

曹星新,段素琴,侯婧涵,等. 基于网络药理学探讨黄芪治疗病毒性胰腺炎的疗效及机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(5): 1-11.

Cao XX, Duan SQ, Hou JH, et al. Network pharmacology analysis of efficacy and mechanism of Astragalus in the treatment of viral pancreatitis [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(5): 1-11.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.05.001

基于网络药理学探讨黄芪治疗病毒性胰腺炎的 疗效及机制

曹星新^{1#}, 段素琴^{1#}, 侯婧涵¹, 马骏驰¹, 李艾亦², 和占龙^{1*}

(1. 中国医学科学院/北京协和医学院 医学生物学研究所, 昆明 650018; 2. 云南大学生命科学学院, 昆明 650500)

【摘要】 目的 基于网络药理学与细胞实验探讨黄芪治疗病毒性胰腺炎疗效及可能的作用机制。**方法** 检索 TCMSP 数据库中黄芪的药物靶点, 结合 GeneCards 数据库中病毒性胰腺炎的疾病靶点, 两者取交集获得黄芪治疗病毒性胰腺炎的靶点基因。基于 DAVID 数据库完成治疗靶点的基因本体 (GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 信号通路富集分析。治疗靶点经 STRING 数据库与 Cytoscape 3.10.2 软件分析其相互作用关系并筛选核心治疗靶点, 采用 PyMOL 3.0 与 AutoDock Tools 1.5.7 软件完成最主要有效治疗成分与核心靶点的分子对接, 利用柯萨奇病毒 B 组 3 型 (Coxsackie virus group B3, CVB3) 构建病毒性胰腺炎细胞模型, 并对上述核心靶点进行验证。**结果** 经筛选获得 78 个治疗靶点, 富集分析结果显示, 黄芪治疗病毒性胰腺炎可能涉及的信号通路有癌症通路、PI3K-AKT 信号通路、脂质与动脉粥样硬化等, 此外, AKT1、TP53、HIF1A、CASP3、IL-6、MMP9 等基因可能是黄芪治疗病毒性胰腺炎的核心靶点。细胞实验结果表明, 模型组淀粉酶 (amylase, AMY) 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 黄芪组相较于模型组 AMY、AKT1、TP53、HIF1A、CASP3、IL-6、MMP9 表达水平显著下降 ($P < 0.05$)。**结论** 黄芪注射液能有效治疗病毒性胰腺炎, 并可能通过降低 AKT1、TP53、HIF1A、CASP3、IL-6、MMP9 表达水平发挥治疗作用。

【关键词】 黄芪; 柯萨奇病毒; 病毒性胰腺炎; 网络药理学; 细胞实验

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 05-0001-11

Network pharmacology analysis of efficacy and mechanism of Astragalus in the treatment of viral pancreatitis

CAO Xingxin^{1#}, DUAN Suqin^{1#}, HOU Jinghan¹, MA Junchi¹, LI Aiyi², HE Zhanlong^{1*}

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650018, China. 2. College of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650500)

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2021-I2M-1-024); 云南省基础研究专项面上项目 (202401CF070048)。

【作者简介】 曹星新 (2001—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 肠道病毒及其药物治疗。

E-mail: s2024018001@student.pumc.edu.cn

段素琴 (1992—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 肠道病毒动物模型研究。E-mail: duansuqin129@163.com

*共同第一作者

【通信作者】 和占龙 (1972—), 男, 博士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 非人灵长类疾病模型及肠道病毒研究。

E-mail: hzl612@126.com

【Abstract】 Objective To explore the efficacy and underlying mechanism of Astragalus in the treatment of viral pancreatitis using network pharmacology, with confirmation of its efficacy and mechanism in cell experiments. **Methods** Astragalus and viral pancreatitis targets obtained from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSP) and GeneCards databases were combined to obtain intersection targets. GO functional enrichment and KEGG signaling pathway enrichment analyses of therapeutic targets were conducted using the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) database. The interactions between therapeutic targets were analyzed using the STRING database and Cytoscape 3.10.2, and the core therapeutic targets were screened. Molecular docking between the most effective therapeutic components and the core targets was performed using PyMOL 3.0 and AutoDock Tools 1.5.7. CVB3 was used to construct a viral pancreatitis cell model for verification of the core targets. **Results** Seventy-eight therapeutic targets were identified. Enrichment analyses revealed the possible involvement of pathways related to cancer, lipids and atherosclerosis, and PI3K-AKT signaling. AKT1, TP53, HIF1A, CASP3, IL-6, and MMP9 were identified as possible core targets. The result of cell experiments showed that the expression level of AMY was significantly increased in the model group ($P < 0.05$). The Astragalus injection group exhibited significantly decreased expression levels of AMY, AKT1, TP53, HIF1A, CASP3, IL-6, and MMP9 compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusions** Astragalus injection effectively treated viral pancreatitis, and its therapeutic mechanism may involve reduced expression levels of AKT1, TP53, HIF1A, CASP3, IL-6, and MMP9.

【Keywords】 Astragalus; Coxsackie virus; viral pancreatitis; network pharmacology; cell experiment

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

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)主要是由胆结石、高脂血症、酗酒或感染等因素诱导胰腺腺泡细胞内多种酶的激活导致胰腺自身消化引起的组织消化、坏死性炎症疾病,危及生命且致死率高,是导致患者住院的主要胃肠道疾病^[1-2]。虽然其主要致病因素是酗酒和胆道疾病,但仍有显著比例的 AP 是由病毒感染及其他因素诱发^[3]。病毒性胰腺炎作为病毒感染诱发的 AP,可由多种病毒感染导致,如感染柯萨奇病毒(Coxsackie virus, CV)、肝炎病毒、流行性腮腺炎病毒、人类免疫缺陷病毒、埃可病毒等,其中柯萨奇病毒 B 组 3 型(Coxsackie virus group B3, CVB3)和柯萨奇病毒 B 组 4 型(CVB4)血清检出率最高^[4-6]。病毒性胰腺炎若迁延不愈可发展为慢性胰腺炎,后者是致死性疾病胰腺癌的主要诱因^[7]。病毒性胰腺炎发病机制仍有待研究,目前缺乏特效治疗方法^[8]。

黄芪注射液作为辅助治疗手段在 AP 治疗中已表现出显著疗效,同时既往研究发现其具有抗炎、抗病毒、增强免疫等多重药理作用^[9-11]。但在病毒性胰腺炎这一特殊诱因所致的 AP 中,黄芪注射液是否具有潜在的治疗效果与药理作用仍不明确。故本文基于网络药理学与细胞实验,探

索黄芪注射液是否存在可能作用于病毒性胰腺炎的药理作用,并进行疗效与部分机制的验证,以拓展黄芪注射液在不同 AP 类型中的应用。

1 材料和方法

1.1 细胞

BxPC-3 人原位胰腺腺癌细胞系(美国 OriCell 公司,220106E61)。CVB3 毒株-80℃低温保存于中国医学科学院医学生物学研究所。

1.2 主要试剂与仪器

RPMI 1640 培养基(美国 Thermo Fisher 公司,6124241);胎牛血清(美国 OriCell 公司,T221212H501);青霉素-链霉素溶液(武汉赛维尔生物科技有限公司,ATXE07131);磷酸缓冲液(北京兰杰柯科技有限公司,24074838);黄芪注射剂(黑龙江珍宝岛药业股份有限公司,A03230308);引物(上海生工生物公司,320054532);台盼蓝染料(北京索莱宝科技有限公司,15250-061);T75 细胞培养瓶(无锡耐思生命科技股份有限公司,021721AG010217A);CCK-8 试剂盒(碧云天生物科技股份有限公司,010924240605);Evo M-MLV 一步法 RT-qPCR 试剂盒(艾科瑞生物科技有限公司,A5A3815)。

荧光定量 PCR 检测系统(美国 Bio-Rad 公

司, 785BR15148); 酶标仪(美国 BioTek 公司, 18052119); 细胞计数仪(江苏卓微生物科技有限公司, ZY2020000399); 高速低温离心机(美国 Thermo Fisher 公司, 42302425); CO₂ 培养箱(美国 Thermo Scientific 公司, 267743-17203); 倒置显微镜(德国 Carl Zeiss 公司, 4155101104000); 振荡器(美国 Scientific Industries 公司, 2E4-250423)。

1.3 实验方法

1.3.1 黄芪有效成分筛选及靶点获取

以“黄芪”为检索词检索 TCMSP 数据库, 以类药性(drug like, DL)>0.18, 生物利用度(oral bioavailability, OB)>30% 为筛选条件, 获得黄芪有效成分^[12]。有效成分对应的靶蛋白通过 Uniprot 数据库统一转化为对应的靶基因。

1.3.2 疾病基因获取

以“viral pancreatitis”为检索词检索 GeneCards 数据库, 并以相关性>10 为筛选条件得到病毒性胰腺炎的有效致病靶点^[12]。

1.3.3 治疗靶点获取

利用 Venny 图工具, 对黄芪有效成分靶基因和病毒性胰腺炎致病基因取交集, 获得黄芪治疗病毒性胰腺炎的靶点。

1.3.4 “药物-有效成分-靶基因-疾病”网络构建

根据“1.3.1”“1.3.2”“1.3.3”结果, 使用 Cytoscape 3.10.2 软件构建“黄芪-有效成分-靶基因-病毒性胰腺炎”网络。

1.3.5 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建和核心靶点筛选

基于 STRING 数据库, 获得“1.3.3”药物治疗靶点 PPI 网络, 并使用 Cytoscape 3.10.2 制作网络图。利用 Centiscape 2.2, 参考各蛋白的度中心性(Degree)、中介中心性(Betweenness)、接近中心性(Closeness), 并以度中心性为标准筛选核心靶点。

1.3.6 GO 富集分析和 KEGG 富集分析

将黄芪治疗靶点上传 DAVID 数据库, 进行 GO 富集分析以及 KEGG 富集分析, 并下载分析数据。基于“微生信”平台, 以 $P<0.01$ 为筛选条件, 制作 GO/KEGG 图。

1.3.7 分子对接

根据“1.3.4”“黄芪-有效成分-靶基因-病

毒性胰腺炎”网络中与靶基因的联接数量, 确定黄芪治疗病毒性胰腺炎的最主要有效成分, 将其与“1.3.5”筛选的核心靶点进行对接。从 RCSB 数据库检索核心靶点的三维蛋白结构, 下载 PDB 格式文件; 从 TCMSP 数据库获取黄芪最主要的活性成分, 下载 Mol 2 格式文件。利用 PyMol 3.0 和 AutoDock Tools 1.5.7 对核心靶点与主要活性成分进行分子对接, 并对结果进行可视化。

1.3.8 细胞培养

BxPC-3 细胞于含有 30 mL 1640 培养基(含 10% 胎牛血清、1% 双抗)的 T75 培养瓶中培养, 培养环境为 37 °C、5% CO₂ 的培养箱, 观察细胞密度, 待其>90% 时进行传代操作。

1.3.9 药物浓度确定

台盼蓝染色后使用细胞计数仪确定 BxPC-3 细胞浓度, 用 1640 培养基(2% 胎牛血清、1% 双抗)稀释, 以 5×10^3 /孔接种于 96 孔板, 黄芪组加入黄芪注射液, 使其浓度为 1000、800、600、400、200、100 mg/mL, 对照组无处理, 两组总体积均为 100 μ L。培养于 37 °C、5% CO₂ 培养箱, 24 h 后每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 相同培养条件下培养 1 h, 使用酶标仪将吸光度设置为 450 nm, 检测光密度, 以此计算不同黄芪注射液浓度干预下的细胞活性。选取细胞活性>50% 的最大药物浓度为后续实验浓度^[13]。

1.3.10 PCR 检测

用 1640 培养基(2% 胎牛血清、1% 双抗)稀释后的 BxPC-3 细胞以 5×10^5 /孔接种于 6 孔培养板中, 分为对照组、黄芪组、病毒组进行干预。病毒组以 MOI = 0.01 加入 CVB3 病毒液, 黄芪组在病毒组的基础上加入“1.3.9”确定后浓度的黄芪注射液, 对照组无处理。于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后收集细胞。提取细胞总 RNA, 进行 PCR 检测。按照本文引物序列(表 1), 选用 GAPDH 作为内参基因, 依照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算核心治疗靶点的 RNA 表达水平。

1.4 统计学方法

SPSS 26.0 软件用于统计学分析, GraphPad Prism 9.0 用于数据可视化及统计学差异分析。检测结果用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用成组 t 检验, 以 $P<0.05$ 为有显著性差异。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')
<i>AKT1</i>	F:GGACAAGGACGGGCACATTA R:CGACCGCACATCATCTCGTA
<i>TP53</i>	F:GAGGTGGCTCTGACTGTACC R:TCCGTCCCAGTAGATTACCAC
<i>HIF1A</i>	F:GAACGTCGAAAAGAAAAGTCTCG R:CCTTATCAAGATGCGAACTCACA
<i>CASP3</i>	F:GAAATTGTGGAATTGATGCGTGA R:CTACAACGATCCCCTCTGAAAAA
<i>IL-6</i>	F:ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG R:CCATCTTTTGAAGGTTCAAGTTG
<i>MMP9</i>	F:TGTACCGCTATGTTTACACTCG R:GCCAGGACAGTTGCTTCT
<i>AMY</i>	F:ATGAGGACGTGGCTTTATTTCTC R:AGGCAACTAAGCAACAACCTG
<i>GAPDH</i>	F:GGGAGCCAAAAGGGTCAT R:GAGTCCTTCCACGATACCAA

2 结果

2.1 网络药理学结果

2.1.1 黄芪有效成分及其靶点

经检索,共得到黄芪 87 个化学成分,筛选后获得 20 个有效成分(表 2)。经去重校正后,获得其对应靶蛋白的靶基因共 195 个。

2.1.2 病毒性胰腺炎致病靶点

检索 GeneCards 数据库,获得病毒性胰腺炎靶点 9700 个,筛选后获得有效靶点 652 个。

2.1.3 黄芪治疗病毒性胰腺炎靶点

对黄芪的 195 个有效治疗靶基因与病毒性胰腺炎 652 个有效致病基因取交集,共获得 78 个黄芪治疗病毒性胰腺炎靶点对应的靶基因(图 1)。

2.1.4 “药物-有效成分-靶基因-疾病”网络

78 个有效治疗靶点对应 15 个黄芪有效成分,分别为槲皮素、山萘酚、刺芒柄花素、异鼠李素、毛蕊异黄酮等。绿色六边形代表黄芪,黄色正六边形代表黄芪有效成分编号,蓝绿色圆形代表治疗靶点,橙红色六边形代表病毒性胰腺炎,灰线代表各部分之间的相互联系(图 2)。

2.1.5 PPI 网络构建与核心靶基因筛选

根据黄芪治疗病毒性胰腺炎 PPI 网络(图 3),78 个蛋白质中无游离蛋白质,根据蛋白质联接节点数量由多到少,形状也由大到小,颜色依次变为蓝色、绿色、黄色。黄芪治疗病毒性胰腺

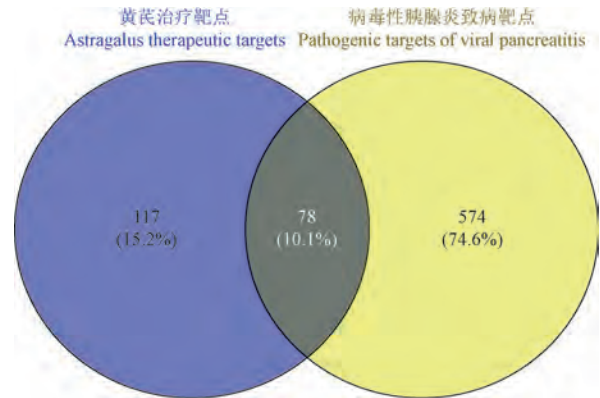


图 1 黄芪治疗病毒性胰腺炎靶点维恩图

Figure 1 Venn diagram of Astragalus therapeutic targets

炎的核心靶点如下(表 3),主要的核心治疗靶点依次为 AKT1、TP53、HIF1A、CASP3、IL-6、MMP9。

2.1.6 GO 富集分析

根据 DAVID 数据库进行 GO 富集分析,以 $P < 0.01$ 为筛选标准,按照基因比例(gene-ratio)大小为评价指标,细胞组分(cellular component, CC)富集包括细胞核、细胞液、细胞质、核质、细胞外间隙等组成部分。生物功能(biological process, BP)分析结果显示,黄芪治疗病毒性胰腺炎涉及的主要生物过程包括 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、基因表达正调控、DNA 模板转录的正调控等。分子功能(molecular function, MF)分析结果显示,治疗靶点的分子功能包括蛋白结合、相同蛋白质结合、酶结合等。

2.1.7 KEGG 富集分析

根据黄芪治疗病毒性胰腺炎 KEGG 富集分析数据制作气泡图(图 4A)。以 $P < 0.01$ 为筛选条件,结果显示黄芪治疗病毒性胰腺炎主要涉及癌症通路、PI3K-AKT 信号通路、脂质与动脉粥样硬化等通路。

根据“治疗靶点-KEGG 通路”网络(图 4B),结果显示黄芪治疗病毒性胰腺炎过程中,AKT1、TP53、IL-6 等主要靶点和癌症通路、PI3K-AKT 信号通路、脂质与动脉粥样硬化等通路富集程度较高。

2.1.8 分子对接

根据“2.1.4”结果,以 Degree 值大小为衡量标准,可知黄芪最主要活性成分为槲皮素,将其与 AKT1、TP53、HIF1A、CASP3、IL-6、MMP9 核心治疗靶点进行分子对接,结果显示分子结合能均 $< 0 \text{ kJ/mol}$,提示具备结合可能(表 4)。分子对接可视化结果如图 5 所示。

表 2 黄芪有效成分
Table 2 Effective component of Astragalus

编码 Code	活性成分 Active ingredient	口服生物利用度/% OB	类药性 DL
MOL000392	刺芒柄花素 Formononetin	69.67	0.21
MOL000422	山柰酚 Kaempferol	41.88	0.24
MOL000417	毛蕊异黄酮 Calycosin	47.75	0.24
MOL000438	(3R)-3-(2-羟基-3,4-二甲氧基苯基)苯并二氢吡喃-7-醇 (3R)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol	67.67	0.26
MOL000098	槲皮素 Quercetin	46.43	0.28
MOL000239	熊竹素 Jaranol	50.83	0.29
MOL000398	异黄酮 Isoflavanone	109.99	0.30
MOL000378	7-O-甲基异微凸剑叶莎醇 7-O-methylisomucronulatol	74.69	0.3
MOL000354	异鼠李素 Isorhamnetin	49.6	0.31
MOL000380	(6aR,11aR)-9,10-二甲氧基-6a,11a-二氢-6H-苯并呋喃并[3,2-c]色烯-3-醇 (6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	64.26	0.42
MOL000371	黄芪紫檀烷苷 3,9-di-O-methylnisolin	53.74	0.48
MOL000442	1,7-二羟基-3,9-二甲氧基紫檀烯 1,7-Dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	39.05	0.48
MOL000439	黄芪异黄酮苷 Isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole	49.28	0.62
MOL000387	联苯双酯 Bifendate	31.1	0.67
MOL000374	5'-羟基异胞壁糖醇-2',5'-二-O-葡萄糖苷 5'-hydroxyiso-muronulatol-2',5'-di-O-glucoside	41.72	0.69
MOL000433	黄芪黄酮 FA	68.96	0.71
MOL000296	三萜皂苷 Hederagenin	36.91	0.75
MOL000211	白桦脂酸 Mairin	55.38	0.78
MOL000033	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-二甲基-17-[(2R,5S)-5-异丙基辛烷-2-基]-十二氢-1H-环戊[a]菲-3-醇 (3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl]octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	36.23	0.78
MOL000379	(6aR,11R)-9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷 9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside	36.74	0.92

2.2 细胞实验结果

2.2.1 药物浓度确定

根据细胞活性检测结果(图6),与对照组相比,黄芪注射液与细胞活性成负相关,以细胞活性>50%为界限,取最大浓度为200 mg/mL,以此作为后续实验的药物浓度。

2.2.2 PCR 结果

CVB3 以 MOI=0.01 感染 BxPC-3 细胞后,病毒组(模型组)相较于对照组血淀粉酶表达水平

显著升高,表明成功构建了病毒性胰腺炎细胞模型;同时,黄芪组血淀粉酶表达水平显著低于病毒组($P<0.05$),表明黄芪注射液对于病毒性胰腺炎具有潜在疗效(图7)。对于黄芪注射液治疗病毒性胰腺炎核心靶点的验证部分,病毒组 AKT1、TP53、HIF1A、CASP3、IL-6、MMP9 表达水平显著高于对照组($P<0.05$),黄芪组 AKT1、TP53、HIF1A、CASP3、IL-6、MMP9 表达水平显著低于病毒组($P<0.05$,图8)。以上结果均具有统计学意义。

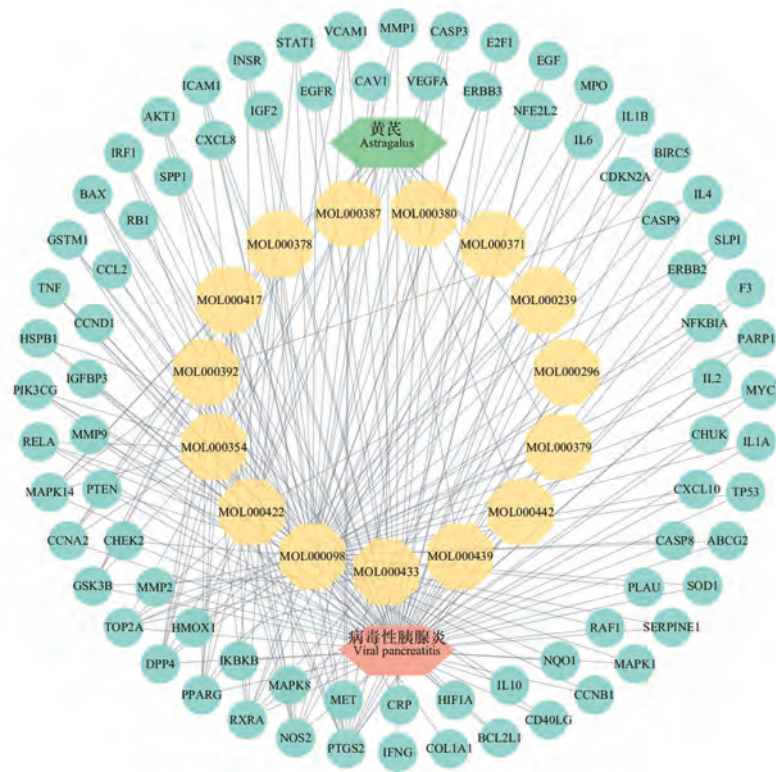


图 2 “药物-有效成分-靶基因-疾病”网络

Figure 2 “Drug-active ingredient-target-disease” network

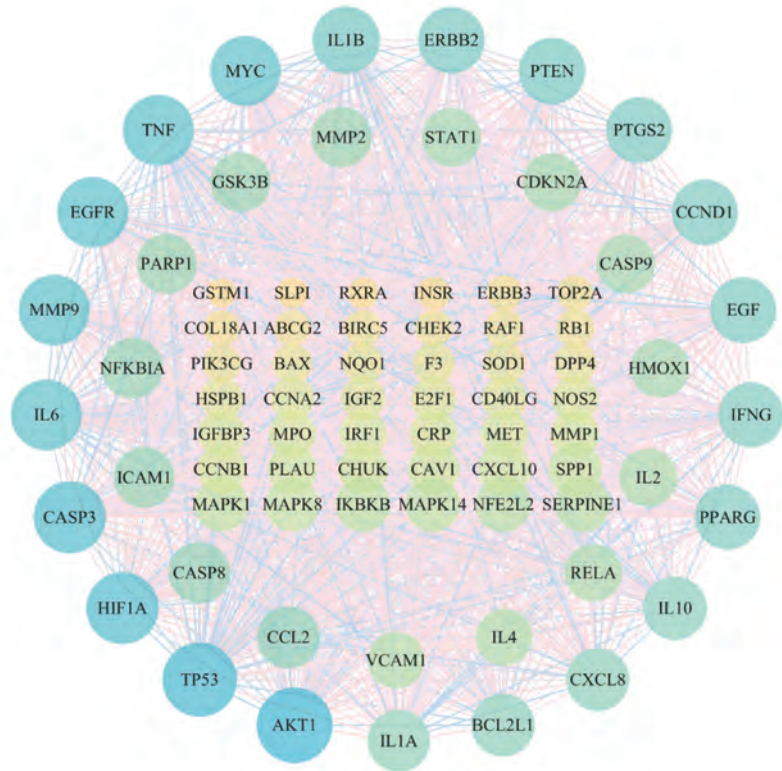


图 3 黄芪治疗病毒性胰腺炎 PPI 网络

Figure 3 Astragalus treatment of viral pancreatitis PPI network

表 3 黄芪治疗病毒性胰腺炎核心靶点

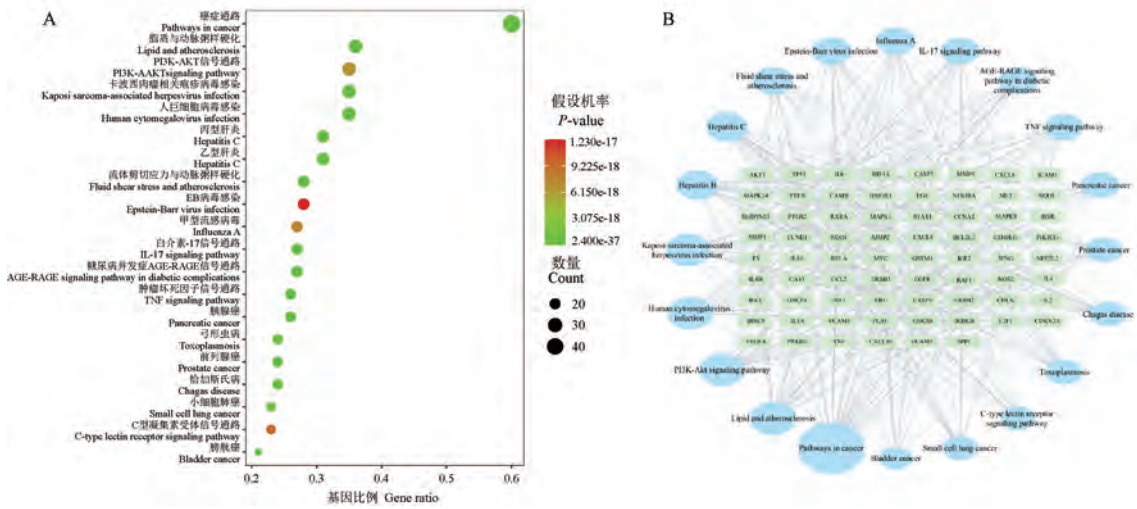
Table 3 Core target of Astragalus in the treatment of viral pancreatitis

基因 Gene	度中心性 Degree	中介中心性 Closeness	接近中心性 Betweenness
AKT1	75	0.012658228	172.4601083
TP53	73	0.012345679	171.0500454
HIF1A	70	0.011904762	112.4511509
CASP3	70	0.011904762	109.9738714
IL6	68	0.011627907	92.36725735
MMP9	68	0.011627907	97.11106823

表 4 槲皮素与核心治疗靶点分子对接结果

Table 4 Molecular docking results of quercetin and key targets

配体化合物 Ligand compound	受体蛋白 Receptor protein	PUB 编号 PUB ID	结合能/(KJ/mol) Binding energy
Quercetin	AKT1	3CQW	-4.28
Quercetin	TP53	5O1E	-4.61
Quercetin	HIF1A	1LQB	-2.73
Quercetin	CASP3	3H0E	-4.87
Quercetin	IL6	6MG1	-4.69
Quercetin	MMP9	8KY5	-4.17



注:A:KEGG 富集分析气泡图;B:“治疗靶点-KEGG 通路”网络。

图 4 KEGG 富集分析

Note. A, KEGG enrichment analysis bubble diagram. B, “Target-KEGG pathway” network.

Figure 4 KEGG enrichment analysis

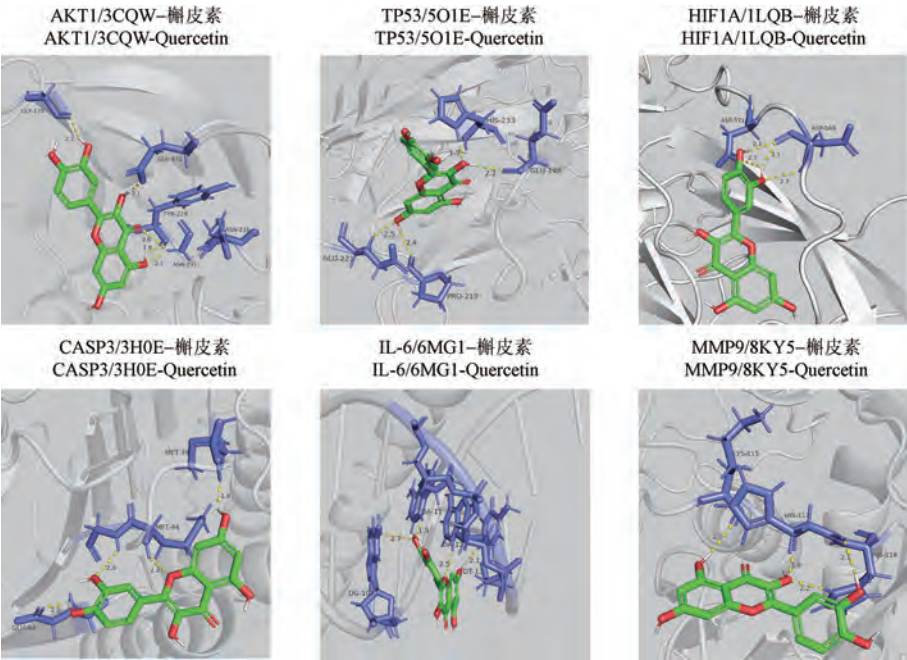
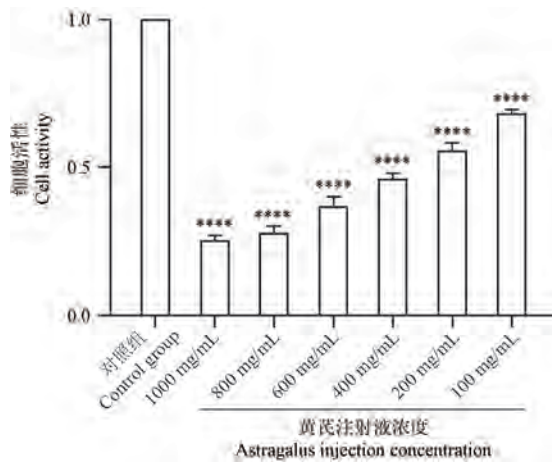


图 5 分子对接结果

Figure 5 Molecular docking results

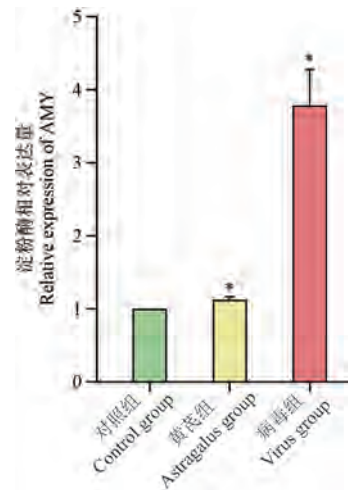


注:与对照组相比, **** $P < 0.0001$ 。

图 6 不同浓度黄芪注射液干预 BCPC-3 细胞 24 h 后细胞活性

Note. Compared with control group, **** $P < 0.0001$.

Figure 6 Cell activity of BCPC-3 cells was intervened by different concentrations of astragalus injection for 24 hours

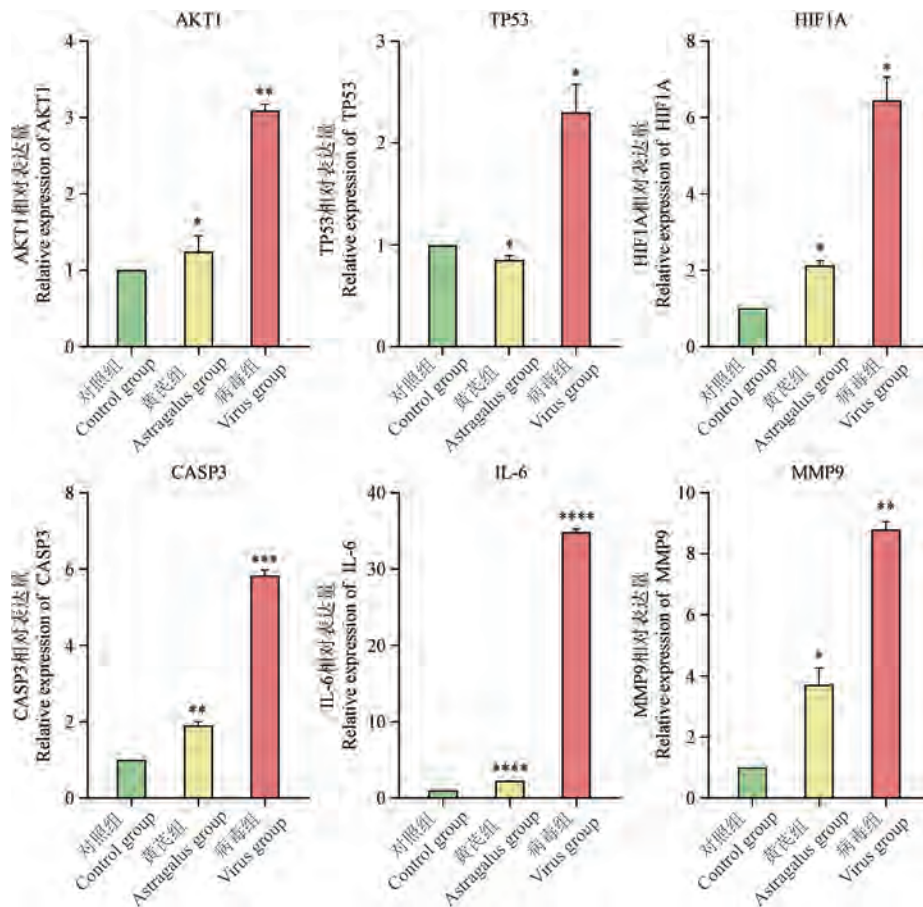


注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 7 CVB3 感染 BxPC-3 细胞后淀粉酶 RNA 表达水平

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

Figure 7 Expression level of serum amylase RNA in BxPC-3 cells infected with CVB3



注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 8 黄芪注射液治疗病毒性胰腺炎核心靶点 RNA 表达水平

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Figure 8 Expression level of core target RNA of Astragalus injection in the treatment of viral pancreatitis

3 讨论

病毒性胰腺炎在中医临床上属于“腹痛”范畴,病机为肝胆疏泄失司,三焦通降受阻,实热、湿热、毒邪积滞中焦,腑气不通,可佐以利湿化浊、活益气扶正之品^[14]。黄芪作为传统补气药,有着补脾益气、脱毒生肌等功效^[15]。

本文研究结果显示黄芪治疗病毒性胰腺炎的有效成分为槲皮素、山萘酚、刺芒柄花素、异鼠李素、毛蕊异黄酮等。既往研究表明,使用槲皮素治疗 AP 时,治疗组胰腺外形重量、淀粉酶数值、病理炎症评分均显著低于对照组,治疗机制可能与抑制 NF- κ B 的表达相关^[16-17]。此外,毛蕊异黄酮可以通过调控 TREM-1 表达减轻胰腺腺泡细胞炎症,诱导细胞凋亡^[18]。但对于山萘酚、刺芒柄花素、异鼠李素治疗 AP 的作用及机制尚未见报道,有待进一步研究。

根据 GO 分析结果,黄芪治疗病毒性胰腺炎的治疗靶点的细胞组分主要包括细胞核、细胞液、细胞质等组成部分,并可能通过影响相应靶点的蛋白结合、酶结合等功能,从而调控基因转录、基因表达等生物过程。KEGG 结果显示治疗过程主要涉及癌症通路、PI3K-AKT 信号通路、脂质与动脉粥样硬化等通路。

本文通过构建黄芪治疗病毒性胰腺炎 PPI 网络,发现核心治疗靶点主要为 AKT1、TP53、HIF1A、CASP3、IL-6、MMP9。既往研究表明,以上靶点在 AP 致病过程中均具有重要意义。AP 疾病进展中,胰蛋白酶原的激活依赖 PI3K-AKT 途径,抑制 AKT1 表达可通过减少胰腺酶的激活降低炎症组织损伤^[19]。胡涛等^[20]发现,橘皮苷可以通过降低 AKT1、IL-6 表达量,减轻 AP 大鼠模型的肺损伤。TP53 编码的 P53 蛋白质激活后可通过诱导腺泡细胞凋亡促进 AP 疾病进展^[21]。HIF-1 α 可诱导胰腺内凝血、升高淀粉酶与脂肪酶的基因表达^[22]。王晓东等^[23]通过临床试验发现黄芩汤可通过降低血清 HIF-1 α 水平发挥抗炎作用。BAX/BCL2/CASP3 凋亡信号传导通路可介导病毒性胰腺炎的炎症反应以及细胞凋亡^[24]。WANG 等^[25]发现 miR-339-3 可通过降低 CASP3 表达水平治疗 AP。AP 中,IL-6 由坏死的胰腺腺泡细胞释放,其通过介导中性粒细胞的迁移与爆

发、激活 JAK/STAT 信号通路等途径参与全身炎症反应与组织损伤^[26]。既往研究表明,黄芪多糖能降低 IL-6 表达水平,从而减轻 AP 模型大鼠的炎症反应,大黄牡丹汤可以通过降低 IL-6 水平减轻 AP 大鼠的肝损伤^[27-28]。MMP9 是 FasL/Fas 通路的上游调节因子,诱导 AP 的肠道屏障损伤与细胞凋亡,其在 AP 患者血清中高表达,与坏死感染情况、病情程度紧密相关^[29-30]。

血淀粉酶作为 AP 的特异性标志物,是临床诊断 AP 的重要指标^[31]。此外,IL-6 对于诊断 AP 具有参考意义^[32]。根据本文细胞实验 PCR 结果,相较于对照组,病毒组血淀粉酶、IL-6 表达水平显著升高,表明本文通过使用 CVB3 病毒成功构建由病毒感染诱导的 AP 细胞模型,即病毒性胰腺炎细胞模型。同时,黄芪组 AMY、IL-6 两项指标表达水平均远低于病毒组,表明黄芪能有效治疗病毒性胰腺炎。本实验黄芪组 TP53 表达水平低于对照组,但两者间无统计学意义。原因可能为本实验使用的 BxPC-3 细胞系为人原位胰腺腺癌细胞,野生型 TP53 基因可诱导癌症发生,此前有研究表明黄芪可治疗胰腺癌,故可能因此黄芪组 TP53 表达水平低于对照组^[33-34]。总之,相较于病毒组,黄芪注射液能显著下调 AKT1、TP53、HIF1A、CASP3、IL-6、MMP9 表达水平,故黄芪注射液可能通过作用于上述靶点发挥治疗效果。

病毒性胰腺炎作为由病毒感染诱发的特发性 AP,相应的药物治疗和机制研究都鲜有报道,本文基于网络药理学和细胞试验发现黄芪注射液对于病毒性胰腺炎具有潜在的治疗效果,其治疗作用涉及多成分、多靶点的联合作用,并可能通过降低 AKT1、TP53、HIF1A、CASP3、IL-6、MMP9 表达水平发挥治疗作用。

参考文献:

- [1] LANKISCH P G, APTE M, BANKS P A. Acute pancreatitis [J]. *Lancet*, 2015, 386(9988): 85-96.
- [2] 钟焕英, 刘礼剑, 黎丽群, 等. PI3K/AKT 信号通路 with 急性胰腺炎相关研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25(2): 139-144.
- ZHONG H Y, LIU L J, LI L Q, et al. Research progress on the relationship between PI3K/AKT signaling pathway and acute pancreatitis [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*,

- 2023, 25(2): 139–144.
- [3] RAMSINGH A I. Cocksackieviruses and pancreatitis [J]. Front Biosci, 1997, 2: e53–e62.
- [4] SIMONS-LINARES C R, IMAM Z, CHAHAL P. Viral-attributed acute pancreatitis: a systematic review [J]. Dig Dis Sci, 2021, 66(7): 2162–2172.
- [5] SAKORAFAS G H, TSIOTOU A G. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts [J]. J Clin Gastroenterol, 2000, 30(4): 343–356.
- [6] CAPNER P, LENDRUM R, JEFFRIES D J, et al. Viral antibody studies in pancreatic disease [J]. Gut, 1975, 16(11): 866–870.
- [7] RAMSINGH A I. CVB-induced pancreatitis and alterations in gene expression [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2008, 323: 241–258.
- [8] LIU W H, REN L N, CHEN T, et al. Abdominal paracentesis drainage ahead of percutaneous catheter drainage benefits patients attacked by acute pancreatitis with fluid collections: a retrospective clinical cohort study [J]. Crit Care Med, 2015, 43(1): 109–119.
- [9] 黄正桥. 黄芪注射液穴位注射治疗急性胰腺炎 38 例 [J]. 江西中医药, 2013, 44(6): 54–55.
HUANG Z Q. Treatment of 38 cases of acute pancreatitis by acupoint injection of *Astragalus* injection [J]. Jiangxi J Tradit Chin Med, 2013, 44(6): 54–55.
- [10] 张琪, 张会芳, 李兆洋, 等. 黄芪注射液对急性胰腺炎患者氧化应激状态及肠黏膜屏障功能的影响 [J]. 吉林中医药, 2021, 41(12): 1616–1619.
ZHANG Q, ZHANG H F, LI Z Y, et al. Effects of Huangqi Injection on the oxidative stress and intestinal mucosal barrier function in patients with acute pancreatitis [J]. Jilin J Chin Med, 2021, 41(12): 1616–1619.
- [11] 姜辉, 顾胜龙, 张玉婷, 等. 黄芪化学成分和药理作用研究进展 [J]. 安徽中医药大学学报, 2020, 39(5): 93–96.
JIANG H, GU S L, ZHANG Y T, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Astragalus membranaceus* [J]. J Anhui Univ Chin Med, 2020, 39(5): 93–96.
- [12] 陈品良, 陈汉裕, 陈梓欣, 等. 基于网络药理学探讨黄芪治疗病毒性心肌炎的作用机制 [J]. 世界中医药, 2021, 16(23): 3491–3495.
CHEN P L, CHEN H Y, CHEN Z X, et al. Investigation of mechanisms of *Radix astragali* seu *hedysari* in the treatment of viral myocarditis based on a network pharmacology approach [J]. World Chin Med, 2021, 16(23): 3491–3495.
- [13] 姜瀚, 陈金润, 王倩雯, 等. 基于网络药理学、分子对接和实验验证探讨参苓白术颗粒治疗特应性皮炎的作用机制 [J]. 安徽中医药大学学报, 2025, 44(1): 96–102.
- JIANG H, CHEN J R, WANG Q W, et al. Mechanism of action of Shenling Baizhu Granule in treatment of atopic dermatitis: a study based on network pharmacology, molecular docking, and experimental validation [J]. J Anhui Univ Chin Med, 2025, 44(1): 96–102.
- [14] 孙安, 刘汉顺, 盛超. 中药内注外敷疗法联合西医常规治疗急性胰腺炎湿热瘀滞证临床观察 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2024, 32(5): 432–435.
SUN A, LIU H S, SHENG C. Clinical observation on the combination of traditional Chinese medicine internal injection and external application therapy with Western medicine routine treatment for damp heat and stasis syndrome in acute pancreatitis [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2024, 32(5): 432–435.
- [15] 李中豪, 顾凯元, 任晋宏. 基于网络药理学和分子对接探讨黄芪治疗病毒性心肌炎的作用机制 [J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(7): 1223–1233, 1212.
LI Z H, GU K Y, REN J H. Study on the mechanism of *Astragali Radix* in the treatment of viral myocarditis based on network pharmacology and molecular docking [J]. Nat Prod Res Dev, 2022, 34(7): 1223–1233, 1212.
- [16] 方丽, 周进, 李小安, 等. 槲皮素对小鼠急性胰腺炎治疗效果研究 [J]. 四川医学, 2012, 33(12): 2039–2041.
FANG L, ZHOU J, LI X A, et al. Effect of quercetin on treating acute rat pancreatitis [J]. Sichuan Med J, 2012, 33(12): 2039–2041.
- [17] 方丽, 何峰, 李小安, 等. 槲皮素对急性胰腺炎小鼠核转录因子 NF- κ B 表达的影响 [J]. 四川医学, 2016, 37(5): 488–490.
FANG L, HE F, LI X A, et al. The effect of quercetin on nuclear transcription factor NF- κ B's expression in mice with acute pancreatitis [J]. Sichuan Med J, 2016, 37(5): 488–490.
- [18] 陈晓琴, 黄小英, 丁文. 毛蕊异黄酮通过调控 TREM-1 表达对重症急性胰腺炎腺泡细胞损伤的影响 [J]. 新中医, 2021, 53(4): 1–6.
CHEN X Q, HUANG X Y, DING W. Effect of calycosin on acinar cell injury in severe acute pancreatitis by regulating TREM-1 expression [J]. J New Chin Med, 2021, 53(4): 1–6.
- [19] SARKER R S, STEIGER K. A critical role for Akt1 signaling in acute pancreatitis progression [J]. J Pathol, 2020, 251(1): 1–3.
- [20] 胡涛, 冯强, 王媛媛, 等. 橘皮苷通过调控 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路减轻重症急性胰腺炎大鼠肺损伤的实验研究 [J]. 武警后勤学院学报(医学版), 2019, 28(9): 13–18.
HU T, FENG Q, WANG Y Y, et al. Experimental study of

- hesperidin on reducing lung injury in rats with severe acute pancreatitis by regulating PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway [J]. J Logist Univ PAP Med Sci, 2019, 28(9): 13-18.
- [21] ZHOU L, TAN J H, ZHOU W Y, et al. P53 activated by ER stress aggravates caerulein-induced acute pancreatitis progression by inducing acinar cell apoptosis [J]. Dig Dis Sci, 2020, 65(11): 3211-3222.
- [22] PARK M J, IYER S, XUE X, et al. HIF1- α regulates acinar cell function and response to injury in mouse pancreas [J]. Gastroenterology, 2018, 154(6): 1630-1634.
- [23] 王晓东, 朱兴, 李东屿. 黄芩汤联合序贯肝动脉化疗栓塞术对原发性肝癌患者血清 NF- κ B、HIF-1 α 、AFP 水平和肝功能的影响 [J]. 长春中医药大学学报, 2022, 38(2): 175-178.
- WANG X D, ZHU X, LI D Y. Effects of Huangqin Decoction combined with sequential hepatic arterial chemoembolization on the serum levels of NF- κ B, HIF-1 α and AFP and the liver function in patients with primary hepatic carcinoma [J]. J Changchun Univ Chin Med, 2022, 38(2): 175-178.
- [24] YU X, ZHANG Y, PEI K, et al. *Lactiplantibacillus plantarum* attenuates Cocksackievirus B3-induced pancreatitis through the BAX/BCL2/CASP3 signaling pathway [J]. Food Funct, 2023, 14(9): 4129-4142.
- [25] WANG Q, LIU S, HAN Z. miR-339-3p regulated acute pancreatitis induced by caerulein through targeting TNF receptor-associated factor 3 in AR42J cells [J]. Open Life Sci, 2020, 15(1): 912-922.
- [26] MITITELU A, GRAMA A, COLCERIU M C, et al. Role of interleukin 6 in acute pancreatitis; a possible marker for disease prognosis [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(15): 8283.
- [27] 孙银凤, 杨丹, 白敏, 等. 大黄牡丹汤对急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 169-176.
- SUN Y F, YANG D, BAI M, et al. Protective effect of Dahuang Mudan Decoction on liver injury in rats with acute pancreatitis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 169-176.
- [28] 孙银凤, 杨丹, 白敏, 等. 大黄牡丹汤对急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 169-176.
- SUN Y F, YANG D, BAI M, et al. Protective effect of Dahuang Mudan Decoction on liver injury in rats with acute pancreatitis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 169-176.
- [29] MO Y, ZHANG X, LAO Y, et al. Fentanyl alleviates intestinal mucosal barrier damage in rats with severe acute pancreatitis by inhibiting the MMP-9/FasL/Fas pathway [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2022, 44(5): 757-765.
- [30] 苏华, 陈琛, 许玉环, 等. 急性胰腺炎患者血清中 MMP-9、IL-10 及 B7-H3 的表达及意义 [J]. 广东医学, 2020, 41(22): 2335-2338.
- SU H, CHEN C, XU Y H, et al. Expression and significance of MMP-9, IL-10 and B7-H3 in serum of patients with acute pancreatitis [J]. Guangdong Med J, 2020, 41(22): 2335-2338.
- [31] 李非, 曹锋. 中国急性胰腺炎诊治指南(2021) [J]. 中国实用外科杂志, 2021, 41(7): 739-746.
- LI F, CAO F. Guidelines for diagnosis and treatment of acute pancreatitis in China(2021) [J]. Chin J Pract Surg, 2021, 41(7): 739-746.
- [32] 何平, 郑海波. C 反应蛋白、降钙素原和白细胞介素 6 在早期急性胰腺炎合并感染中的诊断价值分析 [J]. 中国医药指南, 2024, 22(18): 18-21.
- HE P, ZHENG H B. Diagnostic value analysis of C-reactive protein, procalcitonin, and interleukin-6 in early acute pancreatitis complicated with infection [J]. Guide China Med, 2024, 22(18): 18-21.
- [33] JUN H H, KWACK K, LEE K H, et al. Association between TP53 genetic polymorphisms and the methylation and expression of miR-34a, 34b/c in colorectal cancer tissues [J]. Oncol Lett, 2019, 17(5): 4726-4734.
- [34] 王一休, 薛伟杰, 刘鹏, 等. 基于网络药理学探讨黄芪对胰腺癌的作用机制 [J]. 精准医学杂志, 2019, 34(6): 518-523.
- WANG Y X, XUE W J, LIU P, et al. Mechanism of action of *Astragalus membranaceus* in treatment of pancreatic cancer: an analysis based on network pharmacology [J]. J Precis Med, 2019, 34(6): 518-523.

[收稿日期] 2024-08-21

牛弘璘,杨木,曹琳,等. EV71 通过 Caspase-1/IL-1 β 信号通路诱导 BALB/c 乳鼠骨骼肌损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(5): 12-23.

Niu HL, Yang M, Cao L, et al. Enterovirus 71 induced skeletal muscle injury in BALB/c lactating mice via the caspase-1/interleukin-1 β signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(5): 12-23.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.05.002

EV71 通过 Caspase-1/IL-1 β 信号通路诱导 BALB/c 乳鼠骨骼肌损伤

牛弘璘¹, 杨 木¹, 曹 琳⁴, 邹欣宏¹, 陈雨菲¹, 石国欣², 刘 蕾^{3*},
王柏欣^{3*}, 崔国利^{1,2*}

(1.佳木斯大学临床医学院,黑龙江 佳木斯 154007;2.佳木斯大学第一附属医院医学检验科,黑龙江 佳木斯 154007;
3.佳木斯大学基础医学院,黑龙江 佳木斯 154007;4.佳木斯国际旅行卫生保健中心(佳木斯海关口岸门诊部),
黑龙江 佳木斯 154000)

【摘要】 目的 观察 EV71 型肠道病毒(Enterovirus 71, EV71)诱导骨骼肌损伤的影响,探讨 caspase-1/IL-1 β 信号通路在 EV71 诱导的骨骼肌损伤中的作用机制。**方法** 将 1 日龄 BALB/c 乳鼠随机分为 3 组,正常对照(normal control, NC)组 60 只、EV71 感染组 60 只、caspase-1 抑制剂(EV71+VX-765)组 15 只。正常对照组及 EV71 感染组各随机分为 5 d、7 d、10 d、14 d 4 个亚组,每亚组 15 只。将 25 mL/kg 的 EV71 病毒液,腹腔注射到 1 日龄 BALB/c 乳鼠体内,连续注射 3 d,建立 EV71 感染组模型。在病毒接种后 6 h 腹腔注射 caspase-1 抑制剂 VX-765(20 mg/kg),连续 10 d 接种,直至取材,建立 caspase-1 抑制剂组模型。同时,正常对照组等体积注射含有 5% DMSO+10% PEG300 的生理盐水,6 h 后注射 2% 的细胞维持液。造模成功后,记录各组 BALB/c 乳鼠体质量和疾病评分,苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察骨骼肌病理损伤,蛋白免疫印迹(Western blot)和免疫荧光(immunofluorescence, IF)检测肠道病毒 71 型病毒蛋白 1(Enterovirus 71 viral protein 1, EV71 VP-1)、前体胱天蛋白酶-1(pro-cysteine-dependent aspartate-specific protease-1, pro-caspase-1)、切割型胱天蛋白酶-1(cleaved cysteine-dependent aspartate-specific protease-1, cleaved-caspase-1)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)、 α -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, α -SMA)、I 型胶原蛋白(Collagen type I, Collagen I)蛋白的表达。**结果** 与同时时间点正常对照组相比, EV71 感染组乳鼠体质量减轻,疾病评分升高; EV71 感染组乳鼠骨骼肌组织 HE 染色可见炎性细胞大量浸润、肌束断裂溶解,肌肉组织横截面积减少; Western blot 结果显示,与正常对照组相比, EV71 感染组乳鼠 5 d、7 d、10 d 骨骼肌组织匀浆中 EV71 VP-1、IL-1 β 、 α -SMA 和 Collagen I 水平均明显升高($P<0.001$); 与 EV71 感染组相比, EV71+VX-765 组乳鼠体质量升高及临床疾病评分降低($P<0.01$), Western blot 与免疫荧光结果一致显示, caspase-1 抑制剂可以显著降低 EV71 感染组乳鼠骨骼肌组织匀浆中 EV71 VP-1 蛋白表达($P<0.01$), 下调 pro-caspase-1、cleaved-caspase-1、IL-1 β 和 Collagen I 蛋白水平($P<0.001$), 抑制 caspase-1 减弱了 EV71 病毒对 BALB/c 乳鼠骨骼肌损伤作用。**结论** EV71 可能通过激活 caspase-1/IL-1 信号通路诱导骨骼肌损伤。

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金(LH2023H004); 佳木斯大学“东极”研究团队(DJXSTD202405)。

[作者简介] 牛弘璘(1997—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: EV71 病毒的发病机制。E-mail: m15965809764@163.com

[通信作者] 崔国利(1974—), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 病毒发病机制及药物防治。E-mail: cuiguoli@jmsu.edu.cn

刘蕾(1973—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 病毒发病机制及药物防治。E-mail: liuleitianxue@163.com

王柏欣(1969—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 肿瘤病毒的发病机制及防治研究。E-mail: wangbaixin@jmsu.edu.cn

* 共同通信作者

【关键词】 EV71; BALB/c 乳鼠; 炎症; caspase-1; 纤维化

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856 (2025) 05-0012-12

Enterovirus 71 induced skeletal muscle injury in BALB/c lactating mice via the caspase-1/interleukin-1 β signaling pathway

NIU Honglin¹, YANG Mu¹, CAO Lin⁴, ZOU Xinhong¹, CHEN Yufei¹, SHI Guoxin², LIU Lei^{3*},
WANG Baixin^{3*}, CUI Guoli^{1,2*}

(1. Clinical Medicine Department, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China.

2. Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154007.

3. Basic Medical College of Jiamusi University, Jiamusi 154007. 4. Jiamusi International Travel Health Care Center (Jiamusi Customs Port Outpatient Department), Jiamusi 154000)

【Abstract】 Objective To investigate the impact of enterovirus 71 (EV71) on skeletal muscle injury and explore its mechanism in relation to the caspase-1/interleukin (IL)-1 β signaling pathway in EV71-induced skeletal muscle damage. **Methods** One-day-old BALB/c suckling mice were divided randomly into three groups: normal control (NC) ($n=60$), EV71 infection model ($n=60$), and caspase-1 inhibitor (EV71+VX765) ($n=15$) groups. The NC and EV71 model groups were further subdivided into four subgroups (5, 7, 10, and 14 days) ($n=5$ mice per group). An EV71-infected model was established by intraperitoneal injection of 25×10^3 μ L/kg EV71 viral solution for 3 consecutive days. Mice in the caspase-1 inhibitor group received VX765 (20 mg/kg) intraperitoneally 6 hours post-viral inoculation, continued daily for 10 days until sample collection. Mice in the NC group received an equivalent volume of saline containing 5% dimethylsulfoxide and 10% PEG300, followed by 2% cell maintenance solution after 6 hours. Post-modeling body weight and clinical disease scores were recorded. Pathological skeletal muscle damage was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and expression levels of EV71 VP-1 (viral capsid protein), pro-caspase-1, cleaved-caspase-1, IL-1 β , α -smooth muscle actin (SMA), and Collagen I were detected by Western blot and immunofluorescence. **Results** Compared with the NC group at the same time points, mice in the EV71 model group exhibited reduced body weight, elevated disease scores, and skeletal muscle pathology characterized by inflammatory cell infiltration, myofiber dissolution, and decreased cross-sectional area (HE staining). Western blot showed significantly increased levels of EV71 VP-1, IL-1 β , α -SMA, and Collagen I in skeletal muscle homogenate from EV71 mice at 5, 7, and 10 days post-infection ($P<0.001$). In contrast, mice in the VX765 group showed improved body weight, reduced clinical scores ($P<0.01$), and significant downregulation of EV71 VP-1 ($P<0.01$), pro-caspase-1, cleaved-caspase-1, IL-1 β , and Collagen I compared with the EV71 model group ($P<0.01$). These findings were confirmed by immunofluorescence, indicating that inhibition of caspase-1 alleviated EV71-induced skeletal muscle injury. **Conclusions** EV71 may induce skeletal muscle injury by activating the caspase-1/IL-1 β signaling pathway.

【Keywords】 EV71; BALB/c suckling mice; inflammation; caspase-1; fibrosis

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

手足口病(hand, foot, and mouth disease, HFMD)是临床上常见的感染性疾病,3岁以下儿童发病率最高。尤其在亚太地区, EV71型病毒引发的 HFMD 频繁暴发,往往产生致命的神经毒性和其他并发症导致患儿死亡^[1]。1969年, EV71型病毒首次在美国加利福尼亚州发现并分

离,随后 EV71 在全国范围内传播,对公共卫生系统构成持续挑战^[2-4]。据统计,2024年5月,全国手足口病的报告病例数量同比增加了 150.11%,重症病例则增长了 47.06%^[3]。在 HFMD 的重症病例中,大部分病情危急的患儿都与 EV71 病毒的感染有着直接的关联^[4]。目前,除了糖皮质激

素外,没有有效和安全的方法来治疗严重的手足口病。因此,揭示其分子机制进而探索安全有效的治疗策对重症手足口病的治疗至关重要。

近年来,病毒引起骨骼肌损伤的研究已经成为热点领域。研究表明,EB 病毒可导致骨骼肌损伤,引起淋巴细胞浸润导致肌炎样改变^[5]。EV71 是一种嗜神经病毒,以往研究主要集中在 EV71 对神经元损伤及所导致的严重神经系统并发症,如无菌性脑膜炎、脑干脑炎、肺水肿、心肌炎等^[6-9],对其他症状关注相对较少。除此以外,研究人员还发现患儿感染后的恢复通常还伴有肢体无力和萎缩等后遗症^[10-13]。进一步探索发现, EV71 也可直接感染骨骼肌细胞,相较于肝、大脑和肾, EV71 病毒首先在骨骼肌中复制,并导致严重的肌炎和骨骼肌溶解。值得注意的是,某医院收治的 288 例重症和危重症手足口病患者中,有 16 例发生了急性弛缓性麻痹(AFP),表现为肌张力减弱、肌力下降和腱反射减弱或消失^[14-16]。因此,探究 EV71 诱导骨骼肌损伤及其发病机制,能够为临床手足口病的预防和治疗提供新思路。

Caspases 是一种半胱氨酸蛋白酶,可以募集和激活局部组织中的炎症细胞产生炎症反应。其中, caspase-1 的激活在 EV 病毒诱导的心、肺等部位的炎症和纤维化中具有重要作用^[17-18]。Caspase-1 具有促炎性,是 NLRP3 炎性小体的一种效应蛋白,通过对 pro-IL-1 β 等炎性因子前体的加工修饰,以促进其成熟、分泌^[19]。因此,本研究拟通过 caspase-1 阻断鼠 EV71 感染模型,探讨 caspase-1/IL-1 β 信号通路在 EV71 感染骨骼肌损伤中的分子机制,为 caspase-1 作为 EV71 感染的抗病毒治疗靶点提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

6~8 周龄 SPF 级成年 BALB/c 小鼠,雌性 40 只,雄性 20 只,体质量 18~20 g,实验前适应性饲养 10 d,按 2:1 比例随机将雌鼠与雄鼠合笼,每天查看有无阴栓待孕鼠生产,取 1~14 日龄 SPF 级 BALB/c 乳鼠,实验期间乳鼠与母鼠同笼。成年 BALB/c 小鼠购自长春市亿斯实验动物技术有限公司[SCXK(吉)2020-0002],饲养于佳木斯大

学动物实验中心[SYXK(黑)2021-018]。本研究 中动物护理和使用程序严格按照《实验动物管理条例》(1988 年)和《中华人民共和国实验动物护理和使用指南》(2006 年)执行。动物实验经佳木斯大学实验动物福利与伦理管理委员会批准(jmsu-2023121401)。实验遵守 3R 原则。

1.1.2 病毒

EV71 病毒株(FY04-R5 C1-R4 20120518)由佳木斯大学病理生理学教研室保存。

1.2 主要试剂与仪器

VX-765 (selleckchem 公司, 273404-37-8); TGF- β (Santa cruz 公司, sc-36); IL-1 β (Santa cruz 公司, sc-1253); Collagen I (Santa cruz 公司, sc-25974); pro-caspase-1 抗体 (Santa cruz 公司, sc-56036); EV71 VP-1 抗体 (Abnova 公司, MAB1255-M08); cleaved-caspase-1 (Affinity 公司, AF4005); Masson 三色染色试剂(索莱宝公司, G1340); 488 标记山羊抗兔 IgG (碧云天生物公司, A0423); 488 标记山羊抗鼠 IgG (碧云天生物公司, A0428); CY3 标记山羊抗鼠 IgG (博士德生物公司, BA1031); CY3 标记山羊抗兔 IgG (博士德生物公司, BA1032); Triton X-100 (碧云天生物公司, ST1723); DAPI (博士德生物公司, AR1177)。激光共聚焦荧光显微镜(卡尔蔡司公司, LSM 900); 显微镜病理切片机(Leica 公司, RM2125 RTS); 全自动化学发光成像分析系统(Tanon 公司, 4600)。

1.3 实验方法

1.3.1 EV71 病毒制备

EV71 病毒被接种至 RD 细胞后,需使用 PBS 进行 3~4 次的洗涤操作,随后吸除 PBS 并继续对细胞进行培养。在显微镜下持续观察细胞形态变化,当细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)超过 80%时,收集病毒样本。通过 3 次冻融循环收集 EV71 病毒液,随后在 4℃、3000 r/min 的条件下离心 15 min。离心完成后,将上清液转移到 30 kDa 的超滤管里,然后在 4℃、6000 r/min 的条件下离心 30 min,以提取病毒浓缩液。最后,使用 0.22 μ m 的孔径滤膜来过滤病毒浓缩液,并对其进行分装储存。

1.3.2 EV71 毒力测定

通过测定 TCID₅₀ 值计算病毒滴度,将 RD 细胞接种在 96 孔板中长成单层细胞, EV71 病毒浓

缩液用含有 2% FBS 的维持液作 10 倍系列稀释加入 RD 细胞中,每一稀释浓度设 8 个复孔,同时设阴性对照,37 ℃ 培养 72 h,观察并记录 CPE,TCID₅₀ 是通过 Reed-Muench 方法根据 CPE 的百分比计算得出的。

1.3.3 动物分组与造模

取 1 日龄 BALB/c 乳鼠随机分为正常对照 (normal control, NC) 组 60 只、EV71 感染组 60 只、caspase-1 抑制剂 (EV71+VX-765) 组 15 只。将 EV71 病毒液 (通过 Reed-Muench 方法,计算出 EV71 的 TCID₅₀ 为 10^{-4.12}/mL) 25 mL/kg 腹腔注射到 1 日龄 BALB/c 乳鼠体内,连续注射 3 d,建立 EV71 感染鼠模型。在病毒接种后 6 h 腹腔注射 caspase-1 抑制剂 VX-765 (20 mg/kg),连续 10 d 接种,每天观察小鼠的精神状况、临床表现、体重变化及死亡情况,直至取材,建立 caspase-1 抑制剂组模型。同时,正常对照组等体积注射含有 5% DMSO+10% PEG300 的生理盐水,6 h 后注射 2% 的细胞维持液。

1.3.4 骨骼肌苏木素-伊红 (HE) 染色和 Masson 染色

将骨骼肌固定后使用乙醇脱水、石蜡包埋、切片,经过 HE 染色或 Masson 染色后封片,光学显微镜下观察骨骼肌组织病理学变化。

1.3.5 Western blot 检测骨骼肌中相关蛋白

取骨骼肌组织研磨后加入裂解液,提取蛋白进行蛋白浓度测定,经 SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h,加入一抗 cleaved-caspase-1 (兔单克隆抗体)、pro-caspase-1 (小鼠单克隆抗体)、IL-1β (小鼠单克隆抗体)、Collagen I (小鼠单克隆抗体)、EV71 VP-1 (兔单克隆抗体) (1:1000) 和 GAPDH 4 ℃ 孵育 12 h,加入二抗 (HRP 山羊抗鼠、HRP 山羊抗兔) (1:10 000) 室温孵育 1 h,避光加入曝光液,用凝胶成像系统计算灰度值并拍照,分析各组蛋白相对表达情况。

1.3.6 免疫荧光法检测蛋白表达

取已制备完成的石蜡切片,脱蜡、水化、盐酸乙醇灭活、抗原修复,5% BSA 封闭后加入一抗 (cleaved-caspase-1、pro-caspase-1、IL-1β、TGF-β、α-SMA、Collagen I、EV71 VP-1) 4 ℃ 孵育过夜, PBST 洗涤后添加对应种属的荧光二抗 37 ℃ 避光孵育 1 h, PBST 再次洗涤后添加 DAPI 染液,封片后在荧光显微镜下观察细胞染色情况。使用 Image J 1.54f 软件进行结果分析。

1.4 统计学方法

实验数据采用 GraphPad Prism 8.2 软件进行统计学分析,正态分布的连续变量以平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组之间比较采用 *t* 检验,多组间的差异采用单因素方差分析 (ANOVA)。 *P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

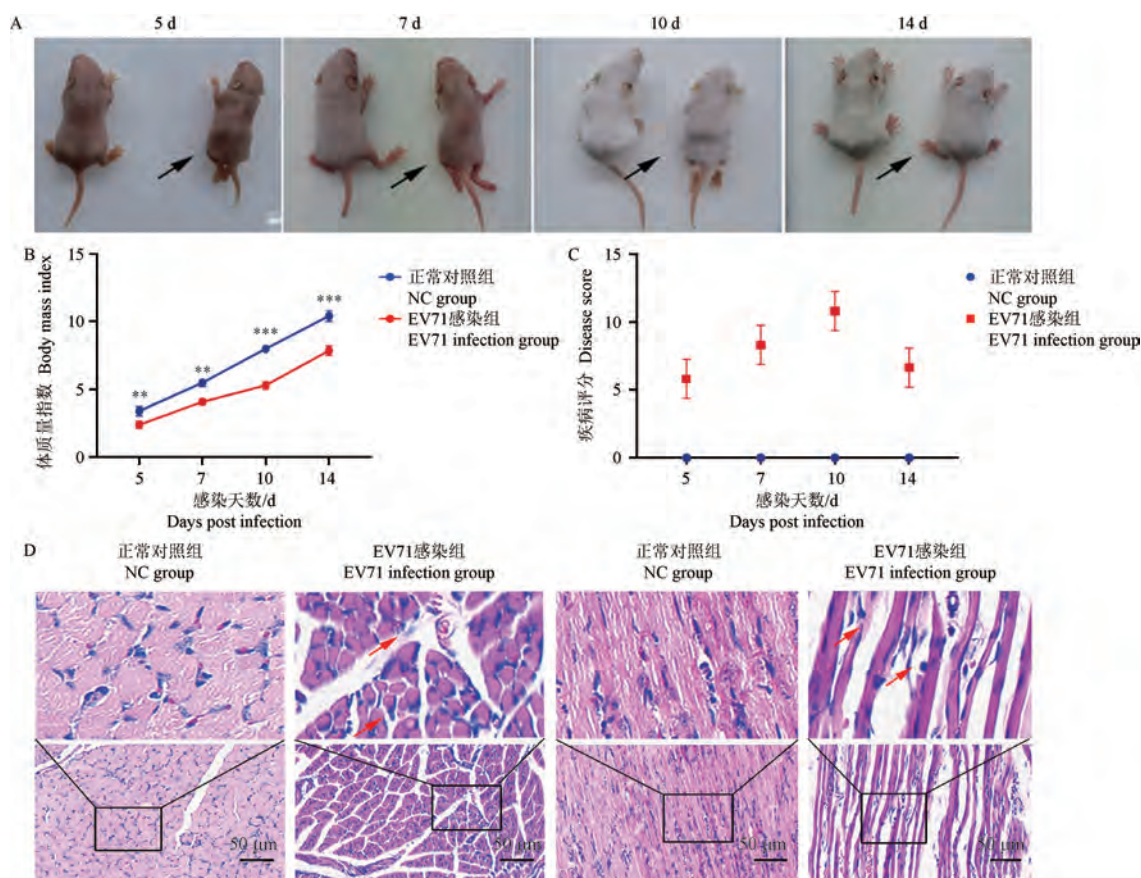
2 结果

2.1 EV71 感染 BALB/c 乳鼠模型的制备

正常对照组 BALB/c 乳鼠体质量稳定增长,皮毛顺滑;EV71 感染组 BALB/c 乳鼠自第 5 天出现身形瘦小、皮毛稀疏、体质量增长减缓和后肢瘫痪的表现 (图 1A)。比较 EV71 感染后 5 d、7 d、10 d 和 14 d 与同一时间点正常对照组 BALB/c 乳鼠的体质量和疾病评分,评分范围为 0~5 分,分数越高表示疾病严重程度越高 (0 分表示健康,5 分表示濒死状态或死亡)^[20]。结果显示,与同一时间点正常对照组相比, EV71 感染组 BALB/c 乳鼠的体质量增速减慢,体质量与正常对照相比下降 18%~30% (*P* < 0.001, 表 1),同时疾病评分增加 (图 1B~1C)。HE 染色后,观察到正常对照组乳鼠的骨骼肌结构完整,排列整齐,没有炎性细胞浸润的迹象;EV71 感染组乳鼠中,骨骼肌纤维排列紊乱,横截面积减少,可见到炎性细胞浸润并伴有充血 (图 1D)。EV71 感染乳鼠感染制备成功。

表 1 正常对照组和 EV71 感染组 BALB/c 乳鼠不同时间点的体质量 (*n* = 15)

Table 1 Body mass of BALB/c suckling mice in the normal group and EV71 model group at different time points (<i>n</i> = 15)				
组别 Groups	5 d	7 d	10 d	14 d
正常对照组 NC group	3.39±0.18	5.54±0.21	7.97±0.38	10.04±0.38
EV71 感染组 EV71 infection group	2.75±0.19	4.15±0.27	5.52±0.20	7.81±0.24
T	6.582	7.561	8.013	7.282
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001



注:A:EV71 病毒感染引起 BALB/c 乳鼠外观形态学改变;B: BALB/c 乳鼠体重分析;C: BALB/c 乳鼠疾病评分分析;D: BALB/c 乳鼠骨骼肌病理切片。与正常对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 1 EV71 感染乳鼠一般情况

Note. A, EV71 infection induced morphological changes in the appearance of BALB/c suckling mice. B, Body mass analysis of BALB/c suckling mice. C, Clinical disease score analysis of BALB/c suckling mice. D, Pathological sections of skeletal muscle in BALB/c suckling mice. Compared with the NC group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 1 General situation of EV71 infected suckling mice

2.2 EV71 对 BALB/c 乳鼠骨骼肌损伤的影响

与同一时间点正常对照组相比, EV71 感染组 EV71 VP-1 蛋白在 5 d、7 d、10 d、14 d 水平明显升高($P<0.001$), 其中 EV71 VP-1 蛋白在 EV71 感染第 10 天表达最高(图 2)。EV71 感染后 5 d、7 d、10 d 与同一时间点正常对照组比, EV71 感染组促炎细胞因子 IL-1 β 和 α -SMA、细胞外基质 Collagen I 蛋白均明显升高($P<0.001$)(图 2)。然而, 与正常对照组第 14 天相比, EV71 感染组第 14 天细胞外基质 Collagen I 蛋白差异无统计学意义。

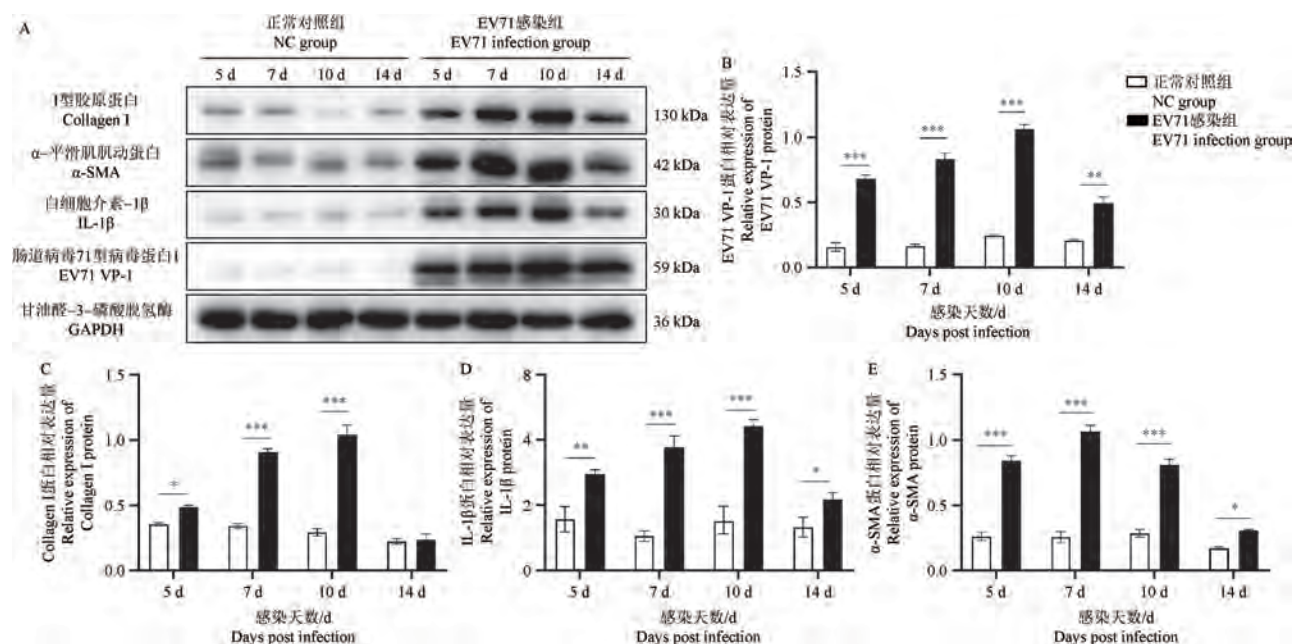
2.3 EV71 激活 caspase-1/IL-1 β 信号通路

Western blot 检测结果显示, 与正常对照组相

比, EV71 感染组 pro-caspase-1、cleaved-caspase-1 和 IL-1 β 蛋白水平明显升高($P<0.001$, 图 3)。使用 caspase-1 抑制剂 VX-765 后, EV71+VX-765 组骨骼肌组织匀浆中 pro-caspase-1、cleaved-caspase-1 和 IL-1 β 蛋白水平较 EV71 感染组明显降低($P<0.001$)。与免疫荧光检测结果相一致($P<0.01$, 图 4)。表明 EV71 能够激活 caspase-1/IL-1 β 信号通路。

2.4 阻断 caspase-1/IL-1 β 信号通路降低感染组乳鼠骨骼肌 TGF- β 、 α -SMA、Collagen I 的表达

由图 5 可见, 免疫荧光结果显示, 正常对照组中 EV71 VP-1 表达极低, 而 EV71 感染组骨骼肌中 EV71 VP-1 表达较高($P<0.001$), 且和正常对照组比, EV71 感染组 TGF- β 、 α -SMA 和 Collagen I

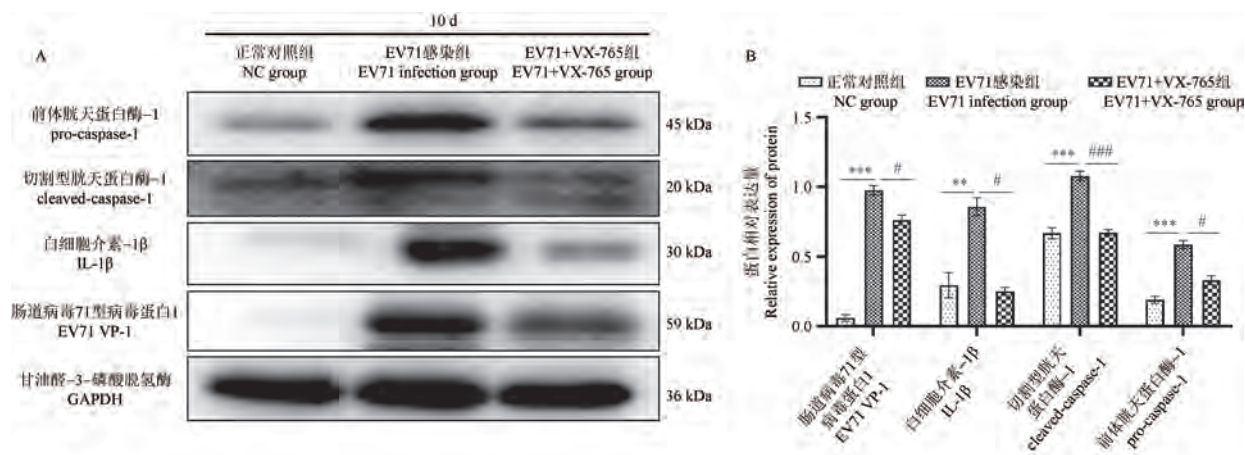


注:A:Western blot 检测骨骼肌样本中 EV71 VP-1、IL-1β、α-SMA、Collagen I 蛋白质水平;B~E:半定量分析表明 EV71 VP-1、Collagen I、IL-β 和 α-SMA 蛋白质变化。与正常对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 2 EV71 对 BALB/c 乳鼠骨骼肌损伤的影响

Note. A, Western blot analysis of protein levels of EV71 VP-1, IL-1β, α-SMA, and Collagen I in skeletal muscle samples. B, Semi-quantitative analysis revealed significant changes in EV71 VP-1, Collagen I, IL-β and α-SMA protein expression. Compared with NC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 2 Effect of EV71 on skeletal muscle damage in BALB/c suckling mice

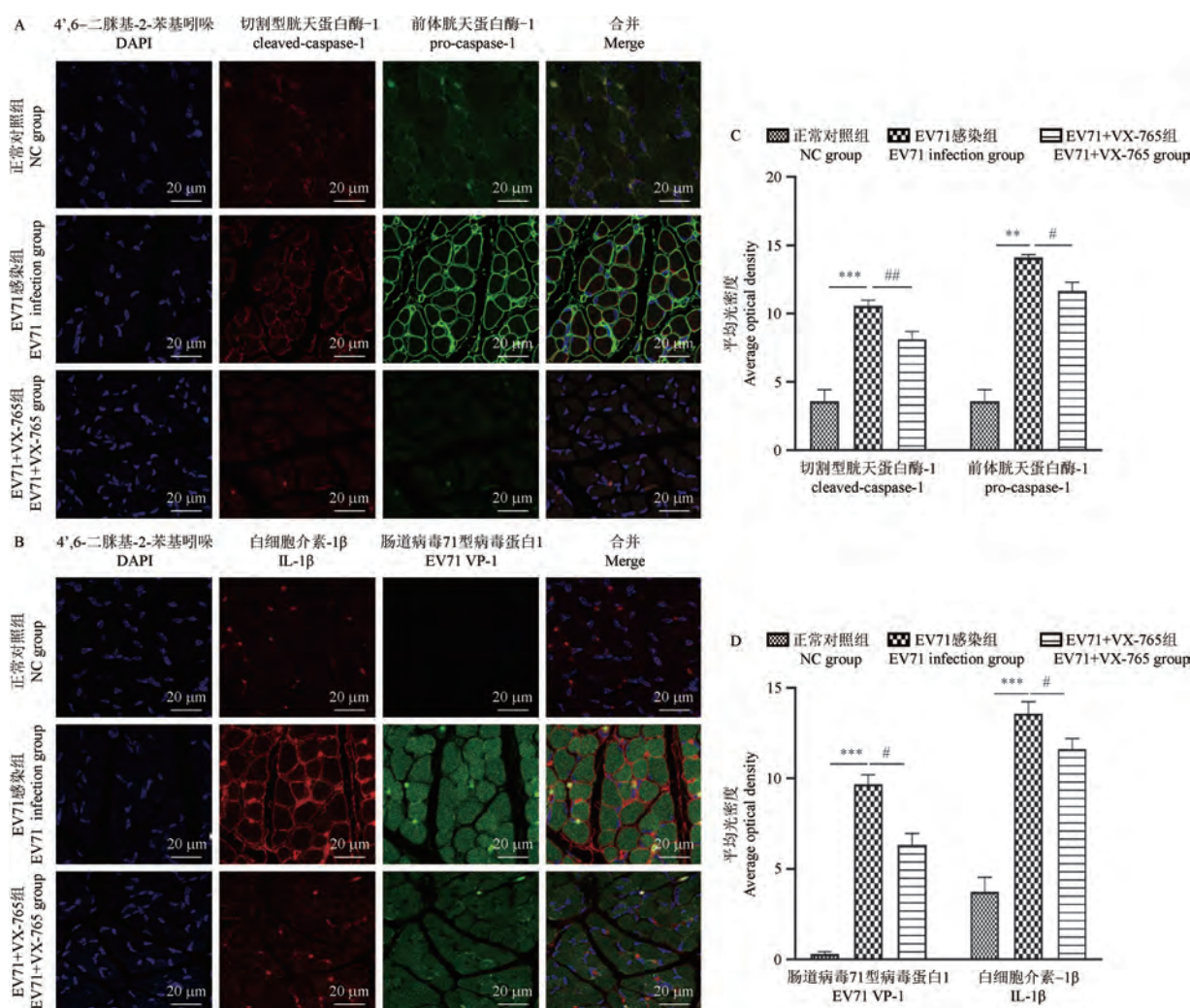


注:A:Western blot 检测 BALB/c 乳鼠骨骼肌组织匀浆中 EV71 VP-1、pro-caspase-1、cleaved-caspase-1 和 IL-1β 蛋白质表达;B:半定量分析表明 EV71 VP-1、pro-caspase-1、cleaved-caspase-1 和 IL-1β 蛋白质变化。与正常对照组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 EV71 感染组相比, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ 。

图 3 Western blot 检测 BALB/c 乳鼠骨骼肌组织 EV71 VP-1、pro-caspase-1、cleaved-caspase-1 和 IL-1β 蛋白水平

Note. A, Western blot analysis of protein expression levels of EV71 VP-1, pro-caspase-1, cleaved-caspase-1, and IL-1β in skeletal muscle tissue homogenates from BALB/c suckling mice. B, Semi-quantitative analysis revealed dynamic changes in the expression of EV71 VP-1, pro-caspase-1, cleaved-caspase-1, and IL-1β proteins. Compared with the NC group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with the EV71 infection group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$.

Figure 3 Western blot analysis of protein levels of EV71 VP-1, pro-caspase-1, cleaved-caspase-1, and IL-1β in skeletal muscle tissue from BALB/c suckling mice



注:A:免疫荧光共定位分析 pro-caspase-1 与 cleaved-caspase-1 在骨骼肌组织中的表达;B:免疫荧光共定位分析 EV71 VP-1 与 IL-1β 在骨骼肌组织中的表达;C:pro-caspase-1 与 cleaved-caspase-1 的相对荧光强度;D:EV71 VP-1 与 IL-1β 的相对荧光强度。与正常对照组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 EV71 感染组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

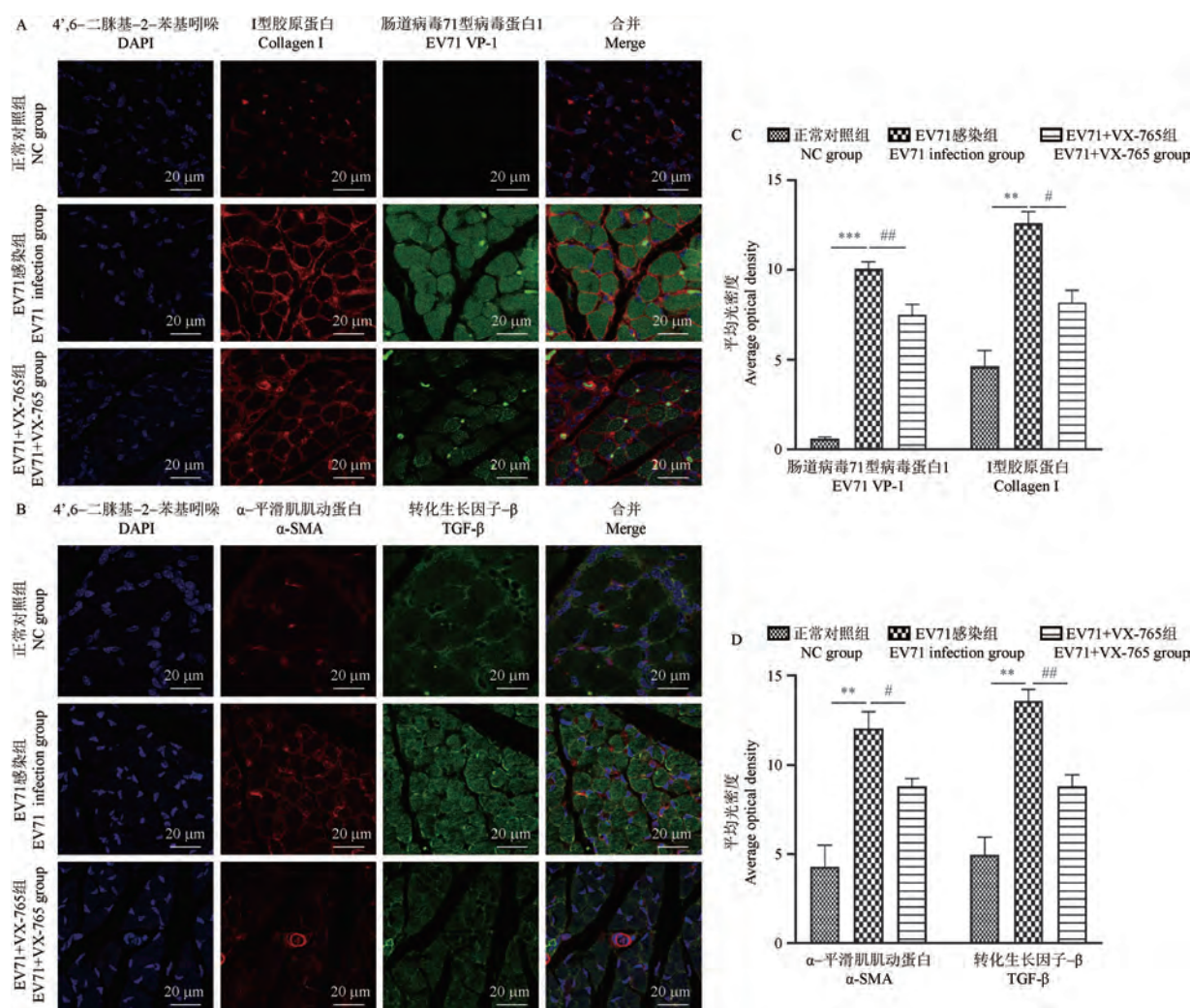
图 4 免疫荧光检测 BALB/c 乳鼠骨骼肌组织 EV71 VP-1、pro-caspase-1、cleaved-caspase-1 和 IL-1β 蛋白水平
Note. A, Immunofluorescence co-localization analysis of pro-caspase-1 and cleaved-caspase-1 in skeletal muscle tissues. B, Immunofluorescence co-localization analysis of EV71 VP-1 and IL-1β in skeletal muscle tissues. C, Relative fluorescence intensity quantification of pro-caspase-1 and cleaved-caspase-1 across experimental groups. D, Relative fluorescence intensity quantification of EV71 VP-1 and IL-1β across experimental groups. Compared with the NC group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with the EV71 infection group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 4 Immunofluorescence analysis of protein levels of EV71 VP-1, pro-caspase-1, cleaved-caspase-1, and IL-1β in skeletal muscle tissue from BALB/c suckling mice

表达均升高 ($P < 0.01$)。使用 caspase-1 抑制剂 (VX-765) 后, EV71 VP-1 和 TGF-β 的表达显著下调 ($P < 0.01$)。Western blot (图 6) 与免疫荧光结果一致, 与正常对照组相比, EV71 感染可以促进 α-SMA、Collagen I 的生成和释放 ($P < 0.01$), 使用 VX-765 治疗可以显著减少 EV71 感染组骨骼肌组织匀浆中 α-SMA 和 Collagen I 的高表达 ($P < 0.01$)。

2.5 阻断 Caspase-1/IL-1β 信号通路对骨骼肌病理变化的影响

观察阻断 caspase-1 对 EV71 诱导的 BALB/c 乳鼠骨骼肌炎症和纤维化的治疗作用, 评估 BALB/c 乳鼠体质量、疾病评分、病理骨骼肌组织变化。组织病理学评价显示, EV71 诱导的感染组骨骼肌结构紊乱、炎症细胞浸润、横纹肌断裂均较对照组严重 (图 7A)。胶原沉积是骨骼肌纤



注:A:免疫荧光共定位分析 EV71 VP-1 与 Collagen I 在骨骼肌组织中的表达;B:免疫荧光共定位分析 α -SMA 与 TGF- β 在骨骼肌组织中的表达;C:EV71 VP-1 与 Collagen I 的相对荧光强度;D: α -SMA 与 TGF- β 的相对荧光强度。与正常对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与 EV71 感染组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

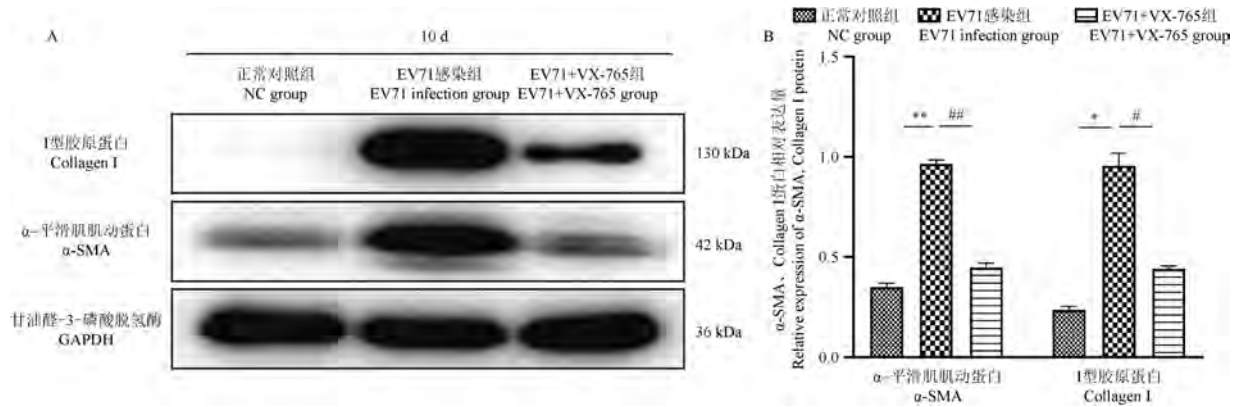
图 5 免疫荧光检测阻断 caspase-1/IL-1 β 信号通路可抑制 EV71 感染乳鼠骨骼肌 TGF- β 、 α -SMA、Collagen I 的表达

Note. A, Immunofluorescence co-localization analysis of EV71 VP-1 and Collagen I in skeletal muscle tissues. B, Immunofluorescence co-localization analysis of α -SMA and TGF- β in skeletal muscle tissues. C, Relative fluorescence intensity quantification of EV71 VP-1 and Collagen I across experimental groups. D, Relative fluorescence intensity quantification of α -SMA and TGF- β across experimental groups. Compared with the NC group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with the EV71 infection group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 5 Immunofluorescence analysis confirmed that pharmacological blockade of the caspase-1/IL-1 β signaling pathway significantly suppresses the expression of fibrosis-associated markers, including TGF- β , α -SMA and Collagen I in the skeletal muscle of EV71-infected suckling mice

维化的典型征象。对骨骼肌组织进行 Masson 染色。胶原纤维 Masson 染色显示大的蓝色纤维条纹。结果显示,感染组的蓝色纤维明显增加,阻断 caspase-1/IL-1 信号通路可缓解 EV71 诱导的骨骼肌组织的上述变化(图 7B)。研究发现, EV71 诱导感染组乳鼠的体质量明显低于正常对

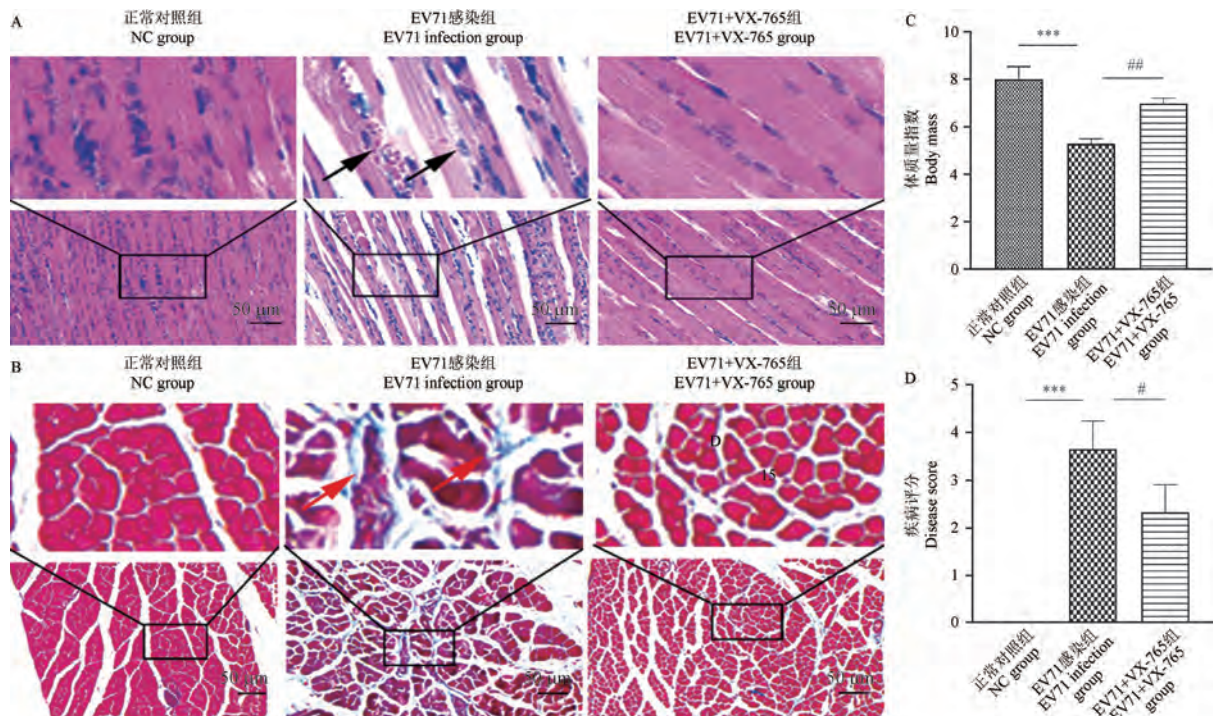
照组($P<0.001$),阻断 caspase-1 可以减轻 EV71 引起的体质量下降($P<0.01$,图 7C)。此外,对各组 BALB/c 乳鼠进行疾病评分分析,发现 EV71 诱导的感染组乳鼠疾病评分比正常对照组明显升高($P<0.001$),阻断 caspase-1 可以降低 EV71 引起的疾病评分的上调($P<0.05$,图 7D)。



注:A;Western blot 检测骨骼肌样本中 α-SMA 和 Collagen I 蛋白质水平;B;半定量分析表明 α-SMA 和 Collagen I 蛋白质变化。与正常对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 EV71 感染组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 6 Western blot 检测阻断 caspase-1/IL-1 β 信号通路可抑制 EV71 感染乳鼠骨骼肌 α-SMA、Collagen I 的表达
Note. A, Western blot analysis of protein levels of α-SMA and Collagen I in skeletal muscle samples. B, Semi-quantitative analysis revealed significant changes in α-SMA and Collagen I protein expression. Compared with the NC group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the EV71 infection group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 6 Western blot analysis demonstrated that blockade of the caspase-1/IL-1 β signaling pathway significantly suppresses the expression of α-SMA and Collagen I in the skeletal muscle of EV71-infected suckling mice



注:A;BALB/c 乳鼠骨骼肌病理学变化矢状切面;B;BALB/c 乳鼠骨骼肌 Masson 染色;C;BALB/c 乳鼠疾病体质量分析;D: BALB/c 乳鼠疾病评分分析。与正常对照组相比, *** $P<0.001$;与 EV71 感染组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 7 阻断 Caspase-1/IL-1 β 信号通路对骨骼肌病理变化的影响

Note. A, Sagittal section of skeletal muscle pathological changes in BALB/c suckling mice. B, BALB/c suckling mouse skeletal muscle Masson staining. C, Disease weight analysis of BALB/c suckling rats. D, Disease score analysis of BALB/c suckling rats. Compared with the NC group, *** $P<0.001$. Compared with the EV71 infection group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 7 Effect of blockade of caspase-1/IL-1 β signaling pathway on pathological changes in skeletal muscle

3 讨论

上述试验结果表明, EV71 病毒通过激活 caspase-1/IL-1 β 信号通路诱导骨骼肌持续的炎症损伤和骨骼肌纤维化因子表达上调, 最终导致小鼠骨骼肌损伤(图 8)。本文基于以往对 EV71 感染随时间变化规律文献的研究^[21], 将 BALB/c 乳鼠分成 5 d、7 d、10 d、14 d 4 个时间点进行观察。结果发现, EV71 感染组 BALB/c 乳鼠自第 5 天开始毛发稀疏、体质量增长减缓、双后肢麻痹瘫痪、疾病评分增加, 且在 EV71 感染后第 10 天损伤严重; HE 染色发现, 与正常对照组相比, EV71 感染组骨骼肌纤维排列紊乱, 横纹肌溶解, 横截面积减少, 可见炎症细胞浸润及充血。EV71 VP-1 蛋白是最主要的衣壳蛋白, 具有重要的细胞受体结合位点及最多型的特异性中和位点, 直接决定病毒的抗原性^[22-23]。Western blot 检测结果显示, 与正常对照组相比, EV71 感染组 EV71 VP-1 蛋白水平明显升高。值得注意的是, EV71 VP-1 蛋白含量在 EV71 感染组 5~10 d 逐渐升高, EV71

感染组 BALB/c 乳鼠肌肉组织中病毒载量在第 10 天达到最高, 提示 EV71 病毒载量随时间对应增加, 并在骨骼肌中大量复制。

骨骼肌损伤表现为肌纤维的部分撕裂甚至是完全断裂触发炎症反应, 且对受累肌肉的功能产生显著影响^[24]。炎症反应中免疫细胞诱导多种继发性促炎细胞因子 IL-1 β 、TGF- β 1 等异常增高^[25-26]。IL-1 β 是一种重要的促炎细胞因子, TGF- β 是调控骨骼肌纤维化的核心分子, 不仅可以上调间质细胞标志物 α -SMA 与细胞外基质 Collagen 的表达, 还可以促进成肌细胞横向分化为肌成纤维细胞^[27-31]。本研究结果表明, IL-1 β 在正常对照组骨骼肌组织匀浆中表达很少, 但在 EV71 感染后的第 5、7、10 天, IL-1 β 蛋白水平明显升高, 在第 10 天达到峰值。这些结果提示 EV71 感染可以上调促炎细胞因子 IL-1 β 的表达, 造成骨骼肌炎症损伤。然而 EV71 诱导骨骼肌炎症损伤是否会伴随纤维化因子的上调目前尚不清楚。因此, 本研究进一步检测各时间点 α -SMA、细胞外基质 Collagen I 蛋白水平, 结果表明, 相较于正

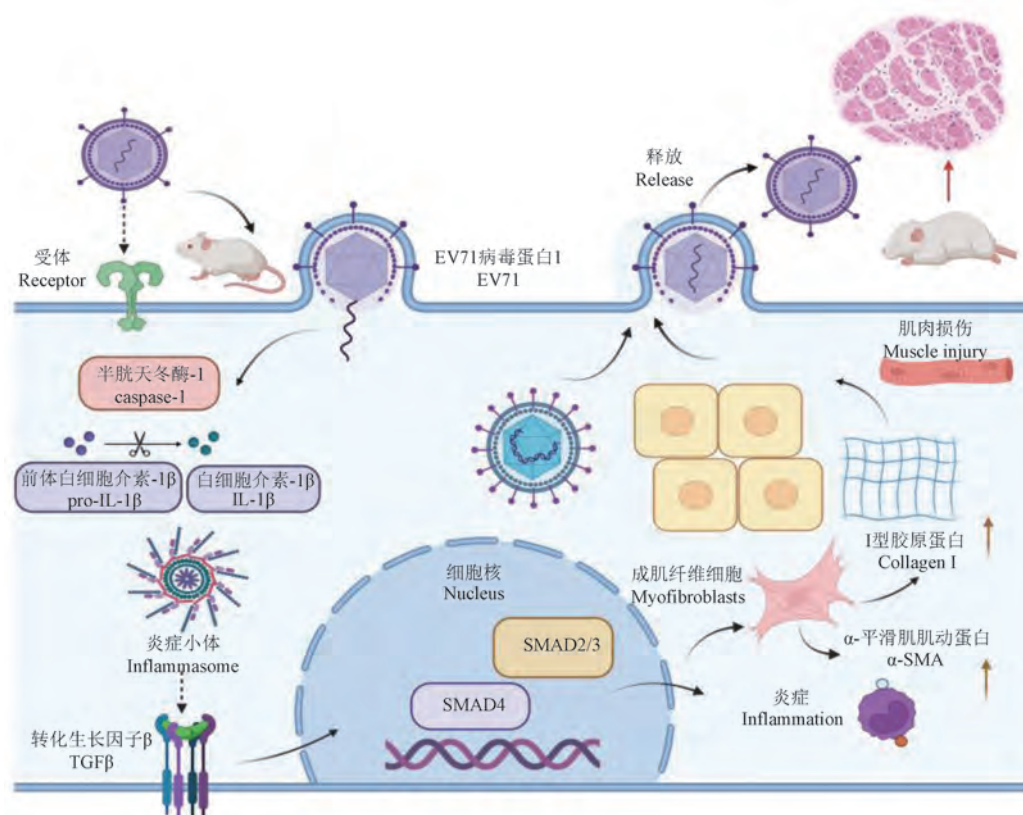


图 8 caspase-1/IL-1 β 信号通路对骨骼肌病理损伤的机制图

Figure 8 Mechanism diagram of pathological injury of skeletal muscle induced by caspase-1/IL-1 β signaling pathway

常对照组同一时间点, EV71 感染组 α -SMA、Collagen I 蛋白水平明显升高, 因此, 推测 EV71 诱导骨骼肌产生肌炎引起炎性细胞因子上调, 可能进一步导致肌成纤维细胞过度活化增殖并产生大量胶原。

Caspase-1 信号通路在各种器官纤维化过程中起重要作用^[32-34], EV71 3D 蛋白通过直接结合 NLRP3 刺激 NLRP3 炎性体的激活^[35]。NLRP3 炎性小体激活后, caspase-1 和 IL-1 β 的分泌增加, 导致肌成纤维细胞合成大量胶原进而引起心肌纤维化样改变^[36]。因此, 为了探讨 caspase-1/IL-1 β 信号通路在 EV71 诱导骨骼肌损伤过程中的作用, 本研究通过给予 caspase-1 抑制剂 (VX-765) 进行干预, 发现与免疫荧光检测结果一致, EV71+VX-765 组 BALB/c 乳鼠较骨骼肌组织匀浆中 pro-caspase-1、cleaved-caspase-1、IL-1 β 、 α -SMA、Collagen I 等蛋白水平较 EV71 感染组明显降低, 提示 VX-765 可以逆转 EV71 导致的 caspase-1、IL-1 β 等炎症因子的表达, 减轻骨骼肌炎症损伤, 临床症状及也得到了改善。这些结果均表明 EV71 可以通过激活 caspase-1/IL-1 β 信号通路诱导骨骼肌持续的炎症损伤和骨骼肌纤维化因子的上调, 证实了 caspase-1/IL-1 β 信号通路在 EV71 诱导骨骼肌损伤中的重要作用, 见图 8。

综上所述, EV71 能够诱导 BALB/c 乳鼠骨骼肌局部出现促炎因子浸润, 肌纤维断裂, 促炎细胞因子和细胞外基质蛋白表达上调。抑制 caspase-1/IL-1 β 信号通路对 EV71 诱导 BALB/c 乳鼠骨骼肌损伤具有一定的保护作用, 能够降低促炎因子分泌, 改善 EV71 诱导 BALB/c 乳鼠骨骼肌炎症反应, 从而减少纤维化因子的分泌。因此, EV71 可能通过 caspase-1/IL-1 β 信号通路诱导 BALB/c 乳鼠骨骼肌损伤, caspase-1/IL-1 β 信号通路可以作为一个新的靶点为临床手足口病的诊疗思路和药物研发提供新方向。但是 EV71 感染儿童引起手足口病机制复杂, 减轻 EV71 感染乳鼠的骨骼肌损伤过程中是否有其他通路参与仍需进一步研究。

参考文献:

[1] CARDOSA M J, PERERA D, BROWN B A, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and

recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes [J]. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(4): 461-468.

