



中国科技论文统计源期刊 (中国科技核心期刊)
ZHONGGUO BIJIAO YIXUE ZAZHI

ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

原名《中国实验动物学杂志》

中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE



2015 **10**

邮发代号: 82-917

第25卷 (第10期) Vol.25 No.10

ISSN 1671-7856



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

中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

月刊 1991 年 3 月创刊

第 25 卷 第 10 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
《中国比较医学杂志》编辑部

出 版
中国实验动物学会

发 行
《中国比较医学杂志》编辑部
100021, 北京市朝阳区潘家园南里 5 号
电话: (010) 67779337
传真: (010) 67763674
E-mail: b67761337@126.com
http://zggydw.alljournal.ac.cn/
zgbjyxzz/ch/index.aspx

广告经营许可证
京朝工商广字第 8131 号

照 排
同方知网(北京)技术有限公司

印 刷
北京市百善印刷厂

邮发代号
82-917

定 价
每期 20.00 元, 全年 240 元

中国标准连续出版物号
ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

2015 年版权归中国实验动物学会所有
本刊已入万方数据网络和中国学术期刊(光盘版)电子杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国实验动物信息网、中国实验动物学会网站和世界卫生组织西太平洋地区医学索引等网络文献数据库, 如不同意自己论文入网, 请在来稿中声明。编辑部支付的稿酬已包含上述网站著作权使用费。

本刊电子版出版发行合作伙伴: 中国邮阅读网: www.183read.com

本期执行主编 顾为望
本期责任编辑 周文君

目 次 (本刊已入编“中文核心期刊要目总览”)

研究报告	
瘦素对大鼠肝纤维化的信号转导调控及 槲寄生碱的干预作用	孟霞, 王学丛, 丰平, 等(1)
斑马鱼 <i>uba6</i> 和 <i>uba7</i> 突变体的构建与鉴定	丁慧美, 阮华, 黄红辉(7)
降钙素基因相关肽转基因小鼠的建立 及血压动态分析	鲍丹, 董伟, 张旭, 等(11)
小鼠脑脊髓炎病毒 RT-PCR 方法的建立及初步应用	李晓波, 付瑞, 王吉, 等(17)
两种不同试剂对 SD 大鼠血凝四项检测结果的比对	高艳新, 朱玉洁, 李慕芳, 等(21)
姜黄素对沙漠干热环境大鼠生存率影响的实验	李佳佳, 刘江伟, 姚刚, 等(24)
雌雄激素联合作用对高脂血症小鼠血脂水平 及凝血功能的影响	戴雯, 李艳, 郑红云, 等(29)
天然山泉水对老龄小鼠 SOD 和 MDA 含量的影响	康爱君, 李雨薇, 王学文, 等(34)
对胃粘膜损伤有辅助保护功能的评价试验中的 病理学方法的探讨与建议	金毅, 甘玉玺, 刘远平, 等(38)
SD 大鼠标本血量不足对凝血四项检测结果的影响	翟青新, 黄爱军, 钱丽萍(42)
以 RBP-4 为靶点的疫苗对 2 型糖尿病小鼠血糖降低的研究	李彦涵, 余柄廷, 孙静, 等(46)
放射耐受性人小细胞肺癌亚株的建立	刘静, 田海梅, 李艳芬, 等(51)
当归补血汤对辐射损伤小鼠的防护作用	冯璟, 于远望(55)
技术方法	
胆汁螺杆菌实时荧光定量 PCR 检测方法的建立	伍妙梨, 袁文, 饶丹, 等(59)
树鼩粪便细菌分离培养与鉴定	刘丽君, 余柄廷, 胡凝珠, 等(64)
光纤引导直视下啮齿目动物气管插管的应用	魏稼黎, 李李, 刘镭(69)
综述与专论	
SAMHD1 限制 HIV/SIV 病毒复制功能研究的最新进展	彭灵娟, 丛哲, 魏强(71)
教育与科普	
实验动物的 10 个“不愿意”(六)	魏强(75)
广告	(封底)

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly Established in March 1991 Volume 25 Number 10 October 30 2015

Responsible Institution

China Association for Science and
Technology

Sponsor

Chinese Association for Laboratory
Animal Sciences
Institute of Laboratory Animal Science,
Chinese Academy of Medical Sciences

Editing

Editorial Board of Chinese Journal of
Comparative Medicine
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District,
Beijing 100021
Tel: (010) 67779337
Fax: (010) 67763674
E-mail: b67761337@126.com
[http://zgswdw.alljournal.ac.cn/
zgbjyxzz/ch/index.aspx](http://zgswdw.alljournal.ac.cn/zgbjyxzz/ch/index.aspx)

Editor-in-Chief

QIN Chuan(秦川)

Publishing

Chinese Association for Laboratory
Animal Sciences
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District,
Beijing 100021
Tel: (010) 67779337
Fax: (010) 67763674
E-mail: b67761337@126.com

Printing

The Baishan Printing House of
Changping, Beijing

Distributor

Editorial Office of Chinese Journal of
Comparative Medicine
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District,
Beijing 100021
Tel: (010) 67779337
Fax: (010) 67763674
E-mail: b67761337@126.com

Mail-order

Editorial Office of Chinese Journal of
Comparative Medicine

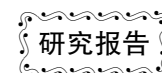
CSSN

ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

Copyright 2015 by the Chinese Association
for Laboratory Animal Sciences

CONTENTS IN BRIEF

- The signal transduction pathway of rats with liver fibrosis regulated by leptin and interfering effects of mistletoe alkali MENG Xia, WANG Xue-cong, FENG Ping, et al. (1)
- Construction and identification of zebrafish *uba6* and *uba7* mutants by TALEN DING Hui-mei, RUAN Hua, HUANG Hong-hui (7)
- Establishment and dynamic analysis of blood pressure in calcitonin gene-related peptide transgenic mice BAO Dan, DONG Wei, ZHANG Xu, et al. (11)
- Development and application of RT-PCR for detection of TMEV LI Xiao-bo, FU Rui, WANG Ji, et al. (17)
- Comparison of coagulation data measured with domestic produced and imported coagulation testing solutions on SD rat GAO Yan-xin, ZHU Yu-jie, LI Mu-fang, et al. (21)
- The experimental research of the effects of curcumin on survival rate of the rats in dry heat environment of desert LI Jia-jia, LIU Jiang-wei, YAO Gang, et al. (24)
- The synergistic effect of estradiol and testosterone on the lipids and coagulation function in mice with hyperlipidemia DAI Wen, LI Yan, ZHENG Hong-yun, et al. (29)
- Effect of natural mountain spring on SOD and MDA content in mice aging KANG Ai-jun, LI YU-wei, WANG Xue-wen, et al. (34)
- Pathologic study and suggestion on evaluation methods of auxiliary protective function on gastric mucosa injury JIN Yi, GAN Yu-xi, LIU Yuan-ping, et al. (38)
- Influence of insufficient blood specimens volume on the detection results of coagulation tests in SD rats ZHAI Qing-xin, HUANG Ai-jun, QIAN Li-ping (42)
- The research of RBP-4 vaccine reducing blood glucose of type 2 diabete mice LI Yan-han, YU Bing-ting, SUN Jing, et al. (46)
- The establishment of a radiation-resistant small cell lung cancer subline LIU Jing, TIAN Hai-mei, LI Yan-fen, et al. (51)
- The protective effect of Danggui Buxue decoction on radiation injury in mice FENG Jing, YU Yuan-wang (55)
- Detection of *Helicobacter bilis* using quantitative real-time PCR with TaqMan probe WU Miao-li, YUAN Wen, RAO Dan, et al. (59)
- Isolation, culture and identification of bacterial strains from tree shrews feces LIU Li-jun, YU Bing-ting, HUNING-zhu, et al. (64)
- A method of tracheal intubation in mice mediated by optical fiber WEI Jia-li, LI Li, LIU Lei (69)
- Progress of signaling pathways abnormal in multiple sclerosis ZHENG Na, WANG Qi, YIN Lin-lin (71)



瘦素对大鼠肝纤维化的信号转导调控及槲寄生碱的干预作用

孟霞¹, 王学丛², 丰平², 卢静¹, 王学江²

(1. 首都医科大学实验动物部, 北京 100069; 2. 首都医科大学病理生理教研室, 北京 100069)

【摘要】 目的 探讨瘦素调控大鼠肝纤维化的信号转导机制及槲寄生碱的干预作用。**方法** 以 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠模型为研究对象, 45 只大鼠随机分为三组, 分别为对照组、模型组、药物干预组。对照组不做任何处理, 自由饮食、饮水; 模型组和槲寄生碱治疗组分别腹腔注射 40% CCl₄-植物油溶液 2 mL/kg, 每周 2 次, 共 8 周。实验第 9 周, 治疗组经灌胃给予大鼠槲寄生碱 8g/(kg·d), 模型组灌胃给予等剂量的生理盐水, 共 8 周。实验第 17 周颈椎脱臼法处死所有动物, 取出肝脏左前叶。采用 HE 染色、MASSON 染色方法观察槲寄生碱对肝纤维化大鼠肝组织形态学的影响; 免疫组织化学的方法观察槲寄生碱对大鼠肝星状细胞瘦素及瘦素受体的影响。Western Blot 法检测大鼠肝脏组织 JAK2、STAT3 蛋白水平以及 JAK2、STAT3 蛋白磷酸化水平。**结果** 肝脏大体、HE 染色以及 Masson 胶原染色结果提示: 大鼠肝纤维化模型复制成功, 槲寄生碱具有阻断逆转肝纤维化的作用。免疫组织化学染色显示, 与模型组比较, 槲寄生碱明显抑制模型大鼠肝组织瘦素、瘦素受体的表达。Western Blot 显示, 正常对照组 JAK2、STAT3 蛋白表达量最少; 模型组 JAK2、STAT3 蛋白高表达; 而药物处理组的 JAK2、STAT3 蛋白表达明显下调。**结论** 槲寄生碱可有效逆转大鼠肝脏纤维化, 其作用机制可能是通过下调大鼠肝组织瘦素、瘦素受体的表达, 进而影响 JAK2/STAT3 信号通路来完成的。

【关键词】 槲寄生碱; 肝纤维化; 肝星状细胞; 瘦素; 瘦素受体; JAK2/STAT3 信号通路

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0001-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 010. 001

The signal transduction pathway of rats with liver fibrosis regulated by leptin and interfering effects of mistletoe alkali

MENG Xia¹, WANG Xue-cong², FENG Ping², LU Jing¹, WANG Xue-jiang²

(1. Department of experimental animals, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Department of pathophysiology, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

【Abstract】 Objective To investigate the signal transduction pathway mechanisms of rats with liver fibrosis regulated by leptin and interfering effects of mistletoe alkali. **Methods** The hepatic fibrosis in rats model was established by injecting carbon tetrachloride. Forty-five SD rats were randomly divided into normal group, model group and therapeutic group. All rats except rats in normal group were intraperitoneally injected with 40% carbon tetrachloride in peanut oil with a dose of 2.0 mL/100g according to the body weight twice a week for 8 weeks. Then, the therapeutic group was given

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(81272757); 北京市属高等学校创新团队建设与教师职业发展计划项目(IDHT20150502)。

【作者简介】 孟霞(1973-), 女, 主管技师, 研究方向: 动物实验及实验动物管理, E-mail: mengxia@cemu.edu.cn。

【通讯作者】 卢静(1969-), 女, 副教授, 研究方向: 实验动物模型研究, E-mail: lijing@cemu.edu.cn; 王学江(1957-), 女, 教授, 研究方向: 病理生理学研究, E-mail: xjwang@cemu.edu.cn。

mistletoe alkali ($8\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$) for 8 weeks via gastrogavage. Rats in normal and model group were served with distilled water at the same time. At the end of the 16th week, blood and tissue specimens were taken from all the rats. The influence of mistletoe alkali on liver morphology in liver fibrosis rat model was reviewed by HE and Masson staining. The effects of mistletoe alkali on the expression of Leptin and its receptor (OB-Rb) in HSC in fibrosis rat model were determined by immunohistochemistry (IH). The expression of JAK2, STAT3 and the activity of phospho-JAK2, phospho-STAT3 were detected by Western blotting analysis. **Results** The degree of fibrosis of the model group was more severe than the normal group and the treatment group, which suggested that mistletoe alkali can reverse liver fibrosis in rats. Immunohistochemical staining showed that mistletoe alkali reduced the hepatic expression of leptin and OB-Rb in rats with liver fibrosis in comparison with their expression in the model group. Compared with the normal group, the expression of JAK2 and STAT3 increased in the model group. However, the expression of JAK2 and STAT3 decreased in the medication groups compared with the model group. **Conclusion** Mistletoe alkali can effectively ameliorate liver fibrosis in rats possibly through inhibiting hepatic leptin and its receptor expressions, which through inhibiting hepatic leptin and its receptor expressions, thus inhibit the JAK2/STAT3 signaling pathway.

【Key words】 Mistletoe alkali; Liver fibrosis; Hepatic stellate cells; Leptin; OB-Rb; JAK2/STAT3 signaling pathway

肝纤维化是由于肝损伤引起纤维增生和纤维分解不平衡,导致肝脏纤维结缔组织的过度沉积所致。细胞、细胞因子及基质之间相互作用,使肝脏细胞外基质代谢紊乱,在窦周间隙过度沉积,继之肝窦毛细血管纤维化,造成纤维在肝脏内沉积过多,最后导致肝纤维化。目前认为,肝星状细胞激活、增殖并大量生成细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过程是肝纤维化病理机制的中心环节^[1],而瘦素(leptin)与受体结合后,激活 JAK/STAT 信号通路,引起下游的转录因子 STAT3 活化后发挥效应^[2],从而促进细胞外基质的形成,促进肝纤维化的发生发展。肝纤维化目前是公认的肝癌前病变,由于肝纤维化过程是可逆的,因此对肝纤维化的治疗研究已成为当今我国肝病研究领域的热点课题。

方剂槲芪散(HQS)是国家级名老中医钱英教授在临床应用多年的经验方。前期临床观察研究表明该方在治疗慢性乙型病毒性肝炎疗效显著^[3]。槲芪散的君药是槲寄生,我们前期实验证明,槲寄生提取物槲寄生碱具有明显的阻断肝癌前病变的作用^[4],而肝纤维化已明确是肝癌前病变,因此我们认为槲寄生碱可以阻断肝癌前病变,因而对于肝纤维化也具有很好的治疗效果,为观察其作用及探讨作用机制,我们进行槲寄生碱对肝纤维化发生发展干预作用的研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验所需动物由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2011-0011】。选用 6 周

龄,健康、雄性 SD 大鼠 45 只,体重 $150\sim 165\text{g}$;动物饲养于首都医科大学实验动物部屏障环境动物实验室【SYXK(京)2010-0020】。

1.2 主要试剂、药物和仪器

DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司), APES(中杉金桥), DAB(中杉金桥), DMSO(美国 Sigma 公司), PBS(中杉金桥), SDS(美国 Sigma 公司), 标准胎牛血清(美国 Gibco 公司), 蛋白预染 Marker(美国 Sigma 公司), 蛋白预染 Marker(美国 Sigma 公司), 其他试剂为国产分析纯。中药槲寄生(北京同仁堂), 槲寄生碱由北京中医研究所提取。

自动脱水机(LEICA ASP 300), 包埋机(LEICA EG 1160), 石蜡切片机(LEICA RM2125), 图象分析处理系统(Leica Qwin)。电泳装置(美国 Bio-Rad 公司), 电转装置(美国 Bio-Rad 公司), 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司), 二氧化碳培养箱(美国 Revco 公司), 超速低温离心机(美国 Sigma 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠肝纤维化模型复制及药物干预

雄性 SD 大鼠 45 只,自由进食一周后进行实验。动物随机分成三组,分别为正常对照组、模型组、药物干预组。正常对照组不做任何处理,常规饲养,自由饮食、饮水;模型组和药物干预组分别进行腹腔注射 $40\%\text{CCl}_4$ -植物油溶液 $2\text{mL}/\text{kg}$,每周 2 次,共 8 周,构建肝纤维化模型。8 周末取一只模型组大鼠进行模型复制是否成功的鉴定。第 9 周开始,药物干预组用槲寄生碱灌胃 $8\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,模型对照组灌等剂量的生理盐水,共 8 周。

1.3.2 肝脏标本采集

末次给药 24 h 后,大鼠称重,戊巴比妥钠麻醉,

打开腹腔;肉眼观察新鲜肝脏的外形、色泽、质地等大体形态;分别在大鼠肝脏左前叶固定部位,取两块肝组织约 $(1 \times 1 \times 1) \text{ cm}^3$ 大小,分别固定于 10% 中性福尔马林溶液和苦味酸固定液,做光镜观察和免疫组化用。

1.3.3 病理切片的的制作及 MASSON 染色、HE 染色

病理切片的制作:按照常规方法,从动物体内取下新鲜肝脏,置入 Bouin 氏液(饱和苦味酸 85 mL,甲醛 10 mL,冰醋酸 5 mL)中固定 24 h 后,换成 70% 酒精,24 h 后用 LEICA ASP 300 自动脱水机进行脱水。完成后用自动包埋机 LEICA EG 1160 包埋入石蜡并切成 5 μm 厚度的连续切片。

Masson 染色:切片脱蜡(烤箱 55℃),水化(二甲苯两遍,各 15 min,无水乙醇两遍,95% 乙醇,80% 乙醇各 5 min)。放入 Bouin 氏液作用一晚(4℃)或 37℃ 烤箱 1~2 h,然后流水冲洗切片至黄色消失再进行染色;苏木精浸染 3 min,自来水洗 3 $\times$ 3 min,氨水(自来水)返蓝 3 min,1% 盐酸酒精分化 1~2 s,大量自来水洗 10 min(显微镜下观察);丽春红酸性品红染色 7 min;蒸馏水冲洗 3 遍至浮色脱去;1% 磷钼酸水溶液处理 3 min;不用水洗,直接用 1% 亮绿液复染 7 min;蒸馏水冲洗 3 遍至浮色脱去;0.2% 冰醋酸处理 3 遍,每遍约 5 s;无水乙醇快速脱水(两遍,共 2 min),二甲苯透明(两遍,各 15 min);中性树脂封片。

HE 染色:石蜡切片,37℃ 烤片 2~3 h。脱蜡、蒸馏水洗 5 min。进行苏木素-伊红染色,用中性树脂,盖玻片封片,置通风柜内晾干。显微镜观察,拍照分析。

免疫组织化学染色:将肝组织切片置于 60℃ 烤箱中烤 1 h,然后二甲苯脱蜡透明 2 次,各 10 min,100% 乙醇 2 次,各 5 min,90%~70% 乙醇每次 3 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min。进行抗原修复(微波修复),用 3% H_2O_2 ,室温封闭 5~10 min,用 PBS 洗 3 次,每次 5 min,胎牛血清白蛋白封闭液,室温 20 min,加一抗 50 μL ,4 度过夜,加二抗,PBS 洗涤后,DAB 显色 5~8 min,镜下控制中止反应。苏木素复染,中性树脂封片,镜检。

1.3.4 Western blot 免疫印记实验

Western blot 免疫印记分析聚丙烯酰胺凝胶电泳采用 40 g/L 浓缩胶,120 g/L 分离胶,上样量 30 μg ,电压 80 V 待蛋白跑出浓缩胶后调致 100 V,电泳结束后取出凝胶,用夹心方法把滤纸,凝胶,硝

酸纤维素薄膜,滤纸依顺序放好,然后用海绵布、筛孔板固定好,插入电转移槽中,并加入电转移缓冲液,保证凝胶在阴极,硝酸纤维素薄膜在阳极方向。放入 Bio-Rad 半干电转仪中,15V 电压转 50 min 左右,根据分子量大小进行调整。用 5% 奶粉室温封闭 3 h 以上,孵育结束后,用 PBST 洗膜液在摇床上剧烈摇动漂洗,3 $\times$ 15 min。分别加入一抗 1:1000 稀释(用抗体稀释),4℃ 过夜,孵育结束后,用 PBS 洗膜液在摇床上剧烈摇动漂洗,3 $\times$ 15 min。二抗 1:2000 稀释(用抗体稀释),室温孵育 1 h,孵育结束后,用 PBST 洗膜液在摇床上剧烈摇动漂洗,3 $\times$ 15 min。加 Santa Cruz 发光试剂,暗室显影并冲洗胶片,用 ImageJ 对条带进行定量析。测定目的条带的平均吸光度值,并将 5 次实验结果的平均值作为蛋白含量的相对值。

1.3.5 统计分析

数值以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示,应用 SPSS11.5 统计软件,采用 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝纤维化模型复制及药物干预

2.1.1 肉眼观察结果:正常对照组大鼠肝脏表面光滑,边缘锐利,质地较软,色暗红,有光泽。模型组大鼠肝脏表面较正常组欠光滑,颜色均较正常组浅,边缘钝,质地硬,部分标本表面凹凸不平,呈小结节状,黄褐色。药物干预组大鼠肝脏表面较光滑,颜色较红,无颗粒状结节(封 2 图 1)。

2.1.2 光镜下形态学变化:正常对照组肝小叶和汇管区结构正常,肝细胞呈索状分布,无明显肝细胞坏死,间质无扩增,胶原纤维主要分布于汇管区和中央静脉周围。模型组正常肝小叶结构破坏,肝索排列紊乱,可见肝细胞点状坏死,炎细胞浸润,肝细胞空泡变性散在分布,间质增生明显,胶原纤维构成的纤维间隔形成,其破坏界板,分割、包绕肝小叶,部分动物形成较多完整的假小叶。药物干预组肝小叶结构明显改善,胶原纤维间隔较少,肝细胞坏死、炎性细胞浸润少见,汇管区结缔组织增生不明显,但个别大鼠仍有不完全性假小叶(封 2 图 2、彩插 1 图 3)。

2.2 槲寄生碱对肝纤维化大鼠肝组织瘦素(leptin)及瘦素受体(OB-Rb)的影响

2.2.1 leptin 的表达

正常组肝细胞内无表达,肝窦间隙、汇管区基质及间质细胞内有极少量表达。模型组肝内 leptin 的表达明显增强,主要见于肝星状细胞中。纤维间隔有弱阳性表达。阳性物质主要集中在胞质内,胞膜上有少量表达。药物治疗组阳性染色程度较模型组明显减轻,主要表达集中在肝星状细胞中(彩插 1 图 4)。

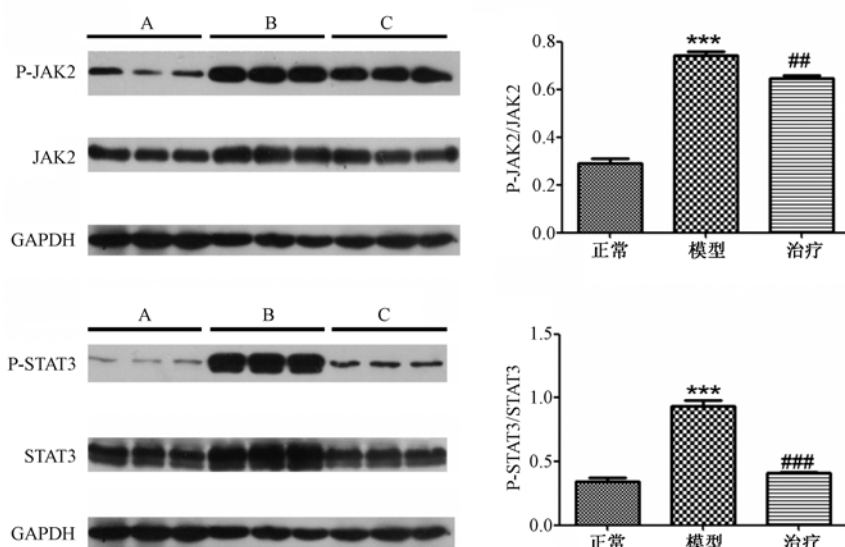
2.2.2 OB-Rb 表达

正常肝组织不表达或仅微弱表达于门静脉、小叶中央静脉周围细胞及汇管区的结缔组织,着色浅淡;模型组汇管区周围细胞、门静脉及中央静脉周围细胞和纤维间隔内均见 OB-Rb 阳性着色细胞,且着色明显增强,主要见于非实质细胞(包括肝星状细胞、窦内皮细胞、枯否细胞等)胞质及胞膜上,部

分可定位于胞核;药物治疗组阳性染色程度较模型组明显减轻,主要表达集中在肝星状细胞中(彩插 2 图 5)。

2.3 槲寄生碱对肝纤维化大鼠肝组织 JAK2/STAT3 信号转导通路的影响

用 Western Blot 法检测肝脏组织内 JAK2、STAT3 表达情况,两种总蛋白三组之间表达比较均一;检测肝脏组织内 P-JAK2、P-STAT3 表达情况,正常组蛋白表达量最少,各药物处理组蛋白条带颜色均较浅,模型组条带颜色最深。与正常组比较,模型组 P-JAK2、P-STAT3 蛋白程度均增高,差异有显著统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,药物治疗组的 P-JAK2、P-STAT3 蛋白表达显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)(图 6)。



注:A. 正常组,B. 模型组,C. 治疗组。数据采用均数加减标准差进行组间方差分析,***:与正常组比较具有极显著性差异($P < 0.01$);###:与模型组比较具有极显著性差异($P < 0.01$)。

图 6 大鼠肝脏组织内 JAK2 和 STAT3 Western blot 结果

Note:A. Normal group, B. Model group, C. Therapeutic group. Data are presented as mean $\pm$ SEM of three independent experiments.

*** $P < 0.01$ vs. normal group; ### $P < 0.01$ vs. model group.

Fig. 6 Expression of JAK2/STAT3 protein in liver tissue detected by western blot

3 讨论

肝纤维化发生的机制至今尚未完全清楚。目前认为,肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)激活、增殖并大量生成 ECM 的过程是肝纤维化病理机制的中心环节^[5]。肝纤维化过程中,启动 HSC 增殖及使其持续的因素尚未完全阐明。最近有文献^[1]报导枯否细胞也与肝纤维化有密切的关系。已知 HSC 的激活和增殖受多种细胞因子(cytokines, CK)

的调控^[6-7]。

瘦素(leptin)是新发现的促肝纤维化的细胞因子,大量的临床与实验研究显示,瘦素与肝纤维化的形成之间有着密切联系。在慢性病毒性肝炎、酒精性肝硬化、原发性胆汁性肝硬化等患者中均可见血清瘦素水平明显升高^[8]。瘦素与 OB-Rb 相结合激活 HSC 内相应的信号分子,在某些转录因子的作用下,转导信号入核,促进相关靶基因的转录和表达,从而进一步活化 HSC,使其增殖、并转化为肌样

成纤维细胞(myofibroblast, MFB),合成、分泌大量细胞外基质(ECM)^[9]。有研究表明,HSC 内瘦素受体后信号转导途径可能涉及到 JAK-STAT 途径,另外,活化的 JAK 激酶可激活 Ras-Raf-MEK-MAPK、PI3K/AKT 等其他信号转导途径。而在肝纤维化中,瘦素的信号转导机制主要与 JAK2^[10]与 STAT3^[11]磷酸化有关,但不完全依赖该通路。

目前推测 leptin 介导的 JAK-STAT 信号转导途径可能是:leptin 与其受体结合后可诱导受体形成同源或异源二聚体,吸引非受体酪氨酸激酶 JAK2。JAK2 能磷酸化 OB-Rb 上的酪氨酸位点(即酪氨酸 Tyr 残基磷酸化,Tyr-P),使 OB-Rb 上产生了与 STAT3 结合的区域。STAT3 在没有特异性的刺激时定位于胞质内,当细胞受到刺激时,STAT3 上的 SH2 结构域与 OB-Rb 上被磷酸化的酪氨酸残基结合,同时自身被 JAK2 磷酸化。两个磷酸化的 STAT3 分子可通过 Tyr-P 和 SH2 域形成二聚体,结合在靶基因上游的反向重复序列上,启动特定基因的表达、转录并翻译特定蛋白质,迅速提高目的基因的转录效率,活化 HSC 促进肝纤维化的发展等疾病发生^[12],从而发挥 leptin 的生物学功能。此外有人证明 leptin 可从其他信号转导途径发挥其生物学功能^[13]。

本实验首先通过体内实验探讨瘦素和肝纤维化的关系,免疫组织化学实验结果显示,模型组大鼠瘦素和瘦素受体的表达量明显增高,而且其下游的信号通路 JAK2/STAT3 蛋白磷酸化的水平明显提高,这说明瘦素确实与肝纤维化密切相关,并且是通过与功能受体结合,从而激活下游 JAK2/STAT3 信号通路蛋白磷酸化而发挥致纤维化作用的。

我们实验室前期的实验证明槲芪散在治疗肝纤维化,使调节能量代谢的酶类基本维持在正常水平,保护实验性肝损伤,抑制/逆转肝癌前病变方面疗效显著^[14],并可干预肝纤维化的发生发展。其君药槲寄生性平、味苦,具有强筋骨、安胎、祛风湿、益血、补肝肾等功能。近年来,槲寄生的抗癌作用受到国内外医药学界的广泛重视^[15-16],并且已从多种槲寄生植物中提取到具有抗癌活性的凝集素,毒肽,植物糖蛋白和生物碱。我们前期研究证实,槲寄生碱具有明显阻断肝癌前病变的作用,而肝纤维化已明确是肝癌前病变,因此我们认为槲寄生碱可以阻断肝癌前病变,因而对于肝纤维化也具有很好的治疗效果,为探讨其发生机制,我们进行研究。

实验结果显示,槲寄生碱治疗组肝脏大体和光镜下结果都明显好于模型组,治疗组免疫组化和 Western Blot 结果显示,瘦素,瘦素受体,JAK2/STAT3 信号通路蛋白磷酸化水平都较模型组低,这都说明槲寄生碱对肝纤维化有很好的治疗效果,且是通过抑制瘦素,瘦素受体,JAK2/STAT3 信号通路蛋白磷酸化这一机制而实现的。

综上所述,CCL₄ 引起肝损伤发生时,触发 HSC 活化并大量表达瘦素,其后瘦素作用于 OB-Rb,激活其 JAK-STAT 信号转导途径,促进窦内皮细胞等表达 TGF- α ,并在其介导下进一步诱导 HSC 的增殖、活化,进而促进胶原(尤其是 I 型胶原)等 ECM 的合成和分泌,如此循环反复,最终促进了肝纤维化的发生、发展。槲寄生碱可有效逆转大鼠肝脏纤维化,其作用机制可能是通过下调大鼠肝组织瘦素、瘦素受体的表达,进而影响 JAK2/STAT3 信号通路来完成的。槲寄生碱能干预瘦素在肝星状细胞内的信号转导,致肝星状细胞 JAK2、STAT3 蛋白低表达,这可能是其抗肝纤维化的机制之一。

参考文献:

- [1] Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells-a key issue in liver fibrosis[J]. Front Biosci, 2002, 7:808-826.
- [2] Wei Zhang, Minghui Niu, Kunfeng Yan, et al. Stat3 pathway correlates with the roles of leptin in mouse liver fibrosis and sterol regulatory element binding protein-1c expression of rat hepatic stellate cells[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2013, 45(3):736-744.
- [3] 高连印,车念聪,付修文. 槲芪散治疗慢性乙型病毒性 30 例疗效分析[J]. 北京中医,2001(3):49-50.
- [4] 文朝阳,丰平,史争鸣,等. 槲寄生总碱和多糖对黄曲霉菌毒素诱发大鼠肝癌前病变时血清同工酶含量的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2009,23(3):201-207.
- [5] Juliane S. Troeger, Ingmar Mederacke, Geum - Youn Gwak, et al. Deactivation of Hepatic Stellate Cells During Liver Fibrosis Resolution in Mice[J]. Gastroenterology, 2012, 143(4):1073-1083.
- [6] Yan Wang, Juncha Gao, Di Zhang, et al. New insights into the antifibrotic effects of sorafenib on hepatic stellate cells and liver fibrosis[J]. Journal of Hepatology, 2010, 53(1):132-144.
- [7] Jiayi He, Jin Gong, Qiang Ding, et al. Suppressive effect of SATB1 on hepatic stellate cell activation and liver fibrosis in rats[J]. FEBS Letters, 2015, 589(12):1359-1368.
- [8] Stergios A. Polyzos, Jannis Kountouras, Christos S. Mantzoros. Leptin in nonalcoholic fatty liver disease: A narrative review[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 158:230-238.
- [9] Aleksandar Sokolović, Cindy P. A. A. van Roomen, Roelof Ottenhoff, et al. Fasting reduces liver fibrosis in a mouse model

- for chronic cholangiopathies[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Basis of Disease*, 2013, 1832(10):1482-1491.
- [10] Anna Ptak, Ewa L. Gregoraszcuk. Bisphenol A induces leptin receptor expression, creating more binding sites for leptin, and activates the JAK/Stat, MAPK/ERK and PI3K/Akt signalling pathways in human ovarian cancer cell[J]. *Toxicology Letters*, 2012,210(3):332-337.
- [11] Nobuhiro Wada, Satoshi Hirako, Fumiko Takenoya, *et al.* Leptin and its receptors[J]. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2014, 61-62:191-199.
- [12] Anil Arora, Praveen Sharma. Non-invasive Diagnosis of Fibrosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease[J]. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 2012, 2(2):145-155.
- [13] Ki Tae Suk, Dae Yong Kim, Kyoung Min Sohn, *et al.* Chapter Two - Biomarkers of Liver Fibrosis[J]. *Advances in Clinical Chemistry*, 2013, 62:33-122.
- [14] 王学江,钱英,丰平,等. 槲芪散对肝癌前病变血清同功酶影响的研究[J]. *北京中医药大学学报*,2000,23:35-37.
- [15] 陈柏年,杨官娥,漆小梅,等. 槲寄生抗肿瘤有效成分研究进展[J]. *中国新药杂志*,2005,14(10):1131-1136.
- [16] Neeraj K. Saxena, Frank A. Anania. Adipocytokines and hepatic fibrosis[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2015, 26(3):153-161.
- [修回日期]2015-08-19

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。学术不端行为在世界各国、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)

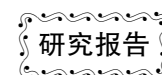
第一章 总则

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。



斑马鱼 *uba6* 和 *uba7* 突变体的构建与鉴定

丁慧美, 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 构建斑马鱼 *uba6* 和 *uba7* 突变体。方法 运用 TALEN 技术在斑马鱼 *uba6* 和 *uba7* 基因编码区引进突变, 并测序鉴定突变类型。结果 成功获得了两种突变类型的 *uba6* 和三种突变类型的 *uba7* 斑马鱼突变体。结论 成功构建了斑马鱼 *uba6* 和 *uba7* 突变体, 为进一步研究斑马鱼 *uba6* 和 *uba7* 基因的功能提供了材料。

【关键词】 斑马鱼; *uba6* 基因; *uba7* 基因; TALEN

【中图分类号】 R-332 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856(2015) 10-0007-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 010. 002

Construction and identification of zebrafish *uba6* and *uba7* mutants by TALEN

DING Hui-mei, 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 construct zebrafish *uba6* and *uba7* mutants. **Method** In-dels were introduced into coding regions of zebrafish *uba6* and *uba7* gene by TALEN technology, and mutation types were identified by sequencing. **Results** We obtained two *uba6* and three *uba7* mutants with different small fragment deletions resulting in reading frame shifts. **Conclusion** These *uba6* and *uba7* mutants provided starting materials for the study of zebrafish *uba6* and *uba7* gene functions.

【Key words】 Zebrafish; *uba6*; *uba7*; TALEN

泛素化以及类泛素化修饰是真核生物中调控蛋白功能的重要机制, 参与多种细胞进程, 如细胞分裂, 免疫反应, 胚胎发育等。泛素化是一个 E1-E2-E3 的多级酶促反应, 使泛素共价结合至靶蛋白上。首先, 泛素激活酶 UBE1 (E1) 消耗 ATP 结合一个泛素分子, 随后 E1 酶将泛素分子转移至泛素结合酶 (E2), 最后 E2 在泛素连接酶 (E3) 的帮助下将泛素分子转移至靶蛋白上, 哺乳动物中执行泛素化

通路的 E1 有两个, 即 UBE1 和 UBA6, E2 则有几十种, 而决定底物特异性的 E3 达上千种^[1-3]。UBE1 和 UBA6 具有 42% 的相似性, 两者激活泛素的活力相似, 但是对应的 E2 则不完全相同, UBA6 能将活化的泛素转移至大部分 UBE1 的 E2 上, 但是也有其特异的 E2, USE1^[2-3]。UBA6 基因敲除小鼠会在胚胎期 E10.5 死亡^[4]。ISG15 是类泛素分子, UBA7 (又称 Ube11) 是激活 ISG15 的 E1 酶, 类似于泛素化

【基金项目】国家自然科学基金面上项目 (31071286); 西南大学中央高校基本科研业务费 (XDJK2014A013; 2362014xk02)。

【作者简介】丁慧美 (1990 -), 女, 硕士, 研究方向: 发育生物学 E-mail: 15895840307@163. 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。

通路的 E1-E2-E3 多级酶促反应可以使蛋白发生 ISG15 修饰。小鼠 *Ube1l* 基因的敲除会导致 ISG15 蛋白修饰缺失,但游离形式的 ISG15 并不受影响,基因敲除小鼠的纯合子可存活至成年并可育^[5-6]。

TALEN (transcription activator-like (TAL) effector nucleases) 是一种新型的靶向基因编辑技术,现已应用于细胞、酵母、植物、斑马鱼及大、小鼠等各类研究对象。其原理是利用植物细菌 *Xanthomonas sp.* TALE 蛋白核酸结合域的氨基酸序列可对应识别结合位点的核酸,组装 *Xanthomonas sp.* TALE 的氨基酸序列模块识别特定 DNA 序列,并与核酸酶重组融合,这一人工构建的核酸酶可在特定位点识别(通过 TALE 氨基酸序列模块执行)并剪切(通过核酸酶执行)目的基因 DNA 序列,断裂的 DNA 在修复过程中会引进小片段插入或缺失,导致基因突变^[7-8]。

斑马鱼是研究脊椎动物发育的理想模式动物,其基因组与人类高度同源。小鼠中 *UBA6* 和 *UBA7* 基因功能已有一定的研究^[4,6],但在斑马鱼中这两个基因的功能尚不可知,运用反向遗传学手段在斑马鱼中建立突变体有助于研究其功能。本文应用 TALEN 技术对斑马鱼中 *uba6* 和 *uba7* 基因进行编辑,通过筛选获得可遗传的突变体,为后续进一步探究斑马鱼中 *uba6* 和 *uba7* 基因的功能提供了重要材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

野生型斑马鱼品系 AB Tübingen 品系。

1.1.2 质粒

TALEN 载体为 pCS2-FokI,靶向 *uba6* 基因外显子 5 和 *uba7* 基因外显子 2 的 TALEN 质粒由北京唯尚立德生物科技有限公司合成。*uba6* 靶位点: CTGGGCACCAACTTCT tcatcagagaggagg ATGTGAATA ATCAGA, 其中左臂 TALE 识别序列 CTGGGCA CCAACTTCT 16 bp,右臂 TALE 识别序列 TCTGATT ATTCACAT 15 bp,间隔 15 bp,突变体检测酶 BseRI 识别序列 GAGGAG。*uba7* 靶位点: TGCCAAAAA CGTGATcctggctggagtagaACAGTTACAATTCAGG, 其中左臂 TALE 识别序列 TGCCAAAAA CGTGAT 15 bp,右臂 TALE 识别序列 CCTGAATTGTAAGTGT 16 bp,间隔 16 bp,突变体检测酶 BpmI 识别序列 CTGGAG。

1.1.3 引物

uba6 基因外显子 5 扩增引物: TTGCTGATATAG GTGACTTGGAG (正向), CACATTAACCTTTTCAC CGGAAG (反向); *uba7* 基因外显子 2 扩增引物: GGTAAATTATTTTGGCACCACACAGC (正向), GGACT TACAAATGCCTATGTGCC (反向)。

1.1.4 主要试剂

本文实验所用引物由上海生工生物技术公司以及上海 Invitrogen 公司合成。限制性内切酶购自 NEB 公司; AxyPrep™ plasmid Miniprep Kit 和 AxyPrep™ PCRCleanup Kit 购自 Axygen 公司; T4 DNA 连接酶购自 Roche 公司; 体外转录试剂购自 Ambion 公司。

1.2 方法

1.2.1 胚胎收集

在成年斑马鱼交配前一天将斑马鱼置于有适量养殖系统水的交配盒中,用挡板将雌雄斑马鱼分开。次日早晨,将挡板拔出,斑马鱼产卵,30 min 后可收集,放置于 28℃ 恒温培养,在胚胎 12 hpf (hour post-fertilization) 时加入 0.03% PTU 抑制色素形成。

1.2.2 全胚胎原位杂交

探针合成与全胚胎原位杂交实验依据已有报导进行^[9]。本实验中所用 *uba6* 和 *uba7* RNA 反义探针浓度为 1 ug/mL。

1.2.3 斑马鱼 *uba6* 和 *uba7* 突变体的构建

将体外转录的编码识别 TALE 左右臂序列蛋白和核酸酶融合蛋白的 mRNA 等量混合显微注射入一细胞期斑马鱼胚胎,注射浓度为 500 pg/nL。在 1.5 dpf (day post-fertilization) 收集胚胎至 EP 管中,每管 8 个胚胎,加入 80 uL 50 mmol/L NaOH 溶液,95℃ 加热裂解 10 min,冷却后加入 8 uL 1mol/L Tris8.0 混合均匀,即为提取的基因组 DNA。以此基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应,扩增产物用特定的酶进行酶切检测。如果对照组胚胎的 PCR 产物能够全部被切开,而注射过 mRNA 的实验组胚胎的 PCR 产物中有未切开的 PCR 条带,则说明靶点发生了突变,TALEN 质粒有效。将注射后的斑马鱼胚胎饲养至成鱼,为 F0 代。F0 代与野生型交配产卵,收集胚胎,重复上述步骤提取基因组 DNA、PCR 扩增及酶切检测,确定此 F0 是否在生殖细胞水平携带突变,如携带突变,将 F0 与野生型生产的胚胎饲养至成鱼,为 F1 代。拔取 F1 成鱼鳞片,将鱼鳞片放入 PCR 管中,加入 10 uL 50 mmol/L NaOH 溶液,

95℃加热裂解 10 min, 冷却后加入 8 uL 1mol/L Tris8.0 混合均匀, 获得基因组 DNA。以此基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应, 扩增产物纯化后送样测序, 通过读取套峰获得斑马鱼 F1 突变类型。

2 结果

2.1 斑马鱼 *uba6* 基因的时空表达模式

检测基因时空表达模式有助于研究基因的功能。我们运用全胚胎原位杂交的方法检测了斑马鱼中 *uba6* 基因早期的表达模式。结果显示 *uba6* 呈现全身性表达, 在 1~3 dpf 时于肠中有一定程度的富集, 此富集随发育的进行趋于明显(彩插 3 图 1)。

2.2 斑马鱼 *uba7* 基因的时空表达模式

类似于 *uba6* 基因, 我们也检测了 *uba7* 基因的时空表达模式。结果显示, *uba7* 基因在 1~3 dpf 的斑马鱼胚胎中表达, 表达模式为全身性, 在肠中稍有富集(彩插 3 图 2)。

2.3 斑马鱼中 *uba6* 和 *uba7* 突变体建立

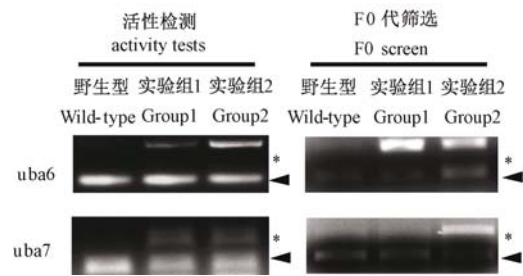
2.3.1 TALEN 质粒活性检测

为检测 TALEN 靶点设计是否工作, 必须检测质粒的活性。将以质粒为模板体外转录的 mRNA 注射至一细胞期的斑马鱼胚胎中, 提取注射后胚胎的基因组 DNA, PCR 扩增包含靶点的 DNA 片段, 酶切检测此片段能否被切开。结果如图 3 所示, 对照组野生型胚胎的 PCR 产物能够完全被切开; 而实验组即注射了 mRNA 的斑马鱼胚胎中部分 PCR 产物被切开, 部分 PCR 产物未被切开, 说明该靶点发生了突变, 且效率较高。

2.3.2 F0 突变体筛选

将上述实验中注射 mRNA 的斑马鱼饲养至成

鱼, 为 F0 代。F0 是野生型和突变型细胞的嵌合体, 为检测突变是否产生在生殖细胞水平, 将 F0 代与野生型交配产生 F1 子代, 提取 F1 胚胎的基因组 DNA, 采取 2.3.1 中相同的策略, 即 PCR 扩增含靶位点的基因组 DNA 并酶切检测。结果如图 3 所示, 对照组野生型的 PCR 产物能够完全被切开; 而实验组 PCR 产物未能被全部切开, 这说明部分 F1 子代含有靶位点突变, F0 代含有可遗传的突变, 将 F1 代斑马鱼胚胎饲养至成鱼。



注: 星形, PCR 产物; 箭头, 酶切产物。

图 3 TALEN 质粒活性检测及 F0 筛选

Note: asterisk, PCR product; arrowhead, enzyme digest products.

