



中国毒理学会
第十一次全国毒理学大会

智创融合赋能毒理新时代

论文集

SU ZHOU 苏州
2024.9.20-23

中国毒理学会第十一次全国毒理学大会

(苏州)

T01-0001

Mid1 在锰酸锂通过破坏海马神经元轴突逆行运输致学习认知障碍中的作用

王鑫森, 沈芝如, 邓宇*

(中国医科大学, 沈阳 110122)

摘要: **目的** 在全球“双碳计划”的大背景下, 锰酸锂作为锂离子电池的正极材料, 因其价格低、性能优等特点被广泛生产应用, 因此也大大增加了锂电工人的职业暴露风险。目前锰酸锂的神经毒性效应及作用机制尚无文献报道, 对其进行阐明并寻求防治靶点尤为关键。**方法** 我们首先对某锂电工厂进行流行病学调查, 按照是否有认知障碍对两组的基线资料和金属浓度进行统计描述。利用 Lasso 回归筛选与认知障碍结局有关的金属元素, 进一步将筛选出来的金属与协变量进行 logistic 回归分析。为了模拟工人实际暴露环境, 采用全身粉尘暴露系统对 C57BL/6J 小鼠进行染毒。染毒后小鼠海马 RNA-seq 结果发现, Mid1 的表达显著上调, 提示我们 Mid1 可能是锰酸锂介导神经毒性的关键因子。因此本研究构建锰酸锂、以及脑立体定位注射 Mid1 沉默慢病毒后的动物及细胞染毒模型, 旨在探索靶向 Mid1 是否可以对锰酸锂导致的神经毒性进行干预, 以期对锰酸锂可能产生神经毒性的职业防治提供实验依据。**结果** 染毒后对小鼠进行行为学检测, 组织病理学染色。同时对 RNA-seq 数据进一步挖掘, 并通过分子对接进行预测, 找出 Mid1 可能调控的动力蛋白复合物关键亚基 dynlt4、dynlrb2。因动力蛋白介导轴突逆行运输, 为了探讨这一功能变化, 提取小鼠原代海马神经元, 染毒后进行时间序列活细胞成像分析。以上旨在探索 Mid1 作为关键靶点在锰酸锂导致的神经毒性效应中发挥的作用。**结果** 流行病学调查结果发现血浆中锰、锂浓度与认知障碍风险增加有关。与对照组相比, 染毒组小鼠出现学习记忆障碍, 组织病理学染色结果提示小鼠海马神经元受损, 时间序列活细胞成像结果提示染毒后海马神经元轴突逆行运输功能破坏, Mid1 沉默后可回复上述结果。机制上, 我们发现染毒后 dynlt4、dynlrb2 表达下调, 提示我们轴突逆行运输功能可能是锰酸锂导致神经毒性的可能原因。有研究表明 VPA 可恢复轴突运输功能, 在细胞及动物层面进行干预后发现, 轴突运输功能恢复, 小鼠学习记忆恢复, 也进一步佐证了我们的研究。染毒后 Mid1 与上述分子结合增强且 Mid1 可通过泛素化活性调控上述分子。**结论** Mid1 通过泛素化活性调控动力蛋白关键亚基 dynlt4、dynlrb2, 从而导致轴突运输功能破坏, 进而导致学习认知障碍。Mid1 可能是锰酸锂神经毒性的关键防治靶点。

关键词: 锰酸锂; 学习记忆障碍; Mid1; 轴突逆行运输; 泛素化**通讯作者:** 邓宇, E-mail: dengyu.cmu@163.com

T01-0002

锂电作业人群血液中多金属内暴露与认知能力的关联研究

鞠兆赫, 沈芝如, 邓宇*

(辽宁省沈阳市中国医科大学, 沈阳 110100)

摘要: **目的** 现有的研究表明, 多金属在脑内的过量暴露会导致神经退行性疾病的发生。本研究旨在探讨锂电工人血浆中多种金属元素水平及其对认知功能的影响。**材料与方法** 本研究采用横断面研究方法, 选择蒙特利尔认知评估 (MoCA) 问卷评估工人的认知功能, 在 MoCA 问卷对轻度认知障碍的评定标准中共包括七个子项: 执行/视觉空间能力、命名、注意力和计算、语言、抽象、回忆和定向力。金属元素的血浆水平

采用了电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)测定。对 MoCA 测定的轻度认知障碍评分结果采用多变量广义线性回归模型、贝叶斯核机器回归(BKMR)、加权分位数回归(WQS)进行统计分析,并对每一个评定子项进行进一步分析,在调整混杂因素后,估计血浆金属水平与 MoCA 问卷评分之间的关系。**结果** 根据研究所需的纳排标准进行筛选后,共有 174 名工人参与了本研究。在多变量广义线性模型中,研究的这十二种金属有三种与 MoCA 评分相关;在 BKMR 模型和 WQS 模型中,观察到血浆锂、铅、锰与总 MoCA 评分之间显著负相关。对于 MoCA 量表上的子项目进行进一步分析后,锰、锂、铅、锌的血浆水平分别与执行/视觉空间能力、回忆能力具有显著相关性。血浆锰、锂、铅的浓度在进行对数转换后,与执行/视觉空间能力和回忆呈负相关。**结论** 基于以上的分析结果,我们确定了中国锂电厂工人血浆中锰、锂、铅浓度水平的增加与轻度认知功能障碍(MCI)的发病率相关。

关键词: 锂; 锰; 铅; 轻度认知障碍; 锂电池厂

通讯作者: 鞠兆赫, E-mail: 773573663@qq.com

T01-0003

p53 磷酸化在新型锂电池负极材料 N-甲基吡咯烷酮诱导精母细胞分裂停滞致小鼠雄性生殖毒性中的作用研究

王进宁, 邓宇*

(中国医科大学, 公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110122)

摘要: **目的** 新型锂电池产业的发展积极响应国家双碳计划, N-甲基吡咯烷酮(NMP)是阴极溶液不可或缺的原材料, 且具有易挥发性, 目前已知 NMP 暴露会导致雄性大鼠精子数量较少及精子畸形率增加, 但其毒理机制尚不明确。本研究旨在确定 NMP 暴露后小鼠精母细胞减数分裂是否存在异常及其机制, 并探究 P53 磷酸化在其中所发挥的作用。**材料和方法** 本研究使用小鼠精母细胞系(GC-2 spd), 分别以 0、1、4、16 μM 暴露于 NMP 24h, 通过 RNA-seq 测序检测 mRNA 表达差异; 通过 CCK-8 及 EDU 检测细胞增殖情况; 结合流式细胞仪检测细胞周期变化及细胞凋亡情况; 通过 Westren blot 验证细胞周期相关蛋白和凋亡相关蛋白表达情况。并选择 7 周龄雄性 C57BL/6 小鼠, 通过 28 天持续灌胃染毒 0、250、500、1000 mg/kg NMP, 在第 29 天对小鼠麻醉处死, 解剖取附睾进行精子计数和精子活力检测; 取睾丸进行病理切片观察及 Westing blot 蛋白验证。**结果** 差异表达基因通过 KEGG 富集分析及 GO 富集表明发现细胞分裂相关通路存在下调。细胞周期结果显示低、中剂量组 S 期延长, 高剂量组 G1 期延长。且 CDK2 和 CCNA、CCNE 在低、中剂量组上调, 在高剂量组下调。CDK4/6 和 CCND 在低、中剂量组下降, 在高剂量组上升。**结论** N-甲基吡咯烷酮诱导精母细胞减数分裂细胞周期停滞, 且诱导精母细胞凋亡, 导致精子生成受阻, 精子数量减少及精子畸形增加。

关键词: N-甲基吡咯烷酮; GC-2 spd; 细胞周期; 雄性生殖毒性

通讯作者: 邓宇, E-mail: dengyu.cmu@163.com

T01-0004

转录因子 c-jun, c-fos 共同参与调控锰酸锂致小鼠血睾屏障结构功能破坏

杨可心, 邓宇*

(中国医科大学, 沈阳 110122)

摘要: **目的** 锰酸锂是较有前景的锂离子正极材料之一, 但其雄性生殖毒性仍不明确。雄性生殖障碍的

主要原因是精子发生异常,而精子发生很大程度上依赖于血睾屏障(BTB)。血睾屏障在精子发生过程中起着防止自身免疫反应和阻止有害物质进入曲细精管的屏障作用。作为保护成熟精子免受破坏的第一道防线,研究血睾屏障的相关结构和功能具有重要的意义。**材料和方法** 通过气体暴露染毒装置建立锰酸锂小鼠染毒模型和小鼠支持细胞(TM4)培养体系。第一部分(体内研究):采用清洁级6周龄C57雄鼠(20~23g)随机分为28天/45天暴露染毒模型,每个暴露模型设立4组,空白对照组;低剂量组;中剂量组;高剂量组。睾丸及附睾组织予以形态学和精子质量检测,蛋白免疫印迹(Western blot, WB)和激光共聚焦检测睾丸组织中构成血睾屏障的关键连接蛋白(包括ZO-1, occludin, N-cadherin)的表达和定位变化;透射电镜观察血睾屏障超微结构变化。通过数据库预测调控血睾屏障相关因子可能的转录因子,以及分子对接和分子动力学模拟预测转录因子c-jun, c-fos与血睾屏障相关因子的结合稳定性;同时检测睾丸组织中c-fos, c-jun因子的表达变化,探究转录因子c-jun, c-fos对小鼠血睾屏障的具体调控机制;最后利用网络药理学探究传统中药药对枸杞-黄芪多糖治疗锰酸锂致小鼠血睾屏障损伤的恢复作用及其机制。第二部分(体外研究):建立体外培养小鼠支持细胞(TM4)培养体系,观察细胞形态,通过cck8确定锰和锂的染毒剂量,随后给予相关抑制剂及siRNA转染。检测支持细胞中构成血睾屏障的连接蛋白(包括ZO-1, Occludin, N-cadherin),以及细胞骨架F-actin的表达变化。**结果** 锰酸锂暴露可致睾丸精曲小管形态结构异常,精子数量减少,活力降低,畸形率增加,雄性生殖功能明显障碍。锰酸锂暴露后可激活原癌基因c-jun, c-fos;致使组成血睾屏障的连接蛋白(如ZO-1, Occludin, N-cadherin)表达显著降低,破坏血睾屏障完整性,影响精子生成,而枸杞-黄芪能显著改善锰酸锂诱导的血睾屏障损伤。**结论** 锰酸锂通过激活c-fos, c-jun导致小鼠血睾屏障破坏,进而影响生殖功能,中药药对枸杞-黄芪能显著改善其生殖功能损害,这为保护锰酸锂工人的生殖功能提供现实意义。

关键词: 锰酸锂; 血睾屏障; 雄性生殖; 网络药理学; 枸杞; 黄芪

通讯作者: 邓宇, E-mail: dengyu.cmu@163.com

T01-0005

细胞色素P450酶CYP1A2在锰酸锂致嗅球小胶质细胞M1型极化诱发嗅觉功能障碍中的作用

陈月, 沈芝如, 邓宇*

(中国医科大学, 沈阳 110122)

摘要: **目的** 本研究旨在探索锂离子电池正极材料锰酸锂暴露致嗅觉功能障碍中的作用与机制。**材料和方法** 第一部分:采用嗅笔检测锰酸锂作业工人嗅觉阈值、辨别和识别功能,电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)检测全血中锰、锂离子含量,采用斯皮尔曼相关性分析评估血锰、血锂与嗅觉评分相关性。第二部分:构建锰酸锂全身暴露28、45天染毒模型,行为学实验检测小鼠的嗅觉功能;染色实验观察小鼠嗅觉脑区组织形态学损伤;ICP-MS检测小鼠嗅球锰锂蓄积情况;Western blot和RT-qPCR检测小胶质细胞M1型极化促炎因子的表达;免疫荧光和流式检测小胶质细胞M1/M2极化水平。第三部分:染毒小鼠嗅球进行RNA-seq测序筛选出差异表达基因,使用Western blot和RT-qPCR检测CYP1A2、CXCL10、CXCR3的表达;ELISA试剂盒检测嗅球中CYP1A2活性及其代谢物2-OH-E2的含量;免疫荧光共定位检测CYP1A2、CXCL10在神经元和小胶质细胞表达。体外采用锰锂联合暴露N2A-BV2共培养模型,使用上述实验观察神经元及小胶质细胞损伤情况。第四部分:为了进一步确认CYP1A2对于CXCL10/CXCR3轴的调控作用,呋喃茶碱(CYP1A2特异性抑制剂)处理N2A后与BV2共培养并进行锰锂联合暴露染毒,小鼠灌胃呋喃茶碱构建小鼠模型,使用上述实验观察CYP1A2抑制后,小胶质细胞极化及神经元损伤是否恢复。**结果** 锰酸锂作业工人嗅觉功能评分与血液中锰锂离子含量呈负相关;行为学实验结果显示,锰酸锂暴露导致小鼠嗅觉功能障碍;病理染色结果显示锰酸锂暴露后小鼠嗅球损伤;Western blot和RT-qPCR结果显示小胶质细胞M1

型极化促炎因子的表达升高;免疫荧光和流式结果显示小胶质细胞出现M1极化。体外实验发现,免疫荧光及流式结果显示神经元N2A中CYP1A2调控CXCL10/CXCR3轴促进BV2的M1极化;Western blot和RT-qPCR结果显示,锰酸锂暴露上调小鼠嗅球中CYP1A2的表达,ELISA结果显示其活性及2-OH-E2的含量升高;CYP1A2抑制后,缓解了锰酸锂暴露造成的小胶质M1极化以及嗅觉功能障碍;其代谢物2-OH-E2含量下降,对CXCL10/CXCR3轴的调控作用降低。**结论** 锰酸锂暴露导致小鼠嗅觉功能障碍,是通过上调细胞色素P450酶CYP1A2致使小胶质细胞M1极化所致。这为保护我国锰酸锂作业人群的健康提供了新思路。

关键词: 锰酸锂; CYP1A2; CXCL110/CXCR3信号通路; 小胶质细胞极化; 嗅觉功能障碍

通讯作者: 邓宇, E-mail: dengyu.cmu@163.com

T01-0006

基于锂电池三元正极材料元素释放模式的毒性预测与风险评估

苗滢, 张泽, 晋小婷*, 郑玉新*

(青岛大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系, 中国青岛 266000)

摘要: **目的** 随着锂电池行业的迅速发展,三元正极材料锂镍钴锰氧化物(NCM)的潜在健康风险日益凸显,相关毒理学研究尚显不足。本研究旨在通过分析NCM材料的溶解行为,评估其吸入毒性,并开发一种用于风险评估的毒理学预测模型。**材料和方法** 我们选取了四种常见的NCM颗粒(NCM622、NCM523、NCM111、NCM811),研究了它们在溶酶体液中的溶解行为和释放动力学模式,并通过体外实验评估了释放元素对肺泡巨噬细胞的毒性。此外,我们构建并筛选了一个整合加成和相互作用(IAI)模型,用于预测NCM颗粒释放元素的毒性,并评估了制造过程中高暴露人群的风险。**结果** 元素在溶酶体液中通过两种不同的动力学模式释放,这一释放过程受颗粒形状和表面粗糙度的显著影响。释放的元素混合物组成比例保持稳定,与NCM原始元素比例一致。元素释放后的毒性受元素间拮抗作用的调节,其中镍(Ni)元素在毒性拮抗中起主导作用,其重要性依次高于锰(Mn)、钴(Co)和锂(Li)。根据毒性风险,NCM颗粒的排序为NCM622 > NCM523 > NCM111 > NCM811,这一排序由Ni/(Co+Mn)比值的增加所引起的拮抗、部分加和及协同效应共同决定。本研究进一步构建并筛选了IAI模型,该模型在预测NCM颗粒释放元素混合物的毒性和评估人群风险方面展现了较高的预测准确性。**结论** 本研究提供了NCM暴露后元素释放模式的关键科学数据,明确了元素间的拮抗作用,为理解元素相互作用提供了重要见解。此外,为设计低毒性NCM颗粒和评估新材料毒性及人群风险提供了科学依据和有效框架。

关键词: 锂镍钴锰氧化物颗粒; 释放动力学; 毒性; 相互作用; 毒性预测

通讯作者: 晋小婷, E-mail: x.jin@qdu.edu.cn; 郑玉新, E-mail: y.zheng@qdu.edu.cn

T02-0001

Nrf2介导铁死亡在生命早期铅暴露致小鼠认知功能障碍中的作用研究

韦佩祁, 韦若昆, 李振宁, 李慧帅, 彭东杰, 区仕燕, 李少军*

(广西医科大学, 广西南宁 530021)

摘要: **目的** 本研究探讨Nrf2介导的铁死亡在生命早期铅暴露致小鼠认知功能障碍中的作用,以期探寻铅神经毒性的新机制和防治的新策略。**材料与方法** SPF级C57BL/6J雌性成年小鼠经含0.5 g/L、1 g/L和2 g/L的醋酸铅饮水染毒一周后与雄鼠合笼繁殖,仔鼠出生后,与母鼠不分笼并按母鼠剂量组染毒至成年(8周)。检测仔鼠血铅浓度、海马组织铁死亡相关蛋白表达情况。HT-22细胞经不同浓度醋酸铅进行染毒后,

测定细胞存活率、铁死亡相关蛋白表达情况;同时,观察甲基巴多索隆预处理对铅致HT-22细胞损伤的作用。**结果** (1)生命早期铅暴露对仔鼠的影响:与对照组相比,染铅组仔鼠逃避潜伏期延长和游泳路程增加,穿台次数显著降低;与对照组相比,各染铅组的血铅浓度均升高,并呈一定剂量-反应关系;与对照组相比,染铅组仔鼠海马组织Nrf2、SLC7A11、SLC3A2、FTL、FTH1、ACSL3的mRNA表达下降,而Keap1、ACSL4的mRNA表达上升;与对照组比较,染铅组仔鼠海马组织Nrf2、GPX4、SLC7A11、SLC3A2、FTL、FTH1蛋白表达下降,而Keap1、P53、HO-1以及APP和 α -Synuclein蛋白表达上升。与对照组比较,染铅组仔鼠海马组织MDA含量增加、GSH-Px活力降低。(2)铅暴露对HT-22细胞的影响:HT-22细胞存活率随着染铅浓度的增加及染毒时间的延长而下降;与对照组比较,染铅组HT-22细胞Nrf2、GPX4、SLC7A11、SLC3A2蛋白表达下降,而Keap1、P53、HO-1以及APP和 α -Synuclein蛋白表达上升;(3)甲基巴多索隆对铅致HT-22细胞损伤的影响:与染铅组比较,甲基巴多索隆干预组的HT-22细胞的存活率增加;甲基巴多索隆预处理可使染铅HT-22细胞Nrf2、GPX4蛋白表达、GSH-Px活力上升,而Keap1蛋白表达和MDA含量降低。**结论** 铅可通过抑制仔鼠海马组织Nrf2蛋白表达,诱导铁死亡,进而引起仔鼠认知功能损伤。而甲基巴多索隆可通过激活Nrf2抑制铅所致的HT-22细胞铁死亡,缓解铅致神经细胞损伤。

关键词:铅; Nrf2; 铁死亡; 小鼠; HT-22细胞

基金项目:国家自然科学基金项目(82160626);国家自然科学基金项目(81803281)

通讯作者:李少军, E-mail:lishaojun0613@163.com

T02-0002

探讨内皮细胞CCM3基因与铅暴露经神经血管单元诱导神经毒性的作用

李雨蒙^{1,5}, 刘耘², 刘康康³, 陶涛¹, 阳柳雪⁴, 刘茹熙¹, 周航¹, 梁丹¹, 张英¹, 黄丹妮¹, 孙易¹

(1. 桂林医科大学毒理学系, 中国 桂林 541004; 2. 唐山市中心医院妇科, 河北 唐山 063000; 3. 中山大学附属第八医院医学研究中心科室, 中国 深圳 518000; 4. 桂林医学院第二附属医院内分泌科, 中国 桂林 541004; 5. 枣庄市疾病预防控制中心职业病防治科, 中国 枣庄 277000)

摘要:目的 本研究期望能够发现血管CCM3基因缺陷联合铅暴露对神经系统的影响,为未来进一步铅神经毒性作用机制研究及预防策略提供新方向和数据支持。**方法** 慢病毒转染构建CCM3基因低表达的脑微血管内皮细胞稳定株,通过2D Transwell模型实现微血管内皮细胞与神经元细胞联合培养,MTT检测铅暴露下细胞的存活率决定体外铅暴露剂量和作用时间,蛋白组学分析bEnd3细胞和HT22细胞的差异表达蛋白,流式细胞术检测细胞凋亡情况,透射电镜观察细胞超微结构,JC-10荧光探针检测线粒体膜电位变化,WB实验和免疫荧光确定相关蛋白表达水平变化,最后对孕产妇的尿液人群样品进行尿铅水平ICP-MS检测和神经递质代谢物HPLC检测,通及外周血DNA的CCM3基因的rs6784267、rs3804610和rs9818496三个位点的SNPs检测,对CCM3基因位点单核苷酸多态性与尿铅水平对神经递质代谢物的交互作用进行分析。**结果** 根据bEnd3(CCM3^{-/-})细胞与HT22细胞联合培养的蛋白组学分析确定HT22细胞和CCM3基因干扰bEnd3细胞差异蛋白包括细胞凋亡和铁死亡通路。电镜检测观察到bEnd3细胞出现铁死亡和凋亡代表性改变,ICP-MS测得其细胞内铁离子负荷增加,以及WB结果表明铁死亡的标志性代表蛋白GPX4的表达水平降低。在电镜中可观察到HT22细胞出现凋亡代表性改变,表明bEnd3细胞的死亡途径为铁死亡和凋亡多种途径调控,而HT22细胞凋亡过程更为明显。流式细胞仪细胞凋亡检测和荧光探针线粒体膜电位检测结果发现HT22细胞凋亡率受到铅暴露与内皮细胞CCM3基因缺陷的交互作用影响($F=2.54, P<0.05$),HT22细胞的线粒体膜电位在有铅暴露联合内皮细胞CCM3基因缺陷干预时降低的更加显著($F=15.56, P<0.001$)。最后通过线性回归模型发现孕产妇尿铅水平和外周血DNA中CCM3基因SNP的rs9818496位点对孕产妇尿液中的神经递质代谢物5-HIAA的浓度存在交互作用($F=4.198, P<0.05$)。**结论** 在联合细胞培养铅暴露模型中CCM3基因缺陷的bEnd3细胞在铅暴露下,可经铁死亡和凋亡途径引发

HT22细胞凋亡,并且内皮细胞的CCM3基因缺陷和铅染毒对神经细胞HT22存在交互作用。孕产妇及新生儿人群流行病学研究在人群体内试验进一步确证孕产妇尿铅水平和外周血DNA的CCM3基因SNP rs9818496位点对孕产妇尿液中的神经递质代谢物5-HIAA的浓度存在交互作用。

关键词:CCM3; 铅; 神经血管单元

通讯作者:孙 易,E-mail:sunyide163@163.com

T02-0003

CCM3在糖尿病铅暴露中神经损伤的作用研究

梁 旭, 孙 易*

(桂林医学院公共卫生学院, 广西 桂林 541199)

摘要:目的 通过CCM3基因缺陷糖尿病铅暴露小鼠模型和糖尿病人群尿,研究铅暴露、糖尿病以及CCM3基因对神经血管的损伤作用,以期为糖尿病、铅暴露以及CCM3基因缺陷造成的神经系统病变提供预防和治疗的理论依据。方法 以CCM3基因缺陷铅暴露糖尿病小鼠模型为基础,采用Morris水迷宫观察铅、血糖和CCM3基因对学习记忆功能以及免疫荧光共定位染色分析神经和血管的损伤。蛋白质组学分析差异蛋白和相关通路,并用WB和GSH检测验证三种因素对脑海马相关蛋白和代谢物水平的影响。在最后糖尿病人群用ICP-MS和HPLC法检测尿铅和神经递质代谢物,KASP法分析CCM3基因的SNP。结果 与对照组相比,糖尿病铅染毒组小鼠血糖和血铅水平最高,且糖尿病铅染毒组小鼠逃避潜伏期显著升高($P=0.003$)。铅染毒组GFAP免疫荧光结果显著低于对照组($P=0.005$)。蛋白质组学筛选出关键调控蛋白AKT明显改变,WB结果表明铅暴露组PI3K和AKT蛋白表达均明显下降($P=0.009$; $P=0.007$),铅暴露组和糖尿病组的GPX4表达均降低($P<0.001$),铅暴露组小鼠海马组织GSH水平低于对照组($P<0.001$)。低尿铅组和高尿铅组糖尿病患者的尿铅与VMA($rs=0.426$, $P<0.001$)和HVA($rs=0.410$, $P<0.001$)有弱正相关性,尿铅、血糖和rs6784267位点三种因素对VMA($F=9.838$, $P<0.001$)和HVA($F=4.788$, $P=0.003$)均存在交互作用。结论 在CCM3基因缺陷糖尿病铅暴露小鼠模型中发现铅暴露、糖尿病和CCM3基因三种因素可能通过同时升高血糖和血铅水平并对血管和神经功能造成影响,且对脑神经的损伤早于血管损伤。抑制PI3K-AKT通路引发铁死亡在该过程中发挥重要调节作用。在糖尿病人群中进一步确证尿铅、血糖和rs6784267三种因素对VMA和HVA的交互作用。

关键词:CCM3; 铅; 糖尿病; PI3K-AKT

通讯作者:孙 易,E-mail:sunyide163@163.com

T02-0004

Kir6.2-KATP通道抑制是导致锰神经毒性中自噬失败和氧化应激损伤的关键

王长勇, 吕善雨, 梁宏烁, 陈科妙, 何果果, 欧超燕*

(桂林医学院公共卫生学院, 桂林 541199)

摘要:背景 锰(Mn)是维持机体生理功能的一种必需微量元素,但长期暴露于高浓度的Mn会导致神经毒性,出现以认知障碍和运动震颤为主要特征的神经系统紊乱症状,这与特发性帕金森病相似,其特征是错误折叠的 α -突触核蛋白异常聚积。流行病学和临床研究数据表明,自噬失败和氧化应激损伤是锰神经毒性的重要诱发因素。目的 在这里,我们首次报道了Kir6.2蛋白,一种ATP敏感钾(KATP)通道的一个孔形成亚基,具有调控细胞能量代谢和电活动的功能。以往虽对自噬失败与Kir6.2的关系有一定研究,然而,在Mn神经毒性中Kir6.2对自噬的调节作用尚未有报道。此外,我们试图加强细胞的自噬和抗氧化功能,及时清除

功能障碍性线粒体和 ROS,为细胞抵御或减轻 Mn 神经毒性提供一种思路。**材料与方法** 本研究利用体外人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞和小鼠海马神经元 HT22 细胞,建立 Mn 暴露模型。构建 Kir6.2 基因的过表达和敲降质粒,根据实验目的的需要,用指定浓度的 NAC、雷帕霉素、ATP-Na₂ 和 2-Deoxy-D-glucose 预处理 4 小时,随后暴露于 400 μM 或 100 μM Mn²⁺ 24 小时。通过 Western blotting 和试剂盒检测相关蛋白和指标的变化。**结果** 我们观察到 Mn 暴露诱导自噬失败和氧化应激损伤,自噬通量和 ATP 产量减少,以及 Kir6.2-KATP 通道活性被抑制。此外,我们评估了给予外源性 ATP 和抗氧化剂 NAC 或过表达 Kir6.2 后自噬激活,部分恢复了 Mn 诱导的线粒体呼吸损伤、ATP 耗竭和 ROS 产生过多。进一步实验表明,Kir6.2 过表达激活的自噬部分是通过促进 ATP 合成和减少 ROS 生成实现的,这与 KATP 通道开放后细胞膜的超极化有关。**结论** 综上所述,本研究首次揭示 Mn 通过抑制 Kir6.2 表达导致自噬失败,这与氧化应激损伤和 ATP 减少有因果关系。这些发现揭示了自噬失败在 Mn 神经毒性中的作用,并将 Kir6.2 确定为潜在治疗靶点。

关键词: 锰; 神经毒性; 自噬失败; 氧化应激损伤; Kir6.2-KATP 通道

通讯作者: 欧超燕, E-mail: 331774955@qq.com

T02-0005

重庆市居民 2012–2022 年膳食镉暴露风险及其疾病负担变迁

李旻涛^{1,2}, 代兴慧^{1,2}, 陈佳辉^{1,2}, 陈京蓉¹, 冯萍¹, 覃梅¹, 赵舰¹, 罗书全¹, 唐文革¹, 张华东¹, 练雪梅², 霍娇^{1,2*}

(1. 重庆市疾病预防控制中心, 重庆 400042; 2. 重庆医科大学公共卫生学院, 重庆 400016)

摘要: **目的** 近年来,大量研究结果显示我国部分地区存在一定的镉膳食暴露风险。为进一步明确膳食镉暴露水平变迁,探讨营养膳食模式和相关政策对暴露水平的影响,以及进一步评估重庆居民饮食中镉暴露的可能健康风险和镉暴露造成的疾病负担开展该研究。**材料和方法** 利用 2012–2022 年重庆市食品安全风险监测系统 2012–2022 年的化学污染物监测数据,11 类共 9219 份食品样品的镉含量监测数据,结合 2011–2018 年重庆市中国健康与营养调查队列膳食调查数据(3 天 24 小时膳食回顾法),该队列分别于 2011 年、2015 年、2018 年进行三次调查,队列人数为 3314 人。采用蒙特卡罗模拟法估计重庆市居民在 2012–2014 年、2015–2018 年、2019–2022 年三个时间阶段膳食镉暴露水平及其健康风险变化。根据 TK 模型计算重庆市 40 ~ 49 岁、50 ~ 59 岁及 60 岁以上人群人群尿镉水平,估算年龄别肾小球滤过率(glomerular filtration rate, GFR)分布,通过低于 15 ml/min/1.73 m² 和 30 ml/min/1.73 m² 的 GFR 曲线下面积计算慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)四期和 CKD 五期发病率,将镉导致的 CKD 发病率转化为伤残调整寿命年(disability adjusted life year, DALY)。**结果** 重庆居民 2015–2018 年平均镉暴露水平最高,其次为 2012–2014 年,2019–2022 年平均镉暴露水平最低,重庆市平均膳食镉暴露水平均低于 JECFA 制定的 PTMI 25 μg/kg bw /month,为 PTMI 的 0.44 ~ 0.54,不具有健康风险。对于重庆市居民高暴露水平(P95)而言,2012–2014 年镉暴露 P95 的范围为 1.342 ~ 1.369 /kg bw/day,2015–2018 年为 1.262 ~ 1.306 μg/kg bw/day,2019–2022 年为 1.153 ~ 1.214 μg/kg bw/day。重庆高膳食镉暴露水平(P95)人群暴露量均高于 JECFA 制定的 PTMI,为 PTMI 的 1.38 ~ 1.64 倍,可能会对人体健康带来一定的风险。2015–2018 年膳食镉暴露导致 CKD 的 DALY 最高,为 2.68/10 万人,其次是 2012 ~ 2014 年膳食镉暴露导致 CKD 的 DALY 为 2.12/10 万人,2019 ~ 2022 年膳食镉暴露导致 CKD 最低,为 DALY 为 1.35/10 万人。**结论** 本研究为重庆市膳食镉暴露及 ≥40 岁成人其可归因 CKD 负担提供了重要信息,重庆市居民平均镉暴露水平引起健康风险可能性较低,而高暴露水平人群可能通过膳食镉暴露引起一定健康风险。卫生政策制定者需要更加重视食物中的镉含量对人群造成疾病负担。

关键词: 镉; 膳食暴露; 风险评估; 疾病负担; 时间趋势

通讯作者: 霍娇, E-mail: lamarhj@126.com

T02-0006

P62/Nrf2/Keap1 信号通路在铅诱导的神经功能障碍中的作用

彭东杰^{1,2}, 韦佩祁^{1,2}, 韦若昆^{1,2}, 李慧帅^{1,2}, 李振宁^{1,2}, 李少军^{1,2*}

(1. 广西医科大学公共卫生学院毒理学教研室, 广西 南宁 530021; 2. 广西医科大学广西高校高发疾病预防与控制研究重点实验室, 广西 南宁 530021)

摘要:目的 铅暴露可导致认知障碍并有助于神经退行性疾病的发展。然而,铅诱导的神经功能障碍的确切机制仍然不十分清楚。本研究旨在探讨氧化应激及自噬相关 P62/kelch like ECH-associated protein 1 (Keap1)/Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)通路在铅所致神经元损伤中的作用。方法 本研究通过体内和体外两种方法探讨 P62/Keap1/Nrf2 通路在铅诱导的神经毒性中的作用。首先建立亚慢性铅暴露雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠模型和 SH-SY5Y 细胞铅暴露模型。采用水迷宫实验评价大鼠的学习记忆能力;苏木精和伊红(HE)和尼氏染色观察海马的病理改变;采用电感耦合等离子体质谱法分析铅水平;采用 CCK8 检测细胞存活率;采用 F-actin 染色法观察细胞表型;DCFH-DA 探针检测活性氧(ROS)水平;用 GSH-Px 检测试剂盒检测 GSH-Px 活性;免疫荧光法检测 LC3、Nrf2 表达水平及 Nrf2、Keap1 和 P62 的共定位。Western Blotting 检测自噬相关蛋白及 Nrf2、Keap1、HO-1 和 Tau 的表达。结果 体内、外研究结果均表明,铅暴露引发 ROS 过量产生,上调 Keap1 蛋白表达,促进 Nrf2 降解,抑制 HO-1、GPx 等抗氧化基因和蛋白表达,导致神经元氧化损伤。此外,我们观察到 P62 通过与 Keap1/Nrf2 相互作用破坏正常的自噬过程,致使 AD 相关蛋白 Tau 的积累,最终导致神经功能障碍。然而,在体外研究中用抗氧化剂 n-乙酰半胱氨酸(NAC)处理铅暴露 SH-SY5Y 细胞,可以抑制 ROS 的生成,改善 P62/Nrf2/Keap1 通路,从而减轻铅暴露导致的神经细胞损伤以及 AD 相关蛋白的表达。结论 这些结果表明 P62/Nrf2/Keap1 通路紊乱介导铅暴露引起的神经功能障碍,并强调其作为减轻铅致神经功能障碍治疗靶点的潜力。

关键词:铅;神经功能障碍;氧化应激;自噬;P62/Nrf2/Keap1**通讯作者:**李少军, E-mail:lishaojun0613@163.com

T02-0007

铅暴露对雌性小鼠脏器的影响

韦佩祁, 韦若昆, 袁海燕, 易 湘, 李慧帅, 李振宁, 姜岳明, 区仕燕, 李少军*

(广西医科大学 1. 公共卫生学院毒理学教研室; 2. 广西环境与健康研究重点实验室;
3. 高校高发疾病预防与控制研究重点实验室, 广西 南宁 530021)

摘要:目的 铅作为一种全身毒物,国内外关于其暴露对器官影响的相关研究较少。本研究通过对经饮水铅暴露对雌性小鼠脏器影响的探讨,以期对铅暴露对主要器官毒性作用机理研究提供理论依据。方法 将 40 只体质量为(19.16±0.56)g 的雌性 C57BL/6 小鼠随机分成 3 个处理组和 1 个对照组,每组 10 只。各处理组分别饮用经高压无菌水配制含 0.5 g/L、1.0 g/L、2.0 g/L 的乙酸铅溶液,对照组饮用双蒸水。每周 7 天,连续 12 周染毒。末次染毒结束 24 h 后使用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠,脱颈椎处死,取其心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏和子宫,称湿重,计算其脏器系数;并采用苏木精和伊红(HE)染色观察各脏器病理形态学变化。结果 与对照组相比,铅对小鼠各脏器系数均无影响($P>0.05$);铅致雌性小鼠脏器的主要病理改变:肺脏:肺泡壁毛细血管充血和破裂;肝脏:广泛性肝细胞小泡性脂变;脾脏:脾脏结构紊乱;肾脏:肾小管上皮细胞变性和肾小球结构破坏;心脏:心肌细胞肿胀和充血,心肌纤维间距增宽及断裂;子宫:内膜上皮细胞排列改变,固有层嗜酸性粒细胞浸润。以上各个器官的病理表现均以高剂量染铅组最为明显。结论 雌性小鼠经铅暴露可造成器官不同程度的病理损伤,且损伤的程度与染毒剂量呈现一定的剂量效应关系。

关键词:铅;雌性小鼠;内脏器官;病理形态学**通讯作者:**李少军, E-mail:lishaojun0613@163.com

T02-0008

活性维生素 D 对砷致大鼠甲状腺功能紊乱的干预作用研究

李会, 向杰, 宋倩, 金英, 周美彤, 范丽丽, 王大朋*

(贵州医科大学环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 公共卫生与健康学院, 贵阳 561113)

摘要:目的 砷作为一种环境内分泌干扰物,可干扰机体内分泌系统,课题组前期研究发现长期砷暴露可造成 SD 大鼠甲状腺功能紊乱,但其具体分子机制及有效防治措施亟待进一步探讨。维生素 D(Vitamin D, VD)是一种机体所必需的脂溶性维生素,近年来多项研究均表明 VD 缺乏与多种甲状腺疾病发生发展密切相关,但 VD 在砷暴露所致甲状腺功能紊乱过程中发挥何种作用尚不清楚。本研究通过建立亚砷酸钠(NaAsO_2)诱导 SD 大鼠甲状腺损伤模型,探讨活性 VD 对砷致大鼠甲状腺功能紊乱的干预作用。方法 选取健康初断乳 SD 大鼠 18 只,雌雄各半,适应性饲养一周后按随机数字表法分为 3 组,每组 6 只,设置正常对照组(给予生理盐水 10 ml/kg·bw 灌胃,6 d/周)、染砷模型组(给予 10 mg/kg·bw NaAsO_2 灌胃,6 d/周)、VD 干预组(给予 10 mg/kg·bw NaAsO_2 灌胃,自第 13 周起间隔 4~6 小时后给予 10 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}$ 活性 VD—Calcitriol 灌胃,6 d/周),处理时间为 36 周。HE 染色和 Masson 染色观察各组大鼠甲状腺病理改变情况;IHC 检测大鼠甲状腺组织中甲状腺激素合成相关蛋白(TSHR、NIS、TPO、TG)表达水平。ELISA 法测定大鼠血清甲状腺功能相关指标(TT3、FT3、TT4、FT4)分泌水平。结果 ① NaAsO_2 暴露导致 SD 大鼠的甲状腺滤泡结构破坏较为严重,并且炎细胞浸润明显,组织出现严重的病理损伤;而活性 VD 干预组淋巴细胞浸润程度均有不同程度降低,炎症面积均小于染砷模型组,呈小范围局灶性,其余正常部分滤泡结构完整充盈;② IHC 染色结果显示,与对照组比较,染砷模型组中 TSHR 蛋白的表达水平显著升高,NIS、TPO 和 TG 蛋白的表达水平则明显降低;而采用活性 VD 干预后,其 TSHR 蛋白表达水平较染砷模型组显著降低,NIS、TPO 和 TG 蛋白表达水平则较染砷模型组明显升高;③与对照组相比,染砷模型组大鼠血清 TT3、FT3、TT4 和 FT4 水平显著降低;活性 VD 干预组大鼠血清 TT3、FT3、TT4 和 FT4 水平较染砷模型组显著上升。结论 活性 VD 干预可有效拮抗砷暴露所引起的 SD 大鼠甲状腺组织中甲状腺激素合成相关蛋白表达改变,一定程度改善砷暴露所致大鼠甲状腺功能紊乱。

关键词:亚砷酸钠;甲状腺;维生素 D;甲状腺激素;大鼠

基金项目:国家自然科学基金(82060604);贵州省科技支撑计划项目([2020] No. 4Y153);贵州省第十三批优秀青年科技人才项目([2021]5611号);贵州医科大学优秀青年领军人才项目([2023] No. 103)

通讯作者:王大朋,E-mail:wojiushiwdp@126.com

T02-0009

p62/Keap1/Nrf2 信号通路调控锰转运蛋白促锰通过血脑屏障致运动功能障碍

陈京琪, 沈芝如, 邓宇*

(中国医科大学, 沈阳 110122)

摘要:目的 锰过度摄入已被认为是帕金森病、阿尔茨海默病、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化症和朊病毒病等多种神经系统疾病发病机制的关键因素。随着基因组学的发展,血锰失调的关键转运体基因相继被发现,进一步解释了血锰失调与锰相关神经疾病之间的关系。然而,锰转运体相关基因的具体调控机制仍有待阐明。方法 第一部分:构建小鼠锰中毒模型,通过行为学实验观察小鼠的运动功能损伤;染色实验观察小鼠黑质和纹状体组织形态学损伤;WB 和 RT-qPCR 检测小鼠内皮细胞锰转运相关蛋白的 mRNA 和蛋白水平;通过 CTD 数据库和 JASPER 数据库预测寻找调控锰转运相关基因的关键转录因子,发现 Nrf2 可能发挥关键作用。第二部分:为了验证 Nrf2 的调控作用,分别使用抑制剂(TPL)和激动剂(DMF)进行回复实验,检测 Nrf2 对小鼠脑微血管内皮细胞锰转运相关基因 SLC39A8、SLC39A14 和 SLC40A1 的转录调控

作用。通过双荧光素酶报告和 CHIP 实验进一步验证 Nrf2 对锰转运相关基因的调控。第三部分:构建内皮细胞 Nrf2 特异性敲除小鼠(Nrf2flox/flox; CDH5-cre),检测内皮细胞特异性敲除 Nrf2 能否减少锰转运相关基因 SLC39A8、SLC39A14 和 SLC40A1 的表达,并减少锰离子通过血脑屏障在脑内发生蓄积。第四部分:为了探明锰致 Nrf2 表达改变的原因,通过 CO-IP 检测 Nrf2 的泛素化水平, WB 和 RT-qPCR 检测其上游相关因子 p62 和 Keap1 的表达情况,免疫荧光检测 p62 与 Keap1 的共定位情况。**结果** 行为学实验结果显示,锰致小鼠运动功能障碍;病理组织染色结果显示,锰暴露使小鼠黑质-纹状体发生损伤;WB 和 RT-qPCR 结果显示 SLC39A8、SLC39A14、SLC40A1 等锰转运相关基因和蛋白表达升高;回复实验、双荧光素酶报告和 CHIP 实验均验证说明 Nrf2 调控锰转运相关基因的表达;小鼠内皮细胞特异性敲除 Nrf2 后,锰转运相关基因 SLC39A8、SLC39A14 和 SLC40A1 的表达减少,脑内锰离子蓄积减少。CO-IP 发现锰可减少 Nrf2 的泛素化水平;WB 结果显示锰增加 p62 的表达,减少 Keap1 的表达水平;免疫荧光结果显示 P62 与 Keap1 的共定位增加。**结论** 研究表明,锰激活 p62/Keap1/Nrf2 信号通路,减少 Nrf2 的泛素化降解,发挥其转录活性,增加锰转运相关蛋白 SLC39A8、SLC39A14 和 SLC40A1 的转录翻译水平,致更多的锰离子通过血脑屏障并在脑组织中产生蓄积,发挥神经毒性作用。

关键词: 锰中毒; 运动功能障碍; 离子转运蛋白; Nrf2

通讯作者: 邓宇, E-mail: dengyu.cmu@163.com

T02-0010

孕哺期骨铅动员对子代骨代谢的影响

张林^{1,2*}, 卢安心², 刘军霞², 林崑², 颜崇淮²

(1. 兰州大学公共卫生学院, 兰州市城关区 200025; 2. 上海交通大学医学院附属新华医院教育部和上海市环境与儿童健康重点实验室, 上海市杨浦区 200092)

摘要: **目的** 母源性铅可经胎盘和乳汁进入儿童体内,对儿童发育产生不良效应。前期观察到孕哺期母体存在显著的骨铅动员现象,本研究进一步探究母源性铅暴露对子代骨代谢及甲状腺功能的影响。**方法** 基于前期孕哺期骨铅动员大鼠模型,即将初断乳 SPF 级雌性 Wistar 大鼠按体重随机分为对照组(0.05% 醋酸钠)和铅暴露组(0.05% 醋酸铅),自由饮水染毒 4 周后改饮蒸馏水,经 4 周洗脱期后,将两组雌鼠与同周龄健康 Wistar 雄鼠按照 3:1 比例合笼交配,受孕成功后分笼饲养。断乳时随机选择雄性子代大鼠继续喂养,直至出生后 49 天,收集大鼠的血和骨样本。电感等离子体质谱仪检测血、骨中铅、钙、镁、铁、锰、铜和锌水平;ELISA 测定血清骨转换标志物、钙调激素及骨组织中炎症因子,生化试剂盒测定骨组织中线粒体功能相关指标;液相色谱串联质谱 LC-MS/MS 行循环代谢组学分析。**结果** 与对照组相比,铅组血铅和密质骨铅水平升高、骨钙水平降低($P<0.05$),而松质骨铅水平及全血中镁、铁、锰、铜和锌并无显著变化($P>0.05$)。铅组大鼠血清 PTH 和维生素 D3 水平较对照组显著升高,且骨吸收标志 TRAP5b 和 CTX-I 含量增加而骨形成标志骨钙素(OT)水平降低。进一步对骨组织中氧化炎症及能量代谢指标进行测定,发现铅组骨组织中氧化产物 ROS、MDA 增多,抗氧化剂 GSH、SOD 的含量及 CAT、GPx 的活性均显著升高;炎症因子 IL-1 β 水平增加,而具有抗炎作用的 IL-33 水平减少;能量代谢指标 ATP 水平及 ATPase 活性均降低。循环代谢组学分析显示甲状腺激素信号通路发生改变,铅组血清 TSH、FT4 水平升高,FT3/FT4 比值降低,而 FT3 水平未发生改变。**结论** 孕哺期母体骨铅动员会影响子代骨代谢,甲状腺功能改变可能参与上述过程。

关键词: 孕哺期; 骨铅动员; 骨代谢; 代谢组学; 甲状腺

基金项目: 国家自然科学基金(81973062);上海市青年科技英才杨帆计划项目(23YF1425800)

通讯作者: 张林, E-mail: lin_zhang@lzu.edu.cn

T02-0011

NLRP3 炎性小体活化介导胰岛 β 细胞损伤在砷致糖稳态失衡中的作用及机制

刘永莲, 王文娟, 梁冰, 邹忠兰, 张爱华*

(贵州医科大学, 环境污染与疾病监控教育部重点实验室/公共卫生与健康学院, 贵阳 550025)

摘要:目的 砷是广泛分布于自然环境中具有毒性的类金属元素, 流行病学研究表明, 长期慢性砷暴露与血糖调节受损、糖耐量减低及糖尿病发病风险存在显著关联, 但其机制仍未阐明。本研究以胰岛 β 细胞胰岛素合成与分泌功能调控为切入点, 探讨 NLRP3 炎性小体在砷致糖稳态失衡中作用机制及潜在的干预靶点。方法 构建体内、外砷染毒模型: 体内实验中, 分别给与 Wister 大鼠 0、2.5、5.0、10.0 mg/kg NaAsO₂ 水溶液灌胃, 每周 6 天连续 4 个月; 体外实验中, 采用不同浓度亚砷酸钠(0、2.5、5.0、10.0 μ M NaAsO₂) 处理 INS-1 细胞 24 h。葡萄糖检测试剂盒检测大鼠血糖含量, 胰岛素检测试剂盒检测大鼠空腹胰岛素及 INS-1 细胞葡萄糖刺激的胰岛素分泌水平; Western blot 及免疫荧光分别检测蛋白表达及定位情况; ELISA 检测胰腺及血清炎症因子含量; MCC950 抑制 NLRP3 炎症小体活化、Extendin-4 诱导 IRS-1/PI3K/AKT 信号转导, 以探讨其在砷致糖稳态失衡中的调控机制。结果 砷暴露可致大鼠胰岛功能受损, 胰岛素分泌量下降, 血糖水平增加; 进一步体内、外结果均显示砷诱导了 PDX-1 的转位入核、GLUT4 膜易位, GCK 及 IRS-1Ser616、P-AKT Ser 473 表达水平均显著降低, 而 NLRP3 炎症小体水平显著升高; MCC950 抑制 NLRP3 炎症小体活化, 可一定程度逆转砷致胰岛素调控关键分子表达及胰岛素分泌的异常, 并可拮抗 PI3K、p-AKT473 水平下降和 p-IRS-1Ser616 水平增加, 且这一作用可被 IRS-1/PI3K/AKT 信号通路活化诱导剂所改善。结论 NLRP3 炎性小体通过 IRS-1/PI3K/AKT 信号通路介导了砷致胰岛 β 细胞功能损害及糖稳态失衡, 靶向干预 NLRP3 有望在分子水平上为其预防和干预提供新方向。

关键词:砷; 糖稳态失衡; 大鼠; 胰岛 β 细胞; 炎症小体**基金项目:**国家自然科学基金(81872569); 国家自然科学基金(81903267)**通讯作者:**张爱华, E-mail: aihuagzykd@163.com

T02-0012

基于血浆神经递质代谢组学的砷致认知损害生物学标志研究

王文娟, 孙宝飞, 罗道朋, 陈雄, 姚茂琳, 张爱华*

(贵州医科大学, 环境污染与疾病监控教育部重点实验室/公共卫生与健康学院, 贵阳 550025)

摘要:目的 砷是常见的环境污染物, 多项流行病学研究表明, 长期砷暴露可致认知水平降低, 但目前机制不清且缺乏早期、敏感的生物学标志。本研究旨在评估砷暴露与成人认知损害的关联性, 表征神经递质代谢产物变化探讨砷致认知损害潜在的生物学标志。方法 本研究以贵州省雨樟镇为调查点, 选取观察对象 543 名, 其中在燃煤型砷中毒病区村选取 310 名曾有砷暴露史居民作为砷暴露组, 在非砷暴露对照村选取 233 名无砷暴露史居民作为对照组; 简易智力状态检查量表(MMSE)评估人群认知水平; 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱仪检测尿液中不同形态、价态砷含量; 液相色谱-质谱联用仪检测血浆中神经递质水平含量; 限制性立方样条、广义线性混合模型评估尿砷、MMSE 评分和神经递质之间剂量-反应关系。研究方案经贵州医科大学伦理委员会审查批准, 观察对象均签署书面知情同意书。结果 与对照组相比, 砷暴露人群 MMSE 评分显著降低($P < 0.05$), 且与尿砷浓度呈无明显阈值的负相关关系($P < 0.05$); 在所检测的血浆神经递质中, 砷暴露人群的差异代谢物主要集中在血清素能、多巴胺能及儿茶酚胺能代谢途径; 中介效应分析结果显示, 色氨酸、酪氨酸、多巴胺和肾上腺素在砷导致 MMSE 评分降低中呈显著的中介作用; 基于神经递质的预测模型评估砷暴露致认知损害的结果显示, 预测概率与实际概率之间的一致率达 91.1%。结论 砷暴露伴随着神经递质代谢的紊乱, 剂量依赖性地降低成年人的认知水平; 该结果揭示了砷致认知损害的

潜在发病机制,并为其早期诊断和早期干预及预后评估提供了理论参考。

关键词: 砷; 神经递质; 神经; 认知; 风险

基金项目: 国家自然科学基金(81430077); 国家自然科学基金(82273679)

通讯作者: 张爱华, E-mail: aihuagzykd@163.com

T02-0013

食源性镉暴露对秀丽隐杆线虫的氧化应激和脂代谢毒性分子通路研究

建宇伦, 牟 为

(上海交通大学 医学院-公共卫生学院, 上海 200025)

摘要: **目的** 镉(Cd)是一种典型的重金属,也是一种广泛存在的环境污染物。除香烟烟雾和职业暴露外,食物中的水和蔬菜也是镉的主要暴露源,镉可通过食物链迅速进入人体,即使是低剂量的镉也会导致氧化应激、DNA 损伤,最终引发各种慢性疾病,包括癌症。本研究通过对野生型 N2 以及基因沉默线虫进行不同浓度镉暴露,发现由食源性镉暴露引起的表型变化以及通过转录组测序探索毒性分子通路的改变,联合表征镉引起线虫的氧化应激和代谢损伤。**方法** 对 N2 线虫进行四个浓度梯度的镉暴露,通过表型实验和转录组测序分析,整合毒物表征和分子信号通路,筛选受镉调控的关键影响因子,通过 GO, KEGG, REACTOME 富集分析镉暴露的相关毒性网络,对数据清洗,收集,整合出分子互作网络。通过 PCR 和携带绿色荧光蛋白以及基因沉默的线虫进行验证,分析可能存在的分子调控方向和对线虫的损伤结局。**结果和讨论** 测序数据分析镉对线虫调控的关键效应基因,富集相关分子途径以及获得相互作用网络模型,为进一步构建镉的分子毒理学作用的暴露提供了更为精准的理论依据与健康效应关系的综合性评价,为研究镉引起氧化应激和脂代谢变化之间的关联提供思路和方法。

作者简介: 建宇伦,男,硕士研究生在读, E-mail: 1418398652@sjtu.edu.cn

通讯作者: 牟 为,女,副教授

T02-0015

基于单细胞测序技术和大脑类器官模型探讨重金属镉的神经发育毒性机制

黄 琰¹, 王志秋¹, 曾品利¹, 卜 迁^{1,2}, 岑小波^{2*}

(1. 四川大学华西公共卫生学院卫生毒理与病理学系, 成都 610041;

2. 四川大学华西医院国家成都新药安全性评价中心, 成都 610041)

摘要: **目的** 大脑是人体最复杂和最敏感的器官之一,大脑发育过程对环境污染物暴露更为敏感。重金属镉在环境中广泛存在,能通过胎盘屏障和血脑屏障在胎儿中枢神经系统蓄积,造成儿童学习记忆能力下降和智力发育障碍。基于大脑类器官模型,我们前期研究发现长期镉暴露造成神经祖细胞提前分化,脑室下区变厚,进而导致晚期成熟神经元比例下降以及深层皮质神经元分布紊乱。为了进一步阐明重金属镉对神经发育过程中皮质神经细胞类型的改变以及关键分子机制,本研究运用单细胞测序技术和大脑皮质类器官模型探讨重金属镉的神经发育毒性机制。**材料和方法** 前期研究发现 1 μM 镉对人干细胞分化的大脑类器官神经分化过程产生了显著的影响,并且主要影响皮质的神经细胞类型及分布,本研究分化了 56 天的皮质类器官,选择 1 μM 镉处理 14 天,收取单细胞测序样本及免疫荧光染色样本,用于单细胞转录组数据分析以及验证。**结果** 在 72 天皮质类器官中得到了神经元(60.4%)、放射状胶质细胞(27.4%)、星形胶质细胞(6.6%)、中间祖细胞(3.8%)、神经祖细胞(1.7%)等五大细胞类群。与对照组相比,镉处理后神经元、星形胶质细胞和神经祖细胞占比分别降低了 7.6%、21.3% 和 4.1%,而放射状胶质细胞和中间祖细胞比例分别升高

了14.4%和55.1%。将神经元分为兴奋性神经元和抑制性神经元亚群,免疫荧光染色验证了镉处理后抑制性神经元占比显著下降。将放射状胶质细胞分为4种放射状胶质细胞,发现早期放射状胶质细胞比例升高而截短放射状胶质细胞比例显著下降,放射状胶质细胞的比例改变可能是镉暴露干扰大脑皮层的层次结构形成和神经元分化及迁移的关键细胞类群。在分子层面,通过生物信息学富集分析发现镉处理后阻碍了胞内翻译过程,导致线粒体ATP合成和神经元轴突生长障碍。另外,重金属镉特异性干扰了神经祖细胞中锌、铜离子稳态并对其细胞周期造成阻滞,导致G2/M期无法顺利转化。**结论** 通过单细胞测序发现在皮质类器官中重金属镉显著影响神经细胞分化,促进了中间祖细胞生成并降低截短放射状胶质细胞和抑制性GABA能神经元的比例,通过分析镉对不同神经细胞的转录组的影响,发现其与锌铜离子稳态及线粒体功能有关。本研究阐明了镉神经发育毒性机制,及其引起胎儿神经发育障碍的潜在风险,提示孕期预防镉暴露具有重要意义。

关键词:皮质类器官;重金属镉;神经发育毒性;单细胞转录组测序

通讯作者:岑小波,E-mail: xbcen@scu.edu.cn

T02-0016

环境镉暴露通过 m6A 修饰激活胎盘内质网自噬损害胎儿睾丸发育

罗叶心,朱华龙*,王 华*

(安徽医科大学环境毒理学安徽普通高校重点实验室,安徽 合肥 230032)

摘要:**目的** 孕期环境镉暴露对胎鼠睾丸发育的作用及机制尚不明确。本研究旨在探讨内质网自噬激活在环境镉暴露损害胎鼠睾丸发育中的作用及其机制。**材料和方法** 本文采用“动物-细胞-人群”相结合的研究方法。**动物实验:**(1)给予孕鼠饮水暴露镉(Cd)(LCd:50 mg/L和HCd:150 mg/L)以建立孕期镉暴露损害胎鼠睾丸发育的小鼠模型;(2)为了探究孕期母体镉暴露是否通降低雌激素水平诱导胎鼠睾丸发育异常,通过腹腔注射给予HCd组孕鼠雌激素处理;(3)为了探究孕期母体镉暴露是否通过激活内质网自噬抑制胎盘雌激素合成和胎鼠睾丸发育,经囊胚转染LV5-*Rtn3l* shRNA和胚胎移植以构建胎盘内质网自噬受体*Rtn3l*敲除小鼠模型;(4)为了探究m6A修饰在孕期母体镉暴露激活胎盘内质网自噬的作用,通过腹腔注射给予HCd组孕鼠METTL3-14抑制剂SAH处理。**细胞实验:**(1)为了探究镉暴露是否激活内质网自噬和抑制人胎盘滋养细胞雌激素合成,给予人JEG-3细胞CdCl₂(20 μM)处理0、2、6和12 h;(2)为了探究RTN3L依赖的内质网自噬在镉抑制人胎盘滋养细胞雌激素合成中的作用,给予人JEG-3细胞*Rtn3l* siRNA预处理;(3)为了探究m6A修饰对镉激活内质网自噬中的作用,给予人JEG-3细胞METTL3抑制剂STM2457和*Igf2bp1* siRNA预处理;(4)为了验证镉暴露对人胎盘的影响,给予人胎盘原代细胞CdCl₂(20 μM)处理0、2、6和12 h。**人群病例对照研究:**通过人群病例对照研究分析内质网自噬激活和胎盘雌激素合成抑制的关联。**结果** 通过孕期镉暴露成功构建胎鼠睾丸发育损害的小鼠模型。基于该模型,我们发现孕期镉暴露诱导胎鼠血雌激素含量降低、胎盘雌激素合成抑制和RTN3L依赖的内质网自噬激活。随后,给予孕鼠雌激素补充,发现补充雌激素通过激活胎鼠睾丸E2/ER信号缓解镉所致胎鼠睾丸发育标志物PCNA、CyclinD1减少。体外实验证实细胞*Rtn3l*敲低缓解镉暴露诱导的人胎盘滋养细胞雌激素合成酶CYP17A1和CYP19A1蛋白水平的降低。同时,通过囊胚转染特异性敲除胎盘*Rtn3l*后发现可以显著缓解胎鼠睾丸发育损伤。基于孕期镉暴露损害胎鼠睾丸发育的小鼠模型,我们还发现胎盘m6A修饰水平在镉暴露后显著增加。为了进一步探究镉暴露是否通过促进m6A修饰激活胎盘内质网自噬,我们给予镉暴露组的孕鼠METTL3和METTL14抑制剂S-腺苷同型半胱氨酸(SAH)处理。SAH处理显著逆转镉诱导的胎盘内质网自噬激活、胎盘雌激素合成抑制和胎鼠睾丸增殖抑制。人群病例对照研究结果进一步证实,相较于适于胎龄儿,小于胎龄儿胎盘中内质网自噬激活和雌激素合成抑制。**结论** 环境镉暴露通过促进m6A修饰激活胎盘内质网自噬以阻断胎鼠睾丸E2/ER信号,进而抑制胎鼠睾丸发育。

通讯作者:朱华龙,E-mail: zhuhualongdev@126.com;王 华,E-mail: wanghuadev@126.com

T02-0017

m⁶A 修饰在砷诱导胰岛β细胞毒性损伤中的作用李荣仙^{1,3}, 杨杰², 袁家敏^{1,3}, 谷仕艳^{1,3*}

(1. 大理大学公共卫生学院; 2. 大理大学工程学院; 3. 大理大学预防医学研究所; 云南 大理 671000)

摘要:目的 探讨N⁶-甲基腺苷(m⁶A)修饰在砷诱导胰岛β细胞毒性损伤中的作用,为今后从表观遗传学层面开展砷毒性的防治研究提供理论基础和方向。方法 以不同浓度亚砷酸钠(0 μmol/L、8 μmol/L、16 μmol/L、32 μmol/L)处理小鼠胰岛素瘤细胞(NIT-1细胞)24 h后,以CCK8法检测细胞存活率,硫代巴比妥酸法检测细胞丙二醛(MDA)含量,WST-8法检测细胞内超氧化物歧化酶(SOD)活性,m⁶A检测试剂盒检测细胞总m⁶A水平。利用20 μmol/L m⁶A激动剂恩他卡朋(ENT)单独或联合亚砷酸钠处理细胞,探讨m⁶A修饰水平改变对亚砷酸钠损伤胰岛β细胞的影响。结果 经0 μmol/L、8 μmol/L、16 μmol/L、32 μmol/L的亚砷酸钠处理后,细胞存活率分别为100%、73.75%、47.14%、42.38%,呈浓度依赖性降低($P<0.05$);MDA含量分别为8.16 nmol/mg protein、14.44 nmol/mg protein、20.30 nmol/mg protein和24.92 nmol/mg protein;SOD酶活力分别为1.40 U、0.94 U、0.66 U和0.73 U。与对照组相比,亚砷酸钠暴露显著增加了细胞MDA含量($P<0.05$),降低了SOD酶活力($P<0.05$)。8 μmol/L、16 μmol/L、32 μmol/L亚砷酸钠处理后,细胞总m⁶A水平呈上升趋势,分别为对照组的1.39倍、1.53倍和1.59倍($P<0.05$)。激动剂ENT单独处理对细胞存活率、MDA含量、SOD酶活力无明显影响($P>0.05$),细胞总m⁶A水平略有升高,但差异无统计学意义($P>0.05$)。ENT和亚砷酸钠联合处理后,显著加剧了亚砷酸钠诱导的细胞存活率降低,MDA含量升高和SOD酶活力下降($P<0.05$)。此外,与亚砷酸钠单独处理组相比,ENT和亚砷酸钠联合处理后细胞总m⁶A水平明显升高($P<0.05$)。结论 砷暴露可能通过升高m⁶A修饰水平,进而调控氧化损伤水平,最终引起胰岛β细胞存活率下降。

关键词: N⁶-甲基腺苷; 亚砷酸钠; 胰岛β细胞; 毒性损伤**作者简介:** 李荣仙, E-mail: lx13578002057@163.com**通讯作者:** 谷仕艳, E-mail: ygsy727@163.com

T02-0018

m⁶A 修饰调控蛋白及铁死亡在镉联合高糖高脂致雄性小鼠生殖毒性中的变化研究刘德^{1,3}, 杨杰², 谷仕艳^{1,3*}

(1. 大理大学公共卫生学院; 2. 大理大学工程学院; 3. 大理大学预防医学研究所; 云南 大理 671000)

摘要:目的 探讨镉和高糖高脂联合暴露致雄性小鼠生殖毒性过程中,m⁶A修饰调控蛋白及铁死亡信号分子的变化规律。方法 8周龄雄性C57BL/6J小鼠经适应性饲养1周后,随机分成6组:正常空白组(正常饮水+普通饲料)、镉组(50、100和200 mg/L CdSO₄饮水暴露+普通饲料)、高糖高脂组(正常饮水+高糖高脂饲料)和联合暴露组(200 mg/L CdSO₄饮水暴露+高糖高脂饲料),自由饮水暴露18周后,计算脏器系数,检测精子数量、精子活力和精子畸形率;HE染色观察睾丸组织病理变化,比色法检测睾丸组织MDA、GPx和亚铁离子含量;应用蛋白免疫印迹法检测细胞内铁死亡信号分子(SLC7A11、GPX4和GCLC)以及m⁶A修饰调控蛋白(YTHDC2、YTHDF2、METTL3、FTO和ALKBH5)的表达水平。结果 在对照组、50 mg/L CdSO₄组、100 mg/L CdSO₄组、200 mg/L CdSO₄组、高糖高脂组和联合暴露组中,各处理组与对照组相比,精子数量显著下降($P<0.05$),精子畸形率显著上升($P<0.05$);200 mg/L CdSO₄组、高糖高脂组和联合暴露组的精子活力分别为59.38%、70.25%和48.00%,与对照组(92.00%)相比显著降低($P<0.05$);睾丸组

织内 Fe²⁺含量分别为 265.74、202.93、291.46 μmol/kg wet weight, 与对照组(95.85 μmol/kg wet weight)相比显著上升($P<0.05$); 在各组睾丸组织中 MDA 含量分别为 1.62、2.40、3.10、3.28、2.89 和 3.59 nmol/mg protein; m⁶A 水平分别为 0.09%、0.11%、0.11%、0.12%、0.13% 和 0.14%; 与对照组相比, 各处理组睾丸组织中的 MDA 含量($P<0.05$)和 m⁶A 水平($P<0.05$)均显著上升; GPx 未见明显变化($P>0.05$)。在 200 mg/L Cd-SO₄组、高糖高脂组和联合暴露组中, m⁶A 调控蛋白 METTL3 的蛋白表达水平分别为对照的 0.85、0.79 和 0.63 倍($P<0.05$), FTO 的蛋白表达水平分别为对照组的 0.75、0.74 和 0.66 倍($P<0.05$), YTHDF2 和 ALKBH5 的蛋白表达水平仅在联合暴露组中显著下降, 为对照组的 0.86 倍($P<0.05$)和 0.88 倍($P<0.05$), 而 YTHDC2 未见明显变化($P>0.05$); 铁死亡调控蛋白 SLC7A11 在各组间均出现上升趋势, 为对照组的 1.78、1.74、1.50、2.08 和 1.77 倍($P<0.05$), 而 GPX4 和 GCLC 未见明显变化($P>0.05$)。结论 镉和高糖高脂联合暴露可能通过降低 m⁶A 调控蛋白水平, 引起亚铁离子增加和 MDA 产生, 进而激活铁死亡信号通路轴 SLC7A11/GPX4 的传导, 损伤睾丸发育和精子发生, 最终引起生殖毒性。

关键词: 镉毒性; 高糖高脂; m⁶A; 铁死亡; 雄性生殖毒性

作者简介: 刘 德, E-mail: amzoiald@163.com

通讯作者: 谷仕艳, E-mail: ygsy727@163.com

T02-0019

多金属复合暴露对认知功能的影响及 DNA 甲基化的中介研究

韦 悦¹, 周艳凤¹, 肖丽丽¹, 覃 健¹, 程 红¹, 蔡海青¹, 陈 星¹, 邹云锋¹, 杨 莉¹, 张海英¹,
张志勇², 杨晓波^{1*}

(1. 广西医科大学公共卫生学院职业卫生与环境卫生系, 南宁 530021;

2. 桂林医学院公共卫生学院职业卫生与环境卫生系, 桂林 541100)

摘要:目的 环境金属暴露与认知功能密切相关, 然而有毒金属和有益的微量金属元素混合暴露对认知功能的影响及其作用机制尚不清楚。本研究旨在鉴定与认知功能相关的关键金属元素, 探究该金属暴露的全基因组水平 DNA 甲基化特征及潜在的中介作用, 并探讨基因-环境交互作用对 DNA 甲基化的影响。方法 采用横断面研究设计, 研究对象来自广西红水河老年健康队列 155 名老年人, 通过 HumanMethylationEP-IC 芯片测定其 DNA 甲基化水平, 采用电感耦合等离子体质谱联用仪测定血细胞金属浓度。认知功能采用简易智能精神状态检查量表进行评价, 评分越高认知功能越好。首先, 采用广义线性回归、兰索回归(LASSO)和贝叶斯核机器回归(BKMR)模型, 分析砷、铅、镉、铜、锰和锌单一暴露和复合暴露与认知功能的关联。其次, 通过表观基因组和中介分析, 发现关键金属相关的差异甲基化位点(DMPs)及其介导效应。最后, 对于同时与认知功能有关联的金属相关 DMPs, 分析其所在染色体上所有 SNP 位点与金属的交互作用对该 DMPs 甲基化水平的影响。结果 血砷与认知功能呈负向关联($\beta = -1.47, 95\% \text{ CI}: -2.57, -0.37$), 并主导了 6 种金属混合物对认知功能的整体负效应($\text{PIP} = 0.817$)。全基因组 DNA 甲基化分析发现 73 个与血砷浓度相关的 DMPs 位点($P < 1 \times 10^{-5}$), 其中, 15 个 DMPs 位点经多重校正后仍有统计学意义($\text{FDR} < 0.05$)。中介分析结果显示 cg05226051(位于 TDRD3 基因)和 cg18886932(位于 GAL3ST3 基因)位点的甲基化水平分别介导了 24.8% 和 25.5% 血砷与认知功能间的关联性($P < 0.05$)。此外, 交互作用分析发现 102 个 SNP 位点多态性与血砷的交互作用与 cg05226051 位点甲基化水平的关联具有统计学意义($\text{FDR} < 0.05$)。结论 血砷浓度升高增加老年人认知功能受损风险, 血砷相关的 DNA 甲基化位点的甲基化水平可在其中发挥介导作用, 且砷暴露的表观遗传机制可能受遗传变异影响。后续尚需大型前瞻性队列和实验研究来验证和进一步阐明其潜在机制。

关键词: 多金属复合暴露; 认知功能; DNA 甲基化; 基因-环境交互

通讯作者: 杨晓波, E-mail: yangx@gxmu.edu.cn

T02-0020

胚胎期强的松暴露所致斑马鱼骨发育毒性的作用特征及分子机制

王佳琪^{1,3}, 上官杨帆^{1,3}, 龙飞^{1,3}, 汪晖^{2,3*}, 陈廖斌^{1,3*}

(1. 武汉大学中南医院骨科关节外科与运动医学科, 武汉 430071; 2. 武汉大学基础医学院药理学系, 武汉 430071; 3. 发育源性疾病湖北省重点实验室, 武汉 430071)

摘要:目的 强的松作为合成类糖皮质激素, 临床已广泛应用于妊娠期母体自身免疫性疾病等的治疗。然而, 研究提示孕期内、外源性糖皮质激素高暴露均可导致子代骨、软骨发育不良及相关疾病易感。本研究拟基于斑马鱼模型, 探讨强的松对胚胎期骨发育的影响、作用特征及发生机制。方法 通过低(10 μ M)、中(50 μ M)、高(250 μ M)浓度强的松全胚胎期(0-72 hpf)、250 μ M强的松胚胎早/晚期(0-36/36-72 hpf)两种暴露方式, 构建胚胎期强的松暴露(embryonic prednisone exposure, EPE)的斑马鱼模型, 分别于4、16 dpf获取斑马鱼整鱼。检测4、16 dpf斑马鱼成骨形态及功能发育相关基因mRNA表达, 评估骨形态和功能发育情况及相关通路表达改变。同时进行4 dpf全鱼mRNA测序, 筛选并进一步验证骨发育相关关键分子靶标。结果 EPE可致斑马鱼体节身体、头部长度缩短, 眼部、头部面积缩小, 鳃盖骨矿化面积及椎体骨矿化减少, 骨组织发育关键标志与功能基因Runx2b、Osterix、Col1a1a、BGLAP的mRNA表达降低。这些作用存在良好的时-效和量-效关系, 以高浓度、胚胎晚期、发育近期改变较为明显, 并可持续至发育远期。进一步实验证实, GR/HDAC6信号活化通过表观遗传调控POSTN β /Wnt/ β -catenin信号通路介导了强的松所致的成骨分化抑制。结论 EPE可导致整体和骨发育不良, 并存在浓度、时期和组织差异性。整体发育毒性尤以高浓度、胚胎晚期、发育近期为重。骨、软骨发育毒性尤以高浓度、胚胎晚期、发育近期、骨组织为重。其成骨分化抑制发生机制为: 强的松诱导活化GR入核并募集HDAC6, 结合于POSTN β 启动子区抑制其表达, 降低Wnt/ β -catenin信号通路活性及Runx2b表达, 抑制成骨分化, 导致骨发育不良。

关键词:强的松; 斑马鱼; 骨发育; 表观遗传修饰; POSTN β

基金项目:国家重点研发计划“发育编程及其代谢调节”重点专项(2020YFA0803900)

作者简介:王佳琪, 男, 医学博士研究生, 主要从事骨关节疾病研究, E-mail: 418866424@qq.com

通讯作者:陈廖斌, 男, 医学博士, 主任医师, 二级教授, 博士生导师, 主要从事骨关节病研究, E-mail: lb-chen@whu.edu.cn; 汪晖, 女, 医学博士, 二级教授, 博士生导师, 主要从事外源物发育毒理研究, E-mail: wanghui19@whu.edu.cn

T3-0001

Association of serum per- and polyfluoroalkyl substances with anemia in adults

Abstract: Background Previous studies have reported a stronger association between PFAS and Hb than red blood cells, suggesting that Hb is more susceptible to PFAS. However, there is currently limited evidence on the effects of perfluoroalkyl substances and polyfluoroalkyl substances (PFASs) on anemia in adults. Therefore, it is important to explore the effects of PFASs on anemia in non-pregnant adults. **Objective** To explore the effect of serum perfluoroalkyl substances (PFAS) and dietary live microbes on the anemia in adults with data from the National Health and Nutrition Survey (NHANES) database. **Methods:** Non-pregnant adults (≥ 20 years) ($n=3,698$) were recruited. We determined the association between PFAS exposure and anemia in individuals with a binary logistic regression model and a mediating analysis was used to assess the role of dietary live microbes in PFAS exposure to anemia. **Results** After the full adjustment for confounders, PFAS may be a protective factor

for anemia (OR: 0.8673, 95% CI: 0.7719, 0.9746, and $p=0.0185$). The P-value was 0.0299 and OR (95%CI) was 0.2962 (0.0996, 0.8802) for anemia with multifactor logistic regression analysis, indicating a protective factor (PFDO). Grams Lo was the protective factor for anemia with the full adjustment for confounders, and P-value was <0.0001 , OR (95% CI) was 0.9998 (0.9996, 0.9999). But no significant association with anemia was detected between the other dietary live microbe groups and PFAS groups. **Conclusions** PFHS, PFDO, Grams Lo are negatively correlated with anemia and may be protective factors for anemia. In addition, further research is needed on the potential mechanisms that may involve the association between participants' exposure to PFASs, dietary live microbes and anemia.

Key words: anemia; perfluoroalkyl substances; dietary live microbes

T3-0003

生成式人工智能技术在未知物鉴定中的应用展望

刘语薇, 张煜轩, 王浩博, 解怀君, 陈景文*

(工业生态与环境工程教育部重点实验室, 大连市化学品风险防控及污染防治技术重点实验室,
大连理工大学环境学院, 大连 116024)

摘要:揭示环境中未知物结构,有助于识别潜在污染物。靶向分析广泛用于化学结构分析,但其依赖标准品,仅能识别数量有限的目标化合物,难以鉴定未知物。非靶向分析借助质谱库匹配,可以不依赖标准品,高通量识别化合物。然而,质谱库中涵盖的化合物有限,限制了非靶向分析的化学鉴定空间。传统机器学习技术通过关联质谱数据和化学结构特征,将非靶向分析覆盖的化学空间进一步拓展至已知结构数据库,但对数据库未能覆盖的未知结构仍然难以识别。

生成式人工智能技术(如:分子生成模型)可学习已知化学结构的分布,生成满足特定约束条件的新结构。利用生成模型,基于隐含未知物结构信息的仪器分析数据(如:质谱数据),定向生成候选结构,或为具有特殊属性/结构的未知物生成新颖的疑似清单,可突破现有数据库限制,进一步扩大鉴定范围。

主流的分子生成模型包括变分自编码器(VAE)、循环神经网络(RNN)和生成对抗网络(GAN)。根据目标和模型的特点,可灵活组合各类生成模型。例如,在质谱-分子结构的生成中,可采用VAE与GAN结合的策略,利用VAE的编码器将分子结构映射为潜在向量,作为GAN中判别器的标签,以训练GAN生成器学习质谱数据与潜在向量的关系。结合生成器与VAE的解码器,可将质谱数据转化潜在向量并解码为分子结构,实现基于质谱从头生成分子结构。

尽管在其他领域,分子生成模型已有一定研究,但利用其识别未知物的研究仍然不足。在训练数据可用性、重现性,生成策略设计,模型评价体系的完备性、可靠性等方面,仍存在众多挑战。迁移学习、数据增强、多模态数据处理等技术为解决训练数据缺乏、改善数据质量提供了支持。综合考虑生成目标、数据情况、算法特点妥善选择生成策略是有效训练模型的前提。除有效性、唯一性、新颖性外,有必要提出可准确描述生成分子在环境中存在趋势的指标,以评价生成模型以及筛选候选结构。

关键词:分子生成模型; 结构生成; 疑似筛查; 非靶向分析

基金项目:国家重点研发计划(2022YFC3902100);国家自然科学基金(22136001)

通讯作者:陈景文, E-mail: jwchen@dlut.edu.cn

T3-0004

化学品 hERG 阻滞效应的图神经网络筛查模型

张煜轩, 陈景文*

(工业生态与环境工程教育部重点实验室, 大连市化学品风险防控及污染防治技术重点实验室,
大连理工大学环境学院, 大连 116024)

摘要:人类 *ether-a-go-go* 相关基因 (hERG) 编码的钾离子通道在心室动作电位中具有重要作用。阻滞 hERG 钾离子通道, 可导致心脏动作电位 QT 间期延长, 进而导致心律失常, 甚至心源性猝死。因此, 在化学品 (包括药物) 进入市场之前, 确定潜在的 hERG 阻滞剂至关重要。仅依靠活体动物 (*in vivo*) 和体外 (*in vitro*) 测试难以满足众多化学品心脏毒性评价的需求。定量结构-活性关系和机器学习等计算预测方法 (*in silico*), 可高效、低成本地筛查潜在的 hERG 阻滞剂。

存在若干限制 hERG 阻滞剂筛查模型发展的问题。首先, 已构建模型依赖于药物的 hERG 阻滞效应数据, 很少考虑环境化学品和天然产物等其它类别化学品相关数据, 限制了模型的预测性能和泛化能力。其次, 大多数研究仅采用一种分子表示方法 (如分子指纹或分子图) 来构建模型, 导致其无法全面学习化学品结构特征, 阻碍了模型预测精度的进一步提升。再者, 以往的模型大都缺乏应用域 (AD) 表征, 难以界定模型是否能够可靠筛查潜在的 hERG 阻滞剂, 限制了其在化学品管理实践中的应用。

本研究构建了一个涵盖多种类别化学品、具有更广泛化学结构空间的 hERG 阻滞效应数据集, 通过融合分子图 (MG) 和分子指纹 (MF) 特征, 开发了筛查 hERG 阻滞剂的图注意力网络 (GAT) 筛查模型。基于 MG 和计数扩展连通性指纹 (CMF) 融合特征所构建的 GAT 模型 (MG-CMF-GAT), 在验证集上的平均受试者工作曲线下面积 (A_{ROC}) 达 0.950, 优于以往的 hERG 阻滞剂筛查模型。采用基于构效关系形貌 (SAL) 的应用域表征方法 (AD_{SAL}), 定义了最优 MG-CMF-GAT 模型的应用域。随着 AD_{SAL} 条件愈发严格, MG-CMF-GAT 预测模型的验证集 A_{ROC} 呈上升趋势 (最高达 0.998), 证实了 AD_{SAL} 在表征模型适用范围和提升模型性能方面所发挥的功能性。所开发的化学品 hERG 阻滞效应 GAT 模型, 结合 AD_{SAL} 应用域, 可作为筛查潜在 hERG 阻滞剂的高效工具。

关键词: 心脏毒性; 融合特征; 深度学习; 应用域

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFC3902100); 国家自然科学基金 (22136001)

通讯作者: 陈景文, E-mail: jwchen@dlut.edu.cn

T3-0005

化学品直接光转化速率常数的多条件建模预测

何家乐, 陈景文*

(工业生态与环境工程教育部重点实验室, 大连市化学品风险防控及污染防治技术重点实验室,
大连理工大学环境学院, 大连 116024)

摘要: 化学品是水环境中新污染物的重要来源, 光化学转化是其在表层水体中重要去除途径, 直接光转化速率常数 (k_d) 是评价其环境暴露行为的重要参数。测定化学品 k_d 耗时耗力, 缺乏标准品。而现有预测模型未能考虑环境条件影响, 泛化能力差, 应用域小。有必要通过多条件建模方法, 将环境条件编码为输入特征, 构建应用域广, 预测能力强的 k_d 预测模型。

收集了 298 种商业化学品的 1361 条 k_d 值, 及相应环境条件 (光源、溶剂、化学品初始浓度与温度)。编码环境特征, 并与分子结构特征结合, 基于极端梯度提升树 (XGBoost) 等机器学习算法, 构建了 k_d 的多条件预测模型。为了表征多条件模型的应用域, 对现有的基于构效关系形貌 (SAL) 的应用域表征方法 (AD_{SAL}) 进行了拓展, 将计算相似性密度 (ρ_s) 和加权崎岖性 (IA) 的依据, 由分子结构相似性改为了特征相似性。

结果表明,以 MACCS 指纹结合环境特征的 XGBoost 模型效果最优,十折交叉验证决定系数为 0.78,测试集决定系数为 0.80。对最优模型进行了应用域表征,验证了所拓展应用域表征方法的有效性。本研究构建的化学品多条件 k_0 预测模型,可为源头防范化学品成为新污染物提供基础性技术工具,为化学品环境风险评估、健全化学品管理提供支持。

关键词: 化学品; 直接光转化速率常数; 多条件建模; 应用域

基金项目: 国家自然科学基金项目(22136001); 国家重点研发计划项目(2022YFC3902100)

通讯作者: 陈景文, E-mail: jwchen@dlut.edu.cn

T3-0006

基于多任务学习的化学品性质预测

肖子君, 朱明华, 陈景文*

(工业生态与环境工程教育部重点实验室, 大连市化学品风险防控及污染防治技术重点实验室,
大连理工大学环境学院, 大连 116024)

摘要: 化学品的性质参数与环境行为参数对环境暴露评价十分重要, 但有实验值的化学品数量少, 难以满足化学品风险评价需求。因而有必要发展机器学习模型预测相关参数以填补数据空缺。传统机器学习模型多为单任务(ST)模型, 忽略了任务间联系, 模型准确性低。多任务(MT)模型可以通过共享机制同时学习到多个相关终点的信息, 提升模型的准确性。因此, 本研究基于化学品溶质参数数据集与生物蓄积性参数数据集, 探索了 MT 模型在小数据建模上的应用。

本研究构建了基于显式氢的分子图和注意力权重的多任务关系型图卷积神经网络(MT-RGAN-H)模型, 实现同时预测五个溶质参数[过量分子摩尔折射率(E)、分子偶极/极化性参数(S)、氢键酸度(A)、氢键碱度(B)和正十六烷-空气分配系数的对数值(L)]。

本研究还发展了结合迁移学习和多任务学习的图神经网络(TL-MTL-GNN)模型。该模型以化学品的正辛醇水分配系数作为源域, 三种生物蓄积性参数作为目标域, 实现了对三种生物蓄积性参数[生物富集因子(F_{BC})、生物放大因子(F_{BM})和生物积累因子(F_{BA})]的同时预测。

MT-RGAN-H 在参数 E , S , A , B 和 L 的验证集上的决定系数(R^2_{val})分别为 0.97, 0.92, 0.84, 0.96 和 0.98, 优于单任务模型和前人模型。进一步, 基于 MT-RGAN-H 模型预测的溶质参数预测了化学品的六种与分配相关的理化性质参数, 其预测准确性高于前人模型。

TL-MTL-GNN 对 $\log F_{BC}$, $\log F_{BM}$ 和 $\log F_{BA}$ 的 R^2_{val} 分别为 0.732, 0.739 和 0.846, 优于单任务模型和前人模型。进一步将 TL-MTL-GNN 应用于预测约 106 个化学品的生物蓄积性。共 58392 种化学品在模型应用域内, 其中约 22.6% 的化学品被判定为具有生物蓄积性。

两种 MT 模型在预测不同重点上效果均优于 ST 模型, 表明 MT 模型可在小数据集建模方面发挥作用。且模型涵盖化学品种类全面, 应用域广, 预测准确性高, 可以为预测化学品的分配行为参数提供支撑。

关键词: 溶质参数; 生物蓄积性; 图神经网络; 多任务学习

基金项目: 国家自然科学基金项目(22136001); 国家自然科学基金项目(22206022); 国家重点研发计划项目(2022YFC3902100)

通讯作者: 陈景文, E-mail: jwchen@dlut.edu.cn

T3-0007

基于机器学习与分子模拟的内分泌干扰物预测在线服务器 EDC Profiler

崔世璇, 邱 语, 庄树林*

(浙江大学环境与资源学院, 杭州 310058)

摘要:目的 内分泌干扰物(Endocrine disrupting chemicals, EDCs)通过模拟或拮抗内源激素,与核受体(Nuclear Receptors, NRs)相互作用,从而破坏生物体内分泌系统的正常功能,引发激动或拮抗效应,导致健康风险。本研究针对 EDCs 筛查,拟从化合物对 NRs 的干扰效应出发,建立化合物分子描述符和 NRs 结合亲和力的融合特征,采用多种机器学习算法构建 NRs 干扰效应预测模型,开发 EDCs 预测在线服务器。**材料和方法** 基于 PubChem、NURA、DrugBank 等数据库,搜集整合化合物针对芳香烃受体、雌激素受体、雄激素受体、甲状腺激素受体等 16 种 NRs 的内分泌干扰效应数据。采用化合物的 RDKit 分子描述符和批量分子对接获取的 NRs 结合亲和力构成融合特征,基于随机森林、支持向量机、XGBoost 等多种机器学习算法构建预测模型,采用准确率、精确率、召回率等多指标评估模型的稳健性及预测能力,通过网格调参筛选最优模型。采用 SHAP 分析模型特征重要性,进一步采用核密度函数构建模型应用域评价模型泛化能力。基于 Vue 与 SpringBoot 组合框架将最优模型与 ESC 云服务器嵌入,开发 EDCs 预测在线服务器。**结果与结论** 采用随机森林和 XGBoost 算法构建的模型具有最优稳健性及预测能力,预测准确率和 F1 分数分别为 0.727 ~ 0.978、0.709 ~ 0.979,构建应用域有效提升模型对应用域内化合物的预测准确性和精确性。模型 SHAP 分析揭示化合物的电性、范德华表面积、脂溶性、结合亲和力与 NRs 干扰效应存在内在关联。基于 Vue 与 SpringBoot 组合框架设计了简洁友好的前端交互界面,构建了稳定高效的后端服务程序,开发了 EDCs 预测在线服务器(<http://datascihub.net/service/EDCProfiler>),为 EDCs 的快速准确筛查提供实用工具。通过在线预测服务器对 EDCs 清单进行了高通量筛查,识别了 104 种化合物的 NRs 干扰效应,证明在线服务器的高可靠性与强实用性。

关键词:计算毒理学;机器学习;分子模拟;内分泌干扰物;在线服务器

T3-0008

基于机器学习的 N-亚硝胺共暴露对小鼠血清代谢谱的影响

张 虎*

(扬州大学公共卫生学院, 江苏 扬州 225009)

摘要:目的 N-亚硝胺作为重要的环境致癌物质,在消化系统肿瘤的环境暴露致癌过程中发挥了重要作用。亚硝胺作为环境致癌物影响了宿主细胞某些基因的表达,诱导基因调控异常,导致 DNA 烷基化损伤的积累并导致致癌作用。目前有关于 N-亚硝胺共暴露致癌过程中的毒性作用机制研究较少,本研究基于代谢组学技术初步探讨亚硝胺暴露对小鼠的血清代谢谱的变化,探讨其产生毒性效应可能的作用机制。**方法** 采用随机分组方式将 20 只 SPF 级 ICR 小鼠分为对照,低,中,高四组,每组 5 只。采用灌胃的方法给予小鼠 0, 7.5 ng/kg, 3 μ g/kg, 1.2 mg/kg 剂量的九种饮用水中常见 N-亚硝胺混合物(NDEA、NDMA、NMOr、NDBA、NDpH、NMEA、NPip、NPyr、NMBA)持续 60 天,利用超高液相色谱-质谱(UHPLC-MS/MS)技术结合主成分分析(PCA),偏最小二乘分析(OPLS-DA)等方法对小鼠血清数据进行分析,鉴定出潜在生物标记物,通过 VIP 及非参数检验筛选差异代谢物;运用 HMDB 数据库对差异性代谢物进行拓扑分析,并通过 MetaboAnalyst 5.0 数据库分析其代谢通路。**结果** 在正、负离子模式下共筛选鉴定出 134 种内源性差异代谢物。与对照组相比,磷脂酰胆碱,棕榈酰肉碱,亚油酸,棕榈酸,二十二碳五烯酸,二十二碳六烯酸,硬脂酸等脂质代谢物在低、中、高浓度的亚硝胺暴露组中发生不同程度的显著性改变,可能作为亚硝胺暴露的潜在效应标志物。代谢通路富集结果显示亚硝胺暴露可引起小鼠血清亚油酸代谢,甘油磷脂代谢,鞘脂代谢,不饱和脂

肪酸的生物合成, α -亚麻酸代谢等代谢通路紊乱。结论 N-亚硝胺共暴露可引起小鼠血清脂质代谢通路紊乱, 具体毒性作用机制有待进一步研究验证。

关键词: N-亚硝胺; 血清; 代谢组学; 脂质代谢

基金项目: 扬州大学“青年百人”人才引进项目(137013326); 中国博士后面基金项目(2024M752726)

通讯作者: 张 虎, E-mail: zhanghu@yzu.edu.cn

T3-0009

基于机器学习的非靶向和靶向代谢组学联合揭示了宫颈癌中类固醇脂质、 咖啡因和维生素D的异常代谢

刘浩瀚, 王适之*

(Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering, Ministry of Education,
School of Public Health, Southeast University, Nanjing, China)

摘要:目的 基于UHPLC-Orbitrap-HRMS系统, 描绘宫颈癌(CC)患者的代谢变化景观, 建立靶向检测方法进行验证, 并基于多种机器学习方法对靶向代谢数据进行挖掘, 开发预测模型。方法 选取CC患者232例及对照204例血浆样本, 将其分为database1 ($N = 236$)和database2 ($N = 200$)两组。对database1中的参与者进行高分辨代谢物非靶相代谢组筛查, 分析差异代谢通路及筛选代谢分子标志物。建立了一套完整的标志物前处理及液质联用检测方法, 在匹配后的database2中利用Waters Xevo TQ系统进行靶向验证。并且利用靶向数据将参与者随机分配到训练集(75%)和测试集(25%), 使用R包“mlr3”“rmda”等, 建立九种常见的机器学习算法(k-NN, SVM, RF, DT, GBM, Adaptive Boosting, NB, GLM, LDA)建立CC诊断模型, 进行多模型比较, 同时通过交叉验证和性能评估如F1分数、准确度、特异度、敏感度和决策曲线(DCA)等来确保模型的泛化能力, 最终为临床决策提供更可靠的支持。结果 我们通过来自更大CC病例对照人群的生物样本database1的非靶向代谢组学分析结果确定了208个差异代谢分子。通过多种数据库的富集分析, 揭示了脂质代谢中的类固醇脂代谢的显著变化在CC代谢重编程中的重要作用。随后我们筛选了8种关键的代谢分子标志物testosterone sulfate, cortisol, estrone glucuronide, 5-hydroxyindoleacetic acid, androstenedione, paraxanthine, theobromine, calcitriol, 并且建立了完善的靶向代谢物液质联用检测方法, 在另外的database2人群中进行验证。其验证结果发现代谢分子的表达趋势与非靶代谢组学的分析结果保持了一致, 提示我们的结果有较好的稳定性。我们发现, 在database1和database2学的两组人群数据中均观察到calcitriol、paraxanthine和theobromine的表达水平显著下降, 暗示咖啡饮用、维生素D补充等一级预防方式在预防CC中的重要潜在作用。进一步地, 我们通过比较不同机器学习建模方法, 确定利用RF算法开发了一个基于4种代谢标志物的CC预测诊断模型, 验证其灵敏度为0.884, 具有较好的预测性能。为代谢组学在CC筛查、治疗和预防中的应用提供了理论基础。结论 性类固醇激素如雌激素在CC中发挥非常重要的作用, 且可能存在多种调控机制影响, 目前环境中存在多种可发挥雌激素作用的新污染物, 如多氯联苯、邻苯二甲酸酯、有机磷农药、双酚A等环境雌激素类污染物都正广泛影响着人类的生活。我们的研究从代谢重编程的角度揭示了类固醇在CC中的重要作用, 为环境雌激素污染物在CC中的健康效应研究补充了理论基础。同时我们开发了基于血浆的非侵入性生物标志物的机器学习预测模型, 从而以尽可能小的代价(20 μ L血浆), 简便精确的进行早期检测识别。总之, 我们的研究为环境与CC相互作用的研究补充了代谢层面的新见解和理论基础。

通讯作者: 刘浩瀚, E-mail: liuhaohan@seu.edu.cn

T3-0010

开展人工智能评估和预测环境中化学物的毒性

姜允申

(南京医科大学毒理学系, 南京 210029)

摘要:本文介绍了现代人工智能 Artificial Intelligence (AI) 技术评估和预测环境中化学物毒性的方法。人工智能自上个世纪 50 年代有了显著发展, 到 21 世纪因深度学习有突破性进展, 使 AI 技术广泛应用到许多领域。当今世界已进入数字经济时代, 因大数据与计算能力的提升, 大大方便了我们对化学物的毒性评价与预测, 今后随着人工智能技术的发展, 计算方法的精准, 会使评价结果更准确。

T4-0001

高灵敏的可视化汞细菌生物传感器的研制及应用

朱凯丽¹, 陈少鹏^{1,2*}

(1. 中国科学院合肥物质科学研究院, 合肥 230031; 2. 皖南医学院, 芜湖 241002)

摘要:汞(Hg)是一种全球性的有毒污染物, 痕量的汞就可以通过食物链富集对人类健康构成巨大威胁。因此, 快速有效地检测汞污染是应对汞健康风险的重要手段。大型分析仪器是汞检测的主要工具, 但昂贵复杂的检测阻碍了对汞污染更实时广泛的检测。细菌生物传感器由于其操作简便、成本低等优点引起研究人员的广泛关注。细菌生物传感器由感应元件与报告元件构成。感应元件与目标物发生相互作用后, 产生可以检测的信号, 以此实现对待测物质的定性或定量检测。目前, 生物传感器已经被广泛应用于众多领域。但在环境监测中由于野生型传感元件灵敏度低和特异性差等问题很大程度上限制了其实际应用。

为了克服野生型汞生物传感器的问题, 我们采用定向进化的方法对野生型汞细菌生物传感器的性能进行改造。以汞响应蛋白(Mercury-responsive transcriptional activator, MerR)为感应元件, 绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)为报告元件, 我们构建了非耦合双启动子野生型汞细菌生物传感器; 接着运用易错 PCR 的方法对 MerR 编码基因引入随机突变, 构建库容量达 10^7 突变体库; 再结合流式细胞分选技术进行对突变体库高通量筛选。四轮定向进化后筛选到一株性能更优的 m4-1 突变体生物传感器。

将进化前后的汞细菌生物传感器进行性能验证和对比分析后发现, 进化后的 m4-1 传感器在诱导 1 小时后即可对 ppt 量级的 Hg^{2+} 响应。m4-1 传感器的灵敏度相较于野生型传感器提升了 115 倍, 检测限由 0.036 $\mu g/L$ 下降到 313 pg/L , 甚至与某些大型分析仪器相当。此外, m4-1 生物传感器对有机汞也产生响应信号(甲基汞检测限达到 98 ng/L)。

为了解决突变体 m4-1 传感器在检测中对流式细胞仪、酶标仪等仪器的依赖, 我们进一步开发了可视化的检测方法, 在 m4-1 检测系统的基础上增加了一个绿色荧光蛋白报告模块, 并优化了 5' 非翻译区(5' UTR) 序列。mRNA 的 5' UTR 区域是基因表达的潜在调控元件, 目前尚没有在细菌传感器中应用的报道。我们分别使用了两种 5' UTR 序列, 产生了两个荧光输出更强的可视化细菌生物传感器 2GM 和 2GC, 他们的荧光信号均可以用肉眼观察。结合手机成像和图像处理软件, 2GC 细菌生物传感器可对实际样品进行简单、快速、可靠的定量和定性分析(检测限为 307 pg/L)。我们使用进化后的细菌生物传感器对海产品、土壤、矿石、小鼠等进行实际样品检测, 结果和原子荧光光谱法(AFS)检测结果非常接近。综上所述, 本研究采用定向进化与逻辑电路设计相结合的策略, 开发了超灵敏的可视化的汞细菌生物传感器, 为环境中汞污染的风险评估提供了一种新型、简便、廉价的检测方法。

关键词:细菌生物传感器; 汞响应蛋白; 定向进化; 5' 非翻译区; 可视化

通讯作者:陈少鹏, E-mail: 20200080@wnmc.edu.cn

T4-0002

纳米微塑料暴露诱导小鼠肝脏毒性的转录特征谱分析

胡利, 车琳*

(华南恶性肿瘤防治全国重点实验室, 中山大学肿瘤防治中心, 广州 510060)

摘要:目的 微塑料(MPs)作为一种新兴环境污染物,其暴露所导致的健康风险,已成为当前毒理学领域的焦点议题。其中,纳米微塑料(NPs)因其较大的表面积/体积比,具有较强的细胞渗透和组织破坏能力。然而,NPs暴露诱导肝细胞毒性损伤的转录特征谱和毒性机制尚未阐明。因此,本研究旨在采用NPs暴露诱导小鼠肝脏损伤模型,阐明NPs暴露对肝脏转录谱的影响及其潜在毒作用机制。**材料和方法** 采用C57BL/6J小鼠建立NPs小鼠饮水暴露(8周)模型;苏木精-伊红染色(HE)观察肝组织病理学形态;采用转录组学技术表征NPs暴露肝脏细胞的转录特征谱,生物信息学分析NPs暴露相关肝毒性通路的富集情况,以期筛选NPs诱导肝细胞毒性损伤的生物标志物和潜在防控靶点。**结果** ①与对照组相比,NPs暴露组小鼠饮水量和体重均无明显差异;肝脏组织呈现炎性细胞浸润等病理学改变。②肝组织转录组学结果显示,以 $|\text{Log}_2(\text{FoldChange})| > 1$,且 $P < 0.05$ 作为筛选差异表达基因的标准,与对照组相比,NPs暴露组中差异表达基因共143个,其中包括表达上调基因59个,表达下调基因84个。③GO生物学过程(BP)分析显示,差异基因主要参与细胞应激,炎症反应和细胞因子调控通路等;分子功能(MF)分析显示,差异基因主要参与神经营养因子结合,生长因子结合和氧化还原活性等。细胞成分(CC)分析显示,差异基因主要参与细胞外区域,细胞外空间和内体膜组分等组成;④KEGG富集分析显示,差异基因主要参与类固醇激素合成,化学致癌作用-DNA加合物,神经营养素信号,脂质代谢,MAPK和PI3K-AKT等信号通路。**结论** NPs暴露可诱导小鼠肝组织炎性损伤,可能与MAPK和PI3K-AKT等激酶级联通路介导的炎性信号激活有关。结果将为筛查NPs暴露对肝脏毒性效应评价的生物标志物和潜在防控靶点提供依据。

关键词: 纳米微塑料; 转录谱; 脂质代谢; 炎症; 肝脏毒性

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(82304180);广东省自然科学基金面上项目(2024A1515010893);中国博士后科学基金特别资助(2024T171083)

通讯作者: 车琳, E-mail: chelin@sysucc.org.cn

T4-0003

基于分子探针“钩钓”技术的朱砂作用靶蛋白识别研究

李璐迪¹, 杨咪咪¹, 曾克武^{2*}, 王旗^{1,3,4*}

(1. 北京大学公共卫生学院毒理学系; 2. 北京大学药学院天然药物学系; 3. 国家中医药管理局中药配伍减毒重点研究室; 4. 食品安全毒理学研究与评价北京市重点实验室, 北京 100191)

摘要:目的 朱砂(cinnabar)是一种含汞矿物药,其主要成分为 α -硫化汞(α -HgS,含量>95%),已有2000多年的临床用药史,作为镇静安神用药疗效显著,在中成药中的用药频率相当高(约为10%),含有朱砂的古方名药如安宫牛黄丸、牛黄清心丸等,现仍在临床医学中发挥重要作用。然而,过量或长期使用朱砂导致神经毒性的不良反应时有发生。目前尚未阐明朱砂神经药理/毒性作用的分子机制,本研究旨在发现HgS作用的靶蛋白并研究其神经毒性分子机制,为朱砂合理用药提供新的科学依据。**方法** 设计并合成一种生物素标记的HgS探针(bio-HgS),应用亲和纯化技术捕获和鉴定HgS作用的靶蛋白。然后用竞争性下拉(Pull down)实验、细胞热位移分析(CETSA)和表面等离子体共振(SPR)技术,验证HgS与靶蛋白的结合能力,分别用LC-MS/MS和分子对接技术对HgS和靶蛋白的结合位点和结合方式进行分析。为探索HgS是否通过与靶蛋白的作用产生神经毒性,应用秀丽隐杆线虫(C.elegans,简称线虫)模型,分别对野生型和靶蛋白基因敲除线虫,经HgS处理后,比较其在一系列神经行为方面的变化差异。**结果** S期激酶相关

蛋白1(Skp1)被确定为HgS的作用靶点。此外,发现HgS通过“Cys-HgS-Cys”模式共价结合Skp1,特别是在半胱氨酸位点Cys62和Cys120。暴露于高剂量(1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的HgS抑制了野生型线虫的运动、排便、产卵和联想学习行为,但对Skp1同源基因敲除的线虫没有显著影响。**结论** 本研究成功识别、鉴定HgS作用的靶蛋白为Skp1,并发现HgS抑制线虫的神经行为须有Skp1的参与,从靶蛋白角度阐释HgS的神经作用分子机制。

关键词:朱砂;硫化汞;分子探针;靶蛋白;神经毒性

基金项目:国家自然科学基金(82174068)

通讯作者:王旗,E-mail:wangqi@bjmu.edu.cn;曾克武,E-mail:zkw@bjmu.edu.cn

T4-0004

纳米银诱导小鼠学习记忆损伤和海马神经元铁死亡效应及机制研究

牛书彦,郭孟昊,杨海涛,马钰,吴丽晴,薛玉英*

(环境医学工程教育部重点实验室,东南大学公共卫生学院,江苏南京 210009)

摘要:**目的** 探究纳米银(AgNPs)诱导小鼠行为学损伤和海马神经元铁死亡效应及其发生机制。**材料和方法** 使用20nm AgNPs,采用鼻腔滴注对ICR小鼠进行每日染毒,持续28天。染毒结束后恢复组继续恢复28天。使用水迷宫和旷场实验分别检测小鼠的学习记忆能力和自主探索能力损伤。并用透射电镜、HE和尼氏染色检测小鼠脑组织的病理损伤和神经元损伤。体外使用CCK-8法检测AgNPs对小鼠海马神经元细胞HT22细胞活性的影响,并确定铁死亡抑制剂去铁胺(deferoxamine, DFO)和抗氧化剂(ferrostatin-1, Fer-1)对AgNPs细胞毒性的干预作用。利用ICP-MS检测AgNPs的离子释放率,银在小鼠各脏器的分布及清除,和HT22细胞对AgNPs的摄取情况。利用二价铁荧光探针染色,激光共聚焦显微镜观察HT22细胞内 Fe^{2+} 含量变化。使用脂质过氧化探针、GSH和MDA试剂盒检测组织和细胞的脂质过氧化水平。并使用Western Blot法和免疫组化检测小鼠脑组织和HT22细胞暴露于AgNPs后的铁死亡相关蛋白表达变化。**结果** AgNPs(5, 50 mg/kg)和 AgNO_3 (0.4 mg/kg)可以通过鼻腔滴注进入小鼠大脑并持续蓄积,海马体为主要蓄积区域。AgNPs诱导海马神经元明显损伤,小鼠空间记忆能力显著受损。使用AgNPs(2-12 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和 AgNO_3 (0.2 ~ 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)染毒HT22细胞,细胞活性随染毒浓度升高而降低。DFO(5 μM)和Fer-1(2 μM)均能明显抑制AgNPs和 AgNO_3 所致的细胞毒性。HT22细胞对 AgNO_3 的摄取能力大于AgNPs。AgNPs的24 h银离子释放率约为2%。AgNPs和 AgNO_3 均可诱导HT22细胞内 Fe^{2+} 含量明显增加和脂质过氧化。AgNPs染毒使小鼠脑组织和HT22细胞内铁稳态相关蛋白如TFRC、FTH1和FTL的表达量均显著改变。AgNPs诱导小鼠脑组织和HT22细胞铁死亡关键蛋白如GPX4和SLC7A11的表达量显著改变,还可诱导ACSL4、HO-1和COX-2表达量增加。其中 Ag^+ 的铁死亡机制与AgNPs类似,但采用高剂量AgNPs组 Ag^+ 释放量的 AgNO_3 染毒组并未发现显著神经毒性和铁死亡效应。**结论** AgNPs可通过鼻腔滴注进入小鼠大脑并持续蓄积,尤其是在海马体区域。AgNPs诱导小鼠神经元损伤和空间记忆能力降低。AgNPs可导致小鼠脑组织和HT22细胞发生明显的铁死亡效应。其机制与细胞内铁稳态失衡,GPX4/SLC7A11通路和脂质过氧化物蓄积相关。AgNPs的神经毒性和铁死亡效应与其纳米颗粒本身有关而非其释放的 Ag^+ 。本研究为AgNPs的神经毒性机制提供了新的见解。

关键词:纳米银;海马神经元;铁死亡;脂质过氧化

基金项目:国家自然科学基金(82273674);江苏省研究生科研创新计划(KYCX21_0165)

通讯作者:薛玉英,E-mail:yyxue@seu.edu.cn

T4-0005

基于微流控技术评估微塑料诱导肾毒性中的力学调控作用

冯蕊^{1,2}, 邓鹏伟^{1,2}, 程绣², 徐燕飞², 秦建华^{1,3*}

(1. 中国科学技术大学苏州高等研究院, 器官芯片与转化医学研究中心, 苏州 215006;

2. 中国科学技术大学, 合肥 230000; 3. 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116000)

摘要:目的 环境中广泛存在的微塑料(Microplastics, MPs)对人类健康构成重大威胁。然而, MPs对肾脏的毒性效应及潜在健康风险知之甚少。肾脏作为体内 MPs 的主要排泄器官, 必然面对由生物体液引起的剪切应力。本文将基于微流控技术评估流体剪切力(Fluid shear stress, FSS)在 MPs 诱导肾毒性中的力学调控作用。方法 以微流控芯片为载体实现对肾小管上皮细胞施加 FSS。选择 HK-2 细胞作为受试模型, 分别暴露于粒径为 1 μm 和 5 μm 的聚苯乙烯微塑料(Polystyrene microplastics, PS-MPs)(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 6 h, 施加/不施加 FSS。检测细胞对 PS-MPs 的摄取、细胞活力、炎性因子白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的 mRNA 表达、ROS 水平、脂滴(Lipids, LDs)积累和脂肪酸 β 氧化(Fatty acid β oxidation, FAO)活性、肾小管间质纤维化标志物 α -SMA、TGF- β 1、Fibronectin、Collagen I 蛋白表达; 共同分析 FSS 是否对 PS-MPs 诱导的肾毒性具有调控作用。结果 在静态培养条件下, HK-2 细胞在短时间内能快速摄取 PS-MPs 进入细胞内, 表现出粒径越小摄取的数量越多, 具有明显的尺寸效应; PS-MPs 暴露后对细胞活力并没有产生显著影响; IL-6、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达水平显著升高; ROS 水平升高; 细胞内出现明显的 LDs 积累, FAO 活性下降。在 FSS 存在下细胞骨架被重塑, 与静态培养相比, 细胞对 PS-MPs 的摄取没有产生显著改变; IL-6、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达水平显著升高; 出现明显的氧化应激反应; α -SMA、TGF- β 1、Fibronectin、Collagen I 表达增加; 相反的是, 细胞没有产生明显的 LDs 积累, FAO 活性也显著增强, 这可能与 FSS 调控脂质代谢有关。结论 本试验证实 PS-MPs 被肾小管上皮细胞摄取后可通过激活炎症反应、诱导氧化应激和扰乱脂质代谢促进肾小管间质纤维化进而产生肾毒性, 在 FSS 的存在下, 肾小管上皮细胞表现出更为显著的毒性反应。提示在传统体外研究中因缺乏肾脏的力学微环境, PS-MPs 对肾脏的毒性作用很有可能被低估。

关键词:微塑料; 肾毒性; 剪切应力; 微流控芯片

作者简介:冯蕊, 医学博士, 博士后, 主要研究方向: 基于微流控芯片解析生/病理状态下肾小管的力学生物学耦合机理以及环境毒理学的新方法研究, E-mail: fengrui@ustc.edu.cn

通讯作者:秦建华, 研究员, E-mail: jhqin@dicp.ac.cn

T4-0006

微塑料和铜联合暴露致血管毒性: 基于人源血管类器官的体外机制研究

陈涵格¹, 周悦¹, 程薇^{1*}, 王艳^{2,1}

(1. 上海交通大学公共卫生学院, 上海 200025; 2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院, 上海 200011)

摘要:目的 微塑料(Microplastics, MPs)是指直径小于 5 mm 的塑料颗粒的统称。MPs 主要通过日常饮食、空气吸入和皮肤接触进入人体, 在人体的胎盘、血液、血栓、粪便等样本中均有 MPs 检出。MPs 的理化性质决定了其具有吸附不同化学物质(如有机污染物、重金属)的能力, 这一特征使 MPs 对机体的毒性效应进一步复杂化。铜是人体健康不可缺少的微量营养素, 铜稳态失衡引发机体多个组织器官损伤。有研究提示, 单独作用时, MPs 可引起血管氧化应激损伤、线粒体损伤、内皮功能障碍以及自噬、凋亡; 铜则可引起血管氧化应激损伤、细胞凋亡、炎症等。血管作为各种内源性、外源性物质在人体内的主要运输通道, 是 MPs 和铜经各种暴露途径进入机体后的共有“转运通道”, 但两者对血管的有害效应未见研究报道。本研究利用

人源三维体外血管模型,探索MPs和铜联合暴露引发的血管毒性效应及机制。方法 利用人胚胎干细胞系H9,在体外经15天培养,诱导血管分化,培养具有三维结构的血管类器官(Vascular organoids, VOs),并表征VOs的生物学特性。MPs和/或CuSO₄暴露后,利用活死细胞染色检测VOs的细胞毒性,并检测VOs的铜水平、SOD活性和铜代谢相关分子mRNA表达水平的改变。结果 诱导人胚胎干细胞H9 ES分化,获得VOs,免疫荧光染色可见血管内皮细胞(CD31+)、平滑肌细胞(α SMA+)。用10 ng/mL MPs和/或400 μ M CuSO₄暴露后,人源VOs中死细胞增多,有明显细胞毒性(MPs<Cu<MPs+Cu)。此外,VOs中Cu水平在单独MPs暴露后,无显著变化,而MPs和MPs+Cu均显著升高VOs中铜水平(Cu<MPs+Cu)。CuZn-SOD活性在Cu组下降,而在MPs和MPs+Cu组升高,而三组VOs中均观察到SOD1、SOD2基因的mRNA表达水平上升。铜转运方面,MPs上调SLC31A1、ATP7B、ATOX1、COX17,Cu下调SLC31A1、ATOX1和上调ATP7B、COX17,MPs+Cu下调SLC31A1、ATOX1、ATP7B、COX17基因的mRNA表达水平;铜代谢方面,MPs上调FDX1和下调DLAT,Cu和MPs+Cu下调FDX1、DLAT基因的mRNA表达水平。结论 在VOs中,MPs与Cu联合暴露能更显著的干扰血管氧化还原平衡和铜代谢调控分子的表达水平,可能通过引起VOs中细胞铜代谢紊乱和还原应激,诱发血管毒性。

关键词:血管类器官;微塑料;血管毒性;铜代谢;联合暴露

基金项目:国家自然科学基金(82204076);上海市科技计划项目(22140901300)

通讯作者:程薇,E-mail:wcheng@shsmu.edu.cn

T4-0007

TFEB调控纳米氧化锌诱导的HT22细胞铁死亡效应及机制研究

郭孟昊,牛书彦,杨海涛,马钰,吴丽晴,薛玉英*

(环境医学工程教育部重点实验室,东南大学公共卫生学院,江苏南京 210009)

摘要:目的 探究纳米氧化锌(ZnONPs)诱导海马神经元(HT22)细胞铁死亡效应及TFEB在其中扮演的角色。材料和方法 使用透射电子显微镜和马尔文粒度仪对20 nm ZnONPs进行表征。使用CCK-8试剂盒检测ZnONPs对HT22细胞存活率的影响,添加铁死亡抑制剂去铁胺(deferoxamine, DFO)和抗氧化剂(ferrostatin-1, Fer-1)来确定ZnONPs是否能导致HT22细胞铁死亡效应。使用LDH试剂盒检测LDH释放率并初步判断膜损伤情况。添加TFEB激动剂以探究TFEB的过表达是否能缓解ZnONPs诱导的HT22细胞铁死亡。使用试剂盒检测GSH含量,脂质过氧化探针和MDA试剂盒检测细胞的脂质过氧化水平。提取蛋白,进行Western Blot实验以检测铁死亡相关蛋白水平的变化。结果 电镜下观察到水中ZnONPs易团聚,马尔文粒度仪检测结果显示100 μ g/mL的ZnONPs在超纯水中的水合粒径为 359.2 ± 14.66 nm, Zeta电位为 20.4 ± 0.9 mV。CCK-8结果表明0~50 μ g/mL的ZnONPs以明显的剂量依赖性方式诱导了HT22细胞的存活率下降,且DFO(5 μ M)和Fer-1(2 μ M)能够抑制ZnONPs诱导的细胞死亡。通过LDH检测得出,8 μ g/mL的ZnONPs能够导致明显的LDH释放和膜损伤,且DFO和Fer-1均能抑制其释放。GSH试剂盒检测发现,ZnONPs能够减少HT22细胞内的GSH含量,此外,ZnONPs明显提高了MDA含量,脂质过氧化荧光结果表明ZnONPs能够导致HT22细胞脂质过氧化水平升高,且DFO、Fer-1和TFEB激动剂均可抑制其升高。Western Blot结果表明,ZnONPs诱导HT22细胞铁死亡相关蛋白GPX4、SLC7A11、FTH、FTL、FSP1水平下调,TFRC水平上调,此外,转录因子TFEB的蛋白表达水平下降,铁自噬相关蛋白NCOA4的表达水平上升。TFEB激动剂使TFEB过表达后能够进一步增加了TFRC的表达水平,同时也提高了FTH、SLC7A11和GPX4的表达。结论 ZnONPs能够导致小鼠海马神经元细胞内明显的脂质过氧化,导致铁死亡的发生。TFEB能够抑制HT22细胞内的抗氧化能力下降以及脂质过氧化水平的升高,从而缓解ZnONPs导致的铁死亡,说明了TFEB的保护性作用。这可能与TFEB提高TFRC等铁死亡效应蛋白水平相关,其增加溶酶体膜上的FTH水平,从而增加溶酶体中Fe²⁺的储存,抑制芬顿反应,减少脂质过氧

化,从而缓解了 ZnONPs 的毒性效应。本研究为 ZnONPs 的导致的铁死亡效应提供了新的数据,并为 ZnONPs 的神经毒效应提供了新的见解。

关键词: 纳米氧化锌; 海马神经元细胞; 铁死亡; 脂质过氧化; TFEB

基金项目: 国家自然科学基金(82273674)

通讯作者: 薛玉英, E-mail: yyxue@seu.edu.cn

T4-0008

Nrf-2 信号通路在焊接烟尘超细颗粒物致 16HBE 细胞氧化损伤中的作用

应梦超, 洪新宇, 肖萍, 陶功华*

(1. 上海市疾病预防控制中心, 国家环境保护新型污染物环境健康影响评价重点实验室、
国家药品监督管理局化妆品监测评价重点实验室, 上海 200336)

摘要: **目的** 焊接烟尘作为职业危害因素之一, 其可诱导机体发生氧化应激反应并引发一系列疾病。然而, 目前关于焊接烟尘的研究主要集中在较大的颗粒物上, 而关于超细颗粒物(UFPs)的研究仍处于起步阶段。本研究在模拟工作环境中采集气保焊(MIG)及手工焊(MMA)两种焊接方法所产生的焊接烟尘 UFPs, 并以人支气管上皮细胞 16HBE 作为研究对象开展相关研究, 旨在分析焊接烟尘 UFPs 对细胞的毒效应及量效关系, 初步探讨其致机体氧化损伤的机制。**材料和方法** 通过撞击式分级采样器采集、切割并分析两种不同焊接方式所产生烟尘的 UFPs 组分; 同时, 以系列浓度开展 4h 短期染毒, 并通过检测细胞存活率、LDH 漏出率及 ATP 水平以综合评估其细胞毒性; 检测染毒后线粒体膜电位、ROS 及 CAT 水平以分析焊接烟尘 UFPs 对细胞造成的氧化损伤水平; 随后, 检测相关炎症因子的改变及 Nrf-2/ARE 信号通路的变化。**结果** 随着染毒浓度的升高, 两种焊接烟尘 UFPs 均能够造成细胞存活率降低、LDH 漏出率升高及胞内 ATP 水平的降低; 同时, 胞内线粒体膜电位在暴露于 UFPs 后显著降低, 并提升了 ROS 及 CAT 水平; 不仅如此, IL-6 等多种炎症因子及 Nrf-2、HO-1 等表达水平也发生上调, 并进一步促使 Nrf-2 信号通路下游多种靶基因的 mRNA 水平上调。**结论** 两种焊接烟尘 UFPs 均具有一定程度的细胞毒性, 能够诱导细胞发生炎症及氧化应激。同时, 在 UFPs 暴露后, Nrf-2/HO-1 信号通路被激活, 并进一步上调下游多种与抗炎抗氧化相关的 AREs 表达, 以对抗由 UFPs 所带来的损伤。

关键词: 焊接烟尘; 氧化损伤; Nrf-2/ARE 信号通路; 超细颗粒物

作者简介: 应梦超, E-mail: yingmengchao@scdc.sh.cn

通讯作者: 陶功华, E-mail: taogonghua@scdc.sh.cn

T4-0009

类器官、器官芯片和类器官芯片在毒理学研究中的应用与进展

张子依^{1,2}, 吴沛豪^{1,2}, 吴炜^{1,2*}

(1. 南京医科大学生殖医学与子代健康全国重点实验室, 江苏 南京 211166;

2. 南京医科大学现代毒理学教育部重点实验室, 江苏 南京 211166)

摘要: 近年来, 各类环境化学物质、环境物理因素和环境生物因素, 特别是一些新型的环境污染物, 正不断对人体健康产生不良影响, 导致一系列的公共卫生问题。然而, 传统的毒理学研究手段, 例如动物实验和二维细胞培养, 常常因物种间差异, 导致动物实验结果难以准确反映毒物对人体的健康损害, 因缺乏生理微环境, 无法模拟人体内复杂的相互作用。传统的毒理学研究手段存在不可忽视的局限性。遵循“减少、优化和替代”的原则, 类器官、器官芯片和类器官芯片等体外模型在毒理学研究领域展现出了巨大的潜力。类器

官是由干细胞分化形成的三维组织结构,能够模拟特定器官的复杂生理或病理过程,在一定程度上再现疾病的发生与发展。器官芯片是基于微流控技术,在芯片上进行细胞培养,模拟器官关键功能或结构的二维小型装置,可以精确控制生理微环境和各项物理条件。类器官芯片将类器官与器官芯片两者相结合,保留类器官的三维结构,同时精确控制各项参数与条件,实现血管化,并且可进行更为复杂且长期的动态分析。这三种体外模型均能够有效提升毒理学研究的准确性与可靠性。本文首先论述了传统毒理学研究平台在毒理学研究中存在的局限性;接着引出并介绍了类器官、器官芯片和类器官芯片这三种新型体外模型的构建方法、优势、进展与应用;然后从毒性研究的角度入手,综述了三种新型体外模型运用于肝肾毒性、生殖毒性、神经毒性、肠道毒性和皮肤毒性等研究的进展;最后讨论了三种体外模型在毒理学研究中存在的不足之处,并进行总结与展望。

关键词:类器官;器官芯片;类器官芯片;毒理学

通讯作者:吴炜,E-mail:wwu@njmu.edu.cn

T4-0010

老化微塑料诱导的还原应激:体内和基于肝类器官的体外研究

程薇^{1*}, 陈涵格¹, 周悦¹, 雷东², 李妍¹, 冯艳¹, 王艳^{1,2}

(1. 上海交通大学公共卫生学院, 上海 200025;

2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院, 上海 200011)

摘要:目的 塑料老化常伴随微塑料(microplastics, MP)的产生,经口摄入是人类接触MP暴露的主要途径之一,可诱发消化系统的健康损害。肝脏是人类最主要的消化器官之一,已有研究在人类的肝脏组织中检出不同类型的MP。然而,MP老化状态是否影响其肝脏毒性效应,仍待探究。方法 在本研究中,以聚丙烯(polypropylene, PP)塑料杯盖作为原料,制备1~10 μm的PP-MP,经紫外线光老化后,检测羰基指数(carbonyl index, CI)以表征塑料老化程度。本研究中使用CI为0.08、0.17、0.22和0.28的老化PP-MP(aged PP-MP, aPP),选用Balb/c小鼠(自由饮水摄入,75 ng/mL,估算每天约200颗aPP)和人胚胎干细胞来源的肝类器官(Liver organoids, LOs;约50颗aPP/mL),研究低剂量aPP的肝脏毒性效应。结果和结论 低剂量的aPP可诱发小鼠肝脏和LOs还原应激,以CI依赖的方式提高NADH/NAD⁺比率,同时伴随AST水平的升高,提示肝脏毒性。aPP显著干扰编码营养物质转运体和NADH亚基的基因表达,伴随ATP产量下降,线粒体膜电位下降,以及线粒体复合体I/IV活性降低,但在肝脏中MDA水平没有显著增加。这些在肝脏中的变化扰动了机体代谢,在不同CI的aPP暴露组中,小鼠体重增幅下降、肝脏NADH含量升高时,可见外周血中乳酸、甘油三酯、成纤维细胞生长因子Fgf21水平显著升高、丙酮酸水平显著降低,提示还原应激。此外,通过LOs评估发现,经人工消化液处理后的aPP可形成大量微米-纳米混合物,进一步影响了线粒体的能量供应、干扰NADH/NAD⁺平衡。本研究以老化MP低剂量作用下诱发的还原应激效应作为切入点,为提示真实世界MP暴露对人类的健康危害提供了新的研究思路和理论依据。

关键词:老化微塑料;低剂量效应;还原应激;NADH;肝类器官

基金项目:国家自然科学基金(82204076);上海市科技计划项目(22140901300)

通讯作者:程薇,E-mail:wcheng@shsmu.edu.cn

T4-0013

RPS2 去磷酸化修饰调控核糖体停滞参与聚苯乙烯纳米塑料诱导肝细胞衰老的体外试验研究

沈雨诗, 杜泽邦, 蔡雨欣, 杨嘉劼, 陆远, 李谚青, 张铭航, 林忠宁, 林育纯*

(传染病疫苗研发全国重点实验室, 分子疫苗学和分子诊断国家重点实验室, 厦门大学公共卫生学院, 厦门 361102)

摘要:目的 聚苯乙烯纳米塑料(PS-NPs)作为新型环境污染物经多种暴露途径致机体的危害效应愈发凸显;研究表明 PS-NPs 暴露可在肝脏蓄积、诱导肝脏毒性损伤;但 PS-NPs 暴露诱导肝细胞衰老的细胞器质量控制调节机制亟待探明。核糖体停滞引起的蛋白质质量控制(PQC)失调是细胞衰老的主要诱因,其中核糖体质量控制的功能调控是研究的焦点。本研究旨在探讨核糖体翻译介导 PQC 调节在 PS-NPs 暴露诱导肝细胞衰老中的靶分子信号通路和调控机制。**材料和方法** 利用我们前期 PS-NPs 暴露组学、PP2A 磷酸化蛋白质组学、衰老小鼠肝脏蛋白质组学进行多组学联合分析,筛选关键靶分子;设置不同剂量浓度 PS-NPs 暴露的肝 HepaRG 细胞和 L02 细胞,构建肝细胞衰老体外试验模型;构建过表达和敲低质粒转染 L02 细胞建立靶向干预模型。检测细胞衰老表型,Co-IP、PLA 和 IF 验证蛋白质互作;嘌呤霉素掺入实验、多聚体谱检测细胞翻译水平;RPS2 和核糖体停滞相关蛋白检测。**结果** (1)衰老小鼠肝脏蛋白质组学提示蛋白质合成途径参与肝脏衰老进展,多聚体在衰老过程中发挥作用。组学筛查到包括 RPS2 等核糖体蛋白在衰老过程中差异表达。(2)PS-NPs 暴露组学发现,编码 PP2A-B56 γ 的 *PPP2R5C* 基因差异表达;PP2A 磷酸化蛋白质组学与衰老小鼠肝脏蛋白质组学的联合分析发现,核糖体小亚基蛋白 RPS2 磷酸化状态改变参与衰老进程;提示 RPS2 作为潜在的关键调控分子,并且 Co-IP、PLA 和 IF 验证 PP2A-B56 γ 与 RPS2 存在互作。(3) PS-NPs 暴露组细胞中,细胞衰老表型显著;嘌呤霉素掺入实验发现蛋白合成减少,多聚核糖体谱 P/M 比例降低,GCN2、ZAK α 、p-p38、p-JNK 蛋白水平增高,提示 PS-NPs 暴露经由核糖体停滞和翻译障碍介导细胞衰老。(4)RPS2 过表达干预组细胞中核糖体停滞相关蛋白与衰老表型增高;在 RPS2 敲低表达干预组细胞中得到挽救。**结论** PS-NPs 暴露可诱导肝细胞衰老表型,阐明 PS-NPs 暴露经由核糖体停滞介导核糖体翻译功能障碍的 RPS2 潜在去磷酸化调控机制,为探讨核糖体质量控制调节通路介导外源物诱导肝细胞衰老进程的潜在生物标志筛查及其磷酸化平衡调控和靶向干预策略提供依据。

关键词: PS-NPs 暴露;多组学整合分析;核糖体停滞;核糖体小亚基蛋白 RPS2;肝细胞衰老**基金项目:**国家自然科学基金面上项目(82273667);国家自然科学基金面上项目(82073588)资助**通讯作者:**林育纯, E-mail: linyuch@xmu.edu.cn

T4-0014

一次性口罩来源的微塑料颗粒暴露对人早期神经发育构成威胁

高雪¹, 李明慧^{1,2*}

(1. 生物工程学院, 重庆大学, 重庆 400030; 2. 西南医院, 陆军军医大学, 重庆 400038)

摘要:研究背景 新型冠状病毒大流行期间及其之后,一次性防护口罩的大量使用已经引发全球环境污染问题。由于一次性口罩主要由塑料纤维制成,口罩一旦被丢弃进入周围环境中会释放大量微塑料颗粒(MPs),进而将对生态系统和人类健康构成巨大威胁。然而,口罩来源 MPs 对人类的潜在危险仍然知之甚少。**研究目的** 本研究旨在揭示一次性口罩在水中释放 MPs 的特性并基于人神经类器官(*organoid*)模型评估 MFs 对人早期神经视网膜发育的潜在影响。**材料和方法:**检测一次性医用口罩在不同的搅拌速率(300、500、700 rpm)和搅拌时间(72 h、1 w、2 w)条件下 MPs 的释放量,并进行 MPs 形貌表征。同时,构建人胚胎

干细胞来源的神经类器官模型,进行不同浓度(0.01、0.1、0.5和1 mg/L)的MPs暴露处理,探究MPs暴露(21天)对类器官形态和发育的影响。研究结果:单个一次性医用口罩在水中释放MPs高达0.068 g,MPs释放量呈现搅拌速率和时间依赖性。MPs暴露21天后,类器官形态和发育出现异常,如:类器官的二维面积减少,神经视网膜的厚度/面积/比例均降低,该毒性作用呈现显著的MPs暴露剂量和时间依赖性。此外,MPs暴露可阻碍神经细胞增殖、诱导细胞凋亡、干扰神经前体细胞分化。**研究结论** 一次性口罩释放的MPs暴露可导致神经类器官生长和发育异常,揭示口罩来源MPs对人早期神经视网膜发育构成威胁。本研究有助于揭示口罩来源的MPs是人类健康的潜在风险。

关键词:一次性口罩;微塑料颗粒;神经类器官;人早期神经发育

通讯作者:李明慧,E-mail:mhli1988@outlook.com

T4-0015

不同粒径 Cou-6-PLGA-NPs 透过血脑屏障的机理研究

张瑞华,王 陈,石 童,陈学军,李丽琴*

(国民核生化灾害防护国家重点实验室,北京 102205)

