



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 **11**

邮发代号: 82-917

第25卷 ( 第11期 ) Vol.25 No.11

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



9 771671 785145

# 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11期 2015年11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://zgswdw.alljournal.ac.cn/  
zghjyxzz/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、中文生物医学期刊全文数据库、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:中邮阅读网:www.183read.com  
**本期执行主编** 顾为望  
**本期专题组织** 代解杰  
**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

- \* 冷驯化条件下中缅树鼩脂肪组织切片的对比 ..... 孙舒然,朱万龙,陈金龙,等(1)
- \* 树鼩鞭毛虫的形态学观察及其18S rRNA基因分析 ..... 陈玲霞,尹博文,李振宇,等(5)
- \* 山羊上颌窦及额窦黏膜可承受压强的对比 ..... 韩奕诗,任桓,孙小雪,等(9)
- \* 人工饲养树鼩皮肤真菌携带的调查 ..... 尹博文,陈玲霞,李振宇,等(13)
- \* 鹤鹑高尿酸血症动物模型脂代谢研究 ..... 马丽,曾贵荣,张妙红,等(17)
- 甲2醛致兔窦房结损伤模型的建立 ..... 刘学武,王小青,赵丞,等(21)
- 制动致福利损伤大鼠肝细胞中NF- $\kappa$ B的表达 ..... 梁磊,马畅,刘捷,等(28)
- 实验应激致小鼠福利受损及音乐干预的效果 ..... 马畅,梁磊,张旭亮,等(32)
- 雌雄FMMU白化豚鼠基础生理生化指标的差异分析 ..... 张晓玉,张修彦,陈伟盛,等(37)
- 扶正化积方剂对H22肝癌小鼠抑瘤的作用 ..... 李晓娟,白云峰,王睿林,等(42)
- 梯度复合HA/ZrO<sub>2</sub>多孔支架材料在松质骨缺损应用的实验 ..... 邵荣学,全仁夫,张亮,等(46)
- 1型糖尿病大鼠模型早期胃平滑肌功能的改变研究 ..... 郝璋森,梁红玉,侯聪聪,等(52)

### 技术方法

- \* 喜马拉雅旱獭的人工繁育技术 ..... 刘海青,范微,张静宵,等(59)

### 综述与专论

- \* 喜马拉雅旱獭实验动物化的研究进展 ..... 刘海青,范微,张静宵,等(64)
- 犬尿氨酸通路在神经退行性疾病中的研究进展 ..... 王丽莎,刘新民,冯利,等(69)
- OPG/RANK/RANKL系统在实验动物骨骼发育营养需要评估中的应用 ..... 吕建敏(76)
- HIV/SIV入侵血脑屏障的分子机制探讨 ..... 黄丹,丛喆,徐珮,等(81)
- 实验动物运输福利的研究进展 ..... 李彩云,潘学营,张超,等(86)

### 教育与科普

- 我是树鼩,你知道我么? ..... 代解杰(90)
- 会讯 ..... (75)
- 书讯 ..... (80)

### 广告

- \* “实验动物新资源标准化研究及疾病动物模型的创建”专题文章

---

---

# CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly    Established in March 1991    Volume 25    Number 11    November 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://zgsydw.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 comparisons of tree shrews (*Tupaia belangeri*) adipose tissue slices preliminary study under cold-acclimation .....  
..... SUN Shu-ran, ZHU Wan-long, CHEN Jin-long, et al. ( 1 )
- Morphological observation and analysis of its 18S rRNA gene of flagellate in tree shrews .....  
..... CHEN Ling-xia, YIN Bo-wen, LI Zhen-yu, et al. ( 5 )
- The comparative studies in goats about the membrane pressure of the top and the bottom of maxillary sinus and the frontal sinus .....  
..... HAN Yi-shi, REN Huan, SUN Xiao-xue, et al. ( 9 )
- The survey of dermatophyte in artificial feeding of tree shrews .....  
..... YIN Bo-wen, CHEN Ling-xia, LI Zhen-yu, et al. (13)
- Lipid metabolism study quail high uric acid hematic disease animal model .....  
..... MA Li, ZENG Gui-rong, ZHANG Miao-hong, et al. (17)
- Establishment of formaldehyde-induced sinoatrial node damage model in rabbits .....  
..... LIU Xue-wu, WANG Xiao-qing, ZHAO Chen, et al. (21)
- The study of expression of NF- $\kappa$ B in rats' liver after welfare impaired by restrain stress .....  
..... LIANG Lei, MA Chang, LIU Jie, et al. (28)
- The study of impaired welfare induced by routine experimental procedures on mice and intervention effect of music .....  
..... MA Chang, LIANG Lei, ZHANG Xu-liang, et al. (32)
- The measurement and comparison of basic physiological and biochemical index of male and female FMMU albino guinea-pig .....  
..... ZHANG Xiao-yu, ZHANG Xiu-yan, CHEN Wei-sheng, et al. (37)
- Experimental study of Fuzheng Huaji decoction inhibition effect on H22 tumor bearing mice .....  
..... LI Xiao-juan, BAI Yun-feng, WANG Rui-lin, et al. (42)
- In vivo experiments of porous gradient bio-composites with HA/ZrO<sub>2</sub> in repair of the lumbar vertebra defect .....  
..... SHAO Rong-xue, QUAN Ren-fu, ZHANG Liang, et al. (46)
- Alterations in the functions of gastric smooth muscle in type 1 diabetic rats .....  
..... HAO Zhang-sen, LIANG Hong-yu, HOU Cong-cong, et al. (52)
- Scale breeding and the establishment of breeding population of *Marmota himalayana* .....  
..... LIU Hai-qing, FAN Wei, ZHANG Jing-xiao, et al. (59)
- Research progress on domestication of *Marmota himalayana* .....  
..... LIU Hai-qing, FAN Wei, ZHANG Jing-xiao, et al. (64)
- Research progress in the kynurenine pathway related with neurodegenerative diseases .....  
..... WANG Li-sha, LIU Xin-min, FENG Li, et al. (69)
- Prospect of OPG/RANK/RANKL system in assessing nutrient requirement for bone development in laboratory animal .....  
..... LV Jian-min (76)
- The molecular mechanism of HIV/SIV invading the blood brain barrier .....  
..... HUANG Dan, CONG Zhe, XUE Pei, et al. (81)
- Research progress of transportation welfare for laboratory animal .....  
..... LI Cai-yun, PAN Xue-ying, ZHANG Chao, et al. (86)



## 冷驯化条件下中缅树鼩脂肪组织切片的对比

孙舒然<sup>1</sup>,朱万龙<sup>1</sup>,陈金龙<sup>2</sup>,曹能<sup>1</sup>,高文荣<sup>1</sup>,左木林<sup>1</sup>,叶芳艳<sup>1</sup>,  
付家豪<sup>1</sup>,杨涛<sup>1</sup>,王政昆<sup>1</sup>

(1. 云南省高校西南山地生态系统动植物生态适应进化及保护重点实验室,云南师范大学生命科学学院,昆明 650500;2. 昆明市海口林场,昆明 650114)

**【摘要】** 目的 探讨冷驯化不同时期中缅树鼩脂肪细胞形态变化,为冷驯化是否可以诱导白色脂肪组织中米色脂肪细胞 (beige adipocytes) 的产生提供形态学依据。方法 通过苏木素-伊红染色切片、免疫组织化学染色切片、免疫荧光染色切片进行对比。结果 随着冷驯化时间延长,白色脂肪细胞和褐色脂肪细胞形态都明显变小,且褐色脂肪组织中解偶联蛋白1 (uncoupling protein 1, UCP1) 表达增加,同时腹部皮下白色脂肪组织中可能已发生褐变,产生一些具有UCP1表达的浅褐色脂肪细胞,即米色脂肪细胞。结论 不同染色切片不仅能够清晰观察到脂肪细胞的形态改变,还能从抗体阳性颜色中观察出UCP1表达变化,为中缅树鼩脂肪组织研究提供基础性材料。

**【关键词】** 冷驯化;脂肪组织;苏木素-伊红切片;免疫组织化学切片;免疫荧光切片

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0001-04

doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2015.11.001

## The comparisons of tree shrews (*Tupaia belangeri*) adipose tissue slices preliminary study under cold-acclimation

SUN Shu-ran<sup>1</sup>, ZHU Wan-long<sup>1</sup>, CHEN Jin-long<sup>2</sup>, CAO Neng<sup>1</sup>, GAO Wen-rong<sup>1</sup>,  
ZUO Mu-ling<sup>1</sup>, YE Fang-yan<sup>1</sup>, FU Jia-hao<sup>1</sup>, YANG Tao<sup>1</sup>, WANG Zheng-kun<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Ecological Adaptive Evolution and Conservation on Animals-Plants in Southwest Mountain Ecosystem of University in Yunnan Province School of Life Science Yunnan Normal University Kunming 650500 China;  
2. Haikou Forest Farm of Kunming, Kunming 650114, China)

**【Abstract】 Objective** To understand the fat cells morphological changes during different periods under cold acclimation in tree shrews, whether the cold acclimation can induce cream-colored fat cells in white adipose tissue (beige adipocytes), and provide morphological basis. **Methods** The Hematoxylin-Eosin staining sections, Immunohistochemical staining sections and Immunofluorescence staining sections are compared. **Results** With the prolonged cold acclimation, the white fat cells and brown fat cells are decreased significantly, and the uncoupling protein1 expression in brown adipose tissues are increased. At the same time, abdominal subcutaneous white adipose tissue may have occurred browning, produce some shallow brown fat cells with UCP1 expression, namely the beige fat cells. **Conclusions** Different staining sections not only can clearly observe the morphological changes of fat cells, but also observe UCP1 from antibody positive color expression changes, and provide basic materials for the study of the adipose tissues in tree shrews.

**【Key words】** Cold acclimatization; Adipose tissues; Hematoxylin-Eosin staining sections; Immunohistochemical staining sections; Immunofluorescence staining sections

[基金项目] 国家科技支撑计划项目子课题(2014BAI01B01-06); 国家国际科技合作专项(2014DFR31040); 国家自然科学基金项目(31360096)。

[作者简介] 孙舒然(1990-), 女, 汉族, 硕士生, 研究方向: 动物生理生态, E-mail: 18487198653@163.com。

[通讯作者] 王政昆(1959-), 男, 教授, 研究方向: 动物生理生态, E-mail: wz\_k\_930@126.com。

哺乳动物体内的脂肪组织主要分为白色脂肪组织(white adipose tissue, WAT)和褐色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)<sup>[1]</sup>。白色脂肪组织由白色脂肪细胞构成,其细胞内含有一较大脂滴,成单室性,线粒体含量较少。WAT 主要以甘油三酯的形式储能,皮下和内脏脂肪为主要贮存能量部位。BAT 主要由褐色脂肪细胞构成,其细胞内含有多个小脂滴,成多腔室,线粒体含量较多且特异性表达解偶联蛋白 1 (uncoupling protein 1, UCP1)。BAT 通过线粒体内膜上的 UCP1 将脂肪酸氧化与 ATP 产生解偶联,把能量直接以热量的形式散失增加能量消耗。

近年来的研究发现,动物实验表明 BAT 具有抵抗肥胖的作用<sup>[2]</sup>。2009 年《新英格兰医学杂志》中发表了系列文章不仅证实健康成人体内存在着具有功能的褐色脂肪组织<sup>[3-5]</sup>,而且还证明冷暴露可以激活人体 BAT 的产热活性<sup>[6]</sup>。不仅如此,许多研究也同样发现,在冷刺激和某些药物的诱导下,WAT 中会出现一种特殊的米色脂肪细胞,这种米色脂肪细胞具有多腔室的脂滴,富含线粒体,且表达褐色脂肪细胞特有标记物 UCP1<sup>[7-8]</sup>。这一研究的发现为防治人类肥胖提供了一种极为重要的新方向,同时使 BAT 作为防治肥胖等疾病的靶器官受到研究者的广泛关注。

中缅树鼩 (*Tupaia belangeri*) 属于攀鼩目 (Scandentia) 树鼩科 (Tupaiaidae), 主要分布于南亚和东南亚,为东洋界特有的小型哺乳动物。现生攀鼩目只有一个科即树鼩科,我国仅有中缅树鼩一种。主要分布于云南、贵州、广西、四川西部及海南岛等地<sup>[9]</sup>。树鼩与灵长类动物亲缘关系较近,具有特殊的进化地位,具有十分广泛的开发应用前景。而以树鼩为实验动物的肥胖模型的建立,在生物医学上可以作为人类代谢疾病的良好动物模型。但目前有关中缅树鼩 BAT 及 WAT 的组织结构和组织特征尚未见报道,缺少相应的基础材料。

本研究选取中缅树鼩作为实验动物,利用苏木素-伊红切片 (hematoxylin-eosin staining sections)、免疫组织化学切片 (immunohistochemical staining sections)、免疫荧光切片 (immunofluorescence staining sections),观察冷驯化是否可以使白色脂肪细胞和褐色脂肪细胞形态存在可塑性转变,并且通过切片寻找米色脂肪细胞出现的可能形态。为中缅树鼩 BAT 研究提供形态学的基础材料。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

实验动物由中国医学科学院医学生物学研究所灵长类研究中心提供【SCXK(滇)2013-0001】,带回云南师范大学生命科学学院动物饲养房饲养【SYXK(滇)2013-0001】,22℃~25℃室温,光照 12L:12D 条件下适应 14 d,此为冷驯化 0 d 对照组。冷驯化 28 d、49 d 共两组,每组 10 只动物,在环境温度 5±1℃、光照 12L:12D、无巢材条件下单笼饲养。每天两次定点喂以由玉米面、奶粉、白糖以 90%:5%:5% 比例混合制得的熟食,少许水,并适量添加苹果,面包虫等。实验动物均为非繁殖期成年个体且体重差异不显著,实验组与对照组中雌雄各半。

### 1.2 脂肪组织的获取

将对照组、冷驯化 28 d、49 d 组的中缅树鼩断颈处死。无菌操作取下树鼩腋下褐色脂肪组织、腹部皮下脂肪组织进行石蜡包埋,为后续切片做准备。

### 1.3 主要实验试剂

封闭用正常羊血清、PV9000 通用二抗试剂盒、DAB 显色试剂盒、抗淬灭封片剂(含 DAPI)均购自北京中杉金桥生物有限公司。TritonX-100、Tween 20 购自 Sigma-vetec。HE 染色试剂盒购于北京索莱宝生物有限公司。

免疫组化与免疫荧光所用 UCP1 抗体均购于 Abcam 公司。

### 1.4 苏木素-伊红染色切片的制备

切片进行常规脱蜡、水化。用 0.01 mol/L PBS 和蒸馏水分别漂洗 3 次,每次 5 min。加入 HE 染色试剂盒中的苏木素,室温孵育 2 min。蒸馏水洗去浮色,用试剂盒中的分化液,密切观察分色情况。蒸馏水漂洗 3 次每次 3 min。加入试剂盒中的伊红染液,孵育 1 min。蒸馏水洗去浮色,继续用蒸馏水漂洗 10 min。梯度酒精脱水(75%→80%→90%→90%→100%→100%,各 5 min),二甲苯透明 30 min,中性树胶封片,待晾干后,光学显微镜下拍照。

### 1.5 免疫组织化学染色切片的制备

切片进行常规脱蜡、水化。用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。加入 3% 过氧化氢覆盖切片,室温避光孵育 30 min。0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次每次 5 min。用滤纸将切片周围的水分吸干后,用组化笔在切片周围画圆圈,防止后续染色过程中液体漏出。5% 羊血清室温封闭 60 min。甩去多余的

封闭液,加合适浓度的第一抗体(UCP1 抗体),4℃冰箱过夜。0.01 mol/L PBST 漂洗 3 次每次 5 min。加入 PV9000 试剂盒中的试剂 I,37℃ 孵育 30 min。0.01 mol/L PBST 漂洗 3 次每次 5 min。加入 PV9000 试剂盒中的试剂 II,37℃ 孵育 30 min。0.01 mol/L PBST 漂洗 3 次每次 5 min。将 DAB 试剂盒中的浓缩液 50  $\mu$ L 加入 1 mL 的稀释液中,混匀备用。吸取切片上多余的水滴,每张组织片上滴加 100  $\mu$ L 的 DAB 显色液,室温下避光反应 5 min,单蒸水终止显色。梯度酒精脱水(75% $\rightarrow$ 80% $\rightarrow$ 90% $\rightarrow$ 90% $\rightarrow$ 100% $\rightarrow$ 100%,各 5 min),二甲苯透明 30 min,中性树胶封片,待晾干后,光学显微镜下拍照。

### 1.6 免疫荧光染色切片的制备

(1)切片进行常规脱蜡、水化。0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次每次 5 min。蒸馏水漂洗 3 次每次 5 min。加入 HE 染色试剂盒中的苏木素,室温孵育 2 min。蒸馏水洗去浮色,用试剂盒中的分化液,密切观察分色情况。蒸馏水漂洗 3 次每次 3 min。加入试剂盒中的伊红染液,室温孵育 1 min。蒸馏水洗去浮色,继续用蒸馏水漂洗 10 min。梯度酒精脱水(75% $\rightarrow$ 80% $\rightarrow$ 90% $\rightarrow$ 90% $\rightarrow$ 100% $\rightarrow$ 100%,各 5 min),二甲苯透明 30 min,中性树胶封片,待晾干后,光学显微镜下拍照。

## 2 结果

### 2.1 苏木素—伊红染色切片

冷驯化 0 d、28 d、49 d 中缅甸树鼩腋下 BAT 的 HE 染色切片形态学变化显著。从切片中可以发现(彩插 2 图 1),随着冷驯化时间延长,中缅甸树鼩腋下褐色脂肪细胞中脂肪滴逐渐变小。对照组腋下褐色脂肪组织中存在比较大的脂肪滴。冷驯化 28 d 后,脂滴直径明显变小,较大的脂肪滴逐渐消失。而在冷驯化 49 d 时,褐色脂肪细胞脂滴比驯化 28 d 明显变小,且分布在血管周围的褐色脂肪细胞脂滴相对更小。

中缅甸树鼩腹部皮下典型 WAT 中脂肪滴也发生显著变化。冷驯化 0 d 时为典型的单泡脂肪细胞,细胞中央有一大脂滴,细胞核被挤到边缘,细胞呈空泡状。冷驯化 28 d 后,在单泡脂肪细胞中分化出部分具有小脂滴的多泡脂肪细胞。而在冷驯化 49 d 时,更多具有小脂滴的多泡脂肪细胞出现。这说明冷驯化不仅使褐色脂肪细胞在形态上发生改变,也改变了白色脂肪细胞的形态。

### 2.2 免疫组织化学切片

在用 UCP1 抗体染色的免疫组织化学切片(彩插 2 图 2)中可以观察到,对照组中缅甸树鼩腋下 BAT 中 UCP1 表达的黄褐色区域较少,随着冷驯化时间的延长,同一组织部位的 UCP1 阳性黄褐色面积增大,且颜色加深,说明经冷驯化后 UCP1 表达量可能增加。同时在冷驯化 28 d 时,BAT 中血管周围的黄褐色颜色明显更深,说明在冷驯化时中缅甸树鼩可通过增加典型 BAT 中 UCP1 的表达来增加产热,并通过毛细血管的运输为机体提供热量,以应对冷胁迫。经过冷驯化,褐色脂肪细胞中脂滴也逐渐变小,与 HE 染色切片的结果相同。

随着冷驯化时间的延长,冷驯化组 28 d、49 d 树鼩腹部大网膜上的白色脂肪细胞皆出现了分化,不仅脂滴变小,而且出现了 UCP1 阳性区域,显示出褐色脂肪细胞的一定特征。冷驯化很有可能使得介于褐色脂肪细胞与白色脂肪细胞特征两者之间的米色脂肪细胞出现。

### 2.3 免疫荧光染色切片

在以 UCP1 为一抗的免疫组织荧光染色切片中(彩插 3 图 3),对照组 BAT 中 UCP1 阳性红色荧光较少且暗淡,而冷驯化组 28 d、49 d 腋下 BAT 中的 UCP1 阳性荧光更亮,且可以看到一些阳性荧光的椭圆点,很可能是线粒体。这说明冷驯化使得中缅甸树鼩 BAT 中 UCP1 表达增加,与免疫组织化学染色结果一致。

冷驯化组 49 d 腹部大网膜的 WAT 中发现一些 UCP1 阳性红色荧光的椭圆点,很有可能是线粒体中 UCP1 的表达,这些细胞很有可能是冷驯化诱导的米色脂肪细胞。结果与免疫组织化学切片相同。

## 3 讨论

近年来,对于认识并挖掘 BAT 在肥胖防制中的应用价值成为防治人类代谢疾病研究的一大热点。Wouter 等<sup>[7]</sup>的研究发现在冷刺激下,24 位健康成年人中有 23 位褐色脂肪组织活性被激活,且较肥胖个体的褐色脂肪组织活性显著低于较瘦个体。体质指数与体重百分比与褐色脂肪组织活性成显著负相关关系,而静止代谢率与之成显著正相关关系。Masayuki<sup>[10]</sup>研究同样发现冷刺激(19℃)2 h 后,32 位健康成年人(23~35 岁)中有 17 位的锁骨及脊椎区域吸收了大量的 18 氟-氟化脱氧葡萄糖(2-fluoro-2-deoxy-D-glucose, 18F-FDG),而这些部位已在组织

学上证明是 BAT 部位。而且冬季的褐色组织活性显著高于夏季。在对中缅树鼩的研究中同样有所报道。根据张麟等<sup>[11]</sup>的研究发现,冷驯化 28 d, BAT 中的 UCP1 含量逐渐增加,且在 21 d 时达到极显著水平。而朱万龙等人的报道也有相似的结果,随着冷驯化时间的延长,树鼩的静止代谢率和非颤抖性产热都明显呈上升趋势<sup>[12]</sup>。冬季的静止代谢率和非颤抖性产热显著高于夏季<sup>[13]</sup>。与袁方等<sup>[14-15]</sup>的报道相一致。

本文通过三种切片对冷驯化不同时期的中缅树鼩脂肪细胞形态变化对比发现,冷驯化可以诱导白色脂肪细胞和褐色脂肪细胞的形态改变。并且 WAT 中可能已发生褐变,产生一些具有 UCP1 表达的浅褐色褐色脂肪细胞,即米色脂肪细胞。从 BAT 切片的 UCP1 阳性表达不仅在免疫组织化学染色中颜色随冷驯化时间逐渐加深,和在免疫组织荧光染色中荧光颜色逐步变亮中可以看出,冷驯化使得 BAT 中 UCP1 表达增加,这以以前的研究结果相一致。而在 WAT 切片中随着冷驯化时间延长,切片中出现米色脂肪细胞说明,UCP1 在典型的白色脂肪组织部位出现,增加了其适应性产热,使树鼩在维持体温应对冷胁迫时做出一定贡献。

但目前关于白色脂肪组织褐变的机制还未清楚。Khanh 等<sup>[16]</sup>通过脂肪组织的超微结构、脂肪细胞分化时的分子标记物以及流式细胞对于抗体的筛选,发现血管内皮细胞具有分化为米色脂肪细胞的特点,认为米色脂肪细胞可能起源于血管内皮细胞。G. Barbatelli 等<sup>[17]</sup>发现冷驯化使 WAT 中抗有丝分裂的 C/EBP $\alpha$  基因表达增加,而与细胞繁殖有关的基因表达未改变,并结合脂肪组织的超显微结构认为冷刺激可以诱导白色脂肪细胞直接分化转化为米色脂肪细胞。而 Tim 则利用流式细胞仪分选出具有一定 - 特性的前体骨骼肌细胞 (Sca-1 + , CD45 - , Mac1), 并经实验证明这些细胞经冷刺激或药物诱导也可分化为米色脂肪细胞<sup>[7]</sup>。目前的研究证据主要指向这三种不同的转变机制,但不能排除这三种机制共同作用,若有共同作用,何种作用为主导皆有待阐明。相信以 BAT 为靶点,安全有效的诱导 WAT 中具有功能性的米色脂肪细胞的方法必将成为防治肥胖等代谢疾病研究的新方向。

#### 参考文献:

[ 1 ] Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance[J]. *Physiological Reviews*, 2004, 84

(1): 277 - 359.

- [ 2 ] Enerback S. Human brown adipose tissue [J]. *Cell Metab*, 2010, 11(4): 248 - 252.
- [ 3 ] Cohade C, Osman M, Pannu HK, *et al.* Uptake in supraclavicular area fat ("USA-Fat"); description on 18F-FDG PET/CT[J]. *J Nucl Med*, 2003, 44(2): 170 - 176.
- [ 4 ] Yeung HW, Grewal RK, Gonen M, *et al.* Patterns of 18FFDG uptake in adipose tissue and muscle: a potential source of false-positives for PET[J]. *J Nuclear Med*, 2003, 44(11): 1789 - 1796.
- [ 5 ] Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 293(2): E444 - E452.
- [ 6 ] Wouter D. van Marken Lichtenbelt, Joost W. *et al.* Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men [J]. *The New England Journal of Medicine*, *N Engl J Med* 2009,360:1500 - 1508.
- [ 7 ] Tim J. Schulz, Tian Lian Huang, Thien T. Trana, *et al.* Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat[J]. *PNAS*, 2011, 108(1): 143 - 148.
- [ 8 ] Sona Rajakumari. EBF2 Determines and Maintains Brown Adipocyte Identity[J]. *Cell Metabolism* 17, 2013, 4(2): 562 - 574.
- [ 9 ] 王应祥, 李崇云, 马世来. 树鼩的分类与生态. 树鼩生物学 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 1991: 21 - 70.
- [ 10 ] Masayuki Saito, Yuko Okamatsu-Ogura, Mami Matsushita, *et al.* High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans Effects of Cold Exposure and Adiposity [J]. *Diabetes*, 2009, 58:1526 - 1531.
- [ 11 ] Lin Zhang, Peng-fei Liu, Wan-long Zhu, *et al.* Variations in thermal physiology and energetics of the tree shrew (*Tupaia belangeri*) in response to cold acclimation[J]. *J Comp Physiol B* 2012, 182:167 - 176.
- [ 12 ] Wan-long Zhu, Li-hua Meng, Zheng-kun Wang. Body mass, Thermogenesis and energy metabolism in *Tupaia belangeri* during cold acclimation [J]. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 2012, 8(2):90 - 109.
- [ 13 ] Wan-long Zhu, Hao Zhang, Zheng-kun Wang. Seasonal changes in body mass and thermo genesis in tree shrews (*Tupaia belangeri*): The roles of photoperiod and cold[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2012, 37:479 - 484.
- [ 14 ] 袁方. 低温对中缅树鼩解偶联蛋白-1 的影响[J]. 昆明医学院学报, 2002, 23(4): 25 - 27.
- [ 15 ] 袁方. 低温对中缅树鼩褐色脂肪组织及肝脏解偶联蛋白 mRNA 表达的影响[J]. 昆明医学院学报, 2010, 31(6): 42 - 44.
- [ 16 ] Khanh-Van Tran, Olga Gealekman, Andrea Frontini, *et al.* The Vascular Endothelium of the Adipose Tissue Gives Rise to Both White and Brown Fat Cells[J]. *Cell Metabolism*, 2012, 15:222 - 229.
- [ 17 ] G. Barbatelli, I. Murano, L. Madsen, *et al.* The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 298: E1244 - E1253.

[ 修回日期 ] 2015 - 10 - 12



# 树鼩鞭毛虫的形态学观察及其 18S rRNA 基因分析

陈玲霞,尹博文,李振宇,孙晓梅,代解杰

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心,  
云南省重大传染病疫苗研发重点实验室,昆明 650118)

**【摘要】** 目的 对树鼩体内的鞭毛虫进行形态学观察及基因分析鉴定。方法 取树鼩回盲部内容物和粪便经过滤离心处理直接涂片和碘液染色镜检,传统方法提取虫体总 DNA,PCR 扩增该鞭毛虫的 18S rRNA,测序后经 BLAST 进行同源性分析,并应用 MEGA5.1 绘制系统发育进化树。结果 形态学观察表明树鼩体内的鞭毛虫为三毛滴虫;测序分析表明树鼩鞭毛虫序列 18S rRNA 与已报道的胎儿三毛滴虫 18S rRNA (AY754332.1) 同源性高达 99%。结论 树鼩体内可感染胎儿三毛滴虫,研究结果为树鼩的寄生虫学质量控制提供依据。

**【关键词】** 鞭毛虫;树鼩;形态观察;18S rRNA

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0005-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.11.002

## Morphological observation and analysis of its 18S rRNA gene of flagellate in tree shrews

CHEN Ling-xia, YIN Bo-wen, LI Zhen-yu, SUN Xiao-mei, DAI Jie-jie

(Chinese Academy of Medical Sciences / Peking Union Medical College, Institute of Medical Biology, Center of Tree shrews Germplasm Resource, Yunnan Key Laboratory of major infectious diseases vaccine development, Kunming 650118, China)

**【Abstract】** **Objective** Morphological observation and gene analysis identification to the strain of flagellate in tree shrews. **Methods** The tree shrews ileocecal contents and feces by filtering centrifugal were observed microscopically direct smear and iodine staining, the total DNA extracted by the traditional method, the 18S rRNA of flagellate was amplified by PCR, then sequenced. Taking homology analysis by the BLAST, and developing the phylogenetic tree using MEGA5.1. **Results** Morphological observation showed that flagellate in tree shrews was tritrichomonas. Sequencing analysis indicated that homology of 18s ribosomal RNA between tree shrews giardia and the reported tritrichomonas fetus 18S ribosomal RNA (AY754332.1) was as high as 99%. **Conclusion** Tree shrews can affect tritrichomonas fetus and the results provide the basis for parasitology quality control of tree shrews.

**【Key words】** Flagellate; Tree shrews; Morphological observation; 18S rRNA

树鼩,属攀鼩目树鼩科的小型哺乳动物,与非人灵长类动物最为近似,分布于东南亚地区以及我国的云南、广西和海南等地<sup>[1]</sup>。树鼩具有体型小、繁殖周期短、操作简便和研究成本低等优点,且全

基因组研究发现它的代谢、神经及免疫系统与人类有着较为高度的同源性<sup>[2]</sup>,这使得树鼩在实验动物的地位越来越高。建立饲养繁殖、质量控制、微生物和寄生虫等级及检测标准是实现树鼩实验动物

**【基金项目】** 国家科技支撑计划项目(2014BAI01B01);云南省科技创新平台建设(2013DA002)。

**【作者简介】** 陈玲霞(1992 -),女,硕士,研究方向:实验动物质量标准化研究,E-mail: 1071508954@qq.com。

**【通讯作者】** 代解杰,男,研究员,项目负责人,E-mail: dj@imbcams.com.cn。

化的重要的基础性工作<sup>[3]</sup>。国际上 GPC<sup>[4]</sup>对树鼩肠道鞭毛虫做过感染率的调查与形态观察,但并没有进行分子生物学方法的鉴定。实验室前期对树鼩体内蠕虫感染率进行了调查<sup>[5]</sup>,种类不多但感染率高。目前对树鼩体内感染鞭毛虫鲜有报道,所以本次对树鼩鞭毛虫的研究调查有一定的意义。本研究采用形态学结合分子生物学方法<sup>[6-7]</sup>对该鞭毛虫进行鉴定,为树鼩进行生物净化及制定树鼩寄生虫等级检测标准提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

1. 随机采集树鼩种质资源中心饲养的普通级成年树鼩 10 只的回盲部内容物和成年树鼩 130 只的粪便。实验动物来源于医学生物学研究所树鼩种质资源中心【SCXK(滇)2013-0001】。实验操作在医学生物学研究所树鼩种质资源中心实验设施进行【SYXK(滇)2013-0001】。

### 1.2 实验设备和试剂

Eclipse 50i Nikon 显微镜, TP600 梯度 PCR 仪, NC320 电泳仪, Universal Hood II 凝胶成像系统, CT15RE 低温离心机, 载玻片。

PBS(购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司), 10% 甲醛(购自重庆川东化工), 碘液, Buffer TE(购自 AXYGEM), 10% SDS, 蛋白酶 K(购自 TIANGEN), 平衡酚(购自北京索莱宝科技有限公司), 氯仿(购自西陇化工), 异戊醇(购自西陇化工), 无水乙醇(购自西陇化工), PCR 扩增试剂盒 R011(购自大连宝生物)

### 1.3 方法

#### 1.3.1 直接涂片观察

用无菌采样棒取树鼩米粒大小粪便置于载玻片, 滴 1 滴 PBS, 低倍镜观察。

#### 1.3.2 碘液染色观察

取树鼩回盲部内容物, 加入 1 mL PBS 制成混悬液, 800 r/min 离心 3 min, 取上清置于干净的 dorf 管, 2500 r/min 离心 5 min, 倒掉上清, 加入 1 mL PBS 重悬。将处理后的悬液涂片, 滴 1 滴 10% 甲醛固定, 盖上盖玻片, 碘液染色 1 min, 40 倍镜下观察。

#### 1.3.3 DNA 提取

1、处理后的回盲内容物加入 376  $\mu$ L TE buffer, 再加入 20  $\mu$ L 10% SDS 和 4  $\mu$ L 蛋白酶 K(20 mg/mL), 混匀, 56 $^{\circ}$ C 2 h;

2、冷却至室温, 加入等体积 400  $\mu$ L 的平衡酚, 缓慢来回颠倒 10 min, 混合为乳浊液 11200 r/min 离心 10 min;

3、取上清至干净的 dorf 管中, 重复步骤 2;

4、取上清至干净的 dorf 管中, 加等体积氯仿: 异戊醇(24:1), 缓慢来回颠倒 10 min, 混为乳浊液, 11200 r/min 离心 10 min;

5、取上清至干净的 dorf 管中, 与两倍体积的冰乙醇混匀, 11200 r/min 离心 10 min;

6、弃上清, 用 75% 冰乙醇洗涤两次, 11200 r/min 离心 1 min, 倒掉上清, 自然风干沉淀;

7、加入 50  $\mu$ L 的 TE, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

#### 1.3.4 16S rRNA 基因扩增与序列分析

根据 NCBI 已发表的胎儿三毛滴虫 18 S rRNA 基因序列设计引物: 上游引物 P1: 5'-GCTCGTAGTCAGAACTGC -3'; 下游引物 P2: 5'-CCCAATTAGAACTCTATCTC -3' (引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司设计并合成)。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): dNTP 2  $\mu$ L, buffer 2.5  $\mu$ L, 上、下游引物各 0.2  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, 水 19  $\mu$ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1. 5% 琼脂糖凝胶电泳, 120V, 20 min, 检测 PCR 产物片段大小。将 PCR 产物冰冻包装邮寄至北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序。

登陆 NCBI, BLAST 进行核酸同源性比较, 应用 MEGA5.1 软件将测得序列与已报道的毛滴虫 18S rRNA 基因进行对比分析并绘制系统发育进化树。

## 2 结果

### 2.1 鞭毛虫感染及形态观察

直接涂片镜下观察粪便中的鞭毛虫, 共采新鲜粪便 130 份, 其中 129 份粪便中有游动活泼的鞭毛虫, 仅 1 份粪便镜下没有检出鞭毛虫, 感染率为 99.2%。

光学显微镜 200 倍下观察树鼩粪便涂片(彩插 4 图 1), 镜下可见大量活泼的蝌蚪形以转圈方式游动的虫体。经 10% 甲醛固定后进行碘液染色, 置于光学显微镜油镜(彩插 4 图 2)下观察虫体可见 3 根前鞭毛, 不同生长阶段的虫体前鞭毛数目 2~4 不等。测量虫体长度平均为 10  $\mu$ m, 宽度平均为 4  $\mu$ m, 前鞭毛长度平均为 5  $\mu$ m。1000 倍镜下观察可见由前上向后下呈波浪状运动的波动膜, 证实了

该滴虫以鞭毛转圈的方式游动。

**2.2 基因测序结果与序列分析**

应用所设计的引物体外扩增 18S rRNA, 扩增出的片段约为 646 bp, 与预期的扩增片段相符。

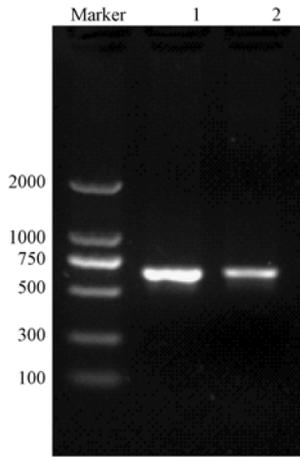


图 3 树鼩三毛滴虫 18S rRNA 基因的 PCR 扩增结果 (1、2 为样品)

Fig. 3 Identification of PCR-amplified tritrichomonas with 18S rRNA gene in tree shrews (1, 2 sample)

18S rRNA 基因的测序结果:

TGCTCGTAAGTTAGAAGCTGCTGCAAAGGCGT  
ACGAACTTCTGTTTCGTTTC50  
ACTGTGAACAAATCAGGACGCTTAGTGTATGG  
TTTTAGGAATGACTTAGC100  
GCAGTATGATATCTTTACCTTTGGTAAGATCAA  
TGAGAGCCACCGGGGGT150  
AGATCTATTTTCATGGCGAACGGTGAATGTTTT  
GACCCATGAGAGAGAAA200  
CGAAGCGGAAAGCATCTACCTAGAGGGTTTCT

GTCGATCAAGGGCGAGAG250  
TAGGAGTATCCAACCGGATCAGAGACCCGGGT  
AGTTCCTACCTTAAACGA300  
TGCCGACAGGGGCTTGTCTTTTCATGAGGGCA  
GGACCTTAGGAGAAATCA350  
TAGTTCCTTGGGCTCTGGGGAACTACGACCCG  
AAGGCTGAAACTTGAAGG400  
AATTGACGGAAGGGCACACCAGGGGTGGAGC  
TTGTGGCTTAATTTGAATC450  
AACACGGGGAAACTTACCAGGACCAGATGTTT  
TTAATGACTGACAGGCTT500  
CGGGTCTTTCAGGATATGACTTTTGGTGGTGCA  
TGGCCGTTGGTGGTGGC550  
TGGGTTGACCTGTCAAGCGTTGATTCAGATAA  
CGAGCGAGATTATCGCCA600  
ATTAATACTCGTTTCTGTTTACAGAGATAGAG  
TCTTAATTTGGGA646

以上基因序列通过 NCBI BLAST 进行核酸同源性比较, 结果与已报道的胎儿三毛滴虫的核酸序列 (AY754332. 1) 具有高度同源性, 同源性为 99%。与胎儿三毛滴虫序列比较, 在该滴虫上述序列第 9 位为插入碱基 A、第 12 位碱基 T-C 转换、第 39 位碱基 T-A 颠换、第 323 位碱基 C-T 转换、第 635 位碱基 C-T 转换、第 636 位碱基 T-C 转换、第 642 位碱基 T-G 颠换。

测得序列使用 MEGA5. 10 软件与已报道的相关毛滴虫 18S rRNA 基因对比分析绘制系统发育进化树, 结果表明树鼩三毛滴虫 18S rRNA 基因与已报道的胎儿三毛滴虫 18S rRNA (AY754332. 1) 位于同一进化分支, 与其他相关毛滴虫亲缘关系较远。

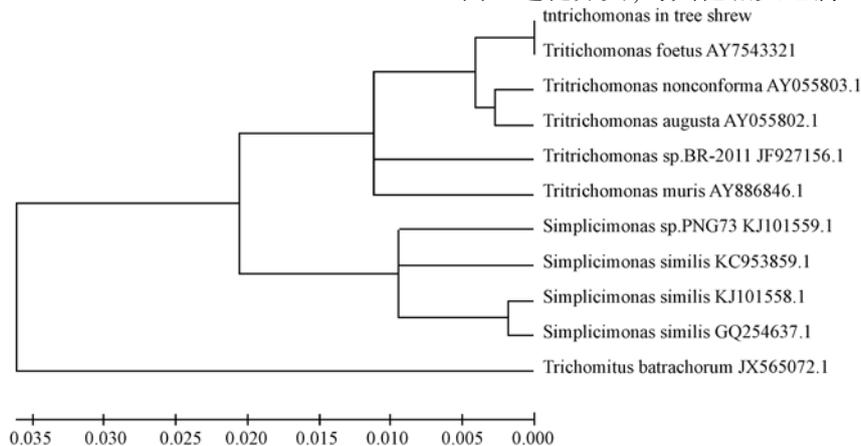


图 4 树鼩三毛滴虫与已报道毛滴虫 18S rRNA 的系统发育进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on 18S rRNA gene of tritrichomonas in tree shrews and the referenced tritrichomonas

### 3 讨论

胎儿三毛滴虫是导致牛生殖器疾病的一种寄生虫,寄生于公牛生殖器或其精液传播于母牛,可引起不育、流产或子宫积脓,危害性大<sup>[8]</sup>。已报道在急性呼吸窘迫综合症病人的呼吸道和腹泻猫、犬的肠道检测分离到胎儿三毛滴虫<sup>[9-11]</sup>。我们观察到树鼩的鞭毛虫分布于回肠末端、回盲端及结肠近端,这与已报道的树鼩鞭毛虫分布区域一致<sup>[4]</sup>。本研究中在一只肺部感染致死的树鼩的十二指肠、空肠、回肠、回盲端及结肠等消化道都检测发现数目不等的鞭毛虫,这提示鞭毛虫的寄生部位的扩散可能跟树鼩其它疾病的感染、免疫力低下等有一定的关联。

我们对树鼩的粪便直接涂片观察发现,其高度感染鞭毛虫(129/130份),且无明显病症。这与德国灵长类中心发现该鞭毛虫不侵入基底膜、不引起树鼩机体的免疫反应且无致病性的结果一致<sup>[4]</sup>。此外,研究过程中发现颜色呈胆汁色的粘状粪便中鞭毛虫数量明显高于正常灰棕色粪便的鞭毛虫数量,由此推测重度感染鞭毛虫可能会引起树鼩轻度腹泻,这与腹泻猫、犬分离出胎儿三毛滴虫的结果一致<sup>[10-11]</sup>,但该鞭毛虫直接或间接导致腹泻的原因还需要深入地研究查证。野生树鼩高度感染鞭毛虫,与树鼩在野外栖息环境和其杂食性的饮食习惯密切相关;而驯养树鼩高度感染鞭毛虫,与其饲养环境的卫生相关。被树鼩自身粪便污染的水盒,鞭毛虫通过粪口传播途径感染与其共同生活的成年树鼩或者幼年树鼩。因此,对于每批从野外引进的树鼩,在隔离期应进行抗寄生虫药物驱虫,保障饮水和食物符合卫生标准的前提下,水盒换成滴水式水瓶以防止外源物的污染,切断经水源的粪口传播途径。

本次从树鼩体内观察到的鞭毛虫,虫体呈蝌蚪状,有2~4根前鞭毛和1根后鞭毛,波动膜和肋发育良好,经形态学观察参照《实验大鼠、小鼠肠道鞭毛虫检索表》<sup>[12]</sup>,属于三毛滴虫属。形态学观察不同虫体的长度、形状和前鞭毛数目不同,2~4根前鞭毛不等,3根居多,该形态与GPC<sup>[4]</sup>只观察到3根前鞭毛有所不同,猜测这可能与该鞭毛虫的生长阶段有关。有个别虫体甚至无鞭毛,镜下只见波动膜的虫体部分,只依靠波动膜来运动。

通过对18S rRNA序列分析,表明该鞭毛虫与

胎儿三毛滴虫(AY754332.1)高度同源,其碱基转换频率<sup>[13]</sup>是颠换频率的2倍,其中转换碱基主要发生在T与C之间,颠换发生在T与A/G之间,一次碱基插入。且寄生部位、致病性与胎儿三毛滴虫相似。根据NCBI提供的有限数据对树鼩核基因18S rRNA序列测定分析,初步判断树鼩所感染的鞭毛虫是鞭毛纲毛滴虫目毛滴虫科三毛滴虫属胎儿三毛滴虫,而与鼠三毛滴虫等其它报道的三毛滴虫亲缘关系较远。

#### 参考文献:

- [1] 郑永唐,姚永刚,徐林. 树鼩基础生物学与疾病模型[M]. 昆明:云南科技出版社,2014:4-14.
- [2] 徐林,张云,梁斌. 实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述[J]. 动物学研究,2013,34(2):59-69.
- [3] 沈培清,郑红,刘汝文. 中国树鼩实验动物化研究进展和展望[J]. 动物学研究,2011,32(1):109-114.
- [4] Brack M, Kaup F J, Fuchs E. Intestinal trichomoniasis due to *Trichomonas mobilensis* in tree shrews (*Tupaia belangeri*) [J]. *Laboratory Animal Science*, 1995, 45(5):533-537.
- [5] 孙晓梅,全品芬,匡德宣. 野生树鼩肠道蠕虫感染调查及分析[J]. 中国比较医学杂志,2015,25(2):15-17.
- [6] Kamaruddin M, Tokoro M, Rahman M M, et al. Molecular Characterization of Various Trichomonad Species Isolated from Humans and Related Mammals in Indonesia [J]. *Korean Journal of Parasitology*, 2014, 52(5):471-478.
- [7] 史深,姚刚,岳城. 鼠三毛滴虫新疆灰仓鼠分离株形态学观察及其16S rRNA基因分析[J]. 中国实验动物学报,2014,22(4):28-30.
- [8] 韩贞珍. 毛滴虫病引起牛低育的临床症状、诊断及防控[J]. 现代畜牧科技, 2015,1:108-108.
- [9] Duboucher C, Pierce RJ, Capron M, et al. Recent advances in pulmonary trichomonosis [J]. *Trends in Parasitol*, 2008, 24(5):201-202.
- [10] Gookin J L, Birkenheuer A J, St J V, et al. Molecular characterization of trichomonads from feces of dogs with diarrhea [J]. *Journal of Parasitology*, 2005, 91(4):939-943.
- [11] Yao C, K02ster L S. *Trichomonas foetus* infection, a cause of chronic diarrhea in the domestic cat [J]. *Veterinary Research*, 2015, 46(35):2-16.
- [12] 高诚,符杰,王胜昌. 实验大鼠、实验小鼠肠道鞭毛虫种类和检索[J]. 中国兽医寄生虫病,1999,6(3):142-145.
- [13] Rowan R G, Hunt J A. Rates of DNA change and phylogeny from the DNA sequences of the alcohol dehydrogenase gene for five closely related species of Hawaiian *Drosophila* [J]. *Molecular Biology & Evolution*, 1991, 8(1):49-70.

[修回日期]2015-09-18



# 山羊上颌窦及额窦黏膜可承受压强的对比

韩奕诗<sup>1</sup>,任 桓<sup>2</sup>,孙小雪<sup>3</sup>,李岩峰<sup>1</sup>,孙一丹<sup>1</sup>,张 月<sup>1</sup>,胡 品<sup>1</sup>,包文雅<sup>1</sup>

(1. 解放军总医院第一附属医院口腔科(解放军总医院口腔医学中心),北京 100048;  
2. 78086 部队 50 分队卫生所,成都 610017;3. 武警辽宁总队医院脑系科,沈阳 110034)

**【摘要】 目的** 探讨山羊鼻窦(上颌窦及额窦)黏膜的可承受压强的差异并分析差异产生原因,为上颌窦底提升术中涉及黏膜问题时提供理论依据和指导。**方法** 从获取的每块鼻窦黏膜(上颌窦顶、上颌窦底及额窦黏膜)上切取所需大小黏膜,以推拉力计及自制夹具、压具测得可承受压强数值,采用配对 t 检验确定参数之间的关系,  $P < 0.05$  被视为差异有统计学意义。**结果** 山羊上颌窦顶黏膜可承受压强为  $260.08 \pm 80.12$  Kpa, 窦底黏膜为  $306.90 \pm 94.37$  Kpa, 额窦黏膜为  $121.72 \pm 31.72$  Kpa。上颌窦顶与额窦、上颌窦底与额窦、窦顶与窦底黏膜可承受压强均值之间差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。上颌窦顶黏膜较额窦可承受压强大,上颌窦底黏膜较额窦可承受压强大,上颌窦底黏膜较窦顶黏膜可承受压强也大。**结论** 额窦、上颌窦顶、上颌窦底黏膜可承受压强之间存在差异,且依次增大。

**【关键词】** 山羊;上颌窦底提升;窦黏膜;可承受压强

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0009-04

doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2015.11.003

## The comparative studies in goats about the membrane pressure of the top and the bottom of maxillary sinus and the frontal sinus

HAN Yi-shi<sup>1</sup>, REN Huan<sup>2</sup>, SUN Xiao-xue<sup>3</sup>, LI Yan-feng<sup>1</sup>, SUN Yi-dan<sup>1</sup>, ZHANG Yue<sup>1</sup>, HU Pin<sup>1</sup>, BAO Wen-ya<sup>1</sup>

(1. Stomatology Department, The first Hospital Affiliated to the PLA General Hospital, Beijing 100048, China;

2. Clinic, Squadron 50 of Unit 78086, Chengdu 610017, China;

3. Brain Science Department, Hospital of Liaoning Armed Police Force, Shenyang 110034, China)

**【Abstract】 Objective** To explore the differences of the membrane pressure about goat paranasal sinus membrane, and analyze the reasons that may cause these. The discussion can provide the theoretical basis and guidance for the issues of the maxillary sinus floor augmentation related to the membrane. **Methods** The membrane was cut into desired size from every sinus membrane. The pressure data could be measured by using the push-pull gauge and the homemade fixtures. A paired t-test was used to determine the relationships between the parameters,  $P < 0.05$  were accepted as statistically significant. **Results** The membrane pressure of the top of maxillary sinus was  $260.08 \pm 80.12$  Kpa, the bottom was  $306.90 \pm 94.37$  Kpa, the frontal sinus membrane was  $121.72 \pm 31.72$  Kpa. The mean differences of membrane pressure between the top of maxillary sinus and the frontal sinus, the bottom and the frontal, the top and the bottom were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The membrane pressure of the top of maxillary sinus was bigger than the frontal sinus membrane, The membrane pressure of the bottom of maxillary sinus was bigger than the frontal sinus membrane, The membrane pressure of bottom of maxillary sinus was bigger than the top. **Conclusions** The membrane pressure among the frontal

[基金项目] 解放军总医院临床扶植基金(2014FC-SXYY-1003);首都卫生发展科研专项(首发2014-4-5022)。

[作者简介] 韩奕诗,住院医师,硕士,E-mail: hanyishi@yeah.net;任桓,医师,E-mail: han\_huan@icloud.com。两者为共同第一作者。

[通讯作者] 李岩峰,副主任医师,副教授,博士。E-mail: m.god@yeah.net。

sinus, the top of maxillary sinus, and the bottom of maxillary sinus were different, and increased in turn.

【Key words】 Goat; Maxillary sinus floor elevation; Sinus membrane; Pressure

上颌窦黏膜的生物学特性与上颌窦提升时黏膜剥离的难易和成骨效果等因素密切相关,因此研究上颌窦黏膜生物学特性对临床上颌窦提升术黏膜的剥离与提升有重要指导意义。本实验将通过建立体外动物模型,初步研究山羊鼻窦(上颌窦、额窦)黏膜的可承受压强问题,增加对黏膜特性的了解,为上颌窦提升术中涉及到的黏膜特性问题和种植体的植入提供理论依据和指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物及材料、设备

18 月龄清洁级山羊 5 只,由解放军总医院第一附属医院动物实验中心提供,雌雄不限,体态身形大小接近,体重平均为 30~40 kg,身体健康,口腔、上颌窦无异常。动物实验于解放军总医院第一附属医院动物实验中心【SYXK(军)2012-0013】进行。

骨锯、自制黏膜剥离器、剪刀、弯止血钳、无齿镊、刀片、生理盐水、刻度尺、自制黏膜夹具和压具、推拉力计(温州一鼎, NK-20)、CT 设备(PHILIPS, Brilliance iCT)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验前期工作

实验模型的获得<sup>[1]</sup>:分离山羊头颅后立即行螺旋 CT 扫描,CT 拍摄前在双侧颊面部表面放置两小段牙胶条作为显影指示,扫描结束后即刻进行三维重建和分析(图 1)。根据影像指示在羊颌面部画截骨线锯开上颌骨,每侧上颌窦均分为顶、底两部分,最终每只山羊鼻窦均可获得左右两个上颌窦顶、左

右两个上颌窦底、左右两个额窦共 6 个窦腔。

#### 1.2.2 实验过程

黏膜剥离下来后平铺于操作台面上,每块黏膜均切取 20 mm × 20 mm 方形黏膜,用无齿镊夹取黏膜展平置于上下同心环形夹具之间(图 2、3),将推拉力计推力端与压具连接,对夹具内环所暴露的中央部位黏膜均匀施加垂直向下的压力,且施力过程中压具避免触碰夹具内环(图 4)。随推拉力计力值增大可见黏膜逐渐变薄和通透,继续施压直至黏膜破裂。

#### 1.2.3 数据及统计分析

选择配对 t 检验作为该实验统计学分析方法,软件应用 SPSS17.0 软件包。所有 P 值均为双边;  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

在压具对黏膜垂直向下加压过程中可见黏膜逐渐变薄且透明,感官上薄、透的黏膜较厚重黏膜容易压破,在黏膜破裂时读取推拉力计读数并记录(图 5、6)。

**2.1** 山羊上颌窦顶、上颌窦底、额窦黏膜可承受压强平均值和标准差(表 1)。

**2.2** 通过 SPSS 软件分析,各组数据服从正态分布,且方差齐性,应用配对 t 检验,得到:①上颌窦顶与额窦、上颌窦底与额窦黏膜可承受压强均值之间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );②上颌窦顶与窦底黏膜可承受压强均值之间差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )(表 2)。

表 1 黏膜可承受压强均值及标准差(Kpa)

Tab.1 The mean and the SD of membrane pressure(Kpa)

位置 Position	均值 Mean	标准差 SD	最小值 min	最大值 max
上颌窦顶 Top of maxillary sinus	260.08	80.12	152.58	388.39
上颌窦底 Bottom of maxillary sinus	306.90	94.37	169.92	471.62
额窦 Frontal sinus	121.72	31.72	69.36	162.99

表 2 黏膜可承受压强均值差异比较

Tab.2 Comparison of the mean difference between membrane pressure(Kpa)

配对组别 Groups	t 值 t	自由度 v	P 值 P-value
上颌窦顶-额窦 Top of maxillary sinus-Frontal sinus	5.131	9	0.001*
上颌窦底-额窦 Bottom of maxillary sinus-Frontal sinus	5.874	9	0.000*
上颌窦顶-上颌窦底 Top of maxillary sinus-Bottom	-2.892	9	0.018*

注: \*  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

Note: \*  $P < 0.05$  were accepted as statistically significant.

