



- ◎ 《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6期

2024.12

医学版

MEDICAL SCIENCES



中国·咸宁

湖 科 学 人

陈清杰，男，1983年9月出生，湖北咸宁人；湖北科技学院医学部药学院副教授，硕士研究生导师。

2018年6月毕业于华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学专业，博士研究生学



历。主要从事糖尿病认知功能障碍分子机制及药物治疗开发利用方面的研究工作。主持国家自然科学基金面上项目1项（82270892），主持并完成湖北省自然科学基金一般面上项目2项（2022CFB287，2020CFB851）、湖北省教育厅重点项目1项（D20202803）、咸宁市科技计划项目1项（2022ZRKX052）、湖北科技学院博士启动基金1项（BK202009）及糖尿病心脑血管病变湖北省重点实验室开放基金4项。近年来，在《Int Immunopharmacol》《Frontiers in Pharmacology》《Traditional Medicine Research》等国际国内知名期刊发表科研论文40多篇，以第一作者或通讯作者发表的SCI期刊论文19篇，获得专利2项。2022年获得湖北省自然科学奖三等奖及湖北科技学院“百名优秀人才”称号、2023年度获得咸宁市“香城人才卡”。四川省、江西省及湖北省科技厅通讯评审专家。

目次

特稿

- 基于IP联合蛋白质组学探讨ENG互作蛋白在bEnd.3细胞中的作用
..... 陈清杰,李奥迪,季慧敏,等(461)

药学研究

- 杨梅素通过调控NF- κ B和炎症因子对肝脏缺血再灌注损伤的作用研究
..... 黄兴琼,陈 迷,李炎坤,等(467)
- 熊果酸联合索拉非尼通过抑制Nrf2/HO-1/GPX4信号通路诱导肝癌细胞铁死亡
..... 胡 玲,杨晓松(472)
- 盐酸小檗胺对脓毒症急性肾损伤小鼠的保护机制研究 孙珊珊,何 昂,黄翠萍,等(477)
- 附子对阿霉素诱导心肌损伤保护的潜在机制 陈星羽,贺 巧,张朝阳,等(482)
- 含苯丙氨酸甲酯侧链螺旋聚苯异腈的合成与性能研究 张 达,郭雅润,郭丽媛,等(488)

基础医学研究

- LncRNA UCA-1对肾细胞癌OS-RC-2细胞增殖、凋亡的影响及机制
..... 田晓玲,朱栋良,陈 莉,等(493)
- BMP-6介导的铁蓄积在LPS诱导的急性肺损伤中的作用 李卓越,李秦汉,林 丽,等(498)
- 肠道菌群结构特征与早产认知障碍大鼠的相关性研究 杨 祺,周雄飞,黄玮玲,等(502)

临床医学研究

- 混合感染对儿童肺炎支原体肺炎并胸腔积液的影响分析 周芷如(507)

奥硝唑注射液联合拉氧头孢钠治疗慢性盆腔炎的疗效及对血清炎症指标的影响	王利勤,吴 辰(511)
心率变异性频域和时域相关指标与冠心病患者心血管事件的关系	霍旭辰,李军丽,曹 昕(514)
烯醇化酶 3 表达与结直肠癌临床病理特征及生存相关性分析	孟凡来,梁晓东(519)

护理学研究

程序化急诊急救护理对 AMI 患者急救效果及家属满意度分析	王 媛,邓 敏(523)
功能康复操训练对妇产科腹腔镜术后患者非切口疼痛的影响	刘 晓,孔令磷,罗菊英,等(527)
FMEA 联合 PDCA 管理循环模式在提高蛋白尿标本合格率中的应用	廖 丹,黄红霞,黎珍珠,等(531)
患者参与健康模型在 2 型糖尿病患者健康管理中的应用	张丹丹,李婷婷(535)

综 述

黄芩苷治疗溃疡性结肠炎的作用机制研究进展	张瀚镭,陈媛媛,要 辉,等(539)
YTHDF1 作为 m ⁶ A 读取器对肿瘤生长和转移的作用研究进展	刘绮雯,梅 燕,潘 丹,等(543)
水凝胶生物粘合剂用于软组织止血修复的研究进展	李 甲,王 彩,郑 敏,等(549)

责任编辑 彭 璐 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

To Investigate the Role of ENG Interacting Proteins in bEnd.3 Cells Based on IP Combined with Proteomics *CHEN Qing-jie, LI Ao-di, JI Hui-min, et al*(461)

Effects of Myricetin on Hepatic Ischemia-reperfusion Injury by Regulating NF- κ B and Inflammatory Factors *HUANG Xing-qiong, CHEN Mi, LI Yan-kun, et al*(467)

Ursolic Acid Combined with Sorafenib Promoted Ferroptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells by Inhibiting Nrf2/HO-1/GPX4 Signaling Pathway *HU Ling, YANG Xiao-song*(472)

The Effect of Berbamine Hydrochloride on Mice with Septic Acute Kidney Injury
..... *SUN Shan-shan, HE Ang, HUANG Cui-ping, et al*(477)

Potential Mechanism of Protection of Fuzi Against Adriamycin-induced Myocardial Injury
..... *CHEN Xing-yu, HE Qiao, ZHANG Cao-yang, et al*(482)

Synthesis and Properties of Helical Poly (phenyl isocyanide) with Methyl Phenylalanine on the Side Chain *ZHANG Da, GUO Ya-run, GUO Li-yuan, et al*(488)

Effects and Mechanisms of LncRNA UCA-1 on the Proliferation and Apoptosis of Renal Cell Carcinoma OS-RC-2 Cells *TIAN Xiao-ling, ZHU Dong-liang, CHEN Li, et al*(493)

Role of BMP-6-mediated Iron Accumulation in LPS-induced Acute Lung Injury
..... *LI Zhuo-yue, LI Qin-han, LIN Li, et al*(498)

Correlation Between Structural Features of Intestinal Flora and Preterm Cognitively Impaired Rats
..... *YANG Qi, ZHOU Xiong-fei, HUANG Wei-ling, et al*(502)

Analysis of the Influence of Mixed Infection on Mycoplasma Pneumoniae Pneumonia and Pleural Effu-

sion in Children *ZHOU Zhi-ru*(507)

Efficacy of Ornidazole Injection Combined with Latamoxef Sodium in the Treatment of Chronic Pelvic Inflammatory Disease and Its Effect on Serum Inflammatory Indicators

..... *WANG Li-qin, WU Chen*(511)

Relationships between Frequency Domain and Time Domain Related Indexes of Heart Rate Variability and Cardiovascular Events in Patients with Coronary Heart Disease

..... *HUO Xu-chen, LI Jun-li, CAO Xin*(514)

Enolase 3 Expression is Associated with the Clinical Pathological Characteristics and Survival of Colorectal Cancer

..... *MENG Fan-lai, LIANG Xiao-dong*(519)

Analysis of the Effect of Programmed Emergency Care on AMI Patients and their Family Members Satisfaction

..... *WANG Yuan, DENG Min*(523)

The Effect of Functional Rehabilitation Exercise Training on Non-Incision Pain in Patients Undergoing Laparoscopic Surgery in Obstetrics and Gynecology

..... *LIU Xiao, KONG Ling-lin, LUO Ju-ying, et al*(527)

Application of FMEA Combined with PDCA Management Cycle Model in Improving the Qualification Rate of Collecting Proteinuria Samples

..... *LIAO Dan, HUANG Hong-xia, LI Zhen-mei, et al*(531)

Application of Patient Participation Health Model in Health Management of Type 2 Diabetes Patients

..... *ZHANG Dan-dan, LI Ting-ting*(535)

Research Progress on Mechanism of Baicalin in Treatment of Ulcerative Colitis

..... *ZHANG Han-lei, CHENG Yuan-yuan, YAO Hui, et al*(539)

Research Progress of the effect of YTHDF1 as an m⁶A Reader on Tumor Growth and Metastasis ...

..... *LIU Qi-wen, MEI Yan, PAN Dan, et al*(543)

Research Progress of Hydrogel Bioadhesives for Soft Tissue Hemostasis and Repair

..... *LI Jia, WANG Cai, ZHENG Min, et al*(549)

基于 IP 联合蛋白质组学探讨 ENG 互作蛋白在 bEnd. 3 细胞中的作用*

陈清杰^{1,2}, 李奥迪^{1**}, 季慧敏², 孙艺瑄², 蒋越², 叶子奇², 潘荣²

(1. 湖北科技学院医学部药学院, 湖北 咸宁 437100; 2. 湖北科技学院糖尿病心脑血管病变湖北省重点实验室)

摘要:目的 本研究拟筛选并验证在脑微血管内皮细胞(bEnd. 3)中 Endoglin(ENG)的互作蛋白及其作用。方法 采用蛋白质组学和生物信息学技术鉴定并富集 ENG 互作蛋白,对这些互作蛋白进行亚细胞定位、GO 功能注释、IPR 注释和蛋白互作网络等分析。将以上分析筛选出的 ENG 互作蛋白,采用免疫共沉淀(IP)实验、细胞免疫荧光(IF)和蛋白免疫印迹(WB)技术进行验证和对比,探究 ENG 互作蛋白在棕榈酸(PA)、基因沉默和过表达 ENG 处理 bEnd. 3 细胞中的表达变化及作用。结果 通过蛋白质组学分析,bEnd. 3 细胞中 ENG 互作蛋白在亚细胞定位分析中细胞骨架相关成分呈现出较高的占比;通过 GO 注释和 IPR 注释进一步发现,是细胞骨架中的中间纤维和微丝蛋白呈现较高的富集状态。ENG 与细胞骨架蛋白互作热力图结果显示,与对照组相比,PA 处理的 bEnd. 3 细胞中微丝蛋白 Filamin B(Flnb)数值显著降低。IP 和 IF 结果显示,bEnd. 3 细胞中 ENG 与 Flnb 存在蛋白互作和共定位情况。WB 结果显示,bEnd. 3 细胞在 PA 处理条件下,ENG 和 Flnb 蛋白表达均下降;在 ENG 沉默条件下,Flnb 蛋白随 ENG 表达的减少而降低;在 ENG 过表达条件下,Flnb 蛋白随 ENG 表达的增加而升高。结论 ENG 互作蛋白广泛参与到多种相关的生物途径以及信号通路之中,ENG 在 bEnd. 3 细胞中与 Flnb 蛋白存在相互作用且二者具有共定位现象,ENG 还能够调控 PA 处理的 bEnd. 3 细胞 Flnb 蛋白表达水平。

关键词:ENG;Flnb;互作蛋白;bEnd. 3;棕榈酸

中图分类号:R34

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)06-0461-006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0461



To Investigate the Role of ENG Interacting Proteins in bEnd. 3 Cells Based on IP Combined with Proteomics

CHEN Qing-jie, LI Ao-di, JI Hui-min, et al

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

ABSTRACT: Objective The aim of this study was to screen and verify the interaction proteins of Endoglin (ENG) in brain microvascular endothelial cells (bEnd. 3) and their effects. **Methods** Proteomics and bioinformatics techniques were used to enrich and identify ENG interacting proteins. Subcellular localization, GO functional annotation, IPR annotation and protein interaction network analysis were performed on these interacting proteins. The ENG interacting proteins screened by the above analysis were verified and compared by immunoprecipitation (IP) experiments, cellular immune-fluorescence (IF) and Western blotting (WB) to explore the expression changes and effects of ENG interacting proteins in bEnd. 3 cells treated with palmitic acid (PA), gene silencing and overexpression of ENG. **Results** Through proteomics analysis, ENG-interacting proteins in bEnd. 3 cells showed a high proportion of cytoskeleton-related components in subcellular localization analysis. Through GO annotation and IPR annotation, it was further found that the intermediate fibers and microfilament proteins in the cytoskeleton showed a high enrichment state. The interaction heat map of ENG and cytoskeletal proteins showed that the value of Filamin B (Flnb) in bEnd. 3 cells treated with PA was significantly lower than that in the control group. IP and IF results showed that there were protein interaction and co-localization between ENG and Flnb in bEnd. 3 cells. WB results showed that the expression of ENG and Flnb protein decreased in bEnd. 3 cells under PA treatment. Under the condition of ENG silencing, Flnb protein decreased with the decrease of ENG expression. Under the

* 基金项目:国家自然科学基金一般面上项目(82270892)

** 通讯作者, li.ad@foxmail.com

condition of ENG overexpression, Flnb protein increased with the increase of ENG expression. **Conclusion** ENG interacting proteins are widely involved in a variety of related biological pathways and signaling pathways. ENG interacts with Flnb protein in bEnd. 3 cells and these two are co-localized. ENG can also regulate the expression level of Flnb protein in PA-treated bEnd. 3 cells.

KEY WORDS: Endoglin; Filamin B; Interaction protein; Brain microvascular endothelial cells; Palmitic acid

内皮糖蛋白(endoglin, ENG),又称为CD105,是血管内皮细胞活化的标志物^[1],通过检测血液中ENG相关分子或者病变部位内皮细胞上ENG的表达情况,可以帮助评估动脉粥样硬化的炎症状态和病变进展程度^[2];评价药物治疗(如抗血小板药物、他汀类药物)对血管内皮功能修复的效果;评估冠心病患者的危险分级及心力衰竭患者的预后;辅助评估高血压患者的靶器官损害(如心脏、肾脏、眼底血管等)^[3]。ENG的可溶性形式已被认为是妊娠高血压综合征、动脉粥样硬化等心血管疾病的生物标志物^[4]。因此,检测患者ENG水平,有助于评估患者血管内皮功能状态,对疾病治疗和预后判断有辅助作用。

ENG互作蛋白可以通过直接或间接对ENG的转录、翻译、修饰、胞内运输等各个环节进行介导,参与细胞信号转导^[5],从而改善疾病的发生进程,其中ENG与斑联蛋白互作已被证实可调节细胞骨架组织肌动蛋白^[6]。Filamin B(Flnb)是一种二聚体肌动蛋白结合蛋白,其在修复血管损伤的过程中可与血小板膜糖蛋白相互作用,响应血管内皮生长因子进而调节血管内皮通透性^[7-8],但其是否可与血管内皮标志物ENG互作并起作用,并未有文献报道。为此,本研究在显著性表达ENG的脑微血管内皮细胞(bEnd. 3)中,通过IP联合蛋白质组学等方法,研究ENG与Flnb的相互作用及其蛋白表达情况,揭示bEnd. 3细胞内ENG和Flnb的生理功能和脂代谢紊乱条件下ENG与Flnb蛋白表达的变化。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

bEnd. 3细胞(CL-0598)、DMEM高糖完全培养基(CM-0598)均购自武汉普诺赛生物科技有限公司;棕榈酸(P0500)、胰酶(C41000)均购自美国Sigma-Aldrich公司;siENG-MUS-1827(318506)、siNC(263868)均购自GenePharma公司;pAV[EXP]-mCherry-CMV-mENG病毒(VB210706-1086rxz)购自云舟生物科技股份有限公司;ENG Rabbit pAb(ab252345)购自英国Abcam公司;Flnb Rabbit pAb(A2481)、 β -actin Rabbit pAb(AC006)、

彩色预染蛋白Marker(RM19001)均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;BSA(S1756)购自上海科雅生物科技有限公司;PBS(G4202)、抗荧光淬灭剂含DAPI(G1407)、FITC山羊抗兔(GB22303)、RIPA裂解液(G2002)、PMSF蛋白酶抑制剂(G2008)、磷酸化蛋白酶抑制剂A、B液(G2007-1、G2007-2)、1×TBS(G0001-15)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;BCA试剂盒(P0010)、5×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(P0015L)均购自上海碧云天生物技术有限公司;飞克特超敏ECL发光液(BL520A)购自安徽白鲨生物科技有限公司。

1.2 主要仪器

超净工作台(SW-CJ-2FD,苏州净化公司);细胞CO₂培养箱(Thermo Fisher Scientific公司);多功能酶标仪(PMT49984,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);激光共聚焦显微镜系统(FV3000,日本Olympus公司);变性仪(ThermoMixer C,德国Eppendorf公司);高速冷冻离心机(5424R,德国Eppendorf公司);高速组织研磨仪(KZ-II,武汉赛维尔生物公司);Milli-Q Synthesis超纯水系统(美国Millipore公司);EASY-nLC™ 1200纳升级UHPLC(Thermo Fisher Scientific公司);Q Exactive™ HF-X质谱仪(Thermo Fisher Scientific公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

从液氮罐中取出bEnd. 3细胞放入37℃水浴锅中快速解冻复苏,1000rpm离心5min,去除上清液,加入含有10% FBS、1% P/S的DMEM高糖完全培养基中,反复吹打成单个细胞后吸出,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。

bEnd. 3细胞接种于细胞培养皿,当细胞密度达到80%以上时,分为Con组,棕榈酸(PA)组;siNC组,si-ENG组;Ad-NC组,Ad-ENG组;每组3孔细胞。PA组处理:加入150 μ mol/L的PA培养48h^[9],收样。沉默ENG:根据转染试剂说明书,分别将siNC、si-ENG片段加入100 μ L含有转染试剂的上样缓冲液中,混匀,静置15min后,缓慢滴加至细胞培养皿处理48h,收样。过表达ENG:前

期实验摸索出病毒感染的 MOI 值为 100, 处理 48h 时效果最好, 分别将稀释好的病毒滴加到 Ad-NC 及 Ad-ENG 组, 培养 48h, 收样。

1.3.2 质谱检测

使用 Q Exactive™ HF-X 质谱仪, Nanospray Flex™ (ESI) 离子源, 设定离子喷雾电压为 2.3kV, 离子传输管温度为 320℃, 质谱采用数据依赖型采集模式, 质谱全扫描范围为 m/z 350-1500, 一级质谱分辨率设为 60000 ($200m/z$), C-trap 最大容量为 3×10^6 , C-trap 最大注入时间为 20ms; 选取全扫描中离子强度 TOP 40 的母离子使用高能碰撞裂解 (HCD) 方法碎裂, 进行二级质谱检测, 二级质谱分辨率设为 15000 ($200m/z$), C-trap 最大容量为 1×10^5 , C-trap 最大注入时间为 45ms, 肽段碎裂碰撞能量设为 27%, 阈强度设为 2.2×10^4 , 动态排阻范围设为 20s, 生成质谱检测原始数据 (DDA raw)。

1.3.3 生物信息学分析

将以上质谱检测得到的 DDA raw 数据, 利用 Proteome Discoverer 2.2 和 Spectronaut 软件进行数据处理, 使用 interproscan-5 程序对蛋白质数据库进行 GO 和 IPR 分析, 使用 COG 和 KEGG 数据库分析蛋白质家族和途径。用维恩图在线软件绘制 IgG 组和 IP 组交集的蛋白数量; 并利用在线网站 UniProt 对 ENG 互作蛋白进行亚细胞定位、GO 和 KEGG 通路等分析并进行蛋白互作网络图的绘制。

1.3.4 免疫共沉淀 (IP) 实验

10cm 培养皿中加入裂解液置于冰上裂解 1h, 4℃, 12000rpm 离心 15min。在 Input 组中, 取 80 μ l 上清液, 加入 4 倍量的上样缓冲液。IP 组取 200 μ l 上清液置于 EP 管中, 加入一抗 ENG。IgG 组同样取 200 μ l 上清液于 EP 管中, 加入与 IP 组等量 IgG 抗体, 并用封口膜封住, 于 4℃ 旋转过夜。按照蛋白: 磁珠 = 15:1 体积比加入磁珠, 4℃ 旋转 2h 除去非特异性结合后, IP 和 IgG 组中加入清洗好的磁珠, 4℃ 旋转 4h。分离磁珠和上清液, 用 PBS 洗涤沉淀物, 经磁力架吸附后, 舍弃上清液, 重复三次。用 SDS 样品缓冲液重悬沉淀物, 变性。置于磁力架吸附, 将样品上样到 SDS-PAGE 凝胶上, 进行 WB 实验并显影即可。

1.3.5 免疫荧光 (IF) 实验

细胞密度达 80% 左右时, 消化细胞, 以每孔 1×10^5 个细胞数量接种于共聚焦皿中。加入 pAV [EXP]-mCherry-CMV-mENG 病毒处理 48h 后, 使 bEnd.3 细胞表达带有 mCherry 红色荧光, 吸掉培养基, PBS 洗涤 3×5 min。用多聚甲醛 (4%) 固定

10min, PBS 洗涤细胞 3×5 min。滴加 0.1% Triton X-100 常温透化 10min, PBS 洗涤细胞 3×5 min, 5% BSA 孵育 1h。加入 Flnb 抗体 4℃ 过夜后 PBS 洗涤细胞。室温下, 用 FITC 山羊抗兔二抗避光孵育 1h 后 PBS 避光洗涤。加入含 DAPI 的抗荧光淬灭剂, 然后置于激光共聚焦显微镜下观察并采集图像。

1.3.6 蛋白免疫印迹 (WB) 实验

细胞加入细胞裂解液, 冰上裂解 10 ~ 15min, 然后刮下细胞, 4℃, 12000rpm 离心 15min 提取蛋白, 使用 BCA 蛋白质测定试剂盒检测各组细胞的蛋白质浓度。校正浓度后, 每组以校正后体积进行 8% SDS-PAGE 凝胶电泳, 然后将蛋白以 240mA、160min 湿转至 PVDF 膜上, 脱脂牛奶封闭后, 在 4℃ 孵育所需的一抗 (1:1000) 12 ~ 16h, 然后用 TBST 洗膜, 加入相对应的二抗 (1:5000), 以 ECL 化学发光底物显色后成像, Image J 软件分析测试结果。

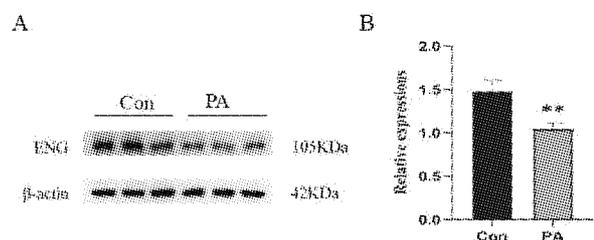
1.4 统计学方法

实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用 GraphPad Prism 9 软件作图和分析, 两组间比较采用 t 检验, 多组间进行 One-Way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 在 bEnd.3 细胞中, 高脂刺激对 ENG 蛋白表达的影响

本研究发现给予 PA 处理 bEnd.3 细胞模拟高脂的病理情况下, 与对照组 (Con 组) 相比, ENG 蛋白相对表达出现下降 (图 1)。



与 Con 相比, ** $P < 0.01$, $n = 3$.

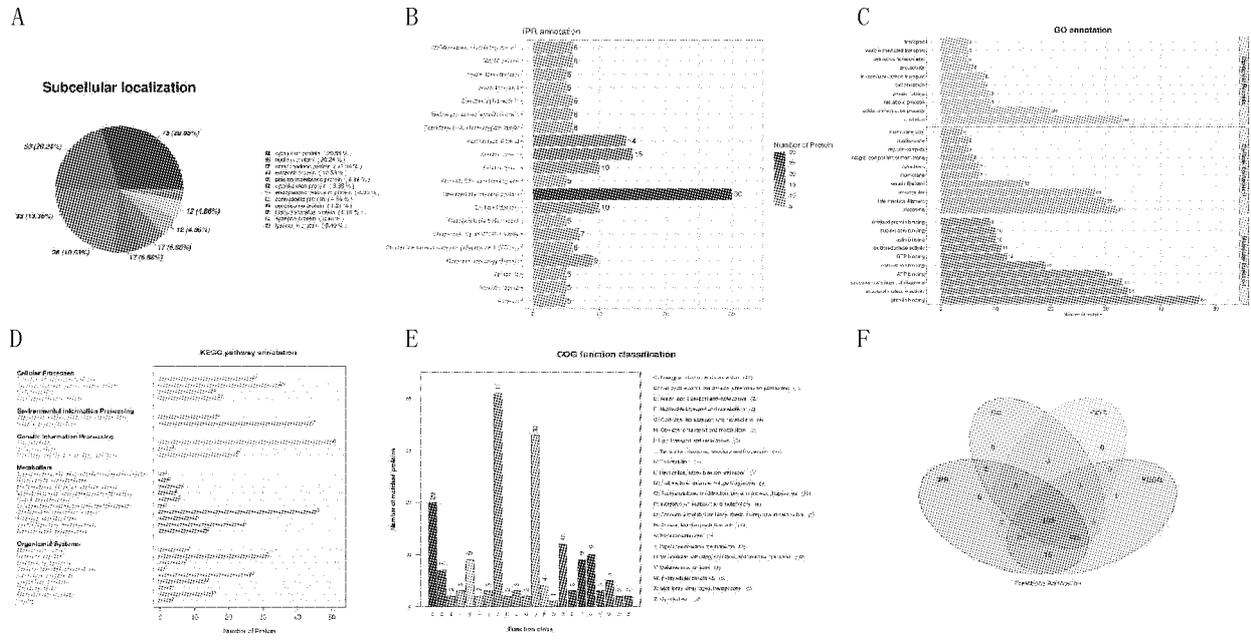
图 1 PA 处理 bEnd.3 细胞对 ENG 蛋白表达的影响

2.2 质谱检测 ENG 互作蛋白并进行蛋白质组学筛选分析

为了检测 bEnd.3 细胞中的 ENG 互作蛋白, 通过对蛋白酶解后肽段进行质谱分析, 得到原始数据, 采用亚细胞定位分析、IPR 注释、GO 注释、

KEGG 通路注释和 COG 功能分类等生物信息技术对数据进行处理分析。亚细胞定位(图 2A)结果显示,除了胞质蛋白和核蛋白占比较大外,还有细胞骨架蛋白占比较高,有 17 个,占比 6.88%,且核蛋白中含有细胞骨架蛋白。IPR 注释(图 2B)和 GO 组分分析(图 2C)结果显示,ENG 互作蛋白在细胞骨架的中间纤维和微丝蛋白中高度富

集。GO 注释(图 2C)、KEGG 通路注释(图 2D)、COG 功能分类(图 2E)结果显示,这些 ENG 互作蛋白在生物过程、细胞组分和分子功能等存在富集,共同调节转录翻译、信号转导、新陈代谢等通路,进而调控细胞凋亡、增殖与分化。最后将这些筛选结果进行 Venn 图(图 2F)交集,得到 ENG 互作蛋白 150 个。



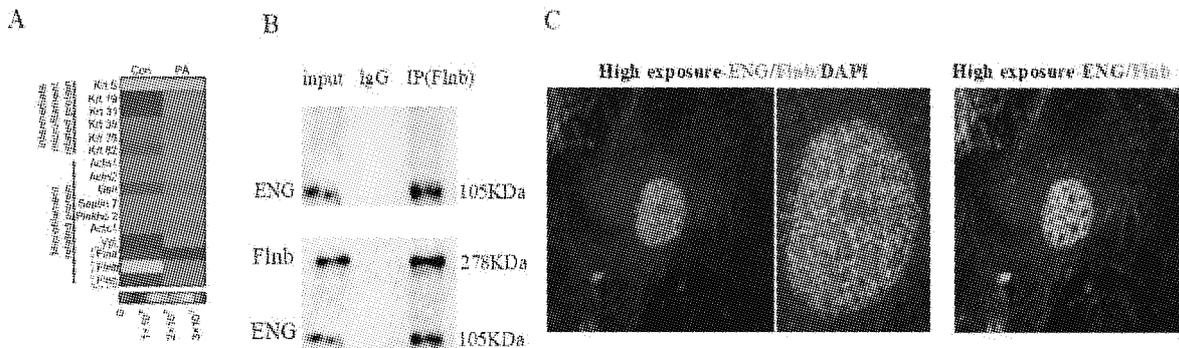
A. 亚细胞定位; B. IPR 注释; C. GO 注释; D. KEGG 通路注释; E. COG 功能分类; F. Venn 图。

图 2 ENG 互作蛋白分析

2.3 IP 和 IF 实验验证 ENG 与 Flnb 的蛋白互作情况

由于 ENG 互作蛋白在细胞骨架蛋白类中高度富集,本研究通过 PA 处理 bEnd. 3 细胞,对 ENG 互作蛋白中细胞骨架蛋白进行热力图分析(图 3A),结果发现,与对照组相比,PA 组 Filamin 家族蛋白数据值显著降低,其中 Flnb 蛋白质相对表达差异最大。为了验证 ENG 与 Flnb 是否存在

蛋白互作,在 bEnd. 3 细胞系中进行 IP 实验(图 3B),结果显示 IgG 组没有鉴定到 ENG 和 Flnb 蛋白,IP 组鉴定到了 ENG 和 Flnb 蛋白。Input 是全细胞裂解液,也鉴定到了 ENG 和 Flnb 蛋白,说明 ENG 与 Flnb 存在蛋白互作。为了进一步验证 ENG 与 Flnb 的互作,采用 IF 检测 ENG 与 Flnb 在 bEnd. 3 细胞中的共定位情况(图 3C),结果显示 ENG 与 Flnb 蛋白在 bEnd. 3 细胞内存在共定位。

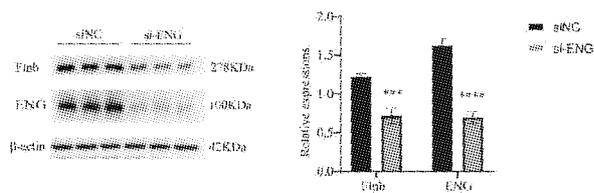


A. ENG 与细胞骨架的互作蛋白热力图; B. ENG 与 Flnb 的 IP 实验图; C. ENG 与 Flnb 的 IF 实验图。

图 3 ENG 与 Flnb 互作蛋白分析

2.4 在沉默 ENG 的条件下, Flnb 相对蛋白表达情况

为了进一步研究 ENG 与 Flnb 的相互作用,在 bEnd.3 中沉默 ENG 来观察 Flnb 的表达情况。通过转染技术将 ENG 的 siRNA 片段转导进入 bEnd.3 细胞来降低 ENG 蛋白表达,提取细胞中蛋白质进行 WB 检测,结果表明与 siNC 组相比,ENG 蛋白表达被沉默,同时 Flnb 蛋白表达水平也显著降低(图 4)。

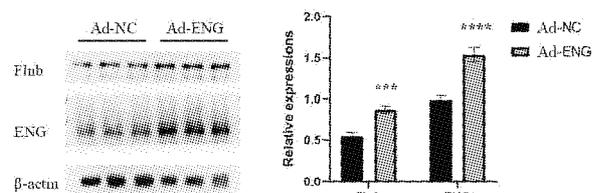


与 siNC 相比,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$, $n = 3$ 。

图 4 在 bEnd.3 细胞中沉默 ENG 对 Flnb 蛋白表达的影响

2.5 在过表达 ENG 的条件下, Flnb 相对蛋白表达情况

为了进一步研究 ENG 与 Flnb 的相互作用,在 bEnd.3 细胞中过表达 ENG 来观察 Flnb 的表达情况。通过 ENG 腺病毒载体导入 bEnd.3 细胞中来使 ENG 蛋白过表达,提取细胞中蛋白质进行 WB 检测,结果显示与 Ad-NC 组相比,腺病毒导入后,ENG 过表达成功,同时 Flnb 蛋白表达水平也显著升高(图 5)。

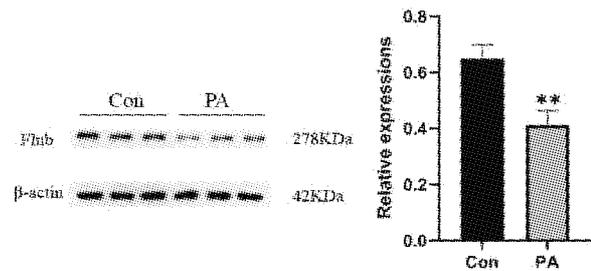


与 Ad-NC 相比,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$, $n = 3$ 。

图 5 在 bEnd.3 细胞中过表达 ENG 对 Flnb 蛋白表达的影响

2.6 在 PA 的条件下, ENG 互作蛋白 Flnb 相对表达情况

由 2.1 项下结果可知,在 bEnd.3 细胞给予 PA 的条件下,发现 ENG 蛋白相对表达量下降。而对 ENG 互作蛋白的表达量是否同样下降?本研究需进行进一步验证。提取细胞中蛋白质进行 WB 检测 Flnb 蛋白表达,发现 PA 处理后 Flnb 蛋白相对表达水平也下降(图 6)。



与 Con 相比,** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图 6 在 bEnd.3 细胞中给予 PA 处理 Flnb 蛋白表达的影响

3 讨论

内皮糖蛋白(ENG)是位于质膜和核体的蛋白,是 TGF- β 受体复合物之一,参与调控与 TGF- β 、Activin-A 和 BMP 结合的应答^[10-11],影响细胞形态和迁移的细胞骨架构成,在心血管系统发育和血管重塑中发挥重要作用^[12]。bEnd.3 是一种小鼠脑部毛细血管内皮细胞系,常用于研究脑血管疾病的发病机制及神经退行性疾病中血脑屏障的变化^[13],bEnd.3 细胞具有表达血管内皮特异性蛋白如 ENG、血管内皮生长因子等蛋白的特点。有文献报道 ENG 与斑联蛋白互作,通过调节细胞骨架的重组来参与细胞机械转导^[6]。因此,本研究采用质谱技术进行蛋白质组学和生物信息学分析富集并筛选 ENG 互作蛋白,观察其在 bEnd.3 细胞中的作用。

通过质谱检测 ENG 互作蛋白并进行蛋白质组学筛选,分析发现 ENG 互作蛋白在细胞骨架类中占比较高,且在中间纤维和微丝蛋白高度富集。由于 ENG 在 TGF- β 信号通路中对脂代谢具有调节作用,而脂代谢紊乱是心血管等疾病的重要危险因素^[14]。因此,本研究通过 PA 处理 bEnd.3 细胞来模拟血管内皮细胞脂代谢紊乱损伤,进一步寻找具体的 ENG 互作蛋白及其在 bEnd.3 细胞中的作用,并通过 ENG 与细胞骨架蛋白互作热力图筛选得到 Flnb。Flnb 是一种二聚体肌动蛋白结合蛋白,能够将肌动蛋白细胞骨架细丝交联成动态结构,调节细胞骨架的收缩和伸展,从而影响细胞的运动能力,参与血管内皮细胞的运动迁移和血管生成及稳态维持^[15-16]。但其与 ENG 是否存在互作及其在血管调控中的作用还未有明确的阐述。

为了进一步验证 ENG 和 Flnb 在 bEnd.3 细胞中的蛋白互作及其调控作用,本研究采用 IP、IF 和 WB 进行验证和对比,发现 ENG 与 Flnb 之间存

在互作和共定位情况,而且 Flnb 表达随 ENG 的表达变化而变化。ENG 可能通过蛋白互作调控 Flnb 蛋白,参与细胞外基质的重构和细胞骨架重组,维持血管稳态。Flnb 可能帮助 ENG 更有效地参与到细胞信号转导路径中,从而影响细胞的生物学行为。

综上,在 bEnd.3 细胞中 ENG 与 Flnb 存在蛋白互作和共定位现象,而且 ENG 能够调控 Flnb 蛋白表达水平。未来可进一步探索 ENG 及其互作蛋白与脂代谢紊乱之间的联系,为脂代谢紊乱的发生发展提供新策略和理论依据。

参考文献:

- [1] 李炳轩,黄涛. 内皮联蛋白在血管生成中的调控机制及作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2022,38(7):858
- [2] WITTMANN A, BARTELS A, ALKOTUB B, et al. Chronic inflammatory effects of in vivo irradiation of the murine heart on endothelial cells mimic mechanisms involved in atherosclerosis[J]. *Strahlenther Onkol*,2023,199(12):1214
- [3] MOLINA PEREZ C J, NOLASCO LEANOS A G, CARRILLO JUAREZ R I, et al. Soluble endoglin and uterine artery flow doppler ultrasonography as markers of progression to preeclampsia in women with gestational hypertension[J]. *Gynecol Obstet Invest*,2021,86(5):445
- [4] IVES C W, SINKEY R, RAJAPREYAR I, et al. Preeclampsia-pathophysiology and clinical presentations: JACC state-of-the-art review [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020,76(14):1690
- [5] LIU S, LI B, LIANG Q, et al. Classification and function of RNA-protein interactions [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*,2020,11(6):e1601
- [6] SANZ-RODRIGUEZ F, GUERRERO-ESTEO M, BOTELLA L M, et al. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins[J]. *J Biol Chem*,2004,279(31):32858
- [7] FAN G, YAN Q, CHEN Y, et al. FLNB overexpression promotes tumor progression and associates with immune suppression, evasion and stemness in pancreatic cancer [J]. *Am J Cancer Res*,2024,14(2):709
- [8] 陶人才,谢旭斌,吴建华,等. 力调控糖蛋白 Ib α 与细丝蛋白相互作用的分子动力学模拟[J]. *生物医学工程学杂志*,2023,40(5):876
- [9] GARCIA J G, DE MIGUEL C, MILAGRO F I, et al. Endothelial NOX5 expression modulates thermogenesis and lipolysis in mice fed with a high-fat diet and 3T3-L1 adipocytes through an interleukin-6 dependent mechanism[J]. *Antioxidants (Basel)*,2021,11(1):30
- [10] LI L, ZHONG L, TANG C, et al. CD105: tumor diagnosis, prognostic marker and future tumor therapeutic target [J]. *Clin Transl Oncol*,2022,24(8):1447
- [11] LIU K, FU J, GUO K, et al. The ENG/VEGF α pathway is likely affected by a nonsense variant of endoglin (ENG)/CD105, causing hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 (HHT1) in a chinese family [J]. *Genes (Basel)*,2024,15(3):304
- [12] 黄倩. Endoglin 在腹膜透析相关腹膜纤维化中的作用及机制研究[D]. 山东:山东大学,2023
- [13] WATANABE T, DOHGU S, TAKATA F, et al. Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bEND.3, bEND.5 and mouse brain endothelial cell 4 [J]. *Biol Pharm Bull*, 2013,36(3):492
- [14] VICEN M, IGREJA SA I C, TRIPSKA K, et al. Membrane and soluble endoglin role in cardiovascular and metabolic disorders related to metabolic syndrome [J]. *Cell Mol Life Sci*,2021,78(6):2405
- [15] NISSOU M F, EL ATIFI M, GUTTIN A, et al. Hypoxia-induced expression of VE-cadherin and filamin B in glioma cell cultures and pseudopalisade structures [J]. *J Neurooncol*,2013,113(2):239
- [16] VALLE-PEREZ B D, MARTINEZ V G, LACASA-SALAVERT C, et al. Filamin b plays a key role in vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility through its interaction with Rac-1 and Vav-2 [J]. *J Biol Chem*,2010,285(14):10748

(收稿日期:2024-10-24)

杨梅素通过调控 NF- κ B 和炎症因子对肝脏缺血再灌注损伤的作用研究*

黄兴琼^{1,2},高满军^{1,2},张丹丹^{1,2},陈 迷^{1,2**},李炎坤^{1,2**}

(1. 湖北科技学院医学部药学院,湖北 咸宁 437100;2. 湖北科技学院糖尿病心脑血管病变湖北省重点实验室)

摘要:目的 观察杨梅素(Myricetin, Myr)对肝脏缺血再灌注损伤(HIRI)炎症因子的作用。方法 将 C57BL/6 小鼠分为 4 组,手术组(Sham)、缺血再灌注组(HIRI)、低剂量杨梅素组(HIRI-Myr-L)和高剂量杨梅素组(HIRI-Myr-H),建立肝脏缺血再灌注损伤模型。测定谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST);HE 染色检测各组小鼠肝组织形态情况;Western blot 和 qRT-PCR 检测各组肝组织中核转录因子- κ B(NF- κ B)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)的蛋白及 mRNA 表达情况。结果 与 HIRI 组比较,HIRI-Myr-L、HIRI-Myr-H 组 ALT、AST 水平均明显下降(P 均 < 0.05);肝脏缺血面积明显减少,肝细胞肿胀变形减少;NF- κ B、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 蛋白及 mRNA 表达水平降低(P 均 < 0.05)。结论 杨梅素能够抑制小鼠肝脏缺血再灌注诱导的 NF- κ B 以及 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子的表达升高,缓解肝脏损伤。

关键词:杨梅素;肝脏;缺血再灌注损伤;炎症因子;核转录因子- κ B

中图分类号:R965

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)06-0467-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0467



Effects of Myricetin on Hepatic Ischemia-reperfusion Injury by Regulating NF- κ B and Inflammatory Factors

HUANG Xing-qiong, CHEN Mi, LI Yan-kun, et, al

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

ABSTRACT: Objective To observe the effect of myricetin (Myr) on inflammatory factors in hepatic ischemia-reperfusion injury (HIRI). Methods C57BL/6 mice were divided into four groups: surgery group (Sham), ischemia-reperfusion group (HIRI), low-dose myricetin group (HIRI-Myr-L), and high-dose myricetin group (HIRI-Myr-H). A hepatic ischemia-reperfusion injury was established. Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured; HE staining was used to detect the morphology of liver tissue in each group of mice; Western Blot and qRT-PCR were used to detect the protein and mRNA expression of nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-1 β (IL-1 β) in liver tissues of each group. Results Compared with the results of the HIRI group, in the HIRI-Myr-L and HIRI-Myr-H groups the ALT and AST levels were significantly decreased ($P < 0.05$), the ischemic area of the liver was significantly reduced, the swelling and deformation of hepatocytes were reduced, and the protein and mRNA expression levels of NF- κ B, IL-6, TNF- α , and IL-1 β were decreased ($P < 0.05$). Conclusion Myricetin can inhibit the increased expression of inflammatory factors including NF- κ B, IL-6, TNF- α , IL-1 β , etc. induced by liver ischemia-reperfusion in mice, and alleviate liver damage.

KEY WORDS: Myricetin; Liver; Ischemia-reperfusion injury; Inflammatory factor; Nuclear transcription factor- κ B

* 基金项目:湖北自然科学基金(2024AFB494);湖北科技学院博士科研启动基金(BK202336);湖北科技学院横向科研经费(2023HX224)

** 通讯作者, E-mail: 1601652945@qq.com; xylyk@163.com

肝脏缺血再灌注损伤(HIRI)是肝脏切除手术或肝移植等外科手术后急性肝衰竭或死亡的主要原因,严重影响患者的预后^[1]。HIRI病理过程主要包括缺血损伤期和再灌注损伤期两个阶段。在缺血损伤期,缺血导致的糖原消耗、供氧不足和腺嘌呤核苷三磷酸耗竭引起局部肝细胞水肿变性乃至坏死。再灌注损伤期,肝脏血供恢复,继发代谢紊乱及炎症信号通路激活,促使肝脏多种免疫细胞浸润,进一步加重肝脏损伤^[2-3]。研究表明炎症因子表达和炎症细胞浸润是HIRI发生的重要机制^[4]。NF- κ B作为调节机体炎症反应的关键性转录启动因子,可以调控TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等下游炎症因子的分泌^[5]。研究发现缺血再灌注后1h即可发现肝细胞核内NF- κ B表达明显升高,且2h后TNF- α 的表达也增高,这说明在HIRI过程中NF- κ B信号被激活,并影响细胞因子等炎症介质的表达^[6-7]。Matsui等^[8]也证明NF- κ B活化参与HIRI过程,并指出抑制NF- κ B表达可显著改善HIRI。因此,靶向调控NF- κ B的表达,缓解炎症反应可能是改善HIRI临床治疗的关键。

杨梅素是一种常见的黄酮类化合物,具有多种药理作用,如消炎、抗氧化、镇痛、抗肿瘤、降血糖、保护肝脏等^[9-10]。研究^[11]发现,杨梅素通过调节PPAR γ /NF- κ B途径发挥抗心肌缺血再灌注损伤。此外研究^[12]表明,杨梅素还能抑制Akt、mTOR及NF- κ B信号通路,减轻TNF- α 介导的炎症因子的产生。在小鼠急性肝损伤中,杨梅素可降低ALT和AST水平,减少肝脏细胞变性及程序性坏死^[13]。但有关杨梅素在HIRI中的作用尚未见报道。本研究通过建立小鼠HIRI模型,探讨杨梅素的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

于斯贝福(北京)生物技术有限公司购入C57BL/6雄性小鼠,并饲养于SPF级动物房中,适应性喂养7d,在光照12h,黑暗12h,湿度45%~55%,温度(25 \pm 1) $^{\circ}$ C的条件下,自由进食和水。

1.2 主要试剂与仪器

杨梅素(PS001011)购置Push Bio-technology公司;NF- κ B抗体(GB11997)、IL-6抗体(GB11117)、TNF- α 抗体(GB11188)、GAPDH抗体(GB15004)、一抗稀释液(G2025)、二抗稀释液

(G2009)试剂、TRIzol(G3013)、HE染液套装购自Servicebio公司;IL-1 β 抗体(A16288)购自Abclonal公司;丙氨酸转氨酶(ALT)(C009)、天冬氨酸转氨酶(AST)(C010)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;ToloScript All-in-one RT EasyMix for qPCR(22107)、2xQBR qPCR Master Mix(Universal)(22204)购自TOLO-BIO公司;荧光定量PCR仪、凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad公司);NanoDrop2000(中国赛默飞世尔科技有限公司);高速冷冻离心机(德国Eppendorf股份有限公司);正置显微镜(日本Olympus科技有限公司);全自动酶标仪(中国赛默飞世尔科技有限公司);组织研磨仪(Servicebio公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物模型的制备及处理

24只雄性C57BL/6小鼠随机分为4组:手术组(Sham组)、缺血再灌注组(HIRI组)、低剂量杨梅素组(HIRI-Myr-L组)、高剂量杨梅素组(HIRI-Myr-H组),每组6只。HIRI-Myr-L组和HIRI-Myr-H组小鼠在造模前7d分别连续灌胃杨梅素50、100mg/kg,Sham组及HIRI组小鼠灌胃等体积含5%二甲基亚砷的溶剂。构建小鼠肝脏缺血再灌注模型,按照50g/kg的剂量1%戊巴比妥采用腹腔注射给小鼠进行麻醉,麻醉后仰卧固定。剪开小鼠腹腔,避免损伤剑突,采用无创血管夹夹闭肝动脉及门静脉,使小鼠肝左半叶和肝中叶处于缺血状态。血流阻断45min后,取出无创血管夹,恢复缺血肝血流。缝合小鼠腹部切口,再灌注16h。Sham组小鼠在开腹后仅补充生理盐水而无其他任何处理,同样等待45min后关闭腹腔。

1.3.2 样本采集与检测

于再灌注16h后麻醉小鼠,剪去小鼠胡须,并用眼科镊取小鼠眼球血,血样离心(3000rpm,10min)得到血清。采用颈椎脱臼法依次处死各组小鼠,小心分离各肝叶,取下缺血叶肝脏组织,并取一小份用4%多聚甲醛溶液固定,其余肝脏组织标本与血清一同储存于-80 $^{\circ}$ C冰箱中以备用。

1.3.3 血清ALT、AST水平测定

从-80 $^{\circ}$ C冰箱取出小鼠血清样本置于冰上溶解。将各组血清样本按照浓度梯度用PBS稀释好,并按照ALT、AST检测试剂盒说明在96孔板中加入相应试剂以及样本。使用酶标仪在37 $^{\circ}$ C、510nm处测定各孔吸光度。按照公式分别计算出各组血清的ALT、AST值。

1.3.4 肝组织缺血形态学

采用 HE 染色法,取每组小鼠肝脏组织石蜡切片,然后经脱蜡、苏木素染色、伊红染色、脱水、中性树脂封片,在显微镜下观察并拍片。

1.3.5 Western blot 检测

取各组小鼠肝组织 10mg 加入 300 μ L 组织裂解液,研磨珠配平后于超速破碎仪充分研磨,所得组织匀浆液置冰上裂解 30min,4 $^{\circ}$ C,12 000rpm 离心 10min 后,取上清液测 BCA 进行蛋白定量,加入 5 \times loadingbuffer 充分混匀,于 98 $^{\circ}$ C 煮沸 10min 进行蛋白变性,10% SDS-PAGE 电泳,200mA 转膜 90min,5% 脱脂牛奶封闭 90min,4 $^{\circ}$ C 摇床过夜孵育一抗稀释液 NF- κ B(1:1000)、TNF- α (1:1000)、IL-6(1:1000)、IL-1 β (1:1000)和 GAPDH(1:1000)。第 2 天,用 1 \times TBST 洗膜 3 次,5min/次,放入配制好的二抗溶液中室温孵育 90min(1:5000),再用 1 \times TBST 洗膜 3 次,5min/次,配制 ECL 发光显影液进行显影。使用 ImageJ 软件对各蛋白条带灰度值进行分析。

1.3.6 实时定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)

取 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存的小鼠肝组织,以 TRIzol 试剂提取组织的总 RNA, NanoDrop 2000 测定 RNA 总浓度,反转录为 cDNA,进行实时荧光定量 PCR,条件:95 $^{\circ}$ C 2min,95 $^{\circ}$ C 10s,60 $^{\circ}$ C 15s,72 $^{\circ}$ C 30s,总共 44 个循环。以 36B4 为内参定量 NF- κ B、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 表达,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
NF- κ B-F	AGCGTTCAGACCTTCACCGT
NF- κ B-R	CGAGAGGAGCAGGATACCA
IL-6-F	GCAAGACAAAGCCAGAGTC
IL-6-R	TTGGTCTTAGCCACTCCT
TNF- α -F	CGTCTAGCAAACCAAG
TNF- α -R	TGGCAGCCTTGTCCCTGA
IL-1 β -F	GCTCTCCACCTCAATGGAC
IL-1 β -R	TGGGATCCACACTCTCCAG
36B4-F	TGGAGACAAGGTGGGAGCC
36B4-R	CACAGACAATGCCAGGACGC

1.4 统计学方法

GraphPadPrism 8.0.1(244) 软件分析数据数

据形式均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组数据的比较采用 one-wayANOVA 检验,两组数据之间采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 杨梅素预处理可降低 HIRI 小鼠 ALT、AST 水平

如图 1 结果显示,Sham 组小鼠中血清 ALT、AST 活性很低,而 HIRI 组小鼠中血清 ALT、AST 活性明显升高($P < 0.001$),这说明缺血再灌注损伤模型构建成功。此外,与 HIRI 组相比,HIRI-Myr-H、HIRI-Myr-L 组的血清 ALT 和 AST 水平均显著降低,具有统计学差异(P 均 < 0.001)。以上结果表明,杨梅素可以减轻 HIRI 引起的肝功能损伤。

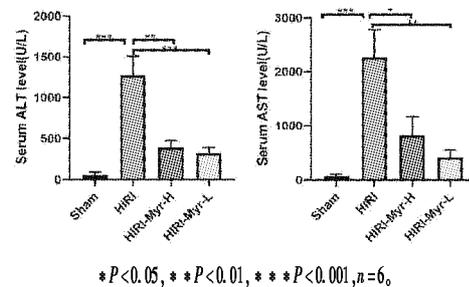


图 1 杨梅素预处理 HIRI 小鼠血清 ALT、AST 水平情况

2.2 杨梅素预处理能减轻小鼠 HIRI 引起的肝脏组织病理损伤

图 2 结果表明,在 Sham 组中可以观察到小鼠肝小叶结构清晰规则以及形态正常的肝实质细胞,无明显病理学改变;HIRI 组小鼠肝组织出现静脉扩张充血,肝小叶结构明显破坏,表现为不同程度肝小叶紊乱、肝细胞肿胀或大片坏死、大量炎性细胞浸润以及局部肝窦充血,HIRI-Myr-H 组和 HIRI-Myr-L 组小鼠肝小叶结构可辨,肝脏坏死区域明显减少,且局部肝窦充血情况有所改善。HIRI 组小鼠肝组织坏死面积显著大于 Sham 组,HIRI-Myr-H 组和 HIRI-Myr-L 组小鼠肝组织坏死面积显著小于 HIRI 组。以上结果表明,杨梅素可以减轻 HIRI 引起的组织病理损伤。

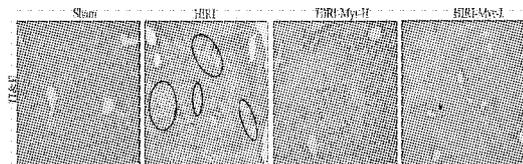
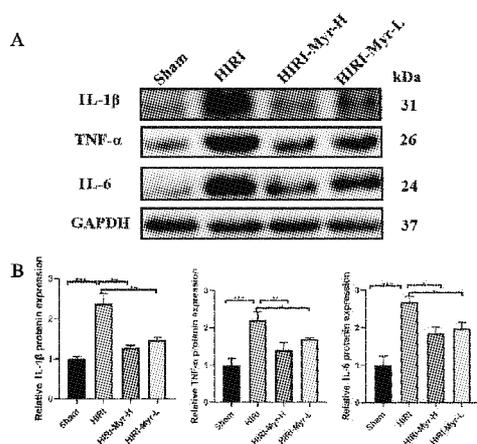


图 2 杨梅素预处理能减轻小鼠 HIRI 引起的组织病理损伤(标尺:50 μ m)

2.3 杨梅素能够抑制 HIRI 诱导的肝脏炎症因子蛋白的表达

图3实验结果显示,HIRI组小鼠肝脏组织中的IL-1 β 、TNF- α 、IL-6水平与Sham组相比均上调(P 均 <0.001)。而与HIRI组相比,HIRI-Myr-H、HIRI-Myr-L组小鼠肝脏组织中的IL-1 β 、TNF- α 、IL-6炎症因子蛋白表达水平下降,具有统计学差异(P 均 <0.05)。结果表明HIRI导致肝脏组织经历无菌性炎症,杨梅素可减少HIRI过程中IL-1 β 、TNF- α 、IL-6等炎症因子的产生,减轻HIRI诱导的炎症反应。

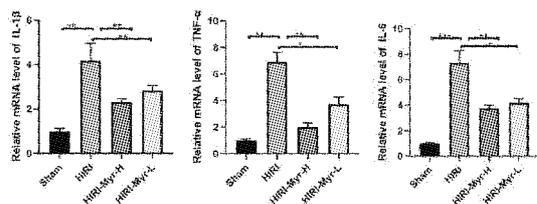


A. Western blot检测杨梅素对肝脏缺血再灌注损伤炎症因子IL-1 β 、TNF- α 、IL-6表达水平变化; B. IL-1 β 、TNF- α 、IL-6蛋白条带灰度值分析(* P <0.05 , ** P <0.01 , *** P <0.001 , $n=6$)。

图3 Western blot 杨梅素对肝脏缺血再灌注损伤炎症因子表达情况

2.4 杨梅素能够抑制 HIRI 诱导的肝脏炎症因子 mRNA 的表达

HIRI小鼠肝组织中IL-1 β 、TNF- α 、IL-6的mRNA相对表达量与Sham组相比显著上调,HIRI-Myr-H、HIRI-Myr-L组小鼠肝组织中炎症因子mRNA相对表达量显著低于HIRI组,差异均有统计学意义(P 均 <0.05),见图4。以上结果表明杨梅素预处理能够抑制小鼠HIRI引起的炎症因子mRNA的表达。

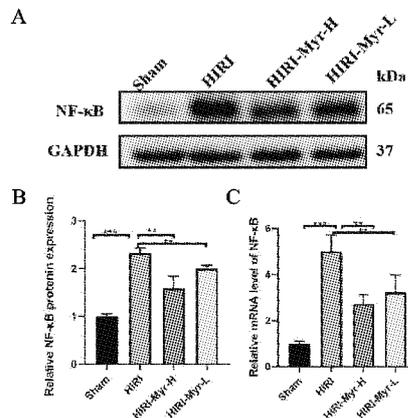


* P <0.05 , ** P <0.01 , *** P <0.001 , $n=6$ 。

图4 qRT-PCR法检测小鼠肝组织中炎症因子mRNA的表达情况

2.5 杨梅素抑制 NF- κ B 信号通路缓解肝脏缺血再灌注损伤

小鼠肝脏在缺血再灌注损伤后,肝脏组织NF- κ B表达升高(P <0.001)。同时,HIRI-Myr-H、HIRI-Myr-L组与HIRI组相比,小鼠在肝脏缺血再灌注损伤后肝组织中NF- κ B表达被显著抑制,差异均有统计学意义(P <0.01),见图5。



A. Western blot检测小鼠肝组织中NF- κ B表达; B. NF- κ B蛋白条带灰度值分析; C. qRT-PCR法检测小鼠肝组织中NF- κ B mRNA表达(** P <0.01 , *** P <0.001 , $n=6$)。

图5 杨梅素预处理小鼠肝脏缺血再灌注后肝组织中NF- κ B表达情况

3 讨论

ALT和AST是肝功能检查的两项常用指标,当肝脏受损时,可引起ALT和AST水平升高^[14]。本研究结果表明HIRI组血清肝酶显著增加,杨梅素预处理可显著降低小鼠ALT和AST的血清水平。此外,肝脏组织形态学检查发现,HIRI-Myr-H、HIRI-Myr-L组较HIRI组肝小叶结构可辨,肝脏坏死区域明显减少,肝细胞水肿、炎性浸润明显减少,且局部肝窦充血情况有所改善。以上提示杨梅素能够减轻小鼠缺血再灌注诱导的肝组织结构损伤。

由于目前还没有完全了解HIRI机制,其发病机制及防治措施已经成为研究热点。该损伤的过程可能与再灌注后的炎症反应、氧自由基生成、线粒体损伤、细胞凋亡、Ca²⁺超载和白细胞的活化等有关,而炎症介质大量释放是导致HIRI病理过程中最主要的介导因素之一^[15]。

NF- κ B可调控炎症因子的转录与表达。在缺血再灌注损伤中,NF- κ B作为炎症损伤反应启动因素之一,可调节多种参与缺血再灌注损伤的细胞因子、黏附分子的基因转录过程,并控制它们生物合成,而导致缺血再灌注损伤发生^[16]。Yang等^[17]发现在小鼠肝脏部分切除后,在肝巨嗜细胞

内 NF- κ B 被激活。Zwacka 等^[18]发现缺血再灌注时肝组织 NF- κ B 被激活并影响炎症因子表达。本实验研究结果也同样发现,在肝脏缺血再灌注中, NF- κ B 表达升高,炎症因子表达增多,损伤加剧。在 HIRI 中,受损的肝细胞和肝窦内皮细胞在释放多种损伤相关模式分子的同时,产生大量的 ROS,导致多细胞免疫反应的启动^[19],库普细胞能识别结合这些分子,激活的 NF- κ B 能上调多种炎症细胞因子基因转录(如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β),而这些细胞因子产生后会继续激活 NF- κ B,增强炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等的不断释放,形成 NF- κ B 信号转导通路正反馈调控机制^[20]。因此,HIRI 中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平直接反映缺血再灌注肝脏炎症性损伤的程度。本研究结果表明,与 Sham 组相比,HIRI 组小鼠肝脏组织中的 NF- κ B、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 表达水平上调。此外,我们也明确了杨梅素减轻 HIRI 的炎症性损伤作用,与 HIRI 组相比,HIRI-Myr-H、HIRI-Myr-L 组小鼠肝脏组织中的 NF- κ B、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 表达水平下降。

综上所述,杨梅素可以缓解肝脏缺血再灌注损伤,抑制 NF- κ B 和炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β)的表达,对于缺血再灌注损伤的肝脏具有保护作用,其潜在机制可能与抑制 NF- κ B 转录激活有关。本研究为深入研究杨梅素如何具体调控炎症信号通路提供了实验依据,为肝脏缺血再灌注损伤的防治提供新的可能治疗靶点。

参考文献:

- [1] CAVALLARI A, CILLO U, NARDO B, et al. A multi-center pilot prospective study comparing celsior and university of wisconsin preserving solutions for use in liver transplantation[J]. *Liver Transpl*, 2003, 9(8): 814
- [2] KLUNE J R, TSUNG A. Molecular biology of liver ischemia/reperfusion injury: established mechanisms and recent advancements [J]. *Surg Clin North Am*, 2010, 90(4): 665
- [3] ZHAI Y, BUSUTTIL R W, KUPIEC-WEGLINSKI J W. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation[J]. *Am J Transplant*, 2011, 11(8): 1563
- [4] ZAKI A M, EL-TANBOULY D M, ABDELSALAM R M, et al. Plumbagin ameliorates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats: role of high mobility group box 1 in inflammation, oxidative stress and apoptosis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 785
- [5] ZHAO X J, YANG Y Z, ZHENG Y J, et al. Magnesium isoglycyrrhizinate blocks fructose-induced hepatic NF- κ B/NLRP3 inflammasome activation and lipid metabolism disorder[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 809: 141
- [6] 徐钧, 解军, 鲍民生, 等. 核因子- κ B/I- κ B 传导通路在肝脏缺血再灌注损伤中的作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2003(7): 39
- [7] 江平, 刘志芬, 艾中立. 核因子 κ B 在肝缺血再灌注损伤中的表达及意义[J]. *中华普通外科杂志*, 2004(3): 52
- [8] MATSUI N, KASAJIMA K, HADA M, et al. Inhibitor of NF-kappaB activation during ischemia reduces hepatic ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *J Toxicol Sci*, 2005, 30(2): 103
- [9] SILVA L N, DA HORA G C A, SOARES T A, et al. Myricetin protects *Galleria mellonella* against *Staphylococcus aureus* infection and inhibits multiple virulence factors [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2823
- [10] ZHENG A W, CHEN Y Q, ZHAO L Q, et al. Myricetin induces apoptosis and enhances chemosensitivity in ovarian cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(6): 4974
- [11] 王博, 李德芳, 韩吉春, 等. 杨梅素对离体大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究[J]. *中国新药杂志*, 2017, 26(12): 1455
- [12] LEED H, LEE C S. Flavonoid myricetin inhibits TNF-alpha-stimulated production of inflammatory mediators by suppressing the Akt, mTOR and NF-kappa B pathways in human keratinocytes[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 784: 164
- [13] 钟正贤, 陈学芬, 周桂芬, 等. 广西藤茶中杨梅树皮素的保肝作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2001(5): 11
- [14] 王健, 李鹏飞, 韩效帆, 等. 间断低氧预适应对大鼠肝切除缺血再灌注肝脏凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的影响[J]. *国际外科学杂志*, 2014, 41(4): 234
- [15] LIU J, CHEN T, LEI P, et al. Exosomes released by bone marrow mesenchymal stem cells attenuate lung injury induced by intestinal ischemia reperfusion via the TLR4/NF- κ B pathway[J]. *Inter J Med Sci*, 2019, 16(9): 1238
- [16] MAEKAWA N, WADA H, KANDA T, et al. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39(7): 1229
- [17] YANG L, MAGNESS S T, BATALLER R, et al. NF- κ B activation in Kupffer cells after partial hepatectomy[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 289(3): G530
- [18] ZWACKA R M, ZHANG Y, ZHOU W, et al. Ischemia/reperfusion injury in the liver of BALB/c mice activates AP-1 and nuclear factor κ B independently of I κ B degradation[J]. *Hepatology*, 1998, 28(4): 1022
- [19] HAN H, DESERT R, DAS S, et al. Danger signals in liver injury and restoration of homeostasis [J]. *J Hepatol*, 2020, 73(4): 933
- [20] 李勇, 张培建, 金成. NF- κ B 与肝脏缺血再灌注损伤的研究进展[J]. *中国现代普通外科进展*, 2008, 11(1): 48

(收稿日期: 2024-05-31)

熊果酸联合索拉非尼通过抑制 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路诱导肝癌细胞铁死亡*

胡 玲¹, 杨晓松^{2**}

(1. 南华大学附属长沙中心医院药学部, 湖南 长沙 410000; 2. 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 探究熊果酸(UA)能否增敏索拉非尼(SOR)抑制肝癌细胞生长及调控机制。方法 使用 UA 或 SOR 单药处理或两药联合处理 HepG2 肝癌细胞,通过 CCK-8 实验、EdU 荧光染色实验和克隆集落形成实验来检测单药处理或联合处理对 HepG2 细胞增殖及克隆集落形成能力的影响;使用 CompuSyn 软件计算两药联合指数(CI);通过 FerroOrange 染色分析肝癌细胞铁死亡情况;通过 Western blot 实验检测 HepG2 细胞中 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达情况。结果 UA 显著增强 SOR 抑制 HepG2 细胞增殖及克隆集落形成的能力,两药联用具有明显的协同作用;UA 促进 SOR 诱导的肝癌细胞铁死亡;联合 UA 治疗使 SOR 对 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路的抑制作用进一步增强。结论 UA 显著提高肝癌细胞对 SOR 治疗的敏感性,两药联用可能是治疗肝癌的有效策略。

关键词:熊果酸;索拉非尼;肝癌;铁死亡;GPX4

中图分类号:R735.7

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)06-0472-006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0472



Ursolic Acid Combined with Sorafenib Promoted Ferroptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells by Inhibiting Nrf2/HO-1/GPX4 Signaling Pathway

HU Ling, YANG Xiao-song

(Department of Pharmacy, University of South China Affiliated Changsha Central Hospital, Changsha Hunan 410000, China)

ABSTRACT; Objective To explore whether ursolic acid (UA) could sensitize sorafenib (SOR) to inhibit the growth of hepatocellular carcinoma cells and its regulatory mechanism. **Methods** HepG2 hepatocellular carcinoma cells were treated with UA or SOR monotherapy or combination of the two drugs. The effects of monotherapy or combination on proliferation and colony formation of HepG2 cells were detected by CCK-8 assay, EdU fluorescence staining assay and clonal colony formation assay. The two-drug combination Index (CI) was calculated by using CompuSyn software. Ferroptosis of HepG2 cells was analyzed by FerroOrange staining. The expressions of Nrf2, HO-1 and GPX4 proteins in HepG2 cells were detected by Western blot assay. **Results** UA significantly enhanced SOR's ability to inhibit proliferation and clonal colony formation of HepG2 cells, and the combination of the two drugs had obvious synergistic effect. In addition, UA promoted SOR induced ferroptosis of HepG2 cells. Mechanically, combined UA therapy further enhanced the inhibitory effect of SOR on Nrf2/HO-1/GPX4 signaling pathway. **Conclusion** UA significantly increased the sensitivity of HepG2 cells to SOR, and the combination of the two drugs may be an effective strategy for the treatment of hepatocellular carcinoma.

