

259-262.

- [14] 胥煥, 杨春燕, 许平. 出生体重 < 1 500 g 早产儿静脉营养疗效及并发症观察[J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31(11): 1395-1400.
- [15] 范丽莉, 刘翠青, 孙立新. 呼吸窘迫综合征早产儿红细胞天然免疫功能变化[J]. 中国新生儿科杂志, 2011, 26(4): 229-231.
- [16] BAILEY SEAN M, HENDRICKS-MUNOZ KAREN D, MALLY PRADEEP. Splanchnic-cerebral oxygenation ratio as a marker of preterm infant blood transfusion needs [J]. Transfusion, 2012, 52(2): 252-260.
- [17] STRITZKE A I, SMYTH J, SYNNESE A, et al. Transfusion-associated necrotizing enterocolitis in neonates [J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2013, 98(1): 10-14.
- [18] PATEL R M, KNEZEVIC A, SHENVI N, et al. Association of red blood cell transfusion, anemia, and necrotizing

enterocolitis in very low-birth-weight infants [J]. JAMA, 2016, 315(9): 889-897.

- [19] 赵洁, 孙天松. 母乳对婴儿肠道菌群及免疫系统影响的研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(1): 289-296.
- [20] HENSCH L A, INDRIKOV S A J, SHATTUCK K E. Transfusion in extremely low-birth-weight premature neonates: current practice trends, risks, and early interventions to decrease the need for transfusion [J]. Neo Reviews, 2015, 16(5): 287-296.
- [21] HWANG J S, REHAN V K. Recent advances in bronchopulmonary dysplasia: pathophysiology, prevention, and treatment [J]. Lung, 2018, 196(2): 129-138.
- [22] 徐春彩, 朱佳骏, 朱以琳, 等. 极低出生体质量儿输血相关危险因素分析[J]. 临床儿科杂志, 2017, 35(9): 641-644.

(收稿日期: 2021-09-12 修回日期: 2022-01-21)

• 短篇论著 •

## RNF5 介导 JAMP 泛素化促进内质网应激和细胞凋亡参与妊娠期糖尿病发展的机制研究\*

丁转南<sup>1</sup>, 黄丽珊<sup>1</sup>, 欧宜静<sup>1</sup>, 黄素然<sup>1</sup>, 黄文<sup>1△</sup>, 禩文婷<sup>2</sup>

南方医科大学附属东莞医院: 1. 妇产科; 2. 内分泌科, 广东东莞 523000

**摘要:**目的 探讨环指蛋白 5(RNF5)通过介导 JNK 相关膜蛋白(JAMP)泛素化促进内质网应激和细胞凋亡,参与妊娠期糖尿病(GDM)疾病进展过程的机制。方法 采用免疫印迹法检测 GDM 胎盘组织标本中 RNF5 蛋白的表达水平,并分析其表达水平与内质网应激标志分子: X 盒结合蛋白 1(XBP-1)、磷酸化真核翻译起始因子 2 $\alpha$ (p-eIF2 $\alpha$ )、真核翻译起始因子 2 $\alpha$ (eIF2 $\alpha$ )、C/EBP 同源蛋白(CHOP)表达水平的相关性。采用高糖环境培养 BeWo 细胞系建立体外 GDM 细胞模型, siRNA 干扰 RNF5 表达后测定内质网应激标志(XBP-1、p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$ 、CHOP)水平的变化。采用 CCK8 法与流式细胞仪分别检测细胞活力、凋亡情况。采用体外泛素化实验来观察 RNF5 对 JAMP 泛素化的调控作用;采用链脲佐菌素注射的方法构建 GDM 小鼠模型,同时采用尾静脉注射 siRNA-RNF5 的方法来进行干预,干预 4 周后观察小鼠体重变化与胰岛素抵抗情况,并于 4 周后处死小鼠取胎盘组织,测定内质网应激标志分子水平。结果 RNF5 蛋白质在 GDM 组胎盘组织中的表达水平显著高于对照组( $P < 0.05$ );内质网应激标志水平在 GDM 产妇胎盘组织内明显上调( $P < 0.05$ ),并且 RNF5 蛋白表达水平与内质网应激标志水平呈正相关( $P < 0.05$ )。高糖环境能够促进 BeWo 细胞发生内质网应激和凋亡、降低细胞活力( $P < 0.05$ ),而下调 RNF5 能够通过调控 JAMP 泛素化逆转以上过程( $P < 0.05$ );此外下调 RNF5 可减轻 GDM 模型小鼠胰岛素抵抗( $P < 0.05$ ),降低胎盘中的内质网应激标记水平。结论 下调 RNF5 表达能抑制 JAMP 泛素化介导的内质网应激并抑制细胞凋亡,从而延缓 GDM 的进展。

