

# 实验性血小板微粒对葡聚糖硫酸钠 结肠炎小鼠肠黏膜通透性的影响

杨彬,李会会,张路遥,刘秋圆,王迪迪,胡静,韩玮,刘晓昌,梅俏

**摘要** **目的** 探讨血小板微粒(PMPs)对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎小鼠肠道炎症程度及肠黏膜通透性的影响。**方法** 实验分为正常对照组( $n=10$ , 饮用无菌蒸馏水+腹腔注射0.9%氯化钠溶液)、PMPs组( $n=10$ , 饮用无菌蒸馏水+腹腔注射PMPs)、DSS模型组( $n=10$ , 饮用DSS溶液+腹腔注射0.9%氯化钠溶液)、实验组( $n=15$ , 饮用DSS溶液+腹腔注射PMPs)。收集炎症性肠病(IBD)患者外周血制备PMPs悬液。小鼠自由饮用5% DSS溶液1周构建结肠炎模型,连续7 d腹腔注射PMPs,每天记录疾病活动指数(DAI)评分,实验结束后取结肠标本,HE染色计算小鼠病理组织学评分(HI)评估肠道炎症的严重程度,结肠匀浆检测髓过氧化物酶(MPO)、中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)、组蛋白H3(citH3)及游离DNA水平,透射电镜观察肠黏膜结构,采用异硫氰酸荧光素-葡聚糖(FITC-D)法检测肠黏膜通透性。**结果** 与正常对照组相比,PMPs组小鼠结肠黏膜水肿、上皮结构破坏严重、炎细胞广泛聚集,总体HI升高( $P<0.01$ );PMPs组小鼠结肠组织匀浆IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等炎症因子水平升高( $P<0.05$ ),NETs表达增加( $P<0.05$ );PMPs组小鼠血浆FITC-D水平明显增高( $P<0.05$ ),肠黏膜通透性增加。与DSS组相比,实验组小鼠血浆FITC-D水平更高( $P<0.05$ )、电镜下结肠上皮损伤更重。**结论** PMPs可在小鼠体内诱导NETs形成,促进小鼠结肠炎症的产生,增加DSS结肠炎小鼠的肠黏膜通透性,加重肠道炎症。

**关键词** 炎症性肠病;血小板微粒;中性粒细胞胞外诱捕网;结肠炎;肠黏膜通透性

**中图分类号** R 573.9

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)08-1361-06  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.019

炎症性肠病(inflammatory bowel diseases, IBD)是一种病因和发病机制尚未完全明确的消化道慢性非特异炎症性疾病,遗传、环境、感染和免疫等多因素相互作用引起的肠道黏膜免疫异常是IBD发病

的重要环节。一般认为,病原相关分子模式和损伤相关分子模式(damage associated molecular pattern, DAMP)是致病因素激发肠道免疫炎症损伤的重要途径<sup>[1]</sup>。血小板微粒(platelet microparticles, PMPs)能够表达多种DAMP信号分子、参与机体的炎症免疫反应。多项研究<sup>[2-4]</sup>表明,IBD患者外周血PMPs水平显著升高且与疾病活动程度正相关。IBD患者损伤的肠道组织局部可见大量中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)形成<sup>[5]</sup>,而抑制NETs形成可以有效减轻结肠炎小鼠的结肠炎症病变,表明NETs在肠黏膜损伤机制中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。IBD患者高表达的PMPs可通过诱导NETs形成参与引发高凝状态和血栓形成<sup>[7]</sup>,而系统性硬化症相关研究中,血小板可通过释放含有HMGB1的PMPs途径激活中性粒细胞促进NETs的形成,进而促进疾病进展<sup>[8]</sup>。但在IBD中,PMPs是否通过诱导NETs的形成促进肠道炎症以及NETs对肠黏膜通透性的作用尚未见报道。该研究通过对DSS结肠炎小鼠腹腔注射PMPs,观察NETs的形成情况和结肠炎症及黏膜通透性的变化,以探讨PMPs作用于IBD结肠黏膜的可能机制,为IBD的病理生理机制研究提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 选取6~8周龄、体质量 $20.0\text{ g}\pm 2.0\text{ g}$ 的雄性C57BL/6小鼠,购自安徽省动物中心,将所有动物饲养于安徽医科大学动物实验中心SPF动物房,保持恒温恒湿、12 h/12 h光暗周期环境。

