

NADPH 氧化酶介导的 ROS 在特发性炎性肌病动物模型骨骼肌组织中的表达及意义^{*}

邓蕊 柴克霞 马苗

(青海大学附属医院风湿免疫科, 青海 西宁 810001)

【摘要】 目的 探讨 NADPH 氧化酶中的 NOX2 和 NOX4 介导的活性氧(ROS)在特发性炎性肌病(IIM)发病机制中的作用及意义。**方法** 将 14 只健康雌性 BALB/c 小鼠随机分为对照组($n=6$)和 EAM 组($n=8$), EAM 组小鼠采用豚鼠骨骼肌匀浆蛋白免疫诱导实验性自身免疫性肌炎动物模型。观察小鼠的体重变化、临床表现, 测定其血清肌酶水平、四肢肌力及骨骼肌组织病理改变; 并采用免疫组织化学法、分光光度法和 ELISA 法分别检测各组小鼠骨骼肌组织中 NOX2、NOX4、NADPH 及 ROS 的表达情况或含量。**结果** 与对照组相比, 末次免疫后 1 周 EAM 组小鼠体重下降, 差异有统计学意义($P<0.05$)。HE 染色结果显示, 对照组小鼠骨骼肌纤维大小、形态、结构基本正常, 有少量炎性细胞浸润, 未见肌纤维萎缩、变性、坏死; EAM 组小鼠骨骼肌纤维大小不一、粗细不等, 有大量炎性细胞浸润, 可见不同程度的萎缩、变性、坏死; EAM 组小鼠骨骼肌组织 HE 染色病理学评分显著高于对照组($P<0.05$)。与对照组相比, EAM 组小鼠骨骼肌组织中 NADPH 含量降低、ROS 含量升高($P<0.05$)。免疫组化染色结果显示, NOX2 和 NOX4 在 EAM 组小鼠骨骼肌组织中的表达均高于对照组($P<0.05$)。Pearson 相关分析结果显示, EAM 组小鼠骨骼肌组织中 ROS 的含量与 NOX2、NOX4 的免疫组化评分均呈正相关($P<0.05$), 而与 NADPH 的含量呈负相关($P<0.05$); EAM 组小鼠骨骼肌组织 HE 染色病理学评分与 NOX2、NOX4 的免疫组化评分及 ROS 的含量均呈正相关($P<0.05$), 而与 NADPH 的含量呈负相关($P<0.05$)。**结论** NADPH 氧化酶中的 NOX2 和 NOX4 可能通过消耗 NADPH 产生大量的 ROS, 导致组织细胞氧化性损伤并诱导铁死亡反应来参与 IIM 的发病; NADPH、NOX2、NOX4 和 ROS 有望成为新的评价 IIM 肌肉组织损伤程度的指标。

【关键词】 特发性炎性肌病; NADPH 氧化酶; 活性氧; NADPH; 实验性自身免疫性肌炎动物模型

【中图分类号】 R392.11; R593.26 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2022.08.003

Expression and significance of ROS mediated by NADPH oxidases in skeletal muscle tissues of animal model of idiopathic inflammatory myopathy

DENG Rui, CHAI Kexia, MA Miao

(Department of Rheumatology and Immunology, Qinghai University Affiliated Hospital, Xining 810001, China)

【Abstract】 Objective This study was performed to detect the expression of NADPH, ROS, NOX2 and NOX4 in the skeletal muscle tissues of experimental autoimmune myositis mice and investigate the role and significance of reactive oxygen species mediated by NADPH oxidases in the pathogenesis of Idiopathic Inflammatory Myopathy. **Methods** Fourteen healthy female BALB/c mice were randomly divided into control group and EAM group (6 in control group; 8 in EAM group), and guinea pig skeletal muscle homogenate was used to induce experimental autoimmune myositis in EAM group. We should observe the changes of weight and clinical manifestations and measure the serum creatinase level, limb muscle strength and skeletal muscle pathology of mice in each group. Then the contents of NADPH and ROS in mice skeletal muscle tissues of each group were detected by spectrophotometry and ELISA respectively, and the expressions of NOX2 and NOX4 were measured by immunohistochemistry. **Results** The results of HE staining showed that the size,

基金项目: 青海省科技厅应用基础研究科技计划项目(2019-ZJ-7094)