Fig. 3 Activity tests of TALEN plasmids and F0 screen

2.3.3 F1 突变体筛选

F1 代斑马鱼中含有野生型和杂合突变体, 为鉴定出杂合突变体, 拔取少许 F1 成鱼鳞片, 提取基因组 DNA, 扩增含有靶位点的基因组 DNA 片段, 测序检测靶位点序列, 测序结果显示 F1 代含有多种突变类型, 表 1 和表 2 分别列举了 F1 代中筛选获得的移码突变类型, 其中红色标记部分是 TALEN 设计敲除的靶位点序列, 这些移码突变都可以产生早熟终止密码子。

表 1 TALEN *uba6* F1 突变类型
Tab.1 TALEN *uba6* F1 mutation type

类型 Type	序列 Sequence
野生型 Wild type	CTGGGCACCAACTTCT TCATCAGAGAGGAGG ATGTGAATAATCAGA
<i>uba6</i> Δ7in2	CTGGGCACCAACTTCT TCAT————GTGAGG ATGTGAATAATCAGA
<i>uba6</i> Δ2	CTGGGCACCAACTTCT TCATC—AGAGGAGG ATGTGAATAATCAGA

表 2 TALEN *uba7* F1 突变类型
Tab.2 TALEN *uba7* F1 mutation type

类型 Type	序列 Sequence
野生型 Wild type	TGCCAAAAACGTGATCCTGGCTGGAGTTAGAACAGTTACAATTCAGGATG
<i>uba7</i> Δ7	TGCCAAAAACGTGATCCT————GTTAGAACAGTTACAATTCAGGATG
<i>uba7</i> Δ5	TGCCAAAAACGTGATCCTGGC————TTAGAACAGTTACAATTCAGGATG
<i>uba7</i> Δ2	TGCCAAAAACGTGATCCTGGCT—AGTTAGAACAGTTACAATTCAGGATG

3 讨论

小鼠中的研究表明, *UBA6* 基因敲除会导致突变体胚胎在 E10.5 死亡^[4], 而 *UBA7* 基因的敲除虽然不影响小鼠的存活与生殖, 但是会导致 ISG15 蛋白修饰的缺失^[6]。斑马鱼中这两个基因的功能未有报道, 我们构建的 *uba6* 和 *uba7* 突变体将是在斑马鱼中研究其功能的出发材料。基因的时空表达模式结果显示, 两个基因在胚胎期都有表达, 这提示着两个基因有可能调控斑马鱼的胚胎发育。尽管我们获得的突变体中基因突变会导致移码, 但是它们有可能不会导致胚胎出现发育缺陷表型, 可能的原因有以下几种(1)斑马鱼中有其他基因(例如可能存在的复制基因、功能相似的基因等)补偿了突变基因的功能;(2)斑马鱼 *uba6* 和 *uba7* 基因有可能存在多种异构体, 突变并没有导致所以异构体移码突变;(3)两者不是斑马鱼胚胎发育必需的基因。

运用 TALEN 技术构建突变体, 可以获得多种突变类型, 通常都是小片段 DNA 的插入或缺失。我们的实验中也获得了多种突变类型, 只保留了引起移码的突变, 这些突变都导致了早熟终止密码子的出现, 从理论上分析这些突变可以导致基因功能丧失, 但是还是需要其他分子生物学方法的验证。

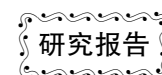
参考文献:

[1] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system [J]. Annu

Rev Biochem. 1998, 67:425-479.

- [2] Pelzer C, Kassner I, Matentzoglou K, *et al.* UBE1L2, a novel E1 enzyme specific for ubiquitin [J]. J Biol Chem. 2007, 282(32):23010-23014.
- [3] Jin J, Li X, Gygi SP, *et al.* Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging [J]. Nature. 2007, 447(7148):1135-1138.
- [4] Chiu YH, Sun Q, Chen ZJ. E1-L2 activates both ubiquitin and FAT10 [J]. Mol Cell. 2007, 27(6):1014-1023.
- [5] Yuan W, Krug RM. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein [J]. EMBO J. 2001, 20(3):362-371.
- [6] Kim KI, Yan M, Malakhova O, *et al.* Ube1L and protein ISGylation are not essential for alpha/beta interferon signaling [J]. Mol Cell Biol. 2006, 26(2):472-479.
- [7] Miller JC, Tan S, Qiao G, *et al.* A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [J]. Nat Biotechnol. 2011, 29:143-148.
- [8] Zhongwei Qiu, Meizhen Liu, Zhaohua Chen, *et al.* High-efficiency and heritable gene targeting in mouse by transcription activator-like effector nucleases [J]. Nucleic Acids Res. 2013, 41(11):e120.
- [9] Huang H, Ruan H, Aw M Y, *et al.* Mypt1-mediated spatial positioning of Bmp2-producing cells is essential for liver organogenesis [J]. Development. 2008, 135(19):3209-3218.

[修回日期]2015-08-18



降钙素基因相关肽转基因小鼠的建立及血压动态分析

鲍 丹,董 伟,张 旭,刘 宁,高 珊,张海涛,高 翔,葛文平,吕 丹

(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)

【摘要】 目的 建立降钙素基因相关肽 α (calcitonin gene-related peptide, CGRP α) 和 β (CGRP β) 转基因小鼠,并对其血压进行动态对比分析,建立可用于高血压研究的动物模型。**方法** 把人 CGRP α 和 CGRP β 基因分别插入鸡 β -肌动蛋白启动子下游,构建转基因表达载体,显微注射法建立 C57BL/6J CGRP α 和 CGRP β 转基因小鼠,PCR 鉴定转基因小鼠基因型。采用 Western Blot 鉴定 CGRP α 和 CGRP β 在心脏、肺、肾脏和肝脏组织中的表达,筛选高表达转基因品系。用无创血压测量仪分析转基因小鼠动态血压变化。**结果** 建立了在心脏、肺、肾脏和肝脏组织中均高表达 CGRP α 基因的 CGRP α 转基因小鼠;在肺和肝脏组织中高表达 CGRP β 基因的 CGRP β 转基因小鼠。CGRP α 转基因小鼠血压正常,CGRP β 转基因小鼠在 12 月龄时表现出显著的血压降低。**结论** CGRP α 和 CGRP β 转基因小鼠可作为用于 CGRP 对外周血管阻力和高血压抵抗机制研究的动物模型。

【关键词】 CGRP;转基因;外周血管阻力;高血压抵抗

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0011-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 010. 003

Establishment and dynamic analysis of blood pressure in calcitonin gene-related peptide transgenic mice

BAO Dan, DONG Wei, ZHANG Xu, LIU Ning, GAO Shan, ZHANG Hai-tao, GAO Xiang, GE Wen-ping, LV Dan
(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences Comparative Medicine Center,
Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine,
Peaking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish calcitonin gene-related peptide α (CGRP α) and β (CGRP β) transgenic mice and analyze dynamic changes of blood pressure using this transgenic mouse model in hypertension research. **Methods** The transgenic vector was constructed by inserting the human CGRP α and CGRP β gene into the down stream of chicken β -actin promoter, respectively. The transgenic mice were created by microinjection. The genotype of transgenic line was identified by PCR and the expression level of target gene was determined by Western blot. Dynamic changes of blood pressure was measured by noninvasive blood pressure meter. **Results** One line of human CGRP α C57BL/6J transgenic mice with high levels of CGRP α expression in the heart, lung, kidney and liver tissues was established. One line of human CGRP β C57BL/6J transgenic mice with high levels of CGRP β expression in the lung and liver tissues was established. Mice overexpressing the human CGRP α were normotensive, whereas mice overexpressing the human CGRP β were hypotensive at 12 months of age. **Conclusions** CGRP α and CGRP β transgenic mice may serve as an animal model for the

[基金项目] 国家自然科学基金(31301932)。

[作者简介] 鲍丹(1987-),女,本科,心脏病和高血压动物模型的制备与分析。

[通讯作者] 吕丹(1980-),女,副研究员,心脏病及高血压相关动物模型建立及相关调节基因功能分析。

mechanism research on the roles of CGRP on peripheral vascular resistance and hypertension resistance.

【Key words】 CGRP; Transgene; Peripheral vascular resistance; Hypertension resistance

动脉血压的形成有赖于循环系统内足够的血液充盈、心脏射血和外周阻力三种因素的相互作用。影响动脉血压的因素包括每搏输出量、心率、外周阻力、大动脉管壁的弹性和循环血量与血管系统容量的比例,其中,外周阻力增大是慢性高血压患者血压升高的原因之一^[1-3]。外周血管阻力主要受交感神经肾上腺素能神经和非肾上腺素能非胆碱能(nonadrenergic noncholinergic, NANC)血管扩张神经共同调控^[4-5]。降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是一种主要的 NANC 血管扩张神经的神经递质^[6],在神经内分泌细胞、感觉 C 纤维^[7]、肺的淋巴组织^[8]、心脏和血管^[9]中表达。自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)和高血压患者体内 CGRP 水平显著降低^[10-11]。研究发现,CGRP 对心血管系统具有保护作用,如抗高血压、抗血小板聚集和抗缺血-再灌注损伤等^[12-14]。哺乳动物的 CGRP 有 CGRP α 和 CGRP β 两个亚型,分别由同一个染色体上的两个独立的基因编码,两个亚型的第 3、22 和 25 位上的氨基酸序列不同,但二者的生物学功能相似^[15-17]。研究证实,CGRP α 基因敲除小鼠平均动脉血压(mean arterial pressure, MBP)显著升高^[18]。在日本人群中,CGRP α 是原发性高血压的易感基因^[19]。

基于上述研究结果,本研究拟通过建立 CGRP α 和 CGRP β 转基因小鼠,并对其血压进行动态分析,为研究 CGRP 与高血压发病机制的关系提供动物模型。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

C57BL/6J 小鼠和 ICR 小鼠均购自北京市维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】。CGRP α 和 CGRP β 转基因小鼠由本实验室制作。本实验所用动物均在屏障设施的饲养间【SYXK(京)2009-0003】饲养,饲养间温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 12:12 h 明/暗灯照,动物自由饮水和摄食。实验中涉及动物操作程序已经得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会的批准(ILAS-GC-2012-001)。

1.1.2 主要试剂及仪器

限制性内切酶以及 PCR 相关试剂均购自中国宝生物工程有限公司。PCR 引物由中国上海英俊生物技术有限公司合成。NC 膜购自 Millipore 公司。鼠抗 CGRP α 和 CGRP β 抗体均购自德国 Abnova 公司。HRP-偶联的羊抗鼠抗体和 HRP-偶联的 GAPDH 单克隆抗体均购自中国康成生物公司。BP-98A 智能无创血压计购自日本 SoftronTM 公司。普通维持饲料购自中国军事科学院。

1.2 方法

1.2.1 CGRP α 和 CGRP β 表达载体的构建及转基因

以 pCR4-TOPO-h-CGRP α 质粒(GE healthcare, 美国, Clone ID 7939598)为模板,用 PCR 法扩增人 CGRP α 全长 cDNA,上游引物为:5' CCCTCGAGCAGAGAGGTCATGGGCTTC,下游引物为:5' CGGAATTCGAAAGGGAGGAGTTTGTAGTTGGC。反应条件:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min,94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s,62 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s,重复变性到延伸 29 次,完成 30 个循环。目的基因人 CGRP α 片段为 452 bp。将扩增片段插入 pMD18T 载体,经测序并比对正确后,以 Xho I 和 EcoR I 酶切回收 CGRP α 片段,并克隆入 CMV 增强子/鸡 β -肌动蛋白启动子下游构建全身表达人 CGRP α 表达载体。提取并酶切鉴定质粒正确后,再用 Pvu II 将其线性化,Sephadex G50 柱纯化 DNA 片段,获得 CMV 增强子/鸡 β -肌动蛋白启动的人 CGRP α 基因的转基因片段,注射前将转基因片段浓度调整至 5 ng/ μL ,用显微注射法将线性化的转基因载体注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中,用 ICR 小鼠作假孕受体,制备转基因小鼠。

以 pDNR-LIB-h-CGRP β 质粒(GE healthcare, 美国, Clone ID 4287225)为模板,用 PCR 法扩增人 CGRP β 全长 cDNA,上游引物为:5' CCCTCGAGAGAGCGGCATGGGTTTC,下游引物为:5' CGGAATTCGTCATTCATCTGCTCAGGCTTG。反应条件:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min,94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s,62 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s,重复变性到延伸 29 次,完成 30 个循环。目的基因人 CGRP β 片段为 406 bp。将扩增片段插入 pMD18T 载体,经测序并比对正确后,以 Xho I 和 EcoR I 酶切回收 CGRP β 片段,并克隆入 CMV 增强子/鸡 β -肌动蛋白启动子下游构建全身表达人 CGRP β 表达载体。提取并酶切鉴定质粒正确

后,再用 Pvu II 将其线性化, Sephadex G50 柱纯化 DNA 片段,获得 CMV 增强子/鸡 β -肌动蛋白启动的人 CGRP β 基因的转基因片段,注射前将转基因片段浓度调整至 5 ng/ μ L,用显微注射法将线性化的转基因载体注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中,用 ICR 小鼠作假孕受体,制备转基因小鼠。

1.2.2 PCR 鉴定 CGRP α 和 CGRP β 转基因小鼠的基因型

转基因小鼠在出生后 9~14 d 用剪趾法标记,收集剪下的组织,用碱裂解法提取基因组 DNA,用 PCR 法对转基因小鼠进行基因型检测。CGRP α 上游引物为:5' CTCTCAGCATCTTGCTCTG,下游引物为:5' GGTCTCTCTCCAAGTCGCT;CGRP β 上游引物为:5' ATGGGTTTCCGGAAGTTCT,下游引物为:5' AGGCTTGAAGTCCCTGC。PCR 反应体系为 20 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,重复变性到延伸 29 次,完成 30 个循环。目的基因 CGRP α 片段为 357 bp,目的基因 CGRP β 片段为 384 bp。

1.2.3 Western blot 鉴定 CGRP α 和 CGRP β 蛋白的表达

提取首建鼠仔代阳性转基因小鼠和同窝转基因阴性(non-transgenic, NTG)小鼠心脏、肺、肾脏和肝脏组织总蛋白,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,蛋白转移至 NC 膜上,置于 5% 脱脂奶粉中封闭,鼠抗 CGRP α 和 CGRP β 抗体检测鼠源 CGRP α 和 CGRP β 以及转入的人源 CGRP α 和 CGRP β 蛋白的表达水平,HRP-偶联的羊抗鼠抗体结合一抗,HRP-偶联的 GAPDH 单克隆抗体作为内参。用 Image J 分析软件测定 Western Blot 条带灰度。

1.2.4 智能无创血压计测量 CGRP α 和 CGRP β 转基因小鼠血压

将待测小鼠提前半小时放入血压测量实验室,让小鼠适应测试环境。按智能无创血压计说明书^[20]和 Steven E.^[21]报道的方法于 2、4、8 和 12 月龄进行小鼠尾部血压测量。

1.2.5 统计分析

实验数据以 Mean $\pm$ S. E. M. 表示,用 one-way ANOVA 分析处理数据, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 CGRP α 转基因小鼠的建立

测序结果表明 PCR 法克隆的片段同已报道人

组织 CGRP α 序列完全一致 (GeneBank: BC093753.1),将人 CGRP α 基因插入 CMV 增强子/鸡 β -肌动蛋白启动子下游,构建得到人 CGRP α 转基因表达载体(图 1A)并用显微注射法制备转基因小鼠。提取小鼠基因组 DNA,用 PCR 法扩增 357 bp 的 CGRP α 基因目的片段,鉴定小鼠基因型(图 1B)。提取小鼠心脏、肺、肾脏和肝脏组织总蛋白,用 CGRP α 抗体进行 Western Blot 分析,确定转基因小鼠 CGRP α 的高表达(图 1C)。Image J 软件分析条带灰度,定量分析 CGRP α 蛋白表达量(图 1D)。通过分别比较 NTG 和转基因小鼠中 CGRP α 表达水平,筛选到在心脏、肺、肾脏和肝脏组织中都高表达 CGRP α 基因的转基因小鼠品系。

2.2 CGRP β 转基因小鼠的建立

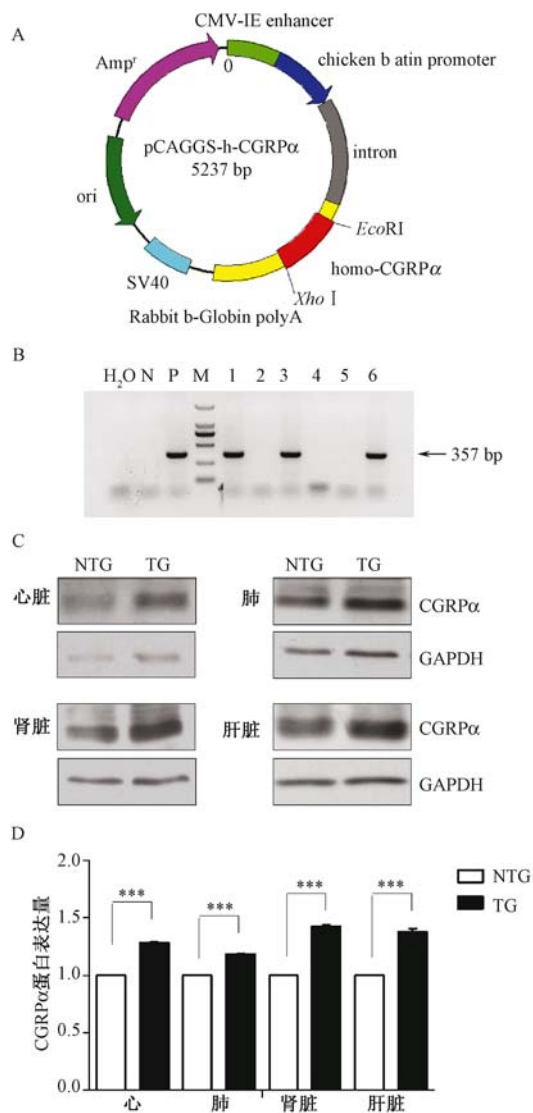
测序结果表明 PCR 法克隆的片段同已报道人组织 CGRP β 序列完全一致 (GeneBank: BC008428.1),将人 CGRP β 基因插入 CMV 增强子/鸡 β -肌动蛋白启动子下游,构建得到人 CGRP β 转基因表达载体(图 2A)并用显微注射法制备转基因小鼠。提取小鼠基因组 DNA,用 PCR 法扩增 384 bp 的 CGRP β 基因目的片段,鉴定小鼠基因型(图 2B)。提取小鼠肺和肝脏组织总蛋白,用 CGRP β 抗体进行 Western Blot 分析,确定转基因小鼠 CGRP β 的高表达(图 2C)。Image J 软件分析条带灰度,定量分析 CGRP β 蛋白表达量(图 2D)。通过分别比较 NTG 和转基因小鼠中 CGRP β 表达水平,筛选到在肺和肝脏组织中都高表达 CGRP β 基因的转基因小鼠品系。

2.3 CGRP α 和 CGRP β 转基因小鼠血压动态对比分析

于 2、4、8 和 12 月龄对 NTG 和转基因阳性小鼠进行血压动态分析。结果显示,NTG 和转基因阳性小鼠 MBP [MBP = 舒张压 + 1/3 (收缩压 - 舒张压)]整体均呈现随着年龄的增长而逐渐升高的表型。与 NTG 小鼠(2、4、8 和 12 月龄样本量分别为 $n = 8, 9, 8$ 和 10)相比,CGRP α 转基因小鼠(2、4、8 和 12 月龄样本量分别为 $n = 7, 11, 8$ 和 14)并未出现明显的血压降低,CGRP β 转基因小鼠(2、4、8 和 12 月龄样本量分别为 $n = 7, 12, 8$ 和 11)在 12 月龄时 MBP 显著降低($P = 0.026$,图 3)。

3 讨论

高血压是严重危害人类健康的常见心血管病



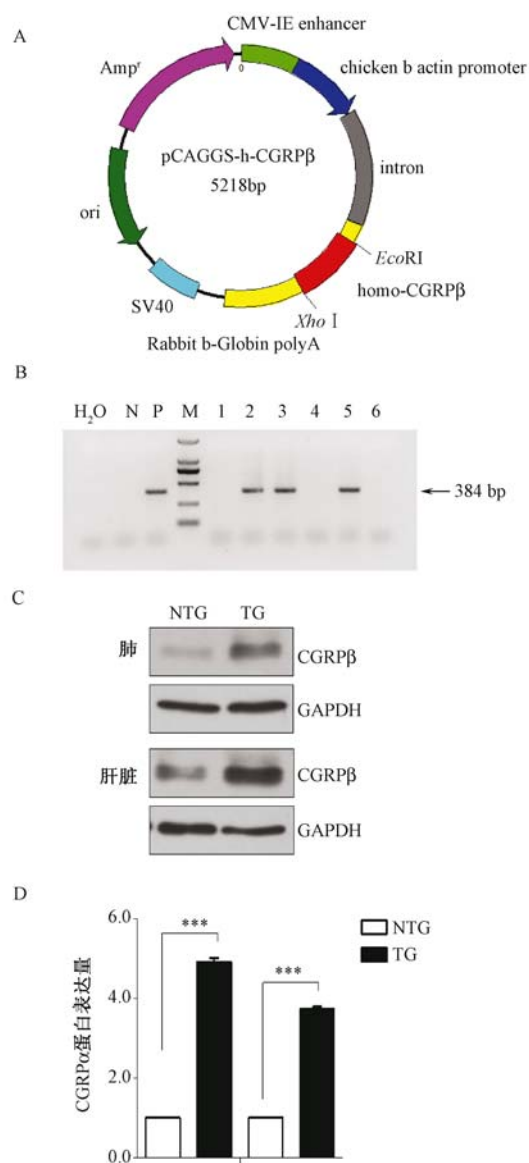
注: A. CGRP α 转基因表达载体的建立; B. PCR 鉴定 CGRP α 转基因小鼠基因型; C. Western Blot 分析 CGRP α 蛋白在转基因小鼠心脏、肺、肾脏和肝脏组织中的表达, GAPDH 为内参; D. CGRP α 蛋白表达的定量分析 (n = 3 次独立实验)。

图 1 CGRP α 转基因小鼠的建立

Note: A. Establishment of CGRP α transgenic vector; B. Genotyping of CGRP α transgenic mice by PCR; C. Expression level of CGRP α in the heart, lung, kidney and liver tissues of CGRP α transgenic mice by Western Blot; D. Quantitative analysis of the CGRP α expression level (n = 3 independent experiment).

Fig. 1 Establishment of CGRP α transgenic mice

之一,目前全球高血压患者约有 10 亿,预计到 2025 年,全球的高血压患者人数可能会再增加 80%^[22]。此外,高血压还是脑卒中、心肌梗死等心血管疾病以及慢性肾脏疾病等最主要的危险因素。高血压已经成为威胁人类生命健康的重要的公共卫生问题,其防治具有重要的现实意义。



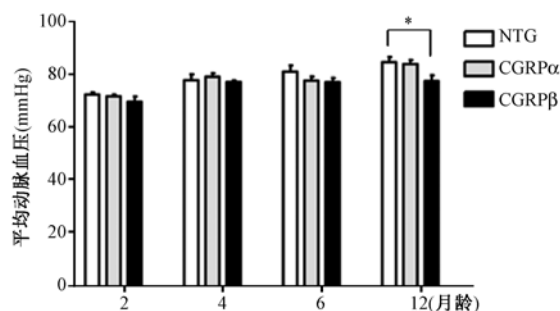
注: A. CGRP β 转基因表达载体的建立; B. PCR 鉴定 CGRP β 转基因小鼠基因型; C. Western Blot 分析 CGRP β 蛋白在转基因小鼠肺和肝脏组织中的表达, GAPDH 为内参; D. CGRP β 蛋白表达的定量分析 (n = 3 次独立实验)。

图 2 CGRP β 转基因小鼠的建立

Note: A. Establishment of CGRP β transgenic vector; B. Genotyping of CGRP β transgenic mice by PCR; C. Expression level of CGRP β in the lung and liver tissues of CGRP β transgenic mice by Western Blot; D. Quantitative analysis of the CGRP β expression level (n = 3 independent experiment).

Fig. 2 Establishment of CGRP β transgenic mice

外周血管阻力的增大致使慢性高血压患者的血压持续升高^[3],外周阻力调控系统的功能障碍可能是慢性高血压的主要病因之一^[23]。研究发现,交感血管收缩神经的兴奋性增强是外周血管阻力增



注: * $P < 0.05$ 。

图3 CGRPα 和 CGRPβ 转基因小鼠血压动态对比分析

Note: * $P < 0.05$.

Fig.3 Contrastive analysis of dynamic changes of blood pressure in CGRPα and CGRPβ transgenic mice

大的一个重要因素^[24]。交感神经肾上腺素能神经通过释放神经递质—去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)调控外周血管阻力,一方面,NE可引起血管极度收缩,外周血管阻力增加,血压升高;另一方面,NE还可通过激活突触前 α_2 -肾上腺素能受体抑制CGRP包含神经释放具有血管扩张效应的CGRP^[25]。此外,与NE共定位于外周肾上腺素能神经的血管收缩神经肽-Y亦可抑制神经性的血管扩张和CGRP的释放^[26]。CGRP已被证实是一种强而有效的血管扩张神经肽^[27]。CGRP包含神经的功能障碍和CGRP的释放抑制增强了交感血管收缩神经的兴奋性,使得血压进一步升高。

本文建立了人CGRPα和CGRPβ转基因小鼠,并对其进行血压动态对比分析。结果发现,与NTG小鼠相比,CGRPα转基因小鼠血压正常,CGRPβ转基因小鼠在12月龄时出现平均动脉压的显著降低。研究发现,CGRPα是人甲状腺髓样癌的主要降钙素基因产物,而CGRPβ是人正常组织中的主要CGRP成分^[28];再者,CGRP对阻力血管的调控效应随着年龄的增长逐渐减弱^[4],外源性的CGRP能抑制CGRP包含神经的血管扩张效应^[29]。这可能是CGRPβ转基因小鼠仅在12月龄表现血压降低的原因。小月龄时,内源性CGRP的血管扩张效应足以维持外周阻力的平衡,外源性CGRP的效应被抑制,血压维持正常水平;随着年龄的增长,内源性CGRP对外周阻力的调控能力逐渐减弱,此时,外源性CGRP发挥血管扩张功能,CGRP转基因小鼠外周血管阻力减小,血压下降。此外,有研究报道,CGRPα基因敲除小鼠MBP显著升高^[18],而本文建立的人CGRPα转基因小鼠在未经病理刺激时血压表现正

常,推测,CGRPα转基因小鼠在给予压力负荷等病理刺激后,抵抗高血压的能力会显著增强。

尽管外周阻力调控系统中CGRP神经的功能抑制对高血压的维持和发展至关重要,但CGRP包含神经功能的减弱的潜在机制仍不清楚。近期研究发现,SHR肠系膜动脉中的血管紧张素II(angiotensin II, Ang II)可通过Ang II受体抑制CGRP包含神经的神经传导^[30],长期抑制肾素-血管紧张素系统可阻止或恢复CGRP包含神经的功能减弱和重构^[31]。

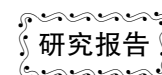
综上所述,CGRP与外周血管阻力的调控密切相关,本文建立的CGRPα和CGRPβ转基因小鼠为CGRP对外周血管阻力和病理刺激下的高血压抵抗机制的研究提供了理想的动物模型。

参考文献:

- [1] Mulvany, M. J. C. Aalkjaer, Structure and function of small arteries[J]. *Physiol Rev*, 1990. 70(4): 921-961.
- [2] Mulvany, M. J., Structure and function of small arteries in hypertension[J]. *J Hypertens Suppl*, 1990. 8(7): S225-232.
- [3] Zimmerman, B. G., Peripheral neurogenic factors in acute and chronic alterations of arterial pressure[J]. *Circ Res*, 1983. 53(2): 121-130.
- [4] Kawasaki, H., Regulation of vascular function by perivascular calcitonin gene-related peptide-containing nerves [J]. *Jpn J Pharmacol*, 2002. 88(1): 39-43.
- [5] Kawasaki, H., C. Nuki, A. Saito, *et al.*, Role of calcitonin gene-related peptide-containing nerves in the vascular adrenergic neurotransmission[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990. 252(1): 403-409.
- [6] Kawasaki, H., K. Takasaki, A. Saito, *et al.*, Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat[J]. *Nature*, 1988. 335(6186): 164-167.
- [7] Goodman, E. C. and L. L. Iversen, Calcitonin gene-related peptide: novel neuropeptide[J]. *Life Sci*, 1986. 38(24): 2169-2178.
- [8] Komatsu, T., M. Yamamoto, K. Shimokata, *et al.*, Distribution of substance P-immunoreactive and calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves in normal human lungs [J]. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1991. 95(1): 23-28.
- [9] Mulderry, P. K., M. A. Ghatei, J. Rodrigo, *et al.*, Calcitonin gene-related peptide in cardiovascular tissues of the rat [J]. *Neuroscience*, 1985. 14(3): 947-954.
- [10] Kawasaki, H., Y. Nuki, N. Yamaga, *et al.*, Decreased depressor response mediated by calcitonin gene-related peptide (CGRP)-containing vasodilator nerves to spinal cord stimulation and levels of CGRP mRNA of the dorsal root ganglia in spontaneously hypertensive rats[J]. *Hypertens Res*, 2000. 23

- (6): 693–639.
- [11] Zhou, Z., J. Peng, C. J. Wang, *et al.*, Accelerated senescence of endothelial progenitor cells in hypertension is related to the reduction of calcitonin gene-related peptide [J]. *J Hypertens*, 2010. 28(5): 931–939.
- [12] Peng, J. and Y. J. Li, The vanilloid receptor TRPV1: role in cardiovascular and gastrointestinal protection [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010. 627(1–3): 1–7.
- [13] Zheng, L. R., J. Han, L. Yao, *et al.*, Up-regulation of calcitonin gene-related peptide protects streptozotocin-induced diabetic hearts from ischemia/reperfusion injury [J]. *Int J Cardiol*, 2012. 156(2): 192–198.
- [14] Li, D., J. Peng, H. Y. Xin, *et al.*, Calcitonin gene-related peptide-mediated antihypertensive and anti-platelet effects by rutaecarpine in spontaneously hypertensive rats [J]. *Peptides*, 2008. 29(10): 1781–1788.
- [15] Steenbergh, P. H., J. W. Hoppener, J. Zandberg, *et al.*, A second human calcitonin/CGRP gene [J]. *FEBS Lett*, 1985. 183(2): 403–407.
- [16] Schutz, B., D. Mauer, A. M. Salmon, *et al.*, Analysis of the cellular expression pattern of beta-CGRP in alpha-CGRP-deficient mice [J]. *J Comp Neurol*, 2004. 476(1): 32–43.
- [17] Wimalawansa, S. J., Calcitonin gene-related peptide and its receptors; molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials [J]. *Endocr Rev*, 1996. 17(5): 533–585.
- [18] Gangula, P. R., H. Zhao, S. C. Supowit, *et al.*, Increased blood pressure in alpha-calcitonin gene-related peptide/calcitonin gene knockout mice [J]. *Hypertension*, 2000. 35(1 Pt 2): 470–475.
- [19] Morita, A., T. Nakayama, M. Soma, *et al.*, Association between the calcitonin-related peptide alpha (CALCA) gene and essential hypertension in Japanese subjects [J]. *Am J Hypertens*, 2007. 20(5): 527–532.
- [20] 鲍丹,董伟,刘宁,等, 三种突变 GRK4 转基因小鼠的血压动态分析 [J]. *中国实验动物学报*, 2013. 21(5): 26–31.
- [21] Whitesall, S. E., J. B. Hoff, A. P. Vollmer, *et al.*, Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and tail-cuff methods [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. 286(6): H2408–2415.
- [22] 高飞,高焱莎,我国高血压流行病学现状 [J]. *中日友好医院学报*, 2012. 26(5): 307–309.
- [23] Head, R. J., Hypertensive innervation: its relationship to functional and hyperplastic changes in the vasculature of the spontaneously hypertensive rat [J]. *Blood Vessels*, 1989. 26(1): 1–20.
- [24] Kawasaki, H., W. H. Cline, Jr., C. Su, Enhanced angiotensin-mediated facilitation of adrenergic neurotransmission in spontaneously hypertensive rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1982. 221(1): 112–116.
- [25] Kawasaki, H., C. Nuki, A. Saito, *et al.*, Adrenergic modulation of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-containing nerve-mediated vasodilation in the rat mesenteric resistance vessel [J]. *Brain Res*, 1990. 506(2): 287–290.
- [26] Kawasaki, H., C. Nuki, A. Saito, *et al.*, NPY modulates neurotransmission of CGRP-containing vasodilator nerves in rat mesenteric arteries [J]. *Am J Physiol*, 1991. 261(3 Pt 2): H683–290.
- [27] Brain, S. D., T. J. Williams, J. R. Tippins, *et al.*, Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator [J]. *Nature*, 1985. 313(5997): 54–56.
- [28] Petermann, J. B., W. Born, J. Y. Chang, *et al.*, Identification in the human central nervous system, pituitary, and thyroid of a novel calcitonin gene-related peptide, and partial amino acid sequence in the spinal cord [J]. *J Biol Chem*, 1987. 262(2): 542–545.
- [29] Nuki, C., H. Kawasaki, K. Takasaki, *et al.*, Pharmacological characterization of presynaptic calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors on CGRP-containing vasodilator nerves in rat mesenteric resistance vessels [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. 268(1): 59–64.
- [30] Kawasaki, H., M. Okazaki, A. Nakatsuma, *et al.*, Long-term treatment with angiotensin converting enzyme inhibitor restores reduced calcitonin gene-related peptide-containing vasodilator nerve function in mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1999. 79(2): 221–229.
- [31] Nakatsuma, A., H. Kawasaki, Y. Kurosaki, *et al.*, Effects of long-term treatment with calcium antagonists on periaarterial nerve function in the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats [J]. *Jpn J Pharmacol*, 2000. 84(2): 156–162.

[修回日期]2015-08-18



小鼠脑脊髓炎病毒 RT-PCR 方法的建立及初步应用

李晓波,付 瑞,王 吉,卫 礼,王淑菁,岳秉飞,贺争鸣

(中国食品药品检定研究院 实验动物资源研究所,北京 100050)

【摘要】 目的 建立小鼠脑脊髓炎病毒 RT-PCR 方法并对方法进行初步应用。**方法** 根据 NCBI 发表的 TMEV GD VII 株(GI:62039)基因组序列设计特异引物,建立 RT-PCR 方法,验证方法的敏感性和特异性;脑腔接种方式感染 9 只 BALB/c 小鼠,感染后第 6 天采集动物的脑、心、肝、脾、肺、肾、盲肠内容物和血清等样本,用建立的方法进行检测;同时检测 100 份小鼠盲肠内容物样本,对方法进行初步应用。**结果** 以 GD VII RNA 为模板,建立的 RT-PCR 方法能够扩增出约 371bp 的单一目的条带,敏感性验证显示能够检测到的最低 GD VII cDNA 量为 0.69pg/ μ L;以脑心肌炎病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒、日本乙型脑炎病毒、小鼠诺如病毒及正常小鼠脑组织为对照进行方法特异性验证,均未出现目的条带。脑腔接种感染小鼠,所有小鼠在接种第 3 天均产生不同程度的精神萎靡后肢麻痹等症状,其中 2 只小鼠于第 5 天死亡;采集心、肝、脾、肺、肾、脑、盲肠内容物及血清等样本进行检测,所有小鼠的脑组织均检测到 GD VII RNA,而其他组织均未检测到;对 100 份小鼠盲肠内容物进行检测,结果均为阴性。**结论** 建立的 TMEV GDVII 株 RT-PCR 方法能够高效的检测小鼠组织中的病毒感染,可作为实验动物国家标准的有力补充。

【关键词】 Theiler 氏脑脊髓炎病毒;GDVII;脑腔接种;逆转录-聚合酶链式反应

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0017-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.010.004

Development and application of RT-PCR for detection of TMEV

LI Xiao-bo, FU Rui, WANG Ji, WEI Li, WANG Shu-jing, YUE Bing-fei, HE Zheng-ming

(Laboratory Animal Institute, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To develop RT-PCR for detection of TMEV and apply the method. **Methods** To design specific primers on the basis of GD VII(GI:62039) genome sequences published in NCBI and establish RT-PCR. To verify the sensitivity and specificity of method after optimizing PCR. We infected 9 BALB/c mice intracerebrally and collected brain, heart, liver, spleen, lung, kidney, cecal contents and serum samples the 6th day postinfection. The samples were tested by the TMEV RT-PCR. 100 mouse cecal contents samples were also detected to apply the established method. **Results** The 371bp single band was amplified using GDVII as template. Sensitivity test showed that the RT-PCR method can detect as low as 0.69 pg/ μ L GDVII cDNA. There were no objective band amplified when encephalomyocarditis virus, lymphocytic choriomeningitis virus, Japanese B encephalitis virus, murine norovirus and normal mouse brain tissue were used as case-control. All infected mice showed symptom of different degrees such as depression and hind limb paralysis the 3th day postinoculation and two of infected mice died the 5th day postinoculation. Tissues such as heart, liver, spleen, lung, kidney, brain, cecal contents and serum were collected and tested for TMEV. All the brain samples were detected positive for GDVII and other tissues were all negative; The 100 cecal contents samples were tested and all were negative.

【基金项目】 国家科技支撑计划“实验动物质量监测体系的完善与检测关键技术研究”(2013BAK11B00)。

【作者简介】 李晓波(1980-),助理研究员,研究方向:实验动物病毒学。E-mail:lx8493059@163.com。

【通讯作者】 贺争鸣(1957-),研究员,研究方向:实验动物微生物学。E-mail:zhengminghe57@163.com。

Conclusions RT-PCR for TMEV GDVII strain can detect virus infection in mouse tissues efficiently and can be used as a powerful supplement for the national standard of lab animal.