### 3 讨论

#### 3.1 实验动物和取材部位的确定

关于实验动物的选择原则上应选择与人类最为接近的灵长类动物如猴子,但考虑到价格和伦理问题,其并不十分适合。有学者利用兔子和犬进行上颌窦实验,但兔子和犬上颌窦小,相对不易操作,且有学者认为犬没有 Schneiderian 膜也不经历气化,有学者却不赞同该观点<sup>[2-4]</sup>;猪上颌窦大小合适,但猪上颌窦外侧壁较厚且皮质骨非常坚韧,且上颌窦黏膜较人类厚<sup>[5-6]</sup>。山羊上颌窦位置、大小形态和骨结构与人类相似,外侧壁骨板较薄,外科钻钻孔开窗以及黏膜的剥离和提升都较容易<sup>[7-8]</sup>;尤其山羊窦腔黏膜厚度、组织结构也近似于人类<sup>[9-10]</sup>,因此,本实验研究选择羊作为动物模型。

侧壁开窗式上颌窦底提升术与冲顶式上颌窦底提升术均需剥离和抬高上颌窦底黏膜,故我们首先考虑将上颌窦底黏膜纳入实验对象中来;并且侧壁开窗术式也需对上颌窦前外侧壁黏膜进行剥离,为将上颌窦其它位置黏膜与窦底黏膜进行对比,我们亦将距离窦底相对较远而易区分清楚的窦顶黏膜纳入。选择额窦黏膜,首先考虑作为上颌窦黏膜特性的对比研究,即使数值不作为上颌窦提升直接参考,但可更好了解上颌窦黏膜生物学特性及分析形成该特性的可能原因。

#### 3.2 实验技术关键点

实验前行 CT 扫描和重建分析,旨在了解上颌窦和额窦的大小、上颌窦外侧壁骨板厚度等,确定双侧上颌窦与参照物(牙胶条)间的位置关系指导截骨;并当出现上颌窦分嵴、黏膜转折和变移时,在黏膜剥离等操作前给予提示和指导。

为保证实验不受其他因素的干扰,应在保证操作质量前提下尽量缩短操作时间。窦腔和正进行剥离的黏膜应随时用室温生理盐水润湿以防止黏膜干燥引起性状改变;为降低实验结果的偶然误差、保证实验结果和最终数据的准确性,窦黏膜的剥离由一人完成。

#### 3.3 黏膜形态学表现

在剥离和切取上颌窦黏膜时,即可直观发现不同位置黏膜之间的厚度、颜色、质地、通透性和剥离时手感等均有不同:黏膜透明、纤薄时剥离时容易发生卷曲也易破裂,黏膜发白、厚重时剥离相对容易,不易破裂。而实验过程中黏膜形态学变化已

叙述。

#### 3.4 压具和夹具的改进

压具曾使用过推拉力计自带的金属压具,夹具曾利用粗圆线将黏膜平铺捆绑在有螺纹的瓶口处,该方法耗时费力,也易松脱,效果均不佳。经历大量预实验失败经验以及对先前学者的参考<sup>[11]</sup>,压具最终采用底面直径为 6 mm 的自凝塑料圆柱体,底面边缘打磨抛光圆钝。夹具改用上下两片同心环金属片夹持黏膜,两金属片由螺丝固定拧紧,由于在垂直向下压迫黏膜时下方金属片内环上缘与黏膜接触,为避免压具对黏膜施加压力时黏膜被金属边缘的锐边刮破,故将下方金属片内环上缘磨圆钝(图 7)。

#### 3.5 对结果的分析

总体来说上颌窦黏膜韧性较大,上颌窦提升操作时若不以锐利器械施加过大的力作用于上颌窦黏膜,黏膜并不会轻易穿破,本实验压具底面直径为 6 mm,其推拉力计测定数值约为 0.6~0.9 kg,最小值为上颌窦顶的 0.44 kg,接近于 500 mL 瓶装水重量,若临床接触黏膜的操作器械面直径与本实验不同,操作力值亦作相应调整。但本实验为山羊窦黏膜,尽管山羊上颌窦情况与人类十分类似,但数值建议作为参考,完全以本数值为依据还需谨慎操作。

山羊上颌窦顶、上颌窦底、额窦黏膜可承受压强均值大小不同,我们从上颌窦、额窦解剖方面分析:①上颌窦与额窦黏膜可承受压强差别考虑可能原因:1)窦腔开口位置不同<sup>[12]</sup>;2)神经支配不同。②上颌窦底与上颌窦顶、额窦黏膜可承受压强差别可能原因:咀嚼力传导致不同位置窦黏膜刺激大小不同。该猜想还有待进一步验证。

#### 参考文献:

- [1] 樊佳东. 新型剥离器的优化和对羊上颌窦底黏膜剥离的对比研究[D]. 辽宁医学院,2014.
- [2] Allegrini S Jr, Yoshimoto M, Salles MB, et al. Bone regeneration in rabbit sinus lifting associated with bovine BMP [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2004,68(2):127-131.
- [3] Haas R, Mailath G, Dörtbudak O, et al. Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus augmentation: analysis of interfacial bond strength of dental implants using pull-out tests [J]. Clin Oral Implants Res. 1998,9(2):117-122.
- [4] 李祥,朱双喜,黄代营,等. 上颌窦外提升及同期牙种植动物模型的建立 [J]. 中国口腔种植学杂志,2010,15(4):165

- 167.

[ 5 ] Estaca E, Cabezas J, Usón J, *et al.* Maxillary sinus-floor elevation; an animal model[J]. Clin Oral Implants Res. 2008, 19(10):1044 – 1048.

[ 6 ] Stelzle F, Benner KU. An animal model for sinus floor elevation with great elevation heights. Macroscopic, microscopic, radiological and micro-CT analysis; ex vivo [ J ]. Clin Oral Implants Res. 2010,21(12):1370 – 1378.

[ 7 ] Derong Z, Lian G, Jiayu L, *et al.* Anatomic and histological analysis in a goat model used for maxillary sinus floor augmentation with simultaneous implant placement[J]. Clin Oral Implants Res. 2010,21(1):65 – 70.

[ 8 ] Grageda E, Lozada JL, Boyne PJ, *et al.* Bone formation in the maxillary sinus by using platelet-rich plasma; an experimental study in sheep[J]. J Oral Implantol. 2005;31(1):2 – 17.

[ 9 ] López-Niño J, García-Caballero L, González-Mosquera A, *et al.* Lamb ex vivo model for training in maxillary sinus floor elevation surgery; a comparative study with human standards [ J ]. J Periodontol. 2012,83(3):354 – 361.

[ 10 ] 肖菲,赵保东,王维英,等. 用盘钻经牙槽嵴提升上颌窦底手术的

术的临床效果观察[J]. 中华口腔医学杂志,2011,46(6):321 – 325.

[ 11 ] Pommer B, Unger E, Sütö D, *et al.* Mechanical properties of the Schneiderian membrane in vitro [J]. Clin Oral Implants Res. 2009,20(6):633 – 637.

[ 12 ] 汪运坤,林清霞,张开文. 上颌窦窦口的应用解剖学观测 [J]. 耳鼻咽喉头颈外科,1999,03:39 – 42.

[ 修回日期 ] 2015 – 10 – 10

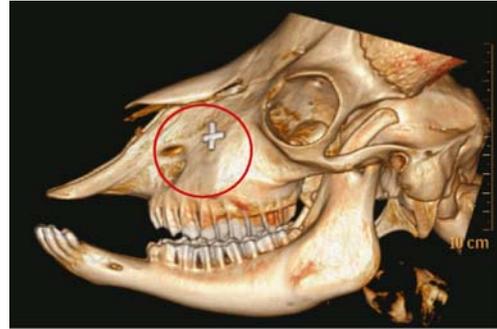


图 1 羊颅骨三维重建

Fig.1 Three-dimensional reconstruction of the goat skull

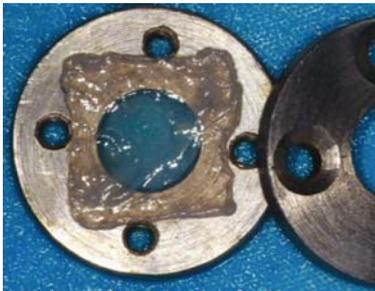


图 2 黏膜置于夹具间  
Fig.2 Membrane infixtures



图 3 拧紧螺丝  
Fig.3 Screw down



图 4 垂直施压  
Fig.4 Pressure vertically



图 5 黏膜中央穿破  
Fig.5 Membranecentre break

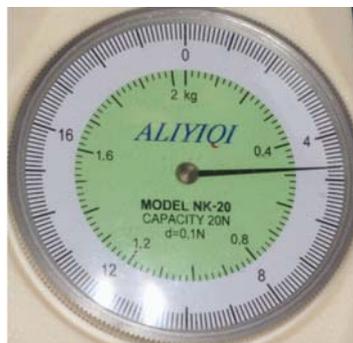


图 6 推拉力计读数  
Fig.6 Reading of the push – pull gauge



图 7 改进后的压具、夹具  
Fig.7 Instrument after improvement



# 人工饲养树鼩皮肤真菌携带的调查

尹博文, 陈玲霞, 李振宇, 李娜, 孙晓梅

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心,  
云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 昆明 650118)

**【摘要】 目的** 调查人工饲养条件下树鼩皮肤真菌携带情况, 为实验树鼩的微生物质量控制提供依据。**方法** 刮取79只树鼩皮肤表皮碎屑, 包括野生来源的51只和人工繁殖的F1代28只, 采用沙氏青霉素瓶斜面法和沙氏平皿培养法分别进行培养, 对长出的每株真菌进行取样涂片染色, 显微镜镜检观察真菌形态, 用酚氯仿法提取真菌DNA, PCR扩增ITS基因, 测序后经BLAST进行核酸同源性比对, 进一步鉴定分析。**结果** 野生来源树鼩有9份样长出真菌, F1代有3份样长出真菌菌落, 携带率分别15.69%和10.71%。所有真菌DNA最后进行BLAST比对鉴定后发现为7个种属的真菌, 但均无致病性。**结论** 人工饲养的树鼩种群中皮肤真菌携带率较低, 并且随繁殖代数增加而下降, 未检测到皮肤病原真菌。

**【关键词】** 树鼩; 皮肤真菌; ITS基因扩增; 鉴定

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0013-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.11.004

## The survey of dermatophyte in artificial feeding of tree shrews

YIN Bo-wen, CHEN Ling-xia, LI Zhen-yu, LI Na, SUN Xiao-mei

(Center of Tree shrews Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infection Diseases, Kunming 650118, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the pathogenic dermal fungi in tree shrews from the center of germplasm resources, to provide the basic data for the experimental tree shrews' microbiological quality control. **Methods** 79 samples obtained from tree shrews were inoculated on Sabouraud's platiculture and slant cultivation, 51 of which are from the wild origin and 28 from artificial feeding F1 generation, and they were subjected to microscope observation. Then extracted DNA with traditional methods. Amplify the ITS gene by PCR. Finally sequencing by blast of nucleotide homology analysis. **Results** 9 samples of the wild tree shrews turned into growing fungus, and so as 3 of the F1 generation. The carrying rate are 15.69% and 10.71% respectively. All fungi were found to be non-pathogenic followed BLAST. **Conclusion** The carrying rate of dermatophyte in artificial feeding of tree shrews is very low, and which decreased with the increasing breeding generation. Pathogenic dermal fungi has not been found.

**【Key words】** Tree shrew; Dermatophyte; ITS gene amplification; Identification

树鼩作为灵长类动物的近亲, 被用于建立各种人类疾病模型研究, 越来越受到研究工作者的重

视<sup>[1]</sup>。在树鼩的实验动物化研究过程中建立普通级、清洁级、无特定病原体菌级动物群需要对多种

[基金项目] 国家科技支撑计划(2014BAI01B01); 云南省科技创新平台建设(2013DA002)。

[作者简介] 尹博文(1990 -), 男, 硕士, 研究方向: 实验动物病原学。E-mail: 464503114@qq.com。

[通讯作者] 孙晓梅(1963 -), 女, 主任技师。E-mail: sxm@imbcams.com.cn。

病原进行检测和控制。其中,皮肤病原真菌(pathogenic dermal fungi)是常见的致病菌<sup>[2-3]</sup>,可引起人兽共患的皮肤病,主要侵害人和动物的皮肤、毛发等部位,各种实验动物均可感染,但可随着饲养设施和环境条件的改善而得到控制。关于树鼩皮肤病原真菌的调查国外鲜有报道,国内多数是关于家兔的皮肤真菌报道<sup>[4-5]</sup>,仅邢进等<sup>[6]</sup>对 61 只刚从野外捕获的树鼩真菌携带情况进行了调查。本调查研究着重关注于长期饲养的野生树鼩及 F1 代的真菌携带情况,排除饲养环境引起的致病真菌,为动物净化提供依据。本次从树鼩身上分离得到的皮肤真菌仅通过形态观察难以鉴定,而菌种间 ITS 区域存在着变异,研究 ITS 序列为菌种分类鉴定提供了十分可靠的证据,所以本次实验结合纯培养、形态观察及 ITS 序列分析进行综合鉴定<sup>[7-9]</sup>。通过本次调查为制定树鼩微生物学等级及监测提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

野生来源树鼩 51 只已在该设施中人工饲养了一年,F1 代树鼩 28 只由本单位人工繁殖,年龄为 1~2 岁的皮肤样本。饲养环境:温度 22℃~28℃,相对湿度 30%~60%,噪音≤40 dB,光照强度 100~1501 Lx。实验动物来源于医学生物学研究所树鼩种质资源中心【SCXK(滇)K2013-0001】。实验操作在医学生物学研究所树鼩种质资源中心实验设施进行【SYXK(滇)K2013-0001】。

### 1.2 仪器及试剂

Eclipse 50i Nikon 显微镜,Universal Hood II 凝胶成像系统,CO2 T/C 恒温培养箱,BS100S 电子天平,R-708 水平电泳槽,CT15RE 低温离心机,CU420 恒温水浴锅,TOMY-SS-325 高压灭菌锅,ND1000 紫外分光光度计,TP600 梯度 PCR 仪,NC320 电泳仪,载玻片;PBS(购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司),棉蓝染色液(购自珠海),Buffer AE(购自 QIAGEN),平衡酚(购自北京索莱宝科技有限公司),氯仿(购自西陇化工),异戊醇(购自西陇化工),无水乙醇(购自西陇化工),PCR 扩增试剂盒 R011(购自大连宝生物)CTAB 提取液(NaCl、Tris-HCl、EDTA 配制)

### 1.3 方法

#### 1.3.1 真菌的分离培养

剔除树鼩背部约 2 cm<sup>2</sup> 的毛发,露出皮肤,用医用酒精消毒,刮取皮肤表面碎屑,沙氏青霉素瓶斜面三点 28℃ 培养 7 d。将青霉素瓶斜面分离培养得到的菌株接种至沙氏平皿培养基上进行纯培养,28℃ 5 d。

#### 1.3.2 染色法观察

取一清洁载玻片,滴加棉蓝染色液 1 滴,然后挑取培养物或标本少许于其中,用接种针将其摊开,加盖玻片微微加温并稍压盖片除去气泡后镜检,真菌将染成蓝色。

#### 1.3.3 真菌 DNA 提取

长出的菌落取约 1 cm<sup>2</sup> 用无菌纱布过滤,无菌蒸馏水洗涤 2~3 遍,沥干水分;将菌体放入无菌研钵中,用足量的液氮将其研至粉末状;加入 1~2 倍体积的 65℃ 预热 30 min 的 CTAB 提取液,充分混匀,65℃ 水浴 30~60 min,其间上下轻缓混合 2~3 次,12000 r/min 离心 5 min;取上清,加入等体积的酚-氯仿-异戊醇(25:24:1),上下轻缓混合 10 min,12000 r/min 离心 5 min;重复一抽提一次;小心取上清,加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1),上下轻缓混合 10 min,12000 r/min 离心 5 min;小心取上清,加入 2 倍体积的无水冰乙醇和 1/10 体积的 3 mol/L 的氯化钠,4℃,12000 r/min 离心 15 min;弃上清,70%的冰乙醇冲洗 2 遍,自然晾干,溶于 TE buffer 中。

#### 1.3.4 真菌 ITS 基因扩增与分析

真菌 ITS 序列通用引物 ITS 1 和 ITS 4 由昆明硕擎生物科技有限公司合成。上游引物(ITS1)为:5'-TCCGTAGGTGAA CCTGCCG-3' 下游引物(ITS4)为:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。将 PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳 90V 50 min 检测片段大小,并将阳性结果的 PCR 产物送至昆明硕擎生物科技有限公司测序。登录 NCBI BLAST 进行核酸同源性比较。

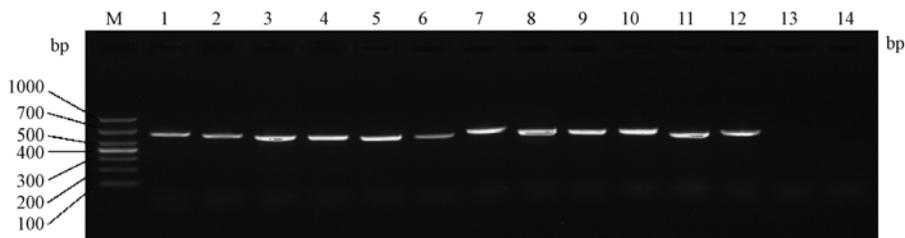
## 2 结果

### 3.1 真菌分离培养

将 79 份斜面沙氏培养基长出的 12 株真菌转接于沙氏平皿培养基上进行培养。培养 10 d 后,观察到若干真菌菌落形态。

### 3.2 真菌分离株电泳结果

真菌提取的 DNA 通过 PCR 后进行电泳,见图 1。M 为 1000 bp DNA marker,1-12 为 12 真菌



注: M: 1000 bp DNA marker; 1 - 12: 12 株真菌 PCR 产物; 13: 钩端螺旋体爪哇型阴性对照; 14: 空白对照。

图 1 12 株真菌 DNA 电泳图

Fig. 1 The DNA electrophoresis of the twelve fungus

表 1 树鼯皮肤分离的真菌和携带率

Tab. 1 Pathogenic dermal fungi in tree shrews and the carrying rate

树鼯来源 Tree shrew resource	采样数 Samples	分离的真菌种类名称 The separated fungus species	检出数 Detected number	携带率 Carrying rate
野生 Wild origin	n = 51	干朽菌属 <i>Byssomerulius corium</i>	2	15. 69%
		Didymellaceae <i>leptosphaerulina</i>	1	
		青霉菌属 <i>Penicillium commune</i>	4	
		链格孢属 <i>Alternaria alternate</i>	2	
		枝孢菌属 <i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	
		人工繁育 F1 代 F1 generation	n = 28	
	毛壳菌属 <i>Chaetomium subaffine</i>	1		

DNA 电泳情况, 片段大小在 500 bp ~ 800 bp 之间, 13 爪哇型为钩端螺旋体的阴性对照, 14 为空白对照。

### 3.3 体表真菌种类鉴定

本次从饲养的野生树鼯和 F1 代树鼯的体表皮肤结痂碎屑及毛发经沙氏斜面培养和沙氏平皿培养后, 分离到真菌。经真菌菌落观察、菌丝染色后镜下形态观察及 ITS 序列分析, 鉴定真菌为 7 个属的 7 种真菌。其中饲养的野生树鼯青霉菌 (*Penicillium*)、链格孢 (*Alternaria alternate*) 和干朽菌 (*Byssomerulius corium*) 检出率最高。而 F1 代树鼯分离到三株真菌, 分别为枝状枝孢菌 (*Cladosporium cladosporioides*)、局限曲霉 (*Aspergillus restrictus*) 及近缘毛壳菌 (*Chaetomium subaffine*) (表 1)。

## 4 讨论

树鼯作为一种实验动物新资源, 对其自身携带的皮肤病原真菌的研究报道甚缺。本次调查旨在了解树鼯资源种质中心人工饲养的树鼯皮肤真菌的携带情况, 特别是是否携带人兽共患致病性较高

的皮肤病原真菌, 如石膏样小孢子菌、石膏样毛癣菌、羊毛状小孢子菌以及猴类毛癣菌<sup>[10-11]</sup>, 为其微生物质量控制提供依据。

此次调查采用形态观察结合分子生物学的方法, 较传统单纯的形态学观察能更加直接精确地鉴别真菌种类。在分离树鼯皮肤真菌的过程中, 参考了实验动物国家标准 GB/T14926. 4 - 2001<sup>[13]</sup> 实验动物皮肤病原真菌检测要求, 沙氏试管斜面三点培养法, 并结合周莎桑<sup>[8]</sup> 等改良的实验动物皮肤病原检测方法, 即沙氏平皿培养法, 最后确定用沙氏青霉素瓶斜面三点培养法分离真菌并用沙氏平皿法转接获得纯培养。青霉素瓶瓶身较试管短, 操作时更方便并且受污染的概率更小。其次, 青霉素瓶体积较试管小, 培养基需量更少, 操作时受到培养基颜色深度的干扰更低。由于有时会存在多种菌混合生长的情况, 这种方法能有效地避免漏检, 并且能获得菌株的纯培养。

从已报道的文献来看, 从啮齿类、兔、犬、猴等实验动物中均能分离到上述的皮肤病原真菌, 但这些病原菌是可以随着饲养设施和环境条件的改善

来得以控制的。至今针对实验树鼩皮肤病原真菌的报道仅有一篇,即邢进等从树鼩中共分离到 11 种真菌,归于 10 个属,其中 1 株为致病菌即石膏样毛癣菌<sup>[6]</sup>。本次对树鼩种质资源中心饲养的野生树鼩和 F1 代的皮肤病原真菌调查,并没有分离到致病真菌。所分离得到的菌株有青霉菌、曲霉菌等,与邢进等分离到的真菌结果一致,但携带率偏低。分析表明这可能是与树鼩长期的饲养卫生、环境、饲料、温湿度控制和单独小笼饲养等方式相关。室内环境洁净度高于野外,从根本上切断树鼩皮肤病原真菌的感染途径。在室内环境中,致病菌也有可能是在人工饲养的条件下,携带率慢慢降低,最终控制在很低的水平。从实验结果可以发现野生树鼩分离到的真菌株多于 F1 代动物群,表明随着人工饲养时间的增加,其微生物的携带率会逐步的下降。对于树鼩携带真菌的调查,今后还将进一步扩大采样量,筛查真菌,以确保树鼩真菌携带率的重复性与其携带真菌的具体情况提供参考依据。

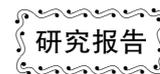
另外,从邢进等的研究和本次调查结合来看,树鼩皮肤病原真菌的携带率非常低。除了上文叙述的可能性因素外,也存在树鼩对上述的皮肤病原真菌不易感的可能性。后期将加大样本量的采集,若能得到相同的结果,那么说明本单位树鼩种质资源中心饲养繁殖树鼩的微生物皮肤病原真菌即得到了控制。

已有研究显示动物与不同微生物群落共生可能会导致宿主的不同结局,影响宿主的健康。如巴拿马金蛙的不同共生微生物群落可能会导致宿主的不同结局,影响宿主的健康<sup>[12]</sup>。所以,我们将在今后研究中针对树鼩皮肤真菌的调查与筛选范围进一步扩大微生物群落,如细菌、真菌等及群落之间的联系,更系统地阐明皮肤致病性的多因素原因,而非单一因素。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 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, 30(2):59-63.
- [ 2 ] 温海. 医学真菌学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2012:14-19.
- [ 3 ] Ainsworth G C. Fungus diseases of animals. [J]. Nature, 1950, 166(4222):547-549.
- [ 4 ] 李明勇,牟特,刘曼,等. 兔皮肤病原真菌的分离及其 ITS 序列的分析鉴定[C]// 第四届(2014)中国业发展大会会刊 2014.
- [ 5 ] 崔丽娜,姜文学,杨丽萍,等. 家兔皮肤真菌通用引物 PCR 检测和培养鉴定的比较研究[J]. 西南农业学报, 2011, 24: 2389-2391.
- [ 6 ] 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, 29(3):34-38.
- [ 7 ] 陈凤毛. 真菌 ITS 区序列结构及其应用[J]. 林业科技开发, 2007, 21:5-7.
- [ 8 ] 周莎桑,戴方伟,宋晓明,等. 实验动物皮肤病原真菌检测方法的改良[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20:58-60.
- [ 9 ] Rittenour W R, Ciaccio C E, Barnes C S, *et al.* Internal transcribed spacer rRNA gene sequencing analysis of fungal diversity in Kansas City indoor environments[J]. Environmental Science Processes & Impacts, 2013, 16:33-43.
- [ 10 ] 吴绍熙. 人畜共患真菌病原菌的分类[J]. 中国人兽共患病学报, 1986, 2(1):34-36.
- [ 11 ] Khaled J M, Golah H A, Khalel A S, *et al.* Dermatophyte and non dermatophyte fungi in Riyadh City, Saudi Arabia[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2015, (47):604-609.
- [ 12 ] Becker M H, Walke J B, Cikanek S, *et al.* Composition of symbiotic bacteria predicts survival in Panamanian golden frogs infected with a lethal fungus[J]. Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences, 2015, 282(1805):1-9.
- [ 13 ] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京:人民军医出版社, 2000:141-149.

[修回日期]2015-10-10



## 鹌鹑高尿酸血症动物模型脂代谢研究

马丽<sup>1</sup>, 曾贵荣<sup>1,2</sup>, 张妙红<sup>1</sup>, 邓青<sup>1</sup>, 张丹<sup>1</sup>, 罗术佳<sup>1</sup>,  
潘善庆<sup>1</sup>, 姜德建<sup>1</sup>, 王小青<sup>1</sup>

(1. 湖南省药物安全评价研究中心, 长沙 410331; 2. 北京协和医学院药用植物所, 北京 100193)

**【摘要】** 目的 研究鹌鹑高尿酸血症动物模型及脂代谢。方法 采用高脂饲养鹌鹑 30 d 后, 灌胃给予腺嘌呤 (50 mg/只), 连续 7 d, 建立鹌鹑高尿酸血症模型, 观察 22 d 后, 取血检测血尿酸、黄嘌呤氧化酶、肌酐 (CRE)、尿素氮 (BUN)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白 (LDL)、高密度脂蛋白 (HDL)、总胆固醇 (CHO)、黄嘌呤氧化酶 (XOD)、肝脂酶 (HL)、脂蛋白脂酶 (LPL)、腺苷脱氢酶 (ADA) 脂代谢指标, 取关节和肾脏进行组织病理学检查。结果 模型对照组动物血尿酸均明显升高 ( $P < 0.01$ ), CRE、BUN、TG、LDL、XOD 均有明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 血清 CHO、LPL、ADA、HDL 含量明显降低 ( $P < 0.05$ )。造模后动物足趾关节明显肿大, 周围软组织肿胀。X 光显示足趾骨密度减低, 部分关节面破坏呈溶骨性破坏。病理学检查可见关节滑膜增生, 有大量炎症细胞浸润, 部分被纤维结缔组织替代, 肾脏组织肾小管及间质可见尿酸盐结晶, 部分小管轻度扩张, 肾间质纤维增生, 并伴有大量炎症细胞浸润。结论 该模型具有关节肿大、肾脏尿酸盐沉积等肾脏损伤, 且伴有脂代谢紊乱, 其病理机制与 XOD、ADA 相关脂代谢酶活性有关。

**【关键词】** 鹌鹑; 高尿酸血症; 脂代谢

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0017-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.11.005

### Lipid metabolism study quail high uric acid hematic disease animal model

MA Li<sup>1</sup>, ZENG Gui-rong<sup>1,2</sup>, ZHANG Miao-hong<sup>1</sup>, DENG Qing<sup>1</sup>, ZHANG Dan<sup>1</sup>, PAN Shan-qing<sup>1</sup>, JIANG De-jian<sup>1</sup>, WANG Xiao-qing<sup>1</sup>

(1. Hunan Center for Drug Safety Evaluation, Changsha 410331, China; 2. Institute of Medicinal Plant Beijing Union Medical College, Beijing 100193, China)

**【Abstract】 Objective** To study quail high uric acid hematic disease animal model and lipid metabolism. **Methods** Quail were used high fat feed after thirty days, gastric gavage adenine (50 mg/only) seven days in a row. Quail high uric acid hematic disease animal model was set up. Observed in twenty-two days, blood was tested blood uric acid, xanthine oxidase, creatinine (CRE), urea nitrogen (BUN), triglycerides (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-c), high density lipoprotein (HDL), xanthine oxidase (XOD), hepatic lipase (HL), lipoprotein lipase (LPL), adenosine dehydrogenase (ADA) lipid metabolism index, joints and kidneys for histopathological examination. **Results** Model control group animals blood uric acid were significantly increased ( $P < 0.01$ ), CRE, BUN, TG, LDL and XOD were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), serum CHO, LPL, ADA, HDL content significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Animal toes jointed obvious swollen after building, surrounding soft tissue swelling. X-ray showed toes bone density decrease, part of the joint surface damage is dissolved bony destruction. Pathological examination showed joint synovial hyperplasia, there

[基金项目] 科技部新药创制重大科技专项(2011ZX09401-301-1)。

[作者简介] 马丽(1983-), 女, 硕士, 主要从事新药安全性评价研究。E-mail: muwukuhe@126.com。

[通讯作者] 王小青, 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事新药安全性评价研究。

was a lot of inflammatory cells infiltration, part is replaced by fibrous connective tissue, Kidney tissue renal tubule and interstitial visibled urate crystals, part of the tubular mild expansion, renal interstitial fibers hyperplasia, accompanied by a large number of inflammatory cells infiltration. **Conclusion** The model has swollen joints, kidney urate deposition kidney injury associated with lipid metabolism disorders, pathological mechanisms and XOD increased ADA.

**【Key words】** Quail; Hyperuricemia; Lipid metabolism

痛风(gout)是长期嘌呤代谢障碍、尿酸增高引起组织损伤的一组异质性疾病。临床特点是:高尿酸血症(hyperuricemia)、痛风性急性关节炎反复发作、痛风石沉积、特征性慢性关节炎和关节畸形,常累及肾脏引起慢性间质性肾炎和肾尿酸结石形成<sup>[1]</sup>。本研究通过建立一种稳定持久的高尿酸血症的动物模型,同时研究该模型脂代谢相关指标的变化。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物

普通级迪法克鹌鹑,雄性,30日龄,购于北京市德岭鹌鹑养殖场,在湖南省药物安全评价研究中心普通级环境饲养【SYXK(湘)2010-0008】,动物检疫合格证:1100063965。

### 1.2 试剂及试剂

腺嘌呤(批号:71016588;Sigma公司产品);尿酸检测试剂盒(批号:108274,日本和光纯药工业株式会社产品);CRE测定试剂盒(批号:901892,日本和光纯药工业株式会社产品);BUN测定试剂盒(批号:909104,日本和光纯药工业株式会社产品);TG测定试剂盒(批号:010568,日本和光纯药工业株式会社产品);黄嘌呤氧化酶(批号:120305,美国RD公司产品);脂蛋白脂酶(批号:111225,美国RD公司产品);肝脂酶(批号:120224,美国RD公司产品);腺苷脱氢酶(批号:120315,美国RD公司产品)。

### 1.3 仪器及器材

MR-96A酶标仪(深圳迈瑞公司生产);柯达72型X光机(柯达公司);自动生化分析仪(日本日立公司生产);RM2235型石蜡切片机、TP1020型全自动脱水机、HI1220型烤片机、HI1210型摊片机、EG1150H+C型组织包埋机、DFC 420C型病理成像系统(德国Leica公司生产)。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS17.0进行统计分析,计量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ ),评价时考虑统计学差异和生物学意义。

## 1.5 方法<sup>[2-4]</sup>

### 1.5.1 造模与分组

普通级迪法克鹌鹑30只,雄性,30日龄,体重164.2~210.4g,以上动物按尿酸兼顾体重随机分成2组,分别为空白对照组、模型对照组,每组15只,空白组给予标准鹌鹑饲料(玉米60%、麸皮15%、鱼粉3%、豆粕15%)喂养,模型对照组给予高钙鹌鹑饲料(玉米54%、麸皮2%、鱼粉7%、豆粕30%)喂养,摄食约33g/只/日,自由饮水,连续喂养30d,然后模型对照组灌胃腺嘌呤混悬液(50mg/只),灌服体积1mL/只,每天1次,连续7d,连续观察22d。分别于造模后第11、22天翅下静脉采血测定尿酸值,末次采血后取材。

### 1.5.2 检测指标:

①尿酸③采用影像学X光照射进行摄片观察骨趾软组织变化。③第11天,第22天取血测定尿酸。末次给药采血测定肌酐(CRE)、尿素氮(BUN)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)、总胆固醇(CHO)黄嘌呤氧化酶(XOD)、鸟脂蛋白脂酶(LPL)、鸟肝脂酶(HL)、腺苷脱氢酶(ADA)。

## 2 结果

### 2.1 鹌鹑高尿酸血症模型血清尿酸、肾功能及相关脂代谢酶的影响

如表1~3所示,与正常对照组比较,模型对照组动物第11、22天尿酸显著升高( $P < 0.01$ ),模型对照组动物肾功能指标CRE、BUN、TG、LDL、XOD均有显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),血清CHO、LPL、ADA、HDL含量显著降低( $P < 0.05$ )。

表1 鹌鹑高尿酸血症模型尿酸的含量

Tab.1 Quail high uric acid hematic disease model of blood uric acid levels

组别	尿酸(mmol/L)	
	D <sub>11</sub>	D <sub>22</sub>
正常对照组	133.1 ± 6.9	168.6 ± 25.8
模型对照组	230.7 ± 63.0**	374.8 ± 210.5**

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

**表 2** 鹌鹑高尿酸血症模型肾功能、甘油三酯、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、胆固醇含量  
**Tab. 2** Quail high uric acid hematic disease model of kidney, triglyceride, low density lipoprotein cholesterol (HDL) content

组别	BUN ( $\mu\text{mol/L}$ )	CRE ( $\mu\text{mol/L}$ )	TG ( $\text{ng/L}$ )	LDL ( $\mu\text{mol/L}$ )	HDL ( $\mu\text{mol/L}$ )	CHO( $\mu\text{mol/L}$ )
正常对照组	0.13 ± 0.07	0.50 ± 0.34	0.18 ± 0.07	0.47 ± 0.04	3.83 ± 0.77	7.4 ± 0.5
模型对照组	0.64 ± 0.52**	2.70 ± 1.81*	1.59 ± 0.71**	2.33 ± 0.97**	2.72 ± 0.17*	9.6 ± 0.3*

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

**表 3** 鹌鹑高尿酸血症模型相关血脂代谢酶活性的影响

**Tab. 3** The quail high uric acid hematic disease model related lipid metabolic enzyme activity

组别	XOD( $\text{ng/L}$ )	LPL( $\text{ng/L}$ )	ADA( $\text{ng/L}$ )	HL( $\text{ng/L}$ )
正常对照组	32.7 ± 3.2	123.4 ± 23.4	61.9 ± 13.9	72.8 ± 22.0
模型对照组	38.4 ± 2.8**	106.4 ± 14.8*	30.8 ± 11.5*	72.4 ± 17.9

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

## 2.2 组织病理学

### 2.2.1 关节 X 摄片及组织病理学检查

如彩插 5 图 1 所示,造模型后,模型对照组动物足趾关节明显肿大,X 光摄片显示模型对照组足趾骨头部骨密度减低,边缘可见小碎骨片,关节面破坏,第四趾末结趾骨呈溶骨性破坏,周围软组织肿胀。病理观察可见模型对照组动物关节滑膜增生,有大量炎症细胞浸润,部分被纤维结缔组织替代,软骨细胞排列不规则,簇集、层次紊乱。

### 2.2.2 肾脏组织病理学检查

如彩插 5 图 2 所示,模型对照组肾脏组织肾小管及间质可见尿酸盐结晶,部分小管轻度扩张,肾间质纤维增生,并伴有大量炎症细胞浸润。

## 3 讨论

目前痛风的发病率日益增高,已成为当今世界尤其是中老年的常见病。鹌鹑作为禽类与人的嘌呤核苷酸代谢途径相似,建立高尿酸血症模型具有明显的优势。本研究采用灌胃给予腺嘌呤配合高脂饲料建立鹌鹑高尿酸血症模型,采用 X 光和病理及血尿酸动态监测模型,研究发现造模后动物关节明显肿大,组织病理学检查可见关节纤维结缔组织增生及炎症细胞浸润,肾脏有不同程度的炎症细胞浸润,提示该方法建立典型的痛风模型是成功的。腺嘌呤是一种含氮杂环嘌呤类化合物,给予大量腺嘌呤后,能干扰正常的嘌呤代谢致血尿酸升高,其代谢途径与人类相近,造模型方法类似于人类过量高蛋白饮食导致嘌呤核苷酸代谢紊乱诱发的高尿酸血症相符合<sup>[5]</sup>,XOD 在嘌呤代谢中催化次黄嘌呤使之转化为黄嘌呤,并催化黄嘌呤使之转化为尿酸,调控尿酸生产的最终环节,是尿酸代谢过

程中的关键酶,控制嘌呤核苷酸分解代谢的关键酶有腺苷脱氨酶(ADA)和 XOD,ADA 占优势地位<sup>[6]</sup>,ADA 参与尿酸生成,可催化次黄嘌呤核苷酸和脱氧次黄嘌呤核苷的生成,再经过嘌呤核苷磷酸化酶的作用生成次黄嘌呤,最终经 XOD 作用生成尿酸<sup>[7]</sup>。模型组动物 ADA 活性呈现较低水平,肝脂酶(HL)在肝细胞中合成,肝脂酶与脂蛋白脂酶(LPL)是清除血浆脂蛋白中所含 TG 的限速酶,主要催化血浆乳糜微粒和极低密度脂蛋白中的甘油三酯和磷脂水解,HL 缺乏可使血浆胆固醇和 TG 升高,能使乳糜微粒和 VLDL、低密度脂蛋白中的甘油三酯分解减少,进入肝细胞内的乳糜微粒和 LDL 中的甘油三酯和脂肪酸含量增加,肝细胞内甘油三酯合成增加,导致甘油三酯在肝细胞内堆积<sup>[8-10]</sup>。综上所述,本研究建立鹌鹑高尿酸血症模型有关节肿大、肾脏尿酸盐沉积等肾脏损伤,且伴有脂代谢紊乱,与临床发病症状类似,对研究抗痛风药物提供了稳定的动物模型。

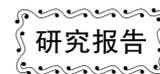
### 参考文献:

- [1] 陈光亮,王琳琳. 防治痛风的药物研究进展[J]. 国外医学内分泌学, 2005,25(4):277-279.
- [2] 杨会军,李兆福,彭江. 高尿酸血症动物模型研究概况[J]. 中医学报,2013,1:60-62.
- [3] 刘小青,张冰,胡京红,等. 鹌鹑高尿酸血症模型建立及菊苣提取物对其影响的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2003,1:44-47.
- [4] 林志健,刘小青,张冰,等. 基于指标量化的高尿酸血症鹌鹑模型中医证候分型研究[J]. 中华中医药杂志,2011,5:1072-1076.
- [5] 陈光亮,徐叔云. 高尿酸血症动物模型研究进展[J]. 中国药理学通报,2004,20(4):373-377.
- [6] 李荣华,聂摇慧,刘友章. 痛风动物模型的研究现状及评价

- [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1519 - 1512.
- [7] 孔悦, 张冰, 刘小青, 等. 黄嘌呤氧化酶活性在高尿酸血症动物模型中的变化[J]. 北京中医药大学学报, 2004, 6: 38 - 40
- [8] 张冰, 刘小青, 丁正磊, 等. 鹤鹑高尿酸血症模型发病机理研究[J]. 北京中医药大学学报, 2006, 9: 595 - 598
- [9] 张剑勇, 刘题章, 邱侠摇, 等. 痛风泰颗粒对兔滑膜细胞 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(2): 103 - 105.
- [10] 张晓刚. 肝脂酶与脂蛋白代谢[J]. 国外医学. 临床生物化学与检验学分册, 2002, 1: 48 - 49.
- [修回日期] 2015 - 10 - 21

(下接第 36 页)

- [14] Schwab CL, Fan R, Zheng Q, *et al.* Modeling and predicting stress-induced immunosuppression in mice using blood parameters [J]. *ToxicolSci*, 2005, 83(1): 101 - 113.
- [15] Kiank C, Holtfreter B, Starke A, *et al.* Stress susceptibility predicts the severity of immune depression and the failure to combat bacterial infections in chronically stressed mice[J]. *Brain BehavImmun*, 2006, 20(4): 359 - 368.
- [16] 光炎. 免疫学原理[M]. 第一版. 上海: 上海科学技术出版社, 2007, 87 - 94.
- [17] 金惠铭, 王建枝. 病理生理学[M]. 第六版. 北京: 人民卫生出版社, 2004, 144 - 151.
- [18] Moberg GP, Mench JA. 动物应激生物学: 动物福利的本质和基本原理[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005, 28 - 41.
- [19] 吴剑平, 杨斐, 胡樱. 常规实验操作对 Wistar 大鼠的影响[J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(4): 312 - 317.
- [20] 杨斐, 胡樱, 许兰文. 小鼠福利受损模型的建立及营养干预作用的研究[J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(2): 74 - 79.
- [21] 尹建春, 颜军. 不同应激方式对大鼠体内  $\beta$ -内啡肽的影响[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(9): 1146.
- [22] 徐志伟, 严灿, 李艳, 等. 慢性心理应激大鼠血浆及中枢  $\beta$ -EP、ACTH 含量的变化及调肝治法方药的影响[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(5): 37 - 39.
- [23] 陈主初, 王树人. 病理生理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001, 184 - 185.
- [修回日期] 2015 - 09 - 18



# 甲醛致兔窦房结损伤模型的建立

刘学武<sup>1,2</sup>, 王小青<sup>1,2</sup>, 赵 丞<sup>2</sup>, 张 丹<sup>2</sup>, 李晓晖<sup>1</sup>, 姜德建<sup>1,2</sup>

(1. 中南大学药学院, 长沙 430013; 2. 湖南省药物安全评价研究中心, 长沙 410331)

**【摘要】** 目的 建立甲醛诱导的兔窦房结损伤模型。方法 采用40%甲醛溶液损伤兔窦房结, 检测心率、窦房传导时间、窦房结恢复时间和校正窦房结恢复时间等指标, 比较不同损伤方法、损伤程度、损伤持续时间等, 并采用阳性药对模型进行验证。结果 (1) 损伤方法: 湿敷法可通过时间及面积大小控制损伤程度; 滴注法创伤小, 可通过甲醛量来控制损伤程度, 但易造成窦房结周围组织损伤; (2) 损伤程度和维持时间: 心率下降百分率小于基础心率的30%时, 模型维持时间小于7 d; 下降至基础心率的30%~60%时, 模型维持时间可达70 d; 下降大于60%基础心率的模型动物死亡率较高; (3) 阳性药物的验证: 阿托品和心宝丸均增加窦房结损伤模型心率, 改善窦房结功能的作用。结论 甲醛湿敷法建立兔窦房结损伤模型较滴注法可靠性更高, 损伤程度宜将心率下降百分率控制在基础心率30%至60%之间, 模型维持时间长且动物死亡率低。

**【关键词】** 兔; 甲醛; 窦房结损伤

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0021-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.11.006

## Establishment of formaldehyde-induced sinoatrial node damage model in rabbits

LIU Xue-wu<sup>1,2</sup>, WANG Xiao-qing<sup>1,2</sup>, ZHAO Chen<sup>2</sup>, ZHANG Dan<sup>2</sup>, LI Xiao-hui<sup>1</sup>, JIANG De-jian<sup>1,2</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 430013;

2. Hunan Provincial Research Center for Safety Evaluation of Drugs, Changsha 410331)

**【Abstract】 Objective** To establish formaldehyde-induced sinoatrial node damage model in rabbit. **Methods** 40% formaldehyde were used to damage the sinoatrial node area of rabbits. The parameters including heart rate, sinoatrial conduction time, sinus node recovery time, and the corrected sinus node recovery time were measured after formaldehyde-induced damage. The differences of the methods, degrees and duration of formaldehyde-induced damage were compared, and the reabilities of models were confirmed by positive control drug in the experiments. **Results** (1) Damage method: In formaldehyde wet compressing method, the damage degree can be controlled by regulating the compressing timing and area. Comparing to the former, the less injuries was caused and the damage degree could be controlled by regulating the drip speed of formaldehyde in the formaldehyde drip method; but it tends to injure the surrounding tissue of the sinus node. (2) Damage degree and maintenance of the model: the damages only maintained less than 7 days, when the percentage of heart rate decreased less than 30% of basic heart rate, and its lasted more than 70 days, when the percentage of heart rate decreased to 30%~60% of basic heart rate, but the heart rate decreased more than 60% of basic heart rate would lead to

[基金项目] 湖湘青年科技创新人才基金(2014)。

[作者简介] 刘学武(1988-), 男, 在读硕士, 研究方向为心血管药理学。E-mail: liuxuewu@hnsc.org。

[通讯作者] 姜德建(1979-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为新药药理学和毒理学。E-mail: jiangdejian@hnsc.org。

higher death rate. (3) Verification of positive drugs: both atropine and xinbao pill could increase the heart rates of sinoatrial node damage model, and improve the sinus function. **Conclusions** Formaldehyde wet compressing method has more reabilites than formaldehyde drip method, and the percentage decreased in heart rate of damage degree should be controlled between 30% to 60% of basic heart rate, so that the duration of models are longer, and the death rates are lower.

**【Key words】** Rabbit; Formaldehyde; Sinoatrial node damage model

病态窦房结综合症(简称病窦)是由于窦房结及其周围组织病变,导致窦房结冲动形成障碍和/或冲动传出障碍而产生心律失常(主要是窦性心动过缓、窦性停搏及窦房传导阻滞)和一系列临床表现的综合征,目前临床缺乏疗效确切的治疗药物<sup>[1-4]</sup>。建立病窦模型的方法包括有冷冻、注射、钳夹、电灼烧、甲醛损伤等方法,其中以甲醛损伤法最为常用<sup>[4-6]</sup>。甲醛损伤窦房结可用浸泡甲醛的纱布湿敷窦房结部位或采用微量注射器向窦房结位置注射微量的甲醛<sup>[4-13]</sup>,但是尚无研究报道不同甲醛损伤方法的差异以及损伤程度与模型持续时间之间的关系。本实验采用家兔甲醛损伤模型,比较甲醛湿敷法和微量注射法建模的优缺点,并观察不同损伤程度兔病窦模型心脏电生理功能的动态变化,然后采用阳性药阿托品和心宝丸对模型的可靠性进行验证,以此建立甲醛致兔窦房结损伤模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

兔 36 只,普通级,雌雄各半,体重 2.0~3.6 kg,购于武汉市万千佳科技有限公司【SCXK(鄂)2011-0011】;在湖南省药物安全评价研究中心普通环境饲养【SYXK(湘)2010-0008】。

#### 1.1.2 主要试剂

心宝丸,由广东心宝制药有限公司生产,规格:60 mg/粒,批号:20130604/20140201。阿托品片,山东仁和堂药业有限公司生产,规格:0.3 mg/片,批号:130604。甲醛购自国药集团化学试剂有限公司;乌拉坦购自国药集团化学试剂有限公司。

#### 1.1.3 主要仪器

B203LED 型生物显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司);DF-5A 型心脏电生理刺激仪(苏州市东方电子仪器厂);BL420S 生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验设计与分组

#### 1.2.1.1 甲醛湿敷法和滴注法造模的比较

兔经耳缘静脉注射 20% 乌拉坦 4~5 mL/kg 麻醉后固定,连接体表心脏 II 导联。以第三肋骨水平为中心备皮、消毒后沿胸骨正中偏右 2~3 mm 纵行切开皮肤约 3 cm,分离皮下组织及肌肉,切断第 2~4 肋骨,开胸并避免损伤右胸廓内动脉及右侧胸膜,经纵隔纵向剪开心包膜,暴露右心房,用注射器连接套管,深入心包膜腔内侧,轻轻吸取心包液。

心房调搏法测量窦房结功能:用 7F 四极食道电极导管(起搏电极)的起始端第 1、2 电极连接心脏电生理刺激仪,末端的第 1 电极连接于自制标测电极,放置于右心房高位,第 2 电极连接外接导线并插入胸部肌肉形成回路,进行心房调搏,测量兔造模前及造模后的窦房传导时间(sinoatrial conduction time, SACT)、窦房结恢复时间(sinus node recovery time, SNRT)、校正窦房结恢复时间(corrected sinus node recovery time, SNRTc)。

湿敷法<sup>[4-11]</sup>:用干棉签轻放于右心耳处,轻轻将心脏拨向左侧,暴露右心房与上腔静脉交界(窦房结区),用 40% 甲醛将棉签底部(3 mm×3 mm)充分浸润,轻轻送至窦房结区,并湿敷 3~5 min。当心率较湿敷前下降 30% 以上或出现窦性停搏、窦房阻滞或结性逸搏时取出棉签,观察心律变化情况。对未出现上述心律失常者则持续湿敷,并继续观察心律情况,如心率恢复到原心率的 60% 以上则需重新湿敷。1 h 后再次测量 SACT、SNRT、SNRTc。

滴注法<sup>[4-11]</sup>:将自制标测电极一端连接于心脏 V1 导联,另一端放置于窦房结区,标测窦房结电图,并固定位置,然后将自制标测电极末端接上装有 40% 甲醛的微量注射器,弹丸样缓慢推注。当心率较注射前下降 30% 以上或出现窦性停搏、窦房阻滞或结性逸搏时暂停推注,观察心律变化情况。对未出现上述心律失常者则持续推注,最大量至 0.03 mL。1 h 后再次测量 SACT、SNRT、SNRTc。

#### 1.2.1.2 兔窦房结损伤模型损伤程度及维持时间的探索

湿敷法复制兔窦房结损伤模型:将模型按心率

下降百分率分为 3 组,分别为小于 30% 基础心率组、30% ~ 60% 基础心率组、大于 60% 基础心率组。其中小于 30% 基础心率组的入选条件为造模后 1 h 心率下降程度小于基础心率的 30%, 30% ~ 60% 基础心率组的入选条件为造模后 1 h 心率下降程度为基础心率的 30% ~ 60%, 大于 60% 基础心率组的入选条件为造模后 1 h 心率下降大于基础心率的 60%。测量各组兔造模前及造模后 1 h 心率、SACT、SNRT、SNRTc,并分别于造模后第 7、14、28、56、70 天重复测量各组模型兔的心率。

### 1.2.1.3 阳性药物对兔窦房结损伤模型的影响

选取用 40% 甲醛湿敷制模法、心率下降百分比在 30% ~ 60% 的模型,于手术后 7 d 重新测量心率,并计算心动周期(sinus cardiac length, SCL),选取心动周期的延长( $\Delta SCL$ ) $\geq 100$  ms 的模型兔 24 只,按心率分层随机分为模型对照组、阿托品组(0.13 mg/kg)、心宝丸组(78 mg/kg),每组 8 只。另取 8 只兔,作为假手术组,仅打开胸腔,剪开心包膜,不进行甲醛湿敷。每日给药前将心宝丸、阿托品片(研磨成粉)用蒸馏水配制成相应浓度药液,各组兔按 5 mL/kg 灌胃给予相应剂量药液,假手术组、模型对照组灌胃给予等体积蒸馏水,1 次/天,连续 28 d。测量各组兔给药前及给药第 14、28 天的心率、SACT、SNRT、SNRTc。

### 1.2.2 检测指标

#### 1.2.2.1 心率

分别测量兔造模前及造模后心率,并根据心率计算心率下降百分率、SCL 及  $\Delta SCL$ 。心率下降百分率 = (基础心率 - 造模后心率)  $\div$  基础心率  $\times 100\%$ ; SCL (ms) = 1000  $\times$  60  $\div$  心率;  $\Delta SCL$  = 造模后 SCL - 造模前 SCL。

#### 1.2.2.2 窦房结功能

以高于心率的刺激频率进行心房调搏,测量兔 SACT、SNRT、SNRTc,具体测量方法如下:

SACT:参考 Narula 法<sup>[5,12,16]</sup>测定 SACT,起搏电压 3.0 mV,脉宽 10 ms,采用高于基础心率 10% 的频率作为刺激频率。将起搏电极放置于右心房高位,连续刺激 8 次,并在心电图上计算 SACT, SACT = (A2 ~ A3) / 2 - (A1 ~ A1) / 2,其中 A1 为短促起搏前窦性 P 波; A2 为末个起搏脉冲, A3 为起搏后恢复的第 1 个 P 波; A1 ~ A1 为基本窦性周期, A2 ~ A3 为起搏后窦性节律恢复时间,1 min 后重复测量一次,取两次测量的平均值作为 SACT。

SNRT:参考 S<sub>1</sub>S<sub>1</sub> 超速抑制分级递增法<sup>[5,12,17-18]</sup>测量 SNRT,起搏电压 3.0 mV,脉宽 10 ms,分别采用高于基础心率 20%、40%、60%、80% 的频率作为刺激频率,将起搏电极放置于右心房高位,连续刺激 15 s,每次刺激间隔 30 s 以上。以末次刺激至窦房结功能恢复(体表心电图上表现为起搏后的窦性 P 波)的间期为 S<sub>1</sub>P,取四次刺激最长的 S<sub>1</sub>P 作为 SNRT。

SNRTc: SNRTc = SNRT - SCL。

### 1.3 统计方法

采用 SPSS16.0 进行统计分析,统计学意义的水平设定为  $P < 0.05$ 。计量资料采用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )。两两配对资料采用配对 t 检验;多重随机分组资料,用 Leven's test 方法检验正态性和方差齐性。如果符合正态性和方差齐性,用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 post Hoc LSD 进行统计分析;如果不符合正态性和方差不齐,则用 Kruskal-Wallis 检验。如果 Kruskal-Wallis 检验有统计学意义( $P < 0.05$ ),则用 Dunnett's Test(非参数方法)进行比较分析。

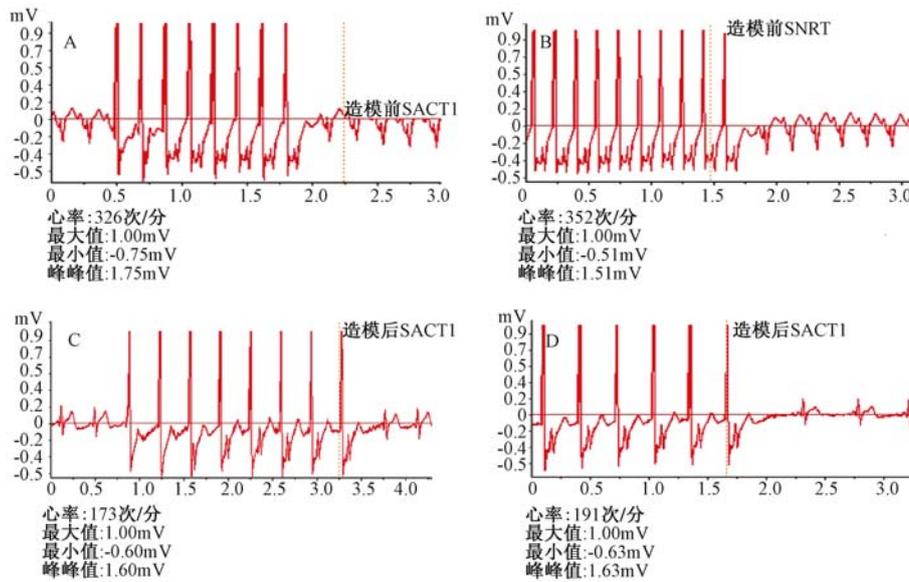
## 2 结果

### 2.1 兔窦房结损伤造模模型方法确定

采用滴注法制备甲醛窦房结损伤模型时,因窦房结的位置不是平行于水平面,标测电极导管固定于窦房结上,并缓慢推注 40% 甲醛溶液时,由于心脏的跳动,且心脏表面是光滑的,甲醛溶液不能吸附于窦房结表面,容易流动至心脏的其它部位而引起损伤。另外窦房结电图的测量容易受到周围组织电信号的干扰,且不同文献报道的窦房结电图存在一定程度的变异<sup>[5,11,14-15]</sup>。以上原因导致滴注法复制兔窦房结损伤模型有一定困难。采用湿敷法造模时,将浸有甲醛溶液的棉签附着于窦房结区,对窦房结组织造成持续的损伤,且可通过湿敷时间及湿敷面签的面积大小来控制损伤程度,造模后心率显著下降, SACT、SNRT、SNRTc 显著延长(图 1)。

### 2.2 兔窦房结损伤模型损伤程度及维持时间的确定

如表 1 所示,与造模前比较,小于 30% 基础心率组、30% ~ 60% 基础心率组、大于 60% 基础心率组家兔造模 1 h 后 SACT、SNRT、SNRTc 均显延长,提示窦房结功能低下。



注: A:造模前 SACT (19.3ms); B:造模前 SNRT (245ms), SNRTc = 35ms; C:造模 1h 后 SACT (45.3ms); D:造模 1h 后 SNRT (570ms), SNRTc = 210ms。

图 1 窦房结损伤模型窦房结功能的变化

Note: A: SACT(19.3ms) before modeling; B: SNRT(245ms) and SNRTc(35ms) before modeling; C: SACT(45.3ms) after modeling 1 hour; D: SNRT(570ms) and SNRTc(210ms) after modeling 1 hour.

