

ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

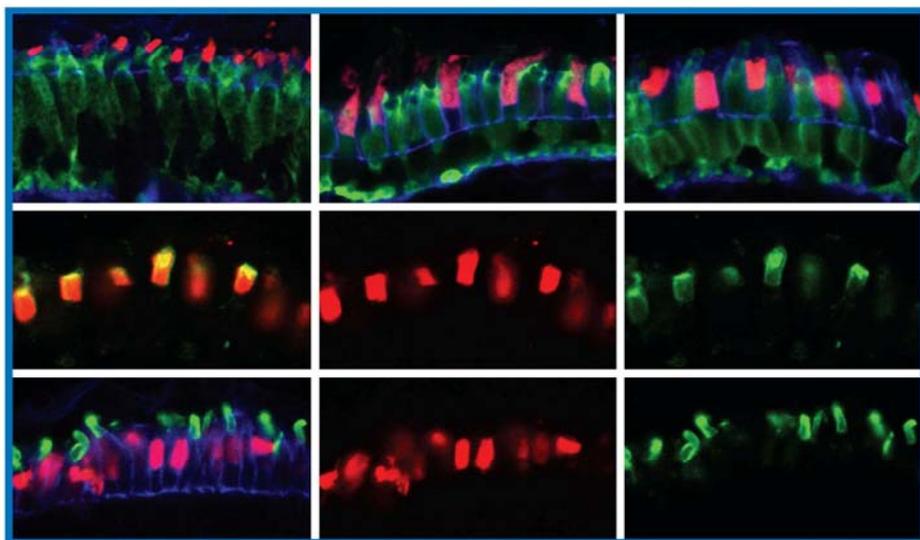


ACTA LABORATORIUM  
ANIMALIS SCIENTIA SINICA

# 中国实验动物学报

ZHONGGUO SHIYAN DONGWU XUEBAO

第23卷 第5期 / Vol.23 No.5



主办单位:

中国实验动物学会

中国医学科学院医学实验动物研究所

ISSN 1005-4847



2015

5

数据库:

中国科学引文数据库CSCD

中文核心期刊要目总览

中国科技论文统计源期刊

世界卫生组织西太平洋地区医学索引

中国核心期刊(遴选)数据库

中国学术期刊综合评价数据库

中国生物医学文献数据库

万方数据资源系统中国数字化期刊群

美国化学文摘

# 中国实验动物学报

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

双月刊 1993年6月创刊

第23卷 第5期 2015年10月30日出版

**主管**  
中国科学技术协会

**主办**  
中国实验动物学会  
中国医学科学院医学实验动物研究所

**主编**  
秦川

**编辑**  
中国实验动物学报编辑委员会

**出版与发行**  
中国实验动物学会  
100021,北京市朝阳区潘家园南里5号  
电话:(010)67779337  
传真:(010)67770690  
E-mail: a67761337@126.com

**网址:** <http://zgswydw.alljournal.ac.cn/sydwbybjyx/ch/index.aspx>

**排版**  
同方知网(北京)技术有限公司

**印刷**  
北京昌平百善印刷厂

**邮发代号**  
2-748

**订购**  
中国实验动物学报编辑部  
100021,北京市朝阳区潘家园南里5号

**广告经营许可证号**  
京朝工商广字第8131号

**定价**  
每期20.00元,全年120.00元

**中国标准连续出版物号**  
ISSN 1005-4847  
CN 11-2986/Q

2015年版权归中国实验动物学会所有  
本刊已加入万方数据网络、中国学术期刊(光盘版)电子杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国科学引文数据库、美国化学文摘、世界卫生组织西太平洋地区医学索引等数据库,在本刊所支付的稿费中已包含上述网站著作权使用费。编辑部有复制权、发行权、汇编权以及信息网络传播权。  
本刊电子版出版发行合作伙: 中邮阅读网: [www.183read.com](http://www.183read.com)

**本期执行主编** 王强  
**本期专题组织** 王强  
**本期责任编辑** 李继平  
**英文编辑** 周传农

## 目次

### 研究报告

- \* 斑马鱼消化器官发育缺陷突变体的遗传筛选 ..... 黄超,张冲,蒋发明,等(441)
- \* *rippy1* 在斑马鱼早期胚胎背腹发育中的作用 ... 孟亚平,刘春业,石德利(446)
- \* 一种在紫外敏感型视锥细胞中特异表达 tdTomato 的转基因斑马鱼系的构建 ..... 陈哲,宋著,王雅冬,等(453)
- \* Midkine-a 通过限制心肌细胞总数的方式阻碍 斑马鱼胚胎心脏生长 ..... 陈静, Luo Jing, Hitchcock Peter(458)
- 顺铂诱导三阴性乳腺癌4T1 耐药小鼠模型的建立 ..... 盛佳钰,陈红凤(466)
- 苏子油对肥胖大鼠肝脏极低密度脂蛋白合成关键基因表达的影响 ..... 解现星,张涛,赵爽,等(474)
- 子宫内膜异位症对小鼠生育能力的影响 ..... 崔阳阳,孙伟伟,赵瑞华,等(479)
- eNOS/NO 途径在单侧输尿管梗阻小鼠肾间质微血管 病变中的作用与机制 ..... 陈雁,牛潼,白海涛,等(484)
- 胸腔原位种植与经左心室注射建立肺癌脑转移 动物模型比较 ..... 陈榆生,涂洵威,俞梅娥,等(490)
- 碱性鞘磷脂酶基因剔除鼠的基因型和表型特征 ..... 杨俐萍,朱顺星,闵娅兰,等(495)
- 实验用猕猴颈部骨骼和血管的影像学及血流动力学分析 ..... 凌泽莎,周志明,郑晓,等(500)
- 大鼠局灶性脑缺血模型评价方法间关联性分析 ..... 崔煦然,刘钊,张志斌,等(506)
- 麝香保心丸对一次性力竭运动大鼠心肌损伤标记物 和C反应蛋白的影响 ..... 陈金良,刘征,张晶,等(509)
- 脂多糖联合 MPTP 诱导的小鼠慢性帕金森病模型的评价 ..... 史肖锦,屈洪党(513)

### 研究进展

- \* Kinesin-2 家族在模式生物中的功能研究进展 ..... 苗珊珊,杨匡,赵呈天(517)
- \* 模式动物斑马鱼在组织屏障发育及功能研究中的进展 ..... 李强,张晶晶(523)
- \* 斑马鱼在生态毒理学研究及环境监测中的应用 ..... 刘辉,戴家银(529)
- 多发性硬化实验动物模型研究进展 ..... 李迎霞,关东升,任德启,等(535)
- 美国实验动物品种资源现状分析 ..... 孔琪,夏霞宇,赵永坤(539)

### 国际前沿

- 3R 和替代方法是否进行了有效的探究 ..... 艾德里安·史密斯(543)
- 科技工作者科学道德规范(一) ..... (452)
- \* 斑马鱼在发育生物及实验动物模型中的应用

# ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

Bimonthly, Established in June 1993

Volume 23 Number 5, October 30, 2015

## Responsible Institution

China Association for Science and Tecnology

## Sponsor

Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

Institute of Laboratory Animal Science, Chinese

Academy of Medical Sciences

## Editor-in-Chief

QIN Chuan(秦川)

## Editing

Editorial Office of ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District,

Beijing 100021

Tel: (010)67779337 Fax: (010)67770690

E-mail: a67761337@126.com

## Publishing

Editorial Office of ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District,

Beijing 100021

Tel: (010)67779337 Fax: (010)67770690

E-mail: a67761337@126.com

## Undertaker

Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences

Department of Laboratory Animal Sciences, Peking Union Medical College

## Printing

Baishan Printing House of Changping, Beijing

## Distributor and Mail-order

Editorial Office of ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District,

Beijing 100021

Tel: (010)67779337 Fax: (010)67770690

## CSSN

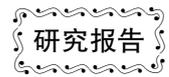
ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

Copyright 2014 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

## CONTENTS IN BRIEF

- Genetic screening of zebrafish mutants with developmental defects in the digestive organs ..... HUANGChao, ZHANG Chong, JIANG Fa-ming, et al(441)
- The role of *rippl1* in zebrafish dorsal-ventral development ..... MENG Ya-ping, LIU Chun-ye, SHI De-li(446)
- Establishment of a transgenic zebrafish line with tdTomato expression in the ultraviolet-sensitive cone photoreceptors ..... CHEN Zhe, SONG Zhu, WANG Ya-dong, et al(453)
- Midkine-a inhibits zebrafish embryonic heart growth by limiting the cardiomyocyte pool ..... CHEN Jing, LUO Jing, Hitchcock Peter(458)
- Establishment of a cisplatin-resistant mouse model of 4T1 triple negative breast cancer ..... SHENG Jia-yu, CHEN Hong-feng(466)
- Effects of perilla oil on the key gene expression regulating hepatic VLDL synthesis in obese rats ..... XIE Xian-xing, ZHANG Tao, ZHAO Shuang, et al(474)
- Effects of endometriosis on the reproductive ability of mice ..... CUI Yang-yang, SUN Wei-wei, ZHAO Rui-hua, et al(479)
- Role of eNOS/NO signaling pathway in peritubular capillary lesions in renal interstitial fibrosis and the related mechanism in mouse models of unilateral ureteral obstruction ..... CHEN Yan, NIU Tong, BAI Hai-tao, et al(484)
- Comparison between the establishment methods of mouse models of lung cancer brain metastases by intrathoracic orthotopic implantation and by left ventricular injection ..... CHEN Yu-sheng, TU Xun-wei, YU Mei-e, et al(490)
- Genotypic and phenotypic characteristics of alkaline sphingomyelinase knockout mice ..... YANG Li-ping, ZHU Shun-xing, MIN Ya-lan, et al(495)
- Morphology and hemodynamic analysis of vertebral arteries in rhesus macaques by 320-CT and color Doppler ultrasound ..... LING Ze-sha, ZHOU Zhi-ming, ZHENG Xiao, et al(500)
- Analysis of the correlation between three evaluation methods of rat models of focal cerebral ischemia/reperfusion ..... CUI Xu-ran, LIU Zhao, ZHANG Zhi-bin, et al(506)
- Influence of Shexiangbaixinwan on myocardial injury markers and C-reactive protein after a single bout of exhaustive exercise in rats ..... CHEN Jin-liang, LIU Zheng, ZHANG Jing, et al(509)
- Evaluation of a mouse model of Parkinson's disease induced by lipopolysaccharide plus MPTP ..... SHI Xiao-jin, QU Hong-dang(513)
- Research progress on the function of kinesin-2 family proteins in model organisms ..... MIAO Shan-shan, YANG Kuang, ZHAO Cheng-tian(517)
- Research progress on the development and functions of tissue barriers using zebrafish model ..... LI Qiang, ZHANG Jia-yin(523)
- Application of zebrafish (*Danio rerio*) in the fields of environmental ecotoxicology and environmental monitoring ..... LIU Hui, DAI Jiayin(529)
- Research progress of animal models of multiple sclerosis ..... LI Ying-xia, GUAN Dong-sheng, REN De-qi, et al(535)
- Analysis of laboratory animal strain resources in USA ..... KONG Qi, XIA Xia-yu, ZHAO Yong-kun(539)
- How can standardised reporting of animal research advance the 3Rs? ..... Adrian Smith(543)



# 斑马鱼消化器官发育缺陷突变体的遗传筛选

黄超, 张冲, 蒋发明, 王飞, 阮华\*, 黄红辉\*

(淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 三峡库区生态环境与生物资源省部共建国家重点  
实验室培育基地, 西南大学生命科学学院, 重庆 400715)

**【摘要】** 目的 正向遗传筛选斑马鱼肝脏、肠和胆囊发育缺陷突变体。方法 ENU 诱变野生型斑马鱼并开展经典的 F2 代筛选, 以 *lfabp* 为探针的全胚原位杂交、BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac 荧光染料分别检测斑马鱼早期胚胎肝脏、肠和胆囊的表型。结果 在 128 个突变基因组中筛选获得了源自 14 个 F2 家族的斑马鱼消化器官发育缺陷突变体品系 23 个, 并按表型划分为 6 类。结论 斑马鱼肝脏、肠和胆囊的发育调控机制有相似性和差异性。

**【关键词】** 斑马鱼; 消化器官; 遗传筛选; 突变体

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0441-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.001

## Genetic screening of zebrafish mutants with developmental defects in the digestive organs

HUANG Chao, ZHANG Chong, JIANG Fa-ming, WANG Fei, RUAN Hua\*, HUANG Hong-hui\*

(Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, State Key Laboratory Breeding Base of Eco-Environments and Bio-Resources of the Three Gorges Reservoir Region, School of Life Sciences, Southwest University, Beibei, Chongqing 400715, China)

**【Abstract】 Objective** To obtain zebrafish mutants with developmental defects in digestive organs from a forward genetic screening. **Methods** ENU mutagenesis and a classical F2 genetic screening were performed. RNA whole mount in-situ hybridization using *lfabp* probe and BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac staining was applied to examine the liver, intestine and gall bladder phenotype in zebrafish embryos. **Results** We harvested 23 mutant lines with developmental defects in digestive organs (originated from 14 F2 families) after screening 128 mutagenized genomes. These mutants were classified into six groups according to their phenotypes. **Conclusions** The liver, intestine and gall bladder share and differ in their developmental molecular mechanisms in zebrafish.

**【Key words】** Zebrafish; Digestive organs; Genetic screening; Mutants

肝脏、胆囊、肠等是重要的消化器官,在食物消化、贮存、营养吸收、排泄和内分泌等方面都有着重要的作用<sup>[1]</sup>。斑马鱼是常用的脊椎模式动物,它的消化器官组成结构和发育分子机制类似于哺乳动物<sup>[2]</sup>。斑马鱼具有体外发育、胚胎透明、胚胎发育周期短、产卵量大等优点,突显其在遗传学研究上的优势,也使得斑马鱼成为目前唯一适合于大规模遗

传筛选的脊椎模式动物<sup>[3]</sup>。构建斑马鱼消化器官发育缺陷突变体有助于研究消化器官发育的分子机制,并可能用于人类相关先天性疾病的研究。本课题通过在斑马鱼中进行无基因差别的正向遗传筛选,获得不同消化器官发育缺陷的突变体,为后续消化器官发育分子机制的研究奠定基础。

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(31471365);西南大学中央高校基本科研业务费(XDJK2014A013、2362014xk02)。

**【作者简介】** 黄超(1990-),男,硕士,研究方向:发育生物学 E-mail: zjhc2007@126.com

**【通讯作者】** 黄红辉(1974-),男,博士,教授,研究方向:发育生物学 E-mail: honghuih@126.com;

阮华(1974-),女,博士,教授,研究方向:发育生物学, E-mail: ruanhua23@126.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

斑马鱼 (*Danio rerio*), 品系 AB Tübingen, 用于突变体遗传诱变及传代。

#### 1.1.2 实验试剂

多聚甲醛、氯化钾、磷酸氢二钠、氯化钠、磷酸二氢钾、柠檬酸钠、氯化镁、柠檬酸、去离子甲酰胺(上海生工生物工程股份有限公司); PTU (1-phenyl-2-thiourea)、ENU (N-ethyl-N-nitrosourea)、Tris (pH 9.5)、蛋白酶 K、BSA、NBT (nitrotetrazolium blue chloride)、BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)、肝素、tRNA (Sigma); BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac 过氧化氢荧光染料(日本和光纯药工业株式会社)。

#### 1.1.3 实验器材

斑马鱼养殖系统(北京爱生科技发展有限公司); 荧光体视显微镜 (Zeiss SteREO Discovery V20); 全自动荧光正置显微镜 (Zeiss Axiolmage Z2); 移液器 (Gilson 10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 mL); 恒温培养箱 (Memmert INE800); 盘旋混合仪 (江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司 KB-3-D); 分子杂交箱 (UVP HL-2000 hybridlinker hybridization Oven/UV cross linker); pH 计及精密电子天平 (Mettler Toledo); 圆周式摇床 (GFL 3005 型); 24 孔细胞培养皿 (Costar)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 胚胎收集及处理

斑马鱼交配产生的受精卵收集于 0.03% 的海盐水中, 并于 28 $^{\circ}$ C 恒温箱饲养。胚胎的发育阶段依据已有报道确定<sup>[4]</sup>。在胚胎 12 hpf (hours post-fertilization) 起用 0.03% PTU 处理抑制色素形成, 并在 3.5 dpf (days post-fertilization) 和 5dpf 时收集用于实验的胚胎。

#### 1.2.2 全胚胎原位杂交 (whole-mount in situ hybridization, WISH)

*lfabp* 探针合成与全胚胎原位杂交实验依据已有报道进行<sup>[5]</sup>。3.5 dpf 胚胎用蛋白酶 K (1:1000 稀释) 在 37 $^{\circ}$ C 消化 26 min。反义 RNA 探针用地高辛标记。NBT/BCIP 显色时, 室温闭光 0.5~1 h 即有明显信号。

#### 1.2.3 BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac (DCFH-DA) 荧光染色

BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac (DCFH-DA) 可用于检测生理过

程中产生的细胞源性活性氧分子 (reactive oxygen species, ROS) 如 O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HO $\cdot$  等, 斑马鱼胚胎发育过程中肠和胆囊可产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 可被 BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac (DCFH-DA) 标记<sup>[6]</sup>。收集的 5 dpf 斑马鱼胚胎放入 24 孔细胞培养盒中, 并换上新的 0.03% 的海盐水。每孔之中加入 1  $\mu$ L BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac 荧光染料 (1mg/L, 溶于 DMSO), 使稀释度约为 1:10 000, 轻轻晃动, 使染液迅速分散开, 然后将培养盒放入 28 $^{\circ}$ C 恒温箱中 1~2 h 后取出, 在荧光显微镜下观察肠和胆囊的形态发育状况。

#### 1.2.4 筛选过程及表型分类

用 ENU 处理野生成年雄性斑马鱼若干, 存活的雄鱼称为 F<sub>0</sub>, 与野生型杂交产生 F<sub>1</sub> 代。F<sub>2</sub> 家族由来自不同 F<sub>0</sub> 的 F<sub>1</sub> 鱼交配产生。将来自同一 F<sub>2</sub> 家族的斑马鱼随机交配以获取 F<sub>3</sub> 子代, 利用 1.2.2 及 1.2.3 中所述方法进行实验, 若 F<sub>3</sub> 子代中 1/4 左右的个体表现出相同的缺陷表型, 则其 F<sub>2</sub> 父母可被认定为携带隐性突变的杂合突变体。将 F<sub>2</sub> 杂合突变体与野生型杂交传代, 产生的后代称为 F<sub>3</sub>, 以同样的方法利用 F<sub>4</sub> 胚胎来确定 F<sub>3</sub> 杂合突变体。最终确定的 F<sub>3</sub> 突变体, 将会依据其表型特征被分为几种不同的类别<sup>[7]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 ENU 诱变与 F<sub>2</sub> 家族的建立

用 ENU 处理 30 条约 6 月龄期健康雄鱼, 9 条 F<sub>0</sub> 存活, 将 F<sub>0</sub> 与野生型雌鱼杂交产生子代, 即 F<sub>1</sub> 代 (每条 F<sub>1</sub> 代表一个突变基因组), 保留 F<sub>0</sub> 第二次与第三次交配产生的子代饲养至成鱼, 可保证 F<sub>1</sub> 携带较多突变, 并降低来自于同一精母细胞带有相同突变的精子都产生子代的概率, 每条 F<sub>0</sub> 生产约 100 条 F<sub>1</sub>, 共计 958 条, 然后将不同 F<sub>0</sub> 产生的 F<sub>1</sub> 交配产生 F<sub>2</sub> 家族。

### 2.2 F<sub>2</sub> 代筛选与突变体的传代

将来自同一 F<sub>2</sub> 家族的鱼随机交配, 检测产生的 F<sub>3</sub> 胚胎的表型, 并根据孟德尔遗传定律判断亲本是否为候选突变体。我们从 64 个 F<sub>2</sub> 家族中的 204 对鱼中, 筛选得到了 65 对候选突变体, 并对表型不确定的候选突变体做了二次鉴定, 排除了 12 对非突变体。有 4 对因表型非特异性被舍弃, 另有 9 对在筛选中丢失或死亡而无法鉴定。最终, 来自 23 个 F<sub>2</sub> 家族的 32 对突变体与野生型进行传代, 产生了 F<sub>3</sub> 家族, 见表 1。因为 F<sub>2</sub> 家族是由不同的 F<sub>1</sub> 相互杂交产生的, 所

以每个 F2 家族突变体代表两个突变基因组,故此次筛选的规模为 128 个突变基因组。

**2.3 F3 代建立与筛选**

F3 代家族筛选与 F2 代筛选类似,将来自同一 F3 家族的斑马鱼雌雄个体之间随机交配以产生 F4 胚胎,根据 F4 胚胎表型比例确定 F3 是否为杂合突变体。在总共 32 个 F3 家族中,其中有一个家族(L39-4)因全是雌鱼无法配对而被舍弃。其余 31 个 F3 家族共成功交配 251 对斑马鱼,从中筛选得到了 40 对突变体。二次鉴定之后,18 个 F3 家族的表型是可遗传的。最终,依据表型、初始 F2 家族,保留下来的 34 对突变体归为 23 个 F3 突变品系,见表 2。

**2.4 F3 突变体的表型分类**

F3 筛选结束之后,根据突变品系的不同表型特征,将其分为六类,见表 3 和表 4,代表品系展示见

图 1。第 I 类为“肠特异性缺陷突变体”,这类突变体的肠具有较大程度缺陷,基本表现为肠弯曲窄细或者几乎无染料荧光,但是肝脏和胆囊都较为正常。第 II 类为“肝脏特异性缺陷突变体”,其肠和胆囊较为正常,而肝脏缺陷较为严重,通常表现为无肝脏和肝脏偏小的表型。第 III 类为“胆囊特异性缺陷突变体”,其肝脏和肠并无明显缺陷,但是胆囊呈现出偏小或者缺失的性状。第 IV 类为“肠和胆囊共同缺陷突变体”,该类突变体中肝脏并没有出现发育缺陷但是肠、胆囊染色均出现了缺陷表型。第 V 类为“肝脏和胆囊共同缺陷突变体”,其肝脏和胆囊都出现了发育缺陷但是肠染色却是正常的,通常表现为肝脏偏小和胆囊偏小的表型。第 VI 类为“肝脏、肠和胆囊共同缺陷突变体”,*lfabp* 和 BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac 染色结果都显示肝脏、肠和胆囊存在明显的发育缺陷。

表 1 F2 代筛选结果

Tab.1 Results of the F2 generation screening

	数量 Number	比例 / % Rate / %
F2 家族总数 Total F2 families	64	100.0
有突变表型的 F2 家族 F2 families identified with mutants	37	57.8
确定有表型并传代的 F2 家族 F2 families confirmed and outcrossed	23	35.9
没有突变体或者丢失的 F2 家族 F2 families without mutants or lost	27	42.2
交配对数总和 Total crossing pairs	204	100.0
候选突变体对数 Pairs of putative mutants	65	31.9
已放弃的待选突变体对数 Abandoned pairs of putative mutants	4	2.0
可用于传代的候选突变体对数 Putative mutants available for outcross	40	19.6
已传代的 F3 家族 F3 families raised	32	15.7

表 2 F3 代筛选结果

Tab.2 Results of the F3 generation screening

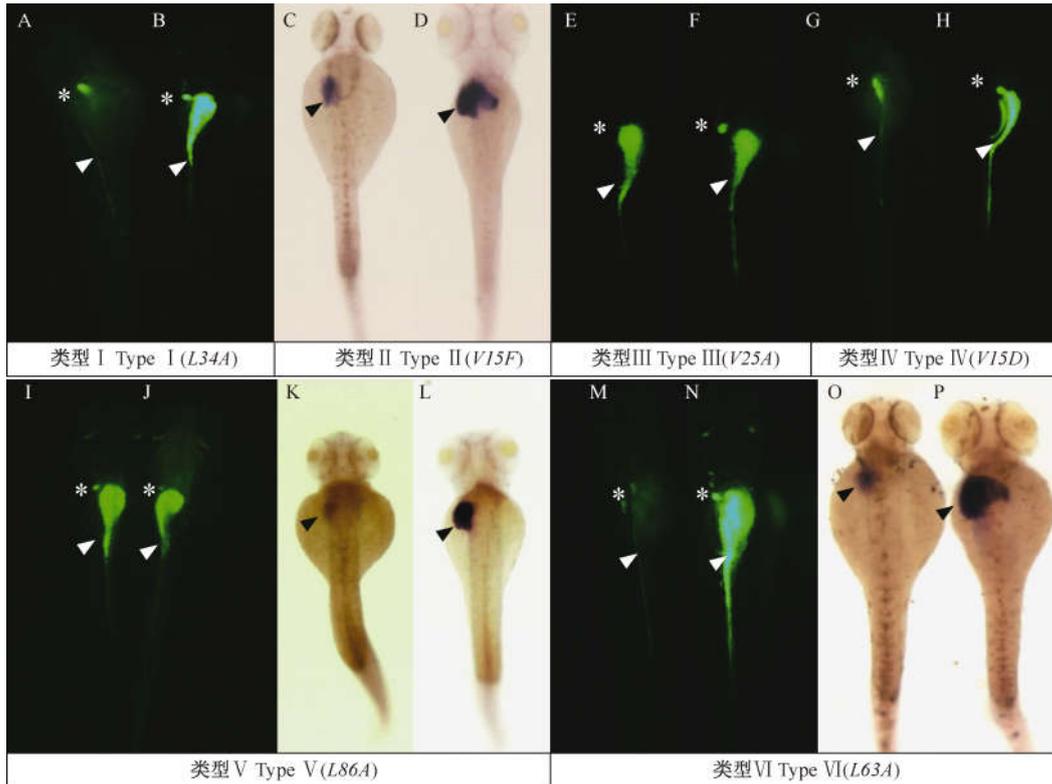
	数量 Number	比例 / % Rate / %	初始 F2 家族数 Number of original F2 families
F3 家族总数 Total F3 families	32 *	100	23
表型可遗传的 F3 家族 Phenotype inheritable	18	56.3	14
表型不可以遗传的 F3 家族 Phenotype not inheritable	14 *	43.7	13
总共交配的对数 Total crossing pairs	251	100	23
突变体对数 Pairs of putative mutants	34	13.5	14

注: \* 包含因全是雌鱼无法交配的 L39-4。Note. \* including the L39-4 family in which all fish are female.

表 3 F3 代突变体的表型分类

Tab.3 Classification of the F3 mutant phenotypes

突变体类型 Type of mutants	品系数量 Number of mutant groups	比例 / % Percentage / %	表型分类 Phenotypical characteristics		
			肠缺陷 Intestine defects	肝脏缺陷 Liver defects	胆囊缺陷 Gall bladder defects
I	1	4.3	√	×	×
II	6	26.2	×	√	×
III	7	30.4	×	×	√
IV	4	17.4	√	×	√
V	1	4.3	×	√	√
VI	4	17.4	√	√	√
Total	23	100			



注:胆囊(星号),肠(白色箭头),肝脏(黑色箭头),B、D、F、H、I、L、N、P 为对照组,A、C、E、G、J、K、M、O 为突变体,A、B、E、F、G、H、M、N 为侧面观,C、D、K、L、O、P 为背侧面观,I、J 为腹侧面观。类型 I. 肠特异性缺陷突变体(L34A, A&B);类型 II. 肝脏特异性缺陷突变体(V15F, C&D);类型 III. 胆囊特异性缺陷突变体(V25A, E&F);类型 IV. 肠和胆囊共同缺陷突变体(V15D, G&H);类型 V. 肝脏和胆囊共同缺陷突变体(L86A, I~L);类型 VI. 肝脏、肠和胆囊共同缺陷突变体(L63A, M~P)。

图 1 6 类突变体品系代表示意图

Note. The gallbladder (asterisk), intestine(white arrowhead), liver (black arrowhead). B, D, F, H, I, L, N, P are siblings. A, C, E, G, J, K, M, O are mutants. A, B, E, F, G, H, M, N are lateral views. C, D, K, L, O, P are dorsal views. I, J are ventral views. Type I. The intestine specific mutant (L34A, A&B); Type II. The liver specific mutant (V15F, C&D); Type III. The gall bladder specific mutant (V25A, E&F); Type IV. The intestine and gall bladder mutant (V15D, G&H); Type V. The liver and gall bladder mutant (L86A, I~L); Type VI. The liver, intestine and gall bladder mutant (L63A, M~P).

Fig. 1 Six groups of representative mutant lines

表 4 突变体品系汇总

Tab. 4 Summary of the mutant lines

突变体类型 Type of mutants	突变体品系 Mutant lines
I. 肠 I. Intestine	L34A
II. 肝脏 II. Liver	V15C、V15F、V27A、L21B、L38B、L48A
III. 胆囊 III. gall bladder	V6A、V25A、V51A、L27A、L38C、L46A、L95A
IV. 胆囊 & 肠 V. Gall bladder & intestine	V6B、V15B、V15E、L86A
V. 肝脏 & 胆囊 IV. Liver & gall bladder	V15D
VI. 肝脏、肠 & 胆囊 VI. Liver intestine & gall bladder	V15A、V21A、L38A、L63A
总数 Total	23

### 3 讨论

#### 3.1 遗传筛选的结果分析

虽然正向遗传筛选斑马鱼发育缺陷突变体的研究已广泛开展,但是利用 ENU 诱变同时筛选多个消化器官发育缺陷突变体的案例却并不多。本次筛选工作着重关注肝脏、胆囊以及肠 3 个消化器官的发育缺陷,在一次筛选中获得多种突变体,提高了突变群体的利用率,并可获得单个消化器官特异性缺陷的突变体。

ENU 筛选过程中的突变效率一般为 0.2% 左右<sup>[8]</sup>,本次研究中并没有检测突变效率,但是在 128 个突变基因组的筛选中,最终获得了突变品系 23 个,可见本次突变和筛选的效率都是比较高。这些突变体表型多样化,说明调控不同消化器官发育的基因是不同的,但也发现不同突变体表型之间有交叉。从 23 个突变品系分类来看,有约 40% 的突变品系具有 2 种及以上的发育缺陷表型。说明这些消化器官在各自发育过程中的某些调控因子之间存在相似性,也暗示了它们在分子发育调控过程中存在着必然的联系。

#### 3.2 筛选过程中存在的不足和限制性因素

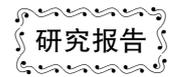
ENU 筛选工作量大,空间和人手都是限制性因素。此次筛选规模并不大,为了弥补这一缺陷,我们采用 F1 代雌雄个体进行交配而非传统的 F1 外交生产 F2 家族的策略,提高了筛选效率,但也导致了突变体的遗传背景更为杂乱,获得的突变体需外交代稀释遗传背景。

我们的筛选获得了 23 个突变品系,将利用图位克隆技术鉴定突变基因,并针对突变体表型和突变基因进一步探究,有望对斑马鱼乃至其他脊椎动物消化器官发育的分子机制有进一步的理解。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Field HA, Ober EA, Roeser T, et al. Formation of the digestive system in zebrafish. I. Liver morphogenesis [ J ]. Dev Biol. 2003, 253(2): 279 - 290.
- [ 2 ] Zorn AM, Wells JM. Molecular basis of vertebrate endoderm development [ J ]. Int Rev Cytol. 2007, 259: 49 - 111.
- [ 3 ] Amsterdam A, Burgess S, Golling G, et al. A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish [ J ]. Genes Dev. 1999, 13(20): 2713 - 2724.
- [ 4 ] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [ J ]. Dev Dyn. 1995, 203(3): 253 - 310.
- [ 5 ] Huang H, Ruan H, Aw MY, et al. Mypt1-mediated spatial positioning of Bmp2-producing cells is essential for liver organogenesis [ J ]. Development. 2008, 135(19): 3209 - 3218.
- [ 6 ] Shi Y, Zhang Y, Zhao F, et al. Acetylcholine serves as a depressor in Loperamide-induced opioid-induced bowel dysfunction (OIBD) in zebrafish [ J ]. Sci Rep. 2014, 4:5602.
- [ 7 ] Jiang F, Chen J, Ma X, et al. Analysis of mutants from a genetic screening reveals the control of intestine and liver development by many common genes in zebrafish [ J ]. Biochem Biophys Res Commun. 2015, 460(3): 838 - 844.
- [ 8 ] de Bruijn E, Cuppen E, Feitsma H. Highly efficient ENU mutagenesis in zebrafish [ J ]. Methods Mol Biol. 2009, 546:3 - 12.

[ 收稿日期 ] 2015-06-22



# *rippy1* 在斑马鱼早期胚胎背腹发育中的作用

孟亚平<sup>1,2</sup>, 刘春业<sup>1</sup>, 石德利<sup>1\*</sup>

(1. 山东大学生命科学学院, 济南 250100; 2. 清华大学生命科学学院, 北京 100084)

**【摘要】目的** 探究 *rippy1* 基因在斑马鱼早期背腹轴发生过程中的作用。**方法** 利用斑马鱼整封原位杂交技术揭示 *rippy1* 基因在斑马鱼早期胚胎发育过程中的表达模式, 通过显微注射技术在胚胎 1 细胞期注射 *rippy1* 的 mRNA 来高表达 Ripply1 蛋白并在后期观察胚胎背腹标记基因的变化及胚胎形态变化。利用 Tol2 转基因技术构建 *rippy1* 启动子驱动 GFP 转基因鱼。**结果** 原位杂交结果显示 *rippy1* 基因在斑马鱼原肠早期胚盾期特异表达在胚盾处, 即预定的背部。高表达 *rippy1* 后, 在胚盾期背部标记基因表达范围扩大, 腹部标记基因表达减弱, 受精后 24 小时胚胎表现出严重的背部化表型: 头部增大, 腹部卵黄延伸减弱, 尾部躯干及尾部区域减少, 有的甚至形成了第二个体轴。得到的转基因鱼揭示 *rippy1* 母源表达, 并且转录起始位点上游 1200 个碱基驱动的 GFP 能模拟内源基因的表达图式。**结论** *rippy1* 可能参与斑马鱼胚胎早期背腹轴的发生。

**【关键词】** 斑马鱼; *rippy1*; 早期胚胎发育; 背腹发生

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0446-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.002

## The role of *rippy1* in zebrafish dorsal-ventral development

MENG Ya-ping<sup>1,2</sup>, LIU Chun-ye<sup>1</sup>, SHI De-li<sup>1\*</sup>

(1. School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China

2. School of Life Science, Tsinghua University, Beijing 100084)

**【Abstract】Objective** To explore the role of *rippy1* in zebrafish dorsal-ventral development. **Methods** Using zebrafish whole-mount in situ hybridization to examine the *rippy1* expression pattern in early embryo development. To analyse the expression pattern changes of dorsal-ventral marker genes at shield stage and the morphological changes at 24 hpf (hours post-fertilization) after overexpression of *rippy1* by injecting synthetic mRNA at 1-cell stage. Using Tol2 transposon technology to obtain a *rippy1* promoter driven GFP transgenic fish and to identify promoter region that recapitulates endogenous *rippy1* expression pattern. **Results** The in situ hybridization results revealed that *rippy1* specifically expresses in the future dorsal region at shield stage. Overexpression of *rippy1* caused an enhanced expression of dorsal marker genes and a reduction of ventral marker genes. Embryos overexpressing *rippy1* also showed severely dorsalized phenotype, with enlarged head, reduced ventral yolk extension, and shortened posterior trunk and tail regions, and the formation of a secondary trunk axis. Transgenic fish revealed the maternal expression of *rippy1* and suggested that a 1.2 kb promoter-driven GFP is able to recapitulate the endogenous gene expression pattern. **Conclusion** *rippy1* may participate in the early development of dorsal-ventral axis in zebrafish embryo.

**【Key words】** Zebrafish; *rippy1*; Early embryo development; Dorsal-ventral axis

胚轴 (embryonic axes) 形成是多细胞生物躯体模式 (body plan) 建立的一个重要过程, 主要包括前-后轴 (anterior-posterior axis)、背-腹轴 (dorsal-

ventral axis) 和左-右轴 (left-right axis)。对两栖动物胚胎的研究发现背-腹轴早在受精后即可观察到, 如爪蛙胚胎皮层转动形成的灰色新月区在后期

[基金项目] 国家自然科学基金项目资助 (No: 31271556, 31471360, J1103515)。

[作者简介] 孟亚平, 女, 博士研究生, 研究方向: Wnt 信号通路, 胚胎诱导核体轴形成。

[通讯作者] 石德利, 男, 博士, 研究方向: Wnt 信号通路, 胚胎诱导核体轴形成。Email: dshi@sdu.edu.cn

发育成背部。德国发育生物学家 Hans Spemann 和他的学生 Hilde Mangold 将原肠早期蝾螈胚胎的背部组织移植到另一种蝾螈胚胎的腹部,得到了形成双体轴的胚胎,次级体轴的脊索来自于供体胚胎,而神经管和体节多数来自于受体,这说明该背部组织能诱导周围受体胚胎的细胞形成神经管,首次提出了胚胎诱导的概念并称该背部组织为组织者 (organizer)。

*rippy* 家族蛋白在 2005 年被发现并揭示了其部分功能<sup>[1]</sup>,研究发现 *rippy1* 和 *rippy2* 特异表达于体节,其中 *Ripply1* 蛋白与转录辅抑制因子 Groucho 结合,能够终止分节基因的表达,维持体节的前后极性。之后对 *rippy1* 的研究都集中在其在体节时期对体节发生的作用,而其在早期胚胎模式发生的作用却研究甚少。但最近在爪蛙中的研究发现 *rippy* 家族蛋白能通过其 WRPW 区域结合多梳蛋白 (Polycomb group proteins) 起转录去抑制的作用,并且在背-腹轴形成过程中起重要作用<sup>[2]</sup>。然而,*rippy* 家族基因在胚胎发育早期的表达图式和调节方式还不清楚。并且,*rippy3* 是人的唐氏综合征关键区域基因 6 (Down syndrome critical region gene 6, *dscr6*) 的同源基因<sup>[3]</sup>。因此,研究 *rippy* 家族基因的功能和作用机制能为人类遗传疾病的致病机理提供信息。我们通过原位杂交技术发现 *rippy1* 在斑马鱼早期胚胎中特异表达在背部,因此推测其可能参与背腹发生。故而通过过表达 *rippy1*,并调取 1.2 kb 的启动子片段,初步研究其在胚胎早期背腹发生的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

AB 品系的斑马鱼养殖在 28.5℃ 的循环水系统中,如早期工作所描述<sup>[4]</sup>。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 获取 *rippy1* cDNA

取斑马鱼胚盾 (shield) 时期的胚胎 50 枚,用 Trizol 方法提取胚胎总 RNA,使用 Transgene 公司 TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒反转录,详细步骤参见使用说明书。

#### 1.2.2 斑马鱼 *rippy1* 整胚原位杂交

调取 *rippy1* 全长 cDNA,引物序列如下 *rippy1*-F: 5'-CAGCGCCAAACAAACG-3', *rippy1*-R: 5'-TCAAATTCGCACAGACGG-3',使用 Taq 酶扩增后将

其连入 pGEM-T 载体中。根据测序方向合成地高辛标记的反义 RNA 作为探针使用。其他探针如 *gooseoid* (*gsc*)、*chordin* (*chd*)、*floating head* (*flh*)、*even-skipped-like 1* (*eve1*)、*T-box6* (*tbx6*)、*wnt8a* 详见作者以前的工作<sup>[5]</sup>。

合成的 *rippy1* 反义 RNA 用原位杂交液  $hyb^+$  (50% 甲酰胺,5 × SSC,0.1% Tween-20,0.5 mg/mL 酵母 RNA,0.05 mg/mL 肝素) 稀释至 1 ng/μL。收集不同时期的斑马鱼胚胎,固定于 4% 多聚甲醛中过夜。过渡到含 0.1% Tween-20 的 PBST 中,并在 PBST 中将胚胎膜剥去,用 PBST 洗过后在原位杂交液  $hyb^-$  (50% 甲酰胺,5 × SSC,0.1% Tween-20) 中 65℃ 孵育 10 min,之后在  $hyb^+$  中 65℃ 孵育 4 h。探针 60℃ 孵育过夜。第 2 天吸出探针以重复使用。胚胎用洗液 I (50% 甲酰胺,2 × SSC,0.1% Tween-20) 洗 30 min (60℃),重复 1 次;用洗液 II (5% 甲酰胺,0.2 × SSC,0.1% Tween-20) 洗 15 min (60℃),重复 1 次;用洗液 III (0.5% 甲酰胺,0.02 × SSC,0.1% Tween-20) 洗 30 min (60℃),重复 1 次。然后用 MABT 在室温下洗 3 次,用封闭液封闭 4 h。偶联碱性磷酸酶的地高辛抗体 1:2500 稀释于封闭液中,4℃ 孵育过夜。第 3 天吸出抗体以重复使用,用 MABT 在室温下洗 30 min,重复 1 次;用 PBST 在室温下洗 30 min,重复 1 次;在平衡缓冲液 (0.1 mol/L NaCl,0.1 mol/L Tris-HCl pH 9.5,0.05 mol/L MgCl<sub>2</sub>,0.1% Tween-20) 中平衡 10 min,加显色液 (5 mL 平衡缓冲液加 100 μL 60 mg/mL 左旋咪唑,100 μL NBT/BCIP),室温避光,待信号足够强加多聚甲醛终止反应,在 70% 酒精中脱去浮色,拍照观察。

#### 1.2.3 显微注射 *rippy1* mRNA

显微注射方法详见早期工作<sup>[5]</sup>。*rippy1* mRNA 注射剂量为每个胚胎 200 pg。

#### 1.2.4 *rippy1* 启动子序列及转基因鱼的获得

从基因组中调取 *rippy1* 基因组上游约 1.2 kb 的片段,引物如下: promoter-F: 5'-ATTCTCGAGG-GATCCAAAACAGCTTAT-3', promoter-R: 5'-ATTAGATCTGAATGAATGAAGGCGCGT-3'。并且在上下游引物中分别引入 *Xho* I 和 *Bgl* II 酶切位点,双酶后切连入 pT2A200R150G 载体。

单独注射该质粒观察胚胎是否有荧光。有荧光后将该质粒和转座酶 mRNA 共注射,剂量均为 50 pg,待该批注射的斑马鱼 F0 代性成熟后外交,筛选后代胚胎有特异荧光的 F1 代。

## 2 结果

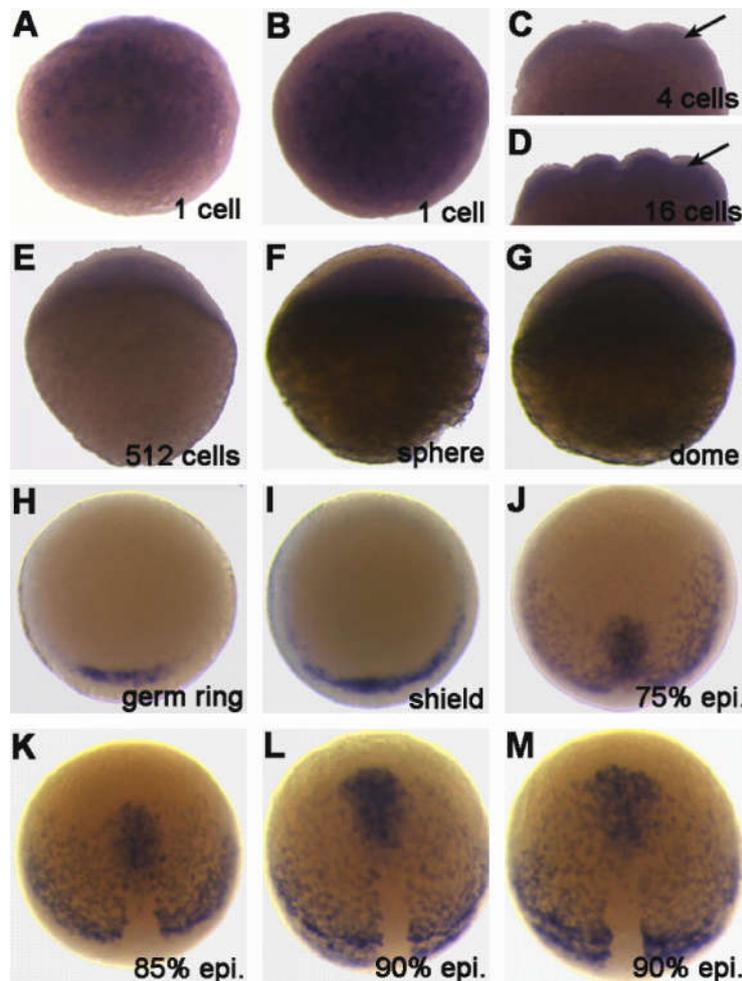
### 2.1 整胚原位杂交揭示 *rippy1* 在斑马鱼早期胚胎发育过程中的表达模式

为了明确 *rippy1* 是否参与早期背-腹轴的形成,我们首先利用整胚原位杂交检测该基因的时空表达图式。结果显示 *rippy1* 母源表达,但表达水平低。在原肠作用早期即胚环期表达增强且集中在预定背部的胚盾位置,在胚盾期 *rippy1* 在背部的表达继续增强,并且向侧部延伸。在原肠期,随着细胞运动的进行,*rippy1* 主要表达在前脊索板中胚层和后部将要形成的体节中,但在脊索中胚层中没有表达(图1)。这个表达图式暗示 *rippy1* 基因可能在背

-腹轴和前-后轴形成过程中起调节作用。

### 2.2 高表达 *rippy1* 导致胚胎背部化

我们下一步对 *rippy1* 在背-腹轴形成中的作用进行了功能检测。在胚胎 1 细胞期通过注射 *rippy1* mRNA 进行高表达,收集胚盾时期的胚胎进行原位杂交。分别检测背部标记基因 *gsc*、*chd*、*flh* 和腹部标记基因 *eve1*、*tbx6*、*wnt8a* 的表达。我们发现几乎所有 *rippy1* 注射的胚胎背部标记基因 *gsc*、*chd*、*flh* 表达不但在背部增强并且明显向腹侧扩增。相反,腹部标记基因 *eve1*、*tbx6*、*wnt8a* 表达明显减弱(图2)。这个结果说明高表达 *Ripply1* 改变了背腹细胞的命运,使背部区域扩大。显示 *rippy1* 能调节斑马鱼背部的发育。



注:(A-B)1 细胞期胚胎侧面观和动物极观,显示 *rippy1* 的母源表达。(C-G)分别为相应时期的侧面观。动物极向上。(H-J)分别为相应时期的动物极观,胚胎背部向下,(K-M)分别为相应时期的背部观,胚胎前部向上。

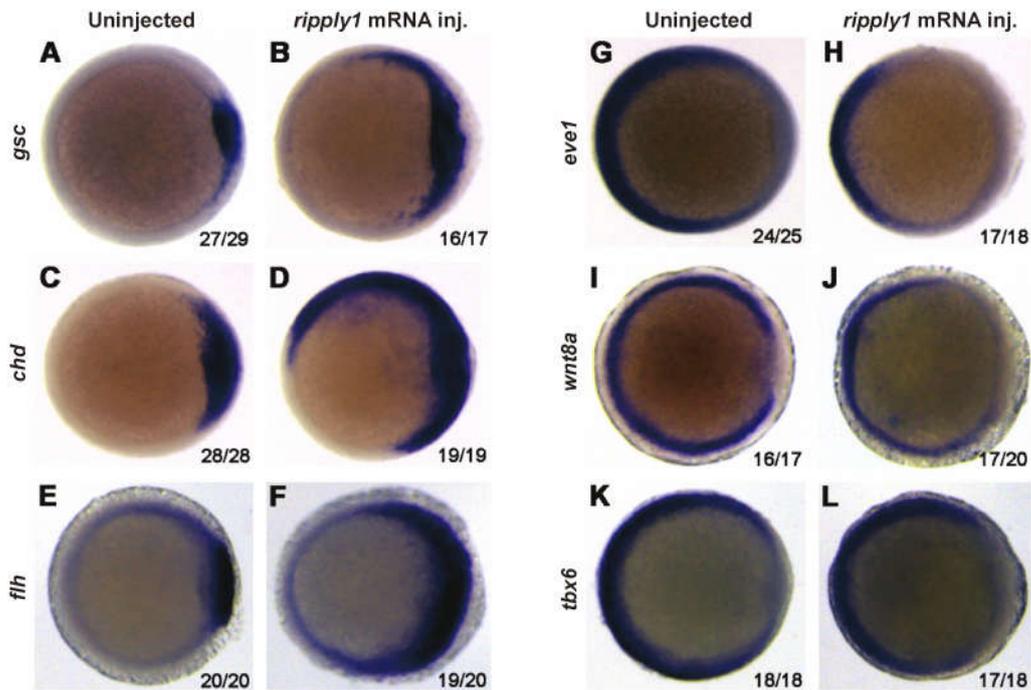
图1 整胚原位杂交显示 *rippy1* 在斑马鱼早期胚胎发育过程中表达图式

Note. (A-B) 1-cell stage lateral view and animal pole view, showing *rippy1* maternal expression. (C-G) Lateral view of indicated stages with animal pole on the top. (H-J) Animal pole view of indicated stages with dorsal side on the bottom. (K-M) Dorsal view of indicated stages with anterior region on the top.

Fig. 1 *rippy1* maternal and zygotic expression patterns in early zebrafish developmental stages.

在 10 hpf(胚芽期)时观察胚胎的表型,发现原本呈球形的胚胎前后伸长,呈现明显的椭球形,这是典型的背部化表型(图 3A, B)。24 hpf 后观察胚胎,大多数胚胎(82/99)表现出背部化,其中 36 枚胚胎头部增大,尾部缺失(图 3C, D),而 46 枚胚胎

头部明显增大,体轴变短,尾部变短,无腹部尾鳍(图 3E),一小部分胚胎(6/99)甚至呈现双体轴(结果未显示)。这些表型进一步说明 *ripply1* 通过抑制胚胎后部发育来促进前部的发育。

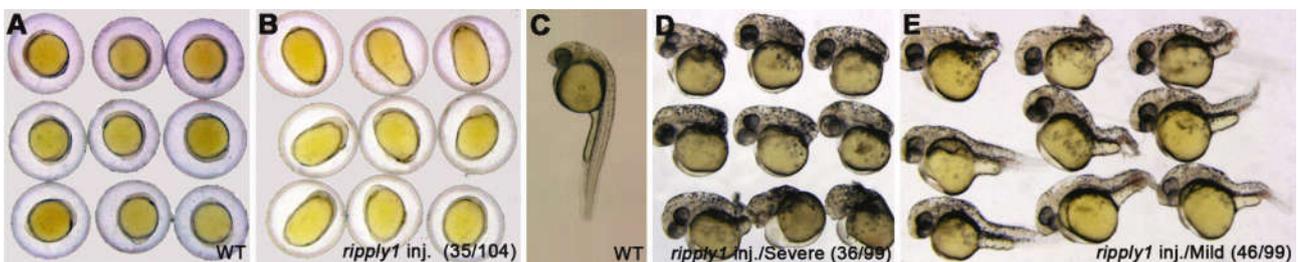


注:(A, C, E, G, I, K)未注射 *ripply1* mRNA 相应基因在胚盾期表达情况,动物极观,背部处在右边。(B, D, F, H, J, L)注射 *ripply1* mRNA 后相应基因在胚盾期表达情况,动物极观,背部处在右边。数据显示该结果所占的比例。

图 2 高表达 *ripply1* 后背腹标记基因在胚盾期的变化

Note. (A, C, E, G, I, K) The expression of indicated genes at shield stage in uninjected embryos. Animal pole view and dorsal is to the right. (B, D, F, H, J, L) The expression of indicated genes at shield stage in *ripply1* mRNA-injected embryos. Animal pole view and dorsal is to the right.

Fig. 2 *ripply1* overexpression causes the expression pattern changes of dorsal-ventral marker genes.



注:(A, C)胚芽期(10 hpf)和 24 hpf 野生型胚胎。(B)注射 *ripply1* mRNA 胚胎在尾芽期呈椭圆形。(D)严重表型。(E)较轻表型。

图 3 高表达 *ripply1* 后导致胚胎背部化和躯干及尾部缺失。

Note. (A, C) Bud stage (10 hpf) and 24 hpf wild-type (WT) embryo. (B) Oval shape of *ripply1* dorsalized embryo at bud stage. (D) Severe phenotype and (E) slightly mild phenotype.

Fig. 3 Dorsalized phenotype and trunk and posterior truncation of *ripply1* injected embryos.

### 2.3 *rippy1* 启动子及转基因斑马鱼

为了研究 *rippy1* 时空表达的调节机制,我们开展了对其启动子的研究。获得 *rippy1* 转录起始位点上游 1.2 kb 的片段后,将其后加 EGFP,然后克隆到 pT2A200R150G 转基因载体上(图 4A, B)。质粒注射后发现在胚盾期在胚盾处有特异的荧光表达(图 4C, D),体节期在体节处有特异的表达(结果未显示),说明该 1.2 kb 的片段能够调控 *rippy1* 在

斑马鱼胚胎中时空特异的表达。与转座酶共注获得转基因鱼 *rippy1:EGFP* 的 F0 代,发现其子代在 1 细胞期即有荧光,直到胚盾期仍是泛表达(图 5A-C'),可能是由于 EGFP 比较稳定,而母源的 *rippy1* 比较容易降解。在体节期该荧光则特异定位在躯干(图 5D, D')。在 24 hpf, EGFP 信号主要集中在体节中(图 5E),而在成鱼中,EGFP 信号主要集中在整个躯干部分(图 5F-G')。

## A

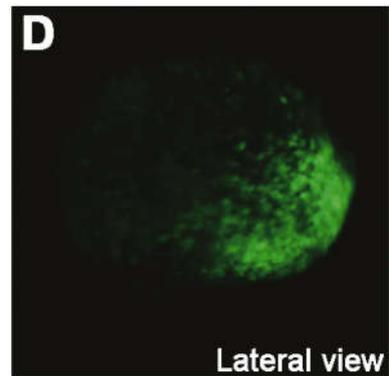
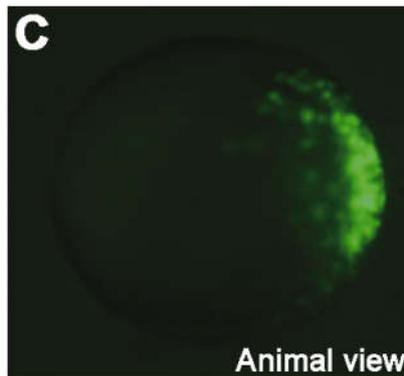
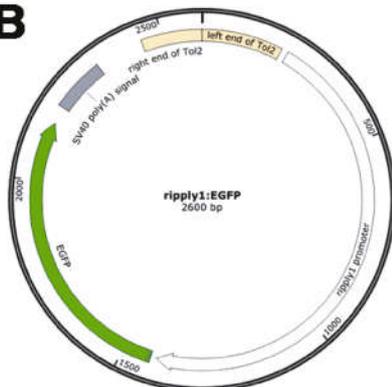
```

CATTAGGGATCCAAAACAGCTTATTAGTATAAAATAAAATAAATATTAATTGTGTGGTATAGCAACATCATTTTTTTTAAATAGTA
GTTCTACATTTGATCATGCTCAAGTAAATAATTGCTTTGAATGACTTATTAATGCCAAAAGATTAGTTAATGCCAACATTTTTTACAAA
CCTTTATTTTTTGTGCAGTACAAAACTGCAGGCTTTTAGACTATTTAACTAGCATAATAAAAACCAGTTCAGTGATCAGTGTGTATT
CACCTGATTGTGCACATTTTAGTCTAACAGCAAAGGCAGAACCTTATACACGTAGTAGTTGTACAATAAGTAAATATATATAATAAT
AATCAATAAATAATTAGTCAAAGAATAACCATTAAAAGCCTTGACACTATACATACAATTGTTAATGTAAAGAGGCTATAAAGCCATAT
CCTATGTAGCCTATAATAGTTTTAGTGACGTTAAGTCATATATTTTTTACTTTAAATTAGTTAAACTAATTAATGTTATGGTTTTTCAG
GTTACCTTTTTTCTGTGTATTGATACAAACCAATACTTTCTAAATATGCTAACCTGAATGATAATGTACACACTTTTTTATCTTTCC
CTTAAGGAAATTTACTAGTCTACAAAAACAACATGTTTACTTTATCTAGTTAATGTTAAATCATGGAAATTCACTTCGATTTTGGCTG
TTTTATGCTAACCATAGTATTTGTAAAACCTGTAAGATGTTAAATAGCCTACAAAAGGCAAAGAATGCGCCAAAAATTAGGCCTATTTCA
ACATTTCACTACATGAAAACAGGGATCATTGTCTGCTCTTAATTTAATGTAGACTCGAAACCTAATAACTAAGTAACTAGCTAACTACATTA
GTTATATATGGCTGCACCTCTGTGTCGCCCCCTGTCTGCTTTCTCGCAGATGGTGTGCAAGTTTGGCCCTCCGTGTTGTTCTAAAAA
CCTCAGGTACCAGTTTTCTCACCTCACGCTGGGGCGCACTGTTTACTCAACTGGAGAAGTCTTCGCACCAAAATGTCCATAGCACA
CTATATCCCATCGTTTGGCAAACAGCACCAACCCCTCTTAAAAACAACCTCGGGTCATTTGGCATCGGCTGCACCGTCCAGCTCCG
CCCCCTGCAGCAGCTGCATAAAAACCCGAGAGCGACGCGCCTTCATTCATTCactgccccgtaaggacgacgactgaccgacc

```

↳ Transcription start

## B

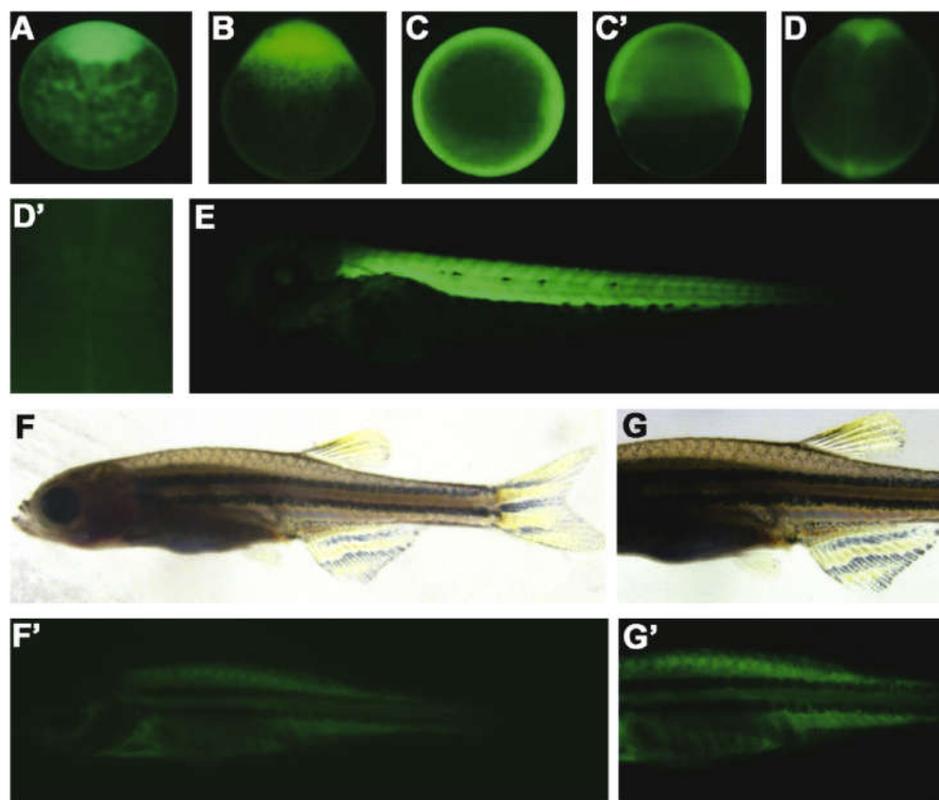


注:(A) *rippy1* 转录起始位点上游 1.2 kb 序列。(B) *rippy1:EGFP* 质粒图谱。(C, D) 注射 *rippy1:EGFP* 质粒后荧光信号位于胚盾期胚胎的背部。动物极观(C)和侧面观(D)。

图 4 注射 *rippy1:EGFP* 质粒后在胚盾期荧光表达情况

Note. (A) 1.2 kb *rippy1* promoter sequence upstream of the transcription start site. (B) *rippy1:EGFP* plasmid map. (C, D) Localization of fluorescence signal driven by the 1.2 kb *rippy1* promoter sequence on the dorsal side of the shield stage embryo. Animal pole view (C) and lateral view (D).

Fig. 4 Localization of fluorescence on the dorsal side at shield stage following injection of *rippy1:EGFP* plasmid



注:(A,B)受精后 10 min 和 1 细胞期胚胎荧光信号。侧面观。(C,C') 胚盾期荧光信号。动物极观和侧面观。(D,D') 体节期胚胎荧光信号。D' 是 D 的躯干部放大图。(E) 24 hpf 荧光信号。(F, G) 斑马鱼成鱼及躯干放大部分。(F', G') 成鱼及躯干放大部分的荧光信号

图 5 *rippy1* 启动子转基因 F1 代鱼的荧光表达图式

Note. (A, B) Fluorescence at 10 min after fertilization and 1 cell stage embryos. (C, C') A shield stage embryo, animal pole view and lateral view, respectively. (D, D') A somite stage embryo. D' is a higher magnification of the trunk region in D. (E) A 24 hpf embryo with fluorescence restricted in the somites. (F, G) An adult fish. G is a higher magnification of F at the trunk region. (F', G') Fluorescence pattern in F and G, respectively.

Fig. 5 Fluorescence signal in *rippy1* promoter-driven GFP F1 progeny transgenic fish

### 3 讨论

近年来许多研究关注 *rippy1* 在体节发生中的作用, *rippy* 家族基因包括 *rippy1*、*rippy2*、*rippy3*, 其与 T-box 蛋白存在相互作用, 三者均可通过结合 *tbx24* 抑制其转录激活<sup>[6]</sup>。爪蟾中 Ledgerline 可明显抑制 *Tbx6* 的表达<sup>[7]</sup>, Bowline 同样能够抑制 *tbx6* 对下游基因的激活作用<sup>[8]</sup>。对 *rippy* 基因家族的进化树分析表明 *rippy1* 基因只出现在后口动物中, 非洲爪蟾中无 *rippy1*, 存在两个 *rippy2* 同源基因 *Ledgerline/rippy2.1* 和 *Bowline/rippy2.2*, 可能会补偿 *rippy1* 的作用<sup>[9]</sup>。另有爪蛙研究表明 XDSCR6/Ripply3 通过拮抗多梳家族蛋白 (polycomb group proteins) 参与胚胎背腹轴的形成<sup>[2]</sup>, 该研究为我们研究斑马鱼中 Ripply1 参与胚胎背腹轴形成提供了一种可能的机制。

原位杂交结果表明 *rippy1* 特异定位在胚盾期

的背部, 可能参与背腹发生, 高表达 *rippy1* 能增强背部基因的转录水平并抑制腹部基因的转录, 导致胚胎背部化表型, 因此, 我们的实验结果说明 *rippy1* 在胚胎背腹轴形成方面有重要作用。这些结论与在爪蛙中研究 XDSCR6/Ripply3 所得到的结果一致<sup>[2]</sup>。

原位杂交揭示的是 mRNA 的表达模式, 而启动子的研究则可以在一定程度上揭示基因在蛋白水平的表达模式, 单独注射 *rippy1:EGFP* 质粒只能在胚盾期观察到特异荧光, 而转基因鱼结果则证明其母源表达, 说明卵母细胞中有蛋白可以调控 *rippy1* 的表达, 而受精之后合子基因的表达决定了 *rippy1* 在胚盾期的特异定位。

因此我们推测 *rippy1* 可能参与胚胎背腹轴, 并且是发生在合子基因开始表达之后, 但母源表达可能会对该作用有一定的影响。我们仍然需要 *rippy1* 敲除后的结果, 以证明其在背腹发生过程中是必要

的,而且 *rippy1* 以何种方式参与,是否涉及 Wnt、BMP 信号通路或者也是通过表观遗传水平调节背腹基因的表达仍待进一步的研究。启动子序列的获得有助于我们获得 *rippy1* 上游调控蛋白,从而绘制出完整的基因调控图谱。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Kawamura A, Koshida S, Hijikata H, et al. Groucho-associated transcriptional repressor *rippy1* is required for proper transition from the presomitic mesoderm to somites [J]. *Dev Cell*, 2005, 9(6): 735 - 744.
- [ 2 ] Li HY, Grifone R, Saquet A, et al. The *Xenopus* homologue of Down syndrome critical region protein 6 drives dorsoanterior gene expression and embryonic axis formation by antagonising polycomb proteins [J]. *Development*, 2013, 140(24): 4903 - 4913.
- [ 3 ] Shibuya K, Kudoh J, Minoshima S, et al. Isolation of two novel genes, *DSCR5* and *DSCR6*, from Down syndrome critical region on human chromosome 21q22.2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 271(3): 693 - 698.
- [ 4 ] Cao JM, Li SQ, Shao M, et al. The PDZ-containing unconventional myosin XVIIIa regulates embryonic muscle integrity in zebrafish [J]. *J Genet Genomics*, 2014, 41(8): 417 - 428.
- [ 5 ] Cao JM, Li SQ, Zhang HW, et al. High mobility group B proteins regulate mesoderm formation and dorsoventral patterning during zebrafish and *Xenopus* early development [J]. *Mech Dev*, 2012, 129(9 - 12): 263 - 274.
- [ 6 ] Kawamura A, Koshida S, Takada S. Activator-to-repressor conversion of T-box transcription factors by the Ripply family of Groucho/TLE-associated mediators [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(10): 3236 - 3244.
- [ 7 ] Hitachi K, Danno H, Tazumi S, et al. The *Xenopus* Bowline/Ripply family proteins negatively regulate the transcriptional activity of T-box transcription factors [J]. *Int J Dev Biol*, 2009, 53: 631 - 639.
- [ 8 ] Kondow A, Hitachi K, Okabayashi K, et al. Bowline mediates association of the transcriptional corepressor XGrg-4 with Tbx6 during somitogenesis in *Xenopus* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359(4): 959 - 964.
- [ 9 ] Janesick A, Shiotsugu J, Taketani M, et al. RIPPLY3 is a retinoic acid-inducible repressor required for setting the borders of the pre-placodal ectoderm [J]. *Development*, 2012, 139(6): 1213 - 1224.

[收稿日期] 2015-07-29

**【编者按】** 学术不端行为是指违反学术规范、学术道德的行为,国际上一般用来指捏造数据(fabrication)、篡改数据(falsification)和剽窃(plagiarism)三种行为。但是一稿多投、侵占学术成果、伪造学术履历等行为也可包括进去。学术不端行为在各国、各个历史时期都曾经发生过,但是像中国当前这样如此泛滥,严重到被称为学术腐败的地步,却是罕见的。这不仅表现在违反者众多、发生频繁,各个科研机构都时有发生,而且表现在涉及了从院士、教授、副教授、讲师到研究生、本科生的各个层面。由于目前中国缺乏学术规范、学术道德方面的教育,科技工作者在学习、研究过程中发生不端行为,经常是由于对学术规范、学术道德缺乏了解,认识不足造成的。因此,对科技工作者进行学术规范、学术道德教育,防患于未然,是遏制学术腐败、保证中国学术研究能够健康发展的一个重要措施。

早在 2007 年,中国科协就发布了科技工作者科学道德规范,本刊重温此规范,以期在我刊营造一种健康的学术研究氛围,由于版面限制,本刊陆续将规范全文刊出。

## 科技工作者科学道德规范(一)

### 第一章 总则

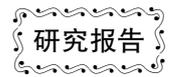
第一条 为弘扬科学精神,加强科学道德和学风建设,提高科技工作者创新能力,促进科学技术的繁荣发展,中国科学技术协会根据国家有关法律法规制定《科技工作者科学道德规范》。

第二条 本规范适用于中国科学技术协会所属全国学会、协会、研究会会员及其他科技工作者。

第三条 科技工作者应坚持科学真理、尊重科学规律、崇尚严谨求实的学风,勇于探索创新,恪守职业道德,维护科学诚信。

第四条 科技工作者应以发展科学技术事业,繁荣学术思想,推动经济社会进步,促进优秀科技人才成长,普及科学技术知识为使命。以国家富强,民族振兴,服务人民,构建和谐社会为己任。

(待续)



# 一种在紫外敏感型视锥细胞中特异表达 tdTomato 的转基因斑马鱼系的构建

陈哲, 宋著, 王雅冬, 赵呈天\*

(中国海洋大学海洋生物多样性与进化研究所, 山东 青岛 266003)

**【摘要】** 目的 鉴于目前对斑马鱼视锥细胞视蛋白运输机制并不明确,且缺乏相应的抗体,本实验拟构建一种可以在视锥细胞中特异表达荧光的转基因斑马鱼。方法 利用编码紫外敏感型视蛋白基因(*sus1*)的启动子,构建了一种在紫外敏感型视锥细胞中特异表达红色荧光蛋白 tdTomato 的转基因斑马鱼。同时,将 tdTomato 荧光蛋白与非洲爪蟾 rhodopsin 蛋白末端 44 个氨基酸相融合,将该融合蛋白定位于紫外敏感型视锥细胞的外节段,进而可模拟内源性视蛋白的定位。结果 共筛选出三种不同品系的转基因斑马鱼,经过免疫组化分析,确定其中一种转基因品系是正确的目标品系。结论 该转基因斑马鱼的构建将会为进一步研究视锥细胞中视蛋白的运输机制提供帮助。

**【关键词】** 斑马鱼;视锥细胞;紫外敏感型; SWS1; UV opsin; 转基因

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0453-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.003

## Establishment of a transgenic zebrafish line with tdTomato expression in the ultraviolet-sensitive cone photoreceptors

CHEN Zhe, SONG Zhu, WANG Ya-dong, ZHAO Cheng-tian

(Institute of Evolution & Marine Biodiversity, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

**【Abstract】 Objective** To better understand the mechanisms of cone opsin transport, we set to generate a transgenic zebrafish line with red fluorescence proteins expressing in the cone photoreceptors. **Methods** We used *sus1* promoter to drive the expression of a chimerical protein, in which the last 44 amino acids of rhodopsin of *Xenopus laevis* were fused to the C-terminus of tdTomato to restrict its localization to the outer segment of photoreceptors. **Results** We successfully isolated such a transgenic zebrafish line and confirmed the localization of tdTomato by immunostaining analysis. **Conclusions** This transgenic zebrafish line will help us to better understand the transport mechanisms of cone opsins, especially the transport in live photoreceptors.