【Key words】 TMEV;GDVII;Intracerebral inoculation;RT-PCR

小鼠脑脊髓炎病毒 (mouse encephalomyelitis virus, MEV) 又称 Theiler 氏小鼠脑脊髓炎病毒 (theiler's mouse encephalomyelitis virus, TMEV), 分类上属于小 RNA 病毒科, 肠道病毒属, 主要侵害小鼠中枢神经系统, 多数呈隐性感染, 有时表现脑脊髓炎和后肢麻痹等症状^[1-3]。目前已从世界各地分离到多个毒株, 根据其毒力的不同分为两个亚群: 高毒力亚群以 GDVII 和 FA 株为代表, 可引起急性致命性脑炎; 低毒力亚群引起持续的中枢神经系统感染和炎性脱髓鞘^[2,4]。实验动物国标将 TMEV 列为 SPF 小鼠检测项目之一。

本实验建立了 TMEV 的 RT-PCR 检测方法, 通过对病毒感染动物组织样本的检测以及小鼠自然感染情况的监测, 对方法进行了初步应用, 试验结果表明该方法可以作为动物中 TMEV 检测的常规方法, 是对实验动物国标检测技术的有力补充。

1 材料和方法

1.1 试剂

逆转录试剂为 Sigma 产品; PCR 相关试剂购自 Takara 公司; RNA 提取试剂盒为 QIAGEN 产品;

Trizol 试剂为 invitrogen 公司产品; 氯仿、异丙醇等其他化学试剂为北京化工。

1.2 病毒毒株

TMEV GDVII 株购自 ATCC, 小鼠脑心肌炎病毒 (mouse encephalomyocarditis virus, EMCV)、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (lymphocytic choriomeningitis virus, LCM)、乙型脑炎病毒 (Japanese B encephalitis virus, JEV) 及鼠诺如病毒 (murine norovirus, MNV) 均为本室保存。

1.3 BALB/c 小鼠

SPF 级, 3 周龄, 雌性, 共 10 只, 来自本院动物供应室【SCXK (京) 2014 - 0013】, 使用许可证号【SYXK (京) 2011 - 0008】。

1.4 动物样本

100 份小鼠盲肠内容物样品来自 2014 年 10 月北京市实验动物会检各实验动物生产单位。

1.5 方法

1.5.1 引物的设计

根据 NCBI 发表的 TMEV GDVII 株 (GI:62039) 基因组序列, 选取保守区域设计引物 (表 1)。

表 1 GD VII RT-PCR 引物
Tab.1 Primers for the GD VII RT-PCR

引物名称	序列 (5'至 3')	基因组中的位置	产物长度
TMEVF1	GCCGTCAGTCTGTTTATTC	5071	371bp
TMEVR1	GGAGCCAGGTATTTCATC	5441	

1.5.2 病毒 RNA 的提取: TMEV GDVII 株 BHK21 细胞培养物经三次冻融后, 分别取 200μL 按试剂盒的操作说明提取 RNA, 其他对照病毒也按照该方法进行。

1.5.3 RT-PCR 方法的建立及反应条件优化: 首先逆转录提取的 TMEV RNA, 再进行 PCR 扩增, 对 PCR 反应体系 dNTP 浓度、DNA 聚合酶量、引物浓度及退火温度等进行优化, 确定最佳反应条件。

1.5.4 敏感性测定: 紫外分光光度法测定 TMEV cDNA 模板浓度, 然后进行 10⁻¹ ~ 10⁻¹⁰ 系列稀释, 用建立的 PCR 方法进行扩增, 检测方法的灵敏度。

1.5.5 特异性测定: 分别以 TEMV, EMCV, LCM, JEV, MNV 及正常小鼠脑组织所提取的 RNA 为模板, 用建立的 RT-PCR 方法进行扩增, 验证方法的特

异性。

1.5.6 初步应用

1.5.6.1 感染试验: 10 只 BALB/c 小鼠, 9 只脑腔注射 30 μL TMEV 病毒液, 另外 1 只作为 PBS 对照, 逐日观察, 于感染后第 6 天对所有动物施行安乐死, 取心、肝、脾、肺、肾、脑、盲肠内容物和血清等样本, 心、肝、脾、肺、肾、脑等组织用 Trizol 试剂法提取 RNA, 盲肠内容物和血清参照 1.5.2 用 RNA 试剂盒提取 RNA, 随后用建立的 RT-PCR 方法进行扩增。

1.5.6.2 样本筛查: 100 份小鼠盲肠内容物, 取 100 mg 加入 900 μL 灭菌 PBS, 漩涡震荡后 10000 r/min 离心 5 min, 取 200 μL 上清按试剂盒说明提取 RNA, 随后用建立的 RT-PCR 方法进行扩增。

2 结果

2.1 RT-PCR 反应体系及条件

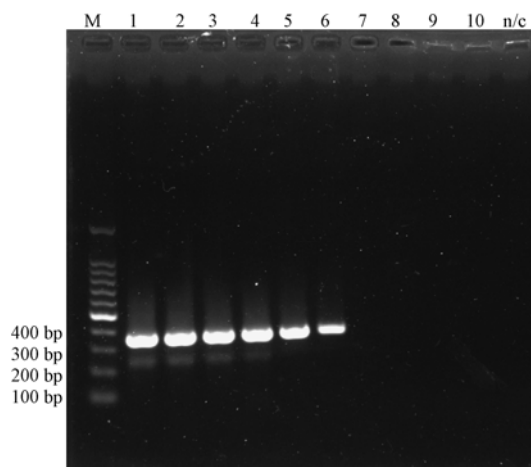
25 μL 逆转录体系包括 5 $\times$ RT buffer 5 μL , dNTP 4 μL , 随机引物 1 μL , 逆转录酶和 RNA 酶抑制剂各 0.5 μL , RNA 模板 8 μL , 无 RNA 酶水 6 μL ; 逆转录反应条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 90 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 各 1 个循环。优化后的 PCR 反应体系为 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μL , dNTP 2 μL , 上下游引物各 1 μL , DNA 模板 2 μL , HS Taq 酶 0.5 μL , 最后加灭菌双蒸水补至 25 μL 。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

2.2 PCR 产物测序

提取 TMEV GD VII 株细胞培养物 RNA, 用建立的双重 PCR 方法进行扩增, 产物送上海生工进行测序, 序列经 NCBI Blast 比对, 符合率均为 99%。

2.3 敏感性测定

紫外分光法测得 TMEV cDNA 模板浓度为 690 ng/ μL , 由图 1 可见, 建立的 TMEV RT-PCR 方法所能检测的最大稀释度为 10^{-6} , 即该方法所能检测的最低 cDNA 浓度为 0.69 pg/ μL 。



注: M: 100 bp marker; 1 ~ 10 分别为 TMEV cDNA 10^{-1} ~ 10^{-10} 稀释。

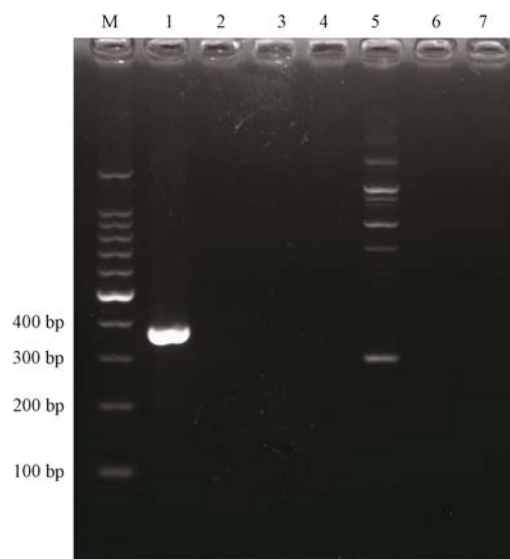
图 1 TMEV RT-PCR 方法敏感性

Note: M: 100 bp marker; 1 to 10: 10^{-1} to 10^{-10} dilution of TMEV cDNA.

Fig. 1 Sensitivity of TMEV RT-PCR

2.4 特异性测定

用建立的 RT-PCR 方法分别扩增 TMEV, EMCV, LCM, JEV, MNV 及正常小鼠脑组织, 结果以 TMEV 为模板产生 371 bp 的特异条带, 以其他对照病毒及正常小鼠脑组织为模板均不产生特异条带 (图 2)。



注: M: 100 bp marker; 1 ~ 7 分别为: TMEV、EMCV、LCM、JEV、MNV、正常小鼠脑组织、灭菌 ddH₂O。

图 2 TMEV RT-PCR 方法特异性

Note: M: 100 bp marker; 1 to 7: TMEV, EMCV, LCM, JEV, MNV, normal mouse brain tissue, sterile ddH₂O.

Fig. 2 Specificity of TMEV RT-PCR

2.5 初步应用

2.5.1 感染实验

感染小鼠于感染第 3 天产生不同程度的临床症状, 比较对照小鼠表现为明显发育不良, 后肢麻痹、精神萎靡 (图 3), 其中 2 只小鼠于感染后第 5 天死亡。对感染小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑、盲肠内容物及血清等组织样本进行 RT-PCR 检测, 结果显示, 所有小鼠脑组织均产生 371 bp 的目的条带, 其他组织均未出现目的条带 (部分结果见图 4)。对脑组织 PCR 产物测序, 结果经 NCBI 比对, 与 TMEV (GI: 62039) 的符合率为 100%。

2.5.2 样本筛查: 对会检的 100 份小鼠盲肠内容物进行 TMEV RT-PCR 扩增, 结果均为阴性。

3 讨论

脑脊髓炎病毒在动物中的感染时有报道, 不仅能够感染小鼠, 也可以感染大鼠, 且感染率较高^[5-10]。实验动物国标中 TMEV 的检测方法主要为血清学方法, 本实验建立了 TMEV 的 RT-PCR 方法, 与以往报道的分子生物学方法相比^[11], 不需要进行后续的探针检测, 用时短, 且敏感性更高, 特异性更好。

参考文献报道^[12], 本实验在脑腔注射感染小鼠的过程中采用眼角斜上方浅进针 (2 mm) 的方式进

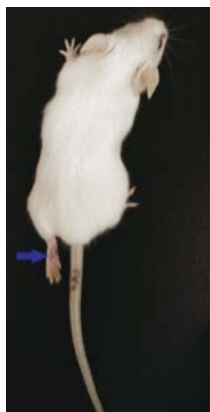
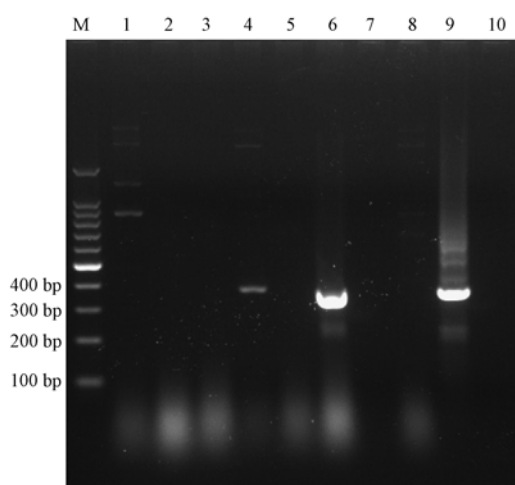


图 3 感染小鼠后肢瘫痪

Fig. 3 Hind legs paralyzed of infected mouse



注: M; 100 bp marker; 1~8: 心、肝、脾、肺、肾、脑、血清、盲肠内容物; 9: 阳性对照; 10: 灭菌 ddH₂O。

图 4 感染小鼠组织 RT-PCR 扩增结果

Note: M; 100 bp marker; 1 to 8: Heart, liver, spleen, lung, kidney, brain, serum, cecal contents; 9: Positive control; 10: Sterile ddH₂O.

Fig. 4 The results of RT-PCR for tissues of infected mice

行注射,减少了对动物脑部的损伤。实验用的 TMEV 毒株为强毒株 GDVII,感染动物在第 3 天均出现明显的临床症状,变现为后肢瘫痪、震颤等,其中 2 只于感染第 5 天死亡。用建立的 RT-PCR 方法对感染小鼠的组织进行检测,所有感染动物的脑组织均检测到 GDVII 核酸,在肺组织产生约 400 bp 的非特异条带,经测序排除了 TMEV,其他组织均未检测到,这与之前的报道结果一致^[13-14],可能病毒未通过血脑屏障,因而未感染到其他器官。

对 100 份小鼠的盲肠内容物样本进行 TMEV 的筛查,结果均为阴性,初步表明近年北京地区实验动物中 TMEV 的控制情况良好。

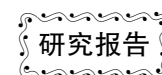
综上所述,我们建立的 TMEV RT-PCR 方法具

有良好的敏感性和特异性,可以作为实验动物国标的补充检测方法。

参考文献:

- [1] 田克恭. 实验动物病毒性疾病[M]. 农业出版社, 1992:99 - 104.
- [2] Downs WG. Mouse encephalomyelitis virus. In: Foster HL, Small JD, Fox JG ed. The mouse in biomedical research, vol. II [M]. New York: Academic Press, 1982. 341 - 352.
- [3] Lipton HL, Rozhon EJ. The Theiler's murine encephalomyelitis viruses. In: Bhatt PN, Jacoby RO, Morse HC, et al. Viral and mycoplasmal infections of laboratory rodents: effects on biomedical research[M]. London: Academic Press Inc, 1986. 253 - 275.
- [4] Lipton HL. Theiler's virus infection in mice: an unusual biphasic disease process leading to demyelination[J]. Infect. Immun, 1975, 11:1147 - 1155.
- [5] Roble GS, Gillespie V, Lipman NS. Infectious disease survey of *Mus musculus* from pet stores in New York City[J]. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 2012, 51:37 - 41.
- [6] Hansen AK, Thomsen P, Jensen HS. A serological indication of the existence of a guinea pig poliovirus[J]. Laboratory Animals, 1997,31:212 - 218.
- [7] Hayashimoto N, Morita H, Ishida T, et al. Microbiological survey of mice (*Mus musculus*) purchased from commercial pet shops in Kanagawa and Tokyo, Japan [J]. Experimental Animals, 2014, Advance Publication:1 - 15.
- [8] Lipton HL, Kim BS, Yahikozawa H, et al. Serological evidence that *Mus musculus* is the natural host of Theiler's murine encephalomyelitis virus[J]. Virus Research, 2001,76:79 - 87.
- [9] Rodrigues DM, Martins SS, Gilioli R, et al. Theiler's murine encephalomyelitis virus in nonbarrier rat colonies [J]. Comparative Medicine, 2005,55(5):459 - 464.
- [10] Dammann P, Hilken G, Hueber B, et al. Infectious microorganisms in mice (*Mus musculus*) purchased from commercial pet shops in Germany [J]. Laboratory Animals, 2011,45:271 - 275.
- [11] Zoll J, Galama J, Melchers W. Molecular identification of cardioviruses by enzymatic amplification [J]. Molecular and Cellular Probes, 1993,7:447 - 452.
- [12] 李慧,王春华,罗姗,等. 关于小鼠脑内不同注射手法的探讨[J]. 实验动物科学,2013,30(2):48 - 50.
- [13] Trottier M, Schlitt BP, Lipton HL. Enhanced detection of Theiler's virus RNA copy equivalents in the mouse central nervous system by real-time RT-PCR[J]. Journal of Virological Methods, 2002,103:89 - 99.
- [14] Shaw - Jackson C, Michiel T. Absence of internal ribosome entry site-mediated tissue specificity in the translation of a bicistronic transgene[J]. J Virol, 1999,73(4):2729 - 2738.

[修回日期]2015-08-31



两种不同试剂对 SD 大鼠血凝四项检测结果的比对

高艳新¹, 朱玉洁², 李慕芳², 杨照新², 符健²

(1. 承德市中医院检验科, 河北 承德 067000; 2. 海南医学院海南省药物安评中心, 海口 571199)

【摘要】 目的 比对进口和国产两种不同厂家品牌的血凝试剂对实验动物 SD 大鼠和人血凝四项 (PT、APTT、TT、FIB) 检测结果, 观察它们之间是否存在差异。**方法** 选用 SPF 级 SD 大鼠及人血凝标本, 分别用国产和进口两种不同品牌血凝试剂检测 PT、APTT、TT 及 FIB 血凝四项指标。**结果** 两种不同品牌血凝试剂对大鼠血凝四项指标检测结果均存在差异, 大鼠血凝指标 PT、APTT、FIB 国产试剂检测结果高于进口试剂 ($P < 0.05$); 大鼠血凝指标 TT 进口试剂检测结果高于国产试剂 ($P < 0.05$); 而人血凝标本未见明显差异。**结论** 不同厂家品牌的血凝试剂检测 SD 大鼠血凝四项 (PT、APTT、TT、FIB) 结果可存在差异, 各实验室应根据需求建立相应的背景数据。

【关键词】 凝血酶原时间; 活化部分凝血酶时间; 凝血酶时间; 纤维蛋白原

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0021-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.010.005

Comparison of coagulation data measured with domestic produced and imported coagulation testing solutions on SD rat

GAO Yan-xin¹, ZHU Yu-jie², LI Mu-fang², YANG Zhao-xin², FU Jian²

(1. clinical laboratory, Chengde City Hospital of traditional Chinese Medicine, Hebei Chengde 067000, China;

2. Research Center for Drug Safety Evaluation, Hainan Medical College, Haikou 571199, China)

【Abstract】 Objective To compare coagulation data measured with domestic produced and imported coagulation testing solutions on SD rat and human by testing prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT), fibrinogen (FIB). **Methods** Blood samples were obtained from SPF SD rat and human. Domestic produced and imported coagulation testing solutions were applied to test PT, APTT, TT, and FIB. **Results** Compared to rat data measured with imported coagulation testing solution, data measured with domestic produced coagulation testing solution of PT, APTT, FIB was significantly higher ($P < 0.05$), while, data of TT was statistically lower ($P < 0.05$), and there was no obvious difference in human blood coagulation. **Conclusion** The data measured with different coagulation testing solution varies on SD rat, so the laboratories are required to establish reference data according to different products.

【Key words】 Prothrombin time; Activated partial thromboplastin time; Thrombin time (TT); Fibrinogen

抗凝和止血药物的药效学及毒理学研究往往需要检测凝血酶原时间 (PT)、活化部分凝血酶时间 (APTT)、凝血酶时间 (TT) 及纤维蛋白原 (FIB) 等 4 项凝血实验, 它们不仅仅是出血和血栓性疾病的常

规检测项目, 也是药物筛选的重要试验。检测实验动物血凝四项除可监测抗凝药物和止血剂的疗效, 也能观察药物的毒性反应。因此在医学实验研究中, 常需要观察实验动物的上述指标, 但不同品牌

[基金项目] 海南省重大科技专项项目 (ZDZX2013003)。

[作者简介] 高艳新 (1976 -), 女, 主管检验师, 学士, 主要从事临床检验数据分析与动物建模。E-mail: 568659214@qq.com。

[通讯作者] 符健, 男, 教授, 从事药物安全性评价研究工作。Email: 168494512@qq.com。

的血凝试剂对实验动物血凝四项检测结果是否存在影响鲜有报道。本研究采用两种不同品牌的血凝试剂对实验动物 SD 大鼠及人的血凝四项指标进行检测, 比对它们之间是否存在差异。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 36 只购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2011-0003】, 雌雄各半, 体重 200 g 左右, 6~7 周龄。

1.2 人血标本

健康成年 36 人, 体检结果肝肾未见明显异常, 无明显血液性疾病, 年龄在 24~42 岁之间, 男女各半, 来源于海南省中医院体检中心志愿者。

1.3 主要试剂来源

国产某品牌血凝四项试剂, PT 试剂盒批号 50020801; APTT 试剂盒批号 2010098; TT 试剂盒批号 Y2020132; FIB 试剂盒批号 132050。进口某品牌血凝四项试剂, PT 试剂盒批号 545534; APTT 试剂盒批号 547177; TT 试剂盒批号 43154; FIB 试剂盒批号 538070。

1.4 主要仪器

SYSMEX CA-50 型自动血液凝固分析仪; EPPENDORF 5810 型离心机。

1.5 样本采集方法

SD 大鼠采用 3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉, 经腹主动脉精确采 10% 枸橼酸钠抗凝血标本 2 mL, 人血凝标本来自外周静脉 10% 枸橼酸钠抗凝血, 轻轻颠倒混匀, 3000 r/min 离心 10 min, 收集上层血浆待检。

1.6 检测方法

血凝指标 PT、APTT 及 TT 均采用凝固法, FIB 采用 Clauss 法。

1.7 采用 SPSS15.0 对结果进行单因素方差分析, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 两种不同血凝试剂对 SD 大鼠及人血凝 PT 检测结果的比较

表 1 结果显示: 大鼠血凝指标 PT 两种不同品牌试剂的检测结果显示存在差异, 国产试剂检测结果高于进口试剂 ($P < 0.05$), 人血凝指标 PT 未见明显差异。

2.2 两种不同血凝试剂对 SD 大鼠及人血凝 APTT 检测结果的比较

表 2 结果显示: 大鼠血凝指标 APTT 两种不同品牌试剂的检测结果显示存在差异, 国产试剂检测结果高于进口试剂 ($P < 0.05$), 人血凝指标 APTT 未见明显差异。

2.3 两种不同血凝试剂对 SD 大鼠及人血凝 TT 检测结果的比较

表 3 结果显示: 大鼠血凝指标 TT 两种不同品牌试剂的检测结果显示存在差异, 进口试剂检测结果高于国产试剂 ($P < 0.05$), 人血凝指标 TT 未见明显差异。

2.4 两种不同血凝试剂对 SD 大鼠及人血凝 FIB 检测结果的比较

表 4 结果显示: 大鼠血凝指标 FIB 两种不同品牌试剂的检测结果显示存在差异, 国产试剂检测结果高于进口试剂 ($P < 0.05$), 人血凝指标 FIB 未见明显差异。

表 1 各组 PT 检测结果
Tab. 1 The results of PT at various groups

组别 Groups	数量 Number	PT(s)	
		大鼠(Rat)	人(Human)
国产试剂 Domestic Reagent	36	17.6 ± 4.2	11.6 ± 2.8
进口试剂 Imported Reagent	36	13.2 ± 2.9 *	10.7 ± 1.9

注: 两种试剂组间比较, * $P < 0.05$ 。
Note: Compared between groups, * $P < 0.05$.

表 2 各组 APTT 检测结果
Tab. 2 The results of APTT at various groups

组别 Groups	数量 Number	APPT(s)	
		大鼠(Rat)	人(Human)
国产试剂 Domestic Reagent	36	35.3 ± 10.2	36.9 ± 10.3
进口试剂 Imported Reagent	36	23.6 ± 5.1 *	36.6 ± 9.4

注: 两种试剂组间比较, * $P < 0.05$ 。
Note: Compared between groups, * $P < 0.05$.

表 3 各组 TT 检测结果
Tab. 3 The results of TT at various groups

组别 Groups	数量 Number	TT(s)	
		大鼠(Rat)	人(Human)
国产试剂 Domestic Reagent	36	34.8 ± 7.8	17.7 ± 4.9
进口试剂 Imported Reagent	36	50.4 ± 9.7 *	18.6 ± 5.1

注:两种试剂组间比较, * $P < 0.05$ 。
Note: compared between groups, * $P < 0.05$.

表 4 各组 FIB 检测结果
Tab. 4 The results of FIB at various groups

组别 Groups	数量 Number	FIB(g/L)	
		大鼠(Rat)	人(Human)
国产试剂 Domestic Reagent	36	1.15 ± 0.23	2.67 ± 0.74
进口试剂 Imported Reagent	36	0.64 ± 0.16 *	2.76 ± 0.54

注:两种试剂组间比较, * $P < 0.05$ 。
Note: Compared between groups, * $P < 0.05$.

3 讨论

凝血四项(PT、APTT、TT、FIB)检测对诊断凝血系统异常的血液性疾病具有很大的意义,它不仅用于出凝血异常疾病的筛选与诊断,对抗凝药物治疗效果的监测也起着重要作用。尤其是动物实验的抗凝和止血药物的药效学及毒理学研究都需要检测 PT、APTT、TT、FIB 等 4 项凝血实验,除可监测抗凝药物和止血剂的疗效,也能观察药物的毒性反应。

由于血凝测定受多种因素的影响,例如仪器精度,标本状况,环境温度,试剂质量等等,尤其是试剂质量,因此血凝检测临床标准化问题也日益突出。目前大多数医院所用的血凝分析仪的试剂大多是开放的,可根据自己的需求选择不同厂家的试剂。但应用不同厂家的血凝试剂,检测同一样本结果未必全部相同,尤其是实验动物血凝标本,因为目前所有血凝试剂均是人临床检测试剂,并非实验动物专用试剂。

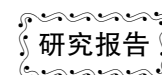
试剂是影响血凝比对试验的关键,本研究结果表明,国产和进口血凝试剂对 SD 大鼠 PT、APTT、TT、FIB 四项指标检测结果均存在差异,其中国产试剂 TT 检测结果小于进口试剂,其余 PT、APTT、FIB 三项指标国产试剂均大于进口试剂($P < 0.05$)。这说明不同品牌的血凝试剂对 SD 大鼠血凝四项检测结果可存在差异,而这种差异在人血标本并不明显。因此,一个实验室在进行同类实验动物血凝检测时,尽量使用同一厂家的凝血试剂来做凝血实验。造成这种差异的原因可能是多方面的,首先品牌不同的试剂,制备标准不尽相同,并且所有血凝试剂均是人临床检测试剂,并非实验动物专用试剂。因此这些人临床检测试剂在检测人血标本时

差异^[1]并不明显,而检测大鼠血凝指标就可能会出现差异。其次有文献报道 PT 检测结果与促凝血酶原激酶和钙离子的活性和含量都是相关联的^[2],来源不同、制备标准不同的促凝血酶原激酶的活性会存在差异。钙离子做为启动剂,其浓度将直接影响着各凝血因子的一系列酶促反应。因此不同凝血试剂的促凝血酶原激酶的活性和钙离子浓度不同,可导致 PT 测定值有不同程度的差异^[3-4]。其次实验动物 SD 大鼠凝血系统可能与人类不尽相同^[5-6],应用人凝血试剂检测大鼠凝血四项,部分方法和标准未必完全适用。因此各实验室应根据需求建立相应的背景数据及相应的实验条件。

参考文献:

[1] 陈莉. 两种不同试剂对血凝四项检测结果影响探讨[J]. 检验医学与临床,2011,8(8):928-931.
[2] 熬必蓉,周全昌,李坤等. 各种不同凝血活酶试剂测定凝血酶原时间的研究[J]. 血栓与止血,2009,12(3):129-131.
[3] 沈洁琼. 不同试剂对凝血酶原实验的影响[J]. 临床医学工程,2011,11(18):1718-1719.
[4] 李明德,王学燕,黄礼兵. 不同批号凝血活酶试剂对 PT、INR 质控图的影响及处理对策[J]. 血栓与止血,2008,14(6):281-283.
[5] Yoshinaka Urasoko, Xi Jun He, et al. Changes in Blood Parameters and the Expression of Coagulation-Related Genes in Lactating Sprague - Dawley Rats[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2012,51(2): 144 - 149.
[6] Yoshinaka Urasoko, Xi Jun He, Tomonori Ebata, et al. Changes in Blood Parameters and Coagulation-Related Gene Expression in Pregnant Rats[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2009,48(3):272 - 278.

[修回日期]2015-08-18



姜黄素对沙漠干热环境大鼠生存率影响的实验

李佳佳^{1,2}, 刘江伟², 姚刚¹, 许琴², 许永华², 马娜², 董翔²,
赵红艳², 是文辉², 李建瑛²

(1. 新疆农业大学动物医学学院, 乌鲁木齐 830052;
2. 兰州军区乌鲁木齐总医院新疆特殊环境医学重点实验室, 乌鲁木齐 830000)

【摘要】 目的 探讨姜黄素对沙漠干热环境下大鼠生存率的影响。**方法** 选择SPF级6~8周龄雄性SD大鼠40只,随机分为对照组、姜黄素低剂量预处理组、姜黄素中剂量预处理组、姜黄素高剂量预处理组、溶剂组。对照组,正常饲喂;低剂量组、中剂量组、高剂量组、溶剂组分别等体积灌胃连续7 d。置于西北地区特殊环境人工实验舱,设定沙漠干热环境气候模式(温度41℃,湿度10%,紫外线辐射度40W/m²)。观察各组大鼠机体的生命体征并每半小时监测核心体温变化,记录死亡时间。**结果** 五组大鼠从被置于沙漠干热环境开始,0~30 min,姜黄素三个剂量组的核心体温与对照组、溶剂组比较无显著差异($P>0.05$)。从60 min开始,60 min、90 min、120 min、150 min、180 min、210 min、240 min 7个时间点,低剂量组、中剂量组、高剂量组的核心体温低于对照组、溶剂组,差异有显著性($P<0.05$)。从0~240 min各时间点低剂量组、中剂量组、高剂量组组间比较均无显著性差异($P>0.05$)。对照组、姜黄素低、中、高剂量治疗组及溶剂组五组大鼠平均生存时间分别为(222.95±28.23) min、(231.35±40.96) min、(255.00±30.39) min、(263.80±56.71) min、(223.00±27.23) min。中、高剂量姜黄素预处理组大鼠的生存时间均明显长于低浓度预处理组、对照组和溶剂组($P<0.05$),其中高剂量组效果显著($P<0.01$)。**结论** 姜黄素预处理能提高沙漠干热环境大鼠的生存时间,提示姜黄素可能在提高沙漠干热环境大鼠耐热性方面发挥重要作用,姜黄素可能在沙漠干热环境中暑的防治方面具有潜在的临床应用价值。

【关键词】 姜黄素;沙漠;干热环境;大鼠;生存率

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0024-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.010.006

The experimental research of the effects of curcumin on survival rate of the rats in dry heat environment of desert

LI Jia-jia^{1,2}, LIU Jiang-wei², YAO Gang¹, XU Qin², XU Yong-hua²,
MA Na², DONG Xiang², SHI Wen-hui², LI Jian-ying²

(1. Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 2. Urumqi The Key Laboratory of Special Environmental Medicine of Xinjiang, General Hospital of Lanzhou Military region, Urumqi 830000, China)

【Abstract】 Objective To study the effects of curcumin on the survival rate of the rats in the dry heat environment of desert. **Methods** The 40 selected 6~8 week-old male SPF grade SD rats were randomly divided into control group, low-dose curcumin pretreated group, middle-dose curcumin pretreated group, high-dose curcumin pretreated group and solvent group. The control group were fed as normal, the three curcumin pretreated group were gavaged with different dose

[基金项目] 军队临床高新技术重大项目(2010gxjs016);自治区自然科学基金项目(2015211C231)。

[作者简介] 李佳佳(1985-),女,硕士研究生,研究方向:实验动物学。E-mail:55159301@qq.com。

[通讯作者] 刘江伟(1970-),男,博士后,教授,研究方向:特殊环境医学研究。E-mail:ljw273@sohu.com;姚刚(1959-),男,博士,教授,研究方向:动物生长与畜产品质量安全研究。E-mail:yaogang516@163.com。

of curcumin for 7 consecutive days, the solvent group were gavaged equal volume of solvent for 7 consecutive days. Then all the rats were put into the dry heat environment (temperature of 41°C , humidity 10%, ultraviolet radiation $40\text{W}/\text{m}^2$) in The Simulated Climate Cabin for Special Environment of Northwest of China. The vital signs of the rats were observed. The core body temperature of the rats were monitored for every half an hour, the dead time were recorded. **Results** The core body temperature of the five groups had no significant different at the first half hour after the started in the dry heat desert environment ($P > 0.05$). However, after 60 min from the beginning, the core body temperature of the three curcumin pretreated group were significantly lower than the control group and the solvent group at the 7 time point of 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min, 210 min, 240 min. The core body temperature had no significant different in the three curcumin pretreated group at each time point from the beginning to 240 min ($P > 0.05$). The survival time for the control group, low-dose curcumin pretreated group, middle-dose curcumin pretreated group, high-dose curcumin pretreated group and solvent group were $(222.95 \pm 28.23)\text{min}$, $(231.35 \pm 40.96)\text{min}$, $(255.00 \pm 30.39)\text{min}$, $(263.80 \pm 56.71)\text{min}$, $(223.00 \pm 27.23)\text{min}$, respectively. The survival time of the middle-dose curcumin pretreated group and high-dose curcumin pretreated group were significantly longer than the low-dose curcumin pretreated group, control group and the solvent group ($P < 0.05$), and the high-dose curcumin pretreated group had the most obvious effects on the survival time compared with the other two curcumin pretreated group ($P < 0.01$). **Conclusion** Curcumin could increase the survival time of rats in the dry heat environment of the desert, which indicated that the curcumin may exert its heat tolerance effects in dry heat environment, curcumin may have potential clinical value in the prevention and treatment for the heatstroke in dry heat environment of desert.

【Key words】 Curcumin; Desert; Dry heat environment; Rats; Survival rate

姜黄素 (curcumin, CUR) 是姜黄中提取的一种植物多酚,也是姜黄发挥药理作用最重要的活性成分,有抗炎、抗氧化、清除氧自由基、抗人类免疫缺陷病毒、保护肝脏和肾脏、抗纤维化以及防肿瘤抗肿瘤等作用^[1-2]。现代科学已经证明,姜黄素在抗炎、抗肿瘤、抗氧化等方面都有着很好的应用前景^[3-4]。目前研究认为,中暑由高温触发,并由内毒素驱使的一种全身的炎症反应,从而引起一系列的出血、凝血、坏死和多器官衰竭^[4]。Yan YE 等^[6]认为中暑和脓毒症有许多相似之处,内毒素血症和细胞因子可能包含于其发病机制中,采取抗炎药、分子伴侣素、抗氧化剂、Hsp 调控因子等措施可能有益于中暑患者的治疗。因此我们推测姜黄素可能在沙漠干热环境大鼠中暑的防治方面具有一定作用。本实验在课题组以往工作基础上^[7],通过观察姜黄素预处理对沙漠干热环境大鼠生存时间的影响,探讨姜黄素在沙漠干热环境中暑大鼠防治中的应用价值。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

选择 6~8 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 40 只,体重 $220 \sim 260\text{g}$,由新疆维吾尔自治区实验动物研究中心提供,实验动物生产合格证号【SCXK(新)2011-0001】。大鼠自购入后适应实验室环境一周,饲养

环境保持温度 $(22 \pm 1)^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $(50 \pm 5)\%$,大鼠无菌饲料喂养,自由摄食和饮水(均经高温灭菌处理)。实验取材等相关工作在中国人民解放军兰州军区乌鲁木齐总医院实验动物科屏障动物实验设施进行【SYXK(新)2011-0003】。并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 仪器与试剂

西北地区特殊环境人工实验舱(兰州军区乌鲁木齐总医院研制),多功能生理信号仪 420(成都仪器厂),电子称(上海仪器厂),分析天平(上海仪器厂)。

姜黄素(TCI-C0434),羧甲基纤维素钠(源叶生物)。

1.3 溶液配制、实验分组与处理

将 40 只健康雄性大鼠随机分为 5 组:

对照组:正常饲喂,不做预处理;

姜黄素低剂量预处理组(以下简称为低剂量组):用姜黄素 $5\text{mg}/100\text{g} + 0.5\%$ 羧甲基纤维素钠溶液,配成混悬液摇匀待用。按照 $1\text{mL}/100\text{g} \cdot \text{d}$ 灌胃,连续灌胃 7 d,1 次/d;

姜黄素中剂量预处理组(以下简称为中剂量组):用姜黄素 $10\text{mg}/100\text{g} + 0.5\%$ 羧甲基纤维素钠溶液,配成混悬液摇匀待用。按照 $1\text{mL}/100\text{g} \cdot \text{d}$ 灌胃,连续灌胃 7 d,1 次/d;

姜黄素高剂量预处理组(以下简称为高剂量

组):用姜黄素 20 mg/100 g + 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液,配成混悬液摇匀待用。按照 1 mL/100g·d 灌胃,连续灌胃 7 d,1 次/d;

羧甲基纤维素钠溶剂组(以下简称为溶剂组):用 5g 羧甲基纤维素钠 + 蒸馏水定容到 1000 mL 配成 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液,超声放置后过夜待用。等体积灌胃,连续灌胃 7 d,1 次/d。

1.4 模型建立

大鼠进舱前,禁食 12 h,可随意饮水。将沙漠干热环境确定为 41℃,湿度 10%,紫外线辐射度 40 W/m²,大鼠进舱后禁食禁水,不麻醉,可在笼内自由活动。详细记录大鼠的核心体温,体重,呼吸频率。

1.4.1 生命体征观察 核心体温由多功能生理信号仪每半个小时监测,实验操作人员分别在 0 min,30 min,60 min,90 min,120 min,150 min,180 min,210 min,240 min,270 min 记录数值的变化。大鼠在舱内沙漠干热环境下的形态及呼吸的改变,实验操作人员通过高清摄像头可以直接观察并记录。

1.4.2 统计学方法 计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 spss17.0 统计软件进行统计分析,先进行 *t* 检验,然后各组采用方差分析两两比较进行显著性分析,生存率比较采用 *Kaplan-Meier* 法,做出生存曲线, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般观察

试验期间,对照组动物未见异常,姜黄素低、中、高剂量组和溶剂组动物试验前期未见中毒、死亡等异常表现。

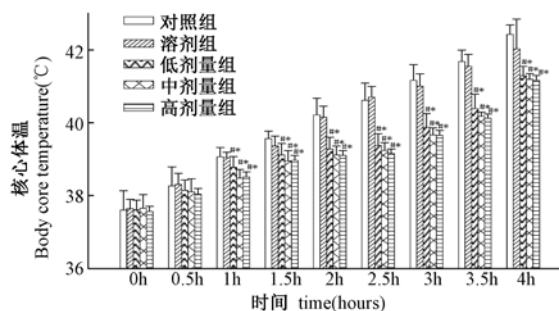
2.2 大鼠形态及呼吸改变

鼠呼吸频率组间比较无统计学差异($P > 0.05$)。沙漠干热舱内所有各组大鼠的体毛从干热环境暴露开始至结束,始终保持干燥状态,这一点与以往湿热环境中暑方面的研究截然不同,湿热环境下大鼠中暑模型中的大鼠体毛明显呈潮湿状态。大鼠出现鼻腔流出泡沫状液体,口腔流涎,张口呼吸,尿失禁等。对照组、姜黄素低、中、高剂量治疗组、溶剂组五组大鼠呼吸频率无明显改变,从实验开始至结束,基本维持在 75 ± 10 次/min 左右,其改变总体来说,180 ~ 210 min 阶段,呼吸频率稍加快,可升高至 112 ± 5 次/min 左右,胸腔起伏程度也较大,然后,至 210 ~ 240 min 阶段,频率进一步加快,

可升高至 135 ± 10 次/min 左右,胸腔起伏程度较 210 ~ 240 min 阶段有所减小,至 270 min,呼吸频率开始减慢,可降低至 60 ± 5 次/min 左右,主要表现为呼气时相延长明显,胸腔起伏程度也减小。

2.3 核心体温(Tc)改变

如图所示,五组大鼠从被置于沙漠干热环境舱开始,0 ~ 30 min,姜黄素三个剂量组的核心体温与其他两组比较无显著性差异($P > 0.05$)。从 60 min 开始,60 min、90 min、120 min、150 min、180 min、210 min、240 min 7 个时间点,低剂量组、中剂量组、高剂量组的核心体温低于对照组、溶剂组,差异有显著性($P < 0.05$)。从 0 ~ 240 min 各时间点低剂量组、中剂量组、高剂量组组间比较均无显著性差异($P > 0.05$)。



注: #: 与对照组比较 $P < 0.05$; *: 与溶剂组比较 $P < 0.05$ 。

图1 各组间不同时间点核心体温变化(单位:℃)

Note: #: Compared with the control group, $P < 0.05$;

*: Compared with the solvent group, $P < 0.05$.