摘要:与活体动物实验相比,体外血脑屏障模型(Blood-brain barrier, BBB)具有许多优点,主要包括成本较低、高通量、细胞毒性症状早期发现、所需要的动物数量少等。体外BBB模型不仅是一个测定药物透过BBB能力的重要工具,也可用于研究药物透过BBB的作用机理。到目前为止,体外BBB模型已广泛应用于正常情况及病理条件下通透性及转运实验研究、药物转运机理预测、病理生理学、毒理学及免疫学等方面的研究。永生小鼠bEnd.3细胞和脑微血管内皮细胞一样,具有较高的电阻抗、细胞之间形成紧密连接、表达多种转运蛋白等,紧密连接可有效阻止药物通过细胞旁路进入到脑组织。因此,本研究拟采用bEnd.3细胞研究不同粒径纳米粒透过血脑屏障的作用机理。**目的** 通过bEnd.3细胞对不同粒径Cou-6-PLGA-NPs的摄取机理进行研究,为研究不同粒径纳米药物透过血脑屏障的作用机制及临床应用奠定坚实的技术基础。**方法** 以香豆素-6(Coumarin-6, Cou-6)为示踪剂,以乙酸乙酯为油相,1%F68为水相,采用O/W法制备平均粒径为50nm左右的Cou-6-PLGA-NPs,以二氯甲烷为油相,1%PVA为水相,采用O/W法制备制备粒径为200nm左右的Cou-6-PLGA-NPs,激光共聚焦显微镜下观察bEnd.3细胞对不同粒径Cou-6-PLGA-NPs摄取情况,以及在抑制剂氯丙嗪、秋水仙碱、布雷非德菌素A、细胞松弛素D、非利平、莫能菌素和叠氮钠存在条件下,bEnd.3细胞对不同粒径Cou-6-PLGA-NPs摄取情况。**结果** bEnd.3细胞对平均粒径为45.9 nm Cou-6-PLGA-NPs的摄取方式主要通过巨胞饮作用和依赖能量的主动转运作用,其次为包被凹陷和细胞膜穴样凹陷的内吞作用,摄取过程可能有酸性溶酶体、高尔基体的参与。bEnd.3细胞对平均粒径为202.8 nm Cou-6-PLGA-NPs的摄取方式主要为包被凹陷的内吞作用,而依赖能量的主动转运、巨胞饮作用和细胞膜穴样凹陷相对较弱,摄取过程中也有酸性溶酶体、高尔基体的参与。**结论** bEnd.3细胞对不同粒径Cou-6-PLGA-NPs的摄取是一个多因素协同作用的过程,但是主要摄取方式明显不同,bEnd.3细胞对平均粒径为45.9 nm纳米粒的摄取主要通过巨胞饮作用和能量依赖的主动转运作用,而平均粒径为202.8 nm的纳米粒的摄取主要为包被凹陷和细胞膜穴样凹陷的内吞作用。

关键词:纳米粒;血脑屏障;摄取机理;香豆素-6

通讯作者:张瑞华,E-mail:15201517118@163.com

T4-0016

纳米 Co_3O_4 诱导的铁自噬和铁死亡:斑马鱼神经发育毒性的新途径王少卓[†], 周昊杰, 李春锦, 谭思悦, 耿成语, 赵育质, 王守林, 王超*

(现代毒理学教育部重点实验室, 生殖医学与子代健康全国重点实验室, 南京医科大学公共卫生学院, 南京 211166)

摘要:目的 纳米四氧化三钴(Co_3O_4)在锂电池和半导体制造中广泛应用,常在水体、土壤和职业环境中被检测到。研究表明,钴离子与神经退行性疾病等疾病有关联,但尚未有关于纳米 Co_3O_4 与神经发育毒性的研究。细胞铁死亡机制是神经系统疾病研究的新兴热点,体内铁离子稳态在其中扮演关键角色。铁离子过载可能通过铁自噬调控铁代谢稳态。已有报道显示钴离子可能影响体内金属离子水平,但尚未有关于钴离子暴露导致铁稳态失衡的机制研究。本研究旨在探讨纳米 Co_3O_4 对铁自噬的诱导作用及其调控机制,这对于深入理解其神经发育毒性至关重要。**材料和方法** 我们基于纳米 Co_3O_4 的环境相关浓度(0、5、50 mg/L)构建斑马鱼幼鱼暴露模型,观察斑马鱼神经行为,检测神经成熟与发育相关基因表达情况,结合转基因斑马鱼Tg(huc:eGFP)和Tg(hb9:eGFP)分别观察泛神经与运动神经发育状况;通过LC-MS/MS构建神经递质代谢组学库,观察神经递质表达情况。采用激光共聚焦和透射电镜观察斑马鱼亚铁离子过载、氧化应激及自噬小体,结合铁离子、GSH、MDA等试剂盒进一步定量分析,免疫印迹分析转铁蛋白、GPX4等铁代谢相关以及自噬相关蛋白;采用铁死亡等特异抑制剂进行挽救实验以及人神经母细胞瘤细胞系(SH-SY5Y和SK-N-SH)染毒模型进行验证。**结果** ①纳米 Co_3O_4 对斑马鱼幼鱼发育毒性呈剂量依赖关系,表现为孵化时间延长、畸形增加,运动能力下降,光照反应减弱,同时神经发育相关基因异常表达。转基因斑马鱼染毒模型显示神经元长度缩短、荧光强度降低,形态紊乱,神经递质水平紊乱,提示神经发育受损。②斑马鱼与细胞模型均发现纳米 Co_3O_4 暴露后整体氧化应激水平升高,GSH水平下降而MDA水平增加,表明有显著脂质过氧化;同时电镜和蛋白结果表明纳米 Co_3O_4 通过诱导二价金属离子转运蛋白DMT1高表达,导致细胞铁过载和细胞铁死亡,铁自噬相关蛋白显著激活。③维生素E(D- α 生育酚)作为新型铁死亡抑制剂,能够明显改善斑马鱼幼鱼的神经发育异常。自噬抑制剂(Bafilomycin A1和3-Methyladenine、经典铁死亡抑制剂(Ferrostatin-1和Deferiprone)的使用进一步证实了纳米 Co_3O_4 导致斑马鱼神经毒性是通过诱导铁自噬引起神经细胞铁死亡,从而导致神经递质紊乱。**结论** 纳米 Co_3O_4 可通过增加细胞铁含量过载引起铁稳态失调,激活神经细胞铁自噬而引发细胞铁死亡导致神经递质紊乱出现神经发育毒性,研究结果可为纳米 Co_3O_4 及其它环境纳米材料的神经发育毒性评价和风险评估提供新的依据和技术支撑。

关键词: 纳米四氧化三钴; 铁自噬; 铁死亡; 斑马鱼; 神经发育毒性

基金项目: 国家自然科学基金(82273584); 国家自然科学基金(81903353), 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目(202210312045Z); 2024年江苏省研究生科研与实践创新计划

作者简介: 王少卓, E-mail: wsznjmu@stu.njmu.edu.cn

通讯作者: 王超, E-mail: wangchao@njmu.edu.cn

T4-0017

中性粒细胞胞外诱捕网在纳米二氧化硅致肺损伤中的作用

袁小丽, 付帅, 何秀*

(贵州医科大学公共卫生与健康学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要:目的 纳米二氧化硅(Silica nanoparticles, SiNPs)广泛应用于化妆品、食品、药品、油漆等产业领域,可引起肺部炎症及纤维化损伤,但损伤机制仍有待于进一步研究。中性粒细胞胞外诱捕网(Neutrophil extracellular traps, NETs)过度产生与多种呼吸道疾病的发生发展密切相关,但其在SiNPs致肺损伤中的

作用尚不清楚。因此本研究通过建立 SiNPs 暴露的 C57BL/6 肺损伤小鼠模型,探究 NETs 的变化情况;应用 NETs 抑制剂 DNase I 促进其降解,明确 NETs 在 SiNPs 所致肺损伤中的作用,为进一步研究 SiNPs 暴露致肺损伤的机制及干预靶点提供科学依据。**方法** ①将 30 只健康雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠分为生理盐水组(Ctrl)、3 mg/kg SiNPs 组和 6 mg/kg SiNPs 组,每组各 10 只。采用非气管暴露方式给予 SiNPs 悬液,每周 1 次,共 12 次,构建 SiNPs 暴露的肺损伤小鼠模型。②将 40 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组: Ctrl、SiNPs 组(6 mg/kg)、SiNPs + DNase I 组和 DNase I 组。DNase I(300 U/只)采用腹腔注射方式,每周 3 次,持续 12 周。造模 90 天后对实验动物进行处死、取材。H&E 和 Masson 染色观察肺组织病理学改变,Western Blot 检测肺组织炎性损伤指标 IL-6、IL-18 及 IL-1 β ,纤维化损伤指标 α -SMA、Col1 及 Fn1 变化情况;透射电镜观察肺组织中 NETs 的形成情况,Western Blot 及免疫荧光检测 NETs 相关指标 MPO、PAD4、MMP-9、Ly6G、CitH3 及 NE 的表达情况。**结果** ①在 SiNPs 暴露的肺损伤小鼠模型中,H&E 和 Masson 染色结果显示 SiNPs 引起小鼠肺组织炎性细胞浸润、胶原纤维沉积,Western Blot 结果显示,3 mg/kg 和 6 mg/kg SiNPs 暴露导致 C57BL/6 小鼠肺组织炎性损伤指标 IL-6、IL-18 及 IL-1 β ,纤维化损伤指标 α -SMA、Col1 及 Fn1 表达增加($P < 0.05$);透射电镜可见 SiNPs 暴露小鼠肺组织 NETs 形成明显,Western Blot 结果显示,3 mg/kg 和 6 mg/kg SiNPs 组 NETs 相关指标 MPO、PAD4 及 MMP-9 蛋白水平均高于对照组($P < 0.05$),免疫荧光共染结果示 Ly6G 和 CitH3、NE 和 MPO 的表达强度增加。②应用 DNase I 干预模型小鼠后,与 SiNPs 组比,SiNPs + DNase I 组 NETs 形成减少,NETs 相关指标 MPO、PAD4 及 MMP-9 蛋白水平降低($P < 0.05$),Ly6G 和 CitH3、NE 和 MPO 的荧光强度降低,IL-6、IL-18、IL-1 β 、 α -SMA、Col1 及 Fn1 表达明显降低,炎性细胞浸润及胶原纤维沉积减轻,肺组织损伤得到缓解。**结论** SiNPs 暴露可引起小鼠肺组织 NETs 释放增多,促进 NETs 的降解能够有效缓解 SiNPs 导致的小鼠肺部炎症及纤维化损伤。

关键词: 纳米二氧化硅; 中性粒细胞胞外诱捕网; DNase I; 炎症; 纤维化

基金项目: 贵州省基础研究计划项目(黔科合基础-ZK[2022]一般 347)

作者简介: 袁小丽, E-mail: yuanxl-gzmu@outlook.com

T4-0018

气-液界面染毒技术在汽油发动机尾气体外毒性评估中的应用研究

宾萍*, 鱼涛

(中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 创伤与化学中毒全国重点实验室, 北京 100050)

摘要: 近年来,随着多孔膜细胞培养技术的发展,推动了人肺细胞直接连续暴露于可吸入物质体外试验方法的可实施性。基于多孔膜细胞培养技术的气-液界面(Air-liquid interface, ALI)染毒技术可将人肺细胞直接暴露于可吸入性物质全部组分,避免了细胞培养液对可吸入性物质染毒过程的干扰,同时又能够使可吸入性物质与肺细胞顶部接触面积达到最大化,更好地模拟人类呼吸系统细胞暴露可吸入性外源化合物的模式。适用于气态、液态和固态气溶胶等物质,尤其适用于气液固混合可吸入性物质的研究,例如香烟烟雾、汽油/柴油发动机尾气和纳米颗粒气溶胶等的吸入毒性评估。汽油发动机尾气(Gasoline engine exhaust, GEE)成分复杂,其包含气相和颗粒相两大部分,且均能造成呼吸系统的健康损害。因此,提示这两种成分在研究 GEE 毒性过程中均不可忽视。目前,动物实验仍是研究 GEE 毒性的主要方法,但体内研究受试对象多为小鼠。由于不同物种之间的敏感性存在很大的差异,在一定程度上可能影响实验结果的外推。随着体外替代实验方法的发展,以及“3R”(减少、优化和替代)原则的提出,运用成熟的毒理学体外替代技术替代动物试验逐渐得到国际社会的认同。浸没式染毒可将汽油发动机尾气颗粒(Gasoline exhaust particles, GEP)溶解于培养液中使人源细胞与颗粒物接触产生相互作用,从而实现 GEP 对细胞的染毒。但这种染毒方式忽略了 GEE 气相的毒性作用,也忽略了颗粒物溶于培养液后会导致其分布的均匀性降低,从而引起颗粒物的团聚状态,无法准确评估 GEE 全部组分的实际毒性作用。利用 ALI 染毒技术将人源肺细胞暴露

于 GEE 全组分,可模拟人体肺细胞实际暴露情况,更精准地用于研究 GEE 全组分对人肺细胞的急性毒性效应、氧化应激指标的变化,以及 GEE 对细胞炎性反应指标的影响等;可短时间内筛选出用于评价 GEE 致呼吸系统健康效应的早期标志物,为 GEE 等典型呼吸系统毒物的风险评估提供重要参考数据,并在推进体外替代毒理学技术体系深入应用提供了新的技术手段和思路。

关键词:替代毒理学;汽油发动机尾气;气-液界面;毒性评估;肺细胞

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82073596);国家自然科学基金面上项目(81472955)

通讯作者:宾萍, E-mail: binping@niohp.chinacdc.cn

T4-0019

高内涵筛选技术在生物活性评价中的应用

李丽琴*, 靳倩, 刘占彪, 陈学军

(国民核生化灾害防护国家重点实验室, 北京 102205)

摘要:高内涵筛选技术是一种基于细胞检测的分析技术,具有多指标、多靶点同时检测的特点。该技术在保持细胞结构和功能完整性的前提下,能够同时检测化合物对细胞形态、生长、分化、迁移、凋亡、代谢途径及信号转导等多个环节的影响,从而确定其生物活性和潜在毒性。高内涵筛选技术的主要优点包括:能同时进行大批量系列化合物毒性比较,具有快速、短期、动态、灵活、样品消耗量小、成本低等特点。应用高内涵筛选技术对药物结构活性分析和毒性评价可指导药物结构改造和开发应用。在毒性评价方面,高内涵筛选技术克服了传统毒性评价技术的动物实验依赖性以及实验周期长、费用高和通量低的缺点,实现了基于细胞结构或功能改变的多参数终点筛选的快速高通量药物毒性效应的识别,可加速药物早期开发阶段的毒性评价进程。例如,利用三重荧光标记法建立的高内涵检测模型,可以反映药物对细胞数目、核形态学变化及线粒体聚集等多个指标的影响,检测模型包括不同种属原代细胞和永生化细胞系、人诱导多能干细胞、类器官等。近年来,在药物筛选方面,高内涵筛选技术因其多靶点多参数分析的特点,成为药物研发技术领域的热点技术,该技术在糖尿病、癌症、神经退行性疾病、中枢系统疾病等领域的药物筛选中取得诸多进展。例如,应用高内涵筛选技术筛选对 β 淀粉样蛋白致 SH-SY5Y 细胞损伤有保护作用的中药提取物,加速了阿尔茨海默病治疗药物的筛选进程。总之,高内涵筛选技术在药物毒性评价和药物筛选方面具有显著优势,通过多参数、多靶点分析,能够提供更全面、更深入的生物学信息,推动药物毒性测试和药物研发的进步。

关键词:高内涵筛选;毒性;生物活性;细胞

通讯作者:李丽琴, E-mail: llq969696@126.com

T4-0020

全氟烷基物质混合暴露诱导大脑类器官神经毒性的新机制

鲁诗雅¹, 朱习之¹, 陈琪琪¹, 郭新华¹, 岑小波², 卜迁^{1,2*}

(1. 四川大学华西公共卫生学院卫生毒理与病理学系, 成都 610041;

2. 四川大学华西医院国家成都新药安全性评价中心, 成都 610041)

摘要:**目的** 全氟烷基物质(PFAS)是一种广泛应用的合成脂肪族化合物,因其结构稳定、难以降解,被列为持久性有机污染物。其中全氟辛酸(PFOA)和全氟辛烷磺酸(PFOS)是最具代表性的传统 PFAS,全氟己磺酸盐(PFHxS)随后作为新型替代物被投入使用。前期通过流行病学分析发现 PFAS 长期暴露与老年人群认知功能下降相关,但毒性机制尚不清楚。本研究旨在通过单细胞 RNA 测序(scRNA-seq)联合脂质组学探讨 PFAS 混合暴露的神经毒性作用及其分子机制。**材料和方法** 利用课题组前期建立的 hESC 分化

的大脑类器官模型,参考妊娠期母体血清中PFAS浓度及比例,将10 ng/ml PFOS、PFOA和1 ng/ml PF-HxS作为低剂量组暴露浓度(1×),设置对照组及中、高剂量组(30×、900×)。从分化第35天开始,将大脑类器官暴露于PFAS混合物,第70天收集样本进行scRNA-seq分析,随后采用免疫荧光、qPCR和脂质组学分析,探索PFAS的神经毒性及在单细胞分辨率下的分子机制。**结果** 采集了对照组和高剂量组大脑类器官各14,556和14,030个细胞,使用特异性标记基因将以上细胞标记为神经祖细胞、中间祖细胞、神经细胞、星形胶质细胞和放射状胶质细胞。其中神经元和星形胶质细胞是受PFAS暴露影响最大的细胞类型。这两种细胞的差异表达基因(DEGs)的KEGG富集分析均显著富集到“阿尔兹海默症(AD)”和“神经退行性疾病通路”。进一步分析发现,神经元的DEGs与“淀粉样蛋白结合”、“tau病理”等通路显著相关。星形胶质细胞的“脂质代谢过程”受到显著影响。进一步验证发现,暴露组A β 沉积、Tau蛋白磷酸化增多;神经元数量、突触前后膜蛋白均随暴露浓度增加逐渐减少;PFAS混合暴露后大脑类器官内各脂质丰度均显著增加,且高剂量组的鞘脂及甘油磷脂代谢酶(SPHK1、SMPD2)的基因表达水平明显改变。**结论** 我们发现PFAS可能通过扰乱星形胶质细胞的脂质代谢过程,影响鞘脂及甘油磷脂代谢酶,从而导致早期AD的病理特征。本研究首次揭露了PFAS对不同类神经细胞的特异性毒性反应,发现了PFAS暴露导致神经毒性的靶细胞群,为持久性有机污染物的健康风险评估提供了新思路。

关键词:全氟烷基物质; 大脑类器官; 神经毒性; 单细胞测序; 脂质代谢

通讯作者:卜 迁, E-mail: buqian7978@scu.edu.cn

T4-0021

肺器官芯片在化学毒物毒理学评价中的应用研究

韩 冰, 董濡铭, 何 俊, 张 丽, 郭家彬*

(中国人民解放军疾病预防控制中心, 北京 100071)

摘要:肺脏是人体与外界环境进行气体交换的场所,也是外源性化学物质毒作用的重要靶器官。传统毒理学研究主要采用动物实验和基于二维细胞培养的体外试验模型,难以全面地重现人类肺组织的组织结构和功能,使实验结果的准确性和科学性受到一定限制。近年来,肺器官芯片的发展和应用于肺脏毒理学研究提供了有力工具。通过应用基于光刻的微细加工技术、热塑性技术和3D生物打印等技术以及特定生物材料,在体外精确模拟构建具有人体肺脏结构和功能的芯片模型。将肺脏来源的原代细胞、细胞系或人诱导多能干细胞等细胞模型培养在肺器官芯片中,旨在更真实地模拟再现人体肺脏的组织结构和功能。目前已开发了肺泡芯片、肺气道芯片、肺血管芯片等多种肺芯片,并在药物毒理学评价、环境毒理学评估、纳米材料安全性评价和烟草制品毒理学评价等领域得到越来越广泛的应用。研究显示,肺芯片在评估药物致肺损伤、纳米颗粒与生物气溶胶等环境污染物对呼吸系统的毒性、肺损伤机制发现等方面展现出独特的优势。本实验室采用软光刻技术,将人肺上皮细胞、巨噬细胞等人源细胞植入芯片中,构建了一种具有免疫系统功能的肺芯片,可部分模拟肺上皮-间质结构和肺纤维化等改变。应用该芯片模型检测了蓖麻毒素等外源性化学物质对肺的毒性作用,并探讨相关作用机制。研究结果表明,受试物可剂量依赖地引起肺芯片中细胞死亡、炎症反应、氧化损伤以及纤维化改变,其机制与巨噬细胞介导的炎症反应密切相关,提示该芯片模型可为外源性化学物质致肺纤维化损伤的评价提供有力工具。

关键词:器官芯片; 肺芯片; 毒性评价; 替代模型

通讯作者:郭家彬, E-mail: gjb321@163.com

T4-0022

Ferritinophagy mediated by oxidative stress-driven mitochondrial damage is involved in the polystyrene nanoparticles-induced ferroptosis of lung injury

Sheng Yang, Tianyi Zhang, Yiling Ge, Geyu Liang*

(Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering, Ministry of Education, School of Public Health, Southeast University, Nanjing, Jiangsu, China P.R. 210009)

Abstract: Objective Nanoplastics are a common type of contaminant in the air. However, no investigations have focused on the toxic mechanism of lung injury induced by nanoplastic exposure. **Methods and results** polystyrene nanoplastics (PS-NPs) caused ferroptosis in lung epithelial cells, which could be alleviated by ferrostatin-1, deferoxamine and N-acetylcysteine. Further investigation found that PS-NPs disturbed mitochondrial structure and function, and triggered autophagy. Mechanistically, oxidative stress-derived mitochondrial damage contributed to ferroptosis, and autophagy-dependent ferritinophagy was a pivotal intermediate link, resulting in ferritin degradation and iron ion release. Furthermore, inhibition of ferroptosis using ferrostatin-1 alleviated pulmonary and systemic toxicity to reverse the mouse lung injury induced by PS-NPs inhalation. Most importantly, the lung-on-a-chip was further used to clarify the role of ferroptosis in the PS-NPs-induced lung injury by visualizing the ferroptosis, oxidative stress and alveolar-capillary barrier dysfunction at the organ level. **Conclusion** our study indicated that ferroptosis was an important mechanism for nanoplastics-induced lung injury through different lung cells, mouse inhalation models and three-dimensional-based lung-on-a-chip, providing an insightful reference for pulmonary toxicity assessment of nanoplastics.

Key words: nanoplastic; ferroptosis; mitochondrial damage; ferritinophagy; lung injury; lung-on-a-chip

T4-0023

微/纳米塑料青春期暴露对小鼠认知损伤的影响

林凯莉^{1#}, 王超群^{2,3,#}, 张柱^{4,#}, 熊婷¹, 潘岩⁵, 张璋¹, 杨军¹, 翁建霖⁵, 师蕾^{2,3*}, 张世卿^{2,3*}

(1. 广州医科大学公共卫生学院, 广东 广州 511436; 2. 暨南大学生物活性分子与成药性优化全国重点实验室, 广东 广州 510632; 3. 暨南大学 JNU-HKUST 神经科学和创新药物研究联合实验室, 广东 广州 510632; 4. 香港浸会大学中医药学院, 香港特别行政区; 5. 香港浸会大学生物系, 香港特别行政区; 6. 香港教育大学科学与环境学系, 香港特别行政区)

摘要:目的 微/纳米塑料(MNPs)的全球环境污染问题及其对多种生理功能的负面影响日益凸显,其对青少年脑功能的神经毒性效应及机制尚不完全清楚。本研究旨在探讨聚苯乙烯 MNPs 对青春期小鼠神经行为功能的影响及其潜在机制。**材料和方法** 青春期小鼠,口服 MNPs 暴露 4 周,利用 Morris 水迷宫和 Y 型迷宫测试评估小鼠的认知功能。同时,运用多组学分析和分子生物学检测手段,探究 MNPs 诱导神经毒性的可能机制。**结果** 研究发现 MNPs 显著诱导了小鼠的认知障碍,其中纳米塑料的毒性作用更为显著。这一损害与胶质细胞活化、神经元和树突棘损失相关。海马组织转录组分析和 Western blotting 结果提示 PI3K/AKT 通路可能参与了 MNPs 诱导的神经毒性过程。此外,代谢组及肠道菌群测序显示, MNPs 暴露导致了海马组织的代谢紊乱并导致肠道微生物群落失衡,其中纳米塑料的影响更为显著。**结论** 本研究揭示

了MNPs在诱导青春期小鼠认知障碍中的毒性机制,为理解MNPs的毒理学影响及潜在干预策略提供了新的见解。这些发现有助于进一步关注MNPs对青少年健康的潜在威胁,并探索有效的预防措施和干预手段。

关键词:微/纳米塑料; 认知损伤; 青春期小鼠

基金项目:国家重点研发计划(2022YFA1104900); 国家自然科学基金(82204092); 国家自然科学基金(82371175); 国家自然科学基金(82071535); 国家自然科学基金(82101614); 广东省基础与应用基础研究基金(2022B1515130007); 广东省基础与应用基础研究基金(2023A1515030012); 广东省基础与应用基础研究基金(2023B1515040015); 广州市科技计划项目(2024A04J10031)

作者简介:林凯莉, E-mail: lin_kaili@gzhmu.edu.cn

T05-0001

从化妆品监管科学角度探讨类器官及器官芯片的发展现状、趋势与启示

林 锐, 张凤兰, 余振喜, 王钢力*, 路 勇*

(中国食品药品检定研究院 化妆品安全技术评价中心, 北京 100050)

摘要:类器官和器官芯片等新型体外替代模型是近年国际前沿技术和研究热点,并被逐渐应用于药品、化妆品领域的研发和监管中,使该类技术备受关注。本文首先简要阐释了类器官和器官芯片的基本概念、发展历程及技术特点,然后列举了该类技术在化妆品原料安全性、功效性测试中的应用场景。最后,结合国内外化妆品技术法规,对类器官和器官芯片在提升我国化妆品原料研发效能、支持监管决策方面的未来趋势进行了展望,并从监管科学角度提出了应用该类新技术时的监管建议,以期符合我国国情的化妆品监管提供技术储备,促进创新性科学研究成果转化为实用性监管科学工具。

关键词:类器官; 器官芯片; 化妆品; 原料; 安全性; 功效性; 监管科学

基金项目:国家重点研发计划项目“基于化妆品和生物制品等产品检验的动物实验替代技术研究”(2022YFF0711100); 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金(2022C1)

作者简介:林 锐, E-mail: nilin@nifdc.org.cn

通讯作者:王钢力, E-mail: wanggl@nifdc.org.cn; 路 勇, E-mail: luyong@nifdc.org.cn

T05-0003

基于毒理学证据和计算机筛选策略的中药毒性物质的高效筛选:以附子为例

尹贻慧, 张 凯, 董 玲*, 徐文娟*

(北京中医药大学 生命科学学院, 北京 102488)

摘要:**目的** 附子在治疗肿瘤、风湿病等疑难杂症方面独具潜力。然而,由于其毒性,应用受到限制。临床的不良反应提示附子具有潜在的肝毒性,但其毒性物质尚不清楚。该研究旨在通过探索附子给药引起肝损伤的例子,提出毒理学证据联合计算机筛选的策略,为中药毒性物质的高效筛选提供靶向思路。**方法** 首先,小鼠灌胃附子后通过毒理学证据表征附子的肝毒性;采用超高效液相色谱-质谱法(UPLC-MS)辨识体外及体内血中移行成分,初步明确附子吸收后可能产生毒性的物质。以入血成分建立数据库,联合多个在线平台获取成分及肝毒性靶点,通过机器算法构建蛋白-蛋白相互作用网络进一步引入成分作用于肝毒性的关键靶蛋白。以入血成分与靶蛋白结合能力和模式为初步的参考指标,利用计算机虚拟筛选技术高效快速筛选出附子潜在的肝毒性物质。将筛选出的毒性单体通过体内实验进一步验证其肝毒性。**结果** 客观指标显示附子诱导小鼠肝毒性:在灌胃的第14天,给药组小鼠毛发蓬松无光泽,灌胃后活动减少、精神状态萎靡;给药期间,给药组小鼠体重相较于对照组显著下降($P < 0.05$);解剖后,肝脏指数显著升高($P < 0.05$);肝脏的

病理切片可见肝细胞排列紊乱,变性坏死细胞和炎性浸润;AST、ALT等指标显著升高($P < 0.05$)。在附子中鉴别出80个化学成分,其中,35个成分可吸收进入体内。根据筛选原则确定ALB、MMP9、CASP3受体为关键靶蛋白,并筛选出乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、尼奥灵、宋果灵等19个化合物与肝毒性靶蛋白稳定结合。提示这些成分可能是潜在的毒性物质,与附子的肝毒性密切相关。新乌头碱和次乌头碱的体内实验显示明显的肝毒性,进一步验证了筛选的可靠性。

结论 本研究以中医药理论的系统性和整体性出发,提出将毒理学证据和计算机筛选策略应用于附子诱导小鼠肝毒性的物质研究,并初步证实此筛选模式的可行性。该策略充分考虑中药化学成分的复杂性,从多个层次联合分析,高效快速地筛选出潜在的毒性物质,为中药毒性物质的筛选提供一定思路。

关键词:毒理学证据;计算机筛选;毒性物质;附子;肝毒性

作者简介:尹贻慧,E-mail:2806462095@qq.com

通讯作者:董玲,E-mail:dongling@bucm.edu.cn;徐文娟,E-mail:cathy_xwj@126.com

T05-0004

邻苯二甲酸酯通过靶向抑制SLC7A11促进睾酮合成障碍的机制研究

常远航,王雪琪,胡子焱,刘瑞琪,杨尚嘉,姜馥薇,李金龙,赵一*

(东北农业大学动物医学学院,黑龙江省哈尔滨市 150030)

摘要:**目的** 邻苯二甲酸酯是一种有机化合物,经常用于塑料大棚、杀虫剂以及聚乙烯塑料中。邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP)是使用范围最广的邻苯二甲酸酯之一,作为常见的内分泌干扰物,其在环境中广泛分布。DEHP环境蓄积效应会造成男性生殖器官损伤和功能障碍,干扰生精过程,从而导致不良妊娠结局。铁死亡是近年来研究的热点,也是一种细胞程序性死亡新形式。本研究的目的是为了探究邻苯二甲酸酯诱导雄性生殖毒性的潜在机制及其与铁死亡的关系。**材料与方法** 本研究的体内试验部分以21日龄的雄性ICR小鼠为受试对象,随机分成5组:空白对照组、溶媒对照组以及DEHP低、中、高剂量组,灌胃处理28天后,检测小鼠血清性激素含量、睾丸间质细胞形态结构、睾酮合成功能、抗氧化能力、脂质过氧化以及铁死亡相关指标的改变。本试验的体外部分以小鼠睾丸间质细胞系(TM3细胞)为研究对象,首先将细胞分为4组:对照组以及邻苯二甲酸单-(2-乙基己基)酯(MEHP)低、中、高剂量组,然后在培养体系中进行质粒SLC7A11过表达载体转染,分别检测TM3细胞结构和功能的变化。**结果** 体内试验表明,DEHP暴露诱导小鼠睾丸间质细胞超微结构损伤(线粒体嵴和膜消失、空泡增加),类固醇激素生物合成和代谢紊乱,血清性激素水平改变,睾酮合成酶和孤儿核受体蛋白水平改变。体外试验表明,MEHP诱导TM3细胞活率下降,超微结构损伤(线粒体膜消失、嵴断裂,空泡和自噬泡的产生),ROS增加,抗氧化功能的下降,睾酮合成酶和孤儿核受体蛋白水平改变。此外,MEHP与铁死亡诱导剂(Erastin)协同诱导TM3细胞和线粒体内ROS和脂质过氧化物增加,谷胱甘肽及其相关酶活性减少,细胞质和线粒体内 Fe^{2+} 水平上调,铁死亡相关指标改变。同时,SLC7A11过表达能够通过改善谷胱甘肽系统和降低脂质过氧化水平来抑制MEHP诱导的间质细胞铁死亡和睾酮合成功能障碍。**结论** DEHP暴露可通过抑制SLC7A11诱导小鼠睾丸间质细胞损伤,促进脂质过氧化产物累积,破坏间质细胞内铁稳态,驱动铁死亡,进而引起小鼠睾丸间质细胞结构和功能受损。本研究为医学及兽医临床中雄性生殖毒性的防治提供新的靶点,并且为有效的保障畜禽生产和繁殖提供了新的思路。

关键词:邻苯二甲酸酯;SLC7A11;间质细胞;铁死亡;睾酮合成

作者简介:常远航,E-mail:hang18337312012@163.com

通讯作者:赵一,E-mail:zhaoyi@neau.edu.cn

T05-0005

Parkin 介导的线粒体自噬缓解阿特拉津暴露所引起的肾损伤和衰老

石宇生, 李金龙*

(东北农业大学动物医学学院, 黑龙江省哈尔滨市 150030)

摘要:目的 阿特拉津在世界范围内被广泛用于抑制杂草的生长,其可在环境长期存在从而对机体造成持续性影响。由于肾小管的高能量需求,肾小管细胞中含有大量的线粒体,而阿特拉津已被证明可以造成线粒体损伤。因此,维持线粒体稳态可能是一种缓解阿特拉津诱导的肾损伤的有效方法。Parkin 介导的线粒体自噬可以清除受损的线粒体从而避免其产生的大量活性氧以及 mtDNA 的释放,细胞中活性氧的积聚以及 mtDNA 从受损线粒体的释放与细胞衰老有关。褪黑素作为一种内源性激素,已被证明可以维持线粒体稳态以及促进线粒体自噬。因此,本研究的目的主要是探索 parkin 介导的线粒体自噬在褪黑素缓解阿特拉津诱导的肾损伤和衰老中的作用。**材料与方法** 本研究以 6 周龄的野生型和 parkin 敲除雄性 C57BL/6N 小鼠为受试对象,随机分成 4 组(对照组、褪黑素组、阿特拉津组以及阿特拉津+褪黑素组),灌胃处理 28 天。通过观察小鼠临床表现、肾脏切片 HE 染色、肾脏线粒体形态观察、抗氧化功能检测、WB 及 IF 相关实验探索 parkin 介导的线粒体自噬在褪黑素缓解阿特拉津诱导的肾损伤和衰老中的作用。**结果** 本研究发现,暴露于阿特拉津后肾小管结构受损,并且线粒体嵴被破坏,肾脏中积累大量受损的线粒体,氧化应激产物增加和抗氧化酶活性下降。阿特拉津暴露还导致胞质中的 mtDNA 增加以及 cGAS 通路的激活。线粒体自噬相关指标的检测结果表明 parkin 水平下降,并与衰老标志物呈负相关。褪黑素处理激活 Sirt3-SOD2 轴,减少肾脏中的 ROS 水平。褪黑素处理恢复线粒体接触位点和嵴组织系统(MICOS)蛋白水平来维持线粒体嵴结构的完整。此外,褪黑素促进 parkin 介导的线粒体自噬以清除受损的线粒体,从而缓解阿特拉津暴露所导致的 mtDNA 的泄露和随后 cGAS 通路的激活。而 parkin 敲除限制了褪黑素对阿特拉津诱导的肾损伤和衰老的保护作用。**结论** 褪黑素处理可以减轻阿特拉津诱导的肾损伤和肾小管细胞衰老。并且,褪黑素的抗衰老作用在很大程度上依赖于 parkin 介导的线粒体自噬。这些结果为延缓细胞衰老提供了新的见解。我们的结果表明 parkin 介导的线粒体自噬是缓解肾小管细胞衰老的一个有前景的药物靶点。

关键词: 阿特拉津; 褪黑素; 线粒体自噬; 肾; 细胞衰老; parkin**作者简介:** 石宇生, E-mail: 562957803@qq.com**通讯作者:** 李金龙, E-mail: Jinlongli@neau.edu.cn

T05-0006

猪角膜通透性与渗透性试验新方法在化学品眼刺激性评价中的应用王志梅^{1,2}, 陈舒怀¹, 孙叶丹¹, 项婉玲¹, 桑晶^{1*}

(1. 浙江省食品药品检验研究院, 浙江省药品接触材料质量控制研究重点实验室, 国家药品监督管理局化妆品动物替代试验技术重点实验室, 杭州 310004; 2. 中国药科大学, 南京 210009)

摘要:目的 建立一种适合于我国国情的猪角膜通透性与渗透性试验方法,通过与牛角膜通透性渗透性方法比较,验证该体外眼刺激性方法建立的准确性。**方法** 建立基于猪角膜的通透性和渗透性试验方法,通过对已知 13 种参比化合物验证,比较猪角膜通透和通透性试验和牛眼角膜通透性与渗透性试验的一致性,选取 22 种常见化合物进行验证,汇总对比两种方法的准确性,灵敏性和特异性。**结果** 通过对 13 种参比化合物验证比较,猪角膜通透性渗透性试验方法与牛角膜通透性渗透性试验比对,方法的一致性 Kappa 系数为 0.88。其次,汇总 13 种参比化合物与 22 种常见化合物,牛角膜通透性渗透方法的准确性为 62.86%,灵敏性为 83.33%,特异性为 43.75%;猪角膜通透性与渗透性方法的准确性为 68.57%,灵敏性为 83.33%,特异性为 68.75%。在本实验条件下,PCOP 方法准确率略高于 BCOP 方法,两种方法灵敏性一致,但 PCOP 方

法的总体准确率和特异性要高于BCOP方法。**结论** 猪角膜通透性与渗透性试验方法由于材料获取相对容易,检验周期短、测试方法简便、评价客观等优点,是一种较好的眼刺激性的动物替代评价方法。

关键词:角膜通透性和渗透性试验;眼刺激;体外模型

T05-0007

中药药源性心脏风险“四维联动”研究路径构建及应用 ——以白屈菜族中药为例

王 雨,吕锦涛,张晓朦,林志健,张 冰*
(北京中医药大学,北京 102488)

摘要:**目的** 针对中药相关心脏安全性风险警戒研究尚不充分的现状,构建中药药源性心脏风险“四维联动”研究路径,旨在为加强中药药源性心脏风险预警等中药安全性研究提供参考,促进中药临床合理用药。**方法** 在本团队前期创建的中药药物警戒“四维联动”技术平台基础上,从构建风险信号发掘、隐患证据强化、风险-效益评价、中药风险沟通4个维度,构建中药药源性心脏风险“四维联动”研究路径。同时,以具有蒙、苗、壮等多民族习用历史的白屈菜族中药(包括白屈菜、博落回、白屈菜、血水草等)为示例,开展路径的应用研究。**结果** 本研究路径集成中药药源性心脏安全风险信号发掘维度、心脏安全隐患证据强化维度、心脏安全风险-效益评估维度以及心脏安全风险沟通警戒维度,可应用于识别、确认白屈菜族中药的药源性心脏风险信号,判断、探讨其心脏风险效用特征、发生机制,从而合理警戒中药药源性心脏风险。在心脏安全风险信号发掘维度,通过梳理183部中医药古籍、标准、本草著作及344篇临床报道,识别白屈菜族中药的心脏损害主要表现为心率及心律紊乱,且预后转归较差,可引起死亡;在心脏安全隐患证据强化维度,白屈菜水提物在亚致死暴露浓度(1 g/L、1.5 g/L)可导致模式动物斑马鱼仔鱼发生心脏损伤,表现为静脉窦-动脉球间距与体长的比值增大、心率减慢,以及仔鱼匀浆液肌钙蛋白水平降低;在心脏安全风险-效益评估维度,需以“药-人-用”三要素为纬,实施药物源头把控(如设置药物风险等级或阈值等)、用药过程控制(如控制剂量、疗程、联用等)、患者终端沟通(如禁忌人群、病证,以及用药监护);心脏安全风险沟通警戒维度,通过以上各维度对白屈菜族中药心脏风险的识别、强化与评估,从医-药-研-企-教-媒体等多途径反馈优化其临床用药,实现该族药物心脏风险沟通警戒的良性循环。**结论** 本研究构建的中药药源性心脏风险“四维联动”研究路径可应用于中药安全性研究,对中药新药研发、药物警戒、临床合理用药均具有参考价值与指导意义,未来可在临床及研究实践中进一步与时俱进地进行路径完善。

关键词:中药药物警戒;药源性心脏风险;白屈菜族中药;四维联动;研究路径

通讯作者:王 雨,E-mail:wangyuxh@163.com

T05-0008

髓鞘化阻滞激活 Nogo-A/S1PR2 通路参与 DEHP 损伤老年小鼠学习记忆功能

李玲玉,王取南*
(安徽医科大学,合肥 230000)

摘要:**目的** 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)是广泛存在的环境污染物,具有神经毒性和甲状腺素(THs)干扰作用,并引起炎症反应,而THs是髓鞘化关键调控激素,炎症因子的分泌、谷氨酸能和 γ -氨基丁酸能均可影响髓鞘化进程。少突胶质前体细胞(OPC)在发生神经损伤时,会过量分泌轴突再生抑制因子(Nogo-A),与1-磷酸鞘氨醇受体2(S1PR2)结合,激活多种信号通路,抑制神经元轴突生长。本研究旨在

探究 DEHP 对老年小鼠海马髓鞘化和突触可塑性的影响及其机制。方法 选取 22 月龄(老年期)C5BL/6J 雄鼠分为四组,经口灌胃 DEHP 0 mg/kg、0.2 mg/kg(人群环境暴露剂量)、20 mg/kg、200 mg/kg,每 6 日停灌 1 日,持续 35 天。旷场、新物体识别和水迷宫检测小鼠学习记忆功能。坚固蓝染色观察海马髓鞘变化。尼氏染色观察海马神经元数量和形态的变化。ELISA 检测外周血与海马体甲状腺素水平。免疫荧光(IF)、免疫印迹(WB)与实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测海马体中甲状腺素转运体(OATP1C1 和 MCT8)、脱碘酶(D2 和 D3)、甲状腺素受体(TR α 和 TR β)、少突胶质谱系细胞标志物(Olig2)、髓鞘化少突胶质细胞标志物(MBP)、少突胶质前体细胞标志物(NG2)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、谷氨酸受体(GluA1)、GABA 受体(GABA-ABR1)、轴突再生抑制因子(Nogo-A)、1-磷酸鞘氨醇受体 2(S1PR2)、Rho-ROCK 通路和突触相关蛋白,观察各组小鼠髓鞘化阻滞、Nogo-A/S1PR2 轴变化、下游 Rho-ROCK 通路激活状况和突触受损情况。结果 ① 行为学发现小鼠出现学习记忆功能受损。② 海马 LFB 染色提示小鼠海马髓鞘异常。③ WB 与 RT-PCR 检测发现 OATP1C1、MCT8、TR α 和 TR β 水平降低,D2 与 D3 水平升高,ELISA 检测发现 DEHP 暴露不干扰小鼠外周血甲状腺素循环,影响脑内甲状腺素水平,海马体 T3、T4 水平降低,WB 与 RT-PCR 发现海马体中 TNF- α 水平升高,GABA β 1 与 GluA1 失衡,MBP 水平降低,Olig2 与 NG2 水平升高,这提示 OPCs 处于增殖环境,髓鞘化受阻。④ 尼氏染色显示海马中神经元数量明显减少,说明存在神经损伤。⑤ IF、WB 与 RT-PCR 发现 Nogo-A、S1PR2、RhoA 和 ROCK2 表达水平升高,Synapsin-1 和 PSD95 表达水平下调,提示 OPCs 分泌 Nogo-A 增多,Nogo-A 与其受体 S1PR2 作用,激活下游 Rho-ROCK 通路,突触受损。结论 DEHP 的老年神经毒性可能与髓鞘化异常损伤突触可塑性有关。老年期 DEHP 暴露通过扰乱脑中甲状腺素内环境稳态,引起炎症,破坏 GABA β 1 与 GluA1 平衡导致小鼠脑中髓鞘化阻滞,而由于存在神经损伤且 OPCs 数目增多,脑中 Nogo-A/S1PR2 通路激活,继而导致下游 Rho-ROCK 通路激活,造成突触损伤。

关键词: DEHP; 髓鞘化; 少突胶质前体细胞; 突触; 学习记忆

通讯作者:李玲玉,E-mail:llyahmu2022@163.com

T05-0011

创新药前药 LW23101 对 Beagle 犬 28 天重复静脉给药毒性试验 伴随毒代动力学研究

张家伟,林俊粒,王显菲,刘婉沂,郭健敏,杨威*

(广州湾区生物医药研究院,广东莱恩医药研究院有限公司,广东省药物非临床评价与研究重点实验室,国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心,广东省创新药物评价与研究工程技术研究中心,从化区药物药代毒代工程技术研究中心,广东 广州 510990)

摘要:目的 按照 ICH 指导原则要求开展创新药前药 LW23101 对 Beagle 犬 28 天重复静脉给药毒性试验伴随毒代研究,为临床设计人用安全剂量提供参考。方法 对阴性对照组、低、中、高剂量组动物静脉注射给予 LW23101,一日一次,连续给药 28 天,恢复期观察 4 周。分别在首次给药(D1)、给药中期(D14)、末次给药(D28)和恢复期(D56)进行毒代采血。采用经方法学验证合格的 LC-MS/MS 方法检测未知血浆样品中 LW23101 及其活性代谢物 FBLF 的浓度,使用 WinNonlin 统计软件对检测浓度进行主要毒代动力学参数统计。结果 (1)动物给药后,LW23101 可快速转化为活性代谢物 FBLF(2)性别差异:首次、中期和末次给药各剂量组 LW23101 和 FBLF 暴露量 $AUC_{(0-t)}$ 和达峰浓度 C_{max} 性别差异比值均在 0.5~2.0 之间。(3)蓄积情况:各组 LW23101 的暴露量 $AUC_{(0-t)}$ 和达峰浓度 C_{max} 的比值(D14/D1、D28/D1、D28/D14)均在 0.5~2.0 之间。各组 FBLF 的暴露量 $AUC_{(0-t)}$ 和达峰浓度 C_{max} 的比值(D14/D1、D28/D1)均大于 2.0,但末次给药与中期给药的暴露量 $AUC_{(0-t)}$ 和达峰浓度 C_{max} 的比值(D28/D14)均在 0.5~2.0 之间,结果提示,各组中期给药和末次给药 FBLF 的暴露量均较首次给药的暴露量高,这可能与首次给药时 FBLF 在 Beagle 犬体内暴露量未达到稳态有关。(4)暴露量与给药剂量关系:LW23101 和 FBLF 在 Beagle 犬体内暴露量 $AUC_{(0-t)}$ 和达峰浓度 C_{max} 与给

药剂量比(1.00:3.33:10.0)组间比例结果显示,在给药剂量0.03~0.1 mg/kg范围内,LW23101和FBLF的暴露量 $AUC_{(0-t)}$ 和达峰浓度 C_{max} 比值均与给药剂量比基本一致。结论 对Beagle犬静脉注射给予低(0.03 mg/kg)、中(0.1 mg/kg)、高(0.3 mg/kg)剂量的LW23101,每天给药1次,连续给药28天,LW23101可快速转化为活性代谢物FBLF,各给药剂量组GD-19和氟比洛芬在Beagle犬体内的暴露量无明显性别差异,无蓄积。在给药剂量0.03~0.1 mg/kg范围内,GD-19和氟比洛芬的暴露量 $AUC_{(0-t)}$ 和达峰浓度 C_{max} 比值均与给药剂量比基本一致。

关键词: LW23101; 重复给药; 毒代动力学

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

作者简介: 张家伟, 硕士, E-mail: zhangjiawei@lewin.com.cn

通讯作者: 杨威, 教授级高级工程师/博士、博士后导师, 广州湾区生物医药研究院院长、广东省药物非临床评价与研究重点实验室主任、广东莱恩医药研究院有限公司董事长、总经理, E-mail: yangwei0719@163.com

T05-0013

创新药LW23131对Beagle犬经口重复给药毒性试验伴随毒代动力学试验研究

王显菲, 林俊粒, 张家伟, 刘婉沂, 郭健敏, 杨威*

(广州湾区生物医药研究院, 广东莱恩医药研究院有限公司, 广东省药物非临床评价与研究重点实验室, 国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心, 广东省创新药物评价与研究工程技术研究中心, 从化区药物药代毒代工程技术研究中心, 广东 广州 510990)

摘要: **目的** 通过对Beagle犬经口重复给予受试物LW23131, 考察药物在Beagle犬全身的暴露情况和持续时间, 系统暴露与剂量、时间以及毒理学结果之间的关系, 为其它安全性评价试验和临床设计人用安全剂量提供基础数据。 **方法** 适应性观察结束后, 主试验选取40例符合要求的Beagle犬, 按体重和性别随机分为4组, 分别为溶媒对照组、LW23131低剂量组(10 mg/kg)、LW23131中剂量组(30 mg/kg)和LW23131高剂量组(60 mg/kg), 每组10例动物, 雌雄各半。其中, 主试验的部分动物作为伴随毒代动力学研究共用动物。每组各例动物每天灌胃给药一次, 连续给药28天, 分别于首次给药(D1)、中期给药(D14)、末次给药(D28)以及恢复期(D56)对各组动物进行血样采集。溶媒对照组动物首次、中期、末次采血时间点为给药前(0 h)和给药后(0.5 h); 低、中、高剂量组动物进行首次、中期、末次以及恢复期采血, 首次、中期、末次采样时间点为给药前(0 h)和给药后0.083 h、0.25 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h, 恢复期仅当天采血1次。采用经验证合格的LC-MS/MS法检测血浆中药物浓度。 **结果** 在本实验条件下, 首次、中期和末次给药各剂量组药物暴露量和达峰浓度性别差异比值均在0.5~2.0之间; 各组中期给药与首次给药的暴露量和达峰浓度的比值(D14/D1)、末次给药与首次给药的暴露量和达峰浓度的比值(D28/D1)以及末次给药与中期给药的暴露量和达峰浓度的比值(D28/D14)均在0.5~2.0之间; 在给药剂量10~60 mg/kg范围内, 药物在Beagle犬体内暴露量和达峰浓度比值与给药剂量比值基本一致。 **结论** 对Beagle犬灌胃给予低(10 mg/kg)、中(30 mg/kg)和高(60 mg/kg)的受试物LW23131, 每天给药1次, 连续给药28天, 药物在Beagle犬体内的暴露量和达峰浓度均无性别差异, 未见明显蓄积, 在给药剂量10~60 mg/kg范围内, 药物在Beagle犬体内暴露量和达峰浓度比值与给药剂量比值基本一致。

关键词: LC-MS/MS; 经口给药; 毒代动力学

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

作者简介: 王显菲, 硕士, Tel: 19120517512, E-mail: wangxianfei@lewin.com.cn

通讯作者:杨 威,教授级高级工程师/博士、博士后导师,广州湾区生物医药研究院院长、广东省药物非临床评价与研究重点实验室主任、广东莱恩医药研究院有限公司董事长、总经理, Tel: 18928860179, (020) 87998690, E-mail: yangwei0719@163.com

T05-0014

一类创新中药 LW23111 凝胶对小型猪连续 3 个月经皮重复给药毒性试验 伴随毒代动力学研究

林俊粒, 张家伟, 刘婉沂, 王显菲, 郭健敏, 杨 威*

(广州湾区生物医药研究院, 广东莱恩医药研究院有限公司, 广东省药物非临床评价与研究重点实验室, 国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心, 广东省创新药物评价与研究工程技术研究中心, 从化区药物药代毒代工程技术研究中心, 广东 广州 510990)

摘要:目的 LW23111 凝胶拟开发为治疗瘙痒性皮肤病的 1 类创新中药, 观察对小型猪连续 3 个月经皮重复给予受试物 LW23111 凝胶, 以丹皮酚为指标成分考察药物在小型猪中的全身暴露情况和局部组织分布情况。方法 40 只小型猪分为空白对照组(A组)、LW23111 低剂量组(B组)、LW23111 中剂量组(C组)、LW23111 高剂量组(D组), 10 只/组, 雌雄各半, 连续给药 3 个月, 恢复期观察 4 周。于末次给药(D91)进行毒代采血, 于毒理解剖时采集动物给药部位皮肤和皮下肌肉、非给药部位皮肤和皮下肌肉。采用经方法学验证合格的 LC-MS/MS 方法检测未知血浆和组织中丹皮酚的浓度。结果 (1) 血浆中药物浓度结果显示, 丹皮酚检测浓度均不大于 29.901 ng/mL; (2) 性别差异: 低、中、高剂量组小型猪体内丹皮酚暴露量 $AUC_{(0-t)}$ 和达峰浓度 C_{max} 性别差异比值均在 0.5~2.0 之间。(3) 暴露量与给药剂量关系: LW23111 低、中、高剂量组的给药剂量比为 1:2:4, 丹皮酚的暴露量 $AUC_{(0-t)}$ 和达峰浓度 C_{max} 不同剂量毒代组间的比值结果提示, 受试物低、中、高剂量组丹皮酚的暴露量 $AUC_{(0-t)}$ 和达峰浓度 C_{max} 比与给药剂量比基本一致; (4) 局部组织分布情况: 在给药末期(D92), 丹皮酚在小型猪给药部位皮肤上有分布, 且各剂量组检测浓度相近, 无剂量比例关系, 在非给药部位皮肤、给药部位皮下肌肉、非给药部位皮下肌肉检测浓度均低于定量下限; 恢复 4 周后, 仅高剂量组 1 例动物给药部位皮肤测得一定量浓度的丹皮酚, 丹皮酚在其余动物的给药部位皮肤检测浓度均低于定量下限, 在非给药部位皮肤、给药部位皮下肌肉、非给药部位皮下肌肉检测浓度均低于定量下限。结论 对小型猪经皮给药给予低、中、高不同剂量的 LW23111, 连续给药 91 天, 丹皮酚在小型猪全身系统的暴露量较低, 各剂量组丹皮酚在动物体内暴露量无明显性别差异, 受试物低、中、高剂量组丹皮酚的暴露量 $AUC_{(0-t)}$ 和达峰浓度 C_{max} 比与给药剂量比基本一致。连续给药 91 天, 丹皮酚主要分布在给药部位皮肤, 在非给药部位皮肤、肌肉中无分布, 在皮肤中可以消除。

关键词: LW23111; 瘙痒性皮肤病; 重复给药; ; 毒代动力学

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

作者简介: 林俊粒, 硕士/副主任药师, Tel: 15017556829, E-mail: linjunli@lewin.com.cn

通讯作者: 杨 威, 教授级高级工程师/博士、博士后导师, 广州湾区生物医药研究院院长、广东省药物非临床评价与研究重点实验室主任、广东莱恩医药研究院有限公司董事长、总经理, Tel: 18928860179, (020) 87998690, E-mail: yangwei0719@163.com

T05-0015

AHR 激活可缓解脱氧雪腐镰刀菌烯醇诱导的猪肠上皮屏障功能破坏

胡子焱, 杨尚嘉, 常远航, 刘瑞琪, 王雪琪, 陈明山, 王嘉欣, 李金龙, 赵一*
(东北农业大学动物医学学院, 黑龙江省哈尔滨市 150030)

摘要:目的 霉菌毒素作为最常见的天然污染物,对公众的健康构成了严重威胁,并日益引起公众对健康的关注。脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)是最主要的霉菌毒素之一,它不仅可造成严重的环境污染和在食物链中的生物积累,还构成世界范围内的严重问题。DON能够引起肠道毒性,造成肠道结构和功能的损伤,并对肠道屏障功能有明显的不良影响。芳基烃受体(AHR)是一种环境化学传感器的转录因子,在肠道屏障位点高度表达,并被激活以执行其生物学功能。本研究的目的是为了探究DON诱导的猪肠上皮屏障功能破坏的机制并阐释AHR在介导DON诱导肠上皮屏障功能中的作用。**材料与方法** 本试验以猪空肠上皮细胞(IPEC-J2)为研究对象,首先将细胞分为2组(空白对照组以及DON组),然后在培养体系中进行AHR过表达质粒转染,分别检测细胞结构和功能的变化。**结果** DON诱导猪肠上皮细胞超微结构受损、线粒体结构和功能损伤、细胞凋亡以及细胞内ROS增加等。DON导致猪肠上皮细胞屏障功能破坏、迁移能力下降和细胞骨架紊乱。DON通过激活NF- κ B/TNF- α /MLCK信号通路引起猪肠上皮细胞炎症反应。此外,DON可以直接与AHR结合,抑制了AHR核易位以及AHR表达和经典AHR通路的激活。然而,AHR过表达抑制了TNF- α /NF- κ B/MLCK通路介导的炎症反应,最终缓解DON诱导的猪肠上皮屏障功能破坏。**结论** DON通过靶向抑制AHR蛋白的表达激活TNF- α /NF- κ B/MLCK信号通路,从而导致猪肠上皮屏障功能的破坏。我们发现了AHR可以作为调节肠道炎症和肠道功能障碍的关键靶点,这是缓解霉菌毒素诱导的肠道损伤的关键机制。本研究不仅为预防肠道疾病提供了一种可靠的预防策略,而且为减轻肠道屏障功能障碍提供了一种新的治疗途径。

关键词:脱氧雪腐镰刀菌烯醇;芳基烃受体;肠道屏障;炎症;IPEC-J2

作者简介:胡子焱,E-mail:hzy13685376753@163.com

通讯作者:赵一,E-mail:zhaoyi@neau.edu.cn

T05-0016

金匱肾气丸临床前安全性评价研究

左泽平¹, 靳冉¹, 田时秋¹, 杨海润¹, 贺润铖¹, 卢星辰¹, 杨硕¹, 曹欣垚¹, 田颖颖²,
徐意¹, 姜克武³, 吴笑如^{1*}, 王志斌^{1,2*}

(1. 北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂, 北京 100079; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029; 3. 康龙化成(北京)生物技术有限公司, 北京 102206)

摘要:目的 研究经典名方金匱肾气丸单次给药毒性和26周重复给药毒性反应,为其临床安全应用提供参考。**材料和方法** 以最高配制浓度和最大可给药剂量灌胃ICR小鼠(11.2g·kg⁻¹BW,相当于临床人用剂量的102倍),观察给药后14d动物毒性反应;SD大鼠随机分为平行对照组和金匱肾气丸(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂生产,批号:20030262)高、中、低剂量组(5.6、2.8、1.4g·kg⁻¹BW,分别相当于临床人用剂量51、25.5、12.75倍),连续灌胃26周,检测给药13周、26周,以及在4周恢复期动物体重和摄食量的变化,采用血液分析仪(德国Siemens公司,型号:Siemens Advia 2120i)和凝血分析仪(天津思塔高诊断技术有限公司,型号:Stago Emo Express)检测血液学和凝血指标等变化,采用全自动生化分析仪(日本HITACHI公司,型号:HITACHI 7180)检测相关生化指标的变化,并通过组织病理学检查,来评价药物的潜在毒性反应、毒性的可逆性,以及可能的继发和/或延迟效应。**结果** 金匱肾气丸单次给药毒性试验给药前后及观察期14d内,所有试验小鼠未出现死亡,给药组小鼠自主活动正常,外观体征良好;各检测时间点给药组

动物体重、摄食与对照组比较均未见显著差异($P > 0.05$);观察期结束后对存活动物进行大体剖检,各组小鼠主要脏器未见异常,金匱肾气丸组脏器重-脑重系数与对照组比较无显著差异($P > 0.05$),最大给药量(MFD)为 $11.2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\text{BW}$ (相当于临床人用剂量的102倍)。金匱肾气丸大鼠连续灌胃26周,给药组大鼠未出现与药物相关的异常反应,各组大鼠皮肤、被毛、眼睛和黏膜、体表淋巴结、呼吸系统、循环系统、自主和中枢神经系统、躯体运动和行为模式等均正常,给药期间未出现大鼠死亡,血常规及血生化未出现与药物相关的严重不良反应,病理检查未见与药物毒性相关的主要脏器组织形态学改变;给药期间出现的雌性大鼠 $5.6\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组给药13周血中CHO、Ca水平稍高于平行对照组,但该指标未呈现明显的量-效关系,且指标变化幅度较空白对照组较小,给药26周和恢复期未见异常,结合血脂相关的其他指标来看并未出现异常改变,因此判定无毒理学意义。在给药13周和给药26周的计划剖检中,随机抽取实验动物进行取材,恢复期的5只雄性大鼠体重基础较其他组高,因此整个恢复期4周体重及摄食显著高于平行对照和其他剂量组,该差异与供试品无关。认为金匱肾气丸重复给药26周对大鼠无潜在及延迟毒性反应,无不良反应剂量(NO-AEL)为 $5.6\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\text{BW}\cdot\text{d}^{-1}$ (为临床人用剂量的51倍)。结论 金匱肾气丸最大给药量未见急性毒性反应,长期给药未出现潜在/继发/延迟性毒性反应,在治疗剂量范围内安全性高。

关键词:金匱肾气丸;小鼠;大鼠;毒性;单次给药;重复给药;安全性

作者简介:左泽平,E-mail:zepingzuo@126.com

T05-0017

基于离子通道生物传感的 Na^+ 通道抑制类海洋毒素检测方法研究

晏婷^{1,2},李治^{2*},马波²,徐华^{2*},谢剑炜²

(1. 青岛大学药学院, 山东 青岛 266000; 2. 军事医学研究院国家安全特需药品全国重点实验室, 北京 100850)

摘要:目的 Na^+ 通道抑制类海洋生物毒素主要为麻痹性贝类毒素(Paralytic shellfish toxins, PSTs),包括石房蛤毒素(Saxitoxin, STX)及其类似物,其均可抑制 Na^+ 进入细胞,引起细胞功能的紊乱,导致离子通道类疾病的发生。为了更加准确、灵敏检测未知样品中的PSTs,拟建立基于离子通道效应导向与生物传感相结合的PSTs检测方法。方法 选用小鼠神经母细胞瘤细胞(Neuro-2a)建立 Na^+ 通道敏感细胞模型,采用 Na^+/K^+ -ATP酶抑制剂乌本苷(Ouabain, O)与 Na^+ 通道激活剂藜芦定(Veratridine, V)联用诱导细胞处于 Na^+ 超载状态,基于实时无标记细胞分析系统(Real time xcelligence analysis system, RTCA),经系列条件优化,最终建立PSTs的RTCA检测方法。结果 以浓度为0.1 ng/mL、0.3 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、2.25 ng/mL和3 ng/mL的STX标准稀释液进行标准曲线的制定,对各浓度的细胞指数(Cell index, CI)曲线进行归一化处理,采用归一化的细胞指数(Normalized cell index, NCI)曲线差异最大的NCI值与未加药组同时刻的NCI值处理得到相应的细胞活力值,将细胞活力值与对应浓度进行线性拟合,可得到 $R^2 > 0.8$ 的标准曲线。RTCA结果显示,含PSTs的样品均能使其CI曲线高于OV对照组的CI曲线,同时,不同样品导致的CI曲线高低差异,提示其PSTs的含量不同。将扇贝与贻贝样品的NCI值代入标准曲线可知,扇贝组织中PSTs含量高于贻贝组织,与液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)验证实验的结果相符。将所建方法应用于国际禁止化学武器组织(OPCW)的第五次和第六次生物学样品联试中的实际样品检测,将测得的NCI值分别代入标准曲线,可准确鉴定出空白基质和含STX样品,并且含STX的样品检测值与理论值的偏差均 $< 50\%$,符合半定量检测的要求。结论 本研究建立了基于离子通道生物传感的PSTs检测方法,可准确灵敏地检测贝类及生物学联试样品中的PSTs,并可对未知样品进行半定量检测,是一种可行且具有前景的PSTs检测方法。

关键词:麻痹性贝类毒素;离子通道;生物传感;RTCA

通讯作者:李治,E-mail:lz880722@163.com;徐华,E-mail:huarxu@163.com

T05-0018

矮壮素对大鼠睾丸间质细胞发育及睾酮分泌的影响

张浩然, 王晓霞, 康陈萍, 李亦佳, 肖倩倩*, 郝卫东*

(北京大学公共卫生学院毒理学系/食品安全毒理学研究与评价北京市重点实验室, 北京 100191)

摘要:目的 探究植物生长调节剂矮壮素暴露对雄性大鼠睾丸间质细胞发育与睾酮分泌的影响。材料和方法 42只9周龄SPF级雄性SD大鼠适应性喂养7天后,按体重随机分为对照组与低、中、高剂量组,其中对照组和高剂量组每组各14只,低剂量组和中剂量组每组各7只。利用二甲磺酸乙烷(EDS)构建体内睾丸间质细胞再生模型,即注射EDS后第7日(Post EDS d7)成熟睾丸间质细胞被全部消除,仅保留睾丸间质干细胞,继续饲养至Post EDS d56睾丸间质细胞发育成熟,睾酮恢复正常。所有大鼠单次腹腔注射75 mg/kg BW EDS,Post EDS d7起每日灌胃染毒矮壮素,对照组为超纯水,矮壮素低、中、高剂量组分别为75、137.5和200 mg/kg BW。Post EDS d28处死对照组和高剂量组7只大鼠;Post EDS d56处死剩余大鼠。采用ELISA法检测大鼠血清及睾丸组织中的睾酮水平;RT-qPCR和Western blot法检测StAR、CYP11A1、CYP17A1、3 β -HSD、17 β -HSD等大鼠睾丸间质细胞睾酮合成酶的表达水平;RT-qPCR、Western blot和免疫组织化学染色方法检测睾丸组织睾丸间质细胞发育标志物11 β -HSD的表达水平;苏木素-伊红染色观察大鼠睾丸组织结构改变。结果 ELISA法检测结果显示,Post EDS d56中剂量与高剂量组雄性大鼠血清及睾丸组织匀浆中的睾酮水平与对照组比较显著降低($P < 0.01$),提示矮壮素暴露抑制了雄性大鼠睾酮分泌;RT-qPCR和Western blot结果显示,与对照组比较,Post EDS d28高剂量组雄性大鼠CYP17A1、17 β -HSD等睾酮合成酶的mRNA水平显著降低($P < 0.05$),Post EDS d56高剂量组雄性大鼠CYP11A1、CYP17A1等睾酮合成酶的mRNA水平显著降低($P < 0.05$),睾酮合成限速酶StAR的mRNA及蛋白水平均显著降低($P < 0.01$),提示矮壮素暴露干扰了睾丸间质细胞的睾酮合成过程;与对照组比较,Post EDS d28高剂量组大鼠11 β -HSD的mRNA、蛋白表达水平及免疫组织化学染色阳性细胞数均显著降低($P < 0.05$),提示矮壮素暴露抑制了大鼠睾丸间质细胞向成熟阶段发育的过程。苏木素-伊红染色结果显示,Post EDS d28与d56的高剂量组大鼠与相应对照组比较睾丸组织结构松散,曲细精管间隙增加,说明矮壮素暴露干扰了睾丸间质细胞的再生过程。结论 矮壮素暴露可抑制睾丸间质细胞的发育过程,可能通过抑制睾丸间质细胞睾酮合成酶的表达,导致大鼠睾酮水平降低。

关键词:矮壮素; 睾丸间质细胞发育; 睾酮**基金项目:**国家自然科学基金项目(82204082)**通讯作者:**肖倩倩, E-mail: 2211210119@stu.pku.edu.cn

T05-0019

番茄红素通过调节SIRT3-FOXO3通路缓解伏马菌素B1致鸡肝细胞衰老

常远航, 刘瑞琪, 王雪琪, 胡子焱, 杨尚嘉, 陈明山, 王嘉欣, 李金龙, 赵一*

(东北农业大学动物医学学院, 黑龙江省哈尔滨市 150030)

摘要:目的 伏马菌素B1(FB1)是一种分布广泛且稳定性强的真菌毒素,经常出现在玉米食品和饲料中,危害动物以及人类健康和食品安全。番茄红素(LYC)是一种天然的类胡萝卜素,通常存在于红色蔬菜或水果中,是目前最有效的抗氧化剂之一。线粒体自噬是一种降解老化或受损线粒体的过程,在维持线粒体稳态中起着重要作用。Sirtuin 3(SIRT3)是一种重要的线粒体去乙酰化酶,与衰老、能量代谢和线粒体自噬有关。在我们的研究中,旨在探讨LYC如何减轻FB1诱导的线粒体自噬抑制和鸡肝细胞衰老,以及SIRT3在这一过程中的作用。材料与方法 为了进一步探讨LYC在FB1致肝细胞损伤中的作用及其潜在机

制,本试验以鸡胚原代肝细胞为研究对象,将鸡胚原代肝细胞分为2组,空白对照组(Con)、FB1处理组(25 μ M FB1)。检测各组细胞衰老和线粒体自噬的相关因子变化,并且同时观察细胞的超微结构、凋亡水平、衰老水平、氧化应激水平、线粒体膜电位、线粒体膜通透性转运孔道的改变。**结果** (1)LYC抑制FB1诱导的鸡胚原代肝细胞的超微结构损伤、凋亡水平增加、衰老相关 β -半乳糖苷酶检测阳性细胞数量上调、细胞内ROS增加、细胞增殖能力下降、细胞衰老(P16、P21、P53、LaminB和 γ -H2AX)相关蛋白水平改变,表明LYC能够缓解FB1诱导的鸡胚原代肝细胞衰老和功能损伤。(2)LYC抑制FB1诱导的鸡胚原代肝细胞的线粒体超微结构损伤、线粒体膜电位下降、线粒体通透性转换孔损伤、自噬及线粒体自噬(TOMM20、Sirt3、BNIP3、BNIP3L、FOXO3、LC3B、P62、Atg5、Atg7、Beclin1和LAMP2)蛋白水平改变,表明LYC能够保护FB1诱导的鸡胚原代肝细胞线粒体自噬降低和功能损伤。(3)敲低SIRT3能够抑制LYC对FB1诱导的鸡胚原代肝细胞衰老和线粒体自噬水平下降的保护作用,表明LYC能够通过调节SIRT3拮抗FB1导致的肝细胞损伤。**结论** FB1可诱发肝细胞结构和功能损伤。LYC拮抗FB1引起的肝脏毒性作用,通过调节SIRT3缓解FB1诱导的肝细胞衰老和线粒体自噬水平下降。本研究证明LYC能够有效的拮抗霉菌毒素对肝脏的毒性作用,为医学及兽医临床中霉菌毒素诱导肝损伤的防治提供新的靶点,并且为有效的保障畜禽健康提供了新的思路。

关键词:伏马菌素B1; 番茄红素; 细胞衰老; SIRT3; 线粒体自噬

作者简介:常远航, E-mail: hang18337312012@163.com

通讯作者:赵一, E-mail: zhaoyi@neau.edu.cn

T05-0020

浅谈细菌类 mRNA 疫苗临床前安全性评价的研究进展

刘光臣, 柳璐, 黄远铿, 郭健敏, 杨威*

(广州湾区生物医药研究院, 广东莱恩医药研究院有限公司, 广东省药物非临床评价与研究重点实验室, 国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心, 广东省创新药物评价与研究工程技术研究中心, 广东 广州 510990)

摘要:目前抗微生物药物会受到细菌耐药性的影响,常规的治疗方式但往往受到细菌耐药性和患者依从性差的限制,所以迫切需要研制出安全高效的治疗性与预防性疫苗,有效对抗Hp感染的同时最大限度地减少耐药性的影响,随着mRNA技术在新冠病毒中的成功应用,有望为研发细菌类疫苗提供新的方向。本文从影响细菌mRNA疫苗的主要安全性因素、抗原选择及免疫应答、组织分布三个方面浅谈细菌类mRNA疫苗临床前安全性评价的研究进展。

细菌类mRNA疫苗的非临床安全性评价可从以下几点考虑:

(一) 影响细菌 mRNA 疫苗的主要安全性因素

对于脂质递送系统的安全性研究包括组织分布和一般毒性研究。由于单一脂质成分的生物分布与递送系统中脂质成分在体内可能存在组织分布的差异,可在单次及重复给药毒性试验中设置缓冲溶液的对照组,以检测脂质递送系统的毒性反应

(二) 细菌 mRNA 疫苗的抗原选择及免疫应答

根据文献报道中可通过生物信息学软件对优势表位进行预测,再通过对多段序列进行融合表达并进行算法优化的筛选,在提高序列蛋白表达的同时降低免疫原性。在非临床安全性研究中,须考察mRNA疫苗的T细胞依赖性抗体反应是B细胞针对T细胞依赖性抗原产生的抗体应答,需要Th2细胞的辅助方可产生特异性抗体。同时可通过检测接种疫苗后机体产生的IgA、IgM和IgG水平,从而反映受试疫苗潜在的免疫毒性。

(三) mRNA 疫苗的组织分布问题

编码细菌抗原的mRNA在受体细胞中表达及mRNA疫苗自身在相应的组织或器官中的异常聚集,可能

会引发机体潜在的安全性风险。mRNA 纳米粒递送载体材料的组成、电势电位、粒径大小以及疫苗注射方式等均可能影响 mRNA 疫苗的生物分布。可通过免疫荧光法通常是将 LNP 作为递送系统包裹荧光素酶 mRNA 的疫苗注射至动物体内,然后通过活体成像观察荧光素酶的分布,对潜在靶器官及毒性作用的发现具有重要意义。

现阶段随着对细菌类 mRNA 疫苗的不断深入,非临床安全性的评价方法需要进一步完善试验整体设计,以提高试验结果的可靠性以及提高疫苗的安全性。

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

作者简介:刘光臣,广东莱恩医药研究院有限公司(广东省药物非临床评价与研究重点实验室),E-mail: liuguangchen@lewin.com.cn

通讯作者:杨 威,教授级高级工程师/博士、博士后导师,E-mail: yangwei0719@163.com

T05-0021

医疗器械颗粒物的生物学风险及评估方法

张 薇

(美敦力(上海)有限公司)

摘要:医疗器械上存在的颗粒物对患者具有潜在的健康风险。这些颗粒物可能来自于器械生产制造过程和环境(包括人体、服装、机械加工、润滑剂等等)、产品包装、器械本身(材料、药物涂层、临床使用过程中的脱落或磨损)。颗粒物造成的健康风险取决于具体的器械以及颗粒物最终进入人体内的位置。例如,进入循环血液系统的颗粒物可通过静脉炎、肺肉芽肿、局部组织梗塞和栓塞等机制造成伤害。不与循环血液直接接触的医疗器械上的颗粒物最终可能会进入并停留在体内的任何地方。在这种情况下,健康风险取决于器械的放置位置以及颗粒物的物理/化学性质。比如,非血管植入器械上的颗粒物带来的一个主要问题是异物反应,这可能导致纤维化、炎症以及对器械排斥的免疫反应。因此,应最大限度地减少医疗器械的颗粒物污染,以避免可能造成的健康风险。

目前有许多标准和指导原则提供了医疗器械颗粒物测试的建议和要求,从原则性的指南到具体的测试方法以及试验通过/失败的标准,包括 USP<788>、ISO 14708、ISO 1135-4、ISO 8536-4、ANSI/AAMI AT6、ISO 18562-2 等。然而,这些标准和指南均未从毒理学可耐受阈值的角度对试验通过/失败的标准提供详细的依据和解释。随着对医疗器械中颗粒物存在情况的日益严格的审查,制造商面临着如何定义和选择安全暴露限值的挑战。在这里,我们建议通过颗粒物危害和化学毒性两方面来评估医疗器械颗粒物的潜在生物学风险,主要方法包括(1)评估颗粒物释放到血液和组织(例如左、右心脏、大脑和其他器官)的生理命运和影响;(2)评估巨噬细胞系统与外来颗粒物之间的潜在相互作用;(3)根据 ISO 10993-17 和 GB/T 16886-17,对颗粒物的化学成分进行长期暴露的毒理学风险评估。

关键词:医疗器械;颗粒物;生物学风险

通讯作者:张 薇,E-mail: wei.zhang2@medtronic.com

T05-0023

LW2116对SD大鼠连续1个月经口重复给药毒性试验研究

牛慧君, 柳璐, 雷夏凌, 杨威*

(广州湾区生物医药研究院, 广东莱恩医药研究院有限公司, 广东省药物非临床评价与研究重点实验室, 国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心, 广东省创新药物评价与研究工程技术研究中心, 广东广州 510990)

摘要:目的 LW2116是在“辩证求因、审因论治”的中医理论基础上,深入分析艾滋病发热患者病因、发病机理特点研制的治疗艾滋病发热伏邪膜原证的方药,临床上主要用于艾滋病引起的发热。本研究的主要目的是观察连续1个月重复灌胃给予LW2116后,对SD大鼠可能产生的毒性反应及其严重程度,主要毒性靶器官或靶组织及其损害的可逆性,探索无毒反应剂量,为重复给药进行风险评价,给临床设计人用安全剂量和主要监测指标提供参考。方法 试验选取适应性观察合格的SD大鼠120只,动物按体重均衡随机分为4组,分别为阴性对照组、LW2116低(5.40g生药/kg)、中(10.81g生药/kg)、高(27.20g生药/kg)剂量组,30只/组,雌雄各半。各组均以15mL/kg/次灌胃给药,每天给药两次,两次给药至少间隔5h,按最新体重调整给药量,连续给药1个月,恢复期1个月。试验期间具体观察和检查包括以下内容:临床观察、摄食量、体重、眼科、血液学、凝血功能、血液生化学、骨髓细胞分类、尿常规、病理组织学等检查。结果 (1)临床观察、眼科检查、摄食量、体重及体重增重、血液学、凝血功能、血液生化学、尿常规、骨髓细胞分类结果:各组均未见与受试物相关的具有毒理学意义的改变。(2)病理结果表明:各组均未见与受试物相关的具有毒理学意义的改变。结论 在本专题研究条件下,LW2116以5.40(低)、10.81(中)、27.20(高)g生药/kg的剂量,一天两次,连续1个月经口重复给予SD大鼠后:未观察到有害作用剂量(NOAEI)为27.20g生药/kg,按体表面积折算相当于人临床拟用量的5.0倍。

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

作者简介:牛慧君,硕士,专题负责人,电话:19927650315,E-mail:niuhuijun@lwwin.com

通讯作者:杨威,教授级高级工程师/博士、博士后导师,广州湾区生物医药研究院院长、广东省药物非临床评价与研究重点实验室主任、广东莱恩医药研究院有限公司董事长、总经理,Tel:18928860179,(020)87998690,E-mail:yangwei0719@163.com

T05-0024

SD大鼠经口灌胃给予ABC-001胚胎-胎仔发育毒性伴随毒代动力学试验

陈琼芳, 刘学武, 王小青*

(湖南普瑞玛药物研究中心有限公司,新药药效与安全评价湖南省重点实验室,湖南长沙 410329)

摘要:目的 ABC-001是一个小分子化学药物。本试验观察妊娠SD大鼠自胚胎着床至硬腭闭合期间经口灌胃给予ABC-001对妊娠大鼠、胚胎及胎仔发育的影响,包括妊娠大鼠与非妊娠雌性大鼠毒性的比较,胚胎-胎仔死亡、生长改变和结构变化(致畸作用)等,为临床试验提供参考信息。材料和方法 选取检疫合格已受精雌鼠共132只,按体重随机分为4组,每组33只(其中毒代卫星组动物8只)。试验设空白对照组和ABC-001低、中、高剂量组(剂量分别为30 mg/kg、60 mg/kg、120 mg/kg)。各组分别按10 mL/kg体积经口灌胃给药,雌鼠交配后GD6开始给药至GD19,每日2次,连续14日。试验期间记录所有母鼠妊娠期的体重、摄食量、笼旁观察情况、妊娠率、死亡情况等。GD20处死母鼠,取胎仔,检查黄体数、子宫连胎重、胎仔重量、胎盘总重、胎盘外观、活胎数、吸收胎数、死胎数、胎仔性别、身长、尾长及外观、内脏和骨骼,并计算着床数,检测孕鼠血清激素等,卫星组动物开展毒代动力学检查(AUC_{0-1} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 C_{max} 及羊水、胎仔、胎盘、子宫、

卵巢中ABC-001含量)。结果 试验期间,各组动物均未见明显药物毒性相关临床症状,无动物死亡,未见流产孕鼠,假孕动物数与空白对照组比较未见明显差异;ABC-001对孕鼠体重、母体增重和摄食量无明显影响;对孕鼠血清激素水平(E2、PROG、FSH和T)未见有明显影响;ABC-001在SD大鼠体内一定剂量范围(30~120 mg/kg)内的暴露量随给药剂量的增大而增加,未发现蓄积现象。SD大鼠妊娠(GD6~GD19)期间连续给药后,药物可通过胎盘屏障,分布于各组织,药物含量随给药剂量的增大而增加,且随着给药剂量的增大出现胎仔致死现象;ABC-001低、中、高剂量对孕鼠妊娠结局(GD20)(子宫连胎重、窝均体重、平均黄体数、平均着床数、平均活胎数、着床前丢失率、吸收率、胎盘均重)无明显影响,ABC-001中、高剂量可致死胎率增高、活胎率降低,低剂量组未见明显影响。ABC-001低、中剂量组对胎仔体格生长发育(体重、身长、尾长等)及胎仔外观畸形均无明显影响;ABC-001高剂量组可见胎仔体格生长发育(体重、身长、尾长等)明显降低,胎仔外观畸形率明显增高。ABC-001中、高剂量组胎仔内脏和骨骼畸形率显著增加,可见明显的致畸作用。结论 在本试验条件下,胚胎-胎仔发育毒性试验中,ABC-001在SD大鼠体内一定剂量范围(30、60、120 mg/kg)内的暴露量随给药剂量的增大而增加,且未发现蓄积现象。药物可通过胎盘屏障,分布于各组织,组织药物含量随给药剂量的增大而增加,且随着给药剂量的增大出现胎仔致死现象。ABC-001经口灌胃给药对母鼠的NOAEL为120 mg/kg(约相当于药效学起效剂量倍数的9倍);对SD大鼠胚胎-胎仔发育毒性的NOAEL为30 mg/kg(约相当于药效学起效剂量倍数的3倍)。

关键词:妊娠大鼠;ABC-001;胎仔发育;胚胎-胎仔发育毒性试验

作者简介:陈琼芳,女,硕士,助理研究员,主要从事新药临床前药理毒理学研究,E-mail:chenqiongfang@hnse.org

通讯作者:王小青,女,博士,副研究员,主要从事新药临床前药理毒理学研究,E-mail:wangxiaqing@hnse.org

T05-0025

SD大鼠经口灌胃给予PRM-005生育力与早期胚胎发育毒性试验

刘可,刘学武,张宗利*

(湖南普瑞玛药物研究中心有限公司,新药药效与安全评价湖南省重点实验室,湖南长沙 410329)

摘要:目的 PRM-005为妇科用中药。本研究采用SD大鼠经口灌胃给予不同剂量PRM-005,评价受试物对动物生殖的毒性或干扰作用。评价内容包括雌性亲代动物配子形成、交配行为、生育力、胚胎着床前及着床后生长发育的影响,为临床用药提供参考资料。材料和方法 选用SD大鼠200只,性成熟且未经交配,按性别体重随机分为4组,分别为空白对照组(纯水)和PRM-005低剂量组(8.0 g生药/kg)、中剂量组(16.0 g生药/kg)、高剂量组(32.0 g生药/kg),每组雌雄大鼠各25只。各组雌鼠交配前每天给药1次,连续2周,同笼期及交配后继续给药至妊娠后第6天结束,雄鼠仅用于交配,不进行给药。记录所有动物交配前的体重、摄食量、笼旁观察、交配情况等,妊娠大鼠于GD15进行终末检查,确认是否妊娠,称量每窝活胎重和子宫连胎重,计数黄体数、总着床数、活胎数、死胎数和吸收胎数,称量双侧卵巢总重和子宫重量,取双侧子宫中间段、卵巢进行组织病理学检查。结果 给药期间,未见流产孕鼠;中、高剂量组可见流涎、尿量增加,考虑与其药理作用相关,未见其它异常体征,无动物死亡;未见未交配成功雌鼠;空白对照组和低、中、高剂量组均有假孕动物,分别为3/25、2/25、6/25、20/25。PRM-005低、中、高剂量对孕鼠母体增重和摄食量均无明显影响。PRM-005中、高剂量对雌鼠生殖能力和母体妊娠结局有明显影响,具体表现为:与空白对照组比较,高剂量组妊娠率明显降低,中、高剂量组平均黄体数和平均着床数、活胎率明显降低,吸收胎数和吸收胎率明显升高。PRM-005对雌性孕鼠血清激素水平(E2、FSH、PROG、T)均无明显影响。显微镜下检查卵巢和子宫,均未发现明显药物相关性病理改变。受试物处方组成中含有具有雌激素样作用的成分,可引起动物卵巢功能低下、排卵数变少、子宫质量下降。本次试验中观察到受试物高剂量组大部分雌鼠表现为未孕,中剂量组孕鼠平均黄体数和平均着床数、活胎率及活胎数明显降低,吸收胎数和吸收胎率明显升高,提示受试

物中、高剂量对雌鼠生殖能力和母体妊娠结局有明显影响,可能与该成分作用相关。**结论** 在本试验条件下,经口灌胃给予 PRM-005 对亲代雌性动物未观察到不良反应的剂量水平(NOAEI)为 32.0 g 生药/kg,约相当于临床拟用剂量的 144 倍(按公斤体重计)和 24 倍(按体表面积计);对雌性动物生育力与早期胚胎发育毒性的 NOAEI 为 8.0 g 生药/kg,约相当于临床拟用剂量的 36 倍(按公斤体重计)和 6 倍(按体表面积计)。

关键词:生育力与早期胚胎发育; SD 大鼠

作者简介:刘 可, E-mail: liuke@hnse.org

通讯作者:张宗利, E-mail: zhangzongli@hnse.org

T05-0026

非布司他心毒性的风险发现与实验观察

王 雪¹, 丁雪丽¹, 鲁程锦¹, 陈思颖¹, 张晓滕¹, 张 冰^{1,2*}, 林志健^{1,2**}

(1. 北京中医药大学中药学院, 2. 北京中医药大学中药药物警戒与合理用药研究中心, 北京 102488)

摘要:目的 挖掘美国自发报告系统中非布司他心脏不良事件,并结合实验观察,分析其风险特点,为降尿酸临床用药安全与警戒提供参考。**方法** 基于 FAERS 数据库 2004 年第 1 季度至 2021 年第 3 季度有关非布司他心脏不良事件报告,挖掘其风险信号。在高尿酸血症状态大鼠模型中,设置非布司他高剂量、低剂量两个组,观察生化检测中尿酸水平及相关心脏指标和组织病理,在降尿酸条件下观察其心脏风险。**结果** FAERS 数据库中共得到非布司他 5001 份不良反应报告,15989 例不良反应,其中涉及与心脏相关的不良事件共 992 例,显示 18 个心脏风险信号。非布司他心脏毒性较多涉及男性,年龄大多发生在 65 岁以上。动物实验观察高尿酸状态下给予非布司他后大鼠尿酸水平显著降低,说明具有良好的降尿酸疗效;心脏指标 AST、CK、cTn-I 水平升高,LDH、CK-MB 水平降低,且 MASSON 染色显示非布司他组出现不同程度的纤维化、蓝色胶原沉积明显。**结论** 临床使用非布司他治疗高尿酸血症的过程中需要关注其心脏风险,针对临床不同人群合理选用非布司他。

关键词:非布司他; 心脏毒性; FAERS; 风险; 药物警戒

作者简介:王 雪, E-mail: wangxue20220222@163.com

T05-0027

番茄红素通过调节 SIRT1-FOXO1 轴介导的线粒体自噬缓解伏马菌素 B1 诱导的鸡肝细胞泛凋亡

王雪琪, 常远航, 刘瑞琪, 胡子焱, 杨尚嘉, 陈明山, 王嘉欣, 李金龙, 赵 一*

(东北农业大学动物医学学院, 黑龙江省哈尔滨市 150030)

摘要:目的 伏马菌素 B1(FB1)是一种毒性最强、分布最广的伏马菌素,在世界范围内引起了高度关注。番茄红素(LYC)作为一种天然有效的类胡萝卜素,因其抗氧化性而受到更多人的青睐。但其是否可缓解 FB1 引起的鸡肝细胞毒性仍有待探究。线粒体自噬可以消除受损或功能失调的线粒体,以防止有缺陷的线粒体破坏细胞。沉默信息调节因子 1(SIRT1)是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)依赖性去乙酰化酶的一个成员,通过调节去乙酰化酶的活性,对叉头盒转录因子 O1(FOXO1)的乙酰化起着至关重要的作用。Panoptosis 是一种程序性细胞死亡,表现为细胞焦亡、细胞凋亡和坏死性凋亡。本研究的目的是探讨 LYC 在 FB1 诱导鸡肝细胞损伤的具体作用机制。**材料与方法** 本试验以鸡肝癌细胞系(LMH)为研究对象,首先将细胞分为对照组(CON)、番茄红素组(LYC)、伏马菌素 B1 组(FB1)以及番茄红素拮抗伏马菌素 B1 组(LFB),分别检测细胞结构和功能及线粒体变化,然后在培养体系中进行 SIRT1 siRNA(siSIRT1)转染,再进

行细胞结构和功能及线粒体变化和 Panoptosis 相关指标的检测。结果 (1)LYC 改善了 FB1 诱导的鸡肝细胞结构损伤、细胞凋亡水平的增加、细胞 ROS 的升高、Panoptosis 相关指标的增加,表明 LYC 能够缓解 FB1 诱导的鸡肝细胞损伤和泛凋亡。(2)LYC 缓解了 FB1 诱导的线粒体空泡化和嵴断裂等线粒体损伤现象、线粒体膜电位的降低、Ac-FOXO1 蛋白表达的增加、自噬和线粒体自噬(Pink1、Parkin、Tomm20、Beclin1、P62、LC3B)相关蛋白的改变,表明 LYC 能够改善 FB1 诱导的鸡肝细胞线粒体结构功能损伤及线粒体自噬下降。(3)敲低 SIRT1 能够加剧 Panoptosis、Ac-FOXO1 的表达及线粒体自噬的减少,敲低 SIRT1 后 LYC 不能拮抗 FB1 对鸡肝细胞的损伤。表明 LYC 能够通过 SIRT1-FOXO 通路增加线粒体自噬拮抗 FB1 致鸡肝细胞损伤。结论 FB1 可诱导鸡肝细胞结构和功能损伤,LYC 通过调节 SIRT1-FOXO 通路增加 Pink-Parkin 介导的线粒体自噬,缓解 FB1 诱导的鸡肝细胞 Panoptosis。本研究表明 LYC 对霉菌毒素诱导的鸡肝细胞损伤具有拮抗作用,为真菌毒素引起的肝脏疾病的预防和治疗提供了一种新的方法和关键靶点。

关键词:伏马菌素 B1; 番茄红素; 线粒体自噬; SIRT1; 泛凋亡

作者简介:王雪琪,E-mail:974531810@qq.com

通讯作者:赵一,E-mail:zhaoyi@neau.edu.cn

T05-0028

低浓度甲醛通过激活巨噬细胞 NLRP3 炎症小体增强小鼠接触性皮炎炎症反应

徐缓^{1*}, 马慧娟²

(1. 安徽理工大学公共卫生学院, 安徽省合肥市 231131;

2. 华东理工大学药学院, 上海市徐汇区 200237)

摘要:目的 甲醛是常见的环境污染物,是 IARC 划定的一类致癌物,也是一种已知的接触致敏剂。甲醛暴露与多种炎症性疾病的发病相关,研究表明,1%或2%的浓度的甲醛能诱发接触性皮炎,但具体的机制未完全研究清楚。甲醛作为辅料和防腐剂添加入一些化妆品中,按照现行的《化妆品安全技术规范》,甲醛浓度低于0.05%时无需在成分列表中标注。尽管这一浓度远低于甲醛作为皮肤致敏剂的浓度,但其是否能够进一步增强接触性皮炎中的炎症反应需要被研究和证实。**材料和方法** 体内实验中,将小鼠分成对照组、甲醛暴露组和 MCC950(NLRP3 抑制剂)治疗组,使用 2,4-二硝基氟苯(DNFB)的丙酮-橄榄油溶液涂抹建立小鼠接触性皮炎模型,在炎症诱发的阶段为实验组和治疗组小鼠加入 0.05%浓度的甲醛,治疗组每天腹腔注射 10 mg/kg 的 MCC950。体外实验中,小鼠原代巨噬细胞外加 50 或 100 μ M 甲醛处理,并尝试通过 20 nM 的 MCC950 逆转 NLRP3 炎症小体的激活效应。**结果** 小鼠原代巨噬细胞在体外通过 50 和 100 μ M 甲醛处理后促炎功能显著增强,并观察到 NLRP3 炎症小体的激活,通过 MitoSOX 荧光探针检测到甲醛于巨噬细胞线粒体中诱导的活性氧升高。类似的炎症反应加剧和炎症小体激活效应也在 0.05% 甲醛涂抹的接触性皮炎小鼠模型中得到证实。同时, MCC950 对 NLRP3 的抑制能显著减弱在体内和体外诱导的 NLRP3 炎症小体的激活,缓解了由于甲醛暴露所加剧的炎症反应。**结论** 实验结果不仅表明低浓度甲醛能够通过促进巨噬细胞 NLRP3 炎症小体的激活来加重接触性皮炎的炎症反应,而且提示该机制可能在一些含甲醛化妆品导致的过敏和皮肤炎症反应中发挥重要的作用。同时,研究结果也说明通过药物靶向 NLRP3 可以缓解甲醛诱导的炎症反应,在甲醛暴露诱发的皮炎、哮喘等炎症性疾病模型中可通过后续实验进一步验证。

关键词:甲醛; NLRP3 炎症小体; 接触性皮炎; 巨噬细胞

通讯作者:徐缓,E-mail:2024078@aust.edu.cn

T05-0029

有机磷农药甲拌磷中毒皮肤吸收重度中毒伴皮肤化学性灼伤一例

张 帅¹, 菅向东², 王 青¹, 刘玉卫¹, 张 哲¹, 魏传香¹

(1. 山东省济南市章丘区人民医院急诊科, 山东 济南 250200; 2. 山东大学齐鲁医院, 山东 济南 250200)

摘要:甲拌磷作为有机磷农药的重要成员,以其高毒性在农业生产中发挥着不可或缺的作用。然而,其强大的毒性也使得在处理不当情况下成为健康的严重威胁。农药可通过消化道、皮肤及黏膜、呼吸道等多种途径引发中毒。特别是当防患意识不强,防护不到位时,不经意间的接触就容易引发接触性中毒,临床症状往往不典型而容易被误诊为胃肠炎,从而延误最佳治疗时机。相较于单纯的化学性灼伤,有机磷农药对皮肤造成的腐蚀伤具有更高的感染风险,无疑增加了治疗难度。2024年4月我院成功救治了1例甲拌磷经皮肤吸收后致重度中毒伴皮肤化学性灼伤患者,现将案例汇报如下,以期提高临床对甲拌磷接触性中毒的识别及处理能力。

一、临床资料

患者女,41岁,农民。患者于2024年4月18日于田间劳作过程中应用甲拌磷原液约200 ml置于喷壶内于大棚内喷洒以去除甜瓜秧苗蚜虫,将农药原液喷洒于瓜秧根部,通过蒸发作用清除蚜虫。劳作过程中,患者直接坐于地面上,未佩戴口罩,棚内工作时间约两小时。期间衣裤被浸湿未察觉。值得注意的是,患者母亲于相同环境工作,时间约六小时,但于小板凳上作业,并未直接接触地面。5小时前患者进餐后出现恶心、呕吐、乏力、腹泻、出汗,同餐人员未出现任何症状,就诊于当地医院,以胃肠炎给予相应补液、纠正水电解质平衡紊乱等治疗。输液完成后患者仍有上述症状且进行性加重,并出现大汗、四肢无力、头晕并跌倒在地,急来我院就诊。来院时查体,神志恍惚,精神差,双侧瞳孔呈针尖样大小,口腔分泌物较多,双肺呼吸音粗,双肺底散在湿性啰音。心率120次/分,律齐,腹软,未及明显触痛,四肢肌束轻震颤。仔细询问病史得知劳作过程中有农药接触史,立即完善相应的辅助检查,检测血胆碱酯酶活力仅为33U/L(4500-12000U/L),分析患者中毒原因接触性或吸入性中毒所致,查体发现患者臀部皮肤轻度红肿,未觉不适,无张力性水疱。结合体征临床诊断为急性有机磷农药(甲拌磷)中毒(重度)。立即去除污染衣物,以清水反复多次清洗皮肤,同时将其母亲接来院后检测胆碱酯酶活力示6256U/L(4500-12000U/L),结合其母在棚内工作时间较患者长,排除两者吸入性中毒可能,反复清洁皮肤同时应用抗胆碱药阿托品(10 mg)、戊乙奎醚(2 mg),胆碱酯酶赋能剂碘解磷定(2 g)等药物对症处理,症状较前好转,完善胸部CT检查未见渗出性改变。参照有机磷农药中毒诊断标准,初步诊断:急性有机磷农药(甲拌磷)接触性中毒(重度),皮肤化学性灼伤收入急诊EICU。

二、治疗

患者入院后1小时后再次出现神志恍惚,大汗淋漓,口角流涎,瞳孔呈针尖样改变、呼吸频率降低至12次/分,血压169/97mmHg,心电监测示末梢血氧降至72%,呼吸浅弱,全身潮湿,心率达130次/分,立即给予阿托品15 mg,分三次静推,每次5 mg,给予面罩高流量吸氧,氧流量调至10 L/min,同时给予碘解磷定40 ml快速静滴,密切监测生命体征,给与保护胃粘膜,预防二次感染发生,维持内环境平衡等治疗,床旁POCT检查如下:WBC 11.58x10⁹/L,中性粒细胞(N)94.5%,C反应蛋白(CRP)23.5 mg/L,降钙素原(PCT)0.46 ng/ml;BNP-pro 225pg/ml;血气分析示pH 7.378,PO₂ 65mmHg,PCO₂ 36mmHg,SaO₂ 85%,乳酸0.80 mmol/L,HCO₃⁻ 21.7 mmol/L,BE-3.3 mmol/L,结合病人病史,考虑存在毒物再吸收引起,经过1小时后,患者面色潮红,心率升至150次/min,血氧饱和度提升至89-92%,瞳孔逐渐增大至3 mm,分泌物较前明显减少,双肺未闻及湿性啰音,腹软,未触及明显触痛,达到阿托品化状况。但考虑患者接触的是剧毒类药物,具有代谢慢、容易反复吸收中毒情况,向家属讲明病情,立即给予血液灌流,已清除进入体内的毒素,住院期间先后给与血液灌流三次。患者臀部皮肤出现农药腐蚀引发的水疱,水疱内有透明液体,部分表皮脱失,有大量渗出,呈深Ⅱ度灼伤。

患者约2小时后神志逐渐恢复,降低氧浓度,氧浓度维持6 L/min,末梢血氧维持90-94%,第2天停用高

流量吸氧,监测CHE升至427 U/L,皮肤创面给与定期换药,应用复方紫草油促愈合,磺胺嘧啶银乳膏及康复新液,同时予以创面的包扎。住院治疗7天后复查胆碱酯酶活力为4160 U/L,治愈出院。患者住院期间部分实验检查指标见表1,患者臀部皮肤化学灼伤性改变见图一。

三、讨论

农业生产中常会接触有机磷农药,日常生活(灭蚊、灭蟑螂等)偶尔也会接触,当个人防护意识不强,极易导致皮肤接触性中毒的发生。通过此病例,值得注意的是,甲拌磷具有毒性高、代谢慢的特点,病人容易出现二次中毒情况。以往急诊接触较多的皮肤接触中毒患者多为老年人,将农药(多以敌敌畏、氧化乐果等)原液涂擦于身体表面以灭虱,或应用背挎式喷雾器对果树进行除虫时个人防护不到位所致且中毒程度多为轻到中度中毒,极少重度。本例患者为甲拌磷吸收所致的重度有机磷中毒,同时伴有皮肤化学性灼伤。事件发生是通过熏蒸法消除植物蚜虫,其母处于同样环境且工作时间较患者长,但其胆碱酯酶活力却正常,患者工作时间短但有皮肤接触史,毒物吸收致人体中毒发生时间可推断为:消化道<皮肤黏膜接触<呼吸道。

通过此例患者的救治,以下几点引发我们思考:①患者前期身体出现不适后以胃肠炎表现就诊于医疗机构,最初表现为肢体无力、恶心、呕吐、腹痛、腹泻,接诊的第一印象为胃肠炎,分析原因多为中毒防护意识不强,就诊过程中忽略提供农药接触史,接诊医师未仔细查体,对于病史,更关心是就诊的临床症状。此例患者在输液后症状无减轻反而出现晕厥,来院后仔细追问情况下考虑接触农药中毒所致,但究竟为皮肤接触所致还是呼吸道吸收所致的中毒,仍无法明确诊断,经过查体发现患者皮肤灼伤,回忆劳作过程中直接坐于地面上,衣裤湿透后皮肤接触,且劳作完成后未及时清洗清除毒物。结合其母的化验检查,明确诊断。日常工作中,尤其是急诊,需要对疑似中毒患者,详细询问病史,包括是否有农药皮肤及呼吸道接触史,并仔细进行体格检查,必要时行毒物浓度的检测,以尽快明确诊断,避免误诊误治。②有机磷农药中甲拌磷(3911),属剧毒类农药,半数致死量(LD50)<10 mg/kg,具有毒性强,代谢慢,容易出现反复吸收,胆碱酯酶恢复慢的特点。中毒发生后毒蕈碱样症状(M样症状)、烟碱样症状(N样症状)和中枢神经系统症状典型,二次中毒时容易发生呼吸衰竭,需密切监测血流动力学及生命体征情况,必要时给予机械通气以维持基本的生命体征。对于此例患者在出现二次中毒情况后,结合胆碱酯酶活力(33U/L),立即给予了血液灌流,效果较理想。③对于皮肤接触行农药中毒患者,应立即去除污染衣物,清水反复冲洗接触部位,尽可能减少毒物吸收。应用解毒药物,尽早达到阿托品化,密切监测生命体征,必要时给予机械通气纠正呼吸衰竭,必要时血液净化,清除体内残存毒物。④皮肤灼烧方面,定期换药,避免二次感染发生,此例患者应用复方紫草油,磺胺嘧啶银乳膏及康复新液。其中复方紫草油有促进创面愈合、止痛解毒、凉血清热的的作用。磺胺嘧啶银乳膏为磺胺类药物,具有磺胺嘧啶和银盐共同的作用,对多数革兰阳性菌、革兰阴性菌、酵母菌都有较好抗菌作用,促使创面干燥、结痂及愈合。同时康复新液具有促进表皮细胞生长和肉芽组织增生,消除炎症水肿,加快创面的修复愈合。⑤患者发生上述情况后,因耽误农作物生产,同时长期俯卧位引发不适及担心留下后遗症而产生焦虑情绪,情绪较低落,给予心理量表评估,实时掌握患者心理状况,使心理护理开展的有的放矢,采取“医健心管”闭环管理模式(暨综合医疗救治、健康宣教、心理干预、随访管理相结合综合模式),给予患者常规的诊治外,给予相关的健康宣教,沉下心来倾听患者倾诉,与患者达到共情,同时采取认知行为心理干预方法,解决患者错误认知,同时集合全科的力量解决患者担心的农产品销售问题,更好的配合治疗,尽快恢复日常生活。同时加强对患者的随访,于患者出院后定期随访电话及微信随访患者,利于指导患者的恢复,同时促使患者尽快走出事件的阴霾,恢复日常的生活。

综上所述,本例病例提醒我们,甲拌磷中毒的临床表现多样,容易误诊。对于农药中毒的救治需要综合考虑多个方面,目前我院采取的“医健心管”的闭环模式,可显著提高救治成功率,避免二次意外事件发生,尤其在心理量表评估实时掌握患者的心理状况方面,使得心理护理可以真正发挥其作用。

还需引起关注的是基层医院的医生,需要提升对有机磷农药中毒皮肤吸收的警觉性,尤其在夏季,多以恶心、呕吐、腹泻等胃肠炎的症状就诊,患者及家属往往又忽略提供有机磷农药接触情况,多方面的原因容易出现误诊误治,所以,基层医生更应熟悉农药中毒相关的临床表现,减少误诊的发生,及时测定胆碱酯酶的活性及药物浓度,降低不必要的风险。

此外,加强农业劳作过程中的安全防护,减少农药的接触,也是预防此类事件发生的重要举措。另外通过普及农药使用的相关知识,帮助群众更好认识农药使用的双面性,避免滥用和误用,减少意外事件的出现。

T05-0030

创新药 LW2368 滴眼液对荷兰兔连续 6 个月滴眼重复给药毒性试验 伴随毒代动力学研究

刘婉沂, 林俊粒, 张家伟, 王显菲, 郭健敏, 杨威*

(广州湾区生物医药研究院, 广东莱恩医药研究院有限公司, 广东省药物非临床评价与研究重点实验室, 国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心, 广东省创新药物评价与研究工程技术研究中心, 从化区药物药代毒代工程技术研究中心, 广东广州 510990)

摘要:目的 按照 ICH 指导原则要求开展创新药 LW2368 滴眼液对荷兰兔连续 6 个月滴眼重复给药毒性试验伴随毒代动力学研究, 为临床设计人用安全剂量提供参考。方法 对低、中、高剂量组按动物体重以及给药剂量进行滴眼给药, 高剂量组每天给药 2 次, 低、中剂量组每天给药 1 次, 连续给药 6 个月, 恢复期观察 4 周, 分别在首次(D1)、中期(D91)、末次(D182)给药时以及恢复期(D210)进行毒代采血。采用经方法学验证合格的 LC-MS/MS 方法检测未知血浆样品中 LW2368 的浓度, 使用 WinNonlin 统计软件对检测浓度进行主要毒代动力学参数统计。结果 (1) 血浆中药物浓度结果显示, LW2368 检测浓度均低于 24.987 ng/mL; (2) 性别差异: 除中期给药中剂量组暴露量 $AUC_{(0-t)}$ 和达峰浓度 C_{max} 的性别差异比值(F/M)略小于 0.5 外, 中期给药低、高剂量组和末次给药低、中、高剂量组暴露量 $AUC_{(0-t)}$ 和达峰浓度 C_{max} 的性别差异比值(F/M)均在 0.5~2.0 之间; 首次给药各剂量组雌雄动物检测浓度均低于 5.580 ng/mL, 综合分析 LW2368 在荷兰兔体内的暴露量无明显性别差异。(3) 蓄积情况: 各组给药后暴露量 $AUC_{(0-t)}$ 和达峰浓度 C_{max} 的比值(D182/D91)均在 0.5~2.0 之间, LW2368 在荷兰兔体内无蓄积。(4) 暴露量与给药剂量关系: 低、中剂量组 LW2368 的暴露量 $AUC_{(0-t)}$ 和达峰浓度 C_{max} 比与给药剂量比基本一致, 中、高剂量组 LW2368 的暴露量 $AUC_{(0-t)}$ 和达峰浓度 C_{max} 比未见成比例增加。高剂量组 LW2368 的暴露量 $AUC_{(0-t)}$ 和达峰浓度 C_{max} 的增加低于给药剂量增加。结论 对荷兰兔重复滴眼给药给予低(0.36 mg/只/天)、中(0.60 mg/只/天)、高(1.20 mg/只/天)剂量的 LW2368 滴眼液, LW2368 在荷兰兔体内的暴露量无明显性别差异, 无蓄积。在给药剂量 0.36~1.20 mg/只/天范围内, 低、中剂量组 LW2368 的暴露量 $AUC_{(0-t)}$ 和达峰浓度 C_{max} 比与给药剂量比基本一致, 中、高剂量组 PAN-90806 的暴露量 $AUC_{(0-t)}$ 和达峰浓度 C_{max} 比未见成比例增加。

关键词: LW2368; 重复给药; 毒代动力学

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

作者简介: 刘婉沂, 硕士, Tel: 13640858036, E-mail: liuwanyi@lewin.com.cn

通讯作者: 杨威, 教授级高级工程师/博士、博士后导师, 广州湾区生物医药研究院院长、广东省药物非临床评价与研究重点实验室主任、广东莱恩医药研究院有限公司董事长、总经理, Tel: 18928860179, (020) 87998690, E-mail: yangwei0719@163.com

T05-0031

SD 大鼠、Hartley 豚鼠、BN 大鼠被动皮肤致敏比较试验

毛春宵, 张曦予, 王志美*

(苏州药明康德新药开发有限公司, 江苏 苏州 215104)

摘要:目的 比较 Sprague Dawley(SD)大鼠、Hartley 豚鼠和 Brown Norway(BN)大鼠对白蛋白诱导的被动皮肤致敏反应的差异性, 以获得被动皮肤致敏试验阳性结果的最优种属。方法 抗体制备: 通过对 5~7 周龄动物隔日 1 次, 连续 3 次皮下注射给药制剂(5 mg/mL 白蛋白与弗氏佐剂进行 1:1 混合)进行诱导。在末次诱导后第 12 天采集血液, 制备致敏血清。

被动过敏和激发:6只SD大鼠、豚鼠,12只BN大鼠(雌雄各半),分别在5个位点皮内注射0.1 mL/部位的稀释致敏血清。前6只BN大鼠注射约24 h后,SD大鼠、豚鼠、后6只BN大鼠注射约48 h后,静脉注射1 mL混合制剂(给药制剂和0.5%伊文思蓝进行1:1混合)。所有动物在静脉给药后约30 min剖检。皮肤内层蓝斑直径大于0.5 cm者判定为阳性。

结果 SD大鼠:致敏48 h后激发,以1:2、1:4、1:8、1:16和1:32稀释致敏血清部位的蓝斑平均直径分别为6.06 mm、1.84 mm、0 mm、0 mm和0 mm。4/6只动物蓝斑平均直径超过0.5 cm。据此,判定为致敏阳性,表明该动物模型有效。

豚鼠:致敏48 h后,2只雄性豚鼠在激发后短时间内死亡。余下1只雄性豚鼠激发后,在皮内注射致敏血清部位发现弥散性蓝斑。这可能是由于诱导血清中的抗体经皮内注射吸收入血后直接结合静脉注射的白蛋白,导致动物出现类似的主动致敏和死亡,并出现弥漫性蓝斑。因雄性动物发生死亡,雌性动物未给药。本试验未观察到被动致敏阳性结果。

BN大鼠:致敏24 h后激发,以1:2、1:4、1:8、1:16和1:32比例稀释致敏血清部位的蓝斑平均直径分别为16.28 mm、11.85 mm、8.30 mm、3.83 mm和0 mm,5/6只动物蓝斑的平均直径超过0.5 cm。致敏48 h后激发,以1:2、1:4、1:8、1:16和1:32比例稀释致敏血清部位的蓝斑平均直径分别为9.49 mm、7.36 mm、2.42 mm、0.19 mm和0.70 mm。4/6只动物蓝斑的平均直径超过0.5 cm。据此,判定为致敏阳性,表明该动物模型有效。

结论 给予5 mg/mL白蛋白后,SD大鼠和BN大鼠可诱导被动皮肤过敏反应,66.7%的Hartley豚鼠在激发后短时间内死亡,判定未启动被动致敏。SD大鼠48 h致敏率为66.7%。BN大鼠24 h致敏率为83.3%,48 h致敏率为66.7%。因此,在本试验条件下,以5 mg/mL白蛋白诱导并在致敏48 h后激发,BN大鼠的蓝斑直径大于SD大鼠。BN大鼠可作为被动皮肤致敏试验的最优种属,且BN大鼠在致敏后24 h激发能观察到更强烈的过敏反应。

作者简介:毛春宵,E-mail:mao_chunxiao0801@wuxiapptec.com;张曦予,E-mail:zhang_xiyu3201@wuxiapptec.com

通讯作者:王志美,E-mail:wang_zhimei@wuxiapptec.com

T05-0032

PET 微塑料对雄性小鼠生殖细胞的影响

张欣^{1,2}, 马天一¹, 孙景然¹, 房彦军¹, 刘建青², 白家磊¹, 吴瑾^{1*}

(1. 军事科学院军事医学研究院, 天津市 300050; 2. 包头师范学院生态环境学院, 内蒙古自治区包头市 014000)

摘要:目的 塑料污染是当今生态系统的一种新型污染,通常粒径小于5 mm的颗粒被称为微塑料,小于1 μm 的被称为纳米塑料。由于微塑料体积微小,很容易被人类和动物体通过呼吸和饮食吸收并富集,危害身体健康。微塑料可伴随血液进入人体循环,可对人体多器官造成损伤。一项关于志愿者血液中微塑料检测的实验中指出,PET(聚对苯二甲酸乙二醇酯)的检出率占比55%。同时在一项关于男性精液样本中的微塑料检测报告指出,PET占8%。然而关于PET微塑料对男性生殖毒性的研究尚不明确,本实验旨在通过研究不同粒径的PET微塑料对小鼠精原细胞系(GC-1)的毒性影响及机制,为其他哺乳动物乃至男性PET微塑料暴露的生殖毒性风险提供新的见解。**材料与方法** 本研究对不同粒径的PET(50 nm、200 nm和1 μm)微塑料进行表征,并将各粒径的红外检测结果与标准图谱进行对比;通过测定细胞活力来检测不同浓度PET暴露对GC-1细胞增殖的影响。设置组别为:对照组、50 nm-50 $\mu\text{g/mL}$ 组、50 nm-100 $\mu\text{g/mL}$ 组、200 nm-50 $\mu\text{g/mL}$ 组、200 nm-100 $\mu\text{g/mL}$ 组、1 μm -50 $\mu\text{g/mL}$ 组以及1 μm -100 $\mu\text{g/mL}$ 组,共聚焦显微镜下观察各组别细胞形态的变化;检测各组线粒体膜电位揭示早期凋亡情况,同时将对照组与50 nm-100 $\mu\text{g/mL}$ 组通过流式细胞仪检测凋亡情况;用 β -半乳糖肝酶检测各组细胞衰老情况。**结果** 50 nm、200 nm和1 μm

的PET微球在扫描电镜下均近似球形,粒径大小基本与预期符合,Zeta电位均值分别为-42.52、-38.72、-12.94,各粒径PET微球红外图谱与标准图谱一致。随着PET微球暴露浓度的增高,细胞增殖受到明显抑制,且粒径越小,抑制效果越明显。显微镜下观察发现细胞在同一粒径的微球暴露下,浓度较高一组细胞形态会发生改变,且50 nm组细胞形态发生显著变化,50 nm-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组出现细胞严重死亡现象;通过JC-1探针检测各组别线粒体膜电位的情况,显微镜下观察到同一粒径的高浓度组的绿色荧光更强烈,同一浓度粒径越小的微球绿色荧光更强烈,线粒体膜电位出现下降,标志着细胞早期凋亡与粒径大小出现负相关,与浓度高低出现正相关。流式检测结果表明50 nm-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组相比出现了明显的早期凋亡和晚期凋亡现象。用 β -半乳糖肝酶检测结果表明浓度越高,粒径越小,细胞衰老越明显。**结论** PET微塑料暴露可引起细胞增殖受到抑制效果,细胞形态发生改变,线粒体膜电位显著下降,出现明显的凋亡现象以及细胞衰老现象,且随着PET暴露浓度增加、粒径减小上述现象更加明显。

关键词: PET; 雄性生殖细胞; 生殖毒性

通讯作者: 吴瑾, E-mail: wujinlch@163.com

T05-0033

山茱萸及其环烯醚萜苷对大鼠正常生理状态及肠道短链脂肪酸的影响

代萌^{1,2}, 王肇扬^{1,2}, 郭蕊^{1,2}, 苏文婷^{1,2}, 乔博灵^{1,2*}

(1. 西北大学, 教育部西部资源生物与生物技术重点实验室, 陕西 西安 710069; 2. 西北大学, 陕西省中药创新药物工程技术研究中心, 陕西 西安 710069)

摘要: **目的** 山茱萸是山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉, 为临床常用中药, 具有减缓老年痴呆、减轻脑缺血再灌注损伤、对抗糖尿病等多种药理活性, 是组成经方六味地黄汤等的要药, 同时又为卫健委公布的药食同源物质。本研究拟通过考察山茱萸对正常大鼠一般生理状态的影响, 以及对粪便短链脂肪酸(SCFAs)水平的影响, 来阐明山茱萸及其主成分药食同源的属性及其潜在作用机制。**材料和方法** 应用30%乙醇加热回流及大孔吸附树脂纯化的方法, 制备山茱萸提取物(CE)和山茱萸环烯醚萜总苷(CIG), 用于动物实验。将健康成年SD大鼠56只, 随机分为空白组, CE和CIG高、中、低剂量组, 共7组, 每日灌胃1次, 连续4d。期间限定每只大鼠同等食量, 记录实验期间大鼠体重、饮水量、尿量及粪便含水量的变化, 并收集每只大鼠新鲜粪便, 提取肠菌液, 制备分析用供试品溶液。另外, 建立测定大鼠粪便中SCFAs(乙酸、丙酸、丁酸)含量的气相色谱法, 并对肠菌液分析用样品进行含量测定。**结果** 在饮水量相同的情况下, 与空白组大鼠相比, 灌胃给予CE和CIG, ①均能控制大鼠体重的快速增加; ②均能促进大鼠增加尿液排泄量, 但亦能明显促进大鼠增加饮水量, 故不影响尿量/饮水量比值; ③CE及CIG组大鼠粪便性状及含水量无明显变化; ④CE及CIG组大鼠SCFAs含量明显升高, 尤以低剂量CE组中的乙酸、丙酸、丁酸含量, 以及中剂量CIG组的丙酸含量最为明显。**结论** 山茱萸及其环烯醚萜苷不影响大鼠正常的生理状态, 但均可提升肠道SCFAs含量, 可能是其有益健康的潜在机制。

关键词: 山茱萸; 环烯醚萜总苷; 大鼠正常生理状态; 气相色谱; 短链脂肪酸

通讯作者: 乔博灵, E-mail: bolingq@nwu.edu.cn

T05-0034

饮食因素和身体活动在减少孕龄妇女烟草暴露所致叶酸缺乏中的作用

吴沛豪^{1,2}, 张子依^{1,2}, 吴炜^{1,2*}

(1. 南京医科大学生殖医学与子代健康全国重点实验室, 江苏省南京市 211166;
2. 南京医科大学现代毒理学教育部重点实验室, 江苏省南京市 211166)

摘要: **目的** 分析孕龄妇女烟草暴露与叶酸水平或叶酸缺乏之间的相关性、因果关系与剂量-风险关系,

并进一步探究饮食因素和身体活动在其中的调控作用,为预防孕龄妇女叶酸缺乏提供新的公共卫生策略。**材料和方法** 整合并分析从 NHANES 数据库获取的新冠大流行前的“2011-2012年”“2013-2014年”“2015-2016年”“2017-2020年”四部分数据,根据严格的纳入和排除标准,1403名20~45岁的孕龄妇女被纳入研究,收集其人口统计学、吸烟暴露、二手烟暴露、运动、24小时回顾饮食、红细胞叶酸和血清叶酸水平等资料。对以上样本人群的烟草暴露和叶酸水平采取相关性分析和两样本孟德尔随机化分析。使用广义加性模型分析饮食因素在不同暴露组中的作用。使用限制性三次样条模型拟合不同可替宁水平下叶酸不足的风险,以寻找疑似敏感人群。**结果** 相关性分析和两样本孟德尔随机化分析表明,烟草暴露与孕龄妇女红细胞叶酸水平呈显著的负相关,在总人群水平上两者存在因果关联。广义加性模型分析表明,增加膳食叶酸、维生素E、铁和膳食纤维摄入量可显著降低烟草暴露者患叶酸缺乏症的风险。亚组分析表明,增加身体活动可以降低烟草暴露引起叶酸缺乏症的风险。限制性三次样条模型对各年龄组进行分析,结果表明35~40岁孕龄妇女可能是吸烟导致叶酸缺乏的易感人群。**结论** 烟草暴露导致孕龄妇女叶酸缺乏或叶酸水平降低,增加膳食叶酸等的摄入或增加体力活动可以有效降低叶酸缺乏的风险。备孕中的妇女应避免烟草暴露。当烟草暴露难以避免时,合适的饮食结构与适当的身体活动可以预防烟草暴露引起的叶酸缺乏。

关键词:孕龄妇女叶酸缺乏;烟草暴露;饮食因素;身体活动

通讯作者:吴炜,E-mail:wwu@njmu.edu.cn

T05-0035

不同粒径PET对雄性小鼠行为学的影响

马天一¹,张欣^{1,2},王永辉¹,李晓丽¹,吴瑾¹,白家磊^{1*}

(1. 军事科学院军事医学研究院,天津市 300050; 2. 包头师范学院生态环境学院,内蒙古自治区包头市 014000)

摘要:**目的** 塑料作为生活中的常用材料,在瓶装水、吸管及外卖餐具中等随处可见,随着其使用量的增加,微塑料的污染问题也日益严重。相关研究表明微塑料可通过饮食,接触等途径在人体累积,并且可通过血脑屏障及胎盘屏障。然而关于PET(聚对苯二甲酸乙二醇酯)微/纳米塑料对小鼠行为学的研究仍较为缺乏,本研究希望通过研究不同粒径的PET微/纳米塑料对小鼠行为学的影响,为其他哺乳动物PET微/纳米塑料暴露的神经毒性风险提供新的见解。**材料与方法** 对50 nm、200 nm和1 μm三种粒径的PET颗粒进行表征,测试粒径大小,Zeta电位并对三种颗粒进行红外吸收峰检测;实验小鼠为C57BL/6雄性小鼠,为了研究三种不同粒径的PET对小鼠行为学的影响,分别将小鼠设置为:对照组,50 nm PET组,200 nm PET组,和1 μm PET组。将三种微球溶解于PBS溶液中,浓度为8 mg/mL,每只小鼠每日灌胃100 μL(对照组小鼠使用PBS灌胃),每三天测量一次体重,灌胃8周后,对小鼠进行行为学实验,并统计测试结果。**结果** 50 nm、200 nm和1 μm的PET微球粒径大小基本与预期符合,Zeta电位均值分别为26.29、-42.81、-41.96,扫描电镜结果显示颗粒排列整齐,且轮廓呈球形,各粒径PET微球所测得的红外图谱吸收峰与其所包含的化学键能够对应。在PET微球暴露8周后,各组小鼠体重与暴露前相比均无明显变化。与对照组相比,实验组小鼠的行为学实验结果出现了明显差异。旷场实验中,实验组小鼠的运动距离和平均速度明显低于对照组小鼠。高架十字迷宫实验中实验组小鼠的开臂区域活动时间百分比明显低于对照组小鼠活动时间,提示长期微塑料暴露会诱发小鼠焦虑行为的发生。水迷宫实验中,对照组小鼠潜伏期明显低于实验组小鼠,提示长期暴露于PET会显著降低小鼠的学习记忆能力。**结论** PET微/纳米塑料的暴露可影响小鼠的行为学实验表现,使小鼠出现焦虑样行为表现,并降低小鼠的学习记忆能力。

关键词:PET; 雄性小鼠; 动物行为学

通讯作者:白家磊,E-mail: baijialeiti@163.com

T05-0043

中国人群住宅劣势与心血管疾病发生风险的关联研究

万婷雅,陶成哲,乔梓烟,卢俐好,张般若,刘敏,汤静雅,徐俏俏,范赟,秦玉峰,陆春城*
(南京医科大学公共卫生学院,南京医科大学生殖医学国家重点实验室,南京医科大学公共卫生学院现代毒理学教育部重点实验室,南京 211166)

摘要:背景 目前关于住宅劣势与心血管疾病(Cardiovascular disease, CVD)之间关联的证据十分有限。本研究基于前瞻性队列设计,旨在评估中国住宅劣势与心血管疾病发生风险的关联并估计对应的归因疾病负担,期望为心血管疾病的干预提供参考和依据。方法 我们采用2011-2018年中国健康与退休纵向队列数据进行分析,将固体燃料使用、不安全卫生设施、不安全水资源作为住宅劣势指标。我们纳入9,843名参与者分析住宅劣势和中风风险,8,752名参与者分析住宅劣势和心脏病风险。基于Cox比例风险回归模型评估住宅劣势与心血管疾病发生风险的关联,并通过计算相应人口归因分数(Population Attributable Fractions, PAF)来估算住宅劣势导致的心血管疾病的负担。结果 与使用清洁能源相比,使用农作物和煤炭作为取暖能源与心脏病发生风险增加35%(95%CI: 8%-68%)和71%(95%CI: 40%-110%)相关。不安全的卫生条件与心脏病风险增加43%(23%-66%)和中风风险增加30%(6%-60%)相关;同时,还发现不安全的水源则与中风风险呈正相关关系。在省级归因负担分析中,研究发现住宅劣势所致心血管疾病负担具有一定的地理差异。每年约有1,380,000例(15.1%)、718,000例(7.9%)和1,471,000例(16.1%)的心脏病发生可归因于煤炭取暖能源使用、农作物取暖能源使用和不安全的卫生条件。约有360,000例(12.1%)和189,000例(6.4%)的中风发生分别可归咎于不安全的卫生条件和水源。我们同时发现,社会经济较落后的地区PAF相对较高。结论 中国人群住宅劣势心血管疾病风险发生呈正相关,同时相对应的人群归因负担具有显著的地理不平等。

关键词:住宅劣势;中国健康与退休纵向研究(CHARLS);心血管疾病;负担估计

通讯作者:陆春城, E-mail: 3352192259@qq.com

T05-0044

基于某农村地区的小型出生队列工作介绍

张济明,周志俊*

(复旦大学公共卫生学院,上海 200032)

摘要:基于母婴人群的出生队列是开展生命早期环境因素影响远期健康水平和疾病发生相关研究的重要手段,但发展中国家、农村地区的出生队列研究相对有限。在2009年,基于“农业生产地区孕妇农药暴露可影响子代生长发育水平”研究假设,课题组在农业大县江苏省射阳县招募1303名当地孕产妇及其所诞下的1312名儿童为研究对象启动了射阳小型出生队列研究,收集了孕晚期孕妇血样和尿样、脐带血、胎粪。在过去的15年中,在子代1、2、3、6、7、8、9、10、14、15岁龄时开展了11次现场随访,根据儿童不同阶段特点采集血液、尿液、口腔拭子等生物样本并评估体格生长、肥胖、神经发育、行为问题性发育等指标。结合问卷和实验室生物标本的利用,课题组工作的关注领域从农药扩展至重金属、全氟/多氟烷基化合物等传统与新现环境污染物。基于射阳小型出生队列工作基础,课题组已发表了中英文期刊论文50余篇,报道了多类传统与新现环境污染物在农村地区人群暴露水平及其与儿童健康的关系,并探讨了激素、代谢组等在其中的中介作用。在15年的过程中,课题组观察到研究人群受到城镇化、人口流动、留守儿童、家庭变故、升学压力等社会因素的影响以及随着多项环境污染物管控政策落实带来的暴露谱变化。研究人群失访、研究现场组织、样品运输与保存、检测方法开发、多维度数据统计分析等问题也在不断制约射阳小型出生队列的发展。随着环境与儿童健康领域的不断发展和研究内容的不断深入,需要基于出生队列研究设计回答的科学问题

也逐渐从“有无关联”、“有何关联”发展到“为何关联”、“多因素关联”。减少制约因素的影响和回答新的科学问题,也给射阳小型出生队列的未来工作提出了新的挑战。

关键词:环境毒理学; 儿童健康; 出生队列

作者简介:张济明, E-mail: zhangjiming@fudan.edu.cn

通讯作者:周志俊, E-mail: zjzhou@fudan.edu.cn

T05-0045

CAR-T细胞疗法非临床安全性评价关注点

李玉薇, 王全军, 戴学栋*

(苏州赛赋新药技术服务有限责任公司, 江苏 工业园区 215028)

摘要:嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)是一种经过基因修饰的T细胞,能特异性识别肿瘤细胞表面的肿瘤特异性抗原进而有效杀伤肿瘤细胞。CAR-T细胞在血液瘤、实体瘤、心肌纤维化、自身免疫性疾病和感染性疾病等领域已经显示出了巨大的治疗潜力。因此CAR-T细胞产品的非临床研究对这些产品的安全性和有效性具有重要意义。本文根据CAR-T细胞产品的特点,结合基因和细胞治疗产品的相关指导原则,探讨了CAR-T细胞产品非临床研究的一般原则和关键问题。

根据临床研究,CAR-T细胞的主要安全风险包括细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)、神经毒性和脱靶效应。此外,对CAR-T细胞的遗传毒性、体内致瘤性、过敏反应等也是需要考虑的潜在风险。同时,对动物的毒理学研究也提出了一些具有挑战性的问题,如动物模型、物种特异性等。除了常规毒理学指标(即临床症状、体重、食物摄入量、血清生化、血液学、大体病理和组织病理学),动物安全性研究还包括免疫毒性指标,如移植物抗宿主反应(GvHR)、外周血细胞计数和表型分析,以及血清中的细胞因子水平(如白介素(IL)-2、IL-6、干扰素(IFN)- γ 和肿瘤坏死因子(TNF)- α)。此外,如果可能的话,安全药理学、局部耐受性和其他研究可以同时或单独进行。一般不推荐进行常规的遗传毒性联合研究和生殖毒性研究。

作为一种个体化的人源性细胞产品,CAR-T细胞的非临床研究应在相关物种上进行。当将人源性CAR-T细胞用于具有正常免疫功能的动物时,会发生排斥反应,导致人源性细胞的消除或GvHR的出现。因此,基因免疫缺陷动物可能是更好的选择。免疫抑制剂的使用也可能消除对异源细胞的免疫反应,但可能干扰对药物疗效或毒理学效应的评价,因此有必要对评价结果进行额外的评估。具有部分人类免疫功能的人源化小鼠,通过将免疫缺陷小鼠植入人类造血细胞、淋巴细胞或组织而产生,已初步用于CAR-T细胞产品的评估。目前,用于CAR-T产品研究的动物模型主要包括移植瘤小鼠模型、同源小鼠模型、免疫系统重建人源化小鼠、转基因小鼠及灵长类动物模型等。

关键词: CAR-T; 非临床研究

第一作者:李玉薇, E-mail: liyuwei@safeglp.com, Tel: 13104144175

通讯作者:戴学栋, E-mail: daixuedong@safeglp.com

T05-0046

基于PP2A亚型探索斑蝥素致肝细胞毒性的作用机制研究

段肖彤^{1a,2}, 李晓飞^{1a,2}, 张建永^{1b*}

(1. 遵义医科大学, a. 基础医学院, b. 药学院, 贵州 遵义 563000;

2. 贵州医科大学基础医学院, 贵阳 550025)

摘要:目的 斑蝥素(Cantharidin, CTD)是斑蝥的主要活性成分,为蛋白磷酸酶2A(protein phospho-

tase 2A, PP2A)选择性抑制剂,目前已被开发成CTD类药物,用于临床抗癌治疗。然而CTD又有一定的毒性作用,能够引起肝、肾等重要脏器的毒性,其中肝毒性尤为严重。因此本研究基于PP2A亚型,探索CTD致人肝HepaRG细胞毒性的毒理机制,为CTD致肝毒性的预防和治疗提供理论依据。

材料和方法 采用瑞氏吉姆萨染色和CCK-8法观察CTD对人正常肝HepaRG和人肝癌Sk-hep-1细胞形态以及细胞活力的影响;采用试剂盒检测细胞上清中AST、ALT和LDH水平;采用试剂盒检测CTD对PP2A活性的抑制作用;采用RT-qPCR和WB法检测CTD对HepaRG和Sk-hep-1细胞PP2A各亚型的mRNA和蛋白表达水平,筛选出差异亚型。采用慢病毒敲低和过表达构建PP2A_{B55}δ稳转细胞系,采用CCK-8法分别检测CTD作用12 h时的HepaRG细胞活力;采用流式细胞术检测HepaRG细胞周期比例和凋亡率;同时采用WB法检测周期蛋白和凋亡蛋白表达水平。