**【Key words】** Zebrafish; Cone photoreceptor; Ultraviolet-sensitive; *sus1*; UV opsin; Transgene

感光细胞是接收光信号并将其传递至大脑形成视觉的第一场所,是视网膜中最重要神经元细胞之一。感光细胞由外节段(outer segment)、内节段(inner segment)、细胞核区及突触区等部分组成,其中外节段与内节段由连接纤毛(connecting cilium)相连,是外节段蛋白运输的主要通道(图 1A)。根

据外节段的形状差异,感光细胞可分为视杆细胞(圆柱形)和视锥细胞(圆锥形)两种,其中视杆细胞可感受弱光形成暗视觉,视锥细胞可感受强光形成明视觉,并具有颜色识别性<sup>[1]</sup>。感光细胞接收光信号主要是通过一种 G 蛋白偶联的跨膜受体蛋白——视蛋白(opsin)来完成。视蛋白产生于感光

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31372274,81301718)。

[作者简介] 陈哲(1995 -),男,生物化学与分子生物学专业,本科,研究方向:斑马鱼眼睛发育。E-mail: craz2012@126.com

[通讯作者] 赵呈天,教授,研究方向:胚胎发育。E-mail: chengtian\_zhao@ouc.edu.cn

细胞内节段,通过连接纤毛运输到外节段,富集于外节段内的膜盘(membrane disk)上行使功能。依据对光线敏感程度的差异,视锥细胞视蛋白可分为长波敏感型(long-wavelength sensitive, LWS)(红光敏感)、中波敏感型(middle-wavelength sensitive, MWS)(绿光敏感)和短波敏感型(short-wavelength sensitive, SWS)(蓝光敏感)三种。相应的,视锥细胞也分为 L 型、M 型以及 S 型等三种不同类型。在部分脊椎动物(如斑马鱼)中,除了上述几种感光色素之外,还存在一种对紫外敏感的短波敏感型视蛋白,即 SWS1(short-wavelength sensitive type 1)视蛋白或 UV 视蛋白<sup>[2,3]</sup>。

斑马鱼具有与人类似的视网膜组成,其感光细胞的结构及功能与人类似,且发育时间较短,是理想的研究感光细胞的发育及视觉形成机制的模式动物。斑马鱼有五种感光细胞,包括一种视杆细胞和四种视锥细胞<sup>[4]</sup>。其中红光敏感型和绿光敏感型视锥细胞可相互结合,形成双锥细胞,紫外敏感型和蓝光敏感型视锥细胞均为单锥细胞,且紫外敏感型视锥细胞长度要短于蓝光敏感型视锥细胞。斑马鱼感光细胞首次出现在胚胎发育至 43~48 hpf(hour post fertilization)之间,在胚胎发育至 72 hpf 后,形成较为成熟的感光细胞层。对不同视蛋白基因的原位杂交结果表明,红光敏感的视锥细胞首先出现,然后是绿光敏感型和蓝光敏感型,紫外敏感型的视锥细胞最晚形成<sup>[5,6]</sup>。在成熟的斑马鱼视网膜中,感光细胞具有非常精细的马赛克排列方式,这种排列与细胞极性蛋白 Crumbs 的存在密切相关<sup>[7]</sup>。

感光细胞凋亡与多种人类疾病密切相关,包括视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP), Leber's 先天性黑朦症(Leber's congenital amaurosis, LCA)等,是导致人类失明的重要原因,研究表明视蛋白的功能及运输缺陷是导致感光细胞凋亡的重要诱因<sup>[8,9]</sup>。由于外节段缺乏相应的蛋白合成系统,所有蛋白均是在内节段合成,经连接纤毛运输至外节段(图 1A),该运输环节出现问题可导致感光细胞的凋亡,因此研究视蛋白的运输机制显得尤为重要。

对斑马鱼视蛋白运输机理研究的一个重要手段是通过抗体免疫染色,分析视蛋白的定位,而目前仅视杆细胞的视蛋白有较好的抗体,对视锥细胞视蛋白的抗体使用较少。同时,由于不同视锥细胞视蛋白在结构上存在非常大的相似性,其抗体使用也存在着交叉结合的风险。为了更好的研究斑马鱼视

蛋白运输的分子机制,我们利用 *sus1* 视蛋白基因的启动子构建了一种在紫外敏感型感光细胞中特异表达荧光蛋白 *tdTomato* 的转基因斑马鱼。我们将 *tdTomato* 基因与编码非洲爪蟾 rhodopsin 末端 44 个氨基酸的基因片段相连接,后者可帮助 *tdTomato* 定位至视锥细胞的外节段,并模拟视蛋白的运输及定位<sup>[10,11]</sup>。我们已成功获得了相应的转基因斑马鱼,并验证了其表达的特异性,该转基因斑马鱼将为进一步研究视锥细胞视蛋白的运输机制提供便利。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

实验所用野生型斑马鱼为 Tübingen 品系,由中国海洋大学药学院分子医学生物学研究室获得。同时,为减少荧光观测时黑色素的干扰,我们将所获得的转基因品系与斑马鱼白化突变体 albino 进行了交配。

### 1.2 载体构建

首先,将 5.5 kb *sus1* 基因启动子(从 Dr Kawamura 处获得)克隆至 Gateway 载体 p5E-MCS 上;后通过 PCR 扩增含有 HA 标签序列的 *tdTomato* 基因,并通过 BP 反应将该片段连接到 pDONR221 载体中(所用扩增引物为:HA-TOM-P5: ATGTACCATACGATGTTCC-AGATTACGCTGTGAGCAAGGGCGAGGAG, HA-TOM-P3: GGGGACCACTTTGTACAAG-AAAGCTGGGTACTTGTACAGCTCGTCCATGC),编码爪蟾 opsin 羧基端 44 氨基酸的片段克隆至 p2rp3 载体<sup>[11]</sup>,最后将上述三个载体与目标载体 pDEST-Tol2pA2 通过 Multisite Gateway 的方式进行连接,具体载体信息见参考文献<sup>[12]</sup>。

### 1.3 显微注射及转基因品系筛选

将表达载体与编码转座酶(transposase)的 mRNA 共同注射至单细胞时期的斑马鱼胚胎中,注射终浓度分别为 30 ng/ $\mu$ L 和 100 ng/ $\mu$ L。5 d 后,在荧光显微镜下挑选眼睛有红色荧光的胚胎进行养殖,至成鱼后进行随机交配,筛选 F1 代眼睛有红色荧光的 F0 品系。

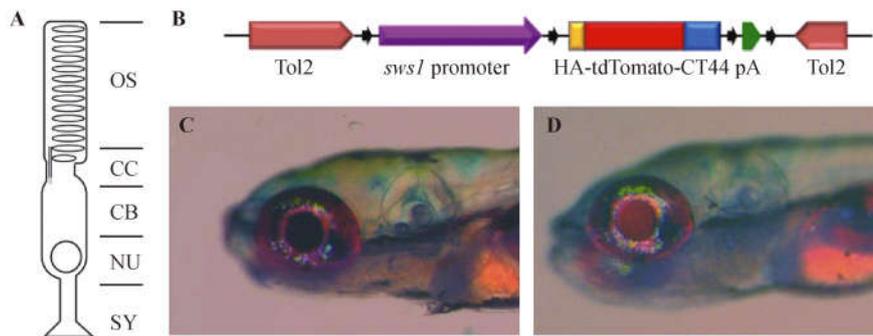
### 1.4 冰冻切片及免疫组化

首先将胚胎或成鱼眼睛用 4% 多聚甲醛 4℃ 固定过夜,1 × PBST 洗两次,每次 5 min,然后加入含 30% 蔗糖的 PBST 脱水;4℃ 过夜后,将胚胎放入冰冻包埋剂中,调整到合适位置,置于 -20℃,包埋剂凝固后进行冰冻切片机切片,厚度约 12  $\mu$ m。收集

的切片置于室温干燥 4 h 或者 4℃ 过夜, 然后 PBST 水化, 用封闭液 (10% 山羊血清, 90% PBST, 0.5% Triton X-100) 封闭 45 min; 加入一抗, 4℃ 过夜; 之后 1 × PBST 洗 3 次, 加入二抗, 室温反应 4 h, 1 × PBST 洗 2 次, 然后进行共聚焦显微镜 (Leica Sp8) 观测。本实验所用抗体比例为: zpr-1 小鼠单克隆抗体 (ZIRC, 1:250), zpr-3 小鼠单克隆抗体 (ZIRC, 1:250) 以及 HA 单克隆抗体 (Santa Cruz, 1:250)

## 2 结果

### 2.1 载体构建



注: A: 视杆细胞的结构示意图; B: Tol2 转基因表达载体示意图; C, D: 注射表达载体 5 d 后幼鱼眼睛荧光照片, 注射幼鱼 (D) 在眼睛晶体中有明显红色荧光, 而未注射幼鱼 (C) 眼睛仅有自发荧光现象。A 中缩写词: OS (outer segment): 外节段; CC (connecting cilium): 连接纤毛; CB (cell body): 细胞体; NU (nucleus): 细胞核; SY (synapse): 突触。

图 1 表达载体构建及显微注射

Note. A: Diagram of a rod photoreceptor cell; B: Diagram of the Tol2 construct for making transgenic line; C, D: Images of 5 dpf zebrafish larvae showing red fluorescence in the lens of injected embryo (D), while only auto-fluorescence exists in the control larvae (C).

Fig. 1 Diagram of microinjection and Tol2 construct

### 2.2 显微注射及转基因筛选

将该表达载体和编码转座酶的 mRNA 共同注射到单细胞时期的斑马鱼胚胎中, 在胚胎发育至 5 d 时, 在眼睛晶体处有明显的荧光表达 (图 1D)。后我们进行了大量注射培养, 共获得约 50 条 F0 成鱼。之后, 对 F0 进行随机交配, 筛选 F1 代具有荧光特异表达的品系。在筛选的过程中, 由于眼睛存在自发荧光现象 (图 1C, D), 我们通过冰冻切片进行了进一步的验证。

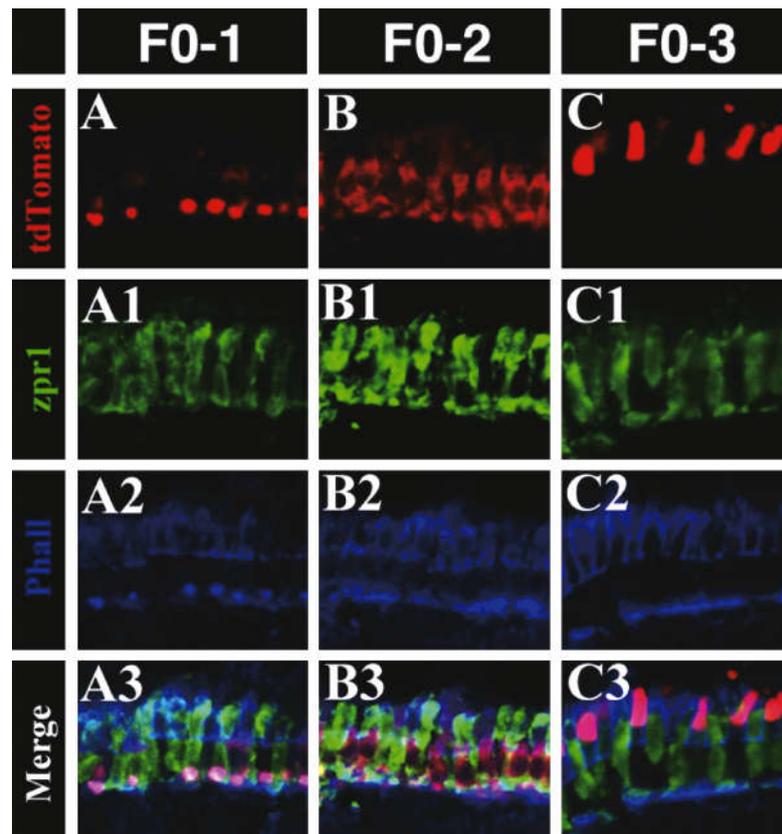
### 2.3 稳定表达转基因品系的建立

我们共获得三种 F0 转基因品系, 免疫染色结果表明三种品系荧光蛋白的表达有明显差异: F0-1 转基因胚胎中红色荧光的表达主要成点状, 存在于视锥细胞的突触部位 (图 2A)。进一步 DAPI 染色显示该表达部位并非细胞核 (图未出示); F0-2 转基因胚胎中红色荧光主要存在于感光细胞细胞体 (cell body) 中, 同时也存在类似于 F0-1 的点状分布

为更好地研究脊椎动物视锥细胞视蛋白的运输机理, 我们设计了一种编码红色荧光蛋白的嵌合基因 *tdTomato-CT44*, 其中红色荧光蛋白编码基因 *tdTomato* 与编码非洲爪蟾 Opsin 末端 44 个氨基酸的序列相互融合。在表达的嵌合蛋白中, 末端的 44 个氨基酸可将融合蛋白定位于感光细胞外节段。进一步利用 Multisite Gateway 技术, 将该嵌合基因连接到 *sws1* 基因的 5.5 kb 启动子后, 从而保证该融合蛋白在紫外敏感型的视锥细胞中特异表达<sup>[13]</sup>。同时, 为了提高转基因筛选的效率, 将整个表达片段克隆到了具有 Tol2 转座子的目标载体上 (图 1B)。

(图 2B); F0-3 转基因胚胎中红色荧光的表达完全存在于外节段, 而且可看到明显的圆锥状, 说明其为目标品系 (图 2C)。

我们对 F0-3 的转基因品系进行了传代, 对 F2 代胚胎的免疫组化分析表明其具有与 F1 代完全相同的亚细胞定位, 表明转基因品系构建成功。同时, 分别收集 3、5 d 和 7 d 的 F2 代胚胎, 进行冰冻切片及免疫染色, 结果表明红色荧光蛋白在发育至 3 d 左右开始表达, 并主要定位于视锥细胞的外节段。随着胚胎的发育, 可观察到外节段逐渐延伸, 呈明显圆锥状 (图 3A-C)。同时, HA 抗体染色的结果表明其染色部位与 *tdTomato* 荧光蛋白表达部位完全重叠, 排除了胚胎自发荧光的干扰 (图 3D)。最后, 我们利用视杆细胞视蛋白抗体 *zpr3* 进行了免疫染色 (图 3E), 结果表明 *tdTomato* 的存在部位与 *zpr3* 的染色部位并不重合, 且均位于 *zpr3* 染色基底部位下方。



注: A, B, C: 红色荧光蛋白的表达位置; A1, B1, C1: zpr1 免疫荧光染色, 显示双锥细胞的位置; A2, B2, C2: 鬼笔环肽 (phalloidin) 染色, 显示肌动蛋白的位置; A3, B3, C3: 为三种的叠加。

图 2 三种不同转基因斑马鱼视网膜切片免疫染色图

Note. Confocal images of the retinal cells stained with zpr-1 antibodies (A1, B1, C1). Sections were also counterstained with phalloidin to label the actin filaments (A2, B2, C2).

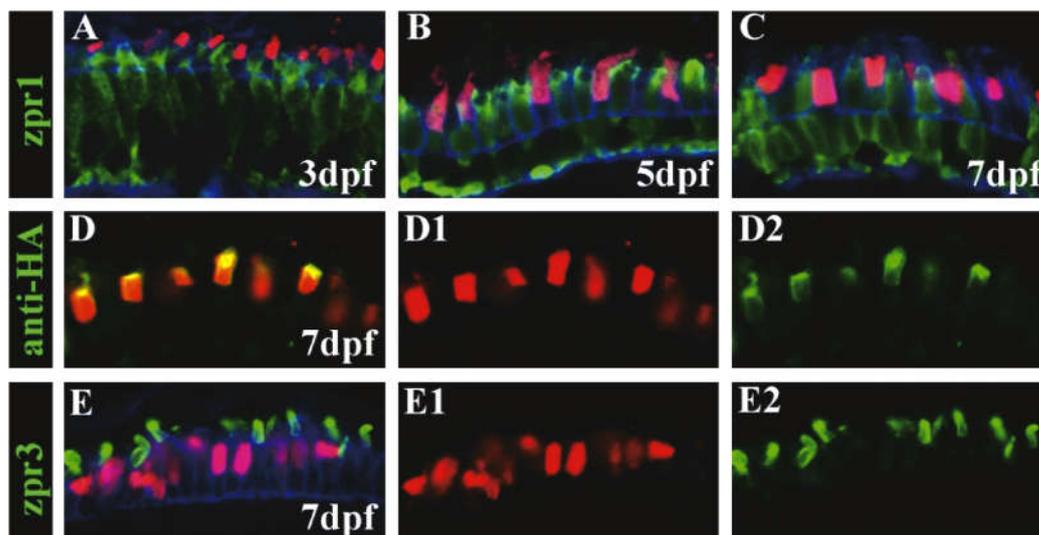
Fig. 2 Immunohistochemistry of the retinal cells in three transgenic zebrafish lines.

### 3 讨论

研究视蛋白的运输机理对认识感光细胞的凋亡及相应的视网膜疾病具有重要意义。斑马鱼感光细胞的结构与人类类似, 研究其视蛋白运输机制可对视网膜色素变性等疾病的研究提供有力支持。目前对视蛋白研究的一个瓶颈问题在于缺乏有效的检测抗体, 虽然针对斑马鱼不同视蛋白的抗体已经有报道<sup>[3]</sup>, 但是由于存在特异性的担心, 在视蛋白的研究中还没有广泛采用。目前, 仅有针对视杆细胞视蛋白的抗体 (zpr3) 得到广泛认可。

为更好的研究视锥细胞视蛋白的运输机制, 本实验建立了一种在紫外敏感型视锥细胞中特异表达红色荧光蛋白 tdTomato 的转基因鱼品系。同时, 通过将 tdTomato 与视蛋白末端 44 个氨基酸相融合, 使得该荧光蛋白特异定位于视锥细胞外节段, 并模拟内源性视蛋白的定位, 从而为视蛋白运输机制的研究提供了新型的研究工具。在视杆细胞外节段, 每

天更新约 10% 的视蛋白, 因此需要大量的视蛋白合成及运输。为适应这一需求, 感光细胞产生了一种特有的高效运输机制: 除非有特异的非外节段定位信号, 感光细胞外节段是几乎所有膜蛋白的默认运输目的地<sup>[14]</sup>。视蛋白末端 44 个氨基酸具有部分跨膜序列, 可将其融合蛋白定位至外节段。但是, 实验中发现这并不是绝对的定位方式, 我们除发现在外节段的定位之外, 也发现两种不同的定位 (F0-1, F0-2)。在这两种转基因品系中, 红色荧光蛋白存在于突触或者胞体中, 与预期结果并不一致。尤其是定位在近突触部位的转基因品系中, 我们发现其表达的融合蛋白虽成点状分布, 但与核染料 DAPI 不能共定位。我们推测造成这种定位的原因可能是与转基因片段在基因组插入位点的特殊性有关, 可能插入的位点附近有增强子的存在, 导致该蛋白的表达明显升高, 而合成的蛋白未能及时包装至运输囊泡中, 自我聚集形成类似于内涵体 (inclusion bodies) 的结构, 从而采取不同的运输机制。



注: A, B, C: 不同时期转基因胚胎 *zpr-1* 抗体染色结果(绿色); D, D1, D2: 7 d 转基因胚胎 HA 抗体染色结果(绿色); E, E1, E2: 7 d 转基因胚胎 *zpr3* 抗体染色结果(绿色), 蓝色为鬼笔环肽的染色。所有图中, 红色均表示 tdTomato 的表达。

图 3 稳定表达转基因品系感光细胞切片染色分析

Note. Confocal images of the photoreceptors in the stable transgenic zebrafish line stained with *zpr-1* antibody (A, B, C), anti-HA antibody (D, D1, D2) and *zpr-3* antibody (E, E1, E2). In all panels, red channel indicates expression of tdTomato in the transgenic zebrafish larvae.

Fig. 3 Immunoanalysis of photoreceptors in the stable transgenic zebrafish line.

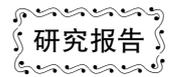
从 F0-3 的免疫染色结果可以看到, 红色荧光间隔性存在于双锥细胞胞体之间 (*zpr1* 染色), 且位置明显要低于视杆细胞视蛋白 (*zpr3* 染色) 的定位, 这与紫外敏感型视锥细胞长度要短于双锥细胞和视杆细胞有关。同时, 对成鱼视网膜的横切染色, 可以看到精确的马赛克排列图案(未出示), 与预期的感光细胞排列方式完全一致, 表明在该品系中, 红色荧光蛋白 tdTomato 完全特异存在于紫外敏感型视锥细胞中。该转基因鱼的建立对下一步研究视锥细胞视蛋白的运输及亚细胞定位分布具有重要的帮助。

(致谢 感谢日本东京大学的 Kawamura 教授提供 UV opsin 启动子, 同时感谢中国海洋大学药学院分子医学生物学研究室提供斑马鱼品系。)

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Ahnelt PK, Kolb H. The mammalian photoreceptor mosaic-adaptive design [J]. *Progr Retinal Eye Res*, 2000, 19: 711 - 777.
- [ 2 ] Jacobs GH, Neitz J, Deegan JF. 2<sup>nd</sup>. Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light [J]. *Nature* 1991. 353: 655 - 656.
- [ 3 ] Vihtelic TS, Doro CJ, Hyde DR. Cloning and characterization of six zebrafish photoreceptor opsin cDNAs and immunolocalization of their corresponding proteins [J]. *Visual Neurosci*, 1999, 16: 571 - 585.
- [ 4 ] Nawrocki L, BreMiller R, Streisinger G, et al. Larval and adult visual pigments of the zebrafish, *Brachydanio rerio* [J]. *Vision Res*, 1985, 25: 1569 - 1576.
- [ 5 ] Larison KD, Bremiller R. Early onset of phenotype and cell patterning in the embryonic zebrafish retina [J]. *Development* 1990. 109: 567 - 576.
- [ 6 ] Raymond PA, Barthel LK, Curran GA. Developmental patterning of rod and cone photoreceptors in embryonic zebrafish [J]. *JComp Neurol*, 1995, 359: 537 - 550.
- [ 7 ] Zou J, Wang X, Wei X. Crb apical polarity proteins maintain zebrafish retinal cone mosaics via intercellular binding of their extracellular domains [J]. *Dev Cell* 2012, 22: 1261 - 1274.
- [ 8 ] Cremers FP, van den Hurk JA, den Hollander AI. Molecular genetics of Leber congenital amaurosis [J]. *Human Molec Genet*, 2002, 11, 1169 - 1176.
- [ 9 ] Humphries P, Kenna P, Farrar GJ. On the molecular genetics of retinitis pigmentosa [J]. *Science* 1992. 256: 804 - 808.
- [ 10 ] Tam BM, Moritz OL, HurdLB, et al. Identification of an outer segment targeting signal in the COOH terminus of rhodopsin using transgenic *Xenopus laevis* [J]. *J Cell Biol*, 2000, 151: 1369 - 1380.
- [ 11 ] Zhao C, Malicki J. 2011. Nephrocystins and MKS proteins interact with IFT particle and facilitate transport of selected ciliary cargos [J]. *EMBO J* 2011, 30: 2532 - 2544.
- [ 12 ] Kwan KM, Fujimoto E, Grabher C, et al. The Tol2kit: a multi-site gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs [J]. *Develop Dynamics* 2007, 236(11): 3088 - 3099.
- [ 13 ] Takechi M, Hamaoka T, Kawamura S. Fluorescence visualization of ultraviolet-sensitive cone photoreceptor development in living zebrafish [J]. *FEBS Letters*, 2003, 553: 90 - 94.
- [ 14 ] Baker SA, Haeri M, Yoo P. et al. The outer segment serves as a default destination for the trafficking of membrane proteins in photoreceptors [J]. *J Cell Biol*, 2008, 183: 485 - 498.

[ 收稿日期 ] 2015-08-07



# Midkine-a 通过限制心肌细胞总数的方式 阻碍斑马鱼胚胎心脏生长

陈静<sup>1\*</sup>, Luo Jing<sup>2</sup>, Hitchcock Peter<sup>2</sup>

(1. 福建师范大学生命科学院, 福州 350117; 2. 美国密歇根大学安娜堡分校克鲁格眼科中心, 安娜堡 48103)

**【摘要】** 目的 探讨一种可溶性的外分泌因子 midkine-a 在斑马鱼胚胎心脏发育过程中的功能。方法 在整体胚胎上做 midkine-a RNA 的原位杂交实验;利用原有的转基因斑马鱼系 Tg (pmidkine-a:EGFP), 动态观察胚胎从出生到心脏发育成形这一段时间心脏荧光表达情况;将原有的转基因斑马鱼体系 Tg (phsp:midkine-a:EGFP) 胚胎进行热休克而过表达 midkine-a, 观察胚胎心脏表型;利用 Tg (pcmlc2:dsRed) 鱼系胚胎的心肌细胞核带有红色荧光, 能进行单个心脏心肌细胞计数这一特点, 将杂合的 Tg (phsp:midkine-a:EGFP) 鱼系与纯合的 Tg (pcmlc2:dsRed) 鱼系交配, 以得到 Tg (phsp:midkine-a:EGFP/pcmlc2:dsRed) 的杂合胚胎, 对其进行热休克而过表达 midkine-a, 计算每个胚胎心脏内心肌细胞的总数;用吗啉寡核苷酸(morpholino, MO)阻碍新生胚胎内的 midkine-a mRNA 表达, 观察胚胎心脏表型。**结果** 原位杂交试验证实 midkine-a 在胚胎 48 hpf(hour post fertilization, 受精后, 用来标记斑马鱼胚胎年龄)大时表达于心脏;转基因 Tg (pmidkine-a:EGFP) 胚胎在 72 hpf 时其 EGFP 表达于心脏;Tg (phsp:midkine-a:EGFP) 胚胎在过表达 midkine-a 后心脏变小;吗啉寡核苷酸敲除 midkine-a 对胚胎心脏发育无影响;最后在 Tg (phsp:midkine-a:EGFP/pcmlc2:dsRed) 鱼系胚胎内过表达 midkine-a 导致其单个心脏内心肌细胞数目变少, 与其小心脏外形吻合。**结论** midkine-a 在斑马鱼胚胎发育过程中表达于胚胎心脏;过表达 midkine-a 导致胚胎心脏内心肌细胞总数减少及心脏变小;敲除 midkine-a 则对胚胎心脏发育无影响。

**【关键词】** 斑马鱼胚胎;心脏发育;midkine-a;心肌细胞池

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0458-08

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.004

## Midkine-a inhibits zebrafish embryonic heart growth by limiting the cardiomyocyte pool

CHEN Jing<sup>1</sup>, LUO Jing<sup>2</sup>, Hitchcock Peter<sup>2</sup>

(1. Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China; 2. Kellogg Eye Center of University of Michigan-Ann Arbor, Ann Arbor, US 48103)

**【Abstract】 Objective** To investigate the functional role of a soluble secretion factor midkine-a in the process of zebrafish embryonic heart development. **Methods** Whole-mount in situ hybridization was performed to detect whether midkine-a is expressed in the embryonic heart. In the transgenic embryonic heart of Tg (pmidkine-a:EGFP), the expression of EGFP in the heart was monitored. Multiple heat shock treatments were applied to Tg (phsp:midkine-a:EGFP) embryos in order to overexpress midkine-a, and the phenotype of the heart was observed. The heterozygous Tg (phsp:midkine-a:EGFP) fish were crossed with homozygous Tg (pcmlc2:dsRed) fish, which specifically expresses RFP in the nuclei of embryonic cardiomyocytes to facilitate myocyte number counting. To get Tg (phsp:midkine-a:EGFP/pcmlc2:dsRed)

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 30971106);福建省自然科学基金(No. 2014J01304);教育部留学回国人员基金(教外司留[2010]1561号)。

[通讯作者] 陈静(1972-),女,副教授,博士,研究方向:斑马鱼胚胎心脏发育。E-mail: jc2417@fjnu.edu.cn

embryos, and the total number of cardiomyocytes in their heart was counted and compared with the controls when the heat shock induced overexpression of midkine-a. Morpholino knocked out of midkine-a was performed to observe the heart phenotype. **Results** Midkine-a was expressed in the zebrafish embryonic heart during development. Overexpression of midkine-a led to a smaller heart and reduced total number of cardiomyocytes in a single heart, which might be associated with the smaller heart phenotype. Morpholino knocked out of midkine-a had no effect upon the heart development. **Conclusions** Midkine-a impedes zebrafish embryonic heart growth by limiting its cardiomyocyte pool.

**【Key words】** Zebrafish embryo; Heart development; midkine-a; Cardiomyocyte pool

midkine 是一种可溶性细胞生长因子,能与小分子肝素结合,并在调节细胞生长、增殖、分化及存活方面起着重要的多样化的作用<sup>[1]</sup>。它是一个 13 kDa 的分泌分子,由两个结构域组成,C 端结构域能与肝素结合,N 端结构域能与受体结合,两个结构域之间以双硫键相连<sup>[1]</sup>。Midkine-a 广泛地表达于神经系统<sup>[2]</sup>、免疫系统、肿瘤组织及心脏等器官或组织内。midkine 能促进神经元生长<sup>[3]</sup>,促进细胞分裂、存活、抗细胞凋亡、促进肿瘤细胞趋药现象发生等<sup>[1]</sup>。

不同于哺乳动物只有一种 midkine,由于基因重复的结果 midkine 在斑马鱼体内有 2 种亚型:a 型和 b 型<sup>[3]</sup>。midkine-a 首先表达于斑马鱼胚胎尾芽期的胚胎的轴旁中胚层,而后 midkine-a 表达逐渐开始集中于神经组织如头部的神经外胚层、神经管及脊髓<sup>[3]</sup>。在 16 hpf 时, midkine-a 开始出现在体节中<sup>[3]</sup>。故而人们普遍地认为 midkine-a 在神经组织形成及胚胎正常发育中起着重要的作用<sup>[2,3]</sup>。有文献报道 midkine-a 亦表达于斑马鱼视网膜的干细胞之内,并作为 Id2a 信号通路的主要成员调节动态的细胞周期进程<sup>[4]</sup>。此外 midkine-a 也存在于成年哺乳动物的心脏<sup>[5]</sup>,可能通过其抗细胞凋亡的功能在心肌缺血时保护心脏<sup>[6]</sup>。在成年斑马鱼受到心肌损伤而导致的再生过程中,再生心肌内 midkine-a 基因的转录水平升高,故而其可能在心脏再生中也起着一种积极的保护性<sup>[7]</sup>。我们的研究表明 midkine-a 也表达于斑马鱼胚胎心脏区域内,尽管如此, midkine-a 在胚胎心脏发育过程中的功能尚不清楚,而且不一定与它在成年心脏或心肌再生中的作用平行一致。由此促使我们开始探索 midkine-a 在心脏发育中的作用。类似于 midkine-a, midkine-b 也是一种能与小分子肝素结合的可溶性细胞生长因子,在体外细胞培养中表现出促进神经生长和血管新生的作用<sup>[1]</sup>。有报道表明 midkine-b 在斑马鱼胚胎发育过程中的原肠胚期中起着促进神经板图式形成的作用,它能调节神经板边缘的干细胞的分化<sup>[6]</sup>。在斑马鱼胚胎内, midkine-a 和 midkine-b 分

别表达于互不重叠的区域<sup>[3]</sup>。而我们的前期数据表明 midkine-b 并不表达于斑马鱼成年或胚胎心脏,故在本系列实验设计时忽略 midkine-b。

斑马鱼的胚胎心脏发育可分为如下过程:心脏前区形成,心脏前体细胞迁移,心腔形成及心室形成。在斑马鱼胚胎原形形成之前心脏前体细胞分散在胚胎腹侧及侧面的区域内<sup>[7]</sup>。在胚胎受精后 12 h (12 hpf, hours post fertilization), 胚胎两侧的心脏前体细胞向中线前部迁移,形成一个平行对称的心脏前区域<sup>[8]</sup>。而后心脏前区域分化出位于中间的心内膜前体细胞群,及位于侧部的心肌前体细胞群<sup>[8]</sup>。在胚胎处于 13-原节期时 (15.5 hpf), 心脏前区域分出前心室前体细胞群及前心房前体细胞群。在 19 hpf 时心肌前体细胞层在中线上汇集并形成一个圆锥形结构<sup>[8]</sup>。该圆锥形结构在 22 hpf 时进一步演化成一个位于胚胎前后轴上的初始心管。到 48 hpf 时,这个心管历经心腔形成,右向心室形成,心瓣膜生成,血循环形成,形成一个成熟的有功能的心脏<sup>[8]</sup>。

我们初步的研究表明:①原位杂变试验证实 midkine-a 表达于发育中的心脏;② Midkine-a 基因 5' 端上游 2.2 kb 长的 DNA 序列能引导 EGFP 在胚胎体内普遍表达,包括心脏或的表达;③ 过表达 midkine-a 导致斑马鱼胚胎心脏变小;④ MO 敲除 midkine-a 对胚胎心脏发育没有影响。⑤ 过表达 midkine-a 导致心脏内心肌细胞总数减少,与小心脏的表型一致。这些数据表明, midkine-a 在斑马鱼胚胎心脏的发育中起着重要的作用,能通过限制心肌细胞总数的方式调整发育中的心脏生长。

## 1 材料与方 法

### 1.1 斑马鱼饲养

所有实验斑马鱼及胚胎均为清洁级,来源于野生型 AB 品系<sup>[10,11]</sup>。用于交配的 30 只斑马鱼均为 24 月龄,体重 0.11 ~ 0.23 kg。实验操作地址为美国密歇根大学安娜堡分校克罗格眼科中心。斑马鱼

胚胎存放于 27℃ 的海盐水 (60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Instant Ocean Salts; Aquarium Systems, Mentor, OH) 中。房间明暗周期为 14 h/10 h<sup>[12]</sup>。转基因斑马鱼 Tg (phsp: midkine-a; EGFP) 是实验室原有的鱼系。其转入的基因为热休克蛋白启动子连接 midkine-a 和 EGFP (加强绿色荧光蛋白, enhanced green fluorescent protein) 的融合基因。在热休克处理下, 该株鱼系会过表达 midkine-a; EGFP mRNA。Tg (pmidkine-a; EGFP) 是另外一株转基因斑马鱼系, 转入基因为 midkine-a。转录起始位点 5' 端上游 2.2 kb 的启动子片段连接 EGFP 报告蛋白。该株鱼系胚胎在有 midkine-a 表达的组织 and 器官会表达 midkine-a; EGFP 融合蛋白而发出绿色荧光。Tg (pcmlc2; dsRed2-nuc) 是另外一株能在胚胎心脏心肌细胞核发出红色荧光的斑马鱼转基因鱼系, 其转入的基因为心肌特异性基因肌球蛋白轻链 2 的启动子连接红色荧光蛋白 (red fluorescent protein, RFP) (Stainier 2001)。该 RFP 蛋白具有核定位信号引导 RFP 在心肌细胞核内表达<sup>[8]</sup>。建立这种鱼系的目的是为了更好的心肌细胞荧光显影并对某单个心脏内的心肌细胞数目进行计数。

## 1.2 原位杂交

斑马鱼胚胎的全组织包埋原位杂交实验根据文献报道的方法进行<sup>[12]</sup>。首先收集 48 hpf 的胚胎, 而后对这些胚胎进行固定、渗透化及预杂交。杂交在 70℃ 下进行。探针为与 midkine-a mRNA 相对应的地高辛标记的小片段反义 RNA。接下来这些胚胎标本经洗涤后加入有碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体。显色反应于室温下的碱性 Tris 缓冲液内进行, 而后胚胎标本在 Zeiss Image A2 蔡司显微镜 (德国蔡司公司) 下显像。

## 1.3 心肌细胞计数

Tg (pcmlc2; dsRed2-nuc) 胚胎用来对心肌细胞进行计数。将杂合子斑马鱼 Tg (phsp: midkine-a; EGFP) line 与纯合子 Tg (pcmlc2; dsRed-nuc) 斑马鱼交配, 后代胚胎基因型有一半是双重转基因胚胎 Tg (phsp: midkine-a; EGFP)<sup>+/-</sup>; Tg (pcmlc2; dsRed-nuc)<sup>+/-</sup>。这些胚胎在热休克处理下能普遍的过表达 midkine-a; EGFP, 并且它们的心脏心肌细胞核也能发出红色荧光。此种交配产生的另一半胚胎具有 pcmlc2; dsRed-nuc<sup>+/-</sup> 基因型, 但不能过表达 midkine-a, 这些胚胎可用来做心肌细胞计数实验的对照。在热休克处理后, 在荧光显微镜下根据心脏

有无绿色荧光将这两组胚胎分开。这些胚胎存养在 0.003% 苯硫脲海盐水中以抑制表皮色素形成。而后在 72 hpf 时将这些胚胎置入玻片上的含 10% 胎牛血清的 Lebovitz's L15 培养液中, 盖上盖玻片后立即在荧光下显像。在每张心脏图像上进行心肌细胞计数<sup>[7]</sup>。此实验重复三次。每次试验的对照组和实验组都包括 10 只胚胎。用来荧光显像及心肌细胞计数的胚胎则从这些胚胎中随机选择。

## 1.4 热休克处理

多次热休克处理的方法: 将 Tg (phsp: midkine-a; EGFP) 胚胎在 15、20、24、27、30 及 48 hpf 大时, 置于 37℃ 持续 1 h, 而后将胚胎置于 24℃ 的环境中恢复。这种热休克处理方法能在最大程度上促进 midkine-a 的表达, 同时野生型胚胎也置于相同条件的环境中作为对照。胚胎心脏于 50 hpf 时显像。

## 1.5 统计分析

实验组与对照组平均值之间差异显著性用 Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK) 软件中的双向分差分析计算, 而后用 Fisher LSD 实验进行验证。结果用平均值 + 标准差表示, “\*” 表明组之间差异具有显著性,  $P \leq 0.05$ 。

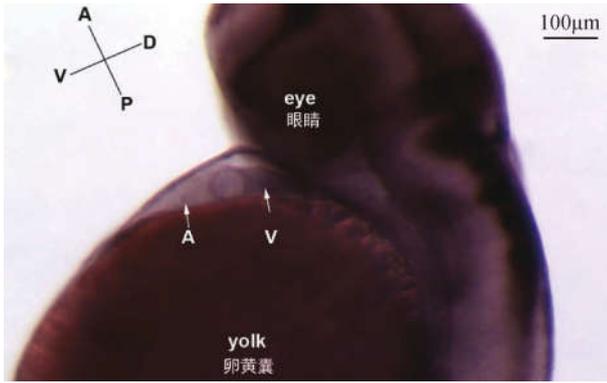
# 2 结果

## 2.1 早期斑马鱼胚胎发育过程中 midkine-a 在心脏表达

我们的原位杂交实验结果表明 midkine-a mRNA 在胚胎早期发育过程中如 48 hpf 时即表达于心房和心室 (图 1)。与此表达一致的是, 在 72 hpf 转基因斑马鱼 Tg (pmidkine-a; EGFP) 的胚胎内, midkine-a 5' 端转录起始位点上游 2.2 kb 的 DNA 片段即可诱导其后的融合基因 midkine-a; EGFP 在心脏特异性的表达 (图 2)。总而言之, midkine-a 能在早期胚胎心脏发育过程中表达于心脏, 这说明 midkine-a 在心脏发育过程中可能扮演了特定的角色。

## 2.2 胚胎体内 midkine-a 过表达导致心脏发育异常变小

为了理清 midkine-a 的功能, 我们利用了 Tg (phsp: midkine-a; EGFP) 转基因斑马鱼以进一步研究过表达 midkine-a 对心脏发育的影响。该鱼系的转基因是由热休克基因的启动子与其后的融合基因 midkine-a 和 EGFP 报告基因组成。在较高的环境温度下, 热休克基因的启动子被激活, 诱导其后的 midkine-a 和 EGFP 融合基因的表达。当这些胚胎

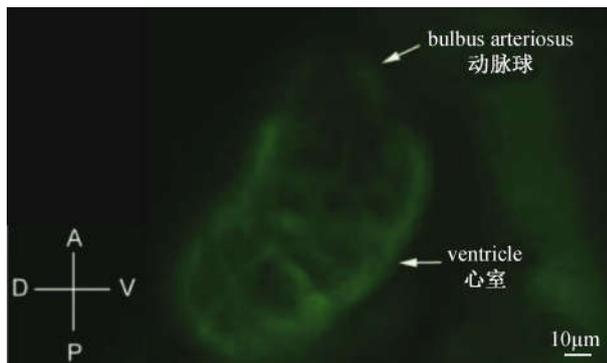


注:斑马鱼胚胎在 48 hpf 时的 midkine-a 全组织包埋原位杂交实验。方向: A, anterior(前方); P, posterior(后方); V, ventral(腹面); D, dorsal(背部)。箭头指向 A, atrium(心房); V, ventricle(心室)。

图 1 原位杂交显示 midkine-a mRNA 存在于胚胎的心脏中(×20)

Note. The whole-mount in situ hybridization of 48 hpf embryos showing the heart. Orientation: A, anterior; P, posterior; V, ventral; D, dorsal. The arrows point to A, atrium; V, ventricle.

Fig. 1 In situ hybridization shows that midkine-a mRNA exists in a 48 hpf embryonic heart



注:Tg (pmidkine-a; EGFP) 转基因斑马鱼胚胎在心脏内表达 EGFP,证实 midkine-a 在胚胎发育早期就表达于心脏。箭头指向动脉球(bulbus arteriosus)和心室(ventricle)。方向:A. Anterior(前方); P. Posterior(后方); V. Ventral(腹面); D. Dorsal(背部)。

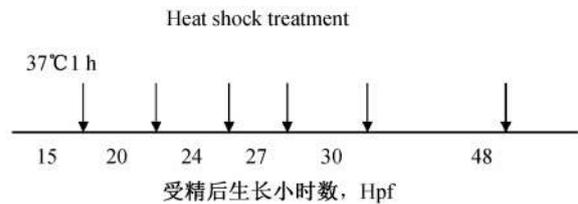
图 2 转基因斑马鱼 Tg (pmidkine-a; EGFP) 胚胎在心脏内表达 EGFP (×100)

Note. Tg (pmidkine-a; EGFP) transgenic fish expresses EGFP in the heart, demonstrating that midkine-a expresses in the early developmental stage of the embryonic heart. The arrows point to the bulbus arteriosus and the ventricle. Orientation: A, anterior; P, posterior; V, ventral; D, dorsal.

Fig. 2 The embryo of transgenic fish Tg (pmidkine-a; EGFP) specifically expresses EGFP in the heart

用热休克处理(方法详见材料和方法,及图 3)后,这些胚胎体内的 midkine-a; EGFP 普遍的大量的整

体表达,包括在胚胎心脏的表达,所以在荧光下整体胚胎包括心脏呈绿色。由于心脏位于胚胎腹侧的体表下,故带绿色荧光的心脏能很容易地与其他组织分辨开来(图 4B, B')。这些心脏与对照组非转基因胚胎心脏比较,其心脏明显变小并伴有轻度的心包积液(图 4C, D)。除了心脏变小的表型外,这些胚胎还并发心动过缓的异常体征。转基因胚胎心脏平均跳动 23 次/分,而对照组胚胎的正常心跳平均为 126 次/分。(midkine-a 整体表达于胚胎内,包括心脏、视网膜、骨骼肌等。由于心脏位于胚胎头部腹侧的体表下,故带绿色荧光的心脏能很容易地与其他组织分辨开来。



注:热休克处理示意图表明对 Tg (phsp; midkine-a; EGFP) 转基因斑马鱼胚胎进行热休克处理以诱导 midkine-a; EGFP 蛋白大量表达。胚胎分别在 15、20、24、27、30、48 hpf 时予以 37 °C 1 h 的热处理后,转移至 24 °C 恢复。

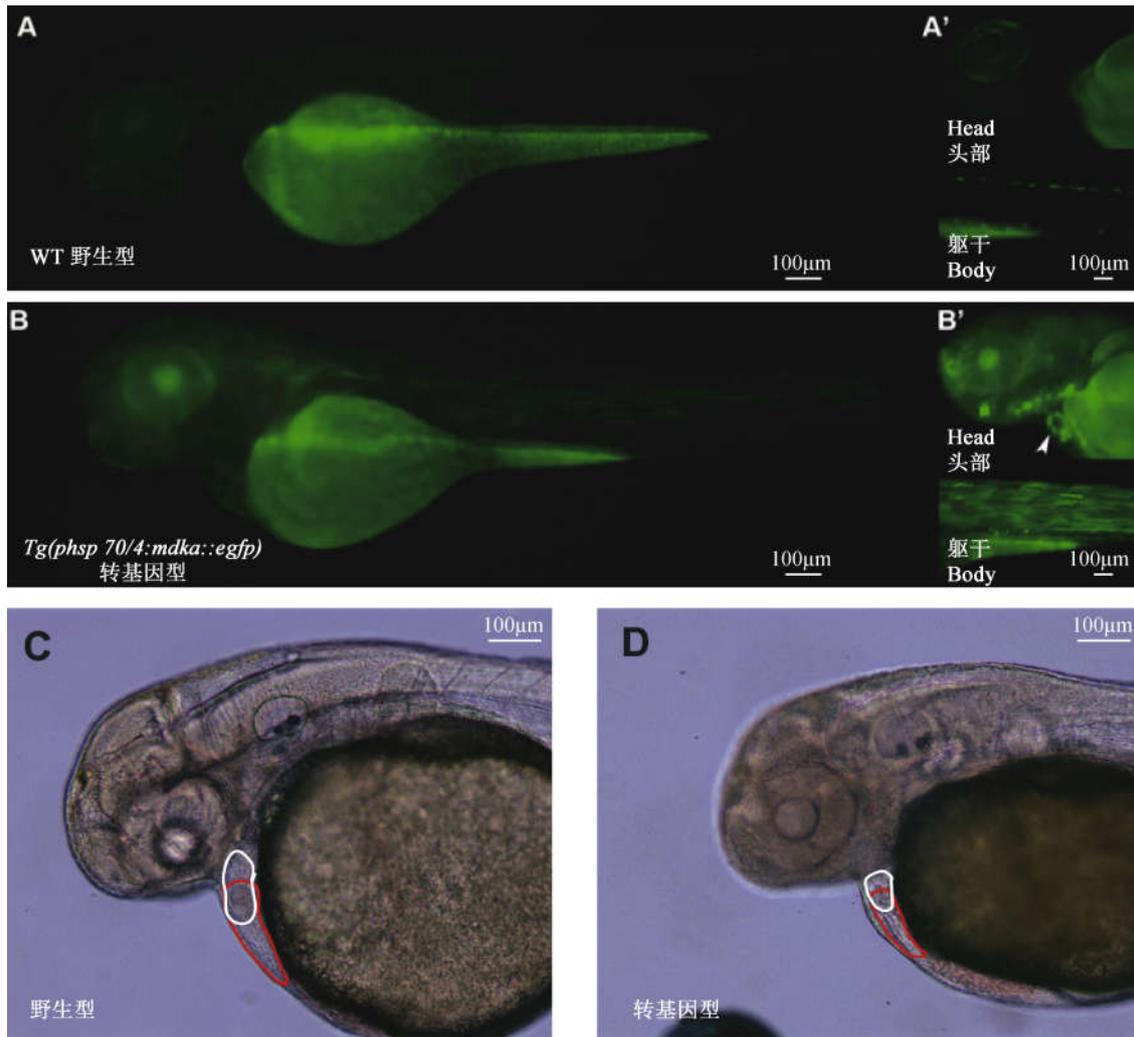
图 3 热休克处理示意图

Note. Diagram showing the regimen of heatshock treatments of Tg (phsp; midkine-a; EGFP) embryos at 15, 20, 24, 27, 30, 48 hpf to induce the maximum production of midkine-a. For each heatshock treatment, embryos were exposed in a 37 °C incubator for 1 h and then recovered in the 24 °C incubator.

Fig. 3 Diagram of the heat shock treatment

### 2.3 吗啉寡核苷酸敲除 midkine-a 对斑马鱼早期胚胎心脏发育无影响

与过表达 midkine-a 不同的是,用吗啉寡核苷酸(morpholino, MO)阻碍 midkine-a 的转录对斑马鱼早期胚胎心脏发育没有影响。在 0~48 hpf 之间,斑马鱼胚胎心脏发育历经心腔形成、右向心室形成、心瓣膜生成、血循环形成,最终形成一个成熟的心脏。而我们从 0~120 hpf 仔细观察了 midkine-a 有机体(morphant,指注射了吗啉寡核苷酸的胚胎)的心脏表型,未见明显异常(图 5)。在 82 hpf 时 midkine-a 有机体心脏发育正常,心腔形成,及右向心室、心瓣膜、血循环形成无异常,与对照组无差别,未见小心脏或心包积液的产生。这说明 midkine-a 的存在对于斑马鱼胚胎心脏的正常发育不是必需的。本 midkine-a 吗啉寡核苷酸阻碍 midkine-a 翻译作用的有效性及其特异性用 midkine-a 及 midkine-b cD-



注:热休克诱导 *midkine-a*:EGFP 在 48 hpf *Tg(phsp:midkine-a:EGFP)* 胚胎中的表达。从野生型与半合子 *Tg(phsp:midkine-a:EGFP)* 斑马鱼交配的后代经历热休克后,在荧光显微镜下根据心脏有无绿色荧光蛋白的引导表达,分成野生型(A, WT)与转基因型[B, *Tg(phsp:midkine-a:EGFP)*]两组。A, B 为胚胎整体图;A', B' 为心脏细节图。白色箭头指向表达绿色荧光蛋白的心脏。C、D,野生型与 *Tg(phsp:midkine-a:EGFP)* 胚胎在热休克处理后的心脏 DIC 图像。心房用红色线描出,心室用白色线描出。

**图 4** 热休克诱导 *midkine-a*:EGFP 在 *Tg(phsp:midkine-a:EGFP)* 胚胎中的过表达导致胚胎心脏变小(上图  $\times 100$ , 下图  $\times 20$ )

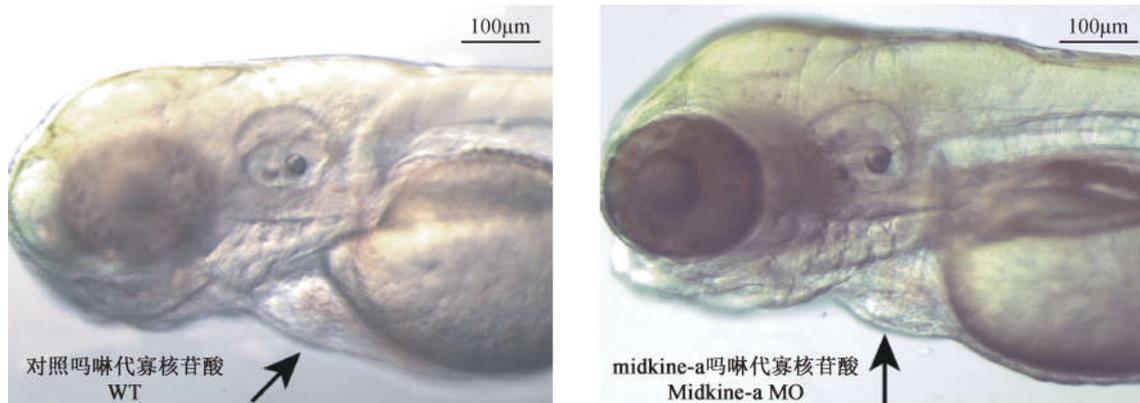
Note. Heatshock treatments induce *midkine-a*:EGFP protein expression in the whole embryos. Wild-type and heterozygous *Tg(phsp:midkine-a:EGFP)* fish were crossed to get the wild-type (A) and *Tg(phsp:midkine-a:EGFP)* (B) embryos, and then these embryos were heatshocked to induce the transgene expression. A, B, whole embryos expressing *midkine-a:EGFP*; A', B', the corresponding hearts expressing *midkine-a:EGFP*. White arrow points to the green heart. C, D, DIC images of the wild-type and *Tg(phsp:midkine-a:EGFP)* hearts. The atriums were outlined by red color and the ventricles were outlined by white color.

**Fig. 4** Heat shock treatment induces the expression of the fusion protein *midkine-a:EGFP* in *Tg(phsp:midkine-a:EGFP)* embryos, leading to a small heart

NA 体外翻译实验(图 6)证实。该实验结果证实 *midkine-a* 吗啉寡核苷酸能有效地阻碍 *midkine-a* cDNA 体外翻译;而无阻止同源基因 *midkine-b* cDNA 体外翻译的作用,证实了其有效性及特异性。

#### 2.4 斑马鱼胚胎过表达 *midkine-a* 导致心肌细胞总数减少

如前(材料与方法)所述,我们将转基因鱼 *Tg(phsp:midkine-a:EGFP)* 与 *Tg(pcmlc2:dsRed-nuc)* 交配,得到并分离基因型为 *Tg(phsp:midkine-a:EGFP)/Tg(pcmlc2:dsRed-nuc)* 杂合子胚胎。先用热休克处理诱导 *midkine-a* 的过表达,而后按照材料与与方法所述在荧光显微镜下计算每个杂合子胚胎心

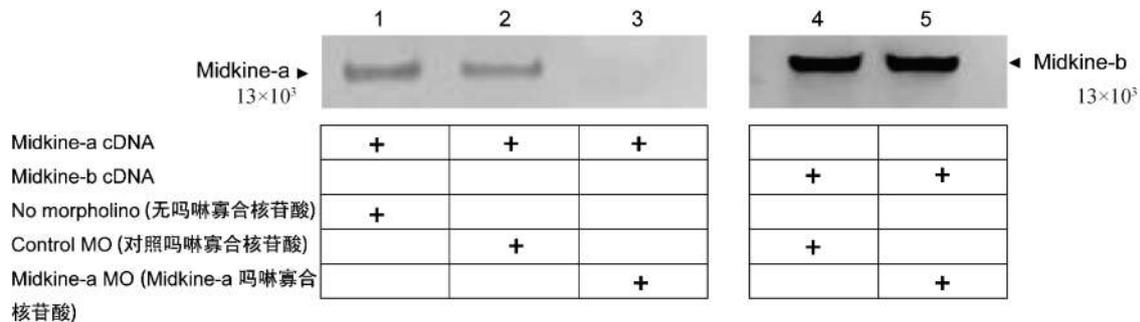


注:注射过对照 MO(左)及 midkine-MO(右)的胚胎的心脏 DIC 图像。图中箭头指向心脏位置。摄像拍于胚胎 82 hpf 时。

图 5 MO 敲除 midkine-a 不影响胚胎心脏正常发育(×20)

Note. DIC images of the embryonic control heart(Left) and the heart of midkine-a Knock-down embryos(Right) with morpholino. Black arrows point to the hearts.

Fig. 5 Knock-down of midkine-a with morpholino does not affect the embryonic heart development



注:体外翻译实验证实 midkine-a 吗啉寡核苷酸阻碍 midkine-a cDNA 翻译作用的有效性及其特异性。midkine cDNA 体外翻译实验用<sup>35</sup>S-甲硫氨酸标记。为决定 midkine-a 吗啉寡核苷酸的有效性, midkine-a cDNA 体外翻译实验在无吗啉寡核苷酸(1 道)、有对照吗啉寡核苷酸(2 道)及有 midkine-a 吗啉寡核苷酸(3 道)存在的条件下进行。为决定 midkine-a 吗啉寡核苷酸的特异性, midkine-b cDNA 体外翻译实验在有对照吗啉寡核苷酸(4 道)或有 midkine-a 吗啉寡核苷酸(5 道)存在的条件下进行。

图 6 midkine-a 吗啉寡核苷酸对斑马鱼 midkine-a cDNA 体外翻译阻碍作用的有效性与特异性

Note. In vitro translation using <sup>35</sup>S-methionine label shows the effectiveness and specificity of midkine-a MO. To determine the effectiveness of midkine-a MO, midkine-a cDNA in vitro translation experiments were conducted in the absence (Lane 1), presence of control MO (Lane 2), and the presence of midkine-a MO (Lane 3). To determine the specificity of midkine-a MO, midkine-b cDNA in vitro translation experiments were conducted in the presence of control MO (Lane 4), and the presence of midkine-a MO (Lane 5).

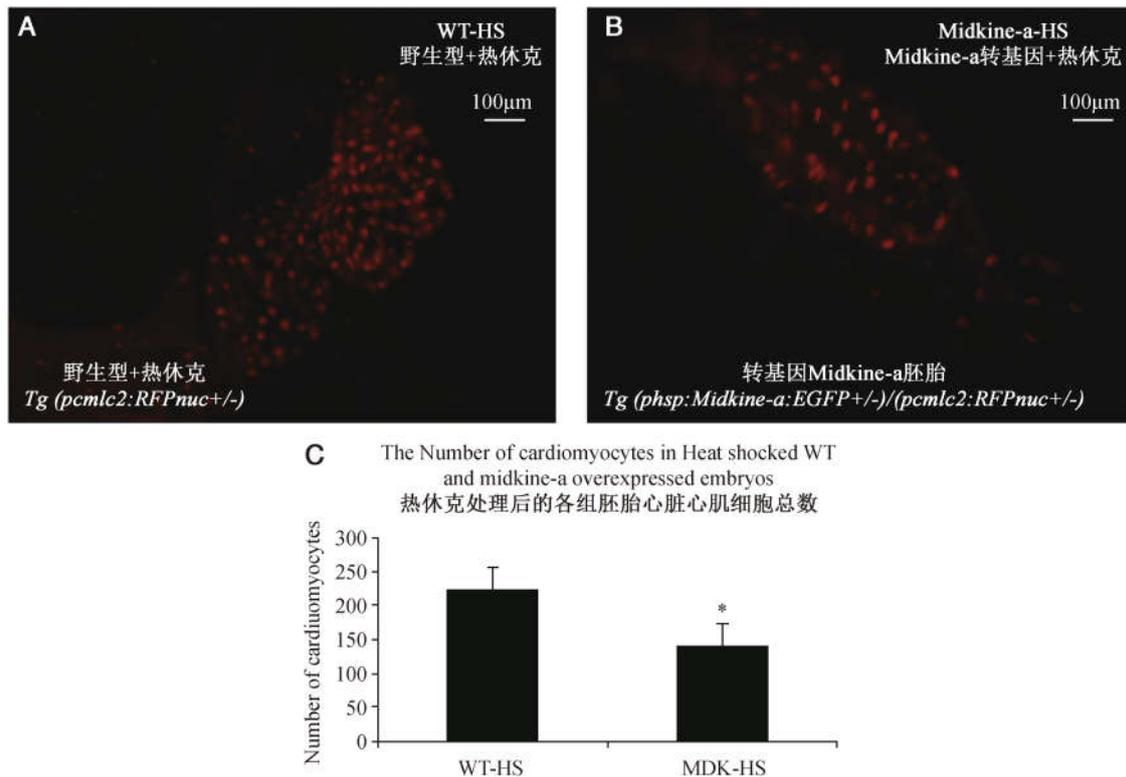
Fig. 6 The specificity and effectiveness of midkine-a MO on blocking the *in vitro* translation of midkine-a and midkine-b cDNA

脏的心肌细胞总数,与对照组相比。结果发现在热休克处理之前 1 h,过表达 midkine-a 组与对照组的心肌细胞总数相比较没有区别;而在热休克处理之后的 72 hpf 时,过表达组心肌细胞总数明显减少至每个心脏平均 126 个心肌细胞。相反的是对照组的心肌细胞总数在这一时刻有约 218 个心肌细胞(图 7)。两者之间的统计学上差异有显著性。这说明,与表型一致的是,过表达 midkine-a 导致心脏内心肌细胞总数减少,且这一现象与过表达 midkine-a 胚胎

的小心脏表型密切相关。这说明很可能 midkine-a 过表达阻碍了胚胎心肌细胞增殖,使其心肌细胞总数减少,导致小心脏的表型。

### 3 讨论

Midkine 是一种可溶性细胞生长因子,能与小分子肝素结合,并在调节细胞生长、增殖、分化及存活方面起着重要的多样化的作用<sup>[1,13]</sup>。它是一个 13 × 10<sup>3</sup> 的分泌分子,由两个结构域组成,C 端结构域



注: 杂合子鱼系 Tg (*phsp*; *midkine-a*; *EGFP*) 与纯合子鱼系 Tg (*cmlc2*; *dsRed-nuc*) 交配, 后代胚胎经热休克后, 在 72 hpf 时根据心脏绿色荧光的有无分两组, 野生型 (A) 和 *midkine-a* 过表达组 (B)。在荧光显微镜下两组 72 hpf 胚胎的发红色荧光的心肌细胞被计数。C 图所显示的数目来自野生型和 *midkine-a* 过表达组各三组, 每组平均 3 只胚胎的统计。\* 表明差异有显著性,  $P < 0.05$ 。

图 7 过表达 *midkine-a* 组的胚胎心脏内心肌细胞总数比对照组低 ( $\times 50$ )

Note. The heterozygous (*phsp*; *midkine-a*; *EGFP*) fish was crossed with homozygous (*cmlc2*; *dsRed-nuc*) fish. Their progenies were heat-shocked and grouped into wild-type (A) and *midkine* overexpression (B) groups by the absence and presence of green fluorescence in the heart. To count their cardiomyocytes, the embryonic hearts were imaged with the red fluorescence under microscope at 72 hpf. The experiments were repeated three times and three embryos were counted each time to get the average number of the cardiomyocytes in each group. \* shows a significant statistical difference between the numbers of cardiomyocytes in the wild type and *midkine-a* overexpression groups.

Fig. 7 Overexpression of *midkine-a* leads to a reduced total number of cardiomyocytes in the embryonic heart

能与肝素结合, N 端结构域能与受体结合, 两个域之间以双硫键相连<sup>[1,13]</sup>。它广泛地表达于神经系统、免疫系统、肿瘤组织及心脏等器官或组织内<sup>[13,14]</sup>。*midkine* 能促进神经元生长, 促进细胞分裂、存活、抗细胞凋亡、促进肿瘤细胞趋药现象发生等<sup>[13,14]</sup>。尽管 *midkine* 也表达于胚胎及成年哺乳动物心脏, 但它在心脏中的功能人们还知之甚少。

斑马鱼的 *midkine* 存在两种亚型: *midkine-a* 和 *midkine-b*<sup>[3]</sup>。二者在斑马鱼胚胎发育及神经系统形成的过程中起着重要的作用。在斑马鱼胚胎时期, *midkine-a* 和 *midkine-b* 各自表达于独立的互不重叠的区域<sup>[3]</sup>。有文献报道表明, *midkine-a* 首先表达于原肠胚晚期的胚胎。当神经胚开始形成时, *midkine-a* 开始出现在未分节的延髓傍中胚层<sup>[3]</sup>。

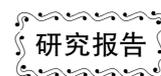
而后, *midkine-a* 以波浪式的方式从前至后表达于这一区域。在后期, *midkine-a* 表达于轴旁中胚层及前神经龙骨<sup>[3]</sup>。此时 *midkine-a* 的表达区域标定了无 *midkine-a* 表达的内侧底板。*midkine-a* 的表达在时间和空间上与内侧底板的出现一致<sup>[3]</sup>。在斑马鱼胚胎体内, 过表达 *midkine-a* mRNA 可致内侧底板增大和其细胞数目显著增加, 而吗啉寡核苷酸敲除 *midkine-a* 可致内侧底板发育异常及其标记物表达的缺失<sup>[3]</sup>。内侧底板与脊索临近, 且均由中线前体细胞发育而来。该研究表明 *midkine-a* 可削弱脊索的发育, 而内侧底板的增大是以脊索发育的减弱为代价, 故而 *midkine-a* 在特化内侧底板及脊索细胞命运上起着重要的作用<sup>[3]</sup>。*midkine* 在脊椎动物发育过程中的作用多样化, 并不单独依赖于 *midkine* 作

为生长因子的作用。虽然 midkine-a 是一种生长因子, BrdU 掺入法及抗磷酸化组蛋白的免疫组化实验均表明底板细胞数目的增加并不来源于细胞增殖。故而 midkine-a 在特化内侧底板及脊索细胞命运上的作用与其自身作为生长因子的作用无关<sup>[3]</sup>。我们的实验表明 Midkine-a 也表达在胚胎心脏内。在胚胎内过表达 Midkine-a 能阻碍心脏生长。故而我们提出假说, 即类似于 midkine-a 在特化内侧底板及脊索细胞命运的功能相似, 过表达 midkine-a 阻碍胚胎心脏发育的机制也可能是其通过特化正常心肌细胞的命运, 限制心肌细胞总数, 使得心肌细胞总数减少。早期的胚胎心脏生长依赖于心肌细胞总数的增加, 而过量的 midkine-a 可能通过阻碍心前细胞分化或阻碍心肌细胞增殖这两种方式, 降低心脏内心肌细胞总数。而吗啉寡核苷酸敲除 midkine-a 对斑马鱼早期胚胎心脏发育无影响, 说明 midkine-a 对心脏发育不是必需的, 而过多的 midkine-a 则能起着限制性的作用。总之, midkine-a 在斑马鱼胚胎心脏发育早期起着通过限制心肌细胞总数的方式以特化心肌细胞的命运的作用。本研究的意义在于它将是将来进一步研究 midkine 在心脏中的下游信号通路的基础, 并提供人们对心肌损伤后的心脏分子内环境进一步的认识, 为成人心肌缺血或梗死的可能的分子生物学治疗奠定基础<sup>[15]</sup>。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Kadomatsu K, Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer [J]. *Cancer Lett*, 2004, 204(2): 127 - 143.
- [ 2 ] Winkler C, Yao S. The midkine family of growth factors; diverse roles in nervous system formation and maintenance [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(4): 905 - 912.
- [ 3 ] Winkler C, Schafer M, Duschl J, et al. Functional divergence of two zebrafish midkine growth factors following fish-specific gene duplication [J]. *Genome Res*, 2003, 13(6A): 1067 - 1081.
- [ 4 ] Luo J, Uribe RA, Hayton S, et al. Midkine-A functions upstream of Id2a to regulate cell cycle kinetics in the developing vertebrate retina [J]. *Neural Dev*, 2012, 7(1): 33.
- [ 5 ] Horiba M, Kadomatsu K, Yasui K, et al. Midkine plays a protective role against cardiac ischemia/reperfusion injury through a reduction of apoptotic reaction [J]. *Circulation*, 2006, 114(16): 1713 - 1720.
- [ 6 ] Liedtke D, Winkler C. Midkine-b regulates cell specification at the neural plate border in zebrafish [J]. *Dev Dynamics*, 2008, 237(1): 62 - 74.
- [ 7 ] Lien CL, Schebesta M, Makino S, et al. Gene expression analysis of zebrafish heart regeneration [J]. *PLoS Biol*, 2006, 4(8): e260.
- [ 8 ] Stainier DY. Zebrafish genetics and vertebrate heart formation [J]. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(1): 39 - 48.
- [ 9 ] Thisse C, Thisse B. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(1): 59 - 69.
- [ 10 ] 何嘉玲, 刘静, 王天奇, 等. 斑马鱼的质量标准化 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(6): 99 - 102.
- [ 11 ] 李阔宇, 潘鲁媛, 孙永华. 斑马鱼资源的开发保藏与国家斑马鱼资源中心 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(6): 93 - 98, 105.
- [ 12 ] 柯贤福, 胡慧颖, 吴立仁, 等. 实验用斑马鱼养殖地方标准的初步探讨 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(8): 75 - 78.
- [ 13 ] Jones DR. Measuring midkine: the utility of midkine as a biomarker in cancer and other diseases [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(12): 2925 - 2939.
- [ 14 ] Sato W, Sato Y. Midkine in nephrogenesis, hypertension and kidney diseases [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(4): 879 - 887.
- [ 15 ] Muramatsu T, Kadomatsu K. Midkine: an emerging target of drug development for treatment of multiple diseases [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(4): 811 - 813.

