubic splines (RCS). Each curve exhibited an inverted-L shape, with inflection points on day 7, indicating that the rate of increase of all indicators was highest within the first 7 days of LPLO, and the rate of increase then slowed from 7 days to 28 days. **Conclusions** A simulated move from a plains to a plateau environment was associated with significant structural and functional renal damage, but the kidneys then showed a self-adaptive adjustment process towards the plateau environment.

【Keywords】 high-altitude hypoxia; kidney injury; renal injury markers; renal pathological changes

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

全球有 1.4 亿人生活在海拔超过 2400 m 的高原地区^[1], 每年有数十万人从平原地区迁移到高原地区, 对于高原地区的人群, 特别是由平原进入高原的人群, 高海拔心脏病、脑水肿和肺水肿的发生严重影响重要脏器的功能, 甚至危及生命。高海拔地区具有低大气压力及低氧的环境特点, 肾在缺氧情况下易受损伤^[2]。流行病学资料显示, 我国西藏地区的慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 患病率为 18.3%~30.4%^[3], 显著高于我国 CKD 总体的 10.8% 患病率^[4]; 另外有研究发现登山者由平原进入高原后, 其肾小球滤过率 (glomerular filtration rate, GFR) 在短期内下降^[5-6], 提示低压低氧环境对肾结构和功能以及肾疾病进展具有一定的影响^[7]。研究发现, 在低压低氧舱模拟海拔 5000 m 的环境, 大鼠出现足细胞损伤伴蛋白尿^[8]。但是, 截至目前, 低压低氧环境下肾损伤的研究资料尚不完整, 尤其缺乏随着低压低氧持续时间的延长, 肾发生相应的病理生理变化的连续性信息。因此, 本研究建立模

拟高原低压低氧条件下肾损伤的大鼠模型, 通过观察低压低氧持续时间相关的大鼠血清学及肾病理指标的变化, 探讨由平原进入模拟海拔 5000 m 的低压低氧环境后对肾功能及组织结构的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 8 周龄雄性 Sprague-Dawley 大鼠 30 只, 体质量 260~280 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2021-0011]。动物饲养于北京世纪坛医院临床实验动物中心 [SYXK (京) 2022-0049], 适应性饲养 1 周后进行实验。期间自由进食饮水, 饲养室温度为 $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$, 湿度为 50%~60%, 维持 12 h 光照和 12 h 黑暗的昼夜节律。本实验设计经首都医科大学附属北京世纪坛医院实验动物伦理委员会批准 [sjtkkll-lx-2023(011)], 实验过程中严格遵守动物实验 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

血清 NGAL 检测试剂盒 (ab119602, 批号: GR3362911-1); 血清 KIM-1 检测试剂盒 (ab119597, 批号: GR3413976-2); 血清 CysC 检测试剂盒 (ab201281, 批号: GR3416876-2); 血清 CRE 检测试剂盒 (ab65340, 批号: GR3405925-2); 血清 IL-18 检测试剂盒 (ab213909, 批号: GR3388522-1) 均购自美国 Abcom。

低压低氧舱 (DSF-II 动物实验负压舱) 购自潍坊华信氧业公司; 显微镜购自日本奥林巴斯 BX43; 病理切片扫描仪购自 3DHISTECH-D12; 石蜡切片机购自浙江省金华市科迪仪器有限公司; 分光光度计购自舜宇恒平 UV-2600。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型构建和分组

对照组 (6 只): 于舱外常压常氧的环境生活 28 d; 实验组 (24 只): 进入低压低氧舱, 模拟海拔 3000 m 环境预适应 2 d, 随后将低压低氧舱参数以 2 m/s 的速度缓慢上升达到海拔 5000 m 水平 (大气压 50 kPa, 氧浓度 10%), 将实验组进一步随机平分为 4 组, 分别在模拟海拔 5000 m 环境生活 3 d、7 d、14 d 及 28 d^[7,9]; 各组生活达预定天数后取血、取肾。

1.3.2 样本收集

达到模拟高原环境生活天数后, 用戊巴比妥钠麻醉大鼠, 心脏取血 2~3 mL, 室温静置 1 h 后, 在 4 °C 环境下以 3000 r/min 离心 20 min, 取上层血清置于 -80 °C 冰箱中待测。统一检测 CRE、CysC、NGAL、KIM-1、IL-18。

1.3.3 肾组织病理学检查及评价

将大鼠右肾称重并测量长度; 肾组织石蜡切片脱蜡后进行苏木素-伊红 (HE) 染色、Masson 染色, 显微镜下观察肾组织病理变化。在肾组织皮质及髓质交界处随机选取 10 个高倍镜视野 (200 倍) 对肾组织损伤的形态学变化进行分析, 肾小管损伤评分依据肾小管的形态改变对损伤的严重程度进行: 0 分, 无明显可见异常; 1 分, 单个视野形态异常 <10%; 2 分, 10% < 单个视野形态异常 <25%; 3 分, 25% < 单个视野形态异常 <50%; 4 分, 50% < 单个视野形态异常 <75%; 5 分, 单个视野形态异常 >75%。肾小管损伤包括肾小管管腔狭窄, 肾小管上皮细胞肿胀、萎缩, 肾小管上皮细胞

数量减少^[10-11]。肾髓质充血程度评分在 HE 染色切片选取外髓质 (outer medulla, OM) 区域, 观察红细胞充血 (瘀滞) 程度, 评分为 0~5 分, 独立反映每个观察区域的红细胞充血程度。0 分表示所有血管开放良好 (0% 充血), 5 分表示所有可见血管充血 (100% 充血), 分级: 0 = 0%、1 = 20%、2 = 40%、3 = 60%、4 = 80%、5 = 100%^[12]。肾小管周围毛细血管 (peritubular capillary, PTC) 密度评分: 每张切片圈定 10 个 120 000 μm^2 区域, 计算该区域内 PTC 数/肾小管数 (PTC/tubule) 比值^[13-14]。肾小球大小测量依据董鸿瑞等^[15]使用的肾小球毛细血管袢直接测量法; 使用蔡司数字病理软件 (ZEN 3.3) 测量病理照片中的最大剖面肾小球 (含血管极和 (或) 尿极的肾小球 (含极肾小球)) 毛细血管袢上相互垂直的两条最长直径, 求平均值。每只大鼠肾切片测量 10 个肾小球, 各组间比较肾小球大小差异。以上所有评分均使用盲法。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件、R 语言 (version 4.2.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), 以及 MSTAT 软件 (<https://www.mstata.com/>) 进行统计学分析。正态分布的计量资料以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析; 非正态分布的计量资料以中位数 (25%、75% 百分位数) 表示, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验。以模拟高原环境生活时间长度 (天数) 为自变量, 以大鼠肾功水平 (CRE、CysC)、肾损伤指标 (NGAL、KIM-1、IL-8) 及肾病理指标 (肾小球平均直径、PTC/tubule、肾髓质充血评分、肾小管损伤评分) 为因变量, 构建回归模型, 显著性 <0.05 视为模型能够拟合, 以 R 平方评价模型拟合效果。对以上有统计学意义的非线性回归模型, 使用 RCS 分析, 以赤池信息量准则 (Akaike information criterion) 最低值作为优先模型选择。以第 10、50 和 90 百分位作为节点 (knots), $P<0.05$ 视为自变量与因变量之间存在显著性关联, $P\text{-Nonliner}<0.05$ 提示自变量与因变量之间存在显著的非线性关系。以 RCS 曲线斜率变化最大时间点作为拐点 (inflection point), 用于寻找暴露于低压低氧环境下各项指标斜率变化最大的时间拐点。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组间肾功能、肾损伤指标及肾组织病理学比较

2.1.1 肾功能指标

与对照组比较,血清 CRE 在 LPLO 14 天组显著升高,LPLO 28 天组最高 ($P<0.05$);血清 CysC 在 LPLO 3 天组显著升高,LPLO 7 天组达最高值,LPLO 28 天组较 7 天组显著下降 (均 $P<0.05$)。见图 1。

2.1.2 肾损伤指标

与对照组比较,血清 NGAL 在 LPLO 14 天组显著升高,血清 KIM-1 在 LPLO 3 天组显著升高

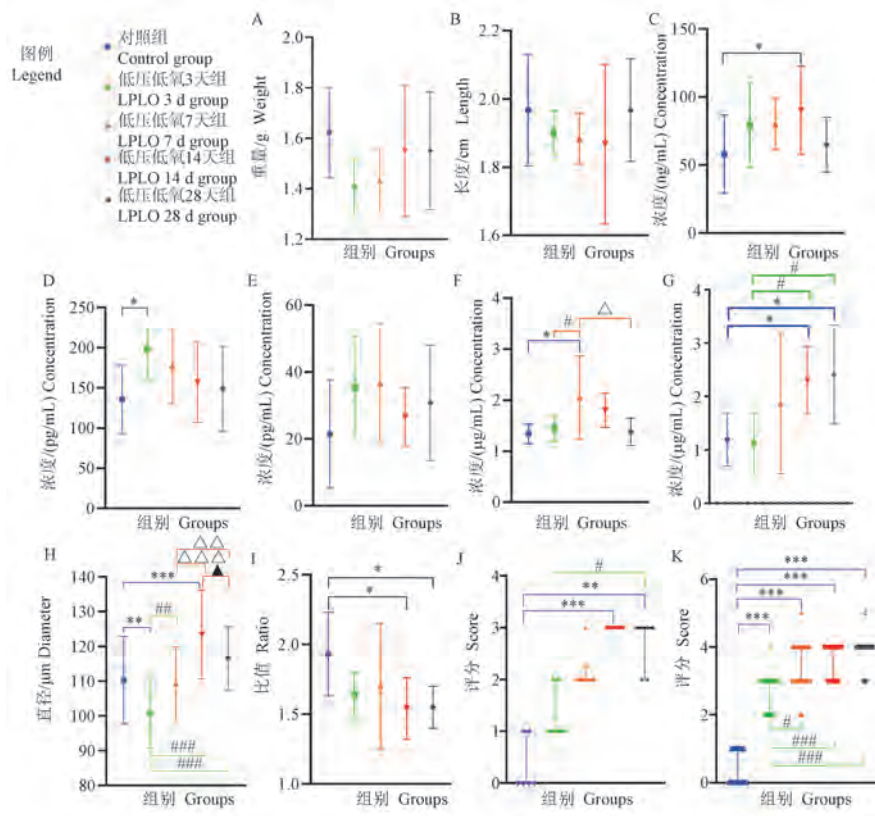
(均 $P<0.05$)。血清 IL-18 各组间无显著性差异。见图 1。

2.1.3 肾病理

与对照组比较,各个实验组肾重量及长径均无显著性差异。见图 1。

与对照组比较,各实验组 PTC/tubule 比值呈下降趋势,其中 LPLO 14 天组及 28 天组 PTC/tubule 比值显著降低 ($P<0.05$),OM 充血评分及肾小管损伤评分呈上升趋势,其中 LPLO 14、28 天组 OM 充血评分显著升高,LPLO 3、7、14、28 天组肾小管损伤评分显著升高 ($P<0.001$)。见图 1。

对照组肾小球、肾小管及肾间质结构正常,



注: A: 右肾重量; B: 右肾长度; C: 血清 NGAL 水平; D: 血清 KIM-1 水平; E: 血清 IL-18 水平; F: 血清 CysC 水平; G: 血清 CRE 水平; H: 肾小球平均直径; I: PTC/tubule 比值; J: 肾髓质充血评分; K: 肾小管损伤评分。与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与 LPLO 3 天组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$; 与 LPLO 7 天组相比, Δ $P<0.05$, ΔΔ $P<0.01$, ΔΔΔ $P<0.001$; 与 LPLO 14 天组相比, ▲ $P<0.05$ 。

图 1 各组大鼠肾功能、肾损伤指标及肾病理评分指标比较

Note. A, Weight of right kidney. B, Length of right kidney. C, Serum NGAL. D, Serum KIM-1. E, Serum IL-18. F, Serum CysC. G, Serum CRE. H, Average diameter of glomeruli. I, Ratio of PTC/tubule. J, OM congestion score. K, Renal tubular injury score. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with LPLO 3 d group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$. Compared with LPLO 7 d group, Δ $P<0.05$, ΔΔ $P<0.01$, ΔΔΔ $P<0.001$. Compared with LPLO 14 d group, ▲ $P<0.05$.

Figure 1 Comparison of renal function, renal injury indicators, and renal pathological scoring indicators among different groups of rats

毛细血管清晰,肾髓质无明显充血。随着实验时间的延长,实验组肾小球直径呈“缩小-增大-缩小”的变化趋势:LPLO 3 天组为各组中最低,LPLO 14 天组达最高值,LPLO 28 天组较 14 天组显著缩小($P<0.05$,图 1);部分肾小球出现毛细血管祥充血、毛细血管祥破裂。肾小管出现管腔狭窄、管腔扩张、肾小管上皮细胞肿胀、萎缩及脱落,部分肾小管上皮细胞可见空泡样变性,部分小管管腔内可见红细胞管型;肾小管周围毛细血管呈现不同程度的数量变化及管腔扩张;肾外髓质出现显著的充血,红细胞瘀滞;肾间质淋巴细胞浸润增加。见图 2。

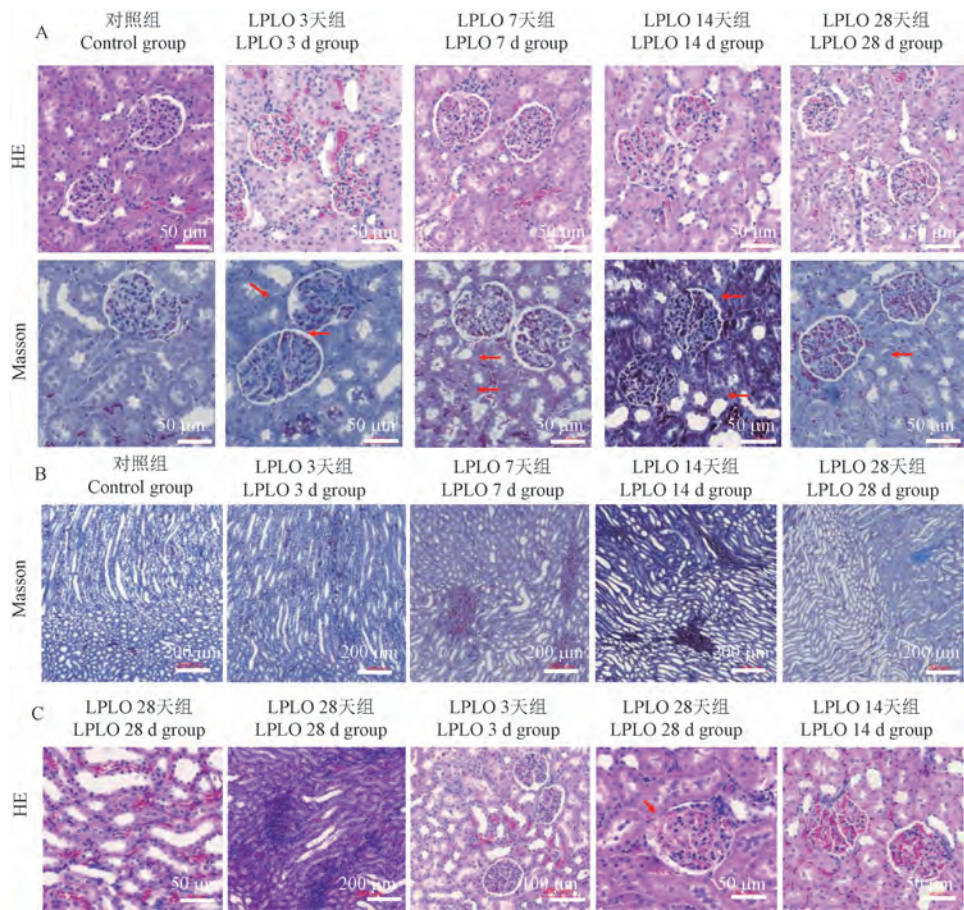
2.2 低压低氧持续时间与肾功能、肾损伤指标及肾组织病理评分的关系

回归分析结果显示,PTC/tubule 与低压低氧

时间呈线性负相关,CRE、CysC 及肾组织病理改变(肾小球平均直径、OM 充血评分及肾小管损伤评分)与低压低氧持续时间呈曲线相关(均 $P<0.05$);血清 NGAL、KIM-1 及 IL-18 水平与低压低氧时间无关。见表 2,图 3。

2.3 相关变量 RCS 分析

如图 4 所示,CRE、CysC 水平及肾病理指标(肾小球平均直径、OM 充血评分及肾小管损伤评分)的变化与低压缺氧持续时间呈非线性关系,各项指标随着低压低氧时间延长,其恶化风险逐渐增高。绘制 RCS 图分析高原停留时间与 CRE、CysC、肾小球平均直径、OM 充血评分及肾小管损伤评分的关联性,各曲线呈“倒 L”形,拐点均在第 7 天,提示各项指标在低压低氧 7 d 内增高速率最大,7~28 d 增高速率减缓。



注:A:各组大鼠肾皮质病理,其中红色箭头标识为呈蓝色的胶原纤维;B:各组大鼠肾髓质病理;C:实验组大鼠肾损伤病理。

图 2 模拟高原环境与大鼠肾病理变化

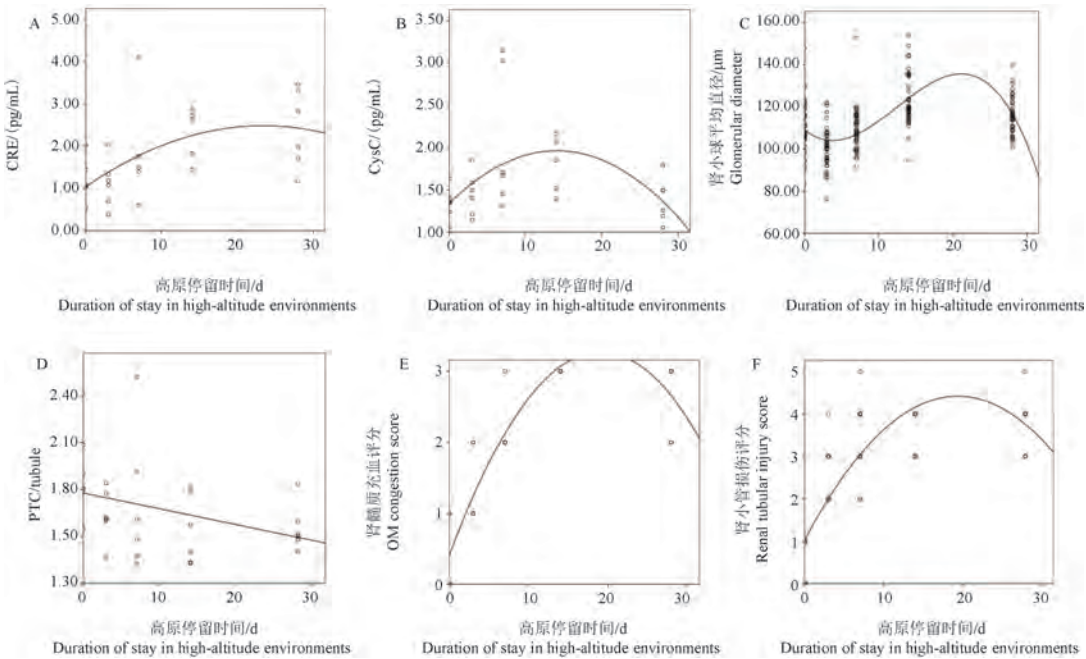
Note. A, Pathology of renal cortex in each group of rats, the red arrows indicate blue collagen fibers. B, Pathology of renal medulla in each group of rats. C, Pathology of renal injury in experimental group rats.

Figure 2 Simulating high-altitude environment and pathological changes in rat kidneys

表 2 低压低氧持续时间与肾功能、肾损伤指标及肾组织病理评分关系的回归分析

Table 2 Regression analysis of the relationship between the duration of low-pressure hypoxia and renal function, renal injury indicators, and renal histopathological scores

观察指标 Observation target	模型类型 Model type	R^2	F	P	常数 Constant	$\beta_1/\beta_2/\beta_3$
CRE/(pg/mL)	二次曲线 Quadratic curve	0.322	5.950	0.008	1.040	0.123/-0.003
CysC/(pg/mL)	二次曲线 Quadratic curve	0.238	3.904	0.033	1.327	0.075/-0.003
NGAL/(pg/mL)	二次曲线 Quadratic curve	0.161	2.495	0.102	-	-
KIM-1/(pg/mL)	二次曲线 Quadratic curve	0.042	0.570	0.572	-	-
IL-18/(pg/mL)	二次曲线 Quadratic curve	0.017	0.206	0.815	-	-
右肾重量/g Weight of right kidney	二次曲线 Quadratic curve	0.031	0.431	0.654	-	-
右肾长度/cm Length of right kidney	二次曲线 Quadratic curve	0.081	1.191	0.319	-	-
肾小球平均直径/ μm Average diameter of glomeruli	三次曲线 Cubic curve	0.298	24.876	<0.001	109.074	-2.902/0.454/-0.012
PTC/tubule	线性 Liner	0.122	3.861	0.050	1.778	-0.010
肾髓质充血评分 OM congestion score	二次曲线 Quadratic curve	0.848	75.450	<0.001	0.414	0.299/-0.008
肾小管损伤评分 Renal tubular injury score	二次曲线 Quadratic curve	0.707	213.811	<0.001	1.042	0.348/-0.009

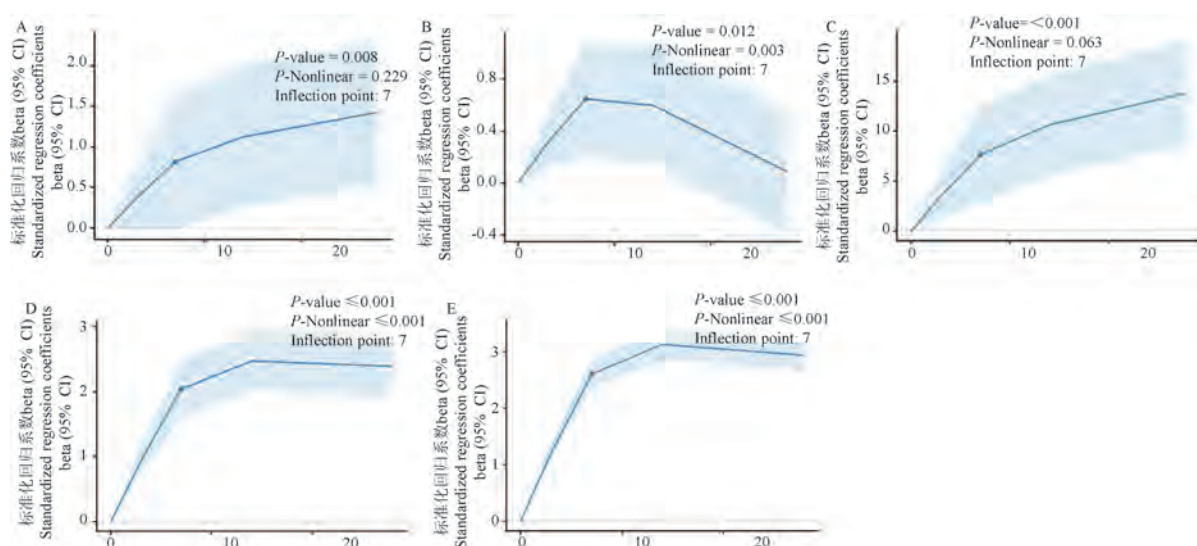


注:A:模拟高原环境停留时间与血清 CRE;B:模拟高原环境停留时间与血清 CysC;C:模拟高原环境停留时间与肾小球平均直径;D:模拟高原环境停留时间与 PTC/tubule;E:模拟高原环境停留时间与肾髓质充血评分;F:模拟高原环境停留时间与肾小管损伤评分。

图 3 模拟高原环境停留时间与大鼠肾功能及病理评分的相关性分析

Note. A, CRE levels with duration of stay in high-altitude environments. B, CysC levels with duration of stay in high-altitude environments. C, Glomerular diameter with duration of stay in high-altitude environments. D, PTC/tubule with duration of stay in high-altitude environments. E, OM congestion score with duration of stay in high-altitude environments. F, Renal tubular injury score with duration of stay in high-altitude environments.

Figure 3 Correlation analysis between simulated high-altitude environment residence time and rat kidney function and pathological score



注:A:模拟高原环境停留时间与血清 CRE;B:模拟高原环境停留时间与血清 CysC;C:模拟高原环境停留时间与肾小球平均直径;D:模拟高原环境停留时间与肾髓质充血评分;E:模拟高原环境停留时间与肾小管损伤评分。

图 4 模拟高原环境停留时间与大鼠肾功能及肾病理指标变化的限制性立方样条分析

Note. A, CRE levels with duration of stay in high-altitude environments. B, CysC levels with duration of stay in high-altitude environments. C, Glomerular diameter with duration of stay in high-altitude environments. D, OM congestion score with duration of stay in high-altitude environments. E, Renal tubular injury score with duration of stay in high-altitude environments.

Figure 4 Restricted cubic spline analysis of the relationship between simulated high-altitude environment residence time and changes in renal function and renal pathological indicators in rats

3 讨论

本研究使用低压低氧舱模拟由平原进入高原环境,建立低压低氧环境下大鼠肾损伤模型,应用血清学指标结合肾病理评分,分析发现大鼠在进入高原低压低氧环境后肾损伤标记物升高,肾小球平均直径呈现动态变化,肾小管损伤显著,PTC 稀疏,外髓质充血。

高原环境的特点是低大气压力导致的氧气稀薄,低压低氧环境下,肾通过利尿效应提高红细胞比容,代偿组织缺氧^[7],利尿效应增加导致肾灌注下降、GFR 降低。PICHLE 等^[5]发现,登山者在进入海拔 4500 m 后出现 GFR 下降, BESTLE 等^[16]发现成年男性在海拔 4500 m 生活 3 d 后 GFR 开始出现显著下降。动物实验证实肾小球体积与 GFR 及肾灌注和超滤呈正相关^[17],本研究中实验组肾小球平均直径在 LPLO 3 天组最短,提示在进入低压低氧环境早期阶段,肾小球灌注减少,肾小球体积缩小。但是,我们发现自 LPLO 7 天组起,肾小球平均直径开始增大, LPLO 14 天组达最高值,而 LPLO 28 天组较 14 天

组显著缩小并接近对照组水平,肾小球体积的变化特点提示由平原进入高原后,肾小球先出现缺血缩小,随后代偿性增大,最后恢复至接近平原水平,肾小球在进入高原环境后具有自适应调节能力。WANG 等^[18]报道世居高原的藏族患者肾活检中普遍存在肾小球肥大,肾小球直径增大与血红蛋白水平呈强相关,而与血肌酐水平无关,该研究认为高原红细胞增多症是导致世居高原的藏族患者肾小球肥大的重要原因。与世居高原人群不同,由平原进入高原环境的过程,大气压力及氧含量剧烈变化,肾功能及结构改变更为复杂,还需进一步研究探索进入低压低氧环境后肾小球血流变化的机制。

肾小管主动重吸收过程极为耗能,消耗了供给肾氧气的 80%^[19-20]。高海拔环境下,肺通气量增加以提高组织供氧,导致呼吸性碱中毒^[21],肾为代偿碱中毒排出过量的碳酸氢盐,同时重吸收氢离子^[22],此过程增加肾组织耗能,加重肾缺氧;此外,肾小管系统的血供来源于 PTC,PTC 具有血管再生能力差和易受损等特点^[23],因此,肾小管系统对缺氧极为敏感。PTC 为二级毛细血管,起

自肾小球出球小动脉,由单层肾小管周围毛细血管内皮细胞(renal peritubular capillary endothelial cells, RPECs)和基膜构成,PTC 血流减少及缺氧引起的 RPECs 损伤均可导致 PTC 损伤,造成 PTC 稀疏,进而加重肾小管缺氧,导致肾小管受损^[23]及肾功能受损^[14]。本研究中实验组 PTC/tubule 比例出现显著下降,提示低压低氧环境可导致 PTC 稀疏。血清 NGAL 和 KIM-1 是肾小管早期损伤的标记物^[24],研究显示血清 NGAL 及 KIM-1 升高与缺氧所致肾损伤显著相关^[25-28]。MELLOR 等^[29]发现,受试者由海平面上升至海拔 1085 m 后,血清 NGAL 即呈现升高趋势,在高原徒步旅行后,血清 NGAL 显著升高。本研究观察到实验组肾小管出现显著损伤,结合既往研究,提示进入低压低氧环境后可能通过影响 PTC 导致肾小管受损。

除肾小球和肾小管的病理变化外,本研究进一步发现,实验组肾外髓质出现显著充血,OM 充血评分升高。OM 充血是红细胞在外髓质的瘀滞(red blood cell trapping)^[13],缺血性 AKI 中常见 OM 充血,瘀滞在髓质的红细胞胞内成分快速外渗并被肾小管所吸收,产生肾小管毒性作用,是缺血性 AKI 的主要致病因素之一^[13]。

组织损伤最终导致功能受损,血清 CRE 和 CysC 的升高可用于诊断 AKI^[30],CysC 是检测新生儿缺氧相关 AKI 敏感且可靠的标记物^[31],并且可以预测手术导致的 AKI^[32]。实验组 CRE 及 CysC 升高提示在低压低氧环境下可导致肾功能受损。

为进一步研究低压低氧环境停留时间与肾损伤的关系,本研究使用相关性分析发现,PTC/tubule 与低压低氧舱停留时间呈线性负相关,其余均为二次曲线或三次曲线相关,提示伴随低压低氧环境停留时间的延长,肾损伤的变化速率和严重程度是非匀速发展的。RCS 分析发现呈曲线相关的各项指标其 RCS 曲线拐点均出现在 7 d,7 d 之后曲线斜率较 7 d 之前下降,提示由平原进入高原环境 7 d 内,肾受损速度较快,7 d 后受损速度减缓,因此,推测机体对进入低压低氧环境后出现的肾损伤存在代偿调节机制以逐渐适应高原缺氧环境。

综上所述,本研究构建了模拟由平原进入高

原低压低氧环境后肾功能及组织病理随时间变化的动物模型,发现进入低压低氧环境后肾功能受损,肾病理损伤伴随高原停留时间逐渐加重,肾对低压低氧环境存在自适应及调整过程。本研究为高原肾病发病机制的研究提供了重要的实验室数据,提示对于由平原地区进入高原地区的人群应重视肾结构和功能的潜在变化。

参考文献:

- [1] ARESTEGUI A H, FUQUAY R, SIROTA J, et al. High altitude renal syndrome (HARS) [J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(11): 1963-1968.
- [2] FU Q, COLGAN S P, SHELLEY C S. Hypoxia: the force that drives chronic kidney disease [J]. Clin Med Res, 2016, 14(1): 15-39.
- [3] ZHANG L, WANG Z, CHEN Y, et al. Prevalence and risk factors associated with chronic kidney disease in adults living in 3 different altitude regions in the Tibetan Plateau [J]. Clin Chim Acta, 2018, 481: 212-217.
- [4] ZHANG L, WANG F, WANG L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey [J]. Lancet, 2012, 379(9818): 815-822.
- [5] PICHLER J, RISCH L, HEFTI U, et al. Glomerular filtration rate estimates decrease during high altitude expedition but increase with Lake Louise acute mountain sickness scores [J]. Acta Physiol (Oxf), 2008, 192(3): 443-450.
- [6] BELLI T, MACEDO D V, DE ARAÚJO G G, et al. Mountain ultramarathon induces early increases of muscle damage, inflammation, and risk for acute renal injury [J]. Front Physiol, 2018, 9: 1368.
- [7] WANG S Y, GAO J, ZHAO J H. Effects of high altitude on renal physiology and kidney diseases [J]. Front Physiol, 2022, 13: 969456.
- [8] ZENG Y, LI Y M, CHENG Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α activation can attenuate renal podocyte injury and alleviate proteinuria in rats in a simulated high-altitude environment [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 602: 35-40.
- [9] PALUBISKI L M, O'HALLORAN K D, O'NEILL J. Renal physiological adaptation to high altitude: a systematic review [J]. Front Physiol, 2020, 11: 756.
- [10] 余紫娟, 赵健秋, 董蓉, 等. 胰岛素样生长因子 1 受体抑制剂可减轻糖尿病肾病小鼠肾小管病变 [J]. 中华肾脏病杂志, 2020, 36(1): 34-40.
YU Z X, ZHAO J Q, DONG R, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor alleviates diabetic kidney disease mouse tubulopathy [J]. Chin J Nephrol, 2020, 36(1): 34-40.

- [11] ZHANG Y L, QIAO S K, WANG R Y, et al. NGAL attenuates renal ischemia/reperfusion injury through autophagy activation and apoptosis inhibition in rats [J]. Chem Biol Interact, 2018, 289: 40–46.
- [12] MCLARNON S R, WILSON K, PATEL B, et al. Lipopolysaccharide pretreatment prevents medullary vascular congestion following renal ischemia by limiting early reperfusion of the medullary circulation [J]. J Am Soc Nephrol, 2022, 33(4): 769–785.
- [13] MCLARNON S R, JOHNSON C, SUN J, et al. Extravasation of blood and blood toxicity drives tubular injury from RBC trapping in ischemic AKI [J]. Function (Oxf), 2023, 4(6): zqad050.
- [14] STEEGH F M E G, GELENS M A C J, NIEMAN F H M, et al. Early loss of peritubular capillaries after kidney transplantation [J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(6): 1024–1029.
- [15] 董鸿瑞, 林瑞琦, 程虹, 等. 国人肾小球大小正常值测定及测量方法探讨 [J]. 中华肾脏病杂志, 2010, 26(3): 155–159.
- DONG H R, LIN R Q, CHENG H, et al. Determination of normal value range of glomerular diameter in Chinese adults with comparison of measurement methods [J]. Chin J Nephrol, 2010, 26(3): 155–159.
- [16] BESTLE M H, OLSEN N V, POULSEN T D, et al. Prolonged hypobaric hypoxemia attenuates vasopressin secretion and renal response to osmostimulation in men [J]. J Appl Physiol (1985), 2002, 92(5): 1911–1922.
- [17] HETTLER S A, PICASCIA T, PASTENE D O, et al. Hyperfiltration can be detected by transcutaneous assessment of glomerular filtration rate in diabetic obese mice [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2023, 325(6): C1558–C1566.
- [18] WANG H, TANG C, DANG Z, et al. Clinicopathological characteristics of high-altitude polycythemia-related kidney disease in Tibetan inhabitants [J]. Kidney Int, 2022, 102(1): 196–206.
- [19] EVANS R G, HARROP G K, NGO J P, et al. Basal renal O₂ consumption and the efficiency of O₂ utilization for Na⁺ reabsorption [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 306(5): F551–F560.
- [20] 祝婷婷, 范德生, 杨婧, 等. Ang II 拮抗剂对慢性肾衰大鼠肾血流量和肾内氧耗的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(5): 1–6, 15.
- ZHU T T, FAN D S, YANG J, et al. Effects of angiotensin II blockade on renal blood flow and renal oxygen consumption in chronic renal failure rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(5): 1–6, 15.
- [21] GOLDFARB-RUMYANTZEV A S, ALPER S L. Short-term responses of the kidney to high altitude in mountain climbers [J]. Nephrol Dial Transplant, 2014, 29(3): 497–506.
- [22] LUKS A M, JOHNSON R J, SWENSON E R. Chronic kidney disease at high altitude [J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(12): 2262–2271.
- [23] 张永吉, 刘彤, 董红霖, 等. 肾小管周围毛细血管与急性肾损伤 [J]. 中华肾脏病杂志, 2020, 36(1): 73–76.
- ZHANG Y J, LIU T, DONG H L, et al. Relationship between peritubular capillary and acute kidney injury [J]. Chin J Nephrol, 2020, 36(1): 73–76.
- [24] IJI O T, AJIBADE T O, ESAN O O, et al. Ameliorative effects of *Glycine* on cobalt chloride-induced hepato-renal toxicity in rats [J]. Anim Model Exp Med, 2023, 6(2): 168–177.
- [25] SHARROD-COLE H, FENN J, GAMA R, et al. Utility of plasma NGAL for the diagnosis of AKI following cardiac surgery requiring cardiopulmonary bypass: a systematic review and meta-analysis [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 6436.
- [26] CHAPMAN C L, JOHNSON B D, SACKETT J R, et al. Soft drink consumption during and following exercise in the heat elevates biomarkers of acute kidney injury [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2019, 316(3): R189–R198.
- [27] MERDLER I, ROZENFELD K L, ZAHLER D, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin for the early prediction of acute kidney injury in ST-segment elevation myocardial infarction patients treated with primary percutaneous coronary intervention [J]. Cardiorenal Med, 2020, 10(3): 154–161.
- [28] SABBISSETTI V S, WAIKAR S S, ANTOINE D J, et al. Blood kidney injury molecule-1 is a biomarker of acute and chronic kidney injury and predicts progression to ESRD in type I diabetes [J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25(10): 2177–2186.
- [29] MELLOR A, BOOS C, STACEY M, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: its response to hypoxia and association with acute mountain sickness [J]. Dis Markers, 2013, 35(5): 537–542.
- [30] SPARROW H G, SWAN J T, MOORE L W, et al. Disparate outcomes observed within kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) acute kidney injury stage 1 [J]. Kidney Int, 2019, 95(4): 905–913.
- [31] XU X, NIE S, XU H, et al. Detecting neonatal AKI by serum cystatin C [J]. J Am Soc Nephrol, 2023, 34(7): 1253–1263.
- [32] PILARCZYK K, PANHOLZER B, HUENGES K, et al. Prediction of acute kidney injury by cystatin C and [TIMP-2] * [IGFBP7] after thoracic aortic surgery with moderate hypothermic circulatory arrest [J]. J Clin Med, 2022, 11(4): 1024.

刘晓静, 刘晓欣, 张天存, 等. 小鼠非手术胚胎移植技术影响因素研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(4): 88-96.
Liu XJ, Liu XX, Zhang TC, et al. Technical factors influencing non-surgical embryo transfer in mice [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 88-96.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.009

小鼠非手术胚胎移植技术影响因素研究

刘晓静, 刘晓欣, 张天存, 田永路, 李夏莹*, 韦玉生*

(北京大学生命科学学院实验动物中心, 北京 100871)

【摘要】 目的 研究不同非手术移植器、植入胚胎数量、胚胎时期、胚胎品系对小鼠非手术胚胎移植效率的影响以及手术移植和非手术移植效率的比较, 以期建立稳定的小鼠非手术胚胎移植技术体系。**方法** 使用非手术的方法进行小鼠的胚胎移植。**结果** 使用两种不同的非手术移植器进行胚胎移植, 怀孕率分别为 $(75.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(66.67 \pm 14.43)\%$, 生存率分别为 $(46.11 \pm 6.31)\%$ 、 $(18.89 \pm 0.96)\%$; 胚胎的数量分为 10、15、20 枚 3 组进行非手术移植, 怀孕率分别为 $(66.67 \pm 11.55)\%$ 、 $(80.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(66.67 \pm 23.09)\%$, 生存率分别为 $(29.33 \pm 4.16)\%$ 、 $(38.67 \pm 4.81)\%$ 、 $(17.00 \pm 3.46)\%$; 将囊胚和桑葚胚进行非手术移植, 怀孕率分别为 $(80.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(46.67 \pm 11.55)\%$, 生存率分别为 $(38.67 \pm 4.81)\%$ 、 $(10.22 \pm 2.77)\%$; 选用 C57BL/6J、ICR、基因修饰 A、基因修饰 B 4 个品系小鼠作为供体, 进行非手术移植, 怀孕率分别为 $(66.67 \pm 11.55)\%$ 、 $(80.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(73.33 \pm 11.55)\%$ 、 $(80.00 \pm 0.00)\%$, 生存率分别为 $(26.67 \pm 2.67)\%$ 、 $(38.67 \pm 4.81)\%$ 、 $(32.00 \pm 3.53)\%$ 、 $(29.34 \pm 2.31)\%$; 手术移植 15 只假孕鼠, 非手术移植 15 只假孕鼠, 怀孕率分别为 $(80.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(86.67 \pm 11.55)\%$, 生存率分别为 $(38.67 \pm 4.81)\%$ 、 $(36.00 \pm 5.82)\%$ 。**结论** 不同移植器进行非手术移植产仔率存在差异; 每次移植 15 枚的胚胎数量移植效率较高; 选用囊胚期胚胎进行非手术移植的效率较高; 手术移植效率与非手术移植效率无明显差异。

【关键词】 小鼠; 非手术移植; 胚胎移植

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0088-09

Technical factors influencing non-surgical embryo transfer in mice

LIU Xiaojing, LIU Xiaoxin, ZHANG Tiancun, TIAN Yonglu, LI Xiaying*, WEI Yusheng*
(Laboratory Animal Research Center, School of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China)

【Abstract】 Objective We aimed to investigate the effects of different non-surgical embryo transfer devices, number of transferred embryos, embryo stage, and embryos obtained from different mouse strains on the efficiency of non-surgical embryo transfer in mice, and to compare the efficiencies of surgical and non-surgical embryo transfer, in order to establish a stable non-surgical embryo transfer technology system. **Methods** Mouse embryo transfer was carried out using non-surgical method. **Results** The pregnancy rates using two different non-surgical transfer devices were $(75.00 \pm 0.00)\%$ and $(66.67 \pm 14.43)\%$, and the birth rates were $(46.11 \pm 6.31)\%$ and $(18.89 \pm 0.96)\%$,

[作者简介] 刘晓静 (1993—), 女, 硕士, 研究方向: 小鼠胚胎操作相关技术研究。E-mail: lxj@pku.edu.cn

[通信作者] 李夏莹 (1986—), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 实验动物福利伦理和微生物检测。E-mail: lixiaying@pku.edu.cn

韦玉生 (1975—), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 基因修饰动物模型研发与实验动物管理。

E-mail: yusheng.wei@pku.edu.cn * 共同通信作者

respectively. Transfer of 10, 15, and 20 embryos resulted in pregnancy rates of $(66.67 \pm 11.55)\%$, $(80.00 \pm 0.00)\%$, and $(66.67 \pm 23.09)\%$, and birth rates of $(29.33 \pm 4.16)\%$, $(38.67 \pm 4.81)\%$, and $(17.00 \pm 3.46)\%$, respectively. When blastocysts and morulae were transferred non-surgically, the resulting pregnancy rates were $(80.00 \pm 0.00)\%$ and $(46.67 \pm 11.55)\%$ and the birth rates were $(38.67 \pm 4.81)\%$ and $(10.22 \pm 2.77)\%$, respectively. Four strains (C57BL/6J, ICR, genetically modified mice A, genetically modified mice B) were used as donors for non-surgical embryo transfer, with resulting pregnancy rates of $(66.67 \pm 11.55)\%$, $(80.00 \pm 0.00)\%$, $(73.33 \pm 11.55)\%$, and $(80.00 \pm 0.00)\%$, and birth rates of $(26.67 \pm 2.67)\%$, $(38.67 \pm 4.81)\%$, $(32.00 \pm 3.53)\%$, and $(29.34 \pm 2.31)\%$, respectively. Fifteen pseudo-pregnant mice were transplanted surgically and 15 were transplanted non-surgically, with pregnancy rates of $(80.00 \pm 0.00)\%$ and $(86.67 \pm 11.55)\%$, and birth rates of $(38.67 \pm 4.81)\%$ and $(36.00 \pm 5.82)\%$, respectively. **Conclusions** Transfer device A resulted in a higher birth rate in this study. The embryo transfer efficiency was higher when 15 embryos were transferred into unilateral uterine horns of pseudo-pregnant 2.5-day recipients. Blastocyst-stage embryo transfer was more efficient than morula-stage transfer. There was no significant difference in efficiency between surgical and non-surgical embryo transfer procedures.

【Keywords】 mice; non-surgical transfer; embryo transfer

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

基因修饰小鼠已经广泛用于鉴定基因功能、动物发育和细胞分化以及各种疾病机制及防治研究^[1-3]。构建基因修饰小鼠过程复杂,包括将 DNA(和/或 RNA 以及蛋白)显微注射或电转到受精卵细胞中,或者在胚胎干细胞利用同源重组靶向基因^[4-5],然后将操作后的胚胎移植到假孕小鼠的输卵管或子宫角中^[6],以获得基因修饰小鼠。目前,将小鼠胚胎通过手术移植到代孕鼠是制备基因修饰小鼠模型的最常用方法,但手术移植需要切开皮肤和肌肉,将内脏器官外化和牵引^[7],并需要缝合伤口,引发代孕鼠疼痛和痛苦^[6]。手术移植过程繁琐,代孕鼠术后恢复方面的潜在问题以及可能的术后感染需要监测^[8-9]。动物福利与伦理要求动物研究需遵循“3R”原则^[10],以寻求替代动物的程序、减少使用的动物数量以及改进方法以尽量减少疼痛和痛苦。2009 年非手术胚胎移植方法作为一种替代方案被提出并由 ParaTechs 公司商业化^[11]。该方法是利用特定器械,通过非手术的方式将胚胎通过子宫颈移植到子宫角的技术,整个操作过程相对于传统的手术子宫角移植简单,且由于无须在腹部开创口以及子宫上打洞,受体动物的疼痛显著降低^[12-13]。在本研究中,对两种非手术胚胎移植器、移植胚胎数量、不同时期胚胎以及不同品系小鼠胚胎的移植效率进行比较,并对比非手术移植和手术移植的效率,从而为小鼠非手术胚胎移

植技术的应用提供更全面的实验数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验所用小鼠均为 SPF 级,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0006];饲养于北京大学实验动物中心[SYXK(京)2020-0035]。代孕雌鼠选用 28~32 g 的 8 周封闭群 ICR 小鼠 189 只,结扎雄鼠选用 32~35 g、10~12 周的封闭群 ICR 小鼠 60 只;供体 ICR 雌鼠选用 12~14 g、3~4 周的封闭群 ICR 小鼠 240 只,交配雄鼠选用 32~35 g、10~12 周的封闭群 ICR 小鼠 60 只;供体 C57 雌鼠选用 12~14 g、3~4 周近交系 C57BL/6J 小鼠 30 只,交配雄鼠选用 28~32 g、10~12 周的近交系 C57BL/6J 小鼠 10 只;A 基因修饰与 B 基因修饰供体雌鼠选用 12~14 g、3~4 周 C57BL/6J 背景基因 A 敲除纯合和基因 B loxp 插入纯合小鼠各 30 只,交配雄鼠分别选用 28~32 g、10~12 周 C57BL/6J 和基因 B loxp 插入纯合小鼠各 10 只。所有操作均遵循北京大学动物实验伦理要求,动物实验伦理审批单位为北京大学实验动物福利伦理委员会(LAC-WeiYS-1),整个研究过程符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

孕马血清促性腺激素(PMSG)(宁波第二激素厂公司,批号:B240501);人绒毛膜促性腺激素

(HCG)(宁波第二激素厂公司,批号:S231005); M2 培养液 (Sigma-Aldrich 公司,批号:0000349107);KSOM 培养液(南京贝尔公司,批号:20240430);三溴乙醇(Sigma-Aldrich 公司,批号:T48402)。手术器械:组织剪、线剪、组织镊、持针器、脂肪夹、眼科剪、眼科镊、手术缝合针、手术缝合线(瑞沃德公司);冲胚针:针尖处理过的 1 mL 胰岛素注射器(碧迪医疗器械有限公司);1 mL 无菌注射器(北京慕鸥生物有限公司);移卵针(自制);移植器 A(保定正木生物科技有限公司);移植器 B(机构赠予);10 μ L 移液器(Eppendorf 公司);体视显微镜(尼康公司);CO₂ 培养箱(日本 PHCbi 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 超数排卵

供体雌鼠腹腔注射 10 IU PMSG,48 h 后腹腔注射 10 IU HCG,并与相同品系雄鼠同笼交配,次日检查阴道,挑出有精栓的雌鼠,见栓 2.5 d 的供体鼠用于移植桑葚胚,见栓 3.5 d 的供体鼠用于移植囊胚。

1.3.2 假孕鼠制备

挑选处于发情期的雌鼠,与结扎雄鼠合笼,第二天检查阴道,挑出有精栓的雌鼠作为见栓 2.5 d 的受体鼠用于子宫移植。

1.3.3 胚胎采集

见栓 2.5 d 或 3.5 d 的供体小鼠处死后,立即取出输卵管和子宫(保证输卵管与子宫连接完好),将输卵管和子宫放于盛有 M2 的培养皿中,镜下找到伞口用冲胚针冲出胚胎(见栓 2.5 d 冲出的胚胎收集桑葚胚,见栓 3.5 d 冲出收集囊胚)。冲出胚胎后将其收集到 M2 液滴中,挑选清洗 3 遍后移入 KSOM 液滴,CO₂ 培养箱内备用。

1.3.4 胚胎移植

(1)手术移植:麻醉假孕鼠,消毒后,剪开毛皮层、真皮层,找到子宫一侧,用脂肪夹固定。镊子轻轻夹住子宫,镜下找到子宫角位置,注射器打孔,迅速将盛有胚胎的移植针送进孔中并轻轻将胚胎吹入子宫内。将子宫部放回小鼠体内,缝合创口后小鼠放在恒温台上等待苏醒,苏醒后的小鼠不超过 2 只放入笼盒加做窝材料,填写笼卡与信息记录。

(2)非手术移植器械 A 移植:麻醉假孕鼠,将

开殖器塞入小鼠阴道内,通过开殖器看到子宫颈口后将盛有胚胎的移植器经子宫颈口送入子宫内,直至中间蓝色管体进入开殖器一半处,将胚胎打入子宫内,向后旋转拔出移植器,镜下检查移植器中是否有胚胎残留。移植结束后取出开殖器,小鼠放恒温台上苏醒后记录信息,放笼盒内待产。

(3)非手术移植器械 B 移植:将 10 μ L 移液枪调至 1.5 μ L,装上移植管并将清洗后的胚胎全部吸入移植管中,将移液枪调至 1.8 μ L,移植管前部保持一段气柱。将开殖器放入小鼠阴道内,找到子宫颈口,将移植管伸入子宫颈口,通过子宫颈口进入子宫。待移植管的热缩管进入开殖器的后 1/3 处停止,将枪打到第一个点,排出胚胎,稍往后退一点,再将枪打到第二个点,将液体排尽。缓慢撤出移植管,在体视镜下检查移植管中的胚胎是否全部排出。移植结束后取出开殖器,小鼠放恒温台上苏醒后记录信息,放笼盒内待产。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 10 对试验数据进行 *t* 检验。实验结果用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组间数据用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 表示有显著性差异。

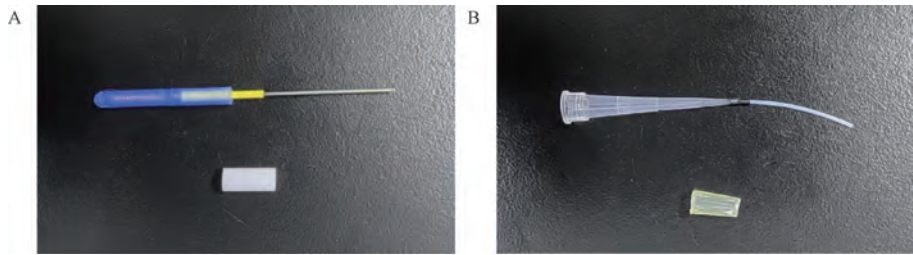
2 结果

2.1 不同移植器对移植效率的影响

移植器是非手术移植效率的主要决定因素之一,本实验利用可获得的两种移植器分别进行实验比较(图 1)。生存率以及怀孕率是移植效率的关键指标。选择囊胚期胚胎,进行胚胎移植试验,在代孕鼠生仔后比较两组的生存率和怀孕率。详细移植数据见表 1。移植器 A 组和移植器 B 组怀孕率无显著差异($P>0.05$),移植器 A 组生存率显著高于移植器 B 组($P<0.05$)(图 2)。

2.2 不同胚胎数量对移植效率的影响

为筛选出最优移植胚胎的数量,将胚胎移植的数量分为 10、15、20 枚 3 组,用移植器 A 进行移植后,分别对怀孕率和生存率做了对比。结果如表 2 所示。根据前期查询资料^[14],15 枚囊胚是较优的移植数量,故本研究分别比较移植 10 枚和 15 枚囊胚、20 枚和 15 枚囊胚的怀孕率和生存率



注:A:移植器 A;B:移植器 B。
图 1 两种移植器

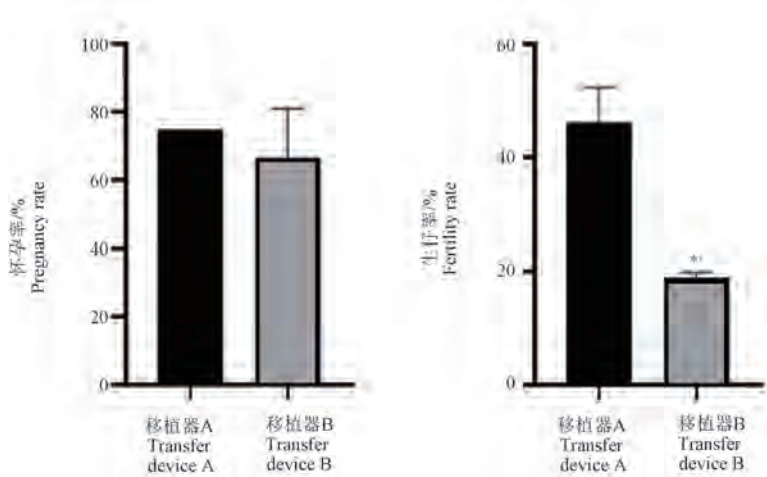
Note. A, Transfer device A. B, Transfer device B.

Figure 1 Two types of embryo transfer devices

表 1 不同移植器的移植数据
Table 1 Transplant data of different transplants devices

移植器 Devices	代孕鼠/n Surrogate mice	怀孕鼠/n Pregnant mice	怀孕率/% Pregnancy rate	平均值± 标准差 $\bar{x}\pm s$	移植囊胚数/n Number of transfer blastocysts	出生数/n Number of births	生仔率/% Fertility rate	平均值±标准差 $\bar{x}\pm s$
移植器 A Transfer device A	4	3	75.00		60	26	43.33	
	4	3	75.00	(75.00±0.00) %	60	25	41.67	(46.11±6.31) %
	4	3	75.00		60	32	53.33	
移植器 B Transfer device B	4	2	50.00		60	12	20.00 *	
	4	3	75.00	(66.67±14.43) %	60	11	18.33 *	(18.89±0.96) %
	4	3	75.00		60	11	18.33 *	

注:与移植器 A 组相比, * $P<0.05$ 。
Note. Compared with transfer device A group, * $P<0.05$.



注:与移植器 A 组相比, * $P<0.05$ 。
图 2 不同移植器移植效率比较

Note. Compared with transfer device A group, * $P<0.05$.