通信作者: 柴克霞, 主任医师, 硕士研究生导师, E-mail: chaikx@163.com

引用本文: 邓蕊, 柴克霞, 马苗. NADPH 氧化酶介导的 ROS 在特发性炎性肌病动物模型骨骼肌组织中的表达及意义[J]. 西部医学, 2022, 34

(8): 1102-1108. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2022.08.003

morphology and structure of skeletal muscle fibers in the control group were basically normal, with a small amount of inflammatory cell infiltration, and no muscle fibers atrophy, degeneration or necrosis. Skeletal muscle fibers of mice in the EAM group were different in size and thickness, with a large number of inflammatory cell infiltration and different degrees of atrophy, degeneration and necrosis. The histopathological scores of skeletal muscle of mice in the EAM group were significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the levels of NADPH were decreased ($P < 0.05$) and levels of ROS were increased ($P < 0.05$) in the skeletal muscle tissues of the EAM group. The expressions of NOX2 and NOX4 in skeletal muscle tissues of EAM group mice were higher than that of control group mice ($P < 0.05$). The contents of ROS in skeletal muscle tissues of mice in EAM group were positively correlated with the Immunohistochemical scores of NOX2 and NOX4 ($P < 0.05$), and negatively correlated with the contents of NADPH ($P < 0.05$). The pathological scores of HE staining in skeletal muscle tissues of mice in EAM group were positively correlated with the Immunohistochemical scores of NOX2 and NOX4 and the contents of ROS ($P < 0.05$), and negatively correlated with the contents of NADPH ($P < 0.05$). **Conclusion** NOX2 and NOX4 may induce ferroptosis by consuming NADPH and producing a large amount of ROS, and ferroptosis may be involved in the pathogenesis of IIM by promoting oxidative damage and accelerating inflammatory response. NADPH, NOX2, NOX4 and ROS may be new indicators to evaluate the degree of muscle tissues injury in IIM.

【Key words】 Idiopathic inflammatory myopathy; NADPH oxidases; Reactive oxygen species; NADPH; Experimental autoimmune myositis animal model

特发性炎性肌病 (Idiopathic inflammatory myopathy, IIM) 是一种以肌无力和肌肉炎症为特征的异质性疾病, 包括多发性肌炎、皮肌炎、包涵体肌炎、免疫介导的坏死性肌病和抗合成酶综合征^[1-2]; 其主要表现为肌无力、肌痛, 出现特征性皮疹, 血清肌酶水平升高, 肌肉活检显示肌纤维变性和再生、慢性单核细胞浸润及肌束周围萎缩^[3]。目前 IIM 发病机制仍不清楚, 多认为是遗传、环境、免疫机制和非免疫机制 (内质网应激、活性氧的产生、自噬调节异常、缺氧、血管新生) 等多因素相互作用的结果^[3]。国内外多采用兔或豚鼠骨骼肌匀浆免疫诱导实验性自身免疫性肌炎 (Experimental autoimmune myositis, EAM) 动物模型, 其操作简单、成本较低、建模效果好, 为研究 IIM 提供了良好的基础^[4-5]。

铁死亡是一种铁依赖性的, 以细胞内活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 累积为特征的调节性细胞死亡形式^[6]。参与铁死亡的 ROS 有多种产生来源, 除了铁介导的芬顿反应产生 ROS 外, 依赖 NADPH 的 NADPH 氧化酶 (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases, NOXs) 和谷胱甘肽的耗竭同样对 ROS 的产生起着重要作用^[7]。活性氧为一系列分子氧的衍生物, 主要包括非自由基 (H_2O_2 、 $ROOH$ 、 1O_2 、 O_3 、 $HOCl$ 、 $HOBr$) 和自由基 ($O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、 $ROO\cdot$ 、 $RO\cdot$)。适量的 ROS 可以促进细胞增殖、分化, 参与细胞信号通路的调节; 然而当 ROS 生成量超过机体调节能力时, 则会引起炎症反应、氧化应激, 从而导致细胞生理功能紊乱, 触发细胞损伤或死亡^[8]。研究表明, NOXs 是体内 ROS 的重要来源, 细胞通过依赖 NADPH 的电子还原系统将体内的氧

分子还原成超氧阴离子, 各种生长因子、细胞因子、炎症介质等刺激均可活化 NOXs, 消耗 NADPH, 产生大量的 ROS^[9]。NOXs 有 7 种亚型, 分别是 NOX1、NOX2、NOX3、NOX4、NOX5、DUOX1 及 DUOX2, 骨骼肌组织表达三种 NOXs 亚型 (NOX1、NOX2 和 NOX4), NOX1 在骨骼肌组织中的生理作用尚未明确, NOX2 和 NOX4 是骨骼肌组织中 ROS 的主要来源^[10]。有研究报道当骨骼肌组织肌管中产生大量 ROS 时可导致炎症细胞浸润, 线粒体功能障碍, 进而发生肌肉收缩功能失调、肌无力^[11-12]。NOXs 介导的 ROS 已被证实参与了代谢性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤、动脉粥样硬化等的发生、发展过程^[9, 13], 而在 IIM 中的作用尚不清楚。本研究通过检测 EAM 小鼠骨骼肌组织中 NADPH、NOX2、NOX4 和 ROS 的表达情况, 探讨 NOXs 中的 NOX2 和 NOX4 介导的 ROS 在 IIM 发生和发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及分组 豚鼠与 BALB/c 小鼠均购自西安科奥生物科技有限公司, 饲养于青海大学实验动物中心, 室内温度保持在 $22^\circ C \sim 25^\circ C$, 湿度 50% 左右, 明暗交替周期为 12 h, 每两日更换一次垫料以保持生存环境清洁干燥, 每日添加饲料并更换清洁水。健康雌性豚鼠 2 只, 体重 $300 \sim 350$ g, 用于制备豚鼠骨骼肌匀浆蛋白; 健康雌性 BALB/c 小鼠 7~8 周龄, 14 只, 体重 $18 \sim 22$ g。本研究通过动物伦理委员会审核批准。