**关键词:**妊娠期糖尿病; 环指蛋白 5; JNK 相关膜蛋白; 泛素化; 内质网应激

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2022. 07. 024

**中图法分类号:** R36

**文章编号:** 1673-4130(2022)07-0876-06

**文献标志码:** A

妊娠期糖尿病(GDM)是妇女在妊娠期出现的糖尿病,全球发病率约占妊娠妇女总数的 17.8%<sup>[1]</sup>。GDM 会增加妊娠期其他并发症的发病风险,同时还可能增加胎儿死亡、生长受限的风险,因此需要对

GDM 采取积极干预措施,以免给母婴带来不良后果<sup>[2-3]</sup>。GDM 是一种机制复杂的疾病,涉及胰岛 B 细胞衰竭、胰岛素抵抗、氧化应激与机体炎症等多种病理因素<sup>[3]</sup>。越来越多的研究表明,这些病理因素存在

\* 基金项目:东莞市人民医院院内科研培育项目(K202020)。

△ 通信作者, E-mail: 13728328898@163.com。

本文引用格式:丁转南,黄丽珊,欧宜静,等. RNF5 介导 JAMP 泛素化促进内质网应激和细胞凋亡参与妊娠期糖尿病发展的机制研究[J].

密切相关,即都可能来自于内质网应激<sup>[4-6]</sup>。高血糖会干扰内质网的蛋白质折叠和运输功能,这导致多肽在内质网中积累,并损害胰岛素的分泌。环指蛋白 5 (RNF5)是 E3 泛素蛋白连接酶,主要存在于内质网与线粒体中,在脑、心、肝、胎盘、胰腺等多种人体组织中均有表达<sup>[7]</sup>。JNK 相关膜蛋白(JAMP)是一种将蛋白质招募到内质网的蛋白,近年来国外多项研究均报道了 RNF5 能将 JAMP 泛素化使其无法完成蛋白体招募和降解工作<sup>[8-10]</sup>。在错误折叠蛋白质无法完成降解清除而大量积累,会诱发内质网应激反应<sup>[11]</sup>。因此推测 RNF5 可能是通过介导 JAMP 泛素化而促进内质网应激,从而参与 GDM 发展,但目前国内外研究中仍无此方向的报道,于是本研究设计了从临床组织标本到体外细胞培养与动物模型实验,旨在探讨 GDM 中 RNF5 与内质网应激的关系,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 临床标本** 收集 2018 年 1 月至 2021 年 4 月于本院行剖宫产的 109 例 GDM 产妇的胎盘组织标本作为 GDM 组。所有产妇均符合 GDM 的诊断标准<sup>[12]</sup>,经 75 g 糖耐量实验测定 2 h 血清葡萄糖水平  $>9.0$  mmol/L;所有产妇均为单胎妊娠、凝血功能均正常;排除合并遗传性疾病、其他器质性疾病者及肿瘤患者。另外,收集同期的 83 例健康产妇胎盘组织标本作为对照组。本研究经本院伦理委员会审批,且所有纳入研究的产妇均对本研究知情同意。本研究中,GDM 产妇年龄为  $(27.32 \pm 4.29)$  岁,平均分娩孕周为  $(39.32 \pm 2.69)$  周;健康产妇年龄为  $(27.18 \pm 4.52)$  岁,平均分娩孕周为  $(39.72 \pm 2.33)$  周。GDM 产妇和健康产妇年龄、分娩孕周比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**1.2 细胞与实验动物** 人妊娠绒毛膜癌细胞系 BeWo(货号:CL-0500)与人胚肾细胞 HEK-293(货号:CL-0001)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司,采用 MEM 培养基(添加 10% 胎牛血清和 1% 链霉素/青霉素)培养,置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下培养。SPF 级 Balb/c 小鼠 36 只购自南方医科大学实验动物中心,其中雌性 24 只,雄性 12 只,6~8 周龄,体重为  $(24.15 \pm 2.62)$  kg,雌雄比例为 2:1。合笼饲养,每日早晨检查雌鼠阴栓,出现阴栓立即进行阴超检查,将 7 d 内出现妊娠症状的小鼠作为实验对象(本研究得到了 15 只)。动物的饲养与处理均符合实验动物伦理学要求。

## 1.3 方法

**1.3.1 蛋白免疫印迹法检测蛋白水平** 将组织标本/细胞裂解后,提取总蛋白,BCA 试剂盒对总蛋白质进行定量,经电泳、转膜、封闭、抗体孵育后,采用 ECL 化学发光试剂盒进行显色,凝胶成像分析仪拍照后计算蛋白相对表达水平。检测的蛋白包括内质网应激

标志分子:X 盒结合蛋白 1(XBP-1)、磷酸化真核翻译起始因子 2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ )、真核翻译起始因子 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ )、C/EBP 同源蛋白(CHOP),以及 RNF5。