Figure 2 Comparison of embryo transfer efficiency of different devices

是否有差异,结果显示怀孕率均无差异,10 枚和 15 枚的生仔率无差异,15 枚和 20 枚的生仔率差异极显著($P<0.01$,图 3)。

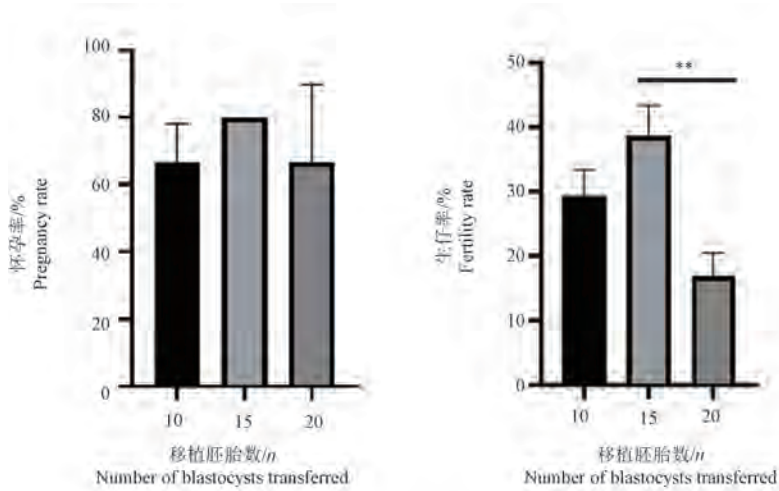
2.3 不同胚胎时期对移植效率的影响
在子宫移植时获取的胚胎常出现发育不同

步的情况,本研究进一步对囊胚和桑葚胚移植效率进行比较,实验使用移植器 A 进行非手术移植,每只代孕鼠移植 15 枚胚胎。结果如表 3 所示。囊胚组怀孕率显著高于桑葚胚组($P<0.05$),生仔率极显著高于桑葚胚组($P<0.001$)。

表 2 不同胚胎数量的移植数据
Table 2 Transplant data of different number of embryos

移植囊胚数/ <i>n</i> Number of transfer blastocysts	代孕鼠/ <i>n</i> Surrogate mice	怀孕鼠/ <i>n</i> Pregnant mice	怀孕率/% Pregnancy rate	平均值±标准差 $\bar{x}\pm s$	移植总囊胚数/ <i>n</i> Total Number of transfer blastocysts	出生数/ <i>n</i> Number of births	生仔率/% Fertility rate	平均值±标准差 $\bar{x}\pm s$
10	5	3	60.00	(66.67±11.55)%	50	13	26.00	(29.33±4.16)%
	5	3	60.00		50	14	28.00	
	5	4	80.00		50	17	34.00	
	5	4	80.00		75	30	40.00	
15	5	4	80.00	(80.00±0.00)%	75	25	33.33	(38.67±4.81)%
	5	4	80.00		75	32	42.67	
	5	2	40.00		100	15	15.00**	
20	5	4	80.00	(66.67±23.09)%	100	15	15.00**	(17.00±3.46)%
	5	4	80.00		100	21	21.00**	

注:与移植 15 枚组相比, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the group of 15 embryos transplanted, ** $P<0.01$.



注:与移植 15 枚组相比, ** $P<0.01$ 。
图 3 不同移植数量移植效率比较

Note. Compared with the group of 15 embryos transplanted, ** $P<0.01$.

Figure 3 Comparison of embryo transfer efficiency of different number of embryos

表 3 不同胚胎时期的移植数据
Table 3 Transfer data at different embryonic stages

胚胎时期 Embryonic stages	代孕鼠/ <i>n</i> Surrogate mice	怀孕鼠/ <i>n</i> Pregnant mice	怀孕率/% Pregnancy rate	平均值±标准差 $\bar{x}\pm s$	移植囊胚数/ <i>n</i> Number of transfer blastocysts	出生数/ <i>n</i> Number of births	生仔率/% Fertility rate	平均值±标准差 $\bar{x}\pm s$
囊胚 Blastocyst	5	4	80.00	(80.00±0.00)%	75	30	40.00	(38.67±4.81)%
	5	4	80.00		75	25	33.33	
	5	4	80.00		75	32	42.67	
桑葚胚 Morula	5	2	40.00*	(46.67±11.55)%	75	6	8.00***	(10.22±2.77)%
	5	2	40.00*		75	7	9.33***	
	5	3	60.00*		75	10	13.33***	

注:与囊胚组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。
Note. Compared with the blastocyst group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

2.4 不同品系对移植效率的影响

不同品系小鼠或野生型与基因修饰小鼠存在移植效率差别,为了比较不同品系移植效率是否存在差异,本研究选用 4 个品系小鼠(C57BL/6J、ICR、A 基因修饰、B 基因修饰)作为供体,假孕鼠均选择 ICR,使用移植器 A 进行非手术移植。对 4 组的生存率和怀孕率进行了对比。结果如表 4 所示,由于 C57BL/6J 是最常用的移植品系,大多数基因修饰小鼠品系为 C57BL/6J 背景,故分别分析了以下 3 个组别的怀孕率和生存率差异:C57BL/6J 和 ICR、C57BL/6J 和 A 基因修饰、C57BL/6J 和 B 基因型修饰,结果显示怀孕率均无差异,C57BL/6J 和 ICR 生存率差异显著($P <$

0.05),C57BL/6J 和 A 基因修饰、C57BL/6J 和 B 基因型修饰均无差异,可能与 A 基因修饰小鼠和 B 基因型修饰小鼠均为 C57BL/6J 背景有关,结果如图 4 所示。

2.5 不同手术类型对移植效率的影响

手术移植是最常用的操作方法,但手术过程相比非手术移植对小鼠伤害较大,而非手术移植操作相对简单,更能保障动物福利,我们对这两种类型的移植方法进行对比,本实验使用移植器 A 进行非手术移植,胚胎选用囊胚,非手术组每只鼠移植 15 枚胚胎,手术组单侧子宫移植 15 枚胚胎,结果如表 5 所示。两组的怀孕率和生存率均无显著性差异。

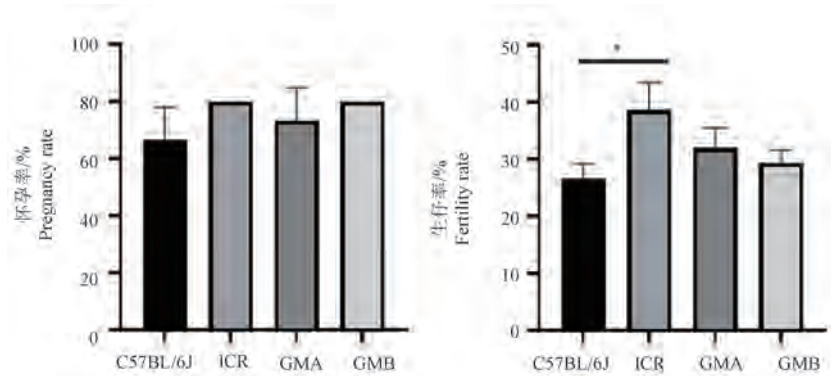
表 4 不同品系小鼠胚胎类型的移植数据

Table 4 Transfer data of different strains of mouse embryo types

胚胎类型 Embryo type	代孕鼠/ <i>n</i> Surrogate mice	怀孕鼠/ <i>n</i> Pregnant mice	怀孕率/% Pregnancy rate	平均值± 标准差 $\bar{x} \pm s$	移植囊 胚数/ <i>n</i> Number of transfer blastocysts	出生数/ <i>n</i> Number of births	生存率/% Fertility rate	平均值±标准差 $\bar{x} \pm s$
C57BL/6J	5	3	60.00		75	18	24.00	
	5	3	60.00	(66.67±11.55)%	75	20	26.67	(26.67±2.67)%
	5	4	80.00		75	22	29.33	
ICR	5	4	80.00		75	30	40.00*	
	5	4	80.00	(80.00±0.00)%	75	25	33.33*	(38.67±4.81)%
	5	4	80.00		75	32	42.67*	
基因修饰 A Genetically modified A	5	4	80.00		75	23	30.67	
	5	3	60.00	(73.33±11.55)%	75	22	29.33	(32.00±3.53)%
	5	4	80.00		75	27	36.00	
基因修饰 B Genetically modified B	5	4	80.00		75	20	26.67	
	5	4	80.00	(80.00±0.00)%	75	23	30.67	(29.34±2.31)%
	5	4	80.00		75	23	30.67	

注:与 C57BL/6J 组相比,* $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the C57BL/6J group,* $P < 0.05$.



注:与 C57BL/6J 组相比,* $P < 0.05$ 。

图 4 不同胚胎类型移植效率比较

Note. Compared with the C57BL/6J group,* $P < 0.05$.

Figure 4 Comparison of efficiency at different embryo types

表 5 不同手术类型的移植数据
Table 5 Transfer data of different surgical types

手术类型 Surgical type	代孕鼠/ <i>n</i> Surrogate mice	怀孕鼠/ <i>n</i> Pregnant mice	怀孕率/% Pregnancy rate	平均值± 标准差 $\bar{x}\pm s$	移植囊胚数/ <i>n</i> Number of transfer blastocysts	出生数/ <i>n</i> Number of births	生存率/% Fertility rate	平均值± 标准差 $\bar{x}\pm s$
非手术移植	5	4	80.00		75	30	40.00	
Non-surgical transfer	5	4	80.00	(80.00±0.00)%	75	25	33.33	(38.67±4.81)%
	5	4	80.00		75	32	42.67	
手术移植	5	4	80.00		75	22	29.30	
Surgical transfer	5	5	100.00	(86.67±11.55)%	75	30	40.00	(36.00±5.82)%
	5	4	80.00		75	29	38.67	

3 讨论

非手术移植的方法最先在 1951 年被提出,但由于过低的植入率和妊娠率阻碍了其在胚胎移植上的应用^[15]。直到 2009 年, GREEN 等^[11]提出了一种非手术小鼠胚胎移植的新装置,这种方法基于在假孕雌鼠阴道内引入一次性锥形导管,将胚胎直接通过宫颈送入到小鼠的子宫角中,生存率达到 33%,提高了非手术移植效率。由此推进了非手术移植技术在胚胎移植中的应用,非手术移植器也不断得到改进^[16-18]。但这些国外研发可售的装置价格较高,作为实验室常用移植器将极大提高实验成本。本实验中使用了价格相对便宜的国产移植器,探讨国产移植器在不同移植实验中的应用。

在使用过程中发现,非手术移植器 B,使用移液枪将胚胎吸入移植器,有一定操作难度,且移液枪的吸样量是固定的,如果单次吸样时胚胎未全数吸入,需打出重新操作,可能影响胚胎质量。且控制移植器对准子宫颈口进入子宫颈操作对初学者也有一定难度。移植完成后一旦移液枪和子宫不在一条线上可能将胚胎带出,影响植入率,故使用此移植器需要更多操作练习。相比之下,非手术移植器 A 吸入胚胎以及进入子宫颈口更好操作,移植器轻便易上手。本研究使用的比较结果显示非手术移植器 A 组生存率为 46.11%,非手术移植器 B 组生存率为 18.89%。综上,后续实验选择非手术移植器 A。

使用非手术移植器只能移植一侧子宫,每次成功植入的胚胎数量较为重要,会对移植效率产生影响,优化的胚胎移植数量会减少假孕鼠和胚

胎的不必要浪费。在 2014 年, BIN ALI 等^[16]总结了 5 年的非手术移植效率数据,每只假孕鼠移植 12~20 枚胚胎,生存率为 21%~35%。2023 年有研究报道使用改进后的非手术移植器,每只假孕鼠移植 5~8 枚胚胎,着床率为 60.3%^[19]。本次实验中移植胚胎数分为 3 组,结果显示移植 15 枚生存率最高,移植效率最好,充分利用了假孕鼠和胚胎。

不同步发育是胚胎相关实验中经常遇到的问题,本研究观察了不同时期胚胎对移植效率的影响。2009 年的研究表明,桑葚阶段胚胎移植到子宫内生存率为 14.5%,在移植 166 枚二细胞到假孕鼠子宫内,仅有 1 只仔鼠出生^[11]。本研究移植了 225 枚桑葚胚到 15 只假孕鼠体内,仅有 23 只仔鼠出生。以上结果表明,在进行非手术子宫移植时,挑选使用囊胚期胚胎可保障一定的移植效率。

不同小鼠品系来源的胚胎以及不同品系的假孕鼠移植效率都会有所不同。有研究报道供体和假孕鼠均使用 ICR 小鼠时的移植产仔率最高可达 75.3%。而用 C57BL/6J 与 C3H F1/Hsd 杂交后代的胚胎供体移植到 ICR 假孕鼠体内的生存率为 33%^[16]。STEELE 等^[6]对非手术移植和手术移植方法进行比较同样也用了 ICR 小鼠做供体提供胚胎和假孕鼠。C57BL/6J 小鼠是目前用量最大的近交小鼠品系,并且近年来随着基因修饰小鼠的大量研制和广泛使用,很多实验需要进行基因修饰小鼠胚胎的子宫角移植,比较野生型小鼠和基因修饰小鼠非手术胚胎移植的效率将为该方法的更广泛应用提供数据支撑。因此,本实验选用 4 个品系 C57BL/6J、ICR、A 基因

修饰鼠、B 基因修饰鼠作为供体,假孕鼠均选择 ICR 小鼠。结果显示 ICR 小鼠作为供体鼠,生存率(38.67%)和怀孕率(80%)是 4 个品系中最高的。有研究报道使用 ICR 假孕鼠时,非手术移植器很难进入子宫角内,选用更瘦更安静的 B6CBAF1/OlaHsd 假孕鼠,5 年的数据总结生存率最高可达 35%^[16]。因此小鼠品系的选择还要结合具体实验和实验室的实际情况。本实验选用两种基因修饰小鼠模型进行移植,结果显示 A 基因修饰鼠和 B 基因修饰鼠在生存率和怀孕率上相差不大,且效率与相同背景的 C57BL/6J 小鼠接近。该结果说明对于没有产生显著的生殖或胚胎发育不良表型的基因修饰小鼠,利用非手术胚胎移植方法效率有所保障。

为了减少人为操作因素对实验结果的影响,研究中非手术移植操作由本中心具有两年和半年净化移植等操作经验的两名技术人员完成,非手术移植操作经过约 1 周的练习后即开展本研究,两人的移植操作以及操作后的怀孕率和出生率无显著差异。非手术移植操作时的注意要点有:①质量合格的胚胎与供体鼠准备,以及达标的小鼠饲养条件;②吸入移植器内液体 5~10 μL 为益,否则可能影响胚胎植入和着床;③移植器进入操作舒缓且深度适当,过深或过浅会影响植入效果;④器械无菌,避免造成小鼠感染;⑤移植后小鼠需保温、添加做窝材料、保证饲养环境安静。

目前胚胎移植应用最广泛的方法是手术移植,但手术移植程序繁琐,不利于假孕鼠的福利保障^[20-23]。相比手术移植,非手术移植方法大大降低了手术移植胚胎所带来的疼痛和痛苦,消除了手术和术后恢复以及感染等潜在并发症的风险,并减少了术后伤口恢复的时间^[24-25]。非手术移植技术相比手术移植技术操作简单^[24-26],对实验人员的操作要求相对低^[27-29]。研究表明手术和非手术移植效率相差不大,本研究结果也显示非手术实验组和手术实验组生存率和怀孕率均无显著差异。综上,非手术移植方法可广泛应用于小鼠胚胎移植操作与相关研究中。

参考文献:

[1] BOCKAMP E, MARINGER M, SPANGENBERG C, et al.

Of mice and models; improved animal models for biomedical research [J]. *Physiol Genomics*, 2002, 11(3): 115-132.

[2] CAPECCHI M R. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century [J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(6): 507-512.

[3] STONE B J, STEELE K H, FATH-GOODIN A. A rapid and effective nonsurgical artificial insemination protocol using the NSETTM device for sperm transfer in mice without anesthesia [J]. *Transgenic Res*, 2015, 24(4): 775-781.

[4] BURCKHARDT H A. Incorporation of analgesics into rodent embryo transfer protocols: assessing the effects on reproductive outcomes. [D]. Texas: A and M University, 2006.

[5] NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE ON RECOGNITION AND ALLEVIATION OF PAIN IN LABORATORY ANIMALS. Recognition and alleviation of pain in laboratory animals [M]. Washington, D. C. National Academies Press, 2009.

[6] STEELE K H, HESTER J M, STONE B J, et al. Nonsurgical embryo transfer device compared with surgery for embryo transfer in mice [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2013, 52(1): 17-21.

[7] 王苗苗, 张静, 陆晓雨, 等. 小鼠非手术胚胎移植技术 [A]. 第十六届中国实验动物科学年会论文集 [C]; 2023.

WANG M M, ZHANG J, LU X Y, et al. Non-surgical embryo transfer technology in mice [A]. *Proceedings of the 16th Annual Conference of Chinese Laboratory Animal Science* [C]; 2023.

[8] RICHARDSON C A, FLECKNELL P A. Anaesthesia and post-operative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: are we making progress? [J]. *Altern Lab Anim*, 2005, 33(2): 119-127.

[9] STOKES E L, FLECKNELL P A, RICHARDSON C A. Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures [J]. *Lab Anim*, 2009, 43(2): 149-154.

[10] RUSSELL W M S, BURCH R L. The principles of humane experimental technique [M]. London (UK): Methuen, 1959.

[11] GREEN M, BASS S, SPEAR B. A device for the simple and rapid transcervical transfer of mouse embryos eliminates the need for surgery and potential post-operative complications [J]. *Biotechniques*, 2009, 47(5): 919-924.

[12] ABELSON K S P, ADEM B, ROYO F, et al. High plasma corticosterone levels persist during frequent automatic blood sampling in rats [J]. *In Vivo*, 2005, 19(5): 815-819.

[13] CUI L, ZHANG Z, SUN F, et al. Transcervical embryo

- transfer in mice [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2014, 53 (3): 228-231.
- [14] LAMASS, FRANQUINHOF, MORGADO M, et al. C57BL/6J and B6129F1 embryo transfer: unilateral and bilateral transfer, embryo number and recipient female background control for the optimization of embryo survival and litter size [J]. Animals (Basel), 2020, 10(8): 1424.
- [15] BEATTY R A. Transplantation of mouse eggs [J]. Nature, 1951, 168(4284): 995.
- [16] BIN ALI R, VAN DER AHÉ F, BRAUMULLER T M, et al. Improved pregnancy and birth rates with routine application of nonsurgical embryo transfer [J]. Transgenic Res, 2014, 23(4): 691-695.
- [17] 蒋瑞, 刘若男, 苗艳平, 等. 影响小鼠非手术胚胎移植技术的因素 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, 68(21): 75-78, 293.
- JIANG R, LIU R N, MIAO Y P, et al. Factors affecting non-surgical embryo transfer technology in mice [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2017, 68 (21): 75 - 78, 293.
- [18] TARKOWSKI A K. Experimental studies on regulation in the development of isolated blastomeres of mouse eggs [J]. Acta Theriol, 1959, 3: 191-267.
- [19] 王苗苗, 王浩洋, 张静, 等. 小鼠非手术胚胎移植器及移植技术改进 [J]. 解剖学杂志, 2023, 46(1): 15-19.
- WANG M M, WANG H Y, ZHANG J, et al. Improving the transcervical embryo transfer devices and transfer technology of mice [J]. Chin J Anat, 2023, 46(1): 15-19.
- [20] 王芊芊, 刘迪文, 洪胜辉, 等. 小鼠生物净化技术平台的设计、运行及维护 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33 (8): 122-126.
- WANG Q Q, LIU D W, HONG S H, et al. Design, operation, and maintenance of the technology platform of mouse rederivation [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(8): 122-126.
- [21] WATANABEN, HIROSEM, HASEGAWAA, et al. Derivation of embryonic stem cells from wild-derived mouse strains by nuclear transfer using peripheral blood cells [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 11175.
- [22] STONEB J, SRODULSKIS J. Inducing pseudopregnancy in female mice without the need for vasectomized males prior to non-surgical embryo transfer or artificial insemination [J]. JVis Exp, 2023, 197: 10.3791/65477.
- [23] CHRISTODOULAKIA, HEH, ZHOU M, et al. Pronuclear transfer rescues poor embryo development of *in vitro*-grown secondary mouse follicles [J]. Hum Reprod Open, 2024, 2024(1): hoae009.
- [24] ZURLO J, RUDACILLE D, GOLDBERG A M. The three Rs: the way forward [J]. Environ Health Perspect, 1996, 104(8): 878-880.
- [25] KRUEGER K L, FUJIWARA Y. The use of buprenorphine as an analgesic after rodent embryo transfer [J]. Lab Anim (NY), 2008, 37(2): 87-90.
- [26] MAHABIR E, BAUER B, SCHMIDT J. Rodent and germplasm trafficking: risks of microbial contamination in a high-tech biomedical world [J]. ILAR J, 2008, 49(3): 347-355.
- [27] CHARLES OSTERMEIER G, WILES M V, FARLEY J S, et al. Conserving, distributing and managing genetically modified mouse lines by sperm cryopreservation [J]. PLoS One, 2008, 3(7): e2792.
- [28] SHAW J M, NAKAGATA N. Cryopreservation of transgenic mouse lines [J]. Methods Mol Biol, 2002, 180: 207-228.
- [29] 高晓茜, 陈培勇, 张帅, 等. 小鼠非同步胚胎移植技术 [J]. 解剖学杂志, 2019, 42(2): 111-115.
- GAO X Q, CHEN P Y, ZHANG S, et al. Asynchronous embryo transfer technique in mice [J]. Chin J Anat, 2019, 42(2): 111-115.

[收稿日期]2024-10-15

张心仪,蔡宏文. 神经纤毛蛋白-1 在动脉粥样硬化中的作用机制研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(4): 97-103.

Zhang XY, Cai HW. Research progress on mechanisms of neuropilin-1 in atherosclerosis [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 97-103.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.010

神经纤毛蛋白-1 在动脉粥样硬化中的作用机制研究进展

张心仪¹, 蔡宏文^{2*}

(1. 浙江中医药大学第一临床医学院, 杭州 310053; 2. 浙江省中医院心血管内科, 杭州 310006)

【摘要】 动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是冠心病的主要病理基础,对其进程的干预对于冠心病的预防和治疗具有重要意义。神经纤毛蛋白-1(neuropilin-1, NRP1)属于 neuropilin 受体家族,与包括血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)在内的多种生长因子关系密切。NRP1 通过其在血管生成、炎症反应和血管内皮壁面剪切应力感受等过程中发挥的重要作用影响 AS 进程。因此,深入探索 NRP1 在 AS 中的作用机制,开发针对 NRP1 的靶向治疗策略,将为 AS 的诊断和治疗提供新的思路。

【关键词】 动脉粥样硬化;神经纤毛蛋白-1;血管内皮生长因子;转化生长因子 β ;壁面剪切应力

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0097-07

Research progress on mechanisms of neuropilin-1 in atherosclerosis

ZHANG Xinyi¹, CAI Hongwen^{2*}

(1. the First Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China.

2. Department of Cardiology, Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006)

【Abstract】 Atherosclerosis is the main pathological basis of coronary heart disease, and is thus of great importance in terms of the prevention and treatment of coronary heart disease. Neuropilin-1 (NRP1), a member of the neuropilin receptor family, is closely associated with various growth factors, including vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor- β (TGF- β). NRP1 influences the progression of atherosclerosis through its crucial roles in angiogenesis and inflammatory responses, and sensing of wall shear stress on the vascular endothelium. This review thus explores the mechanisms underlying the role of NRP1 in atherosclerosis and the development of NRP1-targeted therapeutic strategies, to provide new insights into the diagnosis and treatment of atherosclerosis.

【Keywords】 atherosclerosis; neuropilin-1; vascular endothelial growth factor; transforming growth factor-beta; wall shear stress

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

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81973579)。

【作者简介】 张心仪(2001—),男,在读硕士研究生,研究方向:冠心病基础与临床。E-mail:zhangxinyi4202@163.com

【通信作者】 蔡宏文(1978—),男,博士,主任医师,硕士生导师,研究方向:冠心病基础与临床。E-mail:chwzju2002@163.com

冠心病作为全球范围内最常见的循环系统疾病之一,近年来发病率持续上升,给我国社会经济造成了巨大负担。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是冠心病的主要病理基础,干预 AS 进程对防治冠心病具有重要意义。在 AS 发生发展中,内皮细胞的炎症损伤导致的功能障碍与新生血管影响斑块稳定性被重点关注。神经纤毛蛋白-1(neuropilin-1, NRP1)通过调控血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)等信号传导间接调控 AS 进程。最近,NRP1 还被发现参与对血管内皮壁面剪切应力的响应。本文拟对 NRP1 在 AS 的调控机制的研究现状及进展作一综述。

1 NRP1 概述

神经纤毛蛋白是分子量 130~140 kDa 的非酪氨酸激酶跨膜糖蛋白,分为 NRP1 和 NRP2。NRP1 和 NRP2 分别由独立染色体上的两个不同基因 10p12 和 2q34 编码,其氨基酸序列同源性为 44%。NRP1 于 1987 年在非洲爪蟾中作为一种被称为 A5 的黏附分子而首次被发现,其首先被确认为神经轴突导向因子 3(Semaphorin3, Sema3)的特异性受体,随后也被发现能与多种生长因子及受体结合^[1-2]。NRP1 在血管生成过程中能响应不同的配体以调节一系列下游信号通路,因此在血管的发育中被广泛研究^[3]。NRP1 的分子量为 130 kDa,由 923 个氨基酸组成,其跨膜形式由 17 个外显子编码,基本结构分为 3 个区域,分别为长的 N 端细胞外结构域,单程跨膜结构域和短的细胞质结构域。细胞外结构域又分为 3 个子域,分别为 2 个 CUB 结构域(a1/a2 结构域)、2 个凝血因子 V/VIII 结构域(b1/b2 结构域)和 MAM 结构域(c 结构域)^[4]。

NRP1 作为一种多功能受体,由多种细胞类型表达,包括神经元、内皮细胞、平滑肌细胞、心肌细胞和免疫细胞等,其生理作用是在神经轴突生长、血管新生、肿瘤发展、免疫应答中调节各配体的活性以诱导细胞内信号,并主要通过 VEGF、TGF- β 等多种配体相互作用来介导细胞内信号传导。近年来,NRP1 在肿瘤生物学、神经退行性疾病及病毒感染(如 SARS-CoV-2 入侵)中的

病理作用受到广泛关注,成为潜在的治疗靶点,靶向 NRP1 的药物研发也在逐步推进^[5-6]。此外,NRP1 在心血管病领域扮演多重角色,如通过促进心肌成纤维细胞的活化和细胞外基质的过度沉积,加剧心肌纤维化的进展^[7]。NRP1 在 AS 中的作用主要涉及斑块形成、内皮细胞迁移和血管重塑等过程。首先,NRP1 通过调节血管平滑肌细胞的迁移和增殖影响斑块的形成。其次,通过调节 TGF- β 信号通路和剪切应力响应,NRP1 有助于维持内皮细胞的稳态,减少炎症反应,从而对 AS 起到保护作用。再者,它还通过与 VEGF 相互作用,调控内皮细胞的迁移和血管生成,这是 AS 早期内皮修复和新生血管形成的关键过程。目前的一些研究显示 NRP1 有望成为 AS 治疗中的潜在靶点,但针对 NRP1 的治疗策略仍需要考虑到其不同细胞类型中的多种功能^[8]。

2 NRP1 参与 AS 斑块形成

2.1 AS 斑块形成的炎症因素

AS 是一种慢性系统性炎症疾病,其特征是血脂和炎症免疫细胞在血管内膜的积累。AS 斑块的炎症过程通常始于内皮细胞功能障碍,导致低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)进入血管壁并氧化为 ox-LDL,触发局部的炎症反应。巨噬细胞吞噬 ox-LDL 形成泡沫细胞,释放促炎细胞因子,进一步加剧炎症^[9]。在此过程中,Semaphorins、TGF- β 这些细胞因子成为间接调控炎症的因素。Semaphorins 是一类最初在神经系统中发现的轴突引导分子,最近发现其在调控免疫反应和炎症过程中发挥着复杂的作用。Sema4D 和 Sema7A 分别通过促进血小板活化和白细胞黏附加剧了 AS 的发展;相反,Sema3A 能够抑制白细胞滚动、黏附和迁移到亚内皮层,减少炎症反应,从而抑制 AS 的发展^[10]。TGF- β 是循环系统中一种重要的细胞因子,通过调节脂质聚集、炎细胞浸润及血管平滑肌和内皮功能等,参与调控 AS 的发生^[11]。在血管内膜,TGF- β 信号通路激活后引发内皮-间质转化导致内皮功能障碍,而内皮 TGF- β 受体敲除可使促炎症黏附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达以及白细胞浸润减少,降低高胆固醇血症条件下斑块进展的速度,并诱导已建立的 AS 病变的消退^[12]。在血管外膜

处, TGF- β 诱导成纤维细胞转化为肌成纤维细胞, 从而使其可迁移至受损的血管内膜处, 参与血管外膜炎症反应及血管重构^[13]。另一方面, TGF- β 是诱导调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 形成和维持其功能的关键因子^[14]。Tregs 在心血管炎症疾病的解决中发挥着关键作用, Tregs 数量的增加是 AS 斑块收缩的一个共同特征^[15]。因此, TGF- β 在 AS 中具有双向调节作用, 激活不同下游通路可选择性促进或抑制炎症表达。

2.2 NRP1 调节炎症信号传导

NRP1 通过其 a1/a2 结构域结合 Sema3 家族成员^[16]。在软骨细胞中, Sema3A 通过抑制 Akt、ERK 和 NF- κ B 等炎症相关通路, 减少炎症基因表达, 进而发挥抗炎作用^[17]。干扰 NRP-1 会减弱 Sema3A 过表达对脂多糖诱导的炎症、凋亡和细胞外基质降解的改善作用, 表明 NRP-1 在 Sema3A 发挥抗炎作用中起着协同作用^[18]。然而在角质形成细胞中, NRP1 的表达与角质形成细胞的增殖状态密切相关, 当 NRP1 与 Sema3A 结合时, 可以促进 NF- κ B 从细胞质中的抑制状态释放出来, 激活 NF- κ B 信号通路, 从而调节与细胞增殖和炎症反应相关的基因表达^[19]。因此, NRP1 的多向调节机制可由不同细胞类型所决定。

NRP1 作为 TGF- β 的高亲和力受体介导血管内皮细胞炎症与平滑肌细胞的增殖、迁移。一般来说 TGF- β 以非活性状态存在于细胞内, 是一个活性 TGF- β 分子和一个潜伏相关肽 (latency associated peptide, LAP) 组成的较长的前体肽。LAP 通过保持 TGF- β 1 处于潜伏状态, 使 TGF- β 1 免受过早降解, 确保其在需要的时间和地点被激活^[20]。NRP1 是潜伏和活性 TGF- β 1 的高亲和力受体, 其 b1 结构域中带负电荷的裂缝能与 LAP 的氨基末端结合, 体外实验证实了 NRP1 能够通过结合 LAP-TGF- β 1, 将传统的 CD4⁺CD25⁻T 细胞 (非调节性 T 细胞) 转化为具有调节性 T 细胞活性的细胞, 这意味着 NRP1 在 Tregs 的分化中可能起到关键作用, 从而协助炎症解决^[21]。然而, NRP1 的表达也促进了 CD4⁺T 细胞在主动脉中的募集, 这些细胞可能通过产生促炎细胞因子如 IFN- γ , 从而加剧 AS 的进展^[22]。

NRP1 可以作为调节 TGF- β 信号传导的正或

负调节因子而发挥作用。首先, NRP1 作为 TGF- β 的受体, 可以通过直接结合 TGF- β 或激活其潜伏形式, 改善 TGF- β 配体对其受体的呈递。WANG 等^[23]发现 NRP1 在心脏和血管平滑肌细胞中通过调控线粒体的稳态发挥心脏保护作用, NRP1 通过促进 TGF- β /Smad2 信号传导来抑制 PPAR γ 和 PGC1 α 的表达, 进而控制炎症反应, NRP1 缺失与降低 TGF- β 通路下游效应物的表达有关。其次, 非内皮细胞中 NRP1 通过结合 TGF- β 受体复合物, 提高受体对 TGF- β 的亲合力或增强 TGF- β 受体的稳定性, 从而促进 TGF- β 受体的活化以及其下游信号的传导, 如 NRP1 通过与 TGF- β R2 结合, 促进 Smad 信号传导, 诱导内皮间质转化^[24]。在没有 TGF- β 1 的情况下 NRP1 可以将 TGF- β R1 和 TGF- β R2 连接在一起, 形成一个桥梁, 这种桥接作用有助于受体复合体的形成, 并增加信号传导的效率^[25]。另一方面, 在内皮细胞中情况则完全相反, NRP1 通过稳定细胞间连接中的血管内皮钙黏蛋白 (VE-cadherin, VE-cad) 抑制 TGF- β 信号, 这种抑制作用有助于防止内皮细胞的激活和炎症反应。BOSSEBOEUF 等^[26]通过体内外的双重实验, 利用血流动力学模拟并进行炎症反应监测, 发现 NRP1 能在层流下促进 VE-cad 与 p120 catenin 的结合, 从而维持黏附连接的完整性, 并与 TGF- β R2 形成复合物, 抑制 TGF- β 下游信号传导。NRP1 的下调会促进炎症附着蛋白的表达并诱导白细胞与内皮相互作用, 从而增加内皮的活性和炎症, 表明内皮 NRP1 能发挥抗炎作用抑制 AS 发生^[25]。在载脂蛋白缺乏的高脂血症小鼠中, 遗传性缺乏 NRP1 的内皮细胞增加了白细胞滚动和 AS 斑块的沉积也证实了这一点^[26]。

总之, NRP1 与 TGF- β 相互作用的细胞背景在决定下游信号传导结果中起着关键作用。在血管平滑肌细胞和心肌细胞中, NRP1 是 TGF- β 信号传导的正调节因子; 而在内皮细胞中, NRP1 作为 TGF- β 信号传导的负调节因子而发挥作用。内皮细胞功能障碍和平滑肌细胞增殖、迁移均发生在 AS 的早期阶段, 导致慢性炎症环境。靶向 NRP1 调控 TGF- β 信号传导使内皮细胞具有抗炎特性, 有助于防治 AS 病变进展。

3 NRP1 参与 AS 斑块血管重塑

3.1 AS 中的血管损伤与血管新生

血管损伤通常始于 AS 早期,导致 LDL 渗透、氧化及泡沫细胞形成,激发局部炎症并加速斑块的形成。随着斑块的增大和不稳定性增加,斑块可能破裂并进一步引发血栓形成,损害血管。而血管新生则是斑块内部微血管的形成,它在初期促进斑块内的养分和氧气供应,但过度新生的脆弱血管容易破裂,导致斑块出血并加剧炎症反应,增加血管闭塞的风险,所以斑块中的新生血管增加了斑块的不稳定性^[27]。VEGF 普遍被认为具有增加血管通透性和促进血管形成等作用,其中 VEGF-A 起介导血管生成的主要作用从而成为治疗 AS 的靶点,NRP1 通过调节 VEGF 参与血管重塑^[28]。VEGF-A 通过激活血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)-2,引发 VEGFR-2 的自磷酸化,进而启动多种信号分子的招募,通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导内皮一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的活化,其生成的 NO 有助于促进内皮细胞增殖和迁移,抑制血小板聚集和凝血,同时引起血管舒张,降低 AS 的发生风险^[29]。然而,这一过程也可能增加新生血管的生成,病理性新生血管可加速 AS 斑块的发展,增强斑块的不稳定性,甚至诱发 AS 斑块破裂^[27]。

3.2 NRP1 调节 VEGF 信号传导

NRP1 作为 VEGF 的共受体促进血管生成信号传导,参与动脉内皮功能调节。NRP1 或直接与促血管生成因子如 VEGF-A 结合,或与酪氨酸激酶受体 VEGFR-1、VEGFR-2 结合形成复合物,这种结合均有助于增强 VEGF-A 诱导的血管内皮细胞迁移和 VEGF 信号效应分子如 Akt、ERK1/2 和 p38 MAPK 激酶的磷酸化^[30]。NRP1 与 VEGF 及其同源物的相互作用主要通过其 b1 和 b2 结构域实现,其中 b1 是关键;NRP1 与 VEGF 受体结合则通过 c 结构域的 PDZ 蛋白实现,NRP1 分子发生二聚化和多聚化后与 VEGF 受体络合,从而作为 VEGF 的共受体,增强 VEGF 受体激活后的信号传导^[16]。与 NRP1 的相关性研究目前主要集中于 VEGF-A 和 VEGFR-2,最近也有文献报道

了 NRP1 与 VEGF-B、VEGFR-1 的作用机制。

NRP1 与 VEGF-A 结合可增强 VEGFR-2 激活后的信号传导,发挥血管生成作用。抑制 NRP1 与 VEGF-A 的结合可作为治疗癌症的潜在靶点,并已被用于开发新型抗癌药物^[31]。然而对 AS 治疗来说,精确调控 NRP1 和 VEGF-A 的活性,以确保在减少病理性血管生成的同时,不妨碍血管的修复和再生能力,平衡血管生成与斑块稳定则可能极具挑战。VEGF-B 能够通过激活 Akt 信号通路保护心肌细胞,减少缺血再灌注损伤,VEGF-B 衍生肽类可以作为心肌保护剂,用于治疗心肌梗死或其他形式的缺血性心脏病^[32]。最近研究发现,VEGF-B 衍生的含有 C 端精氨酸的肽表现出对 NRP1 的 b1 结构域的强结合能力,且亲和力高于相应的 VEGF-A 区域,为 VEGF-B/NRP1 信号通路的研究提供了新思路^[33]。VEGF 受体在细胞表面和细胞内分布不均匀,细胞表面的 VEGFR-1 百分比非常低,而 VEGFR-2 在细胞内外是平衡的,这影响了两者与 NRP1 的结合效率^[34]。选择性消除 VEGF-NRP1 结合的突变小鼠系虽然降低了 VEGFR-2 表面表达却仍具有正常血管系统,表明在 VEGF 介导的血管发育中,NRP1 的功能是相对独立的,NRP1 作为 VEGFR2 的共受体,通过控制 VEGFR2 在细胞表面的量来调控血管生成^[35]。SHARMA 等^[36]通过对表达不同受体的小鼠胚胎内皮细胞的培养,发现 NRP1 与 VEGFR-2 的结合可能是由内皮糖蛋白(endoglin, ENG)的桥接形成三聚体复合物而实现的,ENG 和 NRP1 对于 VEGF-A 介导的 VEGFR2 和 ERK1/2 磷酸化至关重要,实现了血管生成信号传导的最大效应。同时,NRP1 直接与 VEGFR-1 相互作用,但这种相互作用与 NRP1 对 VEGF-A 的结合竞争,不会增强 VEGFR-1 的激活,靶向 NRP1 与 VEGFR-1 结合可发挥抗血管生成活性^[37]。

综上所述,NRP1 可以放大 VEGF 的生物学效应,并在促进血管生成、内皮细胞迁移和增殖等过程中发挥作用。在生理情况下,这些功能对于维持心血管稳态至关重要;在病理情况下,这种作用也可能增加血管通透性,导致脂质、炎症因子和免疫细胞更容易进入血管壁,促进 AS 的形成。

4 NRP1 参与 AS 血管内皮壁面剪切应力的响应

4.1 壁面剪切应力在 AS 斑块中的作用

血管内皮细胞与血液直接接触,因此感知不同的血流模式,血液流动对血管壁产生的摩擦力称为壁面剪切应力。AS 的特征是脂质在动脉壁内的沉积、局部炎症反应、内皮功能的损伤、动脉壁结构的改变以及斑块的形成和破裂等,且好发于动脉分叉及弯曲处。斑块处的血流动力学变化也会影响其稳定性,过大的机械应力可加速纤维帽的破裂。血管内皮的屏障功能是维持血管内稳态的关键,复杂血流动力学通过改变内皮通透性影响细胞内外侧的物质交换^[38]。壁面剪切应力的改变影响血管功能,通过白细胞黏附迁移、血栓形成、脂质积聚和内皮-间充质转化,介导 AS 的发生发展^[39]。一般认为,长期暴露于低剪切应力和振荡的剪切应力会导致内皮细胞功能障碍发挥致 AS 作用,而高剪切应力则维持血管内皮稳态发挥 AS 保护作用。然而在 AS 斑块进一步发展时,高剪切应力同时可以通过诱导纤维帽变薄促进易损斑块的形成并加速已形成斑块的破裂^[40]。

4.2 NRP1 参与感受壁面剪切应力

NRP1 在促进内皮和血管稳态中起着关键作用。在内皮细胞中,存在各类感知剪切应力的机械感受复合物以调节血管重构,如由血小板内皮细胞黏附分子-1、VE-cad 和 VEGFR2 组成的分子复合物。MEHTA 等^[41]发现了一种新型剪应力感受器导向受体神经丛蛋白 D1 (plexin D1, PLXND1),其在内皮细胞中具有重要作用,且能够通过两种不同的分子构象实现作为配体或力感受器的双重功能。PLXND1 与 NRP1 和 VEGFR2 形成多聚体机械感受复合物,该复合物在短期暴露于层流剪切应力下传导信号,能够激活包括 Akt、ERK1/2 和 eNOS 在内的关键信号通路,这些信号通路对于维持血管内皮的稳态、促进抗炎转录因子的表达以及抑制炎症基因的激活至关重要,进而有助于血管健康和 AS 的预防。此外,PLXND1/NRP1/VEGFR2 复合物还可以感受振荡剪切应力诱导 M1 巨噬细胞极化,分泌炎症细胞因子和基质金属蛋白酶,参与调节 AS 斑

块位点的特异性分布^[42],这解释了 AS 优先发生在血流紊乱分叉处的现象。同时,BOSSEBOEUF 等^[26]发现,暴露于生理的、AS 保护的剪切应力会增加内皮细胞中 NRP1 的表达并促进内皮细胞对层流剪切流方向的调整,从而发挥保护性的、抗炎症的层流的效应。暴露于高剪切应力层流中,NRP1 作为黏附连接的一部分,增加和 VE-cad 的相互作用,促进了内皮细胞黏附连接的稳定性,阻止内皮细胞活化,发挥抗 AS 作用。总之,这些新的研究表明 NRP1 在维持内皮细胞屏障功能和血管稳态中起着关键作用,这些机械感受信号有助于保护血管内皮免受 AS 的侵害。

5 结语

AS 是全球范围内主要的心血管疾病致死原因之一,研究 AS 的发生机制对于实现更精确的疾病干预具有重要意义。NRP1 在 AS 的发生和进展中扮演着重要角色,其与不同配体之间的相互作用已初见端倪。NRP1 通过与 VEGF、TGF- β 配体及其受体的单独或联合调控作用以及与 PLXND1 结合形成机械感受复合物,间接调控 AS 中的血管生成和炎症反应,贯穿了 AS 斑块的形成到稳定。总体而言,NRP1 单独作用 VEGF、TGF- β ,分别发挥内皮增殖与抗炎作用,NRP1 结合 Sema3A 在 AS 炎症反应中的具体作用尚不明确。而从结合位点上看,NRP1 的 b1 结构域含关键氨基酸,能同时介导 VEGFA 和 TGF- β 1 并由此发挥联合调控作用,这一过程释放下游调控因子如 Akt,激活 eNOS 产生关键血管舒张因子,保护内皮细胞,改善 AS,但也存在促进病理性新生血管生成的风险。因此,靶向 NRP1 发挥 AS 保护作用和抗炎功能需考虑其产生的总体影响,某些功能的意外抑制将对组织和血管稳态有害。然而,目前有关 NRP1 的研究主要聚焦于肿瘤学,直接调控 AS 的相关研究较少。靶向 NRP1 有望成为一种早期干预 AS 的治疗策略或评估 AS 严重程度的有效手段。据此,仍需进一步进行细胞及动物实验,深入挖掘 NRP1 在不同细胞背景下的具体机制,特别是其在血管内皮、平滑肌细胞和免疫细胞中的作用,从而为开发有效的以 NRP1 为靶点的药物提供更为坚实的理论依据。

参考文献:

- [1] TAKAGI S, TSUJI T, AMAGAI T, et al. Specific cell surface labels in the visual centers of xenopus laevis tadpole identified using monoclonal antibodies [J]. *Dev Biol*, 1987, 122(1): 90–100.
- [2] RAIMONDI C, BRASH J T, FANTIN A, et al. NRP1 function and targeting in neurovascular development and eye disease [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2016, 52: 64–83.
- [3] GIOELLI N, NEILSON L J, WEI N, et al. Neuropilin 1 and its inhibitory ligand mini-tryptophanyl-tRNA synthetase inversely regulate VE-cadherin turnover and vascular permeability [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4188.
- [4] BROZ M, KOLARIĆ A, JUKIĆ M, et al. Neuropilin (NRPs) related pathological conditions and their modulators [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8402.
- [5] CANTUTI-CASTELVETRI L, OJHA R, PEDRO L D, et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity [J]. *Science*, 2020, 370(6518): 856–860.
- [6] ZHAO Z, WANG J, LIU M, et al. Neuropilin-1-target self-assembled peptide nanoparticles contribute to tumor treatment by inducing pyroptosis [J]. *BMC Cancer*, 2025, 25(1): 413.
- [7] MATILLA L, ARRIETA V, JOVER E, et al. Soluble St2 induces cardiac fibroblast activation and collagen synthesis *via* neuropilin-1 [J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1667.
- [8] LI Y, LI D, LIN J, et al. Proteomic signatures of type 2 diabetes predict the incidence of coronary heart disease [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2025, 24(1): 120.
- [9] SOEHNLEIN O, LIBBY P. Targeting inflammation in atherosclerosis—from experimental insights to the clinic [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(8): 589–610.
- [10] NAKANISHI Y, KANG S, KUMANOGOH A. Axon guidance molecules in immunometabolic diseases [J]. *Inflamm Regen*, 2022, 42(1): 5.
- [11] LI X, WANG J, WU C, et al. microRNAs involved in the TGF- β signaling pathway in atherosclerosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 146: 112499.
- [12] CHEN P Y, QIN L, LI G, et al. Endothelial TGF- β signalling drives vascular inflammation and atherosclerosis [J]. *Nat Metab*, 2019, 1(9): 912–926.
- [13] 韩淑娟, 王春森, 李玉洁, 等. 血管外膜炎症在动脉粥样硬化中的作用及研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(9): 114–119, 126.
HAN S X, WANG C M, LI Y J, et al. Role and research advances of vascular adventitial inflammation in atherosclerosis [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(9): 114–119, 126.
- [14] 周凤华, 程赛博, 张宇, 等. 黄连解毒汤通过调节性 T 细胞产生抗动脉粥样硬化作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(3): 233–238.
- [15] ZHOU F H, CHENG S B, ZHANG Y, et al. Anti-atherosclerotic effect of a Chinese medicine, Huanglian Jiedu Decoction, mediated by regulatory T cells [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2016, 24(3): 233–238.
- [16] SHARMA M, SCHLEGEL M P, AFONSO M S, et al. Regulatory T cells license macrophage pro-resolving functions during atherosclerosis regression [J]. *Circ Res*, 2020, 127(3): 335–353.
- [17] PELLET-MANY C, FRANKEL P, JIA H, et al. Neuropilins: structure, function and role in disease [J]. *Biochem J*, 2008, 411(2): 211–226.
- [18] SUMI C, HIROSE N, YANOSHITA M, et al. Semaphorin 3A inhibits inflammation in chondrocytes under excessive mechanical stress [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 5703651.
- [19] ZHANG H, LU Y, WU B, et al. Semaphorin 3A mitigates lipopolysaccharide-induced chondrocyte inflammation, apoptosis and extracellular matrix degradation by binding to Neuropilin-1 [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 9641–9654.
- [20] NAGY N. NRP1 activates NF- κ B signaling pathway and initiates proliferation in keratinocytes [J]. *Int J Genomic Med*, 2013, 1(1): 1000102.
- [21] LI Y, FAN W, LINK F, et al. Transforming growth factor β latency: a mechanism of cytokine storage and signalling regulation in liver homeostasis and disease [J]. *JHEP Rep*, 2022, 4(2): 100397.
- [22] GLINKA Y, PRUD' HOMME G J. Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity [J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 84(1): 302–310.
- [23] GADDIS D E, PADGETT L E, WU R, et al. Neuropilin-1 expression on CD4 T cells is atherogenic and facilitates T cell migration to the aorta in atherosclerosis [J]. *J Immunol*, 2019, 203(12): 3237–3246.
- [24] WANG Y, CAO Y, YAMADA S, et al. Cardiomyopathy and worsened ischemic heart failure in SM22- α cre-mediated neuropilin-1 null mice: dysregulation of PGC1 α and mitochondrial homeostasis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(6): 1401–1412.
- [25] DING Z, DU W, LEI Z, et al. Neuropilin 1 modulates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer [J]. *Int J Oncol*, 2020, 56(2): 531–543.
- [26] CHIKH A, RAIMONDI C. Endothelial Neuropilin-1: a multifaced signal transducer with an emerging role in inflammation and atherosclerosis beyond angiogenesis [J]. *Biochem Soc Trans*, 2024, 52(1): 137–150.

- [26] BOSSEBOEUF E, CHIKH A, CHAKER A B, et al. Neuropilin-1 interacts with VE-cadherin and TGFBR2 to stabilize adherens junctions and prevent activation of endothelium under flow [J]. *Sci Signal*, 2023, 16(786): eabo4863.
- [27] DUDLEY A C, GRIFFIOEN A W. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Angiogenesis*, 2023, 26(3): 313–347.
- [28] DABRAVOLSKI S A, KHOTINA V A, OMELCHENKO A V, et al. The role of the VEGF family in atherosclerosis development and its potential as treatment targets [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(2): 931.
- [29] 田静, 马英杰, 王鹏, 等. 血管内皮功能障碍及其评估技术 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(7): 130–140.
TIAN J, MA Y J, WANG P, et al. Vascular endothelial dysfunction and its functional assessment [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(7): 130–140.
- [30] BOSSEBOEUF E, RAIMONDI C. Signalling, metabolic pathways and iron homeostasis in endothelial cells in health, atherosclerosis and Alzheimer's disease [J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2055.
- [31] KO J H, KWON H S, KIM B, et al. Preclinical efficacy and safety of an anti-human VEGFA and anti-human NRP1 dual-targeting bispecific antibody (IDB0076) [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(6): 919.
- [32] RÄSÄNEN M, SULTAN I, PAECH J, et al. VEGF-B promotes endocardium-derived coronary vessel development and cardiac regeneration [J]. *Circulation*, 2021, 143(1): 65–77.
- [33] MOTA F, YELLAND T, HUTTON J A, et al. Peptides derived from vascular endothelial growth factor B show potent binding to neuropilin-1 [J]. *Chembiochem*, 2022, 23(1): e202100463.
- [34] SARABIPOUR S, KINGHORN K, QUIGLEY K M, et al. Trafficking dynamics of VEGFR1, VEGFR2, and NRP1 in human endothelial cells [J]. *PLoS Comput Biol*, 2024, 20(2): e1011798.
- [35] GELFAND M V, HAGAN N, TATA A, et al. Neuropilin-1 functions as a VEGFR2 co-receptor to guide developmental angiogenesis independent of ligand binding [J]. *eLife*, 2014, 3: e03720.
- [36] SHARMA S, EHRLICH M, ZHANG M, et al. NRP1 interacts with endoglin and VEGFR2 to modulate VEGF signaling and endothelial cell sprouting [J]. *Commun Biol*, 2024, 7(1): 112.
- [37] COLOTTI G, FAILLA C M, LACAL P M, et al. Neuropilin-1 is required for endothelial cell adhesion to soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 [J]. *FEBS J*, 2022, 289(1): 183–198.
- [38] MCQUEEN A, WARBOYS C M. Mechanosignalling pathways that regulate endothelial barrier function [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2023, 84: 102213.
- [39] WANG X, SHEN Y, SHANG M, et al. Endothelial mechanobiology in atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2023, 119(8): 1656–1675.
- [40] ZHOU M, YU Y, CHEN R, et al. Wall shear stress and its role in atherosclerosis [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 10: 1083547.
- [41] MEHTA V, PANG K L, ROZBESKY D, et al. The guidance receptor plexin D1 is a mechanosensor in endothelial cells [J]. *Nature*, 2020, 578(7794): 290–295.
- [42] ZHANG S, ZHANG Y, ZHANG P, et al. Plexin D1 mediates disturbed flow-induced M1 macrophage polarization in atherosclerosis [J]. *Heliyon*, 2023, 9(6): e17314.

[收稿日期] 2024-05-28

齐格格,董新刚,李伟峰,等. 视神经萎缩蛋白 1 介导的线粒体动力学在中枢神经系统疾病发生发展中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(4): 104–113, 134.

Qi GG, Dong XG, Li WF, et al. Role of optic atrophy 1-mediated mitochondrial dynamics in the occurrence and development of central nervous system diseases [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 104–113, 134.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.011

视神经萎缩蛋白 1 介导的线粒体动力学在中枢神经系统疾病发生发展中的作用

齐格格¹,董新刚^{2*},李伟峰¹,刘 艳¹,李 慧¹,任艺芹¹,张素清¹

(1.河南中医药大学康复医学院,郑州 450046;2.河南中医药大学第一附属医院,郑州 450000)

【摘要】 线粒体是细胞内能量代谢的中心,线粒体动力学是指线粒体进行融合和裂变的动态过程,在维持线粒体稳态与中枢神经系统功能中起着至关重要的作用。视神经萎缩蛋白 1(optic atrophy 1,OPA1)是参与线粒体动力学的关键因子,通过调控线粒体的融合裂变过程,减轻氧化应激、抑制细胞凋亡、促进线粒体自噬等,进而维持线粒体数量、结构和生物功能等动态变化。大量研究表明 OPA1 介导的线粒体动力学在缺血性脑卒中、阿尔茨海默病、帕金森病、脊髓损伤、多发性硬化等中枢神经系统疾病中有重要意义。本文主要综述了 OPA1 对线粒体动力学的调控机制及其介导的线粒体功能在中枢神经系统疾病中的重要作用,以期为临床治疗提供新思路。

【关键词】 线粒体动力学;视神经萎缩蛋白 1;中枢神经系统疾病;缺血性脑卒中;阿尔茨海默病

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0104-10

Role of optic atrophy 1-mediated mitochondrial dynamics in the occurrence and development of central nervous system diseases

QI Gege¹, DONG Xingang^{2*}, LI Weifeng¹, LIU Yan¹, LI Hui¹, REN Yiqin¹, ZHANG Suqing¹

(1. Rehabilitation Medicine College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.

2. the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Mitochondria are the center of intracellular energy metabolism. Mitochondrial dynamics refers to the dynamic process of mitochondrial fusion and fission, which plays an important role in maintaining mitochondrial homeostasis and central nervous system function. Optic atrophy 1 (OPA1) is a key factor involved in mitochondrial dynamics. OPA1 acts by regulating mitochondrial fusion and fission, reducing oxidative stress, inhibiting apoptosis, and promoting mitochondrial autophagy, to maintain the dynamic changes in mitochondrial quantity, structure, and biological function. Numerous studies have shown that OPA1-mediated mitochondrial dynamics plays an important role

【基金项目】 河南省中医药科学研究专项课题(2024ZY1006);河南省科技发展计划(242102310514);河南省中医药科学研究专项课题重大专项(2022ZYD05);河南省中医药科学研究专项课题(2024ZY1068);第七批全国名老中医药专家学术经验继承工作项目(豫中医函[2022]3号)。

【作者简介】 齐格格(1999—),女,在读硕士研究生,研究方向:中医老年病康复。E-mail:260998930@qq.com

【通信作者】 董新刚(1978—),男,博士,主任医师,研究方向:中医老年病康复。E-mail:35997052@qq.com

in ischemic stroke, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, spinal cord injury, multiple sclerosis, and other central nervous system diseases. Here we review the regulatory mechanism of OPA1 in terms of mitochondrial dynamics and the important role of mitochondrial function mediated by OPA1 in central nervous system diseases, to provide new ideas for clinical treatment.