**1.2 主要试剂和仪器** 葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)、异硫氰酸荧光素-葡聚糖(fluorescein isothiocyanate dextran, FITC-D)和I型胶原购自美国Sigma公司;髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)、组蛋白H3(citH3)、白介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-10和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )ELISA试剂盒购自武汉新启迪生物科技有限公司;BCA法微量蛋白检测试剂盒购自南京建

2023-06-03 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82170564)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院消化内科,合肥 230022

作者简介:杨彬,女,主治医师;

梅俏,男,主任医师,教授,博士生导师,责任作者, E-

mail:meiqiao@hotmail.com

成生物工程研究所;枸橼酸盐缓冲液、EDTA 溶液和改良型台氏液(modified Tyrode's buffer, MTB)为实验室自行配制。MQX200 酶标仪购自美国 Biotek 公司,透射电子显微镜购自日本日立公司。

**1.3 PMPs 悬液制备** 采集 IBD 患者清晨肘静脉血 5 ml,枸橼酸钠管抗凝。样本立即 2 000 r/min 离心 5 min,收集上层富血小板血浆,进一步将富血小板血浆 4 000 r/min 离心 5 min 得到血小板沉淀,经枸橼酸盐缓冲液洗涤后重悬于 MTB 中。调整血小板悬液浓度为  $3 \times 10^8$ /ml,加入 I 型胶原(20 mg/ml)激活血小板,30 min 后加入 EDTA(20 mmol/l)中止活化,随后 2 000 r/min 离心 5 min(2 次)。收集上清液,20 000 r/min 离心 90 min,得到 PMPs 沉淀并悬浮于 MTB 中。BCA 法检测悬液 PMPs 浓度并稀释至 0.2  $\mu$ g/ml, -80  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

**1.4 动物分组、造模、给药和观察** 小鼠正常饮食 7 d 适应环境后,通过用 5% DSS 代替饮用水 7 d(从第 1 天到第 7 天)诱导实验性结肠炎。所有小鼠随机分为 4 组,每组 10 只:① 正常对照组(normal control, NC):正常饮水,腹腔注射生理盐水;② PMPs 组:正常饮水,腹腔注射 PMPs;③ DSS 组:DSS 饮水 + 腹腔注射生理盐水;④ 实验组:DSS 饮水 + 腹腔注射 PMPs。PMPs 每天注射 1 次(0.1 ml,浓度 0.2  $\mu$ g/ml),对照组注射同体积生理盐水。末次给药后麻醉、处死小鼠,收集肠道组织标本。每天定时对各组小鼠进行体质量称量、观察大便性状,并进行粪便隐血检测等,参照文献<sup>[9]</sup>进行疾病活动指数(disease activity index, DAI)统计。取远端结肠组织用 10% 甲醛固定,石蜡包埋,HE 染色,参照文献<sup>[9]</sup>对小鼠结肠进行病理组织学评分(histopathological index, HI)。

**1.5 结肠组织匀浆炎症因子及 NETs 水平检测** 取结肠黏膜组织在冷生理盐水中匀浆,离心后取上清液,按试剂盒说明进行 MPO、NE、citH3 与炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-10 和 TNF- $\alpha$  含量的测定,相对荧光定量法用于检测游离 DNA 含量。

**1.6 肠黏膜通透性检测** 小鼠禁食 8 h 后,按 500 mg/kg 对小鼠进行 FITC-D(浓度 125 mg/ml)灌胃操作,4 h 后对小鼠进行水合氯醛腹腔注射麻醉,经门静脉取血 100  $\mu$ l,立即用 1.9 ml Tris 液(50 mol/L)稀释,4 000 r/min 离心 10 min 后取上清液用酶标仪(激发波长 480 nm 和发射波长 530 nm)测定 FITC-D 含量<sup>[9]</sup>。