Fig. 1 The changes of sinus node function in sinoatrial node damage models

表 1 不同损伤程度窦房结损伤模型窦房结功能的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Tab. 1 The comparisons of sinus node function in different injury degree sinoatrial node damage models ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别 Group	SNRT(ms)		SNRTc(ms)		SACT(ms)	
	造模前 Before modeling	造模后 1 h After modeling for 1 hour	造模前 Before modeling	造模后 1 h After modeling for 1 hour	造模前 Before modeling	造模后 1 h After modeling for 1 hour
小于 30% 基础心率组 Less than 30% of basic heart rate group	300.0 ± 31.2	393.3 ± 29.3 <sup>▲</sup>	59.7 ± 9.2	110.3 ± 18.5 <sup>▲▲</sup>	16.7 ± 9.0	40.6 ± 9.4 <sup>▲▲</sup>
30% - 60% 基础心率组 30% - 60% of basic heart rate group	290.0 ± 27.8	685.0 ± 227.0 <sup>▲▲</sup>	66.0 ± 21.6	207.2 ± 90.4 <sup>▲▲</sup>	18.9 ± 5.5	69.9 ± 21.2 <sup>▲▲</sup>
大于 60% 基础心率组 More than 30% of basic heart rate group	277.3 ± 46.8	906.7 ± 141.9 <sup>▲▲</sup>	50.7 ± 12.1	275 ± 73.7 <sup>▲▲</sup>	13.3 ± 7.6	103.3 ± 27.9 <sup>▲▲</sup>

注:与造模前比较<sup>▲</sup> $P < 0.05$ ,<sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ 。

Note:<sup>▲</sup> $P < 0.05$ ,<sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ , compared with premodeling.

如表 2、表 3 所示,分别重复测量小于 30% 基础心率组、30% ~ 60% 基础心率组、大于 60% 基础心率组兔造模后第 7、14、28、46、70 天的心率,其中小于 30% 基础心率组兔于造模后第 7 天心率先即明显上升,与造模前比较无明显差异,且  $\Delta SCL$  小于 100 ms,不符合窦房结损伤模型的成模标准,故停止对小于 30% 基础心率组兔进行造模后的重复测量;30% ~ 60% 基础心率组兔造模后第 7、14、28、46、70

天的心率虽有一定恢复,但均显著低于造模前心率 ( $P < 0.01$ ),且  $\Delta SCL$  均大于 100 ms,符合窦房结损伤模型的成模标准;大于 60% 基础心率组兔造模后第 7 天心率先即显著低于造模前心率 ( $P < 0.01$ ),且  $\Delta SCL$  均大于 100 ms,但在造模 7 d 后死亡,大体解剖可见动物全身水肿,可能与局部损伤过于严重,引起兔心衰所致。

表 2 不同损伤程度窦房结损伤模型心率的变化( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Tab. 2 The changes of heart rate in different injury degree sinoatrial node damage models( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别 Group	心率(次/min) Heart rate(Beat/min)						
	造模前 Before modeling	造模后 1 h After modeling for 1 hour	造模后 7 d After modeling for 7 days	造模后 14 d After modeling for 14 days	造模后 28 d After modeling for 28 days	造模后 56 d After modeling for 56 days	造模后 70 d After modeling for 70 days
小于 30% 基础心率组 Less than 30% of basic heart rate group	290.7 ± 21.8	217.7 ± 16.9	283.3 ± 33.0	—	—	—	—
30% - 60% 基础心率组 30% - 60% of basic heart rate group	274.3 ± 16.7	139.0 ± 37.3	157.3 ± 20.5	147.3 ± 3.2	177.0 ± 10.5	183.0 ± 6.2	169.0 ± 18.0
大于 60% 基础心率组 More than 30% of basic heart rate group	283.7 ± 48.2	103.0 ± 23.5	114.3 ± 17.0	—	—	—	—

注:与造模前比较 ▲ $P < 0.05$ , ▲▲ $P < 0.01$ 。

Note: ▲ $P < 0.05$ , ▲▲ $P < 0.01$ , Compared with premodeling.

表 3 不同损伤程度窦房结损伤模型心动周期的变化( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Tab. 3 The changes of cardiac cycle in different injury degree sinoatrial node damage models( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别 Group	心率下降百分率(%) Percentage decrease in heart rate(%)	$\Delta$ SCL(ms)				
		造模后 7 d After modeling for 7 days	造模后 14 d After modeling for 14 days	造模后 28 d After modeling for 28 days	造模后 56 d After modeling for 56 days	造模后 70 d After modeling for 70 days
小于 30% 基础心率组 Less than 30% of basic heart rate group	25.1 ± 0.8	6.5 ± 16.0	—	—	—	—
30% - 60% 基础心率组 30% - 60% of basic heart rate group	49.6 ± 11.4	166.3 ± 48.0	188.1 ± 10.7	120.5 ± 23.9	108.9 ± 3.8	108.9 ± 3.8
大于 60% 基础心率组 More than 30% of basic heart rate group	63.9 ± 2.0	317.3 ± 80.8	—	—	—	—

表 4 兔窦房结损伤模型给药前心率及 $\Delta$ SCL 的变化( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Tab. 4 The changes of heart rate and  $\Delta$ SCL before treatment compared in sinoatrial node damage models( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别 Group	剂量 (mg/kg) Dose (mg/kg)	造模前心率 (次/min) Heart rate before modeling( Beat/min)	心率下降百分率(%) Percentage decrease of heart rate(%)	给药前心率 (次/min) Heart rate before treatment (Beat/min)	$\Delta$ SCL(ms)
假手术组 Sham operated group	—	286.8 ± 18.0	—	281.9 ± 20.0	—
模型对照组 Model control group	—	291.6 ± 36.1	36.0 ± 3.4	169.9 ± 23.1 <sup>++▲▲</sup>	150.8 ± 37.4
阿托品组 Atropine group	0.13	278.7 ± 29.9	38.7 ± 8.4	171.5 ± 20.1 <sup>++▲▲</sup>	149.0 ± 38.9
心宝丸组 Xinbao pill group	78	271.3 ± 25.5	38.6 ± 10.4	170.5 ± 21.1 <sup>++▲▲</sup>	140.0 ± 39.2

注:与造模前比较 ▲▲ $P < 0.01$ ,与假手术组比较<sup>++</sup> $P < 0.01$ 。

Note: ▲▲ $P < 0.01$ , compared with premodeling, <sup>++</sup> $P < 0.01$ , compared with sham group.

### 2.3 心宝丸及阿托品对兔窦房结损伤模型的影响

如表 4、5 所示,与假手术组比较,其它各组兔给药前心率显著下降( $P < 0.01$ ),且造模后心率下降百分率均在 30% ~ 60% 范围内;各给药组兔  $\Delta$ SCL 均大于 100 ms,且给药前心率均较造模前显著降低( $P < 0.01$ );各组兔组间进行比较,给药前心率及  $\Delta$ SCL 无明显差异;与模型对照组比较,心宝丸组及

阿托品组兔给药 14、28 d 后心率均显著升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

如表 6 所示,与假手术组比较,模型对照组兔 SACT、SNRT、SNRTc 均显著延长( $P < 0.01$ ),提示窦房结损伤模型复制成功;与模型对照组比较,心宝丸组及阿托品组兔给药 28 d 后 SACT、SNRT、SNRTc 均显著缩短( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

表 5 兔窦房结损伤模型给药后心率的变化( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )Tab. 5 The changes of heart rate compared in sinoatrial node damage models after treatment( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别 Group	剂量 (mg/kg) Dose (mg/kg)	给药前心率 (次/min) Heart rate before treatment (Beat/min)	给药 14 d 心率 (次/min) Heart rate after 14 days treatment (Beat/min)	给药 28 d 心率 (次/min) Heart rate after 28 days treatment (Beat/min)
假手术组 <i>Sham operated group</i>	—	281.9 ± 20.0	285.6 ± 16.0	282.0 ± 15.2
模型对照组 Model control group	—	178.5 ± 44.7 <sup>++</sup>	178.8 ± 27.9 <sup>++</sup>	180.0 ± 40.8 <sup>++</sup>
阿托品组 Atropine group	0.13	171.3 ± 38.4 <sup>++</sup>	212.1 ± 34.4 <sup>*</sup>	226.6 ± 31.4 <sup>*</sup>
心宝丸组 Xinbao pill group	78	177.3 ± 28.5 <sup>++</sup>	259.5 ± 30.8 <sup>**</sup>	239.4 ± 5.0 <sup>**</sup>

注:与假手术组比较<sup>++</sup> $P < 0.01$ ,与模型对照组比较<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note: <sup>++</sup> $P < 0.01$ , compared with sham group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , compared with model group.

表 6 兔窦房结损伤模型给药后窦房结功能的变化( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )Tab. 6 The changes of sinus node function compared in sinoatrial node damage models after treatment( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别 Group	剂量(mg/kg) Dose(mg/kg)	SACT(ms)	SNRT(ms)	SNRTc(ms)
假手术组 <i>Sham operated group</i>	—	19.6 ± 16.7	274.0 ± 59.3	76.0 ± 67.5
模型对照组 Model control group	—	103.6 ± 65.9 <sup>++</sup>	574.4 ± 190.6 <sup>++</sup>	200.5 ± 69.2 <sup>++</sup>
阿托品组 Atropine group	0.13	77.2 ± 26.1 <sup>*</sup>	376.9 ± 71.5 <sup>*</sup>	146.0 ± 68.2 <sup>*</sup>
心宝丸组 Xinbao pill group	78	46.9 ± 21.0 <sup>**</sup>	333.4 ± 56.4 <sup>**</sup>	121.3 ± 74.9 <sup>*</sup>

注:与假手术组比较<sup>++</sup> $P < 0.01$ ,与模型对照组比较<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note: <sup>++</sup> $P < 0.01$ , compared with sham group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , compared with model group.

### 3 讨论

动物病窦模型对研究病窦的发生机制及其临床防治有重要意义。我们通过比较两种方法(甲醛湿敷法和滴注法)建立兔窦房结损伤模型,发现滴注法虽充分利用了窦房结电图的特异性,角度新颖,且对兔创伤相对较小,但同样存在窦房结电图的测量相对困难,容易受到心脏其它部位类似波形的干扰,造模损伤程度不易控制等缺点。湿敷法虽然对兔创伤大,但便于控制模型的损伤程度。然而不管采用何种方法复制窦房结损伤模型,其成模标准均以多样本兔的实验组与对照组之间的统计学差异来确定。但对某一个体动物模型成功建立的标志目前尚无可供参考的标准,具体体现在模型复制过程中,甲醛湿敷后动物心率较湿敷前下降百分率各家说法不一,损伤后期则通常以心动周期延长( $\Delta SCL$ ) $\geq 100$  ms 作为模型成功标准。临床对病态窦房结综合征患者的需通过窦房结功能结合长时间的心率监测进行诊断,但是在兔实验时,样本数

量大,如需对窦房结功能监测,只能通过开胸或经颈静脉插入导管进行测量,工作量大,且势必对模型造成持续性的损伤,不利于药物的疗效的评价。故心率的动态监测在评价模型的发展及药物的疗效方面就显得尤为重要。我们试图通过观察不同损伤程度的模型各时间点的心脏电生理功能变化,并总结出心率下降百分率(损伤程度)、 $\Delta SCL$ 及模型维持时间三者之间的关系,为新药研究的试验设计提供依据。研究结果表明,采用甲醛湿敷法复制兔窦房结是可行的,造模后心率下降百分率与 $\Delta SCL$ 大小有一定的一致性,心率下降百分率大于30%基础心率的模型 $\Delta SCL$ 均大于100 ms, SACT、SNRT、SNRTc较造模前均显著延长,且造模后模型的心率(147.3 ± 3.2 次/min ~ 183.0 ± 6.2 次/min)、SACT(69.9 ± 21.2 ms)、SNRT(685.0 ± 227.0 ms)、SNRTc(207.2 ± 90.4 ms)与文献报道的结果(心率:150 ~ 170 ms; SACT:40 ~ 80 ms; SNRT:400 ~ 500 ms; SNRTc:90 ~ 120 ms)基本一致。并且上述结果在阳性药物验证试验中得到了证实,损伤程度

大于 30% 时即可预测模型的  $\Delta$ SCL 将大于 100 ms; 同时心率下降百分率为 30% ~ 60% 基础心率的模型维持时间可达 70 d, 但当心率下降百分率大于 60% 基础心率时, 由于局部损伤较大, 动物不易存活, 故造模时需控制损伤程度小于 60% 基础心率。

综上所述, 甲醛诱导兔窦房结损伤是研究病窦综合征较好的动物模型。在采用甲醛建立兔病窦模型时, 可将损伤程度心率下降百分率控制在 30% ~ 60% 基础心率作为模型成功的评判标准。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 苏定冯. 心血管药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [ 2 ] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [ 3 ] 苗明三. 常用医药研究动物模型[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- [ 4 ] 耿乃志, 张守红. 手术法建立窦房结损伤模型研究进展[J]. 现代临床医学, 2009, 35(2): 83 - 85.
- [ 5 ] 耿乃志. 复心脉方对病态窦房结综合征家兔模型 HR、SNRT、SACT 影响的实验研究[D]. 黑龙江: 黑龙江中医药大学, 2008: 1 - 146.
- [ 6 ] 刘如秀, 王妮娜, 李汇博, 等. 康心复律方对病态窦房节综合征家兔窦房结电生理功能影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(8): 1118 - 1121.
- [ 7 ] 于阳, 曲秀芬, 刘丽, 等. 起搏治疗对心脏自主神经基质改变的实验研究[J]. 中华心律失常学杂志, 2011, 15(6): 430 - 434.
- [ 8 ] 周圣华, 宋治远. 窦房结组织急性受损后电生理功能改变的动态观察[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2004, 18(2): 127 - 129.
- [ 9 ] 刘宇. 通阳活血方对受损兔窦房结细胞起搏电流电生理及信号转导机制研究[D]. 北京: 中国中医研究院, 2014: 1 - 108.
- [ 10 ] 刘燕青. HCN4 在微波辐射致大鼠窦房结损伤中的作用研究[M]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2013, 1 - 110.
- [ 11 ] Liu RX, Wang YL. Comparative study between original and traditional method in establishing a chronic sinus node damage model in rabbit[J]. Journal of Applied Physiology, 2012, 113(10): 1802 - 1808.
- [ 12 ] Geng N, Jiang N, Peng C, et al. Sodium hydroxide pinpoint pressing permeation method for the animal modeling of sick sinus syndrome. [J]. International Heart Journal, 2015, 56(4): 1 - 5.
- [ 13 ] Feng XY, Ling TK. Influence of racemic higenamine on the sinus node. [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2013, 5(2): 591 - 595.
- [ 14 ] 唐海沁, 朱怀玺. 窦房结电图在射频消融术中实验研究[J]. 临床中老年保健, 2001, 4(2): 103 - 105.
- [ 15 ] 许原. 食管心脏电生理检测窦房结功能[J]. 心电图杂志, 2014, 3(2): 108 - 111.
- [ 16 ] Narula OS, Shantha N, Vasquez M, et al. A new method for measurement of sinoatrial conduction time [J]. Circulation Research, 1978, 58: 705 - 714.
- [ 17 ] Cramer M, Siegal M, Bigger JT, et al. Characteristics of extracellular potentials recorded from the sinoatrial pacemaker of the rabbit[J]. Circulation Research, 1974, 35: 935 - 947.
- [ 18 ] Hugh C, Miller, Harold C, et al. Measurement of sinoatrial conduction time by premature atrial stimulation in the rabbit[J]. Circulation Research, 1977, 41: 292 - 300.

[ 修回日期 ] 2015 - 09 - 14



# 制动致福利损伤大鼠肝细胞中 NF- $\kappa$ B 的表达

梁磊, 马畅, 刘捷, 董敏, 方天, 胡文娟, 陈莉, 贾春梅, 恽时锋

(南京军区南京总医院比较医学科, 全军实验动物科普与伦理教育基地, 全国科普教育基地, 南京 210002)

**【摘要】** 目的 研究制动导致的福利损伤大鼠肝细胞内 NF- $\kappa$ B 的表达变化。方法 选取  $\pm 170$  g SD 大鼠, 雌雄各半, 使用制动的方式造成其福利损伤, 记录实验过程中的体增重和饲料消耗, 而后分别使用实时定量 PCR 和免疫印迹法检测大鼠肝细胞内 NF- $\kappa$ B p65 的 mRNA 量和蛋白表达水平。结果 与对照组相比, 制动组大鼠的体增重和饲料能耗比均降低, 且差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 肝细胞中 NF- $\kappa$ B p65 的 mRNA 量和蛋白表达水平均大幅提升, 同样差异极显著 ( $P < 0.01$ )。其中制动组雄性大鼠的 NF- $\kappa$ B p65 的 mRNA 量和蛋白表达水平显著高于雌性 ( $P < 0.05$ ), 但对对照组大鼠的雄性与雌性之间未表现出差异 ( $P > 0.05$ )。结论 大鼠福利受损时, 肝细胞中 NF- $\kappa$ B 表达水平大幅提升, 提示两者之间可能存在一定关联, 表明 NF- $\kappa$ B 参与了大鼠福利损伤过程。

**【关键词】** 福利损伤; NF- $\kappa$ B; 基因表达

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0028-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.11.007

## The study of expression of NF- $\kappa$ B in rats' liver after welfare impaired by restrain stress

LIANG Lei, MA Chang, LIU Jie, DONG Min, FANG Tian, HU Wen-juan, CHEN Li, JIA Chun-mei, YUN Shi-feng  
(Department of Comparative Medicine, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Army Education Base of Science and Ethics of Experimental Animal, National Science Education Base, Nanjing, 210002, China)

**【Abstract】** **Objective** To study the expression of NF- $\kappa$ B in rats' liver after welfare impaired by restraint stress. **Methods** SD rats,  $\pm 170$  g, male and female half, welfare were impaired by restraint stress. Body weight gain and food consumption were recorded throughout the study, mRNA and protein expression of NF- $\kappa$ B p65 in liver were detected after the study finished by real-time quantitative PCR and Western blotting. **Results** Compared with the control group (group C), the body weight gain and food efficiency ratio (FER) of restraint group (group R) were decreased ( $P < 0.01$ ), but mRNA and protein expression of NF- $\kappa$ B p65 were much higher ( $P < 0.01$ ). Compared with female, mRNA and protein expression of NF- $\kappa$ B p65 of male rats were much higher in group R ( $P < 0.01$ ), but showed no significant difference in group C ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** After welfare impaired, the expression of NF- $\kappa$ B in rats' liver are much higher than before. It shows that NF- $\kappa$ B has effects during the process of welfare being impaired.

**【Key words】** Welfare impaired; NF- $\kappa$ B; Gene expression

实验动物福利是动物实验研究中的一个重要问题, 因为福利受损的动物达不到“康乐”状态<sup>[1]</sup>, 不是标准的实验动物。其生存质量下降, 机体各系

统状态紊乱, 会对动物实验研究的进行造成影响, 降低实验结果的可靠性<sup>[2]</sup>。但对于实验动物福利水平的评估尚缺乏直接的、具代表性的指标。NF-

[作者简介] 梁磊 (1982 -), 男, 技师, 理学学士, 研究方向: 实验动物福利伦理, 人类疾病动物模型。

[通讯作者] 恽时锋 (1965 -), 男, 主任技师, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 实验动物与比较医学, E-mail: yunshifeng1@163.com。

$\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, 核因子- $\kappa$ B) 是一类广泛存在于哺乳动物的各种组织和细胞中的调控因子, 在介导机体应激反应尤其是炎症反应的过程中起关键作用, 多种因素—应激、毒素、感染、LPS、TNF- $\alpha$ 、放射性物质等—均可刺激其活化, 使其表达水平上调<sup>[3-4]</sup>。而动物实验中的各类干预因素对实验动物来说都是应激刺激, 符合 NF- $\kappa$ B 的活化条件。因此, 本研究使用动物实验中常用的 SD 大鼠, 通过束缚制动以降低其福利水平<sup>[5]</sup>, 观测其肝组织中 NF- $\kappa$ B 表达水平的变化, 探寻实验动物福利与 NF- $\kappa$ B 之间的联系。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物与饲养环境

SD 大鼠 32 只, 雌雄各半, 体重  $\pm$ 170 g, 由南京军区南京总医院比较医学科提供【SCXK(军)2012-0014】, 实验场所为南京军区南京总医院比较医学科屏障环境【SYXK(军)2012-0047】。Co<sup>60</sup> 灭菌全价饲料与高温高压灭菌饮用水, 自由采食。

### 1.2 实验分组与福利损伤模型建立

SD 大鼠随机挑选并分组如下 ( $n=8$ ):

对照组雄 (control male, CM): 雄性 SD 大鼠, 正常饲养。

对照组雌 (control female, CF): 雌性 SD 大鼠, 正常饲养。

制动组雄 (restrain male, RM): 雄性 SD 大鼠, 每日 9:00~10:00、15:00~16:00 各使用圆筒容器束缚制动 1 h, 制动程度为大鼠不感觉压迫但无法自由活动, 干预时间为 4 周。

制动组雌 (restrain female, RF): 雌性 SD 大鼠, 干预过程同 RM 组。

### 1.3 试剂及仪器

反转录试剂盒 (TaKaRa, #RR047A), PCR 仪 (MJ research, PTC 200), 荧光定量 PCR 检测系统 (Roche LightCycler 96); 一抗 10745-1-AP p65 antibody (Proteintech), 二抗山羊抗兔-HRP (santa cruz), Protein Marker (Takara), Acr、Bis、Tris (Sigma), TEMED、Gel Doc2000 成像系统、垂直电泳系统 (BIO-RAD)。

### 1.4 指标测定

1.4.1 实验过程中记录各组大鼠体重变化及进食量, 实验结束计算体增重和饲料能效比:

体增重 = 实验结束体重 - 初始体重

饲料能效比 (food efficiency ratio, FER) = 体增重/总进食量  $\times$  100%

### 1.4.2 实时荧光定量 PCR 检测 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 含量

取大鼠肝脏组织, 充分裂解后按 Trizol 操作说明提取总 RNA。反转录体系为 20  $\mu$ L, 每管加入总 RNA 4  $\mu$ g, 按照 TaKaRa #RR047A 反转录试剂盒说明操作, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 70 $^{\circ}$ C 15 min。反转录后的 cDNA 用于实时定量 PCR 反应, 引物由南京中兴医学技术有限公司合成, p65 上游引物 5'-TCACCAA GACCCACCTCACCG-3', 下游引物 5'-GGACCGCA TTCAAGTCATA GTCCC-3', 扩增片段长度 243 bp, 退火温度 60 $^{\circ}$ C; GAPDH 上游引物 5'-ATCATCTCCG CCCCTTCTGC-3', 下游引物 5'-GCCTGCTTACCA CCTTCTT-3', 扩增片段长度 437 bp, 退火温度 57 $^{\circ}$ C。反应体系: SYBR Premix Ex Taq II (2  $\times$ ) 10  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, 上、下游引物各 1  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L), 加入 Nuclease-Free Water 至 20  $\mu$ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, (95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s)  $\times$  40 个循环, 每个样品 3 次重复。将对照组雄性大鼠基因表达水平定为 1, 分析其他组别的基因表达差异。

### 1.4.3 Western blot 检测 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达

取肝脏组织, 裂解细胞提取总蛋白。10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 蛋白转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭, 一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜, 二抗 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 洗膜 ECL 显影。以 GAPDH 为内参照, 每组样本进行 3 次重复。

### 1.5 统计学方法

实验数据统计使用 SPSS13.0 完成, 结果均使用  $\bar{x} \pm S$  表示, 组间差异比较使用单因素方差分析, 选取  $\alpha=0.05$ ,  $\alpha=0.01$ 。

## 2 结果

### 2.1 体增重与饲料能效比较

如表 1 所示, 制动组大鼠无论雌雄其体增重数据均远低于同性别对照组大鼠, 且差异极其显著 ( $P<0.01$ ); 制动组大鼠的饲料能效 (food efficiency ratio, FER) 数据也与同性别的对照组大鼠有较大差距, 其中雄性制动组大鼠 FER 数据差异显著 ( $P<0.05$ )。

### 2.2 基因表达

实时荧光定量 PCR 目的基因 NF- $\kappa$ B p65 和内参 GAPDH 的标准曲线线性良好, 引物扩增效率为 99.8%。结果如图 1 所示, 无论雌雄, 制动组大鼠的该基因表达量远远高于对照组。数据分析表明, 与对照组大鼠相比, 制动组大鼠的该基因表达显著升高 ( $P<0.01$ )。但制动组不同性别大鼠之间表达量

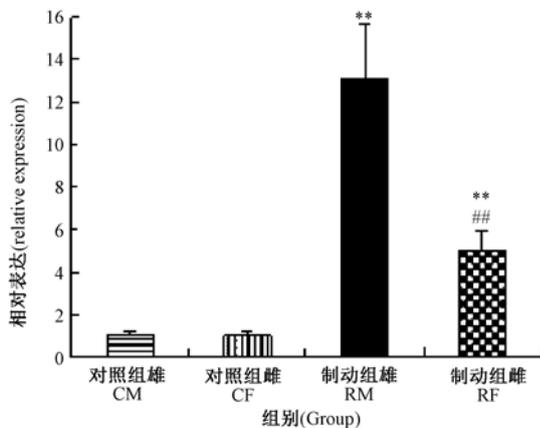
也存在显著差异 ( $P < 0.01$ ), 对照组不同性别大鼠之间未显示出统计学差异。

表 1 各组大鼠体增重与饲料能效比

Tab. 1 Body weight gain and food efficiency ratio of different groups

组别 Group	体增重 Body weight gain (g)	饲料能效比 Food efficiency ratio (%)
对照组雄 (CM)	305.05 ± 18.58	25.19 ± 1.99
对照组雌 (CF)	132.67 ± 6.98	13.34 ± 1.96
制动组雄 (RM)	253.33 ± 23.31**	23.04 ± 2.43*
制动组雌 (RF)	102.50 ± 13.19**	11.43 ± 2.15

注: \* 表示与同性别对照组比较,  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  ( $n = 8$ )。  
Note: Compare with control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  ( $n = 8$ ).



注: \*\* 表明与同性别对照组比较,  $P < 0.01$ ;

## 表明与同组别雌性相比,  $P < 0.01$  ( $n = 8$ )。

图 1 各组大鼠肝细胞 NF-κB p65 基因表达

Note: \*\* means compare with control group,  $P < 0.01$ ;

## means compare with male,  $P < 0.01$  ( $n = 8$ ).

Fig. 1 Gene expression of NF-κB p65 in liver of different groups

### 2.3 蛋白表达

Western Bolt 结果如图 2 所示, 制动组大鼠肝细胞中 NF-κB p65 蛋白表达水平高于对照组大鼠。表 2 将各组大鼠蛋白相对表达量进行了统计分析, 表明制动组大鼠蛋白相对表达量显著高于对照组大鼠 ( $P < 0.01$ )。同组别雄性大鼠的相对表达量均高于雌性大鼠, 其中制动组的差异显著 ( $P < 0.05$ ), 但

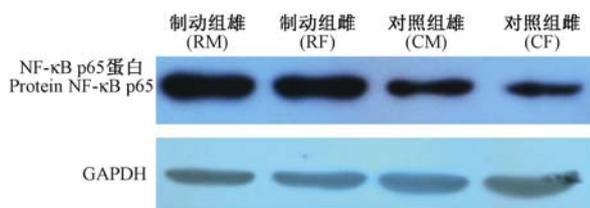


图 2 各组大鼠肝细胞 NF-κB p65 蛋白表达

Fig. 2 Expression of NF-κB p65 in liver of different groups

对照组的差异不具有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 2 各组大鼠肝细胞 NF-κB p65 表达统计结果

Tab. 2 The statistical results of NF-κB p65 expression in liver of different groups

组别 Group	NF-κB p65 蛋白相对表达 NF-κB p65/GAPDH
制动组雄 (RM)	1.5888 ± 0.0172**
制动组雌 (RF)	1.3684 ± 0.0219**#
对照组雄 (CM)	0.8287 ± 0.0626
对照组雌 (CF)	0.6974 ± 0.0743

注: \*\* 表明与同性别对照组比较,  $P < 0.01$ ; # 表明与同组别雌性相比,  $P < 0.05$  ( $n = 8$ )。

Note: \*\* means compare with control group,  $P < 0.01$ ; # means compare with male,  $P < 0.05$  ( $n = 8$ ).

### 3 讨论

动物实验中的各种处理因素对实验动物造成的身心创伤及其累积效应是主要的福利损害<sup>[6]</sup>, 本实验中正是使用反复制动来模拟正常实验过程中的抓取与保定过程, 以试图对实验动物福利造成损害。制动术目前广泛应用于身心压力引发各类动物损害的实验研究中<sup>[5]</sup>, 是一种较为常用的轻度福利损害手段。结合本实验中的数据, 制动组大鼠的体增重和饲料能耗均显著低于对照组大鼠, 可以认为制动组大鼠已经福利受损。

NF-κB 是 1986 年 Sen 和 Baltimore<sup>[7]</sup> 在 B 淋巴细胞中发现的一类能和免疫球蛋白 κ 轻链基因的增强子特异结合的核因子, 广泛存在于各种真核细胞中。它由两类 Rel 家族亚基组成, 活性 DNA 结合形式是两类亚基的同源或异源二聚体, 其中以 P50 和 P65 组成的二聚体最为常见<sup>[8]</sup>。当受到如应激等细胞外信号的刺激时, 经过一系列连锁的酶促反应, IκB (核因子-κB 抑制蛋白) 从 NF-κB 三聚体上解离下来, 从而使 NF-κB 二聚体活化、入核, 启动特异靶基因的转录和表达<sup>[9-11]</sup>。它在调控炎症因子、细胞因子、粘附分子等的表达, 免疫应答及细胞增殖、分化、凋亡的过程中均起关键作用<sup>[12-13]</sup>。其中经 NF-κB 介导调控的多种因子如 TNF-α、IL-1、IL-2、IL-6 均可促进机体的炎症反应, 产生机体损伤。通常情况下, 当福利水平下降时动物往往表现出毛色不顺、食欲下降、免疫抑制、代谢及内分泌紊乱等一系列问题, 本实验中, 对照组大鼠 NF-κB 仅轻微表达, 但制动组大鼠经制动处理后福利受损, NF-κB 表达水平显著上调, 其中制动组雄性大鼠的基因表达量甚至到达了相应对照组大鼠的近 14 倍之多, 表明了 NF-κB 极有可能在这一系列过程中产生了作用, 即 NF-κB 参与了福利损伤及其导致的机体内功能

紊乱过程。

对多种动物的观察和研究表明,动物的福利水平表现为动物在适应环境改变过程中付出的生物学代价,评价这一生物学代价必须综合考虑动物外观、行为模式、生长发育水平、特异性和非特异性免疫力、神经内分泌反应以及器官组织病理等多个指标的变化<sup>[14]</sup>。因此,我们在评估动物福利水平变化时大都要综合分析行为学、生长发育、免疫及神经内分泌等多方面指标。但这些指标已经是福利水平降低所引发的一系列复杂的信号传导、调控的终末表现,当我们观察到这些指标时就表明福利损害已经发生,实验动物的福利水平已经受到了影响。NF- $\kappa$ B 是一种广泛存在于组织和细胞中,能介导机体应激反应的关键调控因子,在机体的应激反应过程中发挥重要的作用,而本研究所探讨的福利损伤其本质是实验因素的身心压力累积而对实验动物形成的一个慢性应激过程,引发福利损伤的因素恰属于 NF- $\kappa$ B 的激活因素。并且 NF- $\kappa$ B 是一种上游调控因子,相对于能较早的提示福利损伤的发生。

根据本次实验的结果,我们认为 NF- $\kappa$ B 有可能作为一个具代表性的福利衡量指标,用以评估实验动物福利损害,但通过本次实验我们也发现了若干问题。首先,制动组雄性大鼠的 NF- $\kappa$ B 水平不但显著高于对照组,同时与同组的雌性大鼠也存在统计差异。经我们研究发现,其原因可能有 2 个方面:一是由于雌性大鼠生长速度低于雄性,相对于束缚容器而言体型较小,导致其束缚效果不如雄性大鼠,从而导致了表达水平的差异;二是由于性别差异,杜晓辉等<sup>[15]</sup>的研究表明,性别差异对脓毒症大鼠肝脏 NF- $\kappa$ B 活化具有影响,雌性大鼠的 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  及 ALT 的变化均显著低于雄性。自然界中雌性个体对于应激等因素的耐受性往往要强于雄性个体,在本实验中的表现也是如此。由此可见性别和干预因素对于 NF- $\kappa$ B 的表达具有很大的影响,这也引发了我们对于动物实验中性别选择的思考。同时本实验使用的制动术是经过大量实验研究论证的,其福利损伤效果目前已被广泛接受。若实验动物经其他因素处理,NF- $\kappa$ B 与福利水平是否仍有关联?其次,NF- $\kappa$ B 要成为一个具代表性的福利衡量指标,并且要及早提示福利损伤的发生,那么 NF- $\kappa$ B 能否于行为学、免疫、内分泌等指标变化之前发生显著变化,同时 NF- $\kappa$ B 与行为学、免疫、内分泌等指标之间是否具有相关性,我们仍不得而知。除此之外,根据嵇晴等<sup>[16]</sup>的研究,特定剂量的氯胺酮可以抑制 NF- $\kappa$ B 的活性,减少 TNF- $\alpha$  的释放,有益于机体恢

复。那么我们设想既然 NF- $\kappa$ B 参与了福利损伤过程,那么当我们使用抑制剂抑制 NF- $\kappa$ B 的表达时,能否缓解福利损伤情况?因此,要明确 NF- $\kappa$ B 能否成为一个具代表性的福利衡量指标,我们仍有很多工作要做,许多问题仍有待进一步研究论证。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 考林·斯伯丁. 动物福利[M]. 崔卫国,译,北京:中国政法大学出版社,2005: 12.
- [ 2 ] Balcombe JP, Barnard ND, Sandusky C. Laboratory routines cause animal stress[J]. Lab Anim Sci, 2004, 43(6):42-51.
- [ 3 ] Li X, Stark GR. NF- $\kappa$ B dependent signaling pathways[J]. Exp Hematol, 2002,30(4): 285-296.
- [ 4 ] Kumar A, Takada Y, Boriek AM, et al. Nuclear factor-kappa B: its role in health and disease[J]. Mol Med, 2004,82: 434-448.
- [ 5 ] 刘克嘉, 鄢勤娥. 应激与应激性疾病[M]. 北京:人民军医出版社,1991:54-56.
- [ 6 ] Van Loo PL, Van der Meer E, Kruitwagen CL, et al. Longterm effects of husbandry procedures on stressed related parameters in male mice of two strains[J]. Laboratory Animals, 2004, 38:169-177.
- [ 7 ] Sennenberg GE, Karkower GR, Kissebah AH. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome [ J ]. Obes Res, 2004,12: 180.
- [ 8 ] Neurath M F, Fuss I, Schurmann G, et al. Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease[J]. Ann NY Acad Sci, 1998, 859: 149.
- [ 9 ] Sennenberg GE, Karkower GR, Kissebah AH. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome [ J ]. Obes Res, 2004,12: 180.
- [ 10 ] Feinman R, Siegel IDS, Berenson J. Regulation of NF- $\kappa$ B in multiple myeloma: therapeutic implications[J]. Clin Adv Hematol Oncol,2004,2:162-166.
- [ 11 ] Chakraborti S, Mandal M, Das S, et al. Regulation of matrix metalloproteinase: an overview [ J ]. Mol Cell Biochem,2003, 253 ( 1-2 ):269-285.
- [ 12 ] Li X, Stark GR. NF- $\kappa$ B dependent signaling pathways [ J ]. Exp Hematol, 2002,30(4): 285-296.
- [ 13 ] Kumar A, Takada Y, Boriek AM, et al. Nuclear factor-kappa B: its role in health and disease[J]. Mol Med, 2004,82: 434-448.
- [ 14 ] Baumans V. Methods for evaluation of laboratory animal wellbeing [ J ]. Altern Lab Anim, 2004, 32(s1): 161-162.
- [ 15 ] 杜晓辉,姚咏明,李荣,等. 性别差异对脓毒症大鼠肝脏核因子- $\kappa$ B 活化的影响[J]. 中国急诊医学杂志,2006,15(8): 679-682.
- [ 16 ] 嵇晴,杨建军,孙杰,等. 氯胺酮抑制内毒素诱导的核因子- $\kappa$ B 及肿瘤坏死因子- $\alpha$  的体内研究[J]. 医学研究学报,2005, 18(4):334-337.

[ 修回日期 ] 2015-09-16



# 实验应激致小鼠福利受损及音乐干预的效果

马 畅, 梁 磊, 张旭亮, 尤金炜, 刘 捷, 恽时锋

(南京军区南京总医院比较医学科, 全军实验动物科普与伦理教育基地, 全国科普教育基地, 南京 210002)

**【摘要】** 目的 探究常规实验操作对动物福利的损伤程度以及音乐干预的效果。方法 采用3周龄雄性ICR小鼠, 实验操作组分别给予保定(E-r)、灌胃(E-g)、腹腔注射(E-p)和眼眶静脉丛采血(E-o)处理, 音乐干预组采取相同处理后给予1h音乐干预(M-r, M-g, M-p, M-o)。连续处理7d后, 测定与福利相关的神经内分泌、免疫、生化、生长指标和饲料能效比。结果 ①与对照组相比, 实验操作四组体增重和饲料能效比均显著降低; E-r组TG、HDL-C、WBC、IL-2、 $\beta$ -EP和脾脏、胸腺指数均显著降低, CORT、ACTH、EPI显著升高; E-g组的TG、WBC、IL-2和 $\beta$ -EP显著降低, CORT、ACTH和EPI显著升高; E-p组IL-2显著降低, CORT、ACTH和EPI显著升高; E-o组脾脏指数和WBC显著降低, CORT显著升高。②与实验操作组相比, M-r组体增重、饲料能效比、脾脏指数、IL-2显著升高, CHOL、CORT、ACTH和 $\beta$ -EP均显著降低; M-g组WBC显著升高, CORT显著降低; M-p组WBC显著降低; M-o组饲料能效比显著升高。结论 四种常规实验操作均对小鼠的健康福利造成了不同程度损伤, 而音乐干预能够改善小鼠的操作应激和福利损伤程度。

**【关键词】** 小鼠; 实验操作; 福利损伤; 音乐

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0032-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.11.008

## The study of impaired welfare induced by routine experimental procedures on mice and intervention effect of music

MA Chang, LIANG Lei, ZHANG Xu-liang, YOU Jin-wei, LIU Jie, YUN Shi-feng

(Department of Comparative Medicine, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Army Education Base of Science and Ethics of Experimental Animal, National Science Education Base, Nanjing 210002, China)

**【Abstract】** **Objective** To study the impaired-welfare induced by routine experimental procedures on mice and the effect of music intervention. **Methods** 3week male ICR mice were divided into 9 groups. The experimental groups were treated by several experimental operations including restraint(E-r), intragastric injection(E-g), intraperitoneal injection(E-p) and orbital venous sampling(E-o). The music intervention groups were given 1 hour music intervention after the same experimental operation(M-r, M-g, M-p, M-o). After 7 days of continuous treatment, the main neuroendocrine, immune, biochemical parameters, body weight and food efficiency ratio(FER) were measured. **Results** ①Compared with the untreated group, the body weight gain and FER were significantly decreased in such four experimental groups; TG, HDL-C, WBC, IL-2,  $\beta$ -EP, spleen index and thymus index were significantly decreased in the E-r group, in addition, CORT, ACTH and EPI were significantly increased; TG, WBC, IL-2 and  $\beta$ -EP were significantly decreased in the E-g

[基金项目] 南京军区南京总医院院管课题(2015061)。

[作者简介] 马畅(1986-), 女, 技师, 硕士, 研究方向: 实验动物福利伦理, E-mail: machang316@126.com。

[通讯作者] 恽时锋(1965-), 男, 主任技师, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 实验动物与比较医学, E-mail: yunshifeng1@163.com。

group, and CORT, ACTH, EPI were significantly increased; IL-2 was significantly decreased in the E-p group, and CORT, ACTH, EPI were significantly increased; The spleen index and WBC were significantly decreased in E-o group, and CORT was significantly increased. ② Compared with the experimental groups, the body weight gain, FER, spleen index, IL-2 were significantly increased in the M-r group, and CHOL, CORT, ACTH,  $\beta$ -EP were significantly decreased; WBC was significantly increased in the M-g group, and CORT was significantly decreased; WBC was significantly decreased in the M-p group; FER was significantly increased in the M-o group. **Conclusion** The four routine experimental procedures cause strong stress response in mice, and lead to health and welfare impaired. However, music intervention played an important role in stress injury improvement.

**【Key words】** Mice; Experimental operation; Welfare impaired; Music

常规的实验操作(如保定、采血、给药等)对实验动物是一种身心复合应激,不仅会引起疼痛和不适,还会造成动物心理上的紧张和反抗情绪,这不但会影响动物的健康和福利,还会降低科研结果可靠性<sup>[1-2]</sup>。音乐是常用的环境修饰手段之一,可以调节生物的情绪,降低抑郁,缓解焦虑,改善神经、内分泌、心血管等系统功能,维持正常的生理与心理平衡<sup>[3]</sup>。实验动物作为生命个体,同样具有感知音乐的能力<sup>[4-5]</sup>。研究报道,非洲灰鹦鹉和葵花凤头鹦鹉会随着音乐的节拍摆动头部和抬脚<sup>[6]</sup>,音乐干预的奶牛日产奶量显著增加<sup>[7]</sup>。但音乐干预在改善实验动物福利,提高实验动物生活质量等方面的报道鲜见。

本研究以 ICR 小鼠为实验对象,使用常规的实验操作(保定、采血、灌胃)处理小鼠,而后进行音乐干预,根据生长发育状况、机体免疫功能和神经-内分泌系统的反应,探究小鼠的福利损伤情况以及音乐干预效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠 90 只,3 周龄,18 ~ 19 g,由南京军区南京总医院比较医学科提供【SCXK(军)2012-0014】。

### 1.2 环境及饲养管理

实验场所为南京军区南京总医院比较医学科屏障环境【SYXK(军)2012-0047】。小鼠饲料为江苏协同医药生物工程有限责任公司提供<sup>60</sup>Co 辐照全价颗粒饲料。

### 1.3 分组和处理

实验共分 3 个大组,9 个小组,每组 10 只,实验期为 7 d,每天 8:00、15:00 开始实验。

分组和处理如下:

对照组(untreated) N 组:常规饲养,不予任何

干预;

实验操作组(experimental) E 组:按照不同操作分为 4 个小组,每组 10 只

保定组(restraint) E-r 组:参照翟亚南方法<sup>[8]</sup>,保定于自制束缚器内,每天 8:00、15:00 开始各保定 1 h,束缚器能限制小鼠肢体自由活动但不产生压迫感,保定期间限食限水。其余时间常规饲养。

灌胃组(intragastric injection) E-g 组:给予灭菌生理盐水 0.1 mL,2 次/日。

腹腔注射组(intraperitoneal injection) E-p 组:腹腔注射灭菌生理盐水 0.1 mL,2 次/日。

眼眶静脉采血组(orbital venous sampling) E-o 组:眼眶静脉丛采血 0.1 mL,1 次/2 日。

音乐干预组(music) M 组:

同上述实验操作四组,保定(M-r)、灌胃(M-g)、腹腔注射(M-p)和眼眶静脉采血(M-o)各组小鼠在每次实验操作处理后,给予 1 h 音乐干预,调节音量使笼盒上方声强为  $50 \pm 5$  dB。干预音乐为恬静、柔和、舒缓的民乐和世界名曲,所选曲目为《春江花月夜》、《梁祝》、《蓝色多瑙河》、《春之奏鸣曲》、《田园交响曲》、《北国之春》、《绿岛小夜曲》,循环播放。音乐干预时各组小鼠正常饮食饮水。

### 1.4 样本采集与指标测定

实验期间,观测各组小鼠的体重变化和饲料消耗情况,于每天最后一次处理后称体重和当日饲料消耗总量,计算饲料能效比(FER) = 实验期间体增重(g)/实验期间摄食总量(g) × 100%。

实验期结束,小鼠经尾静脉采血 20  $\mu$ L,于 1 h 内上机测定外周白细胞计数(WBC)。眼眶采血,血样室温静置 30 min 后以 4000 r/min 的速度离心 10 min,分离血清,进行生化检测。余下血清于 -40℃ 保存,ELISA 法测定血清免疫因子。采集胸腺、脾脏,测量脏器系数。计算脏器系数 = 脏器重量(g)/体重(g) × 100%。

1.5 主要试剂和仪器

Bio-red 酶标仪, Sysmex Xs-800i 血常规自动检测仪, 日立 7600 全自动生化分析仪。小鼠 ELISA 试剂盒为美国 RayBiotech 公司产品。

1.6 统计学处理

结果以均值 ± 标准差表示, 应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 采用 oneway ANOVA 和 Bonferroni 法检验组间差异, 检验水准  $P = 0.05, P = 0.01$ 。

2 结果

2.1 生长和摄食的比较

见表 1。与对照组相比, 实验操作四组体增重均显著减少。音乐干预后, M-r 组, M-p 组, M-o 组体增重均高于实验操作组, 其中 M-r 组差异显著 ( $P < 0.05$ )。

与对照组相比, E-g 组、E-p 组和 E-o 组的饲料能效比显著降低 ( $P < 0.05$ ), E-r 组极显著降低 ( $P < 0.01$ )。音乐干预后, M-r 组和 M-o 组显著升高 ( $P < 0.05$ )。

2.2 血液生化的比较

见表 2。与对照组相比, E-r 组和 E-g 组的 TG 值显著降低 ( $P < 0.05$ ), 同时 E-r 组的 HDL-C 也显著降低 ( $P < 0.05$ )。音乐干预后, M-r 组 CHOL 显著降低 ( $P < 0.05$ )。

表 1 体增重与饲料能效比 (n = 10)

**Tab.1** Body weight gain and food efficiency ratio (n = 10)

组别 Group	体增重 Body weight gain (g)	饲料能效比 Food efficiency ratio (%)
N	10.10 ± 1.45	20.37 ± 1.88
E-r	6.06 ± 1.87**	14.86 ± 3.73**
E-g	7.83 ± 3.29**	15.93 ± 2.82*
E-p	8.07 ± 1.04**	16.35 ± 2.65*
E-o	8.40 ± 2.17*	17.43 ± 2.97*
M-r	6.89 ± 1.54* <sup>Δ</sup>	16.3 ± 2.17* <sup>Δ</sup>
M-g	7.20 ± 1.75**	16.65 ± 2.91*
M-p	8.75 ± 1.13*	18.42 ± 2.84
M-o	9.58 ± 1.78	19.39 ± 2.77 <sup>Δ</sup>

注: 与 N 组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 音乐干预组与实验操作组比较, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ 。

Note: Compare with untreated group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; Music intervention groups compare with the corresponding experimental groups, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ 。

表 2 血液生化测定结果 (n = 10)

**Tab.2** Results of measurements of bloodbiochemistry tests (n = 10)

组别 Group	TP (g/L)	CHOL (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
N	49.23 ± 1.89	2.12 ± 0.18	1.607 ± 0.386	1.563 ± 0.113	0.289 ± 0.062
E-r	50.74 ± 0.91	1.97 ± 0.16	1.474 ± 0.205*	1.400 ± 0.126*	0.227 ± 0.058
E-g	51.88 ± 1.49	1.92 ± 0.42	1.423 ± 0.323*	1.416 ± 0.407	0.303 ± 0.086
E-p	50.45 ± 1.84	1.86 ± 0.23	1.537 ± 0.242	1.486 ± 0.099	0.289 ± 0.052
E-o	49.80 ± 2.67	1.94 ± 0.19	1.526 ± 0.184	1.632 ± 0.170	0.287 ± 0.041
M-r	49.64 ± 2.29	1.82 ± 0.17* <sup>Δ</sup>	1.380 ± 0.171*	1.310 ± 0.081*	0.216 ± 0.088*
M-g	51.78 ± 2.28	2.15 ± 0.23	1.447 ± 0.331*	1.575 ± 0.186	0.347 ± 0.092
M-p	50.60 ± 2.72	2.08 ± 0.27	1.389 ± 0.643	1.548 ± 0.154	0.268 ± 0.046
M-o	50.64 ± 2.16	2.17 ± 0.21	1.437 ± 0.405	1.615 ± 0.159	0.290 ± 0.047

注: 与 N 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 音乐干预组与实验操作组比较, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ 。

Note: Compare with untreated group, \*  $P < 0.05$ ; Music intervention groups compare with the corresponding experimental groups, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ 。

2.3 免疫学指标的变化

见表 3。比对照组相比, 实验操作组脾脏指数均降低, 其中 E-o 组脾脏指数显著降低 ( $P < 0.05$ ), E-r 组脾脏指数极显著降低 ( $P < 0.01$ ), 胸腺指数显著降低 ( $P < 0.05$ )。与实验操作组相比, 音乐干预组脾脏指数均有不同程度升高, 其中 M-r 组差异显著 ( $P < 0.05$ )。胸腺指数无显著变化。

WBC 测定显示, 与对照组相比, 实验操作组中 E-r 组、E-g 组和 E-o 组显著降低 ( $P < 0.05$ )。音乐干预后, M-g 组显著升高而 M-p 组显著降低 ( $P < 0.05$ )。

IL-2 测定显示, 与对照组相比, 实验操作组中 E-r 组、E-g 组和 E-p 组显著降低 ( $P < 0.05$ )。音乐干预后, M-r 组显著升高 ( $P < 0.05$ )。

2.4 神经内分泌功能的变化与比较

见表 4。与对照组相比, 实验操作四组的 CORT 和 ACTH 均不同程度升高, E-r 组和 E-g 组  $\beta$ -EP 显著下降 ( $P < 0.05$ ), E-r 组、E-g 组和 E-p 组 EPI 显著升高 ( $P < 0.05$ )。

音乐干预后, M-r 组 CORT、ACTH 和  $\beta$ -EP 均显著降低 ( $P < 0.05$ )。M-g 组 CORT 显著下降 ( $P < 0.05$ )。

表 3 免疫学指标测定结果 (n = 10)  
Tab. 3 Results of measurements of immunological index (n = 10)

组别 Group	脾脏指数 Spleen index%	胸腺指数 Thymus index%	白细胞计数 WBC (×10 <sup>9</sup> /L)	IL-2 (pg/mL)
N	0.6628 ± 0.1006	0.2703 ± 0.0415	8.43 ± 1.81	152.38 ± 31.49
E-r	0.5097 ± 0.1198 **	0.2514 ± 0.0212 *	6.18 ± 1.39 *	119.14 ± 23.63 *
E-g	0.5680 ± 0.1204	0.2776 ± 0.0474	6.49 ± 1.67 *	136.79 ± 32.08 *
E-p	0.6477 ± 0.1423	0.2791 ± 0.0329	8.33 ± 2.33	122.99 ± 27.90 *
E-o	0.5491 ± 0.0779 *	0.2652 ± 0.0289	5.66 ± 1.20 *	137.02 ± 28.02
M-r	0.5939 ± 0.0829 * <sup>Δ</sup>	0.2333 ± 0.0313 *	6.60 ± 1.59	139.99 ± 34.34 <sup>Δ</sup>
M-g	0.6021 ± 0.1878	0.2666 ± 0.0454	7.32 ± 2.15 <sup>Δ</sup>	140.82 ± 34.56
M-p	0.6727 ± 0.1312	0.2674 ± 0.0253	6.85 ± 1.09 <sup>Δ</sup>	158.53 ± 179.36 *
M-o	0.5583 ± 0.0673 *	0.2565 ± 0.0246	6.21 ± 1.73 *	141.64 ± 62.46

注:与 N 组比较, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; 各音乐干预组与实验操作组比较, <sup>Δ</sup>P < 0.05。

Note: Compare with untreated group, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; Music intervention groups compare with the corresponding experimental groups, <sup>Δ</sup>P < 0.05.

表 4 血清 CORT、ACTH、β-EP 和 EPI 测定结果 (n = 10)  
Tab. 4 Serum levels of CORT、ACTH、β-EP and EPI (n = 10)

组别 Group	CORT (ng/mL)	ACTH (ng/L)	β-EP (pg/mL)	EPI (ng/L)
N	68.95 ± 8.14	7.61 ± 1.07	62.06 ± 4.58	36.02 ± 4.83
E-r	106.96 ± 9.38 **	8.34 ± 1.15 *	56.29 ± 4.49 *	46.42 ± 5.38 *
E-g	90.55 ± 9.72 *	7.95 ± 0.72 *	59.15 ± 3.33 *	42.19 ± 4.68 *
E-p	84.57 ± 7.31 *	8.13 ± 2.10 *	60.06 ± 3.38	45.53 ± 5.39 *
E-o	71.43 ± 8.88 *	7.90 ± 0.90	61.12 ± 3.47	40.05 ± 5.80
M-r	80.39 ± 28.87 * <sup>Δ</sup>	7.5 ± 0.95 <sup>Δ</sup>	52.95 ± 5.57 * <sup>Δ</sup>	41.22 ± 4.58 *
M-g	79.28 ± 36.05 * <sup>Δ</sup>	7.97 ± 0.79 *	59.78 ± 3.75 *	40.53 ± 5.87 *
M-p	76.23 ± 8.49 *	7.72 ± 0.69	59.52 ± 4.62	41.39 ± 5.32
M-o	70.64 ± 10.03	8.06 ± 1.68	58.14 ± 4.37	40.00 ± 4.47

注:与 N 组比较, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; 各音乐干预组与实验操作组比较, <sup>Δ</sup>P < 0.05。

Note: Compare with untreated group, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; Music intervention groups compare with the corresponding experimental groups, <sup>Δ</sup>P < 0.05.

