



- ◎《中国期刊网》全文收录
- ◎《首席医学网》全文收录
- ◎《中国学术期刊(光盘版)》全文收录
- ◎《万方数据-数字化期刊群》全文收录
- ◎《中文生物医学期刊文献数据库—CMCC》全文收录
- ◎《超星期刊域出版平台》收录期刊
- ◎“中国学术期刊综合评价数据库”统计源期刊

(1987年创刊)

双月刊

ISSN 2095-4646

CN 42-1839/R

湖北科技学院学报

JOURNAL OF HUBEI UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

第38卷 第5期

2024.10

医学版

MEDICAL SCIENCES

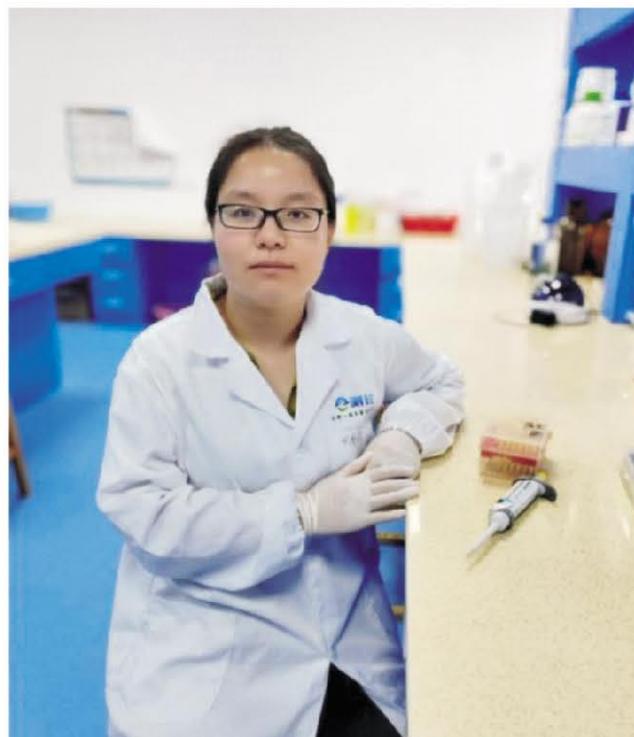


中国·咸宁

湖 科 学 人

刘爱梅，女，1991年2月出生
于山西石楼，2022年6月毕业于华
中农业大学，获得动物科学技术
学院、动物医学院基础兽医学博
士学位。现为湖北科技学院教
师，讲师。目前主要从事糖尿病
及其并发症分子机制和防治药物
的研究。

近年来主持省级项目（湖北
省自然科学基金）1项，校级项目
（博士启动基金和医学部科研专
项）2项，曾参与国家重点研发项
目子课题、国家自然科学基金项
目各1项。在《Food and Chemical Toxicology》《J Cell Physiol》
《Medicinal Research Reviews》《Pharmacology & Therapeutics》
《Toxicology and Applied Pharmacology》《Animal Nutrition》《Food
Chemistry》等国际国内刊物上发表论文20余篇。其中第一作者或通讯作
者发表中科院一区TOP论文4篇，中科院二区论文4篇，中科院三区论文
4篇，中文核心论文3篇，会议论文2篇。2023年入选湖北科技学院“百名
优秀人才”。曾荣获“研究生学术创新之星”称号和国家奖学金，博士
论文荣获学校优秀博士论文奖。



目 次

药学研究

- 人参皂甙 Rg3 抑制卵巢癌 SKOV3 细胞生长的机制研究 黄璐,吴辰,蔡慧兰,等(369)
- 青砖茶提取物缓解小鼠溃疡性结肠炎机制研究 叶丹,苗潇磊,郑敏,等(374)
- 河蚌多糖水提取物对多种恶性肿瘤细胞增殖和迁移的影响 何泓一,李炎坤,李晶,等(380)
- TiO₂ 负载血浆凝血酶的制备及其对血液快速促凝性能的研究 刘坤,李月生,陈黄琴,等(384)
- 基于斑马鱼糖尿病合并肝损伤模型评价黄精复方制剂作用及其机制
..... 王洁琼,孟丽媛,闵清,等(389)
- 基于生信分析探究 TMEM16A 的表达对胶质瘤的影响及实验验证.....
..... 霍盟盟,王紫薇,丁利琼,等(394)
- 基于网络药理学和细胞实验探索柳穿鱼黄素对前列腺癌细胞的作用
..... 阮诗剑,贾爱亭,周红,等(400)

基础医学研究

- HLA-G14bp 插入/缺失多态性与 1 型糖尿病的相关性研究 章康威,谢玉霜,包永芬,等(405)
- NNMT 调控铁死亡在非酒精性脂肪肝细胞模型中的作用研究 华玉,王定森,刘爱梅,等(409)
- 铁死亡在呕吐毒素诱导的 L02 细胞毒性中的作用研究 宋晨晨,王威,刘爱梅,等(414)

临床医学研究

- 贝那普利联合艾司洛尔对合并快速心律失常的感染性休克患者心肌酶谱水平的影响
..... 刘立新,童绥菊(418)

- 腹腔镜辅助下胃癌根治术与传统开腹术对比研究 刘 超,陈爱华(422)
- 砭石循经按摩联合中药砭石热熨在老年股骨骨折术后便秘患者中的应用 林春兰,施晓芸(427)

护理学研究

- 基于 HAPA 模型的护理干预在维持性血液透析患者运动康复中的应用
..... 邹元美,白雪,耿丽丽,等(431)
- 神经外科重症患者精神错乱预测模型的应用研究 陈丽芳,薛 青(434)
- 基于心理资本干预模型的团体护理干预对妊娠期高血压患者自我效能及妊娠结局的影响
..... 张培育,闫 婷,郭巧慧(439)
- 全程护理干预在儿童肺炎雾化吸入治疗中的应用分析 祝 莹,范文霞(443)

综 述

- 苦木的生物活性及代谢研究进展 赵依叶,郑 敏,苗潇磊,等(446)
- 二硫化钨纳米复合材料在抗菌治疗中的作用机制 杨迪迪,范旭珂,庞义军,等(451)
- 天然水凝胶支架的分类及其在 3D 细胞培养的应用研究进展 张利平,吕 慧,吕 斌(455)

责任编辑 余志娟 陈拥彬
英文审校 汪 雯 蔡 飞
 欧阳昌汉 莫启贵
统计学审稿 范 杉

CONTENTS OF MAIN ARTICLES

Ginsenoside Rg3 Inhibits the Growth of Ovarian Cancer SKOV3 Cells by Down-Regulating EZH2 ...
..... HUANG Lu, WU Chen, CAI Hui-lan, et al(369)

Qingzhuan Dark Tea Extract Alleviates Ulcerative Colitis in Mice by Restoring the Content of Short-Chain Fatty Acids YE Dan, MIAO Xiao-lei, ZHENG Min, et al(374)

Effects of Mussel Polysaccharide Water Extract on Proliferation and Migration of Various Malignant Tumor Cells HE Hong-yi, LI Yan-kun, LI Jing, et al(380)

Study on the Preparation and Rapid Coagulation Blood Performance of TiO₂ Loaded Plasma Thrombin
..... LIU Kun, LI Yue-sheng, CHEN Huang-qin, et al(384)

Evaluation of the Effects and Mechanism of Polygonatum Sibiricum Compound Preparation Based on Zebrafish Model of Diabetes Mellitus Complicated with Liver Injury
..... WANG Jie-qiong, MENG Li-yuan, MIN Qing, et al(389)

The Effect of TMEM16A Expression on Glioma by Bioinformatics Analysis and Experimental Verification HUO Meng-meng, WANG Zi-wei, DING Li-qiong, et al(394)

Effects of Pectolarigenin on Prostate Cancer Based on Network Pharmacology and Cellular Experiment RUAN Shi-jian, JIA Ai-ting, ZHOU Hong, et al(400)

The Association Between the HLA-G14bp Insertion/Deletion Polymorphism and Type 1 Diabetes ...
..... ZHANG Kang-wei, XIE Yu-shuang, BAO Yong-fen, et al(405)

The Role of NNMT in Regulating Ferroptosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease
..... HUA Yu, WANG Ding-miao, LIU Ai-mei, et al(409)

| | |
|--|--|
| Role of Ferroptosis in DON-Induced L02 Cell Toxicity | |
| | <i>SONG Chen-chen, WANG Wei, LIU Ai-mei, et al</i> (414) |
| Effects of Benapril Combined with Esmolol on the Myocardial Enzyme Spectrum Levels in Patients with Infectious Shock Combined with Rapid Arrhythmias | <i>LIU Li-xin, TONG Sui-ju</i> (418) |
| A Comparative Study of Laparoscopic Assisted Radical Gastrectomy and Traditional Open Surgery for Gastric Cancer | <i>LIU Chao, CHEN Ai-hua</i> (422) |
| Application of Acupoint Massage with Stone Needles Along the Meridian Combined with Traditional Chinese Medicine Bianshi Hot Ironing in Elderly Patients with Postoperative Constipation after Femoral Fracture Surgery | <i>LIN Chun-lan, SHI Xiao-yun</i> (427) |
| Application of Nursing Intervention Based on HAPA Model in the Exercise Rehabilitation of Maintenance Hemodialysis Patients | <i>ZOU Yuan-mei, BAI Xue, GENG Li-li, et al</i> (431) |
| Study on the Application of Predictive Model of Mental Disorder in Critical Nursing Patients of Neurosurgery Department | <i>CHEN Li-fang, XUE Qing</i> (434) |
| Effect of Group Nursing Intervention Based on Psychological Capital Intervention Model on Self-Efficacy and Pregnancy Outcome of Patients with Hypertensive Disorders of Pregnancy | |
| | <i>ZHANG Pei-yu, YAN Ting, GUO Qiao-hui</i> (439) |
| Application Analysis of Total Nursing Intervention in Nebulised Inhalation Therapy for Pneumonia in Children | <i>ZHU Ying, FAN Wen-xia</i> (443) |
| Research Progress on the Bioactivity and Metabolism of <i>Picrasma Quassioides</i> | |
| | <i>ZHAO Yi-ye, ZHENG Min, MIAO Xiao-lei, et al</i> (446) |
| Mechanism of Molybdenum Disulfide Nanocomposites in Antibacterial Therapy | |
| | <i>YANG Di-di, FAN Xu-ke, PANG Yi-jun, et al</i> (451) |
| The Research Progress on Natural Hydrogels for Classification and Applications in 3D Cell Culture | |
| | <i>ZHANG Li-ping, LV Hui, LV Bin</i> (455) |

人参皂甙 Rg3 抑制卵巢癌 SKOV3 细胞生长的机制研究*

黄璐¹, 吴辰², 施玲¹, 李梅¹, 蔡慧兰^{1**}

(1. 湖北科技学院医学部临床医学院, 湖北 咸宁 437100; 2. 咸宁市中心医院产科)

摘要:目的 探讨人参皂甙 Rg3 抑制卵巢癌细胞生长可能存在的分子机制。方法 采用细胞克隆实验检测人参皂甙 Rg3 对人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖的抑制效果; 四氮唑蓝 (MTT) 比色法、流式凋亡、划痕实验、Transwell 实验分别检测人参皂甙 Rg3 对 SKOV3 细胞凋亡、侵袭、迁移的影响; qRT-PCR 法和 Western blot 法分别检测 Rg3 不同浓度作用下卵巢癌细胞中 Zeste 基因增强子同源物 2 (EZH2) 基因和蛋白的表达。结果 人参皂甙 Rg3 对 SKOV3 细胞增殖抑制率升高 ($P < 0.05$), 凋亡率显著上升 ($P < 0.01$), 侵袭、迁移能力均显著下降 ($P < 0.01$), SKOV3 细胞中 EZH2 的基因和蛋白随着 Rg3 浓度的增加表达量呈现明显的下降 ($P < 0.01$)。结论 人参皂甙 Rg3 可能通过抑制 EZH2 的表达, 促进卵巢癌细胞的凋亡, 抑制卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、侵袭以及迁移的能力, 为卵巢癌的临床治疗提供新思路。

关键词: 人参皂甙 Rg3; EZH2; 卵巢癌; SKOV3 细胞

中图分类号: R737.31

文献标识码: A

文章编号: 2095-4646(2024)05-0369-006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI: 10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0369



Ginsenoside Rg3 Inhibits the Growth of Ovarian Cancer SKOV3 Cells by Down-Regulating EZH2

HUANG Lu, WU Chen, CAI Hui-lan, et al

(School of Clinical Medicine, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the possible molecular mechanism by which ginsenoside Rg3 inhibits the growth of ovarian cancer cells. Methods Human ovarian cancer cells SKOV3 were studied. The inhibitory effect of ginsenoside Rg3 on SKOV3 cell proliferation was detected by cell cloning assay. The effects of ginsenoside Rg3 on apoptosis, invasion and migration of SKOV3 cells were detected by MTT colorimetry, flowcytometry, scratch assay and Transwell assay, respectively. qRT-PCR and Western blot were used to detect the expression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) gene and protein in ovarian cancer cells under different concentrations of Rg3. Results Ginsenoside Rg3 increased the proliferation inhibition rate of SKOV3 cells ($P < 0.05$), increased the apoptosis rate ($P < 0.01$), and decreased the invasion and migration abilities ($P < 0.01$). The expression of EZH2 gene and protein in SKOV3 cells decreased significantly with the increase of Rg3 concentration ($P < 0.01$). Conclusion Ginsenoside Rg3 may promote the apoptosis of ovarian cancer SKOV3 cells and inhibit the proliferation, invasion and migration of the ovarian cancer cells by inhibiting the expression of EZH2, providing new ideas for the clinical treatment of ovarian cancer.

KEY WORDS: Ginsenoside Rg3; EZH2; Ovarian cancer; SKOV3 cells

卵巢癌是临床上最具致死性的妇科恶性肿瘤, 严重威胁女性生命健康, 由于其难以早期发现以及缺乏有效的治疗手段, 使其治愈率不到 40%^[1]。传统的卵巢癌治疗方法以手术联合化疗为主^[2], 但治疗效果欠佳。有研究^[3]显示, 人参皂甙 Rg3 对肺癌、肝癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌等均

具有抗肿瘤活性, 能促进细胞凋亡, 抑制细胞增殖、侵袭、迁移, 但其作用机制尚未阐明。组蛋白赖氨酸 N 甲基转移酶 EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) 与肿瘤血管的生成有密切关系^[4-7], 目前尚未见文献报道人参皂甙 Rg3 对 EZH2 具有抑制作用, 本研究通过探究人参皂甙 Rg3 抑制 EZH2

* 基金项目: 湖北科技学院校内培育科研发展基金项目(L07903/170593)

** 通讯作者, E-mail: 3038195390@qq.com

的表达来阐明其抑制卵巢癌的生长机制,为临床上治疗卵巢癌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

人卵巢癌 SKOV3 细胞购于武汉普健生物医学公司。人参皂甙 Rg3 (纯度 $\geq 98\%$) (HY-N0603) 购自美国 MCE 公司;胎牛血清 (SH30084.03)、RPMI1640 培养基 (SH30027) 购自美国 Hyclone 公司;TRIZOL (15596-018) 购自北京 Solarbio 公司;逆转录试剂盒 (RR036A)、荧光 PCR 试剂盒 (RR820A) 购自 TAKARA 公司;RT-PCR 引物由中国 Vazyme 公司合成;凋亡检测试剂盒 (40302ES20) 购自武汉翊圣生物公司;HRP 标记山羊抗兔二抗 (SA00001-2)、山羊抗小鼠二抗体 (SA00001-1)、EZH2 抗体 (21800-1-AP) 购自武汉三鹰公司;BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (P0012)、细胞膜蛋白与细胞浆蛋白提取试剂盒 (P0033、P0028) 购自上海碧云天公司。

细胞培养箱(上海,Heal Force 公司);高速冷冻离心机(上海,Neofuge 公司);倒置相差显微镜(日本,Olympus 公司);多功能微孔板检测仪(美国,PerkinElmer 公司);流式细胞仪(美国,贝克曼库尔特公司);电泳仪(上海,CAVOY 公司);凝胶成像系统(美国,Bio-Rad 公司);ABI 实时荧光定量 PCR 仪(美国,ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将 SKOV3 细胞置于含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,放入 37℃、5% CO₂ 浓度的细胞培养箱,每隔 2~3d 用胰酶传代 1 次。

1.2.2 MTT 方法检测细胞增殖

将 SKOV3 细胞制成 3×10^4 个/mL 细胞悬液,以每孔 100 μ L 种于 96 孔板中,37℃ 培养贴壁 24h 后取对数生长期的细胞进行药物干预,将 SKOV3 细胞分为空白组、人参皂甙 Rg3 组(3.9、7.8、15.625、31.25、62.5、125、250、500 μ mol/L)。按上列分组进行人参皂甙 Rg3 药物孵育,并在分别作用 24、48h 后进行检测。避光下向每孔中加入 10 μ L MTT 溶液处理细胞,37℃ 培养 4h。弃上清液,加入 150 μ L DMSO,避光下震荡 10min,待结晶完全溶解,用酶标仪立即检测 OD_{490nm} 处 OD 值。计算细胞存活率(%) = [(药物组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)] ×

100%, 计算半数抑制浓度(IC₅₀) 值。

1.2.3 细胞克隆实验

取正常培养的 SKOV3 细胞系进行铺板至 6 孔板,每孔 4×10^5 个,37℃ 培养;按照空白对照组和人参皂甙 Rg3 100 μ mol/L 组进行处理。加药处理 48h 后,收集细胞加入 PBS 清洗,后加入胰酶消化 3~5min,用移液枪吹打成单个细胞,取 20 μ L 细胞悬液加入 20 μ L 台盼蓝进行计数,剩余细胞悬液 300 × g 离心 5min 收集细胞沉淀,PBS 重悬后按照 6 孔板每孔接种 200 个细胞,每组 3 个重复。每 2~3d 换液,2 周后弃上清液,用 PBS 浸洗 2 次,加入多聚甲醛固定 10min。弃去固定液,加入适量结晶紫染色 10min。PBS 清洗,计数拍照,计算克隆形成率。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率

选用对数生长期的 SKOV3 细胞接种于 6 孔板上,人参皂甙 Rg3 100 μ mol/L 组和空白组设置 3 个复孔,孵育箱内培养 24h 后按照人参皂甙 Rg3 100 μ mol/L 给药,并设置空白对照组,处理 48h,用不含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化后收集细胞。将细胞及培养液放至离心管,300 × g,4℃ 离心 5min 收集细胞。用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,每次均需 300 × g,4℃ 离心 5min。加入 250 μ L 1 × Binding buffer 重悬细胞,调节其浓度为 1×10^6 /mL。取 100 μ L 细胞悬液于 5mL 流式管中,加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L PI,轻轻混匀。避光,于室温下反应 15min。加入 400 μ L PBS,混匀,1h 内使用流式细胞仪检测。根据流式细胞仪分析结果确定细胞早期凋亡率和晚期凋亡率,总凋亡率 = 早期凋亡率 + 晚期凋亡率。

1.2.5 划痕实验检测细胞迁移能力

选用对数生长期的 SKOV3 细胞按照 1.5×10^6 个/孔接种于 6 孔板内,24h 后观察细胞铺满整个孔板。培养板接种细胞前用记号笔在 6 孔板背面划横线标记,用 10 μ L 枪头垂直于孔板制造细胞划痕,尽量使各个划痕宽度一致;去除细胞培养液,用 PBS 冲洗孔板 3 次,洗去划痕产生的细胞碎片,加入对应无血清培养基,将细胞分为空白组、人参皂甙 Rg3 (100 μ mol/L) 组,每组设置 3 个复孔,将培养板放入培养箱培养,0、6、24、48h 分别取出拍照。

1.2.6 Transwell 实验检测细胞迁移能力

取正常培养的 SKOV3 细胞系进行铺板至 6 孔板,每孔 4×10^5 个,37℃ 培养。按照人参皂甙 Rg3 100 μ mol/L 进行处理,并设置空白对照组。加药处

理 48h 后,吸去原培养液,加入 PBS 清洗后,再加入胰酶消化 3~5min,使用移液枪吹打成单个细胞,取 20 μ L 细胞悬液加入 20 μ L 台盼蓝进行计数,剩余细胞悬液 300 \times g 离心 5min。细胞离心完成后吸去培养液,使用 PBS 洗 1~2 遍,用无血清 1640 培养基重新悬置,调整细胞密度为 1 \times 10⁵/mL;取细胞悬液 200 μ L 加入 Transwell 小室,24 孔板下室加入 600 μ L 含 10% FBS 的培养基,37 $^{\circ}$ C 培养 16~24h;取出 Transwell 小室,弃去孔中培养液,用 PBS 清洗 2 次;4% PFA 固定 10min,再用 PBS 清洗 2 次;结晶紫染色 10min 后使用 PBS 洗 2 次。显微镜下观察迁移的细胞,随机选择 3 个视野进行拍照,并用 Image J 软件进行计数。

1.2.7 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

同 1.2.6 处理细胞,提前 1 天将基质胶置于 4 $^{\circ}$ C 化冻,将基质胶用无血清培养基稀释 5 倍,每个 Transwell 小室中加入 50 μ L 人参皂甙 Rg3,置于 37 $^{\circ}$ C 的培养箱 30min。细胞处理及检测过程同 1.2.6,在显微镜下观察迁移的细胞,随机选取 3 个视野进行拍照并计数。

1.2.8 RT-PCR 检测 EZH2 mRNA 的表达

细胞接种于 6 孔板中,培养 24h 后按分组用药(空白组,人参皂甙 Rg3 20、100、200 μ mol/L)干预 48h,吸去细胞原培养液,PBS 洗一次,用胰酶消化细胞,300 \times g 离心 5min,PBS 重悬细胞,300 \times g 离心 5min,去上清,细胞沉淀用于后续 RNA 提取,收集细胞后,采用 TRIZOL 法进行总 RNA 的提取。取溶解后的 RNA 用微量分光光度计测定 OD260、OD280 以及 OD260/OD280 值,计算 RNA 的纯度和浓度。检测 RNA 浓度后,使用逆转录试剂盒进行 cDNA 的合成。通过 qRT-PCR 法(引物序列见表 1)测定 mRNA 表达量并进行统计学分析。

表 1 qRT-PCR 引物序列

| 引物 | 序列(5'-3') | 产物长度(bp) |
|--------------------|-----------------------|----------|
| Homo EZH2-Forward | GAGTTGGTGAATGCCCTTGG | 195 |
| Homo EZH2-Reverse | TGCTGTGCCCTTATCTGGAA | |
| Homo GAPDH-Forward | TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG | 115 |
| Homo GAPDH-Reverse | TCAAAGCTGGAGGAGTGGGT | |

1.2.9 Western blot 检测 EZH2 蛋白的表达

对数生长期的细胞接种于 6 孔板中,培养 24h 后按分组用药(空白组,人参皂甙 Rg3 20、100、200 μ mol/L)干预 48h,收集细胞,细胞样本加入现配先用的 RIPA 裂解液后冰上裂解 30min,冰浴超声 3min,4 $^{\circ}$ C 13800 \times g 离心 10min,将上清液转移

到一个新的 EP 管中。BCA 法测定蛋白的浓度,根据裂解液的体积加入 5 \times SDS Loading buffer,100 $^{\circ}$ C 煮沸 5min。为防止蛋白降解,操作尽量在冰上进行。10% SDS-PAGE 凝胶电泳,切胶,转膜,封闭,用 TBST 漂洗 2min。一抗和靶蛋白结合,洗涤,二抗和一抗温育,再洗涤。取等量的 Enhanced L μ Minol Reagent 和 Oxidizing Reagent,用适量 ddH₂O 稀释,混匀后滴加在封口膜上。将 PVDF 膜的正面朝下接触发光试剂,显色 1.5~2.0min,将 PVDF 膜翻转过来,用凝胶成像系统观察结果。

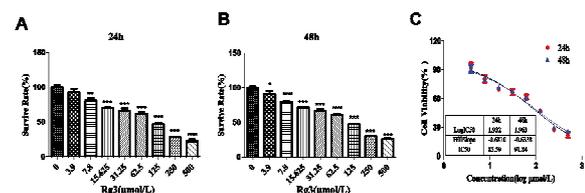
1.3 统计学方法

通过 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。所有结果均代表 3 个独立实验产生的数据。

2 结果

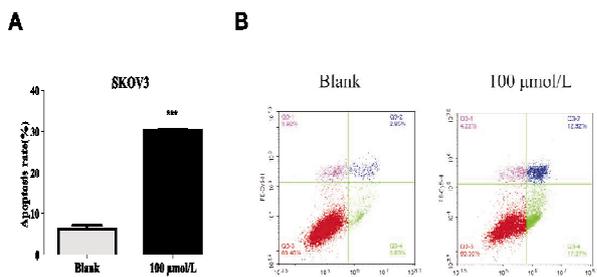
2.1 人参皂甙 Rg3 对人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖的影响

随着人参皂甙 Rg3 浓度的递增,Rg3 对 SKOV3 细胞增殖的抑制作用越明显,细胞存活率逐渐降低。Rg3 分别处理 SKOV3 细胞 24、48h 后,半数抑制率 IC₅₀ 约等于 100 μ mol/L,后续实验选择此浓度进行检测,见图 1。加入 100 μ mol/L 浓度的人参皂甙 Rg3 溶液,作用 48h 后,与空白组比较,卵巢癌 SKOV3 细胞的克隆形成率明显下降,具有统计学差异($P < 0.01$),见图 2。



2.2 人参皂甙 Rg3 对卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡的影响

加入 $100\mu\text{mol/L}$ 浓度的人参皂甙 Rg3 溶液, SKOV3 细胞凋亡率明显增加, 具有统计学差异 ($P < 0.001$), 见图 3A。空白对照组的早凋率以及晚凋率分别为 $(2.55 \pm 0.27)\%$ 、 $(4.12 \pm 0.24)\%$; Rg3 处理后的早凋率以及晚凋率分别为 $(12.73 \pm 0.17)\%$ 、 $(17.68 \pm 0.14)\%$ 。空白对照组以及 Rg3 实验组的总细胞凋亡率分别为 $(6.67 \pm 0.24)\%$ 、 $(30.41 \pm 0.14)\%$, 见图 3B。

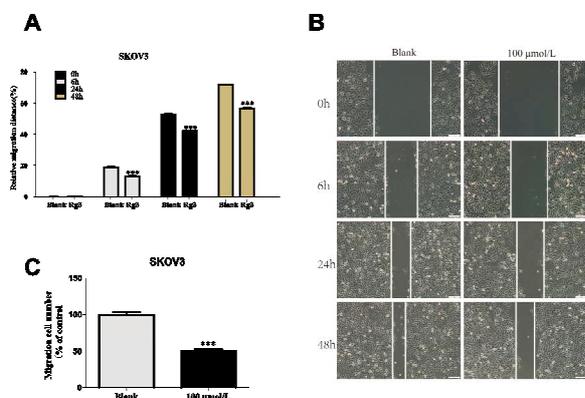


A. 细胞凋亡率(与空白组相比, *** $P < 0.001$, $n=3$); B. SKOV3 细胞的流式凋亡图。

图3 人参皂甙 Rg3 对卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡的影响

2.3 人参皂甙 Rg3 对卵巢癌 SKOV3 细胞迁移的影响

加入 $100\mu\text{mol/L}$ 浓度的人参皂甙 Rg3 溶液, 分别作用于癌细胞 0、6、24、48h, 相对迁移距离均明显下降, 具有统计学差异 ($P < 0.001$), 见图 4A。Rg3 处理 6h 后就可以看到细胞迁移下降; 24h 以及 48h 后细胞迁移速度相比空白对照组明显降低, 见图 4B。人参皂甙 Rg3 对 SKOV3 细胞迁移具有明显的抑制作用, 细胞迁移数量明显减少, 具有统计学差异 ($P < 0.001$), 见图 4C。

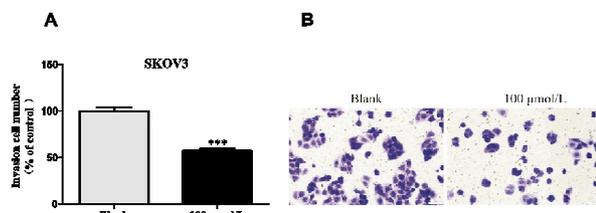


A. 迁移距离(与空白组相比, *** $P < 0.001$, $n=3$); B. 不同时间作用下细胞迁移距离; C. 细胞迁移数量(与空白组相比, *** $P < 0.001$, $n=3$)。

图4 人参皂甙 Rg3 对卵巢癌 SKOV3 细胞迁移的影响

2.4 人参皂甙 Rg3 对卵巢癌 SKOV3 细胞侵袭的影响

加入 $100\mu\text{mol/L}$ 浓度的人参皂甙 Rg3 溶液, 作用 48h 后, 与空白组比较, Transwell 方法检测卵巢癌 SKOV3 细胞的侵袭细胞数量明显下降, 具有统计学差异 ($P < 0.001$), 见图 5。

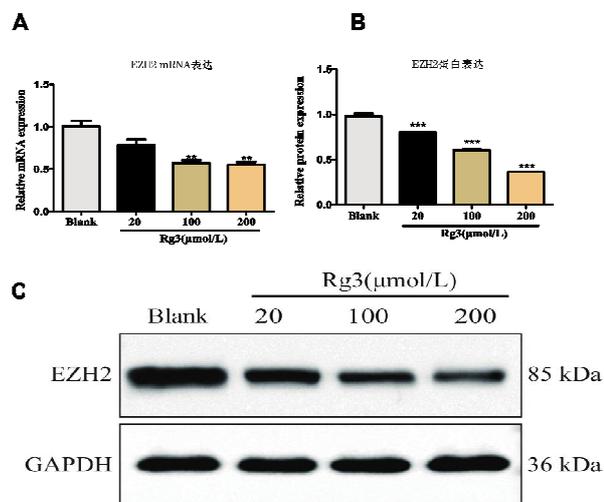


A. 细胞侵袭数量(与空白组相比, *** $P < 0.001$, $n=3$); B. 细胞侵袭图。

图5 人参皂甙 Rg3 对卵巢癌 SKOV3 细胞侵袭的影响

2.5 不同梯度浓度的人参皂甙 Rg3 对人卵巢癌 SKOV3 细胞 EZH2 mRNA 及蛋白表达的影响

人参皂甙 Rg3 对 SKOV3 细胞 EZH2 mRNA 表达具有明显的抑制作用, 分别加入不同浓度的人参皂甙 Rg3 溶液 (20、100、200 μmol/L) 作用 48h 后, 与空白组比较, 卵巢癌 SKOV3 细胞上 EZH2 mRNA 的表达随着浓度的增加呈现明显下降, 具有统计学差异 ($P < 0.01$), 见图 6A。同时, 人参皂甙 Rg3 对 SKOV3 细胞 EZH2 蛋白表达亦具有明显的抑制作用, 20、100、200 μmol/L 组与空白组比较, 具有统计学差异 ($P < 0.001$), 随着药物浓度的升高明显减少, 见图 6B、C。



A. EZH2 mRNA 相对表达量(与空白组比较, ** $P < 0.01$, $n=3$); B. EZH2 蛋白相对表达量(与空白组比较, *** $P < 0.001$, $n=3$); C. EZH2 蛋白表达。

图6 人参皂甙 Rg3 对 EZH2 mRNA 以及蛋白表达的影响

3 讨论

卵巢癌是最常见的女性生殖系统三大恶性肿瘤之一,据2020年最新统计,全球范围内,新增卵巢癌患者313 959例,其中有207 252例死亡^[8]。因卵巢癌发病隐匿,临床上尚缺乏早期有效监测指标,发现时多为晚期,导致卵巢癌成为死亡率最高的妇科恶性肿瘤^[9]。因此,卵巢癌的治疗依然是当今妇科肿瘤医师面临的严峻挑战。

人参皂甙 Rg3 是一种重要的抗血管生成药物,研究^[3,10]显示人参皂苷 Rg3 对卵巢癌等多种恶性肿瘤均具有抑制作用。但是人参皂苷 Rg3 对卵巢癌的血管生成抑制作用多局限于表观遗传学方面的研究,对于抗血管生成的机制研究仍不清楚。EZH2 是 PCG 家族成员中唯一具有甲基转移酶功能的表观遗传沉默子,EZH2 通过催化组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸三甲基化(H3K27me3),介导多种靶基因启动子基因表达沉默^[11]。研究^[12]表明,EZH2 在多种肿瘤细胞以及血管中的表达升高预示不良的临床结果,在卵巢癌细胞及人体卵巢癌标本组织中敲除 EZH2 基因,P57 的表达升高,从而提示 EZH2 的下降或沉默可抑制卵巢癌细胞的生长和迁移^[13]。

在本研究中,我们旨在探索人参皂甙 Rg3 是否能通过抑制 EZH2 阻断卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖、侵袭和迁移。实验结果显示,人参皂甙 Rg3 对卵巢癌 SKOV3 细胞侵袭、增殖和迁移等均有显著抑制作用,同时可以有效促进人卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡。与空白组比较,人参皂甙 Rg3 组对 SKOV3 细胞具有明显的抑制作用,随着浓度的增高,细胞增殖明显减少($P < 0.001$)。Rg3 对 SKOV3 细胞具有明显的促凋亡作用,早期凋亡细胞率和晚期凋亡细胞率均明显增加($P < 0.001$)。Rg3 对 SKOV3 细胞侵袭具有明显的抑制作用,细胞侵袭数量明显减少($P < 0.001$)。Rg3 对 SKOV3 细胞迁移具有明显的抑制作用,细胞迁移数量明显减少($P < 0.001$)。随着作用时间的增加,相对迁移距离明显下降($P < 0.001$)。

本实验研究结果显示,与空白组比较,人参皂甙 Rg3 对 SKOV3 细胞 EZH2 mRNA 和蛋白表达均具有明显的抑制作用。随着人参皂甙 Rg3 浓度的升高,EZH2 mRNA 的表达量明显呈现阶梯式减少($P < 0.01$);EZH2 蛋白相对表达量亦呈现阶梯式显著下降($P < 0.001$)。综上所述,人参皂甙 Rg3 对 SKOV3 细胞上的 EZH2 基因具有明显的抑

制作用,但具体的上下游分子机制尚需进一步的研究。

恶性肿瘤生长、转移依赖于营养的获取,肿瘤的血管生成起着至关重要的作用^[14],有效阻断血管生成可以起到治疗恶性肿瘤的关键性作用。基于以上理论基础,抗肿瘤血管生成的靶向治疗成为癌症治疗的手段之一。经典抗血管生成药物贝伐珠单抗已被美国食品药品监督管理局(FDA)认证用于转移性结直肠癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、肾癌、甲状腺癌、宫颈癌、卵巢癌等多种癌症的治疗。但是,除了价格昂贵,在实际的临床应用过程中,患者常出现包括高血压、动脉血栓、蛋白尿、肠穿孔、伤口愈合不良等常见的副作用,其中高血压、动脉血栓及肠穿孔会引起致命性的危险^[15]。因此,研发价钱合理、副作用更小的抑制肿瘤血管生成的靶向治疗药物迫在眉睫。我国中医药文化博大精深,中药有着得天独厚的优势,可以达到治疗效果显著且副作用少的目的,本研究结果可以为中药人参皂甙 Rg3 治疗卵巢癌提供基础实验依据。

参考文献:

- [1] SONG Z, ZHOU Y, BAI X, et al. A practical nomogram to predict early death in advanced epithelial ovarian cancer [J]. *Front Oncol*, 2021, 11:655826
- [2] 林仲秋, 卢淮武, 霍楚莹, 等. 《2020 年 NCCN 卵巢癌包括输卵管癌及原发性腹膜癌临床实践指南(第 1 版)》解读[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2020, 36(4):340
- [3] SUN M, YE Y, XIAO L, et al. Anticancer effects of ginsenoside Rg3 (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(3):507
- [4] LIANG W, WU J, QIU X. LINC01116 facilitates colorectal cancer cell proliferation and angiogenesis through targeting EZH2-regulated TPM1 [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1):45
- [5] WAN S, PAN Y, YANG W, et al. Inhibition of EZH2 alleviates angiogenesis in a model of corneal neovascularization by blocking FoxO3a-mediated oxidative stress [J]. *FASEB J*, 2020, 34(8):10168
- [6] TSOU P, CAMPBELL P, AMIN M A, et al. Inhibition of EZH2 prevents fibrosis and restores normal angiogenesis in scleroderma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(9):3695
- [7] ZHANG Y, ZHENG D, ZHOU T, et al. Androgen deprivation promotes neuroendocrine differentiation and angiogenesis through CREB-EZH2-TSP1 pathway in prostate cancers [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):4080
- [8] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2021, 3(71):209
- [9] SMITH R A, ANDREWS K S, BROOKS D, et al. Cancer screening in the united states, 2019: a review of current American cancer society guidelines and current issues in cancer screening [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(3):184

(下转第 379 页)

青砖茶提取物缓解小鼠溃疡性结肠炎机制研究*

叶丹¹, 赵依叶¹, 苗潇磊^{1**}, 郑敏^{2**}

(1. 湖北科技学院医学部药学院, 湖北咸宁 437100; 2. 湖北科技学院电子信息与工程学院)

摘要:目的 探讨青砖茶提取物(QDTE)对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的溃疡性结肠炎(UC)小鼠肠道中短链脂肪酸(SCFAs)的影响。方法 将小鼠随机分为5组(10只/组),正常组、模型组、阳性组、L-QDTE组[200mg/(kg·d)]和H-QDTE组[400mg/(kg·d)],模型组连续9d给予3% DSS,阳性组和QDTE组连续给药16d,第17d处死,收集小鼠粪便,采用液相色谱质谱联用仪测定粪便中衍生化后的SCFAs含量。结果 SCFAs含量测定的方法学考察结果均符合要求,QDTE增加UC小鼠肠道中乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸和己酸含量,其中乙酸、丁酸和异戊酸含量呈现剂量依赖性。结论 QDTE可以通过增加SCFAs的含量缓解小鼠UC。

关键词:青砖茶提取物;短链脂肪酸;溃疡性结肠炎;液质联用仪

中图分类号:R-332

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)05-0374-006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0374



Qingzhan Dark Tea Extract Alleviates Ulcerative Colitis in Mice by Restoring the Content of Short-Chain Fatty Acids

YE Dan, MIAO Xiao-lei, ZHENG Min, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effect of Qingzhan dark tea extract(QDTE) on short-chain fatty acids (SCFAs) in the intestines of mice with dextran sodium sulfate (DSS)-induced ulcerative colitis (UC). **Methods** The mice were randomly divided into five groups ($n=10$): control group, model group, positive group, low-dose QDTE group [L-QDTE, 200mg/(kg·d)], and high-dose QDTE group [H-QDTE, 400mg/(kg·d)]. Mice in the model group were administered 3% DSS for 9 consecutive days, while those in the positive and QDTE groups received continuous treatment for 16 days and were sacrificed on the 17th day, and the fecal samples were collected, and the levels of derivative SCFAs were measured using liquid chromatography-mass spectrometry. **Results** The results of the methodological investigations for the determination of SCFAs content were in accordance with the requirements. QDTE increased the levels of acetic acid, propionic acid, butyric acid, isobutyric acid, valeric acid, isovaleric acid and hexanoic acid in the intestines of UC mice, among which acetic acid, butyric acid and isovaleric acid showed dose-dependent effects. **Conclusion** QDTE can alleviate UC in mice by increasing the content of SCFAs.

KEY WORDS: Qingzhan dark tea extract; Short-chain fatty acids; Ulcerative colitis; Liquid chromatography-mass spectrometry

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性胃肠道炎症性疾病,其特征是黏膜损伤、免疫

功能障碍和肠道微生物群失调。近年来,由于饮食和经济水平的提高,UC的发病率在全球呈上升

* 基金项目:湖北科技学院博士启动项目基金(Q201810);药物高通量筛选技术国家地方联合工程研究中心开放课题基金(K20201006)

** 通讯作者, E-mail: xlmiao1013@163.com; zhengminsci@163.com

趋势^[1]。短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)是指碳原子数小于6的脂肪酸,包括乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸和己酸等,是肠道菌群的代谢物,可维持肠道的稳态并发挥抗炎作用^[2]。其中乙酸、丙酸和丁酸3者含量比例占肠道总SCFAs 90%以上,而其他的短链脂肪酸如异丁酸、异戊酸、戊酸和己酸则含量较低,且SCFAs的种类组成及数量与肠炎息息相关^[3]。

青砖茶(qingzhuān dark tea, QDT)是黑茶的一种,属于后发酵茶。QDT具有抗炎、抗肿瘤、降尿酸、保护肠道、抗肥胖、抗糖尿病、预防腹泻等多种作用,具有很高的开发利用价值。研究表明,经常喝茶还可以降低UC的发病率^[4]。SCFAs是肠道菌群产生的关键代谢物之一,其主要职责是维护肠道的稳定性,减轻结肠炎相关的症状^[5],同时也有助于保护肠道的功能^[6]。但是,到目前为止,国内外鲜有关于QDT对肠道中SCFAs影响的研究。本实验目的旨在通过构建UC小鼠模型,研究青砖茶提取物(qingzhuān dark tea extract, QDTE)对UC小鼠肠道中SCFAs含量的影响,揭示QDTE对UC小鼠的缓解作用,为今后QDT的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与仪器

QDT(湖北赤壁赵李桥茶业有限公司);葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)(上海源叶生物科技有限公司);5-氨基水杨酸(5-aminosalicylic acid, 5-ASA)(恒诚药业集团淮南股份有限公司);甲醇(Fisher公司)、乙腈(Fisher公司);乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、2-甲基戊酸(IS)、己酸(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,纯度均 $\geq 98\%$)。3-硝基苯肼盐酸盐(3-nitrophenylhydrazine hydrochloride, 3-NPH·HCl)(美国Sigma);吡啶、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐[N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC·HCl](上海国药集团化学试剂有限公司)。

液相色谱系统购自岛津公司(日本京都),由CBM-20A系统、CTO-20 AC柱温箱、SIL-20 AC自动进样器和LC-20ADXR泵组成。Shim-pack ODS色谱柱(5.0 μm , 250mm \times 4.6mm, 岛津公司),保护柱(4.6 μm , 5mm \times 2mm, 岛津公司),质谱检测器型号为岛津8040(岛津公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 HPLC-MS/MS方法

柱温设定30 $^{\circ}\text{C}$;流动相由A(0.1%甲酸水溶液)和B(甲醇)组成;流速是0.35mL/min;梯度洗脱程序如下:0~12min, 33%B;12~26min, 33%~60%B;26~29min, 25%B;进样10 μL 。

仪器配备了电喷雾离子源,负离子扫描模式。本研究将短链脂肪酸的各个单品进行全扫,再结合单个短链脂肪酸的分子量,得到母离子的质荷比。再将得到的母离子的质荷比进行产物离子优化,得到2~3对离子对,优化结果如表1所示。检测模式设置为多离子反应监控模式(MRM),其他质谱条件如下:离子喷射电压-4.5kV;雾化气流量3.0L/min;干燥气流量15.0L/min;DL温度250 $^{\circ}\text{C}$;加热块温度400 $^{\circ}\text{C}$ 。

表1 7种短链脂肪酸的质谱条件结果

| 分析物 | TR/min | 母离子/(m/z) | 子离子/(m/z) | CE/V | Q1偏差/V | Q2偏差/V |
|--------|--------|-----------|-----------|------|--------|--------|
| 乙酸 | 5.335 | 194.00 | 159.00 | 15.0 | 14.0 | 17.0 |
| | | 194.00 | 152.25 | 14.0 | 14.0 | 30.0 |
| | | 194.00 | 137.30 | 15.0 | 14.0 | 10.0 |
| 丙酸 | 8.877 | 208.10 | 137.00 | 16.0 | 15.0 | 16.0 |
| | | 208.10 | 165.15 | 13.0 | 15.0 | 12.0 |
| | | 208.10 | 152.15 | 14.0 | 15.0 | 17.0 |
| 异丁酸 | 13.675 | 222.15 | 137.10 | 17.0 | 16.0 | 10.0 |
| | | 222.15 | 152.15 | 14.0 | 16.0 | 12.0 |
| | | 222.15 | 179.25 | 12.0 | 15.0 | 14.0 |
| 丁酸 | 15.156 | 222.15 | 137.10 | 16.0 | 16.0 | 11.0 |
| | | 222.15 | 179.25 | 13.0 | 12.0 | 13.0 |
| | | 222.15 | 107.05 | 24.0 | 12.0 | 12.0 |
| 异戊酸 | 20.888 | 236.20 | 137.15 | 18.0 | 17.0 | 26.0 |
| | | 236.20 | 152.10 | 15.0 | 17.0 | 11.0 |
| | | 236.20 | 193.25 | 13.0 | 17.0 | 15.0 |
| 戊酸 | 21.939 | 236.20 | 137.10 | 17.0 | 16.0 | 13.0 |
| | | 236.20 | 152.15 | 14.0 | 17.0 | 12.0 |
| | | 236.20 | 107.05 | 25.0 | 14.0 | 22.0 |
| IS(内标) | 24.612 | 250.20 | 137.10 | 18.0 | 18.0 | 16.0 |
| | | 250.20 | 152.15 | 16.0 | 14.0 | 17.0 |
| | | 250.20 | 107.10 | 27.0 | 14.0 | 19.0 |
| 己酸 | 26.775 | 250.10 | 137.05 | 21.0 | 27.0 | 11.0 |
| | | 250.10 | 107.10 | 28.0 | 28.0 | 21.0 |
| | | 250.10 | 46.10 | 43.0 | 27.0 | 17.0 |

1.2.2 青砖茶提取物的制备

根据文献^[7],青砖茶提取物的制备方法如下:将青砖茶用研磨机研磨,用70%乙醇,在24 $^{\circ}\text{C}$ 提取15min,重复3次(料液比1:6);提取液经二氯

甲烷提取1次,乙酸乙酯提取3次。减压浓缩乙酸乙酯提取物,真空冷冻干燥,得到QDTE。

1.2.3 动物实验

50只6周龄SPF级雄性C57BL/6小鼠(体重18~20g)购自辽宁长生生物技术股份有限公司(中国辽宁),动物许可证号SCXK(辽)2020-0001。所有小鼠实验操作均基于实验动物的护理和使用指南(第八版)。将所有小鼠保持在相对恒定的温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度(55 ± 5)%和12h明暗循环的房间中适应性饲养1周,饲料和饮用水消毒后由动物自由摄取。将小鼠随机分为5组($n=10$),实验周期为16d,具体实验方案如图1所示。对照组小鼠自由饮食和饮用蒸馏水,模型组小鼠于第8天自由饮用3%DSS,阳性组自第8天自由饮用3%DSS,并按照50mg/(kg·d)的剂量连续灌胃16d 5-ASA,青砖茶提取物低剂量组200mg/(kg·d)和高剂量组400mg/(kg·d)自第1天起连续灌胃给药16d,并于第8天开始自由饮用3%DSS^[8]。在实验的第17天,对提前禁食12h的小鼠进行麻醉和安乐死,收集小鼠的粪便,在 -80°C 下保存以供进一步分析。

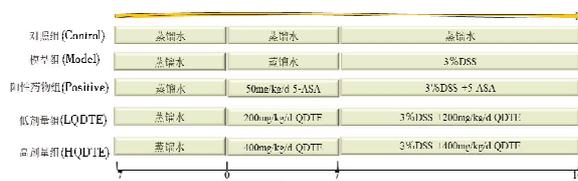


图1 动物实验设计图

1.2.4 方法学考察

在对小鼠粪便中SCFAs(乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸和己酸)的含量测定之前,对这些SCFAs进行柱前衍生化处理,并对衍生化后的SCFAs进行了方法学考查,包括专属性、线性度、定量下限(LLOQ)、准确度、精密度和稳定性。方法学按照美国食品药品监督管理局(FDA)的指导原则进行。

(1)专属性。通过分析含有乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、IS(内标)、己酸的空白组、模型组、阳性组、L-QDT和H-QDT组小鼠粪便样品,评估方法专属性。

(2)线性范围。配置不同浓度SCFAs工作溶液(乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、己酸),以各个短链脂肪酸峰面积比内标峰面积为纵坐标(Y),对应的浓度为横坐标(X)计算回归方程。

(3)准确度和精密度。精密度和准确度分别用相对标准偏差(RSD)和回收率(RE)进行评价。配置SCFAs的质量控制样品(LQC、MQC和HQC)进行检测,测定RSD和RE。

(4)稳定性。将质量控制样品(LQC、MQC和HQC)分别在 4°C 和 25°C 下保存24h,分析其稳定性。

1.2.5 粪便中短链脂肪酸含量测定

将20mg粪便样品放入2mL Eppendorf管中,用200 μL 60%乙腈涡旋3min,10000r/min条件下离心15min,收集上清液。取过滤后的上清液70 μL ,加入10 μL 内标(2-甲基戊酸,IS),与40 μL 的3-NPH·HCl溶液(200mmol/L)混合,随后加入等量的EDC·HCl-6%吡啶溶液(20mmol/L),在 30°C 水浴30min,立即冷却1min,用10%的乙腈溶液定容至2mL,即得粪便样品衍生化溶液^[9-10]。

1.3 统计学方法

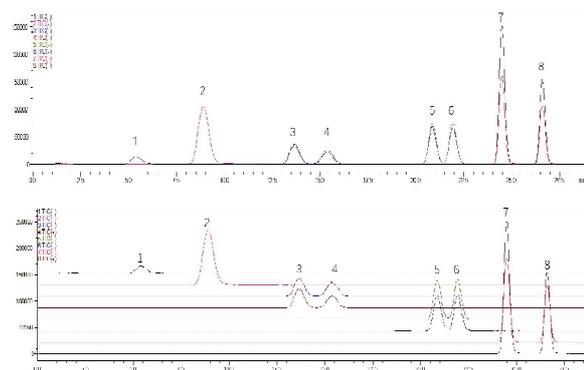
数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用IBM SPSS Statistics 26.0软件进行统计分析。组间差异采用 t 检验。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 方法学

2.1.1 专属性

专属性结果如图2所示。在该色谱条件下,短链脂肪酸(乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、IS、己酸)之间无干扰,表明该方法具有良好的专属性。



1. 乙酸;2. 丙酸;3. 异丁酸;4. 丁酸;5. 异戊酸;6. 戊酸;7. IS;8. 己酸。

图2 混合标准品短链脂肪酸的色谱图

2.1.2 线性范围

线性方程和线性系数如表2所示,表明7种分析物(乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸和

己酸)在 0.003 ~ 109.0 μmol/g 内具有良好的线性。

表 2 7 种短链脂肪酸线性结果(n=3)

| 短链脂肪酸 | 标准曲线 | R ² | 线性范围/(μmol/g) |
|-------|------------------|----------------|---------------|
| 乙酸 | y=50.895x+0.1623 | 0.998 | 0.7~109.0 |
| 丙酸 | y=413.41x+0.2973 | 0.993 | 0.1~20.9 |
| 异丁酸 | y=2859.8x-0.019 | 0.998 | 0.01~0.8 |
| 丁酸 | y=1656.4x+0.0123 | 0.993 | 0.1~8.5 |
| 异戊酸 | y=4199.2x+0.0028 | 0.999 | 0.01~1.8 |
| 戊酸 | y=5431.4x+0.1963 | 0.994 | 0.01~1.8 |
| 己酸 | y=4846.1x-0.0131 | 0.998 | 0.003~0.3 |

2.1.3 准确度和精密度

表 3 结果显示,日内 RE 和 RSD 分别为 85.91% ~ 113.78% 和 3.21% ~ 11.83%, 日间 RE 和 RSD 分别为 90.59% ~ 114.74% 和 2.57% ~ 14.80%, 表明该方法准确度和精密度良好。

表 3 7 种短链脂肪酸精密度和准确度结果(n=6)

| 分析物 | 浓度/(μmol/g) | 日内 | | 日间 | |
|-----|-------------|--------|-------|--------|-------|
| | | RE/% | RSD/% | RE/% | RSD/% |
| 乙酸 | LQC | 90.79 | 11.83 | 102.28 | 13.80 |
| | MQC | 106.70 | 9.86 | 114.74 | 4.45 |
| | HQC | 101.41 | 4.48 | 102.28 | 3.97 |
| 丙酸 | LQC | 96.38 | 10.43 | 108.36 | 8.20 |
| | MQC | 113.78 | 9.38 | 102.91 | 3.87 |
| | HQC | 103.07 | 4.43 | 104.36 | 4.89 |
| 异丁酸 | LQC | 105.51 | 3.43 | 109.28 | 8.40 |
| | MQC | 103.04 | 9.00 | 101.71 | 4.09 |
| | HQC | 107.05 | 5.63 | 109.28 | 3.16 |
| 丁酸 | LQC | 108.57 | 4.77 | 106.84 | 14.80 |
| | MQC | 112.46 | 8.65 | 106.85 | 2.89 |
| | HQC | 106.73 | 3.21 | 106.84 | 6.28 |
| 异戊酸 | LQC | 108.49 | 6.23 | 104.20 | 12.59 |
| | MQC | 113.76 | 5.41 | 109.34 | 3.50 |
| | HQC | 103.30 | 4.80 | 104.20 | 3.76 |
| 戊酸 | LQC | 85.91 | 5.12 | 90.59 | 6.23 |
| | MQC | 110.47 | 3.61 | 114.01 | 2.84 |
| | HQC | 110.01 | 3.99 | 93.59 | 5.81 |
| 己酸 | LQC | 101.30 | 11.42 | 101.63 | 13.13 |
| | MQC | 99.46 | 4.86 | 107.90 | 5.06 |
| | HQC | 109.50 | 5.12 | 101.63 | 2.57 |

2.1.4 稳定性

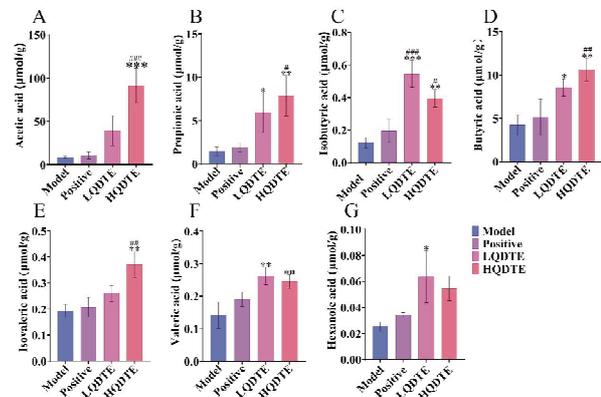
表 4 显示,在 4℃ 下,24h 内分析物的 RE 值和 RSD 值分别为 85.02% ~ 114.02% 和 3.51% ~ 13.30%; 在 25℃ 下,24h 内分析物的 RE 值和 RSD 值分别为 89.63% ~ 113.09% 和 2.30% ~ 14.78%, 表明该方法稳定性良好。

表 4 7 种短链脂肪酸稳定性结果(n=6)

| 分析物 | 浓度/(μmol/g) | 4℃(24h) | | 25℃(24h) | |
|-----|-------------|---------|-------|----------|-------|
| | | RE/% | RSD/% | RE/% | RSD/% |
| 乙酸 | LQC | 85.02 | 8.76 | 96.26 | 10.51 |
| | MQC | 90.32 | 5.25 | 97.99 | 4.85 |
| | HQC | 95.38 | 3.51 | 100.38 | 3.68 |
| 丙酸 | LQC | 100.65 | 13.30 | 113.09 | 9.74 |
| | MQC | 95.27 | 5.97 | 99.95 | 3.42 |
| | HQC | 113.98 | 3.70 | 108.60 | 3.19 |
| 异丁酸 | LQC | 114.02 | 9.54 | 89.63 | 14.78 |
| | MQC | 98.53 | 5.95 | 90.27 | 6.51 |
| | HQC | 108.89 | 7.98 | 95.95 | 4.32 |
| 丁酸 | LQC | 98.47 | 5.26 | 100.59 | 4.34 |
| | MQC | 105.82 | 5.71 | 100.67 | 5.50 |
| | HQC | 110.39 | 4.62 | 100.98 | 3.16 |
| 异戊酸 | LQC | 100.13 | 7.86 | 110.01 | 2.30 |
| | MQC | 108.24 | 11.42 | 98.49 | 4.02 |
| | HQC | 113.61 | 4.44 | 92.37 | 6.65 |
| 戊酸 | LQC | 102.36 | 9.54 | 90.83 | 6.56 |
| | MQC | 109.71 | 10.92 | 92.67 | 4.18 |
| | HQC | 98.26 | 4.68 | 90.42 | 5.55 |
| 己酸 | LQC | 88.30 | 12.16 | 97.81 | 11.78 |
| | MQC | 92.09 | 8.15 | 112.30 | 5.48 |
| | HQC | 96.37 | 9.35 | 111.08 | 5.18 |

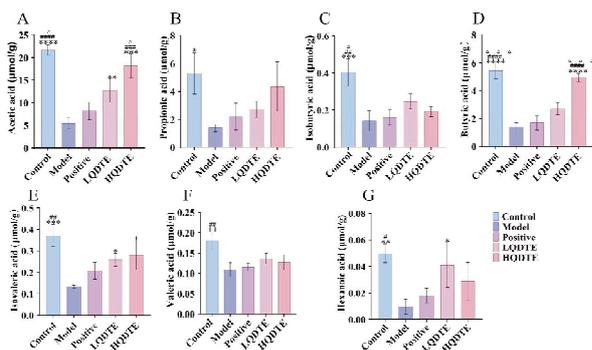
2.2 粪便中短链脂肪酸含量

图 3 表明,在造模之前,7 种 SCFAs 中乙酸的响应值最高,其次是丙酸和丁酸,并且在预防性服用 QDTE 一周后,单个 SCFAs 含量均有所增加,说明补充 QDTE 增加了小鼠粪便中 SCFAs 的水平。如图 4 所示,与对照组相比,模型组粪便中各 SCFAs 含量显著下降(P < 0.05),表明溃疡性结肠炎抑制了 SCFAs 的产生。补充 QDTE 后,丙酸、异丁酸、戊酸、己酸含量增高,其中乙酸、丁酸和异戊酸含量呈显著增高(P < 0.05),并且呈现剂量依赖性。



A. 乙酸; B. 丙酸; C. 异丁酸; D. 丁酸; E. 异戊酸; F. 戊酸; G. 己酸。与 Model 组比较, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001; 与 Positive 组比较, #P < 0.05, ##P < 0.01, ####P < 0.001, n=6。

图 3 QDTE 对造模前 SCFAs 含量的影响



A. 乙酸;B. 丙酸;C. 异丁酸;D. 丁酸;E. 异戊酸;F. 戊酸;G. 己酸。与 Model 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$;与 Positive 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$;与 QDTE 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; $n = 6$ 。

图4 QDTE对DSS诱导结肠炎小鼠SCFAs含量的影响

3 讨论

SCFAs是肠道微生物群产生的主要代谢物之一,负责维持肠道平衡和缓解结肠炎症。SCFAs可以维护肠上皮屏障功能的完整性,调节宿主胃肠道免疫;SCFAs还可以上调白细胞介素10和22等细胞因子的分泌,进一步缓解动物炎症性肠病^[11]。总之,SCFAs具有维持肠黏膜完整性、增强机体免疫、促进肠道电解质平衡、调节肠道微生物、降低肠道pH、减少有害菌及抑制炎症因子的生长、减轻肠道炎症反应等作用。Canfora等^[12]发现在7种SCFAs中,乙酸的浓度最高,其次是丙酸和丁酸,这与我们的研究结果一致。据研究,乙酸不仅每天供给机体10%的能量,而且还能抑制核转录因子(NF- κ B)的活性,从而减轻肠黏膜炎症反应^[13]。丙酸可以增强肠上皮细胞迁移的速度和持久性,有利于肠道损伤的恢复^[14],上调抗菌肽Reg 3 β 的表达以缓解结肠炎。丁酸是最有效的抗炎剂,据研究,丁酸通过激活Akt/mTOR介导的蛋白质合成,增加紧密连接蛋白Claudin-3和Claudin-4表达来增强肠道的紧密连接^[15]。戊酸能改善胃肠道功能和肠道完整性^[16]。己酸能够调节IL-32、IL-18等关键炎症细胞因子,是炎症的主要调节剂^[17]。本实验结果显示,QDTE可使小鼠粪便中SCFAs的含量增加,提示QDT可以预防肠道炎症的发生,保护肠道。