Fig.1 Each core body temperature change between differernt time points(Unit:℃)

2.4 大鼠生存时间

采用 *Kaplan-Meier* 法比较对照组、姜黄素低、中、高剂量治疗组和溶剂组的生存率,然后进行 *Log-rank* 检验,结果两组有统计学意义($P < 0.05$)。生存曲线是最直观的反映大鼠生存情况的线图,我们发现,平缓的生存曲线表示高生存率和较长的生存时间。对照组和溶剂组曲线基本重合,对照组与溶剂组无显著性差异($P > 0.05$);低剂量组与对照组、溶剂组无显著性差异($P > 0.05$);中剂量组生存时间长于对照组、溶剂组和低剂量组,与对照组、溶剂组比较有显著性差异($P < 0.05$);高浓度组生存时间明显长于其他四组,与对照组、溶剂组比较有极显著差异($P < 0.01$)。详见生存曲线图(图2)。

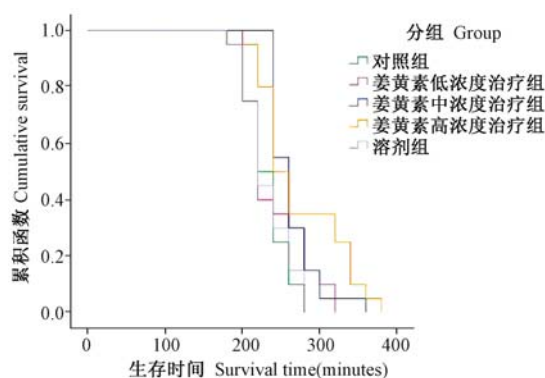
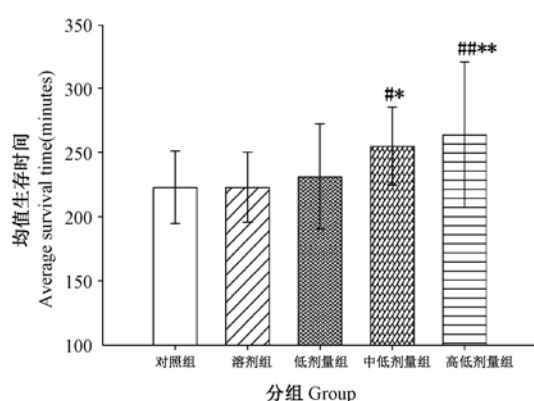


图2 生存曲线

Fig. 2 Survivorship curve



注: #: 与对照组比较 $P < 0.05$, ##: 与对照组比较 $P < 0.01$;

*: 与溶剂组比较 $P < 0.05$, **: 与溶剂组比较 $P < 0.01$ 。

图3 各组大鼠平均生存时间

Note: #: Compared with the control group, $P < 0.05$;

##: Compared with the control group, $P < 0.01$;

*: Compared with the solvent group, $P < 0.05$;

**: Compared with the solvent group, $P < 0.01$.

Fig. 3 Each group average survival time in rats

3 讨论

沙漠干热环境具有气温高、干燥、太阳辐射强等特点,沙漠干热环境中暑往往病情更加严重。目前沙漠干热环境对机体影响的研究在国内外较少,我们先前的研究首先在国内外成功建立了沙漠干热环境下猪的腹部肠管火器伤动物模型^[8]。研究中发现,将长白仔猪在干热环境中放置 3 h 后致伤腹部肠管,建立沙漠干热环境下的腹部肠管火器伤动物模型后继续置于沙漠干热环境中,所有长白仔猪均在 2 h 内死亡,而转移到常温环境的猪能够存活 24 h 以上,提示沙漠干热环境对机体有严重的影响,如何提高机体在沙漠干热环境下的耐热性,减

少沙漠干热环境下机体的损害,是目前亟待解决的问题。

体温调节是集体产热过程和散热过程间的平衡不断地被打破,经过自主调节达到新的平衡过程。当暴露于高热的环境中时,机体在体温调节中枢的调控下,通过呼吸系统、心血管系统、皮肤血管和汗腺协同作用,增加散热和减少热吸收,维持着产热和散热的动态平衡^[9]。障碍导致的热细胞毒性及内毒素导致的级联炎症反应,可能是中暑/热应激的核心病理机制。

本研究首次应用姜黄素进行了沙漠干热环境耐热性研究的初步探讨。本实验参考前期我们课题组周仁鸥等在麻醉、有创状态下建立的大鼠中暑模型^[7],尝试在机体无创非麻醉状态下探讨姜黄素对机体生存时间的影响,所以除外麻醉和创伤因素的影响,我们发现五组大鼠核心体温到达 42.5℃ 以上时,大鼠生存维持时间在 30~70 min 内;然而,当大鼠核心体温到达 43℃ 以后,大鼠生存维持时间在 20~45 min 内,迅速死亡。通过每半个小时时间点对核心体温的监测,发现给予灌胃的姜黄素低、中、高剂量组不同程度的起到了体温保护控制,从 60 min 开始,一直到 270 min 实验结束,低、中、高剂量组核心体温上升速率较对照组和溶剂组相对缓慢。而在给药过程中,用于溶解姜黄素的溶剂羧甲基纤维素钠并没有影响大鼠干热环境下的生存率。从生存率曲线上看,中、高剂量的姜黄素预处理组的生存时间明显长于其他实验组,高剂量组的效果最为明显。本研究同时首次在沙漠干热环境模拟舱内建立了一种非麻醉、无创状态下的中暑模型,较我们前期建立的沙漠干热环境麻醉有创状态下的中暑模型相比,更能真实模拟沙漠干热环境对机体的影响,为我们进一步研究沙漠干热环境的救治研究奠定了基础。

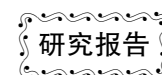
姜黄素具有来源广泛、预防和治疗潜能效果好、价格低廉、安全性高、无毒和不良反应小等优点,从而在临床上具有广阔的应用前景。本研究结果发现:姜黄素三种剂量治疗组均能提高沙漠干热环境大鼠的生存时间,其中高剂量组效果显著,提示姜黄素可能在沙漠干热环境大鼠耐热性方面发挥重要作用,姜黄素可能在沙漠干热环境中暑的防治方面具有潜在的临床应用价值。因此,我们可以推测姜黄素可提高沙漠干热环境大鼠的耐热性,其可能机制是姜黄素通过抗炎症及抗氧化作用而发

挥了对重要脏器的保护,其机制尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 涂永元,徐先祥,邱飞. 姜黄素前药的研究进展[J]. 有机化学,2012,32(5):852-859.
- [2] 王涵东,梁维邦. 姜黄素的研究进展[J]. 江苏医药,2014,40(10):1193-1194.
- [3] Hatcher H, Planalp R, Cho J, *et al.* Curcumin - From ancient medicine to current clinical trials[J]. Cell. Mol. Life Sci, 2008, 65:1631-1652.
- [4] 李高文,徐英,库宝善,等. 姜黄素的中枢药理作用研究进展[J]. 神经药理学报,2011,1(2):48-58.
- [5] Lim CL, Wilson G, Brown L, *et al.* Pre-existing inflammatory state compromises heat tolerance in rats exposed to heat stress[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007, 292(1): 186-194.
- [6] Yan YE, Zhao YQ, Wang H, *et al.* Pathophysiological factors underlying heatstroke[J]. Med Hypotheses, 2006, 67(3):609-617.
- [7] Zhou RO, Liu JW, Zhang D, *et al.* Establishment of a rat heatstroke model of dry-heat environment of desert and a preliminary discuss of rat's organ damage[J]. American Journal of Emergency Medicine, 2014, 32(6):573-579.
- [8] 刘江伟,张永久,李泽信,等. 常温和干热环境下腹部肠管火器伤动物模型的建立[J]. 创伤外科杂志,2007,9:408-410.
- [9] 张雪玲,刘兵,邬堂春. 沙漠干热环境徒手应激行军机体生理变化特点[J]. 中国公共卫生,2002,18(8):960.

[修回日期]2015-08-31



雌雄激素联合作用对高脂血症小鼠 血脂水平及凝血功能的影响

戴雯, 李艳, 郑红云, 许淑文

(武汉大学人民医院检验科, 武汉 430000)

【摘要】 目的 探讨雌雄激素联合作用对高脂血症小鼠血脂水平及凝血功能的影响。**方法** 对小鼠行去势手术后通过高脂饮食建立高脂血症模型, 通过给予不同激素将老鼠分为 5 组。造模结束后采集小鼠血液, 一部分小鼠分离血清检测小鼠血脂水平, 一部分小鼠分离血浆检测凝血功能。**结果** 高脂饮食后, 小鼠血清总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白水平较对照组相比明显升高, 凝血酶原时间、活化部分凝血酶原时间时间明显缩短 ($P < 0.05$), 给予雌雄激素联合治疗后, 与造模组相比, 小鼠血清总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白水平较对照组相比明显下降, 凝血酶原时间、活化部分凝血酶原时间时间明显延长 ($P < 0.05$), 而与对照组无明显差异。**结论** 雌雄激素联合治疗可以调节血脂, 显著降低低密度脂蛋白的水平, 调节凝血功能, 提示雌雄激素联合作用可以降低冠心病的发病风险, 为冠心病的激素治疗提供新思路。

【关键词】 雌激素; 雄激素; 高脂血症; 凝血功能

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0029-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.010.007

The synergistic effect of estradiol and testosterone on the lipids and coagulation function in mice with hyperlipidemia

DAI Wen, LI Yan, ZHENG Hong-yun, XU Shu-wen

(Renmin Hospital of Wuhan University, Department of clinical laboratory, Wuhan 430000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the influence of synergistic effect of estradiol and testosterone on the level of lipids and coagulation function in mice with hyperlipidemia. **Methods** We established a mouse model in hyperlipidemia, giving estradiol (1 $\mu\text{g}/\text{d}$), testosterone (7 $\mu\text{g}/\text{d}$) or estradiol combined testosterone (1 $\mu\text{g}/\text{d}$ E2 + 7T $\mu\text{g}/\text{d}$), respectively. After 14 weeks, we collected the blood from the mice, separated the serum to detect the lipids level, separated the plasma to test the coagulation function. **Result** Compared with controls, after high-fat diet, the serum level of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein (HDL) were significantly increased, PT and APTT were shorter ($P < 0.05$). However, after treating with estradiol combined testosterone, compared with cases, the serum level of C, TG and HDL were lower and PT, APTT were longer ($P < 0.05$), had no significance with controls. **Conclusion** The synergistic effect of estradiol and testosterone can mediate the lipids, reduce the level of LDL, regulate the coagulation function, reduce the risk of coronary heart disease, and also provide a new strategy for hormone therapy in coronary heart disease.

【Key words】 Estrogen; Androgen; Hyperlipidemia; Coagulation function

[基金项目] 武汉大学自主科研项目(410500191)。

[作者简介] 戴雯(1987-), 女, 博士生, 研究方向: 激素调节与冠心病的防治。Email: diane919@qq.com。

[通讯作者] 李艳(1961-), 女, 教授, 研究方向: 激素调节与冠心病的防治。Email: yanlitf120@163.com。

冠心病(coronary heart disease, CHD)是日益突出的公共健康问题。雌激素替代治疗是基于雌激素对心血管系统的保护作用的治疗方案,曾被尝试用于治疗冠心病,但是大规模的临床试验表明,雌激素替代治疗使凝血功能增强,增加静脉血栓和脑卒中的风险,因而建议停止使用^[1]。雄激素作为现今激素的研究的热点,为激素替代治疗提供了新思路。实验研究结果显示,睾酮(testosterone, T)可以有效降低促炎细胞因子 IL-1、IL-6、TNF- α 水平,并增加抗炎细胞因子 I-4 和 IL-10 水平^[2],并可提高纤维蛋白溶解系统及抗凝血酶Ⅲ的活性起到强大的抗血栓作用,延缓动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的病理进程,降低血栓形成和卒中的风险^[3]。分析雌雄激素心血管系统中的利弊,为雌雄激素联合治疗提供了理论依据。高脂血症是 CHD 发生发展的病理基础,本研究拟在动物学水平探讨雌雄激素联合作用对高脂血症小鼠血脂水平及凝血功能的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物模型的建立

本研究所选用的 SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠购于武汉大学实验动物中心【SCXK(鄂)2014-0004】。无菌手术与动物饲养及给药均在武汉大学实验动物中心生物安全三级动物实验室内进行【SYXK(鄂)2014-0013】。对 8 周龄雌鼠进行分组,主要分为对照组和去势组。去势组行双侧卵巢切除术(ovariectomy, OVX)。OVX 2 周后,对小鼠进行剪尾采血。检测小鼠血清雌雄激素的水平,判断卵巢切除是否成功。在 10 周龄时,将小鼠分为以下 5 组:

A: 对照组(n=10)

B: 单纯造模组(n=10)

C: 造模+雌激素组(n=10)

D: 造模+雄激素组(n=10)

E: 造模+最适雌雄激素比例组(n=10)

BCDE 为去势组。对照组给予正常饮食喂养;单纯造模组给予高脂饮食(high fat diet, HD)(基础饲料 77.8%,蔗糖 2%,猪油 10%,胆固醇 2%,胆盐 0.2%)喂养;造模+雌激素组在给予高脂饮食喂养的同时,对小鼠进行雌二醇(estradiol, E2)(1 $\mu\text{g}/\text{d}$)灌胃治疗;造模+雄激素组在给予高脂饮食喂养的同时,对小鼠进行睾酮(7 $\mu\text{g}/\text{d}$)灌胃治疗;造模+雌雄激素联合组在给予高脂饮食喂养的同时,对小鼠进行雌激素(1 $\mu\text{g}/\text{d}$)和睾酮(7 $\mu\text{g}/\text{d}$)联合灌胃

治疗。造模与治疗持续 14 周。

1.2 小鼠血清与血浆取材

造模与治疗持续 14 周后,摘小鼠眼球,尽可能多的收集血液。每组中 5 只小鼠的血液收集至促凝的采血管中,用于分离血清;另 5 只小鼠的血液收集至枸橼酸钠抗凝(血液与抗凝剂的比例约为 9:1)的采血管中,用于分离血浆,进行凝血相关检查。

1.3 血清指标与凝血功能检测

小鼠雌、雄激素的检测采用 ELISA 方法。商品化小鼠雌二醇与睾酮检测试剂盒购于上海博谷生物公司。血脂的检测使用西门子 ADVIA 2400 全自动生化分析仪进行检测。凝血功能的检测使用 sysmex CA7000 全自动凝血分析仪进行检测。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计学分析软件进行统计分析,多组数据间比较应用 one-way ANOVA 和 Student-Newman-Keuls q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况分析

从表 1 可知,给予小鼠高脂饮食喂养后,体重明显增加($P < 0.05$)。对高脂饮食喂养的小鼠单纯的给予 E2 或 T 治疗,并不会使体重减轻($P < 0.05$)。然而,给予雌雄激素联合治疗组小鼠体重与造模组相比明显下降,与对照组小鼠体重无明显差异。

行 OVX 后,造模组血清 E2 和 T 水平较对照组均明显下降($P < 0.05$)。对小鼠进行 1 $\mu\text{g}/\text{d}$ E2 灌胃给药后,小鼠血清 E2 水平明显升高($P < 0.05$);对小鼠进行 7 $\mu\text{g}/\text{d}$ T 灌胃给药后,小鼠血清 T 水平,明显升高($P < 0.05$);而对小鼠进行 1 $\mu\text{g}/\text{d}$ E2 + 7 $\mu\text{g}/\text{d}$ T 联合给药时,小鼠血清 E2 和 T 的水平均明显升高($P < 0.05$),这提示通过灌胃给予小鼠 E2 和 T 治疗可以调节小鼠血清 E2 和 T 水平,证明给药有效。

2.2 雌雄激素联合作用对小鼠血脂的影响

如表 2 所示,与对照组相比,造模组血清 TC、TG 和 LDL 水平明显升高($P < 0.05$),HDL 水平明显降低($P < 0.05$)。而雌雄激素联合治疗中小鼠血清 TG 和 HDL 水平升高,TC 和 LDL 明显降低。这提示,雌雄激素联合治疗时对小鼠血脂具有明显的调节作用。

表 1 小鼠的一般情况分析($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 General features of experimental animals ($\bar{x} \pm s$)

	对照组 Control (n = 9)	造模组 OVX + HD (n = 9)	雌激素组 OVX + HD + E2 (n = 9)	雄激素组 OVX + HD + T (n = 10)	雌雄激素联合组 OVX + HD + E2 + T (n = 9)
体重 Body weight(g)	22.13 ± 0.25	46.75 ± 0.79 *	32.28 ± 1.21 *	44.68 ± 0.86 *	25.46 ± 0.44
雌二醇浓度 E2 (ng/ml)	2.63 ± 0.51	1.96 ± 0.34 *	3.74 ± 0.47 *	2.16 ± 0.98	5.37 ± 1.72 *
睾酮浓度 T (ng/ml)	13.00 ± 1.52	12.48 ± 1.40 *	13.56 ± 0.51	19.32 ± 4.31 *	15.32 ± 2.76 *
雌雄比值 E2/T ratio	0.19 ± 0.09	0.16 ± 0.02 *	0.28 ± 0.04 *	0.11 ± 0.04 *	0.35 ± 0.05 *

注: * 与对照组相比, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。
Note: * Compared with control, $P < 0.05$.

表 2 不同组小鼠血脂水平检测($\bar{x} \pm s$)
Tab.2 The level of plasma lipids in mice ($\bar{x} \pm s$)

	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)
对照组 Control	2.43 ± 0.08	1.18 ± 0.17	1.26 ± 0.06	0.41 ± 0.01
造模组 OVX + HD	3.59 ± 0.23 *	2.10 ± 0.29 *	0.98 ± 0.06 *	0.52 ± 0.05 *
雌激素组 OVX + HD + E2	3.41 ± 0.25 *	0.74 ± 0.16 *#	1.17 ± 0.01	0.34 ± 0.03 **
雄激素组 OVX + HD + T	4.42 ± 0.11 *	2.15 ± 0.37 *	1.88 ± 0.20 *#	0.46 ± 0.03 #
雌雄激素联合组 OVX + HD + E2 + T	4.30 ± 0.14 *	1.14 ± 0.24 #	2.17 ± 0.12 **	0.27 ± 0.06 **

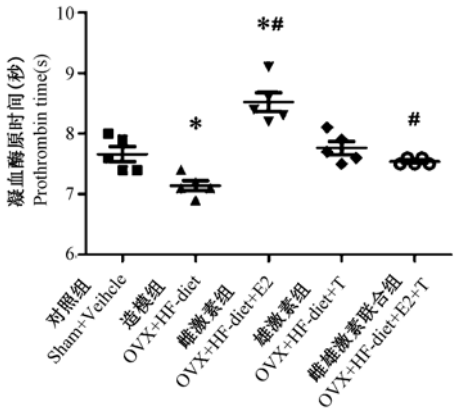
注: * 与对照组相比, $P < 0.05$, 差异有统计学意义; # 与造模组相比, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。
Note: * Compared with control, $P < 0.05$; # Compared with OVX + HD, $P < 0.05$.

2.3 雌雄激素协同作用对小鼠血浆凝血指标的影响

凝血功能在动脉粥样硬化中具有重要作用,而目前对于激素替代治疗中对凝血功能的影响存在广泛争议,因此在本研究中我们用凝血酶原时间(prothrombin time, PT)和活化部分凝血酶原时间(activated partial thromboplastin time, APTT)来评价小鼠的凝血功能。结果如图 1、2 所示,与对照组相比,造模组小鼠 PT 与 APTT 明显缩短($P < 0.05$),单纯 E2 治疗组中 PT 明显延长 APTT 明显缩短($P < 0.05$)。然而雌雄激素联合治疗组中 PT 和 APTT 时间恢复到对照水平,与对照组无差异。

3 讨论

雌激素替代治疗,已有几十年的历史,但结果存在广泛争议。大部分基础研究证实雌激素可以通过舒张血管、调节血脂、抗炎效应等对心血管具有保护作用。然而随着研究的深入,越来越多的学者认为,单纯给予雌激素不能完全预防和治疗女性冠心病。临床试验荟萃分析显示,口服雌激素



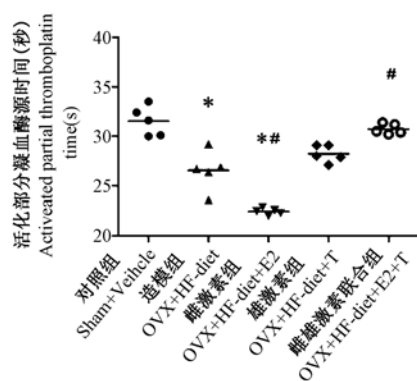
注: * 与对照组相比, $P < 0.05$, 差异有统计学意义;
与造模组相比, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。

图 1 雌雄激素对小鼠 PT 的影响

Note: * Compared with control, $P < 0.05$;
Compared with OVX + HD, $P < 0.05$.

Fig.1 The influence of estradiol combined testosterone on PT in mice

可增加凝血因子 VII,降低血纤维蛋白原、纤溶酶原激活物抑制剂 1^[4]。这种治疗可能增加静脉血栓栓



注: * 与对照组相比, $P < 0.05$, 差异有统计学意义;

与造模组相比, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。

图2 雌雄激素对小鼠 APPT 的影响

Note: * Compared with control, $P < 0.05$;

Compared with OVX + HD, $P < 0.05$.

Fig. 2 The influence of estradiol combined testosterone on APPT in mice

塞或脑卒中的风险。WHI (women health initiative) 的研究结果也认为: 雌激素联合孕激素治疗会增加冠心病、中风和肺栓塞发病危险性, 并建议停止使用。由此可见无论是雌激素替代治疗还是雌/孕激素联合治疗 CHD 效果均不理想。

针对雌激素治疗冠心病的不足, 越来越多的研究者开始研究雄激素对心血管系统的保护作用。雄激素尤其是睾酮可通过代谢产物间接和直接影响人类脉管系统, 进而对心血管起到积极的保护作用^[5]。大量实验研究结果一致认为: 睾酮可以有效降低促炎细胞因子 IL-1、IL-6、TNF、IFN- γ 水平, 增加抗炎细胞因子 IL-4 与 IL-10 水平。此外, 睾酮自身作为免疫抑制剂可调节凝血系统。一方面可激活血栓素 A2 受体及血小板聚集, 另一方面可提高纤维蛋白溶解系统及抗凝血酶 III 的活性起到抗血栓、抗心绞痛的作用^[3]。睾酮强大的抗血栓作用可显著延缓 AS 病理进程并降低其发生静脉血栓甚至中风的危险。

国内外最新研究已开始关注雌雄激素联合治疗在动物疾病模型中的应用。有研究表明在雌雄激素在前列腺增生中发挥了重要的作用^[6]。只有当雌雄激素比例为 1:100 时, 才能在去势大鼠的体内明显减少前列腺基质的改变。另一个研究关注了雌雄激素平衡与脑血管系统的关系^[7]。他们的研究发现, 不同比例的雌雄激素对脑血管的血管功能、内皮功能、氧化应激和炎症有不同的影响。同时也有研究已初步观察雌雄激素联合雄激素治疗对

绝经后妇女心血管系统的影响。随机双盲研究显示^[8]: 绝经后妇女给予雌二醇 (2 mg) 联合睾酮 (40 mg) (E2/T) 治疗 24 周后检测 CHD 高危因子-CRP, IL-6、TNF- α 、VCAM-1 水平, 结果发现: E 联合 T 治疗可明显降低 CRP 水平。因此, 研究雌雄激素协同作用对动脉粥样硬化的影响, 对绝经后女性 CHD 的防治具有重要意义。

通过本研究结果我们发现, 雌雄激素联合作用可以明显降低高脂饮食诱导到的体重减轻。同时, 也可以调节血脂, 显著降低 LDL-C 的水平, 提示雌雄激素联合作用可以降低冠心病的发病风险。

虽然, 大多数研究表明雌激素具有抗动脉粥样硬化效应。然而, 临床研究显示 E2 可紊乱凝血功能^[9], 增加血液粘度、增加血栓发生的风险, 这也是公认的雌激素替代治疗失败的主要原因。本研究在早期动脉粥样硬化模型小鼠中给予生理剂量的 E2 后, 发现小鼠的 PT 时间明显延长而 APTT 时间明显缩短, 这提示小鼠的内源性和外源性凝血途径均紊乱, 为雌激素替代治疗的不良反应提供了理论依据。近期有一项研究表明睾酮可以抑制血栓形成^[10]。这提示睾酮可以抵抗雌激素紊乱凝血功能的不良效应, 为雌雄激素联合治疗提供了理论基础。

也有不少研究表明睾酮替代治疗对雄鼠的动脉粥样硬化具有保护作用。然而, 极少有睾酮替代治疗在 OVX 雌鼠中的研究。本研究结果显示, 与单纯 E2 治疗相比, 给予小鼠单纯 T 治疗对小鼠的凝血功能具有相反的效应。然而, 在给予雌雄激素联合治疗时, 小鼠的凝血功能得到了纠正。这也充分体现了雌雄激素联合治疗的互补作用。

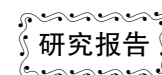
在本研究中, 雌雄激素联合治疗可有效的调节血脂及凝血功能, 而且这些效应明显优于单纯雌二醇或睾酮治疗。这提示在早期动脉粥样硬化模型中雌雄激素与雄激素具有协同作用, 雌雄激素联合治疗可明显抑制动脉粥样硬化的发展。总而言之, 本研究为雌雄激素联合治疗提供了实验基础, 为冠心病的防治提供新思路。

参考文献:

- [1] Lee, L. V., J. M. Foody, Women and heart disease[J]. Cardiol Clin, 2011. 29: 35-45.
- [2] Manolakou, P., R. Angelopoulou, C. Bakoyiannis, et al. The effects of endogenous and exogenous androgens on cardiovascular disease risk factors and progression[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2009. 7: 44.

- [3] Brodin, E. , T. Vikan, J. B. Hansen, *et al.* Testosterone, hemostasis, and cardiovascular diseases in men [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2011. 37: 87 – 94.
- [4] Braunstein, J. B. , D. W. Kershner, P. Bray, *et al.* Interaction of hemostatic genetics with hormone therapy: new insights to explain arterial thrombosis in postmenopausal women [J]. *Chest*, 2002. 121: 906 – 920.
- [5] Villablanca, A. C. , M. Jayachandran, C. Banka, Atherosclerosis and sex hormones: current concepts [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2010. 119: 493 – 513.
- [6] Xiang – Yun, L. , X. Ying-Wen, X. Chen-Jing, *et al.* Possible mechanism of benign prostatic hyperplasia induced by androgen-estrogen ratios in castrated rats [J]. *Indian J Pharmacol*, 2010. 42: 312 – 317.
- [7] Krause, D. N. , S. P. Duckles, R. J. Gonzales, Local oestrogenic/androgenic balance in the cerebral vasculature [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2011. 203: 181 – 186.
- [8] Kocoska-Maras, L. , A. L. Hirschberg, B. Bystrom, *et al.* Testosterone addition to estrogen therapy - effects on inflammatory markers for cardiovascular disease [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2009. 25: 823 – 827.
- [9] Marjoribanks, J. , C. Farquhar, H. Roberts, *et al.* Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012. 7: CD004143.
- [10] Li, S. , X. Li, J. Li, *et al.* Experimental arterial thrombosis regulated by androgen and its receptor via modulation of platelet activation [J]. *Thromb Res*, 2007. 121: 127 – 134.

[修回日期] 2015-07-14



天然山泉水对老龄小鼠 SOD 和 MDA 含量的影响

康爱君, 李雨薇, 王学文, 胡建国, 刘君芳, 郑振辉

(北京大学医学部实验动物科学部, 北京 100191)

【摘要】 目的 探讨天然山泉水对老龄小鼠脂质过氧化水平的影响。**方法** 8 月龄 SPF 级雄性 ICR 小鼠适应性饲养 5 d 后, 禁食 16 h, 取血, 测血清丙二醛(MDA)含量。根据 MDA 含量, 将 ICR 小鼠随机分为两组: 天然山泉水组和自来水对照组。天然山泉水组自由饮用天然山泉水, 自来水对照组自由饮用自来水, 连续饮用两个月, 饮用 1 个月和两个月时禁食 16 h, 取血, 测血清丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活力。**结果** 给予天然山泉水两个月后, 与自来水对照组相比, 天然山泉水组丙二醛(MDA)含量显著降低($P < 0.05$), 超氧化物歧化酶(SOD)活力无显著性差异。**结论** 饮用天然山泉水对缓解老龄小鼠脂质过氧化水平有一定的作用。

【关键词】 天然山泉水; 老龄小鼠; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0034-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 010. 008

Effect of natural mountain spring on SOD and MDA content in mice aging

KANG Ai-jun, LI YU-wei, WANG Xue-wen, HU Jian-guo, LIU Jun-fang, ZHENG Zhen-hui

(Department of Laboratory Animal Science, Health Science Center, P. K. U. Beijing 100191, China)

【Abstract】 Objective To observe the effect of Natural mountain spring on oxidative damage of aging mice. **Methods** Thirty male aging mice were randomly divided into experimental group (drink Natural mountain spring) and control group (drink tap water) according to the level of MDA. The serum in the two groups was taken for T-SOD activity and MDA content analysis after two months. **Results** The MDA content in experimental group decreased markedly than that in control group. **Conclusion** Natural mountain spring could alleviate oxidative damage by free radicals to extent.

【Key words】 Natural mountain spring; Aging mice; Superoxide dismutase; Malondialdehyde

机体抗氧化酶的活性会随着年龄的增长而不断下降, 导致体内氧自由基不能及时被清除, 生成过氧化脂质等过氧化物, 从而引起细胞的衰老和死亡, 加速机体的衰老^[1]。作为体内重要的氧自由基清除剂, SOD 是体内清除自由基的重要抗氧化酶^[2-3], 可以保护细胞免受损伤。检测 SOD 含量的高低可以间接反映机体清除自由基的能力。MDA

是过氧化脂质的降解产物, 其含量与细胞损伤的程度呈正相关, 检测 MDA 含量的变化可间接反应氧自由基含量的变化^[2-3]。

本文选用老龄小鼠作为实验对象, 通过观察其饮用天然山泉水后, 血清中 MDA 和 SOD 含量的变化, 探讨该天然山泉水是否具有降低脂质过氧化作用, 是否具有升高抗氧化酶活力作用, 以及是否具

有抗氧化作用,进而探讨其保健作用。

1 材料和方法

1.1 受试物

天然山泉水,由某生物科技有限公司提供,2014 年 12 月 6 日生产,350mL 塑料瓶装。

1.2 实验动物及分组

实验动物为 ICR 小鼠,SPF 级,共 30 只,雄性,8 月龄,44 ~ 47 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2012 - 0001】。小鼠适应性饲养 5 d 后,禁食 16 h,取血,测定血清中丙二醛(MDA)含量。根据 MDA 含量,将 ICR 小鼠随机分为两组:天然山泉水组自由饮用天然山泉水;自来水对照组自由饮用自来水,连续饮用两个月。ICR 小鼠饲养于屏障环境【SYXK(京)2011-0039】,温度为 24℃ ± 2℃,相对湿度为 55% ± 15%。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.3 血清总超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)的测定

饮用天然山泉水一个月和两个月,小鼠禁食 16 h,取血,应用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒分别测血清丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化

酶(SOD)活力。试剂盒生产批号为 20141219。

1.4 统计方法

采用 SPSS13.0 统计分析软件进行处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据间的比较采用 t 检验分析方法, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠体重

天然山泉水组小鼠体重与自来水对照组相比无显著性差异(表 1)。

2.2 小鼠每日饮水量

天然山泉水组小鼠饮水量与自来水对照组相比无显著性差异(表 2)。

2.3 小鼠血清中 MDA 和 SOD 结果

给予天然山泉水前,与自来水对照组相比,天然山泉水组 MDA 含量无显著差异;实验进行一个月时,与自来水对照组相比,天然山泉水组 MDA 含量、SOD 活力均无显著性差异;实验进行两个月时,与自来水对照组相比,天然山泉水组 MDA 含量显著降低($P < 0.05$),SOD 活力无显著性差异(表 3 和表 4)。

表 1 各组小鼠体重的比较(g)

Tab.1 The comparison of body weight of different groups of mice

组别 Groups	0 天 0 day	1 个月 1 month	2 个月 2 months
天然山泉水组 Mountain spring group	45.1 ± 1.5	49.9 ± 1.5	51.8 ± 1.8
自来水对照组 Control group	44.9 ± 1.3	49.2 ± 1.6	51.9 ± 2.0

表 2 各组小鼠饮水量的比较(mL)

Tab.2 The comparison of water-drinking capacities of different groups of mice.

组别 Groups	1 天 1 day	1 个月 1 month	2 个月 2 months
天然山泉水组 Mountain spring group	6.6 ± 0.9	6.8 ± 1.3	6.3 ± 1.4
自来水对照组 Control group	6.8 ± 0.6	6.5 ± 0.8	6.5 ± 0.6

表 3 各组小鼠丙二醛(MDA)含量比较(nmol/mL)

Tab.3 The comparison of Malondialdehyde (MDA) content of different groups of mice

组别 Groups	0 天 0 day	1 个月 1 month	2 个月 2 months
天然山泉水组 Mountain spring group	10.42 ± 2.05	13.31 ± 2.40	13.09 ± 1.45 *
自来水对照组 Control group	10.30 ± 1.82	13.39 ± 2.38	14.32 ± 1.76

注:与自来水对照组相比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compare with control group, * $P < 0.05$.

表 4 各组小鼠超氧化物歧化酶(SOD)活性比较(U/mL)
Tab.4 The comparison of superoxide dismutase(SOD) activities of different groups of mice

组别 Groups	1 个月 1 month	2 个月 2 months
天然山泉水组 Mountain spring group	303.00 ± 27.09	322.3 ± 18.8
自来水对照组 Control group	295.22 ± 14.86	313.2 ± 14.2

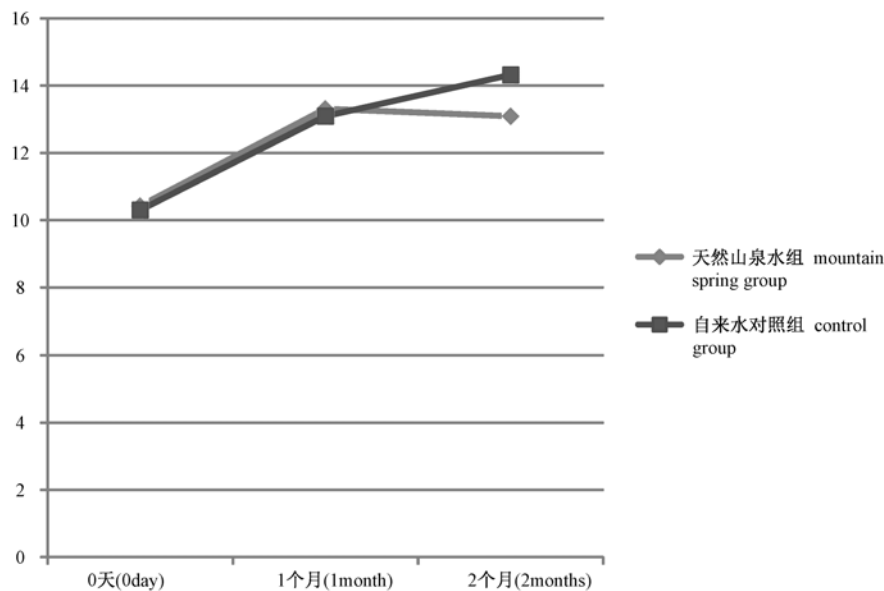


图 1 各组小鼠 MDA 含量(nmol/mL)
Fig.1 MDA content of different groups of mice (nmol/mL)

3 讨论

水为生命之源,健康之本。随着社会的进步,健康水日益受到人们的关注,世界卫生组织(WHO)也提出了“健康水”的概念。指出健康水的指标^[4-6]除了符合清澈、无杂质、无色无味、无毒等基本要求外,还强调了以下几方面:(1)水的硬度要适中(2)人体所需的矿物质含量要适中,(3)要呈弱碱性,pH 值为 7.0~8.0(4)水中溶解氧要适中,不低于 7 mg/L;(5)水的媒体营养生理功能(溶解力、渗透力、代谢力、乳化力等)要强(6)水分子团¹⁷O-核磁共振谱(NMR)半幅宽度应在 90Hz 下。

我们探讨的天然山泉水源自涌泉,采用仿生大自然水循环原理,利用声、光、磁、波技术、完成过滤、加热、冷却以及人体必需的矿物元素的筛取提留等多重技术处理,重组水分子结构排序,去除了水中正电荷,提取大量氢氧根负电离子,使水分子团¹⁷O-NMR 半幅度达到 50~60 Hz 左右的细微化,同时水呈弱碱性,pH 值为 7.2~7.8,水中溶解氧达到 9mg/L。

本研究中,我们以老龄小鼠作为研究对象,初步探讨了天然山泉水对其脂质过氧化水平的影响。脂质过氧化反应是自由基攻击细胞膜上的多不饱和脂肪酸而引发的一系列链式反应,其终产物是 MDA。研究结果显示,饮用天然山泉水 30 d 后,老龄小鼠血液中 MDA 含量未见显著降低,饮用天然山泉水 60 d 后,可以使老龄小鼠血液中 MDA 含量显著降低,提示随着饮水时间的延长,天然山泉水具有降低组织细胞脂质过氧化的作用。本实验中血清中 T-SOD 水平未有显著提高,是否通过其他抗氧化途径参与自由基的清除过程有待进一步探讨。

从上世纪九十年代开始,科研人员用¹⁷O-核磁共振谱(NMR)半幅宽度对水的分子团的大小进行定性的测定,特别是日本、台湾和美国等国家对各种水进行半幅宽的测定发现,国际上认定的长寿村水、天然的优质水的半幅宽都小于 100 Hz,而蒸馏水、雨水和自来水的半幅宽一般都在 100 Hz 以上^[6-7]。越来越多的研究表明^[7],利用¹⁷O-核磁共振谱(NMR)半幅宽可以定性地反映液态水团簇的大小。一般说,谱线越宽,团簇越大;谱线越窄,团

簇越小。团簇小的水对物质,包括中药和营养物质的溶解性高。本实验中饮用天然山泉水可降低老龄小鼠的 MDA 水平,可能与该天然山泉水 ^{17}O -核磁共振谱(NMR)半幅宽度有关。该天然山泉水水分子团 ^{17}O -NMR 半幅度仅为 50 ~ 60 Hz,更利于细胞吸收。

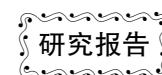
本文首次应用老龄小鼠探讨其饮用天然山泉水对过氧化水平的影响,为健康水的保健作用提供客观资料。

参考文献:

[1] 敖拉哈. 衰老的自由基学说与抗氧化食物[J]. 家庭医学, 2008,3(12):48.

- [2] 黄进,杨国宇,李宏基,等. 动物体内氧自由基的产生及危害[J]. 中国牛业科学,2004,30(5):44.
- [3] 杨东升. 超氧化物歧化酶的研究与应用[J]. 化学与生物工程,2004,3(7):91.
- [4] 尹军,张小雨,刘志生,等. 健康水的研究进展[J],供水技术,2008,2(2)1-5.
- [5] 李福志,张晓健,王占生,等. 健康饮水的水质指标体系探讨[J]. 环境与健康杂志,2002,19(5):407-408.
- [6] 张欣. 欧美及日本对饮用水评价的研究[J]. 西北建筑工程学院学报,1999,(3):54-57
- [7] 李福志,张晓健,吕木坚,等. 用 ^{17}O 核磁共振研究液态水的团簇结构[J]. 环境科学学报,2004,24(1):6-9.

[修回日期]2015-08-26



对胃粘膜损伤有辅助保护功能的评价试验中的 病理学方法的探讨与建议

金 毅, 甘玉玺², 刘远平¹, 陈润桦¹, 谢天柱¹, 黄泽愉¹

(1. 深圳市药品检验所深圳药品质量标准研究重点实验室, 广东 深圳 518057;
2. 中兴通讯股份有限公司, 广东 深圳 518055)

【摘要】 目的 建立科学的大体病理学检查和组织病理学诊断的评分原则、更合理的评分标准以及合理的统计学方法, 为保健食品对胃粘膜损伤有辅助保护作用提供更为科学、可行的评价方法。**方法** 通过对大鼠胃黏膜急性损伤酒精模型的全面分析, 针对现行方法中评价方法的缺点, 根据病变特点及病理学检查的原则和半定量分析方法, 以及相应的统计学方法等信息化处理, 进行方法学探讨。**结果** 大体病理学检查按照病变所占面积以及在整个胃粘膜所占的比例; 组织病理学诊断根据病变累及粘膜层的深度作为判定粘膜受损严重程度的主要依据, 其他各种病变作为参考因素。分别分为未见异常(0分)、轻度病变(1分)、中度病变(2分)和重度病变(3分)。统计学方法采用 Ridit 统计学方法分析病理学半定量的结果。**结论** 从大体病理学、组织病理学的评价方法以及数据处理方法和结果判定等方面, 提出了对胃粘膜损伤有辅助保护功能的动物实验相对更为科学、可行的评价方法的建议。

【关键词】 病理学; 评价方法; 急性胃黏膜损伤酒精模型; 信息化

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0038-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 010. 009

Pathologic study and suggestion on evaluation methods of auxiliary protective function on gastric mucosa injury

JIN Yi¹, GAN Yu-xi², LIU Yuan-ping¹, CHEN Run-hua¹, XIE Tian-zhu¹, HUANG Ze-yu¹

(1. Shenzhen Key Laboratory of Drug Quality Standard Research, Shenzhen Institute for Drug Control, Guangdong Shenzhen 518057, China; 2. ZTE Corporation, Guangdong Shenzhen 518057, China)

【Abstract】 Objective To establish a scientific and practical principle, grading standard and reasonable statistical method for evaluating the protective effect of health food to gastric mucosal injury, based on general pathology and histopathological diagnosis. **Methods** A methodological study was conducted on rat model of acute gastric mucosa injury induced by alcoholic through comprehensive analysis and comparing shortcomings of the current standard evaluation method, and methods of semi-quantitative analysis and corresponding information statistic processing were based on characteristics of the lesion and principles of pathology. **Results** Gross pathological evaluation of gastric mucosa lesion was based on the area occupied and proportion in the whole gastric mucosa. Histopathological diagnosis was based on the mucous layer depth of lesion as main determination point and other lesions as reference factors. Grades of lesion were

[作者简介] 金毅(1971-), 女, 副主任药师, 医学博士, 主要研究领域: 病理, 临床前安全性评价, 医疗信息化等。

divided into no abnormality (0), mild lesions (1 point), moderate lesions (2 points), and severe lesions (3 points). Riddit statistical method was used for pathological analysis of semi-quantitative results. **Conclusion** A scientific and feasible evaluation method for the protective effect of health food to gastric mucosal injury was provided from the aspects of gross pathology, histopathological evaluation method, data processing method and result determination.