### 3 讨论

长期的实验处理给实验动物带来的生理痛苦和心理压力以及累积效应是公认的福利损伤<sup>[9]</sup>,这种福利损伤是工作中不可避免的。因此,评价实验动物福利损伤程度并采取有效措施改善是动物福利研究的重要内容。本研究参考目前探讨较多的动物福利相关指标<sup>[10]</sup>,以小鼠体增重反映其生长发育水平,饲料能效比反映其摄食行为,以血清 TP、CHOL 和 TC 反映其物质代谢状况,以主要免疫器官指数、外周血 WBC 计数、血清 IL-2 水平反映其基础免疫状况,以 4 种血清激素(细胞因子)含量变化反映其神经内分泌状况,通过综合评价这些指标的变化来探究实验操作对动物福利的损伤程度以及音乐干预的效果。

生长和摄食结果显示,实验操作四组小鼠的体增重和饲料能效比均明显降低,表明四种实验操作已经损伤了小鼠福利。与实验操作组相比,音乐干

预组体增重和饲料能效比均有不同程度的改善,表明音乐干预可以通过改善食欲间接缓解小鼠在实验操作下由于食欲减退而出现的机体能量和营养供需失衡状态,此种效应在 M-r 组和 M-o 组体现较明显,提示音乐干预可能对改善眼眶静脉采血和保定小鼠的摄食及生长具有较好效果。

血清生化指标测定结果显示,E-r 组和 E-g 组的 TG 值均显著降低,同时 E-r 组的 HDL-C 也显著降低,提示保定和灌胃实验刺激可能影响了小鼠体内的脂代谢过程,甚至可能影响到体内物质资源的重新分配。有研究报道,较低的血胆固醇浓度往往与抑郁倾向有关<sup>[11-12]</sup>,本研究结果显示,M-r 组 CHOL 值与实验组相比显著降低,提示保定应激小鼠可能出现情绪低落。推测情绪的潜在抑制可能有利于平复实验动物受到刺激后过于亢奋的状态,该可能性有待进一步验证。

实验结果显示,实验操作四组的脾脏指数均不同程度的降低,其中 E-o 组脾脏指数显著降低,E-r

组的脾脏指数和胸腺指数均显著降低,提示 7 d 的实验操作应激已显著影响到小鼠的免疫器官。已有研究表明,实验操作可引起小鼠免疫抑制<sup>[13-15]</sup>,导致主要免疫器官退化,本实验也确认了这一观点。与实验组相比,音乐干预组的胸腺指数均无显著变化,但脾脏指数均有所上升。与 E-r 组相比,M-r 组的脾脏指数下降趋势减缓,表明音乐干预有缓解保定应激小鼠免疫器官衰退的作用。实验操作组小鼠的外周血 WBC 和 IL-2 均有不同程度的降低,提示各种实验操作刺激均已造成小鼠免疫功能不同程度的抑制。与实验操作组相比,M-g 组 WBC 和 M-r 组 IL-2 水平降低趋势减缓,提示音乐干预对恢复灌胃和保定应激小鼠的免疫功能有较明显作用,其确切机制和对各层次免疫功能的影响值有待验证。此外,音乐干预 M-p 组 WBC 结果显著下降,推测可能由于免疫系统间的相互调控,以及免疫系统和内分泌系统间的双向信息传递机制的作用,综合导致了免疫指标的变化趋势并不一致。

在动物福利评价中,下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)是经典的应激反应通路<sup>[17-18]</sup>,外周血中 CORT 和 ACTH 水平升高是 HPA 轴激活的主要生理学表现。前期研究表明,常规实验刺激能够引起 HPA 轴的级联激活,导致肾上腺皮质释放大量糖皮质激素(GC)并使其维持在较高水平<sup>[19]</sup>。当生物体应对环境挑战时提高 GC 的循环水平有助于帮助维持机体在不同环境中的稳态,然而血液中持久的高水平 GC 会导致机体损伤,并可能削弱机体对外界环境的适应能力<sup>[20]</sup>。内阿片肽家族的重要成员  $\beta$ -EP 已被证明和身心刺激存在某种联动,为体内神经内分泌-免疫网络的双重调节因子,而且是作用最强的内源性镇痛物质<sup>[21-22]</sup>。本研究结果显示,实验操作组小鼠外周血清中 CORT 和 ACTH 水平显著升高而  $\beta$ -EP 水平降低,证实四种实验操作使小鼠体内 HPA 轴激活,不同程度改变了实验小鼠相关神经内分泌系统活性,推测外周  $\beta$ -EP 水平下降在一定程度上可引起网络调节的紊乱以及可能改变动物的痛阈。与 E-r 组相比,M-r 组 CORT、ACTH 和  $\beta$ -EP 均显著降低,提示音乐干预有利于缓解保定小鼠的神经内分泌反应使其免受保定应激的损害。

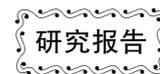
EPI 为交感-肾上腺-髓质系统(SNS)反应的主要外周产物,SNS 生理意义在于通过紧急动员以确保动物体内重要组织器官的血液供应,迅速提高机体的应激抵抗能力,然而 SNS 反应持续时间过长,

可能导致多组织的缺血坏死和功能紊乱<sup>[23]</sup>。研究结果显示,与实验操作组相比,音乐干预组 EPI 水平均有下降趋势,适当的音乐干预有助于小鼠血清 EPI 恢复正常水平。

研究结果明确了常规实验操作(保定、给药、采血)已对小鼠造成了强烈的应激,使其体增重和饲料能效比均显著降低,神经内分泌系统出现紊乱,免疫功能受到抑制,使小鼠的健康和福利受到严重威胁。本研究也初步证实恬静、舒缓的音乐干预能够改善眼眶静脉采血小鼠的摄食生长情况,对灌胃小鼠的免疫功能有较好的恢复作用,对保定应激小鼠的摄食生长、神经内分泌系统和免疫功能均有较明显的恢复作用。证实不同实验操作在各项指标上改善或调节程度的不同,不同的损伤方式采取不同福利干预方案或许会收到更好的效果。

#### 参考文献:

- [1] 李胜利,王钜,陈振文. 实验动物福利发展浅析及教学体会[J]. 中国比较医学杂志,2007,17(8):53-54.
- [2] 恽时锋,田小芸,郭联庆,等. 维护实验动物福利,促进生命科学发展[J]. 医学研究生学报,2009,22(8):858-860.
- [3] 满力,高明个. 音乐疗法在护理工作中应用的现状[J]. 中华护理杂志,2003,38(3):205-206.
- [4] 恽时锋,田小芸,董敏,等. 医学实验动物福利伦理问题分析[J]. 医学研究生学报,2010,23(4):397-400.
- [5] 王福金,詹红微,李慧玲,等. 不同音乐环境对小鼠生长发育的影响[J]. 中国比较医学杂志,2011,1(21):83-86.
- [6] Patel AD, Iversen JR, Bregman MR, et al. Experimental evidence for synchronization to a musical beat in a nonhuman animal[J]. *Curr Biol*, 2009,19:827-830.
- [7] Evans A. Music is for cows, too[J]. *Hoard's Dairyman*, 1990, 135:721.
- [8] 翟亚南,陈伯安,郭萌,等. 束缚应激的研究进展[J]. 实验动物科学,2013,4(30):56-59.
- [9] Van Loo PL, Van der Meer E, Kruitwagen CL, et al. Long term effects of husbandry procedures on stressed related parameters in male mice of two strains[J]. *Laboratory Animals*, 2004,38:169-177.
- [10] Vera Baumans. Methods for evaluation of laboratory animal well-being[J]. *Altern Lab Anim*, 2004,32(s1):161-162.
- [11] 洪力. 低胆固醇与抑郁[J]. 国外科技动态,1995,(5):27.
- [12] 王高华,黄从新. 青年抑郁障碍患者的血清胆固醇、甘油三酯、脂蛋白及载脂蛋白水平[J]. 武汉大学学报(医学版), 2003,24(2):174-176.
- [13] Sheridan F, Dobbs C, Jung J, et al. Stress-induced neuroendocrine modulation of viral pathogenesis and immunity[J]. *Ann NY Acad Sci*, 1998,840:803-808.



# 雌雄 FMMU 白化豚鼠基础生理生化指标的差异分析

张晓玉, 张修彦, 陈伟盛, 梁 宁, 詹纯列

(广州军区广州总医院动物实验中心, 广州 510010)

**【摘要】** 目的 测定与比较雌、雄普通级 FMMU 白化豚鼠血液指标、心率、颈总动脉压及心室压、脏器参数。方法 取 250 ~ 350 g 普通级 FMMU 白化豚鼠 30 只, 雌雄各半, 饲养一周后, 心脏采血测定血液生理生化及血气指标; 颈总动脉插管测定动脉压, 呼吸支持情况下开胸进行心室压测定; 解剖并精确称量各脏器重量。结果 雄性与雌性豚鼠比较: 血液指标中, 血小板计数、谷丙转氨酶、总胆红素、乳酸的差异有显著性意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 颈总动脉舒张压、平均压以及左心室收缩压、平均压的差异有显著性意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 各主要的脏器重量及脏器系数均无显著性差异。结论 普通级雌雄 FMMU 白化豚鼠血液生理生化、血气及心血管功能指标存在差异。

**【关键词】** 普通级 FMMU 豚鼠; 血液指标; 颈总动脉压; 心室压; 脏器参数

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0037-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.11.009

## The measurement and comparison of basic physiological and biochemical index of male and female FMMU albino guinea-pig

ZHANG Xiao-yu, ZHANG Xiu-yan, CHEN Wei-sheng, LIANG Ning, ZHAN Chun-lie

(Animal experiment center, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command of PLA, Guangzhou 510010, China)

**【Abstract】 Objective** To determine and compare the parameters of blood, heart rate, carotid artery pressure, ventricular pressure and organ indexes of male and female FMMU albino guinea-pig. **Methods** A total of 30 guinea-pig about 250 ~ 350 g weight were fed for a week, then blood physiological and biochemical index, blood gas and carotid artery pressure were determined, ventricular pressure were measured by arterial catheterization and heart rate were measured on the respiratory support condition. Finally, weight of guinea-pig body and main organ were weighed. **Result** The difference of platelet count, glutamic-pyruvic transaminase, total bilirubin and lactic acid were significant ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The difference of carotid diastolic blood pressure and mean blood pressure, left ventricular systolic pressure and mean pressure were totally significant ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). And there were no significant differences in weight and organ coefficient of main organs. **Conclusion** There were differences in blood physiology and biochemistry, blood gas, carotid artery pressure and ventricular pressure in different gender of the ordinary grade FMMU albino guinea-pig.

**【Key words】** FMMU albino guinea-pig; Blood parameter; Carotid artery pressure; Ventricular pressure; Organ parameter

FMMU 白化豚鼠具有独特的免疫学特性, 体液免疫及非特异性免疫功能较低<sup>[1]</sup>, 心电图波形与人很相似, 更适合用于制作感染性疾病的动物模型和心肌缺血等实验<sup>[2-3]</sup>, 脂质代谢特点更符合临床高

[基金项目] 广东省科技计划基础条件建设项目(2012B060300022)。

[作者简介] 张晓玉(1989-), 女, 研究方向: 人类疾病动物模型的开发利用, E-mail: zhxiaoyu11@163.com。

[通讯作者] 詹纯列(1963-), 男, 研究方向: 实验动物与人类疾病动物模型, E-mail: 1513508151@qq.com。

脂血症研究<sup>[4]</sup>。目前,国内外有关 FMMU 白化豚鼠脏器参数、血液生理生化、血压及心室压测定及性别间差异的研究不多,以往的资料较为陈旧,不同文献中数据差异较大,给研究者造成困扰。本文较全面地测定和比较了雌雄 FMMU 白化豚鼠的基础生理生化指标,为其在免疫学、心脏疾病及心血管功能研究等方面的应用提供基础数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

普通级豚鼠 250 ~ 350 g,雌雄各 15 只,购于广州花东信华实验动物养殖场【SCXK(粤)2014-0023】,饲养于广州军区广州总医院动物实验中心普通环境【SYXK(粤)2014-0100】,适应性饲养 1 周后用于实验,实验前禁食 12 h,禁水 1 h。

### 1.2 主要仪器及试剂

德国赛多利斯 BSA124S 型电子天平(0.1 mg ~ 120 g)、日本光电 MEK-7222 型全自动血细胞分析仪、美国 IL GEM premier 3000 型全自动血气分析仪、日本日立 7020 型全自动生化分析仪、上海奥尔科特 ALC-V8 型小动物呼吸机、北京微信斯达 Pclab-430C 型生物医学信号采集处理系统及 PY-2 型血压传感器、BD-24G 静脉留置针、体积分数 2% 戊巴比妥钠注射液、500 U/mL 肝素钠生理盐水注射液。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 血液样品检测

取普通级豚鼠雌雄各 15 只,固定后心脏采血约 4 mL,分别注入 EDTA-2K<sup>+</sup> 抗凝管、肝素抗凝管、普通采血管,用于检测血常规指标、血气指标及血生化指标。

#### 1.3.2 心率及颈总动脉血压测定

采血后,为避免心脏采血操作对血压、心室压测定的影响,上述雌雄各 15 只普通级豚鼠,需观察饲养一周待状态恢复良好后,称量体重,腹腔注射戊巴比妥钠(2 mL/kg),待麻醉后固定,分离颈总动脉后,结扎远心端,动脉夹固定近心端。静脉留置针与生理信号采集系统相连接,进行动脉穿刺,成功后抽回针头将软管送入,注入肝素(1000 U/kg),观察显示器中血压波形稳定后,记录数值。

#### 1.3.3 左右心室压测定

结扎颈总动脉后,钝性剥离气管,使用小动物呼吸机进行插管辅助呼吸。开胸进入胸腔,打开心包膜,将留置针针尖插入心尖处立即收回,并将套

管部分继续插入左心室内,观察泵出血液颜色鲜红,节奏有力,显示数值稳定后记录左心室压。后继续将留置针穿过心室隔到达右心室,泵出血液颜色深红,观察并记录右心室压。

#### 1.3.4 脏器重量的测定

上述测定完成后,对豚鼠实施安乐死,并立即剖取脑、脑垂体、甲状腺、胸腺、心、肺、肝、胃、脾、肾、肾上腺、睾丸/子宫、附睾/卵巢,滤纸吸干组织表面水分后,称重记数,计算脏器系数 = [(脏器重量/体质量) × 100%]。

### 1.4 统计方法

数据处理采用 SPSS19.0 统计软件进行,性别间比较采用 *t* 检验,数据以平均数 ± 标准差 ( $\bar{X} \pm s$ ) 表示, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血常规

实验结果表明:普通级雌、雄豚鼠仅 PLT 1 项指标差异显著(表 1)。

表 1 雄性与雌性普通级 FMMU 白化豚鼠血常规测定及比较

Tab. 1 Comparison of blood cell analysis between male and female FMMU albino guinea-pig

项目 Items	雄性 Male (n = 15)	雌性 Female (n = 15)
白细胞 WBC 10 <sup>9</sup> /L	4.46 ± 1.82	5.52 ± 3.054
中性粒细胞 NEUT 10 <sup>9</sup> /L	1.92 ± 0.80	2.42 ± 1.75
淋巴细胞 LYMPH 10 <sup>9</sup> /L	1.92 ± 1.18	2.41 ± 1.63
单核细胞 MONO 10 <sup>9</sup> /L	0.38 ± 0.20	0.57 ± 0.39
嗜酸性粒细胞 EO 10 <sup>9</sup> /L	0.08 ± 0.08	0.10 ± 0.12
嗜碱性粒细胞 BASO 10 <sup>9</sup> /L	0.17 ± 0.49	0.38 ± 0.68
中性粒细胞百分率 NEUT %	44.43 ± 15.91	45.43 ± 13.51
淋巴细胞百分率 LYMPH %	42.09 ± 13.00	45.62 ± 17.79
单核细胞百分率 MONO %	8.30 ± 2.60	10.42 ± 4.30
嗜酸性粒细胞百分率 EO %	1.39 ± 1.22	1.50 ± 1.34
嗜碱性粒细胞百分率 BASO %	0.38 ± 0.15	0.77 ± 0.92
红细胞 RBC 10 <sup>12</sup> /L	5.32 ± 0.65	5.29 ± 0.46
血红蛋白 HGB g/L	134.90 ± 1.53	137.40 ± 1.10
红细胞压积 HCT %	0.391 ± 0.0466	0.392 ± 0.0307
红细胞平均体积 MCV fL	73.67 ± 3.12	74.19 ± 2.75
平均血红蛋白量 MCH pg	25.39 ± 0.94	26.00 ± 0.97
平均血红蛋白浓度 MCHC g/L	344.93 ± 7.47	350.38 ± 6.65
红细胞分布宽度 RDW-CV %	15.21 ± 2.36	14.57 ± 2.04
血小板计数 PLT 10 <sup>9</sup> /L	411.14 ± 76.86	485.90 ± 142.03*
血小板压积 PCT %	0.17 ± 0.06	0.19 ± 0.11
血小板平均体积 MPV fL	8.16 ± 1.05	8.11 ± 0.71
血小板分布宽度 PDW %	17.81 ± 1.99	17.51 ± 0.87

注:普通级豚鼠雌、雄间比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Comparison of the male and female FMMU albino guinea-pig, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

### 2.2 血液生化

实验结果表明,普通级雌、雄豚鼠 ALT、TBIL 2 项指标差异显著(表 2)。

2.3 血气分析

实验结果表明,普通级雌、雄豚鼠 Lac 指标差异显著(表 3)。

2.4 心率、颈总动脉压、心室压

实验结果表明,普通级雌、雄豚鼠的颈总动脉

舒张压、颈总动脉平均压以及 LVMP 3 项指标差异显著, LVSP 差异极显著(表 4)。

2.5 主要脏器参数

实验结果表明,普通级 FMMU 白化豚鼠雌、雄之间脏器重量和脏器系数无显著性差异(表 5)。

表 2 雄性与雌性普通级 FMMU 白化豚鼠血液生化

Tab. 2 Comparison of blood biochemistry between male and female FMMU albino guinea-pig

项目 Items	雄性 Male (n = 15)	雌性 Female (n = 15)
谷丙转氨酶 ALT U/L	80.20 ± 30.15	59.73 ± 13.88 *
谷草转氨酶 AST U/L	95.93 ± 57.12	96.00 ± 49.43
碱性磷酸酶 ALP U/L	135.00 ± 52.28	152.33 ± 37.19
谷氨酰转肽酶 GGT U/L	36.07 ± 24.92	41.73 ± 23.77
淀粉酶 AMY U/L	135.89 ± 22.48	132.13 ± 14.03
总蛋白 TP g/L	54.48 ± 3.68	53.51 ± 5.14
白蛋白 ALB g/L	30.01 ± 2.05	28.45 ± 2.75
球蛋白 GLOB g/L	24.47 ± 2.48	25.05 ± 3.34
血清白/球蛋白 A/G	1.23 ± 0.11	1.149 ± 0.14
总胆红素 TBIL μmol/L	1.13 ± 0.03	1.11 ± 0.023 *
血糖 GLU mmol/L	6.06 ± 2.35	6.81 ± 3.06
尿素氮 BUN mmol/L	13.59 ± 3.48	13.12 ± 4.34
肌酐 CREA μmol/L	49.81 ± 7.56	49.83 ± 9.09
胆固醇 CHOI mmol/L	1.77 ± 3.23	1.167 ± 0.25
甘油三酯 TG mmol/L	0.43 ± 0.30	0.47 ± 0.10
高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C mmol/L	0.20 ± 0.067	0.19 ± 0.057
低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C mmol/L	0.64 ± 0.26	0.80 ± 0.23
尿酸 UA μmol/L	130.93 ± 43.14	136.33 ± 91.29
乳酸脱氢酶 LDH U/L	210.53 ± 158.91	210.07 ± 90.017
免疫球蛋白 G IgG mg/mL	1.33 ± 0.11	1.40 ± 0.12
补体 C3 g/L	0.24 ± 0.015	0.23 ± 0.034
补体 C4 g/L	0.021 ± 0.0035	0.021 ± 0.0046

注:普通级豚鼠雌、雄之间比较 \* P < 0.05, \*\* P < 0.01。

Note: Comparison of the male and female FMMU albino guinea-pig, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01.

表 3 雄性与雌性普通级 FMMU 白化豚鼠血气分析

Tab. 3 Comparison of blood gas analysis between male and female FMMU albino guinea-pig

项目 Items	雄性 Male (n = 15)	雌性 Female (n = 15)
pH 值 pH	7.16 ± 0.11	7.22 ± 0.14
动脉血氧分压 PaO <sub>2</sub> mmHg	92.93 ± 27.20	86.00 ± 22.95
动脉血二氧化碳分压 PaCO <sub>2</sub> mmHg	35.80 ± 13.61	34.40 ± 11.24
PH 温度校正 pHT	7.16 ± 0.11	7.22 ± 0.14
氧分压温度校正 PO <sub>2</sub> T mmHg	92.93 ± 27.20	86.00 ± 22.95
二氧化碳分压温度校正 PCO <sub>2</sub> T mmHg	35.80 ± 13.61	34.40 ± 11.24
二氧化碳总量 TCO <sub>2</sub> mmol/L	13.37 ± 3.48	15.50 ± 5.99
红细胞外液剩余碱 BE <sub>ef</sub> mmol/L	-16.43 ± 3.55	-13.31 ± 7.65
全血剩余碱 BE(B) mmol/L	-15.42 ± 3.46	-12.35 ± 7.26
实际碳酸氢根 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mmol/L	12.28 ± 3.19	14.46 ± 5.82
标准碳酸氢根 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> std mmol/L	12.69 ± 2.80	15.09 ± 5.77
呼吸指数 RI	0.25 ± 0.15	0.34 ± 0.24
肺动脉氧分压比率 paO <sub>2</sub> /pAO <sub>2</sub>	0.88 ± 0.17	0.80 ± 0.14
钾 K <sup>+</sup> mmol/L	4.34 ± 0.93	4.36 ± 1.23
钠 Na <sup>+</sup> mmol/L	134.13 ± 5.30	134.27 ± 4.88
钙 Ca <sup>2+</sup> mmol/L	1.26 ± 0.12	1.26 ± 0.09
乳酸 Lac mmol/L	13.23 ± 2.24	10.99 ± 2.91 *
钙离子 Ca <sub>pH 7.4</sub> <sup>2+</sup> mmol/L	1.14 ± 0.09	1.17 ± 0.10
血氧饱和度 SaO <sub>2</sub> %	90.27 ± 11.39	89.47 ± 14.68
总血红蛋白 THbc g/L	149.07 ± 11.64	137.60 ± 21.76
肺泡气氧分压 pAO <sub>2</sub> mmHg	104.87 ± 16.97	106.67 ± 14.07
肺泡气 - 动脉血氧分压差 A-aDO <sub>2</sub> mmHg	12.73 ± 17.33	20.67 ± 13.22
氧合指数 OI mmHg	442.60 ± 129.36	409.53 ± 109.35

注:普通级豚鼠雌、雄之间比较 \* P < 0.05, \*\* P < 0.01。

Note: Comparison of the male and female FMMU albino guinea-pig, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01.

表 4 雄性与雌性普通级 FMMU 白化豚鼠心率、颈总动脉压、心室压

Tab. 4 Comparison of heart rate, carotid artery pressure and ventricular pressure between male and female FMMU albino guinea-pig

项目 Items	性别 Sex	$\bar{x} \pm s$	范围 Range
体重 g	♂	311.78 ± 17.594	280.4 ~ 344.4
	♀	311.07 ± 22.997	269.8 ~ 347.3
心跳频率 次/min	♂	208.91 ± 24.52	175 ~ 246
	♀	208.44 ± 16.65	180 ~ 242
颈总动脉收缩压 mmHg	♂	65.71 ± 9.75	44 ~ 88
	♀	68.07 ± 13.20	44 ~ 93
颈总动脉舒张压 mmHg	♂	46.69 ± 6.52	30 ~ 56
	♀	43.36 ± 7.61*	30 ~ 59
颈总动脉平均压 mmHg	♂	55.02 ± 6.27	40 ~ 68
	♀	51.40 ± 9.21*	37 ~ 69
左心室收缩压 LVSP mmHg	♂	39.82 ± 7.15	23 ~ 52
	♀	33.13 ± 8.08**	23 ~ 51
左心室舒张压 LVDP mmHg	♂	9.76 ± 4.74	4 ~ 18
	♀	10.33 ± 5.00	4 ~ 19
左心室平均压 LVMP mmHg	♂	21.24 ± 5.36	12 ~ 31
	♀	17.96 ± 4.87*	11 ~ 28
右心室收缩压 RVSP mmHg	♂	14.60 ± 4.32	7 ~ 21
	♀	16.29 ± 5.86	6 ~ 29
右心室舒张压 RVDP mmHg	♂	4.13 ± 3.00	0 ~ 9
	♀	4.07 ± 2.28	0 ~ 9
右心室平均压 RVMP mmHg	♂	9.51 ± 3.94	3 ~ 15
	♀	8.58 ± 3.80	3 ~ 18

注:普通级豚鼠雌、雄之间比较 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Comparison of the male and female FMMU albino guinea-pig, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

表 5 雄性与雌性普通级 FMMU 白化豚鼠主要脏器参数

Tab. 5 Comparison of main organ weights between male and female FMMU albino guinea-pig

指标 Indexes	雄性 Male (n = 15)		雌性 Female (n = 15)	
	脏器重量 g Organ weight	脏器系数% Organ coefficient	脏器重量 g Organ weight	脏器系数% Organ coefficient
脑 Brain	3.687 ± 0.235	1.184 ± 0.0682	3.543 ± 0.176	1.144 ± 0.0938
脑垂体 Pituitary	0.0423 ± 0.0137	0.0136 ± 0.0000434	0.0341 ± 0.0113	0.0111 ± 0.00386
甲状腺 Thyroid	0.060 ± 0.0224	0.192 ± 0.00683	0.0905 ± 0.102	0.291 ± 0.0323
胸腺 Thymus	0.054 ± 0.0231	0.0173 ± 0.00775	0.0416 ± 0.0104	0.0134 ± 0.00388
心 Heart	1.253 ± 0.229	0.402 ± 0.0693	1.144 ± 0.160	0.371 ± 0.0660
肺 Lung	2.731 ± 0.535	0.875 ± 0.161	2.572 ± 0.351	0.833 ± 0.152
肝 Liver	8.294 ± 1.993	2.662 ± 0.617	9.347 ± 1.288	3.020 ± 0.461
胃 Stomach	2.907 ± 0.979	0.925 ± 0.298	2.767 ± 0.538	0.893 ± 0.177
脾 Spleen	0.576 ± 0.296	0.187 ± 0.107	0.518 ± 0.116	0.166 ± 0.0329
左肾 Left Kidney	1.231 ± 0.151	0.395 ± 0.0450	1.191 ± 0.171	0.383 ± 0.0521
右肾 Right Kidney	1.212 ± 0.145	0.389 ± 0.0416	1.192 ± 0.151	0.384 ± 0.0448
肾上腺 Adrenal glands	0.173 ± 0.0413	0.0554 ± 0.0129	0.181 ± 0.030	0.0587 ± 0.0111
睾丸/子宫 Testis/Uterus	1.120 ± 0.328	0.359 ± 0.102	0.959 ± 0.965	0.310 ± 0.321
附睾/卵巢 Epididymis/Ovary	0.205 ± 0.0863	0.0657 ± 0.0261	0.151 ± 0.0173	0.0485 ± 0.00545

注:普通级豚鼠雌、雄间比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Comparison of the male and female FMMU albino guinea-pig, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

### 3 讨论

本文针对毒理学等实验中常用的 250 ~ 350 g 体重范围内白化豚鼠的生理生化特征进行测定,供相关领域的研究人员参考使用。在相近体重范围

内,雌性与雄性普通级 FMMU 白化豚鼠各主要脏器重量及脏器系数差异不显著,测定数据较之前文献报道<sup>[5]</sup>而言,更准确地说明性别对脏器参数没有影响。血液检测结果显示,在 22 项血常规、22 项血生化及 23 项血气指标中,除血小板计数、谷丙转氨酶、

总胆红素、乳酸 4 项指标外不存在性别间差异,与顾为望<sup>[6]</sup>等关于雌雄间血生理生化差异显著的报道不一致。谷丙转氨酶(ALT)主要存在于肝脏、心脏和骨骼肌中,肝脏发生炎症病变可使血清 ALT 增高。外周血 ALT 水平与缺血性脑卒中患者预后独立相关,外周血 ALT 升高可降低谷氨酸盐对脑细胞的损害<sup>[7]</sup>。研究表明高脂血症豚鼠血清 ALT 显著增加<sup>[4]</sup>,而总胆红素(TBIL)主要用来诊断是否有肝脏疾病或胆道是否发生异常<sup>[8]</sup>。实验结果显示,雄性豚鼠 ALT、TBIL 显著高于雌性,因此,在使用白化豚鼠开展相关研究时应注意可能存在的性别差异。此外,在血液生理生化以往研究的基础上<sup>[4,9-10]</sup>,本实验补充了豚鼠血气分析的测定结果。

豚鼠心功能观察通常采用测定心率、冠脉流量<sup>[3]</sup>、心电图<sup>[2]</sup>等方法,而少见报道豚鼠颈总动脉压及心室压的测定值,而血压及心室压是评估心血管功能的重要指标<sup>[11-12]</sup>。目前,国内外测定豚鼠无创血压的仪器较少,耗材昂贵,使用者少,可供查阅的数据不足。本文采用有创血压测定的结果可供使用白化豚鼠开展心血管方面实验的研究者参考。

#### 参考文献:

- [1] 顾为望,曲莉芝,王万山,等. FMMU 白化豚鼠免疫学特性研究[J]. 中国实验动物学报,2002,10(2):105-107.
- [2] 张嘉宁,顾为望,王洪涛. FMMU 白化豚鼠心电图分析[J]. 上海实验动物科学,1999,19(1):35-37.
- [3] 王燕,赵美咪,闵冬雨,等. 不同缺血时间对豚鼠离体心脏缺血/再灌注损伤的影响[J]. 中国药理学通报,2013,29(1):73-78.
- [4] 罗漪. 豚鼠与 SD 大鼠高脂血症模型的比较研究[D]. 昆明:昆明医学院,2009.
- [5] 詹纯列,王洪涛,李建军,等. 封闭群 FMMU 白化豚鼠主要脏器重量及脏器系数的测定[J]. 中国实验动物学报,1997,5(1):33-36.
- [6] 顾为望,王洪涛,张嘉宁,等. 封闭群 FMMU 白化豚鼠与短毛三色豚鼠血液成分比较[J]. 中国实验动物学报,1997,5(1):23-28.
- [7] 刘佳乐,王雪梅,曹婧,等. 谷草转氨酶和谷丙转氨酶水平与急性期缺血性脑卒中患者短期预后的关系[J]. 中国老年学杂志,2015,35(4):935-937.
- [8] 张小丽,张涛,陈瑞明,等. 草澄茄不同极性提取物对豚鼠胆结石形成及其生化指标的影响[J]. 西北药学杂志,2015,30(4):376-378.
- [9] 张琨,孙淑华,仇慧敏,等. 无菌豚鼠与普通豚鼠血液学参数的比较[J]. 中国实验动物学报,2010,18(2):176-180.
- [10] 李英,郭桂华,顾为望. FMMU 白化豚鼠与花色豚鼠血清 Ig 和补体含量及总补体活性比较[J]. 动物医学进展,2003,24(6):91-92.
- [11] 侯翠红,李亚辉,王文,等. 自发性高血压大鼠右心室压、肺动脉压变化的观察[J]. 中国分子心脏病学杂志,2007,7(1):37-38.
- [12] 胡高频,李旭楠,姜东炬. 心脏磁共振成像评价肺动脉高压患者右心室功能的研究进展[J]. 医学综述,2014,20(19):3585-3587.

[修回日期]2015-09-08



# 扶正化积方剂对 H22 肝癌小鼠抑瘤的作用

李晓娟<sup>1</sup>, 白云峰<sup>2</sup>, 王睿林<sup>2</sup>, 邬顺全<sup>1</sup>, 侯俊<sup>1</sup>, 李瑞生<sup>1</sup>

(1. 解放军第302医院实验技术研究保障中心, 北京 100039;  
2. 解放军第302医院中西医结合肝病诊疗与研究中心, 北京 100039)

**【摘要】** 目的 研究扶正化积方(FZHJF)对小鼠H22肝癌移植瘤的抑制作用及对免疫功能的影响。方法 建立小鼠皮下H22移植性肝癌模型,随机分为模型对照组、FZHJF低、中、高剂量组(4.55、13.65、40.95 g/kg)和5-氟尿嘧啶组(0.2 mL/10 g),连续给药12 d后,采集肿瘤与脏器称重并计算抑瘤率、肝脏指数、脾脏指数和胸腺指数;同时对各组肿瘤外观和肿瘤病理进行分析。**结果** 肿瘤病理结果显示均为典型的肝细胞癌。FZHJF剂量组的瘤重显著低于模型对照组( $P < 0.05$ ),FZHJF的抑瘤率随剂量升高而增加,高剂量组的抑瘤率(49.02%)接近5-FU组(51.51%);肿瘤外观图显示FZHJF从低剂量至高剂量组的肿瘤体积呈现逐渐减小的趋势,且均小于模型对照组。FZHJF各剂量组的脾脏指数与胸腺指数均显著高于模型对照组与5-FU组( $P < 0.05$ )。**结论** FZHJF对H22肝癌移植瘤具有显著的抑制作用和免疫增强作用,为今后临床研究提供了试验数据。

**【关键词】** FZHJF;移植性肝肿瘤;抑瘤率;免疫功能

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0042-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.11.010

## Experimental study of Fuzheng Huaji decoction inhibition effect on H22 tumor bearing mice

LI Xiao-juan<sup>1</sup>, BAI Yun-feng<sup>2</sup>, WANG Rui-lin<sup>2</sup>, WU Shun-quan<sup>1</sup>, HOU Jun<sup>1</sup>, LI Rui-sheng<sup>1</sup>

(1. Experimental Research Support Center, Beijing 100039, China; 2. Liver Disease Center for Combined TCM and Western Medicine, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

**【Abstract】** **Objective** To study the anti-tumor and immune effects of FZHJF on H22 liver cancer-bearing mice. **Methods** The H22 transplanted mouse models were established and randomly divided into five groups: model group, low-, medium- and high-dose FZHJF (4.55, 13.65, 40.95g/kg) and 5-Fu groups (0.2mL/10g). 12 days after treatment, the tumor inhibitory rate, liver index, thymus index, spleen index were calculated. At the same time, the appearance of liver tumor and tumor pathology in different groups was analyzed. **Results** Pathology results confirmed the tumors were hepatocellular carcinoma. Tumor weight in FZHJF groups were lower than those of the model group ( $P < 0.05$ ); the tumor inhibitory rate increased with the dosage, and the tumor inhibitory rate in high dose group (49.02%) closed to 5-Fu group (51.51%); the results of tumor appearance showed that the tumor volume have the trend of reduce gradually, and is smaller than the control group. Thymus index and spleen index in FZHJF groups were markedly higher than those of the model and

**【基金项目】**解放军第302医院院长创新基金(YNKT2013026)。

**【作者简介】**李晓娟(1980-),女,硕士,E-mail: sxlily55@163.com;白云峰(1970-),男,博士;李晓娟和白云峰为并列第一作者。

**【通讯作者】**李瑞生(1969-),男,博士,副研究员,主要从事人类疾病动物模型研究,E-mail: lrsheng@sohu.com;侯俊(1973-),女,博士,副主任技师,E-mail: houjun5757@sina.com。

5-FU groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** FZHJF has significant anti-tumor effect on transplanted H22 tumor in mice and has the function of immunological enhancement, and these results will provide theoretical foundation for clinical practice of FZHJF.

**【Key words】** FZHJF; Transplanted liver cancer; The tumor inhibitory rate; Immune function

目前临床上的原发性肝癌死亡率较高,位居各种恶性肿瘤的第三位<sup>[1]</sup>。由于其起病隐匿,发展迅速,预后差,因而对肝癌的防治研究以及降低其发病率和死亡率仍是目前面临的一个重要课题<sup>[2-3]</sup>。迄今为止,肝癌仍以手术治疗为首选,但部分患者发现时已处于中晚期而不能手术,或手术后出现转移造成预后不良,因此迫切需要探索寻找疗效更好的治疗药物和其他方法<sup>[4]</sup>。我国是中医药大国,中医药在抑制肿瘤生长,提高患者生存质量和延长患者生命等方面有着得天独厚的优势,已逐渐成为各种疾病研究的热点<sup>[5]</sup>。FZHJF(抗癌方)经临床观察,对肝癌有明显的抑制作用并能改善患者生存质量和延长其生命。为探讨该方药的抗癌作用机制,本实验通过建立小鼠 H22 肝癌移植瘤模型,观察 FZHJF 对小鼠 H22 肝癌移植瘤的生长抑制作用及其对免疫功能的影响,以期为该方剂的药理机制研究和临床应用提供可靠的实验数据打下坚实的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物与瘤株细胞

选择 SPF 级昆明小鼠 45 只,雄性,20~22 g,购自军事医学科学院实验动物中心,生产许可证【SCXK(军)2012-0004】。本实验室具有 SPF 级实验动物使用许可证【SYXK(军)2012-0010】。H22 肝癌细胞株来源于解放军 302 医院药学部实验室。

### 1.2 实验药物

注射用 5-氟尿嘧啶(5-FU, 0.25 g/10 mL)购自上海旭东海普药业有限公司,批号 FA131122;生理盐水由解放军第 302 医院制剂室提供(石家庄四药有限公司,批号:130527405);抗癌方剂 FZHJF 颗粒是由党参、炙黄芪、焦白术、茯苓、白芍、地龙肉、玄参、草河车、半枝莲、红花、生牡蛎、干姜、天花粉、夏枯草、当归、丹皮、鸡内金、山甲珠、炙甘草、白花蛇舌草配伍组成,由 302 医院药剂室配置,15 g/袋。

### 1.3 模型制备及分组

将制备好的 H22 细胞悬液(癌细胞数调至  $1 \times$

$10^8$ /mL)注射于小鼠右侧腋窝下(0.2 mL/只)<sup>[4]</sup>。接种 24 h 后将小鼠随机分为 5 组(9 只/组):模型对照组, FZHJF 颗粒低、中、高剂量(4.55、13.65、40.95 g/kg)组、5-FU 组。FZHJF 的剂量根据人临床剂量换算,换算公式:小鼠剂量(g/kg) =  $9.1 \times$  人临床剂量(0.5 g/kg)。此剂量作为低剂量,中剂量与高剂量分别为低剂量的 3 倍和 9 倍。FZHJF 各剂量组的灌胃容量为 0.55 mL/20 g 小鼠体重,模型对照组灌胃等容积的生理盐水,5-FU 组腹腔注射(0.2 mL/10 g),1 次/d,连续 12 d。

### 1.4 检测指标

末次给药后次日称体重,处死小鼠剖取肿瘤称重。根据公式计算抑瘤率 =  $[1 - (\text{实验组平均瘤重} / \text{对照组平均瘤重})] \times 100\%$ ;同时采集各组小鼠的肝脏、胸腺和脾脏分别称重,计算各组小鼠的肝脏指数、脾脏指数和胸腺指数<sup>[6]</sup>。将各组剥离的肿瘤组织置入 10% 甲醛固定,HE 染色观察<sup>[4]</sup>。

### 1.5 统计学方法

应用 SPSS17.0 分析软件进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析并进行组间两两比较分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 药物对各组 H22 荷瘤小鼠一般状态、体质量和肿瘤的影响

实验前小鼠活动、饮食、毛色均无异常。实验第 5 天各组小鼠腋下均可触及肿瘤,5-FU 组小鼠毛色较暗,易激惹。给药前各组小鼠体重无统计学差异( $P > 0.05$ ),实验结束时,与模型对照组比较,5-FU 组的体质量显著降低( $P < 0.05$ );而 FZHJF 中、高剂量组的体质量显著高于 5-FU 组( $P < 0.05$ )。与模型对照组比较, FZHJF 中、高剂量组和 5-FU 组的瘤重显著减轻( $P < 0.05$ );而 FZHJF 低剂量组的瘤重显著高于 5-FU 组与高剂量组( $P < 0.05$ )。FZHJF 的抑瘤率随剂量升高而增加,高剂量组抑瘤率接近于 5-FU 组(表 1)。

表 1 FZHJF 对 H22 荷瘤小鼠体质量、瘤重及抑瘤率的影响

Tab. 1 Effect of FZHJF on body weight, the tumor weight and inhibition rate of H22-bearing mice

组别/指标 Group/indicatrix	给药前体重(g) Weight before dose	给药后体重(g) Weight after dose	瘤重(g) Tumor weight(g)	抑瘤率(%) The tumor inhibitory rate (%)
模型对照组 Model group	20.97 ± 1.24	35.78 ± 2.41	1.02 ± 0.67	—
5-FU 组 5-Fu group	21.69 ± 1.07	32.61 ± 3.10 <sup>*</sup>	0.49 ± 0.15 <sup>*</sup>	51.51
FZHJF 低剂量 FZHJF low dose group	21.03 ± 0.69	34.56 ± 2.16	0.90 ± 0.24 <sup>Δ#</sup>	11.76
FZHJF 中剂量 FZHJF med dose group	21.63 ± 1.12	36.31 ± 2.63 <sup>Δ</sup>	0.61 ± 0.17 <sup>*</sup>	40.20
FZHJF 高剂量 FZHJF high dose group	21.54 ± 1.14	36.33 ± 1.99 <sup>Δ</sup>	0.52 ± 0.34 <sup>*</sup>	49.02

注:与模型对照组比较;<sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。与 5-FU 组比较;<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ 。与高剂量组比较;<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the model group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ . Compared with the 5-FU group; <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ . Compared with the high dose group; <sup>#</sup> $P < 0.05$ .

## 2.2 药物对各组 H22 荷瘤小鼠肿瘤大小作用的对比分析

各组荷瘤小鼠的肿瘤病理结果均证实为典型的肝细胞癌。各组小鼠的肿瘤外观图对比显示:模型对照组肿瘤较大, FZHJF 从低剂量至高剂量组的肿瘤体积呈现逐渐减小的趋势, 且高剂量组肿瘤的大小与 5-FU 组肿瘤大小相仿(图 1)。

## 2.3 药物对各组 H22 荷瘤小鼠脏器指数的影响

实验结束时, 各剂量组肝脏指数之间均不具有统计学差异( $P > 0.05$ )。而 FZHJF 各剂量组的胸腺和脾脏指数均显著高于模型对照组和 5-FU 组( $P < 0.05$ )(表 2)。

表 2 FZHJF 对 H22 荷瘤小鼠肝脏指数、脾脏指数和胸腺指数的影响

Tab. 2 Effect of FZHJF on liver index, spleen and thymus index of H22-bearing mice

组别/指标 Group/indicatrix	肝脏指数 Liver index	胸腺指数 Thymus index	脾脏指数 Spleen index
模型对照组 Model group	5.91 ± 0.50	0.14 ± 0.03	0.52 ± 0.11
5-FU 组 5-Fu group	5.74 ± 0.80	0.13 ± 0.03	0.59 ± 0.15
FZHJF 低剂量 FZHJF low dose group	6.03 ± 1.25	0.26 ± 0.12 <sup>*Δ</sup>	0.74 ± 0.08 <sup>*Δ</sup>
FZHJF 中剂量 FZHJF medium dose group	5.83 ± 0.44	0.30 ± 0.08 <sup>*Δ</sup>	0.80 ± 0.14 <sup>*Δ</sup>
FZHJF 高剂量 FZHJF high dose group	5.40 ± 0.37	0.28 ± 0.04 <sup>*Δ</sup>	0.77 ± 0.16 <sup>*Δ</sup>

注:与模型对照组比较;<sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。与 5-FU 组比较;<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the model group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ . Compared with the 5-FU group; <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ .

## 3 讨论

中医学认为, 原发性肝癌属正气不足, 湿热、痰浊、瘀血、气滞等积聚所成。因此, 采用扶正培本、活血化瘀、清热解毒是中医治疗肝脏肿瘤的基本原则, 而扶正抑瘤法是较高层次的治疗大法, 同时需

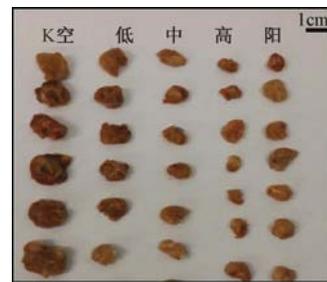


图 1 各组小鼠移植肿瘤外观比较(标尺 = 1cm)

Fig. 1 The appearance of liver tumors in each group (Bar = 1cm)

要结合不同的治疗方法灵活应用<sup>[7]</sup>。邢风举<sup>[8]</sup>等报道周仲瑛教授以味少量轻的扶正药物为基础, 味多量大的具有不同治疗作用的抗肿瘤药物为主导, 佐以数味治疗兼症或新症的药物配伍治疗肝癌, 效果甚佳; 何仁强<sup>[9]</sup>等应用扶正化毒消癌方用于中晚期肝癌患者能改善肝功能、提高生存质量并延长生

存期;苑静波等<sup>[10]</sup>以扶正健脾中药联合经肝动脉插管灌注化疗及栓塞治疗肝癌,效果良好。上述研究均在使用“扶正”中药的基础上,加入不同功能的抗肿瘤中药用于临床肝癌的治疗。而本方也同样以扶正培本类中药为基础,加入活血化瘀类和清热解毒类中药(红花、茯苓、半枝莲等),同时配伍软坚散结类药物(牡蛎、夏枯草)以及治疗兼症药物(白芍、地龙肉、玄参等),经长期临床观察效果佳。然而目前国内外有关此方治疗原发性肝癌的基础性研究鲜有报道。

本实验通过建立肝癌 H22 移植瘤小鼠模型,观察 FZHJF(抗癌方)对肝癌移植肿瘤的抑制作用。肿瘤病理结果显示均为典型的肝细胞癌,说明 H22 移植瘤模型成功。中药治疗结果显示,FZHJF 剂量组的瘤重显著低于模型对照组( $P < 0.05$ ),FZHJF 的抑瘤率随剂量升高而增加,高剂量组的抑瘤率(49.02%)接近 5-FU 组(51.51%)。同时肿瘤外观图更加直观地显示 FZHJF 从低剂量至高剂量组的肿瘤体积呈现逐渐减小的趋势。上述结果均说明此方对肝癌荷瘤小鼠的肿瘤生长有明显的抑制作用。众所周知,抗肿瘤治疗必须依靠机体自身免疫功能的增强或者恢复,而胸腺指数和脾脏指数的大小可直接反映机体免疫水平的高低<sup>[11]</sup>。本实验结果显示,模型对照组和 5-FU 组的荷瘤小鼠有脾脏指数和胸腺指数降低的现象,说明肿瘤以及化疗药物能导致机体的免疫水平下降。而 FZHJF 各剂量组均能够使荷瘤小鼠的脾脏指数和胸腺指数显著升高( $P < 0.05$ ),说明 FZHJF 可促进胸腺和脾脏细胞的增殖分化,具有一定的免疫增强作用从而增强其抑制肿瘤的效果,此结果与部分中药具有增强机体免疫功能作用结果相一致<sup>[12]</sup>。但此方中各味中药各自发挥的抑癌作用需进一步研究。

综上所述,本研究结果表明,FZHJF 对 H22 肝癌移植瘤具有显著的抑制作用,其抑癌作用与 5-FU

相近似,同时还可增强机体胸腺和脾脏细胞的增殖分化,具有免疫增强作用,为 FZHJF(抗癌方)的临床实践提供了试验数据。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 黄展,辛华,江旭东,等. 独角莲醇提液对 H22 肝癌荷瘤小鼠血清 IL-2 和 TNF- $\alpha$  水平的影响[J]. 肿瘤药理学,2013,3(6): 432-435.
- [ 2 ] Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet,2012,379(9822):1245-1255.
- [ 3 ] Cao H, Phan H, Yang LX. Improved chemotherapy for hepatocellular carcinoma[J]. Anticancer Res,2012,32(4):1379-1386.
- [ 4 ] 李晓娟,靳雪源,白冰珂,等. PLC $\epsilon$  基因敲除小鼠移植性肝癌模型的建立与分析[J]. 中国比较医学杂志,2014,24(4):5-7.
- [ 5 ] Qi F, Li A, Inagaki Y, et al. Chinese herbal medicines as adjuvant treatment during chemo-or radio-therapy for cancer [J]. Biosci Trends,2010,4(6):297-307.
- [ 6 ] 李晓娟,张巧云,李蓓,等. BALB/c 突变卷毛小鼠部分生长发育指标初探[J]. 中国比较医学杂志,2013,23(11):36-39.
- [ 7 ] 胡陵静,王怀碧,张国铎. 原发性肝癌的中医治疗现状[J]. 中国中医急症,2013,22(2):273-275.
- [ 8 ] 邢凤举,李柳,周仲瑛. 周仲瑛教授应用复法大方治疗肝癌[J]. 吉林中医药,2014,34(1):22-25.
- [ 9 ] 何仁强,李配富,张宁,等. 扶正化毒消癌方干预原发性肝癌中晚期患者 36 例[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(24):296-300.
- [ 10 ] 苑静波,苏春芝,李光荣,等. 扶正健脾中药对介入治疗后肝癌患者相关指标影响观察[J]. 辽宁中医杂志,2011,38(10):2027-2028.
- [ 11 ] 李晓晶,王爱洁. 白花蛇舌草和半枝莲微粉配伍对 H22 肝癌小鼠抑瘤作用的实验研究[J]. 江苏中医药,2013,45(7):66-68.
- [ 12 ] 蔡鹏,建国,杨士勇,等. 康艾注射液联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究[J]. 中国肿瘤临床与康复,2007,14(2):142.

[修回日期]2015-10-10



# 梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料在松质骨 缺损应用的实验

邵荣学<sup>1</sup>, 全仁夫<sup>2</sup>, 张亮<sup>2</sup>, 谢尚举<sup>2</sup>, 杨迪生<sup>3</sup>, 韦习成<sup>4</sup>

(1. 浙江中医药大学, 杭州 310053; 2. 杭州市萧山区中医院骨科, 杭州 311200;  
3. 浙江大学附属第二医院骨科, 杭州 310009; 4. 上海大学材料科学与工程学院, 上海 200072)

**【摘要】** 目的 评估新型梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> (羟基磷灰石/二氧化锆) 多孔支架材料在修复比格犬椎体骨缺损的效果。方法 (1) 采用泡沫海绵体浸渍成型法、联合梯度复合及高温烧结法制备新型梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料; (2) 将 18 只普通级比格犬 (体重 10 ~ 13 kg, 5 ~ 8 月龄, 雌雄不拘) 随机分成 2 组 (A 组 12 只, B 组 6 只), 通过手术复制椎体骨缺损模型, A 组予以植入梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料, B 组植入自体髂骨; (3) 术后进行影像学检查、形态学观察及生物力学测试, 并比较新型梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料与自体髂骨对修复比格犬椎体缺损的效果。结果 (1) 新型 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料孔隙率为 25 ppi (每英寸 25 个孔)、孔隙均匀, 孔径为 100 ~ 300 μm。 (2) 术后 6 周、12 周、24 周 X 线影像学观察显示: A 组, 随着术后时间延长, 新型梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料植入术后骨痂生成逐渐增多, 植入材料与宿主骨之间的界线逐渐模糊, 至术后 24 周, 人工材料与自体新生骨融为一体; B 组, 在术后 6 周显示移植骨的吸收与塑形, 至术后 24 周移植骨与自体骨完全融合, 无明显界限。 (3) 组织形态学显示: 支架材料孔隙内骨量随着术后时间延长逐步增加, 部分材料降解, 被新生骨替代。 (4) 生物力学测试: 术后 24 周极限抗压试验, 两组比较无明显统计学差异 ( $P > 0.05$ )。结论 新型梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料可诱导骨组织长入孔隙内部, 促进松质骨缺损愈合, 有望在未来的研究中, 广泛应用于松质骨缺损的治疗。

**【关键词】** 羟基磷灰石; 二氧化锆; 骨组织工程; 人工椎体

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0046-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.11.011

## In vivo experiments of porous gradient bio-composites with HA/ZrO<sub>2</sub> in repair of the lumbar vertebra defect

SHAO Rong-xue<sup>1</sup>, QUAN Ren-fu<sup>2</sup>, ZHANG Liang<sup>2</sup>, XIE Shang-ju<sup>2</sup>, YANG Di-sheng<sup>3</sup>, WEI Xi-cheng<sup>4</sup>

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Department of Orthopedics, Xiaoshan Traditional Chinese Medical Hospital, Hangzhou 311200, China; 3. Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310000, China; 4. College of Materials Science and Engineering, Shanghai University, Shanghai 200072, China)

**【Abstract】 Objective** To evaluate the effect of porous gradient composites with hydroxyapatite (HA)/zirconia (ZrO<sub>2</sub>) in repair of lumbar vertebra body defects of dogs. **Methods** (1) New porous gradient HA/ZrO<sub>2</sub> bio-composites were prepared using foam impregnation, gradient compound and high temperature sintering; (2) A total of 18 adult Beagle

[基金项目] 浙江省科技厅计划项目(2012C33114)。

[作者简介] 邵荣学(1980-), 男, 博士生, 研究方向: 骨组织工程材料、脊柱关节疾病的诊治。Email: shaorongxue@163.com。

[通讯作者] 全仁夫(1969-), 男, 博士生导师, 教授。Email: spinequan@yahoo.com。

dogs, weighted 10 ~ 13 kg and aged 5 ~ 8 months, were assigned randomly into two subgroups and were implanted with new porous gradient HA/ZrO<sub>2</sub> bio-composites (subgroup A in 12) and autologous iliac bone (subgroup B in 6); (3) The relative data was analyzed on roentgenoscopy, morphology and biomechanics of post-operation. The effect was compared between the subgroup A and the subgroup B to repair the vertebral body defect. **Results** The porosity of new porous gradient HA/ZrO<sub>2</sub> bio-composites is 25 ppi (pores per inch), and the pores are well distributed with diameter of 100 ~ 300 μm. The roentgenoscopy of post-operation displayed that new-bone formation is increased gradually, and the interface between bio-composite and host-bone becomes blur, and the new-bone around the bio-composite integrated into host-bone at 24 weeks of post-operation in subgroup A. As to subgroup B, the resorption and restructure were found at 6 weeks after the surgery, and the graft-bone and host-bone have integrated completely without obvious boundary at 24 weeks of post-operation. Histomorphology study showed that the amount of bone within pores of the scaffold material increased with a prolonged postoperative, and that partial bio-composite was degraded and replaced by new host-bone. There was no significant difference between the two subgroups ( $P > 0.05$ ) in the maximum compressive strengths of biomechanics test. **Conclusions** New porous gradient HA/ZrO<sub>2</sub> bio-composites can induce bone tissue to grow into the pores, and promote the repair of cancellous bone defect, which may be applied widely to the treatment of cancellous bone defect in the future.