【Keywords】 mitochondrial dynamics; optic atrophy 1; central nervous system disease; ischemic stroke; Alzheimer's disease

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

中枢神经系统疾病是一类全球发病率极高的疾病,包括缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)、脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)、多发性硬化(multiple sclerosis, MS)等^[1]。中枢神经系统疾病涵盖的种类较多且成因复杂,疾病发展过程中涉及了氧化应激、神经炎症、能量代谢紊乱、钙离子稳态失衡、突触功能受损等机制,其次,还会导致一系列的级联反应从而诱发全身性的并发症。

近年来,越来越多的研究表明线粒体功能障碍是导致神经元损伤、诱发中枢神经系统疾病的重要因素^[2]。衰老、代谢异常、遗传突变等因素可能会影响线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的复制、转录和翻译,从而导致线粒体功能障碍^[3],主要表现为线粒体质量控制受损、线粒体能量代谢异常、氧化应激、细胞凋亡、钙离子稳态失衡等。其中,线粒体动力学^[4]主要包括线粒体融合与裂变过程,这种动态变化涉及线粒体的形态、大小、数量和功能的改变,是细胞内一个复杂且重要的生物学过程。视神经萎缩蛋白 1 (optic atrophy 1, OPA1) 是线粒体动力学中至关重要的调控因子^[5],有研究表明 OPA1 的含量变化与中枢神经系统疾病的发病机制密切相关,OPA1 能够参与线粒体融合与线粒体嵴重塑过程,进而维持线粒体内膜结构和功能的稳定^[6]。本文综述了 OPA1 介导的线粒体动力学对中枢神经系统疾病影响的研究进展,旨在为中枢神经系统疾病的治疗策略提供参考依据。

1 线粒体动力学概述

线粒体动力学主要包括融合与裂变、转运、自噬等过程,它们相互协调、相互依赖,线粒体动力学的稳定在维持线粒体的正常形态与功能、促

进线粒体质量控制、调节细胞代谢与能量产生、影响细胞凋亡与信号转导等方面都具有重要作用。一旦线粒体动力学的动态平衡被打破,线粒体的形态与功能将受到影响,从而出现线粒体功能障碍,进而导致中枢神经系统疾病的发生发展。研究指出线粒体融合和裂变之间的动态平衡是细胞功能正常发挥的重要条件,是线粒体动力学中最关键的一环^[7](图 1)。

线粒体融合一般包括线粒体外膜(outer mitochondrial membrane, OMM)融合和线粒体内膜(inner mitochondrial membrane, IMM)融合两部分。OMM 的融合过程受到线粒体融合蛋白(mitofusin, MFN)调节,主要包括线粒体融合蛋白 1 (mitofusin 1, MFN1) 和线粒体融合蛋白 2 (mitofusin 2, MFN2)^[8]。而 IMM 融合主要由 OPA1 调控,从而维持线粒体形态和功能的稳定^[9]。当线粒体膜损伤时,线粒体可以通过融合过程在健康线粒体之间进行线粒体 DNA (mtDNA)、脂质、蛋白质等物质交换,以此来防止细胞凋亡。参与线粒体裂变的蛋白主要包括动力蛋白相关蛋白 1 (dynamin-related protein1, DRP1)、线粒体裂变因子(mitochondrial fission factor, MFF)、线粒体裂变蛋白 1 (mitochondrial fission protein 1, FIS1)、线粒体动力学蛋白 49/51^[10]。当位于 OMM 的 MFF、FIS1、MiD49/MiD51 等 DRP1 受体发出裂变信号时,会吸引细胞质内的 DRP1 与之结合。随着结合数量的增多,环状复合物形成,从而对线粒体进行切割,最终有效地分离出受损线粒体,以此推动细胞进入凋亡阶段,维持线粒体功能的正常运作^[11]。

2 OPA1 对线粒体动力学的影响

2.1 OPA1 的生理结构及功能

OPA1 是一种与动力蛋白相关的 GTP 酶,其

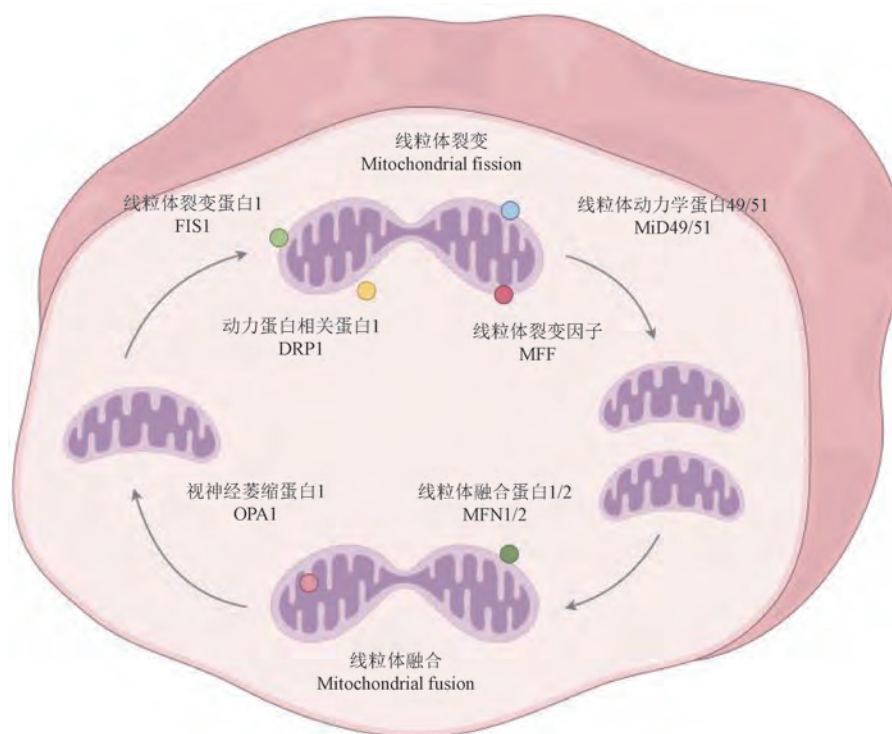


图1 线粒体融合与裂变

Figure 1 Mitochondrial fusion and fission

核心作用是调控线粒体内膜的融合过程。在选择性剪切的情况下,OPA1 存在两种主要形态:长型 OPA1 (long OPA1, L-OPA1) 和短型 OPA1 (short OPA1, S-OPA1)^[12]。L-OPA1 位于 IMM 上,其核心作用在于调节 IMM 融合,而 S-OPA1 位于 IMM 和 OMM 之间的膜间隙 (intermembrane space, IMS) 中,主要用于促进线粒体裂变。有研究发现 IMM 肽酶 OMA1 和 YME1L 含量的增多会促进 L-OPA1 的水解,能够将 L-OPA1 在 S1 和 S2 切割位点剪切成可溶性的 S-OPA1,加速线粒体裂变,进而保持线粒体融合与裂变的动态平衡^[13-14]。除此之外,OPA1 在线粒体嵴重塑方面亦发挥重要作用,其可通过促进电子传递链超级复合物的组装来提高线粒体的呼吸效率,进而加速 ATP 合成酶的寡聚^[15]。SI 等^[16]观察到药物水飞蓟宾能够诱导 MCF-7 和 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞凋亡,其作用机制可能是 OPA1 表达下调进而诱导线粒体嵴皱缩,降低线粒体膜电位,最终损害线粒体动力学。而 QUINTANA-CABRERA 等^[17]研究发现上调 OPA1 能够促进线粒体嵴之间的紧密连接,提高线粒体嵴重塑能力,进而维

持线粒体网络的稳定性。

2.2 OPA1 对线粒体动力学的调控作用

2.2.1 OPA1 介导线粒体融合

在正常情况下,受损线粒体能与周围健康线粒体进行融合,使其功能得以恢复。但是当线粒体融合出现障碍时,损伤线粒体的累积会诱导神经元坏死和凋亡,这可能是各种中枢神经系统疾病的诱因之一^[18]。早期的研究已经证明线粒体融合是通过融合蛋白 OPA1 和 MFN 介导的^[19],其中,OPA1 作为线粒体融合的重要调节因子,其螺旋结构区域包含几个独特的二级结构,这可增强 OPA1 与 IMM 的结合程度,从而促进线粒体融合^[20]。目前,已在多种中枢神经系统疾病中观察到线粒体融合与裂变紊乱,DUAN 等^[21]研究发现百草枯能诱导 PD 运动功能障碍,该过程可能与 OPA1 加工失衡从而导致线粒体功能障碍相关。BAI 等^[22]在肝性脑病模型小鼠大脑黑质中发现,OPA1 含量减少、DRP1 表达上调能够促进线粒体裂变,清除受损线粒体,进而恢复线粒体动力学平衡。HOU 等^[23]指出中药红景天可以通过激活腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK)/沉默信息调节因

子 2 相关酶(SIRT)1 信号通路来增强 OPA1 的表达,进而减轻线粒体钙单向转运蛋白 MCU 介导的线粒体功能障碍,逆转缺氧引起的脑损伤。

2.2.2 OPA1 介导线粒体嵴重塑

IMM 可分为内界膜和嵴膜,这两个膜会产生两个水室:IMS 和线粒体基质。线粒体嵴是由多个管状或层状 IMM 内陷到基质中形成的,其中,嵴连接是将线粒体嵴与 IMM 其余部分隔开的重要结构(图 2)。研究发现线粒体功能与嵴的形态和数量存在密切的关系,线粒体嵴结构可以增加 IMM 表面积,提高氧化磷酸化能力,促进 ATP 的产生^[24]。因此,线粒体嵴结构从某种意义上决定了线粒体功能。本文所提到的 OPA1 不仅是维持线粒体嵴结构完整性的重要因子,还是一种重要的嵴重塑蛋白。在细胞凋亡过程中,线粒体网状结构被破坏,而在 OPA1 的调控下,线粒体嵴结构可以发生重塑,进而维持线粒体形态。先前的研究已经揭示,当 OPA1 的表达受到抑制或存在基因突变时,会导致线粒体内部结构发生变化,具体表现为嵴连接断裂,进而引发线粒体碎片化及细胞凋亡^[25]。CHEN 等^[26]发现,在经历大脑中动

脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)手术^[27]的大鼠海马体中,OPA1 的含量减少,而 SIRT3 的干预则能恢复 OPA1 的表达,修复线粒体嵴结构,进而减少神经元死亡。另外,FRY 等^[28]通过原位冷冻电子断层扫描技术发现线粒体嵴的形状取决于 S-OPA1 与 L-OPA1 的比例变化,L-OPA1 水平升高可促进线粒体融合,而 S-OPA1 水平升高则会诱导线粒体裂变,产生不规则的嵴形状。综上,OPA1 含量的变化是线粒体动力学稳态失衡的早期标志,靶向调控 OPA1 的表达可能是中枢神经系统疾病新的治疗靶点。

3 OPA1 介导的线粒体动力学异常在中枢神经系统疾病发生发展中的作用

3.1 OPA1 与 IS

IS 是一种由于脑局部血液供应不足导致的急性脑血管疾病,占有脑卒中患者总数的 80% 左右^[29]。近年研究表明,脑缺血会诱发大量的线粒体损伤,引起线粒体形态和功能的变化^[30]。因

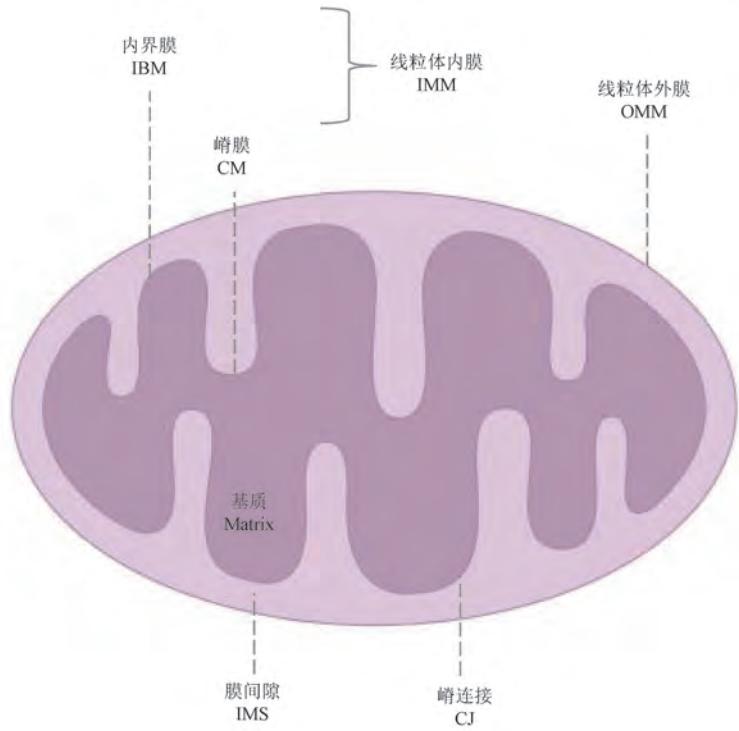


图 2 线粒体结构

Figure 2 Mitochondrial structure

此,线粒体功能障碍可能是导致 IS 神经元损伤的重要机制之一。

OPA1 作为线粒体中的核心蛋白,在线粒体动力学和其他相关功能的调控中起着关键作用。据报道,脑缺血再灌注能够下调 OPA1 的表达,抑制线粒体自噬,导致线粒体动力学紊乱^[31]。LI 等^[32]在此基础上,用银杏叶提取物对 MCAO 模型大鼠进行干预,发现其可以通过增加 OPA1 含量来促进线粒体融合和自噬,抑制细胞凋亡,进而保证 MCAO 模型大鼠学习记忆功能的恢复。TANG 等^[33]通过实验证明花生四烯酸代谢产生的 14,15-环氧二十碳三烯酸也能够上调 MCAO 模型小鼠海马中 OPA1 的表达,减小脑梗死体积,其作用机制可能是通过 AMPK/SIRT1 信号通路调控叉头蛋白 O1,抑制线粒体裂变并促进线粒体融合,维持线粒体动力学的平衡,从而维护神经元树突棘的稳定性,减少神经元凋亡。与此同时,GE 等^[34]通过建立氧-葡萄糖剥夺和复氧 (oxygenglucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 神经元细胞模型发现,通过使用缬草酸 A 激活吡啶胺 2,3-双加氧酶 1 介导的信号转导和转录激活因子 3/OPA1 通路能够增加 OPA1 的含量、下调 ROS 水平,从而促进线粒体融合,减轻氧化应激,恢复线粒体膜电位,进而抑制 OGD/R 诱导的神经元线粒体损伤。在 HUANG 等^[35]的实验中,使用 ARMC10 抑制剂下调 OPA1 的表达水平后,能够引起 ROS 堆积,ATP 水平降低,最终导致线粒体功能障碍和神经元凋亡。DU 等^[36]发现丹红注射液也可以上调 MCAO 模型大鼠 OPA1 含量,通过恢复线粒体呼吸功能、维持线粒体融合与裂变蛋白平衡、抑制细胞凋亡来改善线粒体功能,最终减轻脑缺血再灌注损伤,这支持了 OPA1 介导的线粒体动力学能够改善中枢神经系统疾病的这一观点。因此,通过调节 OPA1 的表达维持线粒体动力学稳态来减轻神经元损伤,这可能是 IS 的潜在治疗靶点之一。

3.2 OPA1 与 AD

AD 是最常见的慢性神经退行性疾病之一,其病理学表现主要包括 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 的异常沉积、Tau 蛋白 (phosphorylated Tau, p-Tau) 的过度磷酸化,进而导致老年斑形成和神经纤维缠结^[37]。这种缠结

会触发氧化应激、神经炎症、突触损伤、神经元变性死亡等一系列级联反应,进而加速 A β 沉积,诱导 AD 的认知功能障碍^[38-39]。

近年来,大量研究指出线粒体功能障碍与 AD 相关,其中,线粒体动力学是 AD 发病过程中至关重要的一环^[40-41]。据报道,OPA1 是线粒体功能正常运作的关键蛋白,是 AD 的潜在治疗靶点^[42]。HAN 等^[43]在 AD 患者海马体和大脑的数据驱动分析中发现 OPA1 和 MFN2 的含量均显著降低,而 HOU 等^[44]进一步研究发现,在药物生物素 A (BCA) 干预下,上调 OPA1 的表达水平能够恢复线粒体生物发生、逆转线粒体动力学失衡和线粒体自噬异常的现象,进而改善 AD 模型小鼠的认知功能障碍,这证实了 OPA1 与 AD 之间存在必然联系。同时,也有研究表明运动可以促进线粒体融合和裂变的平衡,促进线粒体嵴重塑,增加 ATP 水平,减轻 APP/PS1 转基因小鼠的线粒体功能障碍,从而有效改善 AD 模型小鼠的学习和记忆能力,这与海马体中 OPA1 的增加相关^[45]。此外,有研究指出 OPA1 能够通过调节 A β 蛋白的含量来发挥神经保护作用^[46]。REDDY 等^[47]研究发现 A β 的积累会导致原代小鼠海马神经元 (HT22) 中的线粒体融合蛋白 OPA1、MFN1 和 MFN2 含量减少,突触蛋白 MAP2 水平降低,抑制线粒体自噬,并且 ZHANG 等^[48]发现增加 OPA1 的表达能够下调 A β 含量,进而恢复线粒体膜电位,减少神经元凋亡,这与先前的研究一致^[49],表明 OPA1 可能通过影响 A β 蛋白表达来改变 AD 疾病的进展。Tau 作为 AD 的标志性蛋白,也有研究表明,Tau 的存在能通过下调 OPA1 水平来损害线粒体动力学,诱导线粒体膜电位紊乱,降低细胞活力,最终导致线粒体功能障碍^[50]。综上所述,进一步研究 AD 与 OPA1 之间的调控机制,可能有助于揭示 AD 病理的深层机制,为治疗 AD 提供新的治疗靶点。

3.3 OPA1 与 PD

PD 一般发生在中老年群体中,是临床上常见且高发的第二大神经退行性疾病,其主要病理改变是中脑黑质多巴胺能神经元的进行性丢失,进而出现运动功能障碍,包括静止性震颤、肌强直和运动迟缓等^[51-52]。

目前,导致 PD 的确切原因仍待探索,相关研

究显示 PD 的发病机制涉及线粒体功能障碍,其中,OPA1 介导的线粒体融合与裂变和 PD 密切相关^[53]。WANG 等^[54]通过建立 PD 模型小鼠发现,胰高血糖素样肽-1 受体激动剂 PT320 对 PD 具有神经保护作用,其作用机制是上调 OPA1 的表达水平,降低 ROS 含量,促进线粒体嵴重塑,维持线粒体稳态,从而减轻线粒体功能障碍。LIN 等^[55]研究发现激活 parkin/I κ B 激酶 γ /p65 通路也能够增加 OPA1 的含量,抑制细胞色素 C 从线粒体释放,进而减轻细胞凋亡。同时,YAN 等^[56]研究发现环氧合酶 2 抑制剂帕瑞昔布可以上调 OPA1 的含量,降低丙二醛水平,提高 GSH/GSSG 比率,从而促进线粒体融合,减轻氧化应激,改善 PD 大鼠的运动功能障碍。ZIBAEI YEKTA 等^[57]发现进行 6 周的维生素 E 摄入和有氧训练干预,能够增加 OPA1 和 ATP 含量,减少细胞色素 C 的表达,减轻氧化应激,进而逆转 PD 大鼠线粒体损伤。除此之外,有研究指出 PD 可能是由 mtDNA 突变引起的^[58]。HATTORI 等^[59]在 PD 患者的大脑中发现了 4977 个碱基对缺失的突变 mtDNA,这可能是 PD 的诱因之一。MANINI 等^[60]在此基础上,进一步研究发现 OPA1 的突变可导致 mtDNA 缺失,诱导线粒体功能障碍的发生。因此,上调 OPA1 的表达可以通过促进线粒体融合和嵴重塑、减轻氧化应激、抑制细胞凋亡等途径改善运动功能障碍,延缓 PD 的发生发展。

3.4 OPA1 与 SCI

SCI 通常是因创伤、疾病或变性而导致神经元丢失及损伤部位神经元连接中断的不可逆的中枢神经系统疾病^[61],常引起感觉及运动功能的永久性损伤。有研究发现线粒体功能障碍发生在 SCI 后轴突变性的早期,涉及氧化应激、神经炎症、能量代谢障碍等,严重阻碍了 SCI 后神经的再生和修复^[62]。其中,神经干细胞线粒体动力学的正常运作对 SCI 轴突变性和再生起关键作用。

OPA1 是线粒体动力学的关键蛋白,在维持线粒体形态功能以及参与细胞损伤修复等方面都发挥着重要作用。吴明莉等^[63]构建 SCI 模型大鼠,发现电针“大椎”和“脊中”能够促进神经元修复,并有助于减轻肢体运动功能障碍,其作用机制可能是电针能够恢复 OPA1 的表达,促进线粒体融合、增强神经干细胞分化,进而防止细胞

凋亡。神经干细胞是一类具备自我更新能力和广泛分化潜能的细胞,这些细胞能够分化为多种神经细胞类型,主要包括神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞等,其增殖分化能力与 SCI 后中枢神经系统网络的修复程度密切相关^[64]。而细胞代谢决定了 SCI 神经干细胞的特征与分化,是细胞功能正常发挥的必要条件^[65]。有研究指出线粒体动力学能够通过影响神经细胞的代谢过程来调节神经干细胞的增殖分化,从而为 SCI 的轴突再生和中枢神经系统修复提供条件^[66]。DUBAL 等^[67]证实了这一研究结果的同时,进一步发现 OPA1 减少可以诱导线粒体裂变,其作用机制可能是通过 Notch 信号通路阻断果蝇神经干细胞的增殖分化。KHACHO 等^[68]也发现 OPA1 减少能够损害神经干细胞的自我更新能力,诱导神经损伤和认知障碍,这与线粒体动力学紊乱,氧化应激加剧相关。目前,线粒体动力学与 SCI 之间的关系还需进一步明确,未来可围绕 OPA1 及其它动力学相关蛋白的表达探究其促进线粒体功能的具体机制。

3.5 OPA1 与 MS

MS 是一种免疫介导性疾病,以中枢神经系统炎性脱髓鞘病变为主要表现,常伴随髓鞘丢失、轴突断裂、神经元变性等多种病理学变化^[69],临床表现为反复发作的神经功能障碍,病程进行性加重,最终导致运动功能障碍,严重影响生活质量。研究发现 MS 存在线粒体功能障碍,如线粒体呼吸链复合物缺乏、ROS 积累、线粒体动力学紊乱等,这损害了神经元产生 ATP 的能力,造成能量失衡,最终引发进行性神经变性^[70]。OPA1 在调节线粒体动力学方面起着关键作用,DE RASMO 等^[71]在 MS 患者体内发现 OPA1 含量减少,ROS 增加,细胞凋亡受到抑制,从而加剧神经炎症。BUONVICINO 等^[72]研究发现早期的轴突线粒体功能障碍导致 MS 的神经损伤,而 OPA1 介导的线粒体动力学能够逆转轴突线粒体生物能量紊乱,降低 ROS 水平,减轻线粒体功能障碍。除此之外,MASCIA 等^[73]通过对 1294 名 MS 患者在基因水平上对线粒体相关蛋白进行分析,结果发现在患者大脑中,与 MS 相关性最高的基因是 OPA1,这表明 MS 与线粒体活动密切相关。尽管上述研究已经表明 MS 的发生发展与 OPA1 存在

必然联系,但关于 OPA1 通过调节线粒体动力学来改善 MS 的具体机制尚未阐明,而且多停留在基础研究探索阶段,仍有待进一步的临床转化,未来仍需不断揭示 OPA1 在 MS 中发挥的具体作用并深入探讨二者之间的关系。

4 靶向 OPA1 调控线粒体动力学对中枢神经系统疾病的干预作用

中枢神经系统疾病发病机制目前尚不清楚,但越来越多的证据表明大脑中 OPA1 水平的改变会对大脑发育及正常神经细胞功能产生影响。其中,一些生物活性成分和药物可以通过靶向 OPA1 调控线粒体动力学,进而延缓中枢神经系统疾病的进展。

在 IS 的药物干预研究中,CHEN 等^[74]表明人参皂苷 Rg3 可以通过核转录因子 E2 相关因子/血红素加氧酶-1 信号通路下调 MCAO 模型大鼠大脑的 DRP1、FIS1 表达,增加 OPA1 含量,减轻线粒体氧化应激,进而减轻 IS 的神经元损伤。HUANG 等^[75]发现 DL-3-正丁苯酞能够通过丝氨酸蛋白酶 Omi/HtrA2 上调 OPA1 表达,抑制细胞凋亡,减轻脑缺血再灌注损伤。此外,体内外实验均证明银杏叶提取物^[32]、14,15-环氧二十碳三烯酸^[33]、缬草酸 A^[34]、补阳还五汤^[76]等也可以通过靶向 OPA1 调控线粒体动力学进而延缓 IS 的发生发展。在药物治疗 AD 的研究中,XU 等^[77]揭示蒿本内酯改善 AD 的作用机制与调节 OPA1 含量变化密切相关,其能够下调 DRP1 水平、上调 OPA1、MFN1、MFN2 水平,减轻 APP/PS1 小鼠线粒体功能障碍,降低大脑中的 A β 水平,恢复突触结构,进而改善学习记忆障碍。同时,有研究表明芍药内酯苷可以通过降低 APP/PS1 小鼠 ROS、DRP1、BAX、CASPASE-3 和细胞色素 C 水平,增加 MFN1、MFN2、OPA1、BCL2 水平,进而减轻氧化应激、改善线粒体形态、抑制细胞凋亡,最终减少 A β 在大脑中的沉积并改善记忆功能障碍^[78]。除此之外,治疗 AD 的一些药物活性成分已经被证实与 OPA1 介导线粒体动力学紧密相关,如青蒿琥酯^[79]、人参皂苷 Rg1^[80]、齐墩果酸^[81]等。在 PD 的药物干预研究中,通过建立 PD 细胞模型,焦阳等^[82]发现依达拉奉能够上调 OPA1、MFN2 含量,下调 DRP1、FIS1 水平,促进线

粒体融合,抑制线粒体裂变,减轻细胞损伤。LIN 等^[55]证明迷迭香中的鼠尾草酸可以通过激活 parkin/IKK γ /p65 通路上调 OPA1,抑制细胞色素 C 的释放,减轻细胞凋亡。目前,靶向 OPA1 调控线粒体动力学治疗 PD 的药物活性成分还有帕瑞昔布^[56]、大补阴丸和牵正散^[83]等。虽然大量实验已证明药物能够改善中枢神经系统疾病,但其仍处于基础实验阶段,未来仍需要大量的临床试验进行疗效和安全性验证。

5 结语

综上所述,OPA1 可以通过调控线粒体融合与裂变、嵴重塑过程,减轻氧化应激、抑制细胞凋亡、促进线粒体自噬等,进而维持线粒体正常形态、数量及功能的稳定,在 IS、AD、PD、SCI、MS 等中枢神经系统疾病的治疗方面具有一定的潜能。同时,既往实验发现,一些生物活性成分和药物,可以靶向 OPA1 调控线粒体动力学,进而延缓中枢神经系统疾病的进展。然而,目前仍存在需要面对并解决的挑战:①通过研究发现 S-OPA1、L-OPA1 含量的多少分别与线粒体分裂、融合程度成正比,但是现有的大部分研究只探讨了 OPA1 的总含量变化,关于 S-OPA1、L-OPA1 各自表达情况的相关报道甚少,这亟需进一步研究。②尽管已经初步探讨 OPA1 在线粒体动力学中的调控作用,如氧化应激、细胞凋亡、线粒体自噬、能量代谢紊乱等,但其在铁死亡、内质网应激、钙离子稳态、突触功能等机制中的介导途径尚未得到完全阐明。③OPA1 介导的线粒体动力学相关研究大部分集中在 IS、AD、PD 疾病中,而其在 SCI、MS 等其他中枢神经系统疾病中的研究较少。本文基于线粒体动力学探讨并总结了 OPA1 介导的线粒体功能在中枢神经系统疾病中的重要作用,为了提供更安全更具体的治疗方案,未来的研究方向可能是探讨 S-OPA1、L-OPA1 各自的含量变化与线粒体动力学之间的联系、OPA1 介导的线粒体动力学在钙离子稳态、突触功能等机制中的具体调控途径、OPA1 在其余中枢神经系统疾病中的研究进展等。因此,在以后的研究中,学者们仍需开展大量的基础实验和高质量的临床试验,进一步探索 OPA1 的精确调控机制,为其作为中枢神经系统疾病的治疗靶点提供新的理论依据。

参考文献:

- [1] FAN Y, CHEN Z, ZHANG M. Role of exosomes in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of central nervous system diseases [J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 291.
- [2] NAKANO T, IRIE K, MATSUO K, et al. Molecular and cellular mechanisms of mitochondria transfer in models of central nervous system disease [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2024, 14: 271678X241300223.
- [3] KLEMMENSEN M M, BORROWMAN S H, PEARCE C, et al. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders [J]. Neurotherapeutics, 2024, 21(1): e00292.
- [4] CHEN W, ZHAO H, LI Y. Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 333.
- [5] GAO S, HU J. Mitochondrial fusion: the machineries in and out [J]. Trends Cell Biol, 2021, 31(1): 62–74.
- [6] HAN J, TAO W, CUI W, et al. Propofol *via* antioxidant property attenuated hypoxia-mediated mitochondrial dynamic imbalance and malfunction in primary rat hippocampal neurons [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 6298786.
- [7] SYGITOWICZ G, SITKIEWICZ D. Mitochondrial quality control: the role in cardiac injury [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2022, 27(3): 96.
- [8] TÁBARA L C, SEGAWA M, PRUDENT J. Molecular mechanisms of mitochondrial dynamics [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2024, 26(2): 123–146.
- [9] CHEN J, GAO X, ZHENG C, et al. Low-dose Cu exposure enhanced α -synuclein accumulation associates with mitochondrial impairments in mice model of Parkinson's disease [J]. Toxicol Lett, 2023, 387: 14–27.
- [10] XU H, SONG X, ZHANG X, et al. SIRT1 regulates mitochondrial fission to alleviate high altitude hypoxia induced cardiac dysfunction in rats *via* the PGC-1 α -DRP1/FIS1/MFF pathway [J]. Apoptosis, 2024, 29 (9/10): 1663–1678.
- [11] ZHAO Y, WU Z. TROP2 promotes PINK1-mediated mitophagy and apoptosis to accelerate the progression of senile chronic obstructive pulmonary disease by up-regulating DRP1 expression [J]. Exp Gerontol, 2024, 191: 112441.
- [12] FOGO G M, RAGHUNAYAKULA S, EMAUS K J, et al. Mitochondrial membrane potential and oxidative stress interact to regulate Oma1-dependent processing of Opa1 and mitochondrial dynamics [J]. FASEB J, 2024, 38 (18): e70066.
- [13] MACVICAR T, LANGER T. OPA1 processing in cell death and disease-the long and short of it [J]. J Cell Sci, 2016, 129(12): 2297–2306.
- [14] NOONE J, O' GORMAN D J, KENNY H C. OPA1 regulation of mitochondrial dynamics in skeletal and cardiac muscle [J]. Trends Endocrinol Metab, 2022, 33(10): 710–721.
- [15] MEEUSEN S, DEVAY R, BLOCK J, et al. Mitochondrial inner-membrane fusion and *Crista* maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1 [J]. Cell, 2006, 127(2): 383–395.
- [16] SI L, LIU W, HAYASHI T, et al. Silibinin-induced apoptosis of breast cancer cells involves mitochondrial impairment [J]. Arch Biochem Biophys, 2019, 671: 42–51.
- [17] QUINTANA-CABRERA R, QUIRIN C, GLYTSOU C, et al. The cristae modulator Optic atrophy 1 requires mitochondrial ATP synthase oligomers to safeguard mitochondrial function [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 3399.
- [18] MARINO Y, INFERRERA F, D' AMICO R, et al. Role of mitochondrial dysfunction and biogenesis in fibromyalgia syndrome: Molecular mechanism in central nervous system [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2024, 1870 (7): 167301.
- [19] PERNAS L, SCORRANO L. Mito-morphosis: mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function [J]. Annu Rev Physiol, 2016, 78: 505–531.
- [20] NYENHUIS S B, WU X, STRUB M P, et al. OPA1 helical structures give perspective to mitochondrial dysfunction [J]. Nature, 2023, 620(7976): 1109–1116.
- [21] DUAN W, LIU C, ZHOU J, et al. Upregulation of mitochondrial calcium uniporter contributes to paraquat-induced neuropathology linked to Parkinson's disease *via* imbalanced OPA1 processing [J]. J Hazard Mater, 2023, 453: 131369.
- [22] BAI Y, WANG Y, YANG Y. Hepatic encephalopathy changes mitochondrial dynamics and autophagy in the substantia nigra [J]. Metab Brain Dis, 2018, 33(5): 1669–1678.
- [23] HOU Y, FAN F, XIE N, et al. *Rhodiola crenulata* alleviates hypobaric hypoxia-induced brain injury by maintaining BBB integrity and balancing energy metabolism dysfunction [J]. Phytomedicine, 2024, 128: 155529.
- [24] JOUBERT F, PUFF N. Mitochondrial cristae architecture and functions: lessons from minimal model systems [J]. Membranes (Basel), 2021, 11(7): 465.
- [25] ZANNA C, GHELLI A, PORCELLI A M, et al. OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion [J]. Brain, 2008, 131(Pt 2): 352–367.
- [26] CHEN H, LIU J, CHEN M, et al. SIRT3 facilitates

- mitochondrial structural repair and functional recovery in rats after ischemic stroke by promoting OPA1 expression and activity [J]. *Clin Nutr*, 2024, 43(7): 1816–1831.
- [27] LI Y, ZHANG J. Animal models of stroke [J]. *Anim Model Exp Med*, 2021, 4(3): 204–219.
- [28] FRY M Y, NAVARRO P P, HAKIM P, et al. *In situ* architecture of Opa1-dependent mitochondrial cristae remodeling [J]. *EMBO J*, 2024, 43(3): 391–413.
- [29] VIRANI S S, ALONSO A, BENJAMIN E J, et al. Heart disease and stroke statistics-2020 update: a report from the American heart association [J]. *Circulation*, 2020, 141(9): e139–e596.
- [30] WU Q, LIU J, MAO Z, et al. Ligustilide attenuates ischemic stroke injury by promoting Drp1-mediated mitochondrial fission *via* activation of AMPK [J]. *Phytomedicine*, 2022, 95: 153884.
- [31] 罗苑, 陈普, 杨丽萍, 等. 3, 4-二羟基苯甲醛通过 OGT-PINK1 途径对线粒体进行质量控制的机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(12): 3308–3316.
- LUO Y, CHEN P, YANG L P, et al. Quality control mechanism of mitochondria by 3, 4-dihydroxybenzaldehyde through OGT-PINK1 pathway [J]. *China J Chin Mater Med*, 2023, 48(12): 3308–3316.
- [32] LI X, ZHANG D, BAI Y, et al. Ginaton improves neurological function in ischemic stroke rats *via* inducing autophagy and maintaining mitochondrial homeostasis [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2019, 15: 1813–1822.
- [33] TANG J, CHEN Y, LI J, et al. 14, 15-EET alleviates neurological impairment through maintaining mitochondrial dynamics equilibrium *via* AMPK/SIRT1/FoxO1 signal pathways in mice with cerebral ischemia reperfusion [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29(9): 2583–2596.
- [34] GE S, WANG L, JIN C, et al. Unveiling the neuroprotection effects of volvalerenic acid A: mitochondrial fusion induction *via* IDO1-mediated Stat3-Opa1 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155555.
- [35] HUANG Y, ZHANG Z, XU Y, et al. ARMC10 regulates mitochondrial dynamics and affects mitochondrial function *via* the Wnt/ β -catenin signalling pathway involved in ischaemic stroke [J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(12): e18449.
- [36] DU H, HE Y, ZHU J, et al. Danhong injection alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondria-dependent apoptosis pathway and improving mitochondrial function in hyperlipidemia rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 157: 114075.
- [37] CAO Z, KONG F, DING J, et al. Promoting Alzheimer's disease research and therapy with stem cell technology [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(1): 136.
- [38] UDDIN M S, KABIR M T, NIAZ K, et al. Molecular insight into the therapeutic promise of flavonoids against Alzheimer's disease [J]. *Molecules*, 2020, 25(6): 1267.
- [39] YU Y, LV J, MA D, et al. Microglial ApoD-induced NLRC4 inflammasome activation promotes Alzheimer's disease progression [J]. *Anim Model Exp Med*, 2024.
- [40] FIŠAR Z, HROUDOVÁ J. CoQ₁₀ and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(2): 191.
- [41] NASB M, TAO W, CHEN N. Alzheimer's disease puzzle: delving into pathogenesis hypotheses [J]. *Aging Dis*, 2024, 15(1): 43–73.
- [42] WU A T H, LAWAL B, WEI L, et al. Multiomics identification of potential targets for Alzheimer disease and antrocin as a therapeutic candidate [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(10): 1555.
- [43] HAN A R, MOON T K, KANG I K, et al. Integrative analysis of microRNA-mediated mitochondrial dysfunction in hippocampal neural progenitor cell death in relation with Alzheimer's disease [J]. *BMB Rep*, 2024, 57(6): 281–286.
- [44] HOU Y, ZHAO W, YU H, et al. Biochanin A alleviates cognitive impairment and hippocampal mitochondrial damage in ovariectomized APP/PS1 mice [J]. *Phytomedicine*, 2022, 100: 154056.
- [45] YAN Q W, ZHAO N, XIA J, et al. Effects of treadmill exercise on mitochondrial fusion and fission in the hippocampus of APP/PS1 mice [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 701: 84–91.
- [46] ALAVI M V. Tau phosphorylation and OPA1 proteolysis are unrelated events: Implications for Alzheimer's Disease [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2021, 1868(12): 119116.
- [47] REDDY P H, YIN X, MANCZAK M, et al. Mutant APP and amyloid beta-induced defective autophagy, mitophagy, mitochondrial structural and functional changes and synaptic damage in hippocampal neurons from Alzheimer's disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(14): 2502–2516.
- [48] ZHANG Y, MIAO Y, TAN J, et al. Identification of mitochondrial related signature associated with immune microenvironment in Alzheimer's disease [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 458.
- [49] WU W, ZHAO D, SHAH S Z A, et al. OPA1 overexpression ameliorates mitochondrial cristae remodeling, mitochondrial dysfunction, and neuronal apoptosis in prion diseases [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(10): 710.
- [50] PÉREZ M J, VERGARA-PULGAR K, JARA C, et al. Caspase-cleaved tau impairs mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(2): 1004–1018.

- [51] MORRIS H R, SPILLANTINI M G, SUE C M, et al. The pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2024, 403(10423): 293–304.
- [52] BANERJEE R, RAI A, IYER S M, et al. Animal models in the study of Alzheimer's disease and Parkinson's disease: a historical perspective [J]. *Anim Model Exp Med*, 2022, 5(1): 27–37.
- [53] LUO S, WANG D, ZHANG Z. Post-translational modification and mitochondrial function in Parkinson's disease [J]. *Front Mol Neurosci*, 2024, 16: 1329554.
- [54] WANG V, TSENG K Y, KUO T T, et al. Attenuating mitochondrial dysfunction and morphological disruption with PT320 delays dopamine degeneration in MitoPark mice [J]. *J Biomed Sci*, 2024, 31(1): 38.
- [55] LIN C Y, CHEN W J, FU R H, et al. Upregulation of OPA1 by carnolic acid is mediated through induction of IKK γ ubiquitination by parkin and protects against neurotoxicity [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 136: 110942.
- [56] YAN H, ZHAO H, KANG Y, et al. Parecoxib alleviates the motor behavioral decline of aged rats by ameliorating mitochondrial dysfunction in the substantia nigra *via* COX-2/PGE2 pathway inhibition [J]. *Neuropharmacology*, 2021, 194: 108627.
- [57] ZIBAEI YEKTA Y, RANJBAR R, HABIBI A, et al. The interactive effects of the aerobic exercise and vitamin E supplementation on Parkinson's rat model [J]. *Cell J*, 2024, 26(5): 285–292.
- [58] LOPRIORE P, PALERMO G, MELI A, et al. Mitochondrial Parkinsonism: a practical guide to genes and clinical diagnosis [J]. *Mov Disord Clin Pract*, 2024, 11(8): 948–965.
- [59] HATTORI N, SATO S. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease [J]. *J Neural Transm*, 2024, 131(12): 1415–1428.
- [60] MANINI A, ABATI E, COMI G P, et al. Mitochondrial DNA homeostasis impairment and dopaminergic dysfunction: a trembling balance [J]. *Ageing Res Rev*, 2022, 76: 101578.
- [61] DE FRERIA C M, VAN NIEKERK E, BLESCH A, et al. Neural stem cells: promoting axonal regeneration and spinal cord connectivity [J]. *Cells*, 2021, 10(12): 3296.
- [62] CHENG L, CAI B, LU D, et al. The role of mitochondrial energy metabolism in neuroprotection and axonal regeneration after spinal cord injury [J]. *Mitochondrion*, 2023, 69: 57–63.
- [63] 吴明莉, 段昭远, 常文涛, 等. 电针督脉对脊髓损伤大鼠脊髓组织线粒体融合及神经干细胞增殖分化的影响 [J]. *针刺研究*, 2024, 49(2): 119–126.
- WU M L, DUAN Z Y, CHANG W T, et al. Effect of electroacupuncture of Governor Vessel on mitochondrial fusion and proliferation and differentiation of neural stem cells in spinal cord injury rats [J]. *Acupunct Res*, 2024, 49(2): 119–126.
- [64] NARDONE R, HÖLLER Y, SEBASTIANELLI L, et al. Cortical morphometric changes after spinal cord injury [J]. *Brain Res Bull*, 2018, 137: 107–119.
- [65] SHYH-CHANG N, NG H H. The metabolic programming of stem cells [J]. *Genes Dev*, 2017, 31(4): 336–346.
- [66] IWATA R, CASIMIR P, VANDERHAEGHEN P. Mitochondrial dynamics in postmitotic cells regulate neurogenesis [J]. *Science*, 2020, 369(6505): 858–862.
- [67] DUBAL D, MOGHE P, VERMA R K, et al. Mitochondrial fusion regulates proliferation and differentiation in the type II neuroblast lineage in *Drosophila* [J]. *PLoS Genet*, 2022, 18(2): e1010055.
- [68] KHACHO M, CLARK A, SVOBODA D S, et al. Mitochondrial dynamics impacts stem cell identity and fate decisions by regulating a nuclear transcriptional program [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 19(2): 232–247.
- [69] MAKHANI N, TREMLETT H. The multiple sclerosis prodrome [J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17(8): 515–521.
- [70] BARCELOS I P, TROXELL R M, GRAVES J S. Mitochondrial dysfunction and multiple sclerosis [J]. *Biology (Basel)*, 2019, 8(2): 37.
- [71] DE RASMO D, FERRETTA A, RUSSO S, et al. PBMC of multiple sclerosis patients show deregulation of OPA1 processing associated with increased ROS and PHB2 protein levels [J]. *Biomedicines*, 2020, 8(4): 85.
- [72] BUONVICINO D, RANIERI G, GUASTI D, et al. Early derangement of axonal mitochondria occurs in a mouse model of progressive but not relapsing-remitting multiple sclerosis [J]. *Neurobiol Dis*, 2023, 178: 106015.
- [73] MASCIA E, NALE V, FERRÈ L, et al. Genetic contribution to medium-term disease activity in multiple sclerosis [J]. *Mol Neurobiol*, 2025, 62(1): 322–334.
- [74] CHEN D, DUAN H, ZOU C, et al. 20(R)-ginsenoside Rg3 attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury by mitigating mitochondrial oxidative stress *via* the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2024, 38(3): 1462–1477.
- [75] HUANG S, HE Q, SUN X, et al. DL-3-n-butylphthalide attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial omi/HtrA2-mediated apoptosis [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2023, 20(1): 101–111.

(下转第 134 页)

唐徽案,敖广宇,陈民,等.铁过载相关动物模型研究进展[J].中国比较医学杂志,2025,35(4):114-127.

Tang HA, Ao GY, Chen M, et al. Research advances in iron overload and related animal models [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 114-127.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.012

铁过载相关动物模型研究进展

唐徽案,敖广宇,陈民,张宇娇,陈泽君*

(成都中医药大学附属中西医结合医院肾内科,成都 610016)

【摘要】 铁是机体所必需的微量元素,对 DNA 合成、呼吸和氧运输等细胞核心过程至关重要。机体铁稳态由铁的协调吸收、利用、储存和循环来调节。铁缺乏和铁过载都可能导致病理变化;后者通过芬顿反应诱导高活性羟自由基发生脂质过氧化或 DNA 突变,在严重情况下可能引发铁依赖性细胞死亡。目前已知铁过载对脑、肝、脾、心脏、卵巢、肾等多个器官均会造成不容忽视的损害。但遗憾的是人们对调节铁稳态以应对铁过载的确切机制知之甚少。为了研究上述确切机制,学者们针对人类铁过载相关疾病的不同病理和生理特征探索开发了一系列动物模型。选择恰当动物模型,对于准确模拟人类铁过载相关疾病的病理生理状态至关重要。对铁过载相关动物模型的最新文献做一综述,旨在为铁过载相关疾病动物模型的开发及选用提供参考。

【关键词】 铁过载;动物模型;综述

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0114-14

Research advances in iron overload and related animal models

TANG Huian, AO Guangyu, CHEN Min, ZHANG Yujiao, CHEN Zejun*

(Department of Kidney, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine of Integrated
TCM & Western Medicine Hospital, Chengdu 610016, China)

【Abstract】 Iron is an essential trace element for the human body and is critical for vital cellular processes, such as DNA synthesis, respiration, and oxygen transport. The body maintains iron homeostasis through a coordinated balance of absorption, utilization, storage, and distribution. Both iron deficiency and excess can lead to pathologies, with the latter triggering lipid peroxidation and DNA mutations via the Fenton reaction, potentially causing iron-induced cell death in severe cases. Although iron overload can inflict severe damage on multiple organs, including the brain, liver, spleen, heart, ovaries, and kidneys, the mechanisms that regulate iron homeostasis in response to overload are not fully understood. Various animal models have been developed to help elucidate these mechanisms, each reflecting different aspects of iron overload relevant to human diseases, and selection of the most appropriate animal model is needed for the accurate simulation of the pathological and physiological states associated with human iron overload-related diseases. This review synthesizes recent literature on animal models pertinent to iron overload, to offer insights to support the development and analysis of models for diseases related to iron overload.

【基金项目】 成都高新医学会科研专项基金(202302)。

【作者简介】 唐徽案(1998—),女,在读硕士研究生,住院医师,研究方向:维持性血液透析机体炎症状态干预。

E-mail:717154314@qq.com

【通信作者】 陈泽君(1973—),女,博士,主任医师,研究方向:慢性肾脏病。E-mail:jjbb77777@163.com

【Keywords】 iron overload; animal model; review

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

铁是机体必需的微量元素,在参与氧代谢、电子传递,以及 DNA、RNA 合成相关酶的活性环节等方面发挥着重要作用。然而,铁水平需要严格平衡,以避免铁缺乏或过载的病理后果。铁过载(iron overload, IOL)是指体内具有氧化还原活性和可螯合的非转铁蛋白结合铁浓度升高至 $1 \sim 20 \mu\text{mol/L}$ ^[1]。IOL 的调控基因表达和翻译后蛋白质修饰深刻影响各种细胞信号通路,改变细胞的活力、形态、发育、功能、周期甚至死亡^[2-3]。铁死亡是一种不受调控基因调控,而是与氧化应激相关的铁依赖性细胞死亡,其特征是脂质过氧化作用增加和抗氧化剂耗竭,铁蛋白降解释放铁,从而引发铁死亡^[4]。

IOL 常因某些遗传性或获得性病理因素破坏细胞铁稳态诱发,这些疾病多与血色素沉着症相关。遗传性血色素沉着症(hereditary hemochromatosis, HH)常涉及调节铁稳态的基因编码突变、铁调素或铁转运蛋白生物合成的基因突变,病理特征是肠道铁吸收增加以及各种器官与组织中铁进行性积累。地中海贫血和镰状细胞病等血红蛋白病或慢性肾病的继发性或获得性 IOL 通常以贫血为特征,常由输血、外源性补充铁剂治疗所致。IOL 不仅会增加上述疾病的发病率和死亡率,同时也在糖尿病相关并发症、阿尔茨海默病、肝纤维化等慢性疾病中扮演重要角色。临床常建议通过静脉切开术或铁螯合剂来预防或控制全高铁水平的毒性^[5]。不容乐观的是,静脉切开术一时难以被患者及家属接受,而有超过 10% 接受铁螯合剂治疗的患者会出现严重的不良反应^[6],静脉切开术与现有药物治疗限制了依从性和治疗效果。

然而 IOL 状态相关的病理生理学机制以及 IOL 如何促进疾病的发生发展尚未被完全阐明,因此针对铁过载及铁死亡开发并建立临床前 IOL 模型的需求一直存在。本文基于 PubMed 数据库进行铁过载相关文献检索,重点对铁过载相关疾病的动物模型做一总结梳理,旨在为构建和观察铁过载相关疾病模型提供一定参考。

1 铁生成及代谢

在人体铁代谢的复杂网络中,巨噬细胞通过吞噬衰老的红细胞,发挥着铁回收的关键作用^[7]。这些细胞内的铁主要以 Fe^{2+} 的形式储存于铁蛋白中,部分铁通过铁蛋白输出后,经由肝的铜蓝蛋白催化氧化为 Fe^{3+} 。随后,这些 Fe^{3+} 通过转铁蛋白(transferrin, Tf)的介导,被运输至骨髓,参与红细胞的生成过程。饮食中摄入的铁,即非血红素铁,通过十二指肠上皮细胞刷状边缘的铁还原酶,如细胞色素 B 等,将 Fe^{3+} 还原成铁转运蛋白(ferroportin, Fpn)摄取和随后吸收所需的 Fe^{2+} 。这一还原过程对于 Fpn 的摄取至关重要,进而由二价金属转运蛋白 1(divalent metal transporter-1, DMT1)介导跨肠上皮细胞顶膜转运回收^[8]。转铁蛋白的铁结合位点约 20%~45% 被 Fe^{3+} 占据^[9],通过与其受体(transferrin receptor 1, Tfr1)的特异性结合,触发内吞作用,实现铁的有效细胞内输送^[10]。在 Tf 饱和状态下,非转铁蛋白途径通过 DMT1 和 Fpn 的协同作用,促进铁的摄取。*HFE* 基因通过与 Tfr1 的竞争性结合来调节铁代谢。铁调素(hepcidin)在维持全身铁稳态中扮演核心角色,其主要功能是调节十二指肠上皮细胞的铁输出,以及网状内皮巨噬细胞和肝细胞的铁释放^[11]。铁调素的转录受到骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMP)/SMAD 信号通路和 IL-6/JAK/STAT3 信号通路的双重调控。前者控制铁调素对铁的反应,后者驱动铁调素对炎症的应答^[12]。BMP 受体与铁调素调节蛋白(hemojuvelin, HJV)在 BMP-SMAD 信号通路中协同作用,对铁调素的表达及全身铁稳态的维持发挥至关重要的影响。NEO 蛋白作为与 HJV 相互作用的支架蛋白,通过与 BMP 配体的不同结构域结合,参与铁调素的调控机制。BMP 与 BMP 受体结合后,触发调节性 SMAD(R-SMAD)的磷酸化,进而与共配体 SMAD4 形成复合物,转位至细胞核,与铁调素基因启动子区域的 BMP 响应元件结合激活铁调素的转录。

2 IOL 动物模型

2.1 IOL 相关基因突变动物模型

基因工程技术的开展与世界范围内大量近交品系小鼠的广泛运用为了解单个基因的功能创造了新的机会。通过对特定组织中的特定基因进行的条件性基因敲除成为探讨铁过载相关基因突变的重要工具。

2.1.1 HH 相关动物模型

HH 与内源性铁过载密切相关,目前已经发现 4 种人类常见类型的 HH(1 型、2A 型、2B 型和 3 型、4 型 HH)依次是由 *HFE* 基因、*HJV* 基因、*HAMP* 基因和 *TFR2* 基因、*SLC40A1* (*FPN1*) 的突变引起^[13]。不同 HH 表型的铁过载生成机制存在差异。1 型、2 型和 3 型 HH 因巨噬细胞及肠道上皮细胞铁吸收与释放功能受损,无法上调铁调素,引发肝和其他实质组织中出现铁过载,常伴随转铁蛋白的饱和度异常升高、血清铁蛋白(ferritin, Ft)的增加,是 HH 发生最常见的原因。4 型 HH 是由于编码铁输出蛋白 *FPN1* 的基因突变,导致铁调素的生成不足,引起铁吸收增加, Tf 饱和度下降,导致全身和组织铁过载。

HFE 基因突变的 IOL 程度较轻,其中 C282Y 替换占 *HFE* 突变的 90%^[14]。*Hju*^{-/-} 由于铁调素严重失活,其脾、肝和十二指肠中的 Fpn 高表达,会产生严重的 IOL。KATSAROU 等^[15]认为 *Hju*^{-/-} 小鼠的铁转运蛋白表达受铁调素依赖性和铁调素非依赖性机制的铁调节,并且十二指肠 DMT1 因膳食铁的摄入受到调节,未来可能成为 IOL 药理学靶点。*Tfr2* 突变(*Tfr2*^{mut})小鼠模型导致迟发型 IOL,并且在铁饱和的情况下仍会长期从膳食中吸收铁,临床多用来研究 Y250X 突变同源的 3 型 HH^[16]。

2.1.2 骨形态发生蛋白相关铁过载动物模型

内源性 BMP6、BMP2 的缺失也会导致血清铁调素水平低,引发铁过载。由于 BMP2 能替代 BMP6 激活 BMP RSMAD 磷酸化的功能,所以 BMP6 的铁过载程度轻微。*Bmp6* KO 小鼠常在肝、心脏和胰腺组织 IOL 明显^[17]。PAUK 等^[18]选用 129Sv/C57 背景的 3 月龄以及 10 月龄的 *Bmp* KO 小鼠观察 IOL 与胰腺以及葡萄糖稳态的关系,发现 *Bmp6* 优先在外分泌胰腺部位进行铁沉

积。*Bmp1* 型受体 *Alk2* 突变会导致中度 IOL,伴随肝门管周围铁积累,而肝细胞特异性 *Alk3* 缺乏会导致严重铁超载,伴随肝小叶中心铁积累和铁调素水平更明显的降低。特异性 *Alk2/3* 缺陷小鼠的铁过载表型则比 *Alk3* 缺陷小鼠更为严重^[19]。

2.1.3 地中海贫血相关铁过载动物模型

Th3/+小鼠基于杂合性中 β -次要基因和 β -主要基因的缺失产生,与中间型 β -地中海贫血患者的疾病表型相当。铁代谢紊乱表现为铁调素减少,转铁蛋白功能障碍,肠道铁吸收增加,以血浆中非转铁蛋白结合铁(non-transferrin bound iron, NTBI)为主的全身性铁过载。LIU 等^[20]选用 Th3/+小鼠模型通过非靶向脂质组学方法论证 IOL 下磷脂稳态的破坏可能是铁诱导性心肌病发生的潜在机制。

2.1.4 阿尔茨海默病相关铁过载动物模型

Attractin(*Atrn*)基因自发突变的大鼠(LEW zi/zi 大鼠)是由 zitter(*zi/zi*)大鼠(Sprague Dawley 杂交种)在 Lewis 背景下回交而来,其外周血浆铁通过非内皮血脑屏障系统(脉络血管丛)进入中枢神经系统,可与临床中观察到的老年患者铁沉积模式相转化运用^[21]。

2.1.5 非经典 HAMP 调控因子相关铁过载动物模型

近年来,非经典 *HAMP* 调控因子(特别是表观遗传调控因子)也愈发受到学者们的关注,表观遗传变化的调节剂被认为可以调节铁代谢。例如,组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDAC)是与 SMAD 4 竞争性结合的 *HAMP* 表达抑制剂。肝中选择性缺乏 *Hdac3* 表达的小鼠(*Hdac3*-cKO 小鼠)通过 *Hdac3*^{fl/fl} 小鼠与 Alb-Cre+ 转基因小鼠杂交所得, MENG 等^[22]证实 *Hdac3* 缺失通过介导 Hippo-YAP 轴降低肝 *Hamp* mRNA 导致肝 IOL, *Hdac3* 对维持全身铁稳态和抑制铁死亡具有重要作用。

通过外显子组测序已将甘油磷酸 O-酰基转移酶(GNPAT p. D519G)基因确定为 HH 中 IOL 的遗传修饰因子。临床上,即使没有 *HFE* 突变的 GNPAT 多态性受试者也表现出血清铁调素降低及血清铁水平、转铁蛋白饱和度升高,意味着 GNPAT p. D519G 多态性与 *HFE* 突变的 HH 患者更严重的 IOL 有关。RISHI 等^[23]选用 C57BL/6J