1.1.2 主要试剂 本研究中所选用的试剂及抗体购自南京建成生物工程研究所、武汉赛维尔生物科技有限公司及武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 豚鼠骨骼肌匀浆蛋白的制备 5%水合氯醛麻醉豚鼠,在消毒条件下立即留取其四肢骨骼肌,冰浴条件下剔除神经、血管、筋膜等组织;称重后放入4℃预冷的PBS液中,使用无菌外科剪剪碎组织,按每20 mg组织加入150 uL裂解液的比例加入裂解液,放置30 min,冰水浴中用刀式匀浆机5000 rpm进一步破碎组织,每匀浆30 s停30 s,反复多次,直至组织破碎成糊状;用生理盐水稀释后经无菌纱布过滤,收集滤液,低温离心机15000 rpm,4℃离心15 min,取上清液采用BCA蛋白定量法测定蛋白浓度,用PBS液配置其终浓度为20 mg/mL,-80℃冰箱分装保存备用。

1.2.2 建立EAM小鼠模型及分组 造模成功的判定方法 末次免疫处理一周后,通过观察小鼠的临床表现进行临床评分、检测小鼠四肢的肌力、测量小鼠体重、测定血清CK水平以及对小鼠四肢骨骼肌组织HE染色结果进行病理评级来判定造模是否成功。①临床表现评分:观察小鼠毛发的变化、姿势的改变、声音的转变等。采用Lennon等^[14]临床表现评分方法:0分,无肌无力;1分,咬啮/喊叫无力;2分,休息时体位隆起,头下垂,前肢屈曲,行走震颤;3分,严重肌无力,无喊叫,体重减轻,严重的有肌肉萎缩、呼吸困难、濒于死亡(表现居中者分别评分为0.5、1.5、2.5分)。②小鼠肌力测定^[15]:用翻转屏(一个50 cm²铁丝网,由直径为1 mm的金属丝组成网眼大小为12 mm²的屏障)测定肌力,将小鼠放在该铁丝网屏障中央,立即倒置屏障,使小鼠的头部下降,屏障平稳地置于垫子上方约20 cm,秒表记录小鼠掉落前持续的时间,每只小鼠连续测定5次,取平均值作为该小鼠的肌力测定值,时间越短提示肌力越差。③肌肉病理分级:依据Matsumoto等^[16]肌肉组织HE染色病理学分级标准:0级,未发现病灶;1级,累及1~5个纤维;2级,累及6~30个纤维;3级,累及整个肌纤维束;4级,累及超过一个肌纤维束或整块肌肉组织(1级记1分;肌肉病变居中者可增加0.5分)。由2名经验丰富的病理专科医师采用双盲法对每只小鼠四肢的四块肌肉组织的HE染色结果进行评分,取平均值作为每只小鼠的组织病理学得分。EAM组小鼠在背部脊柱旁、尾根部及左右后肢皮下多点注射免疫混悬液(0.25 mL豚鼠骨骼肌匀浆蛋白与0.25 mL完全弗氏佐剂的混悬液),每周1次,连续注射6周,前三周免疫处理的同时腹腔注射百日咳毒素500 ng(用200 μL生理盐水稀释)。对照组小鼠在相同条件下相同部位注射同等剂量的对照混悬液(0.25 mL无菌生理盐水与0.25 mL完全弗氏佐剂的混悬液),每周1次,共注射6次。对

照组6只,体重(20.25±1.29)g;EAM组8只,体重(20.48±1.13)g。两组小鼠体重比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2.3 标本的采集与处理 ①血清标本:于末次免疫一周后,测量各组小鼠体重,按0.1 mL/10 g给予5%水合氯醛进行腹腔注射麻醉,经眼球取血,采血过程避免溶血,使用EP管留存1 mL,随后低温离心机3000 rpm,4℃离心10 min,离心后分离血清,采用全自动生化分析仪检测血清肌酸激酶(CK)水平。②肌肉标本:经眼球取血后,留取四肢骨骼肌,剔除神经、血管及筋膜,一部分组织置于4%多聚甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋、制片,用于免疫组织化学法检测NOX2和NOX4及HE染色;另一部分组织立即置于液氮中冷冻数秒,随后进行组织匀浆,用于分光光度法及ELISA法分别检测NADPH和ROS。

1.2.4 HE染色检测两组小鼠骨骼肌组织病理改变 石蜡切片脱蜡脱苯至水,经苏木素染色、盐酸分化、伊红染色后,脱水透明封片,光镜下观察骨骼肌组织病理改变。

1.2.5 分光光度法检测两组小鼠骨骼肌组织中NADPH的含量 称取约0.1 g组织加入1 mL碱性提取液,冰浴研磨,95℃水浴5 min(盖紧防止水分散失),冰浴中冷却后,10000g 4℃离心10 min;取上清液至另一新的离心管中,加入等体积的酸性提取液使之中和,混匀,10000g 4℃离心10 min,取上清,严格按照说明书测定步骤加入试剂,混匀,波长570 nm,光径1 cm,双蒸水调零测定样本吸光值,代入公式计算NADPH含量。