[收稿日期] 2015-04-27



# 顺铂诱导三阴性乳腺癌 4T1 耐药小鼠模型的建立

盛佳钰, 陈红风\*

(上海中医药大学附属龙华医院 乳腺科, 上海 200032)

**【摘要】** 目的 建立一种耐药性稳定的三阴性乳腺癌 4T1 耐药小鼠模型, 为研究体内肿瘤耐药机制和逆转药物的筛选奠定实验基础。方法 采用顺铂(DDP)低剂量诱导及体内外交叉致瘤结合的方法建立三阴性乳腺癌耐药小鼠模型; MTT 法检测细胞耐药特性; 实时荧光定量 PCR 法分析耐药相关基因 MDR1、BCRP、MMP7 及 GST- $\pi$  表达差异; 免疫组化分析耐药相关蛋白 P-gp、BCRP、MMP7 表达差异; 蛋白印迹法检测磷酸化 Akt (phosphorate-Akt, p-Akt) 和总 Akt (total-Akt, t-Akt) 蛋白表达; 小动物成像检测观察肿瘤生长情况。结果 MTT 显示建立的三阴性乳腺癌耐药 4T1 小鼠模型的耐药指数为 12.84; 耐药小鼠肿瘤组织中 MDR1、BCRP、MMP7、GST- $\pi$  基因 mRNA 的表达量及 P-gp、BCRP、MMP7 蛋白的表达量均高于非耐药小鼠 ( $P < 0.01$ ); Western blot 显示, 耐药小鼠肿瘤组织的 p-Akt 蛋白表达明显高于非耐药小鼠, t-Akt 蛋白表达没有差异。非耐药小鼠与耐药小鼠肿瘤组织生长速度未见明显区别 ( $P > 0.05$ )。分别给予这两种模型小鼠相同剂量的 DDP 治疗后, 耐药小鼠对 DDP 的敏感性明显低于非耐药小鼠 ( $P < 0.01$ )。结论 初步建立了三阴性乳腺癌耐药 4T1 小鼠模型, 为三阴性乳腺癌临床个体化治疗及耐药逆转研究等提供了良好的实验动物平台。

**【关键词】** 三阴性乳腺癌; 肿瘤抗药性; 顺铂; 动物模型; 小鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0466-08

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.005

## Establishment of a cisplatin-resistant mouse model of 4T1 triple negative breast cancer

SHENG Jia-yu, CHEN Hong-feng\*

(Department of Breast Surgery, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

**【Abstract】 Objective** To establish a cisplatin-resistant 4T1 mouse model of triple negative breast cancer. **Methods** A drug resistant mice model was established with cisplatin (DDP) induction and in-vivo/in-vitro tumorigenic approach. Its resistance characteristics were identified by MTT assay. Changes of drug resistance gene (MDR1, BCRP, MMP7, GST- $\pi$ ) and protein (P-gp, BCRP, MMP7) expression, and phosphorate-Akt and total-Akt protein expression were evaluated by real-time PCR, immunohistochemistry and western blot method, respectively. Small animal live imaging technology was applied to detect tumor growth. **Results** Resistance fold (RF) of cisplatin-resistant 4T1 mouse model was 12.84. The expression of MDR1, BCRP, MMP 7, GST- $\pi$  mRNA and P-gp, BCRP, MMP 7 proteins in the resistant mice were higher than that in the non-resistant mice. The result of western blot showed that a statistically higher expression of p-Akt in resistant mice than that in non-resistant mice at protein levels ( $P < 0.01$ ). No significant difference of tumor growth rate was observed between non-resistant and resistant mice ( $P > 0.05$ ). Given same dose of DDP, resistant mice showed lower sensitivity than non-resistant mice significantly ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** We have successfully established a cisplatin-resistant triple negative breast cancer model in mice, which provides a new platform for further study on chemoresistant reversal strategy and individualized clinical treatment of this disease.

**【Key words】** Triple negative breast cancer; Neoplasm drug resistance; Cisplatin; Animal models; Mice

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81373647)。

[作者简介] 盛佳钰(1983-), 女, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 中医药防治乳腺癌研究。E-mail: shengjiayu@gmail.com

[通讯作者] 陈红风。E-mail: chhfluk@126.com

目前认为乳腺癌是一种高度异质性肿瘤,不同的病理特点和分子特征导致其对治疗的反应和预后明显不同。临床上根据免疫组化检测的雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)表达均阴性者被称为三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)。该亚型乳腺癌对内分泌治疗及抗 HER-2 的靶向治疗均不敏感,因此化疗是其主要的治疗手段。近年来研究发现, TNBC 这类与乳腺癌易感基因 1(breast cancer susceptibility gene-1, BRCA1)相关的乳腺癌亚型对铂类药物表现出较高的敏感性<sup>[1]</sup>。然而,事实证明对化疗相对敏感的 TNBC 患者并不意味着拥有更高的生存率。与其他化疗药物一样,在临床应用过程中多数患者经铂类药物化疗缓解后,即会产生耐药性而使后续治疗效果受到严重影响。本实验以顺铂(cisplatin, DDP)为诱导药物,三阴性乳腺癌细胞株 4T1 为诱导对象,采用化疗药物诱导耐药及体内外交叉致瘤的方式建立三阴性乳腺癌耐药小鼠模型,并对三阴性乳腺癌 4T1 耐药小鼠模型产生顺铂耐药性的机制进行初步探讨,为耐药逆转研究提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及试剂

注射用顺铂(冻干粉)购自齐鲁制药有限公司(批号:ZWA2A1305034A), RPMI-1640 液体培养液、胎牛血清、胰酶、磷酸盐缓冲液(PBS)均为 Gibco 公司产品;四甲基氮唑蓝(methylthiazolyl tetrazolium, MTT)及 DMSO 均购自上海生工生物有限公司。TRIZOL 提取试剂盒、反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;实时荧光定量 PCR 所用引物均由宝生物工程(大连)有限公司合成;抗磷酸化 Akt(phosphorated-Akt, p-Akt)、总 Akt(total-Akt, t-Akt)、内参 GAPDH(均为抗兔单克隆抗体)及其相应的二抗均购自美国 Cell Signaling 公司;P-gp、BCRP、MMP7 抗体均购自美国 ABCAM 公司;EliVision plus 试剂盒、DAB 试剂盒均购自福州迈新生物科技有限公司, D-luciferin 购自上海乐辰生物科技有限公司。

### 1.2 细胞培养及动物饲养

鼠三阴性乳腺癌细胞株 4T1 购自中国科学院上海细胞库,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基

培养,培养基中加入 100 U/L 青霉素和 10 mg/mL 链霉素。置于 37℃、CO<sub>2</sub> 体积分数为 5% 的恒温培养箱中培养,次日观察细胞贴壁情况并换液。贴壁生长良好的乳腺癌细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化,选用对数生长期细胞进行实验。

SPF 级 BALB/c 雌性小鼠 56 只,体重 16~18 g,其中 24 只小鼠用于耐药动物模型的建立(每轮 6 只,共 4 轮),余 32 只小鼠用于后续分组研究。小鼠均来源于上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2012-0002],适应性喂养 1 周,饲养在恒温(23±2)℃,湿度 50%~60%,人工照明暗各 12 h 的饲养室内,标准饲料和自来水自行取用。

### 1.3 模型的建立

采用化疗药物诱导耐药及体内外交叉致瘤的方式建立三阴性乳腺癌耐药小鼠模型。将 4T1 细胞体外培养至对数生长期后按 10<sup>5</sup> 个/只,接种于 6 只小鼠的第二乳房垫处,随机均分为 2 组。待肿瘤组织长至 0.5 cm×0.5 cm 时(约 5 d),模型组(3 只)荷瘤小鼠给予腹腔注射 0.3 mg/mL DDP,对照组(3 只)小鼠给予同等剂量的 NS 腹腔注射。每周 1 次,连续 4 周,给药结束后,在无菌条件下取出各组肿瘤组织,行原代细胞培养。将组织块置于培养皿内,剪碎成米粒样大小,用胰酶反复消化瘤块,将消化下来的肿瘤细胞,按 4T1 细胞培养条件进行培养。各组原代培养细胞经稳定传代 2 次后,再接种于小鼠第二乳房垫,每次原代培养细胞均用采用 MTT 的方法计算耐药倍数。反复 4 轮体内外交叉致瘤,至耐药倍数达到中度耐药时(耐药倍数 5~15 倍)为止。最后一轮小鼠给药结束后,2 组小鼠各取部分肿瘤组织置于 4% 多聚甲醛溶液及 -80℃ 冰箱保存用于免疫组化、real-time PCR 及 western blot 检测;剩余肿瘤组织分别行原代细胞培养。

取上述第 4 轮达中度耐药的原始培养 4T1/DDP 细胞,培养至对数生长期,接种于 6 孔板中,继续培养 24 h,当细胞达到 70%~80% 融合时,进行转染。转染按照 Lipofectamine TM 2000 试剂操作指南进行操作。转染 48 h 后, G418 筛选抗性细胞及其单克隆化,得到稳定表达荧光素酶的 4T1/DDP-luc 细胞。取对数生长期的 4T1/DDP-luc 细胞接种到 96 孔黑板中,常规培养 24 h。第 2 天采用活体成像仪进行 luc 发光信号的观察,检测 luc 的表达,用 Living Imaging 软件分析处理数据。

取 32 只小鼠,将上述经鉴定能稳定表达 Luc 质

粒的耐药细胞株 4T1/DDP-luc 及非耐药细胞株 4T1-luc 体外培养至对数生长期后,按  $10^5$  个/只,分别接种于 4 组小鼠的第二乳房垫处,分别建立三阴性乳腺癌耐药及非耐药小鼠模型各 16 只。待各小鼠肿瘤组织均长至  $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$  时(约 5 d),16 只三阴性乳腺癌小鼠模型随机分组为:Model-A 组及 DDP-A 组,每组各 8 只小鼠;16 只三阴性乳腺癌耐药小鼠模型随机分组为:Model-B 组、DDP-B 组,每组各 8 只小鼠。各组小鼠均按  $0.2 \text{ mL}/20 \text{ g}$  剂量腹腔注射相应药物,给药频次为,给药周期为 4 周,具体给药为:DDP-A 及 DDP-B 组小鼠给予  $0.3 \text{ mg/mL}$  DDP;模型组-A 及模型组-B 组小鼠给予  $0.9\%$  生理盐水。

#### 1.4 MTT 法检测细胞药物敏感

分别取对数生长期原代培养 4T1 细胞(Control 组)和 4 批原代培养的 4T1/DDP 细胞(Model-1、2、3、4 组),调整细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/mL,接种于 96 孔培养板中,每孔  $100 \mu\text{L}$ 。置  $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  体积分数为  $5\%$  的恒温培养箱中培养。培养 24 h 后,加药组更换为含不同浓度药物的完全培养液继续培养。每组都设 6 个复孔,并设置调零孔(只含相应培养液,无细胞)和对照孔(只含细胞、培养液)。待药物组作用 24 h 后,每孔加入 MTT( $5 \text{ mg/mL}$ )  $15 \mu\text{L}$ ,继续

培养 4 h,小心吸弃培养液和 MTT 溶液,每孔加入 DMSO  $150 \mu\text{L}$ ,振荡 10 min 使充分溶解显色。用全波长酶标仪测定吸光度值(A490),实验重复 3 次,取平均值,按下式计算细胞生长抑制率。

$$\text{生长抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{药物组 A490}}{\text{对照组 A490}}\right) \times 100\%$$

根据生长抑制率,采用 SPSS16.0 软件计算药物半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ ),并按下式计算耐药倍数(RF)。

$$\text{耐药倍数}(\text{RF}) = \frac{\text{耐药细胞 IC}_{50}}{\text{亲本细胞 IC}_{50}}$$

#### 1.5 Real-time PCR 检测耐药相关基因

采用 TRIZOL 法分别提取第 4 批耐药模型 Model-4 组以及对照模型 Control-4 组小鼠肿瘤组织的总 RNA,分光光度法测定其纯度及浓度。用反转录试剂盒将各组细胞总 RNA 反转录,生成 cDNA,进一步用 MDR1、BCRP、MMP7、GST- $\pi$  引物及内参 GAPDH 引物扩增(引物相关信息见表 2)。Real-time PCR 结果由 Rotor-Gene 6 软件分析,确定各反应样本的 Ct 值,采用相对定量的  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算目的基因的相对表达量,分析各样本之间基因的表达差异。每组取三个样本,取均数。

表 1 引物合成表

Tab.1 List of primers for the real-time PCR

基因 Genes	引物 Primers	产物长度 Product length/pb
MDR1	Forward primer:5'-ATCATCAGCAACAGCAGTCTGGA-3' Reverse primer:5'GGCACCAAAGTGAAACCTGGA-3'	112
BCRP	Forward primer:5'ACGACTGGTTTGGACTCAAGCAC-3' Reverse primer:5'-AAAGATGGAATACCGAGGCTGATG-3'	114
MMP7	Forward primer:5'-CAGACTTACCTCGGATCCTAGTGG-3' Reverse primer:5'-TGCGAAGGCATGACCTAGAGTG-3'	191
GST- $\pi$	Forward primer:5'-CTCTGTCTACGCAGCACTGAATC-3' Reverse primer:5'-CAAGCCTTGCATCCAGGTATC-3'	166
GAPDH	Forward primer:5'-AAATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC-3' Reverse primer:5'-CAACAATCTCCACTTTGCCACTG-3'	90

#### 1.6 免疫组化法检测耐药相关蛋白

取出第 4 批耐药模型(Model-4 组)及对照模型(Control-4 组)小鼠肿瘤组织经石蜡包埋,  $5 \mu\text{m}$  切片,常规脱蜡至水, PBS 洗 3 次,每次 3 min;用 pH 8.0  $0.01 \text{ mol/L}$  TE 热诱导修复( $100^\circ\text{C}$ , 15 min),室温自然冷却, PBS 洗 3 次,每次 3 min;  $0.3\% \text{ H}_2\text{O}_2$  抑制内源性过氧化酶 10 min;室温, PBS 洗 3 次,每次 3 min;  $20\%$  正常羊血清室温孵育 30 min,不洗,适当稀释特异性一抗(P-gp、BCRP、MMP7 抗体以 1:5000 稀释)  $37^\circ\text{C}$  孵育 2 h, PBS 洗 3

次,每次 3 min; EnVision 试剂(HRP-M/R)  $37^\circ\text{C}$ , 30 min; PBS 洗 3 次,每次 3 min; DAB 显色 8~12 min; 苏木素衬染色,热水蓝化;吹干后,树脂封片;镜下观察,核紫蓝色,阳性呈棕黄色。每组随机选取 5 张切片,在 200 倍视野下,每张切片随机选择阳性细胞表达明显的 3 个视野作为测定目标。采用 Image Pro Plus 6.0 软件进行图像分析,比较各组平均吸光度值。

#### 1.7 Western blot 检测 Akt 磷酸化相关蛋白

提取出第 4 批耐药模型(Model-4 组)及对照模

型 (Control-4 组) 小鼠肿瘤组织的蛋白, 并定量样本后, 将等量的蛋白样品 (30  $\mu\text{g}$ ) 加入聚丙烯酰胺凝胶, 常规电泳、转膜。用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭硝酸纤维素膜, 室温 60 min, 分别加入 1:8000 稀释的 P-gp、MDR1 及 BCRP 抗体及 1:5000 稀释的 GAPDH (内参照) 抗体。置于 4 $^{\circ}\text{C}$  摇床过夜, 用含 0.05% Tween 20 的 PBS (PBST) 洗 3 次, 每次 5 min, 加入 1:8000 稀释的二抗室温培育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 加入化学底物发光液结合显影、定影和扫描。用 Photoshop Image J 软件分析各条带灰度值。以目的条带灰度值/GAPDH 条带灰度值的比值表示目的条带的相对表达量。

$$\text{相对灰度值} = \frac{\text{量的蛋白灰度值}}{\text{GAPDH 灰度值}}$$

### 1.8 动物活体成像检测

取材处理前 1 d, 所有 4 组小鼠均行活体成像检测。具体方法如下: 实验前 10 min 将每组老鼠称重, 按 0.2 mL/20 g 体重的量腹腔注射 D-luciferin 试剂 (PBS 配比, 最终使其浓度为 15 mg/mL), 用异氟烷将小鼠放入麻醉盒中麻醉, 将小鼠安放于成像暗箱内, 调整体位为仰卧位, 当时间到达注射 D-荧光素酶后的 15 min, 使用精诺真 Xenogen IVIS 成像向

导完成图像拍摄, 应用 Living Image 4.3 (Lumina XR) 软件对小鼠体内区域信号进行数据分析。选择反应单位弧度、单位体积、单位时间从体内发出的光子数的 Radiance (photons) 作为定量单位, 即 Radiance ( $\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$ ), 计算肿瘤灶数目。

### 1.9 统计学处理

所有实验均平行重复 3 次, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。应用 SPSS 16.0 软件, 两两比较采用单因素方差分析, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 形态学观察

将在无菌条件下取出各组肿瘤组织行原代细胞培养, 约 24 h 后几乎所有的细胞都沉积于瓶底, 轻晃培养瓶约 2/3 的细胞随培养液晃动, 另 1/3 细胞贴壁。用 PBS 冲洗细胞后, 显微镜下观察可见, 原代培养 24 h 后细胞呈三角形或多角形, 并聚集生长成团块; 经 1 次传代培养后, 细胞分散程度较前改善, 细胞形态趋于一致; 经 2 次传代培养后, 贴壁细胞增殖迅速, 形态均一, 以多角形为主, 胞体饱满 (见图 1)。



图 1 4T1/DDP 细胞形态变化 ( $\times 200$ )

Fig. 1 Morphology of 4T1/DDP cells ( $\times 200$ )

### 2.2 耐药程度测定

MTT 法检测原代培养的 4T1 细胞 (Control 组) 以及 4 批原代培养的 4T1/DDP 细胞 (Model-1、2、3、4 组) 对 DDP 的  $\text{IC}_{50}$  分别为 5.73、9.50、17.16、36.03  $\mu\text{g/mL}$  及 73.63  $\mu\text{g/mL}$ , 4 批原代培养的 4T1/DDP 细胞对 DDP 的 RF 分别为 1.66、2.99、6.29 及 12.84, 第 4 批原代培养的 4T1/DDP 细胞已达中等耐药程度, 可用以后续获得性多药耐药小鼠模型建立 (见图 2)。

### 2.3 鉴定 4T1/DDP-luc 细胞荧光素酶活性

将已获得的稳定表达 luc 荧光素酶的 4T1/DDP

细胞置于 96 孔黑板中, 加入底物 D-luciferin 并轻轻混匀后, 运用活体成像系统对贴壁培养的细胞进行成像和图像采集。图 3 (左图) 显示, 4T1/DDP-luc 细胞于 96 孔黑板中检测到的生物发光信号。体内检测, 将 4T1/DDP-luc 细胞接种于小鼠后 1 周, 运用活体成像系统对小鼠进行图像采集。图 3 (右图) 显示, 接种了 4T1/DDP-luc 细胞的小鼠检测到的生物发光信号。

### 2.4 耐药相关基因表达

Real-time PCR 检测结果显示, 第 4 批耐药模型 (Model-4 组) 肿瘤组织中 MDR1、BCRP、MMP7 及

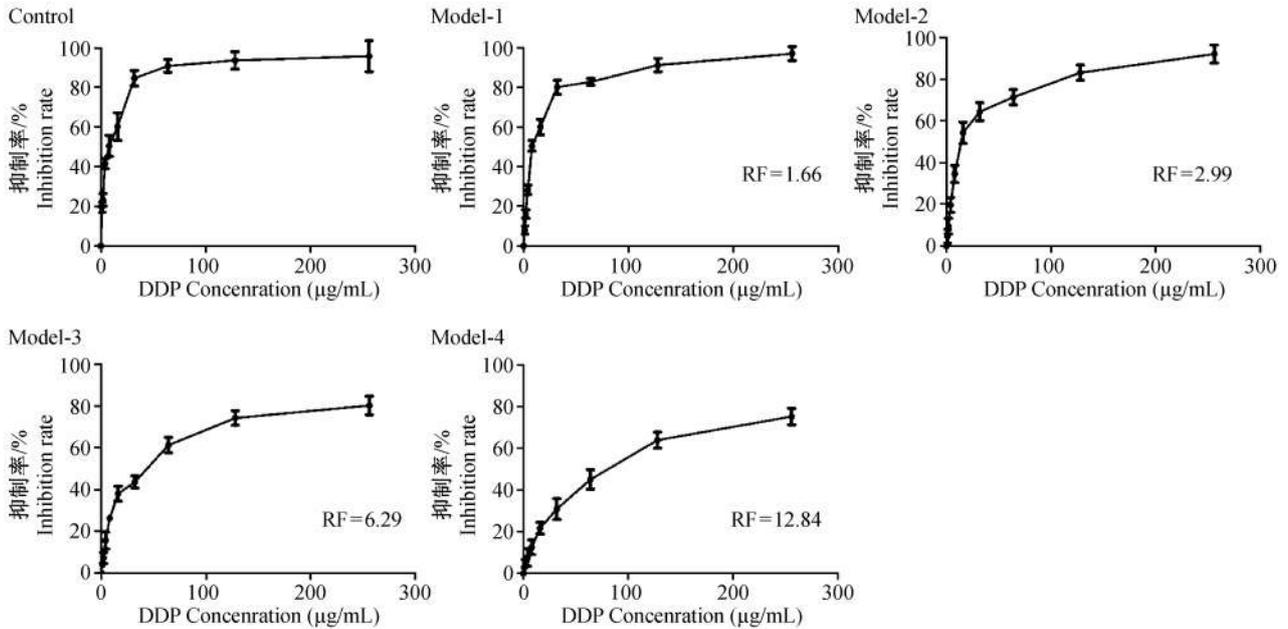


图2 顺铂对4T1和4T1/DDP细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of DDP on proliferation of the 4T1 and 4T1/DDP cells

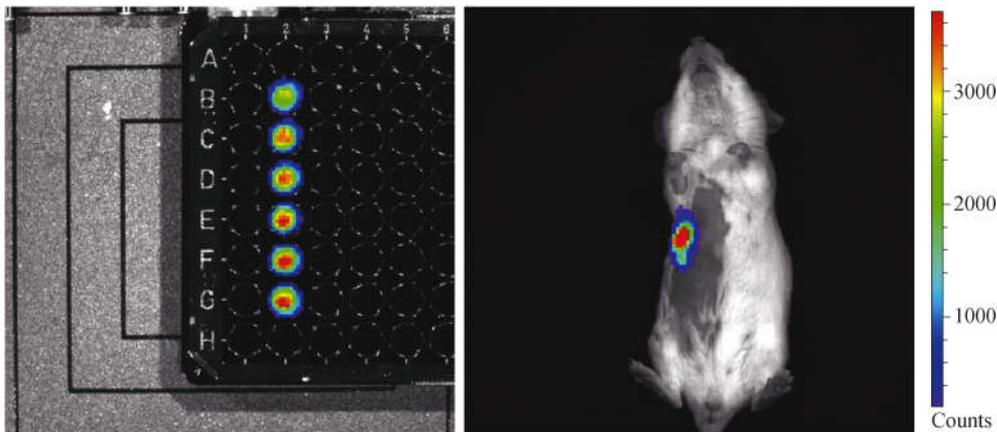


图3 荧光素酶活性鉴定

Fig. 3 Identification of the luciferase activity

GST- $\pi$  基因 mRNA 的表达量均高于 control 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 分别是 control-4 组肿瘤组织的 2.05 倍、3.85 倍、3.58 倍及 3.66 倍 (见图 4)。

### 2.5 耐药相关蛋白表达

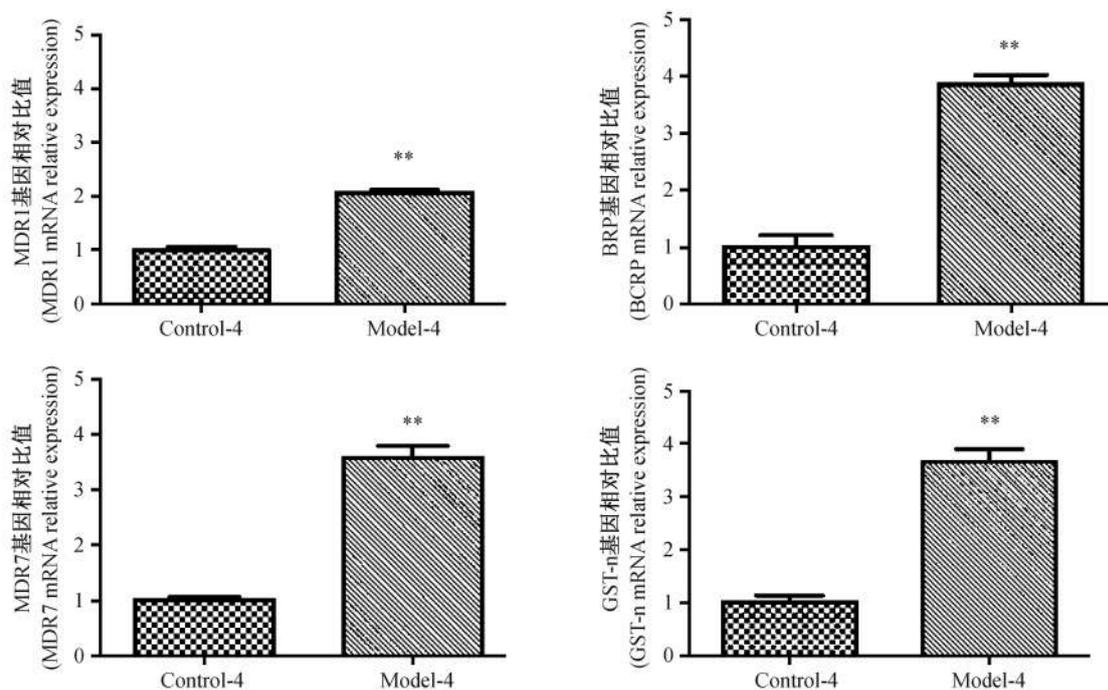
免疫组化检测结果显示, P-gp、BCRP、MMP7 蛋白在第 4 批耐药模型 (Model-4 组) 肿瘤组织中均较强 (棕黄色颗粒为阳性产物), 分别为 ( $4.34 \pm 0.56$ )、( $0.98 \pm 0.50$ )、( $1.08 \pm 0.27$ ); 而在 Control-4 组中表达均较低, 分别为 ( $14.93 \pm 1.18$ )、( $10.95 \pm 1.62$ )、( $15.66 \pm 1.11$ ), 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (见图 5)。

### 2.6 Akt 磷酸化相关蛋白表达

Western blot 检测结果显示, 在基础状态下第 4 批耐药模型 (Model-4 组) 肿瘤组织内磷酸化 Akt (p-Akt) 水平显著高于 control-4 组, 两组 t-Akt 蛋白表达无明显差异。上述 western blot 研究结果证实了三阴性乳腺癌获得性多药耐药小鼠模型顺铂诱导三阴性乳腺癌耐药 4T1 小鼠模型中存在着 PI3K/Akt 通路改变 (见图 6)。

### 2.7 肿瘤动态观察

第 4 周, 通过活体成像系统对采集到的图像进行分析, 以 radiance (photons) 为计量单位, 计算各组小鼠体内光子通量。如图 7, Mode-A 组与 Model-B



注: \*\* 为与 control-4 组比较差异有显著性( $P < 0.01$ )。

图 4 MDR1、BCRP、MMP7 和 GST- $\pi$  的基因在 control-4 和 model-4 组肿瘤组织的表达

Note. \*\*  $P < 0.01$  compared with the control-4 group.

Fig. 4 The mRNA expression of MDR1, BCRP, MMP7 and GST- $\pi$  in the tumor tissues of control-4 and model-4 groups

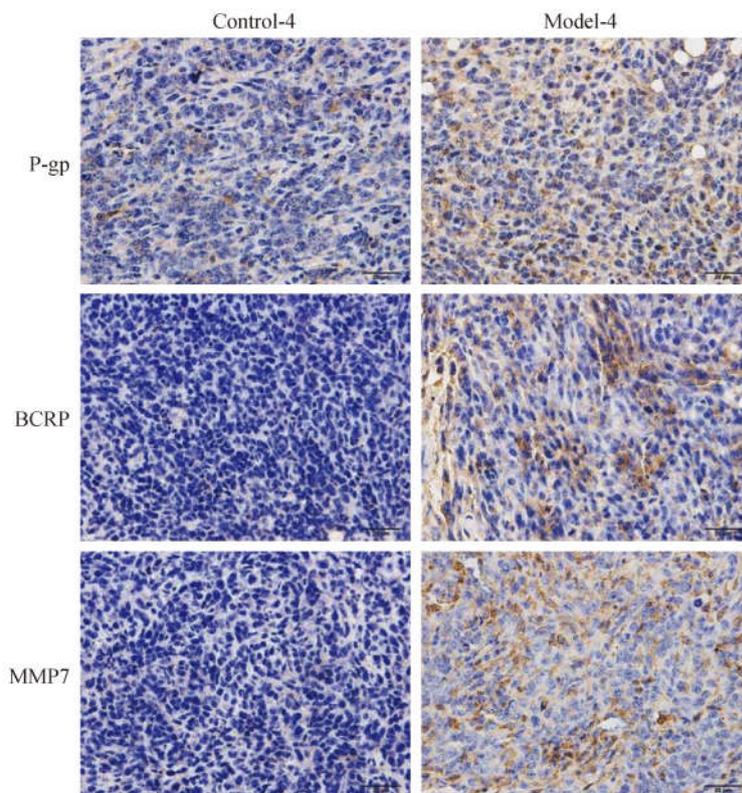


图 5 Control-4 和 model-4 组肿瘤组织中 P-gp、BCRP 和 MMP7 的蛋白表达( $\times 200$ )

Fig. 5 The protein expression of P-gp, BCRP and MMP7 in the tumor tissues of control-4 and model-4 groups( $\times 200$ )

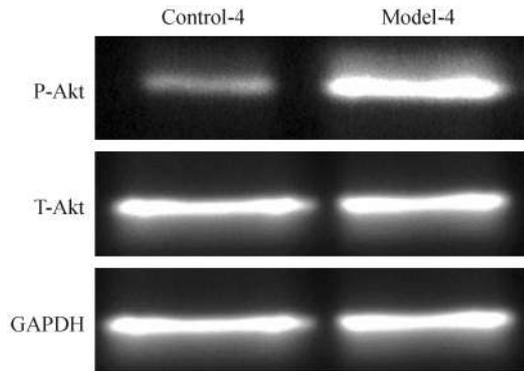


图 6 Control-4 和 Model-4 组肿瘤组织中 p-Akt, t-Akt 的蛋白表达

Fig. 6 The protein expression of p-Akt and t-Akt in the tumor tissues of control-4 and model-4 groups

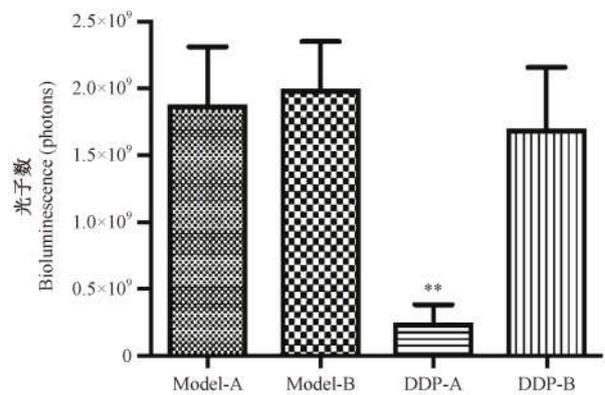
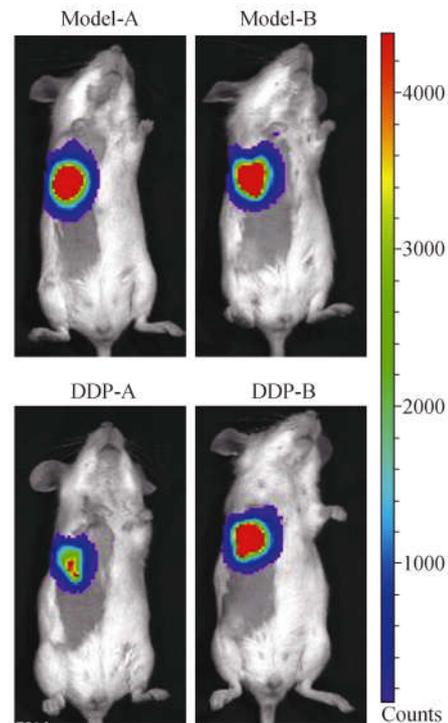
组无明显差异 ( $P > 0.05$ )。与 Model-A 组相比, DDP-A 组光子通量数减少 ( $P < 0.01$ ); 而与 Model-B 组相比, DDP-B 组光子通量数无明显差异 ( $P > 0.05$ )。可见, DDP 对耐药模型小鼠肿瘤的抑制效果明显低于非耐药模型小鼠。

### 3 讨论

顺氯氨铂 (cisplatin, DDP), 简称顺铂, 其抗肿瘤谱广泛、活性高, 且骨髓抑制等副作用较轻<sup>[2]</sup>。DDP 的作用部位是 DNA, 它与 DNA 碱基产生链内及链间交叉连结, 阻止 DNA 的转录和复制, 从而抑制肿瘤细胞的分裂<sup>[3]</sup>。三阴性乳腺癌存在一定的 DNA 损伤修复障碍, 因此该类型乳腺癌对铂类药物敏感性较高。DDP 物美价廉, 治疗效果好, 但应用中却发现其容易产生耐药性, 部分患者先天和后天对铂类药物具有耐药性<sup>[4]</sup>, 严重降低该药物的治疗效果, 使其抗肿瘤谱降低, 限制了该药物的临床使用。

开发耐药肿瘤模型对于耐药相关基础研究和药物评价意义重大。当前国内外对耐药机制的认识和逆转剂的研究主要来自体外细胞实验的研究成果, 研究对象是体外诱导的耐药细胞, 并不能很好地反映体内肿瘤耐药形成的情况。肿瘤动物模型水平的研究比肿瘤细胞培养水平的研究更能模拟人体内的肿瘤生长情况。目前常用的耐药肿瘤的动物模型建立方法有三种: 转基因法<sup>[5]</sup>、耐药性肿瘤细胞悬液移植法<sup>[6]</sup>及药物诱导法<sup>[7]</sup>。

但随着研究的深入, 我们发现药物耐药的形成机制众多, 主要包括外排蛋白的表达增加或活性提高、细胞解毒系统活力增强、抗肿瘤靶点改变以及凋



注: \*\* 为与 model-A 组比较差异及其显著 ( $P < 0.01$ )。

图 7 小鼠体内光子通量测定

Note. \*\*  $P < 0.01$  compared with the model-A group.

Fig. 7 Determination of the number of photons in vivo

亡应答失敏等。这些因素并非独立存在, 往往相互关联, 共同介导了耐药的发生<sup>[8,9]</sup>。因此, 类似转基因法这种借助单一因素建立的多药耐药肿瘤动物模型难以模拟真实情况。而另两种方法相比较, 耐药性肿瘤细胞悬液移植法简单易行, 在已有耐药细胞株的前提下实验周期短, 应用较广; 而药物诱导法则相对周期较长, 但却更能模拟临床实际情况。目前, 乳腺癌耐药研究中应用较多的是激素受体阳性乳腺癌, 针对三阴性乳腺癌的较少, 且主要集中于阿霉素诱导耐药, 尚未有顺铂诱导的耐药细胞模型。此外, 由于耐药细胞株构建时间较长, 一般需要 9 ~ 12 个

月,因此,本研究采用了药物诱导法建立三阴性乳腺癌耐药 4T1 小鼠模型,并在传统的化疗药物单纯诱导的基础上进行了改进,增加了体内外交叉致瘤的方法。将体外培养的对数生长期的三阴性乳腺癌 4T1 细胞接种在小鼠第二乳房垫,形成肿瘤后,低剂量 DDP 体内持续给药 4 周诱导耐药发生,采用肿瘤组织块行体外原代培养细胞,再将此原代培养细胞分别于新一批小鼠第二乳房垫接种致瘤;反复 4 次。采用此种体内外交叉进行致瘤的方法,逐步提高耐药性,不仅模拟临床耐药形成条件,还提高了耐药细胞的致瘤率和缩短致瘤时间,并在诱导过程中做到了对耐药性的实时监测,且整个建模时间缩短为 4 个月。

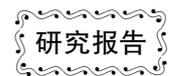
经测定第 4 批原代培养 4T1/DDP 细胞对 DDP 的 RF 为 12.84,已达中等耐药程度。通过 real-time PCR 及免疫组化鉴定该耐药细胞的特性,MDR1、BCRP、MMP7 及 GST- $\pi$  基因及 P-gp、BCRP、MMP7 蛋白均显示其在三阴性乳腺癌 4T1 耐药小鼠模型的肿瘤组织中呈现高表达,而在非耐药小鼠模型的肿瘤组织中均呈现阴性表达。此外,通过 western blot 检测还发现,通过此种方法建立的三阴性乳腺癌获得性多药耐药小鼠模型中存在着 Akt 磷酸化的改变。通过小动物活体成像仪对各组小鼠体内肿瘤生长状态进行直观观测发现,经过 4 周生长非耐药小鼠与耐药小鼠肿瘤组织大小未见明显区别 ( $P > 0.05$ )。而给予这两种模型小鼠相同剂量的 DDP 治疗后,耐药小鼠对 DDP 的敏感性明显低于非耐药小鼠 ( $P < 0.01$ ),提示接种了 4T1/DDP-luc 细胞的模型小鼠体内发生了耐药。良好的耐药模型的建立是进行下游实验的基础,该耐药动物模型的建立,为三

阴性乳腺癌临床个体化治疗及耐药逆转研究等提供了良好的实验动物平台。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Rottenberg S, Nygren AO, Pajic M, et al. Selective induction of chemotherapy resistance of mammary tumors in a conditional mouse model for hereditary breast cancer [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(29):12117-12122.
- [ 2 ] 杨乐,刘文超,李蓉. 顺铂水针剂与粉针剂体外细胞毒作用的差异研究[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(5):1101-1102.
- [ 3 ] 郭青龙. 肿瘤药理学[M]. 北京化学工业出版社, 2008, 第 1 版:140-141.
- [ 4 ] Lieder B, Matema V, Schadendorf D, et al. Over-expression of cMOAT(MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G2-arrest in melanoma cells resistant to DDP[J]. Invest Dermatol, 2009, 121(1):172-176.
- [ 5 ] Van de Vrie W, Marquet RL, Stoter G, et al. In vivo model in P-glycoprotein-mediated multidrug resistance[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 1998, 35(1):1-57.
- [ 6 ] Satta T, Isobe K, Yamauchi M, et al. Establishment of drug resistance in human gastric and colon carcinoma xenograft lines [J]. Jpn J Cancer Res, 1991, 82(2):593-598.
- [ 7 ] Ihnat MA, Nervi AM, Anthony SP, et al. Effects of mitomycin C and carboplatin pretreatment on multidrug resistance-associated P-glycoprotein expression and on subsequent suppression of tumor growth by doxorubicin and paclitaxel in human metastatic breast cancer xenografted nude mice[J]. Oncol Res, 1999, 11(7):303-310.
- [ 8 ] 岑娟,李运曼. 多药耐药肿瘤的联合用药[J]. 国外医药:抗生素分册, 2009, 30(5):224-228.
- [ 9 ] Filipits M. Mechanisms of cancer: multidrug resistance[J]. Drug Discov Today: Dis Mech, 2004, 1(2):229-234.

[收稿日期] 2015-04-14



# 苏子油对肥胖大鼠肝脏极低密度脂蛋白合成关键基因表达的影响

解现星, 张涛, 赵爽, 安星兰, 马兰芝, 张广州, 刘源\*

(中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

**【摘要】** 目的 探究富含 n-3 多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)的苏子油高脂饮食对肥胖大鼠肝脏极低密度脂蛋白(very low density lipoproteins, VLDL)合成关键基因表达的影响。方法 造模期:雄性 SD 大鼠随机分为 2 组,对照组(normal control group, NC)给予普通日粮,高脂组(high fat group, HF)给予高脂纯合日粮诱发肥胖大鼠模型;干预期:将肥胖大鼠随机分为 4 组:持续高脂组(consistent high fat group, CHF)和三个苏子油(perilla oil, PO)替代组,根据 PO 替代 CHF 中猪油比例的不同将替代组分为 20% PO、50% PO、100% PO,4 周后测定大鼠血清甘油三酯(triglyceride, TG)水平;western blotting 方法检测肝脏 VLDL 合成关键蛋白微粒体甘油三酯转运蛋白(microsomal triglyceride transfer protein, MTP)和载脂蛋白 B(apolipoprotein B, APOB)蛋白表达;real-time PCR 方法检测肝脏 *Mtp*、*Apob* mRNA 表达。**结果** 肥胖大鼠血清 TG 水平显著高于 NC 组,并且有严重的脂肪沉积,肝脏 MTP 和 APOB 的 mRNA、蛋白表达均有不同程度的降低;干预 4 周后,与 CHF 组相比,各 PO 替代组大鼠血清 TG 水平明显降低,病理切片结果显示肝脏脂肪沉积有明显改善,并且肝脏 MTP 和 APOB 的 mRNA、蛋白表达均有不同程度的升高。**结论** 不同比例 PO 替代均能促进肥胖大鼠肝脏 VLDL 合成与分泌,改善肝脏脂肪沉积,并且 PO 促进 *Mtp* mRNA、蛋白表达具有剂量依赖性。

**【关键词】** n-3 多不饱和脂肪酸;肥胖大鼠模型;极低密度脂蛋白

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)05-0474-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.006

## Effects of perilla oil on the key gene expression regulating hepatic VLDL synthesis in obese rats

XIE Xian-xing, ZHANG Tao, ZHAO Shuang, AN Xing-lan, MA Lan-zhi, ZHANG Guang-zhou, LIU Yuan

(Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

**【Abstract】 Objective** This study aims to investigate the effects of high-fat diet rich in perilla oil on the expression of key genes that regulate hepatic VLDL synthesis in obese rats. **Methods** Sixty healthy male 5-week old SD rats were randomly divided into 2 groups. The rats in the normal control group (NC,  $n = 12$ ) were given normal diet, and the rats in the high fat group (HF,  $n = 48$ ) were given a pure high fat diet in order to induce rat models of obesity. In the intervention period, the obesity model rats were randomly divided into 4 subgroups including consistent high fat group (CHF) and three intervention groups depending on perilla oil substitution rate of lard in CHF: 20% PO, 50% PO and 100% PO. The serum triglyceride (TG) of the rats was measured after 4 weeks. Real-time PCR was applied to measure microsomal triglyceride transfer protein (*Mtp*) and apolipoprotein B (*Apob*) mRNA, and western blot assay was used for detecting the expression of MTP and APOB in the liver. **Results** Compared with the NC group, the CHF rats exhibited significantly high fat deposition. The serum TG was markedly higher and the MTP and APOB were decreased at gene and protein levels in the CHF group compared with the NC group. After the intervention, PO remarkably reduced the level of serum TG and decreased hepatic fat deposition as it showed by pathological examination. At the gene and protein levels, MTP and APOB were upregu-

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(NO.31272386)。

**【作者简介】** 解现星(1990-),男,硕士,研究方向:实验动物营养及代谢异常动物模型。E-mail: xxx\_ryl@163.com。

**【通讯作者】** 刘源,研究员,主要从事实验动物营养及代谢异常动物模型研究。E-mail: bj\_liuyuan@163.com。

lated by PO to different degrees. **Conclusions** All the three PO intervention can promote VLDL synthesis and secretion, and decrease the hepatic fat deposition in the obese rats. Furthermore, PO upregulates the expression of MTP at gene and protein levels in a dose-dependent manner.

**【Key words】** n-3 polyunsaturated fatty acid; Obesity, animal model; Very low density lipoproteins; Rats

目前,肥胖症已成为全球发病率迅速增加的一种流行性疾病,全球 60 亿人口中 13 亿超重和肥胖,其中半数肥胖<sup>[1]</sup>。研究证实长期过量的脂肪(特别是饱和脂肪)能量摄入是导致肥胖的独立诱发因素<sup>[2]</sup>。肥胖对人体健康的危害很大,可引起高脂血症、动脉粥样硬化、冠心病、脂肪肝、糖尿病等肥胖相关疾病,脂代谢的紊乱是这些疾病的始动环节<sup>[3]</sup>。肝脏通过调节极低密度脂蛋白(very low density lipoproteins, VLDL)的组装和分泌来控制肝脏内甘油三酯(triglyceride, TG)含量是防止脂代谢紊乱的一个重要环节<sup>[4]</sup>。

有研究指出不同种类的脂肪酸对肝脏 VLDL 的合成和分泌有明显不同的作用,这种作用的详细机制仍然不清楚<sup>[5]</sup>。n-3 多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)系长链多不饱和脂肪酸,在抗炎、抗动脉硬化、降血脂等方面有积极意义<sup>[6]</sup>。α-亚麻酸(ALA, C18:3)、二十碳五烯酸(EPA, C20:5)和二十二碳六烯酸(DHA, C22:6)同属 n-3PUFA, DHA 和 EPA 主要来源于深海鱼油,ALA 在苏子油、菜籽油里含量较高。相对于 ALA 而言,关于 DHA 和 EPA 的研究较多。为此,我们研究了在摄入总热量不变的情况下,以 ALA 含量较高的苏子油替代高脂日粮中饱和脂肪酸的热量后,对肥胖大鼠肝脏 VLDL 合成关键蛋白 APOB、MTP 表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠购自军事医学科学院实验动物中心【SCXK-(军)2012-004】,5 周龄,体重(160±10)g。实验动物饲养于军事医学科学院实验动物中心屏障环境中【SYXK-(军)2012-005】,明暗周期 12 h(6:00~18:00),动物可以自由采食、饮水,温度控制在(23±1)℃,湿度为(40±5)%。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

#### 1.1.2 实验动物饲料

纯合日粮配方参照 test diet 58Y2、58V8 制作(主要成分为酪蛋白、麦芽糊精、玉米淀粉、蛋氨酸、

脂肪、纤维素、矿物质、蔗糖、维生素)。对照组日粮能量含量为 15.7 kJ/g,其中蛋白质、碳水化合物、脂肪能量比分别为 20.2%、69.49%、10.31%。CHF 组猪油所占比例为 20.62%,三个替代组分别用 PO 替代 CHF 组猪油含量的 20%(20% PO)、50%(50% PO)、100%(100% PO),能量含量均为 19.35 kJ/g,其中蛋白质、碳水化合物、脂肪能量比分别为 19.67%、34.59%、45.73%。

#### 1.1.3 实验分组

将 60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为 2 组进行肥胖造模:对照组(normal control group, NC)12 只、高脂组(high fat group, HF)48 只;10 周后,将 HF 组中 24 只达到肥胖标准(肥胖标准<sup>[7]</sup>:体重超过安静对照组体重的平均值 20%)大鼠随机分为 4 组:CHF 以及三个 PO 替代组 20% PO、50% PO、100% PO,每组 6 只,干预 4 周后安乐死,取肝脏组织液氮冷冻保存。

#### 1.1.4 主要仪器与试剂

反转录试剂盒(TaKaRa DRR037A,大连);Bio-Rad IQ5 real-time PCR 仪;Trizol(Invitrogen 公司,美国);BCA 试剂(Beyotime);RIPA 裂解液(博迈德生物公司);辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡二抗(中科英沐);辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗(中衫金桥);蛋白酶抑制剂 Cocktail Tablets(Roche 公司,瑞士);Western blotting 发光检测试剂盒(Thermo,美国);β-actin 一抗(ab8227, Abcam, 英国);鸡 APOB 一抗(ab117317, Abcam, 英国);小鼠 MTP 一抗(sc-135994, Santa Cruz, 美国);X 光胶片、显影液、定影液(Kodak, 美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 实时定量 PCR

取 10~20 mg 大鼠肝脏组织于离心管中,分别运用 Trizol 法和 TaKaRa 试剂盒来提取总 RNA 和反转录,操作均按照说明书进行。1 μg 总 RNA 加入到 20 μL 反转录体系中,37℃ 反应 15 min,85℃ 反应 5 s。实时定量 PCR 的引物(表 1)由上海英潍捷基贸易有限公司合成。20 μL 反应体系。30 s 95℃ 预变性,之后进行包括 95℃ 变性 5 s,退火及延伸 30 s 的 40 个循环。每个样品设置 3 个重复。

表 1 测定各基因转录水平的引物

Tab. 1 Primers for analysis of transcription level of the gene expression

基因 Genes	序列号 Accession no.	引物 Primers	退火温度/℃ T <sub>m</sub>	长度/bp Length
<i>Mtp</i>	NM_001107727.1	F 5' - TACCAGGCTCAGCAAGAC - 3'	55	197
		R 5' - AGGAAGTTCAAGGCAAAAG - 3'		
<i>Apob</i>	NM_019287	F 5' - GGCTGACTCTGTGGTTGACCTG - 3'	58	143
		R 5' - CGTGGCTGACTTTGAATTTGGA - 3'		
<i>Actin</i>	NM_031144.2	F 5' - CCCATCTATGAGGTTACGC - 3'	50	150
		R 5' - TTTAATGTCACGCACGATTTC - 3'		

### 1.2.2 Western-blotting 检测

肝脏组织在低温条件下与蛋白酶抑制剂、裂解液快速充分研磨成组织匀浆, 14 440 r/min, 4℃ 离心 10 min, 取上清用 BCA 试剂盒测蛋白浓度。NC、CHF、20% PO、50% PO、100% PO 五组总蛋白量一致的情况下进行 SDS-PAGE 凝胶电泳实验, 采用湿转的方法将目的蛋白转移至 PVDF 膜, 封闭液封闭 2 h, 分别用 BETA-ACTIN、MTP、APOB 一抗孵育 4℃ 过夜, 用 TBST 洗膜, 二抗孵育 1 h, ECL 法检测。β-actin 作为内参。显影片上的条带用 Image J 软件进行蛋白灰度分析, 各组与 actin 蛋白量比值作相对含量计数。

### 1.3 统计学处理

实验数据均以平均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 来表示, 数据进行统计分析软件为 SAS 9.0, 统计分析方法为成组设计定量资料 *t* 检验和单因素多水平方差分析。

## 2 结果

### 2.1 造模期大鼠体重

造模结束后, NC 组大鼠体重平均值为 551.5 g, 挑选出的肥胖大鼠体重平均值为 702.7 g。

### 2.2 干预后大鼠血清指标

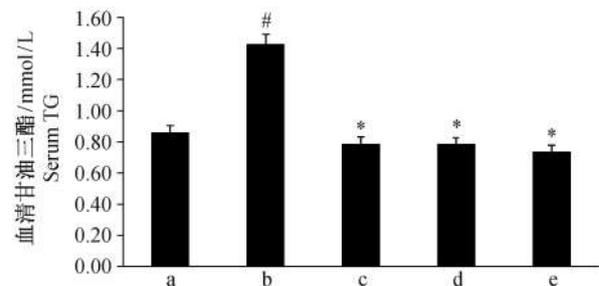
与 NC 组相比, CHF 血清 TG 水平明显升高 ( $P = 0.0008$ ); 而经过各水平 PO 干预之后, 大鼠血清 TG 水平均显著降低 ( $P < 0.0001$ ), 且各替代组之间没有明显差异 ( $P = 0.4619$ ), 见图 1。

### 2.3 肝脏病理切片

大鼠肝脏分别做了油红 O 染色分析和 HE 染色分析 (图 2)。从病理检测结果来看, CHF 组比 NC 组有更多的脂肪泡聚集, 大部分肝细胞内可见油红 O 染色阳性脂滴, 大部分肝细胞内存在脂肪空泡; 经 PO 干预后, 三个替代组部分肝细胞内可见油红 O 染色阳性脂滴, 部分肝细胞内存在脂肪空泡。

### 2.4 实时定量 PCR 分析 *Mtp* 和 *Apob* 表达差异

实时定量 PCR 结果显示, 与 NC 组相比, 肥胖大



注: 实验数据以平均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 来表示, 每组有 6 只大鼠。图中“#” ( $P < 0.05$ ) 代表与 NC 组差异有显著性, “\*” ( $P < 0.05$ ) 代表与 CHF 组差异有显著性。a. 对照组; b. 持续高脂组; c. 20% PO 替代组; d. 50% PO 替代组; e. 100% PO 替代组。

图 1 血清甘油三酯水平

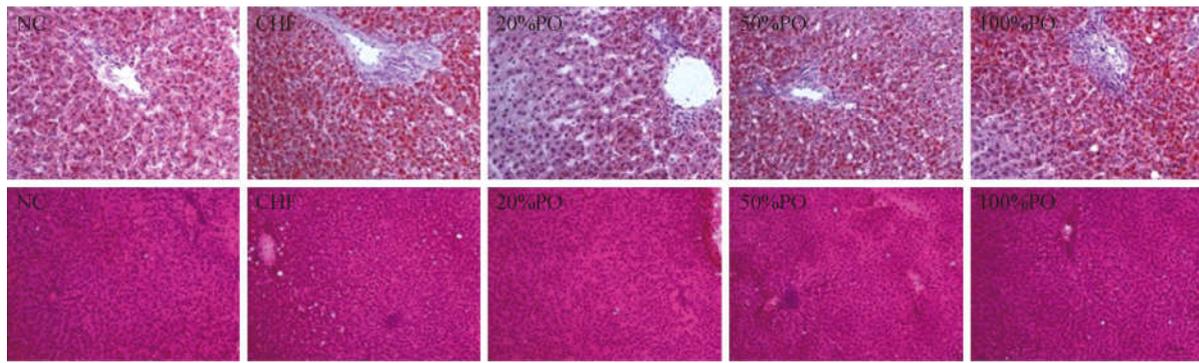
Note. Data are mean ± standard deviation (SD),  $n = 6$  rats per diet. “#” ( $P < 0.05$ ) means it is significantly different compared with the NC group and “\*” ( $P < 0.05$ ) means it is significantly different compared with the CHF group. a. NC; b. CHF; c. 20% PO; d. 50% PO; e. 100% PO.

Fig. 1 Serum TG levels in the rats

鼠肝脏 *Mtp*、*Apob* mRNA 表达量均降低, 但只有 *Mtp* mRNA 显著降低 ( $P = 0.0126$ )。干预后, 与 CHF 组相比, 20% PO 替代组大鼠肝脏 *Mtp* mRNA 表达量有所升高, 但没有统计学差 ( $P = 0.1501$ ), 50% PO、100% PO 替代组大鼠肝脏 *Mtp* mRNA 表达量显著升高 ( $P < 0.0001$ ), 且随着 PO 替代比例的增加, *Mtp* mRNA 表达量随之升高; 各 PO 替代组大鼠肝脏 *Apob* mRNA 表达量均显著升高 ( $P = 0.0001$ ), 且各替代组之间没有明显变化 ( $P = 0.3183$ ), 见表 2。

### 2.5 Western blotting 检测 MTP 和 APOB 蛋白表达

结果表明, 与 NC 组相比, 肥胖大鼠肝脏 APOB 蛋白表达显著降低 ( $P = 0.0156$ ); 经 PO 干预后, 大鼠肝脏 APOB 蛋白表达量均显著升高 ( $P = 0.0024$ ), 且各替代组之间无明显差异 ( $P = 0.2673$ )。与 NC 组相比, CHF 组大鼠肝脏 MTP 蛋白表达显著降低 ( $P = 0.0290$ ); 经 PO 干预后, 大鼠肝脏 MTP 蛋白表达量均显著升高 ( $P < 0.0001$ ), 且各替代组之间有明显差异 ( $P = 0.0011$ )。见图 3。



注:第一行是大鼠肝脏脂肪油红 O 染色和细胞核苏木精染色结果, ×200。第二行是大鼠肝脏苏木精 - 伊红染色, ×100。

图 2 各组大鼠肝脏组织学切片

Note. The top row shows oil-red-O staining (red) for lipids, and hematoxylin staining (blue) for cell nuclei. ×200. The bottom row of images displays hematoxylin and eosin stained liver tissues, ×100.

Fig. 2 Histology of rats fed with diets containing different fat contents

表 2 肝脏 VLDL 合成基因相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Tab. 2 Relative expression levels of genes of hepatic VLDL synthesis

分组 Groups	Mtp	Apob
对照组 NC	1.179 ± 0.267 <sup>b</sup>	1.000 ± 0.239 <sup>A</sup>
持续高脂组 CHF	0.775 ± 0.121 <sup>Aa</sup>	0.797 ± 0.115 <sup>Aa</sup>
20% PO 替代组 20% PO	0.896 ± 0.097 <sup>a</sup>	1.243 ± 0.098 <sup>b</sup>
50% PO 替代组 50% PO	1.111 ± 0.167 <sup>b</sup>	1.376 ± 0.139 <sup>b</sup>
100% PO 替代组 100% PO	1.507 ± 0.177 <sup>c</sup>	1.477 ± 0.325 <sup>b</sup>
<i>P</i>	< 0.0001	0.0001

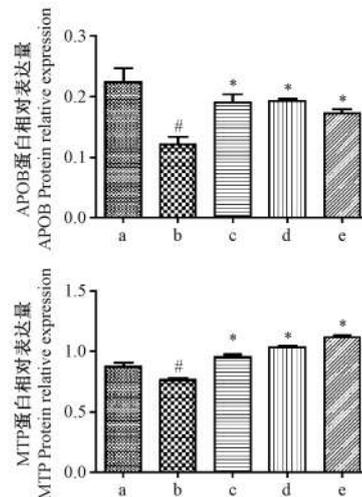
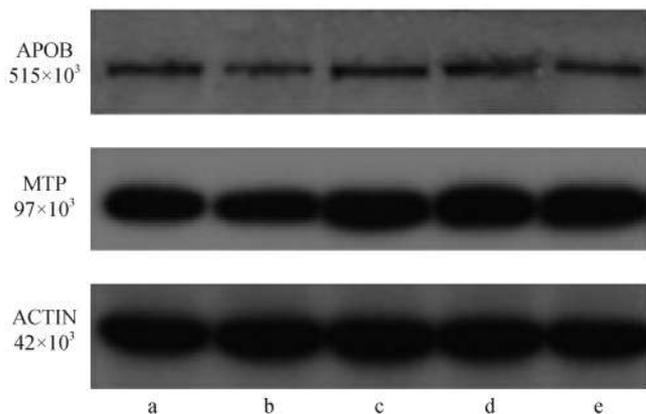
注:字母相同表示差异无显著性。  
Note. The same letters mean nonsignificant difference.

### 3 讨论

超重和肥胖是许多慢性病(如糖尿病、心血管

疾病等)发病的重要危险因素,也是严重影响生命质量和增加财政负担的全球性公共卫生问题,而“糖尿病肥胖”更是表达了肥胖为 2 型糖尿病独立危险因素和主要病因这一观点<sup>[8-10]</sup>。建立可行的动物模型是开展肥胖研究的关键。本研究中经过长期的高脂饮食,SD 大鼠产生肥胖。

随着人们生活水平的日益提高,肥胖伴高脂血症的发病率变得愈来愈高,而血液中 TG 过高,是诱发多种心血管疾病的因素之一。相关研究显示通过改变膳食脂肪酸构成可以降低血脂浓度<sup>[11-12]</sup>。我们的造模结果也显示,高脂饮食诱发大鼠肥胖,血清 TG 水平明显升高,产生高脂血症。而 PO 高脂饮食干预后能够显著降低血清 TG 水平,这提示富含 n -



注:图中“#”(P < 0.05)代表与 NC 组差异有显著性,“\*”(P < 0.05)代表与 CHF 组差异有显著性。a. 对照组; b. 持续高脂组; c. 20% PO 替代组; d. 50% PO 替代组; e. 100% PO 替代组。

图 3 MTP 和 APOB 的蛋白表达量

Note. “#” (P < 0.05) means that it is significantly different compared with the NC group and “\*” (P < 0.05) means that it is significantly different compared with the CHF group. a. NC; b. CHF; c. 20% PO; d. 50% PO; e. 100% PO.

Fig. 3 MTP and APOB protein expressions

3PUFA 的 PO 代替饱和脂肪酸提供的热量后,虽然摄入的能量相等,但同样具有降低肥胖大鼠血清 TG 水平的作用。

VLDL 是以 APOB 为主要骨架的大分子脂蛋白,它将肝内多余的能量以 TG 为主要形式运输出肝脏,因此 VLDL 的装配和分泌与载脂蛋白含量密切相关,因此,任何影响肝内 APOB 含量的因素都会对 VLDL 的装配和分泌产生影响<sup>[13]</sup>。MTP 是继 APOB 之后发现参与 TG 转运及 VLDL 组装的内质网腔内蛋白,是一种重要的脂质转运蛋白<sup>[14]</sup>。MTP 参与脂蛋白组装中的脂质转运活动,使新合成的 APOB 与被 MTP 转运到内质网腔中的 TG 结合,并且将合成的含 APOB 的脂蛋白转运到细胞外<sup>[15]</sup>,主要作用是加快膜间甘油三酯、胆固醇和磷脂的转运及细胞和亚细胞膜的组成,对含有 APOB 的脂蛋白的组装分泌起限速作用<sup>[4]</sup>。有研究指出,DHA 可以降低细胞内 APOB 的表达,而饱和脂肪酸则会抑制 Caco2 细胞中 MTP 活性<sup>[16]</sup>。那么,富含 ALA 的 PO 又是如何影响肝脏内 MTP、APOB 表达的呢?通过我们的实验结果可以看出,ALA 展现出与 DHA 不一样的生物学作用,PO 干预后,模型大鼠肝脏 MTP、APOB 基因及蛋白水平均有不同程度的升高,所以 PO 不但对 VLDL 的分泌没有抑制作用,反而能促进 VLDL 的合成与分泌。此外,我们的病理检查结果显示,CHF 组大鼠肝脏 MTP、APOB 基因及蛋白表达均受到抑制,肝脏内脂肪沉积比 NC 组更为严重,而各干预组大鼠肝脏脂肪沉积却有所改善,这可能是模型大鼠肝脏内 VLDL 分泌作用增强,进而减少肝脏内 TG 聚集<sup>[17]</sup>。肝脏脂肪沉积改善最明显的 20% PO 替代组,对模型大鼠 *Mtp* mRNA 没有明显影响,却能明显升高 *Apob* mRNA 表达量,具体机理需要进一步研究。而 Whitney 等<sup>[18]</sup>肝脏病理结果显示,ALA 比例占 13.8% 的菜籽油与猪油一样可以使 C57BL/6 小鼠肝脏产生明显的脂肪聚积,这可能菜籽油中所含 ALA 较低有关。

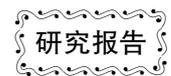
n-3PUFA 的生物学作用与其剂量有关。例如,与 DHA/EPA 相同,ALA 具有改善胰岛素抵抗的作用,但是,在我们之前的研究中,当给 SD 大鼠长时间饲喂大量 ALA,也会导致胰岛素抵抗<sup>[19]</sup>。而从本实验中可以看出,PO 促进模型大鼠肝脏 *Mtp* mRNA、蛋白表达具有剂量依赖性,*Mtp* mRNA、蛋白表达量会随着 PO 添加比例的增加而升高。此外,PO 能促进 *Apob* mRNA、蛋白表达,但是均没有剂量依赖性。

综上所述,不同比例 PO 均能促进肥胖大鼠肝脏 VLDL 合成与分泌,改善肝脏脂肪沉积,并且 PO 促进 *Mtp* mRNA、蛋白表达具有剂量依赖性。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Ponterio E, Gnessi L. Adenovirus 36 and obesity: an overview [J]. *Viruses*, 2015, 7(7): 3719-3740.
- [ 2 ] Kim S, Sohn I, Ahn JI, et al. Hepatic gene expression profiles in a long-term high-fat diet-induced obesity mouse model [J]. *Gene*, 2004, 340(1): 99-109.
- [ 3 ] De Almeida AR, Monte-Alegre S, Zanini MB, et al. Association between prehypertension, metabolic and inflammatory markers, decreased adiponectin and enhanced insulinemia in obese subjects [J]. *Nutr Metab*, 2014, 11: 25.
- [ 4 ] 李国平,唐蔚青,黎健,等. 小鼠肝脏胰岛素受体的特异性敲除降低极低密度脂蛋白中三酰甘油分泌的研究 [J]. *心肺血管病杂志*, 2012, 31(3): 320-323.
- [ 5 ] 闻治国,侯水生,谢明,等. 肝脏极低密度脂蛋白合成和分泌的研究进展 [J]. *动物营养学报*, 2011, 23(11): 1854-1861.
- [ 6 ] Fetterman JW, Jr Zdanowicz MM. Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease [J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2009, 66(13): 1169-1179.
- [ 7 ] Chandler P, Viana J, Oswald K, et al. Feeding response to melanocortin agonist predicts preference for and obesity from a high-fat diet [J]. *Physiol Behav*, 2005, 85(2): 221-230.
- [ 8 ] 孙凤. 肥胖与胰岛素抵抗研究进展 [J]. *中国现代药物应用*, 2010, 4(19): 228-230.
- [ 9 ] 张龙江. 肥胖与胰岛素抵抗 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2009, 24(20): 1548-1551.
- [ 10 ] 何清华,周迎生,王征,等. 2 型糖尿病大鼠模型制备的影响因素及其特点 [J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(6): 425-429.
- [ 11 ] 张涛,刘源,赵爽,等. n-3, n-6PUFA 高脂饮食对大鼠血脂及胰岛素敏感性的影响 [J]. *营养学报*, 2012, 34(6): 613-618.
- [ 12 ] Garg ML, Blake RJ, Clayton E, et al. Consumption of an n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched diet modulates plasma lipid profile in subjects with diabetes type II [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2007, 61(11): 1312-1317.
- [ 13 ] Ginsberg HN, Fisher EA. The ever-expanding role of degradation in the regulation of apolipoprotein B metabolism [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(Suppl): S162-S166.
- [ 14 ] 陈仕均,唐海蓉. 微粒体甘油三酯转运蛋白研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2008, 28(12): 84-89.
- [ 15 ] Anghelescu I. Omega-3 fatty acids for CHD with depression [J]. *JAMA*, 2010, 303(9): 836-836.
- [ 16 ] van Greevenbroek MMJ, Robertus-Teunissen MG, Erkelens DW, et al. Participation of the microsomal triglyceride transfer protein in lipoprotein assembly in Caco-2 cells: interaction with saturated and unsaturated dietary fatty acids [J]. *J Lipid Res*, 1998, 39(1): 173-185.
- [ 17 ] Choi SH, Ginsberg HN. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2011, 22(9): 353-363.
- [ 18 ] Sealls W, Gonzalez M, Brosnan MJ, et al. Dietary polyunsaturated fatty acids (C18: 2 ω6 and C18: 3 ω3) do not suppress hepatic lipogenesis [J]. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Biol Lipids*, 2008, 1781(8): 406-414.
- [ 19 ] Zhang T, Zhao S, Li W, et al. High-fat diet from perilla oil induces insulin resistance despite lower serum lipids and increases hepatic fatty acid oxidation in rats [J]. *Lipid Health Dis*, 2014, 13(1): 15.

[收稿日期] 2015-05-28



# 子宫内膜异位症对小鼠生育能力的影响

崔阳阳<sup>1</sup>, 孙伟伟<sup>1</sup>, 赵瑞华<sup>1\*</sup>, 徐彩<sup>1</sup>, 吴天思<sup>1,2</sup>

(1. 中国中医科学院广安门医院妇科, 北京 100053; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

**【摘要】** 目的 建立子宫内膜异位症小鼠模型, 观察子宫内膜异位症对模型小鼠妊娠能力的影响。方法 通过“腹腔+皮下”同系异体子宫内膜注射法建立子宫内膜异位症小鼠模型, 与假手术组、空白组比较, 观察其妊娠率及活胎率, 观察子宫内膜异位症对模型小鼠妊娠能力的影响。结果 建模2周后, 小鼠皮下和腹腔均见有子宫内膜异位病灶生成, 模型组、假手术组和空白组, 共三组。通过生育功能检测, 三组妊娠率差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。三组的活胎数差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。结论 成功建立子宫内膜异位症小鼠模型, 并证实子宫内膜异位症可影响模型小鼠生育功能。

**【关键词】** 子宫内膜异位症; 小鼠; 生育功能

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0479-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.007

## Effects of endometriosis on the reproductive ability of mice

CUI Yang-yang<sup>1,2</sup>, SUN Wei-wei<sup>1</sup>, ZHAO Rui-hua<sup>1\*</sup>, XU Cai<sup>1</sup>, WU Tian-si<sup>1,2</sup>

(1. Department of Gynecology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;  
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

**【Abstract】 Objectives** The aim of the study was to establish a mouse model of endometriosis, and to observe the effects of endometriosis on the reproductive ability in the mice. **Methods** The mouse models of endometriosis was established by subcutaneous and intraperitoneal injection of heterogenous endometrium. The pregnancy rate and live embryo number in the experimental, sham operation and blank groups were observed and compared, and the effects of endometriosis on reproductive ability of the mice were evaluated. **Results** Two weeks after the establishment of the mouse model of endometriosis, there were lesions in the peritoneal cavity and subcutaneous tissue of the mice. Compared the pregnancy rates among the model group, sham operation group and blank group, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Compared the live embryo number in the three groups, there were also significant differences ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** A mouse model of endometriosis is successfully established, and it demonstrates that endometriosis may affect the reproductive ability of mice.