结果 不同浓度CTD分别干预HepaRG细胞和Sk-hep-1细胞后均可致细胞活力降低及AST、ALT、LDH水平显著增加,呈“量-时-毒”关系,且CTD对Sk-hep-1细胞活力抑制率显著大于HepaRG细胞。CTD干预后,HepaRG细胞中分别有3个PP2A亚型mRNA表达上调和9个PP2A亚型表达下调,而Sk-hep-1细胞中分别有2个PP2A亚型上调和5个PP2A亚型下调。CTD可诱导HepaRG细胞凋亡,且凋亡率随着CTD作用浓度和时间增加,可引起HepaRG细胞中Bax/Bcl-2和Caspase-3蛋白表达水平升高;CTD可导致G0/G1期细胞阻滞,引起CDT1、Geminin、Cyclin A2和Cyclin B1等周期相关蛋白表达水平显著降低,phospho-Histone3表达水平显著升高。过表达PP2A_{B55}δ可显著降低CTD诱导HepaRG细胞凋亡率,敲除PP2A_{B55}δ则相反。过表达PP2AB55δ显著升高CDT1、Geminin和Cyclin A2等蛋白表达水平,降低phospho-Histone3的蛋白表达水平,并且促进细胞周期G0/G1期向S期过渡的进程,敲除PP2A_{B55}δ则相反。

结论 综上所述,CTD可通过PP2AB55δ抑制细胞周期G0/G1期阻滞和细胞凋亡,从而减轻HepaRG的细胞毒性,为CTD诱导肝损伤提供了科学依据。

关键词: 斑蝥素; 肝毒性; 蛋白磷酸酶2A亚型; PP2AB55δ; 细胞周期; 细胞凋亡

通讯作者: 张建永, E-mail: zhangjianyong2006@126.com

T05-0047

探索微塑料的肝毒性并构建相关有害结局路径

李宇涵, 牟 为

(上海交通大学 医学院-公共卫生学院, 上海 200025)

摘要:目的 微塑料(MPs)是一种直径小于5毫米的塑料碎片和微粒,会在环境中蓄积并在生物体内富集,通过食物链向上传递,一些人体器官和婴儿胎盘中已经检测到微塑料。聚苯乙烯是发现的海洋微塑料中最常见的聚合物之一,因此聚苯乙烯微塑料(PS-MPs)经常被用作研究微塑料毒性效应的代表性颗粒。口服PS-MPs后会被消化道吸收或通过表皮渗入肝脏,此外,越来越多的研究表明,未被吸收的微塑料也会沉积到肝脏从而导致肝脏蓄积和肝损伤。本项目通过生物信息分析和统计学比较,在毒理基因组学数据库和AOP-wiki数据库综合研究PS-MPs在肝损伤过程中的分子毒理学途径并构建相关有害结局路径AOP。

方法 以“Polystyrene”为检索词检索比较毒理基因组数据库(Comparative Toxicogenomics Database, CTD),获得PS-MPs暴露引起消化系统疾病信息,筛选非酒精性脂肪肝、非病毒性肝炎、肝硬化等疾病收集整理相关基因进行富集分析,得到PS-MPs引起肝损伤的毒性通路及其发生时间的先后顺序。根据AOP-wiki数据库,获得微塑料相关AOPs,筛选整理微塑料引起肝脏毒性损伤的现有AOP网络及关键事件编号。结合CTD与AOP-wiki数据信息构建PS-MPs引起肝损伤的通路富集和关键销用因子,从而构建新型的有害结局路径网络。

结果与讨论 探讨了微塑料诱发肝损伤不同疾病进程的分子起始事件(MIE),关键事件(KE)和有害结局(AO)。典型通路富集进一步显示:①炎症因子引起的氧化应激;②细胞凋亡和坏死引起的脂肪肝及肝硬化是暴露于微塑料的肝脏中改变最显出的典型信号通路。同时,分析现存的与PS-MPs的肝损伤机制相关

度较高 AOP144、AOP38 和 AOP505, 将它们作为赋权 AOP, 结合毒性信号通路, 绘制得到微塑料暴露引起肝损伤的新的有害结局路径网络。为预测微塑料在肝损伤过程中细胞毒性及炎症的发生机制提供了更为精准的理论依据, 为后续 AOP 在外源性污染物毒性机制探索中的应用提供新的研究思路。

作者简介: 李宇涵, 女, 硕士研究生在读, E-mail: 123711910099@sjtu.edu.cn

通讯作者: 牟为, 女, 副教授, 上海交通大学医学院-公共卫生学院

T05-0048

近 20 年的多溴联苯醚毒性评估研究综述

李明慧^{1,2*}

(1. 生物工程学院, 重庆大学, 重庆 400030; 2. 西南医院, 陆军军医大学, 重庆 400038)

摘要: 多溴联苯醚 (polybrominated diphenyl ethers, PBDEs) 作为溴化阻燃剂, 由于其持久性、生物蓄积性和潜在毒性而持续受到广泛关注。尽管 PBDEs 使用已受到限制并逐步被淘汰, 但每年仍有大量含有 PBDEs 的商业产品在使用或被丢弃。因此, 添加在产品中的 PBDEs 可能会被释放到周围环境中, 尤其是水生系统, 进而对生态系统和人类健康构成长期威胁。虽然大量研究和综述已描述 PBDEs 暴露可造成的各器官和组织毒性作用, 但极少文章对其毒性评估的全球趋势进行全面总结和分析。因此, 本研究采用文献计量学的方法对全球性 PBDEs 毒性评估相关研究的科学产出进行评估, 并分析该领域的实时热点话题及未来发展趋势。本综述首先对 PBDEs 毒性研究的主要贡献国家/机构、期刊、共被引文献、有影响力的作者、关键词等基本信息进行可视化分析。其次, 对 PBDEs 暴露可能产生的各组织/器官/系统潜在毒性, 如: 内分泌、生殖、神经和胃肠道系统, 以及相关的毒性机制进行归纳和讨论。最后, 本文对 PBDEs 毒性评估相关研究的当前挑战和未来前景进行总结, 包括: 如何构建环境相关性 PBDEs 暴露模型和方法、PBDEs 迁移和传化的潜在载体、PBDEs 在环境和人体中的命运追踪、如何运用先进的人体类器官模型进行 PBDEs 毒性评估以及运用先进的组学技术揭示 PBDEs 毒性机制。本综述旨在为 PBDEs 的毒性评估提供系统的见解, 有望促进 PBDEs 毒性评估相关研究的发展。

关键词: PBDEs; 毒性评估; 文献计量学; 类器官; 多组学技术

通讯作者: 李明慧, E-mail: mhli1988@outlook.com

T05-0049

苯并芘对秀丽隐杆线虫生殖与发育毒性的转录组学分析

周津津, 葛阳*

(上海交通大学 医学院-公共卫生学院, 上海 200025)

摘要: 目的 苯并芘 (B[a]P) 被国际癌症研究机构 (IARC) 认定为 I 类致癌物, 并被世界卫生组织 (WHO) 列为重点监控的食品和环境污染物之一。B[a]P 广泛存在于高温加工食品中, 如烧烤和油炸食品。流行病学研究表明, 孕妇在早期接触 B[a]P 会显著增加流产风险。本研究利用转录组学分析, 以秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 为模型生物, 系统探讨 B[a]P 在生物体整个生命周期内对生殖和发育的毒性及其潜在的生物学机制。

材料和方法 本研究采用三种不同浓度梯度的 B[a]P (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对 L1 期线虫幼虫进行 36 小时的暴露处理, 观察头部摆动、身体弯曲、咽部泵动、体长及产卵数量等一系列生理指标的变化。此外, 还测定氧化应激 (ROS) 水平和脂肪积累 (油红染色)。进一步, 通过转录组测序分析筛选出差异表达基因, 并利用基因敲除技术对特定基因进行敲低。同时, 结合 GFP 荧光特异表达, 确定 B[a]P 暴露引起生殖和发育毒性的关键分子及其相关的生物学机制。

结果 结果表明,B[a]P暴露显著抑制秀丽隐杆线虫的体长发育,并显著降低其产卵数量,同时下调与角质层发育和脂质代谢相关的基因和信号通路。

结论 B[a]P对秀丽隐杆线虫幼虫存在生殖和发育毒性。这些发现为B[a]P对人类生殖和发育的潜在长期毒性提供了新的见解,也为深入探讨持久性环境有机污染物的毒性机制提供了新的研究方向。未来的研究可基于本研究结果,进一步探索B[a]P的毒性作用及其在不同生物体中的机制差异,为环境污染物的风险评估和健康防护提供科学依据。

关键词: 苯并芘; 转录组学; 生殖和发育; 环境污染物

作者简介: 周津津,女,硕士研究生在读,上海交通大学医学院-公共卫生学院,E-mail: zjj19980920@sjtu.edu.cn

通讯作者: 葛 阳,男,副研究员,上海交通大学医学院-公共卫生学院

T05-0050

动物抑郁模型构建方法研究进展

章冰倩, 陈员庆, 李丽琴, 张瑞华*

(国民核生化灾害防护国家重点实验室, 北京 102205)

摘要: 抑郁症作为一种严重的精神障碍,对全球公共卫生构成了重大挑战。为了深入理解抑郁症的发病机制并开发有效的治疗策略,研究人员一直在探索构建各种动物抑郁模型。本文综述了近年来动物抑郁模型构建的方法研究进展。目前,构建动物抑郁模型的方法主要有应激造模、药物诱导造模、基因造模、手术造模等。应激造模方法根据对动物施加不可控制及不可预测的压力源分为急性和慢性应激抑郁模型,该模型通过模拟人类长期遭受的低水平压力,成功地在动物中复制了抑郁症的核心症状,如快感缺失和行为绝望,被认为是目前最经典的抑郁症动物模型。依据动物暴露方法和时间可分为习得性无助模型、慢性社交挫败模型、慢性束缚应激模型、慢性不可预测性温和刺激模型等。药物诱导模型通过使用特定药物,如利血平、糖皮质激素、皮质酮等,耗竭或模拟神经递质的不平衡从而引发抑郁样行为,该模型造模时间短且操作简单,这些模型在抗抑郁药物的初筛和神经递质系统的研究中具有重要价值。手术造模主要是通过嗅球切除术引发类似抑郁症的症状,该模型稳定性好,但仅能模仿一定数量的抑郁症患者,并且造模中动物死亡率较高。基因造模是基于抑郁症的单胺假说、BDNF的作用及参与HPA轴调控的基因,通过基因敲除或敲入技术,改变动物的基因表达,从而模拟抑郁症的某些生物学特征。目前已经建立起相应的转基因动物模型是靶向血清素能系统、去甲肾上腺素能系统以及HPA轴调控系统相关的基因。抑郁症是一种由多个基因以及环境因素共同作用的多因素疾病,因此,单基因缺失或过表达不能与所有抑郁核心症状重叠,并且这类基因模型花费成本较高,临床应用受限。动物抑郁模型的构建是抑郁症研究的重要基础,尽管现有的动物抑郁模型在抑郁症的研究中发挥了重要作用,但它们仍然面临着一些挑战。未来的研究需要进一步优化和创新动物抑郁模型,以更好地模拟人类的抑郁症状,为开发更有效的治疗策略提供更有力的支持。

关键词: 抑郁模型; 抑郁症; 应激; 环境

作者简介: 章冰倩,E-mail: 1390088654@qq.com

T05-0051

代谢轮廓改变在异烟肼诱导斑马鱼肝损伤中的作用

郑 特, 钟雅韵, 杨 静, 周家妤, 王玉婷, 张 云*

(齐鲁工业大学(山东省科学院),山东省科学院生物研究所,山东 济南 250103)

山东省斑马鱼人类疾病模型与药物筛选工程技术研究中心,山东 济南 250103)

摘要:目的 异烟肼(Isoniazid, INH)是治疗结核病的一线药物,肝损伤是其主要不良反应。揭示INH

肝毒性的作用机制将有助于提高INH抗结核治疗的安全性。

材料和方法 采用肝脏特异表达绿色荧光的转基因斑马鱼Tg(I-fabp:EGFP)作为实验动物模型,将受精后72小时的斑马鱼幼鱼暴露于6 mM INH,以斑马鱼形态、畸形率和死亡率、肝脏面积和荧光强度,肝脏病理组织切片和肝细胞超微结构等为主要指标,检测药物处理24、48 h后(hour post exposure, hpe)肝脏的损伤情况。通过油红O染色、体内甘油三酯(TG)和总胆固醇(TC)的含量测定评价6 mM INH对斑马鱼肝脏脂质代谢的影响。运用质谱成像技术检测INH导致斑马鱼机体内源性代谢物的变化情况,并运用转录组测序(RNA-seq)以及实时荧光定量PCR(RT-qPCR)技术测定并验证INH对斑马鱼代谢相关基因表达的影响,探究INH肝毒性作用机制。

结果 在48 hpe,6 mM INH导致斑马鱼形态发生变化,肝脏面积和荧光强度显著减小,油红O染色加深即肝脏脂质堆积,TC、TG含量升高,肝组织空泡化,肝细胞器损伤并出现脂滴。质谱成像检测到INH 48hpe导致斑马鱼体内代谢物紊乱,如脂肪酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油等脂质代谢物发生变化。进一步联合转录组学分析发现,INH致肝损伤的机制与代谢相关通路密切相关。RT-qPCR检测结果发现,6 mM INH给药后48 h造成斑马鱼脂质代谢相关基因(elovl5、fads2、sreb1、fasn、acox1)表达异常。

结论 6 mM INH给药后24、48 h导致斑马鱼肝脏损伤,内源性代谢物发生紊乱,联合转录组学分析发现,6 mM INH干扰斑马鱼脂肪酸代谢途径,造成脂质堆积继而引发肝损伤。

关键词: 异烟肼; 肝损伤; 斑马鱼; 代谢物

基金项目: 国家重点研发计划青年科学家项目(2022YFC2804600); 国家自然科学基金项目(81703624); 泰山学者工程资助(tsqn202211204); 山东省自然科学基金优秀青年基金(ZR2020YQ60); 济南市“新高校20条”自主培养创新团队资助项目(2021GXRC047)

作者简介: 郑特, 硕士研究生。电话: 18553735328, E-mail: zhengte_0328@163.com

通讯作者: 张云, 研究员, 主要从事基于斑马鱼模型的药物活性筛选与安全性评价研究。电话: (0531) 82605322, E-mail: xiaohan_0818@163.com

T05-0052

一种基于斑马鱼肝分区面积比的化合物肝损伤作用快速定量评估方法

杨静, 赵竟成, 郑特, 周家灼, 王朵朵, 张云*

(齐鲁工业大学(山东省科学院), 山东省科学院生物研究所, 山东 济南 250103;
山东省斑马鱼人类疾病模型与药物筛选工程技术研究中心, 山东 济南 250103)

摘要:目的 肝脏总面积是利用斑马鱼模型进行化合物肝损伤评价中的常用传统指标。然而有时实验中在显微镜下用肉眼就明显观察到化合物导致斑马鱼肝脏形态发生显著改变,但在统计肝脏总面积时,化合物处理组与空白对照组斑马鱼的肝脏总面积无统计学差异。因此使用肝脏总面积作为评价化合物对斑马鱼肝损伤作用的指标不够准确。本研究以肝脏荧光转基因斑马鱼为基础,利用活体荧光成像技术,将肝分区面积比作为斑马鱼肝损伤评价的检测指标,快速定量评估化合物是否具有肝脏毒性。

方法 选用绿色荧光蛋白标记肝脏细胞的转基因品系斑马鱼Tg(I-fabp:EGFP)为实验对象,将侧体位下斑马鱼肝脏荧光图划分为I区和II区,定义肝分区面积比的计算公式为II区面积与I区面积比值的百分比。计算5 dpf(days post fertilization)和6 dpf两个发育时期的正常斑马鱼的肝脏总面积和肝分区面积比的变异系数,确定肝分区面积比的精密度和离散度。将已知的肝毒性化合物(补骨脂水提物、酒精、 α -萘异硫氰酸盐)分别处理发育至3 dpf的斑马鱼72h,荧光显微镜下拍照计算斑马鱼的肝分区面积比,考察肝分区面积比与指征肝功能的金指标谷丙转氨酶(ALT)的相关性,进一步验证斑马鱼肝分区面积比作为快速定量评估化合物对斑马鱼肝损伤作用的指标的可靠性。

结果 结果发现5 dpf和6 dpf两个发育时期斑马鱼肝分区面积比的变异系数均小于肝脏总面积的变异

系数,说明肝分区面积比的检测结果比肝脏总面积更稳定,离散度更小,精密度更高。与空白对照组相比,补骨脂水提物、酒精、 α -萘异硫氰酸盐处理组斑马鱼的肝分区面积比显著降低($P<0.001$),肝脏形态发生显著改变,ALT水平显著升高。病理结果显示化合物处理组斑马鱼肝组织间出现空泡,肝细胞边界模糊,肝细胞结构受损。采用Pearson相关系数,分析肝分区面积比和肝脏总面积两者与ALT之间的相关性,发现斑马鱼肝分区面积比与ALT水平之间呈负相关,存在强相关性($|r|=0.780, P<0.01$);肝脏总面积与ALT水平之间呈负相关,其相关性低于肝分区面积比与ALT水平的相关性。

结论 斑马鱼肝分区面积比的变化可作为快速评价化合物对斑马鱼肝功能损伤作用的评价指标,比肝脏总面积评价化合物肝损伤作用更灵敏、更准确。

关键词: 斑马鱼; 肝损伤; 肝脏总面积; 肝分区面积比

基金项目: 国家重点研发计划青年科学家项目(2022YFC2804600)、国家自然科学基金项目(81703624)、泰山学者工程资助(tsqn202211204)、山东省自然科学基金优秀青年基金(ZR2020YQ60)、济南市“新高校20条”自主培养创新团队资助项目(2021GXRC047)。

作者简介: 杨 静, 硕士研究生。电话: 17664424138, E-mail: yjingmax@163.com。

通讯作者: 张 云, 研究员, 主要从事基于斑马鱼模型的药物活性筛选与安全性评价研究。电话: (0531) 82605322, E-mail: xiaohan_0818@163.com

T05-0053

转基因斑马鱼模型在药物安全性评价中的应用与创新

张 云*

(齐鲁工业大学(山东省科学院), 山东省科学院生物研究所, 山东 济南 250103;
山东省斑马鱼人类疾病模型与药物筛选工程技术研究中心, 山东 济南 250103)

摘要: 模式动物斑马鱼基因组与人类的同源性高达87%, 心肝肾等器官的生理结构和功能与哺乳动物高度相似。因斑马鱼体外受精、发育快速、胚胎透明的特点, 可通过基因编辑等遗传操作手段构建转基因斑马鱼模型, 并可在显微镜下实时观察药物对其体内器官的作用, 系统评价药物安全性, 提高药物早期毒性预测的可靠性和灵敏度。斑马鱼在药物安全性评价方面具有极大的应用潜力。

本团队采用转基因斑马鱼模型, 结合活体荧光成像、多组学整合分析、器官三维可视化检测等现代技术, 建立了具有快速、准确、高通量特点的斑马鱼早期安全性可视化评价体系。如采用肝脏标记绿色荧光蛋白的转基因斑马鱼为模型, 以三维肝脏形态、转氨酶活性、肝脏超微组织结构变化、代谢轮廓改变等为评价指标, 建立基于斑马鱼模型的药物肝脏毒性评价技术。该评价技术体系兼具体外细胞模型的高通量性和体内动物模型的整体性, 可实现大批量和微克级化合物的快速评价。

团队应用已构建的斑马鱼安全性评价技术体系, 系统开展了药物毒性作用评估和作用机制研究。应用斑马鱼模型对有毒中药(雷公藤、补骨脂等)进行肝毒性物质基础研究, 阐明诱发肝脏毒性的主要物质成分。阐明中药消癌平通过氧化应激、内质网应激、凋亡和wnt通路导致发育毒性, 发现通关藤皂苷H为主要毒效成分。明确炎症、内质网应激和自噬信号通路在抗结核药物(异烟肼、吡嗪酰胺)肝毒性中的作用及分子调控机制, 为临床采取有针对性的保肝治疗提供理论依据。开发了基于斑马鱼的空间代谢组学方法, 为药物毒性靶点识别提供新策略, 探索了异烟肼、补骨脂等药物毒性作用下斑马鱼靶器官的代谢轮廓改变, 揭示毒性作用机制, 为药物毒性评价和干预提供依据。建立了基于炎症状态斑马鱼的药物安全性评价方法, 系统研究了炎症状态下抗结核药物异烟肼和中药雷公藤的肝毒性作用, 阐明了“内质网应激-自噬”通路对异烟肼和雷公藤肝毒性的调控机制, 为异烟肼和雷公藤的临床合理用药和不良反应的监测提供理论基础。

综上, 斑马鱼对药物毒性反应敏感, 应用斑马鱼进行药物安全性评价的结果在一定程度上具有可外推性。建立基于斑马鱼的多靶点、多器官的复合毒性评价模式可为精准评价和科学干预药物毒性提供新的研究视角和评价手段。

关键词:转基因斑马鱼;药物;安全性评价;作用机制

基金项目:国家重点研发计划青年科学家项目(2022YFC2804600);国家自然科学基金项目(81703624);泰山学者工程资助(tsqn202211204);山东省自然科学基金优秀青年基金(ZR2020YQ60);济南市“新高校20条”自主培养创新团队资助项目(2021GXRC047)

作者简介:张云,女,研究员,主要从事基于斑马鱼模型的药物活性筛选与安全性评价研究。电话:(0531) 82605322, E-mail: xiaohan_0818@163.com

T05-0054

综合多组学分析揭示亚硝酸暴露对克氏原螯虾肠道的损伤机制

卞丹丹^{a,b,1}, 石燕霞^{b,c,1}, 朱喜蓉^{b,c,1}, 孙晓丽^{b,c}, 许旋^a, 丁璐^a, 张代臻^b, 刘秋宁^{b*}, 唐伯平^{b*}, 朱保建^{a*}
(a. 安徽农业大学生命科学学院, 资源昆虫生物学与创新利用安徽省重点实验室, 合肥 230036; b. 盐城师范学院湿地学院, 江苏省盐土生物资源研究重点实验室, 江苏省滩涂生物农业协同创新中心, 江苏省滩涂生物资源与环境保护重点建设实验室, 盐城 224007; c. 南京工业大学生物技术与制药工程学院, 南京 210009)

摘要:亚硝酸盐(NIT)是水产养殖中的重要污染物之一,集约化养殖模式的发展,导致水体中NIT浓度超标。过量NIT会危害克氏原螯虾(小龙虾)的健康,造成经济损失,阻碍产业发展。本研究运用组织形态学、分子生物学以及多组学联合分析等实验技术手段,探究NIT暴露对小龙虾肠道的毒性效应及损伤机制。研究发现NIT可在肠道组织中富集,破坏肠道组织结构,当暴露浓度高于30 mg/L时,体重出现负增长,死亡率显著增加。过量的NIT可导致肠道转录谱表达改变及肠道菌群失衡,Enterobacteriaceae、Shewanella、Vibrionaceae等有害菌在肠道积累。NIT暴露还可引起氧化应激、免疫失衡、代谢紊乱、细胞过度自噬、凋亡等异常生理过程,并导致肠道发生炎症损伤。本研究还发现,NIT暴露扰乱了小龙虾的能量代谢,降低了ATP含量,导致能量稳态被破坏。同时肠道免疫系统被抑制导致了肠道菌群稳态的失衡和条件致病菌的过度繁殖,增加小龙虾被病原菌感染的风险。研究结果阐明了小龙虾在NIT暴露后,肠道的损伤机制,该项研究为NIT对小龙虾毒性机制提供了新的见解,对NIT在水产养殖中合理管控和提高甲壳动物的抗病抗逆性具有重要意义。

关键词:克氏原螯虾; NIT; 氧化应激; 凋亡; 自噬; 肠道微生物

作者简介:卞丹丹(1986-),女,主要从事水产毒理学研究。E-mail: 397092144@qq.com

T05-0055

基于斑马鱼模型的艾地苯醌心血管毒性研究

周家妤, 杨亚楠, 郑特, 杨静, 徐慧娟, 张云*

(齐鲁工业大学(山东省科学院), 山东省科学院生物研究所, 山东 济南 250103;
山东省人类疾病斑马鱼模型与药物筛选工程技术研究中心, 山东 济南 250103)

摘要:目的 艾地苯醌是目前临床上治疗精神类疾病的常用药物,不良反应发生率3%左右,主要有过敏反应、皮疹、恶心、食欲不振、腹泻、兴奋、失眠、头晕等。偶见白细胞减少、肝功能损害。我们在前期实验中发现高浓度艾地苯醌可使部分斑马鱼发生心血管毒性,导致死亡。本研究以斑马鱼为模式生物,对艾地苯醌进行了系统的安全性评价,初步阐明艾地苯醌引起的斑马鱼心血管毒性作用机制。

材料和方法 以野生型AB斑马鱼、绿色荧光标记心肌细胞的转基因斑马鱼Tg(cmcl2:EGFP)为研究对象,给予不同剂量的艾地苯醌后,将斑马鱼置于体视显微镜下进行拍照并记录各组斑马鱼幼鱼的形态。倒

置显微镜下观察并拍摄斑马鱼心跳情况,评价艾地苯醌对斑马鱼静脉窦-动脉球(SV-BA)距离、射血分数、心室短轴缩短率、血流速度及心脏红细胞的影响。利用转录组测序技术分析对艾地苯醌有毒性反应和无毒性反应斑马鱼机体基因表达水平的差异,并通过RT-qPCR方法进行验证,初步探究艾地苯醌对斑马鱼心血管的毒性作用机制。

结果 高浓度艾地苯醌能在短时间内(6 h)造成部分斑马鱼产生心血管毒性,主要表现为心脏静脉淤血严重,使部分斑马鱼血流速度降低,心脏区域红细胞染色面积减少。转录组学分析结果表明,对艾地苯醌产生毒性反应的斑马鱼与无毒性反应的斑马鱼的差异表达基因主要富集在药物代谢及脂代谢等代谢通路。RT-qPCR检测结果显示,对艾地苯醌产生毒性反应的斑马鱼机体药物代谢及脂代谢相关通路的基因表达水平与无毒性反应的斑马鱼相比显著下降。

结论 高浓度艾地苯醌可引起部分斑马鱼发生心血管毒性,产生毒性反应的斑马鱼机体代谢相关基因表达显著下调,推测艾地苯醌可能对代谢酶功能弱的机体更容易引起心血管急性毒性。

关键词:艾地苯醌;斑马鱼;安全性评价;心血管毒性

基金项目:国家重点研发计划青年科学家项目(2022YFC2804600);国家自然科学基金项目(81703624);泰山学者工程资助(tsqn202211204);山东省自然科学基金优秀青年基金(ZR2020YQ60);济南市“新高校20条”自主培养创新团队资助项目(2021GXRC047)

作者简介:周家灼,女,出生于2000年,硕士,E-mail: Zhou_Jiashuo@163.com

通讯作者:张云,研究员,主要从事基于斑马鱼模型的药物活性筛选与安全性评价研究。电话:(0531) 82605322,E-mail:xiaohan_0818@163.com

T05-0056

食品中高分子量多环芳烃检测方法的优化及在典型食品污染特征研究中的探索运用

陈柯佳,李胜,王丽,王守林*

(南京医科大学公共卫生学院,南京 211166)

摘要:**目的** 典型的多环芳烃(PAHs)为美国环保署提出的16种优先控制的PAHs,分子量(MW)低于300 Da,而高分子量多环芳烃(HMW-PAHs,主要指MW302和MW328)因同分异构体多、合成困难、难以检测,研究较少。人群可多途径接触PAHs,但研究显示在非吸烟人群中膳食暴露占总暴露量的90%以上,值得关注。本研究在课题组近年来对PM_{2.5}中HMW-PAHs系统研究的基础上,通过建立优化食品中HMW-PAHs的检测方法,分析了部分食品HMW-PAHs含量及产生条件,可为丰富HMW-PAHs膳食暴露评估提供基础资料。**材料和方法** 利用GC-MS/MS对已有的HMW-PAHs标准品进行定性,优化仪器条件,确定仪器的检测限、定量限和内标标准曲线,建立针对不同食品基质的前处理方法并进行方法学验证;基于该方法分别对模拟烹饪实验中的食用油和肉类以及市售食品进行分析,分析不同食品中HMW-PAHs的含量及产生条件。**结果** (1)建立了HMW-PAHs检测方法,综合考虑分离度、灵敏度、样品分析时间和色谱柱使用寿命,选择了15 m色谱柱和1.2 mL/min流速,确定了PAHs内标标准曲线,其决定系数均大于0.999,能够准确对PAHs定量分析,检出限和定量限分别为0.017-0.500 ng/mL和0.057-1.501 ng/mL。(2)在皂化去脂→液液萃取→固相萃取净化的前处理方法基础上,对4种食品基质(高脂食品、低脂食品、谷物、乳制品)中HMW-PAHs检测的样品前处理方法进行了优化,最终内标回收率和加标回收率分别为60.81-97.14%和52.08-126.55%,满足欧盟规定要求(50-120%)。(3)在未进行任何处理的食用油中,菜籽油PAH4和 Σ HMW-PAHs含量均处于最高水平,橄榄油则未检出HMW-PAHs;随着加热温度和时间的增加,食用油和肉类样本中 Σ HMW-PAHs含量均呈增加趋势;煎炒食品中 Σ HMW-PAHs含量显著高于水煮食品。(4)在全脂和低脂牛奶中发现了较高含量的MW302-PAHs,其中超高温灭菌乳显著高于巴氏杀菌乳,而脱脂牛奶未检

出 HMW-PAHs。 **结论** 成功建立和优化了典型食品基质中 HMW-PAHs 的检测方法,初步发现食品种类、烹饪方式、烹饪温度和时间等可显著影响食品 HMW-PAHs 含量,为后续食品 HMW-PAHs 污染特征、人群膳食暴露及健康风险评估提供重要依据和技术支撑。

关键词: 高分子量多环芳烃; 检测方法; 食品污染特征; 影响因素

基金项目: 国家自然科学基金项目(82173562); 国家自然科学基金项目(91743205); 南京医科大学常州医学中心重点项目(CMCM202315)

通讯作者: 王守林, E-mail: wangshl@njmu.edu.cn;

T05-0057

PM 2.5 基于 tPA-Glut1 轴介导气道上皮细胞-成纤维细胞时空互作 在肺损伤中的作用

杨友静, 张 涛, 李倩敏, 陶莎莎*
(重庆大学附属中心医院, 重庆 404100)

摘要:目的 PM 2.5 是威胁健康的典型空气污染物,持续暴露会导致肺炎性损伤甚至纤维化。研究表明气道上皮细胞铁死亡是肺损伤纤维化中的重要环节,然而其具体作用尚未完全阐明。本研究旨在探讨 PM 2.5 暴露所致肺损伤纤维化过程中气道上皮细胞和成纤维细胞之间的时空互作,深入了解肺纤维化的损伤机制并挖掘潜在干预靶点,为其防治提供新的理论基础。

材料和方法 构建小鼠 PM 2.5 诱导的肺损伤纤维化模型,利用免疫印迹,免疫组化等多种分子生物学实验检测及生物信息学分析确定上皮细胞铁死亡;进一步构建体外气道上皮细胞与成纤维细胞共培养模型,检测上皮细胞铁死亡及成纤维细胞活化状态;利用空间转录组分析纤维化肺组织中组织纤维溶酶原激活物(tPA)表达情况;利用生物信息学及 *seahorse* 实验检测成纤维细胞糖酵解水平;调控气道上皮细胞 tPA,利用免疫荧光、免疫印记等检测其对成纤维细胞糖酵解及活化状态的影响。

结果 PM2.5 介导的肺损伤过程中,气道上皮细胞发生铁死亡增加其 tPA 旁分泌促进周围成纤维细胞 Glut1 在细胞内蓄积激活 p-AMPK 通路,上调糖酵解协同 TGF- β 1 活化成纤维细胞。课题组进一步研究发现,STAT6 信号通路在 PM 2.5 介导肺损伤进程中持续上调,并发现 STAT6 在肺损伤的早期阶段通过竞争性结合乙酰转移酶 CBP 抑制 P53 乙酰化,进而在转录水平上恢复 SLC7A11 表达,抑制铁死亡。

结论 PM 2.5 暴露所致的肺损伤纤维化中,气道上皮铁死亡,通过旁分泌 tPA-Glut1-AMPK 轴增强成纤维细胞活化进而促进肺纤维化。在 PM 2.5 介导肺损伤早期靶向 STAT6 通路干预气道上皮铁死亡可能成为肺损伤纤维化早期干预的有效策略。

关键词: PM 2.5; 肺损伤纤维化; STAT6; 铁死亡; 糖酵解

作者简介: 杨友静, E-mail: 18783921296@163.com

T05-0059

预存抗体阳性食蟹猴视网膜下注射 AAV8-antiVEGF 病毒产品对 脉络膜新生血管的药效研究

苏 航², 钱仪敏², 张 鹏², 冯宇玫², 孟 永^{1,2*}, 李 华^{1,2*}

(1. 中国医药工业研究院总院, 上海 201203; 2. 益诺思生物技术南通有限公司, 江苏 南通 226133)

摘要:目的 探究 AA8 预存抗体阳性食蟹猴视网膜下注射 AAV8-antiVEGF 病毒产品对脉络膜新生血管

(CNV)的药效研究。**材料和方法** 采用细胞法对食蟹猴血清进行抗体筛选,筛选出4只预存抗体为阳性动物。将筛选出的4只动物随机分为2组,每组2只,视网膜下注射给予100 μ L浓度分别为5.00 \times 10¹¹ vg/mL(低剂量组)和1.00 \times 10¹² vg/mL(高剂量组)的AAV8-antiVEGF病毒。另设一组溶媒组,视网膜下注射给予100 μ L溶媒。给药后28天对动物视网膜激光光凝诱导CNV。所有动物于给药前、给药当天(D1)、激光当天(D28)、激光后第14天(D42)、激光后第21天(D49)和激光后D28(D56)进行OCT和FFA检查,以观察CNV病灶大小和荧光素渗漏的变化情况,并以四级光斑发生率对FFA结果进行统计。**结果** 给药组4只动物给药前IR%(抑制率)值分别为84%、99%、93%和90%,均大于50%,为AAV8抗体阳性动物。所有动物D1给药后即刻经OCT扫描确认均可见黄斑区视网膜神经上皮层脱离,其下见网膜下液,提示给药成功。D28激光光凝后经OCT确认均可见Bruch膜被击破,提示激光光凝成功。D42~D56,溶媒组动物双眼黄斑区可见视网膜下积液及神经上皮层与色素上皮层脱离,视网膜神经上皮层下团块状、梭形或不规则膨大;FFA结果显示模型组动物光凝处动脉期可见新生血管荧光素钠显影,随即迅速渗漏,造影晚期见光斑处CNV强荧光渗漏相互连接形成片状。给药组抗体阳性动物OCT可见光凝斑局部增厚、隆起,未见上述CNV症状;FFA结果显示给药组抗体阳性动物光斑处造影早、中、晚期未见CNV荧光素钠渗漏,光斑相对独立生长。模型组动物D14、D21和D28的FFA四级光斑发生率分别为75 \pm 10.21、75 \pm 10.21和84.38 \pm 6.25,低剂量组动物D14、D21和D28的四级光斑发生率分别为3.13 \pm 6.25、0 \pm 0和3.13 \pm 6.25,高剂量组动物D14、D21和D28的四级光斑发生率分别为0 \pm 0、0 \pm 0和0 \pm 0,与溶媒组四级光斑发生率均出现显著性差异($P < 0.05$)。**结论** 本研究结果表明AA8预存抗体阳性动物可用于评价视网膜下注射AAV8-antiVEGF病毒的药效学研究,预存抗体阳性动物经视网膜下注射AAV8-antiVEGF病毒产品能有效抑制CNV的发展。

关键词: AA8预存抗体阳性;食蟹猴;视网膜下注射;脉络膜新生血管(CNV)

通讯作者: 孟永, E-mail: mengyong3323@163.com

T05-0060

柚花急性经口毒性及遗传毒性研究

彭宝莹, 陈美芬, 崔丽霞, 黄芳, 李欣*

(广东省疾病预防控制中心, 卫生毒理所, 广东广州 511430)

摘要: **目的** 评估柚花的急性经口毒性与遗传毒性,为评价其食用安全性提供实验依据。**方法** 采用限量法,选用SD大鼠和KM小鼠各20只,雌雄各半,分别设柚花剂量为10.0 g/kg BW和20.0 g/kg BW进行急性经口毒性试验;哺乳动物红细胞微核试验选用KM小鼠50只,雌雄各半,设1.25、2.50、5.00 g/kg BW 3个剂量组并同时设阴性对照组和阳性对照组;体外哺乳类细胞染色体畸变试验选用CHL细胞,设312、625、1250 μ g/mL 3个剂量组,另设阴性对照组和阳性对照组,试验在 \pm S9条件下进行;细菌回复突变(Ames)试验选用鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535试验菌株,设8、40、200、1000、5000 μ g/皿 5个剂量组,同时设未处理对照、溶媒对照和阳性对照组。试验方法均按现行食品安全国家标准进行。采用IBM SPSS 20统计软件对实验数据进行统计学处理,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。**结果** 在本试验条件下,急性经口毒性试验未观察到动物出现中毒反应和死亡,获得柚花雌、雄性SD大鼠急性经口半数致死量(lethal dose, LD₅₀)大于10.0 g/kg BW,获得雌、雄性KM小鼠LD₅₀大于20.0 g/kg BW;柚花1.25、2.50、5.00 g/kg BW 3个剂量组雌、雄KM小鼠的含微核细胞率与阴性对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);柚花对CHL细胞,在加及不加S9时,3个剂量组的染色体畸变细胞率与阴性对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);柚花对鼠伤寒沙门氏菌TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535五个试验菌株,在加及不加S9时,5个剂量组均未引起试验菌株的回复突变菌落数显著增加,亦无剂量反应关系或可重复的阳性反应测试点。**结论** 柚花属实际无毒级物质,在本实验条件下柚花的小鼠红细胞微核试验、体外哺乳类细胞染色体畸变试验和细菌回复突变试验结果均为阴性,未见遗传毒性。

关键词: 柚花;急性毒性;遗传毒性

通讯作者: 李欣, E-mail: 2577328310@qq.com

T05-0061

一种靶向人 IL4RA 的纳米抗体的胚胎-胎仔发育毒性伴随毒代研究

舒柄垚, 陈波, 朱荣, 郭伟, 岑小波*

(成都华西海圻医药科技有限公司, 成都 610200)

摘要:目的 SW002 是一款靶向人类白细胞介素-4 受体 α (IL4RA) 的纳米抗体, 临床拟雾化吸入的方式, 用于治疗哮喘及慢性阻塞性肺病等疾病。该纳米抗体具有高度的特异性, 能特异性识别人类 IL4RA, 而与常规实验动物的 IL4RA 无交叉反应。根据 ICH S5(R3)(人用药物生殖与发育毒性检测)的要求, 为了评估 SW002 对胚胎-胎仔发育的影响, 选择转基因动物 B-hIL4/hIL4RA 小鼠作为实验动物。该转基因小鼠能够表达人类 IL4 和 IL4RA 蛋白, 为评估 SW002 毒性的理想模型。本研究中, 着重探讨了 SW002 对 B-hIL4/hIL4RA 转基因小鼠胚胎和胎仔发育的潜在影响, 并伴随考察了其毒代动力学特征, 为临床使用的安全性提供参考。

值得注意的是, SW002 临床给药方式为吸入。为避免因长时间保定给药对孕鼠造成应激反应而干扰对药物毒性的准确评估, 本研究选择皮下注射的方式给药。

方法 本研究将 240 只交配成功的 B-hIL4/hIL4RA 雌鼠随机分为溶媒对照组及 SW002 10、30、100 mg/kg 组, 其中溶媒对照组 8 只、SW002 各组 32 只动物用于毒代动力学采样。交配成功雌鼠于妊娠期第 6~15 天每天 1 次连续皮下注射溶媒或相应浓度的 SW002 给药制剂。每天观察动物一般状态, 定期进行体重、摄食量测定。妊娠期第 18 天, 对各组雌鼠实施安乐死后进行大体解剖观察, 测定脏器重量及系数, 计数黄体、着床腺、吸收胎、死胎、活胎。对 100 mg/kg 组存活的胎仔在实施安乐死后, 对其外观、体重、身长及内脏、骨骼进行检查。

毒代动物于首、末次给药前及给药后不同时间点采集血样, 采用 ELISA 法检测各时间点血清中 SW002 的浓度。此外, 选择部分毒代动物于首次给药前及妊娠期第 18 天解剖前采集血样, 采用 ELISA 法检测血清中抗 SW002 抗体。

结果 试验期间, SW002 各组孕鼠的一般状态、体重、摄食量、脏器重量及系数、吸收胎数、死胎数、活胎数、着床后丢失率, 各组胎仔的体重、身长、尾长、外观, 以及 100 mg/kg 组胎仔的内脏、骨骼检查均未见明显异常改变。在 10~100 mg/kg 剂量范围内, 孕鼠血清中 SW002 的暴露量增加与剂量增加基本成比例; 连续给药 10 天, 未见明显蓄积。妊娠期第 18 天, SW002 各组均有 1 只(1/8 比例)孕鼠检测出抗药抗体; 从 TK 结果看, 抗药抗体对 SW002 暴露量无影响。

结论 综上所述, 本试验条件下, SW002 对母鼠亲代毒性、生殖毒性及胚胎-胎仔发育毒性的无毒性反应剂量(NOAE)均为 100 mg/kg(该剂量下末次给药后暴露量为 314 h \cdot μ g/mL)。对于无相关种属的生物技术药物, 应合理选择转基因动物、同源蛋白、疾病模型动物开展试验。给药方式应尽量模拟临床, 也可在药代桥接试验的基础上选择系统暴露最佳的方式。

作者简介:舒柄垚, E-mail:bingyaoshu@glpcd.com

通讯作者:岑小波, 电话:028-60662518-8100, E-mail:xbcen@glpcd.com

T05-0062

Calpain 介导 TDP-43 异常聚集在 APAP 诱导的急性肝损伤中的机制研究

柳招兄, 宋福永*

(山东省济南市, 山东大学公共卫生学院)

摘要:研究目的 对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)是全球最常用的 OTC 类解热镇痛药, 其在治疗剂量范围内安全有效, 但过量服用会导致严重肝损伤, 甚至肝衰竭。Calpain 是钙依赖性中性半胱氨酸蛋

白酶,在 APAP 诱导的急性肝损伤中激活。此外,Calpain 可以特异性裂解 TDP-43,进而形成 TDP-43 蛋白包涵体,而 TDP-43 在线粒体内聚集会造成线粒体功能受损。为了探讨在 APAP 诱导的肝损伤中 Calpain 参与调节线粒体功能障碍的机制,TDP-4 是否参与 APAP 诱导的线粒体损伤,建立 APAP 急性肝损伤动物模型和 Calpeptin 干预动物模型,以期为 APAP 急性肝损伤防治提供新的干预靶点。

实验方法 本研究通过 C57BL/6 小鼠建立 APAP 急性损伤模型和 Calpeptin 干预动物模型,急性损伤模型小鼠禁食 12h 后腹腔注射 300 mg/kg APAP。Calpeptin 干预模型小鼠提前 1 h 给予 2 mg/kg Calpeptin 溶液,然后腹腔注射 300 mg/kg APAP。通过相关生化指标检测,病理染色,透射电镜以及 Western Blot,组织免疫荧光染色等检测相关指标。

研究结果 APAP 染毒后 ALT 和 AST 水平升高,肝脏大面积坏死,小叶结构模糊。电镜结果显示 APAP 染毒引起肝细胞线粒体肿胀,嵴异常或消失,基质松散。Western Blot 显示线粒体 Drp1 表达增加,Mfn2 表达减少。同时检测到线粒体内 Calpain 激活,并且线粒体内聚集的 TDP-43 增加并裂解。而 Calpeptin 干预后小鼠血清 ALT 和 AST 的水平降低。H&E 染色显示肝脏细胞坏死病灶明显缩小,炎性细胞浸润减轻,肝小叶结构恢复。Calpeptin 干预还抑制了 Drp1 过度表达,并抑制了 Drp1 和 Mfn2 的裂解。并且 Calpeptin 干预组小鼠肝脏内 TDP-43 表达水平降低。同时,免疫荧光检测发现 Calpeptin 干预后 TDP-43 与线粒体共定位显著减少。

结论 在 APAP 诱导的急性肝损伤中,线粒体 Calpain 激活,并促进 TDP-43 在线粒体中的错误定位,进而导致线粒体严重损伤,Calpeptin 能够抑制 APAP 诱导的急性肝损伤和线粒体损伤。

关键词: 对乙酰氨基酚; 线粒体损伤; Calpain; TDP-43; 急性肝损伤

作者简介: 柳招兄, E-mail: Liuzhx19960319@163.com

T05-0063

基准剂量方法在制定每日允许摄入量中的应用

刘 瑛*, 王文佳, 任 雁

(沈阳沈化院测试技术有限公司安全评价中心, 沈阳 110141)

摘要:目的 为了推进美国 EPA2012 年 6 月发布的基准量剂量技术指导原则(Benchmark Dose Technical Guidance)在国内毒理学实验中的应用,本文尝试性使用导则中提供的基准剂量方法(benchmark dose, BMD)对大鼠慢性毒性与致癌合并试验中产生的数据进行剂量-反应关系分析,从而确定基准剂量下限(BMDL)值,以此作为制定每日允许摄入量(ADI)结果的依据。

材料和方法 本研究在经口饲喂 104 周的大鼠慢性毒性与致癌合并试验中,针对具有剂量-反应关系的毒性结果进行建模,找到包含与特定不良反应效应相对应的剂量水平或基准效应(benchmark dose),或接近可观察范围的最低效应结果。BMD 的计算是由基准反应(benchmark response, BMR)决定的。选择 BMR 需要对使用的数据结果的统计学和生物特性进行判断,从而决定是否可以作为生成基准剂量的数据模型来使用,使用不同的数据将会导致不同的 BMR 结果。通过对 2 年大鼠慢性试验中低、中、高剂量组中出现的雄鼠生殖系统组织病理学病变效应分析,其病变发生率的升高呈现了明显剂量-反应关系,使用该指标用二房型毒理学数据模型进行分析(采用美国 EPA 公开软件 BMDS 3.3),计算得出 BMDL 值。

结果 根据指南中的要求,在制定 ADI 时,有完整的长期毒性数据,且毒理学效应有明显的剂量-反应关系,能够准确推算出 BMDL 值,因此不确定系数选择 100。通过 ADI 计算公式,最终制定 ADI 结果。

结论 在中华人民共和国农业部公告第 1825 号《农药每日允许摄入量制定指南》中指出,可以用 BMDL 代替 NOAEL,即如有合适的剂量-反应模型、或无法确定 NOAEL、或农药长期暴露量与 ADI 接近时,推荐用 BMD 方法来推导 ADI。该研究方法有效替代了通常使用的未观察到有害作用剂量水平和观察到有害作用的最低水平(NOAEL/LOAEL)制定安全参考值的方法。有效避免了由于 NOAEL/LOAEL 主观剂量的选择、剂量间隔、样本量等因素的影响,对慢性毒性试验风险评估提供了更加客观、科学的数据依据。

T05-0064

异丙基化磷酸三苯酯诱导雌性大鼠卵巢功能异常毒理学研究

曹卓华^{1,2}, 李振华^{1,2}, 李萍¹, 门思雨¹, 臧沛霖¹, 金汉永^{1,2*}

(1. 延边大学 药学院; 2. 延边大学 长白山天然药物研究教育部重点实验室, 延吉 133002)

摘要:目的 通过构建 IPPP 重复剂量染毒动物模型, 探究 IPPP 对大鼠卵巢的功能和发育毒性和机制。方法 本研究选用 6 周龄雌性 SD 大鼠为研究对象, 通过灌胃给予不同水平(0, 0.025, 0.25, 2.5, 25 mg·kg·d⁻¹)的 IPPP 共 63 天, 构建 IPPP 重复剂量染毒动物模型; 通过石蜡切片和 H&E 染色检测各器官形态和病理改变; 通过酶联免疫吸附法测定血清激素水平, 探究不同暴露剂量 IPPP 对下丘脑-垂体-卵巢轴(hypothalamic-pituitary-ovarian axis, HPOA)激素分泌功能的影响; 通过 PCNA 免疫组化染色研究 IPPP 对卵巢颗粒细胞增殖的影响; 通过纤维化标志物免疫组化染色和 BODIPY 荧光染色研究卵巢纤维化和脂肪积累水平; 通过各阶段卵泡计数探究 IPPP 对卵巢卵泡储备、发育和排卵的影响; 通过对卵巢组织转录组测序(RNA-Seq), 探究 IPPP 对卵巢中基因转录表达水平的影响和潜在分子机制; 通过实时荧光定量 PCR(Quantitative Real-time PCR)验证转录组测序中关键基因转录水平的改变。结果 (1)0.25 mg·kg·d⁻¹ 暴露剂量下 IPPP 诱导大鼠卵巢原始卵泡比例显著增加, 初级卵泡比例显著减少, Egr1、Fos、Fosb、JunB、Nr1d1 和 Dbp 等 17 个基因在转录水平上显著改变; (2)在 2.5 和 25 mg·kg·d⁻¹ 的暴露剂量下, IPPP 引起卵巢间质细胞空泡化和基质区域纤维化并显著下调血清 FSH 和 E2 水平; (3)25 mg·kg·d⁻¹ 的暴露剂量下, IPPP 显著增加间质细胞脂肪积累, 减少卵泡总数, 增加闭锁卵泡比例, 减少壁层颗粒细胞数量, 减少 PCNA 染色强度, 30 μM 浓度下 IPPP 显著降低了 KGN 细胞的活力和 PCNA 蛋白表达水平(4)转录组差异表达基因分析表明, 25 mg·kg·d⁻¹ 的 IPPP 暴露剂量下, 256 个基因转录表达水平发生显著改变, 生物信息分析提示 IPPP 可能通过调控昼夜节律相关基因(Nr1d1、Nfil3、Arntl、Per3、Dbp、Nr1d2), 细胞外基质相关基因(Mmp2、Mmp9、SERPINE1、Myh6、Acta1)和卵巢内部免疫细胞稳态改变产生生殖毒性。结论 本研究确定 IPPP 造成大鼠卵巢毒性的最小可见损害作用水平(Lowest Observable Adverse Effect Level, LOAEL)为 0.25 mg·kg·d⁻¹; 25 mg·kg·d⁻¹ 的 IPPP 暴露通过干扰 HPOA 的激素分泌功能、卵泡的发生和闭锁、卵巢颗粒细胞和间质细胞功能、卵巢昼夜节律和免疫稳态调控, 诱导卵巢发生衰老样改变。

关键词: IPPP; 生殖毒性; HPO 轴; 卵巢; 毒物基因组学**通讯作者:**金汉永(1985-), 男, 博士生导师, 副教授, 研究方向为生殖毒理学, E-mail: jinhanyong@ybu.edu.cn

T05-0065

新霉素通过氧化应激介导的细胞凋亡诱导斑马鱼胚胎发育毒性

林源^{1,2}, 柳莹莹^{1,2}, 张秋萍^{1,2}, 雷宇清^{1,3}, 曹华⁴, 王心睿^{1,3*}

(1. 福建医科大学妇儿临床医学院, 福建 福州 350004; 2. 福建省儿童医院心脏外科, 福州 350011; 3. 福建省妇幼保健院医学研究中心, 福州 350000 福建医科大学; 4. 福建省立医院, 福建 福州 350001)

摘要:新霉素属于氨基糖苷类抗生素。对于治疗结核病, 痢疾, 皮肤粘膜感染及烧伤等效果较为显著。新霉素除了作为人体抗感染的抗生素应用之外, 它同时在乳腺癌, 呼吸道感染等疾病的治疗, 甚至在畜牧业的疾病预防和控制中发挥着重要作用。近年来, 文献报道自然环境中(例如土壤和地表水)检测到抗新霉素的耐药性菌株, 因此新霉素的大量应用导致的生态风险已不容忽视。新霉素已被证实在动物模型中的应用会导致严重的耳毒性。但是, 在环境浓度下新霉素毒性在胚胎发育早期的作用尚未明确。在本研究中, 将斑马鱼胚胎暴露于一系列浓度梯度的新霉素。结果发现, 斑马鱼具有时间和剂量依赖性的低孵化率、高死亡率, 同时发现具有发育障碍(心包水肿、卵黄囊水肿和生长发育迟缓等)、心血管畸形(心肌线性化、心肌壁

变薄、心内膜分离、血管功能不全、血流减慢等)以及肌肉发育缺陷,骨骼发育障碍和运动速度降低等不同发育障碍的表型。与体内结果一致,新霉素暴露被发现可能通过增强活性氧(ROS)的表达水平和细胞凋亡。此外,斑马鱼胚胎暴露新霉素引起抗氧化生物标志物(SOD、CAT、GST和GSH-Px)的降低,凋亡生物标志物(caspase-9和caspase-3)的增加。心血管发育和骨骼发育及抗氧化应激等相关基因表达下调,凋亡基因表达上调。总之,本研究结果揭示了新霉素对斑马鱼胚胎发育的毒性作用,这可能会引起人们对妊娠早期新霉素暴露危害的关注,并为理解潜在的环境风险提供了新的见解。

关键字:心血管畸形;骨骼发育畸形;发育障碍;新霉素;斑马鱼

通讯作者:王心睿,E-mail:w anxiru@s jtu.edu.cn

T05-0067

新型 MOFs 材料 Fe₃O₄-94 富集测定水中 15 种抗生素

安志新,冯玉超,于正洁,李晓楠,索德成*

(中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所,北京 100081)

摘要:自抗生素问世以来,其种类也多种多样,毫无疑问,抗生素的蓬勃发展给整个社会带来了许多便利和益处,比如治疗和预防疾病,除此之外,还用于畜牧业和食品工业等领域,应用范围也越来越广。抗生素不能被生物完全代谢和吸收,只能大部分以代谢物的形式通过粪便和尿液释放到环境中,每年成千上万吨不被机体吸收的抗生素排入水体中。因此,寻找绿色、经济、高效的抗生素污染治理技术和方法迫在眉睫。基于金属有机框架材料(Metal-Organic Frameworks, MOFs)比表面积高、结构多样、孔径可调、理化性质丰富等特征,通过在 MOFs 材料上引入具有高磁性的 Fe₃O₄磁性纳米微球,实现快速简单的萃取分离。本论文以四环素类、喹诺酮类、磺胺类和大环内酯类等 15 种抗生素为对象,研究了 MOFs 磁性复合材料作为吸附剂富集分离这些抗生素的性能。主要内容如下:

(1)合成了 Fe₃O₄-94,以其作为吸附剂建立了磁性微固相萃取体系,结合高效液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)用于检测水样中 15 种抗生素残留。对所合成的 Fe₃O₄-94 进行表征,N₂吸附/解吸等温线,Brunauer-Emmett-Teller(BET)表面积分析显示,比表面积在 1833 m²/g。孔径大小在 3.3 nm 左右。室温下使用 VSM 对 Fe₃O₄-94 进行磁性的表征;磁滞线表明,Fe₃O₄-94 颗粒具有高饱和磁化强度(52.7emu/g)。

(2)考察了萃取时间等条件对萃取效率的影响,并探讨了 Fe₃O₄-94 对 15 种抗生素药物的吸附作用机理。吸附动力学、吸附等温线、吸附热力学、pH 等影响因素,结合扫描电镜、X 射线光电子能谱等技术探究了吸附剂与污染物之间的吸附进程及机理。

合成了一种新型 MOFs 材料 Fe₃O₄-94 对 15 种抗生素表现出较高的去除效率和良好的可重复利用性。循环 4 次后,吸附效率仍能达到初始吸附量的 80%,Fe₃O₄-94 对 10 mg/L 15 种抗生素的去除率达到了 90%。并且 Fe₃O₄-94 具有良好的抗干扰能力。这些结果表明,Fe₃O₄-94 在实际废水处理中具有很大的应用潜力。

关键词:Fe₃O₄-94; MOFs; 抗生素; 磁性分散微固相萃取

作者简介:安志新,E-mail:zhixinan2022@163.com

T05-0068

戊唑醇暴露对卵巢生殖功能的影响

门思雨^{1,2},李萍^{1,2},李振华^{1,2},曹卓华^{1,2},臧沛霖^{1,2},金汉永^{1,2*}

(1. 延边大学 药学院; 2. 延边大学 长白山天然药物研究教育部重点实验室,延吉 133002)

摘要:目的 本研究旨在通过构建不同剂量戊唑醇(Tebuconazole,TEB)暴露的动物模型,探究 TEB 对

卵巢生殖发育的影响及作用机制。**材料和方法** 本研究选用六周龄的雌性SD大鼠作为受试对象,将实验动物适应喂养一周后,采用灌胃给药的方式给予对照组(玉米油)以及不同剂量的TEB(0.1, 1, 10 mg·kg·d⁻¹)。戊唑醇暴露后28天后对大鼠实施安乐死并测定主要脏器的系数变化。采用H&E组织染色观察包括卵巢等主要器官的组织形态学变化;通过各种试剂盒及酶标仪测定大鼠血清中不同激素含量水平;利用PCNA免疫组化方法观察TEB暴露对主要组织器官的细胞增殖影响;利用PCNA染色卵巢组织切片进行卵泡数量统计;并通过各种分子生物学手段在卵巢组织和人卵巢颗粒(KGN)细胞中鉴定TEB影响卵巢生殖健康的分子作用机制。**结果** (1)与对照组相比,不同剂量的TEB暴露对大鼠体重和脏器系数无显著性差异。(2)最高剂量的TEB暴露显著降低血清中E2激素含量水平,而对抗缪勒管激素及睾酮激素水平无明显影响。(3)卵巢、心脏、脾脏的组织形态学未发生变化,但肝脏和肾脏分别出现了细胞间隙增大以及肾小球结构紊乱。(4)免疫组织化学(IHC)显示肝脏和肾脏的细胞增殖活性受到了抑制,而其它组织的细胞增殖无显著性变化。(5)低浓度的TEB(0.1 mg/kg)暴露导致卵泡数量显著减少,并抑制了原始卵泡的生长发育。(6)TEB通过调控Foxo3a mRNA基因表达抑制卵母细胞的生长发育。(7)TEB暴露抑制CYP19蛋白的表达水平,且分子对接模型显示其还可能抑制CYP19蛋白的活性。**结论** 本研究中首次发现TEB通过调控各种途径导致卵巢生殖健康的不良影响,低剂量TEB暴露通过上调Foxo3a mRNA基因表达导致卵母细胞的生长停滞,从而影响卵泡的正常发育,而最高剂量的TEB暴露则通过抑制卵巢中CYP19蛋白的表达及活性降低血清中雌激素水平。此外,还证实了TEB暴露对肝脏和肾脏组织产生了不良影响。

关键词:戊唑醇;生殖毒性;卵巢发育;毒理学机制

通讯作者:金汉永(1985-),男,博士生导师,副教授,研究方向为生殖毒理学,E-mail:jinhanyong@ybu.edu.cn

T05-0069

基因治疗产品非临床安全性评价的一般考虑

张艺哲,邢红艳,卢言新,尤延飞,张韵佳,周长慧*
(上海益诺思生物技术股份有限公司,上海 201203)

摘要:基因治疗是通过表达(转录或翻译)转移的遗传物质、选择性改变目的基因组和/或通过选择性修饰基因表达来修饰或纠正基因异常的治疗方式,根据用药方式可分为在体和离体两大类型,在体可分为DNA和RNA层面的基因治疗,通过递送系统直接将功能基因片段或基因编辑工具导入体内靶器官,离体主要是细胞治疗,将患者体内细胞取出后在体外进行基因编辑或导入功能性基因片段后再回输至患者体内。本文主要对在体基因治疗产品的非临床安全评价的一般考虑进行概要。

基因治疗产品的非临床安全评价研究周期应基于生物分布和药代动力学特征确定,包括载体的存续性、免疫原性和目的基因的表达,需要考虑不同的给药方式、给药途径和病毒载体在靶组织和非靶组织中的分布及转运特点。种属选择需要考虑递送系统(如病毒衣壳、脂质体、聚合物纳米颗粒和靶向配体)和表达有效载荷的生物活性(即转基因或治疗性基因序列),非啮齿类动物需要考虑动物对载体衣壳和/或表达产物的预存抗体和适应性免疫。

基因治疗产品的非临床安全性评价风险需要考虑其对基因组构成的潜在风险,包括插入性突变、突变和脱靶基因表达。病毒整合可造成与基因破坏、基因表达改变或基因组断裂/融合产生相关的基因组风险及致癌风险,病毒整合的位点也可能对基因组产生一定风险,包括细胞失调甚至转化,转化的潜在风险进一步受到启动子、转基因和载体设计的其他方面以及细胞内载体拷贝的数量的影响,对于具有基因组整合潜力的复制型载体(例如溶瘤病毒),插入突变风险将随着病毒载量的增加而增加。脱靶效应的发生可能导致基因表达紊乱、蛋白功能异常、细胞毒性等一系列问题。

在评估基因治疗产品的生殖和发育毒性时,应考虑产品类型、作用机制、生物分布、脱落特征和目标患者群体。具有整合能力和生殖细胞趋向性的病毒生殖和发育毒性风险较高,当基因治疗产品在生殖器官持

续存在时,需要进一步研究确定其在生殖细胞的暴露水平。根据载体类型、复制能力、基因组整合特性、剂量水平、给药途径等因素,分析评估基因治疗产品生殖系整合风险。

基因治疗产品非临床和临床经验都是确定其潜在风险的一般考虑和方法的基础,研究设计和终点应注重个案的灵活性,以告知临床风险/收益。

关键词:基因治疗产品;非临床;安全性评价

作者简介:张艺哲,E-mail:yzzhang-2@innostar.cn

通讯作者:周长慧,E-mail:chzhou@innostar.cn

T05-0072

人群多环芳烃暴露与不同加工食品摄入的相关性及对肠道炎性损伤的影响

王少卓,陈柯佳,周昊杰,王丽,王守林*

(南京医科大学公共卫生学院,现代毒理学教育部重点实验室,南京 211166)

摘要:目的 多环芳烃(PAHs)是环境常见有机污染物,饮食暴露是重要途径,但其人群暴露及危害研究主要集中于分子量(MW)在128-278Da的16种PAHs,而MW \geq 300Da的高分子量PAHs(HMW-PAHs)也被发现广泛存在于传统PAHs产生过程中,且因分子量大、水溶性较低而脂溶性更大,越有可能在肉食、杂食和大型生物体内蓄积,对肠道产生更大的危害,但因同分异构体多、多数缺乏标准品而未能检测和评估。本研究旨在通过公共数据库和体内外实验研究,试图阐明膳食暴露PAHs(包括传统PAHs和新型HMW-PAHs)与肠道炎症的相关性及其机制,为完善重要PAHs的健康风险评估提供科学依据。材料与方法 (1)利用GC-MS/MS对苏北不同特征人群血液中PAHs进行检测;(2)分析来自NHANES数据库中2009-2016年18岁以上具有完整调查因素及尿液羟基化多环芳烃(OH-PAHs)检测的人群,在排除30天内受感染的人群后,先利用NOVA系统对食品的加工程度进行分级,对人体尿液OH-PAHs水平的来源进行解析;再进一步分析尿液OH-PAHs水平与超灵敏C反应蛋白(HSCRP)、白细胞及其亚型、肠道症状及疾病的相关性;(3)采用HMW-PAHs处理不同部位的肠上皮细胞(小肠上皮细胞IEC6、结肠上皮NCM460),利用ROS荧光探针检测细胞氧化应激,荧光葡聚糖渗透实验检测胞间紧密连接;(4)利用荧光体式显微镜评价HMW-PAHs染毒的Tg(lyz:RED)与Tg(mpeg:EGFP)转基因斑马鱼幼鱼,并通过Image统计中性粒细胞与单核巨噬细胞的数量及荧光强度,通过阿尔新蓝染色拍照并统计杯状细胞及粘液蛋白的含量,RT-PCR检测与中性粒细胞及巨噬细胞相关基因及炎症因子转录状况,评估HMW-PAHs的促炎效应及肠道损伤作用。结果 (1)苏北人群的检测发现,使用油炸、烟熏食品的人群的血液PAHs显著高于一般人群;(2)NHANES数据分析显示,尿液中多种OH-PAHs水平之间高度相关,提示其可能具有共同的来源;OH-PAHs水平与超加工食品(UPF)的摄入以及体内可替宁(吸烟)的水平高度相关;在矫正吸烟因素后,尿液OH-PAHs水平受油炸、烟熏、烧烤、烘焙食物所影响,其中脂肪含量较高且经过高温处理的食物影响更显著;多元线性回归分析结果显示,所有OH-PAHs水平与HSCRP、白细胞及其亚型正相关,且多数与排便紧迫、稀便有关(分子量较低的羟基萘除外);(3)斑马鱼染毒模型显示,HMW-PAHs会造成肠道中性粒及巨噬细胞、ROS的增加,肠道不同部位(回肠、结肠)中的ROS显著增加、肠上皮细胞紧密连接受损、粘液分泌减少,促炎因子IL-6、IL-1 β 、TNF- α 增加。结论 人群PAHs暴露主要与油炸、烟熏、烧烤、烘焙等食物的摄入有关,且易引起机体炎症、肠道炎症细胞增殖、肠道不良症状(腹泻、排便紧迫)等健康危害,分子量高的PAHs可能具有更强的致病效应。

关键词:多环芳烃;食品加工方式;人群暴露;肠道损害;炎症作用

基金项目:国家自然科学基金项目(82173562);国家自然科学基金项目(91743205);南京医科大学常州医学中心重点项目(CMCM202315)

通讯作者:王守林,E-mail:wangshl@njmu.edu.cn

T05-0073

化橘红提取液对糖尿病肾病模型大鼠肾脏组织 MCP-1 的影响

王凤岩¹, 茅莉娜^{1,2}, 周轶琳¹, 唐 娇³, 贺 彩¹

(1. 广东省疾病预防控制中心卫生毒理所, 广东 广州 511430; 2. 广东省生物制品与药物研究所药理研究室, 广东 广州 510440; 3. 广东省公共卫生研究院健康风险评估研究室, 广东 广州 511430)

摘要:目的 糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是目前临床中较为常见的糖尿病并发症,研究表明炎症反应在 DN 的发病机制中发挥了重要作用;单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)是介导炎症反应的重要细胞因子,对 DN 的进展可能起到促进作用。通过建立糖尿病肾病(DN)大鼠模型,探讨化橘红对糖尿病肾病大鼠肾脏 MCP-1 的影响。**方法** 采用高糖高脂饮食联合 STZ 腹腔注射法制备糖尿病肾病大鼠模型。SPF 级雄性 SD 大鼠以高糖高脂饲料喂饲 6 周后,腹腔注射链脲佐菌素(35 mg/g BW),72 h 后采血测空腹血糖、收集尿液测 24 h 尿量及尿蛋白定量(UTP)凡空腹血糖 ≥ 16.6 mmo1L,尿量 $>$ 原尿量的 150%,24 h 尿蛋白定量 >30 mg,即可认为 II 型糖尿病肾病大鼠造模成功。将造模成功的 40 只大鼠随机分为模型组和化橘红低、中、高剂量组,每组 10 只,另设空自对照组。实验中,空自对照组给予纯净水,化橘红剂量组给予化橘红提取液(柚皮苷有效剂量分别为 50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg),8 周后检测各组大鼠 24 h 尿蛋白定量、血肌酐、尿素氮水平,并采用 ELISA 法检测肾脏中 MCP-1 的表达情况。**结果** ①与对照组相比,模型组大鼠 24 h 尿蛋白定量、血肌酐、尿素氮水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);②与模型组相比,化橘红各剂量组大鼠 24 h 尿蛋白定量、血肌酐、尿素氮则明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);③与模型组相比,化橘红各剂量组肾脏组织中 MCP-1 的含量明显下降,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 化橘红可降低糖尿病肾病大鼠 24 h 尿蛋白定量、血肌酐、尿素氮,并能下调肾脏中 MCP-1 的表达,可能对糖尿病肾病的肾脏具有一定的保护作用。

T05-0074

气候变化与海洋毒素风险:波动的海水条件带来的启示

孟瑞阳, 张慧珍*

(郑州大学公共卫生学院, 郑州 450001)

摘要:由海洋生物产生的海洋毒素威胁着人类健康,给沿海国家带来了沉重的公共卫生负担。最近,海洋毒素中毒事件在以前从未有过报道的地区出现,气候变化被认为是一个重要因素。本研究旨在从海水条件的变化方面系统地总结了气候变化对海洋毒素风险的影响。随着人类对化石燃料的扩大利用,大量二氧化碳被释放进空气中导致大气变暖,海洋可吸收大气中多余的热量和二氧化碳,导致海洋热浪、酸化、分层和海平面上升。这些气候事件将引起海水的表面温度、盐度、pH 值和营养状况的变化。一方面,海水理化性质的转变将促进海洋毒素的生产。首先,海洋温度的上升可促进 *Dinophysis acuminata* 等多种有毒藻类的生长和产毒。其次,海水的盐度和 pH 的波动对藻类产毒浓度和产毒模式造成影响。部分藻类如蓝藻和甲藻如 *Gammaproteobacteria* 和 *Cochlodinium polykrikoides* 对高盐度和酸性环境具有强大的适应能力,这将有利于其成为有害藻华的主导物种。另一方面,气候变化可能会扩大海洋生物(如藻类、细菌和鱼类)的生活范围,加剧海洋毒素的传播。值得注意的是,气候变化所引起的海洋毒素产生和传播的增加,将提高人类摄入雪卡毒素、河豚毒素、环亚胺和微囊藻毒素的风险。其中,雪卡毒素可通过促进电压依赖性钠通道的异常激活、降低细胞内 PARP 活性和促进反应性胶质细胞增殖,导致持久疼痛和持续性麻痹。环亚胺通过强烈拮抗 nAChRs 和 mAChRs,干扰神经肌肉接头和突触的正常功能。河豚毒素通过阻断神经细胞的钠通道改变其兴奋性。MC-LR 降低 PP2A 酶活性,诱导氧化应激,进而激活 CaMKKII、NF- κ B 和 JNK 通路,导致细胞凋亡、细胞骨架损伤和炎症。展望未来,发展跨学科合作,加强对新兴海洋毒素的监测,并探索更多

的新方法,对于更好地应对气候变化带来的海洋毒素的风险至关重要。

关键词:微囊藻毒素;气候变化;细菌毒素;有害藻华

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81773384);国家自然科学基金面上项目(82073512);中原科技创新领军人才计划(244200510028)

通讯作者:张慧珍,E-mail:huizhen18@126.com

T05-0075

微囊藻毒素-LR的细胞毒性:细胞超微结构和功能损伤

葛康峰,张慧珍*

(郑州大学公共卫生学院,郑州 450001)

摘要:微囊藻毒素-LR是一种由蓝藻产生的毒素,广泛分布于富营养化水体中,具有多器官毒性。以往的细胞毒性研究大多从分子水平上阐释MC-LR对细胞内相关因子、蛋白质及DNA等的作用,然而对细胞超微结构和功能的负面效应研究较少。因此,本文收集和总结了近年来关于MC-LR的体外细胞实验研究,发现MC-LR可以诱导一系列的细胞毒性效应,包括细胞活性降低,细胞自噬和凋亡,细胞周期改变,细胞形态改变,细胞迁移和侵袭异常以及遗传损伤。在多种类型的细胞中,MC-LR诱导的细胞毒性效应呈时间和剂量依赖性。这些毒性效应可能与细胞超微结构和功能(例如细胞膜、线粒体、内质网、细胞核、细胞骨架、纺锤体、溶酶体等)的损伤有关。进一步发现,MC-LR通过诱导氧化应激和抑制蛋白磷酸酶活性破坏细胞超微结构和功能。一方面MC-LR对细胞膜造成损伤,破坏细胞膜的完整性,导致细胞死亡;另一方面MC-LR可以通过OATP进入细胞,损坏细胞器的结构与功能,影响细胞的正常生命活动,导致细胞活性降低,细胞自噬和凋亡,细胞周期改变,细胞形态改变,细胞迁移和侵袭异常以及遗传损伤等一系列毒性效应。此外,本文还汇总近年来MC-LR与不同环境共存物质的联合毒性作用。这篇综述通过揭示MC-LR作用细胞的方式,以期从亚细胞水平上探明MC-LR的毒作用靶点,为MC-LR多器官毒性的预防和治疗提供新的思路。

关键词:MC-LR;细胞毒性;超微结构;作用机制;联合作用

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82073512);国家自然科学基金面上项目(82273594);中原科技创新领军人才计划(244200510028)

通讯作者:张慧珍,E-mail:huizhen18@126.com

T05-0076

桑葚提取物缓解微囊藻毒素通过CCL2-Jak/stat通路诱导的小鼠卵巢颗粒细胞凋亡

王欣,杜星德,张慧珍*

(郑州大学公共卫生学院,郑州 450001)

摘要:**目的** 微囊藻毒素-LR(microcystin-LR,MC-LR)是蓝藻在水生环境中产生的一种生殖毒素,人类可通过饮水和食物链摄入,对人类生殖健康构成威胁。桑葚果是一种传统的天然植物产品,具有多种药理作用,如抗氧化和抗炎作用。本研究旨在探讨桑葚提取物(mulberry fruit extracts,MFE)在MC-LR引起的卵巢功能障碍中的保护作用。**材料与方法** 使用Balb/c小鼠构建体内模型,将小鼠随机分为五组:对照组、M1组(10 µg/L MC-LR)、M2组(100 µg/L MC-LR)、MFE组(600 mg/kg·体重(BW)/周)和M2+MFE组,每组12只小鼠。使用小鼠卵巢颗粒细胞(KK-1细胞)构建体外染毒和干预模型。HE染色观察小鼠卵巢的病理损伤,Elisa检测小鼠血清性激素水平。RNA-seq分析MC-LR诱导的小鼠卵巢毒性潜在机制,免疫

荧光共定位观察和定位 CCR10 在卵巢组织中的定位和表达, qPCR 和 Western Blot 检测 CCL2-CCR10 轴和下游 Jak/Stat/凋亡信号通路的 mRNA 和蛋白表达水平。结果 研究发现, MC-LR 可在小鼠卵巢中蓄积, 导致性激素紊乱、炎症浸润和卵巢病理损伤。RNA-seq 结果显示, 与炎症反应相关的趋化因子 CCL2 在小鼠卵巢中暴露于 MC-LR 后显著增加。进一步研究发现, 暴露于 MC-LR 会通过 CCL2-CCR10 轴介导的 Jak/Stat 通路加剧颗粒细胞凋亡。加入 MFE 进行干预后发现, MFE 可以减轻 MC-LR 诱导的小鼠卵巢细胞凋亡和性激素紊乱, 从而减轻 MC-LR 对卵巢的毒性作用。与 MC-LR 组相比, MFE 干预后小鼠卵巢组织中 CCL2 的受体 Ccr1、Ccr2、Ccr3、Ccr4、Ccr5、Ccr10 的表达水平降低, 免疫荧光共定位也观察到 MFE 干预可降低 MC-LR 上调小鼠卵巢 CCR10 水平。此外, MFE 干预后, Jak/Stat 通路相关蛋白的表达水平以及 KK-1 细胞的凋亡均有所下降。结论 MFE 可通过抑制 CCL2-CCR10 轴和下游 Jak/Stat 通路的激活, 显著改善 MC-LR 引起的小鼠卵巢颗粒细胞凋亡。这项研究拓宽了对 MC-LR 卵巢毒性的新认识, 并阐明了桑葚对卵巢功能保护的药理作用。

关键词: 桑葚; 微囊藻毒素-LR; CCL2-CCR10 轴; 卵巢功能障碍

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82073512); 国家自然科学基金面上项目(82273594); 中原科技创新领军人才计划(No.244200510028)

通讯作者: 张慧珍, E-mail: huizhen18@126.com

T05-0077

组蛋白乙酰化在短链氯化石蜡诱导颗粒细胞凋亡致小鼠卵巢损伤中的作用

杨滢翡, 吴春蕊, 张慧珍*

(郑州大学公共卫生学院, 郑州 450001)

摘要:目的 短链氯化石蜡(short chain chlorinated paraffins, SCCPs)作为一种常用的工业添加剂, 可在商用品的生产、加工、使用、废弃等过程中释放进入大气、土壤等环境介质中, 并可通过多种途径被人体摄入, 危害人体健康。卵巢是 SCCPs 的潜在靶器官, 但 SCCPs 对卵巢的毒性作用及分子机制尚不清楚。本研究旨在利用小鼠卵巢颗粒细胞(KK-1)探讨 SCCPs 对卵巢的毒性效应, 为防治 SCCPs 所致卵巢损伤提供理论依据。材料和方法 CCK8 实验检测 SCCPs、组蛋白乙酰化抑制剂 C646 对细胞活性的影响并确定后续染毒浓度。将 KK-1 细胞分为对照组、SCCPs 组(0.16 mg/mL)、C646 组(5 μ M)、SCCPs+C646 联合处理组、抗氧化剂 NAC 组(10 mM)、SCCPs+NAC 联合处理组, 在 37 $^{\circ}$ C 下 5% CO₂ 环境中使用相应物质干预 24h。流式细胞术检测细胞中活性氧含量、细胞凋亡率及线粒体膜电位改变, Western blot 检测氧化应激下游蛋白 ASK1 和 JNK 的磷酸化水平、Fas/FasI 通路相关蛋白以及细胞凋亡相关蛋白的改变, qPCR 检测 Fas 和 FasI 的转录水平, Co-IP 检测 Fas 和 FasI 的结合情况。结果 SCCPs 暴露后 KK-1 细胞内 ROS 水平和细胞凋亡率均显著升高, 线粒体膜电位显著降低。同时, SCCPs 引起 ASK1 和 JNK 的磷酸化水平、乙酰化组蛋白 H3(AcH3)、组蛋白乙酰化酶(HAT)、Fas 和 FasI 的蛋白表达显著升高, NAC 显著缓解了氧化应激和细胞凋亡, 并降低了以上蛋白的表达和磷酸化。另外, C646 可抑制染毒后 KK-1 细胞组蛋白乙酰化, 并显著降低细胞凋亡率和细胞凋亡相关蛋白的表达, 缓解染毒后 Fas/FasI 通路相关蛋白的上调及 Fas 和 FasI 的结合。结论 SCCPs 可通过诱导 KK-1 细胞氧化应激增强组蛋白乙酰化, 进而激活 Fas/FasI 通路导致细胞凋亡。

关键词: 短链氯化石蜡; 细胞凋亡; 组蛋白乙酰化; Fas/FasI 通路

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81773384); 国家自然科学基金面上项目(82073512); 中原科技创新领军人才计划(244200510028)

通讯作者: 张慧珍, E-mail: huizhen18@126.com

T05-0078

短链氯化石蜡致小鼠卵巢损伤的作用及机制研究

郭飞洋, 吴春蕊, 张慧珍*

(郑州大学公共卫生学院, 郑州 450001)

摘要:目的 短链氯化石蜡(short chain chlorinated paraffins, SCCPs)是环境中广泛存在的一类持久性有机污染物,具有内分泌干扰作用。卵巢是人体内重要的生殖内分泌腺,是SCCPs毒性的潜在靶器官,然而,SCCPs对卵巢的毒效应及分子机制尚不明确。本研究旨在明确SCCPs对卵巢的毒性效应,为防治SCCPs的卵巢损伤提供理论基础。方法 将40只雌性Balb/c小鼠随机分为4组,每组10只,通过灌胃方式给予不同浓度的SCCPs(0、10、100、1000 mg/kg bw),3个月后提取卵巢组织。HE染色观察小鼠卵巢组织的病理学损伤;透射电镜观察卵巢的超微结构变化;ELISA检测血清中雌二醇和睾酮含量以及卵巢中氧化应激指标(SOD活性,GSH和MDA)的水平。TUNEL检测卵巢组织细胞凋亡情况;qPCR和Western blot检测细胞凋亡相关基因和蛋白Bax、Bcl2、Caspase9和Caspase3的改变以及分离线粒体后胞质中Cyt-C的水平。结果 SCCPs染毒后小鼠卵巢出现透明带塌陷、卵母细胞萎缩和闭锁卵泡增多的病理改变。透射电镜观察到卵巢组织颗粒细胞超微结构损伤。同时,各染毒组小鼠血清中雌二醇水平均显著低于对照组。另一方面,SCCPs促进了线粒体中Cyt-C向细胞质的释放。低剂量(10 mg/kg bw)暴露组小鼠卵巢中SOD活性降低,且随着剂量增加活性逐渐下降,GSH和MDA水平在各染毒组均升高,这表明SCCPs诱导小鼠卵巢细胞氧化应激。TUNEL结果显示,高剂量组小鼠卵巢组织颗粒细胞凋亡率明显升高。高剂量组中Bax、Caspase9和Caspase3的表达升高,Bcl2显著降低。Bax、Bcl-2蛋白表达mRNA表达改变一致。以上研究结果表明SCCPs可诱导小鼠卵巢细胞细胞凋亡。结论 SCCPs暴露可通过诱导卵巢发生氧化应激和细胞凋亡,最终导致小鼠卵巢损伤。

关键词:短链氯化石蜡;卵巢损伤;氧化应激;细胞凋亡

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82073512);国家自然科学基金面上项目(82273594);中原科技创新领军人才计划(244200510028)

通讯作者:张慧珍,E-mail:huizhen18@126.com

T05-0079

巨噬细胞AHR/TLR/STAT3信号轴在黄曲霉毒素B1诱发小鼠结肠炎中的作用机制研究

张砾文, 周骏*, 赵秀兰*

(山东大学公共卫生学院, 山东 济南 250001)

摘要:研究目的 黄曲霉毒素B1(aflatoxin B1, AFB1)是最常见、毒性最大的一种真菌毒素,广泛存在于谷物及其食品制品中。由于其高度的化学和热稳定性,即使食品加工后也很难完全消除,是动物及人类健康潜在的危险因素。AFB1具有致癌性、致突变性、致畸性和免疫抑制作用,对肝脏、肾脏、神经系统均具有毒性作用。近年来的研究显示低剂量AFB1亚急性暴露与肠道炎性损伤相关,但其机制尚不明确。新近研究表明,AFB1是芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AHR)的配体,其结合活性得到了鉴定和确认。因此,我们推测AHR可能参与介导了AFB1对肠道的炎性损伤效应。采用体外实验进一步探索了AFB1通过影响巨噬细胞功能损伤肠上皮细胞的潜在机制,并经多组学技术联合应用分析了AFB1诱导的巨噬细胞AHR/TLR/STAT3相关信号轴改变与小鼠结肠炎间的相关性,以有助于AFB1及其它环境污染物致结肠炎的有效防治。

实验方法 体内实验中,BALB/c雄性小鼠经口染毒AFB1 30 d,通过血常规及血清炎性脂质组学检测评

价体内炎性状态,结肠组织切片病理形态学观察评估 AFB1 对小鼠结肠的损伤。体外实验中,将人单核细胞白血病(THP-1)细胞首先诱导分化为巨噬细胞(M0)后给予 AFB1 暴露,采用 Transwell 与人结肠腺癌(Caco-2)细胞进行共培养,观察 AFB1 经巨噬细胞介导对肠道上皮细胞的损伤作用;探究 AHR/TLR/STAT 信号轴在 AFB1 诱导结肠损伤中的机制作用。

实验结果 体内实验结果表明,AFB1 经口暴露小鼠导致小鼠肠道长度缩短、结肠隐窝模糊甚至消失、杯状细胞黏蛋白分泌增多、上皮细胞损伤,伴有明显的炎性细胞浸润;小鼠结肠组织中活性氧及一氧化氮呈现剂量依赖性升高;免疫荧光染色可见明显的髓系免疫细胞聚集和浸润。体外实验结果表明,将 THP-1 诱导分化的 M0 型巨噬细胞经 AFB1 暴露后与 Caco-2 细胞共培养,采用 7-AAD/Annexin V 染色经流式细胞术检测显示 AFB1 引起 Caco-2 细胞死亡增加,同时升高培养基中肿瘤坏死因子及白介素-6 水平。转录组测序及蛋白质组学分析显示,巨噬细胞暴露于 AFB1 后,炎性通路相关 mRNA 及蛋白发生明显改变;Western blot 检测进一步证实 AFB1 暴露诱导巨噬细胞炎症相关功能蛋白表达呈现显著上升趋势,AHR 及 AHR/TLR/STAT3 信号轴关键蛋白变化显著。

结论 AFB1 亚急性暴露导致 BALB/c 小鼠结肠炎,表现为小鼠肠道长度缩短、结肠隐窝模糊、杯状细胞和上皮细胞受损,伴随明显的炎性细胞浸润。同时 AFB1 可通过 AHR/TLR/STAT 信号轴,使其处于炎性状态,导致肠道上皮损伤。

关键词:黄曲霉毒素 B1; 芳香烃受体; 结肠炎; 巨噬细胞; 线粒体 ROS

作者简介:张砾文,E-mail:2297474506@qq.com

T05-0080

微囊藻毒素-LR 对孕早期小鼠子宫容受性的影响

吴 昊, 张宗鑫, 张慧珍*

(郑州大学公共卫生学院, 郑州 450001)

摘要:**目的** 微囊藻毒素是水体中常见的蓝藻毒素,具有雌性生殖毒性。当前,微囊藻毒素对子宫功能的影响尚不明确。本研究旨在探究微囊藻毒素对小鼠子宫内膜容受性的影响,揭示 MC-LR 对子宫生理结构、免疫微环境,子宫基质细胞形态转化的影响,为防治 MC-LR 的雌性生殖毒性提供科学依据。**方法** 将 8 周龄雌鼠和雄鼠合笼,得到阴道栓阳性的雌鼠记为孕 0.5 天(GestationDay0.5, GD0.5)。从通过 GD0.5 开始,通过腹腔注射 MC-LR(20 mg/kg·bw)对雌鼠连续染毒,并向相应的对照组雌鼠注射生理盐水,雌鼠分别在 GD3.5、GD4.5 和 GD5.5 天时处死并提取子宫组织。苏木精-伊红染色(H&E 染色)观察子宫组织的病理学改变;流式细胞术对提取的细胞进行免疫细胞分型,观察巨噬细胞极化和 NK 细胞的变化情况;qPCR 和 Westernblot Blot 检测子宫组织中的免疫因子、子宫内膜容受性标志物(Hoxa10 和 IGFBPI)、子宫基质细胞形态转化过程相关因子(E-cadherin、N-cadherin、Vimentin)、细胞外基质重塑相关分子(PLAU, PLAUR, TIMP1 和 MMP9)的 mRNA 和蛋白质表达水平。**结果** 与对照组相比,MC-LR 暴露导致孕鼠子宫腺体数量减少,胚胎着床数减少,qPCR 和 Westernblot Blot 的结果表明 Hoxa10、IGFBPI 和 VEGFA 的 mRNA 表达均下降,E-Cadherin 和 N-Cadherin 的表达水平升高,PLAU, TIMP1 和 MMP9 的表达下降,这表明 MC-LR 可通过干扰基质细胞形态转换和细胞外基质重塑引起小鼠子宫容受性下降。此外,MC-LR 暴露导致子宫巨噬细胞的极化由 M2 型向 M1 转化,并且 NK 细胞和 CD19⁺B 细胞的数量升高,CD3⁺T 细胞数量减少,这表明 MC-LR 可引起孕鼠子宫免疫细胞和免疫因子表达紊乱。**结论** MC-LR 可诱导孕鼠子宫免疫细胞和免疫因子表达紊乱,并通过干扰基质细胞形态转换和细胞外基质重塑诱导孕早期小鼠子宫容受性下降。

关键词:微囊藻毒素; 子宫容受性; 胚胎植入; 血管生成

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82073512);国家自然科学基金面上项目(82273594);中原科技创新领军人才计划(244200510028)

通讯作者:张慧珍,E-mail:huizhen18@126.com

T05-0081

微囊藻毒素的精子毒性研究进展

王福芳, 张宗鑫, 张慧珍*

(郑州大学公共卫生学院, 郑州 450001)

摘要:水体富营养化会导致蓝藻大量繁殖, 释放微囊藻毒素(microcystin, MCs)入水, 对生态系统和人类健康构成威胁。MCs具有雄性生殖毒性, 然而其对精子或精子发生的影响尚不完全明确。为此, 本文收集并总结了过去20年有关MCs精子毒性的研究, 旨在系统综述MCs对精子的毒性效应和潜在机制。基于以往的研究发现, MCs可降低精子质量, 引起脊椎动物和无脊椎动物精子畸形、密度降低, 其原因可能是MCs通过损害睾丸的结构和功能对精子造成间接伤害。MCs诱导精子质量下降的机制主要与遗传物质的改变、精子结构和功能的异常有关。此外, 表观遗传修饰如miRNA和piRNA也参与了MC-LR诱导的精子损伤。综上, MCs暴露可损害精子发生过程, 进而导致精子质量下降, 但MCs对精子的直接毒性效应及相关机制仍需深入探索。本综述进一步丰富了MCs的雄性生殖毒性理论, 为理解环境污染物对男性生殖健康带来的不良影响提供了新视角。

关键词: MCs; 精子; 精子发生; 毒性机制

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82073512); 国家自然科学基金面上项目(82273594); 中原科技创新领军人才计划(244200510028)

通讯作者:张慧珍, E-mail: huizhen18@126.com

T05-0082

GRP75调控MAM介导的Ca²⁺转运在DEHP诱导肾小管上皮细胞线粒体自噬中的作用

陈明山, 王嘉欣, 崔家根, 张昊, 赵一, 李金龙*

(东北农业大学动物医学学院, 黑龙江省哈尔滨市 150030)

摘要:目的 邻苯二甲酸酯(DEHP)是一种应用极为广泛的增塑剂, 可以进入人体并对多个器官造成损伤。肾脏是DEHP的主要排泄器官, 也是其潜在的靶器官。但对其引起肾脏毒性的机制的研究目前仍然较为稀少。近端小管作为肾脏的重要功能单元, 具有重吸收营养物质和排泄毒物的作用, 这些过程需要大量的能量来支持。鉴于肾脏近端小管细胞对于维持体液平衡和稳定的重要作用, 探究DEHP对肾脏近端小管细胞的影响及机制具有重要意义。

材料和方法 本研究的体内试验部分以21日龄的雄性ICR小鼠为试验对象, 随机分成4组(溶媒对照组以及DEHP低、中、高剂量组), 灌胃处理28天, 检测小鼠肾脏组织形态结构, 超微结构, 内质网线粒体偶联相关蛋白和线粒体自噬相关蛋白表达水平的变化。本试验的体外部分以人肾小管上皮细胞(HK2)为研究对象, 首先将细胞分为4组(空白对照组、siGRP75敲低组、邻苯二甲酸单-(2-乙基己基)酯(MEHP)组、MEHP+siGRP75联合组), 然后在培养体系进行质粒siRNA转染, 检测HK2细胞结构和功能变化。

结果 体内试验表明, DEHP暴露引起小鼠肾脏脏器系数降低, 诱导小鼠肾脏组织形态结构变化, 超微结构损伤(内质网与线粒体接触面积增加、距离减小、线粒体数量和密度减少等现象)以及肾脏功能水平下降。DEHP还诱导内质网线粒体偶联相关蛋白水平上升, 促进钙离子内流以及过度线粒体自噬的发生。体外试验表明, MEHP诱导HK2细胞活力下降, 活细胞内以及线粒体内ROS含量增加, 钙离子水平增加以及线粒体膜电位发生改变, 内质网线粒体偶联相关蛋白以及线粒体自噬相关蛋白表达增加。同时, 敲低GRP75能够通过改善MAM-Ca²⁺系统紊乱来抑制MEHP诱导的肾脏近端小管过度线粒体自噬。

结论 DEHP暴露可通过上调GRP75表达,增加MAMs的生成,促进Ca²⁺内流进线粒体中,破坏肾脏近端小管细胞内稳态,诱导过度线粒体自噬,进而引起肾脏近端小管细胞结构和功能受损。本研究为医学及兽医临床中肾脏毒性的防治提供新的靶点,并且为有效的保障畜禽生产和繁殖提供了新的思路。

关键词:邻苯二甲酸酯;肾脏近端小管;GRP75;Ca²⁺;线粒体自噬

作者简介:陈明山,E-mail:2734649477@qq.com

通讯作者:李金龙,E-mail:Jinlongli@neau.edu.cn

T05-0083

邻苯二甲酸酯通过靶向抑制MFN2促进心脏衰老的机制研究

王嘉欣,陈明山,张昊,崔家根,赵一,李金龙*

(东北农业大学动物医学学院,黑龙江省哈尔滨市 150030)

摘要:目的 邻苯二甲酸酯作为一大类环境污染物,主要用作增塑剂和溶剂,已成为世界范围内日益严重的问题。流行病学结果表明,心脏疾病的严重程度与环境污染程度有关。邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)是最常用的邻苯二甲酸酯,对机体健康具有毒性作用,也是心脏损伤的主要原因。摄入被DEHP污染的食物、液体或灰尘是机体暴露于DEHP的主要接触途径。细胞衰老是由于细胞压力而导致细胞周期停滞的永久状态。本研究旨在探讨邻苯二甲酸酯诱导心脏衰老的潜在机制及其与线粒体内质网偶联的关系。

材料与方法 本研究的体内试验部分以21日龄的雄性ICR小鼠为受试对象,随机分成4组(对照组以及DEHP低、中、高剂量组),灌胃处理28天。本试验的体外部分以小鼠心肌细胞系(HL-1细胞)为研究对象,将细胞分为4组(空白对照组以及邻苯二甲酸单-(2-乙基己基)酯(MEHP)低、中、高剂量组),进行过表达质粒转染。

结果 体内试验表明,DEHP暴露引起小鼠心脏脏器系数降低,诱导小鼠心肌细胞结构损伤,心脏功能水平下降。DEHP诱导细胞周期相关因子蛋白表达水平上调,衰老相关指标改变。DEHP诱导小鼠心脏内质网应激,内质网线粒体偶联相关蛋白水平改变,钙离子内流。体外试验表明,MEHP诱导HL-1细胞活力下降,凋亡水平、细胞内活性氧和钙离子水平增加,细胞周期相关因子蛋白表达水平上调,衰老相关指标改变。同时,过表达线粒体融合蛋白2(MFN2)能够通过缓解Ca²⁺内流来抑制MEHP诱导的心肌细胞衰老。

结论 DEHP暴露可通过下调MFN2诱导内质网线粒体偶联,引起Ca²⁺内流,破坏心肌细胞的稳态,诱导衰老,进而引起小鼠心肌细胞结构和功能受损。本研究为医学及兽医临床中心脏毒性的防治提供新的靶点,并且为有效的保障畜禽生产和繁殖提供了新的思路。

关键词:邻苯二甲酸酯;细胞衰老;线粒体融合蛋白2;线粒体内质网偶联;心脏毒性

作者简介:王嘉欣,E-mail:2564514440@qq.com

通讯作者:李金龙,E-mail:Jinlongli@neau.edu.cn

T05-0084

Evaluation and prediction of environmental chemical hazards using quantum scientific methods

Jiang YunShen

(Department of toxicology, Nanjing Medical University)

Abstract: Quantum is an important concept in mordent physics, and Quantum toxicology is a sci-

ence that applies the theories and methods of quantum science(quantum chemistry, quantum mechanics, quantum biology, etc) as well big data, computer and artificial intelligence to evaluate and predict the hazards of exogenous chemicals in the environment. It reduces environmental pollution, saves manpower, material resources, and time resources, but it cannot completely replace experiments (For new substances or new indicators). Therefore, units with conditions can carry out.

Key words: Quantum chemistry; Quantum toxicology; Big data; Machine learning; artificial intelligence

T05-0085

肝脏 *Serpina3c* 过表达通过抑制 *chymase*-Ang II-AT1R 信号改善 孕期强的松暴露所致子代 MASLD 易感

戴永国^{1,2,3}, 刘韶^{2,3*}, 汪晖^{1,4*}

(1. 武汉大学基础医学院药理学系, 湖北 武汉 430071; 2. 中南大学湘雅医院药学部, 湖南 长沙 410008; 3. 中南大学湘雅医院国家老年疾病临床医学研究中心, 湖南 长沙 410008; 4. 发育源性疾病湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430071)

摘要: **目的** 代谢功能障碍相关脂肪性肝病(MASLD), 曾用名非酒精性脂肪性肝病(NAFLD), 其发生与发育过程中不良因素暴露有关, 并已成为全球主要的公共卫生问题。强的松是一种在临床上被广泛用于治疗妊娠期母体类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮和其他自身免疫性疾病的人工合成类糖皮质激素药物。然而, 孕期使用强的松已被报道对子代发育产生不良后果。在本研究中, 我们探讨了孕期强的松暴露(PPE)对子代 MASLD 易感的影响, 并探寻其潜在的干预治疗靶点。 **材料和方法** 怀孕的啮齿动物(大、小鼠)于妊娠期全程每天经口灌胃给予临床相当剂量的强的松; 子代出生后 8-12 周给予“第二次打击”[高脂饮食(HFD)]进行造模。然后, 测定第 20 天胎鼠和 12 周龄子代的 MASLD 表型、肝脏葡萄糖和脂质代谢功能、*Serpina3c* 表达及其表观遗传调控机制。进一步, 在体内、外对 *Serpina3c* 进行敲低和过表达来探讨肝脏 *Serpina3c* 在 PPE 所致子代葡萄糖和脂质代谢紊乱中的作用及调控机制。 **结果** PPE 可导致子代出生前、后肝脏脂肪酸氧化和葡萄糖摄取功能降低; 在 HFD 下, PPE 可引起成年子代出现更加典型的 MASLD 改变, 且雄性更为严重。测序筛选和实验验证表明, *Serpina3c* 表达在 PPE 组出生前、后肝脏组织中持续降低; 而肝脏 *Serpina3c* 低表达可导致糜酶(*chymase*)依赖性的血管紧张素 II (Ang II) 生成增加, 后者通过激活其受体 AT1R 介导 PPE 所致子代 MASLD 易感。进一步研究发现, 肝脏 *Serpina3c* 持续低表达与宫内活性代谢产物强的松龙激活糖皮质激素受体(GR)-组蛋白去乙酰化酶 3(HDAC3)信号引起 *Serpina3c* 启动子区组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸的乙酰化(H3K27ac)水平降低有关。而出生后早期过表达肝脏 *Serpina3c* 可明显抑制 PPE 子代肝脏 *chymase*-Ang II-AT1R 信号激活, 并显著改善 HFD 下 PPE 子代 MASLD 易感。 **结论** 本研究揭示了 PPE 可导致子代 MASLD 易感, 并确定 *Serpina3c* 可作为干预治疗靶标, 这对于防治 PPE 所致的胎源性 MASLD 易感具有重要的指导意义。

关键词: 孕期强的松暴露; 代谢功能障碍相关脂肪性肝病; *Serpina3c*; 组蛋白乙酰化; 糖皮质激素受体

基金项目: 国家重点研发计划“发育编程及其代谢调节”重点专项(2020YFA0803900)

作者简介: 戴永国, E-mail: daiyongguo1995@163.com

通讯作者: 刘韶, E-mail: liushao999@csu.edu.cn; 汪晖, E-mail: wanghui19@whu.edu.cn

T05-0086

化妆品体外透皮吸收方法概述

刘梦琪, 张露勇, 刘 婷, 马利波, 刘师卜, 郑济凡, 路 勇*
(中国食品药品检定研究院, 毒理功效实验室, 北京 102629)

摘要:随着化妆品行业的快速发展, 消费者越来越重视化妆品的功效, 而化妆品是否能透皮吸收是其发挥真正功效的前提, 因此, 如何评价化妆品功效成分透皮吸收的能力也成为企业、消费者以及市场监管部门所共同关注的问题。参考有关药物透皮吸收方面的研究方法, 简要对皮肤的结构和生理功能、皮肤模型的选择、促进透皮吸收的方法进行归纳和评述, 并对化妆品体外透皮吸收未来发展趋势进行展望。

关键词:透皮吸收; 化妆品; 经皮给药

T05-0087

替米考星毒副作用及降低毒性反应方法研究进展

张 阳, 符华林*
(四川农业大学动物医学院, 四川成都 611130)

摘要:替米考星属于大环内酯类抗菌剂, 在临床中具有广泛的应用。但大剂量的替米考星可能会导致严重的毒副作用, 甚至畜禽死亡。目前还缺少针对替米考星毒副作用的系统性梳理的报道。本文通过目前关于替米考星产生毒副作用机制的研究, 从替米考星导致的心脏毒性、肝肾毒性、肺脏毒性、胃肠道和神经毒性, 到因给药方式不同导致的局部皮肤毒性作用展开梳理。然后对目前已经报道的能够降低替米考星毒副作用的方法, 从新型纳米制剂、降低对心脏的毒性、降低对肝脏的毒性以及谨慎的联合用药四个方面进行归纳总结。替米考星在临床中常常导致窦性心律失常、血压下降等心脏损害, 可能是由于快速消耗了心肌细胞的钙离子、心肌负荷的增加、心肌细胞损伤和代谢的改变导致的。替米考星在肝脏、肾脏、肺脏中蓄积可能导致脏器损伤及炎症的发生, 而且因肾脏和肺脏局部血流量较高使得替米考星更容易在该处蓄积。因替米考星的广谱杀菌作用还容易导致肠道菌群失衡等胃肠症状。此外, 长期注射使用替米考星还能导致皮肤及肌肉局部出现器质性损伤。目前有研究利用纳米制剂手段对替米考星进行改性, 从而使得替米考星具有靶向性、缓释能力和更高的口服生物利用度, 用于减少临床给药次数和剂量。利用钙制剂、维生素E和S-甲基半胱氨酸等物质能够减少替米考星导致的心脏损害。利用类似于红景天提取物、黄芪多糖等中药成分可以减少替米考星导致的肝脏损害。利用具有杀菌作用的百里香酚、苦参碱等成分可与替米考星产生协同或相加作用, 而减少替米考星的临床剂量。这些方法均可以降低替米考星临床毒副作用的产生。但仍然需要避免与类似于双氯芬酸钠等潜在具有心肌损害能力的药物联合应用。综上, 替米考星能够导致临床包括心脏在内的多种脏器毒副作用, 需要通过多种药剂学手段、保健性药物的使用以及科学、合理的用药来降低替米考星的毒性反应, 保障畜禽养殖业的健康发展。

关键词:替米考星; 毒副作用; 缓解方法

通讯作者:符华林, E-mail: fuhl.sicau@163.com

T05-0088

醋酸铅对雄性小鼠及其后代的生殖和胚胎毒性以及槲皮素的缓解作用

危郭皓, 孙 敏, 宋晓彦, 朱传东*
(南京中医药大学附属南京医院, 南京, 中国)

摘要:目的 男性生育能力对环境污染更为敏感, 因此备受关注。铅作为一种无处不在且不可生物降解

的环境污染物,不仅会损害生殖系统,还可能影响下一代的表现。铅毒性的潜在机制之一是通过产生活性氧和/或减少抗氧化剂来源,导致各种生物大分子受损。尽管人们在确定铅污染源和消除铅暴露方面做出了大量努力,但铅仍然是最棘手的环境污染物之一,对各种生物的健康和繁殖性能仍有重大影响。目前治疗重金属毒性的策略通常是使用螯合剂和天然抗氧化剂。槲皮素是一种含有多个羟基和共轭电子的类黄酮,被认为是一种天然抗氧化剂和金属螯合剂。本研究旨在确定铅诱导毒性对男性生育能力的潜在机制及其对后代生育能力的可能影响,以及槲皮素在减轻可能的影响方面的潜在作用。**材料与方法** 实验小鼠被随机分为三组,分别服用(1)蒸馏水(对照组);(2)醋酸铅(150毫克/千克体重/天);(3)醋酸铅(150毫克/千克体重/天)和槲皮素(75毫克/千克体重/天)。通过采集血样,RNA,精子制备,测定始祖雄性及其后代的精子形态、精子浓度、存活率和运动能力,评估顶体反应等一系列实验探究铅诱导毒性对男性生育能力的潜在机制。**结果** 雄性小鼠摄入醋酸铅后,精子的活力、存活率、形态、成熟度、膜完整性和细胞内活性氧都会发生变化,从而对其生育能力产生不利影响($P<0.05$)。在铅处理雄性小鼠的后代中也观察到了类似的结果。用醋酸铅处理雄性小鼠后,母鼠和子鼠的早期胚胎发育和植入率也受到不利影响($P<0.05$)。另外数据表明,精子中 Cks2(CDC28 蛋白激酶调节亚基-2)的下调与醋酸铅处理组的早期胚胎发育有关。**结论** 本研究表明,醋酸铅不仅会直接影响父代小鼠的生育能力,还会对F1雄性后代的生育能力产生有害影响。父代同时服用槲皮素在一定程度上改善了铅对雄性小鼠及其后代生育能力的不良影响。

关键词: 抗氧化剂; 胚胎学; 生殖毒性; 重金属

通讯作者:朱传东, E-mail: ww03166@163.com

T05-0089

F-53B所致大鼠免疫毒性效应及潜在机制研究

肖露露, 张倩, 王雪莹, 田海林, 赵云*

(苏州大学苏州医学院公共卫生学院, 苏州, 江苏 215123)

摘要:目的 全氟辛烷磺酸(Perfluorooctane sulfonic acid, PFOS)是一种典型的全氟和多氟烷基化合物(Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances, PFAS),广泛应用于多种消费品及工业领域。PFOS具有持久性和生物累积性,可引发多种毒性效应。PFOS的大量生产应用对生态环境和人类健康造成极大威胁,于2009年纳入斯德哥尔摩公约,其生产应用被禁止。随着全球对于PFOS的限制,越来越多的短链PFOS替代品应用于工业生产,相应衍生的环境健康问题亟待关注。6:2氯化多氟烷基醚磺酸(6:2 chlorinated polyfluoroalkyl ether sulfonic acids, 6:2 Cl-PFESA, 商品名F-53B)是PFOS的一种重要替代品,于1970年代开始被广泛用于工业生产,目前仅在中国使用。近年来在环境基质如水和空气、动物及人群中,F-53B的检出率显著增加,其环境暴露引起的健康风险引起人们关注。免疫系统是生物体保护自身免受损害的重要防线,目前关于F-53B的免疫毒性及机制研究有限,且多集中于水生生物和短期暴露。本研究旨在探讨F-53B慢性暴露引起的大鼠免疫毒性效应及潜在机制,以此补充F-53B的免疫毒性资料。**材料和方法** 根据F-53B剂量,40只雄性SD大鼠被随机分为5组,浓度分别为0、1、10、100和1000 $\mu\text{g/L}$ 。通过饮水暴露于F-53B,暴露周期为180天。通过H&E染色观察大鼠免疫器官脾脏及胸腺组织的病理改变,采用ELISA法检测大鼠脾脏中免疫功能相关的细胞因子水平的改变,并通过western blotting探究PI3K/AKT通路在F-53B致免疫毒性过程中的作用。**结果** F-53B慢性暴露后,100、1000 $\mu\text{g/L}$ 组大鼠脾脏出现红髓瘀血,白髓缩小,淋巴细胞减少。10 $\mu\text{g/L}$ 组胸腺皮质、髓质局部空隙增多,1000 $\mu\text{g/L}$ 组胸腺体积减小,皮质、髓质细胞数量明显减少,周围纤维组织增加。F-53B慢性暴露可引起大鼠血清糖皮质激素水平上升,IgG抗体水平下降,并导致胸腺组织中胸腺肽水平上升。脾脏细胞因子IL-2在10、100、1000 $\mu\text{g/L}$ 组显著上升,IFN- γ 在10、1000 $\mu\text{g/L}$ 组显著上升。此外,F-53B慢性暴露引起大鼠脾脏中PI3K/AKT通路抑制,调控下游的炎症和凋亡过程。**结论** F-53B慢性暴露可导致大鼠脾脏与胸腺组织受损,破坏免疫功能。大鼠免疫反

应稳态平衡被扰乱,以 Th1 型免疫反应为主,PI3K/AKT 通路可能参与 F-53B 对大鼠脾脏炎症过程的调控,引起免疫抑制效应。

关键词: F-53B; 免疫毒性; 免疫平衡; 炎症; PI3K/AKT 通路

通讯作者: 赵云, E-mail: yunzhao@suda.edu.cn

T05-0090

F-53B 慢性暴露引起大鼠肾脏毒性的作用和机制研究

张倩,肖露露,王雪莹,田海林,赵云*

(苏州大学苏州医学院公共卫生学院,苏州,江苏 215123)

摘要: **目的** 全氟辛烷磺酸(Perfluorooctane sulfonate, PFOS)作为典型的全氟有机化合物,由于其防水性能、拒油性和热稳定性,广泛的应用于各种消费品和生产工艺中,2009年被《斯德哥尔摩公约》列为禁用的持久性有机污染物之一。因此,寻找PFOS的替代品迫在眉睫。6:2氯化多氟醚磺酸盐(6:2Cl-PFESA,商品名F-53B)是一种重要的PFOS的替代品,其主要作为铬雾抑制剂被广泛应用于中国的电镀行业。多种环境介质当中均检测到F-53B的存在,其环境暴露引起的健康风险引起人们关注。流行病学研究表明,F-53B暴露可能导致肝毒性、神经毒性、生殖发育毒性等,而关于F-53B的肾脏毒性的研究仍有欠缺。本研究采用长期饮水暴露的染毒方式,初步探讨F-53B对雄性SD大鼠肾脏功能以及可能的毒性机制,补充F-53B的慢性毒性资料。**材料和方法** 为探究F-53B慢性暴露对大鼠肾脏的影响,本研究采用雄性SD大鼠进行不同浓度F-53B(0、1、10、100、1000 μg/L,每组8只大鼠)饮水给药,给药周期为180天。暴露结束后,取大鼠的肾脏组织,采用H&E染色对其进行病理学检查。采用Western blotting法测定大鼠肾脏中TGF-β、Smad2/3、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、波形蛋白(vimentin)和纤连蛋白(fibronectin)等蛋白表达水平。**结果** 结果表明,与对照组相比,高浓度F-53B(100 μg/L和1000 μg/L)暴露引起大鼠肾脏组织中肾小管上皮细胞肿胀,局部肾间质纤维化,间质血管高度淤血。此外,长期暴露于1000 μg/L F-53B的大鼠,其血清中的尿酸(uric acid, UA)和尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)水平上升,提示F-53B慢性暴露导致大鼠产生肾脏毒性。另一方面,100 μg/L F-53B暴露能够引起大鼠肾脏中丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平显著升高,同时,1000 μg/L F-53B暴露引起大鼠肾脏中IL-1β水平显著增加,表明高浓度F-53B暴露能够引起大鼠肾脏产生氧化应激,并促使炎症水平升高。分子水平上,纤维化相关的TGF-β、Smad2/3、α-SMA、vi-mentin和fibronectin等蛋白含量均明显升高。**结论** 本研究揭示,F-53B慢性暴露能够导致雄性SD大鼠肾脏发生病理学改变,引起肾间质纤维化发生,引起炎症和氧化应激,产生肾脏毒性。其中,F-53B可能通过TGF-β1/Smad2/3信号通路引起肾脏纤维化,深入机制有待进一步探究。

关键词: F-53B; 肾脏; 肾纤维化; TGF-β1/Smad2/3

通讯作者: 赵云, E-mail: yunzhao@suda.edu.cn

T05-0091

恒河猴肌肉注射 mRNA 疫苗重复给药 8 周恢复 4 周毒性试验 伴随毒代及生物分布研究

安娜,罗丹丹,巨亚坤,梁宗星,董延生*,王全军

(国科赛赋河北医药技术有限公司,河北 廊坊市 065500;北京赛赋医药研究院有限公司,北京市亦庄开发区 101111)

摘要: **目的** 恒河猴连续8周肌肉注射mRNA疫苗,停药恢复4周,考察不同时间点mRNA在各组织中

的分布情况和毒代动力学特征,为临床研究提供参考信息。**材料与方法** 本试验使用40只恒河猴,分为阴性对照、LNP对照及受试物低、高剂量组,5只/性别/组。连续8周肌肉注射,前3次每周1次,后3次每2周1次,共6次。阴性对照和LNP对照组分别于首末次给药前和药后2h采集全血;低、高剂量组分别于首末次给药前、药后8个时间点采集全血。高剂量组分别于给药期结束(D58)、恢复期结束(D86)采集肾脏、脾脏、肝脏、心脏、肺脏、给药部位等15个组织/脏器。采集样品后提取RNA,采用RT-qPCR法检测全血和组织中mRNA浓度。**结果** 毒代动力学:阴性对照、LNP对照组药前、药后及低、高剂量组药前血液中mRNA浓度均低于定量下限。低剂量组首次给药,在6h内达峰并在24h内维持较高的浓度水平,随后浓度逐渐下降,168h偶有检出。末次给药分布规律与首次类似。高剂量组与低剂量组分布规律类似,即在6h内达峰并在24h内维持较高的浓度水平,随后浓度逐渐下降,168h部分检出。低、高剂量组的平均 C_{max} 和平均 AUC_{last} 随剂量增加有增大趋势。蓄积情况:低、高剂量组末次与首次给药 C_{max} 比值和 AUC_{last} 的比值在0.20以内,mRNA无增加趋势。性别差异:首末次给药后,低、高剂量组雌雄动物的 C_{max} 比值和 AUC_{last} 比值均在1.5以内,雌雄无明显差异。组织分布:受试物在高剂量组各组织中广泛分布,在D58的浓度范围为 $1.25E+04\sim 5.48E+07$ copies/ μg total RNA,其中脾脏和全血中浓度较高。D86浓度下降,范围为 $2.96E+03\sim 1.05E+05$ copies/ μg total RNA。除脾脏、胃、肾脏和给药部位中有检出,其他组织未有检出。**结论** 恒河猴连续8周肌肉注射低、高剂量的受试物,血液中药物暴露呈剂量相关性;血液中受试物浓度达峰时间为6h,然后随时间的延长浓度逐渐下降;低、高剂量组均未见明显性别差异,末次给药后血液中暴露量小于首次。受试物在动物各组织中广泛分布,其中脾脏分布浓度最高,恢复期结束后各组织中浓度显著下降,但在脾脏、胃、肾脏和给药部位中仍有一定受试物的存续。

责任作者:安娜, E-mail:anna@safeglp.com;

通讯作者:董延生, E-mail:dongyansheng@safeglp.com

T05-0092

应用多种动物模型研究AN20060的非临床依赖潜能

贾艳丽,王野,李佩云,李子轲,陈瑛*,董延生*,王全军

(国科赛赋河北医药技术有限公司,河北廊坊市 065500;北京赛赋医药研究院有限公司,北京市亦庄开发区 101111)

摘要: **目的** 药物依赖潜能是指由于药物因存在使生理或精神感觉良好或避免感觉不适的药理作用而产生的被反复使用的可能性。AN20060是一种具有中枢神经系统活性的药物,为满足NDA申报需求,本机构从精神和躯体依赖两方面对AN20060的依赖潜能进行了研究。**方法** 根据NMPA、FDA、EMA、ICH M3 (R2)颁布的药物非临床安全性研究系列指导原则中关于非临床依赖性/滥用倾向研究相关的要求,AN20060精神依赖采用大鼠自身给药和药物辨别试验,躯体依赖采用大鼠自然戒断试验综合评估。大鼠自身给药试验选用静脉插管手术成功的SD大鼠,雌雄各半,选用固定比率FR程序训练,大鼠依次经历阳性训练药物自身给药训练期(FR1~FR10)、替代期(FR10;氯化钠注射液替代和不同剂量AN20060替代),统计替代期大鼠各剂量下给药次数等指标。大鼠药物辨别试验选用健康SD大鼠,雌雄各半,选用固定比率FR程序训练,大鼠依次经历食物训练期(FR1~FR10)、药物辨别训练期(FR10;阳性训练药物或氯化钠注射液(NS))、替代期(FR10;不同剂量阳性训练药物替代和AN20060替代),计算替代期大鼠各剂量下有效鼻触正确率(%)。大鼠自然戒断试验选用健康SD大鼠,雌雄各半,根据体重均衡分为溶剂对照组、阳性对照组、AN20060低、中、高剂量组,各组均连续28天经口灌胃相应剂量的制剂,每天2次,之后停药观察21天,试验期间每天称重、每周检测2次摄食和摄水量、戒断后7天内每天进行2次戒断症状观察,统计各组体重、摄食和摄水量变化率及戒断评分差异。**结果** 大鼠自身给药试验结果可见阳性药训练下大鼠给药次数显著高于氯化钠注射液($P\leq 0.05$),提示模型可靠,AN20060各剂量组给药次数均显著低于替代前阳性药给药次数(P

≤ 0.05)。大鼠药物辨别试验结果可见大鼠能够稳定辨别阳性训练药和氯化钠注射液,不同剂量阳性训练药替代结果呈剂量依赖性升高,提示模型可靠,AN20060各剂量组辨别正确率均低于20%。大鼠自然戒断试验结果可见阳性对照组戒断评分显著高于溶剂对照组($P \leq 0.05$),提示试验体系可靠,AN20060各剂量组戒断评分呈剂量依赖性升高,其中中、高剂量组个别时间点戒断评分显著高于溶剂对照组($P \leq 0.05$)。

结论 AN20060在临床拟用剂量30倍以上时可能会出现轻微躯体依赖潜能,不具有精神依赖潜能。

关键词: 精神依赖; 躯体依赖; 自身给药; 药物辨别; 自然戒断

责任作者: 贾艳丽, E-mail:jiayanli@safeglp.com, Tel: 0316-6163266

通讯作者: 陈 瑛, E-mail:chenying@safeglp.com, Tel: 0316-6163266; 董延生, E-mail:dongyansheng@safeglp.com, Tel: 0316-6163266

T05-0093

浅谈上市 mRNA 疫苗的 LNP 在 小鼠体内的非临床研究的毒性风险

陈圣蕾, 陈 爽, 李子轲, 刘 静, 董延生*, 王全军

(国科赛赋河北医药技术有限公司, 河北 廊坊市 065500; 北京赛赋医药研究院有限公司, 北京市亦庄开发区 100176)

摘要: 随着两款针对新冠病毒 SARS-CoV-2 的 mRNA 疫苗的上市,以 mRNA 作为预防和治疗手段的研究越来越多。在非临床研究中,脂质纳米颗粒(LNP)在小鼠模型上的应用主要集中于评估其免疫反应和药物递送效率。治疗性 mRNA 疫苗可使用 LNP 递送技术,其主要通过体液免疫和细胞免疫发挥药理作用,通过激活抗原特异性 T 细胞,引发细胞介导的免疫应答以清除被感染的细胞,并表达 HPV 特异性蛋白刺激机体产生抗表达蛋白抗体,进而发挥抗体及抗肿瘤效应。该疫苗采用脂质纳米颗粒(LNP)递送系统,LNP 是炎症的生理介质,有利于疫苗产生强有力的应答,肌肉注射后会产生短暂的局部炎症,中性粒细胞和抗原递呈细胞被招募到达炎症部位,APCs 内吞 LNP 后 mRNA 在宿主细胞胞浆中表达蛋白,随后 APCs 迁移到淋巴结启动 T 细胞反应。

本机构研究中 LNP 对照组及给药组均可见纤维蛋白原(Fbg C.)升高、脾脏红髓细胞数量增多,其变化幅度或严重程度相当,认为与空载 LNP 相关。此外 LNP 对照组动物可见细胞因子分泌增强(IL-10、TNF- α)、局部刺激性(给药部位嗜中性粒细胞炎症、嗜中性粒细胞浸润、单形核炎细胞浸润)以及免疫激活效应(骨髓髓系幼稚细胞数量增多,腹股沟淋巴结淋巴细胞增多和周围组织混合性炎细胞浸润等),提示空载 LNP 存在一定的免疫激活效应。

虽然 LNP-mRNA 疫苗的剂量较小,但长期或重复给药可能放大炎症并发症和其他长期毒性风险。剂量和给药途径对毒性风险有显著影响,例如静脉给药可能导致 mRNA-LNP 在脾脏和肝脏中的分布,而肌内或皮下给药可能引起局部炎症反应。LNP 在小鼠体内的注射,尤其是皮内给药,可能会引起强烈的炎症反应,包括中性粒细胞浸润和多种炎症细胞因子的产生;LNP 的组织分布特征也可能影响其毒性风险,例如在某些组织中的积累可能导致局部或全身性的毒性效应。

mRNA 的生物分布、药代动力学特征取决于所使用的 LNP 递送系统,这影响了疫苗在体内的行为和潜在的毒性风险;一些研究正在探索非 LNP 类的 mRNA 递送系统,以提高安全性和降低毒性风险,如基于纳米硅的载体。一些研究中提到,经过迭代设计的 mRNA 纳米硅载体显示出良好的安全性,没有急性毒性作用以及 LNP 常见的过敏或促炎免疫反应。还需要进一步的研究来确定人类中由 mRNA-LNP 疫苗触发的炎症反应的确切性质以及其他潜在毒性风险,以及与小鼠的炎症信号有多大的重叠。

关键词: mRNA 疫苗; LNP; NOAEL

责任作者: 陈圣蕾, E-mail:chenshenglei@safeglp.com, Tel: 0316-6163366

通讯作者: 董延生, E-mail:dongyansheng@safeglp.com, Tel: 0316-6163366

T05-0094

食蟹猴静脉输注 ADC 重复给药 6 周毒代动力学试验

李冉, 赵亚青, 梁宗星, 董延生*, 王全军

(国科赛赋河北医药技术有限公司, 河北 廊坊市 065500; 北京赛赋医药研究院有限公司, 北京市亦庄开发区 100176)

摘要:目的 SAFE088 为 ROR1 靶点的 ADC 药物, 偶联小分子药物 Payload01, 临床拟用于治疗恶性肿瘤等。本研究通过食蟹猴重复静脉给予 SAFE088, 了解 SAFE088 的 ADC、总抗体、Payload01 的毒代动力学特征, 为毒性试验评价提供支持。方法 试验设 SAFE088 低、中、高 3 个剂量组(剂量分别为 2、4、6 mg/kg), 每组 10 只食蟹猴, 雌雄各半, 静脉输注给药, 每 3 周 1 次, 连续给药 3 次, 分别在首次和末次给药采集动物血液, 使用 ELISA 法(定量范围: 40~2000 ng/mL)检测血清中的 ADC、总抗(TAb)浓度, 使用 LC-MS/MS(灵敏度: 10 pg/mL)检测食蟹猴血浆中 Payload01 的浓度, 使用 WinNonlin 计算毒代动力学参数。结果 (一)总抗及 ADC: 首次给药后, 食蟹猴血清中 ADC、总抗体的暴露量均随剂量增加而增加, 其暴露指标 C_{max} 增加比例与剂量比(1:2:3)基本一致(C_{max} 组间比值总抗为 1:1.86:2.71, ADC 为 1:1.91:2.89), AUC_{last} 增加比例高于剂量比(AUC_{last} 组间比值总抗为 1:2.71:5.38, ADC 为 1:2.70:5.03)。

末次给药后, 食蟹猴血清中 ADC、总抗体的暴露量均随剂量增加而增加, 其暴露指标 C_{max} 增加比例与剂量比基本一致(C_{max} 组间比值总抗为 1:2.17:2.91, ADC 为 1:2.11:2.97), AUC_{last} 增加比例高于剂量比 AUC_{last} 组间比值总抗为 1.00:4.51:6.37, ADC 为 1.00:4.26:6.13)。各剂量组 ADC 和总抗暴露量未见明显性别差异。重复给药 3 次后, 各剂量组 ADC 和总抗暴露量未见明显蓄积趋势。

(二)Payload01: 首次给药后, 食蟹猴血清中 Payload01 的暴露量均随剂量增加而增加, 其暴露量 C_{max} 和 AUC_{last} 增加比例与剂量比基本一致(C_{max} 组间比值为 1:2.15:2.82, AUC_{last} 组间比值为 1:2.71:4.03)。

末次给药后, 食蟹猴血清中 Payload01 的暴露量均随剂量增加而增加, 其暴露量 C_{max} 和 AUC_{last} 增加比例与剂量比基本一致(C_{max} 组间比值为 1:1.95:2.60, AUC_{last} 组间比值为 1:3.73:4.61)。无明显性别差异; 重复给药后, 各剂量组 Payload01 暴露量无明显蓄积趋势。结论 食蟹猴每 3 周给药 1 次、连续 3 次静脉输注给予 2、4、6 mg/kg 的 SAFE088, 首次及末次给药后, 食蟹猴体内 ADC、总抗体、Payload01 的暴露量均随剂量增加而增加。各剂量组 SAFE088 ADC、总抗和 Payload01 暴露量未见明显性别差异。重复给药后, ADC、总抗和 Payload01 暴露量均未见明显蓄积趋势。

责任作者: 李冉, E-mail: liran@safeglp.com

通讯作者: 董延生, E-mail: dongyansheng@safeglp.com

T05-0095

孕期强的松暴露所致子代大鼠肾脏纤维化易感的过氧化物酶体生物发生缺陷机制研究

刘雨棠^{1,2}, 汪晖^{1,2*}, 敖英^{1,2*}

(1. 武汉大学基础医学院药理学系, 2. 发育源性疾病湖北省重点实验室, 武汉 430071)

摘要:目的 强的松是怀孕期间治疗母亲某些特殊疾病首选的口服糖皮质激素类药物。然而, 多项研究显示孕期使用强的松可增加胚胎腭裂、胎盘功能不全、早产和胎儿宫内生长发育迟缓的发生率。此外, 有研究报道, 孕期暴露于过量的内源性或外源性糖皮质激素可引起子代肾脏发育不良, 但对于其机制研究人们知之甚少。在本研究中, 我们探讨了孕期强的松暴露(PPE)对子代肾脏纤维化易感的影响, 并探寻其潜在的干预治疗靶点。方法 Wistar 大鼠于孕 0-20 天予以 0.25 mg/kg·d 强的松或等量羧甲基纤维素钠经口灌

胃。部分孕鼠于 GD20 处死获得胎肾组织。剩余孕鼠自然分娩,仔鼠正常喂养至 PW12,部分仔鼠麻醉处死,其余仔鼠分别用正常饲料和高脂饲料喂养至 PW12 构建二次打击模型。收集孕 20 天胎肾和出生后 12 周雄性子代肾脏组织进行形态学观察、全基因组测序,并基于形态学及测序结果检测相关基因的表达。**结果** 与对照组相比,PPE 组雄性子代大鼠胎肾肾单位生长发育迟缓,整个皮层宽度显著降低;PPE 组成年雄性子代在给予高脂饮食二次打击后,肾脏出现明显的纤维化与肾功能受损,此外透射电镜显示肾小管细胞微结构受损:细胞出现多处空洞、线粒体空泡化、内质网扩张、排列紊乱以及过氧化物酶体数量显著减少。测序筛选和实验验证表明,PPAR α 表达在 PPE 组出生前、后肾脏组织中持续降低;而肾脏 PPAR α 低表达引起的 PEX5 表达抑制可能导致过氧化物酶体生物发生缺陷,后者通过引起细胞内质网应激、线粒体损伤从而介导 PPE 所致子代肾脏纤维化易感。进一步实验证实,GR/Kdm5a 信号活化通过表观遗传调控 PPAR α /PEX5 信号通路介导了 PPE 所致的肾脏纤维化易感。**结论** 在本研究中,我们首次发现了 PPE 可致雄性子代肾脏纤维化易感和肾功能异常。进一步证实其具体发生机制为:PPE 通过活性代谢产物强的松龙激活 GR-Kdm5a 信号,诱导 PPAR α 启动子区 H3K4me3 水平及表达降低并延续到出生后,进而使 PEX5 的表达持续降低,引起子代肾脏过氧化物酶体生物发生缺陷,ROS 释放增加,导致内质网应激与线粒体损伤,引起子代肾脏纤维化易感和功能异常。

关键词: 孕期强的松暴露;肾脏纤维化;PPAR α ;过氧化物酶体;表观遗传修饰

基金项目: 国家重点研发计划“发育编程及其代谢调节”重点专项(No. 2020YFA0803900)

作者简介: 刘雨棠,硕士研究生,从事药物发育毒理研究,E-mail: 1846645447@qq.com

通讯作者: 敖 英, E-mail: yingao@whu.edu.cn

T06-0001

Kupffer 细胞耗竭减轻短期砷暴露所致 SD 大鼠肝脏炎性损伤

宋 倩, 周美彤, 王大朋*

(贵州医科大学公共卫生与健康学院,环境污染与疾病监控教育部重点实验室,贵安 561113)

摘要: **目的** 砷作为一种广泛存在的环境污染物,其所致健康危害已成为全球关注的公共卫生问题之一。长期砷暴露与肝损伤发展进程密切相关。Kupffer 细胞(KCs)是肝脏中的固有免疫巨噬细胞,病理状态下,活化的 KCs 导致高水平的炎症因子和趋化因子分泌,进而参与各种因素所致肝纤维化的发展进程。然而,KCs 活化在砷暴露诱导肝脏损伤中的具体作用鲜有报道。本研究初步探讨 KCs 耗竭对短期砷暴露诱导大鼠肝脏炎性损伤的影响,旨在为砷致肝损伤的具体分子机制提供新的科学数据。**方法** 选取健康成年 SD 大鼠 24 只,雌雄各半,按体重随机分为以下 4 组(6 只/组):对照组(生理盐水 10 ml/kg·bw 灌胃,6 天/周)、短期砷暴露组(10 mg/kg·bw NaAsO₂ 灌胃,6 天/周)、单纯 KCs 耗竭组(10 mg/kg·bw GdCl₃ 腹腔注射,2 次/周)、KCs 耗竭+短期砷暴露组(10 mg/kg·bw NaAsO₂ 灌胃,6 天/周;10 mg/kg·bw GdCl₃ 腹腔注射,2 次/周),期间喂食标准饲料,自由饮水。4 周后收集血清及肝脏,HE 染色、TUNEL 染色和肝生化功能指标(AST,ALT,TP)评估肝脏病理、细胞凋亡及肝功能变化情况;墨汁吞噬实验检测肝组织中 KCs 吞噬功能,免疫组化和免疫荧光共定位检测肝组织中 KCs 活化相关蛋白(CD68, iNOS, CD163)表达变化;酶联免疫法检测肝组织和血清中炎症因子(TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10)分泌水平。**结果** ①短期砷暴露诱导了 SD 大鼠肝脏病理炎性损伤和肝功能异常,且出现轻微的细胞凋亡;②短期砷暴露增强了大鼠肝脏中 KCs 的吞噬活力,上调了促炎因子 TNF- α , IL-1 β , IL-6 的分泌水平,并诱导了 KCs 活化关键蛋白 CD68 表达水平显著上升且趋向于促炎型细胞 iNOS⁺ M1 型 KCs 极化;③KCs 耗竭后,促炎因子分泌水平显著降低,凋亡细胞减少,进而改善了短期砷暴露诱导的大鼠肝脏病理炎性损伤。**结论** 短期砷暴露可诱导肝脏 KCs 发生 M1 型极化,进而诱导大鼠肝脏炎性损伤;GdCl₃ 可有效耗竭大鼠肝脏 KCs,减轻砷致肝脏炎性损伤。