1.2.6 免疫组织化学法检测两组小鼠骨骼肌组织中NOX2和NOX4的表达 石蜡切片常规脱蜡至水;滴加3% H₂O₂,37℃湿盒孵育10 min;PBS缓冲液洗3次,每次5 min;擦干,浸入0.01 mol枸橼酸缓冲液(pH6.0)中高压锅煮沸15 min;室温冷却后重复步骤三,擦干,滴加5%BSA封闭液,37℃湿盒孵育30 min;甩干勿洗,滴加一抗工作液,4℃湿盒孵育过夜;移去一抗,重复步骤三,擦干,滴加二抗工作液,37℃湿盒孵育30 min,重复步骤三;擦去多余PBS液,滴加新鲜配制DAB工作液,镜下监测染色程度,蒸馏水洗3次,每次5 min;擦干,苏木素复染,蒸馏水冲洗;1%盐酸酒精中分化数秒,蒸馏水冲洗;常规脱水、透明、干燥、封片。显微镜下观察,每张切片先在低倍镜(100×)下选取细胞密集区域,再用高倍镜(400×)拍照,随机选择10个视野,阳性染色呈淡黄色、棕黄色或棕褐色,计算阳性着色细胞占比,NOX2及NOX4主要表达在胞膜及胞浆^[17]。反应结果的判断标准参照许良中^[18]

标准,首先将染色强度打分:0 分为无色,1 分为淡黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色;再将阳性细胞所占的百分比打分:0 分为阴性,1 分为阳性细胞 $\leq 10\%$,2 分为 $11\% \sim 50\%$,3 分为 $51\% \sim 75\%$,4 分为 $>75\%$ 。根据两项评分乘积进行免疫组织化学染色评分,每张切片的得分取 10 个视野的平均分。染色强度与阳性细胞百分比的乘积 >3 才算免疫反应阳性。

1.2.7 ELISA 法检测两组小鼠骨骼肌组织中 ROS 的含量 称取约 0.1 g 组织加入 0.9 mL PBS,冰浴条件下使用匀浆器将标本充分匀浆,低温离心机 5000rpm,4℃ 离心 15 min,收集上清液,分装后一份待检测,其余-20℃ 冷冻备用。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 26.0 统计软件对实验数据进行统计分析,计量资料首先进行正态性和方差齐性检验,服从正态分布且方差齐的数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,独立样本两组间比较采用 *t* 检验。计数资料以百分率(%)表示,采用 Fisher 确切概率检验。相关性分析采用 Pearson 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EAM 小鼠模型造模成功的结果判定 造模过程中对照组小鼠无死亡;EAM 组有 2 只小鼠死亡,其中 1 只死于第 4 次免疫处理次日,另 1 只死于第 5 次免疫处理后 2 h,其余小鼠均顺利完成造模过程。

2.1.1 小鼠临床表现、临床评分及体重变化 对照组小鼠活动姿势正常,叫声响亮,进食良好,体重稳定增长。其中有 2 只小鼠在第 3 次注射后,背部出现直径约 0.3~0.5 cm 的不规则区域毛发脱落,未出现硬结、红肿、破溃等现象,其余小鼠毛发整齐有光泽,未出现脱毛等现象。对照组小鼠临床评分为 0 分。EAM 组小鼠在第 2 次免疫注射后背部注射部位出现毛发脱落,其中 2 只小鼠背部出现 0.2~0.3 cm 的硬结;第 3 次注射后,全部小鼠背部注射部位出现硬结、红肿,此时出现肌无力的表现,行走时后肢拖沓;第 4 次注射后,注射部位出现红肿、破溃现象,全部小鼠毛发凌乱、无光泽,进食减少,体重增长减慢或不增长,休息时背部隆起,其中一只小鼠出现严重的肌肉萎缩、呼吸急促、进食费力等症状,于次日死亡;第 5 次注射后,小鼠背部出现多个硬结,多个注射部位均有脱毛、破溃、流脓现象,叫声嘶哑,行走拖沓,直立困难,其中一只小鼠 2 h 后死亡;第 6 次注射后,小鼠背部大片的毛发脱落,破溃流脓现象严重,活动能力明显下降或不活动,进食费力,呼吸急促,见图 1。EAM 组小鼠临床评分为 2.0~3.0 分,平均 (2.33 ± 0.41) 分。与对照组相比,末次免疫后 1 周 EAM 组小鼠体重下降,差异