**1.3.2 GDM 模型细胞构建** 采用体外高糖刺激 BeWo 细胞来模拟 GDM 胎盘组织细胞,在体外构建 GDM 模型细胞。将对数生长期的 BeWo 细胞分为正常对照组、模型对照组、siRNA-NC 组、siRNA-RNF5 组。正常对照组在葡萄糖浓度为 5 mmol/L 的培养基中培养。其余 3 组均采用葡萄糖浓度为 25 mmol/L 的培养基进行培养;其中,模型对照组不进行转染;siRNA-NC 和 siRNA-RNF5 组在培养 24 h 后进行转染;采用 Lipofectamin2000 转染试剂盒,将 50 nmol/L siRNA-NC、siRNA-RNF5(由上海吉玛制药公司合成)分别转染至对数生长期的 siRNA-NC 组、siRNA-RNF5 组细胞。

**1.3.3 细胞活力与凋亡检测** 将细胞接种于 96 孔板,继续培养 48 h,CCK-8 法测定细胞活力,每孔加入 10  $\mu$ L CCK8 试剂,37 °C 孵育 2 h,酶标仪测定 450 nm 波长的吸光度(A)值,计算细胞活力;采用 Annexin-V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒测定细胞凋亡率,取 100  $\mu$ L 细胞悬液和 Annexin-V-FITC/PI 于黑暗环境下孵育 15 min 后,采用流式细胞仪进行检测。

**1.3.4 体外泛素化实验** 将 FLAG-JAMP 和 siRNA-CN(或 siRNA-RNF5)转染至 HEK 293 细胞,对照组细胞不进行转染。细胞转染 42 h 后加入泛素蛋白酶抑制剂 MG132,孵育 6 h 后收集细胞,加入 500  $\mu$ L 细胞裂解液于 4 °C 裂解后取上清液,留取 40  $\mu$ L 作为 Input 标本,剩余部分加入 20  $\mu$ L 抗-FLAG 磁珠于 4 °C 过夜,低速离心弃上清,再加入 1 mL 细胞裂解液 4 °C 低速离心弃上清,重复几次后煮沸取上清液进行电泳,采用蛋白免疫印迹法检测蛋白质,方法同 1.3.1。

**1.3.5 构建 GDM 模型小鼠** 将 15 只孕鼠单笼喂养,3 只作为正常对照组,其余 12 只用于构建 GDM 模型。GDM 模型小鼠在禁食 12 h 后,经腹腔注射链脲佐菌素(湖南汇百待生物科技有限公司,批准文号:国药准字 H20020475)50 mg/kg,正常对照组则注射等量的枸橼酸钠缓冲液,4 h 后开放进食与饮水。7 d 后进行 2 g/kg 的口服葡萄糖耐量试验(OGTT),并检测空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)水平,计算稳态模型胰岛素抵抗指数(HOMA-IR), $HOMA-IR = FBG \times FINS / 22.5$ 。将  $FBG \geq 5.1$  mmol/L,且 FINS、HOMA-IR 均升高,则表示 GDM 模型构建成功。

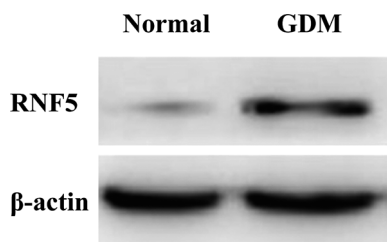
**1.3.6 siRNA-RNF5 干预 GDM 模型小鼠** 将成功构建 GDM 模型的 9 只小鼠平均分为 3 组(每组 3 只),分别作为模型对照组、siRNA-NC 组与 siRNA-RNF5 组。分别将 20  $\mu$ g siRNA-NC、siRNA-RNF5 溶于 2.5 mL 生理盐水中,经尾静脉分别注射入 siR-

NA-NC 组与 siRNA-RFN5 组小鼠,模型对照组则注射等体积生理盐水,干预 4 周。在干预期间检测和记录小鼠体重、FBG、FINS 水平并计算 HOMA-IR。在干预 4 周后处死小鼠,取出胎盘组织,检测 RNF5 与内质网应激分子的表达情况。

**1.4 统计学处理** 采用 PRISM8.0 进行数据的统计分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验,相关性采用 Pearson 相关性分析, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 两组胎盘组织中 RNF5 的表达情况比较** GDM 组 RNF5 相对表达水平高于对照组 ( $0.25 \pm 0.09$  vs.  $0.12 \pm 0.05$ ,  $t = 9.616$ ,  $P < 0.001$ ),见图 1。