**1.7 肠黏膜超微结构透射电镜分析** 将小鼠肠黏

膜组织置于预冷的载玻片上,浸入 2.5% 戊二醛溶液后切成 0.5 ~ 1 mm<sup>2</sup> 小块,置于 2.5% 戊二醛溶液中 4  $^{\circ}$ C 固定 6 h。PBS 冲洗,1% 四氧化锇溶液固定,不同浓度乙醇梯度脱水后,置于 60  $^{\circ}$ C 恒温箱环氧树脂固化 48 h。超薄切片,枸橼酸铅染色,漂洗、干燥后使用透射电子显微镜观察肠黏膜组织结构。

**1.8 统计学处理** 采用 SPSS 21.0 软件进行分析,呈正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验与方差分析。计数资料以例数及百分比表示,组间比较采用卡方检验。非正态分布资料的比较采用 Wilcoxon 符号秩和检验。定量资料相关性分析采用 Pearson 法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 PMPs 对 DSS 结肠炎小鼠 DAI 评分和结肠病理损伤程度的影响** NC 组小鼠无血便和体质量下降等症状,结肠黏膜结构完整、腺体排列整齐、无炎性细胞浸润(图 1B)。DSS 组小鼠表现为体质量减轻,出现稀糊状大便和肉眼血便,DAI 和 HI 评分较 NC 组升高( $P < 0.01$ ,图 2);DSS 组小鼠光镜下可见结肠黏膜水肿增厚,肠黏膜上皮细胞损伤,部分腺体变形,杯状细胞减少,局部可见大量炎细胞浸润(图 1B)。以上表明 DSS 结肠炎小鼠模型构建成功。PMPs 组小鼠 DAI 评分与 NC 组接近,但 HI 评分升高( $P < 0.01$ ,图 2);结肠病理表现为肠黏膜局部水肿,腺体结构轻度变形,杯状细胞大致正常,局部可见炎细胞浸润(图 1B);提示 PMPs 可能具有一定的致炎作用。实验组小鼠血便等症状较 DSS 组重,DAI 和 HI 评分略高于 DSS 组,但差异无统计学意义。病理可见结肠黏膜肿胀、腺体结构受损、隐窝变形、炎性细胞广泛浸润(图 1B)。上述结果提示,PMPs 加重了 DSS 诱导的结肠炎。

**2.2 PMPs 对 DSS 结肠炎小鼠结肠炎症因子水平的影响** ELISA 法检测小鼠结肠组织匀浆中炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-10 及 TNF- $\alpha$  的表达水平,结果如图 3 所示。相较于 NC 组,PMPs 组、DSS 组及实验组促炎因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平均升高( $F = 242.226$ 、 $449.459$ , $P < 0.05$ );其中 DSS 组与实验组 TNF- $\alpha$  水平差异无统计学意义。

与 NC 组相比,PMPs 组、DSS 模型组及实验组 IL-10 均降低( $F = 104.062$ , $P < 0.05$ );其中 DSS 组与实验组 IL-10 水平差异无统计学意义。DSS 模型组小鼠经 PMPs 干预后,IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平升高( $P$

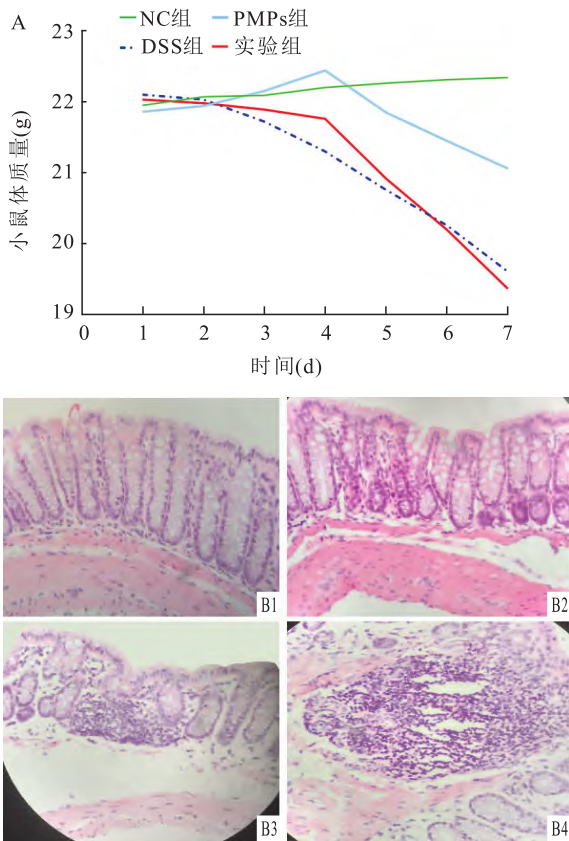


图1 实验性结肠炎小鼠体重及肠黏膜病理改变

A: PMPs对DSS结肠炎小鼠体重的影响; B: DSS结肠炎小鼠肠黏膜病理损伤 HE ×200; 1: NC组; 2: PMPs组; 3: DSS组; 4: 实验组