× CD1.129 混合背景下的杂合 *Gnpat* 缺陷 (*Gnpat*^{+/-}) 雄性小鼠与 C57BL/6J 背景下的纯合 *Hfe* 敲除 (*Hfe*^{-/-}) 雌性小鼠交配产出具有 *Hfe*^{+/-}/*Gnpat*^{+/-} 小鼠, 进行同窝繁殖培育所得的 *Gnpat*^{+/-} 小鼠。与 AN 等^[24] 的研究结论相反的是, RISHI

等^[23] 的研究结果表明喂食高铁饮食的 *Gnpat*^{+/-} 小鼠的 *Hamp* mRNA 表达呈降低趋势, 血清铁水平和转铁蛋白饱和度呈升高趋势, 在动物模型中重现了接受铁耐受性测试的 GNPAT 多态性女性的观察结果(表 1)。

表 1 铁过载相关基因突变动物模型
Table 1 Animal models of gene mutations related to iron overload

品系 Species-strian	造模方法 Modeling method	饲料 Ration	评价指标 Assessment criteria	结局 Outcomes
<i>Hdac3</i> -L 基因敲除小鼠 ^[22] <i>Hdac3</i> -L KO mice	<i>Hdac3</i> ^{flox/flox} 与 <i>Alb-Cre</i> ⁺ 小鼠 (Cre-loxP 系统) <i>Hdac3</i> ^{flox/flox} - <i>Alb-Cre</i> ⁺ mice crossbreeding	50 ppm	肝铁、血清铁浓度 ↑, 铁调素 ↓, 铁转运蛋白 (十二指肠、脾) ↑, <i>Hamp</i> mRNA ↓ LIC、SIC ↑, hepcidin ↓, Fpn (duodenum、spleen) ↑, <i>Hamp</i> mRNA ↓	铁死亡, 肝肿大, 肝纤维化 Ferroptosis, hepatomegaly, hepatic fibrosis
YAP K342M 小鼠 ^[22] YAP K342M mice	敲低 YAP 蛋白 (shRNA 敲低, RNA 干扰) Knockdown of YAP protein (shRNA-mediated knockdown, RNA interference)	NA	血清铁浓度 ↑, 铁调素 ↓, 铁转运蛋白 (十二指肠、脾) ↑, <i>Hamp</i> mRNA ↓ SIC ↑ hepcidin ↓, Fpn (duodenum, spleen) ↑, <i>Hamp</i> mRNA ↓	肝体积增大, 铁中毒 Hepatomegaly, iron toxicity
Th3/+ C57BL/6J 杂合雄性小鼠 ^[20] Th3/+ C57BL/6J male mice	杂交育种 Hybridization	NA	肝铁浓度、铁蛋白、非转铁蛋白结合铁 ↑, 铁调素 ↓ LIC, FER, NTBI ↑, hepcidin ↓	β-地中海贫血, 心肌病, 糖代谢缺陷, 脂代谢紊乱 β-thalassemia, cardiomyopathy, disorders of carbohydrate metabolism, disorders of lipid metabolism
LEWzi/zi 大鼠 ^[21] LEWzi/zi rat	SD 中 zitter (zi/zi) 基因型+Lewis 近交系大鼠 (回交) Zitter (zi/zi) genotype in Sprague-Dawley (SD) rats crossed with Lewis inbred rats (backcrossed)	NA	血清铁浓度、乳酸脱氢酶 ↑, 铁转运蛋白 (脉络丛) ↓, 脑部、肾铁沉积, 脉络丛铁阳性 SIC, LDH ↑, Fpn (choroid plexus) ↓, iron deposition in the brain and kidneys ↑, iron-positive staining in the choroid plexus	血管内溶血, 炎症性脱髓鞘疾病 Intravascular hemolysis, inflammatory demyelinating disease, multiple sclerosis
Y245X 突变小鼠 ^[16] Y245X knock-in mice	<i>Hbb</i> ^{th3/+} + <i>Tfr2</i> ^{Y245X/Y245X} (C57BL/6J 背景下回交) <i>Hbb</i> ^{th3/+} + <i>Tfr2</i> ^{Y245X/Y245X} (backcrossed on a C57BL/6J background)	380 ppm	铁调素 ↓ Hepcidin ↓	遗传性血色素沉着症, 脾肿大 HH, splenomegaly
C57BL/6 <i>Hju</i> ^{-/-} 小鼠 ^[15] C57BL/6 <i>Hju</i> ^{-/-} mice	基因敲除 Gene knockout	75~100 ppm	肝铁浓度、二价金属转运蛋白 1 ↑, 铁蛋白 (脾 ↓, 肝 ↑), 铁调素 ↓, 铁转运蛋白 (十二指肠、肝、脾 ↑), <i>Hamp</i> mRNA ↓ LIC, DMT1 ↑, FER (spleen ↓, liver ↑), hepcidin ↓, Fpn (duodenum, spleen, liver ↑), <i>Hamp</i> mRNA ↓	遗传性血色素沉着症 HH

续表1

品系 Species-strian	造模方法 Modeling method	饲料 Ration	评价指标 Assessment criteria	结局 Outcomes
<i>Bmp2</i> KO 雄性小鼠 ^[17] <i>Bmp2</i> KO male mice	<i>Bmp2</i> ^{fl/fl} ; <i>Bmp6</i> ^{wt/wt} ; Tek-Cre+小鼠 (Tek-Cre+, 基因 floxed) <i>Bmp2</i> ^{fl/fl} ; <i>Bmp6</i> ^{wt/wt} ; Tek-Cre + mice (Tek-Cre+, floxed genes)	2~380 ppm	肝铁、血清铁浓度 ↑, 脾铁沉积 ↓, 胰腺、心脏铁沉积 ↑, <i>Hamp</i> mRNA ↓ LIC, SIC ↑, splenic iron deposition ↓, pancreatic/cardiac iron deposition ↑, <i>Hamp</i> mRNA ↓	遗传性血色素沉着症 HH
<i>Bmp6</i> KO 雄性小鼠 ^[17] <i>Bmp6</i> KO male mice	<i>Bmp2</i> ^{wt/wt} ; <i>Bmp6</i> ^{fl/fl} ; Tek-Cre+小鼠 (Tek-Cre+, 基因 floxed) <i>Bmp2</i> ^{wt/wt} ; <i>Bmp6</i> ^{fl/fl} ; Tek-Cre + mice (Tek-Cre+, floxed genes)	2~380 ppm	肝铁、血清铁浓度 ↑, 脾铁沉积 ↓, 胰腺、心脏铁沉积 ↑, <i>Hamp</i> mRNA ↓ LIC, SIC ↑, splenic iron deposition ↓, pancreatic/ cardiac iron deposition ↑, <i>Hamp</i> mRNA ↓	遗传血色素沉着症 HH
Ecs <i>Bmp6</i> cKO 雄性小鼠 ^[25] Ecs <i>Bmp6</i> cKO male mice	<i>Bmp6</i> ^{fl/fl} ; Tek-Cre+ (Cre-loxP 系统) <i>Bmp6</i> ^{fl/fl} ; Tek-Cre + (Cre-loxp system)	380 ppm	肝铁、血清铁浓度、转铁蛋白 ↑, 铁调素 ↓, 脾铁沉积 ↓, 胰腺、心脏铁沉积 ↑, <i>Hamp</i> mRNA ↓ LIC, SIC, Tf ↑, hepcidin ↓, splenic iron deposition ↓, pancreatic/cardiac iron deposition ↑, <i>Hamp</i> mRNA ↓	遗传血色素沉着症 HH
<i>Smad1/5</i> KO 小鼠 ^[26] <i>Smad1/5</i> KO mice	C57BL/6J; 129S5/SvEvBrd 品系 <i>Smad1/5</i> ^{fl/fl} 与 Cre 转基因小鼠交配 (Cre-loxP 系统) Crossing: <i>Smad1/5</i> ^{fl/fl} (C57BL/6J; 129S5/SvEvBrd) × Cre transgenic mice (Cre-loxP system)	380 ppm	肝铁、血清铁浓度 ↑, 转铁蛋白 ↑, <i>Hamp</i> mRNA ↓ LIC, SIC, Tf ↑, <i>Hamp</i> mRNA ↓	严重肝铁过载 Severe iron overload in the liver
<i>Hfe</i> KO 小鼠 ^[17] <i>Hfe</i> KO mice	<i>Hfe</i> ^{-/-} ; <i>Bmp2</i> ^{fl/fl} ; (Tek-Cre+, 全身性敲除) <i>Hfe</i> ^{-/-} ; <i>Bmp2</i> ^{fl/fl} ; (Tek-Cre +, systemic knockout)	NA	肝铁、血清铁浓度、转铁蛋白 ↑, 铁调素 ↓ LIC, SIC, Tf ↑, hepcidin ↓	遗传性血色素沉着症 HH
<i>Bmp2+Hfe</i> KO 小鼠 <i>Bmp2+Hfe</i> KO mice ^[17]	<i>Hfe</i> ^{-/-} ; <i>Bmp2</i> ^{fl/fl} ; (Tek-Cre+, 全身性敲除) <i>Hfe</i> ^{-/-} ; <i>Bmp2</i> ^{fl/fl} ; (Tek-Cre +, systemic knockout)	NA	肝铁、血清铁浓度、转铁蛋白 ↑, 铁调素 ↓, 脾铁沉积 ↓, 胰腺、心脏铁沉积 ↑ LIC, SIC, Tf ↑, hepcidin ↓, splenic iron deposition ↓, pancreatic/cardiac iron deposition ↑	遗传性血色素沉着症 HH
<i>Gnpat</i> ^{+/-} 雄性小鼠 ^[23] <i>Gnpat</i> ^{+/-} male mice	C57BL/6J <i>Hfe</i> ^{-/-} 雌 鼠 与 CD1. 129 <i>Gnpat</i> ^{+/-} 雄鼠杂交获得 <i>Hfe</i> ^{+/-} / <i>Gnpat</i> ^{+/-} 型 <i>Hfe</i> ^{-/-} ; <i>Gnpat</i> ^{+/-} mice were generated by crossing C57BL/6J <i>Hfe</i> ^{-/-} females with CD1. 129 <i>Gnpat</i> ^{+/-} males	NA	肝铁、血清铁浓度、转铁蛋白 ↑, 铁调素 ↓, <i>Bmp6</i> 、 <i>Smad7</i> mRNA、 <i>Hamp</i> ↓ LIC, SIC, Tf ↑, hepcidin ↓, splenic iron deposition ↓, <i>Bmp6</i> / <i>Smad7</i> mRNA, <i>Hamp</i> ↓	影响铁稳态 Disruption of iron homeostasis

续表1

品系 Species-strian	造模方法 Modeling method	饲料 Ration	评价指标 Assessment criteria	结局 Outcomes
C57BL/6 <i>Hfe</i> ^{-/-} 小鼠 ^[27] C57BL/6 <i>Hfe</i> ^{-/-} mice	同源重组, ES 细胞与胚胎融合 Homologous recombination, embryonic stem cells and embryo fusion	270 ppm	肝铁、血清铁浓度, 铁调素 ↓, 转铁蛋白受体 1、Hamp1 及 Hamp2 mRNA ↑, Slc40a1 ↓ LIC, SIC ↑, hepcidin ↓, Tfr1, Hamp1/Hamp2 mRNA ↑, Slc40a1 ↓	IOL
AKR <i>Hfe</i> ^{-/-} 小鼠 AKR <i>Hfe</i> ^{-/-} mice ^[27]	同源重组, ES 细胞与胚胎融合 Homologous recombination, embryonic stem cells and embryo fusion	270 ppm	肝铁浓度 ↑, 铁调素 ↓, 转铁蛋白受体 1、Hamp1/2、Slc40a1 mRNA ↓ LIC ↑, hepcidin ↓, Tfr1, Hamp1/Hamp2, Slc40a1 mRNA ↓	IOL
<i>Hfe</i> H67D/H67D 小鼠 ^[28] <i>Hfe</i> H67D/H67D mice	同源重组 Homologous recombination	200 ppm	肝铁、血清铁浓度、转铁蛋白 ↑, 铁调素 ↓ LIC, SIC, Tf ↑, hepcidin ↓	遗传性血色素沉着症 HH
C294Y/H67D 小鼠 ^[28] C294Y/H67D mice	同源重组 Homologous recombination	200 ppm	肝铁、血清铁浓度、转铁蛋白 ↑, 铁调素 ↓ LIC, SIC, Tf ↑, hepcidin ↓	遗传性血色素沉着症 HH
C57BL/6 <i>Hfe</i> ^{-/-} 小鼠 ^[29] C57BL/6 <i>Hfe</i> ^{-/-} mice	NA	25 150 ppm, 2 weeks	肝铁、血清铁浓度、铁蛋白、铁转运蛋白 ↑, 铁调素、转铁蛋白受体 1 ↓, 铁调素受体 2 ↑ LIC, SIC, FER, Fpn ↑, hepcidin, Tfr1 ↓, Mfm2 ↑	线粒体受损 Mitochondrial damage
<i>Hju</i> ^{-/-} 雄性小鼠 ^[30] <i>Hju</i> ^{-/-} male mice	129S6/SvEvTac + C57BL/6 混合背景 (基因靶向敲除+Cre/loxP) 129S6/SvEvTac + C57BL/6 mixed background (Gene-targeted knockout +Cre/loxP)	226 ppm	肝铁、血清铁浓度、铁蛋白、转铁蛋白 ↑, 铁调素 ↓, Bmp6 mRNA ↑, 胰腺及心脏铁沉积 ↑, 脾铁沉积 ↓ LIC, SIC, FER, Tf ↑, hepcidin ↓, Bmp6 mRNA ↑, pancreatic/cardiac iron deposition ↑, splenic iron deposition ↓	线粒体受损 Mitochondrial damage
<i>Hepc</i> ^{Δtotal} 雄性小鼠 ^[31] <i>Hepc</i> ^{Δtotal} male mice	<i>Hamp1</i> ^{lox/lox} 小鼠与表达 Cre 重组酶的转基因系 (E2a-Cre) 交配 (基因靶向+Cre/loxP) <i>Hamp1</i> ^{lox/lox} × E2a-Cre mice (Gene targeting+Cre/loxP)	NA	肝铁、血清铁浓度 ↑, 铁蛋白 ↓, 铁转运蛋白 (脾、十二指肠) ↑, 胰腺铁沉积 ↑, 十二指肠细胞色素 B、二价金属转运蛋白 1 ↑ LIC, SIC ↑, FER ↓, Fpn (spleen and duodenum) ↑, pancreatic iron deposition ↑, DCYTB, DMT1 ↑	心肌功能障碍 Myocardial dysfunction
<i>Hepc</i> ^{Δliver} 小鼠 ^[31] <i>Hepc</i> ^{Δliver} mice	<i>Hamp1</i> ^{lox/lox} 小鼠与表达肝细胞特异性 Alb-Cre 重组酶小鼠交配 (基因靶向+Cre/loxP) <i>Hamp1</i> ^{lox/lox} × Alb-Cre (hepatocyte-specific) mice (Gene targeting + Cre/loxP)	NA	肝铁、血清铁浓度 ↑, 铁蛋白 ↓, 铁转运蛋白 (脾、十二指肠) ↑, 胰腺铁沉积 ↑, 十二指肠细胞色素 B、二价金属转运蛋白 1 ↑ LIC, SIC ↑, FER ↓, Fpn (spleen and duodenum) ↑, pancreatic iron deposition ↑, DCYTB, DMT1 ↑	严重肝铁过载 Severe iron overload in the liver

续表1

品系 Species-strian	造模方法 Modeling method	饲料 Ration	评价指标 Assessment criteria	结局 Outcomes
<i>Fpn</i> 1 (H32R) 小鼠 ^[32]	C57BL/6J 雄 鼠 ENU 处 理 flatiron 突变,与同品系雌鼠回交 (化学诱变剂诱变)	NA	肝铁、血清铁浓度 ↑,转铁蛋白、 铁调素 ↓ LIC, SIC ↑, Tf, hepcidin ↓	遗传性血色素沉着症 HH
<i>Fpn</i> 1 (H32R) mice	C57BL/6J male mice treated with ENU to induce flatiron mutation, backcrossed with females of the same strain (chemical mutagenesis)			
<i>Ndst</i> 1 Hepatocyte cKO 小鼠 ^[33]	<i>Ndst</i> 1 ^{l/f} Alb-Cre (CRISPR/Cas9 基因编辑)	200 ppm (1 week)	肝铁、血 清 铁 浓 度 ↑,铁 调 素、 Hamp mRNA ↓,脾铁沉积 ↑	
<i>Ndst</i> 1 Hepatocyte cKO mice	<i>Ndst</i> 1 ^{l/f} Alb-Cre(CRISPR/Cas9)	~ 8300 ppm (3 weeks)	LIC, SIC ↑, hepcidin ↓, Hamp mRNA ↓, Splenic iron deposition ↑	IOL
<i>Alk</i> 3 KO 雌性 小鼠 ^[34]	C57BL/6; SV129 混合背景 <i>Alk</i> 3 ^{fl/fl} ; Alb-Cre(Alb-Cre, 基因 floxed)	380 ppm	肝铁(中央区域)、血清铁浓度,转 铁蛋白 ↑,铁调素 ↓,脾铁沉积 ↓,肾、心脏、胰腺铁沉积 ↑, <i>Alk</i> 3 mRNA、Tfrc mRNA ↓, Bmp6 mRNA ↑	IOL
<i>Alk</i> 3 KO female mice	C57BL/6; SV129 mixed background <i>Alk</i> 3 ^{fl/fl} ; Alb-Cre (floxed)(Alb-Cre, gene floxed)		LIC (central region of the liver), SIC, Tf ↑, splenic iron deposition ↓, kidney/pancreatic/cardiac iron deposition ↑, <i>Alk</i> 3 mRNA、Tfrc mRNA ↓, Bmp6 mRNA ↑	
<i>Alk</i> 2 KO 雌性 小鼠 ^[34]	C57BL/6; SV129 混合背景 <i>Alk</i> 2 ^{fl/fl} ; Alb-Cre (Alb-Cre,基因 floxed)	380 ppm	肝铁(周围门脉型)、血清铁浓度、 转铁蛋白 ↑,铁调素 ↓, <i>Alk</i> 2 mRNA、Tfrc mRNA ↓, Bmp6 mRNA ↑	IOL
<i>Alk</i> 2 KO female mice	C57BL/6; SV129 mixed background <i>Alk</i> 2 ^{fl/fl} ; Alb-Cre (Alb-Cre, gene floxed)		LIC (periportal pattern), SIC, Tf ↑, hepcidin ↓, <i>Alk</i> 2 mRNA, Tfrc mRNA ↓, Bmp6 mRNA ↑	

注: ↑:增加; ↓:降低;KO:基因敲除;cKO:条件性基因敲除;NA:文中未提及;Hamp mRNA:铁调素 mRNA;DCYTB:十二指肠细胞色素 B;DMT1:二价金属转运蛋白 1;NTBI:非转铁蛋白结合铁;Slc40a1:铁转运蛋白;Bmp6 mRNA:骨形态发生蛋白 6 mRNA;Smad7 mRNA: SMAD 家族成员 7 mRNA;Alk2 mRNA:激活素受体样激酶 3 mRNA;Tfrc mRNA:转铁蛋白受体 mRNA。
Note. ↑, Increase. ↓, Decrease. KO, Knock out. cKO, Conditional knock out. NA, Not applicable. Hamp mRNA, Heparin mRNA. DCYTB, Duodenal cytochrome B. DMT1, Divalent metal-ion transporter 1. NTBI, Non-transferrin bound iron. Slc40a1, Solute carrier family 40 member 1. Bmp6 mRNA, Bone morphogenetic protein 6 mRNA. Smad7 mRNA, SMAD family member 7 mRNA. Alk2 mRNA, Activin receptor-like kinase 2 mRNA. Tfrc mRNA, Transferrin receptor mRNA.

2.2 混合实验模式诱导 IOL 动物模型

不少研究者发现 IOL 往往与多种疾病的病因和并发症有关,因此设计了不少 IOL 与其他病理模型一同诱导的混合实验模式。ALTAMURA 等^[35]将 *Fpn*^{wt/C326S} 小鼠与 2 型糖尿病、胰岛素抵抗和脂肪变性为特征的 *Lepr*^{db/db} 小鼠杂交获得 *Lepr*^{db/db}/*Fpn*^{wt/C326S} 小鼠,以此探讨 IOL 作为 2 型糖尿病患者中观察到的“二次打击”对肝和糖尿

病视网膜病变晚期并发症的影响。BAO 等^[36]将 C57BL/6 背景下的 *Fpn*-floxed (*Fpn*^{fl/fl}) 小鼠与 NEX-Cre 小鼠交配以产生条件性 *Fpn*^{fl/fl/NEXcre} 小鼠,即在大脑皮层和海马的主要神经元中遗传删除 *Fpn*,导致类似阿尔茨海默病的海马萎缩和记忆缺陷,恢复 *Fpn* 可改善 APPswe/PS1dE9 小鼠的铁死亡和记忆障碍。AKR 背景下的 *Hfe*^{-/-} 和 *Tfr*2^{mut} 小鼠杂交以生成 *Hfe*^{-/-}×*Tfr*2^{mut} 双突变 3 月

龄小鼠模型再现 IOL 所致肝损伤^[37]。MOON 等^[38]在连续 13 周对饲养 C57BL/6J 品系的 3 周龄氧化偶氮甲烷/葡聚糖硫酸钠(AOM/DSS)雄性小鼠予以 2000 ppm/kg 浓度硫酸亚铁以构建结肠炎、结直肠癌 IOL 模型,研究发现,IOL 下调 AOM/DSS 诱导的炎症基因表达,延缓了结肠肿瘤的进展,并表明实验结果与饮食 IOL 的配方、剂量有关。

CHAN 等^[39]在 9 周龄雄性 B6D2F1 小鼠给予 300 cGy 的非致死全身辐射+皮下注射 0.5 mg 地塞米松磷酸钠诱导急性髓系白血病的基礎上建立接受每周腹腔注射右旋糖酐铁 37.5 mg,长达 70 周的慢性 IOL 模型,以此探讨 IOL 对急性髓系白血病的影响以及评估铁螯合剂的有效性。CHAUDHARY 等^[40]在 *Hfe*^{-/-}小鼠用链脲佐菌素诱导 2 型糖尿病,以了解 IOL 与糖尿病肾病之间的潜在联系。

2.3 外源性 IOL 动物模型

由于人体存在限制肠道铁吸收的保护机制以及通常不会暴露于高浓度的铁,因此正常情况下发生过量摄入膳食铁而导致的 IOL 的情况并不常见。然而多次输血以及补充铁剂的情况除外。在婴儿群体中,已报道的急性铁中毒剂量为 20 mg/kg 体重(mg/kg BW),此剂量水平足以引起局部反应。然而,当摄入量低于 60 mg/kg BW 时,通常不会观察到全身性的影响。在儿童和成人人群中,致死剂量的铁摄入分别约为 200~300 mg/kg BW 和 1400 mg/kg BW^[41]。在动物实验中,通常使用极高水平的铁补充诱导铁过载。典型的铁浓度各不相同,但累积可高达 2%~3%(20 000~30 000 ppm)。

2.3.1 全转铁蛋白(transferrin-bound iron, Holo-Tf)

ZHANG 等^[42]通过向 C57BL/6 小鼠腹膜内注射 10 mg 的 Holo-Tf 建立急性血清铁过载小鼠模型,即血清铁浓度在 2 h 内显著增长 4 倍,Hamp mRNA 浓度 4 h 达到峰值,而作为血清铁过载和肝铁过载的标志物,Tfr2 和 FTH1 也相应增加。结果显示 Holo-Tf 增强肝细胞对 BMP6 的敏感性,并表示 E3 泛素蛋白连接酶 SMURF1 可以通过增加血清铁过载时肝细胞对 BMP 的反应性来特异性调节 BMP/SMAD 途径。

2.3.2 柠檬酸铁胺

如前文所述,IOL 常会诱发氧化应激、炎症和线粒体功能破坏,从而导致神经元死亡,是神经退行性疾病的发病机制之一^[43]。LI 等^[43]在 8 周龄 C57BL/6 小鼠的双侧海马体上注射浓度为 0.5、1、2 μg/d,并且连续注射 1 周的柠檬酸铁铵(ferric ammonium citrate, FAC),以此构建小鼠海马 IOL 模型,研究表明 IOL 对海马体神经元的损伤可能归因于铁诱导下前蛋白转化酶 furin 的下调以及脑源性神经营养因子(BDNF)的减少。成年野生型斑马鱼通过鳃膜和肠道黏膜在浓度为 4×10^{-4} mol/L 的柠檬酸铁铵水中进行铁吸收,短暂的 60 h 巡游后即可在构建大脑 IOL 模型,其小胶质细胞增殖减缓、线粒体膜电位明显受损,细胞 IOL 表现为 FPN1 和 DMT1 水平增加。CAROTA 等^[6]通过该模型验证 α-硫辛酸作为铁螯合剂具有较低的不良反应,通过 NRF2/HO-1 通路激活发挥抗氧化作用,有机会干预脑损伤所致的 IOL 损害发生。

2.3.3 柠檬酸铁

柠檬酸铁是一种无钙、铁基磷酸盐结合剂,除作为食品添加剂以外,还是用于慢性肾病补钙降磷治疗的口服铁补充剂。HUANG 等^[44]对 9 月龄 C57BL/6 小鼠长达 16 周的灌胃柠檬酸铁(333.3 mg/(kg·d),换算为成人剂量约为 2585.9 mg,小于说明书最大推荐量 4800 mg/d)构建慢性脑 IOL 模型,发现其肝、心脏、肾、大脑有明显 IOL 现象,并发现小鼠认知、行为功能障碍,可作为潜在帕金森病动物模型。

2.3.4 二茂铁剂

β-地中海贫血成年小鼠在 4 个月含 2 g/kg 二茂铁剂的饲料喂养下构建慢性高铁饮食干预下的 IOL 模型,SRIPETCHWANDEE 等^[45]将此模型用于探讨 β-地中海贫血外源性 IOL 所致的神认知功能障碍,发生机制可能是通过 T 型钙通道有关,并验证该 IOL 模型伴有神经胶质过度活化、线粒体功能和动力学变化、脑细胞凋亡和阿尔茨海默病样病理等特征。

2.3.5 次氨基三乙酸铁(ferric nitriloacetic acid, Fe-NTA)

Fe-NTA 常用于诱导氧化应激相关疾病模型,多经肠道吸收。单次腹膜内注射 10 mg Fe/kg 次

氨基三乙酸铁后血清铁浓度在 1 h 后达到峰值,还会增加肝脂质过氧化和血清肝损伤标志物的释放,在 24 h 后铁浓度回落至未治疗水平,最初用于建立胰腺内分泌细胞受损引发糖尿病的铁过载动物模型。随后人们发现选用近 90% 的 Wistar 雄性大鼠经多次注射后可在在谷胱甘肽循环强氧化刺激下引发肾 IOL 以及铁死亡,并促使肾近端小管中 Cdkn2a/3b 失活诱发肾细胞癌^[46]。

2. 3. 6 右旋糖酐铁(iron dextran, Fe Dex)

Fe Dex 是继发性 IOL 动物模型最常见的铁剂,并且常采取腹腔内注射的方式进行造模。腹腔注射右旋糖酐铁引起的急性 IOL 会对大鼠下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴产生毒性作用^[47]。SHU 等^[48]采取给 2 月龄的野生型小鼠每周 5 d 腹腔注射 300 μ L 的 10 mg Fe Dex 2~4 周构建全身 IOL 动物模型。FIDELIS 等^[49]通过对 3 月龄的雄性 Wistar 大鼠每周 5 d、总计两周的腹腔注射 200 mg/(kg $\cdot$ d) 右旋糖酐铁,以此用于评估阻断血管紧张素 AT1 受体减轻 IOL 血管损伤的有效性。QIN 等^[50]通过每周 1 次,连续 8 周对成年雌性 C57BL/6J 小鼠腹腔注射浓度分别为 0.1 g/kg

(LF 组)、0.5 g/kg(MF 组)、1.0 g/kg(HF 组)的右旋糖酐铁构建慢性浓度依赖性 IOL 模型,探讨不同梯度铁水平情况下 IOL 对内分泌和卵巢生殖功能的影响,研究表示 IOL 可能通过破坏卵巢类固醇生成、干扰卵巢微环境和抑制 Wnt 信号传导来损害卵巢功能, HF 组小鼠不孕及难产的比例显著增加,子代铁稳态失衡。

WU 等^[51]通过对雌性 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠进行长达 10 周、每周 200 mg 的右旋糖酐铁腹腔内注射,以此模拟再生障碍性贫血并合并 IOL 的动物模型。ÁVILA 等^[52]通过腹腔内注射 100 mg/(kg $\cdot$ d),每周 5 d,共计 4 周的右旋糖酐铁铁剂补充,以此建立慢性 IOL 小鼠模型,探究有氧运动对 IOL 心肌病变的保护因素。JENSEN 等^[53]通过长达 15 个月对雌性哥廷根小猪在臀部进行肌注右旋糖酐铁(每周 7~125 mg/kg)或经长时间地(7~21 个月)口服右旋糖酐铁(每周 5.0~140 mg/kg)构建慢性 IOL 模型,以此探讨心脏核磁 T2* 技术在 IOL 条件下估计心脏铁的有效性,并发现该模型可用来模拟由输血性 IOL 造成的心脏损害(表 2)。

表 2 外源性铁过载动物模型
Table 2 Animal model of exogenous iron overload

品系 Species-strian	铁剂 Iron formulations	造模方法 Modeling method	评价指标 Evaluation indicators	结局 Outcome
C57BL/6 雄性小鼠 ^[42] C57BL/6 male mice	2 mg/mL Holo-Tf 细胞 2 mg/mL Holo-Tf cell	单次腹腔注射 10 mg Holo-Tf (外源性诱导,急性 IOL) Single intraperitoneal injection of 10 mg Holo-Tf (exogenous induction, acute IOL)	血清铁浓度、Hamp mRNA、转铁蛋白受体 2、铁蛋白重链 1、SMAD1 $\uparrow$, SMURF1 $\downarrow$ SIC, Hamp mRNA, TFR2, FTH1 SMAD1 $\uparrow$, SMURF1 $\downarrow$	IOL
Wistar 大鼠 ^[54] Wistar rat	次氨基三乙酸铁 Fe-NTA	腹腔注射,剂量依次为:2 mg Fe/kg BW/d(3 周), 6 mg Fe/kg BW/d(3 周), 10 mg Fe/kg BW/d(2 个月) (药物诱导) Intraperitoneal injection at doses of: 2 mg Fe/kg BW/day (3 weeks), 6 mg Fe/kg BW/day (3 weeks), 10 mg Fe/kg BW/day (2 months) (drug induction)	肝铁浓度、转铁蛋白 $\uparrow$ LIC, Tf $\uparrow$	糖尿病、IOL、胰岛功能障碍 Diabetes mellitus, iron overload, islet dysfunction
C57BL/6 雄性小鼠 ^[42] C57BL/6 male mice	2% 羰基铁 2% carbonyl iron	喂养口服 2% 羰基铁(1 周), 随后喂食低铁饮食(2~6 ppm 铁)2 d (药物诱导) Oral administration of 2% carbonyl iron (1 week), followed by a low-iron diet (2~6 ppm iron) for 2 days (drug induction)	肝铁浓度、铁蛋白重链 1、Hamp mRNA、Bmp6 mRNA、磷酸化的 SMAD1 和 SMAD5 蛋白 $\uparrow$ LIC, FTH1, Hamp mRNA, Bmp6 mRNA, pSMAD1/5 $\uparrow$	肝铁过载 Hepatic iron overload

续表2

品系 Species-strian	铁剂 Iron formulations	造模方法 Modeling method	评价指标 Evaluation indicators	结局 Outcome
Wistar 雄 性 大鼠 ^[55] Wistar male rat	聚麦芽糖铁 Iron polymaltose	单次腹腔注射 45 mg/kg BW STZ 诱导糖尿病模型,随后管饲聚麦芽糖铁 3 mg Fe/kg BW/d (12 周)(药物诱导) Single intraperitoneal injection of 45 mg/kg BW STZ to induce diabetes, followed by oral gavage of polymaltose iron at 3 mg Fe/kg BW/day (12 weeks)(drug induction)	铁调素↓,转铁蛋白受体↓,二价金属转运蛋白 1(肾)↓ Hepcidin ↓, Tfr ↑, DMT1 (kidney) ↓	糖尿病性肾病 Diabetic nephropathy
野 生 型 斑 马鱼 ^[6] wild-type zebrafish	柠檬酸铁铵 FAC	置于含有 400 μmol/L 的柠檬酸铁铵的鱼箱里巡游 60 h(药物诱导,急性 IOL) Placed in a fish tank containing 400 μmol/L ferric ammonium citrate for 60 h (drug induction, acute iron overload)	hmox1b、sod1、ptgs1 ↑,小胶质细胞↓,二价金属转运蛋白 1、Fpn mRNA ↑ hmox1b, sod1, ptgs1 ↑, microglial cell ↓, DMT1, Fpn mRNA ↑	脑铁沉积 Brain iron deposition
C57BL/6 雄 性 小鼠 ^[44] C57BL/6 male mice	柠檬酸铁 Ferric citrate	灌胃 2.5 mg Fe/d (16 周)(药物干预铁代谢诱导,慢性 IOL) Oral gavage of 2.5 mg Fe/d (16 weeks) (drug intervention for iron metabolism induction, chronic IOL)	黑质和脑基底神经节铁沉积,肝铁、血清铁浓度、转铁蛋白受体 1、铁转运蛋白 ↑ Substantia nigra and basal ganglia iron accumulation, LIC, SIC, Tfr1, Fpn ↑	帕金森病 Parkinson's disease
C57BL/6 小鼠 ^[1] C57BL/6 mice	右旋糖酐铁 Fe Dex	腹腔注射:100 mg/(kg·d),连续 5 d(药物诱导,急性 IOL) Intraperitoneal injection; 100 mg/(kg·d)for 5 consecutive days (drug induction, acute IOL)	血清铁浓度、总铁结合力 ↑ SIC, TIBC ↑	高脂血症 Hyperlipidemia
C57BL/6J 雌 性小鼠 ^[50] C57BL/6J female mice	右旋糖酐铁 Fe Dex	腹膜注射:1.0 g/kg,每周 1 次,持续 8 周(慢性 IOL) Intraperitoneal injection; 1.0 g/kg, once weekly for 8 weeks (chronic IOL)	肝铁、血清铁浓度 ↑,转铁蛋白受体 mRNA ↓,Slc40a1 mRNA、促卵泡激素 ↑ LIC, SIC ↑, Tfrc mRNA ↓, Ftl1, Slc40a1 mRNA, FSH ↑	不孕及难产,卵巢功能受损 Infertility and difficult labor, ovarian function impairment
Wistar 雄 性 大鼠 ^[56] Wistar male rat	葡聚糖肝素酸复合物 Dextran heparin complex	腹腔注射 IDHC 100 mg/kg,隔日 1 次,连续 8 次(药物诱导) Intraperitoneal injection of IDHC (100 mg/kg), every other day, for a total of 8 administrations(drug induction)	肝铁、血清铁浓度 ↑, Hamp、铁蛋白轻链 1、Slc40a1、转铁蛋白受体、铁调节蛋白 1、铁调节蛋白 2 ↓,氧化型谷胱甘肽、Hmox1 ↑ LIC, SIC ↑, Hamp, Ftl, Slc40a1, Trfc, IRP1, IRP2 ↓, GSSG, Hmox1 ↑	胆汁分泌减少、代谢异常肠病综合征 Reduced bile secretion, metabolic abnormal enteropathy syndrome
哥 廷 根 迷 你 雌猪 ^[57] Gottingen miniature female pig	右旋糖酐铁 Fe Dex	右旋糖酐铁,5.0~140 mg Fe/kg 体重,每周 1 次肌肉注射,持续 14 个月 (药物诱导) Iron dextran, 5.0 ~ 140 mg Fe/kg body weight, intramuscular injection once weekly for 14 months (drug induction)	心脏铁沉积 Cardiac iron deposition	心脏铁沉积 Cardiac iron deposition

续表2

品系 Species-strian	铁剂 Iron formulations	造模方法 Modeling method	评价指标 Evaluation indicators	结局 Outcome
C57BL/6 小鼠 ^[43] C57BL/6 mice	柠檬酸铁铵 FAC	通过立体定向技术将 1 μL 的柠檬酸铁铵注射至海马体中(药物诱导) Injection of 1 μL of ferric ammonium citrate into the hippocampus via stereotactic technique (drug induction)	铁蛋白轻链、铁蛋白重链 ↑, 转铁蛋白受体 1 ↓ FTL, FTH ↑ Tfri ↓	海马神经损伤 Hippocampal neural injury
Wistar 大鼠 ^[41] Wistar rat	蔗糖铁氢氧化物 SFOH	实验 24 h 以前通过静脉注射给予 15 mg/kg 的铁羧甲基麦芽糖诱导 IOL,随后每天口服管喂蔗糖铁氢氧化物 40 mg Fe/kg BW(13 周)(药物诱导) 24 h prior, IOL was induced by intravenous injection of 15 mg/kg iron carboxymaltose, followed by daily oral gavage of 40 mg Fe/kg BW sucrose iron hydroxide for 13 weeks (drug induction)	脾铁沉积(与雌性相比) ↑, 肝铁浓度 ↓、血清铁浓度 ↑(与硫酸亚铁相比) Spleen iron deposition (compared to female rat) ↑, LIC ↓, SIC ↑ (compared to ferrous sulfate)	IOL
Wistar 大鼠 ^[41] Wistar rat	硫酸亚铁 Ferrous sulfate	实验 24 h 以前通过静脉注射给予 15 mg/kg 的铁羧甲基麦芽糖诱导 IOL,随后每天口服管喂硫酸亚铁 40 mg Fe/kg BW(13 周)(药物诱导) 24 h prior, IOL was induced by intravenous injection of 15 mg/kg iron carboxymaltose, followed by daily oral gavage of 40 mg Fe/kg BW ferrous sulfate for 13 weeks (drug induction)	肝铁浓度 ↑ ↑(与雄性相比), 脾铁沉积(与雌性相比) LIC ↑ ↑ (compared to male rat), spleen iron deposition (compared to female rat)	IOL

注:Ho-If;全转铁蛋白;Hamp mRNA:编码铁调素的信使 RNA;TFR2:转铁蛋白受体 2;FTH:铁蛋白重链;FTL:铁蛋白轻链;SMAD1: SMAD 家族成员 1;SMURF1;SMAD 特异性 E3 泛素蛋白连接酶 1;DMT1:二价金属转运蛋白 1;hmox1b:血红素加氧酶 1 的同工酶;sod1:超氧化物歧化酶 1;ptsg1:前列腺素内过氧化物合酶 1;Tfrc:转铁蛋白受体;IRP:铁调节蛋白;Slc40a1:铁转运蛋白;FSH:促卵泡激素;GSSG:氧化型谷胱甘肽。

Note. Ho-If, Holo-transferrin. Hamp mRNA, Hepcidin mRNA. TFR2, Transferrin receptor 2. FTH, Ferritin heavy chain. FTL, Ferritin light chain. SMAD1, SMAD family member 1. SMURF1, SMAD Ubiquitination regulatory factor 1. DMT1, Divalent metal transporter 1. hmox1b, Heme oxygenase 1b. sod1, Superoxide dismutase 1. ptsg1, Prostaglandin-endoperoxide synthase 1. Tfrc, Transferrin receptor. IRP, Iron regulatory protein. Slc40a1, Solute carrier family 40 member 1. FSH, Follicle stimulating hormone. GSSG, Oxidized glutathione.

3 总结与展望

基因编辑技术的发展极大地促进了铁过载动物模型的精确构建。特别是携带 *Hfe*、*Hjv*、*Hamp*、*Tfr2* 和 *Slc40a1* 基因突变的模型,在模拟人类铁过载病理状态中显示出高度的相关性,为 HH 铁代谢紊乱研究提供了关键工具。IOL 与其他病理模型共同诱导的混合实验模式,涉及对多种疾病和病理状态的综合模拟,这些模型越来越贴近临床实际需求,为研究铁代谢紊乱及其对不同器官功能影响提供了更为精确的实验平台。

IOL 作为一种临床现象,并非孤立发生,而是与多种疾病及病理过程紧密相关。科研人员通

过建立动物模型模拟铁质在心脏、肝、肾、下丘脑等关键器官的沉积,深入探究了 IOL 引发的心肌损害、脑神经损伤、氧化应激、糖脂代谢紊乱以及肝肾损伤等病理变化。这些研究成果为深入理解 IOL 及铁死亡的病理机制、开发新的治疗方法提供了宝贵的实验基础。

在构建 IOL 动物模型时,原发性模型利用 CRISPR/Cas9 和 Cre/loxP 技术模拟铁代谢基因突变。CRISPR/Cas9 以其高效率和精确性在基因编辑中占主导地位,而 Cre/loxP 则因其时空特异性在转基因模型构建中被广泛采用。尽管如此,CRISPR/Cas9 存在脱靶风险,Cre/loxP 可能引发细胞毒性和特异性不足。通过改造 Cas9 蛋白、

优化 gRNA 设计、调控 Cas9 表达量以及选择适宜的启动子和增强子,可以有效减少这些技术在模型构建中的局限性,增强模型的准确性和可靠性。

继发性 IOL 模型主要通过高铁饮食诱导和药物干预铁代谢来模拟由继发性因素引起的铁代谢紊乱。小鼠因遗传和生物学特性与人类相近,常被用作 IOL 研究的模型。然而,小鼠模型与人体 IOL 存在差异,铁相关参数受遗传背景、性别、年龄等因素影响,如 C57BL/6J 小鼠脾中铁含量高于 C57BL/6N^[58]。小鼠在基础代谢率、抗氧化应激能力、粪便排铁等方面具有生理性优势,增加了研究 IOL 终末期疾病表现的难度。此外,继发性 IOL 模型还受铁剂种类、剂型、性激素、炎症、给药途径、剂量等因素的影响。口服铁剂是常用的慢性依赖性 IOL 模型,但铁化合物的理化特性和吸收机制以及体内环境导致铁吸收存在差异^[59]。因此,构建模型时必须综合考虑这些因素,以更准确地模拟患者体内生理状态,推断结果并解释人类疾病的病理生理学及其临床意义。需建立统一规范的综合评价体系,以确保模型的特异性和可重复性。

小鼠作为 IOL 模型虽然应用广泛,但并不能完全模拟人类的 IOL 状况。因此,研究者开始转向家兔、斑马鱼、恒河猴和猪等中型至大型实验动物,更好地满足研究 IOL 多种病理特征的需求。特别是猪,作为杂食性动物,其对血红素铁和非血红素铁的吸收能力与人类相似,加之其生理结构和功能与人类高度一致,使其成为研究人类 IOL 的理想模型之一。正如前文所提及,有研究者已经采用猪模型来研究慢性 IOL 对心肌的损害。尽管体外细胞实验在本文中未被详细讨论,它们在铁代谢研究和 IOL 模型构建中扮演着不可或缺的角色。体外细胞实验能够揭示临床和动物模型难以直接观察到的发病机制,为 IOL 的干预措施提供创新思路。

参考文献:

- [1] TANG Y, WANG D, ZHANG H, et al. Rapid responses of adipocytes to iron overload increase serum TG level by decreasing adiponectin [J]. J Cell Physiol, 2021, 236(11): 7544–7553.
- [2] CHEN X, KANG R, KROEMER G, et al. Organelle-specific regulation of ferroptosis [J]. Cell Death Differ, 2021, 28(10): 2843–2856.
- [3] SUNG H K, MURUGATHASAN M, ABDUL-SATER A A, et al. Autophagy deficiency exacerbates iron overload induced reactive oxygen species production and apoptotic cell death in skeletal muscle cells [J]. Cell Death Dis, 2023, 14(4): 252.
- [4] GUO J, DUAN L, HE X, et al. A combined model of human iPSC-derived liver organoids and hepatocytes reveals ferroptosis in DGUOK mutant mtDNA depletion syndrome [J]. Adv Sci (Weinh), 2021, 8(10): 2004680.
- [5] LIU W, WU Y, WEI H, et al. Lactate administration improves laboratory parameters in murine models of iron overload [J]. Blood, 2024, 143(11): 1045–1049.
- [6] CAROTA G, DISTEFANO A, SPAMPINATO M, et al. Neuroprotective role of α -lipoic acid in iron-overload-mediated toxicity and inflammation in *in vitro* and *in vivo* models [J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(8): 1596.
- [7] 黄一羚, 罗嘉强, 彭鹏. 脑铁沉积动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1102–1106.
- [8] HUANG Y L, LUO J Q, PENG P. Research progress on animal models of brain iron deposition [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1102–1106.
- [9] EMÍLIA D, MONTEIRO JESSYCA D C, SUZANA F, et al. Can iron and polyunsaturated fatty acid supplementation induce ferroptosis? [J]. Cell Physiol Biochem, 2023, 57(S1): 24–41.
- [10] GANZ T, NEMETH E, RIVELLA S, et al. TMPRSS6 as a therapeutic target for disorders of erythropoiesis and iron homeostasis [J]. Adv Ther, 2023, 40(4): 1317–1333.
- [11] KANG Y, ZHU R, LI S, et al. Erythropoietin inhibits ferroptosis and ameliorates neurological function after spinal cord injury [J]. Neural Regen Res, 2023, 18(4): 881–888.
- [12] PINYOPORNPANISH K, TANTIWORAWIT A, LEERAPUN A, et al. Secondary iron overload and the liver: a comprehensive review [J]. J Clin Transl Hepatol, 2023, 11(4): 932–941.
- [13] MO M, PAN L, DENG L, et al. Iron overload induces hepatic ferroptosis and insulin resistance by inhibiting the Jak2/stat3/slc7a11 signaling pathway [J]. Cell Biochem Biophys, 2024, 82(3): 2079–2094.
- [14] WANG X, GARRICK M D, COLLINS J F. Animal models of normal and disturbed iron and copper metabolism [J]. J Nutr, 2019, 149(12): 2085–2100.
- [15] RENASSIA C, LOUIS S, CUVELLIER S, et al. Neutrophils from hereditary hemochromatosis patients are protected from iron excess and are primed [J]. Blood Adv, 2020, 4(16): 3853–3863.

- [15] KATSAROU A, GKOUVATSOS K, FILLEBEEN C, et al. Tissue-specific regulation of ferroportin in wild-type and *hju^{-/-}* mice following dietary iron manipulations [J]. *Hepatol Commun*, 2021, 5(12): 2139–2150.
- [16] SCHMIDT P J, FITZGERALD K, BUTLER J S, et al. Global loss of Tfr2 with concomitant induced iron deficiency greatly ameliorates the phenotype of a murine thalassemia intermedia model [J]. *Am J Hematol*, 2021, 96(2): 251–257.
- [17] XIAO X, DEV S, CANALI S, et al. Endothelial bone morphogenetic protein 2 (Bmp2) knockout exacerbates hemochromatosis in homeostatic iron regulator (hfe) knockout mice but not Bmp6 knockout mice [J]. *Hepatology*, 2020, 72(2): 642–655.
- [18] PAUK M, KUFNER V, RUMENOVIC V, et al. Iron overload in aging *Bmp6^{-/-}* mice induces exocrine pancreatic injury and fibrosis due to acinar cell loss [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(4): 60.
- [19] TRAEGER L, GALLITZ I, SEKHRI R, et al. ALK3 undergoes ligand-independent homodimerization and BMP-induced heterodimerization with ALK2 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 129: 127–137.
- [20] LIU Y, FILLEBEEN C, FOREST A, et al. Perturbations in lipid metabolism and gut microbiota composition precede cardiac dysfunction in a mouse model of thalassemia [J]. *FASEB J*, 2023, 37(12): e23257.
- [21] WIMMER I, SCHARLER C, KADOWAKI T, et al. Iron accumulation in the choroid plexus, ependymal cells and CNS parenchyma in a rat strain with low-grade haemolysis of fragile macrocytic red blood cells [J]. *Brain Pathol*, 2021, 31(2): 333–345.
- [22] MENG H, YU Y, XIE E, et al. Hepatic HDAC3 regulates systemic iron homeostasis and ferroptosis *via* the hippo signaling pathway [J]. *Research (Wash D C)*, 2023, 6: 0281.
- [23] RISHI G, SECONDES E S, ASPLETT K, et al. Dysregulated hepcidin response to dietary iron in male mice with reduced *Gnpat* expression [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(8): BSR20201508.
- [24] AN P, WANG J, WANG H, et al. *Gnpat* does not play an essential role in systemic iron homeostasis in murine model [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(7): 4118–4126.
- [25] CANALI S, ZUMBRENNEN-BULLOUGH K B, CORE A B, et al. Endothelial cells produce bone morphogenetic protein 6 required for iron homeostasis in mice [J]. *Blood*, 2017, 129(4): 405–414.
- [26] WANG C Y, CORE A B, CANALI S, et al. *Smad1/5* is required for erythropoietin-mediated suppression of hepcidin in mice [J]. *Blood*, 2017, 130(1): 73–83.
- [27] LEE S M, LOGUINOV A, FLEMING R E, et al. Effects of strain and age on hepatic gene expression profiles in murine models of HFE-associated hereditary hemochromatosis [J]. *Genes Nutr*, 2015, 10(1): 443.
- [28] TOMATSU S, ORII K O, FLEMING R E, et al. Contribution of the H63D mutation in HFE to murine hereditary hemochromatosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(26): 15788–15793.
- [29] FISCHER C, VOLANI C, KOMLÓDI T, et al. Dietary iron overload and *Hfe^{-/-}* related hemochromatosis alter hepatic mitochondrial function [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(11): 1818.
- [30] GKOUVATSOS K, WAGNER J, PAPANIKOLAOU G, et al. Conditional disruption of mouse HFE2 gene: maintenance of systemic iron homeostasis requires hepatic but not skeletal muscle hemojuvelin [J]. *Hepatology*, 2011, 54(5): 1800–1807.
- [31] ZUMERLE S, MATHIEU J R R, DELGA S, et al. Targeted disruption of hepcidin in the liver recapitulates the hemochromatotic phenotype [J]. *Blood*, 2014, 123(23): 3646–3650.
- [32] ZOHNI E, DE DOMENICO I, POLLOCK A, et al. The flatiron mutation in mouse ferroportin acts as a dominant negative to cause ferroportin disease [J]. *Blood*, 2007, 109(10): 4174–4180.
- [33] POLI M, ANOWER-E-KHUDA F, ASPERTI M, et al. Hepatic heparan sulfate is a master regulator of hepcidin expression and iron homeostasis in human hepatocytes and mice [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(36): 13292–13303.
- [34] STEINBICKER A U, BARTNIKAS T B, LOHMEYER L K, et al. Perturbation of hepcidin expression by BMP type I receptor deletion induces iron overload in mice [J]. *Blood*, 2011, 118(15): 4224–4230.
- [35] ALTAMURA S, MÜDDER K, SCHLOTTERER A, et al. Iron aggravates hepatic insulin resistance in the absence of inflammation in a novel *db/db* mouse model with iron overload [J]. *Mol Metab*, 2021, 51: 101235.
- [36] BAO W D, PANG P, ZHOU X T, et al. Loss of ferroportin induces memory impairment by promoting ferroptosis in Alzheimer's disease [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(5): 1548–1562.
- [37] DELIMA R D, CHUA A C G, TIRNITZ-PARKER J E E, et al. Disruption of hemochromatosis protein and transferrin receptor 2 causes iron-induced liver injury in mice [J]. *Hepatology*, 2012, 56(2): 585–593.
- [38] MOON S, KIM M, KIM Y, et al. Supplementation with high or low iron reduces colitis severity in an AOM/DSS mouse model [J]. *Nutrients*, 2022, 14(10): 2033.
- [39] CHAN L S A, GU L C, WELLS R A. The effects of

- secondary iron overload and iron chelation on a radiation-induced acute myeloid leukemia mouse model [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 509.
- [40] CHAUDHARY K, CHILAKALA A, ANANTH S, et al. Renal iron accelerates the progression of diabetic nephropathy in the HFE gene knockout mouse model of iron overload [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2019, 317(2): F512–F517.
- [41] FLOEGE J, FUNK F, KETTELER M, et al. Iron kinetics following treatment with sucroferric oxyhydroxide or ferric citrate in healthy rats and models of anaemia, iron overload or inflammation [J]. Nephrol Dial Transplant, 2020, 35(6): 946–954.
- [42] ZHANG N, YANG P, LI Y, et al. Serum iron overload activates the SMAD pathway and hepcidin expression of hepatocytes *via* SMURF1 [J]. J Clin Transl Hepatol, 2024, 12(3): 227–235.
- [43] LI J, DING Y, ZHANG J, et al. Iron overload suppresses hippocampal neurogenesis in adult mice: Implication for iron dysregulation-linked neurological diseases [J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(2): e14394.
- [44] HUANG C, MA W, LUO Q, et al. Iron overload resulting from the chronic oral administration of ferric citrate induces Parkinsonism phenotypes in middle-aged mice [J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(21): 9846–9861.
- [45] SRIPETCHWANDEE J, KHAMSEKAEW J, SVAITI S, et al. Deferiprone and efonidipine mitigated iron-overload induced neurotoxicity in wild-type and thalassemic mice [J]. Life Sci, 2019, 239: 116878.
- [46] OKAZAKI Y. The role of ferric nitrilotriacetate in renal carcinogenesis and cell death: from animal models to clinical implications [J]. Cancers (Basel), 2022, 14(6): 1495.
- [47] TALAULIKAR V S, BAJORIA R, EHIDIAMHEN A J, et al. A 10-year longitudinal study of evaluation of ovarian reserve in women with transfusion-dependent beta thalassaemia major [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2019, 238: 38–43.
- [48] SHU W, BAUMANN B H, SONG Y, et al. Iron accumulates in retinal vascular endothelial cells but has minimal retinal penetration after IP iron dextran injection in mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2019, 60(13): 4378–4387.
- [49] FIDELIS H G, MAGESKI J G A, GOES S C E, et al. Blockade of angiotensin AT₁ receptors prevents arterial remodelling and stiffening in iron-overloaded rats [J]. Br J Pharmacol, 2020, 177(5): 1119–1130.
- [50] QIN X, LIANG D, HU M, et al. Chronic overload of concentration-dependent iron exerts different effects on ovarian function in C57BL/6J mice [J]. Biol Reprod, 2021, 104(6): 1347–1359.
- [51] WU D, WEN X, XU L, et al. Iron chelation effect of curcumin and baicalein on aplastic *Anemia* mouse model with iron overload [J]. Iran J Basic Med Sci, 2019, 22(6): 660–668.
- [52] ÁVILA R A, ROSSI E M, DE CARVALHO G M, et al. Moderate-intensity aerobic training reduces cardiac damage attributable to experimental iron overload in rats [J]. Exp Physiol, 2021, 106(8): 1772–1784.
- [53] JENSEN P D, NIELSEN A H, SIMONSEN C W, et al. *In vivo* calibration of the T2* cardiovascular magnetic resonance method at 1.5 T for estimation of cardiac iron in a minipig model of transfusional iron overload [J]. J Cardiovasc Magn Reson, 2021, 23(1): 27.
- [54] AWAI M, NARASAKI M, YAMANOI Y, et al. Induction of diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitrilotriacetate. A model of experimental hemochromatosis [J]. Am J Pathol, 1979, 95(3): 663–673.
- [55] LÓPEZ M, QUINTERO-MACÍAS L, HUERTA M, et al. Capsaicin decreases kidney iron deposits and increases hepcidin levels in diabetic rats with iron overload: a preliminary study [J]. Molecules, 2022, 27(22): 7764.
- [56] PRASNICKA A, LASTUVKOVA H, ALAEI FARADONBEH F, et al. Iron overload reduces synthesis and elimination of bile acids in rat liver [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 9780.
- [57] JENSEN P D, NIELSEN A H, SIMONSEN C W, et al. Biopsy-based optimization and calibration of a signal-intensity-ratio-based MRI method (1.5 Tesla) in a dextran-iron loaded mini-pig model, enabling estimation of very high liver iron concentrations [J]. MAGMA, 2022, 35(5): 843–859.
- [58] MARQUES O, NEVES J, HORVAT N K, et al. Iron-related parameters are altered between C57BL/6N and C57BL/6J *Mus musculus* wild-type substrains [J]. Hemasphere, 2019, 3(6): e304.
- [59] RÍOS-SILVA M, CÁRDENAS Y, ORTEGA-MACÍAS A G, et al. Animal models of kidney iron overload and ferroptosis: a review of the literature [J]. BioMetals, 2023, 36(6): 1173–1187.