**【Key words】** Endometriosis; Mouse; Reproductive ability

子宫内膜异位症(endometriosis, EM), 是一种常见的雌激素依赖性疾病, 是育龄妇女最常见的疾病之一, 简称内异症。内异症患者并发不孕高达40%~60%, 而在不孕症患者中也有40%~50%存在子宫内膜异位症<sup>[1]</sup>, 内异症患者不孕为非内异症人群的20倍<sup>[2]</sup>。可见, 内异症与不孕症存在紧密联系。2000年Buyalos等<sup>[3]</sup>首次提出“内异症相关不

孕”。本研究以中医理论为指导, 在前期工作的基础上, 通过建立子宫内膜异位症小鼠模型, 探讨EM对小鼠妊娠能力的影响。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

**【基金项目】** 国家自然科学基金(No:81173297)。

**【作者简介】** 崔阳阳(1987年-), 女, 硕士, 专业: 中医妇科学。Tel: 18810465649, E-mail: cuiyang870216@163.com

**【通讯作者】** 赵瑞华, 女, 博士生导师, 研究方向: 子宫内膜异位症、不孕症、月经失调方向。Tel: 010-88001139, E-mail: rhzh801@126.com

SPF 级 KM 小鼠, 雌性, 7 周龄, 体重(25 ± 3) g, 40 只, 雄性, 10 周龄, 体重(33 ± 2) g, 10 只。所有实验动物购自北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2009-0007】。实验动物饲养于中国中医科学院广安门医院 SPF 级动物实验室【SYXK(京)2009-0034】。灯光(12L:12D), 室温 22℃。饲养动物所需的笼具及水瓶均由专业饲养人员高压灭菌后提供。雌性 KM 小鼠用于模型小鼠的供体、受体及空白对照, 雄性 KM 小鼠用于与雌鼠合笼。

### 1.1.2 实验药物

苯甲酸雌二醇购自宁波第二激素厂(中国, 浙江, 批号:110252511)。HE 染色由北京大学医学部病理实验室进行操作。其余所有的实验药物及试剂均来自于中国中医科学院广安门医院免疫实验室。

## 1.2 方法

### 1.2.1 子宫内膜异位症小鼠模型的建立<sup>[4]</sup>

模型建立前, 选择动情周期正常的小鼠<sup>[5]</sup>作为模型小鼠的内膜的供体以备移植注射, 供体小鼠皮下注射苯甲酸雌二醇( $E_2$ )促进内膜生长并且使内膜易于剥离。模型建立的实验过程皆在无菌条件下进行操作。

脱颈处死供体小鼠, 常规消毒后小鼠腹部并做一 5 cm 的切口暴露子宫, 剪下子宫将其置于盛有生理盐水的培养皿中(含 100 U/mL 青霉素, 100 U/mL 链霉素)。用盐水冲洗子宫, 尽可能去除子宫上附着的多余脂肪组织、血块及杂质, 使用“滚针法”细心剥离子宫内膜<sup>[6]</sup>。将完整的管状子宫内膜纵形剖开, 剪成 1 mm × 1 mm 的小碎片以备注射使用(如图 1)。

受体小鼠以 0.9% 水合氯醛腹腔注射进行麻醉, 腹部常规消毒备用, 将以 16 号针头吸取 0.2 mL 的子宫内膜碎片悬液(含 4~8 个小碎片)分别进行腹腔注射与皮下注射<sup>[7-8]</sup>。次日, 小鼠皮下注射 0.02 mL  $E_2$ (1 mg/mL), 促进接种内膜生长, 以 5 d 为一周期, 持续 3 个周期。每日腹腔注射青霉素 1 万单位, 连续 5 d 以预防感染。假手术组给予注射等量生理盐水。空白组不给予任何处理。所有小鼠注射的伤口恢复良好, 体征正常, 无不良反应。模型建立的操作由第一作者完成。

### 1.2.2 子宫内膜异位症 KM 小鼠模型异位病灶取材及标本处理

子宫内膜异位症小鼠模型的异位病灶于 2.4 实验步骤处死小鼠时同步取材<sup>[4]</sup>。将取出的异位病

灶用生理盐水冲洗干净, 去除多余的脂肪组织和血块后, 将标本置于 4% 中性甲醛固定 24 h 后, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 连续切片, 常规 HE 染色。HE 染色的操作人员不被告知实验组别。于倒置显微镜下观察异位内膜的组织形态学结构及特点。

### 1.2.3 子宫内膜异位症小鼠成模判断标准

子宫内膜异位症小鼠建模成功判断标准是根据 EMs 的病理诊断标准<sup>[9]</sup>而定, 镜下出现子宫内膜, 腺体或腺体样结构, 间质和出血这 4 种改变的 2 种可判断模型建立成功。

### 1.2.4 子宫内膜异位症 KM 小鼠模型妊娠能力的观察

建模 2 周后, 将三组雌鼠分别与以 2:1 与性成熟雄鼠合笼, 次日清晨见阴栓者视为交配成功, 定为妊娠第 1 天。于合笼后第 7 天处死小鼠, 观察妊娠率及活胎数, 其判断标准<sup>[10]</sup>如下: 妊娠率: 妊娠率 = 妊娠只数/见栓只数; 活胎: 妊娠 7d, 孕体鲜明, 判为存活; 活胎率: 活胎率 = 活胎数/总胎数。

### 1.2.5 统计学方法

计数资料, 数据用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )来表示, 如数据不服从正态分布, 采用中位数与四分位数表示, 采用 SPSS 17.0 软件包分析, 计量资料比较, 满足方差分析条件者, 采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 两两比较用 SNK 法; 若不满足方差分析条件者, 采用多个独立样本的非参数检验(Kruskal-Wallis H test)。计数资料采用 Fisher 确切概率法, 组间比较采用两两四格表的  $\chi^2$  检验。按照  $\alpha = 0.05$  水准,  $P < 0.05$  表示差异显著, 有统计学意义;  $P > 0.05$  表示差异不显著, 无统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 子宫内膜异位症小鼠模型异位病灶观察

建模 2 周后, 模型小鼠腹部皮下手可触及米粒大小的结节, 活动度较好。子宫内膜异位症小鼠模型<sup>[4]</sup>的观察结果如下(如图 2-6): 小鼠皮下病灶, 多为红色、白色或暗红色的米粒大小的结节; 小鼠腹腔内病灶, 多为隆起囊泡或结节, 囊泡内充满淡黄色清亮透明或混浊粘稠液体。皮下和腹腔内病灶表面皆有血管网覆盖并清晰可见。肉眼观察下, 在模型小鼠皮下和腹腔均可见病灶生成, 小鼠皮下及腹腔有不同程度的粘连, 而腹腔内粘连较严重。通过病灶的 HE 染色可见: 切片中可见有血管生成, 并有大大

量腺体和间质存在。本次建模共 14 只小鼠,仅 1 只未在腹腔及皮下找到病灶,仅见腹腔及皮下粘连,成

功建模 13 只,可见,子宫内膜异位症小鼠“腹腔 + 皮下”注射法建立模型的成功率达 90% 以上。



注:A:完整的子宫内膜脱出;B:子宫内膜纵行剖开;C:子宫内膜剪碎。

图 1 供体子宫内膜的剥离

Note. A: A completely separated endometrium; B: To cut the endometrium longitudinally; C: To cut the endometrium into small pieces.

Fig. 1 Separation of the donor endometrium

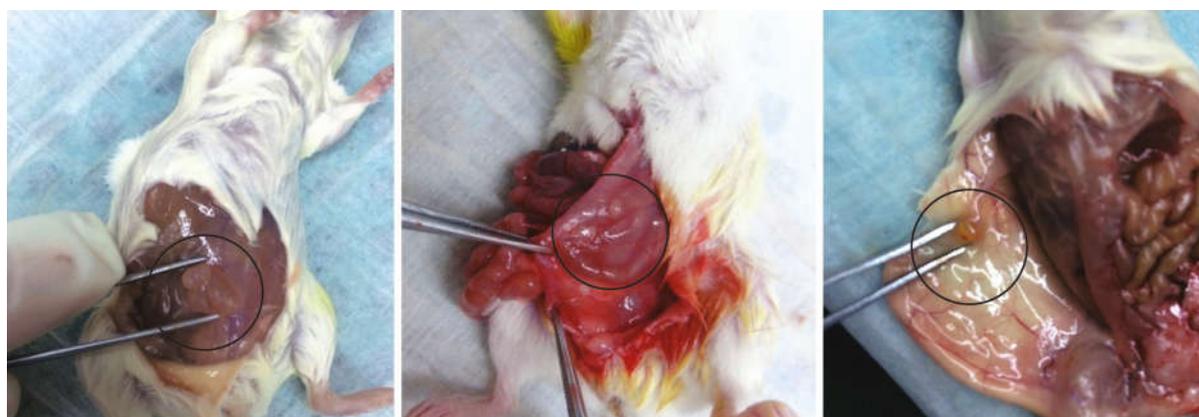


图 2 子宫内膜异位症小鼠模型皮下内异位症灶

Fig. 2 Ectopic lesions of endometriosis in the subcutaneous tissue in the model mice

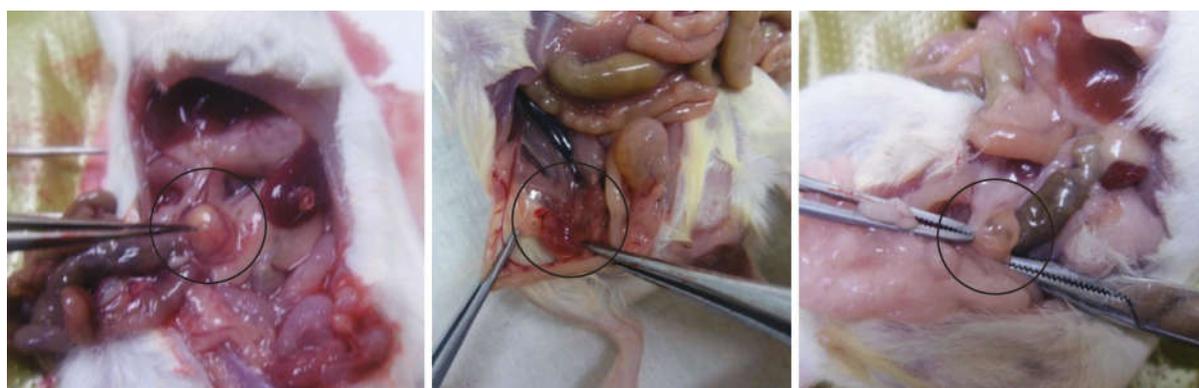


图 3 子宫内膜异位症小鼠模型腹腔内异位症灶

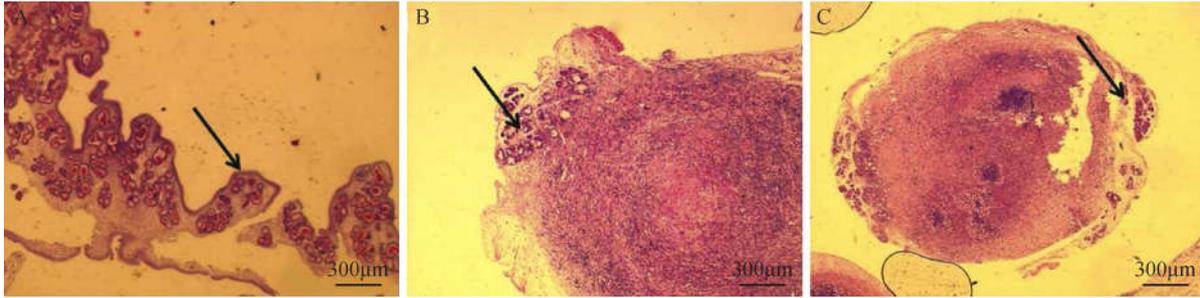
Fig. 3 Ectopic lesions of endometriosis in the abdominal cavity of model mice

## 2.2 子宫内膜异位症模型小鼠妊娠率及活胎数

采用 Fisher 精切概率法,三组妊娠率差异有显著意义( $P < 0.05$ )。通过两两比较,模型组妊娠率明显低于假手术组与空白组( $P < 0.05$ );而假手术组与空白组的妊娠率差异无显著性( $P > 0.05$ ) (见

表 1)。

采用非参数检验,三组的活胎数差异有显著性( $P < 0.05$ )。通过两两比较,模型组的活胎数明显低于假手术组与空白组( $P < 0.05$ ),而假手术组与空白组的活胎数差异无显著性( $P > 0.05$ ) (见表 2)。



注: A:正常子宫内膜;B:异位子宫内膜;C:异位子宫内膜

图 4 子宫内膜异位症小鼠模型腹腔内异位症灶(标尺 = 300 μm)

Note. A: Normal endometrium; B: Ectopic endometrium; C: Ectopic endometrium

Fig. 4 Ectopic endometriotic lesions in the abdominal cavity of model mice. Bar = 300 μm.

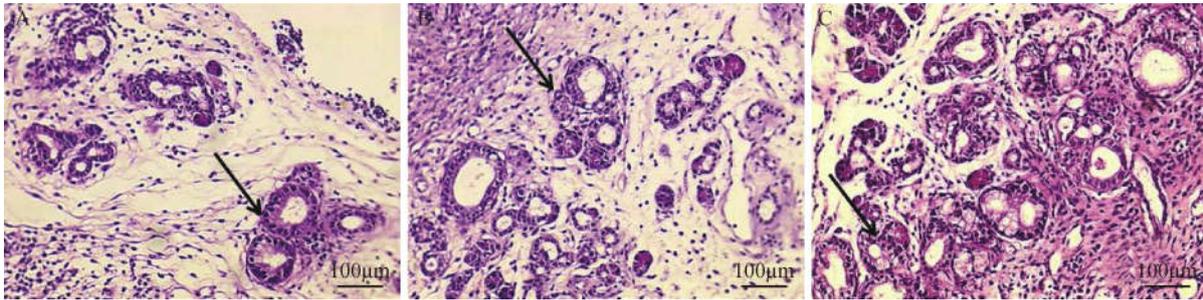
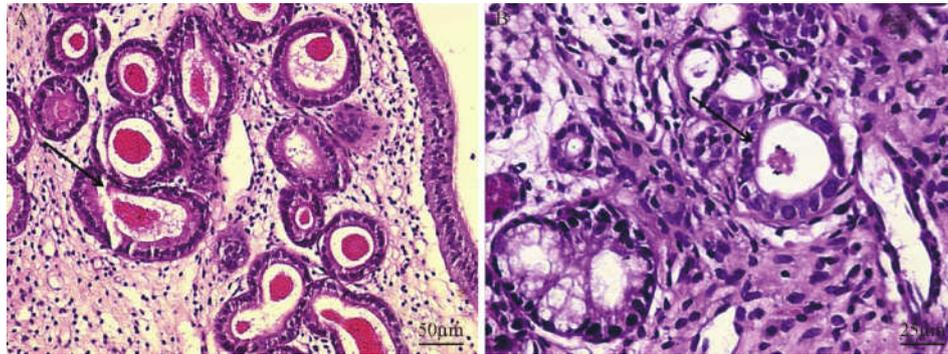


图 5 子宫内膜异位症小鼠模型异位症灶(标尺 = 100 μm)

Fig. 5 Ectopic endometriotic lesions in the model mice. Bar = 100 μm.



注: A 正常内膜(标尺 = 50 μm);B 异位内膜(标尺 = 25 μm)

图 6 正常内膜和子宫内膜异位症小鼠模型异位内膜

Note. A: Normal endometrium(Bar = 50 μm); B: Ectopic endometrium(Bar = 25 μm.)

Fig. 6 Normal endometrium (A) and ectopic endometriotic lesions (B) in the model mice.

表 1 三组妊娠率比较

Tab. 1 Comparison of pregnancy rates in the three groups

组别 Groups	妊娠/只 Pregnancy	未妊娠/只 No pregnancy	妊娠率/% Pregnancy rate
模型组 Model group	5	8	38.46
假手术组 Sham-operation group	10	1	90.91*
空白组 Blank group	11	1	91.67*
总计 Total	26	10	

注: \* 与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

Note. \* Compared with the model group,  $P < 0.05$ .

表 2 各组活胎数比较

Tab. 2 Comparison of live embryo number in the three groups

组别 Groups	活胎数 Live embryo number	秩均数 Rank mean	$\chi^2$	$P$
模型组 Model group	00.00(12.50)	12.96		
假手术组 Sham-operation group	12.00(5.00)*	23.41	6.412	0.041
空白组 Blank group	11.00(3.75)*	20.00		

注: 数据以中位数与四分位数表示, \* 与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

Note. The date expressed as median and quartiles. \* Compared with the model group,  $P < 0.05$ .

### 3 讨论

内异症是一种常见的、多发的良性妇科疾病,具有侵袭性和复发性。子宫内膜异位症的最佳诊断方法为腹腔镜检查,而腹腔镜是有创性的检查。内异症这种疾病仅自发于人类和灵长类动物,因此,关于子宫内膜异位症的研究受到实际操作和伦理道德因素的限制而无法对子宫内膜异位症患者进反复进行创伤性检查,或进行具有侵袭性的 EM 对照试验研究。因此,动物模型则成为研究该内异症的一个主要方式及重要手段。目前,国内外 EM 动物模型在狒狒、猴、巴马香猪、兔、大鼠和小鼠等动物中都已有的研究和发展。其中以兔和鼠最为常用,自发性 EM 动物模型以有月经周期的灵长类动物为实验动物,但因发病率低且代价昂贵而限制了在 EM 模型中的应用。诱发性 EM 动物模型以子宫内膜不发生脱落的动情动物为主,如:兔、鼠等。现有的模型大多是以自体移植诱导模型为主,移植方法是将动物自体的子宫内膜缝合到其腹膜、子宫系膜或肠系膜上,此法虽然能形成病灶且生长良好,但病灶深藏于动物腹腔体内,须进行二次手术进行探查。此法建立的动物模型不能保留完整子宫,限制了子宫内膜异位症关于子宫内膜、妊娠、胚胎方面的研究。为了减少动物内膜和人类内膜存在的种属和生化方面的差异,研究者故将免疫缺陷的裸鼠和严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠作为实验研究对象,其模型建立方法是将人类的子宫内膜移植于小鼠腹腔<sup>[11,12]</sup>或皮下<sup>[13]</sup>,模型成功率可高达 100%。但裸鼠价格较高,且免疫缺陷小鼠不能用于免疫方面的研究。马丽等实验研究根据可靠的组织学观察发现,免疫功能正常的 ICR 小鼠模型建立成功率可达 83.3%,小鼠在价格和免疫学<sup>[14]</sup>研究应用方面很大的优势。针对于大鼠和兔模型,小鼠模型在某些方面有极大优势。如小鼠对 E2 的敏感性要超过大鼠等。

本实验选用 KM 小鼠,因其动情周期短而规律、性成熟早、繁殖力强、生存及适应能力强,免疫功能正常,价格适宜。通过“腹腔+皮下”同种异体子宫内膜注射法建立 EM 小鼠模型。实验研究结果发现,假手术组的妊娠率和活胎数与空白组比较无明显差异( $P > 0.05$ ),这表明小鼠的妊娠功能并未受到“腹腔+皮下”内膜注射法整个操作过程的影响。而利用此方法建立模型较传统开腹自体移植等造模方法相比,对动物创伤小,可在一定程度避免腹腔手术操作、线结异物刺激对盆腔微环境可能产生的影响,减少动物感染、死亡的发生。同时“皮下+腹腔”的叠加方法,不仅有利于观察异位病灶的生长带来方便,避免二次开腹探查,而且也不会脱离腹腔

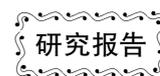
环境,使异位病灶依附于腹腔微环境之中。采用该方法建立的 EM 小鼠模型异位病灶肉眼可见,形态典型、易观察,病灶生长部位分散且易见粘连带,符合人类内异症的发病特征。经 HE 染色的病理组织学验证,其造模成功率可达 90% 以上,故以“腹腔+皮下”同种异体子宫内膜注射法建立 EM KM 小鼠模型是一种较优的动物模型。

本研究结果显示,模型组的妊娠率、活胎数均明显低于假手术组和空白组( $P < 0.05$ ),假手术组的妊娠率和活胎数与空白组比较无明显差异( $P > 0.05$ ),这表明从动物实验角度验证,内异症可降低小鼠的妊娠功能,通过本实验造模方法所建立的 EM 小鼠模型,既保留了小鼠的完整双子宫,又保持较强的生命活力,这与传统自体移植建模方法相比,该模型更适用于子宫内膜异位症相关不孕、生育能力、妊娠、辅助生殖及后续程序繁琐等实验研究,可作为内异症相关不孕研究的理想动物模型,为子宫内膜异位症相关不孕的基础研究提供了良好的研究手段和对象。

#### 参 考 文 献

- [1] 张惜阴. 实用妇产科学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 745-749.
- [2] Birmingham A. Endometriosis and infertility [J]. Fertil Steril, 2004, 82(1): 40-45.
- [3] Buyalos RP, Agarwal SK. Endometriosis-associated infertility [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2000, 12(5): 377-381.
- [4] 崔阳阳, 孙伟伟, 赵瑞华. 子宫内膜异位症模型小鼠胞饮突间位点观察 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(1): 200-202.
- [5] 李靖, 李炫诚, 吴云霞. 确定小鼠动情周期的三种方法 [J]. 实验动物科学, 2007, 24(3): 62-64.
- [6] 谭毅, 顾美礼, 王智彪, 等. 完整分离围着床期小鼠子宫内膜方法的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2001, 9(1): 40-44.
- [7] 马丽, 谢淑武, 朱焰, 等. 注射法小鼠下下子宫内膜异位症模型及组织学观察 [J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(3): 192-195.
- [8] 郭方, 徐丛剑. 腹腔注射甲氨蝶呤对小鼠异位内膜生长的影响 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2007, 23(9): 692-693.
- [9] 高颖. 子宫内膜异位症病理. 见: 曹泽毅主编. 中华妇产科学. 北京: 人民卫生出版社, 2004. 1486-1488.
- [10] 刘光芒, 吴德, 张明, 等. 铁与维生素 A 水平对小鼠子宫分泌蛋白及胚胎存活率影响 [J]. 动物营养学报, 2007, 19: 392-400.
- [11] Van Langendonck A, Casanas-Roux F, Eggermont J. Characterization of iron deposition in endometriotic lesions induced in the nude mouse model [J]. Hum Reprod, 2004, 19(6): 1265-1271.
- [12] Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J. Early-stage endometriosis: adhesion and growth of human menstrual endometrium in nude mice [J]. Fertil Steril, 2000, 74(2): 306-312.
- [13] Aoki D, Katsuki Y, Shimizu A, et al. Successful heterotransplantation of human endometrium in SCID mice [J]. Obstet. Gynecol, 1994, 83(2): 220-228.
- [14] Somigliana E, Vigano P, Rossi G, et al. Endometriosis ability to implant in ectopic sites can be prevented by interleukin-12 in a murine model of endometriosis [J]. Human Reprod, 1999, 14(12): 2944-2950

[收稿日期] 2015-05-05



# eNOS/NO 途径在单侧输尿管梗阻小鼠肾间质微血管病变中的作用与机制

陈雁<sup>1Δ</sup>, 牛潼<sup>2Δ</sup>, 白海涛<sup>1\*</sup>, 杨晓晶<sup>1</sup>, 张燕林<sup>3</sup>, 羊钦裕<sup>4</sup>

(1. 厦门大学附属第一医院儿科, 厦门 361003; 2. 吉林大学基础医学院, 长春 130000  
3. 厦门大学附属第一医院肾内科, 厦门 361003; 4. 四川绵阳中心医院儿科, 四川 绵阳 621099)

**【摘要】** 目的 探讨内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)和一氧化氮(nitric oxide, NO)在单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)肾间质纤维化小鼠微血管病变中的作用及机制。方法 64只KM小鼠随机分为两组:假手术组 $n=32$ 只;单侧输尿管梗阻UUO组 $n=32$ 只。观察4周,每周检测各组小鼠血BUN、Scr及一氧化氮,流式细胞计数外周血CD133<sup>+</sup>/VEGFR<sup>+</sup>内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)、Masson染色观察肾组织形态学变化,免疫组化法检测肾间质CD34<sup>+</sup>表达计数微血管密度,实时定量PCR检测肾皮质eNOS、VEGF mRNA表达。结果 UUO组血一氧化氮、内皮祖细胞计数、肾间质微血管密度、eNOS、VEGF mRNA表达水平持续下降,在第2、3、4周与对照组差异有统计学意义。一氧化氮水平与肾间质微血管密度呈正相关( $r=0.715, P<0.05$ );eNOS mRNA表达水平与肾间质微血管密度( $r=0.624, P<0.05$ )、内皮祖细胞计数( $r=0.375, P<0.05$ )、VEGF mRNA( $r=0.351, P<0.05$ )呈正相关。结论 eNOS/NO途径参与了UUO小鼠肾间质微血管的调节,其调节涉及对血管舒张功能影响、介导促血管肾脏因子VEGF mRNA表达及动员内皮祖细胞等机制。

**【关键词】** 内皮型一氧化氮合酶;一氧化氮;肾小管周围微血管;内皮祖细胞;血管生长因子;小鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)05-0484-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.008

## Role of eNOS/NO signaling pathway in peritubular capillary lesions in renal interstitial fibrosis and the related mechanism in mouse models of unilateral ureteral obstruction

CHEN Yan<sup>1</sup>, NIU Tong<sup>2</sup>, BAI Hai-tao<sup>1\*</sup>, YANG Xiao-jing<sup>1</sup>, ZHANG Yan-lin<sup>3</sup>, YANG Qin-yu<sup>4</sup>

(1. Department of Pediatrics, 2. College of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130000, China;  
3. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital, Xiamen University, Xiamen 361003;  
4. Department of Pediatrics, Mianyang Central Hospital, Mianyang 621099)

**【Abstract】 Objective** To investigate the role of eNOS/NO signaling pathway in peritubular capillary lesions of mouse renal interstitial fibrosis with unilateral ureteral obstruction (UUC) and the potential mechanism. **Methods** Sixty-four healthy male KM mice were randomly divided into sham operated group ( $n=32$ ) and unilateral ureteral obstruction group ( $n=32$ ). At each week, serum BUN, Scr and NO were determined and the percentages of CD133<sup>+</sup>/VEGFR<sup>+</sup> endothelial progenitor cells in peripheral blood mononuclear cells were detected by flow cytometry. Morphological changes of the renal tissue were observed using Masson staining. The expression of CD34<sup>+</sup> cells in the renal interstitium was analyzed by immunohistochemistry to calculate the peritubular capillary density. The expressions of eNos and VEGF mRNA were determined by real-time PCR. **Results** The expression of blood NO, the percentages of endothelial progenitor cells, peritu-

[基金项目]福建省卫生厅青年科研课题(编号:2010-2-92)。

[作者简介]陈雁(1984-),女,主治医师,硕士,专业:小儿肾脏病,Email:ccynthia0324@hotmail.com。Δ共同第一作者。

[通讯作者]白海涛(1967-),女,主任医师,博士,研究方向:干细胞与肾脏再生。Email:baihaitao@163.com

bular capillaries, eNOS mRNA, and VEGF mRNA in the UUO group were significantly decreased compared with those of the sham group at 2, 3, and 4 weeks ( $P < 0.05$ ). NO was positively correlated with peritubular capillaries ( $r = 0.715, P < 0.05$ ), eNOS mRNA was positively correlated with peritubular capillaries ( $r = 0.624, P < 0.05$ ), endothelial progenitor cells ( $r = 0.375, P < 0.05$ ), and VEGF mRNA ( $r = 0.351, P < 0.05$ ). **Conclusions** eNOS/NO signaling pathway participates in regulation of peritubular capillary lesions in renal interstitial fibrosis of UUO mice. The mechanism may be partly related to the regulation of vasomotor reflex, the expression of VEGF mRNA and mobilization of endothelial progenitor cells.

**【Key words】** Endothelial nitric oxide synthase; Nitric oxide; Peritubular capillary; Endothelial progenitor cells; Angiogenesis growth factor; Mice

多种进展性肾病存在肾小管周围微血管(peritubular capillaries, PTC)病变, PTC 病变是加剧肾间质纤维化的重要原因。内皮细胞损伤和修复功能减退是导致 PTC 网丢失减少的主要原因。内皮细胞损伤后的分泌失调是微血管病变发展和演变过程中的重要特征。NO 主要由血管内皮细胞合成, eNOS 是 NO 合成的限速酶, 通过催化 L-精氨酸合成 NO 发挥生物学功能, eNOS/NO 途径参与内皮细胞功能调节和血管生成, 在维持微血管密度中起重要作用。研究显示 eNOS 敲除小鼠可存在先天性的肾脏发育异常, eNOS 缺陷可导致严重的肾损伤<sup>[1]</sup>, 提示 eNOS/NO 在肾脏病的发生发展中扮演着重要角色。本研究通过观察单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral occlusion, UUO)小鼠肾组织 eNOS、VEGF mRNA、血清 NO 表达变化, 计数 PTC 密度, 探讨 eNOS/NO 途径对肾间质纤维化微血管病变的影响及可能机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

6 周龄 SPF 级雄性 KM 小鼠, 体重 37 ~ 40 g, 来源于厦门大学实验动物中心 [SCXK(闽)2013-0001]。无菌手术在厦门大学实验动物中心屏障环境动物实验室进行 [SYXK(闽)2013-0006], 并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。PE 标记抗小鼠 CD133 与同型对照 (PE-CD133: E028258 及 Isotype control: E028728)、Pacific Blue 标记抗小鼠 VEGFR-2 与同型对照 (Pacific Blue: E031625 及 Isotype control: E022113) 购于美国 eBioscience 公司。免疫组化检测兔抗小鼠多克隆抗体 CD34 (BA0532, 抗体购于武汉博士德生物有限公司。Trizol 购于 Invitrogen 公司 (Cat no15596-026)。SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 实时定量反转录试剂盒 (RR420A) 购于 TaKaRa 公司。Real-time PCR 所有引物由 TaKaRa 公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Nucleotide sequences of the primers

引物名称 Primers	引物序列(5' to 3') Sequences	扩增产物/bp Amplification products
Mouse GAPDH forward	TGACCACAGTCCATGCCATC	203
Mouse GAPDH reverse	GACGGACACTTGGGGGTAG	
Mouse VEGF forward	ACATTGGCTCACTTCCAGAAACAC	107
Mouse VEGF reverse	GGTTGGAACCGGCATCTTATC	
Mouse NOS-3 forward	GAAGCGTGTGAAGGCAACCA	146
Mouse NOS-3 reverse	CGTGCTCTAGGGACACCACATC	

### 1.2 动物分组及模型建立

64 只 SPF 级雄性 KM 小鼠随机分为模型组 (UUO 组,  $n = 32$ ) 和假手术组 (sham 组,  $n = 32$ )。UUO 组小鼠 10% 乙醚麻醉后经右侧耻骨上切口, 行右侧输尿管游离结扎。Sham 组仅游离右侧输尿管及右肾, 不结扎, 不切断。分别于实验第 7、14、21、28 天每组各随机抽取 8 只动物处死, 处死当日眼球取血, 其中约 200  $\mu$ L 滴入末梢血 EDTA 抗凝管备流

式细胞检测, 其余以干燥管取上层血清备 NO、BUN、Cr 检测。

### 1.3 血生化指标检测

硝酸还原酶法测定血清 NO。

### 1.4 外周血内皮祖细胞流式细胞检测

(1) 外周抗凝血 50  $\mu$ L 分置 2 个离心管, 一管中加入 5  $\mu$ L PE 标记抗小鼠 CD133 及 2.5  $\mu$ L Pacific-Blue 标价抗小鼠 VEGFR2, 另一管加入等量同型

对照,充分震荡后室温避光静置 50 min。每份标本滴加红细胞裂解液 200  $\mu$ L,避光 20 min。4 $^{\circ}$ C 3000 r/min  $\times$  3 min,吸取上清液后 PBS 洗涤 3 次后悬浮,调节细胞浓度至  $10^5$  个/mL。用 Partec CyFlow Space 流式细胞仪以其配套的 Partec PAS Cell Quest 软件进行流式细胞分析。检测由厦门大学医学院中心实验室协助完成。

### 1.5 肾脏病理形态学检测

常规制作 2  $\mu$ m 石蜡切片做 Masson 染色。

### 1.6 免疫组化检测 CD34 表达计数 PTC 密度

采用 SP 法,以 PBS 代替一抗做阴性对照染色,染色步骤按试剂盒说明。CD34 染色计数 PTC 密度:一抗为兔抗小鼠多克隆抗体 CD34(1:100),二抗为滴加生物素化兔抗山羊 IgG,PTC 计数<sup>[9]</sup>:任何 1 个棕黄色的内皮细胞或内皮细胞簇作为一条微血管,只要结构不相连,分支结构也作为一条血管计数(除外大血管)。每个标本盲法随机观察肾皮质区不含肾小球的 10 个高倍镜视野( $\times$  400, 0.065 mm<sup>2</sup>),计数阳性的毛细血管腔个数,得出 PTC 密度(个/mm<sup>2</sup>)取平均值。

### 1.7 Real-time PCR 测定

肾皮质 VEGF、eNOS mRNA 的表达量:肾皮质称重约 100 mg,加入 Trizol 试剂 1 mL 匀浆,按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,反转录为 cDNA。按三

表 2 两组小鼠血清 NO 比较( $\mu$ mol/L,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Tab. 2 Comparison of serum NO levels in the mice

组别 Groups	1 周 1 week	2 周 2 weeks	3 周 3 weeks	4 周 4 weeks
Sham 组	18.79 $\pm$ 6.02	16.15 $\pm$ 4.77	19.59 $\pm$ 2.65	18.38 $\pm$ 5.43
UUO 组	14.08 $\pm$ 1.06	12.77 $\pm$ 1.88 <sup>a</sup>	10.24 $\pm$ 3.45 <sup>a</sup>	5.73 $\pm$ 1.73 <sup>a</sup>

注:<sup>a</sup>与 Sham 组比较  $P < 0.05$ 。

Note. <sup>a</sup> Compared with the sham group,  $P < 0.05$ .

表 3 两组小鼠 CD133<sup>+</sup>/VEGFR2<sup>+</sup> 双阳性细胞流式细胞检测结果(% ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Tab. 3 Comparison of CD133<sup>+</sup>/VEGFR<sup>+</sup> endothelial progenitor cells in the mice determined by flow cytometry

组别 Groups	1 周 1 week	2 周 2 weeks	3 周 3 weeks	4 周 4 weeks
Sham 组	0.198 $\pm$ 0.046	0.235 $\pm$ 0.046	0.190 $\pm$ 0.021	0.147 $\pm$ 0.016
UUO 组	0.157 $\pm$ 0.029	0.115 $\pm$ 0.030 <sup>a</sup>	0.080 $\pm$ 0.028 <sup>a</sup>	0.075 $\pm$ 0.023 <sup>a</sup>

注:<sup>a</sup>与 Sham 组相比  $P < 0.05$ 。

Note. <sup>a</sup> Compared with the sham group,  $P < 0.05$ .

### 2.3 两组小鼠肾组织病理

Masson 染色 sham 组肾组织形态正常,UUO 组见肾小管扩张及少数蛋白管型,肾间质纤维化逐渐加重,肾小管间质蓝染物质明显增多,见图 3。

### 2.4 两组小鼠免疫组化监测肾间质 CD34 表达及 PTC 计数

免疫组化染色棕黄色细胞作为 CD34 阳性细胞,正常内皮细胞胞膜着色。Sham 组 PTC 密度丰富,分

步法 LightCycler<sup>®</sup> Real-time PCR 扩增仪(型号 G10120)进行实时定量 PCR。PCR 程序:预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s;扩增 95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 15 s,45 个循环;熔解曲线分析:95 $^{\circ}$ C 15 s,65 $^{\circ}$ C 60 s。定量 PCR 反应体系:SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II(2  $\times$ ) 10.0  $\mu$ L,PCR forward primer(10  $\mu$ mol/L)0.8  $\mu$ L,PCR reverse primer(10  $\mu$ mol/L)0.8  $\mu$ L,DNA 模板 2.0  $\mu$ L,dH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu$ L,总体系 20.0  $\mu$ L。

### 1.8 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计软件包进行数据统计学分析。计算数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间计量资料比较用  $t$  检验,指标间相关性用 Pearson 相关分析,均为双侧检验, $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组小鼠血清 NO 变化

UUO 组造模后第一周血清 NO 开始下降,一周后各时间点与 Sham 组差异有统计学意义(见表 2)。

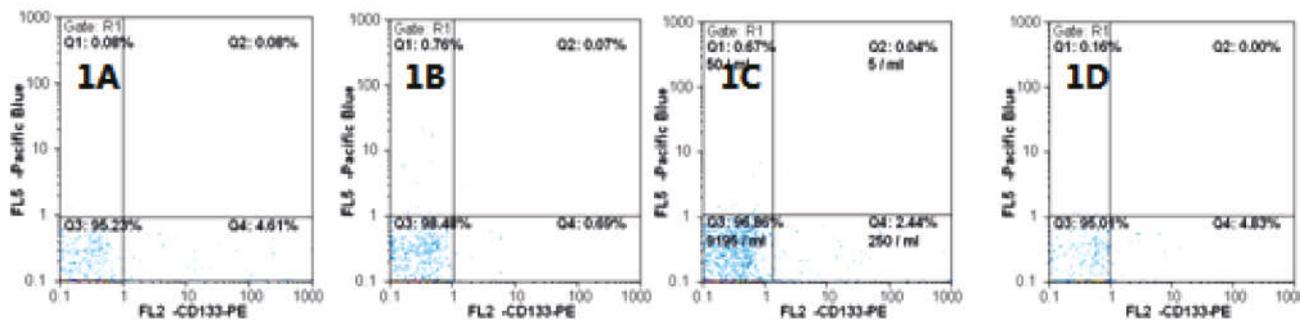
### 2.2 两组小鼠流式细胞检测外周血单个核细胞 CD133<sup>+</sup>/VEGFR<sup>+</sup> 双阳性细胞结果

造模后 UUO 组 CD133<sup>+</sup>/VEGFR<sup>+</sup> 双阳性细胞持续降低,2,3,4 周与 Sham 组差异有统计学意义,见图 1,2 及表 3。

布均匀,形态大致规则。UUO 组 PTC 病变呈局灶性分布,随造模时间延长,PTC 密度逐渐降低,排列紊乱,见图 4。计数 PTC 密度,UUO 组明显降低,第 2,3,4 周与 sham 组差异有统计学意义,见表 4。

### 2.5 两组小鼠肾组织 eNOS mRNA、VEGF mRNA 表达

UUO 组 eNOS mRNA、VEGF mRNA 表达持续下降,2 周起与 Sham 组差异有统计学意义(图 5 及表 5)。

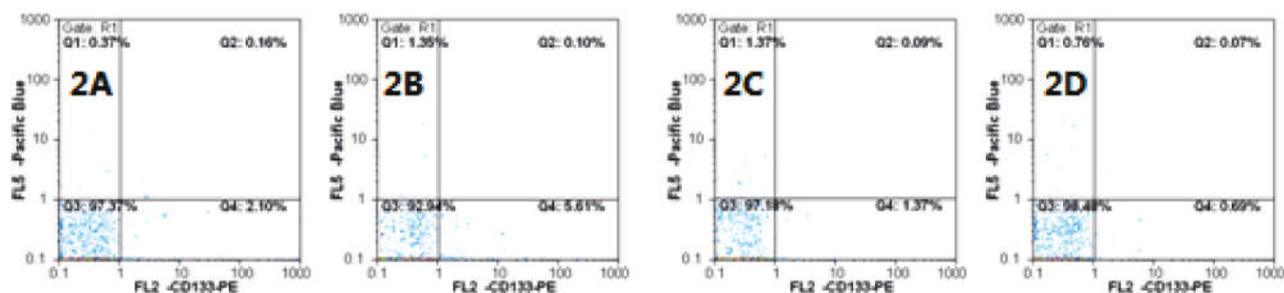


注:1A:UUO 组(1 周);1B:UUO 组(2 周);1C:UUO 组(3 周);1D:UUO 组(4 周)。

图 1 UUO 组小鼠各时间点流式细胞图

Note. 1A:UUO group(1 week);1B:UUO group(2 weeks);1C:UUO group(3 weeks);1D:UUO group(4 weeks).

Fig.1 CD133<sup>+</sup>/VEGFR<sup>+</sup> endothelial progenitor cells in peripheral blood mononuclear cells of the UUO group at different times

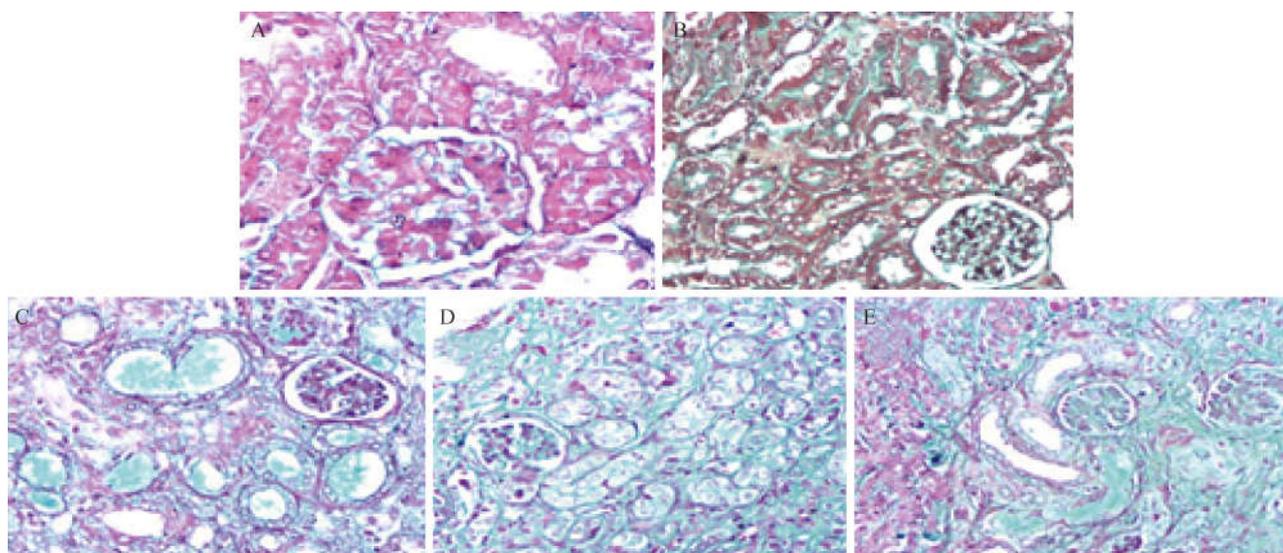


注:A: Sham 组(1 周);B: Sham 组(2 周);C: Sham 组(3 周);D: Sham 组(4 周)。

图 2 Sham 组小鼠各时间点流式细胞图

Note. A: Sham group, 1week; B: Sham group, 2 weeks; C: Sham group, 3 weeks; D: Sham group, 4 weeks.

Fig.2 CD133<sup>+</sup>/VEGFR<sup>+</sup> endothelial progenitor cells in peripheral blood mononuclear cells of the sham group at different times



注:A:Sham 组;B:UUO 组(1 周);C:UUO 组(2 周);D:UUO 组(3 周);E:UUO 组(4 周)。

图 3 两组小鼠肾脏病理(Masson, ×200HPF)

Note. A: Sham group; B: UUO group(1week); C: UUO group(2 weeks); D: UUO group(3 weeks); E: UUO group(4weeks).

Fig.3 Morphological changes in the renal tissue under optical microscope (Masson staining, ×200HPF)

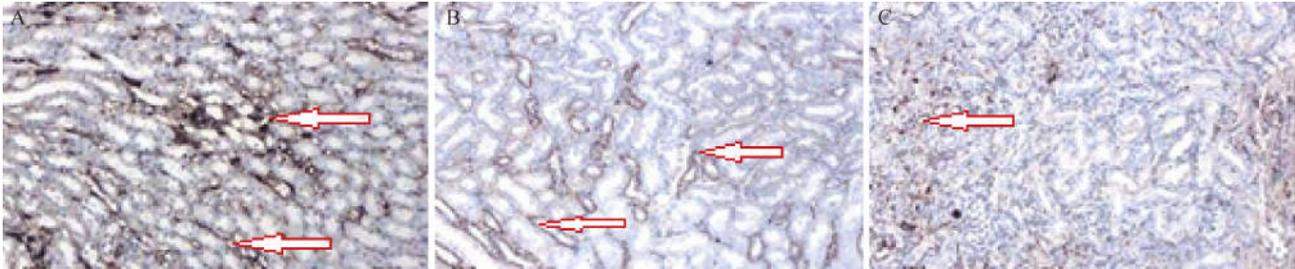
表 4 UUO 组及 Sham 组小鼠肾间质 PTC 计数(个/mm<sup>2</sup>,  $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Tab. 4 Counting of peritubular capillaries in the UUO and sham groups.

组别 Groups	1 周 1 week	2 周 2 weeks	3 周 3 weeks	4 周 4 weeks
Sham 组	418.00 ± 62.62	428.15 ± 58.77	412.59 ± 28.95	405.38 ± 25.69
UUO 组	379.54 ± 28.46	256.46 ± 11.69 <sup>a</sup>	176.92 ± 28.87 <sup>a</sup>	115.38 ± 34.77 <sup>a</sup>

注:<sup>a</sup> *P* 较 sham 相比 *P* < 0.05。

Note. <sup>a</sup> Compared with the sham group, *P* < 0.05.



注:A:Sham 组;B:UUO 组(1 周);C:UUO 组(4 周)。

图 4 两组小鼠肾间质 CD34 染色结果(免疫组化 × 100HPF)

Note. A: Sham group; B: UUO group(1 week); C: UUO group(4 weeks).

Fig. 4 The expression of CD34 of renal interstitium by immunohistochemical staining

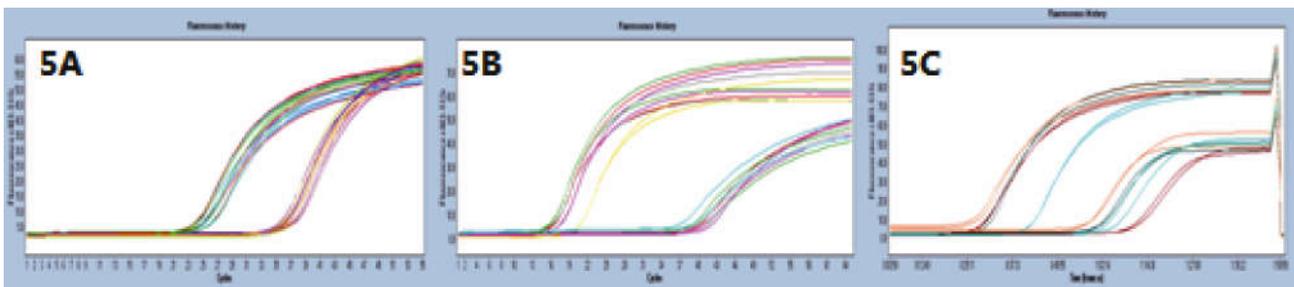
表 5 两组小鼠肾组织 eNOS mRNA、VEGF mRNA 表达(PI,  $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Tab. 5 The expression of eNOS mRNA and VEGF mRNA in renal tissue of the mice.

组别 Groups	eNOS				VEGF			
	1 周	2 周	3 周	4 周	1 周	2 周	3 周	4 周
Sham 组	24.06 ± 6.23	23.36 ± 7.45	26.44 ± 3.06	26.32 ± 7.70	25.16 ± 7.20	27.53 ± 4.57	28.25 ± 7.75	27.66 ± 2.9
UUO 组	20.71 ± 4.66	16.72 ± 4.85 <sup>a</sup>	14.09 ± 3.29 <sup>a</sup>	11.83 ± 2.10 <sup>a</sup>	22.23 ± 3.80	19.75 ± 4.12 <sup>a</sup>	17.30 ± 4.64	13.64 ± 4.6 <sup>a</sup>

注:<sup>a</sup> *P* 较 sham 相比 *P* < 0.05。

Note. <sup>a</sup> Compared with the sham group, *P* < 0.05.



注:A:GAPDH;B:eNOS;C:VEGF。

图 5 Real-time PCR 扩增曲线

Note. A: GAPDH; B: eNOS; C: VEGF.

Fig. 5 Amplification curves of the real-time-PCR analysis

### 2.6 Pearson 相关分析显示

UUO 小鼠血清一氧化氮水平与肾间质微血管密度呈正相关( $r = 0.715, P < 0.05$ ); eNOS mRNA 表达水平与肾间质微血管密度( $r = 0.624, P < 0.05$ )、内皮祖细胞计数( $r = 0.375, P < 0.05$ )、VEGF mRNA( $r = 0.351, P < 0.05$ )呈正相关。

### 3 讨论

内皮细胞的损伤和再生修复功能减退是导致 PTC 丢失的主要原因。eNOS/NO 与内皮细胞功能及血管生成密切相关, eNOS 基因敲除小鼠可导致进展期局灶性肾损伤, 且局部病变的严重程度与 PTC 密度呈正相关, 维持 eNOS 表达, 能减少 PTC 损伤,

从而延缓 RIF 的病理进程<sup>[2]</sup>。本研究显示 UUO 组成模后 eNOS、NO 水平呈持续下降趋势, eNOS、NO 与 PTC 密度存在显著直线正相关, 提示 eNOS/NO 参与了肾间质纤维化微血管病变的发生发展。

eNOS/NO 途径可能通过多种机制参与 PTC 的调节。慢性肾损伤进展过程中炎症因子、缺氧等因素损伤内皮细胞, NO 等舒血管物质分泌减少, ET-1 等缩血管物质释放增加, 可进一步加剧内皮细胞的损伤, 导致间质纤维化进展中微血管病变的恶性循环<sup>[3]</sup>。NO 是目前所知最强的内皮源性舒血管因子之一, 能维持正常内皮舒张抑制痉挛收缩, 清除自由基, 抑制脂质过氧化反应, 保持 PTC 正常的形态学结构和功能。本研究显示 UUO 组 NO 表达持续下降, 提示 eNOS/NO 对血管舒张功能的调节可能参与了 PTC 密度的维持。

eNOS/NO 途径是血管生成必须的调节因子, 参与调节内皮细胞的生长、凋亡、迁移以及干细胞动员、募集, 在不同组织的血管生成过程中都起重要作用<sup>[4]</sup>。给予肢体缺血的家兔口服 L-精氨酸后缺血肢体血管生成明显增加, 而 eNOS 基因缺失时缺血肢体的血管生成明显减弱<sup>[5]</sup>。慢性肾脏病变过程中 eNOS/NO 途径可能通过参与血管的生产而维持肾间质微血管密度。

VEGF 是一个强有力的促血管生成因子, 近年来的研究已经证实它在新生血管形成过程中居于中心地位<sup>[6,7]</sup>, 血管再生能力的下降伴随 eNOS 和 VEGF 表达减少。本研究 UUO 组 VEGF 表达持续下降, 相关分析显示与 eNOS mRNA 表达呈直线正相关。提示介导促血管生长因子的血管新生作用可能参与了, 是 eNOS/NO 维持 PTC 可能机制。

外周血 EPCs 是血管内皮细胞的前体细胞, eNOS/NO 参与干细胞的动员及分化, eNOS 的基因缺陷将造成 EPCs 动员障碍而影响新生血管生成<sup>[8]</sup>。研究显示 II 型糖尿病患者 EPC 血管生成能力下降伴 eNOS mRNA、蛋白表达下调, NO 分泌降低, 补充外源性 NO, 血管生成的数量、复杂程度增加, 提示糖尿病患者血管生成能力降低与 NO 合成减少有关<sup>[9]</sup>。在 Verma 等<sup>[10]</sup>的研究中发现, C 反应蛋白(CRP)通过抑制 eNOS 的表达从而抑制 EPC 增殖及迁移能力, 本研究 UUO 组外周血 EPCs 数量持续下降, 与 eNOS 表达呈正相关, 提示动员 EPCs 是

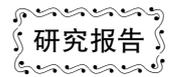
eNOS/NO 途径调控微血管密度的机制之一<sup>[11]</sup>。

综上所述, eNOS/NO 途径对微血管的调控作用可能对慢性肾损伤产生影响的机制之一, eNOS/NO 对微血管的调控有多种机制参与, 临床用药物调控 eNOS/NO 途径从而影响内皮细胞修复及血管再生过程, 将可能产生肾脏保护作用。

#### 参 考 文 献

- [1] Baylis C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease [J]. Am J Physiol Renal Physiol. 2008, 294: F1 - F9.
- [2] Forbes MS, Thornhill BA, Park MH, et al. Lack of endothelial nitric-oxide synthase leads to progressive focal renal injury [J]. Am J Pathol, 2007, 170: 87 - 99.
- [3] Nakayama T, Sato W, Kosugi T, et al. Endothelial injury due to eNOS deficiency accelerates the progression of chronic renal disease in the mouse [J]. Am J Physiol Renal Physiol. 2009, 296 (2): F317 - 327.
- [4] Nakagawa T, Johnson RJ. Endothelial nitric oxide synthase [J]. Contrib Nephrol. 2011, 170: 93 - 101
- [5] Mendoza MG, Castillo-Henkel C, Medina-Santillan R, et al. Kidney damage after renal ablation is worsened in endothelial nitric oxide synthase mice and improved by combined administration of L-arginine and antioxidants [J]. Nephrology (Carlton) 2008, 13: 218 - 227.
- [6] Scaldaferrri F, Vetrano S, Sans M, et al. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis [J]. Gastroenterology. 2009, 136: 585 - 595.
- [7] Yoshida D, Akahoshi T, Kawanaka H, et al. Roles of vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase during revascularization and regeneration after partial hepatectomy in a rat model [J]. Surg Today. 2011, 41 (12): 1622 - 1629.
- [8] Everaert BR, Van Craenenbroeck EM, Hoymans VY, et al. Current perspective of pathophysiological and interventional effects on endothelial progenitor cell biology: focus on P13K/AKT/eNOS pathway [J]. Int J Cardiol. 2010, 144(3): 350 - 366.
- [9] Yan J, Tie G, Park B, et al. Recovery from hind limb ischemia is less effective in type 2 than in type 1 diabetic mice; roles of endothelial nitric oxide synthase and endothelial progenitor cells [J]. J Vasc Surg, 2009, 50(6): 1412 - 1422.
- [10] Verma S, Yao L, Stewart DJ, et al. Endothelin antagonism uncovers insulin-mediated vasorelaxation *in vitro* and *in vivo* [J]. Hypertension. 2001, 37(2): 328 - 333.
- [11] 刘练, 张高福, 李秋, 等. 阿霉素肾病小鼠的肾脏病理转变过程 [J]. 中国实验动物学报. 2014, 22(2): 13 - 16.

[收稿日期] 2015-04-24



# 胸腔原位种植与经左心室注射建立肺癌脑转移动物模型的比较

陈愉生\*, 涂洵崑, 俞梅娥, 林猷, 李鸿茹

(福建医科大学省立临床医学院, 福州 350001)

**【摘要】** 目的 为研究肺癌脑转移机制提供一种可靠的造模方法。方法 18只BALB/c nude裸鼠随机分为2组,分别经胸腔原位种植与经左心室注射的方法,接种处于对数期生长的人肺腺癌PC-9细胞( $1 \times 10^6/0.1$  mL),接种后观察裸鼠状态,在裸鼠出现严重恶液质时处死。解剖裸鼠,观察肺、脑、肝、肾转移情况;病理取材、HE染色观察。结果 胸腔原位种植组:3周后,第4、6、9号裸鼠可见胸壁瘤结凸起形成,渐增大;裸鼠于第4~6周开始出现体重减轻,并逐渐出现恶液质,分别于第5~7周处死。开胸后见:胸腔广泛灰白色肿瘤结节、团块形成,双侧肋骨、胸膜、脊柱多发种植灶,双肺被侵蚀压缩,颜色苍白,形态改变。HE染色见:肺表面广泛种植瘤形成,与正常肺组织分界清楚;仅6号裸鼠出现脑转移。经左心室注射组:裸鼠于第3周开始出现体重下降,并逐渐出现恶液质,全部裸鼠于第4周处死。开胸后:除11、18号裸鼠胸壁见2~3个散在瘤结分布(直径约1~3 mm),其余胸腔视野正常;肺组织轮廓清楚,未见瘤结生成。HE染色见:9只裸鼠均出现大小不一的多发脑转移灶。胸腔原位种植组:脑转移率为11.1%;经左心室注射组:脑转移率为100%。结论 经左心室注射建立肺癌脑转移动物模型的方法,较胸腔原位种植的方法保证了更高的脑转移率。

**【关键词】** 肺癌脑转移;左心室注射;胸腔种植;动物模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0490-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.009

## Comparison between the establishment methods of mouse models of lung cancer brain metastases by intrathoracic orthotopic implantation and by left ventricular injection

CHEN Yu-sheng, TU Xun-wei, YU Mei-e, LIN Xian, LI Hong-ru

(Fujian Provincial Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

**【Abstract】 Objective** To establish an appropriate animal model of brain metastases from lung cancer in nude mice by thoracic orthotopic implantation in the chest or left ventricular injection, and to serve further studies on the mechanisms of lung cancer brain metastasis. **Methods** PC-9 cells ( $1 \times 10^6/0.1$  mL) in logarithmic phase were respectively injected into 18 nude mice by orthotopic implantation in the chest or left ventricular injection ( $n=9$  each group). The statuses of nude mice were observed after implantation. Animals showing clear signs of dyscrasia were killed. At autopsy, the lung, brain, liver and kidney were removed and histological sections were stained with H/E to detect the presence of tumor cells. **Results** In the thoracic orthotopic implantation group, three weeks after implantation, the number 4, 6, 9 mice showed tumor nodules in the chest wall, they began to lose weight in the fourth to sixth week differently, showing signs of dyscrasia gradually, and were sacrificed at the fifth to seventh week. The thoracotomy revealed that the whole thorax was occupied by

[基金项目] 国家卫生和计划生育委员会科研基金(WKJ-FJ-17, 2013-2016);福建省立医院优秀青年医师项目(2014YNQN03);福建省自然科学基金(2015J01376)。

[通讯作者] 陈愉生(1957年-),女,教授,博士生导师。Email: slyyywb@126.com

many large lung cancer masses, spreading into bilateral ribs, pleura and spinal vertebra, with scarce eroded, compressed, pale and distorted lung tissues left. Histological examination with HE staining showed the presence of neoplasms in their lung tissues but only the number 6 mouse showed metastatic lesions in the brain tissue. In the left ventricular injection group, the mice almost began to lose weight in the third week simultaneously and became moribund slowly, which were all sacrificed at the fourth week. After thoracotomy, the thoraxes were clear except the number 11 and 18 mice which appeared 2-3 tiny tumor foci in the chest wall, with normal lung tissues. Histological examination with HE staining showed the presence of brain metastases in all the nine mice. The rate of brain metastases from lung cancer in the left ventricular injection group was 100%, compared with 11.1% in the thoracic orthotopic implantation group. **Conclusions** The establishment method of mouse model by left ventricular injection shows significantly higher rate of lung cancer brain metastases than that by thoracic orthotopic implantation.

**【Key words】** Brain metastases from lung cancer; Left ventricular injection; Intrathoracic implantation; Animal model; Mice

肺癌作为一种常见的恶性肿瘤,其死亡率占癌症死亡率之首<sup>[1]</sup>。肺癌最常见的远处转移部位之一是脑部,肺癌脑转移的发生率为 23% ~ 65%,是脑转移性肿瘤中最常见的类型<sup>[2]</sup>。由于脑组织解剖结构与功能的特殊性,肺癌脑转移患者放、化疗效果不佳,预后差,其中位生存期仅有 4 ~ 5 个月<sup>[3]</sup>。本研究以 PC-9 人肺腺癌细胞分别经胸腔原位种植与左心室注射的方法,接种裸鼠,拟建立肺癌脑转移的实验动物模型,为下一步研究脑转移具体机制提供可靠的造模方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 裸鼠与细胞

BALB/c nude 裸鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2012-002】,18 只,体重(16 ± 2)g,4 ~ 6 周龄,均为雌性,随机编号 1 - 18(1 - 9 为胸腔原位种植组,10 - 18 为经左心室注射组),饲养于福建医科大学动物实验中心 SPF 级动物室【SYXK(闽)2012 - 0001】;所用的饲料、水、垫料都经过严格灭菌处理,并按动物实验的 3R 原则给予人道的关怀。PC-9 人肺腺癌细胞系由华中科技大学同济医学院同济医院分子医学中心惠赠。

#### 1.1.2 试剂与设备

RPMI1640 培养基(HyClone,美国)、胎牛血清(杭州四季青,中国)、0.25% Trypsin-EDTA(Gibco,美国)、Pen-strep 双抗(Gibco,美国)、倒置显微镜(奥林巴斯,日本)、生物安全柜和 CO2 培养箱(三洋,日本)、舒锐 insulin syringe 29G(BD,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

PC-9 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清,1%

Pen-Strep 双抗,1% 谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基中,置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养;以 0.25% 胰酶消化传代。

#### 1.2.2 细胞悬液置备

镜下观察肿瘤细胞生长状况良好时,取对数生长长期的细胞,经胰酶消化制备细胞悬液,以 2000 r/min 离心 5 min,弃去上清液。加入无血清的 1640 培养基,吹打、再次 2000 r/min 离心 5 min,以无血清培养基稀释至细胞密度为 1 × 10<sup>7</sup>/mL 的单细胞悬液。

#### 1.2.3 接种动物

胸腔原位种植组:裸鼠经 5% 水合氯醛麻醉,右侧卧位固定,75% 乙醇常规消毒裸鼠左侧胸皮肤,于腋后线第 6 肋间进针(以进针突破感后再进针 3 ~ 4 mm 为准)。经左心室注射组:裸鼠经麻醉、仰卧位固定、消毒后,于胸骨左缘第二肋间旁开 2 mm 处进针(进针前调节好 BD 针头至滞留空气 0.05 mL 左右后,再吸取细胞液;进针 3 ~ 5 mm,以观察到血液喷射涌出作为进入左心室的标准;并在 10 s 内完成注射)。两组均注入肿瘤细胞悬液 0.1 mL(即 1 × 10<sup>6</sup> 个肿瘤细胞),注射完毕后快速拔针,棉签按压进针点。PC-9 细胞经上述方法接种裸鼠各 9 只。接种后的裸鼠置于 SPF 环境内饲养,并密切观察。

#### 1.2.4 观察与标本留取

期间定期称重,观察裸鼠的精神状态、一般情况等,特别注意裸鼠是否出现共济失调、偏瘫、视物不明等,当裸鼠体重减轻 20% 或者低于 16 g 时,密切观察是否出现嗜睡、行动迟缓等症状或异样体征,并于裸鼠出现严重恶液质(主要表现为弓背、消瘦、精神萎靡、呼吸短促、食欲下降等)时处死。留取脑、肺、肝肾及可疑转移灶处组织,经脱水固定、石蜡包埋、切片、HE 染色,观察。

## 2 结果

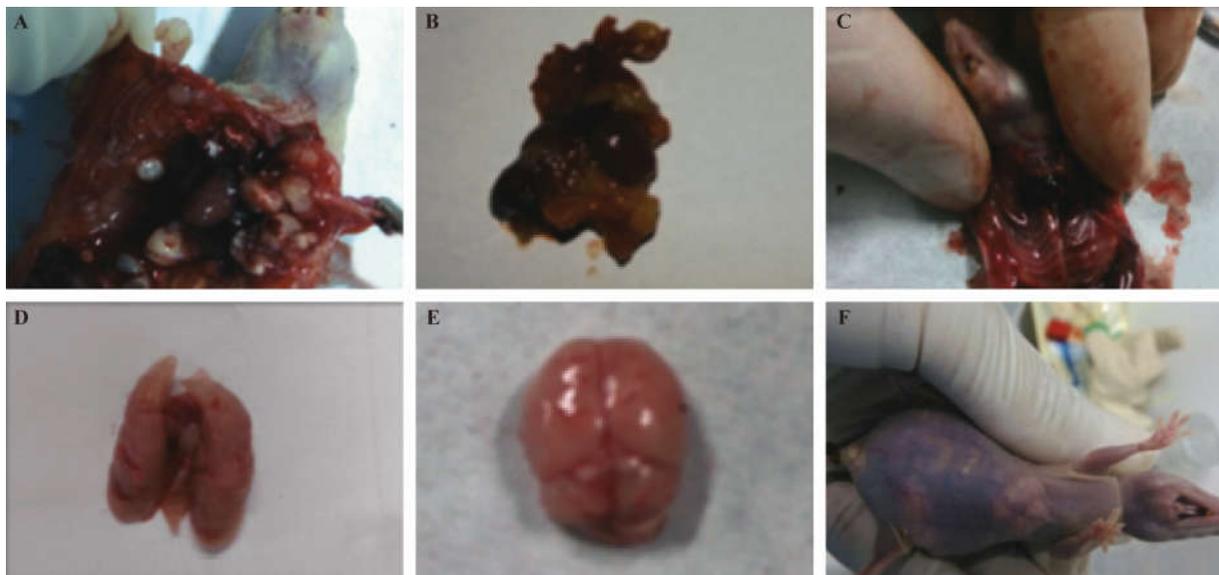
### 2.1 裸鼠的情况

两组裸鼠注射过程中均未发生死亡。胸腔原位种植组:裸鼠于注射后第 4~6 周体重开始下降,并逐渐出现恶液质,期间并未出现颅脑变形,共济失调、偏瘫、跛行、视物不明等情况,全部裸鼠于第 5~7 周处死。经左心室注射组:裸鼠于第 3 周开始出现体重减轻,并逐渐出现恶液质,期间部分裸鼠出现偏瘫、跛行、单侧眼失明,并未出现颅脑变形等情况,全部裸鼠于第 4 周处死。

### 2.2 肺部成瘤、脑部转移瘤及其他脏器转移情况

胸腔原位种植组:3 周后,第 4、6、9 号裸鼠胸壁可见瘤结凸起形成,渐增大。开胸后见:多个大小不一的灰白色瘤组织占据胸腔,双侧肋骨、胸膜、脊柱

多发种植灶,双肺被侵蚀压缩、颜色苍白、形态改变(图 1-A-B)。脑、肝、肾肉眼取材均未见转移灶。病理 HE 示:残留少数肺组织结构背景下,大量异常腺体形成,大小不一,多数与正常肺组织分界清楚,少数腺癌细胞侵入肺实质(图 2-A-B);仅 6 号裸鼠出现脑转移灶,直径约 2~3 mm(图 2-D);肝、肾组织未发现转移灶。经左心室注射组:开胸后:除 11、18 号裸鼠胸壁上见 2~3 个大小约为 1~3 mm 的瘤结形成,其余胸腔视野未见异常(图 1-C);肺组织颜色润红、质软、充气良好,未见瘤结形成(图 1-D)。脑、肝、肾肉眼取材时未见到转移灶(图 1-E)。病理 HE 示:9 只裸鼠均出现大小不一的多发脑转移灶(图 2-E-F)。肺、肝、肾未见转移灶形成(图 2-C)。



注:A、B. 胸腔原位种植组:胸腔-肺组织形态;C、D. 经左心室注射组:胸腔-肺组织形态;E. 经左心室注射组:脑;F. 胸腔原位种植组:腹腔肿块、腹腔积液。

图 1 裸鼠解剖形态

Note. A-B; Thorax and lung at autopsy in the orthotopic implantation group; C-D; Thorax and lung at autopsy in the left ventricular injection group; E; Brain feature in the left ventricular injection group; F; Abdominal masses and effusion in the orthotopic implantation group.

Fig. 1 Macroscopic features of the nude mice

### 2.3 脑转移率的比较

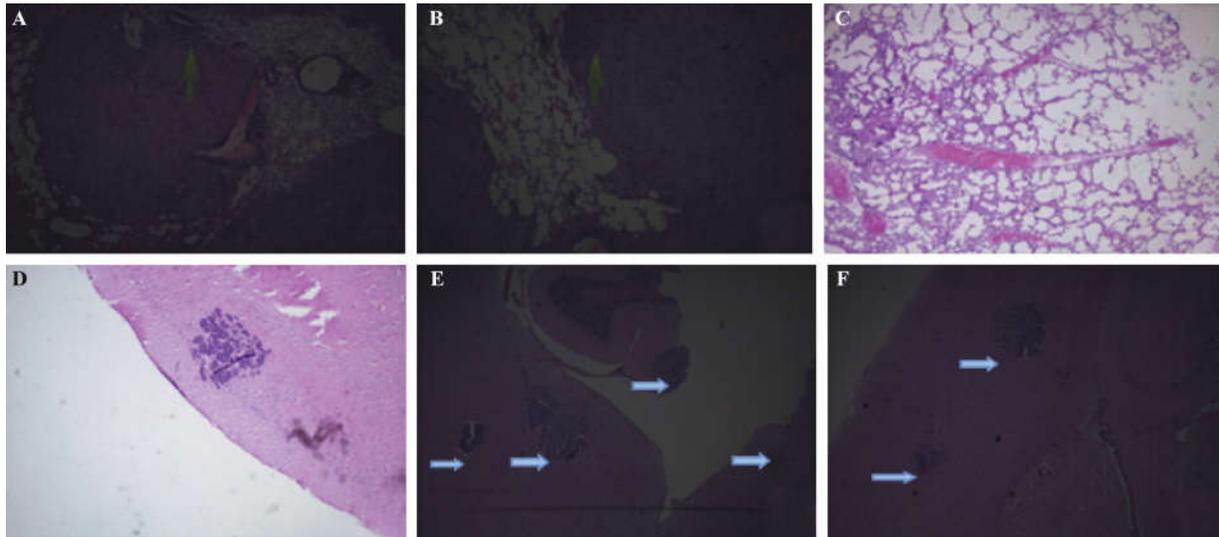
胸腔原位种植组脑转移率为 11.1%;经左心室注射组脑转移率为 100%。

## 3 讨论

肺癌最常见的远处转移部位之一是脑部,肺癌脑转移的发生率为 23%~65%,是脑转移性肿瘤中最常见的类型<sup>[2]</sup>。一直以来,人们致力于肺癌脑转移发生机制的研究探索,希望能进一步改善肺癌脑

转移患者的生活质量、生存期。因此,建立一个合适的肺癌脑转移实验动物模型是非常必须的。

目前建立脑转移实验动物模型的方法主要有以下四种:①脑内局部原位种植<sup>[4-5]</sup>。脑原位植入肿瘤细胞,造成脑转移。②尾静脉注射<sup>[6]</sup>。小鼠经尾静脉注射肿瘤细胞,沿血液循环播散种植在脑中;③肿瘤“原发”部位种植<sup>[7-9]</sup>。模拟肺癌、乳腺癌、前列腺癌、黑色素瘤等发生的脑转移,相应地将肿瘤细胞或者肿瘤组织块种植在肺、乳腺、前列腺、皮下来



注: A、B. 胸腔原位种植组: 肺组织瘤结; C. 经左心室注射组: 正常肺组织; D. 胸腔原位种植组: 脑转移灶; E-F. 经左心室注射组: 脑转移灶。

图 2 裸鼠病理组织形态(HE 染色  $\times 10$ )

Note. A-B: Pulmonary pathology in the orthotopic implantation group; C: Normal lung tissue in the left ventricular injection group; D: Metastatic brain lesions in the orthotopic implantation group; E-F: Metastatic brain lesions in the left ventricular injection group.