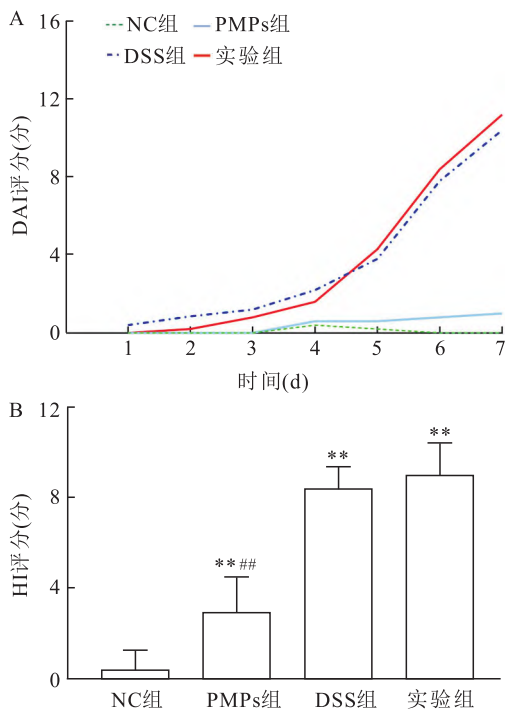


图2 PMPs对DSS结肠炎小鼠结肠DAI、HI评分的影响

A: DAI评分; B: HI评分; 与NC组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与DSS组比较: ## $P < 0.01$

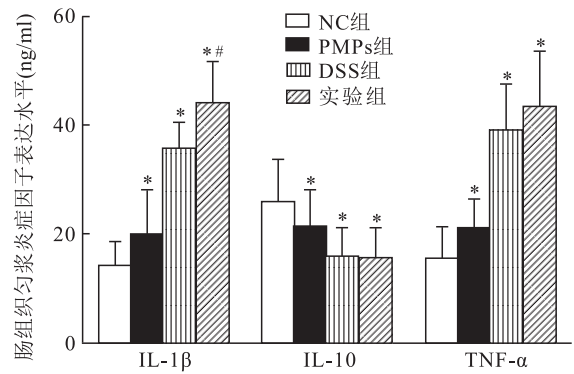


图3 PMPs对DSS结肠炎小鼠肠黏膜组织炎症因子表达水平的影响

与NC组相比较: \* $P < 0.05$ ; 与DSS组相比较: # $P < 0.05$

<0.05), IL-10水平差异无统计学意义。

### 2.3 PMPs对DSS结肠炎小鼠结肠NETs水平的影响

在共聚焦显微镜下无法直接观察到PMPs诱导DSS结肠炎小鼠形成NETs,故以小鼠结肠黏膜中检测NETs成分(MPO、NE和citH3)水平来反映NETs的形成。如图4所示,相较于NC组,DSS组MPO、NE和citH3水平稍增高( $P < 0.05$ ),游离DNA水平降低( $P < 0.05$ );PMPs组MPO、NE和citH3水平均升高( $P < 0.05$ )。与DSS组相比,实验组小鼠结肠组织MPO、NE和citH3表达水平增加,游离DNA表达水平降低( $P < 0.05$ )。结果提示PMPs诱导DSS结肠炎小鼠肠黏膜组织NETs形成。