[收稿日期]2024-09-03

王欣,翟紫薇,王智洋,等. HIF-1 α 与心脏能量代谢关系的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(4): 128-134.

Wang X, Zhai ZW, Wang ZY, et al. Relationship between hypoxia-inducible factor-1 α and cardiac energy metabolism [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 128-134.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.013

HIF-1 α 与心脏能量代谢关系的研究

王 欣[#], 翟紫薇[#], 王智洋, 吴云红^{*}, 朱 亮^{*}

(大连医科大学基础医学院, 辽宁 大连 116000)

【摘要】 心脏,作为人体的“能量工厂”,担负着维持全身血液循环和氧气供应的关键任务,因此,其功能的正常发挥依赖于大量 ATP 生成以支持其机械活动。然而,在心肌梗死、冠状动脉硬化以及肺动脉高压等病理状态下,由于血流供应不足,导致氧气供应的减少,进而激活了一系列代偿性保护机制。缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)作为一种在缺氧环境下稳定表达的核转录因子,已被证实能够通过促进血管生成、调节血管舒张来调控氧气的输送,并通过调节糖代谢和脂代谢的平衡来优化氧气的利用,参与多种心脏疾病的调节。HIF-1 α 在心脏能量代谢和氧化应激的调控中,发挥了至关重要的作用。本文系统地总结了 HIF-1 α 在心脏能量代谢重编程中的多种作用机制,结合最新的研究成果,深入探讨了其在心血管疾病中的潜在临床应用价值,并提出了未来的研究方向和可能的治疗策略。通过全面总结 HIF-1 α 在缺血性心脏病中的作用机制,本文旨在为心血管疾病的防治提供新的思路和治疗靶点。

【关键词】 HIF-1 α ; 缺氧; 脂代谢; 糖酵解; 氧化应激

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0128-07

Relationship between hypoxia-inducible factor-1 α and cardiac energy metabolism

WANG Xin[#], ZHAI Ziwei[#], WANG Zhiyang, WU Yunhong^{*}, ZHU Liang^{*}

(College of Basic Medical Sciences, Dalian Medical University, Dalian 116000, China)

【Abstract】 The heart serves as the “energy factory” of the human body and is responsible for maintaining blood circulation and oxygen supplies. Its normal functioning thus relies on the generation of substantial amounts of ATP to support its mechanical activities. Under pathological conditions such as myocardial infarction, coronary artery sclerosis, and pulmonary hypertension, however, an insufficient blood supply leads to a reduced oxygen supply, subsequently activating a series of compensatory protective mechanisms. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), as a nuclear transcription factor stably expressed under hypoxic conditions, has been shown to regulate oxygen transport by

【基金项目】 辽宁省应用基础研究计划 (2023JH2/101300071); “兴辽英才计划”教学名师 (203843)。

【作者简介】 王欣 (1999—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 心血管疾病。E-mail: wangxin199974@ sina. com

翟紫薇 (2000—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 器官移植与功能重建。E-mail: ziweizhai1006@ 163. com

[#] 共同第一作者

【通信作者】 朱亮 (1974—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 器官移植与功能重建。E-mail: zhuliang0210@ sina. com

吴云红 (1978—), 女, 硕士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 医学人工智能。E-mail: yhwu0106@ dm. edu. cn

^{*} 共同通信作者

promoting angiogenesis and vasodilation, and to optimize oxygen utilization by regulating the balance of glucose and lipid metabolisms, thus participating in the regulation of various cardiac diseases. HIF-1 α plays a crucial role in regulating cardiac energy metabolism and oxidative stress. This review systematically summarizes recent research regarding the various mechanisms of action of HIF-1 α in reprogramming cardiac energy metabolism, explores its potential clinical applications in cardiovascular diseases, and proposes future research directions and possible treatment strategies. By comprehensively summarizing the mechanism of HIF-1 α in ischemic heart disease, this article aims to provide new ideas and therapeutic targets for the prevention and treatment of cardiovascular diseases.

【Keywords】 HIF-1 α ; hypoxia; lipid metabolism; glycolysis; oxidative stress

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

心脏作为生物体的核心动力器官,对能量的需求极为巨大,主要通过氧化磷酸化过程来产生大量的 ATP,以支持其持续的机械收缩和舒张活动,确保全身血液循环和氧气供应^[1]。在全球范围内,心血管疾病已经成为威胁人类健康的重要病因之一^[2]。众多心脏疾病,包括心肌梗死和动脉粥样硬化等,其发展与恶化通常与心肌的缺血缺氧状态密切相关。在心肌缺氧的情况下,能量代谢的重编程成为心脏维持功能和生存的关键机制。

缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1 alpha, HIF-1 α) 是一种在缺氧条件下稳定表达的核转录因子,在心脏能量代谢和氧化应激调控中起着至关重要的作用^[3]。HIF-1 α 能够通过调控糖类和脂肪代谢的平衡^[4],促进血管生成^[5]和血管舒张^[6],改善心脏功能。本文旨在系统综述 HIF-1 α 在心脏能量代谢重编程中的分子机制及其在心血管疾病中的作用,并探讨 HIF-1 α 作为潜在治疗靶点的应用前景。通过总结现有研究的进展与挑战,本文还将展望未来的研究方向,以期对心血管疾病的防治提供新的策略和研究思路。

1 HIF-1 α 的结构特点与生物学功能

HIF 是由对氧敏感的 α 亚基 (HIF α) 和组成性表达的 β 亚基 (HIF β) 组成的异二聚体。HIF-1 α 的水平严格地受到 O₂ 水平的调节,在常氧条件下,其高度保守的脯氨酸残基 (Pro405 和 Pro531) 被脯氨酸羟化酶结构域 (prolyl hydroxylase domain, PHD) 蛋白羟基化后,与肿瘤抑制蛋白 (von hippel-lindau, VHL) 结合发生泛素化,形成 E3 泛素连接酶复合体后标记为蛋白酶体降解^[7]。脯氨酸羟化酶是氧依赖型的,在缺氧

条件下被抑制,不能与 VHL 结合靶向 α 亚基的降解, HIF-1 α 进入细胞核与 HIF-1 β 结合形成二聚体并稳定,招募转录共激活因子 p300/CBP (CREB 结合蛋白) 应答元件结合蛋白结合,激活基因转录。

HIF-1 α 在机体多种细胞中表达,在缺氧反应中调节数百个靶基因^[8]。HIF-1 α 能够通过上调促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 增加红细胞生成、调控血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、血管生成素 1 (angiopoietin1, ANGPT1)、血管生成素 2 (angiopoietin 2, ANGPT2) 等^[4] 促进血管生成从而恢复氧稳态。同时参与代谢重编程,使心脏能量代谢向糖酵解转变,以优化损伤心脏的代谢供能,维持心脏正常工作。HIF-1 α 也可以通过促进线粒体自噬^[9],抵抗氧化应激^[10] 减轻心脏损伤。HIF-1 α 在缺氧环境中的多种功能使其在多种缺血性心脏疾病治疗中成为不可忽视的临床靶点。

2 健康心脏的能量代谢

心脏具有很高的 ATP 水解率,其无休止的机械工作很大程度上依赖于 ATP 的产生。健康心脏中,几乎所有 (95%) 的 ATP 都来源于线粒体氧化磷酸化,其余来源于糖酵解和柠檬酸循环。70%~90% 的心脏 ATP 是由脂肪酸氧化产生,剩下的来自于葡萄糖和乳糖的氧化,以及少量的酮体和氨基酸^[11]。在健康心脏的工作状态下,葡萄糖代谢和脂肪酸代谢相互协调,共同维持心肌细胞的能量需求。

3 缺血缺氧心脏的能量代谢

在心脏遭受缺血缺氧刺激,如心肌梗死或压

力超负荷时,血流供应不足,可用氧气量受限,心脏的能量代谢将经历重塑以维持必要的 ATP 供应来支持机械功能。尽管脂肪酸代谢产生的 ATP 量超过糖代谢,但在同等氧气消耗条件下,葡萄糖的完全代谢相较于脂肪酸代谢能够多产生 50% 的能量^[12]。因此,在几乎所有的缺血性心脏疾病中,脂肪酸氧化的减少通常伴随着糖酵解的增强。在此代谢重塑过程中,HIF-1 α 作为一种快速响应损伤的因子,通过调节多种酶的活性来调控代谢重塑的进程。

3.1 脂代谢

3.1.1 脂质分解代谢

在慢性缺氧模型^[12]以及围产期心脏发育^[13]中,心肌 HIF-1 α 积累的小鼠脂肪酸的摄取明显降低,过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferators-activated receptor α , PPAR α)、过氧化物酶体增殖受体 γ 辅激活因子 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 和 β 氧化相关酶的表达水平显著降低,涉及中链酰基辅酶 A 脱氢酶 (medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase, MCAD)、长链酰基辅酶 A 脱氢酶 (long-chain acyl coenzyme A dehydrogenase, LCAD) 和肉碱棕榈酰转移酶 1A (carnitine palmitoyltransferase 1A, CPT1A)。PPAR α 转录调控复合物由 PPAR α 、类视黄醇 X 受体 (retinoid X receptor, RXR) 和 PGC-1 α 组成,与 PPAR 反应元件结合能够调控包括脂肪酸转运蛋白 (fatty acid transporter, FAT)、CPT1、MCAD、LCAD 的心脏脂肪酸摄入和代谢相关基因^[14]。在大鼠心肌细胞中,HIF-1 α 通过降低 PPAR α /RXR 的 DNA 结合活性参与了缺氧诱导的心肌细胞脂肪酸代谢抑制^[15]。基于此,可以推测 HIF-1 α 协同 PPAR α /PGC-1 α 参与到缺血性心脏病的脂质代谢重塑进程。

3.1.2 脂质合成代谢

在缺氧心脏中,甘油三酯 (triglyceride, TAG) 异常积累^[16]。脂肪酸代谢转向糖酵解可以在一定程度解释损伤心脏的脂质积累,但 HIF-1 α 对脂质代谢相关酶的直接作用不可忽视。HIF-1 α 的敲低抑制白细胞分化抗原 36 (cluster of differentiation 36, CD36) 的表达,减少脂肪酸的转运^[17]。同时 PERMAN 等^[18]研究表明,HL-1 细胞

(小鼠心肌细胞) 中脂质积累的增加是由于 HIF-1 α 介导极低密度脂蛋白受体 (very low density lipoprotein receptor, VLDLR) 表达,VLDLR 通过内吞作用介导富含 TAG 的脂蛋白的摄取。在肥厚动物模型^[19]和血管紧张素 II (Angiotensin II, Ang II) 处理细胞^[20]的研究中,HIF-1 α 的激活能够刺激 3-磷酸甘油脱氢酶 1 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1, GPD1) 和甘油-3-磷酸酰基转移酶 (glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT) 增强甘油脂生物合成通路。HIF-1 α 与 VLDLR^[21] 和 GPD1^[22] 的直接调节作用已在其他组织中被证明,其在心脏中直接作用还需进一步探究。同时,在糖代谢障碍的糖尿病^[23]以及慢性心房颤动犬模型^[24]中,HIF-1 α 表达升高伴随心脏脂肪酸氧化率和脂质代谢蛋白表达降低,以及脂质合成的增加。

在缺氧心脏环境中,HIF-1 α 的稳定表达在脂肪酸代谢的氧化和酯化过程中扮演着关键角色。具体而言,该稳定表达有效地抑制了脂肪酸的氧化过程,并促进了脂质合成的进行。然而,针对特定疾病的特定情况,必须进行更为细致和深入地分析。总体而言,在以糖酵解为主导的能量代谢模式下,缺血性心脏病中基因表达的这些变化将进一步加强脂质合成代谢的趋势,而非促进脂质分解代谢的过程。

3.2 糖代谢

3.2.1 心肌细胞

心脏在缺血缺氧的环境中,糖酵解成为获取 ATP 的主要途径。缺血条件下,糖酵解速率随之增加^[25]。葡萄糖转运蛋白 1 (facilitative glucose transporter, GLUT1)、丙酮酸脱氢酶激酶 1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1, PDK1)、己糖激酶 2 (hexokinase 2, HK-2)、磷酸果糖激酶 (phosphofructokinase, PFK)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GADPH) 和乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase, LDHA) 已被证明是 HIF-1 α 的靶基因^[8],在多种心脏疾病中,随着 HIF-1 α 的表达水平改变。

在慢性缺氧模型中,HIF-1 α 稳定表达,明显增加小鼠心肌葡萄糖摄取,GLUT1 和糖酵解酶表达水平始终显著升高,涉及 HK2、PFK1、丙酮酸激酶 M2 (pyruvate kinase M2, PKM2) 和 LDHA^[12,26]。

此外,HIF-1 α 敲除小鼠的 PDK4 表达和丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase,PDH)磷酸化显著更高,PDH 活性显著降低^[12]。在一项主动脉瓣狭窄模型的研究中,随着 HIF-1 α 表达水平逐渐升高,GLUT1 和 GLUT4、HK-2、PFKF2、LDH 和 PK 以及乳酸浓度的表达也升高,糖原含量和 PDH 的表达降低^[27],此外,在缺血再灌注^[28]、心脏肥大模型^[29-30]以及低氧环境中发育的胚胎心跳启动过程中,都表现出伴随着 HIF-1 α 的升高,相关糖酵解酶的表达增加^[31]。

3.2.2 非心肌细胞

上述讨论的为整体心脏或心肌细胞的 HIF-1 α ,但是心房和心室区域中心肌细胞占比为 30.0%、49.2%^[32],此外还有大量的内皮细胞、成纤维细胞、巨噬细胞等。在缺血性心脏疾病中,这些细胞中的 HIF-1 α 表达量也会增加。

紊乱诱导内皮的代谢重编程过程由 HIF-1 α 介导,增加了糖酵解酶和 PDK1 的表达,从而降低了线粒体的呼吸能力^[33]。但是在成纤维细胞中,HIF-1 α 促进糖酵解通量的增加会加速成纤维细胞的活化^[34-35]。在肌成纤维细胞分化过程中,PFKFB3 的沉默降低了 HIF-1 α 的表达^[36],这提示了 HIF-1 α 与 PFKFB3 的复杂调节关系。但无论如何,成纤维细胞中 HIF-1 α 激活的途径促进代谢向异常有氧糖酵解转变^[37-38],促进肌成纤维细胞的活化,加重纤维化进程。

此外,在平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell,VSMC)中,HIF-1 α 的稳定促进 LDHA、PFKFB3 和 HK2 的活性^[39]。同时,有研究显示 HIF-1 α 通过 PDK1 诱导的糖酵解增加,积极抑制线粒体氧化磷酸化,参与巨噬细胞迁移和分化^[40-41]。

在缺氧心脏的葡萄糖代谢过程中,HIF-1 α 上调葡萄糖转运蛋白和糖酵解相关酶(如葡萄糖激酶、PFK 和 LDH),从而增强葡萄糖的摄取与糖酵解速率,促进丙酮酸和乳酸的生成,增加无氧酵解对能量供应的贡献。与此同时,HIF-1 α 下调 PDH 的活性,减少丙酮酸向线粒体氧化的流入,以降低氧消耗。总之,在多种缺血性心脏病的多个细胞类型中,伴随着 HIF-1 α 的上调,通常存在葡萄糖摄取和糖酵解活性的增强。

3.3 氧化应激活性氧(reactive oxygen species,ROS)

线粒体是氧化应激的主要来源,ROS 是在氧化磷酸化过程中由于抗氧化酶和缓冲系统的降解不平衡产生的^[10]。HIF-1 α 直接靶向线粒体来防止氧化应激^[42]。在心梗引起的 ROS 迅速积累的过程中,激活的 HIF-1 α 可以通过抑制 ROS 的生成减轻缺血后成纤维细胞激活和增殖^[43]。同时,HIF-1 α 在转录水平调节丝氨酸棕榈酰基转移酶长链碱基亚基 3(serine palmitoyl transferase long chain base subunit 1,SPTLC3),SPTLC3 的耗尽改变了复合物 I 的组成并降低了其功能,通过氧化磷酸化减少了 ROS 的产生^[25]。HIF-1 α 还能够通过 PGC-1 α 信号通路上调解偶联蛋白 3(uncoupling protein 3,UCP3)^[44]或增加还原谷胱甘肽的产生^[31]来启动氧化保护。

但是也有研究报道了 HIF-1 α 的激活在氧化应激的负向作用。HIF-1 α 诱导的 miR-210 减少线粒体呼吸并增加炎症性巨噬细胞中 ROS 的产生,有利于动脉粥样硬化中的坏死核心形成^[45]。此外也有研究显示,ROS 的产生促进了 HIF-1 α 的表达,表明其双向的作用^[46-47]。总之,HIF-1 α 在对氧化应激的调控根据具体病理进程有不同作用机制,提示 HIF-1 α 能够在多种疾病中发挥不同的作用,在临床应用中,应结合具体情况判断 HIF-1 α 相关药品使用。

4 小结与展望

本文综述了 HIF-1 α 在心脏能量代谢中的核心作用,并探讨了其在缺血性心脏病中的潜在临床应用价值。通过系统性总结 HIF-1 α 在糖代谢、脂代谢以及氧化应激中的调控机制,本文阐明了 HIF-1 α 在心脏病理生理过程中的多重作用。首先,HIF-1 α 在糖代谢中通过调控一系列糖酵解相关基因^[12,27](如 GLUT1、HK2、PFK1、LDHA),促进心肌在缺氧条件下的糖酵解代谢,提高心肌对缺氧环境的适应能力。其次,HIF-1 α 在脂代谢中通过下调脂肪酸氧化相关基因^[12](如 PPAR α 、LCAD、MCAD、CPT1),减少脂肪酸氧化代谢,增强脂质合成通路蛋白活性^[18-20](GPD1, VLDLR, GAPT),优化心肌能量代谢途径,以适应低氧环境。此外,在不同病理进程中,HIF-1 α 通过调控

线粒体功能,适度增加/减少 ROS 的产生^[43,45],保护心肌细胞免受氧化应激的损伤,增强心肌细胞的抗氧化能力,改善心肌在缺氧条件下的生存环境。

未来的研究应进一步探索 HIF-1 α 在不同类型心脏疾病中的具体作用机制,特别是在急性心肌梗死和慢性心力衰竭中的不同调控途径。同时,还应探讨 HIF-1 α 与其他代谢调控因子(如 AMPK、mTOR)的相互作用,揭示其在心脏代谢网络中的关键节点作用。临床转化研究方面,应开展 HIF-1 α 相关药物的临床试验,评估其在心血管疾病治疗中的安全性和有效性,并利用基因编辑技术,开发基于 HIF-1 α 调控的基因治疗方案,验证其在动物模型中的疗效和可行性。此外,通过系统生物学和多组学技术,整合基因、蛋白质和代谢物数据,构建 HIF-1 α 调控网络模型,为心血管疾病的精准治疗提供理论基础。应用单细胞测序技术,研究 HIF-1 α 在心肌细胞和其他心脏细胞类型中的表达特征和功能差异,有望揭示其在心脏代谢调控中的复杂网络。

综上所述,HIF-1 α 在缺血性心脏病中的调控作用和临床应用潜力,为心血管疾病的治疗提供了新的思路和方向。通过深入研究其在能量代谢中的具体机制,开发针对性的治疗手段,有望显著改善心脏疾病患者的预后。未来的研究应继续致力于揭示 HIF-1 α 在心脏代谢调控中的复杂网络,并推动其在临床治疗中的转化应用。

参考文献:

- [1] BUGGER H, BYRNE N J, DALE ABEL E. Animal models of dysregulated cardiac metabolism [J]. *Circ Res*, 2022, 130(12): 1965–1993.
- [2] RALEIGH V, COLOMBO F. Cardiovascular disease should be a priority for health systems globally [J]. *BMJ*, 2023, 382: e076576.
- [3] MAGAR A G, MORYA V K, KWAK M K, et al. A molecular perspective on HIF-1 α and angiogenic stimulator networks and their role in solid tumors: an update [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(6): 3313.
- [4] LI X, ZHANG Q, NASSER M I, et al. Oxygen homeostasis and cardiovascular disease: a role for HIF? [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 128: 110338.
- [5] YAO H, LI J, LIU Z, et al. Ablation of endothelial *Atg7* inhibits ischemia-induced angiogenesis by upregulating *Stat1* that suppresses *Hif1a* expression [J]. *Autophagy*, 2023, 19(5): 1491–1511.
- [6] GONZÁLEZ-CANDIA A, CANDIA A A, ARIAS P V, et al. Chronic intermittent hypobaric hypoxia induces cardiovascular dysfunction in a high-altitude working shift model [J]. *Life Sci*, 2023, 326: 121800.
- [7] MISSIAEN R, LESNER N P, CELESTE SIMON M. HIF: a master regulator of nutrient availability and metabolic cross-talk in the tumor microenvironment [J]. *EMBO J*, 2023, 42(6): e112067.
- [8] SU Z, LIU Y, ZHANG H. Adaptive cardiac metabolism under chronic hypoxia: mechanism and clinical implications [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 625524.
- [9] MARZOOK H, GUPTA A, JAYAKUMAR M N, et al. GSK-3 α -BNIP3 axis promotes mitophagy in human cardiomyocytes under hypoxia [J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 221: 235–244.
- [10] MIALET-PEREZ J, BELAIDI E. Interplay between hypoxia inducible Factor-1 and mitochondria in cardiac diseases [J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 221: 13–22.
- [11] RITTERHOFF J, TIAN R. Metabolic mechanisms in physiological and pathological cardiac hypertrophy: new paradigms and challenges [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(12): 812–829.
- [12] LIU Y, LUO Q, SU Z, et al. Suppression of myocardial hypoxia-inducible factor-1 α compromises metabolic adaptation and impairs cardiac function in patients with cyanotic congenital heart disease during puberty [J]. *Circulation*, 2021, 143(23): 2254–2272.
- [13] ZOU J, WANG W, LU Y, et al. Neddylation is required for perinatal cardiac development through stimulation of metabolic maturation [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(1): 112018.
- [14] WANG S, ZHANG X, HOU Y, et al. SIRT6 activates PPAR α to improve doxorubicin-induced myocardial cell aging and damage [J]. *Chem Biol Interact*, 2024, 392: 110920.
- [15] BELANGER A J, LUO Z, VINCENT K A, et al. Hypoxia-inducible factor 1 mediates hypoxia-induced cardiomyocyte lipid accumulation by reducing the DNA binding activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha/retinoid X receptor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 364(3): 567–572.
- [16] WYANT G A, JIANG Q, SINGH M, et al. Induction of DEPP1 by HIF mediates multiple hallmarks of ischemic cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2024, 150(10): 770–786.
- [17] CHEN C, QIN S, SONG X, et al. PI3K p85 α /HIF-1 α accelerates the development of pulmonary arterial

- hypertension by regulating fatty acid uptake and mitophagy [J]. *Mol Med*, 2024, 30(1): 208.
- [18] PERMAN J C, BOSTRÖM P, LINDBOM M, et al. The VLDL receptor promotes lipotoxicity and increases mortality in mice following an acute myocardial infarction [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(7): 2625–2640.
- [19] KRISHNAN J, SUTER M, WINDAK R, et al. Activation of a HIF1 α -PPAR γ axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy [J]. *Cell Metab*, 2009, 9(6): 512–524.
- [20] ZHU Z Y, WANG F, JIA C H, et al. Apigenin-induced HIF-1 α inhibitory effect improves abnormal glucolipid metabolism in Ang II/hypoxia-stimulated or HIF-1 α -overexpressed H9c2 cells [J]. *Phytomedicine*, 2019, 62: 152713.
- [21] PEYMAN M, BABIN-EBELL A, RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ R, et al. SIRT1 regulates hepatic vldl levels [J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1): 297.
- [22] LIU R, FENG Y, DENG Y, et al. A HIF1 α -GPD1 feedforward loop inhibits the progression of renal clear cell carcinoma *via* mitochondrial function and lipid metabolism [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 188.
- [23] SOUSA FIALHO M D L, PURNAMA U, DENNIS K M J H, et al. Activation of HIF1 α rescues the hypoxic response and reverses metabolic dysfunction in the diabetic heart [J]. *Diabetes*, 2021, 70(11): 2518–2531.
- [24] LIU Y, BAI F, LIU N, et al. Metformin improves lipid metabolism and reverses the Warburg effect in a canine model of chronic atrial fibrillation [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2020, 20(1): 50.
- [25] KOVILAKATH A, MAURO A G, VALENTINE Y A, et al. SPTLC3 is essential for complex I activity and contributes to ischemic cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2024, 150(8): 622–641.
- [26] ZHOU B, CAUDAL A, TANG X, et al. Upregulation of mitochondrial ATPase inhibitory factor 1 (ATPIF1) mediates increased glycolysis in mouse hearts [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(10): e155333.
- [27] SANT'ANA P G, TOMASI L C, MURATA G M, et al. Hypoxia-inducible factor 1- α and glucose metabolism during cardiac remodeling progression from hypertrophy to heart failure [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6201.
- [28] YU W, KONG Q, JIANG S, et al. HSPA12A maintains aerobic glycolytic homeostasis and Histone3 lactylation in cardiomyocytes to attenuate myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *JCI Insight*, 2024, 9(7): e169125.
- [29] KASHIHARA T, MUKAI R, OKA S I, et al. YAP mediates compensatory cardiac hypertrophy through aerobic glycolysis in response to pressure overload [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(6): e150595.
- [30] HE X, CANTRELL A C, WILLIAMS Q A, et al. p53 acetylation exerts critical roles in pressure overload-induced coronary microvascular dysfunction and heart failure in mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2024, 44(4): 826–842.
- [31] SATO T, ICHISE N, KOBAYASHI T, et al. Enhanced glucose metabolism through activation of HIF-1 α covers the energy demand in a rat embryonic heart primordium after heartbeat initiation [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 74.
- [32] LITVINUKOVÁ M, TALAVERA-LÓPEZ C, MAATZ H, et al. Cells of the adult human heart [J]. *Nature*, 2020, 588(7838): 466–472.
- [33] WU D, HUANG R T, HAMANAKA R B, et al. HIF-1 α is required for disturbed flow-induced metabolic reprogramming in human and porcine vascular endothelium [J]. *eLife*, 2017, 6: e25217.
- [34] ZHANG Y, ZHANG H, YANG Z, et al. miR-155 down-regulation protects the heart from hypoxic damage by activating fructose metabolism in cardiac fibroblasts [J]. *J Adv Res*, 2022, 39: 103–117.
- [35] ZOU X, OUYANG H, LIN F, et al. MYBPC3 deficiency in cardiac fibroblasts drives their activation and contributes to fibrosis [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(11): 948.
- [36] WANG F, YIN X, FAN Y M, et al. Upregulation of glycolytic enzyme PFKFB3 by deubiquitinase OTUD4 promotes cardiac fibrosis post myocardial infarction [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2023, 101(6): 743–756.
- [37] HAILIWU R, ZENG H, ZHAN M, et al. Salvianolic acid A diminishes LDHA-driven aerobic glycolysis to restrain myofibroblasts activation and cardiac fibrosis *via* blocking Akt/GSK-3 β /HIF-1 α axis [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(10): 4540–4556.
- [38] ZHOU Y, SONG K, TU B, et al. METTL3 boosts glycolysis and cardiac fibroblast proliferation by increasing AR methylation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 223(Pt A): 899–915.
- [39] XIAO W, SHRIMALI N, VIGDER N, et al. Branched-chain α -ketoacids aerobically activate HIF1 α signalling in vascular cells [J]. *Nat Metab*, 2024, 6(11): 2138–2156.
- [40] LIN Z J, DONG X, HE H, et al. A simplified herbal decoction attenuates myocardial infarction by regulating macrophage metabolic reprogramming and phenotypic differentiation *via* modulation of the HIF-1 α /PDK1 axis [J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 75.
- [41] SUN H J, ZHENG G L, WANG Z C, et al. Chicoric acid ameliorates sepsis-induced cardiomyopathy *via* regulating macrophage metabolism reprogramming [J]. *Phytomedicine*, 2024, 123: 155175.

- [42] CHUNG Y J, HOARE Z, BAARK F, et al. Elevated Na is a dynamic and reversible modulator of mitochondrial metabolism in the heart [J]. Nat Commun, 2024, 15 (1): 4277.
- [43] JANBANDHU V, TALLAPRAGADA V, PATRICK R, et al. Hif-1a suppresses ROS-induced proliferation of cardiac fibroblasts following myocardial infarction [J]. Cell Stem Cell, 2022, 29(2): 281–297.
- [44] ZHANG Q, GUO D, WANG Y, et al. Danqi pill protects against heart failure post-acute myocardial infarction *via* HIF-1 α /PGC-1 α mediated glucose metabolism pathway [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 458.
- [45] KARSHOVSKA E, WEI Y, SUBRAMANIAN P, et al. HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) promotes macrophage necroptosis by regulating miR-210 and miR-383 [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020, 40(3): 583–596.
- [46] LIU R, XU C, ZHANG W, et al. FUNDC1-mediated mitophagy and HIF1 α activation drives pulmonary hypertension during hypoxia [J]. Cell Death Dis, 2022, 13 (7): 634.
- [47] YEGAMBARAM M, SUN X, FLORES A G, et al. Novel relationship between mitofusin 2-mediated mitochondrial hyperfusion, metabolic remodeling, and glycolysis in pulmonary arterial endothelial cells [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(24): 17533.
- [收稿日期]2024–10–17

(上接第 113 页)

- [76] LIU Z, YIN M, LI J, et al. Buyang Huanwu Decoction restores the balance of mitochondrial dynamics after cerebral ischemia-reperfusion through calcium overload reduction by the PKC ϵ -Namp1-Sirt5 axis [J]. J Ethnopharmacol, 2025, 338 (Pt 3): 119003.
- [77] XU Y J, MEI Y, QU Z L, et al. Ligustilide ameliorates memory deficiency in APP/PS1 transgenic mice *via* restoring mitochondrial dysfunction [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 4606752.
- [78] XU Y J, MEI Y, SHI X Q, et al. Albiflorin ameliorates memory deficits in APP/PS1 transgenic mice *via* ameliorating mitochondrial dysfunction [J]. Brain Res, 2019, 1719: 113–123.
- [79] QIN Y R, MA C Q, JIANG J H, et al. Artesunate restores mitochondrial fusion-fission dynamics and alleviates neuronal injury in Alzheimer's disease models [J]. J Neurochem, 2022, 162(3): 290–304.
- [80] ZHANG Y, LIU S, CAO D, et al. Rgl improves Alzheimer's disease by regulating mitochondrial dynamics mediated by the AMPK/Drp1 signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2025, 340: 119285.
- [81] TAO L, LIU Z, LI X, et al. Oleanonic acid ameliorates mutant A β precursor protein-induced oxidative stress, autophagy deficits, ferroptosis, mitochondrial damage, and ER stress *in vitro* [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2024, 1870(8): 167459.
- [82] 焦阳, 郑月, 宋成洁. 依达拉奉对 MPP⁺处理的 PC12 细胞线粒体融合和分裂平衡的保护作用 [J]. 生理学报, 2020, 72 (2): 249–254.
- JIAO Y, ZHENG Y, SONG C J. Protective effect of edaravone on balance of mitochondrial fusion and fission in MPP⁺-treated PC12 cells [J]. Acta Physiol Sin, 2020, 72(2): 249–254.
- [83] GAI C, FENG W D, QIANG T Y, et al. Da-bu-Yin-Wan and Qian-Zheng-San ameliorate mitochondrial dynamics in the Parkinson's disease cell model induced by MPP [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 372.
- [收稿日期]2025–01–06

李新雨,任周新,赵鹏. 基于肺动脉高压的肺血管丛状病变的鼠类模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35 (4): 135–149.

Li XY, Ren ZX, Zhao P. Progress in murine models of pulmonary vascular plexiform lesions of pulmonary arterial hypertension [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 135–149.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.013

基于肺动脉高压的肺血管丛状病变的鼠类模型的研究进展

李新雨¹, 任周新^{1,2*}, 赵 鹏^{1,2}

(1.河南中医药大学中医药科学院, 郑州 450046; 2.河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 郑州 450046)

【摘要】 目前,进行性肺血管病变的干预成为临床肺动脉高压防治的瓶颈和焦点。肺小动脉的丛状病变是不可逆性肺血管异常重构的典型病理表现,也是Ⅳ期肺血管重构的判断标准。当前,对该病变的病理生理学等机制研究尚不完善,临床无有效的干预措施。因此建立相应的动物模型具有重要的意义。本文介绍了丛状病变体视学研究的新进展,重点阐释了“二次打击”等复合刺激诱导和基因工程技术产生的自发性或结合其它刺激产生的大鼠或小鼠丛状病变模型,对这些模型的特点和用途进行了评价,以期对肺血管丛状病变的肺动脉高压的动物实验研究和机制探讨提供参考。

【关键词】 小鼠;大鼠;肺血管丛状病变;复合刺激模型;基因工程技术模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0135-15

Progress in murine models of pulmonary vascular plexiform lesions of pulmonary arterial hypertension

LI Xinyu¹, REN Zhouxin^{1,2*}, ZHAO Peng^{1,2}

(1. Academy of Chinese Medicine Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.

2. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases Co-constructed by Henan Province and Education Ministry, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

【Abstract】 The need for suitable interventions for progressive pulmonary vascular lesions has become a bottleneck and a consequent focus in the prevention and treatment of clinical pulmonary hypertension. Plexiform lesions in pulmonary arterioles are the typical pathological manifestation of irreversible abnormal pulmonary vascular remodeling and the criterion for stage IV pulmonary vascular remodeling. There is currently no effective clinical intervention for such pathophysiological lesions, highlighting the need for corresponding animal models. This review

【基金项目】 河南省高校科技创新人才支持计划(24HASTIT073);河南省科技研发计划联合基金项目(22301420070);河南省高等学校重点科研项目(24A360013)。

【作者简介】 李新雨(2000—),女,在读硕士研究生,研究方向:中医内科学。E-mail:lixinyu00316@163.com

【通信作者】 任周新(1969—),男,博士,高级实验师,研究方向:中医药防治呼吸疾病。E-mail:renzhouxin123@126.com

considers new progress in the stereology of plexiform lesions and highlights plexiform-lesion models in mice and rats induced by multifactor stimulation, such as two-hit models and genetic engineering. It also evaluates the characteristics and applications of these models to provide a reference for animal experimental studies and to clarify the mechanism of pulmonary hypertension with pulmonary vascular plexiform lesions.

【Keywords】 mouse; rat; pulmonary vascular plexiform disease; multifactor stimulation model; genetic engineering technology model

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

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)是一种以肺动脉压力异常升高为特征的病理生理状态。严重阶段的 PH 不可逆转,持续恶化。患者预后不良的原因之一在于对 PH 的肺血管异常重构病理生理的认识局限,难以产生针对性的有效治疗方法^[1-3]。鼠类动物模型是 PH 研究的重要工具,目前普遍使用的模型包括缺氧性肺动脉高压模型、野百合碱(monocrotaline, MCT)模型、烟草烟雾暴露模型等。这些经典的模型能够复制出肺动脉非特异性的内膜和外膜增厚、肺动脉高压乃至右心室肥厚,但肺动脉重构的病理损伤仅仅达到 I ~ II 级的病变,未能形成不可逆性的丛状病变等严重肺血管病变。从这些模型上得到的某些有效的候选药物,应用于严重阶段的临床患者,效果不佳,甚至加重了丛状病变等肺血管损伤^[4]。因此,建立稳定、可靠的肺血管丛状病变的鼠类模型,是亟需解决的重要课题。随着技术的进步和研究的深入,相关鼠类模型的研究取得了突破。如采用多因素攻击或基因工程技术介入产生新的模型,能够复制出不同表型的鼠类肺血管丛状病变,推动了学术界对 PH 疾病复杂表型的精确机制的认识,为个性化的临床治疗方案指明了方向。本文就这方面鼠类模型的研究进展进行归纳和总结,以期对 PH 肺血管丛状病变的基础研究和药物开发提供参考。

1 肺血管丛状病变

肺血管丛状病变是肺动脉高压患者发展到严重阶段的血管形态学标志,是一种起源于肺动脉的肾小球样复杂的血管结构^[5]。肺血管丛状病变在各种肺动脉高压患者中存在较高的发生率,早期认为丛状病变主要发生在动脉分叉处或闭塞肺动脉的远端,有两种形成模式:茎样血管腔内生长(stalk-like)及动脉瘤样血管腔外生长

(aneurysm-like)^[6]。在管腔内生长的丛状病变大多位于肺动脉分叉点的远端,从血管壁向管腔内生长。血管外生长的丛状病变多从血管细孔中长出,也有可能是坏死血管残留的结果^[6]。丛状病变呈血管球状结构,病灶内细胞核深染卵圆形,相邻细胞之间存在“缝隙样”通道(slut-like channel)。丛状病变管腔内壁由肌成纤维细胞、平滑肌细胞和结缔组织样基质构成,亦可发现纤维素性血栓及血小板^[6]。上述认识来自于对病变的二维形态和结构的观察,存在立体形态及其与周边组织特别是周围血管之间连接等解剖结构阐释不清楚的问题^[7]。因此,迫切需要对 PH 患者的肺血管丛状病变进行更深入和广泛的体视学研究。

随着新的技术如基于同步加速器的相差显微 CT 等三维显微技术等的应用,人们对丛状病变的三维解剖结构有了更深入的认识^[5,8]。WESTÖÖ 等^[9]将患者丛状病变分成了 4 个类别,1 类,位于肺动脉的单轴分支内或源于单轴分支,与母体肺动脉的血管滋养血管之间存在连接;2 类,发源于肺动脉,病变与肺动脉之间成 90°,向末端细支气管或更大的气道延伸,与支气管周围的血管连接;3 类,出现在肺泡管旁边的远端肺动脉/肺小动脉的突出的末端;4 类,至少存在两个管腔闭塞的肺动脉横切面上表现为丛状,病变很少侵犯到血管弹性层,管腔口径很小,路径曲折。这些发现表明,丛状病变不仅连接肺内的支气管-肺吻合,而且可能连接体循环(支气管循环),另外存在丛状病变到静脉之间的侧支血管或丛状病变之间的血管连接。这些发现提示对外周血管闭塞的病理过程的干预,可能是治愈性药物开发的靶点;对 1 类和 2 类病变进行外科分流或改变侧支血管,则是右心衰竭治疗的可能选择^[9]。近期在二次打击的 Sugen5416/缺氧大鼠中,也观

观察到类似于人类 PH 患者肺血管的 4 个类别的丛状病变^[10], 其中 1 类、2 类和 3 类相当于二维的动脉瘤样丛状病变, 4 类相当于茎样血管腔内生长的丛状病变。

2 经典鼠类模型未出现肺血管丛状病变

肺动脉高压有 5 个组别^[1], 即 1 组: 动脉性 PH (pulmonary arterial hypertension, PAH); 2 组: 左心疾病所致 PH; 3 组: 肺部疾病和 (或) 低氧所致 PH; 4 组: 慢性血栓栓塞性 PH (chronic thromboembolic pulmonary hypertension, CTEPH) 和 (或) 其它肺动脉阻塞性病变所致 PH; 5 组: 未明和 (或) 多因素所致 PH。人们根据这些组别的发病机制和病因, 复制出相应的大鼠或小鼠 PH 模型。一些文献将 PH 大鼠的肺血管病变分成了 4 个等级, 其中的 I 级和 II 级为轻度到中度的病变, 包括肺小动脉肌化、肺血管周围炎症、肺小动脉壁增厚和血管内皮功能障碍等表现, 但撤除刺激因素后, 这些病变能够恢复; III 级为新生内膜形成引起的管腔狭窄, IV 级为丛状病变, III 级和 IV 级为不可逆的病变^[11-12]。

早期的模型主要采用单因素攻击动物, 其肺动脉重构的共性表现为轻度到中度的肺血管病变, 未形成以丛状病变为代表性的不可逆的严重病变。这些模型各具特点和应用范围, 适用于不同类别的 PH 研究, 包括模拟 1 组的 MCT 大鼠模型^[13-14]、血吸虫性小鼠模型^[13, 15-16]、肺静脉闭塞性大鼠模型^[13, 17], 模拟 2 组的左肺切除大鼠模型^[18-19]、腹主动脉-腔静脉分流的大鼠/小鼠模型^[18, 20-21], 模拟 3 组的低氧大鼠/小鼠模型^[13-14, 22-24]、烟草暴露大鼠/小鼠模型^[13-14, 25-27], 模拟 4 组的血栓栓塞大鼠/小鼠模型^[28-29], 模拟 5 组的人类镰状蛋白表达的自发 PH 小鼠模型^[30]和溶血性大鼠模型^[31]。需要指出的是, 新生内膜形成的血管或丛状病变的血管应该在检测的血管中满足一定的发生率, 才能达到相应的病变级别。尽管经皮注射曼氏血吸虫的尾蚴的小鼠肺血管中发现了丛状病变, 但这些血管是偶发的^[15], 因此不能判断这些小鼠的肺血管重构达到了 IV 级。

3 丛状病变模型制作的方法

临床 PH 患者的肺血管重构是一个进行性的过程, 分为两个阶段: 第一阶段, 肺动脉非特异性中膜和外膜增厚、肺小动脉肌化以及肺血管周围出现炎症细胞浸润; 第二阶段为不可逆的重构过程, 以肺小动脉丛状病变和血管闭塞性病变为特征。单纯的致病因素如缺氧、野百合碱注射、烟雾刺激或肺切除术等, 不能诱导鼠类产生第二阶段的肺血管重构。原因在于这些因素单独应用的损伤能力不足, 未能启动第二阶段病变的机制。如果将不同机制的因素序贯攻击动物, 达到或超过启动第二阶段病变所需的阈值, 就可能复制出丛状病变等严重损伤。按照这个原理, MCT/缺氧大鼠模型复合模式均成功地复制出了丛状病变。

研究发现, 不同物种之间甚至同一物种的不同品系之间的肺血管对缺氧刺激的反应差异很大。同样的低压缺氧下, 与 Sprague-Dawley (SD) 大鼠比较, Fischer (F) 大鼠的肺动脉高压和右心室肥大明显减轻^[32]; 同样生活在高海拔地区, 青藏高原的藏族人与生活在安第斯山脉和埃塞俄比亚高原的人比较, 藏族人对缺氧引起的肺动脉高压具有更高的抵抗性。这些现象提示出某些基因可能决定了不同物种、不同品系或不同的人类种族对缺氧诱导的肺血管重构的易感/抵抗的差异^[33]。的确, 已经发现了西藏人群中的脯氨酸羟化酶结构域蛋白 2 (prolyl hydroxylase domain protein 2, PHD2)/缺氧诱导因子 2 α (hypoxia-inducible factor 2 α , HIF-2 α) 信号轴的特异性遗传调节模式^[34]。随着这些易感/抵抗基因的不断发现, 利用基因工程技术改变这些基因在大鼠或小鼠的表达, 或者结合低氧等造模方式, 出现了日益增多的丛状病变模型。

4 复合刺激诱导的肺血管丛状病变模型及其它模型

4.1 肺切除术+MCT 大鼠模型

切除大鼠左肺, 一段时间后, 皮下注射 MCT。MCT 注射后, 大鼠逐渐出现肺动脉压增加、肺动脉中膜平滑肌增生肥大、新生内膜、丛状样病变和血管阻塞; 在检测的血管中, 高比例的血管出

现丛状病变^[35-36], 这些丛状病变的内皮细胞 (endothelial cell, EC) 标志物如 VWF 和 VEGF-2 表达显著增加^[35], 与人类 PAH 患者相似。另外, 模型大鼠在 MCT 注射的 3 周内, 血管损伤具有高度的肺血管选择性, 肾、肝和脾的血管没有损伤^[37]。尽管一些报告采用该模型来评估治疗措施对 PH 的干预效果^[38-40], 但未发现这些措施对丛状病变影响的报导。

分流手术+MCT 大鼠模型 (颈部皮下注射 MCT, 然后进行腹主动脉-腔静脉分流手术), 也可能通过改进, 成为具有丛状病变的模型。目前发现该模型大鼠肺血管病变进行性发展, 从单纯的中膜肥大、新生内膜形成与增生、明显的新生内膜增生性血管闭塞, 最终在术后 28~35 d, 出现右心衰竭 (伴有呼吸困难、严重嗜睡和体质量减轻等症状), 此期间动物多数自发死亡^[41]。该模型形成的新生内膜损伤血管百分率高、内膜壁厚度显著增加和严重的右心衰竭, 上述病变稳定而且形成时间较短。因此, 该模型得到了一定的应用^[42-43]。通过延长大鼠的存活时间等步骤, 可能复制出丛状病变。

4.2 缺氧+MCT 大鼠模型

腹腔注射大鼠 MCT, 然后暴露于低压低氧的环境中 (相当于 50% 海平面气压), 4 周后大鼠形成 PH, 肺血管出现血管周围炎症及新生内膜、血管堵塞和血栓等严重病变, 偶然发现丛状病变^[44-45]。尽管该模型制作方法简单, 但丛状病变发生率较低和不稳定。一项研究报告了该类模型未发现丛状病变^[46], 支持该模型丛状病变出现的不稳定。

4.3 基于 Sugen5416 的复合模型

3-[(2, 4-dimethylpyrrol-5-yl) methylidenyl]-indolin-2-one (Sugen5416) 是一种 3-吲哚-2-酮化合物, 抑制血管内皮生长因子受体蛋白酪氨酸激酶 1/2 (vascular endothelial growth factor receptor protein tyrosine kinase 1/2, VEGFR1/2) 的活性。单独应用 Sugen5416, 大鼠即可出现轻微的肺动脉高压和肺血管异常重构。如果复合低氧等条件, 能够形成丛状病变等更为严重的血管病变。

4.3.1 Sugen5416+缺氧+常氧大鼠模型

单次皮下注射大鼠 Sugen5416 后, 暴露于低氧环境, 后暴露于常氧, 肺动脉血管病变程度随

着时间的延长而进行性恶化, 最终形成稳定的丛状病变。关于其机制, 有学者认为, Sugen5416 抑制 VEGFR1/2 信号, 诱导了内皮细胞的凋亡, 出现一个机会窗口, 发生了某种内皮细胞的选择过程; 低氧的二次打击再次促进了这种内皮细胞的选择过程^[4]。“双次”打击后的内皮细胞不再需要 VEGFR1/2 生存, 形成了对凋亡具有抵抗性的内皮细胞。这种正常生理条件下罕有表达的细胞, 获得了过度增殖的潜能。常氧环境下, 这些内皮细胞大量增殖, 导致大鼠肺动脉病变进行性发展, 最终形成丛状病变。

该模型的一个优势是可以根据研究的需要, 选择不同的时间节点, 建立与研究目的相适应的模型。如缺氧阶段, 肺动脉的损伤表现为 I 级~II 级^[11], 可用于 PAH 预防性药物的药效学评估; 缺氧结束-常氧初期 (常氧气条件下 5 周左右), 是血管新生内膜形成和发展、肺小动脉闭塞和丛状病变初始形成时期^[11,47], 表现为 III 级病变, 可用于新生内膜干预的药效学评估; 常氧末期 (常氧条件下第 11 周或 12 周), 则形成了血管内的 stalk-like 病变和管腔外的 aneurysm-like 病变^[11], 丛状病变血管具有较高的比率^[31], 可用于丛状病变的预防和治疗的药物评估。

Sugen5416 的注射次数以及注射剂量 (20~200 mg/kg) 对肺动脉压和肺血管重构没有明显的影响^[48], 另外, 肺动脉高压与肺血管病变的严重程度之间不一致: 常氧后, 右心室收缩压持续降低, 而肺血管病变则持续加重^[49]。该模型的另一个特征是病变局限, 仅表现在肺血管和右心室, 无肺实质损伤^[11], 其它脏器血管也无明显病变^[48]。因此, 该模型是一个较好的 1 组 PAH 模型。

Sugen5416 皮下注射复合缺氧的小鼠的肺动脉出现 I 级病变, 未见丛状病变; 常氧后, 肺血管损伤逐渐恢复正常^[50], 与大鼠显著不同。这种模型适用于轻度肺动脉高压和右心肥厚的研究^[51-52]。

4.3.2 Sugen5416+溶血+常氧大鼠模型

Sugen5416 皮下注射复合重复的红细胞裂解的自身血液攻击, 产生严重的不可逆的肺血管重构, 表现为至少 6% 的丛状病变和至少 40% 的血管闭塞; 该模型大鼠还出现了高血压、严重的肺

损伤(如水肿、出血、充血、肺泡壁增厚和炎症浸润等)和脾肿大的表现^[31]。该模型作为一种不可逆的肺血管重构的溶血性 PH 模型,在 5 组 PH 的研究中具有较高的应用价值,但其制作方式复杂、需要高的手术技巧和昂贵的仪器。本文比较了上述复合刺激模型丛状病变的表现,见表 1。

表 1 复合刺激诱导的具有肺血管丛状病变 PH 模型的比较

Table 1 Comparison of the PH models induced by compound stimulation with pulmonary vascular plexiform lesions

模型名称 Models name	动物 Animals	方法 Methods	丛状病变的形成条件 Conditions for the formation of plexiform lesions	丛状病变的表现 Manifestations of plexiform lesions	其它病变或机能变化 Other lesions or functional changes	模型的局限性 Limitations of the model
肺切除术+MCT ^[35-40]	大鼠 Rat	左肺切除,1 周后单次皮下注射 MCT (60 mg/kg),注射后 14~21 d,形成丛状病变 Left lung was excised, followed by with a single subcutaneous injection of MCT (60 mg/kg) 1 week later. Plexiform lesions were appeared in 14~21 d after injection	切除左肺,增加肺动脉血流量,血流的剪切应力损伤内皮;给予 MCT,MCT 的代谢产物加重肺血管内皮损伤。两次打击形成了丛状病变 Increased shear stress of blood flow by left lung excision damages the endothelium, then, metabolites of MCTs aggravate endothelial injury, which form plexiform lesions	主要形成于血管分叉的远端 Plexiform lesions occur distal to branch points	右心肥大,肺损伤 Right heart hypertrophy and lung injury	动脉瘤样血管腔外生长的丛状病变少见;需要外科手术技巧,动物死亡率高 Aneurysm-like plexiform lesions are few. Model requires general surgical skills and is high mortality rate
缺氧+MCT ^[44,45]	大鼠 Rat	单次腹腔注射 MCT (60 mg/kg),低压 (380 mmHg) 暴露 4 周 A single intraperitoneal injection of MCT (60 mg/kg), followed by low pressure (380 mmHg) for 4 weeks	MCT 的代谢产物加重肺血管内皮损伤;慢性低氧收缩肺血管,诱导肺血管炎症,损伤肺血管内皮。双次打击加重肺血管损伤 Metabolites of MCT damage pulmonary vascular endothelium; chronic hypoxia contracts pulmonary blood vessels, inducing pulmonary vascular inflammation and aggravating vascular endothelial damage	丛状病变是否存在有争议 Presence of plexiform lesions is controversial	右心室肥大,肺动脉血栓 Right ventricular hypertrophy, and pulmonary artery thrombosis	丛状病变偶然出现,重现性差 Plexiform lesions appear incidentally with poor reproducibility
Sugen5416 + 缺氧 + 常氧 ^[4,11,47-49]	大鼠 Rat	单次皮下注射 Suken5416(20 mg/kg),10% O ₂ ,3 周,常氧 (21% O ₂)2~12 周 A single subcutaneous injection of Suken5416 (20 mg/kg), 10% O ₂ , 3 weeks, normoxia (21% O ₂), 2~12 weeks	Sugen5416 抑制 VEGFR1/2 的活性诱导内皮细胞凋亡,低氧的再次打击,导致残存的内皮细胞不再需要 VEGFR1/2 生存,形成抗凋亡的内皮细胞,常氧下大量异常增殖,形成丛状病变 Suken5416 inhibition for VEGFR1/2 activity induces apoptosis of endothelial cells and hypoxia strikes again damage endothelial cells, resulting in forming anti-apoptotic endothelial cells, which survival is no longer need for VEGFR1/2. Under normoxia, they proliferate abnormally and form plexiform lesions	10% 的肺动脉形成丛状病变,管腔内生长和动脉瘤样管腔外的形态均可见 10% of pulmonary arteries formed plexiform lesions, with both stalk-like type and aneurysm-like type	右心室肥大 Right ventricular hypertrophy	肺动脉血管病变持续加重,但右心室收缩压却逐渐降低,与临床患者两者同步恶化不符;肺组织多数基因的表达与人类患者不同 Pulmonary artery vascular lesions continues to worsen, but the right ventricular systolic pressure gradually decreases, inconsistent with the synchronous deterioration in clinical patients and the expression of most genes in lung tissue is different from that of human patients

续表1

模型名称 Models name	动物 Animals	方法 Methods	丛状病变的形成条件 Conditions for the formation of plexiform lesions	丛状病变的 表现 Manifestations of plexiform lesions	其它病变或 机能变化 Other lesions or functional changes	模型的局限性 Limitations of the model
Sugen5416 + 溶血 ^[31] Sugen5416 + hematolysis	大鼠 Rat	右心房注入 1.5 mL 红细胞裂解的自身血液, 每天 1 次, 共 10 d; 首日皮下注射 Sugén5416 200 mg/kg, 共 26 d 1.5 mL of 10 blood once daily for 10 days; first day subcutaneous Sugén5416 200 mg/kg for 26 days	溶血导致红细胞释放腺苷脱氨酶和嘌呤核苷磷酸化酶, 降低腺苷和鸟苷的血管保护作用, 复合 Sugén5416 诱导的血管内皮损伤, 形成丛状病变 Hemolysis causes the release of adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase, reducing the vascular protective effects of adenosine and guanosine, and Sugén5416 again induces vascular endothelial damage, which form plexiform lesion	至少 6% 的血管出现丛状病变 Plexiform lesions occurred in at least 6% of the vessels	高血压, 脾肿大, 肺水肿, 右心衰竭 Hypertension, splenomegaly, pulmonary edema, and right heart failure	右心室收缩压过高, 与人类溶血性 PH 患者的中度肺动脉高压不符合; 血液注入步骤复杂, 需要较高的外科手术技巧和昂贵的仪器 Right ventricular systolic pressure is too high and not compatible with moderate pulmonary hypertension in human patients with hemolytic PH. Blood injection procedure is complex, requiring high surgical skills and expensive instrumentation

与 Sugén5416+缺氧+常氧小鼠模型相似, 一些二次或多次打击的方式未能形成丛状病变, 如红细胞裂解的自身血液+低氧大鼠模型^[53]以及烟草烟雾暴露+克雷伯杆菌感染大鼠模型^[12]。

5 基因工程建立的丛状病变模型

5.1 *Egln1*^{Tie2Cre6} 小鼠

PHD2/HIF-2α 信号轴是低氧性 PH 的重要信号通路。人们采用基因消融技术, 消融小鼠内皮细胞和造血细胞的 *Egln1* (编码 PHD2) 基因, 建立 *Egln1* floxed 小鼠。然后, *Egln1* floxed 小鼠与 *Tie2* 启动子/增强子驱动的 *Cre* 转基因小鼠交配, 产生出 *Egln1*^{Tie2Cre6} 小鼠。这种靶向于降低血管内皮细胞 PHD2 表达的 *Egln1*^{-/-} 小鼠显示出进展性和严重的 PH 表型, 几乎显示出人类 PAH 所有的关键病理特征^[4], 如肺动脉血管内膜、中膜和外膜的增厚, 丛样病变以及血管融合等闭塞性肺动脉重构; 进行性的右心室功能性障碍直至右心衰竭, 大约 80% 的小鼠在 6 个月鼠龄前死亡^[34]。尽管在人类 PHD2/HIF-2α 信号轴与低氧性 PH (归类于 3 组) 关系更为密切, 但由于该模型小鼠的肺血管病变及疾病进程与人类 PAH 患者近似, 因此被认为是较为理想的严重 PAH 的模型。具有短期疗效的 3 个靶向药物西地那非 (靶向一氧化