【Key words】 Pathology; Evaluation methods; Animal model of acute gastric mucosa injury induced by alcohol; Information

《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)^[1](以下简称为 2003 版规范)为我国保健食品检验和监督的主要依据。2012 年 4 月,国家食品药品监督管理局(CFDA)组织对其中的 9 个保健食品功能评价方法进行了修订^[2](以下简称新方法),并于 2014 年 5 月 1 日正式颁布实施。其中,对胃粘膜损伤有辅助保护功能评价的新方法与 2003 版规范相比,动物实验的方法有改进、表述更细致,有利于获得更准确的实验结果。另外,新方法对动物实验的结果判定,在原有的胃黏膜损伤大体观察的基础上,增加了组织病理学检查,并且要求大体病理学检查和组织病理学检查结果均为阳性,即“动物实验:实验组与模型对照组比较,大体观察评分与病理组织学检查评分结果均标明胃粘膜损伤明显改善,可判定该受试样品动物实验结果为阳性。”因此,如何在大体病理学以及组织病理学上运用科学的方法评价动物实验结果至关重要。

为了分析新方法在评价原则、评分标准和相应的数据处理方法的科学性和可行性,本文着眼于急性胃粘膜损伤酒精模型的动物实验,探讨评价方法,提出更趋合理、可行的建议。

1 新方法中动物实验方法的改进有利于进行准确的病理学评价

1.1 相对于 2003 版规范要求的“禁食不禁水 24 h”,新方法强调“严格”禁食。这一点非常重要,如果未做到严格禁食,动物在没有饲料供应的情况下,会吃其周围能获得的任何物品,如自身的粪便、脱落的体毛等,直接干扰无水乙醇对胃粘膜损伤的程度。

1.2 相对于 2003 版规范要求的给受试物第 30 天灌胃受试物 1 h 后造模的方法,新方法修改为各剂量组灌胃 30 d 后,严格禁食 24 d,第 31 天造模。这样的改变,更着重于评价受试物连续 30 d 灌胃的功效,消除造模前 1 小时的灌胃受试物减轻胃损伤程

度的可能性。

1.3 相对于 2003 版规范“取胃于 10% 甲醛溶液中固定 20 min”的粗略说法,新方法细化为“暴露完整胃,结扎幽门,灌注适量 10% 甲醛溶液,固定 20 min”。这一做法使胃腔充盈,粘膜面平整舒展,有利于观察,见彩插 4 图 1A;如果不做幽门结扎灌注适量固定液或灌注失败,

皱缩,不利于大体病理观察、测量以及组织病理学评价,见彩插 4 图 1B。

2 急性胃粘膜损伤酒精模型的大体病理学评价方法分析

2.1 评分原则

2.1.1 新方法评分原则分析

新方法中“因宽度所代表损伤的严重性远较长度大,故双倍积分。”的原则,实际上肉眼所见的病变宽度不能代表组织病理学损伤严重程度。如彩插 4 图 2 A 和 B 所示,肉眼观察胃粘膜宽度为 1.1 mm,其组织病理学可观察到的损伤约为粘膜全层的 1/3,属于轻度胃粘膜损伤;彩插 4 图 2 C 和 D 所示,肉眼观察胃粘膜宽度为 0.6 mm,远小于彩插 4 图 2 A 和 B 中的病变,而其组织病理学损伤约为粘膜全层的 2/3,属于中度胃粘膜损伤;彩插 4 图 2 E 和 F 所示,肉眼观察胃粘膜宽度同彩插 4 图 2 C 和 D 为 0.6 mm,其组织病理学可观察到的损伤约为粘膜全层,属于重度胃粘膜损伤。大体病理学检查只能通过肉眼观察到病变的表象,如病变累及的面积、性状、色泽等,而无法代表使用光学显微镜观察才能确定的组织深层的病变及其程度。

2.1.2 建议

遵循病理学观察的基本原则,如实记录肉眼可观察到的损伤性状、面积以及损伤占胃粘膜比例的大小等,做出大体病理学检查的评价。

2.2 评分标准

2.2.1 新方法的评分标准分析(见表 1)

表 1 急性胃粘膜损伤酒精模型的肉眼观察评分标准

Tab.1 Scoring criteria of gross pathologic findings in acute gastric mucosa injury induced by alcohol

损伤程度 Severity of injury	1 分	2 分	3 分	4 分
出血点 Bleeding spot	1 个	-	-	-
出血带长度 Length of bleeding cord	1 - 5mm	6 - 10mm	10 - 15mm	> 15mm
出血带宽度 Width of bleeding cord	1 - 2mm	> 2mm		

总积分 = 出血点分值 + 长度分值 + (宽度分值 x2)
Total score = score of bleeding spots + score of length (score of the width x2)

如彩插 5 图 3 中的两例,图 A 病例的病变累及面积和范围明显多于图 B 病例,从病理学对病变进行半定量的角度分级,前者病变为中度,后者为高度,很客观地反应了肉眼观察的结果。同样是这两例,按照新方法的评分标准计算,由于图 A 的胃粘膜上可以查到 29 个出血点,和许多大小不等的出血、充血节段,总积分为 65 分;而图 B 的总积分为 39 分,明显低于前者。

按照新方法的评分标准,总长 20 mm 的病变,随着存在形式的不同而使积分从 5 分至 20 分不等,出现很大差距。例如图 4 中所示,图 A 有 20 个≤1 mm 的点状病变,为 20 分;图 B 为一条长度 20 mm、宽度≤2 mm 的病变,则仅为 5 分;图 C 是两条长度 10 mm、宽度≤2 mm 的病变,为 6 分;图 D 是两条长度分别为 9 mm 和 11 mm,宽度均≤2 mm 的病变,为 7 分;图 E 是 5 条长度 4 mm、宽度≤2 mm 的病变,则为 10 分。从病理学的角度,对于相同的病变,其所占面积以及在总体中所占比重是判断病变程度的依据,以上假设的几种情况基本属于同一程度的改变,不会出现如此巨大的差距。

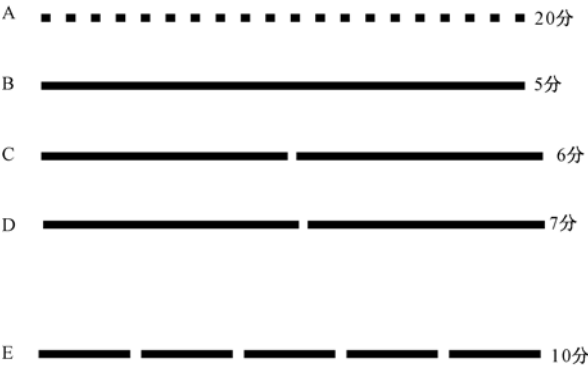


图 4 新方法评分示意图

Fig.4 Diagram of scores in new version of the 9 functions of health food

上述可见,按照新方法的记分方法,无论从实

际还是理论上都可能引起较大偏差,根据病变形态的不同而引起不均等的积分。

从大体病理学和临床角度出发,胃粘膜的总面积是一定的,粘膜发生病变是在这个面积之内的一个有限的改变。由于整个试验的核心是评价受试物对胃黏膜损伤的辅助保护功能,因此,着眼点和评价的关键是胃黏膜损伤的程度,即病变在胃粘膜整体中的比例(例如,胃粘膜无异常所见,或为轻、中、重度等),而不是新方法的计分方法导致的可以无限增加、没有上限的分值。

2.2.2 建议

根据大体病理学检查的半定量分析方法,建议按照病变所占面积以及在整个胃粘膜所占的比重,分为未见异常(0分)、轻度病变(1分)、中度病变(2分)和重度病变(3分)。

3 急性胃粘膜损伤酒精模型的组织病理学评价方法分析

3.1 评分方法

在胃粘膜损伤最严重的部位取材,观察胃粘膜全层。以充血、出血、黏膜细胞变性坏死在整个粘膜上皮层的累及程度分为 5 级。充血权重为 1,出血权重为 2,上皮细胞变性坏死权重为 3。

首先,在实际镜检工作中,对病变五等分的方法很难实行。如彩插 5 图 5 所示,由于粘膜组织本身不是均一、等高的厚度,加之发生病变的组织充血、水肿以及细胞变性、坏死等引起病变部位的粘膜层厚度发生改变。因此,对病变累及的粘膜层按照三等分进行诊断合理可行。

其次,新方法中对充血、出血以及上皮细胞变性坏死权重的划分也值得探讨。由于胃粘膜受损的组织病理学改变为多样性,如彩插 5 图 6 中所示,有些以充血为主(A、B、C),有些以出血为主(D),有些以细胞变性、坏死、脱落为主(E、F),多种病变混

合存在,很难说某一种病变的权重就一定大于其他病变,尤其是充血,往往是机体组织在遇到应激条件时的反应性表现,并不应该因为充血的存在,而给病变另外加分。

3.2 建议

组织病理学诊断应根据病变累及粘膜层的深度为判定粘膜受损严重程度的主要依据,各种病变形态等作为参考因素,分为未见异常(0分)、轻度病变(1分)、中度病变(2分)和重度病变(3分)。

4 急性胃粘膜损伤酒精模型的数据处理的统计学方法分析

4.1 2003 版规范和新方法的统计学方法及分析

对胃粘膜损伤进行了量化处理后采用了方差分析的统计学方法。但是,由于在大体检查和组织病理学检查中量化方法不合理,需要根据建议的病理学半定量的数字化结果,采用相应的统计学方法。

4.2 统计学方法建议

对病理学诊断的半定量结果进行组间统计学分析^[3-7],建议采用 Ridit 统计学方法分析病理学半定量的结果。因为胃粘膜未见异常(0分)、轻度损伤(1分)、中度损伤(2分)和重度损伤(3分),属于单向有序分类资料或等级资料,Ridit 分析对等级资料进行组间比较的假设检验方法,可以通过 SPSS 实现,根据是否有显著性差异,判定病理结果的统计学意义。

4.3 信息处理方法建议

目前,云计算、大数据和移动互联网等信息通信技术发展较快。为了与国际接轨,建议借鉴临床前药物安全性评价的国际性指导方针 GAMP5 (Good Automated Manufacturing Practice),向计算机化系统验证 CSV (computerized system validation) 发展^[8]。实行身份认证和依托大数据统计分析等信息化管理手段,真正实现实验过程和实验数据的在线监控

及实时记录^[9],做到有依可循、有据可查、有源可溯,从而使实验数据到评价结果能获得国际承认和相关机构互认。

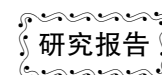
5 结语

通过分析探讨国家食品药品监督管理局 2012 年发布的新方法对胃粘膜损伤有辅助保护作用的功能评价方法,从大体病理学、组织病理学的评价方法以及数据信息化处理方法和结果判定等方面提出建议,通过准确评判动物实验结果,实现更为科学、可行的对胃粘膜损伤有辅助保护作用的功能评价。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范 (2003 年版) [S]. 133-135.
- [2] 国家食品药品监督管理局. 关于印发抗氧化功能评价方法等 9 个保健功能评价方法的通知 (国食药监保化[2012]107 号). <http://wenku.baidu.com/view/e8efd3176c175f0e7cd1376d.html>
- [3] 罗明奎,蔡昌启,雷玉洁,等. 等级资料 Ridit 分析及正确使用[J]. 中国卫生统计. 2003, 20(4): 252-254.
- [4] 李国春. SPSS 编程在 Ridit 分析中的应用[J]. 循证医学. 2004, 4(1): 51-53.
- [5] 刘嵘,白瑞华. Ridit 分析的 SPSS 实现[J]. 中国卫生统计. 2004, 21(4): 236, 238.
- [6] 武松,叶冬青. 多组单向有序资料的 Ridit 分析在 SPSS 中的实现[J]. 中国卫生统计. 2006, 23(6): 554.
- [7] 金毅,徐峰,鲁艺. 关于四氯化碳肝损伤的组织病理学诊断方法的探讨及建议[J]. 中国新药杂志. 2014, 23(19): 2224-2227.
- [8] 金志虎,甘玉玺,金毅,等. GAMP5 的 IP 承载网建设研究[J]. 广东科技. 2013, 22(6): 117-118, 80.
- [9] 甘玉玺,胡龙斌,龚超美,等. 柔性重构的高性能超宽带综合业务网关平台[J]. 计算机应用与软件. 2015, 32(7): 133-136.

[修回日期]2015-08-28



SD 大鼠标本血量不足对凝血四项检测结果的影响

翟青新¹, 黄爱军², 钱丽萍¹

(1. 南京大学医学院附属鼓楼医院动物实验中心, 南京 210008; 2. 南京大学医学院附属鼓楼医院医学检验科, 南京 210008)

【摘要】 目的 探讨大鼠的最佳抗凝比, 分析标本血量不足对凝血四项检测结果的影响。**方法** 60 只大鼠分成 2 组, 按真空采血法采集空腹 12 h 腹主动脉血液。第一组 20 只, 用于全血细胞测定。全自动血液细胞计数仪检测红细胞压积(hematocrit, HCT), 血小板计数(platelet, PLT)。第二组 40 只, 每只鼠采 2 管血, 按抗凝比[枸橼酸钠抗凝剂与全血的比例(V:V)]分成 1:9(对照组)及 1:5(实验组), 1:8(实验组)及 1:7(实验组), 离心获乏血小板血浆。全自动血凝分析仪检测凝血四项:凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶时间(thrombin time, TT)、纤维蛋白原(Fibrinogen, FIB)。**结果** SD 大鼠 HCT(%) 为 41.7 ± 2.9 , PLT($\times 10^9/L$) 为 1114 ± 173 。随着抗凝比的增大, PT、APTT、TT 延长, FIB 减小。与对照组相比, 1:8 实验组, 差异无统计学意义。1:7 实验组, 除 TT 差异有统计学意义外, 另 3 项指标差异无统计学意义。1:5 实验组, 差异有统计学意义。**结论** 凝血四项的结果受抗凝比的影响。1:9 是大鼠最佳抗凝比, 1:8 尚可。大鼠有其独特的生理特性。为大鼠的相关研究提供了基础的科学数据和基本的理论依据。

【关键词】 大鼠; 凝血四项; 红细胞压积; 血小板计数

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0042-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.010.010

Influence of insufficient blood specimens volume on the detection results of coagulation tests in SD rats

ZHAI Qing-xin¹, HUANG Ai-jun², QIAN Li-ping¹

(1. Center of Animal Experiments, Nanjing Drum Tower Hospital, The Affiliated Hospital of Nanjing University Medicine School, Nanjing 210008, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Nanjing Drum Tower Hospital, The Affiliated Hospital of Nanjing University Medicine School, Nanjing 210008, China)

【Abstract】 Objective To explore the best anticoagulant ratio in SD rats. To analyse the influence of insufficient blood specimens volume on coagulation tests. **Methods** 60 rats were divided into 2 groups. According to the method of vacuum blood, collect abdominal aortic blood after fasting 12 hours. The first group 20 rats were used only for routine blood test. Fully automatic hematology analyzer detected hematocrit and platelet. The second group 40 rats were used for coagulation test. Every rat was collected 2 blood specimens with different anticoagulant ratio [the proportion of sodium citrate anticoagulation and the whole blood(volume: volume)] 1:9(the control group) and 1:5(the experimental group), 1:8(the experimental group) and 1:7(the experimental group). Get plasma without platelet through centrifugation. Fully automatic blood coagulation analyzer detected prothrombin time, activated partial thromboplastin time, thrombin time and Fibrinogen. **Results** HCT(%) and PLT($\times 10^9/L$) in SD rats were respectively 41.7 ± 2.9 and 1114 ± 173 . As

anticoagulant ratio was increased, PT, APTT and TT were extended and FIB was decreased. Compared with the control group, these PT, APTT, TT, FIB four results of 1:8 group were not statistically different, of 1:5 group were statistically different, these PT, APTT, FIB three results of 1:7 group were not statistically different, TT of 1:7 group was statistically different. **Conclusions** The detection of coagulation project coagulation test results were affected by the proportion of anticoagulant and blood. 1:9 was the best anticoagulant ratio in SD rats, 1:8 can also. Rat had its unique physiological characteristics. The results could provide reference for the evaluation of rats.

【Key words】 Rat; Coagulation test; Hematocrit; Platelet

正常的止血机制有赖于血管壁内皮细胞、血小板、凝血系统、抗凝系统、纤维蛋白溶解系统、以及血液流变学等结构与功能的完整性以及它们之间的生理性调节与平衡^[1]。据国家卫生和计划生育委员会卫医发[2000]412号文件《出血时间、凝血时间检验方法操作规程的通知》，动物实验中凝血四项的检测逐步兴起。该检测主要用于动物外科手术前凝血功能的检查、肝病动物模型肝功能的判断以及中药对凝血功能的影响。血液离体即开始变化，凝血因子的消耗或激活会导致检测结果的异常，故对标本要求特殊、严格，只有合格标本的检测结果方有意义。特别强调：人血的抗凝比必须为1:9，抗凝比的改变直接影响检测结果的准确性和可靠性^[2-4]。

大鼠实验经常依靠处死前的唯一一次大量采血，实际科研工作中，经常由于采血困难，遇到抗凝比大于1:9的标本。故本文主要针对标本血量不足对凝血四项的影响进行研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级SD雄性大鼠，体重300~320 g，60只，来源于上海杰思捷实验动物有限公司【SCXK(沪)2013-0006】。饲养和实验在南京大学医学院附属鼓楼医院动物实验中心屏障环境内进行【SYXK(苏)2014-0052】。并按实验动物使用的3R原则给予人道的关怀。

1.2 主要器械和耗材

大鼠固定板(含橡皮筋)，解剖剪，血管钳等常规手术器械，砂轮，棉签、棉球、纱布、2 mL注射器少许。碧迪(BD)医疗器械有限公司产品：一次性使用真空采血针组件(规格:0.8×20 mm×180 mm)；一次性使用真空静脉血样采集容器(以下简称“紫头管”)，规格型号:K₂EDTA, 2 mL；一次性使用人体静脉血样采集容器(以下简称“浅蓝头管”)，规格型号:枸橼酸钠管, 2.7 mL。

1.3 主要仪器和试剂

电子天平(精确到1 g, 上海天平仪器厂), XS-800i全自动血液分析仪(日本Sysmex公司), 离心机(52A型医用低速离心机, 河北省安新县白洋离心机厂制造), CA-7000全自动血凝分析仪(日本Sysmex公司), 试剂、校准物和质控品及一次性反应杯等均为该仪器原装进口配套产品。

1.4 方法

60只大鼠随机分成2组：第一组20只，采血测HCT、PLT。第二组40只，采血测凝血四项。适应性饲养1周后，禁食12 h，自由饮水。称重，10%水合氯醛腹腔注射麻醉(0.3 mL/100 g体重)，仰卧固定，开腹，真空采血法用采血针组件和相应的采血管从腹主动脉采血。

第一组，紫头管采血后立即轻轻颠倒180°露底混匀8~10次，使血液与抗凝剂充分混匀，动作要及时、轻柔、到位。头盖向上在室温下放置。淘汰有血凝块的标本。测定HCT、PLT，2 h内检测完毕。第二组，梯度标记60个浅蓝头管：因管内有0.3 mL液态枸橼酸钠抗凝剂，从抗凝剂液面到刻度线为2.7 mL(抗凝比为1:9)，故在管外壁用Mark笔标出相应刻度，使抗凝比为1:5、1:7、1:8。每只大鼠取2个梯度抗凝比的血液，采集方法同上。3000 r/min^[5]离心15 min，目测各管血细胞比容(HCT)，淘汰重度溶血标本。分离血浆，务必去除血小板。测定合格标本的凝血四项，2 h内检测完毕。

1.5 统计学方法

应用SPSS22.0统计学软件进行分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用配对样本T检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 第一组，顺利采样并检测

HCT(%)、(PLT×10⁹/L)的检测结果分别为41.7±2.9和1114±173。

2.2 第二组，顺利采样并检测

凝血四项的检测结果见表1。

表 1 SD 大鼠不同抗凝比例血浆凝血四项测定值 (n = 20)
Tab. 1 Values of coagulation test of diffent anticoagulant ratio plasmas (n = 20)

组别 Groups	凝血酶原时间 PT(s)	活化部分凝血 活酶时间 APTT(s)	凝血酶时间 TT(s)	纤维蛋白原 FIB(g/L)
1:9 对照组	8.51 ± 0.54	14.26 ± 1.59	39.98 ± 9.11	2.88 ± 1.05
1:8 实验组	8.52 ± 0.58 ^φ	14.90 ± 2.20 ^φ	41.28 ± 8.39 ^{δφ}	2.66 ± 1.05 ^φ
1:7 实验组	8.57 ± 0.62 ^φ	15.01 ± 1.95 ^φ	49.22 ± 7.01 ^{*#φ}	2.63 ± 0.74 ^φ
1:5 实验组	11.14 ± 1.23 ^{*#δ}	20.28 ± 3.17 ^{*#φ}	58.01 ± 6.75 ^{*#δ}	1.71 ± 0.18 ^{*#δ}

注: * 与对照组相比, $P < 0.05$; # 与 1:8 实验组相比, $P < 0.05$; δ 与 1:7 实验组相比, $P < 0.05$; φ 与 1:5 实验组比较, $P < 0.05$ 。
Note: * Compared with the control group, $P < 0.05$; # Compared with the 1:8 group, $P < 0.05$; δ Compared with the 1:7 group, $P < 0.05$; φ Compared with the 1:5 group, $P < 0.05$.

2.3 SD 大鼠 HCT、PLT 及凝血四项测定值与人类比较^[6]

与人类相似的是:Hct 分别为 41.7% 和 38.0 ~ 50.8%。高于人类的是:PLT 分别为 $1114 \times 10^9/L$ 和 $100 \sim 300 \times 10^9/L$ 。TT 分别为 39s 和 13 ~ 21s。

3 讨论

动物实验常需要通过血液标本获得数据。《礼记》载“君子慎始,差若毫厘,谬以千里”,要想得到“真值”,必须对所有影响因素要有系统全面的认识,树立全过程质量控制理念,动物自身因素有来源、品种、品系、日龄、性别、微生物等级和饲养环境;人为因素有血液采集方法[应激和麻醉剂、采血部位、采血时间、血液体积、抗凝剂]、贮存方法、测定方法和所采用的仪器和试剂。检验分析前质量控制是广大动物实验科研人员最容易忽略的环节之一。

在用检测人类的仪器检测动物前,有必要先咨询仪器工程师^[7],了解仪器项目设定的线性范围并加以调整,确保标本数据完整。沟通好检测事宜,合理安排实验。采集血液后及时送检和检测。

仔细阅读所有耗材说明书,掌握真空采血原理、注意事项且熟练步骤^[8]。真空采血管不同品牌品质不一,对分析结果有一定干扰^[9-10]。浅蓝头管保质期只有 8 个月,不用过期管,防止管内霉变,防止真空泄漏。

因血液黏稠度或血脂高^[11],血液容易凝集,故大鼠应空腹,且通过麻醉使其平静。尽管全血细胞检测不需要空腹,但动物实验往往一次采血进行多个项目的检测,而大多数项目都需要空腹,故本实验取空腹血测 HCT 和 PLT^[12],更接近科研实际。

人血凝血四项检测抗凝比必须为 1:9 的原因如下:抗凝剂与血的比例是基于“HCT(%) 为 $(45 \pm 5)\%$,即血浆为 $(55 \pm 5)\%$ ”这一基础,实质是“抗凝剂与血浆的比例为 1:5(抗凝剂 0.3 mL,血浆 1.5

mL)”。HCT(%) 小于 20 或大于 50 时(低于或超出正常范围时),应按照下面公式调整抗凝剂用量:抗凝剂用量(mL) = $0.00185 \times \text{全血量(mL)} \times [100 - \text{HCT}(\%)]$ 。抗凝剂浓度推荐为 109 mmol/L,以保证抗凝剂在血浆中的绝对含量不变,血浆中各凝血因子的量越接近于动物生理值,凝血试验结果就越能反映各凝血因子质与量的真实水平^[4]。故本实验测了 HCT,以推断大鼠血的最佳抗凝比。

除抗凝比外,此检测分析前质控主要包括:防止凝块(特别是肉眼不可见的微小凝块)、原始标本(未离心)室温放置时间不超过 2 h、血浆标本 4℃ 冰箱放置时间不超过 4 h、无重度溶血。这些因素对结果的影响,各文献报道略有不同^[13-15],大致可以解释如下:凝块消耗凝血因子,使 PT、APTT、TT 延长、FIB 降低;CA-7000 凝血仪具有强大的抗干扰能力,血浆内 Hb $\leq 4.8 \text{ g/L}$ 时,溶血对 PT、APTT 没有影响,但对 TT 有影响^[16]。冷藏或低温保存(原始标本)会损伤血小板,活化部分凝血因子 VII、XI,使 PT、APTT 缩短,故原始标本需在室温下运送,但易变凝血因子 VIII 及 V 因子对热不稳定,若室温下放置超过 2 h,随着温度升高和放置时间延长凝血因子活性逐渐丧失,使 PT、APTT 延长,TT 缩短。故在做科研之前,有必要了解这些影响因素,统一操作,使数据统计更有意义。

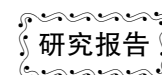
本实验考虑到采血的可操作性,采集研究的是大鼠动脉血。静脉血或许有不同,但不影响科研与临床实际。从分析前质控角度,研究了大鼠的 HCT、PLT 及凝血四项,把实验动物的基础数据研究提高了一个层次。为给对人类血液数据耳熟能详的临床医生及广大医务科技工作者提供生动参考,把大鼠数据与人类进行了简单的比较。初步得出:大鼠 PLT 比人高很多,值得进一步探讨。大鼠 HCT 在 $(45 \pm 5)\%$ 且接近下限,理论上抗凝比 1:9 也是最佳比例。TT 比人高很多,与已报道的文献^[17-18]结论一致。

综上所述,1:9是大鼠凝血四项最佳抗凝比。凝血四项的结果受抗凝比的影响。当标本抗凝比介于1:8与1:9之间时,可以用于凝血检测,谨给科研及兽医临床实际提供参考。

参考文献:

- [1] 丛玉隆. 实用检验医学(第1版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:78-81.
- [2] 李素珍,秦望森,陈凤英. 不同抗凝比血浆凝血试验结果在临床上的应用[J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(1):103-106.
- [3] 王秀明,李志武,孙冀兵,等. 不同抗凝比例对凝血四项检测结果的影响研究[J]. 河北医药,2012,34,(20):3161-3162.
- [4] 徐茵,邸平,夏全成,等. 标本血量不足对凝血酶原时间及活化部分凝血活酶时间检测结果的影响[J]. 检验医学与临床,2014,11(16):2201-2202.
- [5] 刘志锋,张耀辉,李雯丽. 标本离心时间对凝血四项检测结果的影响[J]. 检验医学与临床,2013,10(12):1547-1548.
- [6] 刘江伟,张永久,李泽信,等. 长白仔猪血常规及生化指标正常值探讨[J]. 中国比较医学杂志,2007,17(7):393-394,376.
- [7] 陈渊博,郑文婷,尹志军,等. CA7000全自动凝血仪性能验证[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(2):209-211.
- [8] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程(第3版)[M]. 南京:东南大学出版社,2006:121-122.
- [9] 钟德优,范月珍,黄丽芳,等. 真空采血管添加剂质量控制及其临床应用影响因素[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(7):881-883.
- [10] 沈伟,杨炼,罗德幸. 凝血真空采血管及标本放置温度时间对凝血检验的影响[J]. 中国实验诊断学,2013,17(8):1448-1450.
- [11] 王秋菊,肖辉建,吴双,等. 探讨重度脂血高速离心后对凝血四项的影响[J]. 血栓与止血学,2014,(20)6:336-338.
- [12] 陈君,马海燕,齐寰宇. 影响血常规检验结果的相关因素分析[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(19):3652-3653.
- [13] 宋月华. 分析前质量控制对凝血项目测定中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(11):1505-1507.
- [14] 陈国,梁荣伟. 对比试验分析凝血四项检测的影响因素[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(19):2369-2370.
- [15] 戴庆忠,覃瑜. 影响凝血四项检测的因素分析[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(17):2349-2350.
- [16] 北京协和医院. 北京协和医院医疗诊疗常规检验科诊疗常规(第2版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:289-297.
- [17] 王迎,闫峰,邓帅,等. SD大鼠、Wistar大鼠、ICR小鼠及长爪沙鼠的部分凝血因子凝集时间的测定[J]. 实验动物科学,2007,24(5):1-3,42.
- [18] 孙劲,徐元宏. SD大鼠常见血液学检测指标参考范围的建立[J]. 临床输血与检验,2008,10(3):253-255.

[修回日期]2015-08-18



以 RBP-4 为靶点的疫苗对 2 型糖尿病 小鼠血糖降低的研究

李彦涵¹, 余柄廷², 孙 静¹, 李建芳¹, 乌美妮¹, 王海璇¹, 胡云章¹, 胡凝珠¹

(1. 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所疫苗研究室 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室
云南省重大传染病疫苗工程技术研究中心, 昆明 650118; 2. 河北大学生命科学学院, 河北 保定 071000)

【摘要】 目的 探讨以人源 RBP-4 为靶标的疫苗免疫干预胰岛素抵抗的有效性和可行性, 为 2 型糖尿病治疗新方法的推进提供基础研究数据。**方法** 以 T7 噬菌体为载体表达人源 RBP-4 的疫苗经皮下免疫 2 型糖尿病小鼠, 同时设空载体组和空白对照组, 经 2 次免疫后在不同时间点检测体液免疫水平、空腹血糖值及体重, 并于 20 周处死动物进行病理学切片检测。**结果** RBP-4 疫苗有效诱导了抗 RBP-4 IgG 抗体的产生, 并于 12 周达到峰值, 同时, 免疫组的空腹血糖值从第 8 周开始逐步下降, 到第 12 周时较空载体组和空白组有显著差异, 并始终维持在 2 型糖尿病发病值 (7 mmol/L) 以下。实验期间, 2 型糖尿病小鼠未出现蜷缩、竖毛、搔鼻、抽搐等明显异常, 免疫组、空载体组小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏组织均未观察到明显病变, 表明 RBP-4 疫苗安全性良好。**结论** RBP-4 疫苗能显著降低 2 型糖尿病小鼠的血糖, 有可能成为治疗胰岛素抵抗的一个新突破点。

【关键词】 2 型糖尿病; RBP-4 疫苗; db/db 小鼠

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0046-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 010. 011

The research of RBP-4 vaccine reducing blood glucose of type 2 diabete mice

LI Yan-han¹, YU Bing-ting², SUN Jing¹, LI Jian-fang¹, WU Mei-ni¹, WANG Hai-xuan¹,
HU Yun-zhang¹, HU Ning-zhu¹

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical College and Peking Union Medical College,
Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Diseases, Yunnan
Research Center of Engineering Technique for Vaccines against Severe Infectious Diseases, Kunming 650118, China;
2. Life Science College of Hebei University, Hebei Baoding 071000, China)

【Abstract】 Objective To explore efficacy of the human RBP-4 vaccine interventions targeting insulin resistance, and provide new ways to treatment of type 2 diabetes. **Methods** T7 bacteriophage vector expressing human-derived vaccine RBP-4 subcutaneously immunized mice with type 2 diabetes, at the same time set up empty vector group and control group. After the second immunization, detecting humoral immunity levels, fasting plasma glucose value and weight at different time points, and the animals were sacrificed for pathological slice assay at 20 weeks. **Results** The anti-RBP-4

【基金项目】 2013 年云南省高技术产业发展项目计划; 基因工程药物关键技术研究及新产品开发应用; 云南省社会发展新药专项 (2013BC011); 北京协和医学院协和青年基金 (33320140080)。

【作者简介】 李彦涵 (1982 -), 女, 助理研究员, 研究方向: 疫苗研发。E-mail: 110393273@qq.com。

【通讯作者】 胡凝珠 (1961 -), 女, 主任技师, 研究方向: 疫苗研发。E-mail: 845653517@qq.com。

IgG antibodies induced by RBP-4 vaccine was peaked at 12 weeks, the fasting blood glucose level of immunity group gradual decline from the 8th week to 12 weeks and compared with empty vector group and the control group were significantly different, and always maintain the value (7 mmol/L) or less. During the experiment, mice with type 2 diabetes did not appear straight, vertical hair, scratching nose, convulsions and other obvious abnormalities. The mouse heart, liver, spleen, lung and kidney lesions of Immunization group and vector group have no obviously pathological changes, indicating RBP-4 vaccine safety is good. **Conclusion** RBP-4 vaccine can significantly reduce fasting blood glucose level in type 2 diabetic mice, it may become a new method in the treatment of insulin resistance.

【Key words】 Type 2 diabetes; RBP-4 vaccine; db/db mouse

目前,我国糖尿病发病人数达 9840 万,预计到 2035 年糖尿病的发病比例将达到 13%^[1],随着病程进展 2 型糖尿病患者将出现许多严重并发症,严重影响生活质量甚至死亡。在目前药物治疗尚不能治愈 2 型糖尿病^[2],并且长期服药将带来巨大经济负担的情况下,另辟途径寻找新的预防和治疗方法具有重要意义。

由脂肪组织分泌的脂肪细胞因子视黄醇结合蛋白-4 (retinol binding protein, RBP-4) 是肥胖症和胰岛素抵抗之间的关联因子^[3]。在对胰岛素不敏感性增加的小鼠及患有肥胖症、2 型糖尿病的患者体内,其血清中 RBP4 的含量明显增加^[4]。血清中 RBP-4 含量的增加,会刺激肝脏表达葡糖异生酶—烯醇丙酮酸磷酸羧激酶,并削弱肌肉组织中的胰岛素信号传导途径^[5]。通过转基因技术过表达人源 RBP-4 或将重组 RBP-4 注射到正常小鼠体内,可以引起机体对胰岛素的抵抗;相反,将 RBP-4 基因敲除后机体对胰岛素的敏感性增加。因此, RBP-4 是一种源于脂肪细胞的“信号”,降低 RBP-4 的水平可能成为治疗 2 型糖尿病的一个新的途径^[6-8]。

本实验将展示有人源全长 RBP-4 序列的以 T7 噬菌体为载体的疫苗与铝佐剂混合后免疫 2 型糖尿病 db/db 小鼠模型,观察糖尿病小鼠免疫后体液免疫效果以及体重、血糖等指标以及病理切片的变化,为以 RBP-4 为靶标的疫苗治疗 2 型糖尿病的研究提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 抗原

将人源全长 RBP-4 序列与经酶切处理的 T7 噬菌体基因组连接并展示于 T7 噬菌体表面作为免疫用的疫苗。该疫苗由中国医学科学院医学生物学研究所疫苗研究室提供,噬菌体效价(1.5×10^{10} pfu/mL)。

1.2 实验试剂

稳豪血糖仪和血糖试纸购自强生(中国)医疗器材有限公司;Al(OH)₃ 佐剂(29.9 mg/mL)由中国医学科学院医学生物学研究所提供;ELISA 试剂盒(Anti Mouse ABT System)购自美国 KPL 公司。

1.3 实验动物

B6. BKS(D)-Lepr^{db}/JNju II 型糖尿病小鼠(db/db 小鼠)模型购自南京大学模式动物研究所【SCXK(苏)2015-0001】,6~8 周龄,体重 30~35 g。实验动物使用许可证号【SYXK(滇)2013-0001】。

1.4 动物分组及免疫

将 30 只 II 型糖尿病小鼠(禁食后空腹血糖均 ≥ 10 mmol/L)随机分为 3 组:免疫组(RBP-4 疫苗 1.5×10^8 pfu + Al(OH)₃ 0.6 mg/只)、空载体组(T7 空载体 1.5×10^8 pfu + Al(OH)₃ 0.6 mg/只)、空白对照组(生理盐水),每组各 10 只,免疫剂量为 100 μ L,检测体液免疫效果及体重、血糖指标变化。

1.5 血清中抗-RBP-4 抗原特异性 IgG 抗体水平的检测

于免疫后的 4、8、12、16、20 周采集尾静脉血,分离血清,用 RBP-4 作为抗原包被板子,用间接 ELISA 法检测抗 RBP-4 抗体。取 RBP-4 抗原,加入 96 孔板中,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C 包被过夜;以 BSA 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h;洗板 4 次,加入倍比稀释的小鼠血清(起始稀释倍数为 1:40),100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;洗板 4 次,加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1:400 稀释),100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;洗板 3 次,加入 TMB 显色液,100 μ L/孔,显色 5 min;加入 2 mol/L H₂SO₄, 100 μ L/孔,终止反应。于酶标仪 405 和 655 nm 波长处,检测各孔 A 值,以阳性反应的最大稀释度作为样品的抗体效价,根据 ELISA 结果计算各组的平均滴度。

1.6 体重及空腹血糖检测

实验期间,于免疫前及免疫后的 4、8、12、16、20 周检测实验动物血糖及体重指标的变化。过夜禁食、禁水、撤垫料,禁食 12 h 后,测体重及空腹血糖。

1.7 安全性实验

实验期间,观察并记录小鼠的饮食、体重、毛色、注射部位有无异常。免疫 20 周后,取 RBP-4 免疫组、空载体组及空白对照组小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏组织,制备病理切片,HE 染色,显微镜下观察。

1.8 统计学分析

应用 SPSS 软件进行统计学分析,组间比较采用

t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清中抗 RBP-4 疫苗 IgG 抗体水平

间接 ELISA 检测结果显示,RBP-4 疫苗免疫 db/db 小鼠后,诱导了抗 RBP-4 抗体的产生,并且抗体水平在第二次免疫后的第 12 周时升至最高,并于之后开始逐渐下降。

表 1 2 型糖尿病小鼠抗 RBP-4 疫苗 IgG 水平
Tab.1 The anti-RBP-4 IgG levels of type 2 diabete mice

	免疫前 (Before immunization)	4 周(4w)	8 周(8w)	12 周(12w)	16 周(16w)	20 周(20w)
免疫组 (Immunity group)	1:1.5 ± 1	1:425 ± 45	1:1279 ± 355	1:4966 ± 867	1:3867 ± 688	1:3053 ± 759
空载体组 (Empty vector group)	1:2.3 ± 1	1:3.1 ± 2	1:2.8 ± 1	1:1.9 ± 1.5	1:2.6 ± 1	1:1.9 ± 1.5
空白对照组 (Control)	1:1.8 ± 1	1:2.2 ± 1	1:1.8 ± 1	1:1.6 ± 1	1:2.7 ± 1.3	1:2.3 ± 1

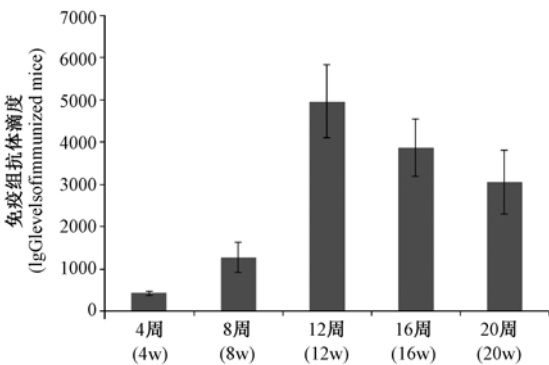


图 1 免疫后不同时间点免疫组小鼠抗 RBP-4 疫苗 IgG 水平

Fig.1 The anti-RBP-4 IgG levels of immunized mice at different time points

2.2 各组小鼠空腹血糖水平

各组小鼠于免疫前及二次免疫后的 4、8、12、16、20 周测空腹血糖。检测结果显示,空载体组和空白对照组在整个实验期间血糖值均大于 7.0 mmol/L,免疫组在免疫后的第 8 周血糖值下降,从第 12 周开始血糖值较空载体组和空白对照组差异显著($P < 0.01$),具有统计学意义。实验结果表明 RBP-4 疫苗免疫 2 型糖尿病小鼠后,对小鼠产生了保护作用,避免血糖水平升高,并且从 12 周以后小鼠血糖值均处于发病值(7.0 mmol/L) 以下,说明 RBP-4 疫苗具有良好的降血糖的作用。

2.3 各组小鼠体重水平

各组小鼠于免疫前及二次免疫后的 4、8、12、16、20 周测体重。检测结果显示,在整个实验期间,

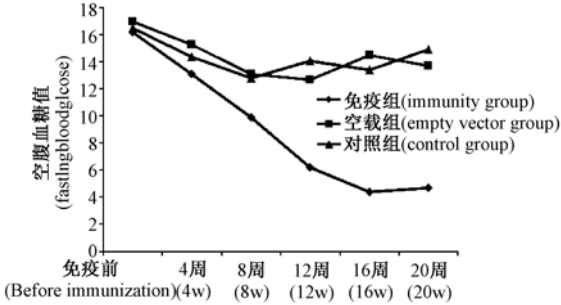


图 2 免疫前及免疫后不同时间点各组小鼠空腹血糖值(单位:mmol/L)

Fig.2 The fasting blood glucose of type 2 diabete mice at different time points (unit: mmol / L)

免疫组较空载体组及空白组体重不具有显著差异($P > 0.05$),说明 RBP-4 疫苗对体重无影响。

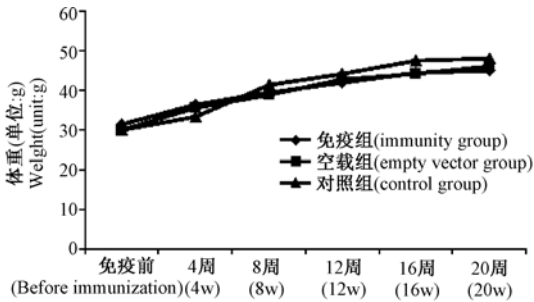


图 3 免疫前及免疫后不同时间点各组小鼠体重水平(单位:g)

Fig.3 The weight of type 2 diabete mice at different time points (unit: g)

2.4 安全性检测

实验期间各组小鼠体重、毛色均正常,未出现

蜷缩、竖毛、搔鼻、抽搐、痉挛、水肿及休克等异常反应,各组小鼠注射部位均未出现红肿、结节。显微镜下观察显示,免疫组、空载体组及空白对照组小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏组织均未观察到病变,表明 RBP-4 安全性良好,病理切片图片见彩插 6 图 4。

3 讨论

慢性非传染性疾病是全球一个严重的公共卫生问题,已成为影响人民健康的主要危害。

糖尿病已成为继肿瘤和心脑血管病之后的第三大非传染病,是导致病残和死亡的第三大原因。根据最新文献报道,2013 年全球已确诊的糖尿病患者约 3.82 亿,预计到 2035 年将增长至 5.92 亿,其中在发展中国家糖尿病患者的数目将显著增加^[1]。

2 型糖尿病是指由于胰岛素抵抗伴胰岛素分泌不足所致的持续性慢性高血糖,占糖尿病总数的 90% 以上。2 型糖尿病为终身疾病,可出现多种并发症,给患者、家庭以及社会带来沉重的负担。治疗 2 型糖尿病的主要药物有磺酰脲类、双胍类降血糖药、 α 葡萄糖苷酶抑制剂和胰岛素增敏剂^[9-10]。但是采用 2 型糖尿病药物治疗具有以下不可避免的缺点:1. 只能从一定程度上控制血糖;2. 药物价格昂贵,导致治疗成本高;3. 长期服用药物有一定的副作用;4. 需要长期服药,给患者带来极大的不便。

RBP-4 是一种转运蛋白,其主要功能是在血液循环中转运视黄醇。正常情况下,血清 RBP4 主要来源于肝细胞,其次为脂肪组织。新近发现,由脂肪组织分泌的 RBP4 是肥胖症和胰岛素抵抗之间的关联因子。在正常个体中,胰岛素与分布于细胞膜上的相应胰岛素受体结合后,刺激 GLUT4 通路将葡萄糖转运到肌肉组织和脂肪细胞中,并抑制肝脏生成葡萄糖,由此维持血糖处于正常水平。Yang 等^[11]发现,在肥胖动物的脂肪组织中,GLUT4 的表达量降低,伴随的是脂肪细胞分泌的 RBP4 表达量和分泌量的增加。这种分泌因子可能与视黄醇一起作用削弱肌肉组织中胰岛素信号通路,阻碍葡萄糖的转运,并干扰胰岛素对肝脏中葡萄糖生成的抑制作用,最终导致血糖升高。因此 RBP-4 作为一种新的脂肪源性信号,为胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的干预治疗提供了新靶标。

本实验用展示于 T7 噬菌体表面的人源 RBP-4 疫苗免疫 2 型糖尿病模型小鼠 db/db,于 2 次免疫

后的各个时间点检测 db/db 小鼠的体液免疫效果、体重、血糖指标,免疫后第 20 周处死动物,检测病理切片。实验结果表明,RBP-4 疫苗免疫小鼠后,诱导了抗 RBP-4 抗体的产生,并于 12 周达到峰值。同时,免疫组小鼠的空腹血糖值从 2 次免疫后的 8 周开始逐渐下降,在 12 周时与空载体组及空白组空腹血糖相比较具有显著差异,并在 12 周之后免疫组小鼠的空腹血糖值均低于 2 型糖尿病发病值(7 mmol/L),而空载体组和空白组小鼠在整个实验期间空腹血糖值均高于 2 型糖尿病发病值(7 mmol/L)。因此实验结果表明,RBP-4 复疫苗免疫 2 型糖尿病小鼠后有效的诱导了抗 RBP-4 抗体的产生,中和了小鼠血液中的 RBP-4 表达量,使胰岛素对肝脏中葡萄糖生成的抑制作用恢复正常,最终血糖达到正常值,对 2 型糖尿病小鼠起到了有效的保护作用。病理切片结果显示,免疫组小鼠各主要组织无明显异常,安全性良好。但 RBP-4 疫苗对 2 型糖尿病小鼠的体重无干预作用,推测 RBP-4 虽然与糖代谢、脂代谢紧密相关,但在 2 型糖尿病干预过程中不涉及体重的降低。本实验结果表明,将 RBP-4 作为 2 型糖尿病免疫干预的新靶标,有可能成为治疗胰岛素抵抗的一个新突破点。

参考文献:

- [1] Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, *et al.* Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035 [J]. *Diabetes Res Clin Prac*, 2014, 103: 137-149.
- [2] 常向云, 糖尿病流行现状及防治对策[J], 全科医学临床与教育, 2004, 2(1): 49-50.
- [3] Shaker O, El-Shehaby A, Zakaria A, *et al.* Plasma visfatin and retinol binding protein-4 levels in patients with type 2 diabetes mellitus and their relationship to adiposity and fatty liver[J]. *Clin Biochem*, 2011, 44(17/18): 1457-1463.
- [4] Tan Y, Sun LQ, Kamal MA, *et al.* Suppression of retinol-binding protein 4 with RNA oligonucleotide prevents high-fat diet-induced metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease in mice [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1811(12): 1045-1053.
- [5] Wang MN, Han YB, Li Q, *et al.* Higher serum retinol binding protein 4 may be a predictor of weak metabolic control in chinese patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *J Int Med Res*, 2012, 40(4): 1317-1324.
- [6] Berry DC, Noy N. Signaling by vitamin A and retinol-binding protein in regulation of insulin responses and lipid homeostasis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821(1): 168-176.
- [7] Rocha M, Banuls C, Bellod L, *et al.* Association of serum retinol binding protein 4 with atherogenic dyslipidemia in morbid obese patients[J]. *Plos One*, 2013, 8(11): e78670.