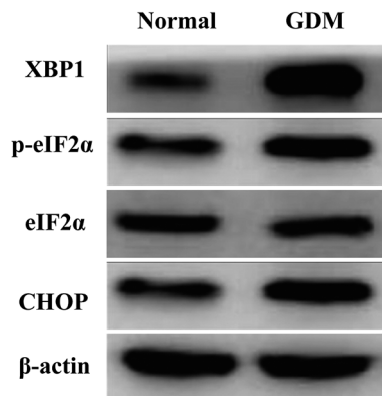
注:Normal 表示对照组;GDM 表示 GDM 组。

图 1 蛋白免疫印迹法检测产妇胎盘组织中 RNF5 蛋白表达情况

**2.2 胎盘组织中内质网应激标志分子水平及其与 RNF5 表达的关系** GDM 组 XBP-1、CHOP 相对表达水平和 p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$  均高于对照组 ( $1.35 \pm 0.47$  vs.  $0.48 \pm 0.12$ ,  $0.81 \pm 0.33$  vs.  $0.41 \pm 0.18$ ,  $0.81 \pm 0.18$  vs.  $0.42 \pm 0.11$ ,  $t = 15.55, 10.00, 10.94$ ,  $P < 0.01$ ),见图 2。对 GDM 组上述应激标志水平与 RNF5 蛋白相对表达量进行相关性分析发现,RNF5 相对表达水平与 XBP-1、p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$ 、CHOP 均呈正相关 ( $r = 0.300, 0.450, 0.229$ ,  $P < 0.05$ )。

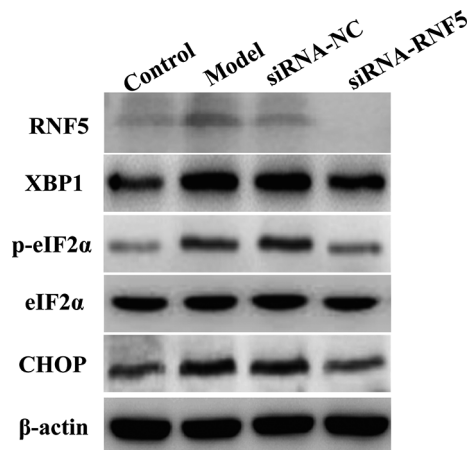
**2.3 下调 RNF5 表达对高糖环境下 BeWo 细胞内质网应激与细胞凋亡的影响** 模型对照组、siRNA-NC 组 RNF5 表达水平较高于正常对照组,且伴随着内质网应激标志 (XBP-1、CHOP、p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$ ) 水平的升高,而下调了 RNF5 表达的 siRNA-RNF5 组细胞上述内质网应激标志水平降低,见图 3。体外泛素化实验结果显示,下调 RNF5 表达减轻了 JAMP 泛素化程度,见图 4。此外 CCK8 法测得模型对照组较正常对照组活力降低 ( $0.72 \pm 0.05$  vs.  $1.253 \pm 0.10$ ,  $t = 8.499$ ,  $P = 0.001$ ),细胞凋亡率升高 [ $(13.32 \pm 0.74)\%$  vs.  $(1.24 \pm 0.06)\%$ ,  $t = 28.28$ ,  $P < 0.001$ ],而 siRNA-RNF5 组(下调 RNF5 表达)较 siRNA-NC 组细胞活力更高 ( $0.97 \pm 0.04$  vs.  $0.67 \pm 0.05$ ,  $t = 7.48$ ,  $P = 0.002$ ),凋亡率降低 [ $(6.72 \pm 0.68)\%$  vs.  $(14.58 \pm 1.25)\%$ ,  $t = 9.540$ ,  $P < 0.001$ ],见图 5。以上结果提示,在 GDM 细胞模型