关键词: 砷;肝损伤;Kupffer 细胞;炎症反应;三氯化钆

基金项目:国家自然科学基金(81872657);国家自然科学基金(82060582);贵州省第十三批优秀青年科技人才项目([2021]5611号);贵州医科大学优秀青年领军人才项目([2023] No. 103)

通讯作者:王大朋, E-mail:wojiushiwdp@126.com

T06-0002

Chk1 介导的 DNA 损伤应答在其靶向协同抗肿瘤作用的实验研究

张金金, 荣超*

(苏州大学苏州医学院基础医学院病理学与病理生理学系, 江苏 苏州 215123)

摘要:目的 前期研究发现细胞周期检查点激酶1(Checkpoint kinase1, CHK1)在肿瘤免疫微环境中发挥了重要的作用,本研究观察CHK1抑制剂对恶性肿瘤细胞增殖、凋亡及PD-L1蛋白表达的影响,探讨靶向CHK1与化疗药物或免疫检查点抑制剂联合运用的抗肿瘤效果。

材料和方法 运用Western blot、免疫荧光染色(IF)等分子生物学技术检测CHK1抑制剂(Prexasertib)对横纹肌肉瘤(RD)、头颈鳞癌(FaDu、Detroit 562)、宫颈癌(C33A)四种恶性肿瘤细胞系中CHK1、PD-L1、 γ H2A.X等相关蛋白和克隆形成、增殖、凋亡等细胞生物学行为的影响。

结果 CHK1抑制剂(Prexasertib)可以增强抗肿瘤药物顺铂、Etoposide、IFN γ 对恶性肿瘤细胞的杀伤作用。在RD、FaDu、Detroit 562、C33A等四种恶性肿瘤细胞系中,经CHK1抑制剂(Prexasertib)与传统化疗药物顺铂联合治疗后,发现Prexasertib可以显著增强顺铂的杀伤敏感性,且不同类型的恶性肿瘤细胞对于Prexasertib的敏感性具有异质性。我们进一步发现CHK1抑制剂(Prexasertib、AZD7762)、PARP抑制剂(AZD2281)和顺铂的联用均可以明显抑制肿瘤细胞增殖并且显著增加肿瘤细胞凋亡,其中Prexasertib与顺铂的联合用药效果更为显著。CHK1抑制剂Prexasertib可以剂量依赖性显著增加肿瘤细胞双链DNA的损伤应答,同时可以提高恶性肿瘤细胞中PD-L1的蛋白水平。

结论 CHK1抑制剂(Prexasertib)可以增强传统化疗药物顺铂对恶性肿瘤细胞的杀伤作用,引起显著的DNA双链损伤应答并改变PD-L1蛋白的表达,实验发现CHK1抑制剂与PD-L1/PD-1免疫检查点阻断剂的联合治疗将是一种值得期待的治疗恶性肿瘤新方法,为后续的临床应用与开发提供了新的科学依据和理论基础。

关键词:恶性肿瘤; CHK1; PD-L1; 化学治疗; 免疫治疗

通讯作者:荣超, E-mail:690455989@qq.com

T06-0003

基于纳米孔测序及 SELECT 技术的芥子气暴露表观遗传修饰研究

邬晓涵^{1,2}, 李治¹, 马波¹, 徐华^{1*}, 谢剑炜¹

(1. 军事科学院军事医学研究院国家安全特需药品全国重点实验室, 北京 100850;

2. 河北大学公共卫生学院, 河北 保定 071000)

摘要:目的 芥子气(sulfur mustard, SM)具有毒性强、毒效持久、作用快、杀伤范围广、防护和救治难等特点,被称为“毒剂之王”,目前主要通过检测环境或生物医学样本中的SM及其产物实现侦检确证。近来研究表明表观遗传修饰可敏感指征外界环境暴露。拟通过纳米孔测序及单碱基延长和连接的qPCR扩增技术(single-base elongation- and ligation-based qPCR amplification method, SELECT)实现对SM暴露N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m⁶A)修饰位点的定位及定量分析,从而构建其m⁶A表观遗传修饰差异谱,从表观遗传毒理学角度开展SM的毒性效应及检测预警应用研究。**材料与方法** 以人神经母细胞瘤细胞

SH-SY5Y作为SM暴露体外模型,考察其 IC_{50} 值并于此浓度下暴露细胞24 h,提取细胞总RNA并质检。参照标准流程进行文库构建及纳米孔测序,对原始数据进行过滤及质控。通过 m^6A net及xPore预测序列中 m^6A 修饰位点,设定差异倍数(fold change, FC) ≥ 1.5 和 $P < 0.01$ 为标准筛选差异位点。进而通过SELECT技术对差异 m^6A 修饰位点进行验证及修饰丰度差异分析。结果 CCK-8结果显示,SM对SH-SY5Y细胞的 IC_{50} 为 $76.27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。测序原始数据经过滤后,对照组得到625657条序列,处理组得到1079937条序列。 m^6A 位点分析结果显示其广泛分布于染色体,且倾向于存在CDS及3'UTR区域,分布特征符合常见的 m^6A motif基序规律RRACH(R=G/A, H=A/C/T)。xPore共分析出21096个显著差异 m^6A 位点($P < 0.01$),筛选出385个显著上调及234个显著下调的差异 m^6A 位点($FC \geq 1.5$)。与 m^6A net分析结果对比后选择共有的差异 m^6A 位点基因EEF1D进行SELECT分析,6个位点(染色体位置:143580642, 143586835, 143579810, 143586847, 143580148, 143580669)中4个位点(染色体位置:143580642, 143579810, 143580148, 143580669) m^6A 分布具有显著差异($P < 0.001$)且符合测序结果。结论 本研究通过纳米孔测序技术揭示芥子气急性暴露SH-SY5Y细胞 m^6A 修饰分布特征,并通过SELECT技术对具显著差异的 m^6A 修饰位点进行验证及修饰丰度分析,构建了SM暴露 m^6A 表观修饰差异谱,为建立SM早期暴露快速、灵敏、便捷的表观遗传修饰检测方案提供理论依据。

关键词:纳米孔测序; SELECT; 芥子气; 表观遗传修饰

通讯作者:徐 华, E-mail: huarxu@163.com

T06-0004

m^6A 甲基识别蛋白YTHDF1通过抗氧化应激维持线粒体稳态缓解 TDI哮喘气道炎症

谢璨灿, 黄俊文, 陈 颖, 龚钊乾, 彭晓阡, 赵文驱, 黄 冰, 赵海金

(南方医科大学南方医院呼吸与危重症医学科慢性气道疾病实验室, 广州 510515;

中南大学湘雅医学院附属株洲医院重症医学科, 株洲 412000)

摘要:目的 N^6 -甲基腺苷(m^6A)是常见的表观遗传修饰方式,对多种RNA具有重要的调控作用。近年来很多研究证实 m^6A 修饰可能参与哮喘的发病并逐步受到关注。YTH结构域蛋白是 m^6A 识别蛋白最关键的部分,在甲基化RNA代谢的所有阶段都发挥着调节作用。课题组既往研究证实,线粒体功能障碍在甲苯二异氰酸酯(TDI)哮喘的发病中扮演着重要角色。研究报道, m^6A 甲基化代谢在免疫调节和线粒体代谢中发挥重要的作用,然而其在哮喘中的作用和机制仍未阐明。本研究旨在明确 m^6A 甲基化修饰在TDI哮喘中的作用,及其与线粒体之间的调控关系。方法 构建TDI哮喘模型,检测YTH结构域蛋白家族(YTHDF1-3、YTHDC1-2)的表达水平差异。筛选出抑制YTHDF1 m^6A 修饰的小分子药物。每次致敏及激发前均使用抑制YTHDF1 m^6A 修饰的替加色罗和线粒体稳定药物Elamipretide triacetate(SS-31 triacetate)进行气道给药预处理。评估气道反应性、气道炎症及气道上皮线粒体功能等指标。结果 生信分析及通过qPCR及蛋白印迹检测发现, m^6A 甲基识别蛋白YTHDF1及其靶基因表达水平显著升高。进一步通过基因互作预测分析发现,NQO1、USP5、ASPSCR1和LRSAM1等抗氧化应激相关分子是YTHDF1互作相关的最显著的基因,使用替加色罗预处理后可显著抑制上述基因的表达水平。进一步使用替加色罗预处理TDI哮喘小鼠后发现,其显著加重了TDI诱导的气道炎症、气道重塑和线粒体功能障碍。同时,使用SS-31 triacetate则可显著抑制TDI诱导的气道炎症、气道重塑和线粒体功能障碍。结论 m^6A 甲基识别蛋白YTHDF1通过抗氧化应激维持线粒体稳态缓解TDI哮喘气道炎症。

关键词:甲苯二异氰酸酯; 哮喘; 线粒体; m^6A 甲基化修饰; YTHDF1

T06-0005

吸入二氧化氮对小鼠支气管和肺泡病理学及超微结构的影响

梁实^{1*}, 齐清文², 赖晃文³, 张岸²

(1. 南方医科大学坪山医院(深圳市坪山区人民医院), 深圳 518118; 2. 中国科学院地理科学与资源研究所, 北京 100101; 3. 南部战区总医院基础医学研究所, 广州 510010)

摘要:目的 研究空气污染物二氧化氮(NO₂)对支气管和肺泡病理学及超微结构的影响。方法 小鼠每天暴露于18 mg/m³ NO₂ 4小时,持续15或30天。使用光学显微镜(optical microscopy, OM)和透射电子显微镜技术(transmission electron microscopy, TEM)检查支气管和肺泡的变化,并检测血清中的C反应蛋白(CRP)、肿瘤坏死因子(TNF- α)和白细胞介素6(IL-6)水平。结果 所有暴露组在OM下未检测到支气管和肺泡有明显的病理改变,但TEM观察到超微结构明显变化,伴有血清CRP和IL-6水平升高($P < 0.005$),但TNF- α 无增高($P > 0.05$)。值得注意的是TEM观察到:在NO₂暴露15天后,I型肺泡上皮细胞在细胞体中表现出肿胀和大量空泡,细胞膜上有较多突起。II型肺泡上皮细胞板层小体减少,细胞间紧密连接松懈,杯状细胞破裂。血管内皮细胞会出现线粒体肿胀和嵴脱落。暴露30天后,注意到血气屏障显著增厚,I型肺泡上皮细胞中的液泡数量增加,II型肺泡上皮细胞破裂,毛细血管扩张和充血,以及血管内皮细胞肿胀,表明损伤加剧。整个暴露实验过程中没有发现炎症细胞浸润。根据有关文献(Naclerio, R., *et al.* International expert consensus on the management of allergic rhinitis (AR) aggravated by air pollutants: Impact of air pollution on patients with AR: Current knowledge and future strategies. World Allergy Organ. 2020; 13: 100106.)国际专家共识,空气污染物对呼吸系统损害过程可分为非炎症氧化阶段和炎症性氧化阶段。氧化应激反应触发非炎症阶段,是代谢和消除污染物所必需的,这些反应产生氧自由基(Reactive Oxygen Species ROS),ROS激活人体的抗氧化机制。如果ROS水平过高并且现有的抗氧化机制无法中和它们,它会触发解毒酶的上调,基因表达的这种上调由抗氧化反应元件(ARE)控制。在抗氧化机制仍然不足以抵消ROS的情况下,氧化应激的炎症阶段开始,TNF- α 水平升高,TNF- α 募集免疫细胞(中性粒细胞、巨噬细胞和嗜酸性粒细胞),导致细胞浸润。在我们的研究中,我们没有发现炎症细胞浸润,TNF- α 水平也没有增高,表明肺部尚未达到炎症阶段。结论 尽管NO₂暴露量尚不足以诱导出在OM可观察到的损伤时,也可能导致支气管和肺泡细胞的显著超微结构变化。血清CRP和IL-6水平是比TNF- α 水平更敏感的空气污染物损害指标。

关键词:二氧化氮; 支气管; 肺泡; 病理; 超微结构; CRP; IL-6; TNF- α

基金项目:国家自然科学基金资助(41471414)

通讯作者:梁实, E-mail: carlsl@126.com

T06-0006

三聚氰胺和甲醛联合暴露对雄性大鼠生殖毒性及其机制研究

郭燕华, 李培宁, 江漪, 黄晓辉, 李光先, 吴剑辉, 刘香梅*

(广州质量监督检测研究院, 广东 广州 510447)

摘要:目的 密胺餐具主要材质是三聚氰胺甲醛树脂,在光照、加热、酸解或其它不当使用时,会造成三聚氰胺、甲醛发生迁移,从而污染食品、危害健康。本研究探讨了三聚氰胺和甲醛联合暴露对雄性大鼠生殖毒性的影响。材料和方法 将检疫合格的4周雄性初断乳SD大鼠随机分为6组,分为对照组、低剂量组(600 mg/kg/day 三聚氰胺+125 mg/kg/day 甲醛)、高剂量组(1200 mg/kg/day 三聚氰胺+125 mg/kg/day 甲醛),每组6只,每日灌胃染毒,分别染毒4周、7周后对各组大鼠进行解剖,对大鼠睾丸和附睾进行组织病理学分析,并对附睾精子数量、活力进行检测。通过MeRIP-seq结合生物信息学分析鉴定三聚氰胺和甲醛联

合染毒影响的 m6A 修饰相关基因。通过 qRT-PCR、Western blot 等技术对 m6A 修饰关键基因表达水平进行检测。结果 三聚氰胺和甲醛高剂量组大鼠体重明显下降,差异有统计学意义 ($P<0.05$, $P<0.01$);染毒 4 周,与对照组比较,高剂量组大鼠解剖时睾丸、附睾质量下降,睾丸系数下降,附睾系数上升,均差异有统计学意义 ($P<0.05$, $P<0.01$);染毒 7 周组,与阴性对照组比较,低剂量组大鼠睾丸质量及睾丸系数下降,高剂量组大鼠睾丸、附睾质量及睾丸系数下降,差异有统计学意义 ($P<0.05$, $P<0.01$)。MeRIP-seq 测序分析结果筛选了一批差异表达的基因。结论 三聚氰胺和甲醛联合染毒引起 SD 大鼠体重下降、睾丸和附睾结构变化、精子质量下降,三聚氰胺和甲醛对 SD 大鼠雄性生殖系统具有损伤作用。m⁶A 修饰参与了三聚氰胺和甲醛造成大鼠生殖系统损伤的调控机制。

关键词:三聚氰胺;甲醛;联合染毒;生殖;毒性

基金项目:广东省自然科学基金项目(2022A1515012159)

作者简介:郭燕华,E-mail:gyh9927@163.com

通讯作者:刘香梅,E-mail:283830090@qq.com

T06-0007

纳米炭黑暴露对人支气管上皮细胞抗氧化系统的影响及调控机制

何静¹, 康宜晖¹, 霍倩茹¹, 王雅洁¹, 任青春¹, 陈顺妍¹, 孟涛^{1,2*}

(1. 山西大同大学脑科学研究所/分子细胞免疫学大同市重点实验室, 山西 大同 037009;

2. 山西大同大学附属第一医院山西省博士创新站, 山西 大同 037006)

摘要:目的 氧化应激是纳米炭黑(CB)致呼吸系统损伤的主要病理生理机制,但是CB在诱导氧化损伤过程中抗氧化防御应答的分子机制仍不十分清楚。通过研究纳米CB暴露对人支气管上皮细胞(16HBE)氧化应激水平和转录因子红系2相关因子2(Nrf2)/抗氧化反应原件(ARE)及其调控的抗氧化酶水平的影响,探讨CB所致氧化损伤中抗氧化应答的调控机制。材料和方法 利用对数生长期的16HBE细胞构建纳米CB(单颗粒尺寸30-50 nm)体外暴露模型。暴露效应实验设对照组、暴露时间组、暴露剂量组;氧化应激干预实验设对照组、N-乙酰半胱氨酸(NAC)+对照组、CB组和NAC+CB组。CCK-8法检测细胞毒性;化学荧光法测定细胞内活性氧(ROS)含量;比色法测定超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力;双荧光素酶报告基因检测法测定ARE荧光素酶活性;荧光定量PCR法和免疫印迹法检测Nrf2及调控的抗氧化酶血红素氧合酶-1(HO-1)、NAD(P)H醌氧化还原酶-1(NQO-1)和谷氨酰半胱氨酸连接酶催化亚基(GCLC)mRNA和蛋白水平。结果 随着CB暴露时间延长,16HBE细胞存活率呈时间依赖性下降;CB处理16HBE细胞24 h,细胞存活率呈剂量依赖性下降。CB诱导16HBE细胞24 h内ROS水平及SOD、CAT和GSH-Px活力呈先升高后降低;CB处理16HBE细胞4 h,ROS水平呈剂量依赖性增加,而SOD、CAT和GSH-Px活力呈剂量依赖性下降。CB诱导Nrf2 mRNA和蛋白总体水平无显著变化,但胞核Nrf2蛋白显著上调而胞质Nrf2蛋白显著下调,且ARE荧光素酶活性显著上调。CB诱导HO-1、NQO-1和GCLC mRNA和蛋白水平显著上调,具有时间和剂量依赖性。NAC显著降低CB诱导细胞毒性和ROS水平,增加SOD、CAT和GSH-Px活性,上调胞质Nrf2蛋白水平而下调胞核Nrf2蛋白水平,降低ARE活性,下调HO-1、NQO-1和GCLC mRNA和蛋白水平。结论 纳米CB诱导16HBE细胞ROS生成,造成氧化应激,促使Nrf2由胞质转位到胞核,激活ARE,上调HO-1、NQO-1和GCLC抗氧化酶表达。Nrf2/ARE抗氧化通路的活化在纳米CB诱导16HBE细胞氧化损伤中发挥重要的抗氧化防御作用,通过深入研究纳米CB诱导抗氧化系统活化的调控机制,为CB毒作用机制解析和基于Nrf2/ARE/抗氧化酶通路防治药物筛选提供实验依据。

关键词:炭黑;纳米颗粒;人支气管上皮细胞;氧化应激;Nrf2抗氧化通路

通讯作者:孟涛,E-mail:taotao198307@163.com

T06-0008

孕期炎症刺激通过调控子代 DNA 甲基化致高血压的跨代遗传

管 潇*, 曾 雪, 徐颖倩, 牛晓东, 甘淋玲, 钟文武, 谭 韬, 冯媛娇, 石 磊, 张亚红, 胥国立, 张如超
(重庆医药高等专科学校药学院(中药学院), 重庆 401331)

摘要:研究目的 已有研究报道高血压的多代遗传性状,但其分子机制仍不清楚。孕期炎症刺激(Prenatal inflammation exposure, PIE)会导致包括高血压在内的心血管疾病的发病率增加,PIE在怀孕期间是一个重大且无有效控制的事件。本研究使用模拟细菌感染的脂多糖(LPS)和模拟病毒感染的poly I:C处理孕中期实验鼠,构建孕期炎症刺激跨代遗传模型,以验证PIE导致子代高血压的遗传特性,并探讨PIE致子代血压升高跨代遗传的表现遗传学机制。

研究方法:将SD孕鼠(F0)分别在孕期第8.5、10.5、12.5天(持续性刺激)或第10.5天(一过性刺激)给予腹腔注射生理盐水、LPS或Poly I:C,其雄性子代(F1)与普通SD雌性大鼠繁育所得子鼠(F2)构建父系跨带遗传模型,选择LPS持续性刺激模型(F2-LPS-P)雄鼠为代表进行多代遗传研究,繁育至第三代(F3-LPS-P)及第四代(F4-LPS-P)。采用鼠尾法测量F2至F4子代8~28周龄的收缩压(SBP)。以F2-LPS-P模型为代表考察PIE对子代动脉结构和功能的影响以及表现遗传学分子机制:用HE染色和组织免疫荧光检测胸主动脉和肠系膜上动脉(SMA)的内膜及管壁结构变化;离体血管环实验测定动脉对去氧肾上腺素(PE)的收缩反应性和对乙酰胆碱(Ach)的舒张反应性。通过甲基化DNA免疫共沉淀测序(MeDIP-seq)检测胸主动脉组织甲基化的全基因组分布,用MEDIPS包比对得出差异甲基化区(DMRs),并用亚硫酸氢盐处理后测序PCR(BSP)验证DMRs的甲基化率。用DAVID、KEGG和IPA对DMRs进行功能分析,用Real-time PCR和BSP对IPA分析所得与血管重构信号转导通路密切相关的TOP 4 Pathway-G β γ 中低甲基化DMRs的相关基因进行验证。用Western-blot检测G β γ 下游PI3K-Akt信号通路中关键信号分子的蛋白表达水平,并用加入PI3K抑制剂LY20094的离体血管环实验评价PI3K的活性在胸主动脉收缩增强效应中的作用。

研究结果:给予F0代孕鼠PIE,无论是持续性刺激还是一过性刺激,其子代大鼠的收缩压均高于对照组,差异具有统计学意义。组织学分析表明,F2-LPS-P子代胸主动脉和SMA均出现明显的血管重塑,如血管壁厚度增加、壁厚/管腔直径比增加、内皮结构异常。血管反应性试验显示,F2-LPS-P子代的胸主动脉和SMA对PE均表现出显著更高的收缩反应,而不会影响ACh诱导的血管舒张。qPCR结果显示,F2-LPS-P胸主动脉和SMA中血管紧张素转化酶(ACE)的mRNA表达显著增高。MeDIP-seq分析得出1111个低甲基化的DMRs和1696个高甲基化的DMRs,表明F2-LPS-P的DNA甲基化发生了整体变化。对启动子区内或倍数变化最大的3个低甲基化和3个高甲基化DMRs的BSP验证结果与MeDIP-seq数据高度一致。David GO生物过程(BP)富集和KEGG分析显示,低甲基化DMRs相关基因富集的GO和信号转导通路与血管重构及高血压发生机制紧密相关。对GO富集的经典通路和IPA相互作用网络分析,显示G β γ 信号通路中的低甲基化DMRs与基因簇可能在PIE-F2子代的血管病变和高血压发生中起关键作用。F2-LPS-P中G β γ 信号通路基因的mRNA表达呈上调趋势,其中有5个基因的mRNA表达差异具有统计学意义,其启动子区内的甲基化DNA比例显著降低。G β γ 信号通路能够激活PI3K信号通路,后者的过度活化通常与血管重塑和病理改变有关。Western-blot结果显示,F2-LPS-P胸主动脉PI3K-Akt信号转导的关键下游效应分子mTORC1和mTORC2的底物Akt和S6的磷酸化水平较对照组显著升高,而Akt和S6的总蛋白水平与对照组无明显差异,这表明PI3K-Akt信号转导的活性在F2-LPS-P子代中增强。离体血管环反应实验显示,LY294002的处理显著逆转了增强的PE诱导的F2-LPS-P胸主动脉收缩反应,两组的收缩强度皆显著性降低且原有的组间差异消失,此结果证实了PI3K信号转导通路在F2-LPS-P子代血管收缩功能增强及高血压发病中的重要作用。

研究结论:本研究建立了孕期LPS/Poly I:C刺激致子代血压升高的跨代遗传模型。F2-LPS-P子代大鼠出现了血管重塑,以及以动脉对缩血管物质反应性增强为特征的血管反应性的变化;其全基因组甲基化状态发生改变,其中低甲基化DMRs相关基因富集的GO和信号转导通路与血管重构及高血压发生机制紧

密相关。PIE 导致 F2 子代胸主动脉富集于 Gβγ 信号转导通路的 DMRs 基因的启动子区域低甲基化,通过影响 F2 子代 PI3K / Akt 信号转导通路,进而导致以对缩血管物质反应性增强为特征的血管反应性的变化和子代高血压的发生。

关键词: 孕期炎症刺激; 表观遗传学; 高血压; 跨代遗传; DNA 甲基化; Gβγ; PI3K/Akt 信号通路; LPS; Poly(I:C)

通讯作者: 管 潇, E-mail: 343482960@qq.com

T06-0009

RNA m7G 甲基转移酶 1 与泛癌预后及其免疫微环境的关联分析

傅嘉琪[#], 程文栋[#], 朱晨雨, 张心煜, 谭璐艺, 黄婷婷, 曹 敏, 张文娟*
(暨南大学基础医学与公共卫生学院, 广州 510632)

摘要:目的 RNA m7G 甲基化修饰是 RNA 表观转录调控新机制,调控肿瘤的发生发展过程。探讨多种肿瘤中 RNA m7G 甲基转移酶 1(METTL1)的表达规律及其与预后和免疫浸润的关联,以期为癌症生物标志物筛选及其调控机制提供新的参考依据。**材料与方法** 运用癌症基因组图谱(TCGA)分析 33 种肿瘤中 METTL1 的 mRNA 表达谱及其与正常对照组表达差异;Cox 回归模型和 Kaplan-Meier 探讨 METTL1 表达与癌症患者预后的相关性;进而分析肝细胞癌(LIHC)中 METTL1 表达与免疫浸润的关联,并结合荧光定量 PCR 检测分析体外培养的正常肝细胞和肝癌细胞中 METTL1 与特定基因免疫检查点关联。**结果** METTL1 在癌组织和癌旁组织中的表达水平存在差异,在膀胱尿路上皮癌、乳腺浸润性癌、胆管癌、结肠腺癌、食管癌等大多数癌组织中高表达,而在嗜铬细胞瘤和副神经节瘤以及甲状腺癌组织中 METTL1 表达均低于对照组;泛癌中 METTL1 表达与癌症分期存在关联,在膀胱尿路上皮癌、乳腺浸润性癌、食管癌、头颈部鳞状细胞癌等晚期肿瘤中表达上调,且随着癌症分期进展而升高;METTL1 表达影响不同癌症预后, METTL1 高表达显著缩短脑低级别胶质瘤(LGG)、LIHC 和间皮瘤(MESO)患者中位生存时间;LIHC 中 METTL1 表达与树突状细胞、B 细胞、淋巴细胞、巨噬细胞等多种炎症细胞水平正相关,且 METTL1 水平与免疫检测点 LAG3 和 PDCD1 正相关($P < 0.001$),与其在肝癌细胞中 mRNA 表达水平一致。**结论** METTL1 显著促进大多数肿瘤发生和进展,其负向调控 LGG、LIHC 以及 MESO 患者预后生存率,并与免疫浸润正相关,有望作为基于 LAG3 和 PDCD1 免疫治疗的癌症生物标志物,并为化学致癌的预防和干预提供新的科学依据。

关键词: m7G; METTL1; 泛癌; 免疫浸润; 生物标志物; 预后

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金项目(2023A1515010353);广东省基础与应用基础研究基金项目(2021A1515011220)

通讯作者: 张文娟, E-mail: zwj2080@126.com

T06-0010

RNA m⁶A 去甲基化酶 FTO 与泛癌的关联分析

黄婷婷, 李 敏, 朱晨雨, 谭璐艺, 张心煜, 傅嘉琪, 张文娟*
(暨南大学基础医学与公共卫生学院, 广东 广州 510632)

摘要:目的 RNA m⁶A 甲基化修饰参与调控癌症的发生发展过程。RNA m⁶A 去甲基化酶 FTO 与多种肿瘤相关,利用生物信息学和荟萃分析评估其在不同癌症组织中的表达水平及其与临床特征、免疫浸润和预后的关联,以期为其在癌症中的作用和预后价值提供新线索。**方法** 基于 FTO 数据的医学文献数据,按照一下标准(a. 研究已在线发表;b. 对不同肿瘤组织中 FTO 表达进行了定量逆转录聚合酶链式反应检测;c. 所

有患者根据FTO水平被分为低表达组和高表达组;d. 患者明确诊断为癌症;e. 可以直接或间接提取风险比(HR)和95%置信区间(CI),经数据清洗后,共纳入1721名患者,进而对患者数据进行整理和荟萃分析。利用TIMER2的Gene_DE模块探索不同肿瘤及其正常对照组织中FTO表达差异。基因组变异分析和Spearman相关性分析FTO表达与肿瘤浸润细胞(TILs)的关联。采用Kaplan-Meier Plotter分析FTO与癌症临床总体生存期的关系。并初步探索FTO影响胃腺癌预后的潜在机制,筛选出STAD组织中与FTO相关的关键调控通路。**结果** 除肝癌外,FTO表达水平在其余34种癌症中均上调。胰腺导管腺癌和胃腺癌中FTO表达水平与多种TILs呈正相关,而脑胶质瘤、间皮瘤、肉瘤和甲状腺癌中与多种TILs呈负相关。同时,FTO表达水平在大多数癌症中与CD56dim亚型细胞负相关。FTO高表达与胃腺癌、膀胱癌和鳞状细胞癌患者预后差密切相关。FTO表达水平与,与胃腺癌患者年龄、临床分期和免疫浸润正相关,且FTO表达升高与其低分化和转移相关。同时,FTO负向调控微管解聚的稳定性和动力学,与胃腺癌细胞增殖有关。**结论** FTO与多种癌症临床特征和免疫微环境密切相关,并参与CD56dim亚型细胞的调控作用,其中FTO与胃腺癌的临床分期、免疫浸润、分化程度、转移及预后密切相关。FTO有望成为胃腺癌的生物标志物和潜在的干预靶点。

关键词:FTO; 荟萃分析; 生物信息学; 胃腺癌; 生物标志物

基金项目:广东省自然科学基金面上项目(2023A1515010353); 广东省自然科学基金面上项目(2021A1515011220)

通讯作者:张文娟, E-mail:zwj2080@126.com

T06-0013

RAGE通过介导线粒体功能障碍参与哮喘-慢阻肺重叠发病

龚钊乾, 黄俊文, 陈颖, 陈垚欣, 彭晓阡, 谢璨灿, 徐桂铃, 王珺娆, 赵文驱, 赵海金
(南方医科大学南方医院呼吸与危重症医学科慢性气道疾病实验室, 100036)

摘要:目的 晚期糖基化终产物受体(RAGE)在慢性阻塞性肺病(COPD)和哮喘的发病中扮演着重要角色,且可溶性RAGE可作为生物标志物与两者的临床预后相关,然而RAGE在哮喘-慢阻肺重叠(ACO)中的作用和机制仍待阐明。研究证实RAGE可通过激活氧化应激介导线粒体功能障碍,且近年来的研究证实线粒体稳态在哮喘和慢阻肺的发病中起着重要的调控作用。本研究旨在阐明RAGE与线粒体稳态在ACO中的作用,及两者之间的交互作用。

材料与方法 本研究纳入30例健康对照,40例COPD患者,54例哮喘患者,52例ACO患者,进行气道炎症、气道阻塞及诱导痰可溶性RAGE(sRAGE)等指标的检测。同时使用屋尘螨(HDM)和1R6F科研标准烟分别构建小鼠哮喘模型、COPD模型和ACO模型,每天激发或烟雾暴露前分别气道给药RAGE抑制剂(FPS-ZM1)和线粒体靶向抗氧化剂Mitoquinone(MitoQ)预处理,对小鼠气道炎症、肺功能、气道重塑及线粒体形态等指标进行检测。

结果 COPD患者、哮喘患者和ACO患者诱导痰中sRAGE水平较健康对照组明显下降,其中ACO患者的sRAGE水平较哮喘和COPD患者显著下降,且与患者气道阻塞水平和症状控制相关。在小鼠模型中,通过连续15周激发及烟熏后,与对照小鼠相比,ACO模型小鼠气道反应性和气道阻塞水平显著升高、肺泡肿胀且明显破坏、气道周围有明显的炎症细胞浸润和胶原蛋白沉积,以及肺部RAGE及其配体HMGB1、S100A和S100B显著激活。ELISA检测提示ACO小鼠IL-4、IL-5、IL-13、IL-17A和TNF- α 水平相比对照组、COPD组及哮喘组显著升高,而IgE水平亦较对照及COPD显著升高。电镜检测进一步提示ACO小鼠气道上皮紧密连接损伤和线粒体形态异常。而使用FPS-ZM1靶向抑制RAGE后显著逆转了烟雾暴露和HDM诱导的上述改变。进一步使用MitoQ预处理后,显著改善了烟雾暴露和HDM诱导的气道炎症、气道高反应性及气道阻塞。

结论 RAGE可能通过介导线粒体功能障碍参与ACO的发病,sRAGE可能作为ACO患者的潜在临床标志物。

关键词:哮喘-慢阻肺重叠; 晚期糖基化终产物受体; 线粒体; 线粒体靶向抗氧化剂

T06-0014

IGF2BP3 液-液相分离调控核糖体翻译参与 HBV/HBx 相关肝细胞癌进展的机制研究

杜泽邦, 蔡雨欣, 沈雨诗, 杨嘉劼, 陆远, 李谚青, 张铭航, 林育纯, 林忠宁*
(分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室, 厦门大学公共卫生学院, 厦门 361102)

摘要:目的 液-液相分离(LLPS)形成生物分子凝聚体已成为细胞内生物活动时空协调的一种广泛机制,近期研究发现LLPS失调是致癌作用和肿瘤发生发展的重要驱动因素。胰岛素样生长因子2 mRNA结合蛋白3(IGF2BP3)作为N6-甲基腺嘌呤(m⁶A)阅读蛋白,在调控mRNA命运中发挥重要作用。IGF2BP3能否经由LLPS调控mRNA表观遗传参与致癌过程尚不明确。本研究旨在探讨IGF2BP3经由m⁶A修饰形成LLPS参与乙型肝炎病毒及其X蛋白(HBV/HBx)相关肝细胞癌(HCC)作用的分子机制。**材料和方法** 多组学联合分析筛选并验证HBV相关HCC患者中IGF2BP3表达水平及其与预后关联性;采用HepG2.2.15和HepG2-HBx细胞构建HBV/HBx表达细胞模型进行体外试验;质粒转染构建IGF2BP3干预模型。采用IDR结构域预测、光漂白实验(FRAP)、体外相分离形成、免疫荧光等检测IGF2BP3相分离形成过程;采用SUnSET实验、AHA点击化学标记、流式细胞术、报告基因实验、多聚核糖体谱分析等检测核糖体翻译水平;采用CCK8、Transwell试验、EdU染色、克隆形成试验和细胞周期检测肿瘤细胞增殖侵袭表型。**结果** (1)与健康人群相比,HBV相关HCC患者肝脏转录组与蛋白组联合分析,发现IGF2BP3显著高表达、且与患者预后不良显著相关;HBV/HBx相关HCC患者肝癌组织、HBx-Tg小鼠肝脏、HBV/HBx表达HCC细胞中,IGF2BP3表达升高,提示与HBV相关HCC存在关联。(2) IGF2BP3结构域分析显示其包含大量IDR,FRAP提示IGF2BP3可在胞内发生LLPS;原核表达纯化EGFP-IGF2BP3蛋白进行胞外LLPS验证,发现IGF2BP3可以胞外形成液滴,使用1,6-己二醇后液滴消失,且绘制获得不同蛋白浓度、温度、pH、离子强度等条件下的相图,提示IGF2BP3可胞外发生LLPS。(3)胞外IGF2BP3的LLPS体系中加入RNA后,液滴形成数量显著增加;加入低m⁶A的mRNA后,液滴形成数量与对照组相比没有差异,提示IGF2BP3发生LLPS依赖于m⁶A修饰mRNA。(4)基因集富集分析(GSEA)表明IGF2BP3参与mRNA翻译调控和LLPS过程;与对照组相比,IGF2BP3敲低细胞中荧光液滴减少,且核糖体翻译效率降低,40S、60S和80S比例降低,P/M比率降低,荧光素报告基因表达减少,提示IGF2BP3经由LLPS调控核糖体翻译过程。(5)与对照组相比,IGF2BP3敲低细胞的增殖、迁移和侵袭显著降低,提示靶向干预IGF2BP3可抑制HBV相关HCC。**结论** 阐明mRNA的m⁶A修饰介导IGF2BP3形成LLPS调控核糖体翻译过程参与HBV/HBx相关HCC转归调节的分子机制;为探明LLPS动态调控参与外源因素诱导致癌作用的mRNA转录后调控机制和靶向干预提供依据。

关键词: IGF2BP3; LLPS; mRNA m⁶A 修饰; 核糖体翻译调控; HBV/HBx 相关 HCC

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82273667);国家自然科学基金面上项目(82073588)

通讯作者: 林忠宁, E-mail: linzhn@xmu.edu.cn

T06-0015

全光谱流式细胞仪在细胞治疗药物研发中的应用

秦潇源^{1*}, 窦速林²

(1. 苏州赛赋新药技术服务有限责任公司, 江苏 苏州市 215100; 2. 苏州赛赋新药技术服务
有限责任公司, 江苏 苏州市 215100)

摘要: 免疫检查点抑制剂、过继性细胞治疗、肿瘤疫苗是肿瘤免疫治疗的重要组成部分,其中CAR-T是个革命性治疗肿瘤的技术,是基因治疗技术和细胞免疫治疗技术的结合。CAR-T细胞是一个基因工程化的

T细胞,使患者的T细胞免疫功能不足的部分能够以基因工程的技术得以赋能,这是CAR-T治疗的重要意义所在。但CAR-T技术也面临许多挑战和痛点,其中一点便是成药性挑战,要解决该问题,鉴定CAR-T细胞的表型对了解CAR-T细胞的特性和功能,从而了解CAR-T药物疗效和临床安全的相关性成为重中之重。流式细胞术对复杂的免疫细胞的鉴定发挥了重要的作用。在EGFRv III-CAR-T产品治疗复发性胶质母细胞瘤的首个人体试验的研究中,需对患者外周血样本进行细胞活力、CAR检测、T细胞标记、激活标记、免疫检查点抑制剂和其他免疫细胞亚群的标记的检测,由于效应细胞的多样性和复杂性以及样本量限制,传统流式仪已无法满足检测需求,研究者选择了28配色的全光谱流式细胞术来实现检测目标。全光谱流式细胞仪凭借全光谱检测技术,解决了滤光片的限制,3激光配置即可轻松实现大于20色的实验检测实现了自发荧光的去除、较小的补偿,同时采用雪崩光电二极管(APD)检测器、高灵敏度粗波分复用(CWDM)半导体检测阵列和平顶光束等先进技术,使分析精度和速度得到有效提升,拥有配色设计更灵活、多功能性和广泛的适应性,使得全光谱流式细胞仪成为细胞分析领域的强大工具。

CAR-T细胞免疫疗法的临床前研究,是成药中关键且漫长的一步,包括了靶点发现、抗体的开发、scFv筛选、CAR-T细胞的构建、CAR-T细胞体外抗肿瘤活性和CAR-T细胞体内抗肿瘤活性评估等多个重要环节。随着流式细胞术的不断发展,并且基于其自身的优势特点,广泛的应用于CAR-T细胞治疗产品开发的各个环节。在CAR-T制造的前期阶段,流式细胞术可用于分析单采血液分离产品的成分,并确定与预后更好或更差相关的供体T细胞的特定群体。流式细胞术还可量化CAR表达、分析CAR阳性细胞的活化、脱颗粒和耗竭状态,以及区分CAR-T细胞和靶细胞群。还可用于评估输注之前CAR-T细胞的表型和功能,来确定可预测患者对免疫疗法反应的CAR-T细胞生物标志物,从而可以帮助建立预后模型,并最终导致更个性化的治疗方法。输注后,流式细胞术成为监测CAR-T细胞扩增和持久性、评估治疗反应的必要工具,同时可确定正在扩增的CAR阳性细胞是否存在非T细胞群体(白血病细胞)^{6,7}。流式细胞术还可以区分众多肿瘤浸润免疫细胞亚群,并评估免疫抑制标志物,例如PD-L1、FoxP3、IL-10和TGF- β ,并进行肿瘤异质区域之间的对比研究。

CAR-T细胞疗法是一种非常有前景的新型精准靶向疗法,但也存在诸多问题和挑战,全光谱流式仪的应用使我们对CAR-T细胞的特性和功能的了解更加深入,为CAR-T细胞疗法的研究指明了方向。

通讯作者:秦潇源, E-mail:qinxiaoyuan@safeglp.com

T06-0016

AHR介导的m⁶A RNA甲基化参与PM_{2.5}对心肌细胞分化的抑制

李晓晓,付保强,赵寿霜,姜岩,陈涛*
(苏州大学公共卫生学院)

摘要:目的 近年来多项研究表明母体大气PM_{2.5}暴露与先天性心脏病密切相关。我们最近发现PM_{2.5}激活芳香烃受体(AHR)后引起m⁶A RNA甲基化异常,导致斑马鱼胚胎心脏畸形。我们设想哺乳动物中PM_{2.5}也通过AHR引起m⁶A RNA甲基化变化,干扰心脏发育。本研究以大鼠胚胎心肌细胞H9c2为模型,探讨PM_{2.5}对AHR的激活及对m⁶A RNA甲基化的影响,并探讨其干扰心肌分化的分子机制。

材料和方法 PM_{2.5}采集于苏州城区,以索式提取法提取有机组分(EOM)。H9c2分化第六天进行EOM染毒并添加各种小分子抑制剂,72 h后在显微镜下观察细胞形态变化。使用荧光探针DCFH-DA和Mito-SOX™检测细胞内总活性氧(ROS)水平及线粒体ROS水平。通过RT-qPCR检测相关基因的表达。使用免疫荧光检测整体m⁶A RNA甲基化和蛋白表达水平。提取总RNA后,进行MeRIP-qPCR实验,分析EOM引起的Nox4基因m⁶A RNA甲基化变化。以双荧光素酶报告基因方法验证AHR对去甲基化酶FTO的直接转录调控。

结果 本研究中,我们首先发现EOM显著抑制H9c2的心肌分化。并且发现EOM暴露降低整体m⁶A RNA甲基化水平,而添加AHR小分子抑制剂或基因敲减具有拮抗作用。进一步研究发现,EOM激活AHR

后直接促进去甲基化酶FTO的转录,导致整体m⁶A去甲基化。我们进而证明,AHR激活引起的FTO过表达降低了Nox4 mRNA的m⁶A甲基化水平,导致Nox4过表达,从而引起EOM样本中的氧化应激。过量的ROS通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路,促进EOM对心脏分化的抑制。

结论 我们的结果表明,PM_{2.5}激活AHR后直接促进去甲基化酶FTO的表达,进而通过Nox4的m⁶A RNA去甲基化来增强其表达,所引起的氧化应激抑制Wnt/ β -catenin信号通路,从而阻碍心肌细胞分化。

关键词:PM_{2.5}; 芳香烃受体; m⁶A RNA甲基化; FTO; 心肌细胞分化

通讯作者:陈涛, E-mail: tchen@suda.edu.cn

T06-0017

TRIM72蛋白相应氧化应激的分子机制

马跃敏, 丁蕾, 周春*

(浙江大学医学院公共卫生学院毒理系)

摘要:机械力、外源化合物或氧化应激等刺激会对细胞膜造成损伤,为了维持细胞稳态,细胞必须通过内在膜修复机制来保护其完整性。TRIM72 (Tripartite Motif Protein 72) 属于TRIM蛋白家族成员,具有RING、B-box、Coiled-coil和SPRY结构域,主要在骨骼肌和心肌中表达,可以快速感知细胞膜损伤后氧分压的变化,将细胞内囊泡转运到损伤部位形成膜补丁,进而修复细胞膜。同时,TRIM72作为一种内源性分泌的肌细胞因子,对重要器官(骨骼肌、心脏、肾脏、肝脏等)的损伤修复具有重要作用。目前关于TRIM72功能的研究取得了丰富的成果,但其结构信息仅限于SPRY结构域,TRIM72寡聚化的分子机制以及转运囊泡的分子机制仍不清楚。在近期的研究中,我们首先解析了TRIM72二聚体的晶体结构,揭示其各个结构域的空间位置和稳定蛋白构象的相互作用界面。通过晶体堆积分析发现B-box结构域相互作用可以促进TRIM72的寡聚化,有利于TRIM72 Cys248分子间二硫键的形成。利用Saponin/H₂O₂诱导的细胞膜损伤模型以及多种生化分析方法,我们明确了不同结构域以及关键氨基酸在膜损伤修复过程中的作用。研究发现RING结构域不是膜损伤修复必须的,Coiled-coil、SPRY结构域与脂质相互作用参与结合囊泡。论文研究结果加深了我们对TRIM72蛋白寡聚,参与膜损伤修复过程的理解,为进一步的机制研究和临床应用提供了支撑。

关键词: TRIM72; MG53; 氧化应激; 膜损伤; 二硫键

通讯作者:周春, E-mail: chunzhou@zju.edu.cn

T06-0018

乳酸特异性调控NMDAR信号通路对睡眠期蓝光致抑郁样行为中外侧缰核突触形态功能的影响机制

李音函, 马颖, 张誉, 程佳玘, 郑馥荔, 邵文亚, 于广霞, 郭振坤, 吴思英*, 李煌元*, 胡红*

(福建医科大学公共卫生学院, 福州 350122)

摘要:目的 夜间蓝光暴露已证实增加抑郁症风险,而乳酸作为潜在治疗靶点,其具体机制尚待阐明。本研究旨在探讨夜间蓝光与抑郁症的关联,以及乳酸是否通过调控N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)信号通路,改变外侧缰核(LHb)突触形态功能,在睡眠期蓝光诱导的抑郁样行为中发挥作用。同时,揭示乳酸的特异性调控机制,为蓝光诱导抑郁症的预防策略提供理论依据。

材料与方法:本研究结合人群调查和动物实验,分析睡眠期蓝光暴露与抑郁症状的关系及其内在机制。首先,通过问卷调查2022-2023年某大学大一新生的睡眠期蓝光暴露情况,评估其与抑郁症状的关联性。

随后,在动物实验中,设置睡眠期蓝光暴露、活动期蓝光暴露及社会失败应激模型作为对照,观察各组抑郁样行为。暴露8周后,采用行为学测试评估抑郁样行为,代谢组学和比色法检测LHb乳酸水平。通过腹腔注射乳酸抑制剂草氨酸钠,进一步验证乳酸在睡眠期蓝光致抑郁样行为中的特异性作用。最后,利用Western blot、免疫荧光、体内钙离子成像、高尔基染色及透射电镜技术,深入探究乳酸对NMDAR信号通路及LHb突触形态功能的调控作用及其在睡眠期蓝光致抑郁样行为中的作用机制。

结果:人群调查显示,大学生抑郁症状检出率为34.7%,且电子显示屏冷光模式下的蓝光辐射与抑郁症状正相关。动物实验发现,睡眠期蓝光暴露可诱发抑郁样行为,伴随LHb乳酸水平升高;乳酸抑制剂有效预防了蓝光暴露导致的抑郁样行为,但对社会应激模型无显著影响,表明乳酸在蓝光致抑郁中的特异性作用。此外,乳酸激活了NMDAR受体及其下游信号分子的磷酸化,影响了LHb神经元活性、突触功能,增加了突触数量并改变了突触后膜的形态结构。

结论:睡眠期蓝光暴露与抑郁症状密切相关,乳酸通过特异性调控NMDAR信号通路,改变LHb突触的形态和功能,在蓝光诱导的抑郁样行为中发挥重要作用。本研究为理解蓝光与抑郁症的关系提供了新的视角,并为开发相关预防策略提供了实验依据。

关键词:睡眠期蓝光;抑郁;乳酸;外侧缰核;NMDAR

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82173553);福建省自然科学基金项目(2021J01734);福建医科大学高层次人才科研启动基金项目(XRCZX2020036)

作者简介:李音函,E-mail:lyh960608@163.com

通讯作者:吴思英,E-mail:fmuwsy@163.com;李煌元,E-mail:fmulhy@163.com;胡红,E-mail:huhong1009@126.com

T06-0019

TRAP1通过抑制氧化应激拮抗顺铂诱导的胃癌细胞凋亡

纪正蕾¹, 吴华彰², 赵云利^{1*}

(1. 蚌埠医科大学公共卫生学院, 安徽 蚌埠 233000; 2. 蚌埠医科大学生命科学学院, 安徽 蚌埠 233000)

摘要:**目的** 探究肿瘤坏死因子受体相关蛋白1(TRAP1)对胃癌细胞顺铂敏感性的影响。**方法** 利用基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)中胃癌数据分析TRAP1在胃癌组织及癌旁组织的表达水平及其对胃癌患者预后的影响;通过转录组测序及生物信息学分析,探究TRAP1过表达和沉默对胃癌细胞活性氧累积、线粒体膜电位及细胞凋亡的影响,蛋白质免疫印迹检测TRAP1对氧化应激和细胞凋亡相关蛋白的表达水平的影响;采用活性氧清除剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)处理胃癌细胞分析TRAP1与胃癌细胞ROS累积的关系,结合顺铂处理探讨TRAP1与顺铂诱导的胃癌细胞凋亡之间的关联。**结果** GEO数据集分析表明,TRAP1在胃癌组织中表达水平显著升高且与患者的不良预后显著相关。过表达TRAP1能抑制胃癌细胞胞内ROS的累积,升高线粒体膜电位,拮抗顺铂所诱导的细胞凋亡;凋亡相反,TRAP1沉默则会诱导胃癌细胞ROS的上升,降低线粒体膜电位,协同顺铂促进胃癌细胞的凋亡,且这些变化可以均被NAC所逆转。蛋白质免疫印迹结果显示,过表达或沉默TRAP1联合顺铂能改变胃癌细胞内氧化应激相关蛋白Nrf2、HO-1及细胞凋亡相关蛋白BAX、BCL-2、caspase 3等的表达水平。**结论** TRAP1可通过调控胃癌细胞ROS水平致线粒体功能障碍,进而影响胃癌细胞对顺铂耐受性。

关键词:TRAP1; 胃癌细胞; ROS; 氧化应激; 顺铂耐药

通讯作者:赵云利,E-mail:yunli201@126.com

T06-0020

父体孕前咖啡因暴露引起男性三代生育力变化的发生机制及预警标志物

汪 晖

(武汉大学基础医学院药理学系/发育源性疾病湖北省重点实验室, 武汉 430071)

摘要: 男性生育力下降形势严峻, 孕前咖啡因摄入是关键诱因, 但其发生机制尚未阐明。首先, 我们以咖啡因作为暴露源, 构建父体孕前咖啡因暴露(PPCE)导致雄性三代生育力变化的大鼠模型, 以观察父系三代生育力的差异性变化。结果发现, PPCE可致F0代生育力受损(如低受孕率、胎儿身长/体重减少)而F1/F2代逐渐恢复, 各代血睾酮水平、精子质量及生育力呈相同变化趋势, 并与血糖皮质激素水平有关。接着, 我们依次探寻PPCE父系三代大鼠生育力变化的“当代糖皮质激素编程”机制及毒性靶标。结果发现, F0代高糖皮质激素暴露抑制睾丸睾酮合成功能, 进而导致F0代生育力显著降低, 并诱导精原细胞/精子印记基因甲基化重编程。其中, 印记基因IGF2/MEST DMR区低甲基化可分别引起F1代肾上腺糖皮质激素/睾丸睾酮合成功能降低。而“当代”糖皮质激素水平变化通过调控睾酮合成功能及精子IGF2/MEST甲基化水平及表达, 导致F1/F2代生育力逐渐恢复。结合整体和细胞实验, 我们发现, PPCE下的F0代高糖皮质激素暴露, 一方面通过上调睾丸间质细胞DNMT3A/DAX1甲基化信号而抑制睾酮合成功能, 导致F0代精子质量及生育力降低, 另一方面通过调控睾丸精原细胞C/EBP α /DNMT3L信号, 引起精子中印记基因DNA甲基化重编程。其中, Mest启动子区DNA低甲基化通过Wnt/ β -catenin信号通路抑制F1/F2代睾丸发育编程及睾酮合成功能, 而IGF2印记控制区DNA低甲基化则可通过IGF1R/AKT信号通路抑制F1/F2代肾上腺发育编程及糖皮质激素合成功能, 从而正向调节睾酮合成功能, 最终导致“当代”精子质量及生育力变化——表现为F0代-明显降低、F1代-降低、F2代-恢复正常。综上提示, 当代糖皮质激素编程机制介导PPCE所致雄性三代生育力变化。最后, 我们基于人群试验结果提出, 生育期男性血皮质醇水平、精子印记基因IGF2/MEST甲基化改变可作为父系三代生育力变化的预警标志物。

基金项目: 国家自然科学基金联合重点项目(U23A20407)

通讯作者: 汪 晖, E-mail: wanghui19@whu.edu.cn

T07-0002

LW2043对体外小鼠淋巴瘤细胞Tk基因突变试验

代彩玲, 蔡达同, 郭健敏, 杨 威*

(1. 广州湾区生物医药研究院, 广东莱恩医药研究院有限公司, 广东省药物非临床评价与研究重点实验室, 国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心, 广东省创新药物评价与研究工程技术研究中心, 从化区抗感染药物研究与评价工程技术研究中心, 广东 广州 510990)

摘要: **目的** 通过检测LW2043在有和无体外代谢活化系统条件(S₀)下, 对小鼠淋巴瘤L5178Y tk⁺ 3.7.2 C细胞进行细胞集落形成率和基因突变频率的检测, 以评价其致突变的可能性, 为其临床试验提供基础依据。

方法: 根据药物遗传毒性研究技术指导原则, 细胞毒性试验实验中采用最高剂量0.5mg/mL进行细胞相对总增长率(RTG)测定试验。小鼠淋巴瘤L5178Y细胞试验: 在3-4h, +S₀、3-4h, -S₀条件下设溶媒对照组、阳性对照组及LW2043四个剂量组进行基因突变试验。阳性结果的判定: 受试物至少一个剂量组的MF与溶媒对照比较有显著性差异, 或比溶媒对照高2倍或以上, 可判断为阳性。但应排除过大的细胞毒性(< 10%RS或RTG)所对应的剂量后方可判定。

结果: 根据细胞毒性试验结果, LW2043在3-4h, -S₀和3-4h, +S₀条件下, 对L5178Y细胞产生约80%~90%的细胞毒性的浓度范围, 设置LW2043在3-4h, -S₀条件下, 浓度分别为4 μ g/mL、2 μ g/mL、1 μ g/mL、

0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 3-4h, +S₉条件下, 浓度分别为 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

基因突变试验结果表明: 在非活化试验中(3-4h, -S₉), 阳性对照组 MF 比阴性对照组高 2 倍以上, 呈明显的阳性反应, 表明检测系统稳定、可靠。LW2043 剂量 C、D、E、F 组 MF 与溶媒对照组相比, 均未见明显增加(一倍以内)。

在活化试验中(3-4h, +S₉), 阳性对照组的 MF 比阴性对照组高 2 倍以上, 呈明显的阳性反应, 表明检测系统稳定、可靠。LW2043 剂量 I、J、K、L 组 MF 与溶媒对照组相比, 均未见明显增加(一倍以内), 均在正常范围内。

结论: LW2043 在代谢活化体系和非代谢活化体系中诱发的小鼠淋巴瘤 *Tk* 基因突变率未见浓度依赖性增加, *Tk* 基因突变率均在正常范围内, 因此判断 LW2043 对体外小鼠淋巴瘤细胞 *Tk* 基因突变试验结果为阴性。

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

作者简介: 代彩玲(1990-), 硕士研究生, 主管药师, 主要从事药物非临床前评价, E-mail: daicailing@lewin.com.cn, Tel: 18840606602

通讯作者: 杨 威, 教授级高级工程师/博士、博士后导师, 广州湾区生物医药研究院院长、广东省药物非临床评价与研究重点实验室主任、广东莱恩医药研究院有限公司董事长、总经理, Tel: 18928860179, (020) 87998690, E-mail: yangwei0719@163.com

T07-0003

LW2355 单次给药裸鼠体内致瘤性试验研究

黄雪映, 张文强, 蒙飞彪, 张发福, 郭健敏, 杨 威*

(广州湾区生物医药研究院, 广东莱恩医药研究院有限公司, 广东省药物非临床评价与研究重点实验室, 国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心, 广东省创新药物评价与研究工程技术研究中心, 广东 广州 510990)

摘要: **目的** 通过对新生裸鼠(出生 3 日龄内)皮下接种 LW2355, 观察 LW2355 对裸鼠的致瘤性。**方法** 将出生 3 日龄内的纯合子 nu/nu 裸鼠随机分为 7 组, 即阴性对照组和 LW2355 I、II、III、IV、V、VI 组, 每组至少 16 只裸鼠, 雌雄兼有。分组后立即对各组动物肩胛骨处皮下单次注射对照品和或 107cells LW2355 细胞裂解物, 100 μL /只。接种后每天观察 1 次, 每周进行 1~2 次称重和触诊, 记录接种部位是否有结节, 连续观察 4 个月(16 周)。于注射 16 周后处死裸鼠, 并进行组织病理学(HE 染色)检查, 显微检查肝、心、肺、脾及接种部位淋巴结是否存在转移性损伤。**结果** (1) 临床观察期间全身触诊检查结果表明, 阴性对照组、LW2355 I、II、III、IV、V、VI 组动物注射部位及其他部位均无可疑性结节生长。(2) 大体病理学检查结果显示, 存活动物阴性对照组、LW2355 I 组、LW2355 II 组、LW2355 III 组和 LW2355 V 组个例动物大体检查见脾脏变色, 白色, 局灶性/多灶性; 其余各组各例动物大体检查未见明显异常变化; 组织病理学检查结果显示, 阴性对照组和各批次 LW2355 组除个别动物个别脏器异常改变, 如肝细胞坏死/浸润、脾脏骨髓细胞数量增多、肺脏单个核细胞浸润和脾脏骨髓外造血增多等外, 其余肝、心、肺、脾、接种部位及接种部位淋巴结(颌下淋巴结)均未见转移性损伤。**结论** 在本次试验条件下, 综合皮下结节观察结果及组织病理学检查结果发现, 本次试验系统成立, 各批次 LW2355 单次接种新生裸鼠后未见致瘤性作用。

关键词: nu/nu 裸鼠; 致瘤性试验; 组织病理学

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

作者简介: 黄雪映, 专题负责人, 从事药物药理毒理研究, Tel: 13922944369, E-mail: huangxueying@lewin.com.cn

通讯作者: 杨 威, 教授级高级工程师/博士、博士后导师, 广州湾区生物医药研究院院长、广东省药物非

临床评价与研究重点实验室主任、广东莱恩医药研究院有限公司董事长、总经理, Tel: 18928860179, (020) 87998690, E-mail: yangwei0719@163.com

LW2356 单次给药裸鼠体内成瘤性试验研究

黄雪映, 张文强, 蒙飞彪, 张发福, 郭健敏, 杨威*

(广州湾区生物医药研究院, 广东莱恩医药研究院有限公司, 广东省药物非临床评价与研究重点实验室, 国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心, 广东省创新药物评价与研究工程技术研究中心, 广东 广州 510990)

摘要:目的 通过裸鼠皮下接种 LW2356, 观察它在动物体内形成肿瘤的过程, 为其应用提供数据支持。**方法** 根据体重将 BALB/c-nu 小鼠进行随机均衡分为 5 组, 即阴性对照组 (MRC-5)、阳性对照组 (HeLa)、LW2356 I、II、III 组。分组后各组动物背部皮下单次给予相应受试细胞, 给药后定期进行皮下结节观察和测量, 连续观察 17 周后处死小鼠, 取各组动物注射部位及其他部位 (心脏、肺、肝、脾、肾、脑及局部淋巴结) 的可疑结节和增生组织进行病理学检查。**结果** (1) 试验期间阴性对照组 1 例动物、阳性对照组 2 例动物、LW2356 I 组 2 例动物、LW2356 II 组 2 例动物于不同的时间段内出现消瘦、弓背的现象, LW2356 III 组 1 例动物于给药第 77 天出现消瘦、弓背、肛周污浊, 给药第 78 天死亡。除以上动物外, 其余动物在整个观察期间均未见异常。(2) 皮下结节观察、测量结果表明, 阴性对照组动物仅在给药后第 1 周观察及测量到一定体积的结节, 此后未观察和测量到皮下有结节; 在给药后第 1~17 周, 阳性对照组动物除 1 例动物外, 其余动物皮下均可观察和测量到一定体积的结节, 且结节体积稳定增长, LW2356 I、II、III 组动物均未能观察和测量到皮下结节的存在。(3) 组织病理学检查结果表明, 接种 Hela 细胞可观察到动物给药部位形成肿瘤, 成瘤率为 91.67%; 接种不同批次的 LW2356, 均未观察到其在动物体内形成肿瘤。**结论** 综合皮下结节观察、测量结果及组织病理学检查结果, 本次试验系统成立, LW2356 未见成瘤性作用。

关键词: BALB/c-nu 小鼠; 成瘤性试验; 组织病理学

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

作者简介: 黄雪映, 专题负责人, 从事药物药理毒理研究, Tel: 13922944369, E-mail: huangxueying@lewin.com.cn

通讯作者: 杨威, 教授级高级工程师/博士、博士后导师, 广州湾区生物医药研究院院长、广东省药物非临床评价与研究重点实验室主任、广东莱恩医药研究院有限公司董事长、总经理, Tel: 18928860179, (020) 87998690, E-mail: yangwei0719@163.com

T07-0004

两种甜味剂阿斯巴甜和糖精的基因毒性体外测试研究

赵晓童^{1,2}, 李治¹, 马波¹, 陈佳¹, 徐华^{1*}, 谢剑炜^{1*}

(1. 军事科学院军事医学研究院国家安全特需药品全国重点实验室, 北京 100850;

2. 河北科技大学化学与制药工程学院, 石家庄 050018)

摘要:目的 人工甜味剂, 被称为食品工业领域迄今为止最重要的成就之一, 但其安全性仍存在较大争议。世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 下属国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 将阿斯巴甜归类为可能对人类致癌的 2B 组 (IARC 2B), 而糖精是最古老的人工甜味剂, 其安全性亦存在争议。本研究基于高效液相色谱串联三重四极杆质谱 (Liquid Chromatography

Tandem Triple Quadrupole Mass Spectrometry, LC-MS/MS)检测阿斯巴甜和糖精暴露后染色体毒性标志物 γ -H2AX和纺锤体毒性标志物p-H3的表达水平,并考察其量效和时效关系。**材料和方法** 用无血清培养基配制终浓度10.0、5.0和2.5 mg/mL阿斯巴甜溶液和终浓度3.00、1.50和0.75 mg/mL糖精溶液急性暴露HepG2细胞24 h;阿斯巴甜2.5 mg/mL和糖精0.75 mg/mL亚急性暴露HepG2细胞7 d;均设置0.1% DMSO的溶剂作为空白对照组,0.1 μ mol/L喜树碱和0.1 μ mol/L紫杉醇作为阳性对照。采用LC-MS/MS多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式定量检测细胞 γ -H2AX/H2AX表达水平。**结果** 阿斯巴甜和糖精短期和长时程暴露均不改变 γ -H2AX和p-H3的 R_{yT} 值,即阿斯巴甜和糖精在考察暴露浓度下均不会引起细胞 γ -H2AX和p-H3表达水平增加,即未呈现染色体断裂和纺锤体毒性。**结论** 本研究基于LC-MS/MS基因毒性体外测试方法检测了两种甜味剂阿斯巴甜和糖精急性和亚急性暴露细胞后的生物标志物 γ -H2AX和p-H3,结果表明两者未呈现显著DNA损伤基因毒性。

关键词:人工甜味剂;高效液相色谱串联三重四极杆质谱; γ -H2AX; p-H3; 基因毒性

通讯作者:谢剑炜, E-mail: xiejw@bmi.ac.cn; 徐华, E-mail: huarxu@163.com

T07-0005

重复给药致瘤性试验中一例NCG小鼠胸腺淋巴瘤的来源鉴别诊断

罗荣荣, 戴锦龙, 陈志森, 杨威*

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

摘要:**目的** 在一项重复给药致瘤性试验研究中,一例受试物高剂量组雌性NCG小鼠出现胸腺淋巴瘤。根据国家药品监督管理局药品审评中心2024年01月18日发布的《人源干细胞产品非临床研究技术指导原则》中3.3成瘤性和致瘤性非临床研究策略指出,当在动物成瘤性和/或致瘤性试验中观察到肿瘤发生时,需进行肿瘤细胞的种属来源分析,以明确其来自于接种的干细胞产品还是来自于受者,分析属于成瘤性还是致瘤性。本试验通过对该动物肿瘤细胞来源进行免疫组化染色,以鉴别其来自于接种的细胞产品还是来自于受试动物本身。**方法** 组织病理学检查心肝脾肺肾和胸腺等多个脏器,并使用鼠CD3抗体(与人组织无交叉反应)和人CD8抗体(与鼠组织无交叉反应)对肿瘤组织特异蛋白进行免疫组织化学染色,以小鼠脾脏以及接种的细胞产品作为阳性对照。**结果** 组织病理学检查结果显示,胸腺中瘤细胞为中等大小淋巴细胞,胞浆少,染色质分散,核圆形或卵圆形,核仁小或模糊,偶见巨细胞。心脏、肝脏和脾脏局部可见少量肿瘤细胞。免疫组织化结果显示,鼠CD3抗体染色可见胸腺大量淋巴细胞阳性;心脏、肝脏和脾脏少量肿瘤细胞呈弱阳性。而人CD8抗体染色胸腺、心脏、肝脏和脾脏肿瘤细胞均呈阴性。结果表明该例动物胸腺、心脏、肝脏和脾脏肿瘤细胞为鼠源性T淋巴细胞,源于受试者本身。根据试验动物生产厂家提供的背景数据,NCG小鼠偶见免疫淋巴造血相关肿瘤,本项目研究中150例动物仅1例动物出现,倾向于判断变为偶发事件,与受试物无关。**结论** 按照指导原则要求完成了对该病例肿瘤来源的病理学鉴别诊断,为该试验研究提供方法和数据参考。

关键词:NCG小鼠;重复给药;淋巴瘤

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

作者简介:罗荣荣,兽医硕士, E-mail: luorongrong@lewin.com.cn

通讯作者:杨威,教授级高级工程师/博士、博士后导师,广州湾区生物医药研究院院长、广东省药物非临床评价与研究重点实验室主任、广东莱恩医药研究院有限公司董事长、总经理, Tel: 18928860179, (020) 87998690, E-mail: yangwei0719@163.com

LW23101 对 Beagle 犬 28 天重复静脉给药毒性试验病理学研究

罗荣荣, 戴锦龙, 陈志森, 杨威*

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

摘要:目的 观察连续 28 天重复静脉注射给予 LW23101 后, 对 Beagle 犬产生的毒性反应及其严重程度, 同时考察药物在 Beagle 犬全身的暴露情况和持续时间, 系统暴露与剂量、时间以及毒理学结果之间的关系, 为重复给药进行风险评价, 给临床设计人用安全剂量和主要监测指标提供参考。方法 选用适应性观察合格的 40 只 Beagle 犬, 按体重和性别均衡随机分为 4 组, 分别为阴性对照组、LW23101 低(0.03 mg/kg)、中(0.1 mg/kg)、高(0.3 mg/kg)剂量组, 10 只/组, 雌雄各半。每天给药一次, 连续给药 28 天, 恢复期观察 4 周。存活动物按计划进行系统解剖检查、睾丸、眼球用 Davidson's 固定, 其他脏器用 10% 中性福尔马林溶液进行固定, 后进行脱水、包埋、切片、染色及病理组织学检查。结果 试验期间未见动物死亡。大体病理学结果显示给药末期中、高剂量组均可见 1 例动物见结肠、直肠或和十二指肠黏膜下弥散性点状暗红色变色, 镜下见肠道黏膜层或黏膜下层轻微出血或淤血, 各组给药部位皮肤见蚕豆大小红色或暗红色变色, 镜下见不同程度的血管内膜或和血管中膜增生、血管周围见不同程度弥散性或局灶性出血、中性粒细胞、单核细胞或和成纤维细胞浸润等改变。各组间程度、性质和数量未见明显差异, 考虑为注射操作相关刺激性变化, 与受试物无关。此外, 给药末期低、中、高剂量组雄性动物脾脏髓外造血增多, 且各组间未见明显剂量关系, 脾脏的髓外造血增多, 结合临床血液学结果分析为红细胞减少的代偿性变化。结论 在本实验条件下, 对 Beagle 犬 28 天重复静脉注射低、中、高剂量的 LW23101 后, 给药末期各剂量 LW23101 组均可引起部分雄性动物脾脏髓外造血增多。此外, 中、高剂量的 LW23101 组动物肠道黏膜层或黏膜下层轻微出血或淤血, 不排除与受试物相关。恢复期结束后, 均可恢复。

关键词: Beagle 犬; 重复静脉给药; 病理学

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

作者简介:罗荣荣, 硕士, E-mail: luorongrong@lewwin.com.cn

通讯作者:杨威, 教授级高级工程师/博士、博士后导师, 广州湾区生物医药研究院院长、广东莱恩医药研究院有限公司董事长、总经理, Tel: 18928860179, E-mail: yangwei0719@163.com

T07-0008

BALB/C Nude 小鼠皮下接种人胃癌 SGC-7901 细胞移植瘤模型的建立

瞿林海, 任微, 戴学栋*

(苏州赛赋新药技术服务有限责任公司, 江苏 苏州 215000)

摘要:目的 本试验使用 BALB/C Nude 小鼠单次皮下注射给予 SGC-7901 细胞后, 观察动物在注射部位和/或转移部位由接种细胞本身形成肿瘤的能力, 以指导后续体内成瘤性试验开展。方法 本试验使用 20 只 SPF 级 BALB/C Nude 小鼠, 雌雄各半。实验小鼠在实验前均经过了严格的健康检查和环境适应。20 只小鼠被分为 SGC-7901 细胞组, 每只小鼠在右侧腋下通过皮下注射的方式接种 1×10^6 个 SGC-7901 细胞, 注射体积为 0.2 mL。接种后的 26 天内, 研究人员每天对小鼠进行临床观察, 记录其一般状态和任何异常行为。每周对小鼠进行体重测量, 并使用游标卡尺对注射部位的结节或肿块进行两次测量, 以监测肿瘤的生长情况。实验材料 试验所用的是 SGC-7901 细胞, 细胞系特征表明其为人类胃癌细胞, 具有贴壁生长的特性。细胞在 37 °C、5% CO₂ 的条件下培养, 并使用 RPMI-1640 完全培养液进行传代。在给药前, 对细胞悬液

进行活率和浓度的测量,结果显示该细胞悬液的平均活率为92.8%,平均活细胞浓度为 4.85×10^6 cells/mL。**结果** 自实验第8天(Day 8, D8)起,SGC-7901细胞组所有雌、雄小鼠(20/20)右侧腋下可见移植瘤,坚硬有弹性且呈进行性增长;D26,对SGC-7901细胞组所有小鼠(20/20)进行人道主义安乐死。SGC-7901细胞组雌雄小鼠自第1次测量(D1)至终末解剖(D26),雌鼠移植瘤平均体积范围为 $0.836 \text{ mm}^3 \sim 858.807 \text{ mm}^3$,雄鼠平均体积范围为 $1.180 \text{ mm}^3 \sim 1025.479 \text{ mm}^3$,雌雄小鼠成瘤率均为100%。这表明SGC-7901细胞在BALB/C Nude小鼠体内具有强烈的成瘤性。此外,小鼠的体重在实验期间逐渐增长,未观察到与细胞接种直接相关的体重下降或其他明显的健康问题,这表明小鼠在对SGC-7901形成的肿瘤的生长具有较好的耐受性。肿瘤的体积随着时间的推移而增加,这与肿瘤的生物特性相符,即肿瘤细胞具有不断增殖的能力。通过大体解剖观察,确认了肿瘤的存在,这进一步验证了实验结果的可靠性。**结论** 在本试验条件下,对BALB/C Nude小鼠单次皮下注射给予SGC-7901细胞(1×10^6 cells/只)后连续观察26天。SGC-7901细胞组肿瘤发生率为100%,且肿瘤体积超过了 2000 mm^3 ,表明BALB/C Nude小鼠皮下接种人胃癌SGC-7901细胞移植瘤模型建立成功。

关键词: 成瘤试验; 移植瘤; 人胃癌SGC-7901细胞

通讯作者: 戴学栋, E-mail: daixuedong@safeglp.com

T07-0009

叶酸通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对 MNNG 诱导的食管上皮细胞增殖的保护作用

陈金, 程遂志, 聂玉红, 倪婷, 彭才婷, 刘振中*

(川北医学院公共卫生学院, 四川南充 637000)

摘要:目的 近年来,科学研究表明,N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)被视为食管癌发生的关键危险因素。PI3K/AKT/mTOR信号通路作为调控细胞增殖的核心机制,在肿瘤的形成与发展中扮演着重要角色。已有研究揭示了叶酸(FA)在抵御MNNG对食管上皮细胞损伤中的保护作用。基于此,我们推测FA可能通过调控PI3K/AKT/mTOR信号通路,抑制MNNG诱导的食管上皮细胞异常增殖。

材料与方法 本研究选取30只SPF级雌性SD大鼠,随机分为五组:对照组、25 mg/kg MNNG处理的模型组、以及3个剂量的叶酸干预组,实验周期为12周。以及选择 $2 \mu\text{mol/L}$ MNNG诱导永生化人正常食管上皮细胞系(Het-1A)细胞恶性转化。通过苏木精-伊红(H&E)染色、TUNEL染色、RT-qPCR、Western Blot和细胞克隆等技术,评估食管组织的病理学变化及相关基因和蛋白表达。

结果 体内实验结果显示,FA显著抑制了MNNG诱导的大鼠食管粘膜上皮细胞的异常增殖,并阻断了PI3K/AKT/mTOR信号通路的过度激活。在体外实验中,我们发现MNNG急性暴露24小时抑制了Het-1A的增殖能力,并伴随PI3K/AKT/mTOR信号通路的下调,而FA的补充有效缓解了这一现象。进一步地,通过MNNG诱导Het-1A细胞恶性转化建立了Het-1A-T细胞系,此过程中PI3K/AKT2/mTOR通路表现出先抑制后激活的特征。重要的是,FA能够抑制Het-1A-T恶性转化细胞的增殖及其PI3K/AKT2/mTOR信号通路的激活。此外,使用PI3K激动剂740Y-P和抑制剂LY294002的干预实验进一步证实,PI3K/AKT2/mTOR通路的激活促进了Het-1A-T细胞的增殖,而抑制该通路则抑制了细胞增殖。

结论 综上所述,补充叶酸可能通过抑制MNNG诱导的PI3K/AKT2/mTOR信号通路的激活,保护正常食管上皮细胞免受异常增殖的影响,进而预防食管癌的发生。

关键词: 叶酸; 食道; MNNG; 致癌; PI3K/AKT/mTOR信号通路

基金项目: 四川省科技厅应用基础项目(2020YJ0382); 四川省卫健委应用普及项目(19PJ199); 川北医学院博士科研启动基金项目(CBY23-QDA12)

通讯作者: 刘振中, E-mail: liuzhenzhong2004@163.com

T07-0010

从环境污染物到癌症促进剂：一项基于细胞和斑马鱼模型的四溴联苯醚 (BDE47) 在肝癌进展中的作用研究

龚兴^{1,2,†}, 谭思悦², 王少卓², 周昊杰², 耿成语², 王守林², 王超^{2*}

(1. 环境卫生科, 南京医科大学附属南京市疾病预防控制中心, 南京 210003;
2. 现代毒理学教育部重点实验室, 南京医科大学公共卫生学院, 南京 211166)

摘要:目的 2,2',4,4'-四溴联苯醚(BDE47)是一种多溴联苯醚的同系物,具有持久性、疏水性和亲脂性的特点,广泛存在于环境和生物样本中。BDE47主要影响肝脏、甲状腺和神经系统,尽管已有研究显示其具有内分泌干扰、免疫损伤和DNA损伤作用,但其与肝癌之间的关系尚不明确。本研究旨在探讨BDE47对肝癌的促进作用及其潜在的分子机制。**材料和方法** 结合环境样本中BDE47的含量,我们构建了环境相关剂量染毒HepG2细胞和KrasG12V斑马鱼肝癌模型,以明确BDE47对肝癌的促进作用。通过分析BDE47染毒后细胞和斑马鱼的转录组测序结果,我们探索了BDE47可能影响的代谢通路(如视黄醇、视黄酸等)和关键代谢相关基因(如CYP3A4或CYP3A65)。在细胞和斑马鱼模型中,我们通过补充视黄酸、敲除CYP3A4或CYP3A65进行进一步验证。通过检测 β -半乳糖苷酶、P16和P21的表达水平,我们明确了BDE47对细胞衰老的影响。此外,我们还检测SIRT1、P53的mRNA及相关蛋白质的水平,以阐明BDE47抑制细胞衰老促进肝癌进展的分子机制。**结果** (1)BDE47的暴露能够明显促进HepG2细胞的增殖、克隆、迁移和侵袭能力,也能够加快KrasG12V斑马鱼肝肿瘤的进展;(2)转录组分析发现,BDE47主要影响视黄醇代谢通路,其中关键代谢基因为CYP3A(人源CYP3A4或斑马鱼CYP3A65),关键小分子为视黄酸,进一步验证发现BDE47可诱导CYP3A4或CYP3A65的高表达,通过代谢清除作用而降低肝脏细胞或斑马鱼肝脏中视黄酸的水平;(3)在HepG2细胞和KrasG12V斑马鱼染毒模型中补充视黄酸、敲降CYP3A4或敲除CYP3A65均能抑制BDE47对肝癌的促进作用;(4)机制方面:BDE47能够明显降低肝癌细胞的衰老水平,在HepG2细胞和KrasG12V斑马鱼染毒模型中补充视黄酸、敲降CYP3A4或敲除CYP3A65均对细胞衰老具有回复作用;(5)BDE47主要通过下调视黄酸水平,增加依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)的去乙酰化酶SIRT1的表达,从而减少细胞中乙酰化P53的表达,进而减少P21蛋白表达以抑制肝癌细胞衰老。**结论** 本研究从环境和生物体内广泛存在的溴代阻燃剂BDE47入手,通过HepG2细胞和斑马鱼KrasG12V自发肝癌模型,发现BDE47对肝癌的进展具有促进作用,进一步研究发现BDE47主要通过诱导代谢酶CYP3A高表达而显著下调细胞中视黄酸水平,进而抑制肝癌细胞衰老来发挥促癌作用,本研究为阐明多溴联苯醚的健康危害及其毒作用机制提供了新的理论依据。

关键词: 2,2',4,4'-四溴联苯醚; 视黄酸代谢; 细胞色素P450酶; 细胞衰老; 肝癌

基金项目: 国家自然科学基金(82273584); 国家自然科学基金(81903353), 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目(202210312045Z); 2024年江苏省研究生科研与实践创新计划

作者简介: 龚兴, E-mail: gongxing0000@163.com

通讯作者: 王超, E-mail: wangchao@njmu.edu.cn

T07-0012

Ames 试验阳性结果的追加试验策略及案例分析

杨容*, 卢叶丹, 张瑶, 刘斌, 岑小波

(成都华西海圻医药科技有限公司, 四川 成都 610041)

摘要: 遗传毒性试验是指用于检测通过不同机制直接或间接诱导遗传学损伤的受试物的体外和体内试

验,这些试验能检测出 DNA 损伤及其损伤的固定。由于单一试验无法对所有遗传学终点进行评价,故遗传毒性试验需要以组合试验形式对受试物进行全面评价。同时标准组合试验中均应包括细菌回复突变试验(又称 Ames 试验)。

指导原则中明确提出 Ames 试验为阳性结果时,需进行充分的追加试验以评价体内致突变和潜在致癌性,除非通过恰当的风险获益分析证明是合理的。所以当 Ames 试验为阳性结果,应从以下方面来分析追加研究的策略。首先考虑阳性结果是否为供试品引起,可通过辨别供试品是否存在风险的警示结构。此外,可从含量、纯度等方面分析是否可能为杂质引起的阳性结果,可通过对除杂、掺杂样本或杂质开展 Ames 试验来判断,如果为杂质引起的阳性结果,则参考相关指导原则制定评价、控制策略。其次,如果 Ames 试验阳性结果仅见于 S9 代谢活化条件下,则应确认是否是代谢活化的原因。试验中通常使用的是大鼠经标准诱导剂诱导后制备并添加辅助因子等成分的 S9 混合物,一般比人 S9 具有更高的活化能力,因此可考虑使用人源 S9 进行重复试验。最后,以上情况都不适用时,应考虑追加其他遗传毒性试验,Ames 试验所评价的遗传学终点为基因突变,且在组合试验中是唯一能够评价基因突变的试验,因此追加试验所评价的遗传学终点应包含基因突变。在常用的遗传毒理学试验中,可以评价基因突变的试验包括哺乳动物细胞基因突变试验、果蝇伴性隐性致死试验、转基因动物致突变试验等。其中哺乳动物细胞基因突变试验是可选择试验中受试对象合适且易获得的,体外试验可以选择小鼠淋巴瘤细胞 Tk 基因突变试验,体内试验可以选择大鼠 Pig-a 基因突变试验。以上两种试验,试验周期较短,研究对象为正常哺乳动物或哺乳动物细胞,均与人体更为接近,两者相比较,体内试验对于评价在临床使用中潜在的致癌性和致突变性可能更有意义。

本机构进行的用于精神类疾病治疗的口服药物 W0000,进行了标准组合的遗传毒性试验,其中 Ames 试验为阳性,体外 CHL 细胞染色体畸变试验为阴性,小鼠骨髓微核试验为阴性。根据上述分析,进行大鼠 Pig-a 基因突变试验作为追加试验,分别在试验第 14、28 天通过流式细胞术检测成熟红细胞(Mut RBC CD⁵⁹⁺)和网织红细胞(Mut RET CD⁵⁹⁺)突变率,均未见异常,试验结果为阴性。

关键词:流式细胞术; pig-a 基因; 突变频率; Ames 试验; 遗传毒性

通讯作者:杨 容,E-mail:rongyang@glpcd.com

T07-0013

STAT3 信号通路在微囊藻毒素-LR 诱导的小鼠子宫容受性下降中的作用机制研究

庞鹏乐, 张宗鑫, 张慧珍*

(郑州大学公共卫生学院, 郑州 450001)

摘要:目的 微囊藻毒素是产毒蓝藻分泌的有害物质,广泛存在于全球各地的水体中,对人体健康造成巨大威胁。课题组前期研究表明微囊藻毒素可引起小鼠子宫损伤和胚胎着床异常,但其分子机制尚不明确。本研究旨在探究微囊藻毒素-LR(microcystin-LR, MC-LR)对小鼠子宫容受性的影响及 STAT3 信号通路在其中的分子机制。方法 40 只 8 周龄性成熟的雌鼠和雄鼠合笼获取阴道栓阳性的小鼠。将见栓雌鼠随机分为 4 组:对照组,MC-LR 组,Garcinone D 组,MC-LR + Garcinone D 组。并通过腹腔注射处理对照组(生理盐水)和 MC-LR(20 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}$ MC-LR),并以灌胃的方式提前给予 STAT3 激活剂 Garcinone D(1 $\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{bw}$)。在妊娠 5.5 天时处死小鼠并提取小鼠子宫组织。Western Blot 和 qPCR 分别检测细胞外基质降解重塑相关分子(PLAU、Serpine1、MMP9、TIMP1)、子宫容受性标志物(Hoxa10)、血管生成相关因子(VEGFA、Angpt1、Angpt4)的蛋白和 mRNA 的表达水平;免疫组织化学观察子宫组织中血管的分布情况。结果 Garcinone D 干预能显著激活 STAT3 蛋白表达,提高 p-STAT3/STAT3 比值,并增加 Angpt1、Angpt4 和 VEGFA 的表达,免疫组织化学结果观察到新生血管的分布增加。在 MC-LR 暴露组中,观察到细胞外基质成分及 TNF- α 、MMP9、TIMP1 的表达变化,以及 Hoxa10 的表达下降。结论 MC-LR 可通过抑制 STAT3

信号通路降低血管生成相关因子的表达,抑制子宫内膜血管生成和细胞外基质转变,导致子宫容受性降低。本研究表明 STAT3 在 MC-LR 诱导的子宫容受性下降中的重要作用,为理解 MC-LR 的毒性机制及开发相关防治策略提供了理论基础。

关键词:微囊藻毒素;子宫容受性;胚胎植入;血管生成

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81773384);国家自然科学基金面上项目(82073512);中原科技创新领军人才计划(244200510028)

通讯作者:张慧珍,E-mail:huihen18@126.com

T07-0014

DLK1 表观遗传重编程介导父体咖啡因暴露所致子代骨质疏松症易感

肖浩^{1,3}, 顾瀚文¹, 陈廖斌^{1,3}, 汪晖^{2,3*}

(1. 武汉大学中南医院, 湖北 武汉 430071; 2. 武汉大学基础医学院, 湖北 武汉 430071;
3. 发育源性疾病湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430071)

摘要:目的 近年来,疾病的胎儿发育起源研究逐渐被前移至配子发育阶段,成年疾病具有父系起源的现象得到证实并提出了“健康和疾病的父系起源”学说。父体孕前不良环境暴露是导致子代近期发育毒性和远期疾病易感的重要诱因,且与印记基因发生表观遗传重编程有关。然而,父体孕前咖啡因暴露(PPCE)是否会引起子代骨发育毒性及远期骨质疏松症易感?深入的表观遗传重编程机制是什么?这些科学问题至今尚未明确。方法 本研究依据人类男性在日常生活环境中可达到的咖啡因暴露剂量和大鼠生殖特点,建立 PPCE 子代大鼠模型,并结合基因敲除模式动物及体外细胞模型,明确父体孕前咖啡因暴露所致子代骨发育不良的近、远期现象及其精子印记基因表观遗传重编程机制。结果 PPCE 可致胎长骨发育不良和成年后骨量低下,且在成年期慢性应激后出现骨质疏松症表型。同时发现,PPCE 可致子代骨组织局部成脂分化增强及成骨分化抑制,且起源于胎儿发育时期。在探究其机制时,对胎骨组织进行转录组测序及 GO 功能富集分析发现,PPCE 可降低印记基因 DLK1 的表达。进一步通过全基因组 DNA 甲基化测序发现,PPCE 导致了亲代精子中 DLK1 印记控制区 IG-DMR 的甲基化水平显著降低。通过构建 DLK1 印记控制区 IG-DMR 的全身性基因敲除小鼠,发现会导致胎鼠发育不良及骨长度缩短。最后,结合体内、外干预实验证实,PPCE 引起的父体高水平糖皮质激素可活化 GR 并上调 TET2 表达,导致精子中 DLK1 印记控制区 IG-DMR 甲基化水平降低,进而引起骨髓间充质干细胞出现成脂分化增强和成骨分化抑制。结论 PPCE 可致子代长骨发育不良及成年后骨质疏松症易感,且其父系遗传机制与精子中 DLK1 印记控制区 IG-DMR 甲基化降低介导的成骨-成脂失衡有关。本研究可为早期防治父源性骨质疏松症提供新靶标和新思路,并在指导父体健康备孕和促进人口健康等方面具有重要的现实意义。

关键词:骨质疏松症;父体孕前咖啡因暴露;印记基因;表观遗传重编程;防治靶标

基金项目:国家自然科学基金联合基金重点项目(U22A201105)

通讯作者:汪晖,E-mail:Wanghui19@whu.edu.cn

T08-0001

敌草快中毒致神经系统损伤影像学表现及机制研究

王林

(中国医科大学附属盛京医院急诊科)

摘要:敌草快(diquat, DQ)是一类非选择性联吡啶类除草剂,其结构与百草枯(paraquat, PQ)相似。近

年来,随着PQ的禁止使用,作为PQ的替代品,DQ的使用越来越多,临床上DQ中毒的患者也呈爆发式增长。大剂量DQ中毒会导致脑神经系统损伤,患者临床表现为躁动,意识不清,昏迷等症状。DQ中毒患者出现脑神经系统损伤往往预示着患者的预后差,死亡率高。DQ中毒神经系统的机制尚未阐明是导致目前缺乏防治有效手段的重要因素。就目前报道病例的影像学表现看,神经系统损伤大都集中在脑干这一部位。但具体的中毒机制并不清楚,也无特效解毒剂。但已有研究显示DQ会显著降低多巴胺能神经元的活性,而脑多巴胺能神经元又主要分布在中脑,这也可能是为什么DQ中毒脑神经损伤集中在脑干这一步为的原因。虽然DQ毒性机制目前尚不完全明确,但其对神经系统的损伤是多方面的。现有的研究发现,DQ可通过氧化还原过程产生大量的氧化还原产物,对中枢神经细胞有较强的毒性作用,是导致神经系统损害的重要因素。在DQ中毒致脑神经系统损伤这一过程中,氧化应激反应,线粒体的自噬泛素化,铁死亡,细胞凋亡,神经元轴突变性,脑桥髓鞘溶解都参与其中。现就DQ中毒神经系统损伤影像学表现以及可能机制的研究进展做综述,希望以此引起大家对DQ中毒导致神经损伤的重视,为DQ中毒的机制研究提出新的思路,为制定DQ中毒治疗方案提供理论依据。并以此理论依据,尝试找出其损害机制中的治疗靶点,开发出针对性的特效解毒剂,以给予DQ中毒患者更有效的治疗,降低病死率,提高生活质量。

关键词:敌草快;中毒;神经系统;铁死亡;氧化应激

通讯作者:王林,E-mail:wanglin906731@163.com

T08-0003

β -catenin通过Neuropilin-1抑制线粒体谷胱甘肽转运分子SLC25A39介导甲苯二异氰酸酯哮喘气道炎症

黄俊文,陈颖,陈垚欣,龚钊乾,彭晓阡,谢璨灿,赵文驱,赵海金

(南方医科大学南方医院呼吸与危重症医学科慢性气道疾病实验室,510515)

摘要:目的 课题组最新的研究证实 β -catenin信号通过调控线粒体功能障碍在甲苯二异氰酸酯(TDI)激素抵抗型哮喘气道炎症中扮演重要角色。Neuropilin-1(NRP1)信号在肺部免疫调节和线粒体功能调控的作用逐渐受到关注,前期已有报道NRP1的b1结构域是2型炎症和线粒体离子转运的干预靶点,然而其调控机制尚不清楚。本研究的目的是明确NRP1的b1结构域在哮喘中的作用和调控机制,以及其与 β -catenin信号的关联。

方法和材料:使用基于分子对接技术的高通量虚拟筛选,从FDA批准的临床药物数据集中筛选出可稳定结合NRP1的b1结构域配体结合靶点的临床药物,并进行分子动力学模拟验证药物结合稳定性。建立TDI体内外哮喘模型,给予 β -catenin抑制剂(ICG-001)、NRP1的b1结构域抑制剂(EG00229)、还原型谷胱甘肽、谷胱甘肽转移酶抑制剂(GSTO-IN-2)和筛选出的临床药物进行预处理,体外使用SLC25A39过表达质粒进行转染,对气道炎症、气道反应性、谷胱甘肽代谢及线粒体功能等指标进行检测。

结果:药物筛选提示用于Raf抑制剂达拉菲尼和组胺抑制剂奥洛他定可靶向结合b1结构域,且靶向抑制NRP1的b1结构域可逆转TDI诱导的哮喘气道炎症、线粒体功能障碍,并显著逆转了TDI诱导的 β -catenin靶基因表达上调。TDI哮喘小鼠肺组织转录组学检测提示,谷胱甘肽转移酶被显著抑制,进一步检测发现,TDI暴露导致还原型谷胱甘肽减少,谷胱甘肽转移酶及谷胱甘肽氧化酶活性显著下降,线粒体内谷胱甘肽水平下降,线粒体谷胱甘肽转运分子SLC25A39被显著抑制,上述改变可被NRP1的b1结构域靶向药所逆转。为明确谷胱甘肽代谢在TDI哮喘中的作用,在人气道上皮细胞中过表达SLC25A39,发现其可逆转TDI诱导的气道上皮警报素IL-25/IL-33/TSLP的释放增加和自噬信号的激活。体内进一步使用还原型谷胱甘肽和谷胱甘肽转移酶抑制剂预处理发现,谷胱甘肽改善TDI哮喘气道炎症,而谷胱甘肽转移酶抑制剂处理无明显影响。此外, β -catenin抑制剂预处理可逆转TDI诱导的NRP1表达上调。

结论: β -catenin可能通过NRP1抑制线粒体谷胱甘肽转运分子SLC25A39介导甲苯二异氰酸酯哮喘气道炎症。

关键词: 甲苯二异氰酸酯; 哮喘; β -catenin 信号; Neuropilin-1 信号; SLC25A39; 谷胱甘肽代谢

通讯作者: 赵海金, E-mail: zhjin@smu.edu.cn

T08-0004

银纳米颗粒诱导神经毒性损伤的分子调控机制研究

杨海涛, 牛书彦, 郭孟昊, 常晓茹, 尚梦婷, 薛玉英*

(东南大学公共卫生学院环境医学工程教育部重点实验室, 南京 210009)

摘要: **目的** 深入研究银纳米颗粒(AgNPs)诱导神经毒性损伤的分子调控机制,为评估AgNPs的神经毒性效应和推动其在医疗卫生领域的安全使用提供数据支持。**方法** 利用体内(ICR小鼠)和体外(HT22和BV2细胞)模型开展实验研究。采用透射电子显微镜和纳米粒度仪对AgNPs进行表征;Morris水迷宫检测小鼠的学习记忆水平;HE染色观察小鼠神经细胞形态结构变化;透射电子显微镜检测样本细胞超微结构的改变;免疫荧光检测ROS、自噬相关蛋白、Drp1、PINK1、MAP2和p65等指标的相对表达量;试剂盒检测IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、TGF- β 和IL-10等炎症因子,GSH、LDH、MDA、GPx等氧化应激因子,以及线粒体膜电位和ATP等的表达改变;流式细胞仪检测神经细胞银离子含量、细胞凋亡水平、小胶质细胞极化状态和ROS等的表达改变;Western blot检测样本细胞中IL-1 β 、TGF- β 、iNOS和CD206等炎症指标,LC3 I、LC3 II和p62等自噬蛋白,以及PINK1、Parkin、Drp1、PI3K、AKT、mTOR、Beclin-1、Bax、Bcl-2和Caspase-3等分子信号通路蛋白的表达水平;qRT-PCR检测样本细胞中PINK1、Parkin、Drp1、PI3K、AKT、mTOR、Beclin-1、Bax、Bcl-2和Caspase-3等基因转录水平。**结果** 体内结果显示,小鼠AgNPs染毒后,学习记忆和认知功能下降,表现为游泳轨迹混乱和无目的探索行为;小鼠大脑病理改变为海马组织神经细胞核深染、核固缩,形态呈梭形。体内外结果均显示,神经细胞超微结构改变,表现为线粒体形态异常、嵴减少和自噬小泡增加;免疫荧光结果显示,神经细胞内ROS、自噬相关蛋白(LC3 II和p62等)、Drp1、PINK1、MAP2和p65等蛋白荧光强度呈剂量依赖性增加;试剂盒检测结果表明AgNPs诱导IL-1 β 和TNF- α 等促炎因子增加、IL-10和TGF- β 等抗炎因子下降、GSH和GPx等表达降低,而MDA和ROS等氧化应激指标表达升高,以及呈剂量依赖性下降的线粒体膜电位和ATP水平;流式结果指出AgNPs暴露条件下,神经细胞银离子含量升高、细胞凋亡增加和M1型小胶质细胞比例上升,且呈剂量依赖性;Western blot和qRT-PCR结果均指出,AgNPs诱导促炎指标、氧化应激指标和自噬相关指标在基因转录和翻译水平的剂量依赖性改变,并涉及ROS/Drp1、PINK1/Parkin/PGC-1 α 、PI3K/AKT/mTOR、Ca²⁺/CaMK II和NF- κ B等分子信号调控通路的激活。**结论** AgNPs可损伤小鼠的学习记忆和认知功能,并在体内外诱导神经炎症反应的发生、氧化应激损伤和自噬通路受阻,最终导致神经细胞凋亡和功能障碍。在此过程中,ROS/Drp1、PINK1/Parkin/PGC-1 α 、PI3K/AKT/mTOR、Ca²⁺/CaMK II和NF- κ B等分子信号调控通路参与AgNPs诱导的神经毒性损伤。本研究加深了AgNPs神经毒性评价的现有证据,并有助于指导其在不同领域的合理使用,特别是生物医学应用。

关键词: 银纳米颗粒; 神经毒性; 炎症反应; 氧化应激; 自噬; 细胞凋亡

基金项目: 国家自然科学基金(82273674)

通讯作者: 薛玉英, E-mail: yyxue@seu.edu.cn

T08-0005

单细胞转录组学技术揭示海马齿状回颗粒细胞在甲基汞暴露致子代大鼠认知功能障碍的作用

陈芳, 张爱华, 王文娟*

(贵州医科大学公共卫生与健康学院, 环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵州 贵阳 561113)

摘要: **目的** 甲基汞是公认的“全球性环境污染物”和持久性有机污染物,极易通过血脑屏障和胎盘屏障

进入胎儿体内,从而导致子代认知功能障碍。本研究通过模拟汞污染地区持续暴露水平及特征,采用单细胞转录组学技术探讨颗粒细胞在甲基汞暴露致子代认知功能障碍中的作用机制。**方法** 将雌鼠按体重随机分为对照组、低、中、高剂量甲基汞染毒组共4个组, Morris水迷宫、T型迷宫、新物体识别以及旷场实验评估子鼠认知功能; DMA-80检测各脏器总汞含量;核磁共振成像技术对子鼠海马组织微观结构进行测定和评价;基于单细胞测序数据分析方法, Monocle2技术构建成体神经发生轨迹图,基于基因富集分析,挖掘神经发生过程中显著变化的基因所富集的生物学过程, CellPhoneDB识别不同亚群间的复杂通讯网路。**结果** Morris水迷宫结果显示,对照组子鼠倾向于使用高认知探索策略,而甲基汞染毒组更倾向于使用扫描搜索策略和无方向重复搜索策略,空间探索结果显示,高剂量组子鼠首次穿越平台时间显著增加,而穿台次数显著降低($P < 0.05$); T型迷宫结果显示,甲基汞染毒组子鼠交替作业正确率降低($P < 0.05$);新物体识别实验结果显示,甲基汞暴露可导致子鼠新物体识别指数(DI)显著降低($P < 0.05$);旷场实验实验结果显示,与对照组相比,甲基汞染毒组子鼠活动总路程、中央区域停留时间差异无统计学意义($P > 0.05$);低、中、高剂量甲基汞暴露组子鼠脑组织汞含量显著高于对照组,且随着染毒剂量的增加,子鼠脑组织总汞含量呈浓度依赖性增加($P < 0.05$)。核磁共振成像技术发现甲基汞暴露组子鼠海马 DG 区 T2 弛豫时间显著降低($P < 0.05$);单细胞测序数据分析识别出10种不同的细胞亚群,甲基汞暴露改变 CA1, CA3 及 DG 区间的细胞通讯网络。通过伪时间排序重建出成体神经发生的发育轨迹,结果提示各细胞亚群在成体神经发生过程中存在明显的异质性。此外,研究结果显示甲基汞暴露严重影响了海马 DG 区颗粒神经元的分化过程。差异基因富集分析结果显示,颗粒细胞主要在化学神经元投射、学习记忆、神经系统发育、突触传递等信号通路中优先富集。**结论** 围产期甲基汞暴露可导致子代大鼠认知功能障碍,主要表现为物体识别记忆能力及空间学习记忆能力下降, DG 区颗粒细胞结构和功能异常可能是甲基汞暴露致子代大鼠认知功能障碍的潜在机制。

关键词: 甲基汞; 子代; 海马; 颗粒细胞; 神经发生

基金项目: 国家自然科学基金项目(82160606); 贵州医科大学优秀青年人才计划项目(2022-105)

通讯作者: 王文娟, E-mail: reality0337@126.com

T08-0006

RAGE 经组氨酸代谢驱动 mtDNA 释放参与 TDI 激素抵抗型哮喘气道炎症

陈颖, 黄俊文, 龚钊乾, 陈垚欣, 彭晓阡, 谢璨灿, 赵文驱, 赵海金*

(南方医科大学南方医院呼吸与危重症医学科慢性气道疾病实验室, 广州 510000)

摘要:目的 课题组既往研究证明晚期糖基化终末产物受体(RAGE)和线粒体功能障碍在甲苯二异氰酸酯(TDI)哮喘发病中扮演重要角色。研究表明组氨酸代谢与临床哮喘发生及炎症表型相关,但组氨酸代谢在哮喘发病中的作用机制及其与 RAGE 和线粒体功能障碍之间的调控关系仍待阐明。

材料与方法: 通过纳入多项大型临床研究的气道上皮转录组学数据,共69例健康对照,192例轻中度哮喘和197例重度哮喘,分析组氨酸代谢靶点改变。收集健康对照人群、轻中度及重度哮喘患者临床资料和诱导痰,检测诱导痰中组氨酸代谢及线粒体 DNA(mtDNA)损伤相关分子水平并分析其与临床肺功能、气道炎症等相关性。构建 TDI 哮喘模型,通过非靶向代谢组学检测小鼠肺组织代谢改变。构建 TDI 与 HDM 哮喘模型,给予高或低组氨酸饮食干预或每次致敏和激发前气道给药:FPS-ZM1(RAGE 抑制剂)、乔松素(组氨酸脱羧酶抑制剂)。评估气道反应性、气道炎症及气道上皮线粒体功能与组氨酸代谢水平等指标。

结果和结论: 转录组测序数据经数据标准化和去批次化处理后,分析提示 HDC 在轻中度哮喘患者和重度哮喘患者气道上皮中均显著升高。轻中度及重度哮喘患者诱导痰组氨酸水平均升高,且与疾病严重程度、气道阻塞及 mtDNA 损伤水平相关。与对照组相比,TDI 哮喘小鼠组氨酸代谢显著上调,其下游代谢产物谷氨酸合成增多,肌肽合成减少。在 TDI 哮喘小鼠模型中干预 RAGE 表达可逆转 TDI 诱导的组氨酸及 HDC 水平上调,而给予低组氨酸饮食或乔松素干预可缓解 TDI 诱导的气道炎症与气道高反应性,高组氨酸饮食则加重上述改变并导致明显气道上皮肿胀、脱落,HDM 哮喘模型中结果一致。蛋白印迹和 qPCR 检测共同支

持靶向干预 RAGE 表达和组氨酸代谢可通过促进下游 mtDNA 释放。总而言之,本研究表明 RAGE 通过调控组氨酸代谢促进下游 mtDNA 释放参与哮喘气道炎症,提示 RAGE 与组氨酸代谢或可成为哮喘治疗潜在靶标。

关键词: RAGE; 哮喘; 线粒体; 组氨酸; mtDNA

作者简介: 陈颖, E-mail: 757607032@qq.com

T08-0007

LW23131 对清醒 Beagle 犬心血管系统的影响试验研究

蒙飞彪, 张发福, 黄雪映, 张文强, 郭健敏, 杨威*

(广州湾区生物医药研究院, 广东莱恩医药研究院有限公司, 广东省药物非临床评价与研究重点实验室, 国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心, 广东省创新药物评价与研究工程技术研究中心, 广东 广州 510990)

摘要: **目的** LW23131 是一种具有抗炎作用的免疫调节剂, 本研究考察 LW23131 对清醒 Beagle 犬心血管系统的影响, 为其临床应用及安全性提供基础依据。 **方法** 选用适应性观察符合要求的 8 只 Beagle 犬, 雌雄各半, 随机分配到 8 个 EMKA 遥测信号发射器。试验共设 4 组, 分别为阴性对照组、LW23131 低、中、高剂量, 将 8 只动物按照均衡随机交叉设计 4 个给药周期, 相隔清洗期为 4 天。各试验组动物均采用灌胃给药, 给药容积按动物体重 5 mL/kg 计算。LW23131 低、中、高剂量组的给药剂量为 10 mg/kg、30 mg/kg、60 mg/kg, 一日单次给药, 共给药 4 轮。使用 EMKA 无创动物生理遥测仪器监测动物给药前、给药后 30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h 时间点动物的 II 导联心电、呼吸、体温、无创血压等生理数据进行统计分析。 **结果** ① 给药前各组动物临床观察均未见异常, 动物的血压、呼吸、体温、心电各项指标未见明显差异。② 给药后各组动物临床观察均未见异常; LW23131 低、中、高剂量动物给药后 30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h 时间点的收缩压、舒张压、平均压、呼吸频率、每分通气量降低、潮气量、吸气与呼气持续时间比、体温、PR 间期、心率、QRS 时程、ST 段平均电压值、T 波最大电压值、QT 间期、校正的 QT 间期 (QTcF) 等检测指标均未见具有毒理学意义的影响。 **结论** 在本研究条件下, LW23131 在 10、30、60 mg/kg 剂量下灌胃给药后对清醒 Beagle 犬心血管系统未见有毒理学意义的影响。

关键词: 心血管系统; 抗炎; 免疫调节

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

作者简介: 蒙飞彪, 专题负责人, 从事安全药理学试验研究, Tel: 13631384595, (020) 87998106, E-mail: mengfeibiao@lewwin.com.cn

通讯作者: 杨威, 教授级高级工程师/博士、博士后导师, 广州湾区生物医药研究院院长、广东省药物非临床评价与研究重点实验室主任、广东莱恩医药研究院有限公司董事长、总经理, Tel: 18928860179, (020) 87998690, E-mail: yangwei0719@163.com

LW23122 对 SD 大鼠呼吸系统的影响试验研究

蒙飞彪, 张发福, 黄雪映, 张文强, 郭健敏, 杨威*

(广州湾区生物医药研究院, 广东莱恩医药研究院有限公司, 广东省药物非临床评价与研究重点实验室, 国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心, 广东省创新药物评价与研究工程技术研究中心, 广东 广州 510990)

摘要: **目的** LW23122 是一种 PDE5 抑制剂, 本研究考察 LW23122 对 SD 大鼠呼吸系统的影响, 为其临

床应用及安全性提供基础依据。**方法** 根据SD大鼠的体重随机均衡分为5组,即空气对照组、辅料对照组、LW23122低、中、高剂量组,每组10只动物,全部雄性。各例动物均使用“精准气溶胶吸入给药系统”吸入给药,单次给药。LW23122低、中、高剂量组的吸入给药时长分别为:10 min、30 min、60 min。于给药前及给药后30min、2h、4h、24h时间点对SD大鼠呼吸功能指标进行监测。**结果** 与空气对照组或辅料对照组相比,LW23122低、中、高剂量组动物给药前、给药后30 min、2 h、4 h、24 h时间点的吸气时间(TI)、呼气时间(TE)、最大吸气量(PIF)、潮气量(TV)、松弛时间(RT)、每分钟吸气量(MV)、呼吸频率(F)、气道狭窄指数(Penh)指标均未见有显著性差异,无毒理学意义。**结论** 在本研究条件下,LW23122在吸入给药时长分别为10 min、30 min、60 min给药后对SD大鼠呼吸系统未见有毒理学意义的影响。

关键词:呼吸系统; PDE5抑制剂; 吸入给药

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

作者简介:蒙飞彪,专题负责人,从事安全药理学试验研究, Tel: 13631384595, (020)87998106, E-mail: mengfeibiao@lewin.com.cn

通讯作者:杨威,教授级高级工程师/博士、博士后导师,广州湾区生物医药研究院院长、广东省药物非临床评价与研究重点实验室主任、广东莱恩医药研究院有限公司董事长、总经理, Tel: 18928860179, (020)87998690, E-mail: yangwei0719@163.com

T08-0008

基于秀丽线虫和SH-SY5Y细胞的硅量子点致帕金森病样毒性机制研究

陈敏, 陈思远, 叶宗建, 刘珂含, 何静, 夏洁仪, 邢鹏程, 杨家富, 钱怡静, 吴添舒*
(东南大学公共卫生学院, 南京 210009)

摘要:**目的** 本研究旨在解析硅量子点(Silicon quantum dots, SiQDs)环境暴露促进帕金森病(Parkinson's Disease, PD)样损伤发生发展的调控机制。**方法** 本研究应用模式生物——秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)和经典PD细胞模型——SH-SY5Y细胞揭示SiQDs导致的PD样毒性效应,并应用MPP+诱导的秀丽线虫和细胞PD模型探索SiQDs暴露后的累积风险。**结果** SiQDs暴露导致*C. elegans*寿命缩短、DAergic神经元缺失和DAergic回路依赖性行为障碍。铁死亡抑制剂Fer-1和铁螯合剂DFOM不但能够抑制SiQDs导致的*C. elegans*体内细胞铁死亡,而且有效缓解PD样损伤。我们进一步发现SiQDs暴露导致转基因*C. elegans*品系DA2123自噬体蛋白荧光增加,自噬抑制剂3-MA和CQ预处理后,*C. elegans*体内细胞铁死亡损伤得到缓解。在SiQDs暴露的SH-SY5Y细胞上,我们同样观察到ATP含量下降、线粒体损伤、TH和 α -syn蛋白表达水平显著改变等PD样毒性效应,以及亚铁离子蓄积、GSH耗竭、脂质过氧化等铁死亡特征性改变;并且这些毒效应能够被Fer-1和DFOM有效缓解。同时,我们发现SiQDs暴露的细胞中发生一种选择性自噬——铁自噬特征性蛋白核受体辅助激活因子4(Nuclear Receptor Co-activator 4, NCOA4)表达上升、铁蛋白重链1(Ferritin Heavy Chain 1, FTH1)表达下降,自噬抑制剂预处理表明该铁自噬进一步诱发细胞铁死亡。将表达人源 α -syn蛋白的转基因*C. elegans*品系NL5901以及MPP+诱导的*C. elegans*和SH-SY5Y细胞PD模型暴露SiQDs后,PD样毒性效应均出现不同程度的加剧。最后,我们依据实验数据构建SiQDs诱发*C. elegans*和SH-SY5Y细胞PD样损伤的定性AOP框架,氧化应激、铁死亡、自噬和帕金森行为障碍是其中的关键节点。通过Bradford-Hill证据权重法证明框架中铁死亡、自噬和PD样损伤之间的合理性、科学性和重要性均具有较高的置信度后,应用效应-效应反应的非线性函数方程,定量分析AOP框架,为预测AO发生概率提供数据支持。**结论** SiQDs暴露诱发铁自噬介导的细胞铁死亡,进而导致*C. elegans*和SH-SY5Y细胞发生PD样毒性效应,并且在*C. elegans*和SH-SY5Y细胞的PD模型中表现出毒性累积风险。基于SiQDs致PD样损伤的毒性通路构建了定量AOP框架,不但为预测

AO发生概率奠定了基础,而且有效支撑量子点纳米材料健康风险评估策略的优化。

关键词:铁死亡;铁自噬;定量AOP

基金项目:国家自然科学基金项目(82373617);国家自然科学基金项目(82103884)

通讯作者:吴添舒,E-mail:ninatswu@seu.edu.cn

T08-0009

免疫细胞、血液代谢物和阿尔茨海默病之间的因果关系： 一项两步，两样本孟德尔随机化研究

李振宁^{1,2}, 李慧帅^{1,2}, 李少军^{1,2*}

(1. 广西医科大学 公共卫生学院 毒理学教研室, 南宁 530021; 2. 广西医科大学 广西高校流行病预防与控制重点实验室, 南宁 530021)

摘要:目的 本研究旨在利用孟德尔随机化法(Mendelian Randomization, MR)分析探讨免疫细胞在阿尔兹海默症(AD)中的致病作用,并探讨这种作用是否由血液代谢物介导。方法 本研究利用公开的AD、免疫细胞特征和血液代谢物的全基因组关联研究(Genome-wide association study, GWAS)汇总统计数据进行MR分析,研究731种外周免疫细胞性状、1400种血液代谢物指标与AD之间的因果关系。在本研究中首先获得免疫细胞对AD的总效应,然后分析免疫细胞对血液代谢物以及血液代谢物对AD的因果效应,接着研究潜在介质因素的中介效应。所有数据均从欧洲人群中获得,根据严格的标准选择了工具变量(IVs),使用逆方差加权法(IVW)、简单模式法(simple mode)、加权中位数法(weighted median)、加权模式法(weighted mode)和MR Egger法进行了孟德尔随机分析,并通过Cochran' Q检验、MR-Egger法、MR-PRESSO法、留一法和漏斗图进行灵敏度检验。结果 对免疫细胞性状与AD进行双向MR分析,IVW结果显示7种免疫细胞特征对AD具有保护作用,以及10种特征能增加AD发病风险;在血液代谢物与AD的MR分析中,IVW结果显示17种血液代谢物指标与AD存在关联,其中9种指标与AD发病风险增加有显著因果关系,8种指标显著降低AD发病风险,并且MR分析结果中其余MR Egger等方法结果与IVW方向一致。值得注意的是,通过中介分析表明,CD14+单核细胞表面上表达的CD33分子对AD发病的因果作用(总效应(IVW):OR = 1.03,95%CI: 1.01-1.04, $P < 0.001$)在很大程度上是由单硫酸雄烯二醇($3\beta, 17\beta$)水平介导的,中介效应为0.002(95%CI: 5.73e-5-0.003, $P = 0.042$),占总效应的6.6%。本研究的全部MR分析均未发现存在异质性和水平多效性,MR-PRESSO分析未发现明显异常值,留一法敏感性分析未发现存在SNP严重影响结果。结论 这项研究强调了免疫细胞、血液代谢物和AD之间的相互作用关系,揭示了AD发病的潜在机制。本研究结果可以为AD发病的免疫学和代谢组学提供新的见解,但仍需要进行更多的实验研究,以进一步探索更多的介质,并在不同人群中验证这些发现,为临床干预提供了新的途径。

关键词:免疫细胞;血液代谢物;阿尔兹海默症;孟德尔随机化;因果关系

基金项目:国家自然科学基金项目(82160626);国家自然科学基金项目(81803281)

通讯作者:李少军,E-mail:lishaojun0613@163.com

T08-0010

铁死亡在B[a]P/BPDE神经毒性中的作用及机制研究

何慧¹, 丁诗涵¹, 周潮丽¹, 马智瑞¹, 郑金平^{1,2*}

(1. 山西医科大学公共卫生学院, 山西太原 030001; 2. 长治医学院, 山西长治 046000)

摘要:目的 苯并[a]芘(B[a]P)是常见的环境污染物,其神经毒性的分子机制尚未完全阐明。铁死亡

是一种铁依赖的,以脂质过氧化物累积为特征的细胞死亡方式,有研究表明其可参与B[a]P诱导的细胞损伤,但铁死亡是否参与B[a]P诱导的神经系统损伤尚未可知。本研究旨在利用传统毒理学方法结合整合多组学技术揭示铁死亡在B[a]P神经毒性中的作用及机制。**方法** 动物实验:不同浓度B[a]P隔日灌胃和/或铁死亡抑制剂Ferrostatin-1隔日腹腔注射90天,水迷宫观测小鼠行为学改变,HE染色和尼氏染色观察海马组织病理结构,电镜观察海马神经元超微结构;生化试剂盒检测海马组织铁、GSH、GSH-Px活性以及MDA水平。细胞实验:不同浓度的B[a]P活性代谢产物BPDE和/或Ferrostatin-1处理HT22细胞24小时后,CCK8检测细胞存活率,电镜观察细胞超微结构,BODIPY 581/591 C11与FerroOrange荧光探针分别检测细胞内脂质ROS含量,Fe²⁺水平,试剂盒检测GSH、GSH-Px活性以及MDA水平。随后,对BPDE处理的细胞进行转录组学和蛋白质组学分析(GO和KEGG)并将差异表达基因和差异表达蛋白与铁死亡数据库(FerrDb V2)中的分子求交集得到铁死亡相关分子。将这些分子通过IPA分析进行整合并利用机器学习算法进一步分析铁死亡发生的潜在机制。**结果** 水迷宫结果表明B[a]P剂量依赖性地引起小鼠认知障碍,HE染色和尼氏染色显示B[a]P损伤海马组织,电镜结果显示B[a]P处理后小鼠海马神经元线粒体皱缩,B[a]P处理后海马组织铁和MDA水平增加,GSH、GSH-Px活性降低。Ferrostatin-1处理则可有效减轻B[a]P诱导的海马神经元铁死亡,改善认知能力。BPDE处理HT22细胞后存活率降低,细胞线粒体皱缩,细胞内脂质ROS和Fe²⁺水平升高,GSH含量与GSH-Px活性降低以及MDA水平升高。GO和KEGG结果显示BPDE显著改变HT22细胞基因和蛋白表达谱,改变类固醇生物合成、P53信号通路、癌症、胆汁分泌、ECM受体相互作用和细胞因子-细胞因子受体相互作用等通路,激活铁死亡。通过IPA分析整合组学结合机器学习算法,我们构建出涉及自噬、ATP浓度和分子转运的网络。机制上,BPDE抑制铁、氨基酸和碳水化合物的转运,降低ATP含量,增加ROS水平,促进自噬,可能导致代谢紊乱和氧化抗氧化系统失衡,最终导致铁死亡。**结论** B[a]P/BPDE诱导海马神经元铁死亡,本研究拓展了我们对B[a]P/BPDE神经毒性的认识,也为今后铁死亡的机制研究提供新思路。

关键词: 苯并芘; BPDE; 神经毒性; 铁死亡; 整合组学

通讯作者: 郑金平, E-mail: zheng_jp@sxmu.edu.cn

T08-0011

昼夜节律紊乱对小鼠抑郁样行为的影响及机制探索

孟庆贺*, 刘倩怡, 戚景博, 郝卫东*

(北京大学公共卫生学院毒理学系; 食品安全毒理学研究与评价北京市重点实验室, 北京 100191)

摘要: **目的** 流行病学研究发现轮班作业和社会时差与抑郁障碍的发病风险升高密切相关,目前诱发该类抑郁障碍的危险因素和机制尚不明确。昼夜节律紊乱是轮班作业和社会时差的共同暴露特征。本研究通过操控光照模拟轮班作业和社会时差,研究昼夜节律紊乱是否是该类抑郁障碍的危险因素并探讨昼夜节律-食欲肽通路的作用,以期对抑郁障碍的干预提供参考。**方法** 雄性C57BL/6J小鼠随机分为正常光照组(NLP)和光照紊乱组(ULP)。NLP组维持12:12 h光暗循环,ULP组每6天进行光暗/暗光循环交替,交替8次,持续54天。跑轮试验监测动物昼夜活动。蔗糖偏好试验(SPT)、悬尾试验(TST)和强迫游泳试验(FST)评价动物抑郁样行为。第8次交替后于去同步期和同步期分6个时段处死动物。ELISA方法测定血清促肾上腺皮质激素(ACTH)和褪黑素(MT)含量;qPCR方法检测核心生物钟基因转录水平的节律振荡;免疫组化法检测视交叉上核(SCN)cFOS蛋白表达的节律振荡;免疫荧光法检测外侧下丘脑(LHA)食欲素A(OX-A)、中缝背核(DRN)OX-A和5-HT蛋白表达的节律振荡。在恢复性研究中,雄性C57BL/6J小鼠分为NLP、ULP和恢复正常光照组(RLP)。实验前54天各组处理同前,RLP组与ULP组相同。随后进入32天恢复期,ULP组光照恢复至正常。恢复期前后评价动物抑郁样行为,并进行同前检测。**结果** ULP组昼夜活动周期显著延长和振幅显著下降;去同步期血清ACTH和MT节律性丧失;SCN、LHA和DRN中核心生物钟基因出现显著相移,甚至节律性丧失,动物出现昼夜节律紊乱。ULP组在TST和FST中固定不动时间显

著延长,动物出现抑郁样行为表现。ULP组 SCN^{cFOS} 在去同步期昼夜节律出现明显相移,同步期昼夜节律振幅显著下降。与NLP组相比,ULP组 LHA^{OX-A} 、 DRN^{OX-A} 和 DRN^{5-HT} 昼夜节律在去同步期相位明显改变且中值显著下调,在同步期中值仍保持下调。恢复正常光照后,小鼠在TST和FST中固定不动时间恢复至正常水平,且随昼夜节律紊乱时间延长固定不动时间明显增加,但血清CORT和MT昼夜节律紊乱持续存在;逆转 SCN^{cFOS} 昼夜节律振幅下降及 LHA^{OX-A} 、 DRN^{OX-A} 和 DRN^{5-HT} 昼夜节律中值下降。**结论** 昼夜节律紊乱可引起小鼠抑郁样行为,且随紊乱时间延长抑郁样表现加重,而恢复正常光照可部分逆转损伤效应。昼夜节律紊乱是轮班作业和社会时差相关抑郁障碍的危险因素。昼夜节律-食欲肽通路信号紊乱与下调可能在其中发挥重要作用。

关键词: 抑郁障碍;昼夜节律紊乱;视交叉上核;食欲肽A

通讯作者:孟庆贺,E-mail:qinghemeng0531@foxmail.com;郝卫东,E-mail:whao@bjmu.edu.cn

T08-0012

脑单细胞转录组学揭示百草枯暴露后帕金森病和重度抑郁症 共病相关细胞类型的特异性变化

江益华[#], 张 誉[#], 李音函, 余 真, 林新培, 郑馥荔, 胡 红, 邵文亚, 于广霞, 郭振坤, 李煌元*, 吴思英*
(福建医科大学公共卫生学院, 福州 350122)

摘要:目的 从单细胞转录组学层面研究特定细胞类型在百草枯(PQ)引起的帕金森病(PD)和重度抑郁症(MDD)共同发病中的作用,为PD与MDD共病机制研究提供新见解。材料和方法 通过腹腔注射0(生理盐水)和10 mg/kg PQ染毒,每3天一次,连续10次,构建PD伴发MDD小鼠模型;收集脑组织进行单细胞测序(scRNA-seq),并利用特征标记基因进行细胞分群和基因注释(GO, KEGG)分析;通过差异表达基因(DEG)和基因集变异分析(GSVA)筛选并量化PD、MDD及共病相关的风险基因;利用GO与KEGG评估PQ暴露后特定细胞类型在PD、MDD发病中的作用,并识别共病特异性亚群;细胞通讯与拟时序分析评估共病特异性亚群与PD特异性DA神经元、MDD特异性VGLUT2神经元的相互作用;采用随机森林法(RF)与LASSO回归识别共病枢纽基因;通过免疫荧光验证PQ暴露后小鼠脑区中特定细胞类型及共病枢纽基因蛋白表达的变化。结果 测序数据符合质控标准,纳入分析的细胞总数为42066个,降维分析显示细胞分为26个聚类,涵盖5种主要细胞类型;PD与MDD相关风险基因在星形胶质细胞和神经元中显著改变,其中星形胶质细胞是PQ暴露后共病风险基因表达变化最显著的细胞类型,主要为A1型;免疫荧光结果显示PQ暴露后小鼠黑质等4个脑区中GFAP强度显著增加;在8种星胶亚型中,共病风险基因在Astro_3中表达变化最为显著;PQ暴露后Astro_3与DA和VGLUT2神经元的相互作用减弱,神经元表现出向Astro_3的极化趋势;7个枢纽基因在PD与MDD共病诊断中具有重要作用,其中RNF7和MTCH2在PQ暴露后的星形胶质细胞中显著改变,免疫荧光结果显示RNF7和MTCH2蛋白在小鼠黑质等4个脑区表达增加,且与星形胶质细胞共定位水平增加。结论 Astro_3是与PD和MDD共病发生相关的最主要星形胶质细胞亚型,RNF7和MTCH2作为共病枢纽基因,在PQ引起PD伴发MDD暴露模型的星形胶质细胞中显著改变,提示其在PQ和MDD共病中的重要作用。

关键词:单细胞RNA测序;共病;帕金森病;重度抑郁症;百草枯

资助项目:国家自然科学基金面上项目(No.82473659, NO. 82173553)

通讯作者:吴思英、李煌元, E-mail: fmuwsy@163.com, fmulhy@163.com

T08-0013

多尺度代谢组学技术在神经科学研究中的应用进展

王潇雅, 董 霁, 彭瑞云*, 赵 黎*

(军事医学研究院辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要:代谢组学是研究生物体内代谢物的整体组合和变化规律的学科。代谢组学技术主要包括质谱分析、核磁共振、液相色谱等,检测和生物体内代谢物的种类和含量,揭示代谢通路的变化及其与疾病发生发展的关系。代谢组学研究广泛应用于基础科学和应用科学,发展迅速,特别是在生物医学方面,有助于对生物化学过程的机理理解、早期疾病诊断和人类疾病的治疗管理。多尺度代谢组技术是综合利用不同尺度的代谢组学技术,包括整体、组织、细胞及细胞器等尺度,并可以结合系统生物学和生物信息学等方法,更全面、深入地研究生物体的代谢过程。整体层面代谢组学技术具有高通量、综合性、无假设、高灵敏度和特异性等优势,适用于各种生物样品的代谢研究。组织层面代谢组学要求具有一定的生物学和医学研究背景和基础知识,理解代谢组学的原理和技术;具备相关实验技术,如取样技术、质谱技术、生物信息学分析等;需要有一定的实验设备和技术支持,如质谱仪、数据分析软件。组织层面代谢组学可以全面了解组织内代谢物谱,有助于揭示组织的生物代谢过程和疾病机理;也可以帮助理解组织在环境、营养和疾病等外部因素作用下的代谢调控机制。细胞层面代谢组学技术在代谢研究领域具有高灵敏度、高通量、精准度高、多样性和可溯源性等优势,为研究者提供了强大的工具和手段,有助于揭示细胞代谢的复杂调控机制。细胞器层面代谢组学技术能够提供高分辨率的代谢组学数据,深度解析细胞器的代谢活动,并且能在细胞器水平上分析微量的细胞器内代谢产物的组成和变化。近年来,由于神经系统对代谢的高度需求,多尺度代谢组学方法在神经科学研究中作用凸显。多尺度代谢组学可以更全面地了解大脑代谢和神经系统功能,为神经系统疾病的诊断、治疗和药物开发提供新的思路和方法。在代谢组学技术的创新和应用过程中,为了更高效地解决科学问题,代谢组学技术的交叉应用势在必行。多尺度代谢组学交互整合以及代谢组学与其他组学领域的整合应用,可提供更全面、深入地理解生物体内复杂的生物学特性,为生命科学研究和医学应用提供更多的信息和可能性。

关键词:代谢组学; 代谢组学技术; 多尺度; 神经系统

通讯作者:赵 黎, E-mail: lillyliz@163.com; 彭瑞云, E-mail: ruiyunpeng18@126.com

T08-0017

MIEF2 依赖性线粒体自噬介导 BDE47 暴露相关阿尔兹海默症样表型的可调控干预靶点

钱 波^{1,2}, 高云璐¹, 张瀚予¹, 王明珠¹, 徐文淇¹, 林育纯¹, 林忠宁^{1*}

(1. 分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室, 厦门大学公共卫生学院, 厦门 361102;

2. 桂林医学院公共卫生学院)

摘要:目的 外源化学物暴露可诱导线粒体自噬(mitophagy)相关神经细胞毒性和介导神经退行性改变(ND);已有报道线粒体自噬抑制是阿尔茨海默病(AD)的新型致病假说。我们前期研究发现2,2',4,4'-四溴二苯醚(BDE47)暴露是AD的环境风险因素;本研究旨在探索靶向线粒体自噬的激活策略调控外源物暴露相关AD的潜在靶点和干预作用。**材料和方法** 本研究构建环境水平BDE47的体内和体外暴露模型,筛查BDE47抑制神经元线粒体自噬的新信号通路和分子调控机制,并采用药物虚拟筛选技术探索小分子化合物靶向干预环境暴露相关AD的功能学作用。**结果** (1)BDE47暴露抑制神经元线粒体自噬,导致损伤线粒体积累和伴随着细胞内的铁过载。(2)利用转录组学和iLIR自噬数据库,鉴定线粒体延伸因子2(MIEF2)

是一种新型的线粒体自噬受体,在BDE47体外暴露模型中下调;MIEF2通过其LIR基序与LC3相互作用促进线粒体自噬,缓解BDE47暴露诱导的线粒体损伤;MIEF2的LIR基序突变或缺失证实其线粒体自噬调控功能障碍。(3)机制上发现MIEF2蛋白稳定性与细胞内铁稳态密切相关。BDE47诱发血红素相关性的铁超载、稳定铁稳态敏感性E3泛素连接酶F-Box和富亮氨酸重复蛋白5(FBXL5),通过特异性识别MIEF2的K7、K69、K167位点促进其泛素化降解。铁离子耗竭或FBXL5基因敲低,验证经由抑制MIEF2泛素降解可挽救BDE47暴露诱导的线粒体自噬抑制和线粒体损伤。(4)利用AD患者尸检大脑样本和AD转基因小鼠脑组织,发现MIEF2基因和蛋白表达下调,MIEF2依赖性线粒体自噬在AD中受到抑制,提示MIEF2的靶向抑制可作为AD潜在的干预靶点。(5)药物虚拟筛选发现,天然小分子激动剂(简称LinA)可与MIEF2的53、437、438氨基酸位点形成结合口袋、激活MIEF2的线粒体自噬调控功能,减轻A β 寡聚体诱导的线粒体损伤。(6)动物实验发现LinA可激活MIEF2调控的线粒体自噬、缓解AD转基因小鼠和BDE47暴露小鼠的AD样神经行为和病理损伤。**结论** MIEF2是一种新的线粒体自噬受体;阐明BDE47暴露诱发的铁稳态失衡经由激活FBXL5对MIEF2的泛素化调节、抑制MIEF2依赖性线粒体自噬、诱导损伤线粒体堆积的分子机制;筛选MIEF2激动剂LinA可经由激活线粒体自噬有效缓解AD样神经行为损伤;为探明环境外源物暴露诱导AD样神经毒性的调控机制研究和小分子靶向干预的转化毒理学应用提供了新的思路。

关键词: MIEF2; 线粒体自噬; 阿尔兹海默症; BDE47暴露; 小分子激活剂靶向干预

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82273667);国家自然科学基金面上项目(82073588)

通讯作者: 林忠宁, E-mail: linzhn@xmu.edu.cn

T08-0018

基于多组学分析研究氟致子代大鼠学习记忆能力下降的可能机制

赵倩*, 毛杰, 古丽菲娅·吐尔逊, 王妍, 苏朝霞, 郝文杰, 金宇锋, 李尚

(山西医科大学公共卫生学院, 太原 030000)

摘要: **目的** 饮水氟暴露对儿童学习记忆能力的不利影响仍不容忽视,虽然氟致发育神经毒性的可能机制已被广泛研究,但其确切机制仍未完全阐明。本研究联合多组学分析旨在探讨氟致子代大鼠学习记忆能力下降的可能机制。**材料与方法** 将6只清洁级成年SD大鼠(雌:雄=2:1)随机分为2组:对照组(饮用氟含量低于1 mg/L的水)和氟染毒组(饮用含100 mg/L氟化钠的水),自由饮水60天后,雌、雄大鼠按2:1合笼,各组受孕大鼠按照上述剂量染毒至子代大鼠断乳,各组随机选择子代大鼠6只(雌:雄=1:1)继续通过饮水接受与亲代相同的染毒处理,出生后60天结束。采用水迷宫实验检测子代大鼠的学习记忆能力;提取大鼠粪便进行16s rDNA测序技术分析肠道菌群结构;提取大鼠海马组织进行代谢组分析。**结果** 与对照组相比,氟暴露组子代大鼠到达平台的潜伏期、时间和路程明显增加,表明氟致子代大鼠学习记忆能力损伤的模型建立成功。菌群结构结果显示, β 多样性有统计学差异,说明氟暴露组子代大鼠肠道菌群结构发生明显变化,进一步分析显示,氟暴露组子代大鼠富集的优势菌为KD4_96属。代谢组结果显示,海马出现明显代谢紊乱,主要集中在5-羟色胺代谢和亚油酸代谢过程。进一步相关性分析,菌群结构的变化与差异代谢物存在密切相关性。**结论** 氟可引起子代大鼠肠道菌群结构失衡,通过“肠—脑”轴诱发海马代谢产物发生紊乱,进而导致子代大鼠学习记忆能力下降。