**【Key words】** Hydroxyapatites; Zirconia; Bone tissue engineering; Artificial vertebrae

多孔支架材料的应用始于上个世纪 70 年代,最初主要用于高温熔融、合金过滤等,后来逐渐扩展到环境、隔热、汽车制造、及化学和生物等领域<sup>[1]</sup>。查阅文献发现,1971 年, Rhineland 等<sup>[2]</sup>率先把多孔支架材料植入犬的胫骨,同时比较与金属材料的效果差异,术后 4 月显示:金属材料被新生骨组织及纤维组织包裹,而多孔支架材料与新生骨、及宿主骨得到严密整合。Benum 等<sup>[3]</sup>将多孔支架材料植入羊的胫骨,术后 3 月发现:骨组织已长入泡沫材料内部达 2 ~ 3 mm,术后 12 月可见材料内部 4 mm 内布满新生骨组织,未发现材料相关并发症。同时,一些学者对多孔支架材料的机械特性、组织相容性等做了相关研究,结果显示机械特性尚可、组织相容性较好<sup>[4-5]</sup>。

制备多孔支架材料的基质材料种类较多,其中最为常用的是羟基磷灰石。羟基磷灰石 [Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>] 是一种生物活性材料,是构成脊椎动物骨组织的主要无机成分。其植入人体后,会被体液部分降解释放出人体组织所必需的钙、磷元素,并被人体组织吸收、利用,结合入新的组织,从而使 HA 植入物和人体骨组织获得良好的结合<sup>[6]</sup>。但是,多孔支架材料的机械强度随着孔隙率的升高和孔径的增大几乎呈直线下降<sup>[7]</sup>。利用泡沫浸渍技术制备的多孔支架材料平均抗压强度和弹性模量分别为 1.04 ± 0.15 MPa 和 0.1 GPa,而松质骨的抗压强度和弹性模量分别为 2 ~ 12 MPa 和 0.3 GPa<sup>[8]</sup>。故单一的 HA 材料难以满足人体松质骨替代的要求、更限制其在承重骨区域的应用<sup>[9]</sup>。从而,通过加入不同性能材料来提高 HA 的力学强度、

韧性等性能已得到广泛关注。本文通过梯度复合二氧化锆(ZrO<sub>2</sub>)陶瓷材料来提高其机械性能,因为 ZrO<sub>2</sub> 具有较高的弯曲强度、断裂韧性和较低的弹性模量,且具有一定的生物相容性。研究显示 HA/ZrO<sub>2</sub> 复合材料的抗弯曲强度、抗压强度明显高于单纯 HA<sup>[10]</sup>。此外,HA/ZrO<sub>2</sub> 在体内、外实验中显示出完全的生物相容性,在骨组织、肌肉组织界面未出现副作用,细胞毒性试验和溶血试验的反应是微弱的、可接受的<sup>[11-12]</sup>。因此,梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料为骨移植提供良好的替代材料。本文通过比较梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料与自体髂骨移植修复椎体骨缺损的效果,为理想的骨组织工程支架材料的应用提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验用梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料的制备

实验选用的添加剂为聚乙烯醇(PVA)、羧甲基纤维素(CMC)、硅溶胶、聚丙烯酸铵(PAA-NH<sub>4</sub>)、辛醇。将 ZrO<sub>2</sub> 粉体和添加剂按照预定配比进行完全混合研磨后和一定量的去离子水进行混合,混合过程采用粉球质量比为 1:2,以 300 r/min 的高速球磨机球磨 3 h 制取浆料,而后进行挂浆。挂浆时,将有机泡沫内部多余的浆料通过挤压法压出,保证其通孔率,随后将试样在室温下放置 18 ~ 24 h 自然干燥,然后放至烘箱中,于 110℃ 烘干 12 h,使其水分质量分数降到 1% 以下。晾干和烘干时,采用翻倒工艺,前 10 min 以 1 次/min 速度翻倒,后翻倒间隔

延长至 2~3 min; 然后进行第二次研磨浆料挂浆, 采用离心挂浆法, 1500 r/min 离心; 最后采用同样的烘干工艺后进行第 3 次挂浆, 3 次挂浆后进行晾晒烘干以供烧结。

烧结时, 分别以 2°C/min 的速度从室温升至 100°C、以 1°C/min 升温至 200°C、以 1°C/2 min 升温至 500°C 并保温 1 h、以 2°C/3 min 升温至 750°C 并保温 1 h、以 2°C/min 升温至 1200°C, 最后以 3°C/min 升温至 1550°C 并保温烧结 3 h, 然后随炉冷却, 获得纯 ZrO<sub>2</sub> 人工椎体。采取两步浸涂法涂覆梯度 HA 涂层, 按照原料质量百分比: HA 粉末 44.5%, 磷酸乙酯约 1.4%, 乙基纤维素约 0.18%, 蒸馏水 53.92%。先将 HA 在 800°C 进行预处理, 然后将上述其他原料在热水中进行混合并搅拌 5 h。将烧结出的多孔陶瓷浸入浆料中, 待完全浸透后取出, 甩掉多余浆料, 100°C 下烘干干 5 h, 然后升温至 900°C 并烧结 5 h, 最后加热至 1250°C 烧结 1 h; 同法进行第二次浸涂浆料。最后根据实验需要制得不同规格的新型梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料。

### 1.1.2 实验动物及分组

普通级比格犬 18 只, 体重 10~13 kg, 月龄 5~8 月, 雌雄不限, 均购于浙江中医药大学实验研究中心【SCXK(浙)2010-0043】。无菌手术在浙江中医药大学实验研究中心手术室实施【SYXK(浙)2013-0184】。并按实验动物使用的 3 R 原则给予人道的关怀。将比格犬随机分成实验组(A 组, 植入新型梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料, 12 只)和空白对照组(B 组, 植入自体髂骨, 6 只)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 手术方法

手术采用 3% 的戊巴比妥钠按 1 mL/kg 的剂量经静脉给药麻醉, 行气管插管, 手术过程持续呼吸机辅助通气。取右斜侧卧位(躯干与手术台面成 45°角), 手术取腰椎前外侧(经腹膜后)入路, 局部脱毛、消毒, 沿第 12 肋后半部下方向下至脐及耻骨联合中点平面的腹直肌外缘作腹侧方斜切口、长约 8~10 cm, 钝性分离皮下脂肪显露腹外斜肌腱膜、沿纤维走向将其分开, 切开腹内斜肌, 轻轻游离腹膜后腔及其内容物并将其推向内侧, 显露手术椎体。充分游离腰 3(L3)椎体水平腰横动脉及伴行静脉并予以结扎, 用盐水纱布保护并牵开腹主动脉、下腔静脉及腹腔脏器, 充分暴露 L3 椎体及上下相邻椎体。在冠状面以横突为界凿除前方 2/3 椎体, 手术

复制椎体部分缺损模型, 刮除手术节段相邻椎间盘。A 组实验动物植入新型梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料; B 组实验动物植入自体髂骨。确认植入物位置满意后, 再以长度 56 mm 掌骨接骨钢板固定。逐层缝合肌肉、皮下组织及皮肤。术后单笼常规饲养; 术后 3 日内每只动物予以青霉素 160 万单位肌注, 每日一次, 以预防感染, 术后 2 周拆线。所有手术操作由同一组医生完成。

## 1.3 观察指标

### 1.3.1 新型梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料结构观察

观察材料的一般情况, 包括新型梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料的孔隙率、孔隙分布情况、孔径的大小, 及材料的力学性能。

### 1.3.2 动物一般情况观察

观察实验动物的四肢活动、饮食、二便情况; 手术部位有无红肿、渗液、感染, 及手术切口的愈合情况。

### 1.3.3 术后影像学观察

术后 6 周、12 周、24 周, 在静脉麻醉下, 行腰椎摄片(曝光条件是: 44 KV, 100 MA, 0.6 MS), 观察植入物位置及手术节段骨痂生长情况。

### 1.3.4 术后取材及组织切片、染色

分别于术后 6 周、12 周、24 周, A 组各取 2 只实验动物在 3% 的戊巴比妥钠(1 mL/kg)静脉麻醉下, 利用空气栓塞法处死动物。暴露手术节段, 相邻椎体从椎间盘处离断, 取手术节段比格犬腰椎椎体, 剔除椎体周围的软组织, 锯除后缘的椎板。用丙酮脱水脱脂 7 d, 甲基丙烯酸甲酯包埋, 隔水式恒温培养箱中保存 7 d。用硬组织切片机(型号: EXAKT 310 CP)切片, 切片厚度约 50 μm, 分别进行苏木精-伊红及甲苯胺蓝染色, 光学显微镜下观察。

### 1.3.5 生物力学测试(极限抗压实验)

将其余实验动物饲养至术后 24 周, 通过上述方法取得新鲜标本, 剔除腰椎椎体周围的软组织, 保留椎体关节突关节完整。将标本置于力学测试系统(型号: Flex Test 40, Load Cell, Hydraulic Power Unit)上并固定, 使椎体的长轴平行于压力轴, 压缩强度速率设定为 0.5 mm/min, 载荷从零开始直到标本破坏为止, 试验机同步记录载荷-位移曲线, 根据载荷-位移曲线读取最大抗压载荷  $F_m$ 。极限抗压强度计算公式:  $P = F_m/S$ , 其中  $S$  为受力

表面积。

#### 1.4 统计学分析

应用 SPSS 18.0 统计学软件进行分析,数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。分别对两组术后生物力学测试进行比较,组间比较采用独立样本  $t$  检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 新型梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料的结构观察

采用泡沫海绵体浸渍成型法、联合梯度复合及高温烧结法制备的新型梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料的孔隙率为 25 ppi (每英寸 25 个孔)、孔隙均匀,孔径为 100 ~ 300  $\mu\text{m}$ ;空白材料的极限抗压强度详见生物力学的测试结果;根据实验需要,制备成不同规格。肉眼观察材料呈多孔交联状;显微镜下观察孔径大小、密度相当,偶见堵孔;扫描电镜下观察涂层均匀、梯度复合良好,两种材料结合致密(彩插 6 图 1)。

### 2.2 一般情况观察

所有实验动物于术后 0.5 ~ 2 h 苏醒,能站立行走、自主进食,四肢活动情况良好,二便无异常;对外界刺激反应灵敏;术后 2 周拆线,切口 I/甲愈合。

### 2.3 影像学观察

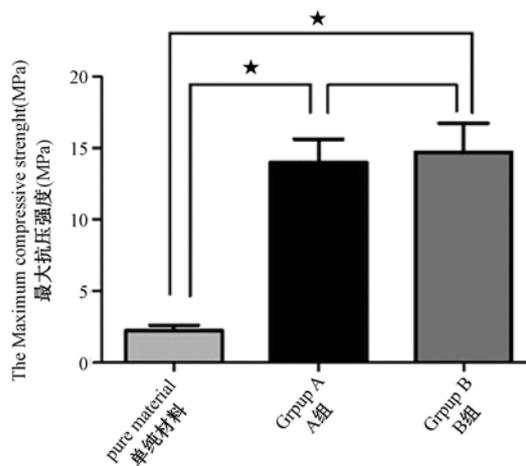
腰椎摄片,手术骨缺损造模满意。材料组(A组):支架材料随着术后时间延长密度降低,至术后 24 周,材料密度与自体骨接近,缺损边界和内部结构模糊,内有毛玻璃样新骨生成(封 3 图 2);自体髂骨组(B组):术后 6 周可见骨吸收、植入骨塑形,至 24 周移植骨与自体骨完全融合(封 3 图 3)。

### 2.4 组织学观察结果

苏木精-伊红染色和甲苯胺蓝染色显示,随着术后时间延长,均可见新生骨小梁向材料孔隙内爬行、并逐渐增加,材料与宿主骨界面模糊,术后 24 周可见部分材料降解被新生骨小梁替代、剩余材料被新生骨小梁包裹,二者交联,结合紧密(封 3 图 4 ~ 5)。

### 2.5 生物力学测试结果

术后 24 周极限抗压试验结果显示:空白新型梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料的极限抗压强度为 2.52 MPa  $\pm$  0.46 MPa, A 组手术椎体的体外极限抗压强度为 13.98 MPa  $\pm$  1.64 MPa; B 组为 14.72 MPa  $\pm$  2.02 MPa。两组比较差异无统计学



注:术后 24 周,新型梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料组(A组)与自体髂骨组(B组)的极限抗压强度比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),两组的抗压强度均大于空白 HA/ZrO<sub>2</sub> 材料( $P < 0.05$ ),(\* 差异有显著统计学意义, $P < 0.05$ )。

图 6 生物力学测试结果

Note: There was no significant difference between the two subgroups ( $P > 0.05$ ) in the maximum compressive strengths of biomechanics test at 24 weeks of post-operation, which was higher than that of pure HA/ZrO<sub>2</sub> material ( $P < 0.05$ ), (\* significant difference,  $P < 0.05$ ).

Fig. 6 Biomechanical results

意义( $P > 0.05$ )(图 6)。

## 3 讨论

目前,常用的人工骨材料多为密质材料,仅能起到骨替代的作用,无法引导新生骨爬行至移植体内并使之融为一体。这也意味着移植材料在体内存在着耗损、老化、断裂的风险。HA 多孔支架材料能诱导新生骨组织长入支架内部,从而达到宿主骨组织与支架材料的严密整合,成功解决了当前密质材料的问题<sup>[13]</sup>。与其他医用生物支架材料相比,HA 具有良好的生物相容性、骨诱导性及骨传导性。但是,材料孔径的大小直接影响新生骨细胞的粘附及新生血管的长入,3-D 网状连接的孔隙为新生骨和血管提供一个通道<sup>[14-15]</sup>。有学者指出,孔径大于 100  $\mu\text{m}$  可以为新生骨细胞、及血管的生长提供一个支架,利于成骨细胞、软骨细胞及血管内皮细胞在其内部分化、扩增和爬行<sup>[16-17]</sup>。然而,材料的机械强度随着孔隙率的升高和孔径的增大而降低,通过加入不同性能的材料,来解决 HA 的力学强度、韧性不足等问题。

本研究通过把 HA 和 ZrO<sub>2</sub> 粉末梯度复合制备

成多孔支架材料,并将材料植入比格犬椎体骨缺损处,术后 24 周极限抗压试验结果显示:HA/ZrO<sub>2</sub> 梯度复合多孔材料组体外的极限抗压强度为 13.98 MPa ± 1.64 MPa,达到松质骨的抗压强度(2 ~ 12 MPa)<sup>[8]</sup>;自体髂骨组为 14.72 MPa ± 2.02 MPa。两组比较无明显统计学差异( $P > 0.05$ )。实验结果显示本材料即达到多孔支架材料的效果,又具有可靠的机械强度。现已有实验表明,HA 陶瓷材料中有选择地加入第二相生物惰性材料(ZrO<sub>2</sub>)颗粒可以显著提高材料的断裂韧性,由于其具有良好的机械力学性能,基体与 HA 梯度复合制成多孔支架材料后,增加其生物相容性,用于承载种植体,当支架材料受到外加应力而产生裂纹时,第二相颗粒能够有效地吸收能量,阻止材料断裂,从而提高材料的机械特性,达到人体承重骨的使用要求<sup>[18]</sup>。

从组织学观察结果看,随着术后时间延长,新生骨小梁向材料孔隙内爬行、并逐渐增加,术后 24 周可见部分材料降解、并被新生骨小梁取代、剩余材料被新生骨小梁包裹,二者交联,结合紧密。但是仅靠骨自身细胞增殖速度较慢,随着干细胞技术的快速发展,骨髓间充质干细胞(BMSCs)已被广泛应用,由于其可通过体外分离、培养、扩增,在不同诱导条件下可向骨细胞、神经细胞、脂肪细胞和内皮细胞等方向转化,且具有取材方便、体外增殖能力强、易于基因操作等优势,逐渐成为基因治疗适宜的细胞载体<sup>[19-20]</sup>。根据文献报道,通过体外培养、扩增的 BMSCs 种植于多孔羟基磷灰石可促进异位成骨、加速新生骨长入多孔结构内部孔道<sup>[21-22]</sup>。但获取 BMSCs 通常需要额外的手术,故受时间、地点及组织来源等限制,术后可能会出现取材局部的感染、愈合不良等并发症,且 BMSCs 会随着供者年龄的增长而增殖能力下降。

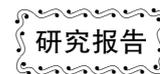
本课题计划在后续的研究中,应用诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)来源的 MSCs 种植于 HA/ZrO<sub>2</sub> 梯度复合多孔材料上,将上述材料植入实验动物骨缺损处,观察其作用效果,并逐步应用于临床。iPSCs 具有和胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)类似的多潜能、多克隆分化等特性,且可以避免应用 ESCs 所面临的免疫排斥和伦理问题<sup>[23]</sup>。目前, iPSCs 可以通过同源宿主细胞重编程获得,例如人类纤维母细胞<sup>[24]</sup>、原始肝细胞<sup>[25]</sup>、神经干细胞<sup>[26]</sup>,及其他体细胞等<sup>[27-29]</sup>。但直接应用 iPSCs 有形成畸胎瘤的潜在

风险,有研究证实 iPSCs 可以在体外诱导分化成 MSCs<sup>[30]</sup>,来源于 iPSCs 的 MSCs 与 H9-hECs 有相似的特性,可通过诱导向成骨细胞和成软骨细胞等分化<sup>[31]</sup>。以 iPSCs 来源的 MSCs 种植于新型梯度复合 HA/ZrO<sub>2</sub> 多孔支架材料,构建的组织工程骨有望成为未来骨组织工程研究和应用的主流。

#### 参考文献:

- [1] 靳洪允. 泡沫陶瓷材料的研究进展[J]. 现代技术陶瓷, 2005, 3:33-36.
- [2] Rhinelander FW, Rouweyha M, Milner JC. Microvascular and histogenic responses to implantation of a porous ceramic into bone [J]. Journal of Biomedical Materials Research, 1971, 5(1): 81-112.
- [3] Benum P, Lyng S, Alm T, *et al.* Porous ceramics as a bone substitute in the medial condyle of the tibia. An experimental study in sheep. Long-term observations[J]. Acta Orthopaedica, 1977, 48(2):150-154.
- [4] Niles JL, Coletti JM Jr, Wilson C. Biomechanical evaluation of bone-porous material interfaces [J]. Journal of Biomedical Materials Research, 1973, 7(2):231-251.
- [5] Gallinetti S, Canal C, Ginebra MP, *et al.* Development and Characterization of Biphasic Hydroxyapatite/ $\beta$ -TCP Cements[J]. J Am Ceram Soc, 2014, 97(4):1065-1073.
- [6] Tancred DC, McCormack BA, Carr AJ. A synthetic bone implant macroscopically identical to cancellous bone [J]. Biomaterials, 1998, 19:2303-2311.
- [7] Taniyama T, Masaoka T, Yamada T, *et al.* Repair of osteochondral defects in a rabbit model using a porous hydroxyapatite collagen composite impregnated with bone morphogenetic protein-2[J]. Artif Organs, 2015, 39(6):529-535.
- [8] Liu B, Lin P, Shen Y, *et al.* Porous bioceramics reinforced by coating gelatin [J]. Journal of materials science Materials in medicine, 2008, 19:1203-1207.
- [9] Linhart W, Briem D, Amling M, *et al.* Mechanical failure of porous hydroxyapatite ceramics 7.5 years after implantation in the proximal tibial[J]. Der Unfallchirurg, 2004, 107:154-157.
- [10] Silva VV, Domingues RZ. Hydroxyapatite-zirconia composites prepared by precipitation method [J]. Journal of materials science Materials in medicine, 1997, 8:907-910.
- [11] Abedi G, Jahanshahi A, Fathi MH, *et al.* Study of nano-hydroxyapatite/zirconia stabilized with yttria in bone healing: histopathological study in rabbit model[J]. Pol J Pathol, 2014, 65(1):40-47.
- [12] Quan R, Yang D, Wu X, *et al.* In vitro and in vivo biocompatibility of graded hydroxyapatite-zirconia composite bioceramic [J]. Journal of materials science Materials in medicine, 2008, 19:183-187.
- [13] Kwon BJ, Kim J, Kim YH, *et al.* Biological advantages of

- porous hydroxyapatite scaffold made by solid freeform fabrication for bone tissue regeneration[J]. *Artif Organs*, 2013, 37(7): 663-670.
- [14] Kovtun A, Goeckelmann MJ, Niclas AA, *et al.* In vivo performance of novel soybean/gelatin-based bioactive and injectable hydroxyapatite foams[J]. *Acta Biomater*, 2015, 12: 242-249.
- [15] 胡莹, 刘笑涵, 王靖宇, 等. 低强度脉冲超声波辐照与泡沫 TiC/Ti 对犬节段性骨缺损修复的促进作用[J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(4): 44-47.
- [16] Lecomte A, Gautier H, Bouler JM, *et al.* Biphasic calcium phosphate: a comparative study of interconnected porosity in two ceramics[J]. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*, 2008, 84: 1-6.
- [17] Omae H, Mochizuki Y, Yokoya S, *et al.* Effects of interconnecting porous structure of hydroxyapatite ceramics on interface between grafted tendon and ceramics[J]. *Journal of biomedical materials research Part A*, 2006, 79: 329-337.
- [18] Silva VV, Domingues RZ. Hydroxyapatite-zirconia composites prepared by precipitation method[J]. *Journal of materials science Materials in medicine*, 1997, 8: 907-910.
- [19] Park J, Ries J, Gelse K, *et al.* Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: a comparison of adenoviral vectors and liposomes[J]. *Gene Ther*, 2003, 10(13): 1089-1098.
- [20] Hu N, Feng C, Jiang Y, *et al.* Regulative Effect of Mir-205 on Osteogenic Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells (BMSCs): Possible Role of SATB2/Runx2 and ERK/MAPK Pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(5): 10491-10506.
- [21] Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells[J]. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 1989, 7: 568-578.
- [22] Ohgushi H, Dohi Y, Tamai S, *et al.* Osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells in porous hydroxyapatite ceramics[J]. *Journal of biomedical materials research*, 1993, 27: 1401-1407.
- [23] Ganji F, Abroun S, Baharvand H, *et al.* Differentiation potential of o bombay human-induced pluripotent stem cells and human embryonic stem cells into fetal erythroid-like cells[J]. *Cell J*, 2015, 16(4): 426-439.
- [24] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131: 861-872.
- [25] Liu H, Ye Z, Kim Y, *et al.* Generation of endoderm-derived human induced pluripotent stem cells from primary hepatocytes[J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2010, 51: 1810-1819.
- [26] Kim JB, Greber B, Arauzo-Bravo MJ, *et al.* Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4[J]. *Nature*, 2009, 461: 649-653.
- [27] Karakikes I, Ameen M, Termglinchan V, *et al.* Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes: Insights Into Molecular, Cellular, and Functional Phenotypes[J]. *Circ Res*, 2015, 117(1): 80-88.
- [28] Ohnishi H, Skerleva D, Kitajiri SI, *et al.* Limited hair cell induction from human induced pluripotent stem cells using a simple stepwise method[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 599: 49-54.
- [29] Yan X, Qin H, Qu C, *et al.* iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin[J]. *Stem cells and development*, 2010, 19: 469-480.
- [30] Yang H, Aprecio RM, Zhou X, *et al.* Therapeutic Effect of TSG-6 Engineered iPSC-Derived MSCs on Experimental Periodontitis in Rats: A Pilot Study[J]. *PLoS one*, 2014, 9(6): e100285.
- [31] Liu Y, Goldberg AJ, Dennis JE, *et al.* One-step derivation of mesenchymal stem cell (MSC)-like cells from human pluripotent stem cells on a fibrillar collagen coating[J]. *PLoS one*, 2012, 7: e33225.



# 1 型糖尿病大鼠模型早期胃平滑肌功能的改变研究

郝璋森<sup>1,3</sup>, 梁红玉<sup>1</sup>, 侯聪聪<sup>1</sup>, 佟苗苗<sup>1</sup>, 刘 帅<sup>1</sup>, 蒋建东<sup>2</sup>, 赵 丁<sup>1,2,4</sup>

(1. 河北医科大学药学院, 石家庄 050017; 2. 中国医学科学院/北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050;

3. 石家庄市第四医院药剂科, 石家庄 050000; 4. 河北医科大学中西医结合研究所, 石家庄 050017)

**【摘要】 目的** 探讨1型糖尿病(type 1 diabetes mellitus)早期大鼠离体胃平滑肌收缩、舒张反应的变化。**方法** 雄性SD大鼠,腹腔注射65 mg/kg链脲佐菌素(STZ)溶液诱导1型糖尿病大鼠模型。采用离体器官肌张力分析方法,以电场刺激及激动剂诱发胃各部位平滑肌收缩、舒张反应,观察糖尿病早期大鼠离体胃平滑肌功能的改变。**结果** (1)电场刺激诱发1型糖尿病大鼠胃底平滑肌收缩反应小于正常大鼠( $P < 0.05$ ),且收缩幅度紊乱,参差不齐;(2)正常大鼠及1型糖尿病大鼠胃体平滑肌收缩反应、胃窦自发收缩活动均无明显改变;(3)与正常大鼠相比,电场刺激诱发1型糖尿病大鼠胃底平滑肌舒张反应明显增加,而幽门环形肌收缩反应明显增加( $P < 0.01$ )。**结论** STZ造模4周的1型糖尿病大鼠胃平滑肌收缩舒张功能的变化中,胃各部位敏感性不同;胃底平滑肌收缩反应明显减小且紊乱,舒张反应明显增强;幽门环形肌舒张反应明显减小。提示在1型糖尿病早期大鼠胃平滑肌功能改变中,胃底和幽门可能最先发生病变,且主要源自神经调节的改变。

**【关键词】** 糖尿病;胃平滑肌;电场刺激;神经损伤;大鼠

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0052-07

doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2015.11.012

## Alterations in the functions of gastric smooth muscle in type 1 diabetic rats

HAO Zhang-sen<sup>1,3</sup>, LIANG Hong-yu<sup>1</sup>, HOU Cong-cong<sup>1</sup>, TONG Miao-miao<sup>1</sup>, LIU Shuai<sup>1</sup>,  
JIANG Jian-dong<sup>2</sup>, ZHAO Ding<sup>1,2,4</sup>

(1. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

2. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Material Medical, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;

3. Pharmacy Department, The Fourth Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, China;

4. Institute of Integrated Traditional and Western Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the alteration of contractile and relaxant responses of the isolated gastric smooth muscle in early type 1 diabetic rats. **Methods** Male SD rats were administrated 65 mg/kg streptozocin (STZ) by intraperitoneal injection. Using the method of organ bath, contractile and relaxant responses were induced by electric field stimulation (EFS) and agonists on gastric smooth muscle in rats, we observe the alterations of contractile and relaxant responses of the gastric smooth muscle in early type 1 diabetic rats. **Results** (1) In type 1 diabetic rats, the contractile responses were decreased, and the contractile amplitudes were disordered significantly, compared with that of in normal rats ( $P < 0.05$ ); (2) There were no differences in the EFS-induced contractions on gastric body smooth muscle and the

[基金项目] 河北省自然科学基金石药基金项目(C2011206175);河北省科技厅科技支撑计划项目(142777114D)。

[作者简介] 郝璋森(1989-),男,硕士,从事糖尿病动物实验研究。

[通讯作者] 赵丁(1965-),女,教授,博士,主要从事糖尿病、肥胖动物模型及相关药理学研究, E-mail: zhaodingd@163.com。

spontaneous contractions on gastric antrum in normal rats and type 1 diabetic rats; (3) Compared with normal rats, both the relaxations on gastric fundus smooth muscle, and the contractions on pylorus circular muscle were increased in type 1 diabetic rats ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Based on the changes of contractile and relaxant responses on gastric smooth muscle in STZ-induced type 1 diabetic 4 weeks rats, the damages of gastric fundus and pylorus seem to occur first, and the alterations of neuromodulation are main reason, which affects the contractile and relaxant functions of gastric smooth muscle in early type 1 diabetic rats.

**【Key words】** Diabetics mellitus; Gastric smooth muscle; Electric field stimulation; Neuropathy; Rats

糖尿病性胃轻瘫 (diabetic gastroparesis, DGP) 是糖尿病常见并发症,病情隐匿,表现复杂,容易被忽视。调查显示 DGP 在糖尿病患者的发病率超过 50%<sup>[1]</sup>,其发病原因尚不完全清楚,主要涉及迷走神经功能紊乱、胃平滑肌形态学和微血管病变、高血糖和胃肠激素失调等<sup>[2-3]</sup>。胃肠运动的神经调节十分复杂,目前多认为,支配胃肠系统肌肉运动的兴奋性神经元递质主要为乙酰胆碱<sup>[4-5]</sup>,抑制性运动神经元递质主要为一氧化氮(NO)、血管活性肠肽(VIP)及 ATP<sup>[5-6]</sup>。长期以来,胃迷走神经损伤被认为在 DGP 的发病中起重要作用<sup>[7]</sup>。但是,在糖尿病早期支配胃平滑肌运动的兴奋性和抑制性神经功能如何改变,胃不同部位的神经和平滑肌活动受损情况是否同步等问题尚不甚明了。STZ 模型大鼠作为研究人类糖尿病胃轻瘫的重要动物模型,以造模 8 周、12 周或更长时间的研究报道为多,且结果多样,对糖尿病早期胃部病变的研究很少有报道。特别是,在重视早期预防,治未病的大环境下,研究早期糖尿病大鼠胃部病变发生特点和规律,了解实验动物与人类相关的差异性,为更好的利用模型动物研究疾病,探索预防和治疗 DGP 的新靶点和新思路提供实验依据。

本研究采用 STZ 诱导的糖尿病大鼠模型,调查 1 型糖尿病早期(4 周)大鼠胃平滑肌收缩、舒张活动,探索神经调节或激动剂诱发收缩、舒张功能的改变情况,以及不同部位胃平滑肌功能损伤的差异。

## 1 材料和方法

### 1.1 药品及试剂

卡巴胆碱(CCh)购自 ABCR GmbH&Co. KG 公司;链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)、硝普钠(SNP)、P 物质(SP)、阿托品(Atr)、河豚毒素(TTX)和三磷酸腺苷(ATP)均购自 Sigma 公司。

### 1.2 动物模型的建立及标本制作

SD 雄性大鼠(河北省实验动物中心提供,【SCXK(冀)2013-1003】),鼠龄 6~8 周,体重 200~

220 g。用 0.1 mol/L 枸橼酸钠缓冲液(pH 4.5)将 STZ 配成 1% 的溶液,按 65 mg/kg 体重单次腹腔注射给药(注射前禁食 12 h)<sup>[8]</sup>,72 h 后尾静脉采血,用雅培血糖仪测定空腹血糖,大鼠血糖值 $\geq 300$  mg/dl(16.7 mmol/L)说明模型成功<sup>[9]</sup>,用于实验。正常大鼠及糖尿病大鼠在处死前称量体重,取尾静脉血测定血糖水平。按照文献所述<sup>[10-11]</sup>,制作 8 mm $\times$ 2 mm 胃底环、纵平滑肌,胃体环形肌,胃窦环、纵平滑肌和幽门环形肌标本。将肌条固定在盛有 37 $^{\circ}$ C K-H 液<sup>[12]</sup>的 10 mL 浴槽中,并持续通以 95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 混合气体。标本给予 1 g 的前负荷,每 15 min 换一次 K-H 液,平衡 1 h 待标本活动平稳后开始实验。进行电场刺激实验的标本,实验结束前加入 0.1  $\mu$ mol/L TTX,30 min 后给予电场刺激,考察电场刺激诱发的反应是否为神经源性反应。

### 1.3 大鼠胃平滑肌收缩反应的改变

#### 1.3.1 胃底平滑肌收缩反应

电场刺激(电压 50 V,频率 20 Hz,波宽 1 ms,刺激时程 10 s,间隔 100 s)胃底平滑肌标本<sup>[13]</sup>,记录张力变化,观察 1  $\mu$ mol/L Atr 对大鼠胃底平滑肌收缩反应的影响;采用累积给药法,观察 CCh(0.01~30  $\mu$ mol/L)、KCl(1~80 mmol/L)对大鼠胃底环形肌的收缩作用。

#### 1.3.2 胃体环形肌收缩反应

电场刺激胃体环形肌标本,记录张力变化。刺激条件同胃底平滑肌。

#### 1.3.3 胃窦平滑肌自发收缩活动

胃窦环、纵形平滑肌标本平衡 1 h,待稳定的自发性收缩出现后记录收缩活动。

### 1.4 大鼠胃平滑肌舒张反应的改变

#### 1.4.1 胃底环形肌舒张反应

胃底环形肌标本给予 0.3  $\mu$ mol/L CCh 或 0.1  $\mu$ mol/L SP 引起收缩,待收缩反应达到平台期后进行电场刺激(电压 50 V,频率 1、2、4、10 Hz,波宽 1 ms,刺激时程 10 s,间隔 100 s)<sup>[14]</sup>,观察记录电场刺激诱发舒张反应的情况。SP 预收缩标本的实

验在营养液中存在 1  $\mu\text{mol/L}$  Atr 条件下进行。

另取标本,给予 0.3  $\mu\text{mol/L}$  CCh 引起收缩,待收缩反应稳定后,采用非累积给药法在浴槽中加入 SNP (0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 或 ATP (0.1、1、10、100、1000  $\mu\text{mol/L}$ ),观察记录 SNP 或 ATP 诱发大鼠胃底环形肌舒张反应的情况。

#### 1.4.2 幽门环形肌舒张反应

在静息张力下刺激幽门环形肌标本,刺激条件同胃底环形肌,观察记录电场刺激诱发舒张反应的情况。

#### 1.5 统计学分析方法

实验数据以  $\text{mean} \pm \text{SE}$  表示,采用 GraphPad Prism4.0 软件进行数据统计分析和作图。电场刺激诱发的大鼠胃平滑肌收缩反应以每 10 个收缩反应的平均值(g)表示。两条量效曲线之间的统计学分析,首先采用双因素方差分析,当  $P < 0.05$  时,进一步采用 Bonferroni's test 比较两对应点间(同一药物浓度或刺激频率)的差异。两组数据之间的比较采用 Student t-test。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 糖尿病大鼠体重和血糖水平变化及胃组织外观改变

STZ(65mg/kg)腹腔注射诱导的糖尿病模型成功率为 88%。与同周龄正常大鼠相比,糖尿病大鼠

体重明显降低(表 1);血糖水平明显升高(表 2)。

与对照组相比,糖尿病大鼠胃明显增大,胃底增大尤其明显且瘫软无力,颜色发白。

### 2.2 大鼠胃平滑肌收缩反应的改变

胃底 电场刺激诱发糖尿病大鼠胃底环形肌收缩反应显著小于正常大鼠(降低约 24.4%,  $P < 0.05$ , 图 1),且收缩幅度明显紊乱,参差不齐(图 2)。CCh (0.01 ~ 30  $\mu\text{mol/L}$ )、KCl (1 ~ 80 mmol/L) 诱发正常大鼠和糖尿病大鼠胃底环形肌产生浓度依赖性收缩反应,糖尿病大鼠与正常大鼠无显著差异( $P > 0.05$ ,图 3)。

电场刺激诱发糖尿病大鼠胃底纵形肌收缩反应显著小于正常大鼠(降低约 20.3%,  $P < 0.01$ , 图 2),且收缩明显紊乱,参差不齐;收缩幅度大于胃底环形肌标本,约为环形肌的 120.5%(图 2)。

与胃底环形肌相比,电场刺激正常大鼠胃底纵形肌标本,收缩幅度大于胃底环形肌,约为环形肌的 110.6%(图 2)。

胃体 电场刺激正常大鼠及糖尿病大鼠胃体环形肌,收缩幅度参差不齐,无法诱发稳定的收缩反应,且正常大鼠及糖尿病大鼠之间无显著性差异(图 4A,B)。

电场刺激诱发的胃平滑肌收缩反应均能被 1  $\mu\text{mol/L}$  Atr 或 0.1  $\mu\text{mol/L}$  TTX 完全阻断。

表 1 正常大鼠和糖尿病大鼠体重的比较(g)  
Tab.1 The body weight in normal and diabetic rats(g)

组别 Groups	体重 Body weight				
	0 天 0 day	1 周 1 weeks	2 周 2 weeks	3 周 3 weeks	4 周 4 weeks
正常大鼠 Normal rats	198.5 $\pm$ 1.0	218.4 $\pm$ 4.4	249.2 $\pm$ 4.2	290.8 $\pm$ 3.8	327.2 $\pm$ 4.3
糖尿病大鼠 Diabetic rats	201.2 $\pm$ 0.9	207.5 $\pm$ 4.2	217.8 $\pm$ 5.7 **	229.1 $\pm$ 7.9 **	231.6 $\pm$ 3.8 **

注:与同期正常大鼠比较, \*\* $P < 0.01$ , n = 10。

Note: \*\*  $P < 0.01$  vs contemporaneous normal rats, n = 10.

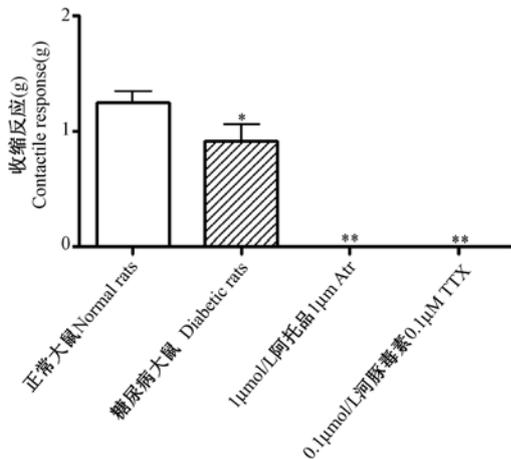
表 2 正常大鼠和糖尿病大鼠血糖值( $\text{mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ )  
Tab.2 The blood glucose values in normal and diabetic rats( $\text{mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ )

组别 Groups	血糖 Blood glucose				
	0 天 0 day	1 周 1 weeks	2 周 2 weeks	3 周 3 weeks	4 周 4 weeks
正常大鼠 Normal rats	79.5 $\pm$ 1.0	77.9 $\pm$ 5.0	82.8 $\pm$ 4.9	92.3 $\pm$ 2.4	89.2 $\pm$ 0.9
糖尿病大鼠 Diabetic rats	75.8 $\pm$ 0.7	332.5 $\pm$ 10.1 **	367.6 $\pm$ 14.3 **	410.0 $\pm$ 14.2 **	432.8 $\pm$ 5.0 **

注:与同期正常大鼠比较, \*\* $P < 0.01$ , n = 10。

Note: \*\*  $P < 0.01$  vs contemporaneous normal rats, n = 10.

胃窦 在静息张力下,正常大鼠及糖尿病大鼠胃窦环、纵形肌标本均可出现稳定的自发收缩活动,胃窦环形肌标本收缩频率分别为  $3.3 \pm 0.5$ 、 $3.4 \pm 0.4$  次/分,纵形肌标本分别为  $2.7 \pm 0.3$ 、 $2.8 \pm 0.3$  次/分。正常大鼠及糖尿病大鼠胃窦平滑肌自发收缩反应无显著性差异(图 4C,D)。



注:与正常大鼠比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;  $n = 8$ 。

图 1 电场刺激诱发大鼠胃底环形肌收缩反应

Note: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs normal,  $n = 8$ .

Fig. 1 Contractile responses to EFS in the isolated circular muscle strips of gastric fundus

### 2.3 大鼠胃平滑肌舒张反应的改变

胃底 应用  $0.3 \mu\text{mol/L CCh}$  及  $0.1 \mu\text{mol/L SP}$  预收缩标本时,糖尿病大鼠胃底环形肌舒张反应显著大于正常大鼠 ( $\text{CCh}$ :  $1\text{Hz}$  时是正常大鼠的  $182.7\%$ ,  $P < 0.01$ , 图 5A;  $\text{SP}$ :  $1\text{Hz}$  时是正常大鼠的  $181.9\%$ ,  $P < 0.01$ , 图 5B)。SNP ( $0.01 \sim 10 \mu\text{mol/L}$ )、ATP ( $0.1 \sim 1000 \mu\text{mol/L}$ ) 使正常大鼠和糖尿病大鼠胃底环形肌产生浓度依赖性舒张反应,糖尿病大鼠与正常大鼠无明显差异 ( $P > 0.05$ , 图 6)。

糖尿病大鼠胃底纵形肌舒张反应显著大于正常大鼠 ( $1\text{Hz}$  时是正常大鼠的  $163.5\%$ ,  $P < 0.01$ ), 胃底纵形肌舒张反应小于胃底环形肌标本, 约为胃底环形肌标本的  $90.7\%$  (电场刺激正常大鼠胃底纵形肌, 舒张反应约为胃底环形肌标本的  $95.1\%$ )。

幽门 糖尿病大鼠幽门环形肌舒张反应显著小于正常大鼠 ( $1\text{Hz}$  时较正常大鼠降低约  $29.2\%$ ,  $P < 0.01$ , 图 7)。

电场刺激诱发的胃底平滑肌和胃窦环形肌舒张反应均能被  $0.1 \mu\text{mol/L TTX}$  完全阻断。

### 3 讨论

根据胃运动的功能特点,将胃分为近端胃和远端胃<sup>[15]</sup>。近端胃包括胃底和胃体上部,以张力性收缩活动为主,调节胃内压力,主要起容受食物的作用。远端胃包括胃体下部和胃窦,以蠕动性收缩活动为特点,主要起胃泵的作用。有文献报道<sup>[16]</sup>,引起糖尿病性胃轻瘫胃排空延缓的动力障碍机制包括胃电节律紊乱,胃体紧张性下降,胃窦收缩推进力减弱,幽门异常紧缩,以及胃窦-十二指肠运动失调等。

本研究采用 STZ 造模 4 周的 1 型糖尿病大鼠进行实验。4 周内,1 型糖尿病大鼠的血糖水平明显升高,并维持在约  $24 \text{ mmol/L}$  水平;体重显著下降。在 STZ 造模 4 周的 1 型糖尿病大鼠胃平滑肌实验中,电场刺激诱发的胃平滑肌收缩、舒张反应均能被  $0.1 \mu\text{mol/L TTX}$  完全取消,表明所观察到的收缩舒张反应均为神经源性反应。Atr 完全取消了电场刺激诱发的胃平滑肌收缩反应,表明引起收缩的兴奋性神经递质为乙酰胆碱。实验中发现,1 型糖尿病大鼠胃底环、纵形肌对电场刺激诱发的收缩反应显

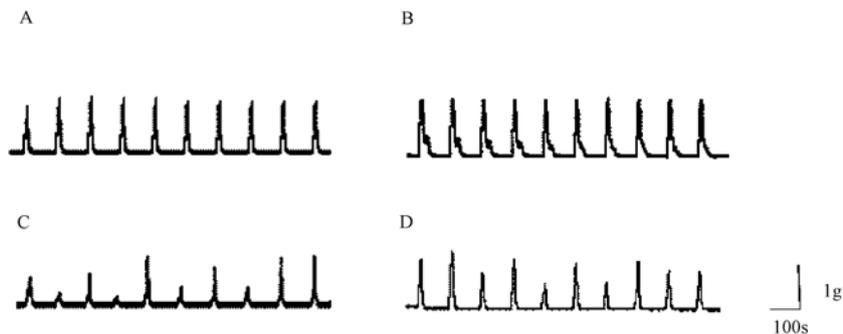


图 2 电场刺激诱发正常 (A, B) 及糖尿病 (C, D) 大鼠胃底环形肌 (A, C) 及纵形肌 (B, D) 收缩反应

Fig. 2 Original traces showing the contraction in isolated circular (A and C) and longitudinal (B and D) muscle strips of gastric fundus from both normal (A and B) and diabetic (C and D) rats

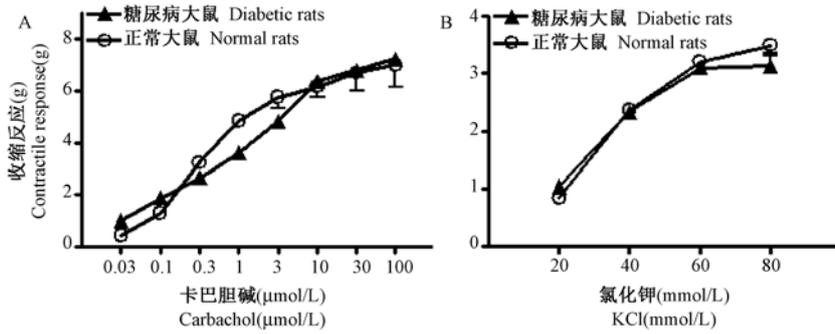


图 3 卡巴胆碱(A)、KCl(B)诱发大鼠胃底环形肌收缩反应, n = 8

Fig. 3 Contractile responses to carbachol or KCl in the isolated gastric fundus strips. n = 8

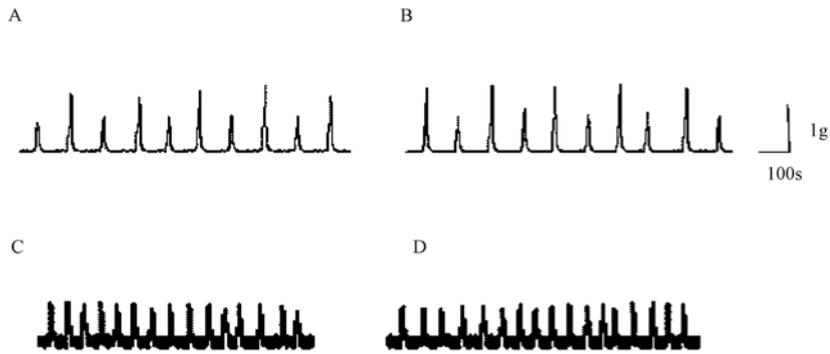
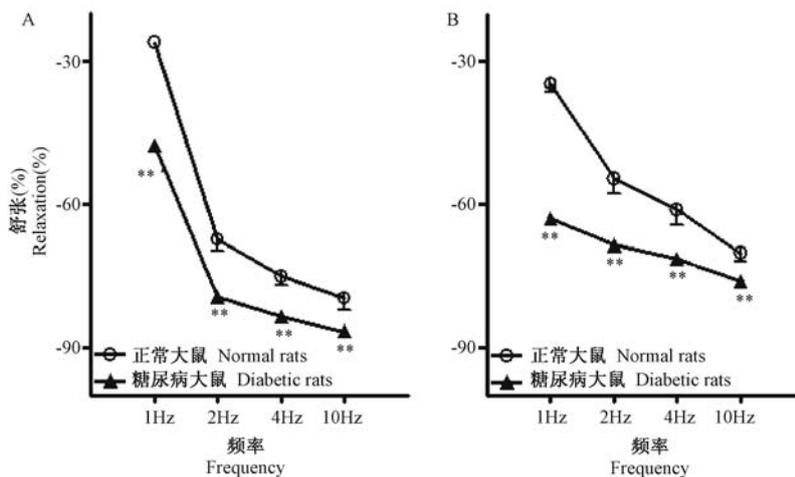


图 4 电场刺激诱发正常(A, C)及糖尿病(B, D)大鼠胃体平滑肌收缩反应(A, B)及胃窦环形肌自发收缩活动(C, D)

Fig. 4 Original traces showing the contraction in isolated circular muscle strips of gastric body from both normal (A) and diabetic (B) rats; the contraction in isolated circular muscle strips of pylorus from both normal (C) and diabetic (D) rats



注:与正常大鼠比, \*\*P < 0.01, n = 8。

图 5 卡巴胆碱(A)或P物质(B)预收缩后电场刺激诱发胃底环形肌舒张反应

Note: \*\*P < 0.01 vs normal rats, n = 8.

Fig. 5 Relaxant responses to EFS in the isolated circular muscle strips of gastric fundus. Strips were pre-contracted with CCh (A) or SP (B)

著小于正常大鼠,且收缩反应明显紊乱;胃体平滑肌对电场刺激诱发的收缩反应与正常大鼠相比并

无差异;胃窦平滑肌自发性收缩活动与正常大鼠相比无显著差异;幽门环形肌对电场刺激诱发的舒张

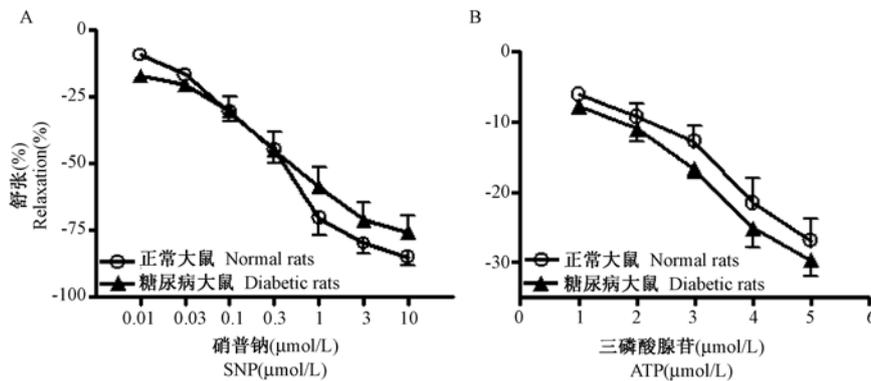
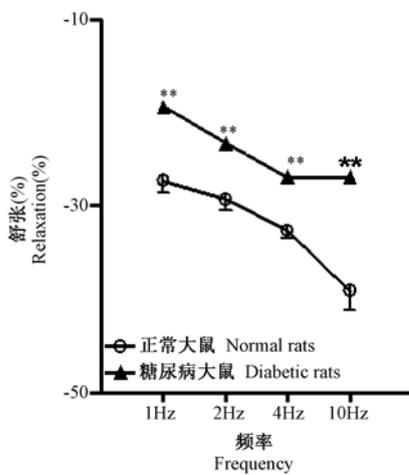


图 6 硝普钠 (SNP)、三磷酸腺苷 (ATP) 诱发大鼠胃底环形肌舒张反应, n = 8

Fig. 6 Relaxant responses to SNP or ATP in the isolated circular muscle strips of gastric fundus. n = 8



注:与正常大鼠比, \*\* $P < 0.01$ , n = 8。

图 7 电场刺激诱发大鼠幽门环形肌舒张反应

Note: \*\* $P < 0.01$  vs normal rats. n = 8.

Fig. 7 Relaxant responses to EFS in the isolated circular muscle strips of pylorus.

反应显著小于正常大鼠。研究结果提示,在 1 型糖尿病早期大鼠胃平滑肌功能活动,胃底和幽门可能最先出现异常。

我们曾报道<sup>[17]</sup>,在 STZ 诱导的早期糖尿病大鼠,电场刺激诱发膀胱逼尿肌收缩反应降低,与支配膀胱的胆碱能神经受损,乙酰胆碱释放减少有关。本研究结果显示,与正常大鼠相比,CCh 及 KCl 诱发 1 型糖尿病大鼠胃底平滑肌收缩反应并无明显变化,但电场刺激诱发兴奋性神经递质乙酰胆碱释放的活动出现障碍,导致电场刺激产生的收缩反应降低并且紊乱。

在舒张反应的研究中,SNP 或 ATP 诱发 1 型糖尿病及正常大鼠胃底环形肌舒张反应并无明显差异,而神经介导的 1 型糖尿病大鼠胃底环形肌舒张

反应明显增强,表明 1 型糖尿病大鼠胃底环形肌舒张反应的异常主要来自突触前神经递质释放的改变,或许主要涉及 NO 和 ATP。我们在实验中观察到,一氧化氮合酶抑制剂可明显降低胃底环形肌舒张反应(机制复杂,另文报道)。Karl & Julianne<sup>[18]</sup>的研究表明,STZ 诱发 8 周的糖尿病大鼠胃底,非胆碱非肾上腺能神经诱发的舒张反应明显受损,且主要受 NO 调节;Burnstock 等曾报道<sup>[19]</sup>,在 STZ 诱发 8 周的糖尿病大鼠胃底,迷走神经的嘌呤能神经成分可能增强。舒张反应调节机制复杂,在 STZ 诱发糖尿病大鼠早期(4 周)胃底及幽门舒张异常很可能和 8 周或更长时间的糖尿病模型有所不同,涉及哪些神经递质改变,如何改变,仍有待于进一步探讨。

#### 4 结论

在利用 STZ 造模 4 周的糖尿病大鼠胃平滑肌收缩舒张反应的变化中,胃各部位敏感性不同;电场刺激胃底平滑肌收缩反应明显减小且紊乱,舒张反应明显增强;电场刺激幽门环形肌舒张反应明显减小。提示在 1 型糖尿病早期大鼠胃平滑肌功能改变中,胃底和幽门可能最先出现异常,且主要源自神经调节的改变。

#### 参考文献:

[ 1 ] 曹魏,石岩. 糖胃舒对改善糖尿病胃轻瘫作用的研究[J]. 中医院学刊, 2004, 22(8):1479 - 1480.  
 [ 2 ] 罗丹,刘诗. 糖尿病性胃轻瘫的胃动力异常机制[J]. 胃肠病学, 2007, 12(6):372 - 374.  
 [ 3 ] 雷辉. 糖尿病胃轻瘫发病机制及治疗方法分析[J]. 中国医学创新, 2014, 11(1):152 - 153.  
 [ 4 ] Pfeiffer RF. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease [J]. The Lancet Neurology, 2003, 2:107 - 116.  
 [ 5 ] Mária Bagyánszki, Nikolett Bódi. Diabetes-related alterations in

- the enteric nervous system and its microenvironment[J]. World Journal of Diabetology, 2012, 3(5):80-93.
- [6] 程小平, 吴国泰, 刘峰林. 当归挥发油对实验性胃肠动力障碍的作用及机制研究[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(4):54-56.
- [7] 李志芳. 糖尿病病人胃肠运动障碍的研究进展[J]. 国外医学内科学分册, 1998, 25(1):5-8.
- [8] Curro D, Ipavec V, Preziosi P. Neurotransmitters of the non-adrenergic non-cholinergic relaxation of proximal stomach[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2008, 12(1):53-62.
- [9] Belaia A, Lefebvre RA, Burnstock G. Motor activity and neurotransmitter release in the gastric fundus of streptozotocin-diabetic rats[J]. European Journal of Pharmacology, 1991, 194(3):225-234.
- [10] 陆英杰, 连至诚, 钟毅. 糖尿病 30 周大鼠胃肌间丛神经元尼氏体的变化[J]. 中国糖尿病杂志, 2010, 18(4):303-305.
- [11] 周吕, 柯美云主编. 胃肠动力学[M]. 北京:科学出版社, 1999. 293-303.
- [12] Ren LM, Burnstock G. Prominent sympathetic purinergic vasoconstriction in the rabbit splenic artery: potentiation by 2, 2'-pyridylisatogen tosylate[J]. British Journal of Pharmacology, 1997, 120(3):530-536.
- [13] Salimeh A, Mansoor K, Mahmood S, et al. Effect of indomethacin on electrical field stimulation-induced contractions of isolated transverse and longitudinal rat gastric fundus strips [J]. World Journal of Gastroenterology, 2005, 11(34):5358-5361.
- [14] Crystal CW, Akira S, Samie J, et al. Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression and function that is lost in diabetic gastropathy[J]. Journal of Clinical Investigation, 2000, 106(3):373-384.
- [15] 高秀来, 于恩华. 人体解剖学[M]. 北京:北京大学医学出版社, 2003. 91-92.
- [16] 李卫东. 糖尿病模型大鼠胃电异常与 ENS、ICC 病理损害及中药“脾胃康”作用研究[D]. 广东, 广州中医药大学, 2002.
- [17] Ren LM, Zhuo YJ, Hao ZS, et al. Berberine improves neurogenic contractile response of bladder detrusor muscle in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 150:1128-1136.
- [18] Karl MJ, Julianne JR. Effect of diabetes on relaxations to non-adrenergic, noncholinergic nerve stimulation in longitudinal muscle of the rat gastric fundus [J]. British Journal of Pharmacology, 1995, 116:1551-1556.
- [19] Belaia A, Lefebvre RA, Burnstock G. Motor activity and neurotransmitter release in the gastric fundus of streptozotocin-diabetic rats [J]. European Journal of Pharmacology, 1991, 194:225-234.