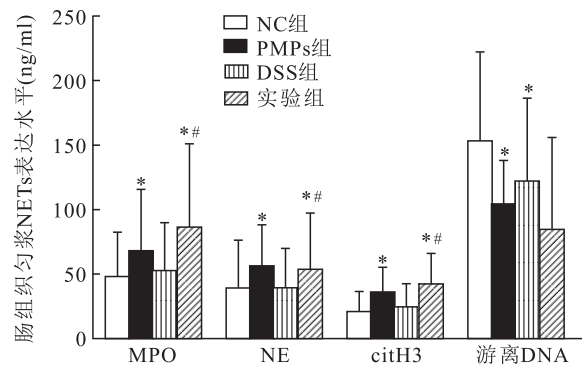


图4 PMPs对DSS结肠炎小鼠肠黏膜组织NETs成分表达水平的影响

与NC组比较: \* $P < 0.05$ ; 与DSS组比较: # $P < 0.05$

### 2.4 PMPs对DSS结肠炎小鼠肠黏膜通透性的影响

如图5所示,与NC组比较,PMPs组、DSS组和实验组小鼠血浆FITC-D水平更高( $P < 0.05$ );与DSS组比较,实验组小鼠的血浆FITC-D水平明显增高( $P < 0.05$ )。以上结果提示PMPs可增加小鼠肠

黏膜的通透性,可能进一步加重结肠炎症。

进一步使用透射电镜对小鼠结肠黏膜超微结构进行观察,如图6所示。NC组小鼠结肠黏膜微绒毛较长,排布紧密有序,细胞间连接结构完整(图6A);PMPs组可见肠微绒毛轻度萎缩,局部排列变稀疏,细胞连接结构尚清晰,紧密程度轻度降低(图6B);DSS组可见结肠微绒毛明显萎缩甚至缺失,细胞间连接复合体缩短变宽,细胞间隙扩大,部分紧密连接开放(图6C)。与DSS组相比,实验组小鼠同样出现微绒毛萎缩缺失,排列稀疏,细胞间隙增大,但细胞连接结构更加模糊(图6D)。以上结果提示PMPs可能加重DSS结肠炎小鼠结肠黏膜屏障结构的损伤,增加肠黏膜通透性。

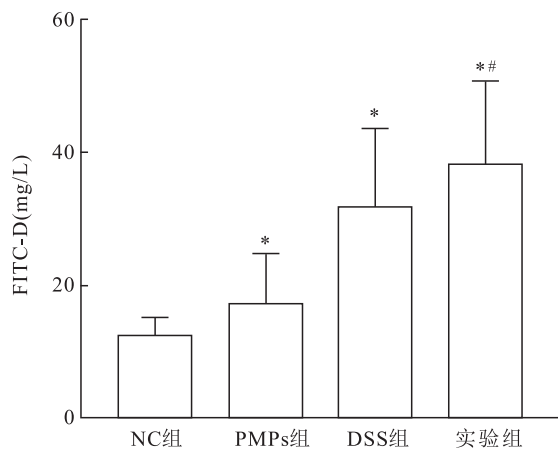


图5 PMPs对DSS结肠炎小鼠肠黏膜通透性的影响  
与NC组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与DSS组比较: #  $P < 0.05$

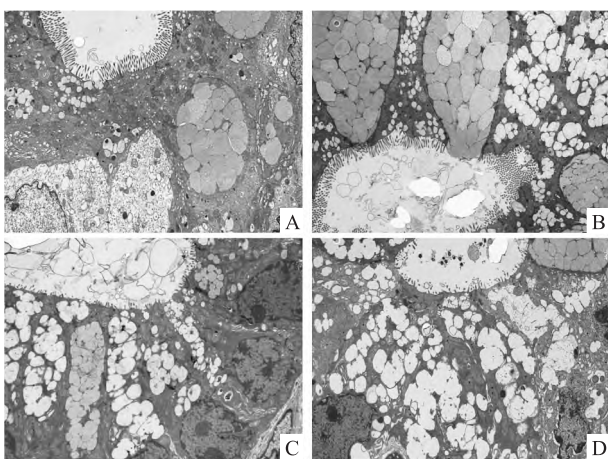


图6 小鼠肠黏膜超微结构图  $\times 2000$

A: NC组; B: PMPs组; C: DSS组; D: 实验组

### 3 讨论

IBD发病机制尚不十分明确,目前认为肠黏膜

屏障损伤和肠道菌群紊乱具有重要作用。肠黏膜通透性增加,细菌和内毒素等致病因素通过病原相关分子模式和DAMP激发免疫反应和炎症损伤。其中,DAMP多来源于机体组织或细胞损伤释放的信号分子,通过识别细胞中的PRR受体,诱导炎症和免疫损伤的发生<sup>[10]</sup>。研究<sup>[8]</sup>表明,含有大量DAMP信号的细胞微粒与炎症免疫损伤过程密切相关。