关键词: 氟; 学习记忆损伤; 肠道菌群; 代谢

T08-0019

高尔基体-线粒体膜接触间 O-糖酰化 COX-2 转位调节肝细胞代谢性衰老的机制研究

吴佳燊, 王磊磊, 麻昕雨, 张馨予, 魏悦悦, 林忠宁, 林育纯*

(传染病疫苗研发全国重点实验室, 分子疫苗学和分子诊断国家重点实验室, 厦门大学公共卫生学院, 厦门 361102)

摘要:目的 线粒体环氧化酶2(mtCOX-2)介导线粒体质量控制(MQC)稳态失调参与外源物暴露诱导的代谢功能障碍相关脂肪性肝病(MASLD),且可经由肝细胞胰岛素抵抗(IR)和脂肪变性诱发肝脏脂毒性损伤。高尔基体(GA)参与蛋白质糖基化修饰,O-糖酰化COX-2(O-COX-2)调节肝细胞IR在MASLD进展中的作用尚不明确。本研究旨在探讨O-COX-2经由高尔基体-线粒体(GA-mt)间的膜接触介导肝细胞IR和衰老相关损伤的调节机制。方法 采用II型糖尿病(T2DM)患者肝脏活检组织的转录组差异表达基因进行通路富集分析;老年(12月龄)小鼠进行肝脏蛋白质组学分析,联合GEO数据库中MASLD小鼠肝脏转录组学进行验证。高脂饮食联合链脲佐霉素联合诱导C57BL6/J小鼠糖尿病模型;构建HepaRG细胞源性肝脏类器官,给予棕榈酸(PA)暴露诱导IR模型;采用pc3.1-PTGS2构建COX-2高表达细胞模型;采用TEM、IHC、IF、WB及线粒体co-IP等进行GA-mt间相关指标检测。结果 (1)T2DM肝组织转录组的DEGs共同富集到GA、胰岛素信号、细胞衰老和IL-6信号通路,提示GA与肝细胞衰老和肝脏IR的关联性。(2)与对照组相比,PA组HepaRG类器官细胞中COX-2与GA和mt共定位增加,线粒体ROS和培养上清中葡萄糖水平增加,糖原合成减少;COX-2高表达组类器官中IR表型增强,提示GA-mt间COX-2分布参与肝脏IR调节。(3)与年轻组(2月龄)小鼠相比,老年组小鼠肝组织蛋白质组学富集到脂肪储存、反式高尔基体膜、线粒体功能障碍等通路;组织学检测发现GA囊泡化增加,与mt接触增多,且反式高尔基体网络(TGN)蛋白GOLPH3与线粒体外膜蛋白TOM20共定位增加,提示GA-mt膜接触通讯参与肝脏衰老进程。(4)与年轻组小鼠相比,老年组小鼠肝组织中GA差异表达蛋白中COX-2下游蛋白Ptges2富集,联合MASLD小鼠转录组数据分析富集到糖代谢、线粒体组织、膜结合细胞器、O-糖基化通路;老年组小鼠肝脏检测发现O-GlcNAc酶(OGA)表达减少,总O-GlcNAc蛋白和COX-2增加;老年组小鼠肝组织COX-2线粒体分布增加,mt-IP显示mtCOX-2的O-GlcNAc水平升高;在糖尿病小鼠模型中同步验证;提示COX-2的O-糖酰化修饰及其线粒体转位的调节参与肝脏衰老进程。结论 阐明GA-mt膜接触调节O-糖酰化COX-2线粒体转位介导肝细胞衰老相关肝脏IR的亚细胞器调控新机制,为筛查肝细胞代谢性衰老相关MASLD早期生物标志和靶向干预提供实验依据。

关键词:高尔基体-线粒体膜接触; O-糖酰化COX-2; 肝细胞代谢性衰老; 肝脏胰岛素抵抗; MASLD

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82273667);国家自然科学基金面上项目(82073588)资助

通讯作者:林育纯, E-mail: linyuch@xmu.edu.cn

T08-0020

靶向干预 PD-L1 诱导转位经由调控线粒体生物发生抑制 HBx 表达肝癌细胞增殖的体外试验研究

张瀚予, 杜泽邦, 徐文淇, 周文丹, 林忠宁, 林育纯*

(传染病疫苗研发全国重点实验室, 分子疫苗学和分子诊断国家重点实验室, 厦门大学公共卫生学院, 厦门 361102)

摘要:目的 线粒体功能调节及其靶向干预成为肿瘤研究热点,其中线粒体生物发生成为肿瘤发生发展

的内在驱动因素;课题组前期研究发现程序性死亡受体-配体1(PD-L1)诱导表达及其线粒体易位调控线粒体功能;但PD-L1对线粒体生物发生的调控机制尚未见报道。本研究旨在探讨诱导PD-L1的线粒体转位对乙型肝炎病毒(HBV)X蛋白(HBx)表达肝细胞癌(HCC)细胞中线粒体生物发生和细胞结局转归的调节作用和潜在分子机制。**材料和方法** 数据库筛查HBV相关HCC病例GEO分析;采用HBx转基因(HBx-Tg)小鼠肝脏进行转录组学分析。选取肝癌HepG2细胞及携带HBV基因组的肝癌HepG2.2.15细胞进行体外试验。检测PD-L1表达和线粒体分布;检测表征线粒体生物发生过程;检测线粒体呼吸等表征线粒体能量代谢;检测肿瘤细胞增殖表型。使用线粒体生物发生抑制剂环孢菌素(CsA)及PD-L1基因敲低、过表达质粒进行干预验证。**结果** (1)HBV相关HCC病人差异蛋白组学分析发现线粒体翻译、ATP合成等过程富集。HBx-Tg小鼠肝脏转录组学发现,线粒体生物发生相关基因*ESRRA*、*PRKAA1*等差异基因表达,提示HBV/HBx表达与线粒体生物发生存在关联性。(2)与对照组相比,HepG2-HBx细胞中线粒体生物发生相关基因*PGC1- α* 、*NRF1*、*TFAM* mRNA水平升高,线粒体DNA含量及荧光标记线粒体强度增加,提示HBx表达HCC细胞中线粒体生物发生过程上调和新生线粒体增强。CsA干预组HepG2-HBx细胞克隆团形成数量减少,EdU荧光染色强度降低,提示靶向线粒体生物发生干预可抑制细胞增殖和发挥抗HCC作用。(3)与6株无HBx表达HCC细胞相比,4株HBx表达HCC细胞中*CD274* mRNA及PD-L1表达水平无明显差异,HepG2-HBx细胞线粒体组分中PD-L1线粒体定位分布增多。(4)与对照组相比,PD-L1高表达细胞中NAD⁺含量和线粒体呼吸复合物I、IV、V活性增高、三羧酸循环关键代谢产物柠檬酸含量增高,提示线粒体代谢通量增强。(5)与对照组相比,PD-L1敲低细胞中线粒体生物发生受阻、增殖活力降低,提示PD-L1及其线粒体分布的靶向干预可抑制HBx表达HCC细胞中线粒体生物发生通路调节及其依赖性细胞增殖效应。**结论** HBx表达HCC细胞中诱导PD-L1线粒体转位可增强线粒体生物发生过程和能量代谢活化,促进肝癌细胞增殖;为进一步探明线粒体PD-L1调控线粒体生物发生的关键信号通路和分子机制、以及筛查和靶向线粒体PD-L1调控分子的联合抗肝癌增效作用提供前期实验基础。

关键词: HBx相关HCC; PD-L1线粒体转位; 线粒体生物发生; 抗HCC细胞增殖

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82273667); 国家自然科学基金面上项目(82073588)资助

通讯作者: 林育纯, E-mail: linyuch@xmu.edu.cn

T08-0021

靶向YAP/ACSL4/TRF介导的铁死亡缓解发育期DEHP暴露引起子代神经发育毒性和行为认知损伤

赵普¹, 袁泉², 马艺露¹, 梁晨¹, 耿俊红¹, 杜歌¹, 林思漫¹, 祝晓莹¹, 刘小莉¹, 王冬梅^{1*}

(1. 河南科技大学基础医学与法医学院, 洛阳 中国 471000; 2. 河南省荣康医院, 洛阳 中国 471000)

摘要:目的 邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(Di-(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP)是最常用的塑化剂,来自不同区域的流行病学、临床神经生物学以及和实验动物模型等多项平行研究表明:发育期DEHP暴露引起子代神经行为异常和认知障碍,然而具体机制尚未阐明,并且没有有效的治疗方法和策略。

方法 构建发育期DEHP暴露子代神经毒性和认知损伤模型:C57BL/6怀孕母鼠(妊娠G0)灌胃给与25mg/kg、50 mg/kg和100mg/kg低中高剂量DEHP,至子代离乳(出生后P21),雄性子代不受干扰直到成年早期(8w)。为了研究DEHP发育神经毒性机制,对子代海马组织采用高通量RNA-sequence。不同浓度DEHP作用HT-22小鼠海马神经元构建体外细胞模型,体内结合体外模型检测铁死亡相关指标(WB结合RT-PCR检测PTGS2及GPX4的表达,FeRhoNox-1检测铁离子含量,C11BODIPY581/591检测lipidROS,生化法检测MDA)。体内结合体外模型,使用铁死亡抑制剂Fer-1,检测神经行为学、神经病理学和铁死亡相关指标。TFR siRNA/ACSL4 siRNA转染HT-22神经元,检测铁死亡相关指标。YAP siRNA转染HT-22神经元,检测Hippo-YAP对TFR及ACSL4表达调控。利用体内模型,给与铁离子螯合剂DFO(100

mg/kg)和ACSL4抑制剂Rosi(30mg/kg)治疗,检测其对子代雄性小鼠神经毒性和认知损伤的改善作用。

结果 神经行为学、尼氏染色和共染突触标志物的结果显示发育期 100 mg/kg DEHP 暴露引起子代雄性小鼠的神经毒性和认知损伤,发生铁死亡。Fer-1 能够缓解 MEHP 诱导的 HT22 神经元铁死亡。RNA-seq 的结果显示铁死亡及其相关代谢通路显著激活,酰基辅酶 A 合成酶长链家族 4(ACSL4)介导的脂质过氧化和转铁蛋白受体(TFR)介导的 Fe²⁺过载在 DEHP 诱导的子代海马神经元铁死亡中发挥关键作用。与此相一致,体内和体外模型中发现 ACSL4 和 TFR 的表达均显著上调,ACSL4 si 及 TFR si 分别能够缓解 MEHP 诱导的 lipid ROS 生成和细胞内 Fe²⁺沉积,从而阻断海马神经元铁死亡。RNA-seq 发现 Hippo-YAP 信号激活,YAP si 能够阻断 MEHP 诱导 ACSL4/TFR 上调,缓解 Fe²⁺沉积和 lipid ROS 生成;而 TEAD si 能够缓解 MEHP 诱导 YAP 激活,进而缓解神经元铁死亡。Fer-1、Rosi 和 DFO 均能有效缓解 DEHP 诱发的海马神经退行性病变/突触功能障碍和子代认知损伤。

结论 发育期 DEHP 暴露激活 YAP/TEAD4,上调 ACSL4/TFR,促进 TFR 介导的 Fe²⁺过载和 ACSL4 介导的脂质过氧化,触发子代海马神经元铁死亡诱导神经退行性病变/突触失功能和认知损伤。

关键词:铁死亡;神经损伤;转铁蛋白受体;长链酰基辅酶 A 合酶 4

通讯作者:王冬梅,E-mail:wdmzgadyx@163.com

T08-0022

单细胞转录组学揭示百草枯致帕金森病样神经退行性改变中 自噬相关细胞异质性变化

张 誉,江益华,李音函,郑馥荔,胡 红,邵文亚,于广霞,郭振坤,吴思英*,李煌元*
(福建医科大学公共卫生学院,福州 350122)

摘要:目的 自噬损伤是帕金森病(PD)的重要病理机制之一,然而,PD 中自噬相关的细胞异质性变化尚不明确。本研究旨在利用单细胞转录组学技术,探索百草枯(PQ)诱导 PD 进程中与自噬最紧密相关的神经细胞类型,并描绘其亚型相关的异质性变化。同时,揭示自噬特异性细胞亚型在 PQ 致 PD 样病变中的调控机制,为理解 PQ 诱导的自噬相关变化提供理论支撑。

材料与方法 依据前期研究,构建 PD 样病变小鼠模型,即 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,腹腔注射 PQ(10 mg/kg,每隔两天一次,共 10 次)进行染毒。收集脑组织进行单细胞测序(scRNA-seq),随后对全脑细胞进行分群和聚类分析。利用 GO 富集和基因集变异分析(GSVA)筛选出自噬相关变化最显著的细胞类型,并进一步鉴定其亚型异质性。通过拟时序分析和细胞间互作网络,揭示各亚型的关联及基因调控机制,并在体内、外模型中验证亚型相关变化。确认自噬调控的关键细胞亚型,并在细胞模型中验证其在 PQ 诱导的自噬障碍中的调控作用。

结果 成功建立了 PQ 诱导的 PD 样神经退行性病变模型,并确认 PQ 处理引发了自噬损伤。单细胞测序结果显示,PQ 暴露后的小鼠脑细胞可分为 5 种主要类型。GO 富集分析指出,PQ 暴露后,自噬相关信号通路主要在小胶质细胞中表达;GSVA 分析进一步表明,PQ 暴露显著改变了小胶质细胞的自噬相关基因表达,因此,小胶质细胞是 PQ 诱导的 PD 样病变中与自噬变化最相关的神经细胞类型。深入分析发现,PQ 暴露后的小胶质细胞可分为三个亚型,这些亚型在基因表达、生物学功能及自噬调控上展现出显著的异质性。PQ 暴露诱导了这些亚型间的遗传转录变化,影响了它们在免疫应答和能量代谢中的功能。特别地,我们识别出一种以选择性表达 Inpp5d 为特征的小胶质细胞亚型,在 PQ 暴露模型中对自噬相关变化起主要调控作用。基因敲低和过表达实验证实,自噬亚型标志基因 Inpp5d 在 PQ 诱导的 BV2 细胞自噬损伤中发挥了关键调控作用。

结论 本研究构建了首个 PQ 暴露后与自噬相关的单细胞转录图谱,突出了不同小胶质细胞亚型的异质性,并强调了自噬特异性小胶质细胞亚型在 PQ 诱导的 PD 样病变中的核心调控作用。

关键词:单细胞测序;百草枯;帕金森病;自噬;细胞异质性

基金项目:国基自然科学基金面上项目(82173553)

作者简介:张 誉, E-mail: yuzhang961104@163.com

通讯作者:李煌元, E-mail: fmulhy@163.com, 吴思英, E-mail: fmuwsy@163.com

T08-0023

新型芳基有机磷酸酯类阻燃剂磷酸甲苯二苯酯(CDP)对斑马鱼幼鱼的神经发育毒作用及分子机制研究

谭思悦[†], 李春锦, 王少卓, 周昊杰, 耿成语, 赵育质, 王守林, 王 超*

(现代毒理学教育部重点实验室, 生殖医学与子代健康全国重点实验室, 南京医科大学公共卫生学院, 南京 211166)

摘要:目的 随着多氯联苯和溴代阻燃剂的限制使用,有机磷酸酯类阻燃剂(OPFRs)的使用量逐渐增加。近年来,OPFRs已在空气、灰尘、水等多种环境介质以及人体血液、尿液和母乳中被广泛检测到,并被证实为一种新兴的环境污染物。由于其化学结构的差异,OPFRs可分为卤代OPFRs、烷基OPFRs和芳基OPFRs。磷酸甲苯二苯酯(CDP)是一种芳基OPFRs,作为一类“新型”OPFRs,目前对其生态风险和人类健康影响的报道相对有限,其神经毒性和作用机制尚未明确。因此,本研究旨在评估CDP的急性毒性,并探索其在斑马鱼中神经发育毒性的分子机制。【材料和方法】我们以斑马鱼为模式生物,将其胚胎暴露于9种代表性OPFRs,浓度分别为0.1 μM 、1 μM 、10 μM 、100 μM 、1000 μM ,以0.1%DMSO为溶剂对照,至受精后120小时(120hpf),统计死亡率、孵化率、畸形率,并计算半数致死浓度(LC50),比较不同取代基团的毒性大小,并记录畸形形态。我们将野生型斑马鱼胚胎及转基因斑马鱼Tg(huc:eGFP)和Tg(hb9:eGFP)分别暴露于0 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ CDP,至受精后120小时(120hpf),统计死亡率、孵化率、畸形率等一般毒性指标,并检测乙酰胆碱酯酶(AchE)活性、分别观察泛神经与运动神经发育状况、进行行为学评价和神经发育相关基因表达分析。最后,对120hpf的染毒斑马鱼进行蛋白组学和代谢组学联合分析,通过KEGG富集分析和代谢通路分析探索其可能的毒作用机制。**结果** (1)在不同取代基团的OPFRs中,芳基OPFRs对斑马鱼幼鱼的急性毒性最强,其中3种代表性芳基OPFRs的半数致死浓度分别为CDP(1.252 μM)、TPHP(1.261 μM)和TCP(1.269 μM)。(2)因此,我们进一步评估了CDP的毒性,发现它能够抑制斑马鱼孵化,导致畸形(如卵黄囊水肿、心包水肿和脊柱弯曲),甚至死亡,并且能够剂量依赖性地降低斑马鱼幼鱼的运动能力。CDP还显著抑制了AchE活性,降低了泛神经和周围神经系统的荧光表达,这表明神经发育受到了损害。(3)蛋白组学和代谢组学分析揭示,CDP主要影响了斑马鱼的糖脂代谢,导致代谢异常,这可能引起细胞内ATP含量显著下降,进而导致凋亡。主要的代谢途径是柠檬酸循环(TCA循环),它导致了磷酸烯醇丙酮酸和醋酸盐的显著减少,以及柠檬酸、丙酮酸、琥珀酸、还原型辅酶I和辅酶I含量的显著增加。**结论** 芳基有机磷阻燃剂磷酸甲苯二苯酯(CDP)对斑马鱼幼鱼具有神经发育毒性,其作用机制可能涉及糖脂代谢异常和柠檬酸循环(TCA循环)的紊乱,具体下游分子机制尚待进一步研究,本研究的结果可为有机磷酸酯类阻燃剂的健康风险评估提供新的依据和技术支持。

关键词:有机磷酸酯类阻燃剂;磷酸甲苯二苯酯;神经发育毒性;蛋白组学;代谢组学

基金项目:国家自然科学基金(82273584);国家自然科学基金(81903353);江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目(202210312045Z);2024年江苏省研究生科研与实践创新计划

作者简介:谭思悦, E-mail: tansiyue2023@163.com

通讯作者:王 超, E-mail: wangchao@njmu.edu.cn

T08-0024

基于空间代谢组学的斑蝥素致小鼠肾脏原位肾损伤靶标及毒理机制

张建永*

(遵义医科大学药学院, 贵州 遵义 563000)

摘要:背景 斑蝥素(Cantharidin,CTD)是临床天然抗肿瘤化合物,但由于临床应用过程中易引起急性肾损伤(acute kidney injury,AKI)而受到限制。然而,其导致AKI的精准部位及深层机制尚不清楚。方法 采用常规毒效学评价方法检测小鼠CTD(1.5 mg/kg)灌胃后3天的血肌酐(SCr)和血尿素氮(BUN)水平。首先采用超高效液相色谱-质谱联用技术脂质组学方法检测CTD暴露后小鼠的脂质紊乱情况;进一步空间代谢组学分析检测脂质代谢物的肾脏空间分布。整合分析揭示CTD所致肾脏脂质空间紊乱机制,并通过靶向含量测定及CCK-8法等对关键脂质进行生物学功能验证。结果 CTD诱导的AKI小鼠肾脏SCr、BUN水平升高,HE染色发现肾小管细胞坏死,表现出急性肾小管坏死特征。脂质组学显示CTD暴露后,232种差异脂质代谢物及甘油磷脂(GP)和鞘脂(SL)代谢等11种途径受到干扰。空间代谢组学显示,55种空间差异脂质代谢物和9种代谢途径受到干扰。整合分析发现,GP代谢在肾皮质和肾髓质激活,SL代谢在肾皮质受到抑制。上调的(LysoPC(18:2(9Z,12Z)))、LysoPC(16:0/0:0)、甘油胆碱和下调的鞘磷脂(SM)(d18:0/16:0)、SM(d18:1/24:0)和SM d42:1是主要的毒性脂质。其中,CTD组LysoPC(16:0/0:0)水平显著升高,含量为1.1196 $\mu\text{g/mL}$,且体外实验证明其可加重了CTD诱导的人肾小管上皮HK-2细胞肾损伤。分子对接提示CTD与LPCAT和CEPT1具有良好的结合性。结论 CTD可通过激活肾皮质和肾髓质GP代谢及抑制SL代谢诱导ATN导致肾损伤,其中LysoPC(16:0/0:0)、LPCAT及CEPT1分别是关键代谢物和潜在靶点。

关键词:斑蝥素;急性肾损伤;毒性脂质代谢物;毒性靶标;毒理机制

通讯作者:张建永,E-mail:zhangjianyong2006@126.com

T08-0025

分子伴侣介导的ACSL4自噬性降解在褪黑素对BDE-47暴露诱导的神经元铁死亡以及神经元毒性中的作用研究

袁 泉¹, 赵 普², 耿俊红², 杜 歌², 林思漫², 祝晓莹¹, 刘小莉², 王冬梅^{2*}

(1. 河南省荣康医院, 洛阳 中国 471000; 2. 河南科技大学基础医学与法医学院, 洛阳 中国 471000)

摘要:目的 2,2',4,4'-四溴联苯醚(BDE-47)是环境和生物样本中最常见的多溴联苯醚(PBDEs),最近研究表明,脂质过氧化介导的铁死亡参与BDE-47暴露诱导的神经毒性和认知功能障碍。褪黑素具有强效的抗铁死亡作用,对神经退行性疾病具有神经保护作用。因此,本研究旨在探讨褪黑素是否能通过抑制铁死亡来减轻BDE-47暴露引起的认知障碍,并进一步阐明其潜在机制。材料和方法 C57BL/6J小鼠连续灌胃8w BDE-47(20 mg/kg)构建BDE-47暴露诱导的神经毒性和认知损伤模型,使用褪黑素(20 mg/kg)经腹腔注射给与BDE-47处理的小鼠,通过Morris水迷宫、Y迷宫、NOR及开放旷场的行为学实验检测小鼠认知功能,Nissl染色检测海马神经退行性病变,免疫荧光共染(PSD95和Synaptophysin)检测突触功能。BDE-47(80 μM)作用HT-22小鼠海马神经元给与褪黑素(20 μM 治疗)构建体外细胞模型。通过抽提溶酶体检测溶酶体内ACSL4的表达。体内结合体外模型检测铁死亡相关指标(WB检测PTGS2,GPX4以及ACSL4的表达,FeRhoNox-1检测 Fe^{2+} 含量,C11BODIPY581/591检测LipidROS,生化法检测MDA和GSH)。LAMP2a siRNA/Nrf2 siRNA转染HT-22神经元,通过WB结合免疫荧光检测LAMP2a与Nrf2的表达,同时检测铁死亡相关指标。利用体内模型,给与分子伴侣介导的自噬(CMA)激活剂AR7(10 mg/kg),ACSL4抑制剂RSG(100 mg/kg)进行干预,检测其对小鼠神经毒性和认知损伤的改善作用。结果 行为学、

尼氏染色以及突触功能检测结果表明褪黑素能够缓解BDE-47暴露诱导的小鼠突触功能障碍和认知功能损伤,有效抑制BDE-47暴露诱导的铁死亡(表现为与BDE-47模型比,PTGS2蛋白表达下调,GPX4蛋白表达上调,GSH水平升高,MDA和Fe²⁺含量下降)。ACSL4介导的脂质过氧化在神经元铁死亡中发挥关键作用,在BDE-47暴露下显著升高,褪黑素治疗可抑制体内外ACSL4的升高,但ACSL4 mRNA水平没有明显差异,研究发现只有溶酶体抑制剂Chloroquine,而非蛋白酶抑制剂MG132能够消除褪黑素对BDE-47诱导的ACSL4上调的有益作用。分离溶酶体,褪黑素能够抑制BDE-47作用下ACSL4在溶酶体中含量的减少,LAMP2a si消除了褪黑素对BDE-47处理的HT-22细胞中ACSL4清除的积极作用。此外,褪黑素激活Nrf2有助于提高LAMP2a的表达和CMA活性促进溶酶体ACSL4的降解,Nrf2 si逆转了褪黑素的积极作用。AR7和RSG均能有效缓解BDE-47暴露诱导的小鼠海马认知损伤。**结论** 褪黑素可通过Nrf2-CMA促进ACSL4降解,抑制BDE-47诱发的海马神经元铁死亡,缓解认知功能障碍。

关键词: BDE-47; 褪黑素; 伴侣介导的自噬; 铁死亡; 认知功能障碍

通讯作者: 王冬梅, E-mail: wdmzgadyx@163.com

T08-0026

Intergenerational neurotoxicity of polystyrene nanoplastics in offspring mice is mediated by dysfunction of the microbe-gut-brain axis

Xing Li, Hao Qiu*

(School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Nanoplastics (NPs) are ubiquitous in daily life, posing potential risks to the environment and human. While their negative effects on parental organisms have been extensively studied, intergenerational effects are still in the early stages of investigation. Here, we aimed to explore how maternal exposure to polystyrene NPs (PSNPs) affects neurotoxicity mediated by the microbe-gut-brain axis in offspring mice. Maternal PSNPs exposure significantly increased brain TNF- α level and microglia by 1.43 and 1.48 folds respectively, compared to control, accompanied by nuclear pyknosis and cell vacuolization in cortex and hippocampus. Targeted neurotransmitter metabolomics analysis revealed dysregulation in dopamine and serotonin metabolism. Specifically, dopamine levels increased significantly from 0.007 ng/L to 0.015 ng/L, while N-acetylserotonin and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid decreased significantly from 0.002 and 0.929 ng/L to 0.001 and 0.680 ng/L, respectively. Through a combination of 16S rRNA sequencing and biochemical analysis, we discovered that maternal PSNPs exposure led to a depletion of anti-inflammatory bacteria and an enrichment of pro-inflammatory bacteria resulting in intestinal barrier damage, elevated levels of lipopolysaccharide in blood, and subsequent activation of neuroinflammation. Meanwhile, gut bacteria dysbiosis interfered with communication between gut and brain by dysregulating neurotransmitter synthesis, as evidenced by significant associations between neurotransmitter-related bacteria (*Akkermansia*, Family_XIII_AD3011_group, *Lachnoclostridium*) and dopamine/serotonin related metabolites. Furthermore, transcriptional alterations in dopamine and serotonin related pathways were observed in the enteric nervous system, suggesting abnormal signal transduction from gut to brain contributes to neurotoxicity. This study provides new insights into NPs-induced neurotoxicity within the context of microbe-gut-brain axis and highlights the risk of cerebral dysfunction in offspring with maternal NPs exposure.

Key words: Nanoplastics; Intergenerational toxicity; Metabolite; Gut microbe

Corresponding author: Hao Qiu, E-mail: haoqiu@sjtu.edu.cn

T08-0027

基于网络药毒学与分子对接技术探讨米酵菌酸引起肝损伤的作用机制

吴丽娟^{1,2}, 秦亦如¹, 王海兰¹, 张 骁^{1*}

(1. 广东省职业病防治院, 广东 广州 510300; 2. 山西医科大学公共卫生学院, 山西 太原 030001)

摘要:目的 米酵菌酸(bongkrekic acid, BA)是一种由椰毒假单胞菌亚种产生的毒素,可引起食物中毒,致死率高。BA中毒可引起肝肾损伤,甚至全身多器官功能衰竭。本文通过网络毒理学结合分子对接技术探讨BA引起肝损伤的分子靶点和作用机制。方法 基于多个数据库收集BA与肝损害靶点,建立BA对肝损害靶点的预测网络,将共同靶点提交至STRING数据库,采用Cytoscape软件分析连通度,对排序前20的基因进行基因本体(GO)功能分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,对获取的靶点进行分子对接,研究BA对肝损伤的作用机制。结果 从数据库获取了286个与BA相关的靶点,6019个与肝损害相关的靶点,236个BA与肝损害的共同靶点。GO功能分析显示,这些靶点与2587个通路相关;KEGG通路富集分析显示了181个相关通路。分子对接结果显示,BA与表皮生长因子受体(EGFR)、非受体酪氨酸激酶(SRC)、AKT 丝氨酸/苏氨酸激酶 1(AKT1)、B细胞淋巴瘤-2(BCL2)、热休克蛋白90AB1(HSP90AB1)、E1A结合蛋白p300(EP300)、雌激素受体1(ESR1)、缺氧诱导因子亚基 α (HIF1A)、磷脂酰肌醇4,5-二磷酸3-激酶催化亚基 α (PIK3CA)、丝裂原活化蛋白激酶1(MAPK1)等靶点均具有良好的结合能力。结论 BA是一种线粒体毒素,能抑制线粒体膜上的腺嘌呤核苷酸转运体(ANT),然而其对肝损伤的作用可能是通过多靶点及多通路共同实现的;BA可能通过与核心靶点EGFR、SRC、AKT1、HSP90AB1、HIF1A和MAPK1等靶点的结合,参与调节MAPK、PI3K-Akt、TNF等信号通路,进而引起肝损伤。

关键词:米酵菌酸;肝损伤;网络毒理学;分子对接;靶点;信号通路

通讯作者:张 骁,副主任医师,E-mail:342616247@qq.com

T08-0028

NLRP3炎症小体在N,N-二甲基甲酰胺致小鼠急性肝损伤中的作用研究

张秀凝, 曾 涛*

(山东大学齐鲁医学院公共卫生学院卫生毒理学系, 山东 济南 250012)

摘要:目的 研究NLRP3炎症小体在N,N-二甲基甲酰胺(DMF)诱导的小鼠急性肝损伤中的作用。

材料和方法 SPF级雄性C57BL/6小鼠灌胃2.0 g/kg bw DMF建立急性DMF肝中毒小鼠模型,检测NLRP3炎症小体通路关键分子的表达、NLRP3炎症小体抑制剂及敲除*Nlrp3*和*Nfe2l2*对DMF诱导的小鼠急性肝损伤的影响、以及巨噬细胞清除剂氯膦酸二钠脂质体对DMF肝毒性的拮抗作用。体外实验以小鼠来源的正常肝细胞AML12细胞和过表达ASC的小鼠巨噬细胞RAW264.7细胞(ASC-RAW264.7)为研究对象,观察DMF对两种细胞炎症小体通路的影响以及其相互作用。采用HE和免疫组化技术观察肝损伤和炎症细胞浸润情况;通过全自动生化仪和ELISA试剂盒测定血清转氨酶活性和炎症因子水平;通过RNA-SEQ检测差异基因表达和相关信号通路富集情况;通过GC和LC-MS测定尿液和血液中DMF代谢物的水平和变化趋势;Western Blot、qPCR和免疫荧光技术检测相关分子的蛋白和mRNA表达。

结果 (1)与对照组相比,DMF染毒组小鼠血清转氨酶活性和肿瘤坏死因子 α (TNF α)水平均显著增加($P<0.05$);HE染色可见DMF染毒组小鼠肝组织出现明显损伤和炎症细胞浸润;RNA-SEQ结果表明DMF染毒组小鼠肝组织免疫相关信号通路显著富集,炎症相关基因表达上调($P<0.05$);此外,DMF染毒组小鼠肝脏NLRP3信号通路活化及肝脏巨噬细胞标记物F4/80的表达水平显著增加($P<0.05$)。(2)NLRP3炎症小体抑制剂MCC950和Dapansutrile预处理以及敲除*Nlrp3*均可显著抑制DMF诱导的小鼠急性肝损伤、炎症细胞浸润以及NLRP3炎症小体的激活。(3)敲除*Nef2l2*可以显著加重DMF诱导的小鼠肝脏损伤、氧化应

激及 NLRP3 炎性小体激活。(4)清除肝脏巨噬细胞可以显著减轻 DMF 诱导的小鼠肝损伤及肝脏 NLRP3 炎性小体的激活。(5)DMF 染毒不能引起 AML12 肝细胞和 ASC-RAW264.7 巨噬细胞炎性小体活化,但 DMF 染毒肝细胞条件培养基可以诱导 ASC-RAW264.7 细胞激活。(6)程序性坏死抑制剂可以显著抑制 DMF 诱导的 AML12 细胞死亡及小鼠肝损伤。

结论 NLRP3 炎性小体通路活化是急性 DMF 肝中毒的主要原因,其激活机制可能与 DMF 引起的肝细胞的程序性坏死有关。

关键词: N,N-二甲基甲酰胺; NLRP3 炎性小体; 巨噬细胞; 程序性坏死

作者简介:张秀凝,E-mail:zxning1128@163.com

通讯作者:曾涛,E-mail:zengtao@sdu.edu.cn

T08-0029

高低分子量透明质酸失衡在 PM 及组分致肺部炎症中的作用研究

摘要:**目的** 本研究旨在探讨大气颗粒物(PM)对呼吸系统炎症的影响,特别是高分子量透明质酸(HMW-HA)与低分子量透明质酸(LMW-HA)失衡在 PM 及其组分诱导肺部炎症中的关键作用。**方法** 研究以北京市某全寄宿小学 9-12 岁儿童空气净化器交叉干预研究为基础,采用非靶向暴露组学结合中介效应分析,筛查出与儿童呼出气冷凝液(EBC)中小分子量透明质酸关联最强的前三种 PM 组分。随后,使用 PM1 标准颗粒物及关键组分,结合 HA 抑制剂,在大鼠中确证高低分子量透明质酸失衡在 PM 及组分致肺部炎症中的关键性作用。大鼠实验设置低(150 ng/kg/次)、中(750 ng/kg/次)、高(3750 ng/kg/次)三种剂量组及空白对照组,并设置 4-MU 干预组(50 ng/kg),每组 30 只,每隔 2 天进行气雾滴注一次。于首次染毒后 1、4、7、14、28 天分批检测肺功能指标,并取 BALF、血、肺组织进行 HA 及相关指标检测。采用 ELISA 和免疫组化等手段收集大鼠炎症指标和高分子量透明质酸表达量等数据。**结果** 人群研究中,通过非靶向暴露组学检测,筛查出 276 个与 EBC 中 LMW-HA 关联的 PM 组分,关联最强的三种组分为 13H-二苯并[a,i]咔唑(CAS 号:239-64-5)、邻苯二甲醛(CAS 号:643-79-8)、可替宁(CAS 号:486-56-6)。在大鼠实验中,PM1 染毒后 16 项肺功能指标随时间的增加均出现不同程度下降,BALF 中的 HA 浓度显著上升,尤其是 LMW-HA 的表达水平较高。4-MU 干预能显著降低所有剂量组中 HA 的浓度,尤其是血清中的 HA 浓度。**结论** PM 暴露可引起急性呼吸道通气功能障碍,并随时间推移加重;4-MU 能部分缓解 PM 对大鼠通气功能的有害影响。PM1 短期暴露对肺部 HA 水平影响较大,BALF 中的 HA 浓度能更好反映肺部状况。4-MU 无法完全抑制 HA 的表达,提示需要发现更多关键调控靶点,以全面探究 PM 引起的肺部炎症及损伤。PM 暴露促进 HA 大量生成,并导致 HMW-HA 与 LMW-HA 比例失衡。

T08-0030

通过心脏超声分析 SW001 对犬心脏结构和功能的影响

曹海娟,向发,郭伟,陈波,岑小波*

(成都华西海圻医药科技有限公司,四川省成都市 610200)

摘要:心脏超声即超声心动图,是一种检测心脏及主要动、静脉结构与功能的无创诊疗技术,具有无创、可重复性好、可动态观察、无辐射、便携等特点,广泛应用于药物的临床前和临床研究中。在临床前研究中,心脏超声可显著减少实验动物的使用,更符合动物福利的要求,常用于伴随一般毒性试验开展的心血管安全药理试验中;通过检测给药前后心脏主要结构及血流动力学指标的改变,并结合心电图、临床病理学、组织病理学综合评估受试物潜在的心血管毒性。

目的 SW001为选择性心肌 β 肌球蛋白抑制剂,通过抑制心肌肌原纤维收缩蛋白的相互作用,减少心肌肌原纤维的收缩力,从而改善心脏的舒张和收缩功能,临床用于治疗肥厚型心肌病;而心脏超声是临床检测心脏功能的最优方式。因此,本试验在GLP条件下使用便携式心脏彩超仪检测SW001多次经口灌胃Beagle犬后对心脏结构和功能的影响,为临床使用的安全性提供参考。

方法 本试验选取14只Beagle犬,随机分为对照组及SW00010、30、100 mg/kg组;对照组2只,SW00010、30、100 mg/kg组各4只,均为雌雄各半。各组犬均按5 mL/kg的体积经口灌胃生理盐水或相应浓度的SW00010、30、100 mg/kg组犬。每天给药1次,连续给药14天。给药前及末次给药后1小时,使用经验证的便携式心脏彩超仪检测左心功能指标,包括舒张末期容量(EDV)、收缩末期容量(ESV)、射血分数(EF)、缩短分数(FS)、每搏输出量(SV)、心输出量(CO)、舒张末期内径(LVD)、舒张末期内径(LVD)。

结果 末次给药后1小时,100 mg/kg组犬射血分数与给药前相比升高、心输出量增加。除此之外,SW00010、30、100 mg/kg组犬舒张末期容量、收缩末期容量、缩短分数、每搏输出量、舒张末期内径、舒张末期内径等其余指标均未见明显异常改变。

结论 在本试验条件下,经口灌胃10、30、100 mg/kg的SW001 14天,100 mg/kg组犬可见射血分数升高、心输出量增加,这与心肌 β 肌球蛋白抑制剂减轻心肌的收缩、改善舒张功能、增加心输出量的药理作用一致。以上结果表明,具有相关专业背景及资质的人员使用已验证的心脏彩超仪能够及时、准确的监测到药物引起的相应改变,为在GLP条件下评价受试物对心脏功能的影响提供了更加高效、可靠的选择。

作者简介:曹海娟,E-mail:haijuancao@glpcd.com

通讯作者:岑小波,E-mail:xbcen@glpcd.com

T08-0031

转基因小鼠经鼻暴露某抗体偶联吸入干粉制剂的重复给药毒性研究

卢叶丹*, 张 瑶, 刘 斌, 岑小波

(成都华西海圻医药科技有限公司, 四川 成都 610041)

摘要:目的 抗体偶联药物(Antibody-Drug Conjugate, ADC)由单克隆抗体通过连接子装载小分子药物精准的将药物递送至表达抗药的细胞,临床多为静脉给药用于抗肿瘤治疗,该类ADC药物的非临床安全性评价现已积累大量的研究经验。本机构开展了某非抗肿瘤的ADC药物W0001经鼻暴露的非临床安全性评价。结合本品的ADC药物特点和经鼻暴露的特殊给药途径,试验设计和实施时需考虑的方面包括:在伴随毒代考察时,除经呼吸道吸收的药物外,会因动物舔舐毛发或固定筒等存在少量经口摄入、胃肠道吸收的药物,大分子可能因消化液而分解,游离小分子则经代谢吸收,因此ADC、总抗与小分子药物在毒代特点上可能存在差异;可能因环境气溶胶的污染,需对动物采血操作时接触的器械、容器进行特殊防护;肺组织中会有较高的药物暴露水平,需关注可能引起的炎性反应;吸入给药途径相较于其他药途径更容易产生抗药抗体,需关注抗药抗体的产生。

方法 280只hIL-4/hIL-4R α 小鼠随机分为对照组和W0001 0.67、1.50、13.88 mg/kg组,各组小鼠每天1次经鼻暴露30分钟的洁净空气或W0001给药制剂,连续给药4周。每次给药时均检测气溶胶浓度,每周检测1次气溶胶粒径,每周测定2次体重、摄食量,给药结束时检测血液学、血生化、免疫球蛋白、抗药抗体,对外周血和肺泡灌洗液的细胞因子进行检测。首、末次给药,检测外周血和肺组织中小分子、ADC和总抗浓度。

结果 给药期间,W0001各剂量组气溶胶浓度分别为0.019、0.049、0.447 mg/L,总体均匀、稳定,气溶胶空气动力学质量中位径(mass median aerodynamic diameter, MMAD)均在5 μ m以内,几何标准偏差(geometric standard deviation, GSD)均在2以内。

W0001高剂量组小鼠主要见体重降低,WBC轻度降低,其余各组小鼠未见明显异常。首、末次给药后,ADC、总抗、小分子药物浓度和肺组织药物浓度均随剂量增加而增加,无性别差异和明显蓄积,未检出抗药抗体。

结论 hIL-4/hIL-4R α 小鼠每天给药1次,连续4周经鼻暴露0.67、1.50、13.88 mg/kg的W0001,其无毒性反应剂量(NOEL)为13.88 mg/kg,其主要表现为小分子药物的毒性特征。

关键词:转基因小鼠;抗体偶联药物;吸入制剂

通讯作者:卢叶丹,E-mail:yedanlu@glpcd.com

T08-0032

慢性环丙沙星暴露诱导大脑类器官细胞周期紊乱和线粒体损伤的机制研究

刘哈晓雨,卜迁,岑小波*

(四川大学华西医院国家成都新药安全性评价中心,成都 610041)

摘要:目的 环丙沙星(Ciprofloxacin, CPMX)是第三代喹诺酮类药物,具有广谱抗菌活性和良好的杀菌作用,作为经典抗生素药物广泛应用于临床和畜牧业。研究表明,CPMX能够引发人神经系统不良反应。由于传统神经细胞模型的局限性,难以全面表征CPMX对人中枢神经系统的毒性效应及其机制。人脑类器官在结构和功能上与人类大脑相似,能够重现人脑的结构和神经功能特征,为研究药物神经毒性提供了理想模型。本研究应用3D人大脑类器官研究CPMX的神经发育毒性及其机制,为解析CPMX中枢神经临床不良反应提供实验证据,也为CPMX神经毒性的防治和减少其临床不良反应提供支撑。

材料和方法:前期研究发现20 μ M CPMX(临床口服环丙沙星后患者脑组织药物浓度)对人干细胞分化的大脑类器官神经分化过程和线粒体功能产生了显著的影响,主要包括干扰皮质的神经细胞类型及分布和线粒体功能紊乱。本研究通过42天/70天大脑类器官在20 μ M CPMX中连续处理14天后,应用免疫荧光、流式细胞术等分子生物学实验对大脑类器官细胞类型及线粒体相关功能指标进行检测;通过转录组、蛋白免疫印迹、实时荧光定量PCR等探究CPMX神经毒性分子机制;并经过小鼠原代神经元MEA等进行机制体外验证,深入探讨CPMX产生神经毒性的可能机制。

结果:(1)CPMX诱导大脑类器官细胞异常凋亡,诱导有丝分裂细胞G0/G1期停滞;CPMX显著改变大脑类器官中神经祖细胞分裂方式,使得其由垂直分裂向水平分裂转化,减少处于增殖状态的神经祖细胞,并促进其向中间神经前体细胞分化,从而扰乱皮质分层和神经元网络平衡;CPMX促使大脑类器官中线粒体功能紊乱,导致活性氧生成增加,线粒体膜电位降低,细胞有氧呼吸显著增强等。(2)CPMX处理后成熟期脑类器官差异基因富集到癫痫、睡眠障碍、偏头痛等神经疾病通路,与CPMX临床患者产生的神经不良反应相高度一致;除此之外,测序结果分析募集到关键基因叉头框G1(Forkhead box G1, FOXG1),FOXG1在CPMX处理后大脑类器官中表达显著降低。(3)FOXG1表达降低诱导小鼠原代神经元线粒体融合、聚集,活性氧生成增加,线粒体膜电位降低,总ATP产生增加;触发小鼠原代神经元的异常电生理活动。阿司匹林能够保持小鼠原代神经元的线粒体形态与功能稳定,并在一定程度上缓解CPMX引发的电生理活动异常。

结论:CPMX可能通过降低大脑类器官转录因子FOXG1表达,改变线粒体形态功能,重塑细胞能量代谢,从而影响神经细胞的发育进程,诱发神经元电信号异常活跃;阿司匹林能够缓解CPMX引起的神经毒性。

关键词:大脑类器官;环丙沙星;神经毒性;线粒体;FOXG1

通讯作者:岑小波,E-mail:xbcen@scu.edu.cn

T08-0033

肠道菌群结构变化:稀土元素引发宿主靶器官代谢紊乱和健康影响的潜在途径

付卓众,何尔凯*

(华东师范大学地理科学学院,地理信息科学教育部重点实验室,中国上海 200241)

摘要:研究背景与研究目的:稀土矿开采不仅造成了严重的稀土环境污染问题和生态系统破坏,还可通

过食物链对人体健康产生潜在风险。进入人体的稀土元素到达胃肠道后能够通过血液传递,在头发、肝脏、肾脏、脾脏等靶器官中累积,当超过一定的阈值时对人体健康产生直接影响,例如损害肝肾功能等。此外,肠道微生物与宿主健康有着密切的联系,其产生的小分子代谢物能够到达器官,作为微生物与宿主交流的典型机制,并且肠道微生物的组成和功能失调也会影响宿主健康。已有研究发现污染物暴露能够引发宿主肠道微生物紊乱,然而,关于稀土通过干扰肠道微生物从而诱发器官损伤并对宿主健康产生影响的间接作用仍亟待进一步探究。因此,本研究以真实稀土污染土壤和水体为暴露介质,聚焦稀土长期口食暴露情境下在小鼠体内的富集特性、引发的毒性效应机制以及肠道微生物在肝脏/肾脏毒性中的介导作用。

主要研究方法:选用6-8周龄C57BL/6N雌性小鼠,以稀土矿区污染土壤和河水开展毒性暴露;使用USEPA 3050B方法消解电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS/ICP-OES)测定稀土含量;采用H&E染色对小鼠肝脏、肾脏进行组织病理检查;采用UPLC-QTOF质谱法对肝脏和肾脏代谢物进行分析;使用16S rRNA测序技术对肠道菌群结构进行分析;使用graphpad 9.5.0、R 4.0进行数据分析。

主要研究结果:不同时间稀土暴露后,各处理组肝脏中均有稀土显著累积,并发现大部分稀土可以通过粪便排出体外;稀土暴露对小鼠肝脏和肾脏的损伤随着时间增加而加重,主要表现为细胞炎症和氧化损伤;稀土暴露后肝脏和肾脏的氨基酸代谢、能量代谢、炎症因子与氧化应激相关代谢通路受到明显扰动,肝脏代谢物变化呈时间依赖性增强;食物来源摄入稀土显著改变了肠道菌群的结构,其中与脂质代谢和能量代谢密切相关的两个门——Firmicutes与Bacteroidota相对丰度的比值显著升高;器官代谢物与肠道微生物相关性网络分析和热图分析结果表明,肠道微生物紊乱对肾脏代谢影响更显著,肠道微生物与氨基酸代谢、能量代谢、氧化应激相关代谢物显著相关。

结论:综上,长期稀土口食暴露会导致稀土元素会累积在宿主体内靶器官中,造成肝脏、肾脏炎症反应和氧化损伤;肠道微生物稳态受到扰乱会进一步引发肝脏、肾脏代谢变化,从而产生间接影响。

关键词:稀土元素;肠道微生物;代谢物;肠-肝轴;肠-肾轴

通讯作者:何尔凯, E-mail: ekhe@geo.ecnu.edu.cn

T08-0034

孕哺期暴露环境浓度毒死蜱对子代神经行为的影响

韦庆好, 宋妹妹, 周姣姣, 游明丹*

(贵州医科大学公共卫生与健康学院, 贵阳 550025)

摘要:目的 研究孕哺期暴露环境浓度毒死蜱(Chlorpyrifos, CPF)对子代神经行为的影响,并探讨可能机制。材料和方法 将交配成功的母鼠随机分到Ctrl组、0.2 mg/kg CPF组、1 mg/kg CPF组、5 mg/kg CPF组。孕哺期暴露相应浓度CPF玉米油溶液,于出生后(Postnatal day, PN)24、28、32、36、40和41天进行理毛、T迷宫、埋珠、三箱、旷场、强迫游泳和悬尾实验。于PN43取仔鼠海马组织,Western Blot方法检测仔鼠海马组织中转录因子EB(Transcription factor EB, TFEB)、瞬时受体电位通道M2(Transient receptor potential melastatin 2, TRPM2)、小胶质细胞标记蛋白、神经炎症标志蛋白、自噬-溶酶体相关蛋白表达。透射电镜观察突触后致密物厚度、突触后致密物宽度、突触活性区长度和突触间隙宽度等突触的超微结构。结果 在理毛、T迷宫和埋珠实验中,CPF仔鼠自我理毛时间、重复进入同一臂次数及埋珠的数量明显多于Ctrl组($P < 0.05$)。社交行为实验显示,Ctrl组仔鼠在陌生鼠1(Stranger1, S1)所在房间的停留时间明显多于在空线杯(Empty, E)所在房间的停留时间($P < 0.05$),而CPF暴露导致子代在S1室停留时间减少,在空笼子房间的停留时间增加($P < 0.05$);社会新奇偏好测试实验表明,CPF组仔鼠在陌生小鼠2(Stranger2, S2)室的停留时间明显少于在S1室($P < 0.05$)。旷场实验结果显示CPF暴露组静止不动时间明显低于Ctrl组($P < 0.05$)。此外,在强迫游泳实验中,CPF组仔鼠不动时间显著长于Ctrl组($P < 0.05$)。悬尾实验结果显示0.2 mg/kg CPF暴露组仔鼠不动时间明显长于Ctrl组($P < 0.05$)。Western Blot结果显示,与Ctrl组相

比, CPF组仔鼠海马 TRPM2 蛋白表达水平升高($P < 0.05$), 1 和 5 mg/kg CPF 组仔鼠海马的 TFEB 蛋白表达水平降低($P < 0.05$); 同时, CPF 组海马组织中 Iba1、iNOS、TSPO 蛋白较 Ctrl 组表达升高($P < 0.05$), 而 CD206 表达水平降低($P < 0.05$); CPF 组自噬相关蛋白 LC3II/I 的相对表达量、Atg5 和 Beclin1 表达水平较 Ctrl 组增加($P < 0.05$), 自噬-溶酶体相关蛋白 P62 和 Ubiquitin 蛋白表达水平升高($P < 0.05$), 而 STX17 表达水平降低($P < 0.05$); 另外, CPF 组溶酶体相关蛋白 LAMP1、LAMP2、CTSB 和 CTSD 的表达水平与 Ctrl 组相比降低($P < 0.05$)。透射电镜结果显示, 与 Ctrl 组相比, CPF 组突触活性区长度和突触间隙宽度无显著性差异($P > 0.05$), 突触后致密物厚度降低($P < 0.05$), 5 mg/kg CPF 组突触后致密物质的宽度与 Ctrl 组相比降低($P < 0.05$)。结论 神经发育期 CPF 暴露引起小胶质细胞炎性激活, 导致小鼠自闭症和抑郁样行为, 其机制可能与小胶质细胞 TRPM2/TFEB 调控的自噬-溶酶体通路障碍有关。

关键词: 毒死蜱; 神经行为; TRPM2; TFEB; 自噬-溶酶体通路

基金项目: 国家自然科学基金(82304096); 国家自然科学基金(82260630); 贵州医科大学优秀青年人才(2023/108); 贵州省自然科学基金(ZK [2022]396); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(KY [2022]217)

通讯作者: 游明丹, E-mail: mdyou_gzmu@outlook.com

T08-0035

高脂饮食加重丙烯酰胺暴露小鼠的运动功能障碍及机制研究

强亚龙[#], 宋福永^{*}

(山东大学齐鲁医学院公共卫生学院卫生毒理系, 山东 济南 250012)

摘要:目的 随着人们生活水平的提高和膳食模式的改变, 肥胖已成为一个全球性公共卫生问题, 高脂饮食(HFD)是诱导肥胖的主要原因之一。丙烯酰胺(ACR)是一种常见的工业原料, 也作为食品加工中的副产物广泛存在于各类食品中。在现实生活中, 人们往往面临 HFD 与 ACR 摄入共存的情况。然而, HFD 是否加重 ACR 暴露引起的神经系统损伤尚未见报道。本研究拟通过建立动物模型, 观察 HFD 与 ACR 联合作用对小鼠运动功能的影响, 检测脊髓线粒体损伤、炎症反应、运动神经元的程序性坏死和轴突损伤的情况, 以此探讨肥胖/HFD 和 ACR 联合暴露引起神经损伤的潜在分子机制。

方法:① 建模。选用 C57BL/6N 小鼠, 随机分为对照组、HFD 组、ACR 组和 HFD+ACR 组($n=15$)。② 神经损伤研究。利用神经行为学评价神经损伤; 组织病理、透射电镜、免疫荧光、TUNEL 染色评价神经元丢失、轴突损伤和神经炎症; WB、免疫荧光检测促轴突变性因子、Necroptosis 和 neuroinflammation 相关蛋白的表达及分布。③ 线粒体损伤研究。利用透射电镜、WB、免疫荧光、ROS、RT-qPCR 观察线粒体形态、动力学、线粒体呼吸链亚基复合物、ROS 产生、mtDNA 释放到细胞质中的含量。④ 线粒体损伤的机制研究。WB 和免疫荧光检测 TDP43 在细胞质和线粒体的表达及分布, 以及钙蛋白酶(calpain)和 CDK5 相关蛋白的表达及分布。

结果:① ACR 和 HFD 联合暴露后加重小鼠的运动功能障碍。② 联合暴露加重运动神经元丢失和轴突变性, Necroptosis 通路激活, 轴突变性因子 SARM1 表达上调。③ 联合暴露后小胶质细胞和星形胶质细胞过度激活, NF- κ B 和 cGAS-STING 通路激活, NLRP3 炎性小体水平上调。④ 联合暴露后诱导线粒体过度分裂, 线粒体肿胀、空泡化严重, 线粒体呼吸链亚基复合物减少, ROS 产生增加, 细胞质中的 mtDNA 含量增加。⑤ 联合暴露促进 TDP43 在线粒体和细胞质中的蛋白水平增加, 加重线粒体损伤进而激活线粒体未折叠蛋白反应(UPRmt); 通过 calpain/CDK5/Drp1 通路促进线粒体过度分裂。

结论:① HFD 和 ACR 联合暴露加剧 TDP43 在线粒体的蓄积和 calpain/CDK5/Drp1 信号通路的激活, 进而加重线粒体损伤。② HFD 加重 ACR 暴露小鼠脊髓运动神经元程序性坏死和 SARM1 介导的轴突变性, 伴随着神经炎症反应, 加剧脊髓神经元损伤和丢失。

关键词:丙烯酰胺;高脂饮食;线粒体损伤;神经炎症;程序性坏死;轴突变性

项目资助:国家自然科学基金(82173552);国家自然科学基金(81673209)

作者简介:强亚龙,E-mail:202116399@mail.sdu.edu.cn

通讯作者:宋福永,E-mail:fysong3707@sdu.edu.cn

T08-0036

FUNDC2调控线粒体动力学失衡介导铁死亡发生在抗结核药物治疗诱导结核病小鼠肝损伤中的作用

陈文彦¹,游明丹¹,黄俊飞²,刘泳廷²,吴长艳²,朱凯²,杨光红^{1,2*}

(1. 贵州医科大学公共卫生与健康学院,环境污染与疾病监控教育部重点实验,贵阳 550025;

2. 贵州省疾病预防控制中心,贵阳 550004)

摘要:目的 抗结核药物性肝损伤(ATB-DILI)是结核病临床治疗过程中最为常见且严重的不良反应。近年来研究发现,铁死亡与ATB-DILI的发生密切相关,但具体机制尚未阐明。基于此,本研究建立抗结核药物治疗结核病小鼠诱导肝损伤模型,初步探讨FUNDC2调控线粒体动力学失衡介导铁死亡在抗结核药物治疗诱导结核病小鼠肝损伤中的作用机制,为ATB-DILI的有效预防、治疗与干预提供研究靶点和理论依据。**方法** 本研究在生物安全三级动物实验室(ABSL-3)建立结核分枝杆菌染毒小鼠模型,将6-8周年龄,雌性C57BL/6小鼠随机分为4组,分别为空白对照组(Ctrl)、结核感染组(TBI)、结核感染治疗组(TBT)及抗结核药物对照组(ATD)。TBI组和TBT组小鼠采用滴鼻的方式感染结核分枝杆菌标准株H37Rv(1×10^5 CFU/20 μ L),Ctrl组和ATD组给予等量生理盐水。在结核分枝杆菌染毒小鼠模型成功建立的基础上,第29 d给予TBT组和ATD组小鼠抗结核药物(INH 50 mg/kg +RFP 100 mg/kg),连续灌胃7天,灌胃体积为10 mL/kg。染毒结束后,采用赖式比色法检测小鼠血清中ALT、AST、ALP及TBIL水平;HE染色和普鲁士蓝染色观察肝脏病理损伤及铁离子沉积情况;免疫印迹法检测小鼠肝脏组织中FUNDC2、线粒体动力学相关指标(Drp1、MFN2)及铁死亡相关分子标志物(Ptgs2、GPX4及SLC25A11)蛋白表达水平。**结果** (1)与Ctrl组相比,TBI组小鼠血清ALT、AST、ALP及TBIL含量均无明显变化;TBT组与ATD组含量明显升高,以TBT组更为明显($P < 0.05$)。(2)HE染色和普鲁士蓝染色结果显示,Ctrl组与TBI组小鼠肝小叶结构正常,肝细胞成索状排列,较少铁离子沉积,TBT组与ATD组可见小鼠肝组织出现炎性细胞浸润,铁离子沉积明显增多,其中TBT组更为明显。(3)TBT组与ATD组小鼠肝脏组织FUNDC2、Fis1蛋白表达水平相较Ctrl组明显升高,MFN2、Ptgs2、GPX4及SLC25A11蛋白表达水平明显降低,尤以TBT组中变化更明显($P < 0.05$)。**结论** 抗结核药物可能通过上调FUNDC2的表达诱导线粒体动力学失衡,进而促进抗结核药物治疗小鼠肝脏铁死亡发生。

关键词:抗结核药物;肝损伤;铁死亡;线粒体动力学失衡;FUNDC2

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82273698);贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gz-wkj2021-420)

通讯作者:杨光红,E-mail:280446859@qq.com

T08-0037

CDK5介导线粒体损伤在1-溴丙烷诱导神经元死亡中的作用及机制

宋铭雪,赵秀兰*

(山东大学公共卫生学院,山东 济南 250012)

摘要:目的 1-溴丙烷(1-BP)不仅是一种职业毒物,其日常生活暴露同样值得关注。神经系统是1-BP

最敏感的靶器官,1-BP 职业暴露可导致中枢神经系统和周围神经系统损伤。我们前期研究显示 1-BP 低剂量暴露可导致实验动物认知功能障碍,但分子机制尚未明确。神经元高表达细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 5(CDK5),病理刺激可引起 CDK5 激活,并通过调控线粒体分裂-融合过程,参与神经元程序性细胞死亡。本研究以线粒体损伤为切入点,探讨 1-BP 诱导神经元死亡中 CDK5 激活与程序性坏死信号通路之间的机制联系,以期阐明 1-BP 诱导神经元死亡的可能机制,为环境神经毒物导致的中毒性神经病的防治提供新靶点。

材料和方法 ① 1-BP 致认知功能障碍剂量效应关系:选用 C57 小鼠建立 1-BP 染毒模型,采用旷场实验和新物体识别试验评价认知功能,免疫组化观察各组动物海马神经元丢失情况。透射电镜观察海马神经元线粒体、突触及死亡情况,Western blot 检测程序性坏死相关蛋白的改变,并采用免疫双荧光进一步确认神经元损伤。② 抑制 CDK5 对 1-BP 致体外培养神经元损伤的逆转作用:利用 1-BP 活性代谢产物 1-溴 2-丙醇(1-B-2-P)处理 N2a 神经细胞,小分子抑制剂抑制 CDK5 活性,采用荧光染色观察对细胞线粒体结构和功能的影响,同时利用 WB 检测 Drp1 表达及其磷酸化程度,以及程序性坏死通路关键蛋白的变化。③ 敲除 Cdk5 对 1-BP 致小鼠神经损伤的逆转作用:利用 Cre-loxp 技术制备神经元 Cdk5 条件敲除小鼠,评价和比较野生型小鼠 CDK5-Drp1 信号通路和程序性坏死通路关键分子的变化。

结果 ① 1-BP 暴露激活小鼠海马组织中 CDK5 信号通路,进而过度磷酸化 Drp1,引起线粒体损伤,导致神经元程序性坏死。② 体外培养 N2a 细胞暴露 1-B-2-P 同时抑制 CDK5 活性,Drp1 Ser616 位点磷酸化水平降低,线粒体片段化现象与细胞程序性坏死程度显著改善。③ 神经元条件敲除 Cdk5 可抑制线粒体过度分裂,缓解神经元程序性坏死,改善 1-BP 染毒所致的小鼠认知障碍。

结论 1-BP 暴露激活神经细胞中的 CDK5/Drp1 信号轴,诱导线粒体损伤,激活程序性坏死,引起认知功能障碍;采用药物或基因手段干预 CDK5 活性可减轻 1-BP 诱导的线粒体损伤,抑制神经元程序性坏死。

作者简介:宋铭雪,2021 级博士研究生,研究方向:神经毒理学。

通讯作者:赵秀兰,E-mail:zhao.xl@sdu.edu.cn

T08-0038

纳米塑料诱导小胶质细胞激活介导小鼠认知功能障碍

单姗,赵秀兰*

(山东大学,济南 250012)

摘要:目的 微塑料是全球范围广泛分布的环境污染物,近年来在多种人类样本中发现微塑料的存在,体内体外研究中显示了微塑料和纳米级塑料颗粒的多器官和系统毒性。啮齿动物经口摄入微塑料导致中枢神经系统(CNS)炎症以及认知功能障碍。近几十年来慢性神经退行性疾病的发病率持续升高,给社会带来了巨大的公共卫生和经济负担,认知功能障碍是渐进性发展的神经退行性疾病的典型特征。鉴于人类不可避免地暴露于微塑料污染,深入探讨微塑料诱导 CNS 炎症,以及在认知功能障碍发生中的作用及其潜在机制,对慢性神经退行性疾病的有效防控至关重要。

材料和方法 前期研究显示聚苯乙烯纳米塑料(PS-NPs)可透过血脑屏障进入大脑,本研究首先体外观察了大脑小胶质细胞对 PS-NPs 的吞噬作用。8 周龄成年雄性 C57BL/6J 小鼠短期暴露 PS-NPs,停止暴露后持续喂养至中年期。结果 小胶质细胞经多种途径内化 PS-NPs,进入细胞内的 PS-NPs 无法完全清除。RNA-seq 分析显示,PS-NPs 暴露小胶质细胞可导致神经元活力下降,并与神经元突触功能改变及细胞死亡通路相关。暴露于 PS-NPs 的小鼠在中年期发生认知功能障碍,伴随焦虑水平增加。病理形态学显示大脑小胶质细胞 M1 极化和 A1 反应性星形胶质细胞形成,神经元和突触受损。进一步观察到小胶质细胞分泌的 C1q 沉积神经元突触增加、小胶质细胞对 PSD 95 吞噬增加。小鼠提前给予米诺环素,能明显减轻 PS-NPs 暴露导致的脑内小胶质细胞激活、星形胶质细胞 A1 形成和神经元损伤,以及 PS-NPs 引起的小胶质细胞对神经元突触的过度吞噬。

结论 PS-NPs 可经多种途径进入小胶质细胞,并导致炎症反应;小鼠暴露 PS-NPs 可形成持续进展的脑内炎症,导致中年小鼠认知功能障碍,抑制小胶质细胞激活有效减轻 PS-NPs 导致的大脑炎症及突触损伤。

关键词: 纳米塑料;小胶质细胞;神经毒性;认知功能障碍

通讯作者: 赵秀兰, E-mail: zhao.xl@sdu.edu.cn

T08-0039

环境暴露因素对抑郁症神经环路和神经可塑性的调控机制

李音函, 张 誉, 马 颖, 程佳玘, 江益华, 郑馥荔, 胡 红, 邵文亚, 于广霞, 郭振坤, 吴思英*, 李煌元*
(福建医科大学公共卫生学院, 福州 350122)

摘要:目的 探讨环境暴露因素(如百草枯和夜间蓝光)对抑郁症发生的影响及其作用机制。具体而言,通过深入分析百草枯对丘脑室旁核(PVT)VGLuT2 神经元亚群及其神经环路的影响,以及夜间蓝光通过干扰外侧缰核(LHb)乳酸释放对神经可塑性的调控,旨在揭示环境因素在抑郁样行为发生中的神经环路及神经可塑性调控相关的致病机制。

材料与方法:在百草枯暴露实验中,采用 C57BL/6 小鼠建立百草枯致抑郁模型,利用空间转录组定位和表征 PVT 中 VGLuT2 神经元亚群的分布;采用化学遗传学调控 VGLuT2 神经元及其投射的神经环路,评估特定神经环路在抑郁发生中的调控作用。夜间蓝光暴露实验中,结合人群调查和动物实验分析睡眠期蓝光暴露与抑郁症状的关系;代谢组学检测 LHb 中乳酸水平;利用钙离子成像、高尔基染色及透射电镜等技术,探究乳酸对 NMDAR 信号通路及 LHb 神经可塑性的调控作用。

结果:百草枯暴露可选择性激活 PVT 中 VGLuT2 阳性的神经元亚群,加剧 PVTVGLuT2 神经元激活引起的抑郁样行为改变。神经投射示踪技术揭示了 PVTVGLuT2 神经元与中央杏仁核(CeA)构建的神经环路联系。激活 PVTVGLuT2-CeA 神经环路可诱导小鼠出现抑郁样行为变化,而抑制该神经环路可缓解抑郁症状。夜间蓝光暴露与抑郁样行为呈正相关;蓝光暴露可诱导 LHb 脑区乳酸水平升高,进一步激活 NMDAR 受体及其下游信号分子,最终干扰 LHb 神经元活性,并损害神经可塑性,而乳酸抑制剂可预防蓝光暴露导致的抑郁样行为。

结论:百草枯和夜间蓝光暴露与抑郁发病密切相关,其发病机制呈现脑区异质性改变,涉及神经环路、神经可塑性的调节障碍和神经活性异常。本研究为进一步理解环境暴露因素对抑郁症发生的影响提供了实验基础,并为特异性的预防和干预策略提供了理论依据。

关键词: 百草枯;蓝光;抑郁;神经环路;神经可塑性;脑区异质性

基金项目: 国基自然科学基金面上项目(82173553)

通讯作者: 李煌元, E-mail: fmulhy@163.com; 吴思英, E-mail: fmuwsy@163.com

T08-0040

基于时间序列的转录组学探讨母体砷暴露对子代小鼠肺损伤的作用

朱 凯, 张爱华*, 王文娟*

(贵州医科大学环境污染与疾病监控教育部重点实验室、公共卫生与健康学院, 贵阳 561113)

摘要:目的 砷是广泛存在于自然界的类金属元素,长期砷暴露可引起多器官损伤,其中肺是主要靶器官之一。生命早期是肺发育的关键时期,宫内暴露于各种污染物可影响子代肺发育,并增加肺结构和功能异常的风险。因此,本研究通过建立母体砷暴露小鼠模型,旨在探讨宫内砷暴露对子代肺损伤作用及潜在机制。

方法 选择健康SPF级ICR小鼠36只(雌:雄=2:1),按雌雄比2:1配对合笼喂养;自观察到阴栓(E0.5)之日起,采用不同剂量NaAsO(0 ppm、0.5 ppm、5 ppm、50 ppm)以自由饮水的方式进行染毒,染毒时间为E0.5至子代小鼠出生后1天(PND1),分别采集小鼠器官发育关键期E15.5胎鼠及出生后一天(PND1)PND14仔鼠肺组织;HE染色观察肺病理改变, Illumina测序技术进行肺组织转录组学测序。

结果 HE染色结果显示,与对照组(0 ppm)相比, E15.5、PND1及PND14三个阶段,砷染毒组胎鼠/仔鼠肺部均呈不同程度损伤,主要表现为肺部炎性细胞浸润增加、肺气肿、出血等;肺组织转录组时间节点胎鼠/仔鼠基因表达谱存在显著差异;进一步通过GO富集分析发现,差异基因CAVIN4、CALCA、HIF3A、MEG3等与肺泡发育、血管生成密切相关,与对照组相比,砷染毒组(E15.5、PND1)仔鼠肺组织中表达显著降低,提示妊娠期砷暴露可导致子代肺发育在器官形成期受阻,此外,与对照组相比,砷染毒组胚胎发育及肺泡发育相关基因MEG3在E15.5、PND14表达均显著降低,表明妊娠期砷暴露对子代肺发育造成的损伤可能会从胚胎期持续至出生后。。

结论 宫内砷暴露可引起子代肺损伤,其机制可能是通过抑制CAVIN4、CALCA、HIF3A、MEG3等基因的表达,从而引起胚胎及肺泡发育异常,且该影响可能会持续到出生后。

关键词:砷;肺损伤;宫内;子代;转录组

资助项目:国家自然科学基金(82273679, 81872569);

通讯作者:王文娟, E-mail: wangwenjuan@gmc.edu.cn

T08-0041

PPAR γ 介导的小胶质细胞炎性极化促进丁草胺诱导的血脑屏障损伤

姜馥薇, 陈明山, 王嘉欣, 刘 硕, 朱洪美, 石宇生, 赵 一, 李金龙*

(东北农业大学动物医学学院, 黑龙江省哈尔滨市 150030)

摘要:目的 农药残留是最常见的环境污染之一,可能对作物生产、食品安全以及动物和人类健康造成损害。近年来,丁草胺被广泛用作除草剂,其可引起神经系统的健康问题和神经炎症。血脑屏障(BBB)是中枢神经系统(CNS)和血液之间的动态界面,神经炎症可导致BBB损伤。过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ)作为一种配体激活的核受体,对神经和血脑屏障具有保护作用。本研究旨在探讨PPAR- γ 在丁草胺诱导的神经炎症和BBB损伤中的作用。

材料与方法:本研究的体内试验部分以21日龄的雄性ICR小鼠为受试对象,随机分成2组:空白对照以及丁草胺组,灌胃处理28天后,检测小鼠行为学、大脑形态结构、紧密连接蛋白相关指标、NF- κ B通路相关指标、HMGB1相关指标以及小胶质细胞极化相关指标的改变。本试验的体外部分以小鼠小胶质细胞系(BV2细胞)及小鼠脑微血管内皮细胞系(bEND3细胞)为研究对象,首先将BV2细胞分为4组:对照组、PPAR- γ 激活剂组、丁草胺组以及丁草胺加PPAR- γ 激活剂组,分别检测BV2细胞结构和功能的变化。此外,对BV2细胞进行外泌体提取,并刺激bEND3细胞,建立体外血脑屏障模型,检测紧密连接蛋白相关指标及血脑屏障通透性。

结果:体内试验表明,丁草胺暴露诱导小鼠大脑小胶质细胞超微结构损伤(小胶质细胞内空泡增加、线粒体嵴和膜消失、空泡增加),并引起小鼠抑郁、降低小鼠的记忆力和平衡力;大脑紧密连接蛋白、NF- κ B及HMGB1通路相关指标以及小胶质细胞极化相关指标水平改变。体外试验表明,丁草胺诱导BV2细胞活率下降,超微结构损伤,NF- κ B及HMGB1通路相关指标以及小胶质细胞极化相关指标水平改变,而PPAR- γ 激活剂组明显改善了这些现象。此外,通过建立体外血脑屏障模型发现,丁草胺暴露导致小胶质细胞极化,改变了血脑屏障通透性及紧密连接蛋白相关指标水平。

结论:丁草胺暴露可通过促进小胶质细胞炎性极化诱导小鼠血脑屏障损伤,降低紧密连接蛋白相关指标的表达,增加促炎因子的表达,引起小鼠小胶质细胞结构和功能受损。激活 PPAR- γ 可以通过调节小胶质细胞极化,抑制炎性因子的表达,减少丁草胺诱导的血脑屏障损伤。本研究为丁草胺引起的神经毒性以及 PPAR- γ 对大脑的保护作用提供了新的见解,为 PPAR 作为神经保护靶点提供了理论依据。

关键词:丁草胺;血脑屏障;小胶质细胞;PPAR- γ ;小胶质细胞极化

作者简介:姜馥薇,E-mail:1923717760@qq.com

通讯作者:李金龙,E-mail:jinlongli@neau.edu.cn

T09-0001

血液灌流联合脂肪乳对家兔倍硫磷清除能力的影响

王子浩^{1,2}, 乔乙春^{2*}, 郭翔^{1*}, 李添娣¹, 何俊涛¹, 谢玉璇

(1. 深圳市职业病防治院; 2. 吉林大学公共卫生学院)

摘要:目的 探讨血液灌流联合脂肪乳对倍硫磷家兔静脉染毒代谢动力学和毒物效应动力学参数的影响,探索血液灌流联合脂肪乳对倍硫磷的清除能力。方法 36 只家兔以 10 mg/kg 倍硫磷静脉注射染毒,然后按随机数字表法随机分为 4 组,每组 6 只。中毒模型组(对照组)染毒后不予处理;脂肪乳组:染毒后缓慢注射 10 mL 的 20% 脂肪乳注射液,持续 1 h。血液灌流组:染毒后立即进行血液灌流,持续 2 h;联合组:染毒后立即进行血液灌流,持续 2 h,同时经缓慢注射 10 mL 的 20% 脂肪乳注射液,持续 1 h。血液灌流开始前及开始后不同时间采集动脉血 1 mL,超高效液相色谱法检测血浆中倍硫磷含量和中毒效应指标,计算毒代动力学参数。结果 脂肪乳组、血液灌流组和联合组 AUC_(0-t)、AUC_(0-∞)、AUMC_(0-t)、AUMC_(0-∞)、MRT_(0-t)、MRT_(0-∞)、VRT_(0-t)、VRT_(0-∞)、 λ_z 、C_{last}、t_{1/2z}、CL_z 的影响与对照组相比有统计学意义 ($P < 0.05$),三组之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$),对中毒效应指标的影响也无统计意义。结论 血液灌流可以降低倍硫磷在家兔体内的负荷量,减少内暴露水平。

关键词:兔;倍硫磷;代谢毒理学;灌流

基金项目:深圳市科技计划项目(JCYJ20220531091213031);深圳市职业病防治院科研培育计划项目(SZF-PY-2023-003)

作者简介:王子浩(1997-),男,硕士研究生在读

通讯作者:乔乙春(1985-),女,博士,副教授,主要研究分子遗传流行病学;郭翔(1982-),男,博士,主任医师,主要从事卫生毒理、职业卫生工作。

T09-0003

经典致幻剂在抑郁症治疗中的应用进展

陈员庆, 章冰倩, 李丽琴, 张瑞华*

(国民核生化灾害防护国家重点实验室, 北京 102205)

摘要:抑郁症是一种常见且严重影响生活质量的精神疾病,全球范围内有数百万人受其困扰。尽管传统的抗抑郁药物和心理治疗方法在很多患者身上有效,但仍有相当一部分患者对常规治疗方法反应不佳或无效。近年来,研究者们开始关注使用 5-HT 能致幻剂治疗抑郁症,这些药物通过其独特的神经生物学作用可能为治疗难治性抑郁症提供新的曙光。目前,关于 5-HT 能致幻剂治疗抑郁症的药物主要包括,包括裸盖菇素、麦角酸二乙胺、N-N 二甲基色胺及其衍生物 5-甲氧基-DMT 等,5-HT 能致幻剂与内源性神经递质 5-HT 具有相似的吲哚骨架,其可以与 5-HT 能系统相互作用,因此定义为 5-HT 能致幻剂。5-羟色胺能致幻剂的作用

用靶点为 5-HT_{2A} 受体,该受体主要位于大脑中额叶/顶叶皮质和海马的谷氨酸神经元上,这些药物为受体的激动剂或部分激动剂,他们对受体的影响与剂量以及血浆浓度相关。神经影像学研究揭示了 5-HT 类致幻剂如何在大脑中改变活动模式,特别是在影响情绪调节和认知处理的大脑网络中。这些药物可能通过增强神经可塑性、促进神经元之间的连接以及调节 5-羟色胺递质系统的活动来产生其治疗效果。有多种临床研究表明致幻剂有显著的效果,一项由 Johns Hopkins 大学进行的研究发现,单次使用裸盖菇素能够显著减轻患者的抑郁症状,这种改善在治疗后数周或数月内仍可持续。其他研究也报道了类似的结果,表明这些药物不仅仅是对症状的暂时缓解,而是能够产生持久的神经心理效应。另一项两期双盲随机临床试验,使用赛洛西宾合成制剂单次给药用来治疗成人难治性抑郁症,从而显示出其安全性和抗抑郁效果,来自美国、欧洲和加拿大的 233 名重度抑郁症患者被分为三组接受 25 mg、10 mg、1 mg 三种剂量,结果显示,三组重度抑郁症患者的症状均有改善,最大接受剂量 25 mg 组初步改善效果最好,治疗三周后 37% 的高剂量组患者有了实质性的改善。5-HT 类致幻剂作为一种新型的抑郁症治疗方法展示出了显著的研究前景和临床应用潜力,未来需要进一步探索其最佳治疗方案、剂量、治疗持续时间以及安全性和长期影响,以全面评估其在临床实践中的应用。

关键词:裸盖菇素; 5-HT; 致幻剂; 抑郁

作者简介:陈员庆, E-mail: 1029112117@qq.com

T10-0001

放射性药物非临床安全性评价研究的关注点

侯 艳, 丁亚军, 乔红群, 刘 晶*

(江苏省药物研究所有限公司, 江苏 南京 21000)

摘要:放射性药物是指用于临床诊断或治疗的放射性核素制剂或者其标记化合物,主要包括诊断用放射性药物和治疗用放射性药物两类。放射性治疗药物是将具有细胞毒性水平的放射性核素选择性地输送到病变部位,利用放射性核素的衰变特征释放射线或粒子对病变细胞产生杀伤作用,从而达到治疗目的的一类药物。放射性体内诊断药物是用于获得体内靶器官或病变组织的影像或功能参数,进行疾病诊断的一类体内放射性药物,可用于体检筛查、疾病诊断、器官结构/功能评估和患者管理。

放射性药物作为一类特殊的药物,涉及辐射剂量学、辐射生物学、放射化学以及药学等多个专业领域。所有研发的放射性药物对人类是否安全都需要通过临床前安全性实验来证明,然后才能决定新药是否能够进入临床实验。

关键词:放射性药物; 非临床安全性评价研究; 关注点

作者简介:侯 艳,女,副研究员, E-mail: 18061680230@163.com

通讯作者:刘 晶,男,高级研究员。

T10-0002

微波辐射致雄性大鼠生殖损伤效应研究

姚斌伟, 门俊琦, 李艳阳, 庞悦悦, 王 惠, 张 静, 赵 黎, 王浩宇, 徐新萍, 董 霁, 彭瑞云*

(军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要:**目的** 生殖器官是微波辐射敏感靶器官之一,研究微波射致雄性生殖损伤效应及其机制,为微波辐射损伤防治措施研究以及防护标准制定提供依据。**方法** 采用 30 mW/cm² S 波段微波辐射(15 min/次, 5 次/w, 持续 6 w)40 只雄性 Wistar 大鼠,于辐射后 1 d 采用单细胞和 ATAC 测序技术对睾丸组织进行测序,于

辐射后 1 d、7 d、14 d、28 d 取材,采用精子分析系统检测精子活力;放射免疫分析法检测睾酮、血清抑制素 B;光镜、电镜观察睾丸组织学、超微结构;ELISA 试剂盒检测 LDH、SDH、ATP 酶和线粒体复合物 I、III、IV 以及附睾 α -葡萄糖苷、顶体酶;酶标仪检测 GSH、MDA 含量和 SOD 活性,蛋白质免疫印迹试验(Western Blot, WB)检测 Bcl-2、Bax、caspase-3 蛋白表达。**结果** (1)微波辐射后 1 d,鉴定出 10 种细胞类型,细胞亚群数量和基因表达均有明显差异,亚群间的细胞通讯数量和强度下降,细胞通讯信号模式改变。(2)微波辐射后 1、7、14 d、28 d,精子活动度、AB 级精子比例下降, D 级精子比例增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(3)微波辐射后 1、7 d,血清睾酮含量升高、抑制素 B 含量下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(4)微波辐射后 1、7 d 大鼠睾丸组织结构损伤,主要变化为生精小管上皮疏松、空泡水肿,生精细胞变性、脱落、精原细胞染色质异常凝集或边移增多、线粒体肿胀灶性空化。(5)辐射后 1、7、14 d、28 d,大鼠睾丸组织中 MDA 含量增加、SOD、GSH 活性下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(6)微波辐射后 1、7、14 d、28 d,大鼠睾丸组织 LDH、SDH、ATP 酶含量减少,线粒体复合物 I、III、IV 下降,附睾 α -葡萄糖苷酶、顶体酶含量减少。(7)微波辐射后 1、7、14 d、28 d,大鼠睾丸组织 Bax/Bcl-2 比值、caspase-3 表达上调。**结论** (1)30 mW/cm²微波辐射可致细胞亚群数量和基因表达发生差异,亚群间的细胞通讯数量和强度下降,细胞通讯信号模式改变。(2)30 mW/cm²微波辐射可致雄性大鼠生殖功能和组织结构损伤;(3)30 mW/cm²微波辐射致雄性大鼠生殖器官损伤与组织氧化应激增强、能量代谢异常、凋亡相关蛋白表达水平异常相关。

关键词:微波辐射;单细胞测序;氧化损伤;能量代谢;凋亡

通讯作者:彭瑞云, E-mail: pengry@bmi.ac.cn

T10-0003

鼠李糖乳杆菌通过调控 lncRNA SNHG17/PTBP1/NICD 轴缓解放射性肺纤维化

罗金华^{1,2}, 鞠昭^{1,2}, 潘慧及^{1,2}, 屈灿¹, 肖良³, 周美玲^{1,2}, 王银¹, 周平坤², 黄瑞雪^{1*}

(1. 中南大学湘雅公共卫生学院, 劳动卫生与环境卫生学系, 长沙 410078; 2. 军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 放射生物学重点实验室, 北京 100850; 3. 海军军医大学, 海军医学系, 上海 410017)

摘要:目的 探究鼠李糖乳杆菌(LGG)对放射性肺纤维化(RIPF)的影响及其潜在机制。材料与方法 实验采用 A549 肺癌细胞,将其分为辐射组和 LGG 联合辐射处理组。通过转录组测序分析长非编码 RNA (lncRNA)表达差异,筛选关键的 lncRNA 并对其沉默与过表达处理,使用细胞划痕试验评估细胞迁移能力,使用流式细胞术分析细胞凋亡率和细胞周期变化。进一步将 A549 细胞分为目的基因沉默组及沉默联合电离辐射处理组,通过 LC-MS/MS 检测收集的细胞样本,对两组结果进行差异蛋白分析,并通过细胞免疫荧光、免疫共沉淀验证相互作用。动物实验中,健康雄性 C57 小鼠被随机分为五组:对照组、单独辐射组、LGG 预处理联合辐射组、SNHG17 沉默联合辐射组及 LGG 预处理联合 SNHG17 沉默联合辐射组。LGG 通过饮水给药 7 天,剂量为每只小鼠 4.5×10^9 CFU/mL。所有辐射组小鼠肺部均接受 10 Gy 剂量的 ⁶⁰Co γ -射线照射,实验期间监测体重、食物和水摄入量,于第七周处死小鼠,收集组织进行相关检测。**结果** 转录组学测序结果显示,接受 LGG 处理的受辐射 A549 细胞中,SNHG17 表达显著下降,并缓解了放射诱导的上皮-间质转化(EMT)进程。SNHG17 过表达与肺癌患者的低整体生存率相关。进一步的实验表明,SNHG17 与 PTBP1 的 3'UTR 结合稳定 PTBP1 表达,激活的 PTBP1 与 Notch1 的 NICD 部分结合,从而上调 Notch1 表达,加剧辐射后的 EMT 及肺纤维化。相反,SNHG17 的沉默抑制了 PTBP1 和 Notch1 的表达,从而减轻了这些效应。此外,LGG 处理显著增加了辐射后 A549 细胞的凋亡率和 G2/M 期的细胞阻滞。在小鼠 RIPF 模型中,LGG 处理通过降低 SNHG17 的表达,显著减轻了肺纤维化的程度。**结论** SNHG17 是放射诱导 EMT 和 RIPF 的关键长非编码 RNA,其通过调控 PTBP1 和 Notch1 的表达参与相应病理过程。LGG 可通过调节 SNHG17/PTBP1/NICD 信号轴来减轻放射性肺纤维化,为益生菌、表观遗传调控与癌症治疗之间的关联提供了新的见解。

关键词:放射性肺纤维化;鼠李糖乳杆菌;长链非编码 RNA;上皮-间质转化

通讯作者:黄瑞雪, E-mail: huangruixue@csu.edu.cn

T10-0004

放射性偶联核素药物研究进展和非临床评价要点

罗胜缤, 瞿林海, 王全军*, 戴学栋*

(苏州赛赋新药技术服务有限责任公司, 江苏 苏州 215000)

摘要:目前, 偶联药物因同时拥有强效杀伤和精准靶向两种特性受到广泛关注, 其中抗体药物偶联物 (Antibody-drug Conjugate, ADC) 现已成为肿瘤领域的焦点和热点。根据“万物皆可偶联”的设计理念, 放射性偶联核素药物 (Radionuclide Drug Conjugates, RDC) 作为一种新兴的肿瘤精准诊疗药物, 其结构组成上与 ADC 类似, 以核素通过疾病靶向分子的引导, 可以迅速进入靶组织, 提供精确诊断和靶向杀伤等功能。根据靶向配体的不同类型, RDC 又可细分为: 抗体偶联核素药物 (Antibody Radionuclide Conjugates, ARC)、多肽偶联核素药物 (Peptide Radionuclide Conjugates, PRC) 和小分子偶联核素药物 (Small Molecular Radionuclide Conjugates, SMRC)。RDC 在药物结构组成上与 ADC 类似, 主要由介导靶向定位作用的抗体或小分子 (Ligand)、连接臂 (Linker)、螯合物 (Chelator) 和细胞毒性基因/显像核素 (放射性同位素, Radioisotope) 构成。对于治疗型核素药物来说, 不仅拥有传统的放射疗法, 还可通过 RDC 通过 Linker 与 Ligand 将单抗、多肽或小分子等偶联在一起, RDC 在体内发挥作用时, Linker 无需断裂, 同时也不需要与细胞直接接触, 而是通过内照射杀伤肿瘤细胞, 此外还具有旁观者效应、远端效应, 因此在扩散性肿瘤中具有应用潜力。同时也可将治疗型核素换成诊断型核素, 从而实现其诊断功能, 用于肿瘤的扫描、成像和诊断, 值得注意的是部分核素甚至兼备这两种功能。RDC 药物作为偶联药物重要的产品类型, 每年有大量的候选药物需要开展非临床研究。但是, 国内工业界在开展非临床评价时面临诸多挑战。因此, 本文围绕 RDC 产品的国内外相关法规与最新研究进展, 从 ARC 类产品的药学研究内容与评价考虑, RDC 药物非临床评价研究的受试物、动物模型、药效学、药代动力学、毒代动力学、毒理实验、迟发放射性毒性、辐照安全剂量与首次人体 (First-In-Human, FIH) 研究考虑等方面对放射性偶联核素药物研究进展和非临床评价的关注点进行综述, 为候选药物进行非临床评价提供参考。

关键词:放射性偶联核素药物; 核素; 体偶联核素药物; 非临床评价

作者简介:罗胜缤, E-mail: luoshengbin@safeglp.com

通讯作者:王全军, E-mail: wangquanjunbeijing@163.com; 戴学栋, E-mail: daixuedong@safeglp.com

T10-0005

单细胞组学技术揭示放射性肺纤维化新机制

卢一鸣*

(军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要:**研究目的** 放射性肺纤维化 (radiation-induced pulmonary fibrosis, RIPF) 是胸部放疗中的主要限制因素, 其中氧化应激和炎症反应在其发病机制中起着关键作用。刻画肺组织各种细胞在放射诱导的氧化应激和炎症微环境中的分子动态变化过程, 发现诱导 RIPF 发生的关键细胞群体, 对于揭示放射性肺损伤的生理病理机制至关重要。**材料方法** 我们采用 20Gy 的 γ 射线胸部照射的放射, 分别针对易发生肺纤维化的 C57BL/6N 小鼠和不易发生肺纤维化的 C3H/HeN 小鼠建立放射性肺损伤模型。采用单细胞 RNA 测序技术, 分别针对照射后 4 周 (急性期)、14 周 (中期) 和 24 周 (慢性期) 时获取的两种品系小鼠肺组织进行检测。通过对上述多个时间点的单细胞转录组数据定量分析、整合、细胞注释, 我们建立了 C3H/HeN 和 C57BL/6N 小鼠在放射性肺炎和随后的肺纤维化期间肺微环境的动态景观。**研究结果** 通过对 C3H/HeN 和 C57BL/6N 小鼠在放射性损伤期间微环境动态景观的系统分析, 我们首先发现粒细胞在 C57BL/6N 小鼠肺纤维化期显

著增多,而C3H/HeN小鼠未出现上述情况。细胞间相互作用分析发现肺泡巨噬细胞在两种小鼠品系之间表现出不同的表型,且巨噬细胞激活和粒细胞募集是与放射性损伤相关的核心事件。值得注意的是,我们在C57BL/6N小鼠中发现了一组异常活化的club上皮细胞。通过一系列分析和实验研究发现,它们通过募集中性粒细胞促进RIPF的发展。**研究结论** 本研究揭示了一种新的放射性肺纤维化机制,有望增进对RILI相关细胞和分子机制的现有理解,同时本研究产出的单细胞转录组数据有望为潜在治疗策略的进一步发展提供宝贵的资源。

通讯作者:卢一鸣,E-mail:luymnet@126.com

T10-0006

基于代谢组学筛选放射诱导肺组织损伤血清及粪便中差异代谢物及其功能初步评价

侯一凡¹,朱娇娇²,刘宇昊²,严紫艳²,周林²,陈会禧³,周平坤^{2*},顾永清^{1,2,3*}

(1.河北大学生命科学院,河北保定 071001; 2.军事科学院军事医学研究院,北京 100850;
3.南华大学衡阳医学院,湖南衡阳 421001)

摘要:目的 放射性肺损伤(Radiation induced lung injury, RILI)是胸部肿瘤放疗常见的并发症,在临床上分为早期的放射性肺炎(Radiation-induced pneumonia)和晚期的放射性肺纤维化(Radiation-induced Pulmonary fibrosis, RIPF)。临床症状表现为干呕、气短、胸痛、发烧甚至会导致呼吸衰竭和死亡,由于RILI缺乏有效的治疗药物,因此,寻找具有诊断潜能的药物干预靶点,对放射性肺损伤的防治研究具有十分重要的临床应用价值。血清及粪便等体液标本由于其易获得及含量丰富等特征,可作为疾病诊断及治疗评估效能的重要标本来源。基于代谢组学手段筛选血清及粪便中具有诊断治疗潜能的标志物对放射性肺损伤的防治具有研究意义。**材料与方法** 我们通过20 Gy γ 射线单次全胸局部照射1个月,构建放射性肺损伤小鼠模型,处死小鼠并收集小鼠肺组织、血清及粪便;通过H&E染色观察肺组织炎症浸润与肺组织损伤情况;利用正负离子两种模式下的非靶向代谢组学分析筛选电离辐射后血清及粪便差异代谢物并分析差异代谢物所富集的关键信号通路。**结果** 动态监测小鼠体重发现,电离辐射可显著降低小鼠体重。HE染色结果表明小鼠肺组织存在明显炎性细胞浸润、肺泡结构塌陷,提示小鼠出现明显肺组织损伤,放射性肺损伤小鼠模型构建成功。对小鼠血清及粪便进行非靶向代谢组学测序发现:放射性肺损伤小鼠血清中有137种代谢物降低、44种代谢物升高;粪便中有56种代谢物降低、57种代谢物升高。PLS-DA结果显示:血清及粪便代谢物对放射性肺损伤具有较好的预测能力。对富集到的差异代谢物进行KEGG信号通路富集分析发现其可富集mTOR、TRP及AMPK等多条炎症信号通路以及精氨酸生物合成等纤维化相关信号通路。**结论** 血清及粪便代谢物对放射性肺损伤具有较好的预测能力。

关键词:放射性肺损伤;代谢组学;代谢物

基金项目:国家自然科学基金(82073488);国家自然科学基金(822735688);国家自然科学基金(81773359)

通讯作者:顾永清,E-mail:yqgu96@163.com;周平坤,E-mail:zhoupk@nic.bmi.ac.cn

T10-0007

TNKS1BP1促进肺泡上皮细胞衰老在放射性肺损伤的作用及机制研究

朱娇娇¹,侯一凡²,刘宇昊¹,严紫艳¹,周林¹,陈会禧³,周平坤¹,顾永清^{1,2,3*}

(1.军事科学院军事医学研究院,北京 100850; 2.河北大学生命科学院,河北保定 071001;
3.南华大学衡阳医学院,湖南衡阳 421001)

摘要:背景 放射性肺损伤(radiation induced lung injury, RILI)是胸部肿瘤放疗常见的并发症,其发病

机制并不明确。目前尚无特异靶向的治疗手段对 RILI 防治有效,这极大地限制了放射治疗在胸部肿瘤治疗中的应用。肺泡上皮细胞是电离辐射诱导放射性肺损伤的关键靶细胞,电离辐射下,肺泡上皮细胞以不同形式受损,这一方面会导致肺上皮干细胞耗竭,肺泡结构破坏;另一方面会引发组织炎症反应,从而加剧 RILI 的发生。肺泡上皮细胞在接收电离辐射后,早期以细胞凋亡为主要损伤形式,而细胞衰老在 RILI 过程中持续存在。衰老除对正常肺泡上皮细胞数目及功能的破坏,同时衰老相关分泌表型可级联放大肺组织炎症。然而,电离辐射诱导肺泡上皮细胞衰老的具体分子机制及靶向衰老干预 RILI 的潜能尚不十分明确。

材料方法 ①构建 TNKS1BP1 基因敲除鼠,使用 20 Gy 单次全胸局部照射构建 RILI 模型,收集小鼠肺组织及血液样本;通过 H&E 染色和 Masson 染色观察肺组织病理改变与胶原沉积;利用 Western-blot、免疫组化与免疫荧光染色,检测 TNKS1BP1 与肺泡上皮细胞衰老相关蛋白等关键信号蛋白的表达。②构建电离辐射诱导肺泡上皮细胞衰老模型,Western-blot 与免疫荧光染色,检测 TNKS1BP1 与肺泡上皮细胞衰老相关蛋白等关键信号蛋白的表达。③利用 Western-blot、免疫共沉淀及蛋白稳定性检测等探讨 TNKS1BP1 调控肺泡上皮细胞衰老的分子机制。

结果 ①电离辐射促进肺泡上皮细胞 TNKS1BP1 表达并诱导肺泡上皮细胞衰老;②TNKS1BP1 与衰老相关标志蛋白 P53 及 P21 在放射性肺损伤小鼠肺组织中高表达;③抑制 TNKS1BP1 减轻由电离辐射诱导的肺泡上皮细胞衰老,且缓解由肺泡上皮细胞衰老促进成纤维细胞与巨噬细胞活化;④TNKS1BP1 高表达可抑制 EEF2 的泛素化降解,并促进肺泡上皮细胞衰老;⑤电离辐射下, TNKS1BP1 与 CNOT4 相互作用增强并降低 CNOT4 含量进而抑制 EEF2 泛素化降解;⑥TNKS1BP1 缺失可缓解电离辐射诱导的肺组织衰老与肺组织损伤。

结论 电离辐射下,靶向 TNKS1BP1/CNOT4/EEF2 轴诱导的肺泡上皮细胞衰老可能是 RILI 的潜在靶点。

关键词: TNKS1BP1; 肺泡上皮细胞; 细胞衰老; 放射性肺损伤

基金项目:国家自然科学基金(82273568)

通讯作者:顾永清, E-mail: yqgu96@163.com

T10-0008

放射诱导 B 细胞重建受阻的机制研究

陈赛, 李忠俊, 冉茜*

(陆军军医大学第二附属医院, 重庆 400037)

摘要:目的 探索放射诱导 B 细胞重建受阻的发生机制。材料和方法 对 6~8 周龄的 C57BL/6J 雄性小鼠采用 ^{60}Co γ 射线以 7 Gy 剂量进行全身辐射,构建急性放射综合征模型。单细胞测序检测放射后骨髓造血系统细胞组分的恢复;流式细胞术检测放射前后骨髓 B 细胞前体细胞、脾脏和外周血成熟 B 细胞数量和比例变化;收集放射后 7、14、21、28 天放射组和对照组小鼠的血清进行 ELISA 检测免疫球蛋白水平变化;收集放射后 7、14 天的共同淋巴祖细胞 (Common Lymphoid Progenitor, CLP) 进行 RNA-seq,通过微量 qPCR、免疫荧光、免疫组化和体外诱导分化实验等方法验证关键信号机制。

结果 小鼠在接受全身辐照后出现骨髓抑制,单细胞测序结果显示除 B 细胞外的骨髓造血系统主要细胞组分在放射后 28 天基本恢复至放射前水平。流式细胞术结果证实,骨髓造血干祖细胞、髓系细胞和 T 淋巴细胞在放射后 60 天均基本恢复至放射前水平,而放射后 6 个月骨髓 B 细胞和外周血 B 细胞仍未恢复至正常水平。ELISA 结果显示小鼠放射后血清免疫球蛋白水平降低。RNA-seq 分析显示小鼠接受放射后,CLP 细胞转录谱发生显著变化,B 细胞谱系分化相关的重要调控分子 *Ikzf1*、*Tcf3*、*Ebf1* 的表达均在放射后降低。除此之外,在放射后差异表达的分子中以造血细胞激酶 (Hematopoietic cell kinase, HCK) 变化最为显著。因此,我们推测放射后 Hck 的激增可能是导致 CLP 向 B 谱系细胞分化受阻的原因。微量 qPCR 和流式细胞术验证了放射后 Hck 在转录水平和蛋白水平均明显增加。在分选放射前后骨髓 CLP 细胞进行体外诱导分化实验中,我们进一步证实放射后 CLP 向 B 谱系细胞分化受阻,且发现 Hck 抑制剂能部分挽救放射后 HCK 升高导致的 B 细胞分化受阻现象。

结论

放射后 Hck 的升高是 CLP 向 B 谱系细胞分化受阻的关键,可作为潜在治疗靶点。

关键词: 电离辐射; 骨髓 B 细胞; B 细胞发育; Hck

通讯作者: 冉 茜, E-mail: louise-r-q@163.com

T10-0009

血清 miR-192-5p 是一种有希望的致死性辐射损伤标志分子

贾 萌, 王粘羽, 刘 鑫, 张 宏, 范 英, 蔡 丹, 李亚琼, 沈丽萍, 王治东*, 王 琪*, 戚振华*
(军事科学院军事医学研究院, 北京 100850)

摘要: **目的** 核事故或辐射事故发生时,需要快速识别那些暴露于潜在致命辐射剂量并需要立即治疗的伤员,而现有技术不能满足致死性损伤的分类。电离辐射可以诱导机体血清中部分 miRNAs 呈现剂量和时间依赖性响应。目前关于致死性辐射损伤特异的 miRNAs 研究较少,本研究旨在筛选并验证小鼠血清 miRNAs 作为致死辐射损伤生物标志物的可能性。**方法** 对 C57BL/6J 雄性小鼠利用 $^{60}\text{Co}\gamma$ -射线进行 0、6.5、10 Gy 剂量全身照射,对照射后 1 天和 3 天的血清进行 miRNA 测序分析。同时设置平行实验观察小鼠 30 天生存率、体重及外周血象。利用生物信息学分析仅在 10 Gy 呈现差异表达的 miRNAs,并通过 RT-qPCR 方法验证不同剂量照射后小鼠血清中差异 miRNAs 表达水平。采用 Pearson 相关分析法分析 miRNA 表达水平与外周血淋巴细胞绝对计数相关性。对 10 Gy 照射小鼠进行放射防护剂氨磷汀预处理,进一步分析候选血清 miRNA 分子的表达与小鼠存活的关系。最后,通过检测 10 Gy 全身照射前后小鼠各器官内差异 miRNA 的分布变化,分析小鼠照射后血清 miRNA 表达异常的原因。**结果** 通过 miRNA 测序及生物信息学分析发现,相对于 0 Gy 组,10 Gy 照射后 1 天和 3 天分别发现 10 个和 12 个显著差异表达 miRNAs。经过 RT-qPCR 验证,初步确定 4 种血清 miRNAs 水平在致死剂量照射后 1 天(miR-374c-5p、miR-194-5p)和 3 天(miR-192-5p、miR-223-3p)发生显著改变。Pearson 相关分析发现 4 种血清 miRNAs 的表达水平均与外周血淋巴细胞数目显著相关。致死剂量改变的 4 种分子中,只有 miR-192-5p 分子的表达水平被辐射防护药物氨磷汀逆转;检测 miR-192-5p 在正常与受致死性电离辐射小鼠各器官内的表达,结果表明小鼠正常状态下 miR-192-5p 在结直肠、小肠、肝和肾脏中高表达,而照射后 miR-192-5p 在骨髓、胸腺、脾脏等组织中表达水平显著增加。**结论** 本研究通过构建致死、亚致死辐射损伤及氨磷汀救治小鼠模型,利用 miRNA 测序技术筛选血清差异 miRNAs,通过 RT-PCR 技术初步证实了 miR-192-5p 是一种潜在的致死性照射分子标志物,为进一步的深入临床研究奠定基础。

关键词: miR-192-5p; 电离辐射; 致死性损伤; 生物标志物

通讯作者: 王治东, E-mail: wangzhidong1977@126.com; 王 琪, E-mail: wqj619@126.com; 戚振华, E-mail: tjuqzh@163.com

T11-0002

QAU 进行 SOP 审核的关注点

李梦茹*, 马俊南, 丛钰佳
(国家沈阳新药安全评价研究中心, 沈阳, 110021)

在非临床安全性评价研究机构中,标准操作规程(Standard Operating Procedure, SOP)是描述研究机构运行管理以及试验操作的程序性文件。SOP 内容是否符合《药物非临床研究质量管理规范》,内容描述是否清晰,可操作,对机构的运行管理和试验操作是否合规,有非常重大的影响,因此在《药物非临床研究质量管理规范》中,质量保证部(Quality Assurance Unit, QAU)人员的职责就包含了要“审核研究机构内所有

现行标准操作规程”的要求。

那么, QAU在审核SOP时, 主要应关注以下几方面内容:

一. SOP内容是否符合《药物非临床研究质量管理规范》、试验准则和国家标准要求。如审核试验方案的SOP时, 首先要关注SOP中试验方案的内容是否包含了《药物非临床研究质量管理规范》中对试验方案主要内容的要求。

二. 机构内不同SOP之间要求的一致性。如审核某台仪器的SOP时, 要关注它是否符合机构“仪器管理SOP”中对仪器管理的总体要求。

三. SOP内容上下文的一致性。如一台天平的SOP, 在SOP的第6页和第7页, 10g校准砝码的允许误差分别为0.0007g和0.0005g, 前后不一致。

四. SOP内容是否完整准确, 是否具有指导意义。如计算机系统安全的SOP, 在数据完整性的内容中描述“必须经过基本的培训程序, 所有与计算机系统有关的员工必须熟悉与之相关的SOP”, 这里基本的培训程序指什么没有说明, 必须熟悉与之相关的SOP, 也未说明是哪些SOP, 没有SOP的指导意义。

五. SOP要求是否明确, 是否有可操作性。如某台仪器的SOP, 在写仪器维护时描述“仪器负责人维护仪器并填写维护记录, 每季度一次”, 只描述了由谁多长时间进行一次维护, 但维护内容未描述, 员工无法按该SOP执行操作。

通讯作者: 李梦茹, Tel: 13998151502, E-mail: limengru@sinochem.com

T11-0003

QA对试验方案的审核在方案批准前还是批准后

王利心, 温鹏, 李梦茹*

(沈阳沈化院测试技术有限公司安全评价中心 沈阳 110141)

QA对试验方案的审核在方案批准前还是后? 这个问题似乎不是个问题, 因为NMPA的GLP规范中有明确的要求: 第二十七条 每项研究开始前, 均应当起草一份试验方案, 由质量保证部门对其符合本规范要求的情况进行审查并经专题负责人批准之后方可生效, 专题负责人批准的日期作为研究的开始日期。接受委托的研究, 试验方案应当经委托方认可。

上面就是说QA应该在试验方案草稿阶段进行审核, 之后SD才能批准去生效。

但是我们也需要注意到GLP规范之间的差异, 比如在OECD的GLP规范中, 就没有提到过QA必须在试验方案草稿阶段进行审核。OECD原文中对QA职责描述如下: 2.2.1. The responsibilities of the Quality Assurance personnel include, but are not limited to, the following functions. They should: b) verify that the study plan contains the information required for compliance with these Principles of Good Laboratory Practice. This verification should be documented; QA人员的职责包括: b) 检查试验计划是否包含有关遵循GLP规范要求的内容。

另外在第8章节试验方案处: 8.1 Study Plan

1. For each study, a written plan should exist prior to the initiation of the study. The study plan should be approved by dated signature of the Study Director and verified for GLP compliance by Quality Assurance personnel as specified in Section 2.2.1.b., above. 试验方案应该由SD签字批准, 并由QA确认GLP符合性。

上述OECD内容中都只说QA要对试验方案进行审核, 但没说在什么时间段审核, 所以这也是和NMPA之间的差异点之一。

另外, 在RQA的QA指南文件中, 也对这一点进行了描述:

Neither OECD nor UK GLP specifies the timing of the study plan review. Theoretically, it could be done

any time between drafting the plan and final reporting, but the most logical time would be prior to the experimental start, either as a draft just prior to signature, or immediately after signature.

经合组织和英国 GLP 都没有具体说明试验方案审查的时间。从理论上讲,可以在起草计划和最终报告之间的任何时间完成,但最符合逻辑的时间是在试验开始之前,要么是在签字之前审核草稿,要么是在签字之后立即审核。

所以,QA 对试验方案的审核能不能在方案批准后?由上可知,对于遵循 NMPA 的 GLP 机构来说,不可以。对于只遵循 OECD GLP 规范的机构来说,可以。对于遵循 NMPA 和 OECD 的机构来说,不可以。

关键词: 质量保证(QA)试验方案 GLP

作者简介: 王利心(1981—),女,高级工程师,硕士, E-mail:wanglixin05@sinochem.com

通讯作者: 李梦茹,高级工程师,QAM, E-mail:limengru@sinochem.com

T11-0004

如何构建符合 NMPA、FDA、OECD 等国际 GLP 标准的 GLP 体系

李腊梅,吴紫君,林嘉珠,雷夏凌,郭健敏,杨威*

(广州湾区生物医药研究院,广东莱恩医药研究院有限公司,广东省药物非临床评价与研究重点实验室,国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心,广东省创新药物评价与研究工程技术研究中心,广东 广州 510990)

作为世界 GLP 发展较晚的国家,我国的 GLP 建设仍处于初期阶段。为推动我国 GLP 实验室检测数据获得 FDA、OECD 等国际组织的认可,我国应形成一套相对完善的国际化 GLP 管理体系。在 GLP 体系建立之初,明确建设标准,融合借鉴欧盟、美国和日本等先进的体系优势,建立既符合国际要求又具有可操作性的带有中国特色的 GLP 体系。

以下是建立国际化 GLP 体系时需要着重思考的几个方面:

(1)按国际 GLP 标准建立 GLP 体系。GLP 机构在设置建设标准时,不仅仅将目光放至我国 GLP。立足于国际,吸收其他国家 GLP 体系的规范性、一致性和多体系的可操作性等优点,打造国际一流的 GLP 平台。如建立中英文对照版标准操作规程(SOP)或工作手册等,可以在 SOP 中规定法定版本的语言形式。如某一国法规对归档时限的要求更严苛,那么在建立之初就采用严苛的归档时限对机构来说有长远意义。

(2)构建兼具合规性和可操作性的 GLP。GLP 的合规不仅仅是规范的文字 SOP 化,一定要兼具可操作性。如我们都知道数字化能够实现数据的集中和共享在线管理,数据质量高、可及时更新,能够更好地实现合规化管理。但是很多机构由于成本、时间、行业特殊等原因没办法定制既满足个性化需求又能通过合规性验证的软件。如 OECD 第 21 号文件中提到一些监管机构希望试验终止前的关键发现被总结,且总结报告交由 QA 进行审核,即使委托方要求从 GLP 试验转为非 GLP 试验时,也应如此。如果碰到想将关键发现保密的委托方,没办法出总结报告,此时就应当思考其他具有可操作性的做法使其合规。

(3)扩大质量保证体系的兼容性。国内外药物开发发展迅速,质量管理要求越来越严格。但只要抓住研究可重建的核心,把控源头和过程,自然能控制结果。为了保证 SOP 的持续合规性和适用性,也应当建立质量体系的持续改进方法。持续改进能够对体系的运作做出动态评价,也可及时对体系文件进行相应的补充与完善。如 USFDA GLP 在关于人员患疾病时的处理程序以及设备出现故障时的处理措施比 NMPA GLP 描述得更详细,那么此时可以考虑制定详细的措施以达到更大的兼容。

(4)强化人才建设。我们需要的不是被动遵守 GLP 原则的人,而是能够主动做出 GLP 符合性的判断的人才。应注重国际化专业团队建设,培养一批既会多国语言又能够及时发现错误的有逻辑思考能力的人员。在一些检查中,检查员根据试验方案偏离、变更数目来判断专题负责人的能力和资历。如果在一个机构里,SOP 中没有规定的地方,就出现不符合 GLP 的情况,那么可能是使用者的 GLP 意识较差。

(5) 严肃应对认证监督检查。加强与 GLP 监管机构间的交流与合作, 形成良性互动, 逐步提高检查人员的水平和能力。定期开展实验室安全检查及各类专项检查, 针对各类检查中发现的安全隐患及时整改并存档备查。培养自己的专业检查团队, 关注实验室环境卫生死角的清洁度, 模拟真实检查过程。如接受 FDA、OECD 检查, 检查前可以提前将检查资料翻译成英文或中英文对照备查。

只有真正秉持 GLP 初心, 才能建立可持续发展的 GLP 体系。正确有效得实施同时落实到试验评价, 体系才能切实推动实验室实现自我提升。

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

通讯作者: 杨 威, 教授级高级工程师/博士、博士后导师, 广州湾区生物医药研究院院长、广东省药物非临床评价与研究重点实验室主任、广东莱恩医药研究院有限公司董事长、总经理, Tel: 18928860179, (020) 87998690, E-mail: yangwei0719@163.com

T11-0005

浅谈 Provantis 系统生殖 III 段模块验证的 QA 检查关注点

王思铭, 吴紫君, 雷夏凌, 杨 威*

(广州湾区生物医药研究院, 广东莱恩医药研究院有限公司, 广东省药物非临床评价与研究重点实验室, 国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心, 广东省创新药物评价与研究工程技术研究中心, 广东 广州 510990)

围产期毒性试验(III段), 是检测从胚胎着床到幼仔离乳给予药物对妊娠/哺乳的雌性动物以及胚胎和子代发育的影响。该试验具有较多繁琐的仔代生理或神经发育指标的检查, 同时也会伴有的大量数据产生和纸质记录。面对上述情况, 采用 Provantis 系统进行数据的采集, 就能提高效率和提高研究数据的真实、准确、完整和可追溯性。但在 Provantis 系统投入使用前, 应对相应的系统模块进行验证, 以保证既能符合 GLP 规范又能满足研究使用的需求。下文, 将浅谈 QAU 对 Provantis 系统生殖 III 段(围产期)模块验证过程中的一些检查关注点:

(一) 验证前的准备

Provantis 系统在验证开展前, 是否由机构负责人任命熟悉系统的专业人员担任验证负责人; 是否组建验证团队, 人员包括系统拥有者、验证负责人、质量保证人员和应用测试人员; 验证负责人是否组织相关参与验证人员进行模块的培训, 其内容包括验证目的、范围、实施方法、注意事项、偏离情况处理等。

(二) 验证方案/脚本的审核

验证方案是系统验证的指导性文件, 其内容应包含概述、遵从的相关法律法规和指南、验证团队、验证方法、验证策略和验收标准等内容; 验证的方案是否经过质量保证负责人的审核, 机构负责人的批准。验证脚本是用于模块验证的执行力基础文件, 其所记载的测试概论、范围、测试方法及判定标准是否满足验证需求; 验证的脚本是否经过质量保证负责人的审核, 验证负责人的批准。

(三) 验证的执行和偏离管理

验证时, 测试人员是否严格按照验证脚本的内容执行。源研究和目标研究的创建是否与验证脚本要求一致; 特有的分娩、胎儿生理及神经发育等检查的设置是否满足研究所需; 执行验证的人员在采集操作时, 是否生成适用的任务进行采集; 在发生偏离情况时, 是否通过验证事件报告(VIR)予以记录。QAU 的检查情况均需及时向验证负责人和机构负责人报告。

(四) 验证结果资料及报告的审核

验证完成后, 应对所有验证产生的结果文件和报告进行审核, 重点关注验证报告中是否对所有发生的偏离情况(VIR)进行描述, 并分析评估其影响。验证投入使用后, 系统维护者应持续关注系统的运行状况和进行日常的维护(如软件更新、系统词库、数据备份等)。

(五)关注点与难点

验证过程中,容易导致不合规事件发生的情况有:①参与验证的人员培训不到位;②操作任务设计欠缺合理性;③数据采集错误导致后续检查指标无法关联;④指标繁多而检查缺漏;⑤问题反馈和解决不及时;因此,验证人员和 QAU 在验证和检查过程中,要特别关注上述的问题。

综上,QAU 检查整个系统验证的过程,是保证验证实施符合 GLP 规范要求,同时也确认能满足研究使用的需求。

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

通讯作者:杨威,教授级高级工程师/博士、博士后导师,广州湾区生物医药研究院院长、广东省药物非临床评价与研究重点实验室主任、广东莱恩医药研究院有限公司董事长、总经理,Tel:18928860179,(020)87998690,E-mail:yangwei0719@163.com;

T11-0006

《实验动物环境及设施 GB14925-2023》实施后的运行管理关注点

吴紫君,孙昊,雷夏凌,郭健敏,杨威*

(广州湾区生物医药研究院,广东莱恩医药研究院有限公司,广东省药物非临床评价与研究重点实验室,国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心,广东省创新药物评价与研究工程技术研究中心,广东 广州 510990)

国家标准《实验动物环境及设施 GB14925-2023》于 2023 年 11 月 27 日批准发布,2024 年 6 月 1 日正式实施。实验动物和动物设施均是《药物非临床研究质量管理规范》(GLP)的重要控制要素,GLP 机构应该及时组织学习和对比差异,根据 GB14925-2023 自查并完善机构设置,防止不合规情况发生。

GB14925-2023 由范围、规范性引用文件、术语和定义、总体要求、环境分类、环境指标、工艺布局、设施、废弃物处理、运输、检测和运行维护 11 部分及附录组成。与 GB14925-2010 相比,除了结构的调整外,主要变化如下:(1)术语与定义:更改和增加了“普通环境”、“普通环境设施”、洁净度等级等相关术语与定义。(2)环境适用动物等级:修改了实验动物环境的分类中负压屏障环境和负压隔离环境适用动物等级的适用范围。(3)指标:更改了普通环境、屏障环境、隔离环境的温度、湿度、最低工作照度等指标;更改了屏障环境设施辅助区的最小压差、相对湿度、洁净度级别等主要环境指标;更改了实验动物设施污水处理标准。(4)设施:增加了工艺布局、消防、实验动物设施建筑、空调、饮水给水及排水、电气、自动控制、检测运行维护等要求。(5)实验动物:更改了常用实验动物所需居所最小空间、运输、动物福利方面的要求。(6)检测条件:附录检测方法中更改了各种环境指标的检测条件。

GLP 机构应及时组织相关人员对试验和机构运行情况进行自查,对不符合标准内容进行整改,确保现行工作符合标准,应重点关注:(1)SOP 中的术语、定义、指标和其他要求;(2)设施的硬件、布局、环境设置、维护工作的要求;(3)实验动物的饲养、运输和福利的要求;(4)环境指标的检测方法和判断标准。

针对 GB14925-2023 的变化,如不及时调整,可能会导致机构:(1)使用术语不一致;(2)设施设计违反国标,维护工作缺失;(3)动物饲养不能满足最小空间要求,缺少动物运输条件,导致违反动物福利;(4)未按新要求、检测方法 and 判断标准对动物设施环境指标进行监控和检测,导致未能发现环境异常或能耗增大。采取的整改措施可包括软件和硬件,软件包括但不限于:(1)组织人员对标准进行学习和培训,确保机构人员清晰了解新版标准要求。(2)更新和完善 SOP,包括术语、定义、动物饲养级别的界定、环境指标、设施维护程序、动物饲养和运输要求、环境指标和判断标准等。(3)按新版标准对动物设施进行检测。硬件包括但不限于:(1)设施建筑与布局;(2)污水处理设备;(3)动物笼具等。如硬件无法更改,则应采取风险管理,采用合适的方法以最大程度地满足标准要求,剩余风险需持续进行监控。

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

目(2021TY060021)

作者简介:吴紫君, 中药学硕士, 广东莱恩医药研究院有限公司质量保证负责人, E-mail: 1062435377@qq.com

通讯作者:杨威, 教授级高级工程师/博士、博士后导师, 广州湾区生物医药研究院院长、广东省药物非临床评价与研究重点实验室主任、广东莱恩医药研究院有限公司董事长、总经理, Tel: 18928860179, (020) 87998690, E-mail: yangwei0719@163.com

T11-0012

浅谈 Provantis 系统验证的质量保证

李丽, 张晓军, 温鹏, 李梦茹*

(沈阳沈化院测试技术有限公司安全评价中心, 沈阳 110141)

为了实现实验室无纸化办公, 建立数据完整性体系, 本机构引入了 Provantis 系统, 此类系统是设计定制程序和编制源代码以使其适应用户业务流程软硬件, 必须符合法规要求。

一 执行供应商审计: 引入系统前, QA 作为验证团队的一员与 IT 人员对系统开发商执行供应商资质审查。

二 参与风险评估: 在其生命周期内对系统进行基于风险管理方法进行管控, 风险管理方法是通过风险识别, 风险分析和风险评价来评估系统在生命周期内的风险等级。对风险等级高的采取风险控制措施降低风险, 对风险等级低的要求严格遵守 SOP, 确保系统符合法规要求, 如突发系统不能正常使用, 重新启动后执行风险评估, 并进行了数据完整性的验证, 提交 QA 进行确认。根据评估结果、风险等级结合风险识别编制风险评估表, 采取控制措施降低风险到可接受的水平。

三 机构负责人任命系统负责人, 审计 QA, 组建验证团队。QA 为验证团队提供 GLP 法规培训和建议, 验证人员需要进行验证的培训, 验证结束后, 形成电子数据审计 SOP, QA 审核系统验证及使用的 SOP。此类系统除了需要完整意义的计算机化验证之外, 还需要贯穿整个生命周期的文档审查, 包括用户需求、功能说明、设计说明、结构测试、源代码审查和系统说明书。

四 QA 审查验证: 审查验证计划, 根据国内外法规的要求, 计划的验证内容是否完整、充分及合理满足机构的需求。根据系统验证模块中的脚本计划进行审查, 关注验证的内容是否覆盖试验的需求。制定现场审核实施计划, 进行现场核查, 内容不局限于账户权限, 参数设置, 数据采集, 修改更正原因, 上传数据, 归档, 打印, 统计及报告输出等。审计脚本验证报告, 将检查发现及偏离报告验证负责人, 并对反馈进行审核, 审核最终验证报告, 特别关注验证失败的步骤对未来系统应用的影响及评估。批准最终的验证报告。QA 权限仅限于只读模式。关注角色分配, 账户权限唯一性, 角色分配的功能不能冲突, 相互影响。审计追踪修改, 重复录入, 删除模式的数据, 回录数据是否完整, 电子签名及时间, 分配的角色和操作是否匹配。

五 验证结束, 验证负责人发布软件放行, 验证的软件从验证库拷贝到生产库。QA 对升级后的系统进行补充验证及周期性验证执行审查, 以保证系统已经满足了预期要求且符合数据完整性的要求。

作者简介:李丽, Tel: 13478815269, E-mail: lili2@sinochem.com

通讯作者:李梦茹 Email: limengru@sinochem.com

T11-0013

浅谈 GLP 机构中 QA 上岗培训

杨金玲, 李梦茹, 温鹏, 张艺夕, 丛钰佳, 李丽, 王利心

(沈阳沈化院测试技术有限公司安全评价中心, 辽宁省沈阳市铁西区沈辽路 600 号 10141)

GLP 机构中 FM 应当任命熟悉试验程序的人员作为 QA 人员, 负责质量保证工作, 对 GLP 法规和试验流

程不了解,不熟悉相关试验的基本试验操作,在检查工作中就不能有效合理的提出意见和建议,就无法对试验进行审核。QA人员在独立上岗前要完成以下内容的培训:

1 熟悉QAU部门工作内容

日常工作内容包括SOP及表格管理、试验检查、过程检查、设施检查、计算机系统验证检查、供应商调查等;同时在工作中掌握与相关试验人员、SD、FM的沟通方法。

2 检查能力的培训

QA要起到监督职责就需要有一定的检查能力。每个GLP机构有自己的QA培训计划,培训内容及评价,由QAM或有经验的QA人员对新人进行检查培训,对检查要点进行讲解培训。试验检查的培训包括试验方案检查、关键环节检查计划制定、原始数据/报告检查、检查资料的保存及归档;过程检查培训要熟悉中心规定的过程检查项目的检查频次、时间及检查记录与报告的撰写等,包括试验体系引入、标本制作、组织病理学检查等;设施检查要了解中心设施检查范围,内容,频次,时间及检查记录与报告的撰写等,主要包括SOP文件的保存管理,仪器设备的摆放、状态标识、验证、记录管理等,动物饲养设施管理及环境指标的检测,空调设备的运行与管理,功能实验室管理,档案的管理等方面;供应商检查:检查对象的选择、检查频率、方法、内容、时间及检查记录与报告的撰写等;

3 试验操作技能的培训

对于试验检查,QA人员必须了解中心所有开展试验的全部试验流程,试验关键操作,在培训期内到相关部门跟随有经验的操作人员完成该领域的关键操作技术的培训,通过多看、多问来熟悉操作关键内容,同时结合SOP的学习,加强与巩固。只有完全熟悉试验流程和相关操作内容才能在工作中发现问题。

4 文献、资料的学习

中心规章制度及管理:对于一个QA新人,首先应熟悉中心的基本情况、管理制度等,主要内容有中心的组织机构组成,各部门的职责与工作内容、安全防范措施、资料保密等管理制度的培训。

GLP规范及指导原则:GLP机构存在多个质量体系,需要QA对其机构运行的国内外GLP规范及其认证条例与要求、试验相关指导原则进行学习和培训。QA要明晰不同GLP体系要求的不同之处,才能进行不同体系的质量检查工作,掌握试验研究的相关知识,以胜任对不断变化的新类型试验及新检测方法的质量检查。

中心SOP文件及表格管理:SOP文件是GLP机构的重要管理文件,撰写的原则是写我所做,做我所写,只有严格执行了SOP,才能使研究过程符合GLP要求,表格则是操作具体内容的真实体现,二者都必须符合GLP法规要求。QA则更应全面掌控机构SOP和表格管理情况,首先要完成SOP及表格的申请生效程序的相关SOP,然后是QAU部门SOP,随后是机构的公共性SOP包括人员职责,人员健康、供试品管理、档案管理、数据修约、数据修改、原始数据、计算机管理系统、仪器设备管理、偏离管理等;最后要学习自己岗位相关的试验流程、试验操作、仪器操作、检测及检查方法等相关SOP。熟悉中心SOP文件,操作前查看,操作过程中遇到问题再查看,能在操作与查看的不断循环中发现问题,更好的完成质量保证工作。

5 职业道德的培训

QA工作要保持独立性,同时应具备良好的职业道德,检查认真、负责、坚持原则且具备良好的沟通能力,还应具对其他部门人员提出的GLP问题做出解答,对法律法规等有完整准确的阐释和理解,言之有据,才能胜任质量保证工作。

关键词:GLP;QA;上岗培训

通讯作者:杨金玲, E-mail:yangjinling1@sinochem.com

T12-0001

药物非临床安全性评价中巴马小型猪常见自发性病变

段怀龙, 李凤婷, 宋泽丽, 王雁, 魏丽萍, 李华*

(益诺思生物技术南通有限公司, 江苏南通 226133)

摘要:因小型猪与人在解剖、生理生化和遗传方面的相似性,常被用于心血管系统、呼吸和皮肤等疾病

的模型,在小分子、免疫调节剂和生物药的安全性评价方面也具明显优势。国内外小型猪已越来越多的被用于毒性试验研究,国内以巴马小型猪为主。然而,巴马小型猪的常见背景病变报道较少。为此,本文对巴马小型猪常见的自发性病变简要综述。**心血管系统:**心肌纤维化和单核细胞浸润;心肌血管/血管周围炎症细胞浸润;心内/外膜炎细胞浸润和水肿;心房纤维化;主动脉外膜炎细胞浸润。**呼吸系统:**气管可见黏膜/黏膜下层炎症细胞浸润;肺脏可见肺泡巨噬细胞聚集和混合细胞浸润;支气管肺泡慢性炎症;支气管相关淋巴组织淋巴增多。**消化系统:**胃可见肌层和黏膜下层炎症细胞浸润;黏膜萎缩和纤维化;贲门糜烂和溃疡;十二指肠可见血管/血管周围炎症细胞浸润;盲肠可见血管周围炎症细胞浸润;胰腺腺泡细胞坏死、血管/血管周围炎症细胞浸润;唾液腺(颌下腺)可见炎细胞浸润和腺泡细胞萎缩。**肝:**炎症细胞浸润和肝细胞空泡化。**泌尿系统:**肾脏可见肾小管扩张和变性、嗜碱性肾小管;肾小球肾炎和透明小滴聚集;间质/血管周围炎症细胞浸润;膀胱可见周围血管和黏膜下层炎症细胞浸润。**生殖系统:**雄性动物睾丸常见生精小管变性/萎缩或扩张;前列腺炎症细胞浸润;附睾可见精子囊肿和导管萎缩。雌性动物可见卵巢卵泡囊肿、血管周围炎症细胞浸润;输卵管炎症细胞浸润;子宫肌层和血管周围炎症细胞浸润;阴道肌层和和血管周围炎症细胞浸润。**内分泌系统:**肾上腺束状带弥漫性空泡化皮质增多、单形核细胞浸润。**免疫系统:**淋巴结可见肉芽肿性炎症、窦扩张、血管/血管周围炎症细胞浸润和色素沉着;胸腺可见易染体巨噬细胞增加;脾脏可见血管/血管周围炎症细胞浸润;皮肤皮下炎症。**肌肉:**骨骼肌炎症细胞浸润。

关键词:巴马小型猪;自发性病变

作者简介:段怀龙,E-mail:hlduan@innostar.cn

通讯作者:李 华,E-mail:hli@innostar.cn

T12-0002

高尿酸参与阿霉素心脏毒性的发生发展

刘亚迪¹, 王 雨^{1,2}, 蔡海丽¹, 张晓朦^{1,2}, 张 冰^{1,2*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 北京中医药大学中药药物警戒与合理用药研究中心, 北京 102488)

摘要:目的 基于临床阿霉素心脏损伤患者出现血尿酸升高现象,探讨高尿酸对于阿霉素心脏毒性进展的影响。方法 使用阿霉素 3.5 mg/kg/3 d 腹腔注射建立阿霉素心脏毒性小鼠模型,在心脏毒性模型基础上外源性给予氧嗪酸钾联合酵母浸膏灌胃建立高尿酸+心脏毒性小鼠模型,进行超声心动图检测,心肌损伤标志物(CTnI、BNP、NT-ProBNP)水平检测以及心脏组织透射电镜观察线粒体损伤情况、心脏组织切片进行HE染色观察病理损伤,探讨高尿酸对于阿霉素心脏毒性的影响。结果 与对照组相比,心脏毒性组于阿霉素累积剂量达 14 mg/kg 即出现左心室射血分数、左心室缩短分数显著降低,CTnI、BNP、NT-ProBNP 心肌损伤标志物水平显著升高以及血尿酸水平显著升高现象,表明阿霉素心脏毒性伴高尿酸模型建立成功;与心脏毒性组相比,实验周期内外源性给予氧嗪酸钾(964 mg/kg/d)联合酵母浸膏(13 g/kg/d)灌胃建立的高尿酸+心脏毒性模型的血尿酸水平显著升高,左心室射血分数、左心室缩短分数显著降低,CTnI、BNP、NT-ProBNP 心肌损伤标志物水平出现升高。透射电镜结果表明:与对照组相比,阿霉素组出现了肌纤维的断裂,线粒体内嵴减少或消失;高尿酸+阿霉素组出现了更为严重的心肌纤维断裂,线粒体膜破裂,线粒体内空泡化,嵴减少或消失。HE染色结果表明:与对照组相比,阿霉素组出现了细胞核聚集、肌纤维断裂现象,表示细胞出现了损伤;高尿酸+阿霉素组出现了更为严重的肌纤维断裂。结论 高尿酸可参与阿霉素心脏毒性的发生发展,加剧阿霉素心脏毒性小鼠的心脏损伤状况。

关键词:高尿酸血症;阿霉素;多柔比星;心脏毒性

作者简介:刘亚迪,E-mail:liuyadi000888@163.com

T12-0003

某中药喷雾剂对SD大鼠连续4周鼻腔重复滴鼻给药毒性试验病理学研究

林晴晴, 戴锦龙, 陈志森, 李玉姣, 杨威*

(广东莱恩医药研究院有限公司, 广东省药物非临床评价与研究重点实验室, 国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心, 广东广州 510990)