KEY WORDS: Ursolic acid; Sorafenib; Hepatocellular carcinoma; Ferroptosis; GPX4

* 基金项目:咸宁市自然科学基金(2023ZRKX086)

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

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma)是世界范围内最常见的癌症之一,目前可供选择的治疗十分有限且预后较差^[1]。索拉非尼(sorafenib, SOR)是治疗晚期肝癌的一线药物,然而多数患者在短短数月内便出现敏感性下降和产生耐药等阻碍治疗问题,最终导致治疗失败^[2]。因此,迫切需要探索更佳的治疗策略以获得更好的治疗结果。

熊果酸(ursolic acid, UA)是存在于植物中的一种天然三萜类化合物,在多项临床前研究中显示出有效的抗癌作用。研究发现 UA 通过抑制肿瘤细胞增殖、肿瘤血管生成以及诱导凋亡等机制发挥抗肿瘤作用^[3]。最近,相关研究发现 UA 对非凋亡形式的细胞死亡(铁死亡)具有潜在调节作用,通过诱导铁死亡增强化疗药物的肿瘤治疗疗效^[4]。具有多重药物抗药性的癌细胞更容易发生铁死亡,表明诱导铁死亡在治疗耐药性癌症上具有巨大的潜力^[5]。

大量临床前和临床中证据都表明 SOR 与其他已知药物联合使用是克服耐药性和提高疗效的有效途径^[6-7]。因此,本文探究 UA 联合 SOR 诱导肝癌细胞铁死亡的作用及机制,为 UA 联合 SOR 应用于临床肝癌治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

本研究使用的人 HepG2 细胞系购自浙江百迪生物科技有限公司。细胞培养在 37℃、含 5% CO₂ 的饱和湿度环境的培养箱中,使用 DMEM 培养基,其中添加 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素溶液。

1.2 仪器与试剂

多功能酶标仪-Synergy HTX(美国 BioTeK);倒置荧光显微镜-DMI3000B(德国 Leica);电泳仪-Mini-PROTEAN Tetra(美国 Bio-Rad);全自动化学发光图像分析系统-4600(上海,天能科技)。

UA(纯度 99.89%, S2370)购自 Selleck 公司;SOR(纯度 99.7%, CSN10381)购自 CSNpharm 中国公司;CCK-8 试剂盒(#CA1210)购自 Solarbio 公司;EdU 细胞增殖染色试剂盒(#KGA331X)购自 KeyGEN Bio TECH 公司;FerroOrange 荧光探针染色试剂盒(#F374)购自同仁化学公司;胎牛血清(FSP500)购自 Excell 公司;核因子-E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nr2)、血红素加氧酶 1(heme oxygenase 1, HO-1)、谷胱甘肽

过氧化酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体购自 CST 公司;ECL 发光底液(#1705062)购自 BIO-RAD 公司。

1.3 方法

1.3.1 CCK-8 实验

将细胞制成单个细胞悬液,以 6000 个细胞/孔的密度种植在 96 孔板中,于细胞培养箱培养 24h 后,分为空白对照组、UA 单独治疗组(2.5、5、10、20、40 μmol/L)、SOR 单独治疗组(2、4、8、16 μmol/L)、UA 与 SOR 联合治疗组(UA:5 或 10 μmol/L;SOR:2、4、8 μmol/L),以上每个组设置 3 个复孔。每组细胞经过不同剂量的药物治疗 48h 后,将原培养液吸除,每孔加入用培养基稀释至浓度为 10% 的 CCK-8 溶液 100 μL,放置培养箱反应 2h。用酶标仪检测每个样品在 450nm 处的吸光度。

1.3.2 EdU 染色

将细胞制成单个细胞悬液,以 6000 个细胞/孔的密度种植在 96 孔板中,于细胞培养箱培养 24h,分为空白对照组、UA 单独治疗组(2.5、5、10 μmol/L)、SOR 单独治疗组(2、4、8 μmol/L)、UA 与 SOR 联合治疗组(UA:5 μmol/L;SOR:4 μmol/L),以上每个组设置 3 个复孔。每组细胞经过不同剂量的药物治疗 24h 后,将预热好的 EdU 工作液加入到上述每组细胞中进行 EdU 标记,孵育 2h 后,除去培养基,每孔中加入 4% 中性多聚甲醛 50 μL,室温孵育 30min。去除固定液,每孔加入 2mg/mL 甘氨酸溶液 50 μL,室温孵育 5min。随后,使用 3% BSA 洗涤细胞 2 次,然后加入 0.5% Triton X-100 到每个孔中,室温孵育 20min。随后加入 Click-iT 反应液 100 μL,室温避光孵育 30min。最后,每孔加入 0.1 mL 1 × Hoechst 33342 溶液,室温避光孵育 15 ~ 30min,最后使用荧光显微镜进行成像。

1.3.3 细胞克隆实验

将细胞制成 8000 个/mL 的细胞悬液,按 1 mL 体积种植于 24 孔板中,培养 24h 后,分为空白对照组、UA 单独治疗组(5、10、20 μmol/L)、SOR 单独治疗组(2、4、8 μmol/L)、UA 与 SOR 联合治疗组(UA:5 μmol/L;SOR:2、4、8 μmol/L),以上每个组设置 3 个复孔。每组细胞经过不同剂量的药物治疗后,待空白对照组细胞密度达 80% (约 5 ~ 7d) 使用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞 2 遍,再使用

4%多聚甲醛溶液固定细胞 30min,于每孔加入 1000 μ L 结晶紫染液(#G1062, Solarbio),染色 4h 后纯水冲洗除去多余染色液,室温避光晾干,使用酶标仪进行定量分析。

1.3.4 FerroOrange 染色

将细胞制成单个细胞悬液,以 6000 个细胞/孔的密度种植在 96 孔板中,于细胞培养箱培养 24h 后,分为空白对照组、UA 单独治疗组(5 μ mol/L)、SOR 单独治疗组(2、4、8 μ mol/L)、UA 与 SOR 联合治疗组(UA:5 μ mol/L;SOR:4 μ mol/L),以上每个组设置 3 个复孔。细胞经过不同剂量的药物治疗 24h 后,去除培养基,用无血清培养基清洗 3 次,加入浓度为 1 μ mol/L 的 FerroOrange 工作液,在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中培养 30min,随后通过荧光显微镜观察并拍照。

1.3.5 蛋白免疫印迹分析

将细胞制成单个细胞悬液,以 5×10^5 个细胞/孔的密度种植在 6 孔板中,于细胞培养箱培养 24h 后,分为空白对照组、UA 单独治疗组(5 μ mol/L)、SOR 单独治疗组(4 μ mol/L)、UA 与 SOR 联合治疗组(UA:5 μ mol/L;SOR:4 μ mol/L)。每组细胞经过不同剂量的药物治疗 24h 后,收集细胞并裂解提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白样品浓度。蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳进行分离,随后

通过转膜至 PVDF 膜上,再将其用 5% 脱脂牛奶封闭 1h 后与一抗在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,使用 TBST 溶液清洗 PVDF 膜,随后孵育二抗 1h 后,采用 ECL 发光底液显影蛋白条带。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 16.0 和 GraphPad Prism 6 进行统计分析,根据两组均数或多组均数性质的不同,分别选择独立样本的 Student *t* 检验,one-way ANOVA 检验来进行比较。 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。所有实验均重复 3 次及以上,以确保数据结果的可靠性和准确性。

2 结果

2.1 UA 抑制 HepG2 肝癌细胞增殖、克隆

UA 对 HepG2 肝癌细胞增殖的影响结果如图 1 所示,UA 呈浓度依赖抑制 HepG2 细胞增殖 IC₅₀ 为(16.20 \pm 0.16) μ mol/L(图 1A)。EdU 荧光染色实验显示 UA 治疗显著减少处于细胞分裂周期细胞的比例(图 1B、C)。同时我们检测了 UA 对细胞的克隆集落形成能力的影响,与上述结果一致,UA 显著抑制肝癌细胞 HepG2 克隆集落形成(图 1D、E)。以上结果说明 UA 在微摩尔浓度级别有效抑制肝癌细胞生长。

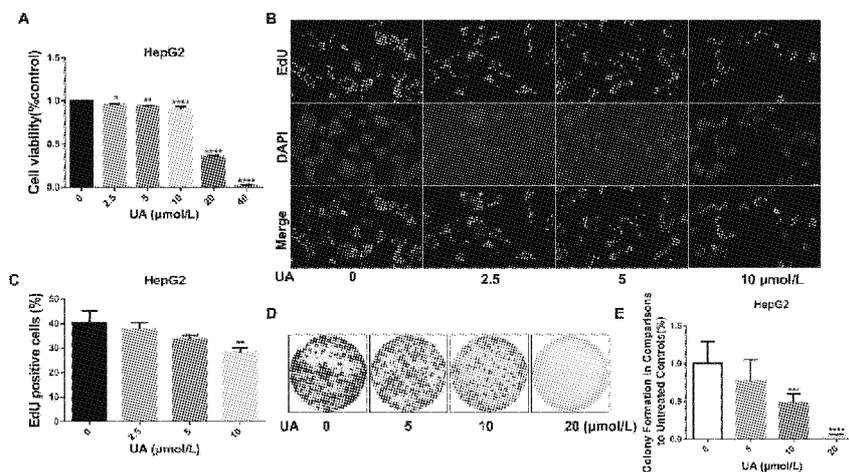


图 1 UA 对肝癌细胞 HepG2 增殖和克隆的影响

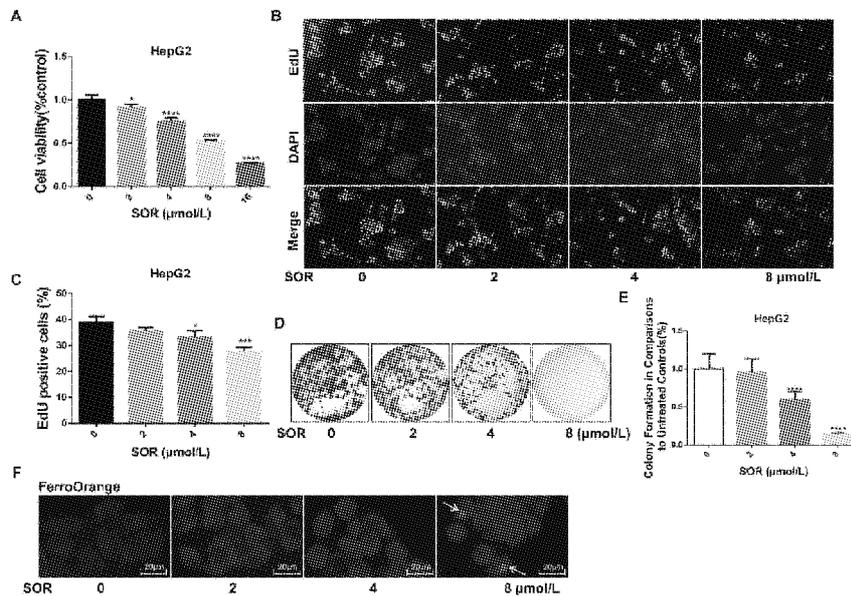
2.2 SOR 抑制肝癌细胞增殖、克隆,诱发铁死亡

SOR 对肝癌细胞 HepG2 增殖活性的影响结果如图 2 所示,SOR 呈浓度依赖性抑制 HepG2 细

胞增殖,其 IC₅₀ 值为(8.49 \pm 0.45) μ mol/L(图 2A)。通过 EdU 荧光染色检测细胞中 DNA 的复制活性,发现随着 SOR 浓度增加处于 S 期的细胞百分数随之减少(图 2B、C)。另一方面,SOR 治

疗导致细胞克隆集落形成能力也相应的被抑制(图2D,E)。相比对照组, SOR 治疗组细胞中呈现强红色荧光。尤其, 当 SOR 浓度达 8 $\mu\text{mol/L}$ 时

细胞中出现更多红色荧光团(图2F), 表明 SOR 治疗导致细胞中 Fe^{2+} 聚集, 诱导细胞发生铁死亡。



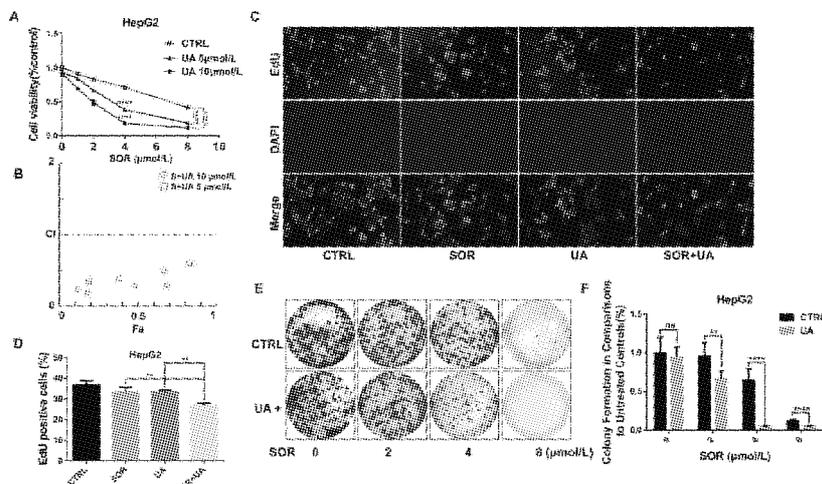
A. CCK-8 实验检测 SOR 处理对肝癌细胞 HepG2 增殖的影响; B, C. EdU 荧光染色实验检测 SOR 治疗对肝癌细胞 HepG2 增殖的影响及统计分析结果 ($\times 20$); D, E. 克隆集落形成实验检测 SOR 处理对细胞克隆集落形成能力的影响及统计分析结果; F. SOR 处理对细胞中 Fe^{2+} 荧光强度的影响(与空白对照组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$, $n=3$)。

图 2 SOR 诱导铁死亡抑制肝癌细胞生长

2.3 SOR 联合 UA 协同抑制肝癌细胞生长

选用 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 UA 联合 SOR 治疗 HepG2 肝癌细胞(图 3A), 相比 SOR 单用组, 联用 UA 显著增强了 SOR 抑制 HepG2 细胞活力的能力。使用 CompuSyn 软件计算两药联合指数(CI), 5 $\mu\text{mol/L}$ UA 与 SOR 联用 CI 的范围为

0.35 ~ 0.64, 10 $\mu\text{mol/L}$ UA 与 SOR 联用 CI 的范围为 0.17 ~ 0.29, 联合指数均小于 1, 表明 SOR 与 UA 联用具有较好的协同作用(图 3B)。同时发现联用 UA 使 SOR 抑制 HepG2 细胞增殖和克隆集落形成能力显著增强(图 3C-F)。这些结果提示 UA 显著增敏 SOR 抗肝癌。



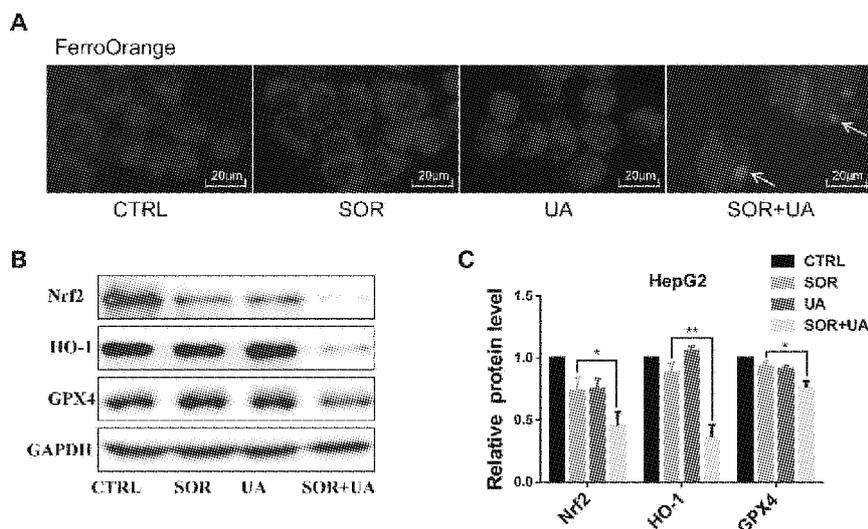
A. CCK-8 实验检测 SOR 联用 UA 对细胞增殖的影响; B. 使用 CompuSyn 软件计算 SOR 合用 UA 的联合指数; C, D. EdU 荧光染色实验检测 SOR 联合 UA 治疗对肝癌细胞 HepG2 增殖的影响及统计分析结果 ($\times 20$); E, F. SOR 联合 UA 对细胞克隆集落形成的影响及统计分析结果 ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$, $n=3$)。

图 3 UA 增敏 SOR 抑制肝癌细胞生长

2.4 UA 增敏 SOR 诱导肝癌细胞铁死亡通过抑制 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路

通过 FerroOrange 荧光探针染色检测 UA 联用对 SOR 诱导 HepG2 细胞 Fe^{2+} 积累的影响,结果如图 4 所示,相比对照组和单药治疗组,联用治疗组细胞中显示更多的红色荧光团(图 4A),表明 UA

增强 SOR 诱导 HepG2 肝癌细胞铁死亡作用。机制方面,联用 UA 进一步增强 SOR 对 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路的抑制作用(图 4B、C)。上述结果表明 UA 使肝癌细胞对 SOR 诱导的铁死亡更敏感,可能是通过协同抑制 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路。



A. UA 联合 SOR 治疗对细胞中 Fe^{2+} 荧光强度的影响;B、C. UA 联合 SOR 治疗对 HepG2 肝癌细胞 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路蛋白表达的影响及定量结果(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$).

图 4 UA 联合 SOR 诱导肝癌细胞铁死亡

3 讨论

SOR 反应率低及快速产生的耐药问题严重限制了其在肿瘤治疗方面的临床应用。研究发现,在肝细胞癌中铁死亡抵抗与 SOR 耐药密切相关^[8]。因此,诱导肝癌细胞铁死亡可能是增强 SOR 抗癌活性的有效途径。药物联合治疗具有增加反应率、逆转耐药、提高疗效和降低毒性等优势^[9]。已发现多种天然化合物显示出与 SOR 的协同作用,包括姜黄素、槲皮素和山奈酚等对 SOR 有增敏作用^[10]。

自从 UA 抗肿瘤活性被发现后,研究者开始探索其与抗癌药物联合的潜力。目前,UA 调节癌细胞对抗肿瘤药物敏感性的作用机制尚不完全清楚。研究发现,UA 诱导线粒体功能障碍,增强耐药乳腺癌细胞对阿霉素的化疗敏感性^[11]。另有研究发现,UA 联合 SOR 通过引起细胞内脂质活性氧的急剧积累,诱导癌细胞选择性凋亡和铁死亡,机制上可能与抑制 SLC7A11 表达有关^[12]。这与我们的发现一致,诱导铁死亡是 UA 增敏 SOR 治疗肝癌的重要机制。Nrf2/HO-1 信号通路对维持细胞氧化还原稳态起关键作用,直接或间接参

与铁死亡的调控^[13]。本研究中,我们发现 UA 增强了 SOR 治疗而引起的 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路下调,进而导致肝癌细胞发生更强烈的铁死亡效应。虽然 SOR 与 UA 联合使用,在细胞水平显示出强大的协同效应,但仍需要进一步明确 SOR 与 UA 联合治疗的精确靶点,这将有助于选择合适的肝癌患者和推进肝癌个体化治疗。同时,未来该联合策略的临床应用还需要更完善的设计和临床试验研究。

总之,本研究结果清楚地表明 UA 显著增敏 SOR 抑制肝癌细胞生长。为联合 UA 与 SOR 用于临床肝癌治疗的策略提供了科学依据。

参考文献:

- [1] ALGHAMDI S, AL-HAMOUDI W. Hepatocellular carcinoma; the role of immunotherapy and transplantation in the era of transplant oncology [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15 (21): 5115
- [2] MA Z, CHEN W, LIU Y, et al. Artesunate sensitizes human hepatocellular carcinoma to sorafenib via exacerbating AFAP1L2-SRC-FUNDC1 axis-dependent mitophagy [J]. *Autophagy*, 2024, 20(3): 541

(下转第 501 页)

盐酸小檗胺对脓毒症急性肾损伤小鼠的保护机制研究

孙珊珊¹, 何昂¹, 马谣谣¹, 黄翠萍^{2*}

(1. 湖北科技学院医学部药学院, 湖北 咸宁 437100; 2. 湖北科技学院第二附属医院)

摘要:目的 探究盐酸小檗胺对脓毒症引起的急性肾损伤(AKI)小鼠模型的保护效应及其可能机制。方法 选用 C57 小鼠 24 只, 随机分为 4 组, 每组 6 只, 分别为空白对照(CON)组、模型(LPS)组、盐酸小檗胺治疗(LPS + BBM)组及盐酸小檗胺对照(BBM)组。通过腹腔注射脂多糖(LPS)建立脓毒症急性肾损伤模型。采用 HE 染色法观察各组小鼠肾脏组织的病理学变化, 通过免疫荧光法检测肾组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)及核因子 κ B p65(NF- κ B p65)蛋白的表达, 使用丙二醛(MDA)与超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒测定 SOD 活性和 MDA 含量, 通过 Western blot 方法检测肾组织中核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、血红素加氧酶-1(HO-1)及磷酸化 NF- κ B(p-NF- κ B)蛋白的表达水平。结果 与 CON 组相比, LPS 组小鼠肾脏出现明显的水肿、变性和炎性细胞浸润, 肾损伤评分显著增加, 肾组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及 NF- κ B p65 蛋白的表达及 p-NF- κ B 蛋白水平显著上升, 而 Nrf2 及 HO-1 表达降低, SOD 活性减弱, MDA 含量增加 (P 均 < 0.05)。相较于 LPS 组, LPS + BBM 组小鼠肾组织炎症浸润减少, 水肿和肾损伤评分降低, TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及 NF- κ B p65 的表达以及 p-NF- κ B 蛋白水平显著下降, Nrf2 与 HO-1 蛋白表达显著增加 (P 均 < 0.05)。结论 盐酸小檗胺能够有效保护脓毒症引起的小鼠急性肾损伤, 其保护作用可能与抑制 NF- κ B 信号通路的活化, 下调相关炎症因子的表达, 以及激活 Nrf2/HO-1 信号通路, 减轻氧化应激反应有关。

关键词: 盐酸小檗胺; 脓毒症急性肾损伤; 炎症; 氧化应激; NF- κ B; Nrf2/HO-1

中图分类号: R332

文献标识码: A

文章编号: 2095-4646(2024)06-0477-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI: 10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0477



The Effect of Berbamine Hydrochloride on Mice with Septic Acute Kidney Injury

SUN Shan-shan, HE Ang, HUANG Cui-ping, et al

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

ABSTRACT: Objective To investigate the protective effect and mechanism of Berbamine Hydrochloride (BBM) on sepsis with acute kidney injury in mice. **Methods** 24 C57BL/6J mice were randomly divided into 4 groups with 6 mice in each group: control group (CON), model group (LPS), model + Berbamine hydrochloride group (LPS + BBM) and Berbamine hydrochloride group (BBM). The model of septic-shock-associated acute kidney injury (SA-AKI) was prepared by intraperitoneal injection with LPS. The pathological changes of renal tissue in each group were observed by HE staining. The expression of inflammatory factors TNF- α , IL-6, IL-1 β and NF- κ B p65 in renal tissues were detected by immunofluorescence assay. MDA and SOD kits were used to detect SOD activity and MDA content. The expression of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1) and p-NF- κ B proteins in renal tissues were detected by Western blot assay. **Results** Compared with LPS group, BBM treatment could decrease inflammatory infiltration, alleviated edema, decreased renal injury score, the levels of inflammatory factors TNF- α , IL-6,

* 通讯作者, E-mail: 1053980935@qq.com

IL-1 β , NF- κ B p65, and the content of MDA, increase SOD activity. In addition, BBM also significantly increased the expression of Nrf2 and HO-1. **Conclusion** Berbamine hydrochloride may reduce SA-AKI by relieving p-NF- κ B activity and expression of inflammatory factors, activating Nrf2/HO-1 signaling pathway.

KEY WORDS: Berbamine Hydrochloride; Acute kidney injury; Inflammation; Oxidative stress; Nrf2

脓毒症(sepsis)是机体感染反应失调而引起的全身炎症反应综合征,可导致多器官功能障碍。肾脏是脓毒症常累及的靶器官之一,较危重的并发症是急性肾损伤(AKI)^[1]。研究显示,脓毒症患者中AKI的发生率为45%~70%,而且脓毒症引发的AKI患者的病死率显著高于其他原因引起的AKI患者^[2]。针对脓毒症引发的AKI,目前临床治疗主要依赖于早期抗感染治疗及晚期肾脏替代疗法,但这些治疗效果依旧不尽人意,高致死率成为一大难题,严重影响患者家庭的生活质量和经济状况,同时,也加大了社会医疗系统的负担^[3]。因此,发掘新的有效药物治疗策略,以改善脓毒症AKI患者的治疗效果和预后,已成为急需解决的问题。

小檗胺(berbamine, BBM)是一种在小檗属植物中广泛存在的天然化合物,具备多种药理作用^[4]。有研究揭示,盐酸小檗胺通过抑制NF- κ B炎症信号通路,减少肾脏组织中炎症介质的释放,从而缓解糖尿病肾病小鼠模型的炎症损伤^[5]。然而,盐酸小檗胺对于脓毒症引起的AKI的具体治疗机制尚未明确。因此,本研究采用LPS诱导的脓毒症AKI小鼠模型,旨在深入探讨盐酸小檗胺对脓毒症AKI的保护效应及其潜在的分子机制。

1 材料与方 法

1.1 材料及试剂

盐酸小檗胺(上海源叶, B21448); 脂多糖 LPS(北京索莱宝, L8880); Nrf2 抗体(ABclonal, A21176); HO-1 抗体(Abcam, ab82585); p-NF- κ B 抗体(ABclonal, A2574); TNF- α (Proteintech, 26405); IL-6(Servicebio, GB11117); IL-1 β (Servicebio, GB115602); NF- κ B p65(Servicebio, GB11997); β -actin 抗兔抗体(ABclonal, AC026)及 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(Servicebio, GB23303); MDA 试剂盒、SOD 试剂盒购自南京建成生物公司。

1.2 实验仪器

电泳槽、电转膜仪、化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); 多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); 研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司)。

1.3 方 法

1.3.1 动物实验

在特定病原体自由(SPF)级别的动物实验室内, 24 只 C57 小鼠经过一周的适应性喂养后, 被随机分配至 4 个实验组, 每组各 6 只, 分别为空白对照组(CON)、模型组(LPS)、盐酸小檗胺治疗组(LPS + BBM)和盐酸小檗胺对照组(BBM)。CON 组小鼠通过口腔灌胃方式接受生理盐水处理(10mg/kg); LPS 组通过腹腔注射脂多糖(10mg/kg)来诱发脓毒症 AKI 模型; LPS + BBM 组在诱导模型前 6 天每天口服灌胃盐酸小檗胺(80mg/kg), 第 6 天腹腔注射脂多糖(10mg/kg); BBM 组连续 7 天每天口服灌胃盐酸小檗胺(80mg/kg)。所有小鼠在最后一次给药后 12h 被处死, 随后收集组织样本进行标记, 其中一部分样本置于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 剩余样本保存于 -80 $^{\circ}$ C 的冰箱中, 待后续实验使用。

1.3.2 肾组织病理损伤观察

取 1.3.1 中甲醛固定的小鼠肾组织经脱水、石蜡包埋后切片, 采用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色。光学显微镜观察并根据肾小球、肾小管以及肾间质的损伤情况进行肾损伤评分, 并采用 0 至 4 分进行量化: 0 分对应无损伤, 即肾脏组织结构未见明显异常; 1 分代表轻微损伤(损伤比例 < 25%), 表现为肾间质轻度炎性细胞浸润; 2 分指中等损伤(损伤比例 25%~50%), 肾间质炎症细胞明显增多, 并伴有肾小管肿胀; 3 分表示重度损伤(损伤比例 50%~75%), 特征为广泛的炎症损伤影响到整个肾小球; 4 分对应极度重度损伤(损伤比例 \geq 75%), 此时肾间质出现显著的炎性浸润, 并在肾小球内观察到炎性颗粒。

1.3.3 肾组织中 SOD 活力与 MDA 含量的测定

取一部分小鼠肾脏组织, 称重。随后, 将肾组织与 9 倍量的生理盐水混合, 制备成 10% 的组织匀浆混合液。在 2500rpm 下离心 10min, 取上清, 用生理盐水将其稀释至适宜的取样浓度。操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.4 各组小鼠肾组织中 Nrf2、HO-1 及 p-NF- κ B 蛋白表达水平

取适量的肾组织, 称重, 依照体积比例(肾

组织: RIPA 缓冲液 = 1:25) 添加含有 PMSF 和磷酸酶抑制剂 A、B 的 RIPA 裂解缓冲液 (RIPA: PMSF: A: B = 100: 1: 1: 1)。随后, 将肾组织剪碎并在冰上裂解 30min, 利用研磨仪将组织匀浆, 并低温高速离心分离, 收集上清液。使用酶标仪在 562nm 波长下测得肾组织的蛋白浓度, 通过 BCA 试剂盒对蛋白进行定量。定量得到的各组蛋白样本, 取 12 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳, 使用 8% 至 15% 的梯度凝胶分离蛋白, PVDF 膜转膜 150min, 室温 5% 脱脂奶粉封闭 60min, 随后用增强型化学发光 (ECL) 显影。使用凝胶成像系统分析 Nrf2、HO-1 及 NF- κ B 蛋白的表达情况。

1.3.5 免疫荧光法检测各组小鼠肾脏组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 炎症因子及 NF- κ B p65 蛋白的荧光表达

将 1.3.2 中制作的石蜡切片, 经脱蜡水化、抗原修复、封闭、一抗及二抗分别孵育、清洗后, 复染核并避光用含抗荧光淬灭剂的封片液封片, 荧光显微镜下观察并采集图像。各组的图像采集设置相同。

1.4 统计学方法

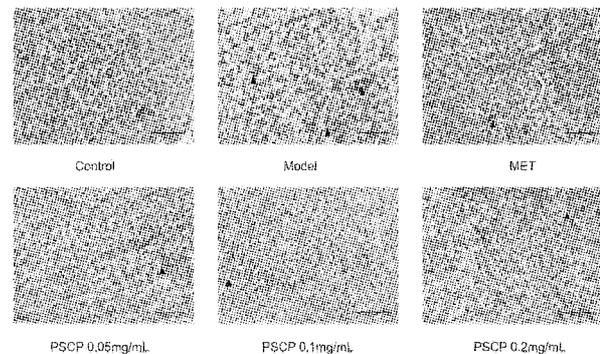
采用 SPSS 20.0 软件处理数据, 所有数据均采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BBM 对各组小鼠肾组织病理学改变的影响

HE 染色结果表明, 在 CON 组中, 肾组织结构保持正常, 未观察到炎性浸润及坏死现象; 与 CON 组相比, LPS 组的肾组织结构显示出重度异常, 视野内大量肾小球内系膜细胞减少, 毛细血管袢结构不清晰 (红色箭头所示), 大量肾小管管腔结构亦不清晰, 上皮细胞数量明显减少 (绿色箭头所示), 肾小管内刷状缘脱落 (蓝色箭头所示), 间质内可见大量炎症细胞浸润 (黄色箭头所示)。此外, LPS + BBM 组的肾组织结构表现为中度异常, 部分肾小管管腔结构不清晰, 受损上皮细胞数量减少 (绿色箭头所示), 部分肾小管内刷状缘脱落 (蓝色箭头所示), 间质内可见少量炎症细胞浸润 (黄色箭头所示)。BBM 组的肾组织结构则基本正常。以上说明 BBM 显著抑制了 LPS 引起的肾组织病理学改变。

与 CON 组相比, LPS 组的肾损伤评分显著升高 ($P < 0.001$); 与 LPS 组相比, LPS + BBM 组的肾损伤评分有所下降 ($P < 0.05$), BBM 组肾损伤评分明显下降 ($P < 0.001$); CON 组与 LPS + BBM 组肾损伤评分无显著差异 ($P > 0.05$)。病理切片的显微结构以及肾损伤评分的柱状图展示均见图 1。



与 CON 组相比, *** $P < 0.001$; 与 LPS 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; $n = 6$ 。

图 1 盐酸小檗胺对脓毒症 AKI 小鼠肾组织病理损伤改变及评分的影响 ($\times 20$)

2.2 BBM 对各组小鼠肾组织 MDA 含量和 SOD 活力的影响

与 CON 组相比, LPS 组小鼠肾组织 MDA 含量升高 ($P < 0.05$), 且 SOD 活力显著降低 ($P < 0.01$); 与 LPS 组相比, LPS + BBM 组小鼠肾组织 MDA 含量降低, SOD 活力升高 (P 均 < 0.05)。表明 BBM 可显著缓解 LPS 引起的氧化应激, 结果见表 1。

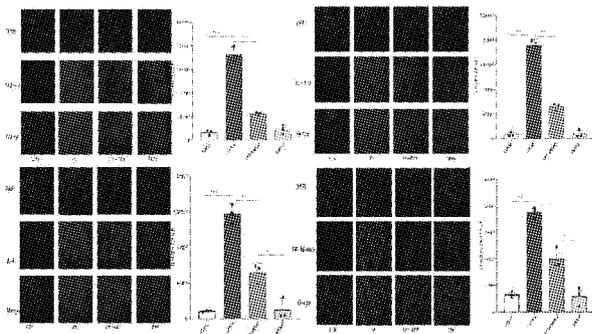
表 1 盐酸小檗胺对脓毒症 AKI 小鼠肾组织 MDA 含量与 SOD 活力的影响 ($n = 6$)

组别	MDA 含量/(nmol/mg prot)	SOD 活力/(U/mg prot)
CON 组	7.22 \pm 3.27	3.40 \pm 0.32
LPS 组	18.06 \pm 3.74 *	1.99 \pm 0.24 **
LPS + BBM 组	7.04 \pm 2.94#	2.41 \pm 0.30#
BBM 组	11.81 \pm 2.74	2.97 \pm 0.29

与 CON 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 LPS 相比, # $P < 0.05$ 。

2.3 BBM 对各组小鼠肾组织的炎症蛋白因子免疫荧光的影响

免疫荧光分析结果表明, 相较于 CON 组, LPS 组炎症因子 (TNF- α 、IL-6、IL-1 β) 及炎症通路标志物 NF- κ B p65 的荧光信号显著增强。然而, 与 LPS 组比较, LPS + BBM 组中这些炎症因子的荧光强度显著降低, 表明盐酸小檗胺能有效抑制 LPS 诱导的炎症反应。如图 2。

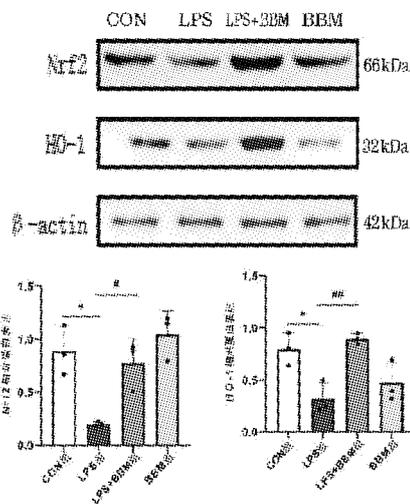


与 CON 组相比,*** $P < 0.0001$;与 LPS 组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$;n=6。

图2 盐酸小檗胺对各组小鼠 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、NF- κ B p65 蛋白免疫荧光强度的影响($\times 200$)

2.4 BBM 对 Nrf2 及 HO-1 蛋白表达的影响

Western blot 结果表明,与 CON 组相比,LPS 组的小鼠肾组织中 Nrf2 和 HO-1 的表达显著下降($P < 0.05$)。与 LPS 组相比较,LPS + BBM 组 Nrf2 和 HO-1 的表达水平显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。表明盐酸小檗胺能够有效逆转脂多糖引起的氧化应激反应,通过调节 Nrf2、HO-1 蛋白的表达来发挥作用。如图 3。



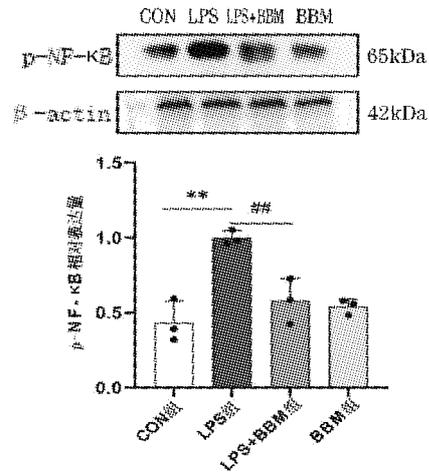
与 CON 相比,* $P < 0.05$;与 LPS 相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;n=6。

图3 盐酸小檗胺对脓毒症 AKI 小鼠肾组织中 Nrf2 及 HO-1 蛋白的影响

2.5 BBM 对 p-NF- κ B 蛋白表达的影响

Western blot 分析结果表明,与 CON 组相比,LPS 组小鼠肾组织中磷酸化 NF- κ B (p-NF- κ B) 蛋白的表达水平显著上升,该差异具有统计学意义($P < 0.01$)。相较于 LPS 组,LPS + BBM 组 p-NF- κ B 蛋白的表达水平显著下降($P < 0.01$),表明盐酸小檗胺能有效抑制 LPS 引起的 NF- κ B 通路的

激活。如图 4。



与 CON 组相比,** $P < 0.01$;与 LPS 组相比,## $P < 0.01$;n=6。

图4 盐酸小檗胺对脓毒症 AKI 小鼠肾组织中 p-NF- κ B 蛋白的影响

3 讨论

脓毒症急性肾损伤(SA-AKI)是侵入机体血液循环的内外源毒素对肾组织的损害,其临床表现包括肾小球滤过率急剧下降、氮质代谢产物累积以及电解质与酸碱平衡的失调^[6]。由于 SA-AKI 的病理生理过程十分复杂,使其成为急诊和重症监护病房中的一个重要关注点^[7]。近来的研究逐渐揭示了氧化应激和炎症反应是 SA-AKI 发生发展的重要因素,这两个过程常同时出现^[8]。因此,能够挖掘多靶点、多通路的药物,减轻这两种生物学过程,将为 SA-AKI 的治疗提供新的策略。

研究表明,炎症反应在 SA-AKI 的发展中扮演着关键角色^[9]。NF- κ B 是调控炎症级联反应的核心转录因子,当细胞遭受病毒、脂多糖、紫外线或免疫刺激时,NF- κ B 抑制蛋白覆盖的 p65 亚基核定位序列被磷酸化,导致 NF- κ B 从细胞质转移到细胞核,促进下游炎症因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的释放。因此,抑制 NF- κ B 通路的活化是治疗策略的关键。研究发现,吡咯烷二硫代氨基甲酸铵(PDTC)通过抑制 NF- κ B 信号通路的活化,减少血清中炎症因子的浓度,来有效预防 LPS 诱导的脓毒症 AKI^[10]。此外,在肾缺血再灌注(IRI)模型中,吡格列酮通过提升 PPAR- γ 蛋白表达抑制 NF- κ B 蛋白活化,改善肾组织炎症损伤^[11]。石磊等^[12]研究发现 BBM 能够通过降低糖尿病肾病大鼠血清中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的 mRNA

含量,缓解糖尿病肾病损伤。本研究显示,在 LPS 诱导的脓毒症 AKI 小鼠体内,炎症因子 TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 的荧光表达明显增强,NF- κ B 通路活化,NF- κ B p65 转位入核,介导了脓毒症 AKI 的炎症反应;而在 LPS + BBM 组中,BBM 预处理显著降低了 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及 NF- κ B p65 炎症蛋白的荧光表达强度,减轻肾组织炎症损伤。

氧化应激在 SA-AKI 中起着至关重要的作用。当机体遭受内外源性毒素刺激时,过量生成的活性氧(ROS)超过了组织的抗氧化清除能力,导致抗氧化与氧化系统间的平衡失调。这种失衡状态引发大量氧自由基的产生,破坏了机体的抗氧化酶系统,进而降低了抗氧化酶的活性。超氧化物歧化酶(SOD)作为体内重要的抗氧化酶之一,能够促进氧自由基的歧化反应,减轻对抗氧化酶系统的损害;而丙二醛(MDA)作为脂质过氧化的重要产物,其含量的增减直接反映了氧化应激损伤的程度^[13]。本研究显示,LPS 组小鼠肾间质出现大量炎性浸润,肾小管发生严重肿胀,肾小球内可见炎症颗粒,肾组织中 SOD 活性下降而 MDA 含量升高。然而,在 LPS + BBM 组中,BBM 预处理显著提高了 SOD 活性,降低了 MDA 含量,并减轻了肾组织的炎性浸润,提示 BBM 能有效缓解肾组织氧化应激及病理损伤。

在脓毒症 AKI 中,炎症和氧化应激之间存在显著的交互作用。核转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2)及其下游靶基因血红素加氧酶-1(HO-1)构成的 Nrf2/HO-1 信号通路,是组织应对氧化应激的主要通路。在生理条件下,Nrf2 以较低的转录活性在细胞质内与 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1(Keap1)复合体形式存在,一旦遭遇氧化应激,Nrf2 被释放并迁移到细胞核,激活 HO-1 等抗氧化酶的表达,从而发挥抗氧化和抗炎作用。而 NF- κ B 通路在氧化应激环境中易于被激活,进而促进炎症因子如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6(IL-6)的释放,加剧组织损伤^[14]。本研究中,Western blot 显示,LPS 组中 p-NF- κ B 蛋白激活与 Nrf2/HO-1 蛋白表达水平的下调,提示了炎症和氧化应激在 SA-AKI 中协同存在。LPS + BBM 组中,BBM 预处理不仅抑制了 NF- κ B 的活化,也显著提升了 Nrf2 及 HO-1 的蛋白表达水平,表明 BBM 能通过调控氧化应激和炎症通路平衡对 SA-AKI 发挥保护作用。

综上所述,本研究证实了 BBM 对 SA-AKI 具

有显著的保护作用,其作用机制涉及抑制 NF- κ B 通路的激活并下调炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)及白细胞介素 1 β (IL-1 β)的表达。同时,BBM 还能够上调核转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2)及其下游血红素加氧酶-1(HO-1)的蛋白表达。这一发现为更好开发 BBM 作为 SA-AKI 临床治疗方案提供了科学依据。

参考文献:

- [1] MANRIQUE-CABALLERO C L, DEL RIO-PERTUZ G, GOMEZ H. Sepsis-associated acute kidney injury [J]. Crit Care Clin, 2021, 37(2): 279
- [2] ZARBOCK A, NADIM M K, PICKKERS P, et al. Sepsis-associated acute kidney injury: consensus report of the 28th acute disease quality Initiative workgroup [J]. Nat Rev Nephrol, 2023, 19(6): 401
- [3] GAO Y R, LI Q, ZENG R F, et al. Clinical characteristics of sepsis-associated acute kidney injury: a retrospective analysis of 197 cases [J]. Chinese Journal of Emergency Medicine, 2022, 31(10): 1368
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 327
- [5] 金磊. 盐酸小檗胺防治 2 型糖尿病肾病的作用及机制的研究 [D]. 辽宁: 辽宁大学, 2020
- [6] POSTON J T, KOYNER J L. Sepsis associated acute kidney injury [J]. BMJ, 2019, 364: k4891
- [7] BELLOMO R, KELLUM J A, RONCO C, et al. Acute kidney injury in sepsis [J]. Intensive Care Med, 2017, 43(6): 816
- [8] 曾江维, 张梦新, 冯凯, 等. 脓毒症相关性急性肾损伤研究进展 [J]. 华北理工大学学报(医学版), 2024, 26(1): 78
- [9] LIU Y C, YAO Y, YU M M, et al. Frequency and mortality of sepsis and septic shock in China: a systematic review and meta-analysis [J]. BMC Infect Dis, 2022, 22(1): 564
- [10] 徐达良. 益母草碱对脓毒症小鼠肾损伤的保护作用及机制研究 [D]. 安徽: 安徽医科大学, 2016
- [11] REEL B, GUZELOGLU M, BAGRIYANIK A, et al. The effects of PPAR- γ agonist pioglitazone on renal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. J Surg Res, 2013, 182(1): 176
- [12] 石磊, 向海燕, 朱玲华. 小檗胺对糖尿病肾病大鼠肾损伤和炎症细胞因子产生的影响 [J]. 免疫学杂志, 2020, 36(7): 599
- [13] HUANG J C, YUE Z P, YU H F, et al. TAZ ameliorates the microglia-mediated inflammatory response via the Nrf2-ROS-NF- κ B pathway [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2022, 28: 435
- [14] HUANG C H, ZOU K W, WANG Y Z, et al. Esculetin alleviates il-1 β -evoked nucleus pulposus cell death, extracellular matrix remodeling, and inflammation by activating Nrf2/HO-1/NF- κ B [J]. ACS Omega, 2023, 9(1): 817

(收稿日期: 2024-04-23)

附子对阿霉素诱导心肌损伤保护的潜在机制*

陈星羽¹,贺巧¹,饶琴¹,雷谊宁¹,李彩蓉¹,张朝阳^{2**}

(1. 湖北科技学院医学部临床医学院,湖北咸宁 437100;2. 咸安区中医医院)

摘要:目的 通过网络药理学和细胞实验探究附子对阿霉素诱导的心肌损伤的潜在机制。方法 通过 TCM-SP、SWISS、Chemal 和 Super-ped 数据库对阿霉素和附子进行活性化合物的鉴定及靶点的预测,通过 Genecard 数据库对心肌损伤的靶点进行预测;利用 Cytoscape 3.8.0 软件构建“成分-靶点”网络关系图;以 STRING 数据库构建 PPI 网络图,并通过 DAVID 数据库进行 GO 分析和 KEGG 分析;利用分子对接和分子动力学验证核心靶点与活性化合物的结合能力;最后通过细胞实验进行初步验证。结果 2,7-二去乙酰基-2,7-二苯酰-云南紫杉宁 F(2,7-Dideacetyl-2,7-dibenzoyl-taxayunnanine F)、多根乌头碱(karakoline)、异塔拉萨定(isotalatizidine)可能是附子对阿霉素诱导的心肌损伤的潜在活性化合物,其中 MAPK1、MAPK3 和 MC4R 可能是附子对阿霉素诱导的心肌损伤的潜在靶点,神经活动配体与受体的相互作用(Neuroactive ligand-receptor interaction)信号通路可能是关键通路。细胞实验也确定了 karakoline 和 isotalatizidine 能降低 MC4R 在阿霉素诱导的心肌损伤中的表达。结论 附子可能通过调控 MC4R 调控阿霉素诱导的心肌损伤,同时也确定了 MC4R 在阿霉素诱导的心肌损伤中的作用,为阿霉素诱导的心肌损伤提供了新的治疗药物及治疗靶点。

关键词:附子;阿霉素;心肌损伤;网络药理学;分子动力学模拟

中图分类号:R965

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)06-0482-006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0482



Potential Mechanism of Protection of Fuzi Against Adriamycin-induced Myocardial Injury

CHEN Xing-yu, HE Qiao, ZHANG Cao-yang, et al

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

ABSTRACT: Objective To investigate the potential mechanism of Fuzi against adriamycin-induced myocardial injury by network pharmacology and cellular experiments. **Methods** The active compounds of adriamycin and Fuzi were identified and targets were predicted by TCMSP, SWISS, Chemal and Super-ped databases, and the targets of myocardial injury were predicted by Genecard database; the component-target network diagram was constructed by using Cytoscape 3.8.0 software; the PPI network diagram was constructed by using STRING database, and GO analysis and KEGG analysis were performed by using DAVID database. Molecular docking and molecular dynamics were used to verify the binding ability of the core targets and active compounds; finally, preliminary verification was carried out through cellular experiments. **Results** 2,7-Dideacetyl-2,7-dibenzoyl-taxayunnanine F, karakoline, and isotalatizidine may be the potential active compounds of Fuzi against adriamycin-induced myocardial injury, among which MAPK1, MAPK3 and MC4R may be potential targets of Fuzi against adriamycin-induced myocardial injury, and the neuroactive lig-

* 基金项目:湖北科技学院大学生创新创业训练计划项目(S202210827033)

** 通讯作者, E-mail:1984648768@qq.com

and-receptor interaction signaling pathway may be the key pathway. Cellular experiments also determined that karakoline and isotalizidine reduced the expression of MC4R in adriamycin-induced myocardial injury. **Conclusion** Fuzi may regulate adriamycin-induced myocardial injury by modulating MC4R, and the role of MC4R in adriamycin-induced myocardial injury was also determined, providing a new therapeutic agent and a therapeutic target for adriamycin-induced myocardial injury.