- [8] Norseen J, Hosooka T, Hammarstedt A, *et al.* Retinol-binding protein 4 inhibits insulin signaling in adipocytes by inducing proinflammatory cytokines in macrophages through a c-Jun N-terminal kinase-and toll-like receptor 4-dependent and retinol-independent mechanism[J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32 (10) : 2010 – 2019.
- [9] 张安玉, 糖尿病流行趋势及其防治的有关问题, 中国慢性病预防与控制, 2005, 13(6) : 257 – 259.
- [10] 任丽, 2 型糖尿病口服药物进展[J]. *辽宁医学杂志*, 2006, 20 (4) : 247 – 248.
- [11] Qin Yang. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes, *Nature*, 2005, 436: 356 – 3.
- [修回日期] 2015-08-31

《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》 入编“中文核心期刊要目总览”

《中文核心期刊要目总览》是学术界对某类期刊的定义, 一种期刊等级的划分。它的对象是中文学术期刊。是根据期刊影响因子等诸多因素所划分的期刊。中文核心期刊是北京大学图书馆联合众多学术界权威专家鉴定, 目前受到了学术界的广泛认同。从影响力来讲, 其等级属同类划分中较权威的一种。按照惯例, 北大核心期刊每四年由北大图书馆评定一次, 并出版《北大核心期刊目录要览》一书。

2014 年版核心期刊定量评价体系采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、他引影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web 下载量、论文被引指数、互引指数等 12 个评价指标, 涉及期刊 14, 728 余种。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出 1983 种核心期刊。

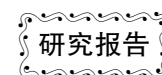
经研究人员对相关文献的检索、统计和分析, 以及学科专家评审:

《中国实验动物学报》入编《中文核心期刊要目总览》2014 年版(即第七版)之生物学类的核心期刊;

《中国比较医学杂志》入编《中文核心期刊要目总览》2014 年版(即第七版)之综合性医药卫生的核心期刊。

《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》编辑部

2015 年 8 月



放射耐受性人小细胞肺癌亚株的建立

刘 静, 田海梅, 李艳芬, 李 茉, 王小兵, 张 伟

(中国医学科学院肿瘤医院生物检测中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 建立肺癌 NCI-H446 细胞放射抗拒性亚株, 为小细胞肺癌放射抗拒和逆转研究提供配对的细胞研究工具。**方法** 通过梯度照射 NCI-H446 细胞株诱导其耐放射性(共 7500cGy), 并通过检测细胞总的 ATP 含量的方法来监测细胞倍增时间, 流式细胞仪检测细胞周期分布, 以及应用多靶单击模型 $SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$ 拟合细胞存活曲线分析其放射敏感参数的变化。**结果** 比较亲本与耐放射株的差异, 放射生物学参数值分别为 D_0 (1.9673, 2.2756)、 N (1.0016, 2.6008)、 D_q (0.6783, 1.6860)、 SF_2 (0.3623, 0.7134), 耐放射株 SF_2 值为亲本的 1.97 倍, G2/M 期细胞所占比由 18.52% 下降到 7.84%。耐放射株的细胞形态发生变化, 倍增时间比敏感株延长。**结论** 通过梯度照射建立了小细胞肺癌 NCI-H446 的耐放射亚株 NCI-H446-R, 与亲本细胞相比放射生物学参数有显著差异 ($P < 0.05$), 本研究结果为研究小细胞肺癌放射抗拒及耐放射逆转提供了新的细胞模型。

【关键词】 放射抗拒; 小细胞肺癌; NCI-H446 细胞株; 细胞周期

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0051-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.010.012

The establishment of a radiation-resistant small cell lung cancer subline

LIU Jing, TIAN Hai-mei, LI Yan-fen, LI Mo, WANG Xiao-bing, ZHANG Wei

(Tumor Marker Research Center, Cancer Institute&Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish a radiation-resistant cell subline from a human small cell lung cancer (SCLC) cell line NCI-H446, providing a pairing research tool for investigating mechanism of radiation tolerance and the reverse strategy in lung cancer. **Methods** The NCI-H446 cell was radiated repeatedly by increased dose of radiation gradually (total 7500cGy) and a radiation-resistant cell substrain was induced and selected from the survival of cells. The doubling time and cell cycle distribution of the substrain were detected by ATP kit and flow cytometry Assay respectively; Radiation biology parameters were calculated and analyzed by cell survival curve fitting from multi-target model, $SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$. **Results** Comparing with the control, The resistant substrain radiobiology parameter values were D_0 (1.9673, 2.2756), N (1.0016, 2.6008), D_q (0.6783, 1.6860) and SF_2 (0.3623, 0.7134) respectively. Cell morphology is more slender and has more tentacles. The SF_2 value of radiation-resistant subline is 1.97 times more than that of wild cell line. The proportion of radiation-resistant cells in G2/M-phase was down to 7.84%, compared with the 18.52% of wild cells. **Conclusions** A radiation-resistant SCLC subline NCI-H446-R is established and may be a useful tool for studying resistant to radiation of SCLC in the future.

【Key words】 Radiation resistance; Small cell lung cancer; NCI-H446 cell line; Cell cycle

[作者简介] 刘静(1984-), 女, 研究实习员, 研究方向: 肿瘤细胞相关实验研究。E-mail: liujingcicams@163.com。

[通讯作者] 张伟(1964-), 男, 研究员, 研究方向: 主要从事转化医学研究。E-mail: zhangww1954@126.com。

由于环境污染日益加剧、吸烟等原因,肺癌已持续成为世界范围内最常见的恶性肿瘤,且发病率仍呈上升趋势,据《2012 中国肿瘤登记年报》发布,从全国来看,肺癌居恶性肿瘤发病的第一位,每 10 万人约有 54 人会患肺癌,占恶性发病率的 18.74%,男性为女性的 1.94 倍^[1],极大威胁着人类的健康和生命。肺癌的病理类型中小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 约占肺癌发病总数的 20%~25%。由于 SCLC 细胞倍增时间短、进展快,与其他肿瘤不同之处就是早期即倾向于远处转移,主要采取以放化疗为主的综合治疗^[2]。然而,部分 SCLC 患者对放疗不敏感,放疗后易出现复发,肿瘤细胞对放射线抗拒是影响 SCLC 放疗效果的主要因素。

SCLC 的放疗抗拒研究对提高肺癌的预后具有重要价值,国内已有分子和细胞水平的研究报道,但不足之处是细胞研究模型不统一且来源各不相同,尤为关键的是尚未稳定成株的肺癌细胞株并缺乏必要的参数鉴定。本研究选择来自 ATCC (american type culture collection) 的小细胞肺癌 NCI-H446 细胞株作为亲本细胞系,体外通过序贯辐射诱导的方法,诱导获得具有放射抗拒性的细胞亚株 NCI-H446-R 并稳定传代。同时,研究和摸索建立耐放射细胞系的实验方法,为其他耐放射细胞系的建立提供依据。

1 材料和方法

1.1 辐射诱导

应用医用电子直线加速器 (X 射线), 品牌: Clinac 600C/D (由中国医学科学院肿瘤医院加速器室提供使用), 由低剂量到高剂量按照 2Gy、5Gy、8Gy、10Gy 的顺序逐渐增加放射剂量,一次照射完成细胞恢复状态后,继续下一次照射。照射次数共 12 次,照射总剂量 7500cGy, 分别为: (2Gy × 3 次, 5Gy × 3 次, 8Gy × 3 次, 10Gy × 3 次), 剂量率 300cGy/min, 射野大小: 10 cm × 10 cm, 细胞瓶表面覆有约 1.5 cm 厚的补偿膜,照射后 4 h 换新鲜培养液。

1.2 细胞培养

NCI-H446 细胞株来自 ATCC, 由本中心常规保存。采用 10% FBS (Hyclone SH30084.03), RPMI1640 (Gibco 31800105) 培养基, 37℃、5% CO₂ 培养箱 (Forma Model3111) 中培养。照射后根据细胞密度传代, 细胞状态稳定后继续下一次照射, 照

射前冻存部分细胞保种。

1.3 单克隆筛选细胞亚株

按照计划的放射剂量完成照射后, 采用单克隆方法得到耐放射性及生长特性趋于统一的细胞, 从而纯化细胞株。取对数生长期的细胞, 0.25% 胰酶消化成单个细胞后接种到 96 孔板上。每日观察克隆的形成情况, 克隆形成后, 显微镜观察标记出单克隆的孔, 消化取出细胞并继续扩大培养, 分别标记其亚株名称。选择生长状况良好的一个亚株并稳定传代 30 次以上, 命名为 NCI-H446-R。

1.4 放射敏感参数测定

通过经典的克隆形成实验, 来检验 NCI-H446-R 的耐放射性。取对数生长期的 NCI-H446 与 NCI-H446-R 细胞, 胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞后, 将细胞悬浮在含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液中备用。细胞悬液按倍数稀释后, 每种细胞设三个平行孔 2 mL/孔, 在标记为 (0Gy, 2Gy, 4Gy, 6Gy, 8Gy) 的不同 12 孔板中分别按 600 个/孔、1000 个/孔、4000 个/孔、8000 个/孔和 10000 个/孔接种细胞, 并轻轻转动使细胞分散均匀, 4 h 后按所标记剂量完成照射。照射后在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中静置培养 2 周左右。当形成克隆的面积足够大 (单克隆细胞数 > 50 个细胞) 且克隆间不相连时终止培养。弃上清并用 PBS 小心浸洗 2 次。加甲醇 2 mL, 固定 15 min, 去固定液, 加适量 Giemsa 染色 10 min, 用流水缓慢洗去染色液, 空气干燥。将 12 孔板置于显微镜下, 统计形成的克隆数并计算得出存活分数值, 实验重复一次。最后应用多靶单击模型绘制细胞存活曲线。

1.5 细胞周期测定

诱导的耐放射株经最后一次 10Gy 照射后, 调整细胞状态最终稳定传代成 NCI-H446-R 细胞株。取对数生长期的敏感株与耐放射株细胞, 胰酶消化制成单细胞悬液并计数, 每种取约 1×10^6 个细胞离心去培养基, 加 75% 冰乙醇固定, 置于 -20℃ 过夜。次日离心弃上清, PBS 洗 2 次后加 PI 染色, 经流式细胞仪 (flow cytometry, FCM) 检测两种细胞的细胞周期分部。最后, 通过 ModFit LT 软件绘制细胞周期分部图, 对比亲本株和耐放射株的细胞周期变化情况。

1.6 ATP 法绘制细胞生长曲线

取对数生长期的敏感株与耐放射细胞株, 消化细胞成单个后计数, 调整细胞密度为 2000 个/mL。

设 8 个平行孔,加 200 μ L/孔细胞悬液,每种细胞株分别接种 8 块 96 孔板,每块培养板分别标注对应的细胞株名称及第 1 天~第 8 天,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。通过检测每个孔中总的细胞内三磷酸腺苷(ATP)含量的方法(试剂盒购于:北京金紫晶生物医药技术有限公司),来观察细胞的增殖情况。每 24 h 检测一对培养板,连续测 8 d,绘制细胞生长曲线。

1.7 统计学方法

实验结果采用 SPSS19.0 软件进行分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 放射生物学参数

统计两次重复实验获得的集落平均数,计算接种率(plating efficiency, PE) = $\frac{\text{OGy 照射组形成集落数}}{\text{接种细胞数}}$,存活分数(surviving fraction, SF) = $\frac{\text{形成的集落数}}{\text{接种的细胞数} \times \text{PE}}$ 。采用 sigmaplot12.0 软件根据多靶单击模型 $SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$ 拟合细胞剂量-存活曲线(图 1),结果显示随着放射剂量的增加,敏感株的存活分数较耐放射株明显下降,耐放射株显示更强的放射抗拒性。通过曲线计算敏感株与耐放射株相关的放射敏感性参数分别为:终斜率 D_0 值(1.9673, 2.2756)、准阈剂量 D_q 值(0.6783, 1.6860)、外推值 N (1.0016, 2.6008)和 SF_2 (0.3623, 0.7134),NCI-H446-R 的 SF_2 值是 NCI-H446 的 1.97 倍。此外,NCI-H446-R 的相关放射生物学参数 D_0 、 N 、 D_q 值也都明显高于 NCI-H446,提示 NCI-H446-R 在放射线照射下具有更强的存活能力。

2.2 细胞周期变化

通过流式细胞仪测得的数据显示,NCI-H446-R 与 NCI-H446 在细胞周期分布上存在显著差异(彩插 7 图 2)。对比两株细胞的细胞周期所占比例,NCI-H446-R 的 G1 期与 S 期细胞所占比例分别由 $63.52 \pm 8.25\%$ 和 $17.96 \pm 2.93\%$ 上升到 $67.94 \pm 6.02\%$ 和 $24.23 \pm 2.26\%$;G2/M 期细胞由 $18.52 \pm 3.14\%$ 下降到 $7.84 \pm 2.19\%$,结果显示耐放射细胞株 G1 期和 S 期比例增多,G2/M 期比例减少。

2.3 细胞生长差异

细胞在射线照射驯化过程中,会出现大片死亡

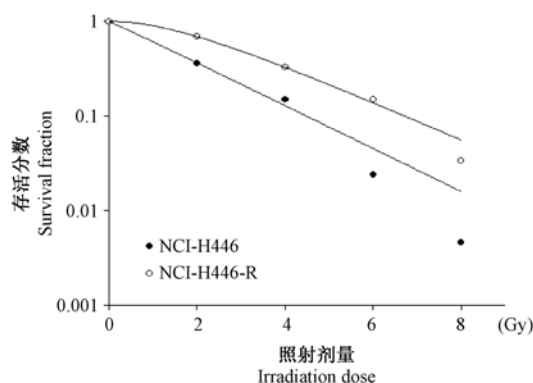


图 1 多靶单击拟合模型拟合的 NCI-H446&NCI-H446-R 细胞存活曲线

Fig. 1 The cell survival curve of NCI-H446&NCI-H446-R with the multi-target model

脱落,镜下观察可见不同程度的细胞变形增大、多伪足,细胞内外颗粒较多,细胞内出现大量空泡、核变大及多核等特征。随着照射剂量的不断加大,细胞恢复状态的时间也随之加长。通过 ATP 法检测并绘制细胞生长曲线(彩插 7 图 3),NCI-H446 约在第 2 天进入对数生长期,第 6 天进入平台期;NCI-H446-R 在第 3 天进入对数生长期,第 8 天进入平台期。耐放射株的倍增时间较敏感株延长。在相同的培养条件下,NCI-H446-R 的细胞形态较其亲本株也有所不同。

3 讨论

目前国内外相关研究者已经通过不同的诱导方法建立起多种不同组织来源的耐放射细胞亚株^[3-5],并对获得的耐放射细胞进行了系统的耐放射性分析。对于细胞耐放射性的产生机制主要有两种不同的观点。首先,有观点认为同一细胞群中即使是同一来源的细胞也存在着放射敏感性不同的细胞亚群。即使是同一细胞来源的肿瘤细胞,在内外环境的不断作用下,对放射线的敏感程度也存在差异,放射线选择性的杀死了放射敏感的细胞,使放射抗拒的细胞存活下来并不断增殖,并使其后代也具有了耐放射性;另外,有学者认为,在照射过程中虽然杀死了大部分的肿瘤细胞,但同时也诱导了部分细胞突变,使其具有耐放射性并不断增殖^[6]。总之,放射线照射后存活的细胞具有了辐射耐受性,它和亲本细胞是具有同一来源放射敏感性不同的细胞株。

本研究采用多次照射、逐步增加放射剂量的方法诱导出耐放射性较高的细胞亚株,总的照射剂量

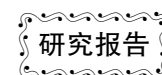
为 7500cGy。从细胞株的初次诱导,到细胞稳定传代后完成耐放射性鉴定,历时 16 个月。设定的照射剂量完成后,通过亚克隆实验纯化出单克隆株,使其生物特性更趋于一致。最后通过经典的克隆形成实验来检测并计算其放射生物学参数:终斜率 D_0 值、准阈剂量 D_q 值、外推值 N 和 SF_2 。计算得出,NCI-H446-R 的 SF_2 值为其亲本株的 1.97 倍,有显著差异($P < 0.05$)。不同细胞周期对放射的敏感性也不同,一般 S 期的细胞最抗拒,G2/M 期对放射线最敏感^[7]。通过流式细胞仪检测,NCI-H446-R 的 G2/M 期所占比例为 7.84%,亲本株为 18.52%,存在显著差异($P < 0.05$)。辐射损伤主要表现为细胞再增值能力的丧失,细胞经放射线照射后的 1~2 代之内细胞并未有明显变化,待传至 2~3 代后细胞会出现大片死亡、脱落,发生有丝分裂性死亡,失去肿瘤的无限增值能力。存活的细胞在形态上会出现显著的变化,细胞核质比增大,双核;细胞内颗粒物增多,多空泡;生长速度变慢,代谢加快;细胞个体间形态差异较大,多伪足。传至 8~10 代以后,细胞形态逐渐恢复,趋于统一,增殖速度和代谢水平也逐渐恢复。最终诱导出的耐放射细胞株 NCI-H446-R,较敏感株在细胞形态和倍增时间上也有所不同,在某种程度上也验证了细胞周期的检测结果。

总之,本研究通过梯度照射法,模拟临床上耐放射细胞的形成过程,建立了小细胞肺癌细胞株 NCI-H446 的放射抗拒性细胞亚株 NCI-H446-R 并稳定传代,通过克隆形成等实验验证了其耐放射性^[9-10]。在未来的工作中,我们将进一步利用获得的放射抗拒细胞株,来开展有关小细胞肺癌放射抗拒及耐放射逆转等相关研究。

参考文献:

- [1] 赫捷,陈万青. 2012 中国肿瘤登记年报[M]. 北京:军事医学科学出版社,2012. 28.
- [2] 周道安,王绿化,傅小龙,等. 新编肺癌综合治疗学[M]. 上海:复旦大学出版社,2009. 168-184.
- [3] 骆志国,周福祥,周云峰,等. 辐射诱导辐射耐受鳞癌细胞株的建立及其生物学特性[J]. 中华放射肿瘤学杂志,2005,14(3): 208-212.
- [4] 金问森,孔肇路,张江虹,等. 放射耐受性肝癌细胞亚株的筛选与建立[J]. 中华放射医学与防护杂志,2009,29(6): 575-579.
- [5] 吴巍巍,赵玉沛,廖泉,等. 人胰腺癌细胞株放射敏感性的体外研究[J]. 中华肝胆外科杂志,2004,10(12): 821-823.
- [6] Pelevina II, Gotlib Vla, Kndriashova OV, *et al.* Properties of progeny of irradiated cells[J]. Tsitologia, 1998, 40(5): 467-477.
- [7] 黄杰夫,孙燕,石远凯. 癌症医学[M]. 北京:人民卫生出版社,2014. 632-639.
- [8] Siles EI, Villalobos M, Valenzuela MT, *et al.* Relationship between p53 status and radiosensitivity in human tumour cell lines[J]. Br J Cancer, 1996, 73(5): 581-588.
- [9] Ogino H, Shibamoto Y, Sngle c, *et al.* Biological effects of intermittent radiation in cultured tumor cells: influence of fraction number and dose per fraction[J]. Radiat Res, 2005, 164(4): 401-406.
- [10] Lee YJ, Shon TJ, Kang PC, *et al.* Enhancement of radiosensitivity in H1299 cancer cells by actin-associated protein cofilin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 335(2): 286-291.
- [11] Raju UI, Nakata E, Yang P. In vitro enhancement of tumor cell radiosensitivity by a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme: mechanistic considerations. [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2002, 54(3): 886-894.

[修回日期]2015-08-18



当归补血汤对辐射损伤小鼠的防护作用

冯 璟¹, 于远望²

(1. 陕西中医药大学医学技术学院, 陕西 咸阳 712046;
2. 陕西中医药大学基础医学院, 陕西 咸阳 712046)

【摘要】 目的 观察当归补血汤对⁶⁰Co- γ 射线辐照小鼠的防护作用。**方法** 将实验小鼠随机分为 5 组(正常对照组、模型组、当归补血汤低、中、高剂量组), 采用⁶⁰Co- γ 放射源照射除正常对照组外的各组小鼠, 建立辐射损伤模型, 测定各组小鼠外周血中性粒细胞数(NEUT)、骨髓有核细胞数(BMC)、血清超氧化物歧化酶(SOD)活性及血清丙二醛(MDA)含量。**结果** 辐射损伤小鼠的 NEUT、BMC 及 SOD 活性均明显降低($P < 0.01$), MDA 含量增高($P < 0.01$)。当归补血汤可升高辐射损伤后小鼠 NEUT、BMC 及 SOD 活性, 降低 MDA 含量, 且当归补血汤高剂量组对辐射损伤小鼠的保护作用更好($P < 0.01$)。**结论** 当归补血汤对辐射小鼠的电离损伤有保护作用, 且与剂量相关。

【关键词】 当归补血汤; 辐射损伤; 防护作用

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0055-04
doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.010.013

The protective effect of Danggui Buxue decoction on radiation injury in mice

FENG Jing¹, YU Yuan-wang²

(1. School of Medical Techniques in Shanxi University of Chinese Medicine, Shanxi Xianyang 712046, China;
2. Basic Medical College of Shanxi University of Chinese Medicine, Shanxi Xianyang 712046, China)

【Abstract】 Objective To observe the protective effect of Danggui Buxue Decoction on ⁶⁰Co- γ ray irradiated mice. **Methods** The experimental mice were randomly divided into 5 groups (the normal control group, model group, Danggui Buxue Decoction of low, middle and high dose groups). The mouse except the normal control group were irradiated by ⁶⁰Co- γ ray and established the radiation-damage model. Peripheral blood neutrophil count (NEUT), the number of bone marrow nucleated cells (BMC), the activity of serum superoxide dismutase (SOD) and the serum levels of malondialdehyde (MDA) were measured. **Results** Radiation injury in mice of NEUT, BMC and SOD were significantly decreased ($P < 0.01$), MDA were increased ($P < 0.01$). Danggui Buxue Decoction can increase the levels of NEUT, BMC and SOD in mice after radiation injury, decrease the content of MDA. And protective effect of high dose group was better ($P < 0.01$). **Conclusions** Danggui Buxue Decoction has protective effect on radiation injury in mice. And there is a correlation between the protection effect and dose.

【Key words】 Danggui Buxue decoction; Radiation injury; Protective effect

金元时代李东垣创造的当归补血汤是著名的补血益气良方, 黄芪和当归按照 5:1 的比例组成, 具

有较好的益气补血功效。研究发现, 当归补血汤具有促进造血、调节免疫、提高自由基清除水平, 增强

机体抵抗力等生物学活性^[1]。本研究观察了当归补血汤对辐射损伤小鼠 NEUT、BMC、SOD 活性及 MDA 含量的影响,探讨其作用机制,为广泛推广使用当归补血汤提供有力的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性昆明种小鼠,SPF 级,6 ~ 8 周龄,体重 18 ~ 22 g,由西安交通大学医学院动物实验中心提供【SCXK(陕)2013-001】。小鼠饲养环境为陕西中医药大学药理实验室【SYXK(陕)2007-006】,按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 仪器与材料

当归补血汤(自行煎制,将黄芪和当归按照 5:1 的比例^[2]煎制为浓度 3.6 g/mL,此为高剂量浓度,用生理盐水配制低剂量浓度 0.9 g/mL 和中剂量浓度 1.8 g/mL)。⁶⁰Co- γ 射线辐射源(第四军医大学辐照中心);BC-2300 全自动血细胞分析仪(深圳迈瑞生物医疗股份有限公司);E220 光学生物显微镜(Olympus 公司);SOD 测试盒、MDA 测试盒(南京建成生物工程研究所);21R 型高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司);UV3600 型紫外分光光度计(日本岛津公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及给药方式:将实验小鼠随机分为 5 组,分别为正常对照组、模型组、当归补血汤低剂量组、当归补血汤中剂量组和当归补血汤高剂量组,每组 10 只。正常对照组与模型组在照射前、后均给予生理盐水灌胃,其它各给药组在照射前、后给予相应浓度当归补血汤灌胃。灌胃给药容量为 0.1 mL/10 g,每日一次,照射前连续给药 10 d,照射后以同样方法继续给药 14 d。

1.3.2 造模方法:⁶⁰Co- γ 射线全身单次照射 5 Gy,剂量率 218.63 cGy/min,照射时间 2 min 17 s,源皮距 80 cm。

1.4 观察指标

1.4.1 外周血中性粒细胞数(NEUT)检测:分别于照射前、照射当天及照射后第 5、10 天,各取小鼠尾血一次,每次约 20 μ L,滴入血细胞稀释液内混匀,用全自动血细胞分析仪测定小鼠外周血中性粒细胞数。

1.4.2 骨髓有核细胞计数(BMC):辐射后第 14 天颈椎脱臼处死小鼠并解剖,取其右侧股骨,除净肌肉组织,用 6 号针头刺穿股骨末端,以 2 mL 生理盐水冲洗

骨髓至股骨为白色,将冲出的骨髓液充分混匀,静置 2 min,再次混匀后取少许滴入计数板的计数池内,在显微镜下计数 4 个大格细胞数(N),依公式计算每毫升有核细胞数(C): $C = N \times 2.5 \times 10^5 / \text{mL}$ 。

1.4.3 血清超氧化物歧化酶(SOD)测定:辐射后第 14 天取小鼠眼球血,2500 r/min 离心 15 min,分离血清,用试剂盒检测 SOD 含量。

1.4.4 血清丙二醛(MDA)含量测定:辐射后第 14 天取小鼠眼球血,2500 r/min 离心 15 min,分离血清,用试剂盒测定 MDA 含量。

1.5 统计学分析

所有数据采用 SPSS16.0 软件包分析,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 当归补血汤对小鼠外周血 NEUT 的影响

辐射前 5 组小鼠外周血中性粒细胞数无明显差异($P > 0.05$)。辐射当天,与正常对照组比较,模型组 NEUT 与其有统计学差异($P < 0.05$),当归补血汤各组 NEUT 均有所降低,但无统计学意义($P > 0.05$)。在辐射后第 5 天,各受辐射组小鼠 NEUT 均与正常对照组有显著统计学差异($P < 0.01$),当归补血汤高剂量组与模型组比较有显著差异($P < 0.01$)。在辐射后第 10 天,与模型组比较,当归补血汤中剂量与其有统计学差异($P < 0.05$),高剂量组差异明显($P < 0.01$)(表 1)。

2.2 当归补血汤对小鼠 BMC 的影响

与正常对照组比较,受辐射各组 BMC 与其均有显著差异($P < 0.01$);与模型组比较,当归补血汤高剂量组与其有显著的统计学差异($P < 0.01$)(表 2)。

2.3 当归补血汤对小鼠血清 SOD 含量的影响

与正常对照组比较,各受照射组小鼠血清 SOD 含量均明显减低($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组 SOD 含量均有所增加,当归补血汤低剂量组与其有统计学差异($P < 0.05$),高、中剂量组与其有显著差异($P < 0.01$)(表 3)。

2.4 当归补血汤对小鼠血清 MDA 含量的影响

与正常对照组比较,各组小鼠血清 MDA 含量均明显增高($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组 MDA 含量均显著降低($P < 0.01$),且以当归补血汤高剂量组 MDA 降低最为明显(表 3)。

表 1 当归补血汤对小鼠外周血中性粒细胞数的影响($n = 10, \times 10^9 / L$)

Tab. 1 Effect of Danggui Buxue decoction on mice peripheral blood neutrophil count ($n = 10, \times 10^9 / L$)

组别 Group	辐射前 Before radiation	辐射当天 Radiation day	辐射后第 5 天 Fifth days after radiation	辐射后第 10 天 Tenth days after radiation
正常对照组 Normal control group	9.39 ± 1.50	9.10 ± 1.66	8.92 ± 1.49	9.80 ± 1.35
模型组 Model group	8.45 ± 1.42	5.77 ± 1.37 [*]	0.45 ± 0.24 [△]	0.57 ± 0.15 [△]
低剂量组 Low dose group	8.28 ± 0.87	6.21 ± 1.35	0.30 ± 0.12 [△]	0.66 ± 0.19 [△]
中剂量组 Middle dose group	9.29 ± 1.06	7.07 ± 2.39	0.51 ± 0.19 [△]	0.83 ± 0.24 ^{△*}
高剂量组 High dose group	9.44 ± 1.47	7.41 ± 1.57	0.69 ± 0.17 ^{△*}	1.21 ± 0.32 ^{△*}

注:与正常对照组比较,[△] $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$ 。
Note:Compared with the normal control group, [△] $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$; Compared with the model group, ^{*} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$.

表 2 当归补血汤对小鼠骨髓有核细胞计数的影响($\times 10^6 / mL$)

Tab. 2 Effect of Danggui Buxue decoction on the content of BMC($\times 10^6 / mL$)

组别 Group	样本数 n	骨髓有核细胞计数 BMC
正常对照组 Normal control group	10	108.9 ± 29.01
模型组 Model group	10	45.6 ± 11.72 [△]
低剂量组 Low dose group	10	37.3 ± 12.28 [△]
中剂量组 Middle dose group	10	51.9 ± 19.11 [△]
高剂量组 High dose group	10	67.6 ± 15.31 ^{△*}

注:与正常对照组比较,[△] $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.01$ 。
Note:Compared with the normal control group, [△] $P < 0.01$; Compared with the model group, ^{*} $P < 0.01$.

表 3 当归补血汤对小鼠血清 SOD、MDA 含量的影响

Tab. 3 Effect of Danggui Buxue decoction on serum SOD, MDA levels in mice

组别 Group	样本数 n	血清超氧化物歧化酶 SOD(U/mL)	血清丙二醛 MDA($nmol/mL$)
正常对照组 Normal control group	10	454.03 ± 14.61	18.51 ± 1.11
模型组 Model group	10	315.75 ± 17.27 [△]	57.58 ± 2.30 [△]
低剂量组 Low dose group	10	362.18 ± 11.51 ^{△*}	39.63 ± 1.02 ^{△*}
中剂量组 Middle dose group	10	396.36 ± 5.63 ^{△*}	30.37 ± 1.87 ^{△*}
高剂量组 High dose group	10	420.77 ± 10.99 ^{△*}	28.31 ± 1.09 ^{△*}

注:与正常对照组比较,[△] $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{*} $P < 0.01$ 。
Note:Compared with the normal control group, [△] $P < 0.01$; Compared with the model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{*} $P < 0.01$.

3 讨论

当归补血汤中的黄芪与当归在配伍时黄芪为君,当归为臣,二者均具有补气补血活血的作用,而黄芪多糖与当归多糖又是其重要的有效成分。有

研究表明,多糖是多种中草药的主要活性物质之一,具有抗细菌、抗病毒、抗肿瘤、抗辐射、抗衰老等功效^[3]。本实验主要观察当归补血汤的抗辐射作用并探讨其机制。

机体受辐射后,造血系统最早出现形态变化,

其主要原因是造血细胞分化程度低,对辐射损伤敏感。电离辐射可抑制或破坏造血干细胞和各系祖细胞的增殖能力^[4-5],因此外周血白细胞计数明显减少^[6]。中性粒细胞计数是白细胞分类中的重要一项,在环境医学研究中是反应白细胞分类变化的重要指标之一。骨髓造血功能的损伤亦会影响中性粒细胞计数的变化。本实验结果表明,在小鼠接受辐射当天,当归补血汤各剂量组 NEUT 均降低,但与正常对照组无统计学差异($P > 0.05$),说明在辐射前使用当归补血汤,可对早期辐射损伤引起的 NEUT 降低起一定程度的保护作用。在辐射后第 5 天,各受照射组 NEUT 均明显降低($P < 0.01$),与模型组比较,当归补血汤高剂量组有明显差异($P < 0.01$)。在辐射后第 10 天,各受照射组 NEUT 均较辐射损伤早期有所回升,与模型组比较,当归补血汤中、高剂量组与其有统计学差异(中剂量组 $P < 0.05$,高剂量组 $P < 0.01$),说明当归补血汤有明显的升中性粒细胞作用,且这一作用与使用当归补血汤的时间和浓度相关。

骨髓是辐射高度敏感的组织,小鼠骨髓有核细胞数可反映其造血功能^[7]。骨髓有核细胞计数的减少表明机体造血功能障碍,这与体内造血干细胞或造血微环境受损有关。实验结果显示,小鼠骨髓有核细胞数在受⁶⁰Co- γ 射线辐射后显著减少($P < 0.01$),而高剂量当归补血汤在照射后期可明显保护骨髓有核细胞,减少其破坏,促进骨髓造血干细胞的修复。

自由基是吸收辐射能量和损伤生物分子的重要媒介,辐射使组织中自由基增加,SOD 减少、活性降低^[8]。SOD 是机体中最重要的抗氧化酶,在清除自由基和脂质过氧化物中起关键作用^[9]。实验结果表明,小鼠在受到辐射后组织中自由基增加,血清抗氧化酶 SOD 含量明显减低,而当归补血汤可以提升照射后小鼠血清中 SOD 含量,具有保护机体免受自由基损害和抗氧化的作用,且这一作用与当归补血汤的浓度相关。

MDA 是脂质氧化的主要产物,可反映机体自由基水平和氧化应激水平^[10]。本实验结果表明,小鼠受辐射后血清 MDA 明显增多,其主要原因是辐

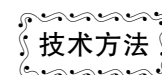
射致机体抗氧化机制被破坏,SOD 活性明显降低,细胞被自由基攻击,导致大量脂质过氧化物堆积,MDA 含量增加^[11]。而当归补血汤可明显抑制辐射损伤小鼠的脂质过氧化,显著降低 MDA 含量,具有较好的抗辐射作用。

综上所述,当归补血汤对辐射所致造血系统损伤具有保护和促进修复的作用,且当归补血汤可明显提升血清 SOD 含量,增强其活性,使机体组织细胞免受自由基攻击,大大降低 MDA 含量,可起到保护机体、抗辐射的作用。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(二部)[S]. 北京: 化学工业出版社,2005:765.
- [2] 窦骏. 不同剂量黄芪配合的当归补血汤对小鼠免疫功能的影响[J]. 实用中西医结合杂志,1996,9(5):293.
- [3] 贺晓静,陈广伟. 人參多糖体外抑制人非小细胞肺癌 A549 细胞作用研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2013,27(11):1097-1098.
- [4] 凌绍苹. 细胞生物学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001.
- [5] Li S, Zhong J, Sun F, et al. Study on the protective effect of grape procyanidins on DNA damage induced by irradiation [J]. Zhonghua Yufang Yi xue Zazhi,2000,34(3):131-133.
- [6] 冯璟,于远望,林洁,等. 用当归补血汤对受⁶⁰Co- γ 射线辐照小鼠的外周血细胞进行防护的效果研究[J]. 当代医药论丛,2014,(20):167-169.
- [7] 杨岚,朱柏贵,田琼,等. 血小板第 4 因子对小鼠骨髓造血细胞辐射损伤保护机理的研究[J]. 中华放射医学与防护杂志,2000,20(5):340.
- [8] 贾晓民,赵杰,刘永彪,等. 超氧化物歧化酶对接受全身放射的荷瘤小鼠脾及外周血的影响[J]. 徐州医学院学报,2003,23(3):232-234.
- [9] 姚勇,孟庆勇. 半叶马尾藻多糖口服液对小鼠的抗辐射作用研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2014,28(11):1060-1062.
- [10] 高旭,刘斌钰,邢雁霞,等. 黄芪多糖对运动损伤心肌的影响[J]. 山西大同大学学报(自然科学版),2013,29(3):43-45,48.
- [11] 蔡彬新,陈爱平,林金科,等. 太子参白茶对辐射的防护作用[J]. 宁德师范学院学报(自然科学版),2013,25(1):21-23,27.

[修回日期]2015-07-22



胆汁螺杆菌实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

伍妙梨,袁文,饶丹,王静,朱余军,尹雪琴,黄韧,郭鹏举

(广东省实验动物监测所,广东省实验动物重点实验室,广州 510663)

【摘要】 目的 建立快速、敏感、特异的胆汁螺杆菌(*Helicobacter bilis*, *H. bilis*) TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 检测方法,对胆汁螺杆菌进行定量检测。**方法** PCR 扩增 *H. bilis* 保守基因 P17 序列全长 ORF435 bp,进行 TA 克隆,构建质粒标准品 pMD-HBP17。通过对 pMD-HBP17 标准品的定量分析,优化反应体系,检测 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 方法的灵敏度、特异性及重复性;用所建立的 qPCR 方法检测 77 份临床样品,并与普通 PCR 的检测结果作比对。**结果** 所建立的 qPCR 检测方法,质粒 DNA 浓度在 $10^8 \sim 10^1$ 拷贝之间表现出较好的线性和相关性,所得标准曲线的斜率为 -3.46 ,相关系数为 0.999 ,检测灵敏度达到 20 个拷贝,对 77 份临床样品的检出率为 14.3% ,较普通 PCR(7.8%)的检出率高。**结论** 建立的 *H. bilis* qPCR 检测方法特异性好、敏感性高、稳定性强,可用于胆汁螺杆菌的定量及定性检测。

【关键词】 胆汁螺杆菌(*H. bilis*);荧光定量 PCR(qPCR);TaqMan 探针

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0059-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.010.014

Detection of *Helicobacter bilis* using quantitative real-time PCR with TaqMan probe

WU Miao-li, YUAN Wen, RAO Dan, ZHU Yu-jun, WANG Jing, YIN Xue-qin, GUO Peng-ju
(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Key Laboratory of Laboratory Animals,
Guangzhou 510663, China)

【Abstract】 Objective To develop a rapid, sensitive and specific assay based on TaqMan probe real-time PCR to quantitate *Helicobacter bilis* (*H. bilis*). **Method** A 435 bp specific fragment of *H. bilis* P17 gene was amplified by PCR, then cloned into pMD19-T vector to construct a recombinant plasmid pMD-HBP17, which was used as standard DNA of this qPCR method. The qPCR system was optimized by using serial dilution of standard plasmid. The sensitivity, specificity, repeatability and quantitation range of this method were evaluated. The established method was used to detect 77 clinical samples. **Result** The quantitative standard curve from 10^8 copies/well to 10^1 copies/well of serial diluted plasmid DNAs showed that they had good linear correlation, the slope of the standard curve was -3.46 , $R^2 > 0.999$, and the lowest limit reached 2×10^1 copies/well. The positive rate of *H. bilis* detected by qPCR was 14.3% which is higher than detected by PCR(7.8%). **Conclusion** This qPCR method showed high sensitivity, specificity and stability and will be utilized for qualitative and quantitative detection of *H. bilis*.