Fig. 2 Pathology of the nude mice. H&E staining,  $\times 10$

建立“原位”模型。④左心室<sup>[10-12]</sup>或颈内动脉注射<sup>[13-15]</sup>。经左心室或颈内动脉注射肿瘤细胞,沿血液循环播散种植在脑中。

脑内原位种植,建模成功率高,但一般只有单发肿瘤,且不能模拟肿瘤细胞自原位形成、移行、侵入血管,透过血脑屏障的过程,在研究肿瘤脑转移的发生机制上具有局限性。尾静脉注射,肿瘤细胞经静脉系首先滞留于肺部,只有那些通过肺毛细血管床及从肺部转移灶脱离的肿瘤细胞方可进入体循环,进而形成脑转移可能;且该方法实验周期较长,脑转移成瘤性不高。

肿瘤“原位”种植,就肺癌脑转移研究上,可将肺癌细胞或组织块经支气管移植、胸腔注射等方法进行原位建模研究。该方法虽较好地模拟了肿瘤发生、发展、转移的过程,但实验周期长,动物模型的生长一致性差,不易形成对照;而且,支气管移植的方法操作要求高、难度大;而胸腔种植又存在气胸、腹腔转移等情况。本实验采用胸腔原位种植的方法,在注射过程中,裸鼠虽未出现呼吸急促、呼吸困难等气胸表现;但存在胸腔广泛种植情况,甚至转移至腹腔,出现腹部肿块、腹腔积液表现(图 1-F);另外,9 只裸鼠恶液质出现时间不一致,没有形成良好对照;且病理 HE 示:仅有一只裸鼠出现脑转移,转移率低。我们猜想:这可能与裸鼠在脑转移灶形成前,就

因不堪胸腔负瘤状态出现恶液质死亡有关。

左心室注射、颈内动脉注射的方法很好地模拟了肺癌的血道转移过程:即通过肺毛细血管床的肿瘤细胞以及从形成的转移灶脱离的肿瘤细胞进入左心室,随血流向脑部,产生脑转移可能<sup>[12]</sup>。此外,该方法大大减少了肺毛细血管床对肿瘤细胞的滞留,增加了穿过脑实质的肿瘤细胞数量,并延迟因肺癌而导致的死亡,进而延长了肿瘤细胞在脑内生长、增殖的时间,从而获得更高的脑转移形成的成功可能<sup>[16-17]</sup>。与颈内动脉注射方法相比,左心室注射虽然存在其他脏器转移的可能,但操作方法相对简单。按照“种子与土壤”转移学说的观点,进入动脉系统的肿瘤细胞形成特定器官的转移,是肿瘤细胞异质性与靶器官微环境相互作用的结果,而与“血流机械”理论无关<sup>[18]</sup>。因此,经左心室注射进入体循环的肿瘤细胞,虽然开始没有经历肺毛细血管床的阻滞,但在后续过程中肿瘤细胞同样要经过粘附、降解、迁移等过程,才能透过血脑屏障,形成脑转移<sup>[19]</sup>。本实验采用左心室注射的方法:裸鼠于第 3 周开始出现体重下降,并逐渐出现恶液质,裸鼠各阶段生存状况相一致;第 4 周裸鼠处死时,肉眼虽未见到肺、脑脏器表面异常结节形成,但病理 HE 示:全部裸鼠均出现大小不一的多发脑转移灶,脑转移率 100%;而肺组织形态正常。我们推测,这与肺癌细

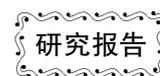
胞直接经动脉系统进入脑组织有关。另外,就开胸后少数裸鼠胸腔内出现散在微小种植灶,我们考虑:左心室注射过程中,不可避免的导致肿瘤细胞漏出至胸腔或针道带出的可能,期望通过加强左心室注射方法的练习得以改进。

综上所述,就胸腔原位种植与经左心室注射建立肺癌脑转移实验动物模型的两种方法,在操作简便性与可行性上相当;但经左心室注射的方法,裸鼠各阶段生存状况相一致,且保证了更高的脑转移率。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62(1): 10-29.
- [ 2 ] Preusser M, Capper D, Ilhan-Mutlu A, et al. Brain metastases: pathobiology and emerging targeted therapies [J]. *Acta Neuropathol*, 2012, 123(2): 205-222.
- [ 3 ] Sandler A, Hirsh V, Reck M, et al. An evidence-based review of the incidence of CNS bleeding with anti-VEGF therapy in non-small cell lung cancer patients with brain metastases [J]. *Lung Cancer*, 2012, 78(1): 1-7.
- [ 4 ] Wang J, Daphu I, Pedersen PH, et al. A novel brain metastases model developed in immunodeficient rats closely mimics the growth of metastatic brain tumours in patients [J]. *Neuropathol Applied Neurobiol*, 2011, 37: 189-205.
- [ 5 ] Martinez-Murillo R, Martinez A. Standardization of an orthotopic mouse brain tumor model following transplantation of CT-2A astrocytoma cells [J]. *Histol Histopathol*, 2007, 22: 1309-1326.
- [ 6 ] Shen L, Chen L, Wang Y, et al. Long noncoding RNA MAL-AT1 promotes brain metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in lung cancer [J]. *J Neurooncol*. 2015, 121(1): 101-108.
- [ 7 ] Johnston MR, Mullen JB, Pagura ME, et al. Validation of an orthotopic model of human lung cancer with regional and systemic metastases [J]. *Ann Thorac Surg*, 2001, 71(4): 1120-1125.
- [ 8 ] 王亚伟. 荧光标记人肺腺癌细胞 A549 后原位种植法建立 NSCLC 脑转移模型及其活检测 [D]. 济南: 山东大学, 2006.
- [ 9 ] 张翠香, 高恒宇, 陈永春, 等. 肺癌脑转移型 A549/GFP-2 细胞的筛选及其条件液对脑微血管内皮细胞的作用 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(9): 1652-1656.
- [ 10 ] Yin JJ, Tracy K, Zhang L, et al. Noninvasive imaging of the functional effects of anti-VEGF therapy on tumor cell extravasation and regional blood volume in an experimental brain metastasis model [J]. *Clin Exp Metast*, 2009, 26: 403-414.
- [ 11 ] Gupta P, Adkins C, Lockman P, et al. Metastasis of breast tumor cells to brain is suppressed by phenethyl isothiocyanate in a novel metastasis model [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8N6: e67278.
- [ 12 ] 雷贝, 曹杰, 沈杰, 等. 人肺腺癌脑转移动物模型建立及显像的研究 [J]. *中国肺癌杂志*, 2013, 16(8): 391-399.
- [ 13 ] Wu YJ, Muldoon LL, Gahramanov S, et al. Targeting alphaV-integrins decreased metastasis and increased survival in a nude rat breast cancer brain metastasis model [J]. *J Neurooncol*, 2012, 110: 27-36.
- [ 14 ] 徐磊, 周伟, 刘科. GFP 标记 Lewis 肺癌细胞 3LL 颈内动脉注射建立脑转移癌动物模型的可行性研究 [J]. *重庆医学*, 2013, 42(23): 2754-2757.
- [ 15 ] Zhang Z, Hatori T, Nonaka H. An experimental model of brain metastasis of lung carcinoma [J]. *Neuropathology*, 2008, 28: 24-28.
- [ 16 ] Yoshimasu T, Sakurai T, Oura S, et al. Increased expression of integrin alpha3beta1 in highly brain metastatic subclone of a human non-small cell lung cancer cell line [J]. *Cancer Sci*, 2004, 95(2): 142-148.
- [ 17 ] Shintani Y, Higashiyama S, Ohta M, et al. Overexpression of ADAM9 in non-small cell lung cancer correlates with brain metastasis [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(12): 4190-4196.
- [ 18 ] Fokas E, Engenhardt-Cabillie R, Daniilidis K, et al. Metastasis: the seed and soil theory gains identity [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(3-4): 705-715.
- [ 19 ] Fidler IJ. The role of the organ microenvironment in brain metastasis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2011, 21:107-112.

[收稿日期] 2015-03-04



# 碱性鞘磷脂酶基因剔除鼠的基因型和表型特征

杨俐萍<sup>1\*</sup>, 朱顺星<sup>2</sup>, 闵娅兰<sup>1</sup>, 刘焕良<sup>1</sup>, 钱红燕<sup>1</sup>, 陈椽<sup>1</sup>, 朱菁焯<sup>1</sup>,  
邵晶晶<sup>1</sup>, 雒润华<sup>1</sup>, 李静<sup>1</sup>, 段瑞冬<sup>3</sup>

(1. 南通大学附属肿瘤医院肿瘤研究所中心实验室, 江苏 南通 226361; 2. 南通大学实验动物中心,  
江苏 南通 226001; 3. 瑞典 LUND 大学胃肠营养实验室, LUND 瑞典, S-22184)

**【摘要】** 目的 为研究 alk-SMase 在结肠癌发生发展中的作用提供动物模型的实验数据。方法 将野生型 (WT, +/+), 杂合子 (+/-), 纯合子 (KO, -/-) alk-SMase 基因剔除小鼠剪尾提取 DNA, PCR 法作基因型鉴定; 取其肝肠组织进行 HE 染色、激光共聚焦分析以及质谱仪检测, 观察和分析不同基因型鼠的表型特征。结果 与 WT 和杂合子比较, KO 鼠显示: 外观和体重无明显区别; 基因型鉴定出现一个条带, 其分子量为 247 bp; 小肠黏膜明显增厚, 但 alk-SMase 表达减弱; 质谱分析显示在肠道和肝脏中的鞘磷脂含量增高, 1-磷酸鞘氨醇含量增加, 而神经酰胺含量降低。结论 alk-SMase KO 鼠有明显特征, 但其外观和体重与其他基因型比较没有明显区别, 为研究 alk-SMase 的生物功能提供了一个理想的动物模型。

**【关键词】** 碱性鞘磷脂酶; 基因剔除小鼠; 基因型; 表型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0495-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.010

## Genotypic and phenotypic characteristics of alkaline sphingomyelinase knockout mice

YANG Li-ping<sup>1\*</sup>, ZHU Shun-xing<sup>2</sup>, Min Ya-lan<sup>1</sup>, LIU Huan-liang<sup>1</sup>, QIAN Hong-yan<sup>1</sup> Chen Yuan<sup>1</sup>,  
Zhu Jing-ye<sup>1</sup>, Shao Jing-jing<sup>1</sup>, LUO Run-hua<sup>1</sup>, LI Jing<sup>1</sup>, Duan Rui-dong<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory, Cancer Research Center, Nantong University, Nantong Juangsu 226361, China;

2. Animal Research Facility in Nantong University, Nantong Juangsu 226001;

3. Gastroenterology & Nutrition Laboratory, Lund University, Lund, Sweden S-22184)

**【Abstract】** **Objective** To determine the genotypic and phenotypic characteristics of alkaline sphingomyelinase (alk-SMase) knockout (KO) mice and to provide the foundation data of this animal model for further study of the role of alk-SMase in colon cancer. **Methods** DNA was extracted from the tail tissue of wild type, heterozygous, homozygous KO mice, respectively. PCR analysis was used for genotyping. HE staining, confocal microscopy, and mass spectrometry were used for the detection of morphology, alk-SMase expression and sphingolipid metabolites in liver and intestine of the mice. **Results** Compared with the wild type and heterozygous mice, the homozygous KO mice showed that no changes occurred in the appearance and body weight, there was only one band (247bp) appeared on the genotyping, the thickness in small intestinal mucosa was significantly increased with a lower expression level of alk-SMase, and the amount of sphingolipid metabolites in the intestine and liver was changed, i. e. increase of SM and SIP, and reduction of ceramide. **Conclusions** Our findings demonstrate that the homozygous KO mice have specific genotype and phenotype that do not affect their growth. These mice will provide an ideal animal model for further study of alk-SMase functions.

**【Key words】** alk-SMase; Knockout mouse; Genotype; Phenotype

[基金项目] 江苏省创新创业人才基金(项目号: 苏人才 2013-41)。

[通讯作者] 杨俐萍(1958-04), 女, 博士, 教授, 主要从事肿瘤标志物研究, E-mail: liping.yang@ntu.edu.cn

碱性鞘磷脂酶 (alkaline sphingomyelinase, alk-SMase) 是肠道中鞘磷脂代谢的关键酶,其通过水解鞘磷脂 (sphingomyelin, SM) 产生一系列生物活性物质,如神经酰胺 (ceramide, Cer) 和 1-磷酸鞘氨醇 (sphingosine-1-P, S1P) 来调控细胞的生长、凋亡及炎症反应<sup>[1,2]</sup>。近年来,随着对 alk-SMase 的深入研究,特别是 alk-SMase 基因剔除 (konckout, KO) 鼠模型的成功建立<sup>[3]</sup>,人们对此酶在生理病理方面的作用有了更进一步的理解,发现它在结肠癌发生发展的研究中起着重要的工具作用<sup>[4]</sup>。然而,对经过转基因技术产生的 alk-SMase KO 鼠本身的特征尚未见有全面的报道。为了阐明 alk-SMase KO 鼠的背景特征,使该模型能更好地应用于 alk-SMase 功能及其在肿瘤中作用的研究,我们从瑞典隆德大学实验动物中心 (瑞典隆德大学段瑞冬教授惠赠) 引进了 alk-SMase KO 杂合子小鼠,在南通大学 SPF 实验动物中心饲养繁殖,并对其仔鼠进行基因鉴定和表型分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

5 只杂合子、3 只纯合子 alk-SMase KO 鼠,其中有 4 只雄性和 4 只雌性,来源于瑞典 LUND 大学实验动物中心 (2012 年由段瑞冬教授惠赠),经中国海关安全检查后入驻南通大学 SPF 动物中心,并饲养繁殖。该小鼠遗传背景为 C57BL/6,近交系,由南通大学实验动物中心提供【SCXK (苏) 2014 - 0001】。动物的饲养繁殖以及实验在南通大学实验动物中心进行【SYXK (苏) 2012 - 0031】,并通过南通大学实验动物伦理委员会的审批,批准号为 NTU-KO-2012-009。

### 1.2 饲养和繁殖

按照 SPF 级动物饲养标准进行饲养,实行自由采食和饮水。采用 1 对 1 雌雄鼠“长期同居”方式进行繁殖。母鼠孕期为 19 ~ 21 d,哺乳期为 18 ~ 23 d。在幼鼠 3 周龄时,断奶分笼,打标记并进行基因鉴定。

### 1.3 基因型鉴定

#### 1.3.1 组织 DNA 的提取

将小鼠尾部组织小段 (长约 0.5 ~ 1.0 cm) 置入 1.5 mL Eppendorf 管中,参照 Fermentas 的 Fast tissue-to-PCR 试剂盒 (Thermo, 美国) 抽提 DNA。

#### 1.3.2 PCR 反应及琼脂糖凝胶电泳基因型鉴定

引物设计参照相关文献<sup>[3]</sup>,上游引物:5'-CT-GCCACTTTACTACTGGTCAC,下游引物:5'-TG-GCACTGAGGCCGAGAAC。PC 仪循环扩增反应条件:95℃ 10 min 预变,95℃ 30s 变性,55℃ 30s 退火,72℃ 1min 延伸,共 35 个循环。电泳鉴定:分别取 10 μL PCR 扩增产物及 DNA ladder (Thermo, 美国) 加载在含 40 μL GelRed 的 1.0% 琼脂糖凝胶中,经 100V 30 min 电泳后置于凝胶成像仪 ChemiDoc XRS + (Bio-Rad, 美国) 观察拍照。

### 1.4 表型观察和分析

#### 1.4.1 外观及体重

定期观察野生型 (wild type, WT)、杂合子, KO 三种不同基因型小鼠毛色及测量体重的变化。

#### 1.4.2 组织切片 HE 染色

取 25 周龄的三种不同基因型的小鼠各 5 只鼠的小肠、大肠、肝脏,将组织置于 4% 多聚甲醛固定中固定,按常规病理标本制备方法进行石蜡包埋、切片以及苏木精和伊红 (HE) 染色,显微镜摄像分析。

#### 1.4.3 激光共聚焦分析

制备小肠新鲜冰冻切片标本:组织标本经 4% 多聚甲醛固定过夜后,用 30% 蔗糖脱水 6 h 以上, OCT 包埋。采用冰冻切片机 (Leica, 德国) 按 6 μm 厚度切片。依照免疫荧光染色方法对切片染色:经 10% 牛血清白蛋白封闭后加入抗 alk-SMase 抗体 (瑞典 LUND 大学段瑞冬教授赠) 4℃ 过夜, PBS 漂洗 3 次后加入荧光二抗 (驴抗兔-FITC 绿色荧光) 室温 40 min, 经 PBS 漂洗 3 次后封片,激光共聚焦摄像分析。

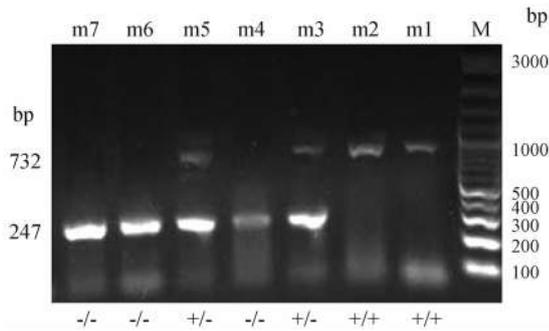
### 1.5 质谱仪检测

取 7 ~ 10 只 14 ~ 16 周龄 WT 及 KO 鼠,安乐死后快速取其小肠、大肠、肝脏器官组织,用 4℃ PBS 冲洗内容物后,将组织放在液氮中研磨成粉末状, -80℃ 中保存。按照参考文献<sup>[5]</sup>的方法提取磷脂并采用质谱仪 (Applied Biosystems, 美国) 测定其代谢产物的含量 (由中科院化学研究所测定)。

## 2 结果

### 2.1 基因型鉴定

取 3 周龄仔鼠尾部组织 DNA 进行 PCR 扩增显带,3 种基因型的条带显示见图 1:m1、m2 只出现 732 bp 条带,为 WT (+/+);m3、m5 出现 732 bp 和 247 bp 两个条带,为杂合子型 (+/-);m4、m6、m7 只出现 247 bp 条带,为 KO 型 (-/-)。



注: m1 ~ m7 为小鼠尾部组织 DNA 样本, M: DL3000 分子量标记, DNA 分子分别显示在 732 bp 和 247 bp 条带上。+/+ 为 WT, +/- 为杂合子型, -/- 为 KO。

**图 1** alk-SMase WT、杂合子和 KO 的基因型 PCR 鉴定

Note. m1 - m7 represent the tail DNA samples derived from the offspring mice of alk-SMase KO. M, DL3000 DNA ladder. On the gel there are two bands, 732 bp and 247 bp, +/+ wild type, +/- heterozygous, -/- homozygous.

**Fig. 1** alk-SMase genotyping by PCR

## 2.2 小鼠的生长、外观及体重变化

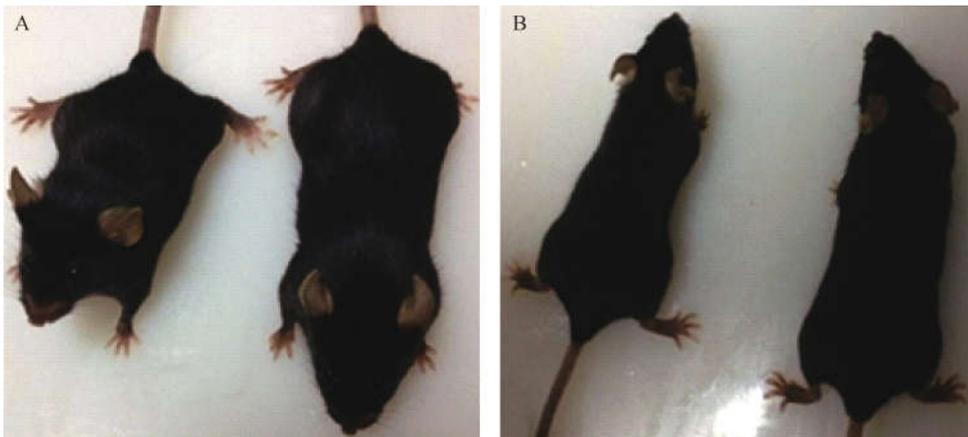
母鼠孕期 19 ~ 21 d, 每胎产仔 6 ~ 10 只, 仔鼠成活率 > 95%, 成熟期; 雄性 10 周, 雌性 8 周。KO 和杂合子型与同窝 WT 小鼠比较, 毛色正常, 外观和体重上未见明显差异 (见图 2)。

## 2.3 组织形态学特征

显微镜下观察不同基因型鼠的肠壁及肝组织的 HE 染色切片, 发现: WT 和杂合子的肠黏膜、肝组织均无明显区别, 而 KO 小肠黏膜有明显增厚, 几乎为 WT 的 3 倍 (图 3 右上), 但其结直肠黏膜及肝组织的形态则无明显差别 (见图 3)。

## 2.4 alk-SMase 蛋白的荧光表达

将带有绿色荧光标记的抗 alk-SMase 抗体对不同基因型鼠的肠黏膜进行免疫荧光染色, 用激光共聚焦显微镜观察到: WT 肠黏膜上的 alk-SMase 表达是显而易见的, 而杂合子和 KO 肠黏膜上的 alk-SMase 表达量均下降, 在 KO 肠黏膜上的表达几乎消失 (见图 4)。



注: A. 正面像, 左侧鼠为 WT (+/+), 右侧鼠为 KO (-/-); B. 背面像, 左侧鼠为 WT (+/+), 右侧鼠为 KO (-/-)。与 WT 比较, KO 小鼠毛色正常, 体重无明显差异。

**图 2** alk-SMase KO 与 WT 鼠外观形态的比较

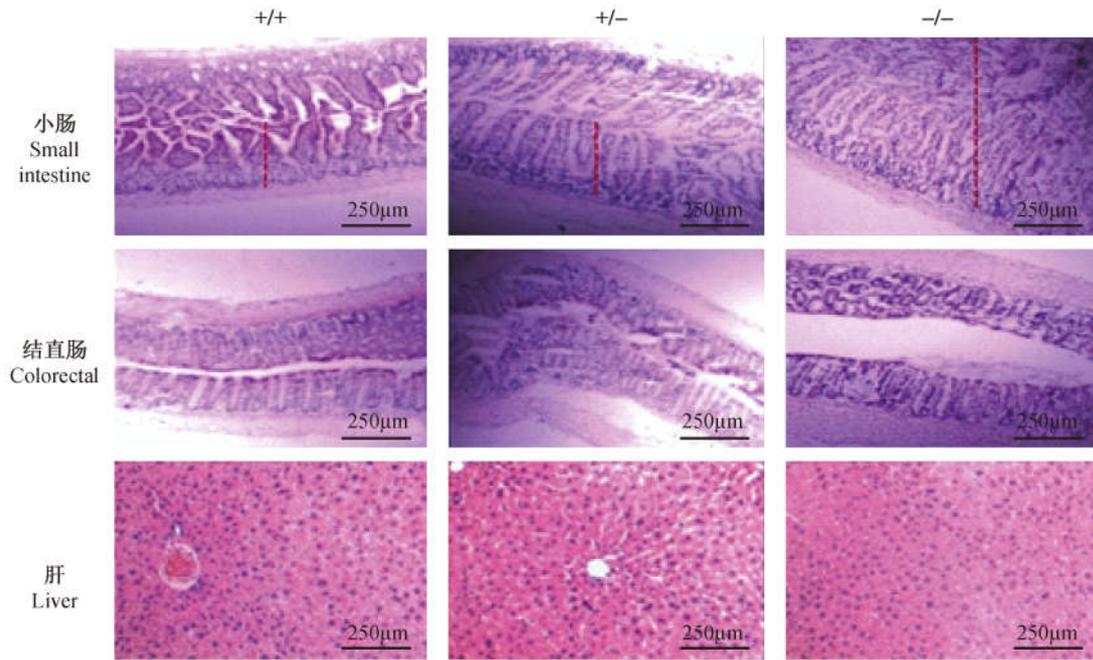
Note. A, B; Photos taken from front and back of the mice, wild-type (+/+) on the left, homozygous (-/-) on the right in each photo. Among the same age littermates there are no differences in the appearance and body weight regardless of genotype.

**Fig. 2** Gross appearance of the alk-SMase KO mice

## 2.5 鞘脂代谢产物的质谱分析

SM 在 alk-SMase 的酶解作用下生成 Cer, 继而产生 SIP 的代谢产物。利用微量敏感的质谱仪测定 alk-SMase KO 鼠的肠道黏膜和肝组织中的鞘磷脂代谢产物含量, 结果显示, ①SM 的含量变化: 虽然与 WT 比较没有统计学的显著差异, 但在 KO 鼠的小肠、结直肠黏膜以及肝组织中的 SM 含量均有所增加, 分别增加 35 pmol/mg (8%), 34 pmol/mg (6%), 29 pmol/mg (6%); ②Cer 的含量变化: 在

KO 鼠的小肠、结直肠黏膜以及肝组织中的 Cer 含量均降低, 分别降低 38 pmol/mg (18%), 24 pmol/mg (13%), 4 pmol/mg (3%), 其中小肠黏膜的 Cer 含量减少与 WT 比较有显著的统计学差异,  $P < 0.05$ 。③SIP 的含量变化: 在 KO 鼠的小肠、结直肠黏膜以及肝组织中的 SIP 含量明显增加, 分别增加 14 fmoL/mg (38%), 13 fmoL/mg (34%), 5 fmoL/mg (18%), 其中肠黏膜的 SIP 含量增加与 WT 比较有显著的统计学差异,  $P < 0.05$  (见图 5)。

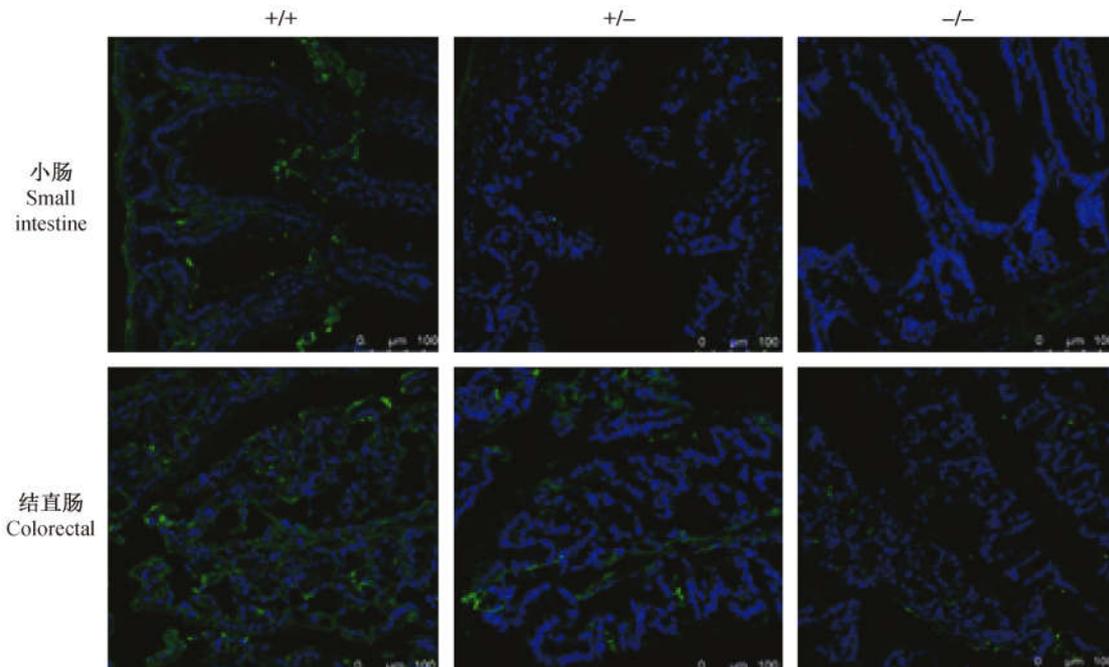


注: HE 染色图片代表来自 10 只不同基因型鼠组织。bar = 250 μm。

图 3 不同基因型小鼠肝肠组织形态学比较, ×200

Note. Representative micrographs of HE stained slides were taken from 10 littermates of identified genotypes of mice, respectively. The bars inserted in the images indicate 250 μm

Fig. 3 Morphological comparison among 3 types of genotype of alk-SMase KO mice

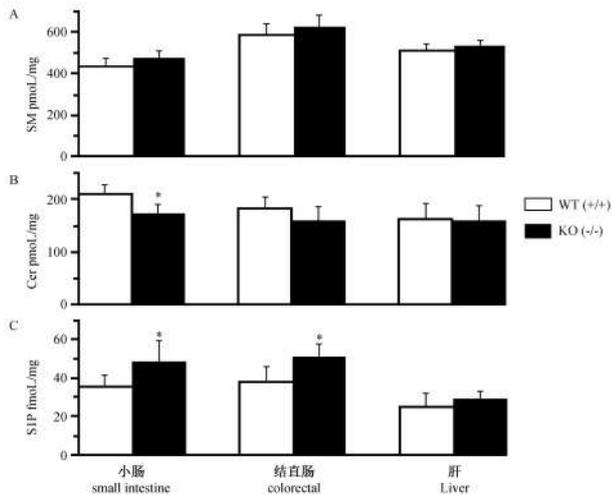


注: 免疫荧光染色图片代表 WT (+/+), 杂合子 (+/-) 及 KO (-/-) 不同基因型鼠的肠壁组织。绿色为 alk-SMase 蛋白, 蓝色为细胞核 (DAPI 阳性)。在 KO (-/-) 肠黏膜上 alk-SMase 的表达明显减弱。标尺 100 μm。

图 4 alk-SMase 在不同基因型鼠肠黏膜上的表达, ×400

Note. Representative micrographs of alk-SMase immunofluorescence staining from the littermates of identified genotypes with WT (+/+), heterozygous (+/-) and KO (-/-), respectively. Green color indicates positive alk-SMase expression, and blue indicates cell nuclei (DAPI+). The alk-SMase expression was down-regulated in KO (-/-) intestine. The bars inserted in the images indicate 100 μm, ×400

Fig. 4 alk-SMase expression in the intestinal mucosa of identified genotype of mice.



注:A、B、C 分别为在小肠、结直肠、肝脏中鞘磷脂代谢物 SM、Cer、SIP 含量的质谱仪分析统计图,其中 SM 和 Cer 的值来自 WT (+/+) 及 KO (-/-) 各 10 只 ( $n=10$ ),SIP 的值来自 WT 及 KO 各 7 只 ( $n=7$ ),3 次独立的实验。柱形图代表平均值  $\pm$  标准误差, \*  $P < 0.05$ 。

**图 5** alk-SMase KO 鼠肝肠组织中鞘磷脂代谢产物含量的质谱仪分析

Note. The histograms in A, B, C represent the levels of sphingolipids metabolites SM, Cer, SIP in the intestine and liver tissues of alk-Mase WT (+/+) and KO (-/-) mice, which were detected by mass spectrometry. Analysis data were from  $n=10$  in both SM group and Cer group, respectively,  $n=7$  in SIP group, respectively. 3 independent experiments, mean  $\pm$  SEM, \*  $P < 0.05$ .

**Fig. 5** SM, Cer, SIP levels detected by MS in the intestine and liver of WT and KO mice

### 3 讨论

早在 1969 年瑞典医学家尼尔森就发现肠道中存在 alk-SMase 酶<sup>[6]</sup>,然而直到 20 世纪 90 年代才被广泛研究,2011 年才见有 alk-SMase 基因剔除鼠模型<sup>[3]</sup>的报道。研究表明,alk-SMase 的特性具有①组织表达特异性,alk-SMase 仅分布于肠道微绒毛膜上(除人的胆汁外);②胆汁盐依赖性,其酶活性需要胆盐的存在;③胰酶消化抵抗性,这就保护了酶的高稳定性等<sup>[1]</sup>。alk-SMase 最主要的功能是水解 SM,肠腔内 SM 在 alk-SMase 酶作用下水解成 Cer,Cer 又在神经酰胺酶的作用下进一步水解成鞘氨醇(sphingosine, Sph),Sph 在鞘氨醇激酶作用下磷酸化成 SIP。Cer、SIP 有第二信使的作用,两者的平衡调节参与了调控细胞的增生、凋亡,抗炎、新生血管形成等过程<sup>[7,8]</sup>。近年研究表明,alk-SMase 基因剔除鼠化学性诱发结肠癌的发生率高于野生型<sup>[4]</sup>,提示 alk-SMase 在结肠炎和结肠癌的发生发展中起着重要作用。

虽然 alk-SMase 基因剔除鼠已被用于研究,但该动物本身的背景特征尚需阐明,这对于今后研究结肠癌发生的诱因、病理机制和抗癌药的使用是很有必要的。基于这个目的,我们从瑞典隆德大学引进了 alk-SMase 基因剔除的小鼠,并在 SPF 级实验动物中心饲养繁殖,利用形态学方法、PCR 以及质谱仪技术对动物的子代进行基因鉴定,表型观察以及代谢物含量的测定,发现从外观、毛色和体重看,KO 与 WT 小鼠没有区别,但它们的基因型和肠道表型有明显的区分。KO 鼠因在 alk-SMase 基因上剔除了一个外显子,使序列长度减少,所以基因鉴定条带上的分子量比 WT 的小<sup>[3]</sup>,导致 alk-SMase 在肠道的表达下调。由于 alk-SMase 缺失引起 SM 的消化障碍,出现抗细胞增殖和促凋亡的 Cer 生成减少,而与 Cer 相抗衡的 SIP 增多,导致肠道细胞增生,肠壁增厚(这点在我们的 HE 染色结果中得到证实),甚至诱发癌症<sup>[4]</sup>。

综上所述,alk-SMase KO 鼠有明显的 alk-SMase 功能缺失背景,在无诱因之下,不影响鼠的一般健康状态,与正常鼠相似,但是它们可能是结肠癌发生的易感高危鼠群。因此,本研究通过实验阐明了 alk-SMase KO 鼠的特征,为进一步利用该动物模型作为研究工具,对 alk-SMase 的功能尤其是在结肠癌发生发展中的作用及其机制的探讨提供了有价值的实验数据。

### 参 考 文 献

- [1] Duan RD. Alkaline sphingomyelinase: An old enzyme with novel implications [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1761(3): 281 - 291.
- [2] 雒润华,杨俐萍. 碱性鞘磷脂酶在结肠癌中作用的研究进展 [J]. *交通医学*, 2013, 27(4): 319 - 322.
- [3] Zhang Y, Cheng YJ, Hansen GH, et al. Crucial role of alkaline sphingomyelinase in sphingomyelin digestion; a study on enzyme knockout mice [J]. *J Lipid Res*. 2011, 52(4): 771 - 781.
- [4] Chen Y, Zhang P, Xu S, et al. Enhanced colonic tumorigenesis in alkaline sphingomyelinase (NPP7) knockout mice [J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(1): 259 - 267.
- [5] Zhao Z, Xu Y. An extremely simple method for extraction of lysophospholipids and phospholipids from blood samples [J]. *J Lipid Res*, 2010, 51: 652 - 659.
- [6] Nilsson A. The presence of sphingomyelin- and ceramide-cleaving enzymes in the small intestinal tract [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1969, 176: 339 - 347.
- [7] Duan RD, Nilsson A. Metabolism of sphingolipids in the gut and its relation to inflammation and cancer development [J]. *Prog Lipid Res*, 2009, 48(1): 62 - 72.
- [8] 覃蒙斌,黄杰安. 鞘氨醇激酶-1 在结肠癌中的作用研究进展 [J]. *国际消化病杂志*, 2009, 29(1): 26 - 28.

[收稿日期] 2015-04-16



# 实验用猕猴颈部骨骼和血管的影像学及血流动力学分析

凌泽莎<sup>1</sup>, 周志明<sup>2</sup>, 郑晓<sup>3</sup>, 江园<sup>1</sup>, 贾功伟<sup>1</sup>, 虞乐华<sup>1</sup>

(重庆医科大学第二附属医院: 康复科<sup>1</sup>, 影像科<sup>2</sup>, 超声科<sup>3</sup>, 重庆 400010)

**【摘要】** 目的 为以猕猴为实验对象的基础研究提供有价值的颈部影像学资料。方法 选择实验猕猴6只, 雌雄各半, 年龄3~5岁, 体重3.5~5 kg, 给予全身麻醉后行颈部CT血管扫描试验, 采用平扫及增强扫描技术, 进行容积数据采集, 获取正常猕猴颈部CT横断面影像。并在横断位图像中测量C6横突孔入口处左右两侧椎动脉直径、C2-C6横突孔的横径、矢状径。彩色多普勒超声对健康猕猴颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)、颈外动脉(ECA)、椎动脉(VA)的收缩期峰值流速(PSV)、舒张期峰值流速(EDV)及血管内径(D)进行分析。结果 螺旋CT三维重建显示: ①猕猴椎动脉经C6横突孔入颈椎, C2横突孔出颈椎, 并有钩椎关节的存在, 猕猴椎动脉的走行与人极其相似; ②猕猴左侧椎动脉直径为(1.89 ± 0.44) mm, 右侧椎动脉直径为(1.72 ± 0.39) mm, 双侧椎动脉直径比较无统计差异( $P > 0.05$ ), 同一节段双侧的横突孔测量指标比较无统计学差异( $P > 0.05$ )与人相似。彩色多普勒超声检测颈部血管提示: 猕猴左右两侧的颈总动脉收缩期峰值流速(CCA-PSV)、舒张期峰值流速(CCA-EDV), 颈内动脉收缩期峰值流速(ICA-PSV)、舒张期峰值流速(ICA-EDV), 颈外动脉的收缩期峰值流速(ECA-PSV), 椎动脉收缩期峰值流速(VA-PSV)的差异有统计学意义。颈部左侧动脉是猕猴的优势动脉。结论 获得了实验用猕猴颈部骨骼及血管的影像学资料, 血流动力学参数及血管内径的测值, 为以猕猴为实验对象的科学研究提供一些有价值的基础资料。

**【关键词】** 猕猴; 椎动脉; CT血管成像; 超声; 血流动力学;

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0500-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.011

## Morphology and hemodynamic analysis of vertebral arteries in rhesus macaques by 320-CT and color Doppler ultrasound

LING Ze-sha<sup>1</sup>, ZHOU Zhi-ming<sup>2</sup>, ZHENG Xiao<sup>3</sup>, JING Yuan<sup>1</sup>, JIA Gong-wei<sup>1</sup>, YU Le-hua<sup>1</sup>

(1. Department of Rehabilitation, 2. Department of Medical Imaging, 3. Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical university, Chongqing 400010, China)

**【Abstract】 Objective** To obtain imaging information of the cervical arteries and vertebral structure of rhesus macaques and provide useful reference data for medical research works using macaques as animal models. **Methods** Six adult macaques (3 males and 3 females) in age of 3-5 years, body weight from 3.5 to 5 kg, were used to examine the neck by 320 row spiral CT imaging under general anesthesia, and three-dimensional reconstruction was performed to observe the vertebral artery morphology, and to measure the diameter of vertebral artery and the size of transverse foramen of the macaques. Color Doppler ultrasound was combined with 320-CT imaging to assess the blood flow velocity in carotid arteries. After CT scan to make sure that the vertebral artery and cervical vertebra of macaques had no deformity, the size of transverse foramen and diameter of vertebral artery were measured in the cross-sectional images. Color Doppler ultrasound was used to analyze the peak systolic velocity (PSV), diastolic peak flow velocity (EDV) and the diameter (D) of common ca-

[基金项目] 重庆市卫生局项目(2010-1-20);国家自然科学基金面上项目(81171859)。

[作者简介] 凌泽莎(1987-), 女, 研究生。Email: lzesha@163.com

[通讯作者] 虞乐华。Email: Yulehuadoc@aliyun.com.cn

rotid artery (CCA), internal carotid artery (ICA), external carotid artery (ECA), and vertebral artery (VA) of the macaques. **Results** The 320-CT scan showed that in the monkeys, the vertebral artery enters the cervical spine through the intervertebral foramina at C6, and leaves the cervical spine at C2 level, and the cervical spine has Luschka joint, which is similar to the anatomic structure in humans. The diameter of left and right vertebral arteries was  $1.89 \pm 0.44$  mm and  $1.72 \pm 0.39$  mm, respectively, with no significant difference between them in the same segment ( $P > 0.05$ ), and the size of transverse foramen also had no significant difference in the same segment ( $P > 0.05$ ). Color Doppler ultrasound showed that the left and right side systolic peak velocity (PSV) and diastolic peak velocity (EDV) of CCA and ICA, the left and right side systolic peak velocity (PSV) of ECA and VA had statistically significant difference ( $P < 0.05$ ), and the left arteries were predominant in the macaques. **Conclusions** In this study we obtained some imaging information of vertebral artery morphology and artery blood flow of macaques and these information may provide some useful basic data for further studies using rhesus macaques as animal models.

**【Key words】** Rhesus macaque; Vertebral artery; Artery CT imaging; Color Doppler ultrasound; Hemodynamics

猕猴与人类都属灵长类,它的生理结构和生存条件与人类十分相似,猕猴有 94% 的基因与人类相同。相对于以鼠、兔为实验对象的科学研究,以猕猴为实验对象的研究结果具备更高的可信度。因此猕猴一直都是多种科学研究中比较理想的实验研究对象<sup>[1-2]</sup>。由于猕猴稀少、饲养困难、价格昂贵等原因,使得猕猴用于实体解剖来研究其各组织、器官的功能形态的数量就相对较少,尤其是颈部的骨骼结构、血管走行、血流动力学的研究资料相对缺乏。目前通过活体解剖实验动物以了解局部组织器官的形态结构,不仅对实验动物创伤大,而且不能全面、重复地去观察研究对象的整体三维结构,仅能在有限的时段里观察到三维解剖结构的某一个侧面。因此,本研究应用三维 CT 血管造影技术(three-dimensional CT angiographic imaging, 3D-CTA)在 CT 扫描的基础上,运用 CT 的后处理重建技术,重建猕猴颈部骨骼、血管的三维影像使其达到一定的立体效果,测量椎动脉与相应横突孔的直径大小。通过高频超声以无创的方法获得猕猴颈部血管的血流动力学相关资料,以丰富实验猕猴的生物学特性数据库,为猕猴相关的科学研究及疾病诊断提供一些有价值的影像学参考资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 研究对象

普通级实验猕猴,6 只,年龄 3~5 岁,雌雄各半,体重 3.5~5 kg,购于重庆硕斯灵长类动物研究有限公司[SCXK(渝)2013-050]。由重庆医科大学动物实验中心[SYXK(渝)2007-0001]饲养,喂养的主食为全价营养膨化饲料和青稞饲料,每天定时定量的喂食,自由饮水,笼内饲养,每天光照 12 h,动物房温度为 20~24℃,相对湿度为 45%~50%,实验前一周不再喂

养含钙质添加剂的饲料。经过外观、心率、呼吸、体温、生化、血液常规等相关检查均到达国家普通级实验猴质量标准检测要求。

### 1.2 仪器和试剂

320-CT(东芝 Aquilion one),百胜 Esaote 彩色超声诊断仪(探头频率 7.5-10 MHz),试验对比剂:碘普罗胺注射液(浓度 370 mg I/mL,优维显,拜耳公司),高压注射器(双筒高压注射器 Ulrich,德国),均由重庆医科大学附属第二医院影像科提供。陆眠宁 II(吉林畜牧责任有限公司),硫酸阿托品(苏州海博生物技术有限公司)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 颈部骨骼、血管 CT 扫描

实验前要求猕猴禁食至少 12 h,CT 扫描前后及过程中需监测猕猴的心率、呼吸、血压。在 CT 扫描开始前,先通过对猕猴肌内注射陆眠宁(0.1 mL/kg)及硫酸阿托品(0.02 mg/kg)进行全身麻醉。在猕猴麻醉后,取头前尾后仰卧位于 CT 诊断床上,胸部正中矢状面垂直于扫描床平面并与床面长轴的中线重合。检查前在猕猴右肘前静脉内留置针,以 Ulrich 高压注射器经留置针注射对比剂 1.5 mL/kg,速率:2.5~3.5 (mL/s)。用头颈部 CTA 智能触发追踪程序,ROI 置于主动脉弓水平,触发阈值设定为 125 Hu。自主动脉弓下缘至颅顶部,头颈部平扫后行 CTA 扫描。扫描参数为:120 kV,250 mA,螺距 0.984,重建 FOV:350 mm,矩阵 512×512,扫描转速 0.5 s/r,采集层厚 0.5 mm,重建间隔 0.5 mm。将收集的猕猴颈部 CT 原始图像数据导入副台工作站及 Vitrea fx 后处理工作站进行图像重建,扫描获得的原始容积数据运用图像后处理技术进行三维图像重组。处理方法有最大密度投影(MIP)、多平面重建(MPR)、容积再现(VR)等相关重建技术的综合应

用并结合开始轴位图像以提供准确的空间定位,运用编辑功能对原始图进行剪切,分别提取猕猴的 CCA、ECA、ICA、VA 和颈椎三维重建目标结构。获得 CTA 影像后,利用后处理功能将所需测量的横突孔旋转至完整、对称的最佳位置进行测量,在 C2-C6 椎体中段的横断位像中,用骨窗条件测量左右横突孔横径及矢状径,VA 直径。VA 直径的测量在入 C6 横突孔处,测量后取平均值作为测量所得数据。

### 1.3.2 颈部血管超声检查

猕猴按前述全身麻醉后,平卧于检查床上,用脱毛剂,脱掉颈部猴毛。颈下垫枕,头略向后仰,偏向检查的对侧,充分暴露颈部。探测时将超声探头置于猕猴颈部胸锁乳突肌前缘,从锁骨上窝 CCA 起始处开始,纵横切面扫查,经 CCA 分叉至 ICA 入颅显示不清为止。二维切面声像图观察血管解剖结构、走行情况、管腔内情况并测量血管管径,CCA 分叉的高度、ICA 与 ECA 起始段的位置关系。彩色多普勒观察整个管腔的血流动力学情况。脉冲多普勒取样观测猕猴颈部血管的血流参数:PSV 和 EDV,声束方向与血管走行夹角  $< 60^\circ$  并校正。由一名经过专门培训的临床超声医师用百胜 Esaote 彩色超声

诊断仪,探头频率 7.5 ~ 10 MHz 进行监测,每组数值重复测量三次以确保其准确性。

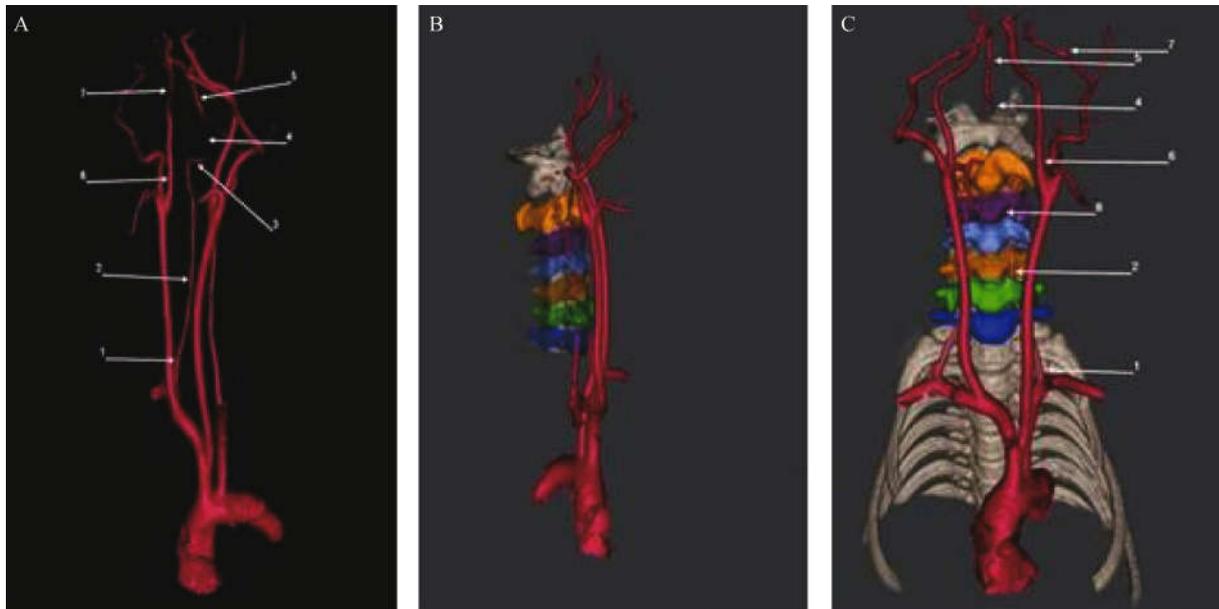
### 1.4 统计学分析

用 SPSS 17.0 统计软件分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用配对 T 检验方法对数据进行分析,  $P < 0.05$  有统计学差异,  $P < 0.01$  为具有显著统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 颈部骨骼、血管 CT 扫描

通过计算机三维重建得到了猕猴颈部动脉血管的数字图像,可以清晰完整地从不角度去观察猕猴颈部动脉的起始及其在颈椎内的行程走向,重建的三维结构可以多彩色、以透明或任意组合显示。本实验获得了实验猕猴活体颈椎结构 CT 连续断层图像数据集;猕猴的颈椎骨均由前方圆柱形的椎体和后方板状的椎弓组成,椎弓发出 1 个棘突、1 对横突和 2 对关节突共 7 个隆起。椎弓及其发出的隆起统称为附件,并且有钩椎关节的存在。猕猴第一颈椎(寰椎)由前弓、后弓和两个侧块组成,第二颈椎(枢椎)的椎体向头侧伸出齿突叉。颈椎的横突有孔,孔内有椎动脉走形。(见图 1-B)。



注:A. 猕猴颈部去骨性结构的血管三维重建:1. 椎动脉起始段;2. 椎动脉椎骨段;3. 椎动脉枕段;4. 椎动脉颅内段;5. 基底动脉;6. 颈内动脉颈段;7. 颈内动脉岩段。B. 猕猴颈部血管及椎体侧位三维重建。C. 猕猴颈部有骨性结构的血管三维重建;8. 钩椎关节。

图 1 猕猴颈部血管及颈椎体的三维图像

Note. A. Three-dimensional image of cervical artery in a macaque; 1. The beginning segment of vertebral artery, 2. Vertebral segment artery, 3. Occipital segment of vertebral artery, 4 Intracranial segment of vertebral artery, 5. Vertebrobasilar artery, 6. Cervical segment of internal carotid artery, 7. Intrapetrous segment of carotid artery. B. Three-dimensional image of cervical artery and vertebral body of a macaque. C. Three-dimensional image of cervical vertebral body of a macaque; 8. Uncovertebral joint

Fig. 1 Three-dimensional images of cervical artery and vertebral body of the macaques

从重建图像中精选具有解剖意义的图像,观察到猕猴颈部大血管系统的起始、走行特点在三维 CTA 影像上主要体现为:① 猕猴的主动脉弓发出两条分支动脉血管,右侧的分支动脉血管较粗称为共干,其进一步又分为左颈总动脉和无名动脉(或称头臂干)(见图 1-A),左侧的分支较小称左锁骨下动脉,左侧椎动脉就起源于左锁骨下动脉(见图 1-C)。无名动脉在气管的前方斜向右上,在右胸锁关节的后方处分为右颈总动脉和右锁骨下动脉,右锁骨下动脉在进一步分支发出右侧椎动脉(见图 1-A)。② 猕猴颈总动脉在 C2-C3 处分为颈内动脉和颈外动脉。(3) 猕猴椎动脉起自锁骨下动脉,经 C6 横突孔入颈椎,在解剖上也可将椎动脉分为 4 部分(见图 1-A、C):横突前段(V1)段:从起始于锁骨下动脉到入 C6 横突孔时的一段;横突段(V2):从颈 6 横突孔

至 C2 横突孔之间的一段,是 VA 中行程最长的一段;枕下段(V3):从枢椎横突孔下口至寰椎椎动脉沟内的一段;颅内段(V4):从 VA 穿过枕骨大孔起,到 VA 进入颅内与对侧的 VA 合成基底动脉。

通过 CT 扫描所得猕猴颈部 C2-C6 横突孔的测量指标结果(见表 1、2)经统计分析,发现猕猴同一节段右侧与左侧横突孔的测量指标比较无统计学意义( $P > 0.05$ ),颈椎横突孔横径最大值为(2.72 ± 0.69)mm,最小值(2.22 ± 0.55)mm;颈椎横突孔矢状径最大值为(2.89 ± 0.74)mm,最小值为(2.39 ± 0.59)mm。左右两侧横突孔内椎动脉直径检测结果:左侧椎动脉直径为(1.89 ± 0.44)mm,右侧椎动脉直径为(1.72 ± 0.39)mm,双侧椎动脉比较差异无显著性( $P > 0.05$ )。

表 1 横突孔横径( $\bar{x} \pm s$ , mm)

Tab. 1 Transverse diameter of the transverse foramen

组别 Groups	C2	C3	C4	C5	C6
左侧 Left	2.68 ± 0.74	2.66 ± 0.71	2.31 ± 0.56	2.24 ± 0.55	2.72 ± 0.69
右侧 Right	2.70 ± 0.72	2.67 ± 0.69	2.31 ± 0.57	2.22 ± 0.55	2.71 ± 0.67

注:同一节段双侧横突孔比较,  $P > 0.05$ 。

Note. Comparison of the left and right transverse foramen of the same segment,  $P > 0.05$ .

表 2 横突孔矢状径( $\bar{x} \pm s$ , mm)

Tab. 2 The sagittal diameter of transverse foramen

组别 Groups	C2	C3	C4	C5	C6
左侧 Left	2.85 ± 0.77	2.75 ± 0.76	2.39 ± 0.59	2.44 ± 0.55	2.81 ± 0.71
右侧 Right	2.89 ± 0.74	2.79 ± 0.76	2.59 ± 0.64	2.51 ± 0.60	2.88 ± 0.77

注:同一节段双侧横突孔比较,  $P > 0.05$ 。

Note. Comparison of the left and right transverse foramina of the same segment,  $P > 0.05$ .

## 2.2 颈部血管超声检查

彩色多普勒超声对健康猕猴颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)、颈外动脉(ECA)、椎动脉(VA)的收缩期峰值血流速度(PSV)、舒张期峰值血流速度(EDV)及血管内径(D)进行检测并比较分析所示(见图 2 及表 3):猕猴左右两侧的颈总动脉收缩期峰值血流速度(CCA-PSV)、舒张期峰值血流速度(CCA-EDV),颈内动脉收缩期峰值血流速度(ICA-PSV)、舒张期峰值血流速度(ICA-EDV),颈外

动脉的收缩期峰值血流速度(ECA-PSV),椎动脉收缩期峰值血流速度(VA-PSV)的差异均具有显著的统计学意义( $P < 0.05$ )。左右两侧颈外动脉舒张期峰值血流速度(ECA-EDV)、颈总动脉血管内径(CCA-D)、颈内动脉血管内径(ICA-D)、颈外动脉血管内径(ECA-D)、椎动脉血管内径(L-VA-D)的差异无显著性( $P > 0.05$ )。通过超声检测猕猴颈部血管管径和健康成人比较发现其血管内径要比人的纤细<sup>[3]</sup>,猕猴颈部左侧动脉是优势动脉。

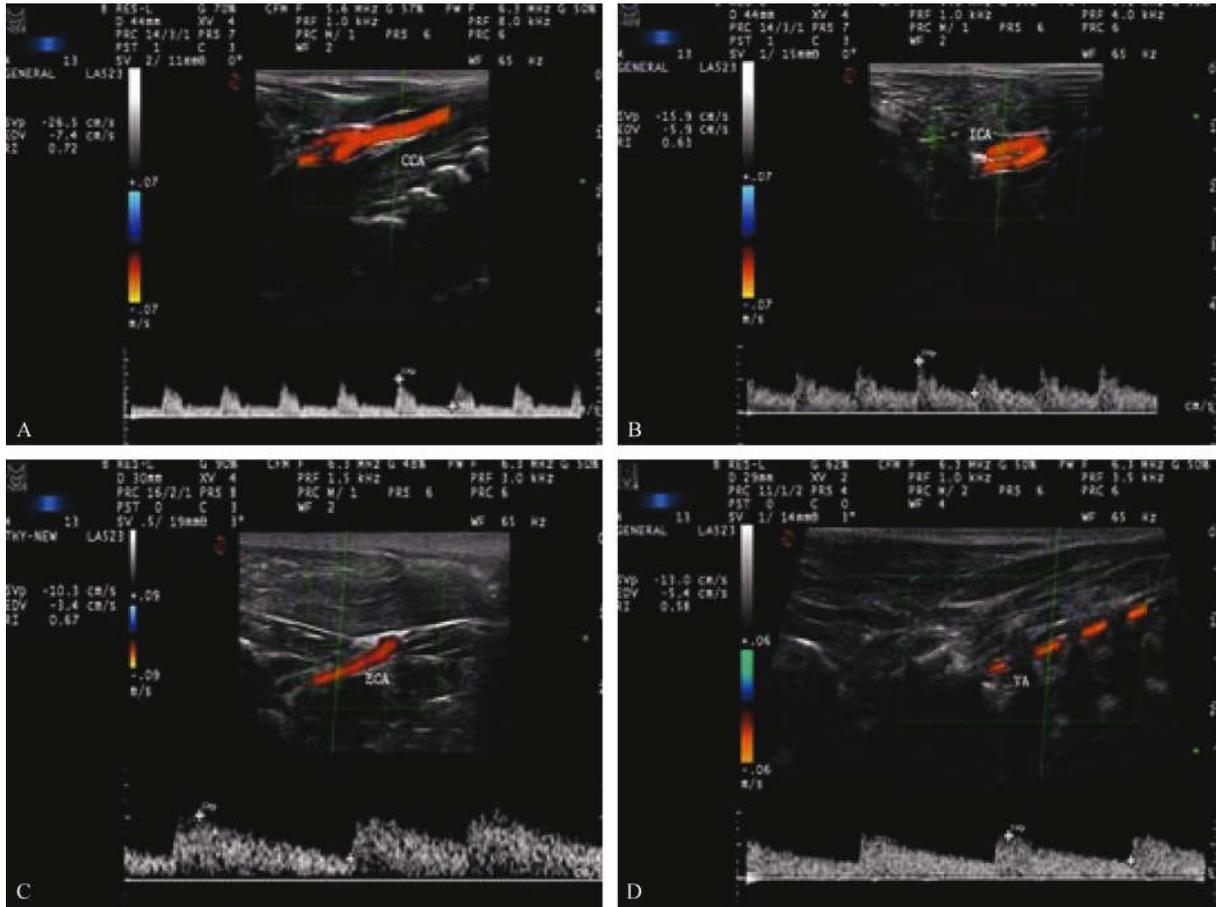
表 3 猕猴颈部大血管血流学指标检测

Tab. 3 Detection of hemodynamic indexes of the macaque cervical arteries

组别 Groups	CCA			IDV			EDV			VA		
	PSV cm/s	EDV cm/s	D/cm									
左侧 Left	30.33 ± 3.47 <sup>a</sup>	8.57 ± 3.24	0.22 ± 0.12	19.47 ± 2.93 <sup>a</sup>	8.37 ± 1.13	0.13 ± 0.01	15.88 ± 2.10 <sup>a</sup>	8.37 ± 1.13	0.12 ± 0.00	10.94 ± 2.57 <sup>b</sup>	4.62 ± 1.37	0.10 ± 0.00
右侧 Right	20.64 ± 1.91 <sup>a</sup>	6.46 ± 0.79	0.21 ± 0.12	13.58 ± 2.28 <sup>a</sup>	6.38 ± 0.70	0.12 ± 0.01	11.85 ± 2.26 <sup>a</sup>	3.95 ± 1.31	0.11 ± 0.01	8.77 ± 2.03 <sup>b</sup>	4.14 ± 1.27	0.09 ± 0.10

注:左右两侧血管血流速度比较, a:  $P < 0.01$ ; b:  $P < 0.05$ 。

Note. Comparison of blood flow velocity in the left and right cervical arteries. a:  $P < 0.01$ ; b:  $P < 0.05$ .



注:A. 颈总动脉; B. 颈内动脉; C. 颈外动脉; D. 椎动脉。

图 2 猕猴颈部动脉彩色多普勒血流图 ( $\bar{x} \pm s$ )

Note. A: Common carotid artery (CCA); B: Internal carotid artery (ICA); C: External carotid artery, (ECA); D: Vertebral artery (VA).

Fig. 2 Color Doppler flow images of the macaque cervical arteries

### 3 讨论

通过对疾病病因及发病机制的探讨,可以起到对疾病预防和治疗方法的改进作用。许多研究都需要在适当的动物模型上进行<sup>[4-5]</sup>。一个理想的动物模型应该在形态学、组织学、生物力学和运动学的特性上与人体相近。灵长类动物猕猴(恒河猴)被认为是与人类最接近的动物。因此,在生命科学各个领域的实验研究过程中常用作人类的最佳“替身”<sup>[6-8]</sup>。猕猴与人类亲缘关系密切,因此它的生理、代谢功能及组织结构等方面都与人类相似。但是,目前对猕猴本身的解剖研究还存有诸多的不足,对它的解剖学研究还停留在大体解剖的水平<sup>[9-10]</sup>。活体解剖所获得的局部组织器官形态结构的二维图谱不能全面地把握整体的三维结构仅能观察到三维解剖结构的某一个侧面,并且对实验动物创伤巨大。

三维 CT 血管造影技术(3D-CTA)是一种微创、快速且能提供高质量图像的检查手段,创伤较小、操作简单,能沿血管的最大径进行重建,显示血管的全过程,同时可以观察与周围骨性结构的解剖关系<sup>[11]</sup>,这是 DSA 和 MRA 无法与其相比的优点之一<sup>[12]</sup>。另外螺旋 CT 三维重建可以随意选择各个扫描期相及层厚进行最大密度投影(MIP)及多平面重组(MPR)进一步显示细节能透明、多彩色及任意切割组合显示<sup>[13]</sup>,具有理想的三维可视化效果,尸体解剖难以达到这样的效果。320 排 CT 又称 320 排动态容积 CT,其诞生被称为医学影像领域发展史的一次革命,是当今唯一能够实现真正动态容积成像的 CT。在获得器官解剖结构的同时还可以进行器官灌注和运动功能成像。仅用 0.35 s 就能完成一圈扫描,以 0.5 mm 层厚进行重建,在得到高质量的薄层横断图像的同时,还具有质量较高的 3D 或

4D 重组功能,亦可进行器官灌注和运动成像。此外, Vitrea FX 工作站的强大功能亦为图像后处理奠定了良好基础,可以任意选择病变中心,根据诊断需要进行不同平面和角度的重组,获得高质量的三维重组图像。既往有范春梅等<sup>[7]</sup>学者利用螺旋 CT 观察猕猴头颈部骨性解剖结构和利用 265 层螺旋 CT 三维重建观察猕猴腹部及盆腔大血管<sup>[15]</sup>,因此,三维重建技术也对传统解剖学起到了良好补充和传承的作用。

目前利用 CT 对猕猴组织器官的研究还不多,主要是集中在脑、肺、胃等器官组织及疾病的相关研究<sup>[12,13]</sup>。尽管对于颈椎形态学测量的研究可通过 X 线片、MRI 等影像学检查进行,然而 CT 测量的结果更真实,可作为实际值应用<sup>[14,15]</sup>。本研究通过 320-CT 扫描研究猕猴颈部血管解剖走行及与周围骨性结构的关系,发现猕猴颈部血管解剖走行及椎体与人的颈部解剖极其相似,但也存在一些差异:①一般情况下人的主动脉弓发出三条分支动脉,依次为头臂干、左颈总动脉和左锁骨下动脉,而猕猴的主动脉弓发出两条分支,依次为共干,左锁骨下动脉;②人类颈总动脉在 C3-C4 处分支为颈内动脉和颈外动脉,猕猴颈总动脉分支为颈内动脉和颈外动脉的位置在 C2-C3;③猕猴颈椎骨的基本组成与人相同,形态略有差异。人的颈椎棘突分叉,猕猴的颈椎棘突未分叉。本研究应用 CT 对活体实验猕猴横突孔及椎动脉直径进行测量,在 CT 横断面测量猕猴横突孔及椎动脉直径大小,我们发现尽管绝大多数的测量参数在不同横突孔之间有所不同,但左右两侧参数值在统计学上比较并无统计学差异,这一现象与人相似。所观察的猕猴椎动脉均经 C6 横突孔入颈椎,C2 横突孔出颈椎,经枕骨大孔入颅腔,与大多数人类双侧椎动脉的走形相似<sup>[16]</sup>。此外,猕猴左右两侧椎动脉直径也无统计学差异。

我们还通过高频超声以无创的方法获得猕猴颈部血管的血流动力学相关资料,以丰富实验猕猴的生物学特性数据库。通过对猕猴颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)、颈外动脉(ECA)、椎动脉(VA)的收缩期峰值血流速度(PSV)、舒张期峰值血流速度(EDV)及血管内径(D)进行检测和分析发现其左侧血管是优势血管,而且猕猴颈部双侧血管直径均要比健康成人纤细。

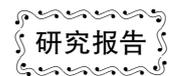
本研究利用 320CT 三维血管重建技术联合高频超声检测获得健康实验猕猴颈部骨骼及血管的影

像学资料,以及猕猴颈动脉血流动力参数及椎动脉血管内径的测值,为以猕猴做实验对象的科学研究提供一些有价值的基础资料。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Frey S, Pandya DN, Chakravarty MM, et al. An MRI based average macaque monkey stereotaxic atlas and space (MNI monkey space) [J]. Neuroimage, 2011, 55(4): 1435 - 1442.
- [ 2 ] Maeda M, Takamatsu H, Furuichi Y et al. Characterization of a novel thrombotic middle cerebral artery occlusion model in monkeys that exhibits progressive hypoperfusion and robust cortical infarction [J]. J Neurosci Methods, 2005, 146(1): 106 - 115.
- [ 3 ] 丁宝维,戴良,夏玉光,等. 健康成人颈动脉和椎动脉颅外段的超声特征解剖学分析 [J]. 解剖学杂志, 2012, 35(5): 645 - 648.
- [ 4 ] 戴芳,王丽,王涛,等. 实验动物呼吸系统主要器官比较组织学研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(4): 11 - 14.
- [ 5 ] 盛孙仁,王向阳,娄伟钢,等. 小牛与人颈椎解剖结构的比较 [J]. 脊柱外科杂志, 2009, 7(1): 45 - 47.
- [ 6 ] Tominaga T, Dickman CA, Sonntag VK, et al. Comparative anatomy of the baboon and the human cervical spine [J]. Spine 1995, 20: 131 - 137.
- [ 7 ] 范春梅,李志雄,周建华. 实验猕猴头颈部 CT 影像学观察 [J]. 畜禽业, 2012, (4): 30 - 32.
- [ 8 ] 范春梅,李志雄,周建华. 实验猕猴全身 CT 影像学观察 [J]. 福建畜牧兽医, 2012, 34(2): 1 - 3.
- [ 9 ] 张修臻,王亭,高甲科,等. 计算机辅助三维 CT 重建椎动脉横突段的走行及解剖变异 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(9): 1619 - 1622.
- [ 10 ] 茹选良,陈天国,郝毅,等. 椎动脉三维 CT 血管成像的应用及临床意义 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2003, 13(4): 224 - 226.
- [ 11 ] 胡翌生,张雪林,周锋,等. 多层螺旋 CT 扫描三维重建后逐层显示解剖结构及临床意义 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2006, 24(1): 47 - 49.
- [ 12 ] 俞诗源,贾宗平,夏冰芝,等. 川金丝猴脑的动脉供应 [J]. 兽类学报, 2007, 27(1): 80 - 85.
- [ 13 ] 范春梅,李志雄,车敏. 螺旋 CT 三维重建观察实验猕猴胸部大血管系统 [J]. 实验动物与比较医学, 2012, 32(3): 215 - 217.
- [ 14 ] 赵刘军,徐荣明,胡铁波,等. 下颈椎椎动脉与横突孔大小及位置关系的影像学研究 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2010, 20(6): 488 - 493.
- [ 15 ] Ebraheim NA, Reader D, Xu R. Location of the vertebral artery foramen on the anterior aspect of the lower cervical spine by computed tomography [J]. J Spinal Disorders Tech. 1997, 10(4): 304 - 307.
- [ 16 ] 姜树军,李鸣皋. 椎动脉结构与功能研究进展 [J]. 中华保健医学杂志, 2012, 14(4): 326 - 329.

[收稿日期] 2015-04-17



# 大鼠局灶性脑缺血模型评价方法间关联性分析

崔煦然, 刘钊, 张志斌, 钟菊迎\*

(中国中医科学院医学实验中心分子生物实验室, 中国中医科学院医学实验中心国家重点实验室, 北京 100700)

**【摘要】** 目的 分析评价线栓法制备大鼠大脑中动脉阻塞模型成功的三种方法之间的相关性, 为评价该模型提供一种新的方法和标准。方法 雄性SD大鼠共(30)只, 随机分成假手术组( $n = 15$ )、模型组( $n = 15$ ), 参照Zea-Longa线栓法稍加改进制备局灶性脑缺血模型, 于术前术后检测各组大鼠脑血流变化。以大鼠脑梗死面积率为金标准, 分析该标准与脑血流变化之间的相关性。结果 模型大鼠脑梗死面积率与脑血流变化量呈正相关, 与行为学评分高低无关。结论 大鼠脑血流量变化可作为评价局灶性脑缺血模型成功的标准。

**【关键词】** 脑梗死面积率; 行为学评分; 脑血流量; 大鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0506-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.012

## Analysis of the correlation between three evaluation methods of rat models of focal cerebral ischemia/reperfusion

CUI Xu-ran, LIU Zhao, ZHANG Zhi-bin, ZHONG Ju-ying

(China Academy of Traditional Chinese Medicine Experimental Center for Molecular Biology Laboratory, State Key Laboratory of Medical Research Center of Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

**【Abstract】 Objective** To analyze the correlation between three evaluation methods of middle cerebral artery occlusion and focal cerebral ischemia, and to explore a new method and standard for the evaluation of the model. **Method** Thirty healthy adult male SD rats were randomly divided into a sham-operated group ( $n = 20$ ) and model group. According to Zea-Longa procedure, we established the disease model to detect the changes in cerebral blood flow before and after surgery. The resulted cerebral infarction area was taken as gold standards. Then we analyzed the correlation between the standards and the changes in cerebral blood flow. **Results** The changes of infarction area ratio were positively correlated with the changes of cerebral blood flow in the model rats. **Conclusions** The changes of rat cerebral blood flow can be used to evaluate whether the cerebral ischemia model is successful or not.