KEY WORDS: Fuzi; Adriamycin; Myocardial injury; Network pharmacology; Molecular dynamics simulation

阿霉素是一种临床上抗肿瘤蒽环类抗生素,广泛用于治疗各种癌症^[1]。心脏是身体的重要器官之一,在癌症化疗期间受到阿霉素的影响,导致心功能障碍,患者容易患心血管疾病和动脉粥样硬化等^[2]。此外,阿霉素介导的铁死亡会损害心脏的正常功能,并且通过增加氧化应激和炎症,导致心肌损伤^[3]。一旦出现心肌病症状,治疗困难,预后不良,一年内死亡率高达45%^[4],并且由于经济等问题,心肌病的治疗也很难执行。因此,寻找新颖有效的治疗策略具有重要意义。

附子是始见于东汉时期《神农本草经》,主治“风寒咳逆,邪气,温中,金创,破癌坚积聚,血瘦,寒温,痿蹇,拘挛,膝痛不能行步”。附子为毛茛科(*Ranunculaceae*)乌头属植物乌头(*Aconitum carmichaelii* Debx.)的子根的加工品,广泛分布于我国四川、浙江等地^[5]。目前研究发现,附子与其它中药材制成方剂治疗各种疾病,如阳虚瘀阻型缓慢性心律失常、肿瘤、心衰等^[6]。此外,其他研究表明2g/L的附子水溶性碱、总碱和多糖都有强心作用和减轻心肌损伤^[7]。这些研究表明,附子对心脏损伤有改善作用,但大剂量使用会导致毒副作用。

附子能否通过活性化合物治疗阿霉素诱导的心肌损伤?本文旨在通过网络药理学和细胞实验预测附子治疗阿霉素诱导的心肌损伤的活性化合物和潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大鼠心肌细胞(H9C2)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;胎牛血清(Gene Codex,货号C002);DMEM高糖培养基(Servicebio,DMEM,货号G4511-500mL);Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒(biosharp,货号BS350B);MC4R抗体(AB-clonal,货号#A10228);山羊抗兔免疫球蛋白G类(IgG)二抗(美国CST,IgG,货号#5174);活性氧(ROS)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,E004-1-1)。

1.2 方法

1.2.1 有效成分和靶点的筛选

通过TCMSP数据库(<https://old.tcm-sp.com/tcm-sp.php>)获得附子有效成分和对应靶点(口服生物利用度 $OB \geq 35\%$,类药性 $DL \geq 0.18$)。同时通过Pubchem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行化合物的验证。并使用Swiss数据库、ChEMBL数据库(<https://www.ebi.ac.uk/chem-bl/>)和super-ped数据库(<https://prediction.charite.de/index.php>)进行阿霉素靶点的预测。以“myocardial injury”为检索词,在Genecards(<https://www.genecards.org>)中查找疾病靶点。

1.2.2 “药物-有效成分-疾病靶点”网络构建

将附子的活性化合物、对应的靶点和疾病导入Cytoscape 3.8.0软件中,构建药物-有效成分-疾病靶点网络图。同时将附子、阿霉素与心肌损伤靶点基因的交集筛选出的靶点输入到STRING数据库(<https://cn.string-db.org/>),保存蛋白互作网络(PPI)图。

1.2.3 GO与KEGG富集分析

将疾病-药物交集靶点基因通过David数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行GO和KEGG信号通路富集分析,然后将数据结果导入微生信(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)进行可视化,最终得到GO和KEGG信号通路图。同时在Cytoscape 3.8.0软件绘制前15个KEGG通路与其对应靶点之间通路-靶点网络图。

1.2.4 分子对接验证方法

通过蛋白质数据库(<http://www.rcsb.org>)查找核心蛋白,并保存其3D结构的PDB格式文件。将有效成分中度值排名前三的小分子通过PubChem数据库下载3D结构。随后导入Auto Dock tools-1.5.7软件中,去除水分子,并加氢,最终保存为PDBQT格式文件。然后进行分子对接,选择最小结合能配体文件和蛋白受体共同导入PyMOL-2.4.0软件中构建3D分子对接图。

1.2.5 分子动力学模拟(Molecule dynamics,MD)

采用AMBER 18软件进行模拟^[8]。在模拟之

前,对体系进行能量优化,包括 2500 步的最陡下降法和 2500 步的共轭梯度法。体系维持温度 298.15K,进行 500ps 的等温等体积模拟,使溶剂分子进一步均匀的分布在溶剂盒子中。然后,在等温等压的情况下,对整个体系进行 500ps 的平衡模拟。最后,两个复合体系在周期边界性条件下,分别进行 100ns 的等温等压系综模拟。在体系压强为 1atm,积分步长为 2fs,每隔 10ps 保存轨迹用于后续分析。

使用 MM/GBSA 方法对所有体系的蛋白和配体间的结合自由能计算。我们使用 90 ~ 100ns 的 MD 轨迹用作计算,具体公式如下:

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{complex} - (\Delta G_{receptor} + \Delta G_{ligand}) = \Delta E_{internal} + \Delta E_{VDW} + \Delta E_{elec} + \Delta G_{GB} + \Delta G_{GSA} \quad (1)$$

在公式(1)中,表示内能、范德华作用以及静电相互作用。其中内能包括键能(E_{bond})、角能(E_{angle})、扭转能($E_{torsion}$)和统称溶剂化自由能。其中,GB为极性溶剂化自由能,GSA为非极性溶剂化自由能。

1.2.6 H9C2 心肌细胞的分组与处理

H9C2 细胞用 DMEM 高糖培养基于 37℃、5% CO₂ 条件下培养,H9C2 细胞生长融合度达到 80% ~ 90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,使用对数生长期细胞进行实验。细胞分为对照组(Ctrl 组)、阿霉素组(DOX 组)、阿霉素 + 异塔拉萨定(isotalatizidine)即 DOX + isotalatizidine 组、阿霉素 + 多根乌头碱(karacoline)即 DOX + karacoline 组。isotalatizidine (200 μmol/L) 和 karacoline (1.25 μmol/L) 预处理 24h 后用 1 μmol/L 的 DOX 诱导 24h,模拟 DOX 心脏毒性中心肌细胞损伤的病理变化。

1.2.7 CCK-8 实验

收集各组细胞(2×10^3 个/孔)接种于 96 孔板中,培养 48h。随后,各孔加入 10 μL CCK-8 溶液继续培养 2h。最后,利用酶标仪测定 450nm 处光密度(A)来计算细胞存活率。

1.2.8 Western blot 检测

取心肌细胞,提取总蛋白。测定蛋白浓度,经 SDS-PAGE 分离蛋白后转自 PVDF 膜,用 5% 脱脂牛奶溶液室温封闭 1.5h,一抗 4℃ 孵育过夜,1 × TBST 洗 3 次,10min/次,二抗室温孵育 1.5h,1 × TBST 洗 3 次,10min/次。配制 ECL 显影液,经凝胶成像分析系统检测,分析目的条带的灰度值,统计比较各组之间差异。

1.2.9 细胞内 ROS 检测

取对数生长期的 H9C2 细胞,弃去上清,每孔

加入 1mL 用无血清培养基稀释的 10 μmol/L DCFH-DA,37℃ 培养箱内孵育 30min,弃培养液,PBS 洗涤 2 遍,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。最后于倒置显微镜下观察并拍照,并用 ImageJ 软件进行相应的分析。

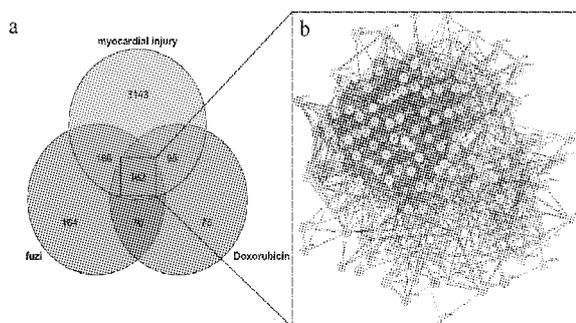
1.3 统计学方法

使用 SPSS 22.0 统计软件对结果进行分析处理,数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较进行 One-way ANOVA 分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 附子中主要生物活性成分筛选结果

从 TCMS 网站上检索并在 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 的条件下,检索获得附子的主要活性成分,并进一步将所得活性成分导入 pubchem 中验证化合物的准确性,然后将化合物导入 Swiss 数据库进行靶点预测,得到 1185 个靶点。此外,将阿霉素的化学结构输入到 Swiss、chemal 和 super-ped 数据库得到 405 个靶点。在 Genecards 数据库中 Relevance score 设置为 ≥ 1.0 后得到 3586 个疾病靶点。三者交集后得到 162 个交集靶点,将 162 个交集靶点导入 STRING 数据库,获得蛋白 PPI 网络图(图 1a、b)。



a. 附子、阿霉素和心肌损伤的靶点 Venn 图; b. PPI 网络图。

图 1 网络药理学图

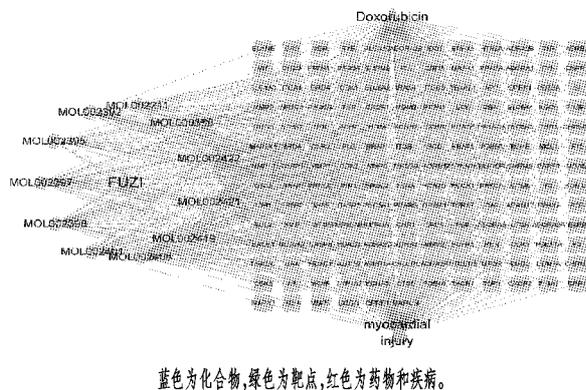
2.2 药物-有效成分-疾病靶点的构建与分析结果

通过 pubchem 的验证后得到 10 个附子的潜在活性化合物(见表 1),而后将这些化合物、对应的靶点和疾病导入 Cytoscape 3.8.0 软件中,构建药物-有效成分-疾病靶点网络图,如图 2。通过对“药物-有效成分-疾病靶点”网络图的分析,发现 MOL002406、MOL002397 和 MOL002422 在其中有重要作用,这 3 个化合物可能在附子对阿霉素诱

导的心肌损伤中发挥重要作用。

表1 附子潜在活性化合物

分子ID	分子名称	OB	DL	degree
MOL002406	2,7-Dideacetyl-2,7-dibenzoyl-taxayunnanine f (2,7-二去乙酰基-2,7-二苯酰-云南紫杉宁f)	39.43	0.38	50
MOL002397	karakoline(多根乌头碱)	51.73	0.73	46
MOL002422	sotalatizidine(异塔拉萨定)	50.82	0.73	43
MOL002398	karanjin(木黄皮素)	69.56	0.34	40
MOL002401	neokadsuranic acid b(丹酚酸b)	43.1	0.85	39
MOL002392	delhoi(三角叶薯蓣皂苷)	46.69	0.37	38
MOL002419	(r)-noroclaurine(去甲乌头碱)	82.54	0.21	35
MOL002421	ignavine(脲碱)	84.08	0.25	31
MOL002395	deoxyandrographolide(去氧穿心莲内酯)	56.3	0.31	31
MOL002211	11,14-eicosadienoic acid(花生二烯酸)	39.99	0.2	31

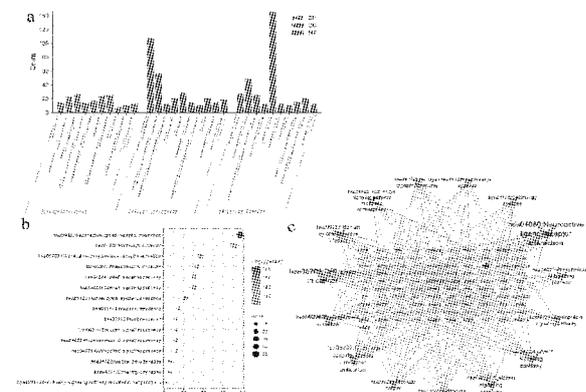


蓝色为化合物,绿色为靶点,红色为药物和疾病。

图2 药物-有效成分-疾病靶点图

2.3 GO 和 KEGG 分析结果

通过 DAVID 数据库对 162 个交集靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析,结果见图 3a、b。同时将排名前 15 个 KEGG 通路及其对应的靶点导入到 Cytoscape 3.8.0 软件中构建“通路-靶点”网络图,见图 3c。发现 Neuroactive ligand-receptor interaction、Pathways in cancer 和 Chemical carcinogenesis - receptor activation 等通路在附子的治疗过程中可能起到关键作用。



a.162 个交集靶点的 GO 富集分析;b.162 个交集靶点的 KEGG 富集分析;c.通路-靶点图

图3 GO 和 KEGG 富集分析

2.4 分子对接结果

通过查阅文献,发现 MAPK1、MAPK3 和 MC4R 可能在其中发挥重要作用。将这 3 个靶点作为核心靶点与排名前 3 名的化合物进行分子对接,所有对接结合能均为负值,提示化合物与核心蛋白的结合结构稳定,见表 2。

表2 分子对接结果

靶点名称	MAPK1-4QTA	MAPK3-4QTB	MC4R-7PIU
2,7-Dideacetyl-2,7-dibenzoyl-taxayunnanine F	-3.68	-2.14	-1.02
karakoline	-6.27	-7.23	-7.46
isotalatizidine	-5.52	-5.46	-7.58

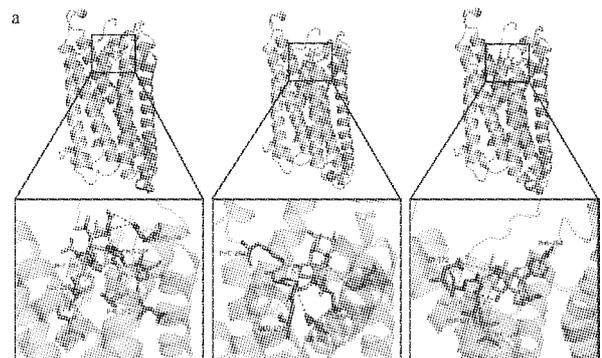
2.5 分子动力学模拟结果

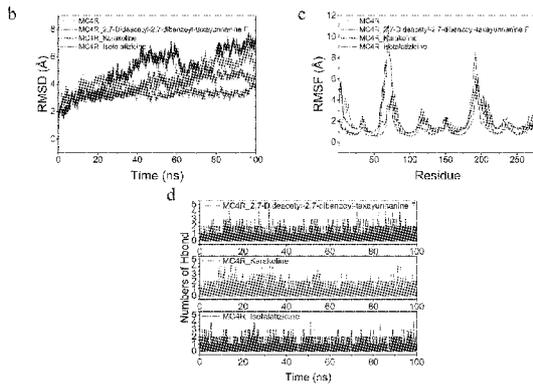
结合能的检测结果如表 3 所示,2,7-Dideacetyl-2,7-dibenzoyl-taxayunnanine F、karakoline、isotalatizidine 的结合能为 (-36.95 ± 1.61) 、 (-32.40 ± 0.95) 、 (-35.90 ± 1.41) kcal/mol。表明小分子与 MC4R 蛋白具较强结合亲和力。综上所述,这些分子与 MC4R 具备结合潜力,表明了 MC4R 在阿霉素诱导的心肌损伤的潜在作用。

同时利用 pymol 绘制出 3D 图,结果见图 4。提示附子中 2,7-Dideacetyl-2,7-dibenzoyl-taxayunnanine F、karakoline 和 isotalatizidine 与 MAPK1、MAPK3 和 MC4R 的生物亲和力较高。

表3 MM/GBSA 预测的结合自由能和能量成分(kcal/mol)

System name	2,7-Dideacetyl-2,7-dibenzoyl-taxayunnanine F	karakoline	isotalatizidine
ΔE_{vdw}	-52.61 \pm 1.45	-35.70 \pm 0.87	-39.17 \pm 1.64
ΔE_{elec}	-1.05 \pm 1.82	-189.91 \pm 3.34	-197.62 \pm 3.76
ΔG_{CB}	23.88 \pm 1.89	198.32 \pm 2.86	205.64 \pm 4.13
ΔG_{SA}	-7.16 \pm 0.26	-5.11 \pm 0.07	-4.76 \pm 0.10
ΔG_{bind}	-36.95 \pm 1.61	-32.40 \pm 0.95	-35.90 \pm 1.41





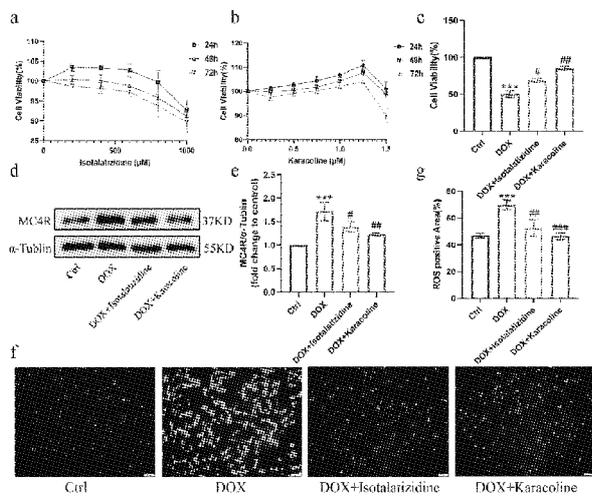
a. 显示 MAPK3 与 karakoline, MC4R 与 karakoline 及 isotalatizidine 的分子对接 3D 分子对接模式图; b. RMSD; c. RMSF; d. 氢键的数量。

图4 分子对接和分子动力学图

2.6 细胞实验结果

首先,检测了 isotalatizidinea 和 karakoline 对细胞的毒性,通过时间和浓度的曲线变化,结果发现:在 isotalatizidine (200 $\mu\text{mol/L}$) 和 karakoline (1.25 $\mu\text{mol/L}$) 剂量下细胞活性较强(图 5a、b)。然后通过 DOX 干预的情况下,发现在 isotalatizidine (200 $\mu\text{mol/L}$) 和 karakoline (1.25 $\mu\text{mol/L}$) 剂量下,DOX 对心肌细胞的毒性明显改善 ($P < 0.05$) (图 5c)。

此外,采用 Western blot 检测 MC4R 在心肌细胞的表达,结果发现(图 5d、e),DOX 明显上调了 MC4R 的表达,给予 isotalatizidinea 和 karakoline 后,MC4R 的表达下降 ($P < 0.05$)。同时检测了 ROS 的表达,结果发现(图 5f、g),DOX 明显上调了 ROS 的表达,给予 isotalatizidinea 和 karakoline 后,ROS 的表达下降 ($P < 0.05$)。



a, b, c. CCK8 检测 isotalatizidinea 和 karakoline 的细胞活力及其对 DOX 的影响; d, e. MC4R 的表达和统计图; f, g. ROS 的表达和统计图。(与 Ctrl 组比, *** $P < 0.001$; 与 DOX 组比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$)

图5 细胞实验结果

3 讨论

阿霉素是一种广泛使用的化疗药物,可提高癌症患者的生存率,但会诱发不可逆的心肌损伤,目前研究表明阿霉素诱发的心肌损伤与氧化应激、炎症反应及凋亡的发生密切相关^[9]。而在中医学的理论中,阿霉素诱导的心脏毒性属于“心衰病”“水肿”“心悸”等范畴^[10]。附子被称为“回阳救逆第一品药”,有显著的强心作用,并已有研究发现由其组成的汤剂能对心功能有显著的改善作用,例如仲景炮附子^[11]。此外也有附子炮制品能改善阿霉素致急性心力衰竭^[12]。但是极少有研究对附子治疗阿霉素诱导的心肌损伤进行研究。

网络药理学是一门研究疾病机制和药物作用机制的新学科。结果发现附子、阿霉素和心肌损伤的交集靶点有 162 个。从网络药理学中发现 2, 7-Dideacetyl-2, 7-dibenzoyl-taxayunnanine F、karakoline 和 isotalatizidine 可能是附子的关键成分。GO 和 KEGG 富集分析中发现 Neuroactive ligand-receptor interaction、Pathways in cancer 通路在附子的治疗过程中可能起到关键作用,MC4R、MAPK1、MAPK3 等可能是治疗的关键靶点。黑皮素 4 受体(melanocortin 4 receptor, MC4R)是一种黑皮质素系统的受体,能影响心脏功能。目前研究表明,MC4R 主要在几个脑核中表达,并在调节食物摄入和能量消耗中起核心作用^[13]。此外,MC4R 激动剂会导致食物摄入量和体重减少,激活交感神经系统,导致血压和心率增加,改善心血管功能^[14]。这些结果也证明了 MC4R 对心脏的调节作用,暗示了其调节心肌损伤的可能机制。

分子对接结果表明,MC4R 与这些活性化合物的结合能力很强。分子动力学模拟的均方根偏(RMSD)可以反应复合物的运动过程,RMSD 越大以及波动越剧烈表示运动剧烈。蛋白和复合物在模拟过程中的 RMSD 都在 8 埃范围波动,表明蛋白和复合物比较稳定。RMSF 可以反应分子动力学模拟的过程中蛋白的柔性。复合物 MC4R 蛋白在整体氨基酸序列上表现出低于未结合配体时 RMSF,表明化合物能可以抑制蛋白柔性,达到影响蛋白功能的效果。氢键为最强的非共价结合作用之一,结果显示 3 组化合物在模拟过程中氢键数目普遍在 0~2 个之间。表明在动力学模拟过程中氢键对小分子和蛋白的结合起到部分作用,氢键作用较弱。这些结果也证明了 MC4R 与这些核心化合物的结合能力。MAPK1 和 MAPK3 是

MAPK 信号通路关键蛋白,在细胞的周期进程、线粒体裂变和细胞存活等生理过程中起重要调控作用^[15]。MAPK1 和 MAPK3 通过阿霉素诱导的线粒体 ROS 释放参与血管紧张素 II 受体 I 型的调节,进而导致心衰^[16]。MC4R 的小鼠敲除实验发现,小鼠出现了线粒体结构变化和扩张性心肌病^[17]。此外,通过细胞实验发现, karakoline 和 isotalatizidine 能减轻 DOX 造成的细胞死亡,降低 MC4R 和 ROS 的表达,这说明了附子可能通过 karakoline 和 isotalatizidine 等活性化合物对 MC4R 等靶点来减轻 DOX 造成的心肌细胞损伤。

综上所述,附子能通过多靶点、多通路影响阿霉素诱导的心肌损伤的发生发展。本研究可为附子的未来基础研究提供理论依据,为阿霉素诱导的心肌损伤这一方向寻找新的药物,并为抑制阿霉素诱导的心肌损伤的治疗及相关疾病方面的研究提供新思路。

参考文献:

- [1] 胡连杰,曹锦,马雪芹,等. 京尼平苷对阿霉素所致小鼠心脏毒性的保护作用[J]. 湖北科技学院学报(医学版),2020,34(1):1
- [2] 胡玲,周子默,周驰,等. MicroRNA 在阿霉素心肌毒性中的作用机制[J]. 湖北科技学院学报(医学版),2021,35(5):441
- [3] SUN H, CHEN D, XIN W, et al. Targeting ferroptosis as a promising therapeutic strategy to treat cardiomyopathy [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14:1146651
- [4] 国家心血管病中心,中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2023 概要[J]. 中国循环杂志,2024,39(7):625
- [5] 杨雅钧,韦卫宁,吴港圆,等. 附子的现代研究进展[J]. 壮瑶药研究,2023(1):19
- [6] 崔国宁,周静. 附子的临床与基础研究述评[J]. 中国中医基础医学杂志,2023,29(9):1576
- [7] 刘杰,林巧,周勤梅,等. 附子中 1 个新的苯基异喹啉生物碱及其心肌保护活性[J]. 中国中药杂志,2022,47(12):3265
- [8] SALOMON - FERRER R, CASE D A, WALKER R C. An overview of the amber biomolecular simulation package[J]. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci*, 2013, 3(2):198
- [9] CHRISTIDI E, BRUNHAM L R. Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4):339
- [10] 张定堃,赵志浩,李春雨,等. 基于生物毒效检测的附子不同炮制品质量评价研究[J]. 药学学报,2019,54(12):2169
- [11] 焦鸣杰,李欣欣,刘淑明,等. 仲景炮附子对慢性心力衰竭的治疗作用及机制研究[J]. 药物评价研究,2022,45(10):1980
- [12] 马君,程阳阳,谭鹏,等. 附子炮制品对阿霉素致急性心力衰竭的实验研究[J]. 时珍国医国药,2017,28(09):2136
- [13] HAINER V, ALDHOON HAINEROVÁ I, KUNEŠOVÁ M, et al. Melanocortin pathways: suppressed and stimulated melanocortin-4 receptor (MC4R) [J]. *Physiol Res*, 2020, 69(Suppl 2):S245
- [14] SHARMA S, GARFIELD A S, SHAH B, et al. Current mechanistic and pharmacodynamic understanding of melanocortin-4 receptor activation [J]. *Molecules*, 2019, 24(10):1892
- [15] COOK S J, STUART K, GILLEY R, et al. Control of cell death and mitochondrial fission by ERK1/2 MAP kinase signalling [J]. *FEBS J*, 2017, 284(24):4177
- [16] HUANG C Y, CHEN J Y, KUO C H, et al. Mitochondrial ROS-induced ERK1/2 activation and HSF2-mediated AT1R upregulation are required for doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(1):463
- [17] LITT M J, OKOYE G D, LARK D, et al. Loss of the melanocortin-4 receptor in mice causes dilated cardiomyopathy [J]. *Elife*, 2017, 6:e28118

(收稿日期:2024-05-30)

含苯丙氨酸甲酯侧链螺旋聚苯异腈的合成与性能研究*

张 达,郭雅润,潘乐园,周俊杰,黄胜堂,吴 诗,郭丽媛**

(湖北科技学院医学部药学院,湖北 咸宁 437100)

摘要:目的 设计合成一个含有苯丙氨酸甲酯侧链的螺旋聚苯异腈,为螺旋结构在药物递送系统提供一个新材料。方法 以苯丙氨酸为起始原料,甲酯后与对甲酰氨基苯甲酸缩合,再脱水得到含有 L/D-苯丙氨酸甲酯侧链的苯异腈单体,通过 1,3-双(二苯基膦丙烷)二氯化镍 $[Ni(dppp)Cl_2]$ 催化聚合反应获得一对具有螺旋性的聚苯异腈化合物 Poly-L/D-PhePI。结果 单体和聚合物结构经 NMR、IR 表征确定,GPC 测定其分子量为 $M_n = 8.9$ kDa, $M_w/M_n = 2.41$;聚合物的比旋光度是单体的 10 倍以上,聚合物的 Poly-L/D-PhePI 的 CD 呈现良好的 Cotton 效应与对称性。结论 成功合成含有丙氨酸甲酯侧链的螺旋聚苯异腈,为新型给药系统方面提供物质基础。

关键词:苯丙氨酸;螺旋聚合物;聚苯异腈;药物递送系统

中图分类号:R944

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)06-0488-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0488



Synthesis and Properties of Helical Poly (phenyl isocyanide) with Methyl Phenylalanine on the Side Chain

ZHANG Da, GUO Ya-run, GUO Li-yuan, et al

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

ABSTRACT: Objective To design and synthesize a helical poly (phenyl isocyanide) with methyl phenylalanine on the side chain, in order to provide a kind of new material for helical structure used in drug delivery system. **Methods** We first used phenylalanine as the starting material for methyl esterification, and condensed with p-formylaminobenzoic acid, and then synthesized a group of phenyl isocyanide monomers containing L/D-phenylalanine groups, and finally obtained a pair of chiral helical poly-L/D-PhePI compounds by catalytic polymerization of 1,3-bis (diphenylphosphopropane) nickel dichloride $[Ni(dppp)Cl_2]$. **Results** The structure of Poly-L/D-PhePI was characterized by NMR and IR, and its polymerization degree was determined by GPC to be $M_n = 8.9$ kDa and $M_w/M_n = 2.41$ kDa. The specific Optical Rotation of the polymer is more than 10 times that of the monomer. The CD spectrum of the polymers shows strong and opposite Cotton effects. **Conclusion** We successfully synthesize a helical polyphenylene isonitrile containing alanine methyl ester side chain, which will provides a new way to be designed for new drug delivery system.

KEY WORDS: Phenylalanine; Chiral polymers; Polyphenylene isonitrile; Drug delivery system

螺旋结构在自然界中广泛存在,宏观上植物以螺旋状生长可以最大化吸收阳光和利用空间,微观上螺旋结构为 DNA 分子作为遗传信息载体和蛋白质作为生命活动载体提供了结构基础。科学家们^[1]不断地从自然界中汲取灵感,设计和合成了各式各样的螺旋聚合物,实现了螺旋聚合物

在手性吸附^[2]、手性分离^[3]、不对称催化^[4]、医药^[5]等领域的大量应用。随着功能性螺旋高分子的快速发展,现已作为一种新型的高分子材料应用于药物递送系统。含有螺旋结构的聚合物的新型载药系统具有载药量高^[6]、控释性能好^[7]、靶向性^[8]、药物释放多功能性^[9]以及生物相容性^[10]等

* 基金项目:湖北科技学院 2023 年度医学科研专项基金资助(2023YKY02);国家级科研项目培育计划项目(2022-24GP03);湖北省大学生创新创业项目(S202010927036)

** 通讯作者, E-mail: 471861351@qq.com

优势。

随着螺旋聚合物在新型药物递送系统的深入研究,科学家们分析发现,分子主链能自由旋转的聚合物,其分子内构象变化较大,通常分子间孔隙分布不均匀,规整度差,影响药物的包埋。而分子内构象变化小的刚性主链聚合物通常表现出与柔性链聚合物相反的性质,即聚合物分子形态较为固定,不易受到外部因素影响,药物包埋效果好。因此,在设计载药螺旋聚合物的主链结构时,共价键相连的刚性结构更受科研工作者的青睐^[11]。近年来,含有聚苯异腈结构的聚合物也实现了在生命体中的应用,与使用昂贵金属催化剂进行催化的聚苯乙炔相比,使用廉价的镍金属催化剂的聚苯异腈也能实现很好的聚合效果。2018年吴宗铨^[12]利用两亲性聚苯异腈和 Fe_3O_4 纳米颗粒制备热响应磁胶束,用于控制药物释放和协同热化疗。其成功得益于聚苯异腈特殊的刚性主链,这种刚性主链赋予了聚合物良好的力学性能和热稳定性,具有较大位阻的聚苯异腈通常多以螺旋构象的形式存在,为其在良好的药物递送性能材料的应用奠定良好的结构基础^[13]。本项目拟利用聚苯异腈具有稳定刚性主链结构的特点,通过侧链共价键相连的方式引入手性天然苯丙氨酸调控,获得了一个在新型药物递送系统具有应用前景的螺旋聚苯异腈结构。这种方式构建的螺旋聚合物在结构上具有较强的化学稳定性,为研究螺旋聚合物提供了科学的刚性骨架。

1 材料与方法

1.1 仪器和材料

日本岛津 IRAffinity-1 傅里叶变换红外光谱仪(KBr压片);德国布鲁克 AV-400MHz 核磁共振仪(TMS内标, CDCl_3 , $\text{DMSO}-d_6$ 为溶剂);美国沃特世 2414 凝胶渗透色谱仪(标准品聚苯乙烯 PS);北京浦肯捷 TU-1810 紫外可见分光光度计;日本 JACSOCDJ-1500 圆二色谱仪。

对氨基苯甲酸、无水甲酸、乙酸酐、三乙胺、L/D-苯丙氨酸、二(三氯甲基)碳酸、1,3-双(三苯基膦丙烷)二氯化镍购自安耐吉化学试剂有限公司;二氯亚砷、EDCI、DMAP、HOBt 购自武汉格奥化学技术有限公司;甲醇购自国药集团化学试剂有限公司;二氯甲烷、石油醚、乙酸乙酯、四氢呋喃购自永华化学科技(江苏)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 聚合物 Poly-L/D-PhePI 的路线设计

聚-L/D-苯异腈苯丙氨酸甲酯(Poly-L/D-Phe-

PI)具体合成路线如图1所示,以对氨基苯甲酸和L/D-苯丙氨酸为原料,分别经甲酰化和甲酯化保护后使用缩合剂形成酰胺键,再使用二(三氯甲基)碳酸酯脱水形成异腈单体 L/D-PhePI,最后经过过渡金属催化剂 1,3-双(三苯基膦丙烷)二氯化镍催化得到一对具有手性的螺旋聚苯异腈 Poly-L/D-PhePI。

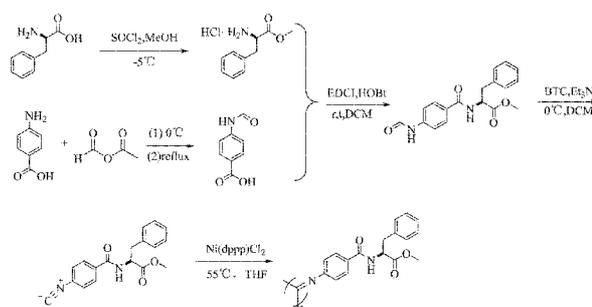


图1 Poly-L/D-PhePI 的合成路线图

1.2.2 分子量及分子量分布测试

在四氢呋喃中制备用于测定分子量及其分布的 Poly-L/D-PhePI 溶液(1.0mg/mL),在美国沃特世凝胶渗透色谱仪中以确定分子量的聚苯乙烯 PS 为标准品,柱温 40°C,流速 1.0mL/min 的条件下进行分子量及分子量分布的测试。

1.2.3 紫外可见光吸收光谱测试及圆二色谱性能

制备 Poly-L/D-PhePI 的四氢呋喃溶液(0.15mg/mL),25°C下,置于1cm石英比色皿放入北京浦肯捷 TU-1810 紫外可见分光光度计,进行 UV-vis 测试,收集波段在 220~550nm 的信号值,绘制 Poly-L/D-PhePI 的紫外可见吸收光谱。

制备同等浓度下 Poly-L/D-PhePI 的四氢呋喃溶液(0.15mg/mL),25°C下,置于1cm石英比色皿放入日立 JACSOCDJ-1500 圆二色谱仪,进行 CD 信号的测试,收集波段在 220~550nm 的信号值,绘制 Poly-L/D-PhePI 的圆二光谱。

1.3 合成实验

1.3.1 4-甲酰胺基苯甲酸的合成

氮气氛围下,于 250mL 双口瓶中加入 4-氨基苯甲酸(0.72g,0.73mmol)和 10mL 无水乙酸乙酯。混合物体系完全溶解后放入冰浴充分冷却,缓慢滴加 1.80mL 新制乙酸酐($V_{\text{无水甲酸}}:V_{\text{乙酸酐}}=2:1$)常温搅拌 2h,滴毕继续搅拌 30min 后,升温至回流继续反应 10h(TLC 监测),反应完成后冷却,析出白色固体,抽滤,滤饼依次用 10mL 乙酸乙酯和 10mL 蒸馏水洗涤 3 次,干燥后得到白色

固体 0.79g。

1.3.2 L/D-苯丙氨酸甲酯盐酸盐的合成

氩气氛下,于 250mL 双口瓶中加入新蒸无水甲醇 50mL, -10°C 下完全冷却,向甲醇中缓慢滴加 SOCl_2 (6.95mL, 95mmol), 滴完后低温下继续搅拌 20min, 分批加入 L/D-苯丙氨酸 (3.14g, 19.0mmol), 固体完全溶解后, 反应转移至常温反应 16h (TLC 监测), 反应结束后旋干溶剂, 得到的固体重新用甲醇溶解后再次旋干, 重复操作 3 次, 得到白色固体 4.08g。

1.3.3 (4-甲酰胺苯基)苯甲酰胺-N-L/D-苯丙氨酸甲酯的合成

氩气氛下,于 250mL 双口瓶中加入 4-甲酰胺基苯甲酸 (2.70g, 17.9mmol), 100mL 二氯甲烷和缚酸剂 Et_3N (2.70mL, 8.8mmol), 剧烈搅拌 10min 后加入 EDCI (3.39g, 25.14mmol), HOBt (3.39g, 25.14mmol) 和 Et_3N (3.98g, 17.95mmol), 剧烈搅拌 16h (TLC 监测), 反应完成后剧烈搅拌下加入 10mL 1.25mol/L HCl 的盐酸水溶液淬灭反应, 此时析出大量白色固体, 过滤, 收集滤饼, 滤液继续经 20mL 1.25mol/L HCl 盐酸水溶液, 20mL 饱和碳酸氢钠溶液, 20mL 饱和食盐水洗涤, V(石油醚): V(乙酸乙酯) = 1:1 柱纯化, 收集产物和滤饼, 得到白色固体共 5.50g。

1.3.4 (4-异氰基苯甲酰基)-L/D-苯丙氨酸甲酯(L/D-PhePI)的合成

在氮气保护下,在 100mL 的双口瓶中加入 4-异腈基苯甲酰胺 L/D-苯丙氨酸甲酯 (2.00g, 6.04mmol) 用 20mL 无水二氯甲烷溶解, 加入 Et_3N (2.44g, 6.03mmol), 并在 0°C 下搅拌 20min, 低温条件下缓慢滴加用 15mL 无水二氯甲烷溶解的二(三氯甲基)碳酸酯 (1.78g, 6.06mmol), 在 0°C 下反应 2h。TLC 监测原料反应至完全, 依次用饱和碳酸氢钠溶液, 蒸馏水, 饱和食盐水洗涤, 收集有机层, 无水硫酸镁干燥。V(石油醚): V(乙酸乙酯) = 4:1 硅胶色谱柱纯化。得到淡黄色固体 1.06g。 $[\alpha]_{589}^{20} = \pm 28(0.1, \text{THF})$ 。

1.3.5 聚合物 Poly-L/D-PhePI 的合成

10mL 聚合管中称取单体 L/D-PhePI (136.00mg, 0.40mmol) 和引发剂 $\text{Ni}(\text{dppp})\text{Cl}_2$ (10.82mg, 0.02mmol), 油泵抽真空置换气 3 次, 加入 2mL 新蒸 THF, 完全溶解后置于 55°C 油浴 3h, 反应结束后, 降温至室温, 向其加入大量甲醇后产生大量固体, 离心后干燥得到金黄色 Poly-L/D-PhePI 固体 185.50mg, 产率: 97.4%。 $[\alpha]_{589}^{20}$

$= \pm 328(0.1, \text{THF})$ 。

2 结果

2.1 单体 L/D-PhePI 的合成

如图 1 所示, 通过甲酯化保护苯丙氨酸羧基和甲酰化修饰对氨基苯甲酸, 利用酸胺缩合将对甲酰胺基苯甲酸和 L/D-苯丙氨酸甲酯盐酸盐以酰胺键结合的方式连接起来, 进一步通过二(三氯甲基)碳酸酯将甲酰胺脱水后得到含异腈基的单体 L/D-PhePI, 四步反应得到单体 L/D-PhePI。各步反应获得的化合物都通过 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 表征确定。其表征结构分别列出如下:

4-甲酰胺基苯甲酸: 白色固体, 产率 91.1%。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.73 (s, 1H, -COOH), 10.77 (s, 1H, -CHO), 8.32 (d, $J = 1.8\text{Hz}$, 1H, -NHCO-), 7.89 (d, $J = 8.5\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2 = \text{CH}_2$), 7.71 (d, $J = 8.5\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2 = \text{CH}_2$)。 ^{13}C NMR (100MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 166.76, 159.98, 142.07, 130.43, 125.57, 118.52。

L/D-苯丙氨酸甲酯盐酸盐的合成: 白色固体。产率: 99.0%。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.72 (s, 3H, $-\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$), 7.38 - 7.21 (m, 5H, $-\text{C}_6\text{H}_5$), 4.24 (dd, $J = 7.4, 5.8\text{Hz}$, 1H, -CH-CO-), 3.65 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.25 - 3.06 (m, 2H, $-\text{CH}_2$ -)。 ^{13}C NMR (100MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 169.34, 134.88, 129.44, 128.61, 127.26, 53.34, 52.52, 35.81。

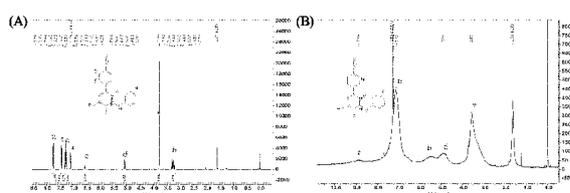
(4-甲酰胺苯基)苯甲酰胺-N-L/D-苯丙氨酸甲酯: 白色固体。产率: 92.9%。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.41 (s, 1H, -CHO), 8.73 (s, 1H, -NH-CO-), 8.32 (s, 1H, -NH-CO-), 7.78 (d, $J = 8.5\text{Hz}$, 2H), 7.64 (d, $J = 8.6\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2 = \text{CH}_2$), 7.32-7.15 (m, 5H, $-\text{C}_6\text{H}_5$), 4.64 (ddd, $J = 10.0, 7.7, 5.3\text{Hz}$, 1H, -CH-CO-), 3.63 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.12 (qd, $J = 13.8, 7.8\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2$)。 ^{13}C NMR (100MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 172.34, 165.82, 160.03, 141.05, 137.76, 129.10, 128.50, 128.28, 126.51, 118.39, 116.32, 54.33, 51.96, 36.27。

(4-异氰基苯甲酰基)-L/D-苯丙氨酸甲酯(L/D-PhePI): 淡黄色固体。产率: 55.2%。 $[\alpha]_{589}^{20} = \pm 28(0.1, \text{THF})$ 。 ^1H NMR (400MHz, $\text{Chloroform}-d$) δ 7.75 (dt, $J = 12.0\text{Hz}, 4.1\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2 = \text{CH}_2$), 7.43 (dt, $J = 8.2\text{Hz}, 4.1\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2 = \text{CH}_2$), 7.34 - 7.22 (m, 3H, $-\text{C}_6\text{H}_5$), 7.11 (dd, $J = 9.2\text{Hz}, 1.8\text{Hz}$, 2H, $-\text{C}_6\text{H}_5$), 6.56 (d, $J =$

7.6 Hz, 1H, -NH-CO-), 5.06 (dt, $J = 7.6, 5.6$ Hz, 1H, -CH-CO-), 3.79 (s, 3H, -CH₃), 3.25 (qd, $J = 13.7$ Hz, 5.7 Hz, 2H, -CH₂-)。¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-d) δ 171.98, 167.07, 165.22, 135.74, 134.88, 129.42, 128.86, 128.48, 127.50, 126.84, 53.78, 52.69, 37.94。

2.2 Poly-L/D-PhePI 的结构表征

单体 L/D-PhePI 经过引发剂 Ni(dppp)Cl₂ 在油浴 55℃ 条件下催动均聚反应, 得到最终产物 Poly-L/D-PhePI。对单体和聚合物的结构¹H NMR 进行表征, 结果如图 2(A) 和图 2(B) 所示。聚合物 Poly-L/D-PhePI 的¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 9.14-8.56 ppm (-NHCO-, 1H), 7.74-6.88 ppm (-C₆H₅-, 5H), 6.09-5.12 ppm (苯环, 4H), 5.06-4.63 ppm (-CH-CO-, 1H), 3.89-2.83 ppm (-CH₃, 3H, -CH₂, 2H)。



A. 单体 L-PhePI 的¹H NMR; B. 单聚物 Poly-L-PhePI 的¹H NMR。

图 2 单体 L-PhePI 和 Poly-L-PhePI 的¹H NMR

聚合物结构进一步通过 FT-IR 光谱图进行表征, 如图 3 所示。红外谱图: (溴化钾, 25℃, cm⁻¹): 单体 L/D-PhePI: 3260 (V_{N-H}), 2125 (V_{NC}), 1724 (V_{C=O})。聚合物 Poly-L/D-PhePI: 3260 (V_{N-H}), 1724 (V_{C=O}), 1640 (V_{C=N})。通过凝胶渗透色谱法(柱温 40℃, 流速 1.0 mL/min, 聚苯乙烯为标样)确定聚合物 Poly-L/D-PhePI 的数均分子量 $M_n = 8.9$ kDa, 分子量分布 $M_w/M_n = 2.41$, 证明成功合成了聚合物 Poly-L/D-PhePI。

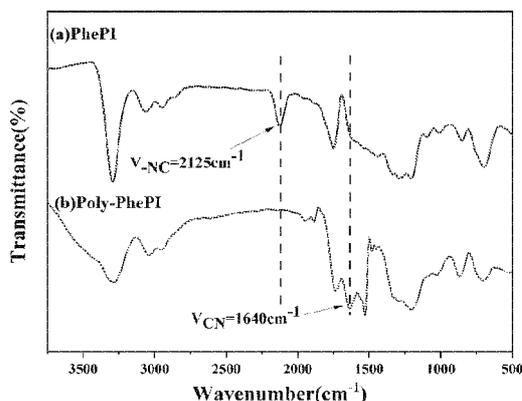


图 3 单体 L/D-PhePI 和单聚物 Poly-L/D-PhePI 的红外光谱图

2.3 Poly-L/D-PhePI 的螺旋性能表征

通过圆二色谱法(CD)和紫外-可见分光光谱法(UV-vis)的测试证实了 Poly-L/D-PhePI 的螺旋手性(如图 4 所示)。UV-vis 显示 Poly-L/D-PhePI 的最大吸收峰位于 287 nm, 而在 CD 图谱的 287 nm 处有明显一正一负的两个 Cotton 效应, 该信号来源于侧链苯丙氨酸的手性。UV-vis 图谱除 287 nm 有最大吸收峰之外在 348 nm 处还有一处吸收峰, 这个吸收峰来自于聚苯异腈主链, 而在 CD 图谱中存在对称的正反 Cotton 信号, 对比单体和单聚物的 CD 图谱, 可以看出, 同样浓度的单体的 Cotton 信号弱, 而且在 348 nm 处几乎没有吸收。进一步测试比旋光度, 单体 L/D-PhePI 和聚合物 Poly-L/D-PhePI 分别为 ± 28 和 ± 328 , 聚合物 Poly-L/D-PhePI 的比旋光度是单体 L/D-PhePI 的 12 倍左右, 这一有力数据证明来源于侧链的苯丙氨酸的手性传递致主链的螺旋结构成为左/右手螺旋。说明了合成的聚合物 Poly-L/D-PhePI 是一对新型的具有明显手性特征的螺旋聚异腈聚合物。

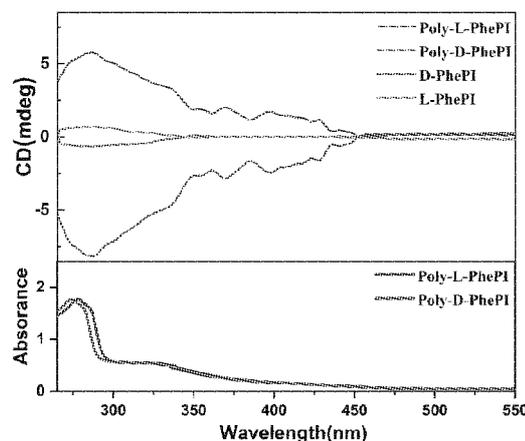


图 4 Poly-L/D-PhePI 和 L/D-PhePI 的 CD 和 UV-vis 谱图 ($c = 0.15$ mg/mL)

3 讨论

苯丙氨酸是一种具有生理活性的氨基酸, 其结构中具有的特殊芳香性官能团, 具有良好的亲脂性, 使得将苯丙氨酸设计成聚合物后应用于各种新型药物递送系统成为可能。2023 年 Bera^[14] 等人设计的一种聚苯丙氨酸包裹银纳米粒子的药物递送系统因其独特的疏水作用, 在胰岛细胞纤维化中发挥强大抑制作用。2017 年 Alzubi^[15] 设计的含有苯丙氨酸酯侧链的螺旋聚苯乙炔利用酰胺键、酯键和苯环三个官能团与锂离子的配位作

用实现了对 Li^+ 刺激响应性。我们通过分析对比单体与聚合物的 ^1H NMR 中的特征吸收峰的化学位移,位于 3.79ppm 的甲酯基、7.28 和 7.11ppm 的苯环、5.07ppm 的亚甲基以及 3.24ppm 的 $\alpha\text{-H}$ 化学位移基本保持不变,而由于聚合物分子各峰之间产生相互干扰和重叠导致了峰型钝圆的现象也与我们测得的 ^1H NMR 谱图一致。由于单体中 -NH-CO- 的氢为活泼氢,在聚合之后酰胺键由 6.57ppm 向低场移动至 9.14-8.56ppm 处;而与异腈基相连的苯环受到吸电子效应影响致使苯环的钝化,单体的化学位移位于 7.73 和 7.44ppm,在聚合之后异腈基团消失,使得聚合物的苯环向高场迁移至 5.74ppm。进一步通过红外光谱分析可知,原本出现在 2100cm^{-1} 的“异腈基”特征峰消失,在 1640cm^{-1} 出现新的“碳氮双键”的伸缩振动。由此可以说明单体 L/D-PhePI 的异腈基的不稳定“碳氮三键”经过过渡金属镍催化后断裂生成了“碳氮双键”。最后经过凝胶渗透色谱法确定聚合物 Poly-L/D-PhePI 的 $M_n = 8.9\text{kDa}$, $M_w/M_n = 2.41$ 。以上结构表征充分说明成功合成了聚合物 Poly-L/D-PhePI。

比旋光度和圆二色谱是表征化合物手性的重要手段。手性单体聚合后假如未能形成主链螺旋结构,仅只有侧链手性,根据范特霍夫光学旋转增加理论(van't Hoff Optical Rotation Addition Theory),其比旋光度不会增加,甚至会降低。通过测量单体与聚合物的比旋光度发现,聚合物的比旋光度是单体 12 倍左右,说明其比旋光度的增加不是来源于手性侧链苯丙氨酸甲酯,而是来源于聚合物主链,此结果说明主链形成了螺旋结构。CD 结果表明,在 UV-vis 有强吸收峰的 287nm、346nm 处均具有 Cotton 信号。Cotton 信号的产生说明结构具有手性因素。346nm 处吸收为亚胺的紫外吸收峰。主链亚胺结构不存在手性碳原子,其手性信号的产生必然为构象手性,即聚合物主链形成了螺旋结构。

综上,本研究合成了一个含有苯丙氨酸甲酯侧链的手性螺旋聚苯异腈。该聚合物合成步骤简单,操作简便,并且具有明显的手性征等优良特性,为开发新型给药系统药物提供了物质基础。

参考文献:

[1] WATSON J D, CRICK F H C. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid[J].

Nature, 1953, 171(4356): 737

- [2] 顾缘缘, 王曜东, 王研, 等. 含联苯侧链聚苯乙炔手性诱导体系中的溶剂致螺旋翻转[J]. 功能高分子学报, 2019, 32(6): 8
- [3] 刘鸣华. 手性导电高分子纳米结构的无手性构筑及手性分离应用[J]. 物理化学学报, 2020, 36(10): 1
- [4] ZHOU L, HE K, LIU N, et al. Recent advances in asymmetric organocatalysis based on helical polymers[J]. POLYMER CHEMISTRY, 2022, 13(27): 3967
- [5] YANG H, GUO M. Bioinspired polymeric helical and superhelical microfibers via microfluidic spinning[J]. Macromolecular Rapid Communications, 2019, 40(12): e1900111
- [6] 郭小炜, 李玉妍, 王秀丽, 等. pH 敏感水凝胶微球的制备及二甲酸钾缓释和抗菌性能分析[J]. 材料工程, 2021, 49(4): 142
- [7] 谈梦璐, 符玲, 蒋镜清, 等. 两性离子多肽 P(EK)₂(60) 修饰 GLP-1 衍生物的皮下缓释及其长效降血糖活性研究[J]. 高校化学工程学报, 2023, 37(3): 421
- [8] BRITTON D, SUN J W, RENFREW P D, et al. Design of coiled-Coil protein nanostructures for therapeutics and drug delivery[J]. Annu Rev Chem Biomol Eng, 2024, 15(13): 1
- [9] ZHANG D, ZHONG D, OUYANG J, et al. Microalgae-based oral microcarriers for gut microbiota homeostasis and intestinal protection in cancer radiotherapy[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 1413
- [10] MENG Y, WU J. One-step and facile synthesis of poly(phenylalanine) as a robust drug carrier for enhanced cancer therapy[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2021, 13(42): 49658
- [11] CAI Z, REN Y, LI X, et al. Functional isocyanide-based polymers[J]. Acc Chem Res, 2020, 53: 8573
- [12] ZHANG W M, ZHANG J, YZN J, et al. Facile fabrication of positively-charged helical poly(phenyl isocyanide) modified multi-stimuli-responsive nanoassembly capable of high efficiency cell-penetrating, ratiometric fluorescence imaging, and rapid intracellular drug release[J]. Polymer chemistry, 2018, 9(31): 4233
- [13] HAN X, ZHANG J, QIAO C Y, et al. High-efficiency cell-penetrating helical poly(phenyl isocyanide) chains modified cellular tracer and nanovectors with thiol ratiometric fluorescence imaging performance[J]. Macromolecules, 2017, 50(11): 4114
- [14] BERA A, GHOSH P, GOSWAMI K, et al. Amino acid-based polymer-coated silver nanoparticles as insulin fibril inhibitors[J]. ACS Applied Nano Materials, 2023, 6(10): 8705
- [15] ALZUBI M, ARIAS S, LOUZAO I, et al. Multipodal dynamic coordination involving cation- π interactions to control the structure of helical polymers[J]. Chem Commun, 2017, 53(61): 8573

(收稿日期: 2024-04-23)

LncRNA UCA-1 对肾细胞癌 OS-RC-2 细胞增殖、凋亡的影响及机制*

田晓玲¹, 朱栋良^{2*}, 陈莉¹, 刘满华³

(1. 咸宁市中心医院/湖北科技学院附属第一医院全科医学科, 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胃肠外科; 3. 咸宁市中心医院/湖北科技学院附属第一医院老年科)

摘要:目的 研究尿路上皮癌相关基因 1(UCA-1)对肾细胞癌 OS-RC-2 细胞恶性生物学进程的影响。方法 通过实时荧光定量 PCR 方法分析肾细胞癌组织与癌旁组织中 UCA-1 的表达;将肾细胞癌 OS-RC-2 细胞随机设置为 3 个实验组:siRNA NC 组、siRNA UCA-1 组与 LY294002 组。采用 MTT 实验方法分析 OS-RC-2 细胞的增殖速度;采用 Transwell 实验方法分析 OS-RC-2 细胞的侵袭数量;采用流式细胞术检测 OS-RC-2 细胞的凋亡情况;采用蛋白免疫印迹方法分析 PI3K/AKT 通路相关蛋白的表达。结果 与肾细胞癌旁的组织比较,肾细胞癌组织的 UCA-1 表达上调。与 siRNA NC 组比较,siRNA UCA-1 组以及 LY294002 组的 OS-RC-2 细胞增殖能力下降($P < 0.05$);OS-RC-2 细胞侵袭数量下降($P < 0.05$);OS-RC-2 细胞凋亡率增加($P < 0.05$);OS-RC-2 细胞 PI3K、AKT 蛋白表达下调($P < 0.05$)。结论 UCA-1 在肾细胞癌细胞中表达增加,抑制 UCA-1 表达后,OS-RC-2 细胞的增殖速度与侵袭数量降低,凋亡率增加,该机制与 UCA-1 调节 PI3K/AKT 信号通路相关。

关键词:尿路上皮癌相关基因 1;PI3K;增殖;AKT;肾细胞癌;凋亡;siRNA

中图分类号:R737.1

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)06-0493-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0493



Effects and Mechanisms of LncRNA UCA-1 on the Proliferation and Apoptosis of Renal Cell Carcinoma OS-RC-2 Cells

TIAN Xiao-ling, ZHU Dong-liang, CHEN Li, et al

(Department of General Medicine, Xianning Central Hospital, The First Affiliated Hospital of Hubei University of Science And Technology, Xianning Hubei 437100, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effect of urothelial carcinoma associated gene 1 (UCA-1) on the malignant biological process of renal cell carcinoma OS-RC-2 cells. **Methods** The expression of UCA-1 in renal cell carcinoma tissues and adjacent tissues was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. Renal cell carcinoma OS-RC-2 cells were randomly divided into three experimental groups: siRNA NC group, siRNA UCA-1 group and LY294002 group. The proliferation rate of OS-RC-2 cells was analyzed by MTT assay. Transwell assay was used to analyze the invasion of OS-RC-2 cells. The apoptosis of OS-RC-2 cells was detected by flow cytometry. The expression of PI3K/AKT pathway related proteins was analyzed by Western blot. **Results** The expression of UCA-1 was up-regulated in renal cell carcinoma tissues compared with adjacent renal cell carcinoma tissues. Compared with those in the siRNA NC group, in the siRNA UCA-1 and the LY294002 group the proliferation ability of OS-RC-2 cells was decreased ($P < 0.05$), the invasion number of OS-RC-2 cells was significantly decreased ($P < 0.05$), the apoptosis rate of OS-RC-2 cells was increased ($P < 0.05$), the expression levels of PI3K and AKT proteins in the OS-RC-2 cells were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of UCA-1 increases in renal cell carcinoma. After inhibiting UCA-1 expression, the proliferation rate and invasion number of OS-RC-2 cells decrease, and the apoptosis rate increases, which may be related to UCA-1 regulating the PI3K/AKT signaling pathway.