中 RNF5 通过介导 JAMP 泛素化诱发了内质网应激和细胞凋亡。



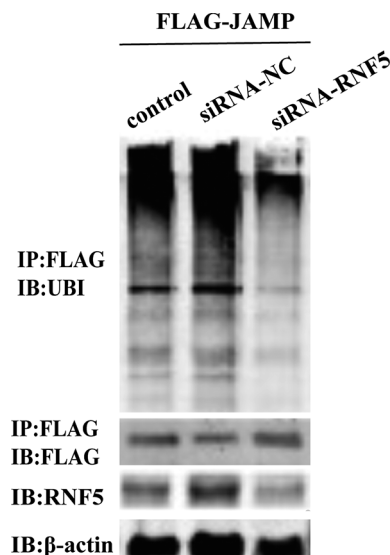
注:Normal 表示对照组;GDM 表示 GDM 组。

图 2 蛋白免疫印迹法检测两组胎盘组织中内质网应激标志分子的表达情况



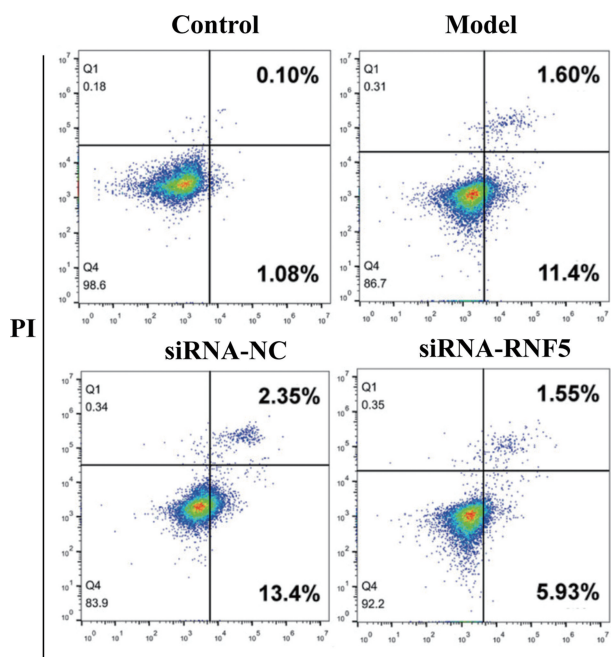
注:Control 表示正常对照组;Model 表示模型对照组;siRNA-NC 表示 siRNA-NC 组;siRNA-RNF5 表示 siRNA-RNF5 组。

图 3 蛋白免疫印迹法测定四组细胞内质网应激标志分子表达情况



注:Control 表示对照组;siRNA-NC 表示转染 siRNA-NC 的细胞;siRNA-RNF5 表示转染 siRNA-RNF5 的细胞;IP 表示免疫沉淀;IB 表示免疫印迹;UBI 表示泛素。

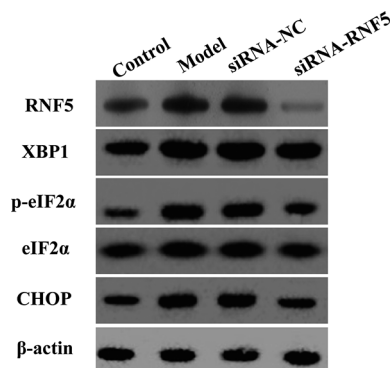
图 4 体外泛素化实验测定 JAMP 泛素化程度



注: Control 表示正常对照组; Model 表示模型对照组; siRNA-NC 表示 siRNA-NC 组; siRNA-RNF5 表示 siRNA-RNF5 组。

图 5 流式细胞仪测定细胞凋亡情况

**2.4 下调 RNF5 表达对 GDM 模型小鼠胰岛素抵抗与内质网应激的影响** GDM 模型建立 2、4 周时,模型对照组小鼠体重均低于正常对照组小鼠 ( $28.04 \pm 0.07$  vs.  $32.16 \pm 0.41$ ,  $31.00 \pm 0.66$  vs.  $37.93 \pm 0.30$ ,  $t = 17.157, 16.556$ ,  $P < 0.001$ ); 而 0、2 周与 4 周的 FBG 水平高于正常对照组 [ $(15.53 \pm 0.53)$  mmol/L vs.  $(5.02 \pm 0.10)$  mmol/L,  $(16.02 \pm 0.27)$  mmol/L vs.  $(5.12 \pm 0.04)$  mmol/L,  $(16.10 \pm 0.70)$  mmol/L vs.  $(5.09 \pm 0.27)$  mmol/L,  $t = 33.751, 69.169, 25.417$ ,  $P < 0.001$ ], HOMA-IR 也高于正常对照组 ( $5.80 \pm 0.37$  vs.  $2.07 \pm 0.21$ ,  $6.33 \pm 0.29$  vs.  $2.14 \pm 0.24$ ,  $7.12 \pm 0.17$  vs.  $2.02 \pm 0.19$ ,  $t = 15.186, 19.279, 34.648$ ,  $P < 0.001$ )。在 siRNA-RNF5 干预 2、4 周时, siRNA-RNF 组小鼠体重高于 siRNA-NC 组 [ $(27.90 \pm 0.26)$  g vs.  $(31.01 \pm 0.24)$  g,  $(31.31 \pm 0.40)$  g vs.  $(36.84 \pm 0.32)$  g,  $t = 15.224, 18.698$ ,  $P < 0.001$ ], 小鼠 FBG 水平 [ $(12.90 \pm 0.29)$  mmol/L vs.  $(16.18 \pm 0.43)$  mmol/L,  $(9.33 \pm 0.21)$  mmol/L vs.  $(16.11 \pm 0.20)$  mmol/L,  $t = 10.954, 40.494$ ,  $P < 0.001$ ] 与 HOMA-IR ( $4.54 \pm 0.16$  vs.  $6.38 \pm 0.33$ ,  $3.71 \pm 0.13$  vs.  $7.11 \pm 0.23$ ,  $t = 8.690, 22.290$ ,  $P < 0.001$ ) 也高于 siRNA-NC 组。GDM 模型对照组小鼠胎盘组织内 RNF5 表达水平升高, 伴随着内质网应激标志分子表达的增强, 而当 siRNA-RNF5 干预 4 周后, 小鼠胎盘组织中 RNF5 水平与内质网应激标志水平平均降低, 见图 6。以上结果提示下调 RNF5 表达可减轻 GDM 模型小鼠胰岛素抵抗与胎盘内的内质网应激。