氮信号传导)、安立生坦 (内皮素受体拮抗剂) 和曲前列尼尔 (前列环素类似物) 应用于该小鼠^[54], 所有药物减弱 *Egln1*^{Tie2Cre6} 小鼠的右心室收缩压, 与它们的血管扩张剂作用一致; 部分改善了右心室功能、右心室肥大和肺血管重塑; 其中西地那非短期提高动物的生存率, 但长期应用, 则无此效果。这些药效学结果与临床 PAH 患者的治疗效果近似。3.5 月龄的小鼠即表现出了明显的丛状病变, 主要存在于较大的肺动脉 (直径 > 100 μm), 小的肺动脉主要表现为血管闭塞^[34]。鼠龄的增加可能增加丛状病变的发生率和严重程度, 但 >3.5 月龄的丛状病变的结果未见报道。需要开展进一步的研究, 阐释 *Egln1*^{Tie2Cre6} 小鼠的肺血管重构出现到小鼠死亡过程中丛状病变的产生和发展, 获取丛状病变过程的完整信息。

5.2 IL-6 过表达转基因小鼠 (IL-6 over expression transgenic mice, IL-6 TG+)

炎症是 PH 的病理生理学基础, 表现为外周血管周围长期存在的炎症细胞浸润和大量炎症介质, 某些炎症介质是 PAH 病理生理所必需的因素, 其中 IL-6 长期处于高水平。

将小鼠的 CC10 启动子 (Clara cell 10 kDa promoter, CC10) 与人类基因组 IL-6 外显子 1 的翻译起始位点 5' 处融合, 形成 CC10-IL-6 转基因, 其

中的 IL-6 包含 5 个外显子和 4 个内含子,第 5 个外显子包含一个 3' 非翻译区;将 CC10-IL-6 基因转入 (CBA×C57BL/6) F2 小鼠,形成过表达 IL-6 的转基因小鼠 (IL-6 TG+) [55]。

肺炎反应是该小鼠的特征,炎症细胞大量浸润于大、中气道和肺血管以及肺间质,包括 CD3+、CD4+、CD8+、MHC II 类和 B220+ 细胞,主要由单核细胞构成;肺组织中 IL-6、IFN- γ 等细胞因子大量表达 [55]。鼠龄 3~4 个月,肺呈现出慢性炎症的表现,如单核细胞为主的浸润、肺水肿、羟脯氨酸含量增加及胶原蛋白 1A1 (Collagen 1A1, Co1A1) 和纤连蛋白表达增加 [56] 等。另外,肺组织也表现出肺泡间隔破裂和肺泡融合,提示可能形成肺气肿 [56]。肺血管周围的炎症细胞浸润及对肺血管的破坏和异常修复,导致肺动脉的异常重构。鼠龄 3~4 个月,除肺小动脉肌化等较轻的重构表现外,也出现了类似于人类 PAH 患者典型的病理学特征,如平滑肌远端延伸至肺小动脉;ECs 增生,导致同心性内膜壁增厚;轻度丛状样病变 [4,57]。但也有认为动物未出现丛状病变 [58]。另外,随着鼠龄的增长,小鼠的体质量增长迟缓,雌性小鼠表现得更为敏感 [55]。除了肺外,心脏也出现病变,如右心肥大和胶原纤维增多等 [56]。需要注意的是该模型与临床 PAH 患者存在一定差异。首先,小鼠的肺主动脉和支气管肺动脉中膜厚度增加,弹性板层数量增加 [57];而临床患者一般肺主动脉和支气管动脉没有肌化的表现 [59]。其次,IL-6 高分泌是小鼠出现炎症反应的原因;而临床患者则是由于细菌感染等病因,导致肺和血管周围炎症反应,从而出现 IL-6 水平升高,两者的因果关系是相反的。

综上所述,该模型适宜于 3 组 PH 的药效学评估 (如慢性阻塞性肺疾病、肺气肿、哮喘等合并肺动脉高压),另外,也适合于炎症对肺血管异常重塑的机制探讨。目前该模型的研究集中于 3~4 月龄,是否随着鼠龄的增加,丛状病变发生率增加或加重,需要进一步的研究。

5.3 EH_{ITSN}-KO^{ITSN+/-}“二次打击”小鼠

利用基因工程技术在近交系 129/SvJ 小鼠上构建 KO^{ITSN+/-}小鼠,减少交叉蛋白 1 (intersectin-1s, ITSN) 的表达;随后,利用脂质体为载体 (Myc-EH_{ITSN} DNA 克隆到 pReceiver/myc-M43 载体中),将促进内皮细胞增殖的一个 ITSN 的 DNA 片段

(EH_{ITSN}) 注入 KO^{ITSN+/-}小鼠的肺;每隔 48 h 注入 1 次,持续 9 次,维持 EH_{ITSN} 的高表达 [60]。

小鼠表现为肺的多种细胞的增殖活性异常增强,如血管内皮细胞、血管平滑肌细胞和成纤维细胞等,导致肺动脉肌化、胶原沉积于血管闭塞性病变和平滑肌层和内皮细胞增生产生的管腔部分或完全闭塞,以及多种形态的丛状病变,如不完全和完全同心洋葱皮状丛状病变、钩钉样式的丛状病变、管壁伸入腔内的柄状丛状病变等,这些病变经常位于细支气管旁和胸膜下,突出到肺实质 [60]。每张肺切片大致发现 4~12 个丛状病变。在病变的小动脉的肺血管床或在病变内或其周围,存在炎症细胞浸润,主要是淋巴细胞,偶见巨噬细胞。另外,肺组织出现局部炎症细胞浸润,肺泡壁增厚,间质水肿,间质出现胶原沉积。实验期间没有小鼠死亡。另外,尽管小鼠出现了肺动脉高压和右心室肥大,但与肺血管的异常重构的严重程度不相符。

性别是影响 PAH 形成、发展和预后的重要因素,临床中女性患者具有高发病率 [61]。然而,已知的具有丛状病变的 PH 模型中,罕见性别差异的报道。如 Sugen5416+缺氧+常氧大鼠模型,关键的右心室收缩压、右心室肥大和肺动脉重构均未有性别差异,而且无论雌性还是雄性对雌激素的干预,均显示出右心室的防护作用 [62]。但雌性 EH_{ITSN}-KO^{ITSN+/-}小鼠显示出更严重的 PH 表型,与雄性比较,严重的闭塞性病变 (包含丛状病变) 增加了 37.5%,而且复杂程度更高 [63]。长链非编码 RNA X 的非活性特异性转录本 (Xist) 的表达和活性的异常增加,是雌性 EH_{ITSN}-KO^{ITSN+/-}小鼠和人类女性 PAH 患者的肺动脉内皮细胞的共有表现 [63]。这种异常上调,进一步强化 p38/Elk1/c-Fos 信号通路的活化 (无论雌性或雄性,该信号通路都是动脉血管内皮细胞异常增殖和形成丛状病变的重要信号通路 [63]),导致雌性小鼠的肺血管损伤更为严重。上述结果表明,EH_{ITSN}-KO^{ITSN+/-}小鼠是一种基于 lncRNA-Xist 调节,适宜于女性 PAH 的药物研究的模型,也适宜于 PAH 性别差异的遗传学研究。另外,基于该模型,发现了 EH_{ITSN} 除了促进 ECs 的增殖和过度生长外,还启动了功能失调的 PAH 的 ECs 细胞内吞活性的上调 [64]。对上述基因工程模型肺血管丛状病变的表现进行比较,见表 2。

表 2 具有肺血管丛状病变的基因工程 PH 模型
Table 2 Genetically engineered PH models with pulmonary vascular plexiform lesions

模型名称 Models name	动物 Animals	方法 Methods	丛状病变的形成条件 Conditions for the formation of plexiform lesions	丛状病变的表现 Manifestations of plexiform lesions	其它病变或机能变化 Other lesions or functional changes	模型的局限性 Limitations of the model
<i>Egln1</i> <i>Tie2Cre6</i> [34,54]	小鼠 Mice	<i>Egln1 floxed</i> 小鼠与 <i>T Cre</i> 转基因小鼠交配的后代 Offspring of <i>Egln1 floxed</i> mice mated with <i>T Cre</i> transgenic mice	利用基因工程技术建立 <i>Egln1</i> ^{-/-} 小鼠,降低血管内皮细胞 PHD2 的表达 <i>Egln1</i> ^{-/-} mice were established using genetic engineering techniques to reduce PHD2 expression in vascular endothelial cells	3.5 月龄小鼠,直径 > 100 μm 的血管中,8% 出现丛状病变 In 3.5-month-old mice, 8% of the vessels > 100 μm in diameter showed plexiform lesions	右心衰竭;1~2 月龄开始死亡,3.5 月龄死亡率为 50%,6 月龄死亡率为 80% Right heart failure; death started at 1~2 months, 50% at 3.5 months and 80% at 6 months	局限于靶向 PHD2/HIF-2α 信号转导机制 Confined to targeting the PHD2/HIF-2α signal transduction machinery
IL-6 TG+ ^[55-57]	小鼠 Mice	CC10-IL-6 基因转入 (CBA × C57BL/6) F2 小鼠 CC10-IL-6 gene was transferred into (CBA × C57BL/6) F2 mice	利用基因工程技术,诱导小鼠肺血管 IL-6 的过表达 Using genetic engineering techniques, the over-expression of IL-6 in mouse lung vessels was induced	3~4 月龄可能出现轻度的丛状病变 (存在争议) It was controversial of occur for mild plexiform lesions at age 3~4 months	慢性肺炎,肺气肿,右心肥大,体重增长缓慢 Chronic pneumonia, emphysema, right heart hypertrophy, and slow weight gain	肺动脉和支气管肺动脉中膜厚度增加,弹性板层数量增加,与临床患者不符 Thickness of the media increased and the number of elastic lamina increased, which was inconsistent with clinical patients
EH _{ITSN} - KO ^{ITSN+/-} [60,63]	小鼠 Mice	应用 ITSN 敲除/杂合子小鼠 (KO ^{ITSN+/-}),经眼眶将 EH _{ITSN} 基因输入到肺,每隔 48 h 注入 1 次,持续 18 d ITSN knockout/heterozygous mice (KO ^{ITSN+/-}) were applied with EH _{ITSN} -gene input into the lungs through the orbit and injected at 48 h intervals for 18 d	利用基因工程技术,诱导小鼠肺血管内皮细胞 ITSN 表达减少;肺内持续输入 EH _{ITSN} 基因,诱导该基因的持续表达 (该基因诱导内皮细胞增殖) Using gene engineering to induce reduced ITSN expression in mouse pulmonary vascular endothelial cells, then, the EH _{ITSN} gene was induced continuous expression (this gene induces endothelial cell proliferation)	每张肺切片大致发现 4~12 个丛状病变,几乎包括各种临床形态 Approximately 4~12 plexiform lesions are per lung section including almost various clinical forms	慢性肺炎、右心肥大、实验期间无死亡,肺动脉重构的程度具有性别差异 Degree of pulmonary artery remodeling was different by chronic pneumonia, right heart hypertrophy, and no death during the experimental period	仅用颗粒酶 B 裂解 ITSN 产生的 NH2 末端蛋白片段转导肺内皮细胞,未考虑 C 端片段的影响 Pulmonary ECs were transduced only with the NH2-terminal protein fragment produced by granzyme B cleavage of ITSN; the potential contribution of the C-terminal fragment to this mouse phenotype was not considered

6 基于 BMPR2 靶点的基因工程小鼠或大鼠

基因突变是遗传性肺动脉高压 (heritable pulmonary arterial hypertension, HPAH) 患者的共

有特征。骨形成蛋白 II 受体 (bone morphogenetic protein receptor type 2, BMPR2) 突变是首个被发现的 PAH 致病基因变异,在 HPAH 患者的比例超过 50%^[65]。作为 HPAH 最重要的致病基因突变,BMPR2 基因变异一直是 PAH 动物模型研究

的热点。另一方面,尽管 BMPR2 基因变异普遍存在于 HPAH 患者,但具有该类变异的人群中,仅有不到 30% 的人群将罹患 PAH^[66],也就是说多数携带者终生可能未发病。这强烈地提示,其它致病因素的干预,对 BMPR2 基因变异者的患病,具有重要的诱导或促进作用。截至目前,应用基因工程技术导致的 BMPR2 基因变异的小鼠或大鼠模型,与上述发现一致,如多能自发形成 PH,但肺血管重构的病变程度轻,基本达不到Ⅲ级,而且阳性率较低。其它病因的介入,不同类型小鼠的表现则差异明显甚至逆转,反映出 BMPR2 基因变异对肺血管重构影响的复杂性:如删除了外显子 4 和 5 的 2.4 kb 的 ClaI-ScaI 片段的 BMPR2^{+/-} 杂合子小鼠对低氧,肺动脉压和肺小动脉病变反而低于野生小鼠^[67-68];利用锌指核酸酶技术构建 BMPR2 基因外显子 71 bp 的单等位基因缺失的 BMPR2^{+/ Δ 71bp} 大鼠对于低氧,则形成

更为严重的 PH 和肺血管病变^[69];给于 BMP9,部分表达 BMPR2 的 BMPR2^{+/ Δ R899X} 小鼠,肺动脉高压降低,肺血管病变得得到逆转^[70];但是,对于内皮细胞完全缺乏 BMPR2 表达的 BMPR2^{EC-/-} 小鼠,肺血管内膜反而增殖明显^[71]。正是通过这些模型,提示未来的针对 BMPR2 基因为靶点的药物或其它方法的治疗中,基因诊断和个体化治疗的重要性和必要性。

5-LOX 诱导的 BMPR2^{+/ Δ 527bp} 大鼠出现了至少Ⅲ级的病变和可能的丛状病变^[72],提示在已知的模型中,应用不同的病因干预,可能出现丛状病变,从而建立与临床 HPAH 患者后期类似的严重的肺血管病变。除了这个思路外,结合临床患者 BMPR2 基因变异的发现,对 BMPR2 基因进行新的构建,甚至进行多基因改造,也可能建立具有丛状病变的模型。基于 BMPR2 靶点的基因工程 PH 模型进行了总结,见表 3。

表 3 BMPR2 靶点的基因工程小鼠或大鼠
Table 3 Genetically engineered mice or rats of the BMPR2 targets

模型名称 Models name	动物 Animals	方法 Methods	自发形成 PH 时间 Time of spontaneous PH formation	对环境刺激反应 Responses to the environmental stimuli	肺血管损伤等级 Grade of pulmonary vascular lesions
BMPR 2 ^{+/[67-68]}	小鼠 Mice	删除了包含外显子 4 和 5 的 2.4 kb ClaI-ScaI 片段的人 BMPR2 基因的 ES 克隆显微注射到 C57BL/6J 小鼠的囊胚中,形成的嵌合体小鼠与雌性 C57BL/6J 小鼠杂交,产生出 BMPR2 ^{+/-} 小鼠 ES clones of the human BMPR2 gene containing the 2.4 kb ClaI-ScaI fragment of exons 4 and 5 deleted were microinjected into blastocysts of C57BL/6J mice, and the formed chimera mice were crossed with female C57BL/6J mice to produce BMPR2 ^{+/-} mice	2~5 个月 2~5 months	低氧 3 周(11% 氧气),肺小动脉肌化程度反而低于野生对照小鼠,平均肺动脉压两者相似 For 3 weeks of hypoxia (11% oxygen), the degree of pulmonary artery muscle arization was lower than that of wild control mice, and the mean pulmonary artery pressure was similar	I 级 I level
BMPR 2 ^{+/Δ71bp[69]}	大鼠 Rat	在 SD 大鼠上,利用锌指核酸酶技术构建 BMPR2 基因外显子 71 bp 的单等位基因缺失 In SD rats, a single allelic deletion of 71 bp in exon of the BMPR2 gene was constructed using zinc finger nuclease technology	6 个月 6 months	低氧刺激,可形成更为严重的 PH 和肺血管异常重构 Hypoxic stimulation can form more severe PH and abnormal pulmonary vascular remodeling	I 级,6 个月 16.0% 阳性率;12 个月 27.8% 阳性率,雌雄差异,雌性阴性 I level, 16.0% positive rate at 6 months; 27.8% positive rate at 12 months. Male and female difference, female negative

续表3

模型名称 Models name	动物 Animals	方法 Methods	自发形成 PH 时间 Time of spontaneous PH formation	对环境刺激反应 Responses to the environmental stimuli	肺血管损伤等级 Grade of pulmonary vascular lesions
BMPR 2 ^{+/R899X} [70]	小鼠 Mice	人类第 899 位氨基酸发生突变的 BMPR II 基因片段 (R899X) 注入 C57BL/6 小鼠的囊胚,产生出嵌合小鼠;与雌性 C57BL/6 交配,形成杂合的 R899X 后代 (BMPR2 ^{+/R899X}) Human BMPR II gene fragment (R899X) at position 899 is injected into blastocysts of C57BL/6 mice to produce chimeric mice; mating with female C57BL/6 to form heterozygous R899X offspring (BMPR2 ^{+/R899X})	6 个月 6 months	BMP9 逆转肺动脉高压和肺血管重构 BMP9 reversed the pulmonary arterial hypertension and pulmonary vascular remodeling	I 级 I level
BMPR 2 ^{EC-/-} [71]	小鼠 Mice	携带 L1-Cre 构建体的 C57BL/6J 小鼠与具有 BMPR2 等位基因的一个 floxed 拷贝的小鼠杂交,后代与 Rosa26 位点内携带 Ai6 floxed reporter 基因构建体的小鼠杂交,得到 L1-Cre ^{+/+} /Ai6 ^{+/+} /BMPR2 ^{flox/flox} ,即 BMPR2 ^{EC-/-} 小鼠 C57BL/6J mice carrying the L1-Cre construct were crossed with mice with one floxed copy of the BMPR2 allele and the offspring were crossed with mice carrying the Ai6 floxed reporter gene construct within the Rosa26 locus to generate L1-Cre ^{+/+} /Ai6 ^{+/+} /BMPR2 ^{flox/flox} , the BMPR2 ^{EC-/-} mice	新生,未知 Freshman, unknown	内皮细胞几乎完全没有 BMPR2 表达的新生小鼠,给予 BMP9 反而促进了内膜的增殖 In neonatal mice with an almost complete absence of BMPR2 expression, administration of BMP9 instead promoted proliferation of the inner membrane	未知 Unknown
BMPR 2 ^{+/Δ527bp} [72]	大鼠 Rat	在 F344 大鼠上,利用锌指核酸酶技术构建 BMPR2 基因中,内含子和外显子 1 边界的交叉区域 527 bp 的单等位基因缺失 In F344 rat, a monoallelic deletion of 527 bp in the crossover region of the intron and exon 1 boundary of the BMPR2 gene was constructed by zinc finger nuclease technology	一年内未形成 PH No PH was formed within one year	重要炎症介质 5-脂氧化酶 (5-lipoxygenase,5-LOX) 的转基因,通过气道输入 4~6 周龄大鼠的肺中,3 周形成严重 PH,5 周存活率仅 25%,多死于右心室功能衰竭 Transgene of the important inflammatory mediator 5-lipoxygenase (5-lipoxygenase, 5-LOX), fed into the lungs of 4~6-week-old rats, developed severe PH at 3 weeks, had a 5-week survival rate of only 25%, and often died from right ventricular failure	5-LOX 诱导后,出现Ⅲ级病变,出现类似的丛状病变 After 5-LOX induction, grade Ⅲ lesions appeared, and similar plexiform lesions appeared
Rosa26-BMPR 2 ^{Δex4+} [73]	小鼠 Mice	Rosa26-rtTA2 小鼠与 Rosa26 BMPR2 ^{Δex4+} 小鼠交配,建立杂合子小鼠 Rosa26-rtTA2 mice were mated with Rosa26 BMPR2 ^{Δex4+} mice, and heterozygous mice were established	未知 Unknown	食物中掺入多西环素,食用 8 周诱导,12~14 周龄形成。每周气管内注射脂质体氯膦酸盐 1 次,共 4 周,以减少肺组织巨噬细胞,则减轻病变 Doxycycline incorporation in food was induced for 8 weeks and formed at 12~14 weeks of age. Intratracheal injection of liposomal clodronate once a week for 4 weeks to reduce macrophages in the lung tissue reduced the lesions	未见Ⅲ级报道 No level Ⅲ report was reported

7 结论和展望

某些模型是否形成稳定的丛状病变,存在争议。稳定的丛状病变模型包括:肺切除术+MCT 大鼠模型、Sugen5416+缺氧+常氧大鼠模型、Sugen5416+溶血大鼠模型、*Egln1*^{Tie2Cre6} 小鼠模型和 $\text{EH}_{\text{ITSN}}\text{-KO}^{\text{ITSN+/-}}$ 小鼠模型。3 种大鼠模型采用普通的大鼠品系,价格便宜易于获得;肺切除术+MCT 模型和 Sugén5416+溶血模型需要一定的实验技巧和繁琐的术后动物的维护(如伤口抗感染、股静脉留置针的抗凝等),而 Sugén5416+缺氧+常氧模型需要低压氧舱。两种基因工程小鼠模型,需要特殊的小鼠品系,价格昂贵且获取较为困难,还需要基因消融等技术和条件;但后期管理简单,正常饲养条件下,动物自发形成丛状病变。按照临床 PH 的分类,Sugen5416+溶血大鼠模型适合于溶血性 PH 的研究,其它 4 种模型均可用于 PAH 的研究,其中,肺切除术+MCT 模型和 $\text{EH}_{\text{ITSN}}\text{-KO}^{\text{ITSN+/-}}$ 模型伴有肺组织炎症和损伤,还可用于某些肺部疾病相关 PH 的研究。上述 5 种模型中,仅有 *Egln1*^{Tie2Cre6} 小鼠模型完整地模拟了 PAH 的病理演变过程:渐进性严重的血管病变、明显的丛状病变等后期特征和右心室功能逐渐恶化,多数自发性死于右心衰竭,丛状病变出现到死亡持续较长的时间(3.5~6 月龄);另外,该模型能够展示出临床经典药物如西地那非的治疗效果。因此,*Egln1*^{Tie2Cre6} 小鼠是目前模拟人类 PAH 病理特征最好的模型。Sugen5416+溶血+常氧大鼠模型的肺血管病变类似于严重溶血性 PH 患者;Sugen5416+缺氧+常氧模型和 $\text{EH}_{\text{ITSN}}\text{-KO}^{\text{ITSN+/-}}$ 模型,能够复制出临床常见的丛状病变类型,而且 $\text{EH}_{\text{ITSN}}\text{-KO}^{\text{ITSN+/-}}$ 模型可以复制出肺动脉重构的雌雄差异;肺切除术+MCT 模型的丛状病变主要表现在血管分叉的远端,模拟人类 PAH 的丛状病变较差。上述 5 种模型形成丛状病变的分子机制涉及复杂的生物活性分子和信号通路,尚未完全阐明。肺切除术+MCT 大鼠模型涉及 HIF-1 α 和 PI3K/Akt 信号通路;Sugen5416+缺氧+常氧大鼠模型涉及 VEGF2 受体、HIF-1 α 、HIF-2 α 、泛素特异性蛋白酶、BMP/Notch 信号通路;Sugen5416+溶血大鼠模型涉及 VEGF2 受体、腺苷和鸟苷的血管保护机制;*Egln1*^{Tie2Cre6} 小鼠模型涉

及 PHD2/HIF-2 α 信号轴; $\text{EH}_{\text{ITSN}}\text{-KO}^{\text{ITSN+/-}}$ 小鼠模型涉及 ITSN、lncRNA-Xist 调节、p38/Elk1/c-Fos 信号通路。上述模型中,仅有少量文献采用阳性百分率或形态学描述,粗略地评估了研究对象对丛状病变的影响,反映了丛状病变作为一种重要的指标,在评价肺血管异常重构中,尚未形成客观和量化的评估体系。未来,亟需建立一种分值评价指标,反映不同形态的丛状病变的损伤程度,通过总积分的变化客观评估研究对象对丛状病变的影响。

在基于 BMPR2 靶点的基因工程小鼠上,建立可靠的丛状病变模型,仍然是未来的研究目标。复合不同的病因刺激,可能是解决该难题的一条有效途径。

参考文献:

- [1] 中华医学会呼吸病学分会肺栓塞与肺血管病学组,中国医师协会呼吸医师分会肺栓塞与肺血管病工作委员会,全国肺栓塞与肺血管病防治协作组,等.中国肺动脉高压诊断与治疗指南(2021 版)[J].中华医学杂志,2021,101(1):11-51.
PULMONARY EMBOLISM AND PULMONARY VASCULAR DISEASE GROUP OF THE RESPIRATORY DISEASE BRANCH OF THE CHINESE MEDICAL ASSOCIATION, PULMONARY EMBOLISM AND PULMONARY VASCULAR DISEASE WORKING COMMITTEE OF THE RESPIRATORY PHYSICIAN BRANCH OF THE CHINESE MEDICAL DOCTOR ASSOCIATION, AND THE NATIONAL PULMONARY EMBOLISM AND PULMONARY VASCULAR DISEASE PREVENTION AND TREATMENT COLLABORATION GROUP, et al. Guidelines for diagnosis and treatment of pulmonary hypertension in China (2021 edition) [J]. Natl Med J China, 2021, 101(1): 11-51.
- [2] HUMBERT M, KOVACS G, HOEPER M M, et al. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension [J]. Eur Respir J, 2023, 61(1): 2200879.
- [3] WOODCOCK C C, CHAN S Y. The search for disease-modifying therapies in pulmonary hypertension [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2019, 24(4): 334-354.
- [4] CARMAN B L, PREDESCU D N, MACHADO R, et al. Plexiform arteriopathy in rodent models of pulmonary arterial hypertension [J]. Am J Pathol, 2019, 189(6): 1133-1144.
- [5] JONICK D, GOLPON H, BOCKMEYER C L, et al.

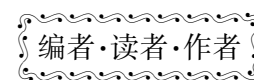
- Plexiform lesions in pulmonary arterial hypertension composition, architecture, and microenvironment [J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(1): 167–179.
- [6] 蒋晓敏, 周陵, 陈绍良. 肺动脉高压肺血管丛状病变的研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(8): 1519–1522.
- JIANG X M, ZHOU L, CHEN S L. Progress in plexiform lesion of pulmonary hypertension [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2014, 30(8): 1519–1522.
- [7] VOELKEL N F, BOGAARD H J. Adding complexity to plexogenic arteriopathy [J]. *Eur Respir J*, 2016, 48(6): 1553–1555.
- [8] GALAMBOS C, SIMS-LUCAS S, ABMAN S H, et al. Intrapulmonary bronchopulmonary anastomoses and plexiform lesions in idiopathic pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 193(5): 574–576.
- [9] WESTÖÖ C, NORVIK C, PERUZZI N, et al. Distinct types of plexiform lesions identified by synchrotron-based phase-contrast micro-CT [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2021, 321(1): L17–L28.
- [10] VAN DER HAVE O, WESTÖÖ C, AHRNÉ F, et al. Shunt-type plexiform lesions identified in the Sugén5416/hypoxia rat model of pulmonary arterial hypertension using synchrotron-based phase-contrast micro-CT [J]. *Eur Respir J*, 2022, 59(6): 2102802.
- [11] ABE K, TOBA M, ALZOUBI A, et al. Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension [J]. *Circulation*, 2010, 121(25): 2747–2754.
- [12] 任周新, 赵鹏, 李建生. 烟雾暴露联合克雷伯杆菌感染诱导大鼠肺小动脉病变的评估 [J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(8): 27–36.
- REN Z X, ZHAO P, LI J S. Evaluation of pulmonary arteriolar lesions in rats induced by cigarette smoke exposure combined with *Klebsiella* infection [J]. *Chin J Comp Med*, 2024, 34(8): 27–36.
- [13] WU X H, MA J L, DING D, et al. Experimental animal models of pulmonary hypertension: Development and challenges [J]. *Anim Model Exp Med*, 2022, 5(3): 207–216.
- [14] FRÖHLICH E. Animals in respiratory research [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(5): 2903.
- [15] CROSBY A, JONES F M, SOUTHWOOD M, et al. Pulmonary vascular remodeling correlates with lung eggs and cytokines in murine schistosomiasis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181(3): 279–288.
- [16] KUMAR R, LEE M H, KASSA B, et al. Repetitive *Schistosoma* exposure causes perivascular lung fibrosis and persistent pulmonary hypertension [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2023, 137(8): 617–631.
- [17] SONG Q, CHEN P, WU S J, et al. Differential expression profile of microRNAs and tight junction in the lung tissues of rat with mitomycin-C-induced pulmonary veno-occlusive disease [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 746888.
- [18] 刘斌, 王献民, 魏丽, 等. 4 种肺动脉高压动物模型肺血管重构模式的差异研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(2): 289–293.
- LIU B, WANG X M, WEI L, et al. Differentiation of pulmonary vascular remodeling pattern in 4 models of pulmonary hypertension [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2008, 24(2): 289–293.
- [19] 罗锋, 向小勇, 赵兴吉. 大鼠左全肺切除致右心室重塑的研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(15): 1642–1644.
- LUO F, XIANG X Y, ZHAO X J. Right ventricular remodeling induced by left total pneumonectomy in rats [J]. *Acta Acad Med Mil Tertiae*, 2010, 32(15): 1642–1644.
- [20] ZHANG M, FENG Z, HUANG R, et al. Characteristics of pulmonary vascular remodeling in a novel model of shunt-associated pulmonary arterial hypertension [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 1624–1632.
- [21] GUAN H, YANG X, SHI T, et al. CTRP9 mitigates the progression of arteriovenous shunt-induced pulmonary artery hypertension in rats [J]. *Cardiovasc Ther*, 2021, 2021: 4971300.
- [22] 黄秀霞, 庞宝森, 王辰, 等. 低氧性肺动脉高压大鼠肺功能变化 [J]. *基础医学与临床*, 2002, 22(4): 328–329.
- HUANG X X, PANG B S, WANG C, et al. Change of lung function in rats with hypoxic pulmonary hypertension [J]. *Basic Med Sci Clin*, 2002, 22(4): 328–329.
- [23] HABRE W, JÁNOSI T Z, FONTAO F, et al. Mechanisms for lung function impairment and airway hyperresponsiveness following chronic hypoxia in rats [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 298(4): L607–L614.
- [24] 张宁宁, 邱奇, 陈永锋, 等. 槲皮素可改善大鼠肺动脉高压: 基于调控 HMGB1/RAGE/NF-κB 通路 [J]. *南方医科大学学报*, 2023, 43(9): 1606–1612.
- ZHANG N N, QIU Q, CHEN Y F, et al. Quercetin improves pulmonary arterial hypertension in rats by regulating the HMGB1/RAGE/NF-κB pathway [J]. *J South Med Univ*, 2023, 43(9): 1606–1612.
- [25] LI Q, WU J, XU Y, et al. Role of RASEF hypermethylation in cigarette smoke-induced pulmonary arterial smooth muscle remodeling [J]. *Respir Res*, 2019, 20(1): 52.
- [26] LEE J H, LEE D S, KIM E K, et al. Simvastatin inhibits cigarette smoking-induced emphysema and pulmonary hypertension in rat lungs [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172(8): 987–993.

- [27] 孙得胜, 刘虹延, 刘先胜, 等. 香烟烟雾刺激诱导肺动脉高压动物模型的构建 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(1): 138-141.
- SUN D S, LIU H Y, LIU X S, et al. Establishment of animal model of pulmonary hypertension induced by cigarette smoke [J]. Chin J Gerontol, 2021, 41(1): 138-141.
- [28] KARPOV A A, VACHRUSHEV N S, SHILENKO L A, et al. Sympathetic denervation and pharmacological stimulation of parasympathetic nervous system prevent pulmonary vascular bed remodeling in rat model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension [J]. J Cardiovasc Dev Dis, 2023, 10(2): 40.
- [29] KARPOV A A, VAULINA D D, SMIRNOV S S, et al. Rodent models of pulmonary embolism and chronic thromboembolic pulmonary hypertension [J]. Heliyon, 2022, 8(3): e09014.
- [30] HSU L L, CHAMPION H C, CAMPBELL-LEE S A, et al. Hemolysis in sickle cell mice causes pulmonary hypertension due to global impairment in nitric oxide bioavailability [J]. Blood, 2007, 109(7): 3088-3098.
- [31] BILAN V P, SCHNEIDER F, NOVELLI E M, et al. Experimental intravascular hemolysis induces hemodynamic and pathological pulmonary hypertension; association with accelerated purine metabolism [J]. Pulm Circ, 2018, 8(3): 2045894018791557.
- [32] HE L S, CHANG S W, VOELKEL N F. Pulmonary vascular reactivity in Fischer rats [J]. J Appl Physiol (1985), 1991, 70(4): 1861-1866.
- [33] HOSHIKAWA Y, NANA-SINKAM P, MOORE M D, et al. Hypoxia induces different genes in the lungs of rats compared with mice [J]. Physiol Genomics, 2003, 12(3): 209-219.
- [34] DAI Z, LI M, WHARTON J, et al. Prolyl-4 hydroxylase 2 (PHD2) deficiency in endothelial cells and hematopoietic cells induces obliterative vascular remodeling and severe pulmonary arterial hypertension in mice and humans through hypoxia-inducible factor-2 α [J]. Circulation, 2016, 133(24): 2447-2458.
- [35] JAMES WHITE R, MEOLI D F, SWARTHOUT R F, et al. Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 293(3): L583-L590.
- [36] KATZ M G, FARGNOLI A S, GUBARA S M, et al. The left pneumonectomy combined with monocrotaline or sugen as a model of pulmonary hypertension in rats [J]. J Vis Exp, 2019, 145: 59050.
- [37] LACHANT D J, MEOLI D F, HAIGHT D, et al. Low dose monocrotaline causes a selective pulmonary vascular lesion in male and female pneumonectomized rats [J]. Exp Lung Res, 2018, 44(1): 51-61.
- [38] GALKIN A, SITAPARA R, CLEMONS B, et al. Inhaled serralutinib exhibits potent efficacy in models of pulmonary arterial hypertension [J]. Eur Respir J, 2022, 60(6): 2102356.
- [39] MEDARAMETLA V, FESTIN S, SUGARRAGCHAA C, et al. PK10453, a nonselective platelet-derived growth factor receptor inhibitor, prevents the progression of pulmonary arterial hypertension [J]. Pulm Circ, 2014, 4(1): 82-102.
- [40] STROBL M, SCHREIBER C, PANZENBÖCK A, et al. Exhaled nitric oxide measurement to monitor pulmonary hypertension in a pneumonectomy-monocrotaline rat model [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013, 305(7): L485-L490.
- [41] VAN DER FEEN D E, WEIJ M, SMIT-VAN OOSTEN A, et al. Shunt surgery, right heart catheterization, and vascular morphometry in a rat model for flow-induced pulmonary arterial hypertension [J]. J Vis Exp, 2017, 120: 55065.
- [42] MAVROGIANNIS E, HAGDORN Q A J, BAZIOTI V, et al. Pirfenidone ameliorates pulmonary arterial pressure and neointimal remodeling in experimental pulmonary arterial hypertension by suppressing NLRP3 inflammasome activation [J]. Pulm Circ, 2022, 12(3): e12101.
- [43] KURAKULA K, HAGDORN Q A J, VAN DER FEEN D E, et al. Inhibition of the prolyl isomerase Pin1 improves endothelial function and attenuates vascular remodelling in pulmonary hypertension by inhibiting TGF- β signalling [J]. Angiogenesis, 2022, 25(1): 99-112.
- [44] MORIMATSU Y, SAKASHITA N, KOMOHARA Y, et al. Development and characterization of an animal model of severe pulmonary arterial hypertension [J]. J Vasc Res, 2012, 49(1): 33-42.
- [45] COSTE F, GUIBERT C, MAGAT J, et al. Chronic hypoxia aggravates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension; a rodent relevant model to the human severe form of the disease [J]. Respir Res, 2017, 18(1): 47.
- [46] LAN B, HAYAMA E, KAWAGUCHI N, et al. Therapeutic efficacy of valproic acid in a combined monocrotaline and chronic hypoxia rat model of severe pulmonary hypertension [J]. PLoS One, 2015, 10(1): e0117211.
- [47] BHAT L, HAWKINSON J, CANTILLON M, et al. RP5063, a novel, multimodal, serotonin receptor modulator, prevents Sugén 5416-hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 810: 83-91.
- [48] TARASEVICIENE-STEWART L, KASAHARA Y, ALGER L, et al. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with

- chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension [J]. *FASEB J*, 2001, 15(2): 427-438.
- [49] DE RAAF M A, SCHALIJ I, GOMEZ-ARROYO J, et al. SuHx rat model: partly reversible pulmonary hypertension and progressive intima obstruction [J]. *Eur Respir J*, 2014, 44(1): 160-168.
- [50] VITALI S H, HANSMANN G, ROSE C, et al. The Sugen 5416/hypoxia mouse model of pulmonary hypertension revisited: long-term follow-up [J]. *Pulm Circ*, 2014, 4(4): 619-629.
- [51] 黄杰, 夏瑜, 姜艳娇, 等. GPR146 经 P-JNK 通路对肺动脉高压小鼠血管重塑的影响 [J/OL]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2023, 16(4): 460-465.
- HUANG J, XIA Y, JIANG Y J, et al. Effects of GPR146 on vascular remodeling in mice with pulmonary hypertension *via* P-JNK pathway [J/OL]. *Chin J Lung Dis Electron Ed*, 2023, 16(4): 460-465.
- [52] 王晓彤, 秦立龙, 王寒黎, 等. 细胞分裂周期蛋白 42 通过内皮-间充质转化参与动脉型肺动脉高压小鼠右心室纤维化 [J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(10): 1756-1764.
- WANG X T, QIN L L, WANG H L, et al. Cell division cycle protein 42 is involved in right ventricular fibrosis in mice with pulmonary arterial hypertension by endothelial-mesenchymal transition [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2023, 39(10): 1756-1764.
- [53] KAROOR V, SWINDLE D, PAK D I, et al. Evidence supporting a role for circulating macrophages in the regression of vascular remodeling following sub-chronic exposure to hemoglobin plus hypoxia [J]. *Pulm Circ*, 2021, 11(4): 20458940211056806.
- [54] PENG Y, DAI J, ZHAO Y Y. *Egln1^{Tie2Cre}* mice exhibit similar therapeutic responses to Sildenafil, ambrisentan, and treprostinil as pulmonary arterial hypertension (PAH) patients, supporting *Egln1^{Tie2Cre}* mice as a useful PAH model [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2391.
- [55] DICOSMO B F, GEBA G P, PICARELLA D, et al. Airway epithelial cell expression of interleukin-6 in transgenic mice. Uncoupling of airway inflammation and bronchial hyperactivity [J]. *J Clin Invest*, 1994, 94(5): 2028-2035.
- [56] PENUMATSA K C, SHARMA Y, WARBURTON R R, et al. Lung-specific interleukin 6 mediated transglutaminase 2 activation and cardiopulmonary fibrogenesis [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1371706.
- [57] KATHRYN STEINER M, SYRKINA O L, KOLLIPUTI N, et al. Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension [J]. *Circ Res*, 2009, 104(2): 236-244.
- [58] 俞佳慧, 巩倩, 庄乐南. 肺动脉高压动物模型及其在药物研究中的应用进展 [J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(4): 381-397.
- YU J H, GONG Q, ZHUANG L N. Animal models of pulmonary arterial hypertension and their application in drug research [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(4): 381-397.
- [59] SAID S I, HAMIDI S A, GONZALEZ BOSCH L. Asthma and pulmonary arterial hypertension: do they share a key mechanism of pathogenesis? [J]. *Eur Respir J*, 2010, 35(4): 730-734.
- [60] PATEL M, PREDESCU D, BARDITA C, et al. Modulation of intersectin-1s lung expression induces obliterative remodeling and severe plexiform arteriopathy in the murine pulmonary vascular bed [J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(3): 528-542.
- [61] HYE T, DWIVEDI P, LI W, et al. Newer insights into the pathobiological and pharmacological basis of the sex disparity in patients with pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2021, 320(6): L1025-L1037.
- [62] FRUMP A L, GOSS K N, VAYL A, et al. Estradiol improves right ventricular function in rats with severe angioproliferative pulmonary hypertension: effects of endogenous and exogenous sex hormones [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 308(9): L873-L890.
- [63] QIN S, PREDESCU D, CARMAN B, et al. Up-regulation of the long noncoding RNA X-inactive-specific transcript and the sex bias in pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Pathol*, 2021, 191(6): 1135-1150.
- [64] PREDESCU D, QIN S, PATEL M, et al. Epsin 15 homology domains: role in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 1393.
- [65] 李天骥, 潘慧, 纪爽, 等. Bmpr2 R491W 点突变致大鼠自发肺动脉高压 [J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2023, 23(2): 5326-5332.
- LI T Q, PAN H, JI S, et al. Bmpr2 R419W point mutation causes spontaneous pulmonary arterial hypertension in rats [J]. *Mol Cardiol China*, 2023, 23(2): 5326-5332.
- [66] LARKIN E K, NEWMAN J H, AUSTIN E D, et al. Longitudinal analysis casts doubt on the presence of genetic anticipation in heritable pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 186(9): 892-896.
- [67] BEPPU H, ICHINOSE F, KAWAI N, et al. BMPR-II heterozygous mice have mild pulmonary hypertension and an impaired pulmonary vascular remodeling response to prolonged hypoxia [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 287(6): L1241-L1247.

- [68] BEPPU H, KAWABATA M, HAMAMOTO T, et al. BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos [J]. Dev Biol, 2000, 221 (1): 249-258.
- [69] HAUTEFORT A, MENDES-FERREIRA P, SABOURIN J, et al. Bmpr2 mutant rats develop pulmonary and cardiac characteristics of pulmonary arterial hypertension [J]. Circulation, 2019, 139(7): 932-948.
- [70] LONG L, ORMISTON M L, YANG X, et al. Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension [J]. Nat Med, 2015, 21 (7): 777-785.
- [71] THEILMANN A L, HAWKE L G, HILTON L R, et al. Endothelial *BMPR2* loss drives a proliferative response to BMP (bone morphogenetic protein) 9 via prolonged canonical signaling [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020, 40(11): 2605-2618.
- [72] TIAN W, JIANG X, SUNG Y K, et al. Phenotypically silent bone morphogenetic protein receptor 2 mutations predispose rats to inflammation-induced pulmonary arterial hypertension by enhancing the risk for neointimal transformation [J]. Circulation, 2019, 140 (17): 1409-1425.
- [73] WEST J D, CHEN X, PING L, et al. Adverse effects of BMPR2 suppression in macrophages in animal models of pulmonary hypertension [J]. Pulm Circ, 2019, 10 (1): 2045894019856483.

〔收稿日期〕2024-10-10



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://zgswydw.cnjournals.com>

期待您的来稿!

朱大诚,刘燕,魏佳旭. 铁死亡介导急性白血病的机制研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(4): 150–158.

Zhu DC, Liu Y, Wei JX. Research progress on the mechanism of acute leukemia mediated by ferroptosis [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 150–158.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.015

铁死亡介导急性白血病的机制研究进展

朱大诚*, 刘 燕, 魏佳旭

(江西中医药大学, 南昌 330004)

【摘要】 铁死亡主要与铁代谢、脂质代谢和氨基酸代谢等三大途径密切相关,这些途径有助于活性氧的产生,使线粒体损伤,致使细胞死亡。近年来,铁死亡在肿瘤发展过程中被认为是一种关键的调控机制,在急性白血病中也不例外。该综述综合分析发现药物通过调控铁死亡三大代谢途径的关键蛋白或因子干预脂质过氧化物的产生来抑制急性白血病发生发展,阐述了铁死亡在急性白血病临床试验中的应用,指出了目前研究存在的不足以及提出了今后该领域的研究方向,为未来针对白血病的治疗提供新的思路。

【关键词】 铁死亡;急性白血病;活性氧;脂质过氧化物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0150-09

Research progress on the mechanism of acute leukemia mediated by ferroptosis

ZHU Dacheng*, LIU Yan, WEI Jiaxu

(Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

【Abstract】 Ferroptosis is closely related to iron metabolism, lipid metabolism, and amino acid metabolism, which contribute to the production of reactive oxygen species, mitochondrial damage, and cell death. Ferroptosis has recently been recognized as a key regulatory mechanism during tumor development, including in acute leukemia. This review considers the inhibitory effects of drugs on the occurrence and development of acute leukemia, by regulating key proteins or factors involved in the above three metabolic pathways of ferroptosis and by interfering with the production of lipid peroxides. We also point out the deficiencies in current research and describe the role of ferroptosis in acute leukemia. The application of these findings in clinical trials will provide new ideas for future research and the treatment of leukemia.

【Keywords】 ferroptosis; acute leukemia; ROS; LPO

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

急性白血病 (acute leukemia, AL) 是一类高度恶性的造血系统疾病,源于造血干细胞失去正常增殖、分化的能力,白血病细胞在体内大量增

殖,使得免疫系统功能受损^[1]。虽然许多研究对急性白血病的发病机制进行了探索,但关于其具体机制至今尚不完全清楚,随着研究逐渐深入,

[基金项目] 江西中医药大学中西医结合一级学科 (江西省双一流学科) (zxylxk20220103)。

[作者简介] 朱大诚 (1964—),男,教授,博士生导师,研究方向:中医药抗肿瘤。E-mail:459067657@qq.com

越来越多的细胞死亡途径如凋亡、自噬等在白血病的发生发展中起作用,铁死亡(ferroptosis)为其中之一。

铁死亡已成为肿瘤研究的热门靶点,其关键机制之一是调控铁死亡相关的关键蛋白表达来抑制实体肿瘤的发生发展^[2]。铁死亡在血液系统肿瘤中的研究较多^[3-4],近年来发现铁过载会诱导急性白血病细胞的铁死亡,并参与 AL 的发生。在多种 AL 动物模型中,铁死亡诱导剂通过调控铁死亡相关通路中的调控因子及蛋白的表达来抑制肿瘤细胞增殖,改善患者治疗和预后效果,这提示铁死亡可能成为治疗急性白血病的新靶点^[5]。虽然当前的研究已经初步探索了铁死亡在 AL 中如何抑制其发生发展的机制,但尚未系统阐明。因此,深入探究铁死亡在 AL 中的具体机制,对于揭示其发生发展的机理具有重要的理论和临床意义。本综述旨在通过总结铁死亡发生的机制,综合分析已有文献和实验数据,阐述铁死亡在 AL 中的具体机理,为后续对 AL 理论与临床研究提供新的思路。

1 铁死亡机制

铁死亡一词是 DIXON 等^[6]在 2012 年最先提出的,作为一种新型的铁依赖性非凋亡细胞死亡形式^[7],与自噬、凋亡、焦亡、坏死等细胞死亡形式有着显著的区别,在形态学呈现出自身的特征:线粒体形态变小、膜密度增加、外膜破损、嵴减少甚至消失^[8]。其发生主要与胞质内活性氧(reactive oxygen species, ROS)或脂质过氧化物(lipid peroxides, LPO)产生过多、堆积以及铁代谢的异常有关^[9],使得细胞膜发生破损。研究表明,在哺乳类动物中,细胞铁死亡主要通过铁代谢、脂质代谢和氨基酸代谢等途径中氧化还原平衡的调节^[10](图 1)。

1.1 铁代谢

铁代谢紊乱是铁死亡发生的重要因素。细胞对铁死亡的敏感性主要依赖于铁离子的转运、储存与利用。体内循环中铁以 Fe^{3+} 的形式通过食物摄入, Fe^{3+} 经十二指肠黏膜上皮细胞内十二指肠细胞色素 b (duodenal cytochrome b, Dcytb) 还原

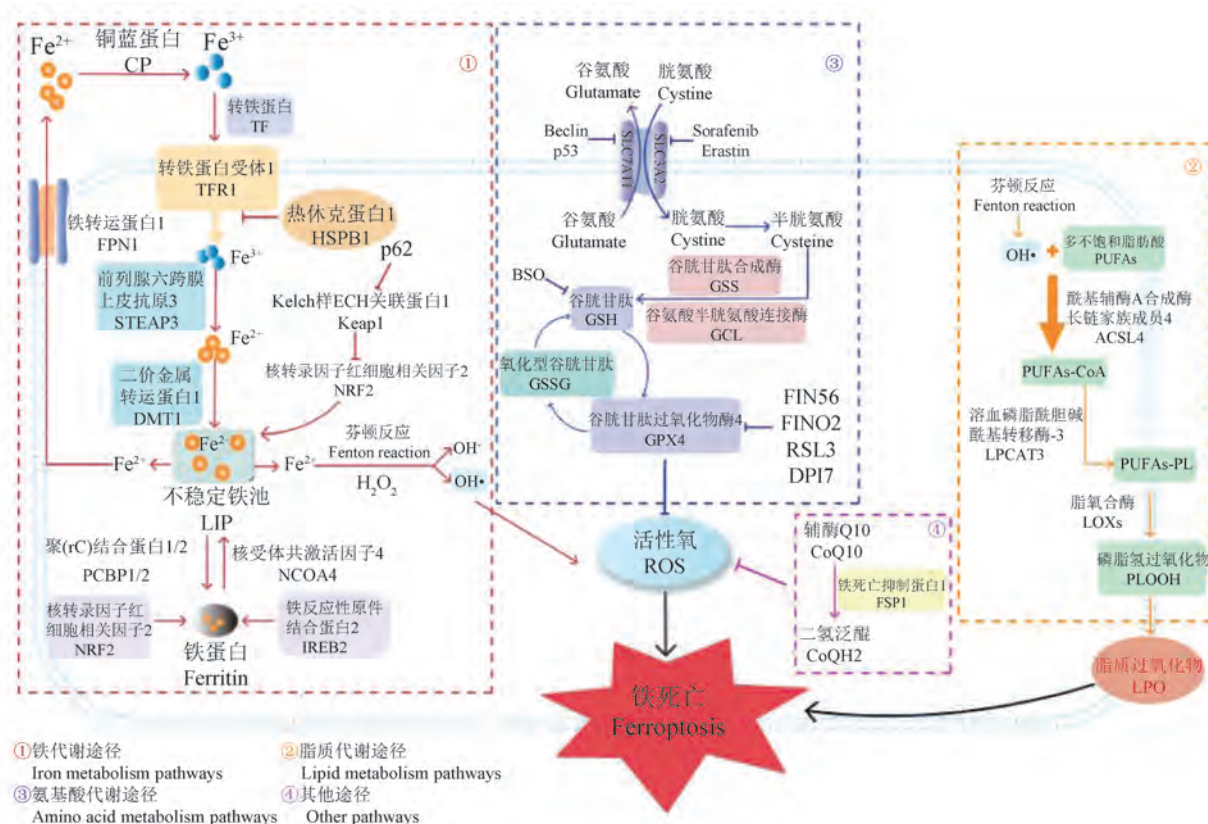


图 1 铁死亡的发生机制示意图

Figure 1 Schematic diagram of the mechanism of ferroptosis

为 Fe^{2+} ^[11], Fe^{2+} 经铁转运蛋白 1 (ferroportin 1, FPN1) 进入循环系统, 通过铁氧化酶铜蓝蛋白 (ceruloplasmin, CP) 氧化成 Fe^{3+} ^[12], 在转铁蛋白 (transferrin, TF) 与转铁蛋白受体 1 (transferrin receptor protein 1, TFR1) 作用下输送至全身^[13], 随后被膜泡表面的氧化还原酶前列腺六跨膜上皮抗原 3 (six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3, STEAP3) 还原为 Fe^{2+} ^[14]。一部分 Fe^{2+} 经二价金属转运蛋白 1 (divalent metal transporter 1, DMT1) 转运到不稳定铁池 (labile iron pool, LIP) 内; 另一部分 Fe^{2+} 则进入线粒体, 参与铁硫簇化和血红素的合成。

1.2 脂质代谢

细胞发生铁死亡与脂质代谢也密切相关。细胞膜基本构架是磷脂 (phospholipid, PL) 双分子层, 磷脂中含有多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 和单不饱和脂肪酸 (monounsaturated fatty acids, MUFAs)。芬顿反应中生成的羟基自由基引起细胞膜上 PUFAs 的非酶自由基链氧化反应。在酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4) 与溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶-3 (lyso-phosphatidylcholine acyltransferase-3, LPCAT3) 的作用下合成含磷脂的多不饱和脂肪酸链 (PUFAs-PL), 随后在脂氧合酶 (lipoxygenase, LOXs) 的作用下生成磷脂氢过氧化物 (phospholipid hydroperoxides, PLOOH), 在膜内反应催生 LPO, 破坏细胞膜引发铁死亡^[15-16]。

1.3 氨基酸代谢

在 GPXs 家族中, 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 和谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 对铁死亡的调节起着至关重要的作用^[17]。GSH 是维持 GPX4 活性的还原底物, 是生成 GPX4 的一个必要辅助因子^[18], 作为这条通路的上游调控靶基因, 可将 GSH 转化为氧化型谷胱甘肽 (glutathione disulfide, GSSG), 使得 GPX4 的表达增加。GPX4 作为谷胱甘肽过氧化物酶家族成员之一^[19], 属于氧化还原酶^[20], 促进 GPX4 的表达可拮抗氧化应激并减少细胞自由基的表达, 起到抗氧化防御作用, 抑制铁死亡发生。因此, GSH 和 GPX4 都是氨基酸代谢中的关键调控点。

1.4 其他

抗氧化防御中, 除了氨基酸代谢途径外, 还可通过铁抑制蛋白 1 (ferroptosis suppressor protein 1, FSP1) 来调节。FSP1 具备高效的泛醌氧化还原反应能力, 可将辅酶 Q10 (coenzyme Q10, CoQ10) 还原为二氢泛醌 (coenzyme QH2, CoQH2), CoQH2 作为一种抗氧化剂, 直接还原脂质自由基以终止脂质过氧化, 有效抑制脂质过氧化物的生成, 通过激活 GPX4 非依赖性轴, 在抑制细胞铁死亡发生中发挥着重要作用^[21]。

2 铁死亡介导 AL 的机制

2.1 急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML)

AML 作为血液恶性肿瘤, 会破坏正常的造血过程并促进骨髓内造血细胞过度增殖与分化, 是成人中最常见的 AL^[22]。AML 发生发展机制与铁死亡代谢途径有关。

2.1.1 铁代谢与 AML

许多生物功能活动依赖于铁^[23], 但铁平衡状态的失调与多种疾病的发生发展有关, 如铁死亡的发生, 很大程度上是因为铁离子浓度升高, 产生 ROS 使得细胞引起氧化应激和细胞膜的损伤^[24-27]。

近年来, 越来越多的研究人员从铁死亡途径来研究 AML 的发生机制。DU 等^[28]发现, 双氢青蒿素 (dihydroartemisinin, DHA) 能抑制 AML 细胞的活性。从机制上讲, DHA 通过调节 AMPK/mTOR/70 kDa 核糖体蛋白 S6 激酶 (p70s6k) 信号转导通路来诱导细胞自噬^[29], 进而加速铁蛋白的降解, 并增加 LIP 不稳定性并进一步促进 ROS 在细胞内的累积并最终导致铁死亡。核转录因子红细胞相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2) 在铁代谢中起重要作用。在正常情况下, NRF2 会被 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 复合体泛素化修饰并在细胞质中降解, 使 NRF2 保持稳定的状态^[30] (图 1)。YU 等^[31]研究发现, NRF2 表达下调会抑制铁储存蛋白重链 1 (ferritin heavy chain 1, FTH1) 和溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 的表达, 从而促进 LIP 不稳定性 and 脂质过氧化, 减少