KEY WORDS: UCA-1; PI3K; Proliferation; AKT; Renal cell carcinoma; Apoptosis; siRNA

* 基金项目:湖北省卫生健康委员会面上项目(WJ2021M092)

** 通讯作者, E-mail: 83335019@qq.com

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是人类泌尿生殖系统最常见的癌症类型,它的死亡率为30%~40%,男性比女性更常见^[1]。除性别外,其他肾癌的危险因素包括肥胖、高血压、吸烟和慢性肾脏疾病。基于组织学和分子亚型,最常见的肾细胞癌类型是透明细胞癌,由于相关抑癌基因突变而经常发生^[2-3]。目前,根治性肾切除术和部分肾切除术常用于切除肾组织中的小肿瘤。然而,这些方法对肾细胞癌患者预后仍不理想^[4]。因此,寻找新的靶点对于肾细胞癌的治疗具有重要意义。

长链非编码 RNA(Long non-coding RNA, LncRNA)尿路上皮癌相关基因 1(urothelial carcinoma antigen 1, UCA-1)首次在膀胱癌中被发现,其异常激活与多种肿瘤进展相关^[5-6]。近期研究^[7-9]表明,UCA-1 能够通过激活磷脂酰肌醇 3 激酶/丝氨酸-苏氨酸激酶(phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine kinase, PI3K/AKT)通路促进肾上皮细胞葡萄糖摄取能力。然而,关于 UCA-1 与肾细胞癌细胞增殖、凋亡的关系尚不清晰。因此,本研究通过分析 UCA-1 对肾细胞癌细胞增殖、凋亡的影响,以期对肾细胞癌的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验细胞与临床样本

人肾细胞癌细胞系 OS-RC-2 细胞购自上海匹拓生物科技有限公司。从 2022 年 9 月至 2023 年 11 月间在本院诊治的 17 例肾细胞癌患者手术过程中获取癌组织与癌旁组织,并将样本组织置于液氮保存。

1.2 试剂

磷酸盐缓冲液(武汉益普生物科技有限公司);RIPA 裂解液(广州博鹭腾生物科技有限公司);脱脂奶粉(北京康瑞纳生物科技有限公司);RPMI-1640 培养基(广东环凯生物科技有限公司);MTT 试剂(无锡耐思生命科技股份有限公司);无水乙醇(上海远慕生物科技有限公司);siRNA NC、siRNA UCA-1(纯度 98.97%,上海吉玛基因公司);PI3K/AKT 通路抑制剂 LY294002(纯度 99.86%,北京擎科生物科技股份有限公司);胎牛血清(上海淳麦生物科技有限公司);脂质体 2000(上海吉至生化科技有限公司);PI3K、AKT 以及 GAPDH 单克隆抗体(上海佰利莱生物科技有限公司)。

1.3 仪器

Olympus CKX41 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);SpectraMax iD5 多功能微孔板读板机(美国 Molecular Devices 公司);S41i 摇床(美国 Eppendorf 公司);MCO-5M 细胞培养箱(日本松下公司);Bio-Rad Basic 伯乐电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 方法

1.4.1 实时荧光定量 PCR 检测 LncRNA UCA-1 的表达

按照制造商的说明,使用 TRIzol 试剂从实验样本中提取总 RNA 含量,使用 NanoDrop 分光光度计测定 RNA 浓度。随后,利用逆转录试剂对互补 DNA 进行逆转录。使用 Power SYBR green PCR master Mix 进行基因表达分析,mRNA 表达水平以 GAPDH 为标准。本研究所用引物序列见表 1。

表 1 引物序列信息

基因名称	正向引物(5',3')	反向引物(5',3')
UCA-1	ACCTGGCCAACCACTGGC	AATAGGTGAGATAGCAGA
GAPDH	CCAACCATCTCGTTUCATC	CCGGCCCAUAAATAGCTAT

1.4.2 细胞培养

将 OS-RC-2 细胞培养在含 9% 浓度胎牛血清的培养基中,待培养至贴壁时,将细胞随机分为 3 组:siRNA NC 组、siRNA UCA-1 组以及 PI3K/AKT 通路抑制剂(LY294002)组。并参照说明书步骤用脂质体 2000 转染各组 siRNA(0.1 μmol/L)以及 LY294002(10 μmol/L)至对应实验组,转染 36h 后,更换完全培养基。

1.4.3 MTT 实验检测 OS-RC-2 细胞增殖

将数量相同的 OS-RC-2 细胞培养于 96 孔板,每个实验组设置 6 个平行对照,培养 72h,在此后 12、24、36h,每孔均用 80 μL MTT 试剂在培养箱处理 2h,在酶标仪中在 570nm 处进行吸光度检测。

1.4.4 Transwell 实验统计 OS-RC-2 细胞侵袭数量

将 OS-RC-2 细胞种植在不含胎牛血清的上室培养液中,并将含 10% 胎牛血清的培养基添加到下室。每个实验组设置 6 个平行对照,将 Transwell 置于培养箱 24h。随后去掉非侵袭的 OS-RC-2 细胞,显微镜下观察侵袭细胞数量。

1.4.5 流式细胞术检测 OS-RC-2 细胞凋亡率

采用细胞凋亡检测试剂盒分析 OS-RC-2 细胞凋亡率。将 1×10^6 个 OS-RC-2 细胞转移至

500 μ L 缓冲液中,每个实验组设置 6 个平行对照,加入 10 μ L FITC Annexin V 和 10 μ L 碘化丙啶,避光情况下孵育 30min。随后磷酸缓冲液漂洗 OS-RC-2 细胞,通过流式细胞仪分析细胞凋亡率。

1.4.6 OS-RC-2 细胞中 PI3K/AKT 通路相关蛋白水平检测

使用含细胞蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液提取 OS-RC-2 细胞总蛋白,所有蛋白在 12% 聚丙烯酰胺凝胶上分离,随后将 PI3K、AKT 和 GAPDH 蛋白转移到蛋白吸附膜并与封闭缓冲液孵育。将膜与一级抗体孵育。随后,将膜与二级抗体孵育。采用 ECL 化学发光法进行可视化,GAPDH 为内参蛋白,每个实验组设置 6 个平行对照。

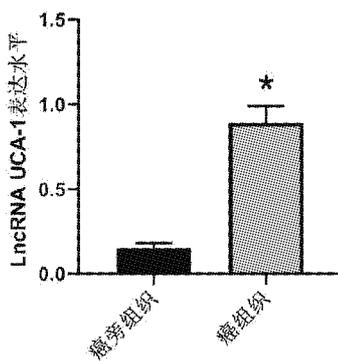
1.5 统计学方法

所有数据以均数 \pm 标准差表示,采用 Graph-Pad Prism 9 软件进行统计分析。两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有结果均代表 6 个独立实验产生的数据。

2 结果

2.1 UCA-1 在肾细胞癌组织中的表达

实时荧光定量 PCR 实验结果显示,与癌旁组织比较,肾细胞癌组织的 UCA-1 表达水平上升 (0.13 ± 0.02 vs 0.92 ± 0.11 , $P < 0.05$)。见图 1。



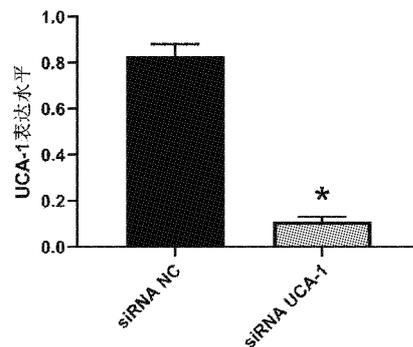
与癌旁组织相比, $*P < 0.05$, $n = 6$ 。

图 1 UCA-1 在肾细胞癌组织中的表达

2.2 UCA-1 在不同转染 OS-RC-2 细胞中的表达

实时荧光定量 PCR 实验结果显示,与 siRNA NC 组比较, siRNA UCA-1 组 OS-RC-2 细胞的 UCA-1 表达降低 (0.83 ± 0.05 vs 0.11 ± 0.02 , $P <$

0.05), 见图 2。

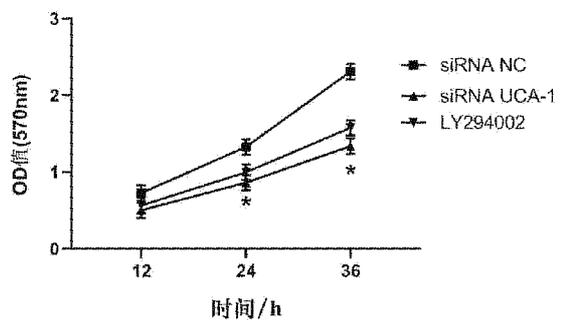


与 siRNA NC 组比较, $*P < 0.05$, $n = 6$ 。

图 2 UCA-1 在不同转染 OS-RC-2 细胞中的表达

2.3 UCA-1 对 OS-RC-2 细胞增殖的影响

MTT 实验检测发现,培养 24、36h 时,与 siRNA NC 组比较, siRNA UCA-1 组与 LY294002 组的 OS-RC-2 细胞生长速度减缓 (1.23 ± 0.08 vs 0.78 ± 0.03 vs 0.71 ± 0.06 , $P < 0.05$; 2.59 ± 0.08 vs 1.56 ± 0.15 vs 1.39 ± 0.09 , $P < 0.05$)。见图 3。



与 siRNA NC 组比较, $*P < 0.05$, $n = 6$ 。

图 3 UCA-1 对 OS-RC-2 细胞增殖的影响

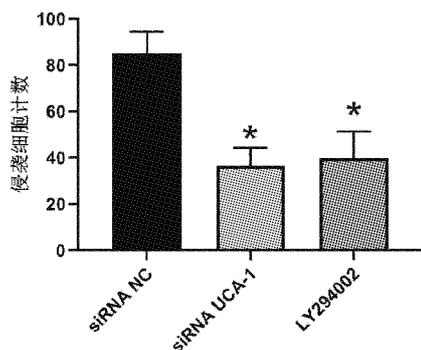
2.4 UCA-1 对 OS-RC-2 细胞侵袭的影响

Transwell 实验结果显示,与 siRNA NC 组比较, siRNA UCA-1 组与 LY294002 组的 OS-RC-2 细胞侵袭数减少 (85.23 ± 9.22 vs 36.62 ± 7.75 vs 39.83 ± 11.58 , $P < 0.05$)。见图 4 与图 5。



A. siRNA NC 组; B. siRNA UCA-1 组; C. LY294002 组。

图 4 UCA-1 对 OS-RC-2 细胞侵袭的影响(标尺:50 μ m)

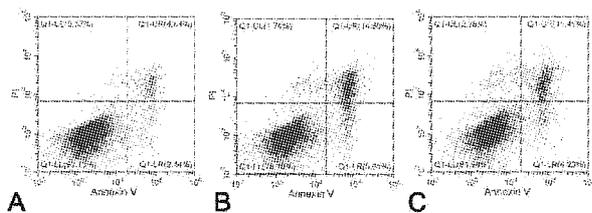


与 siRNA NC 组比较, * $P < 0.05$, $n = 6$ 。

图5 UCA-1对OS-RC-2细胞侵袭的影响

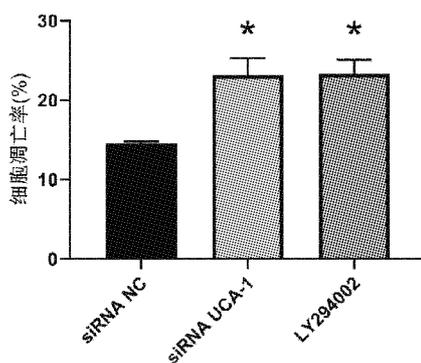
2.5 UCA-1对OS-RC-2细胞凋亡的影响

流式细胞仪分析发现,与 siRNA NC 组比较, siRNA UCA-1 组与 LY294002 组 OS-RC-2 细胞凋亡率上升(14.56 ± 0.25 vs 23.13 ± 2.15 vs 23.25 ± 1.87 , $P < 0.05$)。见图6与图7。



A. siRNA NC组; B. siRNA UCA-1组; C. LY294002组。

图6 UCA-1对OS-RC-2细胞凋亡的影响

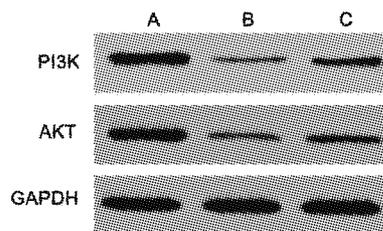


与 siRNA NC 组比较, * $P < 0.05$, $n = 6$ 。

图7 UCA-1对OS-RC-2细胞凋亡的影响

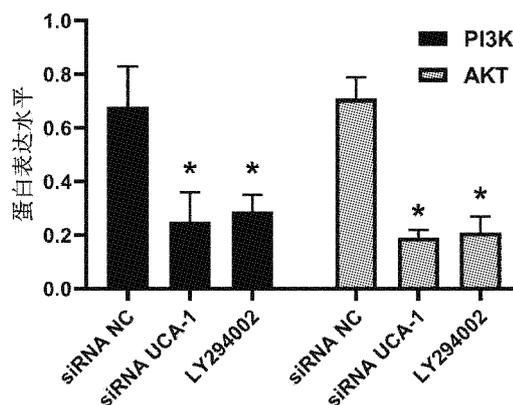
2.6 下调UCA-1对PI3K/AKT通路的影响

与 siRNA NC 组比较, siRNA UCA-1 组与 LY294002 组 OS-RC-2 细胞的 PI3K、AKT 蛋白表达水平降低(0.68 ± 0.25 vs 0.25 ± 0.11 vs 0.29 ± 0.06 , $P < 0.05$; 0.71 ± 0.08 vs 0.19 ± 0.03 vs 0.21 ± 0.06 , $P < 0.05$)。见图8与图9。



A. siRNA NC组; B. siRNA UCA-1组; C. LY294002组。

图8 UCA-1对PI3K/AKT通路的影响



与 siRNA NC 组比较, * $P < 0.05$, $n = 6$ 。

图9 UCA-1对PI3K/AKT通路的影响

3 讨论

肾细胞癌是一种具有多种遗传和表观遗传改变的癌症类型。有学者于1997年首次提出了基于分子遗传学的肾癌分类,该分类随后进入世界卫生组织肿瘤分类,温哥华国际肿瘤学协会肿瘤目录^[2]。约3%的肾细胞癌病例有常染色体显性遗传的家族背景。因此,肾细胞癌可分为散发型和遗传型。不同亚型的肾癌在导致肾癌的基因中存在不同的突变和表观遗传学改变^[4]。异常的PI3K/AKT信号通路与肿瘤增殖、迁移、侵袭和耐药相关^[10]。肾细胞癌常伴随PI3K/AKT基因表达上调,近期研究发现,尽管PI3K/AKT通路没有突变,PI3K/AKT通路在所有肾细胞癌亚型的致癌过程中都发挥着作用,PI3K/AKT通路已被证明是肾细胞癌的治疗分子靶点^[11-12]。鉴于PI3K/AKT通路在肿瘤发生中的作用,本研究通过抑制肾细胞癌OS-RC-2细胞中PI3K/AKT通路后发现,OS-RC-2细胞的增殖以及侵袭能力降低,细胞凋亡率增加。因此,PI3K/AKT通路的激活对肾细胞癌的转移具有促进作用。

据报道,UCA-1首次在膀胱癌中被发现,其异常激活与多种肿瘤恶性进展相关。例如,UCA-1

上调后能够促进非小细胞肺癌和乳腺癌细胞的增殖和迁移,并减少癌细胞凋亡^[13]。此外,在皮下移植瘤小鼠模型中,上调UCA-1后,小鼠皮下移植瘤体积增加速度加快,而抑制UCA-1表达后,小鼠皮下移植瘤体积增加速度减缓^[14]。近期研究表明,UCA-1能够通过激活PI3K/AKT通路促进肾上皮细胞葡萄糖摄取能力^[15]。然而,关于UCA-1与肾细胞癌细胞增殖、凋亡的关系尚不清晰。为进一步UCA-1对肾细胞癌细胞恶性生物学进程的影响,在本研究中,我们比较肾细胞癌组织与癌旁的组织发现,UCA-1蛋白在肾细胞癌组织中高表达。此外,体外实验分析表明,在肾细胞癌OS-RC-2细胞中,下调UCA-1水平后,肾细胞癌OS-RC-2细胞的增殖,侵袭能力受到抑制,并且OS-RC-2细胞凋亡率增加。此外,抑制UCA-1表达后,PI3K/AKT信号通路相关蛋白表达水平降低。这些研究表明,UCA-1能够调控PI3K/AKT信号通路,是一个有前景的治疗肾细胞癌新靶点。

本研究结果显示,UCA-1在肾细胞癌组织中表达上调。抑制UCA-1表达后,OS-RC-2细胞的增殖与侵袭能力下降,凋亡率上升,同时UCA-1的这一作用与调控PI3K/AKT信号通路相关。

参考文献:

- [1] 张远鹏,乐昶捷,叶聿中,等. HIF2 α 抑制剂在肾细胞癌中的研究进展[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2023,52(5):706
- [2] 田熙,徐文浩,朱殊璇,等. 2022年度肾细胞癌基础研究及临床诊疗新进展[J]. 中国癌症杂志, 2023,33(3):191
- [3] 苏伟平,吕玉琼,李鲁宏. 程序性死亡受体-配体1抑制药联合洛铂对肾细胞癌细胞上皮间质转化的作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2023,39(16):2353
- [4] 张昊,施琳. 乳头状肾细胞癌病理分型和形态谱系演变研究进展[J]. 临床与实验病理学杂志, 2023,39(4):451
- [5] KIM B E, KIM J, GOLEVA E, et al. Particulate matter causes skin barrier dysfunction[J]. JCI Insight, 2021,6(5):e145185
- [6] NTOULIA A, ANUPINDI S A, BACK S J, et al. Contrast-enhanced ultrasound: a comprehensive review of safety in children[J]. Pediatr Radiol, 2021,51(12):2161
- [7] WANG J, HU K, CAI X, et al. Targeting PI3K/AKT signaling for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Acta Pharm Sin B, 2022,12(1):18
- [8] MISHRA R, PATEL H, ALANAZI S, et al. PI3K inhibitors in cancer: clinical implications and adverse effects[J]. Int J Mol Sci, 2021,22(7):3464
- [9] 梁霄,陈虹宇,彭雪琴. MTMR6 激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进肝癌细胞侵袭[J]. 陆军军医大学学报, 2024,46(3):249
- [10] 徐思怡,彭火平,徐佳伟,等. 基于 CiteSpace 的关于乳腺癌 PI3K 信号通路的计量分析[J]. 中国医药科学, 2023,13(18):9
- [11] 王洪凯,唐浩,朱世达,等. IL-17A 通过 PI3K/Akt 通路促进肺癌 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭[J]. 现代肿瘤医学, 2023,31(13):2384
- [12] 孙建华,张逸,杨丽萍,等. 尿路上皮癌抗原 1 促进滋养细胞功能及对上皮-间质转化的调控作用[J]. 南方医科大学学报, 2023,43(11):1984
- [13] 李佳佳,伍燕平,白雪,等. UCA1 在 AML 患者骨髓组织单个核细胞中的表达及对 AML 细胞增殖凋亡调节作用观察[J]. 山东医药, 2023,63(6):1
- [14] 汪向明,严敏琴,卢林明,等. 卵巢癌组织中 LncRNA UCA1 的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2021,37(3):270
- [15] 田晓玲,李慧琼,徐焱成,等. 尿路上皮癌相关基因 1 对磷脂酰肌醇 3 激酶-丝氨酸/苏氨酸激酶信号通路和葡萄糖摄取的影响[J]. 中华糖尿病杂志, 2016,8(9):564

(收稿日期:2024-07-03)

BMP-6 介导的铁蓄积在 LPS 诱导的急性肺损伤中的作用*

李卓越,李秦汉,洪怡然,付孝菊,肖驰闯,孙燕玲,林丽**

(湖北科技学院医学部基础医学院,湖北咸宁 437100)

摘要:目的 探讨骨形态发生蛋白 6 (BMP-6) 介导的铁蓄积在脂多糖 (LPS) 诱导的急性肺损伤中的作用。方法 采用腹腔注射 LPS 建立急性肺损伤的动物模型,通过石蜡切片和苏木精-伊红 (HE) 染色法观察肺组织的病理学改变,实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测 BMP-6 和铁调素 (hepcidin) 的 mRNA 表达量,免疫印迹试验 (Western blot) 分析 BMP-6 和 hepcidin 的蛋白表达水平,比色法测定血清和肺组织铁水平。结果 大鼠注射 LPS 后,肺组织病理损伤明显,BMP-6 和 hepcidin 的 mRNA 和蛋白表达水平下降,血清和肺组织铁水平升高。结论 LPS 可能通过下调 BMP-6 和 hepcidin 的表达,导致肺部铁水平升高,从而诱导急性肺损伤的发生。

关键词:急性肺损伤;骨形态发生蛋白 6;铁调素;铁

中图分类号:R965.1

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)06-0498-004

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0498



Role of BMP-6-mediated Iron Accumulation in LPS-induced Acute Lung Injury

LI Zhuo-yue, LI Qin-han, LIN Li, et al

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

ABSTRACT; Objective To investigate the role of bone morphogenetic protein 6 (BMP-6)-mediated iron accumulation in lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury. **Methods** The acute lung injury model was established by intraperitoneal injection of LPS. The pathological changes of lung tissue were observed by paraffin section and hematoxylin-eosin (HE) staining. The mRNA and protein expression levels of BMP-6 and hepcidin were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) and Western blot respectively. The iron levels in serum and lung tissues were determined by colorimetry. **Results** After LPS injection in rats, pathological damage in lung tissues increased, the mRNA and protein expression levels of BMP-6 and hepcidin decreased, and the iron levels in serum and lung tissues increased. **Conclusion** By down-regulating the expression of BMP-6 and hepcidin, LPS increases the level of iron in lung and induces the occurrence of acute lung injury.

KEY WORDS: Acute lung injury; BMP-6; Hepcidin; Iron

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是一种临床综合征,其特征是肺泡毛细血管膜的通透性增加,导致肺水肿和气体交换功能障碍^[1]。虽然对于 ALI 的病理生理学研究已经取得了重要进展,但由于特效药物的缺乏以及常规治疗效果不佳,ALI 仍然是呼吸系统危重患者发病和死亡的主要原因。骨形态发生蛋白 6 (BMP-6) 位点与用力肺活量之间的关联在全基因组关联研究中被发现^[2]。BMP-6 对铁稳态至关重要^[3,4],在慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 患者的巨噬细胞中观察到铁水

平增加,并与肺气肿严重程度呈正相关,表明铁蓄积可能促进肺组织损伤^[5]。然而,BMP-6 在 ALI 病理过程中的作用尚不清楚。因此,本研究通过构建急性肺损伤模型,探讨 BMP-6 是否通过调节铁水平参与 ALI 的发病机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

脂多糖 (LPS) 购自美国 Sigma 公司 (货号

* 基金项目:湖北省大学生创新训练项目 (S202110927022)

** 通讯作者, E-mail: 44469295@qq.com

L2630), BMP-6 抗体购自美国 Santa Cruz 生物技术公司(货号 sc-57042), 铁调素(hepcidin)抗体购自英国 Abcam 公司(货号 ab30760), β -肌动蛋白(β -actin)抗体购自亚科因生物技术有限公司(货号 ABL1011), 血清和组织铁测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所(货号 A039-1-1、A039-2-1)。

RM2245 石蜡切片机购自德国 Leica 仪器有限公司, MDF-U53V 型号 -80℃ 超低温冰箱购自日本 Sanyo 电机株式会社, Epoch 酶标仪购自美国 BioTek 仪器有限公司, CFX Connect 荧光定量 PCR 仪和 PowerPac Basic western blot 电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物及分组

实验所用的动物为 SPF 级健康 Wistar 大鼠, 雌性, 共 16 只, 年龄 8~9 周, 体质量 180~200g, 由辽宁长生生物技术股份有限公司提供, 其动物合格证编号为 No. 211002300050341。大鼠饲养于清洁环境中, 温度为 24℃~28℃, 湿度为 40%~50%, 遵循 12h 的昼夜节律。

使用随机数字表法, 将大鼠分为 Control 组和 LPS 组, 每组 8 只。LPS 组的大鼠通过腹腔注射 LPS(10mg/kg) 来诱发急性肺损伤, 而 Control 组大鼠则接受等量的 0.9% 氯化钠溶液腹腔注射。

1.2.2 肺组织形态学观察

在 LPS 注射后 4h, 通过脊椎脱臼法处死大鼠, 并立即获取左侧肺组织。随后, 使用 4% 多聚甲醛溶液对肺组织进行固定, 固定时长为 24h。固定后的组织经过乙醇溶液的梯度脱水处理, 用二甲苯使组织透明, 石蜡包埋。石蜡包埋的组织块被切成约 5 μ m 厚的切片, 经过 HE 染色后进行封片。最后, 通过光学显微镜观察肺组织的形态学变化。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达量

使用 Trizol 试剂盒并严格遵循说明书提取大鼠肺和肝组织的总 RNA。通过 260nm 波长处的吸光度(A 值)测定来计算 RNA 浓度。逆转录反应条件为 42℃ 下 60min, 之后 95℃ 下 5min, 生成的 cDNA 在 -70℃ 下保存。基于大鼠 BMP-6、hepcidin 和 β -actin 的 GenBank 序列, 设计实时荧光定量 PCR 引物, 并由武汉擎科生物技术有限公司合成。BMP-6 mRNA 引物(201bp)序列, 上游: 5'-GTACAGACCTTGGTCCACCT-3', 下游: 5'-ATCCGAGGCAGAATCACAGC-3'; hepcidin mRNA 引物

(271bp)序列, 上游: 5'-TCTCCTGCTTCTCCTCCTG-3', 下游: 5'-TGTTATGCAACAGAGACCACA-3'; β -actin mRNA 引物(285bp)序列, 上游: 5'-GCGAGTACAACCTTCTTGCAG-3', 下游: 5'-CAATGCCGTGTTCAATGGGG-3'。PCR 扩增反应体系含有 1.5 μ L cDNA 模板、7.5 μ L 2 \times SYBR Green Master Mix、各 0.5 μ L 的上游和下游引物(10 μ mol/L)以及 5 μ L Nuclease-Free Water。PCR 反应条件包括一个变性步骤(95℃, 30s), 然后 60℃ 退火 30s 和 72℃ 延伸 50s 循环, 共进行 39 个循环。

1.2.4 免疫印迹试验测定蛋白表达水平

首先, 从组织中提取总蛋白, 并对其浓度进行测定。随后, 将提取的蛋白与 5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混合, 在沸水中加热 8min, 确保蛋白完全变性。接着利用 12% 的分离胶和 5% 浓缩胶进行电泳分离, 以湿法转膜技术将蛋白转移到 NC 膜上。使用 5% 脱脂奶粉对 NC 膜进行封闭处理, 时间为 90min。接下来, 加入稀释比例为 1:1000 的兔抗大鼠 BMP-6 抗体和 hepcidin 抗体, 于 4℃ 下孵育过夜。然后洗掉未结合的抗体, 加入稀释比例为 1:10000 的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗, 在室温下摇床孵育 60min。最后, 再次洗膜后, 采用增强化学发光法进行显色。

1.2.5 血清和肺组织铁水平测定

大鼠被适当固定后通过眼眶静脉丛采血, 将采集好的血液静置 1h, 随后以 2000rpm 的速度离心 15min, 分离并吸取上层血清。准确地称量待检测肺组织的重量, 按照重量与体积之比为 1:9 的比例, 向肺组织中加入生理盐水, 在冰水浴条件下进行机械匀浆, 以 2500rpm 的速度离心 10min, 收集上清液备用。在整个实验过程中, 严格按照试剂盒的说明指导进行操作, 并根据试剂盒提供的方法来计算血清铁浓度和组织铁含量。

1.3 统计学方法

应用 GraphPad Prism 9.0 统计软件进行数据分析。对于符合正态分布的数据, 采用独立样本 *t* 检验来对比不同组别, 对于不符合正态分布的数据, 则应用秩和检验来进行比较。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织形态学变化

在 Control 组大鼠肺组织中, 支气管和肺泡保持了正常的结构和完整性, 同时肺间质内未见异

常的炎症细胞积聚;相比之下,LPS组大鼠肺组织支气管和肺泡壁增厚,且观察到肺泡腔扩大,肺泡隔宽度增加,见图1。

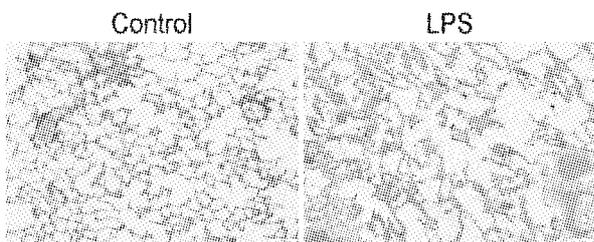
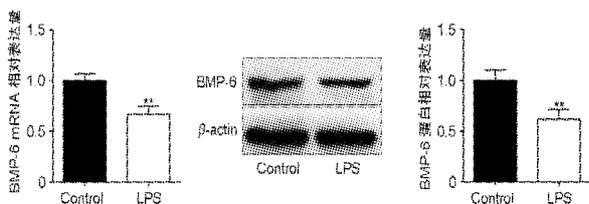


图1 两组大鼠肺组织病理学变化结果($\times 200$)

2.2 肺组织 BMP-6 mRNA 和蛋白表达水平

与 Control 组相比,LPS 组大鼠肺组织的 BMP-6 mRNA 和蛋白表达水平明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图2。

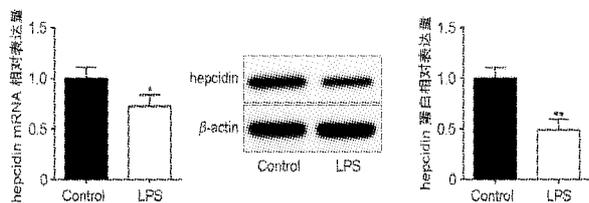


与 Control 组比较, $*P < 0.01, n = 8$ 。

图2 两组大鼠肺组织 BMP-6 mRNA 和蛋白表达水平比较

2.3 肝组织 hepcidin mRNA 和蛋白表达水平

与 Control 组相比,LPS 组大鼠肝组织的 hepcidin mRNA 和蛋白表达水平明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),见图3。

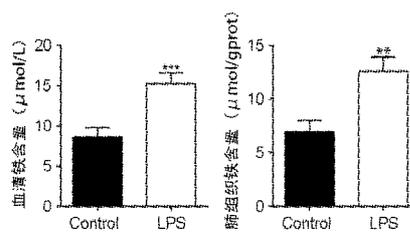


与 Control 组比较, $*P < 0.05, **P < 0.01, n = 8$ 。

图3 两组大鼠肝组织 hepcidin mRNA 和蛋白表达水平比较

2.4 血清和肺组织铁水平

与 Control 组相比,LPS 组大鼠的血清和肺组织的铁水平均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01, P < 0.001$),见图4。



与 Control 组比较, $**P < 0.01, ***P < 0.001, n = 8$ 。

图4 两组大鼠血清和肺组织铁水平比较

3 讨论

ALI 是急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的早期阶段,是由多种因素(如感染、创伤等)引起的临床综合症。其发病机制主要涉及炎症反应和细胞损伤,炎症细胞分泌细胞因子和炎症介质,导致肺毛细血管通透性增加和肺泡上皮细胞损伤,从而引起肺水肿和气体交换障碍。此外,氧化应激、凝血与纤溶系统的失衡也在 ALI 的发生发展中起到关键作用,这些因素共同作用,最终导致严重的呼吸困难和低氧血症^[6]。脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁的一种成分,它能够激发强烈的免疫反应,通过注射小剂量的 LPS 来模拟细菌感染,引起肺部的炎症反应,包括免疫细胞的募集和激活,以及细胞因子和炎症介质的释放。此模型可以有效地模拟人类 ALI 的许多特征,如肺水肿、肺泡出血和气体交换功能受损^[7]。因此,本实验采用腹腔注射 LPS 建立急性肺损伤模型,结果显示,注射 LPS 后,大鼠肺组织支气管和肺泡壁增厚,且观察到肺泡腔扩大,肺泡隔宽度增加。

在 CHARGE 和 SpiroMeta 联盟最近进行的全基因组关联研究的分析中,发现了6个与用力肺活量相关的新位点,包括编码骨形态发生蛋白(BMP)-6的基因。BMP亚家族最初被认为是一个诱导异位软骨和骨形成的蛋白质家族,但在过去的几年里,越来越多的数据表明 BMP 参与了各种器官的发育和体内平衡^[2]。BMP-6 对铁稳态至关重要,因为它是 hepcidin 的重要调节剂^[3,4]。Hepcidin 是一种富含半胱氨酸的氨基酸阳离子肽,由肝脏合成分泌,并通过负反馈调控机体铁水平^[8]。当 BMP-6 表达升高时,通过与 BMP 共受体 haemojuvelin(HJV)结合,促进 Smad1、5 和 8 的磷酸化,磷酸化的 Smad1、5 和 8 随后与 Smad4 相互作用形成 Smad 复合物并被运输到细胞核,该复合物在细胞核中与 hepcidin 启动子内的 BMP 反应元件结合,使 hepcidin 表达增加。Hepcidin 可与

膜铁转运蛋白1(ferroportin1, FPN1)结合,从而诱导其在肝细胞、巨噬细胞和肠上皮细胞内泛素化、内吞和溶酶体降解,并限制铁从结合物释放入血,进而降低铁水平^[9]。

Verhamme等^[10]的研究发现,在COPD患者的肺部中,BMP-6 mRNA的表达和蛋白水平显著降低。本研究结果显示,LPS处理后大鼠肺组织BMP-6 mRNA的表达和蛋白水平下降,这与Verhamme的研究结果一致。且LPS组肝组织hepcidin mRNA的表达和蛋白水平也降低,而血清和肺组织的铁水平升高,提示LPS通过降低肺组织BMP-6表达,使hepcidin表达下降,并通过负反馈升高铁水平,导致肺部铁蓄积。铁在肺部的积累会通过氧化应激导致组织损伤和炎症,进而诱导急性肺损伤。

综上所述,LPS可能通过下调BMP-6和hepcidin的表达,促进肺部铁水平升高蓄积,进而诱导急性肺损伤的发生。本研究分析了急性肺损伤时BMP-6和hepcidin的表达,以及肺部的铁水平,但LPS诱导急性肺损伤的具体机制仍需进一步探究。后续研究将致力于揭示LPS、BMP-6、hepcidin和铁之间的分子交互网络,包括可能的信号传导路径和转录调控机制,通过增设更多实验组与对照组以及临床样本分析,进一步验证BMP-6在急性肺损伤中的作用,并探索其作为潜在治疗靶点的可能性,从而为干预该疾病进程提供新的策略。

参考文献:

- [1] LONG M E, MALLAMPALLI R K, HOROWITZ J C. Pathogenesis of pneumonia and acute lung injury[J]. Clin Sci (Lond), 2022, 136(10):747
 - [2] LOTH D W, SOLER A M, GHARIB S A, et al. Genome-wide association analysis identifies six new loci associated with forced vital capacity[J]. Nat Genet, 2014, 46(7):669
 - [3] ANDRIOPOULOS B J, CORRADINI E, XIA Y, et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism[J]. Nat Genet, 2009, 41(4):482
 - [4] LIM P J, DUARTE T L, AREZES J, et al. Nrf2 controls iron homeostasis in haemochromatosis and thalassaemia via Bmp6 and hepcidin[J]. Nat Metab, 2019, 1(5):519
 - [5] PHILIPPOT Q, DESLÉE G, ADAIR-KIRK T L, et al. Increased iron sequestration in alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease[J]. PLoS One, 2014, 9(5):e96285
 - [6] MOWERY N T, TERZIAN W T H, NELSON A C. Acute lung injury[J]. Curr Probl Surg, 2020, 57(5):100777
 - [7] MOKRÁ D. Acute lung injury—from pathophysiology to treatment[J]. Physiol Res, 2020, 69(Suppl 3):S353
 - [8] GINZBURG Y Z. Heparin and its multiple partners: complex regulation of iron metabolism in health and disease[J]. Vitam Horm, 2023, 123:249
 - [9] XIAO X, ALFARO-MAGALLANES V M, BABITT J L. Bone morphogenetic proteins in iron homeostasis[J]. Bone, 2020, 138:115495
 - [10] VERHAMME F M, DE SMET E G, HOOSTE W V, et al. Bone morphogenetic protein 6 (BMP-6) modulates lung function, pulmonary iron levels and cigarette smoke-induced inflammation[J]. Mucosal Immunol, 2019, 12(2):340
- (收稿日期:2024-06-04)
-
- (上接第476页)
- [3] SANDHU S S, ROUZ S K, KUMAR S, et al. Ursolic acid: a pentacyclic triterpenoid that exhibits anticancer therapeutic potential by modulating multiple oncogenic targets[J]. Biotechnol Genet Eng Rev, 2023, 4:1
 - [4] TANG Z, DONG H, LI T, et al. The synergistic reducing drug resistance effect of cisplatin and ursolic acid on osteosarcoma through a multistep mechanism involving ferritinophagy[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021:5192271
 - [5] MO Y, ZOU Z, CHEN E. Targeting ferroptosis in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatol Int, 2024, 18(1):32
 - [6] KADIA T M, RAVANDI F, MOLICA M, et al. Phase II study of cladribine, idarubicin, and ara-C (CLIA) with or without sorafenib as initial therapy for patients with acute myeloid leukemia[J]. Am J Hematol, 2023, 98(11):1711
 - [7] YOUSEF E H, EL-MAGD N F A, EL GAYAR A M. Norcantharidin potentiates sorafenib antitumor activity in hepatocellular carcinoma rat model through inhibiting IL-6/STAT3 pathway[J]. Transl Res, 2023, 260:69
 - [8] ABDU S, JUAID N, AMIN A, et al. Therapeutic effects of crocin alone or in combination with sorafenib against hepatocellular carcinoma: in vivo & in vitro insights[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(9):1645
 - [9] DENG J, PENG M, WANG Z, et al. Novel application of metformin combined with targeted drugs on anticancer treatment[J]. Cancer Sci, 2019, 110(1):23
 - [10] MO Y, ZOU Z, CHEN E. Targeting ferroptosis in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatol Int, 2024, 18(1):32
 - [11] LUO F, ZHAO J, LIU S, et al. Ursolic acid augments the chemosensitivity of drug-resistant breast cancer cells to doxorubicin by AMPK-mediated mitochondrial dysfunction[J]. Biochem Pharmacol, 2022, 205:115278
 - [12] LI H, YU Y, LIU Y, et al. Ursolic acid enhances the antitumor effects of sorafenib associated with Mcl-1-related apoptosis and SLC7A11-dependent ferroptosis in human cancer[J]. Pharmacol Res, 2022, 182:106306
 - [13] CHEN J, ZHOU S, ZHANG X, et al. S-3'-hydroxy-7',2',4'-trimethoxyisoxane, a novel ferroptosis inducer, promotes NSCLC cell death through inhibiting Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Front Pharmacol, 2022, 13:973611
- (收稿日期:2024-05-08)

肠道菌群结构特征与早产认知障碍大鼠的相关性研究*

杨 祺¹, 张诗懿¹, 但志威¹, 赵志伟², 周雄飞^{3**}, 黄玮玲^{2**}

(1. 湖北科技学院临床医学院, 湖北 咸宁 437100; 2. 湖北科技学院附属第一医院;
3. 湖北科技学院临床医学院/全科医学国家级实验教学示范中心)

摘要:目的 通过高通量测序的方法来分折早产合并认知障碍大鼠的肠道菌群结构特征,探讨两者的相关性。方法 对怀孕16~17d的SD大鼠连续2d腹腔注射脂多糖(LPS),孕21d时行剖宫术,将早产大鼠随机分配给代母鼠喂养,建立早产认知障碍大鼠模型(LPS组);同时,腹腔注射PBS结合自然分娩作为对照组(Con组)。两组大鼠乳鼠出生30d后,应用Morris水迷宫定位航行实验检测早产大鼠的认知功能;Western blot法和实时定量PCR(qPCR)法检测大鼠海马组织中BDNF表达水平;采用HE染色观察两组大鼠海马组织病理改变;对大鼠粪便进行16S rRNA高通量测序分析其肠道菌群结构特征,并与认知功能进行相关性分析。结果 Morris水迷宫结果显示,LPS组大鼠找到指定平台的平均时间明显长于Con组($P < 0.05$);Western blot和qPCR结果显示,LPS组BDNF表达减少;HE染色显示,LPS组CA1区和DG区神经细胞浓染增多,DG区神经细胞数量减少,排列稀疏,提示LPS组大鼠海马体神经受损;16S rRNA肠道菌群检测结果显示,LPS组较Con组肠道菌群丰富度及多样性有下调趋势,肠道放线菌门、厚壁杆菌门、拟杆菌门降低($P < 0.05$)。结论 早产认知障碍大鼠肠道菌群结构发生明显变化,肠道菌群与早产儿脑发育存在相关性,寻找早产儿认知障碍关键功能菌,可为早产儿认知障碍的早期诊断及干预提供新思路。

关键词:早产儿;脂多糖;认知功能障碍;肠道菌群;高通量测序

中图分类号:R722.6

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)06-0502-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0502



Correlation Between Structural Features of Intestinal Flora and Preterm Cognitively Impaired Rats

YANG Qi, ZHOU Xiong-fei, HUANG Wei-ling, et al

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

ABSTRACT: Objective To analyze the structural features of intestinal flora in preterm rats with cognitive impairment via high-throughput sequencing, and to explore the correlation between these two characteristics. **Methods** SD rats were subjected to intraperitoneal injections of lipopolysaccharide (LPS) for two consecutive days at 16-17 days. Cesarean section was performed on the day 21 of pregnancy, and the preterm rats were randomly assigned to the healthy maternal rats for feeding, and established a model of cognitively impaired preterm rats (LPS group). In parallel, rats in the control group (Con group) received intraperitoneal injections of PBS combined with natural delivery. The place navigation test in the Morris water maze was used to evaluate cognition on day 30 after birth. The expression level of BDNF in the hippocampal tissue were measured via real-time quantitative PCR and Western blot. Pathological changes in the hippocampus tissue of the rats in both groups were observed by HE staining. The structural features of the intestinal flora were analyzed through 16S rRNA high-throughput sequencing of fecal samples, and a correlation analysis was conducted with the cognitive function. **Results** The Morris water maze results indicated that the average evasion latency of rats in the LPS group was significantly longer than that of the Con group ($P < 0.05$). Western blot and qPCR results demonstra-

* 基金项目:湖北省大学生创新训练项目(S202210927034);湖北科技学院附属第一医院项目(2020XYB001)

** 通讯作者, E-mail: 814882747@qq.com; 1036604240@qq.com

ted a decrease in BDNF expression in the LPS group. HE staining revealed an increase density of neurons in the CA1 and DG regions in the LPS group, along with a reduction in the number of neuronal and a sparse arrangement in the DG region, suggesting that neuronal damage occurred in the LPS group. 16S rRNA intestinal flora assay results revealed a trend toward reduced richness and diversity in the intestinal flora of the LPS group compared with the Con group, with reductions in the Actinobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes phylum ($P < 0.05$). **Conclusion** The structure of intestinal flora in cognitively impaired preterm rats is significantly altered, indicating a correlation between intestinal flora and brain development in preterm infants. The identified of key functional bacteria associated with cognitive impairments in preterm infants can provide new insights for the early diagnosis and intervention strategies.

KEY WORDS: Preterm infant; LPS; Cognitive dysfunction; Intestinal flora; High-throughput sequencing

随着医疗科技的发展,早产儿的存活率大幅提高,但早产儿由于过早脱离母胎,容易受到各种不良因素的影响,导致脑损伤及认知功能障碍。据文献报道^[1],有50%存活的早产儿在发育过程中会出现认知功能障碍。患有认知功能障碍的早产儿常表现为注意力无法集中,记忆力、计算力、思维判断力、定向力、执行力等较正常体重出生的同龄人相比偏差大,从而导致社会功能大幅下降,甚至无独立生活能力,需要家庭和社会的终身照料。大脑早期具有良好的可塑性和适应能力,早期的预防和干预是防治早产儿认知功能障碍的有效途径。导致认知功能障碍的因素较为复杂,已有研究发现^[2],肠道菌群可通过肠-脑轴影响大脑的发育,然而认知功能障碍早产儿的肠道菌群如何分布,以及丰富度较正常幼儿有何变化却少有研究。基于此,本文旨在通过对建立的早产认知功能障碍模型组大鼠进行16S rRNA高通量测序实验,研究模型组大鼠肠道菌群的结构特征,探讨早产儿肠道菌群与认知功能障碍的相关性,为早产儿认知功能障碍的防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

脂多糖(LPS,美国Sigma公司);BDNF抗体(ABclonal,武汉);HRP标记二抗购于biosharp公司;ECL试剂盒购于大连美仑生物技术有限公司;DEPC水购于碧云天生物技术有限公司;逆转录5试剂盒(vazyme, R323-01);荧光定量试剂盒(vazyme, Q511-02);Illumina NovaSeq测序平台。

1.2 方法

1.2.1 实验动物及分组

SPF级健康雌雄SD大鼠各3只,于华中科技大学同济医学院实验动物中心购入[动物合格证号SCX K(鄂)2008-004],体质量170~210g,饲养条件为12h光照/d,相对湿度40%~62%,不

限饮水。大鼠交配怀孕后,对怀孕16~17d的SD大鼠连续2d腹腔注射脂多糖(LPS),孕21d时行剖宫术,将早产大鼠随机分配给代母鼠喂养,建立早产认知障碍大鼠模型(LPS组)。同时,腹腔注射PBS结合自然分娩作为对照组(Con组),两组各8只,两组乳鼠饲养一个月(30d)后开始后续实验。

1.2.2 Morris水迷宫实验

采用Morris水迷宫实验评价大鼠的学习记忆认知功能。实验前,将水温控制在 $(25.0 \pm 2)^\circ\text{C}$,使平台在水面下约1cm处。实验时,在目标象限(平台所在象限)的对面象限面对池壁将大鼠放入水中,记录其运动轨迹和找到平台所用时间,即潜伏期(s),最长潜伏期为90s。如果大鼠在90s内未找到平台,潜伏期记录为90s,并引导小鼠在平台上停留30s。单次实验结束后立即将实验大鼠擦干后放入饲养笼中,预防其感冒。实验连续进行6d,测试结果以大鼠6d的运动轨迹及潜伏期的平均值作为评价大鼠学习记忆认知功能的指标。

1.2.3 大鼠粪便样本采集

两组大鼠乳鼠出生后30d收集粪便标本,采用按揉大鼠腹部或搔刮法刺激肛周促进其排便,随后立即将新排出的粪便颗粒按编号依次分装于相应编号的无菌离心管中,收集标本封口后立即放入 -80°C 冰箱保存,随即用于16S rRNA检测。

1.2.4 Western blot实验

两组大鼠处死后,迅速于冰上取脑,两组各取5个用于本次Western blot实验,剩余的10个标本(两组各5个)放于 -80°C 冰箱中保存,用于后续HE染色实验。取出的海马用0.1g组织加1mL蛋白裂解液的比例提取组织蛋白。使用常规WB流程来检测各组大鼠大脑海马组织中BDNF的蛋白含量。

1.2.5 qPCR实验

常规TRIzol法提取总RNA,逆转录成cDNA后用荧光定量PCR试剂盒将各组样本的cDNA进

行 qPCR 反应, BDNF 引物序列: 上游 5'-ACA GTA TTA GCG AGT GGG TGA C-3', 下游 5'-GAA CAT ACG ATT GGG TAG TTC G-3', 以 β -action 作内参, 最终以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算胶原合成相关目的基因的 mRNA 表达水平变化。

1.2.6 HE 染色实验

将保存的鼠脑取出, 解冻后先置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24h, 使用常规梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡浸润并包埋成块, 然后在石蜡切片机上行连续冠状切片, 片厚为 $5\mu\text{m}$, 贴于粘附性载玻片上。切片按常规 HE 染色步骤操作, 染色完成后, 在 olympus BX53 显微成像系统中观察摄片。

1.2.7 16S rRNA 检测

小鼠粪便样本的 16S rRNA 测序由赛维尔生物科技有限公司(武汉)完成, 步骤如下: 对两组大鼠的样品总 DNA 提取后, 根据保守区设计得到引物, 在引物末端加上测序接头, 进行 PCR 扩增并对其产物进行纯化、定量和均一化形成测序文库, 并进行文库质检, 使用 Illumina NovaSeq 6000 对质检合格的文库进行测序, 然后对所得的两组样品进行 OTU 聚类分析、菌群多样性分析、菌群群落结构等分析。

1.3 统计学方法

Morris 水迷宫定位航行实验, Western blot 及 qPCR 实验的结果数据均用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 通过 t 检验进行差异分析的统计后, 使用 GraphPad Prism 8.0 作图。16S rRNA 检测的实验数据使用 Trimmomatic v0.33 和 cutadapt 1.9.1 进行质量过滤后, 采用 DADA2 方法进行去噪得到有效数据, 并根据数据结果绘制香农指数曲线、稀释性曲线判断数据可靠性。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫定位航行实验

用于实验的模型组大鼠平均体重为 $(106.00 \pm 8.00)\text{g}$, 正常对照组大鼠的平均体重为 $(107.00 \pm 7.00)\text{g}$, 模型组与对照组平均体重的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

在定位航行实验中, 模型组大鼠的平均逃避潜伏期为 $(71.87 \pm 5.00)\text{s}$, 明显长于正常对照组 $(49.18 \pm 4.00)\text{s}$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明模型组学习与记忆能力受到损害(结果见表 1、图 1)。

表 1 各组逃避潜伏期平均值比较 $(\bar{x} \pm s, n = 8)$

组别	第1d	第2d	第3d	第4d	第5d	第6d	平均/s
Con组	82.92±1.20	77.00±3.20	57.06±4.55	36.76±7.62	26.28±4.08	14.83±3.60	49.18±4.00*
LPS组	90.00±0.00	89.60±0.60*	72.34±2.00*	68.50±1.20*	53.26±5.00*	47.32±4.20**	71.87±5.00*

与 Con 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ 。

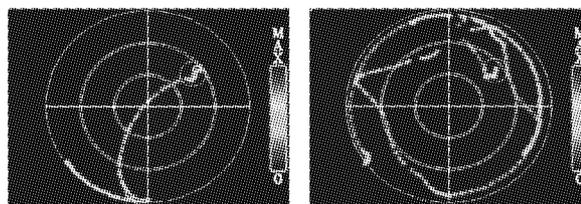
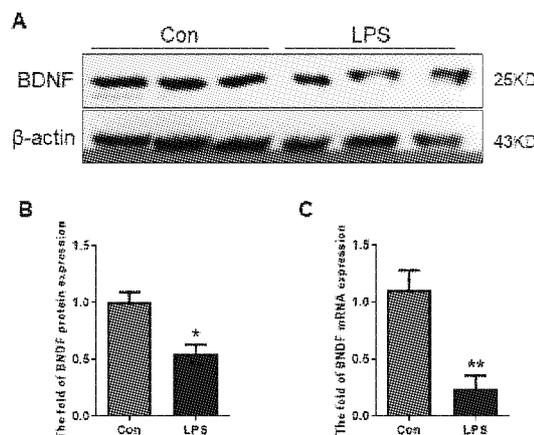


图 1 各组游泳路径比较

2.2 Western blot 及 qPCR 实验

实验结果如图 2 所示, LPS 组 BDNF 蛋白条带更细, 颜色较浅, 表明模型组大鼠的 BDNF 蛋白表达量明显减少。PCR 结果显示模型组 BDNF 表达水平明显低于对照组。



A, B. Western blot 检测结果及其统计分析图; C. qPCR 检测结果统计分析图。与 Con 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01, n = 3$ 。

图 2 两组样本 BDNF 表达水平

2.3 海马组织标本切片 HE 染色

HE 染色显示, LPS 组 CA1 区和 DG 区神经细胞浓染增多, DG 区神经细胞数量减少, 排列稀疏, 提示 LPS 组大鼠海马体神经受损, 如图 3 所示。

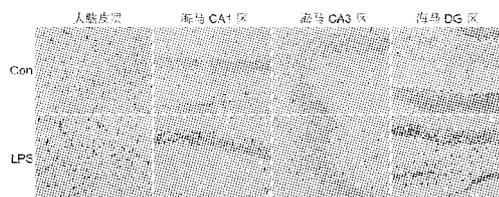


图 3 各组脑组织不同区域 HE 染色 ($\times 400$ 倍)

2.4 大便 16S rRNA 高通量测序

2.4.1 香农指数曲线

由图 4 可见,两组肠道菌群的香农指数曲线均趋于平坦,表明本次测量数据覆盖区域大,数据具有可靠性,可进行后续的多多样性分析。

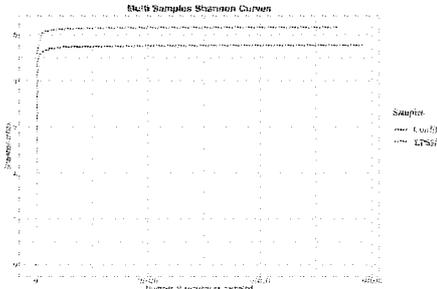


图 4 两组大鼠肠道菌群的香农指数曲线

2.4.2 稀释性曲线分析

由图 5 可见,数据曲线趋于平缓,证明本次数据样本量充分,可以进行后续的数据分析。

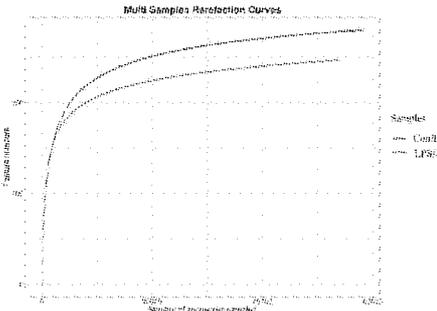


图 5 两组大鼠肠道菌群稀释性曲线

2.4.3 Alpha 多样性指数统计分析

通过 Alpha 多样性检测(表 2)发现,与 Con 组相比,LPS 组大鼠肠道菌群各指标数值虽有下调趋势,但并不具有统计学意义($P > 0.05$)。由此可见,LPS 不能改变大鼠肠道菌群种类。

表 2 两组肠道菌群的多样性指数比较

组别	Chao1 指数	Ace 指数	香农指数	辛普森指数	PD-whole-tree 指数
Con 组(n=5)	290.5±19.2	293.153±62.8	4.7687±1.3	0.8976±0.2	19.1086±2.4
LPS 组(n=8)	264.7692±26.3	263.0411±43.0	4.1632±0.8	0.7086±0.1	16.3817±1.9

2.4.4 Con 组与 LPS 组大鼠肠道菌群在门、目、科、属水平优势菌群的比较

在门水平上(表 3),两组样本菌群主要由厚壁杆菌门、拟杆菌门、放线菌门构成,其中,厚壁杆菌门和拟杆菌门为两组大鼠肠道菌群的优势菌群,LPS 组大鼠肠道菌群中放线菌门降低($P < 0.05$);厚壁杆菌门、拟杆菌门明显降低($P <$

0.01);在目、科、属水平上(表 4、表 5、表 6),选取 11 种优势菌群进行比较;LPS 组伯克氏菌科升高($P < 0.05$),毛螺菌目明显升高($P < 0.01$),S-24、Lachnoclostridium 显著升高($P < 0.001$);而拟普雷沃氏菌属、副杆菌属明显降低($P < 0.01$),乳杆菌目、颤藻目、双歧杆菌目、芽孢杆菌目、唾液联合杆菌属显著降低($P < 0.001$)。

表 3 两组大鼠肠道菌群门水平优势菌群比较($\bar{x} \pm s$,个)

组别	厚壁杆菌门	拟杆菌门	放线菌门
Con 组(n=5)	43260±4086.3	21849±2211.4	1382±659.4
LPS 组(n=8)	30320±5090.3 **	12343±4268.1 **	570±240.1 *

与 Con 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 4 两组大鼠肠道菌群目水平优势菌群比较($\bar{x} \pm s$,个)

组别	乳杆菌目	毛螺菌目	颤藻目	双歧杆菌目	芽孢杆菌目
Con 组(n=5)	3048±1474.1	587±98.5	1803±451.7	1125±410.9	572±39.9
LPS 组(n=8)	2385±1803.7 ***	2821±923.1 **	226±43.5 ***	121±27.6 ***	115±36.9 ***

与 Con 组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

表 5 两组大鼠肠道菌群科水平优势菌群比较($\bar{x} \pm s$,个)

组别	伯克氏菌科	S-24
Con 组(n=5)	235±53.6	8953±758.4
LPS 组(n=8)	996±412.2 *	17235±2141.9 ***

与 Con 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

表 6 两组大鼠肠道菌群属水平优势菌群比较($\bar{x} \pm s$,个)

组别	拟普雷沃氏菌属	副杆菌属	Lachnoclostridium (拉赫诺梭菌)	唾液联合杆菌属
Con 组(n=5)	1234±745.3	996±459.5	0±0	15046±1757.3
LPS 组(n=8)	23±12.3 **	235±89.7 **	2111±777.7 ***	224±63.9 ***

与 Con 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

3 讨论

大脑早期具有良好的可塑性和适应能力,早期的预防和干预是防治早产儿认知功能障碍的最有效途径。已有研究发现^[2],肠道菌群可通过肠-脑轴影响大脑的发育。因此,研究早产认知障碍模型大鼠的肠道菌群分布及丰富度,寻找其中的相关性及其差异,有望为早产儿认知功能障碍的防治提供新思路。

大脑发育受到肠道微生物群的影响,其可能的作用机制有脑肠轴、神经内分泌方式、免疫方式等^[3];有研究表明,肠道菌群通过 MGB 下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴与大脑双向连接^[4-5];Diaz 等人的研究发现肠道细菌可调节突触素表达和突触后密度-95,参与兴奋性突触成熟^[6]。肠道菌群还参与小胶质细胞的发育,小胶质细胞是大脑中的

主要免疫细胞。补充肠道微生物群和短链脂肪酸(SCFA)、含有乙酸丙酸和丁酸的细菌发酵产物,可以恢复有缺陷的小胶质细胞^[7]。这些证据都表明了肠道菌群与大脑发育存在紧密联系,相关肠道细菌的缺陷或肠道菌群的紊乱可能会影响大脑的发育,进而发生认知功能障碍。

在本研究中,首先通过水迷宫实验、海马组织HE染色、免疫组化印迹实验及qPCR实验筛选出了符合早产合并认知功能障碍条件的大鼠;在水迷宫实验中,与Con组相比,LPS组大鼠找到平台的时间明显延长,提示认知功能障碍;通过对两组大鼠的大脑海马体区分别进行HE染色发现LPS组大鼠CA1区和DG区神经细胞浓染增多,DG区神经细胞数量减少,排列稀疏,提示LPS组大鼠海马体神经受损;通过免疫组化印迹实验及qPCR实验发现LPS组大鼠的BDNF蛋白的表达有明显降低,进一步说明了LPS组大鼠出现了脑发育不良及认知功能障碍。

此后,采用16S rRNA高通量测序检测大鼠粪便,发现LPS组肠道菌群种类及分布与正常组对比有明显差异,主要表现为丰富度及多样性下降。门水平上,大鼠肠道菌群中放线菌门降低;厚壁杆菌门、拟杆菌门明显降低;在目、科、属水平上,LPS组伯克氏菌科升高,毛螺菌目明显升高,S-24、Lachnoclostridium显著升高;而拟普雷沃氏菌属、副杆菌属明显降低,乳杆菌目、颤藻目、双歧杆菌目、芽孢杆菌目、唾液联合杆菌属显著降低。短链脂肪酸(SCFAs)通过作用于神经干细胞(NSC)的线粒体促进成体神经发生^[8],普氏菌属、乳杆菌属、拟杆菌目、普雷沃氏菌属可产生SCFAs。SCFAs还可调节免疫细胞功能,而中枢神经系统功能受到免疫应答和炎症的影响^[9]。毛螺菌目、伯克氏菌科、丹毒丝杆菌属、埃希氏-志贺菌属、Lachnoclostridium属、丰度增加往往会导致炎症因子长期过量的释放。

基于肠道微生物组-脑研究,LPS组大鼠补充芽孢杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌等有益菌群,或可改善认知功能障碍。这意味着调节肠道菌群可能为认知功能障碍的治疗提供新思路;SarKar等^[10]研究发现,肠道菌群失调会破坏肠-脑轴,并有效地导致精神疾病,对模型大鼠使用木糖低聚糖和槲皮素可使乳酸菌、双歧杆菌门恢复活力,从而改

善认知功能。

综上所述,早产认知障碍大鼠的肠道菌群结构发生了显著变化,肠道菌群与大脑发育存在相关性。随着对脑肠轴及其相关作用机制的深入探索,未来有望发现治疗或干预早产儿认知功能障碍的新思路。同时,这也要求学术界更加全面地了解哪些大脑细胞受到细菌代谢物的影响,从而能够开发出更具针对性的治疗方法。

参考文献:

- [1] BIAŁECKA-DEBEK A, GRANDA D, SZMIDT M K, et al. Gut microbiota, probiotic interventions, and cognitive function in the elderly: a review of current knowledge[J]. *Nutrients*, 2021, 13(8):2514
- [2] LI H, NI J, QING H. Gut microbiota: critical controller and intervention target in brain aging and cognitive impairment[J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13:671142
- [3] MACPHERSON A, PACHNIS V, PRINZ M. Boundaries and integration between microbiota, the nervous system, and immunity[J]. *Immunity*, 2023, 56(8):1712
- [4] CRYAN J F, ORIORDAN K J, COWAN C S M, et al. The microbiota-gut-brain axis[J]. *Physiol Rev*, 2019, 99:1877
- [5] MISIAK B, ŁONIEWSKI I, MARLICZ W, et al. The HPA axis dysregulation in severe mental illness: can we shift the blame to gut microbiota? [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2020, 102:109951
- [6] DIAZ HEIJTZ R, WANG S, ANUAR F, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(7):3047
- [7] ERNY D, HRABĚ DE ANGELIS A L, JAITIN D, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS[J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(7):965
- [8] RIBEIRO M F, SANTOS A A, AFONSO M B, et al. Diet-dependent gut microbiota impacts on adult neurogenesis through mitochondrial stress modulation[J]. *Brain Commun*, 2022, 2(2):165
- [9] DALILE B, VAN OUDENHOVE L, VERVLIEET B, et al. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(8):461
- [10] SARKAR S R, MAZUMDER P M, BANERJEE S. Oligosaccharide and flavonoid mediated prebiotic interventions to treat gut dysbiosis associated cognitive decline[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2022, 17(1-2):94

(收稿日期:2024-05-13)

混合感染对儿童肺炎支原体肺炎并胸腔积液的影 响分析

周芷如

(咸宁市中心医院/湖北科技学院附属第一医院,湖北 咸宁 437100)

摘要:目的 对比混合肺炎支原体感染及单纯肺炎支原体感染的肺炎合并胸腔积液患者临床特点,探索肺炎支原体肺炎并胸腔积液混合感染的早期识别因素。**方法** 回顾性分析于我院儿内科住院并诊断为肺炎支原体肺炎合并胸腔积液患儿,根据病原学结果分为混合性肺炎支原体肺炎组和单纯性肺炎支原体肺炎组,对其病例特点进行分析,通过多重线性回归分析探索混合感染性肺炎支原体肺炎并胸腔积液的相关影响因素。**结果** 混合组与单纯组对比显示总热程、气促及呼吸困难、WBC、ALT 和 D-Dimer 两组的差异具有统计学意义($P < 0.05$)。多重线性回归分析显示,气促及 D-Dimer 是混合性肺炎支原体肺炎合并胸腔积液的影响因素。**结论** 当肺炎支原体肺炎合并胸腔积液患者出现气促或 D-Dimer 水平升高时,需警惕混合感染发生的可能。

关键词: 儿童肺炎支原体肺炎;胸腔积液;混合感染

中图分类号:R725.1

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)06-0507-004

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0507



Analysis of the Influence of Mixed Infection on Mycoplasma Pneumoniae Pneumonia and Pleural Effusion in Children

ZHOU Zhi-ru

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

ABSTRACT: Objective To compare the clinical characteristics of patients with pneumonia combined with pleural effusion between mixed mycoplasma pneumoniae infection and simple mycoplasma pneumoniae infection, and explore the early identification factors of mixed infection with mycoplasma pneumoniae pneumonia and pleural effusion. **Methods** A retrospective analysis was performed on children admitted to our hospital and diagnosed with mycoplasma pneumoniae pneumonia complicated with pleural effusion. They were divided into simple group and MP mixed group according to the pathogen. The characteristics of the cases were analyzed, and the related influencing factors of mixed mycoplasma pneumoniae pneumonia with pleural effusion were explored by multiple linear regression analysis. **Results** WBC, ALT, D-Dimer, heat course and absorption time, shortness of breath and dyspnea were significantly different between mixed group and simple group ($P < 0.05$). Multiple linear regression analysis showed that shortness of breath and D-Dimer were the influencing factors of mixed mycoplasma pneumoniae pneumonia complicated with pleural effusion. **Conclusion** When patients with mycoplasma pneumoniae pneumonia combined with pleural effusion have shortness of breath or elevated D-Dimer level, the possibility of co-infection should be vigilant.