**【Key words】** Infarct area; Behavioral score; Cerebral blood flow; Rats

线栓法<sup>[1]</sup>是制备大鼠局灶性脑缺血模型的常用方法。该方法无需开颅, 便于操控。评价该模型成功的方法常用大鼠行为学评分<sup>[2]</sup>以及 TTC 染色法, 但行为学评分方法具有主观性, TTC 染色法存在操作繁琐等缺点。本实验对 Zea-Longa<sup>[2]</sup>线栓法稍加改进, 制备大鼠脑缺血模型, 并在此两种评价方法的基础上, 监测大鼠脑血流量变化, 分析三种评价方

法之间的相关性。旨在探索一种客观、操作简便、创伤小且可行的评价方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物来源与分组

清洁级雄性SD大鼠30只, 250 g左右<sup>[3]</sup>, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK

[基金项目] 中国中医科学院院自主课题(ZZ2012012)。

[作者简介] 崔煦然(1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理。Email: cxrkuale@126.com

[通讯作者] 钟菊迎(1981-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 中药药理研究。Email: zhongjuying@hotmail.com

(京)2012—0001】。动物实验在中国中医科学院基础理论研究所动物房【SYXK(京)2010-0032】进行。大鼠随机分成假手术组( $n = 15$ )、模型缺血组( $n = 15$ )。

## 1.2 模型建立<sup>[4]</sup>

### 1.2.1 术前准备

(1)激光散斑血流监测视频系统:帕瑞医学科技(北京)有限公司,型号 PeriCam PSI。线栓:由北京沙东生物技术有限公司提供。

(2)动物准备:大鼠术前自由饮食,适宜条件下饲养。

(3)麻醉:采用 10% 水合氯醛腹腔注射全身麻醉(350 mg/kg)。

### 1.2.2 局灶性脑缺血模型的制备

参照 Zea-Longa 报道的线栓法,制备大鼠左脑局灶性永久性脑缺血模型。首先麻醉大鼠,将大鼠以俯卧位固定,剪开头皮处皮肤,剥离开筋膜,暴露出头骨十字,利用脑血流检测仪监测大鼠双侧脑部血流情况,之后将大鼠以仰卧位固定,颈前部消毒,取颈正中偏右一点切口剪开皮肤并钝性剥离皮下组织,暴露右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA),颈内动脉(internal carotid artery, ICA)和颈外动脉(external carotid artery, ECA),用动脉夹暂时阻断 CCA 及 ICA 血流,探查颈外动脉在颈部发出第一分支处,在其远心端(偏嘴侧)约 0.2 cm 处用缝合线进行结扎。用 6 号注射器于 CCA 处作一小切口,将线栓从 CCA 插入 ICA,轻轻将线栓送入颅内,若不能顺利将线栓送入颅内,可调整线栓与 ICA 的角度,或更换线栓;若线栓插入过程中,线栓进入血管内的长度小于 1 cm 即遇阻力,同时大鼠出现轻微的右侧面肌抽动,则线栓误入翼腭动脉(pterygopalatine artery, PPA),须拔线栓至 CCA 处,再度调整线栓角度,重新插入。栓塞成功后,用手术线结扎 CCA 切口处,移去夹闭 CCA 的动脉夹,观察无活动性出血后缝合切口。将大鼠以俯卧位固定,再次监测其脑部血流变化。

### 1.2.3 假手术组

麻醉大鼠,首先以俯卧位固定,剪开头皮处皮肤,剥离开筋膜,暴露出头骨十字,利用脑血流检测仪监测大鼠双侧脑部血流情况,之后将大鼠以仰卧位固定,颈前部消毒,取颈正中偏右一点切口剪开皮肤并钝性剥离皮下组织,分离出右侧 CCA, ICA 和

ECA,之后缝合切口即可。再次监测大鼠头部血流变化。

## 1.3 行为学评分

分别于术前、术后 24 h 观察大鼠行为并进行评分。参照 Zea-Longa 评分方法:无行为障碍的记为 0 分;左侧前肢屈曲的记为 1 分;爬行时身体向左侧转圈的记为 2 分;身体向左侧倾倒的记为 3 分;不能自主行走并伴有意识障碍的记为 4 分。

## 1.4 大鼠脑梗死面积率<sup>[5]</sup>

术后 24 h,将大鼠深度麻醉,断头取脑,将大鼠置于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中快速冷冻 10 min,以视交叉平面为中心连续冠状切片 5 张,将脑切片置于 2% TTC 染液中孵育约 30 min,梗死区域为白色,正常脑组织则被染为红色。用数码相机对脑切片拍照,利用 IPP 软件计算脑梗死面积率。脑梗死面积率 = 梗死区域面积/全脑面积  $\times 100\%$ 。

## 1.5 大鼠脑血流量变化

脑缺血模型组和假手术组大鼠于术前和术后 24 h 分别监测脑血流量变化。脑血流量变化 = [正常平血流均值 - (脑缺血平血流均值/脑缺血 24 h 平血流均值)/正常平血流均值  $\times 100\%$ ]。

## 1.6 统计学方法

采用 SPSS 软件进行统计学分析。组间比较采用 T 检验的方法。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 行为学评分

术后 24h,观察大鼠行为状态,同时进行评分。假手术组大鼠活动正常,模型组大鼠出现不同症状的形为障碍,平均行为学评分为  $(2.1 \pm 0.3)$ ,与正常组比较差异有显著性( $P < 0.01$ )。

## 2.2 大鼠脑梗死面积率

图 1 显示, TTC 染色结果,其中假手术组大鼠脑部无缺血部位,模型组大鼠左脑出现明显的梗死灶,呈现白色,利用 IPP 软件计算脑缺血面积率为  $(27.05 \pm 11.03)$ ,与模型对照组比较差异有显著性( $P < 0.01$ )。

## 2.3 大鼠脑血流量变化

术前,大鼠双侧脑血流平稳,术后大鼠左侧脑部血流量立即下降,下降明显,右侧大脑血流量基本无变化,24 h 后,大鼠左脑血流量与术后相比无明显变化,其右脑血流量基本正常。假手术组大鼠双侧

脑部血流量于术后术前相比无明显变化。具体数据见表 1、图 2、图 3。

2.4 相关性分析

将术后 24 h 时的大鼠脑梗死面积率与脑血流变化量进行对比,脑梗死面积率与脑血流变化量呈正相关。如图 4 所示。

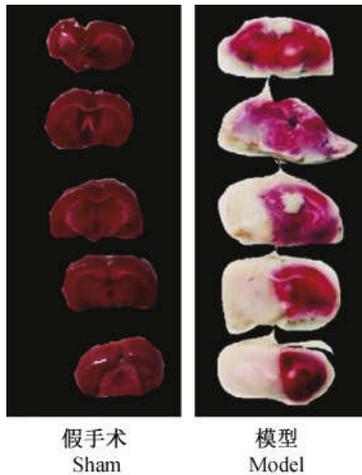


图 1 大鼠脑切片染色图  
Fig. 1 Staining pattern in the rat brain slices

表 1 大鼠脑血流量变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Tab. 1 Changes of cerebral blood flow in the rats

组别 Groups	术前血流量 Normal blood flow	24 h 血流量 24 h blood flow
左半脑 Left brain	327.72 ± 31.56	139.05 ± 36.53**
右半脑 Right brain	324.65 ± 37.39	279.48 ± 44.66

注:与同侧脑术前血流量比较 \*\*P < 0.01。

Note. Compared with preoperative ipsilateral cerebral blood flow,

\*\*P < 0.01.

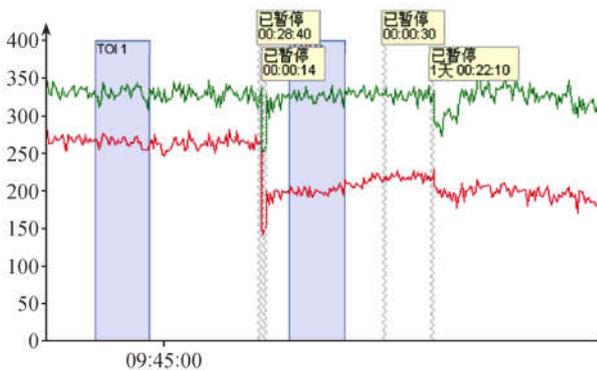
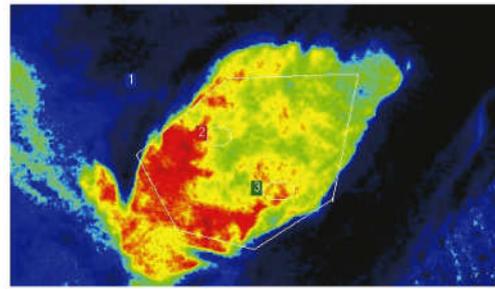
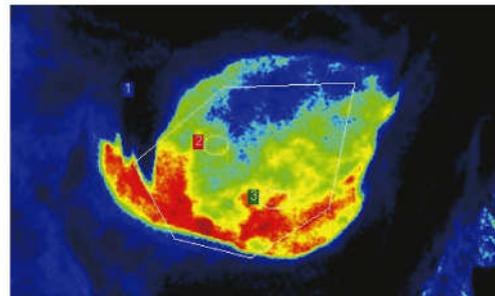


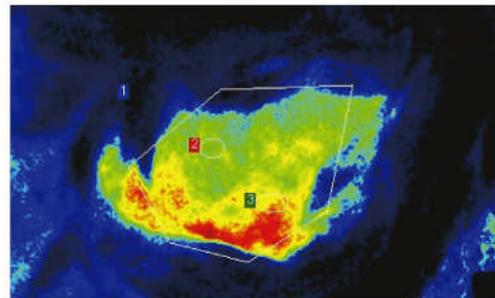
图 2 大鼠双侧脑血流量值变化  
Fig. 2 Changes of bilateral cerebral blood flow in the rats.



术前 Normal



术后即刻  
Immediately after operation



24 h after operation

图 3 大鼠脑部血流变化实时监测图

Fig. 3 Real-time monitoring of the changes of blood flow in the rat brain.

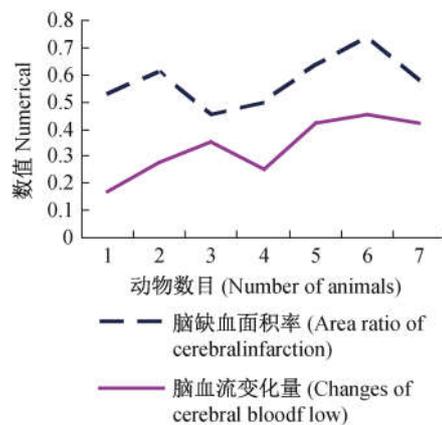
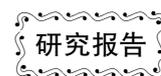


图 4 大鼠脑血流量变化量与脑梗死面积率比较

Fig. 4 Comparison of cerebral blood flow and cerebral infarction area ratio in the rats.

(下转第 512 页)



# 麝香保心丸对一次性力竭运动大鼠心肌损伤标记物和C反应蛋白的影响

陈金良<sup>1\*</sup>, 刘征<sup>1</sup>, 张晶<sup>2</sup>, 车鹏程<sup>3</sup>, 李海军<sup>1</sup>, 李芳<sup>1</sup>, 卢凡<sup>1</sup>, 程庆强<sup>1</sup>

(1. 中国人民解放军第281医院, 河北 秦皇岛 066100; 2. 秦皇岛市第一医院, 河北 秦皇岛 066101;  
3. 河北联合大学医学院, 河北 唐山 063000)

**【摘要】** 目的 探讨麝香保心丸对一次性力竭运动大鼠心肌损伤标记物和C反应蛋白的影响。方法 选择雄性Wistar大鼠52只, 随机分成实验组和对照组, 每组26只。两组大鼠每天自由进食饮水相同, 实验组大鼠每天麝香保心丸2粒(每粒22.5 mg)分2次灌胃, 共两周。两组均接受力竭游泳运动, 制成力竭运动动物模型, 分别测定和比较两组大鼠血清和心肌组织肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、肌钙蛋白T(TnT)、B型脑钠肽(BNP)和C反应蛋白(CRP)水平。结果 大鼠平均力竭运动游泳时间实验组较对照组明显延长( $P < 0.01$ )。实验组血清和心肌组织CK、CK-MB、TnT、BNP和CRP水平均明显低于对照组( $P < 0.05$ )。结论 麝香保心丸可显著降低力竭运动大鼠血清和心肌中CK、CK-MB、TnT、BNP和CRP水平, 能够减轻力竭运动后心肌损伤。

**【关键词】** 大鼠; 力竭运动; 麝香保心丸; 心肌损伤标记物; C反应蛋白

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0509-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.013

## Influence of Shexiangbaixinwan on myocardial injury markers and C-reactive protein after a single bout of exhaustive exercise in rats

CHEN Jin-liang<sup>1</sup>, LIU Zheng<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>2</sup>, CHE Peng-cheng<sup>3</sup>, LI Hai-jun<sup>1</sup>, LI Fang<sup>1</sup>, LU Fan<sup>1</sup>, CHENG Qing-qiang<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, No. 281 Hospital of PLA, Qinhuangdao 066100, China;

2. Department of Cardiology, People's Hospital of Qinhuangdao City, Qinhuangdao, Hebei 066000;

3. Hebei University School of Medicine, Tangshan City, Hebei 063000)

**【Abstract】 Objective** To observe the influence of a Chinese traditional medicine, Shexiangbaixinwan, on myocardial injury markers and C-reactive protein in exhaustively exercised rats. **Methods** A total of 52 male 11-12 week old Wistar rats were divided randomly into two groups: the experimental ( $n = 26$ ) and control groups ( $n = 26$ ). The two groups of rats took food and water freely. The experimental group of rats was given Shexiangbaixinwan (2 capsules per day) for two weeks. Following a single bout of exhaustive swimming ( $\geq 2$  hrs), the serum and myocardial CK, CK-MB, TnT, BNP and CRP in both groups were determined and compared. **Results** Compared with the control group, the exhaustive swimming time of the experimental group was significantly prolonged ( $P < 0.01$ ). The levels of serum and myocardial CK, CK-MB, TnT, BNP and CRP in the experimental group were significantly lower than those in the control group ( $P < 0.05$  for all). **Conclusions** The Chinese traditional medicine Shexiangbaixinwan can significantly decrease the levels of rat serum and myocardial CK, CK-MB, TnT, BNP and CRP after a single bout of exhaustive swimming, and can alleviate myocardial injury.

**【Key words】** Chinese medicine, Shexiangbaixinwan; Rat; Exhaustive swimming; Myocardium injury, markers; C-reactive protein

[基金项目] 河北省科学技术发展计划项目(编号:112761169)。

[通讯作者] 陈金良(1965-), 男, 主任医师, 医学博士。研究方向: 冠心病治疗。E-mail: cj281yy@163.com

力竭运动训练可通过引起心肌代谢和心肌细胞通透性异常,导致心肌损伤坏死,从而对心肌产生不利影响<sup>[1]</sup>。因此,如何防治力竭运动对心肌造成的损伤,保护心肌功能和增强运动能力,成为新的研究热点。本研究通过观察中成药麝香保心丸对一次性力竭游泳运动大鼠心肌损伤标记物和炎症因子的影响,探讨其对心肌损伤的防治作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

选择 11 ~ 12 周龄清洁级雄性 Wistar 大鼠 52 只,体重(200 ± 15) g,由河北医科大学实验动物中心提供[SCXK(冀)2003-1-003],实验在河北联合大学实验动物中心完成[SYXK(冀)2010-0038]。同次实验的各组大鼠均为同窝大鼠,分笼饲养,自由进食饮水,饲养室环境温度(21 ± 4) °C,相对湿度 48% ~ 56%,光照时间每天 12 h。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 动物分组

随机分成对照组和实验组,每组 26 只。两组大鼠每天自由进食饮水相同,实验组大鼠给予麝香保心丸(上海和黄药业生产,批号 140314;每粒 22.5 mg)灌胃,每次 1 粒,每天 2 次,共两周。两组均接受一次性力竭运动游泳。

#### 1.2.2 动物模型制备

两组大鼠分别在长 100 cm、宽 50 cm、高 50 cm 的玻璃游泳槽中游泳,水深 40 cm,水温(31 ± 1) °C。正式实验前 1 d 进行 1 次适应性游泳运动 10 min。后将各组大鼠投入游泳槽中,自入水至游泳力竭的时间即游泳持续时间(短于 2 h 的大鼠除外)。游泳时尾部负重自身体重 2% 的负荷,力竭标准按 Thomas 报道的文献<sup>[2]</sup>:大鼠游泳动作明显失调,且不能再坚持,沉入水下 10 s 不能自主上浮。短时间内力竭的大鼠,捞出休息 5 min,继续游泳,运动时间不少于 2 h。

#### 1.2.3 样本采集

两组动物力竭性游泳后即刻,分离穿刺右颈静脉采血 4 mL,以 3000 r/min 离心 15 min 后取上清液 -70 °C 保存备检。然后将大鼠脱颈椎处死,迅速切取心脏,生理盐水洗去心腔内血液,剔除多余脂肪,剪下左心室肌 20 mg 剪碎,加 2 mL 生理盐水,放入玻璃匀浆管进行匀浆、离心,取上清液 -70 °C 保存备检。

#### 1.2.4 血清和心肌组织实验指标检测方法

以下列方法检测两组大鼠血清和心肌组织的肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、肌钙蛋白 T(troponin T, TnT)、脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)和 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)。CK、CK-MB 用免疫抑制法检测,TnT 应用酶联免疫法(Cusabio 型酶联免疫测定仪),BNP 由 Triage 快速定量监测仪测定,CRP 应用电化学发光法(罗氏 601 测定仪)测定。试剂盒由南京建成生物工程公司提供。

### 1.3 统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件包,结果计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组大鼠力竭游泳运动时间

两组大鼠均完成力竭游泳运动,对照组大鼠平均力竭游泳运动时间为(4.16 ± 1.04) h,实验组为(5.26 ± 1.12) h,两组在运动时间方面差异有显著性( $P < 0.05$ )。游泳运动前喂养麝香保心丸的大鼠耐受游泳运动时间相对延长,运动耐力增强。

### 2.2 两组大鼠血清中 CK、CK-MB、TnT、BNP 和 CRP 水平

表 1 显示,实验组力竭运动心肌损伤各项指标和 CRP 水平均低于对照组( $P$  均  $< 0.05$ ),说明麝香保心丸能够有效地减轻力竭运动对大鼠心肌造成的损伤。

表 1 对照组和实验组力竭运动后血清 CK、CK-MB、TnT、BNP 和 CRP 水平( $\bar{x} \pm s, n = 26$ )

Tab. 1 The changes of serum CK, CK-MB, TnT, BNP and CRP after exhaustive exercise in the rats

组别 Groups	CK /IU/L	CK-MB /IU/L	TnT/ $\mu$ g/L	BNP /ng/L	CRP /mg/dL
对照组 Control	1168.2 ± 447.6	218.9 ± 113.6	2.14 ± 0.73	73.25 ± 21.14	7.38 ± 3.53
实验组 Experimental	619.8 ± 193.3 *	108.7 ± 42.8 *	0.86 ± 0.19 *	36.77 ± 12.31 *	3.52 ± 0.86 *

注: \*  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

Note. \*  $P < 0.05$ , compared with the control group.

### 2.3 两组大鼠心肌中 CK、CK-MB、TnT、BNP 和 CRP 水平

表 2 显示, 实验组大鼠在力竭运动后心肌组织中 CK 等各项指标和 CRP 的活性均明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ )。由于力竭运动可造成心

肌损伤, 心肌细胞内这些酶大量释放, 致使心肌中酶的活性升高, 而应用麝香保心丸后可使心肌细胞内心肌酶和 CRP 释放减少, 进一步说明其可减轻力竭运动对大鼠心肌造成的损伤, 对心肌可以起到保护作用。

表 2 对照组和实验组力竭运动后心肌组织 CK、CK-MB、TnT、BNP 和 CRP 水平 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 26$ )

Tab. 2 The changes of myocardial CK, CK-MB, TnT, BNP and CRP after exhaustive exercise in the rats

组别 Groups	CK /IU/L	CK-MB /IU/L	TnT / $\mu$ g/L	BNP /ng/L	CRP /mg/dL
对照组 Control	174.9 $\pm$ 60.2	23.2 $\pm$ 7.9	1.07 $\pm$ 0.22	55.47 $\pm$ 19.66	3.16 $\pm$ 1.03
实验组 Experimental	71.5 $\pm$ 18.4*	19.4 $\pm$ 4.2*	0.49 $\pm$ 0.13*	20.35 $\pm$ 10.42*	1.76 $\pm$ 0.49*

注: \*  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

Note. \*  $P < 0.05$ , compared with the control group.

### 3 讨论

已有研究<sup>[3-5]</sup>证明, 力竭运动或强负荷军事训练后可导致机体血清 CK、CK-MB、TnT、BNP 和 CRP 水平增高。动物实验也表明<sup>[6,7]</sup>, 大鼠力竭游泳运动后血 CK 及 CK-MB 增高, 心肌细胞凋亡增多, 血 CK 及 CK-MB 与心肌细胞凋亡呈平行的动态变化, 可以反映早期心肌细胞凋亡情况。临床上也已应用 CK、CK-MB、肌钙蛋白 (T 和 I) H 和 BNP 做为判定心肌损伤的特异性指标, 近年来发现 CRP 与心肌损伤有关<sup>[4,5]</sup>。因此可以将血 CK、CK-MB、TnT、BNP 做为心肌损伤标记物和 CRP 做为间接反应或帮助观察药物防治心肌损伤的效果指标。

本实验结果显示, 应用麝香保心丸的大鼠一次性力竭游泳运动后血清和心肌组织中 CK、CK-MB、TnT、BNP 和 CRP 等浓度明显低于对照组的大鼠。就力竭运动引起血清和心肌 CK、CK-MB、TnT、BNP 和 CRP 活性增高的机制而言, 可能系力竭运动导致心肌细胞内代谢产物的积累和渗透压增高, 激素分泌加强; 长时间运动使心肌缺氧, 致使心肌细胞能量代谢障碍, 导致亚细胞结构对高能磷酸化合物的竞争, 使心肌细胞膜的结构变化造成心肌细胞膜通透性损伤性改变, 最终出现心肌细胞内酶释放入血液增多<sup>[6-8]</sup>。许思毛等<sup>[9]</sup>应用电镜观察了大负荷跑台运动对大鼠心肌细胞膜  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  泵、 $\text{Ca}^{2+}$  泵与肌质网  $\text{Ca}^{2+}$  泵活性的影响及其与心肌超微结构变化的关系。结果显示, 运动后 24 h 肌质网  $\text{Ca}^{2+}$  泵活性显著减低, 线粒体和肌原纤维结构明显损伤, 肌细胞及肌质网肿胀, 说明高强度运动可导致心肌微结构损伤。Smith 研究<sup>[10]</sup>发现, 力竭运动后即刻和 24 h, 心肌由于缺血缺氧致使与心肌损伤的相关炎症因子分泌增多, 与本实验中大鼠力竭运动后 CRP 显著升高

意义相似。

本研究中, 在力竭游泳运动前喂养麝香保心丸的大鼠, 之后血液和心肌组织的酶学标记物和炎症因子 CRP 明显低于对照组 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 说明麝香保心丸可减低力竭运动大鼠的心肌酶和炎症因子活性。麝香保心丸由人工麝香、人参提取物、肉桂、苏和香、蟾酥、冰片、人工牛黄组成, 药理作用是多方面的<sup>[11]</sup>: ①麝香具有强心作用, 能够对抗异丙肾上腺素兴奋心脏的作用, 通过抑制心肌细胞的自律性使心率减慢, 因而减少心肌氧耗; ②人参提取物人参茎叶总皂甙对心肌有直接保护作用, 并具有保护心肌毛细血管内皮细胞及减轻线粒体损伤的作用; ③肉桂有扩张冠脉、降低血管阻力, 其成分桂皮醛具有抗血小板药和抗凝血酶作用, 因此可促进心肌微循环, 保障心肌血供; ④动物实验发现苏合香有增强心肌耐缺氧能力的作用, 对狗实验性心肌梗塞有减慢心率、增加冠脉血流和降低心肌耗氧作用, 对兔、大鼠血小板聚集有显著抑制作用; ⑤蟾酥成分蟾毒配基类通过抑制心肌细胞膜上的  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶, 使心肌细胞内  $\text{Na}^+$  增高,  $\text{Ca}^{2+}$  通过  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  交换进入细胞内, 从而使心肌收缩力增强; ⑥另外两种成分牛黄具有强心和镇静作用; 冰片可防止冠脉痉挛, 能够减轻缺血所致的心肌损伤。中医认为此组方具有补气、芳香开窍、益气温阳和理气止痛功效, 对应西医为扩张冠状动脉改善冠脉供血, 增加心输出量; 改善缺血心肌的代谢, 减慢心率降低心肌耗氧; 抑制心肌纤维化, 减轻心肌和血管炎性反应<sup>[12]</sup>; 在改善心功能同时, 降低血浆 BNP 浓度。麝香保心丸还可通过抑制纤维蛋白原, 有效抑制动脉壁炎症反应, 使 CRP 及 P-选择素水平降低, 降低冠状动脉的炎症损害进而保护血管内皮功能<sup>[13,14]</sup>, 减少心血管事件发生。许多基础和临床应用研究证明麝香保心丸是安

全有效的<sup>[15]</sup>。

总之,本研究结果进一步表明,麝香保心丸可明显降低大鼠力竭运动时血清和心肌中 CK、CK-MB、TnT、BNP 和 CRP 的水平,对力竭运动时具有防治心肌损伤和保护心脏功能作用。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] 王晓伟,曹雪滨. 力竭性运动对心脏影响的研究进展[J]. 医学研究与教育, 2012, 29(2): 60-63.
- [ 2 ] Thomas DP, Marshall KI. Effects of repeated exhaustive exercises on myocardial subcellular membrane structure [J]. J Sports Med, 1988, 9(4): 257-264.
- [ 3 ] Tian Y, Nie J, Tong TK, et al. Changes in serum cardiac troponins following a 21-km run in junior male runners [J]. J Sports Med Phys Fitness, 2006, 46(3): 481-488.
- [ 4 ] 陈金良,张晶,樊欣娜,等. 新兵强负荷训练后血清心肌损伤标记物和 C 反应蛋白的变化[J]. 解放军医药杂志. 2014, 26(4): 103-105.
- [ 5 ] Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, et al. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays [J]. N Engl J Med, 2009, 361(9): 858-867.
- [ 6 ] 吴广礼,容俊芳,温进坤,等. 过度训练致大鼠心肌和肾组织细胞凋亡及山莨菪碱干预的影响 [J]. 解放军医学杂志, 2007, 32(1): 68-71.
- [ 7 ] 黄泼泼,刘江伟,张波,等. 沙漠干热环境下中暑大鼠的心肌酶及心肌组织形态学改变[J]. 中国实验动物学报, 2014

(2): 11-15.

- [ 8 ] 王福文,胡志力,赵敬国,等. 反复力竭性运动后大鼠血清 cTnI 和心肌组织形态学的改变 [J]. 心脏杂志, 2011, 23(2): 197-199.
- [ 9 ] 许思毛,刘涛波,苏全生. 大负荷运动对大鼠心肌细胞膜钠钾泵、钙泵与肌浆网钙泵活性的影响 [J]. 体育科学, 2010, 30(12): 82-86.
- [ 10 ] Smith LL. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress [J]. Med Sci Sports Exerc, 2000, 32(2): 317-331.
- [ 11 ] 王仙,徐传新,朱慧娟. 麝香保心丸的心血管系统药理作用研究进展 [J]. 中国药房, 2012, 23(43): 4114-4115.
- [ 12 ] 韩凌,陈金良,周文燕,等. 麝香保心丸联合曲美他嗪对冠心病心力衰竭患者血管内皮功能及血浆脑钠肽影响临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(12): 1431-1433.
- [ 13 ] 张武宁,彭雪梅,高晓东,等. 麝香保心丸对 2 型糖尿病合并慢性心力衰竭患者心功能及 BNP 的影响 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2012, 4(3): 234-236.
- [ 14 ] 张勇,唐海沁,李瑾. 麝香保心丸治疗冠心病的 Meta 分析 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2012, 4(1): 13-17.
- [ 15 ] 魏姗姗,詹常森,邓中平. 麝香保心丸安全性研究概述 [J]. 中成药, 2015, 37(5): 1080-1082.

[收稿日期] 2015-04-13

(上接第 508 页)

### 3 讨论

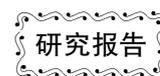
脑卒中是一种常见的急症、重症。Zea-Longa 线栓法被广泛用于实验性局灶脑缺血模型的建立。对于模型成功与否的评价,普遍采用行为学评分以及 TTC 染色法,而对于该模型,大鼠脑血流量的变化则鲜有报道。大鼠行为学评分具有主观性,TTC 染色法虽能客观评价模型的成功性,但却需处死大鼠后取得结果,从而阻碍了后续实验的进行。同时消耗了大量的样本、试剂等。若采用大鼠脑血流量变化为评价标准,则避免浪费过多的样本,且能实时监测大鼠脑部变化,更具客观性。本实验以此为背景,制备了大鼠脑缺血模型,使用血流检测仪实时监测大鼠术前、术后即刻以及缺血 24 h 的脑部血流变化。同时以大鼠行为学评分为辅助标准,以脑梗死面积率为金标准,分析大鼠脑血流变化与脑梗死面积率间的关系。研究结果表明,大鼠脑梗死面积率与血

流减少量呈正相关。因此,大鼠脑血流量变化可以作为一种客观的评价标准应用于缺血模型成功的评价。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Koizumi J, Yodaïda Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema: A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area [J]. Jpn J Stroke, 1986, 8(1): 1-8.
- [ 2 ] Zea-Longa E, Weinstein P, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke. 1989, 20(1): 84-91.
- [ 3 ] 李晶,郭利平. 线栓法制备大鼠局灶性脑缺血模型的研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2008, 27(1): 54-56.
- [ 4 ] 朱继,万东,唐文渊. 改良线栓法制备大鼠局灶脑缺血模型 [J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(8): 685-687.
- [ 5 ] 赵浩,李永宁,王任直,等. 大鼠局灶性脑缺血模型的有效制备[J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(6): 432-436.

[收稿日期] 2015-05-12



# 脂多糖联合 MPTP 诱导的小鼠慢性 帕金森病模型的评价

史肖锦, 屈洪党\*

(蚌埠医学院第一附属医院神经内科, 安徽 蚌埠 233000)

**【摘要】** 目的 建立脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)联合1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)诱导的慢性小鼠帕金森病模型,探讨其行为学和黑质多巴胺能神经元细胞的变化情况。**方法** 将20只C57BL/6小鼠随机分为模型组和对照组,模型组每日腹腔注射LPS(0.25 mg/kg)一次,连续3 d,最后一次注射LPS 4 h后,每日腹腔注射MPTP(25 mg/kg)一次,连续2 d,对照组腹腔注射相同量的生理盐水。8周后用步态分析和转棒实验评价小鼠的行为学能力,免疫组化法观察黑质酪氨酸羟化酶(TH)阳性细胞变化情况。**结果** 模型组小鼠行为学变化较对照组差异有显著性( $P < 0.05$ ),模型组小鼠中脑黑质区显示出严重的神经元细胞损伤。**结论** LPS联合MPTP腹腔注射可成功诱导出慢性小鼠帕金森病模型,提示该模型可用于帕金森病的发病机制及药物治疗效果等相关研究。

**【关键词】** LPS; MPTP; 帕金森病; 小鼠模型; 酪氨酸羟化酶

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0513-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.014

## Evaluation of a mouse model of Parkinson's disease induced by lipopolysaccharide plus MPTP

SHI Xiao-jin, QU Hong-dang

(the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, China)

**【Abstract】 Objective** The aim of this study was to establish a mouse model of chronic Parkinson's disease induced by systemic administration of lipopolysaccharide plus 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), and to study the changes of behavioral manifestation, numbers of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. **Methods** Twenty C57BL mice were randomly divided into 2 groups: the saline control group and model group. The mice in the model group received three intraperitoneal (i. p.) injections of LPS (0.25 mg/kg), once daily for three consecutive days. Four hours following the final LPS injection, the mice received one subcutaneous injection of low-dose MPTP (25 mg/kg). The mice of control group were injected with the same volume of saline. Eight weeks later, the motor ability of the mice was evaluated by footprint test and rotarod test. The tyrosine hydroxylase (TH)-positive cells were observed by immunohistochemical analysis. **Results** Compared with the control group, the scores of behavioral test were significantly lower, numbers of TH immunoreactive cells were significantly less in the Parkinson's model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Behavioral manifestation, number of dopaminergic neurons in the substantia nigra are significantly changed in the mouse models of Parkinson's disease produced by repeated injection of LPS plus MPTP, suggesting that this chronic animal model can be used in the experimental study for pathogenesis and therapy of Parkinson's disease.

**【Key words】** Lipopolysaccharide, LPS; MPTP; Parkinson's disease (PD); Rat model; Tyrosine hydroxylase

[基金项目] 蚌埠医学院研究生创新计划项目(Byycx1406); 教育厅重点项目(KJ2014A163)。

[作者简介] 史肖锦(1988-),女,蚌埠医学院硕士研究生,研究方向:神经病学。Email: 137481290@qq.com

[通讯作者] 屈洪党,男,主任医师,研究方向:神经病学的临床、科研和教学工作。Email: qhd820@souhu.com

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种常见的神经系统退行性疾病,其主要的病理改变为黑质多巴胺能神经元的进行性丢失和残留的神经元胞浆中路易小体形成<sup>[1]</sup>。最近的研究假设 PD 的发病机制可能涉及到多个起因,包括(但不局限于)暴露于环境的神经毒素(如农药、重金属)、遗传学、生活习惯(如农村生活环境)和氧化应激,免疫炎症反应也涉及到 PD 病因学<sup>[2,3]</sup>。且炎症不再被认为仅仅是神经退变过程的一个附带现象,相反它是一个活跃的贡献者<sup>[4]</sup>。目前对 PD 病因和病理生理机制的认知,主要来源于 PD 动物模型,因此模拟出一个能反映 PD 的发病机制、病理学和行为学方面动物模型,是一个有待解决的问题。目前 MPTP 和 6-OHDA 等均是单一因素下诱导的 PD 模型,凋亡的多巴胺神经元可在短时间内自发恢复至正常,且仅仅一个因素并不能必然导致人类慢性多巴胺的耗竭<sup>[5]</sup>。细菌内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导一系列的炎症反应,通过激活迷走神经的传入纤维及中枢神经系统中促炎性细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  等,进而激活中枢炎症过程<sup>[6]</sup>。研究表明,LPS 预处理后应用 MPP<sup>+</sup>(MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydro-pyridine 的代谢毒物),结果显示 LPS 预处理组动物模型的纹状体 DA 持续性减少,超过单独应用 MPP<sup>+</sup>组,且持续的时间也较长,表明 LPS 和 MPTP 共同作用可放大神经退行性变的过程<sup>[7]</sup>。本实验通过注射 LPS 诱导系统性炎症后,继续注射低剂量的 MPTP 诱导慢性 PD 模型,观察其行为学和黑质多巴胺神经元细胞的改变情况,证实其更符合 PD 的缓慢进行性发病的过程,可成为研究 PD 的可靠动物模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 12 周龄的 C57BL/6J 小鼠,20 只,体重 25~27 g,购自扬州大学比较医学中心【SCXK(苏)2012-004】,饲养于蚌埠医学院 SPF 级实验动物中心【SYXK(皖)2012-002】,标准饲养盒内饲养,每盒 5 只。温度控制在 18~22 $^{\circ}$ C,自由饮水和摄食,并保持 12 h/12 h 昼夜循环。

#### 1.1.2 试剂

脂多糖, MPTP, 兔抗酪氨酸羟化酶抗体,生物素

标记的二抗,均购自 Sigma(美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物模型

20 只 C57BL/6J 小鼠适应性饲养 1 周,随机分为空白对照组和模型组,每组 10 只。模型组小鼠每日腹腔注射 LPS (0.25 mg/kg) 一次,连续 3 d。最后一天注射 LPS 4 h 后,继续腹腔注射 MPTP (25 mg/kg) 一次,连续 2 d,相当于 LPS 注射 3 次, MPTP 注射 2 次。空白对照组腹腔注射相同体积的生理盐水。

#### 1.2.2 行为学检测

##### (1) 步长分析

自制一个长 1 m、宽 10 cm、高 20 cm 的单向通道,用同样长宽的宣纸铺在通道的底部,训练小鼠穿过通道以测量步长。将小鼠的两后脚掌涂抹墨汁,放于通道的入口,到达另一端出口后其脚印便留在纸上,测量小鼠同侧身体两个脚印的距离,计算出平均步长。通道的开始和结束的步幅长度均不列入计算,因为小鼠在开始行走时会加速步幅不规则,而出口小鼠为了逃离通道步幅会变小。

##### (2) 转棒实验

将小鼠置于直径为 3 cm 的旋转杆上,转速调整为 20 r/min,每次同时测定 5 只小鼠,每个隔室中 1 只。记录小鼠从转棒开始转动至掉离转棒所经历的时间,测定时间为 5 min,共测 5 次取平均值,同一只小鼠检测间隔为 30 min。

##### (3) 游泳实验

将小鼠单独放入一 40 cm  $\times$  25 cm  $\times$  16 cm 的有机玻璃箱中测试器游泳分数,水深为 12 cm,水温为(27  $\pm$  2) $^{\circ}$ C。评分标准如下:3 分,3 min 内连续不断的游泳;2 分,大部分时间游泳偶尔漂浮;1 分,偶尔游泳;0 分,四肢无活动。

#### 1.2.3 免疫组化染色检测小鼠黑质酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)的表达

##### (1) 制作中脑黑质石蜡切片

对小鼠进行水合氯醛麻醉,用生理盐水灌流,4%多聚甲醛灌注内固定,剥离出完整的脑组织浸入多聚甲醛中固定 24 h。进行梯度脱水、透明、石蜡包埋,在中脑黑质区连续冠状石蜡切片,选取 5 张切片行 TH 免疫组织化学染色。

##### (2) 免疫组化步骤

烘片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,0.01 mmol/L 3%过氧化氢室温下反应 10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次  $\times$  5 min,抗原修复,高火 2 min,使

其快速达到 95℃ 左右,低火维持 12 ~ 14 min,自然冷却至室温,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。5% 羊血清 37℃ 封闭,去掉多余羊血清,加入一抗 4℃ 过夜,37℃ 复温 1 h,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。加入生物素标记二抗,37℃ 室温下反应 1 h,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。DAB 显色,复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,封片,拍照。

### 1.3 统计分析方法

采用 SPSS 16.0 进行数据分析,实验数据均采用均数 ± 标准差表示,两组数据采用独立样本 *t* 检验进行比较,以  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠步长分析、转棒实验和游泳实验的比较

8 周末进行的行为学检测,与对照组相比,模型组小鼠平均步长明显减少、在转棒上的时间明显缩短、游泳分值明显下降, $P$  均  $< 0.05$ ,差异具有统计学意义(见表 1)。

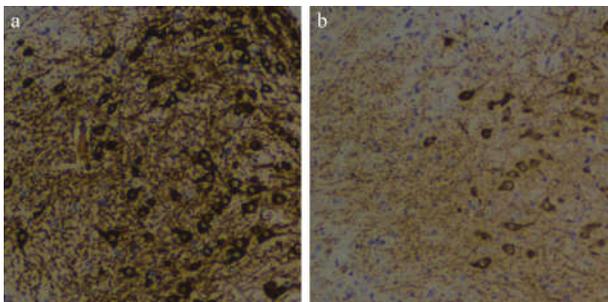
表 1 各组小鼠步长和转棒实验数据结果比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab. 1 The stride length and rotarod performance in the mice of each group

组别 Groups	步长/cm Stride length	转棒实验 /s Rotarod test	游泳实验/min Swimming
对照组 Control	7.32 ± 0.636	183.10 ± 40.668	2.83 ± 0.408
模型组 Model	5.41 ± 0.299	65.50 ± 21.752	1.50 ± 1.049

### 2.2 黑质酪氨酸羟化酶免疫组化结果

与正常对照组小鼠相比,模型组小鼠中脑黑质区显示出严重的神经元损伤,多巴胺神经元细胞明显减少,且表现出更多的神经元细胞的萎缩和损坏,细胞体积变小,突起变短,纤维少而稀疏(见图 1)。



注:a;对照组;b;模型组。

图 1 中脑黑质 TH 免疫组织化学检测( $\times 100$ )

Note. a; Control; b; Model

Fig. 1 Representative photomicrographs of TH-immunoreactive neurons in the substantia nigra of mouse brain ( $\times 100$ )

## 3 讨论

PD 是一种与年龄相关的神经退行性疾病,越来越多的研究显示炎症与黑质多巴胺能神经元凋亡的相关性<sup>[8]</sup>。尸检报告显示 PD 患者中脑黑质多巴胺神经元凋亡与小胶质细胞形态学改变和促炎因子的退化均有关<sup>[9]</sup>,但是其具体的机制仍未明确<sup>[10]</sup>。为了更好的研究 PD 的发病机制及相应的治疗策略,模拟出一个能反应 PD 的发病机制、病理学和行为学方面的慢性 PD 动物模型,是一个急需解决的问题。目前的 6-OHDA 和 MPTP 诱导的 PD 模型均为单一定点注射直接损毁小鼠中脑黑质多巴胺,不能很好的模拟 PD 慢性的发病过程。研究表明<sup>[11]</sup>,PD 神经系统进行性退化可能始发于黑质以外的其他神经系统,故利用神经毒素联合注入黑质以外的部位诱导的小鼠帕金森病模型,引起越来越多的人关注。

LPS 是一种内毒素<sup>[12,13]</sup>,对神经元无毒性作用,但它可诱导强大的先天免疫反应,激活小胶质细胞,释放一系列的细胞炎症因子,导致黑质纹状体通路损害和帕金森病行为学症状。MPTP<sup>[14]</sup>为高亲脂性化合物,能有效的通过血脑屏障,主要被小胶质细胞识别,被单胺氧化酶氧化成 MPDP<sup>+</sup>,随后自氧化成毒素 MPP<sup>+</sup>。MPP<sup>+</sup>被 DA 神经元摄取,阻断线粒体复合酶 I 的活性,大幅度增加氧化应激的水平,从而导致纹状体多巴胺水平下降,并逐渐导致中脑黑质致密部多巴胺神经元的死亡。研究表明 LPS 可能会影响血脑屏障,从而影响大脑中 MPTP 的浓度,系统性注射 LPS 可以提高 MPTP 的毒性<sup>[15]</sup>。且 Gao 等<sup>[16]</sup>认为注射 LPS 后继续注射 MPTP 会产生一种协同作用,后 Byler 等<sup>[5]</sup>利用 LPS 联合 MPTP 腹腔注射成功诱导出慢性帕金森病小鼠模型,然而这种模型在国内并未引起广泛关注。

本研究利用 LPS 联合小剂量的 MPTP 作用于 C57BL/6J 小鼠诱导慢性帕金森模型,8 周末行为学检测显示模型组小鼠步长、转棒时间和游泳分值较对照组均下降,TH 免疫组化结果显示模型组中脑黑质 TH 阳性细胞数量较对照组减少,且神经元细胞体积变小,突起变短,纤维少而稀疏。提示 LPS 联合小剂量的 MPTP 腹腔注射可成功诱导出 PD 小鼠模型,且更符合 PD 的缓慢发病过程,说明此种模型可用于帕金森病的病因、病理生理机制及药物治疗效果的研究。

研究表明<sup>[17]</sup>,6-OHDA 和 MPTP 诱导的 PD 小

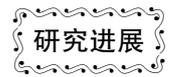
鼠模型仅导致纹状体多巴胺短时的减少,可很快恢复至正常水平,且缺乏相应的行为学改变,而 LPS 联合 MPTP 小鼠模型步长缩短及黑质纹状体多巴胺减少至少可持续 4 个月。本研究结果与这一观点相符合,LPS 联合 MPTP 小鼠模型步长缩短及黑质多巴胺神经元损伤较严重,持续时间较长,且该模型未出现小鼠死亡或者诱导运动功能减退失败的情况。步长缩短是帕金森病患者身上的主要特征<sup>[18,19]</sup>,故利用步长测定进行行为学检测,更能反应帕金森小鼠模型的行为学改变情况。

总之,LPS 联合 MPTP 腹腔注射可成功诱导出帕金森病小鼠模型,该模型可用于 PD 的发病机制和病理生理变化的研究,也可为研究药物的治疗效果提供合适的动物模型。以后可以对小胶质细胞增生、促炎因子的表达以及突触核蛋白的聚集的情况做出进一步研究。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Lazzarini M, Martin S, Mitkovski M, et al. Doxycycline restrains glia and confers neuroprotection in a 6-OHDA Parkinson model [J]. *Glia*, 2013, 61: 1084 - 1100.
- [ 2 ] 孟凛冽,李峰,伞勇智,等. 帕金森病氧化应激机制及抗氧化药物治疗进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2015(2): 380 - 383.
- [ 3 ] 王茜,张辉,刘名,等. 小白菊内酯对帕金森病小鼠模型黑质多巴胺能神经元的保护作用 [J]. *神经解剖学杂志*, 2014, 30(3): 357 - 362.
- [ 4 ] 王玲.  $\alpha$ -synuclein 诱导的神经炎症在帕金森病发生中的作用 [D]. 南京医科大学, 2013.
- [ 5 ] Byler SL, Boehm GW, Karp JD, et al. Systemic lipopolysaccharide plus MPTP as a model of dopamine loss and gait instability in C57Bl/6J mice [J]. *Behav Brain Res*, 2009, 198(2): 434 - 439.
- [ 6 ] 杨绍松,陶凯,逯芳芳,等. iNOS 在 LPS 诱导活化小胶质细胞中的表达变化 [J]. *神经解剖学杂志*, 2014, 30(6): 666 - 670.
- [ 7 ] Goralski KB, Renton KW. Brain inflammation enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium-evoked neurotoxicity in rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 196:381 - 389.
- [ 8 ] Anitua E, Pascual C, Pérez-Gonzalez R, et al. Intranasal PRGF-Endoret enhances neuronal survival and attenuates NF- $\kappa$ B-dependent inflammation process in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *J Controlled Release*, 2015, 203: 170 - 180.
- [ 9 ] 王岚,沈伟. 美满霉素对脂多糖诱导的 BV-2 小胶质细胞肿瘤坏死因子- $\alpha$  表达的影响 [J]. *临床神经病学杂志*, 2014, 27(4): 286 - 288.
- [ 10 ] Hu Y, Yu SY, Zuo LJ, et al. Parkinson disease with REM sleep behavior disorder features,  $\alpha$ -synuclein, and inflammation [J]. *Neurology*, 2015, 84(9): 888 - 894.
- [ 11 ] Del Tredici K, Jost WH. [Gastrointestinal dysfunction in idiopathic Parkinson's disease] [J]. *Der Nervenarzt*, 2012, 83(10): 1282 - 1291.
- [ 12 ] Gao H M, Zhang F, Zhou H, et al. Neuroinflammation and  $\alpha$ -synuclein dysfunction potentiate each other, driving chronic progression of neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *Environ Health Persp*, 2011, 119(6): 807.
- [ 13 ] 郭玉霞,杨波,石磊,等. 姜黄素对中脑定位注射脂多糖引起帕金森样病变小鼠的抗炎机制研究 [J]. *医学研究生学报*, 2012, 25(6): 582 - 587.
- [ 14 ] 陈浩,师亮,王燕宏,等. 甘草黄酮对 MPTP 帕金森病小鼠的实验性治疗研究 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2013, 12: 1112 - 1113.
- [ 15 ] Lecca D, Nevin DK, Mulas G, et al. Neuroprotective and anti-inflammatory properties of a novel non-thiazolidinedione PPAR $\gamma$  agonist in vitro and in MPTP-treated mice [J]. *Neuroscience*, 2015,302:23 - 35.
- [ 16 ] Gao HM, Liu B, Zhang W, et al. Synergistic dopaminergic neurotoxicity of MPTP and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease [J]. *FASEB J*, 2003, 17(13): 1957 - 1959.
- [ 17 ] Tillerson JL, Caudle WM, Reverón ME, et al. Detection of behavioral impairments correlated to neurochemical deficits in mice treated with moderate doses of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine [J]. *Exp Neurol*, 2002, 178(1): 80 - 90.
- [ 18 ] 文龙,钱晋武,沈林勇,等. 帕金森病患者步态测量与定量分析 [J]. *中国康复医学杂志*, 2014, 29(7): 637 - 641.
- [ 19 ] 李利,刘晶,罗蔚锋,等. 帕金森病冻结步态研究进展 [J]. *中华神经科杂志*, 2014, 47(8): 565 - 567.

[收稿日期] 2015-05-20



# Kinesin-2 家族在模式生物中的功能研究进展

苗珊珊, 杨匡, 赵呈天\*

(中国海洋大学海洋生物多样性与进化研究所, 山东 青岛 266003)

**【摘要】** Kinesin-2 蛋白是 Kinesin 超级蛋白家族的一个亚家族, 成员包括 KIF3A, KIF3B, KIF3C 以及 KIF17。作为分子马达蛋白, Kinesin-2 家族成员参与了细胞内多种蛋白复合体及囊泡的运输, 对细胞行使各种生物学功能非常重要。近年来发现 Kinesin-2 在纤毛内物质运输方面发挥重要作用, 其功能缺陷可导致纤毛发育异常, 进而影响组织器官的发育, 并最终导致多种纤毛疾病的形成。本综述将对近期 Kinesin-2 的研究进展进行介绍, 将着重介绍 kinesin-2 家族成员在模式生物研究中的新进展。

**【关键词】** Kinesin-2; 模式生物; 纤毛; 斑马鱼

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0517-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.015

## Research progress on the function of kinesin-2 family proteins in model organisms

MIAO Shan-shan, YANG Kuang, ZHAO Cheng-tian

(Institute of Evolution & Marine Biodiversity, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

**【Abstract】** Kinesin-2 family proteins, including KIF3A, KIF3B, KIF3C and KIF17, are members of the kinesin superfamily motor proteins, which transport various proteins and vesicles in the cell and play diverse biological functions. Recently, studies on members of kinesin-2 family proteins suggest that they play fundamental roles during ciliary transport, whose defects can lead to abnormal cilia development, the major cause of human ciliopathies. In this review, we will summarize the functions of this motor protein family during ciliogenesis and focus mainly on their roles in the development of model organisms.

**【Key words】** Kinesin-2; Model organisms; Cilia; Zebrafish

Kinesin 驱动蛋白是生物体内参与物质运输的一类重要分子马达蛋白, 该蛋白可利用 ATP 水解所释放的能量驱动自身及所携带的货物分子沿着微管做连续运动, 进而为膜细胞器、蛋白复合体及 mRNA 等的运输提供动力。目前已发现超过 45 种 kinesin 蛋白, 根据其结构特征可分为 15 个 kinesin 亚家族, 其中 kinesin-2 亚家族是目前已知的参与纤毛内物质运输的主要动力蛋白<sup>[1]</sup>。

纤毛存在于绝大多数细胞中, 由细胞膜表面突起而形成, 其结构相对保守, 由 9 个微管二聚体形成

的轴丝构成了纤毛的主体支撑结构。根据其结构及运动特征, 纤毛可分为运动纤毛和原生纤毛(不动纤毛)两种, 其中运动纤毛微管具有动力臂结构, 可进行有规则的摆动从而为细胞的运动或表面的液体流动提供动力, 而不动纤毛微管不具有动力臂, 通常不能自主进行摆动, 近年来发现不动纤毛与细胞的多种生理活动密切相关, 参与调控多种重要的信号通路, 包括 Wnt, Hedgehog 等<sup>[2, 3]</sup>。对纤毛重要性的认识来源于近年来对纤毛发育缺陷相关遗传疾病的研究, 纤毛缺陷可导致内脏反转, 多指(趾), 视

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31372274, 81301718)。

[作者简介] 苗珊珊(1990-), 在读硕士, 研究方向: 胚胎发育。Email: miaoshan777@126.com

[通讯作者] 赵呈天, 教授, 研究方向: 胚胎发育。E-mail: chengtian\_zhao@ouc.edu.cn

觉、嗅觉及听觉的减退,多囊肾,不孕不育等多种临床疾病,一些严重的纤毛疾病(如 Meckel-Gruber 综合症)可导致胎儿发育的畸形<sup>[4, 5]</sup>。因此,认识纤毛发育的分子机制成为近期的一个热点研究领域。

纤毛内蛋白运输机理的研究是纤毛相关疾病研究的一个核心问题,目前发现纤毛疾病多由纤毛内的重要功能蛋白的运输缺陷所导致,如跨膜蛋白 PKD1 和 PKD2 的运输缺陷导致多囊肾的形成,视蛋白 opsin 的运输缺陷导致色素性视网膜变性等<sup>[5]</sup>。作为纤毛内运输的主要马达蛋白,对 kinesin-2 蛋白家族的研究是近期的一个研究重点,包括对其结构,功能及运输机理的研究等。目前发现, kinesin-2 蛋白的作用非常广泛,除了在纤毛内发挥运输功能之外,也同时在神经轴突内的运输,有丝分裂,细胞粘连及极性, RNA 运输等多个方面发挥功能<sup>[6]</sup>,鉴于篇幅的限制,本综述将无法在这些方面一一展开,将着重介绍 kinesin-2 成员在几种重要的模式生物发育中的重要功能。

表 1 Kinesin-2 蛋白成员在不同模式生物中的名称

Tab. 1 Members of kinesin-2 family proteins in different model organisms

模式生物 Model organisms	Kinesin-II 异源三聚体 (Heterotrimeric Kinesin II) (KIF3A/KIF3B/KAP3 或 KIF3A/KIF3C/KAP3)				KIF17 同源二聚体 (Homodimeric Kinesin)
	KIF3A	KIF3B	KIF3C	KAP3	
人 <i>Human</i>	KIF3A	KIF3B	KIF3C	KAP3	KIF17
衣藻 <i>Chlamydomonas</i>	FLA10	FLA8	NA	FLA3	NA
线虫 <i>Caenorhabditis elegans</i>	KLP20	KLP11	NA	KAP1	OSM-3
果蝇 <i>Drosophila</i>	KLP64D	KLP68D	NA	KAP	NA
海胆 <i>Sea urchin</i>	KRP85	KRP95	NA	KAP	NA
非洲爪蟾 <i>Xenopus</i>	XKLP3A	XKLP3B	KIF3C	KAP3	KIF17
斑马鱼及其他脊椎动物 <i>Zebrafish and other vertebrate</i>	Kif3a	Kif3b	Kif3c	Kap3	Kif17

注: NA 表示在该物种中不存在或未发现(报导)

Note. NA, Not discovered or reported.

## 2 模式生物中 Kinesin-2 研究进展

### 2.1 衣藻—Kinesin-2 功能研究的最早模型

纤毛是 kinesin-2 最主要的运输场所,而这种运输是通过一种叫 IFT (intraflagellar transport) 的蛋白复合体来完成的。利用微分干涉显微技术, Kozminski 等<sup>[9]</sup>首先在衣藻的纤毛(鞭毛)中观测到了 IFT 的存在。对 IFT 运输复合体的研究主要是在衣藻上完成的,目前发现 IFT 复合体由超过 20 种 IFT 蛋白

## 1 Kinesin-2 家族成员介绍, 结构特征

Kinesin-2 家族成员主要包括 KIF3A, KIF3B, KIF3C 及 KIF17, 该家族成员在不同物种中的命名有些差异(表 1)。Kinesin-2 家族蛋白的共同结构特征为:具有结合微管能力的马达结构域均位于蛋白的 N 端, C 端具有货物蛋白的结合特性,而中间部分含有 Coiled-Coil 蛋白结构域以利于蛋白二聚化的形成。其中 KIF3A 可与 KIF3B(或 KIF3C)相互结合,同时其末端可与货物结合蛋白 KAP3 相互作用,形成 Kinesin-II 异源三聚体参与货物运输。KIF17 自身可以二聚化参与货物的运输<sup>[6]</sup>。但是这些运输方式并不是绝对的,比如细胞质蛋白 RNF33 的运输依赖于 KIF3A/KIF3B 二聚体的存在,但并不需要 KAP3<sup>[7]</sup>。此外, KIF3C 除与 KIF3A 结合外,也有独立于 KIF3A 运输之外的功能<sup>[8]</sup>,这些结果表明 Kinesin-2 蛋白家族功能及运输形式的多样性。

构成,其中包括由 6 个蛋白组成的 IFT-A 亚基和约 14 个蛋白组成的 IFT-B 亚基<sup>[10, 11]</sup>。IFT 蛋白复合体对纤毛内一些重要的结构蛋白(如 tubulin)的运输是必需的,而这种运输所需要的动力主要来自于 kinesin-2 蛋白。目前,衣藻中并没有发现类 KIF17 同源二聚体的存在, kinesin-II 异源三聚体是衣藻鞭毛中主要的运输复合体。衣藻 *fla10* 温度敏感型突变体在正常温度(22 度)可维持鞭毛正常的功能,在温度转变成 32 度时,随着 FLA10 蛋白的缺失, IFT

运输逐渐停止,衣藻鞭毛开始分解,并被重吸收至胞体内,而且,衣藻细胞无法产生新的鞭毛,说明 kinesin-2 复合体对于衣藻鞭毛的形成是必需的<sup>[12, 13]</sup>。衣藻 kinesin-2 不仅对鞭毛的形成及维持至关重要,在配子之间的结合过程中也发挥关键作用<sup>[14]</sup>。最近,在对衣藻 kinesin-2 蛋白 FLA8 的研究中,清华大学的 Liang 等<sup>[15]</sup>发现一个保守的丝氨酸(S663)磷酸化位点,该位点的磷酸化与否可调控 kinesin-2 与 IFT 蛋白的结合,进而调节 IFT 蛋白在鞭毛内的运输。

## 2.2 线虫—Kinesin-2 机制研究的奠基模型

对 kinesin-2 运输机理的研究最重要的贡献来自于对线虫嗅觉纤毛的研究。依据微管排列结构的差异,线虫嗅觉神经元的纤毛可分为近端区和远端区,其中近端区纤毛由 9 对微管二聚体组成,远端区由 9 支微管单体组成。在缺失 kinesin-II 的突变体中,线虫嗅觉神经元 ASH/ASI 纤毛的轴丝结构正常,而在缺失 Osm-3 的突变体中,该纤毛轴丝的远端区不能形成<sup>[16]</sup>,在同时缺失 kinesin-II 和 Osm-3 的突变体中,IFT 停止运输,纤毛轴丝完全缺失<sup>[17, 18]</sup>。Snow 等<sup>[18]</sup>设计了一系列精细的实验,利用荧光标记 IFT 蛋白,并对其在不同突变体内的运输进行活体观测,发现在线虫纤毛近端区 kinesin-II 异源复合体和 Osm-3 同源复合体协同参与物质运输,而在远端区则是 Osm-3 独自进行蛋白运输。kinesin-II 与 Osm-3 的运输速度也存在差异,荧光标记 IFT 的实验表明 kinesin-II 运输 IFT 的速度在 0.4 - 0.5  $\mu\text{m/s}$ ,而 Osm-3 的运输速度相对较快,约 1.1 - 1.3  $\mu\text{m/s}$ ,在 ASH/ASI 纤毛的近端区,kinesin-II 与 Osm-3 同时运输货物蛋白,运输速度处于两者单独运输的速度之间<sup>[18]</sup>。进一步研究发现,BBS 蛋白 BBS-7 和 BBS-8 在运输中起着稳定 IFT 蛋白复合体的作用<sup>[19]</sup>。当然,这种 kinesin-2 成员之间的协同运输机制并不是唯一的,在线虫的 AWB 神经元纤毛中,kinesin-II 和 Osm-3 具有相对独立的运输机制<sup>[20, 21]</sup>。对 IFT 蛋白复合体所运输的货物蛋白到底是什么,一直都缺乏一些直接的证据。Hao 等<sup>[22]</sup>筛选到了一批缺失 ASH/ASI 纤毛远端区的线虫突变体,并通过实验给出了令人信服的证据,证明纤毛轴丝的基本结构单位—tubulin,通过 IFT 蛋白复合体来运输。

## 2.3 斑马鱼—脊椎动物的理想模型

作为脊椎动物模型,斑马鱼在研究 kinesin-2 及

纤毛的发育机制方面具有独特的优势。斑马鱼具有人类多数的器官,纤毛结构与功能与人类类似,可以模拟纤毛缺陷所引起的多囊肾,视网膜凋亡,左右不对称缺陷,脑积水等多种疾病,是理想的研究人类纤毛疾病的模式生物。

在斑马鱼上,对 kinesin-2 蛋白功能的研究主要是通过突变体分析,目前我们及其他一些实验室已经鉴定出了 kinesin-2 家族的所有斑马鱼突变体。*j203* 是鉴定出的第一个斑马鱼 kinesin-2 突变体,在该突变体中由于 Kif3b 蛋白的突变导致嗅觉神经元、内耳 macula、神经丘(neuromast)以及原肾管处的纤毛缺失,表明 Kif3b 对于这些细胞内的纤毛发育所必需。另一方面,在感光细胞中,Kif3b 的缺失导致视杆细胞的快速凋亡,而视锥细胞则发育滞后,并与后期得到部分恢复,这可能与 Kif3c 的互补功能有关<sup>[23]</sup>。类似的,通过注射显性抑制型嵌合质粒抑制 Kif3b 的功能,也可以抑制感光细胞发育<sup>[24]</sup>。最近,我们发现在 *kif3b* 突变体中仍有相当一部分纤毛存在,包括神经系统中绝大多数神经细胞的纤毛以及内耳 crista 的纤毛等,这可能与 Kif3b 与 Kif3c 之间存在互补功能有关(未发表数据)。Kif3b 及 Kif3c 均通过 Kif3a 发挥运输功能,理论上如果敲除 Kif3a 可以起到同时抑制 Kif3b 及 Kif3c 的作用<sup>[8]</sup>。的确,在斑马鱼 *kif3a* 突变体中,所有的纤毛均不能正常形成(未发表数据),同时突变体具有明显的体轴弯曲和多囊肾现象<sup>[25]</sup>。

与线虫不同,斑马鱼 *kif17* 突变体未见明显发育异常,且可存活至成体,表明 Kif17 并非斑马鱼发育所必需<sup>[23]</sup>。在胚胎发育早期,*kif17* 突变体除嗅觉纤毛发育有细微缺陷外,未见其他纤毛的发育异常,同时对幼鱼及成体感光细胞染色也表明, Kif17 并非感光细胞存活所必需<sup>[23]</sup>。有趣的是,通过反义寡核苷酸(morpholino)抑制 Kif17 的实验表明, Kif17 蛋白是感光细胞外节段发育所必需<sup>[26]</sup>。突变体与 morpholino 敲降实验的差异可能与 morpholino 的非特异性有关<sup>[27]</sup>。但是,最近的研究发现基因敲除和基因敲降并不能完全等同<sup>[28]</sup>,也可能在 *kif17* 突变体中激活了一些下游的信号通路,导致胚胎发育的缺陷得到补救,而基因敲降并没有引起这些改变。进一步研究 *kif17* 突变体中 kinesin-II 相关基因的表达是否增加,运输机制是否增强将会对认识脊椎动物 kinesin-2 的作用机制有帮助。

## 2.4 小鼠—纤毛疾病的哺乳动物模型

小鼠是最重要的哺乳动物发育生物学模型,易于从事各种复杂的转基因操作和突变体研究。在小鼠中,对 kinesin-2 家族的研究也比较多。KIF3A 在小鼠中首先被 Kondo 等<sup>[29]</sup>发现,之后在对 *Kif3a* 突变的小鼠研究中,Marszalek 等<sup>[30]</sup>发现小鼠 *Kif3a* 突变体存在纤毛发育异常及体轴不对称缺陷,胚胎畸形并早期致死。鉴于 KIF3A 在胚胎发育中的重要功能,多个实验室利用条件敲除技术,对 KIF3A 在不同组织内的功能进行了研究,发现 KIF3A 突变与感光细胞凋亡,多囊肾以及骨骼发育缺陷等多种疾病密切相关<sup>[31-35]</sup>。上述发育缺陷与 KIF3A 在纤毛内的运输功能密切相关,近来研究发现,KIF3A 也存在一些非纤毛相关的作用机制,如参与调控 Wnt 信号途径,内耳细胞极性<sup>[36, 37]</sup>。

相对 KIF3A,对 KIF3B 及 KIF3C 的研究较少。KIF3B 在小鼠中首先被 Yamazaki 等<sup>[38]</sup>发现,并证明 KIF3B 与 KIF3A 可以相互结合参与物质运输。之后,Nonaka 等<sup>[39]</sup>构建了 *Kif3b* 突变体,证明 KIF3B 是小鼠 Node 处纤毛发生所必需的,其突变将导致 node 纤毛发育异常,进而影响胚胎早期左右不对称的发育。KIF3C 在小鼠中主要在神经系统中表达<sup>[40]</sup>,对其功能的研究也主要集中在神经系统方面。小鼠 *Kif3c* 突变体可以正常存活,说明 KIF3C 并非小鼠发育所必需的<sup>[41]</sup>。近期的研究表明 KIF3C 在调节微管的稳定性方面发挥作用,缺失 KIF3C 的突变体小鼠虽可正常存活,但在神经细胞受到损伤后,其再生功能受到明显抑制<sup>[42]</sup>。

小鼠 KIF17 的功能可能与斑马鱼类似,在纤毛发生方面并不具有明显的作用。对 KIF17 的研究主要集中在对其在海马神经元内的功能研究:小鼠 KIF17 可以在海马神经元中参与 NMDA 受体 NR2B 的运输,因此过量表达 KIF17 的转基因小鼠在记忆及行为测试能力方面得到显著增强,而 KIF17 敲除的小鼠虽然可以正常存活,但记忆能力明显降低<sup>[43-46]</sup>。

## 2.5 其他模型生物的研究

相对上述几种模式生物,kinesin-2 在其他模式生物中的研究相对较少,但也有一些重要的发现。比如,kinesin-2 蛋白最早是在海胆细胞中通过抗体纯化出来的<sup>[47]</sup>。而在果蝇上的研究表明 KLP64D/KIF3A 的缺失可导致胚胎过早死亡,原因可能与 kinesin-II 在弦音感觉器官(chordotonal organ)的原生

纤毛内的运输功能密切相关<sup>[48, 49]</sup>。值得注意的是,果蝇缺失 KLP64D 对精子的发育没有显著影响<sup>[48]</sup>。同时,与脊椎动物功能类似,kinesin-II 在果蝇上也参与了对 Wnt 信号通路的调控<sup>[2, 50]</sup>。

## 3 结论及展望

纤毛内蛋白的运输依赖于 kinesin-2 蛋白的存在,对其运输机制的研究对纤毛相关遗传疾病的机理研究和基因治疗具有重要的意义。虽然目前对 kinesin-2 家族在纤毛内的运输功能得到了认同,仍有许多问题需要解决。首先,脊椎动物的纤毛非常多样化,不同组织的纤毛是否具有不同的运输机制?虽然线虫的研究结果表明异源复合体(kinesin-II)和同源复合体(Osm-3)可协同参与纤毛内的运输,但这种运输方式在脊椎动物中是否存在仍不明确。同时,斑马鱼和小鼠中的研究表明 KIF17 与纤毛的形成并无直接的联系,说明脊椎动物纤毛内的运输机制与线虫并不相同。未来对 kinesin-2 家族成员在不同组织纤毛内的运输机理研究将显得非常重要,因为这些研究将对进一步认识纤毛疾病的组织器官特异性提供理论依据;其次,越来越多的实验表明,kinesin-2 成员除了参与纤毛内的运输之外,在细胞极性的形成,有丝分裂过程,黑色素的运输,神经轴突的发育以及 RNA 的运输等多个方面发挥作用,说明 kinesin-2 家族成员的功能非常多样化,这些功能与 kinesin-2 在纤毛内的运输功能是否存在差异,还需要进一步的研究去验证。此外,纤毛内除了 kinesin-2 是否还有其他 kinesin 的存在?目前在纤毛中已经发现 kinesin-3 家族成员 KLP-6 参与了 IFT 的运输,该蛋白是否在脊椎动物纤毛中有类似的机制还不清楚<sup>[21]</sup>。同时,一些参与调控微管长度的 kinesin,包括 KIF19A, KIF7 以及 KIF24 等<sup>[51-53]</sup>,它们是如何与 kinesin-2 蛋白相互协调控制纤毛发育的,也是未来的一个研究方向。

## 参 考 文 献

- [1] Hirokawa N, Tanaka Y. Kinesin superfamily proteins (KIFs): Various functions and their relevance for important phenomena in life and diseases [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 334(1):16-25.
- [2] Satir P, Christensen ST. Overview of structure and function of mammalian cilia [J]. *Annual Rev Physiol*, 2007, 69:377-400.
- [3] Goetz SC, Anderson KV. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development [J]. *Nature Rev Genet*, 2010, 11(5):331-344.
- [4] Oh EC, Katsanis N. Cilia in vertebrate development and disease

- [J]. Development, 2012, 139(3):443–448.
- [ 5 ] Hildebrandt F, Benzing T, Katsanis N. Ciliopathies [J]. New Engl J Med, 2011, 364(16):1533–1543.
- [ 6 ] Scholey JM. Kinesin-2: a family of heterotrimeric and homodimeric motors with diverse intracellular transport functions [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2013, 29:443–469.
- [ 7 ] Huang CJ, Huang CC, Chang CC. Association of the testis-specific TRIM/RBCC protein RNF33/TRIM60 with the cytoplasmic motor proteins KIF3A and KIF3B [J]. Mol Cellular Biochem, 2012, 360(1–2):121–131.
- [ 8 ] Muresan V, Abramson T, Lyass A *et al.* KIF3C and KIF3A form a novel neuronal heteromeric kinesin that associates with membrane vesicles [J]. Mol Biol Cell, 1998, 9(3):637–652.
- [ 9 ] Kozminski KG, Johnson KA, Forscher P *et al.* A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating [J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 1993, 90(12):5519–5523.
- [10] Cole DG, Snell WJ. Snap shot: Intraflagellar transport [J]. Cell, 2009, 137(4):784–784 e781.
- [11] Taschner M, Bhogaraju S, Lorentzen E. Architecture and function of IFT complex proteins in ciliogenesis [J]. Different Res Biol Diversity, 2012, 83(2):S12–22.
- [12] Kozminski KG, Beech PL, Rosenbaum JL. The Chlamydomonas kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane [J]. J Cell Biol, 1995, 131(6 Pt 1):1517–1527.
- [13] Walther Z, Vashishtha M, Hall JL. The Chlamydomonas FLA10 gene encodes a novel kinesin-homologous protein [J]. J Cell Biol, 1994, 126(1):175–188.
- [14] Pan J, Snell WJ. Kinesin-II is required for flagellar sensory transduction during fertilization in Chlamydomonas [J]. Mol Biol Cell, 2002, 13(4):1417–1426.
- [15] Liang Y, Pang Y, Wu Q *et al.* FLA8/KIF3B phosphorylation regulates kinesin-II interaction with IFT-B to control IFT entry and turnaround [J]. Dev Cell, 2014, 30(5):585–597.
- [16] Perkins LA, Hedgecock EM, Thomson JN *et al.* Mutant sensory cilia in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Dev Biol, 1986, 117(2):456–487.
- [17] Pan X, Ou G, Civelekoglu-Scholey G *et al.* Mechanism of transport of IFT particles in *C. elegans* cilia by the concerted action of kinesin-II and OSM-3 motors [J]. J Cell Biol, 2006, 174(7):1035–1045.
- [18] Snow JJ, Ou G, Gunnarson AL *et al.* Two anterograde intraflagellar transport motors cooperate to build sensory cilia on *C. elegans* neurons [J]. Nature Cell Biol, 2004, 6(11):1109–1113.
- [19] Ou G, Blacque OE, Snow JJ *et al.* Functional coordination of intraflagellar transport motors [J]. Nature, 2005, 436(7050):583–587.
- [20] Mukhopadhyay S, Lu Y, Qin H *et al.* Distinct IFT mechanisms contribute to the generation of ciliary structural diversity in *C. elegans* [J]. EMBO J, 2007, 26(12):2966–2980.
- [21] Morsci NS, Barr MM. Kinesin-3 KLP-6 regulates intraflagellar transport in male-specific cilia of *Caenorhabditis elegans* [J]. Curr Biol: CB, 2011, 21(14):1239–1244.
- [22] Hao L, Thein M, Brust-Mascher I *et al.* Intraflagellar transport delivers tubulin isotypes to sensory cilium middle and distal segments [J]. Nature Cell Biol, 2011, 13(7):790–798.
- [23] Zhao C, Omori Y, Brodowska K *et al.* Kinesin-2 family in vertebrate ciliogenesis [J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2012, 109(7):2388–2393.
- [24] Insinna C, Humby M, Sedmak T *et al.* Different roles for KIF17 and kinesin II in photoreceptor development and maintenance [J]. Dev Dyn, 2009, 238(9):2211–2222.
- [25] Ryan S, Willer J, Marjoram L *et al.* Rapid identification of kidney cyst mutations by whole exome sequencing in zebrafish [J]. Development, 2013, 140(21):4445–4451.
- [26] Insinna C, Pathak N, Perkins B *et al.* The homodimeric kinesin, Kif17, is essential for vertebrate photoreceptor sensory outer segment development [J]. Dev Biol, 2008, 316(1):160–170.
- [27] Kok FO, Shin M, Ni CW *et al.* Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish [J]. Dev Cell, 2015, 32(1):97–108.
- [28] Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C *et al.* Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns [J]. Nature, 2015, 524:230–233.
- [29] Kondo S, Sato-Yoshitake R, Noda Y *et al.* KIF3A is a new microtubule-based anterograde motor in the nerve axon [J]. J Cell Biol, 1994, 125(5):1095–1107.
- [30] Marszalek JR, Ruiz-Lozano P, Roberts E *et al.* Situs inversus and embryonic ciliary morphogenesis defects in mouse mutants lacking the KIF3A subunit of kinesin-II [J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 1999, 96(9):5043–5048.
- [31] Marszalek JR, Liu X, Roberts EA *et al.* Genetic evidence for selective transport of opsin and arrestin by kinesin-II in mammalian photoreceptors [J]. Cell, 2000, 102(2):175–187.
- [32] Koyama E, Young B, Nagayama M *et al.* Conditional Kif3a ablation causes abnormal hedgehog signaling topography, growth plate dysfunction, and excessive bone and cartilage formation during mouse skeletogenesis [J]. Development, 2007, 134(11):2159–2169.
- [33] Liu B, Chen S, Johnson C *et al.* A ciliopathy with hydrocephalus, isolated craniosynostosis, hypertelorism, and clefting caused by deletion of Kif3a [J]. Reprod Toxicol, 2014, 48:88–97.
- [34] Lin F, Hiesberger T, Cordes K *et al.* Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease [J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2003, 100(9):5286–5291.
- [35] Qiu N, Xiao Z, Cao L *et al.* Disruption of Kif3a in osteoblasts results in defective bone formation and osteopenia [J]. J Cell Sci, 2012, 125(Pt 8):1945–1957.
- [36] Sipe CW, Lu X. Kif3a regulates planar polarization of auditory hair cells through both ciliary and non-ciliary mechanisms [J]. Development, 2011, 138(16):3441–3449.