- [2] SCHMIDT N J, LENNETTE E H, HO H H. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system [J]. *J Infect Dis*, 1974, 129(3): 304-309.
- [3] 陆步来, 秦颖, 刘凤凤, 等. 2024 年 6 月中国需关注的突发公共卫生事件风险评估 [J]. *疾病监测*, 2024, 39(6): 673-676.
- LU B L, QIN Y, LIU F F, et al. Risk assessment of public health emergencies concerned in China, June 2024 [J]. *Dis Surveillance*, 2024, 39(6): 673-676.
- [4] 朱其荣, 王川林, 刘娇, 等. EV71 型重症手足口病患儿的临床特征及危险因素的相关性分析 [J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(25): 67-73.
- ZHU Q R, WANG C L, LIU J, et al. Clinical features of children with type EV71 severe hand, foot and mouth disease and correlation analysis of risk factors [J]. *China J Mod Med*, 2017, 27(25): 67-73.
- [5] KOBAYASHI N, MITSUI T, OGAWA Y, et al. A rare case of chronic active Epstein-Barr virus (EBV) infection accompanied by the infiltration of EBV-infected CD8⁺ T cells into the muscle [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2018, 40(3): e171-e175.
- [6] KOMATSU H, SHIMIZU Y, TAKEUCHI Y, et al. Outbreak of severe neurologic involvement associated with enterovirus 71 infection [J]. *Pediatr Neurol*, 1999, 20(1): 17-23.
- [7] XIAO X, QI J, LEI X, et al. Interactions Between Enteroviruses and the Inflammasome: New Insights Into Viral Pathogenesis [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 321.
- [8] CHOOI W H, WINANT O, ZENG Y, et al. Enterovirus-A71 preferentially infects and replicates in human motor neurons, inducing neurodegeneration by ferroptosis [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2024, 13(1): 2382235.
- [9] YANG F, ZHANG N, CHEN Y, et al. Role of Non-Coding RNA in Neurological Complications Associated With Enterovirus 71 [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 873304.
- [10] KOU Z, JIA J, LIU X, et al. Epidemiological characteristics and spatial-temporal clusters of hand, foot, and mouth disease in Qingdao City, China, 2013-2018 [J]. *PLoS One*, 2020, 15(6): e0233914.
- [11] ESPOSITO S, PRINCIPI N. Hand, foot and mouth disease: current knowledge on clinical manifestations, epidemiology, aetiology and prevention [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018, 37(3): 391-398.
- [12] PENG Y, HE W, ZHENG Z, et al. Factors related to the mortality risk of severe hand, foot, and mouth diseases (HFMD): a 5-year hospital-based survey in Guangxi, Southern China [J]. *BMC Infect Dis*, 2023, 23(1): 144.

- [13] CHANG L Y, HUANG L M, GAU S S, et al. Neurodevelopment and cognition in children after enterovirus 71 infection [J]. N Engl J Med, 2007, 356(12): 1226–1234.
- [14] YU P, GAO Z, ZONG Y, et al. Histopathological features and distribution of EV71 antigens and SCARB2 in human fatal cases and a mouse model of enterovirus 71 infection [J]. Virus Res, 2014, 189: 121–132.
- [15] ZHANG H, SONG Z, ZOU J, et al. An infectious clone of enterovirus 71(EV71) that is capable of infecting neonatal immune competent mice without adaptive mutations [J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1): 427–438.
- [16] CHEN C Y, CHANG Y C, HUANG C C, et al. Acute flaccid paralysis in infants and young children with enterovirus 71 infection: MR imaging findings and clinical correlates [J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2001, 22(1): 200–205.
- [17] CAMPBELL G R, TO R K, HANNA J, et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, and HIV-1 derived ssRNA sequences activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages through a non-classical pathway [J]. iScience, 2021, 24(4): 102295.
- [18] MITEVA K, PAPPRITZ K, SOSNOWSKI M, et al. Mesenchymal stromal cells inhibit NLRP3 inflammasome activation in a model of Coxsackievirus B3-induced inflammatory cardiomyopathy [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2820.
- [19] 樊懿萱, 王心威, 李军梅, 等. 基于 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 焦亡通路探索小鼠急性肺损伤动态时间模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(4): 423–434.
- FAN Y X, WANG X W, LI J M, et al. Establishment of a dynamic model of acute lung injury in mice based on the NLRP3/Caspase-1/gasdermin D signaling pyroptosis pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(4): 423–434.
- [20] 李怡沅, 陈恒, 苗瑞雪, 等. EV71 不同临床株的新生小鼠毒力研究 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(3): 335–342.
- LI Y Y, CHEN H, MIAO R X, et al. Virulence of enterovirus 71 in infected neonatal mouse models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(3): 335–342.
- [21] JIN Y, SUN T, ZHOU G, et al. Pathogenesis study of enterovirus 71 using a novel human SCARB2 knock-In mouse model [J]. mSphere, 2021, 6(2): e01048–e01068.
- [22] WANG H, LI Y. Recent progress on functional genomics research of enterovirus 71 [J]. Virol Sin, 2019, 34(1): 9–21.
- [23] PLEVKA P, PERERA R, CARDOSA J, et al. Crystal structure of human enterovirus 71 [J]. Science, 2012, 336(6086): 1274.
- [24] GAUDENZIO N, SIBILANO R, MARICHAL T, et al. Different activation signals induce distinct mast cell degranulation strategies [J]. J Clin Invest, 2016, 126(10): 3981–3998.
- [25] MIGLIORINI P, ITALIANI P, PRATESI F, et al. The IL-1 family cytokines and receptors in autoimmune diseases [J]. Autoimmun Rev, 2020, 19(9): 102617.
- [26] BONNIAUD P, MARGETTS P J, ASK K, et al. TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis [J]. J Immunol, 2005, 175(8): 5390–5395.
- [27] DOLIVO D, WEATHERS P, DOMINKO T. Artemisinin and artemisinin derivatives as anti-fibrotic therapeutics [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(2): 322–339.
- [28] PAROLA M, PINZANI M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues [J]. Mol Aspects Med, 2019, 65: 37–55.
- [29] SÁNCHEZ-DUFFHUES G, GARCÍA DE VINUESA A, VAN DE POL V, et al. Inflammation induces endothelial-to-mesenchymal transition and promotes vascular calcification through downregulation of BMPR2 [J]. J Pathol, 2019, 247(3): 333–346.
- [30] LI Y, FOSTER W, DEASY B M, et al. Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis [J]. Am J Pathol, 2004, 164(3): 1007–1019.
- [31] 李开杨, 吴小梅, 黄敬, 等. 天然产物调控 TGF-β1/Smad 通路治疗肝纤维化研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(10): 1320–1331.
- LI K Y, WU X M, HUANG J, et al. Progress of research into natural products that regulate TGF-β1/Smad pathway for the treatment of hepatic fibrosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(10): 1320–1331.
- [32] HE X, MEKASHA S, MAVROGIORGOS N, et al. Inflammation and fibrosis during *Chlamydia pneumoniae* infection is regulated by IL-1 and the NLRP3/ASC inflammasome [J]. J Immunol, 2010, 184(10): 5743–5754.
- [33] NAM S A, KIM W Y, KIM J W, et al. Autophagy attenuates tubulointerstitial fibrosis through regulating transforming growth factor-β and NLRP3 inflammasome signaling pathway [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(2): 78.
- [34] MULAY S R. Multifactorial functions of the inflammasome component NLRP3 in pathogenesis of chronic kidney diseases [J]. Kidney Int, 2019, 96(1): 58–66.
- [35] WANG W, XIAO F, WAN P, et al. EV71 3D protein binds with NLRP3 and enhances the assembly of inflammasome complex [J]. PLoS Pathog, 2017, 13(1): e1006123.
- [36] LI P L. Cardiovascular pathobiology of inflammasomes: inflammatory machinery and beyond [J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 22(13): 1079–1083.

[收稿日期]2024-10-15

戴锦龙,郭健敏,陈志森,等.胆木浸膏糖浆对4日龄SD大鼠发育毒性的研究[J].中国比较医学杂志,2025,35(5):24-36.
Dai JL, Guo JM, Chen ZS, et al. A study on the developmental toxicity of Dangmu extract syrup in 4-day-old SD rats [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(5): 24-36.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.05.003

胆木浸膏糖浆对4日龄SD大鼠发育毒性的研究

戴锦龙,郭健敏,陈志森,杨威*

(广州湾区生物医药研究院,广东莱恩医药研究院有限公司,广东省药物非临床评价与研究重点实验室,
国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心,从化区动物病理与医学检验检测工程技术研究
中心,广州 510990)

【摘要】 目的 系统考察胆木浸膏糖浆对4日龄SD大鼠生长发育的影响及其毒性反应。**方法** 根据整窝设计法将出生后第二天(postnatal day 2, PND₂) 128例幼鼠随机分为阴性对照组和低、中、高剂量组,从PND₄开始,各组对应经口给予纯水、31 g/kg、93 g/kg和280 g/kg(以生药量计)胆木浸膏糖浆,每天1次,重复给药18 d,停药后恢复观察15 d。随后,对各组动物一般状态、生长发育、神经反射功能、自发行为活动、血液学、凝血、血生化、免疫功能、生长激素及组织病理等指标进行检测。**结果** 连续给药18 d后,与阴性对照组比较,中、高剂量组(雌、雄鼠)GLU升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);中、高剂量组(雌、雄鼠)LDH、(雄鼠)AST,高剂量组(雌鼠)ALT、AST均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);低、高剂量组(雌、雄鼠)RET、RET(%),中剂量组(雄鼠)RET均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);低、高剂量组(雌、雄鼠)、中剂量组(雌鼠)脾质量以及脏体系数均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);低、中、高剂量组(雌、雄鼠)脾小结结构形成,体积大、数量多,且其变化程度呈剂量关系。停药恢复观察15 d后,与阴性对照组比较,低剂量组(雌鼠)GLU显著升高($P<0.05$);中、高剂量组(雌鼠)ALT、AST、ALP、TG,中剂量组(雄鼠)GGT、TG、TCHO和高剂量组(雄鼠)AST、ALP、TG、LDH均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);高剂量组(雌鼠)RET和(雄鼠)RET(%)均升高($P<0.05$);与连续给药18 d后同组比较,各组动物脾结构发育更完整,脾小结结构明显,但各组间比较未见明显差异。其余各项检测结果未见明显药物相关变化。**结论** 胆木浸膏糖浆可使4日龄SD大鼠脾结构提前发育完善,伴随其造血功能增强,同时引起动物血糖升高,糖代谢功能加强导致相关酶消耗增多,导致部分肝功能指标降低,呈剂量相关性,无性别差异,停药后可逆,变化机制需进一步探索证实。临床研究时需注意控制胆木浸膏糖浆的用药剂量,定期进行脾及相关血液、血生化指标监测。

【关键词】 胆木浸膏糖浆;生长发育;毒性研究;幼龄SD大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 05-0024-13

A study on the developmental toxicity of Dangmu extract syrup in 4-day-old SD rats

DAI Jinlong, GUO Jianmin, CHEN Zhisen, YANG Wei*

(Guangzhou Bay Area Institute of Biomedicine, Guangdong Lewwin Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd.,
Guangdong Provincial Key Laboratory of Drug Non-Clinical Evaluation and Research, TCM Non-clinic Evaluation

【基金项目】 广东省药物非临床评价研究企业重点实验室(2023B1212070029);广东省重大人才工程项目(2021TY060021)。

【作者简介】 戴锦龙(1989—),男,硕士,兽医师,中国兽医病理师(CVCP),研究方向:毒性病理学。

E-mail: daijinlong@lewin.com.cn

【通信作者】 杨威(1978—),男,博士,高级工程师,博士后导师,研究方向:药物毒理。E-mail: yangwei0719@163.com

Branch of National Engineering Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Engineering Research Center for Innovative Drug Evaluation and Research, Conghua District Engineering Technology Research Center for Animal Pathology and Medical Laboratory Testing, Guangzhou 510990, China)

【Abstract】 Objective To systematically investigate the effects of Dangmu extract syrup on the growth and development of 4-day-old (postnatal day 4, PND₄) Sprague-Dawley (SD) rats and its toxic reactions. **Methods** According to the whole litter design method, 128 young mice (PND₂) were randomly divided into negative control group and low, medium and high dose groups. From PND₄, the animals were orally given pure water, 31 g/kg, 93 g/kg and 280 g/kg (calculated as raw herb material) of Dangmu extract syrup, respectively, once daily for 18 consecutive days, with a 15 d of recovery phase. During the study period, the general state, growth and development, nerve reflex function, spontaneous behavior, hematology, coagulation, blood biochemistry, immune function, growth hormone and histopathology of the animals in each group were observed or examined. **Results** After 18 d of continuous administration, compared with the negative control group, GLU (male and female) in the medium and high dose groups increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), LDH (male and female) and AST (male) in the medium and high dose groups, ALT, AST (female) in the high dose group decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), RET and percentage of RET (male and female) in the low and high dose groups, RET (male) in the medium dose group increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), spleen mass and the organ-to-body mass ratio (male and female) in the low and high dose groups and female in the medium dose group increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Splenic nodule structures were formed in all dose groups with large size and number, and there was a dose relationship in the degree of changes. After 15 d recovery period, compared with the negative control group, GLU (female) in the low dose group increased ($P<0.05$), ALT, AST, ALP, TG (female) in the medium and high dose groups, GGT, TG, TCHO (male) in the medium dose groups, AST, ALP, TG, LDH (male) in the high dose group decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), RET (female) and percentage of RET (male) in the high dose group increased ($P<0.05$). compared with the 18 d of continuous administration, the spleen structures of the animals in each group were more completely developed and the splenic nodule structures were obvious, but no significant difference was noted in the comparison between groups. No significant drug-related changes were observed in other test result. **Conclusions** Dangmu extract syrup advanced the development of complete spleen structure in 4-day-old SD rats, accompanied by the enhancement of its hematopoietic function, and at the same time, it caused the animals, blood glucose to rise, the enhancement of glucose metabolism function led to the increase of related enzyme consumption, and led to the decrease of some liver function parameters, and showed a dose correlation. There was no gender difference in the changes, which were reversible after stop administration, and the mechanism of the changes needs to be further explored and confirmed. In the clinical trials, attention should be paid to the control of the dose of the test article, and regular monitoring of the spleen and related blood and clinical chemistry parameters.

【Keywords】 Dangmu extract syrup; growth and development; toxicity study; juvenile SD rats

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

胆木是我国重点保护野生植物之一,性寒味苦,归胆、肺、大肠及膀胱经,常用于治疗感冒发热、胆囊炎、肺炎、肠炎及泌尿系统感染等病症^[1]。近年来,胆木提取物制剂在华南地区应用广泛,已有研究表明,胆木浸膏糖浆在改善免疫功能、抗病毒、解热镇痛、抗炎抑菌中具有良好的疗效作用,在临床上主要用于治疗儿童普通感冒、呼吸道感染、扁桃体炎、支气管炎等疾病^[2-5],其在治疗小儿病毒性感冒中效果尤为显著,但同

时也使部分患儿产生不良反应^[6],其毒性作用仍待进一步探讨。

目前,多数研究者主要在药理作用、临床疗效等方面对胆木浸膏糖浆开展研究,仅有少量体外毒性基础数据支撑,仍缺乏较为全面的体内毒理学探究^[7-8],此外,关于胆木浸膏糖浆在发育毒理学方面的研究尚罕见报道,其药物安全性需作进一步评价。基于胆木浸膏糖浆具有良好的临床治疗作用,本研究旨在考察胆木浸膏糖浆对幼

龄大鼠的毒性反应,并进一步探索其无毒反应剂量,以期为其它安全性评价试验和儿童临床安全用药提供理论支撑和科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

100 只 8~15 周龄 SPF 级雌性怀孕 SD 大鼠,体质量 344~476 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2021-0002]。饲养于广东莱恩医药研究院有限公司 SPF 级动物房[SYXK(粤)2022-0146]。所有动物实验得到广东莱恩医药研究院有限公司动物福利与伦理委员会审批(IA-SE2017025-01)。实验设计及实施过程严格遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

胆木浸膏浓缩液(批准文号:国药准字 Z20060432,批号:Y20170601,生药含量:28 g/mL),购自海南森祺制药有限公司;生化相关指标检测试剂盒(批号:170703、170803、170804 和 17903),购自浙江伊利康生物技术有限公司;血液学和凝血功能相关指标检测试剂(批号:G7212、R7012、A7018、A7006、RZA7012、73020811 和 5480398),购自日本 Sysmex 公司;免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig) A、IgE、IgG、IgM、生长激素(Growth hormone, GH)和生长激素释放因子(Growth hormone releasing factor, GHRP)的 ELISA 试剂盒(批号:E20180301A),购自美国 R&D Systems 公司;异氟烷(批号:217170702),购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司。XN-1000[B3]型全自动血液体液分析仪,购自日本 Sysmex 公司;7180 型全自动生化分析仪,购自日本日立公司;BSA2201 型电子天平,购自赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;ELx808 型酶标仪,购自美国 BioTek 公司;生物组织脱水机、石蜡包埋机、石蜡切片机、染色机和 DM3000 型光学显微镜,均购自德国 LEICA 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组

幼龄 SD 大鼠出生后 2 日龄时(postnatal day, PND₂)选用合格的幼龄 SD 大鼠 128 只(体质量 6~10 g,雌雄各半)采用整窝设计法^[9-10]进行分组,按体质量由大到小将所有幼仔组窝抚养,不

同窝幼仔组成的新窝为 1 组,共分成 4 组,即阴性对照组、低、中、高剂量组。每组 4 窝,每窝 8 只,雌雄各半。

1.3.2 药物配置与给药方法

参照药物人用剂量与动物年龄差异^[11],根据药物剂量与体表面积换算^[12-13]方法,本研究设置给予胆木浸膏浓缩液的低、中、高剂量组分别为 31 g/kg、93 g/kg 和 280 g/kg,分别约相当于 1 岁龄儿童临床用量的 1.4、4.3 和 13.0 倍。

量取适量胆木浸膏浓缩液,加入纯水稀释,分别配制成生药量浓度为 3.1 g/mL、9.3 g/mL、28.0 g/mL 的药液。各组动物均采取经口给药,5.0 mL/kg,每天 1 次,连续 18 d(出生后第 4~21 天, PND₄~PND₂₁),恢复期观察 15 d(出生后第 22~37 天, PND₂₂~PND₃₇)其中阴性对照组给予等量纯水。

1.3.3 一般状态观察

试验期间每天对幼龄 SD 大鼠进行观察,记录其体质量、摄食量、体格(顶臀长、尾长、四肢长及胸围)、骨骼(骨比重、骨密度)、生理发育指标(耳郭分离、牙齿萌出、睁眼、腹毛生长、睾丸下降、阴道张开)、神经反射功能(翻正、视觉定位、听觉惊愕、嗅觉触须定位、断崖回避及瞳孔反射)、自发行为活动(转身、步态、爬行、行走、修饰、恋巢)等指标变化。

1.3.4 血液学、凝血功能指标检测

连续给药 18 d 后和停药恢复 15 d 后,各组动物经腹主动脉采血,血样制备成 EDTA-K2 抗凝全血、枸橼酸钠抗凝血浆测定白细胞数(white blood cells, WBC)、红细胞数(red blood cells, RBC)、血红蛋白量(hemoglobin, HGB)、红细胞平均体积(mean erythrocyte volume, MCV)、红细胞平均血红蛋白含量(mean corpuscular hemoglobin, MCH)、血小板数(platelet, PLT)、网织红细胞数(reticulocytes, RET)及网织红细胞比率(reticulocytes ratio, RET%)等血液学指标,检测凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、凝血酶时间(thrombin time, TT)、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)和纤维蛋白原量(fibrinogen, Fbg)等凝血功能指标。

1.3.5 血生化指标检测

连续给药 18 d 后和停药恢复 15 d 后,各组动

物经腹主动脉采血,血样制备成枸橼酸钠抗凝血清,测定天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、 γ -谷氨酰转移酶(γ -glutamyltransferase, GGT)、血糖(glucose, GLU)、甘油三酯(triglycerides, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TCHO)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、尿素氮(blood urea nitrogen, UREA)、肌酐(creatinine, CREA)、总蛋白(total protein, TP)、白蛋白(albumin, ALB)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)、总胆固醇(total cholesterol, TCHO)、肌酸磷酸激酶(creatine kinase, CK)、无机磷(IP)、钙离子(Ca^{2+})、钠离子(Na^{+})、钾离子(K^{+})、氯离子(Cl^{-})。

1.3.6 免疫学指标及相关激素检测

PND₂₂和PND₃₇收集各组动物血样,利用ELISA法分别检测血清中的IgA、IgE、IgG和IgM等免疫指标及GHRP含量。

1.3.7 组织病理学检查

连续给药18 d后和停药恢复15 d后,分别将各组一半动物异氟烷麻醉安乐死,并观察各脏器的病变情况,记录主要脏器质量同时按照公式计算脏器系数,脏器系数/%=脏器质量/g/个体质量/g $\times$ 1000。脏器包括肾上腺、主动脉、股骨、骨髓(胸骨)、脑、盲肠、结肠、子宫和子宫颈、十二指肠、附睾、食管、眼(哈氏腺)、心脏、回肠、空肠、肾、肝、肺(附主支气管)、肠系膜淋巴结、腹股沟淋巴结、乳腺、卵巢和输卵管、胰腺、垂体、前列腺(精囊)、直肠、唾液腺、坐骨神经、骨骼肌、皮肤、脊髓(3个部位:颈椎、中段胸椎、腰椎)、脾、胃、睾丸、胸腺(或胸腺区域)、甲状腺(含甲状旁腺)、气管、膀胱、阴道及所有大体观察到异常的组织、组织肿块。各脏器使用10%福尔马林固定后,进行梯度酒精脱水、石蜡包埋、切片、苏木精-伊红(HE)染色,并于光学显微镜下观察其病理变化。脏器质量及脏器系数:脑、心脏、肝、肾、肾上腺、胸腺、脾、睾丸、附睾、卵巢、子宫。

1.4 统计学方法

检测结果用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,使用SPSS 22.0软件进行统计分析,GraphPad Prism

8.0作图。组间比较使用独立样本 t 检验,以 $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 一般观察结果

与阴性对照组比较,给药期,高剂量组雌雄所有动物在给药1周内陆续出现棕黄色稀便,给药第9天完全恢复。

2.2 体质量与摄食量

雌鼠:与阴性对照组比较,给药期,中剂量组动物PND₄和高剂量组动物PND₇、PND₁₀时体质量显著降低($P<0.05$);恢复期,中剂量组动物PND₃₀、PND₃₃和高剂量组动物PND₃₆时体质量显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组动物的摄食情况未见统计学意义,结果详见图1。

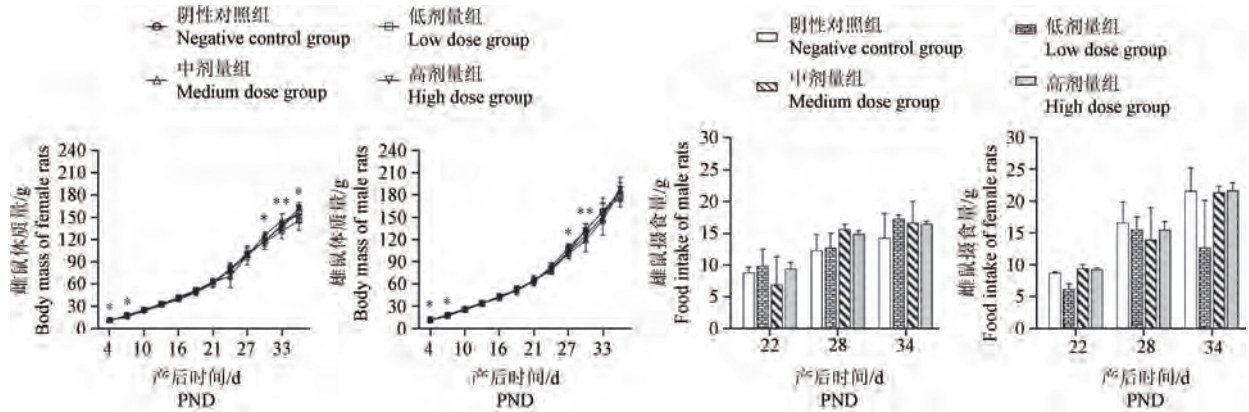
雄鼠:与阴性对照组比较,在给药期,中剂量组动物PND₄、PND₇时体质量显著降低($P<0.05$);恢复期,中剂量组动物PND₂₇时体质量极显著升高($P<0.01$)。各组动物的摄食情况未见统计学意义,结果详见图1。

结果显示,幼龄SD大鼠体质量和摄食量等指标变化无整体连贯性及规律性,未见明显的时间-效应关系和剂量-效应关系。

2.3 体格与骨骼变化

雌鼠:与阴性对照组比较,给药期,PND₄时,高剂量组动物顶臂长、各剂量组动物四肢长和胸围均显著性降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);PND₇时,高剂量组动物顶臂长、低中剂量组动物尾长和高剂量组动物四肢长均显著性降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);PND₂₁时,中高剂量组动物尾长和高剂量组动物胸围均显著性降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),低中剂量组动物四肢长显著性升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);恢复期,PND₂₈时,中剂量组动物四肢长显著性升高($P<0.01$),高剂量组动物胸围显著性降低($P<0.05$);PND₃₅时,各剂量组动物尾长和四肢长均极显著性升高($P<0.01$)。各动物骨比重和骨密度未见明显差异。结果详见图2。

雄鼠:与阴性对照组比较,给药期,PND₄时,低剂量组动物顶臂长和各剂量组动物胸围均显著性降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);PND₇时,低剂量组动物尾长和中剂量组动物四肢长均显著性降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);PND₁₄时,高剂量组动物顶臂长显著性降低($P<0.05$);PND₂₁时,高剂量

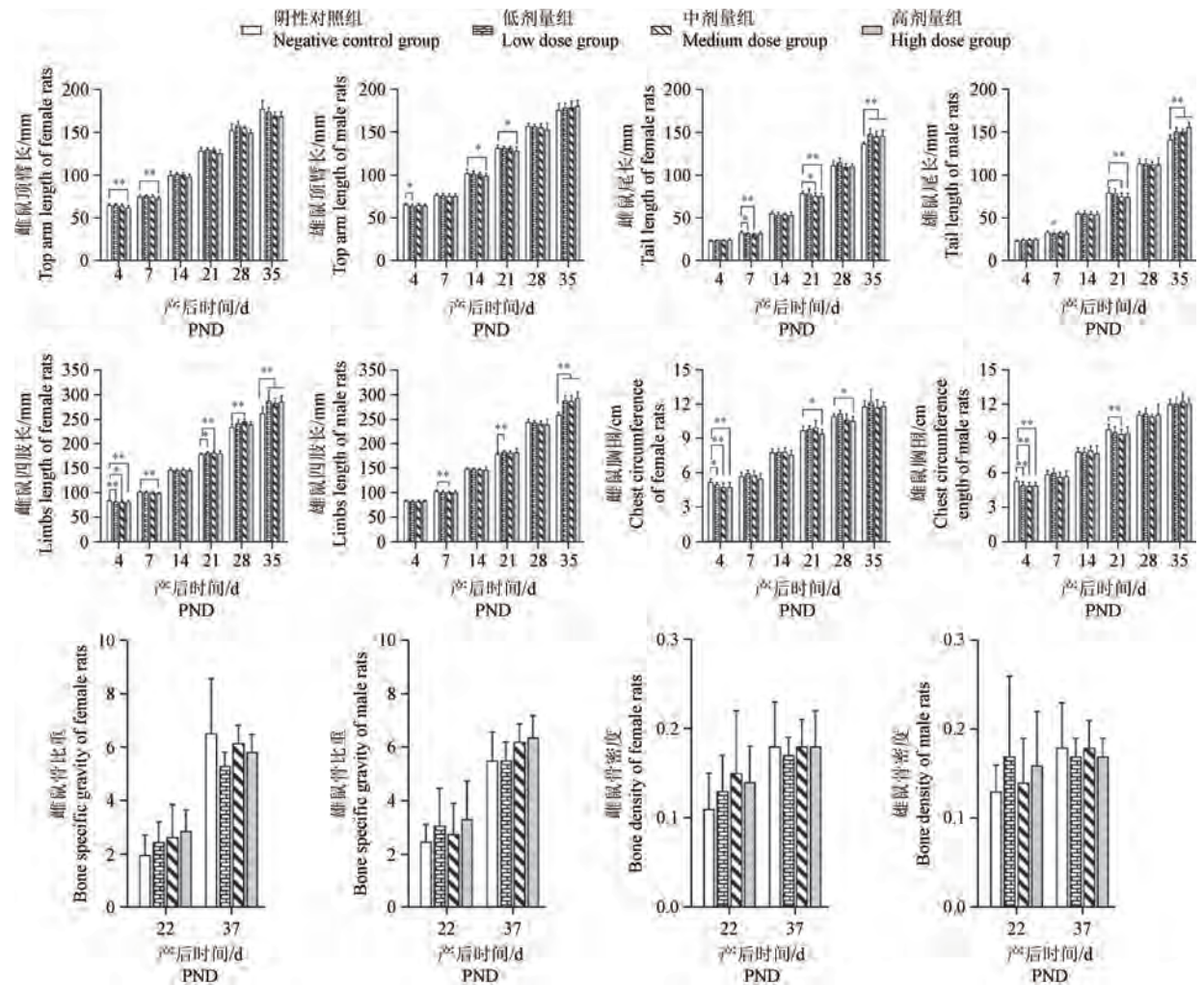


注:与阴性对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 1 胆木浸膏糖浆对幼龄 SD 大鼠体质量与摄食量的影响

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

Figure 1 Effect of Dangmu extract syrup on body mass and food intake in juvenile SD rats



注:与阴性对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 2 胆木浸膏糖浆对幼龄 SD 大鼠体格与骨骼变化的影响

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

Figure 2 Effect of Dangmu extract syrup on body and bone in juvenile SD rats

组动物顶臂长、中高剂量组动物尾长和中剂量组动物胸围均显著性降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),低中剂量组动物四肢长极显著性升高($P<0.01$);恢复期,PND₃₅ 时,各剂量组动物尾长和四肢长均极显著性升高($P<0.01$)。各动物骨比重和骨密度未见明显差异。结果详见图 2。

结果显示,幼龄 SD 大鼠体格及骨骼等指标变化无整体连贯性及规律性,未见明显的时间-效应关系和剂量-效应关系。

2.4 生理发育、神经反射及自发行为活动实验结果

与阴性对照组比较,连续给药 18 d 和停药恢复 15 d 后,各剂量组动物生理发育、神经反射及自发行为活动达标数量均无统计学意义,结果详见表 1。

与阴性对照组相比,各剂量组动物平面翻正反射达标天数极显著降低($P<0.01$),呈剂量相关性,无性别差异性;各剂量组动物空中翻正达标天数显著升高($P<0.05$),无剂量相关性和性别差

异性,其余各指标未见明显差异,结果详见表 2。

与阴性对照组相比,各剂量组动物爬行达标日和中高剂量组动物行走达标日显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)呈剂量相关性,无性别差异性,其余各指标未见明显差异,结果详见表 3。

2.5 血液学和凝血功能检测结果

雌鼠:与阴性对照组比较,连续给药 18 d 后,低、高剂量组动物 RET 和各剂量组动物 RET(%)均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);停药恢复 15 d 后,中剂量组动物 RBC 和高剂量组动物 RET 均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),中剂量组动物 WBC、MCH 和中高剂量组动物 PT 均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。其余各指标未见明显差异。

雄鼠:与阴性对照组比较,连续给药 18 d 后,各剂量组动物 RET 和 RET(%)、高剂量组动物 MCV 和低高剂量组动物 APTT 均极显著升高($P<0.01$),低剂量组动物 PT 显著升高($P<0.05$);停药恢复 15 d 后,高剂量组动物 RET(%)和低剂量组动物 PT 均显著升高($P<0.05$),低剂量组动物

表 1 胆木浸膏糖浆对幼龄 SD 大鼠生理发育的影响(达标个数)

Table 1 Effect of Dangmu extract syrup on physical growth in juvenile SD rats (target number)

组别 Groups	PND ₄	PND ₁₃	PND ₁₄	PND ₁₅	PND ₂₁	PND ₃₅
	耳郭分离	门齿萌出	腹毛生长	开眼	睾丸下降	阴道张开
	Diastasis auris	Incisors erupt	Ventral hair growth	Eyes open	Descension of testis	Vagina open
阴性对照组 Negative control group	32	31	32	32	16	8
低剂量组 Low dose group	32	31	32	32	16	7
中剂量组 Medium dose group	32	29	32	32	16	8
高剂量组 High dose group	32	30	32	32	16	8

表 2 胆木浸膏糖浆对幼龄 SD 大鼠神经反射功能的影响(达标天数, $\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of Dangmu extract syrup on nerve reflex function in juvenile SD rats (target day, $\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	平面翻正反射 Plane righting reflex	断崖回 避反射 Cliff avoidance reflex	触须定 位反射 Tentacular positioning reflex	听觉惊 愕反射 Auditory shock reflex	嗅觉反射 Olfactory reflex	空中翻 正反射 Aerial righting reflex	视觉定 位反射 Visual localization reflex	瞳孔反射 Pupillary reflex
阴性对照组 Negative control group	4.8±0.6	6.1±0.3	8.0±0.0	13.0±0.0	13.0±0.0	13.0±0.0	16.0±0.2	21.0±0.0
低剂量组 Low dose group	4.3±0.5**	6.2±0.4	8.0±0.0	13.0±0.0	13.0±0.0	13.1±0.3*	16.0±0.0	21.0±0.0
中剂量组 Medium dose group	4.0±0.2**	6.0±0.2	8.0±0.0	13.0±0.0	13.0±0.0	13.2±0.4*	16.0±0.0	21.0±0.0
高剂量组 High dose group	4.0±0.0**	6.0±0.2	8.0±0.0	13.0±0.0	13.0±0.0	13.1±0.3*	16.0±0.0	21.0±0.0

注:达标天数为出生后天数。与阴性对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

Note. Standard days are the PND. Compared with the negative control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

MCH 和中高剂量组动物 ATPT 均极显著降低($P<0.01$)。其余各指标未见明显差异。未见性别差异,与给药相关,其余变化未见剂量关系,与 RET 变化相关,停药恢复后可逆,结果详见表 4。

表 3 胆木浸膏糖浆对幼龄 SD 大鼠自发行为活动的影响(达标天数, $\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of Dangmu extract syrup on spontaneous activity in juvenile SD rats (target day, $\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	修饰 Embellish	转身 Turn around	爬行 Crawl	行走 Walk	恋巢 Love nest	步态 Gait
阴性对照组 Negative control group	10.4±0.8	11.0±0.0	9.7±0.7	10.2±0.4	15.0±0.0	14.0±0.0
低剂量组 Low dose group	10.7±0.6	11.0±0.0	10.4±0.7**	10.3±0.5	15.0±0.0	14.0±0.0
中剂量组 Medium dose group	10.8±0.7	11.0±0.0	10.5±0.7**	10.4±0.6*	15.0±0.0	14.0±0.0
高剂量组 High dose group	10.7±0.7	11.0±0.0	10.3±0.7**	10.5±0.5**	15.0±0.0	14.0±0.0

注:达标天数为出生后天数。与阴性对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Note. Standard days are the PND. Compared with the negative control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

表 4 胆木浸膏糖浆对幼龄 SD 大鼠血液学及凝血功能的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of Dangmu extract syrup on hematology and coagulation function in juvenile SD rats ($\bar{x}\pm s$)

时间 PND	组别 Groups	WBC/ 10 ⁹ /L	RBC/ 10 ¹² /L	HGB/ (g/L)	MCV/fL	MCH/ 10 ⁹ /L	RET/ 10 ¹² /L	RET/%	PT/s	APTT/s
PND ₂₂ 雌性 female	阴性对照组 Negative control group	4.09±1.92	4.30±0.24	91.00±7.00	69.70±2.30	21.20±0.80	0.97±0.18	22.48±3.60	8.70±0.30	12.20±1.80
	低剂量组 Low dose group	3.61±0.90	4.33±0.24	92.00±5.00	70.40±2.30	21.20±0.60	1.23±0.16**	28.34±2.94**	10.20±4.20	13.00±2.70
	中剂量组 Medium dose group	3.92±0.75	4.20±0.38	89.00±7.00	72.30±3.80	21.30±1.20	1.21±0.29	28.44±4.45*	8.80±0.20	14.00±4.50
	高剂量组 High dose group	4.91±1.18	4.14±0.31	85.00±2.00	70.90±4.50	20.70±1.30	1.21±0.14*	29.36±3.37**	8.70±0.10	12.70±0.70
	阴性对照组 Negative control group	3.75±0.82	4.08±0.17	86.00±2.00	70.60±2.40	21.10±0.80	0.93±0.14	22.79±2.65	8.60±0.20	11.00±0.70
	低剂量组 Low dose group	3.37±0.89	4.08±0.20	84.00±5.00	70.90±2.80	20.60±0.80	1.14±0.13**	27.79±1.89**	9.10±0.60*	13.50±1.90**
PND ₂₂ 雄性 male	中剂量组 Medium dose group	3.73±1.07	4.26±0.19	88.00±3.00	70.90±3.10	20.70±0.90	1.18±0.15**	27.55±2.79**	9.10±1.10	12.00±1.60
	高剂量组 High dose group	4.32±1.11	3.95±0.21	86.00±5.00	74.10±2.30**	21.70±0.80	1.30±0.19**	32.73±3.83**	8.80±0.30	14.10±2.20**
PND ₃₇ 雌性 female	阴性对照组 Negative control group	6.37±1.06	5.52±0.27	119.00±7.00	65.40±1.80	21.50±0.40	0.55±0.09	9.91±1.82	9.60±0.60	17.70±0.80
	低剂量组 Low dose group	5.97±0.96	5.55±0.33	119.00±4.00	65.30±1.30	21.20±0.60	0.60±0.09	10.69±1.62	9.00±0.50	19.30±4.90
	中剂量组 Medium dose group	5.12±0.90*	5.88±0.15**	123.00±4.00	63.80±2.20	20.90±0.60*	0.58±0.08	9.89±1.43	8.60±0.50**	19.10±8.40
	高剂量组 High dose group	6.54±0.81	5.65±0.22	119.00±5.00	65.40±1.30	21.10±0.40	0.64±0.05*	11.40±0.91	8.40±0.40**	21.50±15.70
	阴性对照组 Negative control group	6.52±1.21	5.48±0.26	121.00±4.00	68.20±2.60	22.10±0.70	0.65±0.08	11.95±1.64	9.50±0.50	17.70±0.40
	低剂量组 Low dose group	5.67±0.80	5.55±0.14	117.00±4.00	66.00±2.20	21.20±0.50**	0.55±0.19	9.91±3.42	10.00±0.30*	18.10±0.80
PND ₂₂ 雄性 male	中剂量组 Medium dose group	6.06±0.54	5.50±0.15	119.00±4.00	67.00±2.30	21.60±0.70	0.68±0.06	12.47±1.28	9.00±0.50	16.30±1.10**
	高剂量组 High dose group	5.87±0.92	5.25±0.44	117.00±6.00	69.20±1.30	22.30±1.40	0.72±0.03	13.81±1.11*	9.30±0.40	15.60±0.70**

注:与阴性对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

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

2.6 血生化检测结果

雌鼠:与阴性对照组比较,连续给药 18 d 后,中高剂量组动物 GLU 显著升高($P<0.05$),高剂量组动物 ALT、AST 和中高剂量组动物 LDH 均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);停药恢复 15 d 后,低剂量组动物 GLU 显著升高($P<0.05$),中高剂量组动物 ALT、AST、ALP、TG 均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。其余各指标未见明显差异。

雄鼠:与阴性对照组比较,连续给药 18 d 后,

中高剂量组动物 GLU 和低剂量组 ALT、TG 均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),中高剂量组动物 AST、LDH 均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);停药恢复 15 d 后,中剂量组动物 GGT、TG、TCHO 和高剂量组动物 AST、ALP、TG、LDH 均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。其余各指标未见明显差异。

动物以上 GLU 升高变化和 AST、ALP、LDH 等降低变化呈剂量关系,未见性别差异,与给药相关,停药恢复后可逆,结果详见表 5。

表 5 胆木浸膏糖浆对幼龄 SD 大鼠血生化指标的影响($\bar{x}\pm s$)
Table 5 Effect of Dangmu extract syrup on blood biochemistry in juvenile SD rats ($\bar{x}\pm s$)

时间 PND	组别 Groups	ALT/ (U/L)	AST/ (U/L)	ALP/ (U/L)	GGT/ (U/L)	GLU/ (mmol/L)	TG/ (mmol/L)	TCHO/ (mmol/L)	LDH/ (U/L)
PND ₂₂ 雌性 PND ₂₂ female	阴性对照组 Negative control group	34.00± 7.00	130.00± 21.00	368.00± 90.00	1.00± 0.00	7.01± 0.90	1.14± 0.45	2.69± 0.32	1237.00± 453.00
	低剂量组 Low dose group	29.00± 5.00	144.00± 30.00	312.00± 28.00	1.00± 0.00	7.06± 1.17	1.12± 0.34	2.61± 0.25	1566.00± 563.00
	中剂量组 Medium dose group	30.00± 10.00	109.00± 38.00	343.00± 60.00	1.00± 0.00	9.43± 2.54*	1.14± 0.57	2.45± 0.30	646.00± 134.00**
	高剂量组 High dose group	26.00± 5.00*	90.00± 11.00**	307.00± 37.00	1.00± 0.00	9.19± 2.10*	0.93± 0.28	2.55± 0.31	415.00± 209.00**
	阴性对照组 Negative control group	32.00± 3.00	125.00± 17.00	353.00± 63.00	1.00± 0.00	7.70± 0.98	0.97± 0.14	2.52± 0.19	1177.00± 451.00
	低剂量组 Low dose group	38.00± 6.00*	126.00± 23.00	361.00± 72.00	1.00± 0.00	7.78± 1.26	1.25± 0.25*	2.55± 0.29	1249.00± 442.00
	中剂量组 Medium dose group	29.00± 7.00	104.00± 15.00*	366.00± 89.00	1.00± 0.00	9.18± 1.17*	0.95± 0.24	2.27± 0.39	571.00± 211.00**
	高剂量组 High dose group	29.00± 8.00	87.00± 4.00**	329.00± 103.00	1.00± 0.00	9.78± 1.06**	1.01± 0.42	2.51± 0.32	384.00± 167.00**
	阴性对照组 Negative control group	39.00± 5.00	119.00± 17.00	309.00± 54.00	1.00± 1.00	7.54± 1.48	1.24± 0.42	2.55± 0.48	1330.00± 497.00
	低剂量组 Low dose group	38.00± 3.00	132.00± 35.00	308.00± 19.00	1.00± 0.00	9.44± 1.79*	1.23± 0.25	2.57± 0.25	1663.00± 818.00
	中剂量组 Medium dose group	28.00± 3.00**	100.00± 12.00*	227.00± 26.00**	0.00± 1.00	8.58± 1.32	0.71± 0.27**	2.41± 0.34	1092.00± 395.00
	高剂量组 High dose group	26.00± 5.00**	93.00± 23.00*	241.00± 40.00*	1.00± 1.00	8.62± 1.46	0.71± 0.14**	2.51± 0.41	913.00± 531.00
PND ₃₇ 雌性 PND ₃₇ female	阴性对照组 Negative control group	39.00± 6.00	118.00± 22.00	366.00± 41.00	1.00± 0.00	8.14± 1.79	1.65± 0.75	2.46± 0.20	1338.00± 571.00
	低剂量组 Low dose group	40.00± 9.00	126.00± 11.00	339.00± 51.00	1.00± 1.00	7.51± 1.60	1.34± 0.27	2.34± 0.31	1472.00± 358.00
	中剂量组 Medium dose group	36.00± 6.00	112.00± 27.00	331.00± 42.00	0.00± 0.00**	7.98± 1.86	0.99± 0.34*	2.24± 0.11*	953.00± 524.00
	高剂量组 High dose group	33.00± 6.00	94.00± 14.00*	322.00± 41.00*	1.00± 0.00	9.68± 2.78	0.84± 0.45*	2.46± 0.24	518.00± 264.00**
	阴性对照组 Negative control group	39.00± 6.00	118.00± 22.00	366.00± 41.00	1.00± 0.00	8.14± 1.79	1.65± 0.75	2.46± 0.20	1338.00± 571.00
	低剂量组 Low dose group	40.00± 9.00	126.00± 11.00	339.00± 51.00	1.00± 1.00	7.51± 1.60	1.34± 0.27	2.34± 0.31	1472.00± 358.00

注:与阴性对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the negative control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$.

2.7 免疫及生长激素检测结果

与阴性对照组相比较,连续给药 18 d 和停药恢复 15 d 后,各剂量组免疫(IgA、IgE、IgG 及 IgM)和生长激素(GH 及 GHRP)指标均无统计学差异,结果详见图 3。

2.8 组织病理学

雌鼠:结果见图 4,连续给药 18 d 后,与阴性

对照组比较,各剂量组动物组织器官大体观察均无明显病理变化;各剂量组动物脾质量和系数均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),HE 染色结果显示,各剂量组动物脾小结结构形成,体积大、数量多。停药恢复 15 d 后,与阴性对照组比较,各剂量组动物脾质量和系数、脾小结结构未见明显差异;与给药结束同组比较,各组动物脾结构发育

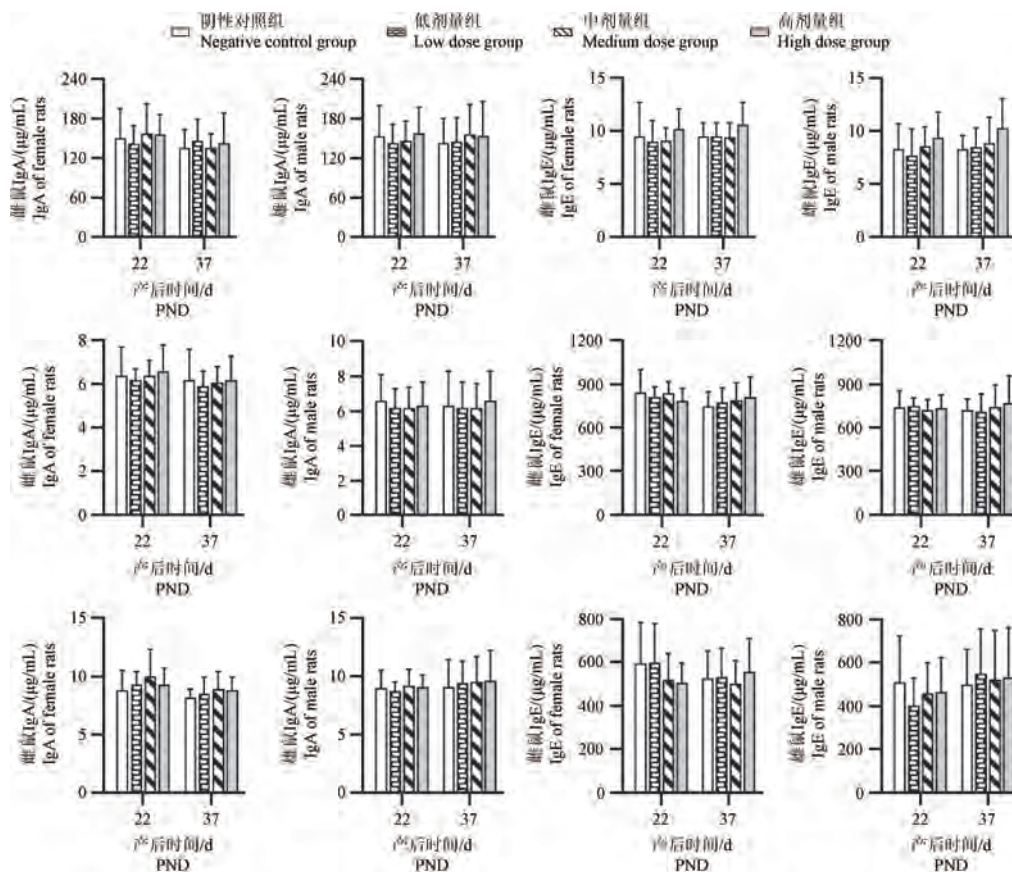


图 3 胆木浸膏糖浆对幼龄 SD 大鼠免疫功能和生长激素的影响

Figure 3 Effect of Dangmu extract syrup on immune function and growth hormone in juvenile SD rats

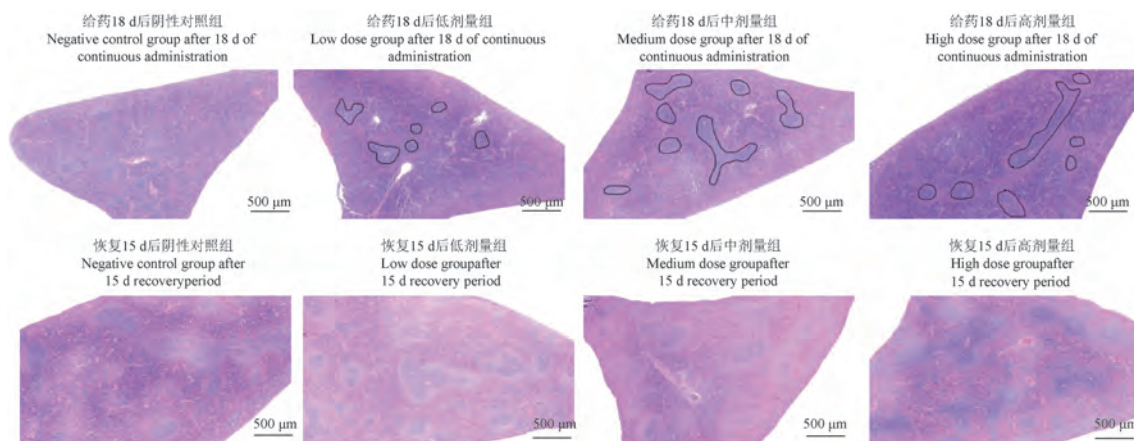


图 4 胆木浸膏糖浆经口给药后幼龄 SD 大鼠的脾病理学变化(HE)

Figure 4 Effect of Dangmu extract syrup on structure of spleen in juvenile SD rats(HE)

更完整,脾小结结构明显。

雄鼠:连续给药 18 d 后,与阴性对照组比较,各剂量组动物组织器官大体观察均无明显病理变化;低高剂量组动物脾质量和系数均显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。停药恢复 15 d 后,与阴性对照组比较,低中剂量组动物脾质量和系数均显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),脾小结结构未见明显差异;与给药结束同组比较,各组动物脾结构发育更完整,脾小结结构明显。

动物以上脾质量和结构变化,变化程度存在剂量关系,未见性别差异,与给药相关,停药恢复后可逆,结果详见图 4 和表 6。

表 6 胆木浸膏糖浆经口给药后幼龄 SD 大鼠脾质量及脏器系数变化 ($\bar{x}\pm s$)

Table 6 Effect of Dangmu extract syrup on organ mass and organ coefficient in juvenile SD rats ($\bar{x}\pm s$)

时间 PND	组别 Group	体质量/g Body mass	脏器质量/g Organ mass	脏器系数 Organ-to-body mass ratio
PND ₂₂ 雌性 PND ₂₂ female	阴性对照组 Negative control group	62.1±3.8	0.277±0.048	0.446±0.067
	低剂量组 Low dose group	62.4±2.1	0.330±0.041*	0.529±0.055*
	中剂量组 Medium dose group	63.5±4.1	0.355±0.075*	0.555±0.093*
	高剂量组 High dose group	59.3±6.1	0.366±0.045**	0.617±0.037**
PND ₂₂ 雄性 PND ₂₂ male	阴性对照组 Negative control group	63.8±5.1	0.291±0.056	0.454±0.056
	低剂量组 Low dose group	65.7±2.2	0.357±0.023*	0.543±0.034**
	中剂量组 Medium dose group	63.8±5.1	0.306±0.048	0.477±0.051
	高剂量组 High dose group	65.0±6.1	0.417±0.072**	0.643±0.105**
PND ₃₇ 雌性 PND ₂₂ female	阴性对照组 Negative control group	145.6±13.3	0.447±0.065	0.307±0.037
	低剂量组 Low dose group	157.0±9.6	0.436±0.045	0.277±0.019
	中剂量组 Medium dose group	152.4±10.6	0.469±0.061	0.307±0.029
	高剂量组 High dose group	161.6±8.3*	0.577±0.235	0.358±0.149
PND ₃₇ 雄性 PND ₂₂ male	阴性对照组 Negative control group	183.6±12.9	0.732±0.128	0.397±0.050
	低剂量组 Low dose group	176.7±13.1	0.562±0.116*	0.316±0.044**
	中剂量组 Medium dose group	184.2±7.4	0.614±0.047*	0.333±0.026**
	高剂量组 High dose group	188.2±15.3	0.684±0.066	0.365±0.041

注:与阴性对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

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

3 讨论

胆木浸膏糖浆于 2006 年上市,是胆木的一种新型制剂,其主要功效为清热解毒、消肿止痛,适用于小儿急性扁桃体炎、急性咽炎、急性结膜炎及上呼吸道感染,且其在小儿上呼吸道感染的疗

效非劣于小儿豉翘清热颗粒^[14]。然而,基于目前胆木浸膏糖浆的不良反应尚未明确,本试验对 PND₄ 幼龄 SD 大鼠连续 18 d 经口给予 3.1 g/mL、9.3 g/mL、28.0 g/mL 的胆木浸膏糖浆,系统探索其毒性反应。

体质量、体格与骨骼发育是生长发育过程中

考察的重要指标^[15],以及通过平面、空中翻正反射可对幼龄大鼠中脑的反射中枢及整个翻正反射弧的发育情况^[16-17]进行考察,本研究发现连续给药 18 d 后,与阴性对照组比较,4 日龄大鼠体质量和摄食量和生长发育部分指标,如顶臂长、尾长以及自发行为如行走等变化有散在的差异性,但其变化无整体连贯性、规律性,未见明显的时间-效应关系和剂量-效应关系,因此考虑该变化是幼龄动物正常范围内的波动,无毒理学意义。与现有关于胆木成人安全性评价结果一致^[18]。

血液学和血生化指标是反应动物健康的重要和敏感指标,是毒性研究中重要的考察指标^[19-20],本试验研究发现,与对照组比较,中高剂量组动物血清中 GLU 不同程度升高,血糖升高常由糖尿病、寒冷或摄食引起,组织病理学检查胰腺等相关脏器未见相关性的异常变化,与胆木浸膏糖浆含糖成分及动物的营养状态、代谢及排泄变化有关^[21]。另外,中、高剂量组动物血清中 AST、ALP 和 LDH 等均不同呈剂量关系显著或极显著性降低,停药 15 d 后部分指标不同程度恢复但未完全恢复至正常水平。AST、ALP 和 LDH 是机体内重要酶,是反应细胞活性和功能的重要指标,其结果升高往往提示机体内重要组织器官如心脏、肝、肾等实质细胞损伤,结果降低一般无临床意义,但大面积肝脏纤维化时 ALT、AST 可能减少^[22],或重度慢性肾炎、甲状腺功能不全等 ALP 降低^[23]。结合组织病理学检查结果,动物心脏、肝、肾等组织结构未见明显异常变化,提示以上变化无毒理学意义。乳酸脱氢酶是糖无氧酵解及糖异生的重要酶系之一,可催化丙酮酸与 L-乳酸之间的还原与氧化反应,也可催化相关的 α -酮酸^[24]。判断动物连续摄入糖浆后,血糖升高,同时大量糖代谢过程消耗 LDH,导致其降低。另外,在糖代谢中,血糖的重要去路之一是在肝、肌肉等组织中进行糖原合成^[24],判断在大量糖原合成后,导致肝和肌肉中相关的功能指标被动性降低,其具体变化机制需进一步探索研究。组织形态学观察发现,连续给药 18 d 后,各剂量组动物脾均出现不同程度的质量增加,脏器系数增大;镜下可见脾小结面积增大、数量多,提示胆木浸膏糖浆与脾变化具有一定的剂量-时间-反应关系;停药恢复 15 d 后,各组动物脾结构变化基本

恢复,其质量随生长发育而增加并达到同时期水平,且组织病理学观察可见脾小结结构完整,脾快速发育,因此认为该变化无毒理学意义。李阳友等^[25]研究结果显示,大鼠脾在 PND₁ 形成动脉周围淋巴鞘,1 月龄形成边缘区,3 月龄前发育成熟,随后继续生长,但无明显变化,与本研究中幼龄 SD 大鼠脾形态学改变特点基本一致。脾在动物胚胎发育过程中是重要的造血器官,动物出生后仍保持造血功能^[26-27],本研究中,给与胆木浸膏糖浆后,动物脾快速发育,伴随其造血功能增强,因此可见血液学中各剂量组动物 RET 和 RET% 显著性升高。与本研究机构中药方剂 LW2184 连续给与 SD 大鼠后 RET 和 RET% 升高具有相似之处^[28]。以上变化提示,胆木浸膏糖浆可能促进 4 日龄 SD 大鼠脾发育,功能加强,该变化与其营养成分有关,无毒理学意义。

综上所述,本研究发现,4 日龄 SD 大鼠连续 18 d 经口给予 31 g/kg、93 g/kg、280 g/kg 的胆木浸膏糖浆,可促进幼龄 SD 大鼠脾结构提前发育,伴随其造血功能增强,同时引起动物血糖升高,糖代谢功能加强导致相关酶消耗增多,导致部分肝功能指标被动性降低呈剂量相关性,无性别差异,停药后可逆,变化机制需进一步探索证实,建议临床研究时注意控制胆木浸膏糖浆的用药剂量,定期对脾及相关血液、血生化指标进行监测。

参考文献:

- [1] 裴晓婷,彭雷,曾纪错,等.胆木化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J].中国中药杂志,2024,49(8):2047-2063.
PEI X T, PENG L, ZENG J K, et al. Chemical constituents and pharmacological effects of *Nauclea officinalis* and predictive analysis of its quality markers [J]. China J Chin Mater Med, 2024, 49(8): 2047-2063.
- [2] 王爽.儿童流感中医证候学特征及胆木浸膏糖浆治疗流感样病例的疗效分析[D].沈阳:辽宁中医药大学,2023.
WANG S. Characteristics of TCM syndromes of influenza in children and analysis of curative effect of Danmu extract syrup on influenza-like cases [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2023.
- [3] 梁万顺,任红波,王园园,等.胆木浸膏糖浆联合氧氟沙星滴耳液治疗儿童急性中耳炎的临床研究[J].现代药物与临床,2022,37(2):342-345.

- LIANG W S, REN H B, WANG Y Y, et al. Clinical study of Danmujin Cream Syrup combined with Ofloxacin Ear Drops in treatment of acute otitis media in children [J]. *Drugs Clin*, 2022, 37(2): 342-345.
- [4] 刘腾, 常艳璐, 王斌. 胆木浸膏糖浆的药理作用与临床应用研究进展 [J]. *药品评价*, 2020, 17(16): 14-17.
- LIU T, CHANG Y L, WANG B. Pharmacological effect and clinical value of Danmu extract syrup [J]. *Drug Eval*, 2020, 17(16): 14-17.
- [5] 徐晓梅, 杨志, 陈必全. 用胆木浸膏糖浆对普通型手足口病患儿进行治疗的效果探讨 [J]. *当代医药论丛*, 2020, 18(1): 54-56.
- XU X M, YANG Z, CHEN B Q. Discussion on the effect of treating children with common hand-foot-mouth disease with bile extract syrup [J]. *Contemp Med Symp*, 2020, 18(1): 54-56.
- [6] 廖凯. 胆木浸膏糖浆治疗小儿病毒性感冒临床效果及安全性分析 [J]. *中外医学研究*, 2017, 15(1): 18-19.
- LIAO K. Clinical efficacy and safety analysis of bile extract syrup in treatment of children with viral influenza [J]. *Chin Foreign Med Res*, 2017, 15(1): 18-19.
- [7] EZEKWESILI C N, EZEIGWE O C, ASOMUGHA R N, et al. Chronic toxicological assessment of aqueous extract of a combination of *Nauclea latifolia* root and *Acalypha torta* leaf on the liver, kidney and heart of wistar rat [J]. *Asian J Biochem Genet Mol Biol*, 2023, 14(1): 1-13.
- [8] WANG Y, LIU H, HOU L, et al. Two new indole alkaloids from *Nauclea officinalis* and their evaluation for cytotoxic activities [J]. *Nat Prod Res*, 2024, 38(4): 607-613.
- [9] 周莉, 孙祖越. 非临床安全性评价中离乳前给药的幼龄动物分组设计 [J]. *中国新药杂志*, 2016, 25(21): 2483-2488.
- ZHOU L, SUN Z Y. Design on grouping of juvenile animal dosed prior to weaning during non-clinical safety evaluation [J]. *Chin J New Drugs*, 2016, 25(21): 2483-2488.
- [10] 黄芳华, 王庆利, JIM Ridings, 等. 幼龄动物毒理学研究: 试验设计、实施和结果分析 [J]. *中国新药杂志*, 2017, 26(2): 151-161.
- HUANG F H, WANG Q L, RIDINGS J, et al. Juvenile animal toxicity study: design, conduct, and report [J]. *Chin J New Drugs*, 2017, 26(2): 151-161.
- [11] 张文鹏, 张志伟, 庄笑梅. 基于 FDA“动物法则”外推超常规抗毒药物人用剂量的方法解读和思考 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(10): 1346-1352.
- ZHANG W P, ZHANG Z W, ZHUANG X M. Analysis on extrapolation of “humanized dose” toward extraordinary use new drugs under Animal Rule of FDA [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2020, 36(10): 1346-1352.
- [12] NAIR A, MORSY M A, JACOB S. Dose translation between laboratory animals and human in preclinical and clinical phases of drug development [J]. *Drug Dev Res*, 2018, 79(8): 373-382.
- [13] NAIR A B, JACOB S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human [J]. *J Basic Clin Pharm*, 2016, 7(2): 27-31.
- [14] ZENG L, LI H, ZHANG C, et al. Effectiveness and safety of Danmu extract syrup for acute upper respiratory tract infection in children: a real-world, prospective cohort study [J]. *J Evid Based Med*, 2022, 15(1): 19-29.
- [15] 吴薇, 罗小平. 科学评估儿童和青少年体格生长发育 [J]. *中华医学信息导报*, 2022, 37(10): 14.
- WU W, LUO X P. Scientifically assess the physical growth and development of children and adolescents [J]. *Chin Med News*, 2022, 37(10): 14.
- [16] 张玉媛, 王春华, 王允, 等. 出生后早期镉暴露诱导小鼠生理及神经行为发育改变 [J]. *第三军医大学学报*, 2016, 38(16): 1826-1830.
- ZHANG Y Y, WANG C H, WANG Y, et al. Physiological and neurobehavioral changes in newborn mice exposed to cadmium at early life [J]. *J Third Mil Med Univ*, 2016, 38(16): 1826-1830.
- [17] 郭健敏, 张文强, 邓应华, 等. 芩香清解口服液对 4 日龄大鼠的发育毒性 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2023, 37(12): 904-913.
- GUO J M, ZHANG W Q, DENG Y H, et al. Developmental toxicity of Qinxiang Qingjie oral solution for 4-day-old young rats [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2023, 37(12): 904-913.
- [18] 马雅鑫, 胡镜清. 胆木的研究进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(7): 3079-3082.
- MA Y L, HU J Q. Review of *Nauclea officinalis* Pierre. ex petard [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2017, 32(7): 3079-3082.
- [19] TOMLINSON L, BOONE L I, RAMAIAH L, et al. Best practices for veterinary toxicologic clinical pathology, with emphasis on the pharmaceutical and biotechnology industries [J]. *Vet Clin Pathol*, 2013, 42(3): 252-269.
- [20] JARDINE L, WEBB S, GOH I, et al. Blood and immune development in human fetal bone marrow and Down syndrome [J]. *Nature*, 2021, 598(7880): 327-331.
- [21] 孔庆喜, 罗曼, 赵煜, 等. 临床生化指标在新药临床前研究中的毒理学意义 [J]. *药物评价研究*, 2014, 37(5): 472-475.
- KONG Q X, LUO M, ZHAO Y, et al. Toxicological significance of clinical biochemical indicators in preclinical studies for new drugs [J]. *Drug Eval Res*, 2014, 37(5): 472-475.
- [22] ROCKEY D C, MONTGOMERY BISSELL D. Noninvasive

- measures of liver fibrosis [J]. *Hepatology*, 2006, 43 (2 Suppl 1): S113-S120.
- [23] 赵春生, 裴春红. 成年男性血清碱性磷酸酶活力降低的主要临床意义 [J]. *中国医学创新*, 2011, 8(12): 104-105.
- ZHAO C S, PEI C H. The main clinical significance of the decrease of serum alkaline phosphatase activity in adult men [J]. *Med Innov China*, 2011, 8(12): 104-105.
- [24] 邹思湘. 动物生物化学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2013.
- ZHOU S X. *Animal biochemistry* [M]. Beijing: China Agriculture Press Co., Ltd, 2013.
- [25] 李阳友, 黄静, 郭洋, 等. 大鼠脾脏主要结构的发育: 2 月、2 年和 3 年龄的形态定量研究 [J]. *川北医学院学报*, 2018, 33(1): 63-65.
- LI Y Y, HUANG J, GUO Y, et al. Development of key structures in the rat spleen: a morphometric study at 2 months and 2 to 3 years of age [J]. *J N Sichuan Med Coll*, 2018, 33(1): 63-65.
- [26] ZHANG Y, XIE X, HUANG Y, et al. Temporal molecular program of human hematopoietic stem and progenitor cells after birth [J]. *Dev Cell*, 2022, 57(24): 2745-2760.
- [27] 孙凤宇, 许强华. 血液发生相关 microRNAs 研究进展 [J]. *遗传*, 2022, 44(9): 756-771.
- SUN F Y, XU Q H. Research progress of microRNAs involved in hematopoiesis [J]. *Hereditas (Beijing)*, 2022, 44(9): 756-771.
- [28] 黄羽静, 柳璐, 雷夏凌, 等. LW2184 对 SD 大鼠 28 天重复给药毒性实验研究 [A]. 中国毒理学会第十次全国毒理学大会论文集 [C]. 珠海: 广东莱恩医药研究院有限公司广东省药物非临床评价研究企业重点实验室国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心广东省创新药物评价与研究工程技术研究中心; 广州华博生物制药研究所; 2023.
- HUANG Y J, LIU L, LEI X L, et al. Experimental study on the toxicity of LW2184 after 28 d repeated administration in SD rats [A]. *Proceedings of the 10th National Toxicology Conference of the Chinese Society of Toxicology* [C]. Zhuhai: Guangdong Lian Pharmaceutical Research Institute Co., LTD., Guangdong Provincial Key Laboratory of Non-clinical Evaluation of Drugs, National Engineering Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine, Sub-Center for Non-Clinical Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Provincial Engineering Research Center for Evaluation and Research of Innovative Drugs; Guangzhou Huabo Biological Pharmaceutical Research Institute; 2023.

[收稿日期]2024-07-26

吴礼毛,贺靖澜,申娜,等. M2 型巨噬细胞外泌体通过 AKT-WEE1 通路促进 SCs 增殖增强神经再生 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(5): 37-50.

Wu LM, He JL, Shen N, et al. M2 macrophage-derived exosomes promote neural regeneration by enhancing proliferation of Schwann cells via the AKT-WEE1 pathway [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(5): 37-50.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.05.004

M2 型巨噬细胞外泌体通过 AKT-WEE1 通路促进 SCs 增殖增强神经再生

吴礼毛¹, 贺靖澜^{2*}, 申娜³, 陈松⁴

(1.河北工程大学临床医学院,河北邯郸 056004;2.河北工程大学附属医院复兴院区,河北邯郸 056003;
3.河北工程大学附属医院科教处,河北邯郸 056004;4.河北工程大学附属医院骨科中心,河北邯郸 056004)

【摘要】 目的 探索巨噬细胞源外泌体在周围神经损伤中的作用机制。**方法** 巨噬细胞极化为 M1 与 M2 表型后提取外泌体干预雪旺细胞,随后进行细胞增殖、实时荧光定量聚合酶链反应、流式细胞术、RNA 测序以及蛋白免疫印迹法实验等。体内建立坐骨神经挤压模型并分为磷酸缓冲盐水治疗组、M1-exo 治疗组及 M2-exo 治疗组,分别注射磷酸缓冲盐水、M1 型外泌体及 M2 型外泌体,同时另设正常组。术后每周对各组坐骨神经功能指数、湿重率以及肌肉神经组织染色等进行评估。**结果** M1 型外泌体促进雪旺细胞迁徙并上调胶质源性神经生长因子;M2 型外泌体促进雪旺细胞增殖迁徙并上调神经生长因子、神经生长因子、髓鞘蛋白零、胶质纤维酸性蛋白、神经生长因子受体及 S100 钙结合蛋白 B 等。体内第 4 周 M2 型外泌体组坐骨神经功能指数、湿重率、肌肉神经组织 Masson 染色及神经轴突与雪旺细胞荧光面积均优于 PBS 治疗组,均具有显著差异,而 M1-exo 治疗组与 PBS 治疗组则无显著差异。同时,体内外实验均表明 M2-exo 可通过磷酸化丝氨酸/苏氨酸激酶后下调细胞周期蛋白 WEE1 促进雪旺细胞增殖。**结论** M2 型外泌体促进雪旺细胞上调神经再生相关基因;并可通过 AKT-WEE1 通路促进雪旺细胞增殖、迁徙以提高神经再生。

【关键词】 巨噬细胞;外泌体;雪旺细胞;周围神经损伤;WEE1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 05-0037-14

M2 macrophage-derived exosomes promote neural regeneration by enhancing proliferation of Schwann cells via the AKT-WEE1 pathway

WU Limao¹, HE Jinglan^{2*}, SHEN Na³, CHEN Song⁴

(1. School of Clinical Medicine, Hebei University of Engineering, Handan 056004, China.

2. Fuxing Branch, Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering, Handan 056003.

3. Department of Science and Education, Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering,

Handan 056004. 4. Orthopedic Center, Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering, Handan 056004)

【基金项目】河北省卫生健康委员会 2023 医学科学研究项目(20231515);河北省优秀人才培养项目(ZF2024207)。

【作者简介】吴礼毛(1985—),男,在读硕士研究生,主治医师,研究方向:神经损伤修复。E-mail:562122050@qq.com

【通信作者】贺靖澜(1980—),男,博士,主任医师,研究方向:神经损伤修复。E-mail:hejinglan@hebeu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of action of macrophage-derived exosomes (Exo) in peripheral nerve injury (PNI). **Methods** Exo were extracted following the polarization of macrophages to either the M1 or M2 phenotype to determine their effects on Schwann cells (SCs), using cell proliferation, quantitative real-time polymerase chain reaction, flow cytometry, RNA sequencing, and Western blot. A sciatic nerve extrusion model was established *in vivo*. PBS, M1-exo and M2-exo treatment groups were injected with PBS, M1-exo, and M2-exo, respectively, and a separate normal group was set up. The sciatic nerve function index (SFI), wet weight ratio, and staining of neuromuscular tissue were evaluated on a weekly basis in each experimental group following surgical intervention. **Results** M1-exo facilitated SC migration and upregulated glial-derived nerve growth factor, whereas M2-exo promoted SC proliferation and migration and upregulated brain-derived nerve growth factor and nerve growth factor. The biomarkers, myelin protein zero, glial fibrillary acidic protein, nerve growth factor receptor (NGFR) and S100 calcium-binding protein B (S100) were also detected. In the *in vivo* experiments, the SFI, wet weight ratio, neuromuscular tissues, and fluorescent areas of nerve axons (marker NF200) and SCs (marker S100) were all significantly better in the M2-exo treatment group at week 4 compared with the PBS treatment group, while there were no significant differences between the M1-exo and PBS treatment groups. Both the *in vivo* and *ex vivo* experiments demonstrated that M2-exo facilitated the proliferation of SCs via phosphorylation of the serine/threonine kinase AKT, resulting in downregulation of the cell cycle protein WEE1. **Conclusions** M2-exo has been demonstrated to promote up-regulation of genes associated with nerve regeneration by SCs and promote SC proliferation and migration, thereby facilitating nerve regeneration via the AKT-WEE1 pathway.

【Keywords】 macrophage; exosome; Schwann cells; peripheral nerve injury; WEE1

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

周围神经损伤(peripheral nerve injury, PNI)在临床创伤中比较常见,据报道占临床创伤的2~3%^[1];损伤后躯干或肢体感觉、运动及自主功能失调,严重影响患者的生活质量,常伴有一些心理应激或抑郁^[2]。因此,寻求更好的促神经再生治疗方法势在必行。外泌体(exosome, Exo)是干细胞的旁分泌产物,可以产生与干细胞相当的治疗效果,而且保留了干细胞的大部分特性,其来源广泛、易保存、功能稳定、致癌风险低^[3];通过转移蛋白质、RNA 和 DNA 在细胞与细胞通讯中发挥着重要作用^[4]。据报道,Exo 疗法在神经再生过程中也起着重要的作用^[5]。来自雪旺细胞(schwann cells, SCs)、巨噬细胞(macrophage, MØ)和间充质干细胞的 Exo 可以促进周围神经再生^[6]。Exo 还可以通过介导轴突再生、SCs 的活化、血管再生和炎症调节来发挥神经再生治疗的作用,正成为治疗 PNI 的一种很有前景的方法^[7]。

PNI 后局部微环境变化, MØ 是起最关键作用的免疫细胞,不断迁移、吞噬轴突及髓鞘碎片为神经再生提供有益的微环境^[8],还能释放大量的细胞外基质蛋白、生长因子、细胞因子和化学因子以及参与髓鞘结构的重建,促进轴突再

生^[9-11]。同时, MØ 分泌的产物也能影响神经元的新陈代谢,有助于体内平衡、免疫和炎症方面的功能^[12]。其中, M2 来源的 Exo 具有天生的炎症靶向能力,能减少炎症和凋亡细胞因子^[13];还具有早期的基因重组因子以及各种细胞因子和生长因子,并可使 M1 转向 M2 的极化;还具有调节增殖和血管生成,促进创面修复等等^[14]。然而, MØ 在神经损伤后的作用机制尚不清楚。因此,本研究的目的是利用 MØ 来源的 M2-exo 探索其在神经损伤修复过程中的作用机制,寻找一些有价值的促进疗法,进一步提高 PNI 的治疗效果。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 46 只, 8 周龄, 体质量 150 g 左右, 骨骼成熟, 临床和功能健康, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2024-0001], 将动物饲养在河北工程大学附属医院中心实验室[SYXK(冀)2023-001]。饲养环境: 独立通气笼盒系统, 受控温度约 20℃, 湿度约 64%, 总送风管风速 8.00 m/s, 12 h 进风约 91%, 换气

次数约 60, 排风约 63%, 12 h/12 h 光照/黑暗循环等方案下, 并维持标准饮食和水。动物实验经河北工程大学附属医院实验动物福利伦理委员会批准 (IACUC-Hebeu-2023-0036), 实验设计与饲养过程均遵循 3R 原则。

1.1.2 细胞

大鼠肺泡 MØ 系 NR8383 (FH0398), 大鼠 SCs 系 (FH1100), 均购自于上海富衡生物科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

含 DAPI 抗碎灭荧光封片液 (P0131, Beyotime); 培养基 F-12K 500 mL (23052602, Thermo Fisher Scientific); 无 Exo 血清 50 mL (2133227, VivaCell BIOSCiENCES); DMEM/F12 250 mL (22101803, ThermoFisher), 10% FBS 500 mL (12B156, ThermoFisher); 青霉素-链霉素-多粘菌素 B 溶液 100 mL (23030103, 北京百奥莱博科技有限公司); 磷脂脂多糖 (Phosphatidylcholine, LPS L2880-10MG, Sigma); 白介素 (interleukin, IL) 4、IL13 (400-04-5uG、400-16-2uG, Peprotech); TSG101 (ab125011, abcam); CALNEXIN (ab22595, abcam); WEE1 (bs-23526R, bioss); AKT (10176-2-AP, proteintech); p-AKT (66444-1-1g, proteintech); S-100B (15146-1-AP, proteintech); NF200 (18934-1-AP, proteintech); GAPDH (bs-41373R, bioss); Beta-tubulin (bsm-33034M, bioss); 通用型二抗 (pk10006, proteintech); FITC (bs-0295G, bioss); Alexa Fluor 594 (bs-0295G-AF594, bioss); RNA 提取试剂盒 (RC112-01, FastPure Cell/Tissue Total RAN Isolation Kit V2, Vazyme); 凯基细胞 DNA 含量检测试剂盒 (KGA512, 凯基生物技术股份有限公司); Rat IL10 ELISA 试剂盒 (EK310/2-48, MULTI SCIENCES); CCK8 试剂盒 (AP20230612, APEXBIO)。

恒温 CO₂ 细胞培养箱 (美国, Thermo Fisher 公司); 离心机 (日本, Sigma 公司); 超级离心机 (美国, BECKMAN COULTER optima XPN-100 Ultracentrifuge); 实时荧光定量 PCR 仪 (美国, Thermo Fisher/Bio-Rad); 流式细胞仪 (美国, Beckman Coulter 公司); 全自动免疫组化染色机 (中国, 中杉金桥); 显微镜 (日本, Olympus)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养、极化及上清细胞因子检测

大鼠肺泡 MØ 系, 大鼠 SCs 系细胞在 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养。10 ng/mL 磷脂脂多糖刺激 MØ 向 M1 表型极化, 种植细胞 1.5×10^5 /孔。10 ng/mL IL-4 及 20 ng/mL IL-13 刺激 MØ 向 M2 表型极化, 种植细胞 5×10^5 /孔。M1 和 M2 表型极化成功后, 用含 20% 的无 Exo 血清 F12K 培养基重悬并再次培养 24 h, 收集上清离心去细胞碎片后 -20 °C 冻存备后续实验。所有实验重复 3 次。取部分 M2 型上清, 使用 Rat IL10 ELISA Kit 检测上清中的细胞因子。

1.3.2 Exo 分离

备用上清连续离心制备 Exo。上清离心过程: 300 r/min、5 min, 1000 r/min、10 min, 4000 r/min、10 min, 10 000 r/min、10 min, 200 000 r/min、120 min, 最后弃上清, 每管使用 200 µL PBS 重悬, 测量蛋白浓度分管并在 -80 °C 下冷藏。

1.3.3 细胞增殖、伤口划痕及流式细胞术实验

增殖实验: 干预 SCs, 设置对照组, M1-exo 组和 M2-exo 组作为实验组, 96 孔板 5×10^3 /孔, 每组 5 个重复, 测试多个剂量组: 2.5 µL、5 µL、10 µL 和 15 µL Exo, 对照组给予相应剂量的 PBS, 干预 24 h, 使用 CCK8 试剂检测比较 Exo 干预 SCs 24 h 后不同组的增殖情况, 光密度值表示活细胞的数量。

划痕实验: 设置对照组, M1-exo 组和 M2-exo 组作为实验组, 6 孔板 1×10^6 /孔 SCs, 各实验组加入相应的 5 µL Exo 混匀, 在 0 h 和 24 h 拍摄划痕区域。

流式实验: 检测细胞周期, 设置对照组与 M2-exo 组, 相应的 5 µL 剂量干预 SCs 24 h 后收集细胞, 处理后 (488 nm) 上机检测。所有实验重复 3 次。

1.3.4 qRT-PCR 及 RNA 测序

收集各组细胞进行 qRT-PCR, 按照试剂盒说明书进行 RNA 分离。总 RNA 用无 RNase 的水稀释, RNA 浓度通过紫外可见分光光度法测定 (MIULAB)。无 RNase 水中 0.5~1 µg RNA 使用 Vazyme, HiSCriptR III RT SuperMix for qPCR (+ gDNA wiper) 生成体积为 20 µL 的 cDNA (MIULAB)。根据制造商方案使用 Vazyme,

ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 进行扩增并通 BIO-RAD, CFX Connect Real-Time System 进行分析。通过计算每个样品的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来获得基因相对表达强度。所有实验重复 3 次。

mi-RNA 测序: 对照组与 M2-exo 组干预 SCs 24 h 后提取 RNA 送检, 送检单位为南京集思慧远生物科技有限公司。mi-RNA 通过样品检测、文库构建、文库质控、上机测序以及生物信息学分析等过程。readcount 矩阵进行差异分析; 差异基因筛选标准: $|\log_2 FC| \geq 1$ 且 $fdr \leq 0.05$; Rggplot2 (v3.6.2) 程序包绘制 MA 图、火山图、箱线图, Rpheatmap (v3.6.2) 绘制基因表达聚类热图并对最显著的前 20 个通路作 KEGG 富集散点图。

1.3.5 蛋白免疫印迹 (Western blot)

Exo 及细胞蛋白变性后加入到 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳和转膜。5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 兔源一抗 TSG101、CALNEXIN、WEE1、AKT、p-AKT、Beta-tubulin 封闭过夜, 通用型二抗孵育 1 h。ECL 发光剂中混匀后, 转移 NC 膜上反应 1 min, 暗室内曝光、显影、定影及胶片扫描。

1.3.6 大鼠坐骨神经损伤模型的制备

所有动物分为 4 组 ($n=46$): PBS 治疗组 ($n=14$)、M1-exo 治疗组 ($n=14$)、M2-exo 治疗组 ($n=14$)、正常组 ($n=4$)。模型构建: 异氟烷吸入麻醉, 左侧大腿后方作约 1 cm 长的纵型切口, 分离肌肉, 显露并挑起坐骨神经, 在梨状肌下约 5 mm 处用止血钳双齿加压坐骨神经并持续 10 s, 直至颜色变成半透明^[15], 在损伤点一次性注射 PBS、Exo 约 50 μ L, 逐层关闭伤口, 手术完成, 监督大鼠恢复过程, 允许随意饮水和进食。手术后 4 周, 每周每组进行 1 次足迹分析和 3 只动物解剖, 持续 4 周; 正常组前 3 周不解剖, 第 4 周全部处死解剖。最后, 收获肌肉与坐骨神经标本包埋切片进一步染色分析。

1.3.7 大鼠腓肠肌湿重率的测定

术后前 3 周每周每组解剖 3 只大鼠双侧腓肠肌, 第 3 周各组解剖 5 只; 正常组前 3 周不解剖, 第 4 周全部处死解剖; 记录各组湿重恢复率。公式: 湿重恢复率/% = (患侧肌肉湿重/健侧肌肉湿重) $\times 100\%$ ^[8]。

1.3.8 坐骨神经功能指数 (siatic nerve function index-SFI) 的测定

自制大鼠步态分析纸箱 (30 cm $\times$ 10 cm $\times$ 60 cm), 开天窗可观察大鼠行走过程, 将 A5 纸置于箱底, 另在箱侧壁自制一纸板压紧 A5 纸, 防止移动, 每组大鼠双侧后足涂抹黑色墨汁, 放置箱入口处, 自由走向箱出口。选取足印清晰的纸张分别测量正常侧 (normal side, N) 及实验侧 (experimental side, E) 的 3 个距离。足印长度 (paw length, PL): 足印的最长距离; 足趾宽度 (toe-spread distance between toes 1 and 5, TS): 第 1 趾至第 5 趾连线的距离; 中间足趾宽度 (toe-spread distance between toes 2 and 4, ITS): 第 2 趾至第 4 趾连线的距离。SFI 为 0 表示神经功能正常, -100 表示神经功能完全损伤^[16], SFI 计算公式:

$$SFI = 109.5 \times \frac{[ET-NTS]}{NTS} - 38.3 \times \frac{[EPL-NPL]}{NPL} + 13.3 \times \frac{[EIT-NIT]}{NIT} - 8.8$$

1.3.9 组织学评估

肌肉和坐骨神经标本用 4% 的多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 5 μ m 切片常规脱蜡复水后分别进行 Masson 染色评估。神经标本进行免疫组化和荧光染色: 一抗兔抗 S-100B (1 : 200)、兔抗 NF200 (1 : 200)、WEE1 (1 : 400)、AKT (1 : 800)、p-AKT (1 : 800) 4 $^{\circ}$ C 过夜; 二抗 Alexa Fluor 594 山羊抗兔 (1 : 400)、FITC (1 : 400), 通用型二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; DAB (proteintech, pk10006, 1 : 20) 15~20 s, 苏木素 20~30 s 用于组化; 常规脱蜡酒精封片; 荧光染色用含 DAPI 抗淬灭荧光封片液覆盖组织后直接封片避光保存; 显微镜下摄取图像分析。每个切片随机选择多个高倍视野点备用分析。使用 Image J (Win64) 软件对神经纤维和 SCs 荧光面积进行计算。

1.4 统计学方法

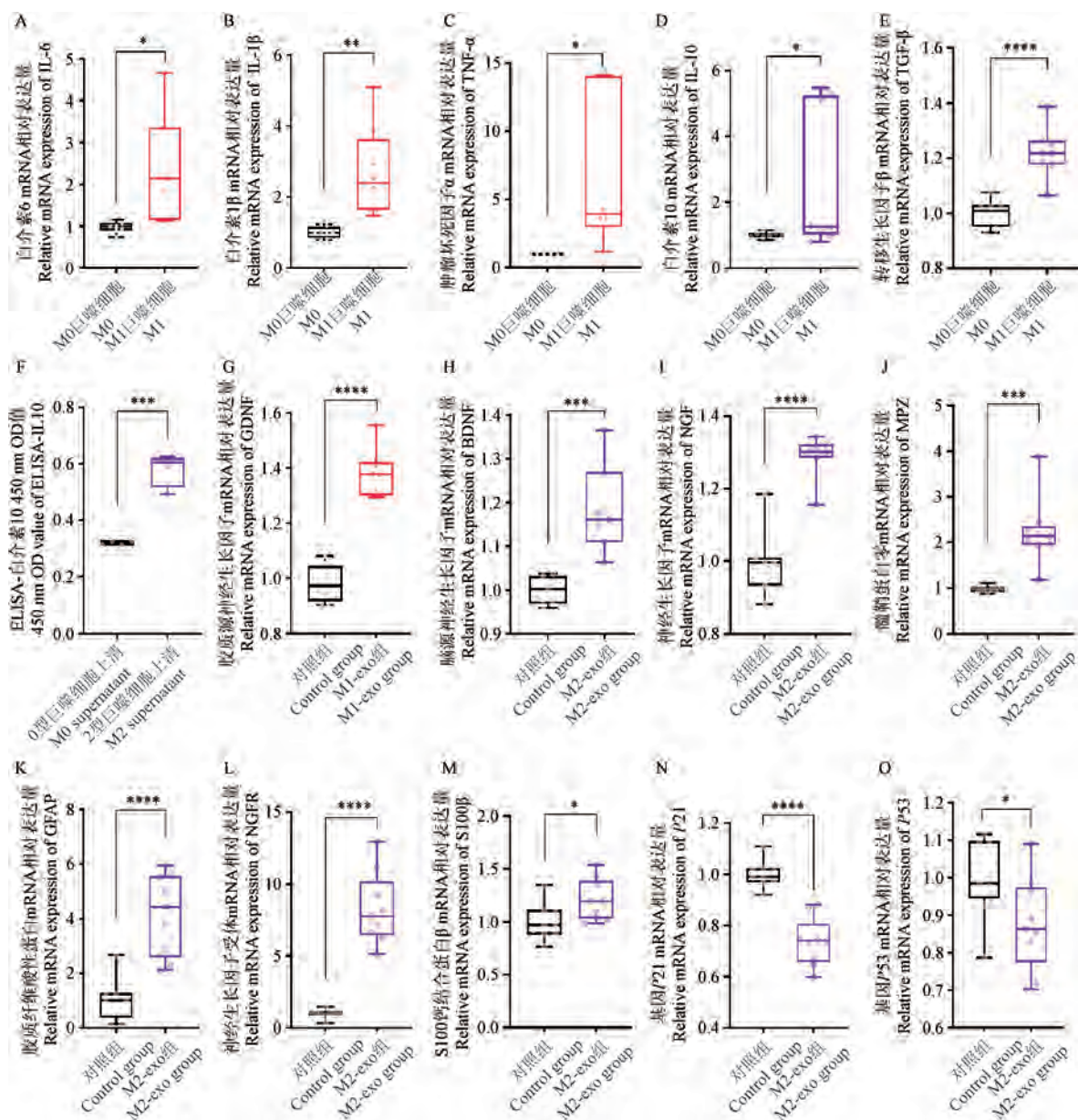
Adobe Illustrator (2024)、Image J (Win64) 和 GraphPad Prism 9.0 (USA) 分别进行数据分析和作图统计分析。检测结果用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 巨噬细胞极化与 SCs 神经再生相关基因的表达

与对照组相比 10 ng/mL LPS 处理 24 h 后 M1

型炎症基因 IL-6 ($P < 0.05$)、IL-1 β ($P < 0.01$)、TNF- α ($P < 0.05$) 表达量具有显著差异 (图 1A~1C), 10 ng/mL IL-4 及 20 ng/mL IL-13 处理 24 h 后 M2 型再生基因 IL-10 ($P < 0.05$)、TGF- β 1 ($P <$



注: A~C: M1 表型 IL-6、IL-1 β 以及 TNF- α 的相对表达水平; D~E: M2 表型 IL-10 与 TGF- β 的相对表达水平; F: M2 型培养上清 IL-10 的相对 OD 值; G: M1-exo 干预 SCs 后 GDNF 的相对表达水平; H~I: M2-exo 干预 SCs 后 BDNF 与 NGF 的相对表达水平; J~O: SCs 各神经再生相关基因相对表达水平。两组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 1 M ϕ 的成功极化与 Exo 干预 SCs 后的相关基因表达

Figure 1 Successful polarization of M ϕ and the expression of related genes in exosome-treated SCs

Note. A~C, Relative expression levels of M1 phenotype markers IL-6, IL-1 β , and TNF- α . D~E, Relative expression levels of M2 phenotype markers IL-10 and TGF- β . F, Relative OD value of IL-10 in the supernatant of M2-type cultures. G, Relative expression level of GDNF after M1-exosome intervention in SCs. H~I, Relative expression levels of BDNF and NGF after M2-exosome intervention in SCs. J~O, Relative expression levels of various neuroregeneration-related genes in SCs. Compared between two groups, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

0.0001) 表达量均有显著差异(图 1D~1E); M1-exo 组胶质源性神经生长因子(glia-derived nerve growth factor, GDNF) ($P<0.0001$)、M2-exo 组上调脑源性神经生长因子(brain-derived nerve growth factor, BDNF) ($P<0.001$)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF) ($P<0.0001$)、髓鞘蛋白零(myelin protein zero, MPZ) ($P<0.001$)、胶质纤维酸性蛋白(glia fiber acidic protein, GFAP) ($P<0.0001$)、神经生长因子受体(nerve growth factor receptor, NGFR) ($P<0.0001$)及 S100 钙结合蛋白 B(s100 calcium-binding protein B, S100)基因($P<0.05$)、P21 基因($P<0.0001$)及 P53 基因($P<0.05$), 这些因子均具有显著性差异(图 1G~1O)。

2.2 Exo 分子标志物检测与干预 SCs

结果见图 2, Western blot 验证分析表明 M0、M1 及 M2 型 Exo 组 TSG101 阳性, CALNEXIN 蛋白阴性。CCK8 发现 5 μ L M2-exo 组与对照组相比 OD 值具有显著差异($P<0.05$)。伤口划痕实验发现: M1-exo 组($P<0.0001$)及 M2-exo 组($P<0.0001$)SCs 愈合面积比率均优于对照组, 有显著差异。流式实验结果发现: M2-exo 组的 SCs G2/M 期细胞数量占比(36.0%、38.2%及 40.5%)均多于对照组(26.0%、27.3%及 28.6%), 有显著差异($P<0.01$)。

2.3 肌肉湿重率恢复结果

湿重率在术后 3 周逐渐下降, 各组对比无显著差异; 至第 4 周 PBS 治疗组与 M1-exo 治疗组湿重率下降基本停止, M2-exo 治疗组较第 3 周有所上升且较 PBS 组有显著差异($P<0.01$)。表明 M2-exo 有利于肌肉的恢复(图 3)。

2.4 SFI 恢复结果

术后每周对每组大鼠的双侧足印采集分析发现: 术后第 1 周各组 SFI 值均下降, M2-exo 治疗组与 PBS 治疗组相比下降缓慢, 有显著差异($P<0.001$); 术后第 2 周各组 SFI 值下降变慢且无显著差异; 第 3、4 周 SFI 值逐步上升, M1-exo 治疗组与 PBS 治疗组相比无显著差异, M2-exo 治疗组与 PBS 治疗组相比第 3 周($P<0.05$)及第 4 周($P<0.01$)有显著差异。表明 M2-exo 促进肢体功能恢复(图 3)。

2.5 M2-exo 干预下肌肉神经恢复

术后第 4 周 M1-exo 治疗组的肌纤维面积优于 PBS 治疗组($P<0.0001$), 但神经束面与 PBS 治疗组无显著差异; 在第 4 周 M2-exo 治疗组的肌纤维面积($P<0.0001$)及神经束面积($P<0.0001$)均优于 PBS 治疗组, 均有显著差异。表明 M1-exo 减缓肌肉萎缩, M2-exo 促进肌肉恢复及神经再生(图 4)。

2.6 M2-exo 干预下 SCs 增殖以及神经轴突再生

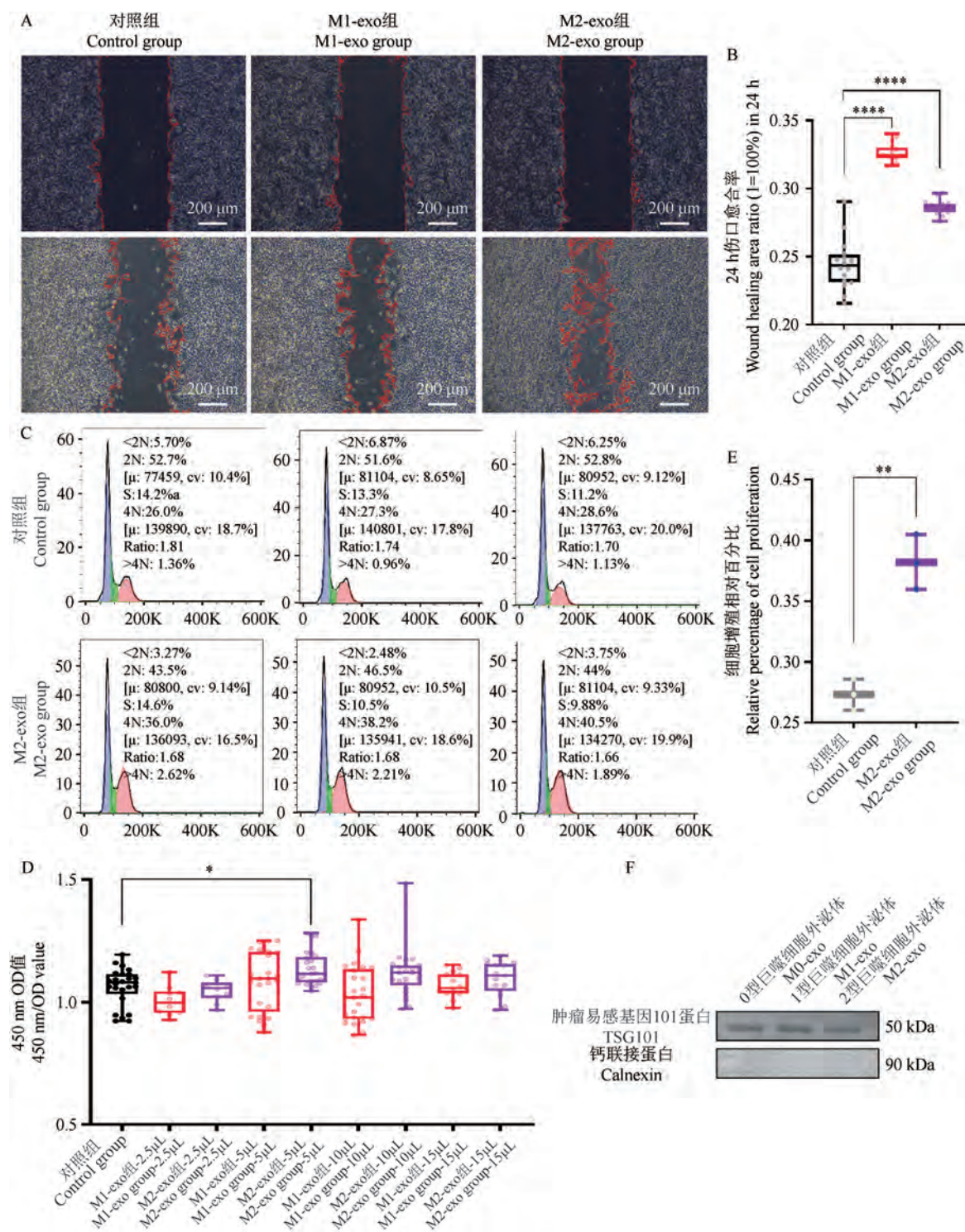
与 PBS 治疗组相比 M2-exo 治疗组 NF200 再生结构更加有序, 神经纤维间距更加紧密, 更少的髓鞘空腔, S100 数量也更多; M2-exo 治疗组的 NF200 荧光和 S100 组化染色面积均优于 PBS 治疗组, 有显著差异($P<0.0001$); 但 M1-exo 治疗组的 NF200 荧光和 S100 组化染色面积与 PBS 治疗组相比均无显著差异。表明 M2-exo 促进 SCs 增殖和轴突再生(图 5、图 6)。

2.7 M2-exo 干预下 RNA 测序基因表达显著

热图显示 M2-exo 组各平行间基因表达是有所差异的(图 7A)。火山图(Volcano plot)及柱状图可见在对照组与 M2-exo 组间共有 2100 个基因表现出显著差异, 其中, 下调 975, 上调 1125 个, 另有 9800 个未变化(图 7B~7C)。KEGG 通路富集分析表明: 通路细胞生长与死亡、细胞运动及转运与分解代谢等基因通路变化明显; 同时前 20 个显著性通路, 如氧化磷酸化、溶酶体、IL-17 信号通路、细胞周期以及细胞凋亡等 P 值较小(图 7D)。

2.8 M2-exo 磷酸化 AKT 抑制 WEE1

体外实验对通路蛋白 AKT、p-AKT、WEE1 及 B-tubulin 进行了蛋白印迹分析, 结果发现: M2-exo 组 p-AKT 蛋白表达优于对照组($P<0.05$), WEE1 蛋白低于对照组($P<0.0001$)(图 8A、8C~8D)。体内对第 4 周坐骨神经损伤点标本进行相关通路蛋白组化分析, 结果发现: M2-exo 治疗组 p-AKT 蛋白优于 PBS 治疗组($P<0.05$), WEE1 次于 PBS 治疗组($P<0.001$), 均有显著差异(图 8B、8E~8G)。以上表明, M2-exo 可以通过磷酸化 AKT 抑制下游 WEE1 途径促进 S100 增殖, 进一步提高 NF200 的再生。

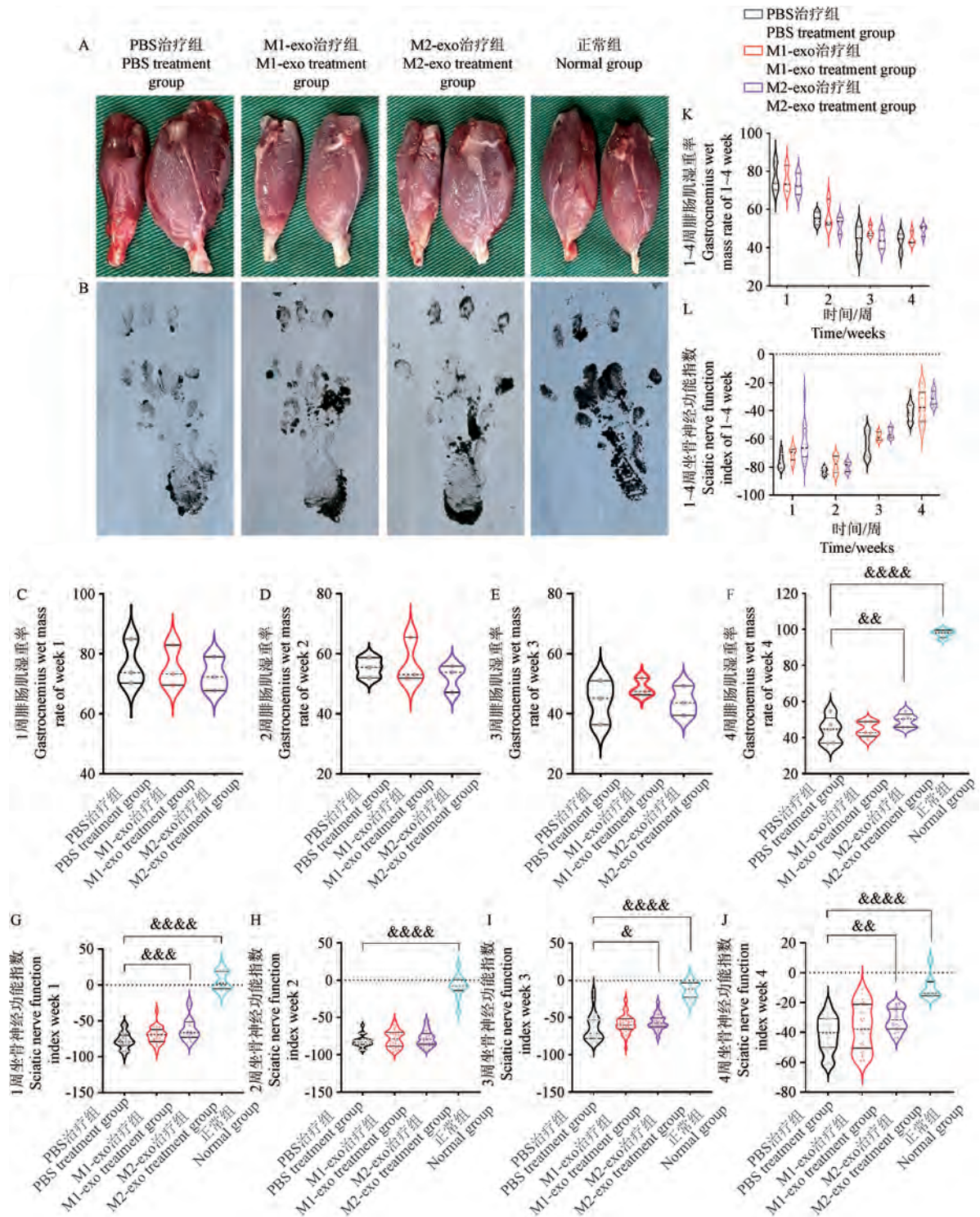


注: A~B; Exo 干预 SCs 24 h 后各组的划痕愈合面积比; C, E: PBS 对照组与 M2-exo 干预 SCs 后的细胞周期检测 ($n=3$); D: 不同浓度的 M1-exo 与 M2-exo 干预 SCs 的增殖变化 (450 nm OD 值); F: M0、M1 及 M2 型 Exo 的蛋白印迹分析。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

图 2 Exo 处理 SCs 后的增殖、迁移及细胞周期变化与 Exo 鉴定

Note. A~B, Ratio of scratch wound healing area of SCs after 24 hours of exosome intervention in each group. C/E, Cell cycle detection of PBS control group and SCs after M2-exo intervention ($n=3$). D, Proliferation changes of SCs intervened by different concentrations of M1-exo and M2-exo (OD values at 450 nm). F, Western blot analysis of proteins in M0, M1, and M2-type exosomes. Compared with Control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

Figure 2 Proliferation, migration, and cell cycle changes in SCs treated with exosomes and exosome identification

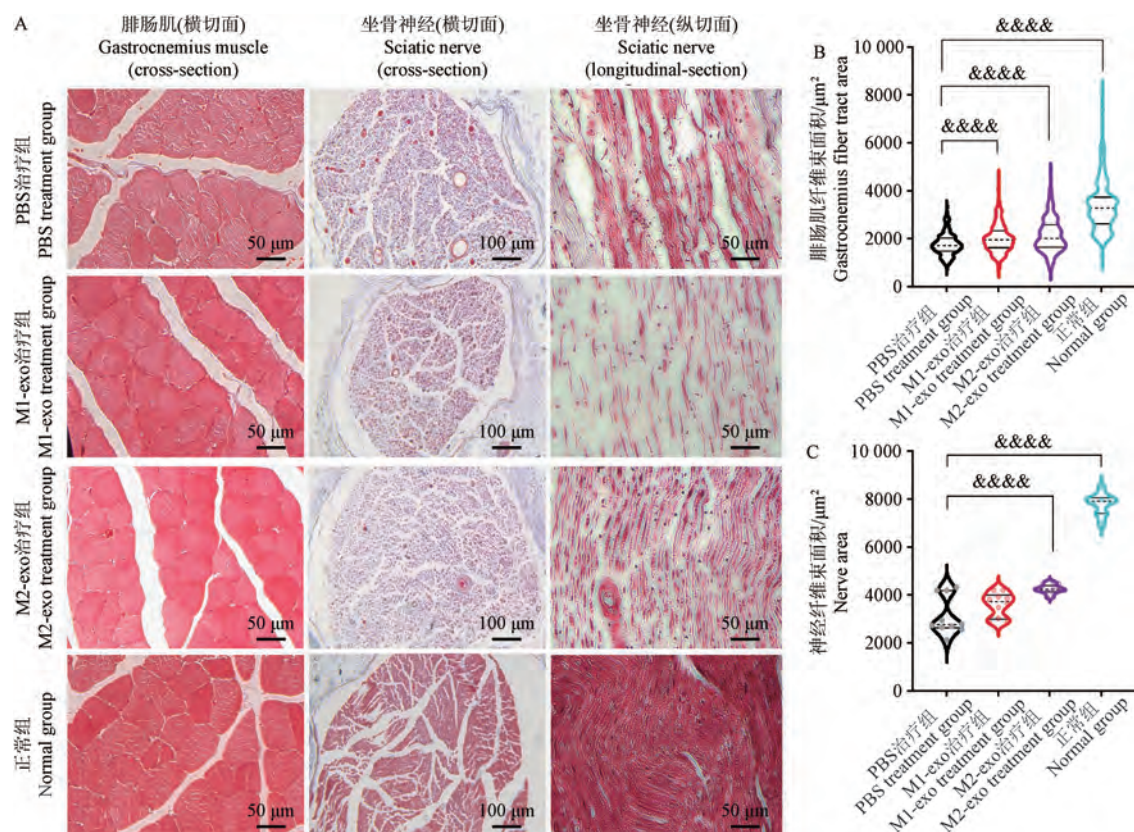


注:A:第4周各组双侧腓肠肌;B:第4周各组患侧足印(左);C~F:每周各组腓肠肌湿重率之比($n=3$);G~J:每周各组坐骨神经功能指数之比($n=3$);K:第1~4周各组湿重率之比;L:第1~4周各组坐骨神经功能指数之比。与PBS治疗组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$ 。

图3 手术过程和每周腓肠肌湿重率与坐骨神经功能指数之比

Note. A, Bilateral gastrocnemius muscle in each group during the week 4. B, Affected lateral foot prints in the week 4 (left). C~F, Ratio of wet weight of gastrocnemius muscle for each group per week ($n=3$). G~J, Ratio of sciatic nerve function index for each group per week ($n=3$). K, Ratio of wet weight for each group from weeks 1 to 4. L, Ratio of sciatic nerve function index for each group from weeks 1 to 4. Compared with PBS treatment group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

Figure 3 Surgical procedure and weekly ratio of gastrocnemius muscle wet weight and sciatic nerve function index

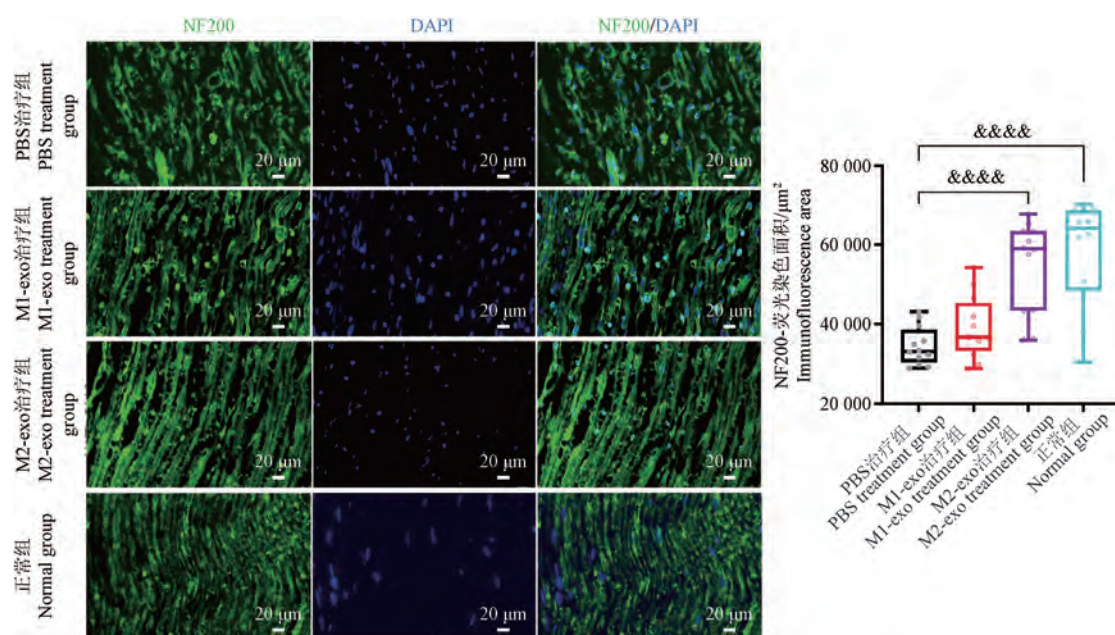


注:A:第4周各组腓肠肌横截面与坐骨神经的横纵截面图;B:各组腓肠肌束横截面积比($n=5$);C:各组坐骨神经纵截面面积比($n=5$)。与PBS治疗组相比, &&&& $P < 0.0001$ 。

图4 Exo注射体内4周后腓肠肌与神经的Masson染色分析

Note. A, Cross-sectional and longitudinal section images of gastrocnemius muscle and sciatic nerve in each group at week 4. B, Ratio of cross-sectional area of gastrocnemius muscle fascicles in each group ($n=5$). C, Ratio of longitudinal section area of sciatic nerve in each group ($n=5$). Compared with PBS treatment group, &&&& $P < 0.0001$.