KEY WORDS: Mycoplasma pneumoniae pneumonia in children; Pleural effusion; Mixed infection

肺炎支原体是儿童社区获得性肺炎(CAP)常见病原体之一,占目前儿童CAP病原10%~40%^[1]。肺炎支原体肺炎(MPP)通常为自限性疾病,但合并胸腔积液(Pleural effusion, PE)时,患者病情进展快并加重、可遗留后遗症,是发展为难治性肺炎支原体肺炎(RMPP)的高危因素之一^[2-3]。同时,目前有研究^[4]指出,混合感染可

加重MPP患者病情,是发展为RMPP可能机制之一。本研究通过回顾性分析2022—2023年于我院儿内科住院并诊断为肺炎支原体肺炎合并胸腔积液患儿,根据病原学结果分组,对两组患者的病例特点进行分析,探索肺炎支原体肺炎并胸腔积液混合感染的早期识别因素,为临床诊治提供依据。

1 资料与方法

1.1 入组及排除标准

入组标准:年龄1月至14岁;胸部B超、平片或胸部CT其中至少一项证明存在肺炎合并胸腔积液;颗粒凝集法测定血清Mp抗体滴度 ≥ 160 或动态监测Mp抗体滴度呈4倍以上增高、肺泡灌洗液或胸腔积液呼吸道病原核酸检测、多重病原PCR检测提示肺炎支原体阳性;符合2019年儿童社区获得性肺炎诊断标准,即肺部实质或间质发生急性感染,通常有发热、咳嗽、肺部湿罗音等呼吸道及影像学的异常改变。

排除标准:存在先天性心脏病、肺发育不全、免疫抑制状态或免疫缺陷、肿瘤性疾病、神经肌肉病变等基础疾病患儿;肺炎病程超过4周再入院患儿;年龄小于1月患儿;临床资料不全患儿。

1.2 研究对象

2022—2023年于我院儿内科住院,且出院诊断中包含“肺炎支原体感染”“肺炎”“胸腔积液”患者共406例,其中不符合入组条件或资料不全27例,最终379例纳入研究。

根据患者坐位胸部B超胸腔积液定量结果,当胸腔积液量 $< 10\text{mm}$ 时为少量胸腔积液, $\geq 10\text{mm}$ 为中大量胸腔积液。

1.3 研究方法

对379例患儿性别、年龄、发病季节、临床症状、肺部体征、肺外并发症、影像学表现及实验室检查结果进行分析,包括胸腔积液量、是否存在肺不张、白细胞计数(WBC)、中性粒细胞比例(N%)、血小板(PLT)、C反应蛋白(CRP)、乳酸脱氢酶(LDH)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、白介素-6(IL-6)、降钙素原(PCT)、铁蛋白(FER)、D-二聚体(D-Dimer)。同时收集其纤维支气管镜镜下表现及胸腔积液吸收天数。研究中有78例患者完成胸膜腔穿刺,收集其胸腔积液常规及生化指标,包括细胞总数、红细胞数、白细胞数、多核细胞数、单核细胞数、比重、腺苷脱氨酶

(ADA)、LDH、氯离子(Cl)、P葡萄糖(Glu)、总蛋白(TP)、酸碱度(PH),根据病原学结果分为单纯肺炎支原体感染组(单纯组)及混合性肺炎支原体肺炎感染组(混合组),比较组间各方面差异,分析肺炎支原体肺炎并胸腔积液混合感染的影响因素。

1.4 统计学方法

应用SPSS 24.0统计分析软件进行分析处理,每组数据先进行正态性检验及方差齐性检验。计量资料正态分布结果用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,各组间比较采用独立样本 t 检验;不符合正态分布的计量资料用中位数及四分位数间距,即 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,各组间比较采用Kruskal-Wallis检验;计数资料用百分比表示,各组间的比较用卡方检验、Fisher确切概率法,多因素分析采用多元线性回归分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般情况比较

379例患儿中,单纯组271例,男女比例1.26(151/120),混合组108例,男女比例0.96(53/55),无统计学差异($\chi^2 = 1.37, P = 0.241$);两组均以3岁以上儿童为主,分别占比93.4%、87.0%;发病季节均以秋冬季节为主,分别占比74.1%、75.0%;两组在发病年龄、发病季节均无统计学差异(发病年龄 $\chi^2 = 4.84, P = 0.09$;发病季节 $\chi^2 = 0.31, P = 0.96$)。

2.2 两组临床症状及影像学特点比较

混合感染组中,混合病毒92例,以EB病毒最多见,占比81.1%,其次为腺病毒(13.0%);混合细菌16例,以肺炎链球菌及金黄色葡萄球菌最多见,分别占比50.0%及37.5%。比较单纯组与混合组临床特点,混合组较单纯组总病程延长,更易出现气促及呼吸困难,两组具有统计学差异($P < 0.05$)。而出现胸痛、喘息、其他系统损害、听诊呼吸音减低、中大量胸腔积液、肺不张、胸膜增厚、形成塑型性支气管炎方面,两组无统计学差异($P > 0.05$),见表1。

表1 两组临床症状及影像学特点比较[n(%)]

组别	例数	气促	喘息	胸痛	呼吸困难	吸氧	总病程 [d, M(P ₂₅ , P ₇₅)]	其他系 统损害	呼吸音 减低	中大量胸 腔积液	肺不张	胸膜增厚	塑型形成
单纯组	271	33(12.2)	17(6.3)	14(5.2)	2(0.1)	26(9.6)	10.0(8.0, 12.0)	111(41.0)	118(43.5)	90(33.2)	140(51.7)	117(43.2)	70(25.8)
混合组	108	28(25.9)*	11(10.2)	10(9.3)	4(4.6)*	14(13.0)	11.0(9.0, 13.0)*	51(47.2)	59(54.6)	35(32.4)	53(49.1)	50(46.3)	28(25.9)

与单纯组比较, * $P < 0.05$ 。

2.3 两组实验室指标比较

混合组较单纯组 WBC、D-dimer、ALT 均偏高, 具统计学差异 ($P < 0.05$); 两组间中性粒细胞比

值 (N%)、PLT、CRP、LDH、IL-6、PCT、AST、ESR、FER 均无统计学差异 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 两组实验室指标比较 [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	WBC/($\times 10^9/L$)	N/%	PLT/($\times 10^9/L$)	CRP/(mg/L)	LDH/(U/L)	IL-6/(pg/mL)	PCT/(ng/mL)	D-Dimer/(ng/L)	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	ESR/(mm/h)	FER/(ug/L)
单纯组 (n=271)	7.97 (6.16,10.88)	70.7 (62.0,78.0)	259.0 (207.0,320)	34.1 (16.5,60.4)	473.0 (373.0,658.0)	39.3 (20.7,61.6)	0.18 (0.11,0.42)	0.30 (0.20,0.80)	21.00 (12.00,40.00)	37.00 (28.00,53.00)	33.0 (23.0,43.0)	218.30 (137.90,401.8)
混合组 (n=108)	9.66 (7.22,12.49) *	71.5 (63.8,78.3)	268.5 (199.5,336.0)	29.8 (18.9,77.7)	502.5 (374.3,705.5)	31.8 (16.4,67.3)	0.15 (0.08,0.41)	0.60 (0.23,1.58) *	27.50 (15.25,56.00) *	39.00 (26.00,58.75)	31.50 (22.50,44.75)	256.13 (130.67,529.80)

与单纯组比较, * $P < 0.05$ 。

2.4 两组胸腔积液常规及生化指标比较

本研究 379 例患者中, 大部分为少量胸腔积液, 未予胸腔穿刺检查, 125 例中大量胸腔积液患者中共有 78 例完成胸腔积液常规及生化检查, 其中

单纯组 47 例, 混合组 31 例。两组积液性质均以渗出性为主, 混合组胸腔积液 LDH 含量偏高 ($P < 0.05$), 其余指标无统计学差异 ($P > 0.05$), 见表 3。

表 3 两组胸腔积液常规及生化指标比较 [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	例数	细胞总数/ (/mm ³)	红细胞数/ (/mm ³)	白细胞数/ (/mm ³)	多核细胞数/ (/mm ³)	单核细胞数/ (/mm ³)	比重	ADA/ (AU/L)	LDH/ (U/L)	Cl/ (mmol/L)	Glucose/ (mmol/L)	TP/(mg/L)	PH
单纯组	47	2400 (1331,3438)	1303 (487,2000)	814 (419,1629)	80 (18,329)	662 (375,1299)	1.010 (1.010,1.015)	55.60 (39.50,65.50)	1241.00 (673.00,2927.00)	101.50 (97.80,103.40)	6.94 (5.82,8.28)	34613.00 (31076.00,40126.00)	7.59 (7.50,7.76)
混合组	31	2493 (1397,4608)	1221 (491,3962)	705 (430,1420)	110 (23,299)	622 (333,1280)	1.010 (1.010,1.015)	48.20 (34.20,57.50)	2340.00 (1500.00,3235.00) *	100.60 (98.30,104.50)	6.04 (5.40,7.34)	36163.00 (30533.00,39285.00)	7.67 (7.51,7.78)

与单纯组比较, * $P < 0.05$ 。

2.5 两组转归情况比较

单纯组与混合组中分别有 143 例和 64 例完成了胸腔积液量复查。对两组胸腔积液吸收天数、形成包裹及分隔进行比较, 混合组较单纯组吸收天数延长, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 而在形成包裹与分隔方面, 二者无差异 ($P > 0.05$), 见表 4。

表 4 两组转归情况比较

组别	积液吸收天数[d, $M(P_{25}, P_{75})$]	形成包裹及分隔[n(%)]
单纯组 (n=143)	6.00(4.00,9.00)	6(2.21)
混合组 (n=64)	7.50(5.00,10.00) *	2(1.85)

与单纯组比较, * $P < 0.05$ 。

2.6 两组多重线性回归分析

多重线性回归分析结果显示, 气促、D-Dimer 水平是肺炎支原体肺炎合并胸腔积液患者发生混合感染的独立影响因素, 见表 5。

表 5 多重线性回归分析

项目	偏回归系数	回归系数	t	P
D-Dimer/(ng/mL)	0.034	0.118	2.393	0.017
气促	0.165	0.143	2.737	0.007

3 讨论

胸腔积液是儿童难治性肺炎支原体肺炎常见肺外并发症, 混合感染是导致难治性肺炎支原体肺炎的机制之一。本研究通过分析混合感染对肺炎支原体肺炎合并胸腔积液患者临床特点的影响, 为临床尽早识别及干预混合感染的难治性肺炎支原体肺炎患者提供依据。

对比两组间临床特点, 混合组较单纯组更易出现气促及呼吸困难, 总热程延长。苏州大学儿童医院一项针对儿童难治性肺炎支原体肺炎的回顾性研究^[5]发现, 混合感染可延长发热天数、住院天数, 增加心肌损害, 与本项研究结果一致。朱燕文等^[6]研究指出, 混合感染可加重全身炎症反应,

肺外并发症发生率增加,均与本研究结果一致。这考虑为肺炎支原体感染后损伤气道黏膜,混合感染加重炎症反应,延长病原清除时间有关。

两组中实验室指标比较显示,混合组中 WBC、D-Dimer 及 ALT 较单纯组升高,与朱燕文等的研究结果相一致^[6]。D-Dimer 升高可能与病原体直接及间接侵犯血管,使血管内皮损伤、胶原暴露,使机体凝血及纤溶系统激活,形成微血栓有关。有研究^[7]表明,D-Dimer 水平可作为预测重症肺炎支原体肺炎的独立因素,也是评估重症的参考指标之一。D-Dimer 水平越高,提示免疫损伤更强烈,更易导致混合感染发生。本研究多重线性回归分析结果显示,气促及 D-Dimer 水平是肺炎支原体肺炎合并胸腔积液患者发生混合感染的独立影响因素,提示出现气促、D-Dimer 水平越高,存在混合感染的可能性越大,与孙慧等^[8]的研究结果相一致。

ALT 是反应干细胞损伤的特异性指标。本研究中,混合组较单纯组 ALT 水平明显增高,提示混合感染对肝细胞损害更明显。有研究^[9]指出,ALT 水平增高可能与肺炎支原体通过丙酮酸脱氢酶直接与肝纤维连接蛋白结合在细胞表面有关,故可通过 ALT 水平评估肺炎支原体感染患者预后^[10]。

LDH 是一种促进丙酮酸转化为乳酸的酶,广泛存在于人体组织细胞中,是一种非特异性炎症指标。当细胞受损时,胞质中 LDH 释放至细胞外,使细胞外 LDH 水平升高,提示混合感染较单纯感染可进一步加重细胞损伤。吴佩等^[11]研究中亦指出,当肺炎支原体肺炎合并胸腔积液伴 LDH 水平升高时,需警惕混合感染可能,与本研究结果一致。同时多项研究^[12-13]指出,LDH 水平是评估支气管塑型形成的重要因素。本研究中,两组间支气管塑型形成比例及影像学特点比较无明显差异,考虑与样本量局限有关。

本研究为回顾性研究,具有一定的局限性。由于混合感染组中细菌感染与病毒感染比例差异较大,未能对混合病毒与混合细菌患者临床特点差异进一步分析。

综上所述,与单纯肺炎支原体合并胸腔积液相比,混合感染可致患者 WBC、ALT、D-Dimer 升高,热程及吸收时间更长,更易出现气促及呼吸困难。当肺炎支原体肺炎合并胸腔积液患者出现气

促或 D-Dimer 水平升高时,需警惕混合感染发生的可能。

参考文献:

- [1]HAO O,WANG X F,LIU J P,et al. Etiology of community-acquired pneumonia in 1500 hospitalized children[J]. J Med Virol,2018,90(3):421
- [2]王崇杰,骆学勤,罗健,等. 46 例重症肺炎支原体肺炎合并胸腔积液患儿临床及预后分析[J]. 临床儿科杂志,2020,38(4):269
- [3]GONG H,SUN B,CHEN Y,et al. The risk factors of children acquiring refractory mycoplasma pneumoniae pneumonia; a meta-analysis[J]. BMC Med,2021,100(11):e24894
- [4]付红敏,聂文莎. 难治性肺炎支原体肺炎诊治中应关注的问题[J]. 中华实用儿科临床杂志,2018,33(12):891
- [5]陆燕红,张新星,严永东,等. 混合感染因素对难治性肺炎支原体肺炎的影响[J]. 临床儿科杂志,2017,35(2):81
- [6]朱燕文,蒋吴君,王宇清. 儿童难治性肺炎支原体肺炎混合感染的临床特点分析[J]. 吉林医学,2019,40(1):29
- [7]LI Y T,ZHANG J,WANG M Z,et al. Changes in coagulation markers in children with mycoplasma pneumoniae pneumonia and their predictive value for mycoplasma severity[J]. Ital J Pediatr,2023,49(1):143
- [8]孙慧,郭艳梅,李君娥,等. 儿童肺炎支原体肺炎混合感染特征及危险因素分析[J]. 中国医药导报,2020,17(32):83
- [9]KIM K W,SUNG J J,TCHAH H,et al. Hepatitis associated with mycoplasma pneumoniae infection in Korean children; a prospective study[J]. Korean J Pediatr,2015,58(6):211
- [10]李洪娜,郭艳霞,谢金霞,等. 肺炎支原体肺炎患儿血清 ALT、AST 水平变化及其对预后的预测价值[J]. 山东医药,2023,63(23):55
- [11]吴佩,曾赛珍,黄倩,等. 混合腺病毒感染对肺炎支原体肺炎合并胸腔积液患儿的影响[J]. 中国小儿急救医学,2022,29(12):968
- [12]王琦,靳蓉,陈敏,等. 儿童塑型性支气管炎早期预警分析及可弯曲支气管镜治疗的临床研究[J]. 中华实用儿科临床杂志,2022,37(23):1786
- [13]华军. 儿童难治性肺炎支原体肺炎发生塑型性支气管炎的危险因素分析[J]. 中华实用儿科临床杂志,2019,34(16):1219

(收稿日期:2024-08-20)

奥硝唑注射液联合拉氧头孢钠治疗慢性盆腔炎的疗效及对血清炎症指标的影响

王利勤¹, 吴辰^{2*}

(1. 咸宁市咸安区浮山社区卫生服务中心, 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)

摘要:目的 探讨奥硝唑注射液联合拉氧头孢钠对慢性盆腔炎的临床治疗效果。方法 将就诊于本院的慢性盆腔炎患者 96 例作为研究对象, 随机分为对照组和观察组各 48 例。对照组给予拉氧头孢钠治疗, 观察组给予奥硝唑联合拉氧头孢钠治疗。10d 后, 评价两组治疗效果, 以及治疗前后盆腔积液量、临床症状评分和血清炎症指标水平差异, 并观察不良反应。结果 观察组总有效率 93.75% 显著高于对照组 77.08% ($P < 0.05$)。治疗后, 与治疗前相比, 两组盆腔积液量、症状评分均显著下降 (P 均 < 0.05); 与对照组相比, 观察组盆腔积液量、症状评分更低, 差异具有显著性 (P 均 < 0.05)。治疗后, 观察组白细胞计数、降钙素原和 C 反应蛋白水平显著低于对照组 ($P < 0.05$)。两组不良反应发生率不具有统计学差异 ($P > 0.05$)。结论 奥硝唑注射液联合拉氧头孢钠对慢性盆腔炎有较好治疗效果, 可更有效地降低机体炎症, 促进患者症状缓解, 且安全性良好。

关键词:慢性盆腔炎; 拉氧头孢钠; 奥硝唑; 疗效; 炎症

中图分类号: R969.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-4646(2024)06-0511-004

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI: 10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0511



Efficacy of Ornidazole Injection Combined with Latamoxef Sodium in the Treatment of Chronic Pelvic Inflammatory Disease and Its Effect on Serum Inflammatory Indicators

WANG Li-qin, WU Chen

(Fushan Community Health Service Center of Xianan District, Xianning Hubei 437100, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the clinical therapeutic effect of ornidazole injection combined with latamoxef sodium on chronic pelvic inflammatory disease. **Methods** 96 patients with chronic pelvic inflammatory disease who were treated in our hospital from January 2022 to June 2023 were randomly divided into a control group (48 cases) and an observation group (48 cases). The control group was treated with latamoxef sodium, and the observation group was treated with ornidazole combined with latamoxef sodium. After 10 days, the therapeutic effects of the two groups were evaluated, and the differences between the two groups in pelvic effusion volume, clinical symptom scores, and serum inflammatory index levels before and after treatment were compared, and adverse reactions were observed. **Results** The total effective rate of the observation group was 93.75%, which was significantly higher than that of the control group (77.08%) ($P < 0.05$). After treatment, compared with those before treatment, the pelvic effusion volume and symptom scores of the two groups were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the pelvic effusion volume and symptom scores of the observation group were lower ($P < 0.05$). After treatment, the white blood cell count, C reactive protein and procalcitonin levels of the observation group were significantly lower than those of the control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the incidence of adverse reactions between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Ornidazole injection combined with latamoxef sodium has a good therapeutic effect on chronic pelvic inflammatory disease. It can more effectively reduce inflammation in the body, promote symptom relief in patients,

* 通讯作者, E-mail: 1395994919@qq.com

and has good safety.

KEY WORDS: Chronic pelvic inflammatory disease; Latamoxef sodium; Ornidazole; Curative effect; Inflammation

慢性盆腔炎是临床常见妇科疾病,是指女性盆腔腹膜、内生殖器官及周围结缔组织等部位出现慢性炎症,可引起下腹疼痛、月经紊乱、白带增多等临床表现。该病病程长,迁延难愈,对患者身心健康造成严重影响^[1]。病原菌侵入是盆腔炎发病的主要原因,而选择适宜的抗菌药物是保证疗效的关键。拉氧头孢钠是一种 β 内酰胺类药物,抗菌谱广,抗菌作用强,是盆腔炎的常用药物^[2-3]。奥硝唑对多种感染性疾病有确切疗效,但单独使用易产生细菌耐药性^[4]。既往研究显示,奥硝唑与其他抗菌药物联合使用可提高对慢性盆腔炎的治疗效果^[5]。本研究拟探讨奥硝唑联合拉氧头孢钠对慢性盆腔炎的治疗效果和安全性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本研究符合《赫尔辛基宣言》。将2022年1月至2023年6月就诊于本院的慢性盆腔炎患者96例作为研究对象。纳入标准:①满足慢性盆腔炎的诊断标准^[6];②年龄18~60岁;③患者知情同意,自愿配合治疗,依从性好。排除标准:①患有盆腔结核者;②伴严重心肝肾功能障碍者;③患有妇科恶性肿瘤者;④孕妇或哺乳期女性;⑤过敏体质。使用随机数表法,将患者分为对照组与观察组各48例,组间一般资料不具有统计学差异($P > 0.05$),表1。

表1 两组一般资料比较

组别	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	病程 ($\bar{x} \pm s$, 年)	体重指数 ($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)	盆腔炎类型(子宫内 膜炎/盆腔结缔组织炎/输 卵管卵巢炎,例)	病情程度 (轻/中/ 重度,例)
观察组(n=48)	30.48±5.74	3.45±1.12	23.69±1.57	15/19/14	15/27/6
对照组(n=48)	31.69±6.23	3.65±1.08	23.58±1.67	12/20/16	14/29/5

1.2 治疗方法

对照组予以拉氧头孢钠(海南灵康制药有限公司,批准文号:国药准字H20083055)治疗,剂量为1.0g/次,使用250mL生理盐水稀释后,静脉滴注,2次/d。观察组在对照组基础上联合奥硝唑(石家庄四药有限公司,批准文号:国药准字H13022514)治疗,剂量为0.5g/次,静脉滴注,2次/d。两组均治疗10d。

1.3 观察指标

(1)盆腔积液量和症状评分。治疗前和治疗后,分别使用超声对患者盆腔积液量进行检测,并参照文献^[6]标准,对患者月经异常、下腹疼痛、白带增多、发热乏力等症状进行计分,每项按严重程度计0~4分,评分越高,意味着患者症状越严重。

(2)炎症指标。治疗前和治疗后,分别对患者进行空腹肘静脉血的采集,抽取5mL,经10min离心处理(3000r/min),得到血清,进行白细胞计数(WBC)的检测(使用血细胞分析仪进行),并进行C反应蛋白(CRP)的测定(免疫散射比浊法)和降钙素原(PCT)的检测(免疫化学发光法)。

(3)不良反应。对患者治疗过程中不良反应进行记录。

1.4 疗效评价

疗效标准依据文献^[6]拟定。患者治疗后症状体征消失,超声检查未见盆腔、附件异常,判定为显效;患者症状体征改善,超声检查提示液性暗区减少,判定为有效;患者症状体征未见明显改变,超声检查提示液性暗区无减少,判定为无效。合计每组显效例数、有效例数之和为总有效例数,对每组总有效率进行计算。

1.5 统计学处理

使用SPSS 24.0软件对研究数据进行处理。计量资料满足正态分布,用($\bar{x} \pm s$)形式表示,用t检验;计数资料用例(%)表示,行 χ^2 检验;以 $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床疗效

观察组总有效率为93.75%,与对照组77.08%相比显著增高($P < 0.05$)。见表2。

表2 两组临床疗效比较[n(%)]

组别	显效	有效	无效	总有效
观察组(n=48)	19	26	3	45(93.75)*
对照组(n=48)	12	25	11	37(77.08)

与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 盆腔积液量和症状评分

治疗后,与治疗前相比,两组盆腔积液量、症

状评分均显著下降($P < 0.05$),与对照组相比,观察组盆腔积液量、症状评分更低($P < 0.05$)。见表3。

表3 两组盆腔积液量和症状评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	盆腔积液量/mL		症状评分	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
观察组(n=48)	4.47±0.94	1.25±0.31**	12.35±1.89	5.22±1.41**
对照组(n=48)	4.39±0.87	1.95±0.44*	12.14±1.76	6.58±1.34*

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

2.3 血清炎症因子

治疗后,与治疗前相比,两组 WBC、CRP 和 PCT 均显著下降($P < 0.05$),与对照组相比,观察组以上炎症指标更低($P < 0.05$)。见表4。

表4 两组血清炎症因子比较($\bar{x} \pm s$)

组别	WBC($\times 10^9/L$)		CRP(mg/L)		PCT($\mu g/L$)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
观察组(n=48)	14.67±2.54	7.15±1.12**	22.65±2.36	9.45±1.64**	1.25±0.31	0.45±0.11**
对照组(n=48)	14.58±2.31	8.45±1.24*	22.38±2.51	12.87±1.89*	1.21±0.27	0.78±0.23*

与治疗前相比,* $P < 0.05$;与对照组比较,# $P < 0.05$ 。

2.4 不良反应

相比对照组,观察组不良反应未明显增高($P > 0.05$)。见表5。

表5 两组不良反应比较[n(%)]

组别	头晕	恶心呕吐	乏力	合计
观察组(n=48)	3	2	1	6(12.50)
对照组(n=48)	1	1	2	4(8.33)

3 讨论

盆腔炎是女性常见的生殖系统感染性疾病,其病情顽固,易反复发作,对患者生活质量有着严重影响。抗菌药物的合理使用是盆腔炎治疗的关键,有效的抗感染治疗能够促使患者临床症状快速缓解,并降低复发率^[7]。研究显示^[8],大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等是盆腔炎的常见致病菌,并常伴随着脆弱拟杆菌等多种厌氧菌组成的混合感染,理想的抗菌治疗需覆盖全部的致病菌。拉氧头孢钠是一种广谱的 β -内酰胺类抗菌药物,可通过与细菌细胞内位蛋白相结合而使得细菌细胞壁

的合成过程受到抑制,而发挥抗菌作用,对革兰阴性菌、阳性菌均有较好抗菌作用,对部分厌氧菌也有着抗菌活性^[9]。但随着广谱抗菌药物的使用,细菌耐药问题日益严峻,联合使用多种抗生素成为了感染性疾病治疗的重要策略。文献^[10]指出,厌氧菌在盆腔炎的病情反复中发挥着重要作用,在疾病治疗中应重视厌氧菌的杀灭。奥硝唑属于第三代硝基咪唑类抗菌药物,在无氧环境中被还原成氨基或通过自由基的形成,作用于微生物的DNA,干扰其正常的复制和转录过程。可通过在无氧环境下将病原菌细胞内硝基成分还原成有细胞毒性的氨基,从而抑制病原菌DNA复制,使病原菌最终凋亡,对梭杆菌属、脆弱拟杆菌等多种厌氧菌具有较强的抗菌活性^[11]。本研究发现,相比对照组,观察组治疗后盆腔积液量、症状评分显著下降,总有效率显著提高,说明奥硝唑注射液联合拉氧头孢钠可提高对慢性盆腔炎的治疗效果,促进患者症状缓解。分析原因:拉氧头孢钠通过破坏细菌的细胞壁产生抗菌作用,奥硝唑通过抑制细菌DNA复制发挥抗菌活性,二者联合使用,通过不同机制发挥协同抗菌作用,从而提高治疗效果。

慢性盆腔炎还伴随着组织炎症性损伤,感染初期引起的炎症反应对于机体是有利的,但炎症反应过度时可导致组织炎性损伤^[12-13]。WBC、CRP是常见的炎症指标,能够反映机体的炎症反应程度^[14]。PCT也是反映感染的典型指标,随着感染程度加重,其含量上升^[15]。本研究发现,相比对照组,观察组治疗后血清WBC、CRP和PCT水平显著下降,说明奥硝唑注射液联合拉氧头孢钠可更有效地降低患者机体炎症水平,从而有利于症状的缓解。本研究还显示,相比对照组,观察组不良反应发生率并未明显增高,说明奥硝唑注射液联合拉氧头孢钠治疗的安全性良好。

综上,奥硝唑注射液联合拉氧头孢钠治疗慢性盆腔炎,可促进患者症状缓解,降低炎症水平,提高疗效,且安全性良好。但本研究入组例数有限,今后仍需更大样本量研究来对所得结果进一步验证。

参考文献:

- [1] SAFRAI M, ROTTENSTREICH A, SHUSHAN A, et al. Risk factors for recurrent pelvic inflammatory disease [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2020, 244: 40

(下转第518页)

心率变异性频域和时域相关指标与冠心病患者心血管事件的关系*

霍旭辰,李军丽,曹昕

(驻马店市中心医院功能检查科,河南驻马店 463000)

摘要:目的 探讨冠心病患者心率变异性频域和时域相关指标与心血管事件的关系。方法 纳入 116 例冠心病患者为研究对象,记录心率变异性频域和时域指标。随访 1 年,将患者分为心血管事件组和无心血管事件组,分析心率变异性频域和时域指标与心血管事件的关系。结果 116 例冠心病患者中发生心血管事件 74 例(63.79%);心血管事件组年龄、TG 水平高于非心血管事件组,LF、LF/HF、SDNN、RMSSD、PNN50 低于非心血管事件组($P < 0.05$);LF、LF/HF、SDNN、RMSSD、PNN50 与冠心病患者发生心血管事件呈负相关($r < 0, P < 0.05$);年龄增大、TG 升高及 LF、LF/HF、SDNN、RMSSD、PNN50 降低是冠心病患者发生心血管事件的危险因素($OR > 1, P < 0.05$);LF、LF/HF、SDNN、RMSSD、PNN50 对冠心病患者发生心血管事件具有一定预测价值($AUC = 0.780, 0.949, 0.749, 0.802, 0.781, P < 0.05$)。结论 冠心病患者心率变异性频域和时域相关指标与冠心病患者心血管事件的发生密切相关,LF、LF/HF、SDNN、RMSSD、PNN50 低可能增加发生心血管事件风险。

关键词:冠心病;心率变异性;心血管事件

中图分类号:R541.4

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)06-0514-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0514

Relationships between Frequency Domain and Time Domain Related Indexes of Heart Rate Variability and Cardiovascular Events in Patients with Coronary Heart Disease

HUO Xu-chen, LI Jun-li, CAO Xin

(Department of Functional Examination, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian Henan 463000, China)

ABSTRACT: **Objective** To explore the relationships between heart rate variability in frequency domain and time domain and cardiovascular events in patients with coronary heart disease. **Methods** 116 patients with coronary heart disease were included as the research objects, and the frequency domain and time domain indexes of heart rate variability were recorded. After a one-year follow-up, the patients were divided into cardiovascular event group and non-cardiovascular event group, and the relationships between frequency domain and time domain indexes of heart rate variability and cardiovascular events were analyzed. **Results** Among 116 patients with coronary heart disease, 74 cases (63.79%) had cardiovascular events. The age and TG levels in cardiovascular event group were higher than those in non-cardiovascular event group, while LF, LF/HF, SDNN, RMSSD and PNN50 were lower than those in non-cardiovascular event group ($P < 0.05$). The results showed that LF, LF/HF, SDNN, RMSSD and PNN50 were negatively correlated with cardiovascular events in patients with coronary heart disease ($r < 0, P < 0.05$). The increased of age, TG, and the decreased of LF, LF/HF, SDNN, RMSSD and PNN50 were risk factors for cardiovascular events in patients with coronary heart disease ($OR > 1, P < 0.05$). LF, LF/HF, SDNN, RMSSD and PNN50 had certain predictive value for cardiovascular events in patients with coronary heart disease ($AUC = 0.780, 0.949, 0.749, 0.802, 0.781, P < 0.05$). **Conclusion** The correlation indexes of heart rate variability in frequency domain and time domain are closely related to the occurrence of cardiovascular events in patients with coronary heart disease. Low LF, LF/HF, SDNN, RMSSD and PNN50 may increase the risk of cardiovascular events.

KEY WORDS: Coronary heart disease; Heart rate variability; Cardiovascular event

* 基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20200658)

冠心病是一种临床常见的心血管疾病,主要是由于冠状动脉管腔狭窄或闭塞所致,可引起患者胸闷、胸痛等典型症状^[1]。冠心病患者就诊时依据临床表现可将其分为低危、中危、高危,其中低危和中危患者给予二级预防药物治疗,定期随访即可。而高危患者病情不稳、变化迅速,可引发心力衰竭、心跳骤停、心肌梗死等心血管事件,危及患者生命安全^[2-3]。因此,积极寻找与冠心病患者心血管事件相关的指标,早期预测患者心血管事件发生风险,并采取相关干预措施对改善患者预后具有重要意义。有研究指出,自主神经系统功能障碍在动脉粥样硬化的发生及发展中起到重要作用^[4]。由此推测自主神经功能障碍可能与冠心病患者心血管疾病存在一定关系。心率变异性检测是一种简单、实用且无创的自主神经系统功能检测方法,主要指一定时间内窦性心律周期性变化现象,包括频域指标和时域指标,能够反映个体交感神经与副交感神经平衡及张力,从而间接反应心脏自主神经系统平衡^[5-6]。本研究观察不同心血管事件发生时的冠心病患者心率变异性频域和时域相关指标,分析其与心血管事件发生的关系,旨在为早期发现冠心病患者心血管事件提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 纳入及排除标准

纳入标准:①冠心病符合《冠状动脉粥样硬化性心脏病诊断标准 2010》^[7]中相关诊断标准,经冠脉 CT 或冠脉造影检查确诊;②认知功能正常,能够配合研究;③患者或家属签署知情同意书。排除标准:①合并脑血管意外;②合并心源性休克、严重心律失常、主动脉夹层、瓣膜病、各种心肌病等;③合并严重肝、肾功能不全;④近 1 个月内发生严重创伤或接受手术治疗;⑤合并免疫系统疾病或严重感染性疾病;⑥合并结缔组织疾病;⑦服用影响心率变异性的药物;⑧合并肺动脉栓塞、肺源性心脏病。

1.2 一般资料

纳入 2021 年 3 月至 2022 年 3 月医院 116 例冠心病患者为研究对象。其中男 65 例,女 51 例;年龄 42 ~ 79 岁,平均(65.53 ± 6.85)岁;病程 2 ~ 16 年,平均(8.13 ± 2.28)年;体重指数 19.58 ~ 28.65 kg/m²,平均(25.38 ± 2.25) kg/m²;吸烟史 29 例,饮酒史 33 例,糖尿病 16 例。

1.3 方法

1.3.1 心率变异性检测

入院时采用 TLC 5000 十二导联动态心电图分析仪对患者进行 24h 动态心电图检查,并记录心率变异性频域[低频功率(LF)、高频功率(HF)、低频功率/高频功率值(LF/HF)]和时域[R-R 间隔标准差(SDNN)、相邻 R-R 间隔差值均方根(RMSSD)、相邻 R-R 间隔差值 > 50ms 数目占所有 R-R 间隔总数百分比(PNN50)]相关指标。

1.3.2 心血管事件评估

对所有患者进行为期 1 年的随访,统计心力衰竭、脑卒中、心跳骤停、心肌梗死等不良心血管事件发生情况。

1.4 观察指标

将发生心血管事件的冠心病患者纳入心血管事件组,反之纳入非心血管事件组,对比两组基线资料及心率变异性频域和时域相关指标,包括性别(男、女)、年龄、冠心病病程、体重指数、吸烟史(有、无)、饮酒史(有、无)、糖尿病[合并、未合并,采用 GM700S 乐享血糖仪(华广瑞特)测定患者空腹血糖及餐后 2h 血糖水平,空腹血糖 ≥ 7.0 mmol/L、餐后 2h 血糖 ≥ 11.1 mmol/L 视为发生糖尿病]、血脂水平[总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)]、TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平[采集患者空腹静脉血 4ml,采用 AU5800 型全自动生化分析仪(贝克曼)测定]、血压水平[舒张压、收缩压,采用 HEM-7124 型血压计(欧姆龙)测定患者舒张压、收缩压水平]、LF、HF、LF/HF、SDNN、RMSSD、PNN50。

1.5 统计学方法

数据处理采用 SPSS 23.0 软件,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,以 *t* 检验;计数资料用 [*n*(%)]表示,以 χ^2 检验,分类变量与连续变量间相关性采用点二列相关性分析检验;心率变异性频域和时域相关指标对冠心病患者发生心血管事件的影响,采用 Logistic 回归分析检验;绘制受试者工作特征曲线(ROC)分析预测价值, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 冠心病患者心血管事件发生情况

116例冠心病患者中发生心血管事件74例,占63.79%。

2.2 心血管事件组与非心血管事件组基线资料及心率变异性相关指标比较

心血管事件组年龄、TG水平高于非心血管事件组,LF、LF/HF、SDNN、RMSSD、PNN50低于非心血管事件组($P < 0.05$);两组性别、冠心病病程、体重指数、吸烟史、饮酒史、糖尿病、TC、HDL-C、LDL-C、舒张压、收缩压、HF比较,差异不显著($P > 0.05$)。见表1。

表1 心血管事件组与非心血管事件组基线资料及心率变异性相关指标比较

指标	心血管事件组 (n=74)	非心血管事件组 (n=42)	χ^2/t	P	
性别[n(%)]	男	41(55.41)	24(57.14)	0.033	0.856
	女	33(44.59)	18(42.86)		
年龄($\bar{x} \pm s$,岁)	66.86 ± 6.52	63.19 ± 7.12	2.818	0.006	
冠心病病程($\bar{x} \pm s$,年)	8.23 ± 2.84	7.96 ± 2.25	0.529	0.598	
体重指数($\bar{x} \pm s$,kg/m ²)	25.41 ± 2.19	25.32 ± 2.28	0.210	0.834	
吸烟史[n(%)]	有	19(25.68)	10(23.81)	0.050	0.823
	无	55(74.32)	32(76.19)		
饮酒史[n(%)]	有	22(29.73)	11(26.19)	0.165	0.685
	无	52(70.27)	31(73.81)		
糖尿病[n(%)]	合并	11(14.86)	5(11.90)	0.197	0.657
	未合并	63(85.14)	37(88.10)		
TC($\bar{x} \pm s$,mmol/L)	5.17 ± 0.96	5.03 ± 1.14	0.705	0.482	
TG($\bar{x} \pm s$,mmol/L)	1.82 ± 0.38	1.65 ± 0.32	2.447	0.016	
HDL-C($\bar{x} \pm s$,mmol/L)	1.18 ± 0.32	1.25 ± 0.36	1.082	0.282	
LDL-C($\bar{x} \pm s$,mmol/L)	3.37 ± 0.87	3.28 ± 0.93	0.522	0.603	
舒张压($\bar{x} \pm s$,mmHg)	78.52 ± 7.58	76.98 ± 7.39	1.061	0.291	
收缩压($\bar{x} \pm s$,mmHg)	138.43 ± 11.57	136.85 ± 12.04	0.697	0.488	
LF($\bar{x} \pm s$,ms ²)	1.13 ± 0.61	1.86 ± 0.69	5.905	0.000	
HF($\bar{x} \pm s$,ms ²)	0.88 ± 0.27	0.92 ± 0.28	0.756	0.451	
LF/HF($\bar{x} \pm s$)	1.28 ± 0.31	2.02 ± 0.34	11.929	0.000	
SDNN($\bar{x} \pm s$,ms)	116.23 ± 22.94	139.49 ± 23.26	5.222	0.000	
RMSSD($\bar{x} \pm s$,ms)	28.10 ± 10.28	43.43 ± 14.57	6.612	0.000	
PNN50($\bar{x} \pm s$,%)	13.52 ± 2.09	17.94 ± 5.16	6.504	0.000	

2.3 心率变异性频域和时域相关指标与患者心血管事件发生的相关性

经点二列相关性分析,结果显示,LF、LF/HF、

SDNN、RMSSD、PNN50与冠心病患者心血管事件发生呈负相关($r < 0, P < 0.05$)。见表2。

表2 心率变异性频域和时域相关指标与患者心血管事件发生的相关性

指标	r	P
LF	-0.485	0.000
LF/HF	-0.748	0.000
SDNN	-0.439	0.000
RMSSD	-0.527	0.000
PNN50	-0.521	0.000

2.4 心率变异性频域和时域相关指标对冠心病患者心血管事件发生的影响

将心率变异性频域和时域相关指标(年龄、TG、LF、LF/HF、SDNN、RMSSD、PNN50)作为自变量(均为数值变量),将冠心病患者心血管事件发生情况作为因变量(1 = 发生,2 = 未发生),建立Logistic回归模型,结果显示,年龄增大、TG升高、LF降低、LF/HF降低、SDNN降低、RMSSD降低、PNN50降低是冠心病患者心血管事件发生的危险因素($OR > 1, P < 0.05$)。见表3。

表3 心率变异性频域和时域相关指标对冠心病患者心血管事件发生的影响

指标	β	标准误	Wald χ^2	P	OR	95%置信区间
年龄	0.302	0.135	4.959	0.026	1.352	1.037-1.763
TG	0.708	0.299	5.615	0.018	2.030	1.130-3.647
LF	2.569	0.730	12.389	0.000	13.051	3.122-54.564
LF/HF	6.835	1.325	26.606	0.000	9.967	6.265-12.014
SDNN	0.062	0.018	12.588	0.000	1.064	1.028-1.102
RMSSD	0.078	0.028	7.927	0.005	1.081	1.024-1.141
PNN50	0.418	0.137	9.333	0.002	1.519	1.162-1.986
常量	-21.610	4.428	23.814	0.000	0.000	-

2.5 心率变异性频域和时域相关指标对冠心病患者心血管事件发生的预测价值

将心率变异性频域和时域相关指标(LF、LF/HF、SDNN、RMSSD、PNN50)作为检验变量,将冠心病患者心血管事件发生状况作为状态变量(1 = 发生,2 = 未发生),绘制ROC曲线(见图1),结果显示,LF、LF/HF、SDNN、RMSSD、PNN50对冠心病患者心血管事件发生具有一定预测价值($AUC = 0.780、0.949、0.749、0.802、0.781, P < 0.05$)。见表4。

表4 心率变异性频域和时域相关指标对冠心病患者心血管事件发生的预测价值

检测变量	AUC	标准误	P	95%CI	cut-off值	敏感度	特异度	约登指数
LF	0.780	0.044	0.000	0.694~0.867	1.370ms ²	0.738	0.649	0.387
LF/HF	0.949	0.019	0.000	0.912~0.986	1.500	0.929	0.770	0.699
SDNN	0.749	0.046	0.000	0.658~0.840	126.935ms	0.643	0.608	0.251
RMSSD	0.802	0.047	0.000	0.710~0.893	33.965ms	0.762	0.703	0.465
PNN50	0.781	0.052	0.000	0.679~0.882	14.995%	0.738	0.770	0.508

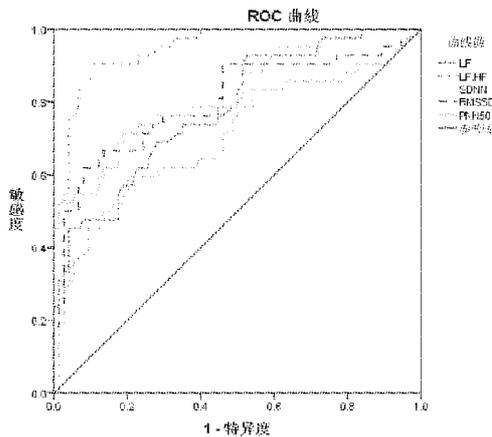


图1 心率变异性频域和时域相关指标预测冠心病患者心血管事件发生的ROC图

3 讨论

冠心病属于一种慢性、终身性心血管疾病,不良心血管事件是导致本病患者病情加重、病死的重要原因^[8-9]。本研究随访1年发现,116例冠心病患者中发生心血管事件74例,占63.79%,可见冠心病患者发生心血管事件风险较高,故预测冠心病患者心血管事件风险十分必要。

心率变异性主要产生于自主神经系统对心脏窦房结的调节,频域分析法和时域分析法主要用于评价自主神经病变^[10]。在心率变异性频域分析中,LF主要反映交感神经调节作用,HF主要反映副交感神经调节作用^[11]。本研究中,心血管事件组LF、LF/HF水平更低,LF、LF/HF与冠心病患者发生心血管事件呈负相关,推测原因在于健康人体中交感神经兴奋性较弱,而副交感神经兴奋性较轻,二者保持相对平衡状态,这种平衡维持患者心血管相对稳定^[12]。冠心病患者由于冠状动脉狭窄,心肌长期处于缺氧环境,致使其交感神经兴奋性上升,副交感神经兴奋性受到抑制,表现为LF、LF/HF降低,此时自主神经间平衡将由适应性的调节转变为失衡状态,降低机体适应能力,导致心血管系统功能紊乱,引发心血管事件^[13]。

在心率变异性时域分析中,SDNN表示全部窦性心搏RR间期的标准差,与自主神经系统的总张力有关;RMSSD与PNN50是评价副交感神经的敏感指标,与交感神经张力有关^[14-15]。本研究结果显示,心血管事件组SDNN、RMSSD、PNN50低于非心血管事件组,且经Logistic回归分析发现,SDNN、RMSSD、PNN50低是冠心病患者发生心血管事件的危险因素。冠心病患者冠状动脉多存在不同程度狭窄,患者心肌细胞长时间缺血、缺氧,持续刺激室壁化学性、机械性感受器,改变心脏自主神经调节的平衡性^[16]。随病情进展,患者心肌缺血、缺氧情况加重,心脏自主神经功能受损严重,机体交感神经与副交感神经张力间平衡遭受破坏,出现交感神经功能亢进、副交感神经张力减弱等情况,冠心病冠脉狭窄程度越重,SDNN、RMSSD、PNN50降低越明显,心血管事件发生风险随之增高。最后绘制ROC曲线,结果显示,LF、LF/HF、SDNN、RMSSD、PNN50对冠心病患者发生心血管事件具有一定预测价值。

综上所述,冠心病患者心率变异性频域和时域相关指标与心血管事件的发生密切相关,监测LF、LF/HF、SDNN、RMSSD、PNN50变化可预测心血管事件发生风险,有助于早期识别心血管事件高风险患者,从而采取相关干预措施。但本研究仍存在样本量少、来源单一、随访时间短等不足,可能导致结果存在一定偏倚,故后期仍需开展大样本量、多中心的前瞻性研究,以进一步验证本研究结论。

参考文献:

- [1] KIANOUSH S, RIFAI M, JAIN V, et al. Prevalence and predictors of premature coronary heart disease among asians in the united states: a national health interview survey study[J]. *Curr Probl Cardiol*, 2023, 48(7): 101152
- [2] 程效, 张彦, 欧阳煜, 等. 2型糖尿病患者胸主动脉钙化与冠心病的关系[J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2021, 35(2): 112
- [3] PELTZER S, HELLSTERN M, GENSKE A, et al. Health

- literacy in persons at risk of and patients with coronary heart disease: a systematic review[J]. *Soc Sci Med*, 2020, 39(245):112711
- [4] 张婷, 刘凌云, 李梦凡, 等. 心率变异性与分支动脉粥样硬化病患者的早期神经功能恶化和转归不良的相关性[J]. *国际脑血管病杂志*, 2022, 30(12):897
- [5] GEORGE K, S I J, THOMAS N S, et al. Gender-based vegetarian and nonvegetarian dietary impact on cardiac autonomic function of heart rate variability[J]. *J Am Coll Nutr*, 2021, 40(3):237
- [6] VREIJLING S R, TROUDART Y, BROSSCHOT J F. Reduced heart rate variability in patients with medically unexplained physical symptoms: a meta-analysis of HF-HRV and RMSSD[J]. *Psychosom Med*, 2021, 83(1):2
- [7] 中华人民共和国卫生部. 冠状动脉粥样硬化性心脏病诊断标准 2010[M]. 北京: 中国标准出版社, 2010:1
- [8] GOLDBOURT U, GROSSMAN E. Blood pressure variability at midlife is associated with all-cause, coronary heart disease and stroke long term mortality[J]. *J Hypertens*, 2020, 38(9):1722
- [9] FRØJD L A, DAMMEN T, MUNKHAUGEN J, et al. Insomnia as a predictor of recurrent cardiovascular events in patients with coronary heart disease[J]. *Sleep Adv*, 2022, 3(1):zpac007
- [10] CHEN X, QIU B, ZOU Q, et al. Source specific PM 2.5 associated with heart rate variability in the elderly with coronary heart disease: a community-based panel study [J]. *Chemosphere*, 2020, 49(260):127399
- [11] SALMOIRAGO-BLOTCHER E, HOVEY K M, ANDREWS C A, et al. Psychological traits, heart rate variability, and risk of coronary heart disease in healthy aging women—the women's health initiative[J]. *Psychosom Med*, 2019, 81(3):256
- [12] KHAN A A, LIP G Y H, SHANTSILA A. Heart rate variability in atrial fibrillation: the balance between sympathetic and parasympathetic nervous system[J]. *Eur J Clin Invest*, 2019, 49(11):e13174
- [13] SHAH A S, LAMPERT R, GOLDBERG J, et al. Alterations in heart rate variability are associated with abnormal myocardial perfusion[J]. *Int J Cardiol*, 2020, 15(305):99
- [14] WEINSTEIN G, LUTSKI M, GOLDBOURT U, et al. Midlife resting heart rate, but not its visit-to-visit variability, is associated with late-life frailty status in men with coronary heart disease[J]. *Aging Male*, 2020, 23(5):1052
- [15] LAI Y R, HUANG C C, CHENG B C, et al. Feasibility of combining heart rate variability and electrochemical skin conductance as screening and severity evaluation of cardiovascular autonomic neuropathy in type 2 diabetes[J]. *J Diabetes Investig*, 2021, 12(9):1671
- [16] 高敏, 李京秀, 王慕秋. 老年冠心病合并高血压患者自主神经功能改变的相关研究[J]. *中华老年医学杂志*, 2021, 40(7):859

(收稿日期:2024-04-21)

(上接第 513 页)

- [2] 陈红磊, 秦金利, 王保峰. 清肺消炎丸联合拉氧头孢钠治疗老年社区获得性肺炎的临床研究[J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(5):950
- [3] 寇晨, 韩冬, 张亚南, 等. 应用蒙特卡洛模拟优化注射用拉氧头孢钠在新生儿细菌感染性疾病中的初始给药方案[J]. *儿科药学杂志*, 2022, 28(6):29
- [4] 苏瑞金, 杨菲, 张岚. 妇炎平胶囊联合奥硝唑栓治疗老年细菌性阴道炎的临床研究[J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(7):1430
- [5] 王增艳, 郭煦, 张丹, 等. 奥硝唑分别联合头孢地尼与左氧氟沙星治疗慢性盆腔炎的临床效果对比[J]. *中国地方病防治杂志*, 2018, 33(6):674
- [6] 谢幸, 苟文丽. 妇产科学[M]. 第 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013:258
- [7] 常俊丽, 李俊勇. 抗炎片联合左氧氟沙星治疗慢性盆腔炎的临床研究[J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(7):1373
- [8] 黄涛阳, 陈龙浩, 王晖, 等. 慢性盆腔炎灌肠液对 7 种致病细菌体外抗菌作用的初步研究[J]. *中国药业*, 2014, 23(18):21
- [9] 张连春, 许建新. 桉柠蒎肠溶软胶囊联合拉氧头孢钠治疗社区获得性肺炎的临床研究[J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(11):2252
- [10] 中华医学会妇产科学分会感染性疾病协作组. 盆腔炎症性疾病诊治规范(2019 修订版)[J]. *中华妇产科杂志*, 2019, 54(7):433
- [11] 陈维凤, 周勤芬. 奥硝唑与甲硝唑联合阿奇霉素治疗急性盆腔炎疗效比较[J]. *海南医学*, 2019, 30(9):1181
- [12] 郝艳红, 高慧, 刘玉兰. 高氏盆炎方三号对慢性盆腔炎大鼠炎症介质和生殖功能的影响[J]. *世界中医药*, 2022, 17(14):1995
- [13] SHROFF S. Infectious vaginitis, cervicitis, and pelvic inflammatory disease[J]. *Med Clin North Am*, 2023, 107(2):299
- [14] 孙月华, 王维玲. C 反应蛋白测定在妇产科感染性疾病诊治中的应用[J]. *蚌埠医学院学报*, 2014, 39(11):2
- [15] ERENEL H, YILMAZ N, ONCUL M, et al. Usefulness of serum procalcitonin levels in predicting tubo-ovarian abscess in patients with acute pelvic inflammatory disease[J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2017, 82(3):262

(收稿日期:2024-09-23)

烯醇化酶 3 表达与结直肠癌临床病理特征及生存相关性分析

孟凡来¹, 梁晓东^{2*}

(1. 徐州医科大学附属宿迁医院, 江苏 宿迁 223800; 2. 南通大学第六附属医院/盐城市第三人民医院)

摘要:目的 探讨结直肠癌(CRC)中糖酵解相关烯醇化酶 3(ENO3)表达与患者临床病理特征及预后生存的相关性。方法 采用免疫组织化学染色技术检测了 154 例 CRC 患者 FFPE 组织样本中的 ENO3 蛋白表达, 经免疫染色评分, 进行临床病理资料统计关联分析和生存分析。结果 结直肠癌组织中 ENO3 表达强弱与患者年龄、性别和肿瘤部位、大小、组织分级、病理分期、淋巴结转移, 以及 KRAS、NRAS 和 BRAF 等基因的热点突变均无统计学相关性。但是, 生存分析结果表明, ENO3 蛋白低表达患者较 ENO3 高表达患者具有更长的总生存期(危险比为 0.425, 95% CI = 0.197 ~ 0.752)。结论 ENO3 在 CRC 中的生物学作用并非糖酵解途径促进 CRC 发生发展, 而可能是治疗反应影响因素, 这可能与 ENO3 蛋白的铁死亡抑制功能相关, 但具体分子机制需进一步研究。

关键词:糖酵解; 烯醇化酶; 结直肠癌; 铁死亡

中图分类号: R735.3

文献标识码: A

文章编号: 2095-4646(2024)06-0519-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI: 10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0519



Enolase 3 Expression is Associated with the Clinical Pathological Characteristics and Survival of Colorectal Cancer

MENG Fan-lai, LIANG Xiao-dong

(The Affiliated Suqian Hospital of Xuzhou Medical University, Suqian Jiangsu 223800, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the Enolase 3 (ENO3) expression in colorectal cancer (CRC) and its correlation with the clinicopathological characteristics and survival of CRC patients. **Methods** Immunohistochemical staining was used to detect ENO3 protein expression in FFPE tissue samples of 154 CRC patients. The immunostaining scores were used to conduct correlation analysis of clinical pathological features and survival. **Results** There were no statistical correlation between the ENO3 expression and the age, gender, tumor location, size, tissue grade, pathological stage, lymph node metastasis, and hotspot mutations of KRAS, NRAS, BRAF genes of the CRC patients (all $P > 0.05$). However, survival analysis showed that the CRC patients with low ENO3 expression had longer overall survival than the CRC patients with high ENO3 expression (hazard ratio 0.425, 95% CI = 0.197 ~ 0.752). **Conclusion** The biological action of ENO3 can not promote the CRC development, and it may be an influencing factor of treatment response of CRC patients, which may be related to the ferroptosis inhibitory function of ENO3. However, the specific molecular mechanism still needs the further study.

KEY WORDS: Glycolysis; Enolase; Colorectal cancer; Ferroptosis

* 通讯作者, E-mail: wenyuegu1818@163.com

结直肠癌(CRC)是最常见的恶性消化系统肿瘤之一,全球每年约有190万新发病例,93万死亡病例,在各类肿瘤中发病率居第三位,死亡率居第二位,且呈逐年上升趋势^[1]。2020年中国数据显示,新诊断结直肠癌病例占全球新发病例的28.8%,死亡病例占全球相关死亡病例的30.6%,给我国社会带来巨大负担^[2-3]。目前,结直肠癌的综合治疗,包括手术切除、新辅助放化疗、术后放化疗、靶向治疗和免疫治疗都已取得长足进步,显著改善了患者预后,提高了患者生存率^[2-3]。目前,CRC患者的临床治疗和预后主要还是基于TNM分期系统^[4],但是肿瘤生物学是一个复杂过程或状态,即便是同一阶段的个体也可能在预后和临床治疗的反应上表现出巨大异质性。例如均为右半结肠肿瘤且TNM分期相同的患者,在预后、治疗反应和生物学机制上均存差异^[5]。因此,探索更佳有效、准确的关键分子标志物,对可靠的预测患者预后和监测治疗是非常重要的。

烯醇化酶家族(Enolases)是细胞糖酵解途径中重要成分,广泛存在于从细菌到哺乳动物生物体内,主要包括烯醇酶1(ENO1)、烯醇酶2(ENO2)、烯醇酶3(ENO3)和烯醇酶4(ENO4)^[6-7]。Kong K W^[8]及Chen J Y^[9]的研究结果表明,ENO3作为一种糖酵解酶,可将2-磷酸甘油酸催化为磷酸烯醇丙酮酸,其表达下调可显著抑制体外肿瘤细胞生长。已有研究报道ENO3对CRC具有预后诊断价值^[10],及与结直肠癌发生进展相关^[9],但其表达与CRC临床病理特征的关系尚不清楚。因此,在本研究中,我们共收集了154例CRC患者FFPE样本,通过免疫组织化学染色(IHC)技术,结合统计学关联性分析了ENO3表达与患者临床病理特征及生存预后关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

ENO3抗体(GeneTex, GTX113429);HRP辣根过氧化物酶标记二抗(北京中杉金桥);人类KRAS、NRAS和BRAF基因突变检测(PCR-荧光探针法,武汉友芝友);组织切片机(Thermo);光学显微镜(奥林巴斯);LightCycler 480荧光定量PCR仪(Roche)。

1.2 组织样本

本研究内容和流程均已获得徐州医科大学附

属宿迁医院伦理委员会批准(伦理号:20210134B)。于本院组织病理样本库中共获取了154例2017年至2019年期间的CRC FFPE(Formalin-fixed paraffin-embedded)标本。其中,研究所用FFPE样本、有关临床病理资料及随访信息(随访6个月/次)的获取和利用均按照伦理程序和规范进行。

1.3 免疫组织化学染色(IHC)及染色评分

组织切片机上制备5 μm组织切片,置于防脱载玻片上;室温二甲苯脱蜡3次,每次10min;用无水乙醇及95%、80%、70%乙醇和蒸馏水、PBS递次水化处理组织切片,于3%双氧水中10min灭活内源性过氧化物酶活性;置EDTA抗原修复液(pH 8.0)中高温高压2min,自然冷至室温;PBC洗涤后滴加抗ENO3抗体(GeneTex, GTX113429;稀释比1:350)50 μL/样本,4℃过夜;PBS冲洗3次,每次5min;滴加辣根过氧化物酶标记二抗50 μL/样本,室温孵育30min;PBS洗涤后,滴加DAB显色剂室温孵育5min,自来水冲洗10min终止反应;经苏木精复染、稀盐酸分化后,经常规脱水、透明、中性树胶封片后,待检。

对胞浆表达的ENO3蛋白进行染色评分,标准为:无着色(0);弱的、不均匀棕黄着色为弱阳性表达(+);呈不均匀中等强度的棕黄着色的为中等强度阳性(++);≥10%细胞呈棕褐色着色的为强阳性表达(+++)。统计分析时,将0/+评分定义为ENO3蛋白低表达组,++/+++定义为ENO3蛋白高表达组。

1.4 KRAS、NRAS和BRAF基因突变检测

由病理医师阅片过程中,选取合适蜡块组织样本,制备蜡卷,进行DNA提取,测定DNA浓度及质量后,采用ARMS-PCR技术进行KRAS、NRAS和BRAF基因突变检测(武汉友芝友),于LightCycler 480荧光定量PCR平台(Roche)按照试剂说明进行ARMS-PCR反应及结果判定,同时设立阴性及阳性对照以保证结果的准确性。

1.5 统计学分析

以中位数±标准差或n(%)表示相应数据。所有统计检验均使用SPSS 21.0软件包进行。连续数据采用Student's-t检验,计数资料采用卡方检验。采用Kaplan-Meier方法进行生存估计,通过Log-rank检验比较两组间生存曲线差异。 $P < 0.05$ 认定为有统计学差异。

2 结果

2.1 患者基本特征

154例CRC患者具体病理特征结果见表1。

表1 纳入研究患者的临床病理特征

特征	n=154
年龄[中位数(范围),岁]	65(30-90)
性别/[n(%)]	
男	100(64.9)
女	54(35.1)
肿瘤部位/[n(%)]	
左半结肠	42(27.3)
右半结肠	35(22.7)
直肠	78(50.0)
肿瘤大小[中位数(范围),cm]	4(1.2-10)
组织学分化/[n(%)]	
高分化	1(0.6)
中分化	94(61.0)
低分化	59(38.3)
病理分期/[n(%)]	
I	14(9.1)
II	47(30.5)
III	88(57.1)
IV	5(3.2)
淋巴结转移/[n(%)]	90(58.4)
KRAS突变/[n(%)]	63(40.9)
NRAS突变/[n(%)]	4(2.6)
BRAF V600E突变/[n(%)]	18(11.7)
MSI状态/[n(%)]	
MSS	125(81.2)
MSI-L	8(5.2)
MSI-H	21(15.6)
随访时间[中位数(范围),月]	23.50(1.0-51)

2.2 ENO3 蛋白表达分级及其与结直肠癌临床病理特征和预后生存之间的相关性分析

ENO3 蛋白定位于胞浆,在 154 例 FFPE 标本中未观察到阴性染色样本,其中,ENO3 低表达样本 60 例,高表达样本 94 例。所观测的各项人口学数据,如年龄分布、性别比例在 ENO3 蛋白高、低表达组之间无显著统计学差异(表 2)。此外,ENO3 蛋白表达与肿瘤发生部位、大小、组织学分级、病理分期、淋巴结转移情况,以及 KRAS、NRAS 和 BRAF V600E 等突变情况和基因组微卫星稳定状态无显著统计学关联(表 2)。随访至 24 个月时,患者总生存分析发现,ENO3 低表达组患者死亡事件发生频度 13.3% (8/60),高表达组患者死亡事件发生频度 28.7% (27/94);并随着随访时间的推移,其低表达组患者较高表达患者具有更长的总生存期,其危险比为 0.425 (95% CI = 0.197 ~ 0.752, $P=0.013$) 见图 1。

表2 ENO3 蛋白表达分级与结直肠癌临床病理特征之间的相关性比较

特征	ENO3 蛋白表达分级		P
	低表达组 (n=60)	高表达组 (n=94)	
年龄[中位数±标准差,岁]	65.5±10.4	64.0±9.5	0.461
性别/[n(%)]			0.305
男	36 (60.0)	64 (68.1)	
女	24 (40.0)	30 (31.9)	
肿瘤部位/[n(%)]			0.347
左半结肠	12 (20.0)	30 (31.0)	
右半结肠	14 (23.3)	21 (22.3)	
直肠	34 (56.7)	44 (46.8)	
肿瘤大小[中位数(四分位数),cm]	4.0 (2.0)	4.0 (1.95)	0.616
组织学分化/[n(%)]			0.269
高分化	0 (0.0)	1 (1.1)	
中分化	41 (68.3)	53 (56.4)	
低分化	19 (31.7)	40 (42.5)	
病理分期/[n(%)]			0.450
I-II	26 (43.3)	35 (37.2)	
III-IV	34 (56.7)	59 (62.8)	
淋巴结转移/[n(%)]	34 (56.7)	56 (59.6)	0.721
KRAS突变/[n(%)]	29 (48.3)	34 (36.2)	0.134
NRAS突变/[n(%)]	0 (0.0)	4 (4.3)	0.105
BRAF V600E突变/[n(%)]	5 (8.3)	13 (13.8)	0.301
MSI状态/[n(%)]			0.924
MSS	48 (80.0)	77 (81.9)	
MSI-L	3 (5.0)	5 (5.3)	
MSI-H	9 (15.0)	12 (12.8)	
随访时间[中位数(全距)]	26.5 (50)	21.0 (49.0)	0.106

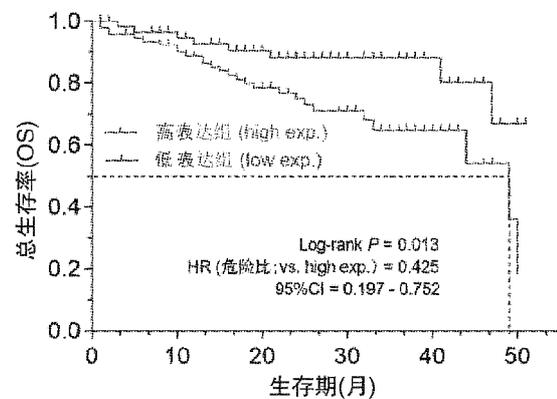


图1 ENO3 蛋白高、低表达组患者的总生存曲线分析

3 讨论

烯醇化酶家族是细胞内糖酵解途径中的重要蛋白酶类,包括烯醇酶 1 (ENO1)、烯醇酶 2 (ENO2)、烯醇酶 3 (ENO3) 和烯醇酶 4 (ENO4)。其中,ENO1 表达与膀胱癌、胃癌和结直肠癌等多种肿瘤相关^[11-12]。ENO4 烯醇酶与精子发育和活性密切相关^[13]。ENO2 也称为神经元特异性烯醇化酶 (NSE),是糖酵解酶烯醇化酶的细胞特异性同工酶,主要在成熟神经元和神经元来源的细胞

表达^[13],可以作为一种可靠的肿瘤标志物,区分早期恶性结直肠肿瘤和良性肿瘤^[14]。其 ENO2 表达与多种肿瘤的发生、发展相关^[13],在肿瘤细胞中的作用主要是加速胞内糖酵解过程,以支撑肿瘤细胞高代谢、高增殖率需求^[15]。与其他恶性肿瘤相似,CRC 细胞典型特征也是细胞信号调控和能量代谢异常。ENO2 在 CRC 中过度表达^[16],与 CRC 转移相关^[17]。然而,烯醇化酶(ENO)基因家族中的 ENO3 与 ENO2 相比,目前有关 ENO3 在肿瘤中的功能作用研究报道较少。Kong K W^[8]等人研究结果表明,下调 ENO3 基因表达可体外抑制肿瘤细胞生长。Pan X H^[10]等人发现,CRC 组织细胞中高水平表达 ENO2 和 ENO3 基因;TCGA 数据分析结果表明,此类 ENO 基因的低表达与 CRC 预后正相关,可作为结肠癌患者的有效预后生物标志物。另外,Chen 等^[9]的研究证实,ENO3 可通过增强细胞糖酵解促进 CRC 进展,在 CRC 中显著上调,其高表达与 CRC 患者预后不良和临床分期呈较高正相关。然而,有研究表明^[18],ENO3 作用会具有肿瘤差异,研究结果显示肝癌组织中 ENO3 蛋白表达水平低于其正常对照组织。与前述 CRC 相关性研究不同,我们的研究结果表明,ENO3 表达与 CRC 临床病理特征(肿瘤部位、大小、组织分级、病理分期、淋巴结转移,以及 KRAS、NRAS 和 BRAF 等基因的热点突变)不存在显著统计学关联性,但与 CRC 患者总生存期显著负相关。这提示,ENO3 在 CRC 中的生物学作用可能并非通过糖酵解途径促进 CRC 发生发展,而是与治疗反应有关,其具体分子机制尚不清楚,需要进一步研究予以证实。

但是,目前最新研究表明,ENO3 除了在磷酸丙酮酸水合酶活性、磷酸丙酮酸水合酶复合物及糖酵解过程发挥作用以外,还可以在抑制肿瘤细胞铁死亡过程^[19]。铁死亡是一种新近发现的铁依赖的调节性细胞死亡形式,其发生的核心在于活性氧(ROS)产生和羟基自由基($\cdot\text{OH}$)介导的脂质过氧化及细胞质膜损伤^[20]。但这个过程受到抗氧化剂和膜修复系统抑制,而 ENO3 参与的糖酵解过程可能参与了这一过程^[19]。既往结直肠疾病的相关研究发现^[19-20],铁死亡通路被激活是非肿瘤性疾病中细胞死亡的重要机制,同时也能介导结直肠肿瘤细胞死亡。目前,结直肠癌具有多种临床治疗手段。现有研究证实,这些治疗手段,包括放疗、化疗和靶向治疗等,都可以促进脂质活性氧和质膜损伤累积,导致细胞铁死

亡^[21];如顺铂已经被证实可诱导结直肠癌细胞铁死亡,其与细胞铁死亡诱导剂具有显著协同作用^[22]。Park S 等人研究表明,对于 KRAS 突变型结直肠患者,可通过诱导肿瘤细胞发生 ACSL4 依赖性铁死亡,增加其临床治疗有效性^[23]。因此,依本研究结果合理推测,ENO3 可作为一个潜在功能的治疗反应蛋白,能够通过靶向抑制其表达或功能,增加 CRC 细胞药物诱导铁死亡敏感性,作为 CRC 患者的补充治疗方式。可见,进一步 ENO3 与铁死亡的机制探索,有望成为 CRC 治疗新方向。

参考文献:

- [1]SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209
- [2]LI N, LU B, LUO C, et al. Incidence, mortality, survival, risk factor and screening of colorectal cancer: a comparison among China, Europe, and Northern America [J]. Cancer Lett, 2021, 522: 255
- [3]ZHANG L, CAO F, ZHANG G, et al. Trends in and predictions of colorectal cancer incidence and mortality in china from 1990 to 2025 [J]. Front Oncol, 2019, 9: 98
- [4]LI J, GUO B C, SUN L R, et al. Tnm staging of colorectal cancer should be reconsidered by t stage weighting [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(17): 5104
- [5]GALLOIS C, PERNOT S, ZAAANAN A, et al. Colorectal cancer: why does side matter? [J]. Drugs, 2018, 78(8): 789
- [6]KANG H J, JUNG S K, KIM S J, et al. Structure of human alpha-enolase (eno1), a multifunctional glycolytic enzyme [J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2008, 64(6): 651
- [7]WU J, ZHOU D, DENG C, et al. Characterization of porcine eno3: genomic and cdna structure, polymorphism and expression [J]. Genet Sel Evol, 2008, 40(5): 563
- [8]KONG K W, ABDUL AZIZ A, RAZALI N, et al. Antioxidant-rich leaf extract of barringtonia racemosa significantly alters the in vitro expression of genes encoding enzymes that are involved in methylglyoxal degradation III [J]. PeerJ, 2016, 4: e2379
- [9]CHEN J, ZHANG Z, NI J, et al. Eno3 promotes colorectal cancer progression by enhancing cell glycolysis [J]. Med Oncol, 2022, 39(5): 80
- [10]PAN X, WU H, CHEN G, et al. Prognostic value of enolase gene family in colon cancer [J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e922980
- [11]JI M, WANG Z, CHEN J, et al. Up-regulated eno1 promotes the bladder cancer cell growth and proliferation via regulating β -catenin [J]. Biosci Rep, 2019, 39(9): BSR20190503
- [12]ZHAN P, WANG Y, ZHAO S, et al. Fbxw7 negatively regulates eno1 expression and function in colorectal cancer [J]. Lab Invest, 2015, 95(9): 995

程序化急诊急救护理对 AMI 患者急救效果及家属满意度分析

王媛, 邓敏*

(湖北科技学院附属第二医院, 湖北 咸宁 437100)

摘要:目的 探究程序化急诊急救护理对急性心肌梗死(AMI)患者临床转归和抢救效率的影响,并分析患者家属对护理服务的满意度。**方法** 以 77 例急性心肌梗死患者作为研究对象,对临床基础资料进行回顾性分析,根据护理方案不同将患者分为两组,程序化急诊急救护理组(程序化组)患者 39 例,常规护理组(对照组)患者 38 例。对照组的护理方法为常规急诊急救护理,程序化组则调整为程序化急诊急救护理。统计并比较两组临床转归情况(急救成功率、不良心脏事件发生率)及抢救效率指标水平。**结果** 程序化组患者急救成功率为 97.44%,不良心脏事件发生率为 7.69%,患者家属对护理服务满意度为 97.44%;对照组患者急救成功率为 78.95%,不良心脏事件发生率为 26.32%,患者家属对护理服务满意度为 78.95%,上述指标两组相比差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组相比,抢救效率指标(首次心电图检查时间、抢救时间及病情缓解时间)程序化组均短于对照组,经检验差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 对急性心肌梗死患者实施程序化急诊急救护理可以改善抢救效率,提高抢救成功率,减少不良心脏事件发生率。

关键词:程序化急诊急救护理;急性心肌梗死;不良心脏事件;临床转归;急救效果;满意度

中图分类号:R473

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)06-0523-004

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0523



Analysis of the Effect of Programmed Emergency Care on AMI Patients and their Family Members Satisfaction

WANG Yuan, DENG Min

(The Second Affiliated Hospital of Hubei University of Science and Technology,
Xianning Hubei 437100, China)

ABSTRACT: Objective To explore the effect of programmed emergency nursing on clinical outcome and rescue efficiency of patients with acute myocardial infarction (AMI), and analyze the satisfaction of patients' families with nursing services. **Methods** 77 patients with AMI were taken as the research objects, and the clinical basic data were retrospectively analyzed. According to different nursing plans, the patients were divided into two groups: 39 patients in the programmed emergency care group (the programmed group) and 38 patients in the conventional care group (the control group). The nursing method of the control group was routine emergency nursing, while that of the programmed group was adjusted to the programmed emergency nursing. The clinical outcomes (first aid success rate, incidence of adverse cardiac events) and rescue efficiency indexes of the two groups were statistically compared. **Results** In the programmed group, the success rate of first aid was 97.44%, the incidence of adverse cardiac events was 7.69%, and the satisfaction rate of patients' families on nursing services was 97.44%, while in the control group, the success rate of first aid was 78.95%, the incidence of adverse cardiac events was 26.32%, and the satisfaction rate of patients' families on nursing services was 78.95%. The above indexes were statistically significant between the two groups (all $P < 0.05$). Compared with the control group, the rescue efficiency index (first ECG examination time, rescue time and disease remission time) of the programmed group was shorter, and showed the statistically difference (all $P < 0.05$). **Conclusion** The implementation of programmed emergency nursing for patients with AMI can improve the success rate of rescue, increase the rescue efficiency and re-

* 通讯作者, E-mail: 2895275149@qq.com

duce the incidence of adverse cardiac events.

KEY WORDS: Programmed emergency nursing; Acute myocardial infarction; Adverse cardiac event; Clinical outcome; First aid effect; Satisfaction

急性心肌梗死(AMI)是由于冠状动脉急性闭塞,血流中断,导致心肌持续性缺血缺氧而引起的坏死^[1],其发病率呈上升趋势,已成为威胁人民生命安全的重大疾病^[2]。AMI治疗的主要目的是尽快恢复心肌血供,防止心肌梗死面积扩大,缩小心肌缺血范围,及时处理严重心律失常、泵衰竭和各种并发症,防止猝死,使患者不但能渡过急性期,且康复后还能保持尽可能多的有功能的心肌^[3]。在该病的抢救工作中,发病至完成再灌注的最佳时间应该在6h内,为达成在6h内完成心肌再灌注,优化急诊急救护理,缩短急诊急救时间对提高急救效率至关重要^[4]。常规急诊急救护理工作内容较多,极容易出现混乱,导致抢救速度受到影响。程序化急诊急救护理是指结合患者的疾病特征及实际护理需求设定预定的急诊急救护理流程,从而避免护理工作忙乱。基于此,本研究以AMI患者为研究对象,通过对照的方式观察和对比程序化急诊急救护理对AMI患者临床转归、抢救效率及患者家属对护理服务满意度等的影响,现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 纳入与排除标准

纳入标准:①参照相关诊疗指南^[5-6],结合临床心电图检查、病理学检查等确诊为急性心肌梗死;②具备正常的沟通、理解能力;③首次发病;④已签署《知情同意书》;⑤发病后及时入院,发病至入院时间 $\leq 3h$ 。排除标准:①凝血系统异常;②伴肺、肾等重要脏器功能衰竭;③入院前自行接受其他药物干预。

1.2 一般资料

以我院2023年6月至2024年2月期间收治的77例AMI患者为研究对象,按照RCT的随机化原则,在符合纳入与排除标准前提下,按照出诊单号(院前急救患者)或急诊登记号(院内急救患者)奇偶数进行分组,奇数者接受程序化急诊急救护理,偶数者接受常规急诊急救护理。将其中39例接受程序化急诊急救护理患者作为程序化组,另将38例接受常规急诊急救护理的患者为对照组。两组患者性别、年龄、梗死部位等资料相比差

异均无统计学意义($P > 0.05$),详见表1,本研究获得了医院科学研究伦理委员会的批准。

表1 两组患者一般情况资料比较

组别	性别		年龄/岁 ($\bar{x} \pm s$)	梗死部位		
	男	女		下壁	侧壁	前壁
程序化组	17	22	57.18 \pm 6.31	19	4	16
对照组	19	19	56.83 \pm 6.82	16	6	16

1.3 护理方法

对照组接受常规急诊急救护理,具体如下。
①院前急救:接到急诊电话后常规出诊;见到患者后一边给予其心电监护、建立静脉通道、吸氧等干预,一边了解病史、症状情况等,确诊后经由绿色通道送入抢救室救治。
②院内急救:对于门诊胸痛来的患者,常规由护理人员快速分诊,并给予心电监护、建立静脉通道、吸氧等干预,确诊后送抢救室救治。

程序化组在对照组的基础上接受程序化急诊急救护理,具体措施如下。

(1)院前急救。
①评估:急救中心接到求救电话后立即通知急救小组,并在3min安排出诊,医师、护理人员分工合作,医师负责询问病史、查体、初步诊断等工作,护士负责进行心电图检查、建立静脉通道等工作。
②诊断:在完成各项检查后及时通过微信将检查结果发送到医院,由医院住院总医师负责评估判断并沟通病情。
③计划:由医生结合评估和诊断结果拟定后续治疗计划和相应的护理需求,护理人员结合护理需求进行护理配合。
④实施:对于开通绿色通道,救护车到医院后直接送入抢救室。对于药物干预,在运输过程中,护理人员遵医嘱给予患者替格瑞洛、阿司匹林、瑞舒伐他汀等药物进行干预。对于病情评估,由急诊医师根据前期检查资料迅速评估患者是否符合经皮冠状动脉介入术(PCI)指征,如符合,迅速电话通知导管室做好手术前期准备。对于介入手术(PCI),患者病情稳定后立即送入急诊科观察,再次评估PCI指征与风险,遵医嘱给予患者干预,在执行知情同意确认后迅速送入导管室予以PCI治疗。

(2)院内急救。
①评估:对自行来院的急性胸痛患者由急诊护士进行预检分诊后,迅速启动院

内胸痛诊疗流程,由急诊护士为患者建立胸痛档案,并迅速完成意识、呼吸、心率、血压等方面体征评估,并做好记录。②诊断:对体征评估结果分为体征稳定和体征不稳定两种结果。③计划:结合不同结果快速拟定后续护理和急救措施。④实施:对于体征稳定的患者,快速完成心电图检查,填写时间管理表,通知心电科医师快速到达现场评估心电图,并将患者转入抢救室,给予心电监护和绝对卧床休息,密切观察其生命体征,如发现异常则及时遵医嘱处理。对于生命体征不稳定的患者,迅速推入抢救室,开启时间节点表,由抢救室医护进入抢救流程,同时急诊护士协助并指导家属办理相关手续。

1.4 质量控制

实验前制定详细的程序化急诊急救护理方案,编制标准操作手册,并对医护人员进行培训,确保每一位参与急诊急救的医护人员掌握操作规程和要求;实验过程中程序化组严格按照操作手册开展急诊急救护理,并由资深护士进行督导;在资料分析阶段由统计分析人员对两组资料进行甄别,剔除可能彼此沾染的病例,避免沾染效应的出现。

1.5 观察指标

(1)临床转归情况。以抢救成功率和不良心脏事件发生率两项指标作为临床转归指示指标。①抢救成功率=抢救成功例数/总例数 $\times 100\%$ 。②不良心脏事件发生率以心力衰竭、再次心肌梗死、恶性心律失常等不良心脏事件发生的概率作为指示指标。

(2)抢救效率指标。①首次心电图检查时间:指护理人员第一次为患者进行心电图检查并获得检查结果的时间;②抢救时间:指患者进入抢救室后至急诊急救结束后其出抢救室的时间;③病情缓解时间:指患者病情稳定时间。

(3)患者家属满意度。急救结束后通过纽卡斯尔护理服务满意度量表(NSNS)对两组患者家属进行调查,评估家属对急救过程中护理服务的满意度。NSNS量表共19个条目,采用Likert 5级评分法(其中非常不满意为0分,不满意为1分,一般为2分,满意为3分,非常满意为4分),并将5个等级合并成3层,即不满意(含非常不满意、不满意)、一般和满意(含满意和非常满意)。对给赋分值进行百分制转换,公式为:有效应答条目得分之和 \div 有效应答条目 $\div 4 \times 100$,总分为100分, <60 分为不满意, $60 \sim 80$ 分为一般, >80 分为

满意^[7-9]。

1.6 统计学方法

应用SPSS 26.0软件进行统计分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床转归情况比较

程序化组抢救成功率为97.44%,高于对照组的78.95% ($P < 0.05$);不良心脏事件发生率程序化组为7.69%,低于对照组的26.32% ($P < 0.05$),见表2。

表2 两组患者临床转归情况比较 [$n(\%)$]

组别	例数	抢救成功率	不良心脏事件发生率			
			心力衰竭	再次心肌梗死	恶性心律失常	总发生
程序化组	39	38(97.44)*	1(2.56)	1(2.56)	1(2.56)	3(7.69)*
对照组	38	30(78.95)	3(7.89)	3(7.89)	4(10.53)	10(26.32)

与对照组相比,* $P < 0.05$ 。

2.2 两组抢救效率指标比较

程序化组抢救效率系列指标(首次心电图检查时间、抢救时间及病情缓解时间)均明显短于对照组 ($P < 0.05$),见表3。

表3 两组患者抢救效率指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	首次心电图检查时间/min	抢救时间/min	病情缓解时间/h
程序化组	39	4.06 \pm 1.07*	42.83 \pm 11.59*	52.39 \pm 9.27*
对照组	38	4.93 \pm 1.16	52.42 \pm 11.67	60.66 \pm 9.64

与对照组相比,* $P < 0.05$ 。

2.3 两组家属对护理服务满意度比较

急救结束后应用NSNS量表对两组家属进行护理服务满意度调查,结果显示,程序化组家属对护理服务满意度为97.44%,高于对照组的78.95% ($P < 0.05$),见表4。

表4 两组家属对护理服务满意度比较 [$n(\%)$]

组别	n	满意	一般	不满意	满意度
程序化组	39	30(76.92)	8(20.51)	1(2.56)	38(97.44)*
对照组	38	22(57.89)	8(21.05)	8(21.05)	30(78.95)

与对照组相比,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

急性心肌梗死(AMI)是由于冠状动脉急性闭塞而导致血供减少,心肌出现缺血、缺氧,近年来其发病率呈逐年上升趋势,并且死亡率明显升高^[21]。对于AMI患者,在院前及院内急救过程中优化护理流程,缩短抢救时间,尽最大程度恢复患者心肌血供,对减少不可逆性心肌损伤,提高抢救成功率尤为重要。常规急诊急救工作人员协调能力较差,导致工作缺乏连贯性,严重影响急救效率。程序化急诊急救护理是指在护理工作中运用系统方式构建护理工作框架,为患者提供计划性、连续性的护理服务。本研究结果显示实施程序化护理组患者首次心电图检查时间、抢救时间、病情缓解时间均短于常规急诊急救护理组($P < 0.05$),这与以往类似的研究结果相一致^[10-11]。程序化急诊急救护理模式可以为医护人员提供一种特殊的思维与行动模式,帮助医护人员快速解决急诊急救过程中出现的各种问题,继而提高急诊急救工作效率,促使患者早期得到救治,对提高抢救效果有重要作用^[12]。

对AMI患者实施程序化急诊急救护理后,其抢救成功率(97.44%)高于常规急诊急救护理组(78.95%),不良心脏事件发生率(7.69%)低于常规急诊急救护理组(26.32%),差异均具有统计学意义($P < 0.05$),可见程序化急诊急救护理可以改善其临床转归情况。分析原因,程序化急诊急救可以为患者提供一个系统的、综合的、完整的、动态的护理过程,通过了解患者的病情,对其进行评估、计划、实施,明确患者具体情况后为其进行急诊急救,有助于提高护理效果和抢救成功率。此外,在该护理模式中,通过快速评估患者病情和生命体征,全面了解其身体情况,有助于预估其不良心脏事件的风险,并为其拟定针对性的护理计划,对预防和减少不良心脏事件有一定效果。

AMI患者的急救需要争分夺秒,在急救过程中患者家属会表现的更加焦虑,对护理工作效率期望值会更高。因此,护理质量和效率也直接影响患者家属的满意度。在本研究中,按照程序化护理流程对AMI患者开展急救,护士之间密切配合,各司其职,避免无效或者重复性工作,不仅能够提高抢救成功率,改善抢救效率,也显著提高了患者家属对急救护理服务的满意度,与朱秋杰、杨美香、熊祥青等的研究结果相一致^[10,13-14]。

综上所述,对AMI患者实施程序化急诊急救

护理可以提高抢救效率,改善患者临床转归,并能够提高患者家属对护理服务的满意度,值得在临床推广应用。

参考文献:

- [1]胡楚婷,宋煜,王琳. TLR4参与急性心肌梗死及其治疗的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志,2024,32(8):705
- [2]《中国心血管健康与疾病报告2022》编写组.《中国心血管健康与疾病报告2022》要点解读[J]. 中国心血管杂志,2023,28(4):297
- [3]戚丽亭. 链式急救护理流程管理对急性心肌梗死患者抢救效果的影响——评《急性心肌梗死现代治疗策略》[J]. 世界中医药,2023,18(12):1792
- [4]陈欣彤,陈小娇. 医护一体化急诊急救护理流程对提高急性心肌梗死抢救成功率的效果研究[J]. 心血管病防治知识,2021,11(12):51
- [5]中华医学会心血管病分会,中华心血管病杂志编辑委员会. 非ST段抬高急性冠状动脉综合征诊断和治疗指南[J]. 中华心血管病杂志,2012,40(5):353
- [6]葛均波,戴宇翔. 中国非ST段抬高型急性冠状动脉综合征诊断和治疗现状[J]. 浙江医学,2017,39(13):1045
- [7]THOMAS L H, MCCOLL E, PRIEST J, et al. Newcastle satisfaction with nursing scales an instrument for quality assessments of nursing care[J]. Qual Health Care,1996,5(2):67
- [8]马利君. 兰州市第二人民医院老年住院患者护理服务质量调查及影响因素研究[J]. 甘肃中医药大学学报,2020,37(5):105
- [9]冯彬,高英,史超,等. 基于急救护理质量构建急性心肌梗死患者急救流程护理方案及其急救效果初探[J]. 中国急救复苏与灾害医学杂志,2024,19(2):237
- [10]熊祥青,叶建平. 急诊护理流程优化在急性心肌梗死患者抢救中的应用价值[J]. 中国医药指南,2023,21(28):148
- [11]邓梅娟. 优化急诊护理流程对急性心肌梗死患者抢救效果的影响分析[J]. 心血管病防治知识,2021,11(7):48
- [12]刘晓阳,王丽萍,吴学勤,等. 个性化护理对老年急性心肌梗死患者转运成功率、急救成功率和护理满意度的影响[J]. 贵州医药,2021,45(9):1512
- [13]朱秋杰,王艳如,朱磊. 程序化急诊急救护理对AMI急救效率及临床转归的影响[J]. 安徽医学,2023,22(1):70
- [14]杨美香. 程序化急诊急救护理对急性心肌梗死患者急救效率及临床转归的影响[J]. 中外医疗,2022,41(9):158

(收稿日期:2024-04-01)

功能康复操训练对妇产科腹腔镜术后患者非切口疼痛的影响

刘 晓,孔令磷,罗菊英,赵梦遐,段 丹,李 彤,冯 丽

(湖北科技学院公共卫生与健康学院,湖北 咸宁 437100)

摘要:目的 探讨功能康复操训练对妇产科腹腔镜术后患者非切口疼痛的影响。方法 采用方便抽样的方法抽取腹腔镜手术治疗的183例患者作为研究对象,采用投硬币的方法分为观察组83例,对照组100例,对照组采用常规护理,观察组在对照组的基础上采用功能康复操训练,比较倾向性评分匹配(PSM)前后患者的一般资料、疼痛得分、发生率、时间、部位、下床活动时间、排气时间和患者满意度。结果 PSM前后观察组术后12h(PSM前)、24h、48h、72h的非切口疼痛得分、疼痛发生率、疼痛时间、下床活动时间和排气时间明显低于对照组(P 均 <0.05),观察组很满意的发生率高于对照组($P<0.05$)。结论 功能康复操训练能有效缓解妇产科腹腔镜术后患者非切口疼痛程度,降低疼痛发生率及疼痛时间,缩短患者术后下床活动时间及排气时间,促进了患者术后早期康复,提高了围术期护理质量,患者满意度增强,值得推广。

关键词:功能康复操训练;腹腔镜;非切口疼痛

中图分类号:R473.71

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)06-0527-004

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0527



The Effect of Functional Rehabilitation Exercise Training on Non-Incision Pain in Patients Undergoing Laparoscopic Surgery in Obstetrics and Gynecology

LIU Xiao, KONG Ling-lin, LUO Ju-ying, et al

(School of Public Health and Nursing, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100, China)

ABSTRACT: Objective Exploring the effect of functional rehabilitation exercise training on non-incision pain in patients undergoing laparoscopic surgery in obstetrics and gynecology. **Methods** 183 patients who underwent laparoscopic surgery in the obstetrics were chosen as the study subjects using a convenient sampling method, and were randomly divided into experimental group with 83 cases and control group with 100 cases using the method of coin toss. The control group received routine nursing care, while the experimental group received functional rehabilitation exercise training on the basis of the control group. The general information, pain scores, pain incidence, pain time, pain location, time to bed activity, exhaust time, and patient satisfaction of two groups were compared before and after propensity score matching (PSM). **Results** The non-incision pain scores, pain incidence, pain time, and time to get out of bed activity of the experimental group before and after PSM were significantly lower than those of the control group at 12 hours (before PSM), 24 hours, 48 hours and 72 hours postoperatively ($P<0.05$). The patient satisfaction of the experimental group was higher than that in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Functional rehabilitation exercise training can effectively alleviate the degree of non-incision pain in patients after laparoscopic surgery in obstetrics and gynecology, reduce the incidence and duration of pain, shorten the time for patients to get out of bed and exhaust, promote early postoperative recovery, improve the quality of perioperative care, enhance patient satisfaction, and is worth promoting.

KEY WORDS: Functional rehabilitation exercise training; Laparoscopy; Non-incision pain

随着外科微创手术和内镜技术的快速发展,腹腔镜已经广泛应用于妇科疾病的治疗过程中,腹腔镜相比传统的开腹手术具有对腹腔和盆腔的脏器干扰小、损伤小、出血少、恢复快、切口小且美观、住院天数短等优点。但腹腔镜用于妇产科患者术后会出现肩部酸痛和膈肌酸痛、肋间牵扯痛等非切口的疼痛,发生率在35%~

80%^[1-2],多持续48~72h后自行消失。当患者深呼吸、翻身、下床活动及咳嗽时疼痛程度较重,部分患者疼痛程度甚至超过术后切口引发的疼痛^[3]。本着“以病人为中心”的人文关怀理念,把高超的护理技术与人文关怀完美结合,让病人最终受益。因此,本研究选取咸宁市某三甲医院妇产科接受腹腔镜手术治疗的183例患者作为研究

对象,探讨功能康复操训练对非切口疼痛的改善作用及影响,以期及时有效地缓解或消除妇产科腹部手术后患者的非切口疼痛,获得合适的护理,提高患者满意度。

1 资料与方法

1.1 一般资料

采取方便抽样的方法,抽取咸宁市某三甲医院妇产科2022年9月至2023年12月接受腹腔镜手术治疗的183例患者。将入选患者采用投硬币的方法进行随机分组,正面为观察组83例,反面为对照组100例。对研究对象实施盲法,为避免干扰,将两组患者安排在不同病房。纳入标准:①经检查均为妇科良性疾病;②符合腹腔镜手术指征,自愿签订知情同意书;③患者能正确感知、表达疼痛,无精神疾病。排除标准:肩颈疾病、恶性肿瘤、盆腔疼痛、心肺脑血管疾病、中转开腹术等患者。研究对象均知情同意,自愿参与本研究。

1.2 方法

对照组采用护理措施如下。①常规护理方法:术前常规健康宣教,术后常规根据医嘱吸氧8h(2L/min);全身麻醉病人在未清醒前由专人看护,去枕平卧位,头偏向一侧,硬膜外麻醉者去枕平卧位6~8h,蛛网膜下腔麻醉者去枕平卧位12h,患者清醒后鼓励早期下床活动,排气后可进流食等。②音乐疗法:可选C调和E调的舒缓音乐如《梁祝》《回家》《催眠曲》《莫斯科郊外的晚上》等。③按摩:可在术后8h进行,每天对肩部、膈肌下缘及腹部进行按摩4次(按压时避开伤口),时间为15~20min。④热敷:用炒热的食盐、米或沙子或装入布袋(或温毛巾)敷于疼痛部位,20min/次,4次/d。

观察组在对照组的基础上采用功能康复操训练。①呼吸训练。腹式呼吸,用鼻吸气,缩唇呼气,吸呼时间比为1:2,尽量深吸慢呼,8次/min,每次训练10min,每天4次。②双手反复握拳:指导患者卧床期间反复进行,左右各20次。③双腿屈膝交叉上抬,左右交替进行:指导患者取双腿屈膝平卧位,将左(右)腿放在右(左)脚上,抬高,坚持10s后放下,左右交替进行,动作重复10次。④踝泵运动:取平卧位,首先将下肢放松,并尽量伸直,然后运动脚尖,将其转向胸口,达到最大限度后保持10s,然后将脚尖向下运动达到最大限度后保持10s,最后彻底放松。⑤屈膝翻身,指导患

者取平卧位,然后双腿屈膝,用腿部力量及重量带动身体翻身,左右交替进行。⑥腹部顺时针按摩:指导患者用手顺时针按摩腹部,避开切口,每次训练15min,每天3次。⑦肩关节内旋外展运动:术后患者能坐起后开始进行肩关节内旋外展锻炼,左右各20次。

1.3 观察及判断标准

满意度采用科室患者满意度评价调查表,分为不满意、基本满意、很满意3个等级;疼痛评分采用面部表情结合“长海痛尺”^[4]进行打分,0~10分表示疼痛程度,重度疼痛(需要麻醉止痛剂,重度影响睡眠)为7~10分,中度疼痛(需要镇痛,轻度影响睡眠)为4~6分,轻度疼痛(不需镇痛药,可以忍受,不影响睡眠)为1~3分,无痛为0分。

1.4 统计学方法

采用SPSS 27.0软件进行统计学分析,先对数据进行正态分布检验,符合正态分布的计量资料采用(均数±标准差)表示,组间比较采用两独立样本 t 检验,不符合正态分布的计量资料采用百分位数 $M(P25, P75)$ 表示,组间比较采用曼-惠特尼检验,组内比较采用威尔科克森符号秩检验。计数资料采用频数(%)表示,卡方检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。运用倾向性评分匹配法(PSM)对两组患者的基线指标及疼痛、满意度和临床指标作为因变量进行1:1匹配,卡钳值设定为0.02^[5]。

2 结果

2.1 一般资料比较

PSM前,观察组83例,对照组100例,两组在年龄、BMI、手术时长、术中出血量及疾病所在部位比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。PSM后,观察组51例,对照组51例,两组在年龄、BMI、手术时长、术中出血量及疾病所在部位比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表1 PSM匹配前后基线均衡性比较($\bar{x} \pm s$)

项目	PSM前		PSM后		
	观察组(n=83)	对照组(n=100)	观察组(n=51)	对照组(n=51)	
年龄/岁	30.81±4.76	28.96±7.52	30.14±5.21	30.53±7.02	
BMI	22.97±3.91	22.38±6.71	23.02±3.95	24.12±6.55	
手术时长/h	1.89±1.19	1.67±0.74	1.71±0.69	1.56±1.04	
术中出血量/mL	76.07±87.69	74.37±92.47	75.55±79.64	54.45±51.31	
疾病部位[n(%)]	子宫	14(16.9)	30(30.0)	9(17.0)	17(33.3)
	输卵管	44(53.0)	41(41.0)	27(50.9)	24(47.1)
	卵巢	25(30.1)	29(29.0)	17(32.1)	10(19.6)

2.2 疼痛得分情况比较

通过功能康复操训练干预后,PSM前,观察组患者术后12、24、48、72h的非切口疼痛得分明显低于对照组,且两组患者疼痛得分均呈下降趋势,差异均有统计学意义($P < 0.05$),两组疼痛得分的时间效应($F = 179.000$)、组间效应($F = 21.055$)和交互效应($F = 179.000$)均具有统计学意义($P < 0.05$);PSM后,观察组术后12、24、48、72h的非切口疼痛评分明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。PSM后,两组术后12h疼痛得分比较无差异,差异无统计学意义($P > 0.05$),观察组术后24、48、72h的疼痛得分均低于对照组,且两组疼痛得分均呈下降趋势,差异均有统计学意义($P < 0.05$),两组疼痛得分的时间效应($F = 98.000$)、组间效应($F = 15.005$)和交互效应($F = 98.000$)均具有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 PSM匹配前后疼痛得分情况比较[M(P25,P75),分]

疼痛评分(分)	PSM前		PSM后	
	观察组(n=83)	对照组(n=100)	观察组(n=51)	对照组(n=51)
术后12h	4(4,5)	4(4,5)	4(4,5)	4(4,5)
术后24h	3(2,3)*	3(3,4)*	2(2,3)* Δ	3(3,4)*
术后48h	1(1,2)** $\#$	2(2,2)** $\#$	1(1,2)** Δ	2(2,2)** $\#$
术后72h	0(0,1)** Δ	1(1,1)** Δ	0(0,1)** Δ	1(1,1)** Δ

与术后12h比较,* $P < 0.05$;与术后24h比较,# $P < 0.05$;与术后48h比较, $\Delta P < 0.05$;与对照组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

2.3 疼痛发生率、疼痛持续时间及所在部位比较

PSM前后观察组疼痛发生率及疼痛持续时间均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);疼痛部位在PSM前后两组比较无差异($P > 0.05$)。见表3。

表3 两组PSM前后疼痛持续时间及部位比较[n(%)]

项目	PSM前		PSM后		
	观察组(n=83)	对照组(n=100)	观察组(n=51)	对照组(n=51)	
疼痛持续时间/h	8.24 \pm 13.76*	12.57 \pm 13.62	8.19 \pm 12.93*	13.76 \pm 13.84	
疼痛	有	27(32.5)*	56(67.5)	17(33.3)*	30(58.8)
	无	51(51.0)*	49(49.0)	34(66.7)*	21(41.2)
疼痛部位	双肩	14(51.9)	18(33.3)	11(64.7)	13(43.3)
	肘间	6(22.2)	14(25.9)	2(11.8)	7(23.3)
	腋窝	1(3.7)	10(18.5)	0(0.0)	3(10.0)
两个或三个部位同时发生	6(22.2)	12(22.2)	4(23.5)	7(23.3)	

与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.4 术后下床活动时间和排气时间比较

在PSM前后,观察组的术后下床活动时间和排气时间均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表4。

表4 PSM匹配前后术后下床活动时间及排气时间比较($\bar{x} \pm s, h$)

项目	PSM前		PSM后	
	观察组(n=83)	对照组(n=100)	观察组(n=51)	对照组(n=51)
术后下床活动时间	10.63 \pm 4.10*	13.33 \pm 5.95	10.81 \pm 4.77*	12.93 \pm 5.22
排气时间	5.83 \pm 1.18*	6.47 \pm 2.04	6.17 \pm 1.10*	6.97 \pm 1.22

与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.5 术后满意度比较

PSM前后观察组不满意及基本满意发生率均低于对照组,很满意的发生率高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表5。

表5 PSM匹配前后满意度比较[n(%)]

满意度	PSM前		PSM后	
	观察组(n=83)	对照组(n=100)	观察组(n=51)	对照组(n=51)
不满意	5(6.0)*	13(13.0)	2(3.9)*	6(11.8)
基本满意	30(36.1)*	57(57.0)	15(29.4)*	24(47.1)
很满意	48(57.8)*	30(30.0)	34(66.7)*	21(41.2)

与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

腹腔镜手术麻醉失效后患者会出现肩部、肋间、膈肌疼痛等非切口疼痛,这种疼痛主要与二氧化碳气腹对机体的刺激反应密切相关^[6],高浓度的二氧化碳可诱导机体发生四烯酸代谢,导致PGI和PGE2生成增多,增加感受器兴奋性、降低神经兴奋的阈值,增加机体对疼痛的敏感性^[7-8],且疼痛的发生与前列腺素的合成并释放密切相关,同时高压的二氧化碳气体长时间刺激膈肌,引发双侧膈肌神经反射性^[9]。

本研究结果显示,PSM前观察组术后12、24、48、72h的非切口疼痛得分明显低于对照组,PSM后观察组术后24、48、72h的非切口疼痛得分明显低于对照组($P < 0.05$),疼痛得分呈下降趋势,且观察组患者疼痛发生率及疼痛持续时间均低于对照组($P < 0.05$),说明功能康复操训练能有效降低妇产科腹腔镜术后患者非切口疼痛程度,减少疼痛发生率及疼痛持续时间。可能原因:①腹式呼吸能改善心肺功能,同时配合氧疗可增加体内氧气含量,减小二氧化碳气腹,降低血液中的碳酸

浓度^[10];②双手反复握拳可以促进肩颈的血液循环,减轻术后二氧化碳潴留引起的肩颈部疼痛;③踝泵运动和双腿屈膝交叉上抬、左右交替进行,能增加腹部和腿部肌肉的锻炼,增加肠蠕动,促进下肢血液循环,预防血栓的形成^[11];④屈膝翻身能减轻腹部张力,加强腰背锻炼,促进腰背部二氧化碳气体的吸收,减轻腰背部的气体游离引起的胀痛感;⑤顺时针按摩腹部能强健胃肠及腹壁肌肉,加强胃肠蠕动;⑥肩关节内旋外展运动能锻炼肩颈部肌肉,加速残留二氧化碳的排出,减轻疼痛。

本研究结果显示,PSM前后观察组术后下床活动时间和排气时间均低于对照组($P < 0.05$),主要原因是因为功能康复操训练能有效促进机体血液循环,利用机械运动刺激肠道蠕动,加四肢运动有助于胃肠道功能早期恢复,进而让患者下床活动时间提前^[12]。观察组不满意及基本满意发生率均低于对照组,很满意的发生率高于对照组($P < 0.05$),说明功能康复操训练增加了患者的依从性,降低疼痛,患者满意度增强。

参考文献:

- [1] TSAI H W, WANG P H, YEN M S, et al. Prevention of postlaparoscopic shoulder and upper abdominal pain: a randomized controlled trial[J]. *Obstet Gynecol*, 2013, 121(3):526
 - [2] 关楚华,莫晓程,徐翠平. 腹腔镜联合中药热奄包对妇科腹腔镜术后非切口疼痛和舒适度的影响[J]. *黑龙江医药*, 2022, 35(5):1048
 - [3] 李雯. 腹腔镜腹直肌悬吊术治疗子宫脱垂的临床疗效[J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2022, 36(6):507
 - [4] 陆小英,赵存凤,张婷婷,等. “长海痛尺”在疼痛评估中的应用[J]. *解放军护理杂志*, 2003, 20(4):6
 - [5] 李智文,张乐,刘建蒙,等. 倾向性评分匹配比在流行病学设计中的应用[J]. *中华流行病学杂志*, 2009, 30(5):514
 - [6] LE A, SHAN L, XIAO T, et al. Removal of an incarcerated intrauterine device in the sigmoid colon under the assistance of hysteroscope and laparoscope: a case report[J]. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2015, 42(4):531
 - [7] 张子宴. 早期功能康复锻炼对妇科腹腔镜手术患者的影响[J]. *护理实践与研究*, 2019, 16(14):104
 - [8] 涂远洁. 中医综合护理联合快速康复护理对卵巢囊肿腹腔镜手术患者疼痛和胃肠功能的影响[J]. *医学信息*, 2024, 37(10):160
 - [9] 周妍. 个性化疼痛护理在缓解妇科腹腔镜术后非切口性疼痛中应用的效果评价[J]. *智慧健康*, 2022, 8(2):22
 - [10] 蔡燕琴,袁伟亮. 呼吸训练联合功能康复操对缓解妇科腹腔镜患者术后非切口疼痛的临床观察[J]. *中国医药指南*, 2023, 21(29):123
 - [11] 赵德宇,储婷婷,周翠,等. 集束化干预对妇科腹腔镜术后非切口疼痛的影响[J]. *安徽医药*, 2020, 24(3):557
 - [12] 张敏. 功能康复操预防妇科腹腔镜术后非切口疼痛的效果[J]. *现代临床医学*, 2019, 45(1):74
- (收稿日期:2024-04-30)

(上接第522页)

- [13] ISGRÓ M A, BOTTONI P, SCATENA R. Neuron-specific enolase as a biomarker: biochemical and clinical aspects[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 867:125
 - [14] ZOU M, ZHANG P J, WEN X Y, et al. A novel mixed integer programming for multi-biomarker panel identification by distinguishing malignant from benign colorectal tumors[J]. *Methods*, 2015, 83:3
 - [15] LIU C C, WANG H, WANG W D, et al. Eno2 promotes cell proliferation, glycolysis, and glucocorticoid-resistance in acute lymphoblastic leukemia[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4):1525
 - [16] YEH C S, WANG J Y, CHUNG F Y, et al. Significance of the glycolytic pathway and glycolysis related-genes in tumorigenesis of human colorectal cancers[J]. *Oncol Rep*, 2008, 19(1):81
 - [17] SELGA E, MORALES C, NOÉ V, et al. E-cadherin, Enolase 2 and pkc alpha on resistance to methotrexate in human ht29 colon cancer cells[J]. *BMC Med Genomics*, 2008, 1:35
 - [18] LIU Z K, ZHANG R Y, YONG Y L, et al. Identification of crucial genes based on expression profiles of hepatocellular carcinomas by bioinformatics analysis[J]. *Peer J*, 2019, 7:e7436
 - [19] SHAO Y, JIA H, HUANG L, et al. An original ferroptosis-related gene signature effectively predicts the prognosis and clinical status for colorectal cancer patients[J]. *Front Oncol*, 2021, 11:711776
 - [20] CHEN X, KANG R, KROEMER G, et al. Organelle-specific regulation of ferroptosis[J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(10):2843
 - [21] 熊襄,朱亿豪,胡志乔,等. 铁死亡在结直肠癌疾病中的研究进展[J]. *中华结直肠疾病电子杂志*, 2021, 10(1):4
 - [22] GUO J, XU B, HAN Q, et al. Ferroptosis: a novel anti-tumor action for cisplatin[J]. *Cancer Res Treat*, 2018, 50(2):445
 - [23] PARK S, OH J, KIM M, et al. Bromelain effectively suppresses kras-mutant colorectal cancer by stimulating ferroptosis[J]. *Anim Cells Syst (Seoul)*, 2018, 22(5):334
- (收稿日期:2024-05-08)

FMEA 联合 PDCA 管理循环模式在提高蛋白尿标本合格率中的应用

廖丹, 黄红霞, 丁芳, 黎珍妹*

(咸宁市中心医院/湖北科技学院附属第一医院, 湖北 咸宁 437100)

摘要:目的 探讨失效模式与效应分析(FMEA)联合 PDCA 循环管理模式在提高 24h 蛋白尿标本合格率中的应用效果。方法 选择我院 2021 年 3~8 月的留取 24h 蛋白尿标本的患者 128 例为对照组, 选择 2021 年 9 月至 2022 年 2 月留取 24h 蛋白尿标本的患者 128 例为观察组。对照组采用常规方法采集尿液, 观察组采取 FMEA 联合 PDCA 循环管理模式进行采集。比较两组风险优先指数(RPN 值)变化、留取成功率、标本留取合格率与护理满意度。结果 观察组中患者标本采集过程中 RPN 值较对照组显著下降($P < 0.05$), 留取成功率显著高于对照组($P < 0.05$), 标本留取合格率优于对照组($P < 0.05$), 对护理满意度更高($P < 0.05$)。结论 运用 FMEA 联合 PDCA 循环管理模式, 有助于提高采集 24h 蛋白尿标本的合格率, 增加留取标本成功率、提高患者对护理的满意度。

关键词:失效模式与效应分析; PDCA 管理循环模式; 蛋白尿; 合格率

中图分类号: R473

文献标识码: A

文章编号: 2095-4646(2024)06-0531-004

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI: 10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0531



Application of FMEA Combined with PDCA Management Cycle Model in Improving the Qualification Rate of Collecting Proteinuria Samples

LIAO Dan, HUANG Hong-xia, LI Zhen-mei, et al

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

ABSTRACT: Objective To explore the application effect of failure mode and effect analysis (FMEA) combined with PDCA cycle management mode to improve the qualification rate of collecting 24-hour proteinuria samples. **Methods** 128 patients with 24-hour proteinuria samples collected from our hospital from March 2021 to August 2021 were randomly selected as the control group, and 128 patients with 24-hour proteinuria samples collected from September 2021 to February 2022 were selected as the observation group. The control group received routine 24-hour proteinuria specimen collection methods, while the observation group received FMEA combined with PDCA cycle management. Compare the changes in the Risk Priority Index (RPN), patient retention success rate, specimen retention qualification rate, and nursing satisfaction between two groups of patients. **Results** The RPN values of patients in the observation group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$). The success rate of retention in the observation group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). The qualified rate of specimen retention in the observation group was higher than that in the control group ($P < 0.05$). The observation group had higher satisfaction with nursing care ($P < 0.05$). **Conclusion** The application of FMEA combined with PDCA cycle management mode can help improve the qualification rate of collecting 24-hour proteinuria samples, increase the patient retention success rate, and enhance patient satisfaction.

KEY WORDS: Failure mode and effect analysis; PDCA management cycle mode; Proteinuria; Qualification rate

* 通讯作者, E-mail: 51909813@qq.com

临床中 24h 尿蛋白定量检测非常重要,不仅是疾病的诊断、疗效观察尿标本检验结果的依据,而且对于疾病预后也有重要参考价值^[1]。24h 尿标本由于采集时间长、过程复杂,极易造成采集标本不合格的情况发生,若标本采集不当、不及时,会对检验结果的准确性及治疗效果造成一定的影响,并且关乎护理工作完成的质量及患者的满意度^[2]。失效模式与效应分析(failure mode effect analysis, FMEA)是一种前瞻性评估系统,通过分析系统中每一环节中可能造成错误的影响因素,做到在错误发生前即采取措施加以干预,这在有效防止风险事件的发生方面具有重要意义^[3]。临床上 FMEA 多用于药物管理与院内控感染等方面,能够前瞻性有效确定错误原因、方式及影响的方法,确定失效环节并制定管理策略和改进方法,降低用药错误的风险^[4]。同时,可以对静脉用药调配中心进行科学化、合理化的控制和管理,有效控制医院感染风险,保障用药安全性^[5]。PDCA 循环管理模式是目前运用较熟悉的管理工具,该方法主要包括计划(plan)、实施(do)、检查(check)以及处理(action)四个阶段,在护理安全管理中表现出显著的效果^[6]。有研究学者通过在手术室护理管理中运用 FMEA 联合 PDCA 循环管理模式,不仅降低手术室隐患保障手术护理安全,还提高手术室护理质量^[7]。因此,本研究采用 FMEA 联合 PDCA 循环对病区 24h 蛋白尿标本采集流程进行细化修改,以期提高标本合格率。

1 资料与方法

1.1 纳入及排除标准

纳入标准:①年龄 18~70 岁;②内科疾病;③早晨 7:00 解尿弃去后,直至次晨 7:00 最后一次解尿,测量总尿量后充分混匀,留取 30mL 送检。排除标准:①严重精神障碍;②认知障碍以及沟通障碍患者;③生活自理能力评分 < 60 分的患者;④因(月经来潮、腹泻、临时加急检查、紧急外出、中途拒做等因素)而未留取成功的。

1.2 一般资料

选择我院 2021 年 3~8 月实施常规 24h 蛋白尿标本采集方法的 128 例作为对照组,选择 2021 年 9 月至 2022 年 2 月实施 FMEA 联合 PDCA 护理管理模式的 128 例留取 24h 蛋白尿标本的患者作为观察组。观察组中男 66 例,女 62 例;年龄(53.82±8.21)岁;文化程度:文盲 8 例,小学 17

例,初中 50 例,高中 47 例,大专及以上学历 6 例;临床诊断:糖尿病肾病 28 例,高脂血症 22 例,类风湿性关节炎 33 例,其他 45 例;其中合并高尿酸 25 例,高血压 40 例,系统性红斑狼疮 2 例。对照组中男 61 例,女 67 例;年龄(52.97±9.52)岁;文化程度:文盲 10 例,小学 17 例,初中 50 例,高中 45 例,大专及以上学历 6 例;临床诊断:糖尿病肾病 36 例,高脂血症 20 例,类风湿性关节炎 30 例,其他 42 例;其中合并高尿酸 30 例,高血压 45 例,系统性红斑狼疮 1 例。两组患者临床资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.3 方法

对照组采取常规采集管理:针对标本采集过程中存在的问题,科室护理人员积极参与,集思广益,根据存在问题及标本收集易出现问题的环节进行分析讨论,制定出大家一致认为较为合理的标本收集流程。制出流程图,张贴在各病房及标本存储处,方便患者随时知晓。

观察组采取 FMEA 联合 PDCA 循环管理模式,具体内容如下。①确立主题:运用 FMEA 分析住院患者采集 24h 蛋白尿标本流程中可能存在的失效模式,讨论潜在失效的原因及采集错误造成的影响。②成立小组:建立 FMEA 管理小组,由本科室 1 名医生、6 名护理人员所组成小组成员,所有成员均接受 FMEA 的系统培训,对住院患者采集 24h 蛋白尿标本流程进行风险评估,讨论改进方案。③现状调查:绘制简要的 24h 蛋白尿采集流程图,并逐一寻找失效模式进行统计。24h 蛋白尿采集流程包括布管准备(核对医嘱并转抄、核对化验单并布管)→采集留取(和患者宣教注意事项、每班交接班)→收取标本。④危害原因分析:团队成员运用头脑风暴法明确对住院患者 24h 蛋白尿标本采集流程中所有可能的失效模式,通过人、物、环、法等方面分析可能的失效原因及潜在后果。⑤运用 PDCA 质量管理工具进行改进:该质量管理工具分为计划、执行、检查与处理四个阶段,且处于周而复始的循环运行中。⑥计划:选择 RPN 值最高的 3 个项目(标本采集中贴条形码错误、主班忘记转达责任、宣教质量不合格)进行讨论及对策拟定,团队成员根据成本、效益、组织能力三方面对拟定对策进行打分(优 5 分,良 3 分,差 1 分),根据 80/20 定律,72 分以上为实行对策。包括:完善采集和布管流程;将“24h 尿标本”与“普通尿标本”分开标识并定位定点放置;明确职

责,建立书面交接班本;制作书面宣教卡片,采取不同形式开展宣教。⑦执行:完善采集流程,并对病区护理人员进行培训及考核;五常法定位定点放置标本,用绿色标识区分“24h尿标本”和“普通尿标本”;护理人员实施布管流程“8步走”,即准备布管、扫描试管、标注信息、贴条形码、贴标识、定点放置、定位悬挂、登记交接班;开展流程化宣教,环环相扣,重点交接,患者只需点状记忆即可;采用制作的书面“温馨提示”宣教卡片进行宣教并悬挂床边,加深患者记忆并提醒患者留取注意事项。⑧检查:组长每周定期进行质控,归纳总结执行结果,明确正确与错误的做法,并找出存在的不足之处。⑨处理:对检查结果中存在问题进行解决,对行之有效的措施予以肯定,并提高其标准化程度。

观察组连续干预3个月。

1.4 观察指标

1.4.1 比较两组 RPN 变化

根据事情的严重性(S)、失效模式出现的频率(O)、不易探测度(D)三个维度进行打分,S、O、D的等级均为1~10分,最后取平均分计算事先风险指数(PRN, $PRN = S \times O \times D$),数值越低则风险指数越低。

1.4.2 患者留取成功率

观察24h蛋白尿标本中患者留取量不足与尿总量不准确等不良事件情况,并计算标本留取成功率:成功率=(总标本数-不良事件发生率)例数/总例数 $\times 100\%$ 。

1.4.3 标本留取合格率

依据检验科结果回报污染的样本,从采样到检验的各个环节进行严密的调查和分析,观察24h蛋白尿标本中尿标本污染、放置时间过长(超过2h)与尿液变质等不良现象,计算标本留取合格率:合格率=(总标本数-不良现象)例数/总例数 $\times 100\%$ 。

1.4.4 护理满意度

由研究者在留取标本后进行调查,采用自拟留取24h蛋白尿标本过程中对护理人员的满意度调查问卷,调查患者在留取标本过程中的10个方面,每个方面评分0~10分,总分100分,非常满意: ≥ 90 分;71分 \leq 满意 ≤ 89 分;不满意 ≤ 70 分,并计算满意度,满意度=(非常满意+满意)例数/总例数 $\times 100\%$ 。

1.5 统计学方法

采用SPSS 22.0统计学软件分析数据。正态

分布且方差齐的计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示;计数资料用频数和百分率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 RPN 变化

观察组标本采集标本中贴条形码错误、主班忘记转达责任、宣教质量不合格均低于对照组($P < 0.05$),见表1。

表1 两组 RPN 变化($\bar{x} \pm s$,分)

组别	贴条形码错误	主班忘记转达责任	宣教质量不合格
对照组(n=128)	6.64 \pm 1.01	6.21 \pm 1.03	7.78 \pm 1.01
观察组(n=128)	4.21 \pm 0.37*	2.65 \pm 0.67*	3.31 \pm 0.54*

与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 患者留取成功率

经比对,观察组24h蛋白尿标本采集成功率显著高于对照组($P < 0.05$),见表2。

表2 患者留取成功率[n(%)]

组别	留取量不足	尿总量不准确	成功率
对照组(n=128)	4(3.12)	8(6.25)	116(90.62)
观察组(n=128)	2(1.56)	1(0.78)	125(97.65)*

与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.3 标本留取合格率

观察组标本留取合格率明显优于对照组($P < 0.05$),见表3。

表3 标本留取合格率[n(%)]

组别	尿标本污染	放置时间过长	尿液变质	合格率
对照组(n=128)	7(5.46)	8(6.25)	5(3.90)	108(84.37)
观察组(n=128)	1(0.78)	1(0.78)	1(0.78)	125(97.65)*

与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.4 护理满意度

观察组在留取24h蛋白尿标本过程中对护理人员的满意度高于对照组($P < 0.05$),见表4。

表4 护理满意度[n(%)]

组别	非常满意	满意	不满意	满意度
对照组(n=128)	50(39.06)	58(45.31)	20(15.62)	108(84.37)
观察组(n=128)	54(42.18)	70(54.68)	4(3.12)	124(96.87)*

与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

FMEA 被医疗保健改善研究所推荐作为一种积极主动的方法,用来评估医疗过程中的失败和伤害风险,制订改进措施,达到有效控制和降低潜在风险的目的^[8]。其作为风险评估、改进及流程管理工具,重点关注“事前预防”而非“事后纠正”,针对系统和流程缺陷而非个人失误,为持续质量改进提供依据^[9]。而 PDCA 循环管理方法又名戴明环循环管理法,是目前国际上通用且科学的管理模型^[10]。由于其具有循环、持续向上以及永不停止等特点,在不断地循环过程中提高管理水平^[11]。有研究学者将二者联合,应用于 ICU 气管插管机械通气患者护理中,有效促进患者康复,减少住院费用,且镇痛和镇静效果好,改善患者生活质量,降低不良事件发生率,提高患者家属满意度^[12]。本次研究将 FMEA 联合 PDCA 循环管理模式运用于提高采集 24h 蛋白尿标本的合格率中,也得到了良好的反馈效果。

本研究结果显示,观察组各项 RPN 值与对照组相比均存在大幅度降低,且标本留取成功率也得到改善,标本合格率显著上升。说明 FMEA 联合 PDCA 循环管理模式的运用不仅能够使 RPN 值降低,还可以提高留取成功率,在一定程度上增加采集 24h 蛋白尿标本的合格率,从而有效改善临床护理质量,保证临床护理安全。其分析原因是,FMEA 强调事先预防,利用前瞻性与系统性的风险管理将风险控制在初始阶段,通过人、物、环、法等方面分析可能的失效原因及潜在后果,及时发现护理管理的不足和漏洞,并对其不断地优化,使得工作流程更加完善,进而提高临床护理质量。

此外,本次研究还发现,观察组不良事件发生率低于对照组,且患者满意率高于对照组,说明 FMEA 联合 PDCA 循环管理模式的运用可保障临床护理安全,进一步提高患者满意度。通过健康宣教让患者能够简单了解在留取蛋白尿的注意事项,随后护理人员还利用书面宣教卡片,加深注意事项在患者脑海中的印象。提高了标本的合格率,减少患者进行二次采样的次数,从而进一步提高患者满意度。

综上所述,FMEA 帮助我们做到事先预防,将风险遏制在源头,而 PDCA 循环则在改进的整个过程中,能对环节进行控制和调整,保证措施的有效实施,并提高其标准化程度,同时重视失误或失

败经验,避免重蹈覆辙。将 FMEA 联合 PDCA 循环管理模式引入提高 24h 蛋白尿标本采合格中,有助于临床护理流程的进一步规范,使护理人员工作有章可循,从而提高临床护理质量,该方法值得在临床上推广应用。然而,本次研究对象范围过小且观察周期较短,仍需要扩大样本的选取范围与观察时间,才能够获得更具说服力的研究结果。

参考文献:

- [1] MENDELSON L, SANCHORAWALA V, CONNORS L, et al. Correlation between 24-hour urine protein and random urine protein-creatinine ratio in amyloid light-chain amyloidosis[J]. *Kidney Med*, 2022, 4(4):100427
- [2] 刘波, 陈姣, 曾素根. 三项尿蛋白相关检测在肾小球疾病中的诊断价值[J]. *实用医院临床杂志*, 2021, 18(1):103
- [3] LIU H C, ZHANG L J, PING Y J, et al. Failure mode and effects analysis for proactive healthcare risk evaluation: a systematic literature review[J]. *J Eval Clin Pract*, 2020, 26(4):1320
- [4] BUJA A, DE LUCA G, OTTOLITRI K, et al. Using failure mode, effect and criticality analysis to improve safety in the cancer treatment prescription and administration process[J]. *J Pharm Policy Pract*, 2023, 16(1):9
- [5] ANJALEE J A L, RUTTER V, SAMARANAYAKE N R, et al. Application of failure mode and effect analysis (FMEA) to improve medication safety: a systematic review[J]. *Postgrad Med J*, 2021, 97(1145):168
- [6] HE Y H, WANG F. PDCA nursing in improving quality management efficacy in endoscopic submucosal dissection[J]. *World J Clin Cases*, 2022, 10(27):9611
- [7] 刘晓娣. 失效模式与效应分析联合 PDCA 管理模式在手术室护理管理中的应用[J]. *中华现代护理杂志*, 2020, 26(13):1803
- [8] 张建男, 袁海娟, 陈虹. 失效模式与效应分析在神经外科患者中线导管风险管理中的应用[J]. *实用临床医药杂志*, 2022, 26(19):115
- [9] 林琴, 袁忠, 王童语, 等. 医疗失效模式与效应分析管理模式对肿瘤患者手臂输液港围手术期护理质量的影响[J]. *中华现代护理杂志*, 2023, 29(5):594
- [10] 颜春蓉, 杨海虹, 廖宇升, 等. 运用 PDCA 循环构建基于内部控制的固定资产管理模式[J]. *中国卫生经济*, 2019, 38(12):102
- [11] TSENG Y W, CHEN C C, LIAO Y Y, et al. Optimizing blood culture volumes by implementing PDCA cycle management[J]. *Clin Lab*, 2023, 69(4)
- [12] 吴玲玲, 郑俊丽, 叶利军. 失效模式与效应分析联合 PDCA 循环在 ICU 气管插管机械通气患者中的应用[J]. *齐鲁护理杂志*, 2023, 29(16):12

(收稿日期:2024-06-03)

患者参与健康模型在2型糖尿病患者健康管理中的应用

张丹丹,李婷婷*

(滨州医学院附属医院,山东 滨州 256600)

摘要:目的 探讨患者参与健康模型在2型糖尿病患者健康管理中的应用效果。方法 选择我院2023年7~9月收治的64例2型糖尿病患者为对照组,给予常规健康管理;选择2023年10~12月我院收治的60例2型糖尿病患者为干预组,给予基于患者参与健康模型的健康管理,分阶段递进式进行干预,比较两组患者疾病认知水平、血糖控制效果及自我管理行为。结果 干预1个月后,干预组疾病认知水平、血糖控制效果、自我管理行为均优于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 应用患者参与健康模型的健康管理对2型糖尿病患者进行干预,可以提高患者疾病认知水平,有效控制血糖,促进自我管理行为的养成,值得临床推广。

关键词:患者参与健康;糖尿病;健康管理;疾病认知;血糖控制

中图分类号:R587.1

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)06-0535-004

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0535



Application of Patient Participation Health Model in Health Management of Type 2 Diabetes Patients

ZHANG Dan-dan, LI Ting-ting

(Binzhou Medical University Hospital, Binzhou Shandong 256600, China)

ABSTRACT: Objective To explore the application effect of patient participation health model in the health management of type 2 diabetes patients. Methods 64 patients with type 2 diabetes admitted to our hospital from July 2023 to September 2023 were selected as the control group and given routine health management. 60 patients with type 2 diabetes admitted to our hospital from October 2023 to December 2023 were selected as the intervention group and given health management based on the patient participation health model. The intervention was carried out in stages and progressively, and the disease cognition level, blood sugar control effect and self-management behavior of the two groups of patients were compared. Results After one month of intervention, the disease cognition level, blood sugar control effect, and self-management behavior of the intervention group were better than those of the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Conclusion Applying the health management of the patient participation health model to intervene in patients with type 2 diabetes can improve patients' disease cognition, effectively control blood sugar, and promote the development of self-management behavior, which is worthy of clinical promotion.

KEY WORDS: Patient health engagement model; Diabetes; Health management; Disease cognition; Blood glucose control

据统计2018年我国糖尿病患病率已达11.2%,呈上升趋势,是全球糖尿病患者最多的国家^[1]。2型糖尿病的发病与患者的不良生活方式息息相关,若长期血糖控制不佳会影响靶器官功能,甚至危害生命。“患者参与”是让患者从自身出发参与疾病诊疗的全过程,包括疾病决策、疾病

照护等行为,可促使疾病相关信息的共享^[2]。研究^[3]显示,糖尿病患者参与健康照护有利于促进糖尿病患者自身血糖监测,并提高疾病治疗依从性。患者参与健康模型(Patient Health Engagement model)由Graffigna等^[4]研发,将患者参与健康照护过程分为昏暗(blackout)、唤醒(arousal)、

* 通讯作者, E-mail: 909643218@qq.com

依从(adhesion)、幸福计划(eudaimonic project)4个阶段,每个阶段通过制定个体化的健康方案,促进医患配合,提高患者参与度,有利于疾病康复。本研究以“患者参与健康模型”为指导,将其应用于2型糖尿病的健康管理中,效果良好,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

采用便利抽样法,选取2023年7~12月我院收治的2型糖尿病患者为研究对象。纳入标准:①经医生评估,符合2型糖尿病诊断标准^[5];②认知沟通正常;③可熟练应用手机微信;④患者及家属对本研究知情同意。排除标准:①合并恶性肿瘤等严重肝肾功能障碍;②应用免疫抑制剂或激素等对血糖影响较大的药物。为避免组间沾染,根据时间先后进行分组,选择我院2023年7~9月我院收治的64例2型糖尿病患者为对照组,2023年10~12月我院收治的60例患者为干预组。对照组中,男38例,女26例,平均年龄(59.12 ± 5.01)岁;病程(6.87 ± 1.87)年;文化程度:初中及以下20例,高中/中专31例,专科或以上13例。干预组中,男35例,女25例,平均年龄(59.06 ± 5.74)岁;病程(7.01 ± 1.92)年;文化程度:初中及以下19例,高中/中专30例,专科或以上11例。两组一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经本院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

对照组:患者就诊时给予常规健康教育,发放糖尿病健康管理手册,并告知患者血糖控制重要性、合理饮食方案、血糖测量方法、运动锻炼计划、遵医嘱用药、常见并发症预防及控制等。

干预组:在常规健康教育基础上制定基于患者参与健康模型的健康管理,分阶段递进式进行干预,具体措施如下。

(1)从昏睡到唤醒。①特点:此阶段患者对疾病治疗处于未知状态,甚至会完全依赖于医护人员。此阶段的特点为医护全面主导,干预目标在于提高患者对糖尿病的认知及血糖控制方案的了解。②认知层面:向患者发放问卷,调查患者对疾病的了解程度及自我管理的行为水平,指出患者对疾病、用药、仪器相关操作等的错误认知,告知口服降糖药、胰岛素等药物正确使用时间及方法,并强调低血糖的可能诱因及预防对策等。③行为层面:了解患者平时饮食习惯,指导其改善不良饮

食习惯,并与患者共同参与个性化食谱的制订,指导患者主动参与诊疗方案的选择,并表达治疗方案的意见。

(2)从唤醒到依从。①特点:此阶段患者对疾病稍许了解,目的在于鼓励患者表达更多疾病康复需求,推动患者健康参与,尽可能帮助患者克服依从性障碍,形成依从行为。②认知层面:强调进食顺序等注意事项,如进餐时细嚼慢咽,先吃蔬菜,再吃肉蛋,最后吃主食;保持规律的进餐时间,一般两餐间隔4~6h。强调适合的运动方式及注意事项,如快走、慢跑的运动频次、时间等,运动方案要遵守循序渐进、由轻至重等原则,在运动前、运动后要测量血糖水平,并根据血糖水平调整运动方案^[6]。强调遵医嘱用药,服用降糖药物时按要求进食。③行为层面:鼓励患者表达参与健康管理期间相关需求及不适应问题,指导患者记录实际饮食情况,并给予食物拍照,上传至饮食管理后台,供医护人员进行饮食管理评价,监督每日的碳水量是否达标,及时指出问题,并对饮食管理良好的患者给予表扬。鼓励患者表达适应自身运动处方时的阻碍,及时为患者解决问题,给予个性化干预。

(3)从依从到幸福计划。①特点:此阶段在于增加患者参与决策的机会,使其逐渐适应健康管理模式,更好的维持健康行为。②认知层面:使患者意识到自身参与健康管理行为对血糖控制的短期效果,提高患者健康管理的决心和积极性。并且向患者说明糖尿病健康管理是个长期过程,贵在坚持,让患者主导自行设计饮食及运动管理计划,医护人员解答患者所有疑问。向患者介绍医院、社区可用的糖尿病管理资源或网站等。③行为层面:加强患者自我居家照护、药物治疗、延续护理的参与等依从性,分享自我管理正面的事例和反面事例,促进患者居家行为改变。

1.3 观察指标与评价工具

1.3.1 糖尿病患者疾病认知水平

本研究在文献查阅^[7]基础上自行编制2型糖尿病疾病知识调查问卷,包括基础知识、饮食知识、运动知识、并发症知识4个维度共20个条目,采用Likert 5级评分法计分,总分20~100,得分越高,疾病知识掌握情况越好。本研究中问卷Cronbach's α 系数为0.872。

1.3.2 血糖控制效果

比较两组干预前及干预后1个月门诊复诊时

空腹血糖、餐后 2h 血糖及糖化血红蛋白。其中干预后 1 个月的空腹血糖、餐后 2h 血糖为患者血糖记录表近一周所测量的平均值。糖化血红蛋白为患者入院及复诊检查时所测得。

1.3.3 自我管理行为

采用糖尿病自我管理行为量表(summary of diabetes self-care activities,SDSCA)进行评价。该量表由 Toobert 等编制,由万巧琴等^[8]汉化修订,包括饮食控制、运动锻炼、血糖监测、足部护理、遵医用药等内容,共 11 个条目。各条目采用 0~7 级计分法,总分为 0~77 分,得分越高表示患者的自我管理行为越好。本研究中量表 Cronbach's α 系数为 0.835。

1.4 资料收集

患者内分泌门诊就诊时研究小组为患者建档,在干预后 1 个月患者门诊复诊时再次收集疾病认知水平、血糖水平、自我管理行为等信息。研究小组采用统一指导语告知 2 型糖尿病患者本次

研究的目的、意义及问卷的填写方法,承诺遵守保密原则。问卷填写结束后,当场回收问卷,并检查填写完整性。为减少样本量的失访率,研究小组会于患者复诊前提前电话通知并提醒按要求复诊。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行处理分析。患者的年龄、病程、糖尿病患者疾病认知水平得分等计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验;文化程度等计数资料采用频数、百分比表示,采用卡方检验; $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组疾病认知水平比较

干预前两组疾病认知水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);干预后两组疾病认知水平各维度及总分明显提高,且干预组优于对照组($P<0.05$),见表 1。

表 1 两组疾病认知水平比较($\bar{x}\pm s$,分)

组别	例数	基础知识		饮食知识		运动知识		并发症知识		总分	
		干预前	干预后								
对照组	64	12.11 \pm 1.69	16.28 \pm 1.61*	12.58 \pm 2.38	15.97 \pm 1.44*	12.02 \pm 1.78	16.44 \pm 1.79*	11.64 \pm 1.83	15.64 \pm 1.27*	48.34 \pm 4.49	64.33 \pm 4.37*
干预组	60	11.88 \pm 1.69	17.65 \pm 3.17**	12.33 \pm 2.18	17.60 \pm 2.65**	11.57 \pm 1.38	17.98 \pm 1.85**	11.95 \pm 1.96	17.23 \pm 2.37**	47.63 \pm 4.05	70.47 \pm 6.00**

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

2.2 两组血糖控制比较

干预后两组空腹血糖、餐后 2h 血糖及糖化血红蛋白均低于干预前,且干预组均低于对照组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 两组患者血糖控制比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	空腹血糖/(mmol/L)		餐后 2h 血糖/(mmol/L)		糖化血红蛋白/%	
		干预前	干预后	干预前	干预后	干预前	干预后
对照组	64	9.14 \pm 1.93	8.19 \pm 1.87*	14.52 \pm 1.96	11.10 \pm 2.17*	10.67 \pm 2.32	8.58 \pm 1.47*
干预组	60	9.02 \pm 1.77	6.54 \pm 1.32**	14.25 \pm 1.84	9.24 \pm 1.59**	10.14 \pm 2.57	6.49 \pm 1.58**

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

2.3 两组自我管理行为比较

两组干预前自我管理行为比较,差异无统计学意义($P>0.05$);干预后两组自我管理行为均优于干预前,且干预组优于对照组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 两组自我管理行为比较($\bar{x}\pm s$,分)

组别	干预前	干预后
对照组(n=64)	43.30 \pm 4.51	50.11 \pm 6.68*
干预组(n=60)	43.90 \pm 5.79	61.30 \pm 11.52**

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

3 讨论

美国糖尿病协会在《糖尿病医学诊断标准(2017 版)》强调,糖尿病患者自身才是疾病的主要管理者,患者参与健康照护是糖尿病诊疗的关键,也是个终生的过程^[9]。本研究以“患者参与健康模型”为指导,给予制定个体化的健康方案,探讨该健康管理模式对 2 型糖尿病患者疾病的认知水平、血糖控制及自我管理行为的影响。

本研究结果显示,干预组通过患者参与健康模型的健康管理,对疾病认知水平各维度评分及

总分均优于对照组,空腹血糖、餐后 2h 血糖及糖化血红蛋白均低于对照组,自我管理行为优于对照组,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。本研究中通过医护的全面指导,持续激励使患者从昏暗逐渐到唤醒阶段过渡,充分提高患者对糖尿病的认知,并积极参与血糖控制方案的管理^[10]。同时,本研究通过对患者进行疾病认知调查,指出错误的认知,引导正确的理解及行为,从本质上提高了患者对疾病的认知水平。研究成员除了告知患者血糖控制的重要性,还加强指导患者用药、饮食、运动管理的要点及注意事项,鼓励其表达更多疾病康复需求,尽可能帮助患者克服依从性障碍,使患者养成健康的生活方式;同时,研究小组还会指导患者正确掌握血糖监测仪的使用方法,动态掌握血糖变化,从而更好的控制血糖^[11]。自我管理行为在慢病管理中至关重要,自我管理行为越强的糖尿病患者对血糖的控制及症状管理的优势越突出^[12]。研究小组前期与患者共同制定康复计划,后期让患者为主导,主动接受计划的执行过程,培养其主观能动性。通过监测指标向患者展示参与健康管理行为的短期效果,直观感受到自我管理的重要意义,进而提高患者积极性及健康管理依从性。在患者参与健康模型的健康管理实施过程中,可以帮助患者正确识别疾病并发症及血糖控制效果,并第一时间得到帮助,在小组的持续关注和监督下,患者已养成高效的自我监测和自我照护的能力,使自我管理行为得到稳步提升^[13]。

综上所述,本研究将患者参与健康模型应用于 2 型糖尿病患者健康管理中,提高了患者疾病认知水平和血糖控制效果,促进了自我管理行为,值得临床推广。但本研究仅调查了 1 所医院,是否可以通过患者参与健康模型长期获益,还需进一步扩大样本量探讨。

参考文献:

[1] LI Y Z, TENG D, SHI X G, et al. Prevalence of diabetes

recorded in mainland china using 2018 diagnostic criteria from the american diabetes association: national cross sectional study[J]. *BMJ*, 2020, 369: m997

- [2] 叶旭春, 刘朝杰, 刘晓虹. 基于扎根理论的互动式患者参与患者安全理论框架构建的研究[J]. *中华护理杂志*, 2014, 49(6): 645
- [3] SABO R, ROBINS J, LUTZ S, et al. Diabetes engagement and activation platform for implementation and effectiveness of automated virtual type 2 diabetes self-management education: randomized controlled trial[J]. *JMIR Diabetes*, 2021, 6(1): e26621
- [4] GRAFFIGNA G, BARELLO S. Spotlight on the patient health engagement model (phe model): a psychosocial theory to understand people's meaningful engagement in their own health care[J]. *Patient Prefer Adher*, 2018, 12(5): 1261
- [5] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2020 年版)[J]. *中华糖尿病杂志*, 2021, 13(4): 315
- [6] 曹亚男, 朱燕妮, 钟赛琼, 等. 2 型糖尿病患者饮食管理的最佳证据总结[J]. *护理学杂志*, 2021, 36(18): 86
- [7] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2020 年版)[J]. *中华糖尿病杂志*, 2021, 13(4): 315
- [8] 万巧琴, 尚少梅, 来小彬, 等. 2 型糖尿病患者自我管理行为量表的信、效度研究[J]. *中国实用护理杂志*, 2008, 24(7): 26
- [9] AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes-2017: summary of revisions [J]. *Diabetes Care*, 2017, 40(suppl 1): S4
- [10] 于静. 慢性病管理护理与健康教育在社区老年 2 型糖尿病患者中的应用价值[J]. *慢性病学杂志*, 2021, 22(7): 1063
- [11] 陈凯, 王彬, 吕素珍, 等. 知信行健康教育模式对 2 型糖尿病患者自我血糖监测能力的作用分析[J]. *中国现代医生*, 2020, 58(9): 176
- [12] 李梅. 全程健康教育护理模式在糖尿病护理工作中的应用价值分析[J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2018, 32(5): 441
- [13] 石瑞峰, 郭晓蕙, 章秋. 我国成人 2 型糖尿病自我管理教育与支持的现状与展望[J]. *中华糖尿病杂志*, 2021, 13(2): 121

(收稿日期: 2024-04-25)

黄芩苷治疗溃疡性结肠炎的作用机制研究进展*

张瀚镭¹,陈媛媛¹,舒璟¹,蒋凯²,王琢文³,闵清^{1,4},姚辉^{1,4**}

(1. 湖北科技学院医学部药学院,湖北咸宁 437100;2. 联勤保障部队第九零四医院常州医疗区药剂科;
3. 莒南县人民医院药品供应科;4. 鄂南特色中药湖北省工程研究中心)

摘要:溃疡性结肠炎是一种常见的慢性非特异性炎症性肠病,目前临床常用的治疗药物包括美沙拉嗪、糖皮质激素和免疫抑制剂等,然而这些药物在治疗过程中存在易复发和药物抵抗等问题。黄芩苷是从中药黄芩中提取分离出的黄酮衍生物,目前研究表明其在治疗溃疡性结肠炎方面具有良好效果。本文回顾了近年来黄芩苷治疗溃疡性结肠炎的相关研究,发现其治疗机制涉及到免疫调节、抗炎、抑制氧化应激和肠道微生物群调节等多个方面。但有关黄芩苷治疗溃疡性结肠炎的临床试验评估、安全性验证及具体作用机制尚缺乏充分论证,今后此方面有待于进一步研究。

关键词:溃疡性结肠炎;黄芩苷;免疫细胞;信号通路;氧化应激

中图分类号:R966

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)06-0539-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0539



Research Progress on Mechanism of Baicalin in Treatment of Ulcerative Colitis

ZHANG Han-lei, CHENG Yuan-yuan, YAO Hui, et al

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

ABSTRACT: Ulcerative colitis is a common chronic nonspecific inflammatory bowel disease. At present, the commonly used drugs in clinical treatment include mesalazine, glucocorticoids and immunosuppressants, et al. However, these drugs are prone to relapse and drug resistance in the treatment process. Baicalin is a flavonoid derivative extracted from *Scutellaria baicalensis*, which has been shown to be effective in the treatment of ulcerative colitis. This article reviewed the recent studies on baicalin in the treatment of ulcerative colitis, and found that its mechanism involves many aspects such as immune regulation, anti-inflammatory, inhibition of oxidative stress and intestinal microbiome regulation. However, the clinical trial evaluation, safety verification and specific application mechanism of baicalin in the treatment of ulcerative colitis have not been fully demonstrated, and these aspects needs further study in the future.

KEY WORDS: Ulcerative colitis; Baicalin; Immune cells; Signal path; Oxidative stress

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性、复发性炎症性肠病,主要症状包括腹痛、腹泻、便血、伴有便意和里急后重^[1]。UC作为炎症性肠病的一种,其炎症通常局限于黏膜表面,起始于直肠并以连续的方式向近端延伸至整个结肠;一些有直肠炎或左侧结肠炎的患者可能存在盲肠炎斑。UC特征在于炎症从远端开始并且可

以向近端延伸最终涉及至整个结肠黏膜,且呈现反复发作的黏膜炎症症状,其病因与环境、免疫系统、肠道微生物组和疾病遗传易感性密切相关^[2]。该疾病分布按结肠受累程度分为直肠炎、左侧结肠炎、广泛结肠炎(全结肠炎)。

溃疡性结肠炎的治疗一直是研究者们关注的重点,目前临床常用药物治疗溃疡性结肠炎的方

* 基金项目:湖北省教育厅科研计划项目(B2023166);湖北科技学院博士启动项目(BK202206)

** 通讯作者, E-mail: hkyh003@163.com

法有:单一使用美沙拉嗪,或联合使用糖皮质激素和免疫制剂,但该方法存在停药反复、药物依赖和抵抗等缺陷^[3]。因此,寻找可以为患者提供显著治疗效果,且副作用小和毒性反应低的治疗药物具有重要意义。

黄芩苷(baicalin, BI)是从黄芩的根中分离出来的一种重要的生物活性黄酮类化合物。BI对克罗恩病和溃疡性结肠炎这两类主要炎症性肠病具有治疗作用^[4]。其主要通过调节免疫细胞、肠道炎症反应、肠道微生物群和抑制氧化应激等方式在溃疡性结肠炎的治疗中发挥作用^[5]。本文综述了黄芩苷对溃疡性结肠炎的作用机制,为其进一步研究和临床应用提供参考依据。

1 免疫调节作用

1.1 调节免疫细胞

CD4⁺CD29⁺T细胞是一种特殊的CD4⁺T细胞亚群,通常由CD4⁺T细胞分化而来,在免疫应答中起调节作用。研究^[6]发现,该细胞在UC的免疫反应中也至关重要,在UC大鼠外周血中CD4⁺CD29⁺T细胞的表达显著上调。因此,CD4⁺CD29⁺T细胞可能是导致UC持续炎症的主要效应细胞亚群,也是导致UC炎症反复发作的原因。黄芩苷具有潜在的免疫调节作用,通过促进CD4⁺CD29⁺T细胞增殖以调节免疫抑制机制,维持免疫平衡,减轻溃疡性结肠炎炎症反应^[7]。

Th17细胞能分泌白介素(IL)-6、IL-17、肿瘤坏死因子(TNF- α)等促炎细胞因子,其过度活化可导致慢性炎症,从而加重UC的发展^[8]。调节性T淋巴细胞(Treg细胞)可以分泌抗炎细胞因子,如IL-10、IL-35和TGF- β ,并通过IL-10和IL-35抑制Th17细胞极化及Th17分化的细胞因子(如IL-6、IL-23A)的分泌^[8]。此外,有研究^[9]认为Th17/Treg免疫平衡是引起溃疡性结肠炎肠黏膜溃疡组织损伤的关键因素,在UC的发生发展中起重要作用。UC患者Th17细胞增多导致血清IL-17水平升高,Treg细胞减少导致血清TGF- β 1水平降低,从而使自身反应性T细胞活化,抑制性免疫细胞因子减少,加重结肠黏膜炎症。研究^[10]证实黄芩苷不仅可以抑制Th17细胞数量及其分泌的炎性因子IL-6和IL-17的水平,还能显著增加Treg细胞、IL-10、TGF- β 的表达,减轻肠道炎症。此外,Zhu等^[11]在大鼠实验中观察到黄芩苷可以抑制由三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的UC大鼠Th17/Treg

细胞的比例,表明黄芩苷对UC具有潜在的治疗作用。

1.2 调节细胞因子

炎症和炎性细胞因子之间复杂的相互作用机制是溃疡性结肠炎发生和发展的重要因素。细胞因子是一种小肽分子,其中促炎细胞因子向相关细胞发送信号引发炎症反应,抗炎细胞因子则起维持炎症和调节免疫反应的作用。这些细胞因子能够直接导致黏膜和组织损伤,并引发溃疡性结肠炎的特异性免疫反应^[12]。NOD样受体蛋白6(NLRP6)参与炎症信号通路调控以维持肠道的稳态,该蛋白在正常情况下能够调节肠道菌群平衡和肠道屏障的完整性,而在UC患者中,NLRP6的缺失或功能异常可能导致肠道菌群紊乱和过度激活的免疫反应,从而导致肠道炎症的产生^[13]。Zhang等^[14]通过葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导慢性UC小鼠模型并给予黄芩苷灌胃治疗,实验结果表明,在受损的结肠组织中IL-33水平升高,促使NF- κ B磷酸化并使其易位到细胞核中,从而刺激TNF- α 、IL-1 β 和IL-6等炎性细胞因子分泌,引起结肠黏膜损伤。然而在黄芩苷治疗慢性UC小鼠的结肠组织中,这些炎性细胞因子的水平显著降低,这表明黄芩苷可通过抑制IL-33的表达和NF- κ B的活化减轻DSS诱导的慢性UC结肠组织的损伤。

巨噬细胞游走抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)是由活化的T细胞及其他细胞类型(如单核细胞等)分泌产生,并以自分泌或旁分泌的方式发挥作用^[15]。MIF与巨噬细胞联系密切,可以抑制巨噬细胞的迁移,分泌并调节巨噬细胞功能,抗MIF抗体能够有效降低TNBS诱导的结肠炎程度^[16]。Dai等^[17]发现在TNBS诱导的大鼠UC中MIF水平显著升高,而黄芩苷与美沙拉嗪效果相同,对MIF具有明显的下调作用,从而改善肠道炎症。

2 抑制炎症反应

2.1 抑制COX-1/COX-2/LOX-5

环氧化酶-1(COX-1)和环氧化酶-2(COX-2)催化游离花生四烯酸转化为前列腺素H₂,5-脂氧合酶(5-LOX)是催化花生四烯酸生成白三烯类的关键酶,在调节肠道炎症中起重要作用。Giovann等^[18]推测黄芩苷通过调节COX-1和COX-2以及(5-LOX)表达,抑制前列腺素生成来发挥抗炎作

用。结果表明,经黄芩苷治疗后结肠炎模型大鼠中前列腺素 E2、6-酮前列腺素 F1、白三烯 B4 及血栓素 B2 水平显著下降,此外,DSS 引起的腹泻减少,体重增加,结肠损伤程度明显改善。有研究^[19]表明,黄芩苷能降低 COX-2 的表达,大鼠经三硝基苯磺酸(Tnbs)诱导 UC 后,给予黄芩苷高剂量治疗 COX-2 水平明显低于 Tnbs 造模组。另有研究者^[20]发现发病期 UC 患者血液样本中 COX-2 水平显著高于健康人群及缓解性 UC 患者。

2.2 调控信号通路

Toll 样受体(TLR)/核因子 kappa B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)可刺激肠上皮细胞,并使炎性细胞浸润和炎性细胞因子释放,促进结肠炎症的发展^[21]。Li 等^[22]发现黄芩苷通过靶向抑制 TLR4/NF- κ B 通路的活化,降低炎症介质和炎性细胞因子的产生(如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6),从而改善 TNBS 诱导的结肠炎症。Toll 样受体 4(TLR4)通常被认为是 NF- κ B 信号通路中关键的上游信号蛋白。TLR4 通过与共受体 CD14 相互作用,激活 MyD 88 依赖的 NF- κ B 通路,进而导致 NF- κ B p65 激活,该信号通路在炎症反应中起着关键作用^[23]。黄芩苷通过调节髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD 88)信号,以增加 IL-10 mRNA 的表达^[24]。

黄芩苷可以上调 NLRP6、IL-18 mRNA 和蛋白的表达,并通过激活 NLRP6 和 IL-18,显著增加小肠杯状细胞数和肠黏膜厚度,改善 DSS 诱导的溃疡性结肠炎^[25]。黄芩苷还可以减轻由 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞产生的炎症反应,抑制 MyD 88/NF- κ B p65 信号通路的激活,并减少 CD14 和 TLR4 表达^[26]。Shen 等^[27]建立 TNBS 诱导的大鼠 UC 模型和 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞模型,并对其施以不同剂量的黄芩苷处理,实验结果显示,黄芩苷能够降低 NF- κ B p65、p-IKK β /IKK β 和 p-IKB α /IKB α 的表达。黄芩苷对 UC 模型大鼠的 IKK/IKB/NF- κ B 信号通路具有调节作用,显著减轻结肠组织的炎症反应。黄芩苷(100mg/kg)能通过 NF- κ B 和 MAPK 通路发挥抗炎作用,显著降低高温潮湿环境下 UC 模型大鼠血清 IL-6、IL-1 β 、IL-17 水平,抑制 SOD、GSH-PX、MDA 水平^[28]。另有研究^[24]表明,黄芩苷(100mg/kg)能阻断 TLR4/NF- κ B-p65/IL-6 信号通路并抑制 TNF- α 、IL-6 和 IL-13 mRNA 表达,从而减轻 DSS 诱导的 UC。

3 抑制氧化应激

细胞因子的释放会导致活性氧(ROS)的过度产生,引起氧化应激、细胞内的内源性抗氧化剂如谷胱甘肽(GSH)和超氧化物歧化酶(SOD)的水平降低^[29]。丙二醛(MDA)是脂质过氧化的产物,被认为是一种具有生理和病理相关性的生物活性化合物。黄芩苷能通过调节过氧化氢酶、SOD 和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)等抗氧化酶的活性,减少细胞内丙二醛(MDA)生成,减轻氧化损伤,从而治疗 TNBS 诱导的 UC。相关研究^[30]表明,其通过上调 Bcl-2 蛋白和下调转化生长因子- β (TGF- β)和 Bax 蛋白表达来抑制细胞凋亡。Zhu 等^[11]实验证明在 TNBS 诱导的 UC 大鼠模型中 ROS 产生增加、GSH 和 SOD 含量降低,导致丙二醛(MDA)水平升高,进而引发结肠炎症和结肠上皮屏障的破坏。黄芩苷通过提高内在抗氧化酶表达来调节 ROS 与抗氧化剂之间的平衡,从而抑制氧化应激,改善 ROS 和内源性抗氧化剂间失衡导致的炎症和结肠组织损伤^[20,27]。Yao 等^[30]实验结果也表明黄芩苷能显著上调 UC 大鼠 CAT、GSH-PX 和 SOD 活性,降低 ROS 的生成,说明黄芩苷对 UC 模型大鼠氧化应激损伤有保护作用。这些结果证实黄芩苷在 UC 治疗中具有良好的抗氧化作用。

4 调节肠道微生物菌群

肠道微生物菌群在调节免疫功能和维持肠道健康方面发挥重要作用,黄芩苷可以调节肠道微生物菌群。一些研究^[31-32]发现,黄芩苷可以促进有益菌类(如双歧杆菌)的增殖或活性,这些菌类对维持肠道健康和功能具有积极作用。同时,黄芩苷还可以减少有害菌类(如变形菌门和放线菌门)的数量,这些有害菌类可能在某些病理状态下促进肠道炎症发展。因此,黄芩苷对肠道菌群数量的转变可能有助于减轻肠道炎症和改善肠道屏障功能。黄芩苷还可以通过调节肠道菌群的代谢产物,如短链脂肪酸(SCFAs),对肠道健康和免疫调节发挥重要作用^[33]。研究^[11]发现,黄芩苷还可以显著增加 TNBS 处理大鼠的肠道菌群产生的丁酸和丙酸等 SCFAs 的生成,这些代谢产物可以促进肠道屏障功能和免疫调节,对溃疡性结肠炎疾病有一定程度缓解作用。上述结果表明,黄芩苷可能通过调节肠道菌群的组成和代谢产物来实现对溃疡性结肠炎的调节,然而,目前还需更多研究

以明确黄芩苷与肠道菌群间的相互作用机制。

5 小 结

近年来,胃肠疾病在世界范围内发病率逐年增加,溃疡性结肠炎是一种慢性炎症性肠道疾病,发病机制复杂。黄芩苷是从黄芩中提取出来的黄酮类成分,相较于常规西药治疗,具有较好的安全性和耐药性优势。黄芩苷从多个方面、多个环节和多个通路共同影响溃疡性结肠炎的发展,具体表现为免疫调节、抑制炎症反应、抑制氧化应激、调节肠道微生物菌群等。通过对黄芩苷的多重作用机制深入研究,有助于发现新的治疗靶点和治疗手段。尽管一些初步研究表明黄芩苷可能对溃疡性结肠炎具有潜在的治疗作用,但大部分实验仍停留在基础阶段,具体机制尚未完全阐明。此外,目前还缺乏大规模、随机临床试验来验证其疗效,临床应用程度仍然处于较低水平。未来的研究需要进一步深入探索黄芩苷在治疗溃疡性结肠炎中的具体机制,特别是与免疫调节、炎症抑制和抗氧化等方面的关系。同时,需要进行更加严格的临床试验来评估其安全性和疗效,并与目前常用的治疗方法进行比较,以确保黄芩苷是作为治疗溃疡性结肠炎的有效选择。这将为溃疡性结肠炎患者提供更多治疗选择,并为临床提供更有力的参考依据。

参考文献:

[1] KAENKUMCHORN T, WAHBEH G. Ulcerative colitis: making the diagnosis [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2020, 49(4):655

[2] SEGAL J P, LEBLANC J F, HART A L. Ulcerative colitis: an update [J]. *Clin Med*, 2021, 21(2):135

[3] KUCHARZIK T, KOLETZKO S, KANNENGIESSER K, et al. Ulcerative colitis-diagnostic and therapeutic algorithms [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2020, 117(33-34):564

[4] WEN Y, WANG Y, ZHAO C, et al. The pharmacological efficacy of baicalin in inflammatory diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11):9317

[5] GANGULY R, GUPTA A, PANDEY A K. Role of baicalin as a potential therapeutic agent in hepatobiliary and gastrointestinal disorders: a review [J]. *World J Gastroenterol*, 2022, 28(26):3047

[6] ZHU Y, FENG Y, LIU H, et al. CD4⁺ CD29⁺ T cells are blamed for the persistent inflammatory response in ulcerative colitis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(3):2627

[7] YU F Y, HUANG S G, ZHANG H Y, et al. Effects of ba-

icalin in CD4⁺ CD29⁺ T cell subsets of ulcerative colitis patients [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(41):15299

[8] KAŁUŻNA A, OLCZYK P, KOMOSIŃSKA VASSEV K. The role of innate and adaptive immune cells in the pathogenesis and development of the inflammatory response in ulcerative colitis [J]. *J Clin Med*, 2022, 11(2):400

[9] GONG Y, LIN Y, ZHAO N, et al. The th17/treg immune imbalance in ulcerative colitis disease in a chinese han population [J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016:7089137

[10] ZOU Y, DAI S X, CHI H G, et al. Baicalin attenuates trbs-induced colitis in rats by modulating the th17/treg paradigm [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(10):1873

[11] ZHU L, XU L Z, ZHAO S, et al. Protective effect of baicalin on the regulation of Treg/Th17 balance, gut microbiota and short-chain fatty acids in rats with ulcerative colitis [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(12):5449

[12] TATIYA APHIRADEE N, CHATUPHONPRASERT W, JARUKAMJORN K. Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis [J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2018, 30(1):1

[13] ALIPOUR M, ZAIDI D, VALCHEVA R, et al. Mucosal barrier depletion and loss of bacterial diversity are primary abnormalities in paediatric ulcerative colitis [J]. *J Crohns Colitis*, 2016, 10(4):462

[14] ZHANG C L, ZHANG S, HE W X, et al. Baicalin may alleviate inflammatory infiltration in dextran sodium sulfate-induced chronic ulcerative colitis via inhibiting IL-33 expression [J]. *Life Sci*, 2017, 186:125

[15] YANG L, YANG C, WANG L, et al. Repurposing old drugs as novel inhibitors of human MIF from structural and functional analysis [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2022, 55:128445

[16] NI L, JING S, ZHU L, et al. The immune change of the lung and bowel in an ulcerative colitis rat model and the protective effect of sodium houttuynfonate combined with matrine [J]. *Front Immunol*, 2022, 13:888918

[17] DAI S X, ZOU Y, FENG Y L, et al. Baicalin down-regulates the expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) effectively for rats with ulcerative colitis [J]. *Phytother Res*, 2012, 26(4):498

[18] PALLIO G, BITTO A, PIZZINO G, et al. Use of a balanced dual cyclooxygenase-1/2 and 5-lipoxygenase inhibitor in experimental colitis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 789:152

[19] CUI L, FENG L, ZHANG Z H, et al. The anti-inflammation effect of baicalin on experimental colitis through inhibiting TLR4/NF-κB pathway activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23(1):294

YTHDF1 作为 m⁶A 读取器对肿瘤生长和转移的作用研究进展*

刘绮雯, 聂锦霞, 黄容易, 梅燕**, 潘丹**

(湖北科技学院医学部基础医学院, 湖北咸宁 437100)

摘要: N⁶-甲基腺苷(m⁶A)是真核生物 RNA 中最常见最丰富的一种转录后 RNA 修饰,也是 mRNA 和非编码 RNA 中主要的甲基化修饰之一,它可影响 RNA 的剪接、翻译、稳定性以及某些非编码 RNA 的表观遗传。YTHDF1 是特性良好且重要的 m⁶A 读取蛋白,被称为 m⁶A 的“读取器”。YTHDF1 通过促进翻译或调节 mRNA 稳定性等不同机制在癌症的发生和转移中发挥重要作用。YTHDF1 在多种肿瘤细胞中表达上调,利用其显著的 m⁶A 识别和修饰功能,通过多种分子机制促进肿瘤细胞的增殖、转移,导致不良预后;并与化疗和免疫治疗药物耐药密切相关。我们主要总结了 YTHDF1 对 mRNA 的调控机制及其在肿瘤发生发展中的作用,认为 YTHDF1 是一个非常有前途的新型的肿瘤生物标志物,是抗肿瘤治疗的潜在靶点。

关键词: YTHDF1; N⁶-甲基腺苷; 肿瘤; 肿瘤治疗

中图分类号: R730.4

文献标识码: A

文章编号: 2095-4646(2024)06-0543-006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI: 10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0543



Research Progress of the effect of YTHDF1 as an m⁶A Reader on Tumor Growth and Metastasis

LIU Qi-wen, MEI Yan, PAN Dan, et al

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

ABSTRACT: N⁶-methyladenosine (m⁶A) is the most common and abundant post-transcriptional RNA modification in eukaryotes, and also is one of the principal methylations found in both mRNA and non-coding RNA. It can influence RNA splicing, translation, stability, and the epigenetics of certain non-coding RNAs. YTHDF1 is a well-characterized and important m⁶A reader protein known for its role as an "reader" of m⁶A. YTHDF1 plays an important role in cancer initiation and metastasis through different mechanisms such as promoting translation or regulating mRNA stability. The expression of YTHDF1 is up-regulated in a variety of tumor cells. By using its significant m⁶A recognition and modification function, YTHDF1 promotes the proliferation and metastasis of tumor cells through various molecular mechanisms, leading to poor prognosis. It is closely related to the resistance of chemotherapy and immunotherapy drugs. In this review, we mainly summarize the mechanism of YTHDF1 to regulate mRNA and its role in tumorigenesis and development. We propose that YTHDF1 is a promising novel tumor biomarker and a potential target for anti-tumor therapy.

KEY WORDS: YTHDF1; m⁶A; Tumor; Oncotherapy

N⁶-甲基腺苷(N⁶-methyladenosine, m⁶A)修饰参与 mRNA 许多重要过程,包括 mRNA 剪接、核输出、翻译以及转录后的修饰。mRNA 中 m⁶A 的

数量由“写入器”(m⁶A 甲基转移酶: METTL3/14、WTAP、RBM15/15B、VIRMA 和 ZC3H13)和“擦除器”(去甲基化酶: FTO、ALKBH5 和 ALKBH3)决

* 基金项目:湖北科技学院校内培育科研项目(2024-25X10, 2024-25X09)

** 通讯作者, E-mail: meihyan@163.com; 1742261852@qq.com

定,它的作用由“读取器”(YTHDC1/2、YTHDF1/2/3、IGF2BP1/2/3、HNRNP 和 eIF3,)介导。 m^6A 修饰通过与不同的阅读蛋白相互作用来控制修饰 RNA 的命运,如 RNA 剪接、调控、核质转运、稳定性、翻译和降解。在 m^6A 调节因子中,YTHDF1 是最重要、最关键的读取器,它可以无序列选择性地识别 $G(m^6A)C$ 和 $A(m^6A)C$ 作为配体^[1],调节靶标 mRNA 的翻译和稳定性,从而改变下游分子的表达,影响各种生物过程。关于 YTHDF1 对 mRNA 的调控机制及其在肿瘤生物学中的作用,本文进行了综述,并突出了 YTHDF1 作为肿瘤治疗靶点的潜力。

1 YTHDF1 调控 RNA 的分子机制

YTHDF1 识别 m^6A 编辑的 mRNA,通过促进其翻译来促进蛋白表达,从而在肿瘤生物学中发挥影响作用。其主要通过促发翻译起始^[2](即与翻译起始因子相互作用)和延伸(常见翻译起始因子有 eIF3A 和 eIF3B)、以帽依赖或帽独立方式(即以不依赖于 cap 的方式促进翻译或仅以少量依赖于 cap 的方式促进翻译)、促进核糖体占用、与 YTHDF3 合作等机制来促进蛋白质翻译(图 1)。 m^6A 修饰的靶 pre-mRNA 首先被 YTHDF3 识别,然后 YTHDF1 和 YTHDF2 分别与 YTHDF3 竞争结合。YTHDF3 协同 YTHDF1 可促进 m^6A -RNA 的翻译,与 YTHDF2 作用加速 m^6A -RNA 的降解。一旦 YTHDF1 与 YTHDF3 结合,YTHDF1 将目标 mRNA 携带到含有 eIF3A 的翻译起始复合物中,然后增加目标 mRNA 的翻译。除促进蛋白质翻译外,越来越多的证据表明^[3] YTHDF1 还能通过增强 RNA 稳定性来发挥作用。

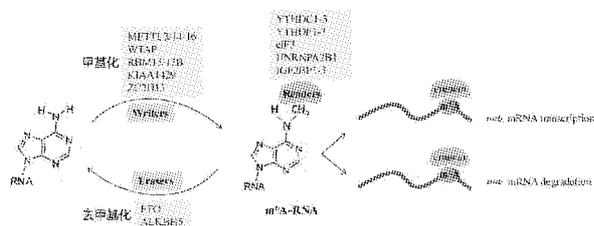


图 1 YTHDF1 参与 m^6A 甲基化修饰的分子机制

2 YTHDF1 在肿瘤生长和转移中的作用

大量研究表明^[4],YTHDF1 的失调与各种癌症的恶性进展密切相关。基因表达谱数据动态分析(GEPIA;<http://GEPIA2.cancer-pku.cn/>)数据

库,是以癌症基因组图谱 TCGA 和基因型-组织表达 GTEX 数据为基础的应用程序,用于癌症和正常组织基因表达谱分析。利用 GEPIA 数据库分析 YTHDF1 在不同肿瘤和其对应癌旁正常组织中的表达差异,结果显示 YTHDF1 在多种人类癌症中高度表达(图 2)。因此,本文总结了一些关于 YTHDF1 参与肿瘤发生机制的最新进展。

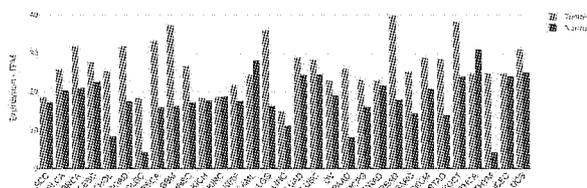


图 2 GEPIA 数据库中 YTHDF1 在不同肿瘤和正常组织中的表达情况

2.1 YTHDF1 影响消化系统肿瘤的生长和转移

YTHDF1 在消化系统肿瘤中的影响较为显著。对于胃癌,在机制上,YTHDF1 以 m^6A 依赖的方式促进 Wnt 关键受体 frizzled7 (FZD7) 的翻译,引起 Wnt/ β -catenin 通路超激活,促进胃癌发生^[5]。体外和体内实验表明,通过抑制 YTHDF1 可减轻胃癌细胞的增殖和肿瘤发生。另有学者发现 PLAGL2 可通过 UCA1/miR-145-5p/YTHDF1 轴增强 Snail 表达,促进胃癌进展。YTHDF1 还可通过上调 TCF7 mRNA 翻译促进胃癌细胞增殖并抑制细胞凋亡^[6]。YTHDF1 通过与 p53 的相互作用调节胃癌中的免疫细胞浸润^[7]。除此之外,还有研究发现低氧诱导因子-1(HIF-1 α)能通过与 H19 启动子结合,诱导 H19 的过表达,从而募集 YTHDF1 促进 SCARB1 翻译来促进胃癌细胞增殖、迁移和血管生成^[8],同时 HIF-1 α 还能促进 ATG2A 和 ATG14 的翻译,驱动缺氧诱导的肝细胞自噬和肝癌的恶化。

在肝细胞癌(HCC)中,YTHDF1 以 m^6A 依赖的方式加速 FZD5 mRNA 的翻译输出,通过 WNT/ β -catenin 通路作为致癌基因在肝癌中发挥作用;通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路来诱导上皮-间质转化(EMT),促进肝癌进展^[9]。研究表明甲基转移酶 3 (METTL3) 的缺失能抑制肝脏免疫微环境中 Kupffer 细胞的 M2 极化,在体外恢复 HCC 细胞的恶性表型和体内的生长和转移。sh-METTL3 则是通过 YTHDF1 依赖性 m^6A 修饰调控 RBM14 的表达,这是抑制 Kupffer 细胞极化和

HCC 进展的关键^[10]。

而对于结直肠癌,有研究发现新的致癌转录轴 YTHDF1-m⁶A-ARHGEF2 能够调节结直肠癌发生和转移^[11]。同时, YTHDF1 也可通过促进 ARHGEF2 翻译和 RhoA 信号传导影响结直肠癌, siRNA 递送 LNP 药物能够验证靶向轴 YTHDF1-m⁶A-ARHGEF2 具有治疗结直肠癌的潜力^[11]。另外 YTHDF1 还能促进 p65 翻译,上调 CXCL1,通过 m⁶A-p65-CXCL1/CXCR2 轴破坏抗肿瘤免疫促进结直肠癌^[12]。还有研究表明靶向 YTHDF1/SH3TC2 轴也能够治疗结直肠癌, YTHDF1 蛋白直接与 SH3TC2 mRNA 结合,并以 m⁶A 依赖的方式促进其高表达。临床上 SH3TC2 的高表达预示着结直肠癌患者更差的无病生存期(DFS),而敲低 SH3TC2 能显著抑制结直肠癌细胞周期进程^[12]。相关研究发现,转录因子 GMEB2 在结直肠癌细胞和组织中的 mRNA 和蛋白水平均显著上调,并促进结直肠癌细胞生长,而 YTHDF1 能够识别并结合 GMEB2 mRNA 上的 m⁶A 位点,增强其稳定性^[13]。YTHDF1 以 m⁶A 依赖性方式增强 B7-H3 的表达,其异常表达与结直肠癌患者的不良预后相关^[14]。

2.2 YTHDF1 影响呼吸系统肿瘤的生长和转移

对于呼吸系统肿瘤, YTHDF1 表达上调,可通过以 m⁶A 依赖的方式加速铁相关蛋白的翻译来促进肺癌的发生。敲低 YTHDF1 则抑制细胞增殖、迁移和侵袭,诱导肺癌细胞铁凋亡。铁蛋白(FTH)被确定为肺癌细胞中 YTHDF1 的关键靶点。METTL3 以 YTHDF1 依赖性方式调节 SH3BP5 的 mRNA 稳定性,从而影响肺癌细胞的侵袭能力^[15]。相关研究显示 m⁶A 甲基转移酶 METTL3 在非小细胞肺癌(NSCLC)细胞系中,诱导 FRAS1 m⁶A 修饰和蛋白质稳定性, METTL3-FRAS1 能够通过协同 YTHDF1 调控 CDON,促进 NSCLC 细胞增殖、集落形成和肿瘤生长。RBMS1 与 YTHDF1 相互作用促进 S100P 的翻译,从而加速 NSCLC 细胞转移^[16]。YTHDF1 和 IGF2BP3 可识别并结合雌激素受体 α 中 mRNA 的 m⁶A 位点,并增强其稳定性来促进 NSCLC 生长^[17]。m⁶A 去甲基酶 ALKBH5 也可通过降低 YTHDF1 介导的 YAP 表达和抑制 miR-107/lats2 的 YAP 活性,从而抑制 NSCLC 生长和转移。还有研究发现^[18],当 YTHDF1 缺乏,可通过调节 CDK2、CDK4 和细胞周期蛋白 D1 的翻译效率来抑制 NSCLC 细胞增殖。

此外, YTHDF 与 KRAS 和 TP53 共突变与肺腺癌(LUDA)的不良预后密切相关。YTHDF1 的升高以 m⁶A 依赖的方式功能性地促进 cyclin B1 mRNA 的翻译,从而加快 KRAS/TP53-mut LUAD 肿瘤增殖而导致不良预后^[19]。

2.3 YTHDF1 影响生殖系统和泌尿系统肿瘤的生长和转移

在乳腺癌中,多数研究发现 YTHDF1 能够促进乳腺癌细胞的增殖和侵袭,其表达水平与肿瘤大小、淋巴结转移、远处转移密切相关。肿瘤缺氧可诱导 HIF1 α 转录,进而抑制 miR-16-5p,促进 YTHDF1 的表达,最终上调 PKM2 促进肿瘤糖酵解,提高乳腺癌细胞的成瘤和转移潜能^[20]。同时,还有研究证明 YTHDF1 可以通过识别并结合 m⁶A 修饰的 FOXM1 mRNA,加速 FOXM1 的翻译过程,促进乳腺癌转移。而 A-to-I RNA 编辑(哺乳动物基因表达最常见的 RNA 修饰类型之一)则通过 ADAR1、METTL3 和 YTHDF1 的连接机制,与 METTL3 相互作用,提高其蛋白水平,促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[21]。

卵巢癌是女性生殖系统中致死率最高的恶性肿瘤, YTHDF1 在其中发挥着重要影响。YTHDF1 可以通过与 m⁶A 修饰的 EIF3C mRNA、DDR2 mRNA 结合,促进其表达,从而加速卵巢癌的发生和发展^[22]。YTHDF1 还能通过介导癌基因 TRIM29 上调来促进顺铂耐药卵巢癌的肿瘤干细胞样特征。有研究^[23]发现 METTL3 可通过 YTHDF1 介导的 m⁶A 修饰来增强 HK2(己糖激酶 2)的稳定性,促进宫颈癌细胞的增殖和有氧糖酵解。YTHDF1 还以依赖 m⁶A 的方式调控 RANBP2 的翻译,促进宫颈癌细胞的生长、迁移和侵袭。

YTHDF1 在前列腺组织中的高度表达能够促进前列腺癌的发生和转移,与其不良预后密切相关。YTHDF1 以 m⁶A 依赖的方式提高 PLK1 的翻译效率,促进 PI3K/AKT 信号通路的过度激活,从而驱动前列腺癌进展^[24]。在肾细胞癌中,泛素连接酶 STUB1 通过调节 YTHDF1 的稳定性抑制肾细胞癌的发生^[25]。

2.4 YTHDF1 在其他肿瘤中的影响作用

YTHDF1 与人类多种肿瘤密切相关。例如, YTHDF1 可通过结合多种癌基因的 mRNA,增强视网膜母细胞瘤细胞中 mRNA 的稳定性和翻译,来促进多种癌基因的表达,促进视网膜母细胞瘤细胞增殖和肿瘤生长^[26]。铁代谢在下咽鳞状细

胞癌(HPSCC)进展中发挥着重要作用,YTHDF1诱导HPSCC肿瘤发生就是依赖于体内外铁代谢。YTHDF1通过增强人乳头状瘤细胞TFRC的表达来介导铁代谢从而促进HPSCC增殖^[27]。在神经母细胞瘤(NB)中,METTL14依赖m⁶A-YTHDF1作用机制抑制YWHAH的表达,激活PI3K/AKT信号通路,促进NB细胞活性^[28]。敲低YTHDF1能够抑制胶质母细胞瘤的肿瘤干细胞样特性以及降低梅克尔细胞癌的增殖能力。还有学者^[29]在进行系统的分析后,发现YTHDF1在黑色素瘤中发生基因突变,从而导致它们在组织中表达上调,并可能通过p53等信号通路影响黑色素瘤的发展。此外,YTHDF1可以识别CCR4-NOT转录复合物亚基7(CNOT7)的m⁶A位点,以m⁶A方式促进CNOT7表达,从而调控骨肉瘤的增殖、迁移和侵袭^[30]。

3 YTHDF1 调节免疫以促进肿瘤进展

人们在研究YTHDF1对于肿瘤影响的同时也发现了它在肿瘤免疫中的重要作用。YTHDF1在肿瘤组织中的表达与肿瘤免疫浸润细胞显著相关,其参与肿瘤的免疫调节,在肿瘤免疫微环境中发挥着重要作用。有研究^[31]表明YTHDF1是限制免疫识别后,通过促进抑制新抗原溶酶体蛋白酶的表达,抑制经典树突细胞(DC)向T细胞呈递内化肿瘤新抗原,从而抑制肿瘤免疫。在机制上,编码这些溶酶体蛋白酶的转录本m⁶A标记后由YTHDF1识别。除此之外,YTHDF1还能通过其他方式影响肿瘤免疫,比如通过促进主要组织相容性复合体I类(MHC-I)降解来驱动免疫逃避。而YTHDF1的缺失能够介导干扰素(IFN)- γ 受体1的过表达,增强IFN- γ 应答,促进肿瘤细胞上MHC-I的表达,从而实现免疫原性肿瘤细胞的自我呈现,刺激细胞毒性T淋巴细胞应答^[32]。综上所述,YTHDF1可以通过调控免疫相关基因的表达、调节T细胞功能以及促进肿瘤细胞的免疫逃逸等机制来促进肿瘤进展。因此,YTHDF1可以作为肿瘤免疫治疗的潜在新靶点,为后续肿瘤免疫治疗提供有效线索和新方向。

4 YTHDF1 在人类肿瘤中的临床意义

YTHDF1作为m⁶A修饰的核心因子,在人类癌症发展中具有靶向和调控多个基因的全局作用。YTHDF1不仅在多种人肿瘤中表现为高表达,促进肿瘤的生长与转移,还与肿瘤的不良预后

也密切相关。高表达的YTHDF1与HCC患者的病理分期和不良预后相关,在结直肠癌患者中预示着较差的总生存期。YTHDF1在前列腺癌和乳腺癌中也被证明与肿瘤大小、淋巴结浸润和远处转移呈正相关^[33]。YTHDF1作为一种致癌因子,在各种肿瘤模型中的特异性和敏感性均较高,可能成为很有前途的肿瘤生物标志物。通过检测YTHDF1的水平,以便更好地评估患者的预后和治疗反应。

YTHDF1在化疗药物、靶向药物耐药、免疫检查点抑制剂(ICI)的治疗中也发挥着重要作用。靶向YTHDF1不仅可以抑制肿瘤细胞的增殖,还可以对抗耐药性,激活抗肿瘤免疫并增强ICI治疗的效果。研究^[34]发现通过表观遗传和免疫调节,有效递送短干扰RNA,抑制frizzled7翻译和灭活Wnt/ β -catenin通路,以m⁶A依赖的方式减少YTHDF1表达,即可抑制胃癌的进展和转移。化疗耐药性仍然是癌症临床治疗的主要障碍。当敲低YTHDF1可以使乳腺癌细胞对阿霉素、顺铂以及PARP抑制剂奥拉帕尼(Olaparib)敏感^[35]。靶向YTHDF1的脂质纳米颗粒显著增强了仑伐替尼和索拉非尼在肝细胞癌中的疗效^[36]。YTHDF1敲除与抗PD-1免疫检查点抑制剂治疗相结合,可显著提高治疗效果并降低肿瘤对免疫检查点抑制剂的耐药性^[12]。鉴于YTHDF1影响肿瘤细胞化疗和免疫治疗的敏感性,YTHDF1与其他治疗方法的联合使用,可能会改善治疗效果。靶向YTHDF1的治疗策略正在被探索。例如,开发小分子抑制剂或RNA干扰技术,以抑制YTHDF1的功能,从而影响肿瘤细胞的生长和转移。

5 总 结

综上所述,作为人类mRNA重要的蛋白解读器,YTHDF1在人类肿瘤中占据着重要的地位,它通过调节靶标mRNA的翻译和稳定性,改变下游分子的表达,从而影响各种生物过程。通过对YTHDF蛋白的功能和机制的进一步探索,可以更充分的了解YTHDF1对多种肿瘤的生长、增殖、侵袭和迁移,肿瘤干细胞的形成、代谢、免疫和耐药的影响。YTHDF1的异常表达通常预示着患者疾病的恶化及不良预后。因此,YTHDF1可用作诊断、进展和预后评估的生物标志物,并为肿瘤的临床治疗提供新的靶点。然而,YTHDF1的研究仍处于临床前阶段,还有很多问题需要解决,如YTHDF1参与m⁶A甲基化修饰的调控机制还未完

全明确。关于探索靶向 YTHDF1 在临床上的应用价值以及开发肿瘤治疗的 YTHDF1 小分子抑制剂或寻找抑制 YTHDF1 表达的天然化合物还有待进一步探索。

参考文献:

- [1] SIKORSKI V, SELBERG S, LALOWSKI M, et al. The structure and function of YTHDF epitranscriptomic m(6) A readers[J]. Trends Pharmacol Sci, 2023, 44(6):335
- [2] WANG X, ZHAO B S, ROUNDTREE I A, et al. N(6)-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency[J]. Cell, 2015, 161(6):1388
- [3] ZOU Z, SEPICH-POORE C, ZHOU X, et al. The mechanism underlying redundant functions of the YTHDF proteins[J]. Genome Biol, 2023, 24(1):17
- [4] REN W, YUAN Y, LI Y, et al. The function and clinical implication of YTHDF1 in the human system development and cancer[J]. Biomark Res, 2023, 11(1):5
- [5] PI J, WANG W, JI M, et al. YTHDF1 promotes gastric carcinogenesis by controlling translation of FZD7 [J]. Cancer Res, 2021, 81(10):2651
- [6] LI Y, GUO X, LIANG X, et al. YTHDF1 promotes proliferation and inhibits apoptosis of gastric cancer cells via upregulating TCF7 mRNA translation [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2024, 29(3):117
- [7] LIAO Q, XIONG J. YTHDF1 regulates immune cell infiltration in gastric cancer via interaction with p53[J]. Exp Ther Med, 2024, 27(6):255
- [8] BAI R, SUN M, CHEN Y, et al. H19 recruited N⁶-methyladenosine (m⁶A) reader YTHDF1 to promote SCARB1 translation and facilitate angiogenesis in gastric cancer [J]. Chin Med J (Engl), 2023, 136(14):1719
- [9] LUO X, CAO M, GAO F, et al. YTHDF1 promotes hepatocellular carcinoma progression via activating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and inducing epithelial-mesenchymal transition[J]. Exp Hematol Oncol, 2021, 10(1):35
- [10] HU J, YANG L, PENG X, et al. METTL3 promotes m⁶A hypermethylation of RBM14 via YTHDF1 leading to the progression of hepatocellular carcinoma [J]. Hum Cell, 2022, 35(6):1838
- [11] WANG S, GAO S, ZENG Y, et al. N⁶-Methyladenosine reader YTHDF1 promotes ARHGEF2 translation and RhoA signaling in colorectal cancer [J]. Gastroenterology, 2022, 162, 1183
- [12] BAO Y, ZHAI J, CHEN H, et al. Targeting m⁶A reader YTHDF1 augments antitumour immunity and boosts anti-PD-1 efficacy in colorectal cancer [J]. Gut, 2023, 72(8):1497
- [13] NING Z, WU Z, ZHANG F, et al. GMEB2 promotes the growth of colorectal cancer by activating ADRM1 transcription and NF-κB signalling and is positively regulated by the m⁶A reader YTHDF1 [J]. Cancers (Basel), 2022, 14(24):6046
- [14] CHEN R, SU F, ZHANG T, et al. N⁶-methyladenosine modification of B7-H3 mRNA promotes the development and progression of colorectal cancer [J]. iScience, 2024, 27(2):108956
- [15] ZHANG B, QIAN R, LI X. METTL3 suppresses invasion of lung cancer via SH3BP5 m⁶A modification [J]. Arch Biochem Biophys, 2024, 752:109876
- [16] SUN Y, CHEN D, SUN S, et al. RBMS1 coordinates with the m⁶A reader YTHDF1 to promote NSCLC metastasis through stimulating s100P translation [J]. Adv Sci (Weinh), 2024, 11(15):e2307122
- [17] XU X, QIU S, ZENG B, et al. N⁶-methyladenosine demethyltransferase FTO mediated m(6)A modification of estrogen receptor alpha in non-small cell lung cancer tumorigenesis [J]. Oncogene, 2024, 43(17):1288
- [18] SHI Y, FAN S, WU M, et al. YTHDF1 links hypoxia adaptation and non-small cell lung cancer progression [J]. Nat Commun, 2019, 10(1):4892
- [19] LOU X, NING J, LIU W, et al. YTHDF1 promotes cyclin B1 translation through m(6)A modulation and contributes to the poor prognosis of lung adenocarcinoma with KRAS/TP53 co-mutation [J]. Cells, 2021, 10(7):1669
- [20] YAO X, LI W, LI L, et al. YTHDF1 upregulation mediates hypoxia-dependent breast cancer growth and metastasis through regulating PKM2 to affect glycolysis [J]. Cell Death Dis, 2022, 13, 258
- [21] LI Y, WANG N X, YIN C, et al. RNA editing enzyme ADAR1 regulates METTL3 in an editing dependent manner to promote breast cancer progression via METTL3/ARHGAP5/YTHDF1 axis [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17):9656
- [22] ZHI D, ZHOU K, LIU S, et al. METTL3/YTHDF1 m⁶A axis promotes tumorigenesis by enhancing DDR2 expression in ovarian cancer [J]. Pathol Res Pract, 2024, 253:155047
- [23] WANG Q, GUO X, LI L, et al. N⁶-methyladenosine METTL3 promotes cervical cancer tumorigenesis and Warburg effect through YTHDF1/HK2 modification [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(10):911
- [24] LI P, SHI Y, GAO D, et al. ELK1-mediated YTHDF1 drives prostate cancer progression by facilitating the translation of Polo-like kinase 1 in an m⁶A dependent manner [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(16):6145
- [25] MA S, SUN Y, GAO G, et al. The ubiquitin ligase STUB1 suppresses tumorigenesis of renal cell carcinomas through regulating YTHDF1 stability [J]. Carcinogenesis, 2024, 25, bgae033
- [26] LUO Y, HE M, YANG J, et al. A novel MYCN-YTHDF1 cascade contributes to retinoblastoma tumor growth by eliciting m⁶A -dependent activation of multiple oncogenes [J]. Sci China Life Sci, 2023, 66(9):2138
- [27] YE J, WANG Z, CHEN X, et al. YTHDF1-enhanced iron metabolism depends on TFRC m⁶A methylation [J]. Ther-

- anostics, 2020, 10(26):12072
- [28] WANG J, YIN H, LI G, et al. METTL14 promotes neuroblastoma formation by inhibiting YWHAH via an m⁶A-YTHDF1-dependent mechanism[J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1):186
- [29] LI T, GU M, DENG A, et al. Increased expression of YTHDF1 and HNRNPA2B1 as potent biomarkers for melanoma: a systematic analysis[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20, 239
- [30] WEI K, GAO Y, WANG B, et al. Methylation recognition protein YTH N⁶-methyladenosine RNA binding protein 1 (YTHDF1) regulates the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma by regulating m⁶A level of CCR4-NOT transcription complex subunit 7 (CNOT7)[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3):5236
- [31] HAN D, LIU J, CHEN C, et al. Anti-tumour immunity controlled through mRNA m(6)A methylation and YTHDF1 in dendritic cells[J]. *Nature*, 2019, 566(7743):270
- [32] LIN W, CHEN L, ZHANG H, et al. Tumor-intrinsic YTHDF1 drives immune evasion and resistance to immune checkpoint inhibitors via promoting MHC-I degradation[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1):265
- [33] HU J, QIU D, YU A, et al. YTHDF1 is a potential pancreatic cancer biomarker for prognosis and immunotherapy[J]. *Front Oncol*, 2021, 11:607224
- [34] YOU Q, WANG F, DU R, et al. m⁶A reader YTHDF1-targeting engineered small extracellular vesicles for gastric cancer therapy via epigenetic and immune regulation[J]. *Adv Mater*, 2023, 35(8):e2204910
- [35] SUN Y, DONG D, XIA Y, et al. YTHDF1 promotes breast cancer cell growth, DNA damage repair and chemoresistance[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(3):230
- [36] ZHANG X, SU T, WU Y, et al. N⁶-Methyladenosine reader YTHDF1 promotes stemness and therapeutic resistance in hepatocellular carcinoma by enhancing NOTCH1 expression[J]. *Cancer Res*, 2024, 84(6):827
- (收稿日期:2024-05-12)

(上接第 542 页)

- [20] WANG X, XIE L, LONG J, et al. Therapeutic effect of baicalin on inflammatory bowel disease: a review[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 283:114749
- [21] YAO D, DONG M, DAI C, et al. Inflammation and inflammatory cytokine contribute to the initiation and development of ulcerative colitis and its associated cancer[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2019, 25(10):1595
- [22] CUI L, FENG L, ZHANG Z H, et al. The anti-inflammation effect of baicalin on experimental colitis through inhibiting TLR4/NF-κB pathway activation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23(1):294
- [23] LIU X, WEI W, WU Y Z, et al. Emodin treatment of papillary thyroid cancer cell lines in vitro inhibits proliferation and enhances apoptosis via downregulation of NFκB and its upstream TLR4 signaling[J]. *Oncol Lett*. 2023, 26(6):514
- [24] FENG J, GUO C, ZHU Y, et al. Baicalin down regulates the expression of TLR4 and NFκB-p65 in colon tissue in mice with colitis induced by dextran sulfate sodium[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(11):4063
- [25] LI Y, HU J, CHENG C, et al. Baicalin ameliorates dss-induced colitis by protecting goblet cells through activating NLRP6 inflammasomes[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022:2818136
- [26] FU Y J, XU B, HUANG S W, et al. Baicalin prevents lps-induced activation of TLR4/NF-κB p65 pathway and inflammation in mice via inhibiting the expression of CD14[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(1):88
- [27] SHEN J, CHENG J, ZHU S, et al. Regulating effect of baicalin on IKK/IκB/NF-κB signaling pathway and apoptosis-related proteins in rats with ulcerative colitis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 73:193
- [28] LIANG S, DENG X, LEI L, et al. The comparative study of the therapeutic effects and mechanism of baicalin, baicalein, and their combination on ulcerative colitis rat[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10:1466
- [29] BALMUS I M, CIOBICA A, TRIFAN A, et al. The implications of oxidative stress and antioxidant therapies in inflammatory bowel disease: clinical aspects and animal models[J]. *Saudi J Gastroenterol*, 2016, 22(1):3
- [30] YAO J, CAO X, ZHANG R, et al. Protective effect of baicalin against experimental colitis via suppression of oxidant stress and apoptosis[J]. *Pharmacogn Mag*, 2016, 12(47):225
- [31] POPOV J, CAPUTI V, NANDEESHA N, et al. Microbiota-immune interactions in ulcerative colitis and colitis associated cancer and emerging microbiota-based therapies[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21):11365
- [32] SHEN Z H, ZHU C X, QUAN Y S, et al. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(1):5
- [33] HU Q, ZHANG W, WU Z, et al. Baicalin and the liver-gut system: pharmacological bases explaining its therapeutic effects[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 165:105444
- (收稿日期:2024-05-22)

水凝胶生物粘合剂用于软组织止血修复的研究进展*

李甲,李淑,林钰洋,邢君,李玲,王彩**,郑敏**

(湖北科技学院医学部生物医学工程与医学影像学院,湖北咸宁437100)

摘要:及时的伤口干预处理对预防伤口感染、促进组织结构和功能恢复至关重要。目前临床手术中最常采用缝合线、钉合器进行伤口闭合处理。然而,这些传统的伤口缝合方式操作复杂繁琐且易对软组织造成二次损伤,尤其不适用于肝脏、脾脏等脆弱软组织以及急性主动脉破裂和无法控制的肝脏大出血等问题。鉴于这些不足,水凝胶生物粘合剂作为缝合线和钉合器的理想替代品引起了人们的极大关注。本文概括总结了近年来水凝胶生物粘合剂在伤口止血和组织愈合等方面的研究进展,并对水凝胶生物粘合剂未来的发展趋势进行了展望,其水下粘附性能和降解性能仍需迫切解决。

关键词:出血;组织损伤;水凝胶生物粘合剂;伤口止血;组织愈合

中图分类号:R973.1

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2024)06-0549-006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024.06.0549



Research Progress of Hydrogel Bioadhesives for Soft Tissue Hemostasis and Repair

LI Jia, WANG Cai, ZHENG Min, et al

(School of Biomedical Engineering and Imaging, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100, China)

ABSTRACT: Timely wound intervention is essential to prevent wound infection and promote the recovery of tissue structure and function. At present, sutures and staples are most commonly used in clinical surgery for wound closure treatment. However, these traditional wound suture methods are complex and cumbersome to operate, and are prone to secondary damage to soft tissues, especially not suitable for delicate soft tissues such as the heart and spleen, as well as acute aortic rupture and uncontrollable cardiac hemorrhage. Given these shortcomings, hydrogel bioadhesives have been attracted a great deal of attention and considered as an ideal alternative to sutures and staples. In this paper, the research progress of hydrogel bioadhesives in wound hemostasis and tissue healing in recent years was summarized, and the future development trend of hydrogel bioadhesives was prospected. In conclusion, the underwater adhesion and degradation properties of hydrogel bioadhesives still need to be solved urgently.

KEY WORDS: Bleeding; Tissue damage; Hydrogel bioadhesives; Wound hemostasis; Tissue healing

据统计,全球每年因疾病、意外事故和外科手术等导致的组织损伤有上千万例,这些伤口急需闭合处理以防止血液渗漏和细菌感染^[1]。目前,缝合线和钉合器仍是常用的伤口闭合方式。尽管这些方法能够有效地闭合伤口,但仍存在着一些不足^[2]。例如,手术缝合耗时长,增加了伤口感染的风险,且不适用于急救。尽管使用钉合器可以

快速地闭合伤口,但伤口处过度的机械张力给患者带来了不适。此外,这两种方式都对损伤组织造成了二次伤害且无法防止组织处血液的渗漏,不适用于微创治疗^[3]。虽然市场上有许多商用粘合止血材料(如纤维蛋白胶水、QuikClot、Vistaseal止血蛋白喷雾等),但生物安全性、止血效果和低成本等一些问题的存在仍然极大地限制了其广泛应

* 基金项目:湖北科技学院博士启动基金(BK202201, BK202307);湖北省自然科学基金青年项目(2022CFB755, 2023AFB538);湖北省教育厅科学研究计划中青年人才项目(Q20222804);国家自然科学基金青年项目(52303182)

** 通讯作者, E-mail: wangcai@hbust.edu.cn; xyzhengmin@hbust.edu.cn

用^[4]。因此,新型伤口闭合材料成为了近年来生物医学领域的研究重点。

水凝胶生物粘合剂是由大分子主链和含有亲水或疏水基团的侧链组成的三维网络^[5]。由于其具有操作便捷、生物相容性好、可无创粘合等优势受到了研究者的广泛关注^[6-8]。水凝胶生物粘合剂稳定的粘附性和力学强度是保证其有效使用的关键。然而,生理环境通常是潮湿的,大多数水凝胶生物粘合剂在充满体液和血液的环境中应用时会受到水分子的侵蚀,造成水凝胶的溶胀水解,最终导致力学性能下降和粘合失效。本文综述了水凝胶生物粘合剂在伤口止血和促进组织愈合修复方面的研究进展,以为水凝胶生物粘合剂在医用粘合剂材料领域的应用提供一些新的思路。

1 基于天然高分子的水凝胶生物粘合剂

基于天然高分子的水凝胶生物粘合剂是由各种天然亲水性聚合物交联而成,包括多糖(透明质酸、壳聚糖、海藻酸等)和蛋白质(胶原蛋白、明胶、丝素蛋白等)等。这些天然聚合物来源丰富且大多数存在于自然界,其中一些甚至参与了人体基质的组成。

1.1 多糖类水凝胶生物粘合剂

(1)透明质酸类。透明质酸(HA)是人体中含有的一种氨基葡萄糖多糖,具有生物相容性好、来源广泛等优点。然而,含有单一HA组分的水凝胶往往力学性能不足,需要与其它材料复合或进行化学改性。

Li等^[9]报道了一种基于酶催化交联和动态席夫碱反应为双重交联机制的可注射复合功能化水凝胶生物粘合剂的制备策略。该水凝胶生物粘合剂以多巴胺改性的氧化透明质酸(OHA-DA)和季铵盐壳聚糖(QCS)为基本组分,通过分子间氢键以及醛基、儿茶酚基团与组织间的动态共价键以实现出色的湿组织粘附,粘附强度可达 (21.68 ± 0.71) kPa。体内外实验表明该水凝胶生物粘合剂具有良好的生物相容性(溶血率 $<1.5\%$)和降解性,并具有抗炎、抗菌(抑菌率可达90%)和促进伤口愈合的效果。Bian等^[10]通过热敏收缩纳米胶束凝胶(PF127)、小分子粘合剂和透明质酸(HA)的协同作用制备了一种具有快速粘附和抗溶胀性能的可注射水凝胶生物粘合剂(RAAS水凝胶)。该RAAS水凝胶在紫外光照射几秒内即可实现稳固的湿组织粘附,粘附强度可达33kPa,

且在整个使用过程中具有优异的抗溶胀性能。此外,它还具有良好的生物相容性和低溶血风险,并在动物肝脏、动脉、心脏、脑血管、脑皮质损伤的多种出血模型中较对照组(失血量 257.65 ± 36.98 mg)均表现出快速止血作用(失血量 34.62 ± 8.56 mg)。Ren等^[11]以酰肼改性的透明质酸(HA-ADH)和邻苯二醛封端的四臂聚乙二醇(4aPEG-OPA)为基本组分,通过邻苯二醛(OPA)/N-亲核缩合反应构建了一种用于无缝线伤口愈合的水凝胶生物粘合剂。邻苯二醛可以与细胞外基质中蛋白质的胺基发生自发偶联,通过形成稳定的邻苯二甲酰胺键以实现水凝胶与组织的牢固粘合,粘附强度可达 (27.6 ± 3.9) kPa。基于邻苯二醛与酰肼基之间形成腙键的可逆性质,该水凝胶生物粘合剂具有优异的自愈合特性,有利于增强其可靠性和耐用性。由体内外实验表明,该水凝胶生物粘合剂具有良好的生物相容性,并能有效封闭伤口、迅速止血、促进创面愈合,其效果明显优于市售氰基丙烯酸酯胶和纤维蛋白胶。

(2)壳聚糖类。壳聚糖(CS)是甲壳素N-脱乙酰基的产物,是一种天然阳离子多糖。因具有良好的止血活性、抗菌、抗感染性能以及生物相容性和生物可降解性被广泛应用于生物医药领域。尽管壳聚糖水凝胶的粘附性、机械强度以及水溶性不稳定,这使其在体内环境中的应用受到了很大的限制。因此,医用壳聚糖水凝胶生物粘合剂往往需要复合其它材料或进行改性。Han等^[12]以二氢咖啡酸改性的壳聚糖(CS-DA)、单宁酸(TA)、Piuronic F127(PF127)为原料并负载间充质干细胞衍生的外分泌体(3D-Exo)设计制备了一种复合功能化水凝胶生物粘合剂(CS-DA/PF/TA/3D-Exo)。通过体内外实验表明,该水凝胶具有优异的止血、粘附、自愈合、抗炎、抗菌(抑菌率 $>99\%$)、抗氧化能力(抗氧化效果 $>80\%$)。此外,凭借3D-Exo调节免疫和促进血管生成的功效以及水凝胶的快速止血、抗菌、抗炎、抗氧化作用,该水凝胶能够显著加快糖尿病伤口的愈合。Liang等^[13]基于季铵盐改性的壳聚糖(QCS)、含有邻苯二酚和醛基的原儿茶醛(PA)以及 Fe^{3+} 之间的动态席夫碱键和金属配位键(儿茶酚基团-Fe)设计开发了一种具有自修复和优异抗菌活性的水凝胶生物粘合剂。该水凝胶具有良好的生物相容性(细胞存活率约为100%)、多功能粘附性(粘附强度可达3~40kPa)、抗菌活性(抑菌率 $>80\%$)以

及止血性能。值得注意的是,基于双动态键所固有的可逆性断裂和再重组性能,使得该水凝胶生物粘合剂具有优异的自愈合性和按需脱粘附性能。通过对大鼠皮肤切口模型和感染的全层皮肤伤口模型进行评估显示,该水凝胶具有很好的皮肤伤口粘合效果和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染伤口的修复效果。

(3)海藻酸类。海藻酸(SA)是一种从海带、巨藻等褐藻细胞壁中提取的天然线性多糖,由L-古洛糖醛酸和D-甘露糖醛酸以不同比例的重复单元交联组成的长链聚合物,因价廉易得且具有良好的生物相容性和吸附性被广泛应用于生物医药领域。近年来,海藻酸基水凝胶生物粘合剂用于临床止血和伤口修复的研究受到了人们的广泛关注^[14]。Jiao等^[15]将聚酯(PET)复丝/壳聚糖(CS)/聚丙烯酰胺(PAM)复合补片与海藻酸钠(SA)/丙烯酸(AAc)/聚(丙烯酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯)(PAA-NHS)水凝胶粘附层相结合制备了一种用于无瘢痕腹壁重建的水凝胶生物粘合剂。通过界面排水机制、氢键和化学交联协同作用,该水凝胶生物粘合剂可以直接粘附在湿组织的表面,并能通过双重顺应性来实现无瘢痕腹壁重建,促进组织再生。

此外,海藻酸极易与钙离子复合形成海藻酸钙水凝胶。有研究^[16]表明,海藻酸钙基水凝胶具有显著的止血和促伤口愈合效果。Wang课题组^[17]利用N-羟基琥珀酰亚胺接枝的海藻酸钙与壳聚糖复合制备了一种用于高曲率生物组织止血、修复的双网络水凝胶生物粘合剂(HAB)。基于NHS酯分子修饰海藻酸钙(AIg-NHS)与壳聚糖(CS)之间的氢键和共价键,该水凝胶生物粘合剂可在含水环境乃至水下实现快速、稳固的粘合,其剪切强度可达 (96.21 ± 8.68) kPa。由于其天然多糖的主要成分,该水凝胶生物粘合剂表现出了优异的生物相容性和生物活性。在应用于高曲率生物组织界面时,HAB可在无外力塑形和无缝条件下,可迅速重连断裂血管,并达到止血修复的效果。

1.2 蛋白质类水凝胶生物粘合剂

(1)胶原蛋白和明胶类。胶原蛋白(Collagen)是动物结缔组织中的主要成分,生物相容性好、来源广泛,凭借其优异的吸水性及止血能力,可作为制备水凝胶粘合剂的潜在原料。Yang等^[18]以collagen和淀粉(starch)为基本组分,设计了一种具有良好生物相容性的强效湿组织粘附性

水凝胶粘合剂(CoSt),通过多种可逆的动态相互作用、界面排水机制以及增强能量耗散作用,该水凝胶生物粘合剂可实现对受伤组织强大的粘附作用以及无缝伤口密封,并起到快速止血、加快伤口愈合和功能恢复的作用。Fu等^[19]基于一种生物相容的一步交联和还原策略,将牦牛I型胶原蛋白(Col)与银离子(Ag^+)相混合制备了一种可注射的抗菌胶原水凝胶生物粘合剂(Col/AgNPs),用于糖尿病伤口的治疗。经研究,Col/AgNPs具有优异的生物相容性、生物活性以及广谱抗菌能力。经大鼠糖尿病全层皮肤伤口模型显示,该水凝胶生物粘合剂能够有效减少细菌在伤口处的繁殖、显著加速伤口愈合及组织功能的重建。

明胶(Gelatin)作为一种胶原蛋白的衍生物,同样具有良好的生物相容性、非免疫原性和止血效果。但单一的明胶材料机械性能较低,尤其是以水凝胶形式应用时无法与组织之间形成稳定持久的粘附力。因此,常常通过改性或与其它材料复合以提高其稳定性,如采用含邻苯二酚基团的多巴胺修饰明胶的羧基,与未改性的明胶相比,邻苯二酚基明胶具有更好的力学性能。Han等^[20]通过将多巴胺功能化接枝的明胶(GelDA)与1,4二硼酸和氧化石墨烯(GO)相混合,制备了一种用于伤口止血修复的明胶基水凝胶生物粘合剂(GelDA/GO),通过氢键、共价键、硼酸酯键以及 $\Pi-\Pi$ 堆叠的协同作用,GelDA/GO能够持久稳定的粘附在伤口表面。此外,氧化石墨烯的引入增强了水凝胶的力学性能。最后,通过体内外实验验证了其优异的止血性能和生物相容性。

(2)丝素蛋白类。丝素蛋白(SF)又名蚕丝蛋白,是从蚕丝中提取的天然高分子纤维蛋白,含量约占蚕丝的70%~80%,由二硫键连接两个亚基组成,因提取简单、成本低、安全性高被广泛应用于水凝胶生物粘合剂的制备。但丝素蛋白水凝胶凝胶速度一般较慢,因此,常采用自由基介导交联来增加其凝胶速度。Liu等^[21]通过将丙烯酸(AAc)和丝素蛋白溶液(SF)相混合,并在365nm紫外光下固化30min,制备了一种用于胃穿孔和创伤性气胸密封的快速强韧水凝胶生物粘合剂(PSA)。在界面排水机制、界面拓扑作用、静电相互作用、氢键和链缠结的共同作用下,该水凝胶生物粘合剂可实现牢固的湿组织界面粘合作用。PSA具有优于传统手术缝合的伤口闭合能力和止血效果,并能通过促进止血和胶原沉积显著加快伤口的重建和愈合。Yang等^[22]设计制备了一种

负载抗菌性聚多巴胺纳米颗粒(PDCl)的丝素蛋白(SF)/甲基丙烯酰化明胶(GelMA)基水凝胶生物粘合剂贴片,并通过使用甲基丙烯酰化多巴胺(DMA)接枝改性甲基丙烯酰化明胶赋予了该水凝胶合适的粘附性能。研究表明,GelMA/SF-PDCl-DMA水凝胶具有极好的柔韧性、透气性、生物相容性和快速止血作用,且具有优异的抗菌性能,并能通过加速新生血管和上皮组织细胞的再生来达到预防伤口感染和促进伤口愈合的效果。

2 基于合成高分子的水凝胶生物粘合剂

基于合成高分子的水凝胶生物粘合剂通常由化学合成材料交联聚合而成,合成材料可以通过化学改性使水凝胶具有精确的可控性。与天然材料相比,其可以很容易的引入官能团来实现目标交联机制和功能,这为设计特定应用的水凝胶提供了更大的化学灵活性。合成材料在工业化过程中易于低成本、大批量制备,且不同批次之间材料的性能相似且稳定。其主要包括聚乙二醇、聚乙烯醇、聚丙烯酸、聚丙烯酰胺等。

(1) 聚乙二醇类。聚乙二醇(PEG)具有优异的生物相容性、非免疫原性、抗蛋白质吸附性和分子可设计性,已成为制备水凝胶生物粘合剂的重要原料。聚乙二醇很容易被官能团化,生成多种同官能或异官能端基,包括硫醇、乙烯基砜、马来酰亚胺、丙烯酸酯、烯丙基和降冰片烯等。同时,通过将不同的类型的材料和分子引入PEG分子链中,可以产生不同的应用方案。Zhang等^[23]通过将溶菌酶(LZM)和四臂聚乙二醇(4-arm-PEG)相复合,制备了一种可喷涂的水凝胶生物粘合剂,用于动态湿环境和隐蔽伤口的有效闭合。该水凝胶生物粘合剂具有强大的机械性能和动态湿组织粘附能力,能够适合体内各种伤口的临床使用。该水凝胶生物粘合剂在密封渗漏和溃疡伤口方面表现出色,其效果超过了常用手术缝合材料和市售组织粘合材料。Wang等^[3]以四臂聚乙二醇(PEG)琥珀酰亚胺琥珀酸盐和胺基明胶(AG)为原料,制备了一种具有坚韧的机械强度、快速生物降解性和粘附性能的水凝胶生物粘合剂(AG-PEG)。凭借琥珀酰亚胺活性酯与胺基的快速反应,AG-PEG能够在几秒内完全凝胶化,从而高效的粘附和密封急性出血组织,快速止血。相较于纱布和市售纤维蛋白胶,该水凝胶生物粘合剂能够加速伤口的愈合和再生,有效避免炎症和术后粘连反应的发生。

(2) 聚乙烯醇类。聚乙烯醇(PVP)作为一种优异的伤口敷料材料因具有优异的生物相容性被广泛应用于功能性水凝胶的制备。其分子结构中具有大量的羟基(-OH),具有极强的亲水性和极性,可通过化学交联形成共价键或分子间氢键形成结晶域来增强水凝胶的机械性能。Ni课题组^[24]通过将聚乙烯醇(PVA)和阳离子- Π 结构改性的聚磷腈(PPBA)相复合,制备了一系列的动态硼酸酯基水凝胶生物粘合剂。在水中,其可通过氢键、 Π - Π 和阳离子- Π 相互作用牢固地粘附在组织表面。该水凝胶生物粘合剂具有优异的抗菌性能和止血行为,能够大大缩短伤口出血时间并减少炎症的产生,显著加快伤口愈合速度。Liu等^[25]以聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯亚胺(PEI)和 β -环糊精(β -CD)为原料制备了一种具有良好生物相容性和抗菌性能的水凝胶生物粘合剂(BPP)。通过物理交联和化学交联的协同作用,BPP表现出了较强的机械强度和组织粘附性。通过体内外实验进一步验证了BPP水凝胶生物粘合剂具有良好的生物相容性、良好的杀菌和促进伤口愈合效果。

(3) 聚丙烯酸类。聚丙烯酸(PAA)通过交联可制备成具有高吸水性的单组分或多组分体系水凝胶。得益于分子结构中丰富的羧酸基团,其可通过化学改性或与其它物质复合来实现强韧而持久的湿组织粘附。Wei等^[26]以聚丙烯酸(PAA)、儿茶酚功能化的壳聚糖(CFCS)、儿茶酚功能化甲基丙烯酰壳聚糖银纳米粒子(CFMC-AgNPs)和生物活性香兰素为原料,通过一步热聚合法制备出PAAc/CFCS-香兰素水凝胶生物粘合剂。该粘合剂具有足够的机械强度和优异的粘附性能,有助于快速止血。水凝胶体系中含有的CFCS、CFMC-Ag NPs和香兰素使其在伤口中表现出优异的抗菌抗感染作用。此外,PAAc/CFCS-香兰素水凝胶生物粘合剂治疗的伤口具有最小的伤口面积,并且在伤口组织中观察到良好的肉芽组织再生、显著的胶原沉积和血管生成。Zhao等^[27]基于聚丙烯酸(PAA)设计制备了一种具有快速止血能力、优异的湿组织粘附性能、强大的机械性能和优异的抗菌活性的水凝胶生物粘合剂粉末。该粉末吸收液体后3s内可原位形成水凝胶贴片,能够抵抗高于两倍血压的压力。将水凝胶粉末沉积在大鼠肝脏、股动脉伤口等多种伤口上,可在10s内止血,并使相应模型的出血量减少1/6以上。此外,该粘合剂粉末可以通过高伤口愈合率和低炎症反应,促进新血管的形成和组织再生,加速伤口愈合。

(4)聚丙烯酰胺类。聚丙烯酰胺(PAM)水凝胶因具有优异的生物相容性、吸水性能和可调控性能在组织止血修复方面具有广泛的应用潜力。Wang等^[28]以聚丙烯酰胺(PAM)和季胺化壳聚糖(QCS)为原料制备了一系列具有优异机械性能和显著抗菌活性的水凝胶生物粘合剂。通过负载槲皮素(QT)增强了其对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抗菌活性。此外,该水凝胶生物粘合剂具有优异的细胞相容性和血液相容性。Feng等^[29]以聚丙烯酰胺(PAM)、聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)、单宁酸(TA)为底物。通过双键交联、席夫碱和氢键相互作用制备出一种复合功能化水凝胶生物粘合剂(AM/PEGDA/TA)。基于多重交联机制,使所设计的复合水凝胶生物粘合剂表现出强大的机械强度、优异的粘附能力和良好的细胞相容性。AM/PEGDA/TA具有抗炎抗菌和加速伤口愈合的功能。

3 复合仿生类水凝胶生物粘合剂

(1)仿海洋生物策略的水凝胶生物粘合剂。贻贝、藤壶、牡蛎等一些海洋生物在海水中能够通过分泌胶粘蛋白,牢固的粘附在岩石或光滑的生物体表面,这对研究水凝胶生物粘合剂的湿粘附性有着极大的启发。这些海洋生物分泌的胶粘蛋白中含有大量的DOPA,其中含有的邻苯二酚基团(又称儿茶酚)是实现水下粘附的重要基团之一。Guo等^[30]通过简单的一步混合法制备了一种基于季铵盐壳聚糖(QCS)和单宁酸(TA)的可注射水凝胶生物粘合剂。在该水凝胶体系中,季铵盐和单宁酸之间的动态离子键和氢键交联赋予了其优异的可注射性、自愈性和粘附性。同时,季铵盐壳聚糖和单宁酸固有的抗氧化、抗菌和止血能力使得该水凝胶生物粘合剂在广谱抗菌、快速止血、活性氧清除方面具有优异的表现。该水凝胶生物粘合剂不仅可用于小鼠断尾、股动脉破裂、肝脏切口的快速止血,而且在全层皮肤伤口中可显著加速伤口愈合。Pan等^[31]受贻贝和藤壶胶蛋白启发,以邻苯二酚接枝改性的壳聚糖(C-CHI)为主要组分,并通过混合单宁酸(TA)、海藻酸钠(SA)和丝素蛋白(SF)制备了一种基于氢键、阳离子- Π 键以及静电相互作用相结合的双仿生水凝胶生物粘合剂。得益于丰富的酚羟基、界面排水机制、酚-醌动态氧化还原平衡反应和坚韧的耗散基质,使该双仿生水凝胶生物粘合剂表现出极强的湿组织粘附性和优异的抗菌性能。通过负载银

纳米颗粒(Ag NPs)和脱细胞细胞外基质(dECM),进一步提高了其预防伤口感染和加速组织愈合的能力。该水凝胶生物粘合剂具有与外科缝合相似的高愈合效率和无瘢痕的伤口愈合能力,并展现出了优于市售纱布的止血性能。

(2)其他仿生策略的水凝胶生物粘合剂。Deng等^[32]使用大鲵皮肤分泌物制备了一种用于伤口愈合的医用水凝胶生物粘合剂(SSAD)。结合疏水相互作用、阳离子- Π 和氢键作用,该水凝胶可与组织之间产生牢固的粘附力(粘附强度可达 $26.66 \pm 8.22\text{kPa}$),明显高于市售纤维蛋白胶的粘合力(粘附强度 $3.76 \pm 0.16\text{kPa}$)。此外,SSAD水凝胶生物粘合剂还可以快速封闭大鼠出血性皮肤切口($< 30\text{s}$),并可有效治愈糖尿病SD大鼠的全皮缺损。受蜗牛粘附现象的启发,Deng等^[33]将蜗牛粘液灭菌后冷冻干燥,得到了一种多孔高粘附性的水凝胶生物粘合剂(d-SMG),该水凝胶对湿润组织表面具有很强的粘附性以及良好的生物相容性和生物降解性,并能快速有效止血、加速急慢性伤口的愈合。

4 总结与展望

水凝胶生物粘合剂因具有良好的粘附性、生物相容性、生物可降解性以及抗菌性能在生物医学领域发挥着日益重要的作用。水凝胶可调节的粘附强度使其可以根据需求作用于人体的不同部位。优异的生物相容性和可降解性使其不会对人体产生不良影响。另外,水凝胶的抗菌作用可以保证伤口免受细菌感染,并为解决细菌耐药性问题提供了有力的支持。虽然水凝胶生物粘合剂在促进伤口愈合方面取得了优异的进展,但仍然存在着一些迫切需要解决的问题:①水凝胶能否在高压情况下保持其自身的粘附性和机械强度,如:当动脉破裂时,大量血液流出,血压升高,水凝胶生物粘合剂必须具有较强的机械强度和粘附性以达到快速止血的效果;②人体组织内存在大量的体液,水凝胶如果想达到修复伤口的目的,就必须具有优异且稳定的水下粘附性能;③水凝胶生物粘合剂应能随伤口愈合过程不断降解且不引起血栓和炎症;④人体伤口的形状是不规则的,水凝胶生物粘合剂必须能够适应这些形状并发挥粘合作用。

参考文献:

- [1] ROSE J, WEISER TG, HIDER P, et al. Estimated need for surgery worldwide based on prevalence of diseases; a modelling strategy for the WHO global health estimate [J].

- Lancet Global Health, 2015, 3: S13
- [2] 耿慧敏, 崔基炜, 郝京诚. 仿贻贝水凝胶在组织愈合中的应用研究[J]. 化学学报, 2020, 78(2): 105
 - [3] WANG H, CHENG J, SUN F, et al. A super tough, rapidly biodegradable, ultrafast hemostatic biogel[J]. Adv Mater, 2023, 35(10): 2208622
 - [4] SHEKARRIZ B, STOLLER M L. The use of fibrin sealant in urology[J]. J Uro, 2002, 167(3): 1218
 - [5] 皮思蒙, 王自瑶, 谢琛, 等. 天然生物基水凝胶在快速止血医用敷料上的研究进展[J]. 湖北科技学院学报(医学版), 2023, 37(3): 244
 - [6] QIAO L P, LIANG Y P, CHEN J Y, et al. Antibacterial conductive self-healing hydrogel wound dressing with dual dynamic bonds promotes infected wound healing[J]. Bio Mater, 2023, 30: 129
 - [7] LIANG Z, LUO J L, LIU S M, et al. Injectable, antibacterial, ROS scavenging and pro-angiogenic hydrogel adhesives promote chronic wound healing in diabetes via synergistic release of NMN and Mg^{2+} [J]. Chem Eng J, 2023, 475: 146092
 - [8] HOU Y, LI Y Z, LI Y Q, et al. Tuning water-resistant networks in mussel-inspired hydrogels for robust wet tissue and bioelectronic adhesion[J]. ACS Nano, 2023, 17(3): 2745
 - [9] LI J K, SU J J, LIANG J H, et al. A hyaluronic acid/chitosan composite functionalized hydrogel based on enzyme-catalyzed and Schiff base reaction for promoting wound healing[J]. Int J Biol Macromol, 2024, 255: 128284
 - [10] BIAN S Q, HAO L Z, QIU X, et al. An injectable rapid-adhesion and anti-swelling adhesive hydrogel for hemostasis and wound sealing[J]. Adv Funct Mater, 2022, 32(46): 2207741
 - [11] REN H, ZHANG Z, CHENG X L, et al. Injectable, self-healing hydrogel adhesives with firm tissue adhesion and on-demand biodegradation for sutureless wound closure[J]. Sci adv, 2023, 9(33): eadh4327
 - [12] HAN P, LI H C, ZHANG X, et al. 3D-exosomes laden multifunctional hydrogel enhances diabetic wound healing[J]. Chem Eng J, 2023, 475: 146238
 - [13] LIANG Y Q, LI Z L, HUANG Y, et al. Dual-dynamic-bond cross-linked antibacterial adhesive hydrogel sealants with on-demand removability for post-wound-closure and infected wound healing[J]. ACS Nano, 2021, 15(4): 7078
 - [14] LEE K Y, MOONEY D J. Alginate: properties and biomedical applications[J]. Prog Polym Sci, 2012, 37(1): 106
 - [15] JIAO Y J, LI C J, LI S J, et al. Hernia mesh with biomechanical and mesh-tissue interface dual compliance for scarless abdominal wall reconstruction[J]. Adv Funct Mater, 2023, 33(48): 2305714
 - [16] TASKIN A L, YASAR M, OZAYDIN I, et al. The hemostatic effect of calcium alginate in experimental splenic injury model[J]. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg, 2013, 19(3): 195
 - [17] WANG S S, ZHAO Q L, LI J H, et al. Morphing-to-adhesion polysaccharide hydrogel for adaptive biointerfaces[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2022, 14(37): 42420
 - [18] YANG W, KANG X Y, GAO X, et al. Biomimetic natural biopolymer-based wet-tissue adhesive for tough adhesion, seamless sealed, emergency/nonpressing hemostasis, and promoted wound healing[J]. Adv Funct Mater, 2023, 33(6): 2211340
 - [19] FU C H, FAN Y R, LIU G Y, et al. One-step fabrication of an injectable antibacterial collagen hydrogel with in situ synthesized silver nanoparticles for accelerated diabetic wound healing[J]. Chem Eng J, 2024, 480: 148288
 - [20] HAN K, BAI Q, WU W D, et al. Gelatin-based adhesive hydrogel with self-healing, hemostasis, and electrical conductivity[J]. Int J of Biol Macromol, 2021, 183: 2142
 - [21] LIU X W, YANG Y, YU H J, et al. Instant and tough adhesives for rapid gastric perforation and traumatic pneumothorax sealing[J]. Adv Healthc Mater, 2022, 11(23): 2201798
 - [22] YANG Z M, FAN S S, MA W, et al. Flexible adhesive GelMA/SF-based patch embedded with polydopamine N-halamine nanoparticles for repair of infected wounds[J]. Chem Eng J, 2023, 460: 141732
 - [23] ZHANG Y, PAN Y J, CHANG R H, et al. Advancing homogeneous networking principles for the development of fatigue-resistant, low-swelling and sprayable hydrogels for sealing wet, dynamic and concealed wounds in vivo[J]. Bioact Mater, 2024, 34: 150
 - [24] NI Z P, YU H J, WANG L, et al. Polyphosphazene and non-catechol-based antibacterial injectable hydrogel for adhesion of wet tissues as wound dressing[J]. Adv Healthc Mater, 2022, 11(1): 2101421
 - [25] LIU D, QIU J J, XU R, et al. β -CD/PEL/PVA composite hydrogels with superior self-healing ability and antibacterial activity for wound healing[J]. Compos B Eng, 2022, 238: 109921
 - [26] WEI X L, LIU C K, LI Z Q, et al. Chitosan-based hydrogel dressings for diabetic wound healing via promoting M2 macrophage-polarization[J]. Carbohydr Polym, 2024(24): 121873
 - [27] ZHAO W B, SUN W T, WANG W J, et al. Robust and wet adhesive self-gelling powders for rapid hemostasis and efficient wound healing[J]. ACS Appl Mater Inter, 2024, 16(6): 6756
 - [28] WANG L L, DONG J H, ZHAO Z Q, et al. Quarternized chitosan/ quercetin/ polyacrylamide semi-interpenetrating network hydrogel with recoverability, toughness and antibacterial properties for wound healing[J]. Int J Bio Macromol, 2023, 228: 48
 - [29] FENG Y, QIN S, LI H, et al. Composite hydrogel dressings with enhanced mechanical properties and anti-inflammatory ability for effectively promoting wound repair[J]. Int J Nanomed, 2023, 18: 5183
 - [30] GUO S, REN Y K, CHANG R, et al. Injectable self-healing adhesive chitosan hydrogel with antioxidative, antibacterial, and hemostatic activities for rapid hemostasis and skin wound healing[J]. ACS Appl Mater Inter, 2022, 14(30): 34455
 - [31] PAN G X, LI F H, HE S H, et al. Mussel-and barnacle cement proteins-inspired dual-bionic bioadhesive with repeatable wet-tissue adhesion, multimodal self-healing, and antibacterial capability for nonpressing hemostasis and promoted wound healing[J]. Adv Funct Mater, 2022, 32(25): 2200908
 - [32] DENG J, TANG Y Y, ZHANG Q, et al. A bioinspired medical adhesive derived from skin secretion of andrias davidianus for wound healing[J]. Adv Funct Mater, 2019, 29(31): 1809110
 - [33] DENG T, GAO D X, SONG X M, et al. A natural biological adhesive from snail mucus for wound repair[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 396

(收稿日期: 2024-05-07)

总目次

特 稿

- 基于 IP 联合蛋白质组学探讨 ENG 互作蛋白在 bEnd.3 细胞中的作用
..... 陈清杰,李奥迪,季慧敏,等(6:461)

药学研究

- 阿司匹林抑制胃癌干细胞的机制研究 王子昂,沈 昕,吴 喆,等(1:1)
基于网络药理学和生物信息分析研究土茯苓抑制结直肠癌的作用机制及实验验证
..... 王梦琦,董思进,刘毅飞,等(1:5)
金刚藤多糖的微波辅助提取及体外抗氧化、降血糖活性分析 汪文丽,曲晓营,刘小玲,等(1:11)
南丹参化学成分研究 赵璐瑶,边 樱,张志君,等(1:17)
复方磺胺甲噁唑人体药动学与生物等效性研究 张 婷,郭东生,甘方良,等(1:25)
木犀草素显著降低 hUC-MSCs 衰老相关分泌表型 熊 婕,李秋柏,吴基良,等(2:93)
新藤黄酸对急性淋巴细胞性白血病的调控机制 张晓玉,冯 康(2:99)
大麦芽碱盐酸盐通过诱导凋亡抑制 HeLa 细胞的恶性行为 贾爱亭,宁志丰,刘复兴,等(2:104)
中药鼠牙半支提取物的体外抗氧化活性研究 付晨祿,黎双炼,刘 超,等(2:109)
丹参酮 II A 环糊精包合物的制备工艺研究 贾 静,单士刚,黎威巍,等(2:114)
泮托拉唑钠肠溶片的生物等效性研究 姜雅琦,田 杰,刘启胜,等(2:118)
姜黄素缓解糖尿病小鼠脑组织氧化损伤的机制研究 姚 月,舒 婷,雷 敏,等(3:185)
果糖对肝癌细胞增殖的影响 程杰娟,梅武轩,曾常春,等(3:189)
Tirzepatide 通过抑制氧化应激和炎症改善糖尿病肾损伤 赵江雁,陈清杰,郭西英,等(3:193)
达格列净拮抗糖尿病肾脏纤维化作用研究 宋 熠,唐明秋,赵宝清,等(3:198)
体外实验验证槲皮素治疗后发性白内障的作用机制 曾 诚,余才翰,胡 军,等(3:204)
Erastin 治疗肺癌的网络药理学分析和体外实验验证 徐 森,周佳婷,吕建国,等(3:209)
星点设计-效应面法优化超声提取桂籽中三萜化合物的工艺研究
..... 杨洪飞,卢雨菲,闵 清,等(3:214)

波生坦片生物等效性研究	李梦瑶,张 婷,王定森,等(3:221)
白及多糖对脂多糖诱导的小鼠急性肝损伤的作用及其机制研究	葛婷婷,闵 清,白育庭,等(4:277)
姜黄素改善糖尿病小鼠脑部 A β 沉积机制研究	张雨晴,何 昂,郭西英,等(4:282)
阿苯达唑对人食管鳞癌细胞 KYSE-150 的抑制作用	蔡 敬,贾爱亭,宁志丰,等(4:287)
双吗啉取代吡啶锌和铜配合物的合成、表征及抗癌活性初步研究	汪清清,潘 耀,王小波,等(4:292)
蕲艾精油纳米乳的制备及伪三元相图的绘制	卢博成,程丽媛,丁洁琼,等(4:297)
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(5:369)
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(5:374)
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(5:380)
TiO ₂ 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(5:384)
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(5:389)
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(5:394)
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(5:400)
杨梅素通过调控 NF- κ B 和炎症因子对肝脏缺血再灌注损伤的作用研究	黄兴琼,陈 迷,李炎坤,等(6:467)
熊果酸联合索拉非尼通过抑制 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路诱导肝癌细胞铁死亡	胡 玲,杨晓松(6:472)
盐酸小檗胺对脓毒症急性肾损伤小鼠的保护机制研究	孙珊珊,何 昂,黄翠萍,等(6:477)
附子对阿霉素诱导心肌损伤保护的潜在机制	陈星羽,贺 巧,张朝阳,等(6:482)
含苯丙氨酸甲酯侧链螺旋聚苯异腈的合成与性能研究	张 达,郭雅润,郭丽媛,等(6:488)

基础医学研究

电针对失神经肌萎缩大鼠自噬相关因子的影响	张淑芳,李 童(1:30)
高糖高脂促进人脐静脉内皮细胞间充质转化	宁宇阳,尧 青,刘 超,等(1:33)

在脓毒症相关急性肾损伤中 FOXM1 靶向调控 NLRP3 表达	孙 甜,张振旺(1:37)
3D 培养诱导胚胎成纤维细胞为神经前体样细胞	苏 莹,熊 俊,朱 丹,等(2:122)
PTPRO 通过减少 STAT3 磷酸化抑制黑色素瘤的恶性行为	陈 攀,李 彦,余同辉,等(2:127)
硒改善妊娠期和哺乳期高脂饮食喂养母鼠子代肠道菌群紊乱	谢 琛,蔡慧兰,张 胜,等(2:132)
基于 PBNPs-Ag 纳米粒子的 ROS 清除和抗菌协同作用促进伤口愈合行为研究	唐冬旭,刘 坤,李月生,等(4:301)
基于碳点印迹聚合物的荧光传感器对磺胺甲恶唑的超灵敏检测	支 悦,陈 涛,陈林枫,等(4:306)
大鼠脱细胞肝支架的制备研究	陈 宁,郭安然,李 玲,等(4:313)
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(5:405)
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(5:409)
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(5:414)
LncRNA UCA-1 对肾细胞癌 OS-RC-2 细胞增殖、凋亡的影响及机制	田晓玲,朱栋良,陈 莉,等(6:493)
BMP-6 介导的铁蓄积在 LPS 诱导的急性肺损伤中的作用	李卓越,李秦汉,林 丽,等(6:498)
肠道菌群结构特征与早产认知障碍大鼠的相关性研究	杨 祺,周雄飞,黄玮玲,等(6:502)

临床医学研究

慢性阻塞性肺疾病患者合并支气管扩张的相关影响因素模型构建及其预防措施分析	陈 霄,史 娟,唐幼玲(1:43)
当归芍药散联合清心莲子汤治疗老年人脾肾气虚兼血瘀水肿型肾病综合征的临床观察	陈岳中(1:48)
儿童屈光状态及眼生物参数研究	徐朝霞,杨朝政,李 岱(1:51)
儿童口腔疾病患者牙科畏惧症的现状及影响因素分析	沈 欢,刘 晓(1:55)
高校医学大学生对生殖健康知识与态度的调查研究	黄 璐,吴 辰,蔡慧兰,等(1:59)
药学干预和系统化处方评估对感染性疾病患者喹诺酮类药物使用情况的影响	马细花(1:64)
首次医疗接触时间对非 ST 段抬高型急性心肌梗死患者临床的影响	王 翔,熊小雪,李 宾,等(2:137)

黄连温胆汤联合艾司奥美拉唑肠溶胶囊治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的疗效及安全性分析	王 静(2:141)
前列安通片联合体外冲击波治疗老年慢性前列腺炎的疗效观察	曾 桥(2:145)
三联药物方案对 BPPV 管石复位后残余眩晕患者临床症状及负面情绪的影响	王 渊,肖 骋(2:149)
尿石症患者尿道真菌感染的病原菌特征、易感因素调查及预防措施分析	刘嘉龙,桂佳梅,张晓玲(2:152)
氢吗啡酮与吗啡鞘内输注对顽固性癌痛患者疼痛的影响	张大钊,张海亮,贺清明(2:156)
肾癌根治术后切口感染的易感因素调查与预防措施分析	陈益楠,杨 瑞(2:160)
生活方式对心血管病高危人群血压控制的影响—基于 5 年面板数据	闵 旻,叶燕丽,杨春艳,等(2:165)
血凝酶治疗肝硬化上消化道出血的临床效果分析	吴成葆(3:226)
SAA、HBP、CRP 对肺癌术后并发肺部感染的预测价值	王玲玲,吕 磊,陈巧艳,等(3:230)
miR-96 联合 HMGB1 检测在胃癌病情及预后评估中的临床价值	皮远涛,王 鹏,张万里,等(3:234)
复方高滋斑片联合右佐匹克隆片治疗老年精神疾病伴睡眠障碍的疗效分析	吴甘霖,徐美荣,吴彩霞,等(3:238)
经输尿管导管逆行超声造影引导下经皮肾镜手术对复杂性肾结石患者结石清除率及肾功能的影响	王 飏,余志娟(4:319)
血清 FABP4、AFP、MCP-1 水平在胃腺癌患者中变化及其临床意义	屈世兴(4:323)
护肝布祖热颗粒治疗药物性肝损伤的疗效观察	陈晓明,曹文韬,樊学文,等(4:328)
超分子水杨酸联合强脉冲光对中重度痤疮的治疗作用研究	黄青丽,李正时,邹逸群(4:332)
能谱 CT 静脉期多定量参数对于实性肺结节良、恶性诊断的价值	赵睿依,赵志伟(4:335)
医共体临床药学同质化服务研究	房树华,曹定雯,徐碧云,等(4:340)
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,童绶菊(5:418)
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(5:422)
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(5:427)
混合感染对儿童肺炎支原体肺炎并胸腔积液的影响分析	周芷如(6:507)

奥硝唑注射液联合拉氧头孢钠治疗慢性盆腔炎的疗效及对血清炎症指标的影响	王利勤,吴 辰(6:511)
心率变异性频域和时域相关指标与冠心病患者心血管事件的关系	霍旭辰,李军丽,曹 昕(6:514)
烯醇化酶 3 表达与结直肠癌临床病理特征及生存相关性分析	孟凡来,梁晓东(6:519)

护理学研究

中医结合群组管理模式在慢性阻塞性肺疾病患者中的应用效果	张 霞,任东海,王鹏燕(1:67)
神经肌肉电刺激联合强制性运动疗法应用于脑卒中偏瘫患者的临床价值	甄洁艳,刘静娜,杨少兵,等(1:71)
快速康复理念在前置胎盘围手术期护理中的应用效果分析	刘菊芳,华 焯,丁 芳(2:169)
核心稳定性训练结合家庭姿势管理在痉挛型脑瘫儿童康复中的应用	钱晶晶,刘 晟,唐胜华(2:172)
强化护理干预对老年慢性心力衰竭患者住院疗效的影响	董春华,张 侠(3:242)
PDCA 与四感联合促醒刺激对脑出血术后昏迷患者的应用	渠长叶,袁 珂,李延翠(3:246)
糖尿病足清创术后的医护一体化干预效果分析	柳赛君,镇普祥,柳赛男(3:250)
基于 BOPPPS 模型的护理干预对冠心病介入手术患者的影响研究	杨敬媛,朱 靖,孙亦粉,等(3:254)
针对性护理联合延续护理对碘-125 粒子植入治疗非小细胞肺癌患者的应用价值研究	李莉平(3:258)
临床护理路径引导下预见性护理在精神分裂症患者 CT 检查中的应用	陈琳霞,陈明芳(3:262)
快速反应团队模式在急性缺血性脑卒中患者救治中的应用效果	吴 慧,谢 莉,金 琳(4:344)
精细化护理在纤维支气管镜肺泡灌洗治疗儿童大叶性肺炎中的应用	黎 美(4:348)
中医饮食调理对肺癌患者营养状况的影响	董春华,何 婷(4:351)
湖北省三甲医院老年病房护士关怀行为现状及影响因素分析	王 芳,林云英,唐春花(4:355)
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(5:431)
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(5:434)

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(5:439)
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(5:443)
程序化急诊急救护理对 AMI 患者急救效果及家属满意度分析	王 媛, 邓 敏(6:523)
功能康复操训练对妇产科腹腔镜术后患者非切口疼痛的影响 ...	刘 晓, 孔令磷, 罗菊英, 等(6:527)
FMEA 联合 PDCA 管理循环模式在提高蛋白尿标本合格率中的应用	廖 丹, 黄红霞, 黎珍珠, 等(6:531)
患者参与健康模型在 2 型糖尿病患者健康管理中的应用	张丹丹, 李婷婷(6:535)

综 述

刺梨抑制氧化应激作用的研究进展	万 哲, 程文敬, 莫启贵, 等(1:74)
紫花牡荆素抗肿瘤作用机制的研究进展	华 丽, 周燕红(1:79)
光动力疗法治疗神经胶质瘤的研究进展	杨田田, 常 婧, 胡美纯(1:83)
非酒精性脂肪肝的诱发机制及中药治疗研究进展	黄兴琼, 李炎坤, 陈 迷, 等(1:88)
刺梨治疗代谢综合征的研究进展	程文敬, 万 哲, 莫启贵(2:176)
构建 5-氟尿嘧啶电化学传感器电极材料的研究进展	敖佳林, 张瑞瑞, 舒 婷, 等(2:180)
红景天苷抗动脉粥样硬化的研究进展	梁 潇, 黄 琪, 鲍翠玉, 等(3:266)
疼痛抑郁共病的研究进展	张培根, 朱海丽, 高 卉(3:270)
菝葜的化学成分及药用价值研究进展	高满军, 陈 迷, 张丹丹, 等(4:360)
沉默信息调节因子 1 在治疗心力衰竭中的作用研究进展	李素云, 阳 绅, 姚志勇, 等(4:364)
苦木的生物活性及代谢研究进展	赵依叶, 郑 敏, 苗潇磊, 等(4:446)
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, 庞义军, 等(5:451)
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(5:455)
黄芩苷治疗溃疡性结肠炎的作用机制研究进展	张瀚镭, 陈媛媛, 要 辉, 等(6:539)
YTHDF1 作为 m ⁶ A 读取器对肿瘤生长和转移的作用研究进展 ...	刘绮雯, 梅 燕, 潘 丹, 等(6:543)
水凝胶生物粘合剂用于软组织止血修复的研究进展	李 甲, 王 彩, 郑 敏, 等(6:549)

《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6期 (总第192期)

2024年12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

12>