[修回日期]2015-10-19



# 喜马拉雅旱獭的人工繁育技术

刘海青, 范 微, 张静宵, 刘巴睿, 张发荣, 加 洛, 陶元清

(青海省地方病预防控制所, 西宁 811602)

**【摘要】 目的** 对野生来源喜马拉雅旱獭的繁殖性能及仔獭的哺育方法进行研究, 探索经济实用、规模化的繁殖方法, 取代以往从野外获取试验用旱獭的方式。**方法** 提供适合的饲养环境和条件, 由母喜马拉雅旱獭自然哺育新生喜马拉雅旱獭, 统计怀孕率、产仔数、成活率、观察仔獭生长情况。**结果** 建立了56对旱獭繁殖群, 成功离乳92只F1代旱獭, 自然繁殖成活率为90.76%。目前已建立野生来源喜马拉雅旱獭繁殖群50对, F1代繁殖群20对, 为建立达到标准要求的喜马拉雅旱獭种群奠定了基础。**结论** 该方法的喜马拉雅旱獭繁殖率和成活率较高, 成本低且操作简单, 为喜马拉雅旱獭实验动物化奠定了基础。

**【关键词】** 喜马拉雅旱獭; 规模化繁殖; 自然哺育

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0059-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.11.013

## Scale breeding and the establishment of breeding population of *Marmota himalayana*

LIU Hai-qing, FAN Wei, ZHANG Jing-xiao, LIU Ba-rui, ZHANG Fa-rong, JIA Luo, TAO Yuan-qing  
(Qinghai Institute for Endemic Disease Prevention and Control, Xi'ning, 811602, China)

**【Abstract】 Objective** To observe the reproductive features of wild original *Marmota himalayana*, and explore an optimum method that is economical, practical and on a large scale to raising *Marmota himalayana* baby. **Methods** Provided suitable environment and conditions for feeding and management, entirely artificial feeding and care by mother. More data were collected and statistics from the pregnancy rate, each litter size, survival rate and observation the growth of young *Marmota himalayana*. **Results** In 2010, 92 *Marmota himalayana* offspring (F1 generation) have been successfully weaned from 56 couples and the survival rate of natural reproduction was 90.8 percent. Now breeding population had been established with 50 couples of wild original *Marmota himalayana* and 20 couples of F1 generation, which have laid the foundation for reaching standard requirements. **Conclusion** This method was one of higher reproductive and survival rate, low cost and simple to operate, it should be promoted to scale produce the *Marmota himalayana* as laboratory animals.

**【Key words】** *Marmota himalayana*; Scale breeding; Nature breeding

喜马拉雅旱獭(*Marmota himalayana*)属啮齿目(Rodentia)松鼠科(Sciuridae)旱獭属(*Marmota*)的大型地栖性啮齿动物,为青藏高原特有种,是我国哺乳动物资源开发利用的重点对象之一。喜马拉雅旱獭作为我国特有的生物资源,在人类乙型肝炎

(乙肝)、艾滋病、心血管疾病、肥胖、肿瘤、烈性传染病(如鼠疫)发病机制研究以及相关药理学、毒理学评价、化妆品制造等诸多领域具有广泛的应用前景<sup>[1-3]</sup>。将其培育为新型的具有知识产权的实验动物新品种,对带动我国生物医药、重大传染病防控

[基金项目] 国家自然科学基金地区基金(31160436)。

[作者简介] 刘海青(1971-),女,主管医师,学士,主要研究方向:医学检验, E-mail:415328482@qq.com。

[通讯作者] 陶元清,研究方向:实验动物管理和动物质量控制及野生动物实验动物化研究, E-mail:tyq001@126.com。

和疫苗研发具有重要意义。自 2009 年以来,对喜马拉雅旱獭进行了人工条件下的繁育技术研究,成功建立了 56 对繁殖种群和一套旱獭批量化繁育技术,为实现喜马拉雅旱獭的实验动物化奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物

喜马拉雅旱獭来自青海省黄南州同仁县非鼠疫疫区。在 2009 年 7~9 月份,采用圈套法安全捕获青年旱獭;为了避免动物在繁殖过程中发生近亲交配,所有动物进行了编号;根据生物安全规范,采取了 15 d 的隔离检疫,包括:按体重肌肉注射高效低毒的驱虫剂伊维菌素以驱除旱獭蛔虫和螨、蜱、虱等旱獭携带的常见体内外寄生虫;按国家标准进行弓形体、鼠疫、布鲁氏菌等人兽共患病和影响旱獭健康的嗜肝病毒的检验,所有检验项目均为阴性。在所捕动物中,挑选个体适中(体重 3~5 kg),年龄 2~4 周岁的发育良好的旱獭 56 对(性别比例 1:1),用安全结实的运输笼快速运抵位于青海西宁的旱獭饲养繁育基地。

### 1.2 环境条件

根据旱獭的野外生物学特性和生活习性,模拟旱獭野外环境修建了培育场所,动物圈舍设计为封闭式棚舍,用建筑用砖、钢筋和水泥等材料做成高 1.5 m,长 3.0 m,宽 2.5 m 长方形饲养繁殖池。饲养繁殖池由动物休息和隐藏区、动物活动和采食饮水区以及动物排便区等部分组成,池内动物休息和隐藏区铺设 0.6 m 厚的蓬松麦草、牧草或芦苇等垫草,所铺垫草必须没有喷洒影响动物繁殖的农药,经日光曝晒,除去杂质和灰尘;饲养池内动物活动、采食、排便区离地面 0.5 m 高处水平铺设钢筋网格做漏粪板,网格大小 3 cm × 3 cm;整个饲养培育室在启用 1 个月前开始卫生处理,包括:打扫、清洁除尘;密闭房间,福尔马林熏蒸 24 h 后,通风 5 d;5% 过氧乙酸消毒液喷雾消毒;培育室所用器具如扫把、拖布、饲料盒、饮水盒等也一并放于培育室经福尔马林、过氧乙酸消毒。

饲养培育室主要环境指标:3~11 月(非冬眠期)室内最适温度 18~20℃;相对湿度 40%~50%;光照可以为自然光照和日光灯,照度控制在 60 Lx 以下;旱獭为穴居动物,怕风,饲养室保持自然通风,风速小于 0.2 m/s;室内氨气浓度小于 10 mg/m<sup>3</sup>。每天清除动物培育池漏粪板下粪尿;每周更换垫草 1 次;噪音

小于 50 dB。

### 1.3 饲料和饮水

旱獭从产地运抵繁育基地第一个月每天每只饲喂 100 g 胡萝卜、200~250 g 白菜和更换饮水 1 次,自由采食;一般从第二个月后,动物开始逐步适应人工饲养环境,对外界干扰已不再敏感。此时开始定时饲喂、调整日粮结构、添加微量成分等。根据旱獭在原产地采食主要以莎草科、禾本科植物的叶、茎、豆科植物的花和种子为食的习性,7~9 月饲喂牧草,阴干后测定营养成分。经测定旱獭原产地阴干牧草饲料营养成分指标为:粗蛋白 10%、粗脂肪 3%、粗纤维 70%、粗灰分 6%、水分 2%;在此基础上,选用苜蓿粉、麸皮、玉米粉为基础日粮,添加食盐、复合维生素和微量元素等添加剂制成配合饲料,配方为苜蓿粉 48%、麸皮 30%、玉米粉 20%、盐 1%、酵母粉 0.95%、微量元素 0.05%,性状为干燥颗粒饲料,直径 0.5 cm,长度 3~5 cm,呈棒状。每天 6:00、12:00、18:00 定时饲喂。饮水为 pH 2.5~2.8 的酸化水。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 旱獭的管理

野生旱獭安全运抵饲养繁育基地后,进行动物临床健康检查,选取体格健壮,肥瘦适中,四肢有力,反应敏感,行动活泼;被毛光亮,眼睛鲜亮有神,无分泌物;鼻孔干净,呼吸正常;肛门干净,粪粒均匀的旱獭作为种群动物。在驱治体内外寄生虫后,放置于经过消毒的饲养繁殖设施,开始人工条件下的饲养繁殖。动物关入笼内的第 1 个月为动物高度紧张期,对外界干扰反应强烈。为减少干扰,降低动物应激,固定人员负责饲养管理,并多接触动物。通过饲喂动物喜食的食物(甘蓝、香蕉、苹果等)建立条件反射和培养感情,约一个月时间可逐渐消除惧怕人的心理。每天上午清扫室内卫生,换洗笼具托粪盘 1 次;隔周 2% 来苏尔、2% 过氧乙酸或强力消毒灵等消毒液轮换消毒饲养设施一次。旱獭为冬眠动物,在 11 月份底进入冬眠期,至翌年 3 月初冬眠动物陆续出蛰,不同阶段采取不同的方法进行动物的管理。

#### 1.4.2 种群旱獭的冬眠前管理

9 月份种群旱獭运抵繁育基地后,经过 2 个月的人工饲养即进入冬眠期。为保证旱獭安全度过第一个人工饲养条件下的冬眠期,动物能储存足够的冬眠所需能量,10 月和 11 月份,每只动物每日增

加投食量至 500 g, 随吃随加, 使其自由采食和饮水。

#### 1.4.3 种群早獭的冬眠期管理

早獭从 11 月初开始冬眠, 翌年 3 月初出蛰。11 月底开始冬眠前的准备工作, 主要包括: 彻底更换垫草, 垫草尽力压实, 铺满休息区; 观察动物活动和采食饮水停止后, 关闭门窗, 保持室内温度在  $0^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度 30% ~ 40%; 减少人员进出, 避免噪音, 使动物自然进入冬眠状态。

#### 1.4.4 出蛰期动物的管理

出蛰前 15 d 饮水盒保持足够的饮水, 少量供应颗粒料, 避免动物因暴食带来不适; 第 16 天开始, 增加颗粒料的供应量, 并饲喂 50 ~ 100 g 麦芽; 此阶段亦为动物交配期, 尽量减少干扰, 特别是不能突然出现刺激的噪音; 保持室温在  $10^{\circ}\text{C} \sim 15^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度 20% ~ 30%, 增加人工光源, 光照时间早 6 时至晚 7 时, 光照强度 50 ~ 60 Lx。

#### 1.4.5 繁殖期动物的管理

3 月底至 5 月中旬为早獭繁殖期, 一般成功交配的动物在 4 月 25 日至 5 月 10 日产仔。人为惊动会导致母獭流产或食仔。为保证动物的繁殖, 3 月底至 5 月管理上采用全封闭措施, 除饲养员外, 禁止其他人员进出繁殖室, 日常卫生清扫管理由每天 1 次减少为 3 ~ 5 d 1 次; 室内最适温度  $18 \sim 20^{\circ}\text{C}$ ; 相对湿度 40% ~ 50%; 增加人工光源, 光照时间调节为 14 h 明, 10 h 暗, 光照强度保持在 100 ~ 120 Lx。此时, 切不可翻动物巢穴内的垫草以免破坏动物所筑的产仔用草窝; 动物分娩后饮水量加大, 因此要保证饮水足量供应。

#### 1.4.6 哺乳期管理

5 月初至 7 月中旬为繁殖早獭哺乳期。为保证动物的哺乳, 此期间每天进行常规的饲养和卫生管理; 增加供食量和饮水量; 幼仔缺乏体温调节能力, 室内要稍高, 保持在温度  $20^{\circ}\text{C} \sim 22^{\circ}\text{C}$ ; 相对湿度 40% ~ 50%; 特别注意避免突然的干扰和噪音以免发生食仔现象; 也不可翻动物巢穴内的垫草以免破坏动物所筑的产仔用草窝, 影响母獭育幼。

#### 1.4.7 离乳期管理

所产早獭幼仔哺乳时间 30 d 左右后, 门齿长出并能采食胡萝卜和白菜等新鲜蔬菜。观察到幼仔粪便由黑变绿即表明幼獭开食了, 即可将幼仔全部分出进行饲养管理。前一个月每天每只饲喂 20 ~ 25 g 胡萝卜和白菜, 同时每只每日投喂 20 ~ 25 g 用加工成年早獭颗粒饲料的原料加水制成半干的软

料; 一般从第二个月后, 饲喂颗粒饲料和自来水, 其它管理技术方法与亲本早獭的饲养方法相同。

亲本早獭则进入下一个繁育周期, 饲养管理方法同上述各阶段方法要点。

### 1.5 观测

#### 1.5.1 行为与形态

饲养繁殖期间, 每日观察记录动物取食、饮水、适应过程、死亡情况以及发情、交配、产仔和育幼等各种活动和行为以及不同阶段动物外形的变化。

#### 1.5.2 繁殖特性统计分析

统计早獭发情周期、妊娠期、胎仔数、离乳数、成活率、繁殖力等繁殖生物学特性。

#### 1.5.3 体重与体尺

测量人工条件下繁殖的 F1 代早獭的体重、体长、尾长、后肢长等量度指标, 并进行差异性分析。

## 2 结果

在研究期间, 观察记录了人工条件下早獭饲养繁殖的主要生物学特性指标, 包括冬眠周期、繁殖周期、交配时间、妊娠期、哺乳期, 繁殖力、离乳率、成活率、仔獭体质量值、生长发育值等。

### 2.1 人工饲养条件下早獭的冬眠时间

在人工饲养环境条件下, 早獭 11 月底至 12 月初陆续停止采食和饮水, 活动量逐日减少, 开始进入冬眠, 出蛰时间在 3 月中旬, 平均冬眠期 140 d。因实验地点西宁市湟中县总寨海拔为 2250 m, 低于早獭原栖息地海拔(海拔 3500 m 以上), 冬眠期缩短约 60 d。

### 2.2 亲本早獭繁殖特性

亲本早獭性成熟年龄为 2 周岁, 体重 2.5 ~ 3.0 kg; 体成熟年龄为 3 周岁, 体重 3.5 ~ 5.0 kg; 繁殖年龄 3 ~ 6 周岁; 发情周期 1 年, 1 公 1 母配对为宜。发情时间在每年 3 月 25 日 ~ 4 月 15 日, 期间可观察到公獭睾丸下垂, 体积增大, 单侧睾丸重量 21 ~ 25 g; 母獭采食量增加, 出现衔草筑窝的行为。剖检母獭卵巢制成石蜡切片, 显微镜  $\times 20$  可观察到成熟卵子。母獭血液中雌激素水平明显升高, 雌二醇检出值为  $530.00 \pm 280.44$ , 而在非繁殖期雌二醇检出值为  $376.73 \pm 168.52$ 。

早獭交配姿势为爬跨式, 交配持续时间 35 s 后, 公獭两前肢放松, 从母獭背上离开, 结束交配。

统计人工饲养条件下早獭 4 年的主要繁殖参数, 妊娠期为 33 ~ 37 d; 平均哺乳期为 47 d; 平均胎

表 1 人工饲养条件下喜马拉雅旱獭的生长发育  
Tab.1 Growth and development of *Marmota himalayana*

年龄	体长 Length(cm)		胸围 Bust(cm)		尾长 Tail length(cm)		体重 Weight(g)	
	雌性 Female	雄性 Male	雌性 Female	雄性 Male	雌性 Female	雄性 Male	雌性 Female	雄性 Male
初生	8.88 ± 0.64	8.88 ± 0.64	3.43 ± 0.31	3.88 ± 0.21	1.10 ± 0.19	1.28 ± 0.24	37.13 ± 2.38	39.76 ± 2.45
1 周龄	9.98 ± 0.68	11.56 ± 0.36	4.10 ± 0.28	4.25 ± 0.64	1.44 ± 0.21	1.52 ± 0.56	102.51 ± 11.43	116.5 ± 7.83
3 周龄	14.56 ± 0.95	15.22 ± 0.31	6.48 ± 0.61	7.15 ± 0.52	2.50 ± 0.34	2.88 ± 0.39	201.16 ± 16.97	232.16 ± 19.27
5 周龄	19.10 ± 1.58	19.72 ± 0.27	7.91 ± 0.39	8.48 ± 0.84	4.21 ± 0.35	4.87 ± 0.49	329.91 ± 32.83	354.91 ± 16.43
7 周龄	21.10 ± 1.58	22.32 ± 0.34	10.58 ± 0.87	11.56 ± 0.54	5.13 ± 0.41	5.68 ± 0.96	734.79 ± 64.21	798.21 ± 44.64
3 月龄	24.35 ± 1.00	26.47 ± 0.67	12.69 ± 0.96	13.85 ± 0.75	5.65 ± 0.47	6.15 ± 0.74	800.03 ± 133.87	823.03 ± 98.55
4 月龄	26.64 ± 1.02	29.52 ± 0.74	14.81 ± 0.94	15.67 ± 0.93	6.25 ± 0.50	6.75 ± 0.62	1066.25 ± 71.70	1156.25 ± 87.20
6 月龄	29.59 ± 1.28	31.43 ± 0.85	16.98 ± 0.86	18.68 ± 1.25	6.76 ± 0.55	7.13 ± 0.57	1365.25 ± 156.15	1471.25 ± 132.35
12 月龄	34.56 ± 1.55	38.21 ± 0.35	21.51 ± 1.24	23.56 ± 2.14	7.45 ± 0.40	8.43 ± 0.85	1518.75 ± 131.52	1689.55 ± 165.52
14 月龄	39.16 ± 1.65	42.56 ± 1.28	25.55 ± 1.52	28.18 ± 1.95	8.61 ± 0.46	9.33 ± 0.76	2372.50 ± 202.04	2772.50 ± 178.25
16 月龄	41.66 ± 1.11	43.67 ± 0.87	27.53 ± 1.45	31.25 ± 2.43	9.70 ± 0.37	10.33 ± 0.56	2898.75 ± 265.25	3198.75 ± 185.55
18 月龄	43.03 ± 1.14	46.49 ± 3.95	29.01 ± 1.68	33.45 ± 2.17	10.53 ± 0.56	10.85 ± 1.32	3275.00 ± 363.95	3515.00 ± 363.95
24 月龄	44.64 ± 1.30	51.78 ± 2.75	31.96 ± 2.00	34.65 ± 3.14	12.04 ± 0.82	12.33 ± 0.85	4165.00 ± 476.12	4245.00 ± 285.48
36 月龄	49.64 ± 2.15	56.34 ± 3.56	33.76 ± 2.14	36.28 ± 3.65	12.94 ± 0.69	13.58 ± 1.45	5125.00 ± 516.20	5338.00 ± 435.30

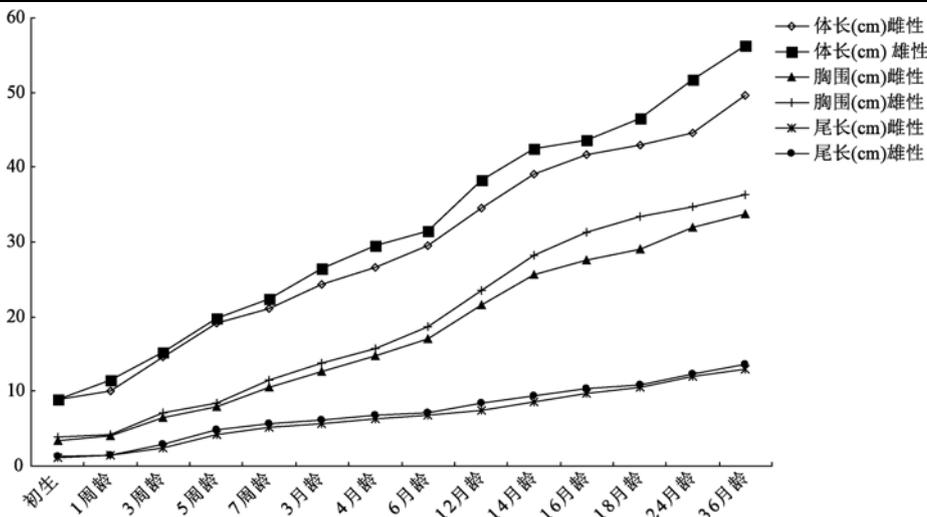


图 1 旱獭体生长示意

Fig.1 Growth and development of *Marmota himalayana*

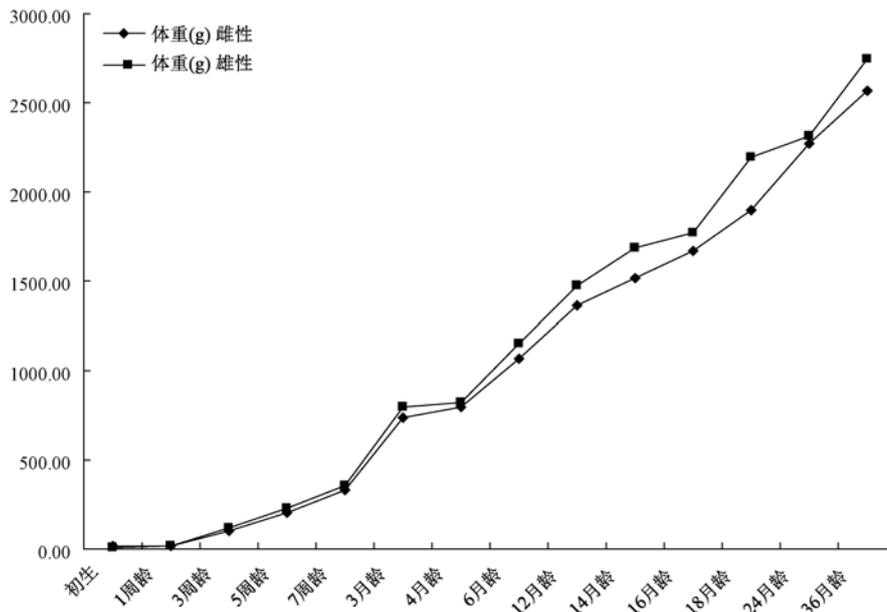


图 2 旱獭的体质量增长

Fig.2 Growth and development of *Marmota himalayana*

仔数为 4.4 只, 性比约为 1:1; 平均离乳数为 3.95 只, 离乳率为 89.7%; 幼獭成活率为 90.8%。

### 2.3 幼獭生长发育

初生早獭全身裸露无毛, 背部黑红色, 腹部粉红色, 皮肤带皱纹、半透明, 耳壳紧贴颅部, 匍伏(封 3 图 3), 体重 35.5~51.5 g, 体长 9~11 cm, 胸围 3~4 cm, 尾长 1.2~1.5 cm; 成体体重 4800~5600 g, 体长 480~550 cm, 胸围 30~40 cm, 尾长 12~15 cm。生长发育快速期在 1 周岁~2 周岁期间。经统计学分析, 不同性别早獭的体重、体长、胸围和尾长等生长发育指标无显著性差异( $P>0.05$ ) (表 1、图 1、图 2)。

### 3 讨论

据黄孝龙等报道<sup>[6]</sup>, 受种群密度、气候、牧草等因素影响, 野生喜马拉雅早獭群体中, 雌性早獭 3 周岁达到性成熟, 参加繁殖的雌性成獭占具有繁殖力的雌性成獭群体的平均百分数为 53.7%, 1 年只繁殖 1 胎, 平均胎仔数 4.7 只, 属低繁殖力动物。因此, 在早獭的野生动物实验动物化工作中, 提高人工饲养条件下的繁殖力是极其重要的关键环节。营养、饮水和隐秘的场所是动物繁殖成功的三大要素。从野生喜马拉雅早獭引入实验室后, 对饲料、笼具和饲养管理技术进行了持续的探索, 对种群动物、不同年龄段动物分别采取不同的饲养管理方法, 效果良好, 动物的繁殖能力逐年上升, 建立了规模化和批量化繁殖的技术能力。比较以往的人工早獭繁殖报道<sup>[7]</sup>, 本研究所建立的技术主要创新点: 早獭脱离了青饲料, 研制了全价营养颗粒; 研制

了开放式的繁殖单元<sup>[8]</sup>、室内繁殖池和室内不锈钢繁殖笼具, 特别是由人工繁殖的 F1 代早獭建立的人工种群在室内不锈钢笼具繁殖成功, 向早獭实验动物化迈出了重要一步。另外, 分别选择 10 对 2 周岁野生种群和 F1 代早獭进行了繁殖试验, 但均未成功, 提示人工条件下早獭的繁殖年龄仍为 3 周岁龄。因技术能力所限, 早獭的繁殖技术仍处于传统的自然繁殖方法, 需在今后工作中探索开展人工催情、人工授精、胚胎移植、剖腹产等人工干预繁殖技术, 进一步提高早獭的繁殖力。

### 参考文献:

- [1] 陶元清, 王忠东. 提高人工饲养条件下喜马拉雅早獭成活率的几点体会[J]. 四川动物, 2006, 25(2): 889-890.
- [2] 刘恩岐. 人类疾病动物模型[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 145-152.
- [3] 张评许, 张陆勇. 喜马拉雅早獭-核苷类药物线粒体毒性评价体系的建立[C]//第二届中国药物毒理学会年会会议论文集: 2012, 66.
- [4] 李厚达. 实验动物学[M]. 北京: 农业出版社, 1992: 222-225.
- [5] 魏泓. 医学实验动物学[M]. 成都: 四川科技出版社, 1998: 215-216.
- [6] 黄孝龙, 王治军, 吴驾淞, 等. 青海海晏县热水滩和乌兰脑滩喜马拉雅早獭的繁殖生物学特征[J]. 兽类学报, 1986, 6(4): 307-311.
- [7] 黄孝龙. 大型冬眠动物喜马拉雅早獭的实验动物化研究[J]. 中国实验动物学, 1996, 6: 70-72.
- [8] 陶元清. 喜马拉雅早獭繁殖设施的设计与应用[J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(3): 242-244.

[修回日期] 2015-10-10



# 喜马拉雅旱獭实验动物化的研究进展

刘海青, 范 微, 张静宵, 刘巴睿, 张发荣, 加 洛, 陶元清

(青海省地方病预防控制所, 西宁 811602)

**【摘要】** 喜马拉雅旱獭是青藏高原特有野生动物, 因其具有的生物学特性在生物医学研究中得到广泛应用。根据喜马拉雅旱獭的生物学特性和实验动物质量控制要求, 对其进行了实验动物化研究。本文综述近年来喜马拉雅旱獭实验动物化的研究进展, 提高对喜马拉雅旱獭的认识, 以期推动旱獭的基础和应用研究, 实现喜马拉雅旱獭的实验动物化目标。

**【关键词】** 喜马拉雅旱獭; 实验动物化; 技术和方法; 人类乙肝

**【中图分类号】**R332 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2015) 11-0064-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.11.014

## Research progress on domestication of *Marmota himalayana*

LIU Hai-qing, FAN Wei, ZHANG Jing-xiao, LIU Ba-rui, ZHANG Fa-rong,

JIA Luo, TAO Yuan-qing

(Qinghai Institute for Endemic Disease Prevention and Control, Xi'ning 811602, China)

**【Abstract】** The Himalayan marmot is unique wildlife resources of the Qinghai-Tibet plateau, because of its biological characteristics is widely used in biomedical research. According to the biological characteristics of the Himalayan marmot and quality control standards of laboratory animals, it was domesticated on the continuous research. This paper reviews research progress in recent years, to improve the understanding of the Himalayan marmot and promote its basic and applied research, let it become a laboratory animals recently.

**【Key words】** *Marmota himalayana*; Domestication; Method and technique; HBV

随着生命科学和医学研究的飞速发展, 对实验动物品种的需求也越来越高, 将野生动物培育和开发为实验动物是我国实验动物工作发展的重要方向<sup>[1]</sup>。喜马拉雅旱獭是我国分布最广, 数量最多的旱獭种类, 广泛分布于青藏高原高山草甸草原、高山草原山地环境的高原土生特有啮齿冬眠动物, 因其特有的生物学特性在生物医学研究中得到广泛应用<sup>[2]</sup>。通过近20年来不懈努力, 青海省地方病预防控制所实验动物中心建成了国内最大规模的人

工喜马拉雅旱獭生产和研究基地, 现有56对旱獭种群, 每年可供应120~150只人工饲养条件下生产的实验獭, 并与科研院校协作开展了多项研究, 取得了显著进展。现将近年来旱獭实验动物化研究进展综述如下。

### 1 背景

#### 1.1 旱獭的分类地位与分布

在分类学上旱獭 (*Marmota*) 属于啮齿目

**【基金项目】** 国家自然科学基金地区基金(31160436)。

**【作者简介】** 刘海青(1971-), 女, 主管医师, 学士, 主要研究方向: 医学检验, E-mail: 415328482@qq.com。

**【通讯作者】** 陶元清, 研究方向: 实验动物管理和动物质量控制及野生动物实验动物化研究, E-mail: tyq001@126.com。

(Rodentia) 松鼠科 (Sciuridae) 旱獭属 (Marmota)。1968 年, Hoffmann 和 Nadler 基于形态学和染色体特征以及化石纪录, 认为旱獭是由早更新世初期的北美地松鼠进化而来。此物种在北美分化形成了 *monax*, *flaviventris* 和 *caligata* 三个种群; 此物种的另一个种群在早更新世晚期经过白令海峡迁徙入欧亚大陆, 在更新世迁徙入西欧亚大陆, 分化形成了 *marmota* 和亚洲化土拨鼠 (包括 *bobak* 种群, *menzbieri* 和 *caudata*); 在更新世晚期欧亚大陆的土拨鼠重新通过白令海峡回迁到阿拉斯加州一带, 分化形成了 *broweri* 种群<sup>[3]</sup>。目前, 学者认为全世界旱獭种类共有 14 种, 我国目前已发现 5 种 (含亚种), 分别为长尾旱獭、喜马拉雅旱獭和草原旱獭的西伯利亚亚种、阿尔泰亚种和天山亚种, 主要分布于我国西北地区<sup>[4]</sup>。

### 1.2 美洲旱獭 (Marmota monax)

又称东方土拨鼠 (eastern woodchuck), 分布于美国和加拿大。1978 年 Summers 等在费城动物园肝癌发生频率很高的美洲旱獭的血清中发现土拨鼠肝炎病毒 (woodchuck hepatitis virus, WHV) 的存在, 并分离出 WHV 病毒株, 由于 WHV 在流行状况、感染后的自然史和致病性等方面与人类乙肝病毒 (HBV) 极为相似, WHV 已经被广泛应用到乙肝病毒感染和抗病毒治疗的模型中; 土拨鼠也已经成为研究嗜肝病毒感染的发病和致癌机制以及筛选治疗性疫苗和药物的有效动物模型<sup>[5-6]</sup>。1998 年 Tennant 等人第一次采用美洲旱獭乙肝动物感染模型研究非阿尿昔 (fialuridine, FIAU) 抗病毒与药理学发现, 旱獭表现出的 FIAU 诱导的线粒体毒性临床表征, 如肝衰竭、乳酸血症、肝脂肪变性与 FIAU 在慢性治疗中诱发人肝衰竭症状相类似, 表明美洲旱獭对开展核苷酸类药物的临床前评价以及探讨核苷酸类药物的分子机制具有很好的应用价值<sup>[7]</sup>。目前土拨鼠是国际公认的核苷酸类抗病毒药物临床前线粒体毒性评价模型。因此, 美洲旱獭在医学生物学研究领域有较多的应用。但由于土拨鼠仅产于北美, 且价格昂贵, 难以在国内广泛应用。

### 1.3 喜马拉雅旱獭 (Marmota himalayana)

我国分布最为广泛、数量最多的一种旱獭, 分布在青藏高原及其毗邻地区, 东至甘肃南部和四川西部, 南至西藏和云南西北部, 北至祁连山北部。在我国因喜马拉雅旱獭属于青藏高原鼠疫自然疫源性宿主动物而倍受关注。1987 年刘寿鹏等证实

在喜马拉雅旱獭中存在类似于土拨鼠肝炎病毒 (类人乙型肝炎病毒) 的感染, 并且显示喜马拉雅旱獭能人工感染土拨鼠肝炎病毒, 已被当作研究人类乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的最理想模型动物<sup>[8-9]</sup>。因其为青藏高原土生特有种, 所以它和高原鼠兔、藏羚羊等动物一样也是研究高原医学理想的模型动物<sup>[10]</sup>。旱獭的冬眠习性, 应用于肥胖症与能量平衡、内分泌与代谢机能、中枢神经系统调控机制以及心血管疾病、脑血管疾病和肿瘤形成等方面的研究<sup>[11]</sup>。目前, 国内外用于实验的旱獭绝大多数是野外捕捉, 来源困难, 背景不详, 健康状况未知, 无法满足生命科学研究的需要。因此, 将野生旱獭进行人工驯化、饲养、繁殖与规范化管理, 建立达到标准要求的种群, 解决喜马拉雅旱獭的实验动物化等一系列基础科学问题, 使其成为新的实验动物品种势在必行, 具有重大的科学意义。

## 2 喜马拉雅旱獭的人工饲养研究

建立了喜马拉雅旱獭种群动物质量控制技术; 环境条件和人工饲养笼具研制; 饲料脱青技术和全价营养颗粒饲料的研制; 配种和人工条件下的繁育技术, 成功建立了数量为 56 对繁殖种群和一套旱獭批量化繁育技术, 人工饲养条件下旱獭繁殖率达到 32%, 为实现该种质资源的实验动物化奠定了坚实的基础<sup>[10]</sup>。

### 2.1 种群动物质量控制

在非鼠疫区, 采取圈套活捕法捕捉体格健壮、肥瘦适中、四肢有力、反应敏感、行动活泼的亚成体和成体旱獭。要求被毛光亮, 眼睛鲜亮有神、无分泌物; 鼻孔干净, 呼吸正常; 肛门干净, 粪粒均匀, 并进行体内外寄生虫的驱治和检疫, 驱除旱獭蛔虫和螨、蜱、虱等旱獭携带的常见体内外寄生虫, 排除旱獭嗜肝病毒、弓形体、鼠疫、布氏菌等主要传染病原体和人兽共患病原体<sup>[11]</sup>。

### 2.2 主要环境指标和笼具

3 月 ~ 11 月 (非冬眠期) 室内最适温度 18 ~ 20℃; 相对湿度 40% ~ 50%; 光照可以为自然光照和日光灯, 照度控制在 60 Lx 以下; 室内风速小于 0.2 m/s; 室内氨气浓度小于 10 mg/m<sup>3</sup>; 噪音小于 50 dB。研制了 4 种不同用途的专用笼具<sup>[12-13]</sup>, 并取得国家专利, 分别为: 喜马拉雅旱獭室外人工繁殖笼具 (专利号: ZL 2011 2 0074289.3); 喜马拉雅旱獭人工室内繁殖池 (专利号: ZL 2011 2 0074075.6);

喜马拉雅旱獭人工室内繁殖笼具(专利号:ZL 2011 2 0074213.0);喜马拉雅旱獭实验用笼具(专利号:ZL 2011 2 0074194.1)。

### 2.3 人工全价营养颗粒饲料的研制和饮水

选用苜蓿粉、麸皮、玉米粉为基础日粮,添加食盐、复合维生素和微量元素等添加剂制成了旱獭配合饲料,配方为苜蓿粉 48%,麸皮 30%,玉米粉 20%,盐 1%,酵母粉 0.95%,微量元素 0.05%,性状为干燥颗粒饲料,直径 0.5 cm,长度 3~5 cm,呈棒状。每天 6:00、12:00、18:00 定时饲喂。饮水为 pH 2.5~2.8 的酸化水<sup>[14]</sup>。

### 2.4 人工饲养条件下旱獭的繁殖特性

人工饲养的亲本旱獭性成熟年龄为 2 周岁,体重 2.5~3.0 kg;体成熟年龄为 3 周岁,体重 3.5~5.0 kg;繁殖年龄 3~6 周岁,每年 3 月份出蛰后进入繁殖期,3 月中旬开始交配;发情周期 1 年,1 公 1 母配对;旱獭的妊娠期为 33~37 d,平均哺乳期为 47 d;平均繁殖率 32.4%,平均胎仔数为 4.4 只,性比约为 1:1,平均离乳数为 3.95 只,离乳率为 89.7%,平均产仔数 4 只,哺乳期 35 d 左右,离乳率 92%,幼獭成活率为 90.8%<sup>[13]</sup>。初生旱獭全身裸露无毛,背部黑红色,腹部粉红色,皮肤带皱纹、半透明,耳壳紧贴颅部,匍伏,体重 35.5~51.5 g,体长 9~11 cm,胸围 3~4 cm,尾长 1.2~1.5 cm;成体体重 4800~5600 g,体长 480~550 cm,胸围 30~40 cm,尾长 12~15 cm。生长发育快速期在 1 周岁~2 周岁期间。经统计学分析,不同性别旱獭的体重、体长、胸围和尾长等生长发育指标无显著性差异。

### 2.5 旱獭生物学特性研究

建立形态学、生理学、血液学和血液生化、行为学、解剖学等方面系统的数据库,取得完整的生物学特性资料,建立旱獭种质资源评价体系。测定了人工饲养条件下健康旱獭白细胞数、白细胞分类计数百分率、红细胞、血小板和血红蛋白等 7 项常用血液生理指标<sup>[14]</sup>;谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、血清总胆红素(TB)、总蛋白(TP)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆固醇、甘油三酯、高密度和低密度脂蛋白、空腹血糖、尿素氮(BUN)和 4 种离子浓度( $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Cl^-$ 、 $Ca^{2+}$ )常用正常血液生化值 15 项<sup>[15]</sup>;血液流变学指标和血脂水平<sup>[16-17]</sup>;主要脏器重量和脏器系数<sup>[18]</sup>;麻醉状态下的心电图<sup>[19]</sup>等喜马拉雅旱獭各项生物学指标,为喜马拉雅旱獭人工饲养繁殖、疾病诊断等提供了相应的参考依据,也

丰富了喜马拉雅旱獭生物学特性的资料。

### 2.6 旱獭遗传学研究

贺学等<sup>[20]</sup>采集喜马拉雅、西伯利亚、灰旱獭和长尾旱獭等四种旱獭肌肉材料,应用微卫星遗传标记检测技术,通过计算有效等位基因数、生物多样性 Shannon 指标、期望杂合度值等估计种群的遗传多样性,计算各位点的多态信息含量、中国四种旱獭和青海玉树、同仁、乌兰三个地区旱獭等位基因频率、杂合度、多态性信息含量、Shannon 指数、遗传相似度和遗传距离,并绘制出遗传发生树分析了四种旱獭的遗传多态性,确定喜马拉雅旱獭遗传结构。结果显示,喜马拉雅旱獭种群为独立分支;蒙古旱獭、灰旱獭和长尾旱獭为一支,蒙古旱獭和灰旱獭血缘关系较近,与长尾旱獭较远。青海省喜马拉雅旱獭种群分两个分支;乌兰和同仁地区旱獭种群为一支;玉树地区旱獭种群为另一支。

### 2.7 喜马拉雅旱獭白化种群的培育

陶元清等<sup>[21-23]</sup>在青海地区发现罕见的白化喜马拉雅旱獭种群,开展了人工白化种群的培育,拟将野外白化喜马拉雅旱獭培育成为带有特定遗传标志的白化品系,建立白化旱獭封闭群,以区别于野生旱獭,最终培育具有我国知识产权的新型实验动物。

### 3 喜马拉雅旱獭动物实验技术和方法

陶元清、范微、王忠东等<sup>[24-28]</sup>对旱獭饲养、动物实验前的准备、动物实验期间的饲养管理、动物实验基本技术等方面进行了探索,建立了包括抓取、固定、普通标记、电子芯片标记、分组、麻醉、取材、肝穿刺技术、给药、处死等规范的实验技术和方法规范,为各项实验的顺利开展提供了技术保证和技术支撑条件。

### 4 喜马拉雅旱獭应用研究

在实现喜马拉雅旱獭人工饲养基地的基础上,与多家合作单位展开人类疾病喜马拉雅旱獭模型的研究,证实喜马拉雅旱獭是理想的人类乙肝、高原病、心血管疾病、肥胖症、癌症、抗乙肝和艾滋病新药毒性评价的动物模型动物,具有广泛的应用前景。

#### 4.1 野生喜马拉雅旱獭自然感染旱獭嗜肝病毒的验证

旱獭与土拨鼠同属松鼠科旱獭属,大量分布在

我国西北地区,其中喜马拉雅旱獭为青藏高原特有品系,经线粒体 DNA 分析发现旱獭与土拨鼠亲缘关系很近。王宝菊等研究发现:青海地区喜马拉雅旱獭自然感染 WHV 感染率 0 ~ 26%<sup>[29]</sup>,旱獭的重要免疫分子包括 IFN、IFNR、IL-6、10、15、CD4、PD-1、PD-L2 以及 MHC-I 类分子的保守区与土拨鼠同类分子具有高度的同源性(95% ~ 100%)<sup>[30-32]</sup>。

#### 4.2 喜马拉雅旱獭人类乙肝动物模型的建立研究

王宝菊等将 WHV 病毒接种成年喜马拉雅旱獭后出现急性感染经过,感染旱獭血清中检测到病毒血症(WHsAg 和 WHV DNA)的出现和病毒特异性抗体的产生(WHcAb),在肝组织中检测到 WHV 的复制(WHV 复制中间体和转录子)和病毒抗原的表达,形成病毒血症及引起感染动物的肝脏出现组织病理学改变。部分旱獭的病毒血症持续时间超过 24 周,其中最长的持续时间接近 2 年,表明我国喜马拉雅旱獭对 WHV 易感,而成功建立了急性 WHV 感染旱獭模型,并应用 WHV 感染旱獭模型研究了 HBV 感染的发病机制和评价新的免疫治疗策略<sup>[33-34]</sup>。

#### 4.3 抗核苷酸病毒药物线粒体毒性模型研究

张评浒等<sup>[35-36]</sup>观察了喜马拉雅旱獭喂服抗病毒核苷类药物齐多夫定后药物对旱獭线粒体的毒性,结果提示喜马拉雅旱獭对阳性药物线粒体毒性的反应与美洲旱獭一致,初步提示喜马拉雅旱獭可以替代美洲旱獭作为我国抗乙肝和艾滋病药物的毒性评价动物,有望成为具有我国知识产权的新的动物模型。

#### 4.4 喜马拉雅旱獭心血管疾病模型研究

李亚芬等<sup>[37]</sup>连续 16 周给喜马拉雅旱獭喂养高胆固醇饲料后诱导高胆固醇血症和动脉粥样硬化,观察喂养 HCD 后喜马拉雅旱獭血脂、脂蛋白和 apo 的影响、主动脉、脑动脉和冠状动脉粥样硬化斑块面积和组织病灶特征、免疫组化研究动脉粥样硬化病灶部位巨噬细胞、平滑肌细胞  $\alpha$  肌动蛋白变化。研究结果显示,实验组旱獭体重和总胆固醇水平明显高于对照组( $P < 0.05$ ),但是甘油三酯水平两组之间没有差异;主动脉未发现明显病变。本研究提示,喜马拉雅旱獭对高胆固醇、高脂饲料诱导的动脉粥样硬化病变具有抵抗力。

## 5 展望

### 5.1 喜马拉雅旱獭虽属青藏高原鼠疫自然疫源性

宿主动物,野生喜马拉雅旱獭经过严格的检疫、驱虫等有效的监测和防疫措施,引入到实验室进行人工饲养和繁育,经过一个冬眠周期,从鼠疫防治学科理论和实践上都证明人工饲养的旱獭不会发生鼠疫的染疫和传播。另外,科学证实鼠疫不会发生垂直传播,人工饲养条件下亲兽繁育的后代旱獭就不会发生鼠疫。因此,只要建立科学的旱獭饲养繁育规范,就可以保证不会引发鼠疫的生物安全问题;从鼠疫防治的长远意义上,旱獭人工饲养繁育并实行特许经营许可管理,实现产业化后,可以满足市场对旱獭产品的需求,人类再不会去捕捉和获取野外的旱獭,从而切断了鼠疫传染病发生的传播途径,扭转当前鼠疫防治工作中禁捕旱獭但禁而不止的被动局面,将从根本上对我国防治鼠疫工作做出极大的贡献。

5.2 喜马拉雅旱獭作为青藏高原特有野生动物,在生命科学领域具有特别的科学研究价值,尤其在人类乙肝、艾滋病、鼠疫等重大传染病的动物模型、肝癌研究、新药研发等方面具有重大的应用前景,对我国重大传染病防治工作的基础研究具有重要的支撑作用,有必要对其进行系统地人工饲养繁育、纯系培育及实验动物化研究,最终培育具有我国知识产权的新型实验动物。

5.3 美洲旱獭已在美国和欧洲成功进行了实验动物化,也已成功建立了人类乙肝的动物模型,但由于乙肝已在欧美国家得到了有效控制,已经不再是欧美国家的医学研究重点,欧美国家已逐渐削减了投入,因此我国作为乙肝大国,乙肝的防治研究工作在今后二十年至三十年间,将是我国面临的重大问题,只有依靠我国的自主研发,才能解决。美洲旱獭作为抗核苷酸药物线粒体毒性的评价模型,由于美洲旱獭也存在鼠疫问题,在动物进出口方面,受到极大的限制。我国是乙肝和艾滋病等重大传染病的高发国家,在对此类疾病的基础研究和新药研发等方面受到技术制约,造成了我国至今尚无任何一种具有自主知识产权的用于乙肝、艾滋病等重大传染病的药物,完全依赖国外进口,给国家利益和人民的健康保护造成巨大损害。经过对喜马拉雅旱獭多年的研究,我国已经具备了打破此种技术垄断的资源优势和技术力量,喜马拉雅旱獭的实验动物化研究完成后可以替代美洲旱獭开展人类乙肝、艾滋病、鼠疫等重大传染病的基础和应用研究。因此,开展喜马拉雅旱獭的人工饲养和实验

动物化研究、建立产学研一体化的科技服务平台等具有重大意义。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 贺争鸣. 我国资源动物的实验动物化潜力与展望[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(3): 1-7.
- [ 2 ] 黄孝龙. 大型冬眠动物喜马拉雅旱獭的实验动物化研究[J]. 中国实验动物学, 1996, 6: 70-72.
- [ 3 ] Hoffmann RS and Nadler CF. Chromosomes and systematics of some North American species of the genus *Marmota* (Rodentia: Sciuridae)[J]. *Experientia* 1968, 24: 740-742.
- [ 4 ] 孟德荣. 我国旱獭的种类及国内分布研究[J]. 毛皮动物饲养. 1996(3): 18-19.
- [ 5 ] Summers J, Smolec JM, Snyder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978; 75: 4533-4537.
- [ 6 ] Menne S, Cote PJ. The woodchuck as an animal model for pathogenesis and therapy of chronic hepatitis B virus infection[J]. *World J Gastroenterol*. 2007, 13: 104-124.
- [ 7 ] Richardson FC, Tennant BC, Meyer DJ, et al. An evaluation of the toxicities of 2'-Fluorouridine and 2'-Fluorocytidine-HCl in F344 rats and Woodchucks (*Marmota monax*) [J]. *Toxicologic pathology*, 1999, 27(6): 607-617.
- [ 8 ] 刘寿鹏. 青海喜马拉雅旱獭类人类乙肝病毒的发现和系列验证[J]. 青海医药杂志, 1987, (4): 1-3.
- [ 9 ] 马丽丽, 金志宏, 冠平原, 等. 中国旱獭类动物肝炎病毒感染调查[J]. 动物学杂志, 1988, 23: 14-15.
- [ 10 ] 范薇, 徐小青, 刘巴睿, 等. 青藏高原小型兽类实验动物化潜力与应用前景[J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(1): 1-5.
- [ 11 ] 王忠东. 喜马拉雅旱獭实验笼具的设计与应用[J]. 实验动物与比较医学, 2012, 4: 356-357.
- [ 12 ] 陶元清. 喜马拉雅旱獭繁殖设施的设计与应用[J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(3): 242-244.
- [ 12 ] 陶元清. 野生白化喜马拉雅旱獭体内寄生虫检测与控制[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(5): 74-76.
- [ 13 ] 陶元清, 王忠东. 提高人工饲养条件下喜马拉雅旱獭成活率的几点体会[J]. 四川动物, 2006, 25(2): 889-890.
- [ 14 ] 陶元清, 范薇, 王忠东, 等. 喜马拉雅旱獭血液生理指标的测定[J]. 四川动物, 2010, 29(5): 625.
- [ 15 ] 刘海青, 王宝菊, 张静宵, 等. 喜马拉雅旱獭血液生化指标测定[J]. 四川动物, 2015, 34(5): 764-766.
- [ 16 ] 刘巴睿, 徐晓青, 刘海青, 等. 人工饲养条件下喜马拉雅旱獭血脂和血液流变学指标测定[J]. 青海畜牧兽医学杂志, 2014, 44(2): 6-7.
- [ 17 ] 范薇, 刘巴睿, 王忠东, 等. 高脂、高胆固醇饮食对喜马拉雅旱獭血脂和血液流变学的影响[J]. 医学动物防制, 2014, 30(3): 279-282.
- [ 18 ] 范薇, 刘巴睿, 刘海青, 等. 人工饲养喜马拉雅旱獭主要脏器及脏器系数的测定[J]. 实验动物与比较医学, 2014, 34(1): 59-61.
- [ 19 ] 徐小青, 范薇, 刘巴睿, 等. 人工饲养喜马拉雅旱獭心电图测定[J]. 医学动物防制, 2015, 31(5): 503-505.
- [ 20 ] 贺学, 王忠东, 陶元清, 等. 青海省喜马拉雅旱獭种群的遗传多态性分析[J]. 中国兽医学, 2012, 42(6): 627-631.
- [ 21 ] 陶元清. 我国首例白化喜马拉雅旱獭家族的发现及其描述[J]. 四川动物, 2009, 28(4): 595.
- [ 22 ] 陶元清. 首例白化喜马拉雅旱獭的野生繁殖[J]. 四川动物, 2010, 29(3): 406.
- [ 23 ] 陶元清. 白化喜马拉雅旱獭的血液生理指标[J]. 四川动物, 2011, 30(4): 521.
- [ 24 ] 陶元清, 王忠东. 喜马拉雅旱獭的动物实验基本技术和方法的建立[J]. 四川动物, 2007, 26: 704-705.
- [ 25 ] 范薇. 喜马拉雅旱獭制动性麻醉方法[J]. 四川动物, 2008, 27: 1139-1140.
- [ 26 ] 范薇, 王忠东. 人工饲养条件下喜马拉雅旱獭寄生虫病的综合防治[J]. 四川动物, 2009, (28)5: 750-752.
- [ 27 ] 范薇, 王忠东, 陶元清. 喜马拉雅旱獭肝穿刺方法的建立[J]. 实验动物与比较医学, 2011, 31(4): 287-289.
- [ 28 ] 王忠东. 喜马拉雅旱獭饲养管理与动物实验方法建立[J]. 医学动物防制, 2012, 29(6): 67-70.
- [ 29 ] 李新宇, 王宝菊, 孟忠吉, 等. 中国青海地区喜马拉雅旱獭嗜肝病毒自然感染的组织学研究[J]. 中国病毒学, 2005, 20: 570-574.
- [ 30 ] 卢银平, 王宝菊, 黄红平. 中国旱獭干扰素 a 家族基因在真核细胞和原核细胞中的表达[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(2): 124-128.
- [ 31 ] 卢银平, 王宝菊, 黄红平, 等. 中国旱獭干扰素 a 家族基因的克隆及序列分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26(3): 269-273.
- [ 32 ] 冯雪梅, 尹莹, 李安意, 等. 一种 HBV 研究的新动物模型-喜马拉雅旱獭  $\beta$ -actin 基因的克隆及系列分析[J]. 医学分子生物学杂志, 2011, 8(2): 95-99.
- [ 33 ] Wang BJ, Tian YJ, Meng ZJ, et al. Establishing a new animal model for hepadnaviral infection: susceptibility of Chinese *Marmota*-species to woodchuck hepatitis virus infection. *The Journal of general virology* 2011, 92(3): 681-691.
- [ 34 ] 朱彬, 朱珍妮, 李安意, 等. 乙肝病毒感染动物模型喜马拉雅旱獭 IL-15 分子的克隆及序列分析[J]. 华中科技大学学报(医学版) 2014, 43(2): 125-129.
- [ 35 ] 张评浒, 张陆勇. 喜马拉雅旱獭-核苷类药物线粒体毒性评价体系的建立[C]//第二届中国药物毒理学会年会会议论文集; 2012, 66.
- [ 36 ] 张评浒, 陶元清, 江振洲, 等. 喜马拉雅旱獭作为药物线粒体毒性替代模型的可行性分析[J]. 实验动物与比较医学, 2012, 32(5): 436-439.
- [ 37 ] Yafeng Li, Zhongdong Wang, Yuanqing Tao, et al. Characteristics of Himalayan Marmots and Their Response to an Atherogenic Diet [J]. *Response to atherogenic diet of Marmots*, 2012, 61(4): 461-466.



# 犬尿氨酸通路在神经退行性疾病中的研究进展

王丽莎,刘新民,冯利,曹芳瑞,陶雪,常琪

(中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所,北京 100193)

**【摘要】** 犬尿氨酸通路是色氨酸代谢的主要途径,与亨廷顿病、阿尔茨海默病、帕金森氏症等神经退行性疾病的发生、发展有着密切联系。本文主要综述了犬尿氨酸通路代谢产物的神经生物学活性及其与相关神经退行性疾病的关系,为研究和治疗神经退行性疾病提供新的思路和方法。

**【关键词】** 犬尿氨酸通路;神经退行性疾病;神经生物学活性

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0069-07

doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2015.11.015

## Research progress in the kynurenine pathway related with neurodegenerative diseases

WANG Li-sha, LIU Xin-min, FENG Li, CAO Fang-ru, TAO Xue, CHANG Qi

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

**【Abstract】** The kynurenine pathway, a major route of tryptophan metabolism, is involved in the occurrence and development of some neurodegenerative diseases, such as Huntington's disease, Alzheimer's disease and Parkinson's disease. This article is focused on the literature review on the neurobiological properties of kynurenine pathway metabolites and their crucial role in related neurodegenerative diseases, for providing novel therapeutic interventions to neurodegenerative diseases.