Figure 4 Masson staining analysis of gastrocnemius muscle and nerve after 4 weeks of exosome injection *in vivo*

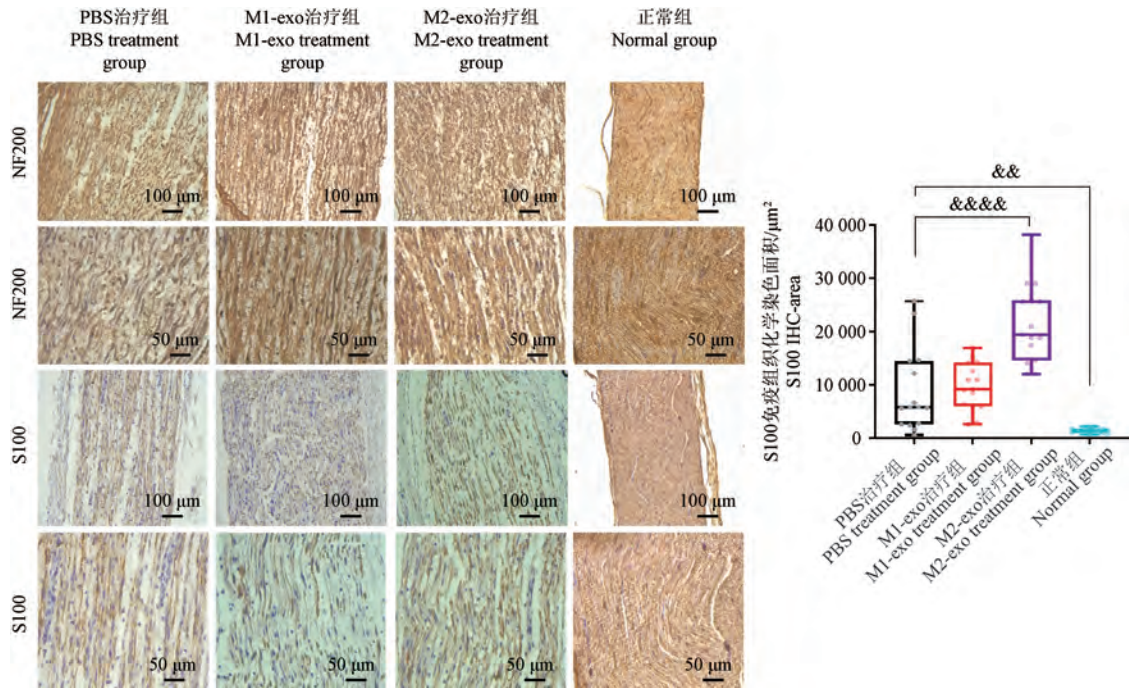


注:Nf200:神经轴突;DAPI:细胞核染色。与PBS治疗组相比, &&&& $P < 0.0001$ 。

图5 第4周坐骨神经纵截面NF200免疫荧光染色

Note. NF200, Neurofilament. DAPI, Nuclear counterstain. Compared with PBS treatment group, &&&& $P < 0.0001$.

Figure 5 Immunofluorescence staining of NF200 in longitudinal sections of the sciatic nerve at week 4



注: NF200: 神经轴突; S100: SCs。与 PBS 治疗组相比, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

图 6 第 4 周坐骨神经纵截面 NF200 与 S100 免疫组织化学染色

Note. NF200, Neurofilament. S100, Schwann cells. Compared with PBS treatment group, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

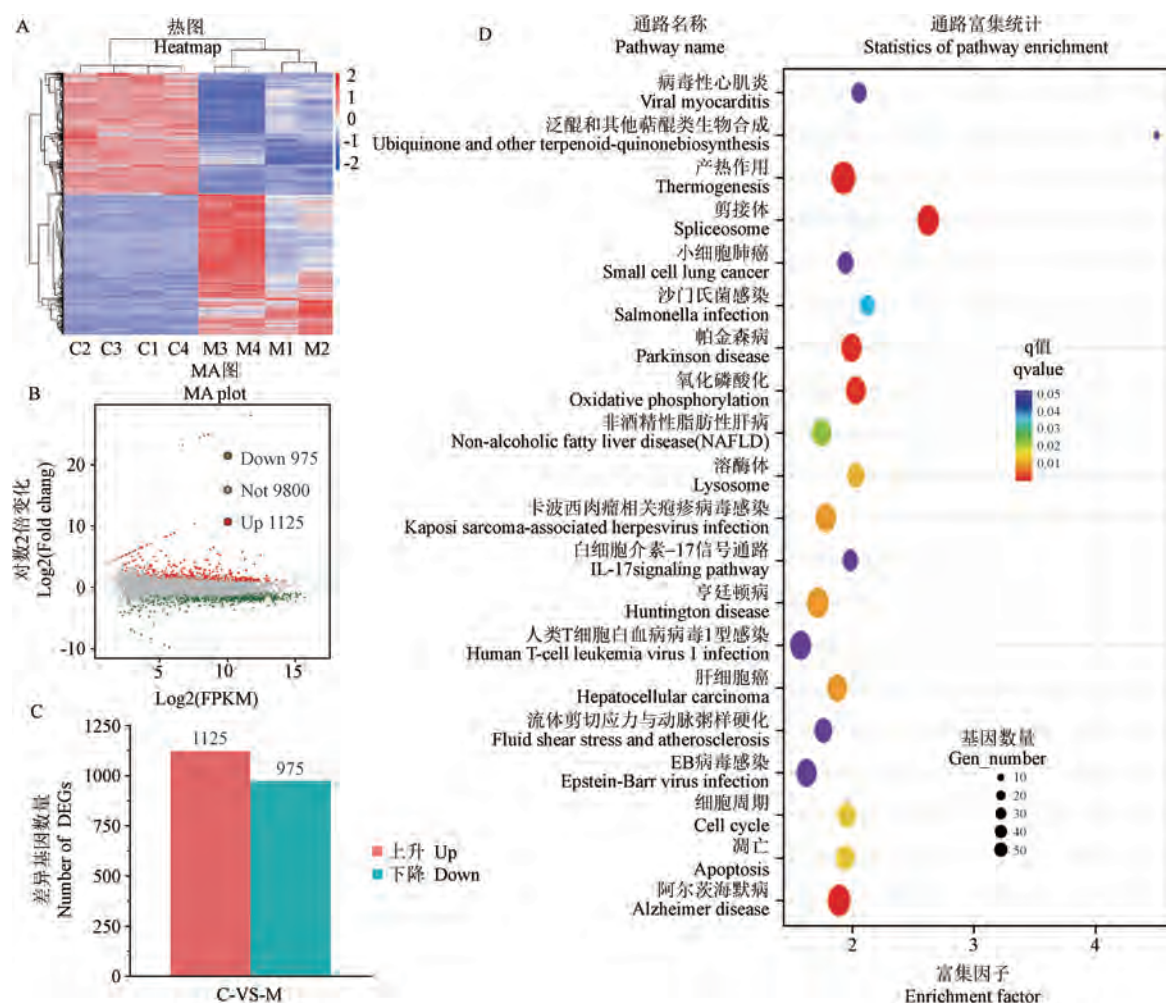
Figure 6 Immunohistochemical staining of NF200 and S100 in longitudinal sections of the sciatic nerve at week 4

3 讨论

在 LPS 诱导下 MØ 可以向 M1 表型极化, 具有更强的细胞毒性、促炎性、细胞外基质粘附性及吞噬髓鞘与神经元碎片的能力, 引发再生相关基因的表达, 促进神经再生; 当神经内注射 LPS 后也能提高 M1 型的聚集并加速髓鞘的吞噬, 为轴突的再生扫除障碍; M2 型随后参与再生修复过程, 在 IL-4 诱导下 MØ 也可以向 M2 极化, 具有更强的抗炎、血管生成、组织愈合及迁徙能力, 在神经再生过程中起着不可替代的作用^[17-20]。对于表型的极化而言, 以往的研究对 MØ 极化的药物种类和剂量是有所不同的, 比如, 对 M1 的诱导单用 LPS 或联合 γ 干扰素 (IFN- γ) 的, LPS 使用的剂量 1 ng/mL、100 ng/mL、1000 ng/mL, IFN- γ 的使用剂量从 10 ng/mL 到 50 ng/mL 不等; 对 M2 的诱导单用 IL4 或联合 IL13 的, 剂量多以 20 ng/mL。另外, 对 MØ 诱导的时间也是不相同的^[21-25]。由于药物种类、剂量及干预时间各不相同, 在本研究中单用了不同浓度的 LPS 对 NR8383 MØ 进行诱导 24 h 和 48 h; 使用不同浓度的 IL-4 及 IL-13 同时对 MØ 进行诱导 24 h 和 48

h; 结果发现 10 ng/mL LPS 处理 24 h 后炎症基因 (IL-6、IL-1 β 、TNF- α) 表达量最高, 成功诱导为 M1 型; 10 ng/mL IL-4 及 20 ng/mL IL-13 处理 24 h 后再生基因 (IL-10、TGF- β 1) 表达量最佳, 成功诱导为 M2 型。与先前的研究相比所使用干预药物的剂量及时间是有所不同, 可能是由于细胞种系来源及体外实验条件不同造成的。

PNI 后在损伤神经的远端 SCs 与近端失去信息联系后, 微环境会发生改变, 促炎相关因子合成显著增加, 诱导大量 MØ 入住并释放多种细胞因子进而影响 SCs^[26-27]。这些研究表明 MØ 与 SCs 之间存在密切的协调, 在神经再生过程中起着非常关键的作用。本研究在多剂量 (5 μ L、10 μ L、20 μ L、40 μ L) Exo 干预 SCs 的实验中发现: 5 μ L M1-exo 干预 SCs 24 h 后能促进 SCs 上调 GDNF; GDNF 能维持和促进细胞增殖、分化、成熟和轴突的生长存活^[28-29]; 在外周神经中能调节纤维脂肪祖细胞的脂肪生成和纤维化, 并可作为去神经化肌肉的治疗靶点^[30]。这也在本研究中表明了这一作用: 神经内注入 M1-exo 4 周后可以减轻肌肉萎缩。当然, 更重要的发现是 5 μ L M2-exo 促进 SCs 明显增殖以及神经再生相关基因



注:A:热图分析了4个重复组间差异表达基因的层次聚类分析;B~C:火山图及柱状图分析样品组间的基因表达水平;D:KEGG 通路富集分析与前20个显著性通路。

图7 M2-exo 处理 SCs 后的基因测序变化

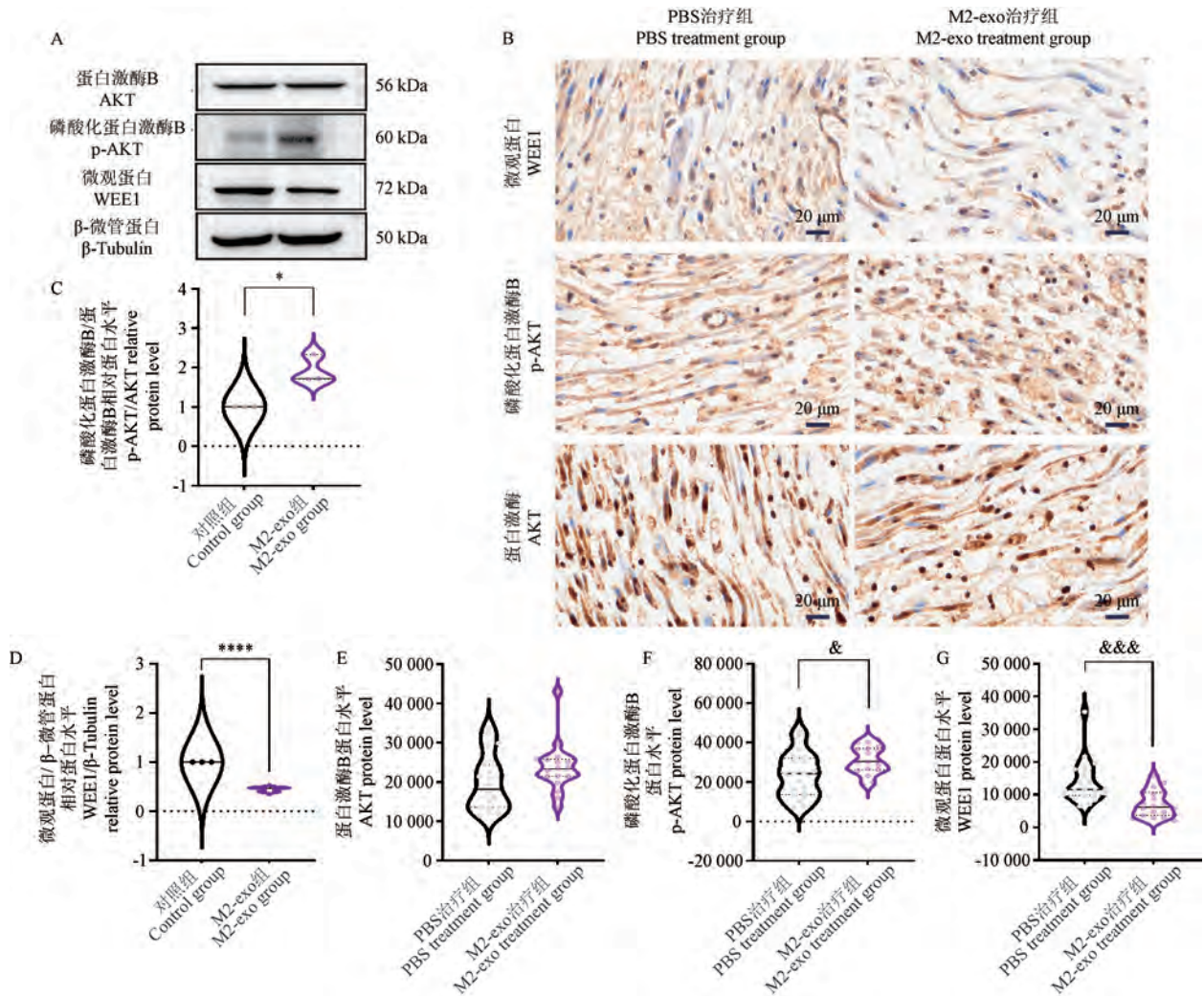
Note. A, Heatmap illustrating the hierarchical clustering analysis of differentially expressed genes among four replicate groups. B~C, Volcano and bar plots analysis of displaying gene expression levels between sample groups. D, KEGG pathway enrichment analysis and the top 20 significantly enriched pathways.

Figure 7 Gene sequencing changes after M2-exo treatment of SCs

BDNF、NGF、MPZ、GFAP、NGFR 及 S100 等显著上调,还可下调基因 *P21* 及 *P53*。表明 MØ 作用于 SCs 后能上调或下调有利于神经再生的相关基因,这些受调控的基因在神经再生过程中起着不可替代的作用。比如 BDNF 与神经营养受体 *P75* (NGFR) 相互作用可改善神经元的存活并增强髓鞘化 SCs,同时调节迁移、表型分化和轴突生长等多种功能^[28]。这在本研究划痕实验中同样表现出了部分类似的作用:Exo 组能促进 SCs 的快速迁移。NGF 同样也有利于神经元的存活并能促进轴突的生长,在 PNI 后与 *p75* NTR 结合调节细胞增殖、髓鞘形成和突触的可塑性^[31]。本研究中 NGF 同样上调,这也表明了 M2-exo 可以调节 SCs

增殖。同样,本研究中其它神经再生相关基因也显著上调,*P21* 与 *P53* 下调,均是有利于 SCs 的增殖和神经的再生,至少增殖这一作用与其密切相关,这些基因的上调或下调充分说明了 M2-exo 强大的基因调节能力。

MØ 分泌的产物在吞噬、神经再生以及免疫调节等多方面起着重要的作用^[32]。来自 M1 型 Exo 的部分受体及 Mic-RNA 在多种组织中起着积极的调控作用^[33];miR-21a-5p 通过靶向抑制转录因子 *GATA2* 促进骨愈合^[34]。而来自 M2-exo 的介质能调节组织稳态和靶向炎症的能力^[13,35];比如,M2-exo 中的 miR-223,被认为是神经再生的关键参与者^[36]。同样,在本研究中也表明了 M1-



注: A、C~D: 对照组与 M2-exo 组 SCs 内通路蛋白的相对表达; B、E~G: PBS 治疗组与 M2-exo 治疗组坐骨神经损伤点内通路蛋白的相对表达情况。与对照组相比, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$; 与 PBS 治疗组相比, & $P < 0.05$, &&& $P < 0.001$ 。

图 8 体内外信号通路机制的表征

Note. A, C~D, Relative expression of pathway proteins in SCs from the control group and the M2-exo group. B, E~G, Relative expression of pathway proteins at the sciatic nerve injury site in the PBS treatment group and the M2-exo treatment group. Compared Control group, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$. Compared with PBS treatment group, & $P < 0.05$, &&& $P < 0.001$.

Figure 8 Evidence of *in vivo* and *in vitro* signaling pathway mechanisms

exo 的部分促进作用以及 M2-exo 积极的组织再生修复能力。从大鼠术后步态分析发现, M2-exo 治疗组相较于 PBS 治疗组足印张开度和功能指数的恢复更加明显。同样对比各组, M2-exo 治疗组湿重率在第 3 周萎缩至最低, 第 4 周逐步恢复并优于第 3 周水平, 与 PBS 治疗组相比有显著差异; 第 4 周肌肉组织 Masson 染色发现: 所有 Exo 治疗组的肌肉纤维束面积恢复得更大一些, 相比 PBS 治疗组均有显著差异; 神经损伤点的 Masson 染色表明: 相比 PBS 治疗组, M2-exo 治疗组神经纤维更加紧密有序, 更少的髓鞘空心化。神经损伤点的荧光组化染色发现: 与 PBS 治疗组相比,

M2-exo 治疗组有更加明显的神经纤维及更多的 SCs 数量; 但 M1-exo 治疗组与 PBS 治疗组无显著差异。以上表明: M1-exo 可能有利于减缓肌肉萎缩的作用, 而 M2-exo 更有利于神经的再生、SCs 的增殖分化和肌肉的恢复。

在测序中发现上下调的基因比较多, 这些差异性基因很多是与 SCs 的周期、增殖及生长发育等有关, 在前 20 个调节通路中发现细胞周期调节通路也比较显著, 其关键调节酶 WEE1 作为丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员之一, 是 G_2/M 期检查点的关键激酶, 在 S 期调节细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK1/2)以阻断复制启动, 在真核细胞周期

调节和 DNA 损伤反应中起着重要作用^[37]。在正常细胞中下调 WEE1 会加速有丝分裂,在测序以及增殖迁徙等这些实验都表明了 M2-exo 能促进 SCs 增殖这一作用,同时流式实验也表明 M2-exo 干预 SCs 后 G₂/M 期的细胞比例明显增加,说明 M2-exo 干预了 SCs 的 G₂/M 并引起增殖的。为了进一步证实这一相关机制。在细胞及动物实验中对细胞周期关节调节酶 WEE1 及上游 AKT 通路进行了充分的验证,发现 M2-exo 组和 M2-exo 治疗组中 p-AKT 上调明显,WEE1 下调显著,说明 AKT 磷酸化(p-AKT)能抑制下游 WEE1 的表达,从而促进细胞分裂增殖。这表明 M2-exo 可通过 AKT-WEE1 通路干预 G₂/M 促进 SCs 的快速增殖,从而有利于神经再生。这或许是一种短暂的快速应急修复机制,但具体的机制还不清楚,需要进行大量的研究工作。

由于该研究还处于基础阶段,也存在许多不足:①Exo 的提取、表征、储存及给药方式并没有行业相关标准,故在使用过程中也存在诸多问题。②体外实验的局限性及未使用原代细胞研究。③动物实验虽然真实模拟了神经损伤再生过程,但样本量小,样本间恢复也有明显的差异性,导致实验的异质性增大。在未来的研究中,我们还将探索 MØ 来源的 Exo 中有利于神经再生的调控 RNA 或靶蛋白,以及与周围神经中各细胞之间的相互作用机制。

参考文献:

- [1] LIU Z, TONG H, LI J, et al. Low-stiffness hydrogels promote peripheral nerve regeneration through the rapid release of exosomes [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 922570.
- [2] WOJTKIEWICZ D M, SAUNDERS J, DOMESHEK L, et al. Social impact of peripheral nerve injuries [J]. *Hand (N Y)*, 2015, 10(2): 161-167.
- [3] YIN L, LIU X, SHI Y, et al. Therapeutic advances of stem cell-derived extracellular vesicles in regenerative medicine [J]. *Cells*, 2020, 9(3): 707.
- [4] YIN G, LIN Y, WANG P, et al. Upregulated lncARAT in Schwann cells promotes axonal regeneration by recruiting and activating proregenerative macrophages [J]. *Mol Med*, 2022, 28(1): 76.
- [5] QING L, CHEN H, TANG J, et al. Exosomes and their microRNA cargo: new players in peripheral nerve regeneration [J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2018, 32(9): 765-776.
- [6] ZHAO J, DING Y, HE R, et al. Dose-effect relationship and molecular mechanism by which BMSC-derived exosomes promote peripheral nerve regeneration after crush injury [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 360.
- [7] YU T, XU Y, AHMAD M A, et al. Exosomes as a promising therapeutic strategy for peripheral nerve injury [J]. *Curr Neuroparmacol*, 2021, 19(12): 2141-2151.
- [8] XU J, WEN J, FU L, et al. Macrophage-specific RhoA knockout delays Wallerian degeneration after peripheral nerve injury in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 234.
- [9] CHEN P, PIAO X, BONALDO P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury [J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 130(5): 605-618.
- [10] LI L, LI Y, FAN Z, et al. Ascorbic acid facilitates neural regeneration after sciatic nerve crush injury [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 108.
- [11] WANG Y, YAN Z, LIU W, et al. Biomechanically-adapted immunohydrogels reconstructing myelin sheath for peripheral nerve regeneration [J]. *Adv Healthc Mater*, 2022, 11(20): 2201596.
- [12] BISWAS S K, MANTOVANI A. Orchestration of metabolism by macrophages [J]. *Cell Metab*, 2012, 15(4): 432-437.
- [13] GAO Z S, ZHANG C J, XIA N, et al. Berberine-loaded M2 macrophage-derived exosomes for spinal cord injury therapy [J]. *Acta Biomater*, 2021, 126: 211-223.
- [14] KIM H, WANG S Y, KWAK G, et al. Exosome-guided phenotypic switch of M1 to M2 macrophages for cutaneous wound healing [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2019, 6(20): 1900513.
- [15] ZENG X, BIAN W, LIU Z, et al. Muscle-derived stem cell exosomes with overexpressed miR-214 promote the regeneration and repair of rat sciatic nerve after crush injury to activate the JAK2/STAT3 pathway by targeting PTEN [J]. *Front Mol Neurosci*, 2023, 16: 1146329.
- [16] HUANG J, ZHANG G, LI S, et al. Endothelial cell-derived exosomes boost and maintain repair-related phenotypes of Schwann cells via miR199-5p to promote nerve regeneration [J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 10.
- [17] ZIGMOND R E, ECHEVARRIA F D. Macrophage biology in the peripheral nervous system after injury [J]. *Prog Neurobiol*, 2019, 173: 102-121.
- [18] YUNNA C, MENGROU H, LEI W, et al. Macrophage M1/M2 polarization [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 877: 173090.
- [19] VEREYKEN E J F, HEIJNEN P D A M, BARON W, et al.

- Classically and alternatively activated bone marrow derived macrophages differ in cytoskeletal functions and migration towards specific CNS cell types [J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8; 58.
- [20] HERVERA A, DE VIRGILIIS F, PALMISANO I, et al. Reactive oxygen species regulate axonal regeneration through the release of exosomal NADPH oxidase 2 complexes into injured axons [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(3): 307–319.
- [21] DAI Y, CHENG X, YU J, et al. Hemin promotes corneal allograft survival through the suppression of macrophage recruitment and activation [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(10): 3952–3962.
- [22] TODA M, MIZUGUCHI S, MINAMIYAMA Y, et al. Pirfenidone suppresses polarization to M2 phenotype macrophages and the fibrogenic activity of rat lung fibroblasts [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2018, 63(1): 58–65.
- [23] WANG D, CAO Q. Shp2 in alveolar macrophages regulates macrophage I phenotype in acute lung injury [J]. *Int J Toxicol*, 2022, 41(5): 412–419.
- [24] KIM M, KWON J H, BAE Y K, et al. Soluble PTX3 of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells attenuates hyperoxic lung injury by activating macrophage polarization in neonatal rat model [J]. *Stem Cells Int*, 2020, 2020: 1802976.
- [25] MOKARRAM N, MERCHANT A, MUKHATYAR V, et al. Effect of modulating macrophage phenotype on peripheral nerve repair [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(34): 8793–8801.
- [26] STRATTON J A, KUMAR R, SINHA S, et al. Purification and characterization of schwann cells from adult human skin and nerve [J]. *eNeuro*, 2017, 4(3): ENEURO. 0307–16. 2017.
- [27] HUANG T C, WU H L, CHEN S H, et al. Thrombomodulin facilitates peripheral nerve regeneration through regulating M1/M2 switching [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 240.
- [28] ADAM M I, LIN L, MAKIN A M, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor regulate the interaction between astrocytes and Schwann cells at the trigeminal root entry zone [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(6): 1364–1370.
- [29] CAI W, LIU Y, ZHANG T, et al. GDNF facilitates the differentiation of ADSCs to Schwann cells and enhances nerve regeneration through GDNF/MTA1/Hes1 axis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2024, 753: 109893.
- [30] DOHERTY C, LODYGA M, CORREA J, et al. Utilization of the rat tibial nerve transection model to evaluate cellular and molecular mechanisms underpinning denervation-mediated muscle injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(3): 1847.
- [31] LI R, LI D, WU C, et al. Nerve growth factor activates autophagy in Schwann cells to enhance myelin debris clearance and to expedite nerve regeneration [J]. *Theranostics*, 2020, 10(4): 1649–1677.
- [32] JHA M K, PASSERO J V, RAWAT A, et al. Macrophage monocarboxylate transporter 1 promotes peripheral nerve regeneration after injury in mice [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(21): e141964.
- [33] MENG M, LU M, FENG J, et al. Exosomal PPAR γ derived from macrophages suppresses LPS-induced peritonitis by negative regulation of CD14/TLR4 axis [J]. *Inflamm Res*, 2023, 72(8): 1567–1581.
- [34] LUO X, MENG C, ZHANG Y, et al. microRNA-21a-5p-modified macrophage exosomes as natural nanocarriers promote bone regeneration by targeting GATA2 [J]. *Regen Biomater*, 2023, 10: rbad075.
- [35] GREENBERG A S, REEVES A R. The good and bad of adipose tissue macrophage exosomes in obesity [J]. *Cell Metab*, 2021, 33(4): 700–702.
- [36] ZHAN C, MA C B, YUAN H M, et al. Macrophage-derived microvesicles promote proliferation and migration of Schwann cell on peripheral nerve repair [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468(1–2): 343–348.
- [37] GHELLI LUSERNA DI RORÀ A, CERCHIONE C, MARTINELLI G, et al. A WEE1 family business: regulation of mitosis, cancer progression, and therapeutic target [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 126.

〔收稿日期〕2024-10-03

林华丹,王旭,陈春宏,等. 三种卵巢储备功能减退小鼠模型的效果比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(5): 51-59.
Lin HD, Wang X, Chen CH, et al. Comparison of three methods for induction of model mice with diminished ovarian reserve [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(5): 51-59.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.05.005

三种卵巢储备功能减退小鼠模型的效果比较

林华丹^{1,2,3}, 王旭¹, 陈春宏¹, 韦郁卓¹, 罗艳春¹, 庞方惠¹,
秦秋云^{1,2}, 阮子芸^{1,2,3*}

(1.广西中医药大学基础医学院, 南宁 530200; 2.广西中医肝脾藏象重点研究室, 南宁 530200;
3.广西高发传染病中西医结合转化医学重点实验室, 南宁 530200)

【摘要】 目的 比较采用雷公藤多苷、环磷酰胺和顺铂构建卵巢储备功能减退(DOR)小鼠模型的效果。方法 小鼠随机分成对照(Ctrl)组、雷公藤多苷(TWP)组、环磷酰胺(CTX)组和顺铂(DDP)组, TWP组以50 mg/kg雷公藤多苷混悬液灌胃小鼠14 d, CTX组以20 mg/kg环磷酰胺混悬液腹腔注射小鼠14 d, DDP组以1.5 mg/kg顺铂溶液腹腔注射14 d。统计小鼠体质量、子宫指数和卵巢指数; 阴道涂片法观察小鼠动情周期变化; ELISA法检测小鼠抗缪勒管激素(AMH)、雌二醇(E₂)、卵泡刺激素(FSH)、促黄体生成素(LH)变化情况; HE检测卵巢卵泡发育情况; 统计卵母细胞成熟率和小鼠生育力。结果 3组模型小鼠体质量、卵巢指数显著降低($P<0.05$); 动情周期紊乱, AMH、E₂激素水平显著降低($P<0.05$); 发育中卵泡率降低, 闭锁卵泡率升高($P<0.05$); 卵母细胞成熟率降低($P<0.05$); 妊娠率及总成活仔鼠数降低。结论 通过雷公藤多苷、环磷酰胺和顺铂成功构建DOR模型小鼠, 小鼠体质量、卵巢指数降低, 动情周期、激素紊乱及卵巢储备功能下降, 引起卵母细胞成熟率、妊娠率及总活产仔数降低; 其中环磷酰胺组小鼠卵巢储备功能下降程度适当并具持续稳定性。

【关键词】 卵巢储备功能减退; 雷公藤多苷; 环磷酰胺; 顺铂; 动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 05-0051-09

Comparison of three methods for induction of model mice with diminished ovarian reserve

LIN Huadan^{1,2,3}, WANG Xu¹, CHEN Chunhong¹, WEI Yuzhuo¹, LUO Yanchun¹, PANG Fanghui¹,
QIN Qiuyun^{1,2}, RUAN Ziyun^{1,2,3*}

(1. School of Basic Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China.
2. Key Research Laboratory of Guangxi Traditional Chinese Medicine on Liver and Spleen
Zang-Xiang Theory, Nanning 530200. 3. Guangxi Key Laboratory of Translational Medicine
for Treating High-Incidence Infectious Diseases with Integrative Medicine, Nanning 530200)

【基金项目】 广西科技厅自然科学基金(2024GXNSFAA010394, 2025GXNSFAA069653); 广西中医药大学“岐黄工程”高层次人才团队培育项目(202401); 广西壮族自治区妇幼保健院重点实验室开放课题(GXWCHZDKF-2022-07); 广西研究生教育创新计划项目(YCSW2024414, YCSY2025004); 广西中医药大学大学生创新创业项目(202410600005)。

【作者简介】 林华丹(1998—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药防治生殖医学疾病。E-mail: 1228041564@qq.com

【通信作者】 阮子芸(1988—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 中医药防治生殖医学疾病。E-mail: ziyunruan@163.com

【Abstract】 Objective To compare the effects of *Tripterygium wilfordii* polyglycosides, cyclophosphamide, and cisplatin on the establishment of a mouse model of diminished ovarian reserve (DOR). **Methods** Mice were randomly divided into the following treatment groups: control (Ctrl), *Tripterygium wilfordii* polyglycosides (TWP), cyclophosphamide (CTX), and cisplatin (DDP). Mice in the TWP group received a 50 mg/kg suspension of *Tripterygium wilfordii* polyglycosides by gavage for 14 days, mice in the CTX group received a 20 mg/kg cyclophosphamide suspension by intraperitoneal injection for 14 days, and mice in the DDP group received a 1.5 mg/kg cisplatin solution by intraperitoneal injection for 14 days. The body weight, uterine index, and ovarian index were recorded, the estrous cycle was monitored using the vaginal smear method, and the levels of anti-Müllerian hormone (AMH), estradiol (E_2), follicle stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH) were detected using ELISA. Hematoxylin and eosin staining was used to detect ovarian follicle development. The rates of oocyte maturation and fertility were analyzed. **Results** The three treatment groups of mice all showed the following: significantly decreased body weight and ovarian index ($P < 0.05$); apparent disorder of the estrous cycle; significantly decreased levels of AMH and E_2 ($P < 0.05$); decreased and increased rates of developing follicles and atretic follicles, respectively ($P < 0.05$); and significantly decreased rates of oocyte maturation, pregnancy, and live birth ($P < 0.05$). **Conclusions** DOR mouse models were successfully constructed using *Tripterygium wilfordii* polyglycosides, cyclophosphamide, or cisplatin, as evidenced by decreased body weight and ovarian index, disordered estrous cycle and hormones, and DOR function, resulting in reduced rates of oocyte maturation, pregnancy, and total number of live births. These DOR effects were most appropriate in the cyclophosphamide group.

【Keywords】 diminished ovarian reserve; *Tripterygium wilfordii* polyglycosides; cyclophosphamide; cisplatin; animal model

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

卵巢储备功能减退 (decreased ovarian reserve, DOR) 是指育龄女性因卵母细胞数量减少和 (或) 质量下降而导致的卵巢功能不足^[1], 主要表现为性激素水平改变, 月经紊乱、生育力下降以及出现更年期症状等, 且该现象逐渐年轻化^[2]。DOR 对育龄女性生殖健康构成隐患, 其引起的类围绝经综合征等表现亦影响女性身心健康, 因此对女性卵巢功能的保护愈发重要。DOR 发病因素包括遗传、免疫、环境、药物和应激因素等, 且发病机制尚未明确^[3-4], 急需构建 DOR 动物模型开展深入研究。本研究采用雷公藤多苷 (*Tripterygium wilfordii* polyglycoside, TWP)、环磷酰胺 (cytoxan, CTX) 和顺铂 (cisplatin, DDP) 建立 DOR 小鼠模型, 并就小鼠动情周期、激素水平、卵巢指数、卵巢储备功能、卵母细胞成熟率及后续生育力进行对比分析, 找寻理想 DOR 小鼠模型建立方法, 为 DOR 相关研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

80 只 6~8 周龄 SPF 级雌性 ICR 小鼠, 体重 18~20 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限

公司 [SCXK (湘) 2021-0002], 饲养温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 12 h/12 h 明暗交替, 自由摄食饮水。于广西中医药大学进行饲养 [SYXK (桂) 2024-0004], 所涉及的小鼠实验均遵守广西中医药大学伦理委员会标准 (DW20240919-184), 符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

雷公藤多苷片 (湖南千金协力药业有限公司, Z43020138); 环磷酰胺片 (通化茂翔制药有限公司, H22022673); 顺铂 (MCE 公司, HY7394); 孕马血清促性腺释放激素 (宁波第二激素厂, 110251282); 人绒毛膜促性腺激素 (宁波第二激素厂, 110254564); 透明质酸酶 (北京索莱宝生物科技有限公司, H3884); 结晶紫染色液 (湖南比克曼控股有限公司, 110703011); 苏木素-伊红 (HE) 染色液 (北京索莱宝生物科技有限公司, G1120); 抗缪勒管激素 (AMH/MIS) 试剂盒 (武汉贝莱茵公司, MU30399); 雌二醇 (E_2) 试剂盒 (武汉贝莱茵公司, MU30395); 促卵泡刺激素 (FSH) 试剂盒 (武汉贝莱茵公司, MU30265); 促黄体生成素 (LH) 试剂盒 (武汉贝莱茵公司, MU30382)。Milli Synthesls 超净纯水机 (Millipore, 美国); 石蜡包埋机 (德国徕卡公司, EG1150H+C); 半自动轮

转切片机(德国徕卡公司, RM2245); 倒置显微镜(德国蔡司公司, primo vert); 全波长酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司, A51119500C)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备

小鼠适应性喂养 1 周后, 随机分配至对照(Ctrl)组、雷公藤多苷(TWP)组、环磷酰胺(CTX)组和顺铂(DDP)组, 每组 20 只。参考相关文献, TWP 组按 50 mg/kg 剂量灌胃小鼠 14 d^[5]、CTX 组按 20 mg/kg 剂量进行腹腔注射 14 d^[6]、DDP 组按 1.5 mg/kg 剂量进行腹腔注射 14 d^[7] 建立 DOR 小鼠模型; Ctrl 组每天给予等体积生理盐水溶液灌胃。

1.3.2 一般情况和体质量

每天观察小鼠的精神状态、毛发状况和摄食饮水等活动情况; 造模结束后禁食不禁水, 于次日上午 8:00 记录每组 20 只小鼠体质量, 比较 3 种造模药对小鼠体质量产生的影响。

1.3.3 子宫指数和卵巢指数

末次体质量记录完成, 每组 6 只小鼠经麻醉采眼眶血后, 开腹剪取小鼠两侧子宫、卵巢并称重, 计算子宫指数和卵巢指数。子宫指数/(mg/g) = 子宫湿重/体质量; 卵巢指数/(mg/g) = 双侧卵巢湿重/体质量。

1.3.4 阴道脱落细胞涂片观察小鼠动情周期

充分暴露小鼠阴道口, 用蘸湿的极细棉签收集小鼠阴道脱落细胞分泌物, 黏附于载玻片后行结晶紫染色, 每组 20 只观察动情周期变化情况^[8]。将动情周期延长(>5 d)或周期错乱的视为动情周期紊乱^[9]。动情周期紊乱率/% = 小鼠动情周期紊乱数/小鼠总数×100%。

1.3.5 ELISA 法检测小鼠血清激素水平

造模结束后每组 6 只小鼠经 1% 戊巴比妥钠麻醉, 采集血样, 室温静置 60 min 后, 4 ℃、3500 r/min, 离心 15 min, 收集上层血清^[5]。按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清 AMH、FSH、LH 和 E₂ 含量。

1.3.6 HE 染色法检测小鼠卵泡发育情况

将多聚甲醛固定的小鼠卵巢组织, 经脱水、透明、浸蜡、包埋后, 将厚度 4 μm 石蜡切片, 行脱蜡后水化, 行常规 HE 染色, 中性树脂胶封片后观察卵巢组织形态, 每组 6 只计算各级卵泡数量^[10]。

将窦前卵泡和窦状卵泡归为发育中卵泡^[11]。发育中卵泡率/% = 发育中卵泡数/小鼠总卵泡数×100%, 闭锁卵泡率/% = 闭锁卵泡数/小鼠总卵泡数×100%。

1.3.7 统计卵母细胞成熟情况

分别于造模 14 d、造模 14 d 结束 2 周时, 对各组 8 只小鼠注射 PMSG 48 h 后, 再注射 HCG 14~16 h 进行促排卵^[12]。在显微镜下使用 1 mL 注射针头划破输卵管膨大部分, 释放卵丘复合体, 通过透明质酸酶分离出卵母细胞, 统计各组小鼠卵母细胞成熟率^[13]。卵母细胞成熟率/% = 减数分裂第二次中期(metaphase II, M II)卵数/获得卵母细胞总数×100%。

1.3.8 小鼠合笼观察生育率和平均产仔数

造模结束后, 将各组 6 只小鼠按照 2:1 雌雄比与正常 8 周龄实验雄鼠合笼自由交配繁殖^[14]。次日上午 8:00 前检测阴道栓。见栓 2 周显怀后分笼饲养, 期间正常饮水自由进食, 于 18~21 d 后记录窝产仔数等指标。窝产仔数 = 总产仔数/生育鼠数。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行统计学分析。计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 计数资料以%表示。小鼠体质量比较、卵巢指数、子宫指数比较、激素水平、小鼠卵泡发育情况、卵母细胞成熟率比较及窝产仔数采用单因素方差分析; 动情周期紊乱率比较采用 Fisher 精确检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 种模型小鼠体质量变化情况

Ctrl 组小鼠精神状态佳, 毛发柔顺、有光泽, 摄食、饮水等活动正常规律; TWP 组和 CTX 组小鼠精神状态较差, 出现活动度降低、毛发粗糙, 部分饮食欠佳; DDP 组小鼠精神差, 不思饮食, 倦怠喜卧, 毛发减少, 尾巴呈灰白色、末端冰凉。对比 Ctrl 组, TWP 组和 CTX 组小鼠体质量降低($P < 0.05$), DDP 组小鼠体质量极显著降低($P < 0.01$); 与 DDP 组相比, TWP 组和 CTX 组的小鼠体质量无明显差异(表 1)。

2.2 3 种模型小鼠子宫、卵巢指数情况

对比 Ctrl 组, TWP 组、CTX 组和 DDP 组小鼠的子宫和卵巢缺血呈苍白样, 伴不同程度的萎缩(图 1)。与 Ctrl 组相比, 3 组模型组小鼠的卵巢指数均极显著降低($P<0.01$)。对比 Ctrl 组, DDP 组小鼠子宫指数极显著降低($P<0.01$), 但 TWP 组和 CTX 组小鼠子宫指数无显著差异($P>0.05$); 此外, 对比 DDP 组, TWP 组小鼠子宫指数显著增加($P<0.01$), CTX 组亦显著增加($P<0.05$)(表 2)。

2.3 3 种模型小鼠动情周期变化情况

小鼠动情周期阶段分为 4 期^[15]: 动情前期大约持续 17~21 h, 可见大量有核的上皮细胞聚集, 角化无核上皮细胞少见; 动情期大约持续 9~15 h, 可见大量完全角化的无核上皮细胞聚集, 有核上皮细胞少见; 动情后期大约持续 10~14 h, 少量白细胞、有核上皮细胞和无核上皮细胞共现; 动情间期大约持续 60~70 h, 可见大量炎细胞聚集(图 2)。

表 1 各组小鼠体质量比较($\bar{x}\pm s, n=20$)

Table 1 Comparison of the weight of mice in each group($\bar{x}\pm s, n=20$)

组别 Groups	体质量/g Body mass
对照组 Ctrl group	29.78±1.85 ^{△△}
雷公藤多苷组 TWP group	28.46±1.77 ^{*△△}
环磷酰胺组 CTX group	28.51±1.56 ^{*△△}
顺铂组 DDP group	23.06±2.17 ^{**}

注: 与对照组相比, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$; 与顺铂组相比, ^{△△} $P<0.01$ 。

Note. Compared with the Ctrl group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$. Compared with the DDP group, ^{△△} $P<0.01$.

与 Ctrl 组比较, 造模期间第 1~7 天的 TWP 组、CTX 组和 DDP 组小鼠动情周期紊乱率均升高, 在造模后期第 8~14 天的 TWP 组和 CTX 组小鼠动情周期紊乱率为 83.34%, DDP 组小鼠动情周期紊乱率为 100.00%(表 3)。

表 2 各组小鼠卵巢指数和子宫指数比较情况($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Comparison of ovarian index and uterine index of mice in each group($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别 Groups	卵巢指数/(mg/g) Ovarian index	子宫指数/(mg/g) Uterine index
对照组 Ctrl group	0.46±0.12	3.74±1.00 ^{△△}
雷公藤多苷组 TWP group	0.29±0.03 ^{**}	3.41±0.48 ^{△△}
环磷酰胺组 CTX group	0.26±0.06 ^{**}	3.17±0.23 [△]
顺铂组 DDP group	0.29±0.04 ^{**}	2.18±0.10 ^{**}

注: 与对照组相比, ^{**} $P<0.01$; 与顺铂组相比, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$ 。

Note. Compared with the Ctrl group, ^{**} $P<0.01$. Compared with the DDP group, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$.

表 3 各组小鼠动情周期变化情况($n=20$)

Table 3 Changes in estrous cycle of mice in each group($n=20$)

组别 Groups	动情周期紊乱率/% Rate of disturbance of the estrous cycle	
	造模第 1~7 天 Day 1~7 of modeling	造模第 8~14 天 Day 8~14 of modeling
	Day 1~7 of modeling	Day 8~14 of modeling
对照组 Ctrl group	0.00	0.00
雷公藤多苷组 TWP group	33.34 ^{**}	83.34 ^{**}
环磷酰胺组 CTX group	50.00 ^{**}	83.34 ^{**}
顺铂组 DDP group	33.34 ^{**}	100.00 ^{**}

注: 与对照组相比, ^{**} $P<0.01$ 。

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

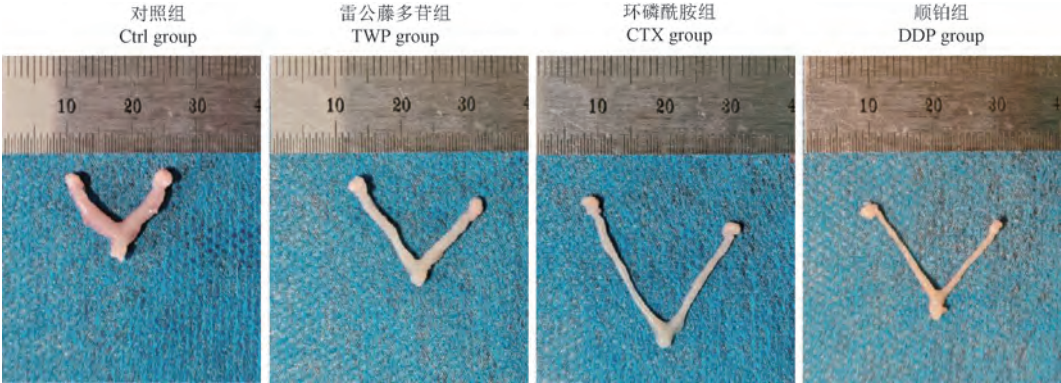


图 1 各组小鼠子宫和卵巢比较情况

Figure 1 Uterus and ovary of mice in each group

2.4 3 种模型小鼠激素水平变化情况

对比 Ctrl 组, TWP、CTX 和 DDP 组 AMH、 E_2 激素水平均显著降低 ($P < 0.05$), CTX 组小鼠 FSH 激素水平显著升高 ($P < 0.05$), 且 CTX 组和 DDP 组小鼠 FSH/LH 激素比值显著升高 ($P < 0.05$), 但 TWP、CTX 和 DDP 组 LH 激素水平无显著差异 ($P > 0.05$) (图 3)。

2.5 3 种模型小鼠卵泡发育情况

Ctrl 组小鼠始基卵泡和窦前卵泡数量较多, 窦状卵泡形态饱满, 颗粒细胞层数丰富, 偶见闭

锁卵泡。对比 Ctrl 组, 3 组模型组小鼠始基卵泡和窦前卵泡和窦状卵泡数量均减少 (图 4)。对比 Ctrl 组, TWP 组和 CTX 组小鼠发育中卵泡率显著下降 ($P < 0.05$) 且闭锁卵泡率显著增加 ($P < 0.01$); 与 Ctrl 组比较, DDP 组小鼠发育中卵泡比例降低 ($P < 0.01$) 且闭锁卵泡比例显著增加 ($P < 0.001$) (表 4)。

2.6 3 种模型小鼠卵母细胞成熟情况

Ctrl 组卵母细胞的胞质颗粒均匀光滑无碎裂, 卵周间隙适中, 极体圆或椭圆, 透明带光滑、

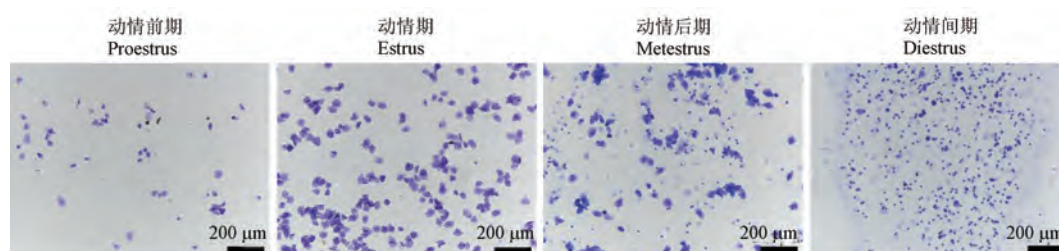
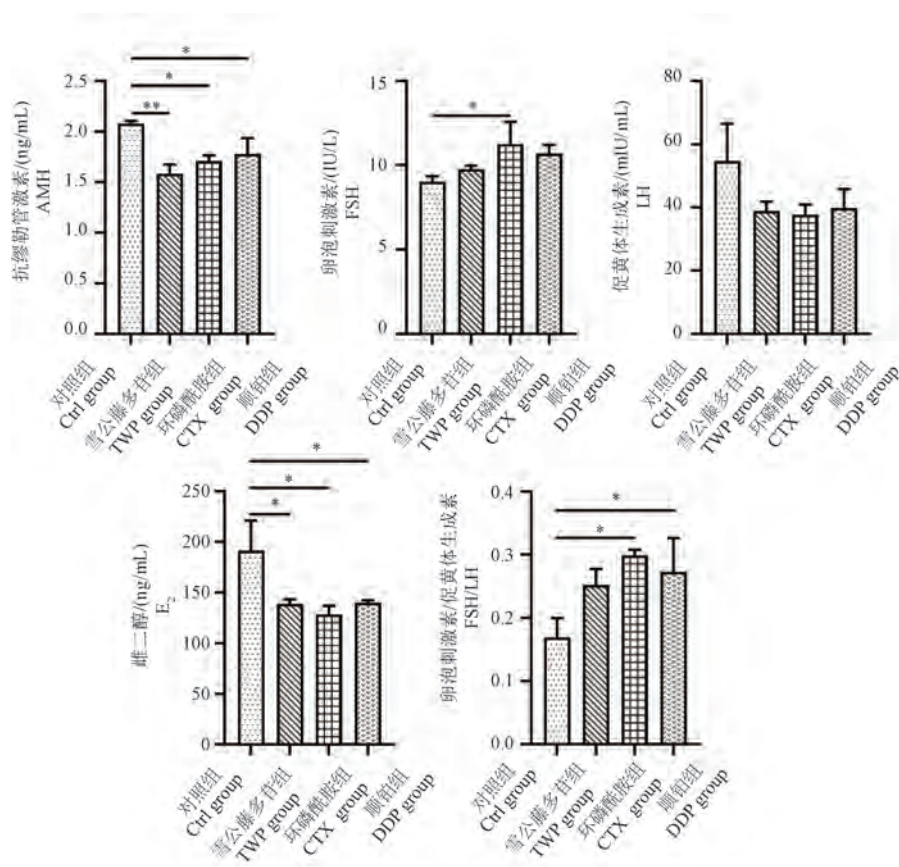


图 2 小鼠不同动情周期阶段阴道脱落细胞情况 (结晶紫染色)

Figure 2 Vaginal exfoliated cells in mice at different stages of estrous cycle (crystal violet staining)



注: 与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 各组小鼠激素水平变化情况 ($n = 6$)

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

Figure 3 Changes in hormone levels of mice in each group ($n = 6$)

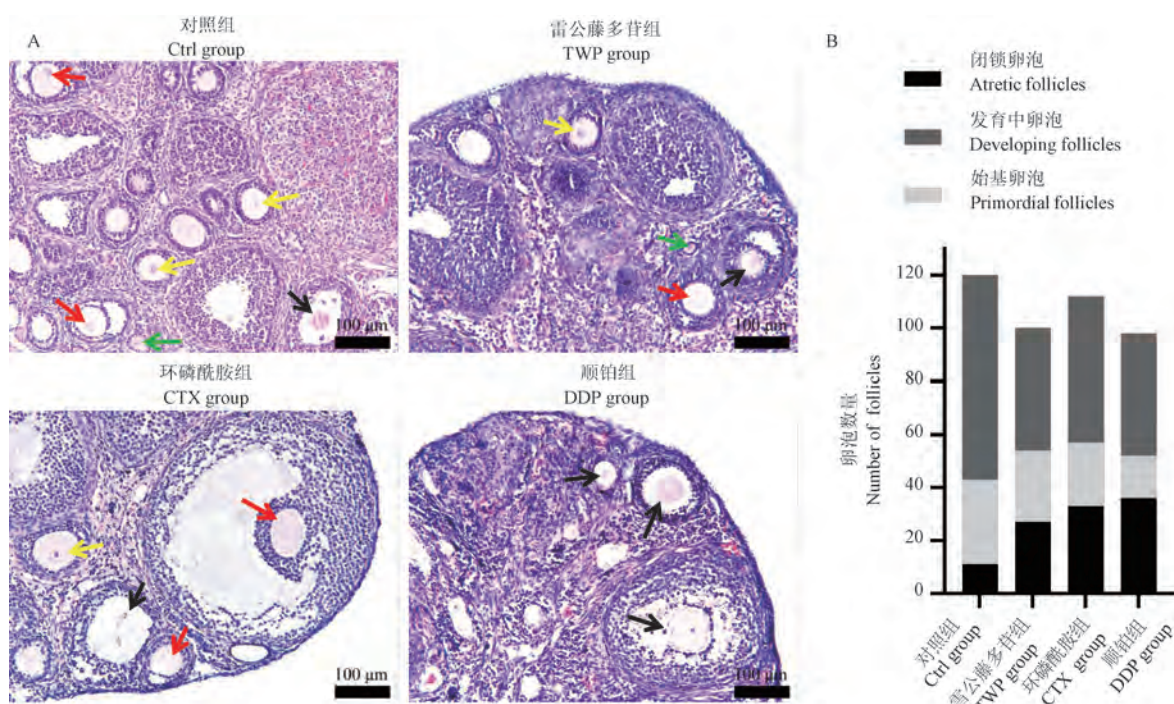
外观清晰且厚度均一;但 3 组模型组卵母细胞胞质颗粒呈不同程度的碎片化(图 5)。

相较于 Ctrl 组,TWP 组和 CTX 组小鼠的卵母细胞成熟率均显著降低($P<0.05$),DDP 组卵母细胞成熟率极显著降低($P<0.01$);造模结束 2 周后,相较于 Ctrl 组,CTX 组和 DDP 组成熟率仍显著降低($P<0.001$),但 TWP 组成熟率升高恢复与

Ctrl 组差异不显著($P>0.05$)(表 5)。

2.7 生育力比较

相对于 Ctrl 组,各模型组窝产仔数无显著差异($P>0.05$);TWP 组、CTX 组和 DDP 组小鼠妊娠数减少,妊娠率降低,总成活仔鼠数减少,各组小鼠子代总活仔率呈相近趋势,均维持在 93.75%~100.00%(表 6)。



注:A:各组小鼠卵巢 HE 染色病理图,绿色箭头标示始基卵泡,黄色箭头标示窦前卵泡,红色箭头表示窦状卵泡,黑色箭头标示闭锁卵泡;B:各组小鼠卵泡数量占比。

图 4 各组小鼠卵巢卵泡发育情况($n=6$)

Note. A, Pathological diagram of ovary HE staining in mice in each group, green arrows mark the primordial follicles, yellow arrows mark the preantral follicles, red arrows indicate the antral follicles, black arrows indicate atretic follicles. B, Proportion of follicles in each group of mice.

Figure 4 Ovarian follicle development of mice in each group ($n=6$)

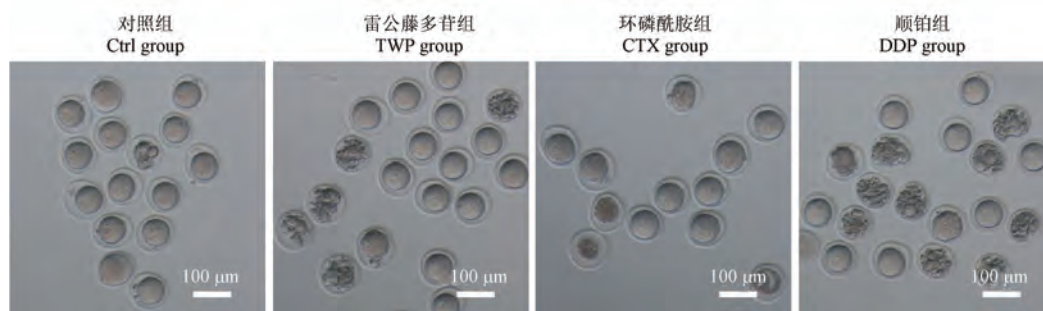


图 5 各组小鼠卵母细胞状态

Figure 5 Oocyte status of mice in each group

表 4 各组小鼠发育中卵泡和闭锁卵泡情况($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Developing follicles and atretic follicles in each group of mice($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别 Groups	发育中卵泡率/% Rate of developing follicles	闭锁卵泡率/% Rate of atretic follicles
对照组 Ctrl group	63.46±5.93	8.73±2.42
雷公藤多苷组 TWP group	47.05±8.18*	27.92±5.59**
环磷酰胺组 CTX group	50.45±15.10*	29.16±11.18**
顺铂组 DDP group	46.03±10.93**	37.59±11.88***

注:与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。
Note. Compared with the Ctrl group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

表 5 各组小鼠卵母细胞成熟率情况($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 5 Maturation rate of oocytes in each group($\bar{x}\pm s, n=8$)

组名 Groups	建模结束后/% At the end of modeling	建模结束 2 周后/% Two weeks after the end of modeling
对照组 Ctrl group	85.09±1.35	88.23±0.33
雷公藤多苷组 TWP group	59.61±13.80*	86.36±2.46
环磷酰胺组 CTX group	55.50±2.33*	24.27±2.90***
顺铂组 DDP group	41.67±1.07**	49.18±2.56**

注:与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。
Note. Compared with Ctrl group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

表 6 各组小鼠生育力情况($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 6 Fertility of mice in each group($\bar{x}\pm s, n=6$)

组名 Groups	妊娠数/小鼠数 Number of pregnancies/ number of mice	妊娠率/% Pregnancy rate	窝产仔数 Litter size	总成活仔鼠数 Total number of live mice	总活仔率/% Total live litter rate
对照组 Ctrl group	6/6	100.00	13.83±4.40	83	100.00
雷公藤多苷组 TWP group	3/6	50.00	10.67±7.77	30	93.75
环磷酰胺组 CTX group	4/6	66.67	13.25±4.03	50	94.34
顺铂组 DDP group	3/6	50.00	10.00±2.65	30	100.00

3 讨论

卵巢储备是指卵巢皮质中始基卵泡发展成为高质量卵母细胞的潜力,当该潜力下降导致女性生育能力下降及性激素缺乏时,即提示 DOR 发生。《卵巢储备功能减退临床诊治专家共识》^[16]指出,目前 DOR 患病率约为 10%~35%且呈逐年上升趋势,生殖医学界需引起重视。本研究选用品格健壮、生长发育快、繁殖能力强的 ICR 小鼠,采用 TWP、CTX 和 DDP 构建 DOR 模型。实验结果表明,3 组模型小鼠均出现体质量减轻、活动减少、脱毛及尾尖冰凉的现象,尤其是 DDP 组的小鼠,体质量下降和脱毛症状最为显著。同时,各模型组小鼠卵巢呈现缺血苍白伴不同程度的萎缩,DDP 组小鼠的卵巢萎缩现象尤为突出;此外,卵巢指数均极显著降低,仅 DDP 组小鼠子宫指数极显著降低。同样的报道小鼠经顺铂腹腔注射

后,进食减少,活跃度降低,有稀便或血便等现象,在干预结束时存活率仅为 50%^[17],表明采用 DDP 构建 DOR 模型小鼠,不仅其卵巢储备功能受影响,同时全身机能亦受影响。此外,相关报道采用连续 7 d 腹腔注射 1.5 mg/kg DDP 构建 DOR 小鼠模型^[18],亦有一次性腹腔注射 3 mg/kg DDP 构建 DOR 小鼠模型^[19];本研究是采用 1.5 mg/kg DDP 进行腹腔注射 14 d 建立 DOR 小鼠模型,因此,采用 DDP 构建 DOR 小鼠模型应注意给药剂量及持续时间,有一定的局限性。

3 组 DOR 模型小鼠均出现动情周期紊乱,符合 DOR 不孕患者临床表现。《美国生殖医学学会实践委员会》指出,临床 DOR 患者血清激素可见 FSH 水平升高、E₂ 和 AMH 水平降低^[20]。此外,基础 FSH/LH 可用于评估正常 AMH 水平的人的卵巢反应,反映其卵巢储备功能^[21]。本研究 3 组 DOR 模型小鼠 AMH、E₂ 激素水平均显著降

低,但仅 CTX 组小鼠 FSH 激素水平显著升高,CTX 组和 DDP 组小鼠 FSH/LH 激素比值显著升高。表明通过 CTX 构建的 DOR 小鼠激素水平更贴近 DOR 患者的激素情况。通过卵巢病理切片结果,3 组模型小鼠卵巢发育中卵泡减少,闭锁卵泡增多,表明成功构建 DOR 小鼠模型。我们进一步研究卵泡卵母细胞的质量变化情况,发现 3 组 DOR 模型小鼠卵母细胞细胞质呈不同程度碎片化,其成熟率亦显著下降;此外,在造模结束 2 周后,发现 TWP 组的卵母细胞成熟率恢复到正常小鼠水平,而 CTX 组和 DDP 组卵母细胞成熟率持续下降。这些结果表明通过 TWP 构建的 DOR 模型有可逆性,CTX 和 DDP 构建的 DOR 模型具有持续稳定性。

研究表明,仅以 AMH 和 FSH 水平界定的 DOR 女性,其生育能力并没有显著降低^[22]。在本研究小鼠生育力统计分析亦发现 3 组 DOR 小鼠窝产仔数虽然与正常小鼠无差异,但妊娠率及总成活仔鼠数则有所降低。

综上所述,本研究证实 TWP、CTX 和 DDP 3 种药物可成功构建 DOR 小鼠模型,其中通过 CTX 建立的 DOR 模型小鼠全身机能、激素水平和卵巢储备功能更接近 DOR 不孕患者临床表现,且具持续稳定性。

参考文献:

- [1] STEINER A Z, PRITCHARD D, STANCZYK F Z, et al. Association between biomarkers of ovarian reserve and infertility among older women of reproductive age [J]. JAMA, 2017, 318(14): 1367-1376.
- [2] HU S, XU B, JIN L. Perinatal outcome in young patients with diminished ovarian reserve undergoing assisted reproductive technology [J]. Fertil Steril, 2020, 114(1): 118-124.
- [3] 黄慧, 邓亚胜, 梁天薇, 等. 卵巢储备功能减退动物模型的造模方法评价与分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(4): 422-428.
HUANG H, DENG Y S, LIANG T W, et al. Evaluation and analysis of modeling methods for animal models with diminished ovarian reserve [J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(4): 422-428.
- [4] 何瑞芬, 杨永秀, 梁晓磊. 卵巢储备功能减退动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 254-259.
- HE R F, YANG Y X, LIANG X L. Research progress on animal models of diminished ovarian reserve [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 254-259.
- [5] 郝健亨, 王海军, 曹玉霞, 等. “秩边透水道”针刺对卵巢低反应小鼠 PI3K/AKT/FOXO3a 通路的影响 [J]. 中国针灸, 2024, 44(7): 821-830.
HAO J H, WANG H J, CAO Y X, et al. Effect of acupuncture at “Zhibian” (BL 54) through “Shuidao” (ST 28) on PI3K/AKT/FOXO3a pathway in mice with poor ovarian response [J]. Chin Acupunct Moxibustion, 2024, 44(7): 821-830.
- [6] SU C, ZHANG R, ZHANG X, et al. Dingkun Pill modulate ovarian function in chemotherapy-induced premature ovarian insufficiency mice by regulating PTEN/PI3K/AKT/FOXO3a signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 315: 116703.
- [7] 梁德库. 槲皮素在顺铂诱导小鼠卵巢损伤中的保护作用及机制研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2022.
LIANG D K. The protective effects and mechanisms of quercetin on cisplatin-induced ovarian injuries [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2022.
- [8] 黎明星, 岳晓蕾, 陈秀榕, 等. 班氏促卵助孕汤改善多囊卵巢综合征小鼠卵母细胞的质量 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(14): 2958-2968.
LI M X, YUE X L, CHEN X R, et al. Ban's Culuan Zhuyun Decoction improves oocyte quality in polycystic ovary syndrome mice [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2025, 29(14): 2958-2968.
- [9] 王洋, 张斐, 许洁夏, 等. 三种卵巢早衰大鼠造模方法比较研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(10): 1225-1230.
WANG Y, ZHANG F, XU J X, et al. Comparative study on three modeling methods of premature ovarian failure rats [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2022, 42(10): 1225-1230.
- [10] 范雅祺, 郑燕鹏, 周子婷, 等. 雷公藤建立卵巢早衰大鼠模型的实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(3): 355-364.
FAN Y Q, ZHENG Y P, ZHOU Z T, et al. Establishment of a rat model of premature ovarian failure induced by *Tripterygium wilfordii* [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(3): 355-364.
- [11] 朱芳芳, 王焱哲, 郜洁, 等. 基于自噬研究麒麟丸对环磷酰胺诱导的卵巢储备功能减退模型小鼠卵巢储备功能的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(4): 1989-1994.
ZHU F F, WANG Y X, GAO J, et al. Effects of Qilin Pills on ovarian reserve function in cyclophosphamide-induced decreased ovarian reserve mice model based on autophagy [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(4): 1989

- 1994.
- [12] 张帆, 安学芳, 赵赫, 等. 还原型谷胱甘肽在 AG129 小鼠生物净化及快速繁殖中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 96-99.
- ZHANG F, AN X F, ZHAO H, et al. Application of reduced glutathione in biological purification and rapid propagation of AG129 mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 96-99.
- [13] 刘奕, 陆华, 董文然. 连续超促排卵致肾精不足伴生育力低下雌性小鼠模型制备和比较研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(5): 1650-1657.
- LIU Y, LU H, DONG W R. Establishment and comparative study of female mice models of kidney essence deficiency with low fertility induced by continuous ovarian hyperstimulation [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2021, 23(5): 1650-1657.
- [14] 韩雨, 陈晨, 王鑫峰, 等. 雌性大鼠吸烟对仔鼠行为学影响的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 810-818.
- HAN Y, CHEN C, WANG X F, et al. Effect of smoking on behavior of female rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 810-818.
- [15] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- CHEN Q. Research methodology of pharmacology of traditional Chinese medicine [M]. 2nd Edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006.
- [16] 卵巢储备功能减退临床诊治专家共识专家组, 中华预防医学会生育力保护分会生殖内分泌生育保护学组. 卵巢储备功能减退临床诊治专家共识 [J]. 生殖医学杂志, 2022, 31(4): 425-434.
- EXPERT GROUP OF CONSENSUS ON CLINICAL DIAGNOSIS & MANAGEMENT OF DIMINISHED OVARIAN RESERVE. REPRODUCTIVE ENDOCRINOLOGY & FERTILITY PRESERVATION SECTION OF CHINESE SOCIETY ON FERTILITY PRESERVATION UNDER CHINESE PREVENTIVE MEDICINE ASSOCIATION. Consensus on clinical diagnosis and management of diminished ovarian reserve [J]. J Reprod Med, 2022, 31(4): 425-434.
- [17] LI D, CHEN Y, QI L, et al. Differentially expressed genes in cisplatin-induced premature ovarian failure in rats [J]. Anim Reprod Sci, 2013, 137(3/4): 205-213.
- [18] 黄天红. 生长激素改善卵巢储备功能下降小鼠模型卵巢生殖功能的研究及作用机制探索 [D]. 成都: 成都医学院, 2023.
- HUANG T H. Research on growth hormone improving ovarian reproductive function in mice model of decreased ovarian reserve function and explore the mechanism [D]. Chengdu: Chengdu Medical College, 2023.
- [19] 王月娇, 孙兆贵, 徐莲薇, 等. 葵源煎配方颗粒对卵巢储备功能下降模型小鼠的改善作用及机制研究 [J]. 中国药房, 2021, 32(9): 1051-1056.
- WANG Y J, SUN Z G, XU L W, et al. Study on improvement effects and its mechanism of Guiyuan decoction formula granules on model mice with decreased ovarian reserve [J]. China Pharm, 2021, 32(9): 1051-1056.
- [20] PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion [J]. Fertil Steril, 2020, 114(6): 1151-1157.
- [21] HE Y, LIU L, YAO F, et al. Assisted reproductive technology and interactions between serum basal FSH/LH and ovarian sensitivity index [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2023, 14: 1086924.
- [22] HARRIS B S, JUKIC A M, TRUONG T, et al. Markers of ovarian reserve as predictors of future fertility [J]. Fertil Steril, 2023, 119(1): 99-106.

[收稿日期]2024-11-25

尚小森,杨依纯,侯佳楠,等. GDF-15 通过激活 NO-cGMP-PKG 信号通路促进大鼠急性心肌梗死侧枝循环改善心功能的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(5): 60-70.

Shang XS, Yang YC, Hou JN, et al. GDF-15 promotes collateral circulation and improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction by activating the NO/cGMP/PKG signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(5): 60-70.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.05.006

GDF-15 通过激活 NO-cGMP-PKG 信号通路促进大鼠急性心肌梗死侧枝循环改善心功能的研究

尚小森¹, 杨依纯^{2,3}, 侯佳楠^{2,3}, 樊林花^{2,3}, 陈小平¹, 卫兵艳^{2,3*}, 陈朝阳^{2,3*}

(1. 太原市中心医院心内科, 太原 030009; 2. 山西医科大学实验动物中心, 太原 030001;

3. 实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室, 太原 030001)

【摘要】 目的 探讨生长分化因子-15(GDF-15)通过激活一氧化氮(NO)-环磷酸鸟苷(cGMP)-蛋白激酶 G(PKG)信号通路对急性心肌梗死(AMI)大鼠侧枝循环及心功能的影响。**方法** 通过结扎冠状动脉左前降支,构建 AMI 大鼠模型,造模成功后,随机分成假手术组、模型组、GDF-15 组,每组 12 只,GDF-15 组腹腔注射 GDF-15 重组蛋白,其余 2 组注射等量生理盐水,每周 2 次,连续 8 周。超声心动图检测大鼠心功能;HE 染色观察大鼠心肌组织病理损伤;CD31 免疫组化染色观察大鼠侧枝循环的情况;qPCR 检测血管内皮生长因子(VEGF)mRNA 表达;取模型组和 GDF-15 组大鼠心脏组织进行转录组学测序,筛选差异表达基因(DEGs),通过京都基因和基因组百科全书(KEGG)对差异表达基因进行通路富集分析。试剂盒检测 NO、活性氧(ROS)、cGMP 表达水平;Western blot 检测 VEGF、eNOS 单体、p-eNOS^{ser1177} 单体、eNOS 二聚体及 PKG 蛋白表达。**结果** 与假手术组相比,模型组左室收缩末期内径(LVEDs)、左室舒张末期内径(LVEDd)增加($P<0.001$),左室射血分数(LVEF)、短轴缩短率(FS)降低($P<0.001$),心肌细胞坏死严重,梗死区血管密度降低($P<0.05$),但 VEGF mRNA 和蛋白水平没有变化($P>0.05$),NO、eNOS 二聚体、cGMP 水平及 PKG 蛋白表达水平降低($P<0.05$),ROS、eNOS 单体及 p-eNOS^{ser1177} 单体的表达水平增高($P<0.05$);与模型组相比,GDF-15 组 LVEDs、LVEDd 降低($P<0.05$),LVEF、FS 升高($P<0.01$),心肌细胞坏死得到缓解,梗死区血管密度明显增加($P<0.0001$),VEGF mRNA 水平增高($P<0.0001$),转录组学测序结果显示,共鉴定到 324 个 DEGs,其中 230 个上调,94 个下调。KEGG 富集分析 T20 通路中 cGMP-PKG 信号通路差异最显著。VEGF、NO、eNOS 二聚体、cGMP 水平及 PKG 蛋白水平增高($P<0.05$),ROS、eNOS 单体及 p-eNOS^{ser1177} 单体的表达水平降低($P<0.05$)。**结论** GDF-15 可通过抑制 eNOS 解偶联并激活 NO-cGMP-PKG 通路,促进缺血心肌侧枝循环、改善心功能。

【关键词】 生长分化因子-15;急性心肌梗死;侧枝循环;NO-cGMP-PKG 信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 05-0060-11

【基金项目】 太原市科技项目(202264);山西省科技厅中央引导地方科技发展资金项目(YDZJSX2022B009);山西省基础研究计划项目青年科学研究项目(202403021212288)。

【作者简介】 尚小森(1988—),女,在读博士研究生,主治医师,研究方向:冠心病的基础与临床研究。E-mail:80130080@qq.com

【通信作者】 卫兵艳(1984—),女,在读博士研究生,高级实验师,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail:wbyan2009@126.com

陈朝阳(1972—),男,硕士,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail:ccytcn@163.com

* 共同通信作者

GDF-15 promotes collateral circulation and improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction by activating the NO/cGMP/PKG signaling pathway

SHANG Xiaosen¹, YANG Yichun^{2,3}, HOU Jianan^{2,3}, FAN Linhua^{2,3}, CHEN Xiaoping¹,
WEI Bingyan^{2,3*}, CHEN Zhaoyang^{2,3*}

(1. Department of Cardiology of Taiyuan Central Hospital, Taiyuan 030009, China.

2. Center for Laboratory Animals, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001.

3. Shanxi Key Laboratory of Experimental Animals and Animal Models of Human Disease, Taiyuan 030001)

【Abstract】 Objective To observe the effects of growth differentiation factor-15 (GDF-15) on collateral circulation and cardiac function in rats with acute myocardial infarction (AMI) in relation to the nitric oxide (NO)/cyclic guanosine monophosphate (cGMP)/protein kinase G (PKG) signaling pathway. **Methods** An AMI rat model was constructed by ligating the left anterior descending coronary artery. After modeling, the rats were divided randomly into Sham, Model, and GDF-15 groups ($n = 12$ rats per group). Rats in the GDF-15 group were injected intraperitoneally with recombinant GDF-15 protein, and the other two groups were injected with the same amount of normal saline twice a week for 8 consecutive weeks. Cardiac function was detected by echocardiography. Pathological damage to rat myocardial tissue was detected by hematoxylin and eosin staining and the collateral circulation was observed by CD31 immunohistochemical staining. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression was detected by quantitative polymerase chain reaction. Transcriptomic sequencing of heart tissues in the model and GDF-15 groups was performed and differentially expressed genes (DEGs) were screened. Pathway enrichment analysis of the DEGs was carried out according to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS), and cGMP were detected using kits, and VEGF, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) monomer, p-eNOS^{ser1177} monomer, eNOS dimer, and PKG protein were detected by Western blot. **Results** Left ventricular end-systolic diameter (LVEDs) and left ventricular end-diastolic diameter (LVEDd) were increased ($P < 0.001$), and left ventricular ejection fraction (LVEF) and the short-axis shortening rate (FS) were decreased in the Model group compared with the Sham group ($P < 0.001$). Myocardial cell necrosis was more severe, vascular density in the infarcted area was decreased ($P < 0.05$), but VEGF mRNA and protein levels were no change ($P > 0.05$), and levels of NO, eNOS dimer, cGMP, and PKG protein were decreased ($P < 0.05$), and expression levels of ROS, eNOS monomer, and p-eNOS^{ser1177} monomer were increased ($P < 0.05$). LVEDs and LVEDd decreased ($P < 0.05$), LVEF and FS increased ($P < 0.01$), myocardial cell necrosis was relieved, vascular density in the infarcted area increased significantly ($P < 0.0001$), and VEGF mRNA levels increased ($P < 0.0001$), compared with the Model group. Transcriptomic sequencing identified 324 DEGs, including 230 up-regulated and 94 down-regulated genes. According to KEGG enrichment analysis, the cGMP-PKG signaling pathway showed the most significant difference in the T20 pathway. VEGF, NO, eNOS dimer, cGMP, and PKG protein levels were all increased ($P < 0.05$), while ROS, eNOS monomer, and p-eNOS^{ser1177} monomer were decreased in the GDF-15 group ($P < 0.05$). **Conclusions** GDF-15 can promote collateral circulation in ischemic myocardium and improve cardiac function by inhibiting eNOS decoupling and activating the NO/cGMP/PKG pathway.

【Keywords】 GDF-15; acute myocardial infarction; collateral circulation; NO-cGMP-PKG signaling pathway

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

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是一种严重的心血管疾病, 其定义为冠状动脉突然阻塞导致心肌缺血坏死^[1]。这种疾病具

有极高的临床危害性, 可导致心力衰竭、心律失常甚至猝死等^[2]。目前, 对于 AMI 的治疗方法主要包括药物治疗、介入治疗和外科手术治疗等,

但这些方法都存在一定的局限性^[3]。因此,深入探索 AMI 的发病机制,寻找新的治疗靶点和手段显得尤为重要。生长分化因子-15 (growth differentiation factor 15, GDF-15) 是一种多功能的细胞因子,属于转化生长因子- β (transforming growth factor, TGF- β) 超家族成员^[4]。它在多种生理和病理过程中发挥着重要功能^[5]。研究表明, GDF-15 可以通过调节细胞增殖、分化和凋亡等过程,参与心血管系统的发育和稳态维持^[6]。此外, GDF-15 还可以通过与其他信号通路相互作用,发挥其生物学功能。例如, GDF-15 可以通过激活 ERK1/2 和 Akt 信号通路,促进血管平滑肌细胞的增殖和迁移^[7];另外, GDF-15 还可以通过抑制 TGF- β /Smad 信号通路,减少心肌纤维化的发生^[8]。

为了探索 GDF-15 在 AMI 中的作用机制,我们对模型组和 GDF-15 组大鼠的心肌组织进行了转录组学分析,发现 cGMP-PKG 信号通路差异最为显著。NO-cGMP-PKG 信号通路是一条重要的细胞内信号转导通路,它在心血管系统中发挥着多种重要的生理功能^[9]。研究表明, NO-cGMP-PKG 信号通路可以通过调节血管平滑肌的舒张和收缩,参与血压的调节^[10];同时, NO-cGMP-PKG 信号通路能够通过抑制血小板的聚集和血栓的形成,参与心血管系统的抗血栓作用^[11]。此外, NO-cGMP-PKG 信号通路还可以通过调节心肌细胞的钙稳态,参与心血管系统的正性肌力作用^[12]。值得注意的是,生理条件下产生 NO 的内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 二聚体在缺氧、炎症及氧化应激刺激下变成单体,从而产生更多的超氧阴离子,使 NO 的生成减少,进而影响 cGMP 及 PKG 活性,使血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达降低^[13]。本研究旨在初步探索 GDF-15 对 AMI 侧枝循环形成及心功能的作用及该作用是否通过介导 NO-cGMP-PKG 信号通路来实现。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 8~10 周龄雄性 SD 大鼠 36 只,体重 (250 $\pm$ 30) g,购自山西医科大学实验动物中心

[SCXK(晋)2024-0004],饲养于山西医科大学实验动物中心屏障环境[SYXK(晋)2024-0007],动物实验过程严格按照 3R 原则给予人道关怀,遵守国际实验动物伦理学要求,经过山西医药大学实验动物伦理委员会批准(SYDL2023019)。

1.2 主要试剂与仪器

Recombinant Rat GDF15 Protein (CP081395) 购自浦斯瑞(上海)生物医药有限公司; NO (S0021S) 和 ROS (S0033S) 检测试剂购自上海碧云天生物技术有限公司; CD31 抗体 (BA2966)、 VEGF 抗体 (BA0407) 和 PKG (A01708-3) 购自武汉博士德生物有限公司; qPCR 套装 (9109-092-830) 购自宝生物工程(大连)有限公司; VEGF 及内参 GAPDH 引物由华大基因科技有限公司合成; cGMP (S14668) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测试剂盒购自武汉赛洛菲生物科技有限公司; Total Protein Extraction Kit for Animal Tissues (PK10021)、eNOS 抗体 (27120-1-AP)、p-eNOS 抗体 (28939-1-AP) 和 β -actin 抗体 (HRP-66009) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

Vevo 770 小动物多普勒超声仪 (加拿大 Visual sonic 公司); BX51 显微镜 (日本 Olympus 公司); Quant Studio 5 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); Bio-Rad 1658028 垂直电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司) 等。

1.3 实验方法

1.3.1 AMI 模型构建及分组

36 只 SD 大鼠随机分为假手术 (Sham) 组、AMI 模型 (Model) 组和 GDF-15 组,每组 12 只 (其中随机选 6 只用来做病理,剩余 6 只取材液氮速冻后,储存于-80℃冰箱)。使用结扎大鼠冠状动脉左前降支的方法,建立 AMI 模型。具体方法参照文献^[14]。

1.3.2 GDF-15 体内给药

根据计算公式:动物 A 剂量/(mg/kg)=动物 B 剂量/(mg/kg) $\times$ 动物 B 的 Km/动物 A 的 Km,结合大鼠的 Km 系数为 6,小鼠的 Km 系数为 3,参考先前文献中报道的小鼠 GDF-15 给药剂量为 100 ng/kg^[15],计算得大鼠的 GDF-15 腹腔注射剂量为 50 ng/kg。每周 2 次,连续 8 周。假手术组和模型组给予等剂量生理盐水,均采用腹腔注射给药。

1.3.3 各组大鼠心功能的检测

使用 Vevo 770 超声仪,在造模前及取材前分别检测大鼠心功能。主要指标有左心室舒张末期内径(left ventricular dimensions at end-diastole, LVEDd)、左室收缩末期内径(left ventricular dimensions at end-systole, LVEDs)、射血分数(ejection fraction, EF)、短轴缩短率(fractional shortening, FS)。

1.3.4 各组大鼠取材及标本处理

各组大鼠心功能检测结束后,随机从每组中挑选 6 只,5%异氟烷麻醉,开胸,磷酸缓冲盐溶液冲洗心脏组织后,液氮速冻,保存于-80℃冰箱。其余 6 只麻醉开胸,剪开右心耳,磷酸缓冲盐溶液灌洗后,用 10 mL 10% KCl 使心脏组织停搏在舒张期,取下心脏组织甲醛灌注固定、脱水、石蜡包埋。制备 5 μm 切片,按照各染色试剂盒说明书分别进行 HE 染色和 CD31 免疫组织化学染色。

1.3.5 qPCR 检测心肌组织 VEGF mRNA 水平表达

根据 qPCR 套装试剂盒使用说明书进行荧光定量 PCR,引物序列:VEGF 上游引物(5'-3'): CTACCTCCACCATGCCAAGT,下游引物(5'-3'): CTACCTCCACCATGCCAAGT。GAPDH:上游引物(5'-3'): GGTGTCTCTCTGCGACTTCA,下游引物(5'-3'): TGGTCCAGGGTTTCTT ACTCC。扩增结束后,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 VEGF 基因的 mRNA 相对于内参 GAPDH 的表达量。

1.3.6 转录组学测序

取模型组和 GDF-15 大鼠心脏组织,液氮快速冷冻后,进行转录组学测序(上海中科新生命技术公司)。根据 $\log_2$ 差异倍数 >1.0 和 $P\text{-adj}<0.05$,鉴定出显著的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。然后进行京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析,以确定受 GDF-15 影响最大的信号通路。

1.3.7 试剂盒检测心肌组织中 NO 和 ROS 的含量

按照 NO 和 ROS 检测试剂盒使用说明分别检测心肌组织中 NO 和 ROS 的含量。

1.3.8 ELISA 检测血清中 cGMP 的含量

异氟烷麻醉大鼠后,腹主动脉采血,室温静

置 30 min, 3000 r/min 离心 20 min, 取上清, 按照 cGMP 的 ELISA 试剂盒说明书检测血清中 cGMP 的含量。

1.3.9 Western blot 检测各组大鼠心肌组织 VEGF、eNOS 单体、p-eNOS^{ser1177} 单体、eNOS 二聚体及 PKG 蛋白水平表达

使用 Total Protein Extraction Kit for Animal Tissues 提取心肌组织蛋白, BCA 法测蛋白浓度。10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 转至 NC 膜。牛血清白蛋白封闭 2 h, 加入按比例稀释的一抗(VEGF(1:500)、eNOS(1:500)、p-eNOS(1:1000)、PKG(1:2000)及 β -actin(1:5000)), 4℃摇床过夜, TBST 洗 3 次, 每次 5 min, 加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 二抗(1:5000), 室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次; 最后, 使用 3-氨基-9-乙基咔唑显色试剂盒进行显色。使用 Image J 15.4 分析蛋白条带灰度值, 分别用 VEGF、eNOS、p-eNOS 及 PKG 与 β -actin 灰度比值计算各自的相对表达量。

1.4 统计学方法

研究过程中使用 SPSS 26.0 软件进行数据分析, 使用 GraphPad Prism 10.0 制作相关图表。计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)分析, 组间多重比较采用 LSD- t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心功能检测指标的变化

超声结果如图 1 所示, 与假手术组比较, 模型组 LVEDs、LVEDd 水平升高($P<0.001$), EF、FS 水平降低($P<0.001$); 与模型组比较, GDF-15 组 LVEDs、LVEDd 水平降低($P<0.05$), LVEF、FS 水平升高($P<0.01$)。

2.2 各组大鼠心肌组织 HE 染色结果

心肌组织 HE 染色结果如图 2 所示, 与假手术组比较, 模型组出现心肌细胞坏死, 肌纤维出现波浪状松解而排列紊乱, 梗死面积明显增大($P<0.0001$); 与模型组比较, GDF-15 组心肌细胞坏死减轻, 肌纤维排列紊乱减轻, 梗死面积明显缩小, 差异有统计学意义($P<0.05$)。

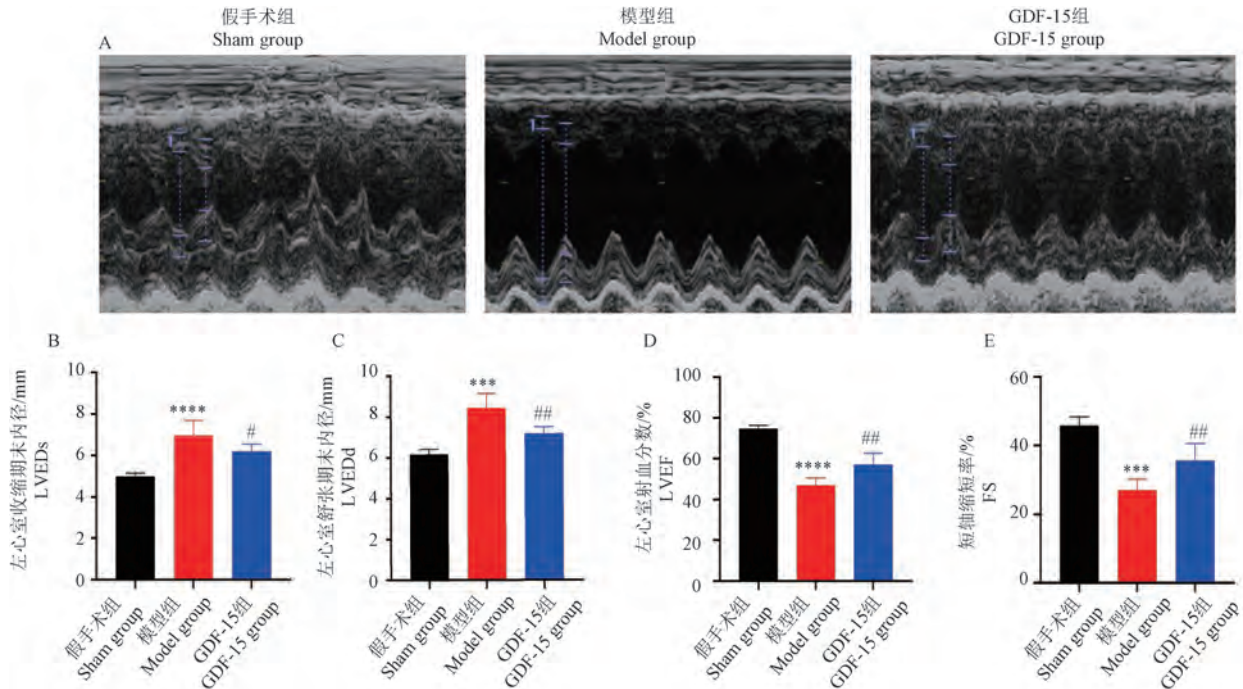
2.3 各组大鼠心肌组织血管密度

心肌组织 CD31 免疫组化结果如图 3 所示,与假手术组比较,模型组心肌组织梗死区域血管密度降低($P<0.05$);与模型组比较,GDF-15 组梗死区

血管密度增加,差异有统计学意义($P<0.0001$)。

2.4 各组大鼠心肌组织中 VEGF mRNA 和蛋白的相对表达水平

从图 4A 中可以看出,和假手术组相比,模型

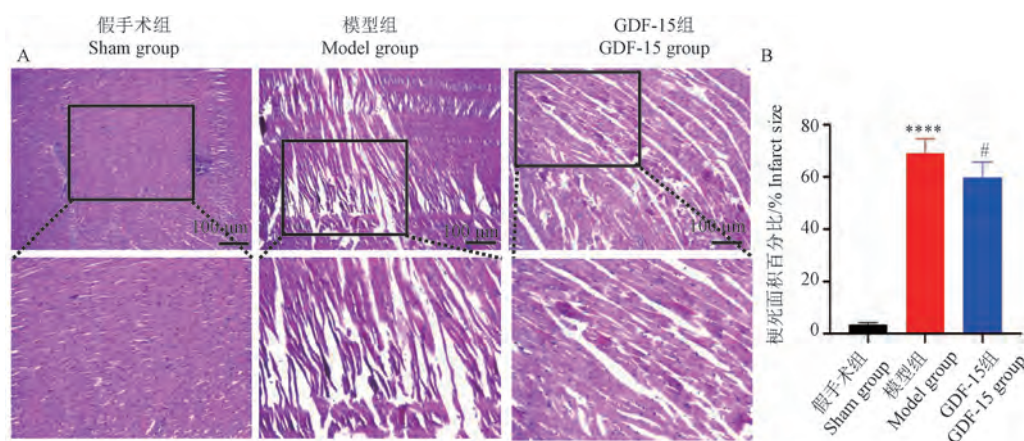


注:A:各组大鼠超声心动图代表图像;B:左室收缩末期内径;C:左室舒张末期内径;D:左室射血分数;E:短轴缩短率。与假手术组相比,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图1 GDF-15 对 AMI 大鼠心功能的影响

Note. A, Representative images of echocardiography in each group of rats. B, LVEDs. C, LVEDd. D, LVEF. E, FS. Compared with the Sham group, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. Compared with the Model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 1 Effect of GDF-15 on cardiac function in rats with AMI



注:A:各组大鼠心肌组织 HE 染色代表图像;B:梗死面积百分比。与假手术组相比,**** $P<0.0001$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图2 各组大鼠心肌组织 HE 染色结果

Note. A, Representative images of HE staining in myocardial tissue of rats in each group. B, Infarct size. Compared with the Sham group, **** $P<0.0001$. Compared with the Model group, # $P<0.05$.