摘要:目的 观察重复滴鼻给予某中药喷雾剂后,对SD大鼠所产生的毒性反应及其严重程度,主要的毒性靶器官或靶组织及其损害的可逆性,探索无毒反应剂量,为其它安全性评价实验和临床用药提供基础数据。**方法** 试验选用经适应性观察符合要求的SD大鼠120只,按性别和体重均衡随机分为阴性对照组(A组)、辅料对照组(B组)、受试物低剂量组(C组)、受试物高剂量组(D组),每组30例动物,雌雄各半。双侧滴鼻给药的方式,每天给药,连续给药4周。其中阴性对照组(A组)、辅料对照组(B组)、受试物高剂量组(D组)每天给药3次,按0.3 mL/鼻(分三次给予,每次0.1 mL,间隔约4h)的体积给予0.9%氯化钠注射液、受试物空白辅料溶液以及45 g/mL/只剂量的受试物喷雾剂,受试物低剂量组(C组)每天给药1次,按0.1 mL/鼻的剂量滴鼻给予15 g/mL/只剂量的喷雾剂。在给药末期处死部分动物,其余动物恢复期观察4周。存活动物按计划麻醉后股动脉或颈总动脉放血处死,进行系统解剖检查及脏器称重等;睾丸、眼球用Davidson's固定,其他脏器用10%中性福尔马林溶液进行固定,后进行脱水、包埋、切片、染色及病理组织学检查。**结果** 试验期间动物均存活至计划剖检日期。大体剖检除见试验动物常见背景/偶发病变外,未见受试物相关异常改变。组织病理学检查结果显示,给药末期时,各组动物肺脏可见不同程度Ⅱ型肺泡细胞增生、肉芽肿性炎症和炎细胞浸润等,其中呈泡沫样的外观的巨噬细胞聚集在肺泡管及其周围,呈灶性分布,各组动物间均未见明显的剂量-效应关系,判断各组动物肺脏病变与给与受试品的滴鼻给药方式相关,与受试物无关。除肺脏外,各期均有个别动物鼻腔鼻中隔见呼吸上皮黏液(杯状)细胞增生,未见明显的剂量-效应关系,这种黏液细胞增生可能是对上皮刺激的一种适应性改变,与受试物无关,其余各组各脏器组织均未见受试物相关异常改变。**结论** 综上所述,对SD大鼠连续4周重复滴鼻给予低(3 g生药/只)、高(9 g生药/只)剂量的中药喷雾剂后,未见受试物相关明显异常变化。

关键词: 中药喷雾剂; 滴鼻; 重复给药毒性试验; SD大鼠**基金项目:** 广东省药物非临床评价研究企业重点实验室(2023B1212070029); 广东省重大人才工程项目(2021TY060021)**作者简介:** 林晴晴, 硕士, 中国兽医协会兽医病理师(CCVP), 广东莱恩医药研究院有限公司(广东省药物非临床评价与研究重点实验室), E-mail: linqingqing@lewin.com.cn**通讯作者:** 杨威, 教授级高级工程师/博士、博士后导师, 广东省药物非临床评价与研究重点实验室主任、广东莱恩医药研究院有限公司董事长、总经理, Tel: 18928860179, (020)87998690, E-mail: yangwei0719@163.com**LW2151-01对SD大鼠连续6个月静脉重复给药毒性试验病理学研究**

林晴晴, 戴锦龙, 陈志森, 柳璐, 杨威*

(广东莱恩医药研究院有限公司, 广东省药物非临床评价与研究重点实验室, 国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心, 广东广州 510990)

摘要:目的 观察静脉重复给予LW2151-01后,对SD大鼠所产生的毒性反应及其严重程度,主要的毒性靶器官或靶组织及其损害的可逆性,探索无毒反应剂量,为其它安全性评价实验和临床用药提供基础数据。**方法** 试验选用经观察合格和眼科检查合格的SD大鼠120只,按体重和性别均衡随机分为3组,分别为溶媒对照组、低(3.75 mg/kg)、高(7.5 mg/kg)剂量组,40只/组,雌雄各半。溶媒对照组给予6%丙二醇,

各组动物每天给药一次,在给药中期(3个月)、给药末期(6个月)分别处死部分动物,其余动物恢复期观察4周。存活动物按计划进行病理学系统检查及脏器称重等;睾丸、眼球用Davidson's快速固定,其他脏器用10%中性福尔马林溶液进行固定,后进行脱水、包埋、切片、染色及病理组织学检查。**结果** 试验期间所有动物均存活至计划剖检日期。大体剖检除可见试验动物常见背景/偶发病变外,其余各组动物均未见受试物相关明显异常改变。组织病理学检查结果显示,各组动物给药部位(尾静脉)可见不同程度的血管内膜或和血管中膜增生、血管周单核细胞浸润以及偶见血管血栓等改变,其中血管内膜增生在镜下表现为内皮细胞的增殖,其细胞方向垂直于血管壁,以及在内膜层可见来源于血管中层的成纤维细胞或肌成纤维细胞的增殖,血管中膜的增生在组织学上表现为成纤维细胞、肌成纤维细胞或肌细胞的增殖。各组动物给药部位(尾静脉)均未见明显剂量-效应关系,且各组病变类型未见明显差异,考虑为静脉注射等机械损伤引起,判断与受试物无关。其余各期各脏器组织均未见受试物相关异常改变。**结论** 综上所述,在本试验条件下,对SD大鼠连续6个月重复静脉注射给予低(3.75 mg/kg)、高剂量(7.5 mg/kg)的LW2151-01后,各期各例动物除给药部位可见与机械刺激相关的改变外,未见受试物相关明显异常变化。

关键词:重复给药毒性试验;SD大鼠;静脉注射

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

作者简介:林晴晴,硕士,中国兽医药学会兽医病理师(CCVP),广东莱恩医药研究院有限公司(广东省药物非临床评价与研究重点实验室),E-mail:linqingqing@lewin.com.cn

通讯作者:杨威,教授级高级工程师/博士、博士后导师,广东省药物非临床评价与研究重点实验室主任、广东莱恩医药研究院有限公司董事长、总经理,Tel: 18928860179, (020) 87998690, E-mail: yangwei0719@163.com

T12-0004

LW2408烧伤膏对小型猪深Ⅱ度烧烫伤模型的有效性研究

黄浪,黄远铿,郭健敏,杨威*

(广州湾区生物医药研究院,广东莱恩医药研究院有限公司,广东省药物非临床评价与研究重点实验室,国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心,广东省创新药物评价与研究工程技术研究中心,广东广州 510990)

摘要:**目的** 构建小型猪深Ⅱ度烧烫伤模型,评价LW2408烧伤膏的有效性。为临床研究及临床毒副反应的监测提供参考信息。

方法 选用24例小型猪,给药前进行1次深Ⅱ度烧烫伤造模,造模面积约为10%体表面积,造模后将小型猪随机分为4组,分别为模型对照组(A组)、上市对照品组(B组)、烧伤膏旧工艺组(C组)、烧伤膏新工艺组(D组),造模次日开始对小型猪进行经皮给药,烧伤膏旧工艺组(C组)、烧伤膏新工艺组(D组)分别按20 g/100 cm²剂量给予LW2408烧伤膏的旧工艺样品、新工艺样品,上市对照品组(B组)给予1倍临床剂量(300 IU/cm²)的上市对照品贝复新,模型对照组动物不进行给药,其它处理与给药组相同,所有动物均连续给药21天。进行创面愈合率、造模部位病理学、羟脯氨酸(HYP)、I型、III型胶原含量、真皮胶原纤维染色(Masson染色), α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、CD31⁺、Ki-67蛋白的表达等指标考察药物有效性。

结果 (1)创面愈合率:于给药后第6、12、15、18、22天,模型对照组(A组)的创面愈合率分别为9.2%、33.1%、59.4%、64.6%、68.4%;上市对照品组(B组)的创面愈合率分别为15.4%、50.8%、77.3%、85.2%、90.4%;烧伤膏旧工艺组(C组)的创面愈合率分别为11.6%、50.9%、78.7%、90.2%、95.0%;烧伤膏新工艺组(D组)的创面愈合率分别为11.5%、57.4%、79.3%、86.3%、90.7%。与模型对照组(A组)相比,给药后第12天,上市对照品组(B组)、烧伤膏新工艺组(D组)小型猪烧烫伤部位创面愈合率明显升高($P<0.05$)。给

药后第 15、18、22 天,上市对照品组(B组)、烧伤膏旧工艺组(C组)、烧伤膏新工艺组(D组)小型猪烧烫伤部位创面愈合率明显升高($P<0.05$ 或 0.01)。表明上市对照品及 LW2408 烧伤膏旧工艺样品、新工艺样品均可促进小型猪深 II 度烧烫伤创面愈合。对小型猪创面愈合的修复程度:LW2408 烧伤膏旧工艺样品 $>$ LW2408 烧伤膏新工艺样品 \approx 上市对照品。(2)羟脯氨酸(HYP)、I 型、III 型胶原检测:与模型对照组(A组)相比,上市对照品组(B组)I 型胶原($47.3\% \uparrow$)及烧伤膏旧工艺组(C组)I 型胶原($37.8\% \uparrow$)表现出升高趋势。提示上市对照品及 LW2408 烧伤膏旧工艺样品可促进伤口愈合以及皮肤形态的恢复具有促进作用。(3)免疫组织化学染色:与模型对照组比,各给药组 CD31⁺和 Ki-67 阳性染色细胞比值明显升高($P<0.05$ 或 0.01),各给药组 α -SMA 阳性染色细胞比值明显升高($P<0.05$ 或 0.01),表明上市对照品及 LW2408 烧伤膏旧工艺样品、新工艺样品均可促进 α -SMA、Ki-67、CD31⁺的表达,从而促进新生血管的形成、成纤维细胞和纤维细胞增生,加速创面愈合。(4)真皮胶原纤维染色(Masson 染色):创面中央:烧伤膏旧工艺组(C组) $>$ 烧伤膏新工艺组(D组) $>$ 上市对照品组(B组) $>$ 模型对照组(A组)。创面边缘:烧伤膏旧工艺组(C组) $>$ 烧伤膏新工艺组(D组) $>$ 上市对照品组(B组) \approx 模型对照组(A组)。表明上市对照品及 LW2408 烧伤膏旧工艺样品、新工艺样品均可促进成纤维细胞和纤维细胞增生,加速创面愈合。(5)组织学检查:上市对照品及 LW2408 烧伤膏旧工艺样品、新工艺样品对小型猪深 II 度烧烫伤模型引起的病理变化均有促进恢复作用,具体表现为改善真皮层炎细胞浸润、胶原纤维变性/坏死等,并且给药组均能促进新生血管的形成、成纤维细胞和纤维细胞增生。

结论 LW2408 烧伤膏旧工艺样品及新工艺样品按 20 g/100cm² 剂量进行给药,每日 1 次,连续给药 21 天,可有效促进深 II 度烧烫伤模型小型猪创面愈合,表现为改善真皮层炎细胞浸润、胶原纤维变性/坏死等,促进新生血管的形成、成纤维细胞和纤维细胞增生,效果优于 1 倍临床剂量(300 IU/cm²)的上市对照品(贝复新)。

关键词: LW2408 烧伤膏; 深 II 度烧(烫)伤; 小型猪模型; 有效性

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

作者简介: 黄 浪,广东莱恩医药研究院有限公司(广东省药物非临床评价与研究重点实验室),E-mail: huanglang@lewin.com.cn

通讯作者: 杨 威,教授级高级工程师/博士、博士后导师,广州湾区生物医药研究院院长、广东省药物非临床评价与研究重点实验室主任、广东莱恩医药研究院有限公司董事长、总经理,Tel: 18928860179, (020) 87998690, E-mail: yangwei0719@163.com

T12-0005

幼龄兔玻璃体腔多次注射对眼组织结构的影响

冉艳洪, 王俐梅, 杨 威*

(广州湾区生物医药研究院, 广东莱恩医药研究院有限公司, 广东省药物非临床评价与研究重点实验室, 国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心, 广东省创新药物评价与研究工程技术研究中心, 广州 510990)

摘要: **目的** 探索幼龄兔玻璃体腔多次注射不同给药剂量对眼功能及组织结构的影响,为药物临床前安全性评价研究奠定基础。 **方法** 将 30 只 5 周龄健康无眼疾的普通级新西兰兔按体重随机分为 A 组 6 只、B 组 8 只、C 组 8 只、D 组 8 只,其中 A 组仅进行双眼前房和玻璃体腔穿刺处理,B、C 和 D 组双眼前房进行穿刺外再分别向玻璃体腔注射内 50 μ L/眼、100 μ L/眼和 150 μ L/眼的复方电解质眼内灌注液(CEIIS),1 次/周,连续 4 次。然后于 D0、D2、D6、D8、D13、D15、D21、D23、D28 进行眼压(IOP)检查,D0、D14、D28 进行彩色眼底照相,D14、D28 安乐死后取眼球进行组织病理学检查。 **结果** 在 IOP 影响方面,A 组与 B、C 和 D 组在 D0、D2、

D6、D8、D13、D15、D21、D23、D28的IOP差异均不具有统计学意义($P < 0.05$)。在眼组织结构影响方面,随着注射次数增多,A组和B组动物在整个试验期内玻璃体均未见浑浊,视网膜及脉络膜血管清晰,无渗出、出血、萎缩等异常表现,但C组在D28有1例眼、D组在D14有3例眼眼底彩色照相可见局部或大面积眼底血管模糊不清,存在玻璃体后脱离症状;组织病理学结果显示上述眼底异常动物玻璃体腔内有轻微多灶性散落的炎性细胞,视网膜全层局灶性轻微变性或坏死,内界膜内侧可见炎性细胞及细胞碎片,各组余下动物各时期的眼组织结构完整,未见明显异常。结论 在本试验条件下,建议进行幼龄兔玻璃体腔多次注射时将单次注射剂量控制在100 μL /眼以内,可避免多次高剂量注射对眼组织结构造成损害和潜在的眼功能生理学影响。

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

作者简介:冉艳洪,兽医师,E-mail:ranyanhong@lewwin.com.cn

通讯作者:杨威,教授级高级工程师/博士、博士后导师,广州湾区生物医药研究院院长、广东省药物非临床评价与研究重点实验室主任、广东莱恩医药研究院有限公司董事长、总经理,Tel:18928860179,(020)87998690,E-mail:yangwei0719@163.com

T12-0008

SkinEthic™ RHE模型在体外皮肤刺激性和腐蚀性检测的应用

陈励藻^{1*}, Nathalie ALEPEE², 丁春梅¹

(1. 欧莱雅中国研发和创新中心, 上海 中国 201206;

2. 欧莱雅法国研发和创新中心, AULNAY-SOUS-BOIS, 法国 93600)

摘要:目的 随着替代方法研究的深入,越来越多的体外重建皮肤模型在中国建立并标准化生产。本研究拟对上海斯安肤诺生物科技有限公司生产的重建人表皮模型SkinEthic™ RHE在体外皮肤刺激性和腐蚀性的检测进行研究,为后续进一步市场应用提供基础。

材料和方法 SkinEthic™ RHE提供1 cm²和0.5 cm²两种孔径模型,本次研究使用0.5 cm²孔径,实验参考体外皮肤刺激性检测(OECD指导原则439)和体外皮肤腐蚀性检测(OECD指导原则431),选择指南推荐参考物质进行测试。并对皮肤模型在质量控制、检测方法、结果判断等方面进行探讨。体外皮肤刺激实验使用10个参考物质,体外皮肤腐蚀实验使用11个参考物质,检测均重复两轮。

结果 SkinEthic™ RHE模型采用组织学评分,细胞活性(空白对照组),ET50(1% Triton X-100 50%抑制率时间)三项指标作为质量控制标准。结果显示本次研究使用的SkinEthic™ RHE模型均符合质量控制标准(细胞层数大于4层;空白对照组MTT细胞活力测试光密度大于0.7;4小时 ≤ ET50 ≤ 10小时),且数据稳定。如OECD指导原则显示,与EpiSkin™测试相比,SkinEthic™ RHE体外皮肤刺激性和腐蚀性测试在实验步骤(包括:上样量,处理时间,活力检测等)和结果判断方面略有不同。测试结果显示,SkinEthic™ RHE模型在体外皮肤刺激性实验和体外皮肤腐蚀性实验中均能对指南推荐参考物质进行正确分类,且批次间重复性良好。

结论 SkinEthic™ RHE模型满足体外皮肤刺激性和腐蚀性实验要求,为后续市场使用提供依据,同时也为基于体外重建皮肤模型的替代方法在中国的建立、应用、推广奠定了坚实的科学基础。

关键词:体外重建皮肤模型;皮肤刺激性;皮肤腐蚀性;安全评估

通讯作者:陈励藻,Email:lizao.chen@loreal.com

T12-0009

利用中医理论解读药物非临床安全性评价数据

刘露¹, 瞿林海, 王全军, 戴学栋*

(苏州赛赋新药技术服务有限责任公司, 江苏 苏州 21500)

摘要: 中医诊断的基本原理包括“司外揣内”、“见微知著”和“以常衡变”,除此之外还有许多经典的器官联动例如“肺与大肠相表里”。在中医体系里,对找到体内真正发生病变的器官是非常重要的,而这正好与非临床安全性评价的主要目之一:发现毒性靶器官,不谋而合。因此在非临床安全性评价中,可以借助中医理论帮助我们判断动物状态,预测毒性靶器官。

在中医理论中器官联动的例子很多,在西医中也有类似描述:右心衰竭导致肝淤血,左心衰竭导致肺淤血,在中医对应的描述为“脾为气血生化之源,而肺主气,心主血,肝藏血”的说法,因此在中医的角度中,西医在上述病变器官中可能忽略了脾脏的变化。

但需要注意的是,虽然不同器官损伤而导致其他器官联动发生病变的原理是基于动物机体本身,这一点是不随药物不同而改变的,但在中医中脏器的病变多由邪气侵入所致,而在非临床评价中,脏器的病变主要由药物的毒性引起,并且除中药外,药物的成分清楚,造成的影响相对单一,因此二者在脏器病变的形成原因、发展速度上会有所不同。另一方面,中药的性味有较为完善的分类,有助于预判靶器官,而对于创新药来说性味的区分是完全空白的,因此中医理论不能盲目照搬。

中医中许多症状是根据人的临床观察得出,其中包括大量的感觉表述,对于药物非临床评价而言,这方面信息的获取是非常有难度的,但我们可以利用观察到的症状反过来推测动物的感觉,给动物提供更合适的照顾,提高动物福利。例如“伤寒伤人身之阳,故喜辛温、甘温、苦热,以救其阳;温病伤人身之阴,故喜辛凉、甘寒、甘咸,以救其阴。”

结合中医与西医对同一脏器的不同定位,能得出更多信息。中医中的脾在西医中还属于重要的免疫器官,因此如果发现药物在中医中与脾脏相关,在推算临床起始剂量时还应考虑药物是否与免疫系统相关选用合适的计算公式。中医中的津液、经络等的影响也是需要考虑的范围。

中医理论的运用与非临床安全性评价一样,需要丰富的经验,因此有较大的局限性,但随着对中医的探索日益精进,及其在全球范围内声望的攀升,我们有责任更加重视这一宝贵遗产。因此,强化中医的保护、传承与创新,不仅是维护医疗多样性的关键,也是弘扬中华民族传统文化的重要途径。

关键词: 中医理论; 非临床安全性评价; 靶器官

作者简介: 刘露, 15928066870, E-mail: liulu@safeglp.com

通讯作者: 戴学栋, E-mail: daixuedong@safeglp.com

T12-0010

制剂安全试验研究评价要点

沈心蕊, 瞿林海, 王全军, 戴学栋*

(苏州赛赋新药技术服务有限责任公司, 江苏 苏州 215000)

摘要:背景 制剂安全性试验(Formulation Safety Test)是用于评价当药物制剂经皮肤、粘膜、腔道、血管等非口服途径给药时,对用药局部产生的毒性作用。由于药物的原形及其代谢物、辅料、有关物质及理化性质(如pH值、渗透压等)均有可能引起刺激、过敏或溶血的发生,因此药物在临床应用前研究其制剂在给药部位使用后引起的局部或全身毒性,以提示临床应用时可能出现的毒性反应、毒性靶器官及安全范围。

开展制剂安全性试验主要参考《药物刺激性、过敏性、溶血性研究技术指导原则》(NMPA, 2014)。根据不同药物类型的也可以同时参考其他指导原则,如欧洲药品管理局非临床评价指南中包含皮肤刺激、眼刺

激以及皮肤过敏试验方法;中华人民共和国国家标准中的化学品试验方法、医疗器械生物学评价、农药登记毒理学试验方法中也有相关试验方法可供参考。

关注点:制剂安全性试验由刺激性、过敏性及溶血性试验三种类型组成。开展制剂安全试验的受试物剂型为除口服制剂外的局部用药制剂,包括注射剂、阴道栓剂、直肠栓剂、皮肤外用制剂及舌下透皮制剂等,需根据受试物的制剂特点考虑开展相关研究。各类型试验开展过程中的主要关注点如下:

刺激性试验:刺激性试验主要是通过肉眼观察及组织病理学检查评价给药部位的刺激性及刺激反应的可逆性和延迟性。实验系统通常选用兔,给药途径通常选择与临床拟用方式一致或相似,药浓度需至少包括临床拟用最高浓度。肉眼观察及组织病理学检查刺激性时在注意给药部位变化的同时需关注受试物可能会接触到的周围组织是否可见刺激性改变。

过敏性试验:过敏性试验主要是观察动物接触受试物后的全身或局部过敏反应,通过不同类型的过敏性试验考察 I 型、II 型、III 型或 IV 型过敏反应。实验系统可选用大鼠、小鼠或豚鼠。以考察 I 型过敏反应的主动全身过敏试验(Active Systemic Anaphylaxis, ASA)为例,受试物给药浓度需至少包括临床拟用最高浓度;由于给药剂量可能会对过敏试验结果有一定影响,为防止药物毒性反应症状影响过敏试验结果判断,可进行剂量预试,正式试验的激发给药阶段受试物组动物出现过敏症状时则增加类过敏试验辅助判断试验结果。

特殊剂型的受试物在开展过敏试验时需根据实际情况进行试验设计,如对于颗粒直径较大的微球类或密度较大的凝胶类等无法静脉注射的药物,激发阶段可以考虑使用临床给药途径激发,为保证激发数据完整,可根据 T max 调整激发观察的时间点。

溶血性试验:注射剂和可能引起免疫性溶血或非免疫性溶血的局部用药制剂均需进行溶血性试验。体内试验通常结合重复给药毒性试验开展;体外试验采用试管法,实验系统为红细胞悬液。常规情况下仅可采用肉眼观察法检测药物溶血性,必要时可以通过测定溶血率的方法辅助判定。

关键词:制剂安全性试验;刺激性;过敏性;溶血性试验;临床前安全性评价

通讯作者:戴学栋, E-mail: daixuedong@safeglp.com

T12-0011

食蟹猴增强的围产期发育毒性试验的设计和一般考虑

孙 伟, 瞿林海, 董 戈, 王全军, 戴学栋*

(苏州赛赋新药技术服务有限责任公司, 江苏 苏州市 215000)

摘要:生物技术药物的发育和生殖毒性(developmental and reproductive toxicity, DART)评价,需考虑大分子类药物的种属特异性、免疫原性、药理活性以及吸收、分布、代谢、排泄过程,使用与人类高度相近的非人灵长类(non-human primates, NHPs)动物(如食蟹猴)在 DART 研究中越来越普遍。对于单克隆抗体的食蟹猴 DART 研究,更推荐将胚胎-胎仔发育毒性试验与围产期毒性试验相结合进行设计,即增强的围产期发育(enhanced pre- and postnatal developmental, ePPND)毒性试验。食蟹猴 ePPND 研究的关注点较多、试验周期较长,需根据药物特性逐案分析、合理设计,保证药物评价的顺利进行,本文对研究的实施提供建议和参考。

动物选择、交配和妊娠诊断:雌性和用于交配的雄性是否性成熟不能仅依靠年龄、体重判断,需通过检查雌性月经周期及雄性精液中是否有成熟精子等生物终点来确定,选择月经周期较为规律的雌性于月经周期的第 12-14 天与雄性连续合笼交配 3 天,交配第 2 天定义为妊娠第 0 天(gestation day 0, GD0),并在 GD18-20 超声检查确认是否妊娠。

动物数量和组别设计:雌猴妊娠期自发流产率较高,通常每组妊娠动物数至少 16 只,以确保产后 1 周可获得 6-8 只幼猴。生物技术药物的非人灵长类 DART 研究主要在于危害识别,选择剂量具有充分科学合理

依据时,可只设1个对照组和1个剂量组来减少动物的使用。

给药期限:通常从GD20开始持续至分娩。绝大多数单克隆抗体类药物属于IgG类,在食蟹猴中通过母乳转移的IgG抗体水平通常较低,因此将给药持续至分娩后,考察新生儿因乳汁哺育导致的暴露意义有限。

母体评价指标:一般实验室检查包括每天临床观察,定期体重测定;妊娠监控措施包括每天观察阴道出血情况以及定期超声检查;分娩时需记录分娩完成日期,并尽可能收集胎盘、脐带;剖检时对母体主要器官及生殖脏器进行大体观察。

子代评价指标:在自然分娩后对妊娠结局和幼仔的生长、发育情况进行评价,时间主要取决于药理、毒理学指标的评价终点,通常为出生后1-12个月。一般实验室检查包括每天临床观察,定期体重测定,母婴互动观察;外观及形态学检查包括性别鉴定,定期的冠臀长、头围、四肢长度等指标测量;神经行为学测试在分娩后1周内进行;出生后第28天进行握力评价;X光检查子代的骨骼发育情况,在试验终点时进行内脏检查。此外,根据药物特点,还可增加免疫系统评价、临床病理学、学习能力测试、心血管功能检查等。

暴露水平/免疫原性:考察母体和子代的暴露情况,采集特定时间的母体/子代的血样/乳汁,评价暴露量、蓄积情况及母体/子代暴露比。还需测定母体和子代的ADA以确定免疫原性情况。

关键词:食蟹猴; ePPND

作者简介:孙 伟, E-mail: sunwei@safeglp.com

通讯作者:戴学栋, E-mail: daixuedong@safeglp.com

T12-0012

PDC 药物, 以及易致敏药物开展临床前试验的考量

史梦瑶, 董 戈, 瞿林海, 王全军, 戴学栋*

(苏州赛赋新药技术服务有限责任公司, 江苏 苏州 215004)

摘要:近些年来,大分子生物药发展迅猛,当然也随之受到了广泛关注。与传统小分子药物相比,生物大分子药物具有相对分子量大、不易透过生物膜以及口服易降解等特点,因此该类药物在临床上几乎都为注射给药。同时大分子药物的作用机制也与一般药物或小分子药物不同,大分子药物主要是通过刺激机体免疫系统产生免疫反应从而发挥功效,在机体内产生体液免疫、细胞免疫或者细胞介导免疫等。正因为以上问题,导致大分子药物了最主要的副作用—免疫原性反应,最常见的如过敏反应。

以PDC(Peptide Drug Conjugate,多肽偶联药物)药物为例,与ADC(Antibody drug conjugate,抗体偶联药物)药物类似,它包括多肽、Linker和毒素分子三个部分,其比ADC药物具有相对较低的免疫原性,但作为大分子药物,其也无法完全避免免疫原性反应。因此针对此类大分子药物的易致敏性,应当在临床前试验中该对其过敏反应进行合理考量,避免或减少此类免疫原性反应发生。

从临床前试验分析来看,PDC药物均为注射给药,其造成的过敏反应主要为严重的系统性超敏反应和给药部位局部刺激性反应。其中系统性过敏反应主要在给药过程中或给药后短时间内发生(24小时内),且多数发生在呼吸系统和循环系统,造成呼吸衰竭和循环功能障碍,引起实验动物死亡。此外系统性过敏反应也可出现在重复给药试验中第二次给药后。而局部刺激性反应主要表现为给药部位肿胀、溃破和坏死等,影响实验动物生存质量,同时增加重复给药难度。通过临床前实际案例分析,尤其是针对系统性过敏反应,多数动物表现为剧烈呕吐、高热、呼吸困难、大量流涎、四肢无力、惊厥等,出现上述症状后,应第一时间给予抗过敏药物治疗,同时补充水分以及电解质,保证机体电解质平衡,必要时吸氧,从而尽可能避免上述症状引起动物严重脱水、电解质紊乱以及呼吸循环系统功能障碍而出现的死亡。

基于多数此类药物在非临床研究中出现的过敏反应以及相关对症治疗经验,比如DRF实验可见多数动物出现严重的过敏反应,影响毒性判断或者完成给药,那么正式实验可以考虑在给药前0.5~1小时给予实验动物一定量的苯海拉明,可以有效缓解上述过敏反应,同时也有利于非临床试验进行以及非临床安全性

的合理判断,也为临床应用提供参考。

关键词: PDC; 免疫原性; 过敏反应

作者简介: 史梦瑶, E-mail: shimengyao@safeglp.com

通讯作者: 戴学栋, E-mail: daixuedong@safeglp.com

T12-0013

AAV 基因治疗产品非临床安全性评价关注点

张成瑞, 瞿林海, 王全军, 戴学栋*

(苏州赛赋新药技术服务有限责任公司, 江苏 苏州 215000)

摘要: 随着基因调控技术的日益发展, 基因治疗产品的陆续获批上市, 让基因疗法逐步从概念走向现实。基因治疗(gene therapy)是指通过将外源基因(或基因编辑工具)导入靶细胞或组织, 替代、补偿、抑制或修正特定基因, 以治疗遗传病、罕见病和癌症等特定适应症的新兴治疗手段。因此, 选择合适的递送载体对于携带目的基因并高效递送至靶器官或组织至关重要。

腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)是一种复制缺陷性病毒, 属于依赖性病毒属, 细小病毒科, 由直径 ~26 nm 的二十面体蛋白衣壳和 ~4.7 kb 的单链 DNA 基因组组成。AAV 因其非致病性、免疫原性低和稳定长期表达等优势成为主流的基因递送方式。由于其载体多样性、复杂性和特殊性的特点, 本文从 AAV 产品非临床研究的一般考虑、特殊考虑及风险考虑三个方面展开讨论。

AAV 产品非临床研究的一般考虑: 标准的毒理学试验并不适用于基因治疗产品, 应遵循“具体问题具体分析”的原则, 综合考虑以下因素, 包括但不限于: (1) 一般原则: 产品导入特征; 载体生物学特征; 研究模型的可行性、可获得性; 适应症及目标患者人群; (2) 动物种属或模型: 具有动物种属相关性; 能有效导入/暴露; 有效转录/翻译; 能发挥药理活性作用; 健康 VS 疾病模型; (3) 受试物: 能够充分代表临床试验拟用样品; (4) 给药途径: 临床拟用途径, 考虑给药操作的可行性及并发症等; (5) 剂量设计: 应足以确立未见明显损害剂量 (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL); 低剂量应高于最低起效剂量; 高剂量是最高起效剂量的一定倍数或最大可行剂量。

AAV 产品非临床研究的特殊考虑: 主要基于药效学、毒理学和药代动力学研究。药代动力学中重点关注暴露量、生物分布 (Biodistribution, BD) 和脱落。其中, 生物分布是基因治疗产品非临床研究的关键部分, 其设计需考虑以下因素: (1) 时间点设置应足以反映 BD 特征 (达峰、稳态和消除); (2) 以探索性生物分布研究结果为导向, 选择取材组织; 由于神经途径也是 AAV 传播的一个重要途径, 因此, 背根神经节的取材和毒性评价至关重要; (3) 非全身暴露产品, 需科学论证; (4) 分析方法学需采用特殊的检测手段, 如核酸扩增 (PCR)、ELISA、PET 等。

AAV 产品非临床研究的特殊考虑: (1) 通常单次给药, 持续发挥药效, 需评估长期有效性和安全性, 关注延迟毒性; (2) 递送载体的安全性风险; (3) 潜在的脱靶风险; (4) 整合和致癌风险; (5) 免疫原性和免疫毒性; (6) 肝脏毒性; (7) 血栓性微血管病变; (8) 神经毒性; (9) 局部耐受性: 如眼内给药、脑实质给药等给药途径的产品。

综上, AAV 基因治疗产品的非临床安全性评价需基于风险, 采用更为灵活的、科学驱动的非临床研究策略。

关键词: 基因治疗; 腺相关病毒; 安全性

作者简介: 张成瑞, E-mail: zhangchengrui@safeglp.com, Tel: 18834892007

通讯作者: 戴学栋, E-mail: daixuedong@safeglp.com

T12-0014

定量检测SD大鼠血浆中环肽浓度的LC-MS/MS方法

逢健¹, 杨翠平², 毕月芳², 康红鑫², 黄莹², 戴学栋¹, 王全军^{1*}

(1. 苏州赛赋新药技术服务有限责任公司, 江苏 苏州 215000; 2. 国科赛赋河北医药技术有限公司, 河北 廊坊 065000)

摘要:目的 本研究旨在开发一种基于液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术的定量分析方法,用于测定SD大鼠血浆中环肽的浓度。环肽作为一种具有潜在药理活性的化合物,在药物研发、临床前药代动力学研究和非临床安全性评价中,其血浆浓度的准确测定对于深入理解其药代动力学特性及安全性至关重要。但是这类药物化学结构特殊,稳定性相对较差,生物体内存在大量干扰物质,且该类药物生理活性强,用药剂量很小,致体液中药物浓度较低。因此,在样品分析过程中,如何保证环肽药物的稳定性,如何提高检测的灵敏度尤为重要。因此,本研究旨在构建一种高灵敏度、高选择性且稳定性良好的LC-MS/MS分析方法,以满足环肽药代动力学和毒代研究的分析需求。

材料和方法 环肽用含0.05%PBS,0.05%Tween20,0.1%甲酸的水溶液溶解并稀释成相应浓度的工作溶液,取28.5 μL空白SD大鼠血浆(EDTA-K2抗凝),加1.5 μL工作液,再加100 μL含0.1%甲酸,0.05%Tween,浓度为2 ng/mL的普萘洛尔的甲醇溶液(双空白样品加100 μL含0.1%甲酸,0.05%Tween的甲醇溶液),涡旋,离心,取80 μL上清加80 μL超纯水,混匀,上机。

正离子模式下,电喷雾电离源(ESI),喷雾电压(IS):5000V;离子源温度(TEM):250 °C;气帘气(CUR):40psi;MRM模式:环肽:552.0→178.0,去簇电压(DP):111.0,碰撞能(CE):111.0;内标(普萘洛尔):260.3→116.3,去簇电压(DP):111.0,碰撞能(CE):25.0;选用ChromCore BR C18 1.8 μm, 2.1×100 mm色谱柱,流动相为0.2%甲酸水和0.2%甲酸乙腈,流速0.5 mL/min,梯度洗脱,采集时间3 min,进样体积10 μL。

结果 研究表明,所建立的LC-MS/MS分析方法在环肽浓度为10.0 ng/mL至300 ng/mL范围内呈现良好的线性关系($R^2 > 0.9950$),各浓度水平质控样品的平均准确度偏差范围为3.93%~12.80%,各浓度水平质控样品的精密度(%CV)范围为2.65%~13.18%,均符合生物样品分析的相关要求。此外,该方法还表现出良好的特异性和稳定性,能够准确测定SD大鼠血浆中环肽的浓度。

该方法创新性的在工作液和沉淀剂中加入了解析剂(Tween),且Tween具有使结合在血浆蛋白中的环肽发生解离,提高检测的灵敏度。在工作液和沉淀剂中加入了甲酸,可以给环肽提供一个良好的离子化环境,从而提高检测的灵敏度。PBS可以提供一个稳定的PH环境,在工作液溶剂中加入0.05%PBS,可以避免环肽因PH波动而降解。但应注意的是Tween和PBS在LC-MS/MS分析中,是一把双刃剑,应注意使用量,浓度过高会抑制质谱信号,其浓度一般不超过0.5%。

结论 本研究成功建立了一种基于LC-MS/MS技术的定量分析方法,用于测定SD大鼠血浆中环肽的浓度。该方法具有高灵敏度、高选择性、操作简便及稳定性良好等优点,适用于环肽的生物分析需求。本研究不仅为环肽的生物分析研究提供了有力的技术支持,也为其他类似药物的分析方法开发提供了有价值的参考。

关键词: 环肽; 方法开发; LC-MS

作者简介: 逢健, E-mail: pangjian@safeglp.com

通讯作者: 王全军, E-mail: wangquanjun@safeglp.com

T12-0015

孕期暴露于环境水平的多环芳烃会抑制成年小鼠的精子发生及其机制

欧坤霖^{1,2}, 张思琦^{2,3}, 雷鑫星¹, 刘笑¹, 张宁芳¹, 王重刚², 袁小澎^{1*}

(1. 深圳市人民医院 检验科, 广东 深圳 518020; 2. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005;
3. 深圳市第三人民医院 国家感染性疾病临床研究中心, 广东 深圳 518112)

摘要:目的 评估孕期多环芳烃(PAHs)暴露对成年小鼠生精功能、精子发生和睾丸DNA甲基化组谱的影响。材料和方法 在胚胎发育第1至16天期间,给孕期C57BL/6小鼠灌胃5、50和500 μg/kg体重的8种PAHs混合物(萘、苊烯、菲、荧蒽、芘、苯并芘、二苯并蒽、苯并[a]芘),每两天一次,孕期共暴露8次。我们研究了出生后第180天F1代小鼠睾丸生精细胞的数量、功能及相关过程。我们还评估了F1代小鼠睾丸的转录组和DNA甲基化组谱,以监测它们与疾病发生的关联。结果 PAHs以剂量依赖性方式抑制了睾酮生成、精子数量和睾丸重量。同时,睾丸凋亡细胞的比例显著增加,促凋亡蛋白BAX的表达上调,表明PAHs暴露可能通过促进睾丸细胞凋亡来抑制精子的形成。雄激素受体和间质细胞标志物Cyp11a1的表达下调,表明类固醇激素的合成受损。睾丸组织中PAHs的残留量没有呈剂量依赖性增加,因此,PAHs可能不是通过直接作用于睾丸组织引发生殖毒性效应。RNA-Seq和RRBS-Seq多组学测序数据表明,PAHs导致睾丸转录组变化与甲基化模式的改变相对应,进一步验证发现,在精子发生调控中至关重要的基因Tnp1和Sohlh2的甲基化水平分别与Tnp1和Sohlh2 mRNA表达量呈负相关。结论 孕期暴露于环境水平的PAHs会导致后代成年后类固醇生成和生精功能的持续受损。PAHs导致的生精细胞受损的DNA甲基化调控机制可能有助于理解持久性有机污染物造成的生殖毒性。

关键词:多环芳烃; 精子发生; 细胞凋亡; DNA甲基化

作者简介:欧坤霖, E-mail: 1279598421@qq.com

T12-0017

PM_{2.5}暴露诱发小鼠认知障碍的机制及其间歇性禁食干预研究

郑欣悦, 陈新月, 杨戈, 李敏, 彭阳, 李婧菡, 杨水清, 李睿*

(华中师范大学 遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430079)

摘要:目的 越来越多的研究发现PM_{2.5}可损伤大脑,加速认知障碍,增加多种神经退行性疾病的发病风险。本研究通过神经行为学和蛋白组学等方法探究PM_{2.5}暴露对小鼠学习记忆能力的影响及其潜在分子机制,以及探究间歇性禁食是否能够缓解PM_{2.5}造成小鼠学习记忆障碍。材料与方法 研究分为两个部分,第一部分:通过气道滴注对8周龄C57BL/6小鼠进行为期12周PM_{2.5}暴露,在进行蛋白质组学分析和其他生理生化检测后,对候选糖代谢机制进行靶向抑制,验证其对PM_{2.5}暴露后海马小胶质细胞M1极化与认知功能的影响;第二部分:在对小鼠进行PM_{2.5}暴露的同时开展“16+8”模式的间歇性禁食,暴露结束后进行系列行为学和生化指标检测,以及对小鼠粪便进行肠道微生物组学分析。而后在对小鼠实施菌群移植基础上再进行PM_{2.5}暴露,以期判断肠道微生物是否在间歇性禁食缓解PM_{2.5}对小鼠学习记忆能力中起作用。结果 12周的PM_{2.5}暴露会诱发小鼠的神经毒性效应,包括神经认知障碍出现、海马损伤以及小胶质细胞的激活,并且存在M1型极化现象。蛋白组学以及定量分析结果表明,PM_{2.5}暴露导致小鼠大脑异常糖代谢的发生。而2-DG抑制糖酵解后可显著缓解由PM_{2.5}引起的海马小胶质细胞M1型极化现象并降低炎症因子的释放,改善突触结构,提高小鼠的学习记忆能力。除此之外,我们的间歇性禁食干预研究发现,每日16小时的禁食能够缓解由PM_{2.5}所致的小鼠血糖上升、学习记忆能力降低、海马组织损伤以及氧化应激水平上升。肠道微生物组学分析发现相比于暴露组,干预后的小鼠肠道菌群增加了小鼠拟杆菌目(*Bacteroidales*)、乳杆菌目(*Lactobacillales*)肠道有益菌的种类和丰度。而移植了间歇性禁食小鼠粪便后的小鼠在PM_{2.5}后学习记忆能力有

所增强,脑组织氧化应激水平有所降低。**结论** 12周的PM_{2.5}暴露降低小鼠学习记忆能力并使大脑受损,抑制异常糖代谢发生能通过调节海马小胶质细胞M1极化以及改善突触结构及相关蛋白表达,从而缓解由PM_{2.5}引起的认知障碍。间歇性禁食可以通过调节肠道微生物进而缓解由PM_{2.5}暴露所致的学习记忆障碍。本研究为PM_{2.5}暴露致神经毒性提供新的见解,并为防控由PM_{2.5}诱发的认知障碍提供一定的理论参考。

关键词:PM_{2.5};糖代谢;小胶质细胞;认知障碍;间歇性禁食;肠道微生物

基金项目:国家自然科学基金面上项目(42077403);华中师范大学中央高校基本科研业务费项目(CCNU18JCXK07);华中师范大学中央高校基本科研业务费项目(CCNU19TS066)

通讯作者:李睿,E-mail:rui@ccnu.edu.cn

T12-0018

动力学直接多肽反应试验应用于化妆品香料皮肤致敏性检测

何国群,蒋关清,陈祥麟

(广东省疾病预防控制中心 国家药品监督管理局化妆品风险评估重点实验室,广东 广州 511430)

摘要:目的 动力学直接多肽反应试验是近年新开发的化学物皮肤致敏性检测方法,实验结果反映了皮肤致敏机制中致敏物质与皮肤蛋白质共价结合的分子起始事件,本研究应用该试验方法,对3种化妆品香料进行皮肤致敏性的检测。**方法** 试验方法参考欧洲经济合作与发展组织化学物测试指南(OECD TG 442C),选用柠檬醛、芳樟醇、新铃兰醛这3种化妆品香料,每种化学物分别用乙腈配制成1.25、2.5、5.0、10.0、20.0 mM 5个浓度,移入96孔测试板中,40 μL/孔,然后每孔分别加入0.667 mM的半胱氨酸肽160 μL混合,使化学物终浓度为0.25、0.5、1.0、2.0、5.0 mM,同时设空白对照、溶剂对照、物质对照和阳性对照(肉桂醛),设6个暴露时间为10、30、90、150、210、1440 min,25℃孵育,作用相应时间后,加入3 mM的单溴二胺(mBrB),40 μL/孔,通过荧光测定检测mBrB与未结合的半胱氨酸肽反应形成的荧光复合物的荧光强度;计算半胱氨酸肽的消耗率,消耗率=[1-(化学物荧光校正值/溶剂对照荧光校正值)]×100%,将各浓度化学物对半胱氨酸肽的消耗率转化为速率常数,获得6个时间点中最大对数速率常数(log k_{max});评价3种化学物的致敏性,当化学物在5 mM终浓度时半胱氨酸肽消耗率<13.89%,则该化学物为无致敏反应性;当化学物在5 mM终浓度时半胱氨酸肽消耗率≥13.89%,则进一步计算log k_{max},若化学物log k_{max}≥-2.0时判为强致敏物,即相当于联合国《全球化学品统一分类和标签制度》(GHS分类)的1A类致敏物,若化学物无致敏反应性或log k_{max}<-2.0时判为非强致敏物,即非1A类化学物。**结果** 在终浓度5 mM时,柠檬醛、芳樟醇、新铃兰醛的半胱氨酸肽消耗率分别为25.40%、0%和99.00%;根据反应速率常数计算,获得柠檬醛和新铃兰醛的log k_{max}分别为-3.21和-1.43,芳樟醇则为无致敏反应性。**结论** 动力学直接多肽反应试验结果表明,柠檬醛、芳樟醇的致敏性分类为非强致敏物(非1A类),新铃兰醛则为强致敏物(1A类),3种化学物致敏性分类均与欧洲化学品管理局数据库中GHS分类一致。

关键词:动力学直接多肽反应试验;化妆品香料;皮肤致敏性

通讯作者:何国群,E-mail:guoqunhe@163.com

T12-0019

华支睾吸虫-HBV双暴露在肝细胞癌中的作用及分子机制

卢文敏¹,陈嘉璠²,冯吉^{1,4},朱广志³,彭涛³,王继刚²,卢国栋^{1,4*}

(1. 广西医科大学公共卫生学院,广西南宁 530021; 2. 中科院中医科学院青蒿素研究中心,北京市 100700; 3. 广西医科大学第一附属医院肝胆外科,广西南宁 530021; 4. 复旦大学公共卫生学院,上海 200032)

摘要:目的 华支睾吸虫(CS)又称肝吸虫,是一种食源性寄生虫,人们因生食或半生食含有CS囊蚴的

淡水鱼感染,CS虫体本身及其分泌排泄产物(CsESP),可引起胆管扩张、胆管上皮细胞增生、管壁增厚等病理改变,进而导致胆管炎、胆囊炎、肝纤维化甚至胆管癌,但其在肝细胞癌中的作用及分子机制尚未完全阐明。乙型肝炎病毒(HBV)是HCC的主要危险因素,本研究旨在探讨CS-HBV感染在HCC发展中的作用及分子机制。方法 采用人群流行病学、单细胞转录组、空间转录组测序及一系列分子生物实验探讨CS-HBV感染在HCC发展中的作用及分子机制。结果 1. 人群流行病学结果显示,HBV-CS感染组HCC患者预后较CS单独感染和HBV单独感染组HCC患者差,CS感染是三组患者总生存期的独立危险因素;2. 单细胞和空间转录组测序结果显示,三种感染类型中肿瘤上皮细胞表现出较高的组间和个体异质性;免疫细胞结果分析显示,对照组和CS感染组具有较高比例的NK和CD8_Tem细胞,HBV感染组具有较高的CD4_TF和CD4_Treg细胞,而CS-HBV感染组则具有较高比例的CD4_Tm2细胞和CD8_Tex细胞;不同亚型的CD8_Tex的发育轨迹出现两条分支,分别指向以HBV感染组为主的cell fate1和以CS-HBV感染组为主的cell fate2;5. 对照组具有较高比例的Neu1细胞,CS感染组具有较高比例的Macro2细胞,HBV感染组具有较高比例的Macro3细胞,而CS-HBV感染组则具有较高比例的Macro1细胞;基质细胞结果分析显示,对照组具有较高比例的LSEC细胞,CS感染组具有较高比例的LVEC_C2,而HBV感染组和CS-HBV感染组具有较高比例的LVEC_C3细胞。三种肿瘤亚型中的LVEC_C3相对对照组具有较高的NOTCH通路分数;3. 体外实验结果显示,CsESP处理肝癌细胞后,促进肝癌细胞增殖,抑制其凋亡,并促进M0型巨噬细胞向M2型巨噬细胞分化,此外其还可抑制T淋巴细胞活化至效应T细胞,促进细胞毒性T细胞耗竭。结论 CS-HBV感染HCC患者较单独感染患者预后差,不同感染类型HCC患者免疫微环境存在异质性,CsESP可以促进肝癌细胞增殖,抑制其凋亡,促进M0型巨噬细胞向M2型巨噬细胞分化,抑制T淋巴细胞活化至效应T细胞,促进细胞毒性T细胞耗竭。

关键词:华支睾吸虫;乙型肝炎病毒;肝细胞癌;单细胞转录组;空间转录组

项目资助:国家自然科学基金面上项目(81972291);区域性高发肿瘤早期防治研究教育部重点实验室(广西医科大学)自主课题(GKE-ZZ202131);广西研究生教育创新计划项目(YCBZ2024142)

通讯作者:卢国栋,E-mail: lugd@fudan.edu.cn

T12-0020

环境相关浓度CPPDQ暴露致秀丽线虫神经毒性和生物蓄积

万 昕¹, 梁戈玉^{1*}, 王大勇^{2*}

(1. 东南大学公共卫生学院, 江苏 南京 210009; 2. 东南大学医学院, 江苏 南京 210009)

摘要:目的 CPPD醌(CPPDQ)是对苯二胺醌(PPDQs)中的一种,广泛分布于环境介质中,与6-PPDQ结构类似,然而关于CPPDQ的潜在机制还知之甚少。本文旨在通过秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*)这一模式生物,探讨CPPDQ致秀丽线虫的神经毒性、生物蓄积及潜在的分子机制。方法 将L1期秀丽线虫幼虫暴露于0.01-10 $\mu\text{g/L}$ 的CPPDQ,暴露至成虫第三天,观察CPPDQ对秀丽线虫运动行为、D-type神经元发育的影响,通过qRT-PCR和RNAi技术对其潜在分子机制进行探讨。结果 暴露于0.01-10 $\mu\text{g/L}$ CPPDQ降低了秀丽线虫头部摆动、身体弯曲和前向转弯,增加后向转弯能力,表明CPPDQ可致秀丽线虫运动行为改变。并且,在暴露于10 $\mu\text{g/L}$ CPPDQ可诱导秀丽线虫神经退行性变及GABA能神经元受损。对其神经退行性变分子基础进行探讨, CPPDQ暴露降低秀丽线虫神经元信号分子daf-7(编码TGF- β 配体)、jnk-1(编码JNK MAPK)、mpk-1(编码ERK MAPK)的表达。此外,暴露于CPPDQ导致G蛋白偶联受体(GPCR)基因dcar-1表达降低和npr-8表达增加。RNAi提示,daf-7、jnk-1、mpk-1和dcar-1基因沉默显著增强了CPPDQ致秀丽线虫神经毒性和生物蓄积,而对npr-8基因沉默表现出抗性。此外,通过信号通路分析,我们发现沉默dcar-1增加了jnk-1和mpk-1基因的表达,沉默npr-8增加了mpk-1的表达。结论 CPPDQ通过抑制TGF- β 、JNK MAPK和ERK MAPK信号通路诱导秀丽线虫神经毒性。抑制JNK MAPK和ERK

MAPK 信号通路与 GPCRs 中 DCAR-1 和 NPR-8 改变有关。

关键词: CPPDQ; 神经毒性; 生物蓄积; 秀丽线虫

通讯作者: 梁戈玉, E-mail: lianggeyu@163.com; 王大勇, E-mail: dayongw@seu.edu.cn

T12-0021

UPLC-MS/MS 法测定人尿中 6 种对苯二胺类抗氧化剂醌类衍生物

梁雨婷¹, 霍宗利², 朱峰², 梁戈玉^{1*}, 周永林^{2*}

(1. 东南大学公共卫生学院, 中国南京 210009; 2. 江苏省疾病预防控制中心, 江苏南京 210009)

摘要:目的 首次建立改进的液液萃取法-超高相液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS)同时测定人尿中 6 种对苯二胺类抗氧化剂醌类衍生物(PPD-Qs)的方法, 分析南京市一般人群 6 种 PPD-Qs 的暴露水平。**方法** 建立尿液中 PPD-Qs 的前处理方法, 取尿液于玻璃离心管中, 加入内标后平衡, 向其中加入提取溶剂, 涡旋提取后离心, 按照以上操作重复萃取一次, 合并上清液并置于洁净氮气下氮吹至干燥, 甲醇定容。采用 WATERS ACQUITY BEH C18(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 色谱柱分离, 电喷雾离子化正离子模式检测 6 种 PPD-Qs 的含量。考察方法的回收率和日内、日间精密度。**结果** 6 种 PPD-Qs 在 0.1~30 ng/mL 范围内线性相关系数均>0.999, 方法检出限为(0.003~0.024) ng/mL, 低(0.1 ng/mL)、中(0.5 ng/mL)、高(2.00 ng/mL) 3 种浓度的加标回收率均在 95.4~113.1% 之间, 日内和日间精密度良好(RSD<10%)。一般人群尿液中 6 种 PPD-Qs 的检出率均高于 90%, 平均浓度在 0.067~1.507 ng/mL 之间。**结论** 该方法灵敏度, 回收率高和精密度好, 可满足测定人尿中 6 种 PPD-Qs 内暴露水平的要求。

关键词: 人体尿液; 醌类衍生物; N-(1,3-二甲基丁基)-N'-苯基对苯二胺醌; 高效液相色谱-串联质谱法

通讯作者: 梁戈玉, E-mail: lianggeyu@163.com

T12-0022

多氯联苯致女性生殖毒性研究进展

陈依姝, 吴春蕊, 张慧珍*

(郑州大学公共卫生学院, 郑州 450001)

摘要:多氯联苯由于其优异的物理特性长期用于工业应用。尽管多氯联苯自 20 世纪 70 年代末以来已在国际上被禁止生产, 但在涉及氯的生产过程和电子废物处理过程中仍常发生无意释放。此外, 多氯联苯是具有极长半衰期的持久性有机污染物, 可在各种环境介质中持续存在并进入人体, 这表明多氯联苯仍然是一个值得关注的公共卫生问题。本研究就多氯联苯对女性生殖系统的不良影响及相关机制进行综述。首先, 多篇研究表明, 血清多氯联苯浓度与女性妊娠率呈负相关, 并与妊娠期血小板减少症发病率呈正相关。多氯联苯与女性性激素紊乱、流产和各种生殖疾病呈高度正相关。动物实验表明, 多氯联苯会诱导卵巢细胞氧化应激和细胞自噬, 从而损害卵巢、子宫和输卵管的结构和功能。多氯联苯还会产生表观遗传效应, 通过母体胎盘传递给后代, 造成胚胎发育迟缓、畸形和死亡, 并对多代器官造成损害。此外, 多氯联苯具有跨代毒性, 宫内接触多氯联苯可对后代的生殖、神经、免疫和内分泌系统的发育造成损害。总之, 多氯联苯可干扰女性性激素水平, 降低卵巢储备功能, 引起生育能力下降, 导致多囊卵巢综合征、卵巢早衰、妊娠期血小板减少症等生殖疾病的发生。在细胞水平上, 多氯联苯影响生殖相关细胞的增殖和发育, 导致雌性生殖系统功能异常。氧化应激介导的细胞凋亡、自噬及表观遗传修饰在多氯联苯诱导的雌性生殖毒性中起重要作用。这些详细资料为充分了解多氯联苯的生殖毒性提供了有价值的参考。

关键词: PCBs; 雌性生殖毒性; 性激素紊乱; 毒性机制

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82073512);国家自然科学基金面上项目(82273594);中原科技
创新领军人才计划(244200510028)

通讯作者:张慧珍,E-mail:huizhen18@126.com

T12-0023

肿瘤治疗性疫苗的研究进展和非临床评价策略

迟晓庆, 翁勤洁*

(浙江大学药物安全评价研究中心, 浙江 杭州 310058)

摘要:肿瘤治疗性疫苗作为一种创新的癌症治疗方式,近年来在全球范围内取得了显著的进展。根据2024年6月国家药监局发布的《肿瘤治疗性疫苗非临床研究技术指导原则》,本文将从国内外最新进展和非临床评价的角度详细探讨该领域的发展状况和评价策略。

近年来,肿瘤治疗性疫苗在全球范围内不断涌现,许多新型疫苗已进入临床试验阶段,并取得了显著的疗效。如 Provenge (sipuleucel-T):这是首个获得FDA批准的肿瘤治疗性疫苗,用于治疗转移性去势抵抗性前列腺癌。Provenge通过提取患者自身的抗原呈递细胞(APC),在体外与前列腺酸性磷酸酶(PAP)结合,再回输到患者体内,激发特异性免疫反应,攻击前列腺癌细胞。Cervarix和Gardasil:这两种疫苗分别由GSK和默沙东公司研发,用于预防人乳头瘤病毒(HPV)感染及其引发的宫颈癌。尽管它们主要是预防性疫苗,但也展现出一定的治疗潜力。在我国,肿瘤治疗性疫苗的研发同样取得了显著进展。如由上海惠盾生物技术有限公司研发的重组EGF-CRM197肿瘤治疗性疫苗,针对经一线化疗失败或一线化疗联合PD-1/PD-L1抑制剂治疗失败的非小细胞肺癌患者,该疫苗已进入临床II期试验,初步显示出良好的治疗潜力。

肿瘤治疗性疫苗的非临床评价是其成功开发的关键步骤。根据《肿瘤治疗性疫苗非临床研究技术指导原则》,评价策略应包括以下几个方面:1)种属选择,通常受试物应在动物种属中产生与人体相似的特异免疫原性和/或药理作用,若采用动物种属进行非临床研究不可行时,可考虑采用替代产品在其相关种属中开展试验。2)药理学活性,评估疫苗在动物体内的免疫原性和保护效果,包括体液免疫和细胞免疫反应。3)安全药理学,观察疫苗对心脏、呼吸和中枢神经系统等主要生理功能的影响。4)药代动力学,研究疫苗在动物体内的吸收、分布、代谢和排泄情况,以了解其在体内的稳定性和生物利用度。5)一般毒理学,肿瘤治疗性疫苗应参考ICH S9、ICH S6、ICH M3开展一般毒理试验。通常,其给药途径、给药频率、给药次数、给药期限等给药方案应尽可能支持临床拟定试验方案。6)遗传学和生殖毒性,核酸(尤其DNA)类疫苗、病毒载体类疫苗因其可能整合入宿主基因,可能具有潜在遗传毒性风险,需对其潜在遗传毒性风险进行研究评价。应根据肿瘤治疗性疫苗的类型、作用机制、一般毒理发现、生物分布特征以及患者人群等因素评估潜在的生殖/发育毒性风险。通常,对于可在常规动物种属中开展毒性研究的产品,应基于ICH S5、ICH S6、ICH S9相关原则考虑开展生殖毒性试验。7)致癌性,对于细胞载体类产品,需对其成瘤/致瘤/致癌性风险进行评估,必要时需进行研究。对于病毒载体类和核酸(尤其DNA)类疫苗,需关注其是否具有整合作用,以及潜在插入突变、致瘤/致癌性风险。8)免疫原性,免疫原性是肿瘤治疗性疫苗的主要药理作用机制,在药理研究中应对其潜在的细胞免疫和体液免疫反应进行研究。在毒性试验中,需要对其抗药抗体进行检测以助于毒性试验结果的综合评价。建议根据药物特点,确定检测目标,例如抗病毒载体抗体、抗目的蛋白抗体、或者抗辅料(如PEG)抗体。9)光安全性,若采用全新的化学类辅料或佐剂,在I期临床试验前应根据化合物的光化学特性和药理/化学类别初步评估潜在光毒性。10)制剂安全性,确保疫苗的制剂成分在使用过程中不会引发不良反应。11)毒代动力学,研究疫苗的毒性分布和代谢过程,以预测人体用药的安全性。

例如, Provenge (sipuleucel-T),通过提取患者自身的抗原呈递细胞(APC),在体外与前列腺酸性磷酸酶(PAP)结合,再回输到患者体内,激发特异性免疫反应,攻击前列腺癌细胞。总体评价策略,选用小鼠和灵长类动物进行研究,以评估不同种属的免疫反应,同时检测疫苗在动物体内的免疫激活能力,并观察疫苗

对心脏、呼吸和中枢神经系统的影响。研究疫苗在动物体内的分布、代谢和排泄。进行重复给药毒性试验,以评估疫苗的系统毒性,分析疫苗引发的免疫反应及其持久性。未进行遗传毒性、生殖毒性和致癌性研究。

肿瘤治疗性疫苗在抗癌治疗领域展现出巨大的潜力,然而其安全性和有效性的验证是关键挑战。通过科学、规范的非临床评价,可以有效预测人类用药的安全性和疗效,减少临床试验中的风险。未来,随着技术的进步和研究的深入,肿瘤治疗性疫苗有望成为癌症治疗的新希望,为患者带来更多的生存机会和生活质量的改善。总之,非临床研究是肿瘤治疗性疫苗研发的基础,通过严谨的评价策略,我们能够更好地理解疫苗的安全性和有效性,从而推动其在临床中的应用。

通讯作者:翁勤洁,E-mail:tiffany1127@zju.edu.cn

T12-0024

孕期对乙酰氨基酚暴露致子代大鼠骨关节炎易感的宫内编程机制

张帆¹,李庆贤¹,汪晖^{2,3*},陈廖斌^{1,3*}

(1. 武汉大学中南医院骨科关节外科与运动医学科,武汉 430071; 2. 武汉大学基础医学院药理学系,武汉 430071; 3. 发育源性疾病湖北省重点实验室,武汉 430071)

摘要:目的 作为妊娠期使用最广泛的镇痛药之一,对乙酰氨基酚(acetaminophen, Ace)所致的软骨发育毒性及其远期疾病风险尚不明确。方法 Wistar大鼠于孕10-12天(gestational day, GD10-12)予以Ace(100 mg/kg·d)或等量生理盐水灌胃处理,部分子代于出生后8-12周(postnatal weeks, PW8-12)进行长距离跑步,在GD20和PW12检测软骨表型及相关指标的变化。结果 与对照组相比,孕期对乙酰氨基酚暴露(prenatal acetaminophen exposure, PAcE)组雄性子代大鼠在GD20和PW12时软骨基质合成减少,降解增强,软骨发育不良,且在长距离跑步后软骨Mankin's评分明显升高,而PAcE组雌性子代大鼠仅在GD20时软骨细胞外基质含量及基质合成降低,而PW12时无明显变化。进一步发现,PAcE雄性子代胎软骨Wnt5a升高明显,且在PW12持续存在。细胞水平发现,Ace在缺氧环境抑制软骨细胞糖酵解关键基因HK1表达,增强糖酵解下游基因G6PD、PKM、LDHA、PEPCK表达和乳酸含量,同时Ace组软骨发育相关基因Wnt5a启动子区H3K181a水平升高,Wnt5a表达增强,软骨基质合成基因(COL2A1和ACAN)表达下降,基质降解基因(MMP3和MMP13)表达上调。HK1过表达、LDHA和Wnt5a敲低逆转了Ace所致软骨细胞糖酵解增强、Wnt5a启动子区高H3K181a和软骨基质合成降低及降解增强。结论 本研究发现PAcE可致雌、雄性子代胎鼠关节软骨质量低下,且雄性成年子代大鼠在长距离跑步后出现骨关节炎易感。其机制主要为Ace在缺氧环境中通过增加糖酵解产物乳酸的生成,进而升高软骨Wnt5a启动子区H3K181a水平,引起Wnt5a表达增强,最终导致软骨基质稳态失调。本研究探究PAcE所致软骨质量低下及远期骨关节炎易感的机制,为其早期防治提供了新的策略和干预靶标,为胎源性骨关节炎早期精准化治疗提供了研究基础。

关键词: 软骨质量低下; 孕期对乙酰氨基酚暴露; 骨关节炎易感; 组蛋白乙酰化; Wnt5a

基金项目: 国家重点研发计划“发育编程及其代谢调节”重点专项(No. 2020YFA0803900)

作者简介: 张帆,男,医学博士研究生,主要从事骨关节疾病研究, E-mail:Zhangfan199902@163.com.

通信作者: 陈廖斌,男,医学博士,主任医师,教授,博士生导师,主要从事骨关节病研究, E-mail:bchen@whu.edu.cn; 汪晖,女,医学博士,二级教授,博士生导师,主要从事外源物发育毒理研究, E-mail:wanghui19@whu.edu.cn

T12-0025

Plagl1 高甲基化编程介导父体咖啡因暴露所致雌性子代肾小管间质纤维化易感

王松狄, 夏微萍, 汪 晖, 敖 英*

(武汉大学基础医学院药理学系, 武 汉 430071)

摘要:目的 越来越多的证据支持“健康和疾病的发育起源”(Developmental Origins of Health and Disease, DOHaD)学说,其中父体暴露于不良环境对子代的影响比现有的认识广泛且深远。咖啡因广泛存在于咖啡、茶和止痛药物中,是男性日常生活环境中容易暴露的外源物。调查数据显示,育龄男性咖啡因暴露的现象较孕期女性更为普遍。然而,男性在备孕期摄入咖啡因对子代发育的影响尚未受到人们广泛的关注。本研究旨在探究父体咖啡因暴露(paternal pre-pregnant caffeine exposure, PPCE)所致宫内和出生后子代近曲小管功能障碍现象及其编程机制。方法 本研究中,F0雄性 Wistar 大鼠连续8周给予咖啡因(60 mg/kg.d)灌胃处理建立 PPCE 模型,与正常雌鼠交配受孕获得 F1 子代,并观察亲代精子印记基因甲基化及雌雄子代出生前后肾脏组织学、近端小管功能及脂代谢相关指标改变。结果 与对照组相比,PPCE 可致 F1 雌性子代宫内宫内皮髓质比下降,出生后不同时间点见近曲小管上皮细胞脱落等病理改变。成年子代大鼠血尿中生化指标改变,以及近曲小管多种转运体基因和结构基因表达下降。高脂二次打击下出现显著的肾小管间质纤维化表型。进一步发现,子代肾脏印记基因 Plagl1 表达持续降低,靶向 PPAR α 介导出生前、后脂肪酸氧化持续抑制。同时,在 HK-2 细胞中敲低 Plagl1 后,观察到了近曲小管功能结构基因的下调和脂肪酸氧化相关指标的改变,用过表达质粒回补 Plagl1 或用 PPAR α 激动剂均可恢复上述改变。PW8 的 PPCE 雌性子代尾静脉注射 Plagl1 过表达腺相关病毒后,也逆转了近端小管损伤的发生。追溯回亲代,精子全基因组甲基化结果显示,PPCE 可致亲代精子 Plagl1 启动子甲基化水平升高,提示子代肾脏 Plagl1 高甲基化低表达源于父体精子。给予父体 GR 拮抗剂 RU486 可逆转 PPCE 所致雌性子代近曲小管功能障碍的影响,提示该编程机制或许与高 GC 所致亲代精子重编程机制相关。结论 本研究表明,PPCE 致雌性子代大鼠宫内肾小管发育不良,成年后近端小管功能障碍,高脂二次打击下出现肾小管间质纤维化易感。其潜在的毒性机制为:PPCE 致亲代父本高糖皮质激素诱导精子中印记基因 Plagl1 高甲基化编程,这种表遗传改变通过精子传递子代,致雌性子代肾脏 Plagl1 表达降低,靶向 PPAR α 调控的脂肪酸 β -氧化功能抑制,致成年后肾小管间质纤维化易感。

关键词: 父体孕前咖啡因暴露; 肾小管间质纤维化; Plagl1; 精子重编程

基金项目: 国家自然科学基金联合重点项目(No. U23A20407); 国家自然科学基金项目(No. 81872943)

通讯作者: 敖 英, E-mail: yingao@whu.edu.cn

T12-0026

肠道编程改变通过影响菌群定植增加 PPE 子代炎症相关多疾病易感性荣凌波¹, 刘一帆², 李 斌², 汪 晖^{1,2,*}

(1. 武汉大学基础医学院药理学系, 2. 发育源性疾病湖北省重点实验室, 武汉 430071)

摘要:目的 研究提示孕期不良环境暴露可致子代多疾病易感,而子代肠道菌群可能参与其中。既往研究表明孕期强的松暴露(prenatal prednisone exposure, PPE)可致成年子代多疾病易感。然而,至今尚未探明子代出生后肠道菌群定植及组成变化在 PPE 所致多器官炎症及疾病易感性的作用。方法 Wistar 大鼠于孕 0-20 天予以 0.25 mg/kg·d 强的松或等量羧甲基纤维素钠经口灌胃,部分子代于出生后 8-12 周进行 4-羟基苯甲酸灌胃处理,处死前 24 小时腹腔注射 4 mg/kg 脂多糖, PW12 检测肠道菌群变化及炎症性疾病相关指标变化。同时,16 周龄 Wistar 大鼠口服抗生素(1 mg/mL 新霉素, 1 mg/mL 氨苄西林, 0.5 mg/mL 甲硝

啉和0.5 mg/mL万古霉素)2周形成伪无菌大鼠(pseudo-sterile rats),再分别将对照组和PPE组大鼠粪便的细菌悬液给伪无菌大鼠连续灌胃2周。**结果** 我们利用本实验室前期稳定构建的PPE大鼠模型,收集了出生后PW12的大鼠粪便,并进行16SrRNA测序分析。基于Bray-Curtis距离的主坐标分析(PCoA)分析显示,雌性PPE组肠道菌群组成均与对照组明显区分。进一步的LEfSe分析显示了PPE雌性子代大鼠的差异性变化细菌,提示抗炎、抗氧化代谢物4-羟基苯甲酸的合成相关菌丰度减少、代谢相关菌丰度增加导致其含量减少。进一步发现,PPE雌性成年子代大鼠和移植了PPE肠道菌群的成年伪无菌鼠均出现肝脏、肺脏、软骨等器官损伤、炎症因子(如IL-6、IL-1b、Tnf- α)表达均增加,提示肠道菌群介导了PPE雌性子代多脏器炎症性疾病易感。雌性成年子代大鼠脂多糖二次打击后出现多器官炎症性易感,而补充4-HBA可部分缓解。同时,4-HBA在多器官中所作用的受体Nrf2表达降低而NF- κ B表达增加。**结论** 本研究首次发现子代肠道菌群来源的4-HBA通过NRF2-NF- κ B通路活化介导PPE所致的多器官炎症反应及多疾病易感。本研究阐明了PPE导致子代肠道菌群定植异常、多脏器炎症及疾病易感的发生机制,为探寻肠道菌群定植异常相关胎源性炎症疾病的早期防治策略提供了新思路和新技术。

关键词: 孕期强的松暴露; 肠道菌群定植; 4-羟基苯甲酸; 表观遗传; 炎症性疾病

作者简介: 荣凌波,女,硕士研究生,从事药物发育毒理研究,E-mail: 1473725420@qq.com

通信作者: 汪 晖,女,医学博士,二级教授,博士生导师,从事外源物发育毒理研究,E-mail: wang-hui19@whu.edu.cn

T12-0027

采用外推因子进行吸入暴露到经口暴露外推的可靠性评估

Xiaoling Zhang^{1*}, 徐思然^{2*}, Sean Collins¹, Gang Yan¹

(1. Procter & Gamble, Central Product Safety, Mason, OH, 45040, USA; 2. 北京宝洁技术有限公司, 北京 101312, 中国)

摘要: **目的** 化学物质经口暴露的安全限值通常来自于相应暴露途径的毒性试验。当经口毒性试验数据不足或缺失时,研究者可以使用质量良好的吸入毒性试验数据,并通过途径到途径(Route-to-Route, R-t-R)外推的方法进行计算。理想情况下,研究者应用化学物质的毒代动力学(toxicokinetic, TK)数据进行R-t-R外推。然而,在没有相关TK数据时,如何进行吸入暴露到经口暴露的外推仍没有共识。本研究的目的是评估能否使用外推因子(extrapolation factor, EF)进行吸入暴露到经口暴露的外推,并为化学物质的安全评估提供支持。**材料和方法** 我们从美国环境保护署(EPA)、美国加利福尼亚州环境健康危害评估办公室(OEHHA)、欧洲化学品管理局(ECHA)和宝洁公司的数据库中收集了200余种化学物质的信息,重点关注吸入毒性试验和经口毒性试验的数据,包括局部效应和全身效应的安全限值。我们对吸入试验外推的安全限值与经口试验得出的安全限值进行分析,计算二者比值,从而得到每种化学物质的EF。我们分析EF的分布,并评估多个因素对EF的影响。相关因素包括被试化学物质的局部效应,物理化学性质,在不同暴露途径下的染毒时间,以及关键效应/靶器官。**结果** 我们的数据表明,化学物质的局部效应会显著影响全身效应的外推结果。在吸入毒性试验中,如果较低剂量引起局部效应,而较高剂量造成全身效应,那么吸入暴露到经口暴露的外推结果往往比较保守——超过90%的化学物质EF小于2.0。反之,如果在较低剂量时出现全身效应,而在较高剂量时出现局部效应,则吸入暴露到经口暴露R-t-R外推时应考虑使用更高的EF。此外,物理化学性质在R-t-R外推中也起到重要作用。如果化学物质具有较高log P值和较少极性基团,其在吸入暴露时的全身生物利用度可能较低,因此我们需要较高的EF来外推经口暴露的安全限值。试验染毒时间对外推结果没有显著影响。当两种暴露途径下的关键效应/靶器官相同时,外推得出的安全限值不确定性较小。**结论** 总体而言,在考虑局部效应、物理化学性质和关键效应/靶器官的前提下,我们对吸入暴露毒性试验的数据使用外推因子,可能得出可靠的经口暴露安全限值,并有助于进行化学物质的安全评估。

关键词: 吸入暴露; 经口暴露; 外推因子

通讯作者: Xiaoling Zhang, E-mail: zhang.x.31@pg.com; 徐思然, E-mail: xu.s.21@pg.com

T12-0028

褪黑素通过 CX43 介导的胞葬作用缓解阿特拉津诱导结肠损伤的研究

李木子, 姚明辉, 李金龙*

(东北农业大学, 动物医学学院, 哈尔滨 150030)

摘要: **目的** 阿特拉津(ATZ)是一种具有环境持久性的三嗪类除草剂,因其化学性质稳定,生物降解性差,易通过食物链富集进入体内,对组织器官造成慢性毒性危害。作为消化系统重要组成部分的肠道,更易通过饮食吸收而受到破坏。褪黑素(MT)是一种可以自身合成并分泌的激素,容易被机体吸收并具有抗氧化作用。然而,ATZ是否会导致结肠细胞胞葬和炎症反应,以及通过何种途径来缓解ATZ诱导的肠道屏障损伤仍有待阐明。本研究旨在探讨MT在ATZ诱导的结肠炎症反应和细胞胞葬中的作用及其潜在机制。**材料和方法** 将80只3周龄的ICR小鼠,适应性饲养一周后,随机分成Con组(无处理组)、M组(5 mg/kg MT)、A组(170mg/kg ATZ)、AM组(5mg/kg MT+170mg/kg ATZ),每日称量体重并记录以调整灌胃剂量,连续灌胃28天,期间小鼠自由饮食饮水。末次灌胃后,禁食禁水12h,眼球取血离心,保存血清。剥离小鼠结肠用于组织学及后续指标的测定。**结果** 通过对组织病理学H&E和AB-PAS染色结果观察,发现ATZ引起结肠肠绒毛排列紊乱,长度变短,形状不规则,且杯状细胞数量明显下降。MT治疗后,结肠状况显著改善,绒毛正常率大幅增加。MT可以缓解ATZ导致的肠道紧密连接蛋白(ZO-1、Occludin、Claudin-5和 β -catenin)表达水平的下降,并且缓解炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和IL-10)的异常紊乱。线粒体损伤检测结果显示,MT缓解了ATZ导致的线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)降低,Pink-1/Parkin通路介导的线粒体自噬和线粒体能量不足。免疫荧光和Western blot实验结果显示,MT缓解了ATZ诱导连接蛋白43(CX43)表达水平下降,巨噬细胞标志物(CD68)与TUNEL双染共定位的胞葬吞噬作用下降,以及CX43与CD68共定位的表达升高。**结论** MT可以通过激活CX43蛋白缓解巨噬细胞对结肠中凋亡细胞的胞葬作用,减轻了ATZ暴露引起的肠道屏障损伤和炎症反应。

关键词: 阿特拉津; 褪黑素; 肠道屏障损伤; CX43; 胞葬作用**通讯作者:** 李金龙, Tel: 13654657668, E-mail: Jinlongli@neau.edu.cn

T12-0029

FAK/occludin/ZO-1复合物对镉破坏鸡血睾丸屏障和睾丸损伤至关重要

李晓伟, 陈建, 李金龙*

(东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨市 150030)

摘要: **目的** 镉(Cd)是一种主要的工业污染物和环境毒物,可对人类和动物的许多器官造成严重损害,包括肺、肝、肾和睾丸。睾丸作为Cd的主要靶器官,Cd能够破坏睾丸的血睾屏障(BTB)和血管系统,导致精子丢失,生殖力下降,引起生殖功能障碍。然而,Cd诱导BTB破坏和睾丸损伤的机制尚未完全阐明。本研究的目的是为了探究Cd对BTB中FAK/occludin/ZO-1复合物的影响及其与类固醇激素合成之间的串联如何影响鸡的睾丸功能。**材料与方法** 本研究选择80只1日龄的海兰白公鸡,随机分为4组:Control组,35 Cd(35 mg/kg), 70 Cd(70 mg/kg), 140 Cd(140 mg/kg)。在严格控制室温和湿度的试验环境下拌料饲喂90天。试验结束后禁食12小时,麻醉、剖杀,取血清和睾丸组织。通过检测生化指标中判定Cd对鸡免疫系统的影响;通过HE染色观察睾丸中生精小管的损伤程度;通过荧光定量PCR, Elisa, Western blot和免疫荧光等方法验证鸡睾丸BTB中FAK/occludin/ZO-1复合物介导的紧密连接蛋白表达,炎症反应和类固醇激素合成情况。**结果** 试验结果表明Cd暴露引起鸡血清中生化指标异常,显著降低了睾丸重量,抑制了睾丸的生长。病理变化也证实了Cd对睾丸造成明显的病理损伤,表现为生精小管萎缩,生精层紊乱,生精细胞消失。免疫荧光双标和蛋白结果证明了Cd激活了NF- κ B介导的炎症反应,加速了BTB内化,促进了FAK/oc-

cludin/ZO-1复合物的解离,破坏BTB的完整性。BTB的完整性的破坏抑制了类固醇合成蛋白的合成和激素的分泌,降低睾酮的生成,诱导睾丸生精障碍。**结论** 我们的研究首次提出Cd诱导的鸟类睾丸功能障碍最初是通过FAK/occludin/ZO-1复合物的作用介导的,该复合物改变了紧密连接蛋白在支持细胞界面重新分布,从而导致BTB功能和结构的破坏。BTB的破坏会导致生殖细胞从睾丸中过早释放,并诱发男性生殖障碍。这一新发现为设计功能实验研究其在BTB动力学中的调节作用提供了理论基础。也为进一步研究Cd诱导的男性生殖功能损伤机制和药理保护提供了证据。

关键词: 镉; 血睾屏障; FAK/occludin/ZO-1蛋白复合物; 类固醇激素; 睾丸功能障碍

第一作者: 李晓伟, E-mail: 1178006970@qq.com

通讯作者: 李金龙, E-mail: Jinlongli@neau.edu.cn

T12-0030

丁草胺通过cGAS/NF- κ B/NLRP3信号轴诱导脾巨噬细胞焦亡的研究

赵汝阳, 李木子, 李金龙*

(东北农业大学, 动物医学学院, 哈尔滨 150030)

摘要: **目的** 丁草胺是一种广泛使用的酰胺类除草剂, 主要用于防治小麦、水稻和其他谷类作物中的有害阔叶杂草。其化学性质稳定, 生物降解性差, 容易沿食物链进入体内, 对组织器官造成慢性毒性危害。脾脏作为重要的免疫器官, 也会受到其潜在毒性的影响。丁草胺是否会导致脾脏中巨噬细胞的焦亡仍有待阐明。本研究旨在探讨丁草胺诱导的脾脏焦亡反应的作用及其潜在机制。**材料和方法** 将40只3周龄的ICR小鼠, 适应性饲养一周后, 随机分成玉米油(Con组)、10 mg/kg 丁草胺(BTR组)共2组, 每日称量体重并记录以调整灌胃剂量, 连续灌胃28天, 期间小鼠自由饮食饮水。末次灌胃后, 禁食禁水12 h, 眼球取血离心, 保存血清。剥离小鼠脾脏用于组织学及后续指标的测定。**结果** 通过组织病理学和超微结构观察, 发现丁草胺暴露会引起脾脏边缘区面积变小, 脾脏包膜变薄, 白髓减少, 炎性细胞浸润, 线粒体空泡化和嵴断裂等现象。检测线粒体损伤的结果显示, 丁草胺暴露会诱导ATP和CS的活性降低, 线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)降低。ELISA、荧光实时定量PCR、免疫荧光和Western blot实验结果显示丁草胺暴露激活干扰素基因的环状GMP-AMP合酶刺激因子(cGAS-STING)信号通路并介导核因子 κ B(NF- κ B)和核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)引起细胞焦亡的发生。**结论** 丁草胺暴露引起脾脏巨噬细胞线粒体损伤, 受损的线粒体将线粒体DNA(mtDNA)释放到胞质溶胶中, 激活cGAS/NF- κ B/NLRP3信号轴引起脾脏巨噬细胞焦亡。

关键词: 丁草胺; 细胞焦亡; 脾巨噬细胞; cGAS-STING

通讯作者: Tel: 13654657668, E-mail: Jinlongli@neau.edu.cn

T12-0031

利用hiPSC分化的皮肤表皮模型研究STING通路激活NLRP3炎症小体对UVA诱导皮肤光老化的作用

左绪磊, 卢红霞, 袁佳玉, 梁戈玉, 尹立红, 浦跃朴, 张娟*

(东南大学公共卫生学院环境医学工程教育部重点实验室, 南京 210096)

摘要: **背景** 皮肤老化, 尤其是UVA诱导的光老化, 涉及细胞DNA损伤、炎症反应和凋亡等机制。STING(干扰素基因刺激蛋白)对先天免疫至关重要, 可参与细胞对自身异常DNA的识别和响应, 当STING被激活时, 会引发一系列信号传导, 可导致炎症相关细胞因子和趋化因子的产生和释放, 从而引发炎

症反应。NLRP3 (NOD样受体家族 pyrin 结构域蛋白 3)通路则是炎症小体激活的关键途径之一, NLRP3通路的激活会导致炎症细胞因子的成熟和释放,引发炎症反应。适当的STING与NLRP3激活对修复组织损伤有重要意义,但过度或不适当的激活可能导致疾病的发生。**目的** 本研究旨在利用人诱导多能干细胞(hiPSC)分化的角质形成细胞构建皮肤表皮模型,探索UVA诱导光老化的机制,重点探讨UVA通过STING通路激活NLRP3炎症小体诱导细胞产生炎症反应和凋亡的作用。**材料和方法** 本研究中hiPSC使用BMP4、RA和EGF经历了28天的分化过程,分化为角质形成细胞,并通过免疫细胞化学和RT-qPCR证实K14和K5,对分化形成的角质形成细胞进行气液界面培养,构建皮肤表皮模型。随后暴露于不同剂量的UVA,使用TUNEL法评估细胞凋亡,通过蛋白质印迹和免疫荧光评估STING和NLRP3的激活情况。**结果** 本研究发现hiPSC诱导的角质形成细胞表达与原代角质形成细胞相似的角蛋白标记物(CK14、CK18、CK19)。使用气液表面培养构建了模仿人类皮肤结构的表皮模型,并通过HE染色进行了确认。使用丝聚蛋白(filaggrin)、外皮蛋白(involucrin)和兜甲蛋白(loricrin)染色进行进一步表征,表明皮肤表皮模型的分层和蛋白质分布正确。进而发现UVA暴露可激活了皮角质形成细胞的STING通路并诱导了NLRP3炎症小体的活化,诱导一系列炎症因子的释放,导致角质形成细胞凋亡增加。**结论** 本研究表明了STING-NLRP3通路在UVA诱导的皮肤老化中的重要性,为UVA导致的皮肤炎性损伤和光老化的预防提供了新的干预策略;同时本研究证明hiPSC分化的皮肤表皮模型为是皮肤毒性研究的有效体外模型。

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFF0711102)

通讯作者: 张娟, E-mail: zhangjuan@seu.edu.cn

T12-0032

药效动物模型建立中需考量的因素

刘兆泉, 于娜, 高明伟, 张炫, 陈聪*

(沈阳沈化院测试技术有限公司)

摘要: 药效模型的建立是药物研发过程中的重要环节,其精准性和可靠性对于评估药物的有效性和安全性至关重要。在构建动物药效模型时,需要综合考虑众多因素,以确保模型能够准确反映药物在体内的作用情况。

动物的选择对于模型的建立至关重要。动物的种属,年龄,体重,性别等因素对药物的代谢和反应均会存在差异。例如,裸鼠由于免疫缺陷,常被用于异种移植肿瘤模型,如将人类肿瘤细胞接种到裸鼠体内,以评估新型抗肿瘤药物的效果。然而,由于其免疫缺陷的特性,对于依赖免疫系统发挥作用的免疫治疗药物的评估没有太大的参考价值。

给药途径的选择也是建立药效模型时需要重点考虑的因素。常见的给药途径包括口服(灌胃)、静脉注射、腹腔注射、皮下注射等。不同的给药途径会影响药物的吸收速度和程度,进而影响药效。给药途径的确定需根据药物的性质、治疗目的和临床应用场景等因素综合考虑后选择,例如在阿莫西林对小鼠细菌感染的药效试验中,虽然经口灌胃更接近人类的常规用药方式,但由于存在首关效应及胃肠道的破坏,到达感染部位的有效浓度不足,效果缓慢,需要较长时间才能观察到明显的抗菌效果,而腹腔注射可避免首关效应及胃肠道的破坏,可在短时间内发挥强大的抗菌作用,效果显著,两种给药途径均可达到抗菌的目的,此时便需要综合其他试验条件进行这两种给药途径的选择和确定。

剂量的确定对于药效模型的准确性十分关键。剂量过低可能无法达到预期的治疗效果,而剂量过高又可能导致严重的毒副作用。在剂量的设定需要综合考虑药物的药效学和药代动力学参数,以及预期的治疗效果和可能的毒性反应。例如,对于某些具有窄治疗窗的药物,如地高辛,剂量的微小变化可能会导致显著的药效差异。此外,还需考虑个体差异对药物剂量需求的影响,如年龄、体重、肝肾功能等因素。实验环境的控制,包括温度、湿度、光照等,也可能影响动物的生理状态和对药物的反应。检测指标的选择

应能够准确反映药物的作用机制和治疗效果,如血液生化指标、组织病理学检查等,对于一些需要人工采集数据的实验还需要保持操作的一致性,如测量荷瘤裸鼠的实体瘤大小时,需同一人员完成所有测量工作以减少误差等。

综上所述,建立药效动物模型是一个复杂而系统的工作,需要综合考虑动物种属、给药途径、剂量、实验环境和检测指标等多种因素,以确保模型的科学性、准确性和可靠性,为药物研发提供有价值的参考和指导。

关键词: 药效学; 动物模型; 试验设计

责任作者: 刘兆泉, E-mail: liuzhaoquan@sinochem.com

通讯作者: 陈 聪, E-mail: chencong1@sinochem.com

T12-0033

玉米赤霉烯酮诱导AML-12细胞铁稳态紊乱从而导致铁死亡机制研究

宝力格, 黄永泽, 李继昌*

(东北农业大学动物医学学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: **目的** 在全世界范围内,一些人类和动物常食用的食品正在悄无声息的被霉菌毒素所污染,其中玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEA)是一种典型的环境/食物污染物,它会对机体造成不同程度的损伤。众所周知,铁死亡是个较为复杂的过程,除了抑制半胱氨酸/GSH/GPX4轴可以引发铁死亡,还可以通过转铁蛋白受体(TFRC)来增加细胞内的铁水平,以及细胞内的铁离子储存和出口出现紊乱等,这些原因都会引起细胞发生铁死亡。目前,关于ZEA诱导肝脏损伤的机制尚不完善。为此,本研究旨在探讨ZEA是否可以诱导小鼠AML-12细胞发生铁死亡,并为ZEA诱导肝脏损伤的机制提供新的研究思路。**材料和方法** 将小鼠肝实质细胞(AML-12 cells)暴露于ZEA体外攻毒浓度(10, 20, 30 μM)。ZEA攻毒AML12细胞24 h后提取细胞蛋白,利用Western Blot法检测铁死亡关键蛋白表达量(TFRC, FTH1, FTL, NCOA4, SLC40A1)。采用三种铁死亡抑制剂Fer-1(0.5 μM)、Lip-1(5 μM)和DFO(10 μM)预处理AML-12细胞2小时,随后与ZEA30共同处理24小时。通过试剂盒检测细胞内 Fe^{2+} 的含量,并检测铁死亡关键的蛋白表达量。**结果** 根据先前试验结果,选取10、20、30 μM 的ZEA作用AML-12细胞24 h开展试验。Western Blot结果显示,与Con组相比较,ZEA10/20/30攻毒组的FTH1、FTL、SLC40A1及NCOA4的蛋白表达量均显著/极显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),同时ZEA可以显著促进TFRC的蛋白表达水平($P < 0.05$)。同时在试验中发现铁死亡抑制剂Fer-1、Lip-1和DFO均可有效缓解ZEA所引起的铁死亡,但DFO的抑制效果优于Fer-1和Lip-1。故此在后续实验中发现,DFO预处理降低了ZEA所引起的细胞 Fe^{2+} 水平升高。与ZEA30组相比较,DFO+ZEA30组显著增加了SLC40A1的蛋白表达。**结论** 本研究证明ZEA攻毒AML12细胞后细胞内亚铁离子含量显著升高,同时ZEA导致FTH1、FTL、SLC40A1及NCOA4的蛋白表达均显著下调,TFRC的蛋白表达上调。以上证实了ZEA可以通过影响铁离子的输入/储存和外排从而诱导铁代谢紊乱,从而引发铁死亡。铁死亡抑制剂DFO阻断了ZEA所诱导的细胞毒性并恢复铁死亡相关的指标,这进一步表明铁死亡引起的细胞死亡对于细胞活力下降至关重要。

关键词: 玉米赤霉烯酮; 铁稳态; 铁过载; 铁死亡

第一作者: 宝力格, E-mail: baolige1992@126.com

通讯作者: 李继昌, E-mail: lijichang@neau.edu.cn

T12-0034

玉米赤霉烯酮诱导小鼠肝星状细胞 JS-1 活化的机制研究

黄永泽, 宝力格, 李继昌*

(东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:目的 玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEA)是一种由镰刀菌属真菌所产生的非甾体雌激素霉菌毒素,可被微生物、植物、动物和人类代谢成许多其他衍生物,其污染在世界范围内都有报道。肝纤维化(Hepatic Fibrosis, HF)是对反复发生的慢性肝损伤的适应性反应,其基本病理特点为细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)过度沉积于肝脏。目前已有报道称ZEA会引起肝脏损伤,但是否会引起肝纤维化或肝硬化等并无报道,故本研究旨在探究ZEA诱导小鼠肝星状细胞JS-1活化的作用机制,为治疗ZEA所引起的肝损伤提供重要的理论依据。**材料和方法** 将小鼠肝星状细胞(JS-1 cells)暴露于ZEA(0、5、10、20、30、40、60、80 μM)中处理12/24 h后,使用CCK8法检测细胞活力,筛选出适宜的ZEA浓度(10、20、30 μM)用于后续实验。利用Western Blot法检测肝纤维化以及自噬关键蛋白表达量(α -SMA、Collagen I/III、LC3 II/I、P62、Beclin-1、ATG5)。**结果** Western Blot结果显示,与Con相比,ZEA30组 α -SMA蛋白表达量极显著升高($P<0.01$),ZEA攻毒组Collagen I/III蛋白表达量均极显著升高($P<0.01$)。ZEA攻毒组LC3 II/I、ATG5、Beclin-1蛋白表达量与Con组相比均极显著上升($P<0.01$),ZEA攻毒组P62蛋白表达量与Con组相比均极显著下降($P<0.01$)。**结论** 根据试验结果推测ZEA可导致小鼠肝星状细胞活化,且上调小鼠肝星状细胞自噬。在肝纤维化发生的过程中,肝星状细胞(Hepatic stellate cell, HSC)的激活是肝纤维化的关键因素。ZEA攻毒组的JS-1细胞中HSC活化标志物 α -SMA和纤维化标志物Collagen I/III的蛋白表达量显著升高,因此推测ZEA可以通过激活HSC诱导小鼠肝脏纤维化。同时有研究表明,HSC可以通过自噬降解脂质为其激活提供能量,诱导纤维化发生。在鼠肝纤维化模型中,自噬水平的上升与HSC的激活紧密相关,因此试验进一步探究了ZEA对小鼠肝星状细胞自噬的影响。而P62、LC3 II/I等自噬关键蛋白是衡量细胞自噬的重要指标,ZEA导致小鼠肝星状细胞自噬关键蛋白表达量发生改变,故ZEA可以诱导小鼠肝星状细胞JS-1活化的同时上调自噬水平。然而ZEA所引起的小鼠肝星状细胞活化及自噬之间的更加密切的联系,有待进一步探究。

关键词: 玉米赤霉烯酮; 肝纤维化; α -SMA; Collagen I/III

第一作者: 黄永泽, E-mail: 1519235070@qq.com

通讯作者: 李继昌, 邮箱: lijichang@neau.edu.cn

T12-0035

线粒体损伤导致 mtDNA 释放介导铅铜联合暴露致 脑内神经炎症发生的机制研究

苏力虹, 陈超, 王涛*, 郑刚*

(空军军医大学军事预防医学系, 西安 710032)

摘要:目的 探讨线粒体损伤导致 mtDNA 释放介导铅铜联合暴露致脑内神经炎症发生的机制研究。**材料和方法** 建立体内 C57BL/6 动物模型,随机分为对照组(Con组)10只、铅暴露组(Pb组)10只、铜暴露组(Cu组)10只和铅铜联合暴露组(Pb+Cu组)10只,通过饮水方式染毒,染毒剂量为100 ppm 铅水和0.12 ppm 铜水,染毒时间为12周;体外培养 BV2 细胞,构建铅铜联合暴露细胞模型,Con组为 DMEM 高糖培养液,处理组分别为 DMEM 高糖培养液加5 μM 醋酸铅、5 μM 氯化铜、5 μM 醋酸铅加5 μM 氯化铜联合染毒,染毒时间24h;构建 BV2 细胞线粒体损伤 mtDNA 释放通道靶向抑制模型,分组为 Con组、Pb+Cu组、Con+BAI1组、Pb+Cu+BAI1组、Con+CsA组、Pb+Cu+CsA组、Con+VBIT-4组、Pb+Cu+VBIT-4组,BAI1和VBIT-4给药模式为伴随重金属铅铜一并处理,给药时间为24h,CsA预给药时间为30分钟。采用透射电镜

评估 C57BL/6 小鼠、BV2 细胞线粒体的损伤程度;免疫荧光染色和实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测铅铜联合暴露后 BV2 细胞的胞质 mtDNA; Western blot 检测铅铜联合暴露致 BV2 细胞促炎细胞因子的表达水平。此外,Western blot 也检测 mtDNA 释放靶向抑制模型中炎症因子的表达。**结果** 铅铜联合暴露致 BV2 细胞炎症因子 IL-1 β 、Nlrp3 的表达上调,Pb+Cu 组显著升高($P<0.05$)。铅铜联合暴露诱导线粒体氧化损伤,促进 mtDNA 释放到细胞质中,BV2 细胞胞质中 Nd1、Cytb 和 D-loop 的 mtDNA 水平较对照组升高且 Pb+Cu 组最为明显($P<0.05$)。mtDNA 释放通道靶向抑制,可使 mtDNA 的释放减少,铅铜联合暴露 BV2 细胞促炎细胞因子的表达回调,Pb+Cu+BAI1、Pb+Cu+CsA 组、Pb+Cu+VBIT-4 组较 Con 组显著下降。**结论** 我们的研究发现了受损线粒体的 mtDNA 渗漏到胞质中的机制,针对 mtDNA 释放通道靶向抑制可能是未来有效的治疗靶点。

关键词: 小胶质细胞;线粒体损伤;线粒体 DNA;神经炎症;mtDNA 释放通道

T12-0036

铜蓄积调节 PDK1 介导铅铜联合暴露小鼠海马神经元氧化损伤的作用及机制研究

谭双双,侯晶晶,李玉琪,王德胜,王涛*,郑刚*

(空军军医大学军事预防医学系,西安 710032)

摘要: **目的** 研究丙酮酸脱氢酶激酶 1(PDK1)在铅铜联合暴露诱导小鼠海马神经元氧化损伤中的作用及机制;**方法** 小鼠海马神经元 HT22 细胞分别以 5 $\mu\text{mol/L}$ 醋酸钠(control)、5 $\mu\text{mol/L}$ 氯化铜(Cu)、5 $\mu\text{mol/L}$ 醋酸铅(Pb)或 5 $\mu\text{mol/L}$ 氯化铜+5 $\mu\text{mol/L}$ 醋酸铅联合暴露(Pb+Cu);采用 ROS、MDA 试剂盒检测细胞氧化水平;流式细胞术检测细胞凋亡水平;检测线粒体氧耗量(OCR);Western blot 检测 PDK1、PDH 及其磷酸化水平;采用 ICP-MS 检测细胞内铅、铜水平;采用铜暴露检测铜蓄积对 PDK1 表达的影响;**结果** 结果显示铅铜联合暴露协同促进 HT22 细胞 ROS 和 MDA 水平增加,并协同促进 HT22 细胞凋亡。ICP-MS 结果显示铅铜联合暴露诱导细胞铜水平增加;Western blot 结果显示联合暴露 HT22 细胞 PDK1 及磷酸化 PDH 水平显著降低;OCR 检测结果显示,暴露早期 HT22 细胞 OCR 水平升高,而在暴露晚期 OCR 水平降低。细胞氧化水平检测显示暴露早期 HT22 细胞 ROS 及 MDA 水平升高;铜暴露导致细胞 PDK1 呈时间依赖性降低,其降低与线粒体氧耗水平升高相一致,采用 TTM 螯合铜可显著降低铅铜联合暴露细胞的氧化水平及凋亡率。**结论** PDK1 是细胞内的重要激酶,通过磷酸化调节丙酮酸脱氢酶(PDH)影响细胞糖酵解和氧化磷酸化过程。本研究发现铅铜联合暴露导致 PDK1 表达水平降低,并抑制 PDH 的磷酸化水平,这导致 HT22 细胞在暴露早期的线粒体氧化磷酸化水平升高,并促进细胞的 ROS 产生,造成细胞氧化损伤。铜蓄积在这一过程起了重要作用,螯合铜可显著降低 ROS 水平,并对细胞起到保护作用。

关键词: 铅铜联合暴露;铜蓄积;氧化损伤;PDK1

T12-0037

Subcategorization of eye irritants using the EpiOcular™ time-to-toxicity test method

M. Klausner¹, S. Letasiova², L. Hudecova², J. Markus², Y. Kaluzhny¹, S. Ayehunie¹, A. Armento¹,
E Zhao⁴, C. Pellevoisin*, E. Adriaens³

(1. MatTek Corporation, Ashland, MA; 2. MatTek Europe, Bratislava, Slovakia; 3. Adriaens Consulting BVBA, Aalter, Belgium; 4. CellEx (西指生物), Shanghai 200131, China)

Background and Purpose: As per OECD TG 405 "Acute Eye Irritation/ Corrosion", albino rabbits

were traditionally used to assess the eye damage/eye irritation of test materials. However, in 2015, OECD TG 492 "Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labeling for eye irritation or serious eye damage" was accepted and validated for the use of in vitro ocular tissue models. The validated EpiOcular™ RhCE is currently produced and provided for tests in China. Initially, this TG allowed for distinguishing between substances and mixtures not requiring classification and those that must be labeled for eye irritation or serious eye damage. Differentiation between materials causing serious eye damage and less-severe eye irritation was not included in the TG. Recently, OECD TG 492B was accepted which allows for distinguishing between chemicals that: a) do not require labeling for serious eye damage or eye irritancy (No Category or No Cat), b) cause serious eye damage (Category 1 or Cat 1), and c) are eye irritants (Category 2 or Cat 2) according to the UN GHS ocular hazard categories. **Methods** Results from 2 studies, the CON4EI project (2017) and the ALT4EI project (2022), were combined and re-analyzed. Prediction models for liquids and solids were developed as part of the CON4EI project which involved a set of 80 chemicals (38 liquids and 42 solids). An additional 64 chemicals were tested within the ALT4EI project. When combined, a robust final set of 144 reference chemicals – 78 liquids and 66 solids, was used to confirm the new testing strategy. **Results** The performance criteria, established by the OECD expert group overseeing OECD TG 492B, were met for all 144 chemicals. This data set was used to develop the EpiOcular™ time-to-toxicity test method for eye hazard identification of liquid and solid chemicals according to the three UN GHS. Based on the new testing strategy for liquids, 78.7% of Cat 1 (N=27), 63.5% of Cat 2 (N=26) and 82.0% of No Cat (N=25) were correctly identified. Using the new testing strategy for solids, 75.0% of Cat 1 (N=28), 59.4% of Cat 2 (N=16) and 80.3% of No Cat (N=22) materials were correctly predicted. Overall, the new test method correctly predicted 76.8% of Cat 1 (N=55), 61.9% of Cat 2 (N=42), and 81.2% of No Cat (N=47) test articles. **Conclusions** The EpiOcular™ time-to-toxicity test method is a novel approach for subcategorizing both liquid and solid compounds. The prediction models that were developed for liquids and solids are capable of distinguishing substances and mixtures into the 3 UN GHS ocular hazard categories: No Cat, Cat 2, and Cat 1. The new test method will further reduce the need to perform animal tests for determination of the eye irritation potential of materials.

Corresponding author: C.Pellevoisin, E-mail:pellevoisin@mattek.com

T12-0038

NFE2L1 维持线粒体稳态在砷致间充质干细胞分化障碍中发挥保护作用

胡玉鑫, 何佳霖, 娄彬, 马悦, 葛莉莉, 王惠惠, 皮静波, 徐苑苑*
(中国医科大学公共卫生学院, 辽宁省沈阳市沈北新区蒲河路77号 110122)

摘要:目的 探讨砷暴露对间充质干细胞(MSCs)分化的影响,及NFE2L1在其中的作用与可能机制。
方法 以小鼠骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)为研究对象,诱导其成脂和成骨分化,同时给予3 μmol/L亚砷酸钠(NaAsO₂)处理,以油红O和茜素红S染色法分别检测细胞脂肪和成骨分化能力;以Western blot方法检测不同时间、剂量NaAsO₂暴露对NFE2L1蛋白水平的影响;以慢病毒转染法构建长亚型Nfe2l1低表达(L-Nfe2l1-KD)BM-MSCs,通过Mitosox、Mito-tacker、JC-1探针标记,采用激光共聚焦和流式细胞术检测线粒体形态和质量、线粒体过氧化物含量和膜电位;利用细胞能量代谢检测系统对细胞线粒体进行压力测试,分析线粒体有氧呼吸功能;RNA-seq测序并通过RT-qPCR和Western blot方法对差异表达基因进行鉴定;

利用 siRNA 干扰 *Lonp1* 基因表达, 诱导分化后以油红 O 染色法和 ALP 含量检测细胞成脂和成骨分化能力。结果 与对照组相比, NaAsO₂ 处理组细胞脂滴和钙化结节数量减少 ($P < 0.05$), 且 NaAsO₂ 处理 12 h 后 BM-MSCs 中 NFE2L1 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$), 且以 L-NFE2L1 为主。15 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂ 处理 BM-MSCs 2、6、12、18、24 h 显著增加了 L-NFE2L1 蛋白表达水平 ($P < 0.05$); 与 Scramble 细胞相比, L-*Nfe2l1*-KD 细胞内超氧化物水平显著升高 ($P < 0.05$), 甲臞生成能力显著升高 ($P < 0.05$), Mito-Tracker Green 荧光强度较高且线粒体片段化形态明显, 线粒体膜电位、基础呼吸、最大呼吸和 ATP 生成均显著降低 ($P < 0.05$); RNA-seq 结果显示, L-*Nfe2l1*-KD 细胞有 68 个线粒体功能相关基因表达发生变化, 其中参与调控线粒体稳态维持的 *Lonp1* 基因差异倍数最大, 且经 RT-qPCR 和 Western blot 验证, *Lonp1* 的 mRNA 及蛋白水平均显著降低 ($P < 0.05$); 干扰 *Lonp1* 基因后, 诱导分化的细胞中脂滴生成数量及体积均发生下降, ALP 阳性细胞数量减少。结论 NaAsO₂ 暴露能够抑制 BM-MSCs 向脂肪细胞和成骨细胞分化, 并诱导 L-NFE2L1 高表达。L-NFE2L1 可能通过调控线粒体稳态调节因子 LONP1 的表达参与线粒体稳态的维持, 进而在 NaAsO₂ 暴露所致 BM-MSCs 分化异常中发挥保护作用。

关键词: 亚砷酸钠; 间充质干细胞; 分化功能; NFE2L1; 线粒体稳态

基金项目: 国家自然科学基金(82022063 & 81573187); 辽宁省自然科学基金(2024-MS-030)

通讯作者: 徐苑苑, E-mail: yyxu@cmu.edu.cn

T12-0039

Mid1 mediates the disruption of retrograde axonal transport in LiMn₂O₄-induced cognitive memory disorder

xinmiao Wang, zhiru Shen, yu Deng*

(China Medical University, Shenyang 110122)

Objective In the context of carbon peaking and carbon neutrality goals, lithium manganese oxide (LMO) is widely used as a cathode material in lithium-ion batteries due to its low cost and superior performance. However, this extensive use has markedly increased occupational exposure risks for lithium battery workers. Currently, no studies have examined the neurotoxic effects and mechanisms of LMO. It is essential to clarify these effects and identify potential intervention targets. **Methods** An epidemiological investigation was undertaken at a lithium battery manufacturing plant. Analyses included baseline data and metal concentrations in workers, distinguished by cognitive impairment status. Lasso regression was used to identify metals linked to cognitive impairment, followed by logistic regression on selected metals and covariates. To mimic the exposure environment, a whole-body dust exposure system administered LMO to C57BL/6J mice. RNA sequencing of the hippocampi from exposed mice showed significant upregulation of Mid1, indicating its crucial role in LMO-mediated neurotoxicity. Subsequently, animal and cellular models were developed using LMO and Mid1-silenced lentivirus for targeted interventions. Behavioral tests and histopathological staining were conducted on exposed mice. Further RNA-seq analysis and molecular docking identified potential key subunits of the dynein complex, *dynl1t4*, and *dynlrb2*. Changes in axonal retrograde transport in primary hippocampal neurons were observed through time-lapse live-cell imaging post-exposure. **Results** Epidemiological data showed that high plasma concentrations of manganese and lithium increased the risk of cognitive impairment. Compared to controls, LMO-exposed mice exhibited learning and memory deficits, with neuronal damage evident in hippocampal histopathological staining. Time-lapse live-cell imaging revealed impaired axonal retrograde transport in hippocampal neurons post-exposure, which was reversed upon

Mid1 silencing. Downregulation of dynlt4 and dynlrb2 post-exposure suggests that impaired axonal transport could be a mechanism for LMO-induced neurotoxicity. VPA was found to restore axonal transport function, and our interventions at both cellular and animal levels confirmed recovery of axonal transport and cognitive functions, supporting our findings. Enhanced binding of Mid1 to these molecules post-exposure, regulated through its ubiquitin activity, was observed. **Conclusion** Mid1 regulates the key dynein subunits dynlt4 and dynlrb2 through ubiquitination, leading to disrupted axonal transport function and resulting in cognitive impairment. Mid1 emerges as a vital target for the prevention and treatment of LMO-induced neurotoxicity.

Key words: Lithium manganese oxide; learning and memory impairment; Mid1; axonal retrograde transport, ubiquitination

Funding: National Natural Science Foundation of China (82273607)

Corresponding author: yu Deng, E-mail: dengyu.cmu@163.com

T12-0040

锂电作业人群血液中多金属内暴露与认知能力的关联研究

鞠兆赫, 沈芝如, 邓宇*

(中国医科大学, 辽宁省 沈阳 110122)

摘要: **目的** 现有的研究表明,多金属在脑内的过量暴露会导致神经退行性疾病的发生。本研究旨在探讨锂电工人血浆中多种金属元素水平及其对认知功能的影响。**材料与方法** 本研究采用横断面研究方法,选择蒙特利尔认知评估(MoCA)问卷评估工人的认知功能,在MoCA问卷对轻度认知障碍的评定标准中共包括七个子项:执行/视觉空间能力、命名、注意力和计算、语言、抽象、回忆和定向力。金属元素的血浆水平采用了电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)测定。对MoCA测定的轻度认知障碍评分结果采用多变量广义线性回归模型、贝叶斯核机器回归(BKMR)、加权分位数回归(WQS)进行统计分析,并对每一个评定子项进行进一步分析,在调整混杂因素后,估计血浆金属水平与MoCA问卷评分之间的关系。**结果** 根据研究所需的纳排标准进行筛选后,共有174名工人参与了本研究。在多变量广义线性模型中,研究的这十二种金属有三种与MoCA评分相关;在BKMR模型和WQS模型中,观察到血浆锂、铅、锰与总MoCA评分之间显著负相关。对于MoCA量表上的子项目进行进一步分析后,锰、锂、铅、锌的血浆水平分别与执行/视觉空间能力、回忆能力具有显著相关性。血浆锰、锂、铅的浓度在进行对数转换后,与执行/视觉空间能力和回忆呈负相关。**结论** 基于以上的分析结果,我们确定了中国锂电厂工人血浆中锰、锂、铅浓度水平的增加与轻度认知功能障碍(MCI)的发病率相关。

关键词: 锂; 锰; 铅; 轻度认知障碍; 锂电池厂

基金项目: 国家自然科学基金(No. 82273607)

通讯作者: 邓宇, E-mail: dengyu.cmu@163.com

T12-0041

p62/Keap1/Nrf2 信号通路调控锰转运蛋白促锰通过 血脑屏障致运动功能障碍

陈京琪, 沈芝如, 邓宇*

(中国医科大学, 沈阳 110122)

摘要: **目的** 锰过度摄入已被认为是帕金森病、阿尔茨海默病、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化症和朊病毒病

等多种神经系统疾病发病机制的关键因素。随着基因组学的发展,血锰失调的关键转运体基因相继被发现,进一步解释了血锰失调与锰相关神经疾病之间的关系。然而,锰转运体相关基因的具体调控机制仍有待阐明。**方法** 第一部分:构建小鼠锰中毒模型,通过行为学实验观察小鼠的运动功能损伤;染色实验观察小鼠黑质和纹状体组织形态学损伤;WB和RT-qPCR检测小鼠内皮细胞锰转运相关蛋白的mRNA和蛋白水平;通过CTD数据库和JASPER数据库预测寻找调控锰转运相关基因的关键转录因子,发现Nrf2可能发挥关键作用。第二部分:为了验证Nrf2的调控作用,分别使用抑制剂(TPL)和激动剂(DMF)进行回复实验,检测Nrf2对小鼠脑微血管内皮细胞锰转运相关基因SLC39A8、SLC39A14和SLC40A1的转录调控作用。通过双荧光素酶报告和CHIP实验进一步验证Nrf2对锰转运相关基因的调控。第三部分:构建内皮细胞Nrf2特异性敲除小鼠(Nrf2^{flox/flox}; CDH5-cre),检测内皮细胞特异性敲除Nrf2能否减少锰转运相关基因SLC39A8、SLC39A14和SLC40A1的表达,并减少锰离子通过血脑屏障在脑内发生蓄积。第四部分:为了探明锰致Nrf2表达改变的原因,通过CO-IP检测Nrf2的泛素化水平,WB和RT-qPCR检测其上游相关因子p62和Keap1的表达情况,免疫荧光检测p62与Keap1的共定位情况。**结果** 行为学实验结果显示,锰致小鼠运动功能障碍;病理组织染色结果显示,锰暴露使小鼠黑质-纹状体发生损伤;WB和RT-qPCR结果显示SLC39A8、SLC39A14、SLC40A1等锰转运相关基因和蛋白表达升高;回复实验、双荧光素酶报告和CHIP实验均验证说明Nrf2调控锰转运相关基因的表达;小鼠内皮细胞特异性敲除Nrf2后,锰转运相关基因SLC39A8、SLC39A14和SLC40A1的表达减少,脑内锰离子蓄积减少。CO-IP发现锰可减少Nrf2的泛素化水平;WB结果显示锰增加p62的表达,减少Keap1的表达水平;免疫荧光结果显示P62与Keap1的共定位增加。**结论** 研究表明,锰激活p62/Keap1/Nrf2信号通路,减少Nrf2的泛素化降解,发挥其转录活性,增加锰转运相关蛋白SLC39A8、SLC39A14和SLC40A1的转录翻译水平,致更多的锰离子通过血脑屏障并在脑组织中产生蓄积,发挥神经毒性作用。

关键词: 锰中毒; 运动功能障碍; 离子转运蛋白; Nrf2

基金项目: 国家自然科学基金(No. 82273607)

通讯作者: 邓宇, E-mail: dengyu.cmu@163.com

T12-0042

细胞色素P450酶CYP1A2在锰酸锂致嗅球小胶质细胞M1型极化诱发嗅觉功能障碍中的作用

陈月, 沈芝如, 邓宇*

(中国医科大学, 沈阳 110122)

摘要: **目的** 本研究旨在探索锂离子电池正极材料锰酸锂暴露致嗅觉功能障碍中的作用与机制。**材料和方法** 第一部分:采用嗅笔检测锰酸锂作业工人嗅觉阈值、辨别和识别功能,电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)检测全血中锰、锂离子含量,采用斯皮尔曼相关性分析评估血锰、血锂与嗅觉评分相关性。第二部分:构建锰酸锂全身暴露28、45天染毒模型,行为学实验检测小鼠的嗅觉功能;染色实验观察小鼠嗅觉脑区组织形态学损伤;ICP-MS检测小鼠嗅球锰蓄积情况;Western blot和RT-qPCR检测小胶质细胞M1型极化促炎因子的表达;免疫荧光和流式检测小胶质细胞M1/M2极化水平。第三部分:染毒小鼠嗅球进行RNA-seq测序筛选出差异表达基因,使用Western blot和RT-qPCR检测CYP1A2、CXCL10、CXCR3的表达;ELISA试剂盒检测嗅球中CYP1A2活性及其代谢物2-OH-E2的含量;免疫荧光共定位检测CYP1A2、CXCL10在神经元和小胶质细胞表达。体外采用锰锂联合暴露N2A-BV2共培养模型,使用上述实验观察神经元及小胶质细胞损伤情况。第四部分:为了进一步确认CYP1A2对于CXCL10/CXCR3轴的调控作用,吡喃茶碱(CYP1A2特异性抑制剂)处理N2A后与BV2共培养并进行锰锂联合暴露染毒,小鼠灌胃吡喃茶碱构建小鼠模型,使用上述实验观察CYP1A2抑制后,小胶质细胞极化及神经元损伤是否恢复。**结果** 锰酸锂作业

工人嗅觉功能评分与血液中锰锂离子含量呈负相关;行为学实验结果显示,锰酸锂暴露导致小鼠嗅觉功能障碍;病理染色结果显示锰酸锂暴露后小鼠嗅球损伤;Western blot和RT-qPCR结果显示小胶质细胞M1型极化促炎因子的表达升高;免疫荧光和流式结果显示小胶质细胞出现M1极化。体外实验发现,免疫荧光及流式结果显示神经元N2A中CYP1A2调控CXCL10/CXCR3轴促进BV2的M1极化;Western blot和RT-qPCR结果显示,锰酸锂暴露上调小鼠嗅球中CYP1A2的表达,ELISA结果显示其活性及2-OH-E2的含量升高;CYP1A2抑制后,缓解了锰酸锂暴露造成的小胶质M1极化以及嗅觉功能障碍;其代谢物2-OH-E2含量下降,对CXCL10/CXCR3轴的调控作用降低。**结论** 锰酸锂暴露导致小鼠嗅觉功能障碍,是通过上调细胞色素P450酶CYP1A2致使小胶质细胞M1极化所致。这为保护我国锰酸锂作业人群的健康提供了新思路。

关键词: 锰酸锂; CYP1A2; CXCL110/CXCR3信号通路; 小胶质细胞极化; 嗅觉功能障碍

基金项目: 国家自然科学基金(No. 82273607)

通讯作者: 邓宇, E-mail: dengyu.cmu@163.com

T13-0001

邻苯二甲酸酯通过靶向抑制SLC7A11促进睾酮合成障碍的机制研究

赵一, 李金龙*

(东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨市 150030)

摘要: **目的** 邻苯二甲酸酯是一种有机化合物,经常用于塑料大棚、杀虫剂以及聚乙烯塑料中。邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP)是使用范围最广的邻苯二甲酸酯之一,作为常见的内分泌干扰物,其在环境中广泛分布。DEHP环境蓄积效应会造成男性生殖器官损伤和功能障碍,干扰生精过程,从而导致不良妊娠结局。铁死亡是近年来研究的热点,也是一种细胞程序性死亡新形式。本研究的目的是为了探究邻苯二甲酸酯诱导雄性生殖毒性的潜在机制及其与铁死亡的关系。**材料与方法** 本研究的体内试验部分以21日龄的雄性ICR小鼠为受试对象,随机分成5组:空白对照组、溶媒对照组以及DEHP低、中、高剂量组,灌胃处理28天后,检测小鼠血清性激素含量、睾丸间质细胞形态结构、睾酮合成功能、抗氧化能力、脂质过氧化以及铁死亡相关指标的改变。本试验的体外部分以小鼠睾丸间质细胞系(TM3细胞)为研究对象,首先将细胞分为4组:对照组以及邻苯二甲酸单-(2-乙基己基)酯(MEHP)低、中、高剂量组,然后在培养体系中进行质粒SLC7A11过表达载体转染,分别检测TM3细胞结构和功能的变化。**结果** 体内试验表明,DEHP暴露诱导小鼠睾丸间质细胞超微结构损伤(线粒体嵴和膜消失、空泡增加),类固醇激素生物合成和代谢紊乱,血清性激素水平改变,睾酮合成酶和孤儿核受体蛋白水平改变。体外试验表明,MEHP诱导TM3细胞活率下降,超微结构损伤(线粒体膜消失、嵴断裂,空泡和自噬泡的产生),ROS增加,抗氧化功能的下降,睾酮合成酶和孤儿核受体蛋白水平改变。此外,MEHP与铁死亡诱导剂(Erastin)协同诱导TM3细胞和线粒体内ROS和脂质过氧化物增加,谷胱甘肽及其相关酶活性减少,细胞质和线粒体内Fe²⁺水平上调,铁死亡相关指标改变。同时,SLC7A11过表达能够通过改善谷胱甘肽系统和降低脂质过氧化水平来抑制MEHP诱导的间质细胞铁死亡和睾酮合成功能障碍。**结论** DEHP暴露可通过抑制SLC7A11诱导小鼠睾丸间质细胞损伤,促进脂质过氧化产物累积,破坏间质细胞内铁稳态,驱动铁死亡,进而引起小鼠睾丸间质细胞结构和功能受损。本研究为医学及兽医临床中雄性生殖毒性的防治提供新的靶点,并且为有效的保障畜禽生产和繁殖提供了新的思路。

关键词: 邻苯二甲酸酯; SLC7A11; 间质细胞; 铁死亡; 睾酮合成

第一作者: 赵一, E-mail: zhaoyi@neau.edu.cn

通讯作者: 李金龙, E-mail: Jinlongli@neau.edu.cn

T13-0002

阿司匹林丁香酚酯减轻其前体药物不良反应的研究

陶琦, 申栋帅, 范丽萍, 冯晨婧, 李剑勇*, 杨亚军*

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 农业农村部兽用药物创制重点实验室, 甘肃省新兽药重点实验室, 兰州 730050)

摘要: 阿司匹林对胃肠道的副作用和丁香酚的刺激性及不稳定性限制了其应用。基于前药原理, 通过酯化反应合成了阿司匹林丁香酚酯(aspirin eugenol ester, AEE)。研究表明, AEE具有确切的抗炎、抗氧化、降血脂和预防血栓形成等作用, 效果优于前体药物 Asp 和/或 Eug, 具有很好的成药性。本研究考察并比较了 AEE 及其前体药物, 对小鼠尾部出血时间和出血量的影响, 以及对大鼠胃肠黏膜损伤的影响。对小鼠连续 1 周灌服给予小剂量的 AEE 及其前体药物后, 外伤造小鼠尾部出血模型, 考察 AEE 对出血时间和出血量的影响; 对大鼠连续 1 周灌服给予大剂量 AEE 及其前体药物后, 考察 AEE 等对大鼠胃肠黏膜损伤及肠道菌群的影响。结果显示, 相比于对照组, Asp 和 Asp-Eug 联合给药能够显著增加出血时间和出血量; 而 AEE 和 Eug 则无显著影响。大剂量的 Asp-Eug 联合给药 1 周后, 大鼠死亡 4 只(共 6 只), AEE 和 Asp(500 mg/kg) 组大鼠则无死亡; Asp 可导致大鼠机体产生严重的氧化应激和炎症反应, 但 AEE 则无显著影响 ($P>0.05$); 病理学检查结果显示, Asp 可造成大鼠胃、肠黏膜的严重损伤, 及肺组织出血; 而 AEE 则无显著影响 ($P>0.05$); 16S 测序结果显示, 相较于 Asp, AEE 对大鼠肠道菌群的影响较小; AEE 可以显著影响粪便代谢物水平, 如 Lysylleucine, Palmitoleic acid, Cholic acid, Sucrose 等。

以上结果说明 AEE 可有效降低其前体药物造成的出血和胃肠黏膜损伤等不良反应; 其中 AEE 可能通过改善菌群结构和代谢物水平, 减轻前体药物对胃肠黏膜的损伤。

关键词: 阿司匹林丁香酚酯(AEE); 阿司匹林(Asp); 丁香酚(Eug); 胃肠道损伤; 16S

通讯作者: 陶琦, E-mail: taoqi19951224@163.com, 杨亚军, E-mail: yangyue10224@163.com, 李剑勇, E-mail: lijy1971@163.com

T13-0003

姜黄素调控 PI3K/AKT 干预 AFB1 致猪卵巢细胞毒性的机制研究

李思鸿, 李瑞, 杜美衡, 蒋君, 刘璐, 马翔, 牛冬*

(浙江农林大学, 动物科技学院•动物医学院, 浙江 杭州市 311300)

摘要: **目的** 黄曲霉毒素(AFB1)是畜禽饲料中最常见的致癌污染物, 具有生殖毒性, 严重影响母畜的繁殖性能。姜黄素是从姜黄中提取得到的一种植物多酚, 药理作用广泛。目前对于 AFB1 致猪生殖毒性的研究尚不清楚。因此, 本研究以体外培养的猪卵巢颗粒细胞(PGCs)和猪卵母细胞为研究对象, 旨在明确姜黄素缓解 AFB1 致 PGCs 和猪卵母细胞的作用机制, 为发现潜在作用靶点、制定有效的减毒措施和深化 AFB1 生殖毒性理论提供新思路和理论基础。**材料和方法** 建立 AFB1 致 PGCs 和猪卵母细胞损伤及姜黄素干预模型, CCK8 法检测细胞活力; 显微镜观察细胞形态; 免疫荧光法及流式细胞术检测细胞活性氧(ROS)、细胞凋亡、细胞周期、线粒体膜电位等变化情况; 转录组学分析; 荧光定量 PCR 及免疫印迹法检测氧化应激、凋亡及线粒体功能相关基因表达水平。**结果** 8 μ m 及以上 AFB1 使 PGCs 细胞活力显著下降, 10 μ m 姜黄素可显著缓解 AFB1 的细胞毒性; AFB1 可显著升高 PGCs 活性氧水平、增加细胞凋亡率、降低线粒体膜电位、引起 G2/M 期阻滞, 姜黄素干预后 PGCs 上述变化均明显改善; 转录组学结果显示 PGCs 各组间的差异基因显著富集于 PI3K/AKT 信号通路; AFB1 显著上调氧化应激基因、促凋亡基因、线粒体分裂基因表达水平, 下调抗凋亡基因、融合基因、G2/M 期基因、PI3K、AKT1 及 mTOR 基因的表达水平, 而姜黄素干预可显著干预 AFB1 诱导的上述基因表达水平的变化; 8 μ m AFB1 显著降低卵母细胞的排极体率和囊胚发育率, 而姜黄素

干预组卵母细胞的排极体率和囊胚发育率显著提高。**结论** 本试验研究发现 AFB1 通过激活氧化应激、凋亡、破坏线粒体功能和细胞周期诱导 PGCs 损伤,降低猪卵母细胞成熟及囊胚发育率,而姜黄素通过 PI3K/AKT 通路调控细胞增殖与凋亡缓解 AFB1 的猪卵巢颗粒细胞和卵母细胞毒性,表明其在食品安全和生殖健康领域中重要的应用前景。

关键词: 黄曲霉毒素 B1; 姜黄素; 猪卵巢颗粒细胞; 猪卵母细胞; PI3K/AKT 通路

通讯作者: 牛 冬, E-mail: dnu@zafu.edu.cn

T13-0004

姜黄素改善 AFB1 诱导的鸡肝细胞脂毒性的作用及机制研究

蒋 君, 杜美衡, 李思鸿, 牛 冬*

(浙江农林大学, 动物科技学院•动物医学院, 浙江 杭州市 311300)

摘要: **目的** 黄曲霉毒素 B1 (Aflatoxin B1, AFB1) 是黄曲霉毒素中毒性最强的毒素, 食用 AFB1 污染的饲料导致畜禽中毒的现象在全球广泛存在。AFB1 中毒畜禽的肝脏细胞常有严重的脂肪变性。姜黄素 (Cur) 是从姜黄中提取出来的多酚类化合物, 具有降脂、抗炎、抗氧化等广泛的生物学活性。前期研究发现, Cur 可缓解 AFB1 中毒引起的鸡肝损伤, 但鲜少从脂毒性角度进行研究。因此, 本研究旨在探讨 Cur 对 AFB1 诱导的鸡肝细胞脂毒性的缓解作用及机制。**材料与方法** 分离并提取 14-20 日龄的鸡胚原代肝细胞 (CEL), 建立 AFB1 诱导的 CEL 脂肪变性及 Cur 干预模型。CCK8 法检测细胞活性; 油红 O 染色检测细胞脂质沉积情况; 试剂盒检测丙二醛 (MDA)、甘油三酯 (TG)、胆固醇 (TC) 等生化指标; 透射电镜观察细胞形态变化; qRT-PCR 和 western blotting 法检测关键基因或蛋白的表达水平; 荧光探针标记脂滴、线粒体或溶酶体, 共聚焦显微镜观察染色结果并分析脂滴与线粒体或溶酶体的共定位情况。**结果** CCK8、透射电镜、及油红 O 染色结果表明 AFB1 诱导的 CEL 细胞活力显著下降, 细胞超微结构损伤显著增加, 表现出脂质沉积; 生化指标检测结果显示 AFB1 组 MDA 含量和 TG 含量显著增加, TC 含量显著减少; 共聚焦观察结果表明, AFB1 组脂滴数量变多, 脂滴与线粒体、溶酶体的共定位显著增加。qPCR 与 WB 结果显示, AFB1 组脂肪酸合成基因 (PTGS2、FAS) 表达显著上调, 脂肪酸代谢基因 (CPT1A) 表达显著下调, 自噬标志物 (p62、LC3B、ATG9a) 表达显著上调; 溶酶体通道基因 (NPC1、LAMP1) 表达显著下调, 溶酶体损伤相关基因 (mTOR、LGALS1a) 表达显著上调; 线粒体功能基因 (DRP1、MFN1、MFN2、FIS1) 表达显著上调。而 Cur 干预后, 以上现象或指标都得到明显缓解。**结论** AFB1 可以通过影响脂肪酸合成引起脂质积累和自噬, 引起线粒体、溶酶体功能障碍, 并通过增加脂滴与细胞器之间的通讯, 使脂滴在溶酶体中积累, 加剧 CEL 脂毒性; Cur 则通过抑制自噬、恢复线粒体和溶酶体功能缓解 AFB1 诱导的 CEL 脂毒性。

通讯作者: 牛 冬, E-mail: dnu@zafu.edu.cn

关键词: 黄曲霉毒素 B1; 姜黄素; 肝损伤; 脂毒性

T13-0005

口服锰基纳米酶 Mn₃O₄ NPs 对小鼠结肠形态、抗氧化、黏膜及粪便微生物群落的影响

张宝月, 舒 刚*

(四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130)

摘要: **目的** 具有多种类酶活性的锰基纳米酶 Mn₃O₄ NPs 被广泛用于抗炎、抗肿瘤等相关研究中, 尤其

是炎症肠病 (Inflammatory bowel disease, IBD) 相关研究。但口服相关研究较少, 具有巨大的开发潜力。因此本研究旨在对纳米酶 Mn_3O_4 NPs 口服安全性 (尤其是肠道) 进行评估, 了解其对生物系统和肠道健康的潜在不利影响。 **材料和方法** 首先根据之前的研究合成了一种已经报道证明具有酶活性的 Mn_3O_4 NPs, 并通过表征及体外类酶活性检测确定其成功合成, 接着探究了一次性灌胃 5000 mg/kg Mn_3O_4 NPs 14 d 后小鼠的存活情况、体重、脏器指数及相关血清肝、肾指数的变化情况, 以及连续 20 d 分别灌胃 125 mg/kg 和 250 mg/kg Mn_3O_4 NPs 对小鼠结肠形态、抗氧化功能、屏障功能、粪便生物群落的影响。 **结果** 本研究合成的 Mn_3O_4 NPs 具有类超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、类过氧化氢酶 (CAT) 活性及类谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 活性。在一次性给予小鼠 5000 mg/kgbw Mn_3O_4 NPs 14 d 后, 对其体重、脏器指数、血清肝肾相关生化指标并无显著影响 ($P>0.05$)。连续灌胃 125 mg/kg Mn_3O_4 NPs bw 20 d 对小鼠结肠抗氧化能力有一定增强作用, 但并未造成明显的小鼠结肠损伤及结肠黏膜屏障损伤 ($P>0.05$)。而连续灌胃 250 mg/kg bw Mn_3O_4 NPs 20 d 会对小鼠结肠造成氧化损伤、轻微炎症以及结肠黏膜屏障损伤。此外, 连续灌胃 250 mg/kg bw Mn_3O_4 NPs 20 d 会造成粪便微生物群落 Chao 1 和 Observed species 指数显著下降 ($P<0.05$)。根据主坐标分析 (Principal coordinates analysis, PCoA), 连续灌胃 Mn_3O_4 NPs 20 d 能一定程度上影响微生物群落整体结构, 但无显著影响。门水平上 Mn_3O_4 Nps 会导致 *Bacteroidota* 和 *Firmicutes* 比值降低。属水平上 Mn_3O_4 Nps 250 mg/kg bw 会导致 *Kineothrix*、*Alloprevotella* 菌属丰度明显下调。 **结论** Mn_3O_4 NPs 口服急性毒性较小, 而 250 mg/kg bw Mn_3O_4 NPs 连续灌胃 20 d 会导致小鼠结肠氧化损伤、结肠炎症、黏膜损伤, 以及造成粪便微生物群落丰富度降低, 同时 *Bacteroidota* 和 *Firmicutes* 比值降低、*Kineothrix* 丰度明显下调。但 125 mg/kg bw Mn_3O_4 NPs 连续灌胃 20 d 对小鼠结肠影响较小, 甚至在一定程度上对小鼠结肠以及粪便微生物群落具有积极作用。