- [37] Corbit KC, Shyer AE, Dowlle WE *et al.* Kif3a constrains beta-catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms [J]. *Nature Cell Biol*, 2008, 10(1):70–76.
- [38] Yamazaki H, Nakata T, Okada Y *et al.* KIF3A/B: a heterodimeric kinesin superfamily protein that works as a microtubule plus end-directed motor for membrane organelle transport [J]. *J Cell Biol*, 1995, 130(6):1387–1399.
- [39] Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y *et al.* Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein [J]. *Cell*, 1998, 95(6):829–837.
- [40] Yang Z, Goldstein LS. Characterization of the KIF3C neural kinesin-like motor from mouse [J]. *Mol Biol Cell*, 1998, 9(2):249–261.
- [41] Yang Z, Roberts EA, Goldstein LS. Functional analysis of mouse kinesin motor Kif3C [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(16):5306–5311.
- [42] Gumy LF, Chew DJ, Tortosa E *et al.* The kinesin-2 family member KIF3C regulates microtubule dynamics and is required for axon growth and regeneration [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(28):11329–11345.
- [43] Yin X, Takei Y, Kido MA *et al.* Molecular motor KIF17 is fundamental for memory and learning via differential support of synaptic NR2A/2B levels [J]. *Neuron*, 2011, 70(2):310–325.
- [44] Guillaud L, Setou M, Hirokawa N. KIF17 dynamics and regulation of NR2B trafficking in hippocampal neurons [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(1):131–140.
- [45] Wong RW, Setou M, Teng J *et al.* Overexpression of motor protein KIF17 enhances spatial and working memory in transgenic mice [J]. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 2002, 99(22):14500–14505.
- [46] Setou M, Nakagawa T, Seog DH *et al.* Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport [J]. *Science*, 2000, 288(5472):1796–1802.
- [47] Cole DG, Chinn SW, Wedaman KP *et al.* Novel heterotrimeric kinesin-related protein purified from sea urchin eggs [J]. *Nature*, 1993, 366(6452):268–270.
- [48] Sarpal R, Todi SV, Sivan-Loukianova E *et al.* Drosophila KAP interacts with the kinesin II motor subunit KLP64D to assemble chordotonal sensory cilia, but not sperm tails [J]. *Cur Biol*, 2003, 13(19):1687–1696.
- [49] Ray K, Perez SE, Yang Z *et al.* Kinesin-II is required for axonal transport of choline acetyltransferase in Drosophila [J]. *J Cell Biol*, 1999, 147(3):507–518.
- [50] Vuong LT, Mukhopadhyay B, Choi KW. Kinesin-II recruits Armadillo and Dishevelled for Wingless signaling in Drosophila [J]. *Development*, 2014, 141(16):3222–3232.
- [51] Niwa S, Nakajima K, Miki H *et al.* KIF19A is a microtubule-depolymerizing kinesin for ciliary length control [J]. *Dev Cell*, 2012, 23(6):1167–1175.
- [52] He M, Subramanian R, Bangs F *et al.* The kinesin-4 protein Kif7 regulates mammalian Hedgehog signalling by organizing the cilium tip compartment [J]. *Nature Cell Biol*, 2014, 16(7):663–672.
- [53] Kobayashi T, Tsang WY, Li J *et al.* Centriolar kinesin Kif24 interacts with CP110 to remodel microtubules and regulate ciliogenesis [J]. *Cell*, 2011, 145(6):914–925.

[收稿日期] 2015-08-07



# 模式动物斑马鱼在组织屏障发育及功能研究中的进展

李强<sup>1</sup>, 张晶晶<sup>1,2\*</sup>

(1. 广东医学院附属医院神经内科, 广东 湛江 524001; 2. 广东医学院附属医院临床医学研究中心, 广东 湛江 524001)

**【摘要】** 斑马鱼作为一种新型的模式动物,以其独特的优势,已经成为现代遗传学、发育生物学等研究的重要模式生物。与人类及其他高等脊椎动物相似,斑马鱼同样具有不同的组织屏障系统。近年来,此领域的研究者利用斑马鱼对血脑屏障等组织屏障的研究取得了重要的进展。这对揭示诸多生理屏障相关的人类疾病的发病机制,以及探讨通过调控组织屏障通透性来达到药物有效投递的可行性等研究具有重要的启示作用。本文将介绍近年来斑马鱼作为模式动物在血脑屏障、血-视网膜屏障、皮肤表皮屏障、肠黏膜上皮屏障等组织屏障发育和功能研究中的最新进展。

**【关键词】** 斑马鱼;组织屏障;血脑屏障;发育;疾病发生

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0523-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.016

## Research progress on the development and functions of tissue barriers using zebrafish model

LI Qiang<sup>1</sup>, ZHANG Jing-jing<sup>1,2</sup>

(1. Department of Neurology; 2. Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang Guangdong 524001, China)

**【Abstract】** Zebrafish has been widely used as an important model system in research fields of genetic and developmental biology over the past 20 years. Similar to the mammals and other vertebrate animals, zebrafish also has various tissue barriers. In recent years, more and more important progress of tissue barrier studies have been achieved using zebrafish as *in vivo* model, such as blood-brain barrier. These findings contribute to the understanding of the mechanisms of diseases caused by the disorders of physiological barriers. It also helps with the modulation of the permeability of tissue barriers for drug delivery. This review summarizes recent progress of zebrafish applications in the study of tissue barriers, such as blood-brain barrier, blood-retina barrier, epidermal barrier, etc.

**【Key words】** Zebrafish; Tissue barrier; Blood-brain barrier; Development; Pathogenesis.

斑马鱼起源于印度,属辐鳍亚纲鲤科短担尼鱼属,是国际标准化组织认可的5种鱼类实验动物之一。斑马鱼繁殖能力强,能够体外受精和发育,其胚胎发育速度快,繁殖周期短,且胚胎和幼鱼身体透明,便于形态学观察。1981年, Oregon 大学的 George Streisinger<sup>[1]</sup>首次介绍了斑马鱼实验技术方法,为人类利用斑马鱼作为模式动物研究人类疾病的发病机制、寻找疾病治疗方法奠定了基础。经过

30余年的发展,斑马鱼已成为可运用于遗传、发育、药理学和毒理学等多领域研究的重要模式生物。斑马鱼基因测序工程的完成,揭示其基因组与人类基因组的相似性高达87%,与人类有着相似的病理特征和信号传导通路,同时斑马鱼大部分组织器官在解剖学、生理学和分子水平上已被证实与哺乳动物类似,这就意味着利用斑马鱼可以作为研究大多数人类疾病的模式生物。本文拟对近年来斑马鱼在血脑

**【基金项目】** 国家自然科学基金(31370824,81102524);广东省“培养高层次人才特殊支持计划”专项基金(粤人才办[2015]8号)。

**【作者简介】** 李强,男,硕士研究生,研究方向:脑组织屏障,E-mail: 330938901@qq.com。

**【通讯作者】** 张晶晶,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:发育神经生物学。E-mail: gdmccrc@163.com。

屏障、血-视网膜屏障、皮肤表皮屏障、肠黏膜上皮屏障等组织屏障中的最新研究进展作一综述。

## 1 组织屏障简介

组织屏障是生物种系在长期进化过程中形成的机体抵抗外来有害物质(特别是细菌、病毒等微生物)入侵机体的重要结构,对维持机体内环境的稳定、各器官的功能以及正常的生命活动具有重要的作用。在人体内,组织屏障主要包括血脑屏障、血-视网膜屏障、皮肤上皮屏障、肠黏膜上皮屏障等。虽然这些屏障的功能各不相同,但主要都是由紧密连接(tight junction, TJ)、粘附连接(adhesion junction, AJ)和桥粒等结构组成,这些结构相互联系、相互作用,共同形成完整的屏障结构,对机体发挥重要的保护作用。

### 1.1 紧密连接

紧密连接主要由跨膜蛋白和胞质附着蛋白两种成分构成,是构成组织屏障的重要结构,位于两个相邻内皮或上皮细胞间,能够封闭细胞间隙,使相邻的细胞紧密贴合在一起,形成细胞间天然的物理屏障,起着选择性通透、维持细胞极性和细胞内环境稳态的作用。除此之外,最近的研究显示,TJ还参与上皮细胞增殖分化、基因的转录和调控等活动<sup>[2,3]</sup>。TJ跨膜结构主要由跨膜蛋白 occludin, claudin 和连接黏附分子(junction adhesion molecules, JAMs)组成。其中 claudin 和 occludin 起主要作用,尤以 claudin 的功能最为重要,它是构成紧密连接的主要骨架蛋白<sup>[4]</sup>,能与 TJ 的其他成分共同作用,形成 TJ 嵴线。1998 年,日本的 Shoichiro Tsukita 研究团队首次发现并报道了 claudin1 和 claudin2 为 TJ 嵴线的整体成分<sup>[5]</sup>。之后的研究表明,claudin 为多基因家族,至今,已有 20 多个 claudin 家族的成员在人类和小鼠体内被发现<sup>[6]</sup>,50 余个在斑马鱼中被发现<sup>[7]</sup>。利用小鼠等哺乳动物细胞模型研究显示,不同 claudin 成员在各种组织中的分布及功能不同。TJ 中每一种 claudin 都有自己独特的细胞间隙离子选择性<sup>[8]</sup>,这种独特的选择性增加了紧密连接的结构和功能的多样性,为不同组织类型屏障功能的多样性提供了分子学依据。同时,同种或异种的 claudin 可形成聚合体并与邻近的 claudin 相互作用构成胞间连接骨架。不同的 claudin 亚型对细胞间隙渗透性的调控通常不同的,这可能是由于表达不同 claudin 的内皮细胞和上皮细胞的不同属性决定的<sup>[9,10]</sup>。也

有证据显示某些 claudin 的亚型能够形成特殊的孔或离子通道,用来调节离子的转运<sup>[11,12]</sup>。在对模式动物斑马鱼的研究中发现,许多在人体和小鼠中表达的 claudin 蛋白也能够在斑马鱼体内检测到,如 claudin5a 主要分布在斑马鱼脑腔内,claudin-b 在斑马鱼皮肤表皮屏障形成过程中起着重要的作用。除此之外,claudin-1, -2, 7, -10, -11, -12, -h, -e, -d, -c 等 claudin 家族的其他成员也先后在斑马鱼体内被检测到<sup>[13]</sup>,这使得斑马鱼成为研究细胞间紧密连接的重要模式动物,从而为我们进一步研究组织屏障的功能和调节提供了一种很好动物模型。

### 1.2 粘附连接

粘附连接是相邻细胞通过细胞膜蛋白相互连接,在  $Ca^{2+}$  的参与下,由单次跨膜的 cadherin 介导,在细胞膜的胞质区域通过多种蛋白与微丝相连接形成贯穿相邻细胞的细胞连接,包括与邻近上皮细胞形成的粘着带以及与成熟成纤维细胞形成的粘着斑。AJ 是不同类型细胞中均普遍存在的一种细胞与细胞之间连接的结构<sup>[14]</sup>,在细胞与细胞的粘附中起着关键作用。AJ 需要  $Ca^{2+}$  的参与,由相邻细胞通过细胞膜的表面蛋白相互连接。目前已发现参与粘附连接形成的蛋白主要包括钙粘蛋白家族(cadherin family)、连接素家族(nectin family)以及与 claudin、occludin 和 JAM 一起构成细胞粘附分子(cell adhesion molecules, CAMs)家族。其中形成粘附连接的钙粘蛋白 cadherin 是钙离子依赖性的介导同质性细胞粘附的单次跨膜糖蛋白,主要包括 E-cadherin, N-cadherin 和 P-cadherin 三种,在粘附连接复合体中起着关键作用<sup>[15]</sup>。然而,E-cadherin 是上皮细胞主要的钙粘蛋白,广泛分布于成熟组织和胚胎的上皮组织中,在组织形成、胚胎发育、细胞粘附和细胞间信息传递等多种生物学过程中起着重要的调控作用;N-cadherin 主要表达于神经和肌肉组织的细胞内;而 P-cadherin 则主要表达在胚胎细胞中。此外,钙粘蛋白还存在很多种亚型,如 K-cadherin (kidney-cadherin) 和 R-cadherin (retinal-cadherin) 等。经研究发现,人 E-cadherin 基因编码 882 个氨基酸,分子量约  $100 \times 10^3$ ,分为胞外区、跨膜区和胞内区三部分。其中胞内结构域上含有 p120-catenin 结合位点和  $\beta$ -catenin 结合位点,可通过  $\beta$ -catenin 等锚定蛋白与 F-actin 细胞骨架相连<sup>[16]</sup>;而胞外区含有 5 个由 110 个氨基酸组成的同源重复序列结构域(EC1-EC5),每个重复序列均有独立的钙

离子结合位点,能够形成依赖钙离子的同源二聚体,从而与邻近细胞的同种分子形成特异的相互作用。在对斑马鱼的研究中也发现,如 cadherin-6,在斑马鱼视网膜的形成过程中具有重要的作用<sup>[17]</sup>,这说明 E-cadherin 对调节细胞之间粘附的发生起着重要作用<sup>[18]</sup>。连接素家族蛋白是  $Ca^{2+}$  非依赖的免疫球蛋白样细胞粘附分子,包括四个成员,分别为 nectin-1, nectin-2, nectin-3, nectin-4,其中,nectin-1, nectin-2, nectin-3 又分别因剪切方式的不同而产生多种亚型<sup>[19]</sup>。

## 2 内皮屏障系统

内皮屏障系统主要是由内皮细胞和基膜构成。通过对小鼠等哺乳动物的研究显示,血管内皮屏障系统的调节机制非常复杂,对机体具有重要的作用。通过对血管通透性的研究显示,许多有害因素均可损伤血管内皮细胞,导致其通透性改变,引起组织、器官水肿和功能障碍;通过对这些有害因素对内皮屏障系统的损伤,能使我们对这些有害因素的损伤机制及药物治疗进行更深入的研究。模式动物斑马鱼体内的内皮屏障系统主要包括血脑屏障及血-视网膜两大内皮屏障系统,下面就这两大系统做主要介绍。

### 2.1 血脑屏障

血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 是位于血液与神经细胞之间,系由脑毛细血管内皮细胞和内皮细胞的紧密连接、星形胶质细胞以及基底膜所组成的一个细胞联合体。它对维持中枢神经系统的内环境稳定起着重要作用。脑毛细血管内皮细胞没有窗孔,缺少收缩性蛋白,彼此之间能够形成较严密的紧密连接,从而构成一个物理屏障,使蛋白质分子及其他大分子物质难以透过,也可限制离子和非电解质通过。研究表明,TJ 存在孔通道和渗漏通道,它们具有不同的结构基础和调节机制。其中孔通道为离子选择性通道,主要由 claudin 胞外环状结构域决定其离子选择性。渗漏通道则主要与大分子物质转运有关。两种通道能够通过各自的调节机制影响 TJ 对物质的渗透性。因此,TJ 被认为是血脑屏障功能发挥作用的重要结构基础。

近年来,斑马鱼逐渐成为研究血脑屏障形成和发育以及药物渗透作用的一种理想的模式动物。Isogai 等<sup>[20]</sup>利用微血管造影术研究注射 Berlin-blue 染料的 1 dpf - 7 dpf (受精后天数,days post fertiliza-

tion, dpf) 的斑马鱼,结果表明斑马鱼循环系统在 24 hpf (受精后小时数, hours post fertilization, hpf) 左右出现。此期间斑马鱼的血管形成过程是高度动态变化的,但又遵循相对固定的模式。Jeong 等<sup>[21]</sup>利用辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 进行血管内注射的观察结果表明,斑马鱼同其他脊椎动物一样,具有以内皮细胞为基础的血脑屏障。2.5 dpf 之前,其头部主要血管形成为血管发生方式,自此之后,一定数量的中央动脉开始刺入脑实质,大量的微血管网开始形成。随着血管网的逐渐形成,血脑屏障也开始发育,并逐渐形成。Claudin-5 和 ZO-1 在表达增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescence protein, EGFP) 的微血管的内皮细胞中检测到,这表明在 3 dpf 时斑马鱼已具备以 TJ 为基础的血脑屏障,而斑马鱼的这种循环系统,能够为其早期发育提供重要保障。

Claudin-5 是构成血脑屏障紧密连接的重要蛋白,其在斑马鱼血脑屏障的形成过程中起着非常重要的作用。在斑马鱼体内共检测到两种 claudin-5,分别是 claudin-5a 和 claudin-5b,且两者具有高度的同源性。Xie 等<sup>[22]</sup>通过建立双转基因斑马鱼 Tg (*l-fabp*:*DBP-EGFP*) 模型,将荧光染料注入不同时期的斑马鱼胚胎,通过对斑马鱼胚胎期前 4 天 claudin-5a 和 claudin-5b 的检测,进一步证实斑马鱼血脑屏障开始发育是在 3 dpf。Zhang 等<sup>[23]</sup>通过对斑马鱼脑室形成和发育的研究,发现 claudin-5a 与脑室膨胀有密切关系,而脑室膨胀则是形成血脑屏障最至关重要的一步,claudin-5a 缺失会影响斑马鱼神经内皮细胞旁路的屏障功能,并导致紧密连接不完整和脑室膨胀障碍,从而导致血脑屏障的形成障碍。此外,claudin-5b 能够特异性的分布在脉管系统,有研究表明 claudin-5b 在节间血管 (intersegmental vessel, IVS) 的生成过程中起着重要的作用<sup>[24]</sup>,但其在血脑屏障中的作用需进一步研究。除了 claudin-5 之外,claudin 家族的其他成员 (如 claudin-1, -j, -7, -10, -11, -12, -e, -d) 也在斑马鱼脑内被发现,但在斑马鱼血脑屏障的发育形成过程的具体作用目前还需进一步研究<sup>[13]</sup>。

ZO-1 (zonula occludens-1) 既是组成 AJ 的主要结构,也是构成 TJ 的重要成分之一,为 TJ 的许多跨膜蛋白和细胞质紧密连接蛋白搭建具有连接作用的脚手架样平台。有研究发现,由于 ZO-1 结构和功能与紧密连接的其他成员密切相关,多数情况下只要

ZO-1 受到破坏,紧密连接的功能多随之发生变化。通过对模式动物斑马鱼血脑屏障的研究发现,从 3 dpf 开始,在斑马鱼鱼卵的大脑微血管中就可检测到 ZO-1 蛋白,并且该蛋白伴随血脑屏障成熟的整个过程这再一次证实斑马鱼血脑屏障开始发育是在 3 dpf<sup>[21]</sup>。

Occludin 是第一个被鉴定出来的跨膜蛋白<sup>[25]</sup>。目前认为,其主要功能可能是参与调控 TJs 间的信号转导<sup>[2]</sup>。但其在斑马鱼血脑屏障中的作用尚需进一步证实。

## 2.2 血-视网膜屏障

血-视网膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)由视网膜血管和视网膜色素上皮共同组成。视网膜毛细血管内皮则形成血-视网膜内屏障(blood-retinal inner barrier),视网膜色素上皮则形成血-视网膜外屏障(blood-retinal outer barrier)。屏障功能依赖于紧密连接,限制细胞间水溶性分子的运动,防止这些分子进入视网膜。电子显微镜显示围绕视网膜毛细血管内皮细胞和视网膜色素上皮顶端有大量阻塞小带,大分子和离子不能从循环中被动的扩散进入视网膜,但可与选择性的主动运输联系起来。斑马鱼眼的发育与人类非常相似,经过数十年的研究,已逐渐成为研究血-视网膜屏障的理想模式动物。Alvarez 等通过对斑马鱼视网膜血管发育过程的研究发现,在透明血管发育成视网膜血管的过程中,血管并未退化。同时,成年斑马鱼的视网膜血管内皮细胞及其周围细胞具有紧密连接结构<sup>[26,27]</sup>。有研究显示,在斑马鱼受精后 3 dpf,其眼内的血管中即可检测到紧密连接蛋白 claudin-5,这表明斑马鱼 BRB 形成与 BBB 一样,亦是在受精后 3 天(3 dpf),同时通过对 ZO-1 蛋白的检测,发现 ZO-1 在眼内的表达比 claudin-5 更早<sup>[22]</sup>。除了 claudin 蛋白之外, cadherin 也在斑马鱼视网膜形成中具有重要作用。Liu 等通过对斑马鱼视网膜的发育过程的研究发现,在斑马鱼受精后 32 h,便可在斑马鱼的视神经和视网膜前腹侧区域检测到 cadherin-6,而此区域是视网膜细胞最早分化的区域,若阻止 cadherin-6 的表达,则会导致视网膜细胞的形成障碍<sup>[19]</sup>。

## 3 上皮屏障系统

上皮屏障系统主要是由上皮细胞和基膜等结构构成,能够通过相邻细胞间的相互连接而形成屏障,使机体免受外来有害物质的损伤,对维持机体的内

环境稳定具有重要的作用。目前在斑马鱼系统中研究较多的上皮屏障主要有皮肤表皮屏障及肠黏膜上皮屏障,下面就这两种屏障做进一步介绍。

### 3.1 皮肤表皮屏障

斑马鱼表皮为其内部结构和外界环境提供了一个必要的屏障结构,在胚胎期 14 hpf,表皮即可完全包裹胚胎<sup>[28]</sup>,随着胚胎的发育,其角质形成细胞也逐渐增殖,可在成鱼时分化形成三层:外层,中间层及基底层<sup>[29]</sup>,但各层间相互粘连,形成 TJ。Raymond 等使用反向遗传法阻止斑马鱼幼鱼 claudin-b 蛋白的翻译,发现 claudin-b 敲低后导致斑马鱼幼鱼皮肤表皮细胞间隙的渗透性增加,Na<sup>+</sup> 丢失,使整个机体的 Na<sup>+</sup> 减少,但 Cl<sup>-</sup> 并未发生明显改变,从而证明了 claudin-b 在调节斑马鱼皮肤上表皮细胞渗透性和 Na<sup>+</sup> 转运中起着重要的作用<sup>[30]</sup>。Zhang 等<sup>[31]</sup>利用仅含 194 到 319 位氨基酸的产气荚膜梭菌内毒素(cCPE<sub>194-319</sub>)肽段来调控斑马鱼幼鱼表皮的渗透性,发现 cCPE<sub>194-319</sub> 能够特定的从上皮细胞移走 claudin-b,使单层细胞的紧密连接中断。通过 4 kDa 荧光染料扩散实验分析发现表皮屏障的渗透性增加主要是因为 cCPE<sub>194-319</sub> 导致的,电子显微镜结果显示移除 cCPE<sub>194-319</sub> 能够使上皮细胞间的 TJs 结构恢复。以上结果表明使用 cCPE<sub>194-319</sub> 能够调控 claudin-b 从而控制表皮屏障的瞬时开关,这就使得斑马鱼可以作为新的模式动物,来研究借助 cCPE 提高药物通过组织屏障的可能性。除此之外,Kiener 等<sup>[32]</sup>通过对斑马鱼胚胎期表皮屏障形成过程的研究发现,Tjp/ZO-3 首先是在其胚胎的周围层(enveloping layer, EVL)被检测到,阻止 Tjp/ZO-3 的表达,将会导致 EVL 的发育缺陷,从而导致胚胎对渗透压力的敏感性增加。因此 Tjp/ZO-3 在斑马鱼胚胎期表皮屏障的功能也具有重要作用。

### 3.2 肠黏膜上皮屏障

人体肠道内栖息着大量的微生物,这些微生物在长期进化过程中和宿主形成了共生关系。正常情况下并不损害机体健康,这完全依赖机体完整的肠道黏膜屏障功能。在正常情况下,肠道的屏障作用可有效的阻挡肠道内 500 多种、浓度高达 10<sup>12</sup> 个/g 的肠道内寄生菌及其毒素向肠腔外组织、器官移位,防止机体受内源性微生物及其毒素的侵害。肠道黏膜屏障主要是由机械屏障、免疫屏障、化学屏障和生物屏障四部分组成,其中以机械屏障及免疫屏障最为重要。成年斑马鱼没有胃,其肠道分为前肠、中肠

和后肠,通过免疫组织化学检测发现其肠道上皮结构主要由柱状细胞、杯状细胞及内分泌细胞等组成,细胞之间由 TJs、AJs 组成物理屏障以限制肠腔内容物进入机体。斑马鱼的消化系统的快速发育大约是在 18 hpf<sup>[33]</sup>,其肠管逐渐形成,随着肠道与外界环境相通,微生物也逐渐进入斑马鱼肠道内。Wallace 等<sup>[34]</sup>通过对斑马鱼肠道形成及发育的研究发现,在斑马鱼 50 hpf 时,大多数肠道上皮细胞即可观察到散乱的 ZO-1,在 74 hpf, ZO-1 更加明显。在这个时期,通过电子显微镜可观察到上皮细胞间的桥粒。有研究表明<sup>[35]</sup>,由免疫细胞和上皮细胞分泌的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF),若其分泌过多,可导致斑马鱼肠上皮屏障功能障碍,从而导致炎症性肠病(inflammatory bowel diseases, IBD) 的发生。该结果说明, TNF 对维持肠道的屏障功能具有重要的作用。

#### 4 利用斑马鱼进行其他组织屏障的研究

斑马鱼作为研究组织屏障结构和功能的理想模式动物,除上述几种组织屏障外,斑马鱼体内还存在肾小球滤过屏障,能够为肾脏发育和功能的研究提供一个适用的生物模型。斑马鱼肾脏结构较为简单,其幼鱼的前肾仅由 2 个肾单位组成,并通过 2 个肾小管连接其肾小球与前肾导管,前肾导管在尾部汇合通到泄殖腔。斑马鱼的肾小球由有孔的毛细血管内皮细胞、毛细血管基底膜(GBM)、足细胞等组成,具有与高等脊椎动物肾脏一样的细胞组成。Kramer 等<sup>[36]</sup>学者通过对斑马鱼肾小球电子显微镜观察,结果表明,斑马鱼足细胞在足状凸起部分形成的隔膜类似于哺乳动物肾脏足细胞,并已证明,斑马鱼在 24 hpf 时期的同源基因 podocin 和 nephrin 均能够特异表达于足细胞中,且该基因在肾脏足细胞隔膜的形成中是必不可少的。

Majumdar 等研究发现,肾小球毛细血管内皮细胞表达 VEGF 受体和其早期标志物 flk-1,而 flk-1 阳性的内皮细胞能够侵入肾小球上皮细胞形成肾小球毛细血管祥。但是当背脊动脉发育发生缺陷而无法形成正常的肾小球脉管系统时,足细胞仍然能够继续表达 WT1 和 VEGF,从该结果推断,足细胞似乎能够从附近的静脉俘获 flk-1 阳性的内皮细胞以形成具有功能的肾小球。可见,足细胞通过表达 VEGF 在吸引和聚集肾小球毛细血管丛的形成中起着重要作用<sup>[38]</sup>。此外, Serluca 等<sup>[37]</sup>研究表明,血管

流量及肾小球基底膜的降解与再塑<sup>[38]</sup>也是毛细血管形成过程中的两个必需因素。

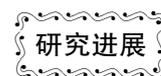
#### 5 总结

人体时刻都与外界接触并进行物质交换,为了防范外界不良因素对机体的侵犯,人体具有数重天然保护性“墙”——组织屏障,作为阻止外来有害物质入侵机体的重要结构。斑马鱼各组织屏障的发育形成过程及结构功能同哺乳动物相似,这就使得斑马鱼成为研究组织屏障结构、功能的理想模型。通过电镜技术及分子生物学技术研究发现,斑马鱼组织屏障主要是由 TJ、AJ、桥粒等结构组成,而这些结构主要是由 occludin, claudin, cadherin, ZO 等蛋白组成,这些蛋白伴随着各组织屏障发育形成的全过程。对这些蛋白形成过程、结构和功能的研究,使得我们对早期发现疾病、研究疾病的发病机制及药物如何通过这些屏障到达靶器官提供了重要的基础。随着免疫荧光技术的发展、转基因斑马鱼模型的建立,世界各国科学工作者在研究组织屏障中也取得了重大的成果。尽管如此,由于各连接蛋白家族数量众多且功能不尽相同,各组织屏障所表达的连接蛋白又各不相同,这就为我们如何发现各组织屏障中的关键蛋白带来难题。虽然有的屏障结构研究日渐清晰,但其与疾病的发生、发展关系仍需进一步探究。如何利用这些研究成果,使药物能够更加容易通过这些屏障结构,从而达到治疗疾病的目的仍待解决。且这些研究成果都是通过动物模型研究所得,在应用于人类时是否具有差异性,仍需继续研究。

#### 参 考 文 献

- [1] Streisinger G, Walker C, Dower N et al. Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*) [J]. *Nature*. 1981, 291(5813): 293–296.
- [2] Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004, 286(6): C1213–1228.
- [3] Shin K, Fogg VC, Margolis B. Tight junctions and cell polarity [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006, 22: 207–235.
- [4] Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins [J]. *J Cell Sci*. 2004, 117(Pt 12): 2435–2447.
- [5] Nitkunan A, Lanfranco RA, Charlton RA, et al. Brain atrophy and cerebral small vessel disease: a prospective follow-up study [J]. *Stroke*. 2011, 42(1): 133–138.
- [6] Wada M, Nagasawa H, Kawanami T, et al. Cystatin C as an index of cerebral small vessel disease: results of a cross-sectional study in community-based Japanese elderly [J]. *Eur J Neurol*. 2010, 17(3): 383–390.

- [ 7 ] Wardlaw JM, Doubal FN, Valdes-Hernandez M, et al. Blood-brain barrier permeability and long-term clinical and imaging outcomes in cerebral small vessel disease [J]. *Stroke*. 2013, 44(2):525–527.
- [ 8 ] Williams LA, Martin-Padura I, Dejana E et al. Identification and characterisation of human junctional adhesion molecule (JAM) [J]. *Mol Immunol*. 1999, 36(17): 1175–1188.
- [ 9 ] Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* [J]. 2001, 2(4): 285–293.
- [ 10 ] Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport [J]. *Annu Rev Physiol*. 2006, 68: 403–429.
- [ 11 ] Amasheh S, Meiri N, Gitter AH et al. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells [J]. *J Cell Sci*. 2002, 115(Pt24): 4969–4976.
- [ 12 ] Hou J, Gomes AS, Paul DL, et al. Study of claudin function by RNA interference [J]. *J Biol Chem*. 2006, 281(47): 36117–36123.
- [ 13 ] Kolosov D, Bui P, Chasiotis H, et al. Claudins in teleost fishes [J]. *Tissue Barrier*. 2013, 1(3): e25391.
- [ 14 ] Meng W, Takeichi M. Adherens junction: molecular architecture and regulation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009, 1(6): a002899.
- [ 15 ] Adams CL, Nelson WJ. Cytomechanics of cadherin-mediated cell-cell adhesion [J]. *Curr Opin Cell Biol*. 1998, 10(5): 572–577.
- [ 16 ] Hogan C, Serpente N, Cogram P, et al. Rap1 regulates the formation of E-cadherin based cell-cell contacts [J]. *Mol Cell Biol*. 2004, 24(15): 6690–6700.
- [ 17 ] Liu Q, Londraville R, Marrs JA, et al. Cadherin-6 function in zebrafish retinal development [J]. *Dev Neurobiol*. 2008, 68(8): 1107–1122.
- [ 18 ] Takeichi M. Self-organization of animal tissues: cadherin-mediated processes [J]. *Dev Cell*. 2011, 21: 24–26.
- [ 19 ] Cocchi F, Lopez M, Dubreuil P, et al. Chimeric nectin1-poliovirus receptor molecules identify a nectin1 region functional in herpes simplex virus entry [J]. *J Virol*. 2001, 75(17): 7987–7994.
- [ 20 ] Isogai S, Horiguchi M, Weinstein BM. The vascular anatomy of the developing zebrafish; an atlas of embryonic and early larval development [J]. *Dev Biol*. 2001, 230(2): 278–301.
- [ 21 ] Jeong JY, Kwon HB, Ahn JC et al. Functional and developmental analysis of the blood brain barrier in zebrafish [J]. *Brain Res Bull*. 2008, 75(5): 619–628.
- [ 22 ] Xie J, Farage E, Sugimoto M, et al. A novel transgenic zebrafish model for blood-brain and blood-retinal barrier development [J]. *BMC Dev Biol*. 2010, 10: 76.
- [ 23 ] Zhang JJ, Piontek J, Wolburg H, et al. Establishment of a neuroepithelial barrier by claudin5a is essential for zebrafish brain ventricular lumen expansion [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, 107(4): 1425–1430.
- [ 24 ] Hassan A, Hunt BJ, O'Sullivan M, et al. Markers of endothelial dysfunction in lacunar infarction and ischaemic leukoaraiosis [J]. *Brain*. 2003, 126 (Pt 2): 424–432.
- [ 25 ] Furuse M, Hirase T, Itoh M, et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions [J]. *J. Cell Biol*. 1993, 123(6 Pt 2): 1777–1788.
- [ 26 ] Alvarez Y, Cederlund ML, Cottell DC, et al. Genetic determinants of hyaloid and retinal vasculature in zebrafish [J]. *BMC Dev Biol*. 2007, 7: 114.
- [ 27 ] Santoro MM, Pesce G, Stainier DY. Characterization of vascular mural cells during zebrafish development [J]. *Mech Dev*. 2009, 126(8–9): 638–649.
- [ 28 ] Raible DW, Wood A, Hodsdon W, et al. Segregation and early dispersal of neural crest cells in the embryonic zebrafish [J]. *Dev Dyn*. 1992, 195(1): 29–42.
- [ 29 ] Le Guellec D, Morvan-Dubois G, Sire JY. Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Int J Dev Biol*. 2004, 48(2–3): 217–231.
- [ 30 ] Raymond W, Kwong M, Perry SF. The tight junction protein claudin-b regulates epithelial permeability and sodium handling in larval zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013, 304(7): R504–513.
- [ 31 ] Zhang J, Ni C, Yang Z, et al. Specific binding of Clostridium perfringens enterotoxin fragment to claudin-b and modulation of zebrafish epidermal barrier [J]. *Exp Dermatol*, 2015, 24(8): 605–610.
- [ 32 ] Kiener TK, Selpitsova-Friedrich I, Hunziker W. Tjp3/zo-3 is critical for epidermal barrier function in zebrafish embryos [J]. *Dev Biol*. 2008, 316(1): 36–49.
- [ 33 ] Ng AN, de Jong-Curtain TA, Mawdsley DJ, et al. Formation of the digestive system in zebrafish; III. Intestinal epithelium morphogenesis [J]. *Dev Biol*. 2005, 286: 114–135.
- [ 34 ] Wallace KN, Akhter S, Smith EM, et al. Intestinal growth and differentiation in zebrafish [J]. *Mech Dev*. 2005, 122: 157–173.
- [ 35 ] Marjoram L, Alvers A, Deerhake ME, et al. Epigenetic control of intestinal barrier function and inflammation in zebrafish [J]. *Proc Nat Acad Sci U S A*. 2015, 112(9): 2770–2775.
- [ 36 ] Kramer-Zucher AG, Wiessner S, Jensen AM et al. Organization of the pronephric filtration apparatus in zebrafish requires nephrin, podocin and the FERM domain protein mosaic eyes [J] *Dev Biol*. 2005, 285: 316–329.
- [ 37 ] Serluca FC, Drummond IA, Fishman MC. Endothelial signaling in kidney morphogenesis: a role for hemodynamic forces [J]. *Curr Biol*. 2002, 12(6): 492–497.
- [ 38 ] Drummond IA. Kidney development and disease in the zebrafish [J]. *J Am Soc Nephrol*. 2005, 16(2): 299–304.



# 斑马鱼在生态毒理学研究及环境监测中的应用

刘辉<sup>1,2</sup>, 戴家银<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院动物生态与保护生物学重点实验室, 中国科学院动物研究所, 北京 100101;  
2. 蚌埠医学院医学检验系, 安徽 蚌埠 233030)

**【摘要】** 斑马鱼作为一种新型的模式动物, 由于其易于饲养、体外受精、产卵量大、胚胎透明及体外发育等优点, 已经广泛应用于生物研究的多个领域。近年来, 斑马鱼及其胚胎也已经广泛应用于生态毒理学研究及环境监测领域; 并且随着转基因斑马鱼技术的建立, 斑马鱼及其胚胎将更好地应用于生态毒理学研究和环境监测。

**【关键词】** 斑马鱼; 生态毒理学; 环境监测; 转基因

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0529-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.017

## Application of zebrafish (*Danio rerio*) in the fields of environmental ecotoxicology and environmental monitoring

LIU Hui<sup>1,2</sup>, DAI Jia-yin<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Animal Ecology and Conservation Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233030)

**【Abstract】** Zebrafish, a new type of model animal, has been widely used in many fields of biological research because of its low cost, ability of external fertilization, high fecundity, allowance of embryo transplant, and ectogenesis. Recently, zebrafish and its embryos have been widely used in ecotoxicological studies and environmental monitoring. Furthermore, with the maturation of zebrafish transgenic techniques, a new era has come for environmental pollution monitoring.

**【Key words】** Zebrafish (*Danio rerio*); Ecotoxicology; Environmental monitoring; Transgene

斑马鱼(英文名: zebrafish, 拉丁文名: *Danio rerio*) 也称为蓝条鱼、花条鱼、蓝斑马鱼、印度鱼或印度斑马鱼等, 属于硬骨鱼类, 辐鳍亚纲(Actinopterygii), 鲤形目(Cypriniformes), 鲤科(Cyprinidae), 鱼丹属(*Danio*)。斑马鱼为淡水鱼类, 原产于孟加拉、印度、巴基斯坦、缅甸和尼泊尔的溪流中, 因全身布满多条深蓝色纵纹与相间排列的银白色或金黄色纵纹, 形似斑马而得名斑马鱼。上世纪70年代, 美国科学家首次把斑马鱼引入实验室研究, 自1981年, 《Nature》杂志刊登美国遗传学家 George Streisinger 关于斑马鱼的论文后, 斑马鱼作为一种新型模式动物开始广泛应用于科学研究。斑马鱼在我国生物科

学方面的研究始于1998年, 孟安明院士在清华大学建立国内第一家以斑马鱼为模式动物的发育生物学实验室。发展至今, 斑马鱼成为大鼠、小鼠以外第三种广泛使用的模式动物应用于各领域的科学研究。

目前, 斑马鱼信息网络(Zebrafish Information Network, ZFIN: <http://www.zfin.org/>) 数据库已较为完备。在生物学上, 斑马鱼和人类基因有高达87%的同源性, 大多数人类基因都有斑马鱼的直系同源基因, 这意味利用斑马鱼做药物实验所得到的结果在多数情况下也适用于人体, 因此它被广泛应用于生命科学实验研究。它成为帮助人类攻克疑难杂症的得力助手, 被誉为“水中小白鼠”。除了帮助

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划; 2013AA065203) 资助。

[作者简介] 刘辉, 男, 博士, 研究方向: 生物化学, 分子生物学。

[通讯作者] 戴家银, 博士, 研究方向: 生态毒理学。Email: daijy@ioz.ac.cn

人类了解疾病病理以外,斑马鱼还是环境检测的“活试剂”,由于斑马鱼对外界环境变化极为敏感,转基因斑马鱼在遇到一些特定物质的时候体色会发生变化,利用这种特性,部分欧美国家开始在河流湖泊中放养斑马鱼,来实时检测水质状况。

## 1 斑马鱼及其胚胎在生态毒理学领域的应用

### 1.1 斑马鱼及其胚胎在急性毒性实验中的应用

鱼类急性毒性试验通常用于评价环境污染物包括工业废水、农药、杀虫剂、除草剂、洗涤剂以及药物等物质的风险,很多国家也将鱼类急性毒性实验用作常规的废水检测模型。斑马鱼胚胎最早应用在生态毒理学领域是 Nagel 等<sup>[1]</sup>2002 年使用斑马鱼胚胎替代鱼类 96 h 的急性毒性实验。由于其胚胎和成体的急性毒性结果一致性很好,胚胎在毒性实验中的应用更能节约试验时间及成本,德国废水收费法案中要求把鱼类急性毒性实验替换成斑马鱼胚胎毒性实验(fish embryo test, FET)<sup>[2]</sup>。

在斑马鱼急性毒性实验中,通常要计算斑马鱼胚胎发育过程中三个阶段的半致死浓度(median lethal concentration,  $LC_{50}$ ):胚胎早期的囊胚期(大约 3 hpf),幼鱼开口期(72 hpf)和幼鱼浮游期(120 hpf)<sup>[3]</sup>。具体的生物检测按照经济合作与发展组织(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)颁布的鱼类早期毒性实验准则进行<sup>[4]</sup>。

Kovacs 等<sup>[5]</sup>利用斑马鱼和胚胎的急性及亚急性毒性实验开展了 4 种环境残留抗肿瘤药物的毒性评价,包括:5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)、顺氯氨铂(cisplatin, CisPt)、表鬼白毒素吡喃葡萄糖苷(etoposide, ET)和甲磺酸伊马替尼(imatinib mesylate, IM),并认为这四种环境剂量的抗肿瘤药物属于低毒性物质,对斑马鱼的毒性作用不大。同时急性试验发现这些药物都有抑制 DNA 复制的作用,仍需要进一步通过慢性毒性实验进行验证,所以斑马鱼及其胚胎的急性及亚急性毒性实验还能为化学品毒性的深入研究提供一些基本信息。

Liu 等<sup>[6]</sup>利用斑马鱼胚胎开展了一种持久性有机污染物(persistent organic pollutants, POPs)—全氟壬酸(perfluorononanoic acid, PFNA)的急性毒性研究,发现 PFNA 对斑马鱼胚胎具有发育毒性,表现出发育迟缓并伴有各种畸形。8 hpf 和 24 hpf 半致死浓度( $LC_{50}$ )分别为 342 和 302  $\mu\text{mol/L}$ 。400  $\mu\text{mol/L}$  暴露条件下所有胚胎在 8 hpf 全部死亡,胚

胎死亡率与畸形率均与 PFNA 的浓度呈正相关。

### 1.2 斑马鱼在慢性毒性实验中的应用

急性毒性实验的优点是能在较短时间内粗略判断某种物质的毒性作用,但是,更为真实和全面的反映某种化学物质在环境中的毒性,还需模拟真实环境,开展低浓度和长时间暴露的慢性毒性实验,因此,斑马鱼作为慢性毒性实验模型具有显著优势,以斑马鱼及其胚胎作为实验对象有利于节约空间,由于其繁殖量大及周期短等优点能有效的节约实验成本及时间,更重要的是化学品在流水暴露条件下更贴近于真实水体环境,在这些方面是大、小鼠等啮齿动物无法比拟的。因此,有毒物质低浓度、长时间暴露实验更加受到生态毒理学家的关注。OECD 还专门制定了关于鱼类 14d 延长毒性试验的标准实验方法和观察化学物质干扰鱼类内分泌系统的 21d 鱼类实验方法<sup>[7,8]</sup>。

下面从斑马鱼在肝脏毒性、生殖发育及内分泌干扰毒性以及心血管毒性等方面的应用进行论述。

#### 1.2.1 斑马鱼在肝脏毒性研究中的应用

肝脏是重要的代谢器官,也是重要的解毒器官。目前,在药物或者环境污染物毒性实验中,仍然以大鼠、小鼠体内实验和肝细胞体外实验检测药物或污染物的肝脏毒性为主。但这些方法还存在一些局限性,例如细胞实验不能准确反映药物或污染物在体内微环境下的毒性或作用;啮齿动物模型实验费时、费力、费资金。近十年来,国内外的研究发现斑马鱼可用于构建多种人类疾病模型并用于药物或污染物的肝脏毒性研究,而且斑马鱼及其胚胎在肝脏毒性方面的研究也更加符合国际上倡导的毒理实验 3R (Replacement, Reduction and Refinement) 原则<sup>[9]</sup>。

Zhang 等<sup>[10]</sup>通过双向凝胶电泳及质谱分析方法,探讨了慢性 PFNA 暴露斑马鱼成鱼后,肝脏内蛋白谱表达的变化情况,鉴定了 57 个可能与 PFNA 肝脏毒性效应相关的差异表达蛋白,主要涉及物质代谢与能量代谢、蛋白质降解与修饰、氧化应激和细胞周期调控等。进一步研究部分差异表达蛋白的 mRNA 转录水平变化,发现蛋白翻译水平变化与 mRNA 转录水平变化并不完全一致,提示了 PFNA 暴露后,生物体可能存在着复杂的基因转录调控与翻译调控机制。Zhang 等<sup>[11]</sup>采用 PFNA 流水式暴露斑马鱼 180 d 的研究方法,评估了 PFNA 在斑马鱼肝脏的累积水平和肝脏毒性效应。结果发现慢性 PFNA 暴露导致雌、雄斑马鱼肝脏内总胆固醇(Total cholesterol, TCHO)的含量升高;而甘油三酯(triglyceride, TG)的含量在雌、雄鱼之间存在明显的性别差异,即雄鱼升高而雌鱼下降的现象。这一发现与一些暴露

于全氟烷酸类化合物(perfluoroalkyl acids, PFAAs)的职业工人血清胆固醇结果类似,即 PFOS 和 PFOA 与胆固醇含量之间有正相关关系<sup>[12]</sup>。这些结果暗示,斑马鱼可能是一个更合适研究 PFAAs 影响胆固醇的模式动物。同样在基因表达水平变化的检测也发现慢性 PFNA 暴露后,脂肪酸结合蛋白(fatty acid-binding proteins, FABPs)及其上游调控基因过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPARs)和 CCAAT 增强子结合蛋白(CCAAT-enhancer-binding proteins, C/EBPs)的转录水平与各自对照组相比,在雄鱼中显著升高,而在雌鱼中则显著下降。有研究指出,PFAAs 暴露所引起的基因表达的性别间差异可能来源于其对 PFAAs 的清除速率不同<sup>[13]</sup>。这种雌雄个体清除速率的差异可能是由于肾脏中有机阴离子转运蛋白的差异表达,这些差异可能产生于性别分化期<sup>[14]</sup>。

Liu 等<sup>[15]</sup>在全氟十二碳羧酸(perfluorododecanoic acid, PFDoA)暴露斑马鱼成鱼实验中发现,PFDoA 可以引起斑马鱼明显的肝脏病理学损伤,导致超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)等发生显著变化,并最终导致肝脏脂质过氧化。在基因水平上,PFDoA 处理显著地改变肝脏中与线粒体脂肪酸代谢和抗氧化相关的基因的表达。能够显著性地抑制 *ppar $\alpha$* , *cpt1*, *ucp-2* 和 *bcl-2* 的转录表达。说明 PFDoA 能够通过干扰肝脏线粒体中脂肪酸的代谢,进而干扰线粒体中能量产生途径,导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)的过量产生并影响抗氧化系统,最终引起肝脏氧化损伤。

### 1.2.2 斑马鱼及其胚胎在生殖内分泌干扰毒性研究中的应用

近年来,斑马鱼也成为研究生殖内分泌干扰毒性的模式动物之一。目前在环境中已经发现有 900 多种内分泌干扰物(endocrine-disrupting chemicals, EDCs),其中有超过 200 多种被认为具有雌激素效应<sup>[16]</sup>,所以近来有关环境污染物对斑马鱼生殖内分泌干扰毒性的研究也引起了广泛地关注。Deng 等<sup>[17]</sup>研究发现,三溴苯酚(tribromophenol, TBP)暴露斑马鱼 120 d 后,显著降低了斑马鱼产卵量;Carnevali 等<sup>[18]</sup>也发现,连续暴露邻苯二甲酸酯(Di-(2-ethylhexyl)-phthalate, DEHP)3 周后,显著降低了斑马鱼的产卵量。

Wang 等<sup>[19]</sup>开展了斑马鱼成鱼暴露一种有机磷酸酯阻燃剂-磷酸三(2,3-二氯丙基)酯(tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate, TDCPP)实验,发现 TD-

CPP 可以从成鱼传递给  $F_1$  代,并显著增加  $F_1$  代幼鱼体内的 ROS 含量,降低存活率,降低血清中甲状腺素水平; $F_0$  代雌鱼和  $F_1$  胚胎或幼鱼的 T3 也显著下降。

Liu 等<sup>[20]</sup>开展斑马鱼慢性暴露 PFNA 的实验,结果发现暴露 PFNA 180 d 后,斑马鱼  $F_0$  代和  $F_1$  代成体鱼血浆中的 T3 水平显著升高,同时  $F_0$  代成体斑马鱼甲状腺滤泡的病理组织切片结构发生改变。肝脏中的甲状腺激素结合蛋白(transthyretin, TTR)基因的表达量显著上升,而  $F_0$  代斑马鱼肝脏内的磷酸尿苷葡萄糖苷(基)转移酶(UDP-glucuronosyl-transferases, UDPG)表达水平显著受到抑制。PFNA 的长期暴露表现出了明显的甲状腺干扰效应。

### 1.2.3 斑马鱼及其胚胎在心血管毒性研究中的应用

斑马鱼由于其其在体外发育,并且胚胎透明,可以在显微镜下实时观察心血管的生成,所以在心血管研究领域有着广泛的应用。Gerger 等<sup>[21]</sup>用斑马鱼成鱼进行苯并芘(Benzo[*a*]pyrene)暴露实验,发现成鱼暴露后,耗氧量明显增加,心率明显下降,肝脏和心脏组织的 *cyp1a* 基因表达量也明显升高,苯并芘对斑马鱼的心血管系统有明显的毒性作用。Zhang 等<sup>[22]</sup>在用菲(phenanthrene, Phe)暴露斑马鱼胚胎实验中也发现菲能够损伤斑马鱼的心血管系统,造成了心室水肿、心室内壁变大变薄、小肠纤维化等现象,而基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)可以缓解菲的毒性效应,进一步研究发现,这一毒性效应与 TGF- $\beta$  通路激活有关。

Liu 等<sup>[6]</sup>利用斑马鱼胚胎进行 PFNA 暴露实验,发现 PFNA 可导致斑马鱼胚胎发育迟缓,孵化率降低心室水肿和脊椎弯曲。另外,PFNA 暴露可显著增加幼鱼体内的 ROS 的含量。并发现这一现象可能与 *lfabp* 和 *ucp2* 基因的表达显著升高,*sod1* 和 *mt-nd1* 基因的表达水平显著下降有关。

## 2 斑马鱼及其胚胎在环境监测与评价中的应用

### 2.1 在水体无机物重金属离子监测中的应用

检测环境中重金属污染最常用的方法就是用斑马鱼及其胚胎进行毒理学实验<sup>[23,24]</sup>。重金属通常可以抑制酶的活性<sup>[24-26]</sup>或者影响基因的表达<sup>[27-28]</sup>。所以可以通过检测斑马鱼成鱼或者胚胎的酶活性或者生物标志物基因的表达来间接地反映水体环境中的重金属污染。例如,Ling 等<sup>[29]</sup>发现一些酶的活性,包括 SOD、CAT 和乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)的酶活性受 Cd、Zn 或者甲

基对硫磷(methyl parathion)的暴露而变化。这三种酶可以作为环境中复合污染的生物标志物。Leite 等<sup>[30]</sup>发现斑马鱼暴露  $\text{Cu}^{2+}$  后,可导致炎症反应,氧化压力,并伴随炎症反应相关基因 *il-1 $\beta$* , *tnf- $\alpha$* , *cox-2* 和 *pge2* 基因表达的变化。Wang 等<sup>[31]</sup>发现斑马鱼在  $\text{Cu}^{2+}$  暴露后,嗅觉系统中与神经发生相关的一些 miRNA 的表达量,如 *let-7*, *miR-7a*, *miR-128* 和 *miR-138* 发生了显著下调,这可能与  $\text{Cu}^{2+}$  介导的神经发生毒性相关。这些表观遗传的改变也可以作为检测重金属污染的新型生物标志物。

## 2.2 在有机污染物监测中的应用

环境中除了无机重金属污染之外,近年来,越来越多的研究发现环境中的有机污染物被频繁检出,并且这些有害有机污染物的对环境及人类健康的影响已经引起流行病学家和生态毒理学家的广泛关注。常见的有机污染物如-多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)等,可以干扰斑马鱼的内分泌系统,影响胚胎发育、损伤 DNA 并且导致氧化压力<sup>[32,33]</sup>。这一类化合物不仅具有发育毒性<sup>[34]</sup>,而且也会影响心血管系统发育及其相关基因的表达<sup>[35]</sup>。

全氟烷酸类化合物(perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances, PFASs)是一种新型持久性有机污染物,在环境中广泛检出。最近研究显示 PFASs 能通过食物链富集放大,因此,对人类及野生动物的健康具有潜在的威胁。全氟辛酸(perfluorooctanoic acid, PFOA)和全氟辛磺酸(perfluorooctane sulfonate, PFOS)是最常见的两种全氟烷酸类化合物,它们都能够影响斑马鱼的胚胎发育<sup>[36]</sup>。Du 等<sup>[37]</sup>研究发现,PFOS 暴露斑马鱼成鱼后,影响雌激素受体和甲状腺受体活性,降低了睾酮水平,升高了雌二醇水平;同时研究还发现,PFOS 能够显著增加甲状腺发育相关基因 *hhx* 和 *pax8* 的表达,降低甾类生成相关酶的基因 *cyp17*, *cyp19a* 和 *cyp19b* 的表达,并呈现浓度(剂量)-效应关系,检测这些基因的表达变化为环境监测提供一个可行的方法。

此外,斑马鱼在水中杀虫剂和抗生素等污染监测中也有着广泛的应用。Huang 等<sup>[38]</sup>研究发现斑马鱼的游泳行为与水体中一种杀虫剂-溴氰菊酯(deltamethrin, DM)的浓度有相关性。水体中 DM 的浓度达到 1% 就能够影响斑马鱼的游泳行为。在暴露的最初 2h 内,斑马鱼的游泳速度和深度会受到明显的影响,这被认为是监测水质最重要的时期。此外,还发现斑马鱼极度活跃的时间和浮出水面的时间与 DM 暴露浓度均呈现指数相关关系,这两个参数可以作为区分水体 DM 污染级别的重要指标。

## 2.3 在水体环境类雌激素监测中的应用

近年来,研究发现一些物质如 PFNA、双酚 A(bisphenol A, BPA)等在体内实验中表现出雌激素效应<sup>[39]</sup>,这些物质在水体环境中可能是扮演一种雌激素的效应,被称为“环境雌激素(xenoestrogens)”<sup>[40]</sup>。Urbatzka 等<sup>[41]</sup>用含有 11 种环境雌激素的杜罗河(位于葡萄牙)河口的水暴露斑马鱼成鱼 21d 后,并用 17 $\alpha$ -乙炔雌二醇(17 $\alpha$ -ethinylestradiol, EE2)作为阳性对照,筛选出 *star*, *17 $\beta$ -hsd1*, *cyp19a1* 候选基因可用于水体环境中类雌激素的监测。Notch 等<sup>[42]</sup>以斑马鱼胚胎为模型进行环境雌激素的暴露研究,斑马鱼胚胎在 0 hpf 时即进行 EE2 的暴露,并在 12、24、48、72 和 96 hpf 取样研究,发现在 24 hpf 时,卵黄蛋白原(vitellogenin, VTG)的 mRNA 的表达水平就已经显著升高,这一基因的表达变化可以作为雌激素暴露的生物指示物。

## 2.4 转基因斑马鱼在环境监测与评价中的应用

尽管野生型斑马鱼及其胚胎已广泛地应用于环境污染物的毒性监测,但是这种方法仍然有不足之处,例如,检测灵敏度相对较低,以及实验过程及结果统计计算相对繁琐等。最近,随着遗传学技术的不断发展,转基因技术也日益成熟,转基因斑马鱼也越来越多地应用于药物筛选和环境毒物监测领域。近年来,随着斑马鱼胚胎显微注射技术的完善,转基因斑马鱼技术也迅速发展,目前,已有很多技术成功地应用于斑马鱼的转基因研究。如 GAL4/UAS 转录激活系统<sup>[43]</sup>、Tol2 转座子系统<sup>[44]</sup>和  $\Phi$ C31 整合酶系统<sup>[45]</sup>等。

目前,应用于环境监测的转基因斑马鱼主要有以下五种类型:芳香烃反应元件(aromatic hydrocarbon response element, AHRE)、亲电反应元件(electrophile response element, EPRE)、金属离子反应元件(metal response element, MRE)、雌激素反应元件(estrogen response element, ERE)和维甲酸和类维生素 A X 反应元件(retinoic acid and retinoid x response elements, RAREs, RXREs)<sup>[46]</sup>。Petersen 等<sup>[47]</sup>构建了一种雌激素反应元件转基因斑马鱼 *tg(cyp19a1b-GFP)* 用于环境中类雌激素的监测,在研究中,分别用 5 种不同的环境雌激素暴露转基因斑马鱼胚胎 96 h,结果发现,所有潜在的和弱的类雌激素都能够检测到。Chen 等<sup>[48]</sup>构建了一种转基因斑马鱼,在这种鱼的体内,利用 *vtg1* 的启动子调控报告基因 EGFP 的表达,直观地检测水环境中的雌激素污染。通过荧光显微镜直接观察转基因斑马鱼的绿色荧光,可以直接判断水样中是否有雌激素污染,为环境雌激素的监测提供了一种便捷的工具。

### 3 前景展望

斑马鱼是一个相对“年轻”的模式生物,但是在最近 30 年,它在脊椎动物发育生物学以及人类疾病研究方面发挥了重要的作用。作为一种模式动物,应用于生态毒理学研究及环境监测领域,具有节约费用,易于饲养,节约空间等诸多优点。尤其是在转基因斑马鱼品系建立后,用于环境监测的优越性日益体现出来,转基因斑马鱼用于环境监测比野生型斑马鱼更加快速、更加灵敏、更加方便,能够反映不同污染类型。在不久的将来,转基因斑马鱼将会成为环境和水质监测的“哨兵”生物。

近年来,组学(-omics)不断兴起,尤其转录组测序及蛋白质组学技术在生态毒理学领域应用也得到了迅速发展,这将更加有利于以斑马鱼为研究模型研究环境污染物对人类健康危害和生物标志物的筛选。随着科学技术手段的不断改进,将来会有更多的转基因(反应元件)斑马鱼品系的建立,为活体监测多种微量环境污染物监测提供可能。各种带有不同反应元件的转基因斑马鱼卵可以像基因芯片一样排列在微孔板中,可以准确地检测出水环境中各种污染物的种类,并可以根据荧光强度来推算污染物的浓度。另外,转基因斑马鱼的 GFP 元件可以替换成其他新型的元件,在污染物存在的情况下可以直接发光,而不需要在荧光显微镜下观察,这样也会大大增加转基因斑马鱼在野外直接检测水体环境污染物的便捷性,使得转基因斑马鱼在环境监测中更好地发挥作用。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Nagel R, DarT. The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*—a general model in ecotoxicology and toxicology [J]. *Altex* 2002, 19(Suppl 1):38–48.
- [ 2 ] OECD, Fish embryo toxicity (FET) test. Draft OECD guideline for the testing of chemicals. <http://www.oecd.org/dataoecd/39/59/36817070.pdf>. 2006.
- [ 3 ] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. *Dev Dynamics* 1995, 203(3): 253–310.
- [ 4 ] Ema M, Fukui Y, Aoyama H, et al. Comments from the Developmental Neurotoxicology Committee of the Japanese Teratology Society on the OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Proposal for a New Guideline 426, Developmental Neurotoxicity Study, Draft Document (October 2006 version), and on the Draft Document of the Retrospective Performance Assessment of the Draft Test Guideline 426 on Developmental Neurotoxicity [J]. *Congenital Anomalies*, 2007, 47(2): 74–76.
- [ 5 ] Kovacs R, Bakos K, Urbanyi B, et al. Acute and sub-chronic toxicity of four cytostatic drugs in zebrafish [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, First online; 24 July 2015.
- [ 6 ] Liu H, Sheng N, Zhang W, et al. Toxic effects of perfluorononanoic acid on the development of Zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. *J Environ Sci (China)* 2015, 32: 26–34.
- [ 7 ] OECD, Guideline for the testing of chemicals 204; Fish, Prolonged Toxicity Test; 14-day Study [M]. Paris: Paris France OECD 1984.
- [ 8 ] OECD, Guideline for the testing of chemicals 230; 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition [M]. Paris: Paris France OECD; 2009.
- [ 9 ] Flecknell P. Replacement, reduction and refinement [J]. *Altex* 2002, 19(2): 73–78.
- [ 10 ] Zhang W, Liu Y, Zhang H, et al. Proteomic analysis of male zebrafish livers chronically exposed to perfluorononanoic acid [J]. *Environ Int* 2012, 42: 20–30.
- [ 11 ] Zhang W, Zhang Y, Zhang H, et al. Sex differences in transcriptional expression of FABPs in zebrafish liver after chronic perfluorononanoic acid exposure [J]. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(9): 5175–5182.
- [ 12 ] Nelson JW, Hatch EE, Webster TF. Exposure to polyfluoroalkyl chemicals and cholesterol, body weight, and insulin resistance in the general U. S. population [J]. *Environ Health Perspect*, 2010, 118(2): 197–202.
- [ 13 ] Ohmori K, Kudo N, Katayama K, et al. Comparison of the toxicokinetics between perfluorocarboxylic acids with different carbon chain length [J]. *Toxicology* 2003, 184(2–3): 135–140.
- [ 14 ] Buist SC, Cherrington NJ, Choudhuri S, et al. Gender-specific and developmental influences on the expression of rat organic anion transporters [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 301(1): 145–151.
- [ 15 ] Liu Y, Wang J, Wei Y, et al. Induction of time-dependent oxidative stress and related transcriptional effects of perfluorododecanoic acid in zebrafish liver [J]. *Aquatic Toxicol (Amsterdam, Netherlands)* 2008, 89(4): 242–250.
- [ 16 ] Soffker M, Tyler CR. Endocrine disrupting chemicals and sexual behaviors in fish—a critical review on effects and possible consequences [J]. *Crit Rev Toxicol* 2012, 42(8): 653–668.
- [ 17 ] Deng J, Liu C, Yu L, et al. Chronic exposure to environmental levels of tribromophenol impairs zebrafish reproduction [J]. *Toxicol Applied Pharmacol*, 2010, 243(1): 87–95.
- [ 18 ] Carnevali O, Tosti L, Speciale C, et al. DEHP impairs zebrafish reproduction by affecting critical factors in oogenesis [J]. *PLoS ONE* 2010, 5(4): e10201.
- [ 19 ] Wang Q, Lai NL, Wang X, et al. Bioconcentration and transfer of the organophorous flame retardant 1,3-dichloro-2-propyl phosphate causes thyroid endocrine disruption and developmental neurotoxicity in zebrafish larvae [J]. *Environ Sci Technol*, 2015, 49(8): 5123–5132.
- [ 20 ] Liu Y, Wang J, Fang X, et al. The thyroid-disrupting effects of long-term perfluorononanoate exposure on zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Ecotoxicology (London, England)* 2011, 20(1): 47–55.
- [ 21 ] Gerger CJ, Weber LP. Comparison of the acute effects of benzo(a)pyrene on adult zebrafish (*Danio rerio*) cardiorespiratory function following intraperitoneal injection versus aqueous exposure

- [J]. *Aquatic Toxicol* (Amsterdam, Netherlands) 2015, 165: 19–30.
- [22] Zhang Y, Huang L, Wang C, et al. Phenanthrene exposure produces cardiac defects during embryo development of zebrafish (*Danio rerio*) through activation of MMP-9 [J]. *Chemosphere* 2013, 93(6): 1168–1175.
- [23] Dave G. The influence of pH on the toxicity of aluminum, cadmium, and iron to eggs and larvae of the zebrafish, *Brachydanio rerio* [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1985, 10(2): 253–267.
- [24] Roales RR, Perlmutter A. Toxicity of zinc and cygon, applied singly and jointly, to zebrafish embryos [J]. *Bull Environ Cont Toxicol* 1974, 12(4): 475–480.
- [25] Devi GP, Ahmed KB, Varsha MK, et al. Sulfidation of silver nanoparticle reduces its toxicity in zebrafish [J]. *Aquatic Toxicol* (Amsterdam, Netherlands) 2015, 158: 149–156.
- [26] Chen M, Chen S, Du M, et al. Toxic effect of palladium on embryonic development of zebrafish [J]. *Aquatic Toxicol* (Amsterdam, Netherlands) 2015, 159: 208–216.
- [27] Miao W, Zhu B, Xiao X, et al. Effects of titanium dioxide nanoparticles on lead bioconcentration and toxicity on thyroid endocrine system and neuronal development in zebrafish larvae [J]. *Aquatic Toxicol* (Amsterdam, Netherlands) 2015, 161: 117–126.
- [28] Komjarova I, Bury NR. Evidence of common cadmium and copper uptake routes in zebrafish *Danio rerio* [J]. *Environ Sci Technol* 2014, 48(21): 12946–12951.
- [29] Ling X, Zhang Y, Lu Y, et al. Superoxide dismutase, catalase and acetylcholinesterase: biomarkers for the joint effects of cadmium, zinc and methyl parathion contamination in water [J]. *Environ Technol* 2011, 32(13–14): 1463–1470.
- [30] Leite CE, Maboni Lde O, Cruz FF, et al. Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper in zebrafish larvae [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 272(3): 681–689.
- [31] Wang L, Bammler TK, Beyer RP, et al. Copper-induced deregulation of microRNA expression in the zebrafish olfactory system [J]. *Environ Sci Technol* 2013, 47(13): 7466–7474.
- [32] Ma Y, Han J, Guo Y, et al. Disruption of endocrine function in *in vitro* H295R cell-based and *in vivo* assay in zebrafish by 2,4-dichlorophenol [J]. *Aquatic Toxicol* (Amsterdam, Netherlands) 2012, 106–107, 173–181.
- [33] Shao B, Zhu L, Dong M, et al. DNA damage and oxidative stress induced by endosulfan exposure in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Ecotoxicology* (London, England) 2012, 21(5): 1533–1540.
- [34] Hawliczek A, Nota B, Cenijn P, et al. Developmental toxicity and endocrine disrupting potency of 4-azapyrene, benzo[b]fluorene and retene in the zebrafish *Danio rerio* [J]. *Reprod Toxicol* (Elmsford, N. Y.) 2012, 33(2): 213–223.
- [35] Huang L, Wang C, Zhang Y, et al. Benzo[a]pyrene exposure influences the cardiac development and the expression of cardiovascular relative genes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. *Chemosphere* 2012, 87(4): 369–375.
- [36] Zheng XM, Liu HL, Shi W, et al. Effects of perfluorinated compounds on development of zebrafish embryos [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2011, 19(7): 2498–2505.
- [37] Du G, Hu J, Huang H, et al. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) affects hormone receptor activity, steroidogenesis, and expression of endocrine-related genes *in vitro* and *in vivo* [J]. *Environ Toxicol Chem / SETAC* 2013, 32(2): 353–360.
- [38] Huang Y, Zhang J, Han X, et al. The use of zebrafish (*Danio rerio*) behavioral responses in identifying sublethal exposures to deltamethrin [J]. *Int J Environ Res Pub Health*, 2014, 11(4): 3650–3660.
- [39] Gao Y, Li X, Guo LH. Assessment of estrogenic activity of perfluoroalkyl acids based on ligand-induced conformation state of human estrogen receptor [J]. *Environ Sci Technol* 2013, 47(1): 634–641.
- [40] Benninghoff AD, Bisson WH, Koch DC, et al. Estrogen-like activity of perfluoroalkyl acids *in vivo* and interaction with human and rainbow trout estrogen receptors *in vitro* [J]. *Toxicol Sci*, 2011, 120(1): 42–58.
- [41] Urbatzka R, Rocha E, Reis B, et al. Effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens on steroidogenic gene expression and specific transcription factors in zebrafish [J]. *Environ Pollut (Barking, Essex: 1987)* 2012, 164: 28–35.
- [42] Notch EG, Mayer GD. Impact of environmental estrogens on nucleotide excision repair gene expression in embryonic zebrafish [J]. *Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol*; 2013, 157(4): 361–365.
- [43] Akitake CM, Macurak M, Halpern ME, et al. Transgenerational analysis of transcriptional silencing in zebrafish [J]. *Dev Biol*, 2011, 352(2): 191–201.
- [44] Fisher S, Grice EA, Vinton RM, et al. Evaluating the biological relevance of putative enhancers using Tol2 transposon-mediated transgenesis in zebrafish [J]. *Nat Protocols* 2006, 1(3): 1297–1305.
- [45] Lister JA. Use of phage phiC31 integrase as a tool for zebrafish genome manipulation [J]. *Methods Cell Biol*, 2011, 104: 195–208.
- [46] Carvan MJ, 3<sup>rd</sup>, Dalton TP, Stuart GW, et al. Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution [J]. *Ann New York Acad Sci*, 2000, 919: 133–147.
- [47] Petersen K, Fetter E, Kah O, et al. Transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos as a tool for assessing combined effects of oestrogenic chemicals [J]. *Aquatic Toxicol* (Amsterdam, Netherlands) 2013, 138–139: 88–97.
- [48] Chen H, Hu J, Yang J, et al. Generation of a fluorescent transgenic zebrafish for detection of environmental estrogens [J]. *Aquatic Toxicol* (Amsterdam, Netherlands) 2010, 96(1): 53–61.

[收稿日期] 2015-08-20



# 多发性硬化实验动物模型研究进展

李迎霞<sup>1</sup>, 关东升<sup>1\*</sup>, 任德启<sup>1</sup>, 郭健<sup>1</sup>, 吴川杰<sup>2</sup>

(1. 河南中医学院第二临床医学院, 郑州 450008; 2. 郑州大学第一附属医院, 郑州 450003)

**【摘要】** 实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)是多发性硬化的实验动物模型,经过近2个多世纪的发展,已可以在猴、大鼠、小鼠等动物制备EAE模型,在同一种品系动物采用不同免疫抗原制备的EAE模型在敏感性和临床特点具有多样性。本研究就EAE的发展史和目前不同品系实验动物、不同抗原制备EAE模型的特点做一述评,对未来EAE模型的发展前景进行探讨。

**【关键词】** 多发性硬化;实验性自身免疫性脑脊髓炎;模型,动物

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0535-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.018

## Research progress of animal models of multiple sclerosis

LI Ying-xia<sup>1</sup>, GUAN Dong-sheng<sup>1</sup>, REN De-qi<sup>1</sup>, GUO Jian<sup>1</sup>, WU Chuan-jie<sup>2</sup>

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China, 2. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003)

**【Abstract】** Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a classic animal model for multiple sclerosis. After more than 2 centuries of development, EAE can be established in mice, monkeys and rats, etc. Some animals can be immunized by different immune antigens which have different features in sensibility and clinical characteristics. In this paper, we will review the development of EAE, discuss the characteristics of EAE models produced by immunization of different animals with different antigens. In summary, we explore the development of animal models of EAE.

**【Key words】** Multiple sclerosis; Experimental autoimmune encephalomyelitis; Models, animal.

实验性变态反应性脑脊髓炎(experimental allergic encephalomyelitis, EAE)亦称实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)。以中枢神经系统内小血管周围出现单个核细胞浸润及髓鞘脱失为病理特征,由于EAE病理改变与人类多发性硬化(MS)相似,而使其成为MS的理想动物模型,在MS的研究中具有重要意义。

### 1 实验性自身免疫性脑脊髓炎模型的发展

自18世纪30年代以来,EAE被广泛应用于MS的实验研究<sup>[1]</sup>。EAE在免疫学特征、发病特点和病

理学特征上与人类MS的表现非常相似<sup>[1-9]</sup>。目前,可以通过用组成髓鞘的多肽致敏和病毒感染两种方式建立EAE模型。最早的EAE模型是使用同种/异种脊髓匀浆(SCH)作为免疫原诱导建立的<sup>[1-3]</sup>。Rivers等<sup>[1]</sup>第一次进行了实验性变态反应性脑脊髓炎的研究,使用兔的脑组织SCH为免疫原,肌肉注射于猴,制备出最早实验性变态反应性脑脊髓炎。1946年,首次使用SCH抗原乳化于完全弗氏佐剂(含有灭活的结核杆菌),混合成油包水乳状液,注射于实验动物,制备出EAE模型,这种急性脑脊髓炎可以持续数周,这即是目前已知最早的EAE<sup>[4-6]</sup>。早期的研究证明,在SCH中导致脑脊髓

**【基金项目】** 国家自然科学基金青年项目(No. 81202657);河南省中医管理局河南省中医临床学科领军人才培养计划(No. 201301006);河南省教育厅科学技术研究重点项目(No. 13A360556)。

**【作者简介】** 李迎霞(1978-),女,博士,研究方向:多发性硬化的实验研究。

**【通讯作者】** 关东升,博士,副教授,研究方向:多发性硬化的实验研究。Email: gds349@126.com

炎的主要抗原是髓磷脂碱性蛋白 (MBP)。1960 年, Paterson<sup>[5]</sup> 通过被动给予来自致敏动物的特异性脑脊髓炎抗原激活的 T 细胞, 建立了被动免疫的 EAE。在啮齿动物身上至今尚未观察到自发的 EAE。在啮齿动物, EAE 或被动免疫的 EAE 可以观察到一个上升性瘫痪状态, 开始与尾部张力降低, 后肢瘫痪和迟缓性死亡。

## 2 实验性自身免疫性脑脊髓炎的免疫原

Theiler's 病毒、中枢神经系统 SCH 或乳化于弗氏佐剂的中枢神经系统特异性抗原均可在不同品系的实验动物及其同种品系的不同实验动物上诱导 EAE。常见的建立 EAE 的抗原包括髓磷脂碱性蛋白 (MBP), 蛋白脂质蛋白质 (PLP), 髓鞘相关糖蛋白 (MAG), 髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 (MOG), 某些非髓性蛋白, 如神经原蛋白、胶原纤维酸蛋白也参与 EAE 的发病<sup>[6-10]</sup>。这些抗原可以引起强烈的细胞毒性 T 细胞介导的反应。

SCH 中致敏的主要抗原是 MBP, 而 MBP 占髓

表 1 不同研究方案建立大鼠 EAE 模型的特点<sup>[10-19]</sup>

Tab. 1 Characteristics of the rat EAE models established by different studies

品种 (性别) Animals (sex)	抗原 (给予部位) Antigens (Administration sites)	临床病程 (发病率/%) Clinical course (Incidence rate)	高峰期/d Peak (days)	最高临床得分 The highest Clinical scores
Lewis (F)	GP-MBP + IFA + Mb (后肢足掌)	急性病程	9 ~ 11	后肢力弱
Lewis (M)	GP-MBP + CFA MC (腹股沟淋巴结收集)	急性病程 (100)	10	后肢瘫痪 后肢瘫痪合并前肢力弱
Lewis (M)	MBP + CFA + Mb (尾部)	急性病程	10	后肢瘫痪
DA (M/F)	大鼠、豚鼠脊髓匀浆 (后肢足掌)	急性病程 (83)	9 ~ 15	后肢瘫痪
DA (F)	MBP + CFA + PT (后肢足掌)	急性病程 (100)	10	四肢无力
Lewis (F)	GP-MBP + CFA + Mt (尾部)	急性病程	9	后肢瘫痪
Lewis (F)	MOG + CFA + Mt (尾部)	急性病程	14	后肢力弱
DA (F)	GP-MBP + CFA + Mt (尾部)	急性病程	11 ~ 12	尾部无力
DA (F)	MOG + CFA + Mt (尾部)	急性病程	11	后肢瘫痪
BN (F)	GP-MBP + CFA + Mt (尾部)	无		
BN (F)	MOG + CFA + Mt (尾部)	急性病程	13	后肢瘫痪
Lew. 1A1V1	MOG + CFA ± PT (尾部)	根据 MOG 注射剂量变化	变化	变化
Lewis (M/F)	豚鼠脊髓匀浆 + CFA + 环孢菌素 A (后肢足掌)	慢性病程	10 ~ 14	严重的后肢瘫痪 四肢无力
Lewis (F)	豚鼠脊髓匀浆 + CFA + Mt (后肢足掌)	慢性病程	10 ~ 12	四肢无力
DA (F)	大鼠脊髓匀浆 + IFA (尾部)	复发-缓解病程	9 ~ 27	后肢瘫痪
DA (F)	MOG + IFA (尾部)	复发-缓解病程	8 ~ 16	后肢力弱

注: BN, Brown Norway 大鼠; Lewis, Lewis 大鼠; DA, Dark-Agouti 大鼠; CFA, 完全弗氏佐剂; F, 雌性; M, 雄性; GP-MBP, 豚鼠髓磷脂碱性蛋白; IFA, 不完全弗氏佐剂; Mb, 乳酪分枝杆菌; MOG, 髓鞘少突胶质细胞糖蛋白; Mt, 结核分枝杆菌; PT, 百日咳毒素。

Note. BN: Brown Norway rat; Lewis: Lewis rat; DA: Dark-Agouti rat; CFA: complete Freund's adjuvant; F: female; M: male; GP-MBP: guinea pig myelin basic protein; IFA: incomplete Freund's adjuvant; Mb: Mycobacterium butyricum; MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein; Mt: Mycobacterium tuberculosis; PT: pertussis toxin.

鞘蛋白的 30% ~ 40%<sup>[11]</sup>, 30% ~ 40% 的 MBP 在髓鞘。H-2u 小鼠, 尤其是 B10. PL 和 PL/J 系, Lewis 大鼠, 是对 MBP 高度敏感的品系<sup>[12]</sup>。对 C57BL/6 (B6) 是最常见的小鼠品系之一, 对 MBP 不敏感<sup>[13]</sup>。

另外, EAE 也可以通过被动转移特异性 T 细胞获得。在同一品种的动物之间, 这些被转移的特异性 T 细胞迁移到被动免疫实验动物的中枢神经系统, 参与局部炎症和继发性瘫痪。而且, 这种能引起被动 EAE 的脑脊髓炎特异性 T 细胞, 并不需要从敏感品系获得, 非敏感品系的脑脊髓炎特异性 T 细胞也可以诱导<sup>[14]</sup>。

## 3 诱导 EAE 的易感性与动物种类的关系

EAE 的敏感性和临床过程的特点 (急性, 超急性, 慢性或复发缓解), 取决于以下因素, 如实验动物的动物品种、年龄、性别, 甚至动物的商业来源; 抗原、及其剂量、物理状态及给药途径; 免疫佐剂的应用。表 1、2 描述了影响 EAE 发病特点的研究结果。

表 2 不同研究方案建立小鼠 EAE 模型特点<sup>[10-19]</sup>

Tab. 2 Characteristics of the mouse EAE models established by different regimens

品种 Animals (性别) (sex)	抗原 Antigens (给予部位) (Administration sites)	临床病程 Clinical course	高峰期/d Peak (days)	最高临床得分 The highest clinical scores
SJL/J (F)	PLP + CFA + Mt(侧腹皮下)	复发-缓解病程	15 ~ 19	后肢瘫痪
SJL/J (F)	MOG + CFA + Mt(后肢足掌、尾部)	复发-缓解病程	40	后肢无力
A. SW (F)	MOG + CFA + Mt(后肢足掌、尾部)	急性病程	60 ~ 90	后肢无力
F1 (SJL/J_C57BL/6)	MOG + CFA + Mt(后肢足掌、尾部)	复发-缓解病程	19	严重的后肢瘫痪四肢无力
SJL/J (F)	PLP + CFA + Mt(后肢足掌、尾部)	复发-缓解病程	17 ~ 23	严重的后肢瘫痪四肢无力
F1 (SJL/J_C57BL/6)	PLP + CFA + Mt(后肢足掌、尾部)	急性病程	19 ~ 23	严重的后肢瘫痪四肢无力
C57BL/6	PLP + CFA + PT(侧腹皮下)	慢性病程	23 ~ 25	后肢瘫痪
C57BL/6	MOG(侧腹皮下)	复发-缓解病程	14 ~ 20	后肢瘫痪
C57BL/6	MBP-PLP + CFA + PT(侧腹皮下)	慢性病程	10 ~ 20	后肢瘫痪

注: SJL/J, SJL/J 小鼠; A. SW, A. SW 小鼠; F1 SJL/J\_C57BL/6, SJL/J 与 C57BL/6 小鼠杂交 F1 代; C57BL/6, C57BL/6 小鼠; CFA, complete Freund's adjuvant 完全弗氏佐剂; F, female 雌性; M, male 雄性; PLP, proteolipid protein 蛋白脂蛋白; MBP, myelin basic protein, 髓脂质碱性蛋白; MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein; Mt, Mycobacterium tuberculosis 结核分枝杆菌; PT, pertussis toxin. 百日咳毒素。

Note. SJL/J: SJL/J mouse; A. SW: A. SW mouse; F1 SJL/J\_C57BL/6: SJL/J and C57BL/6 mice, hybrid F1 generation; C57BL/6: C57BL/6 mouse; CFA: complete Freund's adjuvant; F: female; M: male; PLP: proteolipid protein; MBP: myelin basic protein; MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein; Mt: Mycobacterium tuberculosis; PT: pertussis toxin.

不同品种和不同品系的实验动物诱导 EAE 的易感性和临床特点不同,这归因于主要组织相容性复合体基因的多样性表达<sup>[13]</sup>。从这个角度来讲,每种动物建立的 EAE 模型在 MS 的研究中都具有一定的意义。在过去 30 年中,大鼠和小鼠是建立 EAE 最多的实验动物。如表 2 所示大鼠自行恢复的急性病程的 EAE,提供了研究有关诱导和恢复阶段的机制的模型。有些大鼠品系即使给予低剂量抗原的情况下,仍然显示可预测的临床症状和统一的敏感性<sup>[16]</sup>。大鼠 EAE 的病理学特征为在脊髓、脑干和脑实质的血管周围单个核细胞浸润。大鼠 EAE 不同与人类 MS 的主要特点是髓鞘脱失对大鼠的影响是微乎其微的。因此,引起瘫痪的最重要很可能是水肿和炎症<sup>[17]</sup>。而小鼠的病理学特点与人类相似<sup>[18]</sup>,在慢性进展型病程和复发缓解型病程上均可见脱髓鞘特征。小鼠建立 EAE 的优点还包括的敏感品系较多,可用的实验试剂较多,在转基因小鼠上研究遗传学的易感性。

小鼠建立 EAE 的主要缺陷是相对于易感大鼠,小鼠通常更难以诱导 EAE,小鼠对 EAE 相对抵抗,体现为发病率和发病时间的差异,以及需要佐剂辅助诱发疾病。除了使用百日咳毒素作为辅助补充外,往往需要多次注射高剂量的抗原<sup>[15]</sup>。

使用灵长类动物(如恒河猴和狨猴),在遗传学和免疫学上具有接近人类的优势<sup>[20]</sup>。在灵长类动物建立 EAE,主要表现为慢性病程,急性炎症和脱髓鞘,伴随不断形成新的免疫活性受伤<sup>[21]</sup>。但使用 MBP 和 MOG 诱导灵长类(猕猴)动物,表现为急性病程。病理以广泛的中性粒细胞浸润、坏死、白质破坏,从而影响髓鞘及轴突<sup>[22]</sup>。狨猴对重组、人类 MOG 和完全福氏佐剂的乳剂高度易感,相比之下,无百日咳毒素的 MBP 是一种弱抗原<sup>[23]</sup>。

## 4 CFA 在 EAE 建立过程中的影响

大多数 EAE 模型的建立方案中均采用完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA), CFA 是多种研究中最常应用的免疫佐剂,佐剂的作用是通过降低机体对抗原的破坏,从而延迟机体对抗原的免疫耐受。促进抗原的弥散,使抗原逐渐而持续的对机体发挥免疫原性。另外,在 EAE 模型的建立方案中多采用分歧杆菌,以扩大免疫效应,导致淋巴结增生,主要激发 T 细胞介导的免疫反应<sup>[5,6]</sup>。

不论是皮下或者皮内注射 CFA,均有助于促进细胞免疫反应的强度。从而激发多种自身免疫性疾病。然而,单独使用 CFA 本身就能够诱导强烈的炎症反应,产生众多的免疫调节功能,甚至导致局部皮肤的肉芽肿和坏死。将 CFA 注射入动物足掌底部时, CFA 能够引起局部慢性疼痛,潜藏有慢性伤害感受性的机制,可以用于慢性疼痛的研究。鉴于此,在 EAE 模型建立过程中,注射 CFA 时,应当采用合理的方案,选用恰当的剂量和适宜的部位。CFA 还可以提高 EAE 模型血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的通透性和导致 CNS 血管周围血清蛋白渗出<sup>[21]</sup>。

在没有 CFA 的情况下,使用 MBP 抗原腹腔注射免疫 Lewis 大鼠,需要重复注射抗原的同时使用次氯酸钠预处理(增加淋巴结对 MBP 的吸收程度)和百日咳毒素作为免疫佐剂。另一个方案是直接注射 MBP 水溶液到膈窝淋巴结,并且于致敏前 3 周给予金属锡作为致敏剂。

## 5 发展新的 EAE 模型的原则

EAE 与人类 MS 尚存在一定的差距,要建立能够更好的反映人类 MS 发病机制的 EAE 模型,必须注意以下几点<sup>[24,25]</sup>:①人类与实验动物在遗传学上

的差异,虽然鼠类和狨猴等实验动物与人同属哺乳动物,但是在遗传学上还是有巨大的差异;②MS 的发病与环境密切相关;③MS 临床病程的特点:建立与人类 MS 临床病程特点更加吻合的 EAE 模型;④病理机制:MS 的病理特征是其区别与其他疾病的最主要特征;⑤临床治疗反应:建立 EAE 的最终目的是治疗 MS,因此,建立的 EAE 要能够反映 MS 的临床治疗反应。遗传学上的差异在任何实验动物上均存在。目前,研究者几乎不可避免的使用近交系动物,然而临床治疗反应才是决定药物安全性、有效性、代谢的主要因素。

综上所述,EAE 模型的建立是涉及多因素研究工作,选用实验动物,抗原、佐剂以及抗原给予部位等因素均能够影响 EAE 模型的发病特点及其病理变化。研究出能够真实、准确还原人类 MS 特点的 EAE,是 EAE 研究发展的最终目标。与此同时,研究者需要根据研究目的选择恰当的 EAE 建立方案。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Rivers TM, Schwentker FF. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys [ J ]. J Exp. 1935, 61(5) :689 - 702.
- [ 2 ] Levine S, Sowinski R. Experimental allergic encephalomyelitis in inbred and outbred mice [ J ]. J Immunol, 1973, 110(1) :139 - 143.
- [ 3 ] Simone A, Teixeira, Ana A. et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis: a heterogeneous group of animal models to study human multiple sclerosis. [ J ]. Inflamm Infect Dis. 2005, 2(2) : 127 - 134.
- [ 4 ] Steinman L, Zamvil SS. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis [ J ]. Ann Neurol, 2006, 60(1) :12 - 21.
- [ 5 ] Paterson PY. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells [ J ]. J Exp Med, 1960, 111(1) :119 - 136.
- [ 6 ] Levine S. Experimental allergic encephalomyelitis production by myelin basic protein adsorbed on particulate adjuvants [ J ]. Immunology, 1972, 23(4) : 609 - 614.
- [ 7 ] Raivicha G, Banati R. Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease [ J ]. Brain Res Rev, 2004, 46(3) :261 - 281.
- [ 8 ] Friese MA, Montalban X, Willcox N. et al. The value of animal models for drug development in multiple sclerosis [ J ]. Brain, 2006, 129(Pt 8) :1940 - 1952.
- [ 9 ] Schluesener HJ, Sobel RA, Lington C. et al. A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease [ J ]. J Immunol 1987, 139(12) : 4016 - 4021.
- [ 10 ] Petzold A, Baker D, Pryce G, et al. Quantification of neurodegeneration by measurement of brain-specific proteins [ J ]. J Neuroimmunol, 2003, 138(1 - 2) :45 - 48.
- [ 11 ] Martenson RE, Deibler GE, Kies MW. Myelin basic proteins of the rat central nervous system. Purification, encephalitogenic properties, and amino acid compositions [ J ]. Biochim Biophys Acta, 1970, 200(2) :353 - 362.
- [ 12 ] Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, et al. Animal models. Ann Neurol, 1994, 36(Suppl) : S47 - S53.
- [ 13 ] 关东升, 高颖, 朱陵群. C57BL/6J 小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎模型的建立及其病理特征 [ J ]. 中国实验动物学报, 2008, 6(16) :406 - 409.
- [ 14 ] Stromnes IM, Goverman JM. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis [ J ]. Nat Protoc, 2006, 1(4) :1952 - 1960.
- [ 15 ] Pappalardo LW, Liu S, Black JA. et al. Dynamics of sodium channel Nav1.5 expression in astrocytes in mouse models of multiple sclerosis [ J ]. Neuroreport. 2014, 25(15) :1208 - 1215.
- [ 16 ] Savarin C, Hinton DR, Valentin-Torres A, et al. Astrocyte response to IFN- $\gamma$  limits IL-6-mediated microglia activation and progressive autoimmune encephalomyelitis [ J ]. J Neuroinflamm, 2015, 12(1) :79 - 86.
- [ 17 ] Liu Z, Xu Y, Zhang X, et al. The motorized RhoGAP myosin IXb (Myo9b) in leukocytes regulates experimental autoimmune encephalomyelitis induction and recovery [ J ]. J Neuroimmunol. 2015, 15(282) :25 - 32.
- [ 18 ] Abramowski P, Steinbach K, Zander AR, et al. Immunomodulatory effects of the ether phospholipid edelfosine in experimental autoimmune encephalomyelitis [ J ]. J Neuroimmunol. 2014, 274(1 - 2) :111 - 124.
- [ 19 ] Sakuma H, Kohyama K, Park IK, et al. Clinicopathological study of a myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced demyelinating disease in LEW. 1AV1 rats [ J ]. Brain, 2004, 127(10) : 2201 - 2213.
- [ 20 ] Ovadia H, Siegal T, Weidenfeld J. Delayed central nervous system irradiation effects in rats—part 2: aggravation of experimental autoimmune encephalomyelitis [ J ]. Neuroimmunomodulation, 2013, 20(1) :51 - 56.
- [ 21 ] Laman JD, van Meurs M, Schellekens MM, et al. Expression of accessory molecules and cytokines in acute EAE in marmoset monkeys (Callithrix jacchus) [ J ]. J Neuroimmunol, 1998, 86(1) : 30 - 45.
- [ 22 ] Stewart WA, Alvord EC Jr, Hruby S, et al. Magnetic resonance imaging of experimental allergic encephalomyelitis in primates [ J ]. Brain, 1991, 114(Pt2) : 1069 - 1096.
- [ 23 ] Brok HP, Uccelli A, Kerlero De Rosbo N, et al. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis in common marmosets: the encephalitogenic T cell epitope pMOG24 - 36 is presented by a monomorphic MHC class II molecule [ J ]. J Immunol, 2000, 165(2) : 1093 - 1101.
- [ 24 ] Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy [ J ]. Trends Mol Med, 2001, 7(3) :115 - 121.
- [ 25 ] Sriram S, Steiner I. Experimental allergic encephalomyelitis: a mis-leading model of multiple sclerosis [ J ]. Ann Neurol, 2005, 58(6) :939 - 945.

[ 收稿日期 ] 2015-05-11



# 美国实验动物品种资源现状分析

孔琪<sup>1</sup>, 夏霞宇<sup>1</sup>, 赵永坤<sup>2</sup>

(1. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心; 卫生部人类疾病比较医学重点实验室; 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室; 北京 100021; 2. 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130122)

**【摘要】** 实验动物是生命科学和生物医药创新研究等重要的支撑条件。随着生命科学和生物医药产业的快速发展, 实验动物、动物模型资源数量和种类都快速增加。据统计, 世界各地共培育着 200 多种共计 26 000 多个品系的实验动物, 其中有 2607 个品系为常规实验动物。美国是世界上实验动物资源大国, 拥有最全的实验动物品系品种资源和保藏机构。本文首次对美国实验动物资源进行了系统分析归类, 以便为我国实验动物资源发展提供借鉴。

**【关键词】** 实验动物; 动物模型; 品种; 资源

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0539-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.019

## Analysis of laboratory animal strain resources in USA

KONG Qi, XIA Xia-yu, ZHAO Yong-kun

(1. Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College, Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing, 100021 China; 2. Institute of Military Veterinary Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Changchun, 130122, China)

**【Abstract】** Laboratory animal is an important support condition in life science and biomedical research. With the rapid development of life science and biomedical industry, laboratory animals, and quantity and variety of animal model resource are rapidly increasing. According to the statistics, there are more than 200 kinds of a total of more than 26000 strains, including 2607 strains of conventional laboratory animals in the world. USA is a big country of laboratory animal resource in the world, with most of the laboratory animal breed resources and preservation organization. In this paper, we analyzed American laboratory animal resources, and provided references for the development of laboratory animal resource in China.

**【Key words】** Laboratory animal; Animal model; Strain; Resources

实验动物资源包括常规实验动物、基因突变动物、基因工程动物、动物模型、以及实验动物化的野生动物等。丰富的实验动物资源对生命科学、医药、农业和食品卫生的支撑作用直接或间接的影响人类健康、社会安全和生命科学的创新研究。实验动物资源是实验动物科学赖以发展的基础, 也是实验动物行业发展的重点内容。美国是生命科学技术最发达的国家, 实验动物资源在其中发挥了重要的支撑作用。本文对美国实验动物资源进行了系统梳理分析, 希望对

我国实验动物资源发展提供一定借鉴作用。

## 1 美国实验动物资源管理

为了有效开发和保存实验动物资源, 美国 NIH 在 1962 年设立的国家研究资源中心 (NCRR) 资助建立了许多实验动物种质资源中心, 并采用现代分子生物学、胚胎工程及低温生物学等手段来保存实验动物种质资源, 如美国的 Jackson 实验室、Charles River 公司、小鼠突变资源中心 (MMRRC) 等。在美

**【基金项目】** 中央科研院所基本业务费 (DWS200502, DWS200709, DWS201208) 和传染病科技重大专项 (2009ZX10004-503), 中国工程院咨询研究项目 (2012-XZ-18); 国家自然科学基金 (L1222012) 资助。

**【作者简介】** 孔琪 (1978 -), 助理研究员, 医学博士, 研究方向为实验动物学。E-mail: infor@cnilas.org。

国有 1300 个有关实验动物工作的生产与研究单位。实验动物工作已成为一个专业化、规格化、商品化和社会化的科研和经济体系。2011 年, NCRR 光荣地完成历史使命, 被国家转化科学促进中心 (NCATS) 替代。

美国国家研究资源中心 (NCRR) 是 NIH 下属的一个非官方非营利机构, 以项目资助的方式管理美国研究资源。美国 NIH 和其名下的比较医学部或实验动物中心多没有隶属关系, 只是要从 NIH 获取资助就要服从 NIH 的管理。NCRR 有个比较医学部 (DCM), 负责资助个人或研究机构以促进这些资源单位为生物医学研究提供高质量、无疾病的健康动物或特殊动物。NCRR 经过 50 年的发展, 资助开发了 200 种 26 000 个品系的实验动物资源, 包括: 啮齿类动物、非人灵长类动物、脊椎动物、鱼类动物、生物材料及相关生物信息等<sup>[1-2]</sup>。

相对于欧洲而言, 美国实验动物使用情况并不透明。有人估计美国每年实验动物使用量在 2000

万只以上。美国《动物福利法》和《实验动物福利法》要求美国农业部定期检查实验用猫、狗和非人类灵长类动物的使用情况 (不包括啮齿类动物、鱼类和鸟类)。美国动物福利组织 PETA 调查发现 NIH 资助的 25 个主要机构, 实验动物用量在过去 15 年间增加了 73%, 这主要是小鼠、大鼠的使用量<sup>[3]</sup>。

## 2 啮齿类实验动物资源

啮齿类实验动物包括小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠、仓鼠等, 是最常用的实验动物, 占总数的 90% 以上。啮齿类实验动物在生命科学和医药研究中发挥核心作用, 可以转化为人类疾病的治疗方法。特别是小鼠, 与人类遗传基因上许多共同之处, 常用于开发、生理、行为、疾病和基因工程技术等方面研究。基于啮齿类动物模型, 科学家们发现了许多重要的生物医学成果, 推动了人类健康发展。表 1 列举了美国啮齿类实验动物资源中心。

表 1 美国啮齿类实验动物资源中心一览表

Tab. 1 Rodent laboratory animal resource centers in USA

资源单位 Resource units	承担机构 Undertaking institutions	资源种类 Resources
基因敲除项目 Knockout Mouse Project (KOMP) Repository (2 期)	包括杰克逊实验室、密苏里大学、加州大学戴维斯分校、北卡罗莱纳大学、贝勒医学院等	13 581 个小鼠品系, 包括活体小鼠 957 个, ES 细胞系 13 466 个。
突变小鼠资源中心 Mutant Mouse Regional Resource Centers (MMRRC)	包括杰克逊实验室、密苏里大学、加利福尼亚大学、北卡大学等。是一个信息库, 多个不同国家的中心的整合信息。	32 776 个小鼠品系, 包括活体小鼠 3856 个, ES 细胞系 28 920 个。
诱发突变小鼠资源 (Induced Mutant Resource)	杰克逊实验室	304 种化学诱变小鼠品系。
国家无菌啮齿类动物资源中心 (National Gnotobiotic Rodent Resource Center)	北卡罗来纳大学	无菌、悉生、SPF 小鼠、大鼠、斑马鱼等 20 多种。小鼠品系包括 129S6/SvEv、BALB/C、C57BL/6J、Swiss、CD 和部分转基因动物。
鹿鼠遗传资源中心 (Peromyscus Genetic Stock Center)	南卡罗来纳大学	10 种野生型鹿鼠和 20 种突变型鹿鼠。用于生态学、遗传学、生物进化、疾病和行为学研究。
特殊小鼠品系资源 (Special Mouse Strains Resource)	杰克逊实验室	249 个特殊品系, 包括重组近交系 (199) 和染色体置换系 (50)。
大鼠资源研究中心 (Rat Resource and Research Center, RRRRC)	包括密苏里大学、密歇根大学和德克萨斯大学等	300 多种大鼠品系。
Cre 条件敲除品系资源 (Cre Driver Strain Resources)	杰克逊实验室	Cre 品系, Cre 报告品系, loxP-flanked (floxed) 品系。

## 3 非人灵长类实验动物资源

非人灵长类动物是生物医学研究中常用实验动物, 美国 NIH 资助开发非人灵长类动物 (NHP) 人类

疾病模型, 提供基础设施和专业知识, 并促进 NHP 在生物医学研究各个领域应用, 以及提高动物福利等。美国有八个国家级非人灵长类实验动物中心, 还有若干实验基地 (表 2), 其 NHP 资源最丰富。

表 2 美国非人灵长类实验动物资源中心一览表

Tab. 2 Nonhuman primate laboratory animal resource centers in USA

资源单位 Resource units	承担机构 Undertaking institutions	资源种类 Resources	研究领域 Research fields
加利福尼亚国家灵长类研究中心 (California National Primate Research Center)	加利福尼亚大学	5300 只恒河猴和 56 只南美伶猴。	传染病、生殖和发育、神经疾病、肺疾病、器官移植、认知行为等。
新英格兰国家灵长类研究中心 (New England National Primate Research Center) 注:已关闭。	哈佛大学医学院	9 种 1700 多只猴,包括 1000 多只恒河猴,其他旧大陆猴,及新大陆猴,包括狨猴、松鼠猴、绢毛猴。	艾滋病、癌症、药物成瘾、精神疾病、神经退行性疾病等。
俄勒冈国家灵长类研究中心 (Oregon National Primate Research Center)	俄勒冈州大学	3800 只恒河猴,335 只日本雪猴,10 只长尾黑颞猴,9 只狒狒和 85 只食蟹猴。	生殖和发育学、神经科学、病理学和免疫学、代谢性疾病、干细胞治疗、衰老等研究。
西南国家灵长类研究中心 (Southwest National Primate Research Center)	西南大学	3200 只猴,包括 1600 只狒狒,其他为 SPF 恒河猴、狨猴和绢毛猴。还有 160 只黑猩猩。	慢性疾病、传染病和生物防御、发育和老化等。
图兰国家灵长类研究中心 (Tulane National Primate Research Center)	图兰大学	5000 只猴,包括恒河猴、食蟹猴、狒狒 (5 种)、绿猴、松鼠猴、白眉猴 (5 种)、赤猴、豚尾猴。	传染病和再生医学研究,包括艾滋病、莱姆病、结核病和生物防御相关产品。
华盛顿国家灵长类研究中心 (Washington National Primate Research Center)	华盛顿大学	3000 只猴,包括食蟹猴、恒河猴、松鼠猴、豚尾猴。	艾滋病相关疾病、系统生物学、神经科学、生殖和发育学、新发传染病等。
威斯康辛国家灵长类研究中心 (Wisconsin National Primate Research Center)	威斯康辛大学	3000 只猴,包括恒河猴、食蟹猴和狨猴。	全球传染病 (GID)、再生和生殖医学 (RRM)、能量代谢和慢性疾病 (EMCD)、神经科学。
耶基斯国家灵长类研究中心 (Yerkes National Primate Research Center)	耶基斯大学	3400 只猴,包括恒河猴、白眉猴、松鼠猴、食蟹猴,还有黑猩猩。	微生物和免疫学、神经行为学和精神疾病、发育和认知神经科学、神经药理学和神经疾病。
加勒比灵长类动物研究中心 (CPRC)	波多黎各大学医学院	SPF 猴	社会和性行为,群体遗传学、生殖生物学、药理学、功能形态和自发疾病和恒河猴寄生虫。
狒狒研究资源 (Baboon Research Resource)	俄克拉荷马大学健康科学中心	不同年龄段的狒狒及 SPF 狒狒。	狒狒相关生物医学、行为学研究,疾病动物模型。
松鼠猴繁殖和研究资源 (Squirrel Monkey Breeding and Research Resource)	安德森癌症中心热带灵长类中心	450 个不同年龄段的松鼠猴。	行为研究、生殖内分泌学、医学灵长类动物学、遗传学。
长尾黑颞猴研究中心 (Vervet Research Colony)	维克森林大学医学院	每年提供 100 只长尾黑颞猴,包括 SPF 猴。	代谢性疾病、神经病理学、生殖生物学研究。

#### 4 其他脊椎和无脊椎动物资源

包括酵母、果蝇、线虫、四膜虫、海兔、猪、蟾蜍等资源 (表 3), 以及使用这些动物开发的动物模型、基因工程动物、干细胞、细胞系或遗传资源、计算机建模等。

#### 5 水生实验动物资源

包括斑马鱼、其他鱼类、海洋鼻涕虫等水生动物、疾病模型和相关生物材料。水生实验动物生殖周期短,卵透明,常用于发育生物学、行为学、人类疾

病和功能基因组学研究。俄勒冈州大学斑马鱼国际资源中心拥有斑马鱼 13 161 个品系。德克萨斯州大学的剑尾鱼遗传资源中心拥有剑尾鱼 23 种,65 个品系。

#### 6 其他资源

美国其他生物材料资源中心,包括基因分析资源、信息资源、兽医资源与试剂、生物材料资源等。德州农工大学医药学院健康科学中心再生医学研究所拥有数千种成人间充质干细胞资源。美国疾病研究交换所 (NDRI) 拥有人体组织和器官资源,每年提

供 4000 多份样本给癌症、传染病、心脏病、毒理和器官移植等研究机构。德州农工大学 Kingsville 自然毒素研究中心构建了毒蛇资源中心,拥有 29 种 450

多条毒蛇,提供蛇的毒液、腺体、皮肤、血液和器官用于毒物研究。

表 3 美国无脊椎实验动物资源中心一览表

Tab. 3 Invertebrate laboratory animal resource centers in USA

资源单位 Resource units	承担机构 Undertaking institutions	资源种类 Resources
果蝇资源中心 (Bloomington Drosophila Stock Center)	印第安纳大学	果蝇 41 000 个品系
果蝇基因组学资源中心 (DGRC)	印第安纳大学	100 万以上的细胞克隆
线虫遗传资源中心 (Caenorhabditis Genetics Center, CGC)	明尼苏达大学、爱因斯丹医学院	线虫 11 273 株
国家海兔资源中心 (National Resource for Aplysia)	迈阿密大学	海兔 10 000 多个
国家嗜热四膜虫资源中心 (National Resource for Cephalopods)	康奈尔大学	多种嗜热四膜虫
国家猪资源研究中心 (National Swine Resource & Research Center)	密苏里大学	杜洛克、长白猪等 10 个品系和 16 个转基因品系。
国家蟾蜍资源中心 (National Xenopus Resource Center)	海洋生物研究所	25 个非洲爪蟾品系,提供近交系、突变系和转基因爪蟾。

## 7 结束语

本文对美国实验动物资源进行了系统梳理。自上个世纪 50 年代以来,以英美为首的发达国家在实验动物科学技术研究领域投入大量资金开发实验动物资源和技术,建立实验动物研究服务中心,为社会提供资源与技术服务<sup>[4]</sup>。这些丰富的实验动物资源,带动了欧美生物技术和医药产业蓬勃发展,已经成为欧美国家人民健康、经济发展和社会稳定的重要引擎,成为欧美国家引领世界发展的核心动力。由于国情体制不同,我们不能照搬美国实验动物资源发展模式,但对我国实验动物资源建设具有借鉴意义。

### 7.1 制定实验动物资源建设中长期规划

由于缺乏长期系统规划,过去我们一方面通过引进解决燃眉之急,一方面在小规模研制。我国实验动物品系,尤其是基因工程品系每年增加不超过 200 种。以这样的速度,我们需要 100 年才能达到发达国家现在的水平。我们的实验动物资源面对发达国家,几乎是微不足道的。如果生命科学、医学、药学等领域的科技创新要和发达国家进行竞争,我们必须跳脱现在的思路,在 5~10 年内将实验动物资源建设提升到一定高度。

### 7.2 建立稳定的资金投入机制

实验动物资源保存是一项社会公益性的基础工作。应该把实验动物资源研制、保存与共享所需经费纳入国家财政经常性支出,代替目前的临时性项目方式维持国家实验动物资源库或中心的正常运

转<sup>[5]</sup>。

### 7.3 实现实验动物资源集中研制和共享

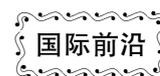
改变“重建设、轻运行、无管理”的现状。我国实验动物资源需要以优势实验室或专业研究机构的集中研制为主,辅以分散深入分析,形成资源研制、资源积累共享、创新研究相互支持的良性循环<sup>[6]</sup>。各机构应建立实验动物资源长期保持机制,并提供维持经费,或交到国家指定机构统一保存。重视实验动物数据库建设<sup>[7]</sup>。

(致谢:感谢秦川教授对本文的指导和帮助。)

### 参 考 文 献

- [1] 美国 NIH 网站 [M/OL], (2015-04-16) [http://dpcpsi.nih.gov/orip/cm/resource\\_dir.aspx](http://dpcpsi.nih.gov/orip/cm/resource_dir.aspx)
- [2] 李亚子, 钱庆, 王敏, 等. 美国国家科研资源中心 (NCRR) 战略规划及对发展我国转化医学的思考 [J]. 基础医学与临床. 2011, 31(3): 339-343.
- [3] Goodman J, Chandna A, Roe K. Trends in animal use at US research facilities [J]. J Med Ethics, doi:10.1136/medethics-2014-102404.
- [4] National Research Council (US) Institute for Laboratory Animal Research. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [M]. Washington (DC): National Academies Press (US); 2008.
- [5] 岳秉飞. 实验动物资源开发, 引进, 共享, 供应 [J]. 中国比较医学杂志. 2011, 21(10): 45-47.
- [6] 张连峰. 我国常用实验动物资源的现状及对未来发展的思考 [J]. 中国比较医学杂志. 2011, 21(10): 39-44.
- [7] 傅江南, 黄韧, 胡凯, 等. 在 Internet 网上建立实验动物资源信息库系统的研究 [J]. 中国实验动物学杂志. 2001, 11(1): 59-61.

[收稿日期] 2015-05-14



## How can standardised reporting of animal research advance the 3Rs?

Adrian Smith

Norecopa, P. O. Box 750 Sentrum, 0106 Oslo, Norway *adrian.smith@norecopa.no*

This article is based on a presentation held at the *Second UK-China Seminar on Research Animal Welfare and Ethics* in Beijing, 17 – 19 March 2015.



艾德里安·史密斯 (Adrian Smith): 挪威 3R 原则国家共识平台 (Norecopa) 教授, 英国兽医, 出生于 1955 年。1979 年从剑桥大学获得兽医医学学位。在英国进行混合兽医执业 1 年后, 于 1980 年移居挪威。1988 年, 他凭借论文“美国蓝狐 (*Alopex lagopus*) 睾丸活动的季节性改变”获得博士学位。同年, 他被任命为毛皮动物和实验动物健康教授。1991 ~ 2009 年, 受雇于挪威兽医学院, 从事与实验动物相关的各种工作。2003 ~ 2011 年间, 艾德里安·史密斯担任欧洲实验动物医学会专家, 直到他离开兽医学院。艾德里安·史密斯与挪威主管部门紧密合作, 参与制定实验动物科学教育和培训的国家要求; 合作起草挪威现行动物实验管理规定; 参与制定兽医护理人员培训课程以及开发 3R 原则国家共识平台。2005 ~ 2006 年, 他领导临时 3R 原则平台工作, 并在 2007 年平台正式成立后, 成为 Norecopa 平台永久的秘书长 ([www.norecopa.no](http://www.norecopa.no))。

Adrian Smith

Title and affiliation:

Professor

Norecopa (Norway's National Consensus-Platform for the 3Rs)

Brief introduction:

Adrian Smith is a British veterinarian, born in 1955. He obtained his degree in Veterinary Medicine at Cambridge University in 1979. After a year in mixed veterinary practice in England, he emigrated to Norway in 1980. He took his doctoral degree on the “seasonal changes in testicular activity in the blue fox (*Alopex lagopus*)” and was appointed Professor in the health of furbearing animals and laboratory animals in 1988.

From 1991 to 2009, He was employed at the Norwegian School of Veterinary Science in a range of positions, all related to the use of animals in research.

He was a Diplomate of ECLAM (European College of Laboratory Animal Medicine) from 2003 until he left the Veterinary School in 2011. He has collaborated closely with the Norwegian authorities, including development of national requirements for education and training in laboratory animal science; co-authorship of the draft of Norway's current Regulation on animal experimentation; participation in the creation of a course for the training of veterinary nurses; and the development of a national consensus – platform for the 3Rs.

He led the work of a temporary 3R – platform in 2005 – 2006 and became secretary of the permanent platform, Norecopa ([www.norecopa.no](http://www.norecopa.no)), when it was established in 2007.

【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2015) 05-0543-08

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.020

**【Abstract】** Although the publication of peer-reviewed scientific papers is the major way in which scientists communicate with one another, these papers often lack essential information about the conditions under which the animals lived and how they were treated during the experiments. Without this information it may be impossible to evaluate the studies, replicate them in another laboratory, or use them to advance the 3Rs in other animal experiments. This paper gives some advice on how the reporting of animal research can be improved.

**【Key words】** Laboratory animal; 3Rs; Animal welfare

## Introduction

Good reporting of animal research is an essential part of the quality control of the use of laboratory animals (Figure. 1). Without it, researchers planning new experiments will not be able to discover experiments which have already been performed, and therefore risk using animals unnecessarily.

Despite that fact that it is in researchers' own interests to report experiments clearly, there is plenty of evidence that this is not the case.

Jane Smith and coworkers<sup>[1]</sup> examined 149 papers published in 8 journals from 1990 – 1991. Among the parameters not mentioned in these papers were:

- Number of animals: 30%
- Number of animals per cage: 73%
- Sex of the animals: 28%
- Age of the animals: 52%
- Weight of the animals: 71%
- Source of the animals: 53%
- Room temperature: 72%
- Relative humidity in the room: 89%
- Daylength in the animal room: 72%
- How the animals were killed: 45%

Whereas there were often detailed descriptions of the chemicals and equipment used and treatments performed, little was written about the animals themselves (where the greatest source of variability lies), including choice of sample size and whether the animals were randomised to the treatment groups or not. Many of these omissions make it more difficult to advance the 3Rs, since practical techniques such as methods of drug administration, blood sampling, anaesthesia, analgesia and humane endpoints all play important roles in defining how much suffering the animal is subjected to. Knowledge of the methods used may also be essential if the experiment is to be reproduced in another laboratory. Kilkenny and coworkers<sup>[2]</sup> found similar results in 271 papers, mostly published in 2003 – 2005.

Bearing in mind that large bibliographic databases may only cite the title and abstract of an article, it is crucial that these are used actively to promote any advances in the 3Rs which the paper may describe. Of-

ten, however, these are rather uninformative. All researchers should be aware of the responsibility which they have to disseminate information about new 3R techniques, and should write their papers accordingly.

For example, the first paper which described the use of the saphenous vein for blood sampling in mice did not mention the technique in the title or abstract. It was not until a separate paper was written with the title *Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea-pig, ferret and mink* that this technique became widely known<sup>[3]</sup>. This paper has for many years been the second or third most cited publication in the journal *Laboratory Animals*<sup>[4]</sup>.

Publication of a new 3R technique does not have to be done in a high-impact journal. The most important aspect is to make sure it is indeed published, so it can be found by search engines and cited.

Ideally, the Materials & Methods section of a paper should be so detailed that it is possible to reproduce the study in another laboratory. However, this information takes space. There are two solutions to this challenge:

1. The first is to avoid all unnecessary or meaningless words in the text in the journal, e. g. 'drinking' water, 'farm' pigs, 'standard conditions'.

2. The second solution is to publish the remaining information elsewhere. Many journals now offer supplementary online space (which is generally unlimited) where more information about the methods and results can be posted. Failing that, most research institutions have access to a website where this information can be placed and referred to in the paper.

Increasing attention is now being focused on the fact that negative results are not published as frequently as positive ones. This automatically causes an incorrect bias in the literature towards positive results. Negative results may be just as important for the scientific community, even if they are less newsworthy. To counter this, many medical journals require registration of trials before they start, to prevent the under-reporting of negative results<sup>[5]</sup>. There are also now a number of journals dedicated to reporting negative results, such as:

- the Journal of Negative Results<sup>[6]</sup>

- the Journal of Negative Results in Biomedicine<sup>[7]</sup>
- the Journal of Pharmaceutical Negative Results<sup>[8]</sup>
- The All Results Journals<sup>[9]</sup>.

## Guidelines for standardised reporting

Good reporting helps researchers better plan their own experiments to identify and ensure the quality of the critical points which may fail if these are not sufficiently attended to. Identification of the most critical points in an experiment should be performed both for animal welfare reasons and to ensure the scientific value of the experiment. When these points have been identified, sufficient resources can be allocated to prevent failure.

Standardised reporting and increased implementation of the 3Rs is also dependent upon a culture of care among staff at all levels of the animal facility. Quality assurance can be achieved by putting in place a number of procedures at different levels in the system:

- Standard Operating Procedures (SOPs) which describe how to perform the techniques
- Education and training in these procedures, to ensure competence
- A checklist describing all the parameters to be reported in the scientific paper. This checklist can then be used on a daily basis by all those involved in the experiment. It can also serve as a contract between the researcher and the facility, so that nothing is forgotten and no doubt exists as to who has responsibility for measuring parameters at the various stages of the study.
- A description of the operation of the facility. The AAALAC Program Description template<sup>[10]</sup> can be very useful for this purpose, even if AAALAC accreditation is not being applied for, because it covers all four major areas of the operation of facility:
  - Institutional policies on animal care and use
  - Animal environment, housing and management
  - Veterinary care
  - Physical plant
  - Finally, a Master Plan should be written, de-

scribing tasks which need to be performed during the year and which otherwise easily get forgotten, particularly if they are not performed often, such as service of equipment.

In addition to these checklists, there now exist several guidelines on how to report animal experiments, to ensure that essential information is not forgotten. The most well-known ones are the ARRIVE guidelines<sup>[11]</sup>, which also are available in Mandarin<sup>[12]</sup> and which have been adopted by many scientific journals. Among other similar guidelines is the Gold Standard Publication Checklist<sup>[13]</sup>, the authors of which have published a comparison with ARRIVE<sup>[14]</sup>.

## Use of the Internet to find 3R resources

With the free availability of information on the Internet, it may be tempting to assume that literature searching skills are no longer needed. The very opposite is true, if relevant papers are to be located among millions of other texts. Indeed, a quick glance at the Internet shows that papers describing 3R advances are not easy to locate.

The World Wide Web consists of two parts, that have been called *The Surface Web* and *The Deep Web*. The Surface Web, which is that part searched by the search engines, is useful for locating a specific document which the researcher knows exists, or for looking for a starting-point for information on a specific topic. Likewise, it is useful for finding so-called “grey literature”, such as reports which are not published in the scientific literature but which may be available on, for example, institutional websites. These reports may be just as valuable scientifically as published papers at some stages when planning experiments.

The Deep Web is several orders of magnitude larger than the Surface Web. The reasons why this material is less accessible include:

- The use of encryption
- Password-protected sites requiring registration or subscription
- Material which is not formatted for standard

search engines, such as text in images or video files.

It should therefore be clear that scientists need access to specialist sources of information if they are to locate the resources they need to advance the 3Rs.

## Databases, guidelines, information centres, journals and discussion groups

The fact that scientists all too rarely use 3R terms in the titles, keywords or abstracts of their papers, is made worse by the fact that many are not aware of the many specialist databases, which should be searched as well as the better known and larger bibliographic databases such as MEDLINE. There is also relatively poor overlapping between these databases, so one search in a large database, even if it returns thousands of hits (many of which will prove to be irrelevant), is not sufficient. Neither do we have one "Journal of Alternatives to Animal Experiments" to search in; the advances that have been made in the 3Rs are published alongside papers on very different topics.

In addition, the growth of the Internet has resulted in an enormous number of websites containing information of relevance to the 3Rs and a large number of specialist databases. Many laboratory animal facilities have their own lists of resources, but these are often rather random, infrequently updated and not particularly comprehensive.

In 2005, Smith and Allen published a paper giving a global overview of available databases, information centres and guidelines which may be of use when planning research that may involve animals<sup>[15]</sup>. In 2014 this information was updated and transferred to a database:

- 3R Guide<sup>[16]</sup>: information on approx. 320 guidelines, databases, information centres, journals and discussions groups of relevance to the 3Rs (<http://www.3RGuide.info>).

The 3R Guide database supplements two other databases hosted by Norecopa:

- NORINA<sup>[17]</sup>: information on approx. 3,600 audiovisual products which can be used as alternatives

or supplements to the use of animals in education and training (<http://oslovet.norecopa.no/NORINA>)

- TextBase<sup>[18]</sup>: information on approx. 1,600 textbooks and other literature within Laboratory Animal Science and the 3Rs (<http://oslovet.norecopa.no/Textbase>)

All these three databases can be searched using an intelligent search engine at <http://search.norecopa.no>.

### *World Congresses on the 3Rs*

Another important source of information on the 3Rs, and a driving force for their implementation, is the series of World Congresses on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences which have been held every 2–3 years since 1993. The most recent of these was the 9th Congress in Prague in 2014<sup>[19]</sup>, where there were over 890 abstracts and 1000 participants from 49 countries. The next Congress is to be held in Seattle in 2017.

### *National 3R Centres*

Many national 3R centres now exist, such as the NC3Rs in the UK<sup>[20]</sup> and the National Consensus Platforms that are members of the European Consensus-Platform on Alternatives, *ECOPA*<sup>[21]</sup>. Several animal welfare organisations have also scientific departments performing valuable tasks related to the 3Rs, and these should also be consulted when planning a literature search. These include UFAW<sup>[22]</sup>, FRAME<sup>[23]</sup> and the RSPCA<sup>[24]</sup> in the UK.

### *Discussion Groups*

The ease in which electronic discussion groups can now be set up, using email, has led to a large number of groups of relevance to the 3Rs. These may be a useful starting point if an initial literature search is fruitless. One of the largest and oldest is CompMed (Comparative Medicine List)<sup>[25]</sup>. More examples may be found in the 3R Guide database<sup>[26]</sup>.

### *Journals*

Likewise, there is now a large number of journals of relevance to laboratory animal science and the 3Rs. Not all of these are well-known to scientists. Again, the 3R Guide database provides a list, sorted by

scientific discipline<sup>[27]</sup>. Many of these have published theme numbers. The papers in these may be a good starting-point for a literature search, even if they are a few years old, because they help to identify key institutions and researchers within the field. These can then be contacted to access the latest knowledge in that area.

### *Guidelines*

Scientific papers which refer to guidelines on the care and use of animals in research will indirectly contribute to the advancement of the 3Rs by signalling to other researchers that there are standards to follow. Many guidelines have been produced locally, for example by the institutional care and use committee, but an increasing number have been produced by specially appointed working groups and are published in peer-reviewed journals. A search should always be made, when planning an experiment, for relevant guidelines for the various stages of the study. A global collection of guidelines is available in the 3R Guide database<sup>[28]</sup>.

Consensus meetings on areas of animal use may also be useful sources of guidance for future research, since these often discuss problem areas and suggest solutions. For example, Norecopa has arranged international consensus meetings on harmonisation of the care and use of fish, wildlife and agricultural animals. All presentations from these meetings are available on the internet, where they function as a lasting resource, also for those who did not attend. At these meetings, the participants also wrote consensus statements describing the strengths, weaknesses and challenges within each area. Such documents are a good way of highlighting areas of concern so that others can take up the challenge and work to solve the issues raised. A similar set of meetings is being arranged in the UK<sup>[29]</sup>.

At the 2nd World Congress in Utrecht in 1996, an initiative was taken to form what became Altweb (Alternatives to animals on the web)<sup>[30]</sup> in 1997. Altweb is now one of several websites offering comprehensive information on the 3Rs and a search guide. Similar search guides have been produced by others, including the Canadian Council on Animal Care (CCAC)<sup>[31]</sup>.

## **Guidelines for good literature searches**

Good reporting is valueless if literature searches are not performed correctly. These are therefore an essential part of the work to advance the 3Rs. Many scientists need professional help to construct an adequate search and advice on which specialist databases they should use.

When performing a search, it can be equally frustrating to retrieve too few hits as it is to retrieve many thousand. A combination of search efficiency (minimising the number of irrelevant or poor-quality results) and search effectivity (maximising the number of high-quality results) must be sought after. Writing one long search string into an Internet search engine will not produce this result.

As a general principle, the following basic search strategies should be followed:

- Define the search as well as possible
- Identify synonyms and 3R terms
- Remember the differences between British and American English
  - Use several databases (there is often little overlapping)
  - Learn the differences between the search engines and their default settings
  - Get used to using Boolean operators to expand or narrow a search, and check which terms are supported by the search engine
  - Look for core articles and key authors
  - Use the possibilities on the Internet to get in touch with key research labs

Knowledge of which Boolean operators (e. g. the terms AND, OR, NOT) and other commands are supported by the search engine in question is essential. Truncation of search terms using wildcards (for example ? or \*) may be a good way to increase hits, but this may also lead to unwanted results. Time should be taken to read the user manual before attempting a search using any search engine.

Identifying suitable search terms may be a problem, particularly if the scientist is unfamiliar with the field or has a poor grasp of the English language. In

these cases a thesaurus or synonym list will be helpful. A thesaurus is a closed list of terms used to index and search databases. A synonym list is a collection of words with similar meanings (e. g. “heart“ and “cardiac”). It is often a good idea to start a literature search with a database that uses a thesaurus. Examples of thesauri are:

- the MeSH ( Medical Subject Headings ) used by PubMed at the US National Library of Medicine, where “animal use alternatives” is one search term<sup>[32]</sup>
- the US National Agricultural Library’s thesaurus for alternatives to animals<sup>[33]</sup>
- EURL ECVAM’s thesaurus within *in vitro* toxicology<sup>[34]</sup>

The Animal Welfare Information Center (AWIC) at the US Department of Agriculture has also made some sample searches available for guidance<sup>[35]</sup>.

In addition to these principles, the search itself should be performed in several parts, and only after this has been done should the individual parts be combined<sup>[36]</sup>. By doing this, it is easier to refine (increase or decrease) the hits obtained for each part of the search. A typical research study involves three aspects:

- The animal model
- The intervention to be carried out on that animal model
- The disease or condition which comprises the research interest

In many studies there is also a fourth component; the disease or condition in the target species (often humans) which the animal model is trying to provide information about. This is not always mentioned in the title/abstract of relevant papers and it is therefore not always a good idea to add this component.<sup>37</sup>

For example, in the following study there are four Search Components (SC):

*The effect of ( SC1 ) group-housing on ( SC2 ) blood pressure in ( SC3 ) rats used in ( SC4 ) diabetes research*

Separate literature searches should be performed for the components before they are combined into one search string. By doing this, the search terms and re-

sulting number of hits for each component can be evaluated and adjusted before this information is pooled in the final search ( SC1 AND SC2 AND SC3 ( AND SC4 ) ). This is explained in much more detail in a paper by Leenaars et al. , 2012<sup>37</sup>.

## Search Guides

There are a number of good guides to literature searching available. They include:

- The EURL ECVAM Search Guide<sup>[37]</sup>
- CCAC Three Rs Search Guide<sup>[38]</sup>
- AltWeb: A step-by-step approach to an alternatives search<sup>[39]</sup>
- UC Davis guide to bibliographic databases for alternatives searching<sup>[40]</sup>
- IMPI I3R working party report on Searching for 3Rs Information – Published Literature Sources<sup>[41]</sup>

### *The EURL ECVAM Search Guide*

The EU Joint Research Centre’s Reference Laboratory for the validation of alternative methods, EURL-ECVAM<sup>[42]</sup>, has produced an excellent Search Guide, single copies of which may be obtained free of charge from the EU Bookshop<sup>36</sup>. The Guide includes

- Data sheets on
- Journals
- Databases
- Open Access resources
- Organisations
- Internet search engines
- Data Retrieval Procedures
- A Check-list for searching for information on alternative methods
- Tables comparing the features of
- Databases
- Journals
- Organisations

The Guide also contains *Seven Golden Steps to Successful Searching*:

1. Clearly define and be aware of your specific information need
2. Identify the fundamental components of your scientific approach
3. Choose the most appropriate information re-

sources

4. Compile relevant and necessary search terms
5. Start your search with a simple query in a 3Rs

specific context

6. Limit search results from more extensive resources
7. Broaden the search horizon

A useful summary of how to approach the planning of an experiment which may involve animals is provided by a flow diagram from the consortium of UK animal welfare organisations Focus on Alternatives (FoA). It may be downloaded free of charge from the internet<sup>[43]</sup>, together with a worked example<sup>[44]</sup>.

## Systematic reviews

Systematic Reviews are methodical and standardised literature searches, as opposed to less rigorous Narrative Reviews which are more frequently carried out by researchers and are less comprehensive, and are more likely to be influenced by the writer's knowledge or interest in an area.

The great advantage of systematic reviews over narrative reviews is that they make it possible to conduct *Synthesis of Evidence* by meta-analysis of the papers found in the literature. This is the use of statistical methods to summarize the results of independent studies. In this way, new results can be obtained from animal experiments which have already been carried out, and which would not have been obvious unless a comprehensive search and analysis of the literature had been performed. This is clearly an important way of advancing the 3Rs. Guidelines for systematic reviews are available<sup>[45,46]</sup>.

## Conclusions

The importance of ensuring that scientific experiments are reported in sufficient detail and in accessible sources is often underestimated. Without good reporting it is difficult to analyse the scientific literature and plan future studies where the 3Rs are given sufficient attention. Guidelines for standardised reporting should be adopted on a greater scale. To fully advance the 3Rs, it is also equally important that scientists are given

sufficient assistance to conduct thorough searches of the literature.

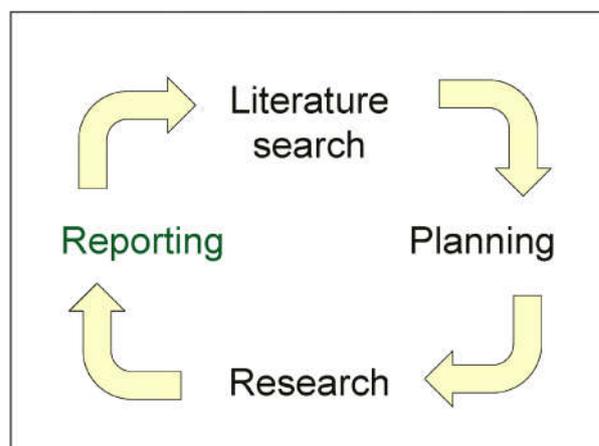
## Acknowledgements

The author wishes to thank all those who have contributed to the work of Norecopa:

- Norwegian Research Council
- Ministries of Agriculture and Fisheries
- Laboratory Animals Ltd.
- Dag S. Stiansen Foundation
- Scottish Accreditation Board

and those who have funded the NORINA database:

Nordic Society Against Painful Experiments, Dag S. Stiansen Foundation, The Norwegian Research Council, the Norwegian School of Veterinary Science, Laboratory Animals Ltd., RSPCA, UFAW, AstraZeneca, Solvay Pharmaceuticals, the Swedish Fund for Research without Animal Experiments, Norwegian Federation for Animal Protection, Allkopi, The Humane Society of the United States, St. Andrew Animal Fund, Microsurgical Developments Foundation, AAA-LAC International, LASA, NEAVS, Amersham Health.



A high standard of reporting advances the 3Rs because it facilitates the discovery of relevant literature when performing a literature search, which is an essential step when planning studies that might involve the use of animals.

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Smith JA, Birke L, Sadler D. Reporting animal use in scientific papers[J]. *Lab Animals*, 1997, 31: 312-317.

- [ 2 ] Kilkenny C, Parsons N, Kadyszewski E, et al. Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals [ J ]. *PLoS ONE* 2009, 4 ( 11 ) : e7824. doi:10.1371/journal.pone.0007824.
- [ 3 ] Hem A, Smith AJ, Solberg P. (1998); Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea-pig, ferret and mink [ J ]. *Lab Animals*, 1998, 32: 364 - 368. <http://lan.sagepub.com/content/32/4/364.full.pdf>.
- [ 4 ] <http://lan.sagepub.com/reports/most-cited>.
- [ 5 ] <http://www.icmje.org/recommendations/browse/publishing-and-editorial-issues/clinical-trial-registration.html>.
- [ 6 ] <http://www.jnr-ceb.org/index.php/jnr>.
- [ 7 ] <http://www.jnrhm.com>.
- [ 8 ] <http://www.pnrjournal.com>.
- [ 9 ] <http://www.arjournals.com/ojs>.
- [ 10 ] <https://www.aalac.org/programdesc/index.cfm>.
- [ 11 ] <https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>.
- [ 12 ] [https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Guidelines/ARRIVE in mandarin v3. pdf](https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Guidelines/ARRIVE%20in%20mandarin%20v3.pdf).
- [ 13 ] Hooijmans CR, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M. A gold standard publication checklist to improve the quality of animal studies, to fully integrate the three Rs, and to make systematic reviews more feasible [ J ]. *Altern Lab Animals*, 2010, 38: 167 - 182.
- [ 14 ] Hooijmans C, de Vries R, Leenaars M, et al. The Gold Standard Publication Checklist for improved design, reporting and scientific quality of animal studies. *Lab Animals*, 2011, 45:61.
- [ 15 ] Smith AJ, Allen T. The use of databases, information centres and guidelines when planning research that may involve animals [ J ]. *Animal Welfare*, 2005, 14 ( 4 ) : 347 - 359. [http://www.nal.usda.gov/awic/newsletters/v13n3/AWICBulletinV13N3. pdf](http://www.nal.usda.gov/awic/newsletters/v13n3/AWICBulletinV13N3.pdf)
- [ 16 ] <http://www.3RGuide.info>.
- [ 17 ] <http://oslovet.norecopa.no/NORINA>.
- [ 18 ] <http://oslovet.norecopa.no/textbase>.
- [ 19 ] <http://www.wc9prague.org>.
- [ 20 ] <http://NC3Rs.org.uk>.
- [ 21 ] <http://www.ecopa.eu>.
- [ 22 ] <http://www.UFAW.org.uk>.
- [ 23 ] <http://www.FRAME.org.uk>.
- [ 24 ] <http://www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals>.
- [ 25 ] [https://www.aalas.org/get-involved/listservs/compmed - . VZztcnC5tn8](https://www.aalas.org/get-involved/listservs/compmed-VZztcnC5tn8).
- [ 26 ] <http://oslovet.norecopa.no/3R/produkter.aspx?type=68> \_ Discussion forums.
- [ 27 ] <http://oslovet.norecopa.no/3R/produkter.aspx?type=69> \_ Journals.
- [ 28 ] <http://oslovet.norecopa.no/3R/produkter.aspx?type=66> \_ Guidelines.
- [ 29 ] <http://norecopa.no/consensus-meetings>.
- [ 30 ] <http://altweb.jhsph.edu>.
- [ 31 ] <http://www.ccac.ca>.
- [ 32 ] <https://www.nlm.nih.gov/mesh>.
- [ 33 ] <http://www.nal.usda.gov/awic/alternatives/alternativeanimalthesaurus.htm>.
- [ 34 ] [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/f\\_main.cfm?idmm=7](http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/f_main.cfm?idmm=7).
- [ 35 ] <http://awic.nal.usda.gov/literature-searching-and-databases/sample-searches>.
- [ 36 ] Leenaars M, Hooijmans CR, van Veggel N, et al. A step-by-step guide to systematically identify all relevant animal studies [ J ]. *Lab Animals*, 2012, 46: 24 - 31.
- [ 37 ] <http://bookshop.europa.eu/en/the-eurl-ecvam-search-guide-pbLBN124391>.
- [ 38 ] <http://3rs.ccac.ca/en/searches-and-animal-index/guide>.
- [ 39 ] <http://altweb.jhsph.edu/resources/searchalt/index.html>.
- [ 40 ] <http://lib.ucdavis.edu/dept/animalalternatives/databaseapproach.php>.
- [ 41 ] [http://www.impi.org.uk/i3r\\_v2\\_jul2002.pdf](http://www.impi.org.uk/i3r_v2_jul2002.pdf).
- [ 42 ] <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
- [ 43 ] <http://oslovet.norecopa.no/EarlyPlanningPoster.pdf>.
- [ 44 ] <http://oslovet.norecopa.no/InvestigationPoster.pdf>.
- [ 45 ] de Vries RBM, Hooijmans CR, Langendam MW, et al. A protocol format for the preparation, registration and publication of systematic reviews of animal intervention studies [ J ]. *Evidence-Based Preclin Med*, 2015, 1 ( 1 ) : 1 - 9. e00007, DOI: 10.1002/ebm2.7.
- [ 46 ] <http://3rs.ccac.ca/en/research/systematic-reviews.html>.

[ 收稿日期 ] 2015-07-10