Figure 2 HE staining results of myocardial tissue in each group

组大鼠心肌组织中 VEGF mRNA 表达没有差异 ($P>0.05$), 而与模型组相比, GDF-15 组 VEGF mRNA 表达明显升高 ($P<0.0001$)。Western blot 结果显示与 qPCR 结果一致 (图 4B)。

2.5 心肌组织转录组学测序

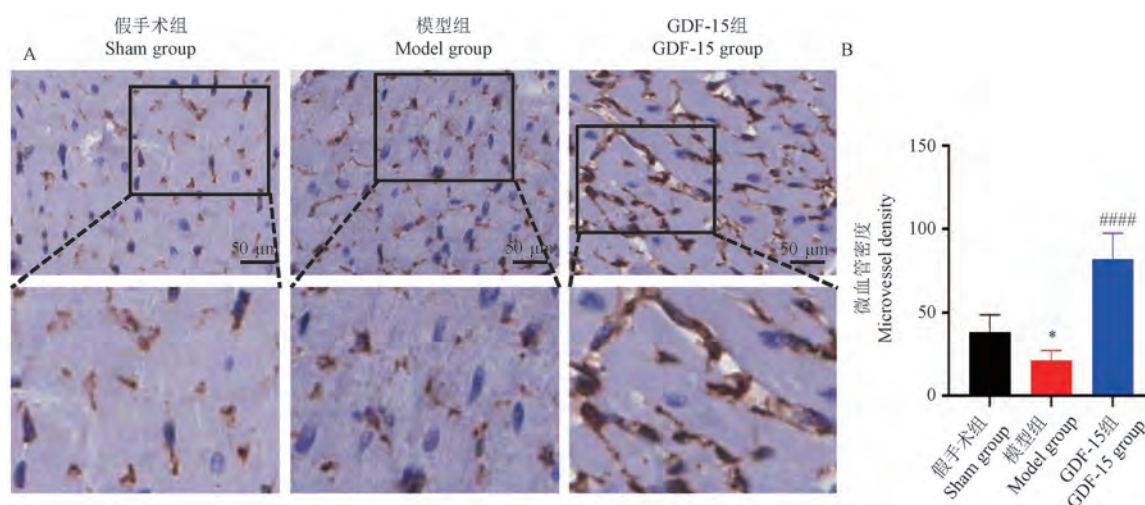
将 $\log_2$ 差异倍数 >1.0 和 $P\text{-adj}<0.05$ 作为界定 DEGs 的标准, 将 GDF-15 组与模型组进行比较, 从图 5 可以看出共筛选出 324 个 DEGs, 其中有 94 个下调, 230 个上调。KEGG 结果显示 cGMP-PKG 信号通路出现最显著上调。

2.6 各组大鼠心肌组织中 NO 和 ROS 含量

与假手术组相比, 模型组大鼠心肌组织中 NO 水平降低 ($P<0.001$), ROS 水平升高 ($P<0.001$); 与模型组相比, GDF-15 组大鼠心肌组织中 NO 水平升高 ($P<0.05$), ROS 水平降低 ($P<0.0001$), 结果见图 6。

2.7 GDF-15 对 NO-cGMP-PKG 信号通路和 eNOS 解偶联的影响

结果见图 7。与假手术组相比, 模型组大鼠心肌组织中 eNOS 单体及 p-eNOS^{ser1177} 单体表达

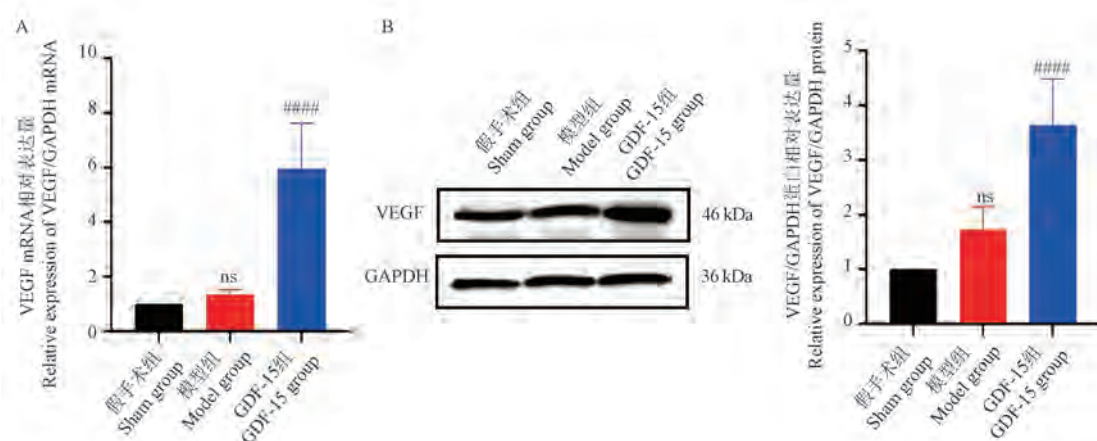


注: A: 各组大鼠心肌组织 CD31 免疫组化代表图像; B: 微血管密度。与假手术组相比, $*P<0.05$; 与模型组相比, $####P<0.0001$ 。

图 3 各组大鼠心肌组织微血管密度检测结果

Note. A, Representative images of CD31 immunohistochemistry in myocardial tissue of rats in each group. B, Microvascular density. Compared with the Sham group, $*P<0.05$. Compared with the Model group, $####P<0.0001$.

Figure 3 Results of myocardial microvascular density in each group



注: A: VEGF mRNA 的表达; B: VEGF 蛋白表达。与模型组相比, $####P<0.0001$ 。

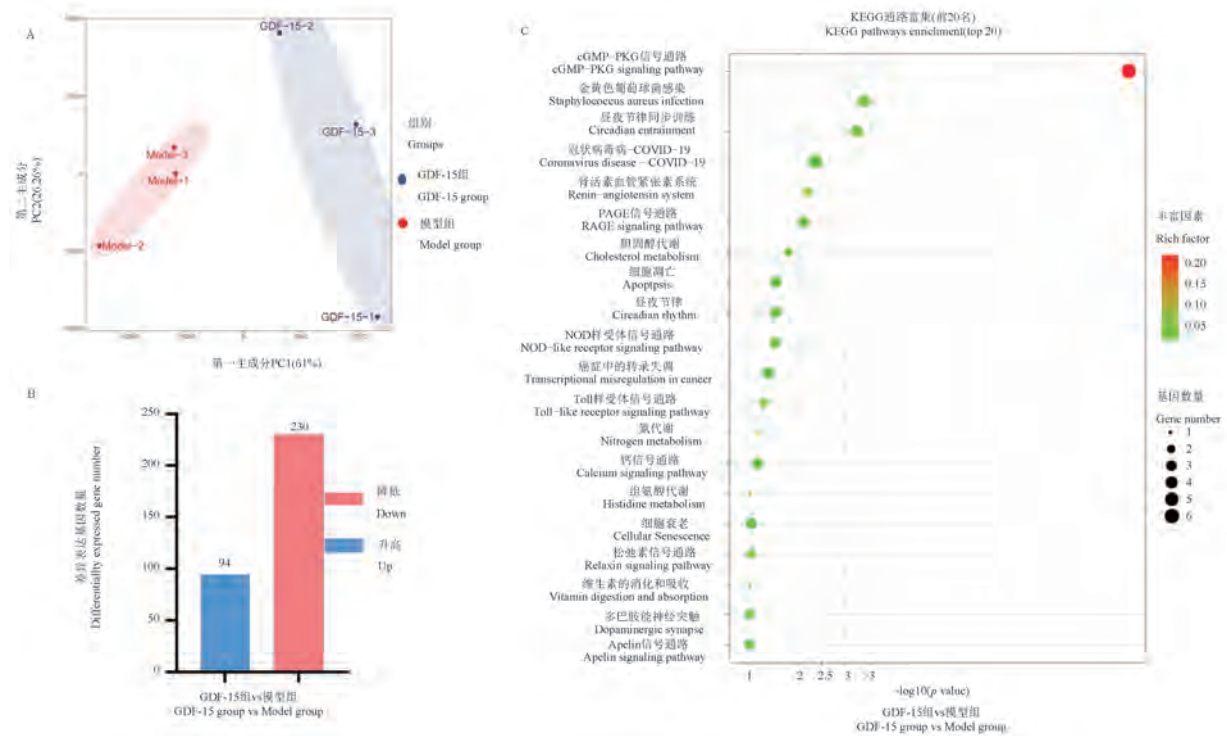
图 4 各组大鼠心肌组织中 VEGF mRNA 和蛋白的相对表达水平

Note. A, Expression of VEGF mRNA. B, Expression of VEGF protein. Compared with the Model group, $####P<0.0001$.

Figure 4 Relative expression levels of VEGF mRNA and protein in myocardium of rats in each group

升高($P<0.01$), eNOS 二聚体及 PKG 蛋白表达降低($P<0.05$), 血浆中 cGMP 含量降低($P<0.0001$)。与模型组相比, GDF-15 组大鼠心肌组

织中 eNOS 单体及 p-eNOS^{ser1177} 单体表达降低($P<0.01$), eNOS 二聚体及 PKG 蛋白表达水平升高($P<0.0001$), 血浆中 cGMP 含量升高($P<0.0001$)。

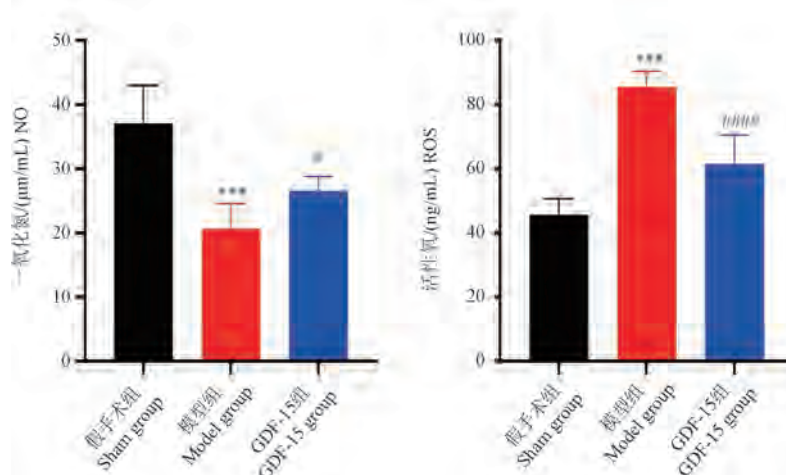


注: A: 模型组和 GDF-15 组主成分分析结果; B: 模型组和 GDF-15 组差异表达基因结果; C: 京都基因和 KEGG 富集分析模型组与 GDF-15 组的差异表达基因。

图 5 模型组和 GDF-15 组心肌组织转录组学测序结果

Note. A, Principal component analysis results of Model group and GDF-15 group. B, Results of DEGs between the Model group and the GDF-15 group. C, KEGG enrichment analysis of DEGs in the Model group and GDF-15 group.

Figure 5 Transcriptomic sequencing results of myocardial tissue in the Model group and GDF-15 group

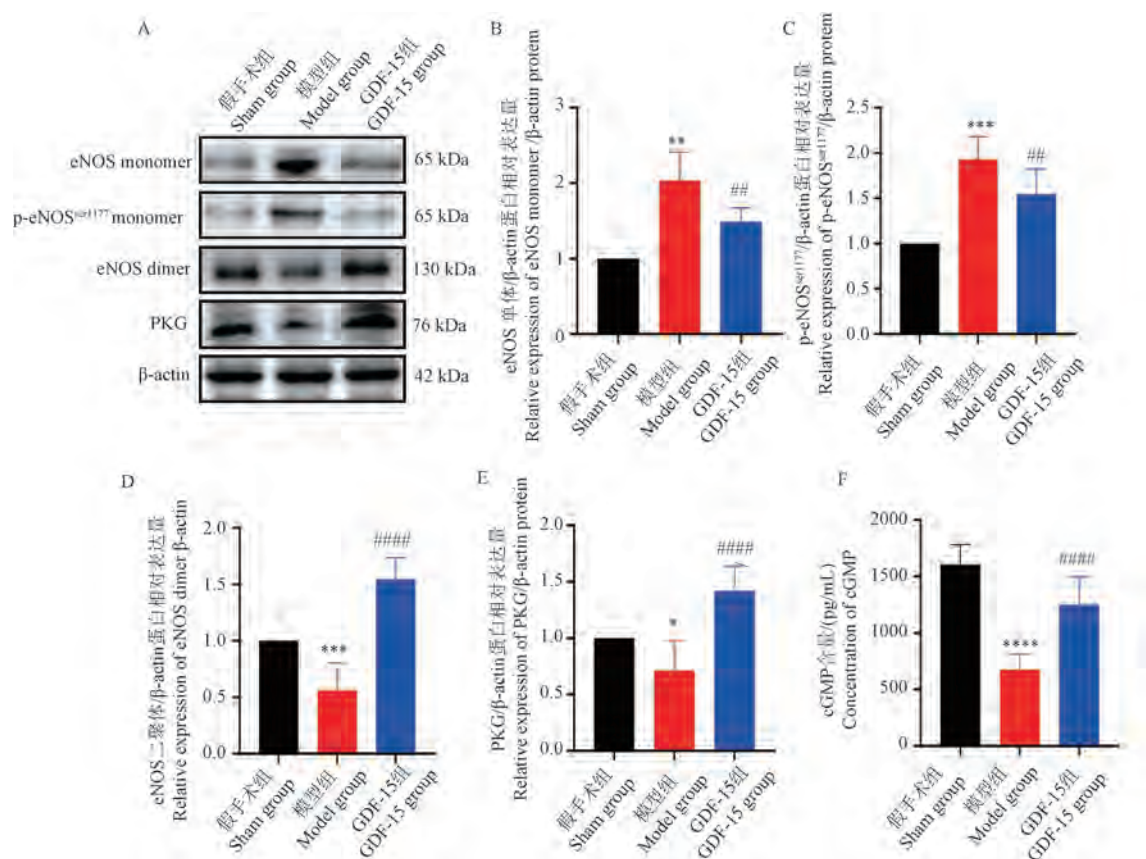


注: A: 一氧化氮含量; B: 活性氧含量。与假手术组相比, *** $P<0.001$; 与模型组相比, # $P<0.05$, #### $P<0.0001$ 。

图 6 各组大鼠心肌组织中 NO 和 ROS 含量

Note. A, NO content. B, ROS content. Compared with the Sham group, *** $P<0.001$. Compared with the Model group, # $P<0.05$, #### $P<0.0001$.

Figure 6 Contents of NO and ROS in myocardial tissue of rats in each group



注:A:Western blot 结果;B:eNOS 单体相对表达量;C:p-eNOS^{ser1177} 单体相对表达量;D:eNOS 二聚体相对表达量;E:PKG 蛋白相对表达量;F:血浆 cGMP 含量。与假手术组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$;与模型组相比, ## $P < 0.01$, #### $P < 0.0001$ 。

图 7 GDF-15 对 NO-cGMP-PKG 信号通路和 eNOS 解偶联的影响

Note. A, Western blot results. B, Relative expression of eNOS monomer. C, Relative expression of p-eNOS^{ser1177}. D, Relative expression of eNOS dimer. E, Relative expression of PKG protein. F, Plasma cGMP content. Compared with the Sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Compared with the Model group, ## $P < 0.01$, #### $P < 0.0001$.

Figure 7 Effect of GDF-15 on NO-cGMP-PKG signaling pathway and eNOS decoupling

3 讨论

AMI 及其相关并发症依旧是致使全球死亡率上升与医疗费用增加的主要缘由^[16]。AMI 被广泛视作冠状动脉疾病的典型表征,其特点为冠状动脉闭塞后,由于长时间缺血引起心肌缺血缺氧进而导致心肌细胞凋亡^[17]。因此,有效激活血管生成,促进侧枝循环的建立是改善梗死区域心肌细胞坏死凋亡的关键机制^[18]。

GDF-15 作为 TGF- β 超家族成员中的一种应激蛋白,与 TGF- β 1 拥有共同结构域,主要调节器官生长分化及组织修复,发挥抗炎、抑制细胞生长的作用^[19]。最近的研究发现,GDF-15 有助于预防心血管疾病,在心力衰竭和梗死期间,GDF-

15 与炎症和心脏纤维化之间存在关联,并且 GDF-15 可能通过调节代谢活性和抑制细胞的氧化、炎症、凋亡和纤维化来预防心血管疾病,显著改善心肌缺血引起的慢性心力衰竭的心功能,缓解心室重构^[14]。此外,GDF-15 过表达的工程分泌体也能够明显增强心肌损伤后的心脏修复^[20]。本研究旨在进一步探讨 GDF-15 对微血管生成的治疗潜力以及 GDF-15 在 AMI 治疗中的分子机制。

本研究通过结扎左前降支构建大鼠 AMI 模型,观察到模型组大鼠 LVEDs、LVEDd 升高,LVEF、FS 降低。这些生理指标的改变反映了心肌梗死对心脏整体结构和功能的显著影响。LVEDs 和 LVEDd 的升高意味着心室在舒张末期

容纳更多血液,这可能是由于心肌梗死导致心肌收缩力下降,心脏不能有效地将血液泵出,而造成血液在心室的淤积。而 LVEF 和 FS 的降低则直接体现了心肌梗死区域心肌细胞失去收缩功能后,整个心脏泵血能力的减弱。HE 染色出现心肌细胞坏死明显,这进一步从组织学层面证实了 AMI 大鼠模型构建成功,心肌细胞坏死是 AMI 的典型病理特征,会引发一系列的级联反应,包括炎症反应、细胞因子释放等^[21],这些可能都与后续的心功能变化以及本研究中所关注 GDF-15 的作用密切相关。GDF-15 在 AMI 病例中具有重要的保护作用^[22],BOUWENS 等^[23]研究发现 GDF-15 能够抑制 caspase-3 等凋亡相关蛋白酶的活性,从而保护心肌细胞免受过度凋亡的损害。在本研究中,证实 GDF-15 与大鼠 AMI 模型中的侧枝循环建立及心功能改善有关。CD31 是一种内皮细胞标记物,其表达增加表明内皮细胞的增殖和迁移活跃,这是血管新生的关键环节。VEGF 作为一种强效的促血管生成因子,在侧枝循环建立过程中起着至关重要的作用。我们通过检测 CD31 和 VEGF 的 mRNA 及蛋白的表达,发现 GDF-15 能明显促进 CD31 和 VEGF 的 mRNA 及蛋白的表达,表明 GDF-15 能够促进梗死区域的血管生成。同时,GDF-15 能够改善 AMI 大鼠心功能,超声心动图参数显示 GDF-15 降低了 LVEDs、LVEDd,提高了 LVEF、FS 参数,与先前 GDF-15 在心功能不全治疗中的积极作用的研究一致^[14]。

为了进一步研究 GDF-15 改善心功能作用背后的潜在机制,通过 RNA-seq 对模型组和 GDF-15 组心脏组织进行转录组学分析。主成分分析 (principal component analysis, PCA) 显示,2 组之间的基因表达高度相似,与模型组相比,GDF-15 组有 324 个 DEGs (230 个上调,94 个下调),说明 GDF-15 参与上调和下调许多推定基因的表达。KEGG 富集分析进一步显示这些 DEGs 最显著富集的途径是 cGMP-PKG 信号通路,这为理解 GDF-15 改善心功能找到了一个关键的切入点。在正常生理状态下,NO 作为一种来自血管内皮的旁分泌松弛剂,通过与鸟苷酸环化酶结合促进 cGMP 的生成,进而激活 PKG,维持微血管正常张力和局部血流稳定,对心肌细胞的正常功能至关

重要^[24]。已有研究证实 NO-cGMP-PKG 信号通路在一定程度上参与心肌梗死后适应保护作用^[25]。然而,在 AMI 发生时,情况发生了急剧变化。缺氧作为主要的致病因素开始起作用,刺激微血管内皮细胞大量产生 ROS。ROS 过量产生是一把双刃剑,一方面,ROS 直接攻击 eNOS 二聚体,促使其解聚变成单体。这种结构变化导致 eNOS 的功能受损,原本能催化 L-精氨酸 (L-Arg) 生成 NO 的能力下降,从而使 NO 产生减少。另一方面,随着 NO 产生的减少,依赖于 NO 的 cGMP 合成也相应减少,进一步使得相邻心肌细胞内 PKG 的活性降低。PKG 活性降低会影响心肌细胞的多种生理功能,如阻止正常的肌丝滑行过程,最终导致心肌收缩力下降^[26]。同时,PKG 活性降低还可影响心肌细胞的离子通道功能,干扰细胞内的钙稳态,这些变化共同加重了 AMI 的发展过程^[27]。

eNOS 即内皮型一氧化氮合酶,其主要功能是催化 L-Arg 生成 NO。eNOS 以单体和二聚体的形式存在。二聚体形式是 eNOS 具有催化活性产生 NO 的活性形式,而单体形式的 eNOS 活性相对较低或者无活性^[28]。磷酸化在 eNOS 的活性调控中起到关键作用,特别是丝氨酸 1177 (ser1177) 位点的磷酸化。当 eNOS 在 ser1177 位点被磷酸化形成 p-eNOS^{ser1177} 时,通常会增强 eNOS 的活性^[29]。在正常生理状态下,针对 eNOS 单体而言,促进 eNOS 发生磷酸化反应,提高 p-eNOS^{ser1177} 的水平,有助于单体向二聚体转化。这一过程会让更多的 eNOS 以二聚体形式存在,从而使 eNOS 能够有效地催化生成 NO。然而,在某些病理状态时,如果这个磷酸化进程受到干扰,eNOS 单体的数量就会增加,使其处于活性较低甚至毫无活性的状态,进而影响 NO 的生成。从细胞信号传导的视角来看,多个细胞内的信号通路都能够调节 eNOS 的磷酸化状态,其中就包括 PI3K-Akt 等信号通路。这些通路一旦被激活,便会导致 Akt 蛋白被活化,随后 Akt 蛋白可使 eNOS 的 ser1177 位点发生磷酸化,提高 p-eNOS^{ser1177} 所占的比例,推动 eNOS 二聚体化并增强其活性,从而实现心血管功能的调节^[30]。

在本研究中,观察到 AMI 大鼠心肌组织中 ROS、eNOS 单体及其磷酸化水平显著增加,NO-

cGMP-PKG 通路受到明显抑制,具体表现为心肌组织中 NO 含量减少、血浆中 cGMP 水平降低以及 PKG 蛋白表达下调。而 GDF-15 干预后,展现出全面的补救作用。首先,GDF-15 抑制了 eNOS 二聚体的解聚,使 eNOS 单体及单体磷酸化水平显著降低的同时,提高了 eNOS 二聚体的表达水平。这一变化直接导致 NO 生成得以恢复,因为只有 eNOS 二聚体处于正常状态才能有效合成 NO。其次,随着 NO 的增加,cGMP 的合成也随之增加,这是由于 NO 对鸟苷酸环化酶的激活作用得到恢复。最后,cGMP 水平的回升进一步促进了 PKG 蛋白的表达上调,从而恢复了 PKG 的活性。PKG 活性的恢复对于改善心肌细胞的收缩功能有着重要意义,它可以重新调整心肌细胞内的钙离子转运,使心肌细胞能够正常地进行收缩和舒张^[31],从根本上缓解 AMI 所造成的心功能损害。而且,PKG 的激活还可能通过影响其他信号分子或细胞内的代谢途径^[9],进一步促进心脏组织的整体修复和功能恢复。

综上所述,基于 AMI 的大鼠模型,本研究表明,GDF-15 通过促进血管生成和激活 NO-cGMP-PKG 通路抑制 eNOS 单体解偶联来改善 AMI 的心功能,这为理解 AMI 的机制提供了新的见解,也为深入理解 AMI 的发病机制提供新的理论依据,同时也为开发新的治疗靶点和手段提供重要的实验依据。本研究虽然在一定程度上揭示了 GDF-15 在大鼠 AMI 模型中的作用及机制,但仍存在局限性。在探讨 GDF-15 激活 NO-cGMP-PKG 通路的机制时,虽然心肌组织上进行了验证,但仍缺乏直接的实验证据。需要进一步通过细胞实验,使用基因编辑技术构建特异性表达或缺失 GDF-15 的细胞系,或使用信号通路特异性抑制剂或激活剂来明确 GDF-15 与 NO-cGMP-PKG 信号通路之间的确切联系。另外,本研究仅从 mRNA 和蛋白表达水平来评估 GDF-15、CD31 和 VEGF 的变化,未能深入探究其在细胞水平的调控机制,这也是未来研究需要改进的方向。除此之外,还需开展更多的临床研究以便更全面地把握 GDF-15 的治疗效果及其具体机制。

参考文献:

[1] DAMLUJI A A, VAN DIEPEN S, KATZ J N, et al.

Mechanical complications of acute myocardial infarction: a scientific statement from the American heart association [J].

Circulation, 2021, 144(2): e16-e35.

[2] KRITTANAWONG C, KHAWAJA M, TAMIS-HOLLAND J E, et al. Acute myocardial infarction: etiologies and mimickers in young patients [J]. J Am Heart Assoc, 2023, 12(18): e029971.

[3] SAITO Y, OYAMA K, TSUJITA K, et al. Treatment strategies of acute myocardial infarction: updates on revascularization, pharmacological therapy, and beyond [J]. J Cardiol, 2023, 81(2): 168-178.

[4] SIDDIQUI J A, POTHURAJU R, KHAN P, et al. Pathophysiological role of growth differentiation factor 15 (GDF15) in obesity, cancer, and Cachexia [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2022, 64: 71-83.

[5] EDDY A C, TRASK A J. Growth differentiation factor-15 and its role in diabetes and cardiovascular disease [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2021, 57: 11-18.

[6] WANG D, DAY E A, TOWNSEND L K, et al. GDF15: emerging biology and therapeutic applications for obesity and cardiometabolic disease [J]. Nat Rev Endocrinol, 2021, 17(10): 592-607.

[7] XIE B, TANG W, WEN S, et al. GDF-15 inhibits ADP-induced human platelet aggregation through the GFRAL/RET signaling complex [J]. Biomolecules, 2023, 14(1): 38.

[8] HUMERES C, SHINDE A V, TULETA I, et al. Fibroblast Smad7 induction protects the remodeling pressure-overloaded heart [J]. Circ Res, 2024, 135(3): 453-469.

[9] CAI Z, WU C, XU Y, et al. The NO-cGMP-PKG axis in HFpEF: from pathological mechanisms to potential therapies [J]. Aging Dis, 2023, 14(1): 46-62.

[10] HUANG Y, ZHANG K, LIU M, et al. An herbal preparation ameliorates heart failure with preserved ejection fraction by alleviating microvascular endothelial inflammation and activating NO-cGMP-PKG pathway [J]. Phytomedicine, 2021, 91: 153633.

[11] DEGJONI A, CAMPOLO F, STEFANINI L, et al. The NO/cGMP/PKG pathway in platelets: the therapeutic potential of PDE5 inhibitors in platelet disorders [J]. J Thromb Haemost, 2022, 20(11): 2465-2474.

[12] KIM S M, YUEN T, IQBAL J, et al. The NO-cGMP-PKG pathway in skeletal remodeling [J]. Ann N Y Acad Sci, 2021, 1487(1): 21-30.

[13] YANG H Y, LIU M L, LUO P, et al. Network pharmacology provides a systematic approach to understanding the treatment of ischemic heart diseases with traditional Chinese medicine [J]. Phytomedicine, 2022, 104: 154268.

[14] WEI B Y, HOU J N, YAN C P, et al. Shexiang Baoxin Pill

- treats acute myocardial infarction by promoting angiogenesis *via* GDF15-TRPV4 signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115186.
- [15] 周继明. 生长分化因子 15 在急性心肌梗死中的功能及分子机制研究 [D]. 西安: 中国人民解放军空军军医大学, 2018.
- ZHOU J M. Function and molecular mechanism of growth differentiation factor 15 in acute myocardial infarction [D]. Xi'an: PLA Air Force Medical University, 2018.
- [16] AKHTAR K H, KHAN M S, BARON S J, et al. The spectrum of post-myocardial infarction care: From acute ischemia to heart failure [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2024, 82: 15–25.
- [17] RALLIDIS L S, XENOIANNIS I, BRILAKIS E S, et al. Causes, angiographic characteristics, and management of premature myocardial infarction: JACC state-of-the-art review [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2022, 79 (24): 2431–2449.
- [18] XIONG Y Y, GONG Z T, TANG R J, et al. The pivotal roles of exosomes derived from endogenous immune cells and exogenous stem cells in myocardial repair after acute myocardial infarction [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (3): 1046–1058.
- [19] MYRMEL G M S, STEIRO O T, TJORA H L, et al. Growth differentiation factor 15: a prognostic marker in patients with acute chest pain without acute myocardial infarction [J]. *Clin Chem*, 2023, 69(6): 649–660.
- [20] ZOU A, XIAO T, CHI B, et al. Engineered exosomes with growth differentiation factor-15 overexpression enhance cardiac repair after myocardial injury [J]. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19: 3295–3314.
- [21] PAOLISSO P, FOÀ A, BERGAMASCHI L, et al. Hyperglycemia, inflammatory response and infarct size in obstructive acute myocardial infarction and MINOCA [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2021, 20(1): 33.
- [22] LIU S, CHEN X, WANG H, et al. Association of GDF-15 and syntax score in patient with acute myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Ther*, 2019, 2019: 9820210.
- [23] BOUWENS E, BRANKOVIC M, MOUTHAAAN H, et al. Temporal patterns of 14 blood biomarker candidates of cardiac remodeling in relation to prognosis of patients with chronic heart failure-the bio-SH i FT study [J]. *J Am Heart Assoc*, 2019, 8(4): e009555.
- [24] MONMA Y, SHINDO T, EGUCHI K, et al. Low-intensity pulsed ultrasound ameliorates cardiac diastolic dysfunction in mice: a possible novel therapy for heart failure with preserved left ventricular ejection fraction [J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(5): 1325–1338.
- [25] QIN L, ZANG M, XU Y, et al. Chlorogenic acid alleviates hyperglycemia-induced cardiac fibrosis through activation of the NO/cGMP/PKG pathway in cardiac fibroblasts [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2021, 65(2): e2000810.
- [26] KOLIJN D, PABEL S, TIAN Y, et al. Empagliflozin improves endothelial and cardiomyocyte function in human heart failure with preserved ejection fraction *via* reduced pro-inflammatory-oxidative pathways and protein kinase G α oxidation [J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(2): 495–507.
- [27] ZHANG N, FENG B, MA X, et al. Dapagliflozin improves left ventricular remodeling and aorta sympathetic tone in a pig model of heart failure with preserved ejection fraction [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2019, 18(1): 107.
- [28] JANASZAK-JASIECKA A, PŁOSKA A, WIERONSKA J M, et al. Endothelial dysfunction due to *ENOS uncoupling*: molecular mechanisms as potential therapeutic targets [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2023, 28(1): 21.
- [29] SANZ-GÓMEZ M, ALEDAVOOD E, BEROIZ-SALAVERRI M, et al. Novel indolic AMPK modulators induce vasodilatation through activation of the AMPK-*ENOS*-NO pathway [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 4225.
- [30] YAO L, LIANG X, LIU Y, et al. Non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist finerenone ameliorates mitochondrial dysfunction *via* PI3K/Akt/*ENOS* signaling pathway in diabetic tubulopathy [J]. *Redox Biol*, 2023, 68: 102946.
- [31] INSERTE J, GARCIA-DORADO D. The cGMP/PKG pathway as a common mediator of cardioprotection: translatability and mechanism [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(8): 1996–2009.

[收稿日期]2024-10-30

陈群英,周波,刘晶,等. 模式动物 db/db 和 KK-Ay 作为糖尿病肾病模型的特点及差异性研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(5): 71-80.

Chen QY, Zhou B, Liu J, et al. Study on characteristics and differences of db/db and KK-Ay as diabetic nephropathy model [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(5): 71-80.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.05.007

模式动物 db/db 和 KK-Ay 作为糖尿病肾病模型的特点及差异性研究

陈群英,周波,刘晶,侯艳*

(江苏省药物研究所 江苏省药物安全性评价中心,南京 211800)

【摘要】 目的 考察两种 2 型糖尿病模式鼠 db/db 和 KK-Ay 作为糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)模型的特点及差异性,并用厄贝沙坦(irbesartan)治疗验证。**方法** 12 周龄的 db/db 及 KK-Ay 鼠各 102 只,根据尿微量白-蛋白肌酐比值(albumin-to-creatinine ratio, ACR)、24 h 尿总蛋白(UCFP)每种模式鼠分别筛选出 78 只,分为 6 组,db/db+irbesartan 组和 KK-Ay+irbesartan 组分别给予 irbesartan(40 mg/kg,)、db/db 组和 KK-Ay 组分别给予等量实验动物饮用水,以及 db/db+受试物 A 组和 KK-Ay+受试物 A 组(给予不同剂量受试物 A,本文受试物 A 组仅展示死亡动物数结果,其他结果未展示)。野生型 C57BL/6J(WT^a/WT^b 组)作为正常对照组,给予实验动物饮用水。每天临床观察,每周称体质量,不定期监测 ACR、UCFP。给药结束解剖,取脑、肝、肺、肾,称体质量,计算脏器系数(脏器质量×1000/动物体质量),采血检测血清总蛋白(totla protein, TP)、白蛋白(albumin, Alb)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、葡萄糖(glucose, GLU)、甘油三酯(triglycerides, TG)、胆固醇(cholesterol, CHO)。肾组织 HE、MASSON 和 PAS 染色观察组织病理学改变。**结果** 78 只 KK-Ay 鼠 8 周共死亡 5 只,78 只 db/db 鼠 6 周共死亡 21 只;ACR 在 db/db 组、KK-Ay 组均随鼠龄增加而升高,在 db/db+irbesartan 组和 KK-Ay+irbesartan 组降低但无统计学意义($P>0.05$);UCFP 在 KK-Ay 组随鼠龄增加而增大,irbesartan 治疗后显著降低($P<0.05$);与 WT 组相比,db/db 组、KK-Ay 组肾系数无明显变化,脑系数显著降低($P<0.01$),肝系数显著升高($P<0.01$),irbesartan 治疗后无显著变化($P>0.05$);与 WT 组相比,db/db 组、KK-Ay 组小鼠的血清 GLU、TG 显著升高($P<0.01$),与 KK-Ay 组相比,KK-Ay+irbesartan 组 GLU、TG 显著降低($P<0.01$);db/db 组、KK-Ay 组小鼠肾均可见肾小球系膜基质增厚伴系膜细胞增生,irbesartan 治疗后病变程度减轻。**结论** 12 周龄的 db/db、KK-Ay 小鼠均可作为 DN 研究模型。相比 db/db 小鼠, KK-Ay 小鼠的 ACR 个体差异小,采尿后动物死亡少,irbesartan 治疗后 GLU、TG、UCFP 均有显著改善。

【关键词】 糖尿病肾病;实验动物模型;db/db;KK-Ay;ACR;UCFP;MAU

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 05-0071-10

Study on characteristics and differences of db/db and KK-Ay as diabetic nephropathy model

CHEN Qunying, ZHOU Bo, LIU Jing, HOU Yan*

(Jiangsu Institute of Materia Medica Jiangsu Center for Safety Evaluation of Drugs, Nanjing 211800, China)

[作者简介] 陈群英(1978—),女,硕士,副研究员,研究方向:药效、毒理。E-mail:gingernj@126.com

[通信作者] 侯艳(1979—),女,硕士,副研究员,研究方向:药理、毒理。E-mail:18061680230@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the characteristics and differences between two type 2 diabetic model mice, db/db and KK-Ay, as models of diabetic nephropathy (DN), and to verify them with irbesartan treatment. **Methods** A total of 102 db/db and 102 KK-Ay mice (12 weeks old) were screened based on the albumin-to-creatinine ratio (ACR) and 24-hour urinary total protein (UCFP), with 78 mice of each strain selected and divided into 6 groups. The db/db + irbesartan group and KK-Ay + irbesartan group were administered irbesartan (40 mg/kg), the db/db group and KK-Ay group received an equal volume of drinking water for experimental animals, and the db/db + test article A groups and KK-Ay + test article A groups were given different doses of test article A (only the result of mortality data in the test articles groups were presented in the study, while other result were not shown). Wild-type C57BL/6J (WT^a/WT^b group) served as the normal control and were given experimental animal drinking water. Daily clinical observations were made, body mass was measured weekly, and ACR and UCFP were monitored periodically. At the end of administration, the mice were dissected, and the brain, liver, lungs and kidneys were collected, and the organ coefficients (organ mass×1000/body mass) were calculated. Blood was collected to measure serum total protein (TP), albumin (Alb), blood urea nitrogen (BUN), glucose (GLU), triglycerides (TG), and cholesterol (CHO). Kidney tissues were stained with HE, MASSON, and PAS to observe histopathological changes. **Results** Among the 78 KK-Ay mice, 5 died over 8 weeks, while among the 78 db/db mice, 21 died over 6 weeks. ACR increased with age in both the db/db and KK-Ay groups but decreased in the db/db+irbesartan and KK-Ay+irbesartan groups, though without statistical significance ($P > 0.05$). UCFP increased with age in the KK-Ay group but significantly decreased after irbesartan treatment ($P < 0.05$). Compared with the WT groups, the kidney coefficients in the db/db and KK-Ay groups showed no significant changes ($P > 0.05$), while the brain liver coefficients decreased significantly ($P < 0.01$) and the liver coefficients increased significantly ($P < 0.01$), but they did not change after irbesartan treatment ($P > 0.05$). Compared with the WT groups, GLU and TG levels were significantly increased in the db/db and KK-Ay groups ($P < 0.01$). Compared with the KK-Ay group, GLU and TG levels were significantly reduced in the KK-Ay+irbesartan group ($P < 0.01$). In the db/db and KK-Ay groups, kidney tissues showed thickening of the glomerular mesangial matrix and mesangial cell proliferation, which were alleviated after irbesartan treatment. **Conclusions** Both 12-week-old db/db and KK-Ay mice can serve as models for DN research. Compared with db/db mice, KK-Ay mice exhibited smaller individual differences in ACR, fewer animal deaths after urine collection, and significant improvements in GLU, TG and UCFP after irbesartan treatment.

【Keywords】 diabetic nephropathy; experimental animal models; db/db; KK-Ay; ACR; UCFP; MAU

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

糖尿病是一种由于胰岛素水平显著下降和胰岛素抵抗增加而导致高血糖的疾病。据世界卫生组织(WHO)报告,目前有 4.22 亿人患有糖尿病,其中 95%以上为 2 型糖尿病^[1]。糖尿病患者体内长期高血糖水平会进一步导致大血管和微血管受损,从而危及心、肝、肾和周围神经等组织,导致一系列并发症^[2]。我国糖尿病患者并发糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)的比例较高,约为 20%~40%,目前已成为终末期肾病(End stage renal disease, ESRD)的第二大原因,仅次于各种肾小球肾炎^[3]。DN 的治疗方法目前主要为降血糖、降血脂、降血压等^[4]。这些治疗方法虽然在一定程度上缓解患者的病情,但仍不能完全阻止 DN 向 ESRD 的进展^[5]。因此,为了更好地

了解 DN 的发病机制以及探索出更有效的治疗途径,合适的 DN 动物模型至关重要^[6]。

在糖尿病研究领域,目前已建立了多种 2 型糖尿病的啮齿动物模型,包括 db/db 小鼠、KK-Ay 小鼠、Zucker 糖尿病肥胖大鼠、Wistar 肥胖大鼠、大冢 Long-Evans 德岛肥胖大鼠和 Goto-Kakizaki 大鼠等^[7]。db/db 以及 KK-Ay 作为常用的 2 型糖尿病模式动物,其并发症肾病与人类 DN 发病过程类似,受到更多的关注。db/db 小鼠是 Leptin 受体基因缺陷导致的先天肥胖性 2 型糖尿病小鼠^[8],通常出生 4 周后逐渐出现肥胖、高血糖、高血脂、糖尿等糖尿病症状,至出生后约 8 周开始出现 DN 症状^[9]。KK 品系最初是从日本小鼠的近亲繁殖中建立的,它们表现出轻度胰岛素抵抗和

肥胖,随后通过将黄色肥胖基因(Ay 等位基因)转移到 KK 小鼠中而开发出 KK-Ay 小鼠。本研究比较了 db/db 和 KK-Ay 两种小鼠作为 DN 药效研究模式动物的模型特点,并给予 irbesartan 治疗,侧重检测临床指标如蛋白尿尿微量白-蛋白肌酐比值(albumin-to-creatinine ratio, ACR)、24 h 尿总蛋白(UCFP)、尿微量白蛋白(microalbuminuria, MAU)、血液生化血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、甘油三酯(triglycerides, TG)、胆固醇(cholesterol, CHO)等,旨在为 DN 新治疗方法临床前药效评价的模型选择、检测指标的建立及机制研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

11 周龄雄性 SPF 级 db/db 小鼠,102 只,体质量(50 ± 5)g,11 周龄的雄性 SPF 级 C57BL/6J 野生型小鼠(WT^a)10 只,体质量(20 ± 2)g,均购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司[SCXK(苏)2018-0008]。10~11 周龄雄性 SPF 级 KK-Ay,102 只,体质量(40 ± 6)g,同样周龄的雄性 SPF 级 C57BL/6J 野生型小鼠(WT^b)10 只,体质量(20 ± 2)g,购自于北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2019-0008]。饲养于江苏省药物安全评价中心屏障环境[SYXK(苏)2021-0040],环境温度 20~26℃,湿度 40%~70%,光照、换气次数均遵循国家标准。动物实验经过江苏省药物研究所伦理委员会批准(IACUC-20220711-01)本实验严格遵守实验动物 3R 标准。

1.2 主要试剂与仪器

检测试剂盒 CRE(批号 GD3073、GD3074)、BUN(批号 BD3103)、UCFP(批号 EA3031、BB3103)、GLU(批号 BA3090),均购自 Siemens Healthcare; TP(批号 20220212)、Alb(批号 20220112),均购自上海科华生物;小鼠尿微量白蛋白 ELISA 试剂盒(mouse MAU ELISA,批号 KLOIPOJB1918、AK10VJBZO789、PP02XLTB8003),购自 Elabscience Healthcare。Irbesartan 片(批号 DA201),购自赛诺菲(杭州)制药有限公司。

自动染色机(ST4040)、半自动切片机(RM2245)、全自动真空脱水机(RM2245)、石蜡包埋机(Arcadia H)(均购自 Leica,德国);全自动

生化分析仪(Siemens,日本)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物筛选、分组与给药

db/db 鼠适应 1 周后代谢笼收集 6 h 尿液(前期研究中,db/db 鼠收集 24 h 尿液后状态差,死亡严重,因此改为收集 6 h),KK-Ay 鼠适应 2 周后代谢笼收集 24 h 尿液。生化仪检测尿 UCFP 浓度、CRE,ELISA 检测 MAU 浓度,计算 24 h UCFP(UCFP 浓度×尿液体积)、MAU(MAU 浓度×尿液体积)和 ACR,根据 ACR、UCFP 筛选分组。血糖仪测量随机血糖。每个动物模型试验各设置 6 组,分别为 WT^a 组、WT^b 组、db/db 组、KK-Ay 组、db/db+irbesartan 组、KK-Ay+irbesartan 组、db/db+受试物 A 组、KK-Ay+受试物 A 组(本文受试物 A 组只展示死亡动物数结果,其余结果未展示)。分组后灌胃(ig)给药,db/db+irbesartan 组和 KK-Ay+irbesartan 组给予 irbesartan(40 mg/kg),WT^a 组、WT^b 组、db/db 组、KK-Ay 组均给实验动物饮用水,db/db+受试物 A 组和 KK-Ay+受试物 A 组给予不同剂量受试物 A。

1.3.2 实验动物临床观察、体质量

动物分组前、首次给药前、解剖前称量体质量并详细观察,给药期间每周称量 1 次体质量,每天临床观察。

1.3.3 尿 UCFP、MAU、CRE 检测

给药后定期代谢笼收集 6 h(db/db)或 24 h(KK-Ay)尿液,生化仪检测尿 UCFP 浓度、CRE,ELISA 检测 MAU 浓度。

1.3.4 脏器系数

给药结束解剖取脑、肝、肺、肾,称质量,计算脏器系数(脏器质量×1000/动物体质量)%。

1.3.5 血生化检测

给药结束小鼠麻醉后眼眶采血,全血静止 1 h 后 3000 r/min 离心 5 min,取血清,全自动生化分析仪检测 BUN、CRE、TP、Alb、GLU、TG、CHO。

1.3.6 组织病理学检查

左右两侧肾福尔马林固定后取材,石蜡包埋,切片,分别行苏木素-伊红(HE)、PAS 和 MASSON 染色。

1.4 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 23.0 软件进行统计,用 GraphPad Prism 6.01 作图。数据以平均数±标

准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组数列均呈正态,方差齐时用 LSD-*t* 检验比较,方差不齐用 Dunnett-*t* 检验。 $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 动物筛选与分组结果

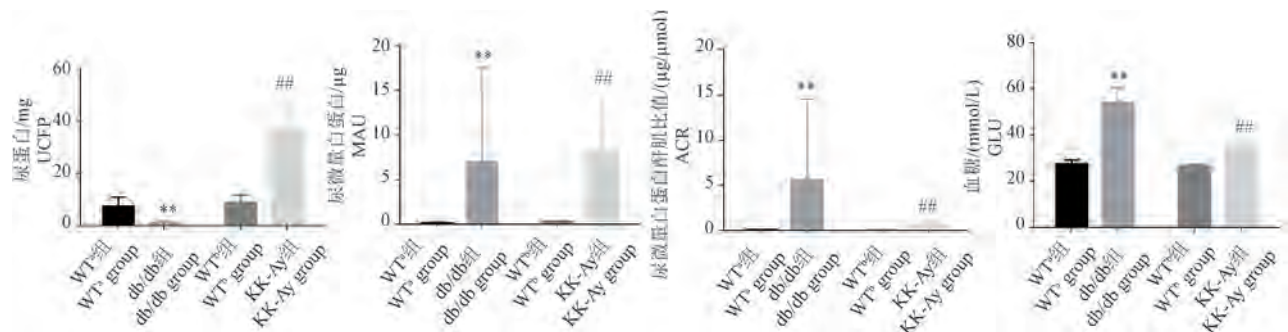
db/db、KK-Ay 小鼠适应 1 或 2 周后均达到 12 周龄。WT^a 组和 WT^b 组 UCFP、MAU、ACR、GLU 结果比较一致,检测结果比较可靠(图 1)。对比 WT^a 组或 WT^b 组,db/db 组与 KK-Ay 组 GLU 均显著升高($P<0.01$)。12 周龄 db/db 小鼠平均体质量 54.1 g,同样周龄 KK-Ay 小鼠平均 35.6 g,WT^a 和 WT^b 均 27 g 左右。与 WT^a 组或 WT^b 组相比,db/db 组及 KK-Ay 组 MAU、ACR 均显著升高($P<0.01$)。102 只 db/db 小鼠 ACR 范围(0.11~39.06),最大值和最小值相差约 355 倍,102 只 KK-Ay 小鼠 ACR 范围(0.06~2.99),最大值和最小值相差约 50 倍。相比 KK-Ay 小鼠,db/db 小鼠 ACR 个体差异更大,分布更广。与 WT^b 组相比,KK-Ay 组 UCFP 显著升高($P<0.01$),而与 WT^a 组相比,db/db 组 UCFP 显著降低($P<0.01$),这可能与 db/db 小鼠基因型的改变相关。因此对于 db/db 小鼠,优先选用 ACR 或者 MAU 指标进行 DN 药效研究,KK-Ay 小鼠则可以以 ACR、MAU、UCFP 作为分组筛选指标。

从 102 只 db/db 和 102 只 KK-Ay 中根据 ACR 分别筛选出 78 只。db/db 小鼠筛选 ACR 在 0.20~23.00 的小鼠区间随机分为 db/db 组、db/db+irbesartan 组以及 db/db+受试物 A 组,每组前

9 号动物 ACR 在 0.20~2.50 之间,后 4 号小鼠 ACR 差异较大,在 3.45~23.00 之间。KK-Ay 小鼠筛选 ACR 在 0.12~1.45 之间的小鼠,区间随机分为 KK-Ay 组、KK-Ay+irbesartan 组以及 KK-Ay+受试物 A 组。

2.2 动物死亡、临床观察结果

db/db 组毛色黑,体型肥胖,屁股肥大,整体成三角形形状,腿短,活动少,多尿。KK-Ay 组毛色黄,体型相对 WT^b 较为肥大,活动正常,尿量多于 WT^b 组,而少于 db/db 组。12 周龄后对 db/db 组 2 d 换 1 次垫料,KK-Ay 组则可以 3~4 d 换 1 次。两种模式鼠在给药后期均可见糖尿病常见并发症,如眼白内障、眼底出血、糖尿病足等。糖尿病肾病药效试验中,试验周期通常较长,由于疾病进展,动物容易死亡。本研究中,WT^a 和 WT^b 组未见死亡。db/db 组动物死亡较多,给药 6 周共死亡 21 只,且各组均有死亡,每组死亡 2~4 只。KK-Ay 组前 6 周死亡 2 只。第 7 周、第 8 周死亡 3 只,给药 8 周共死亡 5 只。动物每周死亡情况见表 1。前期实验结果表明,db/db 组代谢笼常规 24 h 采尿会影响小鼠状态,采尿后死亡严重,因此本研究改为 6 h 采尿,但第 2 周采尿后仍然死亡 8 只,因此原计划给药 8 周改为给药 6 周。经统计后发现 db/db 小鼠 21 只死亡动物中 15 只为分组前或给药中检测 ACR>10 的动物,3 只为 ACR 值在 5~10 的动物,3 只为 ACR<5 的动物。病理结果显示,当 ACR 值较大时,绝大部分肾病变严重,病变评分也较高。因此 ACR 与肾病变程度存在正相关关系。



注:WT^a 组和 WT^b 组, $n=10$; db/db 小鼠和 KK-Ay 小鼠, $n=102$ 。与 WT^a 组对比, ** $P<0.01$; 与 WT^b 组对比, ## $P<0.01$ 。

图 1 分组前 UCFP、MAU、ACR、GLU 水平($\bar{x}\pm s$)

Note. WT^a group and WT^b group, $n=10$. db/db mice and KK-Ay mice, $n=102$. Compared with WT^a group, ** $P<0.01$. Compared with WT^b group, ## $P<0.01$.

Figure 1 Levels of UCFP, MAU, ACR and GLU before grouping($\bar{x}\pm s$)

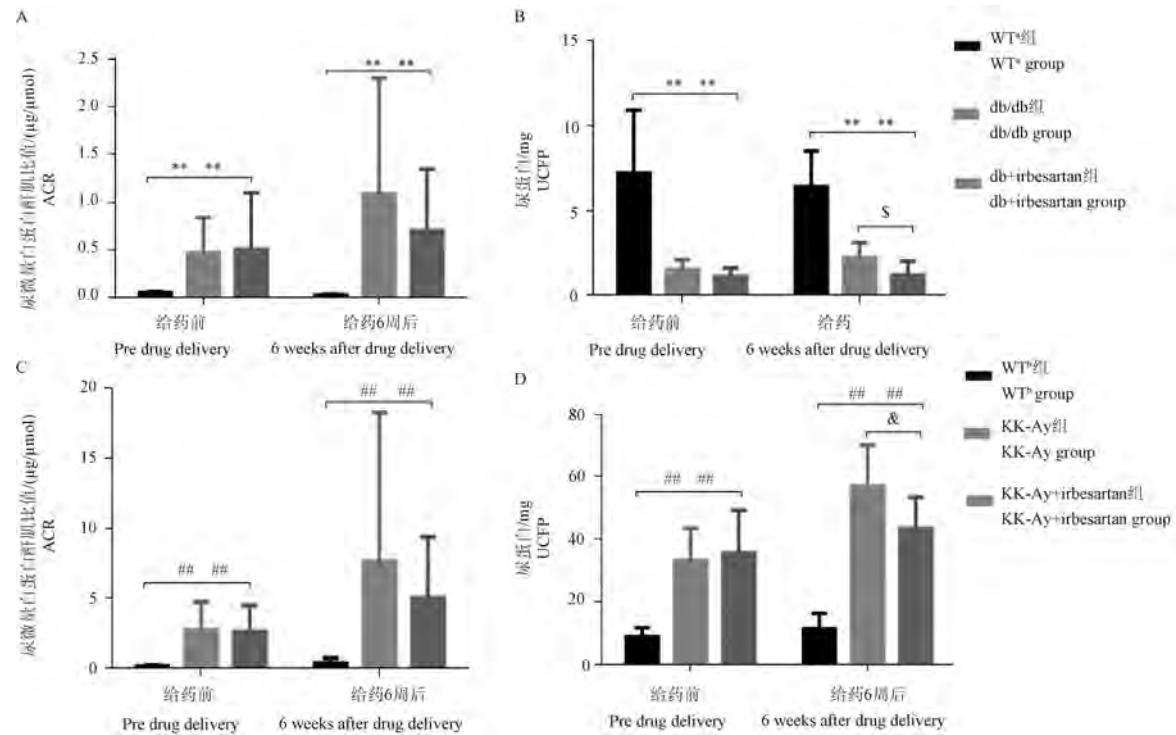
2.3 给药后 UCFP、ACR 结果

给药前后各组 ACR、UCFP 结果见图 2。WT^a 组或 WT^b 组给药前后 ACR 和 UCFP 结果基本一致。实验平行性好,结果可靠。db/db 组和 KK-Ay 组 ACR 均随鼠龄增加而增大(给药前后结果

对比)。irbesartan 能够抑制 ACR 增长,但由于个体差异大,降低未达到统计学意义($P>0.05$)。KK-Ay 组 UCFP 6 周后明显升高, KK-Ay + irbesartan 组 UCFP 显著降低($P<0.05$)。db/db 组给药前后 UCFP 基本一致,虽然给予 irbesartan

表 1 灌胃后 db/db 鼠和 KK-Ay 鼠的死亡统计
Table 1 Mice deaths of db/db and KK-Ay after ig

时间/周 Time/weeks	db/db 小鼠 db/db mouse			KK-Ay 小鼠 KK-Ay mouse		
	db/db 组 db/db group	db/db+irbesartan 组 db/db+irbesartan group	db/db+受试物 A 组 db/db+test article A group	KK-Ay 组 KK-Ay group	KK-Ay+irbesartan 组 KK-Ay+irbesartan group	KK-Ay+受试物 A 组 KK-Ay+ test article A group
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	1	0	0	0
3	2	3	4	0	0	0
4	0	1	3	0	1	0
5	1	0	3	0	0	0
6	0	0	3	0	1	0
7	-	-	-	0	0	1
8	-	-	-	0	0	2
总计 Total		21			5	



注: WT^a 组和 WT^b 组, $n=10$; 其余各组, 给药前 $n=13$, 给药后 $n=7\sim13$ 。与 WT^a 组对比, ** $P<0.01$; 与 db/db 组相比, $^{\$}P<0.05$; 与 WT^b 组对比, $^{##}P<0.01$; 与 KK-Ay 组相比, $^{\&}P<0.05$ 。

图 2 给药前后 ACR 和 UCFP 的变化($\bar{x}\pm s$)

Note. WT^a group and WT^b group, $n=10$. Remaining groups, $n=13$ before administration, $n=(7\sim13)$ after administration. Compared with WT^a group, ** $P<0.01$. Compared with db/db group, $^{\$}P<0.05$. Compared with WT^b group, $^{##}P<0.01$. Compared with KK-Ay group, $^{\&}P<0.05$.

Figure 2 Changes of ACR and UCFP before and after administration ($\bar{x}\pm s$)

治疗后显著降低($P<0.05$),但由于 UCFP 没有随鼠龄增加而升高,且值较小,是否与给药相关有待进一步研究。

2.4 脏器系数结果

脏器系数结果见表 2。相比 WT^a 组和 WT^b 组,db/db 组和 KK-Ay 组肾系数无明显变化,肝指数显著升高($P<0.01$),脑指数显著降低($P<0.01$),irbesartan 治疗后脏器系数均无显著变化($P>0.05$)。

2.5 血清生化结果

血清 TP、Alb、BUN、CRE、GLU、TG、CHO 结果见表 3。与 WT^a 组、WT^b 相比,db/db 组和 KK-Ay

组 TP、BUN 无显著变化($P>0.05$),GLU、TG 显著升高($P<0.01$)。仅 KK-Ay 鼠 irbesartan 治疗后 BUN、GLU、TG 显著降低($P<0.01$)。而 db/db 鼠 irbesartan 治疗后无显著变化($P>0.05$)。

2.6 病理结果

组织病理学结果表明,与 WT^a 组相比,db/db 组肾可见肾小球系膜基质增厚伴系膜细胞增生,肾小管肥大。与 WT^b 组相比,KK-Ay 组肾可见肾小球系膜基质增厚伴系膜细胞增生,肾小管管型,肾间质炎细胞浸润。其中肾小球系膜基质增厚伴系膜细胞增生这一病理特征两种模式鼠共有,为 DN 成模典型病理特征。其他病理特征 db/

表 2 脏器系数结果($\bar{x}\pm s$,mg/g)
Table 2 Results of organ coefficients ($\bar{x}\pm s$,mg/g)

组别 Groups	动物数/ <i>n</i> Quantity of animals	脏器系数 Organ coefficients			
		肾 Kidney	心脏 Heart	肝 Liver	脑 Head
WT ^a 组 WT ^a group	10	13.6±1.7	5.6±0.9	46.6±5.9	14.8±1.1
db/db 组 db/db group	10	12.1±2.1	3.4±0.7**	62.1±11.8**	6.3±0.9**
db/db+irbesartan 组 db/db+irbesartan group	9	15.4±7.8	3.4±0.8	62.5±6.6	6.6±3.5
WT ^b 组 WT ^b group	10	12.8±0.7	5.2±0.7	43.3±13.1	15.6±0.8
KK-Ay 组 KK-Ay group	13	13.2±1.0	4.8±0.7	64.7±8.0##	9.9±0.9##
KK-Ay+irbesartan 组 KK-Ay+irbesartan group	10	12.4±0.9	4.6±0.7	65.3±8.5	9.6±1.3

注:与 WT^a 组相比, ** $P<0.01$;与 WT^b 组相比, ## $P<0.01$ 。
Note. Compared with WT^a group, ** $P<0.01$. Compared with WT^b group, ## $P<0.01$.

表 3 血清生化结果($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Serum biochemistry results($\bar{x}\pm s$)

生化指标 Biochemical indicators	WT ^a 组 WT ^a group	db/db 组 db/db group	db/db+irbesartan 组 db/db+irbesartan group	WT ^b 组 WT ^b group	KK-Ay 组 KK-Ay group	KK-Ay+irbesartan 组 KK-Ay+irbesartan group
TP/(g/L)	57.4±5.1	61.6±3.0	62.6±9.3	65.5±5.0	64.7±7.8	65.4±6.7
ALB/(g/L)	39.0±1.8	36.8±4.0	38.4±6.9	39.7±2.5	29.2±2.3##	29.7±2.9
BUN/(mm/L)	9.1±1.1	13.3±5.6	15.2±6.6	10.1±0.9	10.6±1.0	6.3±0.9&&
CRE/(μm/L)	—	—	—	42.0±11.4	46.7±13.1	38.0±10.4
GLU/(mm/L)	6.8±1.1	28.6±3.1**	32.4±7.6	10.8±1.2	36.8±4.2##	21.4±10.0&&
TG/(mm/L)	0.9±0.2	2.4±1.6**	3.6±2.2	1.8±0.4	7.3±1.9##	4.3±1.4&&
CHO/(mm/L)	2.2±0.9	4.3±1.0**	4.0±1.9	3.0±0.6	3.4±0.6	3.5±0.6

注:WT^a 组和 WT^b 组, $n=10$;其余各组, $n=7\sim13$ 。与 WT^a 组相比, ** $P<0.01$;与 WT^b 组相比, ## $P<0.01$;与 KK-Ay 组相比, && $P<0.01$ 。
Note. WT^a group and WT^b group, $n=10$. Remaining groups, $n=(7\sim13)$. Compared with WT^a group, ** $P<0.01$. Compared with WT^b group, ## $P<0.01$. Compared with KK-Ay group, && $P<0.05$.

db 鼠和 KK-Ay 鼠表现并不完全一致。对上述病变根据严重程度对每只动物进行评分,轻微、轻度、中度、重度分别计 1 分、2 分、3 分、4 分。各组评分结果见表 4,病理图片见图 3。两种模式鼠 irbesartan 治疗后病变程度均减轻。

3 讨论

近年来,糖尿病的全球患病率持续上升。长期糖尿病会导致血管病变和功能障碍,糖尿病并发症是糖尿病患者发病和死亡的主要原因。在糖尿病的血管并发症中,约 40% 为 DN, DN 是全球 ESRD 的主要原因^[12]。因此,开发抑制 DN 的新疗法显得尤为重要。啮齿动物模型有助于阐明疾病的发病机制和测试新的治疗方法,现已建立多种 1 型和 2 型糖尿病啮齿动物模型用于糖尿病及其并发症的研究^[13]。糖尿病并发症动物模型协会(AMDCC)的肾病小组委员会根据人类 DN 的临床和病理特征,发布了以下 DN 啮齿动物模型的验证标准:(1)肾功能>50%下降;(2)蛋白尿>10 倍增加;(3)病理特征,包括晚期系膜基质扩张,肾小球基底膜增厚,小动脉透明化,和肾小管间质纤维化^[14]。然而,目前尚无完全具有所有这些人类 DN 特征的啮齿动物模型。本研究比较了 2 型糖尿病常用的啮齿动物模型 db/db 和 KK-Ay 作为 DN 研究模型的特点及不同之处,并用 irbesartan 治疗验证,侧重检测临床蛋白尿及血液生化相关指标,为新治疗方法的开发以及发病机制研究提供参考。

临床上,蛋白尿相关指标 MAU 和 UCFP 是 DN 诊断和分期的生物标志物^[15], MAU、UCFP 和 ACR 也是评价慢性肾疾病疗效的重要指标^[16]。本研究中,与 WT 相比,12 周龄的 db/db、KK-Ay 鼠 MAU、ACR 均显著升高,显示 DN 蛋白尿的特征。但是 db/db 鼠 MAU、ACR 个体差异非常大,最大值和最小值差异能达到数百倍以上,而同样周龄的 KK-Ay 鼠差异在 50 倍左右。这项结果在另一实验室得到证实。同时 KK-Ay 小鼠 UCFP 对比 WT 也显著升高,且随疾病进展 UCFP 进一步增加,irbesartan 治疗后 UCFP 降低。db/db 鼠 UCFP 对比 WT 显著降低,随疾病进展没有逐渐增大,因此,是否与疾病相关有待进一步确认。在血液生化指标方面,db/db 和 KK-Ay 鼠 GLU、TG 均显著升高,但是仅 KK-Ay 鼠治疗后 BUN、GLU、TG 降低。

DN 的组织病理学特征包括肾小球肥大、肾小球基底膜增厚和系膜基质扩张,以及以结节状肾小球硬化或 Kimmelstiel-Wilson 结节为特征的系膜硬化^[17]。系膜扩张是 DN 发展过程中的一个重要特征,主要变现为系膜细胞异常增殖,基质蛋白在肾小球中心区积聚^[18]。系膜扩张经常用于 DN 的临床诊断,通过活检对系膜基质扩张进行量化是确定糖尿病肾损害进展的金标准^[19]。除肾小球病变外,肾小管间质病变也是 DN 肾功能下降的重要原因^[20]。本研究中,db/db 和 KK-Ay 鼠均可见肾小球系膜基质扩张这一诊断金标准病理特征。此外, KK-Ay 鼠还可见肾小管管

表 4 病理评分结果($\bar{x}\pm s$)
Table 4 Results of pathology scores($\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	动物数/ <i>n</i> Quantity of animals	病理评分 Pathology scores
WT ^a 组 WT ^a group	10	0.00±0.00
db/db 组 db/db group	10	3.90±0.88
db/db+irbesartan 组 db/db+irbesartan group	9	3.44±0.73
WT ^b 组 WT ^b group	10	0.00±0.00
KK-Ay 组 KK-Ay group	13	3.77±1.17
KK-Ay+irbesartan 组 KK-Ay+irbesartan group	10	2.70±0.48

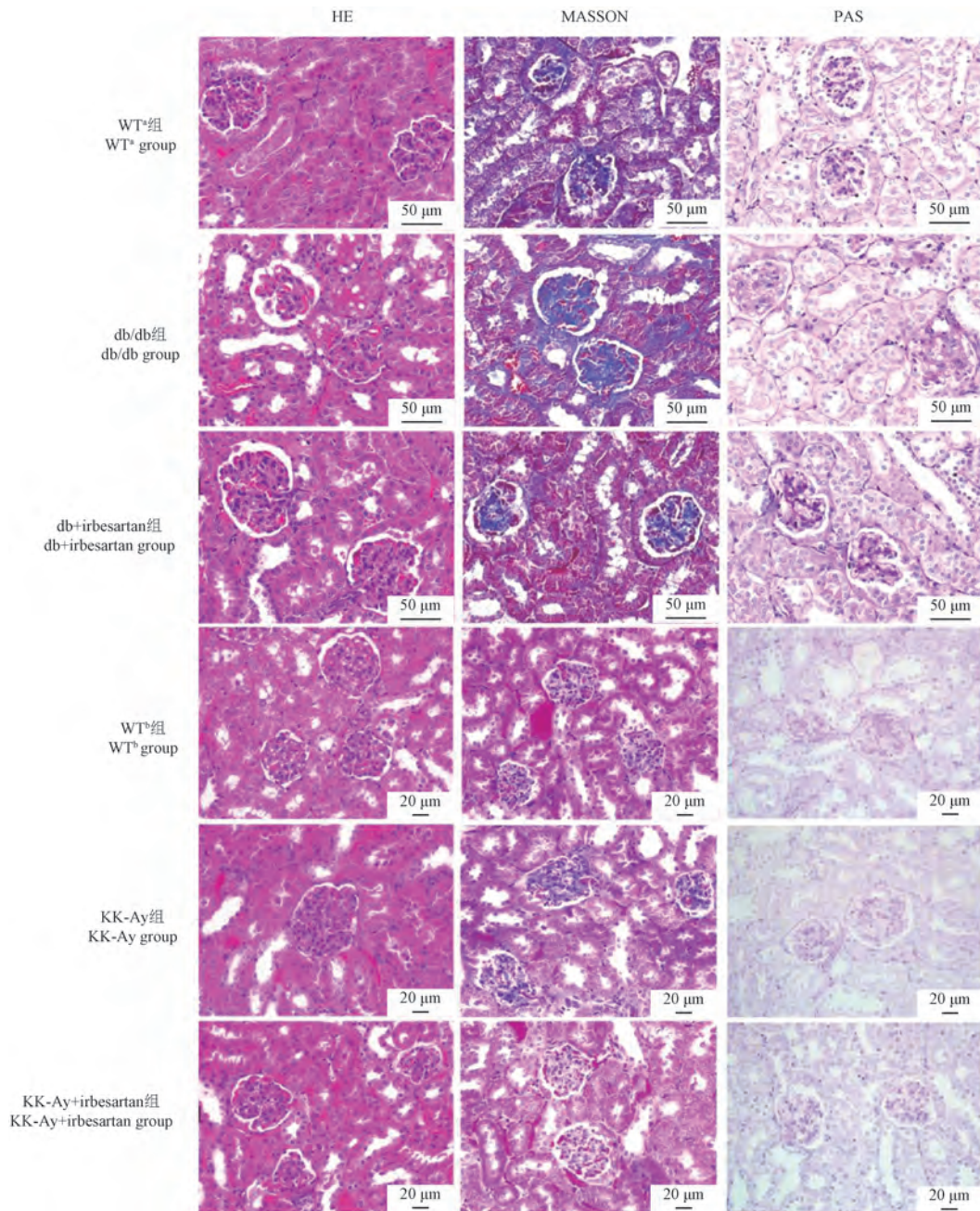


图3 肾组织 HE、MASSON、PAS 染色结果

Figure 3 Kidney histological changes were observed by HE, MASSON and PAS staining

型、肾间质炎细胞浸润,db/db 鼠可见肾小管肥大,db/db 鼠和 KK-Ay 鼠肾病理特征并不完全一致。

在 DN 药效研究中,特别是中药药效研究,给药周期较长,随着疾病进展,动物死亡成为不可避免的问题。在前期实验中,我们发现 14~15 周龄的 db/db 小鼠,在代谢笼收集 24 h 尿液后动物状态较差,死亡严重。小鼠代谢笼结构特殊,为了避免鼠粮污染尿液,食盒较远,需要动物通过

一个通道主动觅食。db/db 鼠由于过度肥胖(14 周龄后体质量 60 g 左右),活动减少甚至几乎不运动,对于糖尿病患者饥饿导致的血糖骤然降低容易发生酮症酸中毒,推测 db/db 小鼠采集 24 h 尿液后死亡严重与此相关,因此正式实验改为 12 周龄的 db/db 小鼠,并缩短采尿时间为 6 h。KK-Ay 鼠(体质量 45 g 左右)相比 WT 相对活动正常,收集 24 h 尿液后对小鼠状态影响不大,死亡也较少。因此,在 DN 药效研究中尤其需要采尿

的情况下, KK-Ay 小鼠优于 db/db 小鼠。db/db 小鼠活动减少, KK-Ay 小鼠活动正常, 与心脏系数结果相对应。脏器系数结果表明, 与 WT 相比, db/db 小鼠心脏系数显著降低, 而 KK-Ay 小鼠心脏系数则无明显变化。

综上, 12 周龄的 db/db 和 KK-Ay 小鼠均具有蛋白尿和 DN 肾损伤典型病理特征, 可用作 2 型 DN 研究模型动物, MAU、ACR 可以作为检测指标。除此之外, KK-Ay 鼠还可以 UCFP 作为检测指标。相比 db/db, KK-Ay 鼠 ACR 和 MAU 个体差异小, 可以采集 24 h 尿液, 采尿后动物死亡少, irbesartan 治疗后 BUN、TG、GLU 均有改善。本研究从临床蛋白尿、血液生化、病理以及脏器系数方面比较了 db/db 和 KK-Ay 鼠作为 DN 模型动物的特点和差异性, 为 DN 治疗药物临床前药理学研究模型选择、检测指标设置提供参考。

参考文献:

- [1] GHOSH S, GHOSH A, RAJANAN A, et al. Natural coumarins: Preclinical evidence-based potential candidates to alleviate diabetic nephropathy [J]. *Phytomed Plus*, 2022, 2(4): 100379.
- [2] ZHU X, XU X, DU C, et al. An examination of the protective effects and molecular mechanisms of curcumin, a polyphenol curcuminoid in diabetic nephropathy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 113438.
- [3] 徐卓, 项想, 尚尔鑫, 等. 丹参茎叶总酚酸对 2 型糖尿病肾病小鼠肠道菌群和短链脂肪酸的调节作用 [J]. *药学报*, 2021, 56(4): 1035-1048.
- XU Z, XIANG X, SHANG E X, et al. Regulatory effect of total phenolic acid from the stems and leaves of *Salvia miltiorrhiza* Bge. on intestinal microflora and short-chain fatty acids in type 2 diabetic nephropathy mice [J]. *Acta Pharm Sin*, 2021, 56(4): 1035-1048.
- [4] 农聪. 糖尿病肾病治疗进展 [J]. *糖尿病新世界*, 2021, 24(2): 196-198.
- NONG C. Progress in treatment of diabetic nephropathy [J]. *Diabetes New World*, 2021, 24(2): 196-198.
- [5] LIMONTE C P, KRETZLER M, PENNATHUR S, et al. Present and future directions in diabetic kidney disease [J]. *J Diabetes Complications*, 2022, 36(12): 108357.
- [6] SEMBACH F E, ØSTERGAARD M V, VRANG N, et al. Rodent models of diabetic kidney disease: human translatability and preclinical validity [J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26(1): 200-217.
- [7] NAGASAKA S, SHIMIZU A. Experimental animal models of diabetic kidney disease [M]//*Diabetic Kidney Disease*. Singapore: Springer Singapore, 2020: 173-190.
- [8] 郑敬民, 刘志红, 张鑫, 等. db/db 小鼠糖尿病肾病相关基因的分析 and 克隆 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2003, 30(3): 406-411.
- ZHENG J M, LIU Z H, ZHANG X, et al. Analyzing and cloning of diabetic nephropathy relative gene from db/db mice [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2003, 30(3): 406-411.
- [9] TESCH G H, LIM A H. Recent insights into diabetic renal injury from the db/db mouse model of type 2 diabetic nephropathy [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 300(2): F301-F310.
- [10] CHOWDHURY N N, SUROWIEC R K, KOHLER R K, et al. Metabolic and skeletal characterization of the KK/ay mouse model-a polygenic mutation model of obese type 2 diabetes [J]. *Calcif Tissue Int*, 2024, 114(6): 638-649.
- [11] 王蕾, 吴旭颖, 高玉龙, 等. KK 鼠料快速建模对 KK/Upj-Ay/J 小鼠相关指标的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(9): 42-48.
- WANG L, WU X Y, GAO Y L, et al. Effect of rapid diabetes modeling with KK feed on related indexes in KK/Upj-Ay/J mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(9): 42-48.
- [12] AZUSHIMA K, GURLEY S B, COFFMAN T M. Modelling diabetic nephropathy in mice [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(1): 48-56.
- [13] BETZ B, CONWAY B R. An update on the use of animal models in diabetic nephropathy research [J]. *Curr Diab Rep*, 2016, 16(2): 18.
- [14] TALUKDAR A, BASUMATARY M. Rodent models to study type 1 and type 2 diabetes induced human diabetic nephropathy [J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(9): 7759-7782.
- [15] ROOHI T F, MEHDI S, AARFI S, et al. Biomarkers and signaling pathways of diabetic nephropathy and peripheral neuropathy: possible therapeutic intervention of rutin and quercetin [J]. *Diabetol Int*, 2023, 15(2): 145-169.
- [16] 国家药品监督管理局药审中心. 慢性肾脏病治疗药物临床试验技术指导原则 (公开征求意见稿) [EB/OL]. (2022-11-16) [2024-06-09]. <https://www.cde.org.cn/zdyz/fullsearchpage>.
- CENTER FOR DRUG EVALUATION, NMPA. Technical guidelines for clinical trials of drugs for the treatment of chronic kidney disease (draft for public comment) [EB/OL]. (2022-11-16) [2024-06-09]. <https://www.cde.org.cn/zdyz/fullsearchpage>.
- [17] HU S, HANG X, WEI Y, et al. Crosstalk among podocytes, glomerular endothelial cells and mesangial cells

- in diabetic kidney disease: an updated review [J]. Cell Commun Signal, 2024, 22(1): 136.
- [18] PENG W, ZHOU X, XU T, et al. BMP-7 ameliorates partial epithelial-mesenchymal transition by restoring SnoN protein level via Smad1/5 pathway in diabetic kidney disease [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(3): 254.
- [19] HUANG R, FU P, MA L. Kidney fibrosis: from mechanisms to therapeutic medicines [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 129.
- [20] THOMAS H Y, FORD VERSYPT A N. Pathophysiology of mesangial expansion in diabetic nephropathy: mesangial structure, glomerular biomechanics, and biochemical signaling and regulation [J]. J Biol Eng, 2022, 16(1): 19.
- [收稿日期]2024-08-10

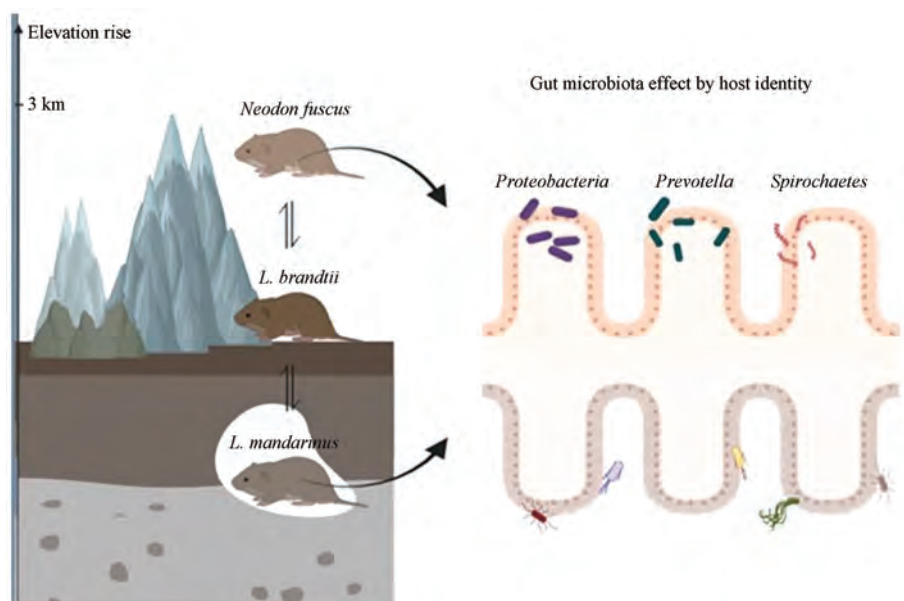
进展快报

宿主对肠道菌群的影响:三种田鼠肠道菌群比较研究

肠道微生物(gut microbiota, GM)与宿主营养代谢、能量传递、免疫调节等有关,也受外部环境,如高海拔、低氧等影响。青海田鼠(*Neodon fuscus*)、棕色田鼠(*Lasiopodomys mandarinus*)和布氏田鼠(*L. brandtii*)属田鼠亚科,其中青海田鼠生活在高寒、低氧、强紫外线的高海拔环境,棕色田鼠生活在低氧、黑暗的地下洞道环境,布氏田鼠分布在低海拔地区。这3种田鼠是适应不同野外生活环境的近缘物种,是研究肠道微生物与宿主关系的良好动物模型。

郑州大学生命科学学院王振龙教授率领的研究团队将野生青海田鼠、棕色田鼠和布氏田鼠相同环境饲养后,采集粪便样本,利用16S rDNA高通量测序获得肠道微生物数据,分析发现相同实验室饲养条件下,田鼠肠道中木质素消化的 *Proteobacteria*、降解纤维素的 *Spirochaetes* 和 *Ruminococcus*、产生短链脂肪酸的 *Prevotella* 和 *Ruminococcus* 等这些与田鼠高纤维食物代谢、能量供给密切相关的微生物仍然保持野生环境下的田鼠肠道菌群特征,而与厌氧代谢或免疫相关的 *Desulfovibrio*、*Clostridium*、*Oscillospira*、*Bacteroidetes* 和 *Lactobacillus* 受环境影响比较大。本研究通过对来自不同环境近缘物种的肠道菌群进行差异比较研究,初步揭示宿主对肠道微生物的影响。

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(2): 98-105. doi: 10.1002/ame2.12404)。



訾化星,党驰,张晶晶. 模式动物斑马鱼在医学实验动物学教学中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(5): 81–86.
Zi HX, Dang C, Zhang JJ. Application of zebrafish in medical experimental zoology teaching [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(5): 81–86.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.05.008

模式动物斑马鱼在医学实验动物学教学中的应用

訾化星^{1,2}, 党 驰¹, 张晶晶^{1,2*}

(1. 广东医科大学医学技术学院, 广东 东莞 523808;

2. 广东医科大学东莞创新研究院, 广东 东莞 523808)

【摘要】 传统啮齿类实验动物在实验教学中存在成本高、周期长等限制。斑马鱼作为一种新兴的模式生物,以其繁殖快、发育迅速、成本低等优势,在生命科学研究中备受青睐。然而,斑马鱼在实验动物学教学中的应用仍有待深入开发。本研究以《医学实验动物学及技术》课程为例,将斑马鱼引入“组织切片技术”和“免疫实验技术”两个实验模块,旨在探索斑马鱼在实验动物学教学中的应用潜力。通过详细介绍实验操作流程、实验设计和教学内容,旨在为本科生提供一个高效、低成本,且具有较高实践性的实验教学平台。实验结果表明,斑马鱼在实验教学中具有显著优势,不仅可以降低实验成本,缩短实验周期,而且能够让学生更直观地掌握实验技术,提高学习兴趣。

【关键词】 斑马鱼;实验动物学;教学改革;组织切片;免疫实验

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 05-0081-06

Application of zebrafish in medical experimental zoology teaching

ZI Huaxing^{1,2}, DANG Chi¹, ZHANG Jingjing^{1,2*}

(1. School of Medical Technology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China.

2. Dongguan Innovation Institute, Guangdong Medical University, Dongguan 523808)

【Abstract】 Traditional laboratory animal breeding is costly and time-consuming, thus limiting experimental zoology teaching practices. Zebrafish have unique biological characteristics and have become widely used as an experimental animal model; however, teaching examples related to zebrafish in experimental zoology courses are still scarce. This review explores the application of zebrafish by incorporating them into the “Tissue Sectioning Techniques” and “Immunological Techniques” modules in the “Medical Laboratory Animal Science and Technology” course. The aim is to utilize the advantages of zebrafish in experimental zoology teaching and to explore their potential applications. This study provides a detailed introduction to the experimental procedures, experimental design, and teaching content involving zebrafish, with the aim of offering undergraduate students a more efficient, cost-effective, and practically meaningful experimental teaching platform.

【Keywords】 zebrafish; experimental zoology; teaching reform; tissue sectioning; immunological techniques

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

【基金项目】 广东省本科高校教学质量与教学改革工程建设项目(粤教高函[2024]9号,粤教高函[2024]30号);广东医科大学本科教学质量与教学改革工程项目(4SG25116P,4SG25124P)。

【作者简介】 訾化星(1991—),男,博士,副研究员,研究方向:疾病动物模型。E-mail: zihuaxing@gdmu.edu.cn

【通信作者】 张晶晶(1984—),男,博士,教授,研究方向:疾病动物模型与脑血管病。E-mail: jingjing.zhang@gdmu.edu.cn

传统的医学实验动物学教学多依赖于大鼠、小鼠和兔等实验动物。虽然这些动物在医学研究中有重要的作用,但其高昂的成本、繁琐的实验准备和较长的生长周期等问题,使得它们在教学实践中存在一定的局限性。与此同时,随着模式动物研究的不断发展,斑马鱼因其独特的优点,逐渐成为一种理想的实验动物模型^[1-2]。作为一种模式脊椎动物,斑马鱼基因组与人的相似度高达 87%,调控其胚胎发育和器官稳态的分子机制大多与高等脊椎动物一致^[3]。此外,相比其他更高等的脊椎动物,斑马鱼具有体型小、繁殖率高、体外发育、胚胎透明、遗传操作方便等特点,这使得斑马鱼在胚胎发育、神经生物学、遗传疾病、药物筛选、毒理评估等方面的研究有独特优势^[3-6]。因此,在医学实验类课程中,斑马鱼相关的实验技术具有较高的教学价值。然而,目前国内斑马鱼相关的实验教程还较少。本研究以《医学实验动物学及技术》课程中的“组织切片技术”和“免疫实验技术”两个教学模块为基础^[7-8],尝试将模式动物斑马鱼引入到实验动物学教学中,并详细探讨其在这些模块中的应用。

1 课程设计与教学目标

1.1 组织切片技术模块

组织切片技术是实验动物学课程中的基础模块,旨在教授学生如何进行动物组织的固定、切片、染色及观察等操作^[9]。传统上,这一技术模块多使用小鼠、大鼠等哺乳动物进行教学。然而,斑马鱼作为一种小型、透明的模式动物,其胚胎和成鱼的组织可以在较短时间内完成取样,且胚胎透明,便于学生观察和操作^[10-11]。

(1) 斑马鱼胚胎组织取样

斑马鱼的胚胎透明且发育周期短,24 h 内胚胎的心脏、眼睛、脑部等器官即已初步成型^[1]。这一特点使得斑马鱼在组织切片实验中具有明显的优势。学生可以在短时间内采集到新鲜的胚胎组织,快速进行固定和处理。

(2) 固定与处理

学生将在指导教师的帮助下,学习如何将斑马鱼胚胎进行固定。常用的固定剂包括福尔马林(paraformaldehyde, PFA)。通过浸泡固定剂、乙醇梯度脱水处理和二甲苯透明处理,使得组织

在光线下完全呈半透明状,在切片前能够保持原有的组织结构和形态。

(3) 石蜡切片与冰冻切片

斑马鱼组织切片有两种常见方式:石蜡切片和冰冻切片。石蜡切片适用于常规组织学染色,如 HE 染色,而冰冻切片则适用于对细胞结构完整性要求较高的组织样品进行分子标记物染色。通过这两种方法,学生能够获得不同切片的观察效果和应用场景,帮助他们理解不同切片方法的优劣势。

(4) 染色与显微观察

通过常规 HE 染色、PAS 染色等方法,学生可以直观观察斑马鱼组织中的细胞形态、结构及其分布情况。实验过程中,学生将学习如何操作显微镜,分析切片中的组织结构,进一步加深对组织学知识的理解。

(5) 教学案例

在实践教学过程中,利用肝特异性转基因斑马鱼品系 Tg(*lfabp:eGFP*)的胚胎和成鱼分别进行了整胚免疫荧光化学实验、组织切片免疫荧光化学实验^[12]。借助于斑马鱼胚胎透明,且 Tg(*lfabp:eGFP*)转基因斑马鱼可直接示踪其肝细胞的优势(图 1A),学生可直接挑选并利用其胚胎进行了免疫荧光组织化学染色实验,通过检测磷酸化组蛋白 H3 的表达定位来反映肝细胞的增殖情况(图 1B~1C);在成年斑马鱼肝的组织切片实验中,由于成鱼个体较小,学生无须解剖出肝组织,可直接对成体进行冰冻切片,切片后在荧光体视镜下得到 eGFP 标记的肝切片并进行了后续免疫荧光组织化学实验即可(图 1D)。操作过程便捷直观,挑选分离的胚胎或定位的组织精准,且整胚染色可同时进行多达 25 个个体的实验,满足了大样本量的需求。与小鼠相比,操作流程简化、样本通量高、易于筛选目的组织、且能节省试剂特别是昂贵抗体等来满足本科生公共实验课的教学需求。

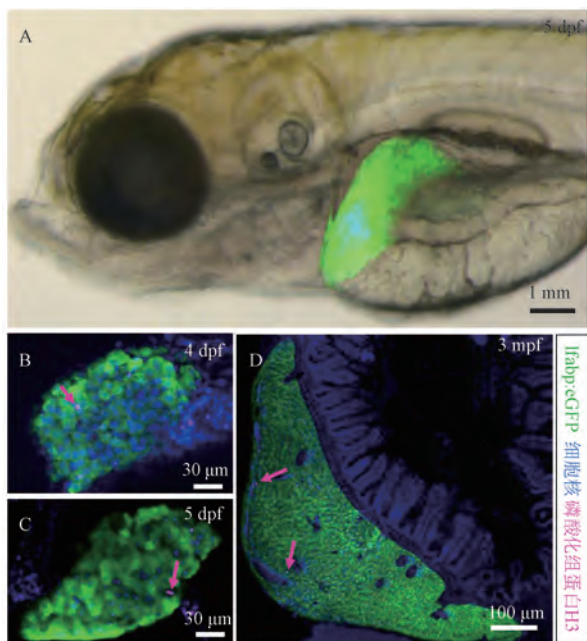
1.2 免疫实验技术模块

免疫实验技术是现代生物医学实验中非常重要的一部分,涵盖了免疫组化(IHC)、免疫荧光染色(IF)等技术^[13-14]。这些技术广泛应用于分子生物学、病理学以及疾病诊断等领域。模式动物斑马鱼在免疫实验中有着较为明显的优势,特

别是在胚胎免疫反应的研究中,透明的胚胎使得学生能够更加直观地观察免疫反应过程(图 1)。

(1) 抗原修复与免疫染色

学生将在实验中学习多种抗原修复方法并进行免疫染色。首先,学生需要对切片进行抗原修复,如蛋白酶消化修复、微波加热修复等,用于去除蛋白交联,充分暴露组织抗原,后利用特异性抗体对组织进行标记,通过免疫组化或免疫荧



注:A:5 d(5 dpf)大小的肝特异性转基因斑马鱼品系 $Tg(lfabp:eGFP)$; B~C: 利用 4 d 和 5 d 大小的 $Tg(lfabp:eGFP)$ 斑马鱼胚胎进行的整胚免疫荧光组织化学实验来检测磷酸化组蛋白 H3 的表达定位情况(粉色箭头); D: 利用 3 个月的 $Tg(lfabp:eGFP)$ 斑马鱼成鱼进行的组织切片来观察其肝细胞磷酸化组蛋白 H3 的表达定位情况(粉色箭头)。

图 1 利用组织切片和免疫组化技术检测斑马鱼肝细胞增殖水平

Note. A, Liver-specific transgenic zebrafish line $Tg(lfabp:eGFP)$ at 5 days post-fertilization (5 dpf). B~C, Whole-mount immunofluorescence histochemistry experiments conducted on $Tg(lfabp:eGFP)$ zebrafish embryos at 4 and 5 dpf to examine the expression and localization of phosphorylated histone H3 (pink arrows). D, Tissue sections from 3-month-old $Tg(lfabp:eGFP)$ adult zebrafish used to observe the localization of phosphorylated histone H3 in liver cells (pink arrows).

Figure 1 Detection of liver cell proliferation levels of zebrafish via tissue sectioning and immunohistochemistry techniques

光技术对斑马鱼的组织进行染色。这一过程中,学生不仅能够理解抗体与抗原特异性结合的原理,还能了解到多种免疫标记的设计思路。

(2) 免疫组化与免疫荧光技术

免疫组化技术可以将目标抗原与特定的抗体结合,并通过显色反应可视化特定蛋白的分布情况。而免疫荧光技术则通过荧光标记的抗体对目标分子进行检测,使得学生能够清晰地观察到细胞或组织中的分子分布。

(3) 成像分析与数据解读

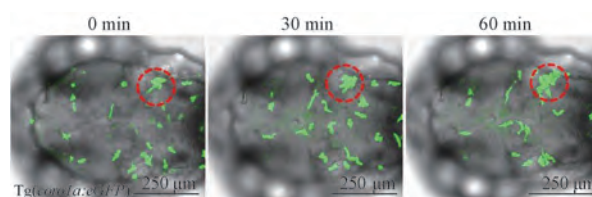
免疫实验技术的核心在于如何通过成像技术分析实验结果。在实验中,学生将使用荧光显微镜或共聚焦显微镜进行成像,学习如何处理、分析实验数据,并根据成像结果推断免疫反应的机制。

(4) 教学案例

在教学过程中利用特异性标记脑部巨噬细胞(小胶质细胞)和中性粒细胞的转基因斑马鱼品系 $Tg(corola:eGFP)$ [15],在荧光体视显微镜下实时观察和跟踪记录了胚胎脑部发生炎症反应后小胶质细胞的动态迁移和往损伤部位聚集情况。该模型和观察方法使得学生能够实时观察免疫反应的发生和免疫细胞的动态迁移(图 2)。相比较,在利用小鼠模型进行的课程教学中无法达到上述理想的教学效果。

1.3 教学方法与创新设计

为了让学生更加深入地理解斑马鱼模式动物在医学实验中的应用,我们对传统的实验教学



注:分别于脑部损伤后 0 min、30 min 和 60 min 实时捕捉脑部损伤部位小胶质细胞聚集情况。

图 2 实时示踪观察斑马鱼脑部损伤后小胶质细胞迁移情况

Note. Real-time capture of microglial aggregation at the brain injury site at 0 minutes, 30 minutes, and 60 minutes after brain injury.

Figure 2 Real-time tracking of microglial migration after brain injury in zebrafish

方法进行了改进,并加入了以下创新:

(1) 学生主导实验操作

传统的实验教学模式多为教师演示,学生仅在教师指导下完成实验步骤。为了提升学生的实验能力,我们采用了“学生主导、教师督促”的教学模式。在该模式下,学生需要全程参与实验的各个环节,从斑马鱼的胚胎孵化、组织切片的准备,到免疫实验的操作和数据分析,学生都能够亲自操作,增加了其动手能力和实验思维。

(2) 多学科整合与实践导向

实验课程不仅仅局限于技术操作,还注重理论知识的学习和思维的培养。每个实验模块都结合免疫学、分子生物学和病理学的相关知识,帮助学生系统地掌握实验技能,理解实验背后的原理。

(3) 小班教学与个性化指导

为了保证每个学生都能获得充分的实验操作机会,我们采取了小班授课的方式,每个班级人数控制在 20 人以內。在实验过程中,教师根据学生的具体情况提供个性化指导,帮助学生及时解决实验中的问题,确保实验效果。

2 实验教学流程

2.1 组织切片技术模块的教学流程

(1) 实验前准备

学生在教师的指导下,学习斑马鱼的基本生物学特性,掌握斑马鱼胚胎的培养技巧,并了解组织切片技术的基本步骤和注意事项。

(2) 胚胎取样与固定

学生使用显微镜仔细观察斑马鱼胚胎的发育进程,并在最佳阶段进行取样。随后,将胚胎放入固定液中进行组织固定,为后续的切片和染色做好准备。

(3) 切片与染色

学生对固定后的组织进行脱水、浸蜡、切片等处理,并进行常规染色(如 HE 染色)。最后,在显微镜下仔细观察组织切片,详细记录实验结果。

(4) 结果分析与讨论

通过观察不同组织的形态变化,学生深入分析不同阶段的胚胎及成鱼组织结构,了解各组织的特点及功能,并进行深入的讨论和交流。

2.2 免疫实验技术模块的教学流程

(1) 免疫染色准备

学生学习如何为斑马鱼制备免疫原,选择合适的抗体,并进行标记。这一步骤是免疫实验的关键环节之一。

(2) 免疫染色操作

学生按照步骤进行免疫组化或免疫荧光染色,学习如何处理组织样本,抗体孵育等关键操作。

(3) 显微观察与数据分析

使用荧光显微镜或共聚焦显微镜观察免疫反应的结果。学生需要仔细分析标记物的分布情况,解读实验结果,并撰写实验报告。

(4) 结果讨论与总结

学生在实验结束后,深入分析实验结果,讨论模式动物斑马鱼在免疫实验中的独特优势及其广阔的应用前景。同时,将其与传统动物模型进行对比分析,进一步加深对免疫学原理的理解。

3 课程实施的效果与评估

在课程实施过程中,斑马鱼作为新型模式动物的引入,有效地克服了传统实验动物在医学实验教学中所面临的各种问题。以下是斑马鱼在教学应用中的具体效果与评估:

3.1 提高学生的实验动手能力

通过模式动物斑马鱼的使用,学生不仅能够获得更丰富的实验操作经验,还能更好地理解动物模型在生物医学实验中的应用。斑马鱼胚胎透明以及早期发育较快等优势,使学生能够更加直观地观察和操作实验,从而有助于学生理论学习和实际操作的良好结合。学生在“组织切片技术”和“免疫实验技术”的实践中,掌握了组织取样、固定、切片、染色和免疫检测的全过程,进一步提升了他们的实验动手能力。为验证斑马鱼教学对学生实验动手能力的促进作用,笔者分别对斑马鱼教学班级和小鼠教学班级的学生进行了问卷调查法,让学生选择投选《医学实验动物与技术》课程中对自己实验操作能力提高最有帮助的两个项目。斑马鱼教学班级学生选择“组织切片技术”和“免疫实验技术”的比例分别为 26% 和 30%,高于小鼠教学班级(对应比例分别为 18% 和 20%),因此用于斑马鱼教学可提高学生的

实验动手能力。

3.2 提高了学生对学科知识的掌握

模式动物斑马鱼不仅能应用于组织学、免疫学等传统学科,还能够作为分子生物学、基因组学等新兴学科的教学工具。因此,利用斑马鱼模型进行实验教学,学生能够在学习实验技术的同时,加深对相关学科理论知识的理解。例如,在免疫实验模块中,学生通过操作斑马鱼胚胎,学习免疫组化、免疫荧光等技术,能够深入理解免疫反应机制和相关疾病的诊断方法,从而实现学科知识的交叉融合。为检测学科知识学习效果,笔者分别随机选择并统计了斑马鱼教学班级和小鼠教学班级各 50 位学生的期末考试成绩,发现在“组织切片技术”和“免疫实验技术”相关的知识考点中(相关题目总分为 14 分),斑马鱼班级学生得分(平均分 8.34 分)高于小鼠班级学生(平均分 8.12 分)。因此,用斑马鱼作为教学材料可有助于学生对于学科知识的掌握。

3.3 降低实验成本与时间消耗

传统的实验动物如小鼠、大鼠等,尤其是用于医学实验教学时,通常需要较高的成本和较长的实验周期。相比之下,斑马鱼具有较短的发育周期和较低的饲养成本,能够大大降低实验的经济负担。此外,斑马鱼的高产卵率和胚胎的透明性使得实验的时间消耗得到了有效缩短。学生能够在较短的时间内完成多个实验操作,提高了实验的效率和教学质量。

4 总结与展望

本文介绍了在《医学实验动物学及技术》课程中,通过引入斑马鱼作为实验动物来实践“组织切片技术”和“免疫实验技术”两个教学模块,并评估了教学效果。结果表明,这一教学方法有助于提高学生对实验操作和理论知识的掌握,提供了进一步在实验课程中发挥斑马鱼这一模式动物优势的参考案例。

随着医学教育的不断发展,模式动物斑马鱼在实验教学中的应用前景广阔。未来可以根据课程需求进一步拓展斑马鱼模型的应用范围,将其引入到其他医学相关课程中。首先,作为毒理学的模型,斑马鱼可用于评估药物或环境有害物质对人类健康的影响。例如,利用胚胎发育过程

中畸形率的变化评估目标样本的胚胎毒性,或者通过观察神经、血管等组织的发育,评估目标样本对相关器官的影响。其次,作为遗传学研究的工具,斑马鱼可用于研究基因突变在神经、心血管等系统性疾病中的致病机制。此外,斑马鱼具有体外发育和胚胎透明的特点,可作为理想的发育生物学模型,动态观察特定组织和器官的发育过程。这些功能使得斑马鱼成为实验教学中不可或缺的资源,为学生提供更加全面的实验教学体验^[16-19]。此外,近年来以 CRISPR/Cas9 技术为代表的斑马鱼基因编辑技术取得了重要进展^[20-21],这使得斑马鱼在疾病模型的建立和药物筛选等方面的潜力得到进一步释放。斑马鱼全器官单细胞转录组数据库的建立^[22-23],为从多角度研究斑马鱼模型中的生物学过程奠定了坚实的基础,同时也为医学研究和临床应用提供了更多的可能性。

参考文献:

- [1] WESTERFIELD M. A guide for the laboratory use of zebrafish danio rerio [M]. Eugene: University of Oregon Press, 2007.
- [2] ANGOM R S, NAKKA N M. Zebrafish as a model for cardiovascular and metabolic disease: the future of precision medicine [J]. Biomedicines, 2024, 12(3):693.
- [3] ENGESZER R E, PATTERSON L B, RAO A A, et al. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field [J]. Zebrafish, 2007, 4(1): 21-40.
- [4] MACRAE C A, PETERSON R T. Zebrafish as tools for drug discovery [J]. Nat Rev Drug Discov, 2015, 14(10): 721-731.
- [5] TORRACA V, MOSTOWY S. Zebrafish infection: from pathogenesis to cell biology [J]. Trends Cell Biol, 2018, 28(2): 143-156.
- [6] ADAMSON K I, SHERIDAN E, GRIERSON A J. Use of zebrafish models to investigate rare human disease [J]. J Med Genet, 2018, 55(10): 641-649.
- [7] MACDONALD R. Molecular methods in developmental biology: Xenopus and Zebrafish [M]. New York: Springer Press, 1999.
- [8] YODER J A, NIELSEN M E, AMEMIYA C T, et al. Zebrafish as an immunological model system [J]. Microbes Infect, 2002, 4(14): 1469-1478.
- [9] 刘世新. 实用生物组织学技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- LIU S X. Practical biohistological techniques [M]. Beijing:

- Science Press, 2004.
- [10] 何嘉玲, 暴国, 王天奇, 等. 斑马鱼幼鱼整鱼石蜡切片制作 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 35-41.
HE J L, BAO G, WANG T Q, et al. Preparation of paraffin-embedded sections of zebrafish larva [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 35-41.
- [11] HER G M, CHIANG C C, CHEN W Y, et al. *In vivo* studies of liver-type fatty acid binding protein (L-FABP) gene expression in liver of transgenic zebrafish (*Danio rerio*) [J]. FEBS Lett, 2003, 538(1/2/3): 125-133.
- [12] 刘承英, 赵燕, 刘娟. 斑马鱼石蜡组织切片技术的优化 [J]. 安徽农学通报, 2019, 25(9): 67-68.
LIU C Y, ZHAO Y, LIU J. Optimization of paraffin tissue section technology for zebrafish [J]. Anhui Agric Sci Bull, 2019, 25(9): 67-68.
- [13] 张文学. 免疫学实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
ZHANG W X. Experimental techniques in immunology [M]. Beijing: Science Press, 2007.
- [14] 赵燕燕. 免疫组化技术在小鼠组织中的应用 [J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(6): 34.
ZHAO Y Y. Application of immunohistochemical technique in mouse tissues [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharmacy, 2010, 19(6): 34.
- [15] LI L, YAN B, SHI Y Q, et al. Live imaging reveals differing roles of macrophages and neutrophils during zebrafish tail fin regeneration [J]. J Biol Chem, 2012, 287(30): 25353-25360.
- [16] 戴明珠, 黄燕烽, 彭逸, 等. 斑马鱼发育毒性与致畸性相关实验研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 137-142.
DAI M Z, HUANG Y F, PENG Y, et al. Advances in zebrafish experimental research on developmental toxicity and teratogenicity [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 137-142.
- [17] 董忠典, 张宁, 刘志刚. 斑马鱼在水产动物育种学课程教学实践应用初探 [J]. 教育现代化, 2018, 5(30): 216-217.
DONG Z D, ZHANG N, LIU Z G. An exploratory study on the practical application of zebrafish in the teaching of aquaculture animal breeding [J]. Educ Modernization, 2018, 5(30): 216-217.
- [18] 李文华, 王福财. 浅谈模式生物斑马鱼在细胞生物学实验教学中的应用 [J]. 当代教育实践与教学研究, 2020, 8(13): 199-200.
LI W H, WANG F C. A brief discussion on the application of model organism zebrafish in cell biology experimental teaching [J]. Contemp Educ Res Teach Pract, 2020, 13: 199-200.
- [19] 马宁, 陈小辉, 张译月, 等. 斑马鱼科学研究平台在医学发育生物学实验教学中的应用 [J]. 基础医学教育, 2016, 18(5): 367-369.
MA N, CHEN X H, ZHANG Y Y, et al. Application of zebrafish scientific research platform in experimental teaching of medical developmental biology [J]. Basic Med Educ, 2016, 18(5): 367-369.
- [20] LI M, ZHAO L, PAGE-MCCAW P S, et al. Zebrafish genome engineering using the CRISPR-Cas9 system [J]. Trends Genet, 2016, 32(12): 815-827.
- [21] MEDISHETTI R, BALAMURUGAN K, YADAVALLI K, et al. CRISPR-Cas9-induced gene knockout in zebrafish [J]. STAR Protoc, 2022, 3(4): 101779.
- [22] FARRELL J A, WANG Y, RIESENFELD S J, et al. Single-cell reconstruction of developmental trajectories during zebrafish embryogenesis [J]. Science, 2018, 360(6392): eaar3131.
- [23] SUR A, WANG Y, CAPAR P, et al. Single-cell analysis of shared signatures and transcriptional diversity during zebrafish development [J]. Dev Cell, 2023, 58(24): 3028-3047.