关键词: 锰基纳米酶; Mn_3O_4 ; 经口毒性; 结肠; 抗氧化; 肠道屏障; 肠道菌群 16S

通讯作者: 舒 刚, E-mail: 1794901278@qq.com

T13-0006

锶对产蛋后期蛋鸡生产性能、抗氧化功能及锶沉积的影响

陈璟怡¹, 付 康¹, 周秉桦¹, 王 洋¹, 舒 刚*

(四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130)

摘要: 试验旨在考察锶对产蛋后期蛋鸡生产性能、抗氧化功能及锶沉积的影响。试验随机选取 650 只 48 周龄产蛋后期旧院黑鸡, 随机分为 5 组, 每组 6 个重复, 每个重复 20 只, 空白组 (BC) 饲喂基础饲料, Sr 50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg 及 400 mg/kg 在基础饲料的基础上分别按照 50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg、400 mg/kg 六水合氯化锶 (以锶含量计算) 进行添加, 预试期 7d, 正式试验期 56d。结果发现: ① 与 BC 组相比, 试验组产蛋率均有提升, 且 Sr 200、400 mg/kg 组与 BC 组差异极显著 ($P<0.01$), Sr 400 mg/kg 组最佳; 除 400 mg/kg 组, 其他组蛋重相较于 BC 组均有所上升, 破蛋率和畸形蛋率 Sr 100、400 mg/kg 组小于 BC 组, 其他两组与 BC 组基本持平, 料蛋比均下降, 且 Sr 200、400mg/kg 组极显著低于 BC 组 ($P<0.01$), Sr 400 mg/kg 组最佳。② 与 BC 组相比, 锶在脏器、肌肉和骨骼中均有沉积, 且试验组的沉积量呈梯度上升趋势, 并较多沉积在钙含量高的部位; 且试验组心、肝、脾、肺、肾、卵巢、输卵管的脏器指数与 BC 组无显著性差异; 锶还可以减轻产蛋后期蛋鸡肝脏炎症并减少脂肪浸润, 促进输卵管纤毛层增高, 延缓卵巢髓质萎缩, 改善卵泡皮质疏松, 增厚颗粒层。③ 与 BC 组相比, 血清 MDA 水平 Sr 100 mg/kg、200 mg/kg 组均显著低于 BC 组 ($P<0.05$), 其他组呈下降趋势; 血清 SOD 水平 Sr 200 mg/kg 组显著高于 BC 组 ($P<0.05$), 其他组呈上升趋势; AOC 水平 Sr 200 mg/kg 组显著高于 BC 组 ($P<0.05$), 其他组呈上升趋势; GSH 水平 50mg/kg 组显著上升 ($P<0.05$), 其他组呈上升趋势; 血清 AST 水平 Sr 100、200、400 mg/kg 组均显著低于 BC 组 ($P<0.05$), Sr 50 mg/kg 组也有所下降; ALT、TC 水平均呈下降趋势; TG 水平 Sr 50 mg/kg 组显著低于 BC 组 ($P<$

0.05),其他组呈下降趋势;BUN水平200 mg/kg组显著下降($P<0.05$),其他组呈下降趋势。由此可见,饲料添加适宜水平的镨能够改善产蛋后期蛋鸡生产性能和抗氧化能力,维护蛋鸡脏器的健康状态,并无毒副作用。以Sr 200 mg/kg组效果最佳,值得进一步开发利用。

关键词: 镨;产蛋后期蛋鸡;生产性能;抗氧化功能

T13-0007

细胞严重空泡化损伤细胞骨架与细胞膜介导药物引起细胞巨泡式死亡的毒性机制

董 斌,肖 静,王俊琪,赵 源,高修歌*,江善祥*

(1. 南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210095; 2. 南京农业大学兽药研究评价中心,江苏 南京 210095)

摘要: 巨泡式死亡(Methuosis)是一种以细胞质过度空泡化为标志特征的新型细胞死亡方式,而细胞质中大量液泡对细胞骨架和细胞膜的影响鲜有报道。本研究以大鼠心肌细胞H9c2和人脑胶质瘤细胞U251为模型,探讨马度米星铵与吡啶查尔酮诱导细胞巨泡式死亡中细胞骨架和细胞膜的变化。通过鬼笔环肽染色、免疫荧光和蛋白免疫印迹实验观察微丝、微管的形态变化和蛋白表达变化;添加V-H⁺-ATPase抑制剂观察微丝、微管的形态变化和蛋白表达变化;蛋白免疫印迹实验考察Rho A/ROCK1表达的变化;添加Rho A激活剂观察细胞骨架的变化;采用ELISA、Hochest/PI染色、免疫荧光来确定细胞巨泡式死亡过程中细胞膜的损伤;蛋白免疫印迹法验证ESCRT-III介导的膜修复机制在细胞巨泡式死亡过程中的作用;siRNA敲低CHMP3/CHMP5来确定细胞巨泡式死亡过程中ESCRT-III介导膜修复的机制。结果表明,细胞巨泡式死亡过程中细胞骨架发生可逆性破坏,抑制过度空泡化会逆转细胞骨架的破坏,微丝结构的变化依赖于RhoA/ROCK1的抑制;细胞膜的完整性丧失并释放DAMPs,细胞膜的破裂不依赖打孔蛋白作用。进一步研究发现,膜修复蛋白ESCRT-III亚基CHMP3、CHMP5表达显著增加,使用siRNA敲低相应基因后均增加了细胞的死亡率,说明ESCRT-III依赖性膜修复损伤参与了巨泡式死亡,CHMP3可能是巨泡式死亡的重要负调节因子。综上所述,本研究揭示了细胞过度空泡化导致细胞骨架微丝、微管和应力纤维的破坏,Rho A/ROCK1信号通路调节的微丝结构改变参与了细胞巨泡式死亡。此外,细胞过度空泡化导致细胞膜损伤促进DAMPs的释放,ESCRT-III依赖性的膜修复障碍参与了细胞巨泡式死亡,ESCRT-III亚基CHMP3是巨泡式死亡潜在关键负调控因子。本研究为人们认识细胞骨架与细胞膜损伤介导药物引起细胞巨泡式死亡的毒性机制提供了理论依据。

关键词: methuosis; 细胞质空泡化; 细胞骨架; 细胞膜; ESCRT-III; CHMP3

T13-0008

高效氯氟氰菊酯毒性中的氧化应激和线粒体损伤:抗氧化机制的综合综述

徐小庆^{1,2},赵永霞^{1,2},闻德锋^{1,2},王旭^{1,2*}

(1. 华中农业大学动物医学院,湖北 武汉 430070; 2. 华中农业大学国家兽药残留基准实验室,农业部兽药残留检测重点实验室,湖北 武汉 430070)

摘要: 高效氯氟氰菊酯,又称氯氟氰菊酯,是一种高效、广谱、速效的II型拟除虫菊酯类杀虫剂(鳞翅目、双翅目和鞘翅目)和杀螨剂(叶螨、锈螨和瘿螨)。由于其效率高、易生物降解和低毒性,这种活性物质似乎是有比有机氯和有机磷酸盐更常用的杀虫剂。然而,越来越多的证据表明,高效氯氟氰菊酯可以通过吸入、摄

人和接触等多种方式进入人体,这大大增加了人类暴露于高效氯氟氰菊酯的风险。更严重的是,高效氯氟氰菊酯与非靶标生物(陆生和水生动物)的胰腺毒性、肝毒性、神经毒性和生殖毒性等密切相关。因此,必须密切关注高效氯氟氰菊酯的毒性,寻找有效的预防措施。然而,其毒性机理尚未得到充分的解释,这给预防措施的寻找带来了极大挑战。综上,为了更加有效的减少高效氯氟氰菊酯的毒性危害,有必要对其毒性的机理和研究进展进行综述。本文综述了高效氯氟氰菊酯诱导的肝毒性、肾毒性、神经毒性和生殖毒性等,并首次从氧化应激和线粒体损伤的角度阐述了高效氯氟氰菊酯的毒性机理。探讨了具有抗氧化能力的天然产物(维生素C、维生素E和黄酮类化合物)减轻高效氯氟氰菊酯毒性的机理。此外,综述了高效氯氟氰菊酯的主要代谢产物、代谢途径以及参与代谢反应的主要代谢酶。总之,本文揭示了氧化损伤和线粒体损伤是高效氯氟氰菊酯的关键毒性机制,并表明抗氧化剂的使用是预防其毒性的有效方法。

关键词: 高效氯氟氰菊酯; 代谢; 氧化应激; 线粒体损伤; 抗氧化剂

通讯作者: 王旭, E-mail:wangxu@mail.hzau.edu.cn

T13-0009

羧酸类非甾体抗炎药不良作用及其与代谢关系的新进展:对线粒体功能障碍和氧化应激的影响以及天然植物提取物的预防作用

刘雅楠^{1,2}, 赵永霞^{1,2}, 闻德锋^{1,2}, 王旭^{1,2*}

(1. 华中农业大学动物医学院, 湖北 武汉 430070; 2. 华中农业大学国家兽药残留基准实验室, 农业部兽药残留检测重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要: 非甾体抗炎药(NSAIDs)因其良好的解热、镇痛和抗炎效果而在世界范围内被广泛应用,其中,羧酸类非甾体抗炎药(CBA-NSAIDs)相对常用。CBA-NSAIDs在治疗剂量下通常具有合理的安全范围,而且不会像阿片类药物那样具有成瘾性。然而,随着对其应用及研究的增多,越来越多的证据表明,其对机体多种器官都具有一定的损伤作用,并且CBA-NSAIDs引起的多种损伤与线粒体功能障碍和氧化应激密切相关。但是,CBA-NSAIDs在此方面的毒性作用机制并未得到充分解释,这为其损伤作用的治疗和预防带来了极大的困难。因此,本文对CBA-NSAIDs引起的不良反应、线粒体损伤机制、氧化应激、代谢相互作用等进行了综述,并基于抗氧化作用探讨了天然植物提取物对CBA-NSAIDs损伤的治疗和预防。CBA-NSAIDs可诱导活性氧(ROS)生成,介导DNA、蛋白质和脂质损伤,导致细胞抗氧化状态失衡,线粒体膜电位改变,并激活氧化应激信号通路,从而诱导氧化应激和细胞损伤的产生。同时,CBA-NSAIDs引起的不良作用往往呈现剂量和时间依赖性。为避免CBA-NSAIDs引起的不良作用,用药前需要对患者进行详细的咨询,以消除影响因素。此外,对天然植物提取物在防治因CBA-NSAIDs代谢异常而导致的器官特异性毒性和机制,应展开进一步的研究,以对CBA-NSAIDs的使用提供重要的警示和指导价值。总之,本文揭示了CBA-NSAIDs引起氧化应激和线粒体损伤的毒性机制,并表明了天然植物提取物在防治CBA-NSAIDs引起的氧化损伤方面的潜力。

关键词: 羧酸类非甾体抗炎药; 氧化应激; 线粒体功能障碍; 代谢; 天然植物提取物

通讯作者: 王旭, E-mail:wangxu@mail.hzau.edu.cn

T13-0010

新疆一枝蒿口服液对雏鸡磺胺药致急性肝损伤的防治

赵世强, 周秉桦, 舒刚*

(四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130)

摘要:目的 研究新疆一枝蒿口服液对磺胺噻啉诱导雏鸡急性肝损伤的防治效果。材料和方法 将

160只21日龄雪域白鸡雏鸡随机分成4个组,每组4个重复,每个重复10只,包括空白对照组、模型组、模型给药组、正常给药组。模型给药组和正常给药组雏鸡每日饮水给予新疆一枝蒿口服液(28.56 mg/kg 剂量)连续7天;在第5-7天,模型组和模型给药组按4 mL/kg 体重每日灌胃350 mg/mL的磺胺喹噁啉溶液一次,空白组和正常给药组以等体积生理盐水灌胃一次。试验期间末次给药24 h后称重并解剖,采集肝脏、肾脏和十二指肠内容物以作研究。**结果** 分别与空白组和模型组相比,新疆一枝蒿口服液能缓解磺胺喹噁啉引起的体重减少,脏器指数增加,显著降低IL-8、TNF- α 因子的mRNA表达水平($P<0.05$);缓解血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)的升高,降低肝脏肾脏丙二醛(MDA)含量($P<0.05$),提高肝脏还原性谷胱甘肽(GSH)和超氧化物歧化酶(SOD)活性($P>0.05$);减少肝细胞肿胀、小灶性坏死和炎症细胞浸润,减少肾小管上皮细胞坏死;回升十二指肠肠道菌群Alpha多样性和Beta多样性的下降。**结论** 本实验中生化、分子和病理学组织指标阳性,肠道菌群多样性显著回升。证实新疆一枝蒿口服液通过抗炎、抗氧化等途径对磺胺喹噁啉导致的雏鸡肝损伤发挥保护作用,且可以改善磺胺喹噁啉中毒导致的雏鸡肠道微生物失衡。

关键词: 一枝蒿;磺胺喹噁啉;口服液;肝损伤

通讯作者:舒刚, E-mail:1794901278@qq.com

T13-0011

新疆一枝蒿口服液制备及其对雏鸡安全性评价

周秉桦,赵世强,舒刚*

(四川农业大学动物医学院,四川 成都 611130)

摘要:**目的** 研究新疆一枝蒿口服液的制备工艺,并探究其对雏鸡临床应用的安全性,以开发家禽养殖的新型药剂。**材料和方法** 以总黄酮含量为标准制备新疆一枝蒿口服液,采用正交试验选取最佳提取工艺并验证中试工艺。选用240只7日龄雪域白鸡公雏随机分为4组:空白组、3个新疆一枝蒿口服液组(低剂量组、中剂量组、高剂量组),依次为1倍、3倍、5倍使用剂量。用药组持续饮水给药14天,期间记录体重、耗料量,末次给药24小时后采集血清、肝脏、肠道和各主要器官并称重,计算脏器指数,测定血清肝功指标和肝组织抗氧化指标,测量十二指肠绒毛高度、隐窝深度,检查对主要器官组织病理的影响。**结果** 新疆一枝蒿口服液最佳制备工艺:药材粉末在50%乙醇中浸泡24 h后超声提取,料液比1:30 (g/mL)、时间60 min,旋蒸浓缩,溶解后过滤离心,取上清加入0.1%苯甲酸,再湿热灭菌后得到1 g/mL口服液,总黄酮含量28.02 mg/mL。动物试验表明:与空白组相比,新疆一枝蒿口服液高剂量组料重比、空肠脏器指数显著升高($P<0.05$),雏鸡十二指肠肠道隐窝深度显著降低($P<0.05$)。同时新疆一枝蒿口服液各剂量组的其他指标(脏器指数、血清AST、ALT,肝脏GSH、SOD、MDA)与空白组比较差异均不显著($P>0.05$),高剂量组心、肝、脾、肺、肾、胸腺、法氏囊切片未见明显病理变化。**结论** 1 ml/L、3 ml/L以及5 ml/L剂量的新疆一枝蒿口服液对7-21日龄雏鸡均无明显毒害作用。

关键词: 一枝蒿;口服液;工艺优化;安全性评价

通讯作者:舒刚, E-mail:1794901278@qq.com

T13-0012

玉米赤霉烯酮诱导小鼠肝星状细胞JS-1活化的机制研究

黄永泽,宝力格,李继昌*

(东北农业大学动物医学学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:**目的** 玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEA)是一种由镰刀菌属真菌所产生的非甾体雌激素霉菌毒

素,可被微生物、植物、动物和人类代谢成许多其他衍生物,其污染在世界范围内都有报道。肝纤维化(Hepatic Fibrosis, HF)是对反复发生的慢性肝损伤的适应性反应,其基本病理特点为细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)过度沉积于肝脏。目前已有报道称ZEA会引起肝脏损伤,但是否会引起肝纤维化或肝硬化等并无报道,故本研究旨在探究ZEA诱导小鼠肝星状细胞JS-1活化的作用机制,为治疗ZEA所引起的肝损伤提供重要的理论依据。**材料和方法** 将小鼠肝星状细胞(JS-1 cells)暴露于ZEA(0、5、10、20、30、40、60、80 μM)中处理12/24 h后,使用CCK8法检测细胞活力,筛选出适宜的ZEA浓度(10、20、30 μM)用于后续实验。利用Western Blot法检测肝纤维化以及自噬关键蛋白表达量($\alpha\text{-SMA}$ 、Collagen I/III、LC3 II/I、P62、Beclin-1、ATG5)。**结果** Western Blot结果显示,与Con相比,ZEA30组 $\alpha\text{-SMA}$ 蛋白表达量极显著升高($P<0.01$),ZEA攻毒组Collagen I/III蛋白表达量均极显著升高($P<0.01$)。ZEA攻毒组LC3 II/I、ATG5、Beclin-1蛋白表达量与Con组相比均极显著上升($P<0.01$),ZEA攻毒组P62蛋白表达量与Con组相比均极显著下降($P<0.01$)。**结论** 根据试验结果推测ZEA可导致小鼠肝星状细胞活化,且上调小鼠肝星状细胞自噬。在肝纤维化发生的过程中,肝星状细胞(Hepatic stellate cell, HSC)的激活是肝纤维化的关键因素。ZEA攻毒组的JS-1细胞中HSC活化标志物 $\alpha\text{-SMA}$ 和纤维化标志物Collagen I/III的蛋白表达量显著升高,因此推测ZEA可以通过激活HSC诱导小鼠肝脏纤维化。同时有研究表明,HSC可以通过自噬降解脂质为其激活提供能量,诱导纤维化发生。在鼠肝纤维化模型中,自噬水平的上升与HSC的激活紧密相关,因此试验进一步探究了ZEA对小鼠肝星状细胞自噬的影响。而P62、LC3 II/I等自噬关键蛋白是衡量细胞自噬的重要指标,ZEA导致小鼠肝星状细胞自噬关键蛋白表达量发生改变,故ZEA可以诱导小鼠肝星状细胞JS-1活化的同时上调自噬水平。然而ZEA所引起的小鼠肝星状细胞活化及自噬之间的更加密切的联系,有待进一步探究。

关键词: 玉米赤霉烯酮; 肝纤维化; $\alpha\text{-SMA}$; Collagen I/III

通讯作者: 李继昌, E-mail: lijichang@neau.edu.cn

T13-0013

阿司匹林丁香酚酯改善抑郁样行为的作用研究

冯基, 陶琦, 范丽萍, 冯晨婧, 李剑勇*, 杨亚军*

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 农业农村部兽用药物创制重点实验室, 甘肃省新兽药重点实验室, 兰州 730050)

摘要: 阿司匹林丁香酚酯(Aspirin eugenol ester, AEE)是由阿司匹林和丁香酚酯化而成的新型药物化合物。该药具有多种药理活性,如抗炎、降血脂、抗氧化应激和预防神经性疾病等。**目的** 本研究旨在探讨AEE对不同年龄段大鼠的影响,和对老年大鼠抑郁样行为的改善作用及其机制。**材料和方法** 本实验选用青年大鼠和老年大鼠进行评估AEE的效果。SD大鼠随机分为4组($n=8$):(1)老年大鼠组(Old组);(2)老年大鼠组+AEE组(AEE, $18\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$);(3)青年大鼠组(Young组);(4)青年大鼠组+AEE组(AEE, $18\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。采用血清生化检测、酶联免疫吸附法(ELISA)和组织病理学分析,评价AEE对不同年龄段大鼠的影响。通过大鼠海马组织的转录组学和非靶向代谢组学分析AEE对老年大鼠海马组织的影响。**结果** AEE对大鼠的体重无显著的影响($P>0.05$),可以显著降低大鼠脂肪细胞的面积($P<0.05$)。AEE对老年大鼠的血脂四项没有显著影响($P>0.05$),但对青年大鼠的TC和TG有显著影响($P<0.05$);老年大鼠的炎症比青年大鼠严重,AEE可显著降低老年大鼠的炎症反应($P<0.05$);AEE可以显著延长老年大鼠游泳时间($P<0.05$),而对青年大鼠没有显著影响($P>0.05$);通过组织病理学检查发现AEE对大鼠的肝脏和肾脏无显著影响;通过血生化检测发现AEE可以显著改善老年大鼠的肝功能,可以提高老年大鼠的葡萄糖代谢;大鼠海马组织转录组的分析发现AEE可以显著影响大鼠海马组织基因的表达,包括*Ccl19*, *il2ra*, *serpind1*, *serpine1*, *Cacna1f*, *Chrna3*, *Cplx3*, *Gmg14*和*F2rl1*。这些差异表达基因主要富集通路是心血管,免疫,神经,脂质代谢;

AEE可以显著影响大鼠海马组织代谢物的表达,包括L-Phosphoarginine, Epa, PC(22:4(7Z, 10Z, 13Z, 16Z)/0:0), PE(20:4(8Z, 11Z, 14Z, 17Z)/P-16:0), PC(20:4(5Z, 8Z, 11Z, 14Z)/0:0), PC(15:0/20:3(5Z, 8Z, 11Z)), PC(14:0/18:1(11Z)),这些差异表达代谢物主要富集通路是神经系统,脂质代谢。结论 因此,AEE可以改善老年大鼠的机体状态和抑郁样行为,通过调控炎症反应、调节能量代谢和糖代谢等途径。

关键词:阿司匹林丁香酚酯(AEE);转录组学;代谢组学;衰老;炎症

通讯作者: E-mail:杨亚军, E-mail:yangyue10224@163.com;李剑勇, E-mail:lijy1971@163.com

T13-0014

基于光亲和标记的毒素作用位点识别:技术进展与应用前景

杨超,王旭*

(1. 华中农业大学动物医学院 湖北 武汉 430070; 华中农业大学国家兽药残留基准实验室, 农业部兽药残留检测重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要:光亲和标记探针技术作为一种能够高效识别生物大分子与小分子毒素相互作用的工具,近年来在毒理学研究中得到了广泛应用和关注。这一技术通过将光敏基团与目标分子结合,当受到特定波长的光照时,光敏基团活化生成高反应性的中间体,与邻近的分子发生不可逆的共价交联,从而实现了对毒素作用靶标的精准标记。本文综述了光亲和标记技术在多种毒素研究中的应用进展,特别是神经毒素、细胞毒素及环境毒物的靶标识别与作用机制解析。通过系统分析,总结了光亲和标记探针在毒素作用位点识别中的原理、技术优势及其在不同毒素类型中的应用成效,如响尾蛇毒素和炭疽霉毒素的靶标研究。这些研究表明,光亲和标记技术不仅能够纳米级别空间内精确标定毒素的结合位点,还能帮助解析毒素与特定蛋白质的相互作用机制,从而深入揭示毒素的分子毒性机制。此外,本综述对该技术在实际应用中面临的挑战,如探针设计的复杂性、靶标分离和鉴定的技术难度等进行了深入探讨,并提出了可能的解决方案和未来的研究方向。随着光亲和标记探针技术与质谱分析等高精度分析方法的结合,未来该技术有望在新型解毒剂开发中发挥关键作用,通过靶向阻断毒素的作用位点,为减轻毒性作用提供新的策略。本文的综述为研究者提供了关于光亲和标记技术在毒理学领域应用的全面视角,并为未来的毒素作用机制研究与解毒剂开发奠定理论基础。

通讯作者:王旭, E-mail:wangxu@mail.hzau.edu.cn

T13-0015

咖啡酸及其衍生物抑制艰难梭菌毒素TcdB的作用及机制研究

郭岩,刘洪涛,邓旭明,邱家章*

(吉林大学动物医学学院,吉林 长春 130062)

摘要:目的 艰难梭菌是一种革兰氏阳性厌氧芽孢杆菌,广泛分布于人、动物肠道和环境中。在过去的十年里,艰难梭菌感染的频率和严重程度在世界范围内不断增加,成为最常见的医院获得性感染之一。其感染所致的临床表现多样。从无症状带菌者状态,到不同程度的腹泻甚至危及生命的结肠炎,最终导致死亡。抗生素的不合理使用是导致艰难梭菌感染的主要危险因素,因此,急需新型治疗策略用以针对严重的艰难梭菌感染。**材料和方法** 本研究通过毒素TcdB介导的细胞病变模型从天然化合物库中筛选毒素介导细胞病变的抑制剂。通过流式细胞术检测毒素内化试验、溶酶体酸化试验、体外InsP6介导毒素自切割试验、葡萄糖基转移酶活性试验、Rac1糖基化修饰试验等对TcdB介导细胞中毒的过程进行分步研究以判断抑制剂的阻断位点;分子动力学模拟、表面等离子体共振、圆二色谱试验等探究抑制剂与毒素间的相互作用

机制;通过建立艰难梭菌小鼠感染模型评价抑制剂的体内治疗效果,并对抑制剂治疗后的肠道微生物群及代谢组学进行分析。**结果** 初步筛选出咖啡酸及其衍生物能够抑制 TcdB 介导的细胞病变,其中咖啡酸苯乙酯被进一步证明通过与 TcdB 直接结合,改变蛋白二级结构,抑制全长毒素的自切割以及葡萄糖基转移酶活性,从而抑制毒素对 Rac1 的糖基化修饰,减少宿主细胞的死亡。除此之外,咖啡酸苯乙酯可有效缓解艰难梭菌感染小鼠的腹泻症状,提高感染小鼠肠道微生物群的丰度及多样性,改变肠道代谢物水平。**结论** 综上所述,咖啡酸及其衍生物可抑制艰难梭菌毒素介导的细胞病变,有效治疗艰难梭菌感染所致的小鼠腹泻模型。本研究可为临床治疗艰难梭菌感染药物的研究提供机制明确的先导化合物。

关键词: 艰难梭菌; 毒素 TcdB; 咖啡酸及其衍生物; 咖啡酸苯乙酯

通讯作者: 邱家章, E-mail: qiujiuz@jlu.edu.cn

T13-0016

没食子酸丙酯抑制四环素降解酶 Tet(X4) 的作用及机制

刘智营, 刘洪涛, 王建锋, 邓旭明, 邱家章*
(吉林大学动物医学学院, 吉林 长春 130062)

摘要: 目的 四环素类抗生素是畜牧兽医行业中用量最大的一类广谱抗菌药物,主要包括四环素、金霉素、多西环素等,广泛用于治疗多种革兰氏阳性菌、阴性菌等导致的感染。然而,四环素类抗生素的大量和不合理使用加速了耐药细菌的出现和流行。质粒携带的 *tet(X4)* 耐药基因能够降解包括替加环素在内的所有四环素类抗生素,严重影响了四环素类抗生素的临床疗效。因此,本文以 Tet(X4) 蛋白为靶标筛选四环素类抗生素增效剂,为临床上治疗 *tet(X4)* 阳性菌感染提供理论和实践基础。**材料和方法** 本研究通过酶活性抑制试验筛选 Tet(X4) 酶抑制剂,采用圆二色谱、分子对接和动力学模拟等技术探究酶抑制剂抗 Tet(X4) 催化活性的分子机制。进一步通过肉汤微量稀释棋盘法、时间-杀菌曲线等试验评估酶抑制剂与四环素类抗生素的体外协同抗菌效果。通过 *tet(X4)* 阳性大肠杆菌建立大蜡螟和小鼠感染模型,评价酶抑制剂与替加环素的体内协同治疗效果。**结果** 本研究通过酶活性试验成功从食品添加剂中筛选到 Tet(X4) 酶抑制剂没食子酸丙酯,机制研究表明没食子酸丙酯能够结合在 Tet(X4) 的活性中心,抑制其催化活性。体外抗菌试验结果表明没食子酸丙酯能够显著增强四环素类抗生素的抗菌活性,且亚抑菌浓度的没食子酸丙酯不易诱导 *tet(X4)* 阳性大肠杆菌产生更高水平的替加环素耐药性。体内试验结果表明 50 mg/kg 没食子酸丙酯能够显著提高替加环素对大蜡螟以及小鼠感染模型的治疗效果,降低小鼠全身感染模型中组织的菌落定植数量。**结论** 没食子酸丙酯联合四环素类抗生素对 *tet(X4)* 阳性大肠杆菌有良好的协同抗菌效果,本研究拓展了食品添加剂在治疗耐药病原菌感染中的应用,为临床上治疗 *tet(X4)* 阳性菌感染提供了一种潜在的治疗策略和安全有效的先导化合物。

关键词: Tet(X4); 没食子酸丙酯; 四环素类抗生素; 抗生素增效剂

通讯作者: 邱家章, E-mail: qiujiuz@jlu.edu.cn

T13-0017

漆黄素抑制沙门氏菌 T3SS 的分子机制

李思琦, 刘洪涛, 王建锋, 邓旭明, 邱家章*
(吉林大学动物医学学院, 吉林 长春 130062)

摘要: 目的 沙门氏菌是一种可导致人和动物胃肠炎、败血症、伤寒等疾病的重要人兽共患食源性致病菌,可随污染的水/食物传播,引起食物中毒,严重威胁养殖业的发展和公共卫生安全。兽医临床上主要通过

使用抗生素控制沙门氏菌感染。随着我国“禁抗”、“限抗”和“减抗”政策的落实,动物疾病将在较长一段时间内增多,并导致养殖收益下降。因此,开发新型抗菌策略迫在眉睫。抗毒力策略是新型替抗策略研究的重要方向之一。沙门氏菌Ⅲ型分泌系统(T3SS)及其分泌的效应蛋白在其入侵宿主细胞过程中发挥关键作用,是抗毒力药物筛选的理想靶标。本研究旨在发现靶向T3SS的抗毒力抑制剂,并探究其作用机制,以期沙门氏菌抗毒力药物的开发提供机制明确的先导化合物。方法 课题组前期采用庆大霉素保护试验从天然化合物中筛选沙门氏菌入侵抑制剂。发现了可抑制沙门氏菌入侵的天然化合物—漆黄素。进一步通过 β 内酰胺酶报告系统、三氯乙酸(TCA)沉淀、qPCR、Western blotting、免疫荧光、凝胶迁移实验(EMSA)等方法探究漆黄素抑制沙门氏菌入侵的分子机制;在小鼠肠炎模型中,以致死剂量(1×10^7 CFU/只)沙门氏菌SL1344灌胃感染小鼠模型,探究漆黄素对感染模型存活率的影响;以亚致死剂量(5×10^6 CFU/只)沙门氏菌SL1344感染小鼠,并在感染4天后采集小鼠肝脏和脾脏,制作病理切片,HE染色;称重研磨后进行细菌载量的测定,以检测漆黄素对感染所致小鼠模型病理损伤的影响。结果 漆黄素可抑制T3SS调控蛋白HilA、HilD的表达,进而抑制T3SS效应蛋白的表达和分泌。qPCR结果表明漆黄素可抑制调控蛋白HilA和HilD的转录。EMSA实验结果发现漆黄素可抑制T3SS重要的调控蛋白HilD与其相关启动子间的相互作用,降低激活T3SS中枢调控因子HilA的转录。在建立的沙门氏菌感染的小鼠肠炎模型中,发现漆黄素可显著增加感染小鼠的存活率、降低靶器官的菌落定殖、减轻由感染所致的病理损伤,并降低促炎细胞因子的分泌。结论 漆黄素通过抑制T3SS调控蛋白HilD与其启动子间的互作,进而抑制沙门氏菌的入侵。漆黄素治疗可显著提高肠炎模型中小鼠的存活率,减轻小鼠的组织器官的病理损伤。综上,本研究可为抗沙门氏菌感染药物的开发提供机制较为明确的先导化合物,为新型替抗策略的研究提供重要参考。

关键词: 漆黄素; 沙门氏菌; 抗毒力; T3SS

通讯作者: 邱家章, E-mail: qiujiuz@jlu.edu.cn

T13-0018

芝麻酚抗肠外致病性大肠杆菌感染的机制研究

姜晨晓, 刘洪涛, 邓旭明, 邱家章*

(吉林大学动物医学学院, 吉林 长春 130062)

摘要: 目的 肠外致病性大肠杆菌(Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, ExPEC)可定殖于宿主肠道外组织器官并引起感染,严重威胁畜禽养殖业和公共卫生安全。耐药问题日益严重,导致临床针对ExPEC感染的治疗面临巨大挑战,探究新型抗感染策略势在必行。基于宿主导向疗法(Host-directed therapy, HDT)的抗细菌感染策略,可通过提高宿主防御能力或干扰细菌胞内存活策略以清除入侵的胞内细菌,不易诱导细菌耐药。为此,本研究拟通过筛选获得基于HDT策略的抗ExPEC感染化合物,并探究其分子机制。材料和方法 本研究首先通过抗生素(头孢噻肟)保护试验从天然化合物中筛选抑制ExPEC胞内增殖的抑制剂。其次,采用RNA测序技术分析活性化合物作用于宿主细胞(RAW264.7)前后转录谱,以期发现差异基因与信号通路。进一步通过qRT-PCR、Western blotting、免疫荧光等手段探究活性化合物发挥抗感染的分子机制。最后,在建立的大蜡螟幼虫感染模型和小鼠急性炎症模型上评价活性化合物对ExPEC感染的治疗效果。结果 筛选发现芝麻酚可在不影响ExPEC自然生长的前提下,显著抑制ExPEC在RAW264.7细胞内的增殖。RNA测序分析揭示芝麻酚能增强宿主细胞的脂肪酸代谢和抑制炎症反应。进一步的机制研究结果表明,芝麻酚可通过提高PPAR- β 水平,进而促进脂肪酸代谢,并可通过抑制MAPK-NF- κ B信号通路的激活抑制过度炎症的发生,最终实现对胞内菌的清除。此外,芝麻酚可以提高ExPEC感染大蜡螟幼虫和小鼠急性炎症模型的存活率,降低小鼠靶器官的菌落定殖,减轻感染所致的病理损伤。结论 芝麻酚可通过增强ExPEC感染细胞的脂肪酸代谢和抑制过度炎症,进而增强宿主细胞对入侵细菌的清除能力。芝麻酚可有效保护动物模型对抗ExPEC感染。本研究为抗ExPEC感染药物的研发提供机制明

确的先导化合物,也可为基于HDT的抗感染策略的制定提供重要参考。

关键词: 肠外致病性大肠杆菌; 宿主导向策略; 芝麻酚; 脂肪酸代谢

通讯作者: 邱家章, E-mail: qiujiuz@jlu.edu.cn

T13-0019

植物炭黑(百草霜)的遗传毒性和致畸性研究

李雨婷¹, 吴晓蝶¹, 柯林富², 汤树生^{1*}

(1. 中国农业大学动物医学院/兽医公共卫生全国重点实验, 北京 海淀 100193; 2. 福建省百草霜生物科技有限公司, 福建 南平 353200)

摘要: **目的** 植物炭黑(百草霜)是由杉木、松树或竹子的碎片在原始木材加工过程中碳化和活化后产生的黑色粉末。百草霜产业化难度大, 现福建省百草霜生物科技有限公司研发并获得了百草霜产业化产品, 经有效性研究证明其添加于饲料中对霉菌毒素具有良好的吸附作用, 并对畜禽胃肠道细菌性感染具有良好疗效。为确保该产品作为饲料添加剂的安全性, 本文开展了该产品的遗传毒性和致畸性研究, 包括小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠骨髓细胞染色体畸变试验、小鼠精子畸形试验及大鼠致畸试验。**材料与方法** 本研究分别按农业部(第1247号公告)公布的兽药小鼠骨髓细胞微核试验指导原则、兽药小鼠骨髓细胞染色体畸变试验指导原则、兽药小鼠精子畸形试验指导原则、兽药大鼠传统致畸试验指导原则, 以SFF大小鼠为实验动物, 开展了小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠骨髓细胞染色体畸变试验、小鼠精子畸形试验和大鼠致畸试验。**结果** 遗传毒性试验结果显示, 各剂量组(3个遗传毒性试验的剂量设计相同, 高中低剂量均分别为1250、2500、5000 mg/kg体重)小鼠骨髓细胞中含微核嗜多染红细胞率、小鼠染色体畸变细胞率、小鼠精子畸形率均与阴性对照组比较无显著性差异, 表明3个遗传毒性试验结果均为阴性。致畸试验结果显示, 各剂量组(5000、1250、312.5 mg/kg体重)均未对妊娠大鼠的采食量、饮水量、日增重产生影响, 且对孕鼠腹中卵巢重等生殖机能相关指标、活胎率等与胚胎生长发育相关指标、胎鼠外观畸形、骨骼畸形、内脏畸形等指标均无显著影响, 即在312.50 mg/kg-5000 mg/kg体重剂量范围内未见生殖毒性和胚胎发育毒性, 其致畸试验的最大无作用剂量(NOEL)可定为5000 mg/kg体重。**结论** 植物炭黑(百草霜)无明显遗传毒性和致畸性, 其作为饲料添加剂具有较好的安全性。

关键词: 植物炭黑(百草霜); 遗传毒性; 致畸性

作者简介: 李雨婷, 在校研究生, E-mail: lytingm@163.com

通讯作者: 汤树生, Tel: 13520539145, E-mail: tssfj@163.com

T13-0020

广东水禽养殖区MPs生物膜菌群定植及其与动物肠道菌群关系初步研究

李馥琳, 曾紫茹, 冯枫琳, 吴怡孝, 黄星汝, 孙永学*

(国家兽药安全评价(环境评估)实验室(华南农业大学), 广东 广州 510651)

摘要: **目的** 微塑料(Microplastics, MPs)污染是全球范围内日益严重的环境问题。MPs作为一个独立的生态位, 可以富集多种畜禽微生物群落, 从而加快致病菌和抗生素耐药基因(Antibiotic resistance genes, ARGs)的传播。许多研究报道了水生生态环境中MPs的污染, 而少有集中在水禽养殖区及其环境MPs生物膜菌群与水禽肠道菌群的关联性研究。**材料和方法** 通过对广东省内6个水禽养殖场调研采样, 首先通过密度分离法从MPs的富集丰度、形状和粒径角度, 对水禽养殖场环境(土壤和水体)和水禽肠道中MPs的赋存情况进行分析, 通过宏基因组学研究对环境中MPs富集的微生物群落与水禽肠道菌群、耐药基因

(ARGs)与水禽肠道 ARGs 之间关联性的进行了初步探究。结果 水禽养殖环境与水禽肠道中 MPs 形状主要为碎片状,粒径大小在 20~50 μm 之间;水禽肠道中 MPs 丰度(45.35 ± 19.52 items/g w.w.)远高于水禽养殖环境中 MPs 丰度(土壤 6.75 ± 2.78 items/g d.w.、池水 0.94 ± 0.28 items/g w.w.),水禽肠道 MPs 丰度与其环境中 MPs 丰度呈明显正相关性。水禽养殖环境中富集 MPs 的细菌群落与水禽肠道菌群相似,且环境中 MPs 的细菌群落多样性与丰富度均较高。经网络分析表明:微生物在养殖环境 MPs 的定植与水禽肠道菌群呈现关联性,并揭示棒状杆菌(*Corynebacterium pollutisoli*)在 MPs 表面微生物群和肠道菌群中起着关键作用;水禽养殖环境中 MPs 富集与水禽肠道中的 ARGs 呈现相关性,但在多样性和丰度之间无明显差异,环境 MPs 中富集了高聚类系数的多粘菌素 ARGs 与其他 ARGs。结论 MPs 已广泛存在于水禽养殖环境中,其所富集的生物膜菌群对养殖动物的肠道菌群健康带来潜在风险。MPs 可促进养殖环境中致病菌和耐药菌及 ARGs 的传播。

关键词: 微塑料; 水禽养殖环境; 微生物群落; ARGs

通讯作者: 孙永学, E-mail: lifulin19970727@163.com

T13-0021

水解酶的改造对促进降解脱氧雪腐镰刀菌烯醇的研究

黎放, 马婉清, 王旭*

(国家兽药残留基准实验室和农业部兽药残留检测重点实验室, 华中农业大学, 武汉, 430070)

摘要: 真菌毒素在饲料中的污染情况相当严重,给动物的健康带来了极大的威胁。动物摄入含有脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)的饲料后,会出现一系列的中毒症状,如呕吐、腹泻、食欲不振、体重下降等,严重的甚至会导致死亡。因此,加强对饲料中真菌毒素的监测和控制,对于保障动物的健康和食品安全具有重要意义。在本研究中,采用定点突变和基因工程的技术,对已发现的水解酶(EH)进行改造,增强 EH 消减 DON 的能力并降低其毒性。首先,将含有 EH 基因的 pPIC9K 重组载体转入到酵母细胞中并处理含有 $4 \mu\text{g/mL}$ 的 DON 溶液,研究表明, EH 在 4 h 内降解 DON 的效率为 31.86%,是对照组的 6.7 倍,同时, EH 还能将 DON 分解为毒性更低的 15, 16-HDON,说明 EH 对 DON 有一定的降解能力。接着,将 EH 与 DON 进行对接,它们共有 4 个氢键作用力在相互作用, DON 分别与 EH 的 GLN84、ARG122、SER167 和 TYR479 之间存在着氢键作用力。其中, GLN84 是 EH 作用 DON 的关键氨基酸,将其定点突变为 GLU84,突变后 EH 的降解率提升到 71%,是对照组的 1.7 倍。最后,将突变后的 EH 基因与氧化应激相关的 GSH 同时构建到 pPIC9K 载体上,并将重组载体转入到大肠杆菌细胞中,降解浓度为 $4 \mu\text{g/mL}$ 的 DON 溶液,研究结果发现,复合蛋白 EH-GSH 能显著的提升 DON 的降解效率,这一效率是对照组的 1.2 倍,说明 GSH 参与了 DON 的降解过程,并且在其中发挥了重要的作用。本课题通过一系列实验和数据分析,有力地证明了经过改造后的 EH,其降解效率得到了显著的提升。更为重要的是,改造后的 EH 降解 DON 所产生的产物,毒性明显降低,这一成果对于相关领域的发展具有重要意义。

关键词: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 水解酶; 定点突变; 基因工程

通讯作者: 王旭, E-mail: wangxu@mail.hzau.edu.cn

T13-0022

聚醚类离子载体药物诱导肝细胞铁死亡的毒性机制

王俊棋, 董斌, 赵源, 郭大伟, 江善祥*, 高修歌^{1,2*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095; 2. 南京农业大学兽药研究评价中心, 江苏南京 210095)

摘要: 目的 聚醚类离子载体抗生素被广泛用作畜禽饲料添加剂,然因该类药物安全范围窄,导致中毒

现象时常发生。虽然其机制已在家禽中被广泛研究,但其在哺乳动物中的毒性机制仍不清楚。在本研究中,我们发现聚醚类离子载体抗生素可诱导肝细胞铁死亡。本研究探明了聚醚类离子载体抗生素诱导的肝毒性的铁死亡机制,也为临床上解决该类药物中毒提供了策略。**材料与方法** 以HepG2细胞作为体外模型,CCK-8法评估细胞活性;透射电镜观察线粒体形态;流式细胞术和荧光显微镜检测脂质过氧化,铁离子含量和溶酶体活性;免疫共沉淀,siRNA干扰,RT-qPCR技术探究其分子机制。**结果与讨论** 铁死亡是一种新型的细胞死亡方式,其特征为铁离子和ROS依赖的脂质过氧化。前期研究结果表明,聚醚类离子载体抗生素导致中毒动物肝脏出血,脂肪变性;硒与维生素E联用可改善其诱导的肝脏脂质过氧化和组织损伤。硒是铁死亡关键蛋白之一谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)的合成底物,维生素E作为脂溶性脂质过氧化物清除剂,也作为铁死亡抑制剂。我们的研究发现:聚醚类离子载体抗生素诱导肝细胞铁死亡;②聚醚类离子载体抗生素诱导自噬,促进了NCOA4和铁蛋白相互作用,抑制自噬和干扰NCOA4可缓解铁蛋白降解和细胞死亡;③溶酶体活性增强对聚醚类离子载体抗生素诱导的铁蛋白降解和铁死亡是必要的,该途径依赖于TFEB的调节。本研究阐明了聚醚类离子载体抗生素的肝毒性机制;为干预和缓解该类药物肝毒性提供了理论依据。

关键词:聚醚类离子载体抗生素;肝毒性;铁死亡;溶酶体;铁稳态

作者简介:王俊棋,博士研究生,主要从事分子毒理学,E-mail:2021207003@stu.njau.edu.cn

通讯作者:江善祥,教授,主要从事新兽药研发、药物代谢、环境生态毒理,E-mail:jiangshanxiang@163.com;高修歌,副教授,硕士生导师,主要从事兽医毒理学与新兽药研发,E-mail:vetgao@njau.edu.cn

T13-0023

大豆苷元——豆类食物恶化高尿酸血症的潜在元凶

王寒飞,张洁莹,王旭*

(华中农业大学动物科学技术学院与动物医学院/国家兽药残留基准实验室,湖北武汉 430070)

摘要:目的 大豆苷元(Daidzein,DAI)是豆类食物中富含的异黄酮类化合物,具有良好的药理活性,然而在其高尿酸方面的研究有限。本研究旨在动物和细胞模型上探究大豆苷元对高尿酸血症的影响,为DAI的应用风险提供依据。**材料和方法** 对高尿酸血症(hyperuricemia,HUA)的KM小鼠和正常饲养KM小鼠分别给予梯度浓度DAI的灌胃处理,每天1次,持续7天。末次给药后采血,检测血清生化指标尿酸(UA)、尿素(UREA)、肌酐(CREA)、白蛋白(ALB)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、碱性磷酸酶(ALP)和总蛋白(TP)以及肝脏黄嘌呤氧化酶(XOD);通过100 μM的黄嘌呤(Xanthine,Xan)诱导小鼠肝细胞AML-12细胞构建HUA模型,同时给予梯度浓度DAI干预12 h,检测细胞XOD和细胞上清UA,以此评估DAI在体内物和体外对HUA环境下尿酸代谢的影响。**结果** 动物模型上,单独使用DAI对小鼠血清指标和肝脏XOD活性无影响,然而而在HUA下,中、高剂量的DAI会使血清UREA、CREA和UA水平持续升高,同时显著提高血清ALB、TP水平以及肝脏XOD的活性($P<0.01$)。在体外,DAI也能显著提高高尿酸环境下AML-12细胞内XOD活性,并使细胞培养液中UA含量明显增加。**结论** 在HUA下,高剂量的大豆苷元会造成肝脏损伤,并能升高HUA环境中肝脏黄嘌呤氧化酶的活性,进而加剧高尿酸的程度。因此,高尿酸血症和痛风患者要警惕豆类食物以及大豆苷元的摄入,大豆苷元的药理使用上要考虑适用范围以及做好对高尿酸血症和痛风患者的风险评估。

关键词:大豆苷元;高尿酸血症;肝脏;黄嘌呤氧化酶

通讯作者:王旭,E-mail:wangxu@mail.hzau.edu.cn

T13-0024

新型胍基吡啶衍生物的合成、抗菌活性、细胞毒性和溶血性及作用机制研究

李玉玺[†], 耿响[†], 陶琦, 郝若晨, 杨亚军, 刘希望*, 李剑勇*

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所农业农村部兽用药物创制重点实验室甘肃省新兽药重点实验室)

摘要:目的 设计合成了一系列新型胍基吡啶衍生物, 以期开发新型抗菌药提供具有潜力的化合物或先导化合物。材料和方法 以吡啶甲醛和7-氮杂吡啶甲醛为原料, 先后与多种被取代苄溴和氨基胍反应, 合成了37个胍基吡啶衍生物3A-3V、4L-4P、5L-5P、6L-6P, 并通过¹H NMR, ¹³C NMR和高分辨质谱(HRMS)表征了化合物结构。通过MIC、MBC、杀菌曲线、耐药性诱导实验、小鼠肺炎克雷伯菌肺炎模型等, 评价了化合物的体外和体内抗菌活性; 应用CCK-8法, 检测了化合物4P对4种人源细胞系(肺癌细胞(A549), 肝细胞(HepG2), 肾细胞(293T), Caco-2细胞)的毒性作用; 检测了4P对绵羊红细胞的体外溶血性; 通过一系列实验研究了化合物4P抗肺炎克雷伯菌的可能的作用机制。结果 结果表明, 大多数化合物对ESKAPE病原菌和肺炎克雷伯菌临床株表现出抗菌活性, 呈现出广谱性, 且不易产生耐药性。在小鼠肺炎模型中, 化合物4P提高了小鼠的存活率, 降低了组织载菌量, 减轻了组织病理损伤。4P对4种人源细胞系均有细胞毒作用, IC₅₀值在3.802 ~ 6.691 μg/mL之间。体外溶血性实验表明, 4P(HC₅₀=529.1 μg/mL)对绵羊红细胞体外溶血性较低。研究结果表明, 4P抗肺炎克雷伯菌的机制可能是破坏细胞膜结构和抑制肺炎克雷伯菌二氢叶酸还原酶受体活性。结论 合成的大部分化合物具有显著的抑菌和杀菌活性。其中, 4P是抗菌活性最强的化合物, 表明4P具有成为抗菌药的潜力。4P的体内抗肺炎克雷伯菌效果与多粘菌素相似。4P的体外细胞毒作用较大, 体外溶血性较低。4P可能存在多种抗菌机制, 潜在作用机制仍值得进一步研究。

关键词: 氨基胍; 吡啶; 合成; 抗菌活性; 细胞毒性; 溶血性; 肺炎克雷伯菌

通讯作者: 刘希望, E-mail:xiwangliu@126.com, 李剑勇, E-mail:lijy1971@163.com

T13-0025

核受体在脂代谢紊乱引发肝、肾毒性中调控作用的研究进展

张治杰^{1,2}, 陶琦¹, 范丽萍¹, 李剑勇^{1,2*}, 杨亚军^{1*}

(1. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所/农业农村部兽用药物创制重点实验室/甘肃省新兽药重点实验室, 甘肃 兰州 730050; 2. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:核受体是依赖于配体激活的转录调节因子, 在机体生长发育和多种代谢途径中发挥着极其重要的功能。然而核受体在天然配体或合成配体的作用下才能被激活, 通过一系列复杂的调控机制来控制下游靶基因的表达, 进而维持机体稳态。脂质代谢紊乱会导致重要脂肪酸异位沉积于肝脏和肾脏的各类细胞中, 进而引起肝、肾毒性, 参与急性或慢性的肝脏和肾脏的发生和发展。核受体的介入能够逆转这种状态, 提示核受体可能是治疗脂质代谢紊乱性疾病的关键靶点。

核受体能够被激素、胆汁酸、肠道细菌的次级代谢产物和药物等内、外源性物质激活, 被激活的核受体通过与视黄醇X受体等形成异源二聚体复合物, 进而调节机体的生理功能。核受体主要通过参与脂质的生成、脂肪酸的β氧化以及脂质转运等过程来调节脂质代谢, 例如: 过氧化物酶体增殖激活受体α和法尼醇X受体, 可以通过激活固醇调节元件结合蛋白1c, 或通过肝X受体信号通路的间接作用来调节肝脏脂肪的产生; 过氧化物酶体增殖激活受体α, 也会促进下游参与脂肪酸氧化的相关基因的表达, 从而促进脂肪酸氧化; 肝X受体通过调节ABC转运蛋白和载脂蛋白的表达, 进而调控胆固醇的逆向转运。因此, 核受体可通过调控脂质代谢相关基因的转录, 来调节脂质代谢进程, 进而缓解脂质代谢紊乱造成的肝脏毒性和肾脏毒性。

核受体参与的脂质代谢调控是一个复杂的、多层次的交互网络, 其被内源性或者外源性配体激活后, 可

以通过二聚化、竞争性结合、招募辅助转录因子以及自身结构的修饰化,来调节下游靶基因的转录。对核受体的深入研究,将会为治疗脂质代谢紊乱性疾病开辟新的解决思路与方案,而研发靶向核受体的小分子药物,将会推动解决脂质代谢紊乱性疾病的进程。

通讯作者: 杨亚军, E-mail: yangyue10224@163.com, 李剑勇, E-mail: lijy1971@163.com

T13-0026

甲硝唑半抗原设计、单克隆抗体的制备及检测技术的研究

姜嘉群, 于雪芝, 温 凯, 沈建忠, 王战辉*

(兽医公共卫生安全全国重点实验室, 动物源食品安全检测技术北京市重点实验室, 中国农业大学
动物医学院, 北京 100193)

摘要:目的 甲硝唑(Metronidazole, MNZ)作为一种重要的抗原虫药和抗菌药物,广泛应用于由厌氧菌和原虫引起的感染治疗,在畜牧养殖业中应用广泛。其不规范使用、滥用可造成其在动物性食品中残留,对MNZ残留进行及时检测是保证动物性食品安全的重要手段。MNZ属亲水性分子且分子量较小,当前关于抗MNZ的单克隆抗体(Monoclonal Antibody, mAb)的制备及免疫分析检测方法的研究较为有限。本研究旨在通过计算机辅助设计(Computer-aided molecular design, CAMD)引入高分子量及疏水性间隔臂的半抗原,并制备高亲和力的MNZ单克隆抗体,为MNZ的免疫快速检测方法及产品的开发奠定基础。材料和方法 本研究通过引入大分子间隔臂聚乙二醇(Polyethylene Glycol, PEG)、疏水性间隔臂苯环及常用间隔臂琥珀酸酐(Succinic Anhydride, SA)设计了三种MNZ半抗原MNZ-PEG、MNZ-Ph、MNZ-SA,此外, MNZ自身也作为一种半抗原合成完全抗原。随后,在最低能量构象、分子电性、原子电荷分布、亲疏水性等方面验证半抗原设计的合理性。采用活泼酯法偶联钥孔血蓝蛋白(Bovine Thyroglobulin, BTG)及牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)作为免疫原和包被原。通过小鼠免疫、细胞融合以及杂交瘤筛选,制备MNZ单克隆抗体。测定抗体亚型、半数抑制浓度(Half maximal inhibitory concentration, IC₅₀),评价抗体的亲和力及特异性,筛选性能最优的mAb建立MNZ免疫分析方法。随后,对灵敏度次优的抗体进行分子识别机制的研究,并对关键氨基酸进行虚拟饱和突变,使用真核表达后的突变体mAb建立MNZ免疫分析方法。结果 经CAMD分析半抗原设计合理,经核磁共振氢谱和质谱鉴定半抗原和免疫原合成成功。目前,制备了来自MNZ-SA-BTG的2株细胞株9H8、12G8、来自MNZ-CDI-BTG的1株细胞株46C1。灵敏度及交叉反应率测定结果显示, mAb 46C1对靶标分子的亲和力最高, IC₅₀值为0.39 ng/mL。此外,经血清学分析,免疫原MNZ-PEG-BTG的血清对浓度为1 ppm的靶标抑制率达9.82%,有望制备高亲和力的单克隆抗体,目前正在进行杂交瘤细胞筛选。结论 本研究设计合成了MNZ的新型半抗原,经小鼠免疫、细胞融合及杂交瘤筛选,获得了三株MNZ的单克隆抗体,其中mAb 46C1亲和力最高,可用于建立MNZ快速、灵敏、可靠的免疫分析检测方法。

关键词: 兽药残留; 半抗原设计; 甲硝唑; 单克隆抗体; 免疫分析方法

通讯作者: 王战辉, E-mail: wangzhanhui@cau.edu.cn, E-mail: Zhanhui.wang@foxmail.com

T13-0027

红木精油对沙门氏菌感染的保护作用及其机制

王 恒, 王建锋*

(吉林大学动物医学学院 吉林 长春 130062)

摘要:目的 玫瑰花大茴香精油(Anibarosaeodora Essential Oil, RO)具有显著的抗抑郁和抗菌作用,是天然药物中抗生素的替代品。沙门氏菌是食源性疾病中的一种常见耐药性病原体,对目前的抗生素治疗

提出了重大挑战。然而,RO对沙门氏菌的抗菌效果和作用机制尚不清楚。仍然没有得到充分开发;本研究旨在阐明RO的化学成分,评价其体外抗沙门氏菌的抗菌活性及机制,并进一步探讨其体内抗炎机制。**材料和方法** 采用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)对RO的化学成分进行了表征。采用最小抑菌浓度(MIC)和时间-杀灭试验评价RO的抗菌活性。采用多种生化试验来揭示潜在的杀菌机制。此外,还建立了小鼠和鸡沙门氏菌感染模型,以研究RO治疗的预防效果。**结果** RO对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均表现出显著的抗菌活性,对沙门氏菌属的MIC为 4 mg/mL^{-1} 。反渗透处理通过破坏脂质和嘌呤代谢导致细菌损伤。此外,RO减少了感染小鼠和雏鸡的损伤和微生物定植。RO处理还通过抑制促炎通路调节宿主的炎症反应。**结论/讨论** 本研究阐明了RO的抗菌机制,并成功建立了鸡和小鼠沙门氏菌感染模型,以评估RO的体内抗炎作用。我们的研究表明,RO破坏细菌的膜结构,从而削弱细菌的能力,消除羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和促进细胞内的活性氧产生通过激活脂质代谢。通过干扰嘌呤代谢,RO引起细菌代谢过程的不平衡,导致ATP耗竭和ROS过量产生。这种破坏导致包括核酸和蛋白质在内的细胞内内容物的泄漏。此外,RO提供了有效的保护,防止沙门氏菌感染小鼠和小鸡,通过MAPK/RPS 3/NF- κ B途径减少沙门氏菌诱导的炎症。本文从分子生物学的角度,阐述了RO的抗肠杆菌作用及其对靶动物的保护作用,强调了RO作为天然抗菌化合物的潜在临床应用价值。本研究为加强畜禽养殖和保护工作提供理论基础,并为肠杆菌科感染的临床治疗提供可行的参考。

关键词: 红木精油; 沙门氏菌; 抗菌作用; 抗炎; 抗感染

通讯作者: 王建锋,吉林大学动物医学学院教授, E-mail:wjf927@jlu.edu.cn

T13-0028

靛红- β -甲基二硫代氨基甲酸酯衍生物作为新德里金属 β -内酰胺酶-1(NDM-1)抑制剂的发现

吕红发, 邓旭明*, 王建锋*

(吉林大学动物医学学院, 吉林 长春 130062)

摘要: 目的 大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)是携带多种毒力因子的常见病原体,会导致血液感染、腹泻和尿道感染等病症。目前碳青霉烯类抗生素仍然是治疗大肠杆菌的常规方法,但临床上抗生素的滥用和误用导致了碳青霉烯类耐药大肠杆菌的出现,对细菌感染的治疗构成了新的威胁。B类金属 β -内酰胺酶是最有效的碳青霉烯酶,其中新德里金属 β -内酰胺酶-1(New Delhi metallo- β -lactamase-1, NDM-1)常见于大肠杆菌,可降解几乎所有的 β -内酰胺类抗生素,包括青霉素、头孢菌素和碳青霉烯类抗生素,限制了NDM-1阳性病原体治疗药物的选择,对公众健康构成威胁。因此,寻找新的NDM-1抑制剂以恢复 β -内酰胺类抗生素的杀菌活性已成为当务之急。**材料和方法** 在本研究中,利用机器学习和虚拟筛选方法来筛选NDM-1抑制剂,并通过NDM-1酶抑制试验进一步验证抑制剂对NDM-1的抑制作用。通过小鼠肝微粒体和血浆稳定性试验评估抑制剂的代谢稳定性。采用微量稀释法、时间杀伤曲线、联合圆盘法、活/死细菌染色试验和扫描电镜探究抑制剂与美罗培南的协同杀菌效果。通过分子对接和定点诱变,揭示抑制剂与NDM-1结合的关键氨基酸残基。通过细胞毒性试验和细菌侵袭试验探究抑制剂与美罗培南对体外细胞的协同抗感染活性。最后,建立小鼠腹膜炎感染模型,在体内评估抑制剂与美罗培南的协同作用。**结果** 通过虚拟筛选和NDM-1酶活性抑制试验,确定Zndm19为一种新的NDM-1抑制剂。 $16\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的Zndm19能在不影响NDM-1表达的情况下抑制NDM-1活性,恢复美罗培南对NDM-1阳性大肠杆菌的体外杀菌活性。分子对接和定点诱变结果表明,MET-67、ASP-124、HIS-189和HIS-250氨基酸残基构成了NDM-1中Zndm19的活性位点。Zndm19在小鼠血浆中半衰期超过4 h,代谢稳定。在大肠杆菌诱导的A549细胞感染模型中,Zndm19与美罗培南联合使用对胞内细菌表现出更强的杀伤效果。这种联合疗法在小鼠腹膜炎感染模型中也表现出协同抗感染活性,使小鼠存活率提高,组织细菌负荷减少。**结论** 我们的研究表明,化合物Zndm19

是一种有效的新型NDM-1抑制剂,在体外、细胞模型和小鼠模型中均能够恢复美罗培南对NDM-1阳性菌的抑菌活性,为治疗耐药细菌感染,尤其是携带NDM-1的细菌感染提供了新的候选药物。

关键词: NDM-1; 金属 β 内酰胺酶抑制剂; 机器学习; 分子对接

通讯作者: 邓旭明, 教授, 博士, 博士生导师, E-mail: Dengxm@jlu.edu.cn; 王建锋, 教授, 博士, 博士生导师, E-mail: wjf927@jlu.edu.cn

T13-0029

玉米赤霉烯酮诱导AML-12细胞铁稳态紊乱从而导致铁死亡机制研究

宝力格, 黄永泽, 李继昌*

(东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:目的 在全世界范围内,一些人类和动物常食用的食品正在悄无声息的被霉菌毒素所污染,其中玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEA)是一种典型的环境/食物污染物,它会对机体造成不同程度的损伤。众所周知,铁死亡是个较为复杂的过程,除了抑制半胱氨酸/GSH/GPX4轴可以引发铁死亡,还可以通过转铁蛋白受体(TFRC)来增加细胞内的铁水平,以及细胞内的铁离子储存和出口出现紊乱等,这些原因都会引起细胞发生铁死亡。目前,关于ZEA诱导肝脏损伤的机制尚不完善。为此,本研究旨在探讨ZEA是否可以诱导小鼠AML-12细胞发生铁死亡,并为ZEA诱导肝脏损伤的机制提供新的研究思路。**材料和方法** 将小鼠肝实质细胞(AML-12 cells)暴露于ZEA体外攻毒浓度(10, 20, 30 μ M)。ZEA攻毒AML12细胞24 h后提取细胞蛋白,利用Western Blot法检测铁死亡关键蛋白表达量(TFRC, FTH1, FTL, NCOA4, SLC40A1)。采用三种铁死亡抑制剂Fer-1(0.5 μ M)、Lip-1(5 μ M)和DFO(10 μ M)预处理AML-12细胞2小时,随后与ZEA30共同处理24小时。通过试剂盒检测细胞内 Fe^{2+} 的含量,并检测铁死亡关键的蛋白表达量。**结果** 根据先前试验结果,选取10、20、30 μ M的ZEA作用AML-12细胞24h开展试验。Western Blot结果显示,与Con组相比较,ZEA10/20/30攻毒组的FTH1、FTL、SLC40A1及NCOA4的蛋白表达量均显著/极显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),同时ZEA可以显著促进TFRC的蛋白表达水平($P < 0.05$)。同时在试验中发现铁死亡抑制剂Fer-1、Lip-1和DFO均可有效缓解ZEA所引起的铁死亡,但DFO的抑制效果优于Fer-1和Lip-1。故此在后续实验中发现,DFO预处理降低了ZEA所引起的细胞 Fe^{2+} 水平升高。与ZEA30组相比较,DFO+ZEA30组显著增加了SLC40A1的蛋白表达。**结论** 本研究证明ZEA攻毒AML12细胞后细胞内亚铁离子含量显著升高,同时ZEA导致FTH1、FTL、SLC40A1及NCOA4的蛋白表达均显著下调,TFRC的蛋白表达上调。以上证实了ZEA可以通过影响铁离子的输入/储存和外排从而诱导铁代谢紊乱,从而引发铁死亡。铁死亡抑制剂DFO阻断了ZEA所诱导的细胞毒性并恢复铁死亡相关的指标,这进一步表明铁死亡引起的细胞死亡对于细胞活力下降至关重要。

关键词: 玉米赤霉烯酮; 铁稳态; 铁过载; 铁死亡

通讯作者: 李继昌, E-mail: lijichang@neau.edu.cn

T13-0030

截短侧耳素衍生物PDC的临床前毒理学评价

张贺超^{1,2}, 李 准¹, 杨亚军¹, 刘希望¹, 李剑勇^{1,2*}

(1. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所/农业农村部兽用药物创制重点实验室/甘肃省新兽药重点实验室, 甘肃 兰州 730050; 2. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:目的 截短侧耳素(Pleuromutilin)是一种具有独特的抗菌机制,对革兰氏阳性菌和支原体具有高

度抑菌活性的二萜类抗生素,其抗菌特性有望使得截短侧耳素及其衍生物的开发成为抗生素研究的新热点。为了评价截短侧耳素衍生物PDC的临床前毒理学,进行了其在大鼠体内的急性毒性试验和28天经口毒性试验。**材料和方法** 依据《兽药急性毒性试验(LD₅₀测定)指导原则》进行PDC在大鼠体内的急性毒性试验,按照寇氏法进行设计,通过预试验和正式试验确定PDC在大鼠体内的LD₅₀。依据急性毒性试验结果和《兽药30天和90天喂养试验指导原则》进行PDC在大鼠体内的28天经口毒性试验,将大鼠按体重随机分为对照组、高剂量组、中剂量组、低剂量组,每组雌雄各10只。对照组每天给予相同体积的空白溶剂,试验组每天灌胃高、中、低剂量的PDC,连续给药28天。试验期间进行日常观察,给药结束后进行血常规和血生化检测、脏器系数及病理检查。**结果** 急性毒性试验结果表明,当高剂量组已达5000 mg/kg,实验动物死亡率为0/4,并且将动物数增至10只(雌、雄各半),并重复两次试验后动物均未出现死亡,结束整个急性毒性试验,急性毒性试验(LD₅₀测定)结论为:截短侧耳素衍生物PDC的LD₅₀大于5000 mg/kg。28天经口毒性试验结果表明,在3000 mg/kg、1000 mg/kg、300 mg/kg试验剂量范围内,PDC对大鼠精神行为,食欲无影响;试验各组大鼠体重无显著差异;总采食量及日均增重无显著差异;与对照组脏器系数相比,给药组大鼠肝的脏器系数极显著增高;中、高剂量组大鼠胃的脏器系数极显著增高;PDC中、高剂量组血常规指标PLT与对照组相比显著增高,但均在正常值范围内;血生化指标中ALB、ALT、ALP、Urea、CK和T-Bil具有显著性统计学意义。**结论** 截短侧耳素衍生物PDC安全性高,LD₅₀大于5000 mg/kg,属于实际无毒化合物。在试验剂量范围内,PDC对机体体重无显著影响;从血常规和饲料消耗变化来看,药物对机体不会造成炎症及贫血等影响;从脏器系数、血生化和病理检查来看,PDC的毒性靶器官可能为肝脏和肾脏。

关键词: 截短侧耳素;毒理学;急性毒性;经口毒性

T13-0031

一种新型甜叶菊提取物的遗传毒性研究

吴晓蝶¹,李雨婷¹,朱理平²,何冬生²,方玲²,汤树生^{1*}

(1. 中国农业大学动物医学院/兽医公共卫生全国重点实验,北京 海淀 100193; 2. 诸城市浩天药业有限公司,山东 诸城 262200)

摘要:目的 甜叶菊是一种多年生菊科草本植物,叶片可提取一类天然高倍甜味剂—甜菊糖,广泛应用于医药、食品、畜禽饲料等领域。甜叶菊废渣中仍富含绿原酸类物质,具有良好抗氧化、促进肠道健康、提高动物生产性能、改善畜禽产品品质的效果,从甜叶菊废渣中再次提取绿原酸类物质应用于畜禽生产具有重要意义。现诸城市浩天药业有限公司从甜叶菊废渣中成功提取绿原酸类物质,获得了一种主要成份为绿原酸类物质的新型甜叶菊提取物,经有效性研究证明此新型甜叶菊提取物可提高动物生产性能、改善动物产品品质和肠道健康,为确保该产品作为饲料添加剂的安全性,本文开展了该产品的遗传毒性研究,包括Ames试验、小鼠骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸形试验。**材料与方法** 本文分别按农业部(第1247号公告)公布的兽药Ames试验指导原则、兽药小鼠骨髓细胞微核试验指导原则、兽药小鼠精子畸形试验指导原则,以鼠伤寒沙门氏菌(TA97、TA98、TA100、TA102)和SFF小鼠为实验材料,开展了Ames试验、小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验。**结果** Ames试验结果显示,受试物在0.048 μg ~ 30 μg/皿范围内,在有或无代谢活化系统(S9)时,四种鼠伤寒沙门氏菌试验株的每皿平均回变菌落数与阴性对照组比较均无显著性差异,表明受试物对鼠伤寒沙门氏菌无致突变性;小鼠骨髓细胞微核试验结果显示,各剂量组(高中低剂量分别为1250、2500、5000 mg/kg体重)小鼠骨髓细胞中含微核嗜多染红细胞率与阴性对照组比较无显著性差异,表明受试物的小鼠骨髓细胞微核试验结果为阴性;小鼠精子畸形试验结果显示,各剂量组(剂量设计同小鼠骨髓细胞微核试验)小鼠精子畸形率与阴性对照组比较均无显著性差异,表明受试物小鼠精子畸形试验结果为阴性。**结论** 两个体内遗传毒性试验在剂量高达5000 mg/kg体重时其试验结果均为阴性,鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验结果亦为阴性,可初步判定此新型甜叶菊提取物无明显遗传毒性,其作为饲料

添加剂具有较好的安全性。

关键词: 甜叶菊提取物; 遗传毒性; 微核; 精子畸形

作者简介: 吴晓蝶, 在校研究生, E-mail: wxd@cau.edu.cn

通讯作者: 汤树生, 教授, Tel: 13520539145, E-mail: tssfj@163.com

T13-0032

内质网/线粒体互作调控硫酸铜肝毒性的分子机制研究

李 萌, 汤树生*, 代重山*

(中国农业大学动物医学院国家兽医公共卫生全国重点实验室, 北京 海淀 100193)

摘要: 铜是一种必需的微量元素, 也是一种重要的动物饲料添加剂, 铜过量暴露能够损伤肝脏, 造成肝毒性, 但其潜在的分子机制尚不完全清楚。本研究旨在通过体外细胞模型和动物实验探讨内质网-线粒体互作调控硫酸铜(CuSO_4)诱导的肝毒性作用的分子机制。在体外, 不同剂量(100、200和400 μM)的 CuSO_4 处理 HepG2 和 L02 细胞 24 h, 细胞存活率、活性氧(ROS)产生、氧化应激生物标志物、线粒体功能、线粒体超微结构、细胞内钙(Ca^{2+})浓度以及与线粒体凋亡和内质网(ER)应激相关的蛋白质表达被检测。在体内, C57BL/6 小鼠按照 CuSO_4 10和30 mg/kg BW 剂量连续灌胃 35天, 或同时给予 100 mg/kg BW 的 4-苯基丁酸(4-PBA), 完成给药后, 小鼠肝功能、组织病理学特征和线粒体及内质网相关蛋白质表达被检测。结果发现, 100-400 μM 的 CuSO_4 处理 24 h 显著降低了 HepG2 和 L02 细胞的存活率, 并且呈剂量依赖性。此外, CuSO_4 处理的 HepG2 细胞和小鼠肝组织, 导致明显的氧化应激和线粒体功能障碍, 同时显著上调 GRP94、GRP78、p-PERK、p-eIF2 α 和 CHOP 等内质网应激蛋白表达。抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)补充能够有效改善 CuSO_4 诱导的氧化应激、线粒体功能失调和内质网应激。进一步发现, 药理性抑制内质网应激或 ATF4 基因干预能够显著恢复线粒体复合物 I 和 II 的表达, 从而显著改善 CuSO_4 诱导的线粒体功能失调和线粒体凋亡通路的激活。动物模型进一步确证发现, 4-PBA 补充明显降低 CuSO_4 暴露诱导的小鼠肝脏内质网应激, 并进一步抑制线粒体凋亡通路的激活。综上, 我们的研究揭示了 ATF4 介导的线粒体-内质网互作在硫酸铜诱导的肝毒性和细胞凋亡中发挥重要作用。

关键词: 硫酸铜; 线粒体; 内质网; ATF4

T13-0033

Evaluating the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from nipponianippon feces

YANG Lei, SHU Gang*

(四川农业大学 611134)

Abstract: This study aimed to identify an optimal lactic acid bacterial strain from the feces of healthy *Nipponianippon*. From the fecal samples, twenty isolates were obtained. The isolates were subjected to biochemical identification, acid and bile tolerance test, *in vitro* inhibition of pathogenic bacteria assays, cell surface hydrophobicity assessment, antibiotic susceptibility test, and hemolytic activity evaluation to determine their probiotic potential. The results indicated that six isolates (D1, D2, D6, E7, D8, D9) could survive in low acid and high bile salt conditions. Except for D8, all six isolates exhibited inhibitory activity against tested pathogens. Isolates D6 and E7 showed the least resistance to antibiotics,

and only E7 demonstrated moderate hydrophobicity. The E7 strain was further studied in depth and identified as *L. plantarum* through 16srRNA sequencing. To assess its safety, mice were fed with the E7 strain, and the results showed no deaths or adverse effects on blood cellular components.

Whole genome sequencing of *Lactobacillus plantarum* E7 using Nanopore PromethION48 and the Illumina Novaseq revealed a ring chromosome and two ring plasmids. The chromosome encodes 3024 genes, some associated with cell adhesion, acid and bile salt tolerance, antioxidant enzymes, secondary metabolites. Plasmids contained fewer coding genes. Comparing VFDB database detected only a few virulence genes related to adherence, stress survival, exoenzyme production, immune modulation, and regulation factors. KEGG database analysis indicated that the genes of this bacterium are primarily involved in carbohydrate metabolism, amino acid metabolism, vitamin and cofactor metabolism, environmental information processing and genetic processing. This study lays a theoretical foundation for the clinical application and development of probiotics

Key words: Lactic acid bacteria; Nipponianippon; Probiotic; antibacterial activity; the complete genome

Corresponding routh: YANG Lei, E-mail: 1540073796@qq.com; SHU Gang, E-mail: dyysg2005@sicau.edu.cn

T13-0034

鞣花酸通过抑制氧化应激和激活 Nrf2/HO-1 信号通路改善硫酸镉诱导的 HT22 细胞凋亡的分子机制研究

刘月, 汤树生*, 代重山*

(中国农业大学动物医学院兽医公共卫生全国重点实验室, 北京 100193)

摘要: 镉能够穿过哺乳动物血脑屏障诱发神经毒性, 但精确的分子机制尚不清楚。同时, 从天然活性物质中寻找能够有效的减毒剂对临床预防和治疗镉暴露导致的神经毒性具有重要的科学意义, 已收到各国科学家的关注。我们使用 HT22 细胞高通量筛选发现, 鞣花酸能够有效逆转硫酸镉(CdSO_4)诱导的细胞毒性作用, 因此, 我们进行了一系列的分子机制研究探究。通过使用 0.625、1.25、2.5、5 和 10 μM 的 CdSO_4 处理 HT22 细胞和 PC12 细胞 24 h, 其细胞活力显著下降, 并伴有明显的剂量依赖性, 形态学变化表现为细胞密度下降、漂浮细胞增多、细胞体积变小、凹陷、皱缩变圆; 乳酸脱氢酶(LDH)检测结果显示, LDH 释放率随剂量依赖性增加; Hoechst33342 和 Annexin V/PI 双染法检测发现, CdSO_4 暴露能够显著诱导 HT22 细胞凋亡。进一步研究发现, 5-20 μM 鞣花酸处理, 能够显著抑制 CdSO_4 暴露对 PC12 细胞和 HT22 细胞的细胞毒性和凋亡。同时, 鞣花酸补充显著抑制 CdSO_4 暴露诱导的活性氧(ROS)的产生, 显著降低丙二醛(MDA)水平, 并恢复抗氧化酶超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活性, 这些数据表明, 鞣花酸补充能够显著抑制 CdSO_4 暴露诱导的氧化应激损伤。此外, 5-20 μM 的 EA 补充显著抑制 CdSO_4 诱导的线粒体膜电位损失, 显著下调降低 Bax/Bcl-2 比率、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 蛋白(cleaved caspase-3)和 PARP1 剪切体的表达(cleaved PARP-1)的表达及磷酸化(p)-JNK、p-ERK、p-p38 蛋白的表达, 显著上调 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达。进一步研究发现, 药理学的抑制 JNK 显著下调 Nrf2 和 HO-1 的表达, 从而加剧 CdSO_4 的细胞毒性, 但抑制 p38 和 ERK 信号通路对 CdSO_4 的细胞毒性没有明显影响。抗氧化剂 NAC 补充能够明显抑制 CdSO_4 诱导的细胞毒性, 同时显著抑制 JNK 表达。综上, 我们的研究揭示, 氧化应激介导的 JNK 激活在 CdSO_4 诱导的细胞毒性中发挥保护性作用, 鞣花酸能够通过抑制氧化应激和激活 Nrf2 通路改善 CdSO_4 诱导的 HT22 细胞凋亡。我们的发现为临床预防和治疗镉中毒提供了重要数据。

关键词: 硫酸镉; 神经毒性; 鞣花酸; 凋亡

通讯作者: 汤树生, E-mail: tssfj@cau.edu.cn; 代重山, E-mail: daichongshan@cau.edu.cn

T13-0035

砷通过 Bmp4/Smad 信号通路致雄性小鼠生殖损伤及核黄素的干预研究

周云霄, 卢怡光, 宋小超, 杨威, 张建海*
(山西农业大学动物医学学院, 山西 太谷 030801)

摘要: **目的** 诸多研究发现, 砷会损伤睾丸组织、破坏血睾屏障的完整性并影响精子发生过程以及雄性生殖功能。然而, 砷究竟通过何种机制来影响精子发生过程未见报道; 核黄素具有良好的抗氧化和抗感染作用, 可预防多种疾病的发生发展, 但其能否缓解砷诱导的雄性生殖损伤尚不清楚。因此本研究旨在探明砷中毒引起雄性生殖损伤的机制及核黄素的干预作用。**材料和方法** 将 36 只 4 周龄雄性小鼠随机分为四组: 对照组 (Control 组)、5 mg/L 三氧化二砷组 (As 组)、10 mg/kg 核黄素组 (Ribo 组)、砷+核黄素组 (As+Ribo 组), 各组自由饮水、采食, 处理 22 周后采集睾丸及附睾组织; 体外培养 TM4 小鼠睾丸支持细胞, 使用 0、3 μM As_2O_3 、3 μM As_2O_3 +4/8/16 μM Ribo 处理 TM4 细胞, 24 h 后收集细胞样以评估砷诱导对睾丸支持细胞中细胞骨架的影响及核黄素的干预效果。**结果** (1) 体内试验结果显示: 砷会使小鼠精子活力和精子活率降低, 畸形率升高; 病理形态学观察发现砷能够导致睾丸生精细胞数量减少并脱落至管腔, 出现血管壁增厚硬化的现象, 附睾头和附睾体精子数减少, 而核黄素干预可以缓解精子质量及组织受损情况。另外, 砷会降低睾丸组织中 Cx43、Occludin、Bmp4 和 Bmpr1a 蛋白的荧光强度, 而核黄素干预后蛋白的荧光强度显著增强。与 Control 组相比, As 组睾丸中 Bmp4、Bmpr1a mRNA 表达水平显著降低, Ribo 组 Wt1、Gdnf、Ar、Flad1、Smad2、Smad3 mRNA 表达水平平均显著升高; 而与 As 组相比, As+Ribo 组中 Gdnf、Ar、Flad1、RFK、Smad1 mRNA 表达水平平均显著升高, Vimentin、Tgfb3 mRNA 的表达水平则显著降低。(2) 体外试验结果显示: TM4 细胞活力在 3 μM As_2O_3 处理 24 h 后显著降低, 与 As 组相比, As+4/8/16 μM Ribo 处理组的细胞活力均显著升高。罗丹明标记鬼笔环肽染色和细胞免疫荧光结果发现, As 组 F-actin 和 Tubulin 荧光强度减弱, 而补充核黄素能加强 TM4 细胞骨架蛋白的表达。另外, As 组能显著下调 TM4 中 Bmp4、Bmpr1a 的蛋白表达量, 而 As+Ribo 组 Bmp4、Bmpr1a 蛋白的表达水平与对照相比无显著性差异。**结论** 综上所述, 砷中毒能够破坏小鼠血睾屏障, 损伤细胞紧密连接功能, 促使睾丸组织形态结构受损、精子质量下降以及生殖功能受损; 而添加核黄素能够在一定程度上缓解砷中毒所致的上述损伤, 其机制主要与 Bmp4/Smad 信号通路有关。

关键词: 砷中毒; 睾丸; 血睾屏障; 核黄素; Bmp4/Smad 信号通路

通讯作者: 张建海, E-mail: jianhaiz@sxau.edu.cn

T13-0036

网络毒理学和分子对接: 探究硒干预氟化物毒性的机制

崔煜坤, 张建海*
(山西农业大学环境兽医学省重点实验室, 山西 太谷 030801)

摘要: **目的** 硒对氟化物毒性的干预作用已经被广泛报道。硒蛋白是硒元素在机体内发挥生理功能的关键生物分子。然而, 氟化物毒性, 硒及硒蛋白之间的相互作用关系尚不明确。因此, 本研究旨在从硒蛋白的角度, 为氟化物与硒的相互作用研究提供新的思路。**材料和方法** 本研究通过网络毒理学及分子对接的方式对氟化物与硒的相互作用途径及靶点进行分析。首先利用比较毒理学数据库分别收集氟化物及硒的作用靶点, 取交集得到共同作用靶点。GO 及 KEGG 富集分析得到氟化物与硒相互作用的通路信息。利用 string 和 cytoscape 构建蛋白-蛋白互作网络并筛选出核心靶点。进一步将核心靶点分别与 25 种硒蛋白进行分子对接, 以说明在硒干预氟化物毒性过程中可能作用的硒蛋白靶点。**结果** 共收集氟化物作用靶点 2454 个和硒作用靶点 1742 个, 共同作用靶点 316 个。所有共同作用靶点富集在 response to xenobiotic stimulus, negative regulation of apoptotic process, positive regulation of gene expression, positive regu-

lation of apoptotic process, apoptotic process 等生物进程, 以及 Environmental Information Processing, Cellular Processes, Organismal Systems, Human Diseases 四个 KEGG 大类中。其中 TNF signaling pathway, FoxO signaling pathway, Apoptosis, IL-17 signaling pathway 是除 Human Diseases 相关通路外主要的四个通路。筛选出的 Top5 核心靶点 TP53, TNF, JUN, Caspase3, AKT1 均富集在上述四个通路中。进一步分子对接结果显示, TNF-Selenoprotein T, AKT1-DIO1, AKT1-DIO2, Caspase3-DIO2, Caspase3-Selenoprotein P, Caspase3-Selenoprotein I 具有较低的结合能, 表现出显著的稳定结合潜力。结论 硒能够通过调控凋亡, 基因表达等方面干预氟化物毒性, 具体可能通过 DIO1, DIO2, Selenoprotein T, Selenoprotein P, Selenoprotein I 发挥作用。我们的结果为氟化物与硒及硒蛋白相互作用分析提供了新的深入的通路及靶点研究方向。

关键词: 氟化物; 硒; 硒蛋白; 网络毒理学; 分子对接

通讯作者: 张建海, E-mail: Jianhaiz@sxau.edu.cn, E-mail: jianhaiz@163.com

T13-0037

SU3327 通过双靶点途径对重要抗菌药物黏菌素的减毒的 增效作用的分子机制研究

刘月¹, 汤树生¹, 陈洪亮², 郑海灵², 郝智慧¹, 沈建忠¹, 代重山^{1*}

(1. 中国农业大学动物医学院兽医公共卫生全国重点实验室 北京 100193; 2. 厦门汉力信药业有限公司, 福建 厦门 361000)

摘要: 近 10 年来, 多重耐药革兰氏阴性细菌造成的感染严重威胁动物和人类健康。目前多黏菌素类抗菌药物被认为是临床治疗多重耐药革兰氏阴性细菌(主要包括耐碳青霉烯类大肠杆菌、多重耐药肺炎克雷伯菌等)感染的最后一线治疗选择。然而, 由于多黏菌素耐药基因(MCR)的出现, 导致临床多黏菌素的治疗输出显著降低, 严重危险这一重要抗菌药物的使用寿命。因此, 开发有效的黏菌素减毒剂和增效剂, 基于黏菌素的联合给药, 已经成为临床治疗治疗这些危害生命的多重耐药革兰氏阴性细菌的重要治疗策略。本研究通过高通量筛选发现, SU3327 能够有效抑制 JNK 信号通路, 降低硫酸黏菌素诱导的 HEK293T 的细胞毒性, 小鼠模型研究发现, SU3327 能够明显改善黏菌素诱导的小鼠肾脏肾小管损伤和炎症反应; 通过转录组学研究发现, 溶酶体通路、胆固醇合成通路可能在 SU3327 改善黏菌素肾毒性中发挥关键作用。进一步研究发现, SU3327 能够通过抑制革兰氏阴性细菌的细胞膜电位和增加膜通透性, 显著增强黏菌素的抗菌活性。通过小鼠感染模型发现, SU3327 联合黏菌素能够显著提高黏菌素对大肠杆菌导致的腹泻和创伤感染。综上, 本研究揭示了 JNK 信号通路在黏菌素肾毒性中可能发挥重要, 也为临床开发黏菌素/SU3327 的复方制剂提供了重要依据和数据支持。

关键词: 黏菌素; 增效; 减毒; 肾毒性; SU3327

通讯作者: 代重山, E-mail: daichongshan@cau.edu.cn

T13-0038

黏菌素通过激活 AhR/CYP1A1 信号通路诱导 PC12 细胞氧化应激和 凋亡的机制研究

谢宝夫, 汤树生, 沈建忠*, 代重山*

(中国农业大学动物医学院兽医公共卫生全国重点实验室, 北京 100193)

摘要: 由于多重耐药性细菌的快速传播及新药研发的匮乏, 多黏菌素已成为临床治疗多重耐药革兰阴

性杆菌最重要的最后一线治疗希望。然而,多黏菌素具有明显的神经毒性和肾毒性,严重限制了其临床应用和产品开发。本研究旨在探究黏菌素暴露对PC12细胞的毒性作用及其相关分子机制。结果发现,不同浓度的黏菌素处理(100、200和400 μM)能够剂量和时间依赖性的诱导PC12细胞活力的下降和凋亡性死亡。同时,黏菌素可剂量依赖性的诱导细胞内活性氧(ROS)的产生,显著上调MDA水平,显著下调抗氧化酶SOD和CAT水平,导致PC12细胞发生氧化应激损伤。此外,黏菌素处理能够诱导PC12细胞线粒体功能失调,同时显著上调caspase-9和caspase-3活力。抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)补充能够明显抑制黏菌素诱导的ROS产生、caspase激活和细胞凋亡。此外,黏菌素处理显著上调PC12细胞中AhR和CYP1A1 mRNA和蛋白表达。药理学抑制(α -萘黄酮)或基因干预CYP1A1显著抑制黏菌素诱导的ROS产生、caspase激活和细胞凋亡。综上,本研究首次证实了AhR/CYP1A1信号通路参与调控黏菌素诱导的凋亡,同时也发现 α -萘黄酮是一种有效的黏菌素减毒剂。我们的研究为黏菌素毒性机制研究提供了新的观点。

关键词: 黏菌素; AhR/CYP1A1 信号通路; 凋亡; 线粒体功能失调

通讯作者: 沈建忠, E-mail: sjz@cau.edu.cn; 代重山, E-mail: daichongshan@cau.edu.cn

T13-0039

防治粘菌素耐药大肠杆菌噬菌体鸡尾酒的分离与评价

朱晓林¹, 肖天石¹, 贾旭晨², 倪选¹, 张晓松¹, 方奕焯¹, 郝智慧^{1,2*}

(1. 中国农业大学动物医学院 兽医公共卫生全国重点实验室, 北京 100193; 2. 新疆农业大学动物医学院乌鲁木齐 830052)

摘要: 世界范围内频繁出现的耐粘菌素大肠杆菌推动了对抗生素替代疗法的探索,而噬菌体已成为解决这一挑战的有希望的候选者。在这项研究中,分离、筛选了三株大肠杆菌噬菌体,并对来自不同来源的96株耐粘菌素菌株进行了评估。三株噬菌体对菌株的总裂解谱为43.6%,单一噬菌体裂解谱为17.0%~24.5%。值得注意的是,在所测试的噬菌体(FJ3-79、SD1-92L和FJ4-63)中,FJ4-63表现出较短的潜伏期(20 min)和较大的爆发量(95.99 ± 3.61 PFU/cell),在感染细菌后调节宿主种群动态方面表现独特,且在pH 3~11和60 $^{\circ}\text{C}$ 以下均表现出相对稳定性。透射电子显微镜和基因组分析鉴定噬菌体FJ4-63属于Strabovirus科的Dhakavirus属。其基因组由一条长度为169,669 bp的线性双链DNA组成,包含272个编码序列,GC含量为39.76%,其中93个(34.2%)具有已知功能,其余177个被注释为假设的蛋白质。此外,两个tRNA被识别,具有“holin-endolysin”裂解系统,未检测到耐药或毒力基因。系统发育树和平均核苷酸同源性(ANI)分析显示,FJ4-63噬菌体与Escherichia phage C6(679410.1)相似性最高,表明在同一分支内具有一致的亲缘关系。与单个噬菌体相比,包含三个噬菌体的鸡尾酒的体外杀菌功效更强。在MOI=100的高剂量下,可在1 h内迅速完全杀灭细菌,同时显著减少细菌生物被膜。所有这些证据表明,裂解噬菌体为临床治疗提供了一种有效的解决方案,噬菌体鸡尾酒在替代治疗耐粘菌素大肠杆菌感染方面显示出更大的潜力。

关键词: 噬菌体基因组; 大肠杆菌; 粘菌素耐药; 噬菌体鸡尾酒; 生物被膜

通讯作者: 郝智慧, E-mail: haozhahui@cau.edu.cn

T13-0040

千里光肝脏毒理学及其减毒、增效策略研究进展

倪选, 朱晓林, 方奕焯, 张晓松, 郝智慧*

(兽医公共卫生全国重点实验室, 中国农业大学动物医学院, 北京 100193; 农业农村部中兽医生物学重点实验室(中国农业大学), 北京 100193)

摘要: 中药自古以来在防治动物疫病、提高动物生产性能、保障健康养殖中发挥重要作用。中药通过发

挥营养、抗微生物、抗氧化、提升免疫、改善肠道功能和促生长作用,有潜力成为抗生素替代品,以提高动物的生产性能。农业农村部第 194 号公告宣布退出除中药外的所有促生长类药物饲料添加剂,给中药在畜牧业发展提供了新的契机。中药安全性问题不仅关乎着畜牧业发展,也同样影响着人类健康,中药安全性问题愈加受到国内外研究者的重视。中药的不合理使用对肝脏、肾脏、心脏以及胃肠道等造成严重的损伤,甚至导致器官衰竭。

中药千里光为菊科植物千里光 *Senecio scandens Buch.-Ham.* 的地上干燥部分,味苦,性寒,归肺、肝经。具有清热解毒,明目,利湿的作用。用于痈肿疮毒,感冒发热,目赤肿痛,泄泻痢疾,皮肤湿疹。其化学成分包括生物碱类、黄酮类、萜类、酚酸类和挥发油成分等。现代药理学研究证明千里光具有抗菌、抗钩端螺旋体、抗滴虫、抗氧化及自由基清除活性和抗癌的作用。千里光对各种炎症性疾患及细菌性感染具有一定疗效,有相当于广谱抗菌的作用,在治疗细菌感染方面,具有疗效比较稳定、不易产生细菌耐药性以及无明显毒性反应等特点。然而千里光具有肝脏损伤的风险,这限制千里光的临床应用。研究发现千里光中的吡咯里西啶生物碱(Pyrrolizidine Alkaloids, PAs)具有显著的肝脏毒性,其毒性分子机制尚不清楚。因此,开展千里光的肝毒性分子机制及干预靶点研究,科学评价千里光肝脏毒性及探究其毒性作用机制在新中兽药研发、增效减毒及毒理学安全风险评估过程中具有重要的科学价值。本文主要就近 10 年来千里光的毒性分子机制及其减毒、增效研究工作进行归纳总结,并进一步分析讨论当前主要存在的问题,从而促进千里光毒性分子机制研究及开发利用,以期为动物疾病防控提供新策略。

通讯作者:郝智慧, E-mail: haozhahui@cau.edu.cn

T13-0041

几种千里光所含吡咯里西啶生物碱的斑马鱼肝毒性初步研究

方奕焯, 张晓松, 朱晓林, 倪选, 郝智慧*

(兽医公共卫生全国重点实验室, 中国农业大学动物医学院, 北京 100193; 农业农村部中兽医生物学重点实验室(中国农业大学), 北京 100193)

摘要:目的 千里光是菊科植物千里光 *Senecio scandens Buch.-Ham.* 的干燥地上部分,味苦,寒,归肺、肝经,具有清热解毒,清肝明目,利湿等功效。研究证明千里光中含有一类代表性的有毒次生代谢产物-吡咯里西啶生物碱(PAs),但对其毒性分子机制尚不深入。为研究其斑马鱼模型在 PAs 肝毒性评估效果,本文利用斑马鱼胚胎与成鱼模型就三种千里光所含 PAs 开展了急性暴露试验。**材料与方法** 本研究以 GB/T 27861-2011 鱼类急性毒性试验为指导原则,以 AB 系斑马鱼胚胎与五月龄成鱼为实验动物,开展了千里光碱、千里光菲灵碱、阿多尼弗林碱(三种 PAs 的剂量设计相同,各剂量均分别为 0.01、0.1、1、10、100 mg/L)的急性暴露试验。并对其死亡率,肝脏组织学进行检测。**结果** 急性暴露试验结果显示,各剂量组死亡率与空白对照组相比无显著性差异,表明三种 PAs 无明显的斑马鱼胚胎、成鱼个体致死效果。组织学检查结果显示,三种 PAs 在 0.01、1、100 mg/L 剂量组均对斑马鱼成鱼肝脏结构具有一定的损伤效果,主要表现为肝实质细胞出现不同程度的萎缩,核皱缩、碎裂,空泡化。**结论** 三种 PAs 对斑马鱼具有肝毒性,造成肝组织损伤。

关键词: 千里光; 吡咯里西啶生物碱; 斑马鱼; 肝毒性

通讯作者:郝智慧, E-mail: haozhahui@cau.edu.cn

T13-0042

槟榔提取散急性和慢性毒性试验研究

马丹阳, 伍少峰, 侯思鲁, 惠乔岳, 郝智慧*

(中国农业大学三亚研究院, 三亚 572025; 中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

摘要:目的 槟榔提取散是由槟榔经提取、浓缩、干燥、混合制成的提取物散剂,为考察制剂的毒性和安

全性,开展槟榔提取散对小鼠经口急性毒性试验和慢性毒性试验。**材料和方法** 依据《兽药急性毒性试验指导原则》和《GB15193.3-2014 食品安全国家标准 急性经口毒性试验》,采用限量法,经口一日3次给予雌雄各10只SD大鼠槟榔提取散,给药剂量为15 g/kg体重。分别于给药前D0、给药后D1、D2、D7、D14对动物进行体重测定,并连续14天进行临床观察。依据《兽药慢性毒性和致癌试验指导原则》,将240只SPF级4-5周龄SD大鼠分为4组,每组60只,雌雄各半,分为空白对照和低、中、高3个受试品剂量组(5 g/kg、15 g/kg、30 g/kg饲料)。各组给药180天期间每天观察动物临床表现,并对动物体重、增重率、摄食量、饲料利用率、饮水量、血液学指标、生化指标、脏器比值、组织病理学变化。**结果** 经口急性毒性试验结果表明,雌雄大鼠在给药后,精神状态良好,饮食未见明显异常,小便未见明显异常,大多数动物(雄性为7/10,雌性为6/10)在给药后3 h内出现急性拉稀现象,雄性动物体重持续增长,雌性动物48 h内个别动物(2/10)体重下降或不增长。直至给药后14天试验结束,动物无死亡。动物剖检显示,无肉眼可见明显病变。慢性毒性试验结果显示,槟榔提取散对动物生长、动物摄食量、饮水量未见明显异常影响。180 d血常规结果显示雄性中剂量组淋巴细胞(Lym)偏低,雌性中剂量组白细胞、Lym、单核细胞(Mon)及血小板偏低,雌性高剂量组Mon偏低,与对照组比显著差异。180 d血生化结果显示,雄性中、高剂量组甘油三酯偏低,雌性高剂量组肌酐偏高,与对照组比差异显著。给药180 d后,雄性中剂量组睾丸系数偏高,雌性中剂量组肾脏系数偏低,与对照组比差异显著。给药180 d后与空白对照相比,雄性中、高剂量组心肌间各见一例少量淋巴单核细胞浸润(1/5),各见一例肝组织少量肝细胞脂变(1/5),胃组织胃底腺各见一例见少量浆细胞浸润(1/5),肠组织各见一例肠绒毛顶端上皮脱落(1/5)。与空白对照相比,雌性中、高剂量组肝细胞偶见嗜碱性增强,双核细胞增多(2/5、1/5),部分肾小管上皮细胞嗜碱性增强(1/5、1/5),高剂量肾上腺偶见网状带充血,并伴有少量的淋巴单核细胞浸润(1/5)。**结论** 在本试验条件下,槟榔提取散对SD大鼠的急性经口最大耐受量为15 g/kg体重,毒性分级为无毒。当饲料中添加5 g/kg剂量槟榔提取散时,对SD大鼠无不良影响。换算后,槟榔提取散对大鼠的无作用剂量(NOEL)为0.26 g/kg体重。

关键词: 槟榔提取散;急性毒性;慢性毒性;安全性评价

通讯作者: 郝智慧, E-mail: haozhahui@cau.edu.cn

T13-0043

山竹提取散的急性与长期毒性实验研究

伍少峰¹, 马丹阳¹, 侯思鲁¹, 惠乔岳¹, 郝智慧^{1,2*}

(1. 中国农业大学三亚研究院 三亚 572024; 2. 中国农业大学 动物医学院 农业部中兽医生物学重点实验室 北京 100193)

摘要: **目的** 为评估山竹提取散的临床用药安全性,我们分别进行了急性毒性实验和长期毒性实验,以确定其急性和长期给药的安全剂量范围,并预测可能的不良反应及毒性靶器官。**材料和方法** **急性毒性实验:**选取20只SD大鼠(雌雄各半),随机分为2组。采用限量法,以15 g/kg体重剂量经口一日3次给予山竹提取散。于染毒前后(D0、D1、D2、D7、D14)测定体重,并连续14天观察其临床表现,最后进行大体剖检,检查脏器异常。**长期毒性实验:**240只4-5周龄SD大鼠分为4组(每组60只,雌雄各半),包括空白对照组及3个剂量组(2.5 g/kg、5 g/kg、15 g/kg)。通过饲料混入的方式给药,实验持续180天。期间定期观察临床表现、测量体重、摄食量及饮水量,并在第60、120、180天采集血液和器官样本,进行血液学、血清生化、组织病理学及器官重量分析。**结果** **急性毒性实验:**实验结果表明,受试大鼠在给药后精神状态、饮食和小便均未见明显异常,大多数大鼠(雄性8/10,雌性4/10)在给药后3小时内出现拉稀症状,部分大鼠(雄性4/10,雌性6/10)体重在给药后2天内下降。试验期间14天内无动物死亡,剖检结果显示,无肉眼可见的脏器异常。**长期毒性实验:**实验结果显示,在给药180天期间,所有大鼠存活且无异常表现。体重测量显示,低、中剂量组对大鼠体重和增重率无显著影响,而高剂量组体重显著较低($P<0.01$)。高剂量组在部分周期内摄食量和饮水量显著较低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。血液学检查结果表明,高剂量组在不同时间点MCV偏高、RBC和MPV

偏低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。血液生化检查显示,高剂量组在 180 天后 ALT、Crea、Urea 偏高, TG 偏低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。脏器系数结果显示,给药后 180 d,高剂量组胃、肠、脑系数显著偏高 ($P < 0.05$),雌性动物中剂量组胃系数显著偏低 ($P < 0.05$)。组织病理学分析显示,高剂量组在 180 天后部分脏器(肝、肾、脾、子宫)组织结构出现轻度异常,肝脏有少量炎性细胞浸润。**结论** 山竹提取散的急性经口最大耐受量为 15 g/kg,毒性分级为无毒。长期毒性实验中,低剂量组(2.5 g/kg)未显示对大鼠的生长、摄食、饮水、血液指标、器官重量和组织病理的显著影响。中剂量组(5 g/kg)对部分血液指标及器官有轻微影响。高剂量组(15 g/kg)对生长、摄食、饮水及多个血液和器官指标产生影响,出现多器官轻度异常。因此,山竹提取散的长期无作用剂量(NOEL)为 0.16 g/kg。

关键词: 山竹提取散;急性毒性;长期毒性;SD 大鼠

通讯作者: 郝智慧, E-mail: haozhahui@cau.edu.cn

T13-0044

艾草精油抑制鼠伤寒沙门氏菌鞭毛的作用及机制

丁琳琳, 徐 蕾*, 邓旭明*

(吉林大学动物医学学院, 吉林 长春 130062)

摘要: **目的** 鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 是重要的食源性病原体,感染症状主要为急性肠胃炎、伤寒和败血症等,死亡率极高,在世界范围内造成了巨大的公共卫生负担。然而,抗生素耐药性的出现和广泛传播严重威胁了沙门氏菌的临床治疗。沙门氏菌的致病性与多种毒力因子密切相关,包括不同类型的细菌分泌系统、菌毛、黏附素和鞭毛等。其中,鼠伤寒沙门氏菌周身长有鞭毛,可驱动细菌的滑动运动,参与粘附并入侵宿主细胞,激活宿主免疫反应。鉴于鞭毛对沙门氏菌致病机理的重要性,我们提出了一种有效的治疗方案,靶向抑制沙门氏菌鞭毛,进而显著降低沙门氏菌致病力,旨在为开发抗沙门氏菌感染药物及治疗策略提供新的研究思路。**材料和方法** 基于网络药理学分析预测了传统中草药艾草的潜在靶点,并通过滑动运动试验考察艾草精油靶向抑制沙门氏菌鞭毛的活性,进一步应用抗菌活性测定、透射电镜观察、鞭毛蛋白的纯化,以及相关毒力基因的转录和表达水平测定、细胞毒性检测、细胞粘附试验等试验探究艾草精油通过靶向调控鞭毛相关基因进而影响沙门氏菌致病力的作用机制。此外,在体内通过建立小鼠肠道感染模型以探究艾草精油对于小鼠感染 *S. typhimurium* 的治疗作用。最终,应用气相色谱质谱检测(GC-MS)结合网络药理学分析艾草精油中发挥抗 *S. typhimurium* 感染作用的主要活性成分。**结果** 本研究基于网络药理学分析发现传统中药艾草具有抗沙门氏菌感染的潜在活性,进一步研究表明,艾草精油处理能够通过下调鞭毛相关蛋白的表达和转录水平,进而显著抑制鞭毛介导的细菌滑动运动功能。此外,艾草精油能够抑制 *S. typhimurium* 粘附定植,显著减轻 *S. typhimurium* 感染介导的细胞损伤。体内试验结果表明,艾草精油可以通过抑制肠道细菌载量,降低促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平,进而减轻组织病理损伤,显著改善沙门氏菌感染导致的肠道病变损伤。最终,通过 GC-MS 从艾草精油中鉴定发现 43 种主要化合物,进一步应用网络药理学和体内试验预测并分析了相关的作用靶标和主要活性成分。**结论** 本研究表明艾草精油及其生物活性成分能够通过抑制细菌鞭毛功能,进而降低 *S. typhimurium* 的致病力,为治疗 *S. typhimurium* 感染提供了潜在的先导化合物。

关键词: 传统中草药;鼠伤寒沙门氏菌;鞭毛;艾草精油

T13-0045

黄连素通过影响糖酵解代谢改善镉暴露诱导的肝细胞铁死亡

乔卫栋^{1,2}, 汤树生^{1,2*}, 代重山^{1,2*}

(1. 中国农业大学三亚研究院, 海南省食品安全监测及检测技术创新中心, 三亚 572025; 2. 中国农业大学动物医学院, 北京, 海淀 100193)

摘要: 镉(Cadmium, Cd)是最常见的金属污染物之一。Cd暴露可导致明显的肝脏毒性,但精确的分子机制尚不清楚。本研究旨在通过靶向和非靶向代谢组学探究Cd暴露诱导的肝损伤作用机制及黄连素的干预作用。5-40 μM 剂量的 CdSO_4 处理HepG2细胞剂量依赖性的诱导细胞死亡,黄连素补充能够剂量依赖性的改善 CdSO_4 对HepG2细胞的毒性作用,进一步研究发现,黄连素补充能够显著上调SLC7A11和GPX4蛋白表达,从而显著抑制 CdSO_4 诱导的铁死亡。代谢组学研究发现,20 μM 的 CdSO_4 暴露24 h后,HepG2细胞中共有46个代谢物发生显著变化,富集的主要代谢通路包括缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成、果糖和甘露糖代谢、糖酵解代谢、三羧酸循环、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、精氨酸生物合成、组氨酸代谢、泛酸和辅酶A生物合成等代谢通路;与 CdSO_4 模型组相比,黄连素干预后,56个代谢物差异显著,富集的代谢通路包括缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成、新霉素、卡那霉素和庆大霉素的生物合成、半乳糖代谢、淀粉和蔗糖代谢、糖酵解代谢、三羧酸循环、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、乙醛酸盐和二羧酸盐代谢、精氨酸生物合成、甘油磷脂代谢、组氨酸代谢和甘油酯代谢。进一步通过动物模型研究发现,黄连素口服补充(100 mg/kg)能够显著改善 CdSO_4 暴露诱导的肝损伤和炎症反应,与对照组相比,硫酸镉暴露后,小鼠肝脏组织中有77个差异代谢物,富集的代谢通路包括嘌呤代谢、嘧啶代谢、糖酵解代谢、三羧酸循环、精氨酸生物合成、糖酵解、淀粉和蔗糖代谢;与硫酸镉暴露组相比,黄连素+硫酸镉联合处理后,富集到90个差异代谢物,富集的代谢通路包括嘧啶代谢、果糖和甘露糖代谢、 β -丙氨酸代谢、糖酵解和三羧酸循环。通过整合分析,我们的研究证实,糖酵解和三羧酸循环在 CdSO_4 诱导肝细胞铁死亡中可能发挥关键作用,黄连素能够重塑糖酵解和三羧酸循环有效改善 CdSO_4 肝毒性作用。

关键词: 重金属镉; 黄连素; 代谢组; 肝毒性

通讯作者: 汤树生, E-mail: tssfj@cau.edu.cn; 代重山, E-mail: daichongshan@cau.edu.cn

T13-0046

黄曲霉毒素B1毒性作用机制及天然酚类化合物槲皮素的干预作用研究进展

陈春红, 汤树生, 郝智慧, 代重山*

(中国农业大学动物医学院兽医公共卫生全国重点实验室, 北京 100193)

摘要: 黄曲霉毒素(AFTs)是一种主要由寄生曲霉和黄曲霉产生的霉菌毒素,可以在食品、饲料、中草药、粮食作物中检测到,对公共卫生安全构成巨大威胁,其中黄曲霉毒素B1(AFB1)毒性最强。AFB1暴露会对人类和动物造成各种健康风险,包括慢性炎症疾病、心血管疾病、神经退行性疾病和癌症的发展。这些风险背后的分子机制是复杂的,取决于特定的环境。本文主要综述了槲皮素(一种天然酚类化合物)在体外实验和动物模型中减轻AFB1诱导的毒性作用的保护作用及潜在的分子机制。槲皮素已被证明不仅对曲霉产生AFTs具有直接的抑制作用,而且对AFB1诱导的细胞毒性、肝毒性和神经毒性也有显著的改善作用,这些效应归因于对氧化应激、线粒体功能障碍、线粒体凋亡途径和炎症反应的抑制;此外,槲皮素还可通过直接靶向几种代谢酶(即CYP3As和GSTA1),从而减少宿主细胞内AFB1有毒代谢物的产生,从而减少AFB1诱导的细胞毒性。总之,通过体外和动物模型研究证实槲皮素是一种有前景的AFB1解毒剂,在动物饲养方

面具有广阔的应用前景。

关键词: 黄曲霉毒素; 槲皮素; 毒性; 脱毒作用

通讯作者: 代重山, E-mail: daichongshan@cau.edu.cn

T13-0047

AEE对高脂血症大鼠炎症的改善作用研究

范丽萍, 陶琦, 张治杰, 葛闻博, 杨亚军*, 李剑勇*

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 农业农村部兽药创制重点实验室, 甘肃省新兽药重点实验室, 兰州 730050)

摘要: **目的** 高脂饮食可诱导非酒精性脂肪肝的发生, 并伴随炎症反应, 炎症进一步的加重会诱发不可逆转的非酒精性脂肪肝。血清 IL-1 β 、TNF- α 升高是炎症反应的重要标志, 降低炎症水平可缓解非酒精性脂肪肝的发生和发展。本研究旨在探讨 AEE 对高脂血症大鼠炎症水平的改善作用。**方法** 健康雄性 SD 大鼠, 随机分为 5 组, 分别给予普通日粮 (Control)、高脂日粮 (HFD)、高脂日粮并灌胃 AEE 27 mg/kg/d (HFD+AEE-L)、高脂日粮并灌胃 AEE 54 mg/kg/d (HFD+AEE-M)、高脂日粮并灌胃 AEE 108 mg/kg/d (HFD+AEE-H), 连续处理 8 周。采集血清、肝脏, 检测血脂指标甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TCH)、低密度脂蛋白 (LDL), 炎症指标 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10, 肝脏 HE 染色观察病理变化。**结果** 与 Control 组大鼠比较, HFD 组血清 TCH、LDL 显著升高, 表明高脂日粮诱导了大鼠高脂血症; 与 HFD 组比较, HFD+AEE-L、HFD+AEE-M、HFD+AEE-H 组大鼠血清 TCH、LDL 明显下降, 表明 AEE 能够降低高脂血症大鼠血脂水平。与 Control 组比较, HFD 组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 显著升高, IL-10 显著下降, 表明高脂日粮诱导大鼠炎症发生; 与 HFD 组比较, HFD+AEE-L、HFD+AEE-M、HFD+AEE-H 组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 显著下降, IL-10 显著上升, 表明 AEE 可显著改善高脂血症大鼠炎症水平。与 Control 组比较, HFD 组肝脏组织中大量肝细胞发生脂肪变性, 可见肝细胞胞质内含不着色、边缘光滑的圆形脂滴, 以小脂滴为主; 部分肝细胞肿胀明显, 肿胀肝细胞散在分布, 可见肝细胞变大变圆。与 HFD 组比较, AEE 给药组肝细胞脂肪变性明显改善, 表明 AEE 可以缓解高脂日粮诱导的大鼠肝脏脂肪性病变。**结论** AEE 显著降低高脂血症大鼠血清 TCH、LDL; 显著降低 IL-1 β 、TNF- α , 升高 IL-10; 并且缓解肝脏脂肪性病变。

关键词: AEE; 大鼠; 高脂血症; 炎症

T13-0048

磁性 COF(TpPa-NO₂)@Fe₃O₄ 负载低共熔溶剂检测鸡肉中喹诺酮残留

杜涓丽¹, 徐淑雅², 荆旭², 王晓闻^{2*}, 张建海^{1*}

(1. 山西农业大学动物医学学院, 晋中 太谷 030801; 2. 山西农业大学食品科学与工程学院, 晋中 太谷 030801)

摘要: 鸡肉作为动物源食品的重要组成部分, 含有丰富的优质蛋白, 深受大众喜爱, 鸡肉食用安全性不言而喻。近年来鸡肉中兽药残留超标的报道屡见不鲜, 以喹诺酮类药物残留最为普遍, 严重危害人群健康。因此, 开发一种简单可靠、高灵敏度、绿色的检测鸡肉中喹诺酮残留的方法是至关重要的。

鸡肉中含有多种复杂成分, 比如脂肪、蛋白质, 分析测定低浓度残留兽药时会产生干扰, 造成误差。因此研究开发既能消除干扰, 又能最大程度分离富集所分析的残留兽药的样品前处理技术至关重要。传统常用的鸡肉样品前处理的技术普遍存在, 耗时、提取条件苛刻、需要大量有害溶剂等缺点。与其它提取技术相比, 磁固相萃取 (MSPE) 和液液微萃取 (DLLME) 相结合, 通过绿色低共熔溶剂 (DES) 和磁性材料进行萃取

和分离,具有操作简便,易于分离和绿色环保的优点。本研究基于DES-DLLME和高效的MSPE相结合,建立了一种快速、灵敏、可靠的喹诺酮兽药提取和测定方法。采用简单的溶剂热法合成了一种具有核壳结构的磁性共价有机骨架COF(TpPa-NO₂)@Fe₃O₄负载结合乳酸山梨醇合成的亲水DES,对鸡肉中的喹诺酮兽药残留进行萃取;用外部磁铁捕捉喹诺酮兽药,并用新型合成的疏水DES辛酸小茴香醇解析。整个过程只需12 min,大大缩短了处理时间,避免了离心涡旋和有机溶剂的使用。结合主成分分析法(PCA),即使在很低的浓度下,也能很好地区分八种喹诺酮兽药。在优化条件下,对各种吸附解析条件和萃取机理进行探索,该方法在10–300 μg·L⁻¹范围内具有较宽的线性范围;灵敏度高,检出限为0.16 μg·L⁻¹;鸡肉中喹诺酮兽药的回收率为95.2%–103.6%;结果表明该方法对喹诺酮兽药具有很好的吸附性,提高了鸡肉中喹诺酮兽药的检测效率。通过研究探索,该方法有望成为一种通用的平台用于动物食品中喹诺酮兽药残留的检测。

关键词: 磁性COF(TpPa-NO₂)@Fe₃O₄;低共熔溶剂;分离和提取;喹诺酮残留;鸡肉样品

通信作者: 张建海,主要从事畜禽营养代谢与中毒病发病机制与干预,动物性食品质量与安全研究。
E-mail: jianhaiz@163.com

T13-0049

番茄红素对黄曲霉毒素B1毒性的脱毒作用分子机制研究进展

陈欣¹, 李萌¹, 汤树生¹, 代重山^{1*}

(1 中国农业大学三亚研究院, 海南省食品安全监测及检测技术创新中心, 三亚 572025; 2. 中国农业大学动物医学院, 北京 海淀 100193)

摘要: 黄曲霉毒素(AFTs)污染是一个重大的全球公共卫生和粮食安全问题,受到了广泛的担忧。在黄曲霉毒素家族中,黄曲霉毒素B1(AFB1)因其显著的毒性及其污染与一系列慢性疾病发生率呈正相关,因而备受关注。番茄红素是一种脂溶性天然类胡萝卜素,一系列动物实验和体外细胞实验证实能够有效改善AFB1暴露引起的多种毒性效应,包括心脏损伤、肝毒性、肾毒性、肠道损伤和生殖损伤。分子机制探究证明番茄红素对AFB1毒性保护作用机制涉及对氧化应激、炎症和脂质过氧化、线粒体凋亡途径的抑制以及线粒体生物发生、内源性抗氧化系统和核因子红系2相关因子2(Nrf2)/kelch样ECH相关蛋白1(KEAP1)和过氧化物酶体增殖物激活受体γ辅活化因子-1(PGC-1)途径的激活,以及调节细胞色素P450(CYP450)酶的活性。本文综述了番茄红素对AFB1暴露诱导的毒性的保护作用及其潜在的分子机制。此外,还探讨了番茄红素的安全性和潜在的临床应用。本综述强调了番茄红素作为对抗AFB1暴露的有前景的解毒剂的潜力,旨在促进该领域的进一步研究和番茄红素的实际应用。

关键词: 黄曲霉毒素;番茄红素;毒性;脱毒作用

通讯作者: 代重山, E-mail: daichongshan@cau.edu.cn

T13-0050

新型依倍硼罗纳米颗粒在KPC阳性肺炎克雷伯菌引起的伤口和肺部感染方面的潜在应用价值

刘敏达, 邱家章, 邓旭明, 王建锋*

(吉林大学动物医学学院, 吉林 长春 130062)

摘要: **目的** 肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)作为革兰氏阴性菌,是医疗相关性感染的重要病原体。临床上肺炎克雷伯菌可引起肺部、尿路、术后等感染,由于抗生素的不良使用,其具有的高耐药性和高

毒力对公共健康造成严重威胁。 β -内酰胺酶是该病原体主要的抗生素耐药机制,其中在临床广泛传播的肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶-2 (KPC-2)是一种A类丝氨酸- β -内酰胺酶。KPC-2可水解新一代头孢菌素及碳青霉烯类药物,通过亲核丝氨酸攻击 β -内酰胺环,其sp³杂化中间体形成酰基-酶复合物。氨酰-tRNA合成酶(aaRS)在蛋白质合成的第一步中起着重要作用,如亮氨酰-tRNA合成酶(LeuRS)。本研究旨在抑制细菌耐药性和降低细菌活力,筛选出具有双重靶向机制的小分子化合物,为抗肺炎克雷伯菌感染的药物开发提供潜在先导化合物。**材料和方法** 本研究通过Carba NP试验、KPC酶活性试验筛选抑制KPC酶活性的小分子化合物。联合多种抗生素,应用微量稀释棋盘法、抑菌圈测定、扫描电镜、活死细胞染色和胞内杀菌试验,验证小分子的体外协同抗菌活性及广谱性。进而通过溶血毒性、细胞毒性试验及体内急性毒性试验,对小分子进行安全性评价。同时,开发多功能纳米颗粒,通过zeta电位、核磁共振等对其表征。随后,建立肺炎克雷伯菌肺炎模型和皮肤感染模型,通过活体成像观察、菌落定植、存活率、病理观察等试验验证纳米制剂的体内治疗效果。此外,应用圆二色谱、分子动力学模拟,酶动力学测定、氨酰化测定等探究小分子的协同及抑菌机制。**结果** 本研究成功筛选依倍硼罗可显著抑制KPC酶的活性,在8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下联合美罗培南的MIC可降低16倍。联合使用后,抑菌圈直径显著增加、细菌形态变化、并在胞内杀死肺炎克雷伯菌,具有良好的体外协同抗菌活性。随后开发出多功能纳米颗粒,具有良好的载药量、包封率及生物相容性。在肺炎感染模型中,多功能纳米制剂主动靶向肺部,降低脏器的细菌载量发挥抗感染作用,在皮肤感染模型中可加速伤口愈合。机制研究表明,小分子可竞争性抑制KPC的酶活性,直接占据其丝氨酸活性口袋;且非竞争性抑制LeuRS酶的编辑活性,阻止蛋白质合成。**结论** 研究表明,依倍硼罗联合美罗培南对KPC阳性肺炎克雷伯菌表现出强大的协同活性,同时靶向KpLeuRS具有独特的抑菌作用,为多功能抗生素佐剂的开发提供了有前景的候选化合物。

关键词: 肺炎克雷伯菌; β -内酰胺酶; 亮氨酰-tRNA合成酶; 纳米制剂

通讯作者: 王建锋,教授,博士,博士生导师, E-mail:wjf927@jlu.edu.cn

T13-0051

Chronic arsenic exposure-provoked biotoxicity involved in liver-microbiota-gut axis disruption in chickens based on multi-omics technologies

Jiayi Li, Biqi Han, Zhigang Zhang*

(College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Introduction: Arsenic has been ranked as the most hazardous substance by the U.S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Environmental arsenic exposure-evoked health risks have become a vital public health concern worldwide owing to the widespread existence of arsenic. Multi-omics is a revolutionary technique to data analysis providing an integrated view of bioinformation for comprehensively and systematically understanding the elaborate mechanism of diseases. **Objectives** This study aimed at uncovering the potential contribution of liver-microbiota-gut axis in chronic inorganic arsenic exposure-triggered biotoxicity in chickens based on multi-omics technologies. **Materials and methods** Forty Hy-Line W-80 laying hens were chronically exposed to sodium arsenite with a dose-dependent manner (administered with drinking water containing 10, 20, or 30 mg/L arsenic, respectively) for 42 d, followed by transcriptomics, serum non-targeted metabolome, and 16S ribosomal RNA gene sequencing accordingly. **Results** Arsenic intervention induced a serious of chicken liver dysfunction, especially severe liver fibrosis, simultaneously altered ileal microbiota populations, impaired chicken intestinal barrier, further drove enterogenous lipopolysaccharides translocation via portal vein circulation aggravating liver damage. Furtherly, the injured liver disturbed bile acids (BAs) homeostasis

through strongly up-regulating the BAs synthesis key rate-limiting enzyme CYP7A1, inducing excessive serum total BAs accumulation, accompanied by the massive synthesis of primary BA—chenodeoxycholic acid. Moreover, the concentrations of secondary BAs—ursodeoxycholic acid and lithocholic acid were markedly repressed, which might involve in the repressed dehydroxylation of Ruminococcaceae and Lachnospiraceae families. Abnormal BAs metabolism in turn promoted intestinal injury, ultimately perpetuating pernicious circle in chickens. Notably, obvious depletion in the abundance of four profitable microbiota, Christensenellaceae, Ruminococcaceae, Muribaculaceae, and Faecalibacterium, were correlated tightly with this hepato-intestinal circulation process in chickens exposed to arsenic. **Conclusion** Our study demonstrates that chronic inorganic arsenic exposure evokes liver-microbiota-gut axis disruption in chickens and establishes a scientific basis for evaluating health risk induced by environmental pollutant arsenic.