**【Key words】** Kynurenine pathway; Neurodegenerative diseases; Neurobiological properties

色氨酸(tryptophan, TRP)是哺乳动物体内维持细胞活化和增殖所必需的氨基酸,主要通过犬尿氨酸(kynurenine, KYN)和5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)两条途径代谢。哺乳动物体内超过95%的TRP是通过犬尿氨酸通路(kynurenine pathway, KP)代谢的。最初人们认为KP的生理作用仅限于其最终代谢产物烟酰胺腺嘌呤二核苷酸辅酶(NAD<sup>+</sup>)的多种生物学过程。自20世纪70年代以来,许多研究证明KP代谢产物在

中枢神经系统(CNS)中发挥着重要作用:影响大脑神经传递系统功能,发挥神经保护和神经毒性作用。现已在亨廷顿病、阿尔茨海默病、帕金森氏症等多种神经退行性疾病中发现KP代谢产物和相关酶的水平有明显变化。

本文综述了KP的构成及其代谢产物的神经生物学作用,重点介绍了KP与亨廷顿病、阿尔茨海默病和帕金森氏症等神经退行性疾病的联系,为KP作为防治神经退行性疾病的治疗靶点提供重要

[基金项目] 科技部对欧盟科技合作专项(1108);新疆科技厅资助项目(20146021和201491174)。

[作者简介] 王丽莎(1990-),女,硕士,主要从事药物吸收代谢研究;E-mail: gawlsv@163.com。

[通讯作者] 常琪,博士生导师,主要从事药物吸收代谢研究;E-mail: qchang@implad.ac.cn。

参考。

### 犬尿氨酸代谢通路

哺乳动物体内 TRP 主要通过 KP 代谢(图 1)。首先,TRP 在吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)或色氨酸-2,3-双加氧酶(TDO)的催化下生成 N-甲酰犬尿氨酸,进而在犬尿氨酸甲酰胺酶催化下生成犬尿氨酸(kynurenine, KYN)。然后, KYN 沿三种途径分别在犬尿氨酸氨基转移酶(KATs)、犬尿氨酸酶(KYNU)和犬尿氨酸-3-单加氧酶(KMO)的催化下生成犬尿喹啉酸(kynurenic acid, KYNA)、邻氨基苯甲酸(anthranilic acid, AA)和 3-羟基犬尿氨酸(3-hydroxykynurenine, 3-HK)。脑内存在相对大量的 3-羟基邻氨基苯甲酸-3,4-双加氧酶(3-HAO),可氧化 3-HANA 生成不稳定的半醛类中间产物,后者立刻经过非酶催化生成喹啉酸(quinolinic acid, QUIN)。QUIN 在喹啉酸磷酸核糖转移酶催化下生成 KP 的最终代谢产物  $\text{NAD}^+$ 。

### KP 代谢产物的神经生物学作用

#### KYN

KYN 是芳香烃受体(AHR)的内源性激动剂,与 AHR 结合后,引起一系列靶基因表达,促进调节性 T 细胞的生成<sup>[1]</sup>,并抑制抗原呈递细胞 DCs 的成熟,

进而抑制免疫反应<sup>[2]</sup>,改善神经损伤。

#### KYNA

在 mM 水平的高浓度下, KYNA 是非选择性竞争性离子型谷氨酸受体的拮抗剂,与 N-甲基-D-天门冬氨酸受体(NMDARs)的甘氨酸结合位点有很高的亲和力<sup>[3]</sup>,并且可以拮抗另外两种离子型谷氨酸受体:  $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异唑丙酸受体(AMPA Rs)和红藻氨酸受体(KARs),从而阻断兴奋性神经传递。通过抑制 NMDARs, KYNA 能够阻断兴奋性氨基酸的毒性,避免其损伤脑组织,从而保护神经系统。然而在低浓度下, KYNA 是非竞争性  $\alpha 7$  烟碱型乙酰胆碱受体( $\alpha 7$ nAChRs)的拮抗剂<sup>[4]</sup>。研究发现人体大脑内新皮质和大鼠纹状体内的谷氨酸轴突末梢表达  $\alpha 7$ nAChRs, 促进谷氨酸释放, KYNA 通过拮抗  $\alpha 7$ nAChRs 抑制突触前谷氨酸释放<sup>[5]</sup>,这是 KYNA 的另一种抗谷氨酸机制,它进一步增强了 KYNA 对于 NMDAR 介导的兴奋性氨基酸毒性的抑制作用。 $\alpha 7$ nAChRs 是 KYNA 在生理浓度水平的作用靶点<sup>[4]</sup>,因此抑制  $\alpha 7$ nAChRs 成为脑内内源性 KYNA 最重要的作用机制。研究表明抑制 KYNA 的合成会导致乙酰胆碱、谷氨酸和多巴胺三种神经递质水平上升,因此, KYNA 与胆碱能、谷氨酸能和多巴胺能神经传递系统相关的多种行为有密切联系。此外, KYNA 也是鸟苷酸结合蛋白孤儿

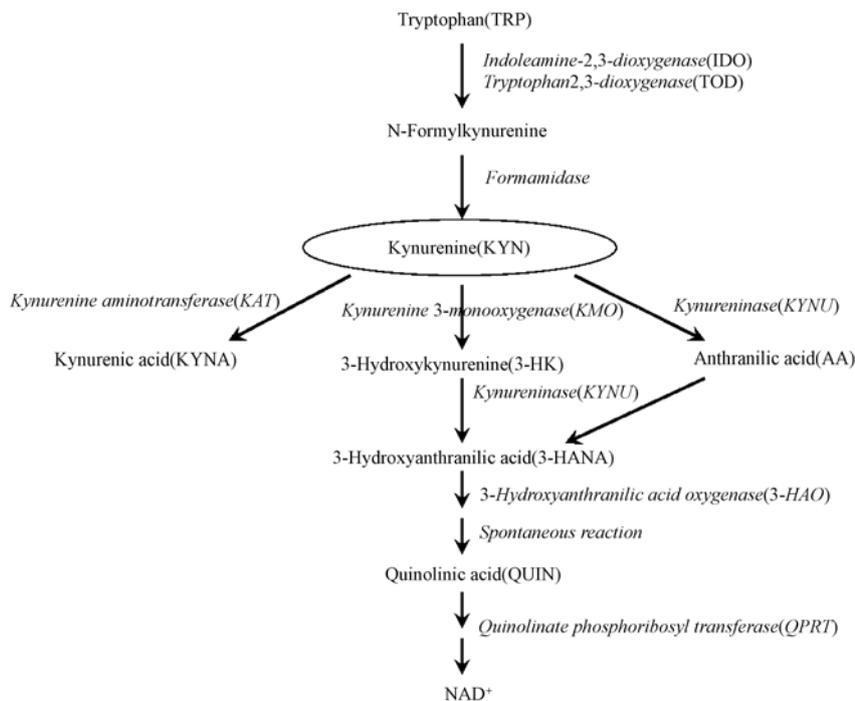


图 1 犬尿氨酸代谢通路

Fig. 1 The kynurenine pathway

受体 35 和 AHR 的激动剂<sup>[6-7]</sup>;还可作为潜在的内源性抗氧化剂<sup>[8]</sup>;并通过调节免疫应答反应发挥抗炎作用<sup>[7]</sup>。

### QUIN

研究发现,QUIN 可选择性激活 NMDARs<sup>[9]</sup>,产生神经兴奋性毒性,并且纹状体内注射 QUIN 会导致注射部位附近产生轴突匮乏性神经病变<sup>[10]</sup>。NMDARs 拮抗剂 MK-801 可完全终止 QUIN 诱导的脂质过氧化,这一发现证明了活化 NMDARs 是 QUIN 神经毒性的主要作用机制<sup>[11]</sup>。此外,QUIN 的复杂神经毒性作用还可以归因于其它一些机制,包括:促进突触谷氨酸释放,抑制星形胶质细胞谷氨酸摄取,活性氧中间体生成,内源性抗氧化剂消耗,线粒体功能障碍和脂质分子过氧化<sup>[12]</sup>。QUIN 还具有免疫调节作用。在兴奋性毒性浓度下,QUIN 作用于人原代星形胶质细胞,促进 IL-1 $\beta$  的表达,抑止谷氨酰胺合成酶的活性,引起星形胶质细胞增生<sup>[13]</sup>。

### 3-HK 和 3-HANA

3-HK 和 3-HANA 具有神经毒性,可诱导羟自由基和过氧化氢等自由基的形成<sup>[14]</sup>,提高氧化应激水平,通过凋亡机制引起神经元死亡<sup>[15]</sup>。当 3-HK 与自由基清除剂一起应用时,可阻断其毒性损伤效应<sup>[16]</sup>。并且,3-HK 和 3-HANA 产生自由基的作用与他们的抗氧化作用以及黄尿酸清除过氧化自由基的作用相平衡<sup>[17]</sup>。与其他氧化还原活性化合物一样,3-HK 和 3-HANA 根据所在部位的氧化还原环境的不同,分别表现出促氧化或抗氧化活性,从而调节组织的氧化还原状态。体外实验表明,3-HK 的毒性依赖于它的细胞摄取过程<sup>[15]</sup>,并且可能产生于细胞内部。皮层和纹状体比小脑更容易受到 3-HK 的毒性损害,这可能是因为在这些部位的神经元中 3-HK 的转运活动存在差异,表明 3-HK 的毒性作用具有脑区域选择性<sup>[15]</sup>。此外,3-HK 和 QUIN 的神经兴奋性毒性具有协同作用,当二者同时注射入纹状体时可引起大量神经元损伤,而在等同剂量下单独应用时却不引起或只引起轻微神经退行性变化<sup>[18]</sup>。

## KP 在神经退行性疾病中的作用

### 亨廷顿病(huntington's disease, HD)

HD 是一种常染色体显性遗传神经退行性疾病,由亨廷顿基因突变所致,以纹状体和大脑皮层

中神经元选择性死亡为主要特征。NMDARs 介导的神经兴奋性毒性是 HD 神经退行性病变的重要机制之一。目前已证实有多种 KP 代谢产物水平在 HD 患者中发生变化,并且越来越多的研究为 KP 代谢紊乱和 HD 病理生理的关系提供直接支持。

一方面,HD 患者早期阶段纹状体和皮质中 QUIN 水平显著增加<sup>[19]</sup>,小胶质细胞激活<sup>[20]</sup>,产生兴奋性毒性神经元损伤。值得注意的是,在 HD 大脑中 3-HK 伴随 QUIN 水平同步升高<sup>[19]</sup>,这两种具有协同致病能力的 KP 代谢产物在 HD 早期阶段发挥重要作用。在转基因 HD 小鼠脑中也存在类似的变化<sup>[21]</sup>。早期研究证明,HD 患者的纹状体中 3-HAO 的活性明显增加;近期研究证明,JM6 抑制 HD R6/2 模型小鼠的 KMO 活性,能够延长动物寿命,保护神经元和突触,并抑制小胶质细胞活化<sup>[22]</sup>。另一方面,HD 患者的皮质、纹状体和脑脊液(CSF)中, KYNA 的水平显著降低<sup>[23-24]</sup>,这加重了 QUIN 神经毒性的易感性<sup>[25]</sup>,加剧了 HD 病理改变。与此同时,催化 KYNA 生成的 KATs 的活性受到抑制<sup>[26]</sup>。另有研究发现,在 HD 患者血液中和模型小鼠脑中 KYN/TRP 比值均显著增加<sup>[27-28]</sup>。并且,血液中 KYN 的浓度与亨廷顿基因中 DNA 密码子(CAG)过度重复显著相关,为 KP 代谢产物在 HD 中的作用提供强有力的支持<sup>[29]</sup>。

基于 KP 与 HD 的密切联系,KP 为 HD 的治疗提供了新的治疗方法,通过逆转 KP 毒性代谢产物的生成,提高 KYNA 水平,可以起到神经保护作用,抵抗 HD 中的兴奋性毒性。KMO 抑制剂和 KYNA 衍生物对于 HD 模型的退行性神经损伤均有保护作用<sup>[30-31]</sup>。然而,在提高脑内 KYNA(一种 NMDARs 拮抗剂)水平时,应当注意其带来的负面作用。NMDARs 在 CNS 中普遍存在,当突触 NMDARs 被阻断时,cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)和脑源性神经营养因子(BDNF)介导途径的保护作用就会受到抑制,最终发生神经损伤<sup>[32]</sup>。相反,当采用低剂量选择性作用于突触外 NMDARs 的抑制剂时,则可以起到保护作用<sup>[33]</sup>。新型大尿喹啉酸酰胺类化合物对 HD 模型 N17182Q 转基因小鼠有保护作用<sup>[34]</sup>。该类化合物选择性抑制主要存在于突触外区域含有 NR2B 亚基的 NMDARs,因此具有较好的疗效<sup>[35]</sup>。

### 阿尔茨海默病(alzheimer's disease, AD)

AD 是发生在老年期的一种神经系统慢性渐进

性退行性疾病,以细胞外淀粉样蛋白斑块、细胞内神经纤维缠结和营养不良性神经突起为主要病理特征。炎症反应是 AD 重要病理机制之一,虽然尚不清楚炎症反应是如何引发 AD 的,但已发现 KP 在 AD 中起重要作用。许多炎症因子激活 KP,产生与 AD 发病机制密切相关的代谢产物<sup>[36]</sup>。

促炎细胞因子 IFN- $\gamma$  诱导淀粉样蛋白斑块周围的小胶质细胞过度表达 IDO,使其活性增加<sup>[37]</sup>。另有研究发现,AD 患者和模型小鼠脑中 TDO 和 IDO 的表达水平均有所提高,但只有 TDO 的变化具有统计学差异<sup>[38]</sup>。并且,AD 患者血液中 KYN/TRP 比值增加<sup>[39]</sup>。此外,在 AD 患者大脑和血清中,3-HK 水平升高<sup>[40-41]</sup>。3-HK 和 3-HANA 介导氧化应激,损伤神经组织,并可能通过随后的  $\beta$  淀粉样蛋白积聚、神经胶质激活和 KP 上调等机制进一步加剧神经退行性病<sup>[42]</sup>。而且,3-HK 和 3-HANA 均能显著抑制线粒体呼吸链酶复合物 I 和 II 的活性,3-HK 和 AA 还分别能抑制复合物 IV 和 I-III 的活性,这些均可导致 AD 的能量损失<sup>[43]</sup>。

淀粉样前体蛋白的裂解产物淀粉样肽 A $\beta$ -1-42 可诱导 IDO 的表达,导致巨噬细胞和小胶质细胞中 QUIN 的生成增加<sup>[44]</sup>。QUIN 在神经胶质细胞中的免疫反应与淀粉样蛋白斑块几乎一样强烈,并标记神经纤维缠结,表明 QUIN 诱导的兴奋性毒性或氧化应激可能参与了 AD 的致病过程<sup>[45]</sup>。还有研究表明,在人原代培养的神经元中给予 QUIN,可诱导参与 tau 蛋白磷酸化的基因的表达。并且,QUIN 与超磷酸化 tau 蛋白共定位,抑制磷酸酶介导的去磷酸化过程,使 tau 蛋白在 AD 皮层神经元中超磷酸化<sup>[46]</sup>。QUIN 毒性的另一主要原因是脂质过氧化,这也是 AD 的标志物之一。因此,QUIN 可能是 AD 神经损伤病理机制中的关键因素。

在 AD 患者脑内尤其是纹状体中,KYNA 水平上升<sup>[47]</sup>,增加其阻断谷氨酸和胆碱能受体的能力,促进认知功能障碍。但在 AD 患者 CSF 和血浆中,KYNA 浓度显著下降,而 KAT 活性基本保持不变<sup>[48-49]</sup>。最近的研究发现,AD 患者和正常人相比,CSF 中 KYNA 水平没有统计学差异<sup>[50]</sup>。因此,这有待于进一步深入研究。

上述研究结果表明,KP 可以为 AD 提供一种很有前途的治疗方法。KMO 抑制剂不仅提高脑内 KYNA 水平,也会导致转基因 AD 模型小鼠中谷氨酸水平降低,并改善空间学习记忆能力,减少大脑

突触损失和焦虑行为<sup>[22]</sup>。此外,黄连碱能够抑制 AD 模型小鼠 IDO 的活性及胶质细胞的活化,从而阻断神经元丢失,减少淀粉样蛋白斑块生成,改善认知功能损伤,为治疗 AD 提供一种新的思路<sup>[51]</sup>。

帕金森氏症 (parkinson's disease, PD)

PD 是一种以脑内多巴胺能神经元损失为主要特征的神经系统退行性疾病,以中脑黑质致密区多巴胺能神经元进行性缺失并伴有 Lewy 小体生成为主要病理特征。线粒体功能障碍、ROS 过量生成、异常蛋白聚集、兴奋性神经递质谷氨酸和神经炎症在 PD 的发病中起关键作用<sup>[52]</sup>。而 KP 与上述机制密切相关,在 PD 中扮演重要角色。

在 PD 患者 CSF 中,TRP 水平下降,KYN/TRP 比值增加,3-HK 水平上升<sup>[53-55]</sup>;而其血浆中 KYNA 水平下降,KAT I 和 KAT II 活性降低<sup>[56]</sup>。在 PD 动物模型中也发现类似的 KP 变化。经过 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶或 6-羟基多巴胺处理后,黑质中的 KATI 表达水平下降<sup>[57-58]</sup>,这为 PD 中 KYNA 水平下降提供了实验依据。而 KYNA 能够对抗 1-甲基-4-苯基吡啶在大鼠纹状体多巴胺能神经末梢的神经毒性,这种神经保护作用主要是通过 AMPA-kainate 亚型所介导的,而非 NMDARs<sup>[59]</sup>。

目前还没有治疗 PD 有效的方法。临床上常用的左旋多巴和多巴胺能激动剂替代纹状体内的多巴胺,仅能缓解 PD 症状,不能减慢神经退行性病进程。并且,长期使用该类药物会导致严重的副作用。在 PD 和左旋多巴引起的副作用中,多巴胺和谷氨酸之间的平衡状态被打破,导致皮质纹状体谷氨酸功能上调。KMO 抑制剂 Ro 61-8048 能够提高 KYNA 水平,增强其对于 NMDARs 的拮抗作用,降低兴奋性毒性,与左旋多巴联合使用,可以产生适度疗效,缓解左旋多巴引起的副作用,为治疗 PD 提供了新的方案和思路<sup>[60]</sup>。

## 总结

综上所述:内源性 KP 代谢产物在多种神经退行性疾病中发生改变而偏离生理稳态。因此,维持 KP 代谢产物的正常水平在脑部功能方面极为重要。预防或纠正 KP 的异常改变可以减缓神经退行性疾病的病理进程。靶向于 KP 的新治疗方式已引起人们的广泛关注,KYNA 类似物、前体药物和 KP 代谢酶抑制剂等新化合物有望被用于治疗神经退行性疾病。

然而,神经退行性疾病非常复杂,目前尚不清楚 KP 作用于此类疾病的准确机制。并且,许多实验都是在动物身上进行的,针对人体的临床实验仍需进一步的研究确认。另外,早期研究是在较高的非生理浓度下进行的,KYNA 和 QUIN 基本上是充当探针药物来检测谷氨酸受体的后续改变,这并不能充分说明内源性 KP 代谢产物在动物体内的生物学作用。基因突变小鼠和酶抑制剂的应用有助于改善上述问题<sup>[61-62]</sup>。基于病理状态下 KP 的复杂变化过程,需要在多种脑细胞模型和各种疾病模型中进行全面评估 KP 功能,才能从根本上找到大脑由生理向病理转变的真正原因。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Mezrich JD, Fechner JH, Zhang XJ, *et al.* An Interaction between Kynurenine and the Aryl Hydrocarbon Receptor Can Generate Regulatory T Cells[J]. *J Immunol*, 2010, 185(6): 3190-3198.
- [ 2 ] Benson JM, Shepherd DM. Dietary Ligands of the Aryl Hydrocarbon Receptor Induce Anti-Inflammatory and Immunoregulatory Effects on Murine Dendritic Cells[J]. *Toxicol Sci*, 2011, 124(2): 327-338.
- [ 3 ] Birch PJ, Grossman CJ, Hayes AG. Kynurenic Acid Antagonises Responses to Nmda Via an Action at the Strychnine-Insensitive Glycine Receptor[J]. *European journal of pharmacology*, 1988, 154(1): 85-87.
- [ 4 ] Hilmas C, Pereira EF, Alkondon M, *et al.* The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications[J]. *The Journal of neuroscience*; the official journal of the Society for Neuroscience, 2001, 21(19): 7463-7473.
- [ 5 ] Marchi M, Risso F, Viola C, *et al.* Direct evidence that release-stimulating alpha7\* nicotinic cholinergic receptors are localized on human and rat brain glutamatergic axon terminals[J]. *Journal of neurochemistry*, 2002, 80(6): 1071-1078.
- [ 6 ] Wang J, Simonavicius N, Wu X, *et al.* Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35 [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2006, 281(31): 22021-22028.
- [ 7 ] DiNatale BC, Murray IA, Schroeder JC, *et al.* Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling[J]. *Toxicol Sci*, 2010, 115(1): 89-97.
- [ 8 ] Thevandavakkam MA, Schwarcz R, Muchowski PJ, *et al.* Targeting Kynurenine 3-Monooxygenase (KMO): Implications for Therapy in Huntington's Disease[J]. *Cns Neurol Disord-Dr*, 2010, 9(6): 791-800.
- [ 9 ] Stone TW, Perkins MN. Quinolinic Acid - a Potent Endogenous Excitant at Amino-Acid Receptors in Cns[J]. *European journal of pharmacology*, 1981, 72(4): 411-412.
- [ 10 ] Schwarcz R, Whetsell WO, Mangano RM. Quinolinic Acid - an Endogenous Metabolite That Produces Axon-Sparing Lesions in Rat-Brain[J]. *Science*, 1983, 219(4582): 316-318.
- [ 11 ] Santamaria A, Rios C. MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum[J]. *Neurosci Lett*, 1993, 159(1-2): 51-54.
- [ 12 ] Guillemain GJ. Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin[J]. *Febs J*, 2012, 279(8): 1356-1365.
- [ 13 ] Ting KK, Brew BJ, Guillemain GJ. Effect of quinolinic acid on human astrocytes morphology and functions: implications in Alzheimer's disease[J]. *Journal of neuroinflammation*, 2009, 6: 36.
- [ 14 ] Goldstein LE, Leopold MC, Huang XD, *et al.* 3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote alpha-crystallin cross-linking by metal ion reduction[J]. *Biochemistry-Us*, 2000, 39(24): 7266-7275.
- [ 15 ] Okuda S, Nishiyama N, Saito H, *et al.* 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity[J]. *Journal of neurochemistry*, 1998, 70(1): 299-307.
- [ 16 ] Guidetti P, Schwarcz R. 3-Hydroxykynurenine and quinolinate: pathogenic synergism in early grade Huntington's disease? [J]. *Advances in experimental medicine and biology*, 2003, 527: 137-145.
- [ 17 ] Christen S, Peterhans E, Stocker R. Antioxidant Activities of Some Tryptophan-Metabolites - Possible Implication for Inflammatory Diseases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(7): 2506-2510.
- [ 18 ] Guidetti P, Schwarcz R. 3-Hydroxykynurenine potentiates quinolinate but not NMDA toxicity in the rat striatum[J]. *The European journal of neuroscience*, 1999, 11(11): 3857-3863.
- [ 19 ] Guidetti P, Luthi-Carter RE, Augood SJ, *et al.* Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2004, 17(3): 455-461.
- [ 20 ] Tai YF, Pavese N, Gerhard A, *et al.* Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers[J]. *Brain*, 2007, 130: 1759-1766.
- [ 21 ] Guidetti P, Bates GP, Graham RK, *et al.* Elevated brain 3-hydroxykynurenine and quinolinate levels in Huntington disease mice[J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 23(1): 190-197.
- [ 22 ] Zwillig D, Huang SY, Sathyaikumar KV, *et al.* Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration[J]. *Cell*, 2011, 145(6): 863-874.
- [ 23 ] Beal MF, Matson WR, Storey E, *et al.* Kynurenic Acid Concentrations Are Reduced in Huntingtons-Disease Cerebral-

- Cortex[J]. *J Neurol Sci*, 1992, 108(1): 80–87.
- [24] Beal MF, Matson WR, Swartz KJ, *et al.* Kynurenine pathway measurements in Huntington's disease striatum; evidence for reduced formation of kynurenic acid [J]. *Journal of neurochemistry*, 1990, 55(4): 1327–1339.
- [25] Sapko MT, Guidetti P, Yu P, *et al.* Endogenous kynurenate controls the vulnerability of striatal neurons to quinolinate; Implications for Huntington's disease[J]. *Exp Neurol*, 2006, 197(1): 31–40.
- [26] Jauch D, Urbanska EM, Guidetti P, *et al.* Dysfunction of Brain Kynurenic Acid Metabolism in Huntingtons-Disease - Focus on Kynurenine Aminotransferases [J]. *J Neurol Sci*, 1995, 130(1): 39–47.
- [27] Stoy N, Mackay GM, Forrest CM, *et al.* Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease[J]. *Journal of neurochemistry*, 2005, 93(3): 611–623.
- [28] Veres G, Molnar M, Zadori D, *et al.* Central nervous system-specific alterations in the tryptophan metabolism in the 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease [J]. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 2015, 132: 115–124.
- [29] Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, *et al.* Blood levels of kynurenines, interleukin-23 and soluble human leucocyte antigen-G at different stages of Huntington's disease[J]. *Journal of neurochemistry*, 2010, 112(1): 112–122.
- [30] Toledo-Sherman LM, Prime ME, Mrzljak L, *et al.* Development of a Series of Aryl Pyrimidine Kynurenine Monooxygenase Inhibitors as Potential Therapeutic Agents for the Treatment of Huntington's Disease[J]. *J Med Chem*, 2015, 58(3): 1159–1183.
- [31] Fulop F, Sztamari I, Vamos E, *et al.* Syntheses, transformations and pharmaceutical applications of kynurenic acid derivatives [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(36): 4828–4842.
- [32] Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways[J]. *Nature neuroscience*, 2002, 5(5): 405–414.
- [33] Okamoto SI, Pouladi MA, Talantova M, *et al.* Balance between synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor activity influences inclusions and neurotoxicity of mutant huntingtin[J]. *Nat Med*, 2009, 15(12): 1407–U1408.
- [34] Zadori D, Nyiri G, Szonyi A, *et al.* Neuroprotective effects of a novel kynurenic acid analogue in a transgenic mouse model of Huntington's disease[J]. *Journal of neural transmission*, 2011, 118(6): 865–875.
- [35] Borza I, Kolok S, Galgoczy K, *et al.* Kynurenic acid amides as novel NR2B selective NMDA receptor antagonists [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(2): 406–409.
- [36] Tan L, Yu JT, Tan L. The kynurenine pathway in neurodegenerative diseases: mechanistic and therapeutic considerations[J]. *J Neurol Sci*, 2012, 323(1–2): 1–8.
- [37] Yamada A, Akimoto H, Kagawa S, *et al.* Proinflammatory cytokine interferon-gamma increases induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase in monocytic cells primed with amyloid beta peptide 1–42: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Journal of neurochemistry*, 2009, 110(3): 791–800.
- [38] Wu W, Nicolazzo JA, Wen L, *et al.* Expression of tryptophan 2, 3-dioxygenase and production of kynurenine pathway metabolites in triple transgenic mice and human Alzheimer's disease brain [J]. *Plos One*, 2013, 8(4): e59749.
- [39] Greilberger J, Fuchs D, Leblhuber F, *et al.* Carbonyl Proteins as a Clinical Marker in Alzheimer's Disease and its Relation to Tryptophan Degradation and Immune Activation [J]. *Clin Lab*, 2010, 56(9–10): 441–448.
- [40] Bonda DJ, Mailankot M, Stone JG, *et al.* Indoleamine 2, 3-dioxygenase and 3-hydroxy-kynurenine modifications are found in the neuropathology of Alzheimer's disease[J]. *Redox Report*, 2010, 15(4): 161–168.
- [41] Schwarz MJ, Guillemin GJ, Teipel SJ, *et al.* Increased 3-hydroxykynurenine serum concentrations differentiate Alzheimer's disease patients from controls [J]. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 2013, 263(4): 345–352.
- [42] Gulaj E, Pawlak K, Bien B, *et al.* Kynurenine and its metabolites in Alzheimer's disease patients [J]. *Adv Med Sci-Poland*, 2010, 55(2): 204–211.
- [43] Schuck PF, Tonin A, da Costa Ferreira G, *et al.* Kynurenines impair energy metabolism in rat cerebral cortex [J]. *Cellular and molecular neurobiology*, 2007, 27(1): 147–160.
- [44] Guillemin GJ, Smythe GA, Veas LA, *et al.* A beta 1–42 induces production of quinolinic acid by human macrophages and microglia [J]. *Neuroreport*, 2003, 14(18): 2311–2315.
- [45] Guillemin GJ, Brew BJ, Noonan CE, *et al.* Indoleamine 2, 3-dioxygenase and quinolinic acid immunoreactivity in Alzheimer's disease hippocampus [J]. *Neuropath Appl Neuro*, 2005, 31(4): 395–404.
- [46] Rahman A, Ting K, Cullen KM, *et al.* The excitotoxin quinolinic acid induces tau phosphorylation in human neurons [J]. *Plos One*, 2009, 4(7): e6344.
- [47] Baran H, Jellinger K, Deecke L. Kynurenine metabolism in Alzheimer's disease [J]. *Journal of neural transmission*, 1999, 106(2): 165–181.
- [48] Heyes MP, Saito K, Crowley JS, *et al.* Quinolinic Acid and Kynurenine Pathway Metabolism in Inflammatory and Noninflammatory Neurological Disease [J]. *Brain*, 1992, 115: 1249–1273.
- [49] Hartai Z, Juhász A, Rimanoczy A, *et al.* Decreased serum and red blood cell kynurenic acid levels in Alzheimer's disease [J]. *Neurochem Int*, 2007, 50(2): 308–313.
- [50] Wennstrom M, Nielsen HM, Orhan F, *et al.* Kynurenic Acid levels in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease or dementia with lewy bodies [J]. *International journal of tryptophan research*, 2014, 7: 1–7.

- [51] Yu D, Tao BB, Yang YY, *et al.* The IDO inhibitor coptisine ameliorates cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Journal of Alzheimer's disease*, 2015, 43(1): 291-302.
- [52] Kincses ZT, Vecsei L. Pharmacological therapy in Parkinson's disease: focus on neuroprotection [J]. *CNS neuroscience & therapeutics*, 2011, 17(5): 345-367.
- [53] Molina JA, Jimenez-Jimenez FJ, Gomez P, *et al.* Decreased cerebrospinal fluid levels of neutral and basic amino acids in patients with Parkinson's disease[J]. *J Neurol Sci*, 1997, 150(2): 123-127.
- [54] Widner B, Leblhuber F, Fuchs D. Increased neopterin production and tryptophan degradation in advanced Parkinson's disease[J]. *Journal of neural transmission*, 2002, 109(2): 181-189.
- [55] Lewitt PA, Li J, Lu M, *et al.* 3-hydroxykynurenine and other Parkinson's disease biomarkers discovered by metabolomic analysis [J]. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 2013, 28(12): 1653-1660.
- [56] Hartai Z, Klivenyi P, Janaky T, *et al.* Kynurenine metabolism in plasma and in red blood cells in Parkinson's disease [J]. *J Neurol Sci*, 2005, 239(1): 31-35.
- [57] Knyihar-Csillik E, Csillik B, Pakaski M, *et al.* Decreased expression of kynurenine aminotransferase-I (KAT-I) in the substantia nigra of mice after 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment[J]. *Neuroscience*, 2004, 126(4): 899-914.
- [58] Knyihar-Csillik E, Chadaide Z, Mihaly A, *et al.* Effect of 6-hydroxydopamine treatment on kynurenine aminotransferase-I (KAT-I) immunoreactivity of neurons and glial cells in the rat substantia nigra [J]. *Acta neuropathologica*, 2006, 112(2): 127-137.
- [59] Merino M, Vizuete ML, Cano J, *et al.* The non-NMDA glutamate receptor antagonists 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione and 2, 3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo (f) quinoxaline, but not NMDA antagonists, block the intrastriatal neurotoxic effect of MPP+ [J]. *Journal of neurochemistry*, 1999, 73(2): 750-757.
- [60] Samadi P, Gregoire L, Rassoulpour A, *et al.* Effect of kynurenine 3-hydroxylase inhibition on the dyskinetic and antiparkinsonian responses to levodopa in Parkinsonian monkeys [J]. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 2005, 20(7): 792-802.
- [61] Kanai M, Funakoshi H, Takahashi H, *et al.* Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice [J]. *Molecular brain*, 2009, 2: 8.
- [62] Wu HQ, Okuyama M, Kajii Y, *et al.* Targeting kynurenine aminotransferase II in psychiatric diseases: promising effects of an orally active enzyme inhibitor [J]. *Schizophrenia bulletin*, 2014, 40 Suppl 2: S152-158.

[修回日期]2015-10-21

·会 讯·

## 认仕医生重构医疗生态,改善医生生活 ——未来医生·新生活·发布会

2015年10月22日,一场以打造互联网新医疗生态圈,改善医生生活为探讨主题的“未来医生·新生活·发布会”在北京隆重召开。原卫生部副部长孙隆椿,军事科学院微生物流行病学研究所政委唐明山,解放军第306医院院长顾建文,中华医学会杂志社副社长刘冰,急诊科女超人于莺,九州通医药集团业务总裁耿鸿武,中国医疗器械商学院创始人朱明,万方医学专家委员会秘书长王光跃等嘉宾都做了主题发言,他们在畅想互联网+医疗各种可能的同时,也充分肯定了认仕医生平台打造互联网新医疗生态圈对于中国医疗发展的积极意义。

认仕医生董事长、CEO万马,万马表示他和他的团队一直在寻找可以真正帮助到医生,打破行业封闭,让医生获得应有回报与职业尊严的方法。CEO万马表示:连接的彼此需要信息,而医疗当中大量存在的信息都在医院当中,如何让医院中的信息发挥出价值,帮助更多患者找到好的医生,求得好药,快速看对病。2014年12月中国首个互联网+医生轻职业生活平台——认仕医生,正式上线。到目前为止已覆盖280万执业医师数据,20余万家医疗企业数据,数十个医学分会,并与网易、民生银行、三大运营商、国家密码局建立深度合作。截至到今天,认仕医生平台已签约北京、上海、广州、深圳、浙江、四川、湖北、湖南等地,签约多家顶级医院的医疗专家上千位。



# OPG/RANK/RANKL 系统在实验动物骨骼发育营养需要评估中的应用

吕建敏

(浙江中医药大学动物实验研究中心, 杭州 310053)

**【摘要】** OPG/RANK/RANKL 系统是调节骨代谢的主要信号通路,在维持骨形成和吸收之间的动态平衡中发挥着重要作用。本文主要综述 OPG/RANK/RANKL 的特点、作用机制,及其在骨代谢疾病、药物和相关营养因素干预效果评价等领域的应用现状,并展望将其引入实验动物骨骼发育营养评估领域的应用前景。

**【关键词】** OPG;RANK;RANKL;实验动物;骨骼发育;营养需要

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0076-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2015. 11. 016

## Prospect of OPG/RANK/RANKL system in assessing nutrient requirement for bone development in laboratory animal

LV Jian-min

(Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**【Abstract】** OPG/RANK/RANKL system is an important signaling pathway in regulating bone metabolism, which plays key role in maintaining bone homeostasis. This paper focus on characteristic and regulation mechanism of OPG/RANK/RANKL system, and its current utility in the areas of bone metabolism diseases, pharmacodynamic and nutrient facts assessment. Furthermore, the prospect of OPG/RANK/RANK system in assessing nutrient requirement for bone development in laboratory animal was elaborated.

**【Key words】** OPG;RANK;RANKL;Laboratory animal;Bone development;Nutrient requirement

骨骼发育需要多种营养成分参与,这些营养成分(如钙、磷等)不仅是骨骼的重要组成成分,而且对维持正常骨代谢具有重要意义<sup>[1]</sup>。骨形成和吸收之间的动态平衡是保持正常骨代谢必要条件,而这种平衡需要依靠相应的细胞通路来调节。OPG/RANK/RANKL 系统是近年发现的调节骨代谢的重要通路<sup>[2-3]</sup>,由肿瘤坏死因子家族的三个新成员—①护骨素(osteoprotegerin, OPG)、②核因子  $\kappa$ B 受体

活化子(receptor activator of NF- $\kappa$ B, RANK)和③核因子  $\kappa$ B 受体活化子配体(receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, RANKL)组成。目前,有关 OPG/RANK/RANKL 系统在骨代谢疾病病因学及药物疗效评价研究等领域报道很多,而在营养干预效果评价方面则报道较少。因此,本文在阐述 OPG/RANK/RANKL 系统的特点和作用机制的基础上,对近年来该系统在骨代谢疾病及相关药物和营养因素疗效

**【基金项目】** 浙江省科技厅资助项目基金(2014C37008);浙江中医药大学比较医学创新团队基金(XTD201301)。

**【作者简介】** 吕建敏(1971-),女,研究员,博士,研究方向:实验动物营养。E-mail: ljm6666@163.com。

评价的研究进展作一综述,将其广泛应用于与骨代谢相关的营养学研究提供理论依据。

## 1 OPG/RANK/RANKL 系统概述

### 1.1 OPG, RANK 和 RANKL 的结构与功能

#### 1.1.1 骨保护素 (OPG)

OPG 是由 Simonet 等<sup>[4]</sup>于 1997 年首先在大鼠上发现的一种新型肿瘤坏死因子,属于 TNF 受体 (tumor necrosis factor receptor, TNFR) 超家族成员。大鼠、人、和小鼠 OPG 同源性大于 85%<sup>[4]</sup>。OPG mRNA 可在小鼠皮肤、肝脏、肺和心脏等组织中表达<sup>[4]</sup>。OPG 蛋白属分泌型糖蛋白,无疏水跨膜区,氨基酸全长为 401 个残基,包含 21 个氨基酸的信号肽和 380 个氨基酸成熟肽<sup>[5]</sup>,共 7 个结构域(D1~D7): D1~D4 区为半胱氨酸含量丰富区域,位于 N 端,主要功能是抑制破骨细胞分化和骨吸收;D5、D6 区是位于 C 端的高度同源的两个区域,为死亡域。D7 区含有肝素结合位点,可通过 N 端糖基化,形成硫酸化二聚体<sup>[4]</sup>。

OPG 主要功能是作为诱饵受体调节配体和受体之间的相互作用。如 OPG 与 RANKL 具有高度结合能力,是 RANKL 的诱饵样受体,对 RANK 信号起着负调控的作用。体外实验表明 OPG 可抑制破骨细胞(osteoclast, OC)产生<sup>[4]</sup>。

#### 1.1.2 NF- $\kappa$ B 受体活化因子(RANK)

RANK 也属于 TNF 受体家族成员,是 RANKL 的信号受体,属 I 型跨膜蛋白。人的 RANK 蛋白是由 616 个氨基酸的组成的同源三聚体,其胞外结构由 208 个氨基酸组成,包含 4 个富含半胱氨酸的重复序列<sup>[6]</sup>,为 N-末端,主要功能是与 RANKL 的 C-端结合并产生传递信号。RANK 在细胞内的信号传递需要由细胞浆内的肿瘤坏死因子受体相关因子 (TRAFs) 介导<sup>[7]</sup>。RANK 蛋白的胞内结构域有 383 个氨基酸,在细胞膜末端的氨基酸胞质尾区可与 TRAF 家族中的 1、2、3、5 因子结合,使其活性被激活;在细胞膜近端 Pro-X-Glu-X-X-(aromatic/acid residue) 结合部与 TRAF6 结合<sup>[8]</sup>。RANK mRNA 广泛存在于胸腺、肝脏、骨骼肌、结肠、胰腺、肾上腺、心脏、乳腺、骨髓、肺、脑、肾脏、皮肤等组织器官<sup>[9]</sup>。

RANK 信号区别于其他 TNFR 超家族成员的一个重要特征是它不仅可激活典型的 NF- $\kappa$ B 信号通路,还可以激活非典型的 NF- $\kappa$ B 信号通路<sup>[10]</sup>。RANK 的主要功能是与 RANKL 结合形成 RANK-

RANKL 信号,在相关信号转导因子的参与下,促进 OC 的形成和骨吸收功能的加强<sup>[11]</sup>。

#### 1.1.3 RANK 的配体 (RANKL)

RANKL 是由 4 个独立的研究团队分别发现并加以命名的肿瘤坏死因子超家族成员<sup>[12]</sup>,因此还被称为肿瘤坏死因子活化诱导细胞因子 (TRANCE),破骨细胞分化因子 (ODF),护骨素配体 (OPGL)。

RANKL 蛋白属 II 型跨膜蛋白,与肿瘤坏死因子超家族 (TNFSF) 成员中的 TRAIL, FasL 和 TNF- $\alpha$  具有同源性<sup>[13]</sup>。人和小鼠的 RANKL 蛋白具有 83% 的同源性<sup>[11]</sup>,小鼠的 RANKL 蛋白包含 316 个氨基酸,由细胞外 C-端受体作用区域和跨膜区域组成。研究发现 RANKL 蛋白存在膜结合和分泌型两种形式<sup>[9]</sup>。RANKL 蛋白有 3 种不同的亚型,最短的亚型缺乏细胞内区域和跨膜区,以分泌型存在于细胞外基质中,对 RANKL 活性具有抑制作用<sup>[14]</sup>。

RANKL mRNA 可在多种组织表达,包括 T 淋巴细胞,成骨细胞,骨细胞,骨基质和肺<sup>[12]</sup>。RANKL 不仅可与功能性受体—RANK 结合,还可以与诱饵受体—OPG 结合<sup>[12]</sup>。RANKL 对骨代谢具有重要调节作用,它与 RANK 结合后产生的转录活化信号,可促进 OC 的分化成熟<sup>[13]</sup>。

### 1.2 OPG/RANK/RANKL 系统对骨代谢的调节机制

OPG/RANK/RANKL 系统在维持骨吸收和骨形成两者动态平衡,防止骨的丢失,保证正常的骨转化更新等方面起着关键调节作用<sup>[15]</sup>,并主导了破骨细胞 (OC) 的形成和活化的调控<sup>[16]</sup>。其作用机制是<sup>[16]</sup>:破骨细胞 (OC) 和成骨细胞 (osteoblast, OB) 分别介导骨的吸收和合成过程,RANKL 主要由成骨细胞前体细胞及骨髓基质细胞表达,RANK 主要由破骨细胞表达,RANKL 与 RANK 结合,可促进破骨细胞分化、融合及成熟,并抑制破骨细胞凋亡,从而促进骨的吸收;与此同时,成骨细胞也表达 OPG,OPG 实质上是一种受体诱饵,可与 RANKL 家族竞争性结合,抑制破骨细胞的形成、成熟。RANK 与 OPG 竞争性地与 RANKL 的结合,使骨吸收和骨形成处于平衡状态(图 1)。因此,正常情况下,骨组织中 RANKL、RANK 与 OPG 三者相互间比值保持恒定,一旦由于某种原因使这种稳态被打破,就可能引起骨代谢紊乱,导致相应骨代谢疾病的发生。如 OPG 缺失小鼠具有骨质疏松的骨病变<sup>[17]</sup>,其病因就是 OPG 缺失使体内 OPG、RANK、RANKL 相互间的

正常比例被打破, RANKL 与 RANK 结合的能力增强, 从而促进了 OC 的增殖。

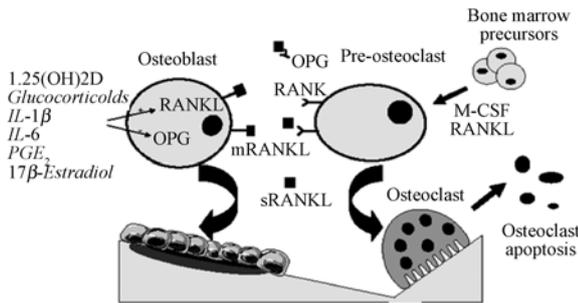


图1 OPG/RANK/RANKL 对骨代谢的调节机制<sup>[16]</sup>

Fig. 1 Regulatory mechanisms of bone remodeling: role of RANK, RANKL, and OPG in osteoclast activation

## 2 OPG/RANK/RANKL 系统在骨代谢疾病和药物治疗研究中应用现状

在骨代谢疾病研究方面, 大量资料显示, 许多先天遗传性骨病<sup>[18-19]</sup> (和后天获得性骨代谢疾病<sup>[20-21]</sup>) 都与 OPG/RANK/RANKL 系统发生异常密切相关。遗传性骨病变的产生主要就是 OPG/RANK/RANKL 系统中的相关基因编码发生了改变, 如家族扩张性骨质溶解症 (FEO) 的发病与 RANK 基因编码外显子 1 瞬间框内复制有关<sup>[18]</sup>; 少年 Paget's 病的骨病变主要由 OPG 基因编码发生突变所致<sup>[19]</sup>。OPG/RANK/RANKL 系统在骨质疏松和类风湿关节炎等后天获得性骨代谢疾病的发病过程中也起着重要作用。目前已证实, 绝经后妇女骨质疏松的发病原因是由于绝经后体内雌激素水平急剧下降, 引起骨髓细胞 RANKL 水平的上升, RANKL/OPG 的比值发生改变, 增强了 OC 的骨吸收功能<sup>[20]</sup>; 有关类风湿关节炎 (RA) 大鼠模型的研究也证明在 RA 形成过程中存在 RANK/RANKL/OPG 表达异常<sup>[21]</sup>, 该研究显示, RA 模型动物的关节滑液中 CD3 + T 细胞的 RANK、RANKL 表达明显升高, 并伴有 OPG 表达减少。

另一方面, 与骨代谢疾病相关的药效学研究显示, 一些与此相关的激素 (如甲状旁腺激素 (PTH)、糖皮质激素、雌激素) 和药物都可调节 OPG、RANKL、RANK 的表达。如甲状旁腺激素 (PTH) 可使 RANKL 表达持续升高, 而对 OPG 产生抑制作用, 导致骨吸收作用增强<sup>[22]</sup>; 王建忠等<sup>[23]</sup> 研究发现, 糖皮质激素可使 OPG mRNA 表达降低, RANKL mRNA 表达增高, 使 RANKL/OPG 比值上升, 从而加速破骨细胞的分化。Shu 等<sup>[24]</sup> 观察了一种植物异

黄酮类药物—鹰嘴豆芽素 A (BCA) 对卵巢切除大鼠骨丢失的保护作用, 发现 BCA 可降低大鼠股骨组织 RANKL/OPG mRNA 比值, 起到防止骨破坏作用; 冯建书等<sup>[25]</sup> 在研究仙灵骨葆的疗效时也证实该药物对骨质疏松模型大鼠的治疗作用是通过促进 OPG 的表达, 抑制 RANK 及 RANKL 的表达来实现。以上一系列研究表明 PG/RANK/RANKL 系统可较直观反映骨代谢疾病的发病原因和药物的干预效果, 是研究骨代谢特征的重要标志物。

## 3 OPG/RANK/RANKL 系统在骨骼发育营养需要研究中的应用前景

### 3.1 传统骨骼发育营养需要研究方法应用于实验动物的局限性

在骨骼发育营养需要 (如钙、磷等需要量的研究) 研究的方法学上, 传统动物营养学通常是通过“剂量—反应”、“析因法”及“平衡试验”等方法来研究和确定动物钙、磷需要量的推荐值, 主要采用的观察指标是动物的生长性能, 平衡状况指标、骨骼和血液指标<sup>[26]</sup>。以上方法虽然操作简单, 但存在工作量大, 准确度低, 不能精确反映钙、磷等相关营养摄入对骨代谢的影响等缺点。同时, 与经济动物的生产目的不同, 实验动物的饲养目的是为科学研究提供健康、标准的实验材料。在研究实验动物钙、磷需要量时, 不仅要考虑宏观水平上的标准化, 更需要关注一些微观的、更能精准反映骨代谢情况的生理指标。

### 3.2 OPG/RANK/RANKL 系统在骨骼营养学研究中的应用现状

随着生物技术的发展, 分子生物学为营养学研究提供了新的方法, 营养学研究的相关参数也从宏观向微观发展。一些调控营养物质代谢的关键基因和蛋白逐步受到人们的重视。如在钙、磷等营养成分与骨代谢关系的研究过程中, 人们发现钙、磷摄入水平的变化会引起体内一些激素和细胞因子水平的改变 (如甲状旁腺激素 (PTH)、降钙素 (CT)、 $1\alpha, 25$ -双羟维生素 D<sub>3</sub> 等), 它们作用于成骨细胞和/或破骨细胞, 进而影响骨代谢并使骨组织形态发生改变<sup>[27]</sup>。而以上因素对骨代谢的作用最终都是通过直接或间接调节 OPG、RANK 和 RANKL 的表达来实现的<sup>[28]</sup>。因此, OPG/RANK/RANKL 系统是反映骨代谢水平的核心环节。

目前, 有关营养因素对 OPG/RANK/RANKL 系统影响的研究报道较少, 但仅有的几个报道都充分

证明该系统可作为反映骨代谢水平的重要指针,用于营养干预对骨代谢影响的系统性研究。如 Shin-ichi 等<sup>[29]</sup>研究高磷日粮对大鼠骨代谢的影响,发现高磷日粮可显著提高大鼠股骨中 RANKL mRNA 的表达,导致破骨细胞数量增加和骨量的大量丢失。Dan Liang M 等<sup>[30]</sup>利用体外细胞培养方法,观察了微量元素锌对 MC3T3-E1 成骨细胞增殖的影响,发现适量的锌可使细胞内 OPG 基因和蛋白的表达显著提高,并推断锌可能是通过改变成骨细胞中的 OPG 表达水平来影响骨的重塑,且锌与骨骼形成和吸收的动态平衡间存在一定剂量关系。Spyridon Kanellakis 等(2012)<sup>[31]</sup>在研究富含钙、磷、VD 和 VK 的营养日粮对绝经妇女骨代谢影响时,首次以血清 OPG、RANKL 的水平为主要参数来评估营养干预对骨代谢的作用效果,为骨骼营养学的研究提供了新的途径。据此,我们可以将 OPG/RANK/RANKL 作为骨骼发育营养需要研究的一种新手段,通过定量研究某种营养成分对 OPG/RANK/RANKL 表达的影响,探询营养因素与 RANK/RANKL/OPG 表达之间的相关性,最终较精确地评估动物对该种营养成分的需要量。

#### 4 总结

OPG/RANK/RANKL 系统是近年来骨科学研究的重大发现,不仅为骨代谢疾病发病机制和治疗手段的研究开辟了新方向,也为骨骼营养方法学研究提供了一种全新思路。OPG/RANK/RANKL 系统在骨骼营养学研究中应用的不断完善,必将为营养学研究带来广阔的前景。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 付强, 刘源. 钙、磷与维生素 D 对动物骨代谢的影响研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(8): 502-505.
- [ 2 ] Morinaga T, Nakagawa N, Yasuda H, *et al.* Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor[J]. Eur J Biochem, 1998, 254: 685.
- [ 3 ] Yun TJ, Chaudhary PM, Shu GL, *et al.* OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40[J]. J Immunol, 1998, 161(11): 6113-6121.
- [ 4 ] Simonet WS, Lacey D, Dunstan C, *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density[J]. Cell, 1997, 89: 309-319.
- [ 5 ] Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, *et al.* Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor [J]. J Biochem, 1998, 273(9): 5117-5123.
- [ 6 ] Kanazawa K, Kudo A. Self-assembled RANK induces osteoclastogenesis ligand-independently[J]. J Bone Miner Res. 2005, 20(11): 2053-2060.
- [ 7 ] Galibert L, Tometsko ME, Anderson DM, *et al.* The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily[J]. J Biol Chem. 1998, 273(51): 34120-34127.
- [ 8 ] Ye H, Arron JR, Lamothe B, Cirilli M, *et al.* Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling [J]. Nature, 2002, 418(6896): 443-447.
- [ 9 ] Silva I, Branco JC. Rank/Rankl/opg: literature review [J]. Acta Reumatol Port, 2011, 36(3): 209-218.
- [ 10 ] 姚静, 侯加法. OPG/RANK/RANK 系统的研究进展[J]. 动物医学进展, 2006, 27(2): 5-9.
- [ 11 ] Boyce BF. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions[J]. J Dent Res, 2013, 92(10): 860-867.
- [ 12 ] Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, *et al.* A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function [J]. Nature, 1997, 390(6656): 175-179.
- [ 13 ] Wong BR, Josien R, Lee SY, *et al.* TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor[J]. J Exp Med, 1997, 186(12): 2075-2080.
- [ 14 ] Ikeda T, Kasai M, Suzuki J, *et al.* Multimerization of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis[J]. J Biol Chem, 2003, 278(47): 47217-47222.
- [ 15 ] Patrick Garnero. New developments in biological markers of bone metabolism in osteoporosis[J]. Bone, 2014, 66: 46-55.
- [ 16 ] Damaris Vega, Naim M. Maalouf, The Role of Receptor Activator of Nuclear Factor-B (RANK)/RANK Ligand/Osteoprotegerin: Clinical Implications [J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2007, 92(12): 4514-4521.
- [ 17 ] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, *et al.* Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification [J]. Genes Dev, 1998, 12(9): 1260-1268.
- [ 18 ] Hughes AE, Ralston SH, Marken J, *et al.* Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis[J]. Nat Genet, 2000, 24(1): 45-48.
- [ 19 ] Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, *et al.* Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease [J]. N Engl J Med, 2002, 347(3): 175-184.
- [ 20 ] Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal, *et al.* Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption of in early postmenopausal women[J]. Clin Invest, 2003, 111(8): 1120-1122.

- [21] 王建杰, 罗文哲, 齐建祥, 等. 川芎嗪对类风湿关节炎模型大鼠关节滑液 RANK/RANKL/OPG 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31:833-835.
- [22] Locklin RM, Khosla S, Riggs BL. Mechanisms of biphasic anabolic and catabolic effects of parathyroid hormone (PTH) on bone cells[J]. Bone, 2001, 28(Suppl):80.
- [23] 王建忠, 王坤正, 时志斌, 等. 长期应用糖皮质激素对大鼠股骨头骨组织 OPG/RANKL mRNA 表达的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2008, 12(6):629-632.
- [24] Shu-Jem Su, Yao-Tsung Yeh, Huey-Wen Shyu. The Preventive Effect of Biochanin A on Bone Loss in Ovariectomized Rats: Involvement in Regulation of Growth and Activity of Osteoblasts and Osteoclasts [J/OL]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, Article ID 594857, 10 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/594857>.
- [25] 冯建书, 付强, 闫世杰, 等. 仙灵骨葆对骨质疏松大鼠 OPG/RANK/RANKL 表达的影响[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(23): 4438-4441.
- [26] 赵智力, 王洪荣. 评定反刍动物钙、磷营养需要的指标[J]. 畜牧与饲料科学, 2005, 4: 14-16.
- [27] 俞路, 王雅倩, 章世元. 动物钙营养代谢的基因调控探讨[J]. 猪与禽, 2007, 27(4): 61-62.
- [28] L. C. Hofbauer, C. A. Kühne, V. Viereck. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases [J]. J Musculoskel Neuron Interact, 2004, 4(3):268-275.
- [29] Shin-ichi Katsumata, Ritsuko Masuyama, Mariko Uehara, et al. High-phosphorus diet stimulates receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand mRNA expression by increasing parathyroid hormone secretion in rats[J]. British Journal of Nutrition, 2005, 94, 666-674.
- [30] Dan LM, Yang AW, Guo BL, et al. Upregulates the Expression of Osteoprotegerin in Mouse Osteoblasts MC3T3-E1 Through PKC/MAPK Pathways[J]. Biol Trace Elem Res, 2012, 146: 340-348.
- [31] Spyridon Kanellakis, George Moschonis, Roxane Tenta, et al. Changes in Parameters of Bone Metabolism in Postmenopausal Women Following a 12-Month Intervention Period Using Dairy Products Enriched with Calcium, Vitamin D, and Phylloquinone (Vitamin K1) or Menaquinone-7 (Vitamin K2): The Postmenopausal Health Study II [J]. Calcif Tissue Int, 2012, 90: 251-262.