[收稿日期] 2024-12-23

刘婕,章美玲,陈抒鹏,等. 肠道菌群及其代谢物在白血病及其并发症中作用的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(5): 87-94.

Liu J, Zhang ML, Chen SP, et al. Research progress on the role of the gut microbiota and its metabolites in leukemia and related complication [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(5): 87-94.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.05.009

肠道菌群及其代谢物在白血病及其并发症中作用的研究进展

刘 婕¹, 章美玲¹, 陈抒鹏¹, 伍振辉², 曾英坚^{2*}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004;
2. 江西中医药大学附属医院 血液病科, 南昌 330006)

【摘要】 白血病是一种源于造血系统的恶性肿瘤,其发病率逐年增加。尽管化疗和造血干细胞移植等传统治疗方法在一定程度上改善了患者的生存率,但仍存在副作用严重、药物耐受及高复发率等问题。近年来,研究发现肠道菌群及其代谢物在白血病的发生、发展及并发症中发挥着重要作用。肠道菌群失衡可导致免疫功能下降和炎症反应加剧,是推动疾病进展的关键因素之一。短链脂肪酸等代谢物通过增强免疫功能和改善肠道屏障修复白血病患者的预后,而硫化氢和胆汁酸等代谢物则在调节肿瘤细胞凋亡和免疫平衡中表现出潜在的抗肿瘤作用。此外,中医药通过调节肠道菌群结构和代谢物显示出缓解白血病化疗副作用的巨大潜力。本文综述了肠道菌群及其代谢物在白血病发生发展及并发症中的作用,并探讨了调节菌群的治疗策略,包括粪便菌群移植、益生菌及中医药干预,进一步为白血病治疗和预后改善提供参考。

【关键词】 肠道菌群; 菌群代谢物; 白血病; 免疫; 炎症

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 05-0087-08

Research progress on the role of the gut microbiota and its metabolites in leukemia and related complication

LIU Jie¹, ZHANG Meiling¹, CHEN Shupeng¹, WU Zhenhui², ZENG Yingjian^{2*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China. 2. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006)

【Abstract】 The incidence of leukemia, a malignant cancer originating from the hematopoietic system, is increasing annually. Although traditional treatment method such as chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation have improved patient survival rates to some extent, serious side effects, drug tolerance, and high recurrence rates remain. In recent years, studies have shown that the gut microbiota and its metabolites play an important role in the occurrence, development, and complications of leukemia. Imbalance of the gut microbiota can lead to decreased immune function and an intensified inflammatory response, which is a key factor driving disease

【基金项目】 国家自然科学基金(82260914)。

【作者简介】 刘婕(1998—),女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治血液疾病基础研究。E-mail:2781565932@qq.com

【通信作者】 曾英坚(1975—),男,博士,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:中医药防治血液疾病的临床与基础研究。
E-mail:13431762390@163.com

progression. Some metabolites, such as short-chain fatty acids, enhance immune function and improve patient prognosis through intestinal barrier repair, while others, such as hydrogen sulfide and bile acids, show potential anti-tumor effects exerted through regulation of tumor cell apoptosis and immune balance. Traditional Chinese medicine aimed at regulating the structure of the gut microbiota and its metabolites has shown great potential in alleviating the side effects of chemotherapy for leukemia. This review covers the role of the gut microbiota and its metabolites in the occurrence, development, and complications of leukemia, and explores treatment strategies for regulating the microbiota, including fecal microbiota transplantation, probiotics, and traditional Chinese medicine intervention. We anticipate that this review will serve as a reference for improving the treatment and prognosis of leukemia.

【Keywords】 gut microbiota; microbial metabolites; leukemia; immunity; inflammation

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

白血病,一种起源于造血系统的恶性肿瘤,涵盖了急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)、各种类型的慢性及急性淋巴细胞白血病以及儿童特有的白血病形式^[1]。该病的发病人群主要集中在 35~64 岁的中年组,其次是 0~14 岁的儿童组,35~65 岁及以上年龄段的白血病发病率呈逐年上升趋势^[2]。其临床表现主要有发热、贫血和肝脾淋巴结肿大等^[3]。尽管放射疗法、化学疗法和造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)等治疗策略已在一定程度上提升了治疗效果,但治疗过程中的不良反应、耐药、复发等问题依旧是所面临的巨大的挑战^[4]。

人体肠道是一个复杂的生态系统,寄居着众多特定的微生物群体。近年来越来越多的研究揭示肠道微生物及其代谢物对白血病的发生、发展和预后中发挥重要的调节作用。肠道菌群及其代谢产物不仅是维持肠道环境稳定不可或缺的因素,而且在维护人体免疫力和抵御病原体方面起着至关重要的作用^[5]。研究发现在儿童年龄群中,厚壁菌门的相对丰度减少是易患急性淋巴细胞白血病的危险因素之一^[6]。此外调节肠道菌群及其代谢物通过减少炎症和增强免疫可有效减少白血病耐药、复发、感染等问题^[7-9]。目前调控肠道菌群治疗白血病已经成为当下的热点话题。因此,本文梳理了肠道菌群及其代谢物在白血病研究的最新进展,为展开进一步研究提供参考。

1 肠道菌群

人体肠道寄居着约 10 万亿个细菌,包括致病菌、共生菌和条件致病菌,共同构成了肠道菌群。

微生物群落通过各种生物化学反应与肠道内物质相互作用,维持人体的免疫、代谢和营养等生理功能,对人体健康产生深远影响^[5,10]。最新研究发现,与健康儿童相比,白血病患者肠道菌群的组成上存在差异,厚壁菌门的相对丰度上减少,而拟杆菌门的相对丰度增加^[6]。白血病化疗后,肠道菌群结构也有明显差异,拟杆菌相对丰度显著降低而其他类群,如梭状芽胞杆菌和链球菌相对丰度增加^[11]。进一步研究发现放化疗患者接受益生菌治疗后,胃肠道副作用明显减少,预后改善^[12]。且使用如双歧杆菌等有益菌可显著增强嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法(chimeric antigen receptor T-Cell immunotherapy, CAR-T)的疗效,减少 AML 复发^[13]。因此,菌群丰富度影响白血病发生、发展,调节菌群丰富度可改善其预后,减少其复发。

2 肠道菌群及其代谢物影响白血病的发生

抑癌基因的突变、免疫功能的缺陷是诱发白血病的关键。研究发现尿石素 B、鞣花酸和没食子酸等肠道菌群代谢物可通过调节肿瘤微环境影响 p53 基因的致癌作用^[14]。肠道菌群及其代谢物还可刺激免疫系统,抑制白血病的发生,如 *C. cateniformis* 肠道菌群可下调程序性死亡受体-2 表达来促进抗肿瘤免疫应答^[15-17]。另外,研究显示, TET2 基因突变导致的白血病可能与乳酸杆菌等肠道菌群介导的白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)炎症反应有关^[18]。菌群代谢物丁酸能够抑制核转录因子(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)通路,诱导促炎巨噬细胞死亡,抑制白血

病细胞的生长和增殖^[19]。可见,肠道菌群及其代谢物可通过抑制抑癌基因的表达、调节机体免疫和减轻炎症反应,影响白血病发生发展。

3 菌群及其代谢物对白血病预后的影响

3.1 菌群对白血病预后的影响

肠道菌群结构的破坏是白血病预后不良的关键因素之一。肠球菌、脆弱拟杆菌及梭杆菌数量增加会通过介导炎症反应导致白血病感染和移植物抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)的发生^[20-21]。短链脂肪酸产生菌的缺失通过损害 CD8⁺T 细胞毒性促进急性淋巴细胞白血病感染的发生^[6]。白血病的进一步发展会加重体内肠道菌群的失衡,粪杆菌数量的减少及变形杆菌、肠球菌数量的升高,会导致肠道屏障通透性增加,肠道屏障功能损害,引发内毒素血症等不良反应事件的发生^[22]。WANG 等^[23]发现普氏栖粪杆菌灌胃可修复 AML 小鼠受损的肠屏障,抑制脂多糖吸收,抑制 AML 进展。可见,菌群结构是白血病预后不良的相关危险因素。

3.2 菌群代谢物对白血病预后的影响

3.2.1 短链脂肪酸

短链脂肪酸是由肠道微生物发酵膳食纤维和非消化性碳水化合物产生的一类有机酸,包括丁酸、乙酸、丙酸,及其丁酸盐、丙酸盐等化合物^[24]。WANG 等^[23]发现丁酸盐可修复破损的肠道屏障,减少炎症细胞极化而抑制 AML 的进展。CAI 等^[25]发现丙酸盐可促进树突状细胞成熟,进一步促进 AML 细胞的有效杀伤。HE 等^[26]发现丁酸盐通过激活 IL-12 信号通路,增强细胞毒性 CD8⁺T 细胞反应来提高化疗药物抗肿瘤疗效。因此,短链脂肪酸可通过调节炎症反应,促进免疫细胞成熟来增强机体免疫,发挥抗肿瘤疗效。

3.2.2 脂多糖

脂多糖是革兰氏阴性肠道细菌细胞壁外膜的主要成分,常在细菌死亡破裂后释放^[27]。脂多糖不仅通过激活炎症信号通路促进 AML 发展^[28],还可促使 T 细胞增殖、活化等效应功能异常,导致白血病细胞逃避免疫监视^[29]。另外,研究发现,维生素 C 通过抑制 ATP 积累和阻碍自噬信号传导,缓解脂多糖诱导的白血病细胞高炎症

状态,减少感染的发生^[30]。因此,脂多糖一方面通过促进炎症信号,发生炎症转换,诱导白血病的发生,另一方面通过损害免疫反应,促使了白血病细胞的免疫逃逸。

3.2.3 硫化氢

肠道内多种细菌产生硫化氢,对维持机体内环境稳定和健康至关重要。NGUYEN 等^[31]发现硫化氢通过降低抑凋亡基因表达来抑制白血病细胞的恶性增殖,改善白血病的预后。一方面,硫化氢可通过重塑同源半胱氨酸代谢,提升肺癌细胞对铁死亡的敏感性,增强抗肿瘤治疗^[32]。ZHANG 等^[33]发现一种纳米酶通过释放硫化氢诱导铁死亡,抑制肿瘤。另一方面,研究发现硫化氢气体释放破坏细胞稳态,促进细胞凋亡,还可抑制 ATP 产生,增强对肿瘤的抑制作用^[33]。研究发现,通过耗尽癌细胞线粒体中的硫化氢,可导致糖酵解显著减少和线粒体损伤,促进肿瘤细胞凋亡^[34]。因此,菌群代谢物硫化氢抑制白血病的主要方式可能是调节肿瘤细胞的铁死亡、线粒体凋亡等途径。

3.2.4 胆汁酸

胆汁酸是肝合成并储存于胆囊中的化合物,肠道菌群参与其代谢并产生相关代谢产物^[25]。研究发现胆汁酸通过抑制巨噬细胞极化,阻碍 AML 进一步发展^[35]。胆汁酸可进一步促进胃肠道调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)的分化,影响 Treg 细胞和参与炎症反应的 T 辅助细胞 17(T helper cell 17, Th17)之间的平衡^[36]。另外,胆汁酸还可降低抗原呈递机制活性和预防肠上皮细胞凋亡,减少 GVHD 的发生和延缓其进展^[37]。YIN 等^[38]发现使用胆酸盐修饰的纳米颗粒载体能够提高槲皮素的口服生物利用度和治疗指数,抑制白血病发展。可见,胆汁酸可通过减少炎症反应,降低抗原呈递机制活性和预防肠上皮细胞凋亡等抑制白血病进展,减少 GVHD 的发生。

3.2.5 色氨酸

色氨酸代谢途径在白血病的发生进展中扮演着复杂的角色。色氨酸是蛋白质组成和细胞含量最低的氨基酸,肠道色氨酸代谢通路主要包括:吡啶途径、犬尿氨酸途径及血清素途径^[39]。有研究发现苯导致儿童白血病的发生可能与色

氨酸代谢物,犬尿氨酸和吲哚-3-丙酸等介质干扰有关^[40-41]。而 SHOREY 等^[42]发现色氨酸吲哚途径可诱导白血病细胞 G₁ 期阻滞和凋亡。含有色氨酸和精氨酸残基的环状细胞穿透肽能有效递送阿霉素,克服耐药性,这为提高化疗药物递送效率和治疗效果提供新策略^[43]。可见,色氨酸代谢途径在不同环境下对于白血病的发生和进展表现出双向作用,其深层次机理值得进一步探索。

4 肠道菌群及其代谢物与白血病并发症

4.1 感染

感染是儿童白血病治疗失败的主要原因。而肠道菌群与白血病感染的发生发展关系日益受到关注。STEIN-THOERINGER 等^[20]发现肠球菌数量增加,乳酸积累过多,会导致肠黏膜通透性增加,引发内毒素血症。YIN 等^[44]发现肠道噬菌体负荷是肠道屏障损伤的一个标志物,与白血病患者单核巨噬细胞激活和全身炎症反应有关。NAKAGAWA 等^[45]发现短链脂肪酸通过刺激免疫细胞活性,提高白血病患者的免疫力,抑制感染。广谱抗生素的使用会破坏人体正常菌群,损害机体免疫功能及引发炎症反应,导致感染的发生或进一步加重^[46],而 RASHIDI 等^[47]发现 FMT 可去除临床相关的抗生素耐药基因肠道定植,减少感染的发生。因此,调控菌群结构对于减少白血病并发感染具有积极作用。

4.2 肠道菌群及其代谢物对出血的影响

出血是白血病常见的并发症,主要表现为皮肤黏膜出血,若出现严重脏器出血,可导致早期死亡发生^[48]。BOE 等^[49]发现菌群代谢物维生素 K 对几种凝血因子的合成至关重要,可加速血液凝固,减少出血情况发生。JIAN 等^[50]发现由菌群及其代谢物介导的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 及 IL-6 等炎症介质可导致血管内皮损伤。因此,肠道菌群及其代谢物可通过调控炎症介质来缓解白血病出血。肠道菌群及其代谢物通过促进凝血因子产生及调节炎症细胞因子水平在白血病出血中发挥重要作用。

4.3 肠道菌群及其代谢物对 GVHD 的影响

GVHD 是白血病异体造血细胞移植后,供体

淋巴细胞对宿主抗原反应过度引起的一种病理过程,严重可致患者死亡^[4]。脆弱拟杆菌及梭杆菌可通过刺激 IL-6、TNF- α 、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 等炎症介质分泌,促进该并发症的发生发展^[21]。吲哚代谢物可通过介导 IFN 反应,减少炎症细胞因子产生,降低 GVHD 死亡率^[51]。此外,研究表明短链脂肪酸丁酸盐和丙酸盐可通过促进 Treg 的分化,预防慢性 GVHD 发生及降低 GVHD 风险,提高其生存率^[52-53]。BIERNAT 等^[8]发现 FMT 增强机体免疫,可降低早期使用广谱抗生素治疗同种异体 HSCT 后感染导致的肠道 GVHD 死亡率及改善类固醇药物抵抗。因此,肠道菌群及其代谢物可通过减少炎症及增强免疫等途径改善 GVHD 不良结局。

5 菌群治疗技术的临床挑战

当前菌群疗法在临床中显示诸多的机遇与挑战。如双歧杆菌等有益菌能够显著增强 CAR-T 细胞免疫疗法的疗效,有效降低 AML 复发的风险^[13]。FMT 可通过去除耐药基因及增强机体免疫减少感染发生,降低肠道 GVHD 死亡率^[8,47]。乳酸菌通过调节 Th17/T 细胞平衡和限制肠球菌的扩增,明显改善 GVHD 患者预后^[54]。有研究进一步表明 FMT 可增强免疫抑制剂的抗肿瘤疗效^[55]。然而,FMT 和益生菌的使用并非完全有益,JENQ 等^[56]发现乳酸杆菌的丰度超过肠球菌时会刺激 T 细胞重建(包括 TH17),从而促进炎症发展,逆转其治疗作用。BEYER 等^[57]发现 FMT 治疗后患者出现空肠梭菌感染,这可能与 FMT 中的某些机会致病菌存在有关。JANS 等^[58]发现大肠杆菌菌株可促进基因毒性分子如 colibactin 的传递,引发 DNA 损伤并增加患结肠癌的风险。以上机遇与挑战表明,尽管 FMT 和益生菌在临床治疗白血病中具有潜力,但仍需克服诸多安全性和有效性问题。

6 中医药的调节作用

6.1 调节菌群结构

中医药在治疗血液肿瘤(血症、温病、虚劳、急劳等)疾病已有数千年历史,因其安全性高和低副作用广受青睐。在治疗白血病的过程中,中医药发挥着重要的作用。齐宇搏^[59]发现具有温

阳补气作用的参附注射液通过调整肠道菌群结构和保护肠道黏膜屏障,在急性白血病化疗后的阳虚患者中常获得较好疗效。李丹红等^[60]发现艾迪注射液通过增加肠道有益菌群数量,扶助机体正气,与化疗合用可显著减轻化疗药物的毒副作用。幽门螺旋杆菌引起肠道菌群紊乱是白血病发生风险因素之一^[61],而研究发现清胃和中汤可改善幽门螺旋杆菌引起的肠道菌群紊乱^[62]。黄芩贝母汤联合双歧杆菌四联活菌片可通过促进粒细胞和红细胞分化成熟,改善化疗引起的骨髓抑制^[63]。因此,中医药调节菌群结构可改善白血病患者的预后,降低不良反应的发生。

6.2 调节菌群代谢物

菌群代谢物是影响白血病进展的重要因素之一。史颖颖等^[28]发现中药提取物熊果酸减少肠道内炎症因子的产生,而抑制 AML 的进展。尚广彬等^[64]发现肿节风中提取的黄酮类成分可通过上调 L-组氨酸、L-蛋氨酸、黄嘌呤、鞘氨醇、L-精氨酸,下调 1-油酰基甘油磷酸胆碱等代谢物抑制白血病细胞生长。研究显示,精氨酸可促进淋巴和 T 细胞的增殖和活化,增加中枢记忆样 T 细胞的产生,增强巨噬细胞的吞噬和杀伤能力,发挥抗肿瘤作用^[65-66]。另外,经典复方如葛根芩连汤^[67]、香连丸^[68]等被发现具有显著调节菌群代谢物作用。因此中医药调节菌群代谢物抗白血病的研究值得进一步的探索。

7 小结

白血病是一种具有高发病率和复杂病理机制的恶性肿瘤,具有高度异质性,其治疗和预后面临诸多挑战。近年来,肠道菌群及其代谢物在白血病发生、发展及并发症中的重要作用逐渐受到关注。肠道微生物失衡与白血病的发生及预后密切相关,其代谢物如短链脂肪酸、硫化氢和胆汁酸等通过调节免疫功能、炎症反应及肿瘤微环境,对白血病的进展产生显著影响。同时,益生菌如双歧杆菌、乳酸菌、粪便菌群移植和中医药单体及复方在调节肠道菌群和代谢物中展现出良好的治疗潜力,为白血病的干预和治疗提供了新的方向。尽管如此,肠道菌群及其代谢物在白血病中的具体机制仍需深入研究,特别是在个体化治疗和安全性评估方面亟待突破。本研究

总结了相关领域的最新进展,为未来更高效的治疗策略提供参考。

参考文献:

- [1] BHANSALI R S, PRATZ K W, LAI C. Recent advances in targeted therapies in acute myeloid leukemia [J]. *J Hematol Oncol*, 2023, 16(1): 29.
- [2] BISPO J A B, PINHEIRO P S, KOBETZ E K. Epidemiology and etiology of leukemia and lymphoma [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2020, 10(6): a034819.
- [3] 赵子璇, 南苗苗, 贺喜白乙, 等. MEC-1 移植法构建慢性淋巴细胞白血病小鼠模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(1): 75-81.
- [4] ZHAO Z X, NAN M M, HE X B Y, et al. Preparation of mouse models of chronic lymphocytic leukemia by MEC-1 cells transplantation [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(1): 75-81.
- [5] ALADAĞ E, KELKITLI E, GÖKER H. Acute graft-versus-host disease: a brief review [J]. *Turk J Haematol*, 2020, 37(1): 1-4.
- [6] FU Q, SONG T, MA X, et al. Research progress on the relationship between intestinal microecology and intestinal bowel disease [J]. *Anim Model Exp Med*, 2022, 5(4): 297-310.
- [7] PEPPAS I, FORD A M, FURNESS C L, et al. Gut microbiome immaturity and childhood acute lymphoblastic leukaemia [J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23(8): 565-576.
- [8] ZHANG Z J, WU Q F, REN A Q, et al. ATF4 renders human T-cell acute lymphoblastic leukemia cell resistance to FGFR1 inhibitors through amino acid metabolic reprogramming [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(11): 2282-2295.
- [9] BIERNAT M M, URBANIAK-KUJDA D, DYBKÓ J, et al. Fecal microbiota transplantation in the treatment of intestinal steroid-resistant graft-versus-host disease: two case reports and a review of the literature [J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(6): 300060520925693.
- [10] YE Y, YANG X, LI F, et al. C-myb is involved in CML progression and is a therapeutic target in the zebrafish CML model [J]. *Anim Model Exp Med*, 2024, 7(2): 136-144.
- [11] CHEN Y, ZHOU J, WANG L. Role and mechanism of gut microbiota in human disease [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 625913.
- [12] THOMAS R, WONG W S W, SAADON R, et al. Gut microbial composition difference between pediatric ALL survivors and siblings [J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2020, 37(6): 475-488.
- [13] REYNA-FIGUEROA J, BEJARANO-JUVERA A A,

- GARCÍA-PARRA C, et al. Decrease of postchemotherapy complications with the use of probiotics in children with acute lymphoblastic leukemia [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2021, 43(4): e457-e461.
- [13] GABRIELLI G, SHOUVAL R, GHILARDI G, et al. Harnessing the gut microbiota to potentiate the efficacy of CAR T cell therapy [J]. *Hemasphere*, 2023, 7(9): e950.
- [14] KADOSH E, SNIR-ALKALAY I, VENKATACHALAM A, et al. The gut microbiome switches mutant p53 from tumour-suppressive to oncogenic [J]. *Nature*, 2020, 586(7827): 133-138.
- [15] 陈梦云, 宋早文, 方金勇, 等. 人类 T 淋巴细胞白血病 1 型病毒的感染复制及致病机制研究进展 [J]. *浙江师范大学学报(自然科学版)*, 2017, 40(3): 324-330.
- CHEN M Y, SONG Z W, FANG J Y, et al. Research progress in human T-cell leukemia virus type 1 and its mechanisms of oncogenesis [J]. *J Zhejiang Norm Univ Nat Sci*, 2017, 40(3): 324-330.
- [16] ZHOU B, YUAN Y, ZHANG S, et al. Intestinal flora and disease mutually shape the regional immune system in the intestinal tract [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 575.
- [17] PARK J S, GAZZANIGA F S, WU M, et al. Publisher Correction: Targeting PD-L2-RGMb overcomes microbiome-related immunotherapy resistance [J]. *Nature*, 2023, 618(7966): E27.
- [18] MEISEL M, HINTERLEITNER R, PACIS A, et al. Microbial signals drive pre-leukaemic myeloproliferation in a Tet2-deficient host [J]. *Nature*, 2018, 557(7706): 580-584.
- [19] SARKAR A, MITRA P, LAHIRI A, et al. Butyrate limits inflammatory macrophage niche in NASH [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(5): 332.
- [20] STEIN-THOERINGER C K, NICHOLS K B, LAZRAK A, et al. Lactose drives *Enterococcus* expansion to promote graft-versus-host disease [J]. *Science*, 2019, 366(6469): 1143-1149.
- [21] STEFAN K L, KIM M V, IWASAKI A, et al. Commensal microbiota modulation of natural resistance to virus infection [J]. *Cell*, 2020, 183(5): 1312-1324.
- [22] 陈森敏, 刘四喜, 陈芬, 等. 儿童急性淋巴细胞白血病化疗前后肠道菌群变化特点 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2022, 24(5): 550-560.
- CHEN S M, LIU S X, CHEN F, et al. Changes of intestinal flora in children with acute lymphoblastic leukemia before and after chemotherapy [J]. *Chin J Contemp Pediatr*, 2022, 24(5): 550-560.
- [23] WANG R, YANG X, LIU J, et al. Gut microbiota regulates acute myeloid leukaemia *via* alteration of intestinal barrier function mediated by butyrate [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2522.
- [24] LIU M, LU Y, XUE G, et al. Role of short-chain fatty acids in host physiology [J]. *Anim Model Exp Med*, 2024, 7(5): 641-652.
- [25] CAI J, SUN L, GONZALEZ F J. Gut microbiota-derived bile acids in intestinal immunity, inflammation, and tumorigenesis [J]. *Cell Host Microbe*, 2022, 30(3): 289-300.
- [26] HE Y, FU L, LI Y, et al. Gut microbial metabolites facilitate anticancer therapy efficacy by modulating cytotoxic CD8⁺ T cell immunity [J]. *Cell Metab*, 2021, 33(5): 988-1000. e7.
- [27] 占凯, 吴皓萌, 郑欢, 等. IBS-D 大鼠肠道菌群-短链脂肪酸代谢轴变化特点及丁酸钠干预作用研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(9): 16-24.
- ZHAN K, WU H M, ZHENG H, et al. Alterations in gut microbiota short chain fatty acid axis in rats with diarrhea predominant irritable bowel syndrome and the effect of sodium butyrate [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(9): 16-24.
- [28] 史颖颖, 冯金梅, 黄丽霞, 等. 熊果酸对脂多糖诱导的人髓系白血病单核细胞来源巨噬细胞炎症因子的调节作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(13): 1663-1667.
- SHI Y Y, FENG J M, HUANG L X, et al. Regulation of ursolic acid on lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokines in human myeloid leukemia mononuclear cells derived macrophages [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2021, 37(13): 1663-1667.
- [29] REN J, TAO Y, PENG M, et al. Targeted activation of GPER enhances the efficacy of venetoclax by boosting leukemic pyroptosis and CD8⁺ T cell immune function in acute myeloid leukemia [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(10): 915.
- [30] PIRES D A, BRANDÃO-RANGEL M A R, SILVA-REIS A, et al. Vitamin C inhibits lipopolysaccharide-induced hyperinflammatory state of chronic myeloid leukemia cells through purinergic signaling and autophagy [J]. *Nutrients*, 2024, 16(3): 383.
- [31] NGUYEN K, CHAU V Q, MAURO A G, et al. Hydrogen sulfide therapy suppresses cofilin-2 and attenuates ischemic heart failure in a mouse model of myocardial infarction [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2020, 25(5): 472-483.
- [32] ZHENG H, CHEN H, CAI Y, et al. Hydrogen sulfide-mediated persulfidation regulates homocysteine metabolism and enhances ferroptosis in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Cell*, 2024, 84(20): 4016-4030.
- [33] ZHANG A, WEI Q, ZHENG Y, et al. Hydrogen sulfide delivery system based on salting-out effect for enhancing synergistic photothermal and photodynamic cancer therapies

- [J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13(27): e2400803.
- [34] ZHANG Y, FANG J, YE S, et al. A hydrogen sulphide-responsive and depleting nanoplatfor for cancer photodynamic therapy [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1685.
- [35] LIU J, WEI Y, JIA W, et al. Chenodeoxycholic acid suppresses AML progression through promoting lipid peroxidation *via* ROS/p38 MAPK/DGAT1 pathway and inhibiting M2 macrophage polarization [J]. *Redox Biol*, 2022, 56: 102452.
- [36] LEE M H, NUCCIO S P, MOHANTY I, et al. How bile acids and the microbiota interact to shape host immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2024, 24(11): 798–809.
- [37] HARING E, UHL F M, ANDRIEUX G, et al. Bile acids regulate intestinal antigen presentation and reduce graft-versus-host disease without impairing the graft-versus-leukemia effect [J]. *Haematologica*, 2021, 106(8): 2131–2146.
- [38] YIN J, HOU Y, SONG X, et al. Cholate-modified polymer-lipid hybrid nanoparticles for oral delivery of quercetin to potentiate the antileukemic effect [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 4045–4057.
- [39] 陈青青, 郑建华, 董巧燕, 等. 色氨酸代谢调控肠道应激损伤作用的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(4): 539–546.
- CHEN J Q, ZHENG J H, DONG Q Y, et al. Regulation of tryptophan metabolism in stress-related gastrointestinal disorders [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(4): 539–546.
- [40] WANG J, HAN L, LIU Z, et al. Genus Unclassified_Muribaculaceae and microbiota-derived butyrate and indole-3-propionic acid are involved in benzene-induced hematopoietic injury in mice [J]. *Chemosphere*, 2023, 313: 137499.
- [41] GALÁN-DÍEZ M, BOROT F, ALI A M, et al. Subversion of serotonin receptor signaling in osteoblasts by kynurenine drives acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(4): 1106–1127.
- [42] SHOREY L E, HAGMAN A M, WILLIAMS D E, et al. 3, 3'-Diindolylmethane induces G1 arrest and apoptosis in human acute T-cell lymphoblastic leukemia cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34975.
- [43] ZOGHEBI K, ALIABADI H M, TIWARI R K, et al. (WR)₈WKβA]-doxorubicin conjugate: a delivery system to overcome multi-drug resistance against doxorubicin [J]. *Cells*, 2022, 11(2): 301.
- [44] YIN X R, LIU P, XU X, et al. Elevated plasma phage load as a marker for intestinal permeability in leukemic patients [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2020, 209(6): 693–703.
- [45] NAKAGAWA N, HASHII Y, KAYAMA H, et al. An oral WT1 protein vaccine composed of WT1-anchored, genetically engineered *Bifidobacterium longum* allows for intestinal immunity in mice with acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2023, 72(1): 39–53.
- [46] DUNN K A, MACDONALD T, RODRIGUES G J, et al. Antibiotic and antifungal use in pediatric leukemia and lymphoma patients are associated with increasing opportunistic pathogens and decreasing bacteria responsible for activities that enhance colonic defense [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 924707.
- [47] RASHIDI A, EBADI M, REHMAN T U, et al. Long- and short-term effects of fecal microbiota transplantation on antibiotic resistance genes: results from a randomized placebo-controlled trial [J]. *Gut Microbes*, 2024, 16(1): 2327442.
- [48] YILMAZ M, KANTARJIAN H, RAVANDI F. Acute promyelocytic leukemia current treatment algorithms [J]. *Blood Cancer J*, 2021, 11(6): 123.
- [49] BOE N J, HALD S M, KRISTENSEN A R, et al. Association of antithrombotic drug use with incident intracerebral hemorrhage location [J]. *Neurology*, 2024, 102(12): e209442.
- [50] JIAN Z W, ZHANG X M, HUANG G S. Clinical value of the platelet and inflammatory factor activation in vascular endothelial injury in essential hypertension [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2023, 83(2): 171–180.
- [51] SWIMM A, GIVER C R, DEFILIPP Z, et al. Indoles derived from intestinal microbiota act *via* type I interferon signaling to limit graft-versus-host disease [J]. *Blood*, 2018, 132(23): 2506–2519.
- [52] ROMICK-ROSENDALE L E, HASLAM D B, LANE A, et al. Antibiotic exposure and reduced short chain fatty acid production after hematopoietic stem cell transplant [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2018, 24(12): 2418–2424.
- [53] MARKEY K A, SCHLUTER J, GOMES A L C, et al. The microbe-derived short-chain fatty acids butyrate and propionate are associated with protection from chronic GVHD [J]. *Blood*, 2020, 136(1): 130–136.
- [54] BEAK J A, PARK M J, KIM S Y, et al. FK506 and *Lactobacillus acidophilus* ameliorate acute graft-versus-host disease by modulating the T helper 17/regulatory T-cell balance [J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 104.
- [55] DAVAR D, DZUTSEV A K, MCCULLOCH J A, et al. Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients [J]. *Science*, 2021, 371(6529): 595–602.
- [56] JENQ R R, UBEDA C, TAUR Y, et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic

- bone marrow transplantation [J]. J Exp Med, 2012, 209(5): 903-911.
- [57] BEYER B R, SHEPPARD C, MULLINS J, et al. *Campylobacter* infection introduced following fecal microbiota transplantation [J]. Cureus, 2024, 16(6): e62541.
- [58] JANS M, KOLATA M, BLANCHE G, et al. Colibactin-driven colon cancer requires adhesin-mediated epithelial binding [J]. Nature, 2024, 635(8038): 472-480.
- [59] 齐宇博. 急性白血病化疗后阳虚证的肠道微环境改变及干预机制 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2021.
- QI Y B. Changes of intestinal microenvironment and intervention mechanism of Yang-deficiency syndrome in acute leukemia after chemotherapy [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2021.
- [60] 李丹红, 杨景云, 卢林. 艾迪注射液对急性白血病患者化疗减毒增效作用及肠道菌群影响的研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(4): 345-346.
- LI D H, YANG J Y, LU L. The therapeutic action of AiDi injection for the function of toxicity reducing and efficacy enhancing and disordered intestinal flora after the chemotherapy to the acute leukemia patients [J]. Chin J Microecol, 2007, 19(4): 345-346.
- [61] LARFORS G, RICHTER J, SJÄLANDER A, et al. Increased risk of chronic myeloid leukemia following gastric conditions indicating *Helicobacter pylori* infection: a case-control study [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2020, 29(1): 151-156.
- [62] 赵西斌, 吴山永. 清胃和中汤辅助治疗小儿幽门螺杆菌感染脾胃湿热证 47 例临床观察 [J]. 中医儿科杂志, 2023, 19(1): 51-55.
- ZHAO X B, WU S Y. Qingqi and Zhongtang assisted in the treatment of children's *Helicobacter pylori* infection, spleen and stomach dampness and heat syndrome, and 47 cases were clinically observed [J]. J Pediatr Trad Chin Med, 2023, 19(1): 51-55.
- [63] 张雯, 宋超, 钟镇阳, 等. 基于肠道菌群平衡分析微生态制剂联合浙贝黄芩汤对急性淋巴细胞白血病大剂量化疗后患者的临床影响 [J]. 中国药物与临床, 2024, 24(18): 1157-1162.
- ZHANG W, SONG C, ZHONG Z Y, et al. Clinical effects of microecological preparations combined with Zhebei Huangqin Decoction on acute lym-phoblastic leukemia after high-dose chemotherapy based on the analysis of intestinal flora balance [J]. Chin Rem Clin, 2024, 24(18): 1157-1162.
- [64] 尚广彬, 柳歌, 孙慧娟, 等. 基于转录组学分析肿节风总黄酮抑制白血病 K562 细胞生长的作用机制 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(11): 1445-1452.
- SHANG G B, LIU G, SUN H J, et al. Transcriptomic analysis of inhibitory mechanism of total flavonoids from *sarcandrae herba* on the growth of leukemia K562 cells [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2022, 33(11): 1445-1452.
- [65] KASHFI K, KANNIKAL J, NATH N. Macrophage reprogramming and cancer therapeutics: role of iNOS-derived NO [J]. Cells, 2021, 10(11): 3194.
- [66] FULTANG L, BOOTH S, YOGEV O, et al. Metabolic engineering against the arginine microenvironment enhances CAR-T cell proliferation and therapeutic activity [J]. Blood, 2020, 136(10): 1155-1160.
- [67] LV J, JIA Y, LI J, et al. Gegen Qinlian decoction enhances the effect of PD-1 blockade in colorectal cancer with microsatellite stability by remodelling the gut microbiota and the tumour microenvironment [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6): 415.
- [68] YE C, WU C, LI Y, et al. Traditional medicine Xianglian pill suppresses high-fat diet-related colorectal cancer *via* inactivating TLR4/MyD88 by remodeling gut microbiota composition and bile acid metabolism [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 333: 118411.

[收稿日期] 2024-06-10

揭育祯,丁宁,卢冠军,等.表观遗传修饰在 HHcy 引起的肾功能损伤中的研究进展 [J].中国比较医学杂志,2025,35(5):95-101.

Jie YZ, Ding N, Lu GJ, et al. Research progress in epigenetic modification in renal damage caused by hyperhomocysteinemia [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(5): 95-101.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.05.010

表观遗传修饰在 HHcy 引起的肾功能损伤中的研究进展

揭育祯^{1,2},丁宁³,卢冠军⁴,马胜超^{3*}

(1.海南医科大学 临床医学院,海口 571199;2.海南医科大学附属海南医院 泌尿外科,海口 570311;3.宁夏医科大学 国家卫生健康委代谢性心血管疾病研究重点实验室,银川 750004;4.宁夏医科大学总医院 泌尿外科,银川 750003)

【摘要】慢性肾脏疾病(chronic kidney disease,CKD)是由各种原因引起的慢性肾脏结构和功能障碍的一组临床综合征,治疗费用高、预后差。作为基因表达的重要调节因子,研究表明表观遗传修饰对基因表达和细胞功能的影响在 CKD 的发生发展中起关键的调控作用。同型半胱氨酸(homocysteine,Hcy)是体内常见的一种含有氨基酸的硫醇基团,高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia,HHcy)作为终末期肾脏疾病发病率和死亡率的独立预测因子,涉及脏器多,危害性大。本文介绍了 HHcy 与慢性肾功能损伤关系,进一步对表观遗传修饰在同型半胱氨酸介导慢性肾功能损伤机制中调控作用的研究进展进行综述,旨在更加深入的了解慢性肾脏疾病发生发展的过程及其机制,为慢性肾脏疾病的研究提供一定新的思路和理论基础。

【关键词】同型半胱氨酸;DNA 甲基化;组蛋白修饰;非编码 RNA 调控;慢性肾脏疾病

【中图分类号】R-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856 (2025) 05-0095-07

Research progress in epigenetic modification in renal damage caused by hyperhomocysteinemia

JIE Yuzhen^{1,2*}, DING Ning³, LU Guanjuan⁴, MA Shengchao^{3*}

(1. School of Clinical Medicine, Hainan Medical University, Haikou 571199, China. 2. Department of Urology, Affiliated Hainan Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570311. 3. National Health Commission Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Disease Research, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004. 4. General Hospital of Ningxia Medical University, Department of Urology, Yinchuan 750003)

【Abstract】Chronic kidney disease (CKD) comprises a group of clinical syndromes affecting kidney structure and function, with various causes, high treatment costs, and a poor prognosis. Epigenetic modification of gene expression and cell function has been shown to play a key regulatory role in the occurrence and development of CKD. Homocysteine (Hcy) is a common amino acid-containing thiol group in the body. Hyperhomocysteinemia (HHcy) is a damaging condition involving many organs, and is an independent predictor of end-stage renal disease morbidity and mortality. This review considers the relationship between HHcy and chronic renal injury, and examines research

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(82270492);宁夏自然科学基金优青项目(2023AAC05035)。

【作者简介】揭育祯(1996—),男,在读博士研究生,研究方向:肾损伤的分子机制。E-mail:jieyuzhen160301@163.com

【通信作者】马胜超(1985—),男,博士,副教授,研究方向:病理学与病理生理学。E-mail:solarmsc@163.com

progress in the role of epigenetic modification in the mechanism of Hcy-mediated chronic renal injury, with the aim of furthering our understanding of the occurrence and development of CKD. This process and its mechanism provide new ideas and a theoretical basis for further research into CKD.

【Keywords】 homocysteine; DNA methylation; histone modification; non-coding RNA regulation; chronic kidney disease

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

近年来在全球范围内慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD)的发病率和患病率急剧增长,占人口的 10%~13%,预后差,且常引起严重的心血管并发症,是威胁人类生命和健康的常见疾病之一^[1-2]。研究发现,足细胞损伤是肾小球硬化的关键因素和初始事件^[3],而同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)可直接作用于足细胞引起肾小球功能障碍^[4]。最新研究表明 CKD 的发生、发展与表观遗传学有着密切的关系,表观遗传修饰可能是高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)诱导肾损伤的一种新的调控机制,表观遗传学的变化可能会填补我们对 CKD 发展认识上的一个重要空白,因为这些变化不仅反映了新陈代谢的变化,而且还在细胞分裂过程中得以保存和传递^[5]。随着肾功能损伤发生机制的基础和临床研究日趋深入,针对现有的调控机制所采取的防治措施将有望于降低 CKD 的发病率和死亡率。下面将对近些年关于 HHcy 引起的肾功能损伤的发生机制及表观遗传调控在其中发挥的调控作用的最新进展作如下综述。

1 高同型半胱氨酸血症与肾功能损伤

Hcy 是体内蛋氨酸代谢过程中产生的重要中间产物,其主要代谢途径有:再甲基化途径、转硫途径和直接释放到细胞外基质^[6-7]。当代谢异常使血清 Hcy 水平超过 15 $\mu\text{mol/L}$ 即可诊断为 HHcy^[8]。HHcy 被认为是终末期肾脏疾病(end stage renal disease, ESRD)发病率和死亡率的独立危险因素,能更好地反映肾功能损伤程度^[9]。研究数据显示, Hcy 诱导足细胞损伤通过调节足细胞凋亡破坏肾单位滤过膜的正常结构和功能,引起 BUN 和 Scr 升高,导致肾功能损伤^[10-11]。ZHANG 等^[12]的研究也表明 HHcy 通过氧化应

激、炎症反应以及内质网应激等方式来调控足细胞凋亡、焦亡,导致肾小球滤过率下降,促使 CKD 发展为 ESRD。

2 高同型半胱氨酸血症诱导肾功能损伤的分子机制

2.1 炎症小体 NLRP3 形成

炎症是基于对抗损伤、感染的一种自然免疫保护机制。核苷酸结合寡聚结构域样受体家族蛋白 3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)是细胞内众多蛋白复合物的一种,被认为是炎症反应的关键环节^[13]。其激活有两个阶段,一是诱导 Toll 样受体 4 激活核转录因子信号通路,介导产生白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)和白细胞介素 18(interleukin 18, IL-18)前体;二是通过脂多糖等刺激信号与 NLRP3 受体结合,促进分泌成熟的 IL-1 β 和 IL-18,发挥免疫炎症效应^[14-15]。最新研究表明,肾组织中的肾单核细胞浸润会影响 NLRP3 炎症小体的表达, NLRP3 炎症小体通过激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(cystein-aspartate protease-1, Caspase-1)诱导 IL-1 β 和 IL-18 的分泌,从而促进细胞死亡并诱导自动防御和炎症反应,而 NLRP3 炎症小体可由促炎介质脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导和激活,其激活引起的持续性炎症与 DN 的发生和发展有关^[16]。此外,最新研究发现 Sanziguben 多糖(sanzuben polysaccharide, SZP)可通过稳定肠道微生物群、上调紧密连接蛋白表达水平、降低 LPS 水平以及抑制 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路的激活以改善炎症,并最终减轻 DN 小鼠的肾损伤^[17]。

2.2 氧化应激

氧化应激(oxidative stress, OS)是指体内氧化与抗氧化作用失衡的一种状态。当活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)与活性氮和抗氧

化防御系统之间的水平不能维持平衡,就会发生 OS 反应^[18]。氧化能力增强使多种炎性细胞浸润,蛋白酶分泌能力增加,导致足细胞损伤^[19]。研究表明,线粒体功能障碍可能导致 ROS 产生、生物发生受损、氧化应激增殖,并最终导致细胞死亡。其中肾功能损伤患者体内 ROS 比正常人群显著增高,且随着肾功能损伤发展的趋势呈正相关性^[20]。近来研究证明,Hcy 影响一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)/Akt 途径来改变细胞信号传导增加 OS 介导足细胞的损伤导致肾功能障碍^[21]。Hcy 诱导足细胞 OS 产生的 ROS 是 HHcy 导致肾损伤的重要机制。

2.3 内质网应激

蛋白稳态通过蛋白质翻译、折叠、运输和降解的协调调节来保护,对细胞健康和活力至关重要。内质网(endoplasmic reticulum, ER)作为一种特殊的细胞器,主要负责折叠和修饰分泌蛋白及整合膜蛋白,以维持蛋白质稳态,而其中未折叠蛋白是 ER 的重要指标蛋白^[22]。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)减慢蛋白质折叠,导致错误折叠和未折叠蛋白质的积累,激活细胞凋亡的途径;而未折叠蛋白在 ER 内滞留可以激活相关的细胞自噬通路,促进自噬小体的形成而造成组织损伤^[23-24]。研究表明 Hcy 诱导内皮功能障碍,损害内皮依赖性扩张,促进内皮炎症和血栓形成,发生 ERS^[25]。最新研究也证实了 HHcy 释放炎症介质,如核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、IL-1 β 和 IL-18,增加细胞内超氧阴离子的产生,降低细胞内一氧化氮水平,引起 ERS,这可以解释 Hcy 促进细胞损伤的许多过程^[26]。

2.4 DNA 去甲基化

DNA 甲基化是在胞嘧啶的 C5 位置上添加一个甲基基团,形成 5-甲基胞嘧啶,甲基胞嘧啶的形成通常发生在 CpG 位点上。已知 CpG 岛区域中包含基因的启动子和外显子^[27],如发生高甲基化时,启动子表达降低,微观层面上即基因沉默,引起染色质结构及 DNA 与蛋白质相互作用方式的改变,从而控制基因表达情况;宏观层面上则使细胞凋亡、焦亡损伤细胞甚至让细胞失去活性从而导致病理性改变。HHcy 介导细胞损伤与 DNA 低甲基化有一定相关性,研究发现,血液中

Hcy 的累积和 DNA 损伤修复被认为是足细胞中 DNA 甲基化改变的潜在原因^[28]。足细胞是终末分化的细胞,增殖能力很小或没有增殖能力;因此,Hcy 的积累和 DNA 甲基化变化对肾功能产生关键影响^[29]。GUAN 等^[30]的研究也表明 DNMT1 在 HBx 过表达的 HK-2 细胞和足细胞中上调,导致 PTEN 和 VDR 启动子高甲基化,进而使 PI3K/Akt/mTOR 和 NF- κ B 信号通路的激活,导致乙型肝炎病毒相关性肾小球肾炎的肾脏损伤。

3 表观遗传修饰的概念及主要调控方式

3.1 概念

表观遗传学是指细胞核在核苷酸序列没有改变的情况下,通过有丝分裂和减数分裂保持的基因表达状态而功能发生的可逆的、可遗传的改变^[31]。主要研究内容包括 DNA 的修饰(如甲基化修饰)、组蛋白的各种修饰以及非编码 RNA(ncRNA)等。其中任一过程的异常都将影响基因结构以及基因表达,导致某些复杂综合症、多因素疾病或癌症。

3.2 DNA 甲基化修饰

DNA 甲基化修饰作为一种基因沉默的机制,在器官和疾病的发展过程中发挥重要的作用。近来大量研究证实了启动子区 DNA 甲基化促进或抑制转录因子结合,从而激活或沉默基因转录,即 DNA 高甲基化时基因表达降低^[32]。DNA 甲基化可以募集甲基 CpG 结合蛋白,后者又募集抑制基因表达的组蛋白脱乙酰酶复合物。去甲基化则是用胞嘧啶取代 5-甲基胞嘧啶的过程,与 DNA 甲基化作用相反。随着全球面临巨大的挑战,CKD 患病率呈逐年升高的趋势,对肾功能损伤的遗传学研究也已从简单到复杂的探索递进,目前已确定 CKD 和 DNA 甲基化之间的关联,深入认识表观基因组,将有助于 CKD 的预防和治疗。

DNA 甲基化与高同型半胱氨酸血症介导的肾功能损伤。HHcy 作为 ESRD 进展的主要致病因素之一,Hcy 可直接作用于足细胞引起肾功能损伤^[33]。DNA 异常甲基化重要来源之一是蛋氨酸的活化,生成 S-腺苷甲硫氨酸(s-adenosylmethionine, SAM),而蛋氨酸是连接 Hcy 介导

细胞损伤与 DNA 异常甲基化过程的一个关键枢纽。研究表明, HHcy 存在时 S-腺苷 Hcy (s-adenosyl homocysteine, SAH) 催化下生成 SAM, 诱导肾小球功能障碍和硬化, 说明 DNA 低甲基化修饰促进 HHcy 的毒性作用。随着研究不断深入, 大量证据表明, DNA 低甲基化诱导 DNA 损伤和促进足细胞凋亡与 CKD、ESRD 的进展过程有着密切联系以及 DNA 异常甲基化表达参与了 HHcy 介导肾功能损伤的调控作用^[34]。最新研究发现, DNMT1 介导 miR-30a-5p 启动子高甲基化以抑制 miR-30a-5p 转录, 从而调节 FOXA1 表达促进 HHcy 介导肾小球足细胞凋亡^[35]。XIE 等^[36]的研究也表明 Hcy 在表观遗传学层面对肾损伤进行调控, Hcy 通过 c-Myc 募集 EZH2 和 DNMT1 表观遗传修饰因子到 miR-1929-5p 的启动子区以沉默 miR-1929-5p 的表达, 促进了 Hcy 诱导的足细胞凋亡。上述研究阐明了 DNA 甲基化修饰参与 HHcy 诱导 CKD 的发生, 调控足细胞凋亡引起慢性肾功能损伤的相关机制。

3.3 组蛋白的共价修饰

组蛋白是真核生物体细胞染色质中的一种碱性蛋白质, 和 DNA 共同组成核小体结构。而组蛋白修饰是指组蛋白在体内相关酶作用下发生甲基化、乙酰化、磷酸化等多种翻译后修饰的过程^[37]。最新研究发现, 组蛋白甲基化能够针对基因转录调控的表达, 导致细胞出现病理状态发挥了重要的作用, 而甲基化不改变组蛋白与 DNA 之间的联系, 但却改变基因正常表达情况, 导致异常发育和疾病的发生^[38]。

目前, 已经在多种慢性肾脏疾病中研究了组蛋白修饰的异常调控, 并且正在广泛研究组蛋白修饰的作用机制。在本文中, 我们简要总结概括了组蛋白转录后修饰在 HHcy 相关性介导的慢性肾功能损伤中的最新研究进展, 为 CKD 的日后研究工作提供一定的研究思路和理论基础。

组蛋白修饰与高同型半胱氨酸血症介导的肾功能损伤。近年来的研究开始关注调控组蛋白修饰的不同靶分子和基因在动物模型和临床试验中对 CKD 的治疗效果^[39]。研究表明, 炎症是连接着组蛋白修饰与高同型半胱氨酸血症的中间桥梁, 炎症也是肾脏病变的主要因素之一, 包括组蛋白的泛素化、甲基化等修饰引起的炎症

均可导致肾损伤, 与 Hcy 炎症因子介导的损伤存在一定协同性^[40]。已知 SAH 可抑制 EZH2 甲基化的修饰作用, 从而影响基因转录和蛋白质的合成^[41], 而 SAH 生成途径之一的是蛋氨酸活化, HHcy 又可诱导 SAH 生成 SAM, 这说明了 HHcy 介导肾功能受损与组蛋白甲基化有密切的相关性, 且共同介导 CKD 及 ESRD 的病理进展。

最近的研究也表明, 组蛋白修饰时引起炎症因子的大量释放也是 Hcy 介导肾功能损伤的机制之一, 炎症小体无疑是一个连接两者中心环节的桥梁, 提示组蛋白修饰与 HHcy 共同介导慢性肾功能损伤的发生存在一定可行性^[42]。随着组蛋白修饰在 HHcy 介导的慢性肾功能损伤的作用机制进一步被发现, 靶向调节组蛋白修饰相关基酶可能是治疗 CKD 的一个有效手段。

3.4 非编码 MicroRNA (miRNA) 调控

无论是 DNA 修饰还是组蛋白修饰, 都是基因活性调节的中间参与者, 而真正诱导基因活性改变的最大可能者是功能性非编码 RNA (ncRNA)。ncRNA 发挥功能的方式很多, 包括调控基因的激活和沉默, RNA 修饰和编辑, 蛋白质翻译等过程。MicroRNAs (miRNAs) 是一类长度约为 18~22 nt 的非编码单链 RNA 分子。通过互补碱基配对, miRNAs 与 mRNA 的 3' UTR 区或 5' UTR 区结合, 从而介导靶 mRNAs 降解或翻译^[43]。有趣的是, miRNAs 能够控制 DNA 甲基转移酶及组蛋白去乙酰化酶等表观遗传调节因子的表达^[44]; 同时 DNA 甲基化和组蛋白修饰也可以调节某些 miRNA 的表达。因此, 表观遗传修饰无论是经典修饰还是非经典修饰近似达到一个封闭循环共同调控细胞生理活动。

非编码 MicroRNA 调控与高同型半胱氨酸血症介导的肾功能损伤。在表观遗传机制中, ncRNA 对基因表达的调控是动态的。最近的研究揭示了肾损伤中铁死亡的 miRNA 调节因子^[45]。在顺铂诱导的 AKI 模型中, miR-214-3p 上调以抑制其靶基因 GPX4, 促进顺铂诱导的肾小管上皮细胞铁死亡。其次, 在 I/R 诱导的 AKI 模型中, miR-182-5p 和 miR-378a-3p 是上调的两种铁死亡调节因子, 分别负调控 GPX4 和 SLC7A11 诱导铁死亡, miR-182-5p 和 miR-378a-3p 抑制剂的递送减轻了 I/R 诱导的大鼠肾损伤, 表明敲低

AKI 中这些 miRNA 的治疗潜力^[46-47]。作为表观遗传机制的一部分,miRNA 也像其他蛋白质编码基因一样通过 DNA 甲基化和组蛋白修饰进行表观遗传调控^[48]。最新证据表明,miRNA 作为主要的表观遗传调节剂之一,能够通过破坏靶 mRNA 和/或抑制翻译调控基因的表达来影响 CKD 的生理和病理过程^[49]。LIU 等^[50]在糖尿病小鼠模型发现减少了 miR-483-5p 对 MAPK1 和 TIMP2 mRNA 的限制,促进肾间质纤维化的进展,提示 miRNA 治疗可以作为慢性肾功能损伤的另一种保护治疗策略。已知 miRNA 主要是通过特异性的与靶基因结合来抑制 mRNA 的转录,在肾脏疾病中扮演了重要的角色。此外,DNA 甲基化修饰与 miRNA 也存在相关性,在甲基化形成过程中 miRNA 参与调控了 DNMT3a、DNMT3b 的表达。研究显示 miRNA 介导的 NLRP3 基因表达通过结合 eNLRP3 基因的 3'-UTR 直接表观遗传调控,导致 NLRP3 基因表达下调并抑制 NLRP3 炎症小体激活的炎症反应和疾病^[51]。根据本文总结的 HHcy 中 DNA 高甲基化可促进 HHcy 的细胞毒性作用这一结论,结合目前 miRNA 又是调控 DNA 甲基化生成的关键环节结论,从侧面表明 miRNA 与 HHcy 介导的慢性肾功能损伤发生的可行性^[52]。

4 总结和展望

近年来,随着表观遗传学研究的不断深入,越来越多的证据表明表观遗传修饰在多种疾病的发生、发展及治疗中扮演着关键角色,尤其在肾脏疾病的研究中,表观遗传学的调控作用日益受到关注。课题组前期基于“Hcy 介导表观遗传修饰调控肾损伤”这一基础热点问题,通过建立体内 *Cbs*^{+/-} 小鼠高 Hcy 血症模型动物和体外 Hcy 诱导的细胞模型,开展了系列前瞻性研究,并取得了一定的研究成果^[53-56],增强了 Hcy 介导肾损伤发病机制及治疗策略的理解。然而,目前关于 HHcy 诱导肾损伤中表观遗传学机制的研究仍处于初步阶段,具体调控作用尚存诸多未解难题,尤其是在如何有效控制 Hcy 水平及靶向表观遗传修饰进行干预方面,仍需进一步探索。未来,深入研究表观遗传学在 HHcy 引发的肾功能损伤中的角色,不仅有助于揭示两者之间的复杂关

系,还将为 CKD 的早期预防、诊断和个性化治疗提供更加精准的靶点。结合表观遗传学与 HHcy 引发肾损伤机制,通过持续深入地探索,我们期待为改善患者预后、延缓肾功能衰竭的进程和提升临床干预效果提供新的解决方案与思路。

参考文献:

- [1] GOODBRED A J, LANGAN R C. Chronic kidney disease: prevention, diagnosis, and treatment [J]. Am Fam Physician, 2023, 108(6): 554-561.
- [2] MOURCHID R, YASSINE A, BELLAHCEN M, et al. Chronic kidney disease in America, Africa, and Asia: overview of treatment cost and options [J]. Ann Pharm Fr, 2024, 82(3): 392-400.
- [3] LIU M, ZHANG Y, ZHAN P, et al. Histone deacetylase 9 exacerbates podocyte injury in hyperhomocysteinemia through epigenetic repression of Klotho [J]. Pharmacol Res, 2023, 198: 107009.
- [4] JIANG J, WEN C, LI Y, et al. IFC-305 attenuates renal ischemia-reperfusion injury by promoting the production of hydrogen sulfide (H₂S) via suppressing the promoter methylation of cystathionine γ -lyase (CSE) [J]. Bioengineered, 2022, 13(5): 12045-12054.
- [5] YAN Y, LIU H, ABEDINI A, et al. Unraveling the epigenetic code: human kidney DNA methylation and chromatin dynamics in renal disease development [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 873.
- [6] WU D F, YIN R X, DENG J L. Homocysteine, hyperhomocysteinemia, and H-type hypertension [J]. Eur J Prev Cardiol, 2024, 31(9): 1092-1103.
- [7] SHI J, CHEN D, WANG Z, et al. Homocysteine induces ferroptosis in endothelial cells through the systemXc-/GPX4 signaling pathway [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2023, 23(1): 316.
- [8] GONZÁLEZ-LAMUÑO D, ARRIETA-BLANCO F J, FUENTES E D, et al. Hyperhomocysteinemia in adult patients: a treatable metabolic condition [J]. Nutrients, 2023, 16(1): 135.
- [9] GAO N, ZHANG Y, LI L, et al. Hyperhomocysteinemia-induced oxidative stress aggravates renal damage in hypertensive rats [J]. Am J Hypertens, 2020, 33(12): 1127-1135.
- [10] 张宏红, 谢琳, 盛思琪, 等. FoxO1 在同型半胱氨酸诱导的肾脏足细胞损伤及凋亡中的作用研究 [J]. 天津医药, 2022, 50(1): 53-58.
ZHANG H H, XIE L, SHENG S Q, et al. The role of FoxO1 in renal podocyte injury and apoptosis induced by homocysteine [J]. Tianjin Med J, 2022, 50(1): 53-58.

- [11] LI Z R, LIU C F, GUO D Q, et al. Association between serum homocysteine and postoperative acute kidney injury in patients undergoing cardiac surgery [J]. *Biomark Med*, 2024, 18(2): 51–57.
- [12] ZHANG M, YUAN J, DONG R, et al. Hyperhomocysteinemia exacerbates ischemia-reperfusion injury-induced acute kidney injury by mediating oxidative stress, DNA damage, JNK pathway, and apoptosis [J]. *Open Life Sci*, 2021, 16(1): 537–543.
- [13] ZHANG H, LIAO J, JIN L, et al. NLRP3 inflammasome involves in the pathophysiology of sepsis-induced myocardial dysfunction by multiple mechanisms [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 167: 115497.
- [14] KIM H J, KIM H, LEE J H, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4): new insight immune and aging [J]. *Immun Ageing*, 2023, 20(1): 67.
- [15] FU J, WU H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation [J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 301–316.
- [16] YANG M, WANG X, HAN Y, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in diabetic nephropathy [J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(42): 8810–8824.
- [17] WANG F, LIU C, REN L, et al. Sanziguben polysaccharides improve diabetic nephropathy in mice by regulating gut microbiota to inhibit the TLR4/NF- κ B/NLRP3 signalling pathway [J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 427–436.
- [18] YOSHIKAWA T, YOU F. Oxidative stress and bio-regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(6): 3360.
- [19] HAJAM Y A, RANI R, GANIE S Y, et al. Oxidative stress in human pathology and aging: molecular mechanisms and perspectives [J]. *Cells*, 2022, 11(3): 552.
- [20] CHANG L Y, CHAO Y L, CHIU C C, et al. Mitochondrial signaling, the mechanisms of AKI-to-CKD transition and potential treatment targets [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(3): 1518.
- [21] SHARMA G S, BHATTACHARYA R, SINGH L R. Functional inhibition of redox regulated heme proteins: A novel mechanism towards oxidative stress induced by homocysteine [J]. *Redox Biol*, 2021, 46: 102080.
- [22] HEMAGIRRI M, CHEN Y, GOPINATH S C B, et al. Crosstalk between protein misfolding and endoplasmic reticulum stress during ageing and their role in age-related disorders [J]. *Biochimie*, 2024, 221: 159–181.
- [23] CHEN Z, ZHANG S L. Endoplasmic reticulum stress: a key regulator of cardiovascular disease [J]. *DNA Cell Biol*, 2023, 42(6): 322–335.
- [24] CHEN X, SHI C, HE M, et al. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 352.
- [25] JIANG S, XU W, CHEN Z, et al. Hydrogen sulphide reduces hyperhomocysteinemia-induced endothelial ER stress by sulfhydrating protein disulphide isomerase to attenuate atherosclerosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(7): 3437–3448.
- [26] CHENG C K, LUO J Y, LAU C W, et al. A GLP-1 analog lowers ER stress and enhances protein folding to ameliorate homocysteine-induced endothelial dysfunction [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(10): 1598–1609.
- [27] TOMPKINS J D. Transgenerational epigenetic DNA methylation editing and human disease [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(12): 1684.
- [28] WANG S D, WANG X, ZHAO Y, et al. Homocysteine-induced disturbances in DNA methylation contribute to development of stress-associated cognitive decline in rats [J]. *Neurosci Bull*, 2022, 38(8): 887–900.
- [29] NAKAMICHI R, HISHIKAWA A, CHIKUMA S, et al. DNA-damaged podocyte-CD8 T cell crosstalk exacerbates kidney injury by altering DNA methylation [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(4): 112302.
- [30] GUAN H, ZHU N, TANG G, et al. DNA methyltransferase 1 knockdown reverses PTEN and VDR by mediating demethylation of promoter and protects against renal injuries in hepatitis B virus-associated glomerulonephritis [J]. *Cell Biosci*, 2022, 12(1): 98.
- [31] WU C, DUAN X, WANG X, et al. Advances in the role of epigenetics in homocysteine-related diseases [J]. *Epigenomics*, 2023, 15(15): 769–795.
- [32] DAVALOS V, ESTELLER M. Cancer epigenetics in clinical practice [J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(4): 376–424.
- [33] ALSOLAMI A A, ALMALKI A A, ALHEDYAN S Y, et al. Plasma homocysteine levels and cardiovascular events in patients with end-stage renal disease: a systematic review [J]. *Cureus*, 2023, 15(6): e40357.
- [34] ZHAO Y, FAN X, WANG Q, et al. ROS promote hypermethylation of NDRG2 promoters in a DNMT5-dependent manner: Contributes to the progression of renal fibrosis [J]. *Redox Biol*, 2023, 62: 102674.
- [35] DING N, XIE L, MA F, et al. miR-30a-5p promotes glomerular podocyte apoptosis via DNMT1-mediated hypermethylation under hyperhomocysteinemia [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2022, 54(1): 126–136.
- [36] XIE L, MA S, DING N, et al. Homocysteine induces podocyte apoptosis by regulating miR-1929-5p expression through c-Myc, DNMT1 and EZH2 [J]. *Mol Oncol*, 2021, 15(11): 3203–3221.
- [37] HE W, LI Q, LI X. Acetyl-CoA regulates lipid metabolism and histone acetylation modification in cancer [J]. *Biochim*

- Biophys Acta Rev Cancer, 2023, 1878(1): 188837.
- [38] MAN C H, LAM W, DANG C C, et al. Inhibition of PLK4 remodels histone methylation and activates the immune response via the cGAS-STING pathway in TP53-mutated AML [J]. Blood, 2023, 142(23): 2002–2015.
- [39] CHAO C T, KUO F C, LIN S H. Epigenetically regulated inflammation in vascular senescence and renal progression of chronic kidney disease [J]. Semin Cell Dev Biol, 2024, 154(Pt C): 305–315.
- [40] MAN E, EVRAN S. Deacetylation of histones and non-histone proteins in inflammatory diseases and cancer therapeutic potential of histone deacetylase inhibitors [J]. Curr Genomics, 2023, 24(3): 136–145.
- [41] JIANG Y, XIANG C, ZHONG F, et al. Histone H3K27 methyltransferase EZH2 and demethylase JMJD3 regulate hepatic stellate cells activation and liver fibrosis [J]. Theranostics, 2021, 11(1): 361–378.
- [42] ZHANG L, CHAI R, TAI Z, et al. Noval advance of histone modification in inflammatory skin diseases and related treatment methods [J]. Front Immunol, 2024, 14: 1286776.
- [43] SHANG R, LEE S, SENAVIRATHNE G, et al. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation [J]. Nat Rev Genet, 2023, 24(12): 816–833.
- [44] YADAV P, BANDYOPADHAYAYA S, FORD B M, et al. Interplay between DNA methyltransferase 1 and microRNAs during tumorigenesis [J]. Curr Drug Targets, 2021, 22(10): 1129–1148.
- [45] YANG M, LUO H, YI X, et al. The epigenetic regulatory mechanisms of ferroptosis and its implications for biological processes and diseases [J]. MedComm, 2023, 4(3): e267.
- [46] JIN S, LIU P S, ZHENG D, et al. The interplay of miRNAs and ferroptosis in diseases related to iron overload [J]. Apoptosis, 2024, 29(1): 45–65.
- [47] SABET SARVESTANI F, AFSHARI A, AZARPIRA N. The role of non-protein-coding RNAs in ischemic acute kidney injury [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1230742.
- [48] NAG S, MITRA O, TRIPATHI G, et al. Exploring the theranostic potentials of miRNA and epigenetic networks in autoimmune diseases; a comprehensive review [J]. Immun Inflamm Dis, 2023, 11(12): e1121.
- [49] SHELKE V, KALE A, SANKRITYAYAN H, et al. Long non-coding RNAs as emerging regulators of miRNAs and epigenetics in diabetes-related chronic kidney disease [J]. Arch Physiol Biochem, 2024, 130(2): 230–241.
- [50] LIU D, LIU F, LI Z, et al. HNRNPA1-mediated exosomal sorting of miR-483-5p out of renal tubular epithelial cells promotes the progression of diabetic nephropathy-induced renal interstitial fibrosis [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(3): 255.
- [51] YI Y S. microRNA-mediated epigenetic regulation of inflammasomes in inflammatory responses and immunopathologies [J]. Semin Cell Dev Biol, 2024, 154: 227–238.
- [52] BRAVO-VÁZQUEZ L A, PAUL S, COLÍN-JURADO M G, et al. Exploring the therapeutic significance of microRNAs and lncRNAs in kidney diseases [J]. Genes (Basel), 2024, 15(1): 123.
- [53] 揭育祯, 丁宁, 谢琳, 等. 同型半胱氨酸上调 miR-488-3p 表达诱导 MPC-5 小鼠肾小球足细胞凋亡 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2022, 38(9): 801–806.
- JIE Y Z, DING N, XIE L, et al. Homocysteine induces glomerular podocyte apoptosis via up-regulation of miR-488-3p expression in MPC-5 mice [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2022, 38(9): 801–806.
- [54] 李小琴, 汪乐新, 马小军, 等. 高同型半胱氨酸经 TRPC6/NF-κB 诱导肾小球足细胞铁死亡的机制 [J]. 实用医学杂志, 2024, 40(2): 174–181.
- LI X Q, WANG L X, MA X J, et al. Mechanism of iron death induced by high homocysteine via TRPC6/NF-κB in glomerular podocytes [J]. J Pract Med, 2024, 40(2): 174–181.
- [55] 张正皓, 马芳, 张晴, 等. lncRNA SNHG1 在同型半胱氨酸致足细胞焦亡中的作用 [J]. 实用医学杂志, 2024, 40(4): 476–482.
- ZHANG Z H, MA F, ZHANG Q, et al. Effect of lncRNA SNHG1 on homocysteine-induced podocytes pyroptosis [J]. J Pract Med, 2024, 40(4): 476–482.
- [56] 卢冠军, 汪乐新, 赵静, 等. 瞬时感受电位通道 6 在同型半胱氨酸诱导的小鼠肾脏足细胞自噬中的作用 [J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(12): 1400–1407.
- LU G J, WANG L X, ZHAO J, et al. Role of transient receptor potential channel 6 in homocysteine-induced podocyte autophagy of mouse kidney [J]. Med J Chin People's Liberation Army, 2024, 49(12): 1400–1407.

[收稿日期] 2024-05-14

范清华,周珂青,吴晓燕,等. 肉桂防治中枢神经系统疾病作用机制实验研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(5): 102-113.

Fan QH, Zhou KQ, Wu XY, et al. Progress in experimental research on the mechanism of action of cinnamon in central nervous system diseases [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(5): 102-113.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.05.011

肉桂防治中枢神经系统疾病作用机制实验研究进展

范清华¹, 周珂青¹, 吴晓燕¹, 伍叙州¹, 胡跃强^{2*}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530001; 2. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023)

【摘要】 肉桂(*Cinnamomum cassia* Presl)属樟科常绿乔木植物,以其树皮入药,其主要含有挥发油、多酚类、多糖类、黄酮类、萜烯醇类等化学成分,具有抑制神经炎症反应、氧化应激、神经细胞凋亡,神经保护以及改善脑缺血再灌注等作用。随着现代医学的进步,发现该药在防治中枢神经系统疾病(central nervous system diseases, CNSD)方面具有独特的优势,肉桂及其制剂已广泛应用于阿尔茨海默病和帕金森病等神经退行性疾病的治疗,因此,肉桂治疗 CNSD 成为热点研究方向之一。目前,肉桂在神经系统中的作用机制尚未有全面的概括与总结,因此,本文通过总结近年来国内外肉桂治疗 CNSD 实验研究进展进行归纳,为肉桂的临床研究及开发利用提供循证医学证据。

【关键词】 肉桂;中枢神经系统疾病;作用机制;活性成分;实验研究

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 05-0102-12

Progress in experimental research on the mechanism of action of cinnamon in central nervous system diseases

FAN Qinghua¹, ZHOU Keping¹, WU Xiaoyan¹, WU Xuzhou¹, HU Yueqiang^{2*}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China.

2. the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023)

【Abstract】 *Cinnamomum cassia* Presl belongs to the camphor family of evergreen trees, and its bark is used as a medicine. It contains volatile oils, polyphenols, polysaccharides, flavonoids, flavanols, and other chemical constituents that can inhibit the neuroinflammatory response, oxidative stress, and neuronal apoptosis, and provide neuroprotection, as well as improving cerebral ischemia-reperfusion. Progress in modern medicine has demonstrated that cinnamon has unique advantages in terms of the prevention and treatment of central nervous system diseases (CNSD), and cinnamon and its preparations have been widely used to treat neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. The role of cinnamon for the treatment of CNSD has thus become a hot research topic; however, its mechanism of action in the nervous system has not been comprehensively outlined and

【基金项目】 国家中医药管理局高水平重点学科-中医内科(ZYYZDXK-2023166);广西中医药大学“歧黄工程”高层次人才团队(202410);广西中医药重点学科建设项目(GZXK-Z-20-13)。

【作者简介】 范清华(2000—),女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治缺血性中风的基础与临床研究。

E-mail:595913369@qq.com

【通信作者】 胡跃强(1973—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:中医药防治缺血性脑血管疾病。E-mail:137463195@qq.com

summarized. This review therefore summarizes the progress in experimental research worldwide, regarding the use of cinnamon to treat CNSD, to provide an evidence base for clinical research and to develop the use of cinnamon.

【Keywords】 cinnamon; central nervous system disorders; mechanism of action; active ingredient; experimental research

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

肉桂是樟科常绿乔木植物肉桂(*Cinnamomum cassia* Presl)的干燥树皮,主要分布在广东、广西、福建等省区的热带及亚热带地区。肉桂始载于《神农本草经》,其性味辛甘,大热^[1],在《日华子本草》中记载其具有通九窍、益精、益火消阴、温补命门之功^[2]。肉桂的化学成分目前分离鉴定出 160 多种^[3],其主要由挥发性和非挥发性两个部分组成,以肉桂醛(Cinnamaldehyde, CA)、乙酸肉桂酯^[3]、邻甲氧基肉桂醛等为主的挥发性成分和肉桂多酚类、肉桂多糖类、肉桂黄酮类及其他成分在内的非挥发性成分^[4]。

最新研究表明,肉桂可通过多靶点及多通路对神经炎、动脉粥样硬化^[5]、胃溃疡^[6]、糖尿病^[7]等疾病发挥出抗氧化、神经保护等功效^[4]。目前肉桂及其制剂已广泛应用于阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)和帕金森病(Parkinson's disease, PD)^[8]等神经退行性疾病^[9]的治疗,且疗效显著,现将肉桂及其制剂治

疗中枢神经系统相关疾病的实验研究做一综述,以探讨其防治 CNSD 的作用机制。

1 肉桂在中枢神经系统疾病中的应用及作用机制

CNSD 是一类全球发病率极高的疾病,包括缺血性脑卒中(cerebral ischemic stroke, IS)、AD、PD、情绪障碍、脊髓障碍等疾病^[10],严重影响患者的生活和工作,给家庭和社会带来沉重的经济负担^[11]。故需对 CNSD 引起高度重视,防治此类疾病刻不容缓。研究表明,肉桂及其化学成分具有抗神经炎症、神经保护、抗氧化、抑制神经细胞凋亡、改善认知障碍、抗焦虑抑郁等作用,其通过多样化的生物途径及通路协同作用,发挥治疗 CNSD 的作用,如图 1 所示。

1.1 AD

AD 是以进行性认知、记忆障碍为主要临床表现神经退行性疾病^[11]。AD 的典型病理特征



图 1 肉桂在中枢神经系统疾病中的作用及机制

Figure 1 Role and mechanism of cinnamon in central nervous system diseases

是 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, $A\beta$) 沉积形成的老年斑和由 tau 蛋白质过度磷酸化后形成的神经纤维缠结 (neurofibrillary tangle, NFT) 所致细胞内扭曲纤维^[12]。另外,炎症反应^[13]和氧化应激^[14]作用对神经细胞结构和功能的改变也有所影响。

肉桂活性成分通过抑制 $A\beta$ 形成与沉积、降低乙酰胆碱酯酶活性、防止 tau 蛋白过度磷酸化、抑制炎症信号通路、减少炎症因子产生、抗氧化应激,营养神经以及改善线粒体功能障碍等多途径对 AD 的治疗发挥神经保护作用。

1.1.1 抗 $A\beta$ 形成与沉积

肉桂提取物 (Cortex cinnamomum extract, CE) 可有效抑制有毒 $A\beta$ 寡聚物的产生和斑块形成,进而防止 $A\beta$ 对神经元 PC12 细胞的毒性作用^[15]。CE 中 CA、黄烷醇和原花青素,可减少 SH-SY5Y 细胞系中 $A\beta$ 的聚集,并抑制 $A\beta$ 诱导的神经毒性^[16]。CE 含有的苯丙类化合物可使稳定表达淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 的中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamsters ovary, CHO) 中 β 分泌酶 (β -secretase) 和 β -secretase 切割产生的片段 (soluble β amyloid precursor protein, sAPP β) 的含量降低,从而有效降低 $A\beta_{40}$ 的产生。根据开柱色谱法和高效液相色谱法可引导分离出以下 6 种苯丙类化合物:丁香树脂醇、中间树脂醇、香豆素、2'-羟基肉桂醛 (2-hydroxycinnamaldehyde, HCA)、cryptamygin A、3',5,7-三甲氧基表儿茶素^[17]。

$A\beta$ 在某些自然条件下转化为不溶性聚集体,这类由于蛋白质错误折叠所形成的聚集体,在细胞外积累并形成细胞内包涵体时,也被称为淀粉样原纤维或斑块^[18]。在 CE 对鸡卵蛋白溶菌酶 (Hen egg white lysozyme, HEWL) 颤动抑制作用的体外研究中,发现 CE 的芳香族小分子可以直接插入早期聚集体的淀粉化核中,通过破坏 π - π 相互作用抑制淀粉样纤维形成^[19]。

1.1.2 抑制乙酰胆碱酯酶活性

AD 的发病机制尚不清楚,目前有研究认为其发病与乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 的水解密切相关。乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 可以快速水解突触前膜的 ACh,使神经递质对突触后膜的兴奋作用下降,导致 AD 的认知障碍^[20]。同时,也有研究认为 AChE 在淀粉样斑

块形成的过程中起到关键作用,可促进毒性 $A\beta$ 的合成、沉积和聚集^[21]。因此,抑制 AChE 可以延迟 ACh 的水解来改善脑区胆碱能功能和降低 $A\beta$ 沉积,这是治疗 AD 的关键策略之一。

在谷氨酸钠诱导下的非转基因 AD 大鼠模型 (non-transgenic rat model of AD, NTAD) 的生命早期阶段给予 CE,发现其更适用于预防治疗,因为它能增加磷酸化糖原合酶激酶-3 β (phosphorylated glycogen synthase kinase-3 β , pGSK3 β),抑制 AChE 活性,增加海马区域的神经元数量^[22]。其中,pGSK3 β 是胆碱代谢的关键因素^[23]。有研究发现肉桂精油可有效地在体外抑制 AChE 和丁酰胆碱酯酶 (butyrylcholinesterase, BChE) 的活性,表明其具有治疗 AD 患者的潜力^[24]。

1.1.3 抗 tau 蛋白过度磷酸化

在甲醛诱导的大鼠模型实验中,CE 可显著改善大鼠的 Morris 水迷宫表现,通过降低高度磷酸化的 tau 蛋白 (p-tau)、蛋白酶 Caspase-8、白细胞介素 IL-6 和肿瘤坏死因子 TNF- α 的水平,从而改善认知能力^[25]。CA 和表儿茶素通过与 Tau187 半胱氨酸相互作用,抑制 Tau187 淀粉样蛋白形成,以促使神经纤维缠结解离;同时,通过抗氧化作用以保护 tau 蛋白免受活性氧物质刺激,降低缠结产生,从而降低 $A\beta$ 沉积^[12]。

1.1.4 抗神经炎症反应

神经炎症可能是 AD 发病的重要组成部分^[26]。常见炎症通路主要有核因子- κ B (Nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路和丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 信号通路,它们可启动和调节几个炎症过程的表达^[5]。小胶质细胞可介导神经细胞的炎症反应,激活后产生大量的炎症因子 (如 TNF- α 、IL-6、IL-8 等)、趋化因子、神经调节素等,这不仅对血脑屏障产生了破坏作用,还会加剧多巴胺能神经元的退行性变性、缺失甚至坏死^[27]。

在 Morris 水迷宫物体识别测试和矿场测试下发现,反式肉桂醛 (Trans-Cinnamaldehyde, TCA) 可明显提高脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导下神经炎症模型小鼠的空间学习和记忆能力。TCA 通过激活核因子红细胞 2 相关因子 2 (Nrf2),恢复海马中下游抗超氧化物歧化酶

(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)的水平,同时降低海马 IL-1 β 、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和 Caspase-3 的表达,从而发挥抗氧化应激、抑制神经炎症作用^[28]。在 LPS 诱导下小鼠小胶质细胞(BV-2)体外实验中,TCA 可通过抑制细胞外信号调节激酶通路 MEK1/2-ERK1/2,缩短诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS) mRNA 的半衰期,阻断 iNOS 表达,减少一氧化氮(nitric oxide, NO)生成,从而减少神经炎症发生^[5]。TCA 也可通过阻断 NF- κ B 信号通路,来抑制 LPS 诱导的 NO 产生和 iNOS、IL-1 β 等促炎因子的表达,以减弱小胶质细胞活化,从而防止神经炎症诱导的神经元损伤^[29]。有研究发现,HCA 可通过靶向 LRP1 抑制 ERK、JNK、p38 MAPK 和 NF- κ B 信号通路活化,降低促炎因子表达^[9]。

1.1.5 抗氧化应激、营养神经

肉桂粉溶剂通过提高 D-半乳糖(D-galactose, D-gal)诱导的 AD 大鼠海马组织中 SOD 和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性,降低 MDA 含量,改善大鼠学习记忆能力^[29]。肉桂中苯甲酸钠(sodium benzoate, NaB)通过抑制 D-氨基酸氧化酶(D-amino acid oxidase, DAAO)的活性,改善轻度 AD 患者的认知功能和整体功能^[30]。肉桂粉溶剂及代谢产物 NaB 通过抑制 5XFAD 转基因小鼠海马体中激活激酶 P21^{rac} 的活化,降低同型半胱氨酸和谷胱甘肽水平,以改善小鼠的记忆和学习能力;NaB 可减少活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,抑制海马体中 A β 的沉积^[31]。同时,肉桂粉溶剂及代谢产物 NaB 通过作用于 PKA-CREB 信号通路,上调脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和神经营养蛋白-3(neurotrophin-3, NT-3)的水平,体现了 NaB 对神经细胞的营养特性^[32]。

1.1.6 改善线粒体功能障碍、抗细胞凋亡

有研究表明,CA 可通过维持线粒体正常形态、抑制 A β 沉积后诱导的线粒体毒素反应、维持线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)和降低 ROS 产生,改善线粒体功能障碍,从而延缓 AD 病程进展^[32]。CA 通过抑制 Drp1 蛋白表达来维持线粒体功能正常,同时也能抑制

A β 的寡聚化,降低其细胞毒性^[33]。半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶(Caspase)是一类与凋亡密切相关的蛋白水解酶家族,必须通过自身活化或相互激活,经过裂解和重新组装,形成活性复合物才能启动凋亡程序^[34]。其中,线粒体途径(Caspase-9)是导致 AD 细胞凋亡的主要途径之一。CA 可减轻神经细胞活力丧失,稳定 MMP,减少 ROS 和细胞色素 c 的含量的作用,此外,可通过抑制 Caspase-9 和-3 的活性和促凋亡蛋白 Bax 的表达,增加抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达,并降低细胞自噬标志物 LC3-II/LC3-I 比值对受损神经细胞可起到抗细胞凋亡作用^[35]。

1.2 IS

IS 又称脑梗死,是临床最常见的脑血管疾病。IS 通常由动脉闭塞引起,具有高发病率、病死率和致残率的特点^[36],会导致一系列生理和病理过程,包括氧化应激、细胞凋亡和炎症等,对神经细胞造成不可逆的损伤^[37]。

肉桂及其活性成分通过作用于包括经典的 NF- κ B 信号通路在内的多通路来起到抗神经炎症,抑制氧化应激、减轻细胞肿胀、改善线粒体功能障碍,同时提高 SOD 活性、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和 BDNF 表达来发挥治疗作用,对恢复 IS 大脑的正常功能、保护血脑屏障、减轻脑梗死引起的组织损伤和功能障碍。

1.2.1 抗神经炎症反应

动脉粥样硬化引起颈动脉和颅内动脉狭窄是 IS 发病因素之一,同时动脉粥样硬化也是一种慢性炎症性疾病。目前炎症在 IS 机制中的相对作用尚未清楚,多项研究表明抗炎疗法可降低血管风险,包括脑梗死、冠状动脉疾病^[38]。实验发现,CA 能够明显降低 Toll 样受体 4(Toll like receptors 4, TLR4)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TNF receptor-associated factor 6, TRAF6)和 NF- κ B 信号通路的活化,从而降低 TNF- α 、IL-1 β 、趋化因子配体 2(chemokine(C-C motif) ligand 2, CCL2)和内皮细胞白细胞黏附分子-1(ELAM-1)的水平,通过抗炎来改善永久性脑缺血^[39]。TCA 通过降低缺血再灌注(middle cerebral artery occlusion, MCAO)诱导脑损伤小鼠中 iNOS 和环氧化酶(Cyclooxygenase-2, COX-2)蛋白表达,可显著减少脑组织梗塞面积^[40]。该研究进一步验

证实验发现,TCA 可抑制 LPS 诱导的小胶质细胞中 NO 产生,降低 iNOS 和 COX-2 蛋白表达。此外,TCA 还可抑制 NF- κ B 信号通路中 p65 和 p50 的核转位来降低肿瘤坏死因子相关核酸 TNF- α mRNA 表达,增加 IkB α ^[40]。IkB α 通过与 NF- κ B 结合,阻止其进入细胞核,从而抑制 NF- κ B 的转录活性^[41]。

1.2.2 抗氧化应激

肉桂水提液通过增加 SOD 活性、提高 NGF 和 BDNF 表达,降低 MDA 含量,对脑组织起到抗氧化应激和改善神经因子表达的作用,对慢性脑缺血大鼠起保护作用^[42]。亦有研究发现,肉桂水提液,通过抑制羟自由基(hydroxyl radical, OH)的生成和提高 GSH-Px 的活性具有抗氧化作用,可修复脑缺血再灌注后损伤,并预防性降低自由基代谢后损伤^[43]。肉桂中槲皮素可降低 ROS 含量,并诱导核转录因子红系 2 相关因子 2/血红素加氧酶-1(nuclear factor erythroid -2-related factor2 / heme oxygenase 1, Nrf2/HO-1)信号通路表达,从而调控抗氧化蛋白的表达,维持细胞内的氧化还原平衡^[44]。

1.2.3 减轻细胞肿胀、改善线粒体功能障碍

星形胶质细胞肿胀是一种细胞源性水肿,多发生于脑缺血,与血管源性水肿共同导致脑水肿。在缺血性损伤中,线粒体功能障碍导致细胞肿胀^[45],原理多与线粒体通透性转变(mPT)导致内膜电位去极化有关。肉桂多酚提取物(cinnamon polyphenol extract, CPE),通过抑制 mPT 以实现减少细胞肿胀,并降低线粒体内膜电位 DeltaPsi (m) 来保护氧糖剥夺(oxygen and glucose deprivation, OGD)后神经细胞的线粒体生物能,从而改善脑缺血^[46]。此外,肉桂有效成分中的原花青素 A 型三聚体,通过降低神经细胞自由基、细胞内钙([Ca²⁺]_i)含量,改善线粒体功能障碍和减少谷氨酸(glutamate, Glu)摄取^[47]。

1.3 PD

PD 是第二大常见神经退行性疾病,临床表现为姿势和步态异常、运动迟缓、静止性震颤等^[11],其特征是黑质(substantia nigra, SN)致密部的多巴胺能神经元显著减少,致使 SN-纹状体通路受损,并且残存神经细胞内出现嗜酸性包涵体,即路易小体^[8]。PD 的发病机制尚未明确,

可能与线粒体功能障碍、氧化应激、细胞凋亡和炎症等有关^[48]。

酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)是一种儿茶酚胺合成的限速酶,可作为中脑神经元的标志物。 α -突触核蛋白(α -Syn)是多种神经系统疾病胞质包涵体的组成结构之一,在神经细胞的突触释放多巴胺(dopamine, DA)的过程中起关键作用^[32]。其一般具有维护突触传递神经冲动、参与调节多巴胺合成和保护神经细胞的功能。但是在外界损伤的条件下, α -Syn 聚集成神经细胞中的原纤维,损害神经细胞。对过表达 α -Syn 基因 PD 黑腹果蝇进行体内实验发现,CE 可以减少脑内 α -Syn 积累,具有抑制 α -Syn 原纤维形成和聚集作用^[8]。CA 通过增加 SN 内 TH 的含量和降低 α -Syn 的过表达,从而减轻多巴胺能神经元损伤,对 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶盐酸盐(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)诱导的亚急性帕金森病模型小鼠具有神经保护作用^[49]。在利血平诱导的 PD 大鼠模型中,CA 可使大鼠黑质中多巴胺受体 D1(dopamine receptor D1, DRD1)阳性表达面积占比增多, α -Syn 水平下调,TH 的表达上调,且脑中 DA、3,4-二羟基苯乙酸(3,4-dihydroxyphenethylamine, DOPAC)和高香草酸(Homovanillic acid, HVA)神经递质水平上调^[50]。

现代研究表明,星形胶质细胞中 PD 相关有益蛋白 Parkin 和 DJ-1 的上调和/或维持对 PD 具有治疗效果。肉桂及其代谢产物 NaB 在 MPTP 诱导的 PD 小鼠模型中发挥神经保护作用,通过抑制 iNOS 保护激活的星形胶质细胞中的 Parkin/DJ-1,使 DJ-1 和 Parkin 水平上调。此外,肉桂和 NaB 改善了运动表现,可使 PD 小鼠模型的 SN 和纹状体中的多巴胺水平恢复正常化^[51]。肉桂总黄酮通过抑制神经细胞 DNA 损伤,降低 Caspase-9 表达及 MDA 含量,升高 SOD 及对 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)活性对神经细胞具有抗氧化应激、保护线粒体、减少细胞凋亡作用^[52]。

综上,肉桂中的活性成分对 PD 可以起到神经保护作用,通过抑制 α -Syn 异常聚集、抗氧化应激、细胞凋亡、保护线粒体,从而改善 PD 行为学障碍,起到治疗作用。同时,肉桂醛与已被临床

应用于治疗 PD 的首选药物美多芭具有相似的抗帕金森病作用^[50]。这表明肉桂在抗帕金森病方面具有一定的潜力,有望成为治疗 PD 的新药。

1.4 焦虑症和抑郁症

焦虑症是最常见的精神障碍之一,大多数焦虑亚型的一线药物是选择性血清素再摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI),包括帕罗西汀、舍曲林等。然而,长期服用 SSRI 会带来各种不良反应^[53]并且存在起效延迟和快速耐受的不足。抑郁症是一种广泛存在的精神疾病,以情绪低落、思维迟缓和自主活动减少为特征。由于发病机制复杂且常伴随其他慢性疾病,抑郁症在治疗上有起效难、病情反复和药物依赖的缺点^[54]。

肉桂及其活性成分通过调节杏仁核功能、抑制炎症通路相关作用、减少炎症因子表达、提高 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)水平,调节海马区神经元死亡和神经炎症相关基因表达来起到缓解焦虑抑郁的作用。最新研究表明,对睡眠不足模型大鼠的杏仁核(Amygdala, CeA)内注射 CA,通过记录和观察小鼠直立试验、排便情况、伤害性行为,以及焦虑测试,得出 CA 可缓解 CeA 和腹侧前扣带皮层(Ventral anterior cingulate cortex, vACC)之间的功能障碍,减少负性情绪,从而改善急性疼痛和焦虑感^[55]。TCA 对慢性不可预知应激模型(Chronic unpredictable mild stress model, CUMS)小鼠可通过抑制前额皮质和海马中的 NF- κ B 通路和 NLRP3 炎症小体的激活,使 TLR4、P50、P-P65、TNF- α 、NLRP3、调节细胞焦亡蛋白 ASC、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 减少^[54]。在强迫游泳实验中,经 TCA 处理后小鼠不动时间显著减少,表明 TCA 具有改善抑郁行为作用;进一步研究发现,TCA 可提高海马中 5-HT 水平,并降低 Glu/ γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)比值、COX-2、瞬时受体电位香草酸亚型 1 (Transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)和大麻素受体 1(Cannabinoid 1 receptor, CB1)的含量^[56]。研究发现,吸入肉桂精油(Cinnamon essential oil, CIEO)可使海马体中的 17 个基因下调,15 个基因上调,其中 DCC、EG2 和 FOS 是参与焦虑相关生物过程和途径的最重要的基因,包括神经元死亡和神经炎症的调节,具有缓解焦虑作

用^[49]。肉桂油固体自微乳可改善海马损伤,通过提高 5-HT、NE 和 DA 的含量,降低炎症因子表达^[57]。

2 肉桂与其他中药配伍在中枢神经系统疾病中的应用

王月儿等^[58]发现“肉桂-黄连”可调节 PI3K、AKT、mTOR、4EBP1 蛋白表达水平,从而调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,发挥抗抑郁作用。最新研究发现,由肉桂、黄连组成的交泰丸通过调控下丘脑-垂体-肾上腺轴的反馈及负反馈平衡,降低 IL-1 β 和 TNF- α 表达,来缓解大鼠的失眠症状^[59]。交泰丸通过降低 APP^{swe}/PS1dE9 双转基因小鼠脑组织内氧化应激水平,激活 PI3K/AKT 信号通路,从而改善记忆障碍^[60]。翟振威^[61]发现交泰丸,通过 AKT1、TP53、IL6 以及 TNF 等核心靶点来调控内源性褪黑素,同时可提高 5-HT、五羟吲哚乙酸、DA、Glu 和乙酰胆碱的表达,降低肾上腺素和去甲肾上腺素的表达,改善睡眠障碍。“附子-肉桂”是经典温阳药对,叶强等发现附子、肉桂配伍后总碱、酯型生物碱含量均有所下降,但附子成分总体升高,反映出附子肉桂配伍能较好促进附子成分溶出,有利于缓解附子毒性且发挥温肾补火作用^[62]。陆欣怡等^[63]研究温阳生肌膏中肉桂与丁香配伍可通过清除细胞 ROS,改善线粒体功能,增加 ATP 生成,从而减轻高糖诱导的血管内皮细胞损伤。

3 总结与展望

在近年来针对 CNSD 的治疗和疗效机制研究中,肉桂提取物、肉桂醛、反式肉桂醛、表儿茶素、肉桂代谢产物苯甲酸钠和肉桂多酚提取物展现出了显著的神经保护作用,这些活性成分通过抑制神经炎症、氧化应激、神经细胞凋亡和改善线粒体功能障碍等提高神经细胞存活率、减少神经元损伤。此外,肉桂相关活性成分可改善认知功能障碍、减少缺血再灌注损伤和缓解焦虑抑郁症状,从而有效地干预、缓解以及治疗 CNSD。值得注意的是肉桂在抑制神经炎症反应中的表现,其可通过对炎症因子、环氧酶及相关炎症信号通路(NF- κ B、MAPK 等)的影响和对 NO 水平的调节,从而在 AD、IS、PD、焦虑症和抑郁症模型中发

挥神经保护作用。随着基因组学、转录组学、蛋白质组学等技术的发展,未来的研究可以利用多组学数据的整合,以深入地了解肉桂防治 CNSD 的复杂网络。表 1 显示根据现有研究,肉桂及

表 1 肉桂活性成分防治中枢神经系统疾病作用及机制

Table 1 Effects and mechanisms of active components of cinnamon against central nervous system diseases

疾病 Diseases	活性成分 Active ingredient	模型 Model	剂量 Dosage	机制 Machine
AD	CE ^[15]	PC12 细胞 PC12 cell	10、100 μg/mL	Aβ 寡聚体和斑块形成 ↓ Aβ oligomers and plaques ↓
	CE ^[16]	SH-SY5Y 细胞 SH-SY5Y cell	2、5 μmol/L	Aβ 聚集和毒性 ↓ Aβ aggregation and toxicity ↓
	CE ^[17]	APP-CHO	50、100 μg/mL	β-secretase ↓ sAPPβ ↓ Aβ40 ↓
	CE ^[19]	HEWL	0.1~1 mg/mL	淀粉样纤维形成 ↓ Amyloid fibril formation ↓
	CE ^[22]	NTAD 大鼠 NTAD rat	50 mg/kg	pGSK3β ↑ AChE ↓
	肉桂精油 ^[24] Cinnamon oil	AChE	100、500 mg/mL	AChE ↓ BChE ↓
	CE ^[25]	Wistar 大鼠 Wistar rat	100、200、 400 mg/kg	p-tau ↓ Caspase-8 ↓ IL-6 ↓ TNF-α ↓
	CA、表儿茶素 ^[12] CA, epicatechin	Tau187	200 μg/mL	Tau187 ↓ NFT ↓ Aβ ↓
	TCA ^[28]	LPS 诱导小鼠 LPS-induced mouse	50 mg/kg	Nrf2 ↑ Aβ ↓ IL-1β ↓ MDA ↓ Caspase-3 ↓ SOD ↑ GST ↑
	TCA ^[5]	LPS 诱导 BV-2 LPS-induced BV-2	10 μmol/L	MEK1/2-ERK1/2 ↓ iNOS mRNA ↓ NO ↓
	TCA ^[29]	LPS 诱导 BV-2 LPS-induced BV-2	10 μmol/L	NF-κB ↓ NO ↓ iNOS ↓ IL-1β ↓
	HCA ^[9]	LPS 诱导 BV-2 LPS-induced BV-2	2 μmol/L	ERK ↓ JNK ↓ p38 MAPK ↓ NF-κB ↓
	肉桂粉溶剂 ^[29] Cinnamon powder solvent	D-半乳糖诱导 SD 大鼠 D-Gal induced SD rat	4 g/kg	SOD ↑ GSH-Px ↑ MDA ↓
	NaB ^[30]	aMCI、AD 患者 aMCI, AD patient	250~750 mg/d	DAAO ↓
	肉桂粉溶剂及 代谢产物 NaB ^[31] Cinnamon powder solvent and metabolite NaB	5XFAD 小鼠 5XFAD mouse	100 mg/kg	P21 ^{rac} ↓ ROS ↓ Aβ ↓
	肉桂粉溶剂及 代谢产物 NaB ^[32] Cinnamon powder solvent and metabolite NaB	原代人星形 胶质细胞 Primary human astrocyte	250、500 μmol/L	BDNF、NT-3 ↑
	CA ^[32]	SH-SY5Y 细胞 SH-SY5Y cell	100 μmol/L	Aβ 聚集和毒性 ↓ ROS ↓ 维持 MMP Aβ aggregation and toxicity ↓ ROS ↓ maintenance of MMP
	CA ^[35]	谷氨酸诱导 PC12 细胞 Glutamate-induced PC12 cells	5、10、 20 μmol/L	ROS ↓ 细胞色素 c ↓ Caspase-9 和 -3 活性 ↓ Bax ↓ Bcl-2 ↑ LC3-II/LC3-I ↓ 稳定 MMP ROS ↓ cytochrome c ↓ Caspase-9 and -3 activity ↓ Bax ↓ Bcl-2 ↑ LC3-II/LC3-I ↓ maintenance of MMP
	CA ^[39]	永久性 MCAO 诱导 SD 大鼠 Permanent MCAO- induced in SD rat	50 mg/kg	TLR4 ↓ TRAF6 ↓ TNF-α ↓ IL-1β ↓ CCL2 ↓ ELAM-1 ↓ NF-κB ↓

续表1

疾病 Diseases	活性成分 Active ingredient	模型 Model	剂量 Dosage	机制 Machine
IS	TCA ^[40]	MCAO 再灌注 BL/6 小鼠 MCAO reperfusion in BL/6 mouse	10、20、 30 mg/kg	INOS ↓ COX-2 ↓ NF-κB ↓
	TCA ^[40]	LPS 诱导 BV-2 LPS-induced BV-2	12.5、25、 50 μmol/L	NO ↓ iNOS ↓ COX-2 ↓ TNF-α mRNA ↓ NF-κB p6 ↓ NF-κB p50 ↓ IκBα ↑
	肉桂水提液 ^[42] Cinnamon aqueous extract	Wistar 大鼠 Wistar rat	2.1、4.2 g/kg	SOD ↑ NGF ↑ BDNF ↑ MDA ↓
	肉桂水提液 ^[43] Cinnamon aqueous extract	MCAO 再灌注 SD 大鼠 MCAO reperfusion in SD rat	10、20、40 g/kg	.OH ↓ GSH-Px ↑
	槲皮素 ^[44] Quercetin	MCAO 再灌注 SD 大鼠 MCAO reperfusion in SD rat	10 μmol/L	ROS ↓ Nrf2/HO-1 ↑
	CPE ^[46]	OGD 处理后 C6 神经胶质瘤细胞 OGD-treated C6 glioma cell	0.01 mg/mL	mPT ↓ DeltaPsi(m) ↓
	原花青素 A 型 三聚体 ^[47] Proanthocyanidin A-Trimer	OGD 处理后 C6 神经 胶质瘤细胞 OGD-treated C6 glioma cell	11.57~ 115.00 μmol/L	自由基 ↓ [Ca ²⁺] _i ↓ Free radicals ↓ [Ca ²⁺] _i ↓
PD	CE ^[8]	黑腹果蝇 Drosophila melanogaster	0.75 mg/mL	α-Syn ↓
	CA ^[49]	MPTP 诱导小鼠 MPTP-induced mouse	0.15、0.3、 0.6 mg/g	TH ↑ α-Syn ↓
	CA ^[50]	Wistar 大鼠 Wistar rat	200 mg/kg	DRD1 ↑ α-Syn ↓ TH ↑ DA ↑ DOPAC ↑ HVA ↑
	肉桂粉溶剂及 代谢产物 NaB ^[51] Cinnamon powder solvent and metabolite NaB	MPTP 诱导小鼠 MPTP-induced mouse	50、100 mg/kg	iNOS ↓ DJ-1 ↑ Parkin ↑
焦虑症、 抑郁症 Anxiety, depression	肉桂总黄酮 ^[52] Cinnamon total flavonoids	6-OHDA 诱导 PC12 细胞 6-OHDA induced PC12 cell	40、60、 80 μg/mL	Caspase-9 ↓ MDA ↓ SOD ↑
	CA ^[55]	Wistar 大鼠 Wistar rat	10 μmol/L	CeA 和 vACC 之间的功能障碍 ↓ 负面情绪 ↓ Alleviates dysfunction between CeA and vACC ↓ negative emotions ↓
	TCA ^[54]	CUMS 小鼠 CUMS mouse	10 mg/kg	NF-κB ↓ NLRP3 ↓ TLR4 ↓ P50 ↓ p-p65 ↓ TNF-α ↓ NLRP3 ↓ ASC ↓ Caspase-1 ↓ IL-1β ↓ IL-18 ↓
	TCA ^[56]	CUMS 小鼠 CUMS mouse	50 mg/kg	5-HT ↑ Glu/GABA ↓ COX-2 ↓ TRPV1 ↓ CB1 ↓
	CIEO ^[53]	CUMS 小鼠 CUMS mouse	20、40 mg/mL	海马区神经元死亡和神经炎症相关基因表达 ↓ Expression of genes associated with neuronal death and neuroinflammation in the hippocampus ↓
	肉桂油固体自微乳 ^[57] Cinnamon oil solid self-microemulsion	CUMS 小鼠 CUMS mouse	40、100、 200 mg/kg	5-HT ↑ NE ↑ DA ↑ 炎症因子 ↓ 5-HT ↑ NE ↑ DA ↑ inflammatory factors ↓

注：“↑”表示表达水平增加，“↓”表示表达水平降低。
Note: ‘↑’ indicates an increase in expression level, ‘↓’ indicates a decrease in expression level.

其活性成分在 CNSD 的动物模型、细胞实验和分子生物学研究中,所使用的剂量范围并未展现出明显的毒性反应,反而均表现出了良好的治疗效果。

目前肉桂及其活性成分在动物、细胞和分子模型中取得了较好的疗效,而且在治疗多种神经系统疾病中与相应的西药治疗效果相仿,其安全性更高,毒副作用相对较少,因此,值得推广应用于各种神经系统疾病。然而,肉桂主要活性成分(如挥发性成分 CA)在水中的溶解性能较差,口服后难以被肠道吸收进入血液,生物利用度较低,使其难以广泛应用。关于肉桂递送体系最新研究发现,乳液、微乳液、纳米乳液、皮克林乳液和微胶囊等先进的药物载体技术能够有效地修饰和递送肉桂主要活性成分,提高了其水溶性、稳定性、缓释性以及生物利用率^[4],为肉桂的广泛应用提供了新的途径和方向。最后,肉桂的应用仍需结合中医的辨证论治思想,加强肉桂与其他中药配伍治疗 CNSD 的药理机制研究,为肉桂及其活性成分的临床应用和相关制剂的研发提供理论依据。

参考文献:

- [1] 张帅. 基于引经报使理论的《本草纲目》中 24 味引经药特点研究 [D]. 保定:河北大学, 2024.
ZHANG S. A Study on the Characteristics of 24 Medicines for Introducing Meridians in the Compendium of Materia Medica Based on the Theory of Introducing Meridians and Promoting Meridians [D]. Baoding: Hebei University, 2024.
- [2] 殷胜骏, 周畅, 刘月, 等. 《韩氏医通》交泰剂用于失眠的方证对应关系探赜 [J]. 中华中医药杂志, 2024, 39 (9): 4726-4729.
YIN S J, ZHOU C, LIU Y, et al. Exploration on the formula-pattern correspondence of Jiaotai Prescription in HANs' Clear View of Medicine for insomnia [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2024, 39 (9): 4726-4729.
- [3] GUO J, JIANG X, TIAN Y, et al. Therapeutic potential of cinnamon oil: chemical composition, pharmacological actions, and applications [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2024, 17(12): 1700.
- [4] 刘婕琳, 刘功良, 李南薇, 等. 肉桂活性成分、功效及递送体系研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2024, 45(10): 196-202.
LIU J L, LIU G L, LI N W, et al. Research progress in bioactive ingredients, health benefits and delivery systems of cinnamon [J]. Food Res Dev, 2024, 45(10): 196-202.
- [5] 沈梦婷, 白丹妮, 王庆伟, 等. 肉桂及其活性成分抗炎作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(10): 3218-3225.
SHEN M T, BAI D N, WANG Q W, et al. Research progress on anti-inflammatory mechanism of Cinnamomum cassia and its active components [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(10): 3218-3225.
- [6] ABDEL-KAWI S H, HASHEM K S, SAAD M K, et al. The ameliorative effects of cinnamon oil against ethanol-induced gastric ulcer in rats by regulating oxidative stress and promoting angiogenesis [J]. J Mol Histol, 2022, 53 (3): 573-587.
- [7] MORIDPOUR A H, KAVYANI Z, KHOSRAVI S, et al. The effect of cinnamon supplementation on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: an updated systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Phytother Res, 2024, 38 (1): 117-130.
- [8] ANGELOPOULOU E, PAUDEL Y N, PIPERI C, et al. Neuroprotective potential of cinnamon and its metabolites in Parkinson's disease: Mechanistic insights, limitations, and novel therapeutic opportunities [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2021, 35(4): e22720.
- [9] HAJINEJAD M, GHADDARIPOURI M, DABZADEH M, et al. Natural cinnamaldehyde and its derivatives ameliorate neuroinflammatory pathways in neurodegenerative diseases [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 1034325.
- [10] 薛剑, 马伟, 徐世一, 等. 赤芍活性成分治疗中枢神经系统疾病的研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(19): 6806-6819.
XUE J, MA W, XU S Y, et al. Research progress on treatment of central nervous system diseases with active ingredients of Paeoniae Radix Rubra [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(19): 6806-6819.
- [11] 张千, 钟光成, 李舒婷, 等. 蛇床子素防治中枢神经系统疾病的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(17): 4650-4657.
ZHANG Q, ZHONG G C, LI S T, et al. Research progress in osthole for prevention and treatment of centralnervous system diseases [J]. China J Chin Mater Med, 2024, 49 (17): 4650-4657.
- [12] RITA L, NEUMANN N R, LAPONOGOV I, et al. Alzheimer's disease: using gene/protein network machine learning for molecule discovery in olive oil [J]. Hum Genomics, 2023, 17(1): 57.
- [13] TWAROWSKI B, HERBET M. Inflammatory processes in Alzheimer's disease-pathomechanism, diagnosis and

- treatment: a review [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6518.
- [14] BAI R, GUO J, YE X Y, et al. Oxidative stress: The core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease [J]. *Ageing Res Rev*, 2022, 77: 101619.
- [15] SUZZI S, CROESE T, RAVID A, et al. N-acetylneuraminic acid links immune exhaustion and accelerated memory deficit in diet-induced obese Alzheimer's disease mouse model [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 1293.
- [16] CIARAMELLI C, PALMIOLI A, ANGOTTI I, et al. NMR-driven identification of cinnamon bud and bark components with anti-a β activity [J]. *Front Chem*, 2022, 10: 896253.
- [17] KANG Y J, SEO D G, PARK S Y. Phenylpropanoids from cinnamon bark reduced β -amyloid production by the inhibition of β -secretase in Chinese *Hamster ovarian* cells stably expressing amyloid precursor protein [J]. *Nutr Res*, 2016, 36(11): 1277–1284.
- [18] KUNDU D, PRERNA K, CHAURASIA R, et al. Advances in protein misfolding, amyloidosis and its correlation with human diseases [J]. *3 Biotech*, 2020, 10(5): 193.
- [19] CHOWDHURY S, KUMAR S. Bioactive phytochemicals: anti-amyloidogenic effects against hen egg-white lysozyme aggregation [J]. *Protein J*, 2021, 40(1): 78–86.
- [20] ZHAO X, HU Q, WANG X, et al. Dual-target inhibitors based on acetylcholinesterase: novel agents for Alzheimer's disease [J]. *Eur J Med Chem*, 2024, 279: 116810.
- [21] ÁLVAREZ-BERBEL I, ESPARGARÓ A, VIAYNA A, et al. Three to tango: inhibitory effect of quercetin and apigenin on acetylcholinesterase, amyloid- β aggregation and acetylcholinesterase-amyloid interaction [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(11): 2342.
- [22] SAHINER M, YILMAZ A S, GUNGOR B, et al. A review on *Phyto*-therapeutic approaches in Alzheimer's disease [J]. *J Funct Biomater*, 2023, 14(1): 50.
- [23] LU Y W, XIE L Y, QI M H, et al. Platycodin D ameliorates cognitive impairment in type 2 diabetes mellitus mice *via* regulating PI3K/Akt/GSK3 β signaling pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(22): 12516–12528.
- [24] SAEEDI M, IRAJI A, VAHEDI-MAZDABADI Y, et al. *Cinnamomum verum* J. presl. bark essential oil: *in vitro* investigation of anti-cholinesterase, anti-BACE1, and neuroprotective activity [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2022, 22(1): 303.
- [25] SAYAD-FATHI S, ZAMINY A, BABAEI P, et al. The methanolic extract of *Cinnamomum zeylanicum* bark improves formaldehyde-induced neurotoxicity through reduction of phospho-tau (Thr231), inflammation, and apoptosis [J]. *EXCLI J*, 2020, 19: 671–686.
- [26] LENG F, EDISON P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here [J]. *Nat Rev Neurol*, 2020, 17(3): 157–172.
- [27] YASSAGHI Y, NAZERIAN Y, GHASEMI M, et al. Microglial modulation as a therapeutic strategy in Alzheimer's disease: Focus on microglial preconditioning approaches [J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(15): e18554.
- [28] ABOU EL-EZZ D, MAHER A, SALLAM N, et al. Trans-cinnamaldehyde modulates hippocampal Nrf2 factor and inhibits amyloid beta aggregation in LPS-induced neuroinflammation mouse model [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(12): 2333–2342.
- [29] SAJADI E, SAJEDIANFARD J, HOSSEINZADEH S, et al. Effect of insulin and cinnamon extract on spatial memory and gene expression of GLUT1 3, and 4 in streptozotocin-induced Alzheimer's model in rats [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2023, 26(6): 680–687.
- [30] CUMMINGS J L, OSSE A M L, KINNEY J W. Alzheimer's disease: novel targets and investigational drugs for disease modification [J]. *Drugs*, 2023, 83(15): 1387–1408.
- [31] XU J, FU C, SUN Y, et al. Untargeted and oxylipin-targeted metabolomics study on the plasma samples of primary open-angle glaucoma patients [J]. *Biomolecules*, 2024, 14(3): 307.
- [32] 安迎凤, 李根林, 吴宿慧, 等. 肉桂及其有效成分治疗神经退行性疾病的研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(9): 2282–2288.
- AN Y F, LI G L, WU J H, et al. Research progress of cinnamon and its active ingredients in the treatment of neurodegenerative diseases [J]. *Chin J Gerontol*, 2022, 42(9): 2282–2288.
- [33] BAI L D, LI X, CHANG Q, et al. Cinnamaldehyde promotes mitochondrial function and reduces A β toxicity in neural cells [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2016, 25(8): 605–613.
- [34] 程宗伟, 曾博宁, 邢飞跃. TPOL 通过激活 ROS 依赖的 p53/p21/p27/Rb/Bax/Cyto C/caspase 信号引发伴随线粒体损伤的细胞凋亡 [J]. *中国病理生理杂志*, 2024, 40(8): 1488–1496.
- CHENG ZW, ZENG BN, XING FY. TPOL triggers apoptosis with mitochondrial injury through activating a ROS-dependent p53/p21/p27/Rb/Bax/Cyto C/caspase-mediated signaling [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2024, 40(8): 1488–1496.
- [35] PENG J, SONG X, YU W, et al. The role and mechanism of cinnamaldehyde in cancer [J]. *J Food Drug Anal*, 2024, 32(2): 140–154.
- [36] LEE E C, HA T W, LEE D H, et al. Utility of exosomes in ischemic and hemorrhagic stroke diagnosis and treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8367.

- [37] RIGUAL R, FUENTES B, DíEZ-TEJEDOR E. Management of acute ischemic stroke [J]. *Med Clínica Engl Ed*, 2023, 161(11): 485–492.
- [38] ANNAELLE Z, SARAH G, KELLY PETER J, et al. Targeting inflammation to reduce recurrent stroke [J]. *Int J Stroke Off J Int Stroke Soc*, 2023, 19(4): 17474930231207777.
- [39] VOET S, SRINIVASAN S, LAMKANFI M, et al. Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases [J]. *EMBO Mol Med*, 2019, 11(6): e10248.
- [40] XU Y, JIA B, LI J, et al. The interplay between ferroptosis and neuroinflammation in central neurological disorders [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(4): 395.
- [41] GUO D, TONG Y, JIANG X, et al. Aerobic glycolysis promotes tumor immune evasion by hexokinase2-mediated phosphorylation of IκBα [J]. *Cell Metab*, 2022, 34(9): 1312–1324.
- [42] YULUG B, KILIC E, ALTUNAY S, et al. Cinnamon polyphenol extract exerts neuroprotective activity in traumatic brain injury in male mice [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2018, 17(6): 439–447.
- [43] 黄宏妙, 郭占京, 罗佩卓, 等. 肉桂水提液对全脑缺血再灌注损伤大鼠羟自由基和谷胱甘肽过氧化物酶的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(16): 3083–3085.
- HUANG H M, GUO Z J, LUO P Z, et al. Effects of aqueous extract of cinnamon on ·OH and GSH-Px in the whole cerebral ischemia reperfusion injury rats [J]. *Chin J Gerontol*, 2011, 31(16): 3083–3085.
- [44] ORELLANA-URZÚA S, BRIONES-VALDIVIESO C, CHICHIARELLI S, et al. Potential role of natural antioxidants in countering reperfusion injury in acute myocardial infarction and ischemic stroke [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(9): 1760.
- [45] CHEN K, XU B, QIU S, et al. Inhibition of phosphodiesterase 4 attenuates aquaporin 4 expression and astrocyte swelling following cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Glia*, 2024, 72(9): 1629–1645.
- [46] SHARIFI-RAD J, DEY A, KOIRALA N, et al. *Cinnamomum* species: bridging phytochemistry knowledge, pharmacological properties and toxicological safety for health benefits [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 600139.
- [47] MAFFEI M E, SALATA C, GRIBAUDO G. Tackling the future pandemics: broad-spectrum antiviral agents (BSAAs) based on A-type proanthocyanidins [J]. *Molecules*, 2022, 27(23): 8353.
- [48] 郑娜, 徐宏, 卢昌均, 等. 肉桂治疗神经系统疾病的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(1): 114–118.
- ZHENG N, XU H, LU C J, et al. Research progress of the use of cinnamon for treating nervous system diseases [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(1): 114–118.
- [49] 吴宿慧, 史亚瑾, 安迎凤, 等. 肉桂醛对 MPTP 诱导的亚急性帕金森模型小鼠的神经保护机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(23): 6485–6493.
- WU S H, SHI Y J, AN Y F, et al. Neuroprotective effect of cinnamaldehyde in MPTP-induced mouse model of subacute Parkinson's disease [J]. *China J Chin Mater Med*, 2022, 47(23): 6485–6493.
- [50] 焦盼盼, 董贝贝, 吴宿慧, 等. 肉桂醛对利血平致帕金森病大鼠模型改善作用的初步研究 [J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(5): 1318–1326.
- JIAO P P, DONG B B, WU S H, et al. Improvement effect of cinnamaldehyde on reserpine-induced Parkinson's disease rat model [J]. *China J Chin Mater Med*, 2024, 49(5): 1318–1326.
- [51] RANGASAMY S B, RAHA S, DASARATHY S, et al. Sodium benzoate, a metabolite of cinnamon and a food additive, improves cognitive functions in mice after controlled cortical impact injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 192.
- [52] 曾华君, 何广俊, 黄海潮, 等. 肉桂总黄酮对 6-羟基多巴胺致 PC12 细胞损伤的保护作用 [J]. *中药材*, 2017, 40(12): 2936–2940.
- ZENG H J, HE G J, HUANG H C, et al. Protective effect of total flavonoids of cinnamomi cortex on PC12 cell injured by 6-hydroxydopamine [J]. *J Chin Med Mater*, 2017, 40(12): 2936–2940.
- [53] NGUYEN L T H, NGUYEN N P K, TRAN K N, et al. Anxiolytic-like effect of inhaled cinnamon essential oil and its main component cinnamaldehyde in animal models [J]. *Molecules*, 2022, 27(22): 7997.
- [54] WANG M, YAN S, ZHOU Y, et al. *Trans*-cinnamaldehyde reverses depressive-like behaviors in chronic unpredictable mild stress rats by inhibiting NF-κB/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 4572185.
- [55] HADEIY S K, HABTEMARIAM S, SHANKAYI Z, et al. Amelioration of pain and anxiety in sleep-deprived rats by intra-amygdala injection of cinnamaldehyde [J]. *Sleep Med X*, 2023, 5: 100069.
- [56] WU Q, DUAN W Z, CHEN J B, et al. Extracellular vesicles: emerging roles in developing therapeutic approach and delivery tool of Chinese herbal medicine for the treatment of depressive disorder [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 843412.
- [57] 马天宇, 平洋, 沈梦婷, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨肉桂抗抑郁的作用机制 [J]. *中国现代应用药学*, 2023, 40(13): 1775–1784.
- MA T Y, PING Y, SHEN M T, et al. Investigation on the

- mechanism of antidepressant effect of cinnamomi cortex based on network pharmacology and experimental verification [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2023, 40(13): 1775-1784.
- [58] 王月儿, 李珠, 冯曼, 等. 交泰丸对慢性温和不可预知性应激抑郁大鼠肠道菌群的影响 [J]. 天津中医药大学学报, 2022, 41(2): 204-211.
- WANG Y E, LI Z, FENG M, et al. Effects of Jiaotai Pills on intestinal flora in depression model mice with chronic unpredictable mild stress [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2022, 41(2): 204-211.
- [59] 黄茜, 戴国梁, 杨欣怡, 等. UHPLC-TOF-MS 结合网络药理学及实验验证研究交泰丸治疗抑郁症的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(7): 1896-1904.
- HUANG Q, DAI G L, YANG X Y, et al. Mechanism of Jiaotai Pills in treatment of depression by UHPLC-TOF-MS combined with network pharmacology and experimental validation [J]. China J Chin Mater Med, 2024, 49(7): 1896-1904.
- [60] 高欣, 蔡伟武, 魏素芬, 等. 基于网络药理学探讨交泰丸治疗阿尔茨海默病的物质基础及作用机制 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38(1): 7-13.
- GAO X, CAI W W, WEI S F, et al. Study on material basis and mechanism of Jiaotaiwan in the treatment of Alzheimer's disease based on network pharmacology [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2022, 38(1): 7-13.
- [61] 翟振威. 基于中药调控内源性褪黑素改善睡眠障碍的数据挖掘和靶点预测 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2023.
- ZHAI Z W. Data mining and target prediction based on traditional Chinese medicine regulation of endogenous melatonin ameliorated in sleep disorders [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2023.
- [62] 黎豫川, 杨元凤, 马鹏, 等. UPLC-Q-TOF-MS 背景扣除法结合多元统计分析不同比例附子-肉桂配伍前后化学成分变化 [J]. 时珍国医国药, 2024, 35(9): 2287-2294.
- LAI Y C, YANG Y F, MA P, et al. Changes of chemical composition of monkshood-cassia couplet medicines with different proportions before and after compatibility by UPLC-Q-TOF-MS background subtraction and multivariate statistical analysis. [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2024, 35(9): 2287-2294.
- [63] 陆欣怡, 周忠志, 王君, 等. 温阳生肌膏及其有效成分改善线粒体功能减轻高糖诱导的血管内皮细胞损伤 [J]. 时珍国医国药, 2024, 35(9): 2053-2057.
- LU X Y, ZHOU Z Z, WANG J, et al. Wenyang Shengji Ointment and its active ingredients improve mitochondrial function and alleviate high glucose induced damage to vascular endothelial cells [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2024, 35(9): 2053-2057.

〔收稿日期〕2024-12-12

裴金英,刘佳林,刘斌,等.已应用于中药研究的阿尔茨海默病动物模型综述[J].中国比较医学杂志,2025,35(5):114-130.

Pei JY, Liu JL, Liu B, et al. Review of animal models of Alzheimer's disease applied in traditional Chinese medicine research [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(5): 114-130.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.05.012

已应用于中药研究的阿尔茨海默病动物模型综述

裴金英¹,刘佳林¹,刘斌^{1*},董晓红¹,丛树园²,任秀敏³,周勇杰⁴

(1.黑龙江中医药大学,哈尔滨 150040;2.云南中医药大学,昆明 650500;
3.佳木斯大学,黑龙江 佳木斯 154007;4.黄渡社区卫生服务中心,上海 201804)

【摘要】 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种与年龄相关的神经退行性疾病,临床主要表现为进行性认知障碍以及记忆、语言功能的减退等。随着我国人口老龄化进程的加快,我国患AD的人数也在不断增加,而AD的确切发病机制尚不明确,目前治疗策略也仅是对症治疗为主。动物模型是临床前研究的重要工具,用于探索疾病的分子机制、行为功能和治疗策略。未来对AD的机制研究和药物开发需要建立与临床病理特征相符合的动物模型。本文主要对近年来研究报道中常用的AD动物模型进行总结,并详细阐述相关AD动物模型的品系、年龄、造模方式、造模剂量、中药组分研究及药效机制,以期对未来建立新的动物模型或深入探讨中药中各组分的具体药理活性、靶点、代谢途径、临床应用等提供一些参考。

【关键词】 阿尔茨海默病;动物模型;啮齿动物;中药组分;药效机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 05-0114-17

Review of animal models of Alzheimer's disease applied in traditional Chinese medicine research

PEI Jinying¹, LIU Jialin¹, LIU Bin^{1*}, DONG Xiaohong¹, CONG Shuyuan², REN Xiumin³, ZHOU Yongjie⁴

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China.
2. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500. 3. Jiamusi University, Jiamusi 154007.
4. Huangdu Community Service Center, Shanghai 201804)

【Abstract】 Alzheimer's disease (AD) is an age-related neurodegenerative disease that mainly manifests clinically as progressive functional impairments in cognition, memory, and language. With the accelerated transition toward an older population in China, the number of people suffering from AD in China is increasing. The exact pathogenesis of AD remains unclear, with current therapeutic strategies mainly limited to symptomatic treatments. Animal models are important tools for preclinical research, enabling explorations of molecular mechanisms, behavioral functions, and treatment strategies of diseases. Future mechanistic research and drug development of AD should involve the establishment of animal models that are consistent with clinical pathological characteristics. This review summarizes the AD animal models commonly used in research, providing details on the strains, age, modeling method and doses. It also discusses research on traditional Chinese medicine (TCM) components and their pharmacodynamic

【基金项目】 黑龙江省自然科学基金(LH2023H073)。

【作者简介】 裴金英(1991—),女,在读硕士研究生,主治医师,研究方向:中药防治老年性疾病。E-mail:peijinying2023@126.com

【通信作者】 刘斌(1970—),男,博士,教授,研究方向:中药防治老年性疾病。E-mail:liubin169@163.com

mechanisms in related AD animal models, aiming to provide references for the development of new animal models and in-depth exploration of the specific pharmacological activities, targets, metabolic pathways, and clinical applications of each TCM component.

【Keywords】 Alzheimer's disease; animal model; rodents; Chinese medicine components; mechanism of action

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

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是发生于老年和老年前期,以进行性认知功能障碍和行为损害为特征的中枢神经系统退行性病变,是老年期痴呆最常见的类型,占有病例的 60%~70%^[1]。现有的研究主要集中在 AD 的两个主要病理特征上:细胞外 β -淀粉样蛋白 (Amyloid β -protein, A β) 异常沉积形成的老年斑 (senile plaque, SP) 和细胞内异常过度磷酸化 tau 蛋白聚集形成的神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs)。AD 发病机制存在多种假说,如 A β 假说、tau 蛋白过度磷酸化、氧化应激、神经炎症、线粒体功能障碍、胆碱能假说等^[2]。根据民政部发布的《2023 年度国家老龄事业发展公报》数据显示,截至 2023 年末,全国 60 岁及以上老年人口为 29 697 万人,约占总人口的 21.1%,中国的老龄化呈现出规模大、速度快、程度深、高龄占比高的特点^[3]。随着人口老龄化的程度进一步加深,AD 患病率也逐年上升,2021 年我国现存的 AD 及其他痴呆患病人数达 16 990 827 例,给社会和家庭都带来了沉重的负担^[4]。目前,AD 的治疗药物主要分为两大类:胆碱酯酶抑制剂与 NMDA 受体拮抗剂。虽然可在一定程度上缓解 AD 症状,但治疗作用却因人而异,且无法治愈或阻止疾病的进展。

良好的 AD 动物模型是研究 AD 病因和机制,寻找特效治疗药物的关键环节。如何基于 AD 临床病症的特点,复制出与临床状态相一致的动物模型,进行新型疗法的临床前测试,是目前研究的重点内容之一。近几十年来,已经报道了各种与 AD 相关的动物模型,但 AD 临床试验的成功记录并不乐观,在某种程度上,这种高失败率可能与动物模型仅反映了 AD 病理学结果有关^[5]。选择合适的实验动物模型是解决这一难题的前提条件。深入地了解每种模型的优缺点,并使用多模型来评估潜在疗法,将有助于提高从

临床前研究到患者治疗的转化成功率。本文分析探讨了不同 AD 动物模型的特征和局限性,以及在不同 AD 动物模型中,相关中药组分研究的现状,以期对未来构建或选择 AD 相关模型以及 AD 相关中药组分的研究提供参考。

1 文献检索策略

文献检索策略:计算机检索 PubMed 和中国知网数据库,检索时间设定为 2020 年 1 月~2025 年 1 月。中文检索词包括“阿尔茨海默病”“动物模型”“啮齿动物”“中药组分”“药效机制”,英文检索词包括“Alzheimer's disease”“animal model”“rodents”“Chinese medicine components”“mechanism of action”。共检索到 3562 篇文献,最后纳入综述 96 篇文章,该领域的年度发文量呈上升趋势。纳入标准:文献涉及啮齿动物、动物模型、中药组分、药效机制等与阿尔茨海默病相关的内容。排除标准:与本文主题无关联,未公开的、无法获取原文的文献。

2 常见 AD 动物模型

实验动物是模拟疾病的载体,可靠的动物模型对 AD 的基础研究和药物开发至关重要。目前,基于病理生理学建立的 AD 模型主要有 3 种类型:自然衰老动物模型、转基因动物模型、药物介入性动物模型^[6]。啮齿动物因为其体型小、寿命短、繁殖能力强、维护成本低以及可基因修饰的胚胎干细胞,长期以来一直作为开发 AD 模型的主要资源。由于 AD 发病机制尚不明确,如何模拟构建出完全符合疾病发病机制特点的模型依旧是未来需要攻克的难题。2022 年 12 月,美国颁布了 FDA 现代化法案 2.0,取消了新药开发中对动物试验的强制性要求^[7],这种变化从另一方面也反映了人工智能和器官芯片技术的进步,为评估吸收、分布、代谢、排泄和毒性提供了阶段

性变化^[8]。尽管有这些发展,目前 AD 的动物实验模型对于提高转化成功率仍然至关重要。

2.1 自然衰老动物模型

某些哺乳类动物,如非人灵长类动物(nonhuman primate, NHP)模型、伴侣动物模型(驯养的猫和狗)、树鼩等,可随着年龄的增长而自然发展为认知障碍出现主要的 AD 样病症。恒河猴的大脑结构和功能比啮齿动物更像人类,且 NHP 的行为与人类相似,具有易于圈养和快速发育等优点,是 NHP 模型中使用最广泛的物种。有团队研究了从年轻到极老(至 38 岁)的恒河猴,以捕捉 tau 磷酸化的早期阶段及其在脑内进展到纤维化的过程,其中最老的动物可达到 Braak III/IV 期^[9]。但这种模型也存在发育缓慢、体型庞大、对社会关系的依赖性问题。众所周知,伴侣动物和人类共享相似的环境,它们表现出相对较长的寿命,并拥有与衰老中相似的神经病理学,包括磷酸化 tau (phosphorylated tau, p-tau)、NFT、斑块、血管性脑淀粉样血管病、髓鞘破坏、脂褐素、神经元液泡、轴突变性和胆碱能神经元异常,就像在 AD 中观察到的那样^[10]。此外,在成年(约 1 岁)和老年(6 岁或以上)树鼩的认知测评中发现,后者表现出明显的认知能力受损,还发现与 AD 相似的病理特征,包括 A β 积累和 p-tau 水平增加、突触和神经元丢失以及皮层和海马组织中的反应性神经胶质增生^[11]。

以上这些动物比啮齿动物的遗传亲和力和要密切得多,所以这些动物模型可用于 AD 发病机制和治疗剂效果的研究。然而,这些哺乳动物和人类之间的 AD 病理学存在一些差异,以及其他因素,如高维护成本、低生殖输出、操作挑战和人畜共患的传播风险^[12]。2023 年 12 月,首届非传统动物模型 AD 和衰老国际会议在智利举行,会议讨论和强调了新的研究方向、替代动物模型和创新方法,以促进 AD 和衰老研究领域的发展^[13]。

2.2 转基因动物模型

基因工程的进步使得更多转基因 AD 模型的产生成为可能。转基因 AD 动物模型可以在分子水平上模拟 AD,呈现典型的症状和体征,而且在稳定性和可靠性方面优于其他 AD 相关模型,但开发成本相对较高^[14]。大鼠在生理、形态和遗传

特征上与人类更相似,有更丰富的行为表型,在实验中也更容易操作。但由于相对较低的繁殖能力、对住房空间的需求较大以及调节技术有限,转基因大鼠模型的发展一直很缓慢^[15]。相较而言,小鼠繁殖周期短、维护成本相对较低和已建立相对完善的研究体系,因此,AD 研究中使用的绝大多数动物模型是转基因小鼠。迄今为止,已经生成了 170 多个包含 AD 相关突变的转基因小鼠模型来研究这种神经退行性疾病,这些发现促进了我们对 AD 的理解^[16]。

有研究发现,在品系为 Tg12099 的人类 tau 表达突变(P301S)的转基因大鼠中发现,tau 蛋白的区域传播和神经变性的更接近于人类原发性的 tau 蛋白^[17]。在 McGill-R-Thy1-APP 转基因大鼠的研究中发现,在 A β 斑块之前,神经元内 A β 积累诱导了海马神经元中突触可塑性基因的早期氧化应激、DNA 损伤和适应不良表达^[18]。野生型小鼠 APP(695 亚型)与人 APP 具有 97% 的序列同源性,而小鼠和人之间的序列差异包括 A β 序列中的 3 个氨基酸(R5G、Y10F 和 H13R),虽然这种模型展现出增加了 A β 产生,但未能一致地显示出广泛的 AD 相关神经病理学^[19]。研究发现,Thy1-ApoE4/C/EBP β 转基因小鼠在没有任何人类淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)或早老素-1/早老素-2(Presenilin 1/Presenilin 2, PS1/PS2)突变的情况下,以年龄依赖性方式展示了关键的 AD 病理,可充当散发性 AD 模型^[20]。此外,在 PS1/PS2 条件性双敲除(DKO)和双转基因(DTG)小鼠的实验中,通过研究其海马组织中纤维蛋白 1(Fibulin 1, FBLN1)基因甲基化改变,可增强对 AD 表观遗传机制的理解^[21]。3xTg-AD 小鼠是将突变基因 APPSwe 和 tauP301L 注入单转纯合子小鼠 PS1M146V 的胚胎干细胞进行培育。其脑内可逐渐出现细胞内沉积、细胞外沉积形成的 A β 斑块和高度磷酸化的微管相关蛋白及随后由它形成的 NFT,更符合临床 AD 患者的病理表现^[22]。此外,5xFAD 小鼠从 2~6 个月的进展,有效地模拟了人类从临床前 AD 到轻度认知障碍(mild cognitive impairment, MCI)的转变。进一步分析发现,其大脑中 A β 积累、髓鞘变性和神经胶质增生呈现年龄依赖性增加,并涉及到皮质乙酸酯代谢和海马葡萄糖代

谢^[23]。这些转基因小鼠模型的一个主要限制是缺乏 AD 中发生的广泛神经变性和局部脑萎缩。大多数情况下这些模型阐述了可能的潜在机制,然而,有些在家族性 AD 模型中被证明成功的疗法却在晚发性 AD 的人体临床试验中进行评估时失败了^[24]。现对已应用于中药研究的转基因啮齿类 AD 动物模型进行介绍(见表 1)。

2.3 药物介入性动物模型

药物介入性 AD 动物模型是通过向模型鼠脑部、皮下或腹腔注射特定物质来建立模型。常见的用于建立 AD 动物模型的药物有 A β 、鹅膏蕈氨酸 (ibotenic acid, IBO)、链 脉 佐 菌 素 (streptozotocin, STZ)、D-半乳糖 (D-galactose, D-gal)、铝、冈田酸 (okadaic acid, OA)、东莨菪碱 (scopolamine, SCOP)。经由药物介入的造模方式

具有快速诱导记忆障碍、易操作和花费少的基本特点,更重要的是它在模拟人类 AD 的典型临床的同时也具备一些组织病理学和关键免疫学特征。然而这些单一的模型复制方法,只能从某一角度反映 AD 的病理机制,未能全面呈现出 AD 中多病理改变的特征^[31]。存在实验动物发病晚、个体差异大、实验持续时间长、死亡率高等局限。

2.3.1 A β

AD 病理的标志之一,是 A β 聚集到患者大脑中的淀粉样蛋白斑块中,将 A β 片段注射到侧脑室或海马 CA1 区中,可模拟 AD 患者中 A β 对中枢神经的毒性^[32]。A β 肽长度可以在 37 到 49 个氨基酸之间变化,一般有 3 种,即 A β 1-42、A β 1-40 和 A β 25-35,其中 A β 1-42 是当中最危险的形式^[33]。研究发现每一种寡聚体都具有独特的特

表 1 转基因啮齿类 AD 动物模型
Table 1 Transgenic rodent AD models

造模动物品系 Model animal strains	年龄 Age	造模方式 Modeling method	已应用评价的中药组分 Traditional Chinese medicine components that have been evaluated	中药组分的药效机制 Pharmacodynamic mechanisms of Chinese herbal medicine components
雄性 APP/PS1 小鼠 ^[25] Male APP/PS1 mice	6 月龄 Six- month old	基因编辑 Gene editing	人参皂甙 Rg1 Ginsenoside Rg1	抗炎,改善突触功能障碍,抑制自噬 Anti-inflammatory, improves synaptic dysfunction, inhibits autophagy
雄性 APP/PS1 小鼠 ^[26] Male APP/PS1 mice	8 月龄 Eight- month-old	基因编辑 Gene editing	毛蕊花糖苷 Verbascoside/acteoside	抗炎,抑制小胶质细胞和星形胶质细胞激活 Anti-inflammatory, inhibits microglia and astrocyte activation
雄性 3xTg 小鼠 ^[27] Male 3xTg mice	3 月龄 3-month old	基因编辑 Gene editing	补骨脂乙素 Isobavachalcone	缓解突触功能障碍,抑制 A β 的寡聚化和原纤 化,抑制 tau 形成和聚集,影响胆汁酸代谢、酪 氨酸代谢、嘌呤代谢 It alleviates synaptic dysfunction, inhibits the oligomerization and fibrillation of A β , inhibits tau formation and aggregation, and affects bile acid metabolism, tyrosine metabolism, and purine metabolism
雄性 3xTg 小鼠 ^[28] Male 3xTg mice	11~13 月龄 11 ~ 13- month-old	基因编辑 Gene editing	高丽参的多糖 Korean red ginseng polysaccharide	减轻神经元损失,改善 A β 沉积、神经变性和 神经炎症 Reduces neuronal loss, improves A β deposition, neurodegeneration, and neuroinflammation
5xFAD 小鼠 ^[29] 5xFAD mice	6 月龄 Six- month-old	基因编辑 Gene editing	枸杞提取物 Lycium barbarum extract	抗炎,减少小胶质细胞活化,促进了小胶质细 胞吞噬作用,调节突触可塑性 Anti-inflammatory, reduces microglial activation, promotes microglial phagocytosis, regulates synaptic plasticity
5xFAD 小鼠 ^[30] 5xFAD mice	5 月龄 Five- month-old	基因编辑 Gene editing	艾蒿提取物 Artemisiae wayomogii herba extract	调节小胶质细胞活化和自噬-溶酶体途径,改 善神经炎症和 A β 积累 Regulates microglia activation and autophagy- lysosomal pathways, improves neuroinflammation and A β accumulation

征, Aβ 原纤维构象差异会对 Aβ 抗体检测产生根本性影响^[34]。Aβ 诱导的 AD 模型大脑内可出现, Aβ 沉积明显、反应性胶质增生、氧化应激、神经炎症以及突触和记忆缺陷等 AD 病理表现^[35]。这种造模方式对脑组织造成的穿透性损伤具有不确定性, 其急性发病与 AD 慢性起病的特点也存在差异。现对已应用于中药研究的 Aβ 诱导啮齿类 AD 动物模型进行介绍 (见表 2)。

2.3.2 IBO

IBO 是一种有效的谷氨酸受体激动剂, 可导致胆碱能神经系统损伤, 继而影响动物认知功能。IBO 可优先与神经元胞体或树突上的 NMDA 受体结合, 导致延长激活和类似于谷氨酸的兴奋

性毒性。研究发现, IBO 诱导的模型会损害前额叶皮层, 令杏仁核的树突棘减少, 表现出工作记忆和社交行为的缺陷^[42]。此外, 将 IBO 注入大鼠梅纳特基底核后, 可选择性地破坏该区域的神经元胞体, 造成被动逃避反应潜伏期缩短。其组织学检查可见, 腹侧丘脑和小丘脑外侧区损毁, 苍白球腹内侧核胆碱能神经元大部分消失, 胶质细胞增生等病理症状^[43]。虽然这种动物模型可表现有胆碱能系统功能丧失和学习记忆损害, 但无全身衰老的表现, 且难以诱导产生 AD 的病理学特征, 还可能损害临近部位的非胆碱能神经元。现对已应用于中药研究的 IBO 诱导啮齿类 AD 动物模型进行介绍 (见表 3)。

表 2 Aβ 诱导啮齿类 AD 动物模型
Table 2 Aβ-induced rodent AD models

造模动物品系 Model animal strains	造模方式 Modeling method	药物剂量 Drug dosage	年龄 Age	已应用评价的中药组分 Traditional Chinese medicine components that have been evaluated	中药组分的药效机制 Pharmacodynamic mechanisms of Chinese herbal medicine components
雄性 C57BL/6J 小鼠 ^[36] Male C57BL/6J mice	Aβ25-35, i. c. v.	200 μmol/L	6~7 周龄 6 ~ 7-week-old	新补骨脂异黄酮 Neobavaisoflavone	改善海马神经元损伤及神经炎症, 减少细胞凋亡、氧化应激和线粒体膜电位, 并调节免疫细胞 Improve hippocampal neuronal damage and neuroinflammation, reduce apoptosis, oxidative stress and mitochondrial membrane potential, and regulate immune cells
雄性 SD 大鼠 ^[37] Male SD rats	Aβ25-35, i. c. v.	5 μL	成年 Adult	戈米辛 N Gomisin N	减轻 Aβ 积累和神经元死亡, 改善氧化应激 Reduces Aβ accumulation and neuronal death, and improves oxidative stress
雄性 ICR 小鼠 ^[38] Male ICR mice	Aβ25-35, i. c. v.	2 μL	未提及 Not mentioned	藏红花素 Crocins	减轻海马神经元损伤, 抑制神经炎症 Reduces hippocampal neuronal damage and inhibits nerve inflammation
雄性 C57BL/6J 小鼠 ^[39] Male C57BL/6J mice	Aβ25-35, i. c. v.	200 μmol/L	6 周龄 6-week-old	山茱萸提取物 Cornus officinalis extract	缓解海马体的突触损伤及免疫失衡, 调节线粒体动力学紊乱, 减轻胶质细胞异常激活引发的免疫炎症 It alleviates synaptic damage and immune imbalance in the hippocampus, regulates mitochondrial kinetic disorders, and alleviates immune inflammation caused by abnormal activation of glial cells
雄性 Wistar 大鼠 ^[40] Male Wistar rats	Aβ1-42, i. c. v.	2 μL	4 月龄 4-month-old	锁阳总黄酮 Cynomorium songaricum flavonoid extract	抑制神经元凋亡, 恢复神经递质的产生, 并增加突触可塑性 Inhibits neuronal apoptosis, restores neurotransmitter production, and increases synaptic plasticity
雄性 ICR 小鼠 ^[41] Male ICR mice	Aβ1-42, i. c. v.	3 μL	6~8 周龄 6~8-week-old	淫羊藿苷 Icariin	修复海马神经元损伤, 改善突触可塑性 Repair hippocampal neuronal damage and improve synaptic plasticity

表 3 IBO 诱导啮齿类 AD 动物模型
Table 3 IBO-induced rodent AD models

造模动物品系 Model animal strains	造模方式 Modeling method	药物剂量/ ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) Drug dosage	年龄 Age	已应用评价的中药组分 Traditional Chinese medicine components that have been evaluated	中药组分的药效机制 Pharmacodynamic mechanisms of Chinese herbal medicine components
雄性 SD 大鼠 ^[44] Male SD rats	IBO, i. c. v.	4	3 月龄 3-month-old	淫羊藿苷 Icariin	抑制促凋亡因子表达,上调钙结合蛋白表达来调节 Ca^{2+} 稳态,以促进海马神经元的存活 Inhibition of pro-apoptotic factor expression and up-regulation of calcium-binding protein expression to regulate Ca^{2+} homeostasis to promote the survival of hippocampal neurons
SD 大鼠,雌雄各半 ^[45] SD rats, half male and half female	IBO, i. c. v.	5	3 月龄 3-month-old	胡椒碱 Piperine	抗炎,调节胆碱能系统,抑制神经元凋亡和氧化应激 Anti-inflammatory, regulates the cholinergic system, inhibits neuronal apoptosis and oxidative stress
雄性 SD 大鼠 ^[46] Male SD rats	IBO, i. c. v.	2	成年 Adult	淫羊藿次苷 Icariside II	抑制神经元凋亡反应,减轻兴奋性氨基酸毒性的损害 Inhibits neuronal apoptotic responses and attenuates damage from excitatory amino acid toxicity
雄性 Wistar 大鼠 ^[47] Male Wistar rats	IBO, i. c. v.	5	未提及 Not mentioned	白藜芦醇 Resveratrol	改变谷氨酸能和胆碱能途径、减少氧化应激 Alter glutamatergic and cholinergic pathways and reduce oxidative stress
Wistar 大鼠 ^[48] Wistar rats	IBO, i. c. v.	5	成年 Adult	富含百里醌的黑孜然油 Thymoquinone-rich black cumin oil	调节胆碱能、谷氨酸能和氨基酸能神经传递,抗神经炎症 Regulates cholinergic, glutamatergic and amino acid neurotransmission, anti-neuroinflammation
雄性 SD 大鼠 ^[49] Male SD rats	IBO, i. c. v.	5	3 月龄 3-month-old	木通皂苷 D Akebia saponin D	影响胆碱能途径,抑制凋亡 Affects cholinergic pathways, inhibits apoptosis

2. 3. 3 STZ

STZ 是一种氨基葡萄糖-亚硝基脲类化合物,会损害胰腺的 β 细胞并导致胰岛素抵抗。此前多项研究表明,AD 患者的脑葡萄糖代谢显著失调,胰岛素信号传导在一定程度上参与调节认知能力、 $\text{A}\beta$ 代谢、tau 表达和磷酸化^[50]。据此,向动物脑内注射胰岛素细胞毒素 STZ 后,会产生脑内胰岛素抵抗状态,破坏脑胰岛素信号传导,导致全身能量代谢失衡。在细胞水平上表现为神经重塑性降低、受体调节神经元释放神经递质功能下降和神经元摄取葡萄糖减弱,最终引起 $\text{A}\beta$ 和 NFT 的积累与进行性认知障碍的发生^[51]。有研究发现,STZ(5 mg/kg)给药后 7 d 诱导了斑马鱼模型的认知缺陷,同时观察到 AD 的淀粉样变和

tau 病理特征^[52]。表明了 STZ 诱导的模型作为研究散发性 AD 病理生理学和快速筛选治疗散发性 AD 分子的潜力。现对已应用于中药研究的 STZ 诱导啮齿类 AD 动物模型进行介绍(表 4)。

2. 3. 4 D-gal

D-gal 是一种天然的还原性单糖。高水平的 D-gal 通过醛糖还原酶的催化转化为半乳糖醇,在细胞中不断积累导致细胞肿胀、功能障碍,并最终导致细胞老化。或者通过另一种代谢途径产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)和晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs),从而加速衰老过程^[58]。该造模过程表现出接近 AD 自然老化的生理特点,多用于制备脑老化模型。此前有研究发现,皮下注射 D-gal

(1000 mg/kg) 1 周,可产生与轻度认知功能障碍特征和病理过程一致的变化^[59]。近期研究发现,在切除雌性大鼠卵巢和注射 D-gal 建立的 AD 模型中,出现了学习和记忆的减退。其作用机制可能与 D-gal 诱导的神经炎症改变、肠道微生物群失调有关,引发海马组织中的细胞死亡和淀粉样斑块沉积^[60]。总的来说 D-gal 诱导的 AD 动物模型可造成 Aβ、tau 蛋白的异常表达,破坏神经元结构,诱导机体氧化应激、中枢炎症反应^[61]。这种造模方式的诱导机制复杂多样,各机制间的关系尚不明确,导致目前该模型的实际运用存在局限性^[62]。现对已应用于中药研究的 D-gal 诱导啮齿类 AD 动物模型进行介绍(见表 5)。

2.3.5 铝中毒

铝是地壳中天然存在的微量元素,对人类具有潜在毒性。通过对小鼠侧脑室或腹腔注射氯

化铝(AlCl₃)造成空间学习障碍和记忆损伤建立衰老模型。由于铝在大脑中被清除需要 100 多天,这个漫长的清除过程导致铝在大脑中积累,进而引起神经毒性作用^[69]。铝纳米颗粒的毒性与 AD 的神经原纤维缠结和神经炎斑块的发展相关,其过程可能涉及神经变性和由于氧化应激、炎症、DNA 损伤、Aβ 聚集等引起的行为改变^[70]。长期接触铝可诱导大鼠海马神经元凋亡,破坏突触可塑性,损害大鼠的学习和记忆功能^[71]。研究发现,对大鼠进行口服 AlCl₃(20 mg/kg) 24 周,可显著增加大脑中 Aβ1-42、p231-tau 以及促炎细胞因子 TNF-α 和 IL-6 水平,减少 GSH 等抗氧化标志物水平^[72]。总的来说,铝的神经性机制复杂,这种造模方式的病理特征和特异性仍待进一步研究。现对已应用于中药研究的 AlCl₃ 诱导啮齿类 AD 动物模型进行介绍(见表 6)。

表 4 STZ 诱导啮齿类 AD 动物模型
Table 4 STZ-induced rodent AD models

造模动物品系 Model animal strains	造模方式 Modeling method	药物剂量/ (mg/kg) Drug dosage	年龄 Age	已应用评价的中药组分 Traditional Chinese medicine components that have been evaluated	中药组分的药效机制 Pharmacodynamic mechanisms of Chinese herbal medicine components
雄性 C57BL/6 小鼠 ^[53] Male C57BL/6 mice	STZ, i. c. v.	3	3 月龄 3-month-old	枸杞多糖 Lycium barbarum polysaccharides	保护突触结构,调控胰岛素信号通路,抑制 tau 蛋白过度磷酸化和提高突触蛋白表达 It protects synaptic structure, regulates insulin signaling pathway, inhibits tau hyperphosphorylation and improves synaptic protein expression
雄性 SD 大鼠 ^[54] Male SD rats	STZ, i. p.	45	9~10 周龄 9 ~ 10-week-old	姜黄素 Curcumin	增加抗氧化活性和减少糖尿病引起的氧化应激 Increases antioxidant activity and reduces oxidative stress caused by diabetes
雄性 C57BL/6N 小鼠 ^[55] Male C57BL/6N mice	STZ, i. c. v.	3	6~8 周龄 6 ~ 8 week-old	熟地黄粉 Radix rehmanniae praeparata extracted	改善脑胰岛素信号传导,调节肠道菌群丰度和多样性 Improve cerebral insulin signaling and regulate the abundance and diversity of intestinal microbiota
雄性 SD 大鼠 ^[56] Male SD rats	STZ, i. c. v.	3	成年 Adult	萝卜硫素 Sulforaphane	抑制小胶质细胞和星形胶质细胞激活,减少促炎细胞因子的释放,促进抗炎介质的产生 Inhibits microglia and astrocyte activation, reduces the release of pro-inflammatory cytokines, and promotes the production of anti-inflammatory mediators
雄性 Wistar 大鼠 ^[57] Male Wistar rats	STZ, i. c. v.	3	60~90 天 60 ~ 90-day-old	穿心莲内酯 Andrographolide	影响星形胶质细胞和小胶质细胞激活。 Affects astrocyte and microglia activation

表 5 D-gal 诱导啮齿类 AD 动物模型
Table 5 D-gal-induced rodent AD models

造模动物品系 Model animal strains	造模方式 Modeling method	药物剂量/ (mg/kg) Drug dosage	年龄 Age	已应用评价的中药组分 Traditional Chinese medicine components that have been evaluated	中药组分的药效机制 Pharmacodynamic mechanisms of Chinese herbal medicine components
雌性 ICR 小鼠 ^[63] Female ICR mice	D-gal, i. p.	100	4 周龄 4-week-old	矮牵牛素-3-O-芸香糖苷 (反-对香豆酰)-5-O-葡萄糖苷 Petunidin-3-O-(trans-p-coumaroylrutinoside)-5-O-glucoside	抗衰老,减轻神经炎症、氧化应激和肝肾损伤 Anti-aging, alleviates neuroinflammation, oxidative stress and liver and kidney damage
雄性昆明小鼠 ^[64] Males Kunming mice	D-gal, i. p.	150	6 周龄 6-week-old	白术多糖 Atractylodes macrocephala polysaccharides	调节肠道菌群,改善大脑皮层病理形态和超微结构,清除自由基和减少线粒体氧化损伤 Regulates intestinal flora, improves the pathological morphology and ultrastructure of the cerebral cortex, scavenges free radicals and reduces mitochondrial oxidative damage
雄性 C57BL/6J 小鼠 ^[65] Male C57BL/6J mice	D-gal, i. p.	150	7~8 周龄 7 ~ 8-week-old	石榴苷 Punicalin	改善了记忆和学习缺陷,抗炎、抗氧化、减少小胶质细胞活化,减少星形细胞增多 Improves memory and learning deficits, anti-inflammatory, antioxidant, reduces microglial activation, and reduces astrogliosis
雄性 ICR 小鼠 ^[66] Male ICR mice	D-gal, i. p.	150	6 周龄 6-week-old	牛蒡多糖 <i>Arctium lappa</i> L. polysaccharide	抗炎、抗氧化应激,调节肠道菌群,恢复肠道屏障功能,缓解肝肾功能障碍 Anti-inflammatory, anti-oxidative stress, regulates intestinal flora, restores intestinal barrier function, and alleviates liver and kidney dysfunction
雄性 C57BL/6 小鼠 ^[67] Male C57BL/6 mice	D-gal, i. p.	150	6 周龄 6-week-old	牡荆素 Vitexin	抗氧化,抑制大脑衰老并改善与衰老相关的认知障碍,减少炎症,抑制应激诱导的衰老 Antioxidant, inhibits brain aging and improves aging-related cognitive impairment, reduces inflammation, inhibits stress-induced aging
雄性 SD 大鼠 ^[68] Male SD rats	D-gal, s. c.	150	12 周龄 12-week-old	黄精多糖 <i>Polygonatum</i> polysaccharide	减弱脂质过氧化,抑制铁死亡 Attenuates lipid peroxidation and inhibits ferroptosis

2.3.6 OA

OA 是一种有效的蛋白磷酸酶 1 (protein phosphatase 1, PP1) 和蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 抑制剂,可引起与神经原纤维变性相关的神经毒性。在向大鼠脑室内注射 OA 并暴露于低氧条件下 3 d,会呈现出 tau 过度磷酸化以及 Aβ 上调,同时伴有神经递质系统功能障碍、认知缺陷、氧化应激增强^[79]。这些都被认为是 AD 发病机制的主要参与者。因此,OA 可用作 AD 实验模型的神经毒素,通过产生过量

的 ROS 及 p-tau,诱导神经细胞凋亡和炎症改变^[80]。此外,其细胞实验还表现出脂质过氧化水平升高,tau 相关激酶 (GSK3β、ERK1/2 和 AMPK) 的过度激活,以及 tau 蛋白磷酸化水平的显著增加^[81]。另外,OA 可减弱大鼠海马齿状回神经元的突触可塑性。该模型可以模拟在 AD 中观察到的大多数神经病理学、神经行为学和神经化学变化,但缺乏在 AD 中观察到的淀粉样蛋白病理学。现对已应用于中药研究的 OA 诱导啮齿类 AD 动物模型进行介绍 (见表 7)。

2.3.7 SCOP

SCOP 是一种胆碱能受体阻滞剂,可穿过血脑屏障。通过腹腔注射 SCOP 能够降低脑内乙酰胆碱水平,诱发中枢神经系统中的胆碱能神经通路及记忆环路的功能紊乱,造成动物短期学习和记忆障碍,可模拟 AD 患者多动、焦虑样行为的异常表现^[88]。有研究发现,SCOP 对脑血容量信号的影响很小,但会导致各个大脑区域之间的功能连接总体降低^[89]。另外,SCOP 可引发记忆功能障碍,表现出海马体中的突触蛋白表达异常,如

突触素、突触素 1 (synaptojanin 1,SYNJ1)、突触后密度蛋白 95 (postsynaptic density protein 95,PSD-95),可能由 BDNF-ERK-CREB 信号通路影响突触可塑性^[90]。该模型操作简单、快速有效、广泛用于 AD 药物筛选。其局限性表现为动物模型缺乏 AD 中神经元变性、Aβ 沉积、tau 蛋白异常等典型病理改变,需结合其他模型进行综合研究,而且 SCOP 引起的胆碱能功能损害具有一过性特征,不适合长期研究。现对已应用于中药研究的 SCOP 诱导啮齿类 AD 动物模型进行介绍 (见表 8)。

表 6 AlCl₃ 诱导啮齿类 AD 动物模型
Table 6 AlCl₃-induced rodent AD models

造模动物品系 Model animal strains	造模方式 Modeling method	药物剂量/ (mg/kg) Drug dosage	年龄 Age	已应用评价的中药组分 Traditional Chinese medicine components that have been evaluated	中药组分的药效机制 Pharmacodynamic mechanisms of Chinese herbal medicine components
雄性 C57 小鼠 ^[73] Male C57 mice	AlCl ₃ , i. g.	200	未提及 Not mentioned	益母草碱 Leonurine	提高机体的抗氧化水平,促进神经递质的表达与传递,降低氧化应激和神经炎症水平 Improves the body's antioxidant level, promotes the expression and transmission of neurotransmitters, and reduces oxidative stress and neuroinflammation levels
雄性 SD 大鼠 ^[74] Male SD rats	AlCl ₃ , i. p.	70	未提及 Not mentioned	酢浆草甲醇提取物 Methanolic extract of <i>Oxalis corniculata</i> Linn.	通过抗氧化、抗炎和抗凋亡,发挥神经保护作用 Exerts neuroprotective effects through antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptosis
SD 大鼠 ^[75] SD rats	AlCl ₃ , p. o.	100	9 周 9-week-old	小檗碱 Berberine	抑制乙酰胆碱酯酶活性,增加神经递质水平,降低氧化应激 Inhibits acetylcholinesterase activity, increases neurotransmitter levels, and reduces oxidative stress
雄性 SD 大鼠 ^[76] Male SD rats	AlCl ₃ , p. o.	100	15 周龄 15-week-old	葡萄细粉 Vitis vinifera fine powder	减少了氧化应激、神经炎症,改善胆碱能作用 Reduces oxidative stress, neuroinflammation, and improves cholinergic effects
雄性 SD 大鼠 ^[77] Male SD rats	AlCl ₃ , i. p.	10	未提及 Not mentioned	红辣椒(辣椒)甲醇提取物 Red hot pepper (<i>Capsicum annuum</i>) methanolic extract	缓解氧化应激和神经炎症,发挥神经保护作用 Relieves oxidative stress and neuroinflammation and exerts neuroprotective effects
雄性 白化小鼠 ^[78] Male albino mice	AlCl ₃ , s. c.	50	4 月龄 4-month-old	人参皂甙 Rb1 Ginsenoside Rb1	抑制氧化应激导致的神经毒性,抑制小胶质细胞和星形胶质细胞的激活 Inhibits neurotoxicity caused by oxidative stress, inhibits the activation of microglia and astrocytes

表 7 OA 诱导啮齿类 AD 动物模型
Table 7 OA-induced rodent AD models

造模动物品系 Model animal strains	造模方式 Modeling method	药物剂量 Drug dosage	年龄 Age	已应用评价的中药组分 Traditional Chinese medicine components that have been evaluated	中药组分的药效机制 Pharmacodynamic mechanisms of Chinese herbal medicine components
雄性 Wistar 大鼠 ^[82] Male Wistar rats	OA, i. c. v.	200 ng/5 μ L	成年 Adult	鞣花酸 Ellagic acid	减轻脑氧化应激, 抗凋亡, 调节神经胶质细胞和炎症因子 Relieves cerebral oxidative stress, anti-apoptosis, regulates glial cells and inflammatory factors
雄性 Wistar 大鼠 ^[83] Male Wistar rats	OA, i. c. v.	200 ng/4 μ L	未提及 Not mention	印度蜂王浆 Indian Royal Jelly	抑制氧化应激和神经炎症, 改善胆碱能功能障碍 Inhibits oxidative stress and neuroinflammation and improves cholinergic dysfunction
雌性 SD 大鼠 ^[84] Female SD rats	OA, i. c. v.	200 ng/kg	15 周龄 15-week-old	葫芦素 E Cucurbitacin E	改善氧化代谢和调节炎症 Improves oxidative metabolism and regulates inflammation
雄性 Wistar 大鼠 ^[85] Male Wistar rats	OA, i. c. v.	200 ng	12~13 周龄 12~13-week-old	Kolaviron	抑制氧化应激、神经炎症, 减轻细胞凋亡、焦亡, 改善线粒体功能 Inhibits oxidative stress and neuroinflammation, reduces apoptosis and pyroptosis, and improves mitochondrial function
雄性 SD 大鼠 ^[86] Male SD rats	OA, i. c. v.	200 ng/kg	8~9 周龄 8~9-week-old	黄芩茎叶黄酮 Scutellaria baicalensis georgi stem and leaf flavonoids	调节神经递质, 抗氧化、调节炎症细胞因子 Regulates neurotransmitters, antioxidants, and regulates inflammatory cytokines
雄性 ICR 小鼠 ^[87] Male ICR mice	OA, i. c. v.	100 ng/ μ L	6 周龄 6-week-old	吴茱萸碱 Evodiamine	下调大脑中的 tau 磷酸化 Downregulation of tau phosphorylation in the brain

表 8 SCOP 诱导啮齿类 AD 动物模型
Table 8 SCOP-induced rodent models

造模动物品系 Model animal strains	造模方式 Modeling method	药物剂量/ (mg/kg) Drug dosage	年龄 Age	已应用评价的中药组分 Traditional Chinese medicine components that have been evaluated	中药组分的药效机制 Pharmacodynamic mechanisms of Chinese herbal medicine components
雄性 C57B/L6 小鼠 ^[91] Male C57B/L6 mice	SCOP, i. p.	3	未提及 Not mention	青藤碱 Sinomenine	改善胆碱能系统失调、肠道及神经炎症、生物屏障损伤以及肠道菌群紊乱 Improve cholinergic system disorders, intestinal and neuroinflammation, biological barrier damage, and intestinal flora disorders
雄性 Wistar 大鼠 ^[92] Male Wistar rats	SCOP, i. p.	3	8 周龄 8-week-old	球松素 Pinostrobin	调节氧化应激、胆碱能和谷氨酸能系统 Regulates oxidative stress, cholinergic, and glutamatergic systems
雄性 SD 大鼠 ^[93] Male SD rats	SCOP, i. p.	1.5	未提及 Not mention	香草酸 Vanillic acid	调节胆碱能系统损伤, 减少氧化应激, 防止神经元损伤和突触功能障碍 Regulates cholinergic system damage, reduces oxidative stress, and prevents neuronal damage and synaptic dysfunction

续表8

造模动物品系 Model animal strains	造模方式 Modeling method	药物剂量/ (mg/kg) Drug dosage	年龄 Age	已应用评价的中药组分 Traditional Chinese medicine components that have been evaluated	中药组分的药效机制 Pharmacodynamic mechanisms of Chinese herbal medicine components
雄性 BALB/C 小鼠 ^[94] Male BALB/C mice	SCOP , i. p.	1	7~8 周龄 7~8-week-old	毛茛苷 Ranuncoside	降低血糖和血脂,减少氧化应激和神经炎症 Lowers blood sugar and blood lipids, reduces oxidative stress and neuroinflammation
雄性 Wistar 大鼠 ^[95] Male Wistar rats	SCOP , i. p.	1	60 日龄 60-day-old	黑莓果提取物 Blackberry fruit extract	调节氧化应激和胆碱能信号传导 Regulates oxidative stress and cholinergic signaling
C57BL/6 小鼠 ^[96] C57BL/6 mice	SCOP , i. p.	3	8~10 周龄 8 ~ 10-week-old	芝麻酚 Sesamol	平衡胆碱能系统,减少神经炎症和氧化应激,改善线粒体功能障碍 Balances the cholinergic system, reduces neuroinflammation and oxidative stress, and improves mitochondrial dysfunction

3 小结

AD 作为当前老年病医学研究领域的热点问题,其重要性和关注度日益倍增。现有的治疗大多是对症治疗为主,虽在一定程度上缓解了 AD 的认知和行为,但无法改变疾病的进程。靶向药物的研发基本以失败告终,其可能原因是由于目前使用的 AD 动物模型存在一定局限性。本研究对现有的常见 AD 动物模型进行了分类总结,介绍了相关动物品系、药物剂量、造模方式等内容,并对不同模型的优缺点进行了评价,认为现有的 AD 动物模型虽种类较多,但与自然发展的人类 AD 患者的病理过程和特点方面还存在着一定的差异。从全文来看,现有的中药组分研究大多建立在单一的动物模型中,并不能表示这些药效机制会发生在其他动物模型中。目前使用的动物模型存在一定局限性,影响了研究成果的临床转化。例如,无法完全模拟人类 AD 的所有临床表现和病理过程,多通过引入特定的因素来模仿一些 AD 的特征;大多数的 AD 动物模型与人类 AD 患者的发病年龄和病程不匹配,通常发生在相对较短的时间内,且缺乏与老年人群体相关的交互因素的影响,AD 的进程变化可能有差异;实验动物与人类在生理、基因、代谢等方面存在显著差异;现有的评估方法不能全面反映病理和认知功能的变化,某些早期的轻微变化可能无法通过现有的测试被捕捉到。本文所述各类 AD 模型的优缺点(见表 9)。未来需要不断改进动物模型,开

发具有更高的转化性、能够模拟人类 AD 疾病复杂性和多样性的动物模型。建立能够反映不同发病阶段(如早期、轻度、重度)的动物模型。通过引入衰老模型或合并其他疾病(如糖尿病、高血压等)的动物模型,模拟临床 AD 患者的复杂生理状况,研究这些因素如何影响 AD 的进展。在实验设计中,除了常规的行为学测试(如迷宫测试)外,还可以增加更多的认知和生理指标,结合神经影像学技术、神经生物学标志物(如血浆或脑脊液中的淀粉样蛋白、tau 蛋白等)进行综合评估。开发新型的生物标志物(如用于早期诊断的脑电图、磁共振成像等)和可穿戴设备,提升模型对临床症状和治疗反应的敏感度。通过跨物种和跨学科的合作,结合小鼠模型、非人灵长类动物模型、人类细胞模型、脑器官等多层次、多模型的方法,增强研究的转化性。应用精准医学的思路,基于个体的遗传背景、环境因素和生理特征来设计和优化 AD 动物模型。在进行临床前实验时,与临床研究人员保持紧密合作,确保实验设计能够直接反映临床需求和临床结果。通过早期的临床数据反馈,修正动物模型中的设计缺陷和不足之处,从而提高模型的临床相关性。关注中医药相关的证候研究模型开发,探索中药活性成分在中医证候模型中的应用。在今后的实验研究中应依据研究机制选择不同动物品系,为 AD 治疗药物的研究开发及作用机制探讨提供可行的依据,力求做到全面、系统、合理、科学评价药物的疗效与作用机制,更好地为临床服务。

表 9 不同 AD 模型的优缺点
Table 9 Pros and cons of different AD models

分类 Category	造模方法 Modeling methods	优势 Advantage	存在问题 Problems and deficiencies
自然衰老动物模型 Animal models of natural aging	日常维持饲养 Daily maintenance feeding	操作简单,在模拟人类 AD 的自然发病过程和疾病机制上,更贴近临床的实际情况 Operation is simple, and it is closer to the actual clinical situation in simulating the natural pathogenesis process and disease mechanism of human AD	发病进程缓慢,实验周期长,投入成本较大,染病机率较高,低生殖率,个体差异大,控制变量困难 Pathogenesis process is slow, the experimental cycle is long, the input cost is large, the probability of infection is high, the reproductive rate is low, the individual differences are large, and the control variables are difficult
	转基因动物模型 Transgenic animal models	基因突变可控性,病理症状已知,有利于 AD 遗传基础及发病机制研究 Controllability of gene mutations and the known pathological symptoms are conducive to the study of the genetic basis and pathogenesis of AD	部分再现 AD 病理特征,基因表达稳定性差,造模过程繁琐且成本高,寿命较短,出生率低 Some reproduce the pathological characteristics of AD, the gene expression stability is poor, the modeling process is cumbersome and costly, the life span is short, and the birth rate is low
药物介入性动物模型 Drug-interventional animal models	A β , i. c. v.	快速诱发 A β 沉积,注射剂量和部位的可控性,影响因素单一,造模时间短 Rapid induction of A β deposition, controllability of injection dose and site, single influencing factor, and short molding time	缺乏长期的病理特征,A β 在脑内分布不均,注射过程可能造成创伤或应激反应,无法全面反所有的 AD 病理变化 Lack of long-term pathological features, uneven distribution of A β in the brain, and the injection process may cause trauma or stress response, and it is impossible to comprehensively reverse all pathological changes of AD
	IBO, i. c. v.	具胆碱能神经毒性,可迅速损伤大脑中与 AD 相关的特定区域,效果稳定且可重复 Cholinergic neurotoxicity that rapidly damages specific areas of the brain associated with AD with stable and reproducible effects	损伤具非选择性,长期效应不足,不能完全模拟人类 AD 病理特征和病理过程 Lesion is non-selective, and the long-term effect is insufficient, which cannot fully mimic the pathological characteristics and pathological process of human AD
	STZ, i. c. v., i. p.	脑室内注射可精准控制注射剂量和部位,模拟 AD 脑内胰岛素代谢紊乱。腹腔注射操作简单,创伤较小,成本低 Intraventricular injection can accurately control the injection dose and site, simulating the insulin metabolism disorder in the brain of AD. Intraperitoneal injection is simple, less invasive, and less costly	脑室内注射操作技术要求高、对动物创伤较大,存活率低。腹腔注射药物的分布不够精准,可能影响模型的可靠性 Intraventricular injection is technically demanding, traumatic to animals, and has a low survival rate. The distribution of intraperitoneal drugs is not precise and may affect the reliability of the model
	D-gal, i. p., s. c.	简便易行,成本较低,周期短,重复性高,主要基于氧化应激和炎症机制 It is simple and easy to implement, low cost, short cycle time, and high reproducibility, mainly based on oxidative stress and inflammatory mechanisms	可引起局部的刺激反应或长期的免疫系统反应,不能完全模拟 AD 所有病理机制 It can cause local irritation or long-term immune system response, and cannot fully mimic all pathological mechanisms of AD
药物介入性动物模型 Drug-interventional animal models	AlCl ₃ , i. p., i. g., p. o., s. c.	操作简便、成本低、死亡率低、实验周期短。腹腔注射可快速且精准的给药。皮下注射适合缓慢释放药物。口服给药方式损伤小,贴近人类实际。灌胃对动物的应激较少 It is easy to operate, low cost, low mortality and short experimental cycle. Intraperitoneal injections allow for rapid and precise administration. Subcutaneous injections are suitable for slow-release medications. The oral administration method has little damage and is close to the actual human experience. Intra gastric administration is less stressful for the animal	腹腔注射应激较大,引起腹腔的局部不良反应。灌胃操作难度大,药物吸收效果不一。口服药物生物利用度低,起效较慢。皮下注射吸收速度较慢,可能有局部反应 Intraperitoneal injection is stressful, causing local adverse reactions in the abdominal cavity. Gavage is difficult to operate, and the effect of drug absorption is varied. Oral drugs have low bioavailability and a slower onset of action. Subcutaneous injections are slower to absorb and may have local reactions

续表9

分类 Category	造模方法 Modeling methods	优势 Advantage	存在问题 Problems and deficiencies
	OA, i. c. v.	研究 tau 蛋白的磷酸化和神经细胞损伤,具有快速性和高特异性 Phosphorylation of tau protein and nerve cell damage are studied with rapidity and high specificity	不能完全模拟 AD 的所有病理,长期效果不明确,可能存在非特异性效应 It cannot completely mimic all pathologies of AD, the long-term effect is unclear, and there may be non-specific effects
	SCOP, i. p.	良好的可控性,可干扰乙酰胆碱系统,模拟早期认知障碍,快速建立模型,成本较低 It has good controllability, can interfere with the acetylcholine system, simulate early cognitive impairment, and quickly establish a model with low cost	作用是暂时性的,不完全代表阿尔茨海默病的病理特征,果量可引起毒性反应,引发的认知功能障碍是可逆的 Effect is transient and does not fully represent the pathological features of Alzheimer's disease, and the amount of fruit can cause toxic reactions, and the cognitive dysfunction caused by it is reversible

参考文献:

[1] 徐勇,王军,王虹峥,等. 2023 中国阿尔茨海默病数据与防控策略 [J]. 阿尔茨海默病及相关病杂志, 2023, 6 (3): 175-192, 173.

XU Y, WANG J, WANG H Z, et al. 2023 Data and strategies of prevention and control for Alzheimer's disease in China [J]. Chin J Alzheimer's Dis and Relat Disord, 2023, 6(3): 175-192, 173.

[2] ROSTAGNO A A. Pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(1): 107.

[3] 中华人民共和国民政部. 2023 年度国家老龄事业发展公报 [EB/OL]. [2024-10-12]. https://www.gov.cn/lianbo/bumen/202410/content_6979487.htm.

MINISTRY OF CIVIL AFFAIRS OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA. 2023 national communiqué on the development of aging undertakings. [EB/OL]. [2024-10-12]. https://www.gov.cn/lianbo/bumen/202410/content_6979487.htm.

[4] 王刚,齐金蕾,刘馨雅,等. 中国阿尔茨海默病报告 2024 [J]. 诊断学理论与实践, 2024, 23(3): 219-256.

WANG G, QI J L, LIU X Y, et al. China Alzheimer report 2024 [J]. J Diagn Concepts & Pract, 2024, 23(3): 219-256.

[5] VIGNON A, SALVADOR-PRINCE L, LEHMANN S, et al. Deconstructing Alzheimer's disease: how to bridge the gap between experimental models and the human pathology? [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16): 8769.

[6] CHEN Z Y, ZHANG Y. Animal models of Alzheimer's disease: applications, evaluation, and perspectives [J]. Zool Res, 2022, 43(6): 1026-1040.

[7] HAN J J. FDA Modernization Act 2.0 allows for alternatives to animal testing [J]. Artif Organs, 2023, 47(3): 449-450.

[8] JOSEPH X, AKHIL V, ARATHI A, et al. Comprehensive development in organ-on-A-chip technology [J]. J Pharm Sci, 2022, 111(1): 18-31.

[9] PASPALAS C D, CARLYLE B C, LESLIE S, et al. The aged *Rhesus macaque* manifests Braak stage III/IV Alzheimer's-like pathology [J]. Alzheimers Dement, 2018, 14(5): 680-691.

[10] DE SOUSA A A, RIGBY DAMES B A, GRAFF E C, et al. Going beyond established model systems of Alzheimer's disease: companion animals provide novel insights into the neurobiology of aging [J]. Commun Biol, 2023, 6 (1): 655.

[11] LI H, XIANG B L, LI X, et al. Cognitive deficits and Alzheimer's disease-like pathologies in the aged Chinese tree shrew [J]. Mol Neurobiol, 2024, 61(4): 1892-1906.

[12] WAINDOK P, JANECEK-ERFURTH E, LINDENWALD D L, et al. *Toxocara canis*-and *Toxocara cati*-induced neurotoxocariosis is associated with comprehensive brain transcriptomic alterations [J]. Microorganisms, 2022, 10 (1): 177.

[13] COGRAM P, GARDUÑO B M, REN B, et al. First international conference on unconventional animal models of Alzheimer's disease and aging [J]. J Alzheimers Dis, 2024, 98(1): 333-336.

[14] 贾亚泉,宋军营,曾华辉,等. 阿尔茨海默病动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 381-386.

JIA Y Q, SONG J Y, ZENG H H, et al. Research progress on animal models of Alzheimer's disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(3): 381-386.

[15] VAN DAM D, DE DEYN P P. How does a researcher choose the best rodent model for their Alzheimer's disease drug discovery study? [J]. Expert Opin Drug Discov, 2020, 15(3): 269-271.

- [16] BAGLIETTO-VARGAS D, FORNER S, CAI L, et al. Generation of a humanized A β expressing mouse demonstrating aspects of Alzheimer's disease-like pathology [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2421.
- [17] AYERS J, LOPEZ T P, STEELE I T, et al. Severe neurodegeneration in brains of transgenic rats producing human tau prions [J]. Acta Neuropathol, 2024, 148(1): 25.
- [18] FORET M K, ORCIANI C, WELIKOVITCH L A, et al. Early oxidative stress and DNA damage in A β -burdened hippocampal neurons in an Alzheimer's-like transgenic rat model [J]. Commun Biol, 2024, 7(1): 861.
- [19] DRUMMOND E, WISNIEWSKI T. Alzheimer's disease: experimental models and reality [J]. Acta Neuropathol, 2017, 133(2): 155–175.
- [20] QIAN Z, WANG Z, LI B, et al. Thy1-ApoE4/C/EBP β double transgenic mice act as a sporadic model with Alzheimer's disease [J]. Mol Psychiatry, 2024, 29(10): 3040–3055.
- [21] TANG R, JIAN Y, HU Z, et al. A bioinformatics-based study on methylation alterations of the FBLN1 gene in hippocampal tissue of Alzheimer's disease model DKO and DTG mice [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(16): 9036.
- [22] 田升, 叶田园, 程肖蕊. 3 $\times$ Tg-AD 小鼠的行为学和病理特征研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2023, 37(S1): 64–65.
TIAN S, YE T Y, CHENG X R. 3 $\times$ advances in the behavioral and pathological characteristics of Tg-AD mice [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2023, 37(S1): 64–65.
- [23] WEST E W, MOLHEMI S, HANSEN C T, et al. Comprehensive analysis of the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease using dMRI, immunohistochemistry, and neuronal and glial functional metabolic mapping [J]. Biomolecules, 2024, 14(10): 1294.
- [24] KING A. The search for better animal models of Alzheimer's disease [J]. Nature, 2018, 559(7715): S13–S15.
- [25] LI X, HUANG L, KONG L, et al. Ginsenoside Rg1 alleviates learning and memory impairments and A β disposition through inhibiting NLRP1 inflammasome and autophagy dysfunction in APP/PS1 mice [J]. Mol Med Rep, 2023, 27(1): 6.
- [26] CHEN S, LIU H, WANG S, et al. The neuroprotection of verbascoside in Alzheimer's disease mediated through mitigation of neuroinflammation via blocking NF- κ B-p65 signaling [J]. Nutrients, 2022, 14(7): 1417.
- [27] ZHANG M, WU Q, ZHAO R, et al. Isobavachalcone ameliorates cognitive deficits, and A β and tau pathologies in triple-transgenic mice with Alzheimer's disease [J]. Food Funct, 2021, 12(17): 7749–7761.
- [28] KIM S, SHIN S J, NAM Y, et al. Korean red ginseng polysaccharide as a potential therapeutic agent targeting tau pathology in Alzheimer's disease [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 263(Pt 2): 130516.
- [29] SUN Z, LIU J, CHEN Z, et al. *Lycium barbarum* extract enhanced neuroplasticity and functional recovery in 5xFAD mice via modulating microglial status of the central nervous system [J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(11): e70123.
- [30] JU I G, LEE S, IM H, et al. Artemisiae Iwayomogii Herba mitigates excessive neuroinflammation and A β accumulation by regulating the pro-inflammatory response and autophagy-lysosomal pathway in microglia in 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease [J]. GeroScience, 2025, 47(2): 1957–1972.
- [31] RAPAKA D, ADIUKWU P C, BITRA V R. Experimentally induced animal models for cognitive dysfunction and Alzheimer's disease [J]. MethodsX, 2022, 9: 101933.
- [32] ZHANG H, LI X, WANG X, et al. Cellular response to β -amyloid neurotoxicity in Alzheimer's disease and implications in new therapeutics [J]. Anim Model Exp Med, 2023, 6(1): 3–9.
- [33] PANDEY R, URBAN B. Oligomer formation by physiologically relevant C-terminal isoforms of amyloid β -protein [J]. Biomolecules, 2024, 14(7): 774.
- [34] JOHANSSON L, SANDBERG A, NYSTRÖM S, et al. Amyloid beta 1-40 and 1-42 fibril ratios and maturation level cause conformational differences with minimal impact on autophagy and cytotoxicity [J]. J Neurochem, 2024, 168(9): 3308–3322.
- [35] ALI J, KHAN A, PARK J S, et al. Neuroprotective effects of N-methyl-(2S, 4R)-trans-4-hydroxy-L-proline (NMP) against amyloid- β -induced Alzheimer's disease mouse model [J]. Nutrients, 2023, 15(23): 4986.
- [36] HAO F, ZENG M, CAO B, et al. Neobavaisoflavone ameliorates memory deficits and brain damage in A β _{25–35}-induced mice by regulating SIRT1 [J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(10): e70068.
- [37] SONG M, ZHANG S, YU W, et al. Gomisins N rescues cognitive impairment of Alzheimer's disease by targeting GSK3 β and activating Nrf2 signaling pathway [J]. Phytomedicine, 2024, 132: 155811.
- [38] SU W, WANG Y, SHAO S, et al. Crocin ameliorates neuroinflammation and cognitive impairment in mice with Alzheimer's disease by activating PI3K/AKT pathway [J]. Brain Behav, 2024, 14(5): e3503.
- [39] CAO B, ZENG M, HAO F, et al. *Cornus officinalis* Sieb. Et Zucc. attenuates A β _{25–35}-induced mitochondrial damage and neuroinflammation in mice by modulating the ERK pathway [J]. Phytomedicine, 2024, 129: 155709.

- [40] GU Z, LV X, GUO Y, et al. Total flavonoids of *Cynomorium songaricum* attenuates cognitive defects in an A β 1-42-induced Alzheimer's disease rat model by activating BDNF/TrkB signaling transduction [J]. *Neuroreport*, 2023, 34(17): 825-833.
- [41] WAN M, SUN S, DI X, et al. Icaritin improves learning and memory function in A β ₁₋₄₂-induced AD mice through regulation of the BDNF-TrkB signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318(Pt B): 117029.
- [42] MARTÍNEZ-TORRES N I, VÁZQUEZ-HERNÁNDEZ N, MARTÍN-AMAYA-BARAJAS F L, et al. Ibotenic acid induced lesions impair the modulation of dendritic spine plasticity in the prefrontal cortex and amygdala, a phenomenon that underlies working memory and social behavior [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 896: 173883.
- [43] 李伟. 胆碱能神经病理损伤阿尔茨海默病模型构建 [J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(24): 5359-5364.
LI W. Construction of a model of Alzheimer's disease in cholinergic neuropathological damage [J]. *Chin J Gerontol*, 2020, 40(24): 5359-5364.
- [44] ZONG N, LI F, DENG Y, et al. Icaritin, a major constituent from *Epimedium brevicornum*, attenuates ibotenic acid-induced excitotoxicity in rat hippocampus [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 313: 111-119.
- [45] YANG X, JI J, LIU C, et al. HJ22, a Novel derivative of piperine, Attenuates ibotenic acid-induced cognitive impairment, oxidativestress, apoptosis and inflammation *via* inhibiting the protein-protein interaction of Keap1-Nrf2 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 83: 106383.
- [46] HE L, DENG Y, GAO J, et al. Icariside II ameliorates ibotenic acid-induced cognitive impairment and apoptotic response *via* modulation of MAPK pathway in rats [J]. *Phytomedicine*, 2018, 41: 74-81.
- [47] KARTHICK C, PERIYASAMY S, JAYACHANDRAN K S, et al. Intrahippocampal administration of ibotenic acid induced cholinergic dysfunction *via* NR2A/NR2B expression; implications of resveratrol against Alzheimer disease pathophysiology [J]. *Front Mol Neurosci*, 2016, 9: 28.
- [48] ITTIYAVIRAH S P, RAMALINGAM K, SATHYAN A, et al. Thymoquinone-rich black cumin oil attenuates ibotenic acid-induced excitotoxicity through glutamate receptors in Wistar rats [J]. *Saudi Pharm J*, 2022, 30(12): 1781-1790.
- [49] YU X, WANG L N, MA L, et al. *Akebia saponin* D attenuates ibotenic acid-induced cognitive deficits and pro-apoptotic response in rats; involvement of MAPK signal pathway [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2012, 101(3): 479-486.
- [50] YU L, JIN J, XU Y, et al. Aberrant energy metabolism in Alzheimer's disease [J]. *J Transl Intern Med*, 2022, 10(3): 197-206.
- [51] PALADUGU L, GHARAIBEH A, KOLLI N, et al. Liraglutide has anti-inflammatory and anti-amyloid properties in streptozotocin-induced and 5xFAD mouse models of Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): E860.
- [52] DHIMAN N, DESHWAL S, RISHI V, et al. Zebrafish as a model organism to study sporadic Alzheimer's disease: Behavioural, biochemical and histological validation [J]. *Exp Neurol*, 2025, 383: 115034.
- [53] HE Y, WANG Y, LI X, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides improves cognitive functions in ICV-STZ-induced Alzheimer's disease mice model by improving the synaptic structural plasticity and regulating IRS1/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Neuromolecular Med*, 2024, 26(1): 15.
- [54] ERMIS M, ÇİFTÇİ G. Role of curcumin on beta-amyloid protein, tau protein, and biochemical and oxidative changes in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2024, 397(12): 9833-9844.
- [55] SU Y, LIU N, SUN R, et al. *Radix Rehmanniae Praeparata* (Shu Dihuang) exerts neuroprotective effects on ICV-STZ-induced Alzheimer's disease mice through modulation of INSR/IRS-1/AKT/GSK-3 β signaling pathway and intestinal microbiota [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1115387.
- [56] YANG W, LIU Y, XU Q Q, et al. Sulforaphene ameliorates neuroinflammation and hyperphosphorylated tau protein *via* regulating the PI3K/Akt/GSK-3 β pathway in experimental models of Alzheimer's disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 4754195.
- [57] SOUZA L C, ANDRADE M K, AZEVEDO E M, et al. Andrographolide attenuates short-term spatial and recognition memory impairment and neuroinflammation induced by a streptozotocin rat model of Alzheimer's disease [J]. *Neurotox Res*, 2022, 40(5): 1440-1454.
- [58] WANG S S, ZHANG X, KE Z Z, et al. D-galactose-induced cardiac ageing; a review of model establishment and potential interventions [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(21): 5335-5359.
- [59] CHEN T, ZHOU Q, XIE D, et al. The method and effect of rapid establishment of a mild cognitive impairment model [J]. *Ann Palliat Med*, 2020, 9(6): 4119-4126.
- [60] ZAHEDI E, NASERI F M, ZAMANI E, et al. Ginger extract improves cognitive dysfunction *via* modulation of gut microbiota-derived short-chain fatty acids in D-galactose/ovariectomy-induced Alzheimer-like disease [J]. *Mol*

- Neurobiol, 2025, 62(4): 5095–5108.
- [61] 魏玉婷, 朱田田, 苏明莉, 等. D-半乳糖法制备 AD 动物模型的分类总结与初步评价 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 846–856.
- WEI Y T, ZHU T T, SU M L, et al. Classification and research progress on animal models of Alzheimer's disease prepared by D-galactose [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 846–856.
- [62] 朱紫悦, 金美玲, 许翔月, 等. D-半乳糖诱导脑老化模型机制的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 104–110, 117.
- ZHU Z Y, JIN M L, XU X Y, et al. Research progress on the mechanism of D-galactose-induced brain aging model [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 104–110, 117.
- [63] WANG R, REN L, WANG Y, et al. Multi-protective effects of petunidin-3-O-(*trans-p*-coumaroylrutinoside)-5-O-glucoside on D-gal-induced aging mice [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(20): 11014.
- [64] LI Y, LIN M, WANG G, et al. *Atractylodes macrocephala* polysaccharides shield a D-galactose-induced aging model *via* gut microbiota modulation [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 281(Pt 1): 136205.
- [65] CHEN P, ZHANG Z, LEI J, et al. Ellagitannin component punicalin ameliorates cognitive dysfunction, oxidative stress, and neuroinflammation *via* the inhibition of cGAS-STING signaling in the brain of an aging mouse model [J]. Phytother Res, 2024, 38(12): 5690–5712.
- [66] JIA X, LIU H, YIN G, et al. *Arctium lappa* L. polysaccharides alleviate oxidative stress and inflammation in the liver and kidney of aging mice by regulating intestinal homeostasis [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 280 (Pt 2): 135802.
- [67] HAN X, LI L, XIE J, et al. Vitexin promotes the anti-senescence effect *via* inhibiting JAK2/STAT3 in D-Galactose-induced progeria mice and stress-induced premature senescence [J]. Eur J Pharmacol, 2024, 980: 176865.
- [68] XIAO L, WEN H, PENG S, et al. *Polygonatum polysaccharide* ameliorates D-galactose-induced cognitive dysfunction in aging rats by inhibiting ferroptosis through activation of Nrf2 [J]. Neurosci Lett, 2024, 836: 137873.
- [69] SANAJOU S, ERKEKOĞLU P, ŞAHİN G, et al. Role of aluminum exposure on Alzheimer's disease and related glycogen synthase kinase pathway [J]. Drug Chem Toxicol, 2023, 46(3): 510–522.
- [70] RAI R, KALAR P L, JAT D, et al. Naringenin mitigates nanoparticulate-aluminium induced neuronal degeneration in brain cortex and hippocampus through downregulation of oxidative stress and neuroinflammation [J]. Neurochem Int, 2024, 178: 105799.
- [71] QIN X, LI L, NIE X, et al. Effects of chronic aluminum lactate exposure on neuronal apoptosis and hippocampal synaptic plasticity in rats [J]. Biol Trace Elem Res, 2020, 197(2): 571–579.
- [72] DEY M, SINGH R K. Chronic oral exposure of aluminum chloride in rat modulates molecular and functional neurotoxic markers relevant to Alzheimer's disease [J]. Toxicol Mech Methods, 2022, 32(8): 616–627.
- [73] 雷洁昕, 陈鹏, 周本宏. 益母草碱改善三氯化铝所诱导阿尔茨海默病小鼠学习记忆能力的作用机制 [J]. 河北医药, 2024, 46(15): 2251–2255.
- LEI J X, CHEN P, ZHOU B H. Leonurine improves learning and memory abilities in mice with Alzheimer's disease induced by aluminum trichloride through anti-inflammatory and antioxidant properties [J]. Hebei Med J, 2024, 46(15): 2251–2255.
- [74] ABU-ELFOTUH K, HAMDAN A M E, MOHAMED S A, et al. The potential anti-Alzheimer's activity of *Oxalis corniculata* Linn. Methanolic extract in experimental rats: Role of APOE4/LRP1, TLR4/NF- κ B/NLRP3, Wnt 3/ β -catenin/GSK-3 β , autophagy and apoptotic cues [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 324: 117731.
- [75] ISMAIL H, KHALID D, WASEEM D, et al. Bioassays guided isolation of berberine from *Berberis lycium* and its neuroprotective role in aluminium chloride induced rat model of Alzheimer's disease combined with insilico molecular docking [J]. PLoS One, 2023, 18(11): e0286349.
- [76] RAPAKA D, BITRA V R, VISHALA T C, et al. *Vitis vinifera* acts as anti-Alzheimer's agent by modulating biochemical parameters implicated in cognition and memory [J]. J Ayurveda Integr Med, 2019, 10(4): 241–247.
- [77] ABDEL-SALAM O M E, EL-SAYED EL-SHAMARKA M, YOUNESS E R, et al. Protective effect of hot peppers against amyloid β peptide and brain injury in AlCl₃-induced Alzheimer's disease in rats [J]. Iran J Basic Med Sci, 2023, 26(3): 335–342.
- [78] SHALABY A M, ALNASSER S M, AHMED KHAIRY D, et al. The neuroprotective effect of ginsenoside Rb1 on the cerebral cortex changes induced by aluminium chloride in a mouse model of Alzheimer's disease: a histological, immunohistochemical, and biochemical study [J]. J Chem Neuroanat, 2023, 129: 102248.
- [79] KAUSHAL A, WANI W Y, BAL A, et al. Okadaic acid and hypoxia induced dementia model of Alzheimer's type in rats [J]. Neurotox Res, 2019, 35(3): 621–634.
- [80] XIE A, CHENG G, WU J, et al. Highly BBB-permeable nanomedicine reverses neuroapoptosis and neuroinflammation to treat Alzheimer's disease [J]. Biomaterials, 2025, 312:

- 122749.
- [81] CARDOSO S, CARVALHO C, CORREIA S C, et al. Protective effects of 2, 4-dinitrophenol in okadaic acid-induced cellular model of Alzheimer's disease [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1870(6): 167222.
- [82] BALUCHNEJADMOJARAD T, ROGHANI M. Exploring the molecular mechanisms underlying neuroprotective effect of ellagic acid in okadaic acid-induced Alzheimer's phenotype [J]. *Metab Brain Dis*, 2024, 39(7): 1417–1432.
- [83] DUBEY R, SATHIYANARAYANAN L, SANKARAN S, et al. Nootropic effect of Indian Royal Jelly against okadaic acid induced rat model of Alzheimer's disease: Inhibition of neuroinflammation and acetylcholinesterase [J]. *J Tradit Complement Med*, 2023, 14(3): 300–311.
- [84] YILMAZ Ş G, ALMASRI S, KARABULUT Y Y, et al. Okadaic acid-induced Alzheimer's in rat brain: phytochemical cucurbitacin E contributes to memory gain by reducing TAU protein accumulation [J]. *OMICS*, 2023, 27(1): 34–44.
- [85] NAZARI-SERENJEH M, BALUCHNEJADMOJARAD T, HATAMI-MORASSA M, et al. Kolaviron neuroprotective effect against okadaic acid-provoked cognitive impairment [J]. *Heliyon*, 2024, 10(3): e25564.
- [86] MA S, XU C C, DONG Y C, et al. *Scutellaria baicalensis* Georgi stem and leaf flavonoids ameliorate the learning and memory impairment in rats induced by okadaic acid [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2025, 28(2): 263–277.
- [87] CHOU C H, YANG C R. Neuroprotective studies of evodiamine in an okadaic acid-induced neurotoxicity [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(10): 5347.
- [88] JAFARIAN S, LING K H, HASSAN Z, et al. Effect of zerumbone on scopolamine-induced memory impairment and anxiety-like behaviours in rats [J]. *Alzheimers Dement (N Y)*, 2019, 5: 637–643.
- [89] VIDAL B, PEREIRA M, VALDEBENITO M, et al. Pharmacofus in cognitive impairment: lessons from a preclinical model [J]. *J Psychopharmacol*, 2022, 36(11): 1273–1279.
- [90] KIM M, LEE H, KWON S, et al. Phlorotannin supplement improves scopolamine-induced memory dysfunction by rescuing synaptic damage in mice [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2024, 34(11): 2301–2309.
- [91] NI H, LIU M, CAO M, et al. Sinomenine regulates the cholinergic anti-inflammatory pathway to inhibit TLR4/NF- κ B pathway and protect the homeostasis in brain and gut in scopolamine-induced Alzheimer's disease mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 171: 116190.
- [92] THONGRONG S, PROMSRISUK T, SRIRAKSA N, et al. Alleviative effect of scopolamine-induced memory deficit *via* enhancing antioxidant and cholinergic function in rats by pinostrobin from *Boesenbergia rotunda* (L.) [J]. *Biomed Rep*, 2024, 21(3): 130.
- [93] CHOI G Y, LEE I S, MOON E, et al. Ameliorative effect of vanillic acid against scopolamine-induced learning and memory impairment in rat *via* attenuation of oxidative stress and dysfunctional synaptic plasticity [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 177: 117000.
- [94] SARA SALAHUDDIN H, ATTAULLAH S, ALI SHAH S, et al. Ranuncoside's attenuation of scopolamine-induced memory impairment in mice *via* Nrf2 and NF- κ B signaling [J]. *Saudi Pharm J*, 2023, 31(9): 101702.
- [95] DE MELLO J E, LUDUVICO K P, DOS SANTOS A, et al. Therapeutic potential of blackberry extract in the preventing memory deficits and neurochemical alterations in the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of a rat model with *Amnesia* [J]. *Metab Brain Dis*, 2023, 38(4): 1261–1272.
- [96] YUN D, WANG Y, ZHANG Y, et al. Sesamol attenuates scopolamine-induced cholinergic disorders, neuroinflammation, and cognitive deficits in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(42): 13602–13614.

〔收稿日期〕2024-12-23

付励严, 辛庆瑄, 岳保红. 铜代谢在肿瘤免疫中的作用及其靶向治疗策略 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(5): 131-138.

Fu LY, Xin QX, Yue BH. Role of copper metabolism in tumor development and tumor immunity [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(5): 131-138.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.05.013

铜代谢在肿瘤免疫中的作用及其靶向治疗策略

付励严^{1,2}, 辛庆瑄^{1,2}, 岳保红^{2,3*}

(1.河南中医药大学第一附属医院检验科,郑州 450046;2.河南中医药大学第一临床医学院,郑州 450046;
3.郑州大学第一附属医院,郑州 450052)

【摘要】 铜(Cu)是一种人体必需的微量元素,以氧化和还原形式参与多种代谢和信号传导过程。它与肿瘤发展的多个方面紧密相关,铜稳态的变化对肿瘤细胞的生长、转移、肿瘤微环境的调节、氧化应激反应、细胞信号传递,以及肿瘤细胞逃避免疫监视等过程都有显著影响。在肿瘤细胞中,铜代谢主要通过调节程序性死亡配体 1(programmed death-ligand 1,PD-L1)的表达来促进肿瘤的免疫逃逸。鉴于铜在肿瘤免疫中的重要作用,调节铜代谢已成为一种有前景的治疗策略。本文综述了铜在人体内的调控机制,探讨了铜代谢紊乱如何影响肿瘤的发生、发展,以及免疫和肿瘤微环境,同时,还探讨了将铜作为肿瘤免疫治疗靶点的研究价值。

【关键词】 铜;铜代谢;铜死亡;肿瘤免疫

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 05-0131-08

Role of copper metabolism in tumor development and tumor immunity

FU Liyan^{1,2}, XIN Qingxuan^{1,2}, YUE Baohong^{2,3*}

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. the First Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046. 3. the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)

【Abstract】 Copper is an indispensable trace element that participates in numerous metabolic and signaling processes in both its oxidized and reduced states. It is intimately associated with several facets of tumor development, and alterations in copper homeostasis can substantially influence processes such as tumor cell growth, metastasis, modulation of the tumor microenvironment, oxidative stress, cell signaling, and the evasion of tumor cells from immune surveillance. Copper metabolism in tumor cells predominantly promotes immune escape by regulating the expression of programmed death ligand 1. In view of its crucial role in tumor immunity, modulating copper metabolism has emerged as a prospective therapeutic approach. This paper reviews the regulatory mechanisms of copper within the human body and investigates how disruptions to copper metabolism impact tumorigenesis and progression, along with the immune and tumor microenvironments. We also discuss the research value of copper as a target for tumor immunotherapy, thus providing a theoretical basis for future research and clinical applications.

【基金项目】 河南省科技攻关资助项目(232102310140);中国博士后科学基金(2021M692929)。

【作者简介】 付励严(1998—),男,在读硕士研究生,研究方向:肿瘤免疫逃逸。E-mail:13170891050@163.com

【通信作者】 岳保红(1968—),男,博士,主任技师,教授,研究方向:血液病发病机制与实验诊断、血液肿瘤流式细胞术 MRD 监测技术。E-mail:fccybh@zzu.edu.cn

【Keywords】 copper; copper metabolism; copper death; tumor immunity

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

铜(Cu)作为人体的必须的微量元素之一,参与人体中多种生物反应过程并发挥重要作用,如酶活性、血红蛋白合成、抗氧化防御、免疫系统功能以及能量代谢等^[1]。正常情况下,细胞内铜的水平往往维持在相对稳定的较低水平范围内,而体内铜发生紊乱往往意味着身体处于疾病状态。近年来的研究表明,铜离子与多种肿瘤的发生和发展密切相关,包括肺癌、急性淋巴细胞白血病和多发性骨髓瘤等,而在这些肿瘤患者中,铜离子的水平通常会出现显著的升高^[2]。而通过进一步的研究发现,细胞内铜离子浓度的升高一方面可以促进肿瘤细胞的发生发展,另一方面也可以通过铜死亡的方式介导肿瘤细胞的死亡^[3]。

肿瘤免疫是指机体的免疫系统识别并攻击肿瘤细胞的过程,涉及到一系列复杂的生物学机制。研究发现,铜不但能直接影响免疫微环境介导肿瘤的免疫逃逸^[4],还能通过免疫原性细胞死亡^[5],以及髓源性抑制细胞来间接影响肿瘤免疫^[6]。本文将从铜对于肿瘤的发生发展,以及铜在肿瘤免疫中的影响进行综述。

1 铜代谢概述

食物的摄取是人体铜的主要来源。食物在胃和十二指肠被消化之后,铜被小肠上皮细胞吸收,吸收后的铜通过门静脉侧支循环进入肝,参与铜蓝蛋白的合成,然后再被运输至全身,铜在体内主要通过胆汁排出,极少部分是通过尿排出。铜在人体内扮演着多重角色,包括能量产生、氧化还原反应和神经传导等生理过程。并且,铜对神经系统功能、铁代谢、免疫功能和结缔组织形成等方面也都有一定作用。因此,维持适当的铜代谢对于维持新陈代谢和细胞功能至关重要。

1.1 人体中的铜代谢

在正常人体中,50%~70%的铜分布在肌肉和骨骼中,20%的铜分布在肝中,而剩余的5%~10%则分布在血液中^[7]。人体中的铜摄取主要依赖于铜转运蛋白1(copper transporter 1, Ctr1),该蛋白以高亲和力转运 Cu^+ 。然而,在人肠细胞中,

铜离子通常以二价Cu形式存在,并通过二价金属转运体1(divalent metal transporter 1, DMT1)进行运输。尽管DMT1能够有效地将 Cu^{2+} 运输进细胞,但这些铜离子在被运输后还需要进一步的还原为 Cu^+ ,才能被细胞直接利用^[8]。因此肠细胞产生steap2/3/4等胞内还原酶,将细胞表面的 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ ,然后 Cu^+ 再通过Ctr1转运^[9-10]。接着,铜会通过铜转运蛋白(ATPase copper-transporting alpha, ATP7A)蛋白在小肠上皮细胞的基底外膜运输,随后进入门静脉循环,最终到达肝^[11]。

1.2 细胞中的铜代谢

Cu^+ 进入细胞后参与细胞内的代谢过程,多余的铜则被金属硫蛋白(metallothionein, MT)和谷胱甘肽(glutathione, GSH)等铜储存蛋白储存起来^[8]。细胞内铜的转运是由铜伴侣介导的,如超氧化物歧化酶铜伴侣(copper chaperone for superoxide dismutase, Ccs)、抗氧化1铜伴侣蛋白(antioxidant 1 copper-chaperone for copper, Atox1)、细胞色素c氧化酶铜伴侣蛋白17(copper chaperone for cytochrome c oxidase, COX17),这些铜伴侣帮助铜到达细胞特定的部位。

Cu^+ 在线粒体中的转运主要通过COX17蛋白来实现,COX17负责将 Cu^+ 从细胞质输送至线粒体,它将 Cu^+ 传递给膜蛋白细胞色素c氧化酶1(synthesis of cytochrome c oxidase 1, SCO1)和细胞色素c氧化酶2(synthesis of cytochrome c oxidase 2, SCO2),然后膜蛋白SCO1和SCO2再将 Cu^+ 传递给线粒体细胞色素氧化酶亚基II(mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 2, MT-CO2)中来辅助ATP的产生。另外,COX17还能将铜离子输送至线粒体细胞色素氧化酶亚基I(mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1, MT-CO1),这是通过将铜传递给另一个线粒体蛋白(cytochrome c oxidase copper chaperone, COX11),即细胞色素c氧化酶的铜伴侣来实现的^[1]。细胞核的 Cu^+ 转运则可以通过Ccs和Atox1来实现,Ccs将 Cu^+ 转运到细胞核,激活缺氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor 1, HIF1)。而Atox1将铜转运到细胞核中,

可作为铜依赖的转录因子^[12]。

Cu^+ 在高尔基体的转运则由 Atox1 介导。在细胞质中, Atox1 与 ATP7A 和 ATP7B 协同工作, 负责将 Cu^+ 输送至高尔基体。但是, 如果 Cu^+ 在细胞内过度积累, 它将产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 可能会对细胞造成氧化损伤。为了预防这种情况, 细胞运动中中介体 1 (mediator of cell motility 1, MEMO1) 蛋白能够增强 Cu^+ 与 Atox1 的结合, 从而减少过量铜引起的 ROS 形成^[13]。在铜浓度升高时, ATP7A 和 ATP7B 会从高尔基体转移到后高尔基体位点或溶酶体, 以促进多余铜的排出^[14]。

2 铜在肿瘤发生发展中的作用

铜与肿瘤之间的关系确实相当复杂。研究表明, 在乳腺癌、口腔癌、胆囊癌、肝癌、胰腺癌和前列腺癌等多种癌症患者的血清中铜水平与健康人群相比会有所升高。然而, 需要注意的是, 铜水平的升高可能与肿瘤的发生、发展有关, 但也可能只是肿瘤存在的一种伴随现象, 并不一定意味着铜的过量摄入直接导致了肿瘤的发生。铜在肿瘤发展中的具体作用机制还需要进一步的研究来阐明^[8]。铜与肿瘤的关系见图 1。

2.1 铜增生介导肿瘤生长

铜介导肿瘤的发展涉及多种机制。包括增加能源供应、促进自噬的激活、血管增生、肿瘤的转移以及炎症反应。

2.1.1 驱动肿瘤存活与免疫抑制

铜通过支持线粒体 ATP 合成 (MT-CO1/MT-CO2 辅因子) 和激活自噬 (ULK1/ULK2-CRIP2 动态平衡), 为肿瘤细胞提供能量并增强其在应激条件下的存活能力。铜作为 MT-CO1 和 MT-CO2 的辅因子, 而 MT-CO1 和 MT-CO2 对于 ATP 的产生起到关键的作用, 这也是肿瘤细胞快速分裂的原因^[15]。此外, 铜还能够激活自噬机制, 进而支持肿瘤细胞的存活、生长和增殖。总的来说, 铜作为 Unc-51 样激酶 1 (Unc-51-like kinase 1, Unc51) 样自噬激活激酶 1 (Unc-51-like autophagy activating kinase 1, ULK1) 和 ULK2 的辅因子, 而这两种激酶在自噬体形成过程中发挥着启动作用^[16]; 富含半胱氨酸的蛋白 2 (cysteine-rich protein 2, CRIP2) 作为一种能够抑制自噬的蛋白, 它通过参与铜代谢进而影响癌细胞中自噬的激活^[17]。此外, 铜通过稳定核缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) 和激活核因子 κB (nuclear factor kappa-B, NF- κB) 通路, 诱导 VEGF、FGF2 等促血管因子表达, 促进异常血管增生^[18-19]。这种紊乱的血管网络不仅加速肿瘤生长, 还形成物理屏障, 阻碍 T 细胞等免疫细胞浸润, 直接削弱抗肿瘤免疫应答。

2.1.2 介导炎症与转移相关的免疫逃逸

肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs) 通过 CD44 内吞 Cu^+ , 引发

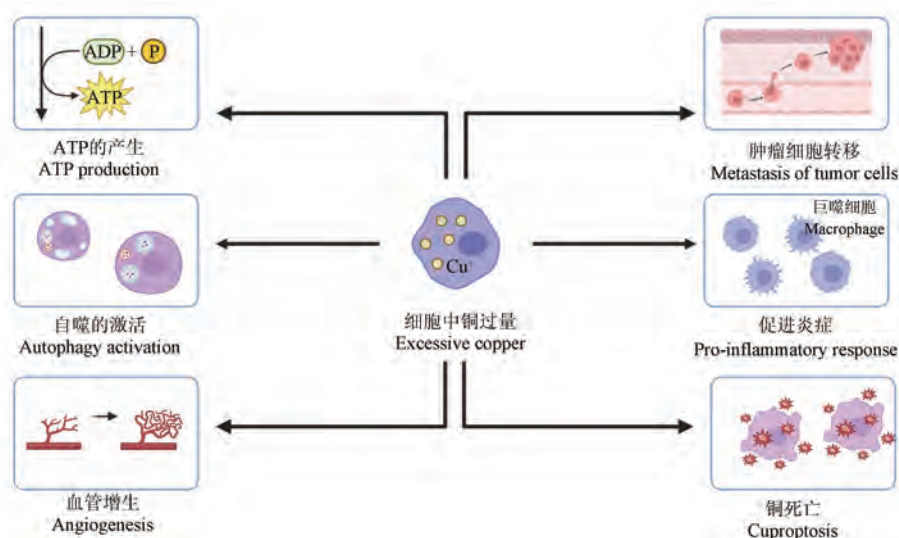


图 1 铜与肿瘤的关系 (由 figdraw 绘制)

Figure 1 Relationship between copper and tumor (by figdraw)

NAD(H) 氧化还原循环驱动的代谢重编程, 激活促炎基因 (如 IL-6、TNF- α), 招募免疫抑制细胞 (Tregs、MDSCs), 形成慢性炎症环境^[20]。此外, 铜依赖的 LOX/LOXL 家族通过硬化细胞外基质 (胶原交联) 和激活蛋白酪氨酸激酶 2 (protein tyrosine kinase 2, PTK2) 通路, 不仅促进肿瘤转移, 还上调 PD-L1 等免疫检查点分子, 协同实现免疫逃逸^[21]。

2.2 铜死亡介导的肿瘤抑制

铜死亡 (cuproptosis) 是一类区别于其他程序性细胞死亡 (如凋亡、焦亡、坏死及铁死亡) 的新型死亡方式, 其调控过程与线粒体代谢密切相关。铜死亡的分子机制主要涉及 3 种: 氧化应激的激活、泛素-蛋白酶体系统的抑制, 以及通过靶向脂酰化 TCA 循环蛋白诱导细胞死亡。

铜通过催化氧化应激, 导致细胞毒性增加诱导肿瘤细胞死亡^[3]。研究发现发现过量摄入铜会破坏 ROS 产生和抗氧化防御之间的平衡, 并激活线粒体和死亡受体凋亡途径, 从而导致小鼠肝氧化应激和细胞凋亡^[22]。此外, 铜还能介导芬顿反应 (Fenton reaction) 催化合成最活跃的羟基自由基, 使得肿瘤细胞中的 ROS 浓度升高, 诱导肿瘤细胞死亡^[23]。铜还能够干扰泛素-蛋白酶体系统的正常功能, 对肿瘤细胞造成损伤。铜离子载体二硫仑可以与 Cu^{2+} 形成复合物抑制蛋白酶体的活性, 增强泛素与蛋白的相互作用, 损伤癌细胞。它还能阻断蛋白酶体系统的上游信号传导, 抑制依赖于泛素化的 ATP 合酶, 从而抑制泛素化蛋白质的降解^[24]。铜也能通过靶向脂酰化 TCA 循环蛋白诱导细胞死亡。铜离子通过与脂酰化组分结合, 导致脂酰化蛋白和铁硫簇蛋白的损失, 诱导蛋白质毒性应激和细胞死亡^[25]。

3 铜在免疫微环境中的作用

铜代谢与免疫密切相关, 铜参与了多种免疫相关酶的活性, 包括抗氧化酶和抗菌肽等, 这有助于清除自由基、抑制病原微生物的生长, 并促进免疫细胞的功能, 这对于免疫系统的正常功能和炎症反应的平衡至关重要^[20]。

3.1 固有免疫

巨噬细胞是免疫系统的重要成员, 具有吞噬病原体、呈递抗原、调节炎症反应和促进组织修

复等多种作用^[26]。研究发现, 缺铜会显著减少巨噬细胞中超氧阴离子的产生, 从而影响巨噬细胞杀伤酵母菌、念珠菌等的的能力, 使机体更容易受到感染, 而过量补充铜会同样会抑制巨噬细胞功能, 因此, 维持细胞内铜的稳态是巨噬细胞正常发挥功能的基本条件^[27-28]。研究发现, Cu 对巨噬细胞的影响可能与这些细胞中 ATP7A 的表达量有关, 促炎因子如脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 或干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 能够促进巨噬细胞摄取铜, 并通过增加 Ctr1 和 ATP7A 蛋白的表达来实现。并且研究还证实, 吞噬细胞清除病原体的能力与其 ATP7A 表达水平呈正相关^[29]。同时还有研究表明, 铜可以通过促进巨噬细胞的代谢和表观遗传重塑促进巨噬细胞的促炎状态^[30]。通过进一步研究发现, 在炎症巨噬细胞的线粒体中存在一组化学反应性铜 (II), 该铜通过激活过氧化氢催化 NAD(H) 氧化还原循环来介导巨噬细胞的代谢和表观遗传编程向炎症状态发展^[20]。

除了调节巨噬细胞, 铜还能通过调节酶的活性来激活固有免疫。研究发现, 铜可以作为信号分子来调节胞质模式识别受体 (PRR) α -激酶 1 (alpha-protein kinase 1, alp1) 的激酶活性, 从而激活宿主细胞的先天免疫途径, 促进宿主细胞对细菌感染的防御^[31]。

3.2 适应性免疫

铜缺乏对适应性免疫的影响已得到证实。研究发现, 严重和边缘性缺铜小鼠体内产生抗体的浆细胞数量减少, 这种损害的程度与小鼠体内缺铜的程度高度相关^[32]。铜缺乏的小鼠显示出细胞毒性 T 淋巴细胞对同种抗原刺激的细胞分解能力下降, 这一现象与辅助性 T 细胞的功能受损有关^[33], 并且铜缺乏也会导致体外 T 细胞数量减少和功能受损^[34]。在铜缺乏的环境中, 免疫细胞的增殖和组成可能会受到影响。研究发现缺铜的雄性大鼠在脾中的单核细胞总生成量以及 CD4^+ 和 CD8^+ T 细胞亚群的相对和绝对数量都有所减少。此外, 缺铜还会相对增加脾中 B 细胞的比例。值得注意的是, 通过补充铜, 可以恢复辅助性 T 细胞的数量和功能, 这表明铜对于维持免疫系统的正常运作具有重要作用。这也就意味着, 铜缺乏导致辅助性 T 细胞的数量和功能

下降^[2]。

铜在生物体中扮演着多重角色,不仅对免疫细胞的发育和分化至关重要,还具有抗真菌的特性。它通过隔离宿主体内的金属元素,有效调控免疫反应。特别是,巨噬细胞能够动员体内的铜离子,创造一个富含铜的环境,以抵御入侵的病原体。此外,铜在感染过程中的作用已通过研究铜过量或铜缺乏状态下宿主对大肠杆菌和沙门氏菌等病原体的抗性而得到进一步的阐明。这些研究表明,铜的水平对于宿主的防御机制至关重要^[35]。而其他研究发现,缺铜饮食并不会对人体中白细胞、单核细胞、中性粒细胞、淋巴细胞和自然杀伤细胞的数量造成影响,这与之前的动物实验相矛盾,因此,缺铜对人体免疫系统的影响还需进一步研究^[36]。

4 铜与肿瘤免疫的关系

铜与肿瘤免疫之间的关系是多方面的,涉及铜死亡、肿瘤免疫逃逸、免疫原性细胞死亡以及髓源性抑制细胞等,铜的这些作用揭示了它在肿瘤免疫中的多面性,表明铜代谢的调节可能对癌症治疗具有重要意义,铜与肿瘤免疫的关系见图 2。

4.1 铜介导的肿瘤免疫逃逸

铜与免疫和肿瘤密切相关。一些研究表明,

铜可能与肿瘤免疫逃逸相关。高水平的铜可能影响免疫细胞的功能,例如抑制肿瘤细胞的免疫识别和杀伤能力,或者调节肿瘤相关炎症反应,从而为肿瘤的生长和转移提供有利条件^[4,37]。在肿瘤细胞表面表达的 PD-L1 可以与 T 细胞上的程序性细胞死亡配体 1 (programmed death 1, PD-1) 结合。PD-1 和 PD-L1 的相互作用可以通过降低 T 细胞活性和加速其凋亡来抑制 T 细胞功能,介导肿瘤免疫逃逸。

通过对癌症基因组图谱数据库和组织微阵列的深入分析发现,在许多癌症中,Ctr1 与 PD-L1 表达之间存在很强的相关性,而在相应的正常组织中没有相关性。补充铜增强了癌细胞中 mRNA 和蛋白质水平的 PD-L1 表达,RNA 测序的结果则表明铜是调节介导 PD-L1 驱动的癌症免疫逃避的关键信号通路。相反,铜螯合剂抑制 STAT3 和 EGFR 的磷酸化,并促进泛素介导的 PD-L1 降解。铜螯合药物还显著增加了肿瘤浸润 CD8⁺T 和自然杀伤细胞的数量,减缓了肿瘤生长,提高了小鼠的存活率。总之,铜可以通过调节 PD-L1 来介导肿瘤的免疫逃逸促进肿瘤的生长^[4]。而其他研究者也得出相同的结论,通过使用单样本基因集富集分析 (ssGSEA) 计算个体铜死亡评分 (CS),发现 CS 与 10 多种肿瘤的肿瘤微环境评分

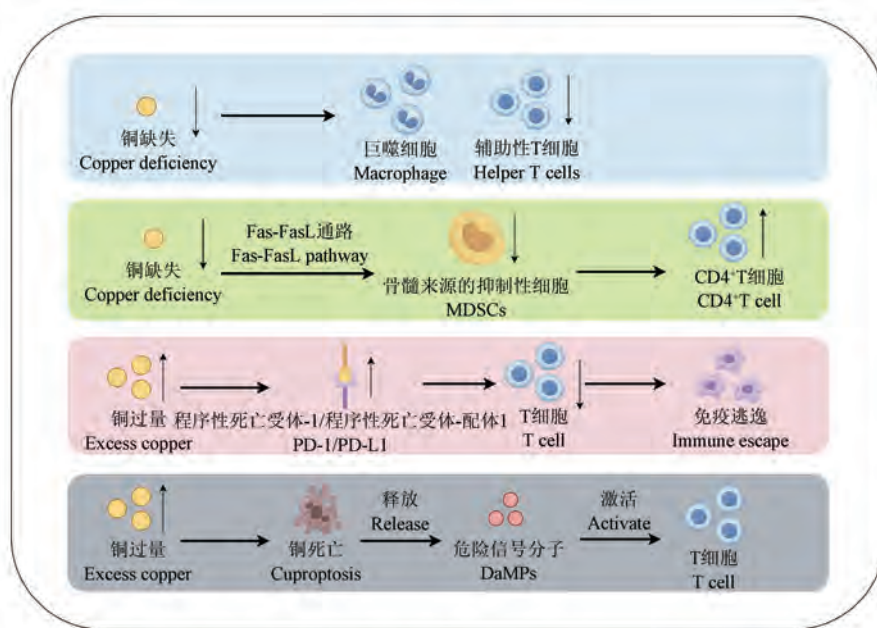


图 2 铜与肿瘤免疫的关系(由 figdraw 绘制)

Figure 2 Relationship between copper and tumor immunity (by figdraw)

显著负相关,与 11 种肿瘤中的 PD-L1 正相关,这也就表明铜死亡可能涉及肿瘤免疫逃逸^[37]。ATP7A 是一个重要的铜转运蛋白,调节着许多细胞生物过程。有研究者分析了 ATP7A 在消化系统肿瘤中的表达及其对预后的影响,评估了来自 319 名 HCC 患者的组织微阵列中 ATP7A 的表达,并研究了 ATP7A 表达与肿瘤免疫之间的关系。发现 ATP7A 水平与免疫细胞浸润和免疫检查点表达(特别是 PD-L1)正相关,这也就意味着 ATP7A 可以作为肿瘤免疫治疗的潜在靶点^[38]。除了 PD-L1 之外,铜离子还可与其他免疫检查点协同治疗肿瘤,如 CD44、CD47 等。细胞表面糖蛋白 CD44 的上调介导了巨噬细胞激活和铜的摄取,导致巨噬细胞线粒体内 Cu^{2+} 浓度增加,而线粒体 Cu^{2+} 可催化 NAD(H) 氧化还原循环,促进代谢改变,并确保导致炎症状态的表现遗传变化;DSF/Cu 在多种肿瘤类型中显示出抗肿瘤作用,其可以促进 M1-巨噬细胞极化和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)介导的葡萄糖代谢重编程;DSF/Cu 和 CD47 阻断的结合协同促进了树突状细胞的成熟,增强了 CD8^+ T 细胞的细胞毒性,诱导肿瘤细胞的死亡^[2]。

4.2 铜死亡与免疫原性细胞死亡

铜死亡是一种铜依赖性免疫原性细胞死亡(immunogenic cell death, ICD)的形式,而 ICD 是一种能在免疫功能完善的宿主体内,激发适应性免疫反应的调控性细胞死亡(regulatory cell death, RCD)模式。发生 ICD 的癌细胞在濒死状态下表达或释放损伤相关分子模式(danger associated molecular patterns, DAMPs),吸引抗原呈递细胞辨识、吞噬并呈递死亡细胞抗原,激发特异性 T 细胞反应,清除残余肿瘤细胞并建立长期免疫记忆,对于延长病患生存期具有重大价值^[5]。

研究者设计了一种由铜诱导的可注射水凝胶,以含有 PD-L1 和一氧化氮(NO)供体的抗体。分别研究了在体外小鼠乳腺癌细胞(4T1 细胞)和癌症相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs),以及体内 4T1 荷瘤小鼠中水凝胶的治疗效果。通过流式细胞术分析了细胞毒性 T 淋巴细胞、树突状细胞(DCs)和巨噬细胞的

免疫作用,结果表明离子诱导的 NO 自组装水凝胶可以通过扩增 ICD 和调节 CAFs 来增强免疫治疗^[39]。研究发现,铜离子载体药物二甲二硫福烷(disulfiram, DSF)/Cu 可以作为 ICD 诱导剂增强肝细胞癌免疫治疗效果,DSF/Cu 处理的 HCC 细胞在疫苗接种试验中引发了显著的免疫记忆,促进树突状细胞活化和成熟,增强了 CD8^+ T 细胞的细胞毒性,介导了肿瘤细胞 ICD 的激活。PDA-PEG 聚合物是一种聚合物材料可以与铜离子结合形成纳米复合物,这种复合物可以通过促进铜离子摄取和溶酶体逃逸,选择性地杀死癌细胞^[40]。研究发现,PDA-PEG/Cu 诱导的免疫原性细胞死亡(ICD)与抗 PD-L1 抗体(aPD-L1)的检查点阻断效应协同作用,促进了免疫细胞对肿瘤的渗透^[41]。

4.3 铜与髓源性抑制细胞

在肿瘤微环境中,髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)可以通过抑制 T 细胞和 NK 细胞的抗肿瘤活性,并刺激调节性 T 细胞(Treg)产生免疫抑制,促进肿瘤发展^[42]。四硫代钼酸盐(tetrathiomolybdate, TM)是一种新型的耗铜化合物,能够与铜离子形成稳定的复合物,从而降低体内铜的浓度。研究发现,经过 TM 治疗的荷瘤小鼠 MDSCs 水平降低,并且 CD4^+ T 细胞的浸润增加,这有助于增强对肿瘤的免疫反应^[6]。螯合物甘氨酸铜(glycine chelate copper, CuNG)是一种潜在的免疫调节剂。研究发现,CuNG 可以通过 Fas-FasL 介导的凋亡途径消耗 MDSCs,减少肿瘤模型中小鼠腹水和脾内的 MDSC 积累,而这一过程与 Th1 反应的增强和调节性 T 细胞(Treg)数量的减少有关^[43]。

5 总结与展望

综上所述,铜代谢的紊乱与肿瘤细胞的增殖、存活、转移密切相关,铜离子的异常积累可促进肿瘤生长,同时,铜诱导的铜死亡在肿瘤细胞死亡中扮演重要角色。此外,铜代谢还涉及调节肿瘤微环境中的免疫细胞功能,影响免疫检查点分子的表达,从而改变肿瘤免疫逃逸的进程。

尽管现有研究初步揭示了铜代谢在肿瘤中的促癌网络,但其深层调控机制仍存盲点:例如,铜离子时空特异性积累的调控因子、铜代谢与铁

死亡或糖代谢的交互作用,以及铜介导的表观遗传修饰在免疫细胞功能极化中的细节尚未明确。未来研究需聚焦以下方向:(1)开发高灵敏度的铜代谢动态示踪技术,解析其在肿瘤异质性及耐药性中的空间分布特征;(2)探索铜螯合剂(如乙二胺四乙酸)或铜离子载体(如埃斯克洛莫尔)与免疫检查点抑制剂(抗 PD-1)的协同治疗方案,破解免疫治疗耐药瓶颈;(3)鉴定铜代谢相关生物标志物(如循环游离铜或 CRIP2 表达水平),用于早期诊断或疗效预测。通过靶向铜代谢网络,不仅有望逆转肿瘤免疫抑制微环境,还可能为克服传统疗法的脱靶效应和耐药性开辟新路径。随着单细胞测序与代谢组学技术的进步,铜代谢调控的精准图谱或将引领肿瘤治疗进入“代谢免疫干预”的新纪元。

参考文献:

- [1] XUE Q, KANG R, KLIONSKY D J, et al. Copper metabolism in cell death and autophagy [J]. *Autophagy*, 2023, 19(8): 2175–2195.
- [2] CHENG F, PENG G, LU Y, et al. Relationship between copper and immunity: the potential role of copper in tumor immunity [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 1019153.
- [3] TANG D, KROEMER G, KANG R. Targeting cuproplasia and cuproptosis in cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2024, 21(5): 370–388.
- [4] VOLI F, VALLI E, LERRA L, et al. Intratumoral copper modulates PD-L1 expression and influences tumor immune evasion [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(19): 4129–4144.
- [5] KROEMER G, GALASSI C, ZITVOGEL L, et al. Immunogenic cell stress and death [J]. *Nat Immunol*, 2022, 23(4): 487–500.
- [6] LIU Y L, BAGER C L, WILLUMSEN N, et al. Tetrathiomolybdate (TM)-associated copper depletion influences collagen remodeling and immune response in the pre-metastatic niche of breast cancer [J]. *NPJ Breast Cancer*, 2021, 7: 108.
- [7] KHOSHBIN K, CAMILLERI M. Effects of dietary components on intestinal permeability in health and disease [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2020, 319(5): G589–G608.
- [8] WANG Z, JIN D, ZHOU S, et al. Regulatory roles of copper metabolism and cuproptosis in human cancers [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1123420.
- [9] MA Y, FEI Y, DING S, et al. Trace metal elements: a bridge between host and intestinal microorganisms [J]. *Sci China Life Sci*, 2023, 66(9): 1976–1993.
- [10] XIAO L, TANG R, WANG J, et al. Gut microbiota bridges the iron homeostasis and host health [J]. *Sci China Life Sci*, 2023, 66(9): 1952–1975.
- [11] LUTSENKO S. Dynamic and cell-specific transport networks for intracellular copper ions [J]. *J Cell Sci*, 2021, 134(21): jcs240523.
- [12] BRISCHIGLIARO M, BADOCCO D, COSTA R, et al. Mitochondrial cytochrome c oxidase defects alter cellular homeostasis of transition metals [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 892069.
- [13] ZHANG X, WALKE G R, HORVATH I, et al. Memo1 binds reduced copper ions, interacts with copper chaperone Atox1, and protects against copper-mediated redox activity *in vitro* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(37): e2206905119.
- [14] HORN N, WITTUNG-STAFSHEDE P. ATP7A-regulated enzyme metalation and trafficking in the menkes disease puzzle [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(4): 391. 15
- [15] GAO L, ZHANG A. Copper-instigated modulatory cell mortality mechanisms and progress in oncological treatment investigations [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1236063.
- [16] TSANG T, POSIMO J M, GUDIEL A A, et al. Copper is an essential regulator of the autophagic kinases ULK1/2 to drive lung adenocarcinoma [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(4): 412–424.
- [17] CHEN L, LI N, ZHANG M, et al. APEX2-based proximity labeling of Atox1 identifies CRIP2 as a nuclear copper-binding protein that regulates autophagy activation [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60(48): 25346–25355.
- [18] DE LUCA A, BARILE A, ARCIELLO M, et al. Copper homeostasis as target of both consolidated and innovative strategies of anti-tumor therapy [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2019, 55: 204–213.
- [19] RUIZ L M, LIBEDINSKY A, ELORZA A A. Role of copper on mitochondrial function and metabolism [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 711227.
- [20] SOLIER S, MÜLLER S, CAÑEQUE T, et al. A druggable copper-signalling pathway that drives inflammation [J]. *Nature*, 2023, 617(7960): 386–394.
- [21] FARHAT A, FERNS G A, ASHRAFI K, et al. Lysyl oxidase mechanisms to mediate gastrointestinal cancer progression [J]. *Gastrointest Tumors*, 2021, 8(1): 33–40.
- [22] LIU H, GUO H, JIAN Z, et al. Copper induces oxidative stress and apoptosis in the mouse liver [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 1359164.
- [23] JOMOVA K, HUDECOVA L, LAURO P, et al. The effect of Luteolin on DNA damage mediated by a copper catalyzed

- Fenton reaction [J]. J Inorg Biochem, 2022, 226: 111635.
- [24] GUO W, JIA L, XIE L, et al. Turning anecdotal irradiation-induced anticancer immune responses into reproducible *in situ* cancer vaccines via disulfiram/copper-mediated enhanced immunogenic cell death of breast cancer cells [J]. Cell Death Dis, 2024, 15(4): 298.
- [25] TSVETKOV P, COY S, PETROVA B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins [J]. Science, 2022, 375(6586): 1254–1261.
- [26] IWASAKI A, MEDZHITOV R. Control of adaptive immunity by the innate immune system [J]. Nat Immunol, 2015, 16(4): 343–353.
- [27] FOCARELLI F, GIACHINO A, WALDRON K J. Copper microenvironments in the human body define patterns of copper adaptation in pathogenic bacteria [J]. PLoS Pathog, 2022, 18(7): e1010617.
- [28] ZHAO H J, ZHAO X H. Modulatory effect of the supplemented copper ion on *in vitro* activity of bovine lactoferrin to murine splenocytes and RAW_{264.7} macrophages [J]. Biol Trace Elem Res, 2019, 189(2): 519–528.
- [29] STAFFORD S L, BOKIL N J, ACHARD M E S, et al. Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper [J]. Biosci Rep, 2013, 33(4): e00049.
- [30] FLEMMING A. Copper boosts pro-inflammatory state of macrophages [J]. Nat Rev Immunol, 2023, 23(6): 344.
- [31] LU J, LIU X, LI X, et al. Copper regulates the host innate immune response against bacterial infection *via* activation of ALPK1 kinase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2024, 121(4): e2311630121.
- [32] WANG X, CHEN D, SHI Y, et al. Copper and cuproptosis-related genes in hepatocellular carcinoma: therapeutic biomarkers targeting tumor immune microenvironment and immune checkpoints [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1123231.
- [33] BABAK M V, AHN D. Modulation of intracellular copper levels as the mechanism of action of anticancer copper complexes: clinical relevance [J]. Biomedicines, 2021, 9(8): 852.
- [34] SCHWENGER K J P, ARENDT B M, SMIEJA M, et al. Relationships between atherosclerosis and plasma antioxidant micronutrients or red blood cell polyunsaturated fatty acids in people living with HIV [J]. Nutrients, 2019, 11(6): 1292.
- [35] LI C, LI Y, DING C. The role of copper homeostasis at the host-pathogen axis: from bacteria to fungi [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(1): 175.
- [36] STEFANACHE A, LUNGU I I, BUTNARIU I A, et al. Understanding how minerals contribute to optimal immune function [J]. J Immunol Res, 2023, 2023: 3355733.
- [37] QIN Y, LIU Y, XIANG X, et al. Cuproptosis correlates with immunosuppressive tumor microenvironment based on pan-cancer multiomics and single-cell sequencing analysis [J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 59.
- [38] SHAO K, SHEN H, CHEN X, et al. Copper transporter gene *ATP7A* A predictive biomarker for immunotherapy and targeted therapy in hepatocellular carcinoma [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 114: 109518.
- [39] SHEN S, ZHANG Z, HUANG H, et al. Copper-induced injectable hydrogel with nitric oxide for enhanced immunotherapy by amplifying immunogenic cell death and regulating cancer associated fibroblasts [J]. Biomater Res, 2023, 27(1): 44.
- [40] GAO X, HUANG H, PAN C, et al. Disulfiram/copper induces immunogenic cell death and enhances CD47 blockade in hepatocellular carcinoma [J]. Cancers (Basel), 2022, 14(19): 4715.
- [41] HU X, WANG M, SHI S, et al. Polymer/copper nano complex-induced lysosomal cell death promotes tumor lymphocyte infiltration and synergizes anti-PD-L1 immunotherapy for triple-negative breast cancer [J]. Biomater Sci, 2023, 11(16): 5641–5652.
- [42] LASSER S A, OZBAY KURT F G, ARKHYPOV I, et al. Myeloid-derived suppressor cells in cancer and cancer therapy [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2024, 21(2): 147–164.
- [43] CHAKRABORTY P, DAS S, BANERJEE K, et al. A copper chelate selectively triggers apoptosis in myeloid-derived suppressor cells in a drug-resistant tumor model and enhances antitumor immune response [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2014, 36(2): 165–175.

[收稿日期]2024-09-30

周海东, 卢姚宏, 胡梁深, 等. 基于信号通路探讨骨肉瘤的发病机制及中药干预研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(5): 139–154.

Zhou HD, Lu YH, Hu LS, et al. Research progress on the pathogenesis and traditional Chinese medicine intervention of osteosarcoma based on signaling pathways [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(5): 139–154.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.05.014

基于信号通路探讨骨肉瘤的发病机制及中药干预研究进展

周海东¹, 卢姚宏¹, 胡梁深², 龚礼², 谢杰飞¹, 胡文涛¹, 单记春², 范少勇^{2*}

(1.江西中医药大学临床医学院, 南昌 330004; 2.江西中医药大学附属洪都中医院, 南昌 330038)

【摘要】 骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是骨组织常见的原发性恶性肿瘤,具有较高的病死率、致残率、转移率和复发率,其发病机制复杂,严重影响患者的生活质量,给家庭和社会都带来了巨大的经济负担。中药具有“多靶点、多成分、多途径”的特点,近年来,大量动物或细胞模型实验研究发现,OS发生进展的作用机制与神经源性位点缺口同源蛋白(neurogenic locus notch homolog protein, Notch)、有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、分泌型糖蛋白(Wingless/Integrated, Wnt)/ β -连环蛋白(beta-catenin, β -catenin)、磷酸酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinases, PI3K)/蛋白质激酶 B(protein kinase B, AKT)、刺猬因子(Hedgehog, Hh)、核转录因子(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)/果蝇抗蜕皮蛋白同源物(small mothers against decapentaplegic, Smad)、信号转导及转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)通路紧密相关,中药可通过干预以上相关信号通路从而影响细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡和自噬等生物学过程发挥抗肿瘤的作用。本研究以细胞信号通路为基础,阐述了上述信号通路在 OS 中的作用,并对近些年中药干预上述信号通路防治 OS 的国内外研究现状进行总结,旨在为今后深入研究中中药治疗 OS 提供参考依据,以期临床治疗 OS 提供新思路。

【关键词】 天然药物;信号通路;靶点;中药;骨肉瘤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 05-0139-16

Research progress on the pathogenesis and traditional Chinese medicine intervention of osteosarcoma based on signaling pathways

ZHOU Haidong¹, LU Yaohong¹, HU Liangshen², GONG Li², XIE Jiefei¹, HU Wentao¹, SHAN Jichun², FAN Shaoyong^{2*}

(1. School of Clinical Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China.

2. Hongdu Hospital of Traditional Chinese Medicine affiliated to Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330038)

【Abstract】 Osteosarcoma (OS) is a common primary malignant bone tumor with high mortality, disability, metastasis, and recurrence rates and a complex pathogenesis, Resulting in serious effects on patient quality of life and huge economic burdens on families and society. Traditional Chinese medicine (TCM) has “multi-target, multi-

【基金项目】 江西省重点研发计划(20202BBG73028);2024 年江西省校级大学生创新创业训练计划(202410412281);2024 年江西省研究生创新专项资金(YC2024-B239)。

【作者简介】 周海东(1995—),男,在读博士研究生,研究方向:中医药在骨科疾病防治中的研究。E-mail:291074907@qq.com

【通信作者】 范少勇(1975—),男,博士,主任医师,研究方向:中医药在骨科疾病防治中的研究。E-mail:755326248@qq.com

component and multi-pathway” characteristics. Recent studies using animal and cell models demonstrated that the mechanism of OS progression was related to Notch, mitogen-activated protein kinase, Wnt/ β -catenin, phosphatidylinositol 3-kinase/AKT, Hedgehog and nuclear factor- κ B, transforming growth factor- β /Smad and signal transducer and activator of transcription pathways. TCM can exert anti-tumor effects by influencing biological processes such as cell proliferation, migration, invasion, apoptosis, and autophagy via interfering with the above signaling pathways. This review considers the roles of these signaling pathways in OS and summarizes the current research status of TCM interventions in the prevention and treatment of OS, with the aim of providing a reference for future studies of TCM treatments of OS and to provide new ideas for its clinical treatment.

【Keywords】 natural medicine; signaling pathways; target; traditional Chinese medicine; osteosarcoma

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

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是最常见的原发性恶性骨肿瘤,儿童和青少年的发病率最高,其次是老年人,OS 常发生在长骨骨骺附近的生长板^[1]。OS 具有骨和肺转移的高风险,研究发现^[2],没有转移的生存率约为 70%,转移的生存率约为 30%。其发病机制尚不清楚^[3],男性发病率高于女性^[4]。相关文献发现,OS 在儿童癌症中排名第八,约占确诊肿瘤的 2.4%^[5]。目前 OS 的治疗方法包括手术、新辅助化疗和术后化疗,但治疗效果大多不令人满意^[6]。近些年,靶向治疗的出现带来了新的希望^[7],中药作为天然活性物质的重要来源,具有多成分、多靶点的特点,因其毒性低、特异性强、疗效高而被广泛应用于肿瘤的治疗^[8],尤其在抑制 OS 生长方面疗效显著^[9],但缺乏中药治疗 OS 的相关机制的归纳总结。因此,本文以细胞信号通路为切入点,通过总结 OS 相关发病机制,归纳中药治疗 OS 作用机制(图 1、图 2 和表 1),以期为中药治疗 OS 的深入研究提供新的理论依据。

1 OS 发病机制的信号通路研究

1.1 PI3K/AKT 信号通路

磷酸酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinases, PI3K)/蛋白质激酶 B(protein kinase B, AKT)信号传导途径是细胞中调节细胞生长、增殖、运动、代谢和存活的核心信号传导途径之一^[10]。PI3K 是一个脂质激酶家族,AKT 是 PI3K 下游非常重要的活性信号靶点,PI3K 轴主要由 AKT 激活。相关文献发现,PI3K/AKT 信号通路在 OS 中促进肿瘤细胞增殖、侵袭和转移,抑制细胞凋亡,增强化疗耐药性^[11];通过激活细胞周期蛋白 D1(G1/S-specific cyclin-D1, Cyclin D1)、细

胞癌基因 C-MYC (cellular myelocytomatosis oncogene, C-MYC)等因子,PI3K/AKT 通路推动细胞周期进程,同时抑制 Bcl-2 相关死亡促凋亡蛋白(Bcl-2-associated death promoter, BAD)、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)等蛋白,增强肿瘤细胞存活,它还通过调控基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)和上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)促进细胞迁移,维持肿瘤干细胞的自我更新和耐药性,增加肿瘤复发风险;此外,PI3K/AKT 通路通过调节药物外排泵减少化疗药物积累,增强化疗耐受性。

1.2 Wnt/ β -catenin 信号通路

分泌型糖蛋白(Wingless/Integrated, Wnt)通过自分泌或旁分泌途径发挥作用。 β -连环蛋白(beta-catenin, β -catenin)是 Wnt 信号通路中重要的信号转导因子,是一种多功能蛋白,经典 Wnt 途径通常是高度保守的,并且通过自分泌/旁分泌方法经由细胞外 Wnt 配体与膜受体的结合而被激活,一旦被激活,典型的 Wnt 途径诱导 β -catenin 的稳定性并将其转移到细胞核,最终促进细胞增殖、存活、分化和迁移基因的表达^[12]。通常, β -catenin 通过糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 beta, GSK-3 β)和腺瘤性息肉病突变基因(adenomatous polyposis coli, APC)降解,但在 OS 中,APC 突变或 GSK-3 β 活性抑制可能导致 β -catenin 积累,进而激活下游转录反应^[13-14]。也有研究表明,调控 Wnt/ β -catenin 信号通路能够改变 OS 癌干细胞的特性,从而抑制 OS 的增殖、复发以及远处转移^[15]。此外,有研究发现,使用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 干扰上调调控基因 11 (up-regulated gene 11, URG11)

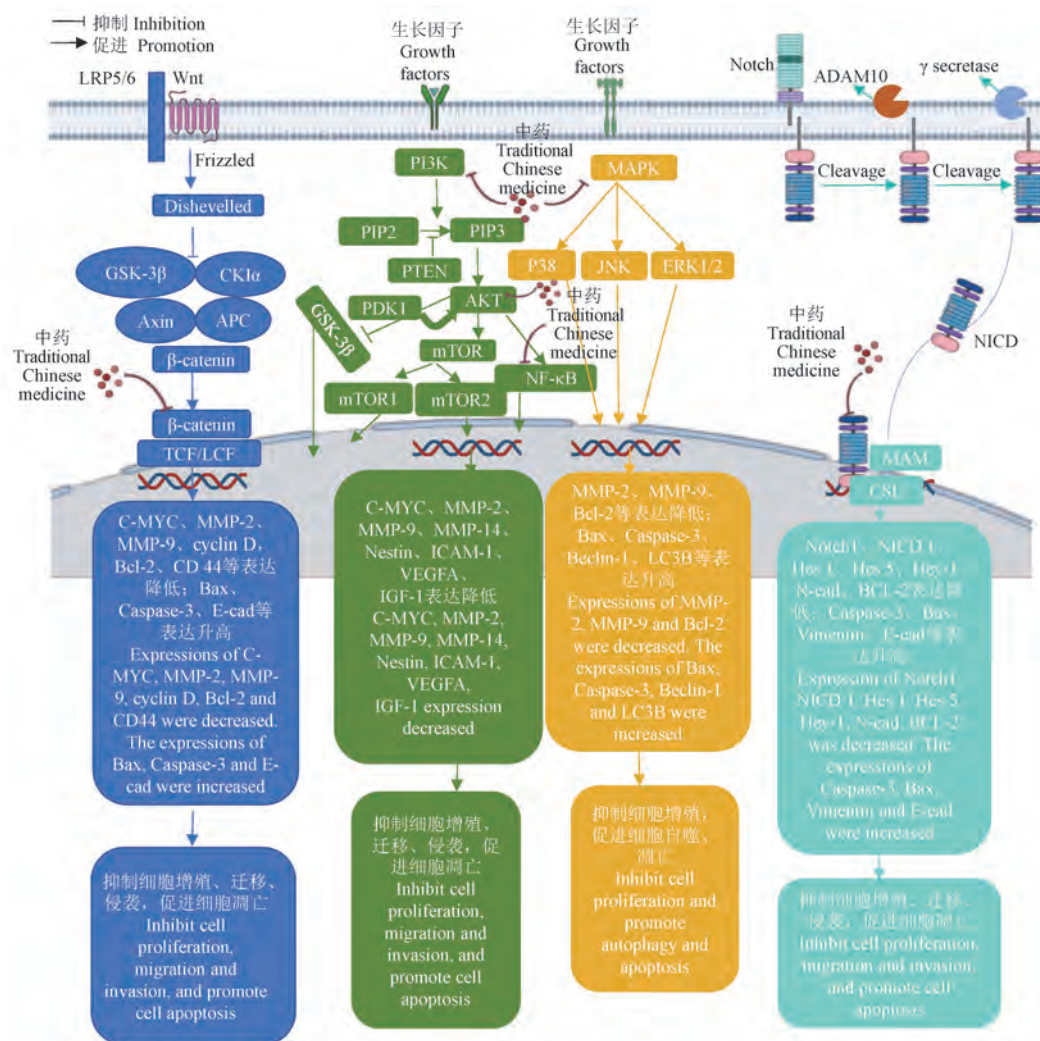


图1 中药调控 Notch、MAPK、Wnt/β-catenin、PI3K/AKT 信号通路防治 OS 的作用机制

Figure 1 Mechanism of action of Chinese traditional medicine in regulating Notch, MAPK, Wnt/β-catenin, and PI3K/AKT signalling pathways to prevent and control OS

表达后,OSMG63 细胞系中 Wnt/β-catenin 信号通路的相关蛋白 (URG11、β-catenin、C-MYC 和 Cyclin D1) 的表达水平显著降低,导致细胞增殖和侵袭能力显著减弱,同时细胞凋亡增加^[16]。

1.3 MAPK 信号通路

有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路包括 P38 丝裂原激活蛋白激酶 (P38 mitogen-activated protein kinase, P38)、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 和 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK), 对细胞增殖、分化、凋亡和存活影响比较明显, MAPK 是调节细胞增殖和癌症发展的关键参与者^[17]。研究发现, MAPK 信号通路在 OS 中主要通过促进细胞增

殖、增强细胞存活、促进迁移侵袭和增加化疗耐药性发挥作用; ERK 通路通过激活转录因子和调控细胞周期因子, 促进细胞增殖, 并与 EMT 相关, 增强肿瘤细胞的侵袭性; JNK 和 p38 通路在应激条件下抑制凋亡, 促进细胞存活^[18-19]。此外, MAPK 通路通过调节抗凋亡蛋白和 MMPs, 增强肿瘤细胞的迁移能力, 并在化疗过程中通过增强抗凋亡反应, 增加化疗耐药性。

1.4 Notch 信号通路

神经源性位点缺口同源蛋白 (Neurogenic locus notch homolog protein, Notch) 信号通路由 Notch 配体、Notch 受体、相关酶、转录因子 CSL、调节因子和 Notch 信号下游分子组成^[20]。由于 Notch 信号传导途径在细胞增殖、存活、凋亡和分

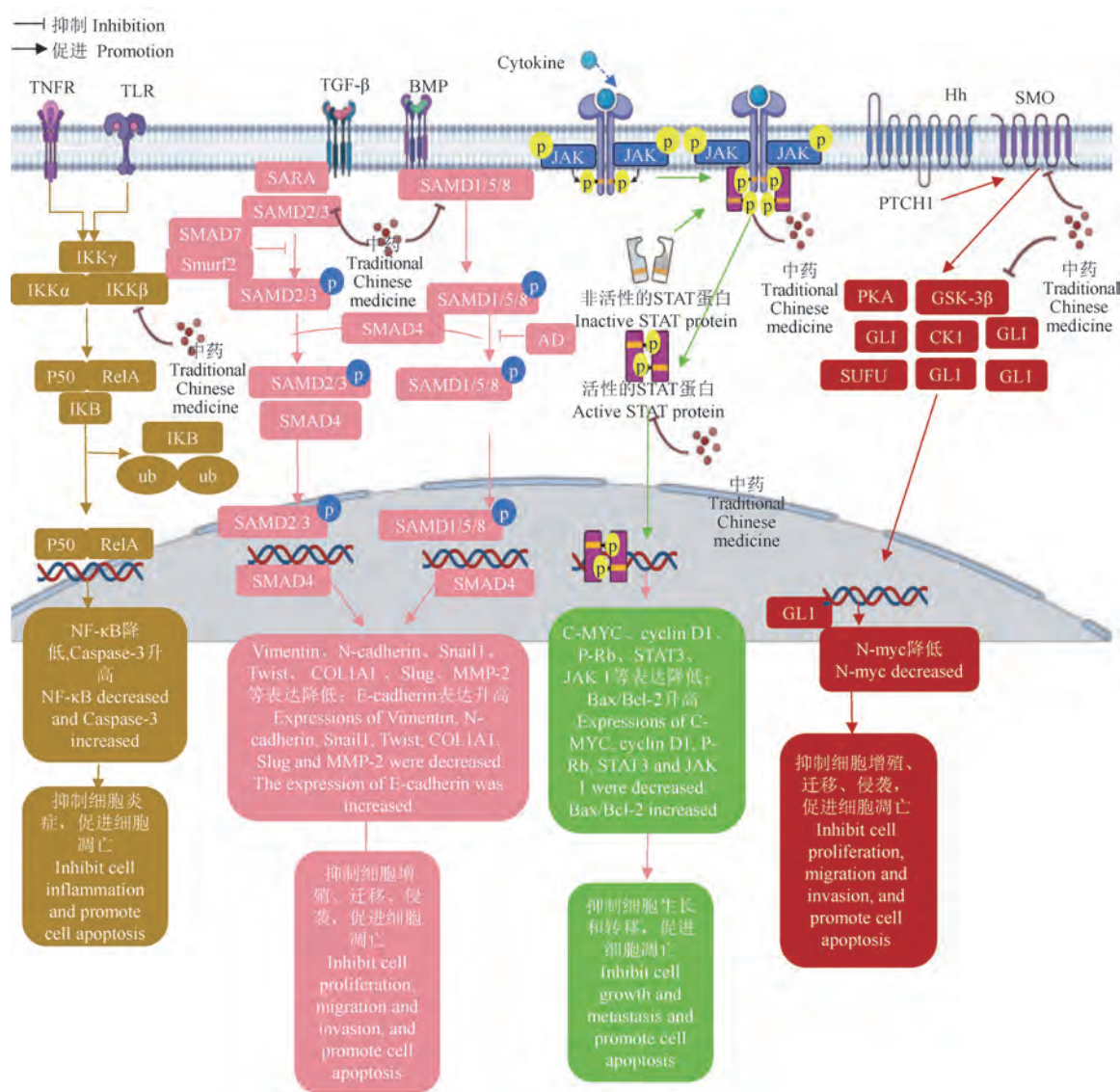


图2 中药调控 NF- κ B、TGF- β /Smad、STAT、Hedgehog 信号通路防治 OS 的作用机制

Figure 2 Mechanism of action of Chinese traditional medicine in regulating NF- κ B, TGF- β /Smad, STAT, and Hedgehog signalling pathways to combat OS

化中起关键作用,因此 Notch 信号传导途径可能是肿瘤靶向基因治疗的有希望的靶标^[21]。也有文献报道,Notch 途径还通过其 Jagged 1 配体的激活与 OS 细胞增殖、耐药和形成转移的能力增加有关^[22]。研究发现,Notch 信号通路在 OS 中通过促进细胞增殖、维持肿瘤干细胞特性、抑制凋亡和增强细胞迁移侵袭,推动肿瘤发展,Notch 信号的持续激活还与化疗耐药性密切相关,增加肿瘤细胞的抗药性^[23-25]。

1.5 Hedgehog 信号通路

刺猬因子(Hedgehog, Hh)/胶质瘤相关癌基因同源蛋白(glioma-associated oncogene homolog,

Gli)信号传导是一种保守的信号转导途径,在生理过程中具有关键的调节功能,包括胚胎发育、组织分化和细胞生长^[26]。Hedgehog 信号通路通过激活 Gli 转录因子,促进 OS 细胞增殖和存活,增加抗凋亡基因的表达并抑制凋亡。该通路还通过诱导 EMT,增强细胞的迁移和侵袭能力,此外,Hh 信号在肿瘤干细胞的维持中发挥重要作用,促进干细胞特性和自我更新,增强肿瘤的耐药性和复发,Hh 信号的激活也与 OS 的骨转移密切相关,促进肿瘤细胞在骨微环境中的定植和生长^[27-28]。Hh 信号通路中的跨膜受体 PTCH/转录因子 Gli1 等蛋白升高,表明 Hh 信号通路可能在

OS 中起重要作用^[29]。

1.6 NF- κ B 信号通路

核转录因子(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)属于一个转录因子家族,包括核因子 κ B 亚基 1(nuclear factor kappa-B Subunit 1, p50)、核因子 κ B 亚基 2(nuclear factor kappa-B Subunit 2, p52)、转录因子 RelA(transcription factor RelA, RelA)、转录因子 RelB(transcription factor RelB, RelB)和原癌基因 c-Rel(proto-oncogene c-Rel, c-Rel), NF- κ B 通常通过与核因子 κ B 抑制蛋白(inhibitor of nuclear factor kappa B, I κ B)家族的抑制分子的相互作用而在细胞质中保持不活跃^[30]。NF- κ B 信号通路通过上调细胞周期和抗凋亡蛋白、下调促凋亡因子,促进 OS 细胞增殖并抑制凋亡;通过激活 MMPs、波形蛋白(vimentin)、神经钙黏蛋白(neural cadherin, N-cadherin)等分子,增强细胞的迁移和侵袭^[31-33]。研究发现, NF- κ B 在 OS 标本和邻近非 OS 组织中分别表达 75.3%和 32.9%,提示 NF- κ B 在该骨癌中表达上调^[34]。

1.7 TGF- β /Smad 信号通路

分泌型细胞因子的转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)家族在人体中至少包含 30 个成员,在哺乳动物中主要有 TGF- β 1、 β 2 和 β 3, TGF- β 常常需要活化成熟形式与受体结合^[35],一旦被激活, TGF- β s 通过结合两种异聚体细胞表面受体(称为 I 型(T β R I)和 II 型(T β R II)受体)从细胞膜向细胞核发出信号,配体结合诱导 T β R I 和 T β R II 组装成复合物,其中 T β R II 磷酸化并激活 T β R I, TGF- β 因此激活果蝇抗蜕皮蛋白同源物(small mothers against decapentaplegic, Smad)级联,称为经典 TGF- β 信号传导途径。TGF- β 还诱导 EMT,改变肿瘤细胞形态,增强其迁移和侵袭能力^[36]。通过调节 MMPs 的表达, TGF- β 增强肿瘤细胞的基质降解能力,促进转移^[37]。研究发现,与健康供体的血清相比, OS 患者血清中 TGF- β s 的表达增加^[38]。

1.8 STAT 信号通路

信号转导及转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)蛋白是由细胞因子和生长因子激活的潜在细胞质转录因子, Janus 激酶(Janus kinase, JAK)-STAT 通路是一种

进化上保守的信号通路,由细胞因子刺激激活传递到细胞核,引起 DNA 转录的变化, JAK-STAT 信号通路可调节增殖、迁移、分化和凋亡; JAK 蛋白家族包含四个成员: JAK1、JAK2、JAK3 和酪氨酸激酶 2(tyrosine kinase 2, TYK2)。文献报道, STAT3 信号通路通过上调细胞周期和抗凋亡蛋白、调节 MMPs 和 EMT 因子,促进 OS 细胞增殖、存活、迁移、转移,并通过增强抗药基因表达和免疫逃逸,增加化疗耐药性^[39]。研究发现, STAT3 的失调激活可以促进恶性肿瘤(包括 OS)的增殖^[40]。

2 中医对 OS 的认识

祖国医学并无对 OS 有明确记载,但是根据其临床表现可将 OS 归属于“肉瘤”“骨瘤”“石瘤”“骨疽”等范畴。内经认为“正气存内,邪不可干”,“邪气所凑,其气必虚”,肾主骨,生髓,所以肾虚是 OS 形成的发病基础,与发病人群为老人小孩相符合,加之风、寒、暑、湿、燥、火、痰、瘀、毒等外邪以及病理产物蕴积于骨所致。OS 病机主要以肾虚为主,寒邪、血瘀、痰凝、癌毒为标^[41],按照急则治其标,缓则治其本的原则,采用补肾、散寒、活血、化痰、祛毒治疗方法,疗效颇佳^[42]。

3 中药调控相关信号通路治疗 OS

3.1 中药调控 PI3K/AKT 信号通路治疗 OS

CHEN 等^[43]实验发现白屈菜红碱(Chelidoneine, CHE)明显降低了八聚体结合转录因子 4(octamer-binding transcription factor 4, Oct 4)、Nanog 同源盒蛋白(nanog homeobox protein, Nanog)、神经巢蛋白(neuroectodermal stem cell marker, Nestin)基因和基质金属蛋白酶(MMP)-2/9 表达,并通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制 U-2 OS 和 MG 63 细胞来源的癌症干细胞样细胞(cancer stem-like cells, CSCs)的干细胞性和恶性行为。2-羟基-3-甲基蒽醌(2-hydroxy-3-methylanthraquinone, HMA)是在白花蛇舌草提取物中发现的中药单体, JING 等^[44]实验发现, HMA 通过 PI3K/AKT 信号通路下调细胞癌基因 MYC(MYC proto-oncogene, MYC)表达抑制 OS 增殖;同时 HMA 通过降低 DNA 双链修复蛋白(DNA double-strand break repair protein RAD51, RAD 51)

的活性增加 DNA 损伤,抑制 OS 增殖,促进 OS 凋亡;降低了细胞周期检测点激酶 1 (checkpoint kinase 1,CHK 1)的表达,抑制对 RAD 51 介导的同源重组过程,表明 HMA 通过 PI3K/AKT 信号通路调节 MYC 抑制 OS 增殖和 DNA 损伤修复。WU 等^[45]研究发现葫芦素 B(cucurbitine B,CuB)可以通过下调趋化因子 2(chemokine (C-C motif) ligand 2,CCL2)、MMP-9、MMP-14、细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule 1,ICAM-1)、胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor 1,IGF-1)和血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A,VEGFA)的表达,有效的抑制了 M2 巨噬细胞的分化,导致 OS 细胞的增殖,迁移和侵袭减少,同时下调 PI3K、AKT 蛋白表达,表明 CuB 对 M2 巨噬细胞分化过程中的 PI3K/AKT 通路有抑制作用。在中药复方的研究中,抑瘤汤由白花蛇舌草、斑蝥等组成,具有逐瘀散结、攻毒蚀疮功效的功效,肖世富^[46]通过细胞实验和动物实验证明了抑瘤汤可抑制 OS 裸鼠瘤体生长,降低 PI3K 蛋白与 AKT 蛋白表达;表明抑瘤汤通过抑制 PI3K/AKT 信号通路,促进 OS 细胞凋亡发挥抗 OS 作用。温蕊嘉等^[47]的体外研究发现,桃红四物汤能够抑制 PI3K、AKT 和葡萄糖转运蛋白 1 型(glucose transporter type 1,GluT1)的表达,降低细胞内葡萄糖含量,增加上清液中的葡萄糖浓度,同时减少上清液和细胞内的乳酸生成。研究结果表明,桃红四物汤可能通过抑制 PI3K/AKT/HIF-1 α 通路调控的糖酵解过程,从而抑制 OSMG63 和 143B 细胞的增殖和迁移。

总体而言,CHE、HMA、CuB、抑瘤汤、桃红四物汤等通过抑制 PI3K/AKT 信号通路的活化,抑制 OS 细胞增殖、迁移和侵袭,促进 OS 细胞凋亡的机制治疗 QS,目前研究药物相对较少,未来还需进一步深入探讨中药基于 PI3K/AKT 通路在 OS 发病机制中的作用。

3.2 中药调控 Wnt/ β -catenin 信号通路治疗 OS

WEI 等^[48]实验发现,异槲皮苷(isoquercitrin, ISO)可以显著增加 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)/Bcl-2 的比率,增加 Vimentin、MMP-2 和 MMP-9 的表达,以及降低上皮钙黏蛋白(epithelial cadherin, E-cadherin)的表达,下调 β -catenin 及其靶基因 C-MYC 和 Cyclin

D1 的表达,说明 ISO 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制 143 B 和 U-2 OS 细胞的增殖、诱导凋亡和抑制转移发挥抗肿瘤作用。QI 等^[49]实验发现,胡椒碱可以显著下调 MMP-2、VEGF、GSK-3 β 、 β -catenin 表达水平,以及下调其靶蛋白环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、cyclin D1、C-MYC 的表达水平,以上结果说明胡椒碱通过 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制 U-2 OS 和 143 B 细胞的增殖、凋亡和侵袭。PANG 等^[50]实验发现,没食子酸(gallic acid,GA)通过下调基因 C-MYC、分化簇 44(cluster of differentiation 44,CD 44)、cyclin D1、Oct 3/4 基因、增殖标记物 KI-67 基因和 β -catenin 的表达水平,表明 GA 对 OS 细胞的抗肿瘤作用是通过抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、阻碍细胞周期和抑制肿瘤转移等途径实现的;同时还发现了 GA 可以下调长链非编码 RNA(long non-coding RNA,lncRNA)H19,从而破坏 OS 细胞中经典的 Wnt/ β -catenin 信号传导。XIE 等^[51]通过实验发现,蜂毒肽可以显著上调 Bax 和胱天蛋白酶(cysteine-aspartic acid protease,caspase)3 的表达,下调 Bcl-2 蛋白的表达,降低 β -catenin 和 Wnt/ β -catenin 相关低密度脂蛋白受体相关蛋白 5(low-density lipoprotein receptor-related protein 5, LRP 5)、C-MYC 和存活素(survivin)在 OS143 B 细胞中的 mRNA 和蛋白水平;ZHU 等^[52]实验发现,蜂毒肽可以降低 LRP 5、 β -catenin、MMP-2、cyclin D、C-MYC、survivin、MMP-9 和 VEGF 的 mRNA 和蛋白表达,蜂毒肽能显著抑制裸鼠胫骨移植瘤的生长,表明蜂毒肽通过 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制 143 B 细胞的增殖、迁移和侵袭。ZHANG 等^[53]研究发现,香芹酚通过降低 Bcl-2 的表达,增加 Bax、MMP-9 的表达以及调节 Wnt/ β -catenin 信号通路进行抑制 OS 细胞 143 B 和 U-2 OS 的增殖、迁移、侵袭和促进凋亡。研究发现,石见穿多糖能减少 β -catenin、Vimentin 蛋白表达,促进 E-cadherin 的表达,表明石见穿多糖可能通过 Wnt/ β -catenin 信号通路,抑制 MG 63 细胞的侵袭以达到抗肿瘤的作用^[54]。在中药复方的研究中,刘俊良^[55]通过动物细胞实验发现,抑瘤汤可抑制 OSU-2 OS 细胞的生长,改善 OS 裸鼠生存质量,还可以通过抑制干扰素诱导跨膜蛋白 1(Interferon-induced transmembrane protein 1,IFITM1)表达,从而导致

Wnt/ β -catenin 的高表达来抑制 OS 细胞的生长。

上述研究表明,ISO、胡椒碱、GA、蜂毒肽、香芹酚、石见穿多糖、抑瘤汤等众多中药单体或中药复方均通过不同机制调节 Wnt/ β -catenin 信号通路,具有抑制 OS 细胞增殖、迁移和侵袭和促进细胞的凋亡的作用,显示了潜在的防治 OS 的疗效,这些研究为开发新的 OS 治疗手段提供了有益的信息。

3.3 中药调控 MAPK 信号通路治疗 OS

研究发现,巴黎皂苷 VII (Paris saponin VII, PS VII) 通过减少 MMP-2、MMP-9 蛋白表达从而抑制 OS 细胞的迁移和侵袭,同时 PS VII 具有下调 P38 MAPK 磷酸化的能力^[56]。七叶皂苷可以上调 Bax、微管相关蛋白轻链 3 β -II 型 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 beta-II, LC3 II)、自噬相关蛋白 (autophagy-related protein, ATG)-5、ATG-12、自噬相关蛋白 (Beclin 1)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、p38 蛋白水平,下调 B 细胞淋巴瘤-特大号蛋白 (B-cell lymphoma-extra large, Bcl-XL)、Bcl-2 和微管相关蛋白轻链 3 β -I 型 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 beta-I, LC3 I) 表达水平,表明七叶皂苷通过激活 ROS/p38 MAPK 信号通路,从而诱导 OS 细胞的自噬和凋亡发挥抗肿瘤作用^[57]。丹参素 B 可抑制 OSMG 63 细胞增殖,诱导其凋亡,并激活 MG 63 细胞中切割型胱天蛋白酶 3 (cleaved caspase-3, c-caspase-3)、p-p38 MAPK、p-p53 蛋白的表达,丹参素 B 还增加了 MG 63 细胞中 ROS 的产生水平,表明丹参素 B 的抗癌作用是通过调节 p38 介导的 ROS 信号通路抑制 MG 63 细胞的增殖和诱导 MG 63 细胞凋亡^[58]。穿心莲内酯通过将细胞周期阻滞在 G₂/M 期和增加 caspase 介导的凋亡来抑制 OS 细胞增殖;同时穿心莲内酯还通过增加 ROS 水平和激活 JNK 来抑制肿瘤生长,从而诱导原代 OS 细胞的细胞毒性,表明穿心莲内酯通过调节 ROS/JNK 信号通路引起 OS 细胞 G₂/M 期阻滞并诱导细胞凋亡^[59]。

以上研究表明,PS VII、七叶皂苷、丹参素 B、穿心莲内酯通过激活 MAPK 相关信号通路诱导 OS 细胞的自噬和凋亡,抑制 OS 细胞增殖,展现了在 OS 治疗中的潜在作用,因此,中药干预

MAPK 信号通路被认为是治疗 OS 的一个有前景的方法。

3.4 中药调控 Notch 信号通路治疗 OS

油酸 (oleic acid, OA) 可能通过抑制抗凋亡因子 BCL-2、BCL-xL 及 ROS, 上调促凋亡因子 caspase-3、P21 和 Bax 的表达,同时还发现 OA 对 Jagged 1 诱导的细胞增殖有负向影响,并且 OA 和 Notch 抑制剂 DAPT 之间存在协同作用,由于线粒体呼吸频率降低往往与 ROS 产生减少有关,这表明 OA 可能通过靶向线粒体抑制 Notch 信号通路,阻碍促凋亡和抗凋亡因子之间的平衡,从而抑制 OS 细胞的增殖,诱导 OS 细胞凋亡^[60]。低剂量华蟾素与顺铂联合应用能下调 Notch1 胞内结构域 (Notch1 intracellular domain, NICD 1)、毛状和分裂增强子 1 (hairy and enhancer of split 1, Hes 1)、Hes 5、具有 YRPW 基序的毛状/分裂增强子相关蛋白 1 (hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1, Hey 1)、BCL-2、VEGF、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达,上调 Bax、caspase-3 和 caspase-9 的表达,表明华蟾素与顺铂联合应用能显著抑制肿瘤细胞的活性和运动,诱导细胞凋亡,使细胞周期阻滞于 S 期,结果还证明了华蟾素通过抑制 Notch 信号的表达,从而消除癌细胞对顺铂的耐药性^[61]。知母皂苷可以增加 Bax、E-cadherin 蛋白,紧密连接蛋白 1 (Claudin, CLDN1) 的表达,降低 N-cadherin、BCL-2、Vimentin 蛋白的表达,体内实验发现知母皂苷可以抑制 Ki67、N-cadherin、Notch1、Hes 1 和 Hey 1 表达,上调 c-caspase-3、Vimentin、E-cadherin 蛋白的表达,同时还发现 Jagged 1 可以抵消知母皂苷对 Notch 通路的限制作用,表明知母皂苷可能通过抑制 Notch 信号通路进行抑制 OS 细胞的增殖、迁移及侵袭^[62]。

综上,OA、华蟾素、知母皂苷等中药单体通过 Notch 通路抑制 OS 细胞的增殖、迁移及侵袭,诱导 OS 细胞凋亡,具有防治 OS 发展的潜力,为中药治疗 OS 的提供了新的思路。

3.5 中药调控 Hedgehog 信号通路治疗 OS

去半乳糖苷肽 (degalaotigonin, DGT) 是龙葵中提取的主要活性成分,其具有抗癌作用,且无明显副作用。研究发现, DGT 能够抑制 Gli1、PTCH 1、N-myc 和 GSK 3 β 表达,表明 OS 细胞增

殖,诱导细胞凋亡,抑制细胞迁移和侵袭,显著减少 OS 异种移植物的体积以及 OS 异种移植物转移到肺部的发生,同时 DGT 可能通过抑制 Hedgehog/Gli1 信号通路的 GSK 3 β 失活而抑制 OS 的生长和转移^[63]。

总体而言,中药调控 Hedgehog 通路干预 OS 的文献较少,通过以上文献发现 Hedgehog 通路与 OS 有相关性,表明今后研究可基于 Hedgehog 通路探讨中药干预 OS 的作用机制,为中药治疗 OS 提供理论依据。

3.6 中药调控 NF- κ B 信号通路治疗 OS

研究发现,白藜芦醇(resveratrol, Res)可抑制细胞增殖、迁移和侵袭,通过上调 caspase-3 的表达激活凋亡细胞死亡,并下调 NF- κ B 和 AKT 细胞内信号转导,同时若 Res 与 NF- κ B 抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)联用,也可协同抑制 OS 的生长^[64]。AHMADI 等^[65]实验发现,槲皮素(Que)显著提高顺铂的细胞毒性($P<0.05$),Que 可显著下调 OS 细胞(MG-63) NF- κ B 的表达($P<0.05$)表明 Que 促进顺铂诱导的 MG-63 细胞凋亡。研究发现,厚朴酚通过激活内源性和外源性凋亡途径对 U-2 OS 细胞产生毒性作用,并通过抑制 ERK/NF- κ B 信号通路,减少了与肿瘤进展相关的抗凋亡和转移基因的表达^[66]。

上述研究表明,Res、Que、厚朴酚等众多中药单体均可通过不同通路与 NF- κ B 信号通路结合发挥治疗 OS 的作用,有望成为治疗和预防 OS 的潜在选择,这些研究为开发新的治疗方法和药物提供了一定的启示。

3.7 中药调控 TGF- β /Smad 信号通路治疗 OS

研究发现,镰形棘豆总黄酮(flavonoids of oxytropis falciformis, FOF)通过下调蜗牛家族转录抑制因子 1(snail family transcriptional repressor 1, Snail1)、扭曲家族 BHLH 转录因子(twist family BHLH transcription factor, Twist)和 Vimentin、p-TGF- β R II、p-Smad3 蛋白表达水平,以及上调 E-cadherin 蛋白表达水平,表明 FOF 通过抑制 TGF- β 1/Smads 通路逆转 OS 细胞的 EMT 抑制其转移能力^[67]。白僵菌素(beauvericin, BEA)抑制 I 型胶原蛋白 α 1(Collagen type I alpha 1 chain, COL1A1)、COL3A1、MMP-2 和磷酸化局部黏着斑

激酶(phosphorylated focal adhesion kinase, P-FAK)的表达,表明 BEA 对 OS 细胞发挥有效的抗增殖和抗转移作用,同时 TGF- β 1 直接结合 TGFBR 2 并抑制 TGF- β /Smad 2/3 途径的激活,这抑制 OS 细胞的增殖、侵袭性、间充质表型、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)重塑和肺转移,阐明了 TGF- β /TGFBR 2/Smad 2/3 通路在 OS 侵袭性进展中的意义和机制^[68]。蓝萼甲素可增加 E-cadherin 的蛋白和 mRNA 表达,降低 N-cadherin、Vimentin 的蛋白和转录表达,同时还降低 EMT 相关转录因子 Snail、蜗牛家族转录抑制因子 2(snail family transcriptional repressor 2, Slug)的蛋白和 mRNA 水平,以及通过抑制 TGF- β 1/Smad 2/3 信号通路抑制 OSEMT 和 TGF- β 1 诱导的 EMT^[69]。

综上所述,中药单体 FOF、BEA、蓝萼甲素通过抑制 TGF- β /Smad 通路抑制 OS 细胞的增殖、侵袭和迁移,并促进 OS 细胞的凋亡治疗 OS,通过以上研究发现抑制 TGF- β /Smad 信号通路或可成为防治 OS 发生的有效途径。

3.8 中药调控 STAT 信号通路治疗 OS

丹参酮 I(Tan I)可以诱导的促凋亡基因 Bax 的表达增加,诱导抗凋亡基因 Bcl-2、MMP 的表达降低,同时降低磷酸化 JAK 1、JAK 2 和 STAT 3 的表达,表明 Tan I 通过靶向 JAK 1/2-STAT 3 信号通路并发挥促凋亡作用来抑制 OS 细胞生长和转移^[70]。T52 是从传统中药万年青中提取的甾体皂苷,实验表明 T52 在体外能下调 Cyclin D1、磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白(phosphorylated retinoblastoma protein, P-Rb)、C-MYC 的表达,诱导凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2 比值增加,也发现 T52 通过与 STAT 3 的 SH2 结构域相互作用抑制其活性,从而抑制 OS 细胞增殖和转移,促进 G₂/M 期细胞阻滞和凋亡,说明 STAT3 信号传导对于调节 T52 的抗 OS 特性是至关重要的^[71]。

综上,Tan I、T52 通过调控 STAT 相关信号通路发挥促凋亡作用来抑制 OS 细胞生长和转移,为治疗 OS 提供了一些新的靶向药物。

3.9 中药调控其他信号通路治疗 OS

中药治疗 OS 除了涉及上述相关通路以外,很多学者也提出一些其他的观点,如钙离子(Ca²⁺)/钙调蛋白依赖性蛋白激酶激酶 β

(calcium/calmodulin-dependent protein kinase (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf 2)/kinase β , CaMKK β)/腺苷酸活化蛋白激酶 谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, (adenosine monophosphate-activated protein kinase, GPX 4)、HIPPO 信号通路等(表 1)。
AMPK)/ Beclin 1、核因子红系 2 相关因子 2

表 1 中药单体、中药复方调控相关信号通路防治 OS 作用机制总结

Table 1 Summary of mechanism of action of Chinese medicine monomer and Chinese medicine compound regulation related signal pathways to prevent OS

中药单体或中药复方 Chinese medicine monomer or Chinese medicine compound	作用细胞 Acting cell	作用机制 Action mechanism	相关信号通路 Correlated signal pathway
白屈菜红碱 ^[43] Chelidoniumine	U-2 OS, MG 63	MMP-2 ↓, MMP-9 ↓, Oct 4 ↓, Nanog ↓, Nestin ↓	PI3K/AKT/mTOR
2-羟基-3-甲基蒽醌 ^[44] 3-2-hydroxy-3- methylantraquinone	U-2 OS	MYC ↓, CHK 1 ↓, RAD 51 ↓	PI3K/AKT, MYC-CHK1-RAD51
葫芦素 B ^[45] Cucurbitine B	HOS, 143 B	CCL2 ↓, MMP9 ↓, MMP14 ↓, ICAM-1 ↓, IGF-1 ↓, VEGFA ↓, PI3K ↓, AKT ↓	PI3K/AKT
抑瘤汤 ^[46] Tumor suppressor decoction	U-2 OS	PI3K ↓, AKT ↓	PI3K/AKT
桃红四物汤 ^[47] Peach and four things soup	MG63, 143 B	PI3K ↓, AKT ↓, GluT1 ↓	PI3K/AKT/HIF-1 α
异槲皮苷 ^[48] Isoquercitrin	143 B, U-2 OS	Vimentin ↑, MMP-2 ↑, MMP-9 ↑, E-cadherin ↓, β -catenin ↓, C-MYC ↓, CyclinD 1 ↓	Wnt/ β -catenin
胡椒碱 ^[49] Piperine	143 B, U-2 OS	MMP-2 ↓, VEGF ↓, GSK-3 β ↓, β -catenin ↓, COX-2 ↓, cyclin D1 ↓, C-MYC ↓	Wnt/ β -catenin
没食子酸 ^[50] Gallic acid	143 B, U-2 OS, MG 63	C-MYC ↓, CD 44 ↓, Cyclin-D1 ↓, Oct 3/4 ↓, Ki-67 ↓, β -catenin ↓	H19-Wnt/ β -catenin
蜂毒肽 ^[51] Melittin	143 B	LRP 5 ↓, β -catenin ↓, MMP-2 ↓, cyclin D ↓, C-MYC ↓, survivin ↓, MMP-9 ↓, VEGF ↓	Wnt/ β -catenin
蜂毒肽 ^[52] Melittin	143 B	Bax ↑, caspase-3 ↑, Bcl-2 ↓, β -catenin ↓, LRP 5 ↓, C-MYC ↓, Survivin ↓	Wnt/ β -catenin
香芹酚 ^[53] Carvacrol	143 B, U-2 OS	Bcl-2 ↓, Bax ↑, MMP-9 ↑	Wnt/ β -catenin
石见穿多糖 ^[54] Stone see through polysaccharide	MG63	β -catenin ↓, Vimentin ↓, E-cadherin ↑	Wnt/ β -catenin
抑瘤汤 ^[55] Tumor suppressor decoction	U-2 OS	IFITM1 ↓, β -catenin ↑	Wnt/ β -catenin
巴黎皂苷 VII ^[56] Paris saponin VII	U-2 OS	p38 MAPK ↓, MMP-2 ↓, MMP-9 ↓	p38 MAPK
七叶皂苷 ^[57] Aesculin	MNNG, HOS, Saos-2, MG 63, U-2 OS	Bax ↑, LC3BII ↑, ATG-5 ↑, ATG-12 ↑, Beclin-1 ↑, ROS ↑, p38 ↑, Bcl-XL ↓, Bcl-2 ↓, LC3IB ↓	ROS/p38 MAPK
丹参素 B ^[58] Danshensu B	MG 63	c-caspase 3 ↑, p-p38 ↑, p-p53 ↑, ROS ↑	p38
穿心莲内酯 ^[59] Andrographolide	HOS, U-2 OS, SAOS-2, MG 63	caspase-3 ↑, caspase-8 ↑, caspase-9 ↑	ROS/JNK

续表1

中药单体或中药复方 Chinese medicine monomer or Chinese medicine compound	作用细胞 Acting cell	作用机制 Action mechanism	相关信号通路 Correlated signal pathway
油酸 ^[60] Oleic acid	SAOS-2, MG 63	BCL-2 ↓, BCL-xl ↓, ROS ↓, caspase-3 ↑, P21 ↑, Bax ↑	Notch
华蟾素 ^[61] Cinobufagin	143 B	NICD 1 ↓, Hes 1 ↓, Hes 5 ↓, Hey 1 ↓, Bax ↑, BCL-2 ↓, caspase-3 ↑, caspase-9 ↑, VEGF ↓, MMP-2 ↓, MMP-9 ↓	Notch
知母皂苷 ^[62] Rhizoma saponins	HOS	E-cad ↑, CLDN1 ↑, BAX ↑, N-cad ↓, Vimentin ↓, BCL-2 ↓, Ki67 ↓, c-caspase-3 ↑, Vimentin ↑, E-cad ↑, Notch1 ↓, Hes 1 ↓, Hey 1 ↓	Notch
去半乳糖苷肽 ^[63] Degalactotigonin	U-2 OS, ZOS, ZOS-M	Gli 1 ↓, PTCH 1 ↓, N-myc ↓, GSK 3β ↓	Hedgehog/Gli 1
白藜芦醇 ^[64] Resveratrol	MG 63	NF-κB ↓, p-AKT ↓, p-Erk ↓, caspase-3 ↑	NF-κB
槲皮素 ^[65] Quercetin	MG 63	NF-κB ↓	NF-κB
厚朴酚 ^[66] Magnolol	U-2 OS	NF-κB ↓, Erk ↓	ERK/NF-κB
镰形棘豆总黄酮 ^[67] Flavonoids of Oxytropis falciformis	MG 63	Vimentin ↓, p-Smad3 ↓, p-TGF-βR II ↓, Snail1 ↓, Twist ↓, E-cadherin ↑	TGF-β1/Smads
白僵菌素 ^[68] Beauvericin	143 B, SJSA-1, U-2 OS	COL1A1 ↓, COL3A1 ↓, MMP-2 ↓, P-FAK ↓	TGF-β/TGFBR 2/Smad 2/3
蓝萼甲素 ^[69] Blue calycetin	MG 63, 143 B	E-cadherin ↑, N-cadherin ↓, Vimentin ↓, Snail ↓, Slug ↓	TGF-β1/Smad 2/3
丹参酮 I ^[70] Tanshinone I	U-2 OS, MOS-J, OS-1	Bax ↑, Bcl-2 ↓, MMP ↓, JAK 1 ↓, JAK 2 ↓, STAT 3 ↓	JAK/STAT 3
T52 ^[71]	MG 63, HOS, U-2 OS, Mnng, HOS, SAOS-2, hFob 1. 19	Cyclin D1 ↓, P-Rb ↓, C-MYC ↓, Bax/Bcl-2 ↑	STAT3
蟾毒灵 ^[72] Bufalin	MG 63, SAOS-2	CaMKKβ ↑, Beclin1 ↑, p-AMPK ↑, LC3-II/LC3-I ↑, p62 ↓	Ca ²⁺ /CaMKK β/AMPK/Beclin 1
姜黄素 ^[73] Curcumin	MNNG, HOS, MG 63	ROS ↑, MDA ↑, Nrf 2 ↓, SLC 7A 11 ↓, HO-1 ↓, GPX 4 ↓	Nrf 2/GPX 4
羟基喜树碱 ^[74] Hydroxycamptothecin	143 B, U-2 OS	E-cadherin ↑, N-cadherin ↓, Snail ↓, Vimentin ↓, p-LATS 1/LATS 1 ↓, p-MST 1/MST 1 ↓, p-YAP/YAP ↓, p-TAZ/TAZ ↓	HIPPO
重楼皂苷 ^[75] Rhizoma Paradis saponins	143 B, MG 63	MIG-7 ↓, pPI3K ↓, p-AKT ↓, p-mTOR ↓, MMP-2 ↓, MMP-14 ↓	miR-520d-3p/miR-7

蟾毒灵是传统中药蟾酥的主要强心化合物，多年来一直用于癌症治疗。研究发现，蟾毒灵可以增加 OS 细胞的细胞内 Ca²⁺ 水平，还可诱导 CaMKKβ、Beclin1、p-AMPK 及 LC3-II/LC3-I 比值的表达增加，降低了 p62 的表达水平，表明蟾毒灵

通过 Ca²⁺/CaMKKβ/AMPK/Beclin1 信号通路启动自噬调节细胞凋亡和自噬来降低细胞活力并触发 OS 细胞死亡，同时研究还表明抑制细胞凋亡有助于细胞自噬，而抑制细胞自噬可增强蟾毒灵诱导的细胞凋亡^[72]。姜黄素是一种抗肿瘤药

物,可抑制 OS 细胞的生长和转移,相关文献发现,姜黄素可诱导 ROS、丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平显著增加,诱导 Nrf 2、溶质转运蛋白(solute carrier family 7 member 11, SLC 7A11)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase 1, HO-1)和 GPX 4 蛋白水平降低,说明姜黄素能有效降低细胞活力,增加细胞凋亡率,同时姜黄素的作用被 livestatin-1(铁凋亡抑制剂)和 bardoxolone-methyl(Nrf 2 激活剂)逆转,表明姜黄素可通过调节 ROS 和 Nrf 2/GPX 4 相对蛋白水平诱导细胞铁死亡^[73]。羟基喜树碱(hydroxycamptothecin, HCPT)主要来源于是早莲的果实,研究表明,HCPT 可以下调 143 B 和 U-2 细胞中 EMT 相关的关键蛋白 N-cadherin、Snail 和 Vimentin,上调 E-cadherin 蛋白,同时还能降低磷酸化大肿瘤抑制激酶 1(phosphorylated large tumor suppressor kinase 1, p-LATS 1)/LATS 1、磷酸化哺乳动物不育系 20 样激酶 1(phosphorylated mammalian sterile 20-like Kinase 1, p-MST 1)/MST 1、磷酸化 Yes 相关蛋白(phosphorylated Yes-associated protein, p-YAP)/YAP 和磷酸化 PDZ 结合基序转录共激活子(phosphorylated transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, p-TAZ)/TAZ 的表达比率,表明 HCPT 可能通过激活 HIPPO 信号通路和逆转 EMT 来抑制 OS 的生长和转移^[74]。重楼皂苷(Rhizoma Paridis saponins, RPS)具有广谱抗肿瘤活性,是中药重楼的主要活性成分。RPS 在体内外均能剂量依赖性地抑制 OS 细胞增殖、转移和血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)的形成,同时 RPS 下调了微 RNA-7(microRNA-7, miR-7)的表达,从而抑制了 PI3K/MMPs/Ln-5γ2 通路和细胞突起的形成,同时 RPS 通过上调 miR-520 d-3p 表达下调 miR-7,表明 RPS 通过调节 miR-520 d-3p/miR-7 信号轴抑制 VM 的形成和 OS 的转移^[75]。

上述研究表明,蟾毒灵、姜黄素、HCPT、RPS 等众多中药单体均通过调控不同通路治疗 OS, Ca^{2+} /CaMKKβ/AMPK/Beclin1 通路与 OS 细胞自噬有关, Nrf 2/GPX 4 通路与细胞铁死亡有关, HIPPO、miR-520 d-3p/miR-7 通路与 OS 转移有关,为开发新的 OS 治疗方法提供了有益的信息。

4 中药在 OS 治疗中的临床运用

近年来,越来越多的研究关注中药在 OS 治疗中的应用,尤其是在缓解化疗副作用和改善患者生活质量方面。徐叶峰等^[76]通过随机对照试验发现,乳没通痹汤(由制乳香、当归、炒白芥子等组成)外洗可缓解 OS 患者手足综合症的疼痛,改善患者的整体功能和生活质量。刘莹^[77]的研究将 114 例 OS 患者随机分为两组,各 57 例。对照组接受大剂量甲氨蝶呤化疗,而观察组在此基础上联合使用清化复肝汤治疗 5 d。研究结果表明,清化复肝汤的应用可以缩短化疗导致的肝损伤恢复时间,改善患者的临床症状和生活质量,并减少化疗不良反应。刘云霞等^[78]的研究发现,三草愈疡汤能够有效缩短 OS 患者在接受大剂量甲氨蝶呤化疗后出现的口腔黏膜炎的持续时间,降低中重度黏膜炎的发生几率,提高治疗效果并减少复发率。其作用机制可能与抑制血清肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素(interleukin, IL)-12 及 IL-10 的表达有关,从而发挥防治口腔黏膜炎的作用。曾俊^[79]的研究发现,化疗期间服用益髓生血方除了可显著减轻骨与软组织肉瘤患者的骨髓抑制,还可以缓解骨与软组织肉瘤患者症状、改善生活质量、增强免疫力。总之中药辅助治疗显示出其增效减毒的潜力,值得在 OS 的综合治疗中进一步推广应用。

5 讨论

OS 是以疼痛、质硬、不断增大的肿块为主要临床表现的一种常见骨科疾病,具有较高的病死率和肺转移率。中药有着悠久的发展历史,以其独特的“整体观、个体化”的治疗理念在恶性肿瘤的防治中发挥着重要作用。近年来,许多基础实验和临床研究都证实了中药在治疗 OS 方面效果良好,能有效提高 OS 患者的免疫功能,提高生存质量,延长生存期,减少化疗带来的副作用^[80]。

近年来,中药干预 OS 相关信号通路的研究取得了显著进展,主要涉及 PI3K/AKT、Wnt/β-catenin、MAPK、Notch、Hedgehog、NF-κB、TGF-β/Smad 及 STAT 等信号通路。这些通路在 OS 的发生、发展和转移中起到关键作用。综述表明,多

种中药单体和复方通过调控这些信号通路,抑制 OS 细胞的增殖、迁移和侵袭,促进细胞凋亡,展现出良好的抗肿瘤效果,如 CHE、ISO、七叶皂苷、CuB、抑瘤汤等,尤其是中药复方抑瘤汤可以同时通过调节 PI3K/AKT 和 p-38 MAPK 通路发挥抗 OS 的作用,表明了中药具有多靶点、多通路的优势和特点。

尽管中药干预 OS 相关信号通路的研究取得了显著进展,但仍存在一些不足。首先,临床研究较为匮乏,目前大多数研究集中在体外实验和动物模型阶段,缺乏大规模的临床试验来验证中药的疗效和安全性,限制了其在临床应用中的推广。其次,中药成分复杂,涉及多成分、多靶点的调控,虽然这是中药的优势,但也给药效机制的精准解析带来了挑战,不同成分之间的相互作用机制仍不明确。第三,研究多聚焦于常见信号通路如 PI3K/AKT 和 Wnt/ β -catenin,其他重要通路如 Hedgehog 和 Notch 的研究相对较少,缺乏对多条信号通路相互作用的系统性分析。此外,药物标准化问题也是挑战,中药制剂的质量控制和一致性需进一步提升。最后,个体化治疗方面的研究不足,如何结合中医药的辨证施治理念与现代精准医学技术,制定个性化治疗方案仍需深入探索。

未来,中药干预 OS 相关信号通路的研究具有广阔的前景。首先,随着分子生物学和现代医学技术的进步,进一步深入解析中药活性成分的分子机制,特别是在 PI3K/AKT、Wnt/ β -catenin 等信号通路中的作用,将有助于揭示中药的抗肿瘤潜力。其次,更多高质量的临床试验将是验证中药疗效和安全性的关键,推动中药在 OS 治疗中的临床转化和应用。此外,未来的研究可以结合现代精准医学和个体化治疗,通过整合患者基因组信息,优化中药治疗方案,实现“辨证施治”与个性化治疗的结合,提高治疗效果。同时进一步借助纳米技术、药物递送系统等新兴技术,中药成分的生物利用度和靶向性也有望得到提升。总之,未来的研究应以中药的多靶点、多通路优势为基础,结合现代科学手段,推动中药在 OS 治疗中的应用,提供更为安全有效的治疗选择。

参考文献:

- [1] HU Z, WEN S, HUO Z, et al. Current status and prospects of targeted therapy for osteosarcoma [J]. *Cells*, 2022, 11 (21): 3507.
- [2] PANEZ-TORO I, MUÑOZ-GARCÍA J, VARGAS-FRANCO J W, et al. Advances in osteosarcoma [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2023, 21(4): 330–343.
- [3] SUN Y, ZHANG C, FANG Q, et al. Abnormal signal pathways and tumor heterogeneity in osteosarcoma [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 99.
- [4] BEIRD H C, BIELACK S S, FLANAGAN A M, et al. Osteosarcoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2022, 8: 77.
- [5] SADYKOVA L R, NTEKIM A I, MUYANGWA-SEMEANOVA M, et al. Epidemiology and risk factors of osteosarcoma [J]. *Cancer Invest*, 2020, 38(5): 259–269.
- [6] BIAN J, LIU Y, ZHAO X, et al. Research progress in the mechanism and treatment of osteosarcoma [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2023, 136(20): 2412–2420.
- [7] EL-NAGGAR A M, CLARKSON P W, NEGRI G L, et al. HACE1 is a potential tumor suppressor in osteosarcoma [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(1): 21.
- [8] ZHANG X, QIU H, LI C, et al. The positive role of traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy for cancer [J]. *Biosci Trends*, 2021, 15(5): 283–298.
- [9] CHANG J L, WANG W Y, LI Y M, et al. Chinese herbal medicine for osteosarcoma in the mouse: a systematic review and meta-analysis [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(5): 370–377.
- [10] YANG J, NIE J, MA X, et al. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 26.
- [11] 苏华华, 王艳华. PI3K/AKT/mTOR 信号通路在 OS 中的作用 [J]. *生命的化学*, 2021, 41(5): 964–971.
SU H H, WANG Y H. Roles of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteosarcoma [J]. *Chem Life*, 2021, 41(5): 964–971.
- [12] LIU J, XIAO Q, XIAO J, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7: 3.
- [13] 李胜. 唑来膦酸通过 AKT/GSK-3 β / β -catenin 信号通路对 OS 细胞系凋亡的作用 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2019.
LI S. Effect of zoledronic acid on apoptosis of osteosarcoma cells via AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway [D]. Shenyang: China Medical University, 2019.
- [14] 麦威, 孔令宇, 宋春雨, 等. 糖原合成激酶 3 β 对 OS 细胞迁移和侵袭的影响 [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2016, 30

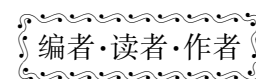
- (6): 492–496.
- MAI W, KONG L Y, SONG C Y, et al. Effects of glycogen synthase kinase-3 β on migration and invasion of human osteosarcoma cells [J]. *Pract Oncol J*, 2016, 30(6): 492–496.
- [15] 谢晓亮, 李玉梅, 朱海霞, 等. Wnt/ β -catenin 信号转导通路对 OS 癌干细胞的调节作用 [J]. *国际骨科学杂志*, 2019, 40(3): 127–130.
- XIE X L, LI Y M, ZHU H X, et al. Regulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway on osteosarcoma cancer stem cells [J]. *Int J Orthop*, 2019, 40(3): 127–130.
- [16] 董成功, 张蔚, 刘颖, 等. siRNA 干扰 URG11 表达对 OS 细胞系 MG63 的生物学功能和 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 [J]. *国际生物医学工程杂志*, 2021, 44(6): 430–435.
- DONG C G, ZHANG W Y, LIU Y, et al. Effects of siRNA mediated interference with URG11 expression on the biological function of osteosarcoma cell line MG63 and Wnt/ β -catenin signalling pathway [J]. *Int J Biomed Eng*, 2021, 44(6): 430–435.
- [17] GUO Y J, PAN W W, LIU S B, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 1997–2007.
- [18] 李国东, 蔡郑东, 张寅权, 等. 丝裂原活化蛋白激酶信号通路相关基因在人 OS 中的表达 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2009, 31(5): 340–345.
- LI G D, CAI Z D, ZHANG Y Q, et al. Gene profiling of MAPK pathway in human osteosarcoma [J]. *Chin J Oncol*, 2009, 31(5): 340–345.
- [19] 秦文英, 陈丽华, 高方方. 普鲁卡因通过 ERK/MAPK/FAK 通路抑制 OS 细胞增殖、迁移和侵袭 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(11): 108–113.
- QIN W Y, CHEN L H, GAO F F. Procaine inhibits proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells through the ERK/MAPK/FAK pathway [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(11): 108–113.
- [20] ŠUCUR A, FILIPOVIC M, FLEGAR D, et al. Notch receptors and ligands in inflammatory arthritis-a systematic review [J]. *Immunol Lett*, 2020, 223: 106–114.
- [21] ZHANG Z, WU W, SHAO Z. NOTCH signaling in osteosarcoma [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2023, 45(3): 2266–2283.
- [22] ZHANG J, LI N, LU S, et al. The role of Notch ligand Jagged1 in osteosarcoma proliferation, metastasis, and recurrence [J]. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16(1): 226.
- [23] 李珂, 李京, 贺西京, 等. Notch 信号通路调控 OS 细胞增殖的机制研究 [J]. *生物骨科材料与临床研究*, 2021, 18(5): 1–5.
- LI K, LI J, HE X J, et al. Study on the mechanism of Notch signaling pathway regulating the proliferation of osteosarcoma cells [J]. *Orthop Biomech Mater Clin Study*, 2021, 18(5): 1–5.
- [24] 高天, 方志伟, 余铃, 等. Notch 信号通路通过抑制 Eph 通路调控 OS 干细胞样特性 [J]. *中华骨科杂志*, 2018, 38(10): 612–619.
- GAO T, FANG Z W, YU L, et al. Notch signaling pathway regulates osteosarcoma stem cell characteristics by inhibiting Eph pathway [J]. *Chin J Orthop*, 2018, 38(10): 612–619.
- [25] 梅红军, 刘洋, 郭卫春. Notch 信号影响耐阿霉素 OS 细胞干细胞特性 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2021, 42(4): 630–633.
- MEI H J, LIU Y, GUO W C. Jagged1/Notch1 signaling influences the stem cell properties in osteosarcoma cells [J]. *Med J Wuhan Univ*, 2021, 42(4): 630–633.
- [26] INGHAM P W. Hedgehog signaling [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2022, 149: 1–58.
- [27] DAS S, ALLAN TUCKER J, KHULLAR S, et al. Hedgehog signaling in tumor cells facilitates osteoblast-enhanced osteolytic metastases [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e34374.
- [28] ZHANG L, ZHANG Y, LI K, et al. Hedgehog signaling and the glioma-associated oncogene in cancer radioresistance [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1257173.
- [29] NAM A, SONG W J, AN J H, et al. Expression of the hedgehog signalling pathway and the effect of inhibition at the level of smoothened in canine osteosarcoma cell lines [J]. *Vet Comp Oncol*, 2022, 20(4): 778–787.
- [30] TAN B, YUAN Z, ZHANG Q, et al. The NF- κ B pathway is critically implicated in the oncogenic phenotype of human osteosarcoma cells [J]. *J Appl Biomed*, 2021, 19(4): 190–201.
- [31] 董嵩, 刘培敏, 杜向阳, 等. 甘草次酸抑制 OS 细胞 MG63 增殖的 NF- κ B 信号通路机制 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(5): 399–401.
- DONG S, LIU P M, DU X Y, et al. Glycyrrhetic acid inhibits proliferation of osteosarcoma cell line MG63 by inhibiting NF- κ B signaling pathway [J]. *Chin J Appl Physiol*, 2020, 36(5): 399–401.
- [32] 刘兵. 染料木黄酮通过 Akt/NF- κ B 通路增敏吉西他滨抑制 OS 增殖和诱导凋亡的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- LIU B. Genistein potentiates anti-cancer effects of gemcitabine and induces apoptosis in human osteosarcoma via Akt/NF- κ B [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017.
- [33] 庄怡富, 干耀恺, 汤亭亭. 柴胡皂苷-d 促进 OS 细胞凋亡的研究 [J]. *国际骨科学杂志*, 2017, 38(2): 115

- 120.
- ZHUANG Y F, GAN Y K, TANG T T. The study of saikosaponin-d promotes apoptosis of osteosarcoma cells [J]. *Int J Orthop*, 2017, 38(2): 115-120.
- [34] WANG X Z, ZHANG S F, YANG Z H, et al. Punicalagin suppresses osteosarcoma growth and metastasis by regulating NF- κ B signaling [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2020, 34(5): 1699-1708.
- [35] LARSON C, ORONSKY B, CARTER C A, et al. TGF- β : a master immune regulator [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2020, 24(5): 427-438.
- [36] AHMADI A, NAJAFI M, FARHOOD B, et al. Transforming growth factor- β signaling: tumorigenesis and targeting for cancer therapy [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 12173-12187.
- [37] MIYAZONO K, EHATA S, KOINUMA D. Tumor-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer [J]. *Ups J Med Sci*, 2012, 117(2): 143-152.
- [38] CHOI S H, MYERS J, TOMCHUCK S, et al. Oral TGF- β R1 inhibitor Vactosertib promotes osteosarcoma regression by targeting tumor proliferation and enhancing anti-tumor immunity [J]. *Res Sq*, 2023; rs.3.rs-2709282.
- [39] LIU Y, LIAO S, BENNETT S, et al. STAT3 and its targeting inhibitors in osteosarcoma [J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(2): e12974.
- [40] KEREMU A, AIMAITI A, LIANG Z, et al. Role of the HDAC6/STAT3 pathway in regulating PD-L1 expression in osteosarcoma cell lines [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2019, 83(2): 255-264.
- [41] 朱青, 朱垚, 赵一帆, 等. OS 中医核心病机分析 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2024, 47(2): 22-26.
- ZHU Q, ZHU Y, ZHAO Y F, et al. Analysis of traditional Chinese medicine core pathogenesis of osteosarcoma [J]. *J Shaanxi Univ Chin Med*, 2024, 47(2): 22-26.
- [42] 刘前, 商冠宁. 基于“痰挟瘀血, 遂成窠囊”从调气散结, 痰瘀同治法论治 OS [J]. *辽宁医学杂志*, 2024, 38(1): 1-5.
- LIU Q, SHANG G N. Based on the theory of “phlegm with blood stasis, then it becomes a nest bag”, osteosarcoma is treated by regulating qi and dispersing knot, and treating phlegm and stasis at the same time [J]. *Med J Liaoning*, 2024, 38(1): 1-5.
- [43] CHEN Z, YANG H, ZHANG Q, et al. Chelerythrine inhibits stemness of cancer stem-like cells of osteosarcoma and PI3K/AKT/mTOR signal [J]. *J Oncol*, 2022, 2022: 6435431.
- [44] JING D, CHEN X, ZHANG Z, et al. 2-Hydroxy-3-methylanthraquinone inhibits homologous recombination repair in osteosarcoma through the MYC-CHEK1-RAD51 axis [J]. *Mol Med*, 2023, 29(1): 15.
- [45] WU H, MA T, HE M, et al. Cucurbitacin B modulates M2 macrophage differentiation and attenuates osteosarcoma progression via PI3K/AKT pathway [J]. *Phytother Res*, 2024, 38(5): 2215-2233.
- [46] 肖世富. 基于 PI3K/Akt 信号通路调控 OS 细胞凋亡探讨抑瘤汤抗 OS 的机制 [D]. 广西: 广西中医药大学, 2023.
- XIAO S F. Based on the PI3K / Akt signaling pathway to regulate the apoptosis of osteosarcoma cells to explore the mechanism of Yiliu Decoction against osteosarcoma [D]. Guangxi: Guangxi University of Chinese Medicine, 2023.
- [47] 温蕊嘉, 董鑫, 麦泳欣, 等. 桃红四物汤通过 PI3K/AKT/HIF-1 α 通路介导的糖酵解抑制 OS 的增殖与迁移 [J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(7): 3705-3710.
- WEN R J, DONG X, MAI Y X, et al. Inhibition of osteosarcoma proliferation and migration of Taohong Siwu Decoction via PI3K/AKT/HIF-1 α pathway mediated glycolysis [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2024, 39(7): 3705-3710.
- [48] WEI Z, ZHENG D, PI W, et al. Isoquercitrin restrains the proliferation and promotes apoptosis of human osteosarcoma cells by inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *J Bone Oncol*, 2023, 38: 100468.
- [49] QI Y B, YANG W, SI M, et al. Wnt/ β -catenin signaling modulates piperine-mediated antitumor effects on human osteosarcoma cells [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(5): 2202-2208.
- [50] PANG F, DING S, LI N, et al. Gallic acid mediates tumor-suppressive effects on osteosarcoma through the H19-Wnt/ β -catenin regulatory axis [J]. *J Orthop Translat*, 2023, 39: 34-42.
- [51] XIE X, LI Y, ZHU H, et al. Melittin inhibits growth of human osteosarcoma 143B cells through induction of apoptosis via suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2022, 22(18): 3172-3181.
- [52] ZHU H, CHEN D, XIE X, et al. Melittin inhibits lung metastasis of human osteosarcoma: Evidence of Wnt/ β -catenin signaling pathway participation [J]. *Toxicon*, 2021, 198: 132-142.
- [53] ZHANG S, HE L, SHANG J, et al. Carvacrol suppresses human osteosarcoma cells via the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2022, 22(9): 1714-1722.
- [54] 李增, 张瑞, 张晓坚, 等. 石见穿多糖通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控 OS 细胞的迁移和侵袭 [J]. *中成药*, 2020, 42(9): 2324-2328.
- LI Z, ZHANG R, ZHANG X J, et al. *Salvia chinensis*

- Benth. polysaccharides regulate the migration and invasion of osteosarcoma cells via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Chin Tradit Pat Med, 2020, 42(9): 2324–2328.
- [55] 刘俊良. 抑瘤汤通过 IFITM1/Wnt/ β -catenin 信号通路调控 OS 恶性增殖的机制研究 [D]. 广西: 广西中医药大学, 2023.
- LIU J L. Mechanism of Yiliu Decoction Regulating Malignant Proliferation of Osteosarcoma through IFITM1/Wnt/ β -catenin Pathway [D]. Guangxi: Guangxi University of Chinese Medicine, 2023.
- [56] CHENG G, GAO F, SUN X, et al. Paris saponin V II suppresses osteosarcoma cell migration and invasion by inhibiting MMP-2/9 production via the p38 MAPK signaling pathway [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(4): 3199–3205.
- [57] ZHU J, YU W, LIU B, et al. Escin induces caspase-dependent apoptosis and autophagy through the ROS/p38 MAPK signalling pathway in human osteosarcoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(10): e3113.
- [58] ZENG Z, ZHANG H, WANG X, et al. Salvianolic acid B suppresses cell proliferation and induces apoptosis in osteosarcoma through p38-mediated reactive oxygen species generation [J]. Oncol Lett, 2018, 15(2): 2679–2685.
- [59] WANG S, LI H, CHEN S, et al. Andrographolide induces apoptosis in human osteosarcoma cells via the ROS/JNK pathway [J]. Int J Oncol, 2020, 56(6): 1417–1428.
- [60] XU Y, SHU B, TIAN Y, et al. Oleanolic acid induces osteosarcoma cell apoptosis by inhibition of Notch signaling [J]. Mol Carcinog, 2018, 57(7): 896–902.
- [61] DAI G, YU L, YANG J, et al. The synergistic antitumor effect of cinobufagin and cisplatin in human osteosarcoma cell line *in vitro* and *in vivo* [J]. Oncotarget, 2017, 8(49): 85150–85168.
- [62] 刘德国, 徐天波, 张颀鸿, 等. 知母皂苷 A III 通过调节 Notch 信号通路调控 OS 细胞增殖、凋亡和上皮间质转化的机制 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2023, 33(8): 692–697, 709.
- LIU D G, XU T B, ZHANG J H, et al. Timosaponin A III regulates osteosarcoma cell proliferation, apoptosis and epithelial-mesenchymal transition through the Notch signaling pathway [J]. Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med, 2023, 33(8): 692–697, 709.
- [63] ZHAO Z, JIA Q, WU M S, et al. Degalactotigonin, a natural compound from Solanum nigrum L., inhibits growth and metastasis of osteosarcoma through GSK3 β inactivation-mediated repression of the hedgehog/Gli1 pathway [J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(1): 130–144.
- [64] XU N, WANG L, FU S, et al. Resveratrol is cytotoxic and acts synergistically with NF- κ B inhibition in osteosarcoma MG-63 cells [J]. Arch Med Sci, 2020, 17(1): 166–176.
- [65] AHMADI M, VALIZADEH A, BAZAVAR M, et al. Investigating the role of quercetin in increasing the rate of cisplatin-induced apoptosis via the NF- κ B pathway in MG-63 cancer cells [J]. Drug Res (Stuttg), 2022, 72(7): 385–389.
- [66] LI C H, KU M C, LEE K C, et al. Magnolol suppresses ERK/NF- κ B signaling and triggers apoptosis through extrinsic/intrinsic pathways in osteosarcoma [J]. Anticancer Res, 2022, 42(9): 4403–4410.
- [67] 马金祥, 马金兰, 马金华. 镰形棘豆总黄酮通过 TGF- β /Smad3 通路抑制 OSMG63 细胞 EMT [J]. 重庆医学, 2019, 48(8): 1284–1287.
- MA J X, MA J L, MA J H. Inhibitory effect of total flavonoids from Oxytropis falciformis on EMT of osteosarcoma MG63 cells via TGF-beta/Smad3 pathway [J]. Chongqing Med, 2019, 48(8): 1284–1287.
- [68] YE G, JIAO Y, DENG L, et al. Beauvericin suppresses the proliferation and pulmonary metastasis of osteosarcoma by selectively inhibiting TGFBR2 pathway [J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(14): 4376–4392.
- [69] JIANG X, ZHANG Z, SONG C, et al. Glaucocalyxin A reverses EMT and TGF- β 1-induced EMT by inhibiting TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway in osteosarcoma [J]. Chem Biol Interact, 2019, 307: 158–166.
- [70] WANG W, LI J, DING Z, et al. Tanshinone I inhibits the growth and metastasis of osteosarcoma via suppressing JAK/STAT3 signalling pathway [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(9): 6454–6465.
- [71] TIAN L, LI C, XIANG L, et al. T52 attenuates oncogenic STAT3 signaling and suppresses osteosarcoma [J]. Phytomedicine, 2023, 114: 154799.
- [72] ZHENG Y D, HE Z, SU Z C, et al. Bufalin induces apoptosis and autophagy via the Ca²⁺/CaMK β /AMPK/Beclin1 signaling pathway in osteosarcoma cells [J]. Cell Biol Int, 2023, 47(8): 1344–1353.
- [73] YUAN C, FAN R, ZHU K, et al. Curcumin induces ferroptosis and apoptosis in osteosarcoma cells by regulating Nrf2/GPX4 signaling pathway [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2023, 248(23): 2183–2197.
- [74] MA X, CHANG J, SUN X, et al. (S)-10-hydroxycamptothecin inhibits EMT-evoked osteosarcoma cell growth and metastasis by activating the HIPPO signaling pathway [J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2024, 27(15): 2239–2248.
- [75] YAO N, ZHOU J, JIANG Y, et al. Rhizoma Paridis saponins suppresses vasculogenic mimicry formation and metastasis in osteosarcoma through regulating miR-520d-3p/MIG-7 axis [J]. J Pharmacol Sci, 2022, 150(3): 180

- 190.
- [76] 徐叶峰, 刘云霞, 严卿莹, 等. 乳没通痹汤外洗治疗 OS 靶向治疗相关手足综合征疗效观察 [J]. 浙江中医杂志, 2024, 59(6): 526-527.
- XU Y F, LIU Y X, YAN Q Y, et al. Observation on the therapeutic effect of Ruweitongbi decoction external washing on osteosarcoma targeted treatment related hand-foot syndrome [J]. Zhejiang J Tradit Chin Med, 2024, 59(6): 526-527.
- [77] 刘莹. 清化复肝汤防治骨肉瘤甲氨蝶呤化疗性肝损伤的临床研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(27): 3047-3049, 3053.
- LIU Y. Clinical study of Qinghua Fugan Decoction in treating methotrexate chemotherapy induced liver injury of osteosarcoma [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2020, 29(27): 3047-3049, 3053.
- [78] 刘云霞, 徐叶峰, 李帅, 等. 三草愈汤防治 OS 大剂量甲氨蝶呤化疗后口腔黏膜炎的临床研究 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(10): 4942-4946.
- LIU Y X, XU Y F, LI S, et al. Clinical study on prevention and treatment of Sancao Yuyang Decoction on oral mucositis of patients with osteosarcoma after high-dose Methotrexate chemotherapy [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(10): 4942-4946.
- [79] 曾俊. 自拟益髓生血方防治骨与软组织肉瘤化疗后骨髓抑制的临床疗效观察 [D]. 江西: 江西中医药大学, 2023.
- ZENG J. Clinical observation of YiSui ShengXue prescription for preventing and treating myelosuppression after chemotherapy for bone and soft tissue sarcoma [D]. Jiangxi: Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2023.
- [80] ZHANG F W, PENG L Y, SHI C J, et al. Baicalein mediates the anti-tumor activity in Osteosarcoma through lncRNA-NEF driven Wnt/ β -catenin signaling regulatory axis [J]. J Orthop Translat, 2022, 33: 132-141.

[收稿日期] 2024-09-26



《中国比较医学杂志》稿约

国内刊号 CN 11-4822/R

国际刊号 ISSN 1671-7856

邮局代号 82-917

一、杂志介绍

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

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

二、投稿要求及注意事项

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

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com>

期待您的来稿!

韦秀红,甄甄,张俊波,等. 咽喉反流性疾病动物模型和相关评价指标的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(5): 155–163.

Wei XH, Zheng Z, Zhang JB, et al. Research progress in animal models and related evaluation indexes of laryngopharyngeal reflux disease [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(5): 155–163.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.05.015

咽喉反流性疾病动物模型和相关评价指标的研究进展

韦秀红^{1,4}, 甄甄², 张俊波³, 马艳苗^{4*}, 李贤煜^{1*}

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700; 2. 北京大学第一医院, 北京 100034;
3. 清华大学附属北京长庚医院, 北京 102218; 4. 山西中医药大学基础医学院, 太原 030619)

【摘要】 咽喉反流性疾病 (laryngopharyngeal reflux disease, LPRD) 是一种在上呼吸道和上消化道共同发生的疾病。发病机制复杂, 尚缺乏有效治疗办法, 合理的动物模型和标准的评价方法对探究其发病机制和开发新型治疗药物尤为重要。新西兰兔是本病常用的造模动物, 球囊扩张术是常用的造模方法。本病较为标准的评价方法包括症状观察评价、影像学评价及 pH 监测等。通过查阅国内外文献, 对咽喉反流的动物模型和评价指标进行了详尽地综述, 以期对今后的研究提供参考。

【关键词】 咽喉反流性疾病; 动物; 模型; 指标评价; 进展

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 05-0155-09

Research progress in animal models and related evaluation indexes of laryngopharyngeal reflux disease

WEI Xiuhong^{1,4}, ZHEN Zhen², ZHANG Junbo³, MA Yanmiao^{4*}, LI Xianyu^{1*}

(1. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China.
2. Peking University First Hospital, Beijing 100034. 3. Beijing Changgeng Hospital Affiliated to Tsinghua University, Beijing 102218. 4. School of Basic Medicine, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030619)

【Abstract】 Laryngopharyngeal reflux disease (LPRD) occurs in the upper respiratory tract and the upper digestive tract. Its pathogenesis is complex and there a lack of effective treatments. Suitable animal models and standard evaluation method are needed to explore the pathogenesis of this disease and to develop new therapeutic drugs. New Zealand rabbits are commonly used to model LPRD, via balloon dilatation. The standard evaluation method for LPRD include symptom observation and evaluation, imaging evaluation, and pH monitoring. This review considers the animal models and evaluation indexes currently used for pharyngeal reflux with reference to the global literature, to provide a reference for future research.

【Keywords】 laryngopharyngeal reflux disease; animals; model; index evaluation; progress

【基金项目】 中药复杂作用解析协同创新团队项目 (XTCX2023001)。

【作者简介】 韦秀红 (1997—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 方剂的现代药理作用及其物质基础研究。

E-mail: wxh00925@163.com

【通信作者】 李贤煜 (1984—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 中药重定位蛋白质组学及中药复杂作用解析的研究。

E-mail: phd_xianyu@foxmail.com

马艳苗 (1982—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 方剂的现代药理作用及其物质基础研究。

E-mail: mymsxtcm@sxtcm.edu.cn * 共同通信作者

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

咽喉反流性疾病 (laryngopharyngeal reflux disease, LPRD) 是一种肠道内容物, 如胃酸、胃蛋白酶、脱氧胆酸等, 逆流进入食管上括约肌 (upper esophageal sphincter, UES) 以上部位, 如鼻、咽及气管黏膜, 导致组织部位水肿、溃疡或肉芽肿等症状和体征的总称^[1-2]。相比于食管, 咽喉黏膜受到反流物刺激的敏感性会更高。主要症状包括声音嘶哑、持续清嗓、咽喉疼痛、吞咽困难和慢性咳嗽等^[3]。文献报道 LPRD 与耳鸣、阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征、下咽癌和喉癌等密切相关^[4-7], 但其病理生理学机制尚不完全清楚, 目前认为的机制主要为 UES 和食管下括约肌 (low esophageal sphincter, LES) 短暂松弛, 及胃内容物损伤上消化道和咽喉。据报道在临床上被转诊给耳鼻喉科的患者中约 10% 被诊断为 LPRD^[8-10]。质子泵抑制剂 (proton pump inhibitor, PPI) 是目前国际公认的治疗 LPRD 的首选药物^[11-12], 但也存在部分患者服用 PPI 后症状并未缓解, 和长期使用具有明显不良反应、耐药性的缺陷^[3]。此外, 有研究表明, 冠状病毒病 (corona virus disease 2019, COVID-19) 患者的 UES 发生了明显损伤, 也由此增加了 LPRD 的患病率^[13]。LPRD 的病程长, 治疗费用高, 且伴随人们饮食习惯及生活方式的改变, 发病率逐年攀升, 由此探寻 LPRD 的发病机制, 找到安全有效地治疗方案是目前亟待解决的问题^[14]。

而建立有效的动物模型和选择正确的评价标准, 是临床前进行基础实验研究的前提, 也是临床上找寻合适治疗方法的理论基础。尽管 LPRD 动物建模和评价方法众多, 但目前尚缺乏详细的归纳、总结和整理, 本文查阅了国内外文献并对此进行总结, 以期今后的研究作为参考。

1 LPRD 建模动物的选择

LPRD 的建模动物主要是大鼠、豚鼠、兔和猪等^[15-18], 根据研究目的不同择优选择。胃酸、胃蛋白酶消化细胞间的链接蛋白, 如上皮细胞钙黏蛋白 (E-cadherin), 引起喉部屏障功能的破坏, 是 LPRD 引起喉部损伤的主要机制。研究发现, 大鼠的喉组织鳞状上皮部分角化, 对咽喉部位的反

流物有一定抵抗作用, 且对 E-cadherin 低表达, 故常通过调节饮食和昼夜节律来建模^[15]。豚鼠、兔子和猪的喉组织主要由纤毛、杯状细胞和复层鳞状上皮细胞组成, 与人类喉部组织相似^[19], 可作为建模动物的首选。这其中猪的体型较大、价格昂贵、饲养成本较高, 限制了规模化的开展动物建模, 一般用来研究反流物对离体喉组织损伤; 豚鼠咽部的感觉神经纤维与人类相似, 常用于研究反流物对咽喉神经的影响, 但也存在环境适应力差, 易受外界环境干扰等缺点^[18]; 而兔子是目前文献报道较多的 LPRD 建模动物。LPRD 相关机制见图 1。

2 LPRD 造模原理及动物模型的制备

制备 LPRD 动物模型主要有外源性方法、内源性方法、慢性睡眠剥夺和高脂饮食法。

2.1 内源性方法造模

内源性方法是通过手术破坏胃肠道的解剖结构, 引起生理功能的改变, 从而使胃内容物反流建模, 常包括球囊扩张术、鼻胃管插管法和颈咽肌切开术等。

2.1.1 球囊扩张术

UES 位于食管下端和胃的连接处, 宽约 1~3 cm 的高压区, 是组织胃内容物逆流入食管的第一道屏障。文献较多使用球囊扩张 LES 法: 球囊和导丝经胃管置入动物胃内, 调整球囊位置, 将球囊的中点置于动物的 LES 处, 缓慢注入适量蒸馏水, 使球囊得以完全扩大 LES 及膈的食管裂孔。扩张持续一段时间, 重复 2~3 次^[20]。LES 松弛后, 反流物迅速到达食管, 引起食管壁扩张和 UES 的松弛反射, 从而使反流物可以顺利到达咽喉部位^[21]。此方法还可用于 UES 扩张, 破坏 UES 的解剖结构。CAO 等^[22]认为长期使用 UES 和 LES 球囊扩张术可能会导致食管裂孔疝, 并在此基础上利用金属支架置入兔的食管中, 对 UES 稳定施加压力, 有效破坏 UES 的收缩功能和食管的蠕动功能。但固定金属支架也会存在困难, 如易脱落和变形等, 长期使用还可能损伤血管或落入胃中, 引起血管出血和干扰胃部正常的功能。总体

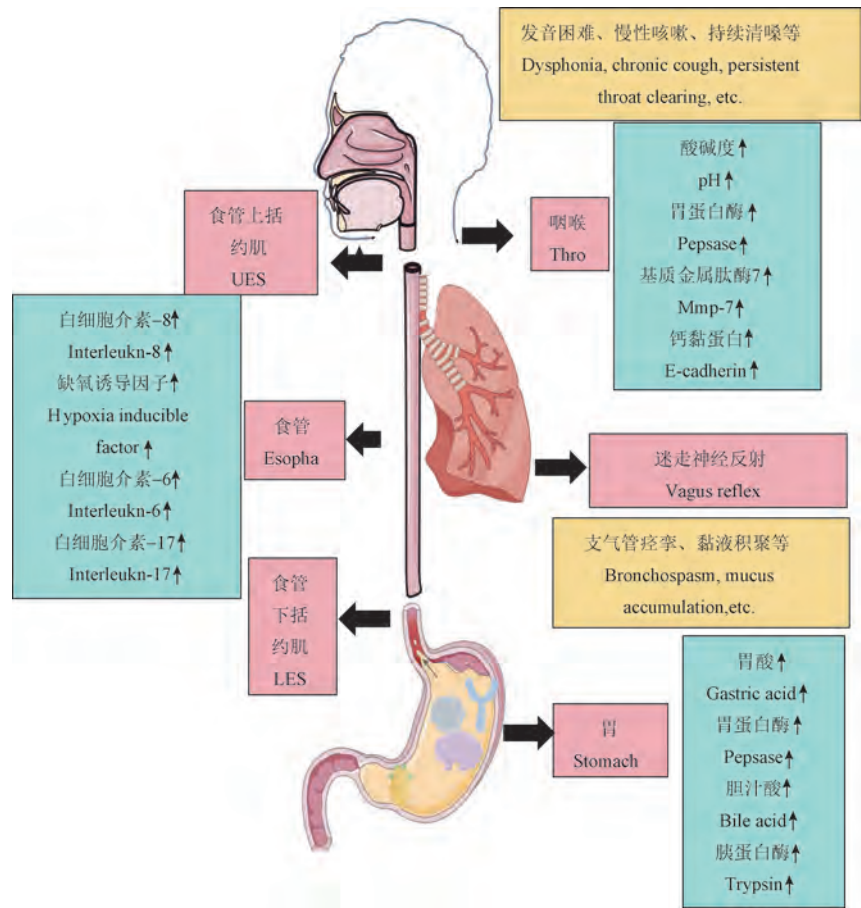


图 1 LPRD 相关机制汇总示意图

Figure 1 Summary diagram of LPRD related mechanisms

而言,该方法微创、安全、成模率高、对动物的刺激相对较小,可以保证动物长时间存活,但容易造成动物的喉痉挛及误吸,引起部分动物死亡,因此需要在喉镜下进行操作。

2.1.2 鼻胃管插管法

鼻胃管在临床上应用广泛,常被用于吞咽困难的患者,但极易引起喉炎等并发症^[23]。而鼻胃管插管法恰巧利用了这一特点,用于 LPRD 的造模。采用合适大小的鼻胃管从鼻腔插入,经过咽喉、食管,最终到达胃里,将外头端缝合到鼻侧软骨上,使胃内容物直接通过食管流入咽喉,引起局部组织的水肿和炎症反应。这种没有机械性损伤的建模方法在大鼠和兔子上得到了有效验证^[24-26]。这其中,鼻胃管的粗细是造模成功的关键,太细的鼻胃管难以打开贲门,而太粗会引起鼻胃管和食管间隙狭窄,限制回流内容物的体积,从而导致 LPRD 建模失败;此外,还会阻碍食物吞咽,导致实验动物的体重减轻。LOU 等^[16]利

用不同尺寸的鼻胃管建立兔子的 LPRD 模型,最终确认 8 号鼻胃管是最为理想的尺寸。LIMA-RODRIGUES 等^[25]通过鼻胃管插管模型实验发现:引起的喉炎有两个重要因素,一是鼻胃管本身对喉黏膜有机械性刺激,二是反流物中的氢离子刺激喉黏膜感受器,促进炎症因子释放,导致血管通透性增加和血液外渗;他们还发现环氧合酶(cyclooxygenase2, COX-2)在单核细胞中的表达随着插管时间的增加而增加,首次证明除了白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α , TNF- α)等炎症因子以外, COX-2 也参与了 LPRD 的咽喉反流机制。

2.1.3 颈咽肌切开术

UES 是防止反流物进入咽喉的最后一道防线。研究表明,在 LPRD 的患者中,UES 的压力是显著降低的^[27],证明了通过松弛 UES 建立 LPRD 动物模型在理论上的合理性。群颈咽肌是负责 UES 收缩力的主要肌。在临床上,对于 UES 收缩

障碍而引起吞咽困难的患者常采用颈咽肌切开术来缓解症状^[28]。SHI 等^[29]在内镜辅助下选择性切开颈咽肌纤维来松弛 UES,有效的建立了巴马猪 LPRD 模型。与对照组相比,手术组特征与临床特征相似,且喉黏膜中有明显的炎性细胞浸润和黏膜下腺体增生。此外,提示了咽喉黏膜上皮细胞间连接破坏后,暴露于反流物中,加重了咽喉反流的症状,这为 LPRD 发生机制提供了一个新见解。但是这种造模方法难度较大,对于手术精准操作要求较高,需要内镜辅助,难标准化。与此同时,猪的黏膜结构与人类最为相似,对手术的耐受性较高,因此,如选用该方法造模,猪即为首选实验动物^[19]。而由于饲养成本高、易产生并发症等,目前尚缺乏对于此类模型更为深入的研究报道。

2.1.4 其他内源性造模方法

HU 等^[30]将 8 只新西兰兔麻醉后,对其施行全肌切除术,即切除食管远端 2 cm 和胃近端 1 cm 的肌纤维,和全部来自食管和胃的肌纤维,并由此证明长时间的 LES 功能障碍与喉炎有关。此方法虽然有效,但是切除的肌纤维较多,影响食管除限制反流外的其他功能,如促进食物蠕动等,而且难以保证动物的存活率。HABESOGLU 等^[31]用导管覆盖 SD 大鼠的幽门及部分十二指肠,同时结扎前胃和腺体之间的过渡区造模。此方法以不仅限制了胃的容量也限制了胃排空,从而使胃内容物通过 LES 和食管,以确保造模成功,并进一步证明反流内容物会引起软腭的组织病理学变化。然而,该模型虽然限制了大鼠胃容量和胃排空,但同样也会减少饮食摄入,进而影响 LPR,难以完全复刻 LPRD。

2.2 外源性方法造模

外源性方法是将反流物:如胃酸、胃蛋白酶、胆盐等,涂抹于实验动物或离体组织的咽喉部位,刺激喉部组织引起炎症。王刚^[18]将 0.5% 胃蛋白酶和 0.01 mmol/L 盐酸混合模拟胃液,通过硬膜外麻醉管经口插入雄性豚鼠的食管中上段,采用灌注方法,模拟咽喉反流的过程造模。灌注液均用美兰试剂标记每天 1 次,每次 20 min,连续 14 d 后,咽喉部呈现蓝色证明反流模型成功。

然而临床上 LPRD 是一个慢性疾病,涉及因素较多不同反流物对喉部损伤的效果也不完

全相同。LOU 等^[17]认为患者对 PPI 无效的原因之一可能是非酸反流物,对患者喉组织的持续损伤,因为 pH>4 时,胃蛋白酶的活性会受到抑制,而非酸反流物,如脱氧胆酸、胆汁酸等在此环境中更加具有活性。因此通过比较胃蛋白酶、脱氧胆酸对猪喉声带上皮的损伤结合 Franz 扩散池、荧光分子 FD4 和电子显微镜观察发现:胆汁酸组的声带上皮对 FD4 具有更大的渗透性,更易引起细胞死亡和细胞间隙扩张,从而破坏了声带上皮的完整性和屏障功能。这为临床上对 PPI 无效的患者提供了一个新的治疗思路。

2.3 慢性睡眠剥夺和高脂饮食造模

有研究显示,慢性睡眠障碍和高脂饮食是 LPRD 的高危因素^[32-33],因此有专家提出模仿临床 LPRD 患者的生活习惯造模。理论机制包括:睡眠不足激活下丘脑-垂体-肾上腺轴,促进氧化应激,触发消化道运动功能障碍引起 LPRD^[34];氧化应激还会释放炎症因子促进全身的炎症反应^[35];慢性快速眼动期(rapid eye movement, REM)睡眠障碍更会增加胃肠道不适的发生率。ZHANG 等^[36]通过实验组大鼠进行不同持续时间的慢性 REM 睡眠剥夺实现 LPRD 造模。具体流程为:将大鼠放入含有圆形平台的水槽中,水位在平台以下 1 cm,当动物达到 REM 阶段时,肌肉松弛而掉进水槽里,从而被唤醒,每天睡眠剥夺 8 h,持续训练 1~3 个月而实现。

张晨彬等^[15]认为高脂饮食会延缓胃的排空,且使 UES 压力下降,有利于胃内容物的反流,在慢性 REM 睡眠剥夺的基础上,给予实验组大鼠高脂饲料,模拟患者高脂饮食的习惯,结果发现实验组大鼠的毛发光泽度下降、暴躁易怒,反流次数增多。上述这种从病因学角度探索 LPRD 动物模型的方法,对动物没有任何创伤,且方法简单、容易操作,符合实验动物的 3R 原则。但是慢性睡眠剥夺和高脂饮食与 LPRD 的关系尚未得到完全证实,因此目前仅仅为模型构建的一种尝试,缺乏理论依据。建立不同动物的 LPRD 模型的方法及比较见表 1。

3 LPRD 模型的评价方法

目前评价 LPRD 模型的方法比较有限,常用的评价方法有一般状态、pH 监测、喉镜及反流体征评分、病理检查等。

表 1 建立不同动物 LPRD 模型的方法及比较

Table 1 Methods of establishing LPRD models of different animals and their comparison

造模动物 Animal model	模型构建方法 Model construction method	造模机制 Molding mechanism	表现 Manifestation	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
新西兰兔 ^[16,20,27] New Zealand rabbits	球囊经胃管置于动物的 LES 处,缓慢注入适量蒸馏水,使球囊得以完全扩大 LES Balloon was placed in the LES of the animal through a gastric tube, and an appropriate amount of distilled water was slowly injected to allow the balloon to fully enlarge the LES	扩张 LES Extended LES	食欲减退、紧张易激惹,声门下肉芽肿及弥漫性充血红斑 Loss of appetite, irritability of tension, subglottic granuloma and diffuse congestive erythema		
	鼻胃管从鼻腔插入,最终到达胃里将外头端缝合到鼻侧软骨上,使胃内容物直接通过食管流入咽喉 Nasogastric tube is inserted through the nasal cavity and ends up in the stomach where the outer tip is stitched to the lateral nasal cartilage, allowing the stomach contents to flow directly through the esophagus into the throat	开放 LES 和 UES Open LES and UES	体质量减轻、食欲减退,咽喉黏膜增厚、炎性细胞浸润 Weight loss, loss of appetite, thickening of the mucosa of the eye and throat, inflammatory cell infiltration	咽喉黏膜与人体组织相近,且反流抗性弱 Throat mucosa is similar to human tissue, and the reflux resistance is weak	群居性差,只能单笼饲养 Poor social, can only be kept in a single cage
	切除食管远端 2 cm 和胃近端 1 cm 的肌纤维 Muscle fibers of distal esophagus 2 cm and proximal stomach 1 cm were removed	松弛 LES 和 UES Relaxed LES and UES	声带水肿、声带下肉芽肿、喉黏膜下腺体增生 Vocal cord edema, subvocal cord granuloma, laryngeal submucous gland hyperplasia		
巴马猪 ^[26] Pama pig	选择性切开颈咽肌纤维 Selective incision of cervicopharyngeal muscle fibers	松弛 UES Relaxed UES	声带轻度水肿、喉内黏液分泌增多 Mild edema of vocal cords and increased mucus secretion in the larynx	喉黏膜上皮组织与人类最相似 Mucosal epithelium of the larynx is most similar to that of humans	体积较大,建模周期长,购买价格贵、养育成本高 Large volume, long modeling cycle, expensive purchase price, high rearing cost
SD 大鼠 ^[28,31] SD rats	导管覆盖幽门及部分十二指肠,同时结扎前胃和腺体之间的过渡区 Catheter covers the pylorus and part of the duodenum, while ligation the transition area between the anterior stomach and the gland	限制胃容量及胃排空 Restriction of gastric volume and gastric emptying	黏膜下腺肥大、上皮下水肿、血管充血等 Hypertrophy of submucosal glands, subepithelial edema, vascular congestion and so on	购买价格便宜、饲养成本低 Purchase price is cheap and the feeding cost is low	咽喉黏膜存在角化上皮,对反流物具有一定的抗性 Keratinized epithelium in throat mucosa, which is resistant to reflux
	慢性睡眠剥夺和高脂饮食 Chronic sleep deprivation and a high-fat diet	模仿 LPRD 患者生活习惯 Mimicking the lifestyle of LPRD patients	毛发光泽度下降、暴躁易怒、夜间撕扯打架 Decreased hair gloss, irritability, tearing and fighting at night		
豚鼠 ^[18] Guinea pig	将模拟胃液,经口灌注入雄性豚鼠的食管中上段 Simulated gastric juices were orally injected into the middle and upper esophagus of male guinea pigs	刺激喉部组织炎症 Stimulates throat tissue inflammation	体重减轻、喉黏膜下白细胞浸润 Weight loss and infiltration of submucous white blood cells in larynx	咽喉部感觉神经纤维与人类相似 Sensory nerve fibers in the throat are similar to those in humans	适应力差,易受环境干扰而死亡 Poor adaptability, susceptible to environmental interference and death

3.1 一般状态观察

在建立 LPRD 动物模型的过程中,动物大多数会死于窒息或者感染,时刻观察动物的一般情况有助于及时补救这些意外。造模成功的动物还会出现食欲减退、体重减轻等情况,内镜下可出现声带充血、水肿,喉内黏稠分泌物附着等表现。

3.2 pH 监测

24 h pH 监测包括咽喉食管 pH、阻抗-pH 和 DX-pH 监测,是主要的客观诊断手段^[37]。pH 监测系统能准确的监测出鼻、咽喉、气管中反流的微量酸或碱性气体,连续动态测量气道内 pH 值变化,协助判断气管内酸碱反流情况,是诊断 LPR 的“金标准”^[38-39]。关于 LPRD 的判定,目前认为当直立位 pH<5.5、卧位 pH<5.0 时,视为一次反流事件。代丽丽等^[20]采用球囊扩张术建立新西兰兔 LPRD 动物模型,在鼻黏膜表面麻醉后,将电极插入动物的口咽部和食道入口下方,固定好装置后,记录 2 h 咽部 pH 值,造模成功的标准为:直立位 2 h 内,反流事件>1 次。曹杰等^[40]采用 DX-pH 检测系统对模型组新西兰兔进行 24 h pH 监测通过统计反流的次数、最长反流时间和反流时间百分比,得出 Ryan 指数。以 Ryan 指数>9.41 分作为反流阳性的判断标准。

3.3 喉镜及 RSI 或 RSF 量表

反流症状指数量表(reflux symptom index, RSI)和/或反流体征评分(reflux finding score, RSF)(见表 2)是初步诊断的简单有效手段。目前国内外诊断 LPRD 的参考分数基本采用 BELAFSKY 等^[41-42]的研究结论,即 RSI>13 分和/或 RFS>7 分,由于不同患者对 LPRD 的敏感性和特异性不同,因此仍有很多学者对此标准存疑^[43]。使用 RSI 评分量表的人为主观因素的干扰较多,相比之下,RSF 喉镜的准确度可能更高、更客观。喉镜是一种内窥喉部的工具,通过喉镜可以在不损伤动物的前提下,随时观察到模型建立的过程和进度。孙喆喆等^[44]通过扩张新西兰兔的 LES 建模,他们记录了扩张前 1 周 RSF 评分(3.1±1.2)分,以及扩张后 8 周为(8.6±2.5)分。喉镜下,模型组的主要表现为声门下水肿、喉部黏液附着、弥漫性喉部水肿等,其中 1 例动物出现声突肉芽肿。

3.4 其他

除了上述的评价方法外还有 LES 压力测试^[29,44]、组织学评价^[20]等。

压力测试一般是在模型建立前后 1~2 周进行,即将动物麻醉后,经口置入测压导管,测量 LES 上缘和下缘的压力,再算出 LES 的平均静息压。比较扩张前后的 LES 的压力变化。这种方法对测压导管的精准度要求较高,模型建立后,LES 会出现较严重的松弛,并且收缩周期会变得不规律^[44]。对于组织学评价,除了之前所述的喉镜检查外,还有一些病理检查,即将动物处死后,取喉部黏膜和 LES 部分,用 10% 甲醛溶液固定,石蜡切片后,进行苏木素-伊红(HE)染色,镜下可见,喉部黏膜主要为淋巴细胞、浆细胞浸润性炎症,并且伴有腺体增生和间质水肿,食管黏膜主要为淋巴细胞浸润性慢性炎症^[20]局部鳞状上皮可见角化不全。

表 2 反流体征评分量表 Table 2 Reflux signs rating scale	
体征 Sign	评分 Score
声门下水肿 Subglottic edema	0=无 None 2=存在 Exist
喉室消失 Laryngeal disappearance	0=无 None 2=部分 Part 3=消失 Disappear
红斑/充血 Erythema/congestion	0=无 None 2=局限于杓状软骨 Restricted to arytenoid cartilage 4=弥漫 Diffuse
声带水肿 Vocal cord edema	0=无 None 1=轻度 Mild 2=中度 Medium 3=重度 Severe 4=声带息肉 Vocal cord polyp
弥漫性喉水肿 Diffuse laryngeal edema	0=无 None 1=轻度 Mild 2=中度 Medium 3=重度 Severe 4=阻塞 Blocking
后联合增生 Posterior synhyperplasia	0=无 None 1=轻度 Mild 2=中度 Medium 3=重度 Severe 4=阻塞 Blocking
肉芽肿 Granuloma	0=无 None 2=存在 Exist
喉内黏稠黏液附着 Sticky mucus sticks in the throat	0=无 None 2=存在 Exist

4 总结与展望

食管黏膜每天可以抵抗 50 次反流事件的发生,并且不会引起组织受损^[45],而每天 4 次的反流事件就足以对咽喉黏膜造成损伤,因此开放或者扩张 UES 是目前建立 LPRD 的关键。球囊扩张术、鼻胃管插管法、全肌切除术等,都是通过扩张或者松弛 UES,或者扩张 LES 来实现。但也存在问题,如:造模中同时伴随胃食管的反流(gastroesophageal reflux disease, GERD),胃内容反流进入食管,引起相应的病理损伤,可导致部分模型 LPRD 和 GERD 共存,也符合临床特征;颈咽肌切除术通过松弛 UES 来建模,可有效排除 GERD 影响,但是手术复杂,需要一定的外科解剖技术,难度较大;相比较而言,外源性方法简单易行,模拟 LPRD 的过程不够充分;慢性睡眠剥夺与高脂饮食的方法从病因学的角度考虑了发病机制,但是模型制作周期较长,过程混杂因素较多。LPRD 的造模方法有各自的优缺点,均从某一角度接近人的 LPRD 发生发展。总之, LPRD 造模难度较大,因此未来应该有较大空间创新和改良 LPRD 的动物模型,使其与临床症状更加贴切。

临床上,胃蛋白酶作为该疾病检测的金指标,提示 LPR 的发生发展,该方法简单、快捷。且迄今未在动物模型上应用,因此笔者认为,该方法理应成为 LPRD 动物模型的标准评价指标之一;此外,反流物中除胃酸、胃蛋白酶等酸性物质外,还存在胆汁酸等非酸性物质,而患者持续的非酸性物质刺激咽喉亦是咽喉组织损伤等症状的原因之一^[17],甚至比酸性物质的损伤更为严重,因此,现有单纯监测 pH 值来证明造模成功的方法不够全面,应该在加上模型动物喉黏膜或唾液中非酸性内容物的检测^[46-47]。而新兴多组学检测方法的兴起,有望从组织、体液等蛋白或者代谢层面增加模型鉴定的可靠性。

另外,基因编辑技术、转基因基因工程改造技术的兴起,使得疾病动物造模的改造相对容易,如阿尔茨海默病^[48]、坏死性筋膜炎^[49]、类风湿关节炎^[50]等。寻找特征基因,尝试利用基因改造技术建立 LPRD 模型是一个有前景和优势的方法。但该方法取决于疾病发病机制的深入研究,到目前为止, LPRD 的发病机制还没有完全阐明,

且 PPI 对部分 LPRD 患者无效的问题还没有彻底解决,因此,成熟的造模技术是当前的关键,未来的研究应当朝着 LPRD 的分子生物学机制和临床新药开发的方向发展。

参考文献:

- [1] SARUÇ M, AKSOY E A, VARDERELI E, et al. Risk factors for laryngopharyngeal reflux [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2012, 269(4): 1189-1194.
- [2] CUI N, DAI T, LIU Y, et al. Laryngopharyngeal reflux disease: Updated examination of mechanisms, pathophysiology, treatment, and association with gastroesophageal reflux disease [J]. World J Gastroenterol, 2024, 30(16): 2209-2219.
- [3] QADEER M A, PHILLIPS C O, ROCIO LOPEZ A, et al. Proton pump inhibitor therapy for suspected GERD-related chronic laryngitis: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Am J Gastroenterol, 2006, 101(11): 2646-2654.
- [4] 曹雅晨, 张瑾, 张文, 等. 耳鸣与咽喉反流相关性研究进展 [J]. 听力学及言语疾病杂志, 2021, 29(2): 226-228.
CAO Y C, ZHANG J, ZHANG W, et al. Research progress on correlation between tinnitus and throat reflux [J]. J Audiol Speech Pathol, 2021, 29(2): 226-228.
- [5] 谢冬雪, 张淑君. 咽喉反流与阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征相关研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2021, 38(1): 63-66.
XIE D X, ZHANG S J. Research progress on correlation between throat reflux and obstructive sleep apnea hypopnea syndrome [J]. J Chengde Med Univ, 2021, 38(1): 63-66.
- [6] 程瑶, 张震, 赵锐, 等. 咽喉反流疾病与下咽癌的相关性的研究进展 [J]. 医学信息, 2022, 35(12): 65-67, 72.
CHENG Y, ZHANG Z, ZHAO R, et al. Research progress on the correlation between laryngopharyngeal reflux disease and hypopharyngeal carcinoma [J]. J Med Inf, 2022, 35(12): 65-67, 72.
- [7] 陈麒竹, 戴德, 罗国庆. 咽喉反流液中胃蛋白酶在喉癌诊断及治疗中的意义 [J]. 中国医学创新, 2021, 18(6): 185-188.
CHEN Q Z, DAI D, LUO G Q. Significance of pepsin in laryngopharyngeal reflux in the diagnosis and treatment of laryngeal cancer [J]. Med Innov China, 2021, 18(6): 185-188.
- [8] CHEN T, LU M, WANG X, et al. Prevalence and risk factors of gastroesophageal reflux symptoms in a Chinese retiree cohort [J]. BMC Gastroenterol, 2012, 12: 161.

- [9] HAMDAN A L, JABBOUR J, BARAZI R, et al. Prevalence of laryngopharyngeal reflux disease in patients with diabetes mellitus [J]. *J Voice*, 2013, 27(4): 495–499.
- [10] WANG Y, LIANG Q, LUO J, et al. Laryngopharyngeal reflux in otolaryngology-head and neck surgery clinic: an epidemiological survey [J]. *Ear Nose Throat J*, 2024; 1455613241301601.
- [11] GUO H, MA H, WANG J. Proton pump inhibitor therapy for the treatment of laryngopharyngeal reflux: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2016, 50(4): 295–300.
- [12] CHEN Y Y, WANG C C, CHUANG C Y, et al. Link between pharyngeal acid reflux episodes and the effectiveness of proton pump inhibitor therapy [J]. *World J Gastroenterol*, 2024, 30(48): 5162–5173.
- [13] JIANG G, CAI Y, YI X, et al. The impact of laryngopharyngeal reflux disease on 95 hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective study [J]. *J Med Virol*, 2020, 92(10): 2124–2129.
- [14] WANG M, MO T, TAN J, et al. Risk factor-related lifestyle habits of patients with laryngopharyngeal reflux [J]. *Ear Nose Throat J*, 2024, 103(10): 640–649.
- [15] 张晨彬, 李木, 张延平, 等. 慢性睡眠剥夺和高脂饮食与咽喉反流性疾病相关性的实验研究 [J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2018, 26(1): 68–72.
- ZHANG C B, LI M, ZHANG Y P, et al. Upper gastrointestinal tract pH monitoring in rats with chronic sleep deprivation and high fat diet [J]. *J Audiol Speech Pathol*, 2018, 26(1): 68–72.
- [16] LOU Z, XUE C, KANG J, et al. Establishment of a novel and effective reflux laryngitis model in rabbits: a preliminary study [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2019, 276(1): 175–183.
- [17] LOU Z, GONG T, ZHANG C, et al. The integrity and barrier function of porcine vocal fold epithelium: its susceptibility to damage by deoxycholic acid compared with pepsin [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2021, 278(12): 4893–4899.
- [18] 王刚. 神经源性炎症与 LPRD 相关性研究 [D]. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2020.
- WANG G. Correlation between neurogenic inflammation and LPRD [D]. Bangbu: Bengbu Medical College, 2020.
- [19] GILL G A, BUDA A, MOORGHEN M, et al. Characterisation of adherens and tight junctional molecules in normal animal larynx; determining a suitable model for studying molecular abnormalities in human laryngopharyngeal reflux [J]. *J Clin Pathol*, 2005, 58(12): 1265–1270.
- [20] 代丽丽, 汤维, 尤悦, 等. 内镜辅助新西兰兔咽喉反流病动物模型建立方法的改进与比较 [J]. *中国内镜杂志*, 2022, 28(5): 40–49.
- DAI L L, TANG W, YOU Y, et al. Endoscopic-guided establishment of the animal model of laryngopharyngeal reflux disease on New Zealand rabbits: comparison and improvement [J]. *China J Endosc*, 2022, 28(5): 40–49.
- [21] LANG I M, MEDDA B K, SHAKER R. Mechanism of UES relaxation initiated by gastric air distension [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, 307(4): G452–G458.
- [22] CAO J, ZHANG L, LIU Y J, et al. Properties of a novel animal model of LPR [J]. *J Voice*, 2021, 35(5): 805. e17–805. e26.
- [23] FRIEDMAN M, BAIM H, SHELTON V, et al. Laryngeal injuries secondary to nasogastric tubes [J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1981, 90(5 Pt 1): 469–474.
- [24] LUO Y, TONG Y, WU L, et al. Alteration of gut microbiota in individuals at high-risk for rheumatoid arthritis associated with disturbed metabolome and the initiation of arthritis through the triggering of mucosal immunity imbalance [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2023, 75(10): 1736–1748.
- [25] LIMA-RODRIGUES M, VALLE-FERNANDES A, LAMAS N, et al. A new model of laryngitis: neuropeptide, cyclooxygenase, and cytokine profile [J]. *Laryngoscope*, 2008, 118(1): 78–86.
- [26] LOU Z, XUE C, KANG J, et al. Establishment of a novel and effective reflux laryngitis model in rabbits: a preliminary study [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2019, 276(1): 175–183.
- [27] RICHTER J E. Computerized learning is a building block but we still have far to go [J]. *Am J Gastroenterol*, 2020, 115(9): 1451–1452.
- [28] WU P I, SZCZESNIAK M M, OMARI T, et al. Cricopharyngeal peroral endoscopic myotomy improves oropharyngeal dysphagia in patients with Parkinson's disease [J]. *Endosc Int Open*, 2021, 9(11): E1811–E1819.
- [29] SHI Q, WANG Y, ZHOU J, et al. A novel laryngopharyngeal reflux disease model for Bama pigs [J]. *J Voice*, 2024; S0892–1997(24)00022–5.
- [30] HU Y, XU X B, CHEN S Y, et al. Laryngoscopy findings and histological results in a rabbit gastroesophageal reflux model [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2012, 269(8): 1939–1944.
- [31] HABESOGU T E, HABESOGU M, SÜRMELI M, et al. Histological changes of rat soft palate with exposure to experimental laryngopharyngeal reflux [J]. *Auris Nasus Larynx*, 2010, 37(6): 730–736.
- [32] LECHIEN J R, BOBIN F, MULS V, et al. Patients with acid, high-fat and low-protein diet have higher

- laryngopharyngeal reflux episodes at the impedance-pH monitoring [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2020, 277 (2): 511-520.
- [33] YAMASAKI T, QUAN S F, FASS R. The effect of sleep deficiency on esophageal acid exposure of healthy controls and patients with gastroesophageal reflux disease [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2019, 31(12): e13705.
- [34] VATAEV S I, OGANESIAN G A, GMIRO V E, et al. Effects of ionotropic glutamate receptor channel blockers ON sleep-waking organization in rats [J]. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova*, 2012, 98(7): 809-818.
- [35] DAIBER A, KRÖLLER-SCHÖN S, OELZE M, et al. Oxidative stress and inflammation contribute to traffic noise-induced vascular and cerebral dysfunction via uncoupling of nitric oxide synthases [J]. *Redox Biol*, 2020, 34: 101506.
- [36] ZHANG Y, JIANG X, CHEN H, et al. Chronic REM-sleep deprivation induced laryngopharyngeal reflux in rats: a preliminary study [J]. *Auris Nasus Larynx*, 2021, 48(4): 683-689.
- [37] 李科, 李可亮, 杨娟娟, 等. 咽喉反流性疾病诊断和治疗研究进展 [J]. *中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志*, 2020, 28(2): 157-160.
- LI K, LI K L, YANG J J, et al. Research progress in diagnosis and treatment of throat reflux disease [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Integr Med*, 2020, 28(2): 157-160.
- [38] ANDREWS T M, OROBELLO N. Histologic versus pH probe results in pediatric laryngopharyngeal reflux [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2013, 77(5): 813-816.
- [39] BANASZKIEWICZ A, DEMBINSKI L, ZAWADZKA-KRAJEWSKA A, et al. Evaluation of laryngopharyngeal reflux in pediatric patients with asthma using a new technique of pharyngeal pH-monitoring [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 755: 89-95.
- [40] 曹杰, 张立红, 王文伦, 等. 白细胞介素-8 在兔咽喉反流中的作用 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2020, 26 (3): 278-282.
- CAO J, ZHANG L H, WANG W L, et al. A preliminary study on the role of interleukin-8 (IL-8) in laryngopharyngeal reflux of rabbits [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2020, 26(3): 278-282.
- [41] BELAFSKY P C, POSTMA G N, KOUFMAN J A. Validity and reliability of the reflux symptom index (RSI) [J]. *J Voice*, 2002, 16(2): 274-277.
- [42] BELAFSKY P C, POSTMA G N, KOUFMAN J A. The validity and reliability of the reflux finding score (RFS) [J]. *Laryngoscope*, 2001, 111(8): 1313-1317.
- [43] 韩悦, 张森, 皇甫辉, 等. 咽喉反流性疾病诊断量表的应用进展 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2023, 37 (4): 313-317.
- HAN Y, ZHANG S, HUANGFU H, et al. The application progress on diagnostic scales of laryngopharyngeal reflux disease [J]. *J Clin Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 2023, 37(4): 313-317.
- [44] 孙喆喆, 王刚, 黄鑫, 等. 下食管括约肌球囊扩张建立咽喉反流性疾病兔模型 [J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2021, 29(2): 184-189.
- SUN Z Z, WANG G, HUANG X, et al. Experimental study on the establishment of A rabbit model of laryngopharyngeal reflux disease by balloon dilation [J]. *J Audiol Speech Pathol*, 2021, 29(2): 184-189.
- [45] KAHIRILAS P J, SHAHEEN N J, VAEZI M F, et al. American Gastroenterological Association Medical Position Statement on the management of gastroesophageal reflux disease [J]. *Gastroenterology*, 2008, 135 (4): 1383-1391.
- [46] KRAUSE A J, YADLAPATI R. Review article: Diagnosis and management of laryngopharyngeal reflux [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2024, 59(5): 616-631.
- [47] KRAUSE A J, GREYTAK M, KESSLER M, et al. Pilot study evaluating salivary bile acids as a diagnostic biomarker of laryngopharyngeal reflux [J]. *Dis Esophagus*, 2024, 37 (7): doae021.
- [48] 谢晓露, 陈秀, 寇利秋, 等. AD 动物模型及其相关指标评价方法研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32 (8): 145-154.
- XIE X L, CHEN X, KOU L Q, et al. Research progress on animal models and evaluation methods of Alzheimer's disease [J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 32(8): 145-154.
- [49] 邢宝杰, 贾代良. 坏死性筋膜炎动物模型构建研究进展 [J]. *济宁医学院学报*, 2024, 47(2): 155-157.
- XING B J, JIA D L. Research progress in animal model construction of necrotizing fasciitis [J]. *J Jining Med Univ*, 2024, 47(2): 155-157.
- [50] 江梦园, 闫敏, 李晓芳, 等. 类风湿性关节炎动物模型的研究进展 [J]. *世界中医药*, 2023, 18(24): 3597-3602.
- JIANG M Y, YAN M, LI X F, et al. Research progress in animal models of rheumatoid arthritis [J]. *World Chin Med*, 2023, 18(24): 3597-3602.

[收稿日期]2024-08-21

蔡秋玲,杨靖,沈慧玲,等. TAM 在胃癌发生发展及耐药中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(5): 164–176.
Cai QL, Yang J, Shen HL, et al. Research progress on roles of tumor-associated macrophages in tumorigenesis, development, and drug resistance in gastric carcinoma [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(5): 164–176.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.05.016

TAM 在胃癌发生发展及耐药中的研究进展

蔡秋玲^{1,2}, 杨靖^{1,2}, 沈慧玲^{1,2}, 许文林^{1,2*}

(1.江苏大学附属第四人民医院 中心实验室,江苏 镇江 212000;2.江苏大学医学院,江苏 镇江 212000)

【摘要】 肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAM)作为近几年肿瘤微环境研究中的热点之一,为实现其功能上的不同作用,巨噬细胞经历了一系列表型的极化,通常存在两个不同的亚群, M1 型巨噬细胞具有促炎和杀肿瘤作用,而 M2 型巨噬细胞具有抗炎和促肿瘤作用。其中, TAM 主要表现出的 M2 极化已被发现与多种癌症的不良预后相关,并表现出对多种恶性肿瘤的支持特性。胃癌患者早诊率低,疾病分期晚,预后也较差,具有易于复发转移的生物学行为特点。目前药物的耐药性和毒副作用极大限制了胃癌治疗的应用和疗效,因而寻找新的治疗靶点或药物至关重要。本文总结了 TAM 在胃癌发生、发展及耐药过程中所取得的研究进展,为胃癌患者的临床治疗和预后分析提供新的见解。

【关键词】 肿瘤相关巨噬细胞; M2 型巨噬细胞; 胃癌; 预后; 耐药

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 05-0164-13

Research progress on roles of tumor-associated macrophages in tumorigenesis, development, and drug resistance in gastric carcinoma

CAI Qiuling^{1,2}, YANG Jing^{1,2}, SHEN Huiling^{1,2}, XU Wenlin^{1,2*}

(1. Central Laboratory, Fourth Affiliated Hospital of Jiansu University, Zhenjiang 212000, China.

2. School of Medicine Jiangsu University, Zhenjiang 212000)

【Abstract】 Tumor-associated macrophages (TAM) are a current focus in the study of the tumor microenvironment. To achieve their functionally distinct roles, macrophages undergo phenotypic polarization resulting in two major subgroups: M1 macrophages with pro-inflammatory and anti-tumor effects, and M2 macrophages with anti-inflammatory and pro-tumor effects. Of these, M2 polarization, as the main manifestation of TAMs, has been associated with a poor prognosis in various cancers and has been shown to support malignancies. Gastric carcinoma has a low early-diagnosis rate, late disease stage, and poor prognosis, with biological behavioral characteristics of easy recurrence and metastasis. Drug resistance and toxic side effects currently limit the application and effectiveness of treatments, and there is thus an urgent need to explore new therapeutic drugs and targets. This review summarizes recent progress in studies of TAM in relation to the occurrence, development, and drug resistance of gastric carcinoma, providing new ideas for clinical treatment and prognosis prediction in patients with gastric carcinoma.

[作者简介] 蔡秋玲(1997—),女,在读硕士研究生,研究方向:胃癌的临床和预后研究。E-mail:1946083943@qq.com

[通信作者] 许文林(1963—),男,教授,博士生导师,研究方向:肿瘤的临床治疗和临床转化研究。E-mail:xuwenlin0806@163.com

【Keywords】 tumor-associated macrophage; M2 type macrophage; gastric carcinoma; prognosis; drug resistance

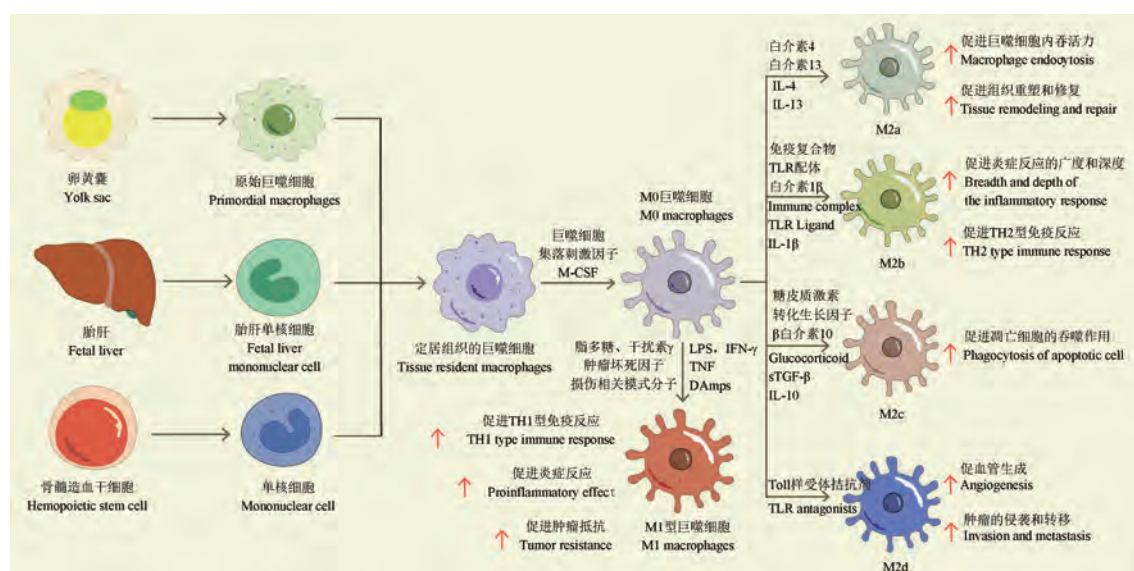
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

胃癌(gastric carcinoma, GC)是全球最常见的消化道恶性肿瘤之一,其中我国 GC 在各种癌症中的发病率及死亡率分别居第 2 位和第 3 位^[1]。由于早期 GC 患者通常无明显症状,所以大多数发现时已是进展期,且晚期 GC 患者的 5 年生存率仅为 5%^[2]。GC 的总体治疗策略是以手术切除为主,但对于半数符合手术条件的患者,术后进行辅助化疗、放疗、靶向治疗以及免疫治疗是标准治疗方法^[3]。肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)在各种恶性肿瘤的增殖、转移、侵袭、血管生成、免疫逃逸和耐药性中发挥着重要作用^[4]。TME 的成分包括肿瘤细胞周围的所有非恶性基质细胞,如成纤维细胞、脂肪细胞、平滑肌细胞、内皮细胞和免疫细胞^[5]。作为一个动态的瘤周环境, TME 的生物表型和组成结构会随着肿瘤的进展而不断变化,显著影响着肿瘤的治疗和预后^[6]。肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)作为 TME 中最丰富的固有免疫细胞种群,约占肿瘤质量的 50%^[7]。巨噬细胞具有可塑性,在不同的环境刺激下可以

极化成不同的表型,它们在细胞表面分子的表达、细胞因子及趋化因子的分泌等方面产生差异,进而发挥其不同的功能^[8]。然而,GC 细胞和巨噬细胞之间的相互作用在很大程度上是未知的。本文总结了 TAM 的起源和表型极化、TAM 在胃癌发生、发展和耐药过程中的作用和机制,并且讨论如何利用这些作用机制为 GC 患者提供潜在的治疗目标和靶点。

1 TAM 的起源和极化状态

1882 年,巨噬细胞首次被发现,随后被证明可以启动和塑造适应性免疫系统,在免疫防御、炎症反应、组织修复和器官发育等多个方面发挥着不可或缺的作用^[9]。巨噬细胞有 3 种不同的来源途径,包括胚胎、成人造血干细胞或骨髓来源的祖细胞以及单核细胞。在稳态条件下,组织中的巨噬细胞来源于胚胎前体细胞和成人造血干细胞或骨髓来源的祖细胞;但在病理性炎症相关反应中,巨噬细胞群由组织浸润的单核细胞发育而来^[10]。见图 1。



注: ↑:促进。

图 1 巨噬细胞的起源和极化状态

Note. ↑, Promote.

Figure 1 Origin and polarization of macrophages

巨噬细胞不是具有明确表型和生物活性的单一细胞群,而是在各种环境因素的刺激下向着不同的表型分化并发挥不同的功能,从而在机体的生理以及病理活动中表现出特定的调节作用,这种动态现象被称为巨噬细胞极化^[11]。在复杂的瘤周环境中,巨噬细胞通过与 TME 的相互作用而被驱动成为免疫抑制性 TAM,TAM 在肿瘤侵袭和转移的不同阶段发挥主导作用,通过动态调节 M1 和 M2 型巨噬细胞的占比来影响肿瘤患者的疗效和预后^[12]。目前,M1 和 M2 型巨噬细胞是根据特定标志物的表达来划分的,M1 型巨噬细胞表达较高丰度的 CD68、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和白细胞介素 12 (interleukin-12, IL-12) 等细胞因子,具有促炎和杀伤肿瘤作用^[13];而 M2 型巨噬细胞表达较高丰度

的转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、CD163、CD206、白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) 和血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等细胞因子,具有抗炎和促肿瘤作用^[14]。M1 和 M2 型巨噬细胞是一种平衡状态,细胞生态位的变化会诱导细胞朝着某一亚型倾斜,其中 TAM 就被认为更接近于 M2 极化的巨噬细胞^[15]。与此同时,由于 M2 型巨噬细胞产生复杂的细胞因子并具有多种功能,还可以进一步分为 M2a、M2b、M2c 和 M2d 亚型。M2a 亚型具有抗炎、伤口愈合、免疫反应和组织纤维化作用;M2b 亚型介导免疫调节,促进感染和肿瘤进展;M2c 亚型具有免疫抑制和组织重塑作用^[16];M2d 亚型通过介导血管生成促进肿瘤侵袭^[17]。M1 和 M2 型巨噬细胞的表达差异和功能比较见表 1。值得关注的是,不同亚

表 1 M1 和 M2 型巨噬细胞的表达差异和功能比较
Table 1 Comparison of expression and function of M1 and M2 macrophages

	M1 型巨噬细胞 M1 macrophages	M2 型巨噬细胞 M2 macrophages
表面受体 Surface receptor	Toll 样受体 2、Toll 样受体 4、分化簇 80、分化簇 86、诱导型一氧化氮合酶和主要组织相容性复合体 II TLR-2, TLR-4, CD80, CD86, iNOS and MHC- II	分化簇 206、分化簇 163、分化簇 209、炎症区域分子-1 和 Ym1/2 CD206, CD163, CD209, FIZZ1 and Ym1/2
核内转录因子 Intranuclear transcription factor	核因子 κ B、信号传导转录激活因子 1、信号传导转录激活因子 5 和干扰素调节因子 3 NF- κ B, STAT1, STAT5 and IRF3	信号传导转录激活因子 6、干扰素调节因子 4、组蛋白去甲基化酶 3、过氧化物酶体增殖物激活受体 δ 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ STAT6, IRF4, JMJD3, PPAR δ and PPAR γ
细胞分泌因子 Cell secretory factor	肿瘤坏死因子- α 、白介素 1 α 、白介素 1 β 、白介素 6、白介素 12、趋化因子 C-X-C 基元配体 9 和趋化因子 C-X-C 基元配体 10 TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, CXCL9 and CXCL10	白介素 10、转化生长因子- β 、血管内皮细胞生长因子、趋化因子配体 1、趋化因子配体 17、趋化因子配体 18 和趋化因子配体 22 IL-10, TGF- β , VEGF, CCL1, CCL17, CCL18 and CCL22
作用 Function	↑ 促炎作用; ↑ TH1 型免疫反应; ↑ 肿瘤抵抗 ↑ Proinflammatory effect; ↑ TH1 type immune response; ↑ Tumor resistance	↑ 抗炎作用; ↑ 组织重塑与修复; ↑ 促血管生成; ↑ 肿瘤侵袭与转移; ↑ 免疫抑制; ↑ 上皮-间充质转化; ↑ 药物抗性 ↑ Anti-inflammatory effect; ↑ Tissue remodeling and repair; ↑ Angiogenesis; ↑ Tumor invasion and metastasis; ↑ Immunosuppression; ↑ EMT; ↑ Drug resistance

注: ↑ : 促进。
Note. ↑ , Promote.

型巨噬细胞间的极化状态是可以相互转换的,因此调节 TAM 的极化状态被认为是一种潜在的治疗肿瘤策略。

2 TAM 与胃癌的发生、发展

2.1 TAM 对免疫抑制的作用

对 22 种免疫细胞进行浸润性分析,证实了巨噬细胞极化是 GC 中主要的免疫浸润模式,其有助于建立一个促进肿瘤免疫逃避的微环境^[18]。对巨噬细胞本身而言,细胞毒性和促炎信号传导的丧失代表其丧失了杀伤肿瘤和免疫清除的功能^[19]。TAM 下调核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、信号传导转录激活因子 1 (signal transducer and activator of transcription 1, STAT-1) 和干扰素调节因子 5 (interferon regulatory factor 5, IRF-5) 等促炎细胞因子的表达,同时上调干扰素调节因子 4 (interferon regulatory factor 4, IRF-4)、信号传导转录激活因子 6 (signal transducer and activator of transcription 6, STAT-6)、MYC 等细胞因子的表达,进而破坏有效的先天免疫和适应性免疫的诱导,使机体对肿瘤细胞处于免疫监控、应答抑制的状态^[20]。除了影响自身外,相关研究发现 TAM 通过分泌 TGF- β 、IL-10 和前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 等相关抗炎细胞因子,进而抑制 NK 细胞和效应 T 细胞的细胞毒性,有助于肿瘤细胞的免疫逃逸^[21]。此外,TAM 在缺氧条件下会激活缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α), HIF-1 α 与缺氧反应原件 (hypoxia-responsive element, HRE) 直接结合选择性上调 PD-L1 的表达,从而介导细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4, CTLA-4) 的表达,导致 T 细胞凋亡和功能衰竭^[22]。同时,FOX 等^[23]研究发现,TAM 分泌的 CD80 和 CD86 与 T 细胞表面的 CTLA-4 相互作用,从而降低细胞毒性和抑制 T 细胞的杀伤效能。

另外值得关注的是,在 TAM 介导的免疫抑制相关代谢过程中,TAM 还会产生一种调节 L-精氨酸代谢的水解酶——重组人精氨酸酶 1 (arginase-1, ARG1),该水解酶通过将 L-精氨酸转化为 L-鸟氨酸和尿素,直接抑制 T 细胞对肿瘤细胞的抗原呈递和杀伤功能^[24]。随着肿瘤的进

展,相关研究还发现 TAM 可以通过趋化因子配体 2 (chemokine ligand 2, CCL2)/趋化因子受体 2 (chemokine receptor 2, CCR2) 和集落刺激因子-1 (colony stimulating factor 1, CSF-1)/CSF1R 信号通路招募免疫抑制性白细胞到肿瘤中,进一步激活免疫抑制效应^[25]。

因此,将 TAM 重编程为抗肿瘤表型能有效地提高机体对肿瘤细胞的免疫应答和杀伤效能。同时,针对 TAM 的免疫治疗可以协同增强免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICI) 的疗效,从而增强患者对免疫治疗的敏感性。

2.2 TAM 对血管生成的作用

实体肿瘤的增殖、转移和侵袭过程中,脉管系统发挥着关键作用,新生的血管不仅为肿瘤细胞源源不断地输送着各种所需的营养物质和细胞因子,而且能启动细胞外基质的降解使得肿瘤细胞进一步向外迁移和转移^[26]。对 M2 型巨噬细胞高度浸润的组织进行免疫组织化学染色可以观察到高密度的微血管,因此 TAM 也被称为“血管生成开关”^[27]。同时,肝转移是影响患者预后的主要原因之一,研究发现巨噬细胞的 M2 极化通过促进肝内转移前微环境的形成和转移后血管生成的来加速这一进程^[28]。

由于快速分裂的肿瘤细胞代谢活动增加和缺乏发育的血管系统所产生的氧气供应,缺氧成为肿瘤微环境的特征之一^[29]。有实质性证据表明,各种恶性肿瘤的缺氧区通过释放各种信号因子,如 VEGF、内皮素和趋化因子 C-X-C 基元配体 12 (C-X-C motif chemokine ligand 12, CXCL12) 等,依赖 CXCL12/趋化因子 C-X-C 基元受体 4 (C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4) 信号轴使得巨噬细胞向这些缺氧区域趋化富集^[30]。这些巨噬细胞一旦进入缺氧的 TME 会发生表型改变,这个过程被称为 M2 极化。M2 型巨噬细胞分泌出 VEGF、成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF-2)、CXCL8、环氧化物酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 和基质金属蛋白酶 12 (matrix metalloproteinase-12, MMP-12) 等血管相关细胞分子,促进新生血管的生成^[31]。另外 TAM 激活了 Wnt 家族成员 7B (Wnt family member 7B, WNT7B)、平足蛋白 (recombinant podoplanin, PDPN)、HIF-1 α 、CCL8 和内皮细胞 TEK 酪氨酸激

酶(recombinant TEK tyrosine kinase, TIE2)的表达也可介导肿瘤新生血管生成^[32]。一旦血管生成开始,肿瘤和 TAM 能够共同启动细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解,促进癌细胞的迁移和转移^[33]。

因此, TAM 在肿瘤血管生成中的作用毋庸置疑,通过抑制巨噬细胞的 M2 极化,进而减少血管相关细胞因子的分泌和新生血管的生成,将有利于临床治疗的疗效和预后。

2.3 TAM 对上皮-间充质转化的作用

肿瘤可塑性的标志之一是上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),肿瘤细胞从上皮状态转分化为间质转态,获得侵袭和转移能力,在肿瘤进展中发挥重要作用^[34]。与 EMT 含量较低的肿瘤样本相比,高含量样本组中的巨噬细胞显著富集,巨噬细胞的富集与各种癌症类型的 EMT 评分呈正相关^[35]。

针对影响 EMT 的相关趋化因子, CHEN 等^[36]发现 M2 型巨噬细胞表达高水平的 CCL2 通过 CCL2/PI3K/AKT 信号轴增强 β -catenin 信号转导,进而诱导 EMT。另外, TAM 释放的 CCL5 可以通过 β -catenin/STAT3 信号轴诱导前列腺癌细胞中 EMT 和干细胞表型^[37]。此外,最近一项研究还发现人单核细胞系来源的巨噬细胞与肿瘤细胞共培养后,趋化因子受体对 CCL20-CCR6 激活 AKT 磷酸化,可以增加 EMT 和肿瘤细胞的迁移^[38]。除趋化因子以外, TGF- β 作为一种已知的 EMT 诱导剂,有研究表明其可能主要来源于 M2 型巨噬细胞, TGF- β 驱动肿瘤细胞中锌指 E 盒结合同源盒 1(zinc finger E-box-binding homeobox 1, Zeb1)的核转位,从而启动 EMT^[39]。另外, TAM 还可以通过释放 IL-6 诱导 COX-2/PGE2 和 STAT3/ERK 信号通路,从而激活 β -catenin 和随后的 EMT^[40-41]。

部分 GC 的发生与 EB 病毒相关, SONG 等^[42]研究发现, EB 病毒编码的 miR-BART11 上调可通过靶向 GC 中的叉头盒蛋白 P1(forkhead box P1, FOXF1),影响 E-钙黏蛋白(E-cadherin)和 Snail 蛋白的表达,进而促进 TAM 诱导的 EMT。另外, TAM 还可以通过调节 JAK2/STAT3/miR-506-3p/叉头盒蛋白 Q1(forkhead box Q1, FOXQ1)信号轴诱导 EMT 程序来增强肿瘤的迁移、侵袭和转

移^[43]。CAO 等^[44]研究发现, M2 型巨噬细胞衍生的细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)还可以将 miR-15b-5p 转移到肿瘤细胞中,并通过靶向乳腺癌转移抑制因子 1(breast cancer metastasis suppressor 1, BRSM1)使细胞外基质粘附能力呈下降趋势, E-cadherin 的表达下调, N-钙黏蛋白和波形蛋白的表达上调,进而诱导肿瘤细胞的 EMT^[44]。

因此,巨噬细胞-EMT 串扰的多种机制有望作为 GC 治疗靶点的新突破口,但仍需要大量的研究去发现这其中涉及的基因和蛋白质。值得关注的是,当前针对相关通路的抗体和抑制剂在不断地研发过程中,部分研究成果正处于临床试验阶段。例如, TGF- β 受体抑制剂 galunisertib 和 PI3K/mTOR 双抑制剂 BEZ235 的癌症治疗已进入 II 期阶段^[45-46]。

2.4 TAM 对自噬的作用

自噬通过一种高度保守的机制将细胞质货物递送至溶酶体进行降解,自噬相关基因(autophagy-related genes, ATGs)在 GC 的肿瘤发生、进展和治疗耐药性中发挥着关键的作用^[47]。巨噬细胞的吞噬和自噬作用过程中共享着许多基因,其中影响 GC 发病率和不良预后的 ATGs,例如 CXCR4、DLC1 和 MAP1LC3C 通过巨噬细胞与肿瘤免疫评估密切相关^[48]。越来越多的证据表明巨噬细胞是连接自噬和免疫的桥梁之一。一方面,巨噬细胞自噬通过抑制 M1 极化来减轻慢性炎症和器官纤维化的进展^[49]。另一方面,通过泛素特异性蛋白酶 19(ubiquitin-specific peptidase 19, USP19)增加巨噬细胞自噬通量可以促进 M2 型巨噬细胞极化^[50]。XU 等^[51]研究发现,肿瘤细胞分泌的 IL-6 和 miR-155-3p 通过 IL-6-pSTAT3-miR-155-3p-自噬-pSTAT3 正反馈环诱导 M2 样巨噬细胞极化,促进肿瘤的进展。此外, M2 型巨噬细胞通过激活 AMPK/mTOR 信号通路,增加精氨酸和脯氨酸代谢来增强细胞中的自噬信号传导,从而抵抗缺氧/血清剥夺诱导的细胞凋亡^[52]。最近一项研究发现, TAM 分泌的胶质细胞系衍生的神经营养因子(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF)通过 GDNF 家族受体 α 1(GDNF family receptor alpha 1, GFRA1)调节溶酶体功能和自噬通量,进而减少肿瘤细胞凋亡和

促进 GC 肝转移^[53]。

早期临床试验已证明自噬是一种有效的癌症逃逸机制,自噬抑制可能是一种癌症治疗方法的新思路,并且与多种癌症耐药性的发展有关,包括胃癌^[54]、胰腺癌^[55]和多发性骨髓瘤^[56]等。然而有趣的是,一些研究者们对自噬抑制持着完全相反的观点,他们认为自噬抑制不仅会降低抗肿瘤 T 细胞的杀伤能力,而且会降低肿瘤抗原呈递效能,通过这两个机制干扰强大的抗肿瘤免疫

反应^[57]。

当前已鉴定的免疫相关预后 ATGs 可能有助于研发新型抑制剂联合免疫治疗并预测 GC 患者对免疫治疗的反应率。同时深入研究自噬作用于巨噬细胞极化、慢性炎症和器官纤维化等的具体机制,将有利于开发 GC 新疗法以提高机体对肿瘤细胞的免疫反应和肿瘤细胞对抗肿瘤药物的敏感性。目前,肿瘤相关巨噬细胞在胃癌中的治疗策略见表 2。

表 2 肿瘤相关巨噬细胞在胃癌中的治疗策略

Table 2 Therapeutic strategies of tumor-associated macrophages in gastric carcinoma

策略 Strategy	体外/体内模型 <i>In vitro/in vivo</i> model	作用机制和结果 Mechanism of action and results	参考文献 References
TAM 重极化 (从 M2 到 M1) TAM reprogramming (From M2 to M1)	体外 BMDMs 细胞系和体内 MFC 细胞系 BMDMs cell line <i>in vitro</i> and MFC cell line <i>in vivo</i>	PI3K-γ 抑制剂 (IPI-549) 抑制 M2 的极化,提高抗肿瘤活性 PI3K-γ inhibitor (IPI-549) inhibites M2 polarization and increases anti-tumor activity	[58]
	体内 MFC 细胞系 MFC cell line <i>in vivo</i>	USP14 抑制剂 (IU1) 阻断 SIRT1/PGC1-A 信号轴,增强抗肿瘤活性 USP14 inhibitor (IU1) blockes SIRT1/PGC1-A signal axis and enhances anti-tumor activity	[59]
	体内 BGC-823 细胞系 BGC-823 cell line <i>in vivo</i>	硫酸葡聚糖钠阻断 IL-6/STAT3 信号轴,降低 M2 TAM 的瘤周浸润 Dextran sulfate blockes IL-6/STAT3 signaling axis and decreases peritumor infiltration of M2 TAM	[27]
	体外 RAW 264.6 和 THP-1 细胞系及小鼠 CD8 ⁺ T 细胞 RAW 264.6 and THP-1 cell lines <i>in vitro</i> and mouse CD8 ⁺ T cells	槐定碱激活 TLR4/IRF3 信号轴,重新编码 TAM 并增强 CD8 ⁺ T 细胞的增殖和细胞毒性 Sophoridine activates the TLR4/IRF3 signaling axis, reprograms TAM and enhances proliferation and cytotoxicity of CD8 ⁺ T cells	[60]
	体外 CD8 ⁺ T 细胞和体内外 MFC 细胞系 CD8 ⁺ T cells <i>in vitro</i> and MFC cell lines <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	DKK1 抗体阻断 PI3K-AKT 信号轴,提高 CD8 ⁺ T 细胞的肿瘤杀伤力及 PD-1 抑制剂的疗效 Anti-DKK1 blocks the PI3K-AKT signaling axis, and improves the tumor destruction of CD8 ⁺ T cells and the efficacy of PD-1 inhibitors	[61]
	体外 U87 和 GI261 细胞系和体内 GI261 细胞系 U87 and GI261 cell lines <i>in vitro</i> and GI261 cell line <i>in vivo</i>	VEGFRs 和 Ang-2 双抗的联合使用,将 TAM 重塑为 M1 表型并修剪未成熟的肿瘤血管,抑制肿瘤的进展 Combination of anti-VEGFRs and anti-Ang-2 reprograms TAM to M1 phenotype and prune immature tumor blood vessels, inhibiting tumor progression	[62]
靶向 M1 TAM Targeting M1 TAM	体外 CD8 ⁺ T 细胞和体内外 MFC 细胞系 CD8 ⁺ T cells <i>in vitro</i> and MFC cell lines <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	DKK1 抗体阻断 PI3K-AKT 信号轴,增强 M1 TAM 对 AGS 细胞的细胞毒性作用 Anti-DKK1 blocks the PI3K-AKT signaling axis and enhances the cytotoxic effect of M1 TAM on AGS cells	[63]
靶向 M2 TAM Targeting M2 TAM	体外 THP-1 细胞系 THP-1 cell line <i>in vitro</i>	氯霉素光动力疗法有效诱导 M2 TAM 的死亡 Chloramphenicol photodynamic therapy effectively induces the death of M2 TAM	[64]

续表2

策略 Strategy	体外/体内模型 <i>In vitro/in vivo</i> model	作用机制和结果 Mechanism of action and results	参考文献 References
靶向 CD40 Targeting CD40	体外 RAW 264.6 和 THP-1 细胞系和体内 NCI-N87 细胞系 RAW 264.6 and THP-1 cell lines <i>in vitro</i> and NCI-N87 cell line <i>in vivo</i>	在 HER2 阳性 GC 中,CD40 和 HER2 双抗的联合使用增加了 M1 TAM 的数量,增强抗肿瘤活性和对曲妥珠单抗的敏感性 In HER2-positive GC, the combination of anti-CD40 and anti-HER2 increases the number of M1 TAM and enhances anti-tumor activity and sensitivity to trastuzumab	[65]
靶向 CD47 Targeting CD47	体外 THP-1 细胞系和体内 MFC 细胞系 THP-1 cell line <i>in vitro</i> and MFC cell line <i>in vivo</i>	CD47 抗体增强 EB 病毒相关 GC 中 TAM 的吞噬作用和 IFN- β 分泌 Anti-CD47 enhances TAM phagocytosis and IFN- β secretion in EBV-associated GC	[66]
靶向 C5aR1 Targeting C5aR1	体外肿瘤单细胞悬浮液 Tumor single cell suspension <i>in vitro</i>	C5aR1 抗体可促进 Dectin-1 ⁺ TAM 分泌促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β ,增强 CD8 ⁺ T 细胞的肿瘤杀伤力和 PD-1 抑制剂的疗效 Anti-C5aR1 promotes the secretion of TNF- α and IL-1 β by Dectin-1 ⁺ TAM, and enhances the tumor destruction of CD8 ⁺ T cells and the efficacy of PD-1 inhibitors	[67]
靶向 SIGLEC10 Targeting SIGLEC10	体外肿瘤单细胞悬浮液 Tumor single cell suspension <i>in vitro</i>	SIGLEC10 抗体增强 CD8 ⁺ T 细胞的增殖和杀伤作用 Anti-SIGLEC10 enhances the proliferation and killing of CD8 ⁺ T cells	[68]

3 TAM 与胃癌耐药

3.1 化疗

由于 GC 的早诊率低,常常临床发现时已经是晚期,一般会辅以化疗,但大多数患者最终会产生化疗耐药并复发^[69]。因此,揭示 GC 的相关化疗耐药机制,增强化疗药物的敏感性,对提高患者的总生存期将大有裨益。

TAM 产生的 IL-6 或其他衍生因子,如乳脂球表皮生长因子Ⅷ,依赖于 STAT3 的激活并促进肿瘤细胞对卡铂的耐药性^[70]。另外,NGABIRE 等^[71]研究发现,TAM 通过上调整合素 β 3(integrin beta 3, ITG β 3)、黏着斑激酶(focal adhesion kinase,FAK)和丝切蛋白的表达丰度介导胃腺癌细胞对 5-氟脲嘧啶(5-fluorouracil,5-FU)的抗性。此外,TAM 可以通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路来上调 GC 细胞中 CXCL5 的表达水平,从而降低肿瘤细胞对 5-FU 的敏感性^[72]。最近,HE 等^[73]发现 M2 极化的巨噬细胞还可以通过分泌 CCL8 并激活 JAK1/STAT3 信号通路的磷酸化来增强 GC 细胞对 5-FU 的耐药性。

研究证实,除了 TAM 分泌的细胞因子和趋化因子激活相应的分子通路外,还可以通过释放包含微小 RNA (microRNA, miRNA)、环状 RNA (circular RNA, circRNA) 和长非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 的 EVs 来影响 GC 细胞对化疗药物的耐药性,最终导致患者的生存期差异。例如来源于 TAM 的 miR-588 通过 EVs 转移至 GC 细胞并靶向圆柱瘤蛋白(cylindromatosis, CYLD)赋予肿瘤细胞对顺铂的耐药性^[74]。同样,TAM 衍生的 EVs 通过转运 miR-365 以促进肿瘤细胞对吉西他滨的耐药^[75]。GAO 等^[76]研究发现,TAM 通过产生含有 miR-223 的 EVs 来降低肿瘤细胞对奥沙利铂和多柔比星的敏感性。最近相关研究证实,TAM 还可以通过分泌 miR-21 来下调磷酸酶与张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN)的表达水平和激活 PI3K/AKT 信号通路,进而抑制 GC 细胞凋亡并赋予其顺铂耐药性^[77]。

除了 miRNA 之外,TAM 来源的 circ 0008253 通过转运到肿瘤细胞中增强 GC 对奥沙利铂的耐药^[78]。进一步研究发现衍生于 TAM 的 circTEX2

通过 miR-145/ ABCC1 信号轴来增强 GC 的顺铂耐药性^[79]。另外, TAM 衍生的 EVs 富集 LncRNA CRNDE 并转移至细胞, 促进神经前体细胞表达的发育下调蛋白 4-1 (neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 4-1, NEDD4-1) 介导的 PTEN 泛素化, 进而降低肿瘤细胞对顺铂的敏感性^[80]。

因此, 靶向瘤周 TAM 的极化方向, 减少 M2 型巨噬细胞的浸润及其相关分泌物的产生, 可缓解肿瘤的免疫抑制和化疗耐药。例如 CircSOD2 通过靶向 miR-1296/STAT1 信号轴, 使巨噬细胞向 M1 极化, 进而减轻肿瘤细胞对顺铂的耐药^[81]。另外, 靶向外泌体通讯也可能是突破药物耐药性的一个有前景的治疗新策略。

3.2 免疫治疗

免疫疗法是当前 GC 患者综合治疗的首选方案之一, 极大地提高了晚期 GC 抗肿瘤治疗的疗效。在许多实体肿瘤中, 释放 T 细胞介导的 1 型免疫反应是免疫检查点阻断 (immune checkpoint blockade, ICB) 疗法的基石, 但 TAM 却是 T 细胞免疫检查点封锁的主要驱动因素, 通过表达多种免疫抑制分子, 包括检查点配体 (如 PDL1、PDL2、CD80 和 CD86 等), 进而介导对免疫治疗的耐药性。例如, TAM 产生的 IL-10 和 TNF- α 通过诱导 PD-L1 的表达, 这与其对肿瘤细胞的吞噬功能和抗肿瘤 T 细胞的免疫功能呈负相关^[82]。GC 肝转移中的肝 CD11b⁺ F4/80⁺ 巨噬细胞通过 Fas-FasL 途径诱导抗原特异性 CD8⁺ T 细胞凋亡来负向调节免疫治疗^[83]。另外, 胸/腹膜腔内的巨噬细胞高表达的 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 4 (T cell immunoglobulin and mucin-containing protein-4, TIM-4) 损害 CD8⁺ T 细胞活性和抗原呈递功能, 所以用抗体阻断 TIM-4 能够增强 ICB 在这些免疫检查位点上的效能^[84]。

众所周知, CD47 是巨噬细胞的主要免疫检查点之一, 通过与巨噬细胞上的配体信号调节蛋白 α (signal regulatory proteins α , SIRP- α) 相互作用, 提供“别吃我”的抗吞噬信号, 从而防止肿瘤细胞被吞噬^[85]。抗 CD47 抗体已被证明能够诱导巨噬细胞表型从 M2 表型转换为 M1 表型, 进一步重启抗肿瘤作用并降低免疫治疗的耐药性。越来越多的研究表明, 对免疫治疗的反应还可以

通过抗 CTLA-4 和抗 PD-1 来调节肠道微生物组的成分来实现, 其中肠道细菌的丰度和多样性可以塑造肿瘤免疫浸润微环境^[86]。

在免疫治疗中, M2 型巨噬细胞的富集与 ICB 的耐药性呈正相关, 因而重新编程 TAM, 可以提高免疫治疗的有效性^[87]。多项以 TAM 为中心的结合检查点抑制剂的治疗策略的临床试验正在进行中^[88]。其中, 靶向 Dickkopf-1 (DKK1) 或使用胃泌素疫苗能有效地将 TAM 从 M2 表型还原为 M1 表型, 增强 CD8⁺ T 细胞的肿瘤杀伤能力以及 PD-1 抑制剂的疗效^[61]。

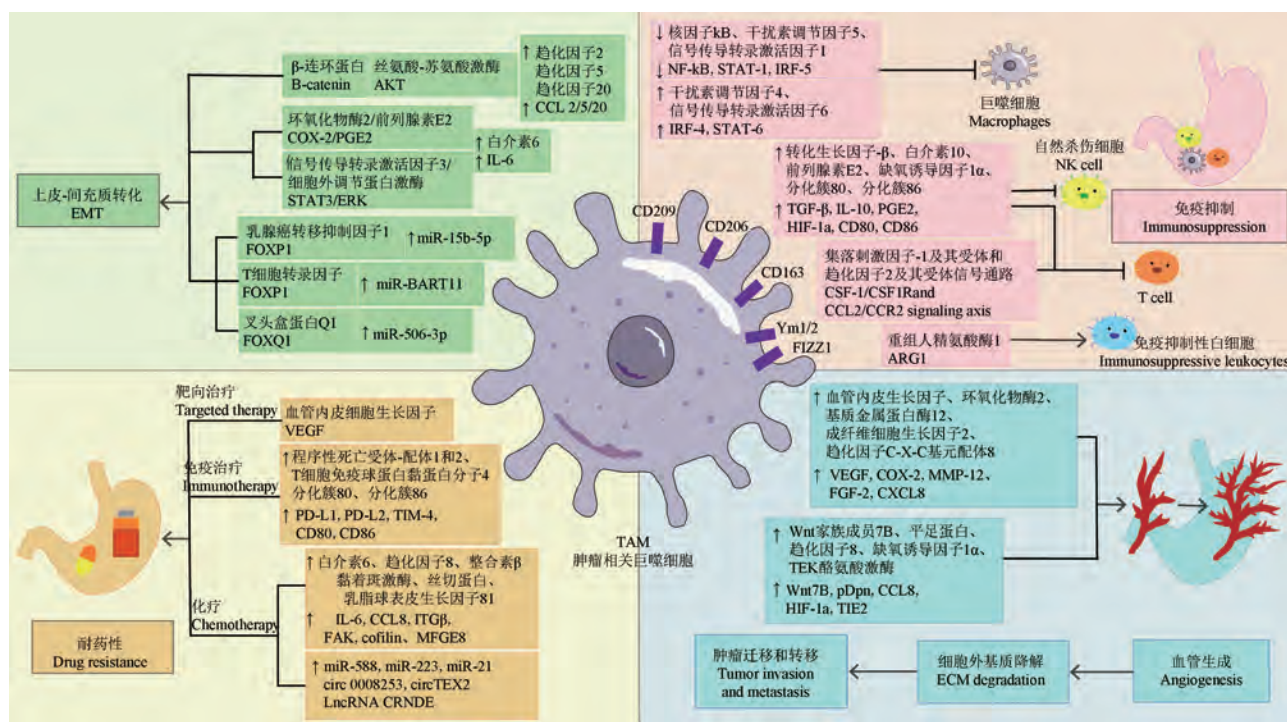
3.3 靶向治疗

靶向治疗通常是 GC 手术患者的辅助治疗方法, 副作用相对较小。其中, 曲妥珠单抗和阿帕替尼两种抗血管生成药物在临床上运用较为广泛^[89]。相关研究发现, 在 HER2 阳性患者中, 通过介导 CCL2-ZC3H12A-肿瘤坏死因子受体相关蛋白 6/3 (TNF receptor associated factor 6/3, TRAF6/3) 信号通路降低了 TAM 中 M1 表型, 从而诱导曲妥珠单抗耐药。使用 CD40 $\times$ HER2 双特异性抗体可以促进 CD40 在巨噬细胞中的降解, 进而激活了 NF- κ B 信号通路, 以增加 M1 型巨噬细胞的转化并提高肿瘤细胞对曲妥珠单抗的敏感性^[65]。

肿瘤组织中的血管密度与 TAM 的丰度常常呈正相关, 因为 TAM 既分泌血管内皮生长因子, 又对血管内皮生长因子做出积极反应^[90]。因此, 贝伐珠单抗等抗血管生成药物的活性受到 TAM 的调节。由于 VEGF 拮抗剂诱导血管正常化并同时重编程 TAM 的极化, 骨髓细胞会通过组织蛋白酶 B 和促血管生成素-2 (angiopoietin-2, ANG-2) 等补偿途径介导抗血管生成药物的耐药性^[91]。有研究表明 ANG-2 和 VEGF 的双重阻断可通过将 TAM 重塑为 M1 表型以及修剪未成熟的肿瘤血管来抑制肿瘤生长并提高生存期^[62]。内容详见图 2。

4 小结与展望

药物耐药性和实体肿瘤微环境极大影响了胃癌临床治疗的应用和疗效。TAM 作为肿瘤微环境中最丰富的固有免疫细胞种群, 具有异质性和可塑性, 越来越多的研究证实巨噬细胞的 M2



注: ↑, 促进。

图 2 TAM 对 GC 生物学行为的影响

Note. ↑, Promote.

Figure 2 Influence of TAM on the biological behavior of GC

极化介导肿瘤增殖、转移、侵袭及免疫抑制等生物学行为导致不良预后和疗效。有必要研究它们的作用以及开发特定的抑制剂来发挥抗肿瘤协同作用。在多学科综合治疗模式的指导下,根据指南采取手术、化疗、分子靶向治疗等多种抗肿瘤手段结合的同时,靶向 TAM 的精准化治疗可以通过限制 TAM 的募集和浸润、重新编程 TAM 亚型的极化和功能、靶向 TAM 的外泌体通讯、自噬抑制和作为免疫治疗的直接靶点等来实现。此外,针对瘤周免疫抑制性 F4/80⁺ 巨噬细胞募集所产生的放射治疗抵抗,使用 CSF-1 的单克隆抗体 (mAb) 或 CSF-1 受体激酶小分子抑制剂能够产生有效地巨噬细胞耗竭,进而显著延长放疗后肿瘤的无复发生存期。

鉴于细胞代谢网络的复杂性、细胞间代谢通讯的多样性以及 TME 的异质性,将来需要进一步的研究来整合代谢组学和转录组学,以更好地对 TAM 的亚型进行分析及其在胃癌中的相应机制进行分类。与此同时,未来仍需要更多的前瞻性研究来评估其在化疗耐药和免疫抑制表型发展中的作用。尽管目前针对 TAM 在的临床试验还

处于早期阶段,但 TAM 在肿瘤微环境中强大的作用表明其作为有效靶点的巨大潜力,正不断地推动着新抗癌治疗的发展。

参考文献:

- [1] QIU H, CAO S, XU R. Cancer incidence, mortality, and burden in China: a time-trend analysis and comparison with the United States and United Kingdom based on the global epidemiological data released in 2020 [J]. Cancer Commun, 2021, 41(10): 1037-1048.
- [2] VERMA R, SHARMA P C. Next generation sequencing-based emerging trends in molecular biology of gastric cancer [J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(2): 207-225.
- [3] LI G Z, DOHERTY G M, WANG J. Surgical management of gastric cancer: a review [J]. JAMA Surg, 2022, 157(5): 446-454.
- [4] ESSA N, O'CONNELL F, PRINA-MELLO A, et al. Gold nanoparticles and obese adipose tissue microenvironment in cancer treatment [J]. Cancer Lett, 2022, 525: 1-8.
- [5] HUANG H W, CHANG C C, WANG C S, et al. Association between inflammation and function of cell adhesion molecules influence on gastrointestinal cancer development [J]. Cells, 2021, 10(1): 67.
- [6] ZHUYAN J, CHEN M, ZHU T, et al. Critical steps to

- tumor metastasis; alterations of tumor microenvironment and extracellular matrix in the formation of pre-metastatic and metastatic niche [J]. *Cell Biosci*, 2020, 10: 89.
- [7] KIM J, BAE J S. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment [J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 6058147.
- [8] WYNN T A, VANNELLA K M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis [J]. *Immunity*, 2016, 44 (3): 450–462.
- [9] GUILLIAMS M, SCOTT C L. Liver macrophages in health and disease [J]. *Immunity*, 2022, 55(9): 1515–1529.
- [10] DEY A, ALLEN J, HANKEY-GIBLIN P A. Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: blood monocytes versus tissue macrophages [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 683.
- [11] XIANG C, FAN C, LU Q, et al. Interfering with alternatively activated macrophages by CSF-1R inhibition exerts therapeutic capacity on allergic airway inflammation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 198: 114952.
- [12] CASSETTA L, POLLARD J W. A timeline of tumour-associated macrophage biology [J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23: 238–257.
- [13] PARK J V, CHANDRA R, CAI L, et al. Tumor cells modulate macrophage phenotype in a novel in vitro co-culture model of the NSCLC tumor microenvironment [J]. *J Thorac Oncol*, 2022, 17(10): 1178–1191.
- [14] UMMARINO A, ANFRAY C, MAEDA A, et al. In vitro methods to evaluate macrophage polarization and function in cancer [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2614: 81–91.
- [15] KERNEUR C, CANO C E, OLIVE D. Major pathways involved in macrophage polarization in cancer [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1026954.
- [16] SICA A, ERRENI M, ALLAVENA P, et al. Macrophage polarization in pathology [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72 (21): 4111–4126.
- [17] MURRAY P J, ALLEN J E, BISWAS S K, et al. Macrophage activation and polarization; nomenclature and experimental guidelines [J]. *Immunity*, 2014, 41(1): 14–20.
- [18] MA M, SUN J, LIU Z, et al. The immune microenvironment in gastric cancer: prognostic prediction [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 836389.
- [19] KANG B, CAMPS J, FAN B, et al. Parallel single-cell and bulk transcriptome analyses reveal key features of the gastric tumor microenvironment [J]. *Genome Biol*, 2022, 23 (1): 265.
- [20] MEDVEDEVA G F, KUZMINA D O, NUZHINA J, et al. How macrophages become transcriptionally dysregulated; a hidden impact of antitumor therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2662.
- [21] SUN H, WU Y, ZHANG Y, et al. IL-10-producing ILCs: molecular mechanisms and disease relevance [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 650200.
- [22] NOMAN M Z, DESANTIS G, JANJI B, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation [J]. 2014, 211(5): 781–790.
- [23] FOX T A, HOUGHTON B C, PETERSON L, et al. Therapeutic gene editing of T cells to correct CTLA-4 insufficiency [J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14 (668): eabn5811.
- [24] YANG H, YAN M, LI W, et al. SIRP α and PD1 expression on tumor-associated macrophage predict prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 140.
- [25] SIERRA-FILARDI E, NIETO C, DOMÍNGUEZ-SOTO A, et al. CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile [J]. *J Immunol*, 2014, 192(8): 3858–3867.
- [26] HANAHAN D. Hallmarks of cancer: new dimensions [J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(1): 31–46.
- [27] GUO J, LI Z, MA Q, et al. Dextran sulfate inhibits angiogenesis and invasion of gastric cancer by interfering with M2-type macrophages polarization [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2022, 22(11): 904–918.
- [28] QIU S, XIE L, LU C, et al. Gastric cancer-derived exosomal miR-519a-3p promotes liver metastasis by inducing intrahepatic M2-like macrophage-mediated angiogenesis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 296.
- [29] VAUPEL P, KALLINOWSKI F, OKUNIEFF P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review [J]. *Cancer Res*, 1989, 49 (23): 6449–6465.
- [30] YANG Y, LI J, LEI W, et al. CXCL12–CXCR4/CXCR7 axis in cancer: from mechanisms to clinical applications [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(11): 3341–3359.
- [31] MARTIN P, GUREVICH D B. Macrophage regulation of angiogenesis in health and disease [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2021, 119: 101–110.
- [32] SZE BENI G J, VIZLER C, KITAJKA K, et al. Inflammation and cancer: extra- and intracellular determinants of tumor-associated macrophages as tumor promoters [J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 9294018.
- [33] ZHAO X, CHEN J, SUN H, et al. New insights into fibrosis from the ECM degradation perspective: the macrophage-MMP-ECM interaction [J]. *Cell Biosci*, 2022, 12 (1): 117.

- [34] SIMEONOV K P, BYRNS C N, CLARK M L, et al. Single-cell lineage tracing of metastatic cancer reveals selection of hybrid EMT states [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(8): 1150–1162.
- [35] TIWARI J K, NEGI S, KASHYAP M, et al. Pan-cancer analysis shows enrichment of macrophages, overexpression of checkpoint molecules, inhibitory cytokines, and immune exhaustion signatures in EMT-high tumors [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 793881.
- [36] CHEN X, YANG M, YIN J, et al. Tumor-associated macrophages promote epithelial-mesenchymal transition and the cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer through CCL2/AKT/ β -catenin signaling [J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1): 92.
- [37] HUANG R, WANG S, WANG N, et al. CCL5 derived from tumor-associated macrophages promotes prostate cancer stem cells and metastasis via activating β -catenin/STAT3 signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4): 234.
- [38] KADOMOTO S, IZUMI K, HIRATSUKA K, et al. Tumor-associated macrophages induce migration of renal cell carcinoma cells via activation of the CCL20-CCR6 axis [J]. *Cancers*, 2019, 12(1): 89.
- [39] GAO L, ZHANG W, ZHONG W Q, et al. Tumor associated macrophages induce epithelial to mesenchymal transition via the EGFR/ERK1/2 pathway in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(5): 2558–2572.
- [40] CHE D, ZHANG S, JING Z, et al. Macrophages induce EMT to promote invasion of lung cancer cells through the IL-6-mediated COX-2/PGE₂/ β -catenin signalling pathway [J]. *Mol Immunol*, 2017, 90: 197–210.
- [41] GAO S, HU J, WU X, et al. PMA treated THP-1-derived-IL-6 promotes EMT of SW48 through STAT3/ERK-dependent activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2018, 108: 618–624.
- [42] SONG Y, LI Q, LIAO S, et al. Epstein-Barr virus-encoded miR-BART11 promotes tumor-associated macrophage-induced epithelial-mesenchymal transition via targeting FOXP1 in gastric cancer [J]. *Virology*, 2020, 548: 6–16.
- [43] WEI C, YANG C, WANG S, et al. Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 64.
- [44] CAO Y, TU Y, XIONG J, et al. MicroRNA-15b-5p encapsulated by M2 macrophage-derived extracellular vesicles promotes gastric cancer metastasis by targeting BRMS1 and suppressing DAPK1 transcription [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 152.
- [45] HERBERTZ S, SAWYER J S, STAUBER A J, et al. Clinical development of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 4479–4499.
- [46] CHEN D, LIN X, ZHANG C, et al. Dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 as a promising therapeutic strategy against paclitaxel-resistant gastric cancer via targeting PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 123.
- [47] WU M Y, LU J H. Autophagy and macrophage functions: inflammatory response and phagocytosis [J]. *Cells*, 2019, 9(1): 70.
- [48] TIAN R, SUN Y, HAN X, et al. Identification and validation of prognostic autophagy-related genes associated with immune microenvironment in human gastric cancer [J]. *Aging*, 2022, 14(18): 7617–7634.
- [49] LIU K, ZHAO E, ILYAS G, et al. Impaired macrophage autophagy increases the immune response in obese mice by promoting proinflammatory macrophage polarization [J]. *Autophagy*, 2015, 11(2): 271–284.
- [50] LIU T, WANG L, LIANG P, et al. USP19 suppresses inflammation and promotes M2-like macrophage polarization by manipulating NLRP3 function via autophagy [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(10): 2431–2442.
- [51] XU J, ZHANG J, ZHANG Z, et al. Hypoxic glioma-derived exosomes promote M2-like macrophage polarization by enhancing autophagy induction [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4): 373.
- [52] XIA W, HOU M. Macrophage migration inhibitory factor induces autophagy to resist hypoxia/serum deprivation-induced apoptosis via the AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(3): 2619–2626.
- [53] NI B, HE X, ZHANG Y, et al. Tumor-associated macrophage-derived GDNF promotes gastric cancer liver metastasis via a GFRA1-modulated autophagy flux [J]. *Cell Oncol*, 2023, 46(2): 315–330.
- [54] FANG L, LV J, XUAN Z, et al. Circular CPM promotes chemoresistance of gastric cancer via activating PRKAA2-mediated autophagy [J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(1): e708.
- [55] CHRYPLEWICZ A, SCOTTON J, TICHET M, et al. Cancer cell autophagy, reprogrammed macrophages, and remodeled vasculature in glioblastoma triggers tumor immunity [J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(10): 1111–1127.
- [56] SU H, YANG F, FU R, et al. Cancer cells escape autophagy inhibition via NRF2-induced macropinocytosis [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(5): 678–693.
- [57] ASCENZI F, DE VITIS C, MAUGERI-SACCÀ M, et al. SCD1, autophagy and cancer: implications for therapy [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 265.

- [58] LUO Q, ZHENG N, JIANG L, et al. Lipid accumulation in macrophages confers protumorigenic polarization and immunity in gastric cancer [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(11): 4000–4011.
- [59] HE F, CHEN Y, HE D, et al. USP14-mediated deubiquitination of SIRT1 in macrophage promotes fatty acid oxidation amplification and M2 phenotype polarization [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 646: 19–29.
- [60] ZHUANG H, DAI X, ZHANG X, et al. Sophoridine suppresses macrophage-mediated immunosuppression through TLR4/IRF3 pathway and subsequently upregulates CD8⁺ T cytotoxic function against gastric cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109636.
- [61] SHI T, ZHANG Y, WANG Y, et al. DKK1 promotes tumor immune evasion and impedes anti-PD-1 treatment by inducing immunosuppressive macrophages in gastric cancer [J]. *Cancer Immunol Res*, 2022, 10(12): 1506–1524.
- [62] PETERSON T E, KIRKPATRICK N D, HUANG Y, et al. Dual inhibition of Ang-2 and VEGF receptors normalizes tumor vasculature and prolongs survival in glioblastoma by altering macrophages [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(16): 4470–4475.
- [63] LI T, LI B, SARA A, et al. Docking protein-1 promotes inflammatory macrophage signaling in gastric cancer [J]. *Oncoimmunology*, 2019, 8(11): e1649961.
- [64] HAYASHI N, KATAOKA H, YANO S, et al. A novel photodynamic therapy targeting cancer cells and tumor-associated macrophages [J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(2): 452–460.
- [65] SUN W, WANG X, WANG D, et al. CD40 × HER2 bispecific antibody overcomes the CCL2-induced trastuzumab resistance in HER2-positive gastric cancer [J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(7): e005063.
- [66] DUAN Y, LI S, HUANG B, et al. CD47-targeted immunotherapy unleashes antitumour immunity in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer [J]. *Clin Immunol*, 2023, 247: 109238.
- [67] ZHANG P, GU Y, WANG J, et al. Complement receptor C5aR1 blockade reprograms tumor-associated macrophages and synergizes with anti-PD-1 therapy in gastric cancer [J]. *Int J Cancer*, 2023, 153(1): 224–237.
- [68] GUO Y, KE S, XIE F, et al. SIGLEC10⁺ macrophages drive gastric cancer progression by suppressing CD8⁺ T cell function [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2023, 72(10): 3229–3242.
- [69] LI Y, XU C, WANG B, et al. Proteomic characterization of gastric cancer response to chemotherapy and targeted therapy reveals new therapeutic strategies [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 5723.
- [70] TANIGUCHI K, KARIN M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer [J]. *Semin Immunol*, 2014, 26(1): 54–74.
- [71] NGABIRE D, NIYONIZIGIYE I, PATIL M P, et al. M2 macrophages mediate the resistance of gastric adenocarcinoma cells to 5-fluorouracil through the expression of integrin β 3, focal adhesion kinase, and cofilin [J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020: 1731457.
- [72] SU P, JIANG L, ZHANG Y, et al. Crosstalk between tumor-associated macrophages and tumor cells promotes chemoresistance via CXCL5/PI3K/AKT/mTOR pathway in gastric cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 290.
- [73] HE Z, CHEN D, WU J, et al. Yes associated protein 1 promotes resistance to 5-fluorouracil in gastric cancer by regulating GLUT3-dependent glycometabolism reprogramming of tumor-associated macrophages [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2021, 702: 108838.
- [74] CUI H Y, RONG J S, CHEN J, et al. Exosomal microRNA-588 from M2 polarized macrophages contributes to cisplatin resistance of gastric cancer cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27(36): 6079–6092.
- [75] BINENBAUM Y, FRIDMAN E, YAARI Z, et al. Transfer of miRNA in macrophage-derived exosomes induces drug resistance in pancreatic adenocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(18): 5287–5299.
- [76] GAO H, MA J, CHENG Y, et al. Exosomal transfer of macrophage-derived miR-223 confers doxorubicin resistance in gastric cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 12169–12179.
- [77] ZHENG P, CHEN L, YUAN X, et al. Exosomal transfer of tumor-associated macrophage-derived miR-21 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 53.
- [78] YU D, CHANG Z, LIU X, et al. Macrophage-derived exosomes regulate gastric cancer cell oxaliplatin resistance by wrapping circ 0008253 [J]. *Cell Cycle*, 2023, 22(6): 705–717.
- [79] QU B, LIU J, PENG Z, et al. Macrophages enhance cisplatin resistance in gastric cancer through the transfer of circTEX2 [J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(5): e18070.
- [80] XIN L, ZHOU L Q, LIU C, et al. Transfer of lncRNA CRNDE in TAM-derived exosomes is linked with cisplatin resistance in gastric cancer [J]. *EMBO Rep*, 2021, 22(12): e52124.
- [81] QU B, LIU J, PENG Z, et al. CircSOD2 polarizes macrophages towards the M1 phenotype to alleviate cisplatin resistance in gastric cancer cells by targeting the miR-1296/STAT1 axis [J]. *Gene*, 2023, 887: 147733.
- [82] LABA S, MALLETT G, AMARNATH S. The depths of PD-

- I function within the tumor microenvironment beyond CD8⁺ T cells [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86 (Pt 2): 1045–1055.
- [83] YU J, GREEN M D, LI S, et al. Liver metastasis restrains immunotherapy efficacy via macrophage-mediated T cell elimination [J]. *Nat Med*, 2021, 27(1): 152–164.
- [84] CHOW A, SCHAD S, GREEN M D, et al. Tim-4⁺ cavity-resident macrophages impair anti-tumor CD8⁺ T cell immunity [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(7): 973–988.
- [85] VEILLETTE A, CHEN J. SIRP α -CD47 immune checkpoint blockade in anticancer therapy [J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(3): 173–184.
- [86] REZASOLTANI S, YADEGAR A, ASADZADEH AGHDAEI H, et al. Modulatory effects of gut microbiome in cancer immunotherapy: a novel paradigm for blockade of immune checkpoint inhibitors [J]. *Cancer Med*, 2021, 10(3): 1141–1154.
- [87] ZHANG J, JIANG M, LI S, et al. Developing a novel anticancer gold (III) agent to integrate chemotherapy and immunotherapy [J]. *J Med Chem*, 2021, 64(10): 6777–6791.
- [88] DENARDO D G, RUFFELL B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(6): 369–382.
- [89] LI K, ZHANG A, LI X, et al. Advances in clinical immunotherapy for gastric cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1876(2): 188615.
- [90] HONGU T, PEIN M, INSUA-RODRÍGUEZ J, et al. Perivascular tenascin C triggers sequential activation of macrophages and endothelial cells to generate a prometastatic vascular niche in the lungs [J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(4): 486–504.
- [91] GREENBERG J I, SHIELDS D J, BARILLAS S G, et al. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation [J]. *Nature*, 2008, 456(7223): 809–813.

[收稿日期]2024-06-15

编者·读者·作者

《中国比较医学杂志》2025 年征订启事

《中国比较医学杂志》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,征稿的范围是与人类生命与健康密切相关的实验动物与动物实验等生命科学各分支学科,重点刊载比较医学成果和进展。要求来稿数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。开设栏目:研究报告、综述与专论、研究快报、研究简讯、技术与方法、经验交流、学术动态、国外研究进展、学术信息、简讯等。读者对象:农牧渔业、医学、药学、环保、生物、体育、国防等单位的科技工作者、教育工作者、管理人员以及有关的生产者、大专院校学生等。

刊期及订价:月刊,大 16 开本,180 页。月末出版。每期 50 元,全年 12 期,共计 600 元。邮发代号:82-917。

汇款方式:银行转帐:中国农业银行股份有限公司北京潘家园支行

帐号:11220201040003764

单位抬头全称:中国实验动物学会

请注明订刊数量,并写明刊物寄往地址及收件人。收到汇款后,我们会及时将发票寄给您。