【Key words】 *Helicobacter bilis*; QPCR; TaqMan probe

啮齿动物螺杆菌(rodent helicobacter)是指寄居于啮齿动物消化道的一群螺杆菌属细菌的总称,目

[基金项目] 国家科技支撑计划(2013BAK11B01)。

[作者简介] 伍妙梨(1987-),女,硕士,研究方向:预防兽医学。

[通讯作者] 郭鹏举,研究员。E-mail: 1517727522@qq.com。

前从大鼠、小鼠、沙鼠等啮齿动物中已陆续分离到三十多种啮齿动物螺杆菌,其中重要的有胆汁螺杆菌 (*Helicobacter bilis*)、肝螺杆菌 (*Helicobacter hepatitis*)、啮齿类螺杆菌 (*Helicobacter rodentium*) 等^[1]。胆汁螺杆菌是啮齿类实验动物的重要致病菌之一,常呈隐性感染,其感染会严重影响实验动物的品质,而被国际实验动物理事会列为啮齿类实验动物必须排除的病原微生物^[2]。传统的胆汁螺杆菌的检测方法主要包括分离培养法、PCR 等。鉴于胆汁螺杆菌的生长条件苛刻,分离培养的成功率较低而不适用于临床鉴定;普通 PCR 技术通过对扩增后的产物进行电泳检测分析,虽然敏感性较高,但存在假阳性问题。实时荧光定量 PCR (qPCR) 通过实时检测荧光量的变化,获得不同样品达到一定荧光信号时所需的循环次数进而通过计算对模板进行准确定量,具有操作简单、结果直观、敏感性高、特异性强、重复性好等优点^[3]。本研究旨在建立一种灵敏度高、特异性强、快速准确检测胆汁螺杆菌的 TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及临床样本

胆汁螺杆菌 ATCC51630 购自美国典型微生物菌种保藏中心(ATCC),大肠杆菌 DH-5 α 菌株均由本实验室保存。临床样本为 SD 大鼠和野鼠的盲肠内容物,SD 大鼠来源于 2014 年本实验室收到广东省送检的 SD 大鼠,背景调查表明该 SD 大鼠曾饲养于普通环境,共 52 只。野鼠为褐家鼠,捕获于广州市某实验动物养殖场附近,共 25 只。无菌采集活体大鼠和野鼠的盲肠内容物,样本采集在本实验室的屏障环境实验间【SYXK(粤)2012-0122】进行,-20℃保存。

1.1.2 试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒均购自天根生化科技有限公司;Premix Ex

TaqTM (Probe qPCR)、Premix Ex TaqTM Version2.0、pMDTM19-T Vector 等均购自 TAKARA 公司。

1.1.3 仪器

ABI7500 荧光定量 PCR 仪,检测软件为 SDS1.4 版本。

1.1.4 引物及探针的设计合成

根据 NCBI 中胆汁螺杆菌 P17 基因序列的保守区域设计一对特异性 qPCR 引物(P17-F1、P17-R1)及探针(P17-probe),同时设计一对普通引物(P17-F2、P17-R2)扩增 P17 全长基因片段(表 1)。引物及探针均由上海立菲生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细菌基因组 DNA 的提取

按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒的操作步骤提取胆汁螺杆菌的基因组 DNA,并用紫外分光光度计检测所获得的 DNA 的纯度及浓度。

1.2.2 *H. bilis* P17 基因全长 ORF 的 PCR 扩增

以抽提的基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,取 2 μ L 基因组 DNA 加入 2 μ L 引物(10 μ mol/L),25 μ L Premix Ex Taq,加灭菌蒸馏水到反应总体积为 50 μ L。95℃预变性 5 min 后,95℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,循环扩增 30 次,72℃终延伸 10 min,4℃保存。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测后用 DNA 纯化回收试剂盒回收,回收产物-20℃保存。

1.2.3 *H. bilis* P17 质粒标准品的制备

将扩增的 *H. bilis* P17 基因片段 PCR 产物纯化后进行 TA 克隆插入 pMD-19T 载体,并转化 DH5 α 感受态细胞,筛选阳性克隆,经 PCR 鉴定后送 invitrogen 公司测序。将测序正确的阳性克隆增殖培养,提取重组质粒。通过紫外分光光度计测定质粒浓度,并根据公式: $C = (N \times 6.02 \times 10^{23}) / (MW \times 10^9)$ 计算质粒拷贝数。C 为每 μ L 质粒中所含目的基因拷贝数;N 为质粒浓度,单位为 ng/ μ L;MW 为重组质粒分子量。

表 1 所用引物及探针

Tab.1 Primer and probe

Primer	Primer sequence	Amplicon Length
P17-F1	5'-TACCACTGGAATGTAAAAGGCA-3'	170bp
P17-R1	5'-CTTCTTTTAGCGTTACATACGGAGT-3'	
P17-F2	5'-ATGGAACAGATAAAGATTTTAAAGCAAC-3'	435bp
P17-R2	5'-CTATGCAAGTTGTGCGTTAAGCATCC-3'	
P17-probe	5'-(FAM)CCACAAGTCCATGCGCAACAGAAG(BHQ1)-3'	

1.2.4 qPCR 反应体系的建立和优化

根据 TAKARA Premix Ex TaqTM (Probe qPCR)

的操作说明书配制 qPCR 反应体系,分别对引物浓度($0.1 \mu\text{mol} \sim 1 \mu\text{mol}$),探针浓度($0.1 \mu\text{mol} \sim 1 \mu\text{mol}$)、循环数(36 ~ 45 个循环)等条件进行优化,通过比较 Ct 值、荧光强度来判定优化结果。

1.2.5 敏感性试验及线性标准曲线的绘制

将 *H. bilis* P17 质粒标准品母液进行 10 倍梯度稀释,取 $10^8 \sim 10^0 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 这 8 个梯度稀释度的质粒作为 qPCR 反应模板,每个稀释度做 3 个重复,同时以 pMD-19T 空质粒为阴性对照,ddH₂O 为空白对照。通过实时荧光定量 PCR 仪自动绘制线性标准曲线。

1.2.6 qPCR 检测方法特异性分析

同时使用小家鼠螺旋杆菌(*H. muridarum*)、啮齿类螺旋杆菌(*H. rodentium*)、肝螺旋杆菌(*H. hepatitis*)、盲肠螺旋杆菌(*H. typhlonius*)、鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌等细菌 DNA 作为模板进行 *H. bilis* qPCR 特异性检测,同时以 pMD-19T 空质粒为阴性对照,水作为空白对照,每个样品做 2 个重复。

1.2.7 qPCR 检测方法重复性分析

测定 5 个浓度梯度模板的 Ct 值,重复 5 次,通过计算 Ct 值的变异系数 CV 来评价检测方法的重复性。

1.2.8 *H. bilis* qPCR 检测方法的临床应用

用本研究建立的 qPCR 方法和普通 PCR 方法^[4]检测普通级别大鼠及野鼠的盲肠样品,并对比两种方法的检出率。

2 结果

2.1 pMD-HBP17 质粒的构建

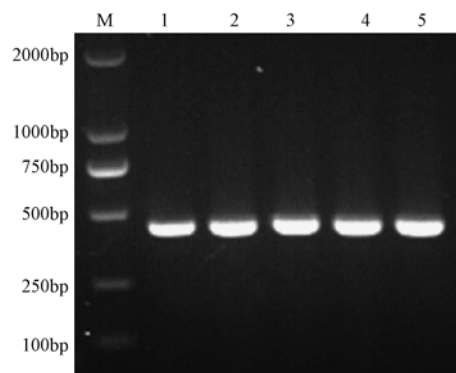
以胆汁螺旋杆菌的基因组 DNA 为模板,通过 PCR 扩增 *H. bilis* P17 基因全长 ORF435 bp,通过 TA 克隆制备重组质粒。重组质粒经过 PCR 鉴定阳性(图 1)。阳性菌株经测序鉴定与 NCBI 中 *H. bilis* P17 基因片段序列一致。

2.2 qPCR 反应体系的建立

通过 ABI7500 系统随机软件 SDS1.4 分析 qPCR 结果。得出最佳反应条件是每 20 μL 反应体系中加入 10 μL Premix Ex Taq, 0.2 μL ROX Reference DyeII,上下游引物各 0.2 μmol ,探针 0.1 μmol ,模板 2 μL 。ABI7500 反应程序为:95℃ 预变性 30 s 后进入 PCR 扩增阶段,95℃ 5 s,60℃ 34 s,同 40 个循环。其中 60℃ 34 s 为荧光收集阶段。

2.3 定量线性分析及敏感度检测

将 pMD-HBP17 质粒标准品进行 10 倍梯度稀释



注:M:DL2000DNA 分子质量标准;

1 ~ 5:pMD-HBP17 质粒阳性克隆菌落。

图 1 重组质粒 pMD-HBP17 的 PCR 鉴定

Note. DL2000 DNA Marker (M) and positive plasmid colony of pMD-HBP17 (1 ~ 5).

Fig.1 Result of PCR identification of the recombinant plasmid pMD-HBP17

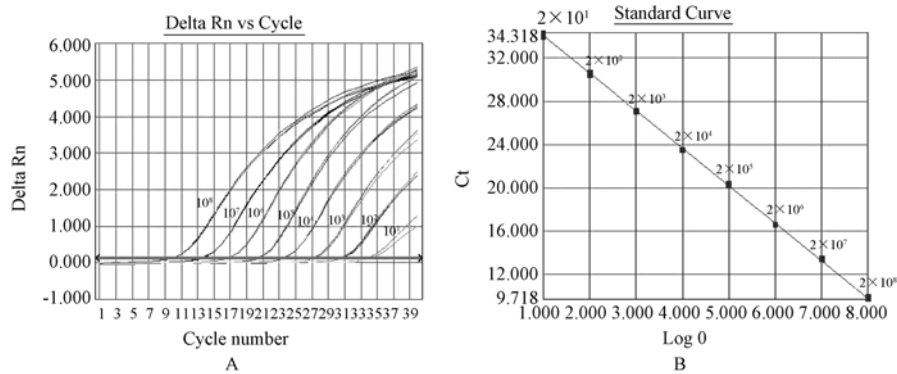
后,以 $2 \times 10^8 \sim 2 \times 10^0 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 稀释度作为模板进行 qPCR 反应,结果显示: $2 \times 10^8 \sim 2 \times 10^1 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 浓度之间,标准曲线线性较好,扩增曲线呈典型的 S 型(图 2),每组复孔间曲线拟合情况较好,相邻两组间起峰的循环数基本维持在 3 个循环左右,Ct 值落在 9 ~ 35 之间。标准曲线定量线性方程所得斜率为 -3.46,截距为 37.51,线性相关系数为 0.999。而 $2 \times 10^0 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 组因模板浓度较低,接近 TaqMan 探针的临界检测浓度,复孔重复性不如前面 8 组,误差偏大,线性相关性不好,故排除。因此,本研究中标准品定量 20 拷贝以上能表现较好线性和相关性,故本方法检测的灵敏度为 20 个拷贝。定性判定可认为 Ct 值大于 35 为阴性,Ct 值小于 35 为阳性。

2.4 qPCR 检测方法特异性分析

对小家鼠螺旋杆菌(*H. muridarum*)、啮齿类螺旋杆菌(*H. rodentium*)、肝螺旋杆菌(*H. hepatitis*)、盲肠螺旋杆菌(*H. typhlonius*)、鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌等进行检测,结果显示其他几种螺旋杆菌模板均未出现特异性扩增,对应扩增曲线均为平缓直线,而用 pMD-19T 空质粒作的阴性对照及水作的空白对照也均未出现特异性扩增,因此,该方法对胆汁螺旋杆菌核酸的检测是特异的(图 4)

2.5 qPCR 检测方法重复性分析

以 $2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^1 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 的模板重复测定 5 次,分别得到 5 个 Ct 值,计算 Ct 平均值、标准差和变异系数(表 2)。由表 2 可知,本方法检测重复性较好。



注:A:质粒标准品 qPCR 扩增荧光动力曲线;B: $2 \times 10^8 \sim 2 \times 10^1$ 拷贝的 pMD-HBP17 质粒标准品 10 倍倍比稀释的标准曲线。

图 2 pMD-HBP17 质粒标准品 qPCR 扩增荧光动力曲线及标准曲线

Note:A was fluorescence quantitative amplification plot of 10-fold serial dilution standard plasmid; B was standard curve obtained with serial dilution of the pMD-HBP17 standard plasmid from 2×10^8 copies/well to 2×10^1 copies/well.

Fig. 2 Real-time fluorescence quantitative amplification plot and standard curve of pMD-HBP17 standard plasmid

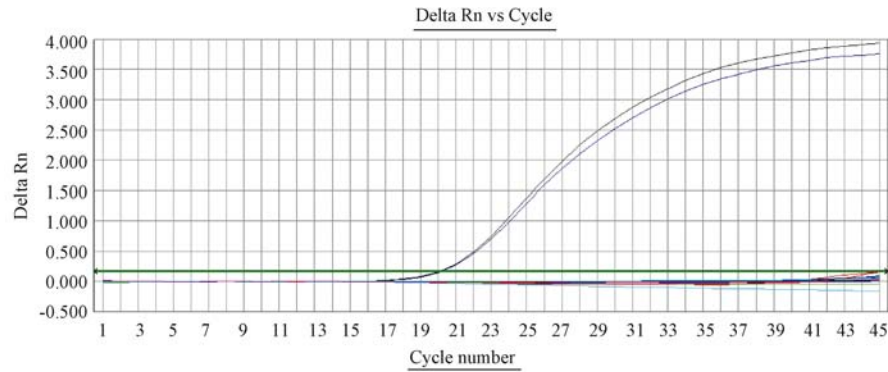


图 3 *H. bilis* qPCR 方法特异性检测结果

Fig. 3 The specificity evaluation of qPCR method

表 2 *H. bilis* qPCR 检测方法的重复性实验

Tab. 2 The repeatability evaluation of 10-fold serial dilution of pMD-HBP17 standard plasmid

模板 Template (Copies/well)	Ct1	Ct2	Ct3	Ct4	Ct5	Ct 平均值 (Ct mean values)	标准差 <i>s</i>	变异系 数 CV%
2×10^6	16.34	16.49	16.41	16.52	16.64	16.48	0.11	0.6%
2×10^5	20.21	20.26	20.14	20.39	20.48	20.29	0.14	0.6%
2×10^4	23.68	23.46	23.75	23.51	23.42	23.56	0.14	0.6%
2×10^3	27.12	27.15	27.24	27.39	27.19	27.21	0.11	0.3%
2×10^2	31.24	31.48	31.34	31.17	31.45	31.33	0.13	0.4%
2×10^1	35.05	34.98	35.12	35.07	35.18	35.08	0.08	0.2%

2.6 qPCR 检测方法的临床应用

对送检的 52 份 SD 大鼠盲肠样品和 25 份野鼠盲肠样品进行组织基因组提取后分别用 qPCR 方法和普通 PCR 方法检测样品中的胆汁螺杆菌,结果表

明,本研究建立的 qPCR 方法的检出率为 14.3%,而普通 PCR 方法的检出率为 7.8%,新建立的 qPCR 方法较普通 PCR 方法具有更高的检出率(表 3)。

表 3 qPCR 方法及普通 PCR 方法检测胆汁螺杆菌

Tab. 3 Detection of *Helicobacter bilis* by qPCR and PCR

试验方法 (methods)	qPCR		PCR	
	野鼠 (wild mice)	SD 大鼠 (SD rat)	野鼠 (wild mice)	SD 大鼠 (SD rat)
阳性样品 (positive sample)	3	8	1	5
检出率 (detection rate)	12.0%	15.4%	4.0%	9.6%
合计 (summation)	14.3%		7.8%	

3 讨论

啮齿动物螺杆菌为革兰氏阴性菌,生长要求苛刻,主要寄生于消化道,可导致肝胆疾病,并在肝炎发生中起促进作用,严重影响实验动物的质量^[5]。用携带啮齿类螺杆菌的实验动物进行相关疾病的发病机制、药效学研究、药品及保健品的安全性评估时,其试验结果将受到干扰^[6]。胆汁螺杆菌是一种典型而重要的螺杆菌,常以隐性感染形式普遍存在于大鼠、小鼠、沙鼠等啮齿动物的消化道中,与啮齿动物肝胆疾病、盲肠炎、结肠炎等的发生高度相关^[7-8]。研究指出,胆汁螺杆菌还与人类胆管癌、胆囊炎等肠道疾病的发生存在相关性,对人类具有潜在危害性^[9]。因此,螺杆菌在实验动物中的感染已经引起国内外研究者的高度重视,欧洲实验动物联盟已将其列为实验动物必须排除的病原菌,但我国因缺乏有效的检测方法,而尚未被列入实验动物质量国家标准,造成我国实验动物科研领域与国际水平的差距,进一步影响我国实验动物产业化,并对实验动物进出口带来不利影响^[10]。因此,建立一种简便、快速、高效、准确的检测啮齿类螺杆菌的方法对保证及提高实验动物质量至关重要。

在螺杆菌检测方法研究的早期,分离培养法与分子生物学方法因其可靠直接而成为螺杆菌诊断检测的首选方法,但因螺杆菌的生长条件苛刻,而阻碍了该检测方法的应用^[11]。随着分子生物学技术的发展,PCR 检测技术因高效、快速简便等优点而被广泛应用于检测螺杆菌。TaqMan 探针荧光定量 PCR 检测技术因其特异性好、灵敏度高及可定量等优点近年来被广泛应用于多种病原微生物的检测^[12]。本研究中利用 TaqMan 探针技术建立胆汁螺杆菌 qPCR 检测方法,可用于胆汁螺的快速检测及定量。

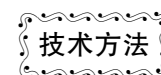
本研究通过构建包含 *H. bilis*P17 基因序列的 pMD-HBP17 质粒,作为 DNA 定量标准品,并对标准品进行倍比稀释以作为反应模板,验证该检测方法的灵敏性。实验结果表明模板浓度在 $10^8 - 10^1$ 拷贝范围内,其相应 Ct 值具有良好的线性相关性,相关系数为 0.999,理论上该检测方法的定量准确性

到达 20 拷贝。用 qPCR 方法和既有的普通 PCR 方法对 77 份临床样品进行检测,结果表明 qPCR 检测方法较普通 PCR 方法具有更高的敏感性和检出率。

参考文献:

- [1] Hodzic E, McKisic M, Feng S, *et al.* Evaluation of diagnostic methods for *Helicobacter bilis* infection in laboratory mice[J]. *Comp Med*, 2001, 51(5): 406-412.
- [2] Flahou B, Haesebrouck F, Smet A, *et al.* Gastric and enterohepatic non-*Helicobacter pylori* *Helicobacters* [J]. *Helicobacter*, 2013, 18 Suppl 1: 66-72.
- [3] Javed S, Mejias-Luque R, Kalali B, *et al.* *Helicobacter bilis* gamma-glutamyltranspeptidase enhances inflammatory stress response via oxidative stress in colon epithelial cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e73160.
- [4] Feng S, Ku K, Hodzic E, *et al.* Differential detection of five mouse-infecting *helicobacter* species by multiplex PCR[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12(4): 531-536.
- [5] Ding C, Feng J, Xie JY, *et al.* Epidemiological investigation of *Helicobacter* in laboratory rats and mice by PCR[J]. *Journal of Yangzhou University*, 2012, 33(2): 6-10.
- [6] Nirah HS, Dangler CA, Robert PM, *et al.* *Helicobacter bilis* *Helicobacter rodentium* co-infection associated with diarrhea in a colony of scid mice[J]. *Laboratory Animal Science*, 1998, 48(5): 455-459.
- [7] Zhang LF, Liu X, Li H. Isolation and Identification of Rodent *Helicobacters*[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2007, 15(3): 215-219.
- [8] Miller CL, Muthupalani S, Shen ZL, *et al.* Isolation of *Helicobacter* spp. from mice with rectal prolapses[J]. *Comp Med*, 2014, 64(3): 171-178.
- [9] Pandey M, Mishra RR, Dixit R, *et al.* *Helicobacter bilis* in human gallbladder cancer: results of a case-control study and a meta-analysis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2010, 11(2): 343-347.
- [10] 林祥梅. 实验动物与出入境检验检疫[J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21: 34-38.
- [11] Zheng Q, Bing F, Zheng M, *et al.* Identification of *Helicobacter hepaticus* firstly isolated in China from mice [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2009, 25(3): 210-213.
- [12] 王静, 张钰, 闵凡贵, 等. 猴免疫缺陷病毒(SIV)实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 09: 70-75

[修回日期]2015-08-18



树鼩粪便细菌分离培养与鉴定

刘丽君^{1,2}, 余柄廷³, 胡凝珠², 孙晓梅², 王 玮², 孙 静², 胡云章², 李建芳²

(1. 昆明医科大学, 昆明 650500; 2. 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所, 昆明 650118;
3. 河北大学生命学院, 河北 保定 071000)

【摘要】 目的 了解人工饲养树鼩粪便菌群多样性, 为树鼩的正常饲养繁殖和微生物质量控制标准化提供依据。**方法** 随机采集 10 份树鼩粪便样品, 利用有氧及厌氧培养基进行细菌分离培养, 提取细菌基因组 DNA 后 PCR 扩增 16S rRNA 基因并测序鉴定。**结果** 本实验从树鼩粪便样品中, 经有氧培养分离鉴定出 25 株、12 种细菌, 经厌氧培养分离鉴定出 25 株、10 种细菌, 包括变形杆菌属、肠球菌属、埃希菌属、志贺菌属、葡萄球菌属、气单胞菌属、拉恩氏菌属、拉乌尔菌属、微小杆菌属、链球菌属、明串珠菌属。**结论** 树鼩肠道好氧菌及厌氧菌具有丰富的种属多样性, 普通变形杆菌群、费格森埃希菌群和屎肠球菌群可能是树鼩肠道的主要寄生菌群。

【关键词】 树鼩; 粪便细菌; 有氧培养; 厌氧培养; 分离鉴定

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0064-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 010. 015

Isolation, culture and identification of bacterial strains from tree shrews feces

LIU Li-jun, YU Bing-ting, HU Ning-zhu, SUN Xiao-mei, WANG Wei, SUN Jing, HU Yun-zhang, LI Jian-fang

(1. Kunming Medical University, Kunming 650500, China; 2. Institute of Medical Biology, Chinese

Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China;

3. Hebei University, Hebei Baoding 071000, China)

【Abstract】 Objective Study the fecal flora diversity of the tree shrew, to provide a basis data of fecal bacteria of feeding the tree shrew. **Methods** Ten tree shrews were used in this study. The stools of the animals were respectively cultured with oxygen and without oxygen to isolate the bacterial. Then the PCR-amplified 16S rRNA of the bacterial was sequenced and analyzed. **Results** 25 bacterial strains belonging to ten bacterial species were isolated by anaerobic incubation, and 25 bacterial strains belonging to twelve bacterial species were isolated by aerobic incubation. *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia fergusonii*, *Enterococcus faecium*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*, *Rahnella aquatilis*, *Exiguobacterium aquaticum*, *Raoultella terrigena*, and *Escherichia coli* were identified in this study. **Conclusions** There is a fecal flora diversity of the tree shrew, and the *Proteus vulgaris*, *Escherichia fergusonii* and *Enterococcus faecium* may be the major parasitic flora.

【Key words】 Tree shrew; Faecal bacteria; Aerobic culture; Anaerobic culture; Isolation identification

树鼩 (*Tupaia belangeri*, tree shrew) 形态酷似松鼠, 是种生活在热带和亚热带地区的哺乳纲攀鼯类

的小型动物, 具有体型小, 繁殖能力强, 易驯养, 经济易得等优点。研究表明树鼩的许多分子和细胞

[基金项目] 国家科技支撑计划项目 (2014BAI01B01); 云南省社会发展新药专项 (2013BC011)。

[作者简介] 刘丽君 (1990 -), 女, 硕士生, 专业: 生物化学与分子生物学。

[通讯作者] 李建芳 (1982 -), 女, 助理研究员, E-mail: jianfangli@126. com。

结构近似于人类,新陈代谢与解剖结构比啮齿类更接近于非人灵长类动物,常用于替代或减少一些非人灵长类动物的使用。树鼩在肿瘤学、内分泌学、神经生物学、生殖生物学、免疫学等方面已有广泛和深入的研究,并对多种人类重要病毒易感,可作为重要人类病毒的动物模型^[1]。

但由于以往研究所用的树鼩多为野外捕获的动物,还没有实现树鼩标准化,使得有些结果判定出现困难,如在动物感染率、感染维持时间、感染指标检测等方面的稳定性和重复性存在不足,致使一些学者提出质疑,很大程度上影响了研究的进展^[2]。

普通级树鼩在人工繁育过程中,曾有病原微生物所致树鼩爆发腹泻少数致死的情况,因此对排便正常的树鼩,粪便中好氧及厌氧细菌的分离鉴定及分析,可为树鼩的正常饲养繁殖和微生物质量控制标准化提供依据,对树鼩的饲养繁殖和科学管理具有重要的现实意义^[3]。

1 材料和方法

1.1 动物

10 只健康来源于中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心人工繁育普通级种群,生产许可证号【SCXK(滇)2013-0001】,使用许可证【SYXK(滇)2013-0001】。动物饲养温度 22℃~25℃,湿度 40%~60%,每日明暗交替照明 12 h 每天分别给予自制蒸料和商品化膨化犬料各一次,饮用城市供应的自来水。

1.2 设备与材料

Forma 恒温培养箱; BIO-RAD 梯度 PCR 仪; 苏州净化设备有限公司 HT6029 型超净工作台; 其林贝尔仪器制造有限公司 QL-901 型漩涡混合器; 恒温摇床; 三菱密闭式厌氧培养盒; 三菱厌氧产气袋; 三菱厌氧指示剂; OXOID LB 和脑心浸出液培养基; Promega-Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 树鼩粪便的收集: 抓取并保定树鼩, 多数树鼩在抓取过程中因紧张而主动排出粪便, 对无粪便者通过轻轻按摩其腹部使其排便, 每只树鼩采集豌豆粒大小新鲜粪便标本。

1.3.2 粪便样品的混悬稀释

将粪便样品混悬到无菌生理盐水中后以 10 倍递增梯度稀释。

1.3.3 细菌分离培养

选取适合的稀释样品涂布 LB 琼脂平板和脑心浸出液琼脂平板, 分别做有氧和厌氧培养分离单菌落。

1.3.4 扩增 16SrDNA 片段

将分离到的单菌落接种到相应的液体培养基培养扩增, 用试剂盒抽提基因组 DNA, 用细菌 16SrRNA 的通用引物 27F 5'-AGAGTTTGATCATG GCTCAG-3' 和 1492R 5'-TACGTTACCTTGTTA CGACTT-3', PCR 扩增细菌 16SrDNA 片段。

1.3.5 载体构建

将纯化的 16SrDNA 片段构建到 pGEM-T 载体上, 转化细菌后筛选阳性克隆。

1.3.6 测序鉴定

将阳性克隆送到英潍捷基(上海)贸易有限公司做 DNA 测序。将得到的碱基序列输入 NCBI GenBank 做 blast 序列比对分析确定分离得到细菌的种属。

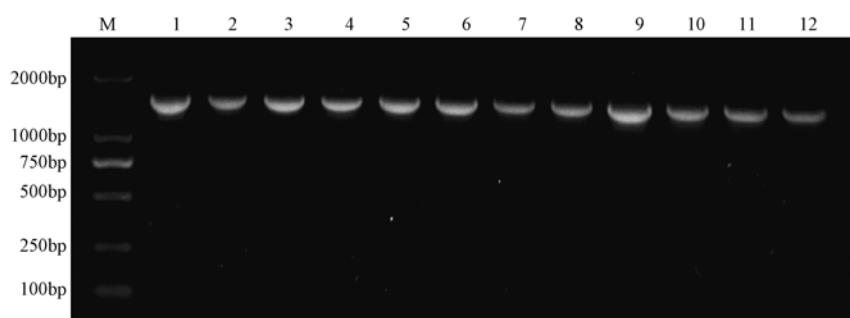
2 结果

2.1 细菌 16SrRNA 基因 PCR 扩增结果

本试验从 10 只无腹泻等症状的正常树鼩的粪便中, 有氧和厌氧培养分别分离鉴定出 25 株、12 种和 25 株、10 种细菌, 对分离菌株进行 16SrRNA 基因 PCR 扩增, 扩增产物进行 10g/L 琼脂糖凝胶电泳观察, 在 1500 bp 处均出现一条明亮的目的条带, 如图 1、图 2。将 PCR 产物送测序, 将测序结果与 NCBI GenBank 中参考菌株 16SrRNA, 基因核苷酸序列进行同源性分析比较, 根据不同属细菌 16SrRNA 基因同源性为 70%~90%, 而同一种内不同株间基因同源性大于 99% 的判定标准。有氧及厌氧培养分离到普通变形杆菌、粪肠球菌、费格森埃希菌、屎肠球菌、弗氏志贺菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、杀鲑气单胞菌、水生拉恩氏菌、索氏志贺氏菌、土生拉乌尔菌、巴黎链球菌、肠系膜明串珠菌、水生微小杆菌等与 NCBI GenBank 中相关参考菌株 16SrRNA 基因的核苷酸序列同源性均在 99%~100% 之间, 从而确定分离到的纯培养菌株的种属。

2.2 细菌总检出数及检出率

树鼩粪便经有氧和厌氧分离鉴定, 检出变形杆菌属、肠球菌属、埃希菌属、志贺菌属、葡萄球菌属、气单胞菌属、拉恩氏菌属、拉乌尔菌属、微小杆菌属、链球菌属、明串珠菌属, 包括普通变形杆菌、屎

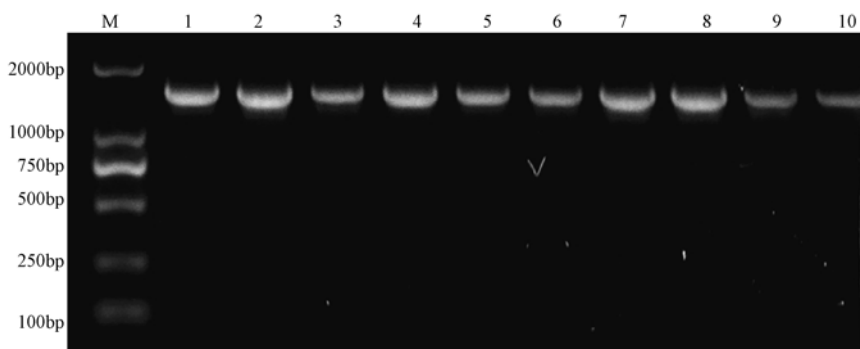


注: M. DNA 标准 DL2000; 1-12. 16S rRNA PCR 产物。

图 1 有氧培养分离细菌 16S rRNA PCR 扩增结果

Note: M. DNA Marker DL2000; 1-12. PCR products of 16S rRNA.

Fig. 1 PCR amplification of 16S rRNA which isolated bacterial strains by aerobic culture



注: M. DNA 标准 DL2000; 1-10. 16S rRNA PCR 产物。

图 2 厌氧培养分离细菌 16S rRNA PCR 扩增结果

Note: M. DNA Marker DL2000; 1-10. PCR products of 16S rRNA.

Fig. 2 PCR amplification of 16S rRNA which isolated bacterial strains by anaerobic culture

肠球菌、费格森埃希菌、弗氏志贺菌、粪肠球菌、索氏志贺氏菌、土生拉乌尔菌、巴黎链球菌、水生拉恩氏菌、水生微小杆菌、肠系膜明串珠菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、杀鲑气单胞菌共 14 种细菌, 总检出数及检出率见表 1。其中普通变形杆菌、屎肠球菌、费格森埃希菌、弗氏志贺菌检出率达到 50%。

2.2.1 有氧培养分离鉴定结果

树鼩粪便经有氧培养分离鉴定得到的细菌主要有变形杆菌属、肠球菌属、埃希菌属、志贺菌属、葡萄球菌属、气单胞菌属、拉恩氏菌属、拉乌尔菌属、微小杆菌属, 其中普通变形杆菌 5 株、粪肠球菌 4 株、费格森埃希菌 3 株、屎肠球菌 3 株、弗氏志贺菌 2 株、索氏志贺氏菌 2 株、大肠埃希菌 1 株、金黄色葡萄球菌 1 株、杀鲑气单胞菌 1 株、水生拉恩氏菌 1 株、土生拉乌尔菌 1 株、水生微小杆菌 1 株。

2.2.2 厌氧培养分离鉴定结果

树鼩粪便经厌氧分离鉴定得到的细菌主要有埃希菌属、志贺菌属、链球菌属、肠球菌属、变形杆菌属、气单胞菌属、明串珠菌属、拉乌尔菌属, 其中费格森埃希菌 5 株、屎肠球菌 4 株、弗氏志贺菌 3 株、索氏志贺氏菌 3 株、巴黎链球菌 2 株、粪肠球菌 2 株、普通变形杆菌 2 株、土生拉乌尔菌 2 株、肠系膜明串珠菌 1 株、杀鲑气单胞菌 1 株。

3 讨论

肠道正常菌群是经过长期历史进化在宿主内形成的定植微生物群落, 他们对宿主是有益的和必需的, 在正常状态下是无害的。种类不同的肠道菌群按一定的比例组合, 各菌间互相拮抗互相协同, 在质和量上形成一种动态生物平衡。实验结果显示正常树鼩粪便菌群的多样性, 间接说明树鼩常态肠道寄生菌群的多样性。

表 1 培养细菌鉴定结果及检出数与检出率

Tab. 1 Identification results and detection number and detection rate of isolated bacterial strains.

细菌编号 Number	细菌名称 Names of bacteria	检出率/% Detection rate
1	普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	6/10(60.00)
2	尿肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	6/10(60.00)
3	费格森埃希菌 <i>Escherichia fergusonii</i>	6/10(60.00)
4	弗氏志贺菌 <i>Shigella flexneri</i>	5/10(50.00)
5	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	4/10(40.00)
6	索氏志贺氏菌 <i>Shigella sonnei</i>	4/10(40.00)
7	土生拉乌尔菌 <i>Raoultella terrigena</i>	2/10(20.00)
8	巴黎链球菌 <i>Streptococcus lutetiensis</i>	2/10(20.00)
9	水生拉恩氏菌 <i>Rahnella aquatilis</i>	1/10(10.00)
10	水生微小杆菌 <i>Exiguobacterium aquaticum</i>	1/10(10.00)
11	肠系膜明串珠菌 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1/10(10.00)
12	大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	1/10(10.00)
13	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	1/10(10.00)
14	杀鲑气单胞菌 <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	1/10(10.00)

在 10 只正常排便树鼩的粪便样品中,我们通过有氧培养和厌氧培养分离到 50 株细菌,经过 16SrRNA 的序列比对分析鉴定分离到细菌包含了变形杆菌属、肠球菌属、埃希菌属、志贺菌属、葡萄球菌属、气单胞菌属、拉恩氏菌属、拉乌尔菌属、微小杆菌属、链球菌属、明串珠菌属共 11 个属,14 种细菌。其中分离到的费格森埃希菌、弗氏志贺菌、粪肠球菌、普通变形杆菌、尿肠球菌、索氏志贺氏菌、土生拉乌尔菌、杀鲑气单胞菌等为兼性厌氧菌,在有氧和厌氧培养过程中均能分离得到。

根据分离培养结果,普通变形杆菌群、费格森埃希菌群和尿肠球菌群的检出比例均达到 60%,表明普通变形杆菌群、费格森埃希菌群和尿肠球菌群为树鼩优势菌群,且可能是树鼩肠道的主要寄生菌群。这些优势菌群与树鼩的饮食习惯、生活习性和生理代谢等密切相关。

肠球菌属的尿肠球菌和粪肠球菌是人和动物肠道内主要正常菌群。粪肠球菌其能产生天然抗生素,有利于机体健康同时还能产生细菌素等抑菌物质,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌等致病菌具有良好的抑制作用,改善肠道微环境^[4-5]。且有报道普通变形杆菌、费格森埃希菌等属于条件致病菌,可存在于健康动物体内,当机体免疫力降低时,极易引起疾病的发生^[6-8]。

本实验对粪便样品进行完全厌氧培养,另外得到肠系膜明串珠菌和巴黎链球菌,已广泛应用于风味剂、血浆代用品的肠系膜明串珠菌,证实其能产生大量有机酸、醇类及各种氨基酸等代谢物,能拮抗致病菌,促进肠道益生菌的生长^[9]。巴黎链球菌

又称婴儿链球菌结肠亚种,是牛链球菌的一种。牛链球菌与结肠疾病有关^[10]。到目前为止国内外报道的文献中,对于巴黎链球菌的研究非常稀少,而这种菌株只从少数的临床血、尿样品以及非临床的粪便样品中分离到,因此该菌株的生物学特性尚不清楚,有待开展进一步的研究^[11-12]。

所有树鼩在采样时虽然粪便色泽有所差异,但数周来均无拉稀腹泻症状,大便正常,而且外观健康,精神活动状况良好,没有治疗用药情况。因此,所检出的普通变形杆菌、费格森埃希菌、志贺氏菌、杀鲑气单胞菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌等条件致病菌种^[5-8,13],可以初步判断应为常态寄生菌种,这些条件致病菌的检测监控对于实验树鼩的健康管理、质量控制、日常饲养管理、疾病预防工作和将来生物净化树鼩种群的建立和生产提供指导具有一定的意义。

邢进、高家红等^[14-15]关于树鼩肠道细菌的研究显示,大肠杆菌菌群、葡萄球菌菌群及链球菌菌群的检出率较高,与本实验结果有较大差异。分析可能原因为本实验检测样品为树鼩的粪便,与活体树鼩的肛门内取样或剖杀树鼩采集回盲部内容物的采样不同,且本实验增加严格厌氧培养,因而可分离获得一些不常检出的厌氧菌。

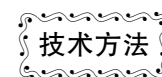
本实验以温和方式采集树鼩粪便样品,可减少树鼩的惊吓及避免不必要的损伤。由于 16SrRNA 序列的保守性和存在的普遍性,以及核酸序列本身的稳定性、序列分析的重现性极高,应用 16SrRNA 作为分子指标,分类鉴定细菌具有快速、微量、准确、简便的特点。但本实验采用的分离培养方式是

传统的细菌鉴定方法,然而在人类微生物群系研究中发现,根据部位的不同,在人体中约有 20% ~ 60% 的细菌不能培养^[16]。且有些细菌在粪便中可能丰度较低,或培养时间较长易遗漏,不易通过传统方法分离,提示我们可利用 454 焦磷酸测序技术等对这些微生物进行高通量测序鉴定^[17],以便更加全面的检测树鼩粪便的微生物群系,为树鼩的正常饲养繁殖和微生物质量控制标准化提供依据。

参考文献:

- [1] 沈培清,郑红,刘汝文,等. 中国树鼩实验动物物化研究进展和展望[J]. 动物学研究,2011,01:109-114.
- [2] 黄晓燕,徐娟,孙晓梅,等. 树鼩在人类疾病动物模型中应用研究进展[J]. 实验动物科学,2013,02:59-64.
- [3] 全品芬,年朝琴,彭超,等. 致树鼩腹泻的奇异变形杆菌分离鉴定及药敏试验[J]. 实验动物科学,2014,01:41-44.
- [4] Malik R K, Montecalvo M A, Reale M R, *et al.* Epidemiology and control of vancomycin-resistant enterococci in a regional neonatal intensive care unit. [J]. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 1999, 18(4):352-356.
- [5] Hugas M, Garriga M, Aymerich M T. Functionality of enterococci in meat products[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 88(2-3):223-233.
- [6] 陶元勇,孙铭艳,李建花,等. 弗格森埃希菌的生物学特征研究与 16SrRNA 检测[J]. 中国病原生物学杂志,2013,(3):229-232.
- [7] Sullivan A, T02rblom H, Lindberg G, *et al.* The micro-flora of the small bowel in health and disease[J]. *Anaerobe*, 2003, 9(1):11-14.
- [8] Norin E. How normal is a "normal" flora in animal or man [J]? *Anaerobe*, 2011, 17(6):431-432.
- [9] 李文斌,宋敏丽,高荣琨. 肠膜明串珠菌的研究和应用进展[J]. 食品工程,2006,(4):3-4.
- [10] 李仲兴. 牛链球菌群感染的研究进展[J]. 临床荟萃,2006,21(24):1802-1804.
- [11] Vanhoutte T, Huys G, Brandt E, *et al.* Molecular monitoring and characterization of the faecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2005, 249(1):65-71.
- [12] 董银苹,崔生辉,李凤琴,等. 乳酸杆菌及嗜热链球菌的种水平鉴定——16SrRNA 基因 PCR 扩增及序列分析[J]. 卫生研究,2010,39(4):454-458.
- [13] 林如涛,周作勇,王小林,等. 羊源杀鲑气单胞菌 16SrRNA 基因的克隆测序及分析[J]. 西南大学学报:自然科学版,2011,33(8):46-51.
- [14] 邢进,冯育芳,付瑞,等. 野生树鼩可培养细菌和真菌携带情况的调查[J]. 实验动物科学,2012,03:34-38.
- [15] 高家红,江勤芳,罗志武,等. 树鼩正常肠道细菌的培养分离鉴定及其药敏试验研究[J]. 中国比较医学杂志,2009,12:24-26+34.
- [16] Peterson J, Garges S, Giovanni M, *et al.* The NIH Human Microbiome Project [J]. *Genome Res.* 2009, 19(12):2317-2323.
- [17] 陈秀,张晓君,李沁元,等. 454 焦磷酸测序分析几种哺乳动物粪便细菌多样性[J]. 微生物学报,2015,06:683-690.

[修回日期]2015-08-31



光纤引导直视下啮齿目动物气管插管的应用

魏稼黎, 李 李, 刘 镭

(中南大学湘雅二医院麻醉科, 长沙 410000)

【摘要】 目的 建立一种给啮齿目动物进行气管插管的简单方法, 并可使用这种方法建立各种需要进行气管插管的动物模型。**方法** 选用昆明雄性小鼠 60 只, 咪达唑仑和氯胺酮麻醉后, 用光纤穿过 22GA 动脉穿刺针套管, 经口腔引导置入气管, 并连接呼吸机, 确认置入气管。**结果** 光纤介导 60 只小鼠均成功置入气管导管, 未出现咽喉部粘膜损伤出血, 无声门水肿, 7d 后解剖未出现气管狭窄等并发症。**结论** 光纤介导可视下小鼠气管插管成功率高, 相关并发症发生率低。

【关键词】 光纤; 小鼠; 气管插管

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0069-02

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 010. 016

A method of tracheal intubation in mice mediated by optical fiber

WEI Jia-li, LI Li, LIU Lei

(The Second Xiangya Hospital, Changsha 410000, China)

【Abstract】 Objective To establish a stable and simple method of tracheal intubation in rodents and to establish various models that needs of endotracheal intubation. **Method** Sixty Kunming mice anesthetized by midazolam and ketamin, were intubated by 22 GA arterial puncture needle casing with optical fiber. Then connect the casing and ventilator and make sure the casing has been into the trachea. **Result** 60 mice were all successfully intubated by casing with optical fiber with no throat mucosa bleeding, edema. Glottis and trachea don't present complications such as tracheal stenosis 7d later. **Conclusion** Fiber mediated intubation is a simple and useful method. It has a success rate with low incidence of complications.

【Key words】 Optical fiber; Intubation; Mice

动物在我国医学实验研究中, 动物模型是必不可少的一部分, 是研究各种疾病发病机制、寻找预防治疗方案、研究药理学机制等医学科研工作中必要环节, 构建合适的动物模型是医学研究不可缺少的。许多的实验动物模型需要进行气管插管, 如心肌梗死模型^[1]、需要开胸手术的模型^[2]、肺相关的动物模型^[3]等。小鼠由于繁殖能力强、饲养管理方便、成本低廉等优点, 成为许多动物实验的首选对象, 但小鼠口腔可操作空间小, 解剖结构复杂, 从而导致给小鼠插管成为构建动物模型中一个非常困难的步骤^[4]。现行的许多小鼠插管方法成功率不高、对小鼠损伤比较大、或者所需器材价格高昂。

所以寻找更为简便廉价的小鼠插管方法则显得很有必要。

1 材料和方法

1.1 材料

昆明小鼠 60 只, 雄性, 体重 30 ~ 40 g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供【SCXK(湘)2014-0003】, 中南大学湘雅二医院进行试验【SYXK(湘)2012-003】。自制小鼠插管台; 16W LED 光纤光源器及直径 0.5 mm PMMA 光纤(千华光纤照明, 广东中山)自组装光源(彩插 8 图 1); 22GA 动脉穿刺针。

1.2 方法

氯胺酮 60 mg/kg 复合咪达唑仑 8 mg/kg 腹腔注射麻醉小鼠,当小鼠达到麻醉深度捏尾反射消失^[5],即可开始气管插管。立起小鼠插管台,将小鼠门齿悬挂与放入自制小鼠插管台上端的细绳,镊子拉出小鼠舌头后,用左手将小鼠舌头往腹侧拉出,右手持套有动脉穿刺针套管的光纤经口腔插入,如彩插 8 图 2 所示。在光纤的照射下,可以清晰地看见声门随呼吸一张一闭,如彩插 8 图 3 所示。直视下将光纤置入气管,然后在光纤引导下,插入动脉穿刺针套管,拔出光纤,接上呼吸机观察小鼠胸廓起伏,判断插管是否成功。插管过程详见附件视频。

2 结果

本小鼠插管方法是利用光纤的光源进入小鼠口腔,并引导导管在直视下进行气管插管。我们对 60 只小鼠使用这种方法进行插管,并维持机械通气 30 min,其中 55 只小鼠一次性插管成功,5 只小鼠第二次插管成功,维持通气 30 min 小鼠各生命体征平稳,胸廓起伏均匀,插管术后 7 d 进行解剖,60 只小鼠声门无水肿,气管无狭窄。对解剖所得气管及其周围组织进行切片行 HE 染色,均无疤痕组织形成,无明显炎性细胞浸润,如封 3 图 4。

3 讨论

现行小鼠的插管方法主要有颈前做切口暴露气管然后经口腔插管、借用经颈前的外置光源经口腔插管^[4],但这些方法对小鼠损伤较大,或所需设备较复

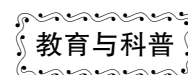
杂。我们实验室一些小鼠模型需要进行气管插管,所以我们摸索了这种小鼠插管方法。其优点在于:所需设备简易,光纤光源器以及塑料光纤来源方便,价格低廉;插管方法简单,经短暂训练即可熟练掌握;进入小鼠口腔的仅仅只有细光纤和导管,插管后对小鼠口腔、声门、气管损伤小,并发症少,所以对小鼠的损伤可以降低到最低;光纤自带光源进入口腔后能够清楚的显露声门,直视下插管成功率高。

综上所述,光纤介导可视下小鼠气管插管成功率高,损伤小,设备简单便宜,是一种具有推广应用的有价值的气管插管方法。

参考文献:

- [1] Wei Y, Yu LM, Pan L, *et al.* Application of an improved tracheal intubation method during the preparation of myocardial infarction model in the mouse[J]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 2011,27;380-3.
- [2] Rendell VR, Giamberardino C, Li J, *et al.* Complete thymectomy in adult rats with non-invasive endotracheal intubation[J]. *J Vis Exp*, 2014.
- [3] Lawrenz MB, Fodah RA, Gutierrez MG, *et al.* Intubation-mediated intratracheal (IMIT) instillation: a noninvasive, lung-specific delivery system[J]. *J Vis Exp*, 2014:e52261.
- [4] 张文超,汪赛赢,欧阳文. 吸入麻醉诱导下大鼠气管插管的应用研究[J]. *现代医药卫生*, 2010;2401-2402.
- [5] Gargiulo S, Greco A, Gramanzini M, *et al.* Mice anesthesia, analgesia, and care, Part I: anesthetic considerations in preclinical research[J]. *ILAR J*, 2012,53:E55-69.

[修回日期]2015-08-18



SAMHD1 限制 HIV/SIV 病毒复制功能研究的最新进展

彭灵娟, 丛 喆, 魏 强

(北京协和医学院比较医学中心, 中国医学科学院医学实验动物研究所, 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)

【摘要】 SAMHD1 是宿主限制性天然免疫分子, 主要在髓系细胞及静息 CD4⁺T 细胞中表达, 通过降低胞内 dNTP 水平限制 HIV-1 的复制和感染。近来研究发现 SAMHD1 还能够促进 HIV/SIV 病毒的基因重组、降解病毒基因组 RNA 以及抑制病毒在细胞间的传播, 在病毒的感染、复制、包装、传播等整个生命过程中都发挥着一定的作用。目前这一天然抗病毒蛋白分子已经成为 HIV 研究领域的新热点, 本文将就 SAMHD1 抗 HIV 病毒研究的最新进展做一综述。

【关键词】 SAMHD1; HIV-1; Vpx

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0071-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.010.017

The updated research progress of SAMHD1 on the restriction of HIV/SIV replication

PENG Ling-juan, CONG Zhe, WEI Qiang

(Comparative Medicine Center, Peking Union College(PUMC)&Institute of Medical Laboratory Animal Science,
Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine,
Ministry of Health; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State administration of Traditional
Chinese medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 The host protein SAMHD1 has been identified as the first mammalian deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase (dNTPase), which blocks the infection of HIV-1 in non-cycling immune cells. SAMHD1 protein is highly expressed in human myeloid-lineage cells and resting CD4⁺T lymphocytes, which restricts HIV-1 replication by hydrolyzing the cellular dNTPs, thus inhibiting reverse transcription and viral complementary DNA (cDNA) synthesis. Recent studies have revealed that SAMHD1 plays an important role in virus whole life by promoting HIV-1 genome recombination, degenerating viral genome RNA and restricting virus transmission between cells. In this review, these progress on SAMHD1 research are summarized and the mechanisms by which SAMHD1 mediates retroviral restriction are analyzed.

【Key words】 SAMHD1; HIV-1; Vpx

SAMHD1 是近年来新发现的抗艾滋病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 的天然蛋白质分子, 与 APOBEC3G、Trim5 α 、BST-2 或 cyclophilin 一样都是固有免疫系统的一部分。人的 SAMHD1

基因位于 20 号染色体, 编码 626 个氨基酸, 蛋白质的分子量为 72.2 $\times 10^3$ ^[1], 最初在人树突细胞中被发现。它包括 SAM (sterile alpha motif) 和 HD (histidine-aspartic) 两个结构域。SAM 结构域, 包含

【基金项目】 国家十二五科技重大专项课题 (2013ZX10004608-003 和 2012ZX10004501-001)。

【作者简介】 彭灵娟, 女, 硕士生, 从事实验动物病毒学研究工作。

【通讯作者】 魏强, 教授, 博士生导师, 研究方向: 实验动物病毒学。E-mail: weiqiang0430@sohu.com。

45 ~ 110 位氨基酸,参与蛋白与蛋白、蛋白与核酸之间的相互作用,具有信号转导和转录调节的功能;HD 结构域,包含 164 ~ 319 位氨基酸,含有两个组氨酸和天冬氨酸,具有核酸酶、dGTP 三磷酸酶、磷酸酶或磷酸二酯酶等活性^[2-3]。早期研究表明,SAMHD1 蛋白作为限制因子,在髓系树突细胞(myeloid derived dendritic cells, MDDCs)、巨噬细胞和 CD4⁺ 静息 T 细胞中,发挥 dNTPase 功能,通过降低胞内 dNTP 水平,阻止 HIV-1 病毒早期复制^[4-5]。除此以外,最新研究发现,SAMHD1 蛋白在 HIV 生命过程中多个重要环节都会发挥一定作用,本文将就这方面的研究进展作简要综述。

1 SAMHD1 具有磷酸水解酶活性,通过降低 dNTP 水平来限制 HIV-1 的复制、促进病毒的基因重组

人们普遍认为在髓系细胞和静息 CD4⁺ T 细胞中,SAMHD1 通过发挥磷酸水解酶作用,降低胞内的 dNTP 水平,从而达到限制 HIV-1 基因组的反转录,抑制感染的作用^[4-5]。不只在人的细胞,Zhang R 在小鼠的脾、淋巴结、胸腺和肺都发现高表达的 SAMHD1 蛋白,Rehwinkel 和 Behrendt 在 SAMHD1 缺陷小鼠的纯合体模型中也发现,用 HIV-1 假病毒感染缺陷鼠或鼠的细胞时,HIV-1 假病毒的感染具有 dNTP 依赖性,随 dNTP 水平增加其反转录水平也逐渐增加,SAMHD1 蛋白在体内具有类似的抵御 HIV-1 的作用,这一结论与体外实验研究结果是一致的^[6-8]。当 siRNA 沉默小鼠骨髓来源的巨噬细胞后,能显著增加 HIV-1 的感染水平。当 shRNA 沉默了小鼠的单核细胞系 RAW264.7,同样增加了胞内 dNTP 水平,也增强了 HIV-1 病毒基因组的复制以及鼠白血病病毒的易感性^[9]。

低水平的 dNTP 可以促进病毒基因组反转录的暂停和降解 RNA 模板,除了限制 HIV-1 的感染和复制外,还可以促进链转移的发生进而导致病毒的基因重组^[10-11]。基因重组是 HIV-1 多态性不断增加的重要进化机制。重组发生在病毒基因组的反转录过程中,通过链转移来实现。两个病毒 RNA 之间的同源区域重组需要 DNA 的合成和降解 RNA 模板^[12]。新的重组病毒可能具有传播优势,从而成为流行重组形式(circulating recombinant forms, CRFs)。全世界现已发现 43 种 CRFs,此数量还会不断增加。HIV-1 基因重组将有利于病毒复制和传播联合起来,使病毒能更快地逃避药物选择和宿主

免疫压力。一些研究表明,HIV-1 在每一个复制周期能够大约重组 2 到 3 次,远远高于在其他逆转录病毒中观察到的水平^[13-14]。基因重组在 HIV-1 的分子进化、适应宿主和逃避药物治疗等方面都是不可或缺的部分。

两种病毒 RNA 的同源重组需要 DNA 的合成和 RNA 模板的降解,在这个过程中,反转录的暂停直接增加链转移的频率和重组的发生^[15-16]。事实上,艾滋病毒反转录的暂停导致更高频率的链转移。在单核来源的巨噬细胞(monocyte-derived macrophages, MDMs)中 SAMHD1 发挥 dNTPase 活性,减少反转录底物,限制 HIV-1 的复制。MDMs 与激活的 CD4⁺ T 细胞相比,HIV-1 链转移频率是后者的两倍^[17]。转染 Vpx 后,随着 SAMHD1 蛋白被降解,胞内的 dNTP 水平升高,MDMs 中 HIV-1 链转移效率随之降低。当 SAMHD1 的 shRNA 转染到细胞 THP1, HIV-1 模板的转换效率降低了两倍。由于 HIV-1 不能编码 Vpx 蛋白,它可能比 HIV-2 和 SIVsm 病毒进行更频繁的基因重组,这也可能是 HIV-1 更流行的一个重要原因。

2 SAMHD1 具有核酸酶活性,通过降解病毒 RNA 来限制 HIV-1 的复制

虽然一直以来,人们认为 SAMHD1 通过降低 dNTP 水平来限制 HIV-1 的复制,然而,也有学者发现,磷酸化的 SAMHD1 限制 HIV-1 感染,并没有同时引起胞内 dNTP 水平的改变^[18]。由此,人们开始注意到,dNTPase 活性可能不是唯一作用机制。此前 Beloglazova N^[19]发现 SAMHD1 有降解单链 DNA,单链 RNA,以及 DNA 和 RNA 混合物中的 DNA 等功能。在 AGS 综合症研究中,Jeongmin Ryoo 利用点突变分别构建了只具有 RNase 活性、只具有 dNTPase 活性和两种酶活性都缺陷的三种突变体。分别转染不表达 SAMHD1 的 U937 细胞后,发现只具有 dNTPase 的活性的 SAMHD1 降低了细胞内的 dNTP 水平,但不能限制 HIV-1 的感染;两种酶活性都缺失的 SAMHD1 不能降低细胞内的 dNTP 水平和限制 HIV-1 的感染;只有具有 RNase 活性 SAMHD1 能限制 HIV-1 感染,抑制病毒早期和晚期反转录 cDNA 产物表达水平。并且在人的单核巨噬细胞和静息的 CD4⁺ T 细胞中,转染 siRNA 沉默 SAMHD1 基因后,HIV-1 的 RNA 的稳定性增加了 2 ~ 4 倍。由此看来,RNase 活性是 SAMHD1 限制 HIV-1 必要的功能之一^[20]。

之前的研究发现 SAMHD1 作为 HIV-1 限制因子,其磷酸水解酶活性具有 dGTP 依赖性,dGTP 既能调节 SAMHD1 磷酸水解酶活性,还可以作为 RNase 的底物^[21-22]。SAMHD1 具有双重酶活性,这两种酶活性不同时发挥作用,但都依赖于 dGTP 水平。结合之前的研究有学者推测,当 dGTP 水平低时,SAMHD1 以单体或二聚体形式存在,具有 RNase 活性,没有 dNTPase 活性,通过裂解 RNA 来限制 HIV-1;当 dNTP 水平高时,SAMHD1 四聚体化,具有 dNTPase 活性,没有 RNase 活性,通过降解 dNTP 来限制 HIV-1。这就可以解释:不管是在不分裂的细胞中如树突细胞和巨噬细胞中低水平 dNTP,还是在含高水平的 dNTP 增殖细胞中,SAMHD1 都可以发挥限制 HIV-1 的功能^[4-5,23-24]。

3 Vpx 与 SAMHD1 的相互作用,通过降解 SAMHD1 促进病毒在细胞间传播

研究发现,HIV-2 和一些 SIV 编码的 Vpx 蛋白,可以通过加载 SAMHD1 到 CRL4^{DCAF1}E3 泛素连接酶上诱导 SAMHD1 蛋白酶体降解,通过降解 SAMHD1 促进 HIV-1 反转录产物 cDNA 的积累,明显促进人的单核细胞、及其来源的树突细胞和巨噬细胞的 HIV-1 的感染^[5,18,25]。在其他 SAMHD1 限制感染的细胞,如星形胶质细胞中,Vpx 也能发挥降解 SAMHD1 功能,促进这些细胞的感染^[26-27]。

Vpx 降解 SAMHD1 作用还影响到病毒在细胞间的传播。早在 2004 年,科学家就发现 HIV 在细胞间的转移可通过感染细胞与正常细胞间形成病毒突触发生,但他们无法了解这一过程在病毒扩散中所处的地位^[28]。包括 HIV-1 病毒通过粘膜表面进入机体后,传播到淋巴组织,造成免疫系统的全身性感染,这种病毒早期传播的机制也不是十分清楚。新的研究显示,HIV 可通过在细胞间直接转移来规避识别。经由病毒突触形成的 T 细胞-T 细胞间直接转移,是 HIV 病毒感染的一个高效途径,甚至也许是最主要的传播模式^[29-30]。在粘膜途径感染过程中,HIV-1 病毒从被感染的巨噬细胞和树突细胞传播到 T 细胞也都被证明是可以通过病毒突触完成的^[30-31]。这也许能解释为什么游离的 HIV-1 病毒很难感染树突状细胞,但当感染的淋巴细胞与 MDDCs 混合培养后,2~3 d 就能检测到 HIV-1 病毒的 gag 蛋白的表达。如果非复制 SIV-Vpx 或 siSAMHD1 处理细胞后,MDDC 感染后的病毒产物表达量更是明显上升^[32]。可见,病毒学突触在病毒

细胞间传播过程中发挥重要作用,Vpx 通过降解 SAMHD1 促进了病毒通过这种途径的传播。

综上所述,在 Vpx 存在的情况下,无论是游离病毒还是通过细胞间病毒突触的传播,HIV-1 都能在 MDDC 内有效复制。可见 HIV-1 不能有效感染 MDDC 是由于病毒缺少 Vpx 样粒子。然而这却不能解释自身携带 Vpx 蛋白的 HIV-2 为什么不能感染 MDDC 细胞。研究发现,HIV-2 病毒感染 MDDC,引起细胞内 SAMHD1 基因的下调,却没有病毒感染的发生,感染的限制应该是发生在病毒进入阶段,即 HIV-2 病毒在进入细胞时存在缺陷,阻止了病毒与胞膜融合以及 SAMHD1 限制性反转录的发生。因此即使在 Vpx 存在的情况下,病毒 DNA 也不能有效合成^[33]。对于此种现象,研究认为,在 HIV 病毒感染过程中,DC 的主要作用是进行抗原提呈,激发 B 和 T 淋巴细胞介导的抗病毒免疫反应,而不是自身的复制性感染,DC 细胞通过体内高水平的 SAMHD1 来实现这一目的^[34]。一旦 DC 细胞出现可复制性感染,会引发机体产生强烈的 I 型 IFN 应答反应^[35]。HIV 病毒为了避免机体的这种免疫反应,在进化过程中也会做出相应的改变,HIV-1 病毒 Vpx 蛋白的丢失和 HIV-2 病毒进入缺陷看来都是这种改变的结果^[33]。

4 结束语

作为天然免疫蛋白,SAMHD1 在免疫系统中发挥着重要作用,在限制 HIV-1 的感染、复制、细胞间传播以及促进病毒基因重组中起到重要作用。深入研究其机制,将有可能为抗艾滋病药物的研究提供新的线索和思路。

参考文献:

- [1] Welbourn S, Miyaqi E, White TE, *et al.* Identification and characterization of naturally occurring splice variants of SAMHD1 [J]. *Retrovirology*, 2012, 9: 86.
- [2] Crow YJ, JH Livingston. Aicardi - Goutieres syndrome: an important Mendelian mimic of congenital infection [J]. *Dev Med Child Neurol*, 2008, 50(6): 410-416.
- [3] 李佩璐,陈倩倩,张弛宇. 髓系单核细胞来源的 HIV-1 限制因子-SAMHD1[J]. *动物学研究*, 2012,33 (5):537-541.
- [4] Baldauf HM, Pan X, Erikson E, *et al.* SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+)T cells [J]. *Nat Med*, 2012, 18(11): 1682-1687.
- [5] Laguette N, Sobhan B, Casartelli N, *et al.* SAMHD1 is the dendritic - and myeloid - cell specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx [J]. *Nature*, 2011, 474(7353): 654-657.

- [6] Wu L. SAMHD1 knockout mice; modeling retrovirus restriction in vivo [J]. *Retrovirology*, 2013, 10:142.
- [7] Rehwinkel J, Maelfait J, Bridgeman A, *et al.* SAMHD1-dependent retroviral control and escape in mice [J]. *EMBO J*, 2013, 32(18): 2454–2462.
- [8] Behrendt R, Schuman T, Gerbaulet A, *et al.* Mouse SAMHD1 has antiretroviral activity and suppresses a spontaneous cell-intrinsic antiviral response [J]. *Cell Rep*, 2013, 4(4): 689–696.
- [9] Zhang R, Bloch N, Nguyen LA, *et al.* SAMHD1 Restricts HIV-1 Replication and Regulates Interferon Production in Mouse Myeloid Cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89558.
- [10] Gao L, Hanson MN, Balakrishnan M, *et al.* Apparent defects in processive DNA synthesis, strand transfer, and primer elongation of Met-184 mutants of HIV-1 reverse transcriptase derive solely from a dNTP utilization defect [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(14): 9196–9205.
- [11] Operario DJ, Balakrishnan M, Bambara RA, *et al.* Reduced dNTP interaction of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase promotes strand transfer [J]. *J Biol Chem*. 2006, 281(43): 32113–32121.
- [12] Onafuwa-Nuga A, Telesnitsky A. The remarkable frequency of human immunodeficiency virus type 1 genetic recombination [J]. *Microbiol Mol Bio Rev*, 2009, 73(3): 451–480.
- [13] Jetz AE, Yu H, Klarmann GJ, *et al.* High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome [J]. *J Virol*, 2000, 74(3): 1234–1240.
- [14] Zhuang J, Jetz AE, Sun G, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots [J]. *J Virol*, 2002, 76(22): 11273–11282.
- [15] Wisniewski M, Balakrishnan M, Palaniappan, *et al.* The sequential mechanism of HIV reverse transcriptase RNase H [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(48): 37664–37671.
- [16] Gao L, Balakrishnan M, Roques BP, *et al.* Insights into the multiple roles of pausing in HIV-1 reverse transcriptase promoted strand transfer [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(9): 6222–6231.
- [17] Nguyen LA, Kim DH, Daly MB, *et al.* Host SAMHD1 Protein Promotes HIV-1 Recombination in Macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(5): 2489–2496.
- [18] Ryo J, Oh C, Choi J, *et al.* The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction [J]. *Nat Med*, 2014, 20(8): 936–941.
- [19] Beloglazova N, Flick R, Tchikvintsev A, *et al.* Nuclease activity of the human SAMHD1 protein implicated in the Aicardi-Goutieres syndrome and HIV-1 restriction [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(12): 8101–8110.
- [20] Goncalves A, Kavayel E, Rice GI, *et al.* SAMHD1 is a nucleic-acid binding protein that is mislocalized due to aicardi-goutieres syndrome-associated mutations [J]. *Hum Mutat*, 2012, 33(7): 1116–1122.
- [21] Goldstone DC, Ennis-Adeniran V, Hedden JJ, *et al.* HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase [J]. *Nature*. 2011, 480(7377): 379–382.
- [22] Powell RD, Holland PJ, Hollis T, *et al.* Aicardi-Goutieres syndrome gene and HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a dGTP-regulated deoxynucleotide triphosphohydrolase [J]. *J Biol Chem*. 2011, 286(51): 43596–43600.
- [23] White TE, Tuzova M, Valle-Casuso JC, *et al.* The retroviral restriction ability of SAMHD1, but not its deoxynucleotide triphosphohydrolase activity, is regulated by phosphorylation [J]. *Cell Host Microbe*, 2013, 13: 441–451.
- [24] Descours B, Cribier A, Chable-Bessia C, *et al.* SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells [J]. *Retrovirology*, 2012, 9: 87.
- [25] Ayinde D, Casartelli N, Schwartz O. Restricting HIV the SAMHD1 way: through nucleotide starvation [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10(10): 675–680.
- [26] Cuadrado E, Jansen MH, Anink J, *et al.* Chronic exposure of astrocytes to interferon-alpha reveals molecular changes related to Aicardi-Goutieres syndrome [J]. *Brain*, 2013, 136(1): 245–258.
- [27] Dragin L, Anh Nguyen L, Lahouassa H, *et al.* Interferon block to HIV-1 transduction in macrophages despite SAMHD1 degradation and high deoxynucleoside triphosphates supply [J]. *Retrovirology*, 2013, 10(1): 30.
- [28] 美国科学家首次拍摄 HIV 在人体内扩散过程 [J]. *生物医学工程与临床*, 2009, 13(3): 217.
- [29] Thomas T. Murooka, Maud Deruaz, Francesco Marangoni, *et al.* HIV-infected T cells are migratory vehicles for viral dissemination [J]. *Nature*, 2012, 10490(7419): 283–287.
- [30] Groot F, S Welsch, QJ Sattentau. Efficient HIV-1 transmission from macrophages to T cells across transient virological synapses [J]. *Blood*, 2008, 111(9): 4660–4663.
- [31] Blanchet F, Moris A, Mitchell JP, *et al.* A look at HIV journey: from dendritic cells to infection spread in CD4(+) T cells [J]. *Curr Opin HIV AIDS*, 2011, 6(5): 391–397.
- [32] Puigdomenech I, Casartelli N, Porrot F, *et al.* SAMHD1 restricts HIV-1 cell-to-cell transmission and limits immune detection in monocyte-derived dendritic cells [J]. *J Virol*, 2013, 87(5): 2846–2856.
- [33] Chauveau L, Puigdomenech I, Ayinde D, *et al.* HIV-2 infects resting CD4+ T cells but not monocyte-derived dendritic cells [J]. *Retrovirology*, 2015, 12(1): 2.
- [34] Bloch N, O'Brien M, Norton TD, *et al.* HIV type 1 infection of plasmacytoid and myeloid dendritic cells is restricted by high levels of SAMHD1 and cannot be counteracted by Vpx [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2014, 30(2): 195–203.
- [35] Sunseri N, O'Brien M, Bhardwai N, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 modified to package Simian immunodeficiency virus Vpx efficiently infects macrophages and dendritic cells [J]. *J Virol*, 2011, 85(13): 6263–6274.

[修回日期]2015-08-18

实验动物的 10 个“不愿意”

魏 强

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021)

(接上期)

10 它们对未做好动物实验准备的人可以说不

动物实验的过程既是科学研究的过程,也是人和动物相互“碰撞”的过程。动物不理解人类拿它们在干什么,一定会对操作、伤害做出反抗、攻击,可能会伤害到人。动物实验可能带来的危害主要有:一是动物咬伤、抓伤等直接危害;二是动物携带人兽共患病病原,在操作过程中通过空气、分泌物、直接接触等途径感染人类;三是人类高致病性病原感染动物实验,从动物或环境再感染人。

实验动物、分泌物、排泄物、样品、器官、尸体等控制、操作不当会变成病原污染的扩大器,造成大范围传播,因此,了解实验动物特性,就知道了动物实验首先要做好思想准备,并通过不断实践,掌握动物操作的基本技术和处置、护理技能,防备于未然。

动物实验的基本操作技术包括很多方面,都应该熟练掌握,如:实验动物的抓取和固定方法、标记方法、被毛的去除方法、给药途径和方法、取血及采样方法、手术方法以及处死方法等。只有熟练掌握了这些方法,做好充分的实验准备,才能顺利完成动物实验。

曾经见过这样的动物实验:10 只小鼠被灌胃后,马上口鼻出血,翻滚挣扎很快死亡。原因是根本没有掌握动物实验技术,不练习、想当然,结果药物没灌入胃内,却灌入了肺中。

我们怎样做呢?面对实验动物的“不愿意”,面对实验动物、动物实验我们做好了么?在动手之前,你认真思考了以下问题吗?

1. 你有关护、善待动物的意识吗?动物福利,大的方面讲就是让动物在康乐的状态下生存,其标准包括动物无任何疾病、无行为异常、无心理紧张压抑和痛苦等。基本原则包括:让动物享有不受饥渴的自由、生活舒适的自由、不受痛苦伤害的自由、



实验人员要求熟练操作动物实验。

生活无恐惧感和悲伤感的自由以及表达天性的自由。小的方面就是在实验的每个环节,贯彻对动物尽可能的照料。有了这种意识,就会在实验过程中同情、关爱实验动物,使动物实验具有人文性、文明性和科学性,在相对舒适的、感谢的氛围中完成科学实验,同时形成良好的文化操行。

国外和国内的许多单位,都设有实验动物感谢纪念碑。开学伊始,实验之后,大家手捧鲜花,鞠躬再三,感谢实验动物对人类的贡献。

2. 你真的了解实验动物么?动物种类不同,生物学特性也不相同,对实验的要求也不同。在做动物实验之前,一定要弄清动物的特性。如啮齿类动物,课本上一般介绍,啮齿类动物是昼伏夜动的杂食动物,喜啃咬硬物,性情较温顺,雄鼠好斗,汗腺不发达,嗅觉灵敏,对噪音敏感,对于湿度要求严格,雄鼠具有分泌醋酸氨臭气的特性,是引起饲养环境产生特异臭气的重要原因。它们的垂体、肾上腺功能发达,应激反应敏感,行为表现多样,情绪敏感。对于空气中的灰尘、氨气、硫化氢极为敏感,如饲养间不卫生,可引起大鼠患肺炎或进行性肺组织坏死而死亡。噪音能使它们内分泌系统紊乱,性功能减退,食仔或死亡,所以饲养的环境必须安静。但在实际使用中,能充分理解么?

讲几个小故事,对这些动物特性的生物学意义,可能理解的更好。有人在做动物实验时,觉得小鼠、大鼠很可爱,因此,他在食堂吃什么,就给小

鼠、大鼠带回来一些。并且随时打开鼠盒,查看动物情况。这样做,严重干扰了啮齿类动物“喜啃咬硬物”和“昼伏夜动”等习性。

有人将 10 只成年 KM 小鼠放在一个鼠盒中,第一天发现它们打斗非常厉害,第二天面部、尾巴等部位出现外伤,等第三天找来新鼠盒,准备分开饲养时发现,动物不再打斗了,安定下来了。问为什么,答曰经过打斗,动物各自地位明确了,不再争斗了。其实不然,小鼠因是昼伏夜动物,打斗在夜间更凶残,甚至将其他动物的睾丸咬掉,这样打斗才会停止。如果不注意观察,不了解动物习性,如果做雄鼠相关实验,那么一定要注意,这些动物还是雄性的吗?

还有这样的事情发生,一个动物室在做雌性小鼠性周期相关实验,其他人带入雄性小鼠。如果了解动物习性,就会知道雄鼠会分泌醋酸氨,这也是鼠类特有的臭味。醋酸氨对人来讲非常难闻,但对雌性小鼠,是最强的诱导气味,就像雄鹿分泌的麝香,具有环境激素的作用,会严重干扰雌性相关实验。

3. 你具备动物实验的能力吗? 动物实验不同于体外实验,任何对动物带来的不良操作,都会影响实验结果。动物实验的结果应该是客观、公正、准确的,要求实验人员必须了解正确的操作和结果判断。北京地区在这方面做得非常好,要求所有从事实验动物和动物实验的人员,包括临时实验人员,必须经过一定时间的培训,考试合格,并取得上岗证后,才能进行动物实验。动物实验的能力,包括动物饲养能力、对动物认知能力、操作能力、信息采集能力、分析能力和关怀能力。具备了这些能力,才能完成良好的动物实验。

以下是一些能力不足的表现:



动物实验根据病原危害程度可采取不同的实验环境,但必须通过风险评估确认。

山羊非病原性实验可在清洁的“场地”进行;啮齿类动物实验要求控制在良好的设施内。

实验室摆放食物和饮料、在实验环境中饮水、吃食、抽烟、化妆等一般不被许可。(中图由徐平提供)

看过一篇博士生论文,讲的是用中药汤剂,治疗裸鼠移植性肿瘤。具体方法为,每次 3ml 灌胃,每天 3 次,10 天后肿瘤体积减少,得出结论为治疗有效。其实,结果不对。成年小鼠一般体重 40g,胃容量 0.8 ~ 1.5 mL,怎么灌进去 3ml? 即使灌进去了,一天的量为 9 mL,如果换算成 40 Kg 人的话,每天得喝 9 L 汤药,大致 20 瓶矿泉水,谁受得了? 人还能正常饮食么? 还能保证营养么? 小鼠肯定痛苦不堪,迅速消瘦。肿瘤细胞较正常组织对营养的依赖更大,变小是肯定的,但不是汤药的作用,是“饥饿疗法”的结果。肿瘤重量的变化测定应该考虑动物体重变化,测定脏器系数比较客观。

有人做流感的动物实验,临床表现是这样描述的:动物第一天开始发烧、流涕、乏力、头疼、恶心、呕吐、无食欲、关节疼……。你怎么知道动物乏力、头疼、恶心、无食欲、关节疼这些主观体验呢? 动物实验的信息采集,一定要客观描述,如使用动物活动减少、摄食量减少、精神萎靡、被毛脏乱等术语。有些人类出现的主观体验,如乏力、恶心等对动物来讲是不得而知的,动物实验是为人类服务,不能反过来把人类的临床主诉,强加于动物。

动物采血是最常见的操作,如果不了解准确的部位,加之血管非常细小,如小鼠的尾静脉,不通过反复练习,临时或匆忙上阵,会造成动物反复损伤。在一项猴动物实验中,要求每次采血 10ml,一周 3 次,连续 3 月。这点血对人来说不算什么,对 4Kg 的猴是不可以的。4Kg 的猴血量大致 350ml,算一算就知道为什么不行了。其他动物也是这样,采血过多过频,是最易忽视的。

动物活体检测、外科手术、活体采样、解剖取材等技能更是要求人员能够熟练掌握。必须经过严格培训,才能实际应用。

4. 你具备生物安全防护能力吗? 提起实验室生物安全,大家会想到发生过的许多“著名”事件和事故,包括实验室人员感染结核、出血热、猴 B 病毒,甚至 SARS 等。其实,实验室生物安全事件造成的实验人员得病、死亡只是极端例子。而无时无刻发生在实验室涉及的化学品、药品、试剂、辐射、热、电、水、病原微生物、实验材料以及实验动物等造成的潜在或一般性事件,很容易被忽略。

大家知道,实验室操作主要分为体内和体外实验,也就是说动物操作和试管操作。动物实验相关实验室既涵盖了一般实验室的生物安全要求,同时也使得实验室生物安全变得更加复杂和多变,人员要求更加严格,生物安全事件也相对较多。

我们时常感到不适、乏力、精神差,有时发烧、局部瘙痒、疼痛,血清检测发现许多病原抗体阳性,等等诸多情况发生时,可能意味着受到了实验室不安全因素干扰,使我们健康受到了伤害。特别是病原微生物的感染,不仅威胁到个人,可能还会造成不同程度的扩散,导致环境、外部人员感染,甚至成为疾病传染源。

实验室生物安全是每个实验室人员应该高度重视的问题,实验的每个环节都会有潜在风险。大家往往想,这些事件总是发生在别人身上,不会在我身上发生。其实不然,大家是在一个环境中工作,从事类似的操作,面临相似的问题,加之我国教育体系中缺乏良好的实验室生物安全教育、培训课程。大家并没有严格、专业的实验室风险识别和风险控制意识和技能,实验室环境也没能形成安全、清洁的文化氛围,只要查一查,每天都会有许许多多程度不同的生物安全隐患和风险。

动物存在哪些危害,怎样防护? 对某种化学品的危害你了解多少? 溅到身上怎么处置? 生物安全柜怎样正确使用? 等等问题,都需要我们认真思考,至少先要有良好的安全意识,然后形成实验室安全操作规范,通常国际上称为 SOP,大家在进行动物实验之前,应该了解清楚,才能及时应用。

在做动物实验操作时不戴手套、不戴口罩、不戴面具、野蛮操作、忽视防护等是非常不负责任的行为。

5. 你知道动物实验要经过审查批准么? 一般实验人员不太关注动物福利、伦理,或不够专业。因此,国际上提倡成立动物实验福利、伦理委员会,负责审查动物实验,对每个环节把关。

动物实验福利、伦理审查的基本原则是兼顾动物福利和人员利益,在综合评估动物所受的伤害和使用动物的必要性基础上进行科学审查。涉及动物保护、动物福利、伦理、科学需要等各方面内容。遵循动物保护原则,禁止无意义滥养、滥用、滥杀实验动物,制止没有科学意义和社会价值或不必要的动物实验。

动物福利原则强调保证实验动物的权利。伦理原则,既要考虑动物的利益,善待动物,又要保证实验动物项目的科学性,还要保证实验人员的安全,同时,要求动物实验方法和目的应该符合人类的道德伦理标准和国际惯例。

动物实验方案审查的内容应该包括:实验人员是否符合操作要求;设施设备是否符合动物要求;饲料、垫料、饮水是否符合动物要求;动物运输是否符合要求;实验方案是否符合动物福利要求;动物处置是否符合伦理规范;动物处死是否符合安乐死原则;动物尸体处理是否符合环保要求等等方面。

动物实验福利伦理审查中应注意的问题非常多,主要有以下一些:

人员培训情况:动物实验人员必须经过操作培训,包括:动物基本知识、动物操作、麻醉方法、手术方法、给药方法、取材方法、解剖方法等各种操作,最好持有专业培训证书。

兽医监护:动物实验中必须配备兽医人员。兽医的基本职责之一就是代表动物利益,维护动物权利。认为对动物伤害过大时,可建议、劝告、终止实验。

是否正确选择动物:应该选用合适品系和级别的动物用于实验,提倡在得到足够结果时最大限度地减少动物数量的使用。尽量使用遗传背景一致性好的动物和微生物控制级别高的动物,可以做到以质量代替数量。

动物实验的必要性:提倡替代性生命系统、非生命系统、电脑模拟的应用。离体培养的器官、组织、细胞、微生物在许多研究中得到广泛应用,能够利用替代性材料时不使用活体动物。如能进行电子模拟、体外方法进行替代实验的,就不易进行动物实验。提倡使用低等动物,代替高价的实验动物。

动物实验方案的合理性:严谨合理的方案应使动物操作合理正确,减少外伤,减少疼痛。使用合适的统计学方法,鼓励用少量动物获得较多结果。

动物运输:运输过程中要避免碰撞和惊吓动

物,饲料饮水充足。运输笼盒空间要保证动物活动自如。长途运输要保证良好的通风。运输最易使动物产生疲惫、不安,甚至死亡,尽量提供良好、舒适的运输方法。

动物饲养:要正确饲养动物,饲养空间要足够大,保证饮水质量,食物要干净,室内、外环境要保持卫生清洁,最好增添色彩。尽量让动物感到自己是快乐的。

实验过程:应尽量在麻醉状态下进行动物实验。实验开始前,准备工作要充分,各种可能发生的意外事故和解决方案均要考虑周全。实验中,要密切关注动物表现和反应,动物麻醉苏醒后要有人看护,避免出现误食、磕碰、病情恶化等情况。

控制疼痛:应判断实验造成动物疼痛的等级。应考虑使用一切手段以减少动物在实验过程中所产生的疼痛,合理使用必要的麻醉剂、镇痛剂或镇静剂。使可能的疼痛降低到最低限度,是我们呵护动物最应该做的事情。

减少对动物侵扰:尽量不过多干扰动物,减少对动物的刺激,避免应激反应。正确而熟练地抓取动物、固定动物,使动物不会剧烈反抗。鼓励人性化动物保定技术,必要时对动物进行训练调教,使其在“我愿意”的情绪下配合实验,使实验结果更加可靠。

具体舒适措施:提倡提供必要的玩具,特别是犬、猴。有条件时可以给动物增加音乐和色彩环境,对于中大型实验动物实验会产生较好效果。尽量保证恒温恒湿、通风换气、噪音、光照度等的合理,同时,设置必要的活动场地,创造相对愉悦环境,对身心。

动物的处死:对实验结束后的动物要施行安乐死,注意不能在其它动物可视范围内进行动物解

剖、处死等操作。试想一下,动物受到死亡威胁或直接面对死亡会怎样想,我们永远不应该和动物结下“死结”。



实验人员要时刻尊重并善待实验动物,营造轻松、惬意的人文环境(由徐平提供)。

结束语

有人会问,实验动物就是被用来做实验的,如果说不愿意,从根本上讲,它们最不愿意被用于实验。也有科学家质疑动物实验的结果,认为目前的实验结果大部分不能得出正确结论,应该叫停动物实验,特别是高等级动物实验。一般动物保护理念也认为应谨慎进行动物实验,更有甚者,极端反对动物实验,并付诸各种各样的行动。

我们如何看待这些问题呢?可能我们目前能做到的就是,充分认识到动物的“不愿意”,要有关护动物的爱心和意识,尽力提供动物舒适的实验环境,熟练掌握实验技术,从每个环节上将可能的痛苦减到最低,积极探索替代方法,减少或不用动物做意义不大的实验……。

总而言之,实验动物“不愿意”的程度,掌握在每个实验人员的手中。