PMPs是体内含量最高的细胞微粒,除了具有抗凝作用外,还兼具传递生物信息、参与炎症免疫反应的功能。大量研究<sup>[11-12]</sup>表明,PMPs可以参与血栓形成、触发炎症反应,在糖尿病、心血管疾病以及自身免疫性疾病中发挥重要作用。IBD发病常伴血小板增多,既往研究提示IBD患者存在PMPs表达上调<sup>[13]</sup>,研究<sup>[4]</sup>结果显示IBD患者循环和肠组织中PMPs的表达水平均与疾病活动程度正相关,且PMPs能够在体外诱导中性粒细胞形成NETs,这些结果提示PMPs可能通过诱导NETs形成参与肠道炎症活动。

NETs是由活化的中性粒细胞释放的纤维网状结构,含有NE、组蛋白H3、抗菌蛋白等高效抗菌成分,在糖尿病、动脉粥样硬化、自身免疫性疾病和癌症等疾病过程中均发挥重要作用<sup>[14]</sup>。在IBD活动期,患者体内PMPs水平升高,并通过与中性粒细胞作用形成NETs,加重结肠组织损伤,触发血栓形成<sup>[7, 15]</sup>。本研究在构建DSS结肠炎小鼠的基础上,通过PMPs腹腔注射,发现PMPs可以加重小鼠的结肠炎症。通过电镜和FITC-D检测,发现PMPs干预后小鼠肠上皮细胞损伤加重,表现为炎细胞广泛浸润、腺体破坏、细胞间连接疏松,肠黏膜通透性增加。本研究未能在结肠免疫荧光实验中直接观察到NETs形成,推测可能是由于NETs具有不稳定性 and 易分解性,肠道蠕动导致NETs清除速度较快,以及DSS结肠炎模型中结肠隐窝脓肿数量不足等原因。但实验组在注射PMPs后结肠黏膜组织匀浆MPO、NE及citH3等NETs成分含量的明显增加,间接反映小鼠结肠黏膜中NETs的形成,表明PMPs能够诱导NETs形成,增加DSS结肠炎小鼠的肠黏膜通透性。

该研究表明,PMPs可在小鼠体内诱导NETs形成,增加DSS结肠炎小鼠的肠黏膜通透性。但有关NETs对肠屏障功能的影响机制研究尚不深入,可能与其对肠上皮细胞的直接毒性作用和抑制炎症因子释放有关;PMPs如何与中性粒细胞相互作用诱导NETs形成、进而影响肠道黏膜免疫,仍需进一步研

究。

### 参考文献

- [1] Gong T, Liu L, Jiang W, et al. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases[J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(2): 95–112.
- [2] Puhm F, Boilard E, Machlus K R. Platelet extracellular vesicles: beyond the blood[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2021, 41(1): 87–96.
- [3] 伍浩,徐美华.血小板活化与炎症性肠病[J].中南大学学报(医学版),2019,44(8):931–4.
- [4] 杨彬,李会会,王兵兵,等.炎症性肠病中血小板微粒改变的临床研究[J].中华消化杂志,2020,40(7):466–73.
- [5] Drury B, Hardisty G, Gray R D, et al. Neutrophil extracellular traps in inflammatory bowel disease: pathogenic mechanisms and clinical translation[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021, 12(1): 321–33.
- [6] Li T, Wang C, Liu Y, et al. Neutrophil extracellular traps induce intestinal damage and thrombotic tendency in inflammatory bowel disease[J]. *J Crohns Colitis*, 2020, 14(2): 240–53.
- [7] Dinallo V, Marafini I, Di Fusco D, et al. Neutrophil extracellular traps sustain inflammatory signals in ulcerative colitis[J]. *J Crohns Colitis*, 2019, 13(6): 772–84.
- [8] Maugeri N, Capobianco A, Rovere-Querini P, et al. Platelet microparticles sustain autophagy-associated activation of neutrophils in systemic sclerosis[J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(451): eaao3089.
- [9] Bai B, Li H, Han L, et al. Molecular mechanism of the TGF- $\beta$ /Smad7 signaling pathway in ulcerative colitis[J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(4):116.
- [10] Zindel J, Kubes P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in immunity and sterile inflammation[J]. *Annu Rev Pathol*, 2020, 15: 493–518.
- [11] Qu M, Zou X, Fang F, et al. Platelet-derived microparticles enhance megakaryocyte differentiation and platelet generation via miR-1915-3p[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4964.
- [12] Bernard N J. HMGB1 + platelet microparticles damage the endothelium[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2018, 14(9): 499.
- [13] Huang B, Chen Z, Geng L, et al. Mucosal profiling of pediatric-onset colitis and IBD reveals common pathogenesis and therapeutic pathways[J]. *Cell*, 2019, 179(5):1160–76. e24.
- [14] Mutua V, Gershwin L J. A review of neutrophil extracellular traps (NETs) in disease: potential anti-NETs therapeutics[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2021, 61(2): 194–211.
- [15] Gottlieb Y, Elhasid R, Berger-Achituv S, et al. Neutrophil extracellular traps in pediatric inflammatory bowel disease[J]. *Pathol Int*, 2018, 68(9): 517–23.