Key words: Chronic arsenic exposure; Liver-microbiota-gut axis; Liver fibrosis; Ileal microbiota; Bile acids; Multi-omics technologies

Corresponding author: Zhigang Zhang, E-mail: zhangzhigang@neau.edu.cn

T13-0052

氟通过 miR-34a-5p 扰乱小鼠睾丸体细胞自噬的机制研究

程 敖, 吴 悦, 乔雨柔, 张建海*

(山西农业大学, 动物医学学院, 山西 晋中 030800)

摘要: 目的 氟是一种普遍存在的环境污染物, 过量摄入对雄性生殖有毒性影响。自噬是将受损细胞器及大分子物质通过溶酶体降解再利用的过程, 在生殖、毒理等进程中起重要作用。研究表明, 氟促进睾丸间质细胞自噬、抑制睾丸支持细胞自噬且与 miR-34a-5p 有关。本研究旨在探究 miR-34a-5p 在睾丸体细胞中的功能及其参与氟扰乱睾丸体细胞自噬的机制。材料和方法 采用小鼠睾丸间质细胞(TM3)和支持细胞(TM4)进行低(0.125 mM)、中(0.25 mM)和高(0.5 mM)浓度氟处理 24 h 构建体外氟暴露模型。通过 Western blot 检测自噬标志蛋白(LC3B 和 P62)表达评估自噬水平。qRT-PCR 检测 miR-34a-5p 表达水平。生物信息学预测 miR-34a-5p 的靶基因并通过双荧光素酶报告实验验证。利用慢病毒感染系统构建 TM3 和 TM4 的 miR-34a-5p 及其靶基因的过表达和敲低稳转株, 证明两者对自噬的调节作用并设置回复(rescue)实验验证参与氟扰乱自噬。结果 中浓度氟暴露促进 TM3 自噬, 抑制 TM4 自噬。中浓度氟暴露 TM3 中 miR-34a-5p 表达显著下降, TM4 中 miR-34a-5p 表达显著升高。敲低 miR-34a-5p 促进 TM3 和 TM4 自噬, 过表达 miR-34a-5p 则抑制。在氟暴露 TM3 中过表达 miR-34a-5p, 氟暴露 TM4 中敲低 miR-34a-5p 进行回复实验, 结果显示, 过表达 miR-34a-5p 会逆转氟导致的间质细胞自噬升高, 敲低 miR-34a-5p 会逆转氟导致的支持细胞自噬降低。通过 CHIP-X Enrichment Analysis Version 3 和 miRWalk version 3 在线软件分析出 51 个 miR-34a-5p 的潜在靶基因, 其中 REST、Foxp1、YY1、SMAD5、ELF1、KLF10、MEF2A 和 Foxo1 的 mRNA 水平在氟暴露 TM3 中显著上调, REST 在氟暴露 TM4 中显著下调。qRT-PCR 和 Western blot 结果显示, 在 TM3 和 TM4 中过表达 miR-34a-5p 抑制 REST 的表达, 敲低 miR-34a-5p 则升高 REST 的表达。miRWalk version 3 分析了 miR-34a-5p 在 REST 3' UTR 上的靶位点, 双荧光素酶报告实验进一步证实 miR-34a-5p 和 REST 存在靶向关系。qRT-PCR 和 Western blot 结果显示, 氟暴露后 TM3 中 REST 表达增加、TM4 中 REST 表达降低。过表达 REST 促进睾丸体细胞自噬, 敲低 REST 则抑制。在氟暴露 TM3 中敲低 REST, 氟暴露 TM4 中过表达 REST 进行回复实验, 结果显示, 敲低 REST 会逆转氟诱导的间质细胞自噬促进, 过表达 REST 会逆转氟诱导的支持细胞自噬抑制。结论 miR-34a-5p 可抑制小鼠睾丸体细胞自噬, REST 可促进睾丸体细胞自噬。REST 被证明是 miR-34a-5p 的一个靶基因。氟通过下调 miR-34a-5p 升高

REST 促进睾丸间质细胞自噬,通过升高 miR-34a-5p 降低 REST 抑制支持细胞自噬。

关键词: 氟; 睾丸间质细胞; 睾丸支持细胞; 自噬; miR-34a-5p

通讯作者: 张建海, E-mail: jianhaiz@163.com

T13-0053

氟致小鼠肝脏铁死亡及双歧杆菌干预的机制研究

李 想, 师二保, 朱潜龙, 张建海*

(山西农业大学, 动物医学学院, 山西 晋中 030800)

摘要: 目的 氟广泛存在于自然环境中,主要通过饮水和食物摄入动物机体。研究发现,氟可在肝脏中蓄积,导致肝脏组织结构和功能损伤。本团队发现氟可通过 System Xc/GPX4、脂质过氧化和铁代谢导致肝脏组织内细胞铁死亡。此外,添加双歧杆菌可缓解氟致睾丸损伤和肝肠循环失衡。然而,氟是否激活 JAK2-STAT3 通路引起线粒体铁代谢紊乱和铁自噬导致肝脏铁死亡,以及双歧杆菌的干预作用尚不清楚。材料和方法 36 只雌雄各半 6 周龄 C57/BL6J 小鼠随机分为对照组(Control,蒸馏水)、氟组(NaF, 100 mg/L NaF)和双歧杆菌(Ba)干预组(NaF+Ba),每组 12 只,18 周后采样。第 10-18 周,双歧杆菌干预组灌胃 0.2 mL 1×10^9 CFU/mL 双歧杆菌溶液,对照组和氟中毒组灌胃 0.2 mL 的生理盐水。采用 AML-12 小鼠肝脏细胞系来探究双歧杆菌代谢物对氟诱导肝脏细胞铁死亡中的作用。采用 HE 染色和普鲁士染色对肝脏组织细胞形态和细胞内铁含量进行观察;采用商业化生化试剂盒对肝脏组织中肝功能,氧化和抗氧化水平进行评估;采用 qRT-PCR 和 Western blot 法检测小鼠肝脏组织和 AML-12 细胞中 JAK2-STAT3 通路,线粒体铁代谢通路和铁自噬关键指标的表达水平。结果 双歧杆菌缓解氟致小鼠肝细胞排列紊乱,肝窦边界模糊,以及枯否氏细胞数量增加。氟可致肝脏组织中 GPT 和氧化水平的含量升高,抗氧化水平降低,加入双歧杆菌可缓解这一现象。对肝脏组织中亚铁含量进行检测,各组均无明显变化。氟使肝脏中线粒体铁代谢相关基因 ABCB8 和铁自噬基因 NCOA4 mRNA 表达水平显著升高,双歧杆菌可降低氟致 NCOA4 mRNA 表达水平升高。氟显著下调肝脏组织中 Nrf2、FTH 和 NCOA4 的蛋白表达量,显著上调磷酸化 STAT3-JAK2 蛋白的表达量。铁死亡抑制剂 DFO 可缓解氟所致肝脏细胞内铁含量升高,且恢复氟致 JAK2-STAT3 通路蛋白表达升高以及 FTH 和 NCOA4 蛋白表达降低。结论 综合分析,氟通过激活铁自噬途径和 JAK2-STAT3 信号通路,扰乱肝脏的铁代谢平衡,触发铁死亡,损害小鼠肝脏组织结构和功能。双歧杆菌的干预显示出了积极的保护作用,能够减轻氟引起的肝脏损伤。

关键词: 氟; 铁代谢; 铁自噬; 双歧杆菌; 肝脏; JAK2-STAT3 通路

通讯作者: 张建海, E-mail: jianhaiz@163.com

T13-0054

褪黑素补充对砷诱导睾丸组织细胞损伤的缓解作用研究

宋小超, 卢怡光, 赵利影, 梁 琛, 张建海*

(山西农业大学, 山西 太谷 030800)

摘要: 目的 砷是一种广泛分布在自然环境中的化学类金属物质,对人类和生态系统具有普遍的风险。近年来,地下水砷污染已成为全世界高度关注的问题。在雄性中砷产生生殖和发育毒性,导致生殖功能障碍。最新的研究表明,褪黑素对生殖过程具有广泛有益的影响。然而,褪黑素在砷诱导的睾丸细胞毒性中的作用和潜在分子机制尚不清楚。因此,我们旨在探究褪黑素在砷诱导生殖毒性的潜在机制。材料方法 36 只 4 周龄雄性 KM 小鼠,随机分成 4 组(9 只/组):对照组(蒸馏水),褪黑素组(80 mg/kg 饲料),砷组

(5 mg/L As₂O₃ 饮水), 砷+褪黑素组, 共21周。采集血清, 精子, 睾丸组织进行后续试验。采用ELISA检测血清睾酮(T)、促黄体素(LH)、促卵泡素(FSH)分泌水平; 收集精子利用红细胞计数法进行数据统计, 评估精子质量; 利用HE染色观察小鼠睾丸组织形态学; 利用qRT-PCR对睾丸体细胞和生殖细胞的特异表达基因进行检测; 采用免疫荧光对褪黑素受体1/2蛋白(MT1/MT2)进行定位分析; 同时, 利用免疫荧光检测Oct4、Sox2蛋白的表达量, 评估睾丸细胞的增殖能力; 最后, 采用Western-blotting对GSDMD、Caspas1、GSDMD-N、Cleaved-Casp1、NLRP3的蛋白表达水平进行检测。结果构建了褪黑素干预砷暴露小鼠模型, 探究其干预砷雄性生殖毒性。ELISA检测结果发现: 砷降低睾酮分泌水平, 使LH、FSH分泌增多, 褪黑素下调了LH、FSH分泌的增加, 但不能恢复T分泌的减少; 精子质量结果显示: 砷降低了精子的活率和活力, 显著增加畸形精子的数量, 并以头部畸形为主, 褪黑素部分恢复了精子质量的降低; HE染色观察发现: 砷减少睾丸间质细胞的数量; 同时, qRT-PCR方法检测间质细胞功能蛋白HSD3 β 、CYP11A1、HSD17 β 3的基因表达证实了间质细胞的减少, 褪黑素干预增加了间质细胞的数量; 免疫荧光检测证实: 砷减少了Oct4、Sox2蛋白的表达量, 降低睾丸细胞的增殖分化, 褪黑素干预恢复了其增殖能力; 同时, 褪黑素受体免疫荧光结果证实: MT1主要在间质细胞中表达, 而MT2在整个睾丸均有表达。Western-blotting结果显示: 砷导致睾丸细胞焦亡关键蛋白表达增多, 褪黑素干预起到了抑制作用。结论 我们的研究表明, 在长期砷暴露后, 在小鼠睾丸中观察到间质细胞功能降低和细胞焦亡发生, 褪黑素治疗恢复了精子质量、睾丸细胞的增殖能力、间质细胞功能和睾丸损伤。为阐明砷对雄性生殖发育的影响提供实践基础, 为寻找可靠缓解剂提供科学依据。

关键词: 砷毒性; 雄性生殖; 间质细胞; 褪黑素

通讯作者: 张建海, Tel: 13835441275, E-mail: jianhaiz@163.com

T13-0055

褪黑素干预及自我恢复对氟中毒小鼠睾丸组织细胞铜死亡的影响

乔雨柔, 崔玉坤, 梁琛, 张建海*

(山西农业大学, 山西 太谷 030800)

摘要: 目的 旨在通过研究氟暴露后自我恢复及褪黑素干预后小鼠睾丸组织中炎症因子、铜转运蛋白、Fe-S簇合成蛋白、铜伴侣蛋白以及蛋白质毒性应激的影响, 探讨褪黑素干预及自我恢复在缓解氟中毒所致小鼠睾丸损伤及生殖功能降低中的作用及机制, 为阐明氟雄性生殖毒性机制和有效防控氟中毒提供重要科学依据。方法 将随机选取的70只C57BL/6J雄性小鼠, 体重16-18 g, 将其分为: NC组、Control组(0.9% NaCl)、MLT组(10 mg/kg MLT)、NaF组(150 mg/L NaF)、NaF+MLT组(150 mg/L NaF+10 mg/kg MLT)以及Withdrawl NaF组(150 mg/L NaF)和Withdrawl NaF+MLT(150 mg/L NaF +10 mg/kg MLT)7组, 每组10只。持续17周; 自我恢复或褪黑素均持续4周。结果 (1)氟中毒组骨中氟含量显著升高; 褪黑素干预及自我恢复后骨中氟含量均显著降低; (2)氟中毒组小鼠精子密度显著下降, 精子畸形率显著升高, 褪黑素干预及自我恢复后可显著缓精子密度降低; (3)氟中毒组红细胞数量、红细胞压积、血红蛋白、淋巴细胞数量以及血小板均显著降低; 褪黑素可显著缓解淋巴细胞数量的减少; (4)氟暴露导致睾丸生精上皮细胞脱落至管腔, 间质细胞减少, 各生精小管间隙增大; 褪黑素干预及自我恢复后, 睾丸组织形态与对照组相比无显著差异; (5)氟暴露后睾丸组织中MDA含量显著增加, 升高促炎因子IL-17A的mRNA表达, 降低抗炎因子TGF- β 的mRNA表达。血清及睾丸组织中铜离子含量在氟暴露后显著升高, 褪黑素干预或自我恢复后, 铜离子含量显著降低。(6)氟暴露后显著降低STEAP4和FDX1以及NDUFS8, 升高DMT1和ATP7B的mRNA表达; 褪黑素干预可显著降低DMT1, 升高FDX1和NDUFS8的mRNA表达; 自我恢复后显著降低DMT1的mRNA表达; 联合组可显著降低DMT1, 升高NDUFS8的mRNA表达。(7)氟暴露可显著升高睾丸组织中ATP7B、DMT1和HSP70, 降低FDX1蛋白表达; 褪黑素干预后显著降低DMT1和HSP70, 显著升高

FDX1 的蛋白表达;自我恢复后显著降低 DMT1 ($P<0.05$) 的蛋白表达;联合治疗后显著降低 HSP70 ($P<0.05$) 的蛋白表达。(8)褪黑素干预氟暴露的 TM4 细胞中,铜死亡关键蛋白 ATP7B、SLC31A1、DMT1、FDX1 和 HSP70 蛋白表达均显著降低。**结论** 氟能引起铜代谢紊乱进而导致睾丸组织细胞铜死亡,并最终导致睾丸组织形态结构损伤,降低精子质量,诱导炎症因子的增加;褪黑素干预能通过调节铜转运蛋白、FDX1 和 HSP70 缓解氟引起的睾丸组织细胞铜死亡。

关键词: 氟中毒;褪黑素;自我恢复;铜死亡;睾丸;睾丸支持细胞

通讯作者: 张建海, Tel: 13835441275, E-mail: jianhaiz@163.com

T13-0056

核黄素干预对砷诱导肝肾组织损伤及纤维化的影响

杨 威, 史砚开, 王俊东, 张建海*

(山西农业大学动物医学学院, 山西 晋中 030801)

摘要: **目的** 砷作为一种典型的环境污染物,会引起肝肾组织的形态学改变,损伤肝肾的功能,造成肝肾组织的损伤及纤维化,而核黄素在维持肝肾功能方面具有重要的作用。本研究通过构建核黄素干预砷暴露小鼠的模型,对小鼠肝肾组织的形态学、纤维化程度和肝肾功能指标的检测,探究核黄素干预对砷诱导肝肾组织损伤及纤维化的影响。**材料和方法** 本实验以 32 只 5 周龄昆明鼠为对象,随机分为四组:对照组、砷处理组 (5 mg/L As_2O_3)、核黄素处理组 (10 mg/kg VB_2)、砷加核黄素处理组 (5 mg/L As_2O_3 +10 mg/kg VB_2), 每组 8 只。饮水添加 As_2O_3 , 饮食添加 VB_2 , 22 周后通过 HE 染色观察各组小鼠肝肾组织的形态学变化, MASSON 染色观察各组小鼠肝肾组织的纤维化状况,利用生化试剂盒检测血清中肝功能指标 (ALT、AST), 肾功能指标 (BUN、SCR 和 UA), 验证砷对肝肾组织损伤以及纤维化的影响及核黄素干预的效果。**结果** HE 结果和 MASSON 结果显示,砷会引起肝肾组织的形态学损伤,导致肝肾组织纤维化。添加核黄素能够减轻砷所引起的肝肾组织学损伤及纤维化的程度。此外,血清肝肾功能指标结果显示,砷能够引起肝脏功能指标 ALT 和 AST 的升高,造成肝脏功能的损伤,但并未引起肾脏功能指标 BUN、SCR 和 UA 的改变,而核黄素干预能够降低砷所致的血清 ALT 和 AST 的升高情况。**结论** 以上结果表明,砷能够引起小鼠肝肾组织的形态学改变,损伤肝脏的正常功能,引起肝肾组织的纤维化,添加核黄素对砷所致的肝肾组织损伤及纤维化程度有着一定的缓解效果。

关键词: 核黄素;砷;组织损伤;肝肾纤维化

通讯作者: 张建海, E-mail: jianhaiz@163.com

T13-0057

Long-term inorganic mercury-induced liver fibrosis: A multi-omics analysis of the key role of gut microbiota

Biqi Han, Jiayi Li, Siyu Li, Zhigang Zhang*

(College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Introduction Mercury pollution has become a serious environmental problem because of its wide application without proper waste disposal. **Objectives** This study aimed to investigating the connection between liver fibrosis induced by long term inorganic mercury exposure and the gut microbiota. **Methods** In this study, we used a long-term low-dose inorganic mercury exposure model in mice to

investigate the molecular mechanisms underlying liver fibrosis induced by chronic inorganic mercury exposure. This was accomplished through modern biological techniques, including transcriptomics, metabolomics, and 16S rRNA sequencing. **Results** The results of 16S rRNA gene sequencing of the mouse ileum contents revealed that exposure to inorganic mercury led to the depleted abundance of Bifidobacterium and Eubacterium_coprostanoligenes_group. These changes were attributable to the intestinal barrier damage, decreased spermidine production, and elevated endogenous alcohol level, which supporting by the plasma level of lipopolysaccharide. Plasma metabolomics analysis showed that inorganic mercury affected methionine metabolism, steroid and bile acid biosynthesis. Notably, fecal microbiota transplantation test and oral administration of Bifidobacterium attenuated the intestinal barrier injury and inhibited the elevation of liver fibrosis markers induced by inorganic mercury exposure. **Conclusion** In conclusion, long-term inorganic mercury exposure with low-dose induces liver fibrosis in mice through the microbiota-gut-liver axis. Inorganic mercury exposure disrupts the intestinal flora balance and intestinal barrier, especially inducing the decrease of Bifidobacterium abundance and polyamine concentration, and the increase of endogenous alcohol in mice. Inorganic mercury induces the abnormal metabolism of cholesterol, bile acid, glucose, and lipid, and then leads to cell cycle disorder, oxidative stress, inflammation, and activation of hepatic stellate cells by inhibiting PGC-1 α signaling pathway in the mouse liver. Hence, the modulation of the microbiota-gut-liver axis, especially Bifidobacterium supplementation, may be a promising treatment for inorganic mercury-induced liver fibrosis.

Key words: Mercury; Microbiota-gut-liver axis; Bifidobacterium; PGC-1 α ; Metabolism; Alcohol; Spermidine

Corresponding author: Zhigang Zhang, E-mail: zhangzhigang@neau.edu.cn

T13-0058

替米考星毒副作用及降低毒性反应方法研究进展

张 阳, 符华林*

(四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130)

摘要: 替米考星属于大环内酯类抗菌剂, 在临床中具有广泛的应用。但大剂量的替米考星可能会导致严重的毒副作用, 甚至畜禽死亡。目前还缺少针对替米考星毒副作用的系统性梳理的报道。本文通过目前关于替米考星产生毒副作用机制的研究, 从替米考星导致的心脏毒性、肝肾毒性、肺脏毒性、胃肠道和神经毒性, 到因给药方式不同导致的局部皮肤毒性作用展开梳理。然后对目前已经报道的能够降低替米考星毒副作用的方法, 从新型纳米制剂、降低对心脏的毒性、降低对肝脏的毒性以及谨慎的联合用药四个方面进行归纳总结。替米考星在临床中常常导致窦性心律失常、血压下降等心脏损害, 可能是由于快速消耗了心肌细胞的钙离子、心肌负荷的增加、心肌细胞损伤和代谢的改变导致的。替米考星在肝脏、肾脏、肺脏中蓄积可能导致脏器损伤及炎症的发生, 而且因肾脏和肺脏局部血流量较高使得替米考星更容易在该处蓄积。因替米考星的广谱杀菌作用还容易导致肠道菌群失衡等胃肠症状。此外, 长期注射使用替米考星还能导致皮肤及肌肉局部出现器质性损伤。目前有研究利用纳米制剂手段对替米考星进行改性, 从而使得替米考星具有靶向性、缓释能力和更高的口服生物利用度, 用于减少临床给药次数和剂量。利用钙制剂、维生素 E 和 S-甲基半胱氨酸等物质能够减少替米考星导致的心脏损害。利用类似于红景天提取物、黄芪多糖等中药成分可以减少替米考星导致的肝脏损害。利用具有杀菌作用的百里香酚、苦参碱等成分可与替米考星产生协同或相加作用, 而减少替米考星的临床剂量。这些方法均可以降低替米考星临床毒副作用的产生。但仍然需要避免与类似于双氯芬酸钠等潜在具有心肌损害能力的药物联合应用。综上, 替米考星能够导致临床包括

心脏在内的多种脏器毒副作用,需要通过多种药剂学手段、保健性药物的使用以及科学、合理的用药来降低替米考星的毒性反应,保障畜禽养殖业的健康发展。

关键词: 替米考星; 毒副作用; 缓解方法

T13-0059

PPAR γ 介导的小胶质细胞炎性极化促进丁草胺诱导的血脑屏障损伤

姜馥薇, 陈明山, 王嘉欣, 刘 硕, 朱洪美, 石宇生, 赵一 1, 李金龙*

(东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨市 150030)

摘要: **目的** 农药残留是世界上最常见的环境污染之一,可能对作物生产、食品安全以及动物和人类健康造成损害。近年来,丁草胺被广泛用作除草剂,其可引起神经系统的健康问题和神经炎症。血脑屏障(BBB)是中枢神经系统(CNS)和血液之间的动态界面,神经炎症可导致BBB损伤。过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ)作为一种配体激活的核受体,对神经和血脑屏障具有保护作用。本研究旨在探讨PPAR- γ 在丁草胺诱导的神经炎症和BBB损伤中的作用。**材料与方法** 本研究的体内试验部分以21日龄的雄性ICR小鼠为受试对象,随机分成2组:空白对照以及丁草胺组,灌胃处理28天后,检测小鼠行为学、大脑形态结构、紧密连接蛋白相关指标、NF- κ B通路相关指标、HMGB1相关指标以及小胶质细胞极化相关指标的改变。本试验的体外部分以小鼠小胶质细胞系(BV2细胞)及小鼠脑微血管内皮细胞系(bEND3细胞)为研究对象,首先将BV2细胞分为4组:对照组、PPAR- γ 激活剂组、丁草胺组以及丁草胺加PPAR- γ 激活剂组,分别检测BV2细胞结构和功能的变化。此外,对BV2细胞进行外泌体提取,并刺激bEND3细胞,建立体外血脑屏障模型,检测紧密连接蛋白相关指标及血脑屏障通透性。**结果** 体内试验表明,丁草胺暴露诱导小鼠大脑小胶质细胞超微结构损伤(小胶质细胞内空泡增加、线粒体嵴和膜消失、空泡增加),并引起小鼠抑郁、降低小鼠的记忆力和平衡力;大脑紧密连接蛋白、NF- κ B及HMGB1通路相关指标以及小胶质细胞极化相关指标水平改变。体外试验表明,丁草胺诱导BV2细胞活率下降,超微结构损伤,NF- κ B及HMGB1通路相关指标以及小胶质细胞极化相关指标水平改变,而PPAR- γ 激活剂组明显改善了这些现象。此外,通过建立体外血脑屏障模型发现,丁草胺暴露导致小胶质细胞极化,改变了血脑屏障通透性及紧密连接蛋白相关指标水平。**结论** 丁草胺暴露可通过促进小胶质细胞炎性极化诱导小鼠血脑屏障损伤,降低紧密连接蛋白相关指标的表达,增加促炎因子的表达,引起小鼠小胶质细胞结构和功能受损。激活PPAR- γ 可以通过调节小胶质细胞极化,抑制炎症因子的表达,减少丁草胺诱导的血脑屏障损伤。本研究为丁草胺引起的神经毒性以及PPAR- γ 对大脑的保护作用提供了新的见解,为PPAR作为神经保护靶点提供了理论依据。

关键词: 丁草胺; 血脑屏障; 小胶质细胞; PPAR- γ ; 小胶质细胞极化

通讯作者: 李金龙, E-mail: jinlongli@neau.edu.cn

T13-0060

Parkin介导的线粒体自噬缓解阿特拉津暴露所引起的肾损伤和衰老

石宇生, 李金龙*

(东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨市 150030)

摘要: **目的** 阿特拉津在世界范围内被广泛用于抑制杂草的生长,其可在环境长期存在从而对机体造成持续性影响。由于肾小管的高能量需求,肾小管细胞中含有大量的线粒体,而阿特拉津已被证明可以造成线粒体损伤。因此,维持线粒体稳态可能是一种缓解阿特拉津诱导的肾损伤的有效方法。Parkin介导的线粒体自噬可以清除受损的线粒体从而避免其产生的大量活性氧以及mtDNA的释放,细胞中活性氧的积聚

以及mtDNA从受损线粒体的释放与细胞衰老有关。褪黑素作为一种内源性激素,已被证明可以维持线粒体稳态以及促进线粒体自噬。因此,本研究的目的主要是探索parkin介导的线粒体自噬在褪黑素缓解阿特拉津诱导的肾损伤和衰老中的作用。**材料与方法** 本研究以6周龄的野生型和parkin敲除雄性C57BL/6N小鼠为受试对象,随机分成4组(对照组、褪黑素组、阿特拉津组以及阿特拉津+褪黑素组),灌胃处理28天。通过观察小鼠临床表现、肾脏切片HE染色、肾脏线粒体形态观察、抗氧化功能检测、WB及IF相关实验探索parkin介导的线粒体自噬在褪黑素缓解阿特拉津诱导的肾损伤和衰老中的作用。**结果** 本研究发现,暴露于阿特拉津后肾小管结构受损,并且线粒体嵴被破坏,肾脏中积累大量受损的线粒体,氧化应激产物增加和抗氧化酶活性下降。阿特拉津暴露还导致胞质中的mtDNA增加以及cGAS通路的激活。线粒体自噬相关指标的检测结果表明parkin水平下降,并与衰老标志物呈负相关。褪黑素处理激活Sirt3-SOD2轴,减少肾脏中的ROS水平。褪黑素处理恢复线粒体接触位点和嵴组织系统(MICOS)蛋白水平来维持线粒体嵴结构的完整。此外,褪黑素促进parkin介导的线粒体自噬以清除受损的线粒体,从而缓解阿特拉津暴露所导致的mtDNA的泄露和随后cGAS通路的激活。而parkin敲除限制了褪黑素对阿特拉津诱导的肾损伤和衰老的保护作用。**结论** 褪黑素处理可以减轻阿特拉津诱导的肾损伤和肾小管细胞衰老。并且,褪黑素的抗衰老作用在很大程度上依赖于parkin介导的线粒体自噬。这些结果为延缓细胞衰老提供了新的见解。我们的结果表明parkin介导的线粒体自噬是缓解肾小管细胞衰老的一个有前景的药物靶点。

关键词: 阿特拉津;褪黑素;线粒体自噬;肾;细胞衰老;parkin

通讯作者: 李金龙, E-mail: Jinlongli@neau.edu.cn

T13-0061

邻苯二甲酸酯通过靶向抑制MFN2促进心脏衰老的机制研究

王嘉欣, 陈明山, 张 昊, 崔家根, 赵 一, 李金龙*

(东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨市 150030)

摘要:目的 邻苯二甲酸酯作为一大类环境污染物,主要用作增塑剂和溶剂,已成为世界范围内日益严重的问题。流行病学结果表明,心脏疾病的严重程度与环境污染程度有关。邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)是最常用的邻苯二甲酸酯,对机体健康具有毒性作用,也是心脏损伤的主要原因。摄入被DEHP污染的食物、液体或灰尘是机体暴露于DEHP的主要接触途径。细胞衰老是由于细胞压力而导致细胞周期停滞的永久状态。本研究旨在探讨邻苯二甲酸酯诱导心脏衰老的潜在机制及其与线粒体内质网偶联的关系。**材料与方法** 本研究的体内试验部分以21日龄的雄性ICR小鼠为受试对象,随机分成4组(对照组以及DEHP低、中、高剂量组),灌胃处理28天。本试验的体外部分以小鼠心肌细胞系(HL-1细胞)为研究对象,将细胞分为4组(空白对照组以及邻苯二甲酸单-(2-乙基己基)酯(MEHP)低、中、高剂量组),进行过表达质粒转染。**结果** 体内试验表明,DEHP暴露引起小鼠心脏脏器系数降低,诱导小鼠心肌细胞结构损伤,心脏功能水平下降。DEHP诱导细胞周期相关因子蛋白表达水平上调,衰老相关指标改变。DEHP诱导小鼠心脏内质网应激,内质网线粒体偶联相关蛋白水平改变,钙离子内流。体外试验表明,MEHP诱导HL-1细胞活力下降,凋亡水平、细胞内活性氧和钙离子水平增加,细胞周期相关因子蛋白表达水平上调,衰老相关指标改变。同时,过表达线粒体融合蛋白2(MFN2)能够通过缓解Ca²⁺内流来抑制MEHP诱导的心肌细胞衰老。**结论** DEHP暴露可通过下调MFN2诱导内质网线粒体偶联,引起Ca²⁺内流,破坏心肌细胞的稳态,诱导衰老,进而引起小鼠心肌细胞结构和功能受损。本研究为医学及兽医临床中心脏毒性的防治提供新的靶点,并且为有效的保障畜禽生产和繁殖提供了新的思路。

关键词: 邻苯二甲酸酯;细胞衰老;线粒体融合蛋白2;线粒体内质网偶联;心脏毒性

通讯作者: 李金龙, E-mail: Jinlongli@neau.edu.cn

T13-0062

番茄红素通过调节 SIRT1-FOXO1 轴介导的线粒体自噬缓解 伏马菌素 B1 诱导的鸡肝细胞泛凋亡

王雪琪, 常远航, 刘瑞琪, 胡子焱, 杨尚嘉, 陈明山, 王嘉欣, 李金龙, 赵 一*
(东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨市 150030)

摘要: **目的** 伏马菌素 B1 (FB1) 是一种毒性最强、分布最广的伏马菌素, 在世界范围内引起了高度关注。番茄红素 (LYC) 作为一种天然有效的类胡萝卜素, 因其抗氧化性而受到更多人的青睐。但其是否可缓解 FB1 引起的鸡肝细胞毒性仍有待探究。线粒体自噬可以消除受损或功能失调的线粒体, 以防止有缺陷的线粒体破坏细胞。沉默信息调节因子 1 (SIRT1) 是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺) 依赖性去乙酰化酶的一个成员, 通过调节去乙酰化酶的活性, 对叉头盒转录因子 O1 (FOXO1) 的乙酰化起着至关重要的作用。Panoptosis 是一种程序性细胞死亡, 表现为细胞焦亡、细胞凋亡和坏死性凋亡。本研究的目的是探讨 LYC 在 FB1 诱导鸡肝细胞损伤的具体作用机制。**材料与方法** 本试验以鸡肝癌细胞系 (LMH) 为研究对象, 首先将细胞分为对照组 (CON)、番茄红素组 (LYC)、伏马菌素 B1 组 (FB1) 以及番茄红素拮抗伏马菌素 B1 组 (LFB), 分别检测细胞结构和功能及线粒体变化, 然后在培养体系中进行 SIRT1 siRNA (siSIRT1) 转染, 再进行细胞结构和功能及线粒体变化和 Panoptosis 相关指标的检测。**结果** (1) LYC 改善了 FB1 诱导的鸡肝细胞结构损伤、细胞凋亡水平的增加、细胞 ROS 的升高、Panoptosis 相关指标的增加, 表明 LYC 能够缓解 FB1 诱导的鸡肝细胞损伤和泛凋亡。(2) LYC 缓解了 FB1 诱导的线粒体空泡化和嵴断裂等线粒体损伤现象、线粒体膜电位的降低、Ac-FOXO1 蛋白表达的增加、自噬和线粒体自噬 (Pink1、Parkin、Tomm20、Beclin1、P62、LC3B) 相关蛋白的改变, 表明 LYC 能够改善 FB1 诱导的鸡肝细胞线粒体结构功能损伤及线粒体自噬下降。(3) 敲低 SIRT1 能够加剧 Panoptosis、Ac-FOXO1 的表达及线粒体自噬的减少, 敲低 SIRT1 后 LYC 不能拮抗 FB1 对鸡肝细胞的损伤。表明 LYC 能够通过 SIRT1-FOXO 通路增加线粒体自噬拮抗 FB1 致鸡肝细胞损伤。**结论** FB1 可诱导鸡肝细胞结构和功能损伤, LYC 通过调节 SIRT1-FOXO1 通路增加 Pink-Parkin 介导的线粒体自噬, 缓解 FB1 诱导的鸡肝细胞 Panoptosis。本研究表明 LYC 对霉菌毒素诱导的鸡肝细胞损伤具有拮抗作用, 为真菌毒素引起的肝脏疾病的预防和治疗提供了一种新的方法和关键靶点。

关键词: 伏马菌素 B1; 番茄红素; 线粒体自噬; SIRT1; 泛凋亡

通讯作者: 赵 一, E-mail: zhaoyi@neau.edu.cn

T13-0063

番茄红素通过调节 SIRT3-FOXO3 通路缓解伏马菌素 B1 致鸡肝细胞衰老

常远航, 刘瑞琪, 王雪琪, 胡子焱, 杨尚嘉, 陈明山, 王嘉欣, 李金龙, 赵 一*
(东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨市 150030)

摘要: **目的** 伏马菌素 B1 (FB1) 是一种分布广泛且稳定性强的真菌毒素, 经常出现在玉米食品和饲料中, 危害动物以及人类健康和食品安全。番茄红素 (LYC) 是一种天然的类胡萝卜素, 通常存在于红色蔬菜或水果中, 是目前最有效的抗氧化剂之一。线粒体自噬是一种降解老化或受损线粒体的过程, 在维持线粒体稳态中起着重要作用。Sirtuin 3 (SIRT3) 是一种重要的线粒体去乙酰化酶, 与衰老、能量代谢和线粒体自噬有关。在我们的研究中, 旨在探讨 LYC 如何减轻 FB1 诱导的线粒体自噬抑制和鸡肝细胞衰老, 以及 SIRT3 在这一过程中的作用。**材料与方法** 为了进一步探讨 LYC 在 FB1 致肝细胞损伤中的作用及其潜在机制, 本试验以鸡胚原代肝细胞为研究对象, 将鸡胚原代肝细胞分为 2 组, 空白对照组 (Con)、FB1 处理组 (25 μ M FB1)。检测各组细胞衰老和线粒体自噬的相关因子变化, 并且同时观察细胞的超微结构、凋亡水

平、衰老水平、氧化应激水平、线粒体膜电位、线粒体膜通透性转运孔道的改变。**结果** (1)LYC抑制FB1诱导的鸡胚原代肝细胞的超微结构损伤、凋亡水平增加、衰老相关 β -半乳糖苷酶检测阳性细胞数量上调、细胞内ROS增加、细胞增殖能力下降、细胞衰老(P16、P21、P53、LaminB和 γ -H2AX)相关蛋白水平改变,表明LYC能够缓解FB1诱导的鸡胚原代肝细胞衰老和功能损伤。(2)LYC抑制FB1诱导的鸡胚原代肝细胞的线粒体超微结构损伤、线粒体膜电位下降、线粒体通透性转换孔损伤、自噬及线粒体自噬(TOMM20、Sirt3、BNIP3、BNIP3L、FOXO3A、LC3B、P62、Atg5、Atg7、Beclin1和LAMP2)蛋白水平改变,表明LYC能够保护FB1诱导的鸡胚原代肝细胞线粒体自噬降低和功能损伤。(3)敲低SIRT3能够抑制LYC对FB1诱导的鸡胚原代肝细胞衰老和线粒体自噬水平下降的保护作用,表明LYC能够通过调节SIRT3拮抗FB1导致的肝细胞损伤。**结论** FB1可诱发肝细胞结构和功能损伤。LYC拮抗FB1引起的肝脏毒性作用,通过调节SIRT3缓解FB1诱导的肝细胞衰老和线粒体自噬水平下降。本研究证明LYC能够有效的拮抗霉菌毒素对肝脏的毒性作用,为医学及兽医临床中霉菌毒素诱导肝损伤的防治提供新的靶点,并且为有效的保障畜禽健康提供了新的思路。

关键词: 伏马菌素B1; 番茄红素; 细胞衰老; SIRT3; 线粒体自噬

通讯作者: 赵一, E-mail: zhaoyi@neau.edu.cn

T13-0064

GRP75调控MAM介导的Ca²⁺转运在DEHP诱导肾小管上皮细胞线粒体自噬中的作用

陈明山, 王嘉欣, 崔家根, 张昊, 赵一, 李金龙*

(东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨市 150030)

摘要: **目的** 邻苯二甲酸酯(DEHP)是一种应用极为广泛的增塑剂,可以进入人体并对多个器官造成损伤。肾脏是DEHP的主要排泄器官,也是其潜在的靶器官。但对其引起肾脏毒性的机制的研究目前仍然较为稀少。近端小管作为肾脏的重要功能单元,具有重吸收营养物质和排泄毒物的作用,这些过程需要大量的能量来支持。鉴于肾脏近端小管细胞对于维持体液平衡和稳定的重要作用,探究DEHP对肾脏近端小管细胞的影响及机制具有重要意义。**材料和方法** 本研究的体内试验部分以21日龄的雄性ICR小鼠为试验对象,随机分成4组(溶媒对照组以及DEHP低、中、高剂量组),灌胃处理28天,检测小鼠肾脏组织形态结构,超微结构,内质网线粒体偶联相关蛋白和线粒体自噬相关蛋白表达水平的变化。本试验的体外部分以人肾小管上皮细胞(HK2)为研究对象,首先将细胞分为4组(空白对照组、siGRP75敲低组、邻苯二甲酸单-(2-乙基己基)酯(MEHP)组、MEHP+siGRP75联合组),然后在培养体系进行质粒siRNA转染,检测HK2细胞结构和功能变化。**结果** 体内试验表明,DEHP暴露引起小鼠肾脏脏系数降低,诱导小鼠肾脏组织形态结构变化,超微结构损伤(内质网与线粒体接触面积增加、距离减小、线粒体数量和密度减少等现象)以及肾脏功能水平下降。DEHP还诱导内质网线粒体偶联相关蛋白水平上升,促进钙离子内流以及过度线粒体自噬的发生。体外试验表明,MEHP诱导HK2细胞活力下降,活细胞内以及线粒体内ROS含量增加,钙离子水平增加以及线粒体膜电位发生改变,内质网线粒体偶联相关蛋白以及线粒体自噬相关蛋白表达增加。同时,敲低GRP75能够通过改善MAM-Ca²⁺系统紊乱来抑制MEHP诱导的肾脏近端小管过度线粒体自噬。**结论** DEHP暴露可通过上调GRP75表达,增加MAMs的生成,促进Ca²⁺内流进线粒体中,破坏肾脏近端小管细胞内稳态,诱导过度线粒体自噬,进而引起肾脏近端小管细胞结构和功能受损。本研究为医学及兽医临床中肾脏毒性的防治提供新的靶点,并且为有效的保障畜禽生产和繁殖提供了新的思路。

关键词: 邻苯二甲酸酯; 肾脏近端小管; GRP75; Ca²⁺; 线粒体自噬

通讯作者: 李金龙, E-mail: Jinlongli@neau.edu.cn

T13-0065

AHR 激活可缓解脱氧雪腐镰刀菌烯醇诱导的猪肠上皮屏障功能的破坏

胡子焱, 赵 一*

(东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨市 150030)

摘要: 目的 霉菌毒素作为最常见的天然污染物,对公众健康构成严重威胁,日益引起公众健康的关注。脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)是最主要的霉菌毒素之一,可造成严重的环境污染和在食物链中生物积累,构成世界范围内的严重问题。DON能够引起肠道毒性,造成肠道结构和功能的损伤,对肠道屏障功能有明显的不良影响。芳基羟受体(AHR)是一种环境化学传感器的转录因子,在肠道屏障位点高度表达,并被激活以执行其生物学功能。本研究的目的是为了探究DON诱导的猪肠上皮屏障功能破坏机制并阐明AHR在介导DON诱导的肠上皮屏障功能中的独特作用。材料与方法 本试验以猪空肠上皮细胞(IPEC-J2)为研究对象,首先将细胞分为2组(空白对照组以及DON组),然后在培养体系中进行AHR质粒转染,分别检测细胞结构和功能的变化。结果 DON诱导猪空肠上皮细胞超微结构的损伤,线粒体结构和功能损伤,凋亡水平、细胞内ROS增加,导致了氧化应激。DON诱导了猪肠上皮细胞屏障功能破坏,也导致了迁移能力下降和细胞骨架紊乱。DON激活了NF- κ B/TNF- α /MLCK信号通路,从而引起炎症反应。最重要的是,DON直接与AHR结合,抑制了AHR核易位,同时还抑制了AHR表达和经典AHR通路的激活。然而,AHR过表达通过抑制TNF- α /NF- κ B/MLCK通路的激活来抑制炎症反应,并且能够缓解DON诱导的肠上皮屏障功能的破坏。结论: DON直接靶向AHR,导致AHR水平下调,进而激活TNF- α /NF- κ B/MLCK信号通路,从而导致DON诱导的猪肠上皮屏障功能的破坏。我们发现了AHR可以作为调节肠道炎症和肠道功能障碍的关键靶点,这是缓解霉菌毒素诱导的肠道损伤的关键机制。本研究不仅为预防肠道疾病提供了一种可靠的预防策略,而且为减轻肠道屏障功能障碍提供了一种新的治疗途径。

关键词: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 芳基羟受体; 肠道屏障; 炎症; IPEC-J2

通讯作者: 赵 一, E-mail: zhaoyi@neau.edu.cn

T13-0066

STAT3/IL-17A 信号通路在内毒素诱导雏鸡肝损伤中的作用研究

原 亮, 王佳琦, 刘芳萍*

(东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 目的 内毒素(Lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性菌的主要致病因子,在细菌感染期间高浓度存在于肠道,经门静脉进入肝脏,产生大量炎症因子造成肝脏损伤。信号转导和转录激活因子3(Signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)是一种炎症蛋白,通过细胞质传递信号,在细胞核中以转录因子发挥作用,可以介导多种炎症反应。白细胞介素-17A(Interleukin-17A, IL-17A)是参与急性和慢性炎症反应的一种细胞因子,在防御微生物感染中起着至关重要的作用。STAT3/IL-17A信号通路在肝损伤的发生和发展中起重要作用。本论文旨在研究STAT3/IL-17A信号通路在LPS致鸡肝损伤中的作用,为进一步研究细菌感染性肝损伤的机制奠定理论基础。材料和方法 将12只雏鸡随机分为对照组和模型组。LPS(60 mg·kg⁻¹)腹腔注射12 h后,采集血液和肝脏。全自动生化仪检测血清肝损伤指标(ALT、AST和LDH);应用HE染色光镜下观察肝脏病理学变化;ELISA试剂盒检测血清炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、TGF- β 和IL-17A含量;实时荧光定量PCR法检测肝脏炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、TGF- β 以及STAT3/IL-17A信号通路相关基因STAT3、IL-17A、TRAF6 mRNA表达;Western blot法检测肝脏STAT3蛋白的表达(p-STAT3/STAT3的比值)和TRAF6蛋白表达。结果 病理组织学结果显示,对照组肝索明显,细胞形态正常,肝小叶结构完好;LPS组肝索紊乱,炎性细胞浸润,有出血点。与对照组相比,LPS组血清ALT、AST和

LDH 活性极显著升高 ($P<0.01$)。ELISA 检测结果显示,与对照组相比,LPS 组血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、TGF- β 和 IL-17A 含量极显著升高 ($P<0.01$)。实时荧光定量 PCR 结果显示,与对照组相比,LPS 组肝脏 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、TGF- β 以及 STAT3、IL-17A、TRAF6 mRNA 表达极显著升高 ($P<0.01$)。Western blot 结果显示,与对照组相比,LPS 组 STAT3 和 TRAF6 蛋白表达均极显著升高 ($P<0.01$)。结论 STAT3/IL-17A 信号通路的激活是 LPS 造成雏鸡肝损伤的重要机制之一。

关键词: STAT3/IL-17A 信号通路; 内毒素; 鸡肝损伤; 炎症

通讯作者: 刘芳萍, 教授, 博士, 博士生导师, E-mail: fangpingliu@126.com

T13-0067

柚皮素与阿米卡星联合对耐药大肠杆菌的协同抗菌活性及机制

伊蓝坤^{1,2}, 朱 阵^{1*}, 张继瑜^{2*}

(1. 河北工程大学, 河北省 邯郸市 056038; 2. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃 兰州市 730050)

摘要: **目的** 细菌耐药性正成为日益严重的问题,开发抗菌增效剂成为控制耐药性的新方向。将现有抗生素与有前景的非抗生素药物相结合是一种已被证明的可以有效克服广泛出现的抗生素耐药性细菌的新策略。本研究旨在探讨柚皮素和阿米卡星对多重耐药大肠杆菌的抗菌协同作用及其潜在机制。**方法** 在本研究中,我们确定了柚皮素联合阿米卡星对多重耐药大肠杆菌的抗菌活性和机制。首先通过棋盘法测量柚皮素与抗生素组合的分数抑制浓度 (FIC),然后通过时间杀菌曲线进一步验证了柚皮素与阿米卡星联合的杀菌效果。此外,使用扫描电子显微镜 (SEM) 观察细胞形态,并通过碱性磷酸酶 (AKP)、K⁺ 和蛋白质的渗漏来确定柚皮素与阿米卡星联合对大肠杆菌细胞壁和细胞膜的损伤作用。最后通过激光共聚焦扫描显微镜 (CLSM) 进一步测定联合组对细胞膜的损伤,确定联合组增强单药抗菌效果的作用机制。**结果与讨论** 本研究测定了柚皮素单独及与抗生素联合使用时对耐药大肠杆菌的体外抗菌效果,结果显示柚皮素与阿米卡星联合使用两者的用量,并且具有更好的杀菌效果。使用时间杀菌曲线进一步证实了该结果。此外,通过扫描电镜和细胞壁、细胞膜损伤试验确定了柚皮素与阿米卡星增强抗菌效果的可能机制。扫描电镜结果显示了大肠杆菌细胞形态的变化和完整性的显著损失,而联合处理后 AKP、K⁺ 和蛋白质渗出量的显著增加证明了大肠杆菌细胞壁和细胞膜的破坏,进行 CLSM 以确定细胞膜损伤的程度(通过 PI 的摄取来测量)。基于这些发现,我们确定柚皮素破坏了大肠杆菌的细胞壁和膜结构,促进阿米卡星进入细胞并发挥抗菌作用。

T13-0068

Preparation and *in vivo* evaluation of poorly soluble chlortetracycline hydrochloride injection

ZHANG Chao, ZHANG Jiyu*

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃 兰州市 730050)

Purpose: With the intensive development of breeding industry, infectious bacterial diseases have gradually become a serious issue and the most important threat to breeding industry development. At present, antibiotic therapy remains the main therapeutic strategy against bacterial pathogens that infect humans and animals^{1, 2}.

Chlortetracycline hydrochloride is a tetracycline antibiotic, has a broad antibacterial spectrum, and

resists many clinically important aerobic and anaerobic Gram-positive and Gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella*^{3, 4}. In clinical settings, CTC has been widely used to prevent or combat various bacterial infections^{5, 6}. Currently, only a few clinical studies have been carried out on CTC⁷; according to the "Veterinary drug Quality Standards", CTC soluble powder was the only single solid preparation in clinical use, which was mainly due to poor aqueous solubility and chemical instability. The drug is prone to degradation and failure in acidic (pH<2) and neutral or alkaline solutions (pH>7), which ultimately compromise its commercial development. To further develop the injection system.

Methods: In order to improve its properties, the clathrates of Chlortetracycline hydrochloride and 2-hydroxypropyl beta-cyclodextrin (HP- β -CD) with different proportions were prepared by different preparation processes (freeze-drying, medium ball milling), and the optimum prescription was screened and optimized. Subsequently, the formation of inclusion compounds was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray diffraction (PXRD), differential scanning calorimetry (DSC), nuclear magnetic resonance (NMR) and scanning electron microscopy (SEM). At the same time, aureomycin hydrochloride injection was prepared on the basis of the inclusion body complex to solve the problem of its bioavailability. The particle size and distribution, drug loading, zeta potential and encapsulation rate were measured. In animal experiments, the irritability of rabbit injection was evaluated. The pharmacokinetics and pharmacodynamics were studied in chickens.

Results and discussion: In this study, the inclusion complexes of CTC and HP- β -CD were successfully prepared by different preparation techniques to enhance their water solubility and stability under temperature, acid and alkaline conditions. DSC, TGA, FT-IR, PXRD, SEM and molecular docking studies showed that the freeze-dried complexes were transformed into amorphous forms. In addition, Compared with pure CTC, the solubility is increased by about 18.3 times. It showed better solubility and stability and successfully prepared CTC/HP- β -CD injection. Therefore, the formation of inclusion body complexes with HP- β -CD is a very effective way to stabilize and dissolve drugs for their future pre-clinical development. At the same time, the in vivo performance of chlortetracycline hydrochloride injection was evaluated by observing initial rate release, plasma concentration-time curve, time to maximum plasma level, and bioavailability. The bioavailability of aureomycin hydrochloride injection was significantly higher than that of oral preparations. We assumed that CTC/HP- β -CD injection may further increase the therapeutic effect and antibacterial activity of CTC. This study studied the antibacterial activity of CTC/HP- β -CD injection in vitro and in vivo for the first time, and the experiment proved that when the injection dose was 20 mg/kg, it played a significant therapeutic effect by observing the H&E diagram of tissue sections. Compared with free chlortetracycline hydrochloride, it has stronger antibacterial activity. Therefore, CTC/HP- β -CD has good solubility and high biological activity, and has broad application prospects in CTC transportation.

T13-0069

IncRNA MSTRG.74.1-BNIP3轴参与TD肉鸡软骨细胞异常增殖的发生

吴晓梅¹, 刘莹炜², 李英¹, 潘家强¹, 胡莲美¹, 廖建昭¹, 唐兆新¹, 李奥运³, 张辉^{1*}

(1. 华南农业大学兽医学院, 广州 510642; 2. 广州国家实验室, 广州 510000;

3. 河南农业大学兽医学院, 郑州 450002)

摘要: 肉鸡胫骨软骨发育不良(Tibial Dyschondroplasia, TD)是家禽在快速生长期因代谢障碍而引起

的一种软骨病。软骨细胞异常增殖是肉鸡 TD 的主要病理特征。近年来,长链非编码 RNA(lncRNA)被证实可以通过不同信号通路调控肉鸡胫骨软骨发育。因此,本试验旨在筛选肉鸡 TD 中差异表达的 lncRNA,并研究其在 TD 肉鸡胫骨软骨细胞异常增殖的作用。试验以福美双诱发的肉鸡 TD 模型和福美双诱导的肉鸡胫骨软骨细胞功能障碍模型为研究对象,观察其临床症状及临床病理学特征,依据相关分子试验探究 TD 肉鸡软骨细胞异常增殖的现象。结果发现,出现站立障碍和跛脚等症状的 TD 肉鸡,在其胫骨近端出现无血管化白色软骨栓,胫骨软骨增殖区的细胞排列不规则,肥大区软骨细胞出现核固缩、溶解,大量的空泡软骨囊,表明软骨细胞增殖异常。在福美双诱发的 TD 肉鸡和福美双诱导肉鸡软骨细胞障碍模型中,RT-qPCR 试验都显示基因 BNIP3 表达下降。转录组测序分析表明,lncRNA MSTRG.74.1 在 TD 肉鸡模型以及福美双诱导的肉鸡胫骨软骨细胞功能障碍模型中的表达量均显著升高。结果表明,lncRNA MSTRG.74.1 在影响肉鸡软骨细胞的增殖和异常分化中起着关键作用。

为探究 lncRNA MSTRG.74.1-BNIP3 在影响肉鸡软骨细胞的增殖和异常分化中的具体作用,我们构建了过表达 lncRNA MSTRG.74.1 软骨细胞,经过 RT-qPCR 等试验结果显示软骨发育相关因子 Col2A1、Aggrecan 都表达下降,细胞外基质合成相关因子 MMP13 表达量下降,表明过表达 lncRNA MSTRG.74.1 可以导致肉鸡软骨细胞异常增殖和发育障碍。本试验经过 RT-qPCR 试验结果显示过表达软骨细胞 lncRNA MSTRG.74.1 可以下调 BNIP3 来调控肉鸡软骨细胞的发育。同时对细胞凋亡自噬相关基因进行分子试验,发现 Bax、Cytc、Bcl2、Apaf1 和 Caspase3 以及基因 Atg5、Beclin1、LC3b 和蛋白 p62 表现负相关表达,提示有可能是通过凋亡与自噬的负调控造成肉鸡软骨细胞的异常增殖。

综上所述,本研究强调了 TD 肉鸡软骨细胞异常增殖的病理表现和相关基因表达,并探究了 lncRNA MSTRG.74.1-BNIP3 轴对肉鸡软骨细胞发育的重要调控作用。

关键词: 肉鸡; 软骨细胞; MSTRG.74.1-BNIP3; Thiram; 增殖

通讯作者: 张 辉, E-mail:hz236@scau.edu.cn

T13-0070

追踪多类型猪粪-土壤体系中抗性组的迁移、致病性和共现性

徐向月, 林旭东, 霍美霞, 寇紫艳, 房梦雅, 马文瑾, 黄玲利*

(国家兽药安全性评价实验室(HZAU), 国家兽药残留基准实验室(HZAU),

华中农业大学动物医学院, 武汉 430071)

摘要: 目的 抗生素抗性基因(ARGs)的产生和传播是一个日益严重的公共卫生和环境安全问题。尽管早期的宏基因组学分析证明了 ARGs 在动物养殖和环境之间的传播,但关于动物粪便-土壤系统中 ARGs 的迁移性和宿主信息是有限的。因此,本研究旨在运用宏基因组组装探究不同类型猪粪-土壤体系中 ARGs 的移动性、宿主信息以及驱动因素。**材料方法** 通过宏基因组测序揭示了猪粪好氧堆肥和新鲜猪粪及堆肥产物改良土壤中 ARGs 的分布与组成;运用宏基因组组装和共定位分析预测不同类型猪粪-土壤体系中 ARGs 的迁移能力和毒力;基于耐药 Contigs (ARCs)的分类注释,我们鉴定并量化 ARGs 的宿主,分析 ARGs 与宿主之间的共现模式。为了探究兽用抗生素在动物粪便处理和应用中对 ARGs 的组成、多样性和传播的影响,以畜禽专用抗生素—替米考星为模型,评估其对多类型猪粪-土壤体系中 ARGs 分布和迁移的影响。**结果** 好氧堆肥和不同类型猪粪改良土壤中 ARGs 的组成发生了显著变化(Adonis, R²=0.908, p=0.001),总丰度显著降低(P<0.05)。值得注意的是,一些临床关键抗性基因(*vanR*、*vanS*、*vanU* 和 *tetX*)在好氧堆肥和猪粪改良土壤中持续存在。位于质粒或染色体上的 ARGs 的总丰度在堆肥和施肥过程中没有显著差异,但其携带的 ARGs 类型具有明显的倾向性。赋予 MLS、氨基糖苷类和磺胺类抗生素抗性的基因大部分位于质粒上,赋予多药类、肽类等抗生素抗性的基因主要位于染色体上。好氧堆肥和施肥有效地促进了共存 ARG-MGE、ARG-VF 的去除和消散。ARG 和 MGE 之间存在特定的共现模式,不同处理组中 *tetA-tetR* 以及 *tetR-floR* 的 ARG 组合通常与 Tn3 家族和多物种转座酶同时出现。基于 ARCs 注释的 VF 中,发现 *ugd* 与多个重叠群中的荚膜共存。厚壁菌门、放线菌门和变形菌门被认为是 ARGs 的优势宿主,粪便类型

显著影响了土壤的微生物群落组成。*Escherichia*、*Enterococcus*、*Bacillus*和*Pseudomonas*是共现网络的关键枢纽,*Escherichia coli*与多种类型的耐药基因存在强相关性。此外,环境变量(C/N、pH和替米考星)显著影响了ARGs、宿主和HPB在猪粪-土壤系统中的分布($r=0.4385$, $p=0.001$)。结论 研究结果为多类型猪粪-土壤系统中抗性风险的迁移和控制提供新的见解,并有助于评估TIL的环境风险。

关键词: 抗生素抗性基因; 好氧堆肥; 施肥; 迁移性; 宿主

通讯作者: 黄玲利, E-mail: huanglingli@mail.hzau.edu.cn

T13-0071

8:2 FTOH对肝损伤的性别差异及其机制研究

陈敏^{1,2}, 梁芷玮^{1,2}, 孙梦圆^{1,2}, 陈珍^{1,2}, 谢书宇^{1,2*}, 陈冬梅^{1,2*}

(1. 华中农业大学动物医学院, 湖北 武汉 430070; 2. 华中农业大学国家兽药残留基准实验室, 农业部兽药残留检测重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要: 8:2 氟调聚醇(8:2 FTOH)是一种具有食物链富集效应的新型环境持久性有机污染物。人类和动物能够通过各种途径和介质而暴露于8:2 FTOH,其暴露后会引发靶器官肝脏组织损伤和炎症,严重威胁着环境安全和人体健康。流行病学调查结果显示PFAS的毒性存在显著的性别差异。然而,大多数实验结果都是基于描述性研究,而8:2 FTOH引起的肝损伤性别差异机制仍然是未知的。因此本课题旨在通过非靶向代谢组学阐明8:2 FTOH引起肝损伤的性别差异机制。材料与方法 将Wistar大鼠(雌雄各半,5-6周龄)分为对照组和8:2 FTOH组(每组 $n=6$),并每天分别腹腔注射2%吐温80和8:2 FTOH溶液(100 mg/kg和200 mg/kg),持续28天。实验结束后,收集雄性和雌性大鼠的血浆进行肝损伤指标和血浆代谢组学测定。通过Metaboanalyst和KEGG进行差异代谢物富集通路分析,并结合细胞毒性试验、QPCR和免疫印迹等分子生物学技术进行通路验证。结果与讨论 结果显示,8:2 FTOH的肝损伤具有显著的性别差异,其在雄性大鼠中的毒性作用大于雌性大鼠。临床症状观察到雌性低剂量组无不良反应,高剂量组出现被毛粗乱和排稀便等症状。而雄性低和高剂量组均出现肛门污秽和睾丸肿大等临床症状。与对照组相比,雄性低和高剂量组的肝损伤指标谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)显著性升高,而这些指标仅在雌鼠高剂量组中观察到,表现出显著的性别差异。基于非靶向代谢组学发现甘氨酸和谷氨酸是雌雄大鼠之间的主要差异代谢物。经分子生物学验证发现,雌性大鼠通过上调甘氨酸合成基因丙氨酸-乙醛酸转氨酶(AGXT)和谷氨酸合成基因一氧化氮合酶II(NOS₂)和N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(Nag)表达,同时降低甘氨酸降解基因过氧化物酶体酶D-氨基酸氧化酶(DAO)表达来增加雌性大鼠中甘氨酸和谷氨酸的循环量。同时增加的甘氨酸和谷氨酸激活抗氧化应激信号通路Keap1-Nrf2,从而增强雌性大鼠的抗氧化能力以抵抗8:2 FTOH导致的氧化应激。我们的研究阐明了甘氨酸/谷氨酸-Keap1-Nrf2信号通路激活是8:2 FTOH毒性性别差异的重要机制。

关键词: 8:2 FTOH; 性别差异; 甘氨酸; 谷氨酸; Keap1-Nrf2

通讯作者: 谢书宇, E-mail: xieshuyu@mail.hzau.edu.cn; 陈冬梅, E-mail: chendongmei@mail.hzau.edu.cn

T13-0072

肉豆蔻酸固体脂质纳米粒提高利福昔明的口服生物利用度和对MRSA肺炎的治疗效果

张傲雪^{1,2}, 张瑶瑶^{1,2}, 陈珍^{1,2}, 胡丹蕾^{1,2}, 陈冬梅^{1,2*}, 谢书宇^{1,2*}

(1. 国家兽药残留基准实验室(HZAU); 2. 农业农村部畜禽产品质量安全风险评估实验室(武汉); 华中农业大学, 湖北 武汉 430070)

摘要: 目的 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)肺炎是导致死亡的主要原因之一,给医疗系统带来了

巨大的经济负担。利福昔明(RFX)对MRSA具有良好的抗菌活性,但由于口服吸收不良,导致口服给药时抗菌效果受到极大影响,其临床应用受到限制。纳米颗粒具有小的比表面积和粒径等特性,其中固体脂质纳米粒具有良好的生物相容性、高载药量、缓释性能和脂质在胃酸中的惰性,可以增强药物跨膜吸收从而增强药物的口服吸收,有利于口服给药。为了提高利福昔明的口服生物利用度,扩大RFX治疗MRSA肺炎的临床应用,本研究开发了一种负载RFX的肉豆蔻酸固体脂质纳米粒(RFX-SLNs)。材料与方法 本研究首先通过热熔乳化和超声波方法制备RFX SLNs,并通过单因素筛选选择RFX SLNs的最佳配方。之后,测量了RFX SLNs的粒径、 ζ 电位和多分散指数(PDI),通过透射电子显微镜观察了RFX SLNs的形态,并通过高效液相色谱检测了RFX SLNs的包封率(EE)和载药量(LC)。然后,通过体外释放和药代动力学研究了RFX SLNs的缓释能力和口服生物利用度。最后,利用小鼠MRSA肺炎感染模型研究了RFX SLNs对MRSA肺炎感染的治疗作用。结果与讨论 通过超声乳化法进行利福昔明固体脂质纳米颗粒的制备,采用单因素试验,选取不同脂肪酸和表面活性剂,以聚合物分散性指数(PDI)、平均粒径、Zeta电位作为评价指标对SLN的配方和工艺进行系统优化。结果表明,RFX SLNs的最佳配方为1%RFX,水(3%PVA)和油(肉豆蔻酸)的比例为1:19。该配方制备的RFX SLN外观是橘黄色的纳米混悬液,RFX SLN呈球形,表面光滑,尺寸均匀。三批RFX SLN的EE和LC分别为 $89.35\pm 2.47\%$ 、 $90.45\pm 3.69\%$ 、 $88.72\pm 1.18\%$ 和 $9.50\pm 0.01\%$ 、 $10.09\pm 0.01\%$ 和 $9.68\pm 0.00\%$ 。体外释放和药代动力学研究表明,肉豆蔻酸固体脂质纳米粒如预期般表现出优异的缓释性,并将RFX的口服生物利用度提高了2.18倍。这表明RFX SLNs可用于细菌感染的口服治疗。与RFX相比,RFX SLNs在小鼠MRSA肺炎感染模型中显示出良好的治疗效果。对治疗10天和14天的小鼠进行了肺部细菌计数,结果表明,与感染组小鼠相比,RFX和RFX SLNs治疗组显著降低了小鼠肺部的细菌数量,尤其是RFX SLN治疗组。本研究表明,肉豆蔻酸固体脂质纳米粒可能是增强RFX和其他不溶性药物口服吸收和治疗有效的有效方法。这不仅为RFX的临床应用开辟了途径,也为开发水溶性药物的新剂型和扩大其临床应用范围提供了途径。

通讯作者:陈冬梅, E-mail: chendongmei@mail.hzau.edu.cn; 谢书宇, E-mail: xieshuyu@mail.hzau.edu.cn

T13-0073

米氮平透皮软膏对皮肤的过敏性试验评价

张乐怡, 沈凌燕, 郝锦臻, 曾紫茹, 孙永学*

(华南农业大学兽药研究评价中心, 广东 广州 510642)

摘要:目的 化学药物及制剂的刺激性、过敏性、溶血性是临床前安全性评价的组成部分。参考《化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》(指导原则编号:(H)GPT4-1)开展了米氮平透皮软膏的皮肤过敏性试验,为其临床安全评价与临床用药提供科学依据。方法 (1)豚鼠封闭贴斑试验:根据预试验引起豚鼠产生轻微反应的剂量,在第0、6~8和13~15d采用滤纸贴敷在豚鼠无毛区进行诱导6h,第28d在未给药肋腹部贴6h局部激发。根据预实验不引起豚鼠反应的最小剂量,在最后一次贴敷2周后将贴敷片单独贴于动物无毛未试部位(肋腹部)激发,6h后去除;(2)主动皮肤过敏试验:在第0、7、14d分3次在豚鼠左侧背部皮肤脱毛区分别涂抹2 mg空白基质、米氮平软膏及0.2 mL 2,4-二硝基氯苯,封闭固定6h后清洁给药部位。第28d在豚鼠右侧背部皮肤脱毛区分别涂抹2 mg空白基质、米氮平软膏及0.2 mL 2,4-二硝基氯苯,固定6h后清洁给药部位。去除药物后观察皮肤反应。结果 (1)豚鼠封闭贴斑试验:阴性对照组在0 h、24 h、48 h过敏反应发生率均为0%,评价分级为I级“弱致敏”;阳性对照组在0 h、24 h、48 h过敏反应发生率均为100%,评价为V级“极强致敏”,而米氮平软膏组在0 h、48 h过敏反应发生率为0%,24 h过敏反应发生率为5.3%,被评价为I级“弱致敏”;(2)豚鼠主动皮肤过敏试验:阴性对照组和米氮平软膏组在0 h、24 h、48 h、72 h过敏反应发生率均为0%,评价为“无致敏性”,阳性对照组在0 h、24 h、48 h、72 h过敏发生率均为

100%,评价为“极强致敏”。在豚鼠封闭贴斑试验和豚鼠主动皮肤过敏试验中米氮平软膏组与阴性组之间的过敏性评分均无显著差异($P>0.05$),与阳性对照组之间的过敏性评分差异均为极显著($P<0.01$)。结论本研究评价的米氮平透皮软膏经局部皮肤涂抹后,对豚鼠均为无过敏性作用,其安全性较好。

关键词: 米氮平软膏;豚鼠;皮肤过敏;封闭贴斑试验;主动过敏试验

通讯作者: 孙永学, E-mail:sunyx@scau.edu.cn

T13-0074

酰胺醇类抗生素在猪粪厌氧发酵过程中的降解及对微生态的影响

马文瑾,寇紫艳,徐向月,霍美霞,黄玲利*

(国家兽药安全性评价(环境)实验室(HZAU),国家兽药残留基准实验室(HZAU),
华中农业大学动物医学院,武汉 430071)

摘要: **目的** 兽用抗菌药经过动物机体代谢后随畜禽粪尿排出,经养殖废弃物直接进入环境或加工成肥料施用于农田,影响环境中动植物健康及微生态。粪便厌氧发酵技术可以有效去除粪便中的抗菌药,但粪便中抗菌药持续的选择压力和环境条件会影响粪便中抗生素抗性基因(ARGs)的去除。酰胺醇类抗生素(AMs)在环境中频繁检出,具有迁移风险,可能会影响环境微生物群落结构和 ARGs 的丰度。因此,研究 AMs 在厌氧发酵(AD)过程中的命运和对微生态的影响十分必要。**材料与方法** 构建自动控温和调节 pH 的猪粪 AD 模型,研究在 AD 过程中理化性质的变化,建立发酵液中 AMs 的 UPLC-MS/MS 检测方法,揭示 AMs 在 AD 过程中的降解特性,并使用 UPLC-QTOF-MS/MS 预测其降解产物。通过宏基因组测序,研究 AMs 对 AD 过程中微生物群落结构和 ARGs、可移动遗传元件(MGEs)影响及相关性。**结果** 氟苯尼考(FF)和甲砜霉素(TAP)在 AD 过程的降解半衰期分别为 0.58 d 和 0.50 d,表明 AD 能有效去除猪粪中的 FF 和 TAP。在 AD 过程中 FF 的主要降解途径是烷基氟水解、脱氯、酰胺水解后脱水,TAP 主要通过脱氯和脱水降解,这些降解产物可能具有微生物活性并且能持续存在,表明 AD 在去除 FF 和 TAP 降解产物方面可能无效。随着 AD 时间增加,微生物的多样性和丰富度降低,使各组间微生物群落结构产生差异的主要细菌门为变形菌门和拟杆菌门,细菌属为 *Acinetobacter*, *Bacteroidales*, *Pseudomonas*, 这些差异属在 TAP 组中丰度较高。TAP 对 ARGs 丰度的影响比 FF 更显著,使 floR、catB8、oprA 等和 AMs 相关的 Phenicol 类基因(PRGs)丰度高于对照组,相关性分析表明 TAP 与广古菌门和 PRGs 显著正相关。变形菌门和拟杆菌门是多个 ARGs 的宿主菌,而广古菌门和绿弯菌门是 AD 过程中丰度较高且持久存在的 macB 和 tetA(58)的宿主菌。**结论** 本研究阐明了 AMs 在 AD 过程中的降解特性,揭示了 AMs、微生物、ARGs 与主要环境因子的互作机制。AD 能有效去除猪粪中的 FF 和 TAP,降低 AMs 从粪便进入土壤的环境风险,但对去除降解产物方面无效。猪粪中的 FF 和 TAP 存在会显著影响无害化处理过程中的微生物群落结构,增加 ARGs 的发生和转移风险,其中 TAP 对微生态影响更显著。

关键词: 氟苯尼考;厌氧发酵;环境风险;抗生素抗性基因

通讯作者: 黄玲利, E-mail:huanglingli@mail.hzau.edu.cn

T13-0075

CYP3A4 对剧毒植物钩吻三种吲哚类生物碱在小鼠各组织分布的影响

龙江裕^{1,2},王子元^{1,2},左梦婷,齐雪佳,黄崇银,刘兆颖^{1,2*}

(1. 动物医学院,湖南农业大学,长沙 410128,湖南 长沙;2. 湖南省兽药工程技术研究中心,
湖南 长沙 410128)

摘要: **目的** 本文旨在探究和分析细胞色素 P450 3A4(CYP3A4)对剧毒植物钩吻的三种吲哚生物碱,

即钩吻素己、钩吻素子和钩吻素甲在小鼠体内组织分布,组织消除和毒性的影响。**材料和方法** ICR雄性小鼠180只,分为1%钠羧甲基纤维素对照组,100 mg/kg康酮唑抑制组,100 mg/kg福利平诱导大组。每组分钩吻素子组(10 mg/kg)、钩吻素甲组(5 mg/kg)、钩吻素己组(0.1 mg/kg和0.24 mg/kg)和空白组,并按时间5 min、10 min、20 min分三小组,每小组各6只。各组动物除对照组前5天连续使用诱导剂或抑制剂处理,第6天各组给予药物后,分别在对应时间取心脏、肺脏、肝脏、脾脏、肾脏、胰腺、脑、脊髓、肠道、肌肉、睾丸、盲肠内容物和血液样本。通过实验室前期建立的二维液相色谱技术对各样本中的三种生物碱进行精确定量检测。**结果** 三种生物碱经腹腔注射后,在体内吸收快,具有穿越血脑屏障的能力。5分钟时可在各组织和器官分布广泛,脾脏和胰腺分布最多,20分钟时各组织含量大幅减少。CYP3A4抑制可增加钩吻素子和钩吻素甲在的血浆和各组织浓度。CYP3A4的诱导可加速三种生物碱清除,特别是在脾脏和肝脏中。此外,CYP3A4的诱导可降低钩吻素己毒性,使高于半数致死量的浓度(0.24 mg/kg)未出现小鼠死亡,相反,CYP3A4的抑制使低于半数致死量的浓度(0.1 mg/kg)毒性增强。**结论** 调节CYP3A4的表达可影响三种钩吻生物碱的组织分布和消除,钩吻素己毒性强弱受CYP3A4改变影响较大,CYP3A4含量的变化可能是钩吻素己毒性差异的原因之一。这些研究结果为钩吻生物碱的药物相互作用、组织分布和毒性研究提供了可靠和详细的数据集。

关键词: 钩吻; 组织分布; 毒性; 钩吻素己; 钩吻素子; 钩吻素甲

通讯作者: 刘兆颖, 教授, 博士生导师, E-mail: liu_zhaoying@hunau.edu.cn

T13-0076

丹参酮 II A 介导 miR-181b-1-3p/WIF1 缓解 TD 肉鸡胫骨 软骨细胞发育障碍的作用机制

陈永健¹, 孙秋雨¹, 李英¹, 潘家强¹, 胡莲美¹, 廖建昭¹, 唐兆新¹, 张辉^{1*}
(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 无血管的软骨栓形成是肉鸡胫骨软骨发育不良(Tibial dyschondroplasia, TD)的主要病理特征,因胫骨软骨细胞发育障碍所引起。我们先前的研究表明,miRNAs参与软骨细胞分化,其中miR-181b在TD肉鸡中显著下调,同时丹参酮 II A有促进骨骼发育的作用,但其在TD发病机制研究中鲜有报道。因此,本实验以福美双诱导的胫骨软骨发育障碍的肉鸡和软骨细胞模型为研究对象,探究丹参酮 II A对肉鸡TD的防治效果和作用机制,为肉鸡TD的治疗提供新的策略和理论依据。

将60只AA肉鸡随机分为对照组、TD组、丹参酮 II A治疗组(10 mg/kg)。21天后采集胫骨样本进行组织病理学和分子生物学检测。结果显示:TD组相比对照组,肉鸡出现跛行,生长板增殖区细胞排列紊乱,软骨栓明显增大。经丹参酮 II A治疗的肉鸡生长板处各区域结构清晰,软骨细胞形态正常。丹参酮 II A组软骨组织中miR-181b-1-3p表达显著升高,WIF1表达显著下降,ACAN、BMP2和Runx2表达显著上升。同时,在福美双诱导原代胫骨软骨细胞实验中,细胞增殖和分化相关基因ACAN、Col2a1和Runx2等受到抑制,miR-181b-1-3p表达降低,WIF1表达增加。结果表明,丹参酮 II A可减轻福美双诱导的胫骨软骨细胞发育障碍,miR-181b-1-3p和WIF1参与其中。

为探究miR-181b-1-3p与WIF1的关系,使用双荧光素酶报告基因实验,结果显示miR-181b-1-3p和WIF1成负相关的靶向关系。同时过表达miR-181b-1-3p,软骨细胞中ACAN、Col2a1的表达上调,GSK-3 β 的表达受到抑制,而抑制miR-181b-1-3p,会降低Col2a1和 β -catenin的表达,表明miR-181b-1-3p可促进软骨细胞发育并激活Wnt/ β -catenin通路。且福美双处理后再过表达miR-181b-1-3p,软骨细胞中 β -catenin、ACAN和ALP的表达恢复至正常水平。为探究WIF1在软骨细胞发育和Wnt/ β -catenin通路中作用,抑制WIF1的表达,软骨细胞中GSK-3 β 的表达降低,ACAN、Col2a1和 β -catenin的表达升高。为探究miR-181b-1-3p、WIF1和Wnt/ β -catenin通路与软骨发育的相互关系,实验分别构建miR-181b-1-3p和

WIF1 沉默细胞株,与 miR-181b-1-3p inhibitor 组相比,同时抑制 miR-181b-1-3p 和 WIF1 的表达,GSK-3 β 的表达下降,ALP、ACAN、Col2a1 和 β -catenin 的表达升高。因此,miR-181b-1-3p 可通过靶向 WIF1 调控软骨细胞的发育。

综上所述,丹参酮 II A 通过介导 miR-181b-1-3p/WIF1 影响软骨细胞发育,同时丹参酮 II A 可上调 miR-181b-1-3p 的表达,抑制 WIF1,减轻福美双对软骨组织的损伤作用,从而防治肉鸡 TD。

关键词: 丹参酮 II A; 胫骨软骨发育不良; miR-181b-1-3p; WIF1; 肉鸡

通讯作者: 张 辉, E-mail:hz236@scau.edu.cn

T13-0077

天然产物对黄曲霉毒素 B₁ 致畜禽多器官损伤的保护作用机制

刘冰雪,魏翔建,张杰兴,于晓庆,李士泽*,吕红明*

(黑龙江八一农垦大学,黑龙江 大庆市 163319)

摘要: 霉菌毒素(mycotoxin)是饲料霉变引起的一类真菌代谢产物,其污染广泛普遍、自然发生且难以控制,仍是全球性棘手问题。黄曲霉毒素 B₁(Aflatoxin B₁, AFB₁)作为一类危害最大、毒性最强的霉菌毒素,可降低畜禽生长性能、引起多个器官损伤,如肝肾毒性、免疫毒性等,甚至其代谢产物可通过血脑屏障、血乳屏障与毛细血管壁,影响子代健康及造成动物产品的污染,严重威胁了动物和人类的健康。目前,预防 AFB₁ 中毒的药物主要有天然化合物(中草药)、微生物制剂、甘露寡糖和化学制剂等。天然化合物因具有抑菌消炎、抗氧化和增强免疫力等功效,且拥有资源丰富及绿色无残留等特点,在禽类养殖中已得到了广泛应用。天然产物主要是通过激活多重细胞保护性基因(如 AMPK、Nrf2 及 GPX4 等)以改善多种因素(包括 AFB₁)造成的动物组织损伤。同样,我们通过前期的研究的确也发现,一些天然产物(如甘草查尔酮 A、棉籽糖、黄腐酚及瑞香素等)可通过激活 AMPK 或 Nrf2 在多种组织损伤中发挥保护作用,并且在这些天然化合物具有良好的抗 AFB₁ 毒性损伤作用。因此,探究防控 AFB₁ 毒性的绿色有效药物或饲料添加剂,对保护畜禽健康、保障动物制品安全及保证人类健康具有重要科学意义和潜在应用价值。

关键词: 霉菌毒素;黄曲霉毒素 B₁;天然产物;畜禽;肝肾毒性

T13-0078

TLR7/8 激动剂及其在畜禽疾病防治中的潜在应用

刘 畅,李剑勇*

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所,农业农村部兽用药物创制重点实验室,

甘肃省新兽药工程重点实验室,甘肃 兰州 730050)

摘要: Toll 样受体 7/8(Toll like-receptor 7/8, TLR7/8)是 TLRs 家族的成员,属于模式识别受体(Pattern recognition receptor, PRR),主要参与单链 RNA 的识别、激活宿主的免疫应答。TLR7/8 激动剂能够激活免疫细胞,刺激抗原呈递细胞中 MHC 分子(主要组织相容性复合体, Major histocompatibility complex)和共刺激信号的上调,调节炎症细胞因子的产生,在抗病原感染、抗肿瘤以及作为免疫佐剂等方面表现出一定的潜力。TLRs 在识别病原体、调控宿主免疫应答中起着关键作用,通过 TLR7/8 增强机体的先天免疫力已被证明是一种有效的抗病毒策略。前期研究表明,TLR7/8 激动剂能够在体外、体内抑制病毒复制,降低病毒载量,同时减轻组织损伤,增强宿主的细胞免疫和体液免疫,对猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)以及牛白血病病毒(Bovine leukemia virus, BLV)等病原感染都有一定的缓解作用。TLR7/8 激动剂对缓解胞内

菌感染也有一定效果,其作用机制与诱导细胞自噬有关,通过诱导抗菌免疫间接实现抗菌的目的。此外,TLR7/8激动剂还能促进有关免疫细胞的活化,促进抗肿瘤细胞因子的产生,调节肿瘤微环境,改善肿瘤清除率,从而增强局部或全身的抗肿瘤免疫反应。作为免疫佐剂时,TLR7/8激动剂与疫苗共同给药,能够长时间刺激机体产生强大的体液和细胞免疫,增强禽的黏膜免疫,提高疫苗效率,对畜禽养殖中多种病毒的感染都有较好效果。本文主要对TLR7/8小分子激动剂在疾病防治中的潜在应用进行概述,以期为靶向TLR7/8的免疫增强剂的筛选、开发以及其在畜禽动物疾病的预防和治疗方面的广泛应用提供参考。

关键词: TLR7/8激动剂; 免疫增强剂; 畜禽疾病防治; 抗病毒; 免疫佐剂

通讯作者: 李剑勇, E-mail: lijy1971@163.com

T13-0079

The role of miR-205a in the differentiation of tibial chondrocytes in broiler chickens through the CDH11/Wnt/ β -catenin pathway

Kai Liu, Ying Li, Jiaqiang Pan, Lianmei Hu, Jianzhao Liao, Zhaoxin Tang, Hui Zhang, Yongxue Sun*
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University 510642)

Abstract: Abnormal differentiation of chondrocytes can lead to skeletal developmental abnormalities, which is also one of the main factors causing tibial chondrodysplasia (TD) in broiler chickens. There are studies indicating that CDH11 and Wnt/ β -catenin pathways are involved in bone development, but there are currently no relevant reports clarifying the specific regulatory mechanisms of the two on cartilage differentiation in broiler chickens. Therefore, this study explores the regulatory mechanism of CDH11 and miR-205a mediated Wnt/ β -catenin pathway on chondrocyte differentiation, providing a theoretical basis for exploring the molecular mechanisms of chondrocyte development. The experiment used thiram to induce primary chondrocytes in broiler chickens to establish a chondrocyte differentiation disorder model. The effect of miR-205a targeting CDH11 on the Wnt/ β -catenin pathway mediated by CDH11 on chondrocyte differentiation was verified by the targeted expression of CDH11 gene and miR-205a in chondrocytes. The results showed that treatment with thiram downregulated the expression of key genes RUNX2, BMP2, and Wnt/ β -catenin pathway genes Wnt4 and β -catenin in chondrocytes, while upregulating the expression of GSK-3 β .

To investigate the specific mechanism by which CDH11 regulates chondrocyte differentiation, the interaction between CDH11 and miR-205a was first validated using a dual luciferase reporter system. Meanwhile, overexpression of miR-205a in chondrocytes revealed downregulation of CDH11, differentiation key gene RUNX2, and Wnt/ β -catenin pathway key genes Wnt4 and β -catenin expression, while upregulation of GSK-3 β expression. We silenced/overexpressed miR-205a and treated chondrocytes with a Wnt/ β -catenin pathway agonist (lithium chloride). We found that the expression of Wnt4, a key gene in cartilage development and pathway, was downregulated, while the expression trend of GSK-3 β was the opposite. The above research results indicate that miR-205a can inhibit chondrocyte differentiation through the CDH11/Wnt/ β -catenin pathway, providing a new direction for the study of TD related bone diseases.

Key words: Tibial dysplasia; CDH11; miR-205a; Wnt/ β -catenin; broiler chicken

Corresponding author: Yongxue Sun, E-mail: sunyx@scau.edu.cn

T13-0080

江苏地区不同畜禽养殖场肠球菌耐药特征分析

赵婕霖, 王丽平*

(南京农业大学动物医学学院, 江苏 南京 210095)

摘要:目的 肠球菌是人和动物肠道微生物群的组成部分, 现已成为医院感染的重要致病菌, 关注畜禽养殖场中肠球菌的耐药情况, 分析其耐药传播机制显得尤为重要。本文旨在研究江苏地区不同畜禽养殖场肠球菌的流行情况和耐药特征, 为畜禽养殖业合理使用抗生素提供参考。**材料与方法** 2021年, 在江苏某鸡场、牛场和猪场采集鸡泄殖腔拭子、牛粪便样品和猪肛门拭子, 进行肠球菌分离、纯化和鉴定, 分析肠球菌在养殖场中的流行情况后, 采用微量肉汤稀释法测定 11 类 15 种常见抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC), 比较不同动物源肠球菌的耐药率。**结果** 共获得肠球菌 103 株, 其中屎肠球菌占比 78.6% (81/103), 粪肠球菌占 22.4% (22/103)。鸡源、牛源和猪源肠球菌的分离率分别为 36.7% (44/120)、37% (37/100) 和 22% (22/100)。分离菌株对抗生素的耐药率从高到低依次为四环素 (89.81%)、泰妙菌素 (88.89%)、红霉素 (75.93%)、多西环素 (75%)、氯霉素 (64.81%)、氟苯尼考 (62.96%)、庆大霉素 (56.48%)、利奈唑胺 (54.63%)、利福平 (18.52%)、青霉素 G (11.11%)、氨苄西林 (10.19%)、万古霉素 (0%)。结果还显示 90.29% 菌株 (93/103) 为多药耐药菌株, 以耐 6 种抗菌药物为主 (38.83%, 40/103), 其中猪牛源肠球菌多药耐药率达到 90% 以上, 均高于鸡源肠球菌。**结论** 本试验分离的鸡源、猪源和牛源肠球菌耐药率较高且多为多药耐药菌, 并对兽医临床重点关注抗生素利奈唑胺、氟苯尼考等的耐药率较高。该结果提示养殖场应基于药敏结果合理、谨慎使用抗菌药物, 并在生产各环节中加强细菌耐药性的常规监测。

关键词: 肠球菌; 耐药性; 抗生素

通讯作者: 王丽平, E-mail: 2362546765@qq.com

T13-0081

江苏与宁夏部分地区鸡源金黄色葡萄球菌的耐药性调查研究

赵文斌, 赵佳琪, 刘 晓, 代兴杨, 黄金虎, 王丽平, 王晓明*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要:目的 对 2023 年在江苏省和宁夏地区部分蛋鸡、肉鸡养殖场分离的金黄色葡萄球菌进行了相关抗菌药物的耐药性调查, 以了解江苏和宁夏地区鸡源金黄色葡萄球菌的流行特征及耐药性差异, 一方面为国家动物源细菌耐药网提供数据, 另一方面为相关养殖场临床抗菌药物的合理使用提供科学依据。**材料和方法** 本研究通过增菌、金黄色葡萄球菌显色培养、PCR 鉴定等方法对样本中的金黄色葡萄球菌进行分离和鉴定, 然后采用微量肉汤稀释法检测 18 种抗菌药物对分离菌株的最小抑菌浓度(MICs), 并采用 PCR 对 17 种常见的耐药基因进行了检测。**结果** 从 760 份鸡泄殖腔拭子、盲肠和粪便样本中共分离出 64 株金黄色葡萄球菌, 其中江苏省 42 株, 宁夏地区 22 株, 分离率分别为 8.24% 和 8.80%, 表明两地区鸡源金黄色葡萄球菌检出率无明显差异。药敏试验表明分离菌株对青霉素、奥格门汀、红霉素、克林霉素、恩诺沙星、氧氟沙星、复方新诺明、氟苯尼考、替米考星、庆大霉素和四环素耐药程度较高, 耐药率均达 80% 以上; 对头孢西丁、磺胺异恶唑和苯唑西林较为敏感, 耐药率低至 3.31%、6.25% 和 7.81%; 未分离出头孢噻唑、万古霉素和利奈唑胺的耐药菌株。总体来看, 分离菌株的多重耐药率高达 93.75%, 其中江苏地区 90.48%, 宁夏地区 100%。耐药谱有 23 种, PEN-ERY-CLI-ENR-OFL-SXT-TET-FFC-TIL-GEN 的耐药表型占比最高, 共有 21 株。共检出耐药基因 13 种, 其中, 氟喹诺酮类药物的耐药基因 *griA* 检出率 96.88%, 环丙沙星的耐药基因 *norA* 检出率为 95.31%。**结论** 本研究表明, 宁夏地区部分养殖场分离的鸡源金黄色葡萄球菌耐药率普遍高于江苏省部分养殖场分离的鸡源金黄色葡萄球菌, 多重耐药情况也较为严重, 相关养殖场应基于药敏结果合理、谨慎

使用抗菌药物,并在生产各环节加强细菌耐药性的常规监测。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 耐药性; 基因型; 江苏省; 宁夏回族自治区; 蛋鸡; 肉鸡

通讯作者: 王晓明, E-mail: zhaowenbin0224@163.com

T13-0082

益生菌来源的胞外囊泡通过调节肠道微生物群和 AHR 激活 缓解 AFB1 诱导的肠道损伤

李金燕, 史梦蝶, 刘水平, 刘鲜姣, 陈兴祥, 黄克和, 刘云欢*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: **目的** 旨在探究食淀粉乳杆菌来源的胞外囊泡对黄曲霉毒素 B1 暴露诱导的小鼠肠道损伤的影响及作用机制。 **材料和方法** 使用 MRS 培养基从猪的粪便中分离和鉴定食淀粉乳杆菌 (*L. amylovorus*, LA)。并采用差速离心法提取 LA 来源的胞外囊泡 (LA.EVs)。选取 7-8 周龄的 C57BL/6 小鼠开展动物试验。动物试验分为三部分: 试验一包含三个处理组, 每组 5 个重复, 空白对照组小鼠每日灌胃 200 μ L 生理盐水; AFB1 组小鼠每日灌胃 0.75 mg/kg B.W. AFB1; AFB1+LA.EVs 组小鼠每日灌胃 0.75 mg/kg B.W. AFB1 和 25 μ g LA.EVs; 试验二在试验一基础上增加抗生素处理组 (ABX 组), 该组小鼠每日饮用抗生素混合溶液; 试验三在试验一基础上增加 AHR 抑制剂 CH223191 处理组, 该组小鼠每两天腹腔注射一次 10 mg/kg B.W. CH223191。整个试验周期为 28d。 **结果** 在我们的研究中, 从猪粪便中分离出一种名为 *Lactobacillus amylovorus*-QC1H (LA-QC1H) 的新菌株, 并且通过透射电镜和纳米颗粒示踪分析证明成功提取得到 LA.EVs。动物试验结果表明, 与 AFB1 组相比, LA.EVs 处理使小鼠回肠绒毛形态恢复完整, 显著提高了肠道紧密连接蛋白 (*Zo-1*、*Occludin* 和 *Claudin-1*) 和黏液蛋白 (*Muc-2*) 的表达, 降低了回肠炎症因子 (*IL-6*、*IL-1 β* 和 *TNF- α*) 分泌和肠道通透性, 减少了肠道细菌移位, 显著减轻了 AFB1 诱导的肠道损伤。16S rRNA 分析显示, LA.EVs 调节了 AFB1 诱导的小鼠肠道菌群失调, 并且显著增加了 *Barnesiella* 的丰度。最后对其通路进行检测, 结果显示相比于 AFB1 组, LA.EVs 处理显著增加了小鼠肠道吲哚-3-乙酸 (IAA) 水平并显著上调了回肠芳香烃受体 (AHR)/白细胞介素-22 (IL-22) 信号通路相关基因的表达。然而, 清除肠道菌群后与 LA.EVs 组小鼠相比, ABX 组小鼠肠道病理损伤加重、肠道屏障严重受损, 炎症因子表达和肠道通透性都显著增加。使用 AHR 抑制剂 CH223191 处理后, 结果显示抑制 AHR 表达后与 LA.EVs 组小鼠相比, 小鼠肠道病理学变化更加严重、肠道屏障紧密连接蛋白显著降低, 炎症因子表达和肠道通透性显著增加。 **结论** LA.EVs 通过调节肠道微生物群进而激活肠道 AHR/IL-22 信号传导减少炎症反应和促进肠道屏障修复来缓解 AFB1 诱导的小鼠肠道损伤。

关键词: 黄曲霉毒素 B1; 食淀粉乳杆菌; 胞外囊泡; 肠道损伤; 小鼠

通讯作者: 刘云欢, E-mail: 2020018@njau.edu.cn

T13-0083

化合物 KOF 对 MCR 和 NDM 的双重抑制作用

李靖红, 刘挺, 王晓明, 王丽平*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: **目的** 本实验旨在探究硝基噻唑类化合物 KOF 对不同细菌的抗菌效果, 并评估化合物 KOF 分别与黏菌素或美罗培南联合使用的体内外协同抗菌效果, 为阐明化合物 KOF 与多黏菌素或美罗培南联合用药

对 *mcr* 和 NDM 双阳性的多重耐药菌产生协同作用的具体机制提供思路,为临床开发治疗多重耐药细菌感染的新药靶点提供实验依据,为探索新的抗菌增效剂奠定理论基础。**材料与方法** 以本实验室设计合成的硝基噻唑类化合物 KOF 为研究对象,通过测定其对不同细菌如产气荚膜梭菌、弯曲杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等菌的最小抑菌浓度(MIC),基于此,进一步评价其与黏菌素或美罗培南联合用药时的分级抑菌浓度(FICI)对其联合用药效果进行评价。**结果** 化合物 KOF 对厌氧菌如产气荚膜梭菌、弯曲杆菌等的 MIC 均小于 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而其对需氧的肠杆菌科细菌的 MIC 绝大多数都大于 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$,表明该化合物对厌氧菌有较好的抗菌活性。同时,我们发现该化合物对需氧菌虽然效果不佳,但其与黏菌素或美罗培南联合用药时对含 *mcr* 或 NDM 菌株由协同抗菌作用,对 65% 以上的菌株 FICI 小于等于 0.5,对不含 *mcr* 或 NDM 菌株的协同率则低于 10%。**结论** 化合物 KOF 对厌氧菌有良好抗菌效果,且可以协同黏菌素或美罗培南抗 *mcr* 或 NDM 的耐药菌株。

关键词: 硝基噻唑类; *mcr*; NDM; 耐药性

通讯作者: 李靖红, E-mail: lijinghong617@163.com

T13-0084

饲料中添加 SeMet 和 Allicin 对 Diquat 诱导的肉鸡空肠氧化应激缓解作用

刘永仕, 吕 茜, 黄金虎, 王晓明, 王丽平*
(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要:目的 本试验旨在研究饲料中添加 SeMet 和大蒜辣素缓解肉仔鸡空肠氧化应激的作用及其分子机制。**材料与方法** 将 105 只 1 日龄 AA 肉鸡随机分为 7 组,每组 3 个重复,每个重复 5 只肉鸡。饲养期为 23 天。将 1 日龄 AA 肉鸡连续 3 周饲喂含 SeMet 和大蒜辣素的饲料。统计采食量和体重变化。分别在腹腔注射 Diquat 后 24 h 和 7 d 后收集空肠和血液样本,通过 HE 染色观察空肠绒毛形态,检测空肠 SOD 活性、MDA 含量和 ROS 含量,并检测空肠氧化应激相关通路的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 在腹腔注射 Diquat 后,与对照组相比,Diquat 组绒毛高度与隐窝深度之比显著降低 ($P < 0.01$),FCR 显著提高 ($P < 0.01$),空肠 SOD 活性显著下降 ($P < 0.01$),而 MDA 和 ROS 含量显著升高 ($P < 0.01$)。与 Diquat 组相比,SeMet 和高剂量的大蒜辣素联用显著升高绒毛高度与隐窝深度之比 ($P < 0.05$),显著降低 FCR ($P < 0.001$),显著升高 SOD 活性 ($P < 0.01$),而显著下降 MDA 和 ROS 含量 ($P < 0.01$),且二者联用较其单独使用作用更显著。qPCR 和免疫组化结果显示,SeMet 和大蒜辣素共同激活 Nrf2 抗氧化通路,抑制内质网应激和铁死亡通路。SeMet 联合大蒜辣素可共同上调 *Nrf2*、*NQO1*、*HO1*、*SLC7A11*、*GPX4* 的 mRNA 相对表达量,降低 *ACSL4*、*GRP78*、*ATF4* 的 mRNA 相对表达量,并显著提高 Nrf2 和 GPX4 的蛋白表达水平,而显著降低 GRP78 的蛋白表达水平 ($P < 0.001$)。**结论** SeMet 和大蒜辣素可通过激活 Nrf2 通路、抑制内质网应激和铁死亡通路,共同提高 Diquat 诱导的肉鸡生产性能和空肠抗氧化能力。

关键词: SeMet; 大蒜辣素; 氧化应激; 生产性能; Nrf2 通路

通讯作者: 刘永仕, E-mail: LYSliuyongshi@163.com

T13-0085

大蒜辣素对 CCl₄ 诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用研究

龚倩梅, 王晓明, 王丽平*
(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要:目的 大蒜辣素最初是由 Cavallito 等从碾碎的大蒜中分离得到的一种含硫有机化合物,是大蒜中

的主要有效成分。随后大蒜辣素被证明具有多种药理活性,如抗炎、抗氧化等作用,研究表明大蒜辣素进入体内代谢后可产生 H_2S ,推测大蒜辣素可作为 H_2S 的供体而间接发挥药理学作用。目前,有关大蒜辣素对肝损伤的缓解作用及其机制的研究甚少。因此,本研究的目的旨在探究大蒜辣素对 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用机制。**方法** 将42只小鼠随机分为7组,分别为对照组、大蒜辣素处理组、 CCl_4 处理组、复方甘草酸苷治疗组($80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)及3个大蒜辣素(40 、 20 和 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)治疗组。小鼠腹腔注射1% CCl_4 ($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)8 h后灌胃给予不同剂量的大蒜辣素和复方甘草酸苷,于 CCl_4 处理48 h后采集小鼠血液和肝脏组织,测定血清生化指标、血清中炎症因子以及肝组织MDA及CAT含量,同时采用Western blot方法检测大蒜辣素对细胞凋亡相关蛋白表达的影响。**结果** 单独使用大蒜辣素对小鼠肝脏无损伤作用($P>0.05$)。40、20和 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 大蒜辣素均可显著降低 CCl_4 处理小鼠的血清AST、ALT及ALP活性水平($P<0.05$),显著提高肝脏CAT含量和降低MDA含量($P<0.05$)。40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 大蒜辣素还可显著降低 CCl_4 处理小鼠血清炎症因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平($P<0.05$)以及肝组织Bax、Cleaved-Caspase 3和Cleaved-Caspase 9蛋白表达水平($P<0.05$),显著提高肝组织NQO1和Nrf2蛋白表达水平($P<0.05$)。在降低小鼠血清生化指标、炎症因子和MDA水平方面,高、中剂量的大蒜辣素优于复方甘草酸苷($P<0.05$)。**结论** 本研究表明大蒜辣素可通过调节氧化应激、炎症和细胞凋亡,减缓 CCl_4 对肝脏的损伤进展,进一步通过体内外实验证实大蒜辣素具有抗氧化和抗炎活性,对肝损伤具有预防性保护作用。该结果为大蒜辣素在预防急性肝损伤和作为饲料添加剂预防动物MAFLD的研究提供了参考和依据。

关键词: 大蒜辣素; 肝损伤; 抗氧化; 抗炎

T13-0086

肺炎克雷伯菌质粒携带的 *pKP91-00067* 对 *mcr-8* 表达以及质粒接合转移的调控研究

洪秋霞, 王晓明, 王丽平*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: **目的** 本研究旨在探讨肺炎克雷伯菌 IncF II 型质粒携带的 *pKP91-00067* 基因对 *mcr-8* 和质粒接合转移的调控, 为控制黏菌素耐药性的水平传播提供理论基础。**材料方法** 采用 λ Red 同源重组法构建 *pKP91-00067* 基因的缺失株, 并通过 pHSG575 质粒构建回补株, 比较野生株、缺失株和回补株的生长曲线、药物敏感性、质粒稳定性、*mcr-1* 和 *amp* mRNA 表达、质粒接合转移水平的差异; 通过 EMSA 研究 *pKP91-00067* 蛋白与 *mcr-8* 和质粒接合转移相关基因的相互作用。**结果** 本研究成功构建缺失株 $\Delta pKP91-00067$ 与回补株 $C\Delta pKP91-00067$ 。与野生株相比, *pKP91-00067* 缺失对菌株的生长和质粒的稳定性(传代 14 代)无显著影响($P>0.05$); 但发现 *pKP91-00067* 缺失可导致菌株对黏菌素的 MIC 降低 8 倍(由 XXX 下降为 XXX), 对头孢西丁的 MIC 降低至原来的 1/4。qPCR 结果显示 *pKP91-00067* 缺失可显著降低同质粒携带的 *mcr-8* 和 *amp* 的 mRNA 表达水平; 接合试验结果表明, *pKP91-00067* 缺失可引起其携带质粒的接合转移频率显著下降($P<0.05$), 由 XXX 下降至 XXX。而该基因回补后可恢复其野生型表型。**结论** 肺炎克雷伯菌 IncF II 型质粒携带的 *pKP91-00067* 基因可调控菌株对黏菌素和头孢西丁的敏感性, 并调控菌株质粒的接合转移, 具体的分子调控机制尚需深入探究。

关键词: 肺炎克雷伯菌; 黏菌素; 质粒; 转录因子; 接合转移; 细菌耐药性

通讯作者: 洪秋霞, E-mail: hongqiu@163.com

T13-0087

江苏省地区畜禽养殖场弯曲菌的分离鉴定及耐药性分析

荣巧, 王丽平*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要:目的 弯曲菌是一类微需氧的食源性人畜共患革兰氏阴性菌,对人类健康、畜禽产品安全、养殖业造成严重危害。随着禁抗减抗替抗政策推行,临床感染弯曲菌现象又有上升趋势。同时,由于养殖过程中抗菌药物的不规范使用和耐药基因突变和水平转移等原因造成弯曲菌对抗菌药物敏感性降低。本试验旨在掌握江苏省弯曲菌的分布和对常用抗生素的耐药情况,为临床防治弯曲菌病合理用药提供参考。材料和方法 对江苏地区2019-2023年采集的1961份鸡源、猪源盲肠样品和肛门拭子进行弯曲菌分离培养,采用聚合酶链式反应(PCR)和革兰染色方法进行鉴定。根据美国临床和实验室标准协会指导标准2016版(CLSI 2016)推荐的微量肉汤稀释法检测分离弯曲菌对萘啶酸、环丙沙星、红霉素、阿奇霉素、四环素、林可霉素、氟苯尼考、庆大霉素和泰利霉素九种常用抗菌药物的敏感性,并进行耐药性分析。结果 共分离到240株弯曲菌,分离率为12.43%。其中鸡源弯曲菌分离率为16.78%(207/1678),猪源弯曲菌分离率为11.66%(33/283)。分离的弯曲菌对大环内酯类抗生素红霉素、四环素类抗生素四环素、氟喹诺酮类抗生素萘啶酸、环丙沙星耐药严重,其耐药率均超过90%;结肠弯曲菌对氨基糖苷类抗生素庆大霉素、酰胺醇类抗生素氟苯尼考和大环内酯类抗生素阿奇霉素的耐药率均高于空肠弯曲菌,空肠弯曲菌对氟苯尼考较为敏感,其耐药率为8.89%。弯曲菌的多重耐药情况严重,结肠弯曲菌多重耐药谱型较空肠弯曲菌广,其多重耐药谱型集中于七重耐药和八重耐药,占比超过60%。空肠弯曲菌多重耐药谱型集中于三重耐药、七重耐药和八重耐药,其所占比例超过80%。结论 江苏地区临床常用治疗弯曲菌感染的药物对菌株敏感性低,弯曲菌耐药情况严重,多种抗菌药物耐药率高,多重耐药谱型广,需引起广泛重视。在加强耐药监测的同时,也应规范使用抗菌药物并积极寻找开发高效绿色健康的新型抗生素和抗生素替代产品。

关键词: 弯曲菌; 分离鉴定; MIC; 耐药性

通讯作者: 荣巧, E-mail: rongq1124@163.com

T13-0088

SeMet和大蒜辣素通过激活Nrf2通路协同缓解氧化损伤和内质网应激机制研究

刘永仕, 王晓明, 王丽平*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要:目的 本研究旨在探讨SeMet和大蒜辣素对IPEC-J2细胞和小鼠模型的协同抗氧化作用及其机制。材料与方法 首先在IPEC-J2细胞上建立细胞氧化应激模型,并筛选了SeMet和大蒜辣素的合适浓度,通过检测细胞活性、ROS的水平、GSH/GSSG含量、MDA含量、NO含量、SOD活性,研究SeMet和大蒜辣素在氧化应激下对IPEC细胞活力和氧化还原平衡的影响,并研究二者的协同效果。通过qPCR和WB检测Nrf2通路、紧密连接蛋白和内质网应激通路的mRNA和蛋白表达,阐明SeMet和大蒜辣素的协同保护机制。然后通过体内实验建立小鼠氧化应激模型,检测空肠绒毛形态,抗氧化水平,以及蛋白表达情况。最后使用Nrf2抑制剂(ML385)在体内和体外进行了SeMet和大蒜辣素的协同保护机制研究。结果 细胞试验结果表明,与H₂O₂组相比,0.04 μg/mL的SeMet与2 μg/mL的大蒜辣素可显著地提升IPEC-J2细胞活力($P < 0.05$),且联用比单独更显著提高细胞活力($P < 0.05$)。与对照组相比,H₂O₂诱导IPEC-J2细胞GSH含量、SOD活性和GR活性显著降低($P < 0.05$),而GSSG、MDA、NO含量和ROS水平显著升高($P < 0.01$),而SeMet和大蒜辣素可显著逆转上述指标,且联用作用更显著($P < 0.05$)。qPCR和WB结果显示:SeMet和大蒜辣素可以显著上调Nrf2、NQO1和ZO-1的mRNA表达,下调GRP78、CHOP、PERK、ATF4、IRE和XBP1

的 mRNA 表达 ($P < 0.05$), Western blot 结果与 qPCR 结果趋势相同。而 ML385 的预处理逆转了 SeMet 和大蒜辣素的上述作用。体内实验表明,与对照组相比, Diquat 损伤肠绒毛形态,并且显著降低绒毛高度与隐窝深度之比 ($P < 0.001$),而 SeMet 和大蒜辣素能显著改善此作用 ($P < 0.05$)。与对照组相比, Diquat 诱导小鼠空肠 SOD、GSH-PX、T-AOC、TrxR 活性和 GSH 含量显著下降 ($P < 0.01$),而小鼠空肠 MDA 含量和 ROS 水平显著上升 ($P < 0.01$)。SeMet 和大蒜辣素可以逆转上述指标,且有协同作用,但 ML385 消除了 SeMet 和大蒜辣素的保护作用。以上结果表明, SeMet 和大蒜辣素协同增强空肠抗氧化能力和肠屏障功能是通过激活 Nrf2 信号通路实现的。**结论** SeMet 和大蒜辣素能够通过激活 Nrf2 信号通路协同缓解氧化损伤并抑制内质网应激。

关键词: SeMet; 大蒜辣素; 氧化应激; Nrf2 通路; 内质网应激

T13-0089

天然产物 SJ013 抑制肝细胞铁死亡缓解对乙酰氨基酚肝毒性的机制研究

王俊棋, 董 斌, 赵 源, 郭大伟, 江善祥**, 高修歌^{1,2**}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095; 2. 南京农业大学兽药研究评价中心, 江苏 南京 210095)

摘要: 目的 对乙酰氨基酚 (APAP) 过量引起的肝毒性是全球范围内急性肝衰竭的常见原因。N-乙酰半胱氨酸是临床治疗对乙酰氨基酚解毒的主要干预措施,然而,其疗效主要在对乙酰氨基酚诱导肝损伤的初始阶段观察到,并且伴随呕吐、恶心及休克等副作用。因此,迫切需要探索新的治疗靶点和药物以应对对乙酰氨基酚引起的肝损伤。本研究阐明了天然产物 SJ013 缓解对乙酰氨基酚诱导肝损伤的铁死亡机制。**材料与方法** 以 AML12 细胞作为体外模型, CCK-8 法评估细胞活性;透射电镜观察线粒体形态;流式细胞术和荧光显微镜检测脂质过氧化;免疫共沉淀, siRNA 干扰,分子动力学模拟探究其分子机制。以 C57 小鼠作为动物模型,对 SJ013 的保护效果进行评价研究。**结果与讨论** 本研究结果表明 SJ013 减轻了对乙酰氨基酚引起的肝损伤,缓解了脂质过氧化物生成。此外, SJ013 降低了肝细胞前列腺素内过氧化合酶 2 (PTGS2) 的 mRNA 水平,增加了谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 的蛋白水平,表明其通过抑制铁死亡缓解对乙酰氨基酚引起的肝损伤。我们进一步揭示 SJ013 通过阻止 Nrf2 的泛素化并增加 Nrf2 稳定性,进而激活 Keap1-Nrf2 通路,以抑制对乙酰氨基酚诱导的肝细胞铁死亡。**结论** 本研究初步阐明天然产物 SJ013 靶向 Nrf2 抑制肝细胞铁死亡的分子机制,为解除乙酰氨基酚的急性肝毒性提供新的干预策略。

关键词: 天然产物; 对乙酰氨基酚; 急性肝损伤; 铁死亡; Nrf2

T13-0090

抗菌肽 BNBD5 的初步安全性试验

黄璟昇, 康伟超, 李 涵, 朱树馨, 戴德嘉, 杨云梅, 何家康*, 梁正敏*

(广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530004)

摘要: 目的 抗菌肽是由机体产生的一类小分子多肽,具有免疫调节、抗菌、抗病毒等生物活性。牛中性粒细胞 β 防御素 5 (BNBD5) 是一种新型阳离子抗菌肽,可调节肺脏先天免疫反应抵御胸膜肺炎放线杆菌和肺炎克雷伯菌感染。本研究通过细胞和动物实验考察 BNBD5 的安全性,为 BNBD5 的研究提供安全性依据。**方法** 溶血性实验:采集兔血,制备 1% 红细胞混悬液并按照 50 μ L/孔接种于 96 孔板,加入 BNBD5 使每组终浓度分别为 0.625、1.25、2.5、5、10、20、40 和 80 μ g/mL,阴性和阳性对照孔分别加入等量 PBS、1% Tritonx-100,培养 1 h 后取上清检测 OD_{450 nm},计算溶血率。CCK-8 细胞活性检测:将 RAW264.7 细胞接种于 96

孔板中过夜培养,弃上清,加入BNBD5使每组终浓度分别为10、20、40和80 $\mu\text{g}/\text{mL}$,空白组仅加入培养基。分别培养24 h、48 h后加入CCK-8试剂,孵育2 h后检测 $\text{OD}_{450\text{nm}}$,计算细胞活性。小鼠和仔猪实验:将10、20和40 μg BNBD5滴鼻Balb/c雌鼠两次,500 μg 、1 mg和2 mg BNBD5滴鼻断奶仔猪两次,每次间隔2 d,空白组滴鼻PBS,观察小鼠和仔猪临床症状。然后分别于6 h、24 h、72 h后采集小鼠样品,72 h后采集仔猪样品。记录小鼠和仔猪精神状态、食欲、体温、体重以及脏器眼观病变;计算脏器指数;HE染色观察脏器病理变化;ELISA和qPCR检测小鼠和仔猪肺部炎性细胞因子。**结果** 溶血性实验:BNBD5无明显溶血毒性。CCK-8细胞活性检测:与10~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BNBD5能促进RAW264.7细胞生长,无抑制细胞生长毒性。小鼠和仔猪实验:与空白组相比,BNBD5组仔猪和小鼠精神状态、食欲正常,体温和体重无显著变化;各脏器质地、颜色正常;脏器指数无显著差异。40 μg BNBD5滴鼻小鼠72 h可见肺组织有少量炎性细胞浸润,心脏、肝脏、脾脏及肾脏无明显病理变化,其余组小鼠脏器未见明显病理变化;2 mg BNBD5滴鼻对断奶仔猪鼻黏膜、肺脏、心脏、肝脏、脾脏及肾脏组织学变化无明显影响。滴鼻BNBD5 72 h后,小鼠和仔猪肺脏IL-1 β 、TNF- α 、IL-22和IL-17水平无显著变化。**结论** 10~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内BNBD5无溶血性,对巨噬细胞活性无影响。小鼠滴鼻 ≤ 20 μg BNBD5或仔猪滴鼻 ≤ 2 mgBNBD5不引起肺脏过度炎性反应,对心脏、肝脏、脾脏及肾脏无明显影响。本研究结果表明了BNBD5对细胞、小鼠和仔猪具有良好的安全性,为其临床应用提供安全性依据。

关键词: 抗菌肽BNBD5; 溶血性; 细胞毒性; 炎性反应; 细胞因子

通讯作者: 何家康,E-mail:jkhe@gxu.edu.cn; 梁正敏,E-mail:liangzm@gxu.edu.cn

T13-0091

茯苓多糖缓解玉米赤霉烯酮诱导小鼠毒性作用

戴德嘉,李环,张远嘉,朱树馨,黄璟昇,康伟超,李涵,杨云梅,何家康*,梁正敏*
(广西大学动物科学技术学院,南宁 530005)

摘要: **目的** 玉米赤霉烯酮(Zearalenone,ZEA)是一种常见的霉菌毒素,广泛存在于霉变饲料中,可导致肝脏、肾脏、肠道和生殖系统等多组织损伤。茯苓多糖(Poria cocos mushroom polysaccharides,PCP)作为一种具有免疫调节、抗氧化和保肝等药理活性的天然多糖,本试验旨在探究其对缓解ZEA诱导小鼠的毒性作用及其可能的作用机制,为PCP在霉菌毒素中毒防治中的应用提供理论依据。**方法** 将24只BALB/C雄性小鼠随机分为正常对照组、ZEA染毒组和PCP+ZEA处理组。PCP+ZEA处理组小鼠连续7天灌胃200 mg/kg茯苓多糖,随后灌胃5天40 mg/kg ZEA溶液,ZEA染毒组小鼠灌胃5天40 mg/kg ZEA溶液,正常对照组小鼠灌胃等体积无菌水和溶剂。末次灌胃24 h后采样进行脏器指数、血清酶学指标、抗氧化酶检测,采用HE染色法观察肝脏、肾脏、小肠和睾丸组织的病理学变化。**结果** ZEA染毒导致小鼠肝脏、肾脏、小肠和睾丸组织损伤。与正常对照组相比,ZEA染毒对照组小鼠肝脏指数和肾脏指数显著降低,小鼠血清中血清中谷丙转氨酶(Glutamic pyruvic transaminase,GPT)和谷草转氨酶(Glutamic oxaloacetic transaminase,GOT)水平升高,血清和小肠组织中超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)水平升高,总谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase,GSH-Px)和过氧化氢酶(Catalase,CAT)水平降低,睾丸组织中SOD水平和GSH-Px水平降低。与ZAE组相比,茯苓多糖显著降低GPT和GOT水平,显著升高血清、肠道及睾丸组织中的抗氧化酶SOD、GSH-Px和CAT水平。HE染色结果显示,ZEA染毒组小鼠肝脏、肾脏、小肠和睾丸组织出现不同程度的病理学改变,肝细胞局部出现变性坏死,肾小管上皮细胞发生变性坏死,小肠中十二指肠和空肠出现绒毛断裂、肠上皮细胞脱落、炎症细胞浸润等病理变化,回肠无明显变化,睾丸中部分生精小管的精子和生精细胞明显减少。与ZEA染毒组相比,PCP+ZEA处理组小鼠肝脏、肾脏、小肠和睾丸组织损伤程度明显减轻。以上结果表明PCP可能通过提高抗氧化能力来减轻ZEA诱导小鼠小肠和睾丸氧化损伤。**结论** PCP对ZEA诱导的小鼠肝脏、肾脏、小肠和睾丸等多组织损伤具有保护作用,其机制可

能与抗氧化作用有关,PCP有望成为预防和治疗ZEA中毒的有效药物。

关键词: 玉米赤霉烯酮; 茯苓多糖; 抗氧化; 毒性作用

通讯作者: 何家康, E-mail: jkhe@gxu.edu.cn; 梁正敏, E-mail: liangzm@gxu.edu.cn

T13-0092

靶向细菌Ⅰ型信号肽酶的抗菌化合物C09的抗菌活性及安全性研究

徐祥瀚¹, 卢晓林², 代兴杨¹, 王晓明¹, 王丽平¹, 张梦晗^{2*}, 张大永^{2*}, 黄金虎^{1*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095; 2. 中国药科大学理学院, 江苏 南京 211112)

摘要: **目的** 耐药菌引起的感染严重威胁全球公共卫生安全,因此迫切需要具有新作用机制的新型抗菌药物来应对细菌耐药性问题。细菌Ⅰ型信号肽酶(Spase I)是一种高度保守且对细菌存活至关重要的酶。细菌和人类的Ⅰ型信号肽酶存在明显差异,因此它是开发新型抗菌药物的潜在靶点。本研究旨在确定并评估一种新型Ⅰ型信号肽酶抑制剂C09对革兰阳性菌的抗菌活性,并对其体内外安全性进行初步评价。**方法** 使用大肠杆菌Ⅰ型信号肽酶LepB的结构进行药物设计,通过体外抑菌活性测定和构效关系研究筛选并获得具有显著抗菌活性的化合物C09,通过微量热涌动和分子对接实验分析化合物C09与LepB之间的相互作用,通过CCK-8法和红细胞溶血实验检测化合物C09对HEp-2和Caco-2细胞的增殖毒性以及对哺乳动物红细胞的毒性,进一步通过急性毒性实验和组织病理学检查评估化合物C09的体内毒性。**结果** 化合物C09是一种杀菌药物,对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度分别为1 μg/mL和4 μg/mL。通过微量热涌动实验和分子对接分析证实了化合物C09能够与LepB直接发生互作, K_d 值为 $13.6 \pm 7.7 \mu\text{M}$ 。细胞增殖毒性实验显示化合物对HEp-2和Caco-2细胞的半数抑制浓度分别为14.65 μg/mL和21.53 μg/mL,选择性指数分别为14.65和21.53。红细胞溶血实验显示化合物C09对小鼠红细胞的半数溶血浓度为13.29 μg/mL,选择性指数为13.29。急性毒性实验未发现化合物C09有体内毒性,以1000 mg/kg的剂量灌胃给药,小鼠精神正常,呼吸平稳,食欲正常,连续观察7天小鼠未出现死亡。7天后处死小鼠采集心脏,肝脏,脾脏,肺脏,肾脏进行组织病理学检查,结果显示,小鼠主要脏器均未出现明显病变。**结论** 化合物C09通过靶向细菌Ⅰ型信号肽酶发挥抗菌作用,具有较高的抗菌活性和较低的体内外毒性,是一种具有潜力的新型抗菌化合物。

关键词: Ⅰ型信号肽酶; 新型抗菌药物; 安全性研究

通讯作者: 徐祥瀚, E-mail: xuxianghan2000@163.com

T13-0093

复方非泼罗尼透皮滴剂安全性及其杀螨效果研究

相亦飞, 莫奕豪, 刘城志, 梁正敏*, 何家康*

(广西大学动物科学技术学院, 南宁 530004)

摘要: **目的** 复方非泼罗尼透皮滴剂是非泼罗尼和伊维菌素制备得到的复方透皮滴剂,两药联合可增大抗虫谱、降低毒副作用、减少用药次数以及延缓虫体耐药性的发展。本研究对其初步安全性和杀螨效果进行评价,旨在为宠物寄生虫病提供一个新的防治策略。**方法** 经口和经皮急性毒性试验:经口试验选用KM鼠(SPF, $20 \pm 2 \text{ g}$),经皮试验选用SD大鼠(SPF, $200 \pm 2 \text{ g}$)。将100只KM鼠随机分成10组,雌雄各半。经口给予125、88.39、62.5、44.20、31.25 mg/kg复方透皮滴剂,或经皮给予1000.00、707.11、500.00、353.55、250.00 mg/kg复方透皮滴剂,观察并记录小鼠7 d内中毒症状及死亡情况,计算LD50。皮肤刺激性试验:6

只家兔背部去毛并划区,采用自身对比法给予复方非泼罗尼透皮滴剂,对试验兔的皮肤刺激反应和刺激强度进行评分。体外杀螨试验:将50只螨虫(来源于自然感染疥螨的病兔)随机分为空白对照组、阴性对照组、复方非泼罗尼透皮滴剂组以及市售非泼罗尼和伊维菌素滴剂对照组,在培养皿中随机挑入10只螨虫,加入600 μ L 药物,于5、10、15、20、25、30 min后计算螨虫死亡率。动物试验:将42只家兔(2.20~2.50 kg)随机分为健康对照组、感染模型组、复方非泼罗尼透皮滴剂(6.6、13.2、26.4 mg/kg)以及市售非泼罗尼和伊维菌素滴剂对照组,除健康对照组外其余家兔均人工感染疥螨后给予不同药物后进行观察和评价。**结果** 复方非泼罗尼透皮滴剂经口和经皮LD₅₀为分别为64.72和590.64 mg/kg,判定其经口和经皮给药毒性分别为中等和低等毒性。复方非泼罗尼透皮滴剂对家兔健康皮肤和破损皮肤均无刺激性。体外杀螨试验结果表明,复方非泼罗尼透皮滴剂在10 min内的杀虫率为100.00%,优于市售单方药物。动物试验表明,复方非泼罗尼透皮滴剂在兔体内对兔疥螨的杀灭效果优于市售非泼罗尼和伊维菌素单方药物,13.2、26.4 mg/kg 复方非泼罗尼透皮滴剂在28 d内杀螨率达100%,且呈现一定的剂量依赖性。**结论** 本研究制备的复方非泼罗尼透皮滴剂经口和经皮毒性较低,且在体、内外均表现出较好的灭螨效果,为该药物的上市和宠物临床用药提供了药理学依据。

关键词: 复方非泼罗尼透皮滴剂; 急性毒性; 杀螨

基金项目: 广西科技基地和人才专项(桂科AD23026289); 广西重点研发计划项目(桂科AB23026082)

通讯作者: 梁正敏, E-mail: liangzm@gxu.edu.cn; 何家康, E-mail: jkhe@gxu.edu.cn

T13-0094

复方苦玄参口服液急性毒性和亚慢性毒性研究

相亦飞, 李佳达, 刘城志, 梁正敏*, 何家康*

(广西大学动物科学技术学院, 南宁 530004)

摘要: **目的** 复方苦玄参口服液是由苦玄参、救必应、桃金娘根和南刘寄奴四位中药组方制备的传统口服制剂,具有抗炎、抗菌、提高免疫力等多种药理作用,本研究对其进行初步毒理学评价,为动物试验和临床用药提供安全性实验依据。**方法** 急性毒性试验:将16只KM小鼠(SPF, 18~22 g)随机分成4组,雌雄各半。给药剂量为5000、2500、1250 mg/kg,对照组灌胃等体积的蒸馏水,连续观察7 d,记录其生长状态和死亡等情况。单次最大给药量试验:将60只KM小鼠(SPF, 18~22 g)随机分成6组,雌雄各半。给药剂量为10000、20000、30000、40000、50000 mg/kg。连续7 d观察小鼠的临床症状、体重变化等,试验结束后剖杀小鼠,观察内脏器官病变情况。亚慢性毒性试验:将40只SD大鼠(SPF, 80~100 g)随机分成4组,雌雄各半,给药剂量为6.25、12.5、25.0 g/kg,对照组给予灌服等体积蒸馏水,每天1次,连续灌胃30 d,试验期间记录体重和精神状态等各项指标,末次给药后取血,检测血常规和血液生化指标;剖检记录各脏器的大体病变,测定脏器指数并取样固定做HE染色。**结果** 急性毒性试验:经口灌服5000 mg/kg 复方苦玄参口服液未引起小鼠死亡,未观察到明显中毒现象,小鼠精神状态和体重等各项指标无明显异常,心脏、肝脏、肾脏、脾脏和肺脏等脏器无明显异常,表明复方苦玄参口服液对小鼠无明显的急性毒性作用。单次最大给药量试验:经口灌服50000 mg/kg BW的复方苦玄参口服液未引起小鼠死亡,但导致小鼠发生腹泻、软便、肛门红肿、肛周污秽等毒性反应,灌服40000 mg/kg BW 复方苦玄参口服液未发现毒性反应。亚慢性毒性试验:与对照组相比,连续给予30 d 复方苦玄参口服液对SD大鼠食欲、饮欲、行为、排便等临床表现无明显影响,对生长性能、脏器指数、血常规、血液生化指标和各脏器组织学等无显著影响,未表现出明显中毒反应。**结论** 急性毒性和亚慢性毒性试验表明,复方苦玄参口服液的口服安全性较高,单次最大耐受量为40000 mg/kg BW。

关键词: 复方苦玄参口服液; 急性毒性; 亚慢性毒性; 毒理学; 安全性

基金项目: 国家自然科学基金(32360897); 广西重点研发计划项目(桂科AB23026082)

通讯作者: 梁正敏, E-mail: liangzm@gxu.edu.cn; 何家康, E-mail: jkhe@gxu.edu.cn

T13-0095

黄连散对黏菌素致小鼠肾毒性的保护作用

刘城志, 黄玲, 相亦飞, 梁正敏*, 何家康*
(广西大学动物科学技术学院, 南宁 530005)

摘要: **目的** 黏菌素(*Colistin*)为多肽类抗生素,对革兰氏阴性菌有较强的抗菌活性,且不易产生细菌耐药性。但是由于具有潜在的毒副作用,黏菌素的临床应用受到限制。黄连是我国传统中药材,为毛茛科黄连属植物,是黄连、三角叶黄连或云连的干燥根茎,最早记载于东汉《神农本草经》中,并被列为上品,具有清热燥湿、泻火解毒等功效,与抗生素联用有协同增效作用。本研究以黄连为药材,经提取纯化制成富含黄连素的散剂,并考察其对黏菌素肾毒性的缓解效果,以期为兽医临床黏菌素的联合用药、减毒增效提供一个可选择的方案。**方法** 将60只BALB/C小鼠随机分为5组,分别为空白对照组、黄连散(200 mg/kg)对照组、模型组(18 mg/kg)、高剂量给药组(200 mg/kg)、中剂量给药组(100 mg/kg)、低剂量给药组(50 mg/kg),每组10只,雌雄各半。对照组和黄连散对照组小鼠腹腔注射生理盐水,其余各组小鼠腹腔注射黏菌素。黏菌素给药前2 h灌胃黄连散,对照组和模型组灌胃生理盐水,连续处理7 d。末次给药24 h后,进行脏器指数、血清酶学指标、抗氧化酶检测,采用HE染色法观察肾脏的组织病理变化。**结果** 黏菌素使小鼠体重下降,肾脏发生肿大,肾功能发生障碍,血清中肌酐(Creatinine, CRE)和尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN)浓度升高,小鼠机体的抗氧化能力下降,脂质过氧化水平升高。黄连散预处理后,小鼠的肾功能指标BUN和CRE趋于正常,50 mg/kg给药剂量能显著提高小鼠肾脏中超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、总抗氧化能力(Total antioxidant capacity, T-AOC)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)含量并降低丙二醛(Malondialdehyde, MDA)水平,极显著提高谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)的活力。HE染色结果显示,对照组与黄连散对照组小鼠肾脏无异常变化,模型组小鼠的肾脏结构紊乱,近端小管刷状缘消失,胞浆染色变淡,细胞核固缩、碎裂、溶解,肾小管上皮细胞脱落或坏死,血管内充血。与模型组相比,高剂量散剂预处理组小鼠的肾组织损伤显著减轻,血管内充血减少,肾小管上皮细胞坏死程度减轻。以上结果表明黄连散可能通过提高机体抗氧化能力以及降低脂质过氧化水平来缓解黏菌素对小鼠造成的肾损伤。**结论** 黄连散对黏菌素诱导的小鼠肾毒性具有一定的保护作用,其机制可能与抗氧化作用有关。黄连散工艺简便易行,有效成分含量高,在兽医临床上具有与黏菌素联合用药、减毒增效的潜力。

关键词: 黏菌素; 黄连散; 氧化性; 毒性作用

基金项目: 国家自然科学基金(32360897); 广西重点研发计划项目(桂科AB23026082)

通讯作者: 梁正敏, E-mail: liangzm@gxu.edu.cn; 何家康, E-mail: jkhe@gxu.edu.cn

T13-0096

盐酸特比萘芬复合水凝胶的生物安全性初步评价

刘城志, 相亦飞, 钟雅文, 梁正敏*, 何家康*
(广西大学动物科学技术学院, 南宁 530005)

摘要: **目的** 水凝胶是多孔结构的三维网络聚合物,其自身并不溶于水但对水具有强大的负载能力,且具有良好的生物相容性、可塑性及自身的响应特性,近些年来经常作为新型药物递送系统的载体,在口腔疾病、伤口敷料等方面得到广泛应用。盐酸特比萘芬复合水凝胶是由盐酸特比萘芬环糊精包合物、氧化海藻酸钠和辛烯基琥珀酸酐改性壳聚糖通过席夫碱反应制备的一种能够负载疏水性药物的新型水凝胶,具有一定的机械稳定性、良好的pH响应以及自我愈合的特性。本试验旨在初步评价盐酸特比萘芬复合水凝胶的生物安全性,为水凝胶的进一步开发提供理论依据。**方法** 溶血性实验:采集健康KM小鼠血液,制备4%红细胞混悬液。将水凝胶在37°C的生理盐水中孵育24 h,制备20 mg/mL的水凝胶提取液。将生理盐水(空

白组)、去离子水(对照组)、水凝胶提取液与4%的红细胞溶液等比例混合,在37℃孵育1h,用酶标仪测定在540nm处的吸光度。CCK-8细胞活性检测:将小鼠成纤维细胞L-929接种于96孔板中过夜培养,弃上清,加入100、200、400、600、1000µg/mL浓度的水凝胶浸提液,培养24h后加入CCK-8溶液100µL,孵育3h后于450nm处测定吸光度。细胞的形态学观察及荧光染色:将试验分为对照组、给药组。1000µg/mL浓度的水凝胶浸提液处理L-929细胞24h、48h、72h,用Calcein/PI细胞活性与细胞毒性检测试剂盒染色L-929细胞,使用倒置荧光显微镜观察并记录细胞生长情况荧光图像。**结果** 溶血性实验:20mg/mL水凝胶提取液溶血率未超过5%。CCK-8细胞活性检测:100-1000µg/mL盐酸特比萘芬复合水凝胶浸提液作用后的细胞存活率均>80%,对细胞生长无显著影响。细胞的形态学观察及荧光染色:盐酸特比萘芬复合水凝胶浸提液分别与细胞共培养24h、48h、72h后,细胞绿色荧光随着时间的推移呈现逐渐增加的趋势并且红色荧光较少,与对照组相比,水凝胶浸提液处理后细胞数量和细胞形态无明显差异。**结论** 本研究所制备的盐酸特比萘芬复合水凝胶具有良好的生物相容性,为其临床应用提供了安全性依据。

关键词: 盐酸特比萘芬; 席夫碱水凝胶; 溶血性; 细胞毒性

基金项目: 广西科技基地和人才专项(桂科AD23026289); 广西重点研发计划项目(桂科AB23026082)

通讯作者: 梁正敏, E-mail: liangzm@gxu.edu.cn; 何家康, E-mail: jkhe@gxu.edu.cn

T13-0097

Exploring the pharmacological mechanism of fermented *Eucommia ulmoides* leaf extract in the treatment of cisplatin-induced kidney injury in mice: integrated traditional pharmacology, metabolomics and network pharmacology

Kexin Lin^a, Lijuan Xiong^b, Wen Zhang^a, Xuan Chen^b, Jieqi Zhu^a, Xiaofei Li^{a,*}, Jianyong Zhang^{b,*}
(School of Basic Medicine, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

Abstract: Cisplatin (CP) is a widely utilized anticancer drug, which also produces significant side effects, notably acute kidney injury (AKI). *Fermented Eucommia ulmoides* leaf (FEUL), a medicinal and edible Chinese herbal remedy, is known for its renoprotective properties. However, the effect and underlying mechanism of FEUL in AKI therapy have remained largely unexplored. This research aimed to elucidate the protective roles of FEUL in an AKI mouse model through biochemical assays, histopathological examinations, and investigating the underlying mechanisms based on metabolomics and network pharmacology. The findings demonstrated that pretreatment with orally administered FEUL significantly reduced blood urea nitrogen (BUN), and serum creatinine (SCr) levels, and ameliorated CP-induced kidney histopathological injuries. Moreover, FEUL attenuated CP-induced endoplasmic reticulum (ER) stress by reducing the protein expressions of PERK, IRE 1 α , GRP78, ATF6, ATF4, and CHOP. The metabolomics results indicated that a total of 31 metabolites, involved in taurine and hypotaurine metabolism, lysine degradation, and steroid hormone biosynthesis, were altered after FEUL administration. Furthermore, metabolomics integrated with network pharmacology revealed that 8 targets, 4 metabolites, and 3 key pathways including steroid hormone biosynthesis, purine metabolism, and tryptophan metabolism were the main mechanisms of FEUL in treating CP-induced AKI. These findings suggested that FEUL could offer valuable insights for potential CP-induced AKI treatment strategies.

Key words: Cisplatin; Fermented *Eucommia ulmoides* leaf; Acute kidney injury; Metabolomics; Network pharmacology

T13-0098

SIRT1 调控 mtROS 在 PM_{2.5} 诱导 HUVECs 细胞应激性衰老中的作用及机制研究武婧[#], 林漫漫, 宫美笛, 胡娟, 许学聪

(苏州大学苏州医学院公共卫生学院毒理学系, 江苏 215123)

摘要: **目的** 近年来, 细颗粒物(Fine particulate matter, PM_{2.5})作为全球性环境威胁, 与心血管疾病和血管内皮衰老关系密切。研究表明, 活性氧(ROS)可导致细胞周期阻滞和应激性衰老。沉默信息调节因子1(SIRT1)是细胞衰老的关键调节因子, 能清除线粒体活性氧(mtROS), 但其在PM_{2.5}诱导的细胞应激性衰老中的具体作用尚不明确。本研究旨在构建PM_{2.5}致人脐静脉内皮细胞(HUVECs)应激性衰老模型, 探究SIRT1和mtROS在其中的作用及机制。**方法** 1. PM_{2.5}表征: 利用扫描电镜和动态光散射测尺寸, 总有机碳仪和质谱仪分析成分。2. PM_{2.5}对HUVECs细胞毒性影响: 通过CCK8和LDH试剂盒评估PM_{2.5}对HUVECs存活率和膜通透性的影响, 使用DCFH-DA和JC-1探针检测ROS和线粒体电位。3. PM_{2.5}暴露诱导HUVECs细胞应激性衰老: 通过芯片分析和实时荧光定量PCR法筛选和验证差异表达mRNA; 采用电子显微镜观察细胞形态和SA-β-gal染色, 流式细胞术检测细胞周期, 免疫印迹法分析P53、P21、P16和PAI-1蛋白表达。4. SIRT1调控mtROS在PM_{2.5}诱导HUVECs细胞应激性衰老中的潜在作用机制: 使用MitoSOX Red荧光探针观察mtROS变化; 用MitoQ和SIRT1激活剂SRT1720处理后检测相关指标和蛋白表达。**结果** 1. 扫描电镜显示PM_{2.5}粒径尺寸0.1-2.5 μm, 平均粒径0.42 μm, PDI 0.334, 表明颗粒细小且均匀稳定。成分上, Al、Mn、Pb、Zn含量较高, 硫酸盐和硝酸盐为主要离子, 苯并芘等多环芳烃显著。2. PM_{2.5}暴露导致HUVECs细胞存活率下降和膜通透性增加, 同时引起细胞形态改变和ROS水平上升, 线粒体膜电位降低。3. PM_{2.5}暴露诱导HUVECs细胞应激性衰老, 表现为SA-β-gal染色增强, 细胞周期阻滞在G0/G1期, 衰老相关蛋白表达增加。4. SIRT1通过调控mtROS参与PM_{2.5}诱导的HUVECs细胞应激性衰老, SIRT1激活剂SRT1720处理可减轻细胞衰老和ROS产生。**结论** PM_{2.5}长期低剂量暴露后HUVECs细胞发生应激性衰老; mtROS通过激活P53、P21和P16表达介导PM_{2.5}长期低剂量暴露诱导HUVECs细胞应激性衰老的发生; SIRT1通过PGC-1α/SIRT3调控FOXO3a表达和IDH2活性, 促进SOD2表达和GSH生成, 以清除mtROS; 而PM_{2.5}长期低剂量暴露时SIRT1表达下降, 引起mtROS积累, 导致HUVECs细胞应激性衰老。

关键词: PM_{2.5}; HUVECs; 应激性衰老; SIRT1; mtROS**通讯作者:** 武婧, E-mail: wujing88@suda.edu.cn

T13-0099

枸杞多糖对 PM_{2.5} 暴露致 HUVECs 细胞衰老的干预作用及其机制研究武婧[#], 宫美笛, 胡娟, 林漫漫, 许学聪

(苏州大学苏州医学院公共卫生学院毒理学系, 江苏 215123)

摘要: **目的** 大气细颗粒物(Fine particulate matter, PM_{2.5})是对公共健康构成重大风险的危险因素, PM_{2.5}污染引发许多健康问题。PM_{2.5}暴露与血管内皮衰老密切相关, 然而, PM_{2.5}引发血管内皮衰老的潜在机制尚不明确。本文以PM_{2.5}暴露的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)为研究模型, 就PM_{2.5}对HUVECs的毒性作用及其影响内皮细胞衰老的潜在机制展开研究。并进一步探究枸杞多糖(Lycium barbarum polysaccharide, LBP)干预对PM_{2.5}诱导HUVECs细胞衰老的作用及其机制。**方法** 1. PM_{2.5}暴露对HUVECs的毒性作用: CCK-8实验检测不同浓度PM_{2.5}暴露对HUVECs的毒性作用, 12.5 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL为低中高剂量组; 相关试剂盒检测细胞氧化损伤指标的改变。2. LBP干预对PM_{2.5}暴露致HUVECs细胞衰老的影响: 试剂盒检测PM_{2.5}暴露后细胞β-半乳糖苷酶活性, 流式细胞仪检测细胞周期, RT-qPCR和Western Blot检测衰老相关分泌表型及衰老关键蛋白; 增加LBP组和LBP+PM_{2.5}组重复上述实验。3. LBP缓解细胞

自噬障碍减轻 PM_{2.5} 暴露诱导 HUVECs 的细胞衰老:检测 PM_{2.5} 暴露后细胞自噬相关蛋白的表达;腺病毒转染 LC3,共聚焦荧光显微镜观察自噬流变化。最后使用自噬抑制剂分别与 PM_{2.5} 共同处理 HUVECs,再检测自噬关键蛋白变化以评估细胞自噬障碍缓解情况,检测衰老标志蛋白表达水平以评估细胞衰老情况。**结果** 1. PM_{2.5} 暴露降低了 HUVECs 的细胞活力和增殖,增加 ROS、MDA、H₂O₂ 产生,抑制 SOD 活性。2. PM_{2.5} 暴露引起细胞衰老和自噬受损,LBP 干预后,降低 PM_{2.5} 引起的 β -半乳糖苷酶活性升高,抑制衰老相关蛋白表达;自噬相关蛋白和 mRNA 水平均有明显降低,自噬小体过度累积现象有所缓解。3. 利用自噬抑制剂与 PM_{2.5} 共处理,检测细胞衰老标志蛋白表达情况。结果提示 LBP 通过减少自噬小体过度积累从而缓解 HUVECs 细胞自噬障碍,进而缓解了细胞衰老的发生。**结论** 本研究探索 PM_{2.5} 暴露对血管内皮细胞的毒性和潜在机制,发现 PM_{2.5} 能够诱导 HUVECs 发生氧化应激和氧化损伤,引起自噬障碍导致细胞衰老的发生。LBP 干预后,减轻 PM_{2.5} 诱导的细胞毒性作用,缓解 HUVECs 细胞衰老,进一步研究指出,LBP 缓解细胞衰老可能是通过改善细胞自噬障碍实现的。本研究结果从环境毒理学和营养毒理学相结合的角度为大气污染防治提供了新的思路和方向。

关键词: PM_{2.5}; 血管内皮; 枸杞多糖; 细胞衰老; 自噬

通讯作者: 武 婧, E-mail:wujing88@suda.edu.cn