AML 中 MV411、MOLM13、HL60、THP1 和 NB4 等细胞的增殖(图 1)。抑制 NRF2 时,可降低 AML 的耐药性,这说明 NRF2 对 AML 的发生发展起着重要调控作用。

游离 Fe^{2+} 过量会引起氧化应激^[32],而由重链 FTH1 和轻链(ferritin light chain, FTL)组成的铁储存蛋白能够维持铁平衡以阻止这一情况发生。除了铁储存蛋白之外,还有其他分子也参与到铁代谢过程中。高迁移率族蛋白盒 1(high-mobility group protein box 1, HMGB1)属于损伤相关分子模式家族,与细胞的死亡、损伤或炎症状态密切相关,可由死亡或受伤的细胞释放^[33]。HMGB1 在细胞外铁死亡激动剂 RSL3 和 erastin 诱导的铁死亡过程中会触发炎症和免疫反应^[34],YE 等^[35]通过研究证明 HMGB1 的表达与 erastin 诱导 HL-60 铁死亡的结果呈正相关,HMGB1 的敲低通过 RAS-JNK/p38 途径来降低 HL-60 细胞中的 TFR1 水平表达,从而抑制铁死亡。

2.1.2 脂代谢与 AML

脂代谢过程中产生的脂质过氧化物是检测铁死亡的金指标。多不饱和脂肪酸的可用性和空间定位决定了脂质氧化的程度,直接诱导铁死亡发生^[36]。PUFAs 作为脂质信号介质合成的底物,在酯化成膜磷脂后,经过氧化才能引发铁死亡级联反应^[37]。在限制 PUFAs-PL 合成的因子中,硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(stearoyl-CoA desaturase 1, SCD1)可限制 MUFAs 合成,是脂质代谢的重要调节因子^[38]。SABATIER 等^[39]提出,FLT3-ITD 突变的 MOLM-14 细胞可通过 CCAAT 增强子结合蛋白 α (CCAAT/enhancer binding protein α , C/EBP α)和 SCD1 来调节 PUFAs 和 MUFAs 的合成。当 C/EBP α 在 FLT3-ITD 突变的 AML 细胞中被抑制时,SCD1 表达下调,导致 MUFAs 减少而 PUFAs 产生增加,从而导致铁细胞死亡。YUSUF 等^[40]研究表明敲低 Aldh3a2 时,其氧化脂质过氧化物下游产物醛的作用减弱,AML 细胞系 HL60、MOLM-14、MONOMAC-6、NB4、NOMO-1 和 THP1 被氧化应激反应损伤细胞膜而发生铁死亡。此外,Aldh3a2 耗竭引起的铁死亡与 GPX4 的抑制具有协同作用,可为 Aldh3a2 抑制剂与细胞毒性治疗的联合应用提供理论依据。酰基辅酶 A 合成酶长链家族(acyl-CoA

synthetase long-chain family member, ACSL)能上调 PUFAs 的表达,促进脂质代谢,产生 LPO 破坏细胞膜以抑制肿瘤细胞增殖。ACSL 家族有 5 个亚型,分别为 ACSL1、3、4、5 和 6,而 CHEN 等^[41]研究发现 ACSL6 在急性髓系白血病中存在,但 AML 患者预后却不理想,其原因与 ACSL6 低表达有关,脂质代谢途径不能被激活,因此 AML 细胞增殖不受铁死亡影响,患者预后差。

2.1.3 氨基酸代谢与 AML

GPX4 作为抗氧化剂,是能将脂质过氧化物还原成脂质的酶,由于 GPX4 是硒蛋白,在合成过程中需要借助硒代半胱氨酸,具有高活性。因此,GPX4 是很多铁死亡诱导剂的靶点^[40]。程霖等^[42]研究证明 RSL3 诱导急性髓系白血病 MOLM13 细胞铁死亡是通过诱导 GPX4 降低蛋白表达量来实现的。BIRSEN 等^[43]研究发现铁死亡激动剂 RSL3 和 FINO2 直接或间接抑制 GPX4 功能(图 1),与新型治疗剂 APR-246 结合可协同抑制 AML 细胞系的细胞增殖,同时细胞发生铁死亡,增强了 AML 中 APR-246 的抗白血病活性。白藜芦醇通过 Hsa-miR-335-5p/NFS1/GPX4 通路下调 NFS1 和 GPX4 表达水平,促进 ROS 积累,导致 AML-193 和 OCI-AML-3 细胞铁死亡^[44]。重楼皂苷 I(Polyphyllin I)靶向 PI3K/SREBP-1/SCD1 轴诱导细胞凋亡,下调 GPX4 表达,减弱细胞的抗氧化能力并增加脂质过氧化,抑制 MOLM-13 细胞增殖^[45]。WANG 等^[46]研究了核长非编码 RNA LINC00618 对诱导 HL60 和 MV4-11 细胞发生铁死亡的影响,通过减弱淋巴特异性解旋酶(lymphoid-specific helicase, LSH)的表达、增加 ROS 和铁的水平、降低 SLC7A11 的表达,促进脂质过氧化物产生,加速铁死亡^[47]。p53 作为氨基酸代谢上游因子,通过抑制谷氨酸-胱氨酸反向转运体(cystine/glutamate antiporter, System Xc-)来达到促进铁死亡的目的,p53 是 hsa-let-7b-5p 的靶基因,CircKDM4C 在 AML 细胞系中抑制 hsa-let-7b5p 的表达,导致 p53 上调,SLC7A11 的转录受到 p53 抑制,从而促进 AML 细胞发生铁死亡^[48]。

2.2 急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)

ALL 是发病率高的恶性肿瘤^[49]。目前铁死

亡在 ALL 的研究中报道较少,在现有文献中,ALL 主要是通过氨基酸代谢途径诱导白血病细胞铁死亡。

白血病细胞可通过以 FSP1 为中心的 GPX4 非依赖轴来防御铁死亡的发生^[50],但 PONTEL 等^[51]研究发现 FSP1 在 ALL 细胞系中的表达几乎缺失,而 ALL 会通过 System Xc⁻/GSH/GPX4 这条通路发生铁死亡。TIAN 等^[52]证实 ALL 是通过氨基酸代谢途径引发细胞死亡,当沉默脂质运载蛋白 2(lipocalin 2,LCN2)时,会增加 RSL3 的表达,而 GSH 和 GPX4 的水平降低,使得急性 T 淋巴细胞白血病(acute T lymphoblastic leukemia, T-ALL)Jurkat 和 Molt-4 细胞发生铁死亡。NRF2 作为抗氧化转录因子,上调其表达会增加 SLC7A11、GSH 和 GPX4 等氨基酸代谢途径中的蛋白表达,抑制脂质过氧化物的产生。JIN 等^[53]发现抑癌因子 PAQR3 通过抑制 NRF2 以及 NRF2 下游靶标 GSH、GPX4 诱导 T-ALL CEM-C1 和 Jurkat 细胞发生铁死亡。

GPX4 依赖性通路其抑制剂有 BSO、RSL3、erastin、Sorafenib、FIN56 等^[54],其作用是抑制 System Xc⁻、GSH、GPX4 的表达,最终诱导铁死亡发生。DÄCHERT 等^[55]证明铁死亡激动剂 RSL3 和 erastin 可诱导 Jurkat 和 Molt-4 细胞产生 ROS,而铁死亡抑制剂 α -Toc 和 Fer-1 则减少 ROS 产生。HONG 等^[56]研究表明索拉非尼(Sorafenib)能够提高 Ph-neg B-ALL 患者的治愈率,其机制可能是索拉非尼作为铁死亡激动剂,能够抑制 System Xc⁻/GSH/GPX4 通路,增加 ROS 的产生,诱导铁死亡。

当药物作用于细胞时,并非只发生铁死亡。LOU 等^[57]研究水芸香素 D 作用于 Jurkat、Molt-4 细胞时,发现它最先诱导的是细胞凋亡与周期阻滞,诱导自噬,同时 ROS 含量增加、GSH 含量减少,GPX4 表达下降,最终引发细胞铁死亡,证明了细胞自噬可促进铁死亡。除此之外,CHEN 等^[58]发现茯苓酸增加 ROS 含量引发 T-ALL 细胞凋亡,通过 AMPK/mTOR 和 LC3 信号通路诱导自噬,同时下调 GSH 和上调丙二醛的表达,导致铁死亡。大豆氯化铵通过 Caspase3、7、8 和 9 激活和改变线粒体膜电位,增加 ROS 生成引发铁死亡抑制 CCRF-CEM 白血病细胞增殖,进一步诱导

CCRF-CEM 细胞凋亡^[59]。朱婷等^[60]发现自噬可以增强 ALL 细胞对 erastin 的敏感性,表明自噬和铁死亡的激活剂联合运用对于 AL 化疗耐药可作为新的治疗方法。因此,药物抗 ALL 可能是通过细胞凋亡、自噬与铁死亡共同作用而导致。

3 铁死亡在 AL 中的临床实验研究

AL 的临床治疗多以化疗为主,但目前化疗后存在不断复发的情况,其原因主要为抗肿瘤药物长时间作用于白血病细胞后,细胞对该药物甚至其它未接触的抗肿瘤药物产生耐药,即多药耐药(multidrug resistance, MDR)。而 MDR 产生的重要原因是白血病干细胞(leukemia stem cell, LSC)在患者体内作祟。白血病干细胞是导致白血病发生、复发、治疗产生耐药性的具有自我更新、分化能力的细胞^[61]。在现有研究中发现铁死亡相关基因可作为治疗因白血病干细胞导致 MDR 的靶点,如 GPX4、GSH、SLC7A11^[62-64],这些靶点能大大增强疗效及改善患者生存质量。在 BIRSEN 等^[43]的一项研究中,APR-246 通过降低 GSH 浓度和增加 ROS 和脂质过氧化物来诱导 AML 细胞铁死亡,在临床 II 期研究中,APR-246 联合阿扎胞苷能有效缓解 AML 患者耐药^[65]。还有研究表明,铁死亡激动剂可以抑制肿瘤细胞的增殖,耐药肿瘤细胞对铁死亡的敏感度会高于普通肿瘤细胞,可能与其自身氧化产物量有关,因此铁死亡激动剂抑制耐药细胞株增殖更为明显,如 erastin 联合顺铂通过抑制 System Xc⁻通路来增强治疗耐顺铂患者的疗效^[66],RSL3 可通过抑制 GPX4 活性诱导 AML 细胞株铁死亡^[42]。

传统中药在抑制肿瘤发生发展、减少耐药性、提高患者机体免疫力等方面,联合铁死亡激动剂能增强疗效,提高治愈率。在此前已有研究有毒中药运用“以毒攻毒”理论通过诱导细胞凋亡、自噬等途径显著抑制 AL 细胞增殖^[67-71]。同时研究可见有毒中药从不同靶点、途径诱导 AL 细胞发生铁死亡。如雷公藤甲素等^[72]化合物能通过铁死亡氨基酸代谢途径影响 GPX4 含量诱导 AML 细胞铁死亡,克服细胞多药耐药。此外,青蒿琥酯(artemisinin, ART)也可通过增强细胞毒性和 ROS 的表达抵抗 ALL 耐药^[73]。因此,有毒中药有效成分诱导 AL 细胞发生铁死亡方面的研究

具有巨大的潜力。

4 小结与展望

AL 是一种复杂且易危及患者生命的疾病,具有病死率高及预后差等特点,患者需依靠化疗和骨髓移植等方法才能生存。因此,探索新的靶点和药物来治疗 AL,改善预后,减少耐药等诱发因素,对患者具有十分重要的意义。综述讨论了通过调控铁死亡各代谢途径中的关键蛋白或因子来平衡 AL 细胞内的 ROS 产生和代谢,增强 AL 细胞对铁死亡的敏感以抑制细胞增殖,提示铁死亡可能成为干预 AL 发生和发展的重要靶点。然而目前关于铁死亡在 AL 中作用的研究更多聚焦于 AML 上,涉及的 ALL 细胞系较少,且研究 ALL 发生铁死亡主要局限于氨基酸代谢途径中的 GPX4 依赖性通路。

当前研究现状存在不足,其一,通过调控铁死亡通路抑制 AL 细胞增殖的研究,目前局限于动物实验和细胞基础实验,临床研究较少。其二,临床上仍使用常规化疗药如长春新碱、阿糖胞苷等,安全有效的铁死亡激动剂较少,APR-246 也仍处于临床试验中。今后可进一步阐明铁死亡的机制,明确更多的针对铁死亡关键代谢点的调节剂,进一步开发靶向化合物并转化临床使用。此外也可考虑从有毒中药中提取有效成分作为铁死亡诱导剂,并与临床常用化疗药物联合使用,以诱导患者体内白血病细胞发生铁死亡起到逆转 MDR 作用,弥补现有治疗方案的不足,以期提高 AL 治愈率及患者生存质量。

参考文献:

[1] KUEK V, HUGHES A M, KOTTECHA R S, et al. Therapeutic targeting of the leukaemia microenvironment [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6888.

[2] HE H, QIAO Y, ZHOU Q, et al. Iron overload damages the endothelial mitochondria via the ROS/ADMA/DDAHII/ENOS/NO pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 2340392.

[3] 王雨淦, 封蔚莹, 王福佛, 等. 髓系肿瘤中铁代谢及铁死亡的研究进展 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2024, 53(6): 735-746.

WANG Y D, FENG W Y, WANG F D, et al. Research progress of iron metabolism and ferroptosis in myeloid neoplasms [J]. *J Zhejiang Univ Med Sci*, 2024, 53(6):

735-746.

[4] 韩炯萍, 方泽浩, 封蔚莹. 铁死亡在多发性骨髓瘤中作用的研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2024, 40(4): 748-754.

HAN J P, FANG Z H, FENG W Y. Progress in role of ferroptosis in multiple myeloma [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2024, 40(4): 748-754.

[5] CHEN Z, ZHU Q, QI X, et al. Dual role of Nrf2/HO-1 pathway in Z-ligustilide-induced ferroptosis against AML cells [J]. *Phytomedicine*, 2024, 124: 155288.

[6] 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.

[7] TAN S, SCHUBERT D, MAHER P. Oxytosis: a novel form of programmed cell death [J]. *Curr Top Med Chem*, 2001, 1(6): 497-506.

[8] WANG H, CHENG Y, MAO C, et al. Emerging mechanisms and targeted therapy of ferroptosis in cancer [J]. *Mol Ther*, 2021, 29(7): 2185-2208.

[9] TANG X, WANG Y, ZHU Y, et al. Basic mechanisms and novel potential therapeutic targets for ferroptosis in acute myeloid leukemia [J]. *Ann Hematol*, 2023, 102(8): 1985-1999.

[10] SUN S, SHEN J, JIANG J, et al. Targeting ferroptosis opens new avenues for the development of novel therapeutics [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 372.

[11] STEELE T M, FRAZER D M, ANDERSON G J. Systemic regulation of intestinal iron absorption [J]. *IUBMB Life*, 2005, 57(7): 499-503.

[12] FRAZER D M, ANDERSON G J. The regulation of iron transport [J]. *Biofactors*, 2014, 40(2): 206-214.

[13] 姜懿洋, 刘帅, 张静涛, 等. 中医药通过诱导铁死亡治疗肺癌的研究进展 [J]. *中医药学报*, 2024, 52(3): 100-108.

JIANG Y Y, LIU S, ZHANG J T, et al. Progress in the treatment of lung cancer by iron death induced by traditional Chinese medicine [J]. *Acta Chin Med Pharmacol*, 2024, 52(3): 100-108.

[14] 董佩, 袁普卫, 康武林, 等. 铁死亡相关肌肉骨骼系统疾病的概述及中医药干预进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(21): 7202-7212.

DONG P, YUAN P W, KANG W L, et al. Overview of ferroptosis-related musculoskeletal system diseases and progress of traditional Chinese medicine intervention [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(21): 7202-7212.

[15] XU R, WANG W, ZHANG W. Ferroptosis and the bidirectional regulatory factor p53 [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 197.

[16] STOCKWELL B R, ANGELI J P F, BAYIR H, et al.

- Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. *Cell*, 2017, 171(2): 273–285.
- [17] JIANG X, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266–282.
- [18] URSINI F, MAIORINO M. Lipid peroxidation and ferroptosis: the role of GSH and GPx4 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 152: 175–185.
- [19] XIE Y, KANG R, KLIONSKY D J, et al. GPX4 in cell death, autophagy, and disease [J]. *Autophagy*, 2023, 19(10): 2621–2638.
- [20] LI C, DENG X, ZHANG W, et al. Novel allosteric activators for ferroptosis regulator glutathione peroxidase 4 [J]. *J Med Chem*, 2019, 62(1): 266–275.
- [21] YANG M, TSUI M G, TSANG J K W, et al. Correction: Involvement of FSP1-CoQ₁₀-NADH and GSH-GPx-4 pathways in retinal pigment epithelium ferroptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(3): 197.
- [22] VAGO L, GOJO I. Immune escape and immunotherapy of acute myeloid leukemia [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(4): 1552–1564.
- [23] LI T, LIN T, ZHU J, et al. Prognostic and therapeutic implications of iron-related cell death pathways in acute myeloid leukemia [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1222098.
- [24] LIU R, ZHOU Y, CAO Y. CircRNA and ferroptosis in human disease: insights for new treatments [J]. *Anim Model Exp Med*, 2023, 6(6): 508–517.
- [25] WEBER S, PARMON A, KURRLE N, et al. The clinical significance of iron overload and iron metabolism in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia [J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 627662.
- [26] MLECZKO-SANECKA K, SILVESTRI L. Cell-type-specific insights into iron regulatory processes [J]. *Am J Hematol*, 2021, 96(1): 110–127.
- [27] 刘玉倩, 杨雯茜, 王海涛. GSH/GPx4 介导的铁死亡通路在有氧运动预防自然衰老小鼠模型肝过氧化损伤中的作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(12): 1581–1587.
- LIU Y Q, YANG W Q, WANG H T. Role of the ferroptosis pathway mediated by GSH/GPx4 in preventing hepatocyte peroxidative injury following aerobic exercise in an elderly mouse model [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(12): 1581–1587.
- [28] DU J, WANG T, LI Y, et al. DHA inhibits proliferation and induces ferroptosis of leukemia cells through autophagy dependent degradation of ferritin [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 131: 356–369.
- [29] GRIGNANO E, CANTERO-AGUILAR L, TUERDI Z, et al. Dihydroartemisinin-induced ferroptosis in acute myeloid leukemia: links to iron metabolism and metallothionein [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 97.
- [30] PANIERI E, BUHA A, TELKOPARAN-AKILLILAR P, et al. Potential applications of NRF2 modulators in cancer therapy [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(3): 193.
- [31] YU X, WANG Y, TAN J, et al. Inhibition of NRF2 enhances the acute myeloid leukemia cell death induced by venetoclax *via* the ferroptosis pathway [J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1): 35.
- [32] GRIGNANO E, BIRSEN R, CHAPUIS N, et al. From iron chelation to overload as a therapeutic strategy to induce ferroptosis in leukemic cells [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 586530.
- [33] WEN Q, LIU J, KANG R, et al. The release and activity of HMGB1 in ferroptosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 510(2): 278–283.
- [34] CHEN X, YU C, KANG R, et al. Cellular degradation systems in ferroptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(4): 1135–1148.
- [35] YE F, CHAI W, XIE M, et al. HMGB1 regulates erastin-induced ferroptosis *via* RAS-JNK/p38 signaling in HL-60/NRAS^{G61L} cells [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(4): 730–739.
- [36] SHARMA A, FLORA S J S. Positive and negative regulation of ferroptosis and its role in maintaining metabolic and redox homeostasis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 9074206.
- [37] ZHANG H, SUN C, SUN Q, et al. Susceptibility of acute myeloid leukemia cells to ferroptosis and evasion strategies [J]. *Front Mol Biosci*, 2023, 10: 1275774.
- [38] YI J, ZHU J, WU J, et al. Oncogenic activation of PI3K-AKT-mTOR signaling suppresses ferroptosis *via* SREBP-mediated lipogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(49): 31189–31197.
- [39] SABATIER M, BIRSEN R, LAUTURE L, et al. C/EBP α confers dependence to fatty acid anabolic pathways and vulnerability to lipid oxidative stress-induced ferroptosis in FLT3-mutant leukemia [J]. *Cancer Discov*, 2023, 13(7): 1720–1747.
- [40] YUSUF R Z, SAEZ B, SHARDA A, et al. Aldehyde dehydrogenase 3a2 protects AML cells from oxidative death and the synthetic lethality of ferroptosis inducers [J]. *Blood*, 2020, 136(11): 1303–1316.
- [41] CHEN W C, WANG C Y, HUNG Y H, et al. Systematic analysis of gene expression alterations and clinical outcomes for long-chain acyl-coenzyme A synthetase family in cancer [J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155660.
- [42] 程霖, 金鑫, 卢文艺, 等. RSL3 诱导急性白血病细胞株 MOLM13 及其耐药细胞株发生铁死亡的作用及相关机制

- 研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2021, 29(4): 1109–1118.
- CHENG L, JIN X, LU W Y, et al. Effect and involved mechanism of RSL3-induced ferroptosis in acute leukemia cells MOLM13 and drug-resistant cell lines [J]. J Exp Hematol, 2021, 29(4): 1109–1118.
- [43] BIRSEN R, LARRUE C, DECROOCQ J, et al. APR-246 induces early cell death by ferroptosis in acute myeloid leukemia [J]. Haematologica, 2022, 107(2): 403–416.
- [44] LIU J, GAO W, SHENG Y, et al. Resveratrol drives ferroptosis of acute myeloid leukemia cells through Hsa-miR-335-5p/NFS1/GPX4 pathway in a ROS-dependent manner [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2023, 69(7): 131–137.
- [45] ZHOU X, ZHANG D, LEI J, et al. Polyphyllin I induces rapid ferroptosis in acute myeloid leukemia through simultaneous targeting PI3K/SREBP-1/SCD1 axis and triggering of lipid peroxidation [J]. J Nat Med, 2024, 78(3): 618–632.
- [46] WANG Z, CHEN X, LIU N, et al. A nuclear long non-coding RNA LINC00618 accelerates ferroptosis in a manner dependent upon apoptosis [J]. Mol Ther, 2021, 29(1): 263–274.
- [47] BALIHODZIC A, PRINZ F, DENGLER M A, et al. Non-coding RNAs and ferroptosis: potential implications for cancer therapy [J]. Cell Death Differ, 2022, 29(6): 1094–1106.
- [48] DONG L H, HUANG J J, ZU P, et al. CircKDM4C upregulates P53 by sponging hsa-let-7b-5p to induce ferroptosis in acute myeloid leukemia [J]. Environ Toxicol, 2021, 36(7): 1288–1302.
- [49] 陈霞, 雷小英, 管贤敏, 等. CCG-ALL-2015 方案治疗儿童急性淋巴细胞白血病复发的危险因素分析 [J]. 中国当代儿科杂志, 2024, 26(7): 701–707.
- CHEN X, LEI X Y, GUAN X M, et al. Risk factors for recurrence of childhood acute lymphoblastic leukemia after treatment with the Chinese Children's Cancer Group ALL-2015 protocol [J]. Chin J Contemp Pediatr, 2024, 26(7): 701–707.
- [50] COCCARO N, ANELLI L, ZAGARIA A, et al. Next-generation sequencing in acute lymphoblastic leukemia [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(12): 2929.
- [51] PONTEL L B, BUENO-COSTA A, MORELLATO A E, et al. Acute lymphoblastic leukemia necessitates GSH-dependent ferroptosis defenses to overcome FSP1-epigenetic silencing [J]. Redox Biol, 2022, 55: 102408.
- [52] TIAN C, ZHENG M, LAN X, et al. Silencing LCN2 enhances RSL3-induced ferroptosis in T cell acute lymphoblastic leukemia [J]. Gene, 2023, 879: 147597.
- [53] JIN L, TONG L. PAQR3 inhibits proliferation and aggravates ferroptosis in acute lymphoblastic leukemia through modulation Nrf2 stability [J]. Immun Inflamm Dis, 2021, 9(3): 827–839.
- [54] LIU Y, WAN Y, JIANG Y, et al. GPX4: The hub of lipid oxidation, ferroptosis, disease and treatment [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2023, 1878(3): 188890.
- [55] DÄCHERT J, SCHOENEBERGER H, ROHDE K, et al. RSL3 and Erastin differentially regulate redox signaling to promote Smac mimetic-induced cell death [J]. Oncotarget, 2016, 7(39): 63779–63792.
- [56] HONG Y, ZHANG L, TIAN X, et al. Identification of immune subtypes of Ph-neg B-ALL with ferroptosis related genes and the potential implementation of Sorafenib [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 1331.
- [57] LOU S, HONG H, MAIHESUTI L, et al. Inhibitory effect of hydnocarpin D on T-cell acute lymphoblastic leukemia *via* induction of autophagy-dependent ferroptosis [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2021, 246(13): 1541–1553.
- [58] CHEN L, FANG W, LIU J, et al. Poricoic acid A (PAA) inhibits T-cell acute lymphoblastic leukemia through inducing autophagic cell death and ferroptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 608: 108–115.
- [59] MBAVENG A T, NOULALA C G T, SAMBA A R M, et al. The alkaloid, soyauxinium chloride, displays remarkable cytotoxic effects towards a panel of cancer cells, inducing apoptosis, ferroptosis and necroptosis [J]. Chem Biol Interact, 2021, 333: 109334.
- [60] 朱婷, 范洋. 自噬通过影响铁稳态调节急性淋巴细胞白血细胞对铁死亡激活剂的敏感性 [J]. 中国实验血液学杂志, 2021, 29(5): 1380–1386.
- ZHU T, FAN Y. Autophagy regulates the sensitivity of acute lymphoblastic leukemia cells to ferroptosis activator by influencing iron homeostasis [J]. J Exp Hematol, 2021, 29(5): 1380–1386.
- [61] 章美玲, 崔亚茹, 陈抒鹏, 等. 中医药干预白血病干细胞免疫逃逸研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 137–143.
- ZHANG M L, CUI Y R, CHEN S P, et al. Mechanism of leukemia stem cells immune escape by Traditional Chinese Medicine intervention [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 137–143.
- [62] ZENG C, NIE D, WANG X, et al. Combined targeting of GPX4 and BCR-ABL tyrosine kinase selectively compromises BCR-ABL+ leukemia stem cells [J]. Mol Cancer, 2024, 23(1): 240.
- [63] CAO K, DU Y, BAO X, et al. Glutathione-bioimprinted nanoparticles targeting of N6-methyladenosine FTO demethylase as a strategy against leukemic stem cells [J].

- Small, 2022, 18(13): e2106558.
- [64] ZHOU H, QIN D, XIE C, et al. Combinations of HDAC inhibitor and PPAR agonist induce ferroptosis of leukemic stem cell-like cells in acute myeloid leukemia [J]. Clin Cancer Res, 2024, 30(23): 5430–5444.
- [65] SALLMAN D A, DEZERN A E, GARCIA-MANERO G, et al. Eprenetapopt (APR-246) and azacitidine in TP53-mutant myelodysplastic syndromes [J]. J Clin Oncol, 2021, 39(14): 1584–1594.
- [66] SATO M, KUSUMI R, HAMASHIMA S, et al. The ferroptosis inducer erastin irreversibly inhibits system x_c^- and synergizes with cisplatin to increase cisplatin's cytotoxicity in cancer cells [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 968.
- [67] ZHU H Y, HUANG Z X, CHEN G Q, et al. Typhaneoside prevents acute myeloid leukemia (AML) through suppressing proliferation and inducing ferroptosis associated with autophagy [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 516(4): 1265–1271.
- [68] LAI X, SUN Y, ZHANG X, et al. Honokiol induces ferroptosis by upregulating HMOX1 in acute myeloid leukemia cells [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 897791.
- [69] BAI W, LIU D, CHENG Q, et al. Tetraarsenic tetrasulfide triggers ROS-induced apoptosis and ferroptosis in B-cell acute lymphoblastic leukaemia by targeting HK2 [J]. Transl Oncol, 2024, 40: 101850.
- [70] 朱大诚, 刘振帅, 吴慧婷, 等. 川楝子提取物抑制白血病细胞增殖的机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(4): 4–8, 259–261.
- ZHU D C, LIU Z S, WU H T, et al. Study on mechanism of Chuanlianzi (toosendan fructus) extract inhibiting proliferation of leukemia cells [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023, 41(4): 4–8, 259–261.
- [71] 海洋, 李建银, 王欣, 等. 雄黄微生物浸出液通过线粒体途径诱导人急性髓系白血病细胞 HL60 细胞凋亡 [J]. 药物生物技术, 2018, 25(4): 283–287.
- HAI Y, LI J Y, WANG X, et al. Apoptosis mechanism of realgar bioleaching solution on HL-60 cell line via mitochondrial membrane potential [J]. Pharm Biotechnol, 2018, 25(4): 283–287.
- [72] 安丽娟, 郝征. 铁死亡在白血病耐药中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 157–167.
- AN L J, HAO Z. Research progress on roles of ferroptosis in chemotherapy resistance in leukemia [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 157–167.
- [73] ISHIKAWA C, SENBA M, MORI N. Evaluation of artesunate for the treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 872: 172953.

[收稿日期]2024-08-27

杨世英,戎玉莹,董玥宏,等. TRIM13 在内质网质量控制中的作用及其与疾病的关系 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35 (4): 159–168.

Yang SY, Rong YY, Dong YH, et al. Role of TRIM13 in endoplasmic reticulum quality control and its association with diseases [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 159–168.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.016

TRIM13 在内质网质量控制中的作用及其与疾病的关系

杨世英^{1,2}, 戎玉莹^{1,2}, 董玥宏^{1,2}, 蒋丽娜^{1,2*}

(1.河北北方学院医学检验学院免疫教研室,河北 张家口 075000;2.河北北方学院微循环研究所,河北 张家口 075000)

【摘要】 内质网质量控制系统是维持细胞稳态的核心机制之一,主要通过内质网相关降解和内质网自噬两条途径介导内质网中错误折叠蛋白质的降解。三方基序蛋白 13 (tripartite motif 13, TRIM13) 是一种定位于内质网膜上的蛋白,其 E3 泛素连接酶活性使其在内质网相关降解过程中发挥重要作用。此外,TRIM13 也作为一种非经典内质网自噬受体介导内质网自噬的发生。近年来,TRIM13 在内质网质量控制领域受到了广泛的关注,本文将对 TRIM13 的结构和功能以及 TRIM13 在内质网质量控制中的作用机制进行综述,并总结其在疾病中的异常表达和调控作用,以期对相关疾病的治疗提供新策略。

【关键词】 TRIM13;内质网质量控制;内质网相关降解;内质网自噬

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0159-10

Role of TRIM13 in endoplasmic reticulum quality control and its association with diseases

YANG Shiying^{1,2}, RONG Yuying^{1,2}, DONG Yuehong^{1,2}, JIANG Lina^{1,2*}

(1. Department of Immunology, College of Lab Medicine, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China.

2. Institute of Microcirculation, Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

【Abstract】 The endoplasmic reticulum quality control (ERQC) system is a core mechanism for maintaining cellular homeostasis, which primarily mediates the degradation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER) through the ER-associated degradation (ERAD) and ER autophagy (ER-phagy) pathways. Tripartite motif 13 (TRIM13) is a protein located on the ER membrane, which plays a critical role in ERAD via its E3 ubiquitin ligase activity. TRIM13 also acts as a non-classical ER-phagy receptor to mediate the occurrence of ER-phagy. TRIM13 has recently received extensive attention in the field of ERQC. Here we review the structure and function of TRIM13 and the mechanisms by which it contributes to ERQC, and summarize its abnormal expression and regulatory role in diseases, with the aim of providing new strategies for the treatment of related diseases.

【Keywords】 tripartite motif 13; endoplasmic reticulum quality control; endoplasmic reticulum-associated degradation; endoplasmic reticulum autophagy

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

[作者简介] 杨世英(1999—),女,在读硕士研究生,研究方向:急危重症免疫学。E-mail:2558156400@qq.com

[通信作者] 蒋丽娜(1979—),女,博士,教授,硕士生导师,研究方向:急危重症免疫学。E-mail:jlh1020@163.com

内质网(endoplasmic reticulum, ER)是细胞内最大的膜系统之一,它是蛋白质合成和折叠的重要场所。ER在诸多因素的影响下,如环境压力、遗传突变和老化等,其内蛋白质折叠会失调,导致内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS),从而引发一系列细胞功能障碍和疾病。为了恢复和维持ER的正常功能,细胞会通过内质网相关降解(endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD)和内质网自噬等内质网质量控制(endoplasmic reticulum quality control, ERQC)机制来监测和清除异常的蛋白质,从而维持细胞的稳态。三方基序蛋白13(tripartite motif 13, TRIM13)是TRIM蛋白家族中的一员,具有E3泛素连接酶的活性,并且与多种疾病的发生发展密切相关。作为一种锚定于内质网膜上的蛋白,TRIM13与ER活动密切相关,其在ERQC过程中发挥着重要作用,深入探讨其参与ERAD和内质网自噬的分子机制将为ERQC的调控提供新的分子靶点,诸多关于TRIM13在疾病中的研究更为开发针对相关疾病的靶向治疗策略提供了新思路。本文综述TRIM13的结构和功能,并总结其在ERQC和相关疾病中的研究进展,以期增进对TRIM13及其在疾病治疗中应用前景的理解。

1 TRIM13 概述

1.1 TRIM13 的定位及命名

人类TRIM13编码基因位于13号常染色体长臂1区4带(13q14)^[1],此区域在B细胞慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukaemia, CLL)中经常缺失。该基因最初是在寻找CLL中常见缺失的13q14位点上的基因时进行克隆的,并将其命名为LEU5^[2]。由于TRIM13在CLL中经常缺失,因此,TRIM13最初也被称为在白血病中缺失的“ret指蛋白2”(ret finger protein 2, RFP2)^[3]。虽然并非每个CLL患者都伴有TRIM13的缺失,但与初始诊断相比,TRIM13在CLL肿瘤进展中表达降低^[4]。故TRIM13被认为是CLL中的肿瘤抑制因子。

在人体组织中,TRIM13有至少3种大小分别为1.6、2.4和7.5 kb的mRNA亚型,这些mRNA具有显著的组织特异性差异。最小的mRNA亚

型在睾丸中表达水平最高,而2.4 kb的转录本在骨骼肌中最丰富,7.5 kb的转录本在除骨骼肌、前列腺、脾、胸腺和小肠外的大多数人体组织中弱存在或不存在^[4]。

1.2 TRIM13 的分子结构与功能

TRIM13属于TRIM蛋白家族中的一员,该家族包含80多个成员^[5],大部分TRIM蛋白由3个高保守性结构域组成,这3个保守结构域从N端到C端依次是RING结构域(RING domain)、B-box结构域(B-box domain)和螺旋-螺旋结构域(coiled-coil domain),因此,TRIM蛋白家族也被称为RBCC家族。这3个结构域分别具有不同的功能,其中RING结构域含有催化位点^[6],在细胞内发挥E3泛素连接酶的作用^[7],但仍有有限数量的TRIM蛋白缺乏RING结构域;B-box结构域作为蛋白-蛋白相互作用域,可以与螺旋-螺旋结构域一起介导TRIM蛋白的同源或异源寡聚化;螺旋-螺旋结构域还可形成高阶分子结构,在自噬的调节中发挥重要作用^[8]。TRIM13除了包含一个RING结构域、一个B-box结构域和一个螺旋-螺旋结构域以外,还具有一个独特的跨膜结构域(transmembrane domain, TM),该结构域在所有TRIM蛋白家族成员中只存在于TRIM13和TRIM59中^[9],TM的存在也使TRIM13得以锚定在内质网膜上^[10](图1)。

尽管TRIM蛋白具有相同的结构域,但它们具有不同的功能。有研究显示,大多数TRIM蛋白含有多个可剪接的mRNA,并且非普遍表达,这表明它们参与细胞的特异性功能^[6]。越来越多的证据表明,TRIM蛋白家族具有独特而重要的作用。在自噬方面,肌肉特异性泛素连接酶TRIM55能够与泛素结合接头蛋白螯合体1(sequestosome 1, SQSTM1/p62)相互作用,在横纹肌中调节肌节的组装和蛋白质降解;TRIM63也可以与p62相互作用,调节烟碱乙酰胆碱受体的周转^[11]。不仅如此,由于TRIM蛋白具有E3泛素连接酶的活性,而底物的泛素化可以为不同的蛋白质降解途径提供降解信号,因此,TRIM蛋白还与蛋白质降解过程密切相关,如TRIM11可以通过调节泛素蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)介导细胞核和细胞质中错误折叠的蛋白和蛋白聚集体的降解^[12];值得注意的是,

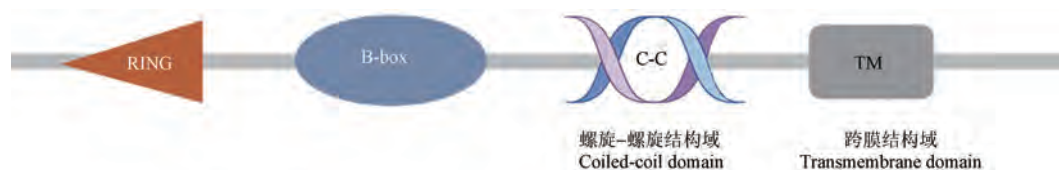


图 1 TRIM13 结构图

Figure 1 Structure diagram of TRIM13

TRIM13 因其独特的亚细胞定位及功能多样性, 可以通过 ERAD 和内质网自噬途径降解 ER 中的错误折叠蛋白^[9], 在 ERQC 领域受到了广泛的关注。

2 ERQC

ER 是一个由相互连接的平板和弯曲小管组成的具有独特结构域和功能的细胞器, 在细胞中积极监测着大多数分泌蛋白和膜蛋白的生物合成、组装和运输^[13], 并参与脂质和类固醇合成、调节钙离子稳态等功能^[14], 在细胞中起着独一无二的作用。

ER 稳态的维持对于保持细胞健康和体内平衡至关重要。然而, 当细胞处于某种生理状态或暴露于应激条件下, 尤其是在氧化应激、能量缺乏、炎症、缺氧等应激状况下时, 蛋白质的加工过程会出现异常, 细胞的内环境会发生紊乱, ER 对蛋白质的折叠效率会降低, 从而导致蛋白质的未折叠或错误折叠^[15], 如果这些未折叠或错误折叠的蛋白质未被及时清除, 就会在 ER 积累, 从而引发 ERS。ERS 不仅与多种疾病(包括癌症、代谢紊乱和蛋白质病变)的发病机制有关, 还与负责蛋白质合成(如抗体产生)的细胞死亡有关^[16]。因此, 维持细胞的 ER 稳态是细胞执行其基本功能的必要条件。为了实现这一目标, 细胞采用了一个相当复杂的质量控制系统—ERQC 系统以隔离、再折叠和降解累积的错误折叠蛋白质从而恢复和维持 ER 的功能及稳态^[17]。

ERQC 即 ER 中的蛋白质质量控制, 该途径由伴侣、折叠酶和降解因子组成, 以确保 ER 蛋白折叠和运输到下游分泌环境的保真度。在 ERQC 过程中, 无法通过与 ER 伴侣和折叠酶相互作用达到正确折叠构象的蛋白质将通过 ERAD 或内质网自噬途径分别被蛋白酶体或溶酶体降解^[18]。ERQC 通过在 ER 蛋白折叠、转运和降解途径之

间分配新生蛋白, 优先促进折叠及构象正确的蛋白分泌, 同时积极阻止非天然蛋白的转运, 从而保护下游分泌环境的完整性^[19]。

ERQC 通过监测蛋白质组的状态, 确保错误折叠的蛋白质被有效地标记和降解^[20]。这种对蛋白质组折叠状态的严密监视是至关重要的, 因为错误折叠的蛋白质会暴露出具有高聚集倾向的区域, 这不仅会使受影响的蛋白质失活, 还会通过与其他细胞因子的共聚集导致关键细胞功能的破坏^[21]。因此, ERQC 是真核细胞消除错误折叠蛋白和维持细胞稳态的关键, 其缺陷往往会导致疾病的发生。研究发现, 错误折叠的蛋白质往往会聚集形成具有抗性的富含 β 片段的寡聚体, 这些寡聚体是许多神经退行性疾病的标志, 如阿尔茨海默病、帕金森病等^[22]; 除此之外, α -1 抗胰蛋白酶错误折叠并保留在 ER 形成聚合物, 可导致肝纤维化并最终导致肝细胞癌; 当胰岛素原分泌增加超过 ER 的折叠能力时, 便会聚积在 ER 并导致 ERS 和胰岛 β 细胞衰竭, 从而导致 II 型糖尿病的发展^[23], 这些均由 ERQC 能力的破坏所导致。因此, ER 作为蛋白质生物发生的枢纽, 其质量控制对于维持细胞稳态至关重要。

2.1 ERAD

ERAD 作为一个起主导作用的 ERQC 途径, 是一种多步骤质量控制机制, 需要一系列复杂组分的协同作用清除错误折叠蛋白^[24]。该过程从内质网膜上的泛素连接酶复合物识别底物开始, 在识别时, 管腔和膜中的底物会逆转到内质网膜的细胞质侧。泛素连接酶复合物组分的膜结构域促进了这一步骤。一旦暴露于内质网膜的胞质表面, 底物就会泛素化。细胞分裂周期 48 (cell division cycle 48, Cdc48) 蛋白是酵母中的一类三磷酸腺苷酶 (adenosine triphosphatase, ATPase), p97, 又名含缬酪肽蛋白 (valosin-containing protein, VCP), 是其在高等生物中的同

源蛋白,它们可以与泛素化的底物结合,利用 ATP 水解的能量将细胞内被多聚泛素化的底物蛋白去折叠,从而将底物蛋白从内质网膜中抽取出来,随后胞质中的蛋白酶体识别底物蛋白并对其进行降解^[25-26](图 2)。

研究发现,ERAD 能够通过控制脂质生物合成酶的周转,调节 ER 脂质组成。此外,ERAD 还控制 1,4,5-三磷酸肌醇受体(inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor, IP3R)等活性钙通道的丰度,影响细胞离子稳态^[27]。细胞器接触,特别是 ER 和线粒体之间的接触位点,最近被证明是由 ERAD 控制的^[28]。在免疫系统中,ERAD 对发育中的 B 淋巴细胞的正常成熟和功能至关重要^[29]。对小鼠的研究发现,ERAD 任何关键成分的缺失都会导致小鼠胚胎死亡,这些研究强调了 ERAD 在发育中的生理意义^[30]。因此,ERAD 具有广泛的底物,并对细胞生理产生深远的影响。

2.2 内质网自噬

内质网自噬是一条新发现的 ERQC 途径,它可以降解因无法折叠而对 ERAD 有抗性的错误折叠或聚集的内质网蛋白,以维持正常和应激条件下 ER 的动态平衡^[31-32]。真核生物,尤其是哺乳动物,已经进化出多种机制来调节不同的内质网自噬模式,包括内质网巨自噬、内质网微自噬以及囊泡转运内质网自噬。在内质网巨自噬中,自噬体包裹 ER 片段,并与溶酶体融合,降解含有

ER 的内部物质;在内质网微自噬中,溶酶体膜内陷并“掐断”部分 ER 进入溶酶体腔内以将其降解;囊泡转运内质网自噬即溶酶体直接与 ER 来源的囊泡进行融合并将其降解^[33]。

内质网自噬在基础、非应激条件下是活跃的;在应激条件下,如钙水平的扰动、错误折叠蛋白的积累或氧化还原电位的变化,内质网自噬会被上调,在该过程中,内质网自噬具有不同的功能,首先,其可以促进 ER 腔内蛋白质聚集体或功能失调的蛋白质的降解以缓解 ERS;其次,ERS 状态会导致内质网膜的扩张,而内质网自噬可以通过降解多余的内质网膜来调节 ER 的大小并维持其稳态^[33]。内质网自噬还能够影响 ER 中蛋白质的质量、数量和分泌,同时通过响应细胞需求调整 ER 亚结构域将 ER 塑造成功能性细胞器^[34]。作为错误折叠蛋白的替代处理途径,内质网自噬可通过降解其他 ER 处理途径无法清除的有害蛋白来维持细胞的稳态^[33]。

内质网自噬作为一种选择性自噬,需要内质网自噬受体的介导,经典的内质网自噬受体包括序列相似性家族 134B (family with sequence similarity 134 member B, FAM134B)、网状蛋白 3 L (reticulon 3 L, RTN3L)、ATL3 (atlastins 3)、分泌转运蛋白 62 (secretory translocation protein 62, SEC62)、细胞周期进程基因 1 (cell-cycle progression gene 1, CCPG1) 和睾丸表达基因 264

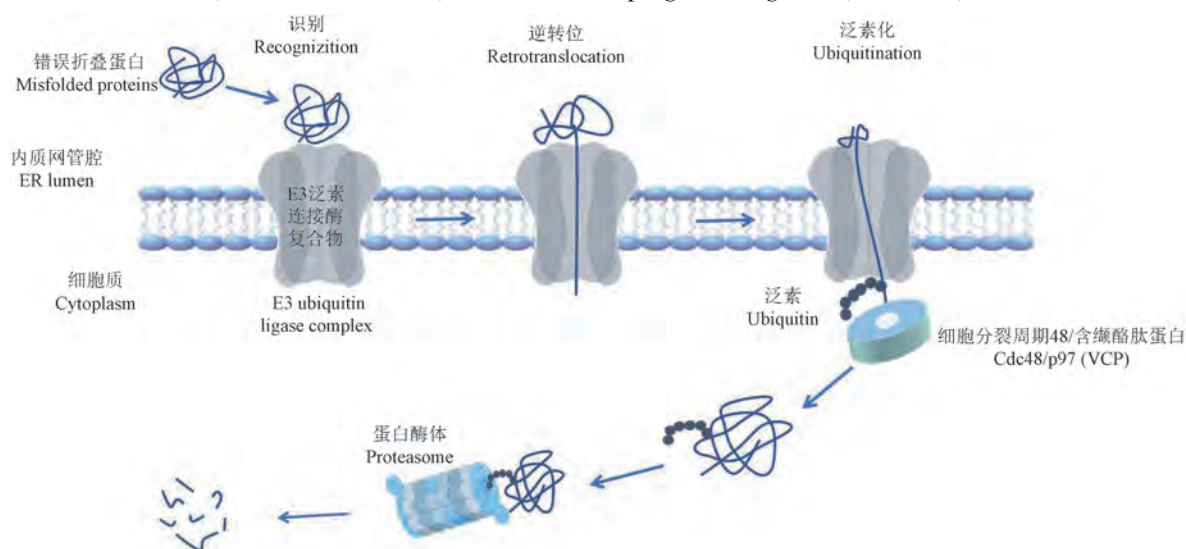


图 2 ERAD 的分子机制

Figure 2 Molecular mechanism of ERAD

(testis expressed gene 264, TEX264)^[35], 它们与体内平衡联系密切, 并且在人类疾病中发挥关键作用。例如, FAM134B 作为肿瘤抑制因子, 在体内和体外都能抑制肿瘤的生长和增殖, 其突变或表达改变在结直肠癌患者中很常见^[36]; 在抗感染方面, 有研究发现 RTN3L 通过结合病毒编码的非结构蛋白 4B (non-structural 4B, NS4B) 来破坏丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 的复制, RTN3L 的耗尽会促进 HCV 的传播^[37]; 最新的研究发现, 通过过表达 ATL 来适度上调苍蝇脑中内质网自噬后, 其与年龄相关的神经退化可显著减弱, 并且在表达人类淀粉样蛋白前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 的阿尔茨海默病果蝇模型中可观察到内质网自噬受损, 而增强内质网自噬可促进 APP 降解, 从而缓解症状^[38]。因此, 内质网自噬与人类健康和疾病密切相关。此外, 某些已知的内质网自噬底物蛋白突变, 如秋田胰岛素原蛋白和血管抑制蛋白, 可导致常染色体显性糖尿病^[39]。不仅如此, 内质网自噬还可以维持成熟 T 细胞的稳态, 以往研究证明, 内质网自噬可以通过保护 ER 功能来维持钙平衡, 从而改善 T 细胞的功能^[40]。

目前关于 ERAD 和内质网自噬的分子机制的研究受到了越来越多的关注, 具有 E3 泛素连接酶活性的非经典内质网自噬受体 TRIM13 在 ERQC 途径中的作用已成为研究的热点。

3 TRIM13 与 ERQC

近年来, 随着对 TRIM13 研究的深入, 发现在 ERS 后 TRIM13 的表达会上调^[41], 且 TRIM13 会增强 ERS 诱导的自噬^[42], 表明 TRIM13 与 ER 功能及稳态之间存在紧密联系。而且 TRIM13 定位于内质网膜的结构特点也决定了其可参与多种 ER 生理活动, 并与 ERQC 密切相关。

3.1 TRIM13 与 ERAD

在哺乳动物细胞中, 至少有 10 种内质网膜结合的泛素连接酶与 ERAD 相关, 其中参与形成泛素连接酶复合物的 E3 泛素连接酶包括羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶降解蛋白 1 (hydroxymethylglutaryl-CoA reductase degradation protein 1, Hrd1)、人膜相关蛋白 TEB4 (membrane-associated RING-CH IV, MARCH-

IV)、糖蛋白 78 (glycoprotein 78, gp78)、热休克蛋白 70 羧基端作用蛋白 (carboxy terminus of Hsc70 interacting protein, CHIP) 等^[21]。研究发现, TRIM13 是一种参与 ERAD 的新型 E3 泛素连接酶, 可以依赖其 RING 结构域识别 ERAD 的底物 CD38 并通过蛋白酶体将其降解^[43]。除此之外, TRIM13 还可以与 VCP 等多种 ERAD 蛋白免疫共沉淀, 在 ERAD 期间, 需要 VCP 与泛素融合降解蛋白 1 (ubiquitin fusion degradation protein 1, UFD1) 和核定位蛋白 4 (nuclear protein localization4, Npl4) 复合物一起将泛素化蛋白从 ER 中抽取到细胞质中进行蛋白水解^[43]。

TRIM13 还参与质膜钙通道 (Cav1.2 通道) 的泛素化。在没有辅助亚基 Cav β 存在的情况下, Cav1.2 通道被 TRIM13 泛素化后会与 ERAD 复合物蛋白 derlin-1 和 p97 相互作用, 最终将通道靶向蛋白酶体进行降解。ALTIER 等^[44]通过敲除典型 ER 定位泛素连接酶的一个子集, 并检测 Cav1.2 通道的泛素化发现敲低 TRIM13 会导致 Cav1.2 通道泛素化显著降低, 而敲低 Hrd1 或 gp78 连接酶并没有显著降低通道的泛素化; 并且在 Cath. a 分化细胞 (源自中枢神经系统的儿茶酚胺能细胞) 和大鼠脑匀浆中都发现 TRIM13 可以与内源性 Cav1.2 通道免疫共沉淀。因此, TRIM13 是调节 Cav1.2 通道泛素化和表达的关键因素。

3.2 TRIM13 与内质网自噬

TRIM13 是一种非经典的内质网自噬受体。研究发现, 经典的内质网自噬受体中, SEC62、CCPG1、ATL3 和 TEX264 含有 TM、FAM134B 和 RTN3L 含有内质网蛋白同源结构域 (reticulon-homology domain, RHD), RHD 存在于内质网膜的外小叶中以感知和诱导膜曲率^[45]。这些受体都包含微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 或 γ -氨基丁酸受体相关蛋白 (gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein, GABARAP) 相互作用结构域 (LC3 (GABARAP)-interacting region, LIR (GIR))^[46], 它们能与 LC3 结合介导自噬体的形成以促进内质网自噬。然而, TRIM13 并不含有 LIR 或 GIR, 因此不能直接与 LC3 结合诱导自噬体包裹 ER。但是 TRIM13 作为一种 E3 泛素连接酶, 具有能够泛素化自身和其他底物的特点。泛

素与底物的连接位点包括 7 个赖氨酸位点(K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63)、1 个甲硫氨酸位点(M1)和 1 个甘氨酸位点(G76)。研究发现,当 TRIM13 通过 K63 位点泛素化时将由自噬降解,而通过 K48 位点泛素化时将由蛋白酶体降解^[41]。

研究表明,TRIM13 能够通过 p62 结合介导内质网自噬^[42]。p62 C 端具有泛素结合(ubiquitin-associated, UBA)结构域,其 UBA 结构域既可以结合 K48 连接的泛素链,也可以结合 K63 连接的泛素链,但对 K63 连接的泛素链具有更高的亲和力^[47]。此外,p62 还具有能与 LC3 结合的 LIR。因此,TRIM13 泛素化之后,与 p62 的 UBA 结构域结合,同时,p62 的 LIR 结合隔离膜上的 LC3,隔离膜不断延伸包裹 ER 形成自噬体,然后自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体以完成对底物的降解(图 3)。

除了作为内质网自噬受体介导内质网自噬外,TRIM13 还参与自噬体的形成。自噬体的生物发生是自噬的标志,可由营养饥饿(包括氮、碳、葡萄糖、氨基酸或磷酸盐剥夺)、有害应激源(包括高温、缺氧、氧化还原失衡或高盐)、功能失调的蛋白质和蛋白质复合物、多余或受损的细胞器以及入侵的病原体等自噬诱导信号引发,也可

由自噬受体与目标物质结合所引发^[48]。随后细胞质自噬相关蛋白(autophagy-related proteins, ATG)被招募到自噬体生物发生的位点以产生“自噬体前体”,在酵母中被称为“自噬前体结构”(pre-autophagosomal structure, PAS)。在酵母中,自噬体形成位点定位于液泡与 ER 密切接触的区域(液泡-ER 接触位点);在哺乳动物中,自噬体的形成始于 ER 亚结构域,主要是与线粒体相关的区域(ER-线粒体接触位点)^[49]。自噬体是由一个被称为吞噬体或隔离膜的小池在这些特定位置成核、膨胀和封闭形成的。在哺乳动物中,自噬诱导信号触发 ER 中依赖磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)复合物 I 的磷脂酰肌醇 3-磷酸(phosphatidylinositol 3-phosphate, PtdIns3P)富集结构域的形成,该结构域可以使双 FYVE 结构域蛋白 1(double FYVE-containing protein 1, DFCP1)形成环状结构,称为 Ω 体,随后隔离膜在 Ω 体上扩张并闭合成自噬体^[50]。研究发现,TRIM13 能够与 Beclin1(酵母 ATG6 的哺乳动物同源物)以及液泡蛋白分选 34(vacuolar protein sorting, VPS34)相互作用,Beclin1 和 VPS34 是哺乳动物 PI3K 复合物 I 的成员,可以在自噬体形成过程中感知和诱导源自

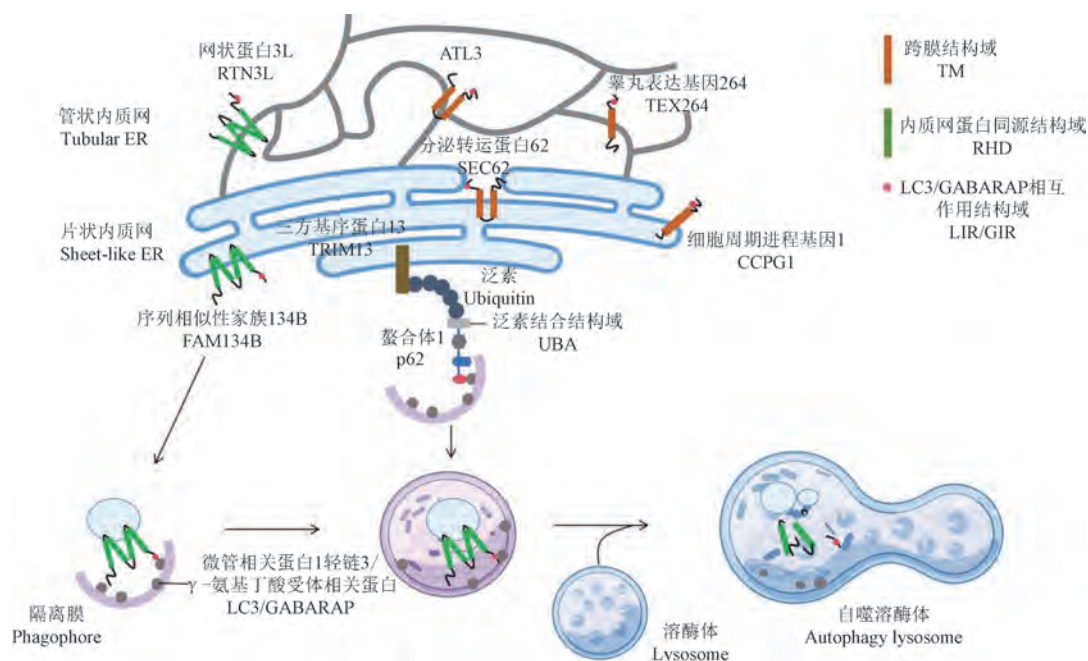


图 3 内质网自噬的分子机制

Figure 3 Molecular mechanism of ER-phagy

Ω 体的隔离膜的膜曲率和扩张^[41]。此外, TRIM13 还被发现能在 ERS 条件下与 DFCP1 共定位, DFCP1 是已知唯一定位于 Ω 体的蛋白质, 其对于自噬体的生物发生是必不可少的^[42]。