有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

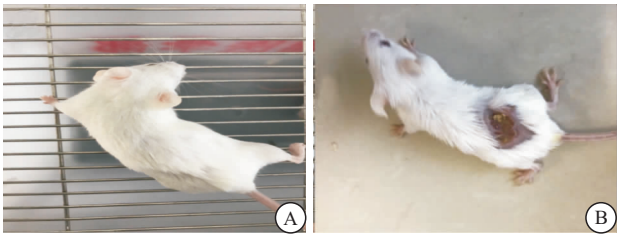


图 1 两组小鼠临床表现

Figure 1 Clinical manifestations of mice in the two groups

注:A. 对照组小鼠;B. EAM 组小鼠

2.1.2 小鼠肌力测定时间及血清 CK 水平 EAM 组小鼠肌力测定时间较对照组明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);EAM 组小鼠血清 CK 水平较对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.1.3 小鼠骨骼肌组织病理改变及病理学评分 两组小鼠骨骼肌组织 HE 染色图见图 2。对照组小鼠骨骼肌纤维大小、形态、结构基本正常,有少量炎性细胞浸润,未见肌纤维萎缩、变性、坏死。EAM 组小鼠骨骼肌纤维大小不一、粗细不等,有大量炎性细胞浸润,可见不同程度萎缩、变性、坏死。EAM 组小鼠骨骼肌组织病理学评分显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。根据造模成功的判定标准,本研究成功建立 EAM 小鼠动物模型。

表 1 两组小鼠的体重、肌力测定时间、血清 CK 水平及骨骼肌组织 HE 染色评分结果比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 1 Comparison of body weight, muscle strength measurement time, serum CK level and HE staining score of skeletal muscle tissues between the two groups of mice

组别	<i>n</i>	体重(g)	肌力测定时间(s)	血清 CK 水平(U/L)	HE 染色评分(分)
对照组	6	24.98 $\pm$ 0.44	142.62 $\pm$ 23.07	328.50 $\pm$ 128.62	0.42 $\pm$ 0.38
EAM 组	6	23.18 $\pm$ 0.57	68.94 $\pm$ 5.14	1911.33 $\pm$ 257.74	2.92 $\pm$ 0.74
<i>t</i>		6.166	7.636	-13.460	-7.408
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 小鼠骨骼肌组织中 NOX2 及 NOX4 的阳性表达率 EAM 组小鼠骨骼肌组织中 NOX2 及 NOX4 的阳性表达率均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 两组小鼠骨骼肌组织中 NOX2 及 NOX4 的阳性表达率结果 $[n(\times 10^{-2})]$

Table 2 Positive expression rates of NOX2 and NOX4 in skeletal muscle tissues of mice between the two groups

组别	<i>n</i>	NOX2 阳性率	NOX4 阳性率
对照组	6	1(16.7)	1(16.7)
EAM 组	6	6(100.0)	6(100.0)
<i>P</i> *		0.015	0.015

注:* 为 Fisher 精确概率检验

2.3 小鼠骨骼肌组织中 NOX2 及 NOX4 的免疫组化评分 两组小鼠骨骼肌组织中 NOX2 与 NOX4 的免疫组化结果见图 2。NOX2 和 NOX4 在 EAM 组小鼠

骨骼肌组织中的免疫组化评分高于对照组 ($P < 0.05$),见表 3。

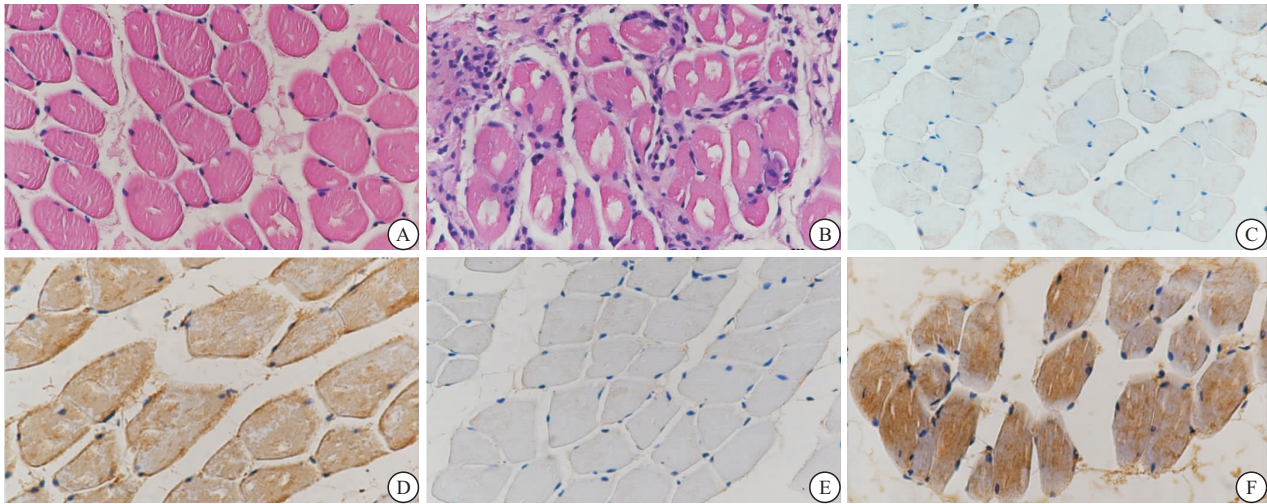


图 2 两组小鼠骨骼肌组织 HE 染色图及 NOX2 与 NOX4 免疫组化图(400×)

Figure 2 HE staining and NOX2 and NOX4 immunohistochemistry of skeletal muscle tissues of mice between the two groups

注:A. 对照组小鼠骨骼肌组织 HE 染色图;B. EAM 组小鼠骨骼肌组织 HE 染色图;C. 对照组小鼠骨骼肌组织 NOX2 免疫组化图;D. EAM 组小鼠骨骼肌组织 NOX2 免疫组化图;E. 对照组小鼠骨骼肌组织 NOX4 免疫组化图;F. EAM 组小鼠骨骼肌组织 NOX4 免疫组化图

2.4 小鼠骨骼肌组织中 NADPH 和 ROS 的含量 与对照组相比,EAM 组小鼠骨骼肌组织中 NADPH 含量明显降低,ROS 含量明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 两组小鼠骨骼肌组织中 NADPH、ROS 的含量及 NOX2、NOX4 免疫组化评分结果比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of NADPH and ROS contents and NOX2 and NOX4 immunohistochemical scores in skeletal muscle tissues of the two groups of mice

组别	<i>n</i>	NOX2 (分)	NOX4 (分)	NADPH (nmol/g)	ROS (U/mL)
对照组	6	2.30±0.68	2.47±0.52	33.32±3.93	169.83±9.06
EAM 组	6	5.57±0.75	5.87±0.62	17.08±4.00	275.33±10.23
<i>t</i>		-7.897	-10.367	7.097	-18.906
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.5 相关性分析 *Pearson* 相关分析显示,EAM 组小鼠骨骼肌组织中 ROS 的含量与 NOX2、NOX4 的免疫组化评分均呈正相关,而与 NADPH 的含量呈负相关($P < 0.05$);EAM 组小鼠骨骼肌组织 HE 染色病理学评分与 NOX2、NOX4 的免疫组化评分及 ROS 的含量均呈正相关,而与 NADPH 的含量呈负相关($P < 0.05$),见表 4。

3 讨论

研究证实,IIM 的发病与许多特定的环境危险因素如细菌、病毒、寄生虫感染,职业性接触灰尘、气体

表 4 EAM 组小鼠骨骼肌组织中有关指标的相关性分析
Table 4 Correlation analysis of related indexes in skeletal muscle tissues of mice in EAM group

指标	NOX2		NOX4		NADPH		ROS	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
ROS	0.968	0.002	0.911	0.012	-0.878	0.021	—	—
HE 染色评分	0.933	0.007	0.942	0.005	-0.920	0.009	0.934	0.006

或烟雾,紫外线照射等有关^[19]。此外在 IIM 的发病过程中会产生大量活化的补体、致病性的自身抗体、免疫复合物及细胞因子等^[20];其次,有研究显示,缺氧及血管新生也参与了 IIM 的发病过程^[20-22]。血管新生可能是对缺氧环境做出的适应性调节,血管内皮生长因子(VEGF)是一种常见的促血管生成因子,通过与受体(VEGFR)结合上调相关基因的转录水平,诱导血管新生,而 VEGF 与 VEGFR 的结合亦可通过激活亚基 Rac 进而激活 NOXs^[23]。有文献报道 NOXs 是体内重要的敏感性氧感受器,在缺氧条件下也可通过促进 VEGF 的表达来促进血管生成,VEGF 和 NOXs 可以相互促进彼此间的表达或激活^[23-24]。本研究认为在 EAM 小鼠体内这些异常的刺激因素可能激活了 NOXs,使得 EAM 小鼠骨骼肌组织中 NOX2 和 NOX4 的表达水平升高,而高表达的 NOX2 和 NOX4 介导生成高浓度的 ROS,大量的 ROS 可降低细胞呼吸速率并减少 ATP 的产生,造成细胞内能量不足、线粒体功能障碍及关键肌肉组分的损伤,从而诱导骨骼

肌组织萎缩及功能丧失,并参与维持骨骼肌组织的炎症进展。

NADPH 是细胞内抗氧化防御系统不可或缺的组成成分,在细胞防御 ROS 氧化性损伤方面起着重要作用^[25]。有研究发现,细胞内 NADPH 的水平是铁死亡敏感性的生物标志,在铁死亡发生过程中,NADPH 的水平降低,而高水平的 NADPH 则会抵抗铁死亡的发生^[26]。铁死亡的发生需要一定水平的 NADPH 作为电子供体,产生 ROS;而在铁死亡发生过程中,NADPH 提供了电子被还原成 $\text{NADP}^+ + \text{H}^+$,因此 NADPH 的水平下降;正常生理情况下,NADPH 的分解与合成处于相对平衡状态,而在炎症、疾病等条件下,NADPH 更倾向于在 NOXs 的作用下产生 ROS,诱发铁死亡^[27]。本研究认为在 EAM 小鼠体内 NADPH 一方面被消耗,用于产生 ROS 诱导铁死亡,并且 NOXs 活化越多,NADPH 消耗越多,随之生成的 ROS 水平越高;另一方面,NADPH 还可以被高水平的 ROS 氧化,从而造成 NADPH 含量进一步降低。而对照组小鼠相比于 EAM 组小鼠,体内的炎症介质、细胞因子、抗体补体等成分较少,因此 NOXs 可能处于静息状态,从而 NADPH 的水平处于氧化还原平衡状态,ROS 的含量也维持在生理水平。

有文献报道,在疾病状态下,NOX2 参与了肌营养不良、肌纤维萎缩和收缩功能障碍的病理生理学进展^[11,28],NOX4 介导产生的超氧化物通过过氧亚硝酸盐和瞬时受体电位阳离子通道等机制诱发骨骼肌肥大^[29];其次,活化后的 NOX2 和 NOX4,通过消耗 NADPH,介导产生大量 ROS,高浓度的 ROS 可直接作用于脂质、DNA 和蛋白质等生物大分子,造成脂质过氧化、诱导基因突变和蛋白质变性,除此以外,还可损伤线粒体、内质网及溶酶体等重要细胞器的功能,激活 NF- κ B 信号通路,导致细胞内的氧化损伤及炎症反应,诱导铁死亡发生^[30];再次,炎症反应、受损的生物大分子及细胞器介导产生的细胞因子与炎症因子又会进一步激活 NOX2 和 NOX4,生成更多的 ROS,对 ROS 的产生发挥正反馈作用并引发氧化损伤级联反应及炎症级联反应,同时诱导细胞铁死亡反应程度愈加强烈。因此在 EAM 小鼠骨骼肌组织中,NOX2/NOX4 的表达水平越高,NADPH 被大量消耗,ROS 的含量越多,细胞铁死亡反应越强,体内氧化还原反应严重失衡,骨骼肌组织炎症反应越显著、损伤程度越严重。本研究发现 EAM 组小鼠骨骼肌组织中 NOX2、NOX4 的表达及 ROS 的含量均较对照组升高,而 NADPH 的含量较对照组降低;与此同时,本研究还发现 EAM 组小鼠骨骼肌组织中 ROS 的含量与

NOX2、NOX4 的免疫组化评分均成正相关,而与 NADPH 的含量成负相关;此外,EAM 组小鼠骨骼肌组织 HE 染色病理学评分与 NOX2、NOX4 的免疫组化评分及 ROS 的含量均成正相关,而与 NADPH 的含量成负相关。以上结果提示铁死亡相关的 NOXs 介导的 ROS 可能参与了 IIM 的发病过程,并在 IIM 肌肉组织的损伤中发挥重要作用。

NOXs 介导的 ROS 可能通过铁死亡途径参与了 IIM 的发病过程,并且 NOXs 可能是通过消耗 NADPH 产生大量的 ROS,导致组织细胞的氧化性损伤并诱导铁死亡反应来参与 IIM 的发病。这为深入研究 IIM 的发病机制提供了新的方向。但是由于 IIM 的发病机制相对复杂,且本研究样本量较小,故还需扩大样本量并增加 NOX2、NOX4 和 ROS 的抑制剂进一步研究探讨 NOXs 介导的 ROS 在 IIM 发病机制中的作用及意义。

4 结论

NADPH 氧化酶中的 NOX2 和 NOX4 可能通过消耗 NADPH 产生大量的 ROS,导致组织细胞的氧化性损伤并诱导铁死亡反应来参与 IIM 的发病。NADPH、NOX2、NOX4 和 ROS 有望成为新的评价 IIM 肌肉组织损伤程度的指标。

【参考文献】

- [1] JINNIN M, OHTA A, ISHIHARA S, *et al.* First external validation of sensitivity and specificity of the European League Against Rheumatism (EULAR)/American College of Rheumatology (ACR) classification criteria for idiopathic inflammatory myopathies with a Japanese cohort [J]. *Annals of the rheumatic diseases*, 2020, 79(3): 387-392.
- [2] SELVA-OCALLAGHAN A, PINAL-FERNANDEZ I, TRALLERO-ARAGUÁS E, *et al.* Classification and management of adult inflammatory myopathies [J]. *The Lancet Neurology*, 2018, 17(9): 816-828.
- [3] RIDER L, MILLER F. Deciphering the clinical presentations, pathogenesis, and treatment of the idiopathic inflammatory myopathies [J]. *JAMA*, 2011, 305(2): 183-190.
- [4] AFZALI A, RUCK T, WIENDL H, *et al.* Animal models in idiopathic inflammatory myopathies: How to overcome a translational roadblock? [J]. *Autoimmunity reviews*, 2017, 16(5): 478-494.
- [5] 尹利国, 张寅丽, 王国春. 肌炎动物模型的研究进展 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2014, 18(11): 783-786.
- [6] SHEN Z, SONG J, YUNG B C, *et al.* Emerging Strategies of Cancer Therapy Based on Ferroptosis [J]. *Adv Mater*, 2018, 30(12): e1704007.
- [7] SCOTT J D, KATHRYN M L, MICHAEL R L, *et al.* Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.

- [8] SIES H, JONES D. Reactive oxygen species(ROS) as pleiotropic physiological signalling agents[J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2020, 21(7): 363-383.
- [9] SCHRÖDER K. NADPH oxidases: Current aspects and tools[J]. *Redox biology*, 2020, 34: 101512.
- [10] MAGNANI F, MATTEVI A. Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases[J]. *Current opinion in structural biology*, 2019, 59: 91-97.
- [11] FERREIRA L F, LAITANO O. Regulation of NADPH oxidases in skeletal muscle[J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 98: 18-28.
- [12] MEYER A, LAVERNY G, ALLENBACH Y, *et al.* IFN- β -induced reactive oxygen species and mitochondrial damage contribute to muscle impairment and inflammation maintenance in dermatomyositis[J]. *Acta neuropathologica*, 2017, 134(4): 655-666.
- [13] TO E, OLEARY J, ONEILL L, *et al.* Spatial Properties of Reactive Oxygen Species Govern Pathogen-Specific Immune System Responses[J]. *Antioxidants & redox signaling*, 2020, 32(13): 982-992.
- [14] LENNON V, LAMBERT E, LEIBY K, *et al.* Recombinant human acetylcholine receptor alpha-subunit induces chronic experimental autoimmune myasthenia gravis[J]. *Journal of immunology*, 1991, 146(7): 2245-2248.
- [15] ALLENBACH Y, SOLLY S, GRÉGOIRE S, *et al.* Role of regulatory T cells in a new mouse model of experimental autoimmune myositis[J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(3): 989-998.
- [16] MATSUMOTO Y, KOHYAMA K, PARK I, *et al.* Characterization of pathogenic T cells and autoantibodies in C-protein-induced autoimmune polymyositis[J]. *Journal of neuroimmunology*, 2007, 190: 90-100.
- [17] 杨新良, 陈也君, 胡高云, 等. NADPH 氧化酶及其抑制剂的研究进展[J]. *药学报*, 2016, (4): 499-506.
- [18] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. *中国癌症杂志*, 1996, 6(4): 229-231.
- [19] MILLER F, LAMB J, SCHMIDT J, *et al.* Risk factors and disease mechanisms in myositis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2018, 14(5): 255-268.
- [20] 柴克霞, 孔令爽, 陈玉琪, 等. 富半胱氨酸蛋白 61 结缔组织生长因子血管内皮生长因子和 CD105 标记的微血管密度在多发性肌炎皮肌炎患者肌肉组织中的表达及意义[J]. *中华风湿病学杂志*, 2017, 21(11): 754-758.
- [21] CERIBELLI A, DE SANTIS M, ISAILOVIC N, *et al.* The Immune Response and the Pathogenesis of Idiopathic Inflammatory Myositis; a Critical Review[J]. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 2017, 52(1): 58-70.
- [22] YOSHIDA K, ITO H, FURUYA K, *et al.* Angiogenesis and VEGF-expressing cells are identified predominantly in the fascia rather than in the muscle during the early phase of dermatomyositis[J]. *Arthritis research & therapy*, 2017, 19(1): 272.
- [23] FUKAI T, USHIO-FUKAI M. Cross-Talk between NADPH Oxidase and Mitochondria: Role in ROS Signaling and Angiogenesis[J]. *Cells*, 2020, 9(8): 1849.
- [24] CHAN E, LIU G, DUSTING G. Redox mechanisms in pathological angiogenesis in the retina: roles for NADPH oxidase[J]. *Current pharmaceutical design*, 2015, 21(41): 5988-5998.
- [25] 张姗姗, 王彦, 李德东, 等. NADH 和 NADPH 代谢和功能的研究进展[J]. *第二军医大学学报*, 2011, 32(11): 1239-1243.
- [26] SHIMADA K, HAYANO M, PAGANO N C, *et al.* Cell-Line Selectivity Improves the Predictive Power of Pharmacogenomic Analyses and Helps Identify NADPH as Biomarker for Ferroptosis Sensitivity[J]. *Cell Chem Biol*, 2016, 23(2): 225-235.
- [27] NADEEM A, AL-HARBI N, AHMAD S, *et al.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibition attenuates acute lung injury through reduction in NADPH oxidase-derived reactive oxygen species[J]. *Clinical and experimental immunology*, 2018, 191(3): 279-287.
- [28] HENRÍQUEZ-OLGUÍN C, BORONAT S, CABELLO-VERRUGIO C, *et al.* The Emerging Roles of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase 2 in Skeletal Muscle Redox Signaling and Metabolism[J]. *Antioxidants & redox signaling*, 2019, 31(18): 1371-1410.
- [29] YOUM T, WOO S, KWON E, *et al.* NADPH Oxidase 4 Contributes to Myoblast Fusion and Skeletal Muscle Regeneration[J]. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 2019: 3585390.
- [30] SUN Y, LU Y, SAREDY J, *et al.* ROS systems are a new integrated network for sensing homeostasis and alarming stresses in organelle metabolic processes[J]. *Redox biology*, 2020, 37: 101696.

(收稿日期: 2021-09-21; 修回日期: 2022-05-31; 编辑: 黎仕娟)