## Effects of platelet microparticles on intestinal mucosal permeability in mice with DSS colitis

Yang Bin, Li Huihui, Zhang Luyao, Liu Qiuyuan, Wang Didi, Hu Jing, Han Wei, Liu Xiaochang, Mei Qiao  
(Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the effect of platelet particles on the extent of intestinal inflammation and intestinal mucosal permeability in mice with dextran sodium sulfate induced colitis. **Methods** The experiment was divided into four groups: normal control group ( $n = 10$ , drinking sterile distilled water + intraperitoneal injection of 0.9% sodium chloride solution), PMPs group ( $n = 10$ , drinking sterile distilled water + intraperitoneal injection of PMPs), DSS model group ( $n = 10$ , drinking DSS solution + intraperitoneal injection of 0.9% sodium chloride solution), and experimental group ( $n = 15$ , drinking DSS solution + intraperitoneal injection of PMPs). Peripheral blood-derived PMPs suspension was collected from inflammatory bowel disease (IBD) patients. A colitis model was constructed in mice by allowing them to freely drink a 5% DSS solution for 1 week, followed by continuous intraperitoneal injection of PMPs for 7 days. Disease activity index (DAI) scores was recorded daily and the severity of intestinal inflammation with histopathological scores (HI) was assessed by HE staining of colon samples at the end of the experiment. Myeloperoxidase (MPO), neutrophil elastase (NE), citrullinated histone H3 (citH3), and free DNA levels were measured in colon homogenate, observe intestinal mucosal structure by transmission electron microscopy, and intestinal permeability was tested using fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-D). **Results**

Compared with the normal control group, the colonic mucosa of mice in the PMPs group showed edema, severe destruction of epithelial structure, extensive aggregation of inflammatory cells, and increased overall HI score ( $P < 0.01$ ); the levels of inflammatory factors such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in colonic tissue homogenates of mice in the PMPs group increased ( $P < 0.05$ ), and the expression of NETs increased ( $P < 0.05$ ); the plasma FITC-D level of