综上所述, TRIM13 不仅通过其独特的底物选择性和分子机制参与 ERAD 过程, 还作为非经典内质网自噬受体参与内质网自噬过程, 并在自噬体的形成中发挥作用。因此, TRIM13 在 ERQC 过程中具有重要作用, 其异常表达会对细胞稳态产生影响, 进而与多种疾病的发生发展相关联。

4 TRIM13 在相关疾病中的作用

TRIM13 最早作为一种肿瘤抑制因子在 CLL 中被发现, 因此, 大量研究集中于阐明其肿瘤抑制作用。近年来, 关于 TRIM13 在疾病中的研究逐渐增多, 其在炎症方面的作用也愈加受到关注。了解 TRIM13 在不同疾病中的作用, 不仅有助于加深对其分子机制的理解, 还为相关疾病的诊断、治疗提供新的思路。

4.1 TRIM13 与肿瘤

TRIM13 被发现在 CLL、多发性骨髓瘤、神经细胞淋巴瘤和弥漫性大细胞淋巴瘤等多种血液恶性肿瘤中表达消失, 在头颈部肿瘤、口腔肿瘤等实体肿瘤中也有缺失的报道^[43], 因此该基因已被归于肿瘤抑制基因。有研究显示, TRIM13 在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 中表达降低, 而在 NSCLC 细胞系中增强 TRIM13 的表达则会诱导细胞凋亡并阻碍肿瘤生长^[51]。进一步研究发现, TRIM13 可以通过调节 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Kelch like ECH associated protein 1, Keap1)-核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2) 信号通路介导 p62 泛素化来诱导肺腺癌细胞中的自噬^[52]。在肾癌组织中, TRIM13 的表达显著降低, 过表达 TRIM13 可降低癌细胞的侵袭和迁移能力^[53]。在乳腺癌中, TRIM13 的高表达预示着更良好的预后^[54], 体现了 TRIM13 的肿瘤抑制作用。

4.2 TRIM13 与炎症

文献显示, TRIM13 可以通过靶向肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6) 调控核因子

κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 活性从而刺激巨噬细胞趋化因子和细胞因子的产生^[55]。研究发现, TRIM13 可以与视黄酸诱导基因 I (retinoic acid-inducible gene, RIG-I) 和黑色素瘤分化相关基因 5 (melanoma differentiation-associated gene 5, MDA5) 相互作用, 并负向调节 MDA5 介导的 I 型干扰素 (interferon, IFN) 的产生, 对于宿主防御病毒感染至关重要^[56]。除此之外, TRIM13 可调节干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3)、IRF7 等干扰素相关基因及白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1)、IL-1 β 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的表达, 在炎症调节中发挥重要作用^[57], 且 TRIM13 缺失诱发的炎症反应与年龄相关^[58]。在巨噬细胞中, TRIM13 可通过降低炎性细胞因子的表达抑制致病 DNA 和环鸟苷酸-腺苷酸 (cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate, cGAMP) 引发的炎症反应^[58]。

4.3 TRIM13 与其他疾病

最新的研究发现, 高脂饮食喂养条件下的小鼠主动脉和巨噬细胞中 TRIM13 表达上调并介导肝 X 受体 α/β (liver X receptor α/β , LXR α/β) 和信号传导抑制因子 1/3 (suppressor of cytokine signaling, SOCS1/3) 的泛素化和降解, 使得胆固醇外排减少和氧化低密度脂蛋白摄取增加, 从而导致泡沫细胞的形成和动脉粥样硬化的发生^[59]。研究发现, TRIM13 参与细胞活性的调节, 其过表达可增加肿瘤蛋白 p53 的稳定性并降低蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/AKT) 的活性导致细胞凋亡^[60]。此外, TRIM13 还可通过调节神经炎症反应参与高脂饮食诱导的中枢神经系统损伤和胰岛素抵抗, 有助于调节外周代谢紊乱^[61]。研究发现, TRIM13 表达下调参与慢性阻塞性肺疾病的发病机制, 过表达 TRIM13 可降低内质网应激和内质网自噬从而抑制肺泡上皮细胞凋亡, 缓解肺部组织损伤^[62]。TRIM13 在糖尿病小鼠肾组织和高葡萄糖/转化生长因子 β -1 (transforming growth factor β -1) 刺激的肾系膜细胞中下调, 而 C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) 的表达上调, 过表达 TRIM13 可减轻糖尿病肾病诱导的胶原蛋白合成, 并通过下调 CHOP 恢复肾功能, 所以, TRIM13 可作为糖尿病肾病的

潜在治疗靶点^[63]。

因此,TRIM13 参与了多种疾病发生发展的病理生理过程,通过多种调控机制在体内发挥着重要作用。

5 总结与展望

ER 作为蛋白质折叠和组装的场所可根据代谢、发育或蛋白质毒性的提示动态改变其质量、成分和形状,以维持或调节其功能,其调控机制非常复杂。ERQC 是其调控机制之一,通过确保蛋白质的正确构象和功能,从而保证细胞的正常生理活动。定位在内质网膜上的非经典内质网自噬受体 TRIM13 作为一种 E3 泛素连接酶,通过多种机制参与 ERQC 中 ERAD 和内质网自噬过程,在维持细胞内 ER 的稳态中发挥着关键作用。目前,关于 TRIM13 在内质网功能中的重要作用受到了越来越多学者的关注,尽管对其在 ERQC 中作用的理解逐步加深,但 TRIM13 在 ERAD 途径中的具体机制及其在不同信号通路中的作用尚不明确。其次,何种情况会触发 TRIM13 介导的内质网自噬以及 TRIM13 介导的内质网自噬在相关疾病中的重要作用也有待进一步阐明。后续研究应关注 TRIM13 与其他 ERQC 相关蛋白的相互作用,深入理解其在 ERQC 中的作用并寻找能够特异性调控 TRIM13 的靶点,为相关疾病的治疗提供新思路;深入研究 TRIM13 的生物学功能和分子机制,为细胞稳态的调控以及相关疾病的治疗和预防提供理论支撑。

参考文献:

- [1] 童森,董宁,祝筱梅,等. 内质网自噬及其相关疾病研究进展 [J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(9): 1062-1072.
TONG S, DONG N, ZHU X M, et al. Research advances in endoplasmic reticulum autophagy and its roles in associated diseases [J]. Med J Chin People's Liberation Army, 2024, 49(9): 1062-1072.
- [2] KAPANADZE B, KASHUBA V, BARANOVA A, et al. A cosmid and cDNA fine physical map of a human chromosome 13q14 region frequently lost in B-cell chronic lymphocytic leukemia and identification of a new putative tumor suppressor gene, Leu5 [J]. FEBS Lett, 1998, 426(2): 266-270.
- [3] DEAN S T, ISHIKAWA C, ZHU X, et al. Repression of TRIM13 by chromatin assembly factor CHAF1B is critical for AML development [J]. Blood Adv, 2023, 7(17): 4822-4837.
- [4] SKOBLOV M, SHAKHBAZOV K, OSHCHEPKOV D, et al. Human RFP2 gene promoter: unique structure and unusual strength [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(3): 859-866.
- [5] HATAKEYAMA S. TRIM family proteins: roles in autophagy, immunity, and carcinogenesis [J]. Trends Biochem Sci, 2017, 42(4): 297-311.
- [6] DI RIENZO M, ROMAGNOLI A, ANTONIOLI M, et al. TRIM proteins in autophagy: selective sensors in cell damage and innate immune responses [J]. Cell Death Differ, 2020, 27(3): 887-902.
- [7] 杨东亮,毕冬琳,杨晓莉,等. TRIM 家族蛋白在病毒感染中作用的研究进展 [J]. 微生物学报, 2023, 63(4): 1356-1364.
YANG D L, BI D L, YANG X L, et al. Role of TRIM family proteins in viral infection [J]. Acta Microbiol Sin, 2023, 63(4): 1356-1364.
- [8] LI X, YEUNG D F, FIEGEN A M, et al. Determinants of the higher order association of the restriction factor TRIM5alpha and other tripartite motif (TRIM) proteins [J]. J Biol Chem, 2011, 286(32): 27959-27970.
- [9] ZHANG L, AFOLABI L O, WAN X, et al. Emerging roles of tripartite motif-containing family proteins (TRIMs) in eliminating misfolded proteins [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 802.
- [10] TOMAR D, SINGH R. TRIM13 regulates ubiquitination and turnover of NEMO to suppress TNF induced NF-κB activation [J]. Cell Signal, 2014, 26(12): 2606-2613.
- [11] KHAN M M, STRACK S, WILD F, et al. Role of autophagy, SQSTM1, SH3GLB1, and TRIM63 in the turnover of nicotinic acetylcholine receptors [J]. Autophagy, 2014, 10(1): 123-136.
- [12] SINGH S J, TANDON A, PHOOLMALA, et al. Bisphenol-A (BPA) impairs hippocampal neurogenesis via inhibiting regulation of the ubiquitin proteasomal system [J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(6): 3277-3298.
- [13] HWANG J, QI L. Quality control in the endoplasmic reticulum: crosstalk between ERAD and UPR pathways [J]. Trends Biochem Sci, 2018, 43(8): 593-605.
- [14] MERIGHI A, LOSSI L. Endoplasmic reticulum stress signaling and neuronal cell death [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(23): 1-30.
- [15] 丰梅,付凌玲,张伟华,等. 内质网应激调控细胞自噬和凋亡 [J]. 中国细胞生物学学报, 2018, 40(3): 455-462.
FENG M, FU L L, ZHANG W H, et al. Endoplasmic reticulum stress regulates cell autophagy and apoptosis [J].

- Chin J Cell Biol, 2018, 40(3): 455–462.
- [16] JI C H, KIM H Y, HEO A J, et al. Regulation of reticulophagy by the N-degron pathway [J]. Autophagy, 2020, 16(2): 373–375.
- [17] SONTAG E M, SAMANT R S, FRYDMAN J. Mechanisms and functions of spatial protein quality control [J]. Annu Rev Biochem, 2017, 86: 97–122.
- [18] GYURKOVSKA V, ALVARADO CARTAGENA Y M, MURTAZINA R, et al. Selective clearance of aberrant membrane proteins by TORC1-mediated micro-ER-phagy [J]. Cell Rep, 2025, 44(2): 1–44.
- [19] LUKE WISEMAN R, MESGARZADEH J S, HENDERSHOT L M. Reshaping endoplasmic reticulum quality control through the unfolded protein response [J]. Mol Cell, 2022, 82(8): 1477–1491.
- [20] CELIK C, LEE S Y T, YAP W S, et al. Endoplasmic reticulum stress and lipids in health and diseases [J]. Prog Lipid Res, 2023, 89: 101198.
- [21] LOPATA A, KNISS A, LÖHR F, et al. Ubiquitination in the ERAD process [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15): 5369.
- [22] KABIR M T, UDDIN M S, ABDEEN A, et al. Evidence linking protein misfolding to quality control in progressive neurodegenerative diseases [J]. Curr Top Med Chem, 2020, 20(23): 2025–2043.
- [23] POOTHONG J, JANG I, KAUFMAN R J. Defects in protein folding and/or quality control cause protein aggregation in the endoplasmic reticulum [J]. Prog Mol Subcell Biol, 2021, 59: 115–143.
- [24] SANDES J M, DE FIGUEIREDO R. The endoplasmic reticulum of trypanosomatids: An unrevealed road for chemotherapy [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 1057774.
- [25] KRSHNAN L, VAN DE WEIJER M L, CARVALHO P. Endoplasmic reticulum-associated protein degradation [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2022, 14(12): a041247.
- [26] KAMADA Y, OHNISHI Y, NAKASHIMA C, et al. HERC3 facilitates ERAD of select membrane proteins by recognizing membrane-spanning domains [J]. J Cell Biol, 2024, 223(7): e202308003.
- [27] GAO X, WOJCIKIEWICZ R J H. The emerging link between IP₃ receptor turnover and Hereditary Spastic Paraplegia [J]. Cell Calcium, 2020, 86: 102142.
- [28] ZHOU Z, TORRES M, SHA H, et al. Endoplasmic reticulum-associated degradation regulates mitochondrial dynamics in brown adipocytes [J]. Science, 2020, 368(6486): 54–60.
- [29] YANG Y, KONG S, ZHANG Y, et al. The endoplasmic reticulum-resident E3 ubiquitin ligase Hrd1 controls a critical checkpoint in B cell development in mice [J]. J Biol Chem, 2018, 293(33): 12934–12944.
- [30] BHATTACHARYA A, QI L. ER-associated degradation in health and disease—from substrate to organism [J]. J Cell Sci, 2019, 132(23): jcs232850.
- [31] GUBAS A, DIKIC I. ER remodeling *via* ER-phagy [J]. Mol Cell, 2022, 82(8): 1492–1500.
- [32] CHINO H, MIZUSHIMA N. ER-Phagy: Quality and quantity control of the endoplasmic reticulum by autophagy [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2023, 15(1): a041256.
- [33] FERRO-NOVICK S, REGGIORI F, BRODSKY J L. ER-phagy, ER homeostasis, and ER quality control: implications for disease [J]. Trends Biochem Sci, 2021, 46(8): 630–639.
- [34] HILL M A, SYKES A M, MELLICK G D. ER-phagy in neurodegeneration [J]. J Neurosci Res, 2023, 101(10): 1611–1623.
- [35] 周佳丽, 姜虎, 蒋丽娜. 内质网应激诱导内质网自噬的分子机制 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2024, 40(6): 788–796.
- ZHOU J L, JIANG H, JIANG L N. Molecular mechanisms of endoplasmic reticulum stress-induced ER-phagy [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2024, 40(6): 788–796.
- [36] REGGIORI F, MOLINARI M. ER-phagy: mechanisms, regulation, and diseases connected to the lysosomal clearance of the endoplasmic reticulum [J]. Physiol Rev, 2022, 102(3): 1393–1448.
- [37] WU M J, KE P Y, HSU J T, et al. Reticulon 3 interacts with NS4B of the hepatitis C virus and negatively regulates viral replication by disrupting NS4B self-interaction [J]. Cell Microbiol, 2014, 16(11): 1603–1618.
- [38] MOU W, TANG Y, HUANG Y, et al. Upregulation of neuronal ER-phagy improves organismal fitness and alleviates APP toxicity [J]. Cell Rep, 2024, 43(5): 114255.
- [39] CUNNINGHAM C N, WILLIAMS J M, KNUPP J, et al. Cells deploy a two-pronged strategy to rectify misfolded proinsulin aggregates [J]. Mol Cell, 2019, 75(3): 442–456.
- [40] 刘世平, 方小雨, 朱睿瑶, 等. 内质网自噬在急性呼吸窘迫综合征中的研究进展 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2023, 44(11): 1352–1360.
- LIU S P, FANG X Y, ZHU R Y, et al. Research progress of endoplasmic reticulum autophagy in acute respiratory distress syndrome [J]. Med J Wuhan Univ, 2023, 44(11): 1352–1360.
- [41] JI C H, KIM H Y, HEO A J, et al. The N-degron pathway mediates ER-phagy [J]. Mol Cell, 2019, 75(5): 1058–1072.

- [42] TOMAR D, SINGH R, SINGH A K, et al. TRIM13 regulates ER stress induced autophagy and clonogenic ability of the cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(2): 316–326.
- [43] LERNER M, CORCORAN M, CEPEDA D, et al. The RBCC gene *RFP2* (Leu5) encodes a novel transmembrane E3 ubiquitin ligase involved in ERAD [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(5): 1670–1682.
- [44] ALTIER C, GARCIA-CABALLERO A, SIMMS B, et al. The Cav β subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels [J]. *Nat Neurosci*, 2010, 14(2): 173–180.
- [45] HOYER M J, CAPITANIO C, SMITH I R, et al. Combinatorial selective ER-phagy remodels the ER during neurogenesis [J]. *Nat Cell Biol*, 2024, 26(3): 378–392.
- [46] 伍美婷, 江俊麟. 内质网自噬—内质网质量控制新途径 [J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(11): 1487–1491.
- WU M T, JIANG J L. ER-phagy: a new way regulates endoplasmic reticulum quality [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2021, 37(11): 1487–1491.
- [47] KIRKIN V, MCEWAN D G, NOVAK I, et al. A role for ubiquitin in selective autophagy [J]. *Mol Cell*, 2009, 34(3): 259–269.
- [48] HU Y, REGGIORI F. Molecular regulation of autophagosome formation [J]. *Biochem Soc Trans*, 2022, 50(1): 55–69.
- [49] NAKATOGAWA H. Mechanisms governing autophagosome biogenesis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(8): 439–458.
- [50] GÓMEZ-SÁNCHEZ R, TOOZE S A, REGGIORI F. Membrane supply and remodeling during autophagosome biogenesis [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2021, 71: 112–119.
- [51] XU L, WU Q, ZHOU X, et al. TRIM13 inhibited cell proliferation and induced cell apoptosis by regulating NF- κ B pathway in non-small-cell lung carcinoma cells [J]. *Gene*, 2019, 715: 144015.
- [52] YU B, ZHOU Y, HE J. TRIM13 inhibits cell proliferation and induces autophagy in lung adenocarcinoma by regulating KEAP1/NRF2 pathway [J]. *Cell Cycle*, 2023, 22(12): 1496–1513.
- [53] LI H, QU L, ZHOU R, et al. TRIM13 inhibits cell migration and invasion in clear-cell renal cell carcinoma [J]. *Nutr Cancer*, 2020, 72(7): 1115–1124.
- [54] CHEN W X, CHENG L, XU L Y, et al. Bioinformatics analysis of prognostic value of *TRIM13* gene in breast cancer [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(3): BSR20190285.
- [55] HUANG B, BAEK S H. Trim13 potentiates toll-like receptor 2-mediated nuclear factor κ B activation *via* K29-linked polyubiquitination of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 [J]. *Mol Pharmacol*, 2017, 91(4): 307–316.
- [56] NARAYAN K, WAGGONER L, PHAM S T, et al. TRIM13 is a negative regulator of MDA5-mediated type I interferon production [J]. *J Virol*, 2014, 88(18): 10748–10757.
- [57] HUANG Y, YANG M, YU Y, et al. Grouper TRIM13 exerts negative regulation of antiviral immune response against nodavirus [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 55: 106–115.
- [58] LI X, YU Z, FANG Q, et al. The transmembrane endoplasmic reticulum-associated E3 ubiquitin ligase TRIM13 restrains the pathogenic-DNA-triggered inflammatory response [J]. *Sci Adv*, 2022, 8(4): eabh0496.
- [59] GOVATATI S, KUMAR R, BORO M, et al. TRIM13 reduces cholesterol efflux and increases oxidized LDL uptake leading to foam cell formation and atherosclerosis [J]. *J Biol Chem*, 2024, 300(5): 107224.
- [60] JOO H M, KIM J Y, JEONG J B, et al. Ret finger protein 2 enhances ionizing radiation-induced apoptosis *via* degradation of AKT and MDM2 [J]. *Eur J Cell Biol*, 2011, 90(5): 420–431.
- [61] QIAN Y, LEI G, WEN L. Brain-specific deletion of TRIM13 promotes metabolic stress-triggered insulin resistance, glucose intolerance, and neuroinflammation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 527(1): 138–145.
- [62] XIANG Y, LI C, WANG Z, et al. TRIM13 reduces damage to alveolar epithelial cells in COPD by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced ER-phagy [J]. *Lung*, 2024, 202(6): 821–830.
- [63] LI Y, REN D, SHEN Y, et al. Altered DNA methylation of TRIM13 in diabetic nephropathy suppresses mesangial collagen synthesis by promoting ubiquitination of CHOP [J]. *EBioMedicine*, 2020, 51: 102582.

[收稿日期] 2024–10–29

徐明胜,孙开宏. 运动对阿尔茨海默病的改善作用及机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(4): 169–176.

Xu MS, Sun KH. Ameliorative effect of exercise on Alzheimer's disease and related mechanisms [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 169–176.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.017

运动对阿尔茨海默病的改善作用及机制

徐明胜¹, 孙开宏^{2*}

(1.扬州工业职业技术学院体育部,江苏 扬州 225127;2.常州纺织服装职业技术学院体育部,江苏 常州 213164)

【摘要】 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的发病机制是当前生命医学领域的研究焦点之一。运动可作为改善神经退行性疾病的重要手段,研究证实,有氧运动、抗阻运动和多模式运动组合均可显著改善 AD。分析发现,其发病机制与运动抑制炎症反应、优化星形胶质细胞和小胶质细胞激活状态、促进海马神经发生以及改善血脑屏障功能密切相关。本文通过对不同运动方式在改善 AD 中的作用及其机制进行综述,并做出展望,以期为 AD 的运动防治提供理论和实验依据。

【关键词】 运动;阿尔茨海默病;神经炎症;神经发生;血脑屏障

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0169-08

Ameliorative effect of exercise on Alzheimer's disease and related mechanisms

XU Mingsheng¹, SUN Kaihong^{2*}

(1. Department of Physical Education, Yangzhou Polytechnic Institute, Yangzhou 225127, China.

2. Department of Physical Education, Changzhou Vocational Institute of Textile and Garment, Changzhou 213164)

【Abstract】 The pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) is a key research focus in the field of life sciences. Exercise serves as an important intervention for ameliorating neurodegenerative diseases, and aerobic exercise, resistance training, and multimodal exercise combinations have been shown to significantly improve AD. Studies have shown that the pathogenesis of AD is closely associated with the regulatory effects of exercise in suppressing inflammatory responses, optimizing the activation of astrocytes and microglia, promoting hippocampal neurogenesis, and improving blood-brain barrier function. This article reviews the effects and mechanisms of different exercise method in improving AD and discusses future prospects, with the aim of providing a theoretical and experimental basis for the role of exercise in the prevention and treatment of AD.

【Keywords】 exercise; Alzheimer's disease; neuroinflammation; neurogenesis; blood-brain barrier

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

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种常见的神经退行性疾病。研究发现,神经炎症、胶质细胞、神经发生和血脑屏障功能等被认为是其发病机制中的关键环节^[1]。近年来,运动

[作者简介] 徐明胜 (1985—), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 体育锻炼与身心健康。E-mail: 454690870@qq.com

[通信作者] 孙开宏 (1976—), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 运动改善神经系统疾病的机制。

E-mail: yztyskh@163.com

在神经炎症调控及 AD 预防中的潜在作用受到了广泛关注。研究显示,适宜的运动能够显著降低神经炎症水平,通过减少促炎因子的释放、促进抗炎因子的产生,以及调节免疫细胞的活性,达到保护神经系统健康的效果^[2]。此外,运动还能通过改善脑部血液循环、增强神经元的代谢活性等,来协助预防 AD 的发生^[3]。

小胶质细胞作为固有的免疫调节细胞,具有清除神经毒性蛋白质聚集体的功能^[4]。然而,小胶质细胞清除 β -淀粉样蛋白($\text{amyloid } \beta\text{-protein}$, $\text{A}\beta$)斑块的过程、损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs)的激活、免疫衰老及其与星形胶质细胞的相互作用将导致神经炎症^[5-10]。研究小胶质细胞相关的信号传导机制对于理解 AD 发病机制具有重要意义。运动对神经炎症和 AD 具有积极的影响,通过影响骨骼肌产生的肌细胞因子、调节外周免疫系统、改变脂肪组织中的巨噬细胞类型,以及在大脑中上调抗炎细胞因子的表达来发挥抗炎作用^[11-14],并且通过减弱年龄相关的大脑促炎细胞因子的表达,激活小胶质细胞和星形胶质细胞,对海马神经发生产生有益的影响^[15]。运动还通过减少炎症反应和氧化应激来增强免疫功能,并改变 AD 大脑中的炎症模式和神经病理学特性^[16-17]。另外,减少外周炎症因子进入中枢神经系统还有助于恢复血脑屏障的完整性,增强认知功能,改善 AD^[18]。综上所述,通过调节免疫系统抗炎机制、对大脑神经炎症的影响以及对海马神经发生和血脑屏障功能的调节,运动可发挥积极的 AD 病理改善作用。

当前,有关运动改善 AD 的机制尚缺少系统性综述。鉴于此,本研究旨在全面梳理不同运动在改善 AD 中的作用,明确神经炎症、神经发生、血脑屏障等在 AD 发病中的关键作用,并深入探讨运动如何通过调控神经炎症等来防治 AD,以为老年人制定个性化运动计划及非药物干预策略的开发提供理论支撑和研究方向。

1 运动对 AD 的改善作用

1.1 有氧运动对 AD 的改善作用

步行锻炼是一种被中老年人广泛接受和喜爱的体育活动。有研究通过对居住在疗养院中

的晚期 AD 患者进行为期 24 周,每周 4 次,每次 30 min 的步行锻炼干预^[8]。研究结果显示,患者的 6 min 步行测试分数和日常生活活动能力有所提高,同时在最低精神状态检查(mini-mental state examination, MMSE)上的得分下降速度也得到减缓。此外,另一项研究为 8 名 AD 患者实施了为期 4 周的适应性跑步机训练,逐步增加运动强度和持续时间,直至达到最大摄氧量的 40%(初始速度为 2 km/h,初始持续时间为 20 min)^[9]。适应期后,患者每周进行两次跑步机步行,每次 30 min,持续 3 个月,可显著改善他们的认知功能。进一步的研究也表明,进行为期 6 个月,每周 5 次,每次 30~45 min 的步行锻炼,能有效地延缓 AD 患者日常生活能力和认知功能的下降,并降低他们跌倒的风险^[10]。这些研究结果都充分证明了步行锻炼对于改善和维持 AD 患者的生活品质具有重要的作用。

固定自行车运动是一种低冲击、非负重的有氧锻炼方式,其跌倒风险极低,特别适合 AD 患者。一项研究中,轻度 AD 患者被分为两组,一组进行每周 3 次,每次 40 min 的中等强度自行车运动,持续 3 个月,对照组则不进行此运动,结果表明,参与自行车运动的 AD 患者在认知功能上有显著改善^[11]。对于轻度 AD 患者,一项为期 16 周的运动计划,包括在跑步机和固定自行车上进行中高强度有氧运动,每周 3 次,每次 1 h,同样能够改善认知功能^[12]。还有研究发现,经过 6 个月的中等强度自行车运动和拉伸运动的结合干预,患有轻度至中度 AD 的老年人每周进行 3 次,每次 20~50 min 的锻炼,其认知能力下降的速度有所放缓,但结合运动的效果与单纯拉伸运动相比,并未显示出额外的认知效益^[13]。

鉴于老年人患 AD 的风险较高,选择适宜的有氧运动形式显得尤为重要。对于未曾有规律运动习惯的老年患者而言,步行锻炼是一个较为理想的选择。而对于轻度 AD 患者来说,选择具有吸引力且能够提供互动性的中等强度有氧运动,可对他们的整体身心健康带来更积极的影响。

1.2 抗阻运动对 AD 的改善作用

针对 24 项有关 AD 患者认知功能的运动干预研究进行了深入的荟萃分析,结果表明,不同形式运动干预均对整体认知功能产生积极影响,

其中,抗阻运动是改善 AD 患者认知功能的最有效运动方式(成为最佳干预方案的累积概率达 72.4%)^[14]。在一项研究中,对 23 名轻度 AD 患者进行了弹力带抗阻训练,每周进行 3 次上肢和下肢运动,为期 5 个月^[15]。在运动干预前后,采用一系列评估身体健康的方法,包括椅腿深蹲、单腿站立、定时出发测试、2 min 步行测试和步态能力评估。结果发现,抗阻运动后 AD 患者的肌肉力量、耐力和心血管功能均有显著改善。此外,长期抗阻运动可降低氧化应激,增加血清脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)和胰岛素样生长因子 I(insulin like growth factor-1, IGF-1)的分泌,并提高认知能力^[15]。研究表明,抗阻运动改善 AD 的机制与神经发生和神经可塑性增加有关,从而有助于抵抗大脑衰老的影响。进一步的研究对 9 月龄具有认知障碍的小鼠进行了阻力阶梯训练,结果显示,与未进行训练的小鼠相比,经过阻力训练小鼠的额叶皮层和海马的认知能力有所改善^[16]。此外,研究还发现,阻力训练对抑制神经炎症、A β 蛋白和 tau 蛋白的病理作用发挥以及改善突触可塑性有积极影响。另有研究也发现,55 名轻度认知障碍患者进行 16 周的抗阻运动后,其循环神经保护生长因子 IGF-1 水平显著升高,白细胞介素-15 水平则有所下降^[17]。抗阻运动对 AD 的认知功能、肌肉力量、耐力、心血管功能、神经发生和神经可塑性具有显著的改善效果,还能够通过降低氧化应激和神经炎症,有效抵抗大脑衰老的影响。

研究发现,每周进行 2 次的抗阻运动能够促进大脑可塑性,并与改善执行功能的表现存在正相关^[18]。抗阻运动能够提升肌肉力量、控制能力和协调性,且这些身体功能的提高对于执行功能亦产生正面效应^[19]。在各项认知功能中,记忆能力对运动干预的反应较为有限^[20],可能与抗阻运动促进脑部与记忆相关区域血流量增加有关^[21]。鉴于此,抗阻运动在临床康复方案中应得到更多的重视,因为其能显著提升 AD 患者的整体认知和记忆水平,有助于延缓患者的认知衰退。

1.3 多模式运动组合对 AD 的改善作用

多模式运动(multi component exercise)指通过 2 种或 2 种以上类型的运动进行干预,如有氧运动、力量/抗阻训练、平衡/协调性训练、柔韧性

训练等运动方式的组合^[22]。研究显示,对 AD 患者进行多种类型运动的联合干预越来越受到关注^[23]。AD 患者认知能力下降是由多种因素导致的,单一运动或认知干预对患者认知功能的影响相对较小。相比之下,运动和认知干预相结合更有效,因为它们可以相互作用。在轻度认知障碍患者中,与单一干预措施相比,运动与认知训练相结合可以在更短的时间内改善他们的认知功能和日常生活能力。基于运动游戏,作为一种融合了身体活动与认知挑战的复合训练方式,通过整合体育运动和交互式虚拟现实技术,构成了一种多元化的干预手段。例如,交互式身体-认知训练将固定自行车与虚拟现实旅游相结合,为患者提供自行车锻炼和认知刺激。有助于改善运动控制,增强额叶认知功能和神经可塑性,并显著改善整体认知(工作记忆、情景记忆和执行功能)^[24]。类似的新兴运动组合还需要进一步探究其功效。

最近的一项荟萃分析深入探讨了有氧运动、抗阻运动和多模式联合运动对 AD 患者认知功能的影响,结果显示多模式联合运动是增强执行功能的最有效方法(成为最佳选择的累积概率达 30.4%),相较于单纯的有氧运动或抗阻运动,多模式联合运动表现出更为显著的优势^[14]。另一研究表明,50 岁及以上人群应结合有氧和抗阻运动来改善大脑健康^[25]。在一项涉及中度 AD 患者(65~78 岁)的研究中,短期中等强度有氧运动(以最大心率的 60%骑自行车 20 min)与认知游戏相结合,可改善认知功能,增加功能活动时间^[26]。而另一项进行 6 个月训练的研究显示,AD 患者(84 岁)经过包括有氧、耐力、柔韧性和姿势训练的综合锻炼后,其身体和认知功能均显著增强^[27]。每次运动持续时间为 45~55 min,每周 2 次。提示,多模式运动引起的执行功能改善可能与感知-运动适应、神经纤维协调等运动任务有关。未来研究需深入探讨不同运动方式增强执行功能的神经生理学机制,以及对大脑结构和功能可塑性的影响。

2 运动改善 AD 的作用机制

2.1 运动通过减轻炎症反应改善 AD

运动具有普遍的抗炎作用且与骨骼肌局部

免疫适应的直接作用有关^[28]。骨骼肌生成并释放的肌因子(如 IL-6)在运动诱发的代谢变化中扮演着关键角色^[29]。运动时,IL-6 被大量释放来促进抗炎因子(如 IL-10)生成和降低促炎因子(如 TNF- α 和 IL-1 β)水平,从而缓解炎症反应^[30-31]。研究发现,定期运动可通过下调促炎因子(如 TNF- α 和 IL-1 β)和上调抗炎因子(如 IL-10)表达来调节外周免疫系统,降低细胞炎症水平^[32-33]。同时,运动亦可通过抑制海马中的补体信号通路来减轻细胞炎症反应,进而维持 AD 患者和小鼠模型中脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)中髓系细胞表达的触发受体 2(triggering receptor expressed on myeloid cells 2, TREM2)的水平,缓解 AD^[34-35]。研究发现,运动可能通过下调脂肪细胞、单核细胞和肝细胞等细胞上的 Toll 样受体 4(toll like receptor 4, TLR4)的表达,间接改变脂肪组织中的巨噬细胞的类型(从促炎(M1)型转变为抗炎(M2)型),进而减轻细胞炎症反应,降低患慢性病的风险^[36]。

此外,相对于 AD 患者,运动亦可通过减少促炎产物和增强抗炎标志物减轻其细胞炎症反应,进而缓解 AD^[33,37]。研究发现,运动通过上调抗炎因子(如 IL-10)和下调与年龄相关的大脑促炎细胞因子(如 IL-6、TNF- α)的表达及降低脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的炎症反应,从而改善老年小鼠的认知能力^[29,38]。表明运动可改变 AD 大脑中的炎症模式,并改变疾病的神经病理学特性。此外,运动亦可通过氧化应激来调节免疫系统,并增强神经可塑性(如增加老年人或 AD 患者的大脑体积和连接性)来改善 AD 患者的认知能力^[39-40]。表明运动通过影响骨骼肌局部免疫适应、调节外周免疫系统、改变脂肪组织巨噬细胞类型来减轻细胞炎症反应和氧化应激,进而增强免疫系统及神经可塑性,从而缓解 AD。然而,关于运动如何通过调节免疫系统和炎症反应来改善 AD 的具体发病机制尚待研究。

2.2 运动通过调节胶质细胞改善 AD

星形胶质细胞和小胶质细胞是大脑中主要的免疫调节细胞。而星形胶质细胞和小胶质细胞的激活会导致 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)分泌上调,GABA 过度释放,造成 A β 沉积增加,进而引发 AD^[41-42]。

运动已被证明可通过减少海马和皮层中电离钙结合适配分子 1(ionized calcium binding adapter molecule-1, Iba-1)和胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)阳性细胞的数量来激活小胶质细胞和星形胶质细胞,进而增强空间记忆^[43]。同时,运动可改善氯化铝(aluminum chloride, AlCl₃)/D-半乳糖(D-galactose, D-gal)处理的小鼠大脑中的小胶质细胞的过度激活,促进小胶质细胞的抗炎/修复表型,进而改善认知能力^[44]。小胶质细胞在免疫损伤时会因刺激从而释放促炎产物,而其持续激活可在 AD 神经炎症中起关键作用^[45]。研究表明,短期(10 d)的跑台训练能增强啮齿动物小胶质细胞的吞噬能力,改善其神经元损失和记忆障碍;长期(5 周)的跑台运动则能减轻转基因小鼠中海马小胶质细胞的激活状态,进而改善 AD^[46-47]。此外,对啮齿动物进行为期 12 周跑步计划后,发现其能促进海马的小胶质细胞从 M1 期向 M2 期转变,从而改善神经炎症、氧化应激和认知能力^[48]。这些作用部分由细胞膜上的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)TLRs 和核苷酸寡聚结构域样受体(nucleotide binding oligomerization domain like receptors, NLRs)所介导。研究显示,6 周的跑台运动通过下调 AD 大鼠大脑中 TLR4、NF- κ B、TNF- α 和 IL-1 α 表达来降低其炎症反应,从而改善其记忆能力,缓解 AD^[41]。此外,另一项动物实验研究发现,阻断 NLRP3 介导的小胶质细胞激活可能是预防 AD 的潜在靶点,而运动可降低 AD 小鼠海马中 NLRP3 和 Caspase-1 的表达^[42,49]。表明运动或能通过靶向小胶质细胞 PRRs 来减轻神经炎症、增强认知功能,从而改善 AD。但现有研究多为动物实验,对人类长期效果及运动调节细胞因子机制、对大脑功能的影响路径尚待研究探索。

2.3 运动通过促进成年海马神经发生改善 AD

成年海马神经发生对学习和记忆至关重要,其失调与衰老相关的认知障碍及 AD 等神经退行性疾病的认知缺陷紧密相关。神经炎症是这些疾病的病理特征,会损害海马神经发生和认知能力。神经炎症会对成年海马神经发生以及认知能力产生负面影响,而运动作为一种有效的抗炎手段可以在一定程度上抵消这种负面效应^[50-51]。

运动被证明能显著促进海马神经发生^[52]。研究显示,成年海马神经发生(adult hippocampal neurogenesis, AHN)障碍往往先于 AD 症状出现,且 A β 聚集会进一步削弱成年海马中神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的功能^[53-54],而运动能够改善神经炎症,进而促进 AHN 并增强记忆功能,从而改善 AD^[55]。此外,运动还能加速成年海马区新生神经元的生成与成熟,并通过提升 BDNF 水平来改善 AD 患者的认知功能^[56]。因此,运动不仅能够减轻神经炎症,还能增加神经元和神经胶质细胞数量,为 AD 患者的大脑功能提供有益支持^[37]。提示运动可通过减少神经炎症、促进海马神经的发生来增强认知功能,进而缓解 AD。但其具体机制尚存盲点,如运动如何调节神经炎症与海马神经发生的相互作用、最佳运动方案及其长期效应的研究。

2.4 运动通过保护血脑屏障改善 AD

血脑屏障功能障碍是 AD 病理学的一个关键特征^[57],其影响大脑 A β 的清除率、内皮细胞和周细胞功能、紧密连接完整性和小胶质细胞激活^[58-59]。当血脑屏障受损时,外周免疫细胞和炎症细胞因子可以进入中枢神经系统并引起神经炎症^[58,60],而运动可通过恢复血脑屏障中的紧密连接蛋白,逆转血脑屏障的渗漏^[61]。研究显示,体育锻炼可通过减少循环炎症(如降低 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 浓度)来保护 T2DM 患者的血脑屏障^[62]。对老年小鼠进行跑步运动干预后,发现其可限制炎症产物流入中枢神经系统,并增强小鼠大脑的突触可塑性和整体行为表现,进而预防与年龄相关的神经血管功能障碍^[63]。值得注意的是,不同强度的运动对 AD 小鼠神经炎症的改善效果相似^[64]。同时,不同类型的中等强度运动(每周 3~5 次,每次 1 h)亦有助于延迟 AD 的发作和治疗^[65]。综上,运动可通过改善神经炎症和增强海马神经发生来保护认知功能及恢复血脑屏障功能,从而缓解 AD。但关于最佳运动强度的研究,未来需更多研究来明确不同类型运动的具体效果及机制,以提供更为准确的理论支持。

3 总结与展望

研究证实,运动可显著改善 AD,运动能够抑制炎症因子的表达,缓解神经炎症,调控星形胶

质细胞和小胶质细胞的激活状态,减轻神经炎症并增强神经可塑性,促进海马区神经新生,改善认知功能,以及通过保护血脑屏障的完整性,从而延缓 AD 的病理进展。

本研究仍存在一定不足之处:①本研究虽表明运动在改善神经炎症、胶质细胞功能、海马神经发生以及血脑屏障保护等机制中的作用,但具体的分子信号通路仍不够深入。②不同的病程阶段、遗传背景及基础身体素质的个体干预效果缺乏深入探索。③本研究已探讨了有氧运动、抗阻运动及多模式运动的不同效果,但针对运动类型、强度、频率和持续时间的最优组合尚缺乏系统性研究,具体的“量效关系”仍有待进一步揭示。基于上述不足,提出以下展望:①分子机制研究:进一步聚焦运动干预在神经炎症、神经营养因子调控、A β 清除、自噬激活及血脑屏障保护中的分子机制,揭示其改善 AD 病理的作用路径,以及利用先进技术(如分子生物学技术)解析神经炎症的信号通路,明确其对脑功能的影响,为开发基于运动的精准干预策略和针对炎症靶点的创新治疗提供理论支持。②个性化运动干预:研究不同运动参数(如模式、强度、频率和持续时间)对 AD 分子调控的作用,结合患者特征(如年龄、性别、疾病阶段等),制定个性化运动方案。同时,重点探索抗阻运动在改善认知功能和肌肉力量中的作用,优化运动类型、强度和时间等参数的组合,以提高干预效果。③综合治疗策略:探索运动与药物、认知训练等疗法的协同增效机制,通过综合干预延缓 AD 进程。还可通过结合数字化健康技术(如可穿戴设备和人工智能),动态监测患者的运动状况及其对认知健康的影响,提供精准的干预和疗效评估支持。

参考文献:

- [1] 李少创,韩诚,秦亚莉,等. 阿尔茨海默病实验动物模型评述[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 131-145.
LI S C, HAN C, QIN Y L, et al. A review of experimental animal models of Alzheimer's disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 131-145.
- [2] 王威丽,宋沧桑. 阿尔兹海默病发病机制的研究进展及临床用药[J]. 中国药物评价, 2019, 36(3): 204-209.
WANG W L, SONG C S. Recent advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease and clinical medication

- [J]. Chin J Drug Eval, 2019, 36(3): 204-209.
- [3] 陈祥和, 仇啸, 刘驰, 等. 自噬: 运动改善神经退行性疾病的关键机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(10): 132-139.
- CHEN X H, QIU X, LIU C, et al. Autophagy: the critical mechanism of exercise in improving neurodegenerative diseases [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 132-139.
- [4] CHAN K Y, WANG W, WU J J, et al. Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China, 1990-2010: a systematic review and analysis [J]. Lancet, 2013, 381(9882): 2016-2023.
- [5] QASEEM A, SNOW V, THOMAS CROSS J Jr, et al. Current pharmacologic treatment of dementia: a clinical practice guideline from the American college of physicians and the American academy of family physicians [J]. Ann Intern Med, 2008, 148(5): 370-378.
- [6] SCHNEIDER L S, TARIOT P N, DAGERMAN K S, et al. Effectiveness of atypical antipsychotic drugs in patients with Alzheimer's disease [J]. N Engl J Med, 2006, 355(15): 1525-1538.
- [7] MAHALAKSHMI B, MAURYA N, LEE S D, et al. Possible neuroprotective mechanisms of physical exercise in neurodegeneration [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(16): 5895.
- [8] VENTURELLI M, SCARSINI R, SCHENA F. Six-month walking program changes cognitive and ADL performance in patients with Alzheimer [J]. Am J Alzheimers Dis Other Demen, 2011, 26(5): 381-388.
- [9] ARCOVERDE C, DESLANDES A, MORAES H, et al. Treadmill training as an augmentation treatment for Alzheimer's disease: a pilot randomized controlled study [J]. Arq Neuropsiquiatr, 2014, 72(3): 190-196.
- [10] 吴丹, 黄葵. 步行对阿尔茨海默病患者认知功能和生活质量的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(26): 94-97.
- WU D, HUANG K. Effects of walking on cognitive function and quality of life in patients with Alzheimer's disease [J]. Chin J Mod Med, 2015, 25(26): 94-97.
- [11] YANG S Y, SHAN C L, QING H, et al. The effects of aerobic exercise on cognitive function of Alzheimer's disease patients [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2015, 14(10): 1292-1297.
- [12] JENSEN C S, SIMONSEN A H, SIERSMA V, et al. Patients with Alzheimer's disease who carry the *APOE* ϵ 4 allele benefit more from physical exercise [J]. Alzheimers Dement (N Y), 2019, 5: 99-106.
- [13] YU F, VOCK D M, ZHANG L, et al. Cognitive effects of aerobic exercise in Alzheimer's disease: a pilot randomized controlled trial [J]. J Alzheimers Dis, 2021, 80(1): 233-244.
- [14] LV S, WANG Q, LIU W, et al. Comparison of various exercise interventions on cognitive function in Alzheimer's patients: a network meta-analysis [J]. Arch Gerontol Geriatr, 2023, 115: 105113.
- [15] AHN N, KIM K. Effects of an elastic band resistance exercise program on lower extremity muscle strength and gait ability in patients with Alzheimer's disease [J]. J Phys Ther Sci, 2015, 27(6): 1953-1955.
- [16] PORTUGAL E M M, VASCONCELOS P G T, SOUZA R, et al. Aging process, cognitive decline and Alzheimer's disease: can strength training modulate these responses? [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2015, 14(9): 1209-1213.
- [17] LIU Y, CHU J M T, YAN T, et al. Short-term resistance exercise inhibits neuroinflammation and attenuates neuropathological changes in 3xTg Alzheimer's disease mice [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 4.
- [18] TSAI C L, PAI M C, UKROPEC J, et al. Distinctive effects of aerobic and resistance exercise modes on neurocognitive and biochemical changes in individuals with mild cognitive impairment [J]. Curr Alzheimer Res, 2019, 16(4): 316-332.
- [19] TSAI C L, WANG C H, PAN C Y, et al. Executive function and endocrinological responses to acute resistance exercise [J]. Front Behav Neurosci, 2014, 8: 262.
- [20] FORTE R, BOREHAM C A G, LEITE J C, et al. Enhancing cognitive functioning in the elderly: multicomponent vs resistance training [J]. Clin Interv Aging, 2013, 8: 19-27.
- [21] SANDERS L M J, HORTOBÁGYI T, LA BASTIDE-VAN GEMERT S, et al. Dose-response relationship between exercise and cognitive function in older adults with and without cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis [J]. PLoS One, 2019, 14(1): e0210036.
- [22] SUZUKI T, SHIMADA H, MAKIZAKO H, et al. Effects of multicomponent exercise on cognitive function in older adults with amnesic mild cognitive impairment: a randomized controlled trial [J]. BMC Neurol, 2012, 12(1): 128.
- [23] 尹丽琴, 汤长发, 罗伟强, 等. 多模式运动对轻度认知功能障碍老年人认知功能和神经可塑性的影响 [J]. 体育科学, 2022, 42(1): 78-87, 97.
- YIN L Q, TANG C F, LUO W Q, et al. Effect of multi-mode exercise on cognitive function and neuroplasticity in the elderly with MCI [J]. China Sport Sci, 2022, 42(1): 78-87, 97.
- [24] NAGAMATSU L S, HANDY T C, LIANG HSU C, et al. Resistance training promotes cognitive and functional brain

- plasticity in seniors with probable mild cognitive impairment [J]. Arch Intern Med, 2012, 172(8): 666–668.
- [25] MAILLOT P, PERROT A, HARTLEY A. Effects of interactive physical-activity video-game training on physical and cognitive function in older adults [J]. Psychol Aging, 2012, 27(3): 589–600.
- [26] ROGERS N T, STEPTOE A, CADAR D. Frailty is an independent predictor of incident dementia; Evidence from the English Longitudinal Study of Ageing [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 15746.
- [27] SAMPAIO A, MARQUES E A, MOTA J, et al. Effects of a multicomponent exercise program in institutionalized Elders with Alzheimer's disease [J]. Dementia (London), 2019, 18(2): 417–431.
- [28] METSIOS G S, MOE R H, KITAS G D. Exercise and inflammation [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2020, 34(2): 101504.
- [29] GOMES DA SILVA S, SIMÕES P S, MORTARA R A, et al. Exercise-induced hippocampal anti-inflammatory response in aged rats [J]. J Neuroinflammation, 2013, 10: 61.
- [30] OSTROWSKI K, HERMANN C, BANGASH A, et al. A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running [J]. J Physiol, 1998, 513(Pt 3): 889–894.
- [31] WILSON L D, ZALDIVAR F P, SCHWINDT C D, et al. The pro-and anti-inflammatory cytokine response to exercise in adolescent swimmers [J]. Pediatr Asthma Allergy Immunol, 2009, 22(3): 95–100.
- [32] SPIELMAN L J, LITTLE J P, KLEGERIS A. Physical activity and exercise attenuate neuroinflammation in neurological diseases [J]. Brain Res Bull, 2016, 125: 19–29.
- [33] DE MIGUEL Z, KHOURY N, BETLEY M J, et al. Exercise plasma boosts memory and dampens brain inflammation *via* clusterin [J]. Nature, 2021, 600(7889): 494–499.
- [34] ZHANG S S, ZHU L, PENG Y, et al. Long-term running exercise improves cognitive function and promotes microglial glucose metabolism and morphological plasticity in the hippocampus of APP/PS1 mice [J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 34.
- [35] JENSEN C S, BAHL J M, ØSTERGAARD L B, et al. Exercise as a potential modulator of inflammation in patients with Alzheimer's disease measured in cerebrospinal fluid and plasma [J]. Exp Gerontol, 2019, 121: 91–98.
- [36] MCFARLIN B K, FLYNN M G, CAMPBELL W W, et al. Physical activity status, but not age, influences inflammatory biomarkers and toll-like receptor 4 [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2006, 61(4): 388–393.
- [37] WANG M, ZHANG H, LIANG J, et al. Exercise suppresses neuroinflammation for alleviating Alzheimer's disease [J]. J Neuroinflammation, 2023, 20(1): 76.
- [38] LITTLEFIELD A M, SETTI S E, PRIESTER C, et al. Voluntary exercise attenuates LPS-induced reductions in neurogenesis and increases microglia expression of a proneurogenic phenotype in aged mice [J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 138.
- [39] INGOLD M, TULLIANI N, CHAN C C H, et al. Cognitive function of older adults engaging in physical activity [J]. BMC Geriatr, 2020, 20(1): 229.
- [40] SELLAMI M, GASMI M, DENHAM J, et al. Effects of acute and chronic exercise on immunological parameters in the elderly aged; can physical activity counteract the effects of aging? [J]. Front Immunol, 2018, 9: 2187.
- [41] CHOI D H, KWON I S, KOO J H, et al. The effect of treadmill exercise on inflammatory responses in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type [J]. J Exerc Nutrition Biochem, 2014, 18(2): 225–233.
- [42] LONNEMANN N, HOSSEINI S, MARCHETTI C, et al. The NLRP3 inflammasome inhibitor OLT1177 rescues cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(50): 32145–32154.
- [43] HE X F, LIU D X, ZHANG Q, et al. Voluntary exercise promotes glymphatic clearance of amyloid beta and reduces the activation of astrocytes and microglia in aged mice [J]. Front Mol Neurosci, 2017, 10: 144.
- [44] HAN H, ZHAO Y, DU J, et al. Exercise improves cognitive dysfunction and neuroinflammation in mice through Histone H3 lactylation in microglia [J]. Immun Ageing, 2023, 20(1): 63.
- [45] LENG F, EDISON P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? [J]. Nat Rev Neurol, 2021, 17(3): 157–172.
- [46] MELA V, MOTA B C, MILNER M, et al. Exercise-induced re-programming of age-related metabolic changes in microglia is accompanied by a reduction in senescent cells [J]. Brain Behav Immun, 2020, 87: 413–428.
- [47] KE H C, HUANG H J, LIANG K C, et al. Selective improvement of cognitive function in adult and aged APP/PS1 transgenic mice by continuous non-shock treadmill exercise [J]. Brain Res, 2011, 1403: 1–11.
- [48] ZHANG X, HE Q, HUANG T, et al. Treadmill exercise decreases $A\beta$ deposition and counteracts cognitive decline in APP/PS1 mice, possibly *via* hippocampal microglia modifications [J]. Front Aging Neurosci, 2019, 11: 78.
- [49] ROSA J M, CAMARGO A, WOLIN I A V, et al. Physical

- exercise prevents amyloid β_{1-40} -induced disturbances in NLRP3 inflammasome pathway in the hippocampus of mice [J]. *Metab Brain Dis*, 2021, 36(2): 351–359.
- [50] MA C L, MA X T, WANG J J, et al. Physical exercise induces hippocampal neurogenesis and prevents cognitive decline [J]. *Behav Brain Res*, 2017, 317: 332–339.
- [51] RYAN S M, NOLAN Y M. Neuroinflammation negatively affects adult hippocampal neurogenesis and cognition: can exercise compensate? [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2016, 61: 121–131.
- [52] GERBERDING A L, ZAMPAR S, STAZI M, et al. Physical activity ameliorates impaired hippocampal neurogenesis in the Tg4-42 mouse model of Alzheimer's disease [J]. *ASN Neuro*, 2019, 11: 1759091419892692.
- [53] KIM T A, SYTY M D, WU K, et al. Adult hippocampal neurogenesis and its impairment in Alzheimer's disease [J]. *Zool Res*, 2022, 43(3): 481–496.
- [54] SUNG P S, LIN P Y, LIU C H, et al. Neuroinflammation and neurogenesis in Alzheimer's disease and potential therapeutic approaches [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 701.
- [55] SUN L N, QI J S, GAO R. Physical exercise reserved amyloid-beta induced brain dysfunctions by regulating hippocampal neurogenesis and inflammatory response *via* MAPK signaling [J]. *Brain Res*, 2018, 1697: 1–9.
- [56] ABSHENAS R, ARTIMANI T, SHAHIDI S, et al. Treadmill exercise enhances the promoting effects of preconditioned stem cells on memory and neurogenesis in A β -induced neurotoxicity in the rats [J]. *Life Sci*, 2020, 249: 117482.
- [57] MONTAGNE A, ZHAO Z, ZLOKOVIC B V. Alzheimer's disease: a matter of blood-brain barrier dysfunction? [J]. *J Exp Med*, 2017, 214(11): 3151–3169.
- [58] PROFACI C P, MUNJI R N, PULIDO R S, et al. The blood-brain barrier in health and disease: Important unanswered questions [J]. *J Exp Med*, 2020, 217(4): e20190062.
- [59] WANG D, CHEN F, HAN Z, et al. Relationship between amyloid- β deposition and blood-brain barrier dysfunction in Alzheimer's disease [J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 695479.
- [60] TAKATA F, NAKAGAWA S, MATSUMOTO J, et al. Blood-brain barrier dysfunction amplifies the development of neuroinflammation: understanding of cellular events in brain microvascular endothelial cells for prevention and treatment of BBB dysfunction [J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 661838.
- [61] MAŁKIEWICZ M A, SZARMACH A, SABISZ A, et al. Blood-brain barrier permeability and physical exercise [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 15.
- [62] BERTRAM S, BRIXIUS K, BRINKMANN C. Exercise for the diabetic brain: how physical training may help prevent dementia and Alzheimer's disease in T2DM patients [J]. *Endocrine*, 2016, 53(2): 350–363.
- [63] SOTO I, GRAHAM L C, RICHTER H J, et al. APOE stabilization by exercise prevents aging neurovascular dysfunction and complement induction [J]. *PLoS Biol*, 2015, 13(10): e1002279.
- [64] ROBISON L S, POPESCU D L, ANDERSON M E, et al. Long-term voluntary wheel running does not alter vascular amyloid burden but reduces neuroinflammation in the Tg-SwDI mouse model of cerebral amyloid angiopathy [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 144.
- [65] PAHLAVANI H A. Exercise therapy to prevent and treat Alzheimer's disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2023, 15: 1243869.

[收稿日期]2024-04-18