茶具有多种成分,不仅是一种新的食品原料,而且具有丰富的保健功能。因此,对SCFAs进行准确、可靠的定量分析对进一步评估茶与人类健康的联系是十分必要的。普洱茶和红茶可以重塑肠道菌群,促进SCFAs的产生,导致肠道炎症蛋白的表达降低^[8]。板栗提取物使模型组的拟杆菌和厚壁

菌的丰度发生了变化,显著提高SCFAs水平,尤其是丙酸、丁酸和异戊酸含量,有利于缓解结肠炎^[18]。富含哈斯克果酚的提取物以剂量依赖性方式升高了总SCFAs水平,减轻肠屏障功能障碍和炎症^[19]。甜茶提取物改变了UC小鼠的肠道微生物群落谱系,调节肠道微生物群组成,提高丁酸的含量^[20]。这些研究结果与本试验结果一致,即QDTE可以通过提高肠道中SCFAs含量来缓解结肠炎。

本研究构建了一个基于3-NPH衍生化反应的LC/MS方法,旨在测定小鼠粪便中7种SCFAs的浓度水平。我们所建立的衍生化技术具有温和的反应条件和易于控制的特点,而且所需的反应时间也是适当的。以液相色谱法为基础建立的分析方法灵敏度高、选择性好、重现性好。色谱方法学的研究^[21]表明,这项技术可以在29min内分离7种SCFAs。这些SCFAs的回收率介于85%~115%,无论是日内还是日间,其精确度均低于15%。另外,SCFAs的峰面积与其浓度之间呈现出很好的线性关系,其 R^2 值均大于0.99。这种方法不仅操作方便、准确,而且可靠。我们的结果表明,QDTE通过增加SCFAs含量,在缓解溃疡性结肠炎中表现出较好的效果,可能通过调节肠道菌群平衡和减轻炎症反应来发挥作用。这一研究为进一步开发青砖茶提取物作为UC治疗的潜在药物提供了重要参考。

参考文献:

- [1] LI M F, YANG L J, MU C L, et al. Gut microbial metabolome in inflammatory bowel disease: from association to therapeutic perspectives [J]. *Comput Struct Biotechnol*, 2022, 20: 2402
- [2] WANG G, YU Y, WANG Y Z, et al. Role of SCFAs in gut microbiome and glycolysis for colorectal cancer therapy [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 17023
- [3] 郭共景. 溃疡性结肠炎患者粪便短链脂肪酸含量特征的茶萃分析[D]. 广州: 广州医科大学, 2021
- [4] ALMOFARREH A, SHEERAH H A, ARAFA A, et al. Beverage consumption and ulcerative colitis: a case-control study from Saudi Arabia [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(4): 2287
- [5] KOH A, VADDER F D, KOVATCHEVA-DATCHARY P, et al. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites [J]. *Cell*, 2016, 165(6): 1332
- [6] YANG S, SHANG J C, LIU L J, et al. Strains producing different short-chain fatty acids alleviate DSS-induced ul-

- cerative colitis by regulating intestinal microecology[J]. Food Funct, 2022, 13(23):12156
- [7] IMRAN A, ARSHAD M U, SHERWANI H, et al. Antioxidant capacity and characteristics of theaflavin catechins and ginger freeze-dried extract as affected by extraction techniques[J]. Int J Food Prop, 2021, 24(1):1097
- [8] HU S S, LIN Z Y, ZHAO S B, et al. Pu-erh tea alleviated colitis-mediated brain dysfunction by promoting butyric acid production[J]. Food Chem Toxicol, 2023, 172:113594
- [9] 丛龙杰, 邵玉健, 沈红, 等. 粪便内中短链脂肪酸柱前衍生化UHPLC-QTOF-MS/MS分析方法研究[J]. 药理学学报, 2020, 55(1):131
- [10] MENG X G, PANG H H, SUN F, et al. Simultaneous 3-nitrophenylhydrazine derivatization strategy of carbonyl, carboxyl and phosphoryl submetabolome for LC-MS/MS-based targeted metabolomics with improved sensitivity and coverage[J]. Anal Chem, 2021, 93(29):10075
- [11] 倪萍, 张海波, 廖晓鹏, 等. 短链脂肪酸、色氨酸代谢物及两性离子多糖A调控动物炎性肠病通路的研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57(6):78
- [12] CANFORA E E, MEEUX R C R, VENEMA K, et al. Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM[J]. Nat Rev Endocrinol, 2019, 15(5):261
- [13] 郑海玲, 孙金辉, 崔培, 等. 短链脂肪酸在水产养殖中的应用研究进展[J]. 中国饲料, 2024(1):108
- [14] BAJIC D, NIEMANN A, HILLMER A K, et al. Gut microbiota-derived propionate regulates the expression of Reg3 mucosal lectins and ameliorates experimental colitis in mice[J]. J Crohns Colitis, 2020, 14(10):1462
- [15] YAN H, AJUWON K M. Butyrate modifies intestinal barrier function in IPEC-J2 cells through a selective upregulation of tight junction proteins and activation of the Akt signaling pathway[J]. PLoS One, 2017, 12(6):e0179586
- [16] WANG R X, HENEN M A, LEE J S, et al. Microbiota-derived butyrate is an endogenous HIF prolyl hydroxylase inhibitor[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1):1938380
- [17] EL-FAR M, DURAND M, TURCOTTE I, et al. Upregulated IL-32 expression and reduced gut short chain fatty acid caproic acid in people living with HIV with subclinical atherosclerosis[J]. Front Immunol, 2021, 12:664371
- [18] LI H Y, CAO W X, XIE J W, et al. α -D-1,6-glucan from *castanea mollissima* blume alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis *in vivo* [J]. Carbohydr Polym, 2022, 289:119410
- [19] WANG R M, YAO L L, MENG T Y, et al. *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk fruit phenolic-rich extract mitigates intestinal barrier dysfunction and inflammation in mice[J]. Food Chem, 2022, 393:133438
- [20] HE X Q, LIU D, LIU H Y, et al. Prevention of ulcerative colitis in mice by sweet tea (*lithocarpus litseifolius*) via the regulation of gut microbiota and butyric-acid-mediated anti-inflammatory signaling[J]. Nutrients, 2022, 14(11):2208
- [21] 赵海燕, 黄婷婷, 陆金玲, 等. 基于UPLC-MS法快速定量检测人血浆中短链脂肪酸[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2022, 41(3):292

(收稿日期:2024-02-26)

(上接第373页)

- [10] CHEN T, LI B, QIU Y, et al. Functional mechanism of ginsenosides on tumor growth and metastasis[J]. Saudi J Biol Sci, 2018, 25(5):917
- [11] CAO R, WANG L, WANG H, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb-group silencing[J]. Science, 2002, 298(5595):1039
- [12] DUAN R, DU W, GUO W. EZH2: a novel target for cancer treatment[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1):12
- [13] GUO J, CAI J, YU L, et al. EZH2 regulates expression of p57 and contributes to progression of ovarian cancer in vitro and in vivo[J]. Cancer Sci, 2011, 102(3):530
- [14] HANAHAN D. Hallmarks of cancer: new dimensions[J]. Cancer Discov, 2022, 12(1):31
- [15] GARCIA J, HURWITZ H I, SANDLER A B, et al. Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: a review of 15 years of clinical experience and future outlook[J]. Cancer Treat Rev, 2020, 86:102017

(收稿日期:2024-02-29)

河蚌多糖水提取物对多种恶性肿瘤 细胞增殖和迁移的影响*

何泓一¹, 赵子越², 李炎坤^{1**}, 李晶^{3**}

(1. 湖北科技学院医学部药学院, 湖北 咸宁 437100; 2. 浙江爱诺生物药业股份有限公司;
3. 湖州师范学院医学院)

摘要:目的 探讨河蚌多糖水提取物体外抗肿瘤活性。方法 通过离心、浓缩和冷冻干燥的方法制备出可溶性的河蚌多糖水提取物, 分别采用 CCK-8 实验、细胞划痕实验和 Transwell 迁移实验检测河蚌多糖水提取物对肝癌细胞 Hep3B、恶性黑色素瘤细胞 A375 和肺癌细胞 PC9 增殖、迁移能力的抑制作用。结果 CCK-8 实验表明, 河蚌多糖水提取物具有时间-浓度依赖性抑制上述 3 种恶性肿瘤细胞的增殖; 划痕实验和 Transwell 迁移实验结果表明, 与对照组相比, 河蚌多糖水提取物能够有效抑制上述 3 种恶性肿瘤细胞的迁移 (P 均 < 0.05)。结论 河蚌多糖水提取物可以有效抑制多种恶性肿瘤细胞增殖和迁移, 为其后续开发和应用提供一定的参考价值。

关键词: 河蚌多糖水提取物; 肝癌; 肺癌; 恶性黑色素瘤; 增殖; 迁移

中图分类号: R730

文献标识码: A

文章编号: 2095-4646(2024)05-0380-004

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI: 10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0380



Effects of Mussel Polysaccharide Water Extract on Proliferation and Migration of Various Malignant Tumor Cells

HE Hong-yi, LI Yan-kun, LI Jing, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology,
Xianning Hubei 437100, China)

ABSTRACT; Objective To investigate the antitumor activity of mussel polysaccharide water extract *in vitro*. **Methods** Mussel polysaccharide water extract was prepared by centrifugating, concentrating and freeze-drying. Then CCK-8 assay, cell scratch assay and Transwell migration assay were used to detect the inhibitory effects of the mussel polysaccharide water extract on the proliferation and migration of hepatoma carcinoma cell Hep3B, malignant melanoma cell A375 and lung carcinoma cell PC9 respectively. **Results** The CCK-8 assay result showed that the mussel polysaccharide water extract inhibited the proliferation of the above three kinds of malignant tumor cells in a time and concentration dependent manner. The scratch assay and Transwell migration assay results showed that the mussel polysaccharide water extract effectively inhibited the migration of the above three kinds of malignant tumor cells compared with the control group (all $P < 0.05$). **Conclusion** The mussel polysaccharide water extract can effectively inhibit the proliferation and migration of malignant tumor cells, providing a certain reference value for its subsequent development and application.

KEY WORDS: Mussel polysaccharide water extract; Hepatoma carcinoma; Lung carcinoma; Malignant melanoma; Proliferation; Migration

* 基金项目: 浙江省湖州市科技局重点项目(2021GZ52); 湖州市科技特派员项目(2021KT07)

** 通讯作者, E-mail: yxylyk@163.com; lijing790629@163.com

根据 2022 年中国最新癌症报告显示,肺癌的发病率和死亡率位居癌症首位^[1],吸烟、肺部慢性病以及环境污染都是导致肺癌高发的原因^[2],免疫疗法治疗肺癌已经取得了显著的临床效果,但由于肺癌的异质性和复杂性,患者难以被治愈。肝癌在肿瘤发病率和死亡率中排名前五,因其发病隐匿,早期未能进行手术切除而使病情逐渐恶化^[3],靶向疗法虽能有效控制肺癌恶化,但长时间使用靶向药物出现耐药性^[4]。恶性黑色素瘤起源于皮肤和其他器官黑色素细胞,目前并没有治疗恶性黑色素瘤的特效药。现阶段研究者基于分子层面寻找抑制黑色素瘤生长和转移相关机制^[5],希望能够发现新的靶点对抗黑色素瘤。

河蚌又名河歪、河蛤蜊,属软体动物门、真瓣鳃目、蚌科。河蚌富含蛋白质、脂肪、维生素等,对人体有保健功效。早期研究报道,河蚌的主要有效成分之一是河蚌多糖(MP)^[6],预实验中,我们发现,河蚌多糖的上清液对肿瘤细胞有一定的抑制作用,但因其溶解性差,无法定量进行相关的细胞实验。

冷冻干燥技术是指将含水物料冷冻到冰点以下,使水变成冰,然后在高真空下将冰转化为水蒸气而除去的方法。该方法可有效保持成分的生物活性、保持样品的性状和结构、延长样品的保存期限并使成品有较好的外观,同时提高样品的溶解度^[7]。本实验借助此方法,将河蚌多糖粉末溶解于水中,充分混匀收集上清液后通过冷冻干燥的方法制备出河蚌多糖的水提取物,并进一步从细胞层面探讨河蚌多糖水提取物对肝癌细胞(Hep3B)、恶性黑色素瘤细胞(A375)和肺癌细胞(PC9)的增殖和迁移的影响,为河蚌多糖水提取物抗肿瘤的研究提供一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

肝癌细胞 Hep3B、恶性黑色素瘤细胞 A375 和肺癌细胞 PC9 购自武汉普诺赛生命科技有限公司,河蚌多糖粉末购自浙江华圣生物药业有限公司。DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司, RPMI-1640 培养基购自上海源培生物科技股份有限公司, PBS、0.25% 胰酶、CCK-8 试剂盒、4% 多聚甲醛购自碧云天生物技术有限公司, Transwell 小室板购自美国康宁 Corning 公司。

1.2 方法

1.2.1 河蚌多糖水提取物的制备

首先将河蚌多糖粉末溶于 ddH₂O 中,通过反复多次离心(10 000rpm, 5min)取上清液收集至玻璃瓶,然后转入烧瓶中,置于旋转蒸发器进行浓缩,温度为 50℃ 左右。最后通过冷冻干燥的方法把浓缩的河蚌多糖制成可溶性的河蚌多糖粉末。实验时称取所需的克重,加入培养基后使其溶解,过 0.22μm 滤膜,置 4℃ 冰箱备用。

1.2.2 细胞培养

将细胞冻存管从液氮中取出,放置 37℃ 水浴锅中解冻,离心后放置 37℃、含有 5% 的 CO₂ 温箱中培养。24h 后更换培养基,当细胞覆盖率达到 80% ~ 90%,则需要进行细胞传代,弃掉原有培养基,用 PBS 清洗 2 ~ 3 次后加入含 0.25% 的胰酶进行消化(不同细胞消化时间不同),传代至所需培养皿中进行实验。实验重复 3 次。

1.2.3 CCK-8 细胞增殖检测

取对数生长期细胞,以每孔 8×10^3 个细胞接种于 96 孔板中,放置培养箱中过夜后加药。用 10、20、30、40、50mg/mL 的河蚌多糖水提取物处理细胞,只加培养基的设为空白对照组,每个浓度重复 3 个孔,37℃ 孵育 24h 和 48h 后分别加入 CCK-8 试剂,使用酶标仪在 450nm 波长处测定吸光值。只加入 CCK-8 试剂孔设为阴性对照组。细胞活力(%) = $(A_{\text{药物}} - A_{\text{阴}}) / (A_{\text{空}} - A_{\text{阴}}) \times 100\%$ 。

1.2.4 划痕愈合检测

取对数生长期细胞,以每孔 1×10^6 个细胞接种于 6 孔板中。待细胞贴壁后划痕,加入不同浓度(0、10、20mg/mL)的河蚌多糖水提取物,未加河蚌多糖水提取物的细胞为对照组,37℃ 孵育 48h 后显微镜下拍照。细胞迁移率(%) = $(0\text{h 划痕面积} - 48\text{h 划痕面积}) / 0\text{h 划痕面积} \times 100\%$ 。

1.2.5 Transwell 迁移检测

将细胞消化后用无血清的培养基制成单细胞悬液,以每孔 2×10^5 个细胞接种于 Transwell 上室,下室加入不同浓度(0、10、20mg/mL)的河蚌多糖水提取物,37℃ 孵育 48h。取出小室,用棉签擦掉小室内细胞和培养基,弃下室的培养基并加入 4% 的多聚甲醛室温固定 30min,加入 600μL 0.1% 的结晶紫溶液室温染色 10min,用 PBS 清洗干净后晾干,显微镜下观察并拍照。使用 Image J 软件统计细胞迁移穿过聚碳酸酯膜的细胞数。

1.3 统计学方法

本实验数据使用 GraphPad Prism 8.0 进行统

统计学分析。不同实验组的数据用($\bar{x} \pm s$)表示,对比采用 one-way analysis of variance (ANOVA) 分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 河蚌多糖水提取物抑制肝癌、肺癌以及黑色素瘤细胞的增殖

如图 1 所示,河蚌多糖水提取物对肝癌细胞 Hep3B、恶性黑色素瘤细胞 A375 及肺癌细胞 PC9 均具有明显的抑制作用,且随给药浓度的增加,抑制作用增强。如表 1 所示,当处理时间增加到 48h 后,其 IC_{50} 值分别为 15.34、12.00 和 19.04mg/mL。上述结果表明,河蚌多糖水提取物以浓度-时间依赖性的抑制 Hep3B、PC9 以及 A375 细胞的增殖。

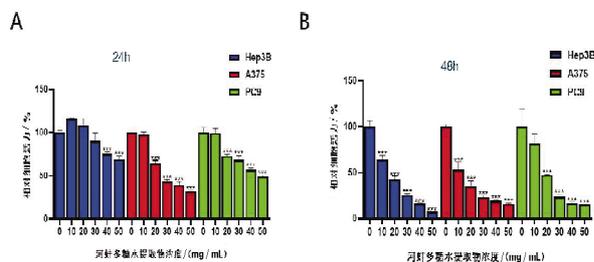


图 1 河蚌多糖水提取物抑制肝癌、恶性黑色素瘤以及肺癌细胞的增殖
A. 河蚌多糖水提取物处理三种肿瘤细胞(肝癌细胞 Hep3B、恶性黑色素瘤细胞 A375 及肺癌细胞 PC9)24h 后 CCK-8 增殖实验结果;B. 河蚌多糖水提取物处理三种肿瘤细胞(肝癌细胞 Hep3B、恶性黑色素瘤细胞 A375 及肺癌细胞 PC9)48h 后 CCK-8 增殖实验结果;与对照组(0mg/mL)相比,*** $P < 0.001$, $n=3$ 。

表 1 河蚌多糖水提取物处理 3 种肿瘤细胞不同时间下的 IC_{50} 值(mg/mL)

| 肿瘤细胞系 | 24h | 48h |
|-------------|-------|-------|
| 肝癌细胞 Hep3B | 60.48 | 15.34 |
| 黑色素瘤细胞 A375 | 29.98 | 12.00 |
| 肺癌细胞 PC9 | 46.97 | 19.04 |

2.2 河蚌多糖水提取物抑制肝癌、肺癌以及恶性黑色素瘤细胞的横向迁移

如图 2 所示,不同浓度的河蚌多糖水提取物作用于各组肿瘤细胞 48h 后,与对照组相比,河蚌多糖水提取物均能够显著抑制 3 种细胞的迁移。对肝癌 Hep3B 细胞,当河蚌多糖水提取物浓度增加到 20mg/mL 时呈现明显的迁移抑制作用;对黑色素瘤 A375 细胞及肺癌 PC9 细胞,当河蚌多糖水提取物浓度增加到 10mg/mL 时均呈现明显的迁移抑制作用,证实了河蚌多糖水提取物对 3 种肿瘤细胞迁移显著的浓度依赖性抑制。

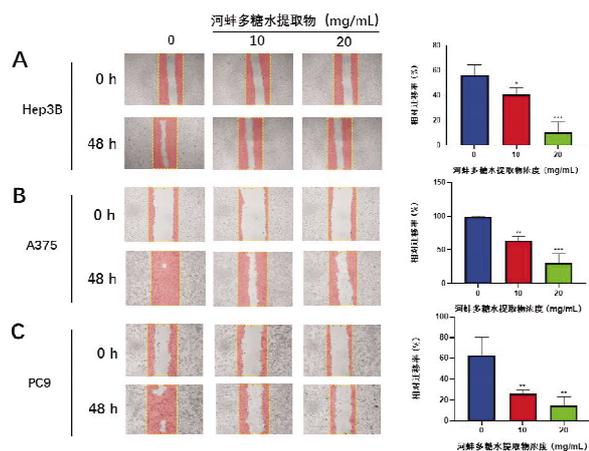


图 2 河蚌多糖水提取物对肝癌细胞 Hep3B 横向迁移的抑制作用(左图)及迁移率的统计图(右图);B. 河蚌多糖水提取物对恶性黑色素瘤细胞 A375 横向迁移的抑制作用(左图)及迁移率的统计图(右图);C. 河蚌多糖水提取物对肺癌细胞 PC9 横向迁移的抑制作用(左图)及迁移率的统计图(右图);倒置显微镜($\times 4$);与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 10mg/mL 浓度相比,## $P < 0.01$, $n=3$ 。

2.3 河蚌多糖水提取物抑制肝癌、肺癌以及恶性黑色素瘤细胞的纵向迁移

2.3 河蚌多糖水提取物抑制肝癌、肺癌以及恶性黑色素瘤细胞的纵向迁移

如图 3 所示,随着河蚌多糖水提取物浓度的增加,细胞聚集的密度逐渐降低,呈分散状态。与对照组相比,当河蚌多糖水提取物浓度增加到 10mg/mL 以上时呈现明显的迁移抑制作用($P < 0.01$)。

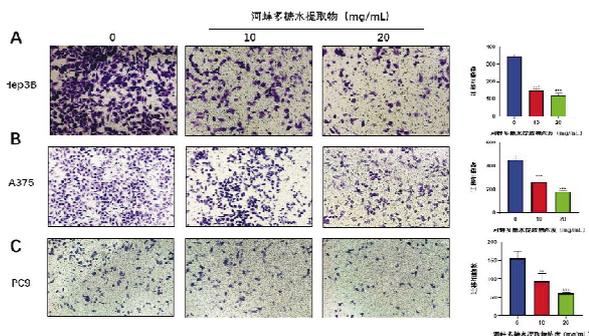


图 3 河蚌多糖水提取物对肝癌细胞 Hep3B 纵向迁移的抑制作用(左图)及细胞迁移率的统计图(右图);B. 河蚌多糖水提取物对黑色素瘤细胞 A375 纵向迁移的抑制作用(左图)及细胞迁移率的统计图(右图);C. 河蚌多糖水提取物对肺癌细胞 PC9 纵向迁移的抑制作用(左图)及细胞迁移率的统计图(右图);倒置显微镜($\times 10$);与对照组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 10mg/mL 组相比,## $P < 0.05$, $n=3$ 。

2.3 河蚌多糖水提取物抑制肝癌、肺癌以及恶性黑色素瘤细胞的纵向迁移

3 讨论

近年来,河蚌多糖因其抗肿瘤效果好、安全性高受到人们广泛关注。有研究^[8]发现,口服河蚌

糖蛋白脂质体可以有效抑制小鼠 Lewis 肺癌、小鼠黑色素瘤 B16 细胞的生长,并且与化疗药相比,其抑癌效果显著。口服河蚌多糖对小鼠腹水瘤细胞 S180、肝癌细胞 H22 具有明显的抑制作用,未见明显毒性反应^[9]。还有研究^[10-11]发现,河蚌多糖可以抑制新生血管生成,诱导肿瘤细胞发生凋亡。我们采用冷冻干燥法提高河蚌多糖的溶解度及利用率,最大限度地保留了河蚌多糖的生物活性,这也是本文的创新点,并且首次对河蚌多糖水提取物开展相关细胞实验。众所周知,肿瘤细胞的无限增殖性、高度转移性是癌症发生发展的关键,本实验首先从增殖和迁移两个方面探究河蚌多糖水提取物对肝癌细胞 Hep3B、恶性黑色素瘤细胞 A375 和肺癌细胞 PC9 3 种肿瘤细胞的影响。CCK-8 实验表明,尽管河蚌多糖水提取物对 3 种肿瘤的抑制作用比较明显,但是值得注意的是,在 24h 低浓度(10mg/mL)条件下,河蚌多糖水提取物对 3 种肿瘤细胞并无抑制作用,河蚌多糖在加工处理过程中发生降解,失去了部分生物活性,推测可能与浓缩时的温度、干燥后水分去除使得药物结构的改变有关。我们根据计算出的 IC₅₀ 值确定后续实验中的给药浓度、时间,发现河蚌多糖水提取物孵育 3 种肿瘤细胞 48h 后抑制作用更强,其半数抑制浓度在 12 ~ 19mg/mL,于是我们选择给药浓度为 10、20mg/mL、作用时间延长到 48h 开展后续实验。另外,划痕实验和 Transwell 实验结果均表明,河蚌多糖水提取物能够有效抑制肿瘤细胞的迁移,揭示了河蚌多糖水提取物在控制癌症转移方面的潜力。

纵观有关河蚌多糖的研究,我们也发现了一些问题和需要进一步探索的方向。首先,由于目前没有规范检测河蚌多糖含量的行业标准,并且因为河蚌多糖的收集地点、方式以及提取的工艺不同,使得河蚌多糖的获取不稳定。因此,规范河蚌多糖提取、含量测定以及分离纯化并使其标准化亟需解决。其次,虽然本实验制备的河蚌多糖水提取物能够抑制肿瘤细胞的生长,但我们并没有从中提取出可以抑制肿瘤细胞生长的单体。再次,划痕实验和 Transwell 迁移实验均验证了河蚌多糖水提取物对癌细胞的抑制作用,细胞迁移与上皮间质转化有着密不可分的联系^[12],可以通过蛋白免疫印记监测迁移相关蛋白(如 E-cadherin、N-cadherin)表达水平。通过高通量测序监测给药前后差异基因的表达,进一步探究其分子机制。最后,虽然先前有研究发现河蚌多糖体内能够抑

制小鼠肿瘤细胞生长,但是河蚌多糖水提取物对体内的抑癌效果及安全性未能得到评估,其具体的药理作用尚不明确。

综上所述,河蚌多糖水提取物能够抑制肝癌细胞 Hep3B、恶性黑色素瘤细胞 A375 和肺癌细胞 PC9 的增殖和迁移,这提示河蚌多糖水提取物可能成为潜在抗癌药物之一。在未来的研究中我们将继续探究河蚌多糖水提取物的体内、体外抑癌效果及相关机制。

参考文献:

- [1] 张思玮. 国家癌症中心-我国肺癌死亡人数居所有癌种首位[N]. 中国科学报, 2022-03-24(003)
- [2] ALZAREA S, KAZMI I, KUMBHAR P, et al. Unlocking the secrets: Volatile Organic Compounds (VOCs) and their devastating effects on lung cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2024, 255:155157
- [3] 刘险. 免疫检查点到个体化治疗策略的肺癌免疫治疗临床现状与进展[J]. *中国医学创新*, 2024, 21(7):179
- [4] TIAN Y, ZHOU Y, CHEN F, et al. Research progress in MCM family: focus on the tumor treatment resistance[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 173:116408
- [5] 陈攀, 李彦, 王佳慧, 等. PTPRO 通过减少 STAT3 磷酸化抑制黑色素瘤的恶性行为[J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2024, 38(2):127
- [6] HU C, LI J, YANG D, et al. A neuroprotective polysaccharide from *hyriopsis cumingii* [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73(9):1489
- [7] TALDAEV A, PANKOV D, TEREKHOV R, et al. Modification of the physicochemical properties of active pharmaceutical ingredients via lyophilization[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(11):2607
- [8] 胡水根, 严惠芳, 王奕军, 等. 圆背角无齿蚌有效组分脂质体抗小鼠肿瘤实验研究[J]. *中国海洋药物*, 2003(4):23
- [9] 罗宇慧, 彭蕴茹, 叶其正. 河蚌多糖抗肿瘤实验研究[J]. *江苏中医药*, 2007(10):72
- [10] QIU S, HUANG S, HUANG J, et al. Antitumor activity of the water-soluble polysaccharide from *hyriopsis cumingii* in vitro[J]. *Toxicol Ind Health*, 2010, 26(3):151
- [11] QIAO D, WEI C, KE C, et al. Effects of *hyriopsis cumingii* polysaccharides on angiogenesis, macrophage chemotaxis, proliferation and phagocytosis [J]. *Food Funct*, 2015, 6(3):869
- [12] KHAN A Q, HASAN A, MIR S S, et al. Exploiting transcription factors to target EMT and cancer stem cells for tumor modulation and therapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2024, 100:1

(收稿日期:2024-04-18)

TiO₂ 负载血浆凝血酶的制备及其对血液快速促凝性能的研究*

刘坤¹, 唐冬旭¹, 张洋林¹, 周士忠¹, 李月生^{2***}, 陈黄琴^{3***}

(1. 湖北科技学院医学部药学院, 湖北 咸宁 437100; 2. 湖北科技学院核技术与化学生物学院;
3. 湖北科技学院医学部口腔与眼视光医学院)

摘要:目的 探究 TiO₂ 负载血浆凝血酶的制备及其对血液快速促凝的作用, 以及用于止血材料的可行性。方法 通过在复钙血浆中加入 TiO₂ 纳米颗粒, 制备 TiO₂/血浆凝血酶促凝血材料, 并通过 BET、FTIR、XRD 等方式分析其组分结构, 通过凝血试验证明这种材料对血液的促凝效果, 并在常温下储存 28d 后, 测试促凝效果变化。结果 TiO₂/血浆凝血酶促凝材料具有良好的止血效果。凝血酶稳定地负载在 TiO₂ 中, 在室温下保存 28d 后, 仍可保持较高的凝血活性。在细胞毒性试验中, 浓度 25 ~ 100 μg/mL 的 TiO₂/血浆凝血酶均无明显细胞毒性。结论 血浆凝血酶在 TiO₂ 表面负载后, 具有快速凝血性、稳定性和安全性。TiO₂/血浆凝血酶有望在机体快速止血方面发挥潜在作用。

关键词: TiO₂/血浆; 凝血酶; 血液促凝; 细胞毒性

中图分类号: R318.08

文献标识码: A

文章编号: 2095-4646(2024)05-0384-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI: 10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0384



Study on the Preparation and Rapid Coagulation Blood Performance of TiO₂ Loaded Plasma Thrombin

LIU Kun, LI Yue-sheng, CHEN Huang-qin, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology,
Xianning Hubei 437100, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the preparation and rapid coagulation blood performance of TiO₂ loaded plasma thrombin, as well as the feasibility of using as hemostatic materials. **Methods** TiO₂/plasma thrombin promoting coagulation material was prepared by adding TiO₂ nanoparticles into calcium compound plasma, and its component structure was further demonstrated by means of BET, FTIR, XRD, etc. The effect of this material on blood coagulation was proved by coagulation test, and changes in the procoagulant effect were tested after 28 d of storage at room temperature. **Results** TiO₂/plasma thrombin procoagulant had good hemostatic effect. The thrombin was stably loaded in TiO₂ and maintained high coagulation activity after 28 d of storage at room temperature. In the cytotoxicity test, TiO₂/ plasma thrombin showed no obvious cytotoxicity at 25 ~ 100 μg/mL concentration. **Conclusion** Plasma thrombin has rapid coagulability, stability and safety after loading on TiO₂ surface. TiO₂/plasma thrombin is expected to play a potential role in rapid hemostasis.

KEY WORDS: TiO₂/plasma; Thrombin; Blood coagulation; Cytotoxicity

血液凝固是一个复杂的过程, 它涉及多种血浆蛋白、血小板和血管壁的相互作用^[1]。因此, 制备具有快速止血, 且对人体没有细胞毒性的促凝材料一直是生物医学领域的研究热点。近年来, 无机纳米技术在血液凝固领域的应用受到了广泛

关注。无机纳米材料因其独特的物理化学性质, 如高比表面积、良好的生物相容性和易于表面修饰等^[2], 为血液凝固提供了新的可能性。无机纳米材料的表面通常具有高度活性, 能够与血液中的凝血因子、血小板等成分发生相互作用, 这种相

* 基金项目: 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队项目(T2020022); 咸宁市科技研究与开发(高新类研发重点专项)项目(2021GXYY021); 湖北省大学生创新创业训练计划项目(S201910927021); 湖北科技学院科学发展基金(2021ZX01, 2022FH09)

** 通讯作者, E-mail: frank78929@163.com; chehuangqin79@163.com

互作用可以促进凝血因子的激活和聚集,从而加速血液凝固过程。 TiO_2 作为常见的无机纳米材料,在生物医学领域具有广泛的应用前景^[7-8]。 TiO_2 具有较强的稳定性和较大的比表面积,其表面含有很多羟基,可以与氨基酸中的羧基结合在一起,形成较为稳定的结构^[9]。

凝血酶是血液凝固过程的关键一步,具有高效止血功能^[3]。凝血酶的提取比较复杂,市场上售卖的凝血酶冻干粉价格较高,并不适宜作为一种普遍的止血产品。凝血酶是一种生物活性物质,必须在低温下储存,常温条件下的凝血酶非常容易失活^[4]。因此,凝血酶不宜直接用于常规的血液促凝。血液中含有大量的凝血酶,抗凝血浆在结合钙离子后会产生大量凝血酶,使血浆凝固^[5]。正常人 1mL 血浆含凝血酶原约 300 单位,在凝血时通常可以全部激活转化为凝血酶^[6],但血浆中也有很强的抗凝血酶活性。因此,如何有效地利用血浆中产生的凝血酶使其不被大量抗凝血酶抑制具有重要意义。

本研究选择 TiO_2 作为血浆的载体,使血浆中产生的凝血酶负载在 TiO_2 上,制备 TiO_2 /血浆凝血酶促凝血材料,并研究它们对血液促凝效果的影响,同时,也探讨 TiO_2 /血浆凝血酶在常温条件下长时间储存后促凝效果的变化。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

冷冻干燥机(SCIENTZ-10N,宁波新芝生物科技股份有限公司);超声波清洗机(SB25-12DTDN,宁波新芝生物科技股份有限公司);HH-1 智能数显恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司);粉末 X 射线衍射仪(XRD-6100,日本岛津);傅里叶变换红外光谱仪(港东 FTIR-650,天津科技发展股份有限公司);比表面积分析仪(NOVA touch 美国康塔仪器公司);高压灭菌锅(DZF-6030,上海一恒科学仪器有限公司);恒温鼓风干燥箱(DHG-9030A,上海一恒科学仪器有限公司);离心机(JJ-1,江苏金坛区城东新瑞仪器厂);紫外可见分光光度计(UV-1800 PC,青岛精诚仪器仪表有限公司);洁净工作台(SW-CJ-IG,苏净集团国泰公司);二氧化碳细胞培养箱(Forma 310,美国赛默飞世尔科技公司);荧光倒置显微镜(IX51,日本奥林巴斯);台式超纯水机(UPT-11-10T,四川优普超纯科技有限公司);酶标分析仪(318C+,上海沛欧仪

器有限公司)。

TiO_2 (P25 购自德国德固赛 Degussa 公司);兔血浆、凝血酶发色底物 S-2238、凝血酶、活化部分凝血酶时间(APTT)检测试剂盒(上海源叶生物科技有限公司);凝血酶原时间(PT)检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);胰酶、L929 培养基、PBS 缓冲溶液、Hoechst 33342 染色液、PI 染色液、MTT 试剂盒(武汉普诺赛生命科技有限公司);无水氯化钙(阿拉丁试剂上海有限公司);无菌采血针、枸橼酸钠采血管(威海赛威医疗科技有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 材料制备方法

(1)新鲜血浆的制备。将家兔仰卧固定在手术台上,在心脏部位备皮,用碘伏消毒皮肤,选择心搏最明显处刺入无菌采血针,见回血后另一头插入枸橼酸钠采血管。待取得所需血量后,迅速将针头拔出摇匀采血管,防止血液凝固。在 3000r/min 条件下,离心 10min,收集上层清液,转移至无菌离心管中,即为缺血小板新鲜血浆(PPP)。

(2) TiO_2 /血浆凝血酶制备。取无水氯化钙 3.4333g 溶于 1L 的去离子水中,制备出 25mmol/L 的 CaCl_2 溶液,取 4mL 溶液加 0.3g TiO_2 ,搅拌、超声,制备出 $\text{TiO}_2/\text{CaCl}_2$ 溶液。取 4mL PPP 加入 $\text{TiO}_2/\text{CaCl}_2$ 溶液中,在 37℃ 水浴锅温育 30min,离心、洗涤重复 3 次,放入冷冻干燥机中冷干、研磨,得到 $\text{TiO}_2/\text{PPP}(\text{TiO}_2/\text{P})$ 凝血粉。

1.2.2 凝血酶原时间(PT)实验

取 0.01g TiO_2/P 粉溶于 4mL PT 凝血活酶溶液中记为溶液 a,分别取 0.14mL 溶液 a 与 0.07mL PPP 置于 37℃ 水浴锅中,温浴 3min。将二者混合,立即计时,重复倾斜试管,记录液体停止移动的时间。实验重复 3 次。

1.2.3 活化部分凝血酶时间(APTT)实验

取 TiO_2/P 10mg 溶于 4mL CaCl_2 (25mmol/L) 溶液,在 37℃ 水浴锅中温浴。将 APTT 鞣花酸溶液平衡至室温,颠倒混匀。取 0.1mL APTT 鞣花酸溶液加入 0.1mL PPP 中,在 37℃ 水浴锅中 5min 混匀。取 0.1mL TiO_2/P CaCl_2 加入混合液中,立即计时,置于 37℃ 水浴锅中不断振荡,约 30s 时取出,观察纤维蛋白丝出现时间,实验重复 3 次。

1.2.4 不同浓度的 TiO_2/P 对血浆的促凝效果

以 25mmol/L CaCl_2 溶液为溶剂,分别制备 0、1、2、5、10、15mg/mL 的 TiO_2/P 溶液,并与血浆 1:1 混合,测量凝血时间,实验重复 3 次。

1.2.5 体外全血凝固时间测定

取家兔心脏全血,注入枸橼酸钠抗凝采血管中,摇匀,防止血液凝固,制备出枸橼酸钠抗凝全血。分别取 TiO_2 、 TiO_2/P 10mg 溶于 4mL CaCl_2 溶液中,吸取 2mL TiO_2 和 TiO_2/P 溶液,分别加入 37℃ 2mL 的枸橼酸钠抗凝全血中,每隔 10s 倾斜离心管,记录血浆凝固所需时间,实验重复 3 次。

1.2.6 TiO_2/P 中凝血酶含量的测定

把 1KU 凝血酶和凝血酶显色底物 S-2238 分别溶于 PBS (pH = 7.4, 0.1mol/L) 中,制备出 30、60、120、250、500U/mL 的凝血酶溶液,S-2238 的浓度为 8×10^{-5} mol/L。取 1mL 不同浓度的凝血酶和 1mL S-2238 混合,在 37℃ 水浴锅中 10min,离心,用紫外分光光度计在 405nm 处测定吸光度,制备出凝血酶的标准曲线。取 10mg TiO_2/P 溶于 1mL PBS 并加入 1mL S-2238,在 37℃ 水浴锅中离心 10min,用紫外分光光度计在 405nm 处测定吸光度,根据标准曲线计算出凝血酶的含量。

1.2.7 溶血率实验

取 2mL 兔抗凝全血,加入 2mL 生理盐水,在 3000rpm 下离心 10min,去除上清液,加生理盐水,离心,去除上清液,重复 2 次,得到红细胞。加入生理盐水稀释制备出 2% 的红细胞悬液。把 TiO_2/P 溶于生理盐水配制成 10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。在不同浓度的 TiO_2/P 溶液中加入 1mL 红细胞悬液,在 37℃ 水浴锅离心 1h,用紫外分光光度计在 540nm 波长下测定上清液的吸光度。以生理盐水作为阴性对照组、去离子水作为阳性对照组,溶血率计算公式如下:

$$\text{溶血率}(\%) = \frac{A_{\text{样品组}} - A_{\text{阴性对照}}}{A_{\text{阳性对照}} - A_{\text{阴性对照}}} \times 100\%$$

1.2.8 细胞毒性试验

MTT 法检测 L929 细胞活力,钙黄绿素 (Calcein-AM)/碘化丙啶 (PI)/Hoechst 33342 染色液检测 L929 细胞凋亡。把 L929 细胞接种于 96 孔板和 6 孔板中,放入 90% DMEM 高糖培养基于 5% CO_2 、37℃ 培养箱中培养。分别在 96 孔板中加入 TiO_2 、 TiO_2/P ,使其浓度为 0、25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对照组加入等体积的 L929 培养基,培养 24h 后加入 MTT 液体进行测试。在 6 孔板中分别加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 TiO_2 、 TiO_2/P ,置于 5% CO_2 、37℃ 培养箱中培养 24h,然后加入 Calcein-AM/PI/Hoechst 33342 进行三染测试,并使用倒置荧光显微镜观察细胞活力,实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

数据采取(平均数 ± 标准差)表示,Turkey 多重比较方法进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 代表具有统计学差异。

2 结果

2.1 样品的表征

图 1a 为 TiO_2 介孔材料的比表面积(BET)图。 TiO_2 的比表面积为 41.85 m^2/g ,这可以为血浆中的凝血因子提供更多的附着位点。图 1b 所示, TiO_2 晶面在 25.28°、37.80°、48.05°、53.98°、55.18°、62.65°、68.9°、70.29°、75.1° 分别对应锐钛矿型的 (101)、(004)、(200)、(105)、(211)、(204)、(116)、(220)、(215),晶面在 27.44°、36.14°、41.18° 的衍射峰归属于金红石相的 (110)、(101)、(111) 面^[10]。 TiO_2/P 表面由于血浆凝血酶的负载,峰的强度减弱。图 1c 红外光谱 (FTIR) 分析, TiO_2 在 663 cm^{-1} 范围出现宽的振动带,该宽振动带为 Ti-OH 的特征吸收带^[11-12],3428 cm^{-1} 和 1650 cm^{-1} 左右为水分子中-OH 的弯曲振动和伸缩振动峰、 TiO_2/P 在 1542 cm^{-1} 处出现了 N-H 弯曲振动及 C-N 的伸缩振动峰、酰胺 II 带,同时 1650 cm^{-1} 处吸收峰与水分子中-OH 峰重叠在一起,这是由于凝血酶中仲酰胺 (-CO-NH-) 中 C=O 的特征峰,对应着酰胺 I 带^[13]。从图 1d 可以看出 TiO_2 是一种纳米颗粒,在与复钙血浆结合后,会使 TiO_2 形成 TiO_2/P 聚集物,如图 1e 所示。

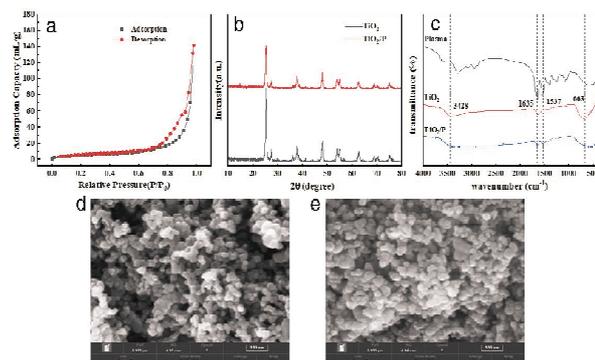


图 1 TiO_2 和 TiO_2/P 的表征图

2.2 凝血酶含量、APTT、PT 时间分析

图 2a 为不同浓度凝血酶的紫外吸收图,S-2238 可被凝血酶催化水解,释放出发色基团对硝

基苯胺(pNA), pNA可在405nm波长处检测到, 由此可以制备出凝血酶标准曲线(图2b)。如图2c所示, TiO₂/P在405nm处测定吸光度值为2.0863。根据标准曲线计算出每10mg TiO₂/P中凝血酶含量约为76U。图2d为TiO₂/P的浓度与凝血效果的关系, 在浓度为10mg/mL时, 对血浆的促凝效果达到最好。

如图2e所示, TiO₂/P的APTT时间为(26.0 ± 1.0)s, 相比于对照组(34.5 ± 0.5)s, TiO₂/P凝血剂均可以显著降低活化部分凝血酶时间, 这也表明TiO₂/P凝血剂存在内源凝血途径。血浆中有大量的凝血酶等凝血因子负载到TiO₂中, 在TiO₂/P与血液接触时, 凝血因子快速释放, 加速凝血。如图2f所示, TiO₂/P凝血粉的PT时间为(17.0 ± 0.3)s, 相比于对照组(22.0 ± 0.3)s, TiO₂/P凝血剂可以显著降低凝血酶原时间, 这也表明了TiO₂/P凝血粉可以在凝血过程中, 对外源性凝血途径起到良好的促进作用。

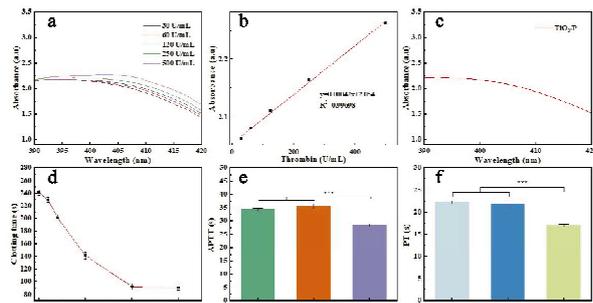


图2 a. 凝血酶的紫外吸收图; b. 凝血酶的标准曲线图; c. TiO₂/P的紫外吸收图; d. TiO₂/P与凝血时间的关系; e. TiO₂、TiO₂/P的APTT时间; f. TiO₂和TiO₂/P的PT时间 (** * P < 0.001, n = 3)。

图2 TiO₂/P中凝血酶的负载率及凝血效果图

2.3 TiO₂/P的体外全血凝固时间分析及溶血率分析

体外全血凝固时间实验可以有效地测试材料的凝血性能, 如图3a所示, TiO₂、TiO₂/P对全血凝固都有促进效果, TiO₂/P的血液促凝效果最好, 在201s左右就可以使全血完全凝固。如图3b所示, TiO₂/P分别在室温下放置0、7、14、28d之后测试其体外全血凝固时间分别为(201 ± 6)s、(212 ± 3)s、(225 ± 3)s、(232 ± 4)s, 这也表明了TiO₂与血浆结合后可以保持其表面产生的凝血酶在经过长时间的保存后, 仍能保持较高的凝血活性, 这也为材料运用于临床提供了支持。图3c表明TiO₂/P在不同浓度下的溶血率均小于1%, 说明TiO₂/P即使在较高浓度下对红细胞的细胞形态也无明显

影响。

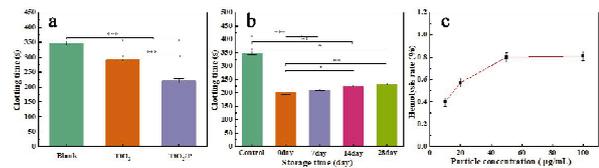


图3 a. TiO₂/P对全血的凝固时间; b. TiO₂/P不同储存时间的体外全血凝固时间; c. TiO₂/P的溶血率 (* P < 0.05, ** P < 0.01, ** * P < 0.001, n = 3)。

图3 TiO₂/P对全血的促凝效果及溶血率图

2.4 细胞毒性结果

使用Calcein-AM/Hoechst 33342和PI染色剂可以观察L929细胞凋亡情况。在倒置荧光的观察下(图4), 与对照组相比, TiO₂、TiO₂/P在50μg/mL的浓度下均没有表现出明显的细胞毒性。MTT结果所示(图5), TiO₂在0~100μg/mL的浓度范围内, 对L929细胞的生长抑制几乎没有影响。负载了血浆凝血酶的TiO₂纳米颗粒TiO₂/P也没有表现出明显的细胞毒性, 随着纳米材料浓度增加, 其对细胞的活力抑制也逐渐增加, 但细胞整体活力仍高于90%。

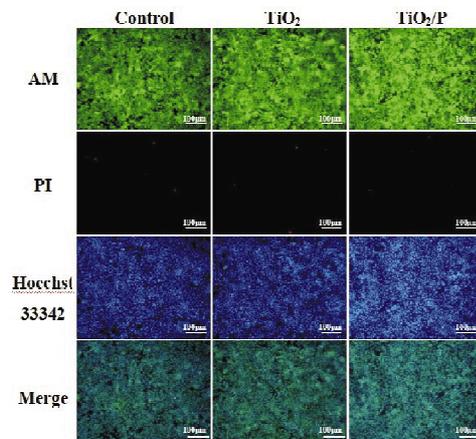


图4 AM/PI/Hoechst 33342染色检测L929细胞凋亡

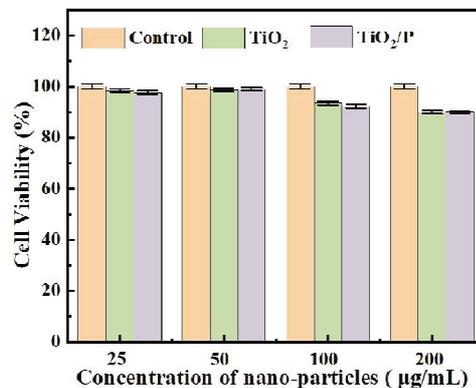


图5 不同浓度TiO₂、TiO₂/P培养L929细胞的MTT图(n = 3)

3 讨论

用枸橼酸钠制备的血浆在与钙离子接触时会重新触发凝血,在凝血过程中会产生大量的凝血酶,这些凝血酶被吸附在纳米材料表面,形成稳定的纳米凝血材料。 TiO_2 凝血效果可能与血小板在其表面吸附、聚集,形成血凝块,加速血液凝固有关^[14]。 TiO_2/P 的凝血效果更强,除了纳米材料本身的促凝效果,其表面负载的凝血酶在与血液接触的过程中可以促进凝血级联中的内源性和外源性凝血,从而加速全血的凝固。本实验结果表明, TiO_2/P 对血液的溶血率低于 1%,这表明了其具有良好的血液相容性; TiO_2/P 在常温下放置 28 天后仍可保持较高的促凝活性,这说明了该凝血材料具有较好的稳定性;细胞毒性实验表明 TiO_2 、 TiO_2/P 均无明显细胞毒性,这说明血浆中的凝血酶负载到纳米材料中,并不会增加纳米材料对细胞的毒性,表明了该凝血材料的安全性。 TiO_2/P 具有快速凝血、稳定性、血液相容性、安全性等特点,这为其临床应用提供了可行性。因此, TiO_2/P 纳米材料在快速血液促凝方面有很大的应用前景。未来,将进一步研究 TiO_2/P 的凝血机制和应用范围,为临床止血治疗提供新的有效手段。

参考文献:

- [1] MROZINSKA Z, KUDZIN M H, PONCZEK M B, et al. Biochemical approach to poly (lactide)-copper composite-impact on blood coagulation processes [J]. *Materials*, 2024, 17(3) :608
- [2] SHAO H, WU X, DENG J, et al. Application and progress of inorganic composites in haemostasis: a review [J]. *Journal of Materials Science*, 2024, 4:1
- [3] ZHANG Q D, DUAN Q Y, TU J, et al. Thrombin and thrombin-incorporated biomaterials for disease treatments [J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13(5) :2302209
- [4] RIMAC V, HERAK D C. Is it acceptable to use coagulation plasma samples stored at room temperature and 4°C for 24 hours for additional prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen, antithrombin, and D-dimer testing? [J]. *Int J Lab Hematol*, 2017, 39(5) :475
- [5] 赵文秀, 马骏, 王志晓, 等. 铭悦茜白片对小鼠出血、凝血、血浆复钙时间及血小板计数的影响 [J]. *甘肃中医药大学学报*, 2020, 37(1) :37
- [6] 王庭槐. 生理学 [M]. 第 9 版. 北京:人民卫生出版社, 2018:77
- [7] LI Y S, HAN Y, QIN J T, et al. Photosensitive antibacterial and cytotoxicity performances of a TiO_2 /carboxymethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) nanocomposite hydrogel by in situ radiation construction [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2016, 133(44) :44150
- [8] LI G W, ZHAO Y Q, WANG H C, et al. The M2 macrophages derived migrasomes from the surface of titania nanotubes array as a new concept for enhancing osteogenesis [J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 23:2400257
- [9] 李云龙. 止血材料开发及其表面功能蛋白研究 [D]. 浙江:浙江大学, 2014
- [10] LIAO Y, QIAN J, XIE G, et al. 2D-layered Ti_3C_2 MXenes for promoted synthesis of NH_3 on P25 photocatalysts [J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2020, 273:119054
- [11] COLLADO L, GARCIA M, GOMEZ M, et al. Unravelling charge dynamic effects in photocatalytic CO_2 reduction over TiO_2 : anatase vs P25 [J]. *Catalysis Today*, 2023, 423:114279
- [12] YANG J Y, LIU D L, LI Y S, et al. Radiation construction and excellent performances of Ag NPs/ TiO_2 /PEG/PVP multifunctional aerogel: Adsorption-photocatalytic degradation, photosensitive antibacterial and cytotoxicity [J]. *Journal of Materiomics*, 2023, 10(3) :585
- [13] CUNHA A V, BONDARENKO A S, JANSEN T L. Assessing spectral simulation protocols for the amide I band of proteins [J]. *J Chem Theory and Comput*, 2016, 12(8) :3982
- [14] HUANG H H, CHEN Z H, NGUYEN D T, et al. Blood coagulation on titanium dioxide films with various crystal structures on titanium implant surfaces [J]. *Cells*, 2022, 11(17) :2623

(收稿日期:2024-04-18)

基于斑马鱼糖尿病合并肝损伤模型评价 黄精复方制剂作用及其机制*

王洁琼¹, 孟丽媛¹, 杨洪飞¹, 葛婷婷¹, 卢雨菲¹, 陈祺¹, 要辉^{1,2}, 闵清^{1,2**}

(1. 湖北科技学院医学部药学院, 湖北咸宁 437100; 2. 鄂南特色中药湖北省工程研究中心)

摘要:目的 研究黄精复方制剂(PSCP)对斑马鱼糖尿病合并肝损伤的保护作用及机制。方法 将120条发育正常4~6月龄野生型AB系斑马鱼随机分为空白对照组(Control组), 模型组(Model组), 阳性对照组(0.01 mg/mL二甲双胍, MET组), PSCP低、中、高剂量组(0.05、0.1、0.2 mg/mL)。通过高脂高糖的方法构建斑马鱼糖尿病肝损伤模型, 经不同给药浓度干预20d后, 测定组织匀浆中葡萄糖、ALT、AST、SOD、MDA、GSH-Px含量; HE染色观察斑马鱼肝脏组织形态学变化, Western blot法检测斑马鱼组织中AMPK、Sirt1、NF- κ B、NLRP3、Caspase-1、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6蛋白的表达情况。结果 与Control组相比, Model组斑马鱼空腹血糖水平上升, 且一定程度上损伤肝组织, 其中AMPK/Sirt1蛋白表达下调($P < 0.01$)。PSCP干预后, 与Model组相比, 各给药组均可有效降低斑马鱼空腹血糖水平, 且能改善肝组织损伤, 其中AMPK/SIRT1蛋白表达水平明显上升($P < 0.01$), NF- κ B、NLRP3、Caspase-1、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6蛋白表达水平明显下调($P < 0.01$)。结论 PSCP对斑马鱼糖尿病合并肝损伤具有一定的保护作用, 其作用机制可能与上调AMPK/Sirt1信号通路蛋白水平, 下调NF- κ B蛋白水平, 降低NLRP3、Caspase-1表达, 减少炎症因子TNF- α 、IL-1、IL-6的释放有关。

关键词:黄精复方制剂; 斑马鱼; 糖尿病合并肝损伤; AMPK/Sirt1/NF- κ B

中图分类号: R-332

文献标识码: A

文章编号: 2095-4646(2024)05-0389-006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI: 10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0389



Evaluation of the Effects and Mechanism of Polygonatum Sibiricum Compound Preparation Based on Zebrafish Model of Diabetes Mellitus Complicated with Liver Injury

WANG Jie-qiong, MENG Li-yuan, MIN Qing, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology,
Xianning Hubei 437100, China)

ABSTRACT: Objective To study the protective effect and mechanism of Polygonatum sibiricum compound preparation (PSCP) on zebrafish diabetes mellitus complicated with liver injury. **Methods** 120 wild-type AB zebrafish aged 4-6 months with normal development were randomly divided into control group (Control group), model group (Model group), positive control group (0.01 mg/mL metformin, MET group), and PSCP low, medium and high dose groups (0.05, 0.1, and 0.2 mg/mL). The zebrafish diabetes mellitus complicated with Liver Injury model was established by high fat and high sugar method. After 20 days of intervention with different administration concentrations, the contents of glucose, ALT, AST, SOD, MDA and GSH-Px in tissue were determined. The liver histomorphology of zebrafish was observed by HE staining. The expressions of AMPK, Sirt1, NF- κ B, NLRP3, Caspase-1, TNF- α , IL-1 β and IL-6 in Zebrafish tissues were detected by Western blotting. **Results** Compared with the Control group, the fasting blood glucose level of Zebrafish in Model group was increased, and liver tissue was damaged, in which AMPK/Sirt1 expression was down-regulated ($P < 0.01$). After PSCP intervention, compared with Model group, all drug administration groups could effectively reduce the fasting blood glucose level and improve liver tissue injury, and the expression level of AMPK/SIRT1 was significantly up-regulated ($P < 0.01$). The expression levels of NF- κ B, NLRP3, Caspase-1, TNF- α , IL-1 β and IL-6 were significantly down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion** PSCP has a protective effect against diabetes-combined liver injury in zebrafish, and its mechanism may be related to up-regulating AMPK/Sirt1 signaling pathway level, down-regulating NF- κ B, NLRP3

* 基金项目: 湖北科技学院医学科研专项基金项目(2022YKY03)

** 通讯作者, E-mail: haimin0628@163.com

and Caspase-1 expression, and reducing the release of inflammatory factors TNF- α , IL-1 and IL-6.

KEY WORDS: Polygonatum sibiricum compound preparation; Zebrafish; Diabetes mellitus with liver injury; AMPK/Sirt1/NF- κ B

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种由遗传和环境因素相互作用所致的机体胰岛素分泌不足的代谢性疾病,会引起糖代谢紊乱,同时伴有脂肪、蛋白质等代谢障碍^[1]。其中糖尿病合并肝损伤的主要诱因由糖代谢异常和脂肪代谢紊乱导致^[2],在长期的高血糖并且持续的代谢紊乱条件下,肝细胞表现为大泡性脂肪滴聚集、气球样变。长期的脂质堆积导致肝脏脂肪病变,脂质过氧化,促炎细胞因子释放,最终导致肝脏组织不可逆的损伤^[3]。

近年来有很多国内外学者从事了有关中草药治疗糖尿病的研究^[4],但对于糖尿病肝损伤的研究较少。黄精又名鸡头黄精,为黄精属植物,是一种中国传统的药食同源中药材和大宗药材,具有甘甜的香气和味道,同时还具有许多药理应用和生物活性,例如降糖、抗氧化活性、刺激免疫系统、抗炎等功效,在治疗糖尿病、疲劳虚弱、心血管系统疾病等疾病中具有良好的效果^[5]。本研究根据补气养阴、清热燥湿、泻火解毒的中药配伍原则,选用黄精为主药,以枸杞、白菊花以及熟地黄为辅药,制成黄精复方制剂(PSCP)进行研究,预期会对糖尿病合并肝损伤有保护作用。

斑马鱼是一种脊椎动物,与人类基因同源性高达85%,其信号传导通路与人类基本近似,具有体积小、发育周期短、单次产卵数较多等优点^[6]。研究^[7]表明,斑马鱼胰腺与人类胰腺的同源性很高,且结构和成分与人类相似,血糖调控机制与哺乳动物高度一致。本研究将基于斑马鱼糖尿病合并肝损伤模型评价PSCP的保护作用,探究其作用机制,通过改善糖尿病合并肝损伤的关键环节来寻找有效的临床治疗药物。

1 材料与方法

1.1 实验动物

AB品系斑马鱼,购自武汉市万物源实验器材经营部,饲养条件为:光照14h,黑暗10h,温度(28 \pm 0.5) $^{\circ}$ C。采用自然交配的方式使斑马鱼进行繁殖。以1:1的比例在产卵盒中放入雄鱼与雌鱼,在28.5 $^{\circ}$ C条件下恒温培养,提前在黑暗条件下适应10h,于第2天早上将隔板抽开进行光照,6h后收集胚胎,并在光学显微镜下去除死卵以及粪便,

置于28.5 $^{\circ}$ C条件下恒温培养,每24h换水一次,去除卵膜及死卵。

1.2 黄精复方制剂的制备

我们根据补气养阴、清热燥湿、泻火解毒的中药配伍原则,选用黄精为主药,以枸杞、白菊花以及熟地黄为辅药,按照一定配比,依次经过浸泡-煮沸-二次煎煮-混合-旋蒸-冷冻干燥,最后得到PSCP粉末作为实验用药物。其中黄精购自湖北领康中药材有限公司,枸杞、白菊花、熟地黄购自咸宁市中医医院。

1.3 实验试剂

葡萄糖(批号:20230305,上海国药集团有限公司);胆固醇(批号:C13463309,麦克林公司);二甲双胍(Metformin, MET, 批号:I2212086,阿拉丁化学试剂有限公司);葡萄糖(Glu)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)、血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)试剂盒(南京建成生物有限公司);RIPA强裂解液、蛋白酶抑制剂(大连美仑生物技术有限公司);SDS-PAGE凝胶试剂盒(武汉塞维尔生物科技有限公司);Sirt1、AMPK、NF- κ B、NLRP3、Caspase-1、TNF- α 、IL-1、IL-6、GAPDH、HRP-标记羊抗兔IgG抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司)。

1.4 仪器

SPARK型酶标仪(瑞士TECAN公司);低温高速离心机TGL-20M(湖南湘仪离心机仪器有限公司);电泳仪、转印槽、免疫印迹工作站(美国BIO-RAD公司);组织脱水机、石蜡包埋机、切片机、摊片机、正置光学显微镜(Lecia公司)。

1.5 方法

1.5.1 PSCP对斑马鱼发育毒性的研究

随机选取4dpf(days post fertilization)斑马鱼,30条/孔/实验组,分组给药。分别给予0.0125、0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6和3.2mg/mL的PSCP水溶液,同时设置空白对照组(超纯水环境),置于6孔板中,每孔容量为6mL。每天换一次含药的培养基,给药周期为8d。在实验过程中,对斑马鱼形态及死亡情况进行及时记录,以确

定不同浓度 PSCP 对斑马鱼的毒性作用,同时确认后续实验给药低、中、高剂量。

1.5.2 斑马鱼糖尿病合并肝损伤模型的构建及分组

将 120 条 4~6 月龄斑马鱼适应性喂养一周后,随机分为 Control 组、Model 组(2% 葡萄糖 + 10% 胆固醇饲料)、MET 组(0.01mg/mL)、PSCP 低剂量组(0.05mg/mL)、PSCP 中剂量组(0.1mg/mL)、PSCP 高剂量组(0.2mg/mL)。除 Control 组外,其余各组连续 10d,采用 2% 葡萄糖浸泡联合喂养 10% 胆固醇饲料的方法,构建斑马鱼糖尿病合并肝损伤模型。第 15d 后每日浸泡药液 20min,持续 20d,药液每天更换。

1.5.3 生化指标的测定

末次给药结束后,24h 禁食,将斑马鱼置于冰水混合液 2min,超纯水清洗 2 次,去除斑马鱼头部及尾鳍,加入 PBS 作为缓冲液,利用组织研磨机进行匀浆至鱼体组织裂解充分,之后于 4℃,4000rpm 离心 10min,得到上清液。根据试剂盒说明书对 GLU、ALT、AST、SOD、MDA、GSH-Px、TC、TG、LDL、HDL 等生化指标进行测定。

1.5.4 肝脏组织的 HE 染色

取 4% 多聚甲醛固定 24h 斑马鱼组织,采用自动脱水机梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡固定,之后进行石蜡包埋,切片,HE 染色后观察病理组织变化。

1.5.5 组织中蛋白质表达的测定

提取各组斑马鱼肝组织中总蛋白,并使用 BCA 法进行蛋白浓度测定,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,湿法转膜,封闭,一抗、二抗孵育后,使用 ECL 显色试剂盒进行显影,使用 Image Lab Software 分析灰度值。

1.6 统计学方法

数据均采用($\bar{x} \pm s$)表示,用 Graphpad prism 8.0 软件分析,所有数据进行正态性检验后用 one-way ANOVA 方差分析, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果

2.1 PSCP 对斑马鱼发育毒性的研究

如表 1 所示,8d 内可以观察到 0.8、1.6、3.2mg/mL 浓度组出现尾部畸形情况,1.6、3.2mg/mL 浓度组出现死亡情况。给药结束后,0.4mg/mL 浓度组出现 1 条尾部畸形情况,但未有

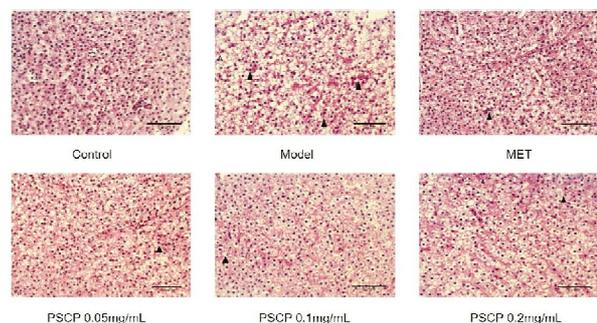
死亡情况出现。以上结果提示,与 Control 组相比,PSCP 0~0.2mg/mL 对斑马鱼无明显影响,为安全浓度范围。因此,选取 0.05、0.1、0.2mg/mL 作为 PSCP 的低、中、高浓度。

表 1 不同浓度的 PSCP 对斑马鱼发育毒性的影响

| 组别 | PSCP 浓度/(mg/mL) | 斑马鱼总数/n | 死亡率/% | 畸形率/% |
|-----------|-----------------|---------|-------|-------|
| Control 组 | 0 | 30 | 0 | 0 |
| PSCP 组 | 0.0125 | 30 | 0 | 0 |
| | 0.025 | 30 | 0 | 0 |
| | 0.05 | 30 | 0 | 0 |
| | 0.1 | 30 | 0 | 0 |
| | 0.2 | 30 | 0 | 0 |
| | 0.4 | 30 | 0 | 3.33 |
| | 0.8 | 30 | 0 | 3.33 |
| | 1.6 | 30 | 10 | 7.41 |
| 3.2 | 30 | 16.67 | 8.00 | |

2.2 PSCP 对斑马鱼糖尿病合并肝损伤肝脏损伤病理变化的影响

通过对不同组别的肝组织切片染色发现,Control 组斑马鱼肝组织结构完整,肝细胞排列规则紧密,未见炎症细胞聚集;相较于 Control 组,Model 组肝结构紊乱,肝小叶结构消失,大量炎症细胞聚集,肝脏受损严重;MET 组肝组织有轻微空泡样变性,少量炎症细胞浸润;PSCP 低剂量给药组中,细胞严重空泡性样变并排列紊乱,PSCP 中剂量给药组中肝组织病变程度轻于低剂量组,偶见空泡样变性,PSCP 高剂量给药组中相较低、中剂量组损伤程度较轻,少量炎症细胞浸润,组织结构较为完整。



▲:淋巴细胞,巨噬细胞聚集;△:气球样变。

图 1 肝脏组织的病理变化($\times 400$)

2.3 PSCP 对斑马鱼糖尿病合并肝损伤糖脂代谢的影响

血糖在反应胰岛 β 细胞功能的同时,常以一种检测指标用于糖尿病的临床诊断及动物模型实

验中。同时脂代谢与糖代谢关系密切,糖尿病合并肝损伤的主要诱因就是由糖代谢和脂代谢紊乱引起,故将 GLU、TC、TG、LDL、HDL 指标共同评价。结果如表 2 所示。

与 Control 组比较, Model 组中 GLU、TC、TG、LDL 水平显著升高($P < 0.01$), HDL 水平显著降低($P < 0.01$);与 Model 组相比, MET 组与 PSCP 高剂量组中 GLU、TC、TG、LDL, PSCP 中剂量组中 GLU、LDL 以及 PSCP 低剂量组中 LDL 水平显著降低($P < 0.01$), PSCP 低剂量组 GLU 水平降低($P < 0.05$), HDL 水平 PSCP 中剂量组升高($P < 0.05$), PSCP 高剂量组显著升高($P < 0.01$)。

表 2 PSCP 对斑马鱼糖尿病合并肝损伤脂代谢的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | GLU/(mg/dL) | TC/(mmol/g prot) | TG/(mmol/g prot) | LDL/(mmol/g prot) | HDL/(mmol/g prot) |
|-----------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Control | 25.155 ± 8.478 | 0.165 ± 0.055 | 0.046 ± 0.020 | 0.046 ± 0.021 | 0.060 ± 0.027 |
| Model | 75.382 ± 17.589 [#] | 0.409 ± 0.196 [#] | 0.174 ± 0.066 [#] | 0.344 ± 0.111 [#] | 0.018 ± 0.013 [#] |
| MET | 39.685 ± 7.996 ^{**} | 0.209 ± 0.105 ^{**} | 0.063 ± 0.028 ^{**} | 0.059 ± 0.031 ^{**} | 0.074 ± 0.018 ^{**} |
| PSCP(0.05mg/mL) | 60.345 ± 14.392 [*] | 0.374 ± 0.111 | 0.142 ± 0.050 | 0.260 ± 0.090 ^{**} | 0.028 ± 0.015 |
| PSCP(0.10mg/mL) | 50.032 ± 11.739 ^{**} | 0.318 ± 0.093 | 0.130 ± 0.027 | 0.195 ± 0.067 ^{**} | 0.041 ± 0.008 [*] |
| PSCP(0.20mg/mL) | 42.656 ± 8.340 ^{**} | 0.221 ± 0.089 ^{**} | 0.102 ± 0.026 ^{**} | 0.197 ± 0.067 ^{**} | 0.065 ± 0.013 ^{**} |

与 Control 组比较, # $P < 0.01$;与 Model 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.4 PSCP 对斑马鱼糖尿病合并肝损伤 AST、ALT 的影响

与 Control 组比较, Model 组斑马鱼明显出现了肝损伤,具体表现在转氨酶 AST 和 ALT 含量显著升高($P < 0.01$),与 Model 组相比, MET 组及 PSCP 各剂量给药组 AST、ALT 指标均有一定程度的降低, MET 组中 AST、ALT 水平显著性降低($P < 0.01$), PSCP 中、高剂量组中 AST、ALT 水平也显著降低($P < 0.01$)。见表 3。以上结果表明 PSCP 对斑马鱼糖尿病肝损伤具有一定的改善作用,改善效果与剂量相关。

表 3 PSCP 对斑马鱼糖尿病合并肝损伤 AST、ALT 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | AST/(U/g prot) | ALT/(U/g prot) |
|-----------------|------------------------------|------------------------------|
| Control | 36.390 ± 2.410 | 5.320 ± 2.716 |
| Model | 28.233 ± 8.025 [#] | 27.540 ± 11.775 [#] |
| MET | 8.564 ± 6.962 [*] | 13.453 ± 4.409 [*] |
| PSCP(0.05mg/mL) | 17.034 ± 7.358 [*] | 23.157 ± 10.513 |
| PSCP(0.10mg/mL) | 14.268 ± 11.122 [*] | 20.557 ± 4.148 [*] |
| PSCP(0.20mg/mL) | 10.585 ± 8.275 [*] | 16.302 ± 5.923 [*] |

与 Control 组比较, # $P < 0.01$;与 Model 组比较, * $P < 0.01$ 。

2.5 PSCP 对斑马鱼糖尿病合并肝损伤 SOD、MDA、GSH-Px 的影响

与 Control 组比较, Model 组中 SOD、GSH-Px 水平显著降低($P < 0.01$), MDA 水平显著升高($P < 0.01$);与 Model 组比较, MET 组中 SOD、GSH-Px 水平显著升高($P < 0.01$), MDA 水平显著降低($P < 0.01$);PSCP 中、高剂量组 SOD、GSH-Px 水平显著升高($P < 0.01$), PSCP 中剂量组 MDA 水平下降($P < 0.05$), PSCP 高剂量组水平显著下降($P < 0.01$)。见表 4。

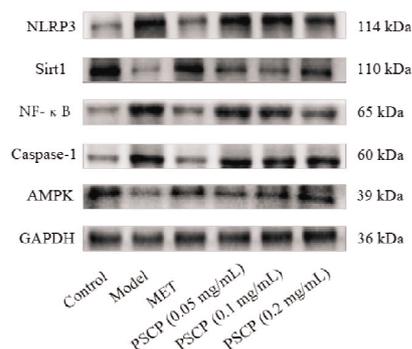
表 4 PSCP 对斑马鱼糖尿病合并肝损伤 SOD、MDA、GSH-Px 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

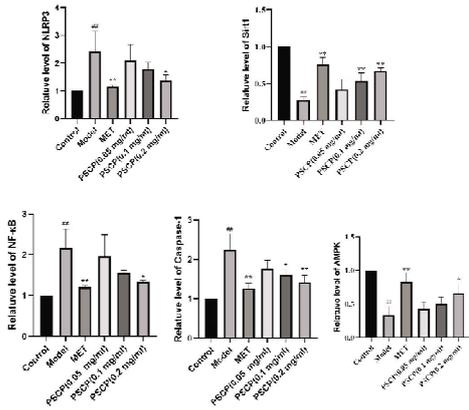
| 组别 | SOD 活力/(U/g prot) | MDA/(nmol/g prot) | GSH-Px 活力/(μ mol/g prot) |
|-----------------|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Control | 112.989 ± 42.891 | 4.832 ± 2.610 | 352.469 ± 123.072 |
| Model | 52.106 ± 11.837 [#] | 9.899 ± 3.399 [#] | 154.629 ± 55.861 [#] |
| MET | 91.491 ± 27.771 ^{**} | 5.479 ± 2.125 ^{**} | 313.214 ± 70.739 ^{**} |
| PSCP(0.05mg/mL) | 71.914 ± 23.135 | 8.055 ± 1.562 | 208.918 ± 116.603 |
| PSCP(0.10mg/mL) | 77.650 ± 16.454 ^{**} | 7.303 ± 3.757 [*] | 287.249 ± 79.891 ^{**} |
| PSCP(0.20mg/mL) | 86.465 ± 18.942 ^{**} | 5.540 ± 1.257 ^{**} | 300.049 ± 120.455 ^{**} |

与 Control 组比较, # $P < 0.01$;与 Model 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.6 PSCP 对斑马鱼糖尿病合并肝损伤 AMPK、SIRT1、NF- κ B、NLRP3、Caspase-1 信号通路的影响

与 Control 组比较, Model 组中 NF- κ B、NLRP3、Caspase-1 的蛋白表达量显著升高($P < 0.01$), AMPK、Sirt1 蛋白表达量显著下降($P < 0.01$)。与 Model 组比较, PSCP 中剂量组中 NF- κ B 蛋白表达降低($P < 0.05$), PSCP 高剂量组中 NLRP3、NF- κ B 蛋白表达降低($P < 0.05$), AMPK 蛋白表达上升($P < 0.05$);MET 组和 PSCP 高剂量组中 Caspase-1 蛋白表达显著降低($P < 0.01$);在 PSCP 中、高剂量组中, Sirt1 蛋白表达量显著上升($P < 0.01$)。见图 2。



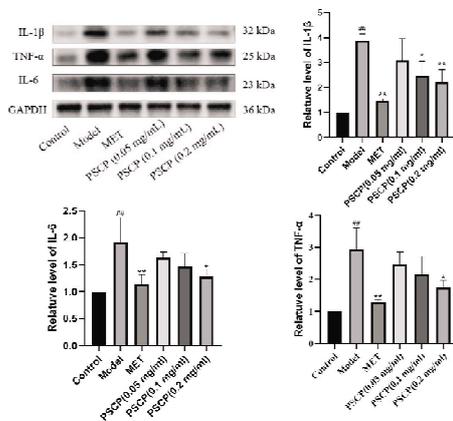


与 Control 组比较, ## $P < 0.01$; 与 Model 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图2 PSCP 干预相关通路蛋白水平的影响 ($n = 3$)

2.7 PSCP 对斑马鱼糖尿病合并肝损伤 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 炎症相关蛋白表达的影响

与 Control 组比较, Model 组中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的蛋白表达量显著升高 ($P < 0.01$)。与 Model 组比较, PSCP 中剂量组 IL-1 β , 以及 PSCP 高剂量组 TNF- α 、IL-6 表达降低 ($P < 0.05$), MET 组及 PSCP 高剂量组中 IL-1 β 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。见图 3。



与 Control 组比较, ## $P < 0.01$; 与 Model 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 PSCP 干预炎症相关蛋白水平的影响 ($n = 3$)

3 讨论

多项研究证实黄精、熟地黄对于糖尿病模型动物有很好的治疗效果,对于血糖血脂有控制作用^[8]。高糖环境结合高脂饮食诱导斑马鱼糖尿病合并肝损伤模型,能够模拟人类因高糖高脂高热量的饮食结构而自发形成的糖尿病进而合并肝损伤的过程,该模型的建立已通过实验室前期研究验证。因此,本实验中采用高糖环境培养联合 10% 高脂饲料喂养,建立斑马鱼糖尿病合并肝损

伤模型。匀浆中的 GLU、TC、TG、HDL、LDL、ALT、AST、SOD、MDA、GSH-Px 水平能够一定程度上反映肝损伤的严重程度,是评价糖尿病合并肝损伤的重要指标^[9]。本实验结果显示,与 Control 组比较, Model 组斑马鱼的 GLU、TC、TG、HDL、ALT、AST、MDA 水平显著升高, LDL、SOD、GSH-Px 水平显著降低,同时肝脏 HE 染色可见肝小叶结构破坏,出现细胞空泡、肝索排列紊乱、炎性细胞浸润等明显病理改变, Western blot 法显示 SIRT1、AMPK 蛋白表达水平显著性降低, NF- κ B、Caspase-1、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 蛋白表达水平显著性升高,表明斑马鱼糖尿病合并肝损伤造模成功。而与 Model 组比较, MET 组和 PSCP 各剂量组 GLU、TC、TG、HDL、ALT、AST、MDA 水平明显降低, LDL、SOD、GSH-Px 水平明显升高,肝组织病理损伤有不同程度减轻, Western blot 法显示, PSCP 中剂量组与高剂量组中 SIRT1、AMPK 蛋白表达水平明显升高, NF- κ B、NLRP3、Caspase-1、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 蛋白表达水平明显减少,表明 PSCP 可明显改善斑马鱼糖尿病合并肝损伤。

目前, AMPK/Sirt1 信号通路是国内外针对糖尿病合并肝损伤的主要研究方向。AMP 依赖的蛋白激酶 (AMPK) 是细胞的能量调节器,能在苏氨酸 172 位点发生磷酸化激活调节糖脂代谢^[10],是生物能量代谢调节的关键分子,是研究糖尿病及其他代谢相关疾病的核心,也是肝脏损伤以及肝脏脂质调节的因素之一。最近的研究^[11]报道,药物可通过 AMPK 通路增强抗氧化酶活性以减轻氧化应激。Sirt1 为 AMPK 的下游因子,其活性随着 AMPK 通路的激活而增加。Sirt1 作用于细胞代谢调节的信号通路,在代谢以及肥胖等相关疾病中广泛应用。Sirt1 是一种依赖烟酰胺二核糖核苷酸的去乙酰化酶,具有调节线粒体氧化应激、能量代谢、凋亡等病理生理过程的作用^[12-13],研究资料^[14]证实, Sirt1 的激活能够增加肝内线粒体的生成,促进肝内超氧化物歧化酶的表达,从而提高 NASH 抗氧化应激能力。AMPK/Sirt1 通路与多种糖脂代谢紊乱疾病有关,而糖尿病性肝损伤是一种典型的糖脂代谢性疾病。本研究结果显示,与 Model 组比较, PSCP 给药组斑马鱼肝组织中 AMPK/Sirt1 蛋白表达显著上升, NF- κ B p65 蛋白表达显著下调。结果表明 PSCP 可能是通过活化 AMPK 来激活其下游因子 Sirt1,从而进一步抑制 NF- κ B p65 表达,发挥改善斑马鱼糖尿病合并肝损伤的作用。 (下转第 399 页)

基于生信分析探究 TMEM16A 的表达对胶质瘤的影响及实验验证*

霍盟盟,王紫薇,郭婉莹,丁利琼**

(湖北科技学院医学部药学院,湖北 咸宁 437100)

摘要:目的 探究 TMEM16A 在胶质瘤中的生物信息学功能及临床意义。方法 利用 TIMER2.0 和 GEPIA 数据库进行泛癌分析,评价 TMEM16A 在肿瘤组织与正常组织中的表达差异;使用 GEPIA 和 CGGA 数据库研究 TMEM16A 的表达对胶质瘤患者预后的影响;利用 GeneMANIA 和 STRING 数据搭建蛋白互作网络,筛选互作蛋白;通过富集分析研究 TMEM16A 相关的信号通路和生物学功能;通过 TIMER2.0 数据库对 TMEM16A 与免疫细胞浸润表达水平的相关性进行研究,以评价其对肿瘤微环境的影响,然后使用 MTT 实验进行验证。结果 TMEM16A 在众多肿瘤中表达上调,对胶质瘤的进展具有促进作用,可以作为胶质瘤的独立预后因子,在蛋白互作网络中证明 TMEM16A 与 CFTR 相互作用,共同调节胶质瘤细胞的进展;富集分析进一步显示了 TMEM16A 在胶质瘤中作用的分子机制, TMEM16A 在 TNF、AMPK 信号通路上富集,与肿瘤免疫微环境相关;免疫细胞浸润水平结果表明, TMEM16A 与多种免疫细胞的浸润水平呈显著正相关。体外实验结果证实, TMEM16A 的抑制剂能够有效降低胶质瘤细胞的增殖。结论 TMEM16A 的表达与胶质瘤的进展相关, TMEM16A 可能是治疗胶质瘤的潜在靶点,可作为胶质瘤治疗的生物标志物。

关键词: TMEM16A;胶质瘤;预后价值;免疫浸润

中图分类号: R739.41

文献标识码: A

文章编号: 2095-4646(2024)05-0394-006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0394



The Effect of TMEM16A Expression on Glioma by Bioinformatics Analysis and Experimental Verification

HUO Meng-meng, WANG Zi-wei, DING Li-qiong, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100, China)

ABSTRACT; Objective To explore the bioinformatics function and clinical significance of TMEM16A in glioma. **Methods** The TIMER2.0 database and GEPIA database were used to evaluate the difference in the expression of TMEM16A in tumor tissues and normal tissues. The effect of TMEM16A expression on the prognosis of glioma patients was studied by using the GEPIA database and CGGA database. The signaling pathways and biological functions related to TMEM16A were studied by using the enrichment analysis, and the correlation between TMEM16A and immune cell infiltration expression levels was studied by using the TIMER2.0 database. MTT assay was performed to verify the role of TMEM16A on glioma. **Results** TMEM16A was up-regulated in many tumors and had a promoting effect on the progression of glioma. It could be used as an independent prognostic factor for glioma. In the protein interaction network, it was proved that TMEM16A interacts with CFTR and jointly regulates the progression of glioma cells. The enrichment analysis further showed that TMEM16A was enriched in TNF and AMPK signaling pathways and was related to the tumor immune microenvironment. TMEM16A was significantly positively correlated with the infiltration levels of a variety of immune cells. *In vitro* experimental results confirmed that inhibition of TMEM16A could effectively inhibit the proliferation of glioma cells. **Conclusion** The expression of TMEM16A is associated with the progression of glioma, and TMEM16A may be a potential target for the treatment of glioma and can be used as a biomarker for glioma treatment.

KEY WORDS: TMEM16A; Glioma; Prognostic value; Immune infiltration

* 基金项目:2020年湖北科技学院博士启动基金项目(BK202120)

** 通讯作者, E-mail: dinglq2021@163.com

胶质瘤是一种具有强侵袭性、致死性的恶性脑肿瘤,其中胶质母细胞瘤(GBM)的发病率占有所有胶质瘤的50%^[1],占有所有颅内肿瘤的16%^[2],若不进行治疗患者的生存时间仅有6个月^[3]。有研究报道,基因突变、环境变化等是诱发胶质瘤的重要因素^[4],因此,详细探究胶质瘤中差异表达的基因,对其早期诊断以及提供新药研发方向具有非常重要的意义。TMEM16A(又称ANO1)是一个参与众多生理活动的蛋白,在许多肿瘤细胞中异常表达,如头颈部鳞状细胞癌^[5]、胰腺癌^[6]、胃肠道癌^[7]、乳腺癌^[8]、胶质瘤^[9]等。本研究通过生物信息技术,对TMEM16A的异常表达与胶质瘤患者的预后、生存以及肿瘤微环境的关系进行研究,并对结果进行实验验证,旨在为胶质瘤的临床治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 材料

U251细胞(人胶质瘤细胞)、U-87 MG细胞(人胶质母细胞瘤细胞)购自上海碧云天生物技术有限公司, CaCCinh-A01 购自上海陶术生物科技有限公司, MTT(甲基噻唑蓝溶液)购自武汉赛维尔生物科技有限公司, DMSO(二甲亚砜)购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 TMEM16A 的表达差异分析

使用TIMER(<https://www.timeanddate.com/timer/>)数据库对TMEM16A在多种肿瘤组织和正常组织中的表达差异进行分析,然后,利用GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)数据库对TMEM16A在胶质瘤组织中与正常组织中的表达进行了分析;最后,通过UALCAN(<http://ualcan.path.uab.edu/>)数据库^[10]研究胶质瘤中与TMEM16A表达相关的临床病理学参数。

1.2.2 生存分析

通过GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)和CGGA(<http://www.cgga.org.cn/>)数据库分析TMEM16A对胶质瘤患者生存的影响,使用R软件包survival(version 3.2-7)的coxph函数分析基因表达与每个肿瘤的预后关系,使用Logrank test进行统计检验,研究TMEM16A的表达对胶质瘤患者预后的影响。

1.2.3 相互作用网络的搭建

在GeneMANIA(<http://gene-mania.org>)数据

库中绘制TMEM16A相关基因网络图;在STRING(<https://cn.string-db.org/>)中生成蛋白相互作用网络图;然后,通过维恩在线工具(<https://jvenn.toulouse.inrae.fr/app/example.html>)获取两个网络中的交集基因。

1.2.4 基因富集分析

通过整理TCGA(<https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>)数据库的相关数据,使用LinkedOmics(<https://linkedomics.org/login.php>)数据库^[11],获得TMEM16A共表达基因,并对其进行KEGG富集分析和GO功能分析。

1.2.5 免疫浸润水平分析

通过TIMER2.0(<http://timer.cistrome.org/>)的SCNA模块分析TMEM16A不同体细胞拷贝数的变化与胶质瘤的免疫浸润关系,检验在胶质瘤组织与正常组织相比基因不同拷贝状态对免疫浸润的影响,包括臂级删除、二倍体/正常、臂级增益以及高扩增,使用双向Wilcoxon秩和检验将每个SCNA类别的渗透水平与正常水平进行比较。通过TIMER2.0数据库^[12]分析TMEM16A与肿瘤微环境的关系。

1.2.6 细胞培养

U251细胞、U-87 MG细胞在含10%胎牛血清、100 μ g/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的DMEM培养基中培养,放入37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的常规细胞培养箱中培养。

1.2.7 MTT(噻唑蓝比色法)实验

将U251细胞和U-87 MG细胞分别接种于96孔板中,培养24h。第2d,在细胞中加入梯度浓度的CaCCinh-A01(TMEM16A抑制剂^[13-14]),在常规培养箱培养48h后,每孔加入20 μ L MTT(5mg/mL)再孵育4h。然后弃掉上清液,每孔加入150 μ L DMSO溶解甲瓞,在490nm处的吸光度由酶标仪测定。

1.3 统计学方法

使用Graphpad prism 8.2软件进行分析,两组之间比较使用独立样本 t 检验,两组以上的样本比较使用单因素方差分析, $P < 0.05$ 即认为差异具有统计学意义。

2 结果

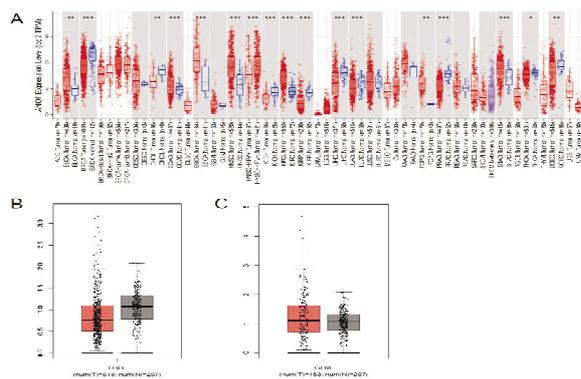
2.1 TMEM16A 在肿瘤组织中的表达

对TMEM16A的泛癌表达分析显示, TMEM16A在膀胱尿路上皮癌(BLCA)、乳腺癌

(BRCA)、结肠癌(COAD)等多种肿瘤中表达上调(图1A),表明 TMEM16A 表达上调与多种肿瘤相关。在胶质瘤中,发现在正常组织中与低级别胶质瘤(LGG)、GBM 组织中 TMEM16A 的表达没有显著差异(图1B、C)。通过 CGGA 数据库分析 TMEM16A 在不同 WHO 病理分级的胶质瘤中的表达,结果发现, TMEM16A 的表达随着分级的上升逐渐增加(图2A),提示 TMEM16A 的异常表达可能与胶质瘤的进展相关^[15]。对 TMEM16A 在各级别原发性肿瘤和继发性肿瘤中的表达进行分析,如图2B所示,在Ⅲ、Ⅳ级胶质瘤中, TMEM16A 在继发肿瘤中表达均显著上调。

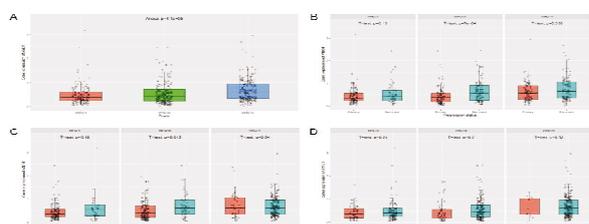
此外,如图2C所示, TMEM16A 的表达在Ⅲ级 IDH 野生型胶质瘤中表达显著上调,但是, 1p19q 共缺失和非共缺失状态的 TMEM16A 的表达并没有显著差异(图2D)。

总之, TMEM16A 的高表达可能促进了低级别胶质瘤向高级别转化的进程。



A. TMEM16A 的泛癌表达; B. TMEM16A 在 LGG 和正常组织中的情况; C. TMEM16A 在 GBM 和正常组织中的表达。

图1 TMEM16A 在肿瘤组织和正常组织中的表达情况



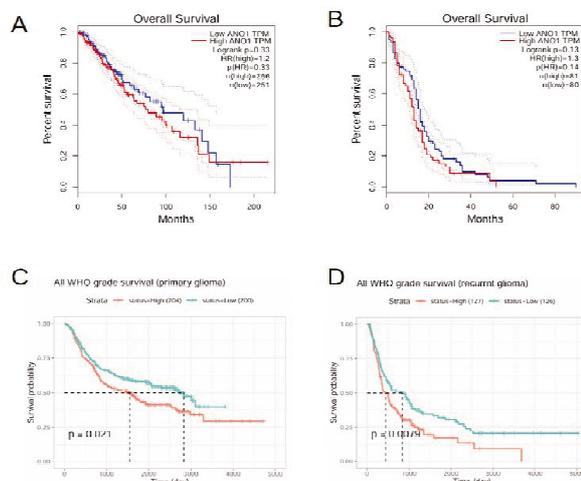
A. TMEM16A 在不同 WHO 病理分级中的表达; B. TMEM16A 在不同 WHO 病理分级中原发与继发肿瘤中的表达; C. TMEM16A 在 IDH 突变型和野生型中的表达; D. TMEM16A 在 1p19q 共缺失和非共缺失胶质瘤中的表达。

图2 TMEM16A 的表达与肿瘤分期的相关性

2.2 TMEM16A 的表达与胶质瘤患者生存预后的关系

如图3A、B结果显示, TMEM16A 的表达对胶质瘤患者总生存期(OS)的影响不具有统计学意

义($P > 0.05$)。发现 TMEM16A 表达上调显著降低了原发性和继发性胶质瘤患者的生存时间(图3C、D)。此外,建立预后模型,如图4,结果发现 TMEM16A 高表达与胶质瘤(GBMLGG)患者($N = 857, P = 4.0e-9, HR = 1.32$)预后不良显著相关,但是 TMEM16A 的高表达对 LGG 患者的预后不良并无显著影响, TMEM16A 的高表达与 GBM ($N = 196, P = 3.6e-4, HR = 1.24$) 患者的预后不良显著相关。由此可知, TMEM16A 的高表达会显著降低胶质瘤患者的生存时间,并与胶质瘤患者的预后不良显著相关。



A. TMEM16A 的表达对 LGG 患者生存时间的影响; B. TMEM16A 的表达对 GBM 患者生存时间的影响; C. TMEM16A 的表达对原发胶质瘤患者生存时间的影响; D. TMEM16A 的表达对继发胶质瘤患者生存时间的影响。

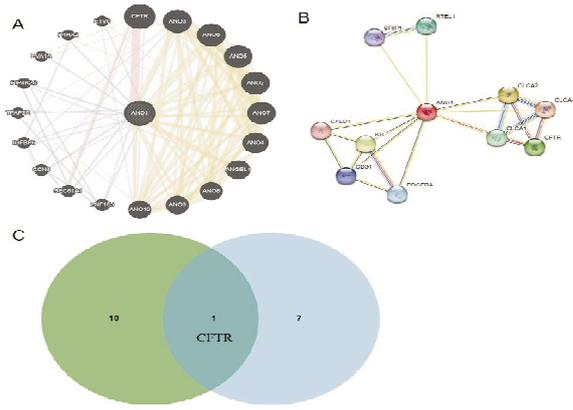
图3 TMEM16A 的表达对胶质瘤患者预后的影响

| CancerCode | pvalue | Hazard Ratio(95%CI) |
|--------------------|--------|---------------------|
| TCGA-GBMLGG(N=857) | 4.0e-9 | 1.32(1.20,1.45) |
| TCGA-GBM(N=196) | 3.6e-4 | 1.24(1.10,1.40) |
| TCGA-LGG(N=802) | 0.20 | 1.08(0.95,1.25) |

图4 TMEM16A 的表达对胶质瘤(GBMLGG)患者的预后分析

2.3 TMEM16A 相互作用网络的构建

由图5A所示, TMEM16A 主要与 CFTR、ANO3、ANO6、ANO5、ANO2、ANGEL1 等基因存在相互作用;蛋白质互作网络分析结果显示, TMEM16A 主要与 BRIP1、RTEL1、CLCA2、CLCA4、CALD1、CD34、PDGFRA、CFTR 等蛋白存在相互作用关系(图5B),通过两个网络靶点进行交集,确定 CFTR 可能是 TMEM16A 作用的潜在靶点(图5C),据报道, CFTR 通过上调 Akt/Bcl2 介导的抗凋亡途径促进胶质瘤的进展^[16],因此, TMEM16A 可能与 CFTR 相互作用,共同参与促进胶质瘤的发生和发展进程。

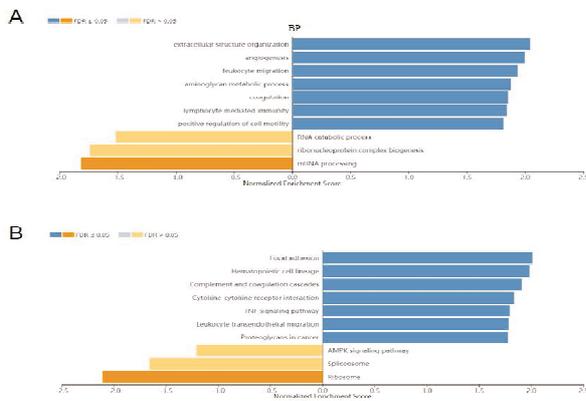


A. TMEM16A 基因互作网络; B. TMEM16A 蛋白互作网络; C. 基因网络与蛋白网络韦恩图。

图5 TMEM16A 相互作用网络图

2.4 TMEM16A 相关生物过程与功能富集分析

对 TMEM16A 进行富集分析,结果表明,在胶质瘤中, TMEM16A 在白细胞的活动、血管生成、淋巴细胞介导免疫、RNA 分解代谢、信使 RNA 加工以及核糖核蛋白复合体生物发生等过程中高度富集(图 6A)。此外,通过 KEGG 分析可见, TMEM16A 在 TNF、AMPK 以及细胞因子等通路高度富集(图 6B)。由此可见, TMEM16A 与胶质瘤的发生、免疫浸润相关。



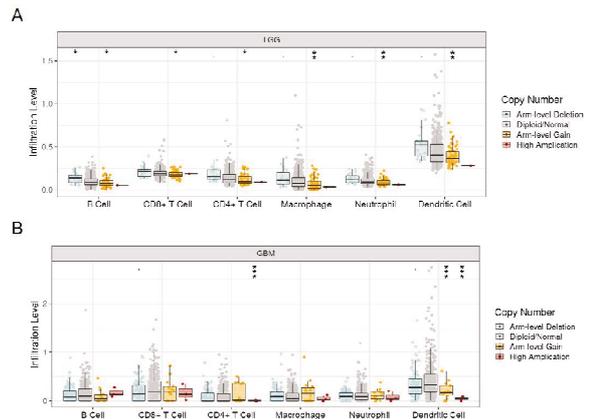
A. GO 富集分析 TMEM16A 在胶质瘤中主要的生物过程分析; B. KEGG 分析 TMEM16A 在胶质瘤中主要参与的信号通路。

图6 富集分析

2.5 TMEM16A 与免疫细胞的关系

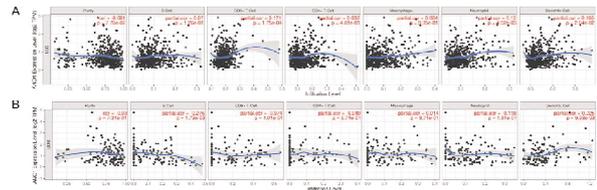
对胶质瘤中 TMEM16A 不同拷贝状态与 6 种免疫细胞浸润水平的关系进行分析。如图 7A 所示,在 LGG 样本中 TMEM16A 臂级删除与 B 细胞的浸润水平显著高于 TMEM16A 二倍体正常样本, TMEM16A 臂级增益的胶质瘤样本与 6 种免疫细胞的浸润水平均显著低于正常样本。而在 GBM 样本中 TMEM16A 高扩增与 CD4⁺、树突细

胞的浸润水平显著降低, TMEM16A 的臂级增益样本与树突细胞的浸润水平显著降低(图 7B)。分析 TMEM16A 的表达与 6 种免疫细胞浸润水平的相关性,由图 8A 所知, TMEM16A 在 LGG 中的表达与六种免疫细胞的浸润水平均呈正相关,而在 GBM 中, TMEM16A 的表达与巨噬细胞、树突细胞的浸润水平呈正相关,其余为负相关(图 8B)。由此可见, TMEM16A 可能是胶质瘤中的肿瘤免疫浸润调节因子。



A. TMEM16A 在 LGG 中不同体细胞拷贝状态下与免疫细胞的浸润水平的关系; B. TMEM16A 在 GBM 中不同体细胞拷贝状态下与免疫细胞的浸润水平的关系。

图7 在胶质瘤中 TMEM16A 不同体细胞拷贝状态下与免疫细胞浸润水平的关系

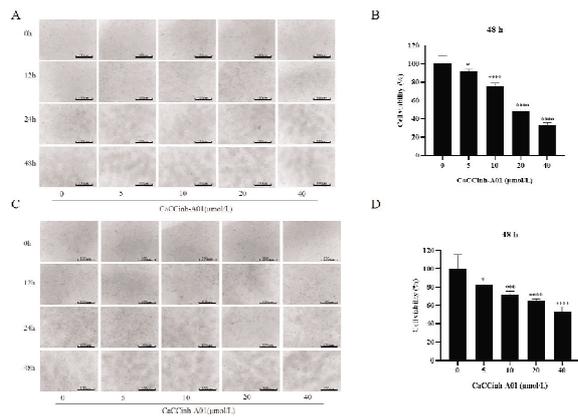


A. TMEM16A 在 LGG 中与六种免疫细胞的浸润水平的关系; B. TMEM16A 在 GBM 中与六种免疫细胞的浸润水平的关系。

图8 免疫浸润相关性分析

2.6 CaCCinh-A01 可抑制胶质瘤的增殖

为了对结论进行验证,本研究选择了一种有效的 TMEM16A 抑制剂 CaCCinh-A01 处理 U251 细胞、U-87 MG 细胞。由图 9 所示,使用 CaCCinh-A01 处理 2 种胶质瘤细胞 48h 后,细胞的存活率均出现了显著的下降,其中 U251 细胞比 U-87 MG 细胞对 CaCCinh-A01 的敏感性更高(图 9B、图 9D),由此可知,使用 TMEM16A 的抑制剂可显著抑制胶质瘤细胞的增殖, TMEM16A 的表达对胶质瘤的发生发展具有促进作用,与上述预测结论一致。



A. CaCCinh-A01 作用不同时间后 U251 细胞状态图; B. CaCCinh-A01 作用 48h 对 U251 细胞增殖的影响; C. CaCCinh-A01 作用不同时间后 U-87 MG 细胞状态图; D. CaCCinh-A01 作用 48h 对 U-87 MG 细胞增殖的影响。

图 9 CaCCinh-A01 对胶质瘤细胞系生长的影响

3 讨论

TMEM16A 在人体组织中广泛表达,并且参与众多生理过程^[17]。有研究证实, TMEM16A 对肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭等方面具有促进作用^[18]。因此,通过干预 TMEM16A 的表达能够有效抑制胶质瘤的发展。

在本研究中,通过公共数据库中对 TMEM16A 的表达差异进行分析,结果显示 TMEM16A 在众多肿瘤中均显示高表达,在胶质瘤中,随着 WHO 病理分级的升高, TMEM16A 的表达增加,在原发性和继发性 III、IV 胶质瘤中的表达同样显著升高,提示其可能与胶质瘤的进展相关。在生存分析中, TMEM16A 的表达越高,胶质瘤患者的生存时间越短,并且 TMEM16A 的高表达与胶质瘤患者的预后不良显著相关。由此,推测 TMEM16A 的高表达对胶质瘤的进展具有促进作用,并且其可能与其他相关基因具有协同作用,于是构建了 TMEM16A 的基因互作网络和蛋白互作网络图,并通过交集后发现了互作靶点蛋白 CFTR,推测 TMEM16A 可能是通过与 CFTR 相互作用起到促进胶质瘤进展的作用,随后,通过对 TMEM16A 的富集分析发现, TMEM16A 在白细胞的活、血管生成、淋巴细胞介导免疫、RNA 分解代谢、mRNA 加工以及核糖核蛋白复合体生物发生等生物过程高度富集,其中核糖核蛋白复合体生物发生以及血管生成都是肿瘤细胞进行分裂生长所必须的过程^[19],在恶性肿瘤发生和发展中, RNA 的转录翻译发生异常是非常关键的步骤,并且异常转录翻译的 RNA 是肿瘤标志物潜在位点^[20],由此可见,

TMEM16A 与胶质瘤的发生和发展都存在密切的关系。KEGG 结果发现, TMEM16A 富集的通路 TNF、AMPK 均与细胞免疫相关,并且先天免疫系统和适应性免疫对于抗肿瘤非常关键^[21],因此,对 TMEM16A 与免疫细胞浸润丰度进行分析,发现无论是在 LGG 中还是 GBM 中 TMEM16A 的表达均与多种免疫细胞呈正相关,这些结果表明, TMEM16A 在调节胶质瘤的肿瘤免疫微环境中具有重要的意义,对胶质瘤的发生发展起到促进作用。另外, MTT 实验结果表明, TMEM16A 的抑制剂 CaCCinh-A01 可以显著降低胶质瘤细胞的增殖。因此,可以将干预 TMEM16A 的表达抑制肿瘤的生长作为新药研发方向。

总之, TMEM16A 的表达与胶质瘤的进展密切相关,可能是胶质瘤的潜在生物靶点,对胶质瘤患者的治疗存在重要的临床价值。

参考文献:

- [1] SHIELDS L, ODELL P, DANIELS M, et al. Impact of reirradiation utilizing fractionated stereotactic radiotherapy for recurrent glioblastoma[J]. *Cureus*, 2024, 16(1): e53001
- [2] EL-KHAYAT S, ARAFAT W. Therapeutic strategies of recurrent glioblastoma and its molecular pathways Lock up the beast[J]. *Ecancermedicalscience*, 2021, 15: 1176
- [3] LUO Q, YANG Z, DENG R, et al. Comprehensive analysis of prognosis of patients with GBM based on 4 m6A-related lncRNAs and immune cell infiltration[J]. *Heliyon*, 2023, 9(2): e12838
- [4] WEI W, HUANG C, ZHANG J, et al. HDAC6-activatable multifunctional near-infrared probe for glioma cell detection and elimination[J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 96(6): 2406
- [5] YASSIN-KASSAB A, CHATTERJEE S, KHAN N, et al. P90RSK pathway inhibition synergizes with cisplatin in TMEM16A overexpressing head and neck cancer[J]. *BMC Cancer*, 2024, 24(1): 233
- [6] ZHANG G, SHU Z, YU J, et al. High ANO1 expression is a prognostic factor and correlated with an immunosuppressive tumor microenvironment in pancreatic cancer[J]. *Frontiers in Immunology*, 2024, 15: 1341209
- [7] JIANG F, JIA K, CHEN Y, et al. ANO1-mediated inhibition of cancer ferroptosis confers immunotherapeutic resistance through recruiting cancer-associated fibroblasts[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(24): e2300881
- [8] ANDRÉ F, SU F, SOLOVIEFF N, et al. Pooled ctDNA analysis of MONALEESA phase III advanced breast cancer trials[J]. *Ann Oncol*, 2023, 34(11): 1003
- [9] WANG H, ZOU L, MA K, et al. Cell-specific mechanisms of TMEM16A Ca-activated chloride channel in cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2017, 16(1): 152
- [10] CHANDRASHEKAR D, BASHEL B, BALASUBRA-

- MANYA S, et al. UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses [J]. *Neoplasia (New York, NY)*, 2017, 19(8): 649
- [11] VASAIKAR S, STRAUB P, WANG J, et al. LinkedOmics: analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46: D956
- [12] LIU X S, LI B, CHEN Q, et al. TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells [J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(W1): W509
- [13] SHI S, GUO S, CHEN Y, et al. Molecular mechanism of CaCC-A01 inhibiting TMEM16A channel [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 695: 108650
- [14] LI X, LIU J, CHEN X, et al. Blockade of TMEM16A protects against renal fibrosis by reducing intracellular Cl concentration [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(12): 3043
- [15] CHEN L, XIONG Z, ZHAO H, et al. Identification of the novel prognostic biomarker, MLLT11, reveals its relationship with immune checkpoint markers in glioma [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 889351
- [16] ZHAO M, ZHANG J, HUANG W, et al. CFTR promotes malignant glioma development via up-regulation of Akt/Be12-mediated anti-apoptosis pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(13): 7301
- [17] LIU Y, LIU Z, WANG K. The Ca-activated chloride channel ANO1/TMEM16A: an emerging therapeutic target for epithelium-originated diseases? [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2021, 11(6): 1412
- [18] ATALA A. Re: Inhibition of Ca²⁺-activated Cl-channel ANO1/TMEM16A expression suppresses tumor growth and invasiveness in human prostate carcinoma [J]. *J Urology*, 2013, 189(6): 2393
- [19] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115
- [20] KANNOUCHE P, MAUFFREY P, PINON-LATAILLADE G, et al. Molecular cloning and characterization of the human KIN17 cDNA encoding a component of the UVC response that is conserved among metazoans [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(9): 1701
- [21] HAMEED Y, USMAN M, LIANG S, et al. Novel diagnostic and prognostic biomarkers of colorectal cancer: capable to overcome the heterogeneity-specific barrier and valid for global applications [J]. *PloS One*, 2021, 16(9): e0256020

(收稿日期: 2024-03-14)

(上接第 393 页)

PSCP 对斑马鱼糖尿病合并肝损伤具有一定的保护作用, 其作用机制可能与上调 AMPK/Sirt1 信号通路蛋白水平, 下调 NF- κ B 蛋白水平, 降低 NLRP3、Caspase-1 表达, 减少炎症因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 的释放有关。

参考文献:

- [1] ZHENG Y, LEY S H, HU F B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(2): 88
- [2] SHIMA T, UTO H, UEKI K, et al. Clinicopathological features of liver injury in patients with type 2 diabetes mellitus and comparative study of histologically proven nonalcoholic fatty liver diseases with or without type 2 diabetes mellitus [J]. *J Gastroenterol*, 2013, 48(4): 515
- [3] KO C, LO Y M, XU J, et al. Alpha-lipoic acid alleviates NAFLD and triglyceride accumulation in liver via modulating hepatic NLRP3 inflammasome activation pathway in type 2 diabetic rats [J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 9(5): 2733
- [4] 傅晔柳, 诸梦露, 楼霆. 白头翁汤对链脉佐菌素诱导的糖尿病肝损伤的保护作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(8): 1430
- [5] CUI X, WANG S, CAO H, et al. A review: the bioactivities and pharmacological applications of polygonatum sibiricum polysaccharides [J]. *Molecules*, 2018, 23(5): 1170
- [6] ZHOU J, XU Y Q, GUO S Y, et al. Rapid analysis of hypolipidemic drugs in a live zebrafish assay [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2015, 72: 47
- [7] GUT P, BAEZA-RAJA B, ANDERSSON O, et al. Whole-organism screening for gluconeogenesis identifies activators of fasting metabolism [J]. *Nat Chem Biol*, 2013, 9(2): 97
- [8] 王洁琼, 闵清. 黄精多糖提取工艺及药理作用研究进展 [J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2022, 36(6): 538
- [9] 袁明, 任延明, 赵协慧, 等. 藏药全缘叶绿绒蒿不同提取部位对小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. *青海医学院学报*, 2012, 33(3): 160
- [10] XIN T, LU C. Sirt3 activates AMPK-related mitochondrial biogenesis and ameliorates sepsis-induced myocardial injury [J]. *Aging*, 2020, 12(16): 16224
- [11] QIANG X, XU L, ZHANG M, et al. Demethyleneberberine attenuates non-alcoholic fatty liver disease with activation of AMPK and inhibition of oxidative stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 472(4): 603
- [12] KIM T S, JIN Y B, KIM Y S, et al. SIRT3 promotes antimicrobial defenses by coordinating mitochondrial and autophagic functions [J]. *Autophagy*, 2019, 15(8): 1356
- [13] 张皓, 周颖祯. 脑出血大鼠相关蛋白表达与脑组织水肿和神经功能缺损关系的研究 [J]. *中南医学科学杂志*, 2020, 48(6): 584
- [14] 明利平, 成扬, 陈建杰, 等. 苍菊清肝降脂方对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝组织 SIRT1、SIRT2 和 SIRT3 表达的影响 [J]. *河北中医*, 2018, 40(8): 1212

(收稿日期: 2024-04-08)

基于网络药理学和细胞实验探索柳穿鱼黄素 对前列腺癌细胞的作用*

阮诗剑¹, 蔡敬², 谢孟婷², 刘艳², 宁志丰³, 刘复兴³, 贾爱亭^{2**}, 周红^{3**}

(1. 湖北科技学院附属第一医院内科, 湖北咸宁 437100; 2. 湖北科技学院医学部药学院;
3. 湖北科技学院医学部基础医学院)

摘要:目的 采用网络药理学、分子对接和细胞实验,探索柳穿鱼黄素对前列腺癌细胞潜在靶点和细胞增殖、迁移、侵袭的影响及作用机制。方法 首先通过数据库筛选柳穿鱼黄素的成分靶点以及前列腺癌相关的疾病靶点,以此来构建药物-靶点-疾病可视化网络和蛋白相互作用网络(PPI),进行GO和KEGG富集分析,采用分子对接软件对潜在的作用靶点进行验证。采用不同浓度的柳穿鱼黄素处理前列腺癌细胞,通过MTT测定和平板克隆形成证明柳穿鱼黄素在前列腺癌细胞增殖中的抑制作用,通过划痕实验以及Transwell侵袭迁移实验证明其侵袭迁移能力。结果 网络药理学结果显示柳穿鱼黄素抗前列腺癌的靶点共有62个,KEGG富集分析发现柳穿鱼黄素通过癌症通路、PI3K-AKT等多种信号通路发挥抗前列腺癌的作用;分子对接显示柳穿鱼黄素与主要靶点之间具有良好的结合活性;与空白对照组相比,体外细胞实验结果显示柳穿鱼黄素能显著降低前列腺癌细胞活性,并且其增殖、迁移能力显著降低。结论 柳穿鱼黄素可能通过多种靶点抑制前列腺癌细胞增殖。经体外细胞实验验证表明,随着柳穿鱼黄素浓度增加,前列腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力被抑制。

关键词:柳穿鱼黄素;前列腺癌细胞;增殖;网络药理学;分子对接

中图分类号:R965

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)05-0400-006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0400



Effects of Pectolarigenin on Prostate Cancer Based on Network Pharmacology and Cellular Experiment

RUAN Shi-jian, JIA Ai-ting, ZHOU Hong, et al

(Department of Internal Medicine, The First Affiliated Hospital of Hubei University of Science and Technology,
Xianning Hubei 437100, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effects of Pectolarigenin on prostate cancer cell proliferation, migration, invasion and potential targets based on network pharmacology, molecular docking technique and cellular assays. **Methods** Databases were searched for Pectolarigenin component targets as well as disease targets associated with prostate cancer in order to create a drug-target-disease visualization network and protein-protein interaction (PPI) network. GO and KEGG enrichment analyses were then performed, and potential targets were confirmed with molecular docking tools. Prostate cancer cells were treated with different concentrations of Pectolarigenin, and the inhibition on the proliferation of prostate cancer cells was demonstrated using MTT and plate clone formation assays. Scratch tests and transwell invasion and migration were used to prove its invasive and migratory abilities. **Results** The results of network pharmacology showed that there were 62 targets for the anti-prostate cancer effect of Pectolarigenin. KEGG enrichment analysis revealed that Pectolarigenin exerts its anti-prostate cancer effects through various signaling pathways such as cancer pathways and PI3K-AKT. Molecular docking demonstrated that Pectolarigenin has good binding activity

* 基金项目:湖北科技学院省级大学生创新创业项目(S202310927021)

** 通讯作者, E-mail: 1610435027@qq.com; 657266869@qq.com

with major targets. *In vitro* cell experiments showed that compared with the blank control group, Pectolarigenin significantly reduced the activity of prostate cancer cells, as well as their proliferation and migration abilities. **Conclusion** Pectolarigenin may inhibit the proliferation and migration of prostate cancer cells in a concentration-dependent manner via a variety of pathways.

KEY WORDS: Pectolarigenin; Prostate cancer cell; Proliferation; Network pharmacology; Molecular docking

前列腺癌被认为是西方国家男性发病率最高的癌症且在老年男性中最为常见,是全球范围内男性癌症死亡的第二大原因^[1]。随着人口老龄化趋势的加剧,我国前列腺癌的发病率也在逐年上升^[2]。目前,前列腺癌的治疗主要包括手术切除、放疗和激素治疗^[3]。然而,化疗和放疗在晚期癌症的治疗中效果并不理想,因此,迫切需要开发更有效、更安全的药物来提高患者的生存率。柳穿鱼黄素是一种天然黄酮类化合物,提取于传统中药大蓟^[4]。据文献^[5]报道,柳穿鱼黄素具有抗癌、抗炎和抗氧化的作用。近年来的研究^[6]表明,柳穿鱼黄素能够抑制多种癌症,如肝癌、乳腺癌和骨肉瘤等,然而在前列腺癌中的作用尚未有相关报道。因此,本研究旨在通过网络药理学和体外细胞实验来探究柳穿鱼黄素对人前列腺癌 Pc3 细胞的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人前列腺癌 Pc3 细胞(servicebio 公司),柳穿鱼黄素(南京广润生物制品有限公司,GR-138-210402,HPLC \geq 98%),1640 培养基(servicebio 公司),FBS(索莱宝公司),胰酶(Biosharp 公司),CO₂ 培养箱(ESCO 公司),荧光显微镜(OLYMPUS 公司)。

1.2 方法

1.2.1 柳穿鱼黄素靶点的筛选

以“Pectolarigenin”为关键词,应用药物靶点数据库 BATMAN(<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm>),获得柳穿鱼黄素药物结构,通过 PubChem、SwissTargetPrediction、Targetnet 和 PharmMapper 数据库预测柳穿鱼黄素的靶点,删除重复部分。所有靶蛋白的名称均从 UniProt 数据库中校正而来,校正后的靶蛋白统称柳穿鱼黄素的潜在靶蛋白。

1.2.2 前列腺癌疾病靶点的筛选

以“prostate cancer”为关键词,基于 GeneCards (<https://www.genecards.org>)、OMIM (<http://www.omim.org>) 数据库查找前列腺癌相关靶

点,并且以前列腺癌靶点和柳穿鱼黄素预测靶点绘制韦恩图。

1.2.3 构建柳穿鱼黄素靶点网络及构建蛋白相互作用网络

运用 STRING 数据库构建一个 PPI 网络图,该图展示了药物与疾病之间的共同靶点。再通过 Cytoscape(3.8.1) 软件对 PPI 网络进行可视化分析及处理。

1.2.4 GO 功能富集与 KEGG 通路富集分析

将交集靶点导入 DAVID 数据库(<http://david.ncifcrf.gov>),设置物种为“Homo sapiens”,为了确保结果的可靠性,我们设置了显著性水平为 $P < 0.05$ 。此外,利用 R 语言进行可视化分析得到气泡图。

1.2.5 柳穿鱼黄素与关键作用靶点分子对接

关键作用靶点蛋白从蛋白数据库 PDB (<https://www.rcsb.org>) 中获得。运用 AutoDock Vina 1.5.6 软件,将柳穿鱼黄素与其主要作用靶点进行了分子对接。在众多对接模式中,我们筛选出结合能最低的模式,以便进一步深入研究。随后,利用 Pymol 软件对最佳结果进行绘图。

1.2.6 细胞培养及增殖能力检测

在含有 10% 血清的 1640 培养基、无菌培养箱中培养 Pc3 细胞,待细胞状态良好时进行实验。

取对数生长期的 Pc3 细胞,96 孔板中每孔铺 8000 个细胞。当培养到每孔密度为 80% 时,加入浓度为 0、5、10、20、40、80 μ mol/L 的柳穿鱼黄素处理 24h 后,再加入 MTT 溶液培养 4h,每孔加 150 μ L 的 DMSO 溶液,并在摇床上摇晃 30min 以促使溶解。用酶标仪测量 OD 值。通过公式计算细胞抑制率 = (药物组 OD 值/对照组 OD 值) \times 100%。实验重复 3 次。

1.2.7 细胞平板克隆形成

取对数生长期的 Pc3 细胞,按每孔 1500 个细胞均匀铺于 6 孔板中,24h 后,配制浓度梯度为 0、5、10、20 μ mol/L 的含药培养基,放入培养箱中培养 10~14d,在显微镜下观察,观察细胞形成独立的细胞群落,终止培养,随后,使用 PBS 对细胞进行 2~3 次清洗,然后在预冷的甲醛中固定 20min。接着,使用 0.1% 结晶紫染色处理 20min,清洗去

除多余染料后,拍摄图像。实验重复3次。

1.2.8 划痕实验

在6孔板中接种 2×10^5 个/孔 Pc3 细胞,待细胞生长至 90% 时进行划痕实验。每孔分别添加浓度为 0、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的柳穿鱼黄素 2mL,24h 后拍照。使用 Image J 软件测量细胞迁移面积,分析细胞伤口愈合面积,计算细胞迁移率:细胞迁移率 = (0h 划痕面积 - 24h 划痕面积)/0h 划痕面积 $\times 100\%$ 。实验重复3次。

1.2.9 Transwell 侵袭与迁移实验

将 Pc3 细胞在无血清培养基饥饿 6h,侵袭组加基质胶,迁移组不加,培养箱放置 30min,之后上室每孔加 10 万细胞,下室分别加浓度为 0、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的柳穿鱼黄素,每孔 0.5mL,24h 结晶紫染色后拍照计数。实验重复3次。

1.3 统计学方法

使用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析并绘图,数据结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,并用 One-Way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 柳穿鱼黄素抗前列腺癌作用靶点

将筛选出的 166 个柳穿鱼黄素靶点、2259 个前列腺癌靶点相交,共得出 62 个交集靶点,即柳穿鱼黄素的抗前列腺癌靶点,如图 1 所示。

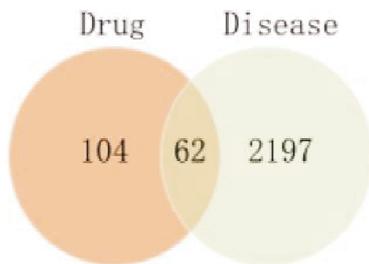


图 1 柳穿鱼黄素与前列腺癌靶点交集韦恩图

2.2 共同靶点蛋白互作网络图

柳穿鱼黄素抗前列腺癌作用的靶点通过 STRING 数据库进行 PPI 网络分析,并使用 Cytoscape 进行可视化处理。在图 2 中,蛋白互作图中的节点颜色越深表示该节点的度值越高,同时结合分数也越大,通过拓扑分析得到 61 个关键靶点, top10 的基因如表 1 所示,分别为 EGFR、AKT1、ESR1、HSP90AB1、PTGS2、MMP9、PPARG、PARP1、GSK3B、SIRT1。

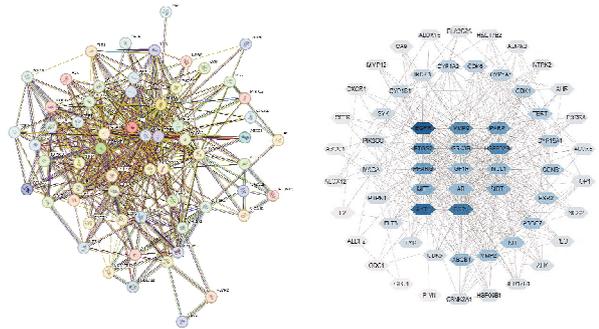


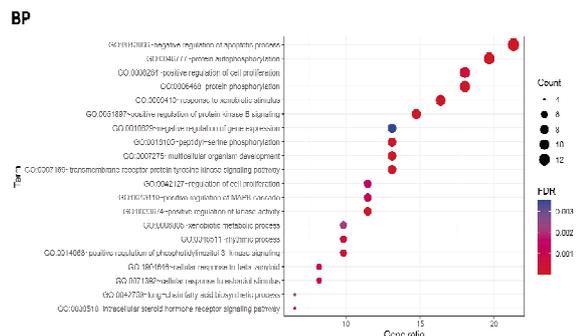
图 2 柳穿鱼黄素抗前列腺癌的 PPI 蛋白互作网络图

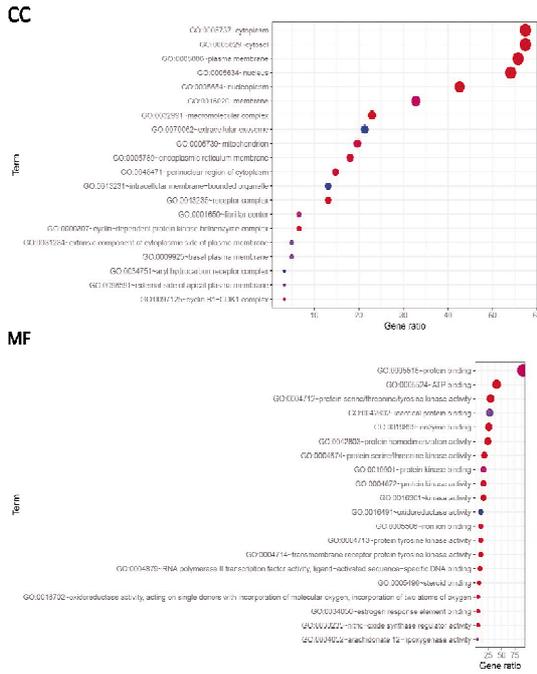
表 1 柳穿鱼黄素抗前列腺癌的拓扑学参数(前 10)

| No | Gene | Degree | Betweenness | Closeness |
|----|----------|--------|-------------|-----------|
| 1 | EGFR | 44.0 | 558.1774 | 0.7792 |
| 2 | AKT1 | 41.0 | 355.1211 | 0.7595 |
| 3 | ESR1 | 38.0 | 259.2111 | 0.7317 |
| 4 | HSP90AB1 | 35.0 | 206.5698 | 0.6977 |
| 5 | PTGS2 | 34.0 | 331.5113 | 0.6977 |
| 6 | MMP9 | 32.0 | 126.9371 | 0.6667 |
| 7 | PPARG | 30.0 | 148.3730 | 0.6593 |
| 8 | PARP1 | 29.0 | 78.2637 | 0.6383 |
| 9 | GSK3B | 27.0 | 64.9952 | 0.6383 |
| 10 | SIRT1 | 26.0 | 64.1587 | 0.6316 |

2.3 GO 功能富集与 KEGG 通路分析

借助 DAVID 数据库 (<https://david.ncicrf.gov>) 平台进行 GO 与 KEGG 富集分析,设置阈值 $P < 0.05$ 进行筛选,整理分析数据,利用 R 语言进行网络可视化。图 3~4 显示,主要涉及的生物学过程(BP)主要有细胞凋亡的负调控、蛋白磷酸化、细胞增殖的正调控等,涉及的细胞组分(CC)主要有细胞膜、细胞质、细胞核等,涉及的分子功能(MF)主要有 ATP 结合蛋白丝氨酸酪氨酸激酶活性等,主要富集的信号通路有癌症通路、PI3K-AKT 信号通路等。





(BP:生物学过程,CC:细胞组分,MF:分子功能)

图3 柳穿鱼黄素抗前列腺癌的GO功能富集分析

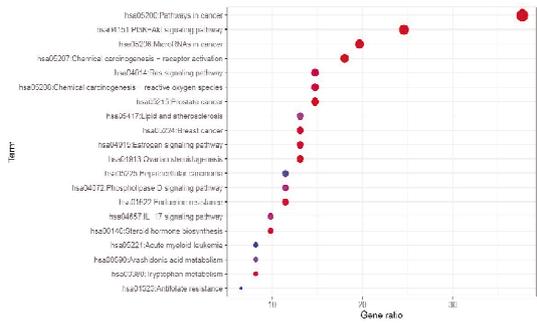


图4 柳穿鱼黄素抗前列腺癌的KEGG通路富集分析

2.4 柳穿鱼黄素与核心靶点的分子对接分析

将柳穿鱼黄素与核心靶点 AKT1 进行分子对接,结合能数据为 -9.4kcal/mol ,如图5。一般认为,结合能 $< -5.0\text{kcal/mol}$,说明两者具有较好的结合活性,表明小分子柳穿鱼黄素与核心靶点蛋白 AKT1 结合性较好。

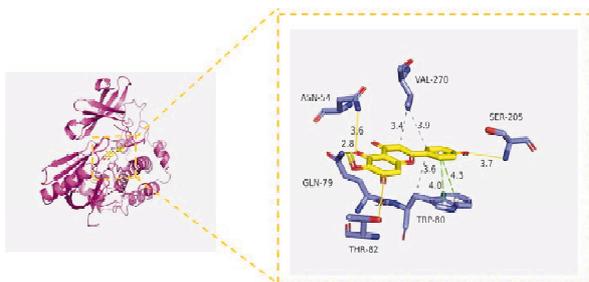


图5 柳穿鱼黄素抗前列腺癌关键靶点 AKT1 分子对接图

2.5 柳穿鱼黄素抑制前列腺癌 Pc3 的增殖

用 MTT 实验检测柳穿鱼黄素对前列腺癌细胞 Pc3 的增殖能力。实验结果如图6所示,随着柳穿鱼黄素给药浓度增加,细胞数量明显减少,细胞活力变差。说明柳穿鱼黄素可以抑制前列腺癌细胞的增殖。

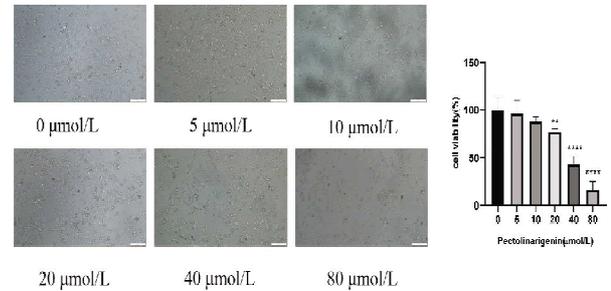


图6 柳穿鱼黄素对 Pc3 细胞增殖的影响 ($\times 10$)

2.6 柳穿鱼黄素抑制前列腺癌细胞的克隆形成

用平板克隆实验检测柳穿鱼黄素对前列腺癌细胞克隆形成能力的影响。实验结果如图7所示,随着柳穿鱼黄素浓度的增加,前列腺癌细胞克隆形成能力逐渐降低。表明柳穿鱼黄素可以抑制 Pc3 的克隆形成能力且呈剂量依赖性。

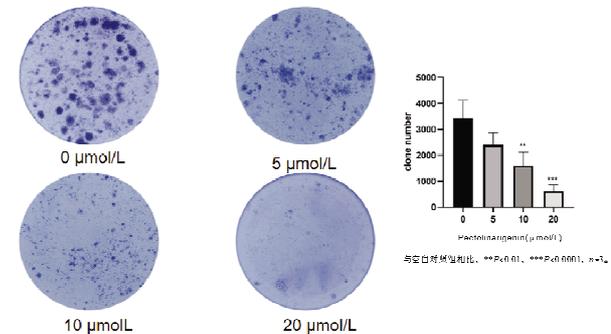


图7 柳穿鱼黄素对 Pc3 细胞克隆形成能力的影响

2.7 柳穿鱼黄素抑制前列腺癌 Pc3 细胞的迁移与侵袭能力

划痕试验的结果揭示了 Pc3 细胞的横向迁移能力,结果如图8所示,24h后 Pc3 细胞的划痕宽度随浓度的变化而显著增加。空白对照组和 20、40 和 $80\mu\text{mol/L}$ 组的 Pc3 细胞愈合面积分别为 51.15%、34.55%、24.82% 和 15.72%,差异具有显著性 ($P < 0.05$),表明柳穿鱼黄素对 Pc3 细胞的横向迁移能力具有浓度依赖性的抑制作用。迁

移实验的结果展示了 Pc3 细胞的纵向迁移能力受到了柳穿鱼黄素的影响。如图 9 所示,与空白对照组相比,经过 20、40 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 的柳穿鱼黄素处理后, Pc3 细胞的迁移抑制率分别达到了 54.04%、44.58% 和 30.3%。这一数据表明,柳穿鱼黄素对 Pc3 细胞的纵向迁移能力具有抑制作用,且这种抑制作用随着药物浓度的增加而增强。侵袭实验证明了 Pc3 细胞的侵袭能力,结果见图 10 所示,与空白对照组相比,20、40 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 的 Pc3 细胞侵袭抑制率分别为 66.13%、42.71%、34.28%,表明 Pc3 细胞的侵袭能力被柳穿鱼黄素抑制。

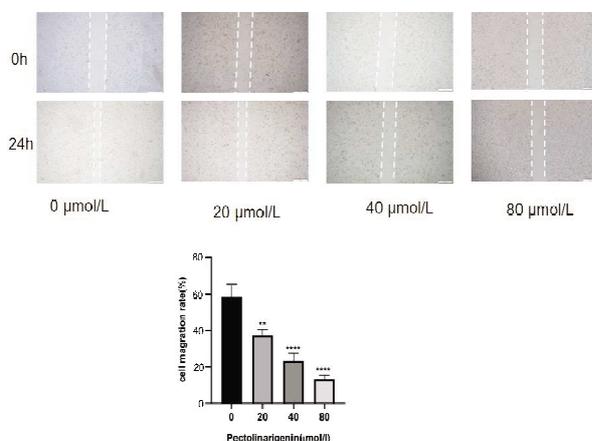


图 8 柳穿鱼黄素对 Pc3 细胞横向迁移能力的影响 ($\times 4$)

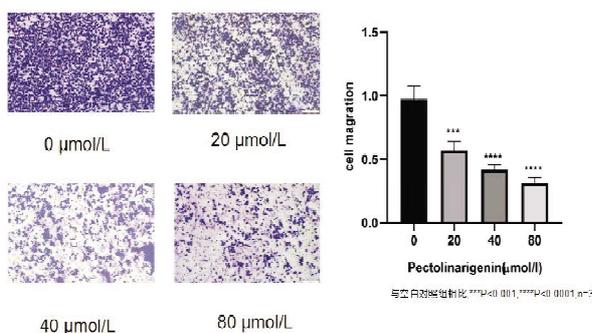


图 9 柳穿鱼黄素对 Pc3 细胞纵向迁移能力的影响 ($\times 10$)

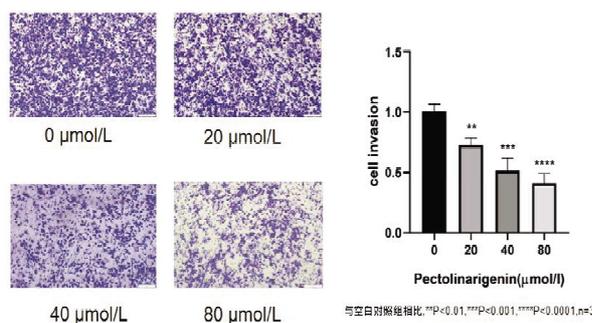


图 10 柳穿鱼黄素对 Pc3 细胞纵向侵袭能力的影响 ($\times 10$)

3 讨论

在一项针对非小细胞肺癌的研究中,柳穿鱼黄素通过调控 PTEN/PI3K/AKT 信号通路抑制了癌细胞的进展^[7]。此外,柳穿鱼黄素还能通过 PI3K/AKT/mTOR/ERK 信号通路诱导肝癌细胞凋亡,并将细胞周期阻滞在 G₂/M 期,从而有效阻止癌细胞的增殖^[8]。另一项研究表明柳穿鱼黄素在调控 SHP-1/JAK2/STAT3 信号通路方面的潜力,这为其成为治疗骨肉瘤的新型药物提供了理论基础^[9]。此外,柳穿鱼黄素可能通过下调 PI3K/AKT/mTOR 通路,导致人胃癌细胞 G₂/M 期周期阻滞、自噬和凋亡,从而起到抗癌作用^[10]。为了更深入地探究柳穿鱼黄素在前列腺癌治疗中的具体作用机制,我们采用了网络药理学方法进行研究,通过 KEGG 富集分析发现主要富集的信号通路有癌症通路、PI3K-AKT 信号通路,并且我们通过柳穿鱼黄素与核心蛋白 AKT1 分子对接发现其结合活性良好,因此,我们推断柳穿鱼黄素可能通过影响 PI3K-AKT 信号通路来发挥其抗肿瘤作用。PI3K/AKT 信号通路被认为是人类癌症中最重要的致癌途径之一,其中 1 类与肿瘤的关系最密切,PI3K/AKT 信号通路主要作用是促进细胞增殖,抑制凋亡^[11],而抑制 PI3K-AKT 信号通路可以抑制肿瘤细胞的生长,AKT 是 PI3K-AKT 信号通路的重要靶点,当肿瘤发生时,AKT 会被激活,进而调控其下游通路,目前 AKT 已成为研究重点,其几乎在包括转录和蛋白合成,细胞代谢、生长、增殖等每个功能方面并且发挥至关重要的作用,而 AKT1 也是公认的一种原癌基因,在许多肿瘤中是最主要表达,也是最具有特征的一个亚型^[12]。在体外细胞实验中,结果显示柳穿鱼黄素能够有效抑制前列腺癌 Pc3 细胞的增殖、克隆形成以及迁移能力。这些发现为柳穿鱼黄素在前列腺癌治疗中的应用提供了有力的实验依据。

综上所述,柳穿鱼黄素作为一种潜在的抗癌药物,展现出了广阔的应用前景和巨大的发展潜力,其多种药理活性为前列腺癌治疗提供了新的思路和可能性。然而,本研究仅进行了细胞实验,为探索其研究机制仍需进一步的研究。

参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1):7

(下转第 408 页)

HLA-G14bp 插入/缺失多态性与 1 型糖尿病的相关性研究*

章康威¹, 谢玉霜¹, 付晓俐¹, 潘欣怡¹, 吴志农², 单士刚³, 包永芬^{4,5**}

(1. 湖北科技学院医学部药学院, 湖北 咸宁 437100; 2. 咸宁市中心医院/湖北科技学院附属第一医院;
3. 湖北科技学院医学部公共卫生与健康学院; 4. 湖北科技学院医学部基础医学院;
5. 湖北科技学院糖尿病心脑血管病变湖北省重点实验室)

摘要:目的 探讨湖北汉族糖尿病患者 HLA-G14bp 插入/缺失多态性与 1 型糖尿病易感性的相关性。方法 采用聚合酶链反应-序列特异引物(PCR-SSP)方法,对湖北地区 70 例汉族 1 型糖尿病患者和 100 例正常对照者进行 HLA-G14bp 基因的插入/缺失位点检测,并对各基因型与临床症状的相关性进行分析。结果 HLA-G14bp 插入/缺失多态性在健康者和 1 型糖尿病患者均显示 Hardy-Weinberg 平衡;1 型糖尿病患者与健康对照组比较,HLA-G14bp +/+、+/-及-/-基因型存在显著性差异($P < 0.05$);HLA-G14bp 的插入/缺失位点在不同的病程中无显著性差异($P > 0.05$)。结论 在湖北地区汉族人群中,HLA-G14bp 插入/缺失多态性可能与 1 型糖尿病疾病易感性相关。

关键词:1 型糖尿病;HLA-G14bp;插入/缺失;多态性

中图分类号:R587.1

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)05-0405-004

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0405



The Association Between the HLA-G14bp Insertion/Deletion Polymorphism and Type 1 Diabetes

ZHANG Kang-wei, XIE Yu-shuang, BAO Yong-fen, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100, China)

ABSTRACT; Objective To explore the association of HLA-G14bp insertion/deletion diversity with the susceptibility of type 1 diabetes mellitus and other clinical features in Han Chinese diabetic patients in Hubei. **Methods** HLA-G14bp insertion/deletion polymorphisms were detected in 70 Han Chinese patients with diabetes mellitus and 100 unrelated healthy patients in Hubei Province by PCR(PCR-SSP), and the relationship between the relevant clinical features and different genotypes was analysed. **Results** HLA-G14bp insertion/deletion polymorphisms showed Hardy-Weinberg equilibrium in both type 1 diabetic patients and unrelated healthy individuals, and the HLA-G14bp +/+, +/- and -/- genotypes were significantly different in the diabetic group compared with the healthy control group($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in HLA-G14bp insertion/deletion polymorphisms between case groups of diabetic patients in different disease courses($P > 0.05$). **Conclusion** HLA-G14bp insertion/deletion polymorphisms may be associated with the occurrence of type 1 diabetes disease susceptibility in the Han Chinese population in Hubei Province.

KEY WORDS:Type 1 diabetes mellitus; HLA-G14bp; Insertion/deletion; Polymorphisms

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是世界范围内最常见的一种慢性非传染性疾病,DM分为1型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)和2型糖尿

病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)。T1DM是由胰岛素完全缺失引起的,而T2DM以胰岛素抵抗为主,我国目前有一亿多的糖尿病患者,居世界首

* 基金项目:湖北科技学院糖尿病专项(2016-18XZ11);湖北省大学生创新创业训练计划项目(201610927014,201810927004)

** 通讯作者, E-mail: 45854259@qq.com

位;其中 T1DM 占比达到 5% ~ 10%, 并且发病率呈上升趋势^[1-2]。现有的研究表明 T1DM 是基因和环境因素共同作用而导致的一种多因素疾病^[3]。在基因方面的研究,主要是探寻 T1DM 遗传型易感基因,其中以人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)基因复合体最为重要。

HLA-G 属于非经典的 HLA- I 类抗原,分为膜结合型 HLA-G 和可溶型 HLA-G。近年来关于 HLA-G 基因多态性与疾病的相关性是该领域研究的热点,特别是 HLA-G3'非翻译区(UTR)的 14bp 插入/缺失存在差异,且不同基因型对其表达水平的影响也不尽相同,14bp 插入(+)位点可导致转录减少,影响机体正常功能,诱发多种疾病。本实验采用聚合酶链反应-序列特异性引物(PCR-SSP)方法检测 HLA-G14bp 插入/缺失多态性在 T1DM 患者与健康对照者中的分布情况,进而探讨该基因多态性与 T1DM 的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2017 年 10 月至 2019 年 12 月于附属医院治疗的 70 例 T1DM 患者(T1DM 组)进行试验,患者符合 1999 年世界卫生组织(WHO)糖尿病的诊断标准^[4],包括 35 例男性和 35 例女性,平均年龄(12.1 ± 4.6)岁。另选同期健康对照者(NC 组)100 例,其中男 50 例,女 50 例,平均年龄(12.6 ± 5.2)岁。本研究由于涉及到血液标本,实验之前已向学校伦理委员会提出申请,并且通过审核,参与者均知情同意。参与本研究的患者和志愿者均排除免疫相关性疾病和肿瘤等,用含有 EDTA-K2 的抗凝管抽取 5mL 静脉血,分装冻存,用于后续 DNA 抽提。

1.2 仪器与试剂

PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司, T100TM);超低温冷冻冰箱、离心机(德国 Eppendorf 公司, MiniSpin[®]);JS680B 凝胶成像系统(美国 UVP 公司)。10 × DNA 琼脂糖电泳缓冲液、MgCl₂、dNTPs, GelRed 核酸染料(北京康为世纪生物科技有限公司);Pfu 聚合酶(碧云天);琼脂糖 G10 (Biowest 公司);基因组 DNA 提取试剂盒(碧云天, D0063);DNA Marker I 分子量标准(天根生物, MD101);全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特有限公司, AU5821);全自动糖化血红蛋白分析仪(TOSOH 公司, HLC-723G7)。

1.3 引物设计

用 Primer 5 手动设计 HLA-G14bp 插入/缺失片段上下游引物。

上游引物(Forward primer)序列为 5'-GTGAT-GGCTGTTTAAAGTGTCCACC-3', 下游引物(Reverse primer)序列为 5'-GGAAGGAATGCAGTTGAGCAT-GA-3'。

1.4 DNA 提取

按照试剂盒的说明书进行试验,采用 Nano-Drop 光谱法测定糖尿病组与正常对照组的 DNA 含量及纯度,其 A260/A280 须在 1.9 左右。

1.5 HLA-G14bp 插入/缺失多态性基因检测

优化的 PCR 反应体系如表 1。PCR 反应步骤及条件:首先对样品进行 5min 95℃ 的预变性,在 94℃ 反应 30s、65℃ 反应 40s、70℃ 反应 50s;最后延伸 10min,反应温度为 70℃。用 25g/L 的琼脂糖凝胶电泳,检测以上步骤的 PCR 产物,并在照相后分析结果。

表 1 优化的 PCR 反应体系

| 体系 | 体积/ μ L |
|--|-------------|
| 10 × DNA 琼脂糖电泳缓冲液 | 2 |
| 25mmol/L MgCl ₂ | 1.5 |
| 2.5mmol/L dNTP | 1.6 |
| 10 μ mol/L HLA-G14bp 插入/缺失片段上、下游引物 | 1.0 |
| 5U/ μ L Pfu 酶 | 0.5 |
| 100ng/ μ L DNA 模板 | 1 |
| dH ₂ O 体系总体积 | 20 |

1.6 统计学方法

用 SPSS 17.0 软件统计分析各组之间的差异。组间计数资料比较采用 χ^2 检验;计量资料的两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间计量资料样本均数比较采用单因素方差(ANOVA)分析;非正态分布的计量资料以中位数及范围表示,组间比较采用非参数检验。 $P < 0.05$ 表明结果有显著性差异。

2 结果

2.1 实验室指标的比较

T1DM 组血糖浓度、糖化血红蛋白水平平均高于正常对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

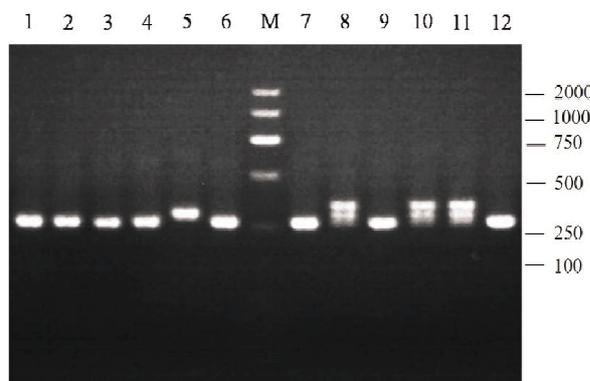
表2 各组生化指标的比较[M(P₂₅, P₇₅)]

| 指标 | NC组(n=100) | T1DM组(n=70) |
|--------------|--------------|-----------------|
| 血糖浓度/(mg/mL) | 78(45-96) | 232(65-314)* |
| 糖化血红蛋白/% | 5.8(2.7-7.3) | 10.4(4.5-18.2)* |

与NC组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 HLA-G14bp 插入/缺失电泳结果

纯合基因型(+14bp/+14bp)仅在224bp出现一条带,14bp缺失纯合子基因型(-14bp/-14bp)仅在210bp出现一条带,而杂合基因型(+14/-14bp)在224bp和210bp各有一条带。如图1所示。



注:1,2,3,4,6,7,9,12为14bp缺失纯合子基因型(-14bp/-14bp);8,10,11为14bp插入/缺失杂合子基因型(+14bp/-14bp);5为14bp插入纯合子基因型(+14bp/+14bp);M为DL2000 DNA marker。

图1 HLA-G14bp 插入/缺失琼脂糖凝胶电泳图

2.3 T1DM 组与健康对照组的 HLA-G14bp 插入/缺失情况分析

两组间的基因型如表3,两组间各基因型阳性率差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表3 HLA-G 第8外显子14bp多态性等位基因及基因型频率的分布[n(%)]

| 项目 | T1DM组(n=70) | NC组(n=100) | χ^2 | P |
|--------------------|-------------|------------|----------|-------|
| HLA-G14bp genotype | | | 9.651 | 0.045 |
| +14/+14 | 8(11.43) | 8(7.84) | | |
| +14/-14 | 37(52.86) | 40(40.00) | | |
| -14/-14 | 25(35.71) | 52(52.00) | | |
| HLA-G14bp allele | | | 13.783 | 0.037 |
| +14 | 53(37.86) | 56(28.00) | | |
| -14 | 87(62.14) | 144(72.00) | | |

2.4 T1DM 组中病程大于5年与病程小于5年 HLA-G14bp 插入/缺失情况

T1DM组中不论是病程大于5年还是病程小于5年 HLA-G14bp 插入/缺失多态性均以 HLA-G14bp +/- 为主,其次是 HLA-G14bp -/-,

HLA-G14bp +/+ 最少见。病程大于5年和病程小于5年间各种基因型阳性率无统计学差异($P > 0.05$)。见表4。

表4 HLA-G 第8外显子14bp多态性等位基因及基因型频率的分布[n(%)]

| 项目 | >5年(n=38) | <5年(n=32) | χ^2 | P |
|--------------------|-----------|-----------|----------|------|
| HLA-G14bp genotype | | | 8.456 | 0.25 |
| +14/+14 | 5(13.16) | 3(9.38) | | |
| +14/-14 | 20(52.63) | 17(53.12) | | |
| -14/-14 | 13(34.21) | 12(37.50) | | |
| HLA-G14bp allele | | | 6.658 | 0.13 |
| +14 | 30(39.47) | 23(35.94) | | |
| -14 | 46(60.53) | 41(64.06) | | |

3 讨论

T1DM 是一种自身免疫性疾病,其发病机制错综复杂,不仅与遗传密切相关,也与环境相关。损伤的胰岛 β 细胞丧失正常的生理功能,胰岛素分泌失常,进而引起 T1DM 患者体内的糖代谢紊乱^[5]。糖尿病主要的危害包括:微小血管和大血管的损伤、血管内皮功能受损、动脉粥样硬化,并导致缺血条件下心血管形成能力降低等。糖尿病在我国是最严重的公共健康问题之一,患者数量逐年攀升。全球每年新增的病例以3%的速度增长^[1-2],由于糖尿病患者可以合并多种并发症,加重多种疾病的发展。给个人和社会带来沉重的负担^[6]。

糖尿病是一种涉及多因素的复杂性疾病,此病为多基因遗传,并且这些基因相互作用、相互影响而共同促进疾病的发生发展。所有与 T1DM 易感性相关的基因中,HLA 是研究者最关心的基因位点^[7]。因此,本研究我们主要集中在 HLA-G 基因多态性与 T1DM 的相关性。HLA 基因可以分为:I类、II类和III类三大类,其中 HLA-I 类中多种亚型,如 HLA-A、HLA-B、HLA-C 和 HLA-II 类中的 DR 亚区、DQ 亚区和 DP 亚区都与 T1DM 存在一些关联性^[7-11]。HLA-I 类通常被分为经典类和非经典类。HLA-G 属于非经典类,其转录产物是天然存在的免疫抑制分子,在机体中具有重要生物学作用。研究发现,HLA-G 基因多态性可能影响基因的表达,从而诱发机体疾病发生,尤其是 HLA-G 3非翻译区的14bp插入/缺失多态性能够影响可溶性 HLA-G (sHLA-G) 分子在机体中的表达水平,含量的高低影响某些疾病的发生,国内外相关文献都进行了详细的阐述^[12-15]。

但是关于 T1DM 与 HLA-G14bp 插入/缺失多态的相关性研究甚少,仅 2016 年 Silva 等^[16]进行了相关的研究,表明 HLA-G14bp 插入/缺失多态与 1 型糖尿病易感性相关;而 De Albuquerque 等^[17]研究表明 HLA-G14bp 插入/缺失多态与 1 型糖尿病易感性无关。我们收集了 70 例 1 型糖尿病患者和 100 例正常对照进行了相关研究,结果表明 HLA-G14bp 插入/缺失多态与 1 型糖尿病易感性相关,但鉴于我们收集的标本数相对较低,相关的研究还需继续进行。

参考文献:

- [1] GROUP E A S. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe[J]. *Lancet*,2000,355(9207):873
- [2] MAAHS D M, WEST N A, LAWRENCE J M, et al. Epidemiology of type 1 diabetes [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*,2010,39(3):481
- [3] TODD J A. Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes [J]. *Immunol Today*,1990,11(4):122
- [4] ALBERTI K G, ZIMMET P Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part1:diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation [J]. *Diabet Med*,1998,15(7):539
- [5] 李蕴. 1 型糖尿病发病及防治的免疫学研究进展 [J]. *微生物学免疫学进展*,2004,32(1):43
- [6] YANG S H, DOU K F, SONG W J. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. *N Engl J Med*,2010,362(25):2425
- [7] RISH N. Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease [J]. *Am J Hum Genet*,1998,40:1
- [8] KANGA U, VAIDYANATHAN B, JAINI R, et al. HLA haplotypes associated with type 1 diabetes mellitus in North Indian children [J]. *Hum Immunol*,2004,65(1):47
- [9] GORODEZKY C, ALAEZ C, MURGUIA A, et al. HLA and autoimmune diseases: type 1 diabetes (T1D) as an example [J]. *Autoimmun Rev*,2006,5(3):187
- [10] EIKE M C, BECKER T, HUMPHREYS K, et al. Conditional analyses on the T1DGC MHC dataset; novel associations with type 1 diabetes around HLA-G and confirmation of HLA-B [J]. *Genes Immun*,2009,10(1):56
- [11] SOLINI A, MUSCELLI E, STIGNANI M. Soluble human leukocyte antigen-g expression and glucose tolerance in subjects with different degrees of adiposity [J]. *J Clin Endocrinol Metab*,2010,95(7):3342
- [12] AMODIO G, SALES DE ALBUQUERQUE R, GREGORI S. New insights into HLA-G mediated tolerance [J]. *Tissue Antigens*,2014,84(3):255
- [13] DONADI E A, CASTELLI E C, ARNAIZ-VILLENA A, et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association [J]. *Cell Mol Life Sci*,2011,68(3):369
- [14] DIAS F C, CASTELLI E C, COLLARES C V, et al. The role of HLA-G molecule and HLA-G gene polymorphisms in tumors, viral hepatitis, and parasitic diseases [J]. *Front Immunol*,2015,6:9
- [15] 单士刚,包永芬,刘超. HLA-G 基因多态性与疾病关联的研究进展 [J]. *现代免疫学*,2015,35(6):519
- [16] SILVA H P, URURAHY M A, SOUZA K S, et al. The association between the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism and type 1 diabetes [J]. *Genes Immun*,2016,17(1):13
- [17] DE ALBUQUERQUE R S, MENDES-JUNIOR C T, LUCENA-SILVA N, et al. Association of HLA-G 3' untranslated region variants with type 1 diabetes mellitus [J]. *Hum Immunol*,2016,77(4):358

(收稿日期:2024-03-30)

(上接第 404 页)

- [2] XIA C F, DONG X S, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants [J]. *Chin Med J (Engl)*,2022,135(5):584
- [3] LU M, WEI F, MA S, et al. Oncolytic virus as a novel modality for the treatment of prostate cancer [J]. *Discov Med*,2021,32(167):133
- [4] LIM H, SON K H, CHANG H W, et al. Anti-inflammatory activity of pectolarigenin and pectolarin isolated from *Cirsium chanroenicum* [J]. *Biol Pharm Bull*,2008,31(11):2063
- [5] YIN, L, et al. Flavonoids analysis and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of crude and purified extracts from *veronicastrum latifolium* [J]. *Industrial Crops and Products*,2019,137:652
- [6] 赵维维,雷涛. 柳穿鱼黄酮研究进展 [J]. *中药材*,2023,46(3):796
- [7] XU F, GAO X, PAN H. Pectolarigenin inhibits nonsmall cell lung cancer progression by regulating the PTEN/

- PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Oncol Rep*,2018,40(6):3458
- [8] WU T, DONG X, YU D, et al. Natural product pectolarigenin inhibits proliferation, induces apoptosis, and causes G2/M phase arrest of HCC via PI3K/AKT/mTOR/ERK signaling pathway [J]. *Onco Targets Ther*,2018,11:8633
- [9] HANG T, LI S Y, LI J, et al. Pectolarigenin acts as a potential anti-osteosarcoma agent via mediating SHP-1/JAK2/STAT3 signaling [J]. *Biomed Pharmacother*,2022,153:113323
- [10] LEE H J, VENKATARAMA G S V, KIM S M, et al. Pectolarigenin induced cell cycle arrest, autophagy, and apoptosis in gastric cancer cell via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Nutrients*,2018,10(8):1043
- [11] 董兰,赵冰洁,曾凤娇,等. 马钱子碱抑制骨肉瘤的作用机制 [J]. *湖北科技学院学报(医学版)*,2023,37(4):277
- [12] 张丽娟. AKT1/2 在去势抵抗性前列腺癌进展中的作用研究 [D]. 新乡:新乡医学院,2019

(收稿日期:2024-03-14)

NNMT 调控铁死亡在非酒精性脂肪肝细胞模型中的作用研究*

华玉^{1,2}, 尧青¹, 莫启贵¹, 季慧敏¹, 王定森^{3**}, 刘爱梅^{1**}

(1. 湖北科技学院医学部医药研究院, 湖北咸宁 437100; 2. 湖北科技学院医学部药学院;
3. 湖北科技学院附属第一医院临床药理机构办公室)

摘要:目的 探讨尼克酰胺-N-甲基转移酶(NNMT)在非酒精性脂肪肝(NAFL)中的作用, 阐明 NNMT 调控铁死亡的分子机制。方法 用油红 O 染色和尼罗红染色检测不同浓度游离脂肪酸混合物 FFA (油酸钠: 棕榈酸钠 = 2: 1) 处理的 HepG2 细胞脂滴的积聚, 探针法检测脂质过氧化水平和 Fe^{2+} 的水平, 并用 Western blot 检测 FFA、铁死亡抑制剂(Fer-1)及 NNMT 抑制剂(NNMTi)处理下 HepG2 细胞的 NNMT 和 GPX4、SLC7A11 等铁死亡相关蛋白的表达变化。结果 FFA 处理 HepG2 细胞后, 细胞脂滴增加, NNMT 蛋白表达增加; FFA 降低铁死亡负调控蛋白 GPX4 和 SLC7A11 的表达, 提高细胞脂质过氧化水平和 Fe^{2+} 含量, 诱导细胞铁死亡, 而铁死亡抑制剂能阻止 FFA 所致的细胞铁死亡; 且 NNMTi 促进 GPX4 和 SLC7A11 的表达, 降低细胞脂质过氧化水平和 Fe^{2+} 含量, 缓解铁死亡。结论 FFA 诱导下, 高表达的 NNMT 介导肝细胞铁死亡, 为 NAFL 病的发生发展提供新机制。

关键词:非酒精性脂肪肝; 铁死亡; NNMT; GPX4; SLC7A11

中图分类号: R575

文献标识码: A

文章编号: 2095-4646(2024)05-0409-006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI: 10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0409



The Role of NNMT in Regulating Ferroptosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease

HUA Yu, WANG Ding-miao, LIU Ai-mei, et al

(Medicine Research Institute, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology,
Xianning Hubei 437100, China)

ABSTRACT: Objective To explore the role of nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) in non-alcoholic fatty liver (NAFL) and to elucidate the molecular mechanism of NNMT regulating ferroptosis. **Methods** The accumulation of lipid droplets in HepG2 cells treated with different concentrations of free fatty acid mixture FFA (sodium oleate: sodium palmitate = 2: 1) was detected using Oil Red O staining and Nile Red staining. The levels of lipid peroxidation and Fe^{2+} were detected using the probe method. Western blot was used to detect the expression changes of iron death related proteins such as NNMT, GPX4 and SLC7A11 in HepG2 cells treated with FFA, iron death inhibitor (Fer-1) and NNMT inhibitor (NNMTi). **Results** After HepG2 cells were treated with FFA, the number of cellular lipid droplets increased and the expression of NNMT protein increased. FFA reduced the expression of iron death negative regulatory proteins GPX4 and SLC7A11, increased cell lipid peroxidation levels and Fe^{2+} content, and induced cell iron death, while iron death inhibitors could prevent FFA induced cell iron death. Moreover, NNMTi promoted the expression of GPX4 and SLC7A11, reduced cellular lipid peroxidation levels and Fe^{2+} content, and alleviated ferroptosis. **Conclusion** Under FFA induction, highly expressed NNMT mediates ferroptosis in liver cells, providing a new mechanism for the occurrence and development of NAFL disease.

KEY WORDS: Non-alcoholic fatty liver; Ferroptosis; NNMT; GPX4; SLC7A11

* 基金项目:湖北科技学院 2022 年度医学科研专项(2022YKY17);湖北科技学院博士启动基金项目(BK202315);湖北省自然科学基金(2023AFB537)

** 通讯作者, E-mail: wangmiao23235@126.com; liuaimai@hbust.edu.cn

非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver, NAFL)是指无过量饮酒史导致肝脏实质细胞的脂肪变性及过度脂肪积累,是世界上第一大慢性肝病^[1]。肝脏内脂肪的过量累积可以促进炎症细胞因子的释放,导致NAFL从单一的脂肪变性发展为非酒精性脂肪肝炎,最后将有30%~40%会发展为肝硬化和肝细胞癌^[2]。

铁死亡是一种以胞内铁稳态失衡、活性氧(reactive oxygen species, ROS)异常蓄积诱导的脂质过氧化为主要标志,与铁代谢、脂质代谢等多种代谢途径密切相关,有别于凋亡、坏死、焦亡、自噬的新型细胞死亡方式,形态上表现为线粒体体积减小、膜密度增加、线粒体嵴减少或消失^[3]。以往的研究表明,NAFL中细胞死亡的主要形式是凋亡^[4]、坏死^[5]、焦亡^[6]等,这些死亡方式在所有器官普遍存在。最近的研究证明,铁死亡也是诱发NAFL发生发展的重要机制之一^[7]。

尼克酰胺-N-甲基转移酶(nicotinamide n-methyltransferase, NNMT)是一种新的组蛋白甲基化调节剂,在人类肝脏中的表达水平最高,能使烟酰胺甲基化,生成N1-甲基烟酰胺从体内排出^[8]。研究报道,NNMT在肥胖小鼠肝脏中的表达增加,而NNMT敲除可预防饮食诱导的肥胖;NNMT抑制剂全身性治疗饮食诱导的肥胖小鼠,能显著减少体重和白色脂肪量^[9],这预示NNMT在肥胖引起的NAFL中可能发挥重要作用。然而,NNMT影响NAFL发生发展的分子机制目前尚不清楚,因此,深入揭示NNMT调控铁死亡的分子机制对临床预防非酒精性脂肪肝恶性发生发展具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与药物配制

1.1.1 实验试剂

棕榈酸钠(S31807)和油酸钠(S30245)购自上海源叶生物科技有限公司;二甲基亚砜(D8418)购自美国Sigma公司;DMEM高糖培养基(SH30022)、青霉素-链霉素(SV30010)和胰蛋白酶(SH30042)购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司;细胞裂解液(P0013B)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(50×,P1050)、BCA蛋白浓度检测试剂盒(P0027)均购自上海碧云天生物技术股份有限公司;Ferro Orange荧光探针试剂盒(F374)购自日本同仁化学;无游离脂肪酸牛血清白蛋白(BSA,

ST2254)购自BBI生命科学有限公司;PVDF膜(IPVH00010)购自Millipore;NNMT抑制剂(HY-131042, NNMTi)和铁死亡抑制剂Ferrostatin-1(347174-05-4, Fer-1)购自美国MedChemexpress生物科技有限公司;油红O染色液(48460)、尼罗红染色液(65633)均购自北京索莱宝科技有限公司;蛋白5×Loading buffer(P0015)、ECL化学发光底物(RM00021)、一抗稀释液(AS425)、抗体包括β-Tubulin、谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)、NAD(P)H醌脱氢酶1[nad(p)h:quinone oxidoreductase 1, NQO1]、谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基(glutamate-cysteine ligase, GCLC)、核因子E2相关因子2(nuclearfactor erythroid-derived 2-like 2, Nrf2)、酰基辅酶a合成酶长链家族成员4(acyl-co synthetase long chain family member 4, ACSL4)、胱氨酸/谷氨酸转运蛋白(solute carrier family 7, membrane 11, SLC7A11)、HRP Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(AS014)、HRP Goat Anti-Mouse IgG(H+L)(AS003)均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.1.2 药物配制

棕榈酸钠的配制:称取棕榈酸钠27.8mg,加1mL的灭菌水,70℃水浴加热至完全溶解,迅速加入9mL DMEM配制的10% BSA溶液中,55℃水浴直至溶液完全澄清,最终浓度为10mmol/L,室温冷却后用0.22μm滤头过滤除菌后分装于-20℃保存。

油酸钠的配制:称取油酸钠120.56mg,加1mL的灭菌水,80℃水浴加热至完全溶解,取溶好的油酸钠加入9mL DMEM配制的10% BSA溶液中,摇匀,55℃水浴直至溶液完全澄清,最终浓度为10mmol/L,室温冷却后用0.22μm滤头过滤除菌后于-20℃保存。

游离脂肪酸(FFA)的配制:油酸钠:棕榈酸钠=2:1,配制不同浓度(0.25、0.50、0.75、1mmol/L) FFA,现配现用。

1.2 实验仪器

超净工作台(苏州净化公司);细胞CO₂培养箱(Thermo公司);多功能酶标仪(美国Bio-Tek公司);垂直电泳仪、电转移槽和自动发光凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);水平摇床(上海福玛实验设备有限公司);高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养与处理

本研究中使用的 HepG2 细胞系来自中国科技学院,并保存在湖北科技学院医药研究院的液氮中。HepG2 细胞接种于细胞培养皿中,培养 24h,细胞 70% ~ 80% 融合时,分为 Control 组、0.25、0.50、0.75mmol/L 3 个不同浓度组、FFA (1mmol/L) 组、铁死亡抑制剂 Fer-1 组 (Fer-1 组) 和 NNMT 抑制剂组 (NNMTi 组)、Fer-1 + FFA 组、NNMTi + FFA 组每组 3 孔细胞,Control 组换为完全培养基继续培养,0.25、0.50、0.75mmol/L 组换为含有对应浓度 FFA 混合物的完全培养基,诱导 24h; FFA 组: FFA (1mmol/L) 诱导 24h; Fer-1 组: Fer-1 (1 μ mol/L) 处理 24h、Fer-1 + FFA 组: Fer-1 (1 μ mol/L) 预处理 2h,紧接着加 FFA (1mmol/L) 继续孵育 24h; NNMTi 组: 加含 1% BSA 的 DMEM 培养基配制的 NNMTi (8 μ mol/L) 处理 24h; NNMTi + FFA 组: NNMTi (8 μ mol/L) 预处理 12h,紧接着加 FFA (1mmol/L) 继续孵育 24h。每个处理组设置 3 个重复,收集细胞做后续检测。

1.3.2 油红 O 染色和尼罗红染色

细胞做相应的处理后,吸去培养基,PBS 洗涤细胞 1 次;加入 4% 中性甲醛溶液固定 10min,PBS 漂洗 2 次;加入适量染色洗涤液覆盖细胞 20s;弃掉染色洗涤液,加入适量改良油红 O 染色液,染色 20min;去除改良油红 O 染色液,加入适量染色洗涤液,静置 30s,弃掉染色洗涤液,PBS 洗涤 30s;加入适量 PBS,均匀覆盖细胞,显微镜下观察和拍照。尼罗红染色:处理后的细胞用基础培养基洗 3 次,除去血清和白蛋白,加入尼罗红工作液,染色 10min,基础培养基洗涤细胞 1 次,在荧光显微镜下观察拍照。

1.3.3 Western blot 检测

HepG2 细胞分别接种于 12 和 6 孔细胞培养板中,设置 Control 组和 0.25、0.50、0.75mmol/L 3 个不同浓度组、FFA (1mmol/L) 组、NNMTi 组、NNMTi + FFA 组。每组设置 3 个重复孔,收集处理好的细胞,每孔中加入含有蛋白酶磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液 (200 μ L),冰上裂解 10min,细胞刮刀收集细胞裂解液于离心管,离心后收集上清,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 技术分离蛋白质 (20 μ g),冰浴下湿法转移至 PVDF 膜 2h,用 5% 的脱脂奶粉室温摇床封闭 1h,

然后在一抗溶液 (1:1000) 4 $^{\circ}$ C 摇床中孵育过夜,包括 GPX4、SLC7A11、Nr1h2、ACSL4 和 GCLC、NQO1 和 β -Tubulin。在一抗孵育后,TBST 清洗 3 次以去除未结合的抗体。随后,将膜在二抗溶液中 (1:5000) 孵育 1h。用 ECL 化学发光显影,使用 ImageJ 进行蛋白条带灰度分析,以 β -Tubulin 为内参基因计算各组蛋白的相对表达水平。

1.3.4 脂质过氧化水平检测

C11 BODIPY 探针检测脂质过氧化水平:将 HepG2 细胞计数后接种至透明玻璃 96 孔板中,分为 Control 组、Fer-1 组、FFA 组和 Fer-1 + FFA 组,每组设置 3 个重复孔,细胞处理完毕后,PBS 洗涤细胞 3 次;加入 DMEM 基础培养基配制的 C11 BODIPY 荧光探针,使得终浓度为 10 μ mol/L,避光于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;孵育结束后用 PBS 清洗细胞 2 次以去除多余的染料。利用共聚焦荧光显微镜收集相关荧光信号图像并分析。

1.3.5 活细胞 Fe²⁺ 水平检测

Ferro Orange 荧光探针检测活细胞内的 Fe²⁺ 水平:接种 HepG2 细胞于 96 孔激光共聚焦培养板,过夜培养;将细胞孔分为 Control 组、Fer-1 组、FFA 组和 Fer-1 + FFA 组,每组设置 3 个重复孔,细胞处理完毕后,弃去上清液,并用基础培养基洗涤细胞 3 次;加入浓度为 1 μ mol/L 的探针工作液,避光于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min,直接在激光共聚焦显微镜下观察并采集图像。

1.4 统计学方法

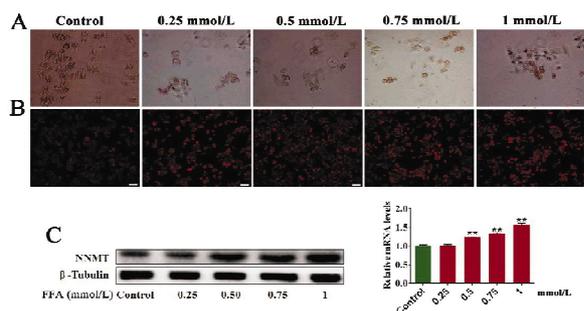
数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 GraphPad Prism 5 统计软件进行数据的分析处理,采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 对各组数据进行不同组间的比较。两组之间的差异采用 Student's t 检验进行显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异显著; $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 不同浓度 FFA 诱导 HepG2 细胞的脂滴积聚及 NNMT 蛋白表达的变化

不同浓度 (0.25、0.50、0.75、1mmol/L) 的 FFA 处理细胞后,与对照组相比,细胞中脂滴积聚增加 (图 1A);尼罗红染色的结果也表明,FFA 导致细胞脂滴积聚增加,说明非酒精性脂肪肝细胞造模成功 (图 1B)。Western blot 检测 NNMT 蛋白表达,结果发现,与对照组相比,FFA (0.5 ~ 1mmol/L)

极显著增加 NNMT 的蛋白表达(图 1C)。

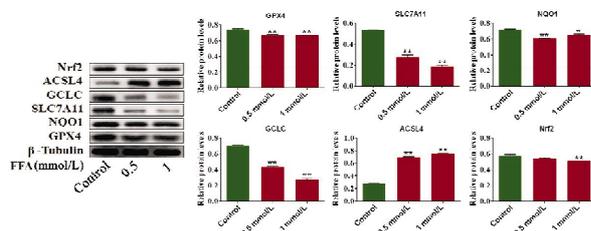


A:油红O染色;B:尼罗红染色;C:NNMT的蛋白表达和定量(与Control相比, ** $P < 0.01$, $n = 3$)。

图 1 FFA 诱导 NNMT 的表达(标尺:50 μm)

2.2 FFA 诱导下 HepG2 细胞铁死亡相关蛋白表达的变化

与对照组相比,FFA(0.5 和 1mmol/L)极显著降低铁死亡负调控蛋白 GPX4、SLC7A11 的表达,也极显著抑制抗氧化蛋白 NQO1、GCLC、Nrf2 的表达,极显著增加 ACSL4 的表达(图 2)。与对照组相比,FFA(1mmol/L)极显著提高细胞脂质过氧化水平(图 3),这些结果证明 FFA 诱导细胞发生铁死亡。



与Control组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图 2 FFA 对铁死亡相关蛋白表达的影响

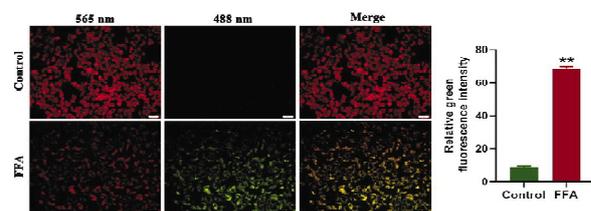
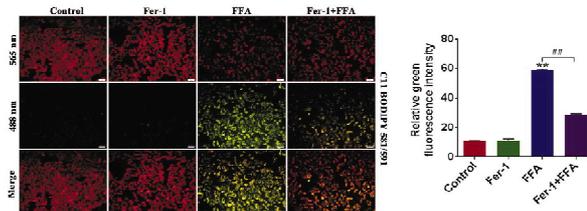


图 3 FFA 增加细胞脂质过氧化水平(标尺:50 μm)

2.3 Fer-1 改善 FFA 诱导的细胞脂质过氧化和 Fe²⁺ 积聚

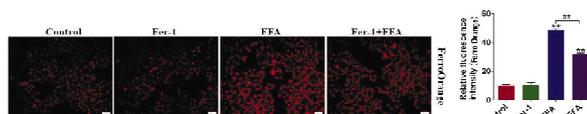
与对照组相比,FFA 提高细胞脂质过氧化和 Fe²⁺ 水平,促进细胞铁死亡,而铁死亡抑制剂 Fer-1 能在一定程度降低 FFA 诱导的细胞脂质过氧化和 Fe²⁺ 积聚,从而缓解细胞铁死亡(图 4、5)。这些结果表明 Fer-1 能在一定程度降低 FFA 诱导的

细胞脂质过氧化和 Fe²⁺ 积累,进一步说明非酒精性脂肪肝肝细胞模型中伴随着铁死亡的发生。



与Control组相比, ** $P < 0.01$;与FFA组相比,## $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图 4 铁死亡抑制剂 Fer-1 降低 FFA 诱导的细胞脂质过氧化水平(标尺:50 μm)

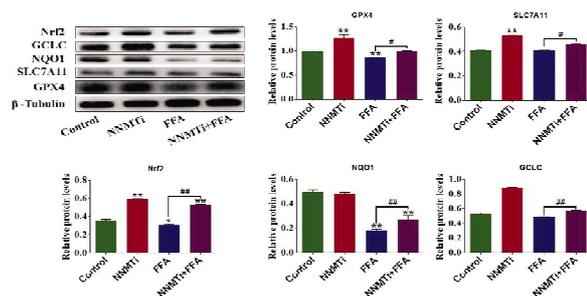


与Control组相比, ** $P < 0.01$;与FFA组相比,## $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图 5 铁死亡抑制剂 Fer-1 降低 FFA 诱导的 Fe²⁺ 水平(标尺:50 μm)

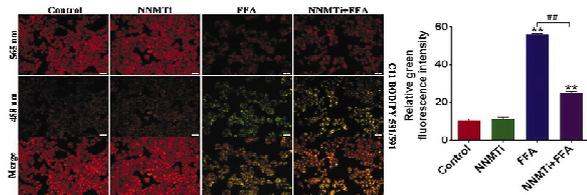
2.4 NNMT 抑制剂降低 FFA 诱导的铁死亡程度

与对照组相比,NNMT 显著增加 GPX4、SLC7A11、GCLC、Nrf2 的蛋白表达;而与 FFA 组相比,NNMT 预处理能显著提高 GPX4、SLC7A11、GCLC、NQO1 和 Nrf2 的蛋白表达(图 6)。进一步的结果表明,与 FFA 组相比,NNMT 预处理可以降低细胞脂质过氧化水平和 Fe²⁺ 水平(图 7、8)。这预示非酒精性脂肪肝肝细胞模型中 NNMT 的高表达参与铁死亡的发生。



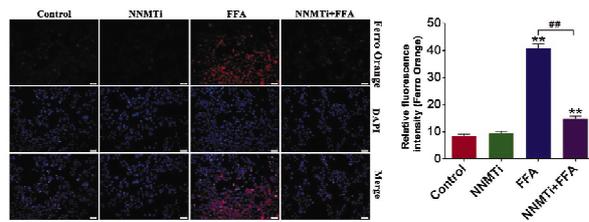
与Control组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与FFA组相比,## $P < 0.05$,### $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图 6 NNMT 抑制剂对铁死亡相关蛋白表达的影响



与Control组相比, ** $P < 0.01$;与FFA组相比,## $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图 7 NNMT 抑制剂降低 FFA 诱导的细胞脂质过氧化(标尺:50 μm)



与 Control 组相比, ** $P < 0.01$; 与 FFA 组相比, ## $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图8 NNMT 抑制剂降低 FFA 诱导的细胞 Fe^{2+} 水平(标尺: $50\mu m$)

3 讨论

铁死亡是 NAFL 的重要机制之一。NAFL 发病的经典机制包括胰岛素抵抗引起的肝脏脂肪变性以及活性氧 ROS 堆积导致的炎症、内质网应激和氧化应激,使肝脏脂质堆积^[10-12]。FFA 处理 HepG2 细胞后,细胞脂滴积聚增加,NNMT 蛋白表达增加;FFA 降低了铁死亡负调控蛋白 GPX4 和 SLC7A11 的表达,提高细胞脂质过氧化水平和 Fe^{2+} 含量,诱导细胞铁死亡。然而,铁死亡抑制剂能阻止 FFA 所致的细胞铁死亡,表明铁死亡促进 NAFL 的发生发展。肝脏是铁储存、脂质代谢的重要器官,当肝脏功能失调时,肝脏中的铁水平显著升高,铁积累引起的脂质过氧化是 NAFL 主要发病机制之一^[13]。高脂诱导的 NAFL 小鼠中发现肝脂质过氧化产物 MDA 和 Fe^{2+} 含量显著增加、GPX4 表达下降,进而引发铁死亡;而增加 GPX4 的表达抑制铁死亡,从而有效改善 NAFL 的进一步发展^[14]。此外,Chen 等^[15] 研究发现游离铁过载可能通过引起肝细胞增大、炎症和纤维化进一步加重 NAFL,从而导致 NAFL 发展为慢性肝病(NASH)。铁死亡与 NAFL 之间的联系越来越明确,NAFL 肝脏中脂质过氧化物水平增加和必要的铁死亡蛋白表达上调,而铁死亡抑制剂能有效预防铁死亡和减轻 NAFL。因此,铁死亡现在被认为是治疗 NAFL 的一个关键目标。

NNMT 抑制剂可以促进 GPX4 和 SLC7A11 的表达,降低细胞脂质过氧化水平和 Fe^{2+} 含量,从而抑制铁死亡,最后阻断 FFA 诱导的 NAFL 发展。这些结果预示 FFA 的诱导下,高表达的 NNMT 参与肝细胞铁死亡,影响 NAFL 的发生发展。一方面,NNMT 可以通过消耗甲基供体及生成活性代谢产物,参与肝脏的脂质代谢,如 NNMT 的敲低降低小鼠胚胎成纤维细胞 3T3-L1 中的脂质积累和甘油三酯含量,影响脂质代谢相关的基因表达^[16];脂质代谢的变化对调节铁死亡也至关重

要。另一方面,在人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 中,NNMT 的过表达通过线粒体膜电位解耦联和增加 GSH 水平,来调控 ROS 的产生和脂质过氧化^[17],这些标志性的变化也是铁死亡的特征。Yang 等^[18] 研究结果显示,NNMT 的抑制通过缓解肝细胞脂质的积累,有效阻止噻虫嗪诱导的小鼠脂质代谢异常和 NAFL 的发生。NNMT 的上调促进小鼠肝细胞 AML12 中脂肪毒性的发展,影响 NAFL 的发生^[19]。本研究首次发现 NNMT 可调控铁死亡,从而参与 NAFL 的发生发展。

综上,NNMT 通过调控铁死亡参与 NAFL 的发生发展,且靶向铁死亡和 NNMT 能缓解 NAFL 的恶性发展,为 NAFL 病的发生发展提供新机制,也为其防治提供新思路。

参考文献:

- [1] MEIJNIKMAN A S, LAPPA D, HERREMA H, et al. A systems biology approach to study non-alcoholic fatty liver (NAFL) in women with obesity [J]. *Science*, 2022, 25 (8):104828
- [2] LEWINSKA M, SANTOS-LASO A, ARRETXE E, et al. The altered serum lipidome and its diagnostic potential for Non-Alcoholic Fatty Liver (NAFL)-associated hepatocellular carcinoma [J]. *eBioMedicine*, 2021, 73(1):103661
- [3] JIANG X, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4):266
- [4] TIAN T, LIAO X C, ZHANG M, et al. Effects of celastrol on autophagy and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2022, 30(6):656
- [5] LIU Y, SONG J, YANG J, et al. Tumor necrosis factor α -induced protein 8-like 2 alleviates nonalcoholic fatty liver disease through suppressing transforming growth factor beta-activated kinase 1 activation [J]. *Hepatology*, 2021, 74 (3):1300
- [6] RUAN S, HAN C, SHENG Y, et al. Antcin a alleviates pyroptosis and inflammatory response in kupffercells of non-alcoholic fatty liver disease by targeting NLRP3 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 100(8):108126
- [7] WU J, WANG Y, JIANG R, et al. Ferroptosis in liver disease: new insights into disease mechanisms [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1):276
- [8] LIU A, YANG Y, GUO J, et al. Cytochrome P450 enzymes mediated by DNA methylation is involved in deoxynivalenol-induced hepatotoxicity in piglets [J]. *Anim Nutr*, 2022, 9:269

(下转第 426 页)

铁死亡在呕吐毒素诱导的 L02 细胞毒性中的作用研究*

宋晨晨^{1,2}, 王 威^{1,2}, 尧 青², 莫启贵², 刘爱梅^{2**}

(1. 湖北科技学院医学部药学院, 湖北 咸宁 437100; 2. 湖北科技学院医学部医药研究院)

摘要:目的 探讨铁死亡在呕吐毒素(DON)诱导的 L02 细胞毒性中的作用。方法 用 1640 培养基培养人正常肝细胞 L02, 用不同浓度的 DON 以及铁死亡抑制剂 Fer-1 处理细胞。荧光定量检测 DON 对铁死亡相关基因的表达变化, C11 BODIPY581/591 荧光探针检测 DON 对细胞脂质 ROS 水平的影响, Ferro Orange 荧光探针检测 DON 对细胞内 Fe²⁺ 水平的影响, CCK-8 法检测 Fer-1 对 DON 暴露下细胞活力的影响。结果 DON 抑制铁死亡相关基因的表达, 尤其是谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)、溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11), 促进转铁蛋白受体 1(TFR1) 的表达。增加细胞脂质活性氧(ROS)和细胞内 Fe²⁺ 水平, 诱导铁死亡, 使细胞活力降低。Fer-1 的预处理抑制了 DON 诱导的细胞铁死亡, 提高了细胞的活力。结论 DON 可导致 L02 细胞铁死亡, 该过程与 SLC7A11/GPX4 通路抑制有关。

关键词: 呕吐毒素; 铁死亡; 谷胱甘肽过氧化物酶 4; 溶质载体家族 7 成员 11

中图分类号: R73-3

文献标识码: A

文章编号: 2095-4646(2024)05-0414-004

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI: 10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0414



Role of Ferroptosis in DON-Induced L02 Cell Toxicity

SONG Chen-chen, WANG Wei, LIU Ai-mei, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100, China)

ABSTRACT; Objective To investigate the role of ferroptosis in vomitoxin(DON)-induced cytotoxicity in L02 cells. **Methods** Human normal hepatocyte L02 were cultured in 1640 medium, and the cells were treated with different concentrations of DON as well as ferroptosis inhibitor Fer-1. qPCR was performed to detect the expression of ferroptosis-related genes induced by DON, C11 BODIPY581/591 fluorescent probe was used to detect the effect of DON on cellular lipid ROS level, and Ferro Orange fluorescent probe was used to detect the effect of DON on intracellular Fe²⁺ level. The effect of Fer-1 on cell viability under DON exposure was detected by CCK-8 assay. **Results** DON inhibited the expression of ferroptosis-related genes, especially GPX4, SLC7A11 and TFR1, increased cellular lipid ROS and intracellular Fe²⁺ levels, which led to ferroptosis and cell viability reduction. Pretreatment with Fer-1 could inhibit DON-induced cell ferroptosis and increase cell viability. **Conclusion** DON may induce ferroptosis in L02 cells, and the process is associated with inhibition of SLC7A11/GPX4 pathway.

KEY WORDS: Vomitoxin; Ferroptosis; GPX4; SLC7A11

呕吐毒素(DON)广泛分布于霉变的小麦、大麦、玉米等谷物和加工食品中,是粮谷中污染严重的霉菌毒素之一,影响着人类健康,已成为重大的食品安全问题^[1-2]。肝脏是 DON 毒性作用的主要靶器官^[3]。长期接触低浓度 DON 污染的食物可能导致人和动物肝损伤,造成食欲下降和生长发育迟缓^[4-5]。因此,深入研究 DON 肝毒性的分子机制显得尤为重要,将为人类和动物 DON 肝疾病

防控提供新思路。铁死亡(ferroptosis)是一种以胞内铁稳态失衡、活性氧(ROS)异常蓄积、诱导脂质过氧化的细胞死亡方式^[6]。铁死亡的调控途径包括溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11)/谷胱甘肽(GSH)/谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)经典途径、脂质代谢途径、铁代谢途径,形态上表现为线粒体萎缩、嵴减少或消失、线粒体膜密度增加、线粒体外膜破裂等。已有研究^[7-8]表明, DON 导致

* 基金项目:湖北科技学院 2022 年度医学科研专项(2022YKY17);湖北科技学院博士启动基金项目(BK202315);湖北省青年基金(2023AFB537)

** 通讯作者, E-mail: 1358080527@qq.com

人正常肝细胞(L02)生长抑制和活力降低,然而,铁死亡在其中的作用尚不清楚。因此,本研究将探讨铁死亡在 DON 诱导的 L02 细胞毒性中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DON(HY-N6684)和 Fer-1(HY-100579)购自 MedChemExpress 公司;L02 细胞系购自通派(上海)生物科技有限公司;RPMI-1640 培养基(SH30809.01B)、青链霉素双抗(SV30010)、胰蛋白酶-EDTA 消化液(SH30042)购自 HyClone 公司;南美来源的胎牛血清(ST30-3302)购自 PANTM Seratech 公司;DMSO(D8418)购自美国 Sigma 公司;细胞冻存液(C40100)购自 NCM Biotech;CCK-8、C11 BODIPY581/591 探针购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;RNAiso Plus(9108Q)、Hiscript® III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)(R323)、ChamQ Universal SYBR qPCR Master(Q311)购自南京诺唯赞生物科技有限公司;Fe²⁺ 检测探针-FerroOrange(F374)购自同仁化学。

1.2 实验方法

1.2.1 L02 细胞的培养和处理

液氮冷冻的 L02 细胞放入 37℃ 水浴锅中快速解冻,复苏,1000rpm 离心 4min,去除上清液,加 1mL 含有 10% 胎牛血清、1% 抗生素(青链霉素)的 RPMI-1640 完全培养基,反复吹打成单个细胞后吸出,加到之前备好的细胞培养瓶中,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。复苏的细胞传代培养 3~4 次,用于后续的实验。

1.2.2 药物配制

1mg DON 标准品,加 337.473μL DMSO,配制成 1mmol/L 母液,分装,于 -20℃ 避光保存。

1.2.3 荧光定量 PCR

接种于 24 孔板中的细胞生长达到 70%,换成基础培养基饥饿处理 12h。根据前期文献^[7-8],选择 0、1.25、2.5、5μmol/L 的 DON 处理 12h。吸出培养基,用预冷的 PBS 清洗 2 次。每孔加入 0.5mL 的 TRIzol 试剂,收集细胞裂解液于 1.5mL 的无酶 EP 管中。将 RNA 分离、沉淀、清洗、溶解,于 -80℃ 保存。取 1μL 总 RNA 样品,于 Q3000 分光光度计中检测 RNA 的浓度和 A260/A280 比值。

提取的总 RNA 样品严格按照 Hiscript® III

RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)反转录说明书进行操作。根据引物(见表 1)和 ChamQ Universal SYBR qPCR Master 进行反应混合物的配制,然后分装于 96 孔板中,于伯乐 CFX96 RT-PCR 仪上进行热循环反应,设置程序为:95℃ 30s;95℃ 10s;60℃ 30s,共 40 个循环。热循环反应结束后,分析各个基因的扩增和溶解曲线。

表 1 qPCR 的引物序列

| 引物 | 序列 | 产物大小(bp) | 序列号 |
|---------|--|----------|-------------|
| GPX4 | Forward:5'-GGAGCCAGGGAGTAACGAAG-3' Reverse:5'-TGTCGATGAGGAAGTGTGTA-3' | 191 | NM_002085.5 |
| SLC7A11 | Forward:5'-TGTCACCATTGGCTATGTGCT-3' Reverse:5'-GCCGCTCAGAAAAGGTCAC-3' | 104 | NM_014331.4 |
| TFR1 | Forward:5'-CAGAGTCCGCTGTCAGTTC-3' Reverse:5'-CCACTGTAAACTCAGCCCA-3' | 152 | NM_003234.4 |
| GCLC | Forward:5'-CCATGGGATTTGGAATGGGC-3' Reverse:5'-AAATCACTCCCGCAGCCACAA-3' | 183 | NM_001498.4 |
| NQO1 | Forward:5'-CGAAGCAGCCTCTTTGACGA-3' Reverse:5'-TGGTGTCAGTGTGGGATGGAC-3' | 134 | NM_000903.3 |
| β-actin | Forward:5'-GAGAAAATCTGGCACCACACC-3' Reverse:5'-GGATAGCACGCCCTGGATAGCAA-3' | 177 | NM_001101.5 |
| HO-1 | Forward:5'-CAAGGAGAGCCAGTCTTCG-3' Reverse:5'-CTTCACATAGCGCTGCATCG-3' | 145 | NM_002133.3 |

1.2.4 单独 DON 处理细胞内 Fe²⁺ 的检测

当 96 孔板中的细胞生长达到 50% 时,换为基础培养基继续培养 12h,加不同浓度(0、1.25、2.5、5μmol/L)的 DON 处理 12h。基础培养基洗涤细胞 3 次。加入浓度为 1μmol/L 的 FerroOrange 荧光探针工作液,避光于 37℃ 孵育 30min,在荧光显微镜下观察并采集图像。

1.2.5 单独 DON 处理细胞脂质 ROS 的检测

细胞分组及处理同 1.2.4。加入基础培养基配制的 C11 BODIPY581/591 荧光探针(10μmol/L),避光于 37℃ 孵育 1h。PBS 清洗细胞 2 次,去除多余的染料。利用荧光显微镜,收集图像并分析。

1.2.6 Fer-1 联合 DON 处理细胞后 Fe²⁺ 的检测

当 96 孔板中的细胞生长达到 50% 时,换为基础培养基继续培养 12h,Fer-1 组和 DON + Fer-1 组加入 10μmol/L 的 Fer-1 预处理 2h,紧接着 DON 组和 DON + Fer-1 组加 5μmol/L 的 DON 继续孵育 12h,并设置空白对照组(Control 组)。后续操作同 1.2.4。

1.2.7 Fer-1 联合 DON 处理细胞后脂质 ROS 的检测

细胞分组及处理同 1.2.6,后续操作同 1.2.5。

1.2.8 CCK-8 实验

接种于 96 孔板中的细胞生长达到 70%,换为

RPMI-1640 基础培养基饥饿处理 12h, 细胞分组同 1.2.6。每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 在培养箱内继续孵育 1h。使用酶标仪在 450nm 波长处测定吸光度值, 根据试剂说明书的公式计算细胞活力。

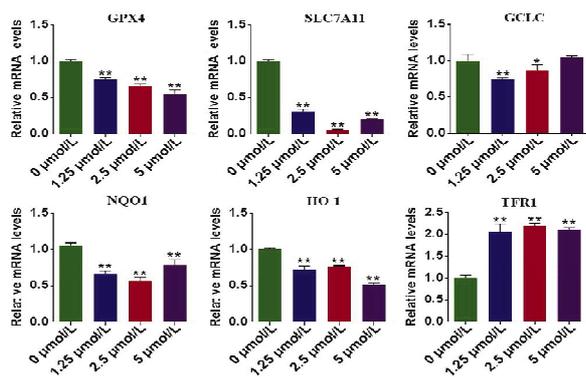
1.3 统计学方法

采用 Graphpad prism 7.0 统计软件绘图, 采用 SPSS 18.0 进行统计学分析, 多组的组间差异采用单因素方差分析(One Way ANOVA), 两组之间的差异采用 *t* 检验, 每次实验至少设置 3 个重复孔。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 DON 对铁死亡相关基因表达的影响

荧光定量 PCR 的结果如图 1, 与对照组相比, 铁死亡负调控基因 GPX4 的表达随 DON 浓度的升高而降低 ($P < 0.05$)。重要的是, DON 抑制铁死亡上游关键调节因子 SLC7A11 的表达。DON 暴露下, 铁死亡其他相关基因如 NAD(P)H: 醌氧化还原酶 1(NQO1)、血红素氧合酶 1(HO-1) 的表达显著降低 ($P < 0.05$)。在 1.25 和 2.5 μ mol/L 的 DON 处理下, 谷胱甘肽合成限速酶(GCLC) 基因的表达也显著下降 ($P < 0.05$)。转铁蛋白受体 1(TFR1) 的丰度增加是铁死亡的标志, 由图 1 可见, TFR1 的表达在 DON 处理后显著增加 ($P < 0.05$)。这些结果表明, GPX4、SLC7A11 可能是 DON 导致细胞铁死亡的关键蛋白。



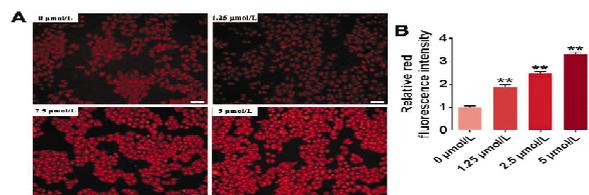
与对照组相比, ** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图 1 DON 对铁死亡相关基因表达的影响

2.2 DON 提高细胞内 Fe^{2+} 的水平

为了进一步证明 DON 所致 L02 铁死亡, 测定了细胞内 Fe^{2+} 水平。如图 2 所示, 与对照组相比, DON 浓度依赖性地增加细胞红色荧光的强度, 说明细胞内 Fe^{2+} 水平增加, 表明 DON 诱导细胞铁死

亡的发生。

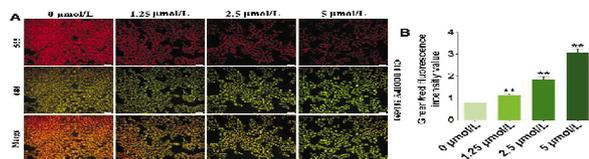


A. 荧光探针染色的结果图; B. 荧光强度定量统计图(标尺: 50 μ m; 与对照组相比, ** $P < 0.01$, $n = 3$)。

图 2 DON 对细胞内 Fe^{2+} 水平的影响

2.3 DON 导致 L02 细胞脂质过氧化

C11 BODIPY581/591 荧光探针染色后, 发生铁死亡的细胞会由红色荧光迁移为绿色荧光, 如图 3 所示。与对照组相比, 随着 DON 浓度的增加, 细胞红色荧光不断变弱, 绿色荧光不断增强, 说明细胞提高了脂质 ROS 水平, 诱导细胞铁死亡。

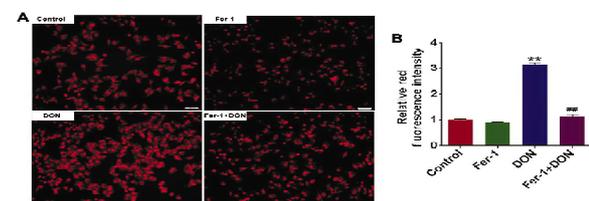


A. 荧光探针染色的结果图; B. 荧光强度定量统计图(标尺: 50 μ m; 与对照组相比, ** $P < 0.01$, $n = 3$)。

图 3 DON 对细胞脂质 ROS 水平的影响

2.4 Fer-1 抑制 DON 诱导的细胞游离 Fe^{2+} 水平升高

为了验证铁死亡是 DON 诱导 L02 细胞毒性的表现形式之一, 采用铁死亡抑制剂 Fer-1 预处理 L02 细胞, 首先检测细胞游离 Fe^{2+} 的水平。如图 4 所示, 与对照组相比, DON 显著提高细胞游离 Fe^{2+} 水平 ($P < 0.05$), 从而导致细胞铁死亡。而与 DON 处理相比, Fer-1 的预处理显著降低 Fe^{2+} 水平 ($P < 0.05$), 从而抑制了 DON 造成的细胞铁死亡。



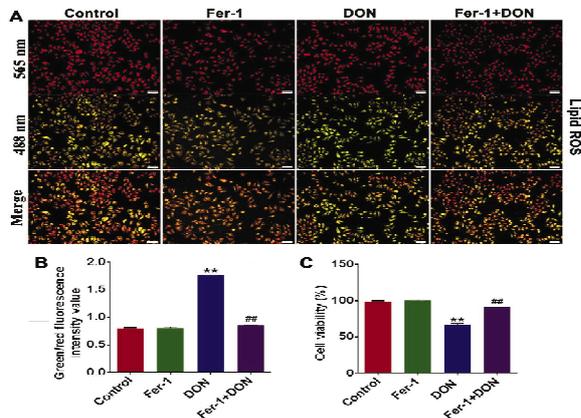
A. FerroOrange 荧光探针检测细胞内游离 Fe^{2+} 的水平; B. 荧光强度定量分析图(标尺: 50 μ m; 与对照组相比, ** $P < 0.01$; 与 DON 处理组相比, *** $P < 0.01$, $n = 3$)。

图 4 Fer-1 降低 DON 暴露下的细胞游离 Fe^{2+} 的水平

2.5 Fer-1 抑制 DON 诱导的细胞脂质 ROS 水平升高

为了进一步证明铁死亡是 DON 诱导 L02 细

胞毒性,采用铁死亡抑制剂 Fer-1 预处理 L02 细胞,并检测脂质 ROS 和细胞活力水平。如图 5 所示,与对照组相比,DON 显著提高细胞脂质 ROS 水平($P < 0.05$),从而导致细胞铁死亡,活力下降。而与 DON 处理相比,Fer-1 的预处理显著降低细胞脂质 ROS 水平($P < 0.05$),从而抑制了 DON 造成的细胞铁死亡,增加了细胞活力。



A. C11 BODIPY581/591 荧光探针检测细胞脂质 ROS 的水平;B. 荧光强度定量分析图;C. 细胞活力的变化(标尺:50 μ m;与对照组相比,* $P < 0.01$;与 DON 组相比,## $P < 0.01$, $n=3$)。

图 5 Fer-1 降低 DON 暴露下的细胞脂质 ROS 水平和提高细胞活力

3 讨论

以往的研究^[9-10]表明,DON 主要通过激活死亡受体途径,氧化应激、炎症、凋亡和自噬等机制,导致肝细胞毒性,促进肝细胞凋亡。铁死亡不同于细胞凋亡、坏死、焦亡、自噬等,而是一种铁依赖性的细胞死亡方式。本研究表明,DON 可通过提高细胞脂质过氧化和 Fe^{2+} 的水平,从而诱发细胞铁死亡,最终导致细胞活力降低。这表明铁死亡是 DON 诱导肝细胞毒性的机制之一。

DON 通过抑制 SLC7A11 和 GPX4 的表达,导致细胞铁死亡。胱氨酸/谷氨酸转运体系统(System Xc^- /GSH/GPX4)是调节铁死亡的经典通路^[11]。 Xc^- 系统由轻链 SLC7A11 和重链溶质载体家族 3 成员 2(SLC3A2)组成,其中 SLC7A11 参与胱氨酸的胞外摄取和谷氨酸释放,促进 GSH 的合成,维持 GPX4 的活性,最终防止细胞因脂质过氧化而死亡^[12-13]。本研究结果表明,DON 可降低 GPX4、SLC7A11 以及 GCLC、NQO1 和 HO-1 的表达,增加 TFR1 的表达和脂质 ROS 水平,导致生成和细胞内 Fe^{2+} 超载,最终造成细胞铁死亡。

总之,DON 通过抑制铁死亡关键蛋白 GPX4 和 SLC7A11 以及抗氧化蛋白 GCLC、NQO1 和 HO-1 的表达,增加 TFR1 的表达,诱导脂质 ROS 生成以

及 Fe^{2+} 过载,导致脂质过氧化和 L02 细胞铁死亡。本课题组将进一步研究 DON 诱导细胞铁死亡的分子机制,以及寻找中药靶向铁死亡来防控真菌毒素的细胞毒性。

参考文献:

- [1] BELASLI A, HERRERA M, ARIÑO A, et al. Occurrence and exposure assessment of major mycotoxins in foodstuffs from Algeria[J]. *Toxins (Basel)*, 2023, 15(7):449
- [2] YILMAZ EKER F, MURATOGLU K, OZTURK M, et al. Determination of multimycotoxin in cereal-based products sold in open-air markets[J]. *Foods*, 2023, 12(14):2744
- [3] FAN S, LIN L, LI P, et al. Selenomethionine protects the liver from dietary deoxynivalenol exposure via Nrf2/PPAR γ -GPX4-ferroptosis pathway in mice[J]. *Toxicology*, 2024, 501:153689
- [4] LIU A, HU S, WU Q, et al. Epigenetic upregulation of galanin-like peptide mediates deoxynivalenol induced-growth inhibition in pituitary cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 403:115166
- [5] PENG Z, CHEN L, NÜSSLER A K, et al. Current sights for mechanisms of deoxynivalenol-induced hepatotoxicity and prospective views for future scientific research: a mini review[J]. *J Appl Toxicol*, 2017, 37(5):518
- [6] LUO K, STOCKER R, BRITTON W J, et al. Haem oxygenase limits mycobacterium marinum infection-induced detrimental ferrostatin-sensitive cell death in zebrafish[J]. *FEBS J*, 2022, 289(3):671
- [7] LIU A, GUO M, HE L, et al. Nicotinamide N-methyltransferase protects against deoxynivalenol-induced growth inhibition by suppressing pro-inflammatory cytokine expression[J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 163:112969
- [8] LIU A, YANG Y, GUO J, et al. Cytochrome P450 enzymes mediated by DNA methylation is involved in deoxynivalenol-induced hepatotoxicity in piglets[J]. *Anim Nutr*, 2022, 9:269
- [9] CHEN H, CHEN X, MA J. The mitigation mechanism of hesperidin on deoxynivalenol toxicity in grass carp hepatocytes via decreasing ROS accumulation and inhibiting JNK phosphorylation[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2023, 134:108646
- [10] MAO X, LI J, XIE X, et al. Deoxynivalenol induces caspase-3/GSDME-dependent pyroptosis and inflammation in mouse liver and HepaRG cells[J]. *Arch Toxicol*, 2022, 96(11):3091
- [11] LI F J, LONG H Z, ZHOU Z W, et al. System Xc^- /GSH/GPX4 axis: an important antioxidant system for the ferroptosis in drug-resistant solid tumor therapy[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:910292
- [12] CUI J, ZHOU Q, YU M, et al. 4-tert-butylphenol triggers common carp hepatocytes ferroptosis via oxidative stress, iron overload, SLC7A11/GSH/GPX4 axis, and ATF4/HSPA5/GPX4 axis[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 242:113944
- [13] WANG P, YAO Q, ZHU D, et al. Resveratrol protects against deoxynivalenol-induced ferroptosis in HepG2 cells[J]. *Toxicology*, 2023, 494:153589

(收稿日期:2024-03-25)

贝那普利联合艾司洛尔对合并快速心律失常的感染性休克患者心肌酶谱水平的影响

刘立新¹, 童绥菊^{2*}

(1. 武汉市东西湖区人民医院急诊医学科, 湖北 武汉 430040; 2. 武汉市东西湖区人民医院药剂科)

摘要:目的 分析贝那普利联合艾司洛尔对合并快速心律失常的感染性休克患者心肌酶谱水平的影响。方法 选取我院收治的合并快速心律失常感染性休克患者90例,随机分为对照组、观察组,每组各45例。对照组给予贝那普利治疗,观察组在对照组的基础上给予艾司洛尔注射治疗,观察并对比两组心肌损害一般标志物、心肌酶谱、心功能指标、炎症因子和临床疗效水平。结果 治疗后,观察组心肌肌钙蛋白-I(cTn-I)、B型脑钠肽(BNP)下降、血清白蛋白(PA)升高更显著,血清乳酸脱氢酶1(LDH1)、肌酸激酶(CK)、 α -羟丁酸脱氢酶(α -HBDH)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)降低更显著,具有统计学差异(P 均 <0.05);观察组心输出量(CO)、左心室舒张早期/晚期速度峰值比值(VA/VE)、超敏C-反应蛋白(hs-CRP)、白细胞介素(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平降低,心搏量(SV)、射血分数(EF)升高更显著,且治疗总有效率高于对照组,具有统计学差异(P 均 <0.05)。结论 贝那普利联合艾司洛尔会降低合并快速心律失常感染性休克患者心肌酶谱水平,减少血小板激活所生成的缩血管物质及炎症物质,抑制炎症反应,改善内皮细胞功能,临床疗效显著。

关键词:快速心律失常;感染性休克;心肌酶谱;心功能;肌酸激酶

中图分类号:R541.7

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)05-0418-004

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0418



Effects of Benapril Combined with Esmolol on the Myocardial Enzyme Spectrum Levels in Patients with Infectious Shock Combined with Rapid Arrhythmias

LIU Li-xin, TONG Sui-ju

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

ABSTRACT: Objective To analyze the effect of Benapril combined with Esmolol on myocardial enzyme spectrum levels in patients with infectious shock combined with rapid arrhythmias. Methods 90 patients with infection shock complicated with rapid arrhythmia admitted to our hospital were randomly divided into a control and an observation group, with 45 patients in each group. The control group was treated with benazepril, and the observation group was given esmolol injection on the basis of the control group. The general markers of myocardial damage, myocardial enzyme spectrum, cardiac function indexes, inflammatory factors and clinical efficacy levels of the two groups were observed. Results After the treatment, the levels of myocardial calponin-I (cTn-I), type B brain natriuretic peptide (BNP) decreased, and serum albumin (PA) increased more significantly, and serum lactate dehydrogenase 1 (LDH1), creatine kinase (CK), beta-hydroxybutyrate dehydrogenase (α -HBDH), and creatine kinase isoenzyme (CK-MB) decreased more significantly in the observation group, with statistical differences (all $P < 0.05$). Cardiac output (CO), left ventricular diastolic early/late peak velocity ratio (VA/VE), hypersensitivity C-reactive protein (hs-CRP), interleukin (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α), increased pacing volume (SV), ejection fraction (EF), decreased in the observation group, and stroke volume (SV) and ejection fraction (EF) increased more significantly, and the total effective rate of treatment was higher than that in the control group, with statistical differences (all $P < 0.05$). Conclusion Benapril combined with esmolol can reduce the myocardial enzyme spectrum level in patients with infection shock complicated with rapid arrhythmia, reduce vasoconstrictor and inflammatory substances generated by platelet activation, inhibit inflammatory response, improve endothelial cell function, and have significant clinical efficacy.

KEY WORDS: Rapid arrhythmia; Septic shock; Myocardial enzyme spectrum; Cardiac function; Creatine kinase

快速心律失常是指患者因心功能、心脏结构异常而产生的心脏疾病,部分患者会有合并感

性休克,主要表现为室性早搏、心慌等,随着病情的加重会产生心室缺氧、缺血等状况,严重者的感

* 通讯作者, E-mail: dxhtsj4547@163.com

染性休克会危及患者生命^[1]。合并快速心律失常感染性休克会存在严重心肌抑制、低心输出量,过快的心率会让心肌耗氧量增加,进一步加重感染性休克,限制心室舒张期充盈,影响患者心功能且预后易恶化^[2]。相关研究显示,贝那普利、艾司洛尔都是治疗快速心率失常的有效药物,贝那普利可有效缓解心脏负荷,改善心肌酶谱水平^[3];艾司洛尔属于 β 受体阻滞剂,不但会让快速心率失常有显著改善,还会降低患者血压、有效恢复组织灌注及心肌做功效率^[4]。因此,基于上述临床基础研究,我们将贝那普利、艾司洛尔联合,探究二者对合并快速心律失常的感染性休克患者心肌酶谱水平的影响及临床疗效,并分析其具体作用机制。

1 资料与方法

1.1 诊断及纳入排除标准

诊断标准:符合《心血管病诊疗标准》^[5]中的诊断标准;感染性休克症状符合《2008 国际严重脓毒症和脓毒性休克治疗指南》^[6];经 12 导联心电图确诊,均为快速心律失常感染性休克。

纳入标准:①符合上述诊断标准;②患者服药依从性良好;③48h 内心电图显示发生快速心率失常,包括房颤、室上性心动过速、室颤等。

排除标准:①严重肝肾功能不全、严重高血压者;②严重房室传导阻滞、心源性休克等;③意识障碍、不能正常交流者;④妊娠或哺乳期女性;⑤心功能 IV 级。

1.2 一般资料

选取 2022 年 2 月至 2024 年 1 月我院收治的合并快速心律失常感染性休克患者 90 例,随机分为对照组、观察组,每组各 45 例。两组一般资料如表 1 所示,两组在性别、心率失常类型、心功能分级对比中无统计学差异($P > 0.05$),具有可比性。

表 1 两组一般临床资料对比[n(%)]

| 组别 | 例数 | 性别 | | 心律失常类型 | | | 心功能分级 | |
|-----|----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 男 | 女 | 房颤 | 室上速 | 室颤 | Ⅱ级 | Ⅲ级 |
| 对照组 | 45 | 27(60.00) | 18(40.00) | 13(28.89) | 21(46.67) | 11(24.44) | 21(46.67) | 24(53.33) |
| 观察组 | 45 | 25(55.56) | 20(44.44) | 10(22.22) | 23(51.11) | 12(26.67) | 19(42.22) | 26(57.78) |

1.3 治疗方法

所有患者入院后均按照快速心率失常感染性

休克治疗流程接受常规治疗。在休克纠正后对照组给予贝那普利(北京诺华制药有限公司,国药准字 H20030514)治疗,口服,5mg/次,1 次/d。观察组在对照组的基础上给予艾司洛尔注射(齐鲁制药有限公司,国药准字 H19991059)治疗,首先在 1min 内静脉注射负荷剂量 0.5mg/kg,然后以 0.1mg/(kg·min)静脉输注 4min,维持治疗 48h。两组患者均治疗 3 个月。

1.4 观察指标

1.4.1 心肌损害标志物

于治疗前后晨起空腹抽取患者静脉血 5mL,加入 EDTA-K2 抗凝后以 2000min 离心 15min,将分离后的上层血清置于 EP 管中,-70℃冰箱保存备用。使用化学发光免疫分析仪(ARCHITECTi1000SR)检测血清中 cTn-I、BNP 水平,仪器由美国雅培公司提供。使用 7180 型生化分析仪检测血清白蛋白(PA)水平,该仪器由日本日立公司提供。

1.4.2 心肌酶谱

利用 ELISA 法检测血清乳酸脱氢酶 1(LDH1)、肌酸激酶(CK)、 α -羟丁酸脱氢酶(α -HBDH)、肌酸激酶同工酶(CK-MB),试剂盒购自北京森美希克玛生物科技有限公司,上述指标均严格按说明书操作进行。

1.4.3 心功能指标

利用 GE Ultra-sound Vivid 7 超声心动图测量记录心功能指标,主要有心输出量(CO)、心搏量(SV)、左心室舒张早期/晚期速度峰值比值(VA/VE)等,采用改良的 Simpson 平面法计算射血分数(EF)。

1.4.4 炎症因子

采用免疫比浊法检测血清 hs-CRP、IL-6、TNF- α 水平。

1.4.5 临床疗效

按照美国纽约心脏协会(NYHA)中心功能分级对治疗后患者临床疗效做出评价。显效:心功能达到 1 级或 2 级,且心率失常等症状基本消失;有效:心功能提高 1 级,临床症状、体征有所改善;无效:心功能无显著变化,患者病情加重甚至死亡。

1.5 统计学方法

采用统计软件 SPSS 25.0 进行分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验,组内比较采用配对 t 检验;计数资料采用百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 时具有统计学差异。

2 结果

2.1 两组心肌损害一般标志物对比

如表2所示,治疗前,两组 cTn-I、BNP、PA 差

异无统计学意义($P > 0.05$),治疗后,两组 cTn-I、BNP 水平下降、PA 水平升高,与治疗前比较,具有统计学差异($P < 0.05$);观察组变化水平更显著,具有统计学差异($P < 0.05$)。

表2 两组心肌损害一般标志物对比($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | cTn-I($\mu\text{g/L}$) | | BNP(pg/mL) | | PA(mg/L) | |
|-----|----|--------------------------|-------------------------------|-----------------------|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| | | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 |
| 对照组 | 45 | 0.39 \pm 0.06 | 0.18 \pm 0.02 [*] | 1680.03 \pm 185.43 | 952.53 \pm 118.07 [*] | 148.82 \pm 18.73 | 175.82 \pm 21.06 [*] |
| 观察组 | 45 | 0.38 \pm 0.05 | 0.10 \pm 0.01 ^{**} | 1671.69 \pm 198.47 | 610.25 \pm 81.16 ^{**} | 146.78 \pm 20.95 | 193.25 \pm 23.44 ^{**} |

与同组治疗前比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,# $P < 0.05$ 。

2.2 两组心肌酶谱对比

如表3所示,治疗前,两组 LDH1、CK、 α -HBDH、CK-MB 无统计学差异($P > 0.05$),治疗后,

LDH1、CK、 α -HBDH、CK-MB 水平均降低,具有统计学差异($P < 0.05$);观察组降低水平更显著,具有统计学差异($P < 0.05$)。

表3 两组心肌酶谱对比($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | LDH1(U/L) | | CK(U/L) | | α -HBDH(U/L) | | CK-MB(U/L) | |
|-----|----|--------------------|--------------------------------|--------------------|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------|
| | | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 |
| 对照组 | 45 | 118.02 \pm 13.92 | 69.74 \pm 9.11 [*] | 473.84 \pm 55.43 | 288.13 \pm 37.40 [*] | 313.24 \pm 42.96 | 247.28 \pm 33.91 [*] | 53.64 \pm 7.41 | 37.72 \pm 5.28 [*] |
| 观察组 | 45 | 117.20 \pm 15.51 | 53.38 \pm 7.62 ^{**} | 474.30 \pm 56.07 | 240.21 \pm 29.26 ^{**} | 321.67 \pm 43.25 | 210.72 \pm 27.72 ^{**} | 54.76 \pm 7.13 | 30.09 \pm 4.02 ^{**} |

与同组治疗前比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,# $P < 0.05$ 。

2.3 两组心功能指标对比

如表4所示,治疗前,两组 CO、SV、VA/VE、EF 无统计学差异($P > 0.05$),治疗后,CO、VA/VE

水平降低、SV、EF 水平升高,具有统计学差异($P < 0.05$);观察组变化水平更显著,具有统计学差异($P < 0.05$)。

表4 两组心功能指标对比($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | CO(L/min) | | SV(mL/s) | | VA/VE | | EF/% | |
|-----|----|-----------------|-------------------------------|---------------------|--------------------------------|-----------------|-------------------------------|------------------|--------------------------------|
| | | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 |
| 对照组 | 45 | 7.40 \pm 1.24 | 6.55 \pm 1.19 [*] | 70.63 \pm 7.24 | 82.20 \pm 8.09 [*] | 1.81 \pm 0.26 | 1.24 \pm 0.19 [*] | 46.52 \pm 5.98 | 49.49 \pm 6.13 [*] |
| 观察组 | 45 | 7.58 \pm 1.32 | 5.09 \pm 1.01 ^{**} | 71.98 \pm 7.36 | 90.52 \pm 8.52 ^{**} | 1.80 \pm 0.25 | 0.89 \pm 0.06 ^{**} | 47.28 \pm 6.01 | 56.85 \pm 5.59 ^{**} |

与同组治疗前比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,# $P < 0.05$ 。

2.4 两组炎症因子对比

如表5所示,治疗前,两组 hs-CRP、TNF- α 、IL-6 无统计学差异($P > 0.05$),治疗后,两组 hs-

CRP、TNF- α 、IL-6 降低,具有统计学差异($P < 0.05$);观察组降低水平更显著,具有统计学差异($P < 0.05$)。

表5 两组炎症因子水平($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | hs-CRP(mg/L) | | TNF- α (ng/L) | | IL-6(mg/L) | |
|-----|----|-------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| | | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 |
| 对照组 | 45 | 12.26 \pm 3.71 | 7.45 \pm 1.83 [*] | 9.50 \pm 0.85 | 7.88 \pm 0.77 [*] | 153.43 \pm 26.85 | 130.54 \pm 17.93 [*] |
| 观察组 | 45 | 12.18 \pm 3.67 | 4.61 \pm 1.42 ^{**} | 9.46 \pm 0.91 | 6.12 \pm 0.66 ^{**} | 152.90 \pm 25.73 | 85.15 \pm 15.02 ^{**} |

与同组治疗前比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,# $P < 0.05$ 。

2.5 两组临床疗效比较

如表6所示,观察组治疗总有效率高于对照组,具有统计学差异($P < 0.05$)。

表6 两组临床疗效比较[n(%)]

| 组别 | 例数 | 显效 | 有效 | 无效 | 总有效率 |
|-----|----|-----------|-----------|----------|------------|
| 对照组 | 45 | 18(40.00) | 20(44.44) | 7(15.56) | 38(84.44) |
| 观察组 | 45 | 21(46.67) | 23(51.11) | 1(2.22) | 44(95.56)* |

与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

贝那普利属于第三代ACEI药物,近年来被证实可降低快速心率失常感染性休克患者的致残率、病死率,改善患者预后,预防心室重构等^[7]。相关研究^[8-9]表明,贝那普利服用后会加速机体代谢,有改善器官灌注、降低血压、缓解心脏负荷的多重作用,对治疗快速心率失常感染性休克有显著疗效。艾司洛尔则是短效选择性阻滞心肌 β_1 受体药物,会让心肌收缩减弱,减慢心率,同时可降低心脏外周阻力、扩张冠状动脉,减少心肌耗氧量,降低感染性休克发生率,改善快速心率失常预后^[10-11]。心肌损伤标志物cTn-I、BNP、PA含量可直接反映患者心脏收缩功能,评价心脏壁张力和心肌缺血状况,在快速心率失常的疗效判定及预后中价值较高^[12-13]。心肌酶谱属于特异性心肌损伤标志物,和健康人比较,快速心率失常感染性休克患者机体中心肌酶LDH1、CK、 α -HBDH、CK-MBI水平较高,心肌酶谱指标的异常升高标志着心肌细胞损伤坏死^[14-15],感染性休克合并快速性心律失常心功能I级的患者因心肌酶谱损伤不明显,而心功能IV级的患者为 β 受体阻滞剂使用的禁忌症,故均未纳入本研究中。

本研究结果表明,采用贝那普利联合艾司洛尔治疗的患者cTn-I、BNP下降、PA、SV、EF升高水平更显著,LDH1、CK、 α -HBDH、CK-MB降低水平更明显。积极有效监测心脏功能指标有利于优化快速心率失常感染性休克的治疗方案,帮助指导临床用药,降低心脏毒性发生率,二者联合会改善感染性休克患者心肌氧利用程度,调节患者机体免疫功能、抑制高分解代谢,有效改善心肌复极的不均一性,降低折返发生率和心率失常发生率。

综上所述,贝那普利联合艾司洛尔会降低合并快速心律失常感染性休克患者心肌酶谱水平,有效改善心肌复极不均一性,降低折返发生率和

心率失常发生率。同时,二者联合用药会改善患者机体组织灌注及心肌做功效率,减少血小板激活所生成的缩血管物质及炎性物质,抑制炎症反应,改善内皮细胞功能,临床疗效显著,值得临床推广。

参考文献:

- [1] 杨婷,黄惠斌,翁利,等.有效动脉弹性评估感染性休克患者容量反应性的临床研究[J].中华危重病急救医学,2021,33(3):269
- [2] 冯芳,杨伟伟,张正馨,等.影响感染性休克患者经外周静脉输注去甲肾上腺素安全性的危险因素分析[J].中华危重病急救医学,2021,33(3):276
- [3] 马力,罗亚玮,白如冰.贝那普利氢氯噻嗪片基层临床应用全科专家共识[J].中国全科医学,2021,24(11):1309
- [4] 中国生物医学工程学会心律分会心律失常药物工作委员会.艾司洛尔注射液抗心律失常中国专家建议[J].中华内科杂志,2021,60(4):314
- [5] 贝政平,沈卫峰.心血管病诊疗标准[M].上海:上海科学普及出版社,2013:129
- [6] 姚咏明,黄立峰,林洪远.《2008国际严重脓毒症和脓毒性休克治疗指南》概要[J].中国危重病急救医学,2008,20(3):135
- [7] 蔡国强,邹洁.贝那普利片联合美托洛尔片治疗高血压合并心力衰竭的临床研究[J].中国临床药理学杂志,2020,36(16):2386
- [8] 余洪.益气宁心汤联合贝那普利治疗慢性心衰患者的临床观察[J].中国全科医学,2019,22(S2):157
- [9] 刘志煜,孔亚伟,韩东建,等.沙库巴曲缬沙坦与贝那普利对终末期心力衰竭的疗效[J].郑州大学学报(医学版),2021,56(4):480
- [10] 徐恩国,刘文华,任诗佳,等.艾司洛尔联合丹参多酚酸盐对老年冠心病心绞痛患者心功能、血流动力学及氧化应激指标的影响[J].中国老年学杂志,2020,40(2):228
- [11] 龚爽,李树岩.胺碘酮联合艾司洛尔静脉注射治疗室性心动过速的临床疗效研究[J].中华老年心脑血管病杂志,2019,21(1):29
- [12] 陈发超,徐银川,张召才.新型生化标志物在脓毒症心肌损伤中的诊断价值研究进展[J].中国全科医学,2021,24(5):533
- [13] 余志华,余浩,祝炜,等.老年新型冠状病毒肺炎患者心肌损伤标志物与NT-proBNP对临床结局的预测价值[J].实用医学杂志,2021,37(8):965
- [14] 陈情,李越,颜若难.调强放疗对肺癌患者心电图心肌酶谱及B型利钠肽的影响[J].中国肿瘤临床,2020,47(18):944
- [15] 刘金艳,段云鹏,刘建伟,等.急性心肌梗死PCI术后肺部感染患者外周血Ang-2及肌红蛋白和降钙素原与心肌酶谱的相关性[J].中华医院感染学杂志,2020,30(19):2965

(收稿日期:2024-02-06)

腹腔镜辅助下胃癌根治术与传统开腹术对比研究*

刘超,陈爱华**

(宜昌市中心人民医院,湖北宜昌443000)

摘要:目的 对比腹腔镜辅助下胃癌根治术与传统开腹术临床疗效与患者应激反应程度。方法 回顾性选取我院收治的94例胃癌患者,将其中采用开腹胃癌根治术(ORG)治疗的46例纳入ORG组,采用腹腔镜辅助下胃癌根治术(LAGR)治疗的48例纳入LARG组。对比两组手术情况、术后恢复进程、术后各项指标及术后并发症发生率;术后3个月对比两组血清肿瘤标志物变化情况;随访1年,统计两组生存率、复发率与转移率。结果 LARG组顺利完成手术,未发生中转开腹;术后LARG组患者炎症指标水平低于ORG组(P 均 <0.05);LARG组手术用时长于ORG组,LARG组术中出血量与切口总长度均小于ORG组(P 均 <0.05);LARG组患者术后肠功能恢复时间、总住院时间均短于ORG组(P 均 <0.05);LARG组患者术后疼痛评分和术后并发症总发生率低于ORG组(P 均 <0.05);术后1年,两组复发率、转移率与生存率均未见统计学差异(P 均 >0.05)。结论 腹腔镜辅助下胃癌根治术与传统开腹术相比,能够达到持平的手术效果,虽手术时间较长但术中出血量减少,术后应激反应程度减轻,术后恢复时间缩短。

关键词:胃癌根治术;腹腔镜;开腹;炎症应激反应;氧化应激反应

中图分类号:R735.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)05-0422-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0422



A Comparative Study of Laparoscopic Assisted Radical Gastrectomy and Traditional Open Surgery for Gastric Cancer

LIU Chao, CHEN Ai-hua

(Yichang Central People's Hospital, Yichang Hubei 443000, China)

ABSTRACT: Objective To compare the clinical efficacy and stress response level of gastric cancer patients after laparoscopic assisted radical gastrectomy and traditional open surgery. **Methods** A retrospective selection was conducted on 94 gastric cancer patients who underwent surgical treatment in our hospital. Among them, 46 patients who underwent open radical gastrectomy (ORG) were included in the ORG group, and 48 patients who underwent laparoscopic assisted radical gastrectomy (LAGR) were included in the LARG group. Compared the surgical situation, postoperative recovery progress, various postoperative indicators and the incidence of postoperative complications in the two groups of patients. Subsequently, compared the changes of serum tumor markers between the two groups at 3 months after surgery. Follow up for 1 year and calculated the survival rate, recurrence rate, and metastasis rate for both groups. **Results** The surgeries of the LARG group were successfully completed without any conversion to open surgery. The levels of inflammatory markers in the LARG group were lower than those in the ORG group after surgery (all $P < 0.05$). The surgery time in the LARG group was longer than that in the ORG group, and the intraoperative blood loss and total incision length in the LARG group were smaller than those in the ORG group (all $P < 0.05$). The postoperative recovery time of intestinal function and total hospital stay in the LARG group were shorter than those in the ORG group (all $P < 0.05$). The postoperative pain score and total incidence of postoperative complications of patients in the LARG group were lower than those in the ORG group (all $P < 0.05$). One year after surgery, there was no statistically significant difference in the recurrence rate, metastasis rate and survival rate between the two groups (all $P > 0.05$). **Conclusion** LAGR for gastric cancer can achieve a similar surgical effect compared to traditional open surgery. Although LAGR is conducted with longer time, it can reduce intraoperative bleeding, alleviate postoperative stress response, and shorten postoperative recovery time.

KEY WORDS: Radical gastrectomy for gastric cancer; Laparoscopy; Open abdomen; Inflammatory stress response; Oxidative stress response

* 基金项目:湖北省健康委科研项目(WJ2023M129)

** 通讯作者, E-mail: 1796229421@qq.com

胃癌为临床上一种常见的消化系统恶性肿瘤^[1-3],早期时多无明显的典型表现,其主要症状易与胃肠道良性病变混淆^[4-6]。随着临床治疗水平的不断提高,早期胃癌通过根治术及围术期综合抗癌治疗多可获得理想预后^[7-9]。既往主要采用开腹胃癌根治术(ORG)操作直观,能够准确切除病灶、清扫淋巴结,但手术创伤较大,手术过程中患者腹腔完全暴露,术后恢复难度大、应激反应较明显,且部分体弱老年患者难以耐受。腹腔镜辅助下的胃癌根治术(LARG)于腹腔镜显像系统支持下操作,是一种微创手术,手术创口小、术中腹腔无直接暴露,术后易恢复、应激反应小。且腹腔镜系统的高清摄像头具有放大功能,能够辅助提高病灶切除的精准度,但操作过程较复杂。为了客观评估 LARG 与传统 ORG 治疗胃癌的临床疗效及对患者术后应激反应的影响,本院特开展此项研究。

1 资料与方法

1.1 纳入及排除标准

纳入标准:①符合《外科学》中胃癌相关诊断标准^[10];②经病理化验与医学影像学检查后确诊;③年龄 ≥ 18 岁;④符合手术治疗要求。排除标准:①合并其他恶性肿瘤;②本次入组前有放疗史或其他抗癌治疗史;③合并慢性阻塞性肺疾病;④入组时处于心脑血管不良事件急性期、感染性疾病急性期、各种慢性炎症急性发作期、其他手术或重大外伤后 14d;⑤术后立即转院或患方主动放弃治疗;⑥合并精神科疾病、认知功能障碍。

1.2 一般资料

回顾性选取 2022 年 1 月至 2023 年 1 月在本院接受手术治疗的 94 例胃癌患者。其中采用 ORG 治疗的 46 例纳入 ORG 组,采用 LARG 治疗的 48 例纳入 LARG 组。两组患者的性别、年龄、病灶位置、病理分期对比,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。本研究已通过我院伦理委员会审查(2024-014-01)。

表 1 两组一般资料对比

| 组别 | 性别 (男/女) | 年龄($\bar{x} \pm s$,岁) | 病灶位置[n(%)] | | | 病理分期[n(%)] | |
|-------------|-------------|-------------------------|------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| | | | 胃窦 | 胃体 | 胃底贲门 | Ⅱ期 | Ⅲ期 |
| ORG组(n=46) | 24/22 | 54.56 \pm 9.26 | 15(32.61) | 11(23.91) | 20(43.48) | 12(26.09) | 34(73.91) |
| LARG组(n=48) | 25/23 | 55.03 \pm 10.12 | 16(33.33) | 13(27.08) | 19(39.58) | 13(27.08) | 35(72.92) |

1.3 方法

1.3.1 ORG 组

采用 ORG 治疗,根据具体情况采用远端胃癌根治术、胃空肠 Y 型吻合,近端胃癌根治术、食管空肠 Y 型吻合、胃空肠吻合(双通道),全胃切除术、食管空肠 Y 型吻合。患者取平卧位,气管插管行全身麻醉。于上腹正中做手术切口绕脐,约 15cm,逐步切开入腹,仔细观察肿瘤病灶及周围转移情况。以远端胃癌根治为例,依据《腹腔镜局部进展期远端胃癌 D2 根治术标准操作流程:CLASS-01 研究共识》操作^[11]。具体操作:游离胃大弯,清扫 2、4 组淋巴结;游离十二指肠,清除第 6 组淋巴结;暴露肝总动脉,清除第 8 组淋巴结;显露腹腔动脉干、脾动脉近段、胃左动脉,清扫第 7、9、11p 组淋巴结;结扎切断胃右动脉,清扫第 5 组淋巴结;暴露肝固有动脉,清扫第 12a 组淋巴结。游离胃小弯,清扫 1、3 组淋巴结;游离十二指肠球部至幽门下 2cm。离断十二指肠,残端包埋;预定平面横断胃,距屈氏韧带约 15cm 处切断空肠,距屈氏韧带约 45cm 处空肠与近端空肠行 ROUX-Y 吻合,远端空肠经胃后壁作胃空肠吻合。充分止血,冲洗手术创面,放置引流管,关腹完成手术。

1.3.2 LARG 组

采取五孔 LARG 治疗,根据具体情况采用腹腔镜远端胃癌根治术、胃空肠 Y 型吻合,腹腔镜近端胃癌根治术、食管空肠 Y 型吻合、胃空肠吻合(双通道),腹腔镜全胃切除术、食管空肠 Y 型吻合。以腹腔镜远端胃癌根治术为例:气管插管全麻后,患者取仰卧位双腿分开呈人字位。于脐下缘放置 10mm 套管作为观察孔,以 CO₂ 建立气腹压力维持于 12mmHg,置入腹腔镜,于左腋前线肋缘下 1cm 处放置 12mm 套管作为主操作孔,左锁骨中线平脐处放置 5mm 套管作为副操作孔,右侧对称位置同样放置。探查病灶与周围组织、腹腔腹膜、盆腔等其他脏器的转移情况,观察淋巴结情况。超声刀游离远端胃组织,具体步骤同开腹远端胃癌根治术。游离完毕后于上腹正中做一约 5cm 切口,切口保护套护皮,体外做吻合,消化道重建方式同开腹胃癌根治。

1.4 观察指标

(1)观察两组血清炎症性应激反应指标:于术前、术后 24h 采集全部患者空腹肘静脉血样 3mL,常规避光无菌静置后置入离心机,3000r/min 处理 10min,制备为血清样本。按免疫酶联吸附法检测:C 反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)、白介素-6

(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)。

(2) 两组手术情况:手术用时、清扫淋巴结个数、术中出血量、切口总长度。

(3) 两组术后恢复进程:肠鸣音恢复、排气时间、排便时间、下床时间、总住院时间。

(4) 两组疼痛程度、静脉自控镇痛(patient controlled intravenous analgesia, PCIA):术后 6、12、24、72h 疼痛程度采用视觉模拟法(visual analog scale, VAS)评估^[12]。VAS 评分范围为 0~10 分,得分越高提示疼痛程度越严重。

(5) 术后 3 个月两组血清肿瘤标志物:糖类抗原(carbohydrate antigen, CA)199、CA724。

(6) 两组术后并发症:残胃无力、创口出血、十二指肠残端瘘、创口感染的发生率。

(7) 随访 1 年,统计两组生存率、复发率与转

移率。

1.5 统计学方法

使用 SPSS 26.0 软件进行数据分析。计量资料经 K-S 检测符合正态分布,采用 t 检验,按 $(\bar{x} \pm s)$ 表示;计数资料采用卡方检验,按 $n(\%)$ 表示;以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清应激反应指标比较

治疗前两组各项应激反应指标对比差异均无统计学意义($P > 0.05$);术后,两组 CRP、PCT、IL-6、TNF- α 与 MDA 水平均高于本组术前, SOD 水平均低于本组术前($P < 0.05$);术后 LARG 组 CRP、PCT、IL-6、TNF- α 与 MDA 水平均低于 ORG 组, SOD 高于 ORG 组(P 均 < 0.05)。见表 2。

表 2 两组血清应激反应指标比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | CRP/(mg/L) | | PCT/(ng/mL) | | IL-6/(ng/L) | | TNF- α /(pg/mL) | | MDA/(μ mol/L) | | SOD/(U/L) | |
|------------------|-----------------|--------------------|-----------------|-------------------|-----------------|--------------------|------------------------|----------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| | 术前 | 术后 | 术前 | 术后 | 术前 | 术后 | 术前 | 术后 | 术前 | 术后 | 术前 | 术后 |
| ORG 组($n=46$) | 5.83 \pm 0.46 | 20.59 \pm 2.37* | 0.11 \pm 0.01 | 0.51 \pm 0.09* | 8.83 \pm 0.89 | 48.86 \pm 3.87* | 117.93 \pm 11.64 | 153.62 \pm 14.17* | 5.86 \pm 0.94 | 8.29 \pm 1.31* | 101.16 \pm 14.32 | 53.78 \pm 7.14* |
| LARG 组($n=48$) | 5.91 \pm 0.56 | 14.35 \pm 1.12** | 0.12 \pm 0.04 | 0.36 \pm 0.05** | 8.52 \pm 1.02 | 38.23 \pm 3.13** | 120.15 \pm 11.35 | 137.91 \pm 13.82** | 5.87 \pm 0.96 | 7.13 \pm 1.25** | 101.42 \pm 14.41 | 83.62 \pm 9.85** |

与同组术前比较,* $P < 0.05$;与 ORG 组比较,** $P < 0.05$ 。

2.2 两组手术指标比较

LARG 组均顺利完成手术未发生中转开腹;LARG 组手术时长于 ORG 组,LARG 组术中出血量与切口总长度均小于 ORG 组($P < 0.05$),两组清扫淋巴结个数差异未见统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 两组手术指标比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 手术用时/min | 清扫淋巴结个数/个 | 术中出血量/mL | 切口总长度/cm |
|------------------|---------------------|------------------|-------------------|------------------|
| ORG 组($n=46$) | 134.96 \pm 15.27 | 24.83 \pm 2.83 | 75.12 \pm 9.37 | 16.67 \pm 2.24 |
| LARG 组($n=48$) | 165.12 \pm 18.46* | 25.12 \pm 2.92 | 40.06 \pm 4.25* | 5.31 \pm 0.56* |

与 ORG 组比较,* $P < 0.05$ 。

2.3 两组术后恢复进程指标比较

LARG 组术后肠鸣音恢复、排气时间、排便时间、下床时间、总住院时间均短于 ORG 组($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 两组术后恢复进程指标比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 肠鸣音恢复/h | 排气时间/h | 排便时间/h | 下床时间/h | 总住院时间/d |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| ORG 组($n=46$) | 53.24 \pm 5.32 | 67.94 \pm 7.12 | 93.64 \pm 6.73 | 58.34 \pm 5.84 | 17.67 \pm 1.78 |
| LARG 组($n=48$) | 31.73 \pm 2.46* | 42.48 \pm 4.24* | 76.12 \pm 4.54* | 21.52 \pm 2.15* | 13.78 \pm 1.35* |

与 ORG 组比较,* $P < 0.05$ 。

2.4 两组术后疼痛程度与 PCIA 累计次数比较

LARG 组术后 6、12、24、72h 时 VAS 评分均低于 ORG 组,术后 PCIA 累计按压次数少于 ORG 组($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 两组术后疼痛程度与 PCIA 累计次数比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | VAS/分 | | | | PCIA 累计次数/次 |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 术后 6h | 术后 12h | 术后 24h | 术后 72h | |
| ORG 组($n=46$) | 6.35 \pm 0.83 | 5.17 \pm 0.62 | 4.27 \pm 0.46 | 3.17 \pm 0.35 | 13.53 \pm 1.65 |
| LARG 组($n=48$) | 3.91 \pm 0.46* | 2.86 \pm 0.28* | 1.91 \pm 0.22* | 0.94 \pm 0.12* | 6.17 \pm 0.86* |

与 ORG 组比较,* $P < 0.05$ 。

2.5 两组血清肿瘤标志物比较

术前、术后 3 个月两组血清 CA199、CA724 水平对比,均未见统计学差异($P > 0.05$);术后 3 个月两组患者 CA199、CA724 水平均低于本组术前($P < 0.05$)。见表 6。

表 6 两组血清肿瘤标志物比较($\bar{x} \pm s$, U/mL)

| 组别 | CA199 | | CA724 | |
|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| | 术前 | 术后 | 术前 | 术后 |
| ORG 组($n=46$) | 59.64 \pm 6.15 | 18.08 \pm 1.89* | 30.96 \pm 3.14 | 8.17 \pm 1.31* |
| LARG 组($n=48$) | 60.06 \pm 6.23 | 17.45 \pm 1.94* | 31.06 \pm 3.23 | 8.03 \pm 0.95* |

与同组术前比较,* $P < 0.05$ 。

2.6 两组术后并发症发生率比较

LARG组并发症总发生率低于ORG组($P < 0.05$)。见表7。

表7 两组术后并发症发生率比较[n(%)]

| 组别 | 痰胃无力 | 创口出血 | 十二指肠残端瘘 | 创口感染 | 合计 |
|-------------|---------|---------|---------|---------|-----------|
| ORG组(n=46) | 3(6.52) | 2(4.35) | 3(6.52) | 2(4.35) | 10(21.74) |
| LARG组(n=48) | 1(2.08) | 0(0.00) | 0(0.00) | 0(0.00) | 1(2.08)* |

与ORG组比较,* $P < 0.05$ 。

2.7 两组随访情况比较

术后1年,两组患者复发率、转移率与生存率均未见统计学差异($P > 0.05$)。见表8。

表8 两组随访情况比较[n(%)]

| 组别 | 复发 | 转移 | 生存 |
|-------------|---------|---------|------------|
| ORG组(n=46) | 3(6.52) | 2(4.35) | 46(100.00) |
| LARG组(n=48) | 1(2.08) | 1(2.08) | 48(100.00) |

3 讨论

胃癌系指源于胃黏膜上皮细胞的恶性肿瘤,以腺癌为主要类型。胃癌在我国仍是最常见的恶性肿瘤之一,根治性手术为胃癌最重要的治疗方式,能够直接清除肿瘤病灶与邻近淋巴结,延缓肿瘤的发展进程,预防癌细胞远端转移及扩散。ORG为胃癌治疗的传统术式,于直视下手术,可直观的观察患者肿瘤病灶,病灶切除与淋巴结清扫操作均于直视条件下完成,且可通过快速病理确定切缘。

本组资料显示LARG组患者均成功完成手术未出现中转开腹病例;LARG组手术用时长于ORG组,说明LARG手术操作过程较为复杂。有研究认为腹腔镜下通过建立气腹能够完成胃癌根治术需要的操作空间,与本次研究结果相符^[13]。LARG组术中出血量与切口总长度均小于ORG组,提示LARG能够缩小术中创伤,有利于患者术后恢复。经对比可知,LARG组患者术后恢复时间更短。说明腹腔镜辅助下胃癌根治术虽然操作较传统开腹术复杂,但能够满足手术切除需要。

疼痛为临床最为常见的应激源。有研究认为疼痛可造成胃癌手术患者术后恢复进程延迟^[14]。因此,减轻胃癌患者术后疼痛程度是促进患者术后恢复的重要基础。本次研究结果表明,LARG组患者术后各时间点的疼痛程度更轻,患者按压

PCIA的次数更少,能够有效减少术后阿片类止痛药物的应用剂量,减轻疼痛诱发的应激反应程度。

炎性应激反应与氧化应激反应为各种手术术后常见的应激反应。本组资料表明,LARG组术后炎性应激反应与氧化应激反应水平均轻于ORG组;提示LARG能够减轻胃癌患者术后应激反应程度。黄新玲^[15]研究认为腹腔镜辅助下胃癌根治术能够减轻患者的术后炎性反应、减少对患者免疫功能的负面影响,从而有利于术后综合抗癌治疗,可与本次研究结论相互印证。

血清CA199、CA724为临床上常用的胃癌血清标志物。有研究认为,血清肿瘤标志物的表达水平能够量化性反应恶性肿瘤的进展情况,术后肿瘤病灶被切除,血清肿瘤标志物水平也会逐渐降低^[16]。本次研究结果表明,术后两组患者血清CA199、CA724水平均有明显下降,但两组间未见统计学差异;提示LARG能够达到传统手术的临床疗效,并不受手术操作空间受限的限制,同时腹腔镜的放大显像功能有利于进一步精确定切缘,发现微小病灶与微小转移灶。

本研究对比了两种手术方式的疗效及优缺点,尚有一定的不足,如样本量有限,不是多中心对比研究,在今后的科研工作中应进一步完善优化。综上所述,腹腔镜辅助下胃癌根治术与传统开腹术相比,能够达到持平的临床疗效,虽手术时间较长但可降低手术创伤,减少术中出血量,患者术后应激反应程度减轻,整体术后恢复时间缩短。

参考文献:

- [1] 郑宇,朝鲁孟,石宝琪,等.超高龄胃癌晚期患者介入治疗的临床观察[J].实用放射学杂志,2021,37(2):300
- [2] 李伟,潘静,陈曦.胃癌患者血清miR-21,miR-181表达与临床病理参数,预后的关系[J].现代消化及介入诊疗,2020,25(4):449
- [3] 朱阿考,刘信春,翟路路,等.全腹腔镜下胃癌根治术中应用免打结可吸收倒刺线关闭共同开口的可行性研究[J].腹腔镜外科杂志,2021,26(1):45
- [4] 张旺,裴琪,李涛.毕Ⅱ+Braun吻合与毕Ⅱ式吻合在腹腔镜远端胃癌根治术中的疗效对比研究[J].腹腔镜外科杂志,2021,26(4):252
- [5] 纪林冬,姜宝飞.GPX3的转录表达作为胃癌患者生存的预后标志物[J].现代消化及介入诊疗,2023,28(3):305
- [6] 王智浩,李毅,牛兆建,等.全腹腔镜远端胃癌根治术治疗局部进展期胃癌的近期疗效分析[J].腹腔镜外科杂志,2020,25(11):804

- [7] 王娟,王权,李孟彬,等.腹腔镜远端胃癌根治术非离断式 Roux-en-Y 和 Roux-en-Y 吻合的倾向评分匹配疗效分析[J].中华消化外科杂志,2020,19(9):970
- [8] 胡礼,杭晨,方雷,等.腹腔镜下远端胃癌根治术非离断式 Roux-en-Y 重建方式术后三年的随访结果[J].中华普通外科杂志,2020,35(12):932
- [9] 李前进,高金保,刘宇翔.术前动脉灌注化疗加栓塞介入治疗原发性胃癌的疗效及安全性评价[J].海南医学,2022,33(14):1806
- [10] 陈孝平,汪建平.外科学[M].第8版.北京:人民卫生出版社,2013:360
- [11] 中国腹腔镜胃肠外科研究组(CLASS),中国抗癌协会胃癌专业委员会,中华医学会外科学分会腹腔镜与内镜外科学组.腹腔镜局部进展期远端胃癌 D2 根治术标准操作流程:CLASS-01 研究共识[J].中华胃肠外科杂志,2019,22(9):807
- [12] 严广斌.视觉模拟评分法(整理)[J].中华关节外科杂志,2014,8(2):34
- [13] 闫文貌.完全腹腔镜下胃癌根治术中消化道重建的术式选择[J].中国临床医生杂志,2021,49(4):394
- [14] SHAO J, XIE J, SUN P, et al. Factors influencing postoperative recovery time of patients with gastric cancer[J]. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech, 2023, 33(4):370
- [15] 黄新玲.腹腔镜辅助胃癌 D2 根治术对进展期胃癌患者预后、术后免疫功能及细胞因子含量的影响研究[J].中国医药科学,2018,8(4):192
- [16] XU J, SONG J, WANG T, et al. A combination of methylation and protein markers is capable of detecting gastric cancer[J]. Epigenomics, 2021, 13(19):1557
- (收稿日期:2024-03-08)

(上接第 413 页)

- [9] NEELAKANTAN H, VANCE V, WETZEL M D, et al. Selective and membrane-permeable small molecule inhibitors of nicotinamide N-methyltransferase reverse high fat diet-induced obesity in mice[J]. Biochem Pharmacol, 2018, 147:141
- [10] BIAO Y, CHEN J, LIU C, et al. Protective effect of dan-shen zexie decoction against non-alcoholic fatty liver disease through inhibition of ROS/NLRP3/IL-1 β pathway by Nrf2 signaling activation[J]. Front Pharmacol, 2022, 13(6):877924
- [11] LI D, ZHAO D, DU J, et al. Heme oxygenase-1 alleviated non-alcoholic fatty liver disease via suppressing ROS-dependent endoplasmic reticulum stress[J]. Life Sci, 2020, 253(5):117678
- [12] PARK M N, RAHMAN M A, RAHMAN M H, et al. Potential therapeutic implication of herbal medicine in mitochondria-mediated oxidative stress-related liver diseases[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(10):2041
- [13] RYAN J D, ARMITAGE A E, COBBOLD J F, et al. Hepatic iron is the major determinant of serum ferritin in NAFLD patients[J]. Liver Int, 2018, 38(1):164
- [14] YANG Y, CHEN J, GAO Q, et al. Study on the attenuated effect of Ginkgolide B on ferroptosis in high fat diet induced nonalcoholic fatty liver disease[J]. Toxicology, 2020, 445(6):152299
- [15] CHEN S, ZHU J Y, ZANG X, et al. The emerging role of ferroptosis in liver diseases[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9:801365
- [16] SHA W, HU F, XI Y, et al. Mechanism of ferroptosis and its role in type 2 diabetes mellitus[J]. J Diabetes Res, 2021, 2021:9999612
- [17] KE P, BAO X, LIU C, et al. LPCAT3 is a potential prognostic biomarker and may be correlated with immune infiltration and ferroptosis in acute myeloid leukemia: a pan-cancer analysis[J]. Transl Cancer Res, 2022, 11(10):3491
- [18] YANG D, ZHANG X, YUE L, et al. Thiamethoxam induces nonalcoholic fatty liver disease in mice via methionine metabolism disturb via nicotinamide N-methyltransferase overexpression[J]. Chemosphere, 2021, 273(5):129727
- [19] GRIFFITHS A, WANG J, SONG Q, et al. Nicotinamide N-methyltransferase upregulation via the mTORC1-ATF4 pathway activation contributes to palmitate-induced lipotoxicity in hepatocytes[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2021, 321(3):C585
- (收稿日期:2024-04-21)

砭石循经按摩联合中药砭石热熨在老年股骨骨折术后便秘患者中的应用

林春兰,施晓芸

(大田县中医院,福建 大田 366100)

摘要:目的 探讨给予老年股骨骨折术后便秘患者砭石循经按摩联合中药砭石热熨的应用效果。方法 选取我院收治的老年股骨骨折术后便秘住院患者200例,按照随机数表法分成干预组(100例)与对照组(100例),对照组给予中药砭石热熨,干预组给予砭石循经按摩联合中药砭石热熨,比较两组恢复情况、便秘程度、肛门疼痛程度、睡眠质量。结果 干预组肠鸣音频率较对照组更高,首次排便时间更短(P 均 <0.05);两组干预后便秘患者症状自评量表(PAC-SYM)评分、简化版McGill疼痛问卷(SF-MPQ)评分、匹兹堡睡眠质量指数量表(PSQI)评分均下降,干预组较对照组更低(P 均 <0.05)。结论 老年股骨骨折术后便秘患者给予砭石循经按摩联合中药砭石热熨,能够促进患者恢复,改善便秘、疼痛情况,提高睡眠质量。

关键词:股骨骨折;便秘;砭石循经按摩;中药砭石热熨

中图分类号:R244

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)05-0427-004

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0427



Application of Acupoint Massage with Stone Needles Along the Meridian Combined with Traditional Chinese Medicine Bianshi Hot Ironing in Elderly Patients with Postoperative Constipation after Femoral Fracture Surgery

LIN Chun-lan, SHI Xiao-yun

(Datian County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Datian Fujian 366100, China)

ABSTRACT: Objective To explore the application effect of acupoint massage with stone needles along the meridian combined with traditional Chinese medicine Bianshi hot ironing on postoperative constipation in elderly patients after femoral fractures. **Methods** A total of 200 elderly patients admitted in our hospital with constipation after femoral fractures surgery were selected, and divided into the intervention group (100 cases, acupoint massage with stone needles along the meridian combined with traditional Chinese medicine Bianshi hot ironing) and the control group (100 cases, traditional Chinese medicine Bianshi hot ironing). The recovery, degree of constipation, anus degree of pain and sleep quality in both groups were compared. **Results** Compared with the control group, the audio frequency of bowel sounds in the intervention group was higher, and the first bowel movement time was shorter (all $P < 0.05$). After intervention, patient symptom checklist for constipation (PAC-SYM) scores megill pain questionnaire (SF-MPQ) scores and pittsburgh sleep quality index (PSQI) scores in both groups were decreased, and the intervention group was lower than the control group (all $P < 0.05$). **Conclusion** The combination of Bianshi meridian massage and traditional Chinese medicine Bianshi hot ironing can promote patient recovery, improve constipation, pain and sleep quality in elderly patients with postoperative constipation after femoral fracture surgery.

KEY WORDS: Femoral fracture; Constipation; Acupoint massage with stone needles along the meridian; Traditional Chinese medicine Bianshi hot ironing

股骨骨折多由间接或直接暴力作用导致,老年人骨量减少、骨骼脆性增加,轻微外力即可引发骨折,不仅引起局部畸形、肿胀等症状,还会严重限制患者日常生活活动^[1]。临床上常采用手术方法治疗股骨骨折,但手术创伤可造成术后疼痛,且患者长期卧床休息,容易出现便秘问题,不仅影响早期进食,还可导致胃肠功能恢复时间延长。中药砭石热熨主要利用透皮吸收原理,以中医经络学说作为理论基础,对特定穴位进行热熨,操作简便,且安全性高,但单纯使用整体干预效果不理想^[2]。砭石循经按摩是一种较为简单的中医技术,以顺时针或逆时针方向进行按摩,能够促进气血运行,减少疼痛介质分泌,降低疼痛程度^[3]。本研究对200例老年股骨骨折术后便秘患者进行分析,旨在探讨砭石循经按摩联合中药砭石热熨的应用效果,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 纳入与排除标准

纳入标准:①符合《外科学(9版)》^[4]中关于股骨骨折的诊断标准,经影像学检查证实;②均于股骨骨折术后住院期间出现便秘症状,符合《实用内科学》^[5]中关于功能性便秘的诊断标准;③患者年龄 ≥ 60 岁;④均为意外摔伤,生命体征稳定,符合手术指征;⑤沟通能力正常,可配合干预;⑥患者对本研究知情同意。排除标准:①骨折前即存在肠道器质性疾病、严重便秘者;②合并穴位皮肤破损、炎症或对胶布过敏者;③合并精神疾病、认知异常者;④合并重要脏器功能异常者;⑤合并恶性肿瘤者。

1.2 一般资料

选取我院2022年1月至2023年6月期间收治的200例老年股骨骨折术后便秘住院患者,以随机数表法分成干预组($n=100$)与对照组($n=100$),干预组男44例,女56例;年龄62~85岁,平均 (71.32 ± 4.24) 岁;骨折类型:股骨粗隆间骨折50例,股骨颈骨折36例,股骨干骨折5例,其他9例。对照组男47例,女53例;年龄61~86岁,平均 (72.09 ± 4.15) 岁;骨折类型:股骨粗隆间骨折48例,股骨颈骨折39例,股骨干骨折6例,其他7例。两组患者上述基线资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究经我院医学伦理委员会审核批准。

1.3 方法

两组均给予常规治疗及护理,开展股骨骨折健康宣教,进行骨折康复训练,早期以主动、被动屈伸关节为主,循序渐进,30~60min/次,2次/d;为患者按摩肢体,密切观察下肢周径和皮肤颜色、温度等,及时处理异常情况,预防下肢深静脉血栓形成;关注患者心理状态,以温和亲切的态度进行沟通,鼓励患者合理宣泄负性情绪、保持积极乐观态度。根据患者便秘程度采取合理的干预手段,如肥皂水灌肠、使用开塞露(湖北康正药业有限公司,国药准字H42020134,规格:20mL)等,以脐为中心,顺时针按摩,每次20min,2次/d,共干预6d。

对照组给予中药砭石热熨:取黄芪、肉桂、厚朴各10g,及艾草20g,研磨成粉,加酒调和成糊状,将药膏敷于神阙周围,将砭石热熨仪热力调至38℃~42℃,将其至于膏状中药中,以神阙穴为中心点进行按揉,按揉穴位包括神阙、中脘、气海、天枢、关元等,1次/d,每次15min。

干预组给予砭石循经按摩联合中药砭石热熨(同对照组):对天枢、大横、中脘、神阙、关元、气海、肾俞、脾俞、大肠俞、八髎等穴位进行确定,使用鹊跃牌电热砭石按摩仪,链接电源,将温度控制在45℃,将凡士林涂抹于患者皮肤表面,将按摩仪置于患者背部双侧太阳膀胱经,由风门穴开始,按摩至下髎穴,对上述穴位进行来回推行、熨烫,以顺时针方向进行按摩,重点对肾俞、脾俞、大肠俞、八髎进行按摩,每个穴位按摩时间为1min。将神阙穴作为中心,依次对天枢、左侧大横、气海、关元、天枢、右侧大横、中脘等穴位以顺时针方向进行按摩,重点对上俞穴进行按摩、熨烫,两个相近的穴位为1min,将操作力道控制在合理范围内,由轻至重逐渐向下压,操作过程中随时询问患者感受,若出现不适及时停止操作。

两组均干预6d。

1.4 观察指标

①恢复情况:比较两组肠鸣音频率、首次排便时间。②便秘程度:采用便秘患者症状自评量表(PAC-SYM)^[6],于干预前、干预6d后进行评估,该量表共包含12个条目,每个条目0~4分,总分0~48分,得分与便秘严重程度呈正比。③肛门疼痛程度:采用简化版McGill疼痛问卷(SF-MPQ)^[7],于干预前、干预6d后评估肛门疼痛情况,该量表共包含疼痛强度(PPI)、视觉模拟评分(VAS)、疼痛分级指数(PRI)3个部分,其中PPI

得分0~5分,VAS得分0~10分,PRI得分0~45分,得分与疼痛程度呈正比。④睡眠质量:采用匹兹堡睡眠质量指数量表(PSQI)^[8],于干预前、干预6d后进行评估,该量表共包含入睡时间、睡眠时间、睡眠质量、睡眠效率、睡眠障碍、催眠药物、日间功能7个部分,总分0~21分,得分与睡眠质量呈反比。

1.5 统计学方法

采用SPSS 25.0统计学软件,计量资料用($\bar{x} \pm s$)描述,组间比较行 t 检验,计数资料用率描述,组间比较行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组恢复情况比较

与对照组比较,干预组肠鸣音频率更高($P < 0.05$),首次排便时间更短($P < 0.05$)。见表1。

表1 两组恢复情况比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | 肠鸣音频率/(次/min) | | 首次排便时间/h | |
|-----|-----|---------------|---------------|-----------------|-----------------|
| | | 干预前 | 干预后 | 干预前 | 干预后 |
| 干预组 | 100 | 4.76 ± 1.18 * | 4.76 ± 1.18 * | 42.69 ± 15.70 * | 42.69 ± 15.70 * |
| 对照组 | 100 | 3.53 ± 1.09 | 3.53 ± 1.09 | 55.21 ± 16.63 | 55.21 ± 16.63 |

与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 两组便秘程度比较

干预前,两组PAC-SYM评分比较差异无统计学意义($P > 0.05$),干预后,两组评分均有所下降

($P < 0.05$),与对照组比较,干预组更低($P < 0.05$)。见表2。

表2 两组便秘程度比较($\bar{x} \pm s$,分)

| 组别 | 例数 | 便秘程度 | |
|-----|-----|--------------|-----------------|
| | | 干预前 | 干预后 |
| 干预组 | 100 | 25.92 ± 5.13 | 19.20 ± 3.25 ** |
| 对照组 | 100 | 26.17 ± 5.45 | 21.96 ± 4.41 * |

与同组干预前比较,* $P < 0.05$;与对照组同时期比较,** $P < 0.05$ 。

2.3 两组肛门疼痛程度比较

干预前,两组SF-MPQ评分比较差异无统计学意义($P > 0.05$),干预后,两组较干预前有所下降($P < 0.05$),与对照组相比,干预组更低($P < 0.05$)。见表3。

表3 两组肛门疼痛程度比较($\bar{x} \pm s$,分)

| 组别 | 例数 | PPI | | VAS | | PRI | |
|-----|-----|-------------|----------------|-------------|----------------|--------------|-----------------|
| | | 干预前 | 干预后 | 干预前 | 干预后 | 干预前 | 干预后 |
| 干预组 | 100 | 3.32 ± 0.68 | 1.96 ± 0.43 ** | 7.47 ± 1.26 | 4.20 ± 1.15 ** | 30.65 ± 4.73 | 16.29 ± 3.37 ** |
| 对照组 | 100 | 3.37 ± 0.51 | 2.12 ± 0.54 * | 7.55 ± 1.38 | 5.39 ± 1.26 * | 30.82 ± 4.54 | 22.50 ± 5.11 * |

与同组干预前比较,* $P < 0.05$;与对照组同时期比较,** $P < 0.05$ 。

2.4 两组睡眠质量比较

干预前,两组PSQI评分比较差异无统计学意义($P > 0.05$),干预后,两组均有所改善($P < 0.05$),与对照组比较,干预组更低($P < 0.05$)。见表4。

表4 两组睡眠质量比较($\bar{x} \pm s$,分)

| 组别 | 例数 | 入睡时间 | | 睡眠时间 | | 睡眠质量 | | 睡眠效率 | | 睡眠障碍 | | 催眠药物 | | 日间功能 | |
|-----|-----|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|
| | | 干预前 | 干预后 |
| 干预组 | 100 | 2.20 ± 0.51 | 1.45 ± 0.39 ** | 1.59 ± 0.31 | 0.73 ± 0.18 ** | 2.06 ± 0.59 | 1.35 ± 0.26 ** | 1.43 ± 0.36 | 0.78 ± 0.23 ** | 1.82 ± 0.57 | 1.16 ± 0.35 ** | 2.13 ± 0.31 | 1.29 ± 0.40 ** | 2.20 ± 0.63 | 1.19 ± 0.35 ** |
| 对照组 | 100 | 2.27 ± 0.43 | 1.76 ± 0.44 * | 1.56 ± 0.36 | 1.12 ± 0.23 * | 2.14 ± 0.67 | 1.71 ± 0.52 * | 1.47 ± 0.32 | 1.05 ± 0.31 * | 1.91 ± 0.53 | 1.39 ± 0.41 * | 2.15 ± 0.38 | 1.45 ± 0.37 * | 2.25 ± 0.61 | 1.52 ± 0.47 * |

与同组干预前比较,* $P < 0.05$;与对照组同时期比较,** $P < 0.05$ 。

3 讨论

股骨骨折好发于老年群体,患者受到撞击、砸压、坠落等暴力作用影响,股骨的完整性和连续性被破坏,可引发剧烈疼痛,并伴有下肢活动障碍,使患者无法正常站立或行走^[9]。股骨骨折发生后,患者需要借助螺钉、钢板、石膏等固定骨折断端,对体位有一定限制,且手术创伤会造成疼痛、失血,患者血亏津枯、气血失调、肠腑通降失常,出

现便秘症状,不利于术后康复^[10]。合理有效的护理措施能够减轻患者身心痛苦,维持机体正常功能,有助于预后改善。

近年来,人们对传统中医的研究不断深入,以中医理论为指导的中医特色护理在临床上也得到广泛应用^[11]。中药砭石热熨利用药膏与热作用刺激患者体表穴位,药物成分透过皮肤进入毛细血管,在局部维持稳定、持久的血药浓度^[12]。本研究选取神阙、中脘、气海、天枢、关元等穴位,其

中神阙可和胃理肠、培元固本;中脘可调节气血、降逆止呕;气海可活血化瘀、补肾益气;天枢可活血散瘀、理气止痛、清利湿热;关元可培元固本、下焦补益;向上述穴位实施中药砭石热熨,能够疏通经络、泻热通便、调理脏腑^[13]。但单纯使用时起效缓慢,存在一定局限性。砭石循经按摩主要借助仪器对贴近经脉的表层皮肤循经脉流注路线进行按摩,以按揉的方式刺激穴位,直达脏腑,以达到气血运行的目的,从而加快食物消化,促进粪便排出,而且还可温补肾脾、补气益肺,刺激神经根,影响盆底肌节律性收缩及舒张运动,从而对排便反应进行调节,改善便秘问题^[14-15]。本研究中,干预组肠鸣音频率较对照组更高,首次排便时间更短。推测其原因,联合干预能够激发周身经气、振奋脏腑功能,减轻组织炎症性水肿,促进肠道功能的改善,缩短患者恢复时间。本研究结果中,干预组 PAC-SYM 评分较对照组更低。考虑其原因,联合干预能够调节胃肠自主神经功能,改善交感神经、副交感神经兴奋性,调理脏腑气机,缓解胃肠平滑肌痉挛,加快胃肠道蠕动速度,从而消食导滞、理气通便,减轻患者便秘症状。

本研究中,干预组 SF-MPQ 评分较对照组更低。分析其原因,联合干预能够刺激患者特定穴位,发挥神经-体液调节作用,纠正机体内分泌紊乱,减少疼痛介质的释放,同时促进肛门处血管扩张,加快局部血流循环,消除组织肿胀,降低患者疼痛程度。本研究中,干预组 PSQI 评分为较对照组更低($P < 0.05$)。考虑其原因,联合干预能够疏通气血、调和阴阳,发挥养心安神之效,激活副交感神经紧张效应,调节神经递质的合成及释放,起到镇静、助眠作用,同时改善脑部血流循环,维持大脑的正常生理功能,提高患者睡眠质量。

综上所述,砭石循经按摩联合中药砭石热熨应用于老年股骨骨折术后便秘患者,可促进患者更快恢复,对便秘、疼痛情况有显著改善作用,提高睡眠质量。

参考文献:

[1] 顾宇青,朱霞,徐敏. 预防性护理在老年股骨颈骨折患者术后下肢深静脉血栓形成预防中的效果[J]. 中外

医学研究,2023,21(29):109

- [2] 吴海燕,崔俊瑜. 穴位电刺激配合中药脐部热熨治疗脑卒中后功能性便秘临床观察[J]. 实用中医药杂志,2023,39(8):1662
- [3] 赵丹娜,于明珠,杨艾影,等. 砭石循经按摩联合生物反馈治疗脾肾阳虚型出口梗阻型便秘的疗效观察[J]. 护理研究,2023,37(18):3404
- [4] 陈孝平,汪建平,赵继宗. 外科学[M]. 第9版. 北京:人民卫生出版社,2018:657
- [5] 陈灏珠,林果为,王吉耀. 实用内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:1944
- [6] FRANK L, KLEINMAN C, FARUP L, et al. Psychometric validation of a constipation symptom assessment questionnaire[J]. Scand J Gastroenterol, 1999, 34(9):870
- [7] MELZACK R. The McGill pain questionnaire: major properties and scoring methods[J]. Pain, 1975, 1(3):277
- [8] BUYSSE D J, RERNOLDS C F, MONK T H, et al. The pittsburgh sleep quality index: a new instrument for psychiatric practice and research[J]. Psychiatry Res, 1989, 28(2):193
- [9] 梁文斌,沈静. 责任制护理在髌关节置换术治疗股骨颈骨折护理中的应用及对预后的影响[J]. 中外医学研究,2020,18(6):84
- [10] 叶丽英. 穴位贴敷联合艾灸干预对行髌关节置换术髌部骨折患者的影响[J]. 中西医结合护理(中英文), 2021, 7(11):65
- [11] 吴玉,李家玲,邓雄伟. 坐卧式“六字诀”联合耳穴压豆对老年髌部骨折术后睡眠障碍的临床护理研究[J]. 临床护理杂志,2023,22(2):42
- [12] 邹修梅,段筱妍,贾妮,等. 中药砭石热熨治疗帕金森病气虚便秘的疗效观察[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2022,24(11):4620
- [13] 洪颖. 莱菔子中药热熨腹部对单侧全髌关节置换患者胃肠功能恢复的影响[J]. 医学食疗与健康,2021, 19(20):19
- [14] 韩菲,王玉慧. 子午流注循经拍打联合穴位按摩预防化疗所致便秘的临床观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2023, 32(15):2164
- [15] 曹秋菊. 穴位按摩改善胸腰椎骨折病人腹胀、便秘的疗效观察[J]. 循证护理,2022, 8(14):1986

(收稿日期:2024-05-06)

基于 HAPA 模型的护理干预在维持性血液透析患者运动康复中的应用

邹元美¹,白雪²,杨斌¹,王禄¹,耿丽丽^{3*}

(1. 滨州医学院附属医院血液透析室,山东滨州 256600;2. 滨州医学院附属医院手术室;
3. 滨州医学院附属医院肾内科)

摘要:目的 以健康行动过程取向(HAPA)模型理论为依据,研究其在维持性血液透析患者运动康复中的实施效果。方法 将符合标准的维持性血液透析(MHD)患者根据其透析时间分为干预组和对照组,每组均30例。对照组接受传统的透析护理,在干预组中,除了进行对照组相同的透析护理外,还采用基于HAPA模型的运动干预。对比两组干预前后的身体功能、运动自我效能以及透析患者锻炼益处/障碍得分。结果 干预3个月后,干预组躯体功能、运动自我效能及透析患者锻炼益处/障碍与对照组相比,均显著改善(P 均 <0.05)。结论 基于HAPA模型的运动护理干预能有效改善MHD患者躯体功能、运动自我效能及透析患者锻炼益处/障碍得分,并建立运动健康信念。

关键词:健康行动过程;维持性血液透析;运动康复;健康行动过程取向模型

中图分类号:R47

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)05-0431-004

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0431



Application of Nursing Intervention Based on HAPA Model in the Exercise Rehabilitation of Maintenance Hemodialysis Patients

ZOU Yuan-mei, BAI Xue, GENG Li-li, et al

(Department of Hemodialysis Room, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou Shandong 256600, China)

ABSTRACT: Objective To examine the implementation effects of intervention strategies employed in the rehabilitation of maintenance hemodialysis patients based on the HAPA model theory. **Methods** Patients who met the inclusion and exclusion criteria were randomly divided into two groups based on their dialysis time. The study included an intervention group and a control group, each comprising 30 participants. The control group received traditional dialysis care, while the intervention group, in addition to the same dialysis care as the control group, underwent exercise intervention based on the HAPA model. A comparison was made between the two groups in terms of physical function, exercise self-efficacy and exercise benefits/barriers scores for dialysis patients before and after the intervention. **Results** Three months after intervention, in the intervention group, there were significant improvements in physical function, exercise self-efficacy and exercise benefits/barriers for dialysis patients compared to the control group, with statistically significant differences (all $P < 0.05$). **Conclusion** Exercise intervention based on HAPA model can effectively improve physical function, exercise self-efficacy and exercise benefit/impairment scores in dialysis patients, and establish exercise health beliefs.

KEY WORDS: Healthy action process; Maintenance hemodialysis; Exercise rehabilitation; HAPA model

维持性血液透析(maintenance hemodialysis, MHD)是目前延长慢性肾衰竭患者生存期的有效治疗方法,随着血液净化技术的不断进步,终末期肾脏病患者的临床症状得到改善。有研究^[1]显示,科学合理的运动可以提高血液透析的效果,加强患者心血管功能,增加肌肉力量,对于慢性肾脏疾病的转归也有积极的影响。然而,研究^[2]显示,MHD患者运动水平低下、运动依从性不佳是一种

普遍现象。调查^[3]显示,我国MHD患者中将近一半运动频率低于每周1次,另外运动锻炼“知-信-行”也处于较低水平。健康行动过程取向(health action process approach, HAPA)模型根据人的健康行为划分前意向阶段、意向阶段和行动阶段,可将行为意向转化为健康行为,该理论兼具了阶段性与连续性理论的优点^[4],目前应用于脑卒中、冠心病、COPD、糖尿病等患者的自我管理和运动锻炼

* 通讯作者, E-mail: gengli30115@163.com

中,在MHD患者的运动康复中鲜有报道。因此,我们深入研究基于HAPA模型的运动干预对MHD患者的应用效果。

1 资料与方法

1.1 纳入及排除标准

纳入标准:①经临床检查,确认病情为晚期肾病,且已经接受三个月以上有规律的血液透析治疗的患者,透析频率为3次/周;②年龄18~65周岁;③肌力在3级以上,能自主活动者;④知情同意本研究方案,愿意配合者。

排除标准:①有严重心脏疾病、急性肺栓塞、未经处理的气胸和咯血等无法参与运动者;②有

意识或认知功能障碍,无法配合运动者。

剔除标准:①运动康复过程中出现严重胸闷、气短、韧带、肌肉拉伤;②因病情变化需出院、转院或肾移植等无法参与运动康复锻炼者。

1.2 一般资料

选择60例在我院血液透析室接受规律透析的MHD患者作为研究对象,时间跨度为2023年7~10月。其中干预组为在每周一、三、五透析的患者,对照组为每周二、四、六透析的患者,每组各30例。两组研究对象的年龄、性别、既往史、透析龄、每周运动频率在统计学上并无显著性差异($P>0.05$)。具体数据详见表1。

表1 两组患者一般资料比较

| 组别 | 年龄(岁, $\bar{x}\pm s$) | 性别[n(%)] | | 既往史[n(%)] | | | | 透析龄[月, $M(P_{25},P_{75})$] | 每周运动频率[n(%)] | | |
|-----------|------------------------|-----------|-----------|-----------|---------|----------|----------|-----------------------------|--------------|----------|----------|
| | | 男 | 女 | 肾小球肾炎 | 糖尿病肾病 | 高血压肾病 | 其他 | | 0 | 1~2 | ≥ 3 |
| 干预组(n=30) | 65.32 \pm 3.96 | 19(0.633) | 11(0.367) | 17(0.57) | 7(0.23) | 3(0.10) | 3(0.10) | 41(21.6,65.7) | 9(0.30) | 15(0.50) | 6(0.20) |
| 对照组(n=30) | 67.17 \pm 2.71 | 16(0.533) | 14(0.467) | 15(0.50) | 9(0.30) | 4(0.133) | 2(0.067) | 37(18.5,50.2) | 7(0.233) | 18(0.60) | 5(0.167) |

1.3 方法

两组均接受科室常规治疗护理措施及健康教育,包括基础护理、限制液体摄入、动静脉内瘘护理、心理护理等。干预周期3个月。

1.3.1 对照组

由专科护士讲解运动康复方法、时机、注意事项,并发放健康知识手册;解答患者及家属关于运动康复的疑问,嘱家属对患者提供鼓励与安全保障。

1.3.2 干预组

实施基于HAPA模型的运动康复干预方案,具体内容:①组建HAPA模型运动康复小组,成员包括:1名护士长,5名护士(均具有中级职称),1

名医师,干预之前对组内成员进行HAPA模型理论及运动康复知识的培训,培训合格者参与研究。②制订HAPA模型的运动康复干预方案:查阅国内外相关文献,咨询科室中医医师的意见制订方案,并邀请本科及以上学历、副高及以上职称、从事血液净化医疗、运动康复及护理等相关工作、经验超过十年的六位专业人士对干预计划的科学性、合理性以及可行性进行评估,结合专家的观点进行修改。选取5例符合纳入排除标准的患者进行预试验,评定方案的可行性及安全性,根据预试验过程中出现的问题及受试者的反馈进一步调整,最终形成基于HAPA模型的运动护理干预方案。见表2。

表2 基于HAPA模型的运动护理干预方案

| 行为阶段 | 阶段特点 | 干预重点 | 干预措施 | 干预地点 | 干预形式 |
|-------|-----------------------|--|--|-------|---------------------------|
| 前意向阶段 | 未形成康复运动的意愿 | 加强对运动康复知识的教育,增加患者对运动康复与健康之间的认知,激发行为改变的动机 | ①开展运动健康知识讲座,研究者组织患者及家属结合PPT讲解与透析患者相关的运动康复知识,以促进患者形成正确的运动认知。②建立微信群,邀请运动积极的患者分享运动经验和益处,激发其他患者的积极性,也为后期的运动打卡做准备。③播放科普视频,不发放运动对于疾病的危害,利用反向心理,激发患者的风险意识。 | 病房 | ①健康讲座②演示文稿 ③病友交流群④科普视频 |
| 意向阶段 | 具有康复运动的意愿,尚无实际行动和具体计划 | 制订运动锻炼计划,促进健康行为的转化 | ①研究小组录制居家运动视频,并制作成二维码,在微信群里发放,患者可扫描二维码进行视频观看。②发放《血液透析患者运动手册》,内容包括运动锻炼的积极影响、相关注意事项,同时提供柔韧性运动、有氧运动、抗阻运动的详细训练图示。③对患者进行上肢和下肢肌力以及基础活动量的评估,根据评估结果,医师和专科护士向患者推荐不同的运动方式,并与患者协商制定合适的运动方案。 | 病房 | ①视频演示②运动手册 ③运动计划 |
| 行动阶段 | 已产生并坚持规律的运动行为 | 落实运动锻炼计划,帮助患者养成良好的健康行为 | ①实施透析中运动,由研究小组成员指导进行。血液透析开始30min后进行包括借助弹力带、握力球的有氧运动/抗阻运动,2次/周,其中弹力带根据患者耐受力量选择合适的磅数,主要用于上、下肢的肌力训练。运动中观察患者对运动的耐受性并及时调整运动量。②实施居家运动:需要患者在非透析日自主居家完成,运动方法自由选择,主要包括步行、慢跑、太极拳、居家运动操等。患者根据自身运动习惯和运动能力合理规划运动频率,嘱家属做好安全保障,在运动过程中最好全程监督。运动结束后在微信群里打卡,由小组成员监督。③做好运动日志的记录,包括:运动的方式、次数、时间以及运动中的问题。 | 病房、家庭 | ①面对面指导②微信群 ③运动日志 |

1.4 观察指标

1.4.1 躯体功能

①上肢肌肉力量:通过测量手部握力值评估上肢肌力。在本研究中,采用了电子握力计来进行握力的测量。具体的实施步骤为:患者保持站立姿势,双上肢自然垂放,确保无内痿的一侧手掌用力握住握力计,进行3次不间断的测量,每次之间保持10s的间隔,并记录下最大握力数值。

②下肢肌肉力量:该研究运用了10次坐-立位实验(Sit-to-Stand-to-Sit Test 10, STS-10)的方法,以评估下肢肌肉的力量和耐力。STS-10是一种简便而安全性较高的操作,研究人员能够系统地了解受试者的肌肉功能。具体的步骤是:受试者需将双臂交叉于胸前,并坐在同一标准高度的椅子上。然后,尽可能以最快的速度连续进行站起和坐下的动作,每组重复10次。为确保测试的准确性,研究人员需要使用秒表记录这10次动作所耗费的时间。时间越短,反映出受测者下肢和躯体功能越出色。

1.4.2 运动自我效能^[5]

本研究采用的运动自我效能量表共包含18项内容,每一项0~10分。分数愈高,表明个体在运动自我效能方面的水平愈为显著。

1.4.3 透析患者锻炼益处/障碍

本研究采用的透析患者锻炼益处/障碍量表是由郑晶^[6]编制。该量表共包含24项,每项都使用Likert 4级评分法进行评分,分数1~4分。具体而言,与锻炼益处相关的项目采用正向计分,而涉及运动障碍的项目则采用反向计分。整体评分在24~96分之间变动。分数愈高,表示患者对锻炼益处的感知愈强烈,对运动障碍因素的认知则愈少。

1.5 统计学方法

通过SPSS 21.0软件对数据进行统计、分析。计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 进行描述性统计,对于符合正态分布的数据应用 t 检验;而对于不符合正态分布的数据则采用秩和检验;计数资料用频数、率进行描述性统计,用 χ^2 检验进行分析性统计。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组躯体功能指标的比较

经过干预后,干预组握力值为 (20.88 ± 3.14) kg,相较于对照组的 (16.29 ± 2.69) kg有显著提

高($P < 0.05$);干预组 STS-10 水平为 (21.53 ± 3.58) s,也明显低于对照组的 (26.13 ± 4.33) s ($P < 0.05$)。

2.2 两组运动自我效能指标的比较

干预后,干预组运动自我效能得分为 (51.22 ± 2.37) ,显著高于对照组 (44.88 ± 1.24) ,组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 两组锻炼益处/障碍指标的比较

干预后,干预组表现出明显的优势,在运动益处得分、运动障碍以及总得分方面均显著高于对照组($P < 0.05$),见表3。

表3 两组干预后锻炼益处/障碍比较($\bar{x} \pm s$,分)

| 维度 | 运动益处 | 运动障碍 | 总分 |
|-----------|-------------|-------------|-------------|
| 干预组(n=30) | 36.29±3.79* | 28.66±5.11* | 64.95±9.71* |
| 对照组(n=30) | 32.54±3.24 | 24.34±4.71 | 56.88±8.07 |

与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

在大多数MHD患者中,随着年龄的增长以及透析时间的延长,患者普遍存在体力活动和躯体功能的下降,可能导致日常生活能力受到制约,生活质量下降,同时也可能增加并发症和不良结局的风险。而在评估MHD患者躯体功能时,常常使用握力测试、10次坐-立位实验评估。这些评估手段被广泛应用,可以有效预测患者可能面临的不良结局和死亡的风险^[7]。本研究通过基于HAPA模型的运动干预,结果显示干预组的握力测试值、STS-10值明显提高,说明该运动干预方案可显著改善MHD患者的躯体功能。在干预过程中,研究人员通过分析患者不同行为阶段的特点,抓住不同阶段的主要矛盾,并采取针对性的措施。在前意向阶段和意向阶段,使患者具备运动康复与健康之间关系的正确认知,并且产生运动康复的意愿,小组成员为其制订运动计划和运动日志。在行动阶段,通过在透析中根据患者的自身情况采取针对性的抗阻运动或有氧运动的处方,以及居家运动方法,使患者产生自主运动的意愿和行为。研究^[8]表明,有氧运动可以改善MHD患者的下肢肌肉力量及运动功能,而且可以促进患者躯体功能改善。

(下转第438页)

神经外科重症患者精神错乱 预测模型的应用研究

陈丽芳,薛青*

(咸宁市第一人民医院神经外科,湖北咸宁 437000)

摘要:目的 构建并验证神经外科重症患者精神错乱预测模型的应用价值。方法 选取2017年12月至2020年10月我院神经外科245例重症患者的临床资料,其中发生精神错乱者99例,未发生者146例,采用多因素 Logistic 回归性分析对12项精神错乱危险因素进行分析和建模,利用 ROC 曲线下面积进行预测效果检验,选取2020年11月至2022年5月我院神经外科重症护理患者105例进行模型应用效果检验。结果 本研究最终预测模型认为性别、年龄、身体束缚情况、镇静药使用、利尿药使用、GCS评分是神经外科重症护理患者精神错乱发生的独立影响因子($P < 0.05$),神经外科重症护理患者精神错乱预测模型为: $Y = 1/[1 - \exp(X)]$, $X = -5.388 + 0.873 \times \text{性别} + 0.051 \times \text{年龄} + 1.274 \times \text{身体束缚} + 2.281 \times \text{镇静药使用} + 1.871 \times \text{利尿药使用} - 0.512 \times \text{GCS评分}$ 。模型验证结果显示灵敏度80.00%、特异度89.41%、准确率87.62%。结论 本研究模型对神经外科重症护理患者精神错乱的发生预测效果良好,对高危患者采取预见性护理干预措施,具有一定的临床指导意义。

关键词:神经外科;重症护理;精神错乱;风险预测模型;危险因素

中图分类号:R473

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)05-0434-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0434



Study on the Application of Predictive Model of Mental Disorder in Critical Nursing Patients of Neurosurgery Department

CHEN Li-fang, XUE Qing

(Department of Neurosurgery, The First Hospital of Xianning City, Xianning Hubei 437000, China)

ABSTRACT: Objective To construct and verify the application value of a mental disorder prediction model for intensive care patients in neurosurgery department. Methods The clinical data of 245 patients in the intensive care of brain surgery in our hospital from December 2017 to October 2020 were selected. Among them, 99 cases were mentally disordered and 146 cases did not occur. Multivariate Logistic regression was used to analyze 12 risk factors of mental disorders and build the model. The area under the ROC curve was used to test the prediction effect, and 105 patients in intensive care of the brain surgery in our hospital from November 2020 to May 2022 were selected to test the effect application of the model. Results The final prediction model of this study concluded that gender, age, physical restraint, sedative use, diuretic use and GCS score were independent factors influencing the occurrence of mental disorders in intensive care patients of brain surgery ($P < 0.05$), and the prediction model for confusion mentality of intensive care patients in brain surgery was: $Y = 1/[1 - \exp(X)]$, $X = -5.388 + 0.873 \times \text{gender} + 0.051 \times \text{age} + 1.274 \times \text{body restraint} + 2.281 \times \text{sedative use} + 1.871 \times \text{diuretic use} - 0.512 \times \text{GCS score}$. The model verification results showed that the sensitivity was 80.00%, the specificity was 89.41%, and the accuracy was 87.62%. Conclusion This research model has a good predictive effect on the occurrence of mental disorders in intensive care patients of brain surgery, and has certain clinical guiding significance to take predictive intervention measures for high-risk patients.

KEY WORDS: Neurosurgery; Critical care; Mental confusion; Risk prediction model; Risk factors

精神错乱亦称为谵妄、急性脑综合征,主要临床表现为患者意识水平下降、注意力缺损、睡眠-觉醒节律周期紊乱、认知和(或)情感功能障碍等^[1]。该病通常起病较急、发展速度快,导致患者

并发症增多、住院周期延长^[2],不但影响患者自身的生活质量和生命安全,同时会占用更多的临床医疗资源^[3]。神经外科患者多病情较重,需要给予重症护理,而继往研究发现,入驻ICU病房的神

* 通讯作者, E-mail: 1831011950@qq.com

经外科患者精神错乱发生率高达40%以上^[4],但由于临床针对该类疾病的具体病因病机尚未有定论,治疗方式仍局限在对症、支持治疗等阶段^[5]。因此,临床中若能够在患者发生精神错乱前进行预防性干预或给予早期针对性治疗,或可减少精神错乱的发生率、降低患者的病情程度。基于此,结合我院近期神经外科重症发生精神错乱患者的临床资料,运用统计学方法尝试构建风险预测模型,以期评估和预防患者精神错乱的发生提供参考。

1 资料与方法

1.1 纳入及排除标准

纳入标准:年龄 ≥ 18 周岁、预计ICU住院时间 >24 h的神经外科重症护理患者,经疾病诊断为脑血管疾病或颅内肿瘤或颅内损伤或功能性神经外科疾病。排除标准:存在精神病史、继往心脑血管疾病史、认知功能障碍和(或)智力低下的患者;存在严重的视觉或(和)听觉功能障碍的患者;进入ICU前(时)已存在精神错乱的患者;入ICU后处于持续昏迷和深度镇静的患者[注:昏迷标准:患者格拉斯哥昏迷评分(GCS评分) ≤ 8 分;深度镇静标准:患者躁动-镇静评分(RASS评分) < -3 分,均为经过培训的专业人员进行评估]。

1.2 资料收集

本研究为回顾性、观察性研究。采取便利抽样法进行抽样,选取我院2017年12月至2022年5月符合纳入标准的神经外科重症护理患者为研究对象。基于文献资料与专家咨询,初步确认了12个预测因子,假设每个因子至少需要10个病例进行验证^[6],神经外科ICU精神错乱发生率约42%^[4,7],同时可能存在10%的失访,因此,本研究预计统计量 $=12 \times 10 \div 0.42 \div 0.9 = 318$ 例,最终入组符合上述标准的病例350例。根据患者入驻ICU时间顺序,按照7:3的比例进行病例建模与验模分配^[8],建模组为2017年12月至2020年10月的245例病例,验模组为2020年11月至2022年5月的105例病例。

1.3 方法

1.3.1 情况评估

由接受过培训且经验丰富的专业护理人员于每日早8点和晚22点记录患者情况,使用ICU意识模糊评定法(CAM-ICU)进行患者精神错乱情况的评估,包括意识情况的急性改变或反复波动、思

维紊乱、注意缺损及意识清晰度改变,当患者出现以上任意一条及以上认为发生精神紊乱^[9]。于患者转出ICU后停止精神错乱情况评估。

1.3.2 资料收集

于患者入驻ICU的24h内采集包括性别、年龄和疾病诊断结果等一般资料,收集患者的C反应蛋白浓度、血肌酐、降钙素原浓度等血清指标,患者GCS评分、机械通气情况、身体约束情况、利尿药和(或)脱水药使用情况、镇静药物使用情况。均由同一研究者团队进行采集,并进行准确性、真实性审核2次。

1.4 统计学方法

应用SPSS 26.0统计学软件进行数据处理。计数资料采用百分比和频数表示,组间差异采用卡方检验比较,等级资料采用秩和检验比较。计量数据采用中位数和四分位数描述,组间比较采用秩和检验。采用Logistic回归构建预测模型。根据各独立因子的偏回归洗漱构建神经外科重症护理患者的精神错乱预测模型,应用ROC曲线下面积评价模型区分度。采用H-L拟合优度检验评价模型校准,以 $P > 0.05$ 表示模型准确度良好。

2 结果

2.1 一般资料比较

本研究纳入350例有效病例,其中男172例(49.14%),女178例(50.86%);年龄20~75岁,中位数55(49,61)岁;疾病诊断结果:脑血管疾病174例(49.71%)、颅内肿瘤132例(37.71%)、颅内损伤27例(7.71%)、功能性神经外科疾病17例(4.86%);重症护理时间2~30d,中位数4(3,5)d。其中建模组245例,男120例(48.98%),女125例(51.02%);年龄20~75岁,中位数56(49,63)岁;疾病诊断结果:脑血管疾病123例(50.20%)、颅内肿瘤91例(37.14%)、颅内损伤18例(7.35%)、功能性神经外科疾病13例(5.31%);发生精神错乱者99例(40.82%)、未发生者146例(59.59%);重症护理时间2~30d,中位数4(4,4)d。验模组105例,男52例(49.52%),女53例(50.48%);年龄22~76岁,中位数57(50,64)岁;疾病诊断结果:脑血管疾病51例(48.57%)、颅内肿瘤40例(38.1%)、颅内损伤10例(9.52%)、功能性神经外科疾病4例(3.81%)。建模组与验模组的一般资料比较无显著差异($P > 0.05$)。

2.2 单因素分析

对12项指标进行筛查,单因素分析结果显示,性别、年龄、入院方式、疾病诊断结果、C反应蛋白浓度、血肌酐、降钙素原浓度、GCS评分、机械通气情况、身体约束情况、利尿药和(或)脱水药使用情况、镇静药物使用情况等变量组件比较均具有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 单因素分析[n(%)]

| 项目 | 精神错乱组 (n=99例) | 非精神错乱组 (n=146例) | 统计量 (χ^2/Z) | P |
|---------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|-------|
| 性别 | | | 9.252 | 0.003 |
| 男 | 60(60.61) | 60(41.10) | | |
| 女 | 39(39.39) | 86(58.90) | | |
| 年龄/岁 | 55.0(48.0,65.0) | 48.5(42.0,55.0) | 19.220 | 0.000 |
| 入院方式 | | | 18.185 | 0.000 |
| 急诊 | 56(56.57) | 44(30.14) | | |
| 门诊 | 43(43.43) | 102(69.86) | | |
| 身体束缚 | | | 54.972 | 0.000 |
| 是 | 67(67.68) | 40(27.40) | | |
| 否 | 32(32.32) | 106(72.60) | | |
| 机械通气 | | | 14.001 | 0.000 |
| 是 | 14(14.14) | 3(2.05) | | |
| 否 | 85(85.86) | 143(97.95) | | |
| 镇静药使用 | | | 61.643 | 0.000 |
| 是 | 42(42.42) | 8(5.48) | | |
| 否 | 57(57.58) | 138(94.52) | | |
| 利尿药使用 | | | 9.074 | 0.003 |
| 是 | 67(67.68) | 87(59.59) | | |
| 否 | 32(32.32) | 59(40.41) | | |
| 疾病诊断类型 | | | 6.526 | 0.011 |
| 脑血管疾病 | 56(56.57) | 67(45.89) | | |
| 颅内肿瘤 | 32(32.32) | 59(40.41) | | |
| 颅内损伤 | 5(5.05) | 13(8.90) | | |
| 功能性神经外科病 | 3(3.03) | 10(6.85) | | |
| C反应蛋白/(mg/dL) | 27.00(18.00,39.50) | 12.00(8.00,18.00) | 7.613 | 0.000 |
| 血肌酐/($\mu\text{mol/L}$) | 63.00(56.5,70.00) | 54.00(46.00,62.00) | 6.612 | 0.000 |
| 降钙素原/(ng/mL) | 0.10(0.06,0.16) | 0.08(0.05,0.10) | 4.048 | 0.000 |
| GCS评分/分 | 10.00(7.00,11.50) | 15(15.00,15.00) | -14.742 | 0.000 |

2.3 风险预测模型的建立

对上述12项指标进行 Logistic 回归分析,赋值方法见表2。性别、年龄、身体束缚情况、镇静药使用、利尿药使用、GCS评分是神经外科重症护理患者精神错乱发生的独立影响因子($P < 0.05$),见表3。根据表3得出神经外科重症护理患者精神错乱预测模型为: $Y = 1/[1 - \exp(X)]$, $X = -5.388 + 0.873 \times \text{性别} + 0.051 \times \text{年龄} + 1.274 \times \text{身体束缚} + 2.281 \times \text{镇静药使用} + 1.871 \times \text{利尿药使用} - 0.512 \times \text{GCS评分}$ 。

表2 预测模型赋值表

| 自变量 | 赋值方法 |
|---------------------------|--|
| 性别 | 男=1,女=0 |
| 年龄/岁 | 原值输入 |
| 入院方式 | 急诊=1,门诊=0 |
| 身体束缚 | 是=1,否=0 |
| 机械通气 | 是=1,否=0 |
| 镇静药使用 | 是=1,否=0 |
| 利尿药使用 | 是=1,否=0 |
| 疾病诊断类型 | D1:脑血管疾病,有=1,无=0。D2:颅内肿瘤,有=1,无=0。D3:颅内损伤有=1,无=0。D4:功能性神经外科病,有=1,无=0。即:脑血管疾病=1000,颅内肿瘤=0100,颅内损伤=0010,功能性神经外科病=0001 |
| C反应蛋白/(mg/dL) | 原值输入 |
| 血肌酐/($\mu\text{mol/L}$) | 原值输入 |
| 降钙素原/(ng/mL) | 原值输入 |
| GCS评分/分 | 原值输入 |

表3 多因素分析

| 危险因素 | β | 标准误 | Wald | P | OR | 95% CI |
|-------|---------|-------|--------|-------|-------|--------------|
| 性别 | 0.873 | 0.335 | 6.436 | 0.005 | 2.507 | 1.108~2.942 |
| 年龄 | 0.051 | 0.015 | 12.134 | 0.000 | 1.032 | 1.021~1.083 |
| 身体束缚 | 1.274 | 0.335 | 16.014 | 0.000 | 3.592 | 1.005~1.021 |
| 镇静药使用 | 2.281 | 0.413 | 15.995 | 0.000 | 9.264 | 4.549~19.396 |
| 利尿药使用 | 1.871 | 0.806 | 5.385 | 0.001 | 6.495 | 1.337~31.539 |
| GCS评分 | -0.512 | 0.064 | 63.231 | 0.000 | 0.682 | 0.493~0.689 |
| 常量 | -5.388 | 5.133 | 0.904 | 0.310 | 0.008 | - |

2.4 对预测模型进行验证

通过 ROC 曲线对模型进行拟合验证,见图1。按照 Youden 指数最大值确定临界值,测得曲线下面积 0.628(95% CI:0.732,0.893),灵敏度和特异度分别为 0.723、0.858。

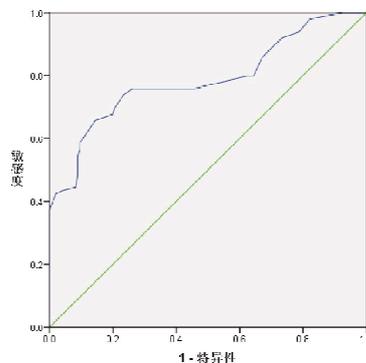


图1 预测神经外科重症护理患者精神错乱的 ROC 曲线

2.5 模型验证与应用

将验证模组的数据代入公式,计算模型预测发生精神错乱患者数量。依据共识,当 $Y \geq 0.628$ 时

认为发生精神错乱。模型计算发生精神错乱患者 25 例(23.81%),未发生 80 例(76.19%)。实际发生精神错乱患者 20 例(19.05%),未发生 85 例(80.95%)。灵敏度 80.00% (16/20),特异度 89.41% (76/85),准确率 87.62% (92/105)。

3 讨论

疾病的风险预测模型是一种通过统计学方法,将治病的多种危险因素和疾病的发生进行定量关系衡量的交叉学科操作,在临床中主要用于计算预测疾病的发生概率^[10]。精神错乱作为神经外科重症患者的常见严重并发症,虽然随着医疗水平的提升和临床的重视,发病率有所下降^[11-12],但临床尚未明确该病的病理生理机制,也无特异性治疗方案,因此,精神错乱的风险预测存在积极意义。此外,继往相关研究^[13]认为,临床一线医护人员对精神错乱的认知水平参差不齐,这无疑增加了漏诊和误诊的概率,不利于精神错乱患者的早期医疗性干预。而精神错乱每延长 1 天,相应患者一年内的病死率也会有所提升^[14]。因此,进行神经外科重症护理患者精神错乱的预测,理论上能够为临床医护人员提供科学参考,对高风险患者给予早期干预。

经过对文献的查阅和专家咨询,本研究最终入选了 12 项拟观察的危险因素。结果显示,初步筛选的 12 项观察因子,在发生精神错乱和未发生精神错乱患者的表达情况均具有统计学意义($P < 0.05$)。进一步进行多因素分析,结果发现发生精神错乱组的男性患者更多($P < 0.05$),这与国内多数研究一致^[15-16],提示了该病的流行病学倾向。此外,研究结果还显示,发生精神错乱患者的年龄较非发生者大($P < 0.05$),这可能是随着年龄的增加,大脑的生理性变化导致自主认知功能下降,更容易导致精神错乱的发生^[17]。在身体束缚、镇静药使用方面,研究结果显示对发生身体束缚的患者,精神错乱发生率更高,这可能是由于当对患者束缚时,下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能由于患者的焦虑、烦躁情绪被激活,致使皮质醇水平提升^[18],进一步增加了患者的烦躁感和镇静药使用率。相关研究^[19]表明,镇静药的使用,不但会延长中枢神经的抑制效果,对神经正常传递有不良影响,此外镇静药带来的戒断综合征也是致使患者出现精神错乱出现的因素之一^[20]。这提示我们在临床操作中,应加强与患者及家属的沟通,并规范化身体束缚治疗的医疗操作,尽可能的

安抚患者情绪,避免因医疗操作给患者带来的焦虑情绪。

此外,对需要镇静的患者,应尽可能的找到患者的躁动因素,合适给予镇静药,且镇静药撤离速度不宜过快,避免戒断反应的发生。使用利尿药物的患者发生精神错乱的概率远高于未使用者($P < 0.05$),这可能是由于利尿药(脱水类药)的使用导致患者体内出现医源性低钠血症,影响神经递质的传导,进而容易引发患者出现精神错乱^[21]。但考虑到临床患者实际情况,针对药物使用后的医源性低钠血症,最佳的针对方案是加强对患者的监测,及时纠正低钠血症的情况。GCS 评分作为评判患者昏迷情况的指标,研究发现随着评分程度的降低,患者越容易发生精神错乱,这与国际相关研究结果一致^[22]。因此,临床中应注意 GCS 评分的使用,加强对低评分患者的观察和医疗预防,规避风险因素。

通过 Logistics 逻辑回归进行风险模型的构建,最终得出了神经外科重症护理患者发生精神错乱模型与性别、年龄、身体束缚情况、镇静药使用、利尿药使用、GCS 评分的定量公式,通过 ROC 曲线进行拟合度验证,ROC 曲线下面积为 0.628,具有较强的科学性。通过将 105 例患者的资料代入公式进行验证,结果显示模型灵敏度 80.00%,特异度 89.41%,准确率 87.62%。此外,模型纳入的 6 个预测因素是临床较为容易获取的资料,通过规范化培训后能精准采集,临床可行性较好。

本研究仍具有一定的局限性。首先是病例纳入的样本量仍较小,便利抽样法存在随机误差,仍需要进一步扩大样本量进行研究。此外,本模型并未进行院外资料的验证,还需进一步进行应用价值的相关验证。

参考文献:

- [1]郝伟,于欣.精神病学[M].第7版.北京:人民卫生出版社,2013:87
- [2]周建雄,杨静.术后谵妄病因及机制研究进展[J].实用老年医学,2019,33(1):7
- [3]黄定瑞.渐进式早期康复训练对 ICU 机械通气病人谵妄、机械通气时间及 ICU 住院时间的影响[J].全科护理,2021(4):469
- [4]WANG J,JI Y Y,WANG N, et al. Risk factors for the incidence of delirium in cerebrovascular patients in a neurosurgery intensive care unit: a prospective study[J]. J Clin Nurs, 2018, 27(1-2):407
- [5]陈小燕,岳冀蓉,董碧蓉.谵妄患者的药物治疗[J].中华老年医学杂志,2020,12:1379
- [6]EIJ E W,MARGOLIN R,FRANCIS J, et al. Evaluation of delirium in critically ill patients: validation of the confusion assessment method for the intensive care unit (CAM-

- ICU[J]. Crit Care Med, 2001, 29(7):1370
- [7] TANG E, LAVERTY M, WEIR A, et al. Development and feasibility of a smartphone-based test for the objective detection and monitoring of attention impairments in delirium in the ICU[J]. Journal of Critical Care, 2018, 48:104
- [8] 祝晓迎. ICU 谵妄的风险因素分析及风险预测模型的构建[D]. 重庆:第三军医大学, 2017
- [9] DANZENG Q Z, CUI N, WANG H, et al. Translation and validation of the Tibetan confusion assessment method for the intensive care unit[J]. Chin Med J (Engl), 2019, 132(10):1154
- [10] RANSTAM J, COOK J A, COLLINS G S. Clinical prediction models[J]. Br J Surg, 2016, 103(13):1886
- [11] GREEN C, BONAVIA W, TOH C, et al. Prediction of icu delirium: validation of current delirium predictive models in routine clinical practice[J]. Critical Care Medicine, 2019, 47(3):428
- [12] KANOVA M, SKLIENKA P, ROMAN K, et al. Incidence and risk factors for delirium development in ICU patients: a prospective observational study[J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2017, 161(2):187
- [13] 王怡, 任学芳, 徐燕. 神经外科护士谵妄知行信现状调查[J]. 上海护理, 2021(7):43
- [14] 李里英, 钟萍, 胡小萍, 等. 重症监护谵妄筛查量表在 ICU 常规监测的效果研究[J]. 全科护理, 2017, 15:1879
- [15] 赵洁, 蒋月娟. ICU 老年高血压脑出血病人谵妄发生状况及其影响因素分析[J]. 全科护理, 2021(9):1283
- [16] WANSRISUTHON W, RATTA-APHA W, THONGCHOT L, et al. Accuracy of diagnosis and international classification of diseases; tenth revision coding for alcohol dependence, alcohol withdrawal, and alcohol withdrawal delirium among inpatients at a university hospital[J]. J Addict Med, 2017, 11(3):241
- [17] 周建雄, 杨静. 术后谵妄病因及机制研究进展[J]. 实用老年医学, 2019, 33(1):7
- [18] 张兰, 张武丽, 唐启寿. 身体约束使用中的伦理问题及其对策探讨[J]. 中国医学伦理学, 2017, 30(9):1122
- [19] DE WIT H A, WINKENS B, MESTRES G C, et al. The development of an automated ward independent delirium risk prediction model[J]. Int J Clin Pharm, 2016, 38(4):915
- [20] 邓露茜, 曹岚, 黄艳, 等. 基于谵妄预测模型的风险分级预防护理在 ICU 患者中的应用研究[J]. 中国实用护理杂志, 2019, 35(9):704
- [21] WOLFF R F, M K G, MOONS, et al. PROBAST: A Tool to assess the risk of bias and applicability of prediction model studies[J]. Ann Intern Med, 2019, 170(1):51
- [22] MANEEWONG J, MANEETON B, MANEETON N, et al. Delirium after a traumatic brain injury: predictors and symptom patterns[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2017, 13(2):459
(收稿日期:2024-03-18)

(上接第 433 页)

Olvera 等^[9]进行为期 12 周的抗阻运动疗法, 结果表明, 这种疗法在改善慢性肾脏疾病患者的肌肉力量和握力值方面具有显著的积极效果。因此, 从单方面来看, 有氧运动和抗阻运动都可以改善 MHD 患者的肌肉力量。而本研究在透析中实施有氧运动与抗阻运动联合的运动方式对患者的上肢和下肢肌肉力量均有明显改善。

运动自我效能感是指在参与有规律的体育活动时, 个体主观意识所拥有的自信心。随着透析时间的延长, 患者相应的并发症也会增多, 其中运动能力受损、日常生活能力下降, 加之对运动康复重要性认识不足, 缺乏对锻炼益处的正确认知, 对运动的恐惧感增加等因素都会一定程度上削弱患者运动信心。因此, 医护人员应对评估透析患者运动自我效能高度重视。在此次基于 HAPA 模型的干预过程中, 根据个体健康行为不同阶段的特点采取针对性的措施, 使患者逐步从健康行为的前意向阶段过渡到行为阶段, 充分发挥患者在整个行为改变阶段中的主观能动性, 根据患者躯体健康状况、心理状态和内心情感的变化, 使患者逐步建立运动康复的信念并产生行为。在患者产生健康行为阶段中为其制订个性化的康复运动方案, 并指导和监督执行, 使患者从康复运动中获益, 提高对运动和疾病康复的自信心, 从而更好地坚持康复运动。

综上所述, 以 HAPA 模型为理论依据的运动行为干预可显著改善 MHD 患者的躯体功能、运动

自我效能并建立运动健康的信念, 本方案中制订的运动措施安全可行。

参考文献:

- [1] CLARKSON M J, BENNETT P N, FRASER S F, et al. Exercise interventions for improving objective physical function in patients with end-stage kidney disease on dialysis: a systematic review and meta-analysis[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2019, 316(5):F856
- [2] 赵杏, 周文琴, 张帆. 维持性血液透析病人运动依从性研究进展[J]. 护理研究, 2021, 35(15):2742
- [3] 徐凤玲, 刘银艳. 维持性血液透析患者运动锻炼“知行-行”水平的影响因素分析[J]. 临床医学研究与实践, 2022, 7(8):5
- [4] 柏乐, 颜琬华. 基于健康行动过程取向模型的支气管哮喘患者自我管理影响因素的验证分析[J]. 齐鲁护理杂志, 2020, 26(3):57
- [5] 熊晓红, 袁怀红, 杨玉洁, 等. 维持性血液透析患者运动现状与运动自我效能的关系[J]. 实用医院临床杂志, 2020, 17(5):53
- [6] 郑晶. 维持性血液透析患者体力活动及其影响因素[D]. 广州:中山大学, 2009
- [7] 陈静, 刘一秀, 罗细菊, 等. 运动干预对维持性血液透析患者躯体功能影响的 Meta 分析[J]. 中国血液净化, 2022, 21(11):850
- [8] 姚毅, 朱欢, 向政, 等. 有氧运动对中老年人微循环功能干预效应的研究进展[J]. 湖北科技学院学报(医学版), 2022, 36(3):268
- [9] OLVERA-SOTO M G, VALDEZ-ORTIZ R, LÓPEZ ALVARENGA J C, et al. Effect of resistance exercises on the indicators of muscle reserves and handgrip strength in adult patients on hemodialysis[J]. J Renal Nutr, 2016, 26(1):53
(收稿日期:2024-03-14)

基于心理资本干预模型的团体护理干预对妊娠期高血压患者自我效能及妊娠结局的影响

张培育¹, 闫婷², 郭巧慧²

(1. 河南省第二人民医院妇科, 河南 郑州 451100; 2. 河南省第二人民医院妇产科)

摘要:目的 回顾性分析基于心理资本干预模型的团体护理干预在妊娠期高血压(HDP)中的应用价值。方法 收集本院174例HDP患者,按护理方法不同分为对照组($n=87$)、观察组($n=87$),对照组行常规护理,观察组在此基础上实施基于心理资本干预模型的团体护理干预。比较两组妊娠结局、血压水平[收缩压(SBP)、舒张压(DBP)]、积极心理资本、自我效能。结果 干预2个月后,观察组产后出血、羊水过多发生率均低于对照组(P 均 <0.05);观察组SBP、DBP指标水平均低于对照组(P 均 <0.05);观察组积极心理资本评分、一般自我效能感量表(GSES)评分高于对照组(P 均 <0.05)。结论 对HDP患者实施基于心理资本干预模型的团体护理干预,能提高积极心理资本、自我效能感,改善血压水平、妊娠结局。

关键词:心理资本干预模型;团体护理;妊娠期高血压;自我效能;妊娠结局

中图分类号:R473

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)05-0439-004

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0439



Effect of Group Nursing Intervention Based on Psychological Capital Intervention Model on Self-Efficacy and Pregnancy Outcome of Patients with Hypertensive Disorders of Pregnancy

ZHANG Pei-yu, YAN Ting, GUO Qiao-hui

(Department of Gynecology, The Second People's Hospital of Henan Province, Zhengzhou Henan 451100, China)

ABSTRACT: Objective To retrospectively analyze the application value of group nursing intervention based on psychological capital intervention model in hypertensive disorders of pregnancy (HDP). **Methods** A total of 174 cases of HDP patients in our hospital were collected and divided into group nursing group ($n=87$) and control group ($n=87$) according to different nursing methods. The control group received routine nursing, and the group nursing group received routine nursing and group nursing intervention based on psychological capital intervention model. Pregnancy outcomes, blood pressure levels (SBP, DBP), positive psychological capital and self-efficacy (GSES) were compared between the two groups. **Results** The incidence of postpartum hemorrhage and polyhydramnios in the group nursing group were lower than those in the control group (all $P < 0.05$) after two months of intervention. Meanwhile, the levels of SBP and DBP in the group nursing group were lower than those in the control group after the intervention (all $P < 0.05$). Finally, the score of positive psychological capital and GSES score of the group nursing group was higher than those of the control group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Group nursing intervention based on psychological capital intervention model for HDP patients can improve positive psychological capital, self-efficacy, blood pressure level and pregnancy outcome.

KEY WORDS: Psychological capital intervention model; Group nursing; Hypertensive disorders of pregnancy; Self-efficacy; Pregnancy outcome

妊娠期高血压(HDP)是女性在妊娠期较常发生的疾病之一,以血压升高、全身功能紊乱为特征,严重威胁围产期孕妇、胎儿生命健康^[1-3]。目前,HDP临床治疗以药物、饮食干预为主,以合理控制血压^[4]。但由于多数HDP患者对疾病认知有限,担心药物会影响胎儿健康,易出现焦虑等不良情绪,不良情绪又会影响交感神经,导致自主神

经功能紊乱,增加不良妊娠结局发生风险^[5]。因此,积极改善HDP患者心理状态、提高自我效能感,对减少不良妊娠结局发生风险具有重要意义。常规护理干预可为患者提供饮食、用药等基础护理,侧重身体机能的恢复,但缺乏心理等方面的干预,具有明显的局限性。心理资本包括希望、乐观、自我效能、韧性4个方面,是个体所表现出的

一种积极心理状态,是超越人力资本、社会资本的积极心理资源^[6]。基于心理资本干预模型的团体护理干预将以上4种资源重新整合成一个高阶模型,激发个体积极心理潜能,强化积极心理状态^[7-8]。本研究创新性的对HDP患者实施基于心理资本干预模型的团体护理干预,探讨其临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 纳入及排除标准

纳入标准:符合HDP相关诊断标准^[9];血压超过90/140mmHg;无精神疾病、言语障碍者;临床资料完整;处于病情稳定期。排除标准:伴有肾肺心等器质性病变;原发性高血压、糖尿病者;伴有血液系统、免疫系统疾病;合并活动性出血或有明显出血倾向。本研究经医院伦理委员会审批同意,患者知情。

1.2 一般资料

收集我院2021年4月至2023年10月174例HDP患者,1:1匹配设计按护理方法不同分为观察组($n=87$)、对照组($n=87$)。两组年龄、产次、HDP分级、付费方式、文化程度均衡可比($P>0.05$),见表1。

表1 两组一般资料比较

| 资料 | 观察组($n=87$) | 对照组($n=87$) | χ^2/U | P | |
|------------------------|---------------|---------------|------------|-------|-------|
| 年龄($\bar{x}\pm s$,岁) | 33.54±4.83 | 33.76±4.86 | 0.299 | 0.765 | |
| 产次($\bar{x}\pm s$,次) | 1.86±0.41 | 1.93±0.45 | 1.073 | 0.285 | |
| 孕周($\bar{x}\pm s$,周) | 31.43±1.65 | 31.12±1.62 | 1.250 | 0.213 | |
| HDP分级[n(%)] | 轻度 | 38(43.68) | 41(47.13) | 0.803 | 0.422 |
| | 中度 | 25(28.73) | 29(33.33) | | |
| | 重度 | 24(27.59) | 17(19.54) | | |
| 付费方式[n(%)] | 医保 | 79(90.80) | 76(87.35) | 0.429 | 0.668 |
| | 自费 | 5(5.75) | 4(4.60) | | |
| | 其他 | 3(3.45) | 7(8.05) | | |
| 文化程度[n(%)] | 高中及以下 | 22(25.29) | 19(21.84) | 0.187 | 0.852 |
| | 大专 | 41(47.13) | 45(51.72) | | |
| | 本科及以上 | 24(27.58) | 23(26.44) | | |

1.3 方法

两组均进行HDP常规药物治疗,遵医嘱口服小剂量硝苯地平缓释片(烟台鲁银药业有限公司,国药准字H20223442);中重度患者还需静脉滴注硫酸镁注射液(哈药集团三精制药有限公司,国药准字H23021033)等,均治疗1周。

对照组行常规护理,密切监测HDP患者心

率、血压、呼吸等情况及胎心、宫缩变化;给予常规健康宣教,告知患者HDP病情严重程度,为其讲解日常注意事项、治疗方式,指导患者保持良好心态,叮嘱按时按量用药;指导患者合理饮食,保证营养全面均衡,低盐饮食;养成良好的生活习惯,避免抽烟喝酒,保证充足的休息;每日进行适量有氧运动,如慢走等;必要时可终止妊娠。

观察组在对照组基础上实施基于心理资本干预模型的团体护理干预。

(1)成立基于心理资本干预模型的团体护理小组。成员包括1名护士长(制定护理方案并监督实施)、1名主治医师(治疗、答疑、复查)、5名护理人员(收集患者资料、实施方案),护士长担任小组组长,对全体成员进行HDP和基于心理资本干预模型的团体护理干预相关知识培训,考核通过可参与此次研究。以心理资本干预模型为基础,查阅相关文献,结合HDP患者病情,构建干预方案。干预方法为团体干预,将患者按住院批次分为10组,每组7~8人。住院期间的干预时间为每日下午4~5点,地点为科室大会议室,出院的干预时间提前在微信群与患者沟通,共干预5次,每周1次,每次40min左右。

(2)基于心理资本干预模型的团体护理具体措施。①住院第1天,进行全体成员的HDP主题讲座,邀请妇产科专家及护士长进行讲解,内容包括HDP相关知识、日常注意事项、治疗过程中常见不良情绪的识别与处理、心理资本相关知识及正常血压范围、自用血压检测仪的使用方法等。讲座结束后向HDP患者发放饮食计划书,以高蛋白、高维生素食物为主,如牛奶、鸡蛋、豆制品等,每日蛋白质摄入量控制在100g左右,减少动物类脂肪摄入,控制盐分摄入。②住院第3天,进行“武松打虎滚雪球”游戏,小组成员围坐成一圈,任选一名患者进行自我介绍,第2名患者介绍我是XXX后面的XXX,第3名患者介绍我是XXX后面的XXX后面的XXX,最后1名复述前面所有人名字。③住院第4天,进行“自我寻宝”游戏,每位HDP患者写出10句“我是一个XXX的人”,成员对其所写句子进行消极/积极分类,消极倾向句子在该句后标“-”,反之标“+”,统计加减号数量,判断患者对自我的接纳程度。进行“我的五样”游戏,每位HDP患者写下最想实现的5个愿望,思考并按照相对不重要性依次划掉4样,分享最终留下的1个愿望是什么并说出心理感受。④住院第5天,进行药物自我管理方法分享会,护理人员

向 HDP 患者讲解按时按量用药的重要性,对于记忆力较差的患者,可把药物放置于碗筷、牙刷等日常生活必需品旁边,起到提示用药的作用;对于手部活动不太灵活的患者,可用易打开的药盒代替,或鼓励向旁人寻求帮助。护理人员协助 HDP 患者及家属罗列出所需服用的药物清单并标明药名、用药时间、剂量等。⑤住院第 6 天,小组成员共同聆听歌曲“明天会更好”,引导 HDP 患者对未来进行积极想象,团体成员间相互传递美好祝福,回顾并反馈前几天的活动感想。⑥出院时,建立微信群,邀请患者及家属加入,护理人员每日在微信群内推送 HDP 疾病相关知识文章,要求每位患者查看并做笔记,笔记每周上传至群内 1 次,护理人员检查。

两组均持续干预 2 个月。

1.4 观察指标

(1)妊娠结局。统计两组产后出血(剖宫产后失血超过 1000mL 或顺产后 24h 内生殖道出血超过 500mL)、羊水过多(妊娠期间羊水量超过 2000mL)、胎儿窘迫(胎儿心率 > 160 次/min 或 < 120 次/min)、胎膜早破、巨大儿(胎儿体重 \geq 4kg)等不良妊娠结局发生率。

(2)血压水平。采用 HEM-7124 欧姆龙血压计监测两组干预前后收缩压(SBP)、舒张压(DBP)水平。

(3)积极心理资本。干预前后采用由张阔等^[10]汉化的积极心理资本问卷评估,包括韧性、乐观、自我效能、希望 4 个维度,分别包含 7/6/7/6 项,共 26 项,每项计 1~7 分,表示由完全不符合到完全符合,总分为 26~182 分,积极心理状态越好则得分越高。

(4)自我效能。干预前后采用一般自我效能感量表(GSES)^[11]评估,包含 10 项,总分 10~40 分,自我效能感越好得分越高。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 27.0 统计软件分析,符合正态分布计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,行 t 检验;计数资料 n (%)表示, χ^2 检验,等级资料用 Ridit 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组不良妊娠结局比较

两组胎儿窘迫、胎膜早破、巨大儿发生率比较无明显差异($P > 0.05$);观察组产后出血、羊水过

多发生率低于对照组($P < 0.05$),见表 2。

表 2 两组不良妊娠结局发生率比较[n(%)]

| 组别 | 例数 | 产后出血 | 羊水过多 | 胎儿窘迫 | 胎膜早破 | 巨大儿 |
|-----|----|----------|----------|---------|---------|---------|
| 观察组 | 87 | 1(1.15)* | 0(0.00)* | 0(0.00) | 1(1.15) | 0(0.00) |
| 对照组 | 87 | 8(9.20) | 6(6.90) | 2(2.30) | 4(4.60) | 2(2.30) |

与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 两组血压水平比较

干预前,两组血压水平比较,无显著差异($P > 0.05$);与对照组相比,干预后观察组 SBP、DBP 指标水平降低幅度更大($P < 0.05$),见表 3。

表 3 两组血压水平比较($\bar{x} \pm s$, mmHg)

| 组别 | 例数 | SBP | | DBP | |
|-----|----|-------------------|---------------------|------------------|--------------------|
| | | 干预前 | 干预后 | 干预前 | 干预后 |
| 观察组 | 87 | 149.52 \pm 6.48 | 127.14 \pm 6.31** | 94.47 \pm 6.28 | 74.87 \pm 5.22** |
| 对照组 | 87 | 149.48 \pm 6.45 | 137.97 \pm 6.35* | 94.51 \pm 6.24 | 82.69 \pm 5.26* |

与同组干预前比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,# $P < 0.05$ 。

2.3 两组积极心理资本比较

干预前,两组积极心理资本评分比较,无显著差异($P > 0.05$);与对照组相比,干预后观察组韧性、乐观、自我效能、希望 4 个维度评分及总分更高($P < 0.05$),见表 4。

表 4 两组积极心理资本评分比较($\bar{x} \pm s$, 分)

| 时间 | 组别 | 例数 | 韧性 | 乐观 | 自我效能 | 希望 | 总分 |
|-----|-----|----|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 干预前 | 观察组 | 87 | 12.98 \pm 3.36 | 10.99 \pm 3.54 | 13.01 \pm 3.64 | 11.01 \pm 2.52 | 47.99 \pm 13.06 |
| | 对照组 | 87 | 13.02 \pm 3.33 | 11.03 \pm 3.51 | 12.97 \pm 3.68 | 10.98 \pm 2.55 | 48.00 \pm 13.07 |
| 干预后 | 观察组 | 87 | 21.35 \pm 2.15** | 18.66 \pm 2.07** | 19.14 \pm 2.36** | 17.51 \pm 2.82** | 76.66 \pm 9.40** |
| | 对照组 | 87 | 18.47 \pm 2.12* | 15.39 \pm 2.05* | 17.38 \pm 2.34* | 15.33 \pm 2.86* | 66.57 \pm 9.35* |

与同组干预前比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,# $P < 0.05$ 。

2.4 两组自我效能比较

干预前,两组 GSES 评分比较,无显著差异($P > 0.05$);与对照组相比,干预后观察组 GSES 评分更高($P < 0.05$),见表 5。

表 5 两组 GSES 评分比较($\bar{x} \pm s$, 分)

| 组别 | 例数 | 干预前 | 干预后 |
|-----|----|------------------|--------------------|
| 观察组 | 87 | 18.98 \pm 4.26 | 31.14 \pm 3.11** |
| 对照组 | 87 | 19.02 \pm 4.23 | 26.76 \pm 3.15* |

与同组干预前比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,# $P < 0.05$ 。

3 讨论

HDP 是产科常见疾病,妊娠所致的循环血量增加、腹压增大是诱发 HDP 的重要因素^[12-13]。病情较轻时,患者表现为轻度水肿、血压略高等,病情严重时血压会显著增高,甚至发生抽搐、昏迷,威胁孕妇、胎儿健康^[14]。目前临床多采用药物控制血压,提升孕妇生活质量。但由于 HDP 症状影响及患者对疾病相关知识缺乏正确认识,多数 HDP 患者会出现焦虑、恐惧等不良情绪,影响妊娠结局。因此,需对 HDP 患者实施更加科学、全面、有针对性的护理干预,以改善负性情绪,提高护理效果。

本次研究结果显示,观察组妊娠结局优于对照组($P < 0.05$),提示基于心理资本干预模型的团体护理干预能改善妊娠结局。原因分析为基于心理资本干预模型的团体护理干预通过多种团体活动,使患者及时有效的判别、处理自身存在的心理问题,提升自控能力;加之从药物识别、用药时间、剂量等方面加强患者自我管理,都有利于疾病的好转,从而改善妊娠结局。

常规护理干预中心理疏导环节相对薄弱,加之负性情绪影响,致使 HDP 患者自我效能感不高,不利于积极配合医护人员开展工作。基于心理资本干预模型的团体护理干预主要通过建立心理资本模型,构建社会、人力资源之外的一种综合性的积极心理资源,开发个体潜力,使其持续保持乐观积极的心态^[15]。本次研究结果显示,干预后观察组积极心理资本评分、GSES 评分高于对照组,血压指标水平低于对照组(P 均 < 0.05),提示基于心理资本干预模型的团体护理干预能提高积极心理资本、自我效能感,改善血压水平。原因分析为基于心理资本干预模型的团体护理干预通过“自我寻宝”游戏、小组成员共同聆听歌曲“明天会更好”,激发患者对未来美好生活的期望,团体成员间相互传递美好祝福,使患者深层次、全方位地了解自己的积极资源,提升自我价值,以积极的眼光正视自己的问题并探讨自我,从而有利于提高自我效能感、积极心理资本;通过积极向患者讲解遵医用药的重要性,提高患者对正确用药的重视程度,有利于疾病改善,加之积极有效的心理干预,减少患者情绪上的波动,从而在一定程度上控制血压。

综上,对 HDP 患者实施基于心理资本干预模型的团体护理干预,能提高积极心理资本、自我效

能感,改善血压水平、妊娠结局。本研究只进行了 2 个月的干预且没有后续回访,后续研究应延长干预时间,以便更准确地评估基于心理资本干预模型的团体护理干预的长期干预效果。

参考文献:

- [1] 郭婷,杨晓丽,田珏,等. 妊娠期高血压病人 RDW-CV、NLR、MLR、PLR 与血栓弹力图的相关性分析[J]. 护理研究,2022,36(22):3963
- [2] CHAPPELL L C, TUCKER K L, GALAL U, et al. Effect of self-monitoring of blood pressure on blood pressure control in pregnant individuals with chronic or gestational hypertension: the BUMP 2 randomized clinical trial[J]. JAMA, 2022, 327(17):1666
- [3] 杨佳双,程莎莎,陈德花. LMR、 β -HCG、D-D 与妊娠期高血压疾病严重程度及妊娠结局的相关性研究[J]. 湖北科技学院学报(医学版),2022,36(4):305
- [4] BABORE G O, AREGAGO T G, ERMOLLO T L, et al. Determinants of pregnancy-induced hypertension on maternal and foetal outcomes in hossa town administration, hadiya zone, southern ethiopia: unmatched case-control study[J]. PLoS One, 2021, 16(5):e0250548
- [5] 杨孜,张为远. 管控妊娠期高血压产科医师不该局限在自我意识范畴内谈管控妊娠期高血压认知重点[J]. 中华妇产科杂志,2021,56(11):753
- [6] 方敏,何燕娴,余海洋,等. 护士心理资本、职业获益感与留职意愿结构方程模型的构建[J]. 护士进修杂志, 2021, 36(23):2117
- [7] 方芳,郎颖春,沈韵,等. 基于心理资本干预模型的团体辅导在肿瘤科护士中的实施效果[J]. 上海护理, 2022, 22(4):58
- [8] 李娜,韩然然,徐晨雪,等. 基于心理资本干预模型的团体护理干预在乳腺癌改良根治术患者中的干预效果研究[J]. 右江民族医学院学报,2023,45(1):159
- [9] 中华医学会妇产科学分会 HDP 疾病学组. HDP 疾病诊治指南(2015)[J]. 中华妇产科杂志,2015,50(10):721
- [10] 张阔,张赛,董颖红. 积极心理资本:测量及其与心理健康的关系[J]. 心理与行为研究,2010,8(1):58
- [11] 郭茜,李明朴,吴昌霞,等. 基于 CICARE 沟通模式的赋能护理模式对老年髌骨骨折患者术后恐动症及跌倒恐惧心理的影响[J]. 海南医学,2023,34(13):1942
- [12] BAKOUEI F, DELAVAR M A, MASHAYEKH-AMIRI S, et al. Efficacy of n-3 fatty acids supplementation on the prevention of pregnancy induced-hypertension or pre-eclampsia: a systematic review and meta-analysis[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2020, 59(1):8
- [13] 钟文,王璇,漆洪波,等. 妊娠期高血压疾病风险预测模型建立探讨[J]. 实用妇产科杂志,2022,38(3):228
- [14] 姜婷婷,万立新,何欢,等. 吉林省孕产妇妊娠期高血压疾病患病率及影响因素[J]. 中华疾病控制杂志, 2021, 25(11):1287
- [15] 岳丽,程璐,李凤云,等. 团体心理资本干预对重症监护室护士心理弹性、情绪状态和职业倦怠的影响[J]. 临床与病理杂志,2022,42(9):2248

(收稿日期:2024-05-10)

全程护理干预在儿童肺炎雾化吸入治疗中的应用分析

祝莹¹,范文霞^{2*}

(1. 咸宁市中心医院/湖北科技学院附属第一医院儿内科,湖北咸宁 437100;
2. 湖北省肿瘤医院静脉配置中心)

摘要:目的 观察在儿童肺炎雾化吸入治疗中实施全程护理干预的效果。方法 选取入院雾化吸入治疗的肺炎患儿150例,其中2021年收治的75例为对照组,2022年收治的75例为观察组。两组均给予常规护理,观察组在常规护理基础上实行全程护理干预,1周后比较两组患儿的肺功能、治疗依从性、临床疗效及家属满意度。结果 干预后,观察组用力肺活量(FVC)和1s用力呼气容积(FEV1)改善状况优于对照组,雾化吸入的治疗依从性高于对照组,临床症状消失时间短于对照组,家属满意度也高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 儿童肺炎雾化吸入治疗中应用全程护理干预能有效改善患儿肺功能,提高治疗依从性、临床疗效和家属满意度,值得临床推广。

关键词:全程护理干预;雾化吸入治疗;肺炎;儿童

中图分类号:R473.72

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)05-0443-03

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0443



Application Analysis of Total Nursing Intervention in Nebulised Inhalation Therapy for Pneumonia in Children

ZHU Ying, FAN Wen-xia

(Department of Paediatrics, Xianning Central Hospital/The First Affiliated Hospital of Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100, China)

ABSTRACT; Objective To observe the effect of implementing the whole process nursing intervention in the nebulised inhalation treatment of pneumonia in children. **Methods** 150 cases of children with pneumonia treated by nebulised inhalation were selected, of which 75 cases admitted in 2021 were the control group, and 75 cases admitted in 2022 were the observation group. Both groups were given routine care, and the observation group implemented the whole nursing intervention based on routine care. After one week, the lung function, treatment compliance, clinical efficacy and family satisfaction of the children in the two groups were compared. **Results** After the intervention, the improvement of forceful lung volume (FVC) and forceful expiratory volume in 1s (FEV1) of the observation group was better than the control group, the adherence to the treatment of nebulised inhalation was higher than the control group, the disappearance time of clinical symptoms was shorter than the control group, and the satisfaction of family members was higher than the control group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** The application of whole process nursing intervention in nebulised inhalation treatment of childhood pneumonia can effectively improve the lung function of children, improve treatment compliance, clinical efficacy and family satisfaction, and is worthy of clinical promotion.

KEY WORDS: Total nursing intervention; Nebulised inhalation therapy; Pneumonia; Children

肺炎是儿童时期最常见的一种呼吸系统疾病,其起病急、变化快、病程长、并发症多^[1],治疗

不及时或干预措施不当,极易进展成重症而危及生命^[2]。雾化吸入治疗作为儿童肺炎的重要给药

* 通讯作者, E-mail: 871874762@qq.com

途径,其利用高速氧气气流,使药液形成雾状,随呼吸进入气道直接作用于肺部,从而达到消除炎症、稀释痰液和解除痉挛的目的^[3]。相较于传统的用药方式,雾化吸入操作简单起效快,克服了儿童口服用药的困难和注射输液的疼痛,但儿童心智发育不够完善,容易对陌生的环境和雾化仪器产生恐惧和抵触的心理,导致雾化吸入时哭吵不安,配合度不佳,严重影响治疗效果^[4],所以需要加强护理干预。本文通过对全程护理干预措施在儿童肺炎雾化吸入治疗中的应用效果分析,旨在探讨提高雾化吸入治疗的依从性及效果的解决方案。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2021—2022年于我科住院行雾化吸入治疗的肺炎患儿150例为研究对象,其中2021年收治的75例为对照组,男43例,女32例;年龄(3.54 ± 0.84)岁;病程(1.45 ± 0.77)d。2022年收治的75例为观察组,男40例,女35例;年龄(3.67 ± 0.71)岁;病程(1.33 ± 0.84)d。所有病例均符合《儿科学》第9版^[5]中小儿肺炎的诊断标准。两组患儿的性别、年龄等一般资料具有可比性($P > 0.05$)。医院伦理委员会审核通过本研究,患儿家属已签署知情同意书。

1.2 方法

两组患儿均进行布地奈德混悬液联合特布他林混悬液雾化吸入治疗,2次/d,每次5~15min,共7d。对照组施行儿童肺炎雾化吸入常规护理措施,即向患儿及家属告知雾化吸入治疗目的与注意事项,并协助完成雾化吸入治疗。观察组在常规护理的基础上实行全程护理干预,具体如下。
①雾化吸入前护理:将雾化室座椅、墙壁等的色调布置成粉红色,房间光源为暖色调,粘贴上正确雾化吸入的卡通漫画,地面铺上彩色泡沫板,放置各种各样的玩具,显示屏反复播放雾化吸入治疗相关内容的动画视频;全面了解患儿的性格特点和生活习惯,及时评估患儿病情,做好健康宣教,指导并协助患儿家属清洁雾化吸入器。
②雾化吸入时护理:播放患儿喜欢的动画片或喜爱的儿歌,协助家属让患儿取坐位或半卧位,佩戴好面罩,调节开关保证雾化吸入的量由小逐渐变大,用童趣化的语言鼓励和肯定患儿的配合行为。
③雾化吸入后护理:指导并协助家属帮患儿洗脸漱口,清除颜

面及口腔内残留的药液,及时给患儿进行60s的拍背促进气道分泌物排出,及时消毒雾化吸入用具。

1.3 观察指标

①肺功能指标:分别免费测量两组患儿干预前后用力肺活量(FVC)和1s用力呼气容积(FEV1)。
②依从性判定:患儿全程无哭闹和抵抗,配合完成雾化吸入治疗为完全依从;患儿偶有哭闹和抵抗行为,但仍坚持配合完成雾化吸入治疗为部分依从;患儿全程哭闹不止,抗拒雾化吸入治疗为不依从。治疗依从性=(完全依从+部分依从)/总例数 $\times 100\%$ 。
③临床症状消失时间:咳嗽缓解时间、肺部啰音消失时间。
④家属满意度:采用我科自制的护理满意度调查表,由患儿家属填写,有满意、基本满意和不满意3个选项。满意度(%)=(满意+基本满意)/总例数 $\times 100\%$ 。

1.4 统计学方法

用SPSS 22.0统计软件将所得数据进行比较,两组肺功能指标和临床症状消失时间采取 t 检验,治疗依从性和家属满意度采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患儿干预前后肺功能比较

治疗后两组患儿FVC、FEV1均较治疗前升高,且观察组较对照组升高更明显(P 均 < 0.05)。见表1。

表1 两组患儿干预前后肺功能比较($\bar{x} \pm s, L$)

| 组别 | n | FVC | | FEV1 | |
|-----|----|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|
| | | 干预前 | 干预后 | 干预前 | 干预后 |
| 观察组 | 75 | 1.16 \pm 0.31 | 1.82 \pm 0.62** | 0.82 \pm 0.22 | 1.57 \pm 0.64** |
| 对照组 | 75 | 1.25 \pm 0.52 | 1.48 \pm 0.34* | 0.87 \pm 0.24 | 1.03 \pm 0.51* |

与同组干预前比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,# $P < 0.05$ 。

2.2 两组患儿雾化吸入治疗依从性比较

观察组雾化吸入治疗依从性高于对照组($P < 0.05$)。见表2。

表2 两组患儿雾化吸入治疗依从性比较[n(%)]

| 组别 | n | 完全依从 | 部分依从 | 不依从 | 治疗依从性 |
|-----|----|-----------|-----------|-----------|------------|
| 观察组 | 75 | 56(74.67) | 14(18.67) | 5(6.57) | 70(93.33)* |
| 对照组 | 75 | 37(49.33) | 18(24.00) | 20(16.67) | 55(73.33) |

与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.3 两组患儿临床症状消失时间比较

观察组咳嗽缓解时间及肺部啰音消失时间短于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表3 两组患儿临床症状消失时间比较($\bar{x} \pm s, d$)

| 组别 | n | 咳嗽缓解时间 | 肺部啰音消失时间 |
|-----|----|---------------|---------------|
| 观察组 | 75 | 3.21 ± 0.86 * | 4.15 ± 0.61 * |
| 对照组 | 75 | 5.48 ± 0.76 | 6.07 ± 0.30 |

与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

2.4 两组患儿家属满意度比较

观察组患儿家属满意度高于对照组($P < 0.05$)。见表4。

表4 两组患儿家属满意度比较[n(%)]

| 组别 | n | 满意 | 基本满意 | 不满意 | 满意度 |
|-----|----|-----------|-----------|-----------|-------------|
| 观察组 | 75 | 36(48.00) | 34(45.33) | 5(6.67) | 70(93.33) * |
| 对照组 | 75 | 20(26.67) | 35(46.67) | 20(26.67) | 55(73.33) |

与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨论

雾化吸入相较于目前临床上治疗儿童肺炎的其他方法,具有用药剂量小、无创伤、局部药物浓度高、能快速到达肺组织发挥作用等优势^[6],容易被儿童及家属接受。但在雾化吸入治疗过程中受限于儿童的自我管理意识和认知水平,患儿哭闹不止、抗拒不配合等现象时有发生,导致治疗中断或延长,使雾化吸入效果大打折扣^[7]。因此,亟需在雾化吸入治疗过程中实施针对儿童自身特点的护理干预措施,消除抵触心理,有效提升患儿的治疗依从性,保障治疗效果。

环境行为理论认为,一旦环境满足了个体的心理需求和行为规律,那个体便可获得心理、生理及社会层面的满足^[8]。基于这一理论,全程护理干预对患儿及家属可产生持续的积极作用,进而影响到其思想及行为。本研究将全程护理干预应用于儿童肺炎雾化吸入治疗之中,结果显示,观察组FVC、FEV1较对照组明显升高,治疗依从性高于对照组,咳嗽及肺部啰音消失时间短于对照组(P 均 < 0.05),与朱杰等^[9]报道一致。究其原因在于全程护理干预充分考虑到患儿的年龄和喜好,通过卡通漫画、动画视频等帮助患儿了解了雾化吸入治疗相关知识,通过玩游戏、播放儿歌童谣等分散了患儿注意力,使患儿在治疗过程中身心

愉悦,有利于雾化药液充分进入肺部,从而改善肺通气功能,有利于雾化吸入治疗配合度的提高,从而有效缓解临床症状。同时,观察组患儿家属满意度达93.33%,明显高于对照组($P < 0.05$),分析原因在于全程护理干预重点强调护患之间的沟通交流和互动,鼓励并协助患儿及家属顺利完成整个雾化吸入操作,同时童趣、温馨、舒适的雾化室使患儿处于放松状态,治疗效果更加显著,患儿家属更加满意。当然,受限于样本量的不足,本研究未充分考虑到诸如注射用药干扰临床症状缓解时间的问题及雾化吸入治疗的不良反应等情况,有必要在今后的研究中进一步完善。

总的来说,在儿童肺炎雾化吸入治疗中实施全程护理干预有助于患儿肺功能的改善、依从性的提升、临床症状缓解时间的缩短和家属满意度的提高,值得临床推广。

参考文献:

- [1] SAME R G, AMOAH J, HSU A J, et al. The association of antibiotic duration with successful treatment of community-acquired pneumonia in children[J]. J Pediatric Infect Dis Soc, 2021, 10(3): 267
- [2] BARDO D M E, BROWN B P, CHANDRA T, et al. ACR appropriateness criteria pneumonia in the immunocompetent child[J]. J Am Coll Radiol, 2020, 17(5): 215
- [3] WANG M, LI H, YANG J, et al. Clinical efficacy enhancement of a Chinese herbal injection in the treatment of mycoplasma pneumonia in children; a protocol of randomized controlled trial[J]. Medicine, 2021, 100: e25135
- [4] 谭艳平, 吴杨超, 吴雅娜. 同龄同病示范教育在哮喘学龄前儿童病例肺功能监测与呼吸训练护理中的应用研究[J]. 全科医学临床与教育, 2021, 19: 278
- [5] 王卫平, 孙锟, 常立文. 儿科学[M]. 第9版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 253
- [6] 毕晓雪. 快乐治疗环境创设与兴趣诱导护理在学龄前儿童肺炎雾化吸入中的效果观察[J]. 河北医药, 2022, 44(9): 1438
- [7] 校晓丽, 林蓉. 童趣化诱导联合改良式拍背排痰法在学龄期支气管肺炎患儿雾化吸入治疗中的应用效果[J]. 医学临床研究, 2022, 39(5): 796
- [8] 吴曼. 基于感觉统合理论的儿童医院公共空间环境设计——以芝加哥安与罗伯特·卢里儿童医院为例[J]. 装饰, 2020(10): 138
- [9] 朱杰, 胡雪萍. 视频宣教配合舒适护理对支气管肺炎患儿雾化吸入依从性、疗效影响分析[J]. 国际护理学杂志, 2022, 41(3): 536

(收稿日期: 2024-04-19)

苦木的生物活性及代谢研究进展*

赵依叶¹, 叶丹¹, 谢琛¹, 权浩洋¹, 郑敏^{2**}, 苗潇磊^{1**}

(1. 湖北科技学院医学部药学院, 湖北, 咸宁 437100; 2. 湖北科技学院)

摘要:苦木系苦木科苦木属植物, 是一种传统中药, 其主要活性成分包括生物碱、苦木素、三萜类等化合物, 药理学主要研究抗炎、抗癌、解热、抗病毒和降血压等作用。本综述就苦木的化学成分、作用及代谢等相关文献进行归纳总结, 旨在指出未来进一步开发苦木资源、药用价值及临床新药研发等方向, 为其在医药领域的应用提供更多的参考。

关键词:苦木; 化学成分; 生物活性; 代谢

中图分类号: R282

文献标识码: A

文章编号: 2095-4646(2024)05-0446-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI: 10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0446



Research Progress on the Bioactivity and Metabolism of *Picrasma Quassioides*

ZHAO Yi-ye, ZHENG Min, MIAO Xiao-lei, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100, China)

ABSTRACT: *Picrasma quassioides* (D. Don) Benn. is a member of the Simaroubaceae family, which has a long history of medicinal use in China. Its main active ingredients include alkaloids, quassin, triterpenoids and other compounds. Its pharmacology mainly studies its anti-inflammatory, anti-cancer, antipyretic, antiviral and antihypertensive effects. This review summarizes the relevant literature on the chemical composition, effects and metabolism of *P. quassioides*, aiming to point out the direction of further development of *P. quassioides* resources, medicinal value and clinical new drug research and development in the future, and provide more references for its application in the medical field.

KEY WORDS: *Picrasma quassioides*; Chemical composition; Biological activity; Metabolism

苦木 [*Picrasma quassioides* (D. Don) Benn.] 系苦木科苦木属植物, 为中国传统中草药, 具有悠久的药用价值, 其味苦、性寒, 归肺、大肠经。据 2020 版《中国药典》记载, 苦木具有清热解毒、祛湿功效, 用于风热感冒、咽喉肿痛、湿热泻痢、湿疹、疮疖、蛇虫咬伤等症状^[1]。苦木化学成分组成复杂且丰富, 除了具有特征性的苦木生物碱类和苦味素类成分之外, 还含有三萜类、挥发油、黄酮类、甾醇、皂苷、香豆素、酚苷等成分^[2]。现代药理学研究表明, 苦木具有抗癌、抗炎、抗菌、降压、解热、抗

蛇毒、抗疟、健胃等作用^[1-2]。临床上, 已有多种苦木中活性成分被应用于中药制剂, 如苦木注射液、苦木合剂、复方苦木消炎胶囊、莲胆消炎片、消炎利胆片等, 并在治疗上呼吸道感染、胆囊炎、肠炎等多种炎症疾病中取得了较好的疗效^[3-5]。除了具有显著的抗炎作用外, 苦木含有的苦木生物碱、苦味素等成分, 具有抗肿瘤、降低血压及抗病原微生物等多种药理活性^[2,6]。本研究对近些年苦木的化学组成、药理活性及药代动力学研究进行综述, 为更好地开发和利用中药苦木提供依据。

* 基金项目: 湖北省自然科学基金(2018CFB361); 药物高通量筛选技术国家地方联合工程研究中心开放课题基金(K20201006); 湖北科技学院校内项目(BK201810)

** 通讯作者, E-mail: 345701500@qq.com; 409581863@qq.com

1 苦木的化学成分

苦木化学成分较为复杂,1973年日本学者 Kondo 等^[7]从苦木中首次分离并鉴定出了一种 β -咔巴啉类生物碱,苦木中主要化学组成是生物碱类和苦木素类物质,且苦木生物碱由于其显著的药理活性得到了广泛关注,已经作为苦木及其相关制剂质量控制的标记性化合物。

1.1 生物碱类

苦木生物碱分为 β -咔巴啉类生物碱、铁屎米酮类生物碱和生物碱二聚体。据已有文献^[2,8]报道,在中药苦木中已鉴定出 86 种生物碱,其中 β -咔巴啉类有 60 种,分为 2 种母核结构;铁屎米酮类有 15 种,分为 3 种母核结构;生物碱二聚体有 11 种,分为 4 种母核结构。

1.2 苦味素类

苦味素类化学物质是中药苦木植物中的特征性成分,目前已经有 64 种苦味素类物质结构被鉴定^[9-10],其母核结构有 3 种,可分为半缩醛类和内酯类。

1.3 三萜类

三萜类化合物也是苦木的主要组成成分之一。目前,苦木中三萜类物质共鉴别出 42 种^[2,11],其母核结构有 2 种。

1.4 其他物质

到目前为止,从苦木中分离得到的化合物还有挥发油、苯丙素类、黄酮类,酚苷、酚酸类以及环己酮类化合物紫罗兰酮衍生物,包括近几年新发现的倍半萜类、桂皮酰胺衍生物、新木脂素、新的酚类衍生物和紫罗兰酮类衍生物^[12]。

2 苦木的生物活性

2.1 抗癌

据近年来文献^[13]研究,苦木的抗癌作用与机制如下:使用苦木提取物处理细胞,可增加细胞内活性氧,损伤线粒体膜电位,降低细胞增殖和迁移能力,并引起自噬,从而诱导细胞凋亡。研究发现^[14],苦木提取物汤剂对原发性肝癌有一定疗效,可能是通过调控患者血清中 AFP、VEGF、nm23、CD44、Bcl-2 含量水平来实现的抗肿瘤作用。此外,苦木中提取的 β -咔啉对映体能够降低 H-Ras 的表达,抑制肝癌细胞的活力,并影响 H-ras 突变的 HepG2 细胞中 ROS 积累和线粒体

功能^[15]。

苦木对于宫颈癌同样具有治疗作用,苦木碱 F 可以通过介导 miR-331-3p/PSME3 轴抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖,促进凋亡,发挥抗肿瘤作用。苦木乙醇提取物可以抑制 ATP 合成,诱导宫颈癌 SiHa 细胞凋亡,且 P38MAPK 信号通路是诱导细胞凋亡的关键^[16]。从苦木茎的乙醇提取物中分离出的 3 个 β -咔巴啉生物碱成分对宫颈癌和其他癌细胞均有抑制作用,进一步证实了苦木的抗癌作用^[6]。

苦木中提取的脱氢海人藻苷可通过调节 JNK 和 ERK 信号通路,诱导鼻咽癌细胞周期阻滞和细胞凋亡。苦木天然二聚体生物碱 Picrasidine G (PG)可以降低 MDA-MB468 细胞系(TNCEGFR +)的活力,增加细胞凋亡标记物,抑制 STAT3 靶基因 survivin 的转录等,可能有助于三阴性乳腺癌(TNBC)患者的靶向治疗^[17]。

2.2 抗炎

苦木的生物碱成分是主要有效的抗炎物质,从苦木的枝、茎、根中分离出的大量 β -咔啉类生物碱化合物表现出良好的抗炎生物活性^[7]。苦木中的咔巴啉生物碱也具有潜在的抗炎症和抗菌活性,研究发现 1-甲酰-4-甲氧基- β -咔巴啉和 1-甲酰- β -咔巴啉具有很高的抑制效果^[18]。此外,苦木脂素 A、BuddenolA、BuddenolC 和黄颜木素也能抑制炎症因子的释放,达到抗炎效果^[19]。研究还发现,苦木总碱对胶原蛋白诱导性关节炎有显著的影响,能降低肿胀和关节损伤程度^[20]。

由于苦木良好的抗炎作用,苦木相关药物在临床得以应用。苦木注射液雾化吸入辅助常规治疗能显著提高小儿急性上呼吸道感染的总有效率^[21]。此外,小儿急性上呼吸道感染肌内注射苦木注射液治疗,总有效率达到 97.8%,证明苦木注射液在治疗小儿急性上呼吸道感染中疗效显著,安全性高^[3]。苦木注射液对于小儿肠炎疗效优势明显、安全性高,并可有效缩短肠炎患儿的治疗时间,可在临床上推广使用^[4]。另外,苦木制剂消炎利胆片联合头孢曲松钠治疗慢性胆囊炎疗效显著,能有效控制炎症反应,降低胆囊壁厚度,从而促进胆囊生理功能的恢复^[5]。

2.3 抗菌

苦木生物碱在体外对多种细菌有不同程度的抑制效果,如溶血性乙型链球菌、金黄色葡萄球菌、宋内氏痢疾杆菌、枯草杆菌和八叠球菌^[22]。

苦木水煎液和脂溶性总生物碱在体外对4种实验菌均有抗菌作用,苦木水煎液外用可缓解过敏性皮炎小鼠的耳部红肿,降低血清IgE及IL-6水平,表明其具有抗菌和抗炎作用^[23]。

陈猛等^[18]抑菌实验发现,苦木中的4,5-二甲氧基-铁屎米酮对肺炎球菌有显著抑制效果,且4-甲氧基-5-羟基-铁屎米酮和3-甲基-铁屎米-2,6-二酮也具有抑菌作用。苦木的叶、种子、茎和根皮提取出的甲醇物质以及馏分石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇等物质,都对多种真菌具有广谱的抗菌活性。石国华等^[6]从苦木茎的乙醇提取物中分离得到了3个β-咔巴啉生物碱成分 picrasidine F、G 和 S,对金黄色葡萄球菌有显著的抑菌和细胞毒活性。

苦木注射液和阿奇霉素联用可能通过激活NF-κB和MAPKs信号通路,抑制NO、TNF-α和IL-6的释放来协同抑制金黄色葡萄球菌等多种细菌,包括耐药性强的菌株。此外,联合治疗还能改善肺炎克雷伯菌诱导的肺组织病变,缓解临床症状^[24]。

2.4 治疗心血管疾病

研究^[25]发现苦木提取物可以显著提高原发性高血压大鼠的血清一氧化氮和超氧化物歧化酶SOD水平,并促进内皮一氧化氮合酶(eNOS)的表达,这提示其降压机制主要是通过影响主动脉内皮一氧化氮合酶蛋白的表达来增加血管舒张因子NO的含量,从而使血管扩张并降低血压。苦木总生物碱通过静脉注射或灌胃给药的方式对正常和肾性高血压大鼠均有明显的降压作用;同时,苦木总生物碱还能减缓心率,改善心肌营养性血流量并抑制交感神经放电^[26]。有研究者对大鼠进行了急性降压实验,发现苦木总生物碱具有明显的降压作用和一定的解毒作用,并且远期疗效好,副作用轻微^[27]。

除此之外,有学者证明苦木乙醇浸膏片的降压效果与降压灵相近似,其原因可能是苦木内酯通过中枢α受体实现的^[28]。对苦木成分进行系统分离和药理筛选,发现苦木内酯甲(I)具有显著的降压作用。制成片剂后,在临床试验中也显示出较好的疗效^[29]。

2.5 对胃肠道的作用

研究^[30]发现,苦木中的铁屎米-6-酮和β-咔巴啉-1-丙酸可增加家兔胃肠道血流速率,而4,5-二甲氧基-铁屎米酮、5-羟基-4-甲氧基-铁屎米酮和1-

甲氧甲酰-β-咔巴啉则仅增加肠道血流速率。此外,苦木的活性成分对胃黏膜也具有保护作用,对胃溃疡和黏膜损伤有疗效。魏明强等^[4]研究表明,苦木注射液治疗小儿肠炎疗效较传统方法显著。此外,苦木注射液穴位注射也是治疗小儿腹泻的有效方法,尤其对1岁以上的小儿秋冬腹泻疗效好^[31]。

2.6 抗病毒

Chen等^[32]研究发现,苦木中的生物碱具有抗烟草花叶病毒(TMV)的功能,其通过对苦木的甲醇提取物进行分离,获得了所有β-咔啉类生物碱,这些生物碱均表现出中等强度的抗TMV活性。且在与苦木苦味素苦木内酯B联用时,具有协同作用,其中1-甲氧羰基-β-咔啉比宁南霉素更有效地抑制TMV的复制。临床试验显示^[33],苦木注射液有清热解毒、祛湿止痛的功效,在治疗止疱、止痛、结痂、愈合时间上的效果优于病毒唑注射液。

2.7 抗代谢紊乱作用

据报道,苦木中的化合物可以刺激PPARγ和PPARβ/δ等受体,在调节能量代谢、炎症等生理过程中发挥重要作用,具有治疗代谢紊乱疾病如肥胖、糖尿病等潜在用途^[34]。另外,苦木根中的二聚体β-咔啉型生物碱化合物苦树碱C也是一种PPARα激活剂,具有治疗高脂血症、动脉粥样硬化和高胆固醇血症等代谢性疾病的潜在应用^[35]。

2.8 对神经系统的保护作用

苦木中的铁屎米-6-酮类生物碱具有潜在的抗神经炎症作用,可对星形胶质细胞介导的促炎反应和相关内皮屏障破坏具有显著的保护作用^[36]。另外,苦木茎的乙酸乙酯提取物可改善淀粉样β肽诱导的阿尔兹海默症(AD)小鼠的记忆和认知能力,并在神经细胞模型中具有神经保护作用,其抗AD机制可能涉及抑制神经炎症和减少Aβ1-42沉积^[37]。

2.9 其他

苦木还被发现具有抗疟作用,Pavanand等^[38]发现从泰国苦木茎皮提取的化合物6-羟基-4-甲氧基-1-乙炔基-B-咔巴啉和4-甲氧基-1-6-咔巴啉对多种镰状疟原虫产生抑制活性。苦木的根、茎、枝、叶均具有抗氧化作用,以叶的效果最佳。Yang等^[39]发现苦木具有明显的抗氧化活性,证明4-甲氧基-5-羟基-6-酮是唯一具有抗氧化活性的化合

物,为进一步开发苦木作为抗氧化剂提供了基础。苦木对中毒动物也具有保护作用,梁文法^[40]实验发现,苦木注射液对注射致死量蛇毒的小白鼠和犬都有显著的保护作用,小白鼠的保护率达到75.6%,犬的保护率则高达100%。

3 苦木的代谢

近年来,关于苦木的代谢研究也有了新的进展。Miao等^[41]研究了4,5-二甲氧基-铁屎米酮在不同动物(大鼠、小鼠、犬和人)肝微粒体中的代谢产物M1-M8,并分析了主要代谢产物在大鼠体内的组织分布和药代动力学特征。Shi等^[42]采用LC-MS法研究了口服苦木后大鼠血浆中4,5-二甲氧基-铁屎米酮和5-羟基-4-甲氧基-铁屎米酮的浓度及其药代动力学特征,发现4,5-二甲氧基-铁屎米酮在大鼠体内消除较快。还采用LC-Q-TOF-MS等技术,对大鼠体内CAN代谢产物进行筛选和表征,总共鉴定出17个代谢产物,并发现了一条新的CAN代谢途径。Zhao等^[43]用LC-MS/MS测定了大鼠血浆中5-甲氧基-铁屎米酮的含量并研究了其药代动力学特征,结果表明5-甲氧基-铁屎米酮在大鼠体内吸收快、消除半衰期适中,但生物利用度低。蔡梅香等^[44]分析了苦木的生物碱化学成分及其在SD大鼠体内的转化规律,发现4,5-碳碳双键和6,7-内酰胺键能在体内断裂,形成 β -咔巴啉型生物碱,证明4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮可以在大鼠体内转化成1-甲氧甲酰- β -咔巴啉。Fan等^[45]利用短刺小克银汉霉模拟哺乳动物代谢4,5-二甲氧基-铁屎米酮生物碱的微生物转化,并成功分离出化合物1的7种代谢产物;还提出了化合物1的代谢途径,其中包括I、II相反应。以上对苦木成分的代谢规律研究,皆为苦木的新药开发与临床合理用药提供了有利依据。

4 总结与展望

近年来,中药苦木的化学成分、生物活性和代谢的研究都取得了显著的进展。苦木的化学成分不断被发现,并利用新的技术分离出了新的生物碱、苦味素、三萜类等主要成分物质及其他物质。苦木中的活性物质除具有抗癌、抗炎、降压等作用外,还有抗病毒、抗氧化、神经保护等作用,在治疗多种疾病方面具有潜在的应用前景。同时,苦木生物碱代谢物的研究,可以更好地了解其作用机制,为苦木的药物开发提供了重要的理论依据。未来需要继续深入研究苦木的化学成分、药理作

用及药代动力学,开发出新的安全有效的药物。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:209
- [2] 赵文娜. 苦木的化学成分及药理活性研究[D]. 西安:西北大学,2013
- [3] 伍万慧. 苦木注射液雾化吸入治疗小儿急性上呼吸道感染临床观察[J]. 中国社区医师,2016,32(22):119
- [4] 魏明强,陈斌,吴宴勇. 海立新(苦木注射液)治疗小儿肠炎的临床研究[J]. 中国医药指南,2018,16(34):170
- [5] 裴书飞,张向东,赵先群,等. 消炎利胆片联合头孢曲松钠治疗慢性胆囊炎临床研究[J]. 新中医,2022,54(22):76
- [6] 石国华,焦伟华,杨帆,等. 苦木中3个二聚 β -卡巴林生物碱及其生物活性研究[J]. 中草药,2015,46(6):803
- [7] KONDO Y, TAKEMOTO T. The structure of a new β -carboline alkaloid from *Picrasmaailanthoides planchon*[J]. Chem Pharm Bull,1973,21(4):837
- [8] ZHANG J, ZHAO S S, XIE J, et al. N-methoxy- β -carboline alkaloids with inhibitory activities against A β 42 aggregation and acetylcholinesterase from the stems of *Picrasma quassioides*[J]. Bioorg Chem,2020,101:104043
- [9] HE C, WANG Y, YANG T, et al. Quassinoids with insecticidal activity against diaphorina citri kuwayama and neuroprotective activities from *Picrasma quassioides*[J]. J Agric Food Chem,2020,68(1):117
- [10] ZHAO W Y, SONG X Y, ZHAO L, et al. Quassinoids from *Picrasma quassioides* and their neuroprotective effects[J]. J Nat Prod,2019,82(4):714
- [11] YANG P Y, ZHAO P, BAI M, et al. Structure elucidation and absolute configuration determination of C26, C27 and C30 tirucallane triterpenoids from the leaves of *Picrasma quassioides* (D. Don) Benth[J]. Phytochemistry, 2021, 184:112675
- [12] XU R, ZHANG D, SHU F, et al. Picraquinines A-C, three new phenolic derivatives from the stems of *Picrasma quassioides*[J]. Nat Prod Res,2021,35(21):3687
- [13] 金永哲,谢丹萍,孙虎男. 苦木提取物对耐药性肺癌细胞的促凋亡作用[J]. 延边大学医学学报,2020,43(4):243
- [14] 李玥,罗鑫,李玉凤,等. 苦木提取物汤剂对肝癌患者治疗的效果观察[J]. 中医临床研究,2017,9(20):41
- [15] XIE D P, GONG Y X, JIN Y H, et al. Anti-tumor properties of *Picrasma quassioides* extracts in H-RasG12V liver cancer are mediated through ROS-dependent mitochondrial dysfunction[J]. Anticancer Res,2020,40(7):3819
- [16] GONG Y X, LIU Y, JIN Y H, et al. *Picrasma quassioides* extract elevates the cervical cancer cell apoptosis through

- ROS-mitochondrial axis activated p38 MAPK signaling pathway[J]. *In Vivo*, 2020, 34(4): 1823
- [17] HSIEH M C, LO Y S, CHUANG Y C, et al. Dehydrore-natidine extracted from *Picrasma quassioides* induces the apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells through the JNK and ERK signaling pathways[J]. *Oncol Rep*, 2021, 46(2): 166
- [18] 陈猛. 苦木生物碱活性成分的研究[D]. 烟台: 烟台大学, 2007
- [19] 焦伟华. 中药苦木抗炎活性成分研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2010
- [20] 陈慈成, 李振荣, 刘晓春. 苦木注射液治疗小儿急性上呼吸道感染的疗效观察[J]. *中国处方药*, 2016, 14(5): 40
- [21] 刘博文, 刘富垒, 王如意, 等. 苦木总生物碱的化学成分分析及其对大鼠胶原诱导性关节炎的作用[J]. *中国药科大学学报*, 2019, 50(5): 585
- [22] 振玉, 周同惠, 方起程, 等. 中草药现代研究[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996: 468469
- [23] 赵文娜, 崔迎, 白静, 等. 苦木提取物的体外抗菌活性和抗炎作用研究[J]. *西北药学杂志*, 2019, 34(4): 505
- [24] YU M, GU X, QU Y, et al. Combination therapy with TCM preparation kumu injection and azithromycin against bacterial infection and inflammation; *in vitro* and *in vivo*[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 8533005
- [25] 赵文娜, 苏琪, 何姣, 等. 苦木提取物对原发性高血压大鼠的降压作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(5): 108
- [26] 马树德, 谢人明, 苗爱蓉, 等. 苦木总生物碱对心血管系统的作用[J]. *药科学报*, 1982(5): 327
- [27] 杜志德, 张爱武, 王玉凤. 苦木总生物碱的降压作用及毒性研究[J]. *中国药理学杂志*, 1981(6): 5
- [28] 程准权, 王素侠, 王宗和, 等. 苦木内酯甲治疗高血压病 136 例[J]. *新药与临床*, 1987(5): 275
- [29] 张振杰, 李遂英, 郭立, 等. 苦木降压成分的分离与鉴定[J]. *西北植物学报*, 1986(2): 138
- [30] OHMOTO T, SUNG Y, KOIKE K, et al. Effect of alkaloids of simaroubaeous plants on the local blood flow rate[J]. *Pharmacognosy Magazine*, 1985, 39(1): 28
- [31] 刘文兴. 海立新牌苦木注射液穴位注射治疗小儿秋冬季腹泻 60 例报告[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2015, 15(14): 125
- [32] CHEN J, YAN X H, DONG J H, et al. Tobacco mosaic virus (TMV) inhibitors from *Picrasma quassioides* benn [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(15): 6590
- [33] 谢伟宣. 苦木注射液治疗带状疱疹疹效果观察[J]. *右江民族医学院学报*, 2000(6): 967
- [34] ZHAO S, KANNO Y, LI W, et al. Picrasidine N is a subtype-selective PPAR β / δ agonist[J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(4): 879
- [35] LI F, WANG H, WANG Y, et al. Computational investigation reveals picrasidine C as selective PPAR α lead: binding pattern, selectivity mechanism and ADME/tox profile[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2020, 38(18): 5401
- [36] YUE Q, XU Y, LIN L, et al. Canthin-6-one (CO) from *Picrasma quassioides* (D. Don) Benn. ameliorates lipopolysaccharide (LPS)-induced astrocyte activation and associated brain endothelial disruption[J]. *Phytomedicine*, 2022, 101: 154108
- [37] GUO E, HU Y, DU T, et al. Effects of *Picrasma quassioides* and its active constituents on Alzheimer's disease *in vitro* and *in vivo*[J]. *Bioorg Chem*, 2019, 92: 103258
- [38] PAVANAND K, YONGVANITCHIT K, WEBSTER H K, et al. In vitro antimalarial activity of a Thai medicinal plant *Picrasma javanica* Bl [J]. *Phytother Res*, 1988, 2(1): 33
- [39] YANG N, SHI Y, XIONG A, et al. Preparation and purification of canthinone and β -carboline alkaloids from *Picrasma quassioides* based on bioautography and mass-spectrometry-directed autopurification system[J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(15): 3014
- [40] 梁文法. 苦木的抗蛇毒研究[J]. *中药通报*, 1987(4): 56
- [41] MIAO X, WANG J, CHEN Y. Pharmacokinetics and tissue distribution of 4, 5-dimethoxycanthin-6-one and its major metabolites in rats[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 139: 22
- [42] SHI Y, XIA Y, WANG J, et al. Metabolic profile of 5-hydroxy-4-methoxycanthin-6-one, a typical canthinone alkaloid, in rats determined by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry together with multiple data processing techniques[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 129: 60
- [43] ZHAO L, ZHAO Y, GUO L, et al. Pharmacokinetic and bioavailability study of 5-hydroxy-4-methoxycanthin-6-one, a typical canthinone alkaloid, in rats using ultra-high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Biomed Chromatogr*, 2020, 34(7): e4830
- [44] 蒋梅香, 周应军, 毛群芳. 苦木生物碱化学成分及生物转化研究[J]. *中医药导报*, 2022, 28(1): 56
- [45] FAN H X, ZHOU Z Q, PENG J, et al. A microbial model of mammalian metabolism: biotransformation of 4, 5-dimethoxyl-canthin-6-one using *Cunninghamella blakesleeana* CGMCC 3.970[J]. *Xenobiotica*, 2017, 47(4): 284

二硫化钼纳米复合材料在抗菌治疗中的作用机制*

杨迪迪,范旭珂,张梦盼,庞义军**

(湖北科技学院医学部药学院,湖北 咸宁 437100)

摘要:由于细菌感染和抗生素耐药性问题日益严重,二硫化钼(MoS_2)纳米材料因其独特的化学和物理特性而表现出巨大的潜力。本文结合国内外文献报道,就二硫化钼(MoS_2)的结构特点与其抗菌机制进行综述,认为未来 MoS_2 基纳米抗菌材料的开发应实现多重抗菌机制的协同作用,以降低纳米材料的浓度,实现优异抗菌的同时实现生物相容性、安全性。

关键词:二硫化钼;光响应抗菌;纳米材料;协同抗菌

中图分类号:R945

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)05-0451-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0451



Mechanism of Molybdenum Disulfide Nanocomposites in Antibacterial Therapy

YANG Di-di, FAN Xu-ke, PANG Yi-jun, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology,
Xianning Hubei 437100, China)

ABSTRACT: Due to the increasingly severe problems of bacterial infections and antibiotic resistance, molybdenum disulfide (MoS_2) nanomaterials have exhibited remarkable potential owing to their unique chemical and physical properties. This article reviewed the structural characteristics and antibacterial mechanisms of MoS_2 based on domestic and foreign literature reports, proposing that the development of MoS_2 -based nano-antibacterial materials in the future should achieve the synergistic effect of multiple antibacterial mechanisms to reduce the concentration of nanomaterials, achieve excellent antibacterial properties, and achieve biocompatibility and safety.

KEY WORDS: Molybdenum disulfide; Photo-induced antibacterial; Nanomaterials; Photothermal antibacterial

细菌性感染由多种细菌引起,包括大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和白色念珠菌(*C. albicans*)等,其引发的健康影响程度亦有所不同。1928年,青霉素的发现为感染性疾病的治疗带来了划时代的变革,抗生素通过干扰细菌的细胞壁、核酸复制和蛋白质合成来达到消灭细菌的效果^[1-2]。细菌可通过细胞膜的通透性降低以阻止抗生素的入侵,产生水解酶直接破坏抗生素,或改变抗生素的靶标蛋白等方式使传统抗生素治疗失效^[3],导致抗生素耐药性的增加和耐药菌株的出现,为传统抗生素疗法带来严重挑战,开发异

于抗生素治疗途径的细菌感染应对策略显得尤为重要。

多种类型的纳米材料被应用于抗菌研究,如贵金属、金属氧化物、二维层状纳米材料等。在众多纳米材料中,二维(2D)纳米材料因其超大的比表面积,可以作为抗菌药物的适合载体,另外,二维纳米材料出色的电子、光学及热学性能,使其可以通过物理或化学途径杀灭细菌,大大降低细菌耐药性的产生^[4-6]。在常见的二维纳米材料中,由于Mo是人体内某些酶中必不可少的微量元素,而S是蛋白质中常见的生物元素,因此,作为典型的

* 基金项目:湖北省科技厅青年面上项目(2019CFB365);湖北省教育厅青年项目(Q20192805);湖北科技学院博士启动项目(BK201809)

** 通讯作者, E-mail: yijunpang@hbust.edu.cn

过渡金属硫化物, MoS_2 更适用于生物医学方面的应用, 受到广泛研究^[7-8]。本综述旨在全面概述 MoS_2 的结构性质以及其可能的抗菌机制, 这将有助于更好地理解 MoS_2 在抗菌应用中的作用方式, 并为进一步的研究提供理论基础和实验指导。

1 MoS_2 的结构与性质

块状的 MoS_2 是一种半导体材料, 其间接带隙为 1.2 eV。但 MoS_2 层与层之间由弱的范德华力相结合, 因此, 可以通过物理或者化学的方法进行剥离。所获得的单层 MoS_2 具有 1.9 eV 的直接带隙^[9]。当 MoS_2 被可见光照射时, 会产生电子-空穴对, 从而生成活性氧(ROS)。 MoS_2 根据其维度的不同分为 0D 的 MoS_2 量子点、1D 的 MoS_2 纳米管、2D 的纳米片以及 3D 的纳米花和纳米球等^[10]。1D 和 3D 的 MoS_2 具有独特的几何形状, 可以增强与细菌的相互作用, 但存在生产成本低且制备复杂等问题。与 1D 和 3D 的 MoS_2 相比, 2D MoS_2 的制备成本低且具有较大的比表面积, 可以通过表面功能化与其他多种材料进行结合。与 0D 的 MoS_2 相比, 2D 的化学性质更稳定。因此, 2D MoS_2 在抗菌方面的应用可能更加广泛。

2D MoS_2 的结构类似于“三明治”, 两层 S 原子中间夹着一层 Mo 原子。根据其原子排列的不同表现出多种晶体结构, 如三角形的 1T 结构、六边形的 2H 结构以及菱形的 3R 结构。1T- MoS_2 是对称的 Mo-Mo 键, 具有金属性质, 这显著提高了它的电催化活性。单层 2H 结构的 MoS_2 最为常见, Mo 和 S 原子呈蜂窝状排列, 这种结构使 MoS_2 在近红外(NIR)区域表现出优秀的光吸收能力, 并在光谱应用中提供了巨大的潜力^[11-13]。另外, 2H 结构的 MoS_2 广泛应用于催化领域, 其层状结构为催化反应提供了活性位点, 使其成为一种有前途的催化材料^[10]。

2 MoS_2 的抗菌机制

2.1 物理损伤抗菌

作为新型抗菌材料, MoS_2 纳米片与其他二维纳米材料一样, 具有锋利的边缘结构, 可以通过破坏细菌的细胞膜、细胞内部脂质的泄露进而引起细菌凋亡^[14]。 MoS_2 与石墨烯在结构上类似, Tu 等^[15]深入探讨了石墨烯及氧化石墨烯纳米片对 *E. coli* 细胞膜的破坏机制, 通过透射电子显微镜(TEM)观察和分子动力学模拟, 发现石墨烯纳米

片能够穿透并从细胞膜中抽取大量磷脂分子, 引起细胞膜破裂和细胞死亡; 并且石墨烯纳米片的抗菌活性随其横向尺寸和浓度的增加而增强。

在 2018 年, Wu 等^[16]重点研究了 MoS_2 纳米片与 *E. coli* 是如何通过物理相互作用来破坏细菌的细胞膜结构。结果表明, MoS_2 纳米片通过在膜表面形成凹痕并提取磷脂分子来破坏膜的完整性, 此过程归因于脂质尾部与 S 原子的色散相互作用及脂质头部与 MoS_2 纳米片边缘的 Mo 原子和 S 原子的静电相互作用。Roy 等^[17]的研究揭示了聚合物修饰的 MoS_2 纳米片通过与细菌细胞膜的直接物理相互作用, 包括电静力作用导致的膜去极化、凹陷形成引起的膜破裂以及 ROS 水平的上升, 从而有效杀死细菌。这些研究说明, 尽管石墨烯和 MoS_2 在结构上具有相似性, 但它们与细菌细胞膜的相互作用机制具有特定的特点和效果, MoS_2 的抗菌机制可能对细胞膜的破坏造成更为精细和特异性的影响, 有可能减少对周围非目标细胞的损害。

金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)作为革兰氏阳性菌的代表, 在我们的生活环境中也有分布, 且常常引起各种感染性疾病。Kumari 等^[18]通过分子动力学模拟深入探讨了 MoS_2 纳米片对 *S. aureus* 的抗菌作用。在生理温度下, MoS_2 纳米片通过与细菌细胞膜的物理相互作用, 引发脂质分子的紧密排列和轻微的膜相界缺陷, 而在温度轻微上升时, 则通过促进脂质分子的重排和大孔形成, 导致类似于细胞内容物的泄露。此外, 垂直排列的 MoS_2 纳米片能够直接穿透细胞膜, 采用“磷脂质抽取及纳米刀”路径, 表现出强效的抗菌活性。以上这些研究成果不仅加深了我们对 MoS_2 纳米片作为新型抗菌剂物理机制的理解, 也为基于这些二维纳米材料抗菌策略的进一步开发提供了重要的理论基础和指导。

2.2 光响应抗菌

2.2.1 光催化抗菌

MoS_2 作为一种典型的半导体材料, 能够在光照下利用电子跃迁进行光催化反应并生成活性氧(ROS), 包括羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、过氧化氢(H_2O_2)和超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$), 这些 ROS 能够破坏微生物细胞内的抗氧化平衡, 导致细胞内关键成分的氧化, 最终引起微生物失活^[19-21]。

Wang 等^[22]成功制备了 $\text{CoS}_2/\text{MoS}_2$ 混合金属硫化物纳米片, 其可在中性条件下实现酶催化和

光催化协同效应、高效产生 ROS 的能力,特别是 $O_2^{\cdot-}$,这显著提高了对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抗菌效率。Li 等^[23]开发了一种含有单宁酸螯合铁修饰的二硫化钼纳米片($MoS_2@TA/Fe\ NSs$)多功能水凝胶,用于治疗细菌感染的伤口。这种水凝胶利用 PTT、谷胱甘肽(GSS)损失以及催化产生 $\cdot OH$ 的过氧化物酶样(POD)活性,在酸性环境下实现有效抗菌。同时,其具有的过氧化氢酶样(CAT)活性在中性条件下可促进氧气的生成,改善缺氧环境,加速伤口愈合。Deng 等^[24]设计了一种光激活级联生物异质结(C-bio-HJs),由石墨相碳化氮($g-C_3N_4$)和 MoS_2 组成,并集成了葡萄糖氧化酶(GOx),旨在快速消毒和促进糖尿病创面再生。该独特组合利用光产生的电子-空穴对有效分离,进而催化葡萄糖生成 H_2O_2 ,随后转化为 $\cdot OH$,实现了光动力和化学动力-光热协同抗菌疗法。

2.2.2 光热疗法(PTT)

此外, MoS_2 在近红外区域具有强吸收和光热转换能力,能将特定波长光的能量转换为热能,通过热效应直接破坏细菌,导致其死亡^[25-26]。Cao 等^[27]制备了一种壳聚糖(CS)功能化的二硫化钼纳米复合物(M-CS-Ce6),通过结合光热和光动力效应显著提高了其对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌的抗菌能力。在 660nm 激光照射下,M-CS-Ce6 展示了优异的光抗菌性能和广谱抗菌效果,证明了该纳米复合物可以有效提高革兰氏阴性细菌的细胞壁通透性,从而实现光抗菌效果。另外,二氢卟吩 e6(Ce6)可以进入革兰氏阳性细菌细胞内部达到杀菌效果。Chen 等^[28]研究了具有金属相(1T 或 1T')的 MoS_2 纳米片作为声动力抗菌治疗的声敏剂,发现这些金属相 MoS_2 纳米片在声动力治疗中表现出比半导体相(2H) MoS_2 更强的活性,尤其是在 ROS 生成方面。在 1064nm 激光照射下,不仅显著增强了光热效应,还进一步提高了 ROS 的生成,两种机制起到了协同抗菌的效果。

2.3 协同抗菌

近年来,研究者们通过设计具有特定功能的 MoS_2 基纳米复合材料,实现了多模式协同抗菌效应,有效对抗耐药细菌并促进伤口愈合。Tang 等^[29]开发了一种基于碳纤维(CF)的二硫化钼(MoS_2)纳米片复合材料(CF- MoS_2),采用物理破坏和光热效应的双重模式实现高效的抗菌作用。通过模仿猪笼草表面结构,CF- MoS_2 的锋利边缘直接破坏细菌细胞膜,表现出物理抗菌特点。在

NIR 光照射下,CF- MoS_2 展现出光热性质,进一步杀死受损的细菌,实现了近乎 100% 的杀菌效率。Wang 等^[30]通过将十二烷基硫酸钠(SDS)改性到 $Fe_2O_3@MoS_2$ 的表面,制备成了 $Fe_2O_3@MoS_2@SDS$ 纳米复合材料,具有光热和光动力协同效应,在 NIR 光照射下有效杀灭细菌、分解四环素类抗生素,阻断抗生素抗性基因(ARCs)的传播。

Jin 等^[31]研究介绍了一个基于 MoS_2 的纳米平台(MQCP@ZIF-8),用于解决耐药细菌感染和伤口愈合。该平台利用 PTT 和光动力疗法 PDT 的协同效应, MoS_2 纳米粒子用于增强光热转换效率,而附着的季铵化聚乙烯亚胺(QPEI)、Ce6 和三七皂苷(PNS)有助于光动力活性和伤口愈合。纳米平台不仅对耐多药大肠杆菌和金黄色葡萄球菌展现出显著的抗菌活性,破坏细菌生物膜和细菌细胞结构,还能促进小鼠的伤口愈合。

Liao 等^[32]开发了一种金属-有机框架(MOF)修饰的 MoS_2 纳米酶(UNMS NCs),通过结合 PTT、PDT 和过氧化物酶样活性的协同方法来对抗耐药菌的感染。该纳米酶表面的正电荷能有效捕获并限制细菌,在 NIR 光照射下,它通过其光热效应和纳米酶活性产生反应 ROS,包括单线态氧和羟基自由基。这种多模式策略显著提高了对耐药菌的杀菌效率,且具有良好的生物相容性。

Zheng 等^[33]通过选择性激光烧结技术,成功构建了一种银锚定的 MoS_2 纳米片($Ag@PMoS_2$),并通过原位还原合成了复合聚合物支架($Ag@PMoS_2/PGA$),展示了显著的抗菌和抗肿瘤活性。其主要抗菌机制涵盖了银纳米颗粒通过释放银离子(Ag^+)直接杀死细菌,以及 MoS_2 纳米片在 NIR 光照射下引发的光热效应,这两种机制的协同作用显著增强了抗菌效果。 Ag^+ 通过破坏细菌的细胞膜和生物功能来抑制其生长,而光热效应则通过增加局部温度直接破坏细菌细胞,实现了长效的抗菌能力。

3 结论

在本综述中,探讨了基于 MoS_2 纳米材料在抗菌领域的应用,突出其通过物理损伤、光响应杀菌以及协同杀菌机制对抗细菌。虽然每种方法各有优势,但未来的研究可能会倾向于开发集成多种杀菌机制的纳米材料,以增强抗菌效能并应对多重耐药性问题,特别是结合物理和光响应机制的纳米材料可能提供对抗复杂感染的新策略。同时,为了临床应用的可行性,改进纳米材料的生物

相容性和安全性也将是未来研究的关键方向,这些努力将有助于纳米技术在防治感染性疾病中的进一步应用和发展。

参考文献:

- [1] WRIGHT G D. Molecular mechanisms of antibiotic resistance[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2011, 47(14):4055
- [2] MEI L, ZHU S, YIN W, et al. Two-dimensional nanomaterials beyond graphene for antibacterial applications; current progress and future perspectives [J]. *Theranostics*, 2020, 10(2):757
- [3] BLAIR J M, WEBBER M A, BAYLAY A J, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(1):42
- [4] SETHULEKSHMI A, JAYAN J S, SARITHA A, et al. Insights into the reinforceability and multifarious role of WS2 in polymer matrix[J]. *Journal of Alloys and Compounds*, 2021, 876:160107
- [5] AGARWAL V, CHATTERJEE K. Recent advances in the field of transition metal dichalcogenides for biomedical applications[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(35):16365
- [6] SETHULEKSHMI A, SARITHA A, JOSEPH K, et al. MoS₂ based nanomaterials; advanced antibacterial agents for future[J]. *Journal of Controlled Release*, 2022, 348:158
- [7] WANG Z, MI B. Environmental applications of 2D molybdenum disulfide (MoS₂) nanosheets [J]. *Environmental Science Technology*, 2017, 51(15):8229
- [8] RADISAVLJEVIC B, RADENOVIC A, BRIVIO J, et al. Single-layer MoS₂ transistors[J]. *Nature Nanotechnology*, 2011, 6(3):147
- [9] KUC A, HEINE T. The electronic structure calculations of two-dimensional transition-metal dichalcogenides in the presence of external electric and magnetic fields [J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(9):2603
- [10] SHEN J, LIU J, FAN X, et al. Unveiling the antibacterial strategies and mechanisms of MoS₂; a comprehensive analysis and future directions[J]. *Biomaterials Science*, 2024, 12(3):596
- [11] ZHU G, ZHANG D, QIAN J. Research advances in molybdenum disulfide-based nanomaterials in field of electrochemical sensing/hydrogen evolution [J]. *Cailiao Gongcheng-Journal of Materials Engineering*, 2019, 47(6):20
- [12] GRAYFER E D, KOZLOVA M N, FEDOROV V E. Colloidal 2D nanosheets of MoS₂ and other transition metal dichalcogenides through liquid-phase exfoliation[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2017, 245:40
- [13] YADAV V, ROY S, SINGH P, et al. 2D MoS₂-based nanomaterials for therapeutic, bioimaging, and biosensing applications[J]. *Small*, 2019, 15(1):1803706
- [14] CHEN Y, JI Q, ZHANG G, et al. Synergetic lipid extraction with oxidative damage amplifies cell-membrane-destructive stresses and enables rapid sterilization[J]. *Angewandte Chemie*, 2021, 133(14):7823
- [15] TU Y, LV M, XIU P, et al. Destructive extraction of phospholipids from Escherichia coli membranes by graphene nanosheets [J]. *Nature Nanotechnology*, 2013, 8(8):594
- [16] WU R, OU X, TIAN R, et al. Membrane destruction and phospholipid extraction by using two-dimensional MoS₂ nanosheets[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(43):20162
- [17] ROY S, MONDAL A, YADAV V, et al. Mechanistic insight into the antibacterial activity of chitosan exfoliated MoS₂ nanosheets: membrane damage, metabolic inactivation, and oxidative stress[J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2019, 2(7):2738
- [18] KUMARI M, KASHYAP H K. Wrapping-trapping versus extraction mechanism of bactericidal activity of MoS₂ nanosheets against staphylococcus aureus bacterial membrane[J]. *Langmuir*, 2023, 39(15):5440
- [19] ZHENG Q, LIU X, ZHENG Y, et al. The recent progress on metal-organic frameworks for phototherapy[J]. *Chemical Society Reviews*, 2021, 50(8):5086
- [20] FAN J, LI Y, NGUYEN H N, et al. Toxicity of exfoliated-MoS₂ and annealed exfoliated-MoS₂ towards planktonic cells, biofilms, and mammalian cells in the presence of electron donor [J]. *Environmental Science: Nano*, 2015, 2(4):370
- [21] CHEN F, LUO Y, LIU X, et al. 2D molybdenum sulfide-based materials for photo-excited antibacterial application [J]. *Adv Healthc Mater*, 2022, 11(13):e2200360
- [22] WANG J, WANG Y, ZHANG D, et al. CoS₂/MoS₂ nanosheets with enzymatic and photocatalytic properties for bacterial sterilization[J]. *ACS Applied Nano Materials*, 2021, 4(8):7698
- [23] LI Y, FU R, DUAN Z, et al. Construction of multifunctional hydrogel based on the tannic acid-metal coating decorated MoS₂ dual nanozyme for bacteria-infected wound healing[J]. *Bioactive Materials*, 2022, 9:461
- [24] DENG Y, OUYANG X, SUN J, et al. Rapid sterilisation and diabetic cutaneous regeneration using cascade bio-heterojunctions through glucose oxidase-primed therapy [J]. *Bioactive Materials*, 2023, 25:748
- [25] ZHAO Y, WEI C, CHEN X, et al. Drug delivery system based on near-infrared light-responsive molybdenum disulfide nanosheets controls the high-efficiency release of dexamethasone to inhibit inflammation and treat osteoarthritis [J]. *ACS Applied Materials Interfaces*, 2019, 11(12):11587

(下转第460页)

天然水凝胶支架的分类及其在3D细胞培养的应用研究进展*

张利平¹, 吕慧², 吕斌^{1**}

(1. 华中科技大学同济医学院公共卫生学院, 湖北武汉 430030; 2. 武汉市武昌医院检验科)

摘要:天然水凝胶支架由亲水性聚合物链交联形成, 有相互连接的多孔结构、良好的生物相容性, 通过模拟细胞外基质为细胞的增殖、分化、迁移和相互作用提供了空间微环境, 是一种很有前景的3D细胞培养支架材料。本文从制备方法、交联方式、支架材料对天然水凝胶支架进行分类, 详细介绍了近年来基于天然水凝胶支架的3D细胞培养在细胞工程、组织工程、病毒培养等生物医学领域的应用。随着生物医学不断发展, 需深入研究3D培养细胞与天然水凝胶支架微环境之间相互作用, 不断探索新的天然聚合物材料与凝胶制备方式, 以便开发高性能、可调控、适用性强的多功能新型天然水凝胶。

关键词:3D细胞培养; 水凝胶; 凝胶支架; 应用

中图分类号: R34

文献标识码: A

文章编号: 2095-4646(2024)05-0455-006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI: 10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.05.0455



The Research Progress on Natural Hydrogels for Classification and Applications in 3D Cell Culture

ZHANG Li-ping, LV Hui, LV Bin

(School of Public Health, Tongji Medical College of Huazhong University of Science & Technology, Wuhan Hubei 430030, China)

ABSTRACT: Natural hydrogel scaffolds are formed by cross-linking hydrophilic polymer chains with interconnected porous structure, good biocompatibility, and provide a spatial microenvironment for cell proliferation, differentiation, migration, and interactions by mimicking the extracellular matrix, which is a promising scaffolding material for 3D cell culture. This paper classifies natural hydrogel scaffolds in terms of preparation method, cross-linking method, and scaffold material, and describes in detail the application of 3D cell culture based on natural hydrogel scaffolds in recent years in biomedical fields such as cell engineering, tissue engineering, and viral culture. With the development of biomedical disciplines, the interaction between cells and microenvironment in 3D cell culture should be studied, and new natural polymer materials and preparation methods should be further explored in order to design multifunctional natural hydrogels with high performance, regulation and strong applicability.

KEY WORDS: 3D cell culture; Hydrogel; Cryogel scaffold; Application

二维(two-dimension, 2D)培养作为一种经典的细胞培养技术, 凭借简单、操作便捷、细胞存活率高等优点被广泛应用。但2D培养细胞只能进行平面生长, 无法模拟体内三维(three-dimension, 3D)生理微环境下的真实组织生理特性, 不能准确反映体内细胞与细胞、细胞与基质相互作用的复杂性, 在形态、极性、受体表达、癌基因表达、与细胞外基质(包括基底膜)的相互作用以及整体细

胞结构等方面与体内生长的细胞都有所不同^[1]。

目前已经尝试建立的各种3D细胞培养系统, 可分为无支架和基于支架的培养系统。这些3D培养系统要求高效、快速、可重复、实用, 并确保3D细胞球体大小均匀, 减少细胞损伤和细胞毒性, 促进细胞生长、增殖。无支架培养是将细胞直接聚合成细胞球体或微组织, 无需支架材料介质。具体方法有细胞自发聚集、悬滴法、旋转式细胞培

* 基金项目: 国家自然科学基金(21611130030)

** 通讯作者, E-mail: lubin@hust.edu.cn

养系统等。细胞自发聚集简单、高效、细胞易提取,但商用超低吸附培养板价格昂贵,手工覆膜操作复杂^[2];悬滴法重现性好、球体大小可控,细胞易获得,但工作量较大,在不干扰细胞的前提下培养基更换困难^[3];旋转式细胞培养系统动态培养的方式有助于营养物质的运输,但需要专门的设备,无法控制球体的细胞数量和大小,且旋转剪切力可能对细胞造成损害^[4]。

而基于支架的培养系统使细胞在支架孔隙间迁移与附着,支架内的空间在细胞生长分裂时被细胞填充,形成3D培养细胞。这是目前3D细胞培养的主要方式,特别在组织工程等领域应用广泛。天然水凝胶支架通过模拟细胞外基质,为细胞的增殖、分化、迁移和相互作用提供了空间微环境,是一种很有前景的支架材料^[5]。本文将从水凝胶支架种类、支架材料、交联方式及其应用等方面介绍近年来基于水凝胶支架的3D细胞培养的研究进展。

1 天然水凝胶支架分类

1.1 按制备方法分类

1.1.1 传统水凝胶

传统水凝胶不溶于水,表现出高亲水性的3D聚合物网络,可以吸收大量的水(约大于30%),对小分子和营养物质(如 O_2)具有高渗透性,允许细胞在支架内存活,并且能模拟细胞外基质的机械特性和化学特性,这对于细胞存活、增殖、分化、极化和信号转导至关重要^[6]。但它们也存在一些缺点,例如机械强度弱、孔隙率较低,无法完全复制生物体内微环境。

1.1.2 冷冻凝胶

冷冻凝胶是在零下温度下制备的相互连接的多孔凝胶^[7]。理想的冷冻凝胶化过程是通过形成冰晶的相分离、交联和聚合,然后冰晶解冻以形成互连的多孔冷冻凝胶网络^[8]。冷冻凝胶弥补了需去除致孔剂和实际互连水平不足的缺点,它是一种典型的海绵状大孔水凝胶,在低于溶剂(例如水)凝固点的温度下形成,通过利用溶剂冰晶致孔,避免了产生细胞毒性,只需将温度保持在溶剂凝固点以上即可去除致孔剂。另一方面,致孔剂实际互连水平不足,而冷冻凝胶是高度互连的,结晶过程中,溶剂晶体不断增大直至与另一个晶体接触,产生高度互连的多孔凝胶^[8]。研究显示,冷冻凝胶具有良好的体内生物相容性并降低阻抗,

在低压电流控制下能激活脑神经前体细胞,以增强脑神经再生^[9]。

一方面,冷冻凝胶高表面积为细胞渗透和生长提供空间,相互联通的孔隙结构使得冷冻凝胶的完全水合速度快于无孔水凝胶,可支持营养物质和代谢物的流通。另一方面,冷冻凝胶海绵状的网络结构提供了良好的机械稳定性和形状记忆特性,使其能在受力后仍保持其结构完整性,当去除机械载荷,能恢复到原始形状^[10]。形状记忆特性和高机械强度的结合使冷冻凝胶成为一种可行的微创输送、保护细胞、止血并促进伤口愈合的支架载体^[11-12]。Liu等^[13]制备的透明质酸-单宁酸-KR2肽冷冻凝胶通过破坏细菌细胞膜,对大肠杆菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌等具有强抗菌活性,能清除自由基并减少肿瘤坏死因子和白细胞介素-6等促炎因子表达,促使感染性伤口愈合。

除此之外,冷冻凝胶具有可调控性。通过调节冷冻温度、单体类型和单体浓度从而调节孔径、孔隙度和硬度^[7]。根据成核理论,冷冻温度和冷却速度可以直接影响冰晶大小。降低前体溶液中单体浓度或预聚物分子量会增加冰晶体积,产生更大的孔径。冷冻凝胶物理特性的可调控性对细胞生长至关重要,研究表明通过改变支架物理特性可诱导不同的细胞反应,调节基质与细胞的相互作用^[14]。体外实验显示孔径和刚度与巨噬细胞表型之间存在相关性,小而柔软的孔($30\mu\text{m}$, 20kPa)促进了促炎反应,而大而坚硬的孔($80\mu\text{m}$, 190kPa)则促进了促愈合反应;体内伤口愈合模型也支持免疫反应的多样性,其中孔小而软的支架促进炎症反应,孔大而硬的支架更有可能促进纤维化反应和伤口愈合,表明支架的物理特性可以调节组织再生^[15]。

1.2 按交联方式分类

1.2.1 物理交联

通过物理交联形成水凝胶,仅依赖于弱相互作用(如氢键、范德华力和静电相互作用)的非共价键形成可逆凝胶,具有易生产和无需使用交联剂的优势,但也存在机械稳定性差、孔径难以调节的缺点^[16]。已报道形成物理交联水凝胶的方法有氢键交联、离子相互作用、结晶交联(冻融和形成立体络合物)、多嵌段共聚物或接枝共聚物物理交联、蛋白质相互作用交联等^[17]。

1.2.2 化学交联

化学交联凝胶中,共价键存在于不同聚合物

链之间,作为交联点形成不可逆凝胶,并使水凝胶具有更强的机械强度。合成化学交联水凝胶的方法有自由基聚合交联、通过互补基团的化学反应交联、辐照交联、酶交联等^[18-19]。化学交联水凝胶通常比物理交联水凝胶更稳定,降解时间更长。除非共价交联点被裂解,否则不溶于任何溶剂。

1.3 按支架材料分类

1.3.1 明胶及其衍生物

明胶细胞粘附性和生物相容性良好,广泛用于生物医学各领域,但明胶溶液-凝胶转变过程可逆,且其水凝胶机械强度低^[8]。2000年,Bulcke等^[20]基于明胶合成了一种具有代表性的水凝胶——甲基丙烯酰基明胶(GelMA)。通过明胶的氨基与甲基丙烯酸酯基团反应,得到光敏聚合物^[21]。在增加力学强度和稳定性的同时,反应过程中大部分的功能性氨基酸序列不会发生显著变化,使得GelMA能保留良好的细胞粘附性能^[17]。GelMA在特定光引发剂诱导下可迅速交联固化为高分子聚合物,支持细胞的增殖及迁移。例如,Kaemmerer等^[22]研究表明GelMA水凝胶包封的人上皮卵巢癌细胞会形成球体,并具有高水平的代谢率。

在紫外或可见光(405nm)照射下GelMA分子链中不稳定的碳-碳双键发生断裂产生自由基,光引发剂的诱导下交联聚合成三维凝胶网络。Irgacure 2959是常用光引发剂,对Irgacure 2959施加紫外线照射会导致 α 裂解反应,产生苯甲酰基和乙酰自由基,自由基通过链式增长聚合GelMA,形成稳定的水凝胶网络^[23]。虽然Irgacure 2959比同类光引发剂更具细胞相容性,但紫外光照射会导致活性氧和双链DNA断裂的产生,具有致突变性。因此,近年来人们开始聚焦于可见光固化系统。例如,光引发剂LAP可在405nm蓝光下引发自由基链聚合,并与GelMA结合生成聚合物,具有高水溶性(可达85mg/mL)、无氧抑制和可见光交联的优点,但其产生的自由基也具有潜在的细胞毒性^[24]。该凝胶已被报道应用于其它方面^[25-28]。

1.3.2 海藻多糖类

海藻多糖是由一种或多种单糖组成的多组分混合物,分布于藻类细胞间和细胞内。据报道^[29],海藻多糖对基质金属蛋白酶具有良好的抑制作用,可改善中波紫外线辐射、炎性细胞因子和某些激素和化学试剂引起的基质金属蛋白酶表达

上调,并减轻由自由基和活性氧引起的结缔组织炎症和降解。海藻多糖由于其与天然组织成分的化学相似性、来源广泛、易于加工、生物相容性良好、免疫原性低以及价格低廉等优势广泛用于生物医学领域^[30]。

(1)海藻酸钠。海藻酸盐易通过化学或物理交联改性,从而形成海藻酸盐水凝胶,改善其物理化学性质和生物活性。海藻酸盐交联的方法有离子交联、共价交联、细胞交联、相变(热凝胶)、“click”反应和自由基聚合^[31]。海藻酸盐羟基的常见化学改性包括氧化、硫酸化、接枝共聚、乙酰化和磷酸化,羧基可以通过酯化和酰胺化修饰^[32]。海藻酸盐可以与二价阳离子形成金属络合物来诱导凝胶化,根据阳离子性质的不同,形成凝胶所需的最低浓度和机械性能有很大差异, Ca^{2+} 与海藻酸盐的相互作用比 Mg^{2+} 更强,形成水凝胶所需的 Ca^{2+} 更少^[33]。

生物医学领域研究^[24]显示,海藻酸盐水凝胶中神经细胞分化增加,生成的神经元能够在簇内和簇外形成网络,神经突触生长和延伸,并且在无添加任何外源因素的情况下,可以获得由不同神经元亚型组成的神经元群。海藻酸盐广泛用于药物控制释放载体、伤口敷料、医疗组织工程支架,Wang等^[35]将海藻酸钠-多巴胺冷冻凝胶作为伤口敷料,促进血小板粘附与活化,比传统棉纱更能促使伤口表面止血与愈合。

(2)琼脂糖。琼脂糖具有高吸水性,可用于细胞生长、增殖与分化。它的聚合物链在高温以无规卷曲构象存在,在接近生理温度时开始形成双螺旋聚集体,其熔点和凝胶点取决于分子量、浓度和侧基数量^[36]。温敏成胶的特性使其可以不需添加化学交联剂便可形成聚合物网络。琼脂糖及其衍生物已广泛用于生物医学,包括软骨形成、神经再生、血管生成以及伤口愈合等^[37-39]。例如,Zeng等^[40]研究显示基于生物玻璃-琼脂糖-海藻酸盐合成的热敏可注射水凝胶促进了成纤维细胞和上皮细胞的迁移,促进血管形成,可被用作伤口敷料促进伤口愈合。

2 基于天然水凝胶支架3D细胞培养的应用

2.1 细胞工程

细胞工程是应用细胞生物学和分子生物学的理论和方法在细胞水平上进行遗传操作及大规模的细胞和组织培养。水凝胶的物理特性(刚度、结

构、孔径等)可以通过改变机械转导信号(局灶性粘附复合物累积与激活、细胞骨架重排、蛋白质的胞质-核转运和激活)来调节细胞行为^[15,41]。水凝胶的刚度已知是调节细胞行为的重要特性^[42]。异构胶原蛋白水凝胶中,可以通过调节水凝胶刚度和结构调控间充质干细胞的迁移速度、成骨分化,并诱导多功能干细胞中胚层分化^[43]。随着水凝胶孔径减小,细胞扩散面积、迁移速度、局灶性粘附显著增加^[44]。今后研究中可以根据不同研究目的,调节水凝胶物理特性来调控细胞行为以及功能表达。

2.2 组织工程

组织工程的目的是对受损的组织和器官进行再生和重建,用于组织工程应用的凝胶支架的必要条件包括生物降解性、生物相容性、特定部位的附着、高孔隙率以及良好的机械强度^[45]。Huang等^[46]将明胶-葡萄糖胺冷冻凝胶微珠皮下注射到小鼠,可在21d内形成异位软骨组织,显示了凝胶支架作为软骨组织工程的载体的潜力。Bilici等^[47]通过3D打印技术成功制备形状复杂、机械结构稳定的GelMA-海藻酸钠冷冻凝胶支架,支架上成纤维细胞呈高增殖率扩散生长,可通过调整GelMA浓度改变凝胶物理特性,以满足组织工程的特定需要。Gao等^[48]研究显示含骨髓基质细胞的线性阵列琼脂糖凝胶通过分泌脑源性神经营养因子促进轴突生长,表明脊髓损伤后运动神经元的适当再生。此外,以琼脂糖-海藻酸钠-苯胺四聚体为基质的生物电活性凝胶生物相容性好、具有可调控的神经再生药物释放能力,已被证明是一种很有前景的神经组织工程支架材料^[49]。

2.3 病毒培养

目前,我们对病毒性疾病和抗病毒药物的了解主要基于传统的2D细胞培养和动物模型,但2D细胞培养在难以模拟病原体感染过程中体内复杂的生理微环境,不能准确地再现自然感染过程^[50]。此外,2D培养细胞无法长时间保持良好的生长状态,易死亡。与2D培养细胞相比,水凝胶更能模拟体内3D环境,适于进行病毒培养和研究细胞对病毒感染的反应^[51]。研究^[52]显示,传统2D细胞培养技术无法培养的病毒(如人乳头瘤病毒、人诺如病毒和腺相关病毒2型等),通过3D细胞培养可以实现其体外繁殖。Sano等^[53]通过将人支气管上皮细胞嵌入到基质胶水凝胶中,成功生成了人支气管3D细胞模型,用新型冠状病毒感

染该3D模型后,病毒受体血管紧张素转换酶2和启动刺突蛋白的必需蛋白酶跨膜丝氨酸蛋白酶2的表达增加,表明3D培养模型可用于评估候选药物对新型冠状病毒的抗病毒作用。

3 总结和展望

天然水凝胶因其良好的生物相容性、高亲水性等特性在生物医学领域的应用中展示出巨大潜力,通过模拟细胞外基质,为细胞的增殖、分化、迁移和相互作用提供了空间微环境。本文从制备方法、交联方式、支架材料方面对天然水凝胶支架进行分类,详细介绍了近年来基于天然水凝胶支架的3D细胞培养在细胞工程、组织工程、病毒培养等领域的应用,为合成新型天然水凝胶提供思路。

现已开发了3D打印技术、微流控等天然水凝胶制备技术,但为满足生物医学的发展需要,仍需深入研究3D培养中细胞-细胞、细胞-基质的相互作用,调节水凝胶物理、化学特性来调控细胞行为以及功能表达,减小体内、体外培养差异,不断探索新的天然聚合物材料与凝胶制备方式,以便合成高性能、可调控、适用性强的多功能新型天然水凝胶。

参考文献:

- [1] XU N Y, LI J, WANG M L, et al. Fabrication of a coculture organoid model in the biomimetic matrix of alginate to investigate breast cancer progression in a TAMs-leading immune microenvironment [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2024, 16(9): 11275
- [2] LEE S W L, ADRIANI G, CECCARELLO E, et al. Characterizing the role of monocytes in T cell cancer immunotherapy using a 3D microfluidic model [J]. Front Immunol, 2018, 9: 416
- [3] SHRI M, AGRAWAL H, RANI P, et al. Hanging drop, a best three-dimensional (3D) culture method for primary buffalo and sheep hepatocytes [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1203
- [4] 唐建华. 三维肝癌类组织体模型建立及肺侵袭关联蛋白筛查 [D]. 上海: 复旦大学, 2010
- [5] LOU J, MOONEY D J. Chemical strategies to engineer hydrogels for cell culture [J]. Nat Rev Chem, 2022, 6(10): 726
- [6] HABANJAR O, DIAB-ASSAF M, CALDEFIE-CHEZET F, et al. 3D cell culture systems: tumor application, advantages, and disadvantages [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(22): 12200
- [7] MANCINO R, CACCAVO D, BARBA A A, et al. Agarose cryogels: production process modeling and structural characterization [J]. Gels, 2023, 9(9): 765
- [8] CARRIERO V C, DI MUZIO L, PETRALITO S, et al. Cryogel scaffolds for tissue engineering: advances and challenges for effective bone and cartilage regeneration

- [J]. *Gels*, 2023, 9(12):979
- [9] CHEN T, LAU K S K, HONG S H, et al. Cryogel-based neurostimulation electrodes to activate endogenous neural precursor cells[J]. *Acta Biomater*, 2023, 171:392
- [10] JONIDI SHARIATZADEH F, SOLOUK A, BAGHERI KHOULENJANI S, et al. Injectable and reversible preformed cryogels based on chemically crosslinked gelatin methacrylate (GelMA) and physically crosslinked hyaluronic acid (HA) for soft tissue engineering[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2021, 203:111725
- [11] FANG Y, CHEN J, LI Q, et al. Chitosan based Janus cryogel with anisotropic wettability, antibacterial activity, and rapid shape memory for effective hemostasis[J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 254 (Pt 2):127821
- [12] KUMAR N, BOSE P, KUMAR S, et al. Nanoapatite-loaded κ -carrageenan/poly(vinyl alcohol)-based injectable cryogel for hemostasis and wound healing[J]. *Biomacromolecules*, 2024, 25(2):1228
- [13] LIU M, DING R, LI Z, et al. Hyaluronidase-responsive bactericidal cryogel for promoting healing of infected wounds: inflammatory attenuation, ROS scavenging, and immune regulation[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(17):e2306602
- [14] JOUKHDAR H, SEIFERT A, JÜNGST T, et al. Ice templating soft matter: fundamental principles and fabrication approaches to tailor pore structure and morphology and their biomedical applications[J]. *Adv Mater*, 2021, 33(34):e2100091
- [15] JIANG S, LYU C, ZHAO P, et al. Cryoprotectant enables structural control of porous scaffolds for exploration of cellular mechano-responsiveness in 3D[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):3491
- [16] WARTENBERG A, WEISSER J, SCHNABELRAUCH M. Glycosaminoglycan-based cryogels as scaffolds for cell cultivation and tissue regeneration[J]. *Molecules*, 2021, 26(18):5597
- [17] GUO A, ZHANG S, YANG R, et al. Enhancing the mechanical strength of 3D printed GelMA for soft tissue engineering applications[J]. *Mater Today Bio*, 2023, 24:100939
- [18] DODDA J M, AZAR M G, SADIKU R. Crosslinking trends in multicomponent hydrogels for biomedical applications[J]. *Macromol Biosci*, 2021, 21(12):e2100232
- [19] ACCIARETTI F, VESENTINI S, CIPOLLA L. Fabrication strategies towards hydrogels for biomedical application: chemical and mechanical insights[J]. *Chem Asian J*, 2022, 17(22):e202200797
- [20] VAN DEN BULCKE A I, BOGDANOV B, DE ROOZE N, et al. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels[J]. *Biomacromolecules*, 2000, 1(1):31
- [21] ARGUCHINSKAYA N V, ISAEVA E V, KISEL A A, et al. Properties and printability of the synthesized hydrogel based on GelMA[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3):2121
- [22] KAEMMERER E, MELCHELS F P, HOLZAPFEL B M, et al. Gelatine methacrylamide-based hydrogels: an alternative three-dimensional cancer cell culture system[J]. *Acta Biomaterialia*, 2014, 10(6):2551
- [23] TOZAR T, NISTORESCU S, BONI M, et al. Pulsed laser photo-crosslinking of gelatin methacryloyl hydrogels for the controlled delivery of chlorpromazine to combat antimicrobial resistance[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(10):2121
- [24] NGUYEN A K, GOERING P L, ELESAPURU R K, et al. The photoinitiator lithium phenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinate with exposure to 405 nm light is cytotoxic to mammalian cells but not mutagenic in bacterial reverse mutation assays[J]. *Polymers*, 2020, 12(7):1489
- [25] BESSOT A, GUNTER J, WAUGH D, et al. GelMA and biomimetic culture allow the engineering of mineralized, adipose, and tumor tissue human microenvironments for the study of advanced prostate cancer in vitro and in vivo[J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12(14):e2201701
- [26] NGUYEN L, MCCAUGHEY-CHAPMAN A, CONNOR B. GelMA hydrogel as a scaffold to enhance the survival and differentiation of human induced lateral ganglionic eminence precursor cells[J]. *J Neurosci Methods*, 2024, 405:110102
- [27] ORTEGA-SÁNCHEZ C, MELGAREJO-RAMÍREZ Y, RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ R, et al. Hydrogel based on chitosan/gelatin/poly(vinyl alcohol) for in vitro human auricular chondrocyte culture[J]. *Polymers (Basel)*, 2024, 16(4):479
- [28] SINGH A, TAYALIA P. Three-dimensional cryogel matrix for spheroid formation and anti-cancer drug screening[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2020, 108(2):365
- [29] BERTHON J Y, NACHAT-KAPPES R, BEY M, et al. Marine algae as attractive source to skin care[J]. *Free radical research*, 2017, 51(6):555
- [30] LOMARTIRE S, CONÇALVES A M M. Algal phyco colloids: bioactivities and pharmaceutical applications[J]. *Mar Drugs*, 2023, 21(7):384
- [31] SUN J, TAN H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications[J]. *Materials (Basel, Switzerland)*, 2013, 6(4):1285
- [32] YANG J S, XIE Y J, HE W. Research progress on chemical modification of alginate; a review[J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 84(1):33
- [33] BEAUMONT M, TRAN R, VERA G, et al. Hydrogel-forming algae polysaccharides: from seaweed to biomedical applications[J]. *Biomacromolecules*, 2021, 22(3):1027
- [34] BOZZA A, COATES E E, INCITTI T, et al. Neural differentiation of pluripotent cells in 3D alginate-based cultures[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(16):4636
- [35] WANG F, SUN J, SHI H, et al. Multifunctionalized alginate/polydopamine cryogel for hemostasis, antibacteria and promotion of wound healing[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 224:1373
- [36] ZARRINTAJ P, MANOUCHEHRI S, AHMADI Z, et al. Agarose-based biomaterials for tissue engineering[J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 187:66
- [37] ÁVILA-FERNÁNDEZ P, ETAYO-ESCANILLA M, SÁNCHEZ-PORRAS D, et al. A novel in vitro pathological model for studying neural invasion in non-melanoma skin

- cancer[J]. *Gels*, 2024, 10(4):252
- [38] BHATTACHARYYA A, KHATUN M R, NARMATHA S, et al. Modulation of 3D bioprintability in polysaccharide bioink by bioglass nanoparticles and multiple metal ions for tissue engineering[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2024, 21(2):261
- [39] CAI Y, XIN L, SUN P, et al. Temperature-sensitive multifunctional intelligent responsive hydrogel based on carboxymethyl agarose and N-isopropylacrylamide: controlled drug release and accelerated wound healing[J]. *Carbohydr Polym*, 2023, 322:121327
- [40] ZENG Q, HAN Y, LI H, et al. Design of a thermosensitive bioglass/agarose-alginate composite hydrogel for chronic wound healing[J]. *J Mater Chem B*, 2015, 3(45):8856
- [41] CAO H, DUAN L, ZHANG Y, et al. Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1):426
- [42] GUDDE A N, VAN VELTHOVEN M J J, TÜRKEL B, et al. Vaginal fibroblast behavior as a function of stiffness changes in a polyisocyanide hydrogel for prolapse repair[J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2023, 6(9):3759
- [43] NGUYEN R Y, CABRAL A T, ROSSELLO-MARTINEZ A, et al. Tunable mesoscopic collagen island architectures modulate stem cell behavior[J]. *Adv Mater*, 2023, 35(16):e2207882
- [44] XIA J, LIU Z Y, HAN Z Y, et al. Regulation of cell attachment, spreading, and migration by hydrogel substrates with independently tunable mesh size[J]. *Acta Biomater*, 2022, 141:178
- [45] RAZAVI M, QIAO Y, THAKOR A S. Three-dimensional cryogels for biomedical applications[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2019, 107(12):2736
- [46] HUANG Y H, CHEN H A, CHEN C H, et al. Injectable gelatin/glucosamine cryogel microbeads as scaffolds for chondrocyte delivery in cartilage tissue engineering[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 253(Pt 1):126528
- [47] BILICI Ç, ALTUNBEK M, AFGHAH F, et al. Embedded 3D printing of cryogel-based scaffolds[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2023, 9(8):5028
- [48] GAO M, LU P, BEDNARK B, et al. Templated agarose scaffolds for the support of motor axon regeneration into sites of complete spinal cord transection[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(5):1529
- [49] ALIZADEH R, ZARRINTAJ P, KAMRAVA S K, et al. Conductive hydrogels based on agarose/alginate/chitosan for neural disorder therapy[J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 224:115161
- [50] HARB A, FAKHREDDINE M, ZARAKET H, et al. Three-dimensional cell culture models to study respiratory virus infections including COVID-19[J]. *Biomimetics (Basel)*, 2021, 7(1):3
- [51] MUANGSANIT P, CHAILANGKARN T, TANWATTANA N, et al. Hydrogel-based 3D human iPSC-derived neuronal culture for the study of rabies virus infection[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13:1215205
- [52] KOBAN R, LAM T, SCHWARZ F, et al. Simplified bio-printing-based 3D cell culture infection models for virus detection[J]. *Viruses*, 2020, 12(11):1298
- [53] SANO, E, SUZUKI T, ITOH Y, et al. Cell response analysis in SARS-CoV-2 infected bronchial organoids[J]. *Communications Biology*, 2022, 5(1):516

(收稿日期:2024-04-12)

(上接第454页)

- [26] WANG C, LI J, LIU X, et al. The rapid photoresponsive bacteria-killing of Cu-doped MoS₂(2)[J]. *Biomater Sci*, 2020, 8(15):4216
- [27] CAO W, YUE L, ZHANG Y, et al. Photodynamic chitosan functionalized MoS₂ nanocomposite with enhanced and broad-spectrum antibacterial activity[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 277:118808
- [28] CHEN H, HE X, ZHOU Z, et al. Metallic phase enabling MoS₂ nanosheets as an efficient sonosensitizer for photo-thermal-enhanced sonodynamic antibacterial therapy[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1):136
- [29] TANG Y, QIN Z, ZHONG Y, et al. Bioinspired MoS₂ nanosheet-modified carbon fibers for synergetic bacterial elimination and wound disinfection[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2023, 12(8):2202270
- [30] WANG H, LI X, GE Q, et al. A multifunctional Fe₂O₃@MoS₂@SDS Z-scheme nanocomposite: NIR enhanced bacterial inactivation, degradation antibiotics and inhibiting ARGs dissemination[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2022, 219:112833
- [31] JIN W, SONG P, WU Y, et al. Biofilm microenvironment-mediated MoS₂ nanoplateform with its photothermal/photodynamic synergistic antibacterial molecular mechanism and wound healing study[J]. *ACS Biomaterials Science Engineering*, 2022, 8(10):4274
- [32] LIAO Z Y, XIA Y M, ZUO J M, et al. Metal-organic framework modified MoS₂ nanozyme for synergetic combating drug-resistant bacterial infections via photothermal effect and photodynamic modulated peroxidase-mimic activity[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2022, 11(1):2101698
- [33] ZHENG L, ZHONG Y, HE T, et al. A codispersed nanosystem of silver-anchored MoS₂ enhances antibacterial and antitumor properties of selective laser sintered scaffolds[J]. *International Journal of Bioprinting*, 2022, 8(3):111

(收稿日期:2024-01-26)

《湖北科技学院学报(医学版)》稿约

《湖北科技学院学报(医学版)》是国内外公开发行的医药卫生类综合性学术期刊,以我校为重点,报道科研、医疗等方面的新成果、新技术、新经验。内容包括基础医学、临床医学、新技术、新方法、综述讲座等。欢迎投稿,欢迎订阅。来稿要求如下:

- 1 文稿应具有科学性、真实性,重点突出,文字简练,数据可靠。论著和综述一般6000字,经验、调查、技术方法一般5000字。
- 2 学术论文、研究报告一般分为引言、材料和方法、结果、讨论四部分;临床分析、个案报道一般分为临床资料和讨论两部分。论著需附250字左右的结构式中、英文摘要,摘要内容包括目的、方法、结果和结论,且中、英文要一致。在摘要后正文前附中、英文关键词3~8个和中国图书资料分类号(中图分类号)。关键词选用《医学主题词注释字顺表》中的术语。
- 3 文中各层次的标题应简短明确,节段层次序号分别用阿拉伯数字“1”“1.1”“1.1.1”形式表示。专用名词用统一医学科技名词,翻译名词应附原文。简化字按1986年10月10日国务院批准重新公布的《简化字总表》书写。统计学符号按GB3358—82《统计学名词及符号》的有关规定书写。
- 4 图表应少而精,其内容与文字不可重复。必要的图表应按规定绘制,表格用三线表,要有表序和表题、图序和图题。照片应对比度好,清晰可辨,并附说明。
- 5 参考文献以亲自阅读近5年的重要文献为主,提倡引用本学报的论文,勿引用未公开发表的文章。参考文献附于文末,按文中出现先后为序,在文中引用处的右上角标以带方格括号的数字。论著一般不超过10条,综述不超过20条。书写格式如下:

期刊 [序号] 作者(一至三位作者,将其姓名均写出,之间用逗号隔开;三位以上作者,只写前三位作者,后加等).文题[J].刊名,年,卷(期):起页

[1]袁学文.输血传播病毒(TTV)研究新进展[J].咸宁医学院学报,1999,13(3):198

[2]OLIVETTI G, ABBIR, QUAINI F, et al. Apoptosis in the failing human heart [J]. N Engl J Med, 1997, 336: 1131

书籍 [序号] 作者(主编).书名[M].卷次.版次.出版地:出版社,年:起页.(或作者.题目.见:主编.书名[M].卷次.版次.出版地:出版社,年:起页)

[3]王慕逖.儿科学[M].第5版.北京:人民卫生出版社,2001:285

[4]宁寿葆.循环系统疾病.见:王慕逖主编.儿科学[M].第5版.北京:人民卫生出版社,2001:285

6 稿件应以Word电子稿通过本网站 <http://xbbjb.hbust.edu.cn> 在线投稿系统投稿,来稿一律文责自负。编辑部对来稿有修改权,如不同意修改请在来稿时声明。

7 来稿请附作者单位介绍信,证明文稿的真实性,无一稿两投,署名无争议等情况。各级重大科技攻关和基金的科研成果论文,可以优先发表,请在介绍信中说明项目名称。

8 本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》、“中国期刊网”和“万方数据系统(ChinaInfo)数字化期刊群”。凡本刊录用的稿件,由编辑部统一纳入上述系统。不同意者在来稿时声明,以便另行处理。

9 本刊不退稿,作者请自留底稿。若投稿后3个月内未见回音,作者可另投他刊。投稿注册请写明稿件联系人的详细通讯地址、邮政编码和电话。

《湖北科技学院学报(医学版)》编辑部

《湖北科技学院学报(医学版)》编委会

主任:吴基良

副主任:白育庭

委员:(按姓氏笔画为序)

马萍 王诗 王俊芳 宁志丰 朱海丽 刘超 李岱
李玲 李青春 闵清 沈定文 张侠 陈子敏 陈黄琴
陈清杰 武阳 欧阳昌汉 周燕红 查文良 高卉 黄翠萍
梅武轩 鲍翠玉 蔡飞 蔡慧兰

特邀委员:(按姓氏笔画为序)

邓启红 郑州大学教授、博士生导师
李华 华中科技大学教授、博士生导师
李秋柏 华中科技大学教授、主任医师、博士生导师
杨旭 华中师范大学教授、博士生导师
杨智宽 爱尔眼科医院集团有限公司教授、博士生导师



微信公众号



超星数字期刊

湖北科技学院学报(医学版)

Journal of Hubei University of Science
and Technology (Medical Sciences)

(双月刊 1987年创刊)

第38卷 第5期 (总第191期)

2024年10月出版

主管单位:湖北省教育厅

主办单位:湖北科技学院

编辑出版:湖北科技学院学报编辑部

主编:吴基良

副主编:白育庭 陈拥彬

封面设计:张利平

网址: <http://xbbjb.hbust.edu.cn>

邮箱: XNXYYXB@163.com

邮编: 437100

电话: (0715)8266018

地址: 湖北省咸宁市咸宁大道88号

印刷: 咸宁市万达文化传媒有限公司

Administrated: Hubei Provincial Department of Education

Sponsored: Hubei University of Science and Technology

Edited, Published: The Editorial Department of Journal of Hubei
University of Science and Technology

Chief Editor: WU Jiliang

Deputy Editor: BAI Yuting, CHEN Yongbin

Cover Designer: ZHANG Liping

Website: <http://xbbjb.hbust.edu.cn>

E-mail: XNXYYXB@163.com

Postcode: 437100

Telephone: (0715)8266018

Address: 88# Xianning Ave., Xianning City, Hubei

Printed: Xianning Wanda Culture and Media Co.td

国际标准刊号 ISSN 2095-4646

国内统一刊号 CN 42-1839/R

定价 15.00 元/期

ISSN 2095-4646



9 772095 464241