注: Control 表示正常对照组; Model 表示模型对照组; siRNA-NC 表示 siRNA-NC 组; siRNA-RNF5 表示 siRNA-RNF5 组。

图 6 各组小鼠胎盘组织中 RNF5 与内质网应激标志分子的表达情况

### 3 讨论

胎盘是分泌多肽较多的器官, 容易受到内质网应激的影响, 在内质网应激状态下胎盘功能失调, 可能会改变母体新陈代谢的平衡, 并导致 GDM。国外研究已证明了胎盘内质网应激在妊娠并发症的病理生理学中的核心作用<sup>[13]</sup>。

本研究观察到, 与正常产妇胎盘组织相比, GDM 产妇胎盘组织中 RNF5 呈高表达, 同时伴随着内质网应激标志水平的升高, 且 RNF5 与内质网应激标志水平呈正相关, 提示 RNF5 可能通过诱发内质网应激来促进 GDM 发展。在细胞受到高糖环境刺激时, 内质网形态和功能受破坏, 蛋白质加工和运输受阻, 使得内质网积累了大量错折叠或未折叠蛋白, 引发细胞采取一系列应答措施来缓解内质网压力, 促进内质网功能恢复<sup>[14-15]</sup>。而由错误折叠或未折叠蛋白质在内质网腔内大量积累会引发一系列反应, 是糖尿病发生的重要病理机制<sup>[16-17]</sup>。在发生内质网应激时, 作为内质网传感器的 XBP-1 表达上调, XBP-1 是一种转录活化因子, 诱发细胞内未折叠蛋白反应 (UPR), 从而引发下游 eIF2 $\alpha$  磷酸化成为 p-eIF2 $\alpha$  并失活, 促使胞内蛋白质合成终止, 同时引起促凋亡分子 CHOP 表达增加<sup>[18-20]</sup>。

体外细胞实验证明, 高糖环境刺激 BeWo 细胞会导致 RNF5 与内质网应激标志水平升高、细胞凋亡率升高、细胞活力降低, 而下调 RNF5 能通过减轻 JAMP 泛素化降低高糖环境下的 BeWo 细胞内的内质网应激标志水平, 同时减少细胞凋亡, 增强细胞活力。JAMP 是锚定在内质网膜上的一种跨膜蛋白, 是多种蛋白复合体中的重要组件, 可促进内质网内的错误折叠蛋白的清除; RNF5 作为泛素化连接酶, 介导了 JAMP 的泛素化, 但是不影响 JAMP 的稳定性<sup>[8,10]</sup>。而 JAMP 泛素化后无法再组装内质网相关降解的蛋白复合体, 导致内质网功能的失调, 进而诱发了内质

网应激,促进了细胞凋亡<sup>[11]</sup>。

随后的研究探讨了下调 RNF5 是否在体内也能缓解内质网应激从而改善 GDM 症状,结果显示下调 RNF5 表达可减轻 GDM 模型小鼠胰岛素抵抗症状,同时可降低胎盘内的内质网应激分子表达水平。既往 LIONG 等<sup>[21]</sup>学者研究中对 GDM 模型采用内质网应激抑制剂来进行干预,发现 GDM 模型中的胰岛素抵抗得到了改善,明确证实了内质网应激在 GDM 发病中的重要作用。结合此文献结果,本研究可基本确定 RNF5 是通过诱导内质网应激与细胞凋亡来促进 GDM 进展的。

综上所述,GDM 产妇胎盘组织中 RNF5 表达水平存在异常升高,高 RNF5 水平通过泛素化 JAMP 诱发内质网应激与细胞凋亡,从而促进了 GDM 的发展,而下调 RNF5 表达水平可以逆转此过程,从而抑制 GDM 的进展。

## 参考文献

- [1] KIM S Y, SAPPENFIELD W, SHARMA A J, et al. Racial/ethnic differences in the prevalence of gestational diabetes mellitus and maternal overweight and obesity, by nativity, Florida, 2004-2007 [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2013, 21(1):33-40.
- [2] YUNG H W, ALNAS-KATJAVIVI P, JONES C J, et al. Placental endoplasmic reticulum stress in gestational diabetes: the potential for therapeutic intervention with chemical chaperones and antioxidants [J]. *Diabetologia*, 2016, 59(10):2240-2250.
- [3] SKORZYNSKA-DZIDUSZKO K E, KIMBER-TROJNAR Z, PATRO-MALYSZA J, et al. Heat shock proteins as a potential therapeutic target in the treatment of gestational diabetes mellitus: what we know so far [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10):3205.
- [4] VILLALOBOS-LABRA R, SUBIABRE M, TOLEDO F, et al. Endoplasmic reticulum stress and development of insulin resistance in adipose, skeletal, liver, and foetoplacental tissue in diabetes [J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 66:49-61.
- [5] LIONG S, LAPPAS M. Endoplasmic reticulum stress is increased in adipose tissue of women with gestational diabetes [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4):e0122633.
- [6] JIAO Y, ZHANG S, ZHANG J, et al. Tetramethylpyrazine attenuates placental oxidative stress, inflammatory responses and endoplasmic reticulum stress in a mouse model of gestational diabetes mellitus [J]. *Arch Pharm Res*, 2019, 42(12):1092-1100.
- [7] 孙士波, 罗壮, 杜晓华, 等. 血浆环指蛋白 5 检测在慢性阻塞性肺疾病中的意义 [J]. *昆明医科大学学报*, 2019, 40(6):109-113.
- [8] ROY S J, GLAZKOVA I, FRECHETTE L, et al. Novel, gel-free proteomics approach identifies RNF5 and JAMP as modulators of GPCR stability [J]. *Mol Endocrinol*, 2013, 27(8):1245-1266.
- [9] ADIR O, BENING-ABU-SHACH U, ARBIB S, et al. Inactivation of the *Caenorhabditis elegans* RNF-5 E3 ligase promotes IRE-1-independent ER functions [J]. *Autophagy*, 2021, 17(9):2401-2414.
- [10] TCHERPAKOV M, DELAUNAY A, TOTH J, et al. Regulation of endoplasmic reticulum-associated degradation by RNF5-dependent ubiquitination of JNK-associated membrane protein (JAMP) [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(18):12099-12109.
- [11] TCHERPAKOV M, BRODAY L, DELAUNAY A, et al. JAMP optimizes ERAD to protect cells from unfolded proteins [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(11):5019-5028.
- [12] 王昊, 漆洪波. 美国妇产科医师学会“妊娠期糖尿病指南(2017)”要点解读 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2018, 34(1):62-66.
- [13] LORENZON A R, MORELI J B, DE MACEDO MELO R, et al. Stromal cell-derived factor (SDF) 2 and the endoplasmic reticulum stress response of trophoblast cells in gestational diabetes mellitus and in vitro hyperglycaemic condition [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2021, 19(2):201-209.
- [14] He Y X, Shen Q Y, Tian J H, et al. Zonisamide ameliorates cognitive impairment by inhibiting ER stress in a mouse model of type 2 diabetes mellitus [J]. *Front Aging Neurosci*, 2020, 12:192.
- [15] WANG Z, DO CARMO J M, DA SILVA AA, et al. Mechanisms of synergistic interactions of diabetes and hypertension in chronic kidney disease: role of mitochondrial dysfunction and ER stress [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2020, 22(2):15.
- [16] ABDEL-GHAFFAR A, ELHOSSARY G G, MAHMOUD A M, et al. Potential prophylactic effect of chemical chaperones for alleviation of endoplasmic reticulum stress in experimental diabetic cataract [J]. *Bull Natl Res Cent*, 2019, 43:71.
- [17] 李鹤超, 陈莉明. 内质网应激对胰岛素抵抗和糖尿病的影响 [J]. *中国实用内科杂志*, 2008, 28(5):404-405.
- [18] SHA H, ZENG H, ZHAO J, et al. Mangiferin ameliorates gestational diabetes mellitus-induced placental oxidative stress, inflammation and endoplasmic reticulum stress and improves fetal outcomes in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 859:172522.
- [19] 鞠营辉. 黄芩甲苷对 2 型糖尿病肾病大鼠内质网应激诱导的肾小管上皮细胞凋亡的抑制作用 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2019.
- [20] GABALLAH H H, ZAKARIA S S, MWAIFY S E, et al. Mechanistic insights into the effects of quercetin and/or

GLP-1 analogue liraglutide on high-fat diet/streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 92: 331-339.

muscle from pregnant women[J]. Mol Cell Endocrinol, 2016, 425: 11-25.

[21] LIONG S, LAPPAS M. Endoplasmic reticulum stress regulates inflammation and insulin resistance in skeletal

(收稿日期: 2021-09-12 修回日期: 2021-12-28)

• 短篇论著 •

## 双歧四联活菌片通过调节肺腺癌患者肠道微生物 辅助抗肿瘤治疗的研究\*

龙瑜琴, 莫兰英, 高 潘<sup>△</sup>

重庆市大足区人民医院呼吸与危重症医学科, 重庆 402360

**摘要:**目的 探讨双歧四联活菌片通过调节肺腺癌患者肠道微生物辅助抗肿瘤治疗的效果。方法 选取 2018 年 1 月至 2019 年 12 月于该院确诊并进行治疗的肺腺癌患者 124 例, 根据数字表法随机分为观察组与对照组, 各 62 例。两组患者均采用吉西他滨联合顺铂的静脉化疗方案。观察组在此治疗方案基础上服用双歧四联活菌片进行治疗, 而对照组不使用双歧四联活菌片进行治疗。比较两组患者治疗前后的肠道菌群中乳酸菌、双歧杆菌、肠球菌、肠杆菌的水平; 对两组患者治疗前后的细胞免疫功能(以淋巴细胞亚群指标来反映)进行比较; 对两组患者治疗前后血清肿瘤标志物[肿瘤特异性生长因子(TSGF)、癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 72-4(CA72-4)]水平进行比较; 对两组患者用药期间的不良反应进行统计和比较。结果 治疗后对照组肠道菌群中的双歧杆菌水平低于治疗前( $P < 0.05$ ), 而肠球菌与肠杆菌水平高于治疗前( $P < 0.05$ ); 两组患者间比较, 除乳酸杆菌外, 其余 3 种细菌水平比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。治疗后两组的各项指标均比治疗前有所下降, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 观察组  $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 、低于对照组( $P < 0.05$ )。治疗后两组患者血清 TSGF、CEA、CA72-4 水平均较治疗前有所下降, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 观察组各项指标水平均低于对照组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。观察组中, 有 III~IV 级不良反应的患者共 6 例, 严重不良反应发生率为 9.68%(6/62); 对照组中, 有 III~IV 级不良反应的患者共 15 例, 不良反应发生率为 24.19%(15/62); 观察组严重不良反应发生率低于对照组( $\chi^2 = 7.142, P < 0.05$ )。结论 肺腺癌患者在化疗过程中服用双歧四联活菌片可以调节肠道微生物, 提高免疫力, 辅助抗肿瘤治疗, 同时用药的安全较好。

**关键词:** 双歧四联活菌片; 肺腺癌; 乳酸菌

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2022.07.025

**中图法分类号:** R446.6

**文章编号:** 1673-4130(2022)07-0881-04

**文献标志码:** A

肺腺癌是肺癌的一种, 占全部肺癌患者的 45% 左右<sup>[1]</sup>。因为肺腺癌早期一般无明显症状, 待患者出现症状再就诊时, 多数已处于中晚期, 已经错过了最佳的手术时机。放化疗、分子靶向及免疫治疗是目前中晚期肺腺癌的主要治疗方式<sup>[2]</sup>。铂类是一种在肺腺癌化疗中使用最为广泛的药物, 可以通过降低肿瘤活性、预防远处转移来提高患者近、远期生存率, 虽然 80% 以上的患者对化疗敏感, 但其耐药性的快速出现使得患者很少有可能被治愈。肺腺癌患者 5 年生存率不足 20%<sup>[3]</sup>。肠道菌群不仅可以影响炎症、免疫、代谢和组织发育, 同时与某些癌症的发病也有着密切联系<sup>[4]</sup>。双歧四联活菌片是由双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、粪肠球菌和蜡样芽孢杆菌 4 种益生菌组成的复合

制剂, 可以有效调节肠道菌群失衡<sup>[5]</sup>。有研究报道, 适当补充益生菌可给宿主带来健康, 益生菌对多种疾病的治疗发挥辅助作用<sup>[6]</sup>, 但益生菌对肺腺癌的治疗是否有益还鲜有报道。因此, 本研究将双歧四联活菌片用于辅助肺腺癌患者治疗, 对其调节肠道微生物, 辅助抗肿瘤治疗的效果进行了分析, 现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2018 年 1 月至 2019 年 12 月于本院确诊并进行治疗的肺腺癌患者 124 例, 根据数字表法随机分为观察组与对照组, 各 62 例。观察组: 男 29 例, 女 33 例; 年龄(56.72 ± 6.54)岁, 36~74 岁; 病理分期 III B 期 28 例, IV 期 34 例。对照组: 男 31 例, 女 31 例; 年龄(54.86 ± 5.49)岁, 38~71 岁; 病理分期 III

\* 基金项目: 重庆市科学技术局科卫联合医学科科研项目(2020FYYX053)。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: 260202706@qq.com。

本文引用格式: 龙瑜琴, 莫兰英, 高潘. 双歧四联活菌片通过调节肺腺癌患者肠道微生物辅助抗肿瘤治疗的研究[J]. 国际检验医学杂志,