# 达格列净在 ox-LDL 诱导形成的 THP-1 源性泡沫细胞焦亡中的作用

龚才伟<sup>1,2</sup>, 赵广建<sup>1,2</sup>, 刘大男<sup>1,2</sup>, 欧航君<sup>1,2</sup>, 赵权威<sup>1,2</sup>, 李 辉<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 探讨达格列净(DAPA)在氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导形成的人髓系白血病单核细胞(THP-1)源性泡沫细胞焦亡中的作用。方法 通过 ox-LDL 诱导 THP-1 源性巨噬细胞构建 THP-1 源性泡沫细胞焦亡模型。设置实验分组为:空白对照(NC)组、ox-LDL 组和药物干预(ox-LDL + DAPA)组;以油红 O 法检测巨噬细胞泡沫化水平;细胞增殖与毒性检测试剂盒(CCK-8)检测 DAPA 对泡沫细胞活力的影响;Hoechst 33342/PI 双染检测 THP-1 源性泡沫细胞焦亡;细胞免疫荧光双染检测 DAPA 对泡沫细胞焦亡中焦亡关键因子 Caspase-1 表达的影响;采用微量酶标法检测细胞培养基中乳酸脱氢酶(LDH)活性;采用 qRT-PCR 和 Western blot 分别检测核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、消皮素 D(GSDMD)、白细胞介素(IL)-18、IL-1 $\beta$  mRNA 和蛋白表达水平。结果 CCK-8 法检测结果提示 DAPA 的最佳干预浓度为 10  $\mu$ mol/L;油红 O 染色结果提示 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞焦亡模型构建成功;与 NC 组比较,ox-LDL 组中 NLRP3、Caspase-1、ASC、GSDMD、IL-18、IL-1 $\beta$  mRNA 和蛋白表达水平均升高( $P < 0.05$ ),碘化丙啶(PI)阳性细胞数及 LDH 活性增加( $P < 0.05$ ),Caspase-1 的荧光强度增强,细胞胞质内的红色脂滴增多;予 DAPA 干预后,ox-LDL + DAPA 组中前述焦亡相关因子的 mRNA 和蛋白表

达水平均降低(均  $P < 0.05$ ),PI 阳性细胞数及 LDH 活性降低( $P < 0.05$ ),Caspase-1 的荧光强度减弱,细胞胞质内的红色脂滴减少( $P < 0.05$ )。结论 DAPA 对 ox-LDL 诱导形成的 THP-1 源性泡沫细胞焦亡具有抑制作用。

**关键词** 达格列净;人髓系白血病单核细胞;泡沫细胞;细胞焦亡;氧化低密度脂蛋白

**中图分类号** R 541.4

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)08-1366-08  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.020

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是动脉血管壁脂质聚积的慢性炎症性疾病<sup>[1]</sup>,严重危害人类健康,是心血管疾病致死、致残的主要病因。巨噬细胞是 AS 斑块的主要组成细胞,既能吞噬脂质形成泡沫细胞,又能分泌多种促炎细胞因子来维持局部炎症反应,进而导致斑块的不稳定<sup>[2-3]</sup>。细胞焦亡是一种与炎症相关的新型程序性细胞死亡,最初发现于巨噬细胞,其发生机制主要分为依赖于半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶(cystein-containing aspartate-specific protease, Caspase)-1 的经典途径和依赖于 Caspase-4/5/11 的非经典途径<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>表明,细胞焦亡在 AS 的发生和发展中起重要作用。目前,临床上用于调脂、稳定斑块的抗 AS 药物主要是他汀类药物,其不良反应多,规律用药后仍难以有效终止 AS 的进展。研究<sup>[6]</sup>证实,达格列净(dapagliflozin, DAPA)可减轻 AS、减少巨噬细胞的浸润,并增强斑块的稳定性,但其作用机制不明。该研究拟通过 ox-LDL 诱导 THP-1 源性巨噬细胞构建 THP-1 源性泡沫细胞焦亡模型,探讨 DAPA 对 THP-1 源性泡沫细胞焦亡的调控作用,为 DAPA 用于防治 AS 及

2023-06-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81660083);贵州省科技计划项目(编号:黔科合平台人才[2020]5014);贵州省高层次创新型人才培养计划项目(编号:黔科合人才[2015]4026号)

作者单位:<sup>1</sup>贵州医科大学附属医院内科,贵阳 550004

<sup>2</sup>贵州医科大学医学科学研究所,贵阳 550004

作者简介:龚才伟,男,硕士研究生;

刘大男,女,教授,主任医师,硕士生、博士生导师,责任作者, E-mail: Liudanan2000@sina.com

mice in the PMPs group significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the permeability of intestinal mucosa increased. Compared with the DSS group, the experimental group mice had higher plasma FITC-D levels ( $P < 0.05$ ) and more electron microscopic colonic epithelial damage. **Conclusion** PMPs induces NETs formation in mice, promotes colonic inflammation in mice, increases intestinal mucosal permeability and aggravates intestinal inflammation in mice with DSS colitis.

**Key words** inflammatory bowel disease; platelet microparticles; neutrophil extracellular trap; colitis; intestinal permeability