[修回日期]2015-10-15

·书讯·

## 《树鼩基础生物学与疾病模型》

由中国科学院昆明动物研究所郑永唐、姚永刚、徐林主编的《树鼩基础生物学与疾病模型》专著 2014 年 10 月已由云南科技出版社正式出版。该专著由中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机制国家重点实验室联合中国科学院武汉病毒研究所、中国科学院武汉物理与数学研究所、中国科学院心理研究所、中国科学技术大学、昆明医科大学、华南农业大学、昆明理工大学共 8 家单位的专家学者撰写而成。作者结合自己的最新研究成果,较全面地介绍了树鼩基础生物学和疾病模型研究相关领域的最新进展与发展趋势。

全书分为树鼩基础生物学和疾病模型两篇共 28 章。第一篇涵盖了树鼩的分子进化、群体遗传多样性、基因组学、免疫遗传、肿瘤相关基因、基础生理学和代谢数据、血液生理生化、乳腺生物学、生殖生理与辅助生殖技术、共生微生物学、组织学、脑形态及脑立体定位、脑结构演化与行为、情绪相关脑区肽能神经元等树鼩基础生物学的研究内容。第二篇探讨了抑郁症、药物成瘾、情绪相关精神疾病、病毒感染、细菌感染、乳腺癌、胶质母细胞瘤、血栓疾病、代谢性疾病等模型的创建以及转基因树鼩的研究。

本书可作为从事生物学、实验动物学、医药卫生等领域的科研人员、教师、研究生和高年级大学生参考用书。

中国科学院/云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室 (Emil: wangshuang@mail.kiz.ac.cn) 供稿



# HIV/SIV 入侵血脑屏障的分子机制探讨

黄丹, 丛喆, 徐珮, 金光, 高锡强, 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】** HIV/SIV 侵入中枢神经系统(CNS), 造成严重的神经病理学改变, 引发艾滋病相关的神经认知性障碍(HAND)。尽管有效地使用了高效抗逆转录病毒疗法, HAND 在慢性感染者中的发病率仍然很高。通常认为, HIV/SIV 在感染早期即可通过感染脑毛细血管内皮细胞或破坏内皮细胞间的紧密连接穿透血脑屏障进入 CNS, 但其机制尚不明确。目前有几种比较公认的假说, 包括病毒直接入侵假说、单核/巨噬细胞入侵假说、T 细胞诱导假说和液相入胞假说。本文将就 HIV/SIV 入侵血脑屏障的分子机制作一综述。

**【关键词】** BMECs; 血脑屏障; 趋化因子受体

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0081-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.11.017

## The molecular mechanism of HIV/SIV invading the blood brain barrier

HUANG Dan, CONG Zhe, XUE Pei, JIN Guang, GAO Xi-qiang, 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】** HIV/SIV invade the central nervous system, causing severe nerve pathological changes and AIDS related neural cognitive dysfunction (HAND). While effectively combined with highly active antiretroviral therapy, the incidence of HAND in the infected is still high. It is universally accepted that HIV/SIV could penetrate BBB (blood brain barrier) invading CNS in the early stage of infection through infecting brain capillary endothelial cells or just destroying the tight junction between the endothelial cells (ECs), however the mechanism of HIV/SIV invading BBB is unclear. There are several more renowned hypotheses towards HIV/SIV invading CNS, including virus directly infecting ECs hypothesis, monocyte/macrophage invasion hypothesis, T cells induced penetrating BBB hypothesis, and the hypothesis of liquid phase into ECs. This article will elucidate molecular mechanisms of HIV/SIV invading BBB.

**【Key words】** BMECs; BB; Mechanisms; Chemokine receptors

艾滋病是由人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染引起的获得性免疫缺陷综合症。HIV 进入人体后, 除攻击免疫系统外, 还伴有严重的神经侵袭性。HIV 侵入 CNS 导

致的认知障碍、行为和运动缺陷称为艾滋病相关的神经认知紊乱 (HAND)<sup>[1-4]</sup>。艾滋病相关的神经认知障碍伴随着艾滋病的疾病进程而产生, 尽管有效地使用了高效抗逆转录病毒治疗, HAND 在慢性感

**【基金项目】** 国家十二五科技重大专项课题 (2012ZX10004-501 和 2013ZX10004608-003)。

**【作者简介】** 黄丹, 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。

染者中的发病率仍高达 18% ~ 50%<sup>[4]</sup>。目前认为, HIV 在感染早期即可穿透血脑屏障(BBB), 侵入中枢神经系统(CNS), 但具体的作用机制, 依然不是十分明确。本文将就 HIV 穿透血脑屏障的途径, 目前比较公认的几种假说两个方面进行综述。

## 1 HIV/SIV 病毒入侵 BBB 进入 CNS 的途径

血脑屏障是介于血液和脑组织之间的对物质通过有选择性阻碍作用的动态界面, 由脑的连续毛细血管内皮(BCECs)及其细胞间的紧密连接、完整的基膜、周细胞以及星形胶质细胞脚板围成的神经胶质膜构成, 其中脑毛细血管内皮细胞是血脑屏障的主要结构。然而, 在 HIV/SIV 感染等某些病理情况下, 血脑屏障的结构和功能发生紊乱, 内皮细胞间的紧密粘合处开放, 屏障的通透性显著提高, 很多大分子物质可随血浆滤液渗出毛细血管, 这会破坏脑组织内环境的稳定, 造成严重后果, 那么 HIV/SIV 病毒是藉由何种途径进入脑组织内部的呢?

### 1.1 经过血管内皮细胞穿透 BBB 进入 CNS

内皮细胞是血脑屏障的主要结构, 这就决定了病毒如果要穿透血脑屏障, 进入中枢神经系统, 通过内皮细胞应该是一条必经之路。随着相继在内皮细胞、星形胶质细胞内发现病毒颗粒, 分子生物学的证据显示病毒可以通过感染内皮细胞继而在基底膜释放进入到 CNS。Zink<sup>[5]</sup>等人从感染 SIV/17E-Br(即 SIVmac239/17E)6 个月后发生脑炎的猴脑组织血管内皮细胞中检测到病毒 RNA。SIV/17E-Br 感染原代脑内皮细胞 7 d 后上清中检测到病毒载量和 P27 蛋白, 同时电镜观察到脑内皮细胞内存在病毒颗粒提供了更加确凿的证据。进一步证明, HIV/SIV 病毒可以通过感染内皮细胞, 继而穿透血脑屏障, 侵入 CNS。

游离病毒的感染和细胞介导的感染是病毒传播的两种主要方式。研究发现, 细胞介导的感染比游离病毒的直接感染, 感染能力强 10 ~ 1000 倍<sup>[6]</sup>, 抑制细胞间的接触能有效抑制病毒的复制及传播<sup>[7]</sup>。携带 HIV-1 病毒的 DC 细胞和 T 细胞与正常的 T 细胞之间, 通过形成病毒突触这种特殊的结构增强感染<sup>[8-12]</sup>。病毒突触(virological synapse)是肌动蛋白依赖的感染细胞 Gag、Env 极化于与未感染细胞接触位点, 并与其 CD4 受体结合形成的一种特殊结构<sup>[13]</sup>。整合素(LFA-1)和 ICAMs 以及 Envs 与 CD4 受体的结合能够促进病毒蛋白在粘附位点的

聚集、组装和病毒在细胞间的转移。这种传播方式有利于病毒对中和抗体的抵抗<sup>[14-15]</sup>。感染的 T 细胞或单核/巨噬细胞和血脑屏障的主要组成成分内皮细胞能否通过细胞间的粘附形成病毒突触, 高效感染内皮细胞目前还不清楚, 有待进一步研究。

### 1.2 破坏内皮细胞间的紧密连接入侵 BBB 进入 CNS

脑微血管内皮细胞之间的紧密连接(tight junction, TJ)是血脑屏障的结构与功能的基础。在病理情况下, 内皮细胞间的紧密粘合处开放, 通透性显著提高, 这会破坏脑组织内环境的稳定, 造成严重后果。ZO-1 是构成紧密连接的重要成分之一, 能与其同源体 ZO-2、ZO-3 一起, 为紧密连接的许多跨膜蛋白和细胞质紧密连接蛋白搭建具有连接作用的脚手架样平台<sup>[16]</sup>。如果其水平下降或活性降低均会影响细胞间紧密连接结构的稳定性和细胞功能的完整性。

对比 HIV 未感染者和感染者(又分脑炎和非脑炎)的 CNS 中 ZO-1 蛋白免疫组织化学结果, 发现在 HIV 患者(HIV 脑炎患者)的皮质下白质区、基底节和皮质的灰质区均有 ZO-1 蛋白免疫着色的缺失或断裂<sup>[17]</sup>。进一步研究表明 HIV/SIV 完整的病毒颗粒, 分泌型 Tat 蛋白, Nef 蛋白均可以使得紧密连接蛋白 ZO-1 表达量下降<sup>[18]</sup>。由此看来, ZO-1 的表达下降导致紧密连接的破坏, 继而导致 HIV/SIV 藉此进入 CNS 也是可能的途径之一。

## 2 HIV/SIV 入侵 BBB 的机制

HIV 可以通过感染血管内皮细胞或破坏血脑屏障进入脑组织, 引起艾滋病性神经系统综合症(HIV neurosyndrome, HNS)<sup>[1]</sup>。然而, HIV 入侵 BBB 是以游离病毒的形式, 还是借助了其他的载体呢? 目前有几种比较公认的假说。

### 2.1 病毒直接入侵假说

病毒感染的高峰期甚至平台期, 机体外周血内都存在大量的游离病毒, 这在相当长时间内为病毒感染进入内皮细胞提供了机会。很多研究都在脑部毛细血管内皮细胞内发现了 HIV/SIV 病毒的存在<sup>[19]</sup>, 体外实验也多次证实了 HIV 病毒具备感染脑血管内皮细胞的能力<sup>[20-21]</sup>, SIV 的变异株也可以直接感染 BMECs<sup>[22-23]</sup>。然而, BMECs 并没有与 Gp120 结合的 CD4 分子, 在缺乏 CD4 受体的情况下, 病毒是如何感染的呢?

HIV/SIV 感染除了需要 CD4 分子外,还需要细胞膜上的辅助受体的参与,如趋化因子受体家族中的 CXCR4、CCR5、CCR3 和 STRL33 (BONZO) 等<sup>[24]</sup>,这些分子在脑血管内皮细胞上都有表达。如作为 HIV 感染的主要辅助受体的 CXCR4 和 CCR5,通常与 CD4 分子协同作用介导 HIV 病毒进入靶细胞<sup>[25]</sup>。但在 CD4 缺乏的情况下,某些病毒或其变异株可以通过 CD4 非依赖的途径感染。1997 年 Edinger A. L.<sup>[24]</sup> 就发现,神经嗜性毒株 SIV/17E-Fr (SIV/17E-Br 的单克隆株) 可以通过 CD4 非依赖,CCR5 依赖的途径感染脑毛细血管内皮细胞。HIV-2 的突变毒株 HIV-ROD 也被证明可以感染 CXCR4 顺转的猫肾细胞系 CCC 细胞<sup>[26]</sup> 和 CD4<sup>-</sup>/CCR5<sup>-</sup>/CXCR4<sup>+</sup>T 细胞<sup>[27]</sup>。以上这些研究结果为包膜蛋白 Gp120 和 CXCR4 或 CCR5 分子的直接作用提供了重要证据,证明 HIV 病毒在体外可以通过 CD4 非依赖的途径感染 CD4<sup>-</sup> 细胞。

然而迄今为止,除 CXCR4 或 CCR5 分子外,其他的辅助受体,如 STRL33 和 CCR3 分子都被认为是 CD4 依赖的辅助受体,即只有在 CD4 分子存在的情况下才能介导病毒的感染,在 CD4 缺乏的情况下,这些分子是否能单独介导感染,还没有确凿的证据。

针对该假说的另一个疑点是细胞外循环流动的 HIV/SIV 为什么能够长时间存活且有效地感染脑血管内皮细胞,内皮细胞上的糖蛋白似乎解决了这一问题。某些蛋白聚糖,如硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (HSPG)、硫酸软骨素蛋白聚糖 (CSPG) 等在 HBMECs 细胞上高表达,表达量可达 CXCR4 和 CCR5 的十倍以上。他们能够长时间约束和保护循环流动中的 HIV 免受降解<sup>[28]</sup>。进一步研究发现,HSPG 和 CSPG 与 Gp120 结合,促进 BMECs 对病毒的吸附、内化和转胞吐作用。当使用肝素酶和软骨素酶分别处理 BMECs 细胞后,将抑制病毒对内皮细胞的感染<sup>[29]</sup>。这表明细胞表面高表达的蛋白聚糖促进 HIV-1 病毒吸附于 BMECs,进而增强感染。

## 2.2 单核/巨噬细胞 (monocytes/macrophages, M/MΦ) 入侵假说

血液和组织中的单核/巨噬细胞是病毒的重要储存库之一<sup>[30]</sup>。在 HIV/SIV 感染者(猴)脑组织中会发现血管周围有单核/巨噬细胞聚集的现象<sup>[31]</sup>,且目前为止脑组织中发现的病毒均为巨噬细胞 (R5) 嗜性。因此有学者提出感染的单核/巨噬细胞进入脑组织,是发生脑部 HIV/SIV 感染的主要方

式,继而引起脑内与巨噬细胞同源的小胶质细胞等的进一步感染,引发一系列感染症状。

研究表明,HIV 感染的单核/巨噬细胞可以高表达 CD16 和 CX3CR1 分子、唾液酸化和硫酸化的低聚糖乳糖胺<sup>[32-33]</sup>、分泌性 Tat 蛋白和低水平的 NO<sup>[34-35]</sup>。CD16 和 CX3CR1 可以分别和 CNS 产生的趋化因子 CXCL12 和 CX3CL1 结合,这种结合能促进 HIV 感染的单核/巨噬细胞与脑部微血管内皮细胞有较高频率的接触和黏附。CXCL12 可以通过 β2 整合蛋白调节血流中单核细胞迁移并黏附到 BMVEC。Tat 蛋白和 NO 则诱导 BMVEC 高表达黏附分子 E-选择素, E-选择素可以和 HIV 感染的单核/巨噬细胞产生的细胞间黏附分子 (intracellular adhesion molecules, ICAMs) 发生结合,使其更加牢固的粘附在 BMVEC 表面<sup>[36-37]</sup>。NO 可以扩张血管,使血液循环中的单核/巨噬细胞流动速度减慢,这也提高了与 BMVEC 的黏附频率。

单核/巨噬细胞在黏附到 BMVEC 以后,一方面可以募集更多的感染巨噬细胞到局部 BMVEC,另一方面可以产生及促进其他细胞分泌大量的促炎分子,如 TNF-α, IL-1, IFN-γ 等<sup>[38]</sup>。这些促炎分子一方面介导炎症反应,进一步破坏紧密连接,另一方面可以进一步活化 BMVEC 和星形胶质细胞。例如, IFN-γ 能够上调 BMVEC 趋化因子受体 CCR3 和 CCR5 的表达,进而增强感染和产生毒性。IFN-γ、HIV 的膜蛋白 Gp120、激活的促分裂原活化蛋白激酶 P38 共同作用还能够对 BMEC 产生毒性。Yang<sup>[39]</sup> 发现 Gp120 能够激活 BMVEC 的信号转导和 ATF-1,并且释放 IL-8 和 IL-6 增强单核/巨噬细胞穿透 BBB。因此 Gp120 蛋白能够通过多途径来影响 BBB 正常功能的发挥,进而促使单核/巨噬细胞细胞入侵 BBB<sup>[40]</sup>。除 Gp120 蛋白以外,病毒的 Nef 蛋白和 Vpr 蛋白在单核/巨噬细胞入侵过程中也发挥了一定的作用<sup>[41]</sup>。可见,单核/巨噬细胞入侵 BBB 是一个很多途径而复杂的过程,具体的机制还不是十分清楚。

## 2.3 T 细胞诱导假说

CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞是 HIV/SIV 攻击的靶细胞,也被认为是循环系统中最主要的 HIV 贮存库。当血脑屏障出现损坏时,CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞进入脑内,产生免疫应答<sup>[42]</sup>。在此过程中,IL-2 的量明显下降,T 细胞受体发生交联,T 细胞受体与 HIVGp120 结合,这些综合因素导致 T 细胞发生凋亡。T 细胞凋亡是

神经系统控制脑部炎症特有的机制。此时血液中的巨噬细胞可以进入 CNS 并且对凋亡产物进行吞噬。T 细胞凋亡小体内的 HIV DNA 以非整合的形式存在细胞质中<sup>[43]</sup>, 可以耐受巨噬细胞的吞噬和水解并且能在其中产生感染性的病毒<sup>[44]</sup>。然而迄今为止, 在脑组织中很少检出 T 淋巴细胞, 且脑中发现的病毒大多为巨噬细胞嗜性 (R5 嗜性), 而非淋巴细胞嗜性 (X4 嗜性), 这也使得人们对这一假说质疑不断。

#### 2.4 液相入胞假说

HIV 进入机体的第四个机制是毛细血管内皮细胞和星形胶质细胞的内摄作用或者是巨吞饮作用促使 HIV 跨越血脑屏障, 然后将病毒转移到 CNS 实质<sup>[45]</sup>。BBB 的巨吞饮依赖于完整的脂筏和促分裂原活化蛋白激酶信号转导途径, HIV 通过巨吞饮进入 CNS 表现为脑部毛细血管内皮细胞的微绒毛数量的增加, 丰富的细胞质囊泡。通过二甲基氨基吡咪抑制膜表面的  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  泵可以抑制 HIV 侵入 CNS, 这也间接地证明 HIV 是借助于  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  泵进入 CNS<sup>[46]</sup>。然而内皮细胞内病毒粒子的存在也可以归因为病毒直接感染这些细胞。由于脑血管内皮细胞的胞饮作用较弱, 这一机制的可能性存疑。

#### 2.5 小结

免疫缺陷病毒除攻击人体免疫系统外, 也会进入神经中枢系统, 造成神经性损伤。但 HIV/SIV 侵入血脑屏障的机制尚不明确。目前认为, HIV/SIV 可以通过单独使用趋化因子受体 CXCR4、CCR5 等直接感染 BMECs, 进而侵入中枢神经系统; 也可能破坏紧密连接, 以游离病毒或感染的单核-巨噬细胞和  $\text{CD4}^+ \text{T}$  淋巴细胞的形式将病毒携带进入 CNS, 甚至可能通过内皮细胞的内吞以及通过感染细胞和内皮细胞接触形成病毒学突触使病毒进入。总之, HIV/SIV 病毒进入脑组织应该是一个多因素、多途径共同作用的结果, 彻底弄清楚病毒的感染机制还需要进一步深入研究。

#### 参考文献:

[ 1 ] Ances BM, Ellis RJ. Dementia and Neurocognitive Disorders Due to HIV-1 Infection [ J ]. *Semin Neurol*, 2007, 27 ( 1 ): 86 - 92.

[ 2 ] Valcour V, Chalermchai T, Sailasuta N, *et al.* Central Nervous System Viral Invasion and Inflammation During Acute HIV Infection [ J ]. *J Infect Dis*, 2012, 206 ( 2 ): 275 - 282.

[ 3 ] Mattson MP, Haughey NJ, Nath A, *et al.* Cell death in HIV dementia [ J ]. *Cell Death Differ*, 2005, 12 ( 1 ): 893 - 904.

[ 4 ] Zayyad Z, Spudich S. Neuropathogenesis of HIV: From Initial Neuroinvasion to HIV-Associated Neurocognitive Disorder (HAND) [ J ]. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2015, 12 ( 1 ): 16 - 24.

[ 5 ] Mankowski JL, Speiman JP, Zink MC, *et al.* Neurovirulent simian immunodeficiency virus replicates productively in endothelial cells of the central nervous system in vivo and in vitro [ J ]. *Virology*, 1994, 68 ( 12 ): 8202 - 8208.

[ 6 ] Anderson DJ. Modeling mucosal cell-associated HIV type 1 transmission in vitro [ J ]. *J Infect Dis*, 2014, 15 ( 210 ): 648 - 653.

[ 7 ] Sourisseau M, Sol-Foulon N, Porrot F, *et al.* Inefficient human immunodeficiency virus replication in mobile lymphocytes [ J ]. *Virology*, 2007, 81 ( 2 ): 1000 - 1012.

[ 8 ] McDonald D, Wu L, Bohks SM, *et al.* Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions [ J ]. *Science*, 2003, 300 ( 5623 ): 1295 - 1297.

[ 9 ] Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, *et al.* Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton [ J ]. *Science*, 2003, 299 ( 5613 ): 1713 - 1716.

[ 10 ] Wolfgang Hübner, Gregory P, McNeerney, *et al.* Quantitative 3D Video Microscopy of HIV Transfer Across T Cell Virological Synapses [ J ]. *Science*, 2009, 323 ( 5922 ): 1743 - 1747.

[ 11 ] Do T, Murphy G, Earl LA, *et al.* Three-dimensional imaging of HIV-1 virological synapses reveals membrane architectures involved in virus transmission [ J ]. *J Virol*, 2014, 88 ( 18 ): 10327 - 10339.

[ 12 ] Politch JA, Marathe J, Anderson DJ. Characteristics and quantities of HIV host cells in human genital tract secretions [ J ]. *J Infect Dis*, 2014, 15 ( 210 ): 609 - 615.

[ 13 ] Alvarez RA, Barría MI, Chen BK, *et al.* Unique Features of HIV-1 Spread through T Cell Virological Synapses [ J ]. *PLoS pathogens*, 2014, 10 ( 12 ): 1 - 4.

[ 14 ] Dale BM, McNeerney GP, Thompson DL, *et al.* Cell-to-cell transfer of HIV-1 via virological synapses leads to endosomal virion maturation that activates viral membrane fusion [ J ]. *Cell Host Microbe*, 2011, 10 ( 6 ): 551 - 562.

[ 15 ] Durham ND, Yewdall AW, Chen P, *et al.* Neutralization Resistance of Virological Synapse-Mediated HIV-1 Infection Is Regulated by the gp41 Cytoplasmic Tail [ J ]. *J Virol*, 2012, 86 ( 14 ): 7484 - 7495.

[ 16 ] Gonzalez ML, Betanzos A, Avila-Flores A, *et al.* MAGUK proteins: structure and role in the tight junction [ J ]. *Semin Cell Dev Biol*, 2000, 11 ( 4 ): 315 - 324.

[ 17 ] Dallasta, LM, Pizarro LA, Espien JE, *et al.* Blood-brain barrier tight junction disruption in human immunodeficiency virus-1 encephalitis [ J ]. *Am J Pathol*, 1999, 155 ( 6 ): 1915 - 1927.

[ 18 ] Pu H, Tian J, Andras IE, *et al.* HIV-1 Tat protein-induced alterations of ZO-1 expression are mediated by redox-regulated ERK 1/2 activation Cereb [ J ]. *Blood Flow Metab*, 2005, 25 ( 10 ): 1325 - 1335.

[ 19 ] Wiley CA, Schrier RD, Nelson JA, *et al.* Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of

- acquired immune deficiency syndrome patients [J]. PNAS, 1986, 83(18):7089-7093.
- [20] Moses AV, Bloom FE, Pauza CD, *et al.* Human immunodeficiency virus infection of human brain capillary endothelial cells occurs via a CD4/galactosylceramide-independent mechanism [J]. PNAS, 1993, 90(22):10474-10478.
- [21] Poland SD, Rice GP, Dekaban GA, *et al.* HIV-1 infection of human brain-derived microvascular endothelial cells in vitro [J]. Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1995, 8(5):437-445.
- [22] Edinger AL, Mankowski JL, Doranz BJ, *et al.* CD4-independent, CCR5-dependent infection of brain capillary endothelial cells by a neurovirulent simian immunodeficiency virus strain [J]. PNAS, 1997, 94(26):14742-14747.
- [23] Strelow LI, Watry DD, Fox HS, *et al.* Efficient infection of brain microvascular endothelial cells by an in vivo-selected neuroinvasive SIVmac variant [J]. Neurovirol, 1998, 4(3):269-280.
- [24] Edinger AL, Mankowski JL, Doranz BJ, *et al.* CD4-independent, CCR5-dependent infection of brain capillary endothelial cells by a neurovirulent simian immunodeficiency virus strain [J]. PNAS, 1997, 94(26):14742-14747.
- [25] Deng H, Liu R, Ellmeier W, *et al.* Identification of a major coreceptor for primary isolates of HIV-1 [J]. Nature, 1996, 381(6584):661-666.
- [26] Reeves JD, McKnight A, Potempa S, *et al.* CD4-independent infection by HIV-2 (ROD/B): use of the 7-transmembrane receptors CXCR-4, CCR-3, and V28 for entry [J]. J Virol, 1997, 231(1):130-134.
- [27] Borsetti A, Parolin C, Ridolfi B, *et al.* CD4-independent infection of two CD4(-)/CCR5(-)/CXCR4(+) pre-T-cell lines by human and simian immunodeficiency viruses [J]. J Virol, 2000, 74(14):6689-6694.
- [28] Argyris EG, Acheampong E, Nunari G, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 enters primary human brain microvascular endothelial cells by a mechanism involving cell surface proteoglycans independent of lipid rafts [J]. J Virol, 2003, 77(22):12140-12151.
- [29] Bobardt MD, Salmon P, Wang L, *et al.* HIV-1 latency in monocytes/macrophages [J]. J Virol, 2004, 78(12):6567-6584.
- [30] Kumar AW, Abbas, Herbein G, *et al.* HIV-1 latency in monocytes/macrophages [J]. Viruses, 2014, 6(4):1837-1860.
- [31] 刘克剑, 丛喆, 金光, 等. 表现神经症状的 SIVmac251 感染猴大脑基底节病毒 gp120 序列变异分析 [J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(4):271-275.
- [32] Varki A. Selectin ligands [J]. PNAS, 1994, 91(16):7390-7397.
- [33] Patel TP, Goelz SE, Lobb RR, *et al.* Isolation and characterization of natural protein-associated carbohydrate ligands for E-selectin [J]. Biochemistry, 1994, 33(49):14815-14824.
- [34] Hofman FM, Wright AD, Dohadwala MM, *et al.* Exogenous tat protein activates human endothelial cells [J]. Blood, 1993, 82(9):2774-2780.
- [35] Boven LA, Gomes L, Hery C, *et al.* Increased peroxynitrite activity in AIDS dementia complex: implications for the neuropathogenesis of HIV-1 infection [J]. Immunol, 1999, 162(7):4319-4327.
- [36] Eugenin EA, Osiecki K, Lopez L, *et al.* CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 mediates enhanced transmigration of human immunodeficiency virus (HIV)-infected leukocytes across the blood-brain barrier: a potential mechanism of HIV-CNS invasion and NeuroAIDS [J]. Neurosci, 2006, 26(4):1098-1106.
- [37] Gabriel G, Marcus K. Molecular mechanisms of neuroinvasion by monocytes-macrophages in HIV-1 infection [J]. Retrovirology, 2010, 7(30):1-11.
- [38] Michaelis B, Levy JA. HIV replication can be blocked by recombinant human interferon beta [J]. AIDS, 1989, 3(1):27-31.
- [39] Kanmogne GD, Schall K, Leibhart J, *et al.* HIV-1 gp120 compromises blood-brain barrier integrity and enhances monocyte migration across blood-brain barrier: implication for viral neuropathogenesis [J]. Cereb Blood Flow Metab, 2007, 27(1):123-134.
- [40] King JE, Eugenin EA, Buckner CM, *et al.* HIV tat and neurotoxicity [J]. Microbes Infect, 2006, 8(5):1347-1357.
- [41] Joseph AM, Kumar M, Mitra D, *et al.* Nef: "necessary and enforcing factor" in HIV infection [J]. Curr HIV Res, 2005, 3(1):87-94.
- [42] Tomimoto H, Akiguchi I, Akiyama H, *et al.* T-cell infiltration and expression of MHC class II antigen by macrophages and microglia in a heterogeneous group in leukoencephalopathy [J]. Am J Pathol, 1993, 143(2):579-586.
- [43] Pang S, Koyanagi Y, Miles S, *et al.* High levels of unintegrated HIV-1 DNA in brain tissue of AIDS dementia patients [J]. Nature, 1990, 343(6253):85-89.
- [44] Kombluth RS, Rhodes J, Richman DD, *et al.* Recovery of infectious HIV following the passage of apoptotic cellular debris through phagocytic macrophages [J]. Chest, 1993, 103:102-103.
- [45] Marechal V, Prevost MC, Petit C, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis [J]. J Virol, 2001, 75(22):11166-11177.
- [46] Liu NQ, Lossinsky AS, Popik W, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. [J]. J Virol, 2002, 76(13):6689-6700.



# 实验动物运输福利的研究进展

李彩云, 潘学莹, 张超, 宋征, 常艳

(国家上海新药安全评价研究中心, 上海 201203)

**【摘要】** 运输是实验动物行业的必要环节, 运输过程的装卸、装载密度、运输时间、禁食禁水、运输笼盒、环境温度等因素如控制不当, 均会使实验动物产生应激。本文介绍了国内外动物运输福利法规, 从运输过程中对被运输动物产生应激影响的因素进行了探讨, 总结了实验动物运输中减少动物应激的措施和方法。

**【关键词】** 运输; 动物福利; 应激

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0086-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.11.018

## Research progress of transportation welfare for laboratory animal

LI Cai-yun, PAN Xue-ying, ZHANG Chao, SONG Zheng, CHANG Yan

(National Shanghai Center for New Drug Safety Evaluation and Research, Shanghai, 201203, China)

**【Abstract】** Transportation is essential in laboratory animal field. If control is improperly, stress occurs to the laboratory animal in terms of loading and unloading, density, transporting duration, fasting, handle cages and temperature, etc. during transportation. This article elaborates laws and regulations on animal transportation both domestically and oversea, discusses the factors that cause stress to laboratory animals during transportation, summarizes measures and methods to minimize the stress to lab animals in transportation.

**【Key words】** Transportation; Animal welfare; Stress

现代生物技术和生物医药的快速发展推动了生物医药研究中基础的研究体系实验动物行业的发展。实验动物在国际和国内的增长显著, 尤其是近20年国际知名医药企业的涌入, 全面提升了国内实验动物行业的整体水平。实验动物行业的发展必然导致生产和使用的分离, 运输是衔接实验动物生产和使用的必要环节。运输环节对于实验动物的福利和健康的影响和干扰已受到公认。本文主要关注机构之间实验动物运输, 介绍国内外动物运输福利法规、运输对于动物产生的影响, 以及对如何改善和提升动物运输福利的各个关键方面进行

概括和论述。

### 1 国内外动物运输法规

#### 1.1 国际法规

针对动物运输福利法的规定以欧盟的法律法规早而齐全, 从最早的1964年出台的64/432/EEC, 经过多次修改和补充, 到现行的1/2005/EC法案, 内容包括了对动物运输车辆、运输物种、生理阶段、年龄和性别、运输时间、食水供应、停车休息、装卸设施、运输记录装置、防疫、检疫等做了相应的细致规定<sup>[1]</sup>。此外1988年德国颁布《保护在容器中的

[作者简介] 李彩云(1983-), 女, 兽医学硕士, 助理研究员, 国家上海新药安全评价研究中心, E-mail: cyli@ncdser.com。

[通讯作者] 常艳(1974-), 女, 药理学博士, 研究员, AAALAC检查顾问, 国家上海新药安全评价研究中心, E-mail: ychang@ncdser.com。

运输动物的条例》中列出动物在运输中的福利要求;1997 年英国颁布了专门的《动物运输法案》,限定了运输时间和运输过程中的动物福利要求<sup>[2]</sup>。实验动物运输参考和使用的法律法规,航空运输方面以 IATA 列出的国际航空运输活体动物的规章制度是商业航空运输活体动物的通用国际标准,内容包括包装箱的设计和结构、温度、食物和饮水等有要求<sup>[3]</sup>;AVMA 则要求在动物运输过程中有专业人员陪同,合理的保定动物和运输过程中动物福利保障,对于相关人员需要提供专业培训等<sup>[4]</sup>;AAALAC 指南 Guide 中,单独列出动物运输章节,对于动物运输前准备、运输过程中的防护和福利保障以及人员培训等方面都提出了一些要求和规范;国际兽医局对于动物运输中动物的饮水、饮食和运输包装盒、安全等方面也有明确的规定和指导<sup>[5]</sup>;而对于某些特定阶段或条件下的运输考虑,如动物处于怀孕或围产期、老年动物、或处于疾病期的动物、转基因动物、手术动物等运输需要有特殊的指导和要求<sup>[6]</sup>。

## 1.2 国内法规

国内在动物运输方面的法规相对起步晚。在我国针对动物运输相关内容有提到的法律法规有《进出境动植物检疫法》、《动物防疫法》、《野生动物保护法》;《水生野生动物保护实施条例》、《进出境动植物检疫法实施条例》、《水路运输管理条例》、《实验动物管理条例》;民航总局《中国民用航空货物国内运输规则》、国家林业局《活体野生动物运输要求》、农业部《动物检疫管理办法》和《动物免疫标识管理办法》等部门规章制度的内容主要涉及动物运输及其过程中的检疫和免疫问题<sup>[7]</sup>。上述我国的法律法规仅包含动物运输过程中的检疫、防疫、标识等方面的规定和一些规定运输物种的限制,对动物运输过程中的福利问题几乎没有涉及,且内容描述简单。目前我国尚无明确的动物运输法规。而涉及实验动物运输的法规是 1988 年我国实验动物行业唯一的一部国家行政法规《实验动物管理条例》,第二十一条规定“实验动物运输工作应当有专人负责。实验动物的装运工具应当安全、可靠。不得将不同品种、品系或者不同等级的实验动物混合装运”。其他部分省市修订的地方立法,如《北京实验动物管理条例》、《湖北省实验动物管理条例》和《云南省实验动物管理条例》,关于实验动物运输的要求与《条例》基本一致。《实验动物环境及设施》国标第 9 章节提出的实验动物运输的要求,包含了

对于动物笼具结构、材质、和设计要求,运输工具配备空调设备的要求,运输超过 6 h,需要提供饮食和饮水<sup>[8]</sup>。相对于国际动物运输法规,国内法律法规略显简单,对于实验动物运输过程的指导、辨别和借鉴效果不明显。

## 2 运输对实验动物的影响

运输对实验动物造成的最重要的影响是应激。运输应激的外在表现为反应激烈、恐惧或抑郁、异常发声、攻击性加强、心跳和呼吸频率加快、体温变化等;运输后动物饮食饮水减少或废绝、疲乏衰弱、腹泻或排便减少、脱水、甚至导致疾病无法恢复、死亡<sup>[9]</sup>。造成的体内变化表现为各种酶和激素的异常,如皮质醇、皮质酮、加压素、甲状腺激素、若干转氨酶、脱氢酶、肌酸磷酸激酶等浓度变化;此外运输饥饿造成游离脂肪酸、beta-羟基丁酸酯、血糖、尿素以及血液生化参数的变化<sup>[10]</sup>。以上运输应激不仅妨碍实验动物身心健康,降低其福利水平,且可导致对实验研究的背景性干扰。

### 2.1 装卸

动物敏锐的感官使得对任何不熟悉的景象和声音异常警觉。装卸过程中动物面对不熟悉的景象和声音不可避免。一些不适当的操作可能会使动物恐慌。装卸对大型的高智商的实验动物造成应激更大,例如比格犬在装卸车的时候心率达到最高。非人灵长类因运输应激导致的行为改变可以持续到抵达后超过 1 个月<sup>[11]</sup>。

### 2.2 装载密度

装载密度决定了拥挤的程度,一般情况下幼龄动物对于拥挤的适应性比成年动物更强<sup>[12]</sup>。装载密度主要影响心率和血浆乳酸浓度,高密度装载的动物心率和乳酸浓度比中等密度和低密度的高;处于装载车辆后面或中部圈栏的动物比处于前面圈栏的动物心率和乳酸浓度高<sup>[7]</sup>。

### 2.3 禁食禁水

出于方便运输的目的,很多时候对动物采用禁食禁水运输的方式。研究证明休息、食物和饮水可以不同程度地改善动物福利<sup>[7]</sup>。欧盟现行规定运输动物的饲喂间隔和饮水间隔分别不超过 24 h 和 12 h<sup>[11]</sup>。中国国标则要求运输时间超过 6 h 以上需要提供饮食和水<sup>[8]</sup>。提供食物和饮水不仅补充营养和水分,也是缓解动物紧张情绪和应激反应的手段。

## 2.4 颠簸或震动

运输过程中的振动和加速度对动物的影响一直存在。有研究显示运输过程中震动的频率使猪心率显著提高,加速度会使这种影响更加显著;粗糙路面上运输的牛的 pH 和心率比在柏油路面运输的值均要高<sup>[7]</sup>。此外,动物的头部朝向与行驶方向的角度对水平和横向振动有显著影响,与行驶方向成直角的站姿比面向行驶方向的水平和横向振动更小<sup>[14]</sup>。关于运输过程中震动对实验动物的影响尚未有相关研究。

## 2.5 运输时间

运输时间的长短对动物影响显著。Wistar 大鼠血糖和血清皮质酮在运输初期均升高<sup>[15]</sup>。短途运输比格犬对动物的心肺生理参数影响显著<sup>[16]</sup>;另外皮质醇和钠的浓度随运输时间而显著升高,心率和乳酸浓度随运输时间而显著降低<sup>[7]</sup>。在自由获得干草和饮水的情况下长途运输亦可导致动物 T3、T4 浓度显著升高<sup>[17]</sup>。

## 2.6 其他

运输时的外部环境温度也影响运输福利的一个重要因素。极端天气导致动物运输过程中产生应激、疾病的发生,甚至死亡。美国国家委员会推荐常见实验动物运输中比较安全的外环境温度范围,小鼠、豚鼠和兔子建议在 4℃~34℃,大鼠 6℃~33℃,犬为 10℃~28℃,恒河猴 6℃~35℃<sup>[18]</sup>。带有空调设施的运输车辆,运输过程对外界环境温度的依赖变小,中国国家标准要求运输工具应配备空调设备,运输内环境温度应符合相应的等级要求,如大小鼠运输车内温度为 20℃~26℃<sup>[8]</sup>。一般情况下高温天气运输的危害大于低温天气的运输。包装容器的材质和合适程度也影响着被运输动物的舒适度。航空运输动物中造成的事故,因为包装容器不合格,导致动物逃逸占 22%;造成动物死亡的占 10%<sup>[19]</sup>。

## 3 实验动物运输的改进和完善方向

### 3.1 改善硬件设施和软件程序减少运输应激

硬件设施包括运输车辆和运输笼盒。适宜的运输车辆和笼盒能够很大程度的改善动物运输过程中的福利和应激。例如小型啮齿类需要专用运输箱,确保充分换气和防止外面微生物污染;兔需要保证有自由的活动空间,底板防滑,保持适当的温度和良好的通风;犬和猴要求单只运输,留有足

够的空间让动物保持自然的姿态,足够的通风。运输装载密度根据动物的体重提供适当的底面积<sup>[8]</sup>。运输箱固定,防止急刹车或颠簸;给运输车辆配备导航系统和温湿度监控和调节装置等。目前,国内实验动物生产供应机构基本上采用专用运输车和运输包装箱运送实验动物,提供符合动物种属和微生物级别的装载笼具,运输期间保障对温度和湿度的控制。软件程序方面从运输方案、计划和人员培训等各个方面进行有效的提升和改善。设置合理的运输方案或计划及应激情况下的备用方案;安排运输负责人和紧急联系人;提供动物运输的相关人员包括司机陪同人员等进行专业的动物护理培训和福利培训;运输过程中供水供食,部分实验动物供应商均考虑了长途运输过程中供食饮水问题。例如在 SPF 动物运输盒中提供果冻;给猴在运输笼中提供水果。最后尽量避免高温天气运输减少动物应激和死亡<sup>[20]</sup>。

### 3.2 采用干预的方式减少运输应激

由于运输应激的不可避免性,科研人员尝试以主动干预的模式来解决动物运输应激问题。目前研究发现酪氨酸和维生素 E 能使运输中的猪更多的趴卧和降低心率;酪氨酸、镁离子、维生素 E 和维生素 C 配合制剂可以改善动物应对振动和加速度的能力<sup>[21]</sup>;提供富含氨基酸和维生素的营养补充剂有助缩短小鼠短途运输后恢复所需时间<sup>[22]</sup>;另外抗氧化剂维生素 C、维生素 E、槲皮素和止痢草油在大鼠的运输过程中具有一定的抗运输应激效果<sup>[23]</sup>;在运输前灌饲谷氨酰胺具有保护大鼠抵抗运输应激的作用<sup>[24]</sup>。由维生素 C、维生素 E、碳酸氢钾和  $\gamma$ -氨基丁酸制作的抗应激复合添加剂对大鼠进行灌胃后,能降低大鼠运输应激敏感性,起到抵抗运输应激的作用<sup>[25]</sup>。

### 3.3 给动物足够的适应期从运输应激中恢复

目前在国内外实验动物行业应对动物运输应激的最常用的方式是设定适应期,让动物能够自动平复运输应激带来的身体可见或不可见的多种参数的变化。OECD 规定大小鼠、豚鼠的适应性饲养至少 5 d,兔至少 6 d,犬和非人灵长类至少 14 d<sup>[26]</sup>。而中国 FDA 则规定啮齿类动物在进行试验前至少需要适应性饲养 5 d,非啮齿类至少需要 2 周<sup>[27]</sup>。对于啮齿类实验动物在接收后,接收单位均会按照惯例或研究需求和经验设立一个 1~7 d 不等的适应期限<sup>[28]</sup>。上海市为例,针对实验大鼠的检

疫和适应期均定为 3~5 d,部分单位定为 1 周。短途运输的小鼠和 Wistar 大鼠常规需要 72 h 的恢复期<sup>[16,22]</sup>。对于犬、猴等智商高等的动物,运输应激会持续 1 个月左右,因此非人灵长类动物的适应时间通常大于 1 个月<sup>[11]</sup>。

#### 4 结语

综上所述,运输对动物产生应激的因素是多方面的,如将动物从熟悉的笼盒和种群中转移;运输过程中将动物单独饲养或密集的群体饲养;装载在不熟悉的运输容器中;装卸和运输途中的运动和震动;为保证平衡导致的紧张,特别是大动物;不熟悉的信息、声音和气味;温度的波动,尤其是极端温度;黑暗;运输过程中被停止供食供水等。如何改善和减少运输的应激和影响,一方面从硬件运输设备上改善,另一方面操作程序的合理可控能有效减少应激,改善动物运输福利;再者运输后给予动物合适的适应期来平复运输应激是现在实验动物行业的主流方式,但是我们需要在这方面有更多的研究证明和确定一个合理的适应期;采用干扰物质减低运输应激是一个新的研究方向,但尚未成为主流形式,仍然需要有更多的研究数据来支持可行性。最后从根本上我国在动物运输法律法规方面较为欠缺,需要建立起一个规范合适的制度来保证动物运输过程中的福利得到有效保障。

#### 参考文献:

[ 1 ] 1/2005/EC: Council Regulation ( EC ) No 1/2005 of 22 December 2004 on the protection of animals during transport and related operations and amending Directives 64/432/EEC and 93/119/EC and Regulation ( EC ) No 1255/97 [ EB/OL ].

[ 2 ] 常纪文. 动物福利法—中国与欧盟之比较 [ M ]. 北京: 中国环境科学出版社, 2006.

[ 3 ] Live Animal Regulations, The Global Standard for the Transportation of Live Animal by Air. IATA, 2015 edition.

[ 4 ] A Report from the American Veterinary Medical Association Animal Air Transportation Study Group. Schaumburg, IL: AVMA, 2002.

[ 5 ] Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [ M ]. Eighth Edition, 2010.

[ 6 ] FASS ( Federation of Animal Science Societies ). Transport// Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching, 3<sup>rd</sup> ed [ M ]. Champlain, IL: FASS, 2010: 54.

[ 7 ] 邓红雨. 公路运输条件下牛的运输应激反应研究 [ D ]. 河南农业大学, 2013.

[ 8 ] 实验动物环境及设施, 中华人民共和国国家标准, 2010.

[ 9 ] Swallow J, Anderson D, Buckwell AC, *et al.* Guidance on the transport of laboratory animals [ J ]. Lab Anim. 2005, 39(1): 1 - 39.

[ 10 ] The Scientific Panel on Animal Health and Welfare. The welfare of animals during transport. European Food Safety Authority, 2004.

[ 11 ] 梁春南, 李明, 黎绍明, 等. 实验动物运输中的福利保障 [ J ]. 中国动物保健, 2012, 14(9): 20 - 23.

[ 12 ] Broom D M, Fraser A F. Domestic animal behavior and welfare, 4<sup>th</sup> ed [ M ]. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2007.

[ 14 ] Girma G, Samuel A, Fufa S B, *et al.* Vibration levels and frequencies on vehicle and animals during transport [ J ]. Biosystems Engineering, 2011, 110(1): 10 - 19.

[ 15 ] 杨斐, 胡樱. 短途运输应激对 Wistar 大鼠的影响 [ J ]. 中国实验动物学报, 2009, 17(4): 279 - 281.

[ 16 ] 潘永明, 陈亮, 何欢, 等. 无创遥测技术观察运输应激对 Beagle 犬部分生理指标的影响 [ J ]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(4): 56 - 61.

[ 17 ] Fazio E, Medica P, Alberghina D, *et al.* Effect of Long-distance Road Transport on Thyroid and Adrenal Function and Haematocrit Values in Limousin Cattle: Influence of Body Weight Decrease [ J ]. Veterinary Research Communications, 2005, 29: 713 - 719.

[ 18 ] National Research Council. Guidelines for the Humane Transportation of Research Animals. <http://www.nap.edu/catalog/11557.html>, 2006.

[ 19 ] 王实, 张伟. 野生动物航空运输包装容器安全问题调查与分析 [ J ]. 2009, 30(4): 210 - 213.

[ 20 ] Grandin T. Livestock handling and transport, 3<sup>rd</sup> ed [ M ]. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2007.

[ 21 ] Peeters E, Neyt A, Beckers F, *et al.* Influence of supplemental magnesium, tryptophan, vitamin C, and vitamin E on stress responses of pigs to vibration [ J ]. Journal of Animal Science, 2006, 1827 - 1838.

[ 22 ] 胡樱, 杨斐. 小鼠短途运输应激及其营养干预的研究 [ J ]. 实验动物科学, 2012, 29(3): 15 - 19.

[ 23 ] 田艳. 抗氧化剂的体外评价及在运输应激大鼠中的抗应激效果研究 [ D ]. 2014. 06.

[ 24 ] 吴艳. 大鼠的运输应激及谷氨酰胺的抗应激研究 [ D ]. 南京农业大学, 2008. 05.

[ 25 ] 赫荣贺. 复合添加剂对大鼠抗运输应激能力的影响及配伍剂量筛选 [ D ]. 黑龙江八一农垦大学, 2013, 04.

[ 26 ] OECD. Guideline for testing of Chemicals. 2011.

[ 27 ] SFDA. 药物重复给药毒性试验技术指导原则. 2014.

[ 28 ] Obernier J A, Baldwin R L. Establishing an appropriate period of acclimatization following transportation of laboratory animals [ J ]. ILAR J, 2006, 47(4): 364 - 369.



# 我是树鼩,你知道我么?

代解杰,罕园园,孙晓梅

(中国医学科学院医学生物学研究所/北京协和医学院,医学生物学研究所树鼩种质资源中心,昆明 650118)

我长得酷似松鼠,喜欢在树枝和地面上玩耍,动画片《冰河世纪》中那只倒霉“松鼠”其实是以我为原型的,许多人常常叫错我的名字,其实我叫树鼩(qú)。我的外形与松鼠是有区别的:我的鼻尖长,外毛灰棕色,肚皮灰白色,尾巴腹面毛很短,没有松鼠那样蓬松。我还有5个手指和脚趾,大拇指和四趾相对,抓东西很准呢;有发达的大脑和小脑、发达的视交叉结构和上丘,眼睛的视网膜里有96%的视锥细胞,所以看东西有立体感和颜色,特别能看清蓝色和黄色的东西。我们7~8个月大的时候就可以结婚了,树鼩妈妈怀胎40d左右可以生下4个兄弟姐妹,刚生下来时我的体重很轻,只有10g左右,长大后也不到200g,体长25cm,尾巴20cm左右,我很小,但很可爱。我家的亲戚们居住在云南、广西、海南、四川和东南亚的国家,喜欢温暖的环境,我胆子很小,怕惊吓,白天在僻静的野外寻找水果、粮食、昆虫等食物吃,偏好甜食,在水边清洗脸和洗手脚,晚上回到洞穴或草丛里睡觉,我们用身上的腺体分泌液和尿液标记自己的领域,如果有不属于我们家庭的不速之客,我们会齐心协力地把他们撵出我们的领地哦。

以前有科学家把我认为是最低等的猴子,后来,人类用各种各样的仪器对我的身体和DNA进行了全面的检查,确定了我在动物王国的地位,是一个独立的家族—攀鼩目,比大小白鼠高,接近于猴子,所以,科学家们越来越重视我,那些穿白大褂的叔叔阿姨们将我们从野外运到漂亮的大楼里,分开饲养在一室一厅的不锈钢房间里,有恒定的温度、湿度和照明,每天为我们打扫房间卫生,提供健康

的绿色食品和清洁的饮水,每年还为我们检查一次身体,看看我们身上带有哪些微生物和寄生虫,如果我们生病受伤了,就转到病房里,给我们打针、吃药和包扎伤口,避免了我们在野外挨冻受饿、有病得不到治疗的痛苦,在这样的环境下,我们结婚生子,家族不断发展壮大,寿命提高至8~10年。

我们能享受这一切都是因为我们拥有实验动物的使命和责任。我许多健康的兄弟姐妹,像大小白鼠、猴子一样,定期被穿白大褂的叔叔阿姨们送到其他大楼的实验间里打针、吃药或手术,手术之前他们都会给我们打麻醉药来减轻我们的痛楚,不可避免地,我的一些亲人在这过程中牺牲了,但我知道,由于我们的身体结构、生长发育和疾病与人类极为相似,对进行人类疾病的研究有很高的科学价值,例如:神经功能障碍症、抑郁症、“应激”症、眼睛疾病、肝炎、手足口、和代谢性综合征、肿瘤等许多疾病,我们可以作为人类的“替身”,研究人类疾病的发生、发展和预防治疗规律,用我们制作的“疾病模型”,筛选新的治疗药物和评价药物是不是有效果。另外,与猴子相比较,我家族的成员多,体型小,饲养费用低,操作方便,是科学家们的新宠。为了能够减少人类疾病的痛苦,作为实验动物界的新成员,我们非常希望能够更好地履行我的职责和使命,为人类健康作出更大的贡献!

## 参考文献:

- [1] 彭燕章,叶智彰,邹如金,主编. 1991. 树鼩生物学[M]. 昆明:云南科学技术出版社,1-422.
- [2] 郑永唐,姚永刚,徐林. 2014. 树鼩基础生物学与疾病模型[M]. 昆明:云南科技出版社,1-342.

[基金项目]国家科技支撑计划项目(2014BAI01B01)。

[作者简介]代解杰(1961-),男,研究员,主要从事人类疾病动物模型研究和实验动物饲养管理。Email:djj@imbcams.com.cn。

- [ 3 ] 陈瑾, 代解杰, 孙晓梅. 树鼩肝炎动物模型的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2008,18(2): 59-62.
- [ 4 ] 张立, 贡昆龙. 树鼩免疫细胞体外感染 I 型人免疫缺陷病毒的实验研究[J]. 动物学研究, 2001,22(1): 33-40.
- [ 5 ] 江勤芳, 匡德宣, 仝品芬, 等. 树鼩规模化繁殖及繁殖群的建立[J]. 实验动物科学. 2011, 28(6):35-38
- [ 6 ] 白继丽, 孙晓梅, 王欣, 等. 人工饲养树鼩血液学及生化指标正常值测定及分析[J]. 中国比较医学杂志. 2009,19(7): 38-41.
- [ 7 ] 罗其胜, 王庆玲, 李松珍, 等. 180 例树鼩尸检的病理学分析[J]. 上海实验动物科学. 1987,7(2):80-83.
- [ 8 ] 万新邦, 庞其方, 丘福禧, 等. 成年的中国云南树鼩对人轮状病毒易感性的实验研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志. 1985,5:304-307.
- [ 9 ] 王新兴, 李婧潇, 王文广, 等. 野生中缅甸树鼩病毒携带情况的初步调查[J]. 动物学研究. 2011,32(1): 66-69.
- [ 10 ] 王文广, 黄晓燕, 徐娟, 等. EV71 可感染幼龄中缅甸树鼩[J]. 动物学研究 2012,33(1): 7-13
- [ 11 ] Yu Fan, Zhi-Yong Huang, Chang-Chang Cao, *et al.* Genome of the Chinese tree shrew [J]. Nature Communications. 2013, 4: 1426 | DOI: 10.1038/ncomms2416.
- [ 12 ] Amako Y, Tsukiyama KK, Katsume A, *et al.* Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri* [J]. J Virol, 2010, 84(1): 303-11.
- [ 13 ] Daral G, Zöller L, Matz B, *et al.* Experimental infection and the state of viral latency of adult *Tupaia* with herpes simplex virus type 1 and 2 and infection of juvenile *Tupaia* with temperature-sensitive mutants of HSV type 2 [J]. Arch Virol, 1980, 65:311-318.
- [ 14 ] Xie ZC, Riezu-Boj JI, Lasarte JJ, *et al.* Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews [J]. Virology. 1998, 244(2):513-520.
- [ 15 ] Zhao X, Tang ZY, Klumpp B, *et al.* Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection [J]. J Clin Invest. 2002,109(2):221-232.
- [ 16 ] Li Y, Wan DF, Wei W, *et al.* Candidate genes responsible for human hepatocellular carcinoma identified from differentially expressed genes in hepatocarcinogenesis of the tree shrew (*Tupaia belangeri* chinese) [J]. Hepatol Res, 2008b,8(1):85-95.
- [ 17 ] Xu X, Chen H, Cao XM, *et al.* Efficient infection of tree shrew (*Tupaia belangeri*) with hepatitis C virus grown in cell culture or from patient plasma [J]. J Gen Virol. 2007,88: 2504-2512.



树鼩