



中国科技论文统计源期刊
中文核心期刊要目总览

ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

ZHONGGUO BIJIAO YIXUE ZAZHI

中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

原名《中国实验动物学杂志》



2016 **10**

邮发代号: 82-917

第26卷(第10期) Vol.26 No.10

ISSN 1671-7856

主办 中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所



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26卷 第10期 2016年10月31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)67770690
E-mail:bjb@cnilas.org
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

2016年版权归中国实验动物学会所有
本刊已入万方数据网络和中国学术期刊(光盘版)电子杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国实验动物信息网、中国实验动物学会网站和世界卫生组织西太平洋地区医学索引等网络文献数据库,如不同意自己论文入网,请在来稿中声明。编辑部支付的稿酬已包含上述网站著作权使用费。
本刊电子版出版发行合作伙伴:中邮阅读网:www.183read.com
本期执行主编 徐平
本期责任编辑 吴漪丽

目次

(本刊已入编“中文核心期刊要目总览”)

研究报告

- 脊髓灰质炎疫苗脑内法猴体神经毒力试验
病理学评价方法的探讨 徐艳峰,邓巍,于品,等(1)
- 基于牛分枝杆菌 PPD 的猕猴全血 IFN- γ
释放试验观察 闵凡贵,郭羽,罗挺,等(5)
- 6种常用 SPF 级大小鼠繁殖性能测定与分析
..... 孙侠,刘科,杨林,等(9)
- 桃核承气汤对大鼠肝性脑病模型干预治疗的分析
..... 李晓娟,朱云,王立福,等(14)
- 慢性心力衰竭大鼠肝脏组织的代谢轮廓 巫菲,李彤,张磊,等(19)
- 谷氨酰胺联合脐间充质干细胞移植在
大鼠肠缺血再灌注损伤中的作用
..... 王炳杰,胡延伟,赵叶芳,等(25)
- 血管活性肠肽(VIP)对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)
大鼠脑组织 IL-17A 含量的影响
..... 杨元,袁正洲,吕志宇,等(32)
- 槲芪散对肝癌前病变端粒酶活性的调控作用
..... 孟霞,刘树红,李霞,等(36)
- 针刺对人羊膜间充质细胞移植治疗
去卵巢大鼠骨质疏松的协同效应
..... 陈玉敏,陈涛平,韩翠玉,等(43)
- 北京中国农大小型猪三个亚系群体的遗传状况分析
..... 魏杰,巩薇,王洪,等(50)
- 组织块法分离培养小鼠脾脏间充质干细胞
..... 丁丽,朱恒,张海宏,等(56)
- PCR 检测实验恒河猴和食蟹猴群体中
幽门螺杆菌和“猕猴螺杆菌”的感染
..... 王立鹏,李永旺,郭连香,等(61)
- 不同剂量野百合碱联合异丙肾上腺素对
大鼠血流动力学变化及心指数、右心肥厚指数研究
..... 邹习俊,杨红宇,江滢,等(69)

技术方法

- 基于高通量测序技术的实验动物
沙门氏菌检测方法的建立与评价
..... 胡毅翔,张欢欢,余陈欢,等(72)
- 一种简易小鼠尾静脉注射固定法—笼盖压制法
..... 李轶惊,张娜,田枫(79)
- 一种小鼠尾静脉注射的操作方法 余涛,曾阳,孙玉侠,(82)

标准专栏

- 中国实验动物从业人员标准的编制 孔琪,郑志红,魏强,等(85)
- 广告 (封二,封三,封底)

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly Established in March 1991 Volume 26 Number 10 October 31 2016

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) 67770690
E-mail: bjb@cnilas.org
<http://zgsydw.alljournal.ac.cn/zgbjyzzz/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) 67770690
E-mail: bjb@cnilas.org

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) 67770690
E-mail: bjb@cnilas.org

Mail-order

Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine

CSSN

ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

Copyright 2016 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

CONTENTS IN BRIEF

- Pathological evaluation of the intrathalamic neurovirulence test of poliomyelitis vaccine in monkeys
 ... XU Yan-feng, DENG Wei, YU Pin, ZHU Hua, et al. (1)
- Performance of bovine-PPD based whole blood IFN- γ assay for rhesus macaques
 ... MIN Fan-gui, GUO Yu, LUO Ting, et al. (5)
- Measurement and analysis of the reproductive performance in six commonly used SPF mice and rats
 ... SUN Xia, LIU Ke, YANG Lin, et al. (9)
- Analysis of the preventive and therapeutic effects of Taohe Chengqi decoction on a rat model of hepatic encephalopathy
 ... LI Xiao-juan, ZHU Yun, WANG Li-fu, et al. (14)
- Metabolic profiling of liver in the rats with chronic heart failure
 ... WU Fei, LI Tong, ZHANG Lei, et al. (19)
- Effects of glutamine in combination with umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantation on intestinal ischemia reperfusion injury in rats
 ... WANG Bing-jie, HU Yan-wei, ZHAO Ye-fang, et al. (25)
- Effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the content of IL-17A in the brain tissue of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)
 ... YANG Yuan, YUAN Zheng-zhou, LV Zhi-yu, et al. (32)
- Regulatory effect of a Chinese medicine prescription Hu Qi Shan on the telomerase activity in hepatic precancerous lesions in rats
 ... MENG Xia, LIU Shu-hong, LI Xia, et al. (36)
- Synergistic effect of acupuncture and human amniotic mesenchymal stem cell transplantation on the treatment of osteoporosis in ovariectomized rats ...
 ... CHEN Yu-min, CHEN Tao-ping, HAN Cui-yu, et al. (43)
- Population genetic quality analysis of 3 subbreeds of China Agricultural University miniature pigs in Beijing
 ... WEI Jie, Gong Wei, Wang Hong, et al. (50)
- Primary culture of murine spleen-derived mesenchymal stem cells by explant culture
 ... DING Li, ZHU Heng, ZHANG Hai-hong, et al. (56)
- PCR test of *Helicobacter pylori* and "*Helicobacter macacae*" infections in rhesus and cynomolgus monkey breeding colonies
 ... WANG Li-peng, LI Yong-wang, GUO Lian-xiang, et al. (61)
- Effect of different doses of monocrotaline in combination with isopropylarterenol on the hemodynamic response, heart index and right heart hypertrophy index in rats
 ... ZOU Xi-jun, YANG Hong-yu, JIANG Yan, et al. (69)
- Establishment and evaluation of a high throughput sequencing technology for detection of *Salmonella* in laboratory animals
 ... HU Yi-xiang, ZHANG Huan-huan, YU Chen-huan, et al. (72)
- A simple fixing method for tail vein injection in mice—cage lid pressing method
 ... LI Yi-jing, ZHANG Na, TIAN Feng (79)
- A new device and method for tail vein injection in mice
 ... YU Tao, ZENG Yang, SUN Yu-xia, et al. (82)
- Establishment of the Standard for Laboratory Animal Practitioner in China
 ... KONG Qi, ZHENG Zhi-hong, WEI Qiang, et al. (85)



脊髓灰质炎疫苗脑内法猴体神经毒力试验 病理学评价方法的探讨

徐艳峰, 邓巍, 于品, 朱华, 黄澜, 徐玉环, 韩云林, 乔红伟, 秦川

(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, 新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 探讨脊髓灰质炎疫苗脑内法猴体神经毒力试验病理评价方法。方法 采用恒河猴双侧丘脑内注射给药, 观察 21 d 后进行解剖, 完整取出脑和脊髓, 经修切后脱水包埋, 切片经 HE 染色和没食子蓝染色后在光镜下观察, 对神经组织病变进行评分, 根据分值对病变严重程度进行判定。本研究涉及 12 批实验中的 240 动物。结果 本方法对左右大脑包括针迹在内的不同部位、中脑、小脑、脑桥、延髓、颈膨大、腰膨大进行取材, 参照脊髓法神经毒力试验病理学评价的半切面评分方法, 对双侧脑干、颈髓和腰髓的病变进行评价并计分, 根据平均分并结合具体病变情况分别判定此 3 个部位的病变程度。本研究中特异性的神经系统病变的发生率 15%。各型疫苗病变发生率相似, 轻微病变出现的比例最高。较严重的病变主要见于Ⅲ型疫苗。结论 在脑内法神经毒力试验中, 用半切面评分方法对病变进行评分, 较客观地反映了神经系统病变的情况, 方法简便易行, 实用性较强, 利于判断标准的统一, 可作为脊髓灰质炎疫苗脑内法神经毒力试验病理学评价方法的参考。

【关键词】 脑内法神经毒力试验; 脊髓灰质炎疫苗; 病理学评价

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0001-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.001

Pathological evaluation of the intrathalamic neurovirulence test of poliomyelitis vaccine in monkeys

XU Yan-feng, DENG Wei, YU Pin, ZHU Hua, HUANG Lan, XU Yu-huan, HAN Yun-lin,
QIAO Hong-wei, QIN Chuan

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine,
Ministry of Health, Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine,
Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging Infectious Diseases, Beijing 100021, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the pathological evaluation method of intrathalamic neurovirulence test of poliomyelitis vaccine in monkeys. **Methods** Two hundred and forty healthy rhesus monkeys age 1–3 years, body weight 1.7–4.5 kg, in 12 lots, were used in this study. The monkeys were injected with poliomyelitis vaccine into bilateral thalamus. The animals were sacrificed after observation for 21 days and specimens of the brain and spinal cord were collected. After dehydration, embedding and sectioning, HE and gallocyanin staining were used for pathological

[基金项目] 卫计委行业基金(201302006); 国际科技专项项目(2015DFG32230)。

[作者简介] 徐艳峰(1972-), 女, 助理研究员, 研究方向: 毒性病理学。E-mail: xuyan2009@163.com。

[通讯作者] 秦川(1959-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 病理与病理生理学。E-mail: chuanqin@vip.sina.com。

observation. The pathological changes were scored, and the severity of the pathological changes were determined by scoring. **Results** The sections were taken from bilateral cerebellum (needle tracts included), midbrain, pons, medulla oblongata, cervical enlargement and the lumbar enlargement. The pathological changes were evaluated referring to the hemisection scoring method of intraspinal neurovirulence test. Lesions on both sides of the brain stem, cervical enlargement and lumbar enlargement were scored, and the severity of the lesions at these three regions were determined according to the average score. The total incidence rate of specific neuronal pathological changes was 15%. The incidence rates of lesions caused by different types of vaccines were similar. Most of the lesions were minimal, and severe lesions were seen mainly in the type III vaccine tests. **Conclusions** In intrathalamic neurovirulence test, scoring of the lesions of nervous system by hemisections can objectively reflect the pathological changes in the nervous system. This method is simple and easy to apply, practical, and can facilitate the unification of diagnostic criteria. We would recommend this method to be used in pathological evaluation in intrathalamic neurovirulence test of poliomyelitis vaccine.

【Key words】 Intrathalamic neurovirulence test; Poliomyelitis vaccine; Pathological evaluation; Rhesus monkeys

脊髓灰质炎是一种急性传染病,传播广泛,病原为脊髓灰质炎病毒。此病毒常侵犯中枢神经系统,损害脊髓前角运动神经细胞,导致肢体松弛性麻痹,多见于儿童,故又名小儿麻痹症。多数人感染后为轻症,少数重症患者可发生瘫痪,甚至因呼吸、循环衰竭而死亡。目前随着疫苗的广泛接种,人类在根除脊髓灰质炎方面已经取得很大进展,大多数国家已消除这种疾病。但最近报道此疾病在叙利亚、乌克兰、以色列等国家重新流行^[1],在我国也有死灰复燃的现象。目前包括我国在内的 140 多个国家仍以口服脊髓灰质炎减毒活疫苗作为主要预防措施,因疫苗可能会在某些情况下恢复神经毒性而引起脊髓灰质炎病变,对其安全性进行恰当评价是非常重要的工作。

根据《中华人民共和国药典(三部)》(2010 年版)及 WHO 的相关规定,目前脊髓灰质炎疫苗的神经毒性评价需通过猴体神经毒力试验进行,主要有两种方法:脊髓法和脑内法。脊髓法需要将供试品组的病变与同型参考品的病变进行比较;脑内法不需与参考品的病变进行比较,但对手术操作要求较高,结果判定中单只猴病变的影响较大。两种方法对于疫苗安全性评价的敏感性基本是一致的^[2],也有报道认为脑内法比脊髓法更敏感^[3]。目前根据药典规定的方法,脑内法只需要总体判定每只动物的病变程度,而未详细规定具体的判定标准,因此在不同的机构和人员之间易造成偏差。此试验借鉴脊髓法中的半切面计分法,对脑内法的脑干、颈髓及腰髓等部位的病变进行评分,并根据此三个部位的各自的平均分对单只动物的病变程度进行判定,旨在提高病变判断的准确性和一致性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级健康恒河猴,购自中国医学科学院医学实验动物研究所北方资源中心【SCXK(京)2014-0011】。年龄 1~3 周岁,体重 1.7 kg~4.5 kg。猴血清经 1:4 稀释后证明不含同型别病毒中和抗体,猴血清用间接免疫荧光(DIA)抗体检查法检查排除潜在的猴 B 病毒(BV)和无泡沫病毒病(SFV)。猴结核菌素试验为阴性。动物实验在中国医学科学院医学实验动物新药安全研究评价中心进行【SYXK(京)2010-0030】。本文所涉及的动物数量为 12 批实验中的 240 只动物。

1.2 实验仪器及试剂

Stoelting 51600 型脑立体定位仪(美国 Stoelting 公司),Leica ASP300 全自动组织脱水机,IVS-410 推拉式切片机(日本樱花),ST5010 自动染色机(德国徕卡),EG1150H+C 石蜡包埋机(德国徕卡),BX51 光学显微镜(日本奥林巴斯公司)。苏木素及伊红染色液购自北京利精细化学品有限公司,没食子蓝染料购自上海源叶生物科技有限公司。

1.3 动物实验

使用脑立体定位仪将微量注射器针头插入丘脑,在两侧丘脑分别注入 0.5 mL 脊髓灰质炎疫苗样品,原倍浓度及 10^{-1} 浓度各 10 只。注射后 48 h 内死亡或出现非特异性麻痹症状者剔除不计,中途死亡及到期处死动物,做中枢神经系统病理组织学检查。

1.4 动物解剖及取材

动物在给药 21 d 后,进行安乐死并解剖。完整取出脑组织及脊髓,10% 甲醛溶液充分固定后,进行取材。取材时首先寻找脑顶叶区注射点,在注射点

前后各取一个切面,以确保取材部位包含针迹。取材部位包括:额叶、顶叶、注射点、颞叶、枕叶、海马、基底节、丘脑(以上部位左右大脑双侧取材)、中脑、小脑、脑桥、延髓、颈膨大、腰膨大。

1.5 切片制作及观察

组织块经梯度酒精脱水,石蜡包埋,切片厚度 $8\ \mu\text{m} \sim 15\ \mu\text{m}$,进行 HE 染色及没食子蓝染色,光镜下检查。

2 结果

2.1 病变发生情况及评价

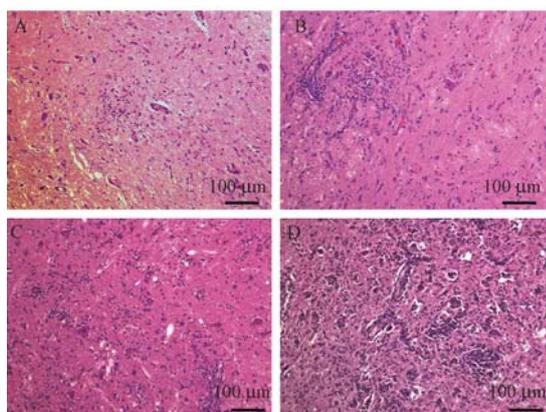
在 12 批实验 240 只动物中,36 只动物出现特异性的神经系统病变,发生率 15%。大部分动物病变轻微,仅表现为胶质细胞增生、炎细胞浸润,未见神经元损伤,且病变多局限于脑干。小部分表现为不同程度运动神经元的损伤,病变部位主要位于脑干(中脑、脑桥、延髓)、颈膨大、腰膨大。出现神经元变性、坏死、噬神经细胞现象和卫星现象,伴有轻重不一的炎性反应如散在的炎细胞浸润、血管周围炎细胞袖套状浸润、胶质细胞增生。脑干及脊髓左右两侧的病变可有较大差别。病变严重的病例在大脑顶叶、丘脑注射针迹周围也出现血管袖套及少数神经元变性坏死,但病变程度较脑干、颈髓及腰髓等部位为轻,海马、基底节区域因距丘脑针迹较近,亦偶有累及,病变均较轻。额叶、枕叶、颞叶未见特异性病变。参照《中华人民共和国药典(三部)》(2010 年版)中脊髓病变的半切面计分法,对病变进行分级和评分。评分标准如下:0 分,未见

病变;1 分,轻微病变,仅有炎细胞浸润,未见神经元损伤;2 分,轻度病变,炎细胞浸润伴有少量的神经元损伤;3 分,中度病变,炎细胞浸润伴有广泛的神经元损伤;4 分,重度病变,大量的神经元损伤,伴或不伴有炎细胞浸润(图 1,2)。对脑组织的针迹附近病变进行评价时,只对高倍镜下($40\times$)距离针迹反应两个视野范围以外的病变进行评分,距针迹反应两个高倍视野范围内的病变计为“0”分。分值计算方法:脑干(中脑、脑桥、延髓)、颈膨大和腰膨大各个切面左右两侧分别计分;脑干、颈膨大和腰膨大三个部位分别取各切面双侧的病变平均值作为这三个部位的病变分值。

部分动物出现脑膜及脊髓膜血管周围少量炎细胞浸润,此类病变均较轻,且局限于脑膜和脊髓膜的部分血管周围,未累及实质区,其是否出现及出现的范围、严重程度与脑和脊髓出现脊髓灰质炎病变的情况无关,未对此种病变计分。部分动物出现注射部位附近脑膜出血,亦未计分。

2.2 动物病变程度的判断

每只动物总的病变程度判断主要依据脑干、颈髓及腰髓各自的平均分,以其中较高的分值,结合每个切面较重病变的出现情况,作为病变严重程度的指标^[4]。本研究发现各型疫苗病变发生率相似,轻微病变出现的比例最高。较严重的病变主要见于Ⅲ型疫苗。病变发生率和严重程度与给予病毒的滴度无关,有些病毒株在以 10^{-1} 倍浓度注射时出现病变,而以原倍浓度注射时则未见病变,此结果与文献报道一致^[5]。

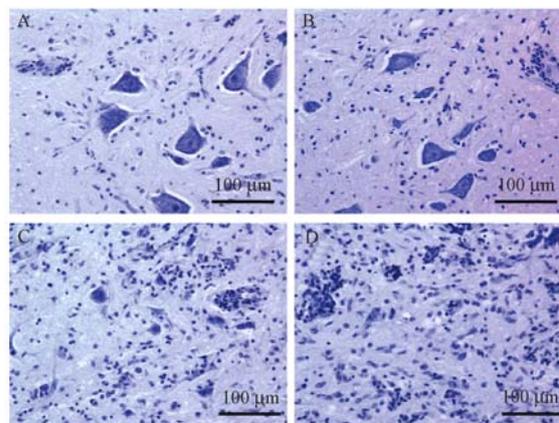


注: A. 轻微病变;B. 轻度病变;C. 中度病变;D. 重度病变

图 1 脊髓病变,HE 染色

Fig. 1 Histopathological lesions of the spinal cord.

A. Minimal lesion;B. Mild lesion;C. Moderately severe lesion;D. Severe lesion. HE staining.



注: A. 轻微病变;B. 轻度病变;C. 中度病变;D. 重度病变

图 2 脊髓病变,没食子蓝染色

Fig. 2 Histopathological lesions of the spinal cord.

A. Minimal lesion;B. Mild lesion;C. Moderately severe lesion;D. Severe lesion. Gallocyanin staining.

3 讨论

目前世界卫生组织虽制定计划用灭活脊髓灰质炎疫苗取代口服脊髓灰质炎疫苗,但因受到多种因素的限制只能逐步进行实施^[6]。口服脊髓灰质炎疫苗为减毒活疫苗,病毒可在特定环境下发生突变,恢复神经毒性,引起脊髓灰质炎疫苗相关病例(vaccine-associated paralytic poliomyelitis, VAPP),并可能在人群中扩散,成为脊髓灰质炎传播的重要危险因素,世界范围内每年有超过 200 例 VAPP,因此对于脊髓灰质炎减毒活疫苗需进行猴体神经毒力试验检测其神经毒性。目前脊髓灰质炎疫苗猴体神经毒力实验可采用脊髓法和脑内法两种方法。脊髓法是把待检疫苗和参考品直接注射于脊髓,比较待检疫苗和参考品神经系统损伤的差异而判断疫苗减毒的情况,而脑内法将疫苗注射于丘脑,通过观察神经系统的病变,特别脑干及脊髓的运动神经元损伤情况,判断疫苗的神经毒性。

药典中对于脊髓法病理评价方法的规定较为明确,对于脑内法只规定了神经毒力试验中疫苗是否合格的判断标准,但对于取材的部位和具体的病变程度的判定并未做详细规定,因此不同人员在操作中可能出现诊断标准的差异。本文探讨了将脊髓法中的半切面评分法用于脑内法病理改变的评价方法,分别对脑组织、脊髓颈膨大和腰膨大的半切面病变进行评分,并对这三个部位的平均病变分值进行计算,根据分值并参考具体情况进行病变程度的判定。在本试验中,发现脑内法出现较明显中枢神经系统病变的动物其病变部位主要位于脑干、颈膨大和腰膨大,而其他部位如丘脑虽可出现病变,但病变程度与脑干及脊髓相比较轻微,可能是由于缺乏对脊髓灰质炎病毒敏感的运动神经核团所致^[5]。因此,在判定动物病变程度的时候,建议脑部的病变程度主要考虑中脑、脑桥和延髓的平均病变。颈髓和胸髓出现病变时,提示病毒已远途扩散至此部位,因此建议将脑干、颈髓和腰髓的三个部位病变中的最大值作为判断动物病变严重程度的标准。

在对脑干、颈膨大及腰膨大三个部位的多个半切面进行平均值计算时,因不同切面病变程度差异较大,可能会掩盖个别较重的病变区,而此区出现的病变因有神经元的损伤已可能引起脊髓灰质炎

的症状。因此对于这三个部位的病变程度的判断,除主要参考平均分值得外,需慎重考虑个别切面较大的值。

本研究发现各型疫苗出现病变的总比例相似。轻微病变出现比例最高,病变位置多在脑干,很少向脊髓扩散。中度及以上病变主要见于Ⅲ型疫苗,病变在脑干、颈髓和腰髓均较明显,与此前报道的结果一致^[7]。少数动物出现注射部位附近脑膜出血,考虑与手术操作引起的损伤有关。部分动物出现脑膜及脊髓膜血管周围少量炎细胞浸润等病变,考虑为疫苗引起的固有反应,并非疫苗的神经毒性所致^[8]。

本文探讨了脑内法脊髓灰质炎疫苗的猴体神经毒力试验中,对神经系统病变进行评分并判定病变程度的方法,操作简便易行,实用性较强,有利于统一病理学评价标准,提高诊断的一致性,可作为脊髓灰质炎疫苗脑内法神经毒力试验病理学评价方法的参考。

参考文献:

- [1] Benck G, Ferenci T. Effective case/infection ratio of poliomyelitis in vaccinated populations [J]. *Epidemiol Infect*, 2016, Feb 2;1-10.
- [2] 谢忠平, 陈瀚博, 沈冬, 等. 口服脊髓灰质炎减毒活疫苗猴体神经毒力试验病理结果分析 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2007, 20(3): 206-208, 218.
- [3] 罗其胜, 王庆玲, 李艳梅, 等. 口服脊髓灰质炎活疫苗(OPV)猴体神经毒力试验国内外病理学检定结果分析 [J]. *中国生物制品学杂志*, 1998, 11(2): 84-86
- [4] Nathanson N, Horn SD. Neurovirulence tests of type 3 oral poliovirus vaccine manufactured by Lederle Laboratories, 1964-1988 [J]. *Vaccine*, 1992, 10(7): 469-474.
- [5] Contreras G, Fzlesz J, Karpinski K, et al. Experience in Canada with the new revised monkey neurovirulence test for oral poliovirus vaccine [J]. *J Biol Stand*, 1988, 16(3): 195-205.
- [6] Sutter RW, Platt L, Mach O, et al. The new polio eradication end game: rationale and supporting evidence [J]. *J Infect Dis*, 2014, 210(S1): S434-438.
- [7] 杨建勇, 王红燕, 柯为华, 等. 口服脊髓灰质炎减毒活疫苗猴体神经毒力试验参考品合格标准的统计分析 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2005, 33(4): 7-12.
- [8] 罗其胜, 罗国祥, 陈淑范, 等. 口服脊髓灰质炎减毒活疫苗猴体神经毒力试验病理学分析 [J]. *生物制品学杂志*, 1990, 3(2): 73-77.

[修回日期] 2016-04-10



基于牛分枝杆菌 PPD 的猕猴全血 IFN- γ 释放试验观察

闵凡贵¹, 郭羽², 罗挺¹, 潘金春¹, 刘助红¹, 黄树武¹, 张钰¹

(1. 广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广东广州 510663;
2. 北京天坛生物制品股份有限公司, 北京 100176)

【摘要】 目的 分析全血 IFN- γ 释放试验在猕猴分枝杆菌检测中的应用价值。方法 首先测定结核菌素试验(TST)阳性、阴性猕猴血清样本的基础 IFN- γ 含量。然后以 PBS 为对照, 200 IU bovine-PPD 为刺激抗原, 分别与 TST 阴性和阳性猕猴肝素抗凝血共培养约 24 h, 收集血浆, 测定 IFN- γ 含量。通过分析抗原刺激前后血浆 IFN- γ 含量变化和刺激指数探讨全血 IFN- γ 释放试验的诊断效能。结果 TST 阳性猕猴血清基础 IFN- γ 含量明显高于 TST 阴性猕猴, 但离散度都较大。PPD 刺激前后, TST 阴性猕猴血浆 IFN- γ 含量无明显变化, 而 TST 阳性猕猴血浆 IFN- γ 含量明显升高($P < 0.01$)。刺激指数结果显示, TST 阳性猕猴明显高于 TST 阴性猴($P < 0.01$)。ROC 曲线分析表明, 血浆 IFN- γ 含量和刺激指数均可作为全血 IFN- γ 释放试验的评价指标。结论 本研究基于小样本量的实验结果证实, 全血 IFN- γ 释放试验是猕猴分枝杆菌快速诊断的有益补充方法。

【关键词】 猕猴, 全血 IFN- γ 释放试验, PPD, 分枝杆菌

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0005-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.002

Performance of bovine-PPD based whole blood IFN- γ assay for rhesus macaques

MIN Fan-gui¹, GUO Yu², LUO Ting¹, PAN Jin-chun¹,
LIU Zhu-hong¹, HUANG Shu-wu¹, ZHANG Yu¹

(1. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China; 2. Beijing Tiantan Biological Product Co. Ltd., Beijing 100176)

【Abstract】 **Objective** To assess the potential of whole blood IFN- γ assay for diagnosing mycobacterium in rhesus macaques. **Methods** Firstly, basic serum IFN- γ concentrations of TST-negative and -positive rhesus macaques were detected. Then, heparinized whole blood from TST-negative and -positive rhesus macaques was incubated with PBS and 200 IU bovine-PPD (tuberculin purified protein derivative) for about 24 h, respectively. The supernatant plasma were harvested and used to determine the concentrations of IFN- γ . The results of plasma IFN- γ concentrations and stimulation index (SI) were used to analyze the diagnostic potential of the whole blood IFN- γ assay. **Results** The basic serum concentrations of IFN- γ for the TST-positive monkeys were significantly higher than that of the TST-negative macaques, showing a high coefficient of variation. There was no significant effect on the production of IFN- γ in the TST-negative macaques. While significantly elevation of IFN- γ concentrations was found in stimulated plasma of TST-positive macaques ($P < 0.01$). The SI of TST-positive macaques was significantly higher than the TST-negative ones. ROC curve analysis revealed that IFN- γ concentrations and SI could be used as evaluation index of whole blood IFN- γ assay. **Conclusions** Based on a small sample experiment we have demonstrated that whole blood IFN- γ assay may be one possible auxiliary

[基金项目] 广东省科技计划项目(2013B020307005; 2015A030302029; 2016A030303023); 国家科技支撑计划(2013BAK11B01)。

[作者简介] 闵凡贵(1980 -), 男, 副研究员, 硕士, 研究方向: 实验动物与比较医学研究。

[通讯作者] 张钰(1970 -), 女, 研究员, E-mail: zhangyuzh@hotmail.com。

diagnostic method for tuberculin skin test.

【Key words】 Rhesus macaques; Whole blood IFN- γ assay; Tuberculin purified protein derivative, PPD; Mycobacterium; Diagnosis

猕猴是目前用量最大的实验非人灵长类动物,已实现了人工规模化 and 标准化的生产繁育。然而,猕猴的生产繁育却长期遭受到多种病原的威胁,其中,分枝杆菌病对猕猴饲养的影响巨大,以结核分枝杆菌病最为严重,由于其病原具有强烈的人兽共患性,并且群内传播和种间传播速度快,传播途径多样,控制其传播显得尤为重要,而早期筛查与及时隔离感染猴为当前最有效的控制手段^[1]。

目前,实验猴结核诊断的金标方法是结核菌素试验(tuberculin skin test, TST),其次是病原学诊断,病理学(活体病理学)诊断应用相对较少。血清学诊断和分子生物学诊断方法也被用于猕猴结核诊断中,但多数仍处于研究阶段^[2-4]。鉴于目前常用的诊断方法缺乏足够的准确性以及不能实现快速诊断,本研究将探讨全血 IFN- γ 释放试验的可行性。全血 IFN- γ 释放试验是基于外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)对分枝杆菌抗原刺激的记忆功能而实现的,体外抗原刺激活化的 PBMC 可诱导产生 IFN- γ ,通过测定血浆 IFN- γ 的增量来初步判断机体是否感染病原。在医学领域,全血 IFN- γ 释放试验被证实具有快速、简便等特点,降低了成本要求,成为较好的辅助诊断方法。如能将该技术充分用于实验猴的检测中,则有望大大提高结核病的诊断效能。

1 材料和方法

1.1 血清

近年来,在日常检疫和监督检测中收集到 TST 阳性猕猴血清 30 份, TST 阴性猕猴血清 70 份。上述血清用于测定基础 IFN- γ 含量。

1.2 抗凝血

广东某猕猴饲养场曾多次检出 TST 阳性病例,本研究收集到 14 例阳性猕猴肝素抗凝血,参照此前建立的方法进一步测定了 PPD 抗体^[5-6],结果全部为阳性(A_{450} 值为 1.62 ± 0.70 , cutoff 值为 0.217)。在其他猕猴饲养场采集 TST 阴性且 PPD 抗体阴性猕猴的肝素抗凝血 37 头份。上述抗凝血用于全血 IFN- γ 释放试验。

1.3 抗原

Bovituber-PPD, 2 mL/瓶,源于 Synbiotics Corp.,

批号: Lot 142574。

1.4 全血 PPD 刺激培养

取 24 h 内的抗凝血 2 mL,分别加入 24 孔细胞培养板孔内,1 mL/孔,每个样本 2 孔,然后依次加入 0.1 mL PBS 和 0.1 mL PPD(200 IU),置 37°C、5% CO₂ 培养箱孵育过夜,约 24 h,收集血浆 300 μ L 以上, -20°C 保存。

1.5 血浆 IFN- γ 含量测定

通过流式细胞仪,采用 luminex[®] 液相芯片技术测定血浆中 IFN- γ 含量,检测试剂盒源于默克密理博(Merck Millipore)。

1.6 统计学方法

测得的数据用 Excel 和 SAS 8.01 软件进行统计分析,分析方法包括随机、成对 Student's *t* test 和 ROC 曲线分析等。

2 结果

2.1 血清基础 IFN- γ 含量

分别测定 TST 阴性和阳性猕猴血清样本的 IFN- γ 含量,检测结果见图 1,分别为: 3.08 ± 5.67 pg/mL($n = 70$, CV = 184%) 和 31.88 ± 85.46 pg/mL($n = 30$, CV = 268%)。与 TST 阴性猕猴比较, TST 阳性猕猴血清 IFN- γ 水平显著升高(unpaired *t*-test, $P < 0.01$)。

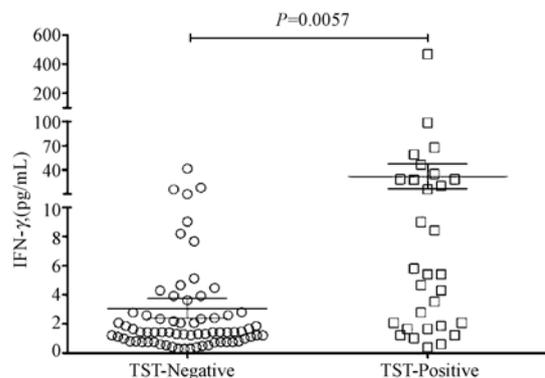


图 1 TST 阳性和阴性实验猴血清 IFN- γ 含量
Fig. 1 Basic serum IFN- γ concentrations of TST-positive and -negative macaques

2.2 体外抗原刺激全血诱导 IFN- γ 产生情况

以等体积 PBS 为阴性对照,分析 PPD 体外刺激全血诱导 IFN- γ 产生的情况,结果见图 2。对于 TST

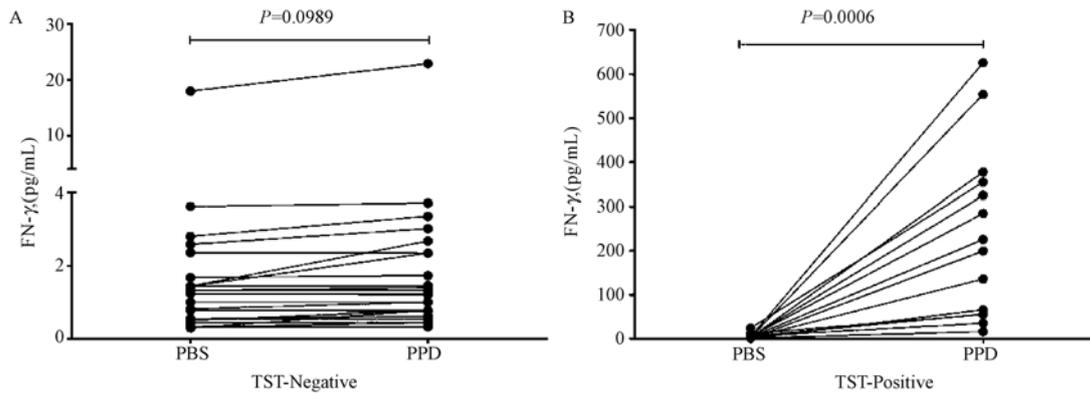


图 2 PPD 刺激前后血浆 IFN- γ 含量变化

Fig. 2 Changes in plasma IFN- γ pre- and post-stimulation by PPD

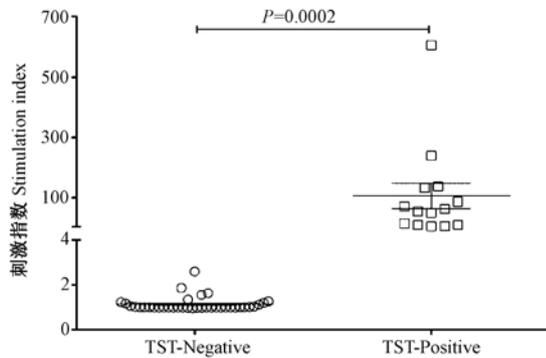


图 3 PPD 全血 IFN- γ 释放试验的刺激指数

Fig. 3 Stimulation indexes of PPD-based whole blood IFN- γ assay

阴性猕猴, PPD 刺激全血不会诱导 PBMC 产生 IFN- γ , 血浆 IFN- γ 含量不会显著升高 (paired t -test, $P > 0.05$); 而对于 TST 阳性猕猴, PPD 能显著刺激 PBMC 产生 IFN- γ , 血浆 IFN- γ 含量显著升高 (paired t -test, $P < 0.01$)。

2.3 刺激指数

鉴于 TST 阴性猕猴基础血清 IFN- γ 含量分布离

散度较大, 通过分析抗原刺激后的绝对 IFN- γ 含量来判定感染状态存在一定的风险。本研究进一步探讨了全血 IFN- γ 释放试验的刺激指数 (stimulation index, SI), 即抗原刺激后和刺激前 (PBS 对照) 血浆 IFN- γ 含量的比值。对 TST 阴性和阳性猕猴 SI 进行比较, 结果显示, TST 阳性猕猴 SI 明显高于 TST 阴性猕猴 (unpaired t -test, $P < 0.01$)。

2.4 ROC 曲线分析

对 TST 阴性和阳性猕猴 PPD 刺激后血浆 IFN- γ 含量做 ROC 曲线分析, 以阳性似然比最大时对应的 IFN- γ 含量为 cutoff 值, 结果显示, 最佳 cutoff 值为 10.19 pg/mL, 敏感性为 100%, 特异性为 97.3%, ROC 曲线下面积为 0.9981 (图 4, A)。同样, 对 TST 阴性和阳性猕猴的刺激指数做 ROC 曲线分析, 显示最佳 cutoff 值为 2.230, 敏感性为 100%, 特异性为 97.3%, ROC 曲线下面积为 1.0 (图 4, B)。以上述两种 cutoff 值判定, 本研究选择的 TST 阳性猕猴均为分支杆菌感染。

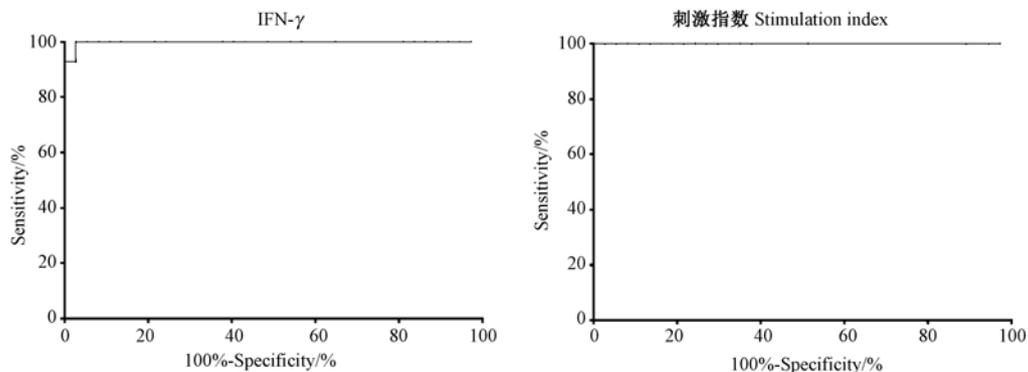


图 4 ROC 曲线分析

Fig. 4 Results of ROC curves analysis

3 讨论

IFN- γ 体外释放试验包括全血 IFN- γ 释放试验和 ELISPOT, 与 TST 相比, 具有敏感性和特异性高, 不受 TST 操作上的主观因素的影响, 结果更为客观可靠, 检测快速, 并且单次 TST 对 IFN- γ 检测结果影响不大等优点, 且该方法只需接触动物一次, 有效减少了对动物的应激, 具有很大的优越性; 因此, IFN- γ 体外释放实验被认为是 TST 理想的补充方法^[7]。全血 IFN- γ 释放试验相比 ELISPOT, 进一步优化了试验程序, 不需要分离 PBMC, 并且降低了对仪器和试剂的需求。

在结核病人全血 IFN- γ 检测方面已有商品化试剂盒 (QuantiFERON-TB Gold), 并得到了美国 FDA 和欧盟 CE Mark 的双重认可; 在牛方面, 澳大利亚于 1989 年率先推出商品化检测试剂盒 (BovigamTM), 此后被澳大利亚政府确认为根除牛结核计划的普检方法。尽管全血 IFN- γ 释放试验在人和牛结核检测中应用广泛, 但是, 其敏感性和特异性稳定性差, 相关 Meta 分析的合并敏感性 (低于 80%) 和特异性 (低于 75%) 仅为中等水平^[8-10], 尚不能替代 TST 成为结核诊断的金标准, 可以成为 TST 的有益补充。全血 IFN- γ 释放试验在非人灵长类动物结核诊断方面应用不多, 主要原因在于试剂盒用量小, 而且非人灵长类动物 IFN- γ 与人和牛 IFN- γ 不同, 具有种属特异性, 导致试剂盒成本增高。国外现有的少量研究和病例报道显示, 全血 IFN- γ 释放试验在诊断非人灵长类分枝杆菌感染方面具有较高的效能^[11-13]; 目前, 国内仅有的 1 项初步应用报道只显示出中等的敏感性^[14]。由此可见, 全血 IFN- γ 释放试验在猕猴中的应用仍需进一步验证。我国是猕猴生产繁育大国, 开展这方面研究具有重要的现实意义。

本研究首先分析了猕猴的血清基础 IFN- γ 水平, 尽管 TST 阳性猕猴血清基础 IFN- γ 水平升高, 但是离散度大, 不足以成为诊断分枝杆菌感染的依据。然后, 分析了 PPD 体外刺激对猕猴 PBMC 诱导产生 IFN- γ 的情况, 结果表明, PPD 刺激 TST 阴性猕猴不会诱导 PBMC 产生 IFN- γ , 血浆 IFN- γ 含量刺激前后无显著性变化; PPD 刺激则可以诱导 TST 阳性猕猴 PBMC 产生大量的 IFN- γ , 导致血浆 IFN- γ 含量显著高于刺激前的测定值。进一步分析显示, PPD 刺激后的 IFN- γ 绝对含量和 SI 均可作为判定分枝

杆菌感染的依据, 其中 SI 的准确性稍高 (ROC 曲线下面积比较)。本研究结果初步证实, 全血 IFN- γ 释放试验是适于猕猴分枝杆菌感染诊断的有效补充手段, 可以弥补 TST 的不足。

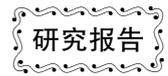
在刺激抗原用量方面, 国外文献多数未提供 PPD 浓度, 国内报道的 PPD 终浓度基本不超过 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[15-16]。影响全血 IFN- γ 释放试验的因素很多, 除了动物个体差异外, 还包括 PPD 来源、用量、批次和生产厂家等^[16]。本研究选择了 Synbiotics Corp. 生产的牛分枝杆菌 PPD, 纯度很高, 预实验结果显示 200 IU/孔和 400 IU/孔无显著性差异, 故选择 200 IU/孔开展实验, 相比国产 PPD 用量偏低。

本研究基于小样本量取得了较理想的实验结果, 但仍处于初级研究阶段, 尚需要大量临床样本来验证该方法的敏感性与特异性, 尤其是 TST 检测假阴性样本的验证。

参考文献:

- [1] Lerche NW, Yee JL, Capuano SV, et al. New approaches to tuberculosis surveillance in nonhuman primates [J]. *ILAR J*, 2008, 49(2): 170-178.
- [2] 罕园园, 高家红, 罗志武, 等. 猕猴结核分枝杆菌 PCR 检测方法的建立与初步应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(9): 78-82.
- [3] Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Department of Health and Human Services (HHS). Control of communicable disease; foreign—requirements for importers of nonhuman primates (NHP). Final rule [J]. *Fed Regist*, 2013, 78(32): 11521-11545.
- [4] Rosenbaum M, Mendoza P, Ghersi BM, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in new world monkeys in Peru [J]. *Ecohealth*, 2015, 12(2): 288-297.
- [5] 张钰, 黄韧, 刘香梅, 等. 猴结核病血清抗体检测方法的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2006, 14(1): 63-66.
- [6] Min FG, Zhang Y, Huang R, et al. Serum antibody responses to 10 *Mycobacterium tuberculosis* proteins, purified protein derivative, and old tuberculin in natural and experimental tuberculosis in rhesus monkeys [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(12): 2154-2160.
- [7] Ryan TJ, Buddle BM, DeLisle GW. An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing [J]. *Res Ver Sci*, 2000, 69: 57-61.
- [8] Aggarwal AN, Agarwal R, Gupta D, et al. Interferon gamma release assays for diagnosis of pleural tuberculosis: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(8): 2451-2459.

(下转第 18 页)



6种常用SPF级大小鼠繁殖性能测定与分析

孙侠, 刘科, 杨林, 夏冠玲, 谭巧燕, 王刚

(广东省医学实验动物中心, 佛山 528248)

【摘要】 目的 测定、分析本中心保存的6种常用SPF级大小鼠(SD大鼠、C57BL/6小鼠、BALB/c小鼠、NIH小鼠、KM小鼠、ICR小鼠)的主要繁殖性状。**方法** 近交系小鼠采用全同胞同居交配, 封闭群大鼠和小鼠采用循环交配。测定这6种品系大小鼠第1~4胎所生仔鼠的平均产仔数、平均带仔数和平均离乳数, 并计算离乳率。同时测定初配日龄、初产日龄、初产间隔和各胎胎间隔。**结果** 近交系小鼠的平均产仔数均为6~7只, 前3胎繁殖数据基本保持稳定, 第4胎各项数据相比第3胎明显下降($P < 0.05$)。BALB/c小鼠的离乳率在98%~99%, C57BL/6小鼠为96%~98%。封闭群实验动物的平均产仔数可达12~14只, 第2~3胎平均产仔数均较第1胎明显升高($P < 0.05$), 但第4胎又比第3胎显著下降($P < 0.05$)。NIH、KM和ICR小鼠的离乳率都维持在98%~99%; SD大鼠的离乳率则略低(95%~97%)。小鼠的初配日龄在70 d~80 d之间, 大鼠在109 d; 封闭群小鼠的初产日龄和初产间隔低于近交系小鼠, 大鼠的初产日龄和初产间隔分别为136.3 d和27.7 d; 近交系小鼠的胎间隔在34 d~40 d之间, 封闭群小鼠在25.5 d~28.7 d之间, 大鼠在32.8 d~33.8 d之间。**结论** 本中心保存的6种常用大小鼠繁殖性能较高, 获得的繁殖性能参数为华南地区实验大小鼠商业化生产和啮齿类实验动物资源库的建立提供依据和基础数据。

【关键词】 大鼠; 小鼠; 繁殖性能; 测定; 统计分析

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0009-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.003

Measurement and analysis of the reproductive performance in six commonly used SPF mice and rats

SUN Xia, LIU Ke, YANG Lin, XIA Guan-ling, TAN Qiao-yan, WANG Gang
(Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Guangdong Foshan 528248, China)

【Abstract】 Objective To determine the main reproductive performance of six SPF mice and rats preserved in our laboratory, including C57BL/6, BALB/c, NIH, KM, ICR mice and SD rats. **Methods** Inbred mice mated with full sib and random mating. Meanwhile, closed colony animals were bred by cross circular mating. These indexes of reproductive performance were measured in the six kinds of animals during the first birth to the fourth birth, i. e. the average litter size (ALZ), average baby number reared (ABN) and average weaning number (AWN), and weaning rate (WA) were calculated. Meanwhile, the initial mating age in days, initial bearing age in days, first gestation and intervals were measured. **Results** The ALZ of inbred mice were 6 to 7. The reproductive indexes were basically stable in the first 3 births, however, the various data were dramatically declined in the fourth birth ($P < 0.05$). The WA of BALB/c mice were 98% to 99%, and that of C57BL/6 mice were 96% to 98%. The ALZ of closed colony animals were 12 to 15, and significantly increased in the second and third births compared with that of the first birth ($P < 0.05$), then was significantly

[基金项目] 广东省科技计划项目(2013B060300014), 广东省医学科研基金(B2013056)。

[作者简介] 孙侠(1979-), 女, 硕士, 助理研究员。研究方向: 实验动物病理与比较医学。Email: 593533301@qq.com。

[通讯作者] 王刚(1966-), 男, 高级兽医师, 从事实验动物工作。Email: wangzhy2005@21cn.com。

reduced ($P < 0.05$). The WA maintained at 98% to 99% in the NIH, KM and ICR mice. In contrast, The WA of SD rats was slightly lower, reaching 95% to 97%. The initial mating age in days of mice was between 70 d to 80 d. The initial bearing age in days and first gestation of rats were less than that of inbred mice, the initial bearing age in days and first gestation of closed colony rats were 136.3 d and 27.7 d, respectively. The pregnancy interval of inbred mice was between 34 d to 40 d, the pregnancy interval of closed colony mice was between 25.5 d to 28.7 d, the pregnancy interval of rats was between 32.8 d to 33.8 d. **Conclusions** The 6 mouse and rat strains have a higher reproductive performance, and the data obtained in this study provide a basis for commercialized production of mice and rats in southern areas of China, and for establishment of rodent experimental animal resource.

【Key words】 Rats; Mouse; Reproductive performance; Measurement; Statistical analysis

1988 年北京建立了国家级啮齿类实验动物种子中心^[1],同时,上海也成立了国家啮齿类实验动物种子中心(上海分中心)^[2],开展保种繁育、供种生产和动物生物学特性背景数据库的研究。近年来,广东省医学实验动物中心也开展起啮齿类实验动物资源库建设及研究工作。

C57BL/6、BALB/c、NIH、KM、ICR 是最常用的几种实验小鼠,而 SD 大鼠是最常用的实验大鼠,根据广东省实验动物公共服务平台提供的数据,从平台有统计数据的 2012 年开始到 2016 年 2 月份,这 5 种小鼠占有所有小鼠生产销售量的 96%,SD 大鼠占有所有大鼠生产销售量的 90%。我中心保有上述 6 个品系 SPF 级动物,通过对其繁殖性能测定与分析研究,为华南地区实验大、小鼠的商业化生产、选择保种繁育技术和评价保种效果提供依据和背景数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠、BALB/c 小鼠、NIH 小鼠、KM 小鼠、ICR 小鼠、SD 大鼠均来源于广东省医学实验动物中心 SPF 级动物房保种室,实验动物生产许可证号: SCXK(粤)2013-0002,实验动物使用许可证号: SYXK(粤)2013-0002。

1.2 保种繁育方式

近交系 C57BL/6 小鼠、BALB/c 小鼠保种核心群采用平行线法繁育方式,雌雄按 1:1 比例同胞兄妹长期同居交配;血缘扩大群采用雌雄 2:1 比例长期同居交配,交配方式为随机交配,每对动物生产 4 胎后淘汰。封闭群 NIH 小鼠、KM 小鼠、ICR 小鼠、SD 大鼠保种核心群采用循环交配,雌雄按 1:1 比例长期同居交配,每对动物生产 4 胎后淘汰。

1.3 饲养管理

实验动物饲养于屏障设施配套隔离器内。饲养温度与湿度: 20℃ ~ 26℃, 40% ~ 70%, 采用 10 h:14 h 昼夜间断照明;饲料为生产部生产的全价配合颗粒饲料[SCXK(粤)2013-0002],采用辐照剂量为 20 ~ 25 kGy 的⁶⁰Co 灭菌;饮用水为净化水经真空高温高压灭菌,动物采用自由进食和饮水,在喂全价配合颗粒料的同时,每周加喂灭菌蛋黄、瓜子和黄豆各 1 次;保种群繁殖鼠笼垫料使用杨木刨花,垫料经灭菌炉高温高压灭菌。

1.4 繁殖性能测定

分别测定各品系保种核心群第 1 ~ 4 胎所生仔鼠的平均产仔数、平均带仔数和平均离乳数,并计算离乳率(离乳率 = 离乳数/带仔数 × 100%)。同时记录种母鼠出生日期、初配日期(即雌雄合笼日期)及各胎出生日期,并计算初配日龄、初产日龄、初配至初产间隔(简称初产间隔,初产间隔 = 初产日龄 - 初配日龄)和各胎胎间隔。

1.5 统计学方法

所测数据采用 Excel 录入和 SPSS 21.0 统计分析软件进行统计分析,统计学方法采用 *t* 检验、方差分析和多重比较(LSD 法),以 $P < 0.05$ 判为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 个品系近交系小鼠繁殖性能

2.1.1 不同胎次繁殖情况: C57BL/6 和 BALB/c 小鼠第 1 ~ 4 胎每窝平均产仔数均为 6 ~ 7 只,前 3 胎每窝平均产仔数、平均带仔数和平均离乳数基本维持稳定,但第 4 胎各项数据相比第 3 胎明显下降($P < 0.05$)。方差分析也显示各胎次间总体上存在显著差异($P < 0.05$)。不同胎次繁殖结果见表 1。

表 1 C57BL/6 小鼠、BALB/c 小鼠不同胎次繁殖情况
Tab. 1 Reproduction of the C57BL/6 and BALB/c mice

| 品系 Strains | 项目 Items | 胎次 Births | | | | ANOVA |
|------------|---------------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------------------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| C57BL/6 小鼠 | 窝数 Litter(n) | 117 | 117 | 95 | 67 | — |
| | 平均产仔数(只) Average litter size | 6.80 ± 1.87 | 7.20 ± 2.04 | 6.51 ± 1.93 | 5.76 ± 2.00 [#] | 0.000 |
| | 平均带仔数(只) Average breastfeed number | 6.58 ± 2.03 | 7.04 ± 2.01 | 6.39 ± 2.09 | 5.48 ± 2.04 [#] | 0.000 |
| | 平均离乳数(只) Average weaned number | 6.45 ± 2.05 | 6.88 ± 2.06 | 6.14 ± 2.24 | 5.30 ± 2.02 [#] | 0.000 |
| | 窝数 Litter(n) | 126 | 126 | 121 | 108 | — |
| BALB/c 小鼠 | 平均产仔数(只) Average litter size | 6.71 ± 2.21 | 7.05 ± 2.11 | 7.08 ± 2.04 | 6.32 ± 2.17 [#] | 0.025 |
| | 平均带仔数(只) Average breastfeed number | 6.71 ± 2.21 | 7.02 ± 2.13 | 7.02 ± 2.05 | 6.32 ± 2.17 [#] | 0.043 |
| | 平均离乳数(只) Average weaned number | 6.56 ± 2.23 | 6.86 ± 2.11 | 6.96 ± 2.06 | 6.23 ± 2.18 [#] | 0.047 |

注：#与第3胎比较, $P < 0.05$ 。

Note: #Comparison to the third birth, $P < 0.05$.

2.1.2 离乳率: 由图 1 可知, 两种小鼠的离乳率都保持比较高的水平, C57BL/6 小鼠达到 96% ~ 98%, BALB/c 小鼠在 98% ~ 99%。

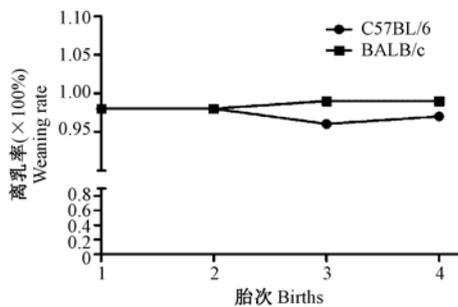


图 1 C57BL/6 小鼠、BALB/c 小鼠离乳率

Fig. 1 Weaning rates of the C57BL/6 and BALB/c mice

2.1.3 初配日龄、初产日龄、初产间隔和胎间隔: C57BL/6 小鼠的初配日龄、初产日龄、初产间隔分别是 74.4 d、98.5 d、24.1 d 左右, 低于 BALB/c 小鼠的 79.5 d、109.1 d、29.6 d, 其中初产日龄和初产间隔差异显著 ($P < 0.05$)。各胎间隔在 34 d ~ 40 d 之间, 各胎次之间除 BALB/c 小鼠的第 2、3 胎胎间隔略高外, 其余差异无显著性 (图 2)。

2.2 4 个常用封闭群大小鼠繁殖性能

2.2.1 不同胎次繁殖情况: NIH 小鼠第 1 ~ 4 胎每窝平均产仔数为 12 ~ 14 只, KM 小鼠第 1 ~ 4 胎每窝平均产仔数为 12 ~ 15 只, ICR 小鼠第 1 ~ 4 胎每窝平均产仔数为 13 ~ 15 只, SD 大鼠第 1 ~ 4 胎每窝

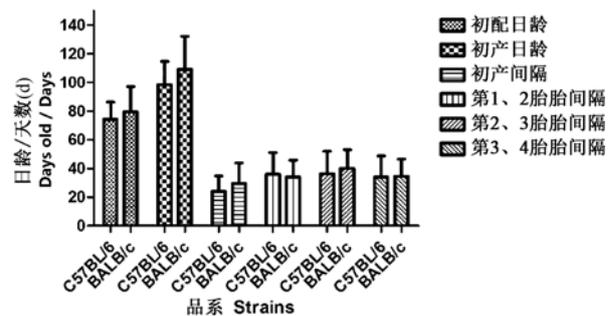


图 2 C57BL/6 小鼠、BALB/c 小鼠初配日龄、初产日龄、初产间隔和胎间隔

Fig. 2 Initial mating age in days, initial bearing age in days, first gestation and intervals of the C57BL/6 and BALB/c mice

平均产仔数为 12 ~ 13 只 (表 2)。这 4 种动物第 2 ~ 3 胎每窝平均产仔数均较第 1 胎明显升高 ($P < 0.05$), 但到第 4 胎平均产仔数均又较第 3 胎明显下降 ($P < 0.05$)。方差分析显示, 除 KM 小鼠和 SD 大鼠的平均带仔数和平均离乳数外, 其他指标各胎次间总体上存在显著差异 ($P < 0.05$)。

各胎每窝平均产仔数、平均带仔数和平均离乳数之间比较, NIH、KM 和 ICR 小鼠第 2、3 胎的平均产仔数和平均带仔数均差异显著 ($P < 0.05$), KM 小鼠的第 4 胎平均产仔数和平均带仔数也差异显著 ($P < 0.05$); SD 大鼠第 1 ~ 4 胎的平均产仔数和平均带仔数均差异显著 ($P < 0.05$); 其他时间点平均带仔数和平均离乳数之间均差异无显著性 (表 2)。

表 2 4 个常用封闭群大、小鼠不同胎次繁殖情况
Tab.2 Reproduction of the NIH, KM, ICR mice and SD rats

| 品系 Strains | 项目 Items | 胎次 Births | | | | ANOVA |
|------------|---------------------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| NIH 小鼠 | 窝数 Litter(n) | 138 | 131 | 119 | 82 | — |
| | 平均产仔数(只) Average litter size | 12.38 ± 2.61 | 13.30 ± 2.99* | 13.55 ± 2.82* | 12.50 ± 3.04# | 0.002 |
| | 平均带仔数(只) Average breastfeed number | 12.25 ± 2.55 | 12.22 ± 2.66 | 11.29 ± 2.02 | 12.04 ± 2.79 | 0.008 |
| | 平均离乳数(只) Average weaned number | 12.25 ± 2.55 | 11.96 ± 2.47 | 11.29 ± 2.02 | 11.95 ± 2.77 | 0.017 |
| | 窝数 Litter(n) | 132 | 130 | 126 | 108 | — |
| KM 小鼠 | 平均产仔数(只) Average litter size | 12.36 ± 3.02 | 14.52 ± 3.51* | 14.42 ± 3.09* | 13.06 ± 3.04# | 0.000 |
| | 平均带仔数(只) Average breastfeed number | 11.72 ± 2.80 | 11.57 ± 2.56 | 11.36 ± 2.05 | 12.11 ± 2.93# | 0.160 |
| | 平均离乳数(只) Average weaned number | 11.64 ± 2.83 | 11.55 ± 2.52 | 11.34 ± 2.01 | 11.96 ± 2.86 | 0.322 |
| | 窝数 Litter(n) | 190 | 189 | 188 | 171 | — |
| | 平均产仔数(只) Average litter size | 13.09 ± 3.03 | 14.73 ± 3.39* | 15.19 ± 2.97* | 13.94 ± 3.06# | 0.000 |
| ICR 小鼠 | 平均带仔数(只) Average breastfeed number | 12.89 ± 2.89 | 13.53 ± 3.16* | 11.54 ± 1.95* | 13.80 ± 3.13# | 0.000 |
| | 平均离乳数(只) Average weaned number | 12.65 ± 2.68 | 13.52 ± 3.15* | 11.53 ± 1.94* | 13.61 ± 3.11# | 0.000 |
| | 窝数 Litter(n) | 99 | 99 | 96 | 88 | — |
| | 平均产仔数(只) Average litter size | 11.90 ± 2.93 | 12.96 ± 3.61* | 12.82 ± 3.18* | 11.50 ± 3.30# | 0.004 |
| | 平均带仔数(只) Average breastfeed number | 10.10 ± 1.60 | 10.30 ± 2.27 | 10.71 ± 2.02* | 10.36 ± 2.56 | 0.252 |
| SD 大鼠 | 平均离乳数(只) Average weaned number | 9.74 ± 1.80 | 10.04 ± 2.22 | 10.35 ± 1.70* | 9.75 ± 2.78 | 0.157 |

注: * 与第 1 胎比较, $P < 0.05$; # 与第 3 胎比较, $P < 0.05$ 。

Note. * Compared with the first birth, $P < 0.05$; # Compared with the third birth, $P < 0.05$.

2.2.2 离乳率: NIH、KM 和 ICR 小鼠的离乳率都维持在 98% ~ 99%; SD 大鼠的离乳率则略低(95% ~ 97%) (图 3)。

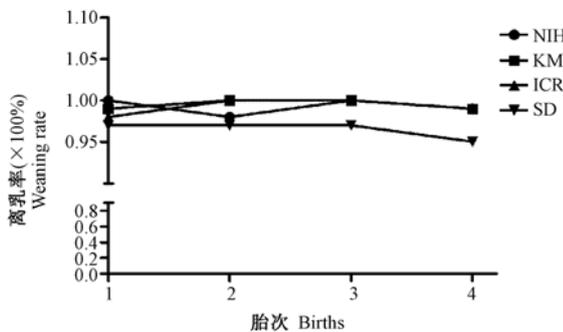


图 3 4 个常用封闭群大、小鼠保种核心群离乳率

Fig.3 The weaning rate of NIH, KM, ICR mice and SD rats of core groups

2.2.3 初配日龄、初产日龄、初产间隔和胎间隔: 根据图 4 结果, NIH、KM 和 ICR 这三个封闭群小鼠的初配日龄在 72.8 d ~ 77.6 d, 初产日龄在 93.9 d

~ 98.5 d, 初产间隔 20.9 d ~ 21.5 d, 各胎间隔在 25.5 d ~ 28.7 d, 总体无显著差异。SD 大鼠的初配日龄、初产日龄、初产间隔为 109.0 d、136.3 d、27.7 d, 各胎间隔在 32.8 d ~ 33.8 d, 各胎间隔之间无显著差异。

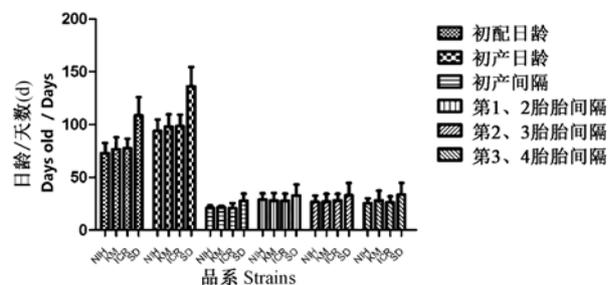


图 4 4 个常用封闭群大、小鼠初配日龄、初产日龄、初产间隔和胎间隔

Fig.4 Initial mating age in days, initial bearing age in days, first gestation and intervals of the NIH, KM, ICR mice and SD rats

3 讨论

繁殖性能是实验动物的一项重要生物学特性参数,对实验动物生产、育种、研究、应用和经济效益都有重要影响。繁殖性状受环境因素的影响比较大^[3],不同气候、营养、饲养管理、育种方式等条件都可能对繁殖性能造成影响。C57BL/6 和 BALB/c 小鼠是科研工作中最常用的两种近交系小鼠,本中心保存的这两种小鼠每窝平均产仔数为 6~7 只,与兰州大学报道的数据相一致^[4],不过 C57BL/6 小鼠 96%~98% 的离乳率高于对方 76%~87%,BALB/c 小鼠 98%~99% 的离乳率也高于其 85%~97%。

NIH、KM、ICR 和 SD 是科研工作中最常用的几种封闭群大小鼠,本中心保存的 NIH 每窝平均产仔数可达 12~14 只,高于孟琼等人报道的 8~10 只^[5]和张静旭等人报道的 10.85 只^[6],98%~100% 的离乳率也高于 89%~100% 和 68%。兰州生物制品研究所对 136 对 KM 小鼠的繁殖性能进行了测定^[7],第 1~4 胎的平均产仔数为 10~11 只,平均带仔数为 9 只左右,平均离乳数为 7~8 只,都低于本中心 KM 小鼠的数据。80%~92% 的离乳率也远低于本中心的 99%~100%;孟琼等人报道的 ICR 小鼠的平均产仔数为 10 只左右^[5],低于本中心的 12~15 只。87%~91% 的离乳率也远低于本中心的 98%~100%;浙江省医学科学院对 SD 大鼠的繁殖数据进行了研究^[8],其平均产仔数为 12.9,与本中心数据 12~13 只接近。其哺乳成活率为 95.84%,与本中心数据 95%~97% 接近。总体来看,本中心保存的 6 种常用 SPF 级大小鼠的繁殖性能较高,尤其是离乳率,本中心大小鼠的离乳率都在 95% 以上,反应了较好的实验动物种群和饲养管理。

小鼠一般 35~50 日龄之间性成熟,大鼠一般 2 月龄时性成熟^[9],但体成熟后再繁殖可能更能保证繁殖效率和后代质量,因此本中心保种核心群实验动物选择初配日龄小鼠在 70~80 d 之间,大鼠为 109 d 左右。封闭群小鼠,初产日龄在 93.9 d~98.5 d,初产间隔 20.9 d~21.5 d,与小鼠的实际妊娠期非常接近(19 d~21 d)^[9],说明这 4 个封闭群小鼠的配种成功率非常高,首次合笼后很快就可以配种成功。与之相比,近交系小鼠的配种成功率较低,C57BL/6 小鼠初产间隔为 24.1 d,BALB/c 小鼠更低,达到了 29.6 d。胎间隔也反应了这一现象,近交系小鼠在 34 d~40 d 之间,封闭群小鼠在 25.5 d~28.7 d 之间,封闭群小鼠的胎间隔数据与邝少松等

人的报道比较接近^[10]。有文献报道 SD 大鼠的交配成功时间在合笼后第 1 d~17 d 之间,其中 94.34% 都在 1 d~5 d 完成^[8],本研究 SD 大鼠 27.7 d 的初产间隔与之接近。SD 大鼠的胎间隔在 32.8 d~33.8 d,低于文献报道的 48.1 d~52.8 d^[11]。

根据 4 胎繁殖数据总体来看,本中心保存的封闭群动物平均产仔数 12~15 只,明显高于近交系小鼠的 6~7 只,说明封闭群实验动物的繁殖能力优于近交系实验动物。总体来看,各品系动物平均产仔数在第 2、3 胎会有所提高或保持稳定,到第 4 胎则会显著下降,平均带仔数、平均离乳数也有所下降或保持稳定。因此,为保持较高且稳定的生产效率,选择第 4 胎后就淘汰种鼠的繁育方式较为合理。

本中心封闭群实验动物第 2、3 胎的平均带仔数较平均产仔数显著减少,主要原因是由于母鼠的每窝平均产仔数较高,而第 2、3 胎需要留种,为了防止母鼠因带仔数过多而影响留种仔鼠的生长发育,所以在母鼠带仔时对部分超生的仔鼠进行了人为的选育和淘汰。不同品系、不同胎次每窝平均产仔数、平均带仔数和平均离乳数之间的差异也可能与环境、营养等有关,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 岳秉飞. 国家啮齿类实验动物种子中心简介 [J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(S1): 25.
- [2] 鲍世民. 国家啮齿类实验动物种子中心上海分中心 [EB/OL]. <http://www.lascn.net/Item/10847.aspx>, 2014-07-28.
- [3] 潘金春, 闵凡贵, 王希龙, 等. 藏麻小型猪繁殖性能测定和分析 [J]. 畜牧与兽医, 2014, 46(12): 47-49.
- [4] 席晓霞, 秦天达, 吴润, 等. SPF 级 BALB/c、C57BL/6 小鼠繁殖性能及生长发育的比较研究 [J]. 畜牧兽医杂志, 2009, 28(6): 11-12.
- [5] 孟琼, 杨锡平, 胡一江, 等. 3 个不同品种小鼠繁殖性能及生长发育的比较观察 [J]. 湖南中医学院学报, 2000, 20(3): 9-10.
- [6] 张静旭, 刘淑霞, 马丹, 等. NIH 小鼠生长繁殖性能的观察 [J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(5): 292-293.
- [7] 左谦益, 宁磊. 昆明小鼠生长发育指标及繁殖性能测定 [J]. 中国实验动物学杂志, 2001, 12(11): 199-202.
- [8] 洪雅青, 顾刘金, 黄雅丽, 等. SD 大鼠的繁殖性能及子代生长发育情况 [J]. 职业与健康, 2014, 30(22): 3215-3217.
- [9] 孙倩. 实验动物学基础 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2005: 49-53.
- [10] 邝少松, 潘甜美, 赵伟健, 等. 三个品种 SPF 级小鼠繁殖性能和生长发育的统计比较 [J]. 实验动物与比较医学, 2006, 26(1): 42-43.
- [11] 张平, 陈建康, 刘莉, 等. SPF 级封闭群 SD 大鼠生产繁殖性能的测定 [J]. 医学动物防制, 2015, 31(12): 1359-1361.

[修回日期] 2016-04-07



桃核承气汤对大鼠肝性脑病模型干预治疗的分析

李晓娟¹, 朱云², 王立福², 杜宁², 孙永强², 宋雪艾²,
景婧², 王丽苹², 张帆², 余思邈², 王睿林², 李瑞生¹

(1. 解放军第302医院临床研究管理中心, 北京 100039, 2. 解放军第302医院中西医结合诊疗与研究中心, 北京 100039)

【摘要】 目的 探讨桃核承气汤(去甘草)对硫代乙酰胺(TAA)诱导的大鼠肝性脑病的干预治疗作用。方法 通过TAA腹腔注射诱导建立大鼠肝性脑病模型,观察桃核承气汤(去甘草)颗粒对肝性脑病的神经行为改变、神经病学测试、血清生化指标及肝脏和脑病理损伤的影响。结果 本实验成功构建了大鼠肝性脑病模型。桃核承气汤(去甘草)颗粒低、中、高剂量均能不同程度地改善TAA引起的HE大鼠的神经反射情况,降低HE级别,降低血氨和生化指标指数以及使病理结果均呈现减轻的现象,其中以高剂量组为最佳($P < 0.05$),效果与阳性药相近。结论 桃核承气汤(去甘草)对TAA引起的大鼠肝性脑病有较好的预防治疗作用,本实验为该方剂的临床肝性脑病的使用提供了坚实的实验依据。

【关键词】 桃核承气汤;肝性脑病;硫代乙酰胺;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0014-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.004

Analysis of the preventive and therapeutic effects of Taohe Chengqi decoction on a rat model of hepatic encephalopathy

LI Xiao-juan¹, ZHU Yun², WANG Li-fu², DU Ning², SUN Yong-qiang², SONG Xue-ai²,
JING Jing², WANG Li-ping², ZHANG Fan², YU Si-miao², WANG Rui-lin², LI Rui-sheng¹

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

【Abstract】 **Objective** To analyze the preventive and therapeutic effects of a traditional Chinese medicine Taohe Chengqi decoction on a rat models of hepatic encephalopathy (HE) induced by thioacetamide (TAA). **Methods** The rat model of HE was established by intraperitoneal injection of TAA, and the effects of Taohe Chengqi decoction were observed by neurobehavioral changes, neurological test, blood ammonia, serum biochemical indexes, and liver and brain pathological examination. **Results** The rat model of hepatic encephalopathy was successfully established. Low, medium and high dose Taohe Chengqi decoction markedly improved neuro-reflexes and liver and brain pathological damages, and significantly decreased the HE staging and serum biochemical indexes, and the results of high dose group was the best, similar to that of positive drug-treatment group. **Conclusions** Taohe Chengqi decoction exhibits promising preventive and therapeutic effects on the rat model of TAA-induced hepatic encephalopathy, and these results provide substantial experimental evidence for its clinical application.

【基金项目】 国家“十二五”科技重大专项资助项目(2012zx10005010-002-002)。

【作者简介】 李晓娟(1980-),女,硕士,E-mail: sxlily55@163.com;朱云(1983-),女,博士, zynorway@126.com;二者为并列第一作者。

【通讯作者】 王睿林(1979-),男,博士,主治医师,从事中西医结合治疗研究,E-mail: wr17905@163.com;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。

【Key words】 Taohe Chengqi decoction; Hepatic encephalopathy; Thioacetamide; Rat

肝性脑病 (hepatic encephalopathy, HE) 是一种以可逆性意识障碍为主要特征的神经紊乱和运动异常综合征, 多为急慢性肝病较严重的并发症。临床先出现精神症状, 而后出现意识障碍, 甚至并发的脑水肿常导致颅内压增高和脑卒的发生, 因此具有较高死亡率^[1,2]。HE 发病机制尚未完全阐明, 也无有效的防治药物与方法, 因此对 HE 的基础和临床研究十分迫切。肝性脑病动物模型的建立对于发病机制、诊断和治疗的研究发挥着非常重要的作用, 其中以大鼠模型应用最为广泛^[3]。桃核承气汤是《伤寒论》治太阳蓄血证的主方, 具有活血软坚、疏肝解郁、健脾化湿之功效, 研究表明此方剂对肝脏具有一定的保护作用^[4,5]。因此本实验拟通过硫代乙酰胺 (TAA) 诱导大鼠肝性脑病模型, 观察桃核承气汤对其 HE 评分、生化指标以及肝脏和脑病理结果的影响, 探讨其对肝性脑病的防护作用和作用机理, 以期为临床寻求治疗 HE 的药物提供坚实的实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只, 单鼠体质量 180 ~ 220 g, 军事医学科学院实验动物中心提供, 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】。

1.2 药品与试剂

硫代乙酰胺 (thioacetamide, TAA) (Sigma 公司), 产品号: G2501, 批号: 9029-12-3。氯化钠注射液 (0.9%) 来自石家庄四药有限公司, 批号: 1412273201; 氯化钾来自中国医药公司北京采购供应站, 产品号: 090407; 葡萄糖来自北京化工厂, 产品号: 20090228; 乳果糖 (Abbott 公司), 产品号: 1083418。甲醛溶液来自天津市大茂化学试剂厂, 批号: 20100523。桃核承气汤 (去甘草) 颗粒 (桃仁、桂枝、芒硝和生大黄) 由本院制剂室制备 (6.5g/袋)。

1.3 动物分组及模型制备

SD 大鼠在本中心 SPF 级屏障环境饲养, 动物自由饮水、采食正常饲料, 1 周后随机分为六组 (8 只/组): 空白对照组, 模型对照组, 桃核承气汤 (去甘草) 颗粒低、中、高剂量 (1.17、3.51、10.53 g/kg) 组, 乳果糖组 (0.2 mL/d/只)。桃核承气汤 (去甘草) 的剂量根据人临床剂量换算, 换算公式: 大鼠剂量 (g/

kg) = 6.3 × 人临床剂量 (0.5 g/kg)。此剂量作为低剂量, 而中剂量与高剂量分别为低剂量的 3 倍和 9 倍。给药: 中药高、中、低剂量组以及阳性药组从造模前 1 周开始至造模后 2 d 连续给药, 中药各剂量组的灌胃容量为 2 mL/200 g 大鼠体重, 乳果糖组灌胃体积为 (0.2 mL/200 g), 1 次/d。正常对照组和模型组给予相同体积的生理盐水。造模: TAA 250 mg/(kg/d) 隔日腹腔注射 2 次。正常对照组则给予生理盐水 ip, 共 2 次。首次注射 TAA 后每隔 12 h, 各组大鼠 (包括正常对照组) 均皮下注射 0.5 mL 混合溶液 (含 0.45% NaCl、5% 葡萄糖、0.2% KCl) 行补液治疗。

1.4 检测指标

1.4.1 造模后, 观察大鼠精神状态、体质量变化、自主活动等情况: 根据大鼠肝性脑病诊断标准, 若大鼠出现嗜睡、反应迟缓, 自主性活动减少、共济失调、昏迷等症状之一, 即可诊断 HE^[6]。并根据 Zimmermann 法^[6]对大鼠 HE 进行分级: 0 级: 正常 (11 分); I 级: 嗜睡, 反应迟缓, 自主活动减少, 反射正常 (11 分); II 级: 共济失调, 但反射仍基本正常 (10 ~ 11 分); III 级: 反射逐渐消失 (< 10 分); IV 级: 角膜反射消失, 动物昏迷 (0 分)。

1.4.2 血液生化指标及肝脏与脑病理学检测: 于末次注射 TAA 的第 2 天, 各组大鼠禁食 8 h 后经眶后静脉丛采集 3 mL 血液分离血清用于检测丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP) 和白蛋白/(总蛋白 - 白蛋白) A/G 比值等生化指标。采集完血液后, 取各组大鼠相同部位肝脏组织和两侧脑组织置 4% 甲醛溶液固定, 切片, HE 染色, 进行病理组织学检查^[7]。肝组织病理观察参照文献 [8] 方法对肝组织病变程度进行分级: 正常 (-)、肝细胞水肿 (+)、气球样变 (++)、点状坏死伴门管区炎症细胞浸润 (+++)、小灶样坏死 (++++)

1.5 统计学方法

应用 SPSS 17.0 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 药物对各组大鼠行为、神经反射、HE 等级影响及血氨对比分析

各组大鼠神经反射评分、HE 分级结果显示：空白对照组大鼠活动灵活，神经反射灵敏。模型组大鼠均不同程度的出现行动迟缓，步态不稳，共济失调等反射极迟钝或消失等现象。与模型组比较，其他各组 HE 级别均降低，但只有阳性对照组与桃核承气汤高剂量组具有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型对照组的血氨显著高于空白对照组 ($P < 0.05$)，用药组均出现不同程度的降低，而与模型组比较，阳性对照组、中剂量组和高剂量组的血氨显著降低 ($P < 0.05$) (表 1)。

2.2 药物对各组大鼠生化指标的影响

通过对各组大鼠生化指标的对比分析显示：与空白对照组比较，模型组大鼠的 ALT、AST、ALP 均显著增高 ($P < 0.05$)，A/G 比值显著降低 ($P < 0.05$)。与模型对照组比较，其他各组大鼠的 ALT、AST、ALP 均显著降低 ($P < 0.05$)，A/G 比值显著增高 ($P < 0.05$)。与阳性对照组比较，桃核承气汤低剂量组的 ALT、AST 显著增高 ($P < 0.05$)，A/G 比值

显著降低 ($P < 0.05$)，而桃核承气汤中剂量组和高剂量组与阳性对照组结果差异无显著性 (表 2)。

2.3 药物对各组大鼠肝脏和脑的病理结果影响

肝脏病理学研究结果显示：正常对照组肝细胞结构基本正常，未见脂肪变性、肿胀、炎症、细胞变性坏死等明显的病理组织学的改变。模型对照组：肝细胞排列紊乱，肝小叶结构不清，呈现不同程度的肿胀、变性、点片状、小灶或大灶性碎屑状坏死。与模型对照组比较，桃核承气汤低、中和高剂量组以及乳果糖组的肝组织变性、肿胀、坏死均有不同程度的减轻和改善 (表 3)。脑病理结果显示：正常对照组未见异常。模型组大脑有轻度脑水肿致血管周围轻度袖套样改变，神经元光镜下有少量噬神经现象，原浆型胶质细胞散在或灶性退变，部分区域有轻度增生，轻度脑水肿。与模型组比较，桃核承气汤低、中和高剂量组以及乳果糖组的脑组织的病变程度均有所减轻和改善 (图 1)。

表 1 各组大鼠神经反射得分、HE 等级及血氨比较结果

Tab. 1 Comparison of scores of neuro-reflexes, the staging of hepatic encephalopathy and blood ammonia in each group

| 组别/指标 Group/Indexes | 神经反射得分 Scores of neuro-reflexes | HE 级别 Staging of HE | 血氨 (mmol/L) Blood ammonia (mmol/L) |
|------------------------------|------------------------------------|--------------------------|---|
| 空白对照组 Control group | 11 | 0 | 42.71 ± 9.87 |
| 模型对照组 Model group | 2 - 8 | 3.0 ± 0.00 | 190.45 ± 35.76 ^Φ |
| 阳性对照组 Positive control group | 8 - 11 | 2.13 ± 0.64* | 58.38 ± 16.75* |
| 低剂量 Low dose group | 4 - 10 | 2.75 ± 0.46 ^Δ | 157.80 ± 27.14 ^{ΦΔ} |
| 中剂量 Medium dose group | 6 - 11 | 2.63 ± 0.74 | 120.44 ± 29.65 ^{Φ*} ^Δ |
| 高剂量 High dose group | 9 - 11 | 2.00 ± 0.53* | 62.97 ± 13.21* |

注：与空白对照组比较：^Φ $P < 0.05$ 。与模型对照组比较：^{*} $P < 0.05$ 。与阳性对照组比较：^Δ $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the control group: ^Φ $P < 0.05$. Compared with the model group: ^{*} $P < 0.05$. Compared with the positive control group: ^Δ $P < 0.05$.

表 2 各组大鼠血清生化指标分析

Tab. 2 Analysis of serum biochemical indexes in each group

| 组别/指标 Group/Indexes | 丙氨酸转氨酶 ALT (U/L) | 天冬氨酸氨基转移酶 AST (U/L) | 碱性磷酸酶 ALP | 白蛋白/(总蛋白 - 白蛋白) A/G |
|---------------------------------|---|---|------------------------------|---------------------------|
| 空白对照组 Control group | 55.88 ± 8.63* ^Δ | 165.25 ± 25.64* ^Δ | 457.50 ± 70.95* | 2.12 ± 0.19* |
| 模型对照组 Model group | 467.5 ± 171.28* ^Δ | 1158.25 ± 256.86* ^Δ | 781.25 ± 88.20* ^Δ | 1.30 ± 0.33* ^Δ |
| 阳性对照组 Positive control group | 175.5 ± 54.45* [*] | 406.38 ± 178.72* [*] | 533.88 ± 160.48* | 1.94 ± 0.26* |
| 低剂量 Low dose group | 277.13 ± 65.20* [*] ^Δ | 638.88 ± 87.91* [*] ^Δ | 648.13 ± 82.63* [*] | 1.54 ± 0.33* ^Δ |
| 中剂量 Medium dose group | 237.25 ± 53.82* [*] | 524.63 ± 280.18* [*] | 564.38 ± 128.25* | 1.79 ± 0.64* |
| 高剂量 High dose group | 135.13 ± 29.75* | 249.63 ± 147.26* | 523.75 ± 99.68* | 2.20 ± 0.59* |

注：注：与空白对照组比较：^{*} $P < 0.05$ 。与模型对照组比较：^{*} $P < 0.05$ 。与阳性对照组比较：^Δ $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the control group: ^{*} $P < 0.05$. Compared with the model group: ^{*} $P < 0.05$. Compared with the positive control group: ^Δ $P < 0.05$.

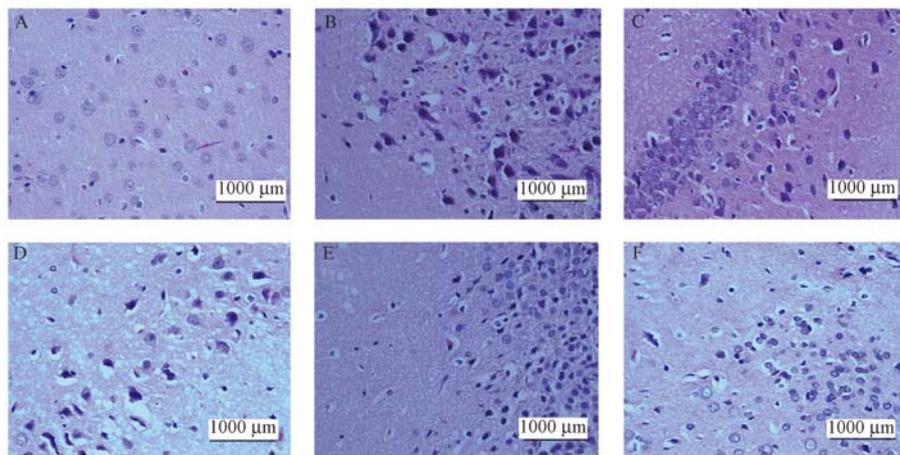
表 3 各组大鼠肝脏组织的病变程度

Tab. 3 The degrees of liver damage in the rats in each group

| 组别 Groups | N | (-) | (+) | (++) | (+++) | (++++) |
|-----------------------|---|-----|-----|------|-------|--------|
| 空白对照组 Control group | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 模型对照组 Model group | 8 | 0 | 3 | 2 | 1 | 2 |
| 阳性对照组 Positive group | 8 | 2 | 4 | 1 | 1 | 0 |
| 低剂量 Low dose group | 8 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| 中剂量 Medium dose group | 8 | 1 | 3 | 3 | 1 | 0 |
| 高剂量 High dose group | 8 | 1 | 4 | 2 | 1 | 0 |

注：正常(-)、肝细胞水肿(+)、气球样变(++)、点状坏死伴门管区炎症细胞浸润(+++)、小灶样坏死(++++)

Note. Normal (-), Hepatocyte edema (+), balloon degeneration (++) , punctate necrosis accompanied with inflammatory cell infiltration in portal area (+++), focal necrosis (++++).



注：A：对照组；B：模型组；C：阳性对照组；D：桃核承气汤低剂量组；E：桃核承气汤中剂量组；F：桃核承气汤高剂量组(标尺=1 000 μm)

图 1 各组大鼠脑组织病理学检查结果(HE 染色)

Note: A: A control mouse; B: A mouse of model group; C: A mouse of positive control group; D: A mouse of low Taohechengqi Decoction group;

E: A mouse of medium Taohe Chengqi Decoction group; F: A mouse of high Taohe Chengqi Decoction group(Bar = 1 000 μm)

Fig. 1 The results of pathological examination of the brain in different groups(HE staining)

3 讨论

肝性脑病的临床表现非常复杂,虽然氨中毒学说在肝性脑病的发病机制中占着核心地位,但对肝性脑病的定义以及治疗仍存在争论^[9],目前临床上仍以西医结合中医的综合治疗为主,中医法常见有化痰通腑法、通腑开窍法、退黄降氨汤等,能够降低血氨来改善 HE 病情。在西医无特效疗法之时,中药治疗有着广阔的发展空间^[10]。张照兰等^[11]运用肠毒清颗粒灌肠法治疗肝性脑病,达到泻下排毒、化浊开窍的目的。胡瑜等^[12]证实丹参注射液对肝性脑病有较好的防治作用。而桃核承气汤是仲景之名方,主治瘀血与邪热互结于下焦之蓄血证^[13],杨荣源等^[4]证实桃核承气汤(桃仁、大黄、桂枝、芒硝、甘草)对脓毒症大鼠肝脏组织具有保护作用。而本实验中对传统的桃核承气汤进行了方剂改良,由于中医理论认为“甘”能令人中满,肝病常见腹胀

症状,为防出现中满之候加重,故去之。本方在临床使用中,对肝性脑病具有一定的疗效,但国内外尚无对该改良方剂的报道。

因此本实验使用 TAA 构建 SD 大鼠肝性脑病模型,观察桃核承气汤(去甘草)改良方剂对肝性脑病的作用效果。各组大鼠神经反射和 HE 等级、血清生化指标以及肝脏和脑病理结果显示:模型组大鼠均不同程度的出现行动迟缓,步态不稳,共济失调等反射极迟钝或消失等现象,评分较低,级别较高,血氨浓度显著升高,生化指标 ALT、AST、ALP 均显著增高($P < 0.05$),A/G 比值显著降低($P < 0.05$),同时模型组肝脏病理显示出现了不同程度的灶样坏死,脑病理结果也显示轻度的脑水肿,由此说明本实验成功构建了大鼠肝性脑病模型。而其他用药各组的 HE 级别、血氨浓度、血清生化指标以及病理学改变结果均显示按照桃核承气汤(去甘草)颗粒从低、中到高剂量出现了依次的降低和减轻现

象,由此表明桃核承气汤(去甘草)颗粒低、中、高剂量均能不同程度地改善 TAA 引起的 HE 大鼠的神经反射情况,降低 HE 级别,降低生化指标的指数以及使病理结果均呈现减轻的现象,其中血氨浓度的显著降低可能对 HE 症状的改善起到决定性作用,而其中尤以高剂量组为最佳($P < 0.05$),效果与阳性药相近。此结果与胡瑜等^[12]使用丹参对肝性脑病的干预结果较一致,同时对对肝脏组织保护作用方面,与杨荣源等^[4]使用桃核承气汤(桃仁、大黄、桂枝、芒硝、甘草)对肝脏保护作用的结果相一致,但本实验中的桃核承气汤(去甘草)为改良方剂,具体的改良剂量对药物的作用影响及其作用机制有待进一步研究。

综上所述,本实验应用桃核汤承气(去甘草)对 TAA 大鼠肝性脑病模型进行干预实验,结果表明本方剂对 TAA 引起的肝性脑病症状具有减缓作用,显著降低血氨浓度,同时对 TAA 造成的肝损伤具有一定保护作用,为该方剂用于临床肝性脑病的治疗提供坚实的动物实验支持以及为进一步作用机制的研究奠定研究基础。

参考文献:

- [1] 刘冀,朱建忠,隋月林,等. 四氯化碳诱导大鼠肝性脑病模型的制备 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(2): 33-37.
- [2] 江文明. 肝性脑病的发病机制及治疗进展 [J]. 求医问药, 2012, 10(7): 580-581.
- [3] 谭琳玲,潘锦瑶,郑德俊,等. 硫代乙酰胺诱导大鼠急性肝

性脑病模型建立的用药时间研究 [J]. 现代消化及介入诊疗, 2013, 18(6): 344-348.

- [4] 杨荣源,黄宏强,刘云涛,等. 桃核承气汤对脓毒症大鼠肝脏组织的保护作用及机制 [J]. 新中医, 2014, 46(6): 210-212.
- [5] 张英军,王军,徐阳,等. 桃核承气汤的实验研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2014, 30(2): 234-237.
- [6] Zimmermann C, Ferenci P, Pflü C, et al. Hepatic encephalopathy in thioacetamide-induced acute liver failure in rats: characterization of an improved model and study of amino acid-ergic neurotransmission [J]. Hepatology, 1989, 9: 594-601.
- [7] 王睿林,李晓娟,白云峰,等. 黄连解毒汤对小鼠酒精性脂肪肝的预防作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(2): 34-37, 87.
- [8] 王丽卿,祝胜美,周衡俊,等. 急性肝性脑病大鼠脑水肿与脑水通道蛋白 4 的相关性 [J]. 中华医学杂志, 2011, 91(36): 2573-2577.
- [9] 逢菲,胡瑾华. 肝性脑病的动物模型及分子生物学机制研究进展 [J]. 国际消化病杂志, 2014, 34(2): 84-86.
- [10] 徐大海,张楠,高金莹,等. 肝性脑病治疗进展 [J]. 临床肝胆病杂志, 2011, 27(2): 218-221.
- [11] 张照兰,时峰. 肠毒清颗粒灌肠治疗肝性脑病 II-III 级的临床观察 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(9): 2365-2366.
- [12] 胡瑜,蔡梦婷,陈健文,等. 丹参注射液对肝性脑病的防治作用及机制研究 [J]. 中国药师, 2014, 17(11): 1811-1814.
- [13] 张英军,王军,徐阳,等. 桃核承气汤的实验研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2014, 30(4): 234-237.

[修回日期] 2016-04-28

(上接第 8 页)

- [9] Yu J, Wang ZJ, Chen LH, et al. Diagnostic accuracy of interferon-gamma release assays for tuberculous meningitis: a meta-analysis [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2016, 20(4): 494-499.
- [10] Lahuerta-Marin A, Gallagher M, McBride S, et al. Should they stay, or should they go? Relative future risk of bovine tuberculosis for interferon-gamma test-positive cattle left on farms [J]. Vet Res, 2015, 46: 90.
- [11] Vervenne RA, Jones SL, van Sooling D, et al. TB diagnosis in non-human primates: comparison of two interferon-gamma assays and the skin test for identification of *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2004, 100(1-2): 61-71.
- [12] Garcia MA, Yee J, Bouley DM, et al. Diagnosis of tuberculosis in macaques, using whole-blood in vitro interferon-gamma (PRIMAGAM) testing [J]. Comp Med, 2004, 54(1): 86

-92.

- [13] Parsons SD, de Villiers C, Gey van Pittius NC, et al. Detection of *Mycobacterium kansasii* infection in a rhesus macaque (*Macaca mulatta*) using a modified QuantiFERON-TB Gold assay [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2010, 136(3-4): 330-334.
- [14] 汪乾坤,姜勇,童胜涛,等. 猕猴结核 IFN- γ 体外释放检测法的建立与初步应用 [J]. 中国兽医学报, 2015, 35(9): 1488-1494.
- [15] 廖娟红. 新型牛结核 IFN- γ 体外释放检测法的建立和应用 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010: 38-44.
- [16] 杨新婷,杨扬,杜凤娇,等. 肺结核患者全血 γ 干扰素释放试验影响因素的探讨 [J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(12): 1007-1012.

[修回日期] 2016-03-19



慢性心力衰竭大鼠肝脏组织的代谢轮廓

巫菲¹, 李彤^{2,3}, 张磊², 董志欢¹, 米睿²

(1. 天津医科大学三中心临床学院 300170; 2. 天津市第三中心医院; 3. 天津市人工细胞重点实验室)

【摘要】目的 建立慢性心力衰竭大鼠肝脏组织代谢轮廓模型,从代谢角度探索慢性心衰肝脏代谢变化规律,探寻对心力衰竭分子机制及疾病诊疗具有价值的特征代谢物。**方法** Wistar 雄性大鼠 20 只,心衰组行腹主动脉缩窄手术,对照组行假手术,术后饲养 24 周。利用代谢组学研究平台对大鼠肝脏组织进行代谢轮廓分析,建立心衰大鼠肝脏组织正交偏最小二乘判别模型及主成分分析模型,结合 SPSS 19.0 软件的数据处理最终得到特征代谢物。**结果** 成功建立了主成分分析模型及正交偏最小二乘判别模型,同时从模型中筛选并鉴定了 10 种在心衰组与对照组具有差异的特征代谢物,包括溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、油酸、甘氨酸、硫酸脱氢表雄酮等物质。**结论** 构建的代谢轮廓模型很好地拟合慢性心衰大鼠肝脏的代谢紊乱状态,筛选出的特征代谢物可为该疾病的病理生理分子机制以及该疾病诊疗等提供参考和帮助。

【关键词】 心力衰竭;色谱法;高压液相;质谱分析法;代谢组学;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0019-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.005

Metabolic profiling of liver in the rats with chronic heart failure

WU Fei¹, LI Tong^{2,3}, ZHANG Lei², DONG Zhi-huan¹, MI Rui²

(1. The Third Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China; 2. Tianjin Third Central Hospital; 3. Tianjin Institute of Hepatobiliary Diseases, Tianjin Key laboratory of Artificial Cells)

【Abstract】 Objective To establish a rat model of liver metabolism profile in chronic heart failure (CHF), to explore the dynamics of liver metabolism in CHF from the point of view of metabolism, and to find the characteristic metabolites valuable for the molecular mechanism and management of CHF. **Methods** Twenty male Wistar rats were assigned to the CHF group to receive aortic coarctation or to the control group to receive sham surgery, and were bred for 24 weeks following surgery. The metabolic profiling of the rat liver tissues was analyzed on a metabolomics research platform. Orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) model and principal component analysis (PCA) model were established for liver tissues of the CHF rats, and the characteristic metabolites were finally derived by data processing with SPSS 19.0 software. **Results** The PAC and OPLS-DA models were established successfully. Ten characteristic metabolites with significant differences between the CHF and control groups, including lysophosphatidyl choline, lysophosphatidyl ethanolamine, oleic acid, glycocholic acid, and dehydroepiandrosterone sulfate, were screened and identified from the models. **Conclusions** The metabolic disorders in CHF rats are well fitted to the established metabolic profile models, and these identified characteristic metabolites may provide reference for the pathophysiological molecular mechanism and management, etc., of chronic heart failure.

【Key words】 Chronic heart failure; Chromatography, high pressure liquid; Mass spectrometry; Metabolomics; Rat

[基金项目]天津市卫生局攻关项目(12KJ106)。

[作者简介]巫菲(1989-),女,硕士研究生,主要从事心血管代谢研究。

[通讯作者]李彤,博士生导师,主要从事心血管研究。E-mail:Litongtj@163.com。

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是高血压和冠心病等多种心血管疾病进行性发展的终末阶段。肝脏是机体代谢的枢纽,参与了合成、分解、转化和排泄等代谢过程,心力衰竭可以导致不可逆的肝脏损伤和肝硬化,反之,肝损伤会加剧心衰患者预后不良,给患者及社会造成较大的负担。因此了解心力衰竭状态下肝组织代谢变化有重要意义。代谢组学是一种研究生物体状态改变后内源性小分子物质变化情况的新技术,可揭示生物体在内外因素的刺激后整个代谢网络的变化规律,得出和病理状态、疾病进程相关的系统生物学结果^[1]。本研究利用代谢组学的研究平台构建疾病区分模型,筛选慢性心力衰竭状态下肝组织特征代谢产物,初步探讨心衰状态下肝组织代谢变化,为该疾病病理生理分子学机制以及该疾病诊疗等提供参考和帮助。

1 材料和方法

1.1 材料

正常雄性 Wistar 大鼠 20 只,SPF 级,体质量 225 ~ 250 g,购自北京维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2012-0001】。Accela 超高效液相色谱仪、低温高速离心机 Multifuge X1R 型、LTQ Orbitrap XL 质谱仪(美国 Thermo 公司);Vevo2100 view 高分辨率小动物超声系统(英国 Sonic 公司);甲酸、乙腈、甲醇购自德国 Merck KGaA 公司。实验相关操作在天津医科大学动物实验设施内进行【SYXK(津)2009-0001】。

1.2 方法

1.2.1 分组:将大鼠按随机数字表法分为心力衰竭组(CHF 组)、对照组(SHAM 组)。

1.2.2 模型制备:3%戊巴比妥钠(0.05 g/kg)溶液行腹腔注射麻醉。手术区域备皮、消毒,腹正中暴露腹腔探查,游离腹主动脉,穿过 3-0 丝线,进行缺血预适应,将腹主动脉缩窄于平头绿色注射器针头(21G, d=0.6 mm)上,后撤出针头并确认缩窄效果良好,逐层关闭腹腔。消毒、排气并注射 20 万单位青霉素预防腹腔感染。术后合理饲养 24 周,行心动超声检测。Sham 组:经相同手术操作程序,腹主动脉穿线缺血预适应后不结扎,饲养同 CHF 组。

1.2.3 标本的采集和预处理:大鼠脱颈处死后,摘

取肝脏组织,迅速液氮冷冻后置于 -80℃ 超低温冰箱保存。取出组织称重,以 1:3 加入纯水充分研磨,超声震荡器混匀,10 000 r/min 离心 15 min,取上清液 100 μ L,再加入 300 μ L 甲醇,充分震荡摇匀,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 100 μ L 真空离心蒸干得干粉后加 300 μ L 乙腈重新溶解,上样。

1.2.4 样本分析:液相色谱为 Thermo 公司的 Accela 超高效液相色谱系统。色谱柱为 Thermo Hypersil GOLD 反相 C18 柱(2.1 mm i. d. x 50 mm. 1.9 μ m)。流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液,流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液,色谱洗脱过程为 15 min,进样量为 10 μ L,流速设定在 200 μ L/min。洗脱梯度起始为 5% B 并维持 3 min,然后 10 min 内 B 线性增加至 50%,再往后 3 min 内 B 增加至 95%,并维持 4 min,然后降回 5%,平衡色谱柱 4 min,进样量为 10 μ L。自动进样器内温度保持在 4℃。质谱采用正离子模式进行检测,采用棒状(centroid)模式扫描,扫描质荷比区间为 50 ~ 1000 (m/z)。二级质谱采用选择离子检测(SIM)模式,碰撞能量为 35(标准化碰撞能量)。分辨率为 100000 (FMHW)。毛细管电压 30 V,锥孔电压 150 V,离子源电压 4.5 kV,鞘气流速为 30 arb,辅气流速 5 arb。使用厂家提供校正液进行质量校正。

1.2.5 数据处理:根据筛选出的变量重新设定仪器参数,对质控溶液进行 MS/MS 扫描,获得这些代谢物的二级质谱图;利用精确质量数(m/z)和 MS/MS 图谱搜索 Mass Frontier 6.0 自带数据,Medlin 数据库,KEGG 数据库以及 HMDB 数据库,经过结构推导得出初步结果;通过与标准品的 MS/MS 质谱图对比得到鉴定。

1.2.6 统计学方法:经 SPSS 19.0 统计软件对实验数据进行两个独立样本的非参数检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心脏超声结果

CHF 组可见射血分数(EF)、缩短分数(FS)、收缩期末左室后壁厚度(LVPW)、收缩期室间隔厚度(IVS)、主动脉平均流速(Mean Vel),主动脉峰值流速(Peak Vel)明显降低(表 1)

表 1 各组超声心动检查结果比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Cardiac echocardiography of the rats

| 项目 Indexes | CHF 组 CHF group | SHAM 组 Sham group | P 值 |
|--------------------------------|--------------------|----------------------|-------|
| 左心室射血分数/(%) EF | 43.2 ± 3.0 | 61.2 ± 2.5 | 0.018 |
| 左心室短轴缩短分数/(%) FS | 22.2 ± 1.8 | 33.9 ± 1.8 | 0.013 |
| 室间隔收缩期厚度/(mm) IVS;s, mm | 1.4 ± 0.1 | 2.1 ± 0.8 | 0.020 |
| 左心室后壁收缩期厚度/(mm) LVPW;s, mm | 1.5 ± 0.1 | 1.98 ± 0.2 | 0.013 |
| 主动脉平均流速/(mm/s) Mean Vel, mm/s | 388.1 ± 29.7 | 675.7 ± 98.3 | 0.010 |
| 主动脉平均压差/(mmHg) Mean Grad, mmHg | 0.6 ± 0.1 | 1.9 ± 0.5 | 0.012 |
| 主动脉峰流速/(mm/s) Peak Vel, mm/s | 695.1 ± 45.9 | 1218.3 ± 18 | 0.008 |
| 主动脉峰压差/(mmHg) Peak Grad mmHg | 2.0 ± 0.3 | 6.06 ± 1.7 | 0.010 |

2.2 病理学检查

同倍数下观察 CHF 组可见肝组织的病理严重程度与心衰模型构建的时间呈正相关,镜下主要表现为肝脏淤血性损害。可见肝血窦增宽,细胞出现轻度肿胀,细胞核出现深染、核固缩改变,提示可能发生了肝细胞凋亡;肝脏病理改变加重,静脉系统内淤血明显,肝细胞出现大面积坏死,尤其以中央静脉周围多见,局部仍还有散在的形态正常的细胞团。肝细胞本身出现核固缩、核碎裂、核溶解改变,并存在不同程度的脂肪变,没有出现明显的肝硬化征象,无明显的结缔组织增生和假小叶形成。(图 1)

2.3 数据的总离子流图和质控分析

以正常和心衰肝脏样本为依托,结合超高效液相色谱与质谱连用系统平台成功得到标本的总离子流图(图 2)。通过质控溶液在整个样品分析过程中的检测分析评价 UPLC-MS 系统的工作稳定性,对 15 个质控溶液数据进行主成分分析(PCA)后,得到一个拥有 2 个成分的 PCA 模型,系统在样品分析过

程中相对平稳,整个质控没有出现界外值。且根据相关文献提出的有关 UPLC-MS 平台重复性的质控合格标准本研究 15 个质控液穿插于样品分析过程中,可靠离子峰分布在 85.6% 到 94.8% 之间。因此,可以认为该批次样本分析结果可靠。

2.4 代谢轮廓对疾病的区分能力

Simca 分析软件将数据转换成 UV 格式和平均中心化模式,获得更直观的图像结果。Simca 软件进行 PCA 分析共获得四个主成分, $R^2X = 42.1%$, $Q^2 = 22.4%$ 。当 R^2X 值大于 40% 就可以认为该模型可靠,因此当前 PCA 模型可用于显示两组之间的代谢差异(图 3A)。同时构建正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)模型分析,该模型有一个预测主成分,三个正交主成分, $R^2X = 68.5%$, $R^2Y = 99.3%$, $Q^2 = 96.1%$,由此可见此模型具有很好的拟合度和预测能力。模型组样本数据构建的 OPLS-DA 模型在第一预测主成份与第一正交主成份上的打分图(图 3B)。全部的验证组标本均能够正确的归入相应分组聚类,模型的预测准确度达 100%。

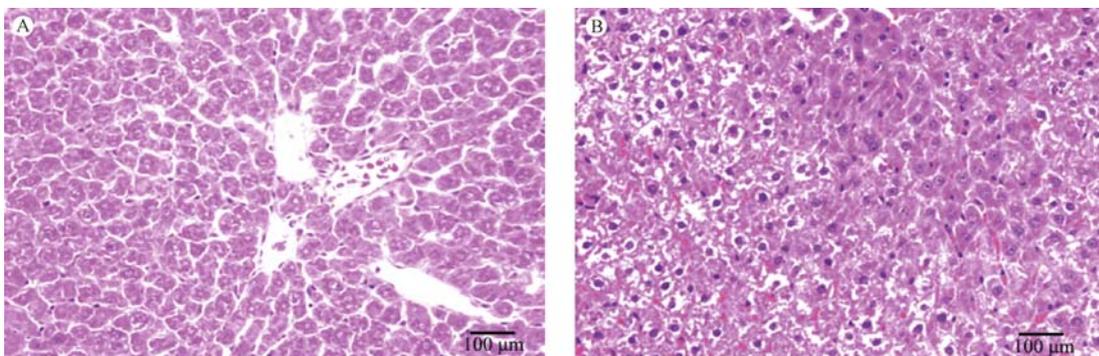


图 1 光镜下肝脏病理改变。A: 正常肝脏; B: 心衰肝脏(标尺 = 100 μm)

Fig.1 Pathological changes of the liver tissues. A: Liver of the sham group; B: Liver of the CHF group.

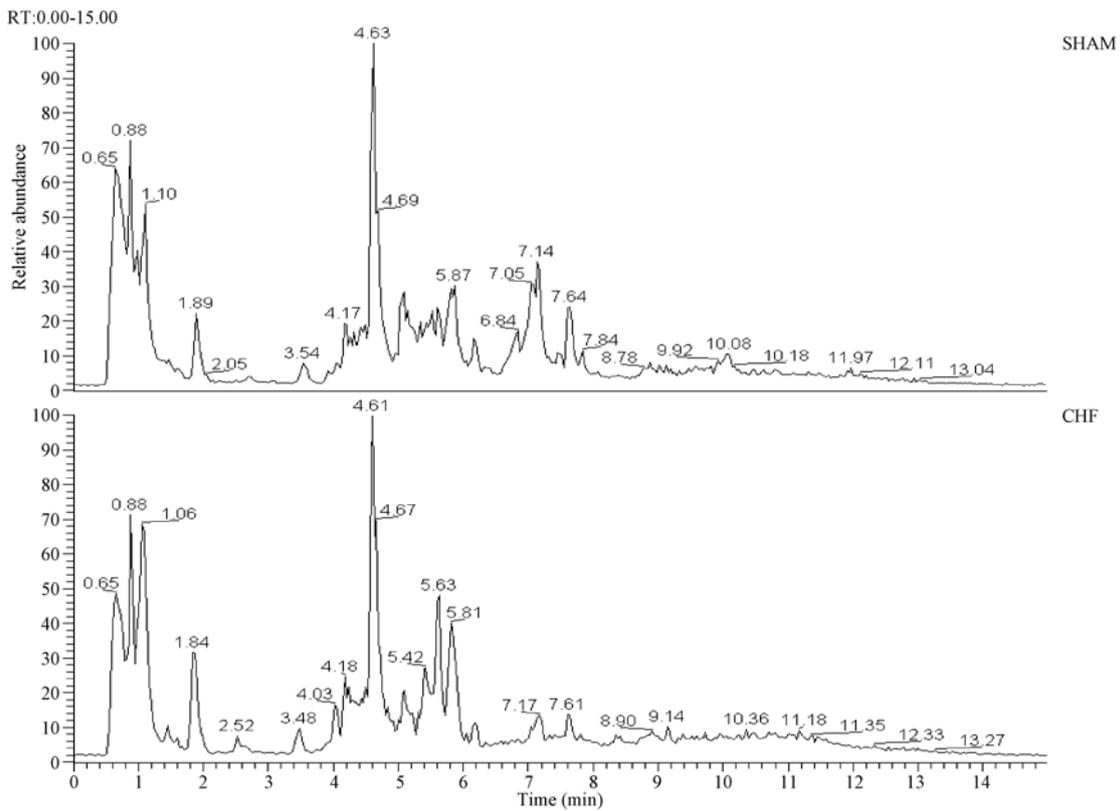
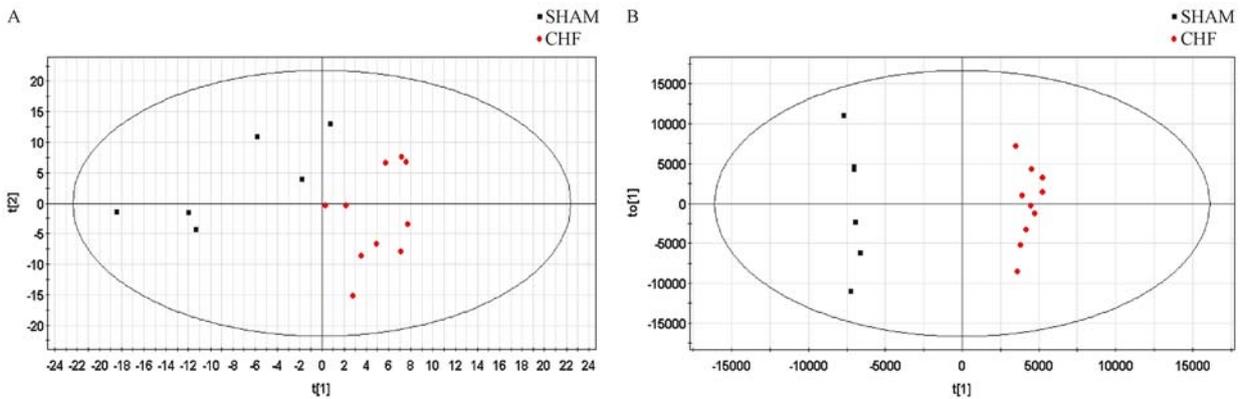


图 2 总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of serum metabolic profile



A: PCA 模型; B:OPLS-DA 模型; CHF:心衰组; SHAM:对照组

图 3 肝脏样本代谢轮廓模型

A: PCA model. B:OPLS-DA model. CHF:Heart failure group. SHAM:Control group.

Fig. 3 Metabolic profile of the liver samples

2.5 特征代谢物的筛选和鉴定

根据检测得出的一级质谱,设定质谱仪分辨率为 100000 (FMHW),得到特征代谢物的精确质荷比数值,然后进入 HMDB 数据库比对查找,按照质荷比(m/z)值误差不超过 0.01 的标准,得到与之相匹配的物质鉴定结果;将特征代谢物进行二次质谱 (MS/MS) 检测,得到该代谢物的二级质谱图,同

HMDB 数据库内的理论碎片进行比对,按照特征代谢物的二级质谱质荷比值与理论碎片比对差值 ≤ 0.01 ,且理论碎片与特征代谢物的二级碎片的主要峰匹配,能够覆盖特征代谢物二级碎片主要质谱峰的 80% 以上,即可认定该特征代谢物为理论碎片物质,有鉴定结果的特征代谢物共计 10 个,且在 2 组间差异均有统计学意义(表 2)

表 2 特征代谢物鉴定结果

Tab. 2 Identification of the characteristic metabolites

| No | 保留时间 min | 质荷比 m/z | 电离方式 Ionization methods | 代谢物鉴定结果 Results of metabolite identification | 心衰组 VS 对照组 CHF vs. SHAM |
|----|-------------|------------|----------------------------|---|----------------------------|
| 1 | 8.7 | 504.3 | M + Na | LysoPE(18:0/0;0) | DOWN ** |
| 2 | 7.0 | 500.2 | M + Na | LysoPE(0;0/18;2(9Z,12Z)) | DOWN ** |
| 3 | 7.0 | 502.3 | M + H | LysoPE(0;0/20;4(5Z,8Z,11Z,14Z)) | DOWN ** |
| 4 | 7.1 | 520.3 | M + H | LysoPC(18:2(9Z,12Z)) | DOWN ** |
| 5 | 5.6 | 504.2 | M + Na | LysoPC(15:0) | UP ** |
| 6 | 5.4 | 410.2 | M + NH ₄ | LPA(16:0/0;0) | UP ** |
| 7 | 6.2 | 300.2 | M + NH ₄ | 油酸 | DOWN ** |
| 8 | 5.6 | 466.3 | M + H | 甘氨酸 | UP ** |
| 9 | 0.7 | 230.0 | M + H | 麦角硫因 | UP ** |
| 10 | 4.6 | 386.2 | M + NH ₄ | 硫酸脱氢表雄酮 | DOWN ** |

LysoPC: 溶血磷脂酰胆碱(LPC); LysoPE: 溶血磷脂酰乙醇胺(LPE); $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

在心血管疾病的研究中代谢组学已得到广泛的应用,有关心力衰竭的代谢研究多集中于血清、血浆、尿液等物质,对于组织代谢变化的关注较少。

心力衰竭过程中,肝脏由于长期的体循环淤血会发生了病理学改变。越来越多的研究显示心力衰竭过程中会出现血清白蛋白下降、转氨酶升高、黄疸等表现,表明肝脏在心衰过程中存在代谢紊乱,肝功能的进行性损害会制约且影响着心衰患者的诊疗效果及预后。故本文应用代谢组学方法研究了慢性心力衰竭大鼠模型肝脏组织的代谢变化,构建慢性心力衰竭大鼠的代谢轮廓,成功筛选出肝脏特征代谢物,对特征代谢物分析发现其主要与糖脂代谢、细胞膜代谢等有关。

本研究结果显示 3 种溶血磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰胆碱(18:2(9Z, 12Z)) 对照组比较呈明显降低趋势,而溶血磷脂酰胆碱(15:0)与对照组则出现了明显上调的趋势,该类物质主要是与细胞膜的水解代谢有关。溶血磷脂酰胆碱(LPC)和溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)通过磷脂酶 A2 水解磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺生成。研究表明在肝组织中磷脂代谢的变化与肝组织修复过程中肝细胞膜和细胞内各种生物膜的更新换代相关。此外磷脂是胆汁和膜表面活性物质的成分之一,并参与细胞膜对蛋白质的识别和信号传导。研究还表明当溶血磷脂类物质释放入循环系统会给机体带来巨大的危害。LPC 参与心血管内皮的损伤以及炎症反应,在体内大量的 LPC 会引起心肌细胞膜的电信号紊乱,引发心律失常^[2]。LPE 会影响钙离子通道信号传导,从而影响心肌的收缩功能^[3]。本研究中肝组织中溶血磷脂类代谢异常应与心衰状态下,心排量减少,肝

脏低灌注造肝脏损伤,肝细胞出现大面积坏死,肝细胞凋亡,线粒体、细胞器数目的减少相关。

此外,本研究显示心衰状态下肝组织中油酸,硫酸脱氢表雄酮相对于对照组呈显著增高趋势,甘氨酸,麦角硫因相对于对照组呈降低趋势。这些变化主要反映心衰大鼠肝脏中糖脂类、胆汁酸,类固醇类等代谢紊乱。油酸(oleic acid, OLA)一种含有一个双键单不饱和游离脂肪酸。近年来研究指出心力衰竭本身是一种代谢综合征,而心力衰竭的患者往往存在胰岛素抵抗^[4], Perdomo 等研究表明油酸可预防心血管胰岛素抵抗、改善内皮功能障碍,降低促炎反应信号扩散和减少细胞凋亡,有助于改善动脉粥样硬化过程和斑块稳定性^[5]。在饮食中用油酸代替亚油酸可以改善 2 型糖尿病患者中低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)的水平。本研究中油酸含量显著降低,这是否与机体胰岛素敏感性下降相关有待进一步研究。而对于心衰患者适量增加富含油酸的饮食可有助于改善其临床转归。

脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)是循环血液中浓度最高的类固醇激素,在体内以硫酸盐形式(DHEAS)的形式存在。DHEAS 在经肝脏、脂肪、肌肉等组织可转化性激素、皮质醇和皮质酮等其他激素,经过血液循环到达靶器官,发挥调解机体生理功能的作用。在动物实验证实 DHEAS 能降低血浆 TG 和磷脂^[6]。Kathleen Brennan 等人研究表明 DHEAS 与胰岛素抵抗指数 HOMA-IR 负相关,提示 DHEAS 有利于增加胰岛素敏感性,具有提高胰岛素水平、抗糖尿病作用^[7]。老年人口服 DHEA(85 mg/d)可有效地减少血浆脂质过氧化物,抑制低密度脂蛋白的氧化^[8]。本研究中肝脏组织中的脱氢表雄酮呈明显下调趋势,这与以往研究中

血清中 DHEAS 下调是相一致的,提示在心衰状态下肝脏的物质转化作用出现了异常,并可能通过受体机制和离子通道影响肝脏糖脂质代谢。对与心衰患者是否可以补充 DHEA 治疗,其损害作用及相应的机理可作为进一步的研究方向。

甘氨酸胆酸(glycocholic acid, GCA)是由胆酸与甘氨酸在肝内合成的结合型胆汁酸,是胆汁酸的主要成分之一。在正常生理情况下外周血清 GCA 浓度维持较低的稳定水平,当肝脏发生病变时,血清 GCA 会出现不同程度的增高。既往的研究表明当血清中出现较高浓度的胆汁酸可能提示心脏疾病。2013 年, Moezi 等报道表明胆汁酸是导致心血管功能异常的主要因素。在体外实验中,亲脂性胆汁酸可对离体心肌细胞造成损伤,破坏心肌细胞线粒体功能诱导心肌细胞凋亡^[9]。细胞水平研究发现牛磺去氧胆酸(taurodeoxycholic acid, TDCA)、牛磺胆酸(taurocholate, TC)、甘氨酸胆酸(glycocholic acid, GCA)均可影响心肌细胞的收缩。甘氨酸胆酸在 300 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时候会形成特殊的钙波频率双相改变和细胞内钙超载,从而改变钙离子动力学,对心肌细胞收缩起抑制作用^[10]。本研究中发现在心力衰竭时的肝脏组织中甘氨酸胆酸呈上调趋势,这应与早期肝损害相关,心衰进展时肝瘀血加重造成肝实质损害,肝脏对甘氨酸胆酸摄取和排泄功能发生障碍从而导致血清甘氨酸胆酸量增高。循环中胆汁酸升高可能会影响心肌细胞功能,在心衰的发生和进展中起一定作用,对此类产物进行监测可以为心力衰竭的临床诊治提供帮助。

综上所述,对心衰大鼠肝脏代谢轮廓的研究并对特征代谢物代谢途径进行分析,可为心力衰竭的病理生理分子机制以及该疾病诊疗等提供新的思路。

参考文献:

- [1] 马晓丽, 骆新, 卢伟, 等. 基于 ^1H 核磁共振谱分析的自发性高血压大鼠尿液代谢特征[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(4): 20-23.
- [2] 郑明奇, 刘刚, 田立. 溶血磷脂酰胆碱对 T 型钙离子通道的心肌细胞内信号调控机制[J]. 中华心脏与心律电子杂志, 2013, 1(1): 24-26.
- [3] Park KS, Lee HY, Lee SY, et al. Lysophosphatidylethanolamine stimulates chemotactic migration and cellular invasion in SK-OV3 human ovarian cancer cells: Involvement of pertussis toxin-sensitive G-protein coupled receptor [J]. FEBS Lett, 2007, 581(23): 4411-4416.
- [4] Perrone-Filardi P, Paolillo S, Costanzo P, et al. The role of metabolic syndrome in heart failure [J]. Eur Heart J. 2015, 36(39): 2630-2634.
- [5] Perdomo L, Beneit N, Otero YF, et al. Protective role of oleic acid against cardiovascular insulin resistance and in the early and late cellular atherosclerotic process [J]. Cardiovasc Diabetol. 2015, 14: 75. doi: 10.1186/s12933-015-0237-9.
- [6] Lea-currie YR, Wu SM, McIntosh MK. Effects of acute administration of dehydroepiandrosterone sulfate on adipose tissue mass and cellularity in male rats [J]. Int J Obesity. 1997, 21: 147-154.
- [7] Brennan K, Huang A, Azziz R. Dehydroepiandrosterone sulfate and insulin resistance in patients with polycystic ovary syndrome [J]. Fertil Steril, 2009, 91(5): 1848-1852.
- [8] Longcope C. Metabolism of dehydroepiandrosterone [J]. Ann N Y Acad Sci, 1995, 774: 143-147.
- [9] Zavec JH, Battarbee HD. The role of lipophilic bile acids in the development of cirrhotic cardiomyopathy [J]. Cardiovasc Toxicol, 2010, 10(2): 117-129.
- [10] Gorelik J, Harding SE, Shevchuk AI, et al. Taurocholate induces changes in rat cardiomyocyte contraction and calcium dynamics [J]. Clin Sci (Lond), 2002, 103(2): 191-200.

[修回日期]2016-05-12



谷氨酰胺联合脐血间充质干细胞移植在大鼠肠缺血再灌注损伤中的作用

王炳杰¹, 胡延伟², 赵叶芳³, 张仕东⁴

(河北医科大学附属邢台市人民医院 肛肠外科¹, 普外科^{2,4}, 妇产科³, 邢台 054001)

【摘要】 **目的** 探讨谷氨酰胺联合脐血间充质干细胞(MSCs)移植在大鼠肠缺血再灌注损伤中作用。**方法** 体外复苏并培养脐血间充质干细胞移植前备用,观察CM-DiI 荧光标记后脐血间充质干细胞的去向。80只SD大鼠随机分为正常对照组,缺血再灌注损伤组,谷氨酰胺组, MSCs移植组及联合组每组各15只。对照组采用生理盐水灌肠,损伤组采用TNB(S乙醇稀释)灌肠,在TNBS建模后1h,谷氨酰胺组于尾静脉输入谷氨酰胺0.45g/kg, MSCs移植组于尾静脉输入 1×10^{10} /L脐血间充质干细胞悬液,联合组尾静脉输入谷氨酰胺0.45g/kg + 脐血间充质干细胞悬液 1×10^{10} /L。通过ELISA法检测各组大鼠血清中肠脂肪酸结合蛋白(IFABP)、白介素-6(IL-6)、超氧化物歧化酶(SOD)的含量;各组于再灌注1h,3h后检测肠组织含水率;通过RT-PCR、Western blot观察大鼠肠黏膜上皮细胞caspase-3、NF- κ B、Bcl-2在谷氨酰胺联合MSCs移植后的mRNA和蛋白的表达情况。**结果** 通过荧光示踪法观察到移植的MSCs细胞分布于肠黏膜淋巴组织内和腺上皮细胞间,表明MSCs可能参与了肠缺血再灌注损伤的修复过程。各组大鼠血清中SOD、IFABP、IL-6的含量变化比较,损伤组血清中IFABP、IL-6的含量较对照组显著增加,而谷氨酰胺组, MSCs移植组及联合组与之比较,则显著减少,联合组减少更为明显,损伤组血清中SOD的含量较对照组显著减少,而谷氨酰胺组, MSCs移植组及联合组与之比较,则显著增高,联合组增高更为明显($P < 0.05$)。再灌注1h和3h,损伤组肠组织含水率均明显高于对照组;与损伤组相比,谷氨酰胺组、MSCs移植组及联合组肠组织含水率值均显著降低,联合组降低更为明显,而谷氨酰胺组、MSCs移植组差异无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组比较,损伤组肠黏膜上皮细胞caspase-3、NF- κ B的mRNA和蛋白表达明显上调, Bcl-2的mRNA和蛋白表达明显下调($P < 0.05$),而谷氨酰胺组、MSCs移植组及联合组与之比较, caspase-3、NF- κ B的mRNA和蛋白表达明显下调, Bcl-2的mRNA和蛋白表达明显上调($P < 0.05$),谷氨酰胺组及MSCs移植组之间无统计学差异($P > 0.05$),但两组与联合组比较,差异明显($P < 0.05$)。**结论** 谷氨酰胺组及MSCs移植后,明显减轻了大鼠肠缺血再灌注损伤程度,其可能通过抑制caspase-3、NF- κ B表达和促进Bcl-2表达减轻肠黏膜缺血再灌注损伤。

【关键词】 脐血间充质干细胞;谷氨酰胺;移植;大鼠;肠道损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0025-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.006

Effects of glutamine in combination with umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantation on intestinal ischemia reperfusion injury in rats

WANG Bing-jie¹, HU Yan-wei², ZHAO Ye-fang³, ZHANG Shi-dong⁴

(1. Department of Anorectal Surgery, 2,4. Department of General Surgery, 3. Department of Obstetrics and Gynecology, Hebei Medical University Xingtai City People's Hospital, Xingtai Hebei 054001, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of glutamine in combination with umbilical cord blood

mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation on intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** Umbilical cord blood mesenchymal stem cells were isolated, and were labeled with CM-DiI fluorescent dye. Eighty Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control group, ischemia reperfusion injury group, glutamine group, MSCs transplantation group and combined group with 15 rats in each group. The control group received saline enema. The injury group was treated with TNBS (ethanol dilution) enema. The glutamine group at 1 h after TNBS received intravenous injection of 0.45 g/kg glutamine. The rats of MSCs transplantation group had tail vein injection of 1×10^{10} /L umbilical cord blood mesenchymal stem cell suspension, and the combined group received intravenous injection of glutamine 0.45 g/kg and 1×10^{10} /L umbilical cord blood mesenchymal stem cell suspension. ELISA was used to detect the midgut fatty acid binding protein (iFABP), interleukin 6 (IL-6), and superoxide dismutase (SOD) content in the rat serum. The water content of intestinal tissue was detected at 1 h and 3 h after reperfusion in each group. The expressions of NF- κ B, Bcl-2 and caspase-3 mRNA and proteins in the rat intestinal epithelial cells after treated with glutamine in combination with MSCs were detected by RT-PCR and Western blot assays. **Results** The fluorescent tracer method revealed that the transplanted MSCs cells were distributed in the intestinal mucosal lymphoid tissues and glandular epithelial cells, indicating that MSCs might be involved in the repair process of intestinal ischemia-reperfusion injury. The content of serum IFABP and IL-6 in the injured group was significantly higher than that in the control group, while significantly reduced in the glutamine group, MSCs transplantation group and combined group, with the most obvious in the combined group. The content of SOD in the injury group was significantly lower than that in the control group, and significantly increased than that in the glutamine group, MSCs transplantation group, with the most striking in the combined group ($P < 0.05$ for all). The water content of intestinal tissue in the injury group at 1 and 3 hours after reperfusion was significantly higher than that in the control group, significantly lower in the glutamine group, MSCs transplantation group and the combined group, with the most decreased in the combination group, and there was no significant difference between the glutamine group and MSCs transplantation group ($P > 0.05$). Compared with the control group, the caspase-3 and NF- κ B mRNA and protein expressions in the intestinal mucosal epithelial cells of the injury group were significantly increased, and the expressions of Bcl-2 mRNA and protein were significantly reduced ($P < 0.05$), the expressions of caspase-3 and NF- κ B mRNA and protein were significantly reduced in the glutamine group, MSCs transplantation group and combined group. The expressions of Bcl-2 mRNA and protein were significantly increased ($P < 0.05$), while no significant difference was shown between the glutamine group and MSCs transplantation group ($P > 0.05$), but there was a significant difference between these two groups and the combined group ($P < 0.05$). **Conclusions** After treated with glutamine and MSCs transplantation, the degree of intestinal ischemia reperfusion injury is obviously reduced in rats. It may be mediated through inhibiting the expression of caspase-3 and NF- κ B and promoting the expression of Bcl-2.

【Key words】 Umbilical cord blood mesenchymal stem cells; Glutamine; Transplantation; Rat; Intestinal ischemia reperfusion injury; Rat

缺血再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, IR) 是多种原因诱发的器官缺血时引起原有结构破坏,当恢复血液供应时细胞和组织结构遭到损伤并出现功能障碍,使损伤加重的现象^[1,2]。小肠是 IR 最常累及的器官,在临床上是无法避免的病理生理过程,肠系膜动脉取栓术后、溶栓术后、出血性休克、小肠移植术后常会继发性发生,有很高的死亡率,且预后很差^[3]。肠 IR 与其他器官的 IR 损伤不同,其不仅有氧自由基的生成、免疫细胞应答、炎症因子释放的过程^[4],还有缺血缺氧所致的内皮细胞和上皮细胞屏障功能受破坏,进而引起细菌移位,导致全身性的免疫应答和多器官功能障碍^[5,6]。

谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 对肠上皮细胞正常

作用的发挥起重要作用,是抗氧化防御系统中重要物质谷胱甘肽和核苷酸等合成的前体,在抗氧化应激中对机体起到保护作用^[7]。既往研究表明, Gln 能够减轻 IR 损伤,起到保护性作用^[8]。

IR 损伤目前还没有确切的治疗手段,国际研究热点集中在干细胞移植治疗^[9]。干细胞有脐血和骨髓两种来源^[10],因自体移植需抽取自体骨髓来进行分离以及培养周期较长,并且得到的数目较少,活性不高,定向迁移以及促进再生的能力均下降,且病人及家属较难接受,所以临床实施有一定的困难^[11]。脐血间充质干细胞 (human umbilical cord blood mesenchymal stem cells, HUMSCs) 从脐血中分离得到,相比于祖细胞更加原始,增殖分化能力更

强,无论是在体内还是体外均能多方向分化^[12],是目前在脑损伤、肠 IR 损伤等多种疾病在内的治疗中常用的理想细胞^[13-14]。HUMSCs 免疫原性极低,一般情况下不会引起免疫反应或者是移植物抗宿主病,因此受到临床工作者的青睐,有望成为理想的取材细胞。本研究联合应用 Gln 和 HUMSCs,观察其对 IR 的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验于 2013 年 3 月~2015 年 10 月在河北医科大学动物实验中心完成,实验动物使用许可证号:【SYXK(冀)2011-0005】。80 只 SD 大鼠,体质量 220~250 g,由河北医科大学动物实验中心提供,实验动物生产许可证号:【SCXK(冀)2011-0004】。实验中对动物的处置符合动物伦理学要求。CM-DiI(美国 Invitrogen 公司);谷氨酰胺粉末,纯度 99%(美国 Sigma 公司);细胞裂解液和 BCA 法定量试剂(碧云天生物技术公司);PVDF 膜(Millipore 公司);anti-NF- κ B antibody(Santa Cruz 公司);anti- β -actin(福州中彬金桥公司);IFABP 检测试剂盒(武汉博士德生物有限公司);总 RNA 提取试剂 TRIzol(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒(TaKaRa 公司);Soniprep150 型超声波发生器(上海宁商超声仪器有限公司);酶联免疫试剂盒(上海恒远生化试剂有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 体外复苏并培养脐血间充质干细胞:将冻存管从液氮中取出,迅速放入 37℃ 水浴中解冻,注意避免冻存管顶部沾水而受污染。将细胞加入有培养基的离心管中,1 500 r/min 离心 5 min,去掉上清液,接种到新的培养基皿中,置入体积分数为 0.05 的 CO₂ 培养箱内培养。每 3 d 半量换液 1 次,7~10 d 传代 1 次。继续观察,待贴壁细胞融合完全后对其进行消化并进行传代,将第 2 代的细胞分别接种到 2 个 6 孔板上,调整细胞密度使其满足 1×10^5 孔,当再次融合达 80% 时,向其中添加诱导剂。倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。

1.2.2 大鼠建模及其实验分组:参加实验 80 只,进入结果分析 75 只,中途死亡及其脱落 5 只。将其 75 只 SD 大鼠随机分为正常对照组,缺血再灌注损伤组,谷氨酰胺组,MSCs 移植组及联合组每组各 15 只。对照组采用生理盐水灌肠,损伤组采用 TNB(S

乙醇稀释)灌肠,在 TNBS 建模后 1h,谷氨酰胺组于尾静脉输入谷氨酰胺 0.45 g/kg, MSCs 移植组于尾静脉输入 1×10^{10} /L 脐血间充质干细胞悬液,联合组尾静脉输入谷氨酰胺 0.45 g/kg + 脐血间充质干细胞悬液 1×10^{10} /L。

1.2.3 脐血间充质干细胞示踪:利用 CM-DiI 与 HUMSCs 结合而将其标记,使其在显微镜下观察时能够表现出红色的荧光而进行跟踪。将等量的 CM-DiI 与 DMSO 进行混合并充分溶解后制成原液,随后从中抽取 2 μ L 放到干净的 E_p 管中,添加 DPBS 液 1 mL 制成 2 μ g/mL 的工作液。向上述已制备好的 HUMSCs 中添加 PBS 进行浓度的调整,使其满足 1 mg/mL,并从中抽取 50 μ L 添加到干净的 E_p 管中,向其中添加等量的上述配好的工作液,放在培养箱中温育 5 min,随后将其放在 4℃ 条件下静置 15 min,毕后用 PBS 进行冲洗。将其放在离心机中,调整参数进行离心,2 h 后将其取出丢弃上层液体,用枪头对下层留下的沉淀进行反复吹打,随后将其进行接种及培养。并从中取出少量的细胞行细胞爬片,监测细胞的变化,6 h 后将其置于荧光显微镜下对 CM-DiI 标记的 HUMSCs 的进行观察,对结果进行拍照。4 周后将大鼠处死,同时取肠组织立即以 OCT 包埋,冰冻切片,直接荧光显微镜下观察,记录和分析 CM-DiI 荧光分布情况。

1.2.4 ELISA 法检测 IFABP、IL-6、SOD 的含量:将大鼠麻醉后处死,截取肠管约 1 000 mg,将肠系膜以及内含物分离,用生理盐水对其进行冲洗,随后放在 -80℃ 条件下进行保存。在 4℃ 条件下将 300 mg 的肠组织用生理盐水进行冲洗,随后用滤纸将其表面的水分吸干,将 9 倍于组织块的生理盐水视为匀浆介质。调整 Soniprep150 超声波发生器的参数为振幅 14 μ m,时间 30 s,使细胞充分破裂。将组织匀浆中的 10% 放在低温离心机中,调整其参数,进行离心,将上清液取出并保留。采用 ELISA 方法测定血清中 IFABP、IL-6、SOD 的含量。

1.2.5 各组于再灌注 1 h、3 h 后检测肠组织含水率:将大鼠处死后进行消毒并剖开腹部取回盲瓣以上肠管 3 cm,将其内的内容物以及附于表面的肠系膜丢弃,用生理盐水进行反复冲洗。用吸水纸将附于表面的水分吸取干净,随后将其放在电子分析天平上称量其湿重(W),将其放在 80℃ 的恒温干燥箱中进行烘干,对其进行反复称重直至重量不再变化,再次进行称重,得到干重(D),根据公式[(W -

D)/W] × 100%, 计算含水率。

1.2.6 通过 RT-PCR 检测 caspase-3、NF-κB、Bcl-2 mRNA 的表达:对总 RNA 进行提取并转录。β-actin 上游引物:5'-GGGAAATCGTGCCTGACAT-3', 下游引物:5'-TCAGGAGGAGCAATGATCT TG-3'; Caspase-3 上游引物:5'-AGATACCGGTGGAGGCTGACT-3', 下游引物:5'-TCTTTCGTGAGCATGGACACA-3'; NF-κB 的上游引物:5'-GCATTCTGACCTTGCCCTATC-3', 下游引物:5'-ATCCTTCCCAAACTCCACC-3'; Bcl-2 上游引物:5'-CGCTGGGAGAACAGGGTA-3', 下游引物:5'-GGGCTGGGAGGAGAAGAT-3'。加入 SYBR Green RCR Master Mix 10 μL, 上游引物 0.4 μL, 下游引物 0.4 μL, cDNA 1 μL, DEPC H₂O 8.2 μL, 将上述物质进行混合, 随后进行离心, 行 PCR 反应。毕后行溶解曲线分析, 根据结果来确定该反应是否特异。应用软件分析得到的结果。

1.2.7 Western blot 检测 caspase-3、NF-κB、Bcl-2 蛋白的表达:将大鼠麻醉后, 迅速取出包含损伤区域在内的肠组织约 10 mm, 对其中的总蛋白参照说明书进行提取, 随后对蛋白样品浓度进行检测。清洗玻璃板, 进行灌胶上样, 并进行电泳, 将蛋白采用印迹法取 50 μg 总蛋白于 10% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳。取纤维膜用半干式电印迹将蛋白进行转膜, 37℃ 温育 2 h, 加入一抗后过夜, 次日洗膜后加入 HRP 标记的二抗, 重复进行上述温育及洗膜处理, 用显色剂进行显色。重复以上操作步骤 3 次。用 Quantity One 处理系统进行结果的处理。

1.2.8 统计学方法:实验数据采用 SPSS 17.0 进行分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差 (ANOVA) 进行不同组之间差异的比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSCs 细胞的形态观察

刚接种完毕后对细胞形态进行观察发现其形态不一, 差异性较大。进行首次换液后将未贴壁的细胞及杂质去除后可见到部分细胞已贴壁, 但形态仍不规则 (图 1A)。4 d 后再次换液可见有小的细胞集落形成, 7 d 后再次观察可见集落明显增大, 并且呈方向性排列, 10 ~ 12 d 后细胞融合度良好, 可以进行传代。传代后生长速度明显增快, 且形态逐渐趋于一致。第 3 代时细胞胞质色变浅, 核较清晰, 胞体以纺锤形和梭形为主, 周围可见数量不等的突起, 突起间相互交织, 细胞排列较紊乱, 极性不明显 (图 1B)。至第 6 代时, 细胞的形态比较无明显变化, 但胞体变长变大, 形态更加均一, 呈方向性排列, 极性较一致 (图 1C)。

2.2 CM-Dil 标记的 HUMSCs 形态观察

HUMSCs 能否于肠 IR 损伤中发挥作用的前提是其能否有效的表达于肠组织中, 为了对其进行证明, 我们用活细胞染色剂 CM-Dil 对其进行染色。将活细胞染色剂 CM-Dil 与 HUMSCs 共同放置 6h 后利用荧光显微镜进行观察发现, 经 CM-Dil 标记后的 HUMSCs 细胞均发出红色荧光 (图 2A)。将 CM-Dil 标记的 HUMSCs 细胞经尾静脉移植入肠 IR 大鼠后, 用荧光显微镜在大鼠肠粘膜的淋巴以及上皮细胞的冰冻切片中可以见到大量的 HUMSCs 分布, 且向损伤区迁移 (图 2B), 提示其可能参与肠 IR 损伤的修复过程。

2.3 ELISA 法检测 IFABP、IL-6、SOD 的含量

对各组中 IFABP、IL-6 以及 SOD 含量进行比较发现, 损伤组血清中 IFABP 以及 IL-6 的含量较对照组明显增加, 而谷氨酰胺组、MSCs 移植组以及联合组两者的含量则明显减少, 且联合组减少

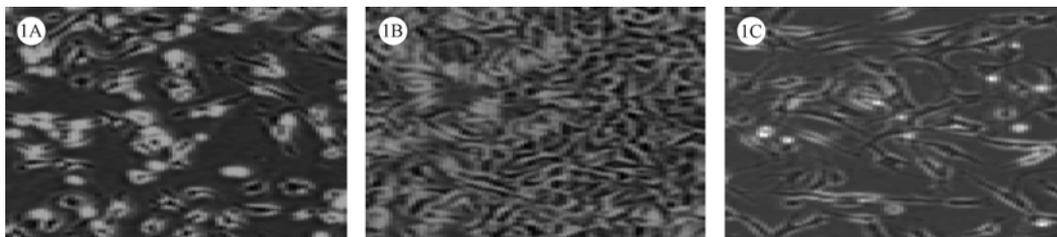


图 1A:首次换液后可见部分细胞已贴壁;图 1B:第 3 代 MSCs 细胞;图 1C:第 6 代 MSCs 细胞

图 1 MSCs 细胞的形态观察 (×100)

Fig. 1A. After the first change of medium, some cells were adherent to the glass surface.

Fig. 1B: The 3rd generation of MSCs cells; Figure 1C: The 6th generation of MSCs cells

Fig. 1 Morphological observation of the MSCs

表 1 各组小肠组织匀浆的上清液中 IFABP、IL-6、SOD 变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The changes of supernatant IFABP, IL-6, and SOD in the intestinal tissue of various groups

| 组别 Groups | 人肠脂肪酸结合蛋白 (IFABP) (ng/L) | 白介素-6 (IL-6) (ng/L) | 超氧化物歧化酶 (SOD) (ng/L) |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 对照组 Control | 1223.04 ± 76.54 ^a | 1380.48 ± 131.32 ^a | 134.09 ± 27.05 ^a |
| 损伤组 Injury | 1302.23 ± 136.13 ^b | 1535.68 ± 104.56 ^b | 116.88 ± 25.93 ^b |
| 谷氨酰胺组 Glutamine | 1033.04 ± 126.24 ^c | 976.57 ± 114.60 ^c | 234.66 ± 24.12 ^c |
| MSCs 组 MSCs | 1016.17 ± 105.13 ^d | 957.83 ± 105.06 ^d | 249.58 ± 23.20 ^d |
| 联合组 Combination | 636.78 ± 35.40 | 305.98 ± 29.69 | 420.53 ± 23.20 |

注: ^{abcd} $P < 0.05$ 。Note. ^{abcd} $P < 0.05$ 。

表 2 各组肠组织含水率比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of the water content in the intestinal tissue of the groups

| 组别 Groups | 肠组织含水率 (%) Water content in the intestinal tissue | |
|-----------------|--|---------------------------|
| | 1 h | 3 h |
| 对照组 Control | 41.52 ± 2.18 ^a | 45.41 ± 2.24 ^a |
| 损伤组 Injury | 84.46 ± 2.66 ^b | 89.26 ± 2.08 ^b |
| 谷氨酰胺组 Glutamine | 64.94 ± 2.11 ^c | 62.53 ± 2.80 ^c |
| MSCs 组 MSCs | 64.68 ± 2.20 ^d | 62.42 ± 2.67 ^d |
| 联合组 Combination | 43.42 ± 2.56 | 45.13 ± 2.23 |

注: ^{abcd} $P < 0.05$ 。Note. ^{abcd} $P < 0.05$ 。

更为显著 ($P < 0.05$); 对各组中 SOD 含量进行比较发现, 损伤组较对照组明显减少, 而其他三组较其则显著增高, 且联合组增高更显著 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.4 再灌注 1 h、3 h 后肠组织含水率的检测结果

IR 损伤后不同时间点对各组含水率进行比较: 损伤组中肠组织的含水率较对照组明显升高, 且显著高于其他三组, 与联合组相比差异最为显著 (均 $P < 0.05$); 而谷氨酰胺与 MSCs 组进行比较无意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.5 Caspase-3、NF-κB、Bcl-2 mRNA 的表达

经 RT-PCR 对各组 mRNA 进行测定可知, 与对照组相比, 损伤组的肠粘膜上皮细胞中 caspase-3 及 NF-κB 的 mRNA 表达量显著上调, 而 Bcl-2 的 mRNA 的表达量明显下调 ($P < 0.05$); 而谷氨酰胺、

MSCs 以及联合组与之相比较, caspase-3、NF-κB 明显下调, Bcl-2 明显上调, 各组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。如图 3。

2.6 Caspase-3、NF-κB、Bcl-2 蛋白的表达

对蛋白的表达情况进行测定发现, 损伤组中 caspase-3 的表达量较对照组显著上调, Bcl-2 的表达量明显下调 ($P < 0.05$); 而谷氨酰胺、MSCs 以及联合组与之相比较, caspase-3 明显下调, Bcl-2 明显上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 4)。对各组间总 NF-κB 进行比较, 差异无统计学意义, 进一步对各组磷酸化的 NF-κB 表达水平进行比较, 得到与 caspase-3 一致的结果, 即损伤组中磷酸化的 NF-κB 表达量较对照组显著上调; 而谷氨酰胺、MSCs 以及联合组与之相比较, 磷酸化的 NF-κB 明显下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 5)。

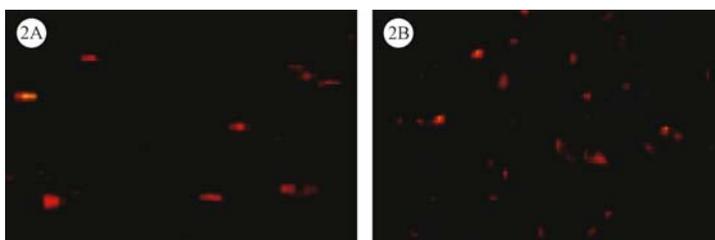


图 2A: 肠粘膜淋巴组织 CM-Dil 标记的 MSCs; 图 2B: 上皮细胞 CM-Dil 标记的 MSCs

图 2 CM-Dil 标记的 MSCs (×200)

Fig. 2A: CM-Dil-labeled MSCs in the intestinal lymphoid tissue; Fig. 2B: The epithelial cell CM-Dil-labeled MSCs

Fig. 2 The CM-Dil labeled MSCs

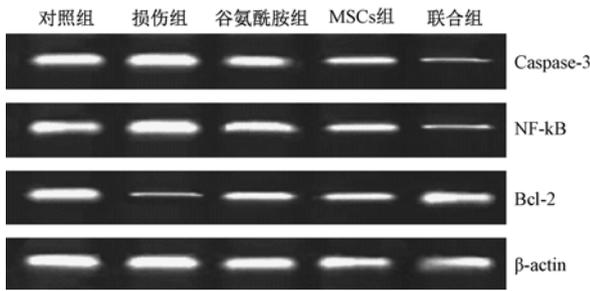


图 3 各组 Caspase-3、NF-kB、Bcl-2 mRNA 表达
Fig. 3 Expression of caspase-3, NF-kB, and Bcl-2 mRNA in each group

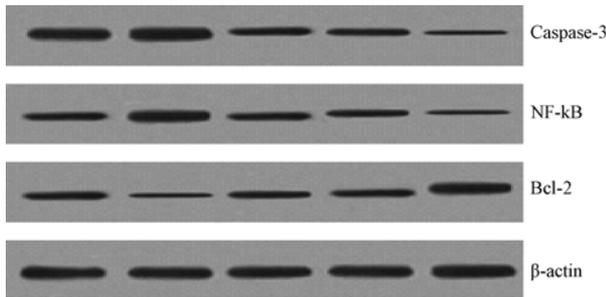


图 4 各组 caspase-3、NF-kB、Bcl-2 蛋白表达
Fig. 4 The expression of caspase-3, NF-kB, and Bcl-2 protein in each group

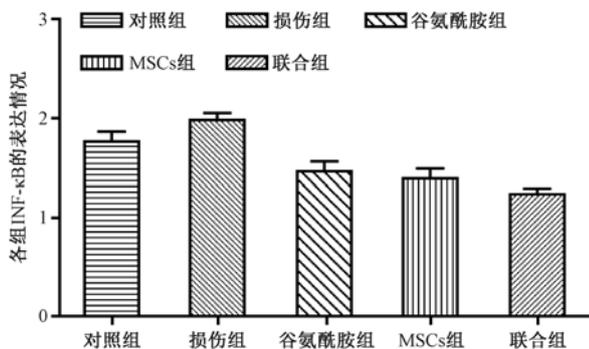


图 5 各组 NF-kB 的表达情况
Fig. 5 The expression of NF-kB in each group

3 讨论

大量研究表明,肠道可能是对缺血缺氧最敏感的器官之一,在肠绞窄、腹部外伤及肠系膜血管缺血性疾病等情况下,小肠出现不同程度的缺血性损伤,当恢复血流时,其损伤进一步加重^[15-18]。因此,研究 IR 的机制以及如何对其进行预防有重要意义。牛琼等^[19]研究表明,在 IR 中 Gln 能够保护肠粘膜,但是否和抗氧化应激以及抗炎相关,未见报道。

近年来,人们对肠 IR 损伤的机制有了更加深入的了解,如氧自由基、促炎细胞介质、黄嘌呤氧化酶

的释放等机制均参与肠 IR 损伤^[20]。小肠绒毛中含有大量的活性氧簇相关的酶,当 IR 时能够激活腺嘌呤-次黄嘌呤途径,增加氧自由基的产生。SOD 是氧自由基的去除剂能够反映机体对其的去除能力。而 IL-6 被认为是 IR 的主要致病因子。本研究通过对 SOD 及 IL-6 进行检测发现,机体损伤后 SOD 表达减少,而 IL-6 表达增加,与以往研究一致^[21]。IFABP 亦是肠 IR 损伤的指标之一。本研究发现,损伤组 IFABP 表达量明显增加,与既往^[22]的研究结论相同。

细胞凋亡是 IR 过程中的关键一环。通过对肠组织中凋亡相关蛋白进行检测,能够反映大鼠 IR 损伤后肠道的变化情况。其通过激活 caspase 最终诱导凋亡的发生。Bcl-2 是抗凋亡因子中的一员^[23,24]。而 NF-kB 能够上调炎症及免疫因子的表达,诱发炎症反应、细胞凋亡,最终导致脏器的损伤^[25]。本研究通过对其进行检测发现,IR 后 caspase 以及 NF-kB 表达增加,而 Bcl-2 减少。

总之,通过本研究发现,大鼠肠 IR 损伤后进行谷氨酰胺联合 HUMSCs 移植,能够改善损伤,对肠道起到保护性作用。其可能的机制是减少 caspase-3、NF-kB 并促进 Bcl-2 表达来实现。

参考文献:

- [1] Tian S, Guo R, Kong Y, et al. Curcumin protects against intestinal ischemia-reperfusion injury: involvement of the tight junction protein ZO-1 and TNF- α related mechanism [J]. Korean J Pharmacol, 2016, 20(2): 147-152.
- [2] 王爱丽,牛琼,史宁,等. 谷氨酰胺对大鼠肠缺血再灌注损伤后闭合蛋白的保护作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(2): 364-368.
- [3] 董建新,杨伞,张居文,等. 线粒体通透性转换孔在缺血后适应减轻兔肠缺血再灌注损伤中的作用 [J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(2): 327-329.
- [4] Stringa P, Lausada N, Romanin D, et al. Pretreatment combination reduces remote organ damage secondary to intestinal reperfusion injury in mice: follow-up study [J]. Transplant Proc, 2016, 48(1): 210-216.
- [5] 喻苗,金镭,吕艳锋,等. 天然虾青素对大鼠肠缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国现代普通外科进展, 2015, 18(8): 589-592.
- [6] 段常鹏,解雅英,于建设. 右美托咪定与异丙酚对大鼠肠缺血再灌注损伤影响的比较 [J]. 中华麻醉学杂志, 2015, 35(7): 837-839.
- [7] 马春燕,王爱丽,王爱娜,等. 谷氨酰胺对大鼠肠缺血再灌注损伤后 ZO-1 的作用及其机制研究 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2015, 9(9): 1644-1648.

- [8] Peng Z, Ban K, Wawrose RA, et al. Protection by enteral glutamine is mediated by intestinal epithelial cell peroxisome proliferator-activated receptor- γ during intestinal ischemia/reperfusion [J]. *Shock*, 2015, 43(4): 327-333.
- [9] Seo JH, Cho SR. Neurorestoration induced by mesenchymal stem cells: potential therapeutic mechanisms for clinical trials [J]. *Yonsei Med J*, 2012, 53(6): 1059-1067.
- [10] 邱振宇, 周盾, 孙洞箫, 等. 脐血间充质干细胞治疗大鼠肾缺血再灌注损伤的效果及机制探讨 [J]. *山东医药*, 2012, 52(6): 32-33.
- [11] Fang B, Wang H, Sun XJ, et al. Intrathecal transplantation of bone marrow stromal cells attenuates blood-spinal cord barrier disruption induced by spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits [J]. *J Vasc Surg*, 2013, 58(4): 1043-1052.
- [12] Shao H, Xu Q, Wu Q, et al. Defective CXCR4 expression in aged bone marrow cells impairs vascular regeneration [J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(10): 2046-2056.
- [13] Shao P, Tang L, Li P, et al. Application of a vasculature model and standardization of the renal hilar approach in laparoscopic partial nephrectomy for precise segmental artery clamping [J]. *Eur Urol*, 2013, 63(6): 1072-1081.
- [14] Luo F, Lv Q, Zhao Y, et al. Quantification and purification of mangiferin from Chinese Mango (*Mangifera indica* L.) cultivars and its protective effect on human umbilical vein endothelial cells under H_2O_2 -induced stress [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(9): 11260-11274.
- [15] 徐超, 孟庆祥, 许可, 等. 右美托咪定联合维生素 C 对小鼠小肠缺血再灌注损伤的保护 [J]. *徐州医学院学报*, 2015, 35(7): 460-463.
- [16] 李为明, 徐鹏远, 岑云云, 等. 远隔缺血后适应对大鼠小肠缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2015, 44(5): 549-551.
- [17] 王震东. 肠缺血再灌注损伤对 Rho 激酶影响及法舒地尔保护作用研究 [J]. *心理医生*, 2015, 21(8): 52-53.
- [18] Sarsu SB, Ozokutan BH, Tarakcioğlu M, et al. Effects of leptin on intestinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Indian J Surg*, 2015, 77(2): 351-355.
- [19] 牛琼, 王爱丽, 王伟, 等. 谷氨酰胺预处理对大鼠肠缺血再灌注损伤的保护作用及其对 eNOS-NO 通路的影响 [J]. *天津医药*, 2015, 43(3): 252-255.
- [20] Akinrinmade FJ, Akinrinde AS, Sovemi OO, et al. Antioxidant potential of the methanol extract of *Parquetina nigrescens* mediates protection against intestinal ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *J Diet Suppl*, 2016, 13(4): 420-432.
- [21] Zhao W, Gan X, Su G, et al. The interaction between oxidative stress and mast cell activation plays a role in acute lung injuries induced by intestinal ischemia reperfusion [J]. *J Surg Res*, 2014, 187(2): 542-552.
- [22] 曹志新, 刘斌, 赵德银. 前列腺素 E1 预处理对大鼠 SMA 急性缺血再灌注损伤保护的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(10): 1409-1412.
- [23] Woodruff TM, Wu MC, Morgan M, et al. EPHA4-FC treatment reduces ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by inhibiting vascular permeability [J]. *Shock*, 2016, 45(2): 184-191.
- [24] 范玲玲, 侯明星, 陈冬梅, 等. 乌司他丁对肠缺血再灌注损伤大鼠小肠细胞凋亡的影响 [J]. *山东医药*, 2015, 55(5): 28-29.
- [25] Yuan DD, Chi XJ, Jin Y, et al. Intestinal injury following liver transplantation was mediated by TLR4/NF- κ B activation-induced cell apoptosis [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(2): 1525-1532.

[修回日期] 2016-06-15



血管活性肠肽(VIP)对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)大鼠脑组织IL-17A含量的影响

杨元,袁正洲,吕志宇,张淑江,李晓红,李作孝

(西南医科大学附属医院神经内科,四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)对实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)大鼠脑组织IL-17A含量的影响。**方法** 60只健康雌性Wistar大鼠随机分成正常对照组、EAE对照组、VIP低剂量防治组和VIP高剂量防治组。利用髓鞘碱性蛋白(MBP)+完全福氏佐剂(CFA)诱导建立EAE模型。自造模当日起,每隔一日分别对VIP低、高剂量防治组大鼠腹腔注射VIP 4 nmol/kg(0.2 mL)、16 nmol/kg(0.8 mL),正常对照组及EAE对照组注射0.8 mL生理盐水,连续10 d。观察大鼠发病情况;ELISA法检测脑组织匀浆中IL-17A因子含量变化;免疫组化技术,利用抗胶质纤维酸性蛋白抗体(GFAP)检测脑组织内的星型胶质细胞活化情况。**结果** VIP各剂量防治组大鼠发病潜伏期延长、进展期缩短、发病高峰期神经功能障碍评分(NDS)降低,脑组织匀浆中IL-17A含量降低,活化的星型胶质细胞即GFAP⁺细胞量减少,且各剂量组间存在一定剂量依赖关系。**结论** VIP通过降低脑组织中IL-17A含量、抑制星型胶质细胞活化,发挥对EAE的防治作用。

【关键词】 血管活性肠肽;实验性自身免疫性脑脊髓炎;IL-17A;GFAP⁺星型胶质细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0032-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.007

Effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the content of IL-17A in the brain tissue of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)

YANG Yuan, YUAN Zheng-zhou, LV Zhi-yu, ZHANG Shu-jiang, LI Xiao-hong, LI Zuo-xiao
(Department of Neurology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou Sichuan 646000, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the content of IL-17A in the brain tissue of rat models of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Methods** Sixty healthy female Wistar rats were randomly divided into normal control group, EAE control group, low-dose VIP group and high-dose VIP group. Ten healthy guinea pigs were used to prepare anti-IL-17A antibody. Myelin basic protein (MBP) + complete adjuvant (CFA) were used to establish the EAE model. Since the first day of modelling, the low-dose and high-dose VIP groups received intraperitoneal injection of VIP 4 nmol/kg (0.2 mL) and 16 nmol/kg (0.8 mL), respectively, every other day for 10 consecutive days. The normal control group and EAE group were injected with 0.8 mL saline instead of VIP. The incubation period, progression and the peak of neurological dysfunction scores (NDS) of the rats were recorded. The levels

[作者简介] 杨元,女,硕士,E-mail: lsh880801@163.com,电话:18715760908。

[通讯作者] 李作孝,男,教授,硕士生导师,E-mail: lzx3235@sina.cn,电话:13882794776。

of IL-17A in the brain tissue was determined by ELISA assay, and the GFAP⁺ astrocyte activation in brain at morbidity peak in the rats was examined using anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein) antibodies. **Results** The incubation period were extended, the progression period was shortened and the peak neurological dysfunction score (NDS) was decreased in the VIP-treated groups, in a dose-response relationship. The cytokine levels of IL-17A and the astrocyte activation degree in brain tissue were reduced in each VIP dose group, in a dose-response relationship. **Conclusions** VIP exerts therapeutic effect on experimental autoimmune encephalomyelitis through lowering the IL-17A content and inhibition of astrocyte activation in the brain tissue.

【Key words】 Vasoactive intestinal peptide; Experimental autoimmune encephalomyelitis; IL-17A; GFAP⁺ astrocytes; Rats; Guinea pigs

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)作为一种中枢神经系统(central nervous system, CNS)的自身免疫性疾病,其病因尚不明确,各种病因通过破坏 Th1/Th2 细胞免疫平衡,最终导致 CNS 炎细胞浸润、白质脱髓鞘、轴突变性等病理改变^[1,2]。随着对其动物模型实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)研究深入,越来越多的证据表明 Th17 细胞分泌的 IL-17A 因子在该疾病发病过程中也发挥重要的作用^[3-5]。血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)是一种非胆碱能非肾上腺能神经递质,由 28 个氨基酸残基组成,属于胰高血糖素-胰泌素家族^[6,7]。研究表明 VIP 通过诱导免疫细胞增殖、分化、活化及迁移,抑制炎症因子(IL-17A、IFN- γ 、NO 等)的合成及分泌,发挥免疫调节的作用^[8]。国内外有将 VIP 运用在类风湿关节炎(RA)的治疗报道^[9,10],但尚未明确阐明 VIP 对 MS 发病中各种免疫细胞因子的具体作用,因此本实验通过探讨 VIP 对 EAE 大鼠脑组织 IL-17A 含量影响、星型胶质细胞活化影响,为临床应用 VIP 治疗 MS 提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要实验动物、药物及试剂

健康雌性 Wistar 大鼠 60 只(200 g ~ 250 g/只, 6 ~ 8 周龄)、健康豚鼠 10 只(250 g ~ 300 g)/只,均购于西南医科大学实验动物中心,均为一级合格动物【生产许可证号:SCXK(川)2013-17】(喂食清洁饲料和自来水,每日按时更换垫料,保持动物房的清洁、适宜的温度和湿度等,使用许可证号【SYXK(川)2013-181】);血管活性肠肽(北京博奥森生物技术有限公司);完全弗氏佐剂 CFA(美国 Sigma 公司产品);IL-17A ELISA 免疫试剂盒(广州雅怡生物科技有限公司);兔抗 GFAP 多克隆抗体(1:160)(上海雅吉生物科技有限公司);SP 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物技术公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫抗原的制备:断颈处死 10 只豚鼠后,在无菌条件下迅速分离出脊髓,去脊髓,称重后移入玻璃匀浆器,与等量的 0℃ 生理盐水混合后研磨成 50% 的全脊髓匀浆(WSCH)。将完全弗氏佐剂(CFA)与 WSCH 等体积混合,玻璃注射器抽打至油包水乳状,以滴在水面不散即为合格抗原。

1.2.2 实验动物分组、制模及药物干预:将 60 只雌性 Wistar 大鼠随机分为四组(15 只/组):正常对照组、EAE 对照组、VIP 低剂量防治组、VIP 高剂量防治组。将免疫抗原注入 EAE 对照组、VIP 低、高剂量防治组大鼠双侧后肢足掌皮下(0.2 mL/100 g)进行主动免疫,正常对照组给予等量生理盐水 + CFA。自造模当日起, VIP 低、高剂量防治组每隔一日分别腹腔注射 VIP 4 nmoL/kg (0.2 mL)、16 nmoL/kg (0.8 mL),正常对照组及 EAE 对照组给予腹腔注射 0.8 mL NS,连续 10 d。

1.2.3 动态观察实验动物:自造模日起,每日早晨 10 时由同一观察者采用 Kono's s 评分标准对大鼠进行神经功能让障碍评分(NDS)。在发病高峰期(将连续 3 d 评分无加重、四肢瘫痪或死亡作为大鼠发病高峰期)处死大鼠,未发病大鼠饲养 8 周后处死。

1.2.4 检测脑组织匀浆中 IL-17A 含量变化:采用双抗体夹心(ABC-ELISA)法检测脑组织匀浆中 IL-17A 含量。

1.2.5 检测脑组织中星型胶质细胞的活化情况:利用免疫组织化学(SP)技术,采用抗胶质纤维酸性蛋白抗体(GFAP)检测各组大鼠脑组织内的星型胶质细胞活化情况。

将大鼠脑组织行石蜡切片后常规脱蜡、水化、清除内源性过氧化物酶活性、封闭组织蛋白后,逐次滴加一抗(以 1:160 稀释的兔抗 GFAP 多克隆抗体)、生物素标记的二抗(山羊抗兔 IgG 抗体)、链霉

卵白素(辣根酶标记),DAB 显色液,复染,脱水,透明,封片。400 倍光镜下观察大鼠脑组织 GFAP⁺ 细胞表达情况,胞质呈棕黄色为阳性细胞。采用 ImagePro Plus 软件分析 GFAP⁺ 细胞的平均光密度值(IOD),对 GFAP⁺ 表达行半定量测定。

2 统计学方法

计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组计量资料均数比较,当方差齐时用单因素方差分析,方差不齐时采 Kruskal-Wallis 检验;两两比较采 LSD 检验;变量间相互关系采用 Pearson 直线相关分析。SPSS 17.0 软件包完成统计分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠的发病情况

正常对照组大鼠未发病,EAE 对照组、VIP 各剂量组大鼠均出现不同程度的临床症状:发病大鼠先后表现为食量下降,精神萎靡,后肢无力,尾部拖地,在免疫后第 14~17 天病情症状最为典型;大鼠

出现双侧后肢无力拖地、行走画圈、爬行困难、自伤后肢、精神极度衰弱、抽搐、甚至死亡。但与 EAE 对照组比较,VIP 低、高剂量组大鼠症状明显缓解,表现为发病潜伏期时间延长、进展期时间缩短、发病高峰期 NDS 降低。见表 1。

3.2 各组大鼠脑组织中 IL-17 的含量变化

同正常对照组比较,EAE 对照组、VIP 各剂量组大鼠脑组织匀浆中 IL-17A 含量升高;与 EAE 对照组比较,VIP 各剂量组大鼠脑组织匀浆中 IL-17A 含量明显降低;与 VIP 低剂量组比较,VIP 高剂量组脑组织匀浆中 IL-17A 含量明显降低。说明在 IL-17A 在 EAE 发病过程中起促进作用;同时 VIP 可以降低 EAE 大鼠脑组织匀浆中 IL-17A 含量,且呈一定剂量依赖关系。见表 2。

3.3 各组大鼠脑组织中星型胶质细胞活化情况

正常对照组大鼠脑组织未见 GFAP⁺ 细胞表达;EAE 对照组大鼠脑组织内活化的 GFAP⁺ 细胞呈弥漫性分布;VIP 各剂量组大鼠脑组织 GFAP⁺ 细胞明显减少,主要延血管周围分布。见表 3,图 1。

表 1 EAE 对照组、VIP 各剂量组大鼠发病潜伏期、进展期及高峰期神经功能障碍评分(NDS)的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of the incubation period, progression period and peak neurological dysfunction scores in the EAE control group and each dose VIP treatment group

| 组别 Groups | 潜伏期(d) incubation period | 进展期(d) Progression period | NDS(min) NDS scores |
|------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|
| EAE 对照组 Control | 10.34 ± 2.13 | 7.85 ± 1.65 | 4.16 ± 0.77 |
| VIP 低剂量组 Low dose VIP | 14.17 ± 1.67* | 6.20 ± 1.97* | 3.75 ± 0.98 ^Δ |
| VIP 高剂量组 High dose VIP | 20.73 ± 1.98* [●] | 3.99 ± 1.57* [○] | 2.59 ± 0.58* [●] |
| F | 37.48 | 28.54 | 18.95 |
| P | <0.01 | <0.05 | <0.01 |

注:与 EAE 对照组比较,* $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ 、^Δ $P > 0.05$;与 VIP 低剂量组比较,[●] $P < 0.01$ 、[○] $P < 0.05$ 。

Note. * $P < 0.01$, * $P < 0.05$ and ^Δ $P > 0.05$, Compared with the control group. [●] $P < 0.01$, [○] $P < 0.05$, Compared with the low-dose VIP group.

表 2 各组大鼠脑组织匀浆中 IL-17A 含量($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Content of IL-17A in the brain tissue of each group rats

| 组别 Groups | 动物数 n | IL-17A (pg/mL) |
|---------------------------|-------|-----------------------------|
| 正常对照组 Normal control | 15 | 22.84 ± 3.51 |
| EAE 对照组 EAE control | 15 | 78.26 ± 5.87* |
| VIP 低剂量组 Low-dose VIP | 15 | 57.49 ± 4.85* [●] |
| VIP 高剂量组 High-dose VIP | 15 | 30.01 ± 5.59* ^{●▲} |
| F | | 101.99 |
| P | | <0.01 |

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与 EAE 对照组比较,[●] $P < 0.01$;与 VIP 低剂量组比较,[▲] $P < 0.01$ 。

Note. * $P < 0.01$, compared with the normal control group. [●] $P < 0.01$, compared with the EAE control group. [▲] $P < 0.01$, compared with the low-dose VIP group.

表 3 EAE 对照组及 VIP 各剂量组大鼠脑组织免疫组化 GFAP⁺ 细胞的平均 IOD 值($\times 10^{-2}$)($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 The average IOD of GFAP⁺ cells in the brain tissue of EAE control group and each dose VIP group by immunohistochemistry($\times 10^{-2}$)

| 组别 Groups | 动物数 n | GFAP ⁺ 细胞平均 IOD($\times 10^{-2}$) Mean IOD of GFAP ⁺ cells |
|---------------------------|-------|---|
| EAE 对照组 EAE control | 15 | 15.78 ± 1.92 |
| VIP 低剂量组 Low-dose VIP | 15 | 12.40 ± 1.79* |
| VIP 高剂量组 High-dose VIP | 15 | 8.32 ± 1.82* [▲] |
| F | | 48.09 |
| P | | <0.01 |

注:与 EAE 对照组比较,* $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$;与 VIP 低剂量组比较,[▲] $P < 0.01$ 。

Note. * $P < 0.01$, * $P < 0.05$, compared with the EAE control group. [▲] $P < 0.01$, compared with the low-dose VIP group.

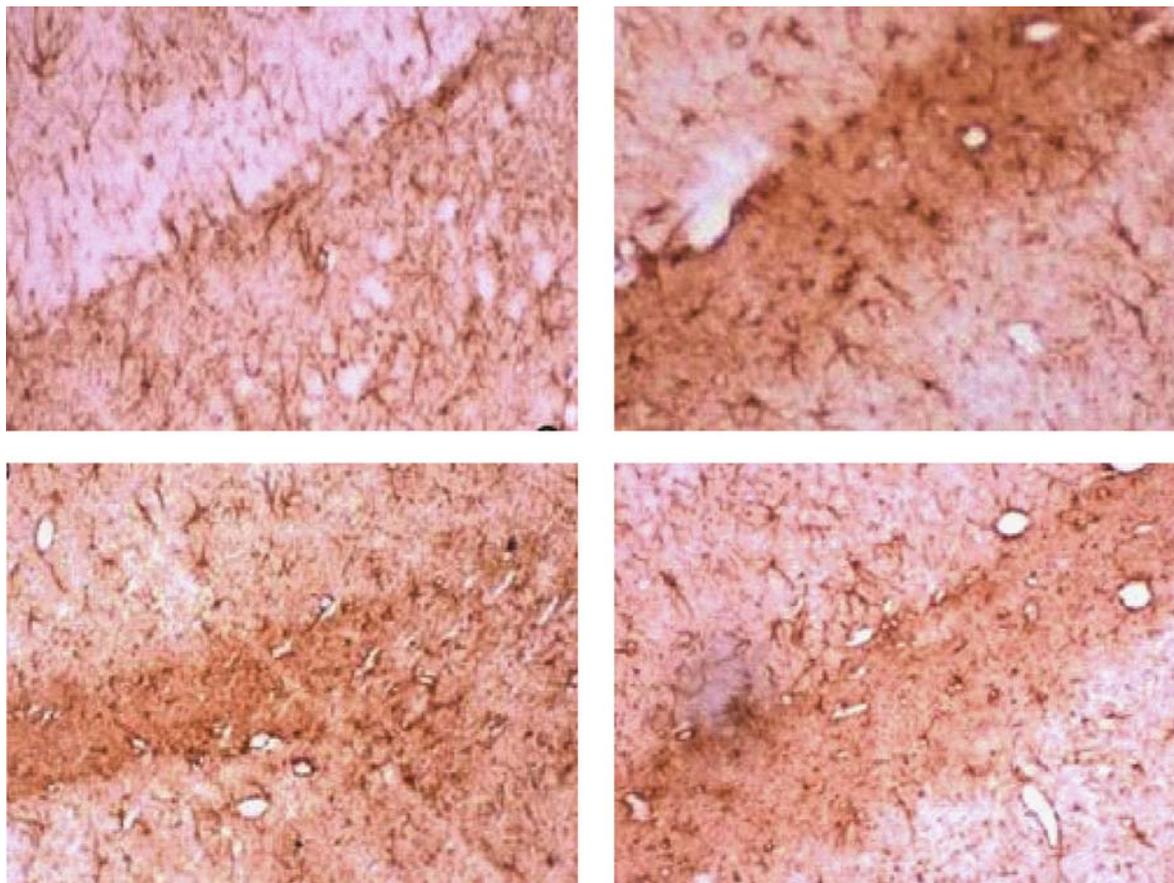


图 1 各组大鼠侧脑室旁脑组织 GFAP⁺ 细胞表达。免疫组化染色, (标尺 = 100 μm)。

Fig. 1 Expression of GFAP⁺ cells in the rat lateral ventricle of all group rats. Immunohistochemical staining.

3.4 相关性分析显示

利用 Pearson 直线相关软件分析,结果显示发病大鼠脑组织匀浆中 IL-17A 因子含量与与发病高峰期 NDS 呈正相关 ($r = 0.798$, $P < 0.05$),与脑组织匀浆中 GFAP⁺ 细胞平均 IOD 呈正相关 ($r = 0.825$, $P < 0.05$)。

4 讨论

IL-17A 作为一种具强促炎作用的细胞因子,其主要作用包括:①调节固有免疫^[11,12];IL-17A 作为炎症介质,参与自身免疫性炎性疾病的发生和发展,通过作用于基因靶点产生急性反应蛋白、炎症趋化因子等物质,同时上调 MHC-II 抗原、集落共刺激因子、及 T 细胞刺激因子、促使 T 细胞活化,导致免疫失衡;②信号转导作用^[13,14];IL-17A 作为细胞内及细胞间信使,参与信号的转导过程,可促进多种炎性蛋白的转录及合成,加速免疫紊乱。

星型胶质细胞作为中枢神经系统一种非特异性抗原提呈细胞 (APC),参与复杂的免疫病理过

程^[15]。在 EAE 的炎症反应中,IL-17A 通过 Act1 转录因子激活星型胶质细胞促进释放炎症因子,加速髓鞘脱失的发生发展^[16,17],同时活化的星型胶质细胞通过上调 GFAP⁺ 的表达,形成活化的胶质斑块^[18]。因此抑制 IL-17A 产生、干预星型胶质细胞介导的炎症过程,是治疗 EAE 的一种有效方法。

本实验研究发现:与正常对照组相比,EAE 对照组、VIP 各剂量组大鼠脑组织匀浆中 IL-17A 含量升高 (P 均 < 0.01)、脑组织中 GFAP⁺ 细胞的平均光密度值 (IOD) 增加 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),表明 IL-17A 在 EAE 发生发展过程中起促进作用。与 EAE 对照组比较,VIP 各剂量组大鼠脑组织匀浆中 IL-17A 含量均明显降低 ($P < 0.01$)、脑组织中 GFAP⁺ 细胞的 IOD 明显降低 ($P < 0.01$),且两者呈正相关关系 ($r = 0.825$, $P < 0.05$)。表明 VIP 通过降低发病大鼠脑组织匀浆中 IL-17A 含量,可明显缓解 EAE 大鼠脑组织星型胶质细胞活化的病理改变,从而减轻 EAE 的临床表现。

(下转第 68 页)



槲芪散对肝癌前病变端粒酶活性的调控作用

孟霞¹, 刘树红², 李霞², 丰平², 卢静¹, 王学江²

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

【摘要】 目的 探讨端粒酶在肝癌前病变形成和发展中的作用及方剂槲芪散(HQS)、君药槲寄生对其活性的调控机制。方法 将大鼠分为模型组、HQS大剂量组[8 g/(kg·d)]、小剂量组[4 g/(kg·d)]、槲寄生碱组[8 mg/(kg·d)]及正常组。运用经典的Solt-Farber二步法复制大鼠肝癌前病变的模型,采用组织化学方法检测肝脏组织中 γ -谷氨酰转肽酶活性的表达;免疫荧光的方法检测肝脏组织中AFP的表达;采用Quantitative Telomerase Detection Kit(QTD Kit)测定肝脏组织中端粒酶的活性;免疫组织化学方法检测肝脏组织中NF- κ B P65蛋白的表达;Western blot的方法测定I κ B- α 在胞浆蛋白中的含量。结果 HQS和槲寄生总碱治疗后,肝脏中 γ -GT阳性灶面积、AFP的阳性细胞数均较模型组明显减少($P < 0.05$);同时显示治疗组大鼠肝脏中NF- κ B P65的阳性细胞数较模型组相比明显减少($P < 0.05$);治疗后I κ B- α 在胞浆中的蛋白含量与模型组相比有所增加,差异有显著性($P < 0.05$)。结论 HQS和槲寄生总碱能够抑制肝癌前病变组织端粒酶活性的表达,其作用是通过抑制凋亡相关基因NF- κ B的过表达,增加I κ B- α 的表达,进而降低端粒酶的活性。

【关键词】 槲芪散;端粒酶;肝癌前病变;NF- κ B P65;I κ B- α ;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0036-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.008

Regulatory effect of a Chinese medicine prescription Hu Qi Shan on the telomerase activity in hepatic precancerous lesions in rats

MENG Xia¹, LIU Shu-hong², LI Xia², FENG Ping², LU Jing¹, WANG Xue-jiang²

(1. Department of Experimental Animals, 2. Department of Pathophysiology, Capital Medical University, Beijing 100069)

【Abstract】 Objective To explore the possible mechanism of action of telomerase in hepatic precancerous lesions, and the regulatory effect of a Chinese medicine prescription HU Qi Shan (HQS) and its principal drug mistletoe alkali on the telomerase activity in rat liver tissues. **Methods** Rat model of hepatic precancerous lesions was established by Solt-Farber two-step protocol. The model rats were randomly divided into 5 groups, including the model group, high-dose HQS [8 g/(kg·d)] group, low-dose HQS [4 g/(kg·d)] group, and mistletoe alkali [8 mg/(kg·d)] group. γ -Glutamyl-transpeptidase (γ -GT) was analyzed by immunohistochemistry. AFP was detected by immunofluorescence technique. The telomerase activity was detected using a quantitative telomerase detection kit. The expression of NF- κ B P65 was detected by immunohistochemistry. The cytoplasmic protein I κ B- α was detected by western blotting. **Results** After treated with HQS and mistletoe alkali, the areas of γ -GT-positive foci and number of AFP-positive cells in the liver tissues were significantly decreased than those of the model group ($P < 0.05$ for both), the telomerase activity was decreased, the number of NF- κ B

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

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

【通讯作者】 卢静(1969-),女,副教授,研究方向:实验动物模型研究,E-mail:lujing@ccmu.edu.cn;王学江(1957-),女,教授。研究方向:肝脏肿瘤的发生发展机制研究,E-mail:xjwang@ccmu.edu.cn。

P65-positive cells was also decreased ($P < 0.05$), whereas the intracytoplasmic expression of I κ B- α proteins was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusions** HQS and mistletoe alkali can suppress the telomerase activity. Its possible mechanism may be through inhibition of the over-expressed apoptosis-related genes such as NF- κ B P65 and increase the expression of I κ B- α decreasing the telomerase activity.

【Key words】 HQS; Telomerase; Hepatocarcinogenesis; NF- κ B; I κ B- α ; Rat

由于端粒酶在恶性肿瘤中的广泛表达,将端粒酶作为靶点进行肿瘤治疗受到重视。中药通过调控端粒长度和端粒酶活性对肿瘤影响的研究也有了一定的进展。特别是中药复方可以通过对细胞变异的多阶段、多靶点干预作用,调节细胞凋亡和细胞增殖的平衡^[1]。中药可通过作用于肿瘤基因以及抑制端粒酶活性等方面来诱导肿瘤细胞向正常细胞方向分化^[2],从而达到预防或延缓癌变发生的目的^[3]。

方剂槲芪散(HQS)是国家级名老中医钱英教授在临床应用多年的经验方,具有抗炎、逆转肝硬变的显著临床治疗作用。我们以往的实验观察到,HQS可减少肝癌前病变大鼠肝脏中 γ -谷氨酰转肽酶阳性灶的数目和面积,抑制大鼠肝癌前病变灶中原癌基因的表达,阻断肝癌前病变的发生发展;HQS及其从君药槲寄生中提取的总碱和多糖可以在体外抑制肝癌细胞的增殖,促进其凋亡^[4]。为探讨HQS、槲寄生总碱及多糖促进肝肿瘤细胞凋亡的机制,我们探究了端粒酶、端粒在肝癌形成过程中的作用,并观察了HQS、槲寄生总碱、多糖对端粒酶、端粒的影响,以期阐明HQS及槲寄生逆转肝癌前病变的机制。

1 材料和方法

1.1 中药 HQS 的制备

中药复方 HQS 由槲寄生、黄芪等八味中草药组成,所用中药一次备齐,经鉴定符合药典用药规定,由中日友好医院药剂科制成无糖颗粒备用,4℃保存。槲寄生总碱由北京市中医研究所提取制备。

1.2 主要试剂及仪器

羟乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES)、胰蛋白酶(trypsin)、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)购自Sigma公司;Quantitative Telomerase Detection Kit(QTD Kit)为Allied Biotech, Inc。酶标仪 SA1000 奥地利 Digiscan; Real-time PCR Bio-Rad 3000; Leica Qwin 图象分析处理系统(Leica)。

1.3 实验动物及肝癌前病变动物模型复制

实验所需动物由北京维通利华实验动物技术有限公司提供(实验动物生产许可证号:SCXK(京)2011-0011)。选用6周龄,健康、雄性Wistar大鼠50只,体重110~120g;动物饲养于首都医科大学实验动物部屏障环境动物实验室(实验动物设施许可证号:SYXK(京)2010-0020)。

1.3.1 肝癌前病变动物模型:采用Solt-Farber实验模型的选择程序。选用6周龄Wistar雄性大鼠,腹腔一次性注射二乙基亚硝胺(DEN)200 mg/Kg体重,作为启动剂,2周后进入选择性促进程序,即按经典术式施行大部肝切除术(PH),再饲以含0.015%二乙酰氨基芴(2-AAF)饲料5周。第7周末,所有实验大鼠禁食24h后断颈椎处死。在每只大鼠肝脏右前叶、右后叶和尾叶规定部位取肝组织进行检测。

1.3.2 实验分组及药物处理:实验分为5组,每组10只动物,即正常组、模型组、槲芪散大剂量(15 g/kg体重/d)治疗组、槲芪散小剂量(4g/kg体重/d)治疗组、槲寄生总碱治疗组(8 mg/kg体重/d)。除正常组外,其余各组在大部肝切除术(PH)1周后,用不同浓度槲芪散开始经胃饲给药,持续至实验结束,连续给药3周;正常组以等量生理盐水灌胃。第7周末,所有实验大鼠禁食24h后断颈椎处死。在每只大鼠肝脏右前叶、右后叶和尾叶固定部位取肝组织,进行各种实验检测。

1.4 端粒酶的活性测定

采用Quantitative Telomerase Detection Kit(QTD Kit)进行端粒酶活性检测。取冻存的各组大鼠肝脏组织在液氮中研磨,加入lysis buffer制备肝组织悬液。阴性对照组:取25 μ L的肝组织悬液上清,进行实时定量PCR检测,灭活端粒酶的活性作为阴性对照。阳性对照:取5个0.5 mL EP管,分别加入8 μ L细胞裂解液,1号管加入端粒酶RNA(TSR)2 μ L,2~4号管依次按照5:1稀释,使各管TSR浓度依次为0.1 amol/ μ L,0.02 amol/ μ L,0.004 amol/ μ L,0.0008 amol/ μ L,0.00016 amol/ μ L。严格按照端粒酶检测试剂盒说明进行操作,上样后进行实时荧光PCR反应:变性(30 s 95℃),退火(30 s

60℃),延伸(30 s 72℃),循环数(35 ~ 40 循环)。制作标准曲线,作为阳性对照反应的模板。用倍比稀释的 TSR 进行实时定量 PCR 检测,绘制标准曲线。根据标准曲线计算待测样品中由端粒酶催化合成的端粒重复序列的拷贝数,由此推算出端粒酶的活性。

1.5 常规方法制作病理切片

改良的 Rutenberg 法进行 γ -GT 阳性灶的组织化学染色;SABC-FITC 免疫荧光方法测定大鼠肝脏组织中 AFP 的表达;链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结(SP)法检测大鼠肝脏组织中 NF- κ B p65 的基因蛋白表达;western blot 方法检测 I κ B 的蛋白表达。

1.6 统计学方法

数值以 mean \pm s 表示,应用 SPSS 11.5 统计软件,采用 F 检验和 χ^2 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 病理变化

正常对照组,大鼠肝脏表面光滑,呈红褐色,质软,边缘锐利;模型对照组大鼠肝脏颜色浅淡,表面粗糙,出现散在的灰白色小结节,直径在 1 毫米左右,有的达 2 毫米,结节边缘界限清;治疗组较模型组相比肝脏表面点状结节明显减少,仅见少量散在小结节,肝脏颜色、质地、体积接近正常。镜下可见正常对照组肝小叶结构清晰完整,肝细胞呈多边形,肝细胞板以中央静脉为中心呈放射状排列(图 1-1A);模型组肝细胞变性坏死明显,已出现较为明显的细胞增生灶,即嗜酸细胞灶、嗜碱细胞灶和透明细胞灶三种。这些病灶内肝细胞变大,有胞浆染色的改变、核亦稍大,有明显核仁,亦可见到呈核浓缩或溶解的细胞混杂其中,并可见嗜酸小体形成。增生灶细胞密集成团,对附近肝细胞并不产生压迫现象,但细胞丧失正常肝索结构,血窦不明显。(图 1-1B);槲芪散治疗大、小剂量组和槲寄生总碱组肝细胞表现为部分细胞的脂肪变性、毛玻璃样变性,与模型组相比病灶数量明显减少和病变程度上有所减轻(图 1-1C、1D、1E)。

2.2 γ -GT 显示肝癌前病变

在正常组大鼠肝脏切片上肝细胞中几乎无 γ -GT 阳性灶出现,只在汇管区有少量表达(图 2-2A);模型组肝组织中出现大量散在的 γ -GT 阳性灶,呈

类圆形、棕红色,部分病灶周围肝细胞有明显的压迫现象(图 2-2B)。各用药组阳性灶相对于模型组面积减少、主要集中在汇管区附近(图 2-2C、2D、2E)。图 3 显示了槲芪散及其君药槲寄生总碱对 DEN 诱导的大鼠肝脏中 γ -GT 的影响,结果显示与模型组相比,HQS 大、小剂量治疗组以及槲寄生总碱组都显著地减少了 DEN 导致的肝脏中 γ -GT 阳性灶的面积,以大剂量组的作用更显著。

2.3 AFP 表达

正常组肝脏基本无 AFP 的表达(图 3-A);模型组中表达明显增多,主要定位于胞浆,呈绿色荧光(图 3-B);HQS 大、小剂量治疗组和槲寄生总碱组中 AFP 的阳性细胞数明显减少(图 3-C、D、E)。

2.4 端粒酶测定结果

正常组中基本无端粒酶活性的表达,模型组中端粒酶活性高表达,经治疗后端粒酶活性有所下降(图 4),与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.5 NF- κ B P65 表达

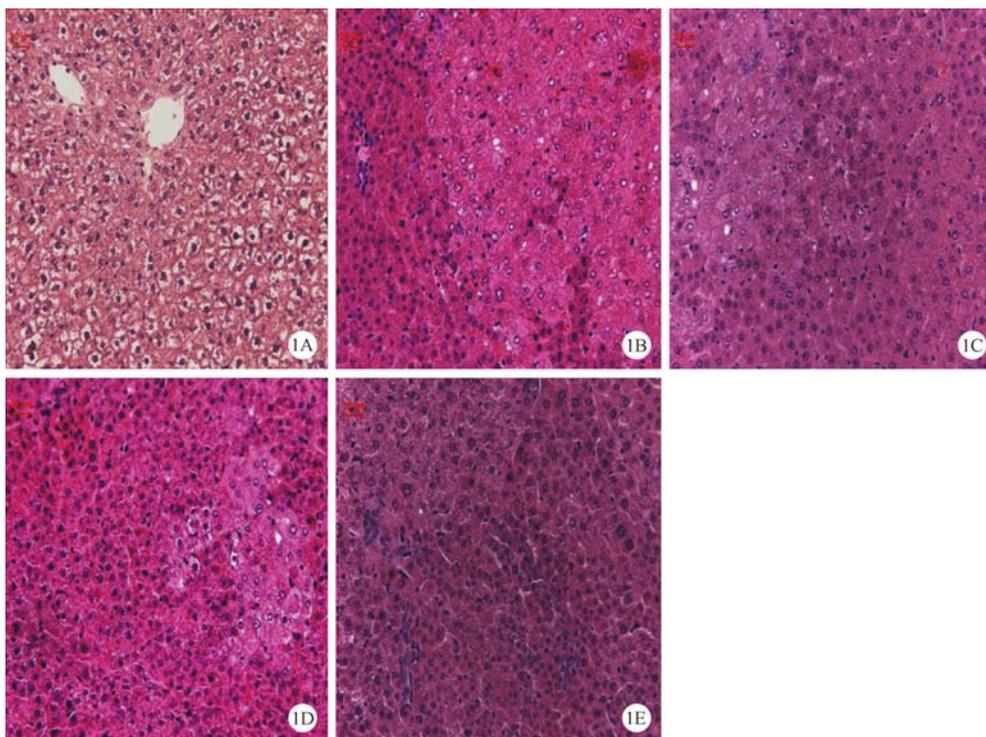
正常肝脏组织中 NF- κ B P65 基本无表达(图 5-A);模型组中 NF- κ B P65 在胞核和胞浆中表达显著增强,呈深棕褐色(图 5-B),以胞核表达为主;而 HQS 的大小治疗组和槲寄生总碱组的大鼠肝脏中 NF- κ B P65 在胞浆和胞核中均有表达,其中在胞核中的表达显著减弱(图 5-C、D、E)结果显示 NF- κ B P65 在 HQS 大小治疗组和槲寄生总碱组中的阳性细胞数与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 I κ B- α 在胞浆中的蛋白表达

正常肝脏组织胞浆蛋白中有 I κ B- α 蛋白的表达;模型组中 I κ B- α 蛋白的表达有所减少,经 HQS 大小剂量组和槲寄生总碱组治疗后 I κ B- α 蛋白有所增加,与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 6)。

3 讨论

癌前期肝细胞常伴有生化特性的改变和某些胚胎特性的重新获得,因此可以作为肝细胞发生癌变的标志物。肝脏组织化学染色 AFP、 γ -GT 阳性酶变灶即为此标志物。是显示肝细胞增生病变最敏感而可靠的方法。它们在正常成年大鼠肝脏基本无活性,在癌前肝细胞增生灶中及肝癌细胞则活性增高,这是由于变异肝细胞反分化而类似胚胎期酶生成增多,同时刺激其周围的正常肝细胞使其合成

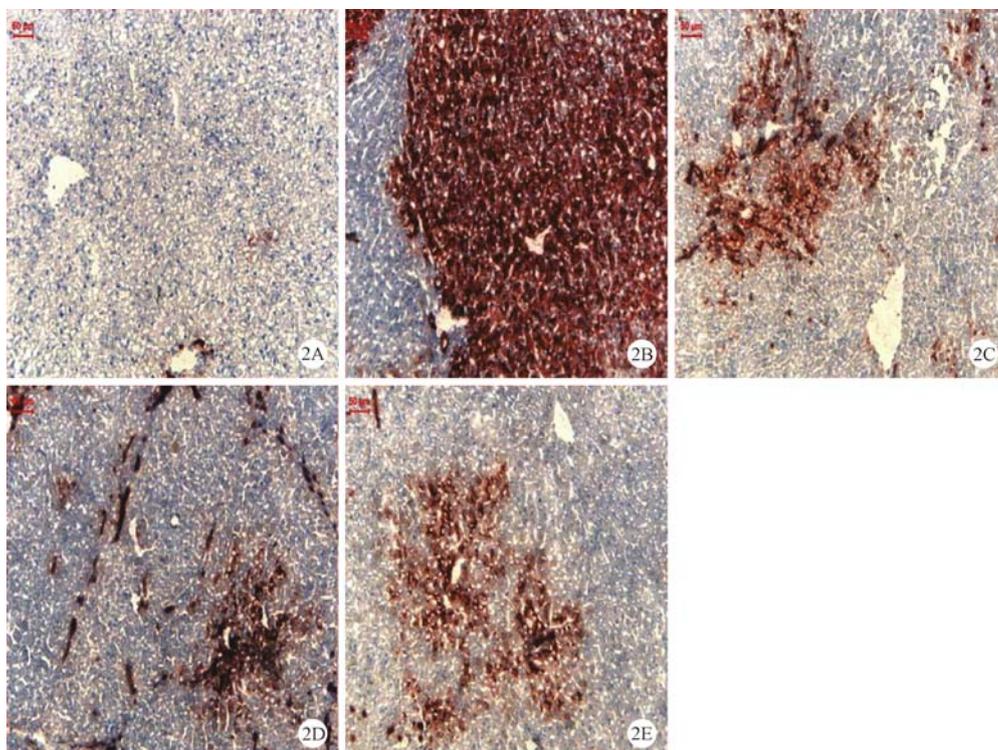


1A: 正常组; 1B: 模型组 (DEN + 2-AAF + PH); 1C: HQS 大剂量治疗 [8 g/(kg·d)]; 1D: HQS 小剂量治疗组 [4 g/(kg·d)]; 1E: 槲寄生总碱组 [8 mg/(kg·d)]. HE 染色 ×200,

图 1 槲芪散及其君药槲寄生总碱对 DEN 诱导的大鼠肝脏改变。标尺 = 20 μm

Note. 1A: Normal control; 1B: Model group (DEN + 2-AAF + PH) (1B); 1C: High-dose HQS-treatment (8 g/kg·bw) group; 1D: Low-dose HQS (4 g/kg b. w.) treatment group; 1E: HQS and mistletoe alkali treatment group.

Fig. 1 DEN induced rat liver alterations treated with Huqi San and mistletoe alkali. HE Staining.

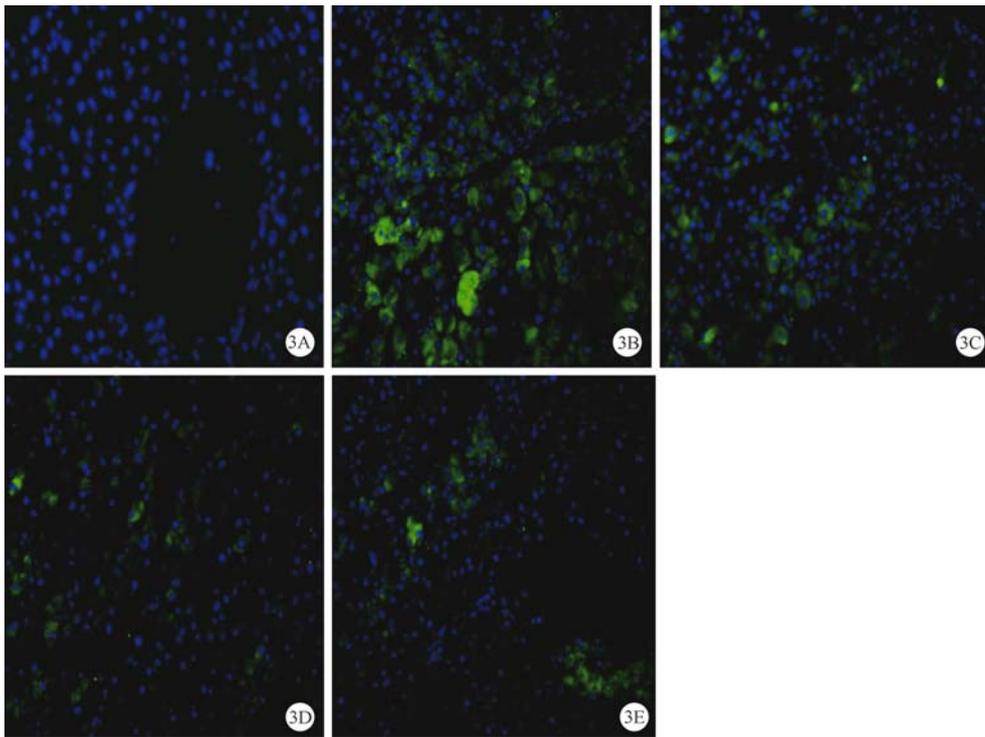


2A: 正常组, (标尺 = 60 μm); 2B: 模型组 (DEN + 2-AAF + PH); 2C: HQS 大剂量治疗组 [8g/(kg·d)] (标尺 = 50 μm); 2D: HQS 小剂量治疗组 [4 g/(kg·d)]; 2E: 槲寄生总碱组 [8 mg/(kg·d)]. ×100

图 2 槲芪散及其君药槲寄生总碱对 DEN 诱导的大鼠肝脏 γ-GT 的表达

Note. 2A: Normal control; 2B: Model group (DEN + 2-AAF + PH); 2C: High-dose HQS (8 g/kg. bw.) group; 2D: Low-dose (4 g/kg b. w.) HQS treatment group; 2E: HQS and mistletoe alkali treatment group. The red stained areas are the γ-GT-positive foci. For details see text.

Fig. 2 γ-GT expression in the rat liver tissues treated with HQS and mistletoe alkali

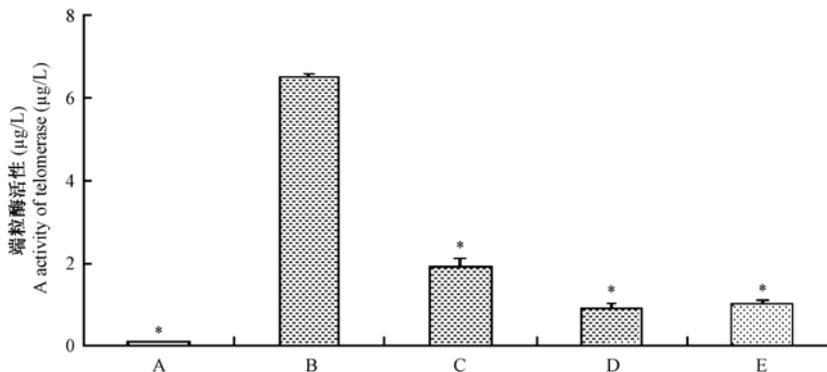


3A: 正常组; 3B: 模型组 (DEN + 2-AAF + PH); 3C: HQS 大剂量治疗组 [8 g/(kg·d)]; 3D: HQS 小剂量治疗组 [4 g/(kg·d)]; 3E: 槲寄生总碱组 [8 mg/(kg·d)]. 如图中所示 AFP 阳性表达为绿色荧光, 主要定位于细胞浆, 细胞核染为蓝色。×200

图 3 槲芪散及其君药槲寄生总碱对 DEN 诱导的大鼠肝脏中 AFP 的表达

Note. 3A: Normal control; 3B: Model group (DEN + 2-AAF + PH); 3C: High-dose HQS (8 g/kg b. w.) group; 3D: Low-dose HQS (4 g/kg b. w. treatment group); 3E: Mistletoe alkali treatment group.

Fig. 3 The expression of AFP in the DEN-induced rat liver tissues treated with HQS and mistletoe alkali. Green fluorescence indicates positive intracytoplasmic expression of AFP with blue-stained nuclei.

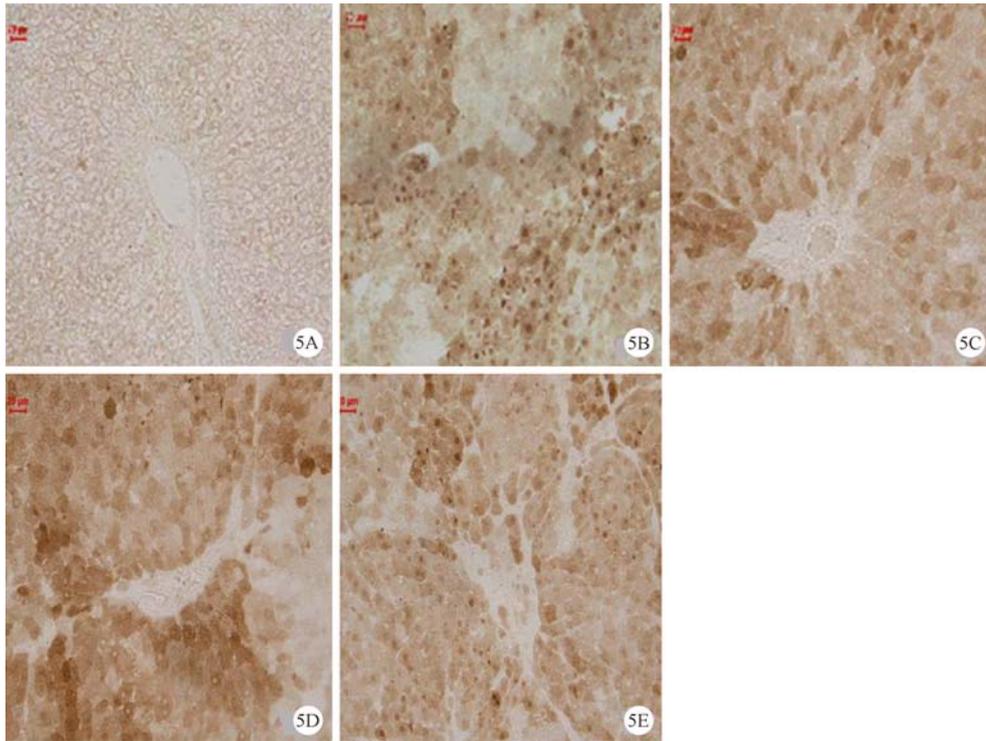


A: 正常组; B: 模型组 (DEN + 2-AAF + PH); C: HQS 小剂量治疗组 [4 g/(kg·d)]; D: HQS 大剂量治疗组 [8 g/(kg·d)]; E: 槲寄生总碱组 [8 mg/(kg·d)]. 结果用均数 ± 标准差表示。* 代表与模型组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

图 4 DEN 诱导的大鼠肝脏组织中端粒酶活性的表达

Note. A: Normal control; B: Model group (DEN + 2-AAF + PH); C: Low-dose HQS (4 g/kg b. w.) treatment group; D: High-dose HQS (8 g/kg b. w.) group; E: HQS and Mistletoe alkali treatment group. Results are expressed as means ± s. * $P < 0.05$, compared with the model group.

Fig. 4 Effect of HQS and mistletoe alkali on the expression of telomerase in DEN-induced rat liver tissues

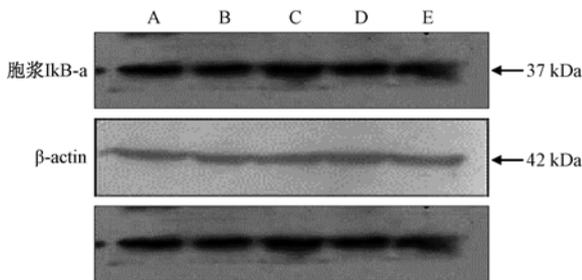


5A: 正常组; 5B: 模型组 (DEN + 2-AAF + PH); 5C: HQS 大剂量治疗组 [8 g/(kg·d)];
5D: HQS 小剂量治疗组 [4 g/(kg·d)]; 5E: 槲寄生总碱组 [8 mg/(kg·d)].

图 5 槲芪散及其君药槲寄生总碱对 DEN 诱导的大鼠肝脏中 NF-κB P65 的表达。×200, (标尺 = 20 μm)

Note. 5A: Normal control; 5B: Model group (DEN + 2-AAF + PH); 5C: High-dose HQS (8 g/kg b. w.) treatment group; 5D: Low-dose HQS (4 g/kg. bw) treatment group; 5E: Mistletoe alkali treatment group.

Fig. 5 Expression of NF-κB P65 in the DEN-induced rat liver treated with HQS and mistletoe alkali



A 正常组; B 模型组 (DEN + 2-AAF + PH); C HQS 大剂量治疗组 [8 g/(kg·d)]; D HQS 小剂量治疗组 [4 g/(kg·d)]; E 槲寄生总碱组 [8 mg/(kg·d)].

图 6 槲芪散及其君药槲寄生总碱对 DEN

诱导的大鼠肝脏组织胞浆蛋白中 IκB-α 的表达

Note. A: Normal control; B: Model group (DEN + 2-AAF + PH); C: High-dose HQS (8g/kg. bw) treatment group; D Low-dose HQS (4 g/kg. bw) treatment group; E: Mistletoe alkali treatment group.

Fig. 6 HQS and mistletoe alkali enhanced the expression of IκB-α in the liver tissue with DEN-induced alterations.

增多。将它们作为癌变标志物有特异性,是实验性肝癌研究中检测癌前病变、观察癌变程度的常用指标。HQS 及其君药槲寄生碱能够明显减少肝癌前

病变大鼠肝脏中 γ -GT 阳性灶的面积和 AFP 阳性细胞数的表达;与模型组比较差异有显著性 ($P < 0.005$),说明该药能有效控制癌前病变的增长,对癌变过程的促癌阶段有阻断作用。这对临床上延长病人的生存时间(生存率)有较重要的意义。

在恶性肿瘤的发生发展过程中,端粒酶的激活可能是细胞永生化的关键环节,是恶性肿瘤细胞得以无限增殖的必需条件^[5]。端粒酶活性定量检测方法可从只有 10 个细胞的标本中检测出端粒酶的活性,由于检测所需组织细胞量少,已广泛用于端粒酶活性的判断^[6]。端粒酶具有逆转录酶的活性,是一种核糖核蛋白酶,能以自身携带的 RNA 为模板,不断合成新的端粒序列添加到染色体末端,维持端粒不缩短,使细胞永生化的,获得无限增殖的能力^[7]。端粒酶与引起肿瘤细胞凋亡的相关基因关系密切,它可能是已知的最为广谱的恶性肿瘤分子标记物^[8]。HQS 及其君药槲寄生碱能够明显降低肝癌前病变大鼠肝脏中端粒酶的活性;与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.005$),说明该 HQS 及槲寄生碱能够通过影响端粒酶的活性,进而抑制异型变的

肝细胞端粒合成,对癌变过程的促癌阶段有阻断作用。

NF- κ B 作为一种转录刺激因子,主要起介导细胞质和细胞核之间的信号转导的作用^[9]。它的主要包括 P50 和 P65 二个亚基,通常与其抑制蛋白 I κ B 结合,以非活性形式存在于细胞质中^[10]。I κ B- α 与 P65 亚单位结合时使 P65 的空间构象改变,从而使与靶 DNA 结合的关键氨基酸残基被隐蔽,这样就抑制了 NF- κ B 与靶 DNA 调节区的特异性结合。当细胞受到胞外信号刺激时,通过一个或多个信号转导途径,激活一系列激酶,使 I κ B 降解,NF- κ B 与 I κ B 发生解离,并迅速从胞质易位到胞核,在胞核内与相关基因上的 κ B 位点发生特异性结合,调控相关基因表达^[11]。由于 I κ B- α 启动区中存在 κ B 结合位点,NF- κ B 激活后 I κ B- α 表达相应升高,以防止 NF- κ B 过度激活^[12]。本研究观察到端粒酶活性与 NF- κ B P65、I κ B- α 的蛋白表达在大鼠肝癌前病变中的分布基本相一致,进一步证实了端粒酶和 NF- κ B P65、I κ B- α 参与了槲芪散及其君药槲寄生总碱阻断肝癌前病变的过程。我们的实验结果只能说明端粒酶和 NF- κ B P65、I κ B- α 参与了肝癌前病变的形成,通过下调端粒酶的活性,抑制相关基因的表达,从而干预肝癌前病变的形成。但是 NF- κ B P65、I κ B- α 在调节端粒酶的活性的过程中以怎样的顺序依次出现,目前尚不是很清楚。

参考文献:

- [1] 刘名昆,李国庆. 石斛提取物抗肿瘤作用研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2015, 31(23): 3571 - 3574.
- [2] 洪卫,马胜林,冯建国,等. 毛兰素对胃癌细胞 SGC-7901 端粒酶活性的影响 [J]. 浙江实用医学, 2009, 14(3): 181 - 182.
- [3] 吴红彦,荣倩倩,李海龙,等. 当归贝母苦参丸含药血清对胃癌细胞 SGC-7901 抑制作用机制的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(2): 137 - 142.
- [4] 王鹏雁,安建多,王池,等. 槲芪散及槲寄生提取物对肝癌细胞内游离钙离子浓度的影响 [J]. 首都医科大学学报, 2012, 33(3): 291 - 296.
- [5] Terah K, Yilmazer A. New surprises from an old favourite: The emergence of telomerase as a key player in the regulation of cancer stemness [J]. Biochimie, 2016, 121: 170 - 178.
- [6] Li PY, Wu ML, Jing Wang J, et al. NAC selectively inhibit cancer telomerase activity: A higher redox homeostasis threshold exists in cancer cells [J]. Redox Biol, 2016, 8: 91 - 97.
- [7] Qian YQ, Yang LL, Cao S. Telomeres and telomerase in T cells of tumor immunity [J]. Cell Immunol, 2014, 289(1 - 2): 63 - 69.
- [8] El-Mazny A, Sayed M, Sharaf S. Human telomerase reverse transcriptase messenger RNA (TERT mRNA) as a tumour marker for early detection of hepatocellular carcinoma [J]. Arab J Gastroenterol, 2014, 15(2): 68 - 71.
- [9] Chen J, Zhang JY, Cao JM, et al. Inflammatory MAPK and NF- κ B signaling pathways differentiated hepatitis potential of two agglomerated titanium dioxide particles [J]. J Hazard Materials, 2016, 304: 370 - 378.
- [10] Unger C, Kiss I, Vasas A, et al. The germacranolide sesquiterpene lactone neurolelin B of the medicinal plant *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. ex Cass inhibits NPM/ALK-driven cell expansion and NF- κ B-driven tumour intravasation [J]. Phytomedicine, 2015, 22(9): 862 - 874.
- [11] Wier EM, Fu K, Hodgson A, et al. Caspase-3 cleaved p65 fragment dampens NF- κ B-mediated anti-apoptotic transcription by interfering with the p65/RPS3 interaction [J]. FEBS Lett, 2015, 589(23): 3581 - 3587.
- [12] Manu KA, Shanmugam MK, Ramachandran L, et al. Isorhamnetin augments the anti-tumor effect of capecitabine through the negative regulation of NF- κ B signaling cascade in gastric cancer [J]. Cancer Lett, 2015, 363(1): 28 - 36.

[修回日期] 2016 - 06 - 20



针刺对人羊膜间充质细胞移植治疗 去卵巢大鼠骨质疏松的协同效应

陈玉敏¹, 陈涛平², 韩翠玉², 史同焕², 董淑香²

(1. 河北大学医学院, 生理教研室, 保定 071000; 2. 河北大学附属医院, 骨科, 保定 071000)

【摘要】 **目的** 探讨针刺联合人羊膜间充质细胞(human amniotic mesenchymal cells, HAMCs)移植对去卵巢骨质疏松协同效应研究。**方法** 选择雌性未孕的Wistar大鼠45只,完全随机分组分为假手术组、模型组及实验组(针刺+人羊膜间充质细胞移植),每组各15只。各组手术伤口恢复后,第7天开行针刺+尾静脉注射HAMCs液(假手术组除外)连续干预12周,于末次干预后24h,处死大鼠并采集标本。从开始干预至处死,每周测定1次各组大鼠的体质量,双能X线吸收骨密度仪分别测定左侧股骨中点、远端和近端骨密度,用原子吸收法测定其骨钙含量;干预12周后采用ELISA法检测血清25-羟基维生素D(25-HVD)、I型胶原C端肽(CTX-I)、骨特异性碱性磷酸酶(BAP)、抗酒石酸酸性磷酸酶5b(TRAP5b)的表达变化;干预12周后检测各组大鼠生物力学性能的变化。干预12周后RT-PCR技术检测椎骨中转化生长因子 β 1(TGF- β 1)的基因表达情况。**结果** 假手术组大鼠体重逐渐增加,符合动物自然生长规律,模型组于造模后两个月开始,体重却明显高于假手术组,实验组体重渐增,与假手术组相近。模型组比较假手术组的骨密度和骨钙含量均降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),与模型组较,实验组的骨密度和骨钙含量均升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。ELISA法显示,血清25-HVD、CTX-I、BAP、TRAP5b的表达,与假手术组比较,模型组显著降低,与模型组比较,实验组显著升高, ($P < 0.05$)。生物力学检测显示,假手术组的极限载荷、极限应力和弹性模量比模型组有显著增高($P < 0.05$),实验组的极限载荷和弹性模量比假手术组有显著增高($P < 0.05$)。RT-PCR检测显示TGF- β 1的m-RNA的表达,与假手术组、模型组比较,实验组明显上调($P < 0.05$)。**结论** 针刺联合人羊膜间充质细胞(HAMCs)移植具有较好的对去卵巢骨质疏松协同效应,可改善去卵巢大鼠骨质疏松症的作用。

【关键词】 人羊膜间充质细胞;针刺;移植;去卵巢;大鼠;骨质疏松

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0043-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.009

Synergistic effect of acupuncture and human amniotic mesenchymal stem cell transplantation on the treatment of osteoporosis in ovariectomized rats

CHEN Yu-min¹, CHEN Tao-ping², HAN Cui-yu², SHI Tong-huan², DONG Shu-xiang²

(1. Department of Physiology, Hebei University School of Medicine, Baoding 071000, China;

2. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of acupuncture combined with human amniotic mesenchymal stem

[作者简介] 陈玉敏(1976-),女,硕士研究生,E-mail:chenyuminwt@163.com。

[通讯作者] 陈涛平。E-mail: ctp00@163.com,电话:18603121976。

cells (HAMCs) transplantation on the osteoporosis in ovariectomized rats. **Methods** Forty-five healthy female non-pregnant Wistar rats were randomly divided into sham operated group, model group and experimental group (acupuncture + HAMC transplantation), 15 rats in each group. At 7 days after the surgical wound healing, the rats received acupuncture every day and intravenous injection of HAMCs suspension (except the sham operated group) once a week for consecutive 12 weeks. The body weight was measured every week. 24 hours after the last intervention, the rats were killed and specimens were collected. Specimens of the mid-, proximal- and distal femur were taken to measure the bone mineral density using a dual energy X-ray absorptiometer. At 12 weeks after the intervention, changes of the expression of serum 25-hydroxy-vitamin D (25-HVD), C-terminal peptide of type I collagen (CTX-I), bone specific alkaline phosphatase (BAP) and human tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) were determined by ELISA, the biomechanical properties of the removed femur was measured, and the expression of transforming growth factor- β (TGF- β) in the vertebrae was assessed by RT-PCR assay. **Results** Body weight of rats in the sham operation group was increased gradually in accordance with the natural growth of animals, that of the model group was significantly higher than that of the sham operated group since two months after modeling, and the body weight of the experimental group was similar to that of the sham operated group. The bone mineral density and calcium content of the model group were significantly decreased compared with that of the sham operated group ($P < 0.05$), and the bone mineral density and bone calcium content of the experimental group were significantly higher than that of the model group ($P < 0.05$). The ELISA showed that the expressions of serum 25-HVD, CTX I, BAP, and TRAP5b in the model group were significantly lower than that of the sham operated group, and those of the experimental group were significantly higher than that of the model group ($P < 0.05$). Measurement of biomechanical properties showed that the limit load, limit stress and elastic modulus of the femur of the sham operated group were significantly higher than that of the model group ($P < 0.05$), and the limit load and elastic modulus of the experimental group were significantly higher than that of the sham operated group ($P < 0.05$). T-PCR showed that the expression of TGF- β 1 m-RNA in the experimental group was significantly up-regulated than that of the sham operated and model groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Acupuncture combined with human amniotic mesenchymal stem cell (HAMCs) transplantation has a synergistic effect on the treatment of osteoporosis, and can improve the conditions in ovariectomized rats.

【Key words】 Human amniotic mesenchymal stem cells, HAMCs; HAMCs transplantation; Acupuncture; ovariectomized rats; Osteoporosis

骨质疏松症多见于中老年,病变特征为骨骼结构改变,骨脆性增加,强度减低,较易发生骨折。骨质疏松症可由多种因素导致,发病机制较为复杂,可反复发生骨折,对患者的生活质量造成了严重的影响,同时也给患者的家庭及社会带来较大经济负担^[1-3]。随着我国老龄化社会的到来,发病人数越来越多,防治骨质疏松症已经成为一个迫切需要解决的问题^[4-6]。近些年来随着医学科研的发展与医疗水平的提高,骨质疏松症的治疗手段也多样化,较为常用的有药物治疗法、中医中药治疗、中医针灸治疗、细胞移植治疗等,其中细胞疗法是目前实验研究的热点^[7-9]。人羊膜间充质细胞 (HAMCs) 来源于羊膜组织,是孕妇产生的一种废弃物,只要征得孕妇同意即可获得,不受伦理道德的限制,来源广泛,且具有在特定条件下分化为各种细胞的能力,这种特性的存在,使其为各种疾病的治疗提供了新的思路^[10-12]。居于以上优点,AM-MSCs 成为近几年的研究又一热点,其在包括免疫相关的疾病

在内的多种疾病的治疗方面取得了令人瞩目的成绩。本研究旨在联合应用针刺及 AM-MSCs 移植干预去卵巢大鼠骨质疏松症,观察其作用效果。

1 材料和方法

1.1 材料及来源

骨密度测定仪器(法国 GK 公司)、LG-DMEM (Gibico 公司)、胰蛋白酶 (Amresco 公司)、体重计、双能 X 射线骨密度测量仪(美国 GE 公司)、骨特异性碱性磷酸酶 (BAP) 酶联免疫测定试剂盒、大鼠 I 型胶原 C 端肽 (CTX-I) 检测试剂盒、大鼠抗酒石酸性磷酸酶 5b (TRAP5b) 检测试剂盒(上海斯信生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物与分组:选择 2 月龄 45 只 Wistar 大鼠,均为雌性、未孕,每只大鼠体重控制在 215 ~ 255 g,购自河北医科大学第二医院,动物质量合格证号:【SCXK(冀)2010-0-056】。河北大学附属

医院 SPF 级实验动物室常规饲养 SY【XK(冀)2011-0008】，所有大鼠均在相同条件下进行饲养。采用完全随机法。将 45 只大鼠平均分成 3 组，分别为假手术组、模型组及实验组，各组均为 15 只。

1.2.2 模型的建立：将各组大鼠采用吸入乙醚法进行麻醉，麻醉后将大鼠固定，经皮肤消毒后，选择腰椎后侧正中为切口切开皮肤，分离两旁肌肉，打开腹膜，找到双侧卵巢，模型组及实验组两组大鼠双侧卵巢需完全切除，而对假手术组大鼠的处理则为相同部位切开皮肤后，在卵巢周围的周边部位切下少量的组织，而不切除卵巢，操作完成后向腹腔中撒入青霉素粉末，然后相同的方法缝合皮肤。手术结束后 7 d 大鼠伤口愈合后，对实验组大鼠行行针刺+尾静脉注射 HAMCs 液进行干预。具体注射方法为每次为各只大鼠注射约 2 mL 的 HAMCs 细胞悬液，注射 2×10^4 个细胞，每周注射 1 次。具体针刺方法为：实验组运用针刺膻穴治疗，参照《实验针灸学》动物穴位的定位方法选取“大杼”“肾俞”“脾俞”，均取双侧。将大鼠固定，穴位局部剪去鼠毛，进行常规消毒，采用一次性美容针，左手固定大鼠皮肤，右手持针准确刺入上述膻穴 2~5 mm，每日 1 次，每次持续 30 min，每隔 10 min 轻捻转行针 1 次（持续 10 s，以增强针感）。干预时长为 12 周，整个操作过程均由同实验者完成^[13]。

1.2.3 HAMCs 的培养及鉴定：经过孕妇同意后，收集胎膜组织，将羊膜与绒毛膜进行分离，整个操作均在无菌条件下进行。将分离后得到的羊膜经过反复冲洗将血液及杂物冲洗干净后，用剪刀将洗净的羊膜剪成乳糜样大小的颗粒，首先向盛有羊膜的器皿中加入胰蛋白酶进行消化，再次进行冲洗将未消化的组织洗去，然后向其中加入胶原酶将组织进行彻底消化，将消化后的液体通过 300 目钢网进行过滤，将过滤液进行收集，吸取少量过滤液置于离心管中，将离心管放入离心机中在 1 500 r/min 状态下进行离心，10 min 将其取出向其中加入 LG-DMEM 培养基，并吹打均匀使细胞呈完全悬浮状态，用滴管吸取少量悬浮细胞液滴在 6 孔培养板上进行接种，接种完毕将培养箱调至特定状态，将 6 孔板放在其中进行培养。培养至第 3 天时，取出培养板弃去旧的培养基并重新加入新的培养基继续进行培养，当细胞贴壁细胞数达 80%~90% 后，先后加入胰蛋白酶、培养基，经过消化后再次进行离心，最后进行细胞传代，当细胞生长至第 3 代时，取适量

AM-MSCs 液注射至实验组各只大鼠体内。最后采用光学显微镜对 AM-MSCs 进行观察^[14]。

1.2.4 测定各组大鼠的体质量：从造模后 7 d 开始，每周测定 1 次各只大鼠体重，直至造模后的第 13 周将大鼠处死时结束。具体操作过程为，将体重计置于桌面上，置“0”后将事先准备好的小桶置于体重计上，记录小桶重量，然后分别将各组各只大鼠置于小桶中，记录体重计读数，将每次读数减去小桶重量，分别对每只大鼠进行两次体质量测定，为确保测定结果的准确性将两次测定结果的平均值做为大鼠体质量^[15]。

1.2.5 双能 X 线吸收骨密度仪测定左侧股骨中点、远端和近端骨密度：在造模后的第 13 周后将各组大鼠处死，固定后，无菌条件下将大鼠左侧股骨取出，标记出大鼠股骨中点，分别对大鼠左侧股骨中点、近端及远端分别进行骨密度测定。具体操作方法为将大鼠股骨中点、远近端分别置于双能 X 线吸收骨密度仪进行测定记录测定值结果用于最后数据比较^[16]。

1.2.6 原子吸收法测定其骨钙含量：模型建立第 13 周后，经过最后一次干预后 24 h，以颈部脱臼法将各组大鼠处死，固定在支架上，用手术刀将大鼠股骨取出，将股骨上附着的组织剔除干净，用原子吸收法对剔除干净软组织的股骨进行钙含量的测定^[17]。

1.2.7 采用 ELISA 法检测血清：25-HVD、CTX-I、BAP、TRAP5b 的表达变化：实验组大鼠经过 12 周的干预后，将各组大鼠取仰卧位，固定后，用注射器经大鼠境外静脉进行采血，将注射器中抽出的血液注入离心管，把离心机调至 3 000 r/min 状态，打开离心机将离心管放入进行离心，15 min 后用胶头滴管将离心管中的上清液吸出，采用 ELISA 法对血清 25-HVD、CTX-I、BAP、TRAP5b 进行测定，所有操作均按照试剂盒的说明书进行。对各项结果进行记录^[18]。

1.2.8 检测各组大鼠生物力学性能的变化：于模型建立第 13 周后，在末次干预后 24 h，将各组大鼠处死，将大鼠固定在支架上，用手术刀将大鼠股骨取出，将股骨上附着的组织剔除干净，然后进行股骨生物力学测试，所采用的实验为三点弯曲实验，将各组大鼠处理后的股骨放在试验机上进行测试，所选择的跨距为 17 mm，加载速度为 2.0 mm/min，然后根据结果对其载荷-变形曲线，应力-应变曲线进行描绘^[19]。

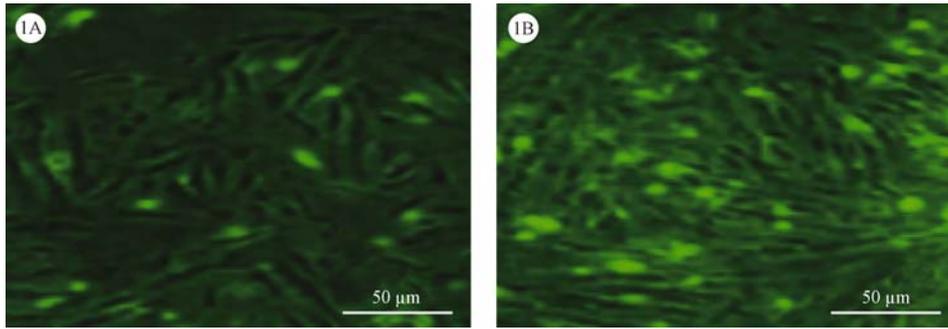


图 1A:第 6 天时 HAMCs($\times 200$,标尺 = $50\mu\text{m}$);图 1B:传至第 8 代的 HAMCs($\times 200$,标尺 = $50\mu\text{m}$)

图 1 HAMCs 的形态观察

Fig.1 Morphological observation of the HAMCs at 6th day (A) and after 8th passage (B).

1.2.9 RT-PCR 检测 TGF- $\beta 1$ 基因表达情况:抽取各组大鼠血液,将各组大鼠血液经过特定处理后从中提取出总的 RNA,从中取出 $2\mu\text{L}$ 进行逆转录,结果为 cDNA。将逆转录得到的片段作为 PCR 反应模板进行 PCR 反应,整个操作按照相关试剂盒说明进行。TGF- $\beta 1$ 上下游引物委托 TaKaRa 生物公司设计合成。TGF- $\beta 1$ 引物:上游 5'-TTTCCCGATATT CGGGCAGC-3',下游 5'-GTACATGAGCAGGCTCAG CC-3'。 β -actin 引物:上游 5'-TG-GTGGGTATGGGTC AGAAGGACTC-3',下游 5'-CATG-GCTGGGGTGT GAAGGTCTCA-3'。PCR 反应条件为:在 94°C 条件下变性,时长为 1 min,然后在 56°C 条件下进行退火,退火时长为 0.5 min,最后进行延伸,延伸所需条件为 72°C ,延伸时长为 1 min,共经过 30 个循环。

2 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用单因素方差分析和双因素重复测量数据方差分析,组间比较采用 LSD-t 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 HAMCs 的形态观察

贴壁细胞数随培养时间的延长而逐渐增多,细胞形态也由刚开始的长梭形而逐渐发生改变,第 6 天时贴壁细胞数量可达 80% 以上,此时细胞排列紧密,细胞体较前拉长,呈漩涡状生长(图 1A)。传代生长分为不同的时期,不同时期内细胞增殖速度是不同的,细胞增殖速度在第 4 天左右是最快,当传代至第 8 代以后逐渐减慢,细胞形态变化较为明显,胞体逐渐变大使整个细胞形态呈扁平状。根据从生长曲线(图 1B)可以进行不同分期,1~3 d 为细胞

生长潜伏期,此期细胞呈贴壁生长,数量逐渐增多;第 4~7 天为细胞对数生长期,此期细胞增殖速度最快;第 8 天细胞增殖速度变缓,达到平台期。

3.2 各组大鼠的体质量

分别在造模后第 7 天开始每周对大鼠体质量进行 1 次测定,将各组大鼠体质量最终结果进行比较结果显示,假手术组大鼠在造模结束后第 7 天至第 13 周体重逐渐增加,这符合动物的自然生长规律,从造模后的第 8 周开始,比较模型组与假手术组体质量,模型组显著高于假手术组;而实验组大鼠体重在这段测定时间内逐渐增加,与假手术组结果相比,二者结果相接近。如图 2。

3.3 双能 X 线吸收骨密度仪测定左侧股骨中点、远端和近端骨密度

在造模后的第 13 周将各组大鼠处死后,取出股骨置于双能 X 线吸收骨密度仪上,对大鼠不同部位骨骼进行骨密度检测,标本选定均为离体骨,测定结果显示,通过比较各组各部位骨密度结果可以得出以下结论,假手术组、模型组两组相比,模型组骨密度升高,且二者差异具有显著性,模型组及实验组两组进行比较,实验组的骨密度升高,差异也具有显著性($P < 0.05$)(表 1)。

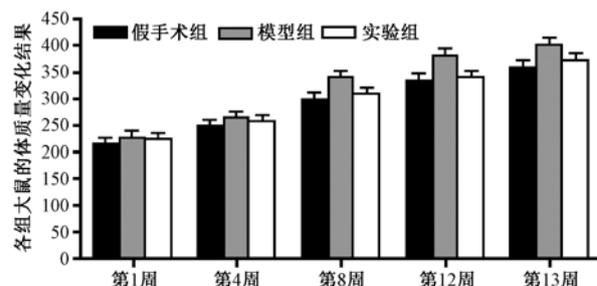


图 2 各组大鼠的体质量比较

Fig.2 Comparison of body weight of the rats in each group

3.4 原子吸收法测定其骨钙含量

在模型建立第 13 周后,用原子吸收法对各组大鼠骨钙含量进行测定,选用的标本为各组大鼠左侧股骨,并对各组测定结果进行比较,测定及比较结果显示,将假手术组、模型组两组大鼠的骨钙含量进行比较,模型组骨钙含量升高,而将模型组及实验组两组结果进行比较,结果显示实验组的骨钙含量升高,且差异有显著性意义,即 $P < 0.05$ (表 2)。

3.5 各组大鼠 25- HVD、CTX- I、BAP、TRAP5b 的表达变化

采用 ELISA 法对大鼠血清 25- HVD、CTX- I、BAP、TRAP5b 的表达进行测定,经各组大鼠结果比较得出结论如表 3 所示,首先将假手术组、模型组两组的各项结果进行比较,比较结果显示模型组的各项指标均呈现明显的降低趋势,然后将模型组及实验组两组进行比较,比较结果显示实验组各项指标

较前者则升高显著,差异具有显著性意义 ($P < 0.05$)。

3.6 生物力学性能的变化

各组大鼠经过不同处理后,生物力学性能均发生不同变化,采用三点弯曲实验对大鼠生物力学性能的变化测定并对结果进行比较,从表 4 中可以看出,假手术组与模型组相比 N, MPa, M Pa 增高显著,差异具有显著性;而将假手术组与实验组两组相比,后者的 N 和 M Pa 均显著升高,差异具有显著性, $P < 0.05$ 。

3.7 RT-PCR 检测 TGF-β1 基因表达情况

以 RT-PCR 法对大鼠 TGF-β1 基因的表达情况进行检测,记录检测结果,将大鼠的检测结果进行比较,结果显示,假手术组、模型组及实验组三组中实验组的 TGF-β1 基因表达明显上调,差异具有显著性意义 ($P < 0.05$),见图 3。

表 1 大鼠不同部位离体骨的骨密度(BMD)值
Tab.1 Values of BMD of different parts of the rat femur measured ex vivo

| 组别 Groups | 左侧股骨中点 Left femur midpoint | 远端 Distal end | 近端 Proximal end |
|------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 假手术组 Sham | 124.33 ± 12.02 | 80.74 ± 10.42 | 149.31 ± 11.42 |
| 模型组 Model | 128.38 ± 12.31 ^a | 85.41 ± 10.72 ^a | 150.42 ± 14.57 ^a |
| 实验组 Experimental | 134.42 ± 13.12 ^b | 87.79 ± 11.31 ^b | 157.38 ± 15.03 ^b |

注:^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.05$ 。
Note. ^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.05$ 。

表 2 针刺联合人羊膜间充质干细胞移植对大鼠股骨钙含量的影响
Tab.2 Effect of acupuncture combined with human amniotic mesenchymal stem cell transplantation on the rat femoral calcium content

| 组别 Groups | 动物数(只) Number of animals | 骨钙含量(mg/g) Calcium content (mg/g) | LSD 平均差(I-J) LSD Mean difference | P 值 |
|------------------|-----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------|
| 假手术组 Sham | 15 | 157.36 ± 13.45 | | |
| 模型组 Model | 15 | 206.22 ± 25.42 | -11.258 | <0.05 |
| 实验组 Experimental | 15 | 241.15 ± 27.17 | 15.672 | <0.05 |

表 3 各组大鼠 25- HVD、CTX- I、BAP、TRAP5b 的表达影响
Tab.3 Expression of serum 25-HVD, CTX-I, BAP, and TRAP5b of rats in each group

| 组别 Groups | 25- HVD | CTX- I | BAP | TRAP5b |
|------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 假手术组 Sham | 22.82 ± 4.17 | 23.34 ± 0.28 | 0.50 ± 0.26 | 50.74 ± 23.12 |
| 模型组 Model | 18.16 ± 2.42 ^a | 11.21 ± 0.14 ^a | 0.15 ± 0.17 ^a | 38.23 ± 11.34 ^a |
| 实验组 Experimental | 27.41 ± 5.05 ^b | 22.86 ± 0.14 ^b | 0.59 ± 0.28 ^b | 59.69 ± 23.25 ^b |

注:^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.05$ 。Note. ^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.05$ 。

表 4 针刺联合人羊膜间充质干细胞移植对去卵巢大鼠股骨生物力学的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.4 Effect of acupuncture combined with human amniotic mesenchymal stem cell transplantation on femur biomechanics in the ovariectomized rats

| 组别 Groups | 极限载荷(N) Limit load (N) | 极限应力(M Pa) Limit stress (MPa) | 弹性模量(M Pa) Elastic modulus (MPa) |
|------------------|-----------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| 假手术组 Sham | 142.61 ± 14.23 | 0.985 ± 0.130 | 6122.01 ± 205.43 |
| 模型组 Model | 121.06 ± 20.14 ^a | 0.759 ± 0.216 ^a | 5174.34 ± 597.21 ^a |
| 实验组 Experimental | 153.42 ± 13.54 ^b | 1.040 ± 0.304 ^b | 6752.50 ± 165.03 ^b |

注:^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.05$ 。Note. ^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.05$ 。

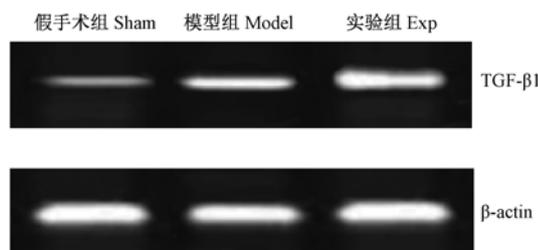


图 3 各组 TGF-β1 基因表达情况

Fig. 3 Expression of TGF-β1 gene in each group

4 讨论

骨质疏松症是临床中较为常见的一种疾病,本实验切除雌性大鼠的卵巢使得大鼠雌激素分泌减少,从而造成骨质疏松症模型与女性绝经后雌激素分泌减少引起的骨质疏松症特征相似,因此可以用这种方法造模来研究绝经后骨质疏松症^[20-21]。因骨质疏松症致病因素多,发病机制复杂,所以很难使用一种药物来解决骨质疏松症的所有问题。本研究采用针刺联合 HAMCs 移植干预去卵巢大鼠骨质疏松症,探讨针刺是否具有骨相对特异性调节作用,尤其是抗骨质疏松的效应。

骨组织的成骨细胞和破骨细胞都有雌激素受体,骨组织形成和溶解都受到雌激素的调节。研究表明雌激素减少是性骨质疏松症发生的主要原因,雌激素可预防治疗骨质疏松症。人的骨形成由骨吸收与骨形成相互平衡决定,这种平衡受各种因素扰乱而打破时,骨量就会发生异常,骨结构随即改变,从而影响骨的正常功能。女性患者在月经完全消失后,由于雌激素分泌减少,骨形成与骨吸收的平衡受到影响后,经过复杂的机制作用,导致的最终结果是骨形成与骨吸收平衡打破使骨量形成减少,从而导致的骨骼强度变小,脆性增加,所以极易发生骨折。大量研究表明雌激素对骨质疏松症可以通过作用于相应受体而对成骨及破骨过程直接发挥作用;还可通过旁分泌机制产生大量的作用因子,对成骨及破骨过程产生间接的作用,通过各种凋亡机制发挥作用^[22-24]。这些作用机制增强成骨作用,而减弱破骨作用,所以雌激素可以促进骨生成,当雌激素减少时骨生成减少即可发生骨质疏松症。

目前随着高龄社会的到来,骨质疏松症患者也逐年增加,其治疗方法很多,但效果不是很理想。针刺是一种中医治疗方法,研究发现针刺可以改变机体激素分泌,通过这种内分泌的改变来影响成骨

及破骨作用,因此对骨质疏松症患者有较好的作用^[25-26]。HAMCs 大量相关实验研究将其用于各种疾病的治疗中,并且已经取得了令人瞩目的成绩,探讨 HAMCs 用于疾病治疗安全性的研究发现该种细胞对小鼠的肝肾功能未造成损伤,小鼠生长良好,不存在种间排异反应,且移植后无致瘤现象发生,安全可行^[27]。骨质疏松症发病机制复杂,目前有大量研究采用联合法治骨质疏松症,但是还尚未有将 HAMCs 与针刺相结合干预骨质疏松症。

本研究将这两种治疗方法联合起来干预大鼠骨质疏松症,通过对各组大鼠进行不同处理后观察大鼠骨质疏松症改善程度,结果显示与模型组比较,实验组的骨密度和骨钙含量均升高。ELISA 法显示,血清 25-HVD、CTX-I、BAP、TRAP5b 的表达,与模型组比较,实验组显著升高。生物力学检测显示,假手术组的极限载荷、极限应力和弹性模量比模型组有显著增高,实验组的极限载荷和弹性模量比假手术组有显著增高。RT-PCR 检测显示 TGF-β1 的 m-RNA 的表达,与假手术组、模型组比较,实验组明显上调。一系列结果均提示针刺联合 HAMCs 移植对大鼠骨质疏松症具有协同效应,可改善去卵巢大鼠骨质疏松症的作用。然而目前对 HAMCs 的相关研究仍处于探索阶段,将 AM-MSCs 移植用于临床各种疾病的治疗仍需大量研究支持,需要不断探索,仍有许多问题需要解决。

参考文献:

- [1] 文天林,孙天胜,王玲. 骨质疏松的流行病学、病因和分类[J]. 人民军医, 2010, 35(9): 662-663.
- [2] 戴如春,张丽,廖二元. 骨质疏松的诊治进展[J]. 中国医刊, 2008, 43(4): 4-6.
- [3] Tian YG, Li Y, Li JS, et al. Effects of therapies for regulating and reinforcing lung and kidney on osteoporosis in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Trad Chin Med, 2015, 35(02): 175-183.
- [4] 徐敏,刘保新,黄承军,等. 原绝经后骨质疏松症的穴位治疗进展[J]. 浙江中医药大学学报, 2011, 35(2): 301-302.
- [5] Ono Y. Multifunctional and potent roles of the 3-hydroxypropoxy group provide eldcalcitol's benefit in osteoporosis treatment [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2014, 139: 88-97.
- [6] Maloste M, Ariane B, Graziela Z, et al. Whole-body vibration improves fracture healing and bone quality in rats with ovariectomy-induced osteoporosis [J]. Acta Cirurg Bras 2015, 30(11): 727-735.
- [7] Li N, Li XM, Xu L, et al. Comparison of QCT and DXA: Osteoporosis detection rates in postmenopausal women [J]. Int J Endocrinol, 2013, Article ID 895474.

- [8] 朴正福,丁淑琴,张海燕,等. 人羊膜间充质干细胞的分离及分化潜能的研究 [J]. 生物医学工程与临床,2010, 14(1): 15 - 19.
- [9] Karlsson H, Samarasinghe S, Amrolia PJ, et al. Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses [J]. Blood, 2008, 112(3): 532 - 541.
- [10] Perin L, Sedrakyan S, Giuliani S. Protective effect of human amniotic fluid stem cells in an immunodeficient mouse model of acute tubular necrosis [J]. PLoS One. 2010, 5(2): e9357.
- [11] Kobayashi M, Yakuwa T, Sasaki K, et al. Multilineage potential of side population cells from human amnion mesenchymal layer [J]. Cell Transplant, 2008, 17(3): 291 - 301.
- [12] Gerdoni Z, Gallo B, Casazza S, et al. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Ann Neurol, 2007, 61(3): 219 - 227.
- [13] 谢肇,李起鸿,孟萍,等. 去卵巢大鼠骨质疏松模型的特点 [J]. 中国临床康复,2006,10(28): 79 - 81.
- [14] 方宁,张路,宋秀军,等. 人羊膜间充质干细胞的分离、培养及鉴定 [J]. 遵义医学院学报,2009, 32(3): 234 - 236.
- [15] 李媛媛,胡慧,梁翠梅,等. 针刺“带脉”穴对代谢综合征大鼠体质量、血糖和脂代谢的影响 [J]. 针刺研究,2014, 39(3): 202 - 206.
- [16] 董军,闫虎,谭远超,等. 双能 X 射线骨密度仪测量离体羊股骨骨折端及钢板对接骨折端的骨密度 [J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(35): 6555 - 6558.
- [17] 李学朋,孟照明,孟兆亮,等. 补肾活血方对去卵巢大鼠骨质疏松检测指标的影响 [J]. 中国医学创新,2013, 10(2): 16 - 18.
- [18] 张荔,孙付军,李贵海. 葛藤分散片对去卵巢大鼠骨质疏松的保护作用 [J]. 中药药理与临床,2014, 30(2): 87 - 89.
- [19] 李双,牛丽颖,窦玉红,等. 淡豆豉对去卵巢骨质疏松大鼠生物力学性能的影响 [J]. 中药药理与临床,2008, 24(2): 57 - 58.
- [20] Soncini M, Vertua E, Gibelli L, et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes [J]. J Tissue Eng Regen Med. 2007, 1: 296 - 305.
- [21] 刘儒鹏,荣培晶, Gary Guishan Xiao. 针刺治疗原发性骨质疏松症的研究概况与述评 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(12): 1400 - 1401.
- [22] 杜革术. 针刺对绝经后骨质疏松患者骨密度及血清雌二醇的影响 [J]. 上海针灸杂志,2011, 30(2): 104 - 106.
- [23] Richey F, Schacht E, Bruyere O, et al. Vitamin D analogs versus native vitamin D in preventing bone loss and osteoporosis-related fractures—A comparative meta-analysis [J]. Calcif Tissue Int, 2005, 76(3): 176 - 186.
- [24] Díaz-Prado S, Muñoz-López E, Hermida-Gómez T, et al. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine [J]. Differentiation. 2011, 81(3): 162 - 171.
- [25] De Coppi P, Bartsch, GJr, Siddiqui MM, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy [J]. Nature Biotechnol. 2007, 25(1): 100 - 106.
- [26] Alviano F, Fossati V, Marchionni C, et al. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro [J]. BMC Dev Biol. 2007, 7: 11.
- [27] 郭亚男,关方霞,李国栋,等. 人羊膜间充质干细胞静脉移植治疗阿尔茨海默病 APP + 转基因鼠的有效性及其安全性评估 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(10): 1811 - 1818.

[修回日期] 2016 - 06 - 12



北京中国农大小型猪三个亚系群体的遗传状况分析

魏杰, 巩薇, 王洪, 李晓波, 付瑞, 王吉, 邢进,
冯育芳, 王淑菁, 高正琴, 岳秉飞

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

【摘要】 目的 对北京地区中国农大小型猪三个亚系群体进行遗传质量评价与分析。方法 利用 DB11/T828.3-2011 中的 25 对微卫星引物, 对 3 个中国农大小型猪亚系群体进行微卫星分型, 利用群体遗传分析软件 Popgen32 对所得结果进行处理分析。结果 农大 I 系、农大 II 系和农大 III 系小型猪群体分别得到 130、122 和 138 个等位基因, 平均杂合度分别为 0.6759、0.5967、0.6779, 平均多态信息含量 (PIC) 分别为 0.6344、0.5540、0.6403; 农大 II 系和农大 III 系的遗传距离为 0.4251, 农大 I 系与农大 II 系的遗传距离为 0.2084。结论 三个亚系中, 农大 II 系和农大 III 系小型猪均具有较好的遗传多样性和稳定性, 符合封闭群动物的群体遗传特征。

【关键词】 农大小型猪; 微卫星标记; 亚系; 群体遗传

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0050-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.010

Population genetic quality analysis of 3 subbreeds of China Agricultural University miniature pigs in Beijing

WEI Jie, Gong Wei, Wang Hong, LI Xiao-bo, FU Rui, Wang Ji,
XING Jin, FENG Yu-fang, WANG Shu-jing, GAO Zheng-qin, YUE Bing-fei
(National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To analyze and evaluate the population genetic quality of 3 subbreeds of China Agricultural University miniature pigs in Beijing. **Method** According to the local standard DB11/T828.3-2011, 25 pairs of microsatellite primers were used in 3 subbreeds of China Agricultural University miniature pigs, and software Popgen32 was used to process the data. **Results** 24 microsatellite loci shared 130, 122 and 138 alleles in the China Agricultural University miniature pigs I, II, III, respectively. The average heterozygosity was 0.6759, 0.5967 and 0.6779, respectively, while the average polymorphism information content (PIC) was 0.6344, 0.5540 and 0.6403, respectively. The genetic distance between China Agricultural University miniature pig II and III was 0.4251, while the genetic distance between China Agricultural University miniature pig I and II was 0.2084. **Conclusions** In the 3 subbreeds, China Agricultural University miniature pigs II and III have genetic stability and genetic diversity, and both of which satisfy with the genetic characteristics of closed colony laboratory animal.

【Key words】 China Agricultural University miniature pig; Microsatellite; Subbreed; Population genetics

[基金项目] 中国食品药品检定研究院中青年基金(2014C4)。

[作者简介] 魏杰(1982-), 女, 硕士。研究方向: 免疫遗传检测。E-mail: jane3040320@163.com。

[通讯作者] 岳秉飞(1960-), 男, 研究员, 博士。研究方向: 动物遗传学。E-mail: y6784@126.com。

小型猪在解剖学、生理学、疾病发生机理等方面与人有极高的相似性,近年来已成为生物医学研究中广泛应用的非啮齿类实验动物^[1-3]。上世纪 80 年代,北京农业大学以贵州从江和广西环江引进的香猪为亲本,经近交育种、负向选择等手段培育成中国农大 I 系小型猪。又根据不同用途,与北京本地黑猪杂交培育出了抗逆性强的农大 II 系;与兰德瑞斯杂交培育成了白色的农大 III 系^[4,5]。该系列小型猪统称农大小型猪或中国实验用小型猪 (Chinese experimental mini-pig, CEMP),具有体型小、基因纯、健康敏感、抗逆性强的特点,并在心脏模型、外科、口腔、烧伤等领域有着广泛应用^[5-8]。

三个亚系的亲本来源的不同,必然构成了种群上的差异。在中国农大小型猪的选育上,已经过 78 项生理生化指标测定及病原净化,但对与遗传质量状况的调查尚未见报道^[9]。对于品系资源的保护和发展,需要依托科学的遗传理论和技术。微卫星 DNA 标记即是群体遗传学研究中最为常用的分子标记之一^[10]。它是以 1-6 个核苷酸为单位的段串联重复序列标记来进行遗传的种质鉴定和多样性分析等,具有数量大、分布广、多态性丰富、共显性遗传,检测快速简便且结果稳定性重复性好等特点^[11]。2012 年 3 月,应用微卫星标记技术的北京市地方标准 DB11/T828.3-2011 正式实施,这是目前针对小型猪遗传质量控制最为具体的地方标准。本研究即依据 DB11/T828.3-2011 中 25 对微卫星引物,对北京地区三个农大亚系小型猪的群体进行遗传构成分析,阐明农大小型猪三个亚系的遗传质量,从而为农大小型猪的生产繁育提供科学的依据,同时丰富地标 DB11/T828.3-2011 在实际检测中的应用。

1 材料和方法

1.1 样本

按照 DB11/T828.3-2011 的要求,分别从甲、乙 2 家单位抽取封闭繁育 4 代以上、不同窝别,雌雄各半的小型猪样本,采抗凝血用于提取 DNA 进行遗传检测分析。采样单位、动物品系数量等信息详见表 1。

1.2 样本 DNA 的制备^[12]

用改良酚-氯仿抽提法从血样中提取基因组 DNA,双蒸 H₂O 溶解,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,并用紫外分光光度计测定 DNA 纯度及含量,-20℃ 冻

存备用。

1.3 引物^[13]

本研究所用 25 对引物均按照北京市地方标准对封闭群实验用小型猪的规定,并由北京擎科新业生物技术有限公司合成。序列详见 DB11/T828.3-2011 附录 B。

1.4 主要试剂和仪器

Taq 酶, DNA marker 均购自上海生物工程技术服务有限公司; dNTP、琼脂糖为 Takara 公司产品; 其余试剂均为国产。

Mettler GB303 电子天平, Bio-Rad MyCycler 型 PCR 仪, Bio-Rad Model 3000Xi 型电泳仪, GelLogic 212PRO 紫外与可见光凝胶分析装置。

1.5 PCR 扩增程序

参照 DB11/T828.3-2011 中的 PCR 反应体系进行实验,并调整模板引物浓度,底物浓度及酶含量,采用如下反应体系:总反应体系 20 μL,其中 10 × PCR buffer 2 μL,上下游引物 (10 pmol/μL) 0.8 μL, dNTP (100 μmol/L) 1.2 μL, 0.2 μL Taq 酶 (2.5 U/μL), 基因组 DNA 0.7 μL (50 ng ~ 100 ng), 纯水 (ddH₂O) 补齐体积。镁离子浓度详见 DB11/T828.3-2011 附录 B。

PCR 反应程序:95℃ 预变性, 4 min; 94℃ 变性, 30 s; 退火温度 (T_m 参照 DB11/T828.3-2011 附表 B), 30 s; 72℃ 延伸, 30 s; 35 个循环; 72℃ 继续延伸 7 min; 扩增产物 4℃ 保存。

1.6 电泳结果及记录

2.5% 的琼脂糖凝胶电泳,电压 110 V,由负极到正极,电泳时间 35 min。溴化乙啶 (2 μg/mL) 染色,紫外可见分析装置记录拍照。无效扩增和非特异扩增需要优化条件重新实验,重复试验无结果记为无效位点。

扩增稳定条带送北京擎科新业生物技术有限公司进行 STR 分型扫描,依据扫描结果记录纯合子与杂合子,并依据片段大小依次记录为 AA、AB、BB、BC、CC……纯合子与杂合子判定见图 1,图 2。片段大小记录示例详见表 2。

1.7 统计学方法

统计各位点等位基因的组成,利用 Popgen32 软件计算不同个体在各微卫星位点上的基因频率、平均有效等位基因数 (N_e)、观测杂合度、期望杂合度、平均杂合度 (H); 利用 Littleprogram 0.6 计算各位点的多态性信息含量 (PIC)。

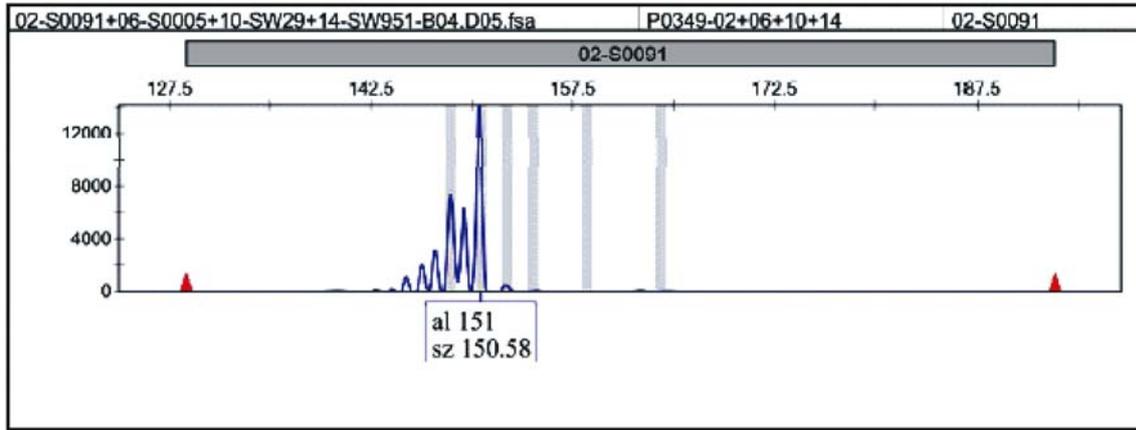


图 1 纯合子示例图(S0091)

Fig. 1 Example picture for homozygote(S0091)

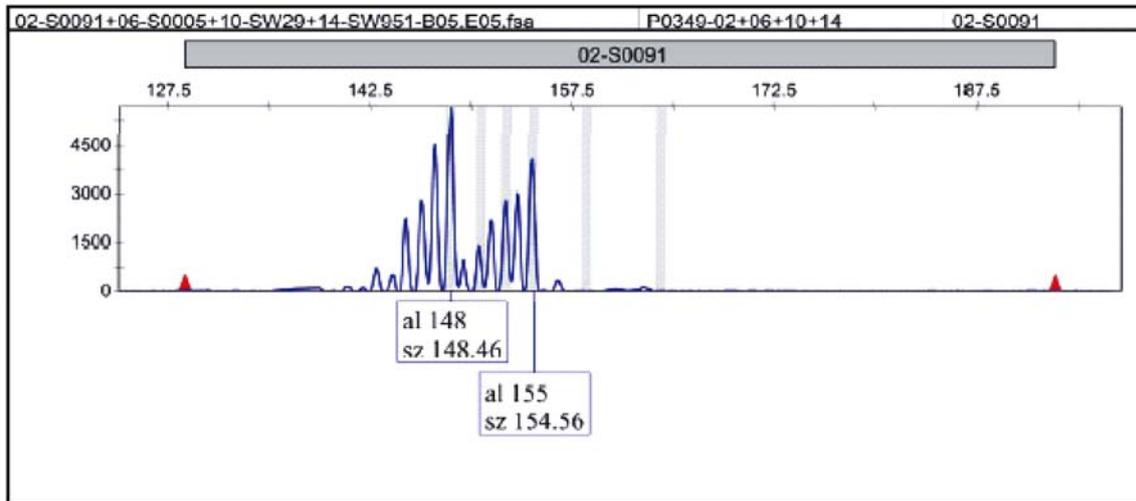


图 2 杂合子示例图(S0091)

Fig. 2 Example picture for heterozygote (S0091)

表 1 小型猪取样单位、品系及数量信息表

Tab. 1 Information table of the miniature pigs

| 单位 Company | 生产许可证号 Production license | 品系 Strains | 被毛颜色 Color | 数量(头) Number |
|---------------|------------------------------|---------------|---------------|-----------------|
| 甲 | SCXK(京)2013-0005 | 农大 II 系 | 黑 | 15 |
| 乙 | SCXK(京)2012-0005 | 农大 I 系 | 黑 | 15 |
| 乙 | SCXK(京)2012-0005 | 农大 III 系 | 白 | 15 |

表 2 微卫星扫描结果片段记录示例表(SW2494)

Tab. 2 Example table for microsatellite scanning results (SW2494)

| 扫描值(bp) Scanning results | 记录值 Record results |
|-----------------------------|-----------------------|
| 100 | BB |
| 100 106 | BC |
| 98 100 | AB |
| 98 106 | AC |
| 98 | AA |

1.8 结果评价

群体遗传质量评价参见 DB11/T828.3-2011 的判定标准,即采用平均杂合度指标或群体平衡状态方法进行评价^[13]。当平均杂合度在 0.5~0.7 时,且期望杂合度与观测杂合度经卡方检验无明显差异时,群体为合格的封闭群实验用小型猪群体。或用群体是否达到平衡状态来判定,如果没有达到平衡状态,说明群体的基因频率或基因型频率发生变化,该封闭群实验用小型猪群体判为不合格。

对于群间的遗传变异,采用近交系数、遗传距离等指标进行分析与评价遗传结构和亲缘关系。

2 结果

2.1 农大三个亚系小型猪的群体遗传质量评价

经测定,共有 24 个微卫星标记位点在 I 系、农大 II 系和农大 III 系小型猪群体中得到稳定扩增。SWr312 位点在三个群体样本中均存在严重的非特异扩增,故而舍弃该位点。

农大 I 系、农大 II 系和农大 III 系小型猪群体的平均杂合度分别为 0.6759、0.5967、0.6779,平均多态信息含量(PIC)分别为 0.6344、0.5540、0.6403,群体卡方值分别为 48.48、29.76、19.85,P 值分别为 0.0022、0.1927、0.7054。三个亚系农大小型猪平均

杂合度均在 0.5~0.7 之间,但农大 I 系小型猪群体期望杂合度与观测杂合度经卡方检验有统计学差异($P < 0.05$),不能判定为合格的封闭群小型猪群体,其余两个亚系可判定为合格群体。各品系小型猪遗传参数详见表 3~表 5。

2.2 农大小型猪群体的遗传距离与遗传相似系数

农大 I 系、农大 II 系和农大 III 系三个群体分别得到了 130 个、122 个和 138 个等位基因。将三个亚系的农大小型猪群体作进一步的分析,两两比较得到农大 I 系与农大 II 系的遗传距离为 0.4251,农大 I 系和农大 III 系的遗传距离为 0.3351,农大 II 系和农大 III 系的遗传距离为 0.2084。遗传相似系数与遗传距离互为负对数关系,结果详见表 6。

表 3 农大 I 系小型猪群体遗传参数表
Tab.3 Genetic parameters of the China Agricultural University miniature pig I

| 位点 Locus | 等位基 因 na | 有效等 位基因 na | 观测杂 合度 Obs_Het | 期望杂 合度 Exp_Het | 平均杂 合度 Ave_Het | 多态 信息含量 PIC | 多态度 Degree of PIC |
|-------------|----------------|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|-------------------------|
| SW974 | 7.0000 | 2.9221 | 0.4667 | 0.6805 | 0.6578 | 0.6233 | 高 |
| S0091 | 6.0000 | 3.5433 | 0.8000 | 0.7425 | 0.7178 | 0.6773 | 高 |
| SW0240 | 5.0000 | 2.3560 | 0.6000 | 0.5954 | 0.5756 | 0.5280 | 高 |
| SW1066 | 6.0000 | 4.8387 | 0.9333 | 0.8207 | 0.7933 | 0.7620 | 高 |
| SW1089 | 6.0000 | 3.8136 | 0.6667 | 0.7632 | 0.7378 | 0.7060 | 高 |
| S0005 | 3.0000 | 1.5901 | 0.4667 | 0.3839 | 0.3711 | 0.3226 | 中 |
| SW1057 | 4.0000 | 3.5433 | 1.0000 | 0.7425 | 0.7178 | 0.6691 | 高 |
| SW632 | 8.0000 | 5.7692 | 0.9333 | 0.8552 | 0.8267 | 0.8064 | 高 |
| OPN | 4.0000 | 2.6012 | 0.3333 | 0.6368 | 0.6156 | 0.5384 | 高 |
| SW29 | 7.0000 | 3.2609 | 1.0000 | 0.7172 | 0.6933 | 0.6518 | 高 |
| SW911 | 5.0000 | 3.4351 | 0.8000 | 0.7333 | 0.7089 | 0.6649 | 高 |
| SW511 | 7.0000 | 4.0909 | 0.0667 | 0.2184 | 0.7556 | 0.7239 | 高 |
| SWr158 | 5.0000 | 4.2453 | 0.1333 | 0.2092 | 0.7644 | 0.7245 | 高 |
| SW951 | 6.0000 | 4.6392 | 0.0667 | 0.1885 | 0.7844 | 0.7533 | 高 |
| SW271 | 6.0000 | 3.8462 | 0.1333 | 0.2345 | 0.7400 | 0.7033 | 高 |
| S0386 | 5.0000 | 3.9130 | 0.2000 | 0.2299 | 0.7444 | 0.7034 | 高 |
| S0068 | 4.0000 | 1.9824 | 0.3333 | 0.4874 | 0.4956 | 0.4416 | 中 |
| SWr1008 | 6.0000 | 4.7368 | 0.4000 | 0.1839 | 0.7889 | 0.7564 | 高 |
| S0007 | 7.0000 | 4.1667 | 0.3333 | 0.2138 | 0.7600 | 0.7237 | 高 |
| SW857 | 8.0000 | 5.0000 | 0.0000 | 0.1724 | 0.8000 | 0.7736 | 高 |
| SW81 | 4.0000 | 2.8662 | 0.7333 | 0.3264 | 0.6511 | 0.5973 | 高 |
| SWr1120 | 3.0000 | 2.7607 | 0.5333 | 0.3402 | 0.6378 | 0.5650 | 高 |
| S0062 | 4.0000 | 1.4196 | 0.8000 | 0.6943 | 0.2956 | 0.2816 | 中 |
| S0218 | 4.0000 | 2.4324 | 0.7333 | 0.3908 | 0.5889 | 0.5283 | 高 |
| Mean | 5.4167 | 3.4905 | 0.6889 | 0.6992 | 0.6759* | 0.6344 | / |
| St. Dev | 1.4720 | 1.1158 | 0.2568 | 0.1380 | 0.1334 | 0.1374 | / |

* $P < 0.05$

表 4 农大 II 系小型猪群体遗传参数表

Tab. 4 Genetic parameters of the China Agricultural University miniature pig II

| 位点 Locus | 等位基 因 na | 有效等 位基因 na | 观测杂 合度 Obs_Het | 期望杂 合度 Exp_Het | 平均杂 合度 Ave_Het | 多态 信息含量 PIC | 多态度 Degree of PIC |
|-------------|----------------|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|-------------------------|
| SW974 | 3.0000 | 1.2262 | 0.1333 | 0.1908 | 0.1844 | 0.1754 | 低 |
| S0091 | 6.0000 | 5.1724 | 0.8000 | 0.8345 | 0.8067 | 0.7787 | 高 |
| SW0240 | 4.0000 | 2.0179 | 0.2667 | 0.5218 | 0.5044 | 0.4581 | 中 |
| SW1066 | 3.0000 | 2.0179 | 0.6667 | 0.5218 | 0.5044 | 0.4065 | 中 |
| SW1089 | 4.0000 | 1.5254 | 0.3333 | 0.3563 | 0.3444 | 0.3244 | 中 |
| S0005 | 2.0000 | 1.1421 | 0.0000 | 0.1287 | 0.1244 | 0.1168 | 低 |
| SW1057 | 4.0000 | 2.4324 | 0.3333 | 0.6092 | 0.5889 | 0.5026 | 高 |
| SW632 | 4.0000 | 1.7647 | 0.4667 | 0.4483 | 0.4333 | 0.4019 | 中 |
| OPN | 7.0000 | 3.6000 | 0.6000 | 0.7471 | 0.7222 | 0.6841 | 高 |
| SW29 | 6.0000 | 3.0405 | 0.5333 | 0.6943 | 0.6711 | 0.6288 | 高 |
| SW911 | 5.0000 | 2.7607 | 0.6667 | 0.6598 | 0.6378 | 0.5908 | 高 |
| SW511 | 6.0000 | 3.1915 | 0.6667 | 0.7103 | 0.6867 | 0.6413 | 高 |
| SWr158 | 7.0000 | 4.6392 | 0.5333 | 0.8115 | 0.7844 | 0.7514 | 高 |
| SW951 | 4.0000 | 3.3835 | 0.7333 | 0.7287 | 0.7044 | 0.6492 | 高 |
| SW271 | 4.0000 | 2.5714 | 0.8000 | 0.6322 | 0.6111 | 0.5490 | 高 |
| S0386 | 6.0000 | 4.7872 | 0.2667 | 0.8184 | 0.7911 | 0.7624 | 高 |
| S0068 | 6.0000 | 2.9221 | 0.7333 | 0.6805 | 0.6578 | 0.6227 | 高 |
| SWr1008 | 11.0000 | 5.8442 | 0.5333 | 0.8575 | 0.8289 | 0.8127 | 高 |
| S0007 | 4.0000 | 2.4590 | 0.8000 | 0.6138 | 0.5933 | 0.5213 | 高 |
| SW857 | 5.0000 | 3.1915 | 0.6000 | 0.7103 | 0.6867 | 0.6520 | 高 |
| SW81 | 7.0000 | 2.9221 | 0.6000 | 0.6805 | 0.6578 | 0.6232 | 高 |
| SWr1120 | 4.0000 | 2.3684 | 0.5333 | 0.5977 | 0.5778 | 0.5108 | 高 |
| S0062 | 5.0000 | 2.0362 | 0.5333 | 0.5264 | 0.5089 | 0.4668 | 中 |
| S0218 | 5.0000 | 3.4351 | 0.3333 | 0.7333 | 0.7089 | 0.6649 | 高 |
| Mean | 5.0833 | 2.9355 | 0.5194 | 0.6172 | 0.5967 | 0.5540 | / |
| St. Dev | 1.8396 | 1.2120 | 0.2153 | 0.1869 | 0.1806 | 0.1777 | / |

表 5 农大 III 系小型猪群体遗传参数表

Tab. 5 Genetic parameters of the China Agricultural University miniature pig III

| 位点 Locus | 等位基 因 na | 有效等 位基因 na | 观测杂 合度 Obs_Het | 期望杂 合度 Exp_Het | 平均杂 合度 Ave_Het | 多态 信息含量 PIC | 多态度 Degree of PIC |
|-------------|----------------|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|-------------------------|
| SW974 | 7.0000 | 2.9221 | 0.3195 | 0.6805 | 0.6578 | 0.6233 | 高 |
| S0091 | 6.0000 | 4.5000 | 0.8667 | 0.8046 | 0.7778 | 0.7433 | 高 |
| SW0240 | 5.0000 | 2.4862 | 0.5333 | 0.6184 | 0.5978 | 0.5661 | 高 |
| SW1066 | 5.0000 | 3.9823 | 0.9333 | 0.7747 | 0.7489 | 0.7043 | 高 |
| SW1089 | 6.0000 | 2.4725 | 0.6000 | 0.6161 | 0.5956 | 0.5625 | 高 |
| S0005 | 5.0000 | 2.0642 | 0.6667 | 0.5333 | 0.5156 | 0.4792 | 中 |
| SW1057 | 7.0000 | 4.1284 | 0.7333 | 0.7839 | 0.7578 | 0.7183 | 高 |
| SW632 | 5.0000 | 3.8462 | 0.8667 | 0.7655 | 0.7400 | 0.7014 | 高 |
| OPN | 6.0000 | 3.4351 | 0.4000 | 0.7333 | 0.7089 | 0.6622 | 高 |
| SW29 | 8.0000 | 4.4118 | 0.6667 | 0.8000 | 0.7733 | 0.7488 | 高 |
| SW911 | 4.0000 | 3.0612 | 0.4000 | 0.6966 | 0.6733 | 0.6076 | 高 |
| SW511 | 6.0000 | 4.3269 | 0.6667 | 0.7954 | 0.7689 | 0.7363 | 高 |
| SWr158 | 4.0000 | 3.4351 | 0.4667 | 0.7333 | 0.7089 | 0.6556 | 高 |
| SW951 | 5.0000 | 4.2056 | 0.8000 | 0.7885 | 0.7622 | 0.7203 | 高 |
| SW271 | 6.0000 | 2.1327 | 0.6000 | 0.5494 | 0.5311 | 0.5089 | 高 |
| S0386 | 6.0000 | 4.5455 | 0.4000 | 0.8069 | 0.7800 | 0.7478 | 高 |
| S0068 | 6.0000 | 1.9397 | 0.4667 | 0.5011 | 0.4844 | 0.4591 | 中 |
| SWr1008 | 9.0000 | 4.7872 | 0.6667 | 0.8184 | 0.7911 | 0.7674 | 高 |
| S0007 | 8.0000 | 5.5556 | 0.7333 | 0.8483 | 0.8200 | 0.7966 | 高 |
| SW857 | 7.0000 | 3.9474 | 0.8000 | 0.7724 | 0.7467 | 0.7090 | 高 |
| SW81 | 7.0000 | 4.4118 | 0.5333 | 0.8000 | 0.7733 | 0.7427 | 高 |
| SWr1120 | 3.0000 | 1.7442 | 0.2667 | 0.4414 | 0.4267 | 0.3878 | 中 |
| S0062 | 3.0000 | 2.1127 | 0.2000 | 0.5448 | 0.5267 | 0.4668 | 中 |
| S0218 | 4.0000 | 2.5140 | 0.4667 | 0.6230 | 0.6022 | 0.5504 | 高 |
| Mean | 5.7500 | 3.4570 | 0.5861 | 0.7012 | 0.6779 | 0.6403 | / |
| St. Dev | 1.5393 | 1.0772 | 0.1985 | 0.1181 | 0.1141 | 0.1163 | / |

表 6 三群农大小型猪的遗传距离与遗传相似系数

Tab.6 Genetic distance and genetic identity of 3 groups of China Agricultural University miniature pigs

| | 农大 I 系 CEMP I | 农大 II 系 CEMP II | 农大 III 系 CEMP III |
|------------------------|------------------|--------------------|----------------------|
| 农大 I 系 (CEMP I) | - | 0.6537 | 0.7153 |
| 农大 II 系 (CEMP II) | 0.4251 | - | 0.8119 |
| 农大 III 系 (CEMP III) | 0.3351 | 0.2084 | - |

注:对角线以上为遗传相似性指数,对角线以下为遗传距离。

Note. Data above the diagonal are genetic similarity index, and which below it are genetic distance.

3 讨论

3.1 遗传地方标准的应用与三品系农大小型猪群体的遗传质量评价

DB11/T828.3-2011 是国内第一版有具体检测方法的小型猪遗传质量地方标准,但目前其应用研究并不多见^[12]。上海市地方标准 DB31/T240-2001 对小型猪遗传质量控制虽然有指导原则,却没有具体的检测方法。DB11/T828.3-2011 中的 25 个微卫星标记分布于 19 对染色体中的 18 对上(缺少 12 号染色体标记),较为全面的反应小型猪的遗传概貌。本研究即丰富了该标准的实际应用。

从结果可见,三个群体均存在 SWr312 位点的非特异扩增,依据其余 24 个标记位点的遗传信息进行了质量评价与判断。三个品系的小型猪平均杂合度均在 0.5~0.7 之间,但农大 I 系小型猪的平均杂合度与期望杂合度经卡方检验有统计学差异($P < 0.05$),则农大 I 系小型猪此次采样群体不能认定为合格的封闭群小型猪群体。农大 II 系和农大 III 系均为合格的封闭群小型猪群体。

3.2 三品系农大小型猪群体遗传多样性

3.2.1 多态信息含量:多态信息含量(PIC)是衡量基因座位多态性的指标^[14]。高度多态性座位($PIC > 0.5$)可提供高度丰富的遗传信息;中度多态性座位($0.25 < PIC < 0.5$)能够提供较为合理的遗传信息;低度多态性座位($PIC < 0.25$)可提供的遗传信息较差。

本研究中,三品系农大小型猪的平均多态信息含量均大于 0.5。就不同位点而言,仅 SW974 和 S0005 在农大 II 系中表现为低度多态位点,提供的遗传信息较差;其余各位点在群体均为中高度多态位点,提供了丰富合理的遗传信息。

3.2.2 遗传距离和遗传相似系数:遗传距离和遗传

相似系数互为负对数关系。遗传距离越大,则遗传相似系数越小;反之亦然^[15]。本研究中,农大 I 系与农大 II 系的遗传距离最大(0.4251),其遗传相似系数也最小(0.6537);农大 II 系和农大 III 系的遗传距离最小(0.2084),其遗传相似系数也最大(0.8119);农大 I 系和农大 III 系的遗传距离居中(0.3351),其遗传相似系数也居中(0.7153)。两者共同反映群体的遗传分化,也即在群体亲缘关系上,农大 II 系和农大 III 系小型猪遗传分化小亲缘关系更近,农大 I 系与农大 II 系小型猪遗传分化大亲缘关系较远。

参考文献:

- [1] Whyte JJ, Prather RS. Genetic modifications of pigs for medicine and agriculture [J]. Mol Reprod Dev, 2011, 78(10-11): 879-891.
- [2] Eric M, Wolf E, Jeffery J, et al. Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model [J]. BMC Med Genomics, 2012, 5: 55.
- [3] 袁进, 顾为望. 小型猪作为人类疾病动物模型在生物医学研究中的应用 [J]. 动物医学进展, 2011, 32(2): 108-111.
- [4] 裴德智, 马理武, 王瑞成. 农大小型猪的外部形态及发育规律的研究 [J]. 当代畜牧, 1991, (2): 24-25.
- [5] 裴德智, 马理武, 王瑞成. 农大小型猪的选育 [J]. 当代畜牧, 1991, (3): 27-28.
- [6] 陈明飞, 许厚强, 陈伟, 等. 贵州从江香猪与中国农大小型猪 I 系的杂交性能 [J]. 贵州农业科学, 2015, 43(6): 120-122.
- [7] 唐颜苹, 张癸荣, 聂凌云, 等. 农大 III 系实验小型猪烧伤模型的建立 [J]. 解放军药学报, 2015, 31(6): 538-541.
- [8] 罗刚, 张乐, 刘连生, 等. 我国实验用小型猪的应用研究前景 [J]. 实验动物科学与管理, 2004, 21(2): 37-38.
- [9] 于书敏, 王传武, 赵德明, 等. 中国实验小型猪培育和病原净化 [J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(2): 44-46.
- [10] 牛丽莉, 李宏滨, 杜立新. 分子标记在家畜遗传多样性研究中的应用 [J]. 生物技术通讯, 2008, 19(2): 299-302.
- [11] 瞿陆峰, 潘伟荣, 曾养志. 微卫星 DNA 标记及其应用 [J]. 畜牧与饲养科学, 2010, 31(4): 6-8.
- [12] 魏杰, 王吉星, 王洪, 等. 房山封闭群小型猪微卫星位点的测定 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(11): 7-12.
- [13] DB11/T828.3-2011. 实验用小型猪 第 3 部分: 遗传质量控制 [S].
- [14] Kunieda T, Kobayashi E, Tachibana M, et al. Polymorphic microsatellite loci of the rat (*Rattus norvegicus*) [J]. Mamm Genome, 1992, 3(10): 564-567.
- [15] 柴文琼, 成述儒, 靳建华, 等. 5 个绵羊群体微卫星多态性分析 [J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2012, 33(1): 38-42.

[修回日期]2016-05-02



组织块法分离培养小鼠脾脏间充质干细胞

丁丽¹, 朱恒², 张海宏³, 杨洋¹, 韩冬梅¹, 王志东¹, 郑晓丽¹,
董磊¹, 闫洪敏¹, 刘静¹, 朱玲¹, 薛梅¹, 郭子宽⁴, 王恒湘¹

(1. 中国人民解放军空军总医院血液科, 北京 100142; 2. 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850;
3. 中国人民解放军空军总医院普外科, 北京 100142; 4. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

【摘要】 目的 通过组织块培养法, 建立一种高效可靠的小鼠脾脏间充质干细胞分离扩增策略。方法 无菌条件下取小鼠脾脏组织充分碾碎, 使用胶原酶消化获得的脾脏基质组织, 将消化后的组织块种于培养瓶中, 观察从组织块中迁移出的细胞形态, 采用流式细胞术分析其表型, 并将其做成骨和成脂肪诱导分化。结果 消化后的脾脏组织块中迁移出大量梭形纤维样细胞, 流式细胞术检测结果表明, 该种细胞高表达 CD29、CD44、Sca-1 和 CD105, 低表达 CD11b、CD34、CD45 和 Ia。多向分化实验结果表明: 小鼠脾脏基质组织中迁移出的细胞具有较好的成脂肪和成骨分化能力。结论 组织块法可以分离培养出小鼠脾脏间充质干细胞, 所获得的细胞纯度高, 分化能力强, 为开展相关研究提供了良好的细胞模型。

【关键词】 组织; 细胞培养; 脾脏; 间充质干细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0056-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.011

Primary culture of murine spleen-derived mesenchymal stem cells by explant culture

DING Li¹, ZHU Heng², ZHANG Hai-hong³, YANG Yang¹, HAN Dong-mei¹,
WANG Zhi-dong¹, ZHENG Xiao-li¹, DONG Lei¹, YAN Hong-min¹, LIU Jing¹,
ZHU Ling¹, XUE Mei¹, GUO Zi-kuan⁴, WANG Heng-xiang¹

(1. Department of Hematology, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing, 100142, China;
2. Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100850;
3. Department of General Surgery, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing, 100142;
4. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100850)

【Abstract】 Objective This study aimed to establish a reliable primary culture protocol for preparing murine spleen-derived mesenchymal stem cells (MSCs) by tissue explant culture. **Methods** Healthy mouse spleens were crushed by syringe handle to harvest spleen mesenchymal tissues. Then the tiny pieces of spleen tissue were digested by collagenase II before seeded into culture flasks. The morphological characteristics of spleen tissue-derived cells were observed under the inverted microscope. Further, the surface antigen profile of the cells was analyzed by flow cytometry (FACS). The cells

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81500083, 81371945, 81572159, 81101342); 空军总医院院级课题(KZ2014023); 北京市自然科学基金项目(7132133)。

【作者简介】 丁丽(1975-), 女, 博士, 研究方向: 干细胞与血液病学。E-mail: dingli7578@163.com。

【通讯作者】 王恒湘, 硕士, 主任医师, 从事血液系统疾病的研究与治疗, wanghengxiang123@aliyun.com; 郭子宽, 博士, 研究员, 主要从事转化医学研究 guozk@bmi.ac.cn; 朱恒, 博士, 副研究员, 主要从事干细胞与再生医学研究, E-mail: zhudingabc@163.com。

were induced to differentiate into osteoblasts and adipocytes. **Results** The murine spleen-derived MSCs exhibited a spindle-shaped appearance. The FACS results showed that the spleen-derived MSCs highly expressed CD29, CD44, CD105 and Sca-1, but weakly expressed CD11b, CD34, CD45 and Ia. In addition, the spleen-derived MSCs steadily differentiated into osteoblasts and adipocytes in the induction medium. **Conclusions** A method of primary culture of murine spleen-derived MSCs by explant culture is successfully established. The harvested MSCs exhibit high purity and cell proliferation ability, and provide a reliable cell model for related researches.

【Key words】 Tissue explant; Cell culture; Spleen; Mesenchymal stem cells; Osteoblast differentiation; Adipocyte differentiation; Mice

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是一种具有多向分化潜能和高度自我更新能力的干细胞^[1,2]。MSC 最早由 Friedenstein 等^[3]在骨髓中发现,随后研究人员陆续在骨、脐带、脂肪等多种组织中分离成功。MSC 在适宜的条件下可以大量扩增,并且分化为成骨细胞、脂肪细胞、内皮细胞、神经细胞等多种组织类型的细胞,是目前组织工程领域最常用的种子细胞之一^[1]。此外,MSC 还具有造血支持能力,能够调节造血干细胞分化为多种谱系的造血细胞,是造血微环境的重要组成部分^[4]。更有意义的是,MSC 还能够调节多种免疫细胞如巨噬细胞、树突状细胞、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞等的发育和功能,有助于维持机体免疫反应和免疫稳态^[5]。

脾脏是人和动物体内重要的造血器官和免疫器官^[6]。在人和动物的胚胎发育早期,脾脏有造血的功能。出生后脾的造血功能基本消失,但在极端条件下,如机体出现严重造血障碍时,脾脏也可重新出现造血功能。此外,某些啮齿类动物如小鼠的脾脏可以终身造血^[6]。脾脏还是重要的免疫器官。脾脏内含有大量的 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、巨噬细胞和树突状细胞(dendritic cells, DCs)等免疫细胞,是机体细胞免疫和体液免疫的中心。其中的树突状细胞能够摄取机体内的肿瘤抗原或者外源入侵的抗原,加工递呈给相应的 T 细胞,促进相关的 T 细胞亚群增殖分化,并启动 B 细胞为主的体液免疫,实现肿瘤清除和病原清除^[7]。

值得关注的是,脾脏内造血细胞和免疫细胞的发育分化过程受到脾脏微环境的调控^[8,9]。MSC 及由 MSC 分化而来的成纤维细胞和内皮细胞等不仅为造血细胞和免疫细胞发育分化提供空间结构,而且表达多种调节因子(如细胞因子、膜微粒和一氧化氮等)和细胞间粘附分子,共同构成脾脏微环境,从而发挥调节作用。因此,分离获得脾脏 MSC,深入开展功能研究,对于了解脾脏基质微环境尤为重

要。然而,多年以来有关脾脏 MSC 分离培养的策略一直报道不多^[10]。鉴于此,我们在参阅大量文献的基础上,探索了胶原酶消化联合组织块培养法,以期建立出稳定、重复性好、细胞纯度高的小鼠脾脏 MSC 分离策略,从而为开展脾脏相关的造血和免疫学相关研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠,6~8 周龄,雌雄不限,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号[SCXK(京)2012-0001]。

1.2 仪器与试剂

干细胞培养用胎牛血清、 α -MEM 培养基、高糖 DMEM 培养基和磷酸盐缓冲液(PBS)购自美国 Gibco 公司; β -磷酸甘油、磷酸化维生素 C、地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、胰岛素、油红 O 染液、II 型胶原酶、胰酶、碱性磷酸酶试剂盒购自美国 Sigma 公司;MSC 流式表型检测用抗体:PE-anti-mouse CD11b、PE-anti-mouse CD29、FITC-anti-mouse CD34、PE-anti-mouse CD44、FITC-anti-mouse CD45、PE-anti-mouse CD105、PE-anti-mouse Ly-6A/E(Sca-1)、PE-anti-mouse Ia 购自美国 Ebioscience 公司;细胞培养板和培养瓶购自美国康宁公司;流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司;细胞培养箱购自英国 Thermo 公司;倒置显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 细胞培养

无菌条件下,打开小鼠腹腔取脾脏,在超净台内以注射器柄将其在培养皿中充分碾碎,以 PBS 冲去细胞成分,将获得的基质组织加入 0.1% 的 II 型胶原酶液中,37℃ 条件下以消化 1 h,弃消化液,将消化后的脾脏基质组织种入含有 10% 血清的 α -MEM 中,3 d 换液,待 MSC 爬满培养瓶后,以胰酶消化,收 MSC 分别种入贴附培养瓶和低吸附培养皿

中,在倒置显微镜下观察形态,拍照。每隔 2~3 d 传代,收取第 3~6 代细胞用于实验。

1.4 流式细胞分析

参照我们前期发表的方法采用流式细胞术分析小鼠脾脏 MSC 的免疫表型^[11,12]。简言之,以胰酶消化收获第 4 代细胞,制备为单细胞悬液,调整细胞数为 1×10^6 细胞/管。按照说明书要求,分别加入抗小鼠 CD11b, CD29, CD34, CD44, CD45, CD105 和 Sca-1 和 Ia 抗体。4℃ 避光孵育 30 min。洗涤未结合的抗体后,采用美国 Becton Dickinson 流式细胞仪上机,实验数据采用 WinMDI 2.9 软件分析。

1.5 细胞分化潜能的鉴定

成骨和成脂肪诱导分化实验参照以往发表的方法进行^[11,12]。简言之,成骨分化以及染色取第 4 代小鼠脾脏 MSC,按照 5×10^4 细胞/cm² 的细胞密度种于 24 孔培养板中,诱导体系为高糖 DMEM、10% 胎牛血清,维生素 C 磷酸盐(50 μmol/L),β 磷酸甘油(10 mmol/L) 和地塞米松(10^{-7} mol/L)。7 d 后根据试剂盒说明书要求进行碱性磷酸酶染色。成脂肪分化以及染色收获第 4 代小鼠脾脏 MSC,按照 3×10^4 细胞/cm² 的细胞密度种于 24 孔培养板内,诱导体系为高糖 DMEM, IBMX (0.5 μmol/L), 10% 胎牛血清,胰岛素(10 ng/mL) 和地塞米松(10^{-6} mol/L)。成脂肪诱导的第 7 天,染油红 O 判断分化效率。染色结果显微镜下观察,照相。

2 结果

2.1 组织块法分离获得的小鼠脾脏 MSC 具有经典的形态特征

无菌条件下,分离小鼠脾脏,碾碎后得到脾脏基质组织(图 1A),以胶原酶消化为小组织块(图 1B)。

将胶原酶消化后的脾脏基质组织在培养基中静置培养 3~5 d 左右,即可在倒置显微镜下观察到有细胞从组织块中爬出(图 2A)。这些细胞为梭形贴壁生长,经过传递培养后,生长迅速,并可呈漩涡状或者纺锤状密集生长,符合经典的 MSC 形态和生长特点(图 2B)。

2.2 组织块法分离获得的小鼠脾脏 MSC 具有经典的细胞免疫表型

为了判断组织块法分离获得的小鼠脾脏 MSC 的细胞纯度,我们进一步检测了其免疫表型。流式

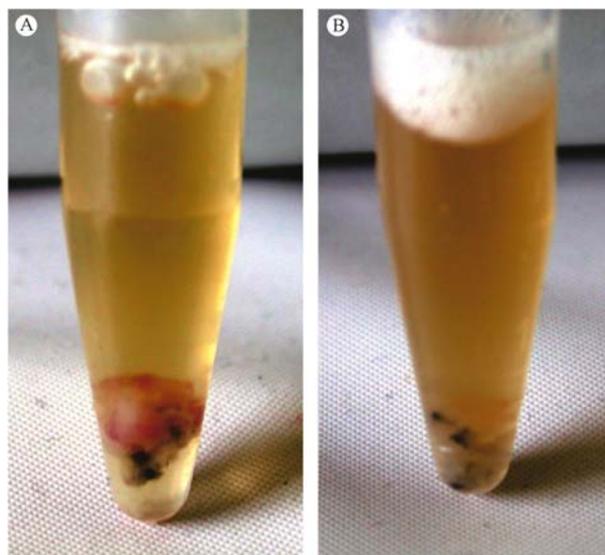
细胞术的检测结果表明,我们分离获得的小鼠 MSC 高表达间质标记 CD29, CD44, 高表达干细胞标记 Sca-1 和 CD105, 低表达造血标记 CD11b 和 CD45, 低表达造血干细胞标记 CD34, 低表达免疫共刺激分子 Ia(图 3)。该结果表明我们获得的是一群间质来源的非造血干细胞,且具有较低的免疫原性,符合经典的 MSC 免疫表型特征。

2.3 组织块法分离获得的小鼠脾脏 MSC 具有多谱系分化潜能

为观察小鼠脾脏 MSC 的多向分化潜能,我们分别进行了成骨和成脂肪诱导分化实验。碱性磷酸酶是 MSC 成骨分化过程中的重要指标。如图 4A 所示,在成骨诱导体系中培养的小鼠脾脏 MSC 碱性磷酸酶染色阳性,提示该种类的 MSC 具有成骨分化潜能。油红 O 具有较好的脂肪结合能力。小鼠脾脏 MSC 成脂肪诱导 7 d 后,即可见细胞中逐渐出现大量脂肪滴,加入油红 O 染色液之后,可观察到脂肪滴被染为红色,该结果表明小鼠脾脏 MSC 具有良好的成脂肪分化能力(图 4B)。

3 讨论

脾脏微环境是调节机体免疫功能、胚胎造血和出生后病理性造血的重要生理结构。但是脾脏微环境研究一直缺乏与体内环境相对应的细胞工具。



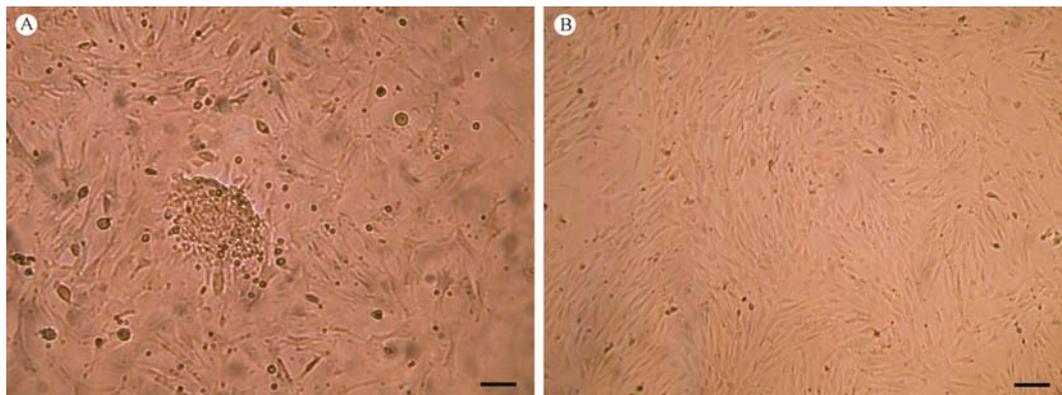
A 为未消化的脾脏基质组织,
B 为胶原酶消化后的脾脏基质组织

图 1 分离消化脾脏基质组织

(A) Undigested spleen mesenchymal tissues;

(B) Collagenase-digested spleen mesenchymal tissues

Fig. 1 Isolation and digestion of spleen mesenchymal tissues



(A) 间充质干细胞从脾脏基质组织块中爬出; (B) 为增殖良好的脾脏间充质干细胞

图 2 原代培养脾脏间充质干细胞(标尺 = 200 μm)

(A) Mesenchymal stem cells migrate from a spleen tissue explant. (B) Highly proliferative spleen mesenchymal stem cells

Fig. 2 Primary culture of spleen mesenchymal stem cells

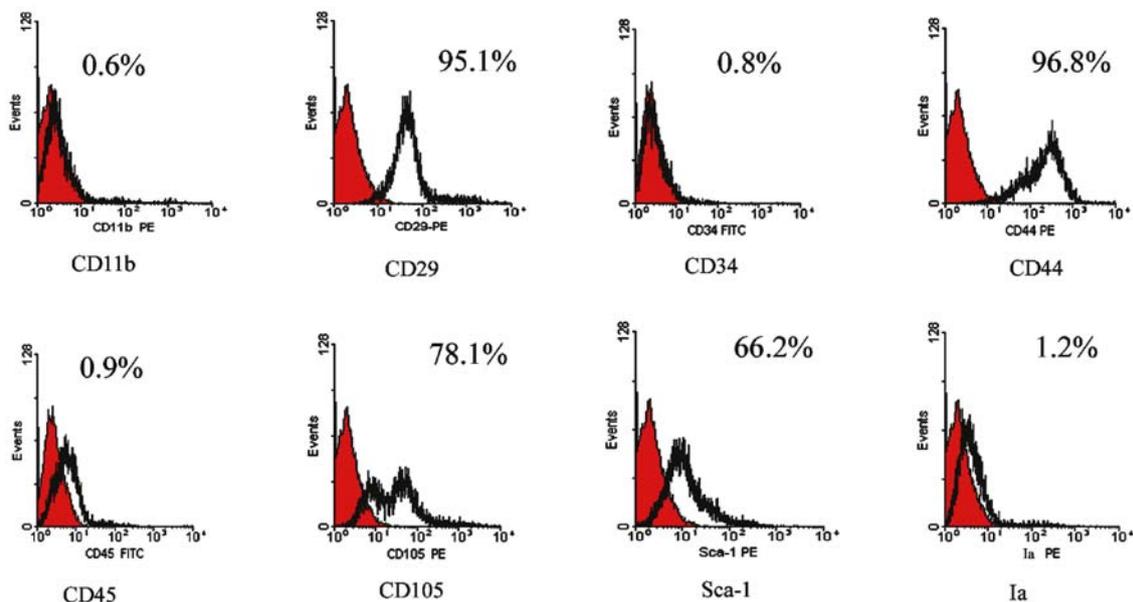
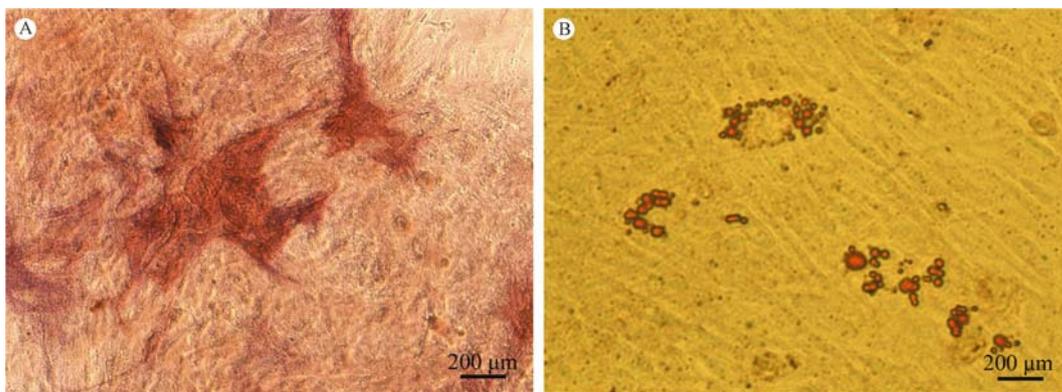


图 3 脾脏间充质干细胞的流式免疫表型

Fig. 3 Immunophenotypes of the spleen mesenchymal stem cells detected by flow cytometry



(A) 脾脏间充质干细胞成骨分化后碱性磷酸酶染色, (B) 为脾脏间充质干细胞成脂肪分化后油红 O 染色

图 4 脾脏间充质干细胞多向分化(标尺 = 200 μm)

(A) Osteoblast differentiation of the spleen mesenchymal stem cells. ALP staining; (B) Adipocyte differentiation of the spleen mesenchymal stem cells. Oil-red O staining.

Fig. 4 Multi-directional differentiation of the spleen mesenchymal stem cells

相关领域研究人员采用脾脏基质细胞成份来模拟脾脏微环境,研究其对造血系统和免疫系统的调控作用,取得了较好的发现。Zhang 及其同事从小鼠脾脏中分离获得 CD106 阳性的内皮样脾脏基质细胞(ESSCs)来观察其对 DC 发育的影响^[13]。相关研究结果表明 ESSCs 能够促进 CD11c^{high}Ia^{high} 成熟 DC 增殖并继续分化为有免疫负调控能力的调节性 DC,从而打破了成熟 DC 是终末分化细胞的定论。而 Tang 等的进一步研究表明脾脏基质细胞促进 CD34⁺ 的造血干细胞分化为调节性 DC^[14]。

值得关注的是,目前对于脾脏微环境的研究侧重于终末分化细胞(主要是基质细胞和内皮细胞等),而对处于发育源头的干细胞对脾脏微环境的影响国内外文献却报道不多。实际上,MSC 是脾脏微环境的重要参与者。首先,MSC 是脾脏微环境中多种支持细胞的起源细胞,研究 MSC 生物学特性的改变有助于从“源头”发现规律解决问题;其次,MSC 能够不断自我自我复制,即自我更新,能够为脾脏微环境提供源源不断的“种子”。基于此,我们开展了脾脏 MSC 相关的研究。

目前关于小鼠脾脏 MSC 的报道却不多。为了建立一种可靠的研究工具,我们在本研究中尝试采用组织块联合胶原酶消化法分离获得了小鼠脾脏 MSC。从细胞形态上看,我们获得的细胞具有成纤维样贴壁生长的特点。从细胞免疫表型方面看,该细胞表达经典 MSC 表面分子。然而,细胞形态和细胞免疫表型并不足以判断一种细胞是 MSC,成纤维细胞也具有同样的特点^[15]。只有多向分化实验是判断 MSC 的“金标准”^[16],我们的结果表明该细胞同时具有成骨和成脂肪分化能力,从而确定了其是脾脏来源的 MSC。当然,有关该脾脏 MSC 的生理和病理特性仍有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008; 8(9): 726 - 736.
- [2] Ding L, Zhu H, Yang Y, et al. Functional mesenchymal stem cells remain present in bone marrow microenvironment of patients with leukemia post-allogeneic hematopoietic stem cell transplant [J]. *Leuk Lymphoma*, 2014; 55(7): 1635 - 1644.
- [3] Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, et al. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo [J]. *Transplantation*, 1974, 17(4): 331 - 340.
- [4] Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche [J]. *Nature*, 2010, 466(7308): 829 - 834.
- [5] Wang Y, Chen X, Cao W, et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications [J]. *Nat Immunol*. 2014, 15(11): 1009 - 1016.
- [6] Chiu SC, Liu HH, Chen CL, et al. Extramedullary hematopoiesis (EMH) in laboratory animals: offering an insight into stem cell research [J]. *Cell Transplant*, 2015, 24(3): 349 - 366.
- [7] McGaha TL, Karlsson MC. Apoptotic cell responses in the splenic marginal zone: a paradigm for immunologic reactions to apoptotic antigens with implications for autoimmunity [J]. *Immunol Rev*, 2016, 269(1): 26 - 43.
- [8] Tan JK, O'Neill HC. Concise review: Dendritic cell development in the context of the spleen microenvironment [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(9): 2139 - 2145.
- [9] Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(4): 290 - 301.
- [10] da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organ and tissues [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt11): 2204 - 2213.
- [11] Zhu H, Guo ZK, Jiang XX, et al. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(3): 550 - 560.
- [12] Guo ZK, Li H, Li XS, et al. In vitro characteristics and in vivo immunosuppressive activity of compact bone-derived murine mesenchymal progenitor cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(4): 992 - 1000.
- [13] Zhang M, Tang H, Guo Z, et al. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells [J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(11): 1124 - 1133.
- [14] Tang H, Guo Z, Zhang M, et al. Endothelial stroma programs hematopoietic stem cells to differentiate into regulatory dendritic cells through IL - 10 [J]. *Blood*, 2006, 108(4): 1189 - 1197.
- [15] Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood [J]. *Exp Hematol*, 2005, 33(11): 1402 - 1416.
- [16] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315 - 317.

[修回日期] 2016 - 06 - 06



PCR 检测实验恒河猴和食蟹猴群体中 幽门螺杆菌和“猕猴螺杆菌”的感染

王立鹏, 李永旺, 郭连香, 时长军

(苏州西山生物技术有限公司, 江苏 215123)

【摘要】 目的 调查国内实验恒河猴和食蟹猴中幽门螺杆菌和“猕猴螺杆菌”的感染情况。方法 参考文献中的螺杆菌属 16S rRNA 和幽门螺杆菌 16S rRNA 的引物序列, 和新设计的“猕猴螺杆菌”16S rRNA 特异性引物, 在人工养殖的 45 只成年恒河猴和 90 只成年食蟹猴粪便样本中, 通过 qPCR 或常规 PCR 检测来初步调查这两种猕猴中两种螺杆菌的感染情况。结果 在恒河猴中幽门螺杆菌和“猕猴螺杆菌”的感染率均为 100%, 在食蟹猴中幽门螺杆菌和“猕猴螺杆菌”的感染率分别为 100% 和 97.8%。结论 证实我国人工繁育饲养的恒河猴和食蟹猴普遍存在“猕猴螺杆菌”感染。幽门螺杆菌和“猕猴螺杆菌”几乎同时存在于所有人工繁育的实验猴个体中, 可能会对这两种猕猴的健康以及相关动物实验结果的准确性存在不利影响。

【关键词】 恒河猴; 食蟹猴; 幽门螺杆菌; 猕猴螺杆菌; 感染; 诊断

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0061-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.012

PCR test of *Helicobacter pylori* and “*Helicobacter macacae*” infections in rhesus and cynomolgus monkey breeding colonies

WANG Li-peng, LI Yong-wang, GUO Lian-xiang, SHI Chang-jun
(Suzhou Xishan Biotechnology Inc., Suzhou Jiangsu 215123, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the status of *Helicobacter pylori* and “*Helicobacter macacae*” infection in rhesus and cynomolgus monkeys in China. **Methods** With the use of 16S rRNA specific primers for *Helicobacter* spp and *Helicobacter pylori* (HP) from published literatures, and new 16S rRNA specific primers designed for “*Helicobacter macacae*” (HM), we investigated the infection status of these two *Helicobacter* spp in both of 45 rhesus and 90 cynomolgus monkeys by qPCR or conventional PCR on stool samples. **Results** All three primer sets for 16S rRNA exhibited excellently sensitivity and specificity. Both the infection rates of HP and HM were 100% among 45 young adult rhesus monkeys. The infection rate of HP and HM in 90 young adult cynomolgus monkeys were 100% and 97.8%, respectively. **Conclusions** *Helicobacter pylori* and “*Helicobacter macacae*” are present in almost every artificially bred adult rhesus and cynomolgus individuals which may adversely affect the health of laboratory monkeys and the accuracy of related animal experiments.

【Key words】 Rhesus monkey; Cynomolgus monkey; *Helicobacter pylori*; “*Helicobacter macacae*”; Infection; Diagnosis

[作者简介] 王立鹏(1989-), 男, 硕士。Email: wlpburry@126.com。

[通讯作者] 时长军(1953-), 男, 博士。Email: changjun.shi@vrl.net。

Warren 和 Marshall 在 1983 年从胃炎患者胃粘膜活检标本中首次分离出幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, HP), 此后以该细菌为代表菌建立了螺杆菌属。目前, 螺杆菌属已有 23 个种^[1]。幽门螺杆菌, 螺旋形弯曲, 革兰氏染色阴性, 长 2~4 μm , 直径 0.4 μm , 菌体一端有 4 条鞭毛^[2]。在人体内, 幽门螺杆菌主要定居于胃窦粘膜, 会导致胃炎和胃溃疡, WHO 已将其定为胃癌的第一类致癌因子^[3]。体外研究表明幽门螺杆菌对多种抗生素敏感, 但是在体内应用发现感染人群的许多幽门螺杆菌对抗生素具有抗性。为了研究出更有效的根治幽门螺杆菌的药物或疫苗, 预防胃癌的发生, 需要构建能够感染幽门螺杆菌的动物模型^[4]。目前, 只有家猫和非人灵长类是幽门螺杆菌的自然宿主动物^[5]。

1987~1990 年期间的 5 篇研究报告表明, 在恒河猴 (rhesus monkey) 和南方豚尾猕猴 (Southern pig-tailed macaque) 中存在幽门螺杆菌的自然感染; 而在食蟹猴 (cynomolgus monkey) 中则既没有发现自然感染, 人工感染幽门螺杆菌也无效^[2,6-9]。1993 年, Takahashi 的团队用人源和恒河猴源的幽门螺杆菌人工感染食蟹猴, 结果证明食蟹猴可以被人工感染幽门螺杆菌^[10,11]。1999 年, Reindel 等首次发现食蟹猴也存在幽门螺杆菌的自然感染^[12]。目前, 国内仍未见对猴群中幽门螺杆菌自然感染情况的调查研究。

2001 年, Fox 等学者从恒河猴结肠组织中分离培养出一种新的螺杆菌, 暂时命名为“猕猴螺杆菌” (*Helicobacter macacae*)。“猕猴螺杆菌”, 螺旋形弯曲, 革兰氏染色阴性, 长 2~3 μm , 直径 0.2 μm , 菌体两端各有 1 条带鞘的鞭毛^[13]。该菌长期存在于肠道中, 可能与结肠炎的发生有关, 引发慢性痢疾、体重下降和脱水等症状^[14]。目前, 国内尚未有对猴群中该种螺杆菌感染情况的调查研究。

本研究用螺杆菌属 16S rRNA 特异性引物的普通 PCR 方法, 对我国人工繁育的两种猕猴群中的螺杆菌流行情况进行初步调查。确认螺杆菌在猴群中有感染后, 进一步以幽门螺杆菌 16S rRNA 特异性引物实时荧光定量 PCR 方法 (qPCR) 对养殖场恒河猴和食蟹猴的幽门螺杆菌感染进行调查。针对“猕猴螺杆菌” 16S rRNA 特异性保守区域设计引物, 通过 PCR 方法检测我国猕猴和食蟹猴中是否存在“猕猴螺杆菌”感染。由于“*Helicobacter macacae*” (“猕猴螺杆菌”) 尚未被原核生物命名国际委员会

(ICSP) 正式采用, 因此本文用引号标记以示区别。

1 材料和方法

1.1 猕猴粪便样本

45 只 2~4 岁的雄性恒河猴和 90 只雌雄各半的 4 岁左右食蟹猴的新鲜粪便样本分别采集自不同实验猴人工繁育场, 样本冷藏空运至本公司, -20℃ 保存待用。

1.2 粪便样本 DNA 提取

取恒河猴或食蟹猴的粪便样本 200 mg, 用粪便基因组 DNA 提取试剂盒 (天根, 货号#DP328) 提取核酸, 操作步骤按照试剂盒说明书进行。最终用 100 μL 无菌水洗脱, -20℃ 保存待用。

1.3 幽门螺杆菌阳性对照制备

Helicobacter pylori 株 (ATCC 43504), 用含有血琼脂和 7% 马血等的弯曲杆菌选择性血琼脂培养基, 在 37℃ 微需氧环境下培养。之后用无菌棉棒刮取部分菌落, 计数并稀释至 10^9 CFU/mL, 10 倍梯度稀释至 10^0 CFU/mL。经 PCR 测试, 10^3 CFU/mL 菌液提取的 DNA 模板可作为 PCR 反应的阳性对照。

1.4 其他细菌 DNA 样本

从肺炎克雷伯氏杆菌 CVCC3699, 大肠埃希氏菌 CMCC44102, 嗜肺巴斯德杆菌 ATCC35149, 假结核耶尔森 CMCC53504, 乙型溶血性链球菌 CMCC32210, 肺炎链球菌 ATCC49619, 多杀巴斯德杆菌 CVCC458, 金黄色葡萄球菌 CMCC26003, 鸡白痢沙门氏菌 CVCC528, 志贺氏菌 CMCC51252, 小肠结肠耶尔森氏菌 GIM1.265 及空肠弯曲杆菌 ATCC33291 中提取基因组 DNA, 用于 3 种引物的特异性实验。

1.5 引物及质粒合成

引物和质粒的合成均由苏州金唯智生物技术有限公司合成和构建。螺杆菌属 16S rRNA 特异性上游引物 HSP767 F: GGCTATGACGGGTATCCG GC, 下游引物 HSP767 R: GCCGTGCAGCACCT GTTTTC^[15]; 幽门螺杆菌 16S rRNA 特异性上游引物 HP-P1 F: TTTGTTAGAGAAGATAATGACGGTATCTA AC, 下游引物 HP-P1R: CATAGGATTTACACCT GACTGACTATC^[4]; “猕猴螺杆菌” 16S rRNA 特异性引物 H. M8F: GGGATGCTCTTAGAAATGC, H. M8R: GCTCTTTACGCCAGTGATT, 为本公司设计。HSP767 F/HSP767 R、HP-P1F/HP-P1R 和 H. M8F/H. M8R 的靶序列人工合成后分别连接到

pUC57 载体上,即为 pc12、pc16 和 pc20。

1.6 普通 PCR 反应

PCR 仪为 Eppendorf 6321。反应体系包含 10 mM Tris-Cl(pH 8.3), 50 mM KCl 和 2 mM MgCl₂, 4 种 dNTP 各 0.2 mM, 上下游引物各 0.4 μM, 1U rTaq DNA 聚合酶(Takara, #KA201A), 5 μL 粪便样本提取的 DNA 模板, 总体积为 25 μL。PCR 反应条件为 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 进行 35 个循环, 之后 72℃ 延伸 5 min。2% 琼脂糖凝胶电泳, 5 V/cm, 100 bp DNA marker(天根, #BSA22S1) 4 μL, 凝胶中掺入 0.01% GeneRed(博美达, #41003 - 0.5 mL) 作为荧光染料, 由凝胶成像分析仪(上海勤翔, Genosens1560) 采集电泳结果。每次实验中, 均设置质粒阳性对照和模板空白对照, 所有测试组均重复 2 次。

1.7 实时荧光定量 PCR 反应

PCR 仪为 ABI 7500 Real-Time PCR System。反应体系为 20 μL, 含 2 × Premix Ex Taq(SYBR) 10 μL, ROX(50 ×) 0.4 μL, 上下游引物各 0.2 μM, 补加无菌水至 20 μL。反应条件为 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火延伸 31 s, 采集信号, 40 个循环; 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火延伸 1 min, 95℃ 变性 15 s, 60℃ 15 s 绘制溶解曲线。每次实验中, 均设置质粒阳性对照和模板空白对照, 所有测试组均重复 2 次。

1.8 扩增产物测序与比对

部分 PCR 产物送交苏州金唯智生物技术有限公司测序。序列比对分析软件为 DNAMAN 6.0。

2 结果

2.1 PCR 方法建立

以各自相应的质粒为模板, 10⁻¹ ~ 10⁻¹² 做系列梯度稀释, 用于 3 种引物的敏感性实验, 结果表明

HSPP767 和 H. M8 的普通 PCR 检测下限为 1 132 拷贝/5 μL, HP-P1 引物的 qPCR 检测下限为 68 拷贝/5 μL。3 对引物均不会扩增鸡白痢沙门氏菌、志贺氏菌、小肠结肠耶尔森氏菌、大肠埃希氏菌及空肠弯曲杆菌等细菌的核酸, 表明 3 对引物用于粪便提取核酸的 PCR 特异性好。这一部分的结果未展示。

2.2 猕猴中螺杆菌属细菌检测

以 HSPP767 引物对恒河猴和食蟹猴的粪便提取 DNA 样本进行 PCR 扩增, 45 份恒河猴粪便样本均为螺杆菌阳性; 90 份食蟹猴粪便样本中有 89 份为螺杆菌阳性, 仅有 1 份样本为螺杆菌阴性。阳性样本扩增产物大小与目的扩增片段相同, 为 767 bp。结果见图 1 和图 2。

2.3 猕猴中幽门螺杆菌的检测

用 HP-P1 引物对恒河猴和食蟹猴的粪便提取 DNA 样本进行 qPCR 检测, 135 份猕猴的粪便样本检测结果全部为幽门螺杆菌阳性, 随机选取 3 份样本的扩增产物送交测序并与靶序列进行分析比对, 确认扩增产物均为幽门螺杆菌。扩增产物见图 3。

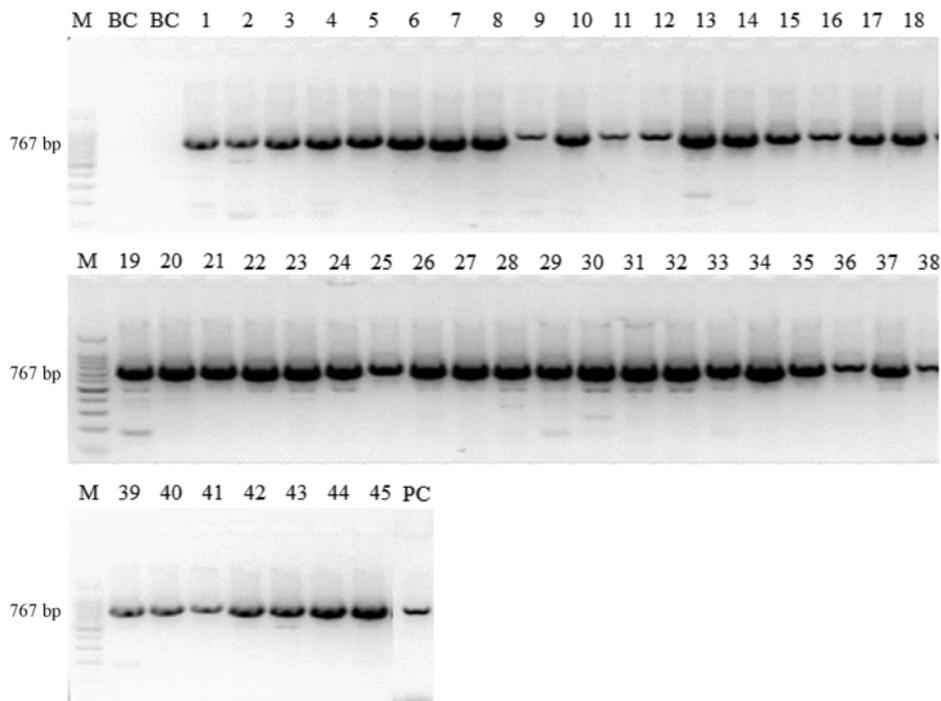
2.4 猕猴中“猕猴螺杆菌”的检测

以 H. M8 引物对恒河猴和食蟹猴的粪便提取 DNA 样本进行 PCR 扩增, 45 份恒河猴粪便样本均为“猕猴螺杆菌”阳性; 90 份食蟹猴样本中, 有 88 份为“猕猴螺杆菌”阳性, 2 份阴性。阳性样本扩增产物大小与目的片段相同, 为 493 bp。随机选取 3 份扩增产物送交测序, 结果表明扩增子与靶序列高度相似, 确认为“猕猴螺杆菌”。结果见图 4 和图 5。另外, 图 4 中展示了这对引物以 *Helicobacter pylori* 菌株 DNA 为模板时, 扩增结果是阴性的, 表明该引物不扩增幽门螺杆菌。以上六项检测结果的汇总见表 1。

表 1 恒河猴和食蟹猴中螺杆菌感染统计

Tab.1 Statistical analysis of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter macacae* infection in rhesus and cynomolgus monkeys.

| 检测项目 Test items | | 阳性数 Positive | 阴性数 Negative | 感染率 Infection rate |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|
| 恒河猴 <i>Macaca mulatta</i> | 螺杆菌 <i>Helicobacter</i> spp | 45 | 0 | 100.0% |
| | 幽门螺杆菌 <i>Helicobacter pylori</i> | 45 | 0 | 100.0% |
| | “猕猴螺杆菌” <i>Helicobacter macacae</i> | 45 | 0 | 100.0% |
| 食蟹猴 <i>Macaca fascicularis</i> | 螺杆菌 <i>Helicobacter</i> spp | 89 | 1 | 98.9% |
| | 幽门螺杆菌 <i>Helicobacter pylori</i> | 90 | 0 | 100.0% |
| | “猕猴螺杆菌” <i>Helicobacter macacae</i> | 88 | 2 | 97.8% |



M: 100 bp marker ladder; BC: 不含核酸模板的空白对照组;
PC: 阳性质粒对照 PC12; 泳道 1~45: 为 45 份恒河猴粪便提取 DNA 样本扩增产物

图 1 恒河猴 45 份样本中螺杆菌的检测结果

M, 100 bp marker ladder; BC, blank control without nucleic acid template; PC, positive control with plasmid PC12; Lane 1-45, 45 DNA samples from feces of rhesus macaques.

Fig. 1 PCR results of 45 rhesus macaques stool samples with HSP767 primers for Helicobacter.

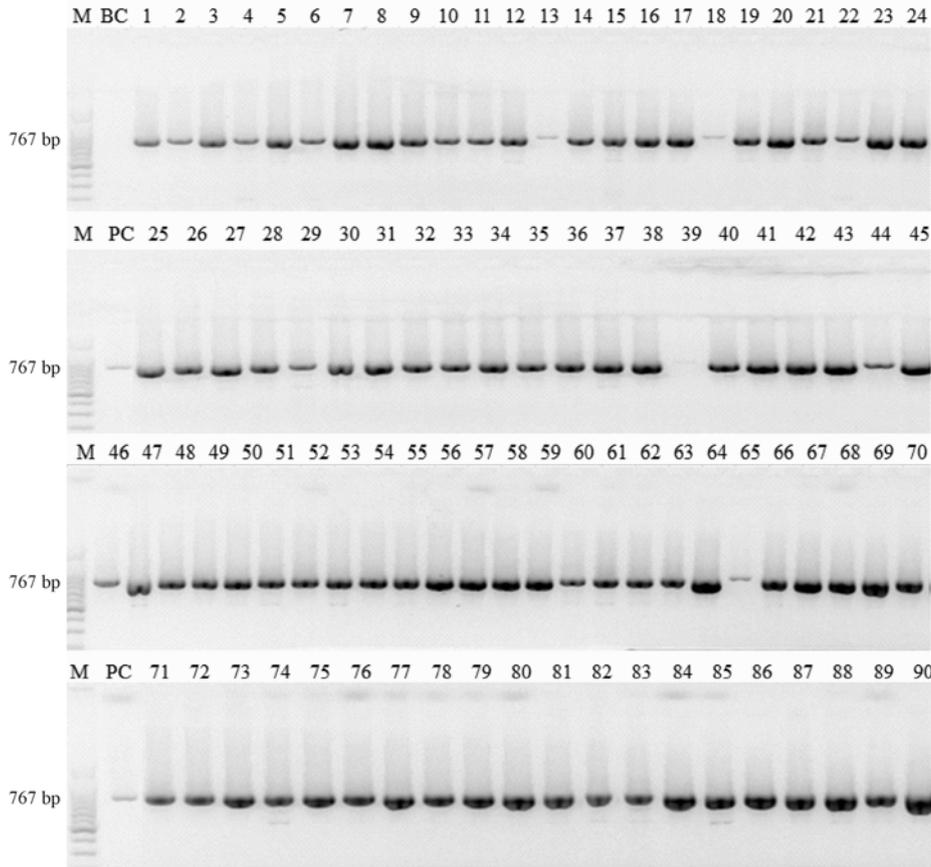
3 讨论

本研究建立了 PCR 用粪便样本检测实验猴幽门螺杆菌和“猕猴螺杆菌”的方法,并证实我国人工繁育的恒河猴和食蟹猴中普遍存在这两种螺杆菌感染。

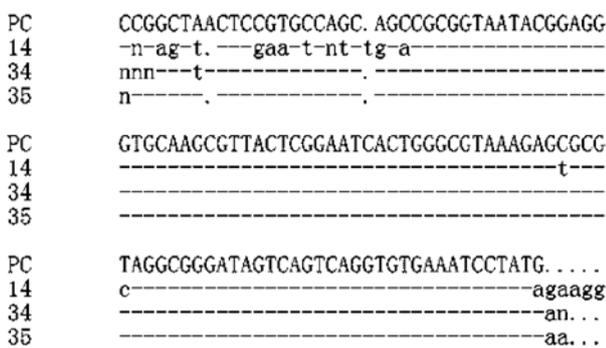
恒河猴和食蟹猴中自然感染幽门螺杆菌后,通常都不会表现出明显的临床症状。内窥镜检常见胃黏膜红斑、表层粘膜增生及单核细胞浸润等炎症反应,但未见萎缩性胃炎或胃癌的发生^[2,12]。1988 年, Baskerville 等在 11 只恒河猴中以组织学检查和胃黏膜微生物分离培养法确认其中有 6 只被幽门螺杆菌感染,感染率为 54.5%^[7]; 1990 年, Arther 等以上述相同的方法在 34 只恒河猴中检测到 12 只被幽门螺杆菌自然感染,感染率为 35.5%^[2]; 1995 年, Dubios 等用 ELISA 法检测血清中抗幽门螺杆菌 IgG 水平,在 196 只不同年龄段和饲养方式(包括野生)的恒河猴中,发现在 1 岁恒河猴的幽门螺杆菌感染率已达到 50% 以上, 2~6 岁时感染率为 80% 左右,在 7~10 岁时感染率最高,可达到 90% 左右^[16];

1997 年, Laurence 等用 PCR 检测了 23 只 1~3 岁中国来源恒河猴的胃部活检组织样本,其中有 21 只幽门螺杆菌阳性,感染率为 91.3%; 而同时用培养的方法检出率仅 52%^[5]。这些结果表明,血清学或 PCR 方法检测幽门螺杆菌的敏感性远高于组织学检查或微生物培养。本文用 16S rRNA 特异性引物对 45 只恒河猴粪便样本的筛查表明,在 2~4 岁的恒河猴群中,幽门螺杆菌感染率为 100%。此结果说明 PCR 检测粪便样本幽门螺杆菌在实验动物健康监测应用的可行性,并证明我国恒河猴群体中幽门螺杆菌感染的普遍性。

目前,对食蟹猴感染幽门螺杆菌的研究很少^[12]。由于恒河猴资源有限,而食蟹猴的人工养殖更普遍,生物医药研究中应用更广泛。早期用内窥镜检、胃黏膜样本组织学检查和微生物培养法进行的调查研究认为食蟹猴既不会自然感染幽门螺杆菌,也对人工感染的人源和恒河猴源的幽门螺杆菌不敏感^[2,6]。相反, Takahashi 等在 1993 年成功地用幽门螺杆菌人工感染了食蟹猴^[10,11]。Reindel 等 1999 年也报道了与上述相同方法进行的调查,发现



M; 100 bp marker ladder; BC; 不含核酸模板的空白对照组;
 PC: 阳性质粒对照 pc12; 泳道 1~90: 90 份食蟹猴粪便提取 DNA 样本
图 2 食蟹猴 90 份样本的螺杆菌检测结果
 M, 100 bp marker ladder; BC, Blank control without nucleic acid template;
 PC, positive control with plasmid pc12; Lane 1-90, 90 DNA samples from feces of cynomolgus monkeys.
Fig. 2 PCR results of the HSP767 primers for Helicobacter in 90 cynomolgus monkeys.



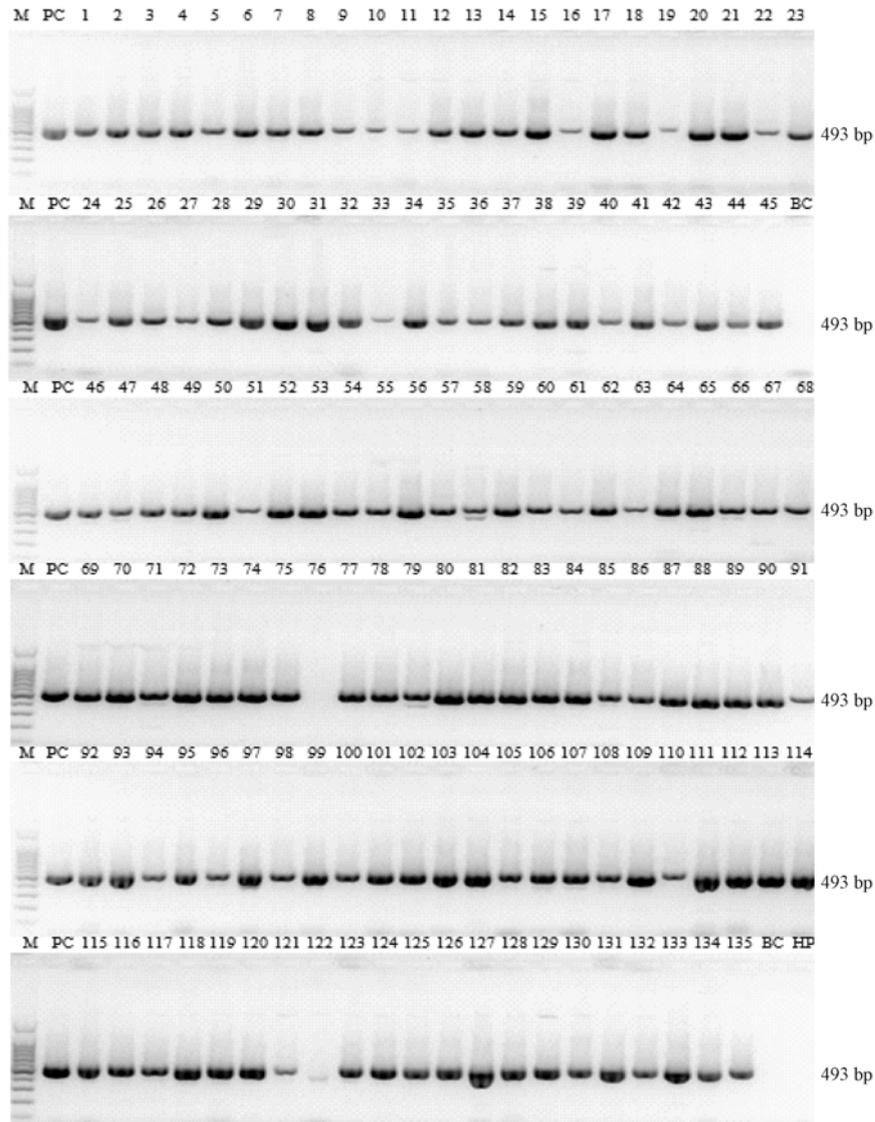
—: 完全一致序列; ...: 空缺序列
图 3 恒河猴 3 个样本 HP-P1 产物测序结果比对
 “—”: The identical sequence; “...”: Absence of sequence.

Fig. 3 The alignment results of 3 amplicons of HP-P1F/ HP-P1R in rhesus macaques

食蟹猴可以自然感染幽门螺杆菌, 在 63 只 2~4 岁的食蟹猴中, 幽门螺杆菌阳性感染率达 69.8%, 病

理研究也确认感染造成组织炎症改变^[12]。目前, 尚未见有用 PCR 方法对食蟹猴中幽门螺杆菌感染情况的调查。本文首次用 16S rRNA 特异性引物对 90 只雌雄各半的 4 岁食蟹猴的粪便样本进行调查研究, 结果表明幽门螺杆菌感染率为 100%, 比以往国外报道的感染率都高, 与本文中恒河猴群中感染率相同, 而传统的分离培养或血清学方法检测幽门螺杆菌有低敏感性的局限。

Fox 等在 2007 年从一例患有腺癌的恒河猴回肠内容物中分离出一种螺杆菌新种并命名为“猕猴螺杆菌”。此后, 该研究团队对饲养在一起的 26 只患有回结肠炎恒河猴的回肠内容物进行分离培养, 其中有 21 只恒河猴为螺杆菌阳性; 同时对 35 只没有回结肠炎的恒河猴检测发现也有 20 只为螺杆菌阳性^[13,14]。但是作者仅选择其中少数样本进行 16S rRNA 分析, 因此无法得知该群体中“猕猴螺杆菌”



M: 100 bp marker ladder; BC: 不含核酸模板的空白对照组; PC: 质粒阳性对照 pc20; HP: *H. pylori* 对照; 泳道 1~45: 45 份恒河猴粪便提取 DNA 样本; 泳道 46~135: 90 份食蟹猴提取 DNA 样本

图 4 恒河猴和食蟹猴样本中“猕猴螺杆菌”PCR 产物电泳结果

M, 100 bp marker ladder; BC, blank control without nucleic acid template; PC, positive control with pc20; HP, *H. pylori* DNA; Lane 1-45, 45 DNA samples from feces of rhesus macaques; Lane 46-135, 90 DNA samples from feces of cynomolgus monkeys

Fig. 4 PCR results of the *Helicobacter macacae* in rhesus and cynomolgus monkeys.

感染的实际数量。至今尚未见有关食蟹猴中“猕猴螺杆菌”感染的相关研究报道。文献中猕猴螺杆菌是通过活组织培养,此培养方法有损动物健康;通过粪便培养分离猕猴螺杆菌难度太大,由于粪便中菌群复杂,且猕猴螺杆菌生长环境、形态特征普遍,进一步分纯进行微生物培养鉴定难度大。因此我们针对“猕猴螺杆菌”的 7 个细菌株的 16S rRNA 序列进行比对分析后,设计了特异性引物。实验表明

该引物灵敏度高,且特异性好,与包括幽门螺杆菌在内的数种常见肠道菌无交叉。我们用该引物进行的调查结果表明,在 45 只 2~4 岁的恒河猴中“猕猴螺杆菌”的感染率为 100%;在 90 只食蟹猴中有 88 只为“猕猴螺杆菌”阳性,感染率达 97.8%,证明了我们建立的检测该菌的 PCR 方法的可行性和实验猴感染“猕猴螺杆菌”的普遍性。

在本研究中,有 1 份食蟹猴样本的螺杆菌属特



—: 完全一致序列; ···: 空缺序列

图 5 恒河猴 3 份样本 H. M8 扩增产物测序结果比对

—: The Identical sequence; ···: Absence of sequence.

Fig. 5 The alignment result of the amplicon of H. M8 primers with 3 rhesus macaque samples.

异性引物 PCR 检测结果为阴性,但幽门螺杆菌特异性引物 qPCR 检测结果为阳性。由于 qPCR 比常规 PCR 灵敏度高 20 倍以上,因此该例结果的不符合可能是不同方法的敏感性的差异所致。需进一步建立螺杆菌和“猕猴螺杆菌”的 qPCR 检测方法可提高检测敏感性。

目前的研究表明,只有家猫和非人灵长类是幽门螺杆菌的自然感染动物宿主^[5]。非人灵长类与人亲缘关系非常紧密,幽门螺杆菌在非人灵长类中也分布于胃黏膜中,会引发不同程度的持续性胃炎,以及幽门螺杆菌在猴群中广泛存在自然感染的情况,使得非人灵长类成为研究幽门螺杆菌感染人体后的致病机理、药物筛选和疫苗开发的最佳实验动物^[5, 16]。另一方面,由于幽门螺杆菌感染人群后,会造成胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡甚至胃癌,在实验猴群中广泛存在的幽门螺杆菌污染,可能会对饲养人员和实验人员的身体健康造成威胁,因此应及时发现并清除实验猴中自然感染的幽门螺杆菌^[3]。而实验猴感染幽门螺杆菌造成的胃炎以及“猕猴螺杆菌”造成的回结肠炎,可能会对使用这些动物进行的药理学或药物毒理学实验造成干扰^[14]。虽然目前国内外尚未有对实验猴中的幽门螺杆菌感染的监测要求,但有必要建立不携带幽门螺杆菌的 SPF 级实验猴应用于消化道药物临床前研究。

总之,本研究针对螺杆菌属、幽门螺杆菌和“猕猴螺杆菌”的 16S rRNA 特异性区域建立的 PCR 方

法,检测实验猴粪便样本中这些细菌具有特异、敏感和可行的优势,通过对人工繁育的恒河猴和食蟹猴的螺杆菌感染状况初步调查,表明实验恒河猴和食蟹猴都存在幽门螺杆菌和“猕猴螺杆菌”的复合感染。

参考文献:

[1] 华杰松, 郑鹏远, 张振华, 等. 螺杆菌属细菌的分类和鉴定 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 1999, 8(2): 83-88.
 [2] Euler AR, Zurenko GE, Moe JB, et al. Evaluation of two monkey species (*Macaca mulatta* and *Macaca fascicularis*) as possible models for human *Helicobacter pylori* disease [J]. J Clin Microbiol, 1990, 28(10): 2285-2290.
 [3] Duš I, Dobosz T, Manzin A, et al. Role of PCR in *Helicobacter pylori* diagnostics and research—new approaches for study of coccoid and spiral forms of the bacteria [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2013, 67: 261-268.
 [4] Roussel Y, Harris A, Lee MH, et al. Novel methods of quantitative real-time PCR data analysis in a murine *Helicobacter pylori* vaccine model [J]. Vaccine, 2007, 25: 2919-2929.
 [5] Handt LK, Fox JG, Yan LL, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in a colony of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) [J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(1): 165-168.
 [6] Newell DG, Hudson MJ, Baskerville A. Naturally occurring gastritis associated with *Campylobacter pylori* infection in the rhesus monkey [J]. Lancet, 1987, 2: 1338.
 [7] Newell DG, Hudson MJ, Baskerville A. Isolation of a gastric campylobacter-like organism from the stomach of four rhesus monkeys, and identification as *Campylobacter pylori* [J]. J Med Microbiol, 1988, 27(1): 41-44.

- [8] Bronsdon MA, Schoenknecht FD. *Campylobacter pylori* isolated from the stomach of the monkey, *Macaca nemestrina* [J]. J Clin Microbiol, 1988, 26(9): 1725 - 1728.
- [9] Reed, KD, and Berridge BR. Campylobacter-like organisms in the gastric mucosa of Rhesus monkeys [J]. Lab Anim Sci, 1988, 38: 329 - 331.
- [10] Takahashi S, Igarashi H, Ishiyama N, et al. Serial change of gastric mucosa after challenging with *Helicobacter pylori* in the cynomolgus monkey [J]. Zentralbl Bakteriell, 1993, 280: 51 - 57.
- [11] Masubuchi N, Takahashi S, Nakano M, et al. Experimental infection of the cynomolgus monkey with *Helicobacter pylori* [J]. Nippon Rinsho, 1993, 51: 3127 - 3131.
- [12] Reindel JF, Fitzgerald AL, Breider MA, et al. An epizootic of lymphoplasmacytic gastritis attributed to *Helicobacter pylori* infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) [J]. Vet Pathol, 1999, 36(1): 1 - 13.
- [13] Fox JG, Boutin SR, Handt LK, et al. Isolation and characterization of a novel *helicobacter* species, "*Helicobacter macacae*," from rhesus monkeys with and without chronic idiopathic colitis [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(12): 4061 - 4063.
- [14] Marini RP, Muthupalani S, Shen Z, et al. Persistent infection of rhesus monkeys with '*Helicobacter macacae*' and its isolation from an animal with intestinal adenocarcinoma [J]. J Med Microbiol, 2010, 59(8): 961 - 969.
- [15] Fatemeh Soghra Abdi, Shahram Jamshidi, Farhad Moosakhani, et al. Detection of *Helicobacter* spp. DNA in the colonic biopsies of stray dogs: molecular and histopathological investigations [J]. Diagn Pathol, 2014, 9: 50.
- [16] Dubois A, Fiala N, Weichbrod RH, et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* gastric infection in nonhuman primates housed in social environments [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(6): 1492 - 1495.

[修回日期] 2016 - 05 - 09

(上接第 35 页)

参考文献:

- [1] Abad C, Waschek JA. Immunomodulatory roles of VIP and PACAP in models of multiple sclerosis [J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(10): 1025 - 1035.
- [2] Delgado M, Pozo D, Ganea D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation [J]. Pharmacol Rev, 2004, 56(2): 249 - 290.
- [3] Domingues HS, Mues M, Lassmann H, et al. Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. PLoS One, 2010, 5(11): e15531.
- [4] Kang ZZ, Altuntas CZ, Gulen MF, et al. Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis [J]. Immunity, 2010, 32(3): 414 - 425.
- [5] Geremia A, Jewell DP. The IL-23 /IL-17 pathway in inflammatory bowel diseases [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2012, 6(2): 223 - 237.
- [6] Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery [J]. Pharmacol Rev, 2009, 61(3): 283 - 357.
- [7] Delgado M, Robledo D, Rueda B, et al. Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(4): 1010 - 1019.
- [8] Waschek JA. VIP and PACAP: neuropeptide modulators of CNS inflammation, injury, and repair [J]. Br J Pharmacol, 2013, 169(3): 512 - 523.
- [9] Jimeno R, Gomariz RP, Garín M, et al. The pathogenic Th profile of human activated memory Th cells in early rheumatoid arthritis can be modulated by VIP [J]. J Mol Med (Berl), 2015, 93(4): 457 - 467.
- [10] Jimeno R, Leceta J, Garín M, et al. Th17 polarization of memory Th cells in early arthritis: the vasoactive intestinal peptide effect [J]. Leukoc Biol, 2015, 98(2): 257 - 269.
- [11] Patel DD, Kuchroo VK. Th17 cell pathway in human immunity: lessons from genetics and therapeutic interventions [J]. Immunity, 2015, 43(6): 1040 - 1051.
- [12] Sharma J, Balakrishnan L, Datta KK, et al. A knowledge base resource for interleukin-17 family mediated signaling [J]. J Cell Commun Signal, 2015, 9(3): 291 - 296.
- [13] Krstic J, Obradovic H, Kukulj T, et al. An overview of interleukin-17A and interleukin-17 receptor A structure, interaction and signaling [J]. Protein Pept Lett, 2015, 22(7): 570 - 578.
- [14] Waisman A1, Hauptmann J, Regen T. The role of IL-17 in CNS diseases [J]. Acta Neuropathol, 2015, 129(5): 625 - 637.
- [15] Yang JF, Tao HQ, Liu YM, et al. Characterization of the interaction between astrocytes and encephalitogenic lymphocytes during the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice [J]. Clin Exp Immunol, 2012, 170(3): 254 - 265.
- [16] Kang ZZ, Altuntas CZ, Gulen MF, et al. Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis [J]. Immunity, 2010, 32(3): 414 - 425.
- [17] Kang ZZ, Wang CH, Zepp J, et al. Act1 mediates IL-17-induced EAE pathogenesis selectively in NG2 + glial cells [J]. Nat Neurosci, 2013, 16(10): 1401 - 1408.
- [18] Yan YP, Ding XL, Li K, et al. CNS-specific therapy for ongoing EAE by silencing IL-17 pathway in astrocytes [J]. Mol Ther, 2012, 20(7): 1338 - 1348.

[修回日期] 2016 - 05 - 06



不同剂量野百合碱联合异丙肾上腺素对大鼠血流动力学变化及心指数、右心肥厚指数研究

邹习俊, 杨红宇, 江滢, 智妍, 兰露莎, 朱颜鑫, 邹乾

(贵州医科大学实验动物中心, 贵阳 550004)

【摘要】 目的 研究不同剂量野百合碱联合异丙肾上腺素对大鼠血流动力学变化及心指数、右心肥厚指数。**方法** 采用SD大鼠64只,雌雄各半,体重200~250g,随机分为空白对照组($n=16$);模型组($n=48$)。模型组分为高剂量组($n=16$):80mg/kg野百合碱采取腹腔一次性注射;10mg/kg异丙肾上腺素采取腹腔连续注射1周;中剂量组($n=16$):55mg/kg野百合碱采取腹腔一次性注射;8mg/kg异丙肾上腺素采取腹腔连续注射1周;低剂量组($n=16$):30mg/kg野百合碱采取腹腔一次性注射,3mg/kg异丙肾上腺素采取腹腔连续注射1周。动物饲养到第6周后,行肺动脉压和右心室内压检测,心系数和右心室肥厚指数测定。**结果** 与对照组比较,低剂量平均肺动脉压和右室收缩压均无差异变化;中剂量组平均肺动脉压、右室收缩压均有差异变化($P<0.05$),低剂量组心系数和右心室肥厚指数均无差异显著。中剂量组心系数差异极显著($P<0.01$),右心室肥厚指数差异显著($P<0.05$)。**结论** 说明采用一次性注射野百合碱55mg/kg,联合连续注射8mg/kg异丙肾上腺素1周。既保证了大鼠的存活率,又保证了肺动脉高压的成功形成,野百合碱和异丙肾上腺素能对大鼠产生肺动脉高压,导致心气虚弱。

【关键词】 野百合碱;异丙肾上腺素;大鼠;血流动力学;心指数;右心肥厚指数

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0069-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.013

Effect of different doses of monocrotaline in combination with isopropylarterenol on the hemodynamic response, heart index and right heart hypertrophy index in rats

ZOU Xi-jun, YANG Hong-yu, JIANG Yan, ZHI Yan, LAN Lu-sha, ZHU Yan-xin, ZOU Qian
(Laboratory Animal Center of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of different doses of monocrotaline in combination with isopropylarterenol on the hemodynamic response, heart index and right heart hypertrophy index in rats. **Methods** Sixty-four healthy adult SD rats, male : female = 1:1, body weight 200 - 250 g, were randomly divided into blank control group ($n=16$) and three model groups ($n=16$ in each group). The high dose model group ($n=16$) received i. p. injection of monocrotaline 80 mg/kg once and epinephrine 10 mg/kg once daily for one week. The moderate dose group received i. p. injection of monocrotaline 55 mg/kg once and epinephrine 8 mg/kg once daily for one week. The low dose group received i. p. injection of monocrotaline 30 mg/kg once and epinephrine 3 mg/kg once daily for one week. The rats were fed for 6 weeks, and then pulmonary artery pressure and right ventricular pressure were tested and heart index and right ventricular

[基金项目] 贵州省科技厅基金(编号:黔科合 LH 字[2014]7100)。

[通讯作者] 邹习俊(1981-),男,硕士,研究方向:实验动物科学,E-mail: xijzhou@163.com。

hypertrophy index were determined. **Results** Compared with the control group, the mean pulmonary artery pressure and right ventricular systolic blood pressure in the low dose monocrotaline group were not significantly changed, but significantly changed in the moderate dose monocrotaline group ($P < 0.05$). The heart index and right ventricular hypertrophy index in the low dose monocrotaline group were not significantly changed, but in the moderate dose monocrotaline group, the heart index was significantly reduced ($P < 0.01$) and the right ventricular hypertrophy index was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusions** The use of a single injection of 55 mg/kg monocrotaline in combination with continuous injection of 8 mg/kg isopropylarterenol once daily for one week can ensure the survival rate of rats, and the successful formation of pulmonary artery hypertension, leading to heart weakness.

【Key words】 Monocrotaline; Isopropylarterenol; Blood flow dynamics; Heart index; Right heart hypertrophy index; Rats

血管系统疾病已经成为严重危害人类身体健康与生活质量的最为常见的疾患之一,其发病率和死亡率均超过肿瘤性疾病而位居世界第一,临床常见的合并心血管和呼吸系统疾病具有更高的死亡率。在我国传统医学中,常表现为心肺气虚,即心气虚弱、肺气不足,是以心悸,喘促为主证的虚弱证候。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

实验用 SD 大鼠购自第三军医大学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(军)2012-0011。动物实验在贵州医科大学实验动物中心实施,使用许可证号:SYXK(黔)2012-0001。

1.2 仪器与试剂

BL-420 生物信号采集仪(成都泰盟科技),BSA822-CW 电子天平(精确到 0.01 g 德国 Sartorius)。野百合碱(MCT:分析标准品,HPLC $\geq 99\%$,CAS 号:315-22-0),盐酸异丙肾上腺素(ISO:含量 $\geq 98\%$,CAS 号 51-30-9)和 ELSA 试剂盒购自上海源叶生物科技有限公司;水合氯醛,生理盐水,肝素钠,等购自市售分析纯。其中野百合碱和盐酸异丙肾上腺素用无水乙醇与 0.9% 氯化钠注射液混合液(1:4)配成溶液备用。

1.3 动物实验

实验用 SD 大鼠 64 只,雌雄各半,体重 200 ~ 250 g,适应性饲养 1 周。随机分为空白对照组($n = 16$);模型组($n = 48$),模型组分为高剂量组($n = 16$):80 mg/kg 野百合碱采取腹腔一次性注射;10 mg/kg 异丙肾上腺素采取腹腔连续注射 1 周;中剂量组($n = 16$):55 mg/kg 野百合碱采取腹腔一次性注射;8 mg/kg 异丙肾上腺素采取腹腔连续注射 1 周;低剂量组($n = 16$):30 mg/kg 野百合碱采取腹腔

一次性注射,3 mg/kg 异丙肾上腺素采取腹腔连续注射 1 周。自由饮水、进食。

1.4 研究方法

1.4.1 大鼠的一般情况观察:包括活动情况,饮食及毛发等。

1.4.2 血流动力学测定:动物饲养到第 6 周,称重,10% 水合氯醛 3 mL/kg 腹腔麻醉注射,仰卧固定,消毒。参照袁平等^[1]改良心导管测定大鼠肺血管阻力的方法,分离颈外静脉,结扎血管远心端,剪口,插入自制弯曲的 PE-10 导管,固定。导管末端弯曲向左下方向缓慢推进,1 ~ 2 cm 到达颈外静脉与腋静脉交汇处,顺时针旋转导管进入上腔静脉,继续向前推进 1 ~ 2 cm 进入右心房,适当旋转继续推进 1 cm,若感阻力明显下降,多道生理仪显示右心室波形后提示导管进入右心室。导管前端在右心室停留片刻,使其能流向肺动脉入口,然后缓慢推进 0.5 ~ 1 cm,当显示器呈现“M”与“N”交替的肺动脉波形时,提示导管已进入肺动脉,固定导管,记录压力曲线。

1.4.3 心系数、右心室肥厚指数测定:当血流动力学测定完毕后放血处死大鼠,取出心脏,用 0.9% 氯化钠溶液冲洗,滤纸吸干后称重,心系数 = 心重/体重 $\times 100\%$ 。然后把心脏左、右心房及相连的大血管去除,游离左心室(left ventricle, LV)、右心室(right ventricle, RV)与室间隔(interventricular septum, IVS),用 0.9% 氯化钠溶液冲洗掉附着血栓,滤纸吸干、称重,计算右心室肥厚指数,即 $RV/(LV + IVS)$ 。

1.4.4 统计学方法:采用 SPSS 19.0 中文统计软件。计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示, t 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠的一般情况

在注射后的第 2 周,除体重略有变化,其他无明显行动异常。第 3 周观察发现:高剂量组雄性行动异常,饮食减少,粪便疝积,毛发有脱落现象,2 只死亡;中剂量组和低剂量组肉眼观察均无明显变化。第 4 周观察发现:高剂量组雄性全部死亡,雌性组死亡 3 只,其它组没有发现有明显异常。第 6 周发现:高剂量组雌性也全部死亡;中剂量组有毛发脱落现象,饮食减少,行动迟缓,眼神呆滞。

2.2 心系数、右心室肥厚指数测定结果

结果表明:与对照组比较,低剂量组心系数和

右心室肥厚指数差异均无显著性意义。中剂量组心系数差异极显著($P < 0.01$),右心室肥厚指数差异显著($P < 0.05$)(表 1)。

2.3 血流动力学分析结果

结果表明,中剂量组的肺动脉压、右心室收缩压都呈平稳曲线变化(图 1)。与对照组比较,低剂量组平均肺动脉压和右室收缩压均无差异变化;中剂量组平均肺动脉压、右室收缩压均有差异变化($P < 0.05$)(表 2)。

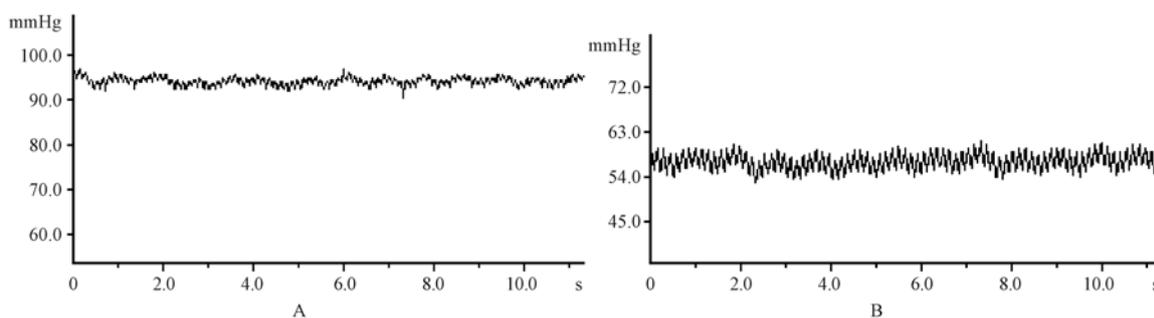


图 1 A 肺动脉压, B 右心室收缩压

Fig. 1 Stable pulmonary artery pressure (A) and right ventricular systolic pressure (B) in a rat of the moderate dose group.

表 1 心系数及右心室肥厚指数

Tab. 1 The heart index and right heart hypertrophy index

| 组别 Groups | 性别 Male/Female | 心系数(%) Heart index (%) | 右心室肥厚指数 Right heart hypertrophy index |
|---------------------|-------------------|---------------------------|--|
| 对照组 | ♀ | 0.4123 ± 0.0605 | 0.2685 ± 0.0452 |
| Control group | ♂ | 0.3889 ± 0.0342 | 0.2742 ± 0.0641 |
| 低剂量组 | ♀ | 0.4049 ± 0.0495 | 0.2967 ± 0.0102 |
| Low dose group | ♂ | 0.4140 ± 0.0949 | 0.2895 ± 0.0419 |
| 中剂量组 | ♀ | 0.3529 ± 0.0388 ** | 0.3216 ± 0.0572 * |
| Moderate dose group | ♂ | 0.3096 ± 0.0475 ** | 0.3591 ± 0.0428 * |

注:与对照组比较,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 2 血流动力学指标(mmHg, 1 mmHg ≈ 0.133 kPa)

Tab. 2 The blood flow dynamics indexes

| 组别 Groups | 性别 Male/Female | 平均肺动脉压 Mean pulmonary arterial pressure | 右室收缩压 Right ventricular systolic pressure |
|---------------------|-------------------|--|--|
| 对照组 | ♀ | 93.30 ± 4.45 | 49.87 ± 5.90 |
| Control group | ♂ | 86.69 ± 4.93 | 44.34 ± 4.57 |
| 低剂量组 | ♀ | 95.97 ± 6.27 | 54.24 ± 4.31 |
| Low dose group | ♂ | 81.58 ± 7.10 | 45.12 ± 3.59 |
| 中剂量组 | ♀ | 103.81 ± 6.80 * | 58.62 ± 7.06 * |
| Moderate dose group | ♂ | 102.50 ± 10.98 * | 62.16 ± 2.18 * |

注:与对照组比较,*表示 $P < 0.05$ 。

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



基于高通量测序技术的实验动物沙门氏菌 检测方法的建立与评价

胡毅翔,张欢欢,余陈欢,金晓音,应华忠

(浙江省医学科学院 浙江省实验动物与安全性研究重点实验室, 杭州 310013)

【摘要】 目的 建立基于高通量测序技术的实验动物沙门氏菌检测方法,应用于实验动物沙门氏菌的检测。**方法** 提取小鼠粪便 DNA 样本,分别针对 16S rDNA 区域、23S rDNA 区域、16S~23S rDNA IS、23S~5S rDNA IS、*gyrB* 优选区域设计通用引物,对各个引物进行测试分析,优化扩增条件并建库,利用 Illumina 高通量测序技术检测区分 42 个样本中的沙门氏菌,评价该方法的特异性和稳定性。**结果** 筛选发现沙门氏菌的菌种分类优选区域为 *gyrB* 基因,*gyrB* 基因引物序列为 FP5'-AACCACCGCAATCAGACCTT3',FP5'-AGCCACGAAACCTTCACYA-3'。对引物进行优化,确定最佳扩增条件及样品上样量并正式建库,通过高通量测序和序列分析能检测出 42 个样品中极微量的沙门氏菌,检测方法稳定,灵敏度高,检测限可达 0~10² 的 cfu。**结论** 本实验利用高通量测序技术,建立了一套完整检测实验动物沙门氏菌的生物体系,能检测出实验动物体内极微量的沙门氏菌,检测方法稳定性好,灵敏度高,可沿用至其他种类病原微生物的检测。

【关键词】 沙门氏菌;实验动物;高通量测序

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0072-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.014

Establishment and evaluation of a high throughput sequencing technology for detection of *Salmonella* in laboratory animals

HU Yi-xiang, ZHANG Huan-huan, YU Chen-huan, JIN Xiao-yin, YING Hua-zhong
(Zhejiang Key Laboratory of Experimental Animal and Safety Evaluation,
Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

【Abstract】 Objective To establish a detection method of *Salmonella* in laboratory animals based on a high-throughput sequencing technology, and to apply it in detection of *Salmonella* in laboratory animals. **Methods** DNA samples were extracted from mouse feces. Universal primers for 16S rDNA, 23S rDNA, 16S-23S rDNA, 23S-5S rDNA region, *gyrB* preferred area were designed, respectively. Each primer was tested and analyzed to determine the best amplification conditions and build a database. Forty-two samples of *Salmonella* were assayed by Illumina high-throughput sequencing technology and evaluated the specificity and stability of this method. **Results** The species preferred region of *Salmonella* was *gyrB* gene region. The primers for *gyrB* gene were FP5'-AACCACCGCAATCAGACCTT3' and FP5'-AGCCACGAAACCTTCACYA-3'. The primers were optimized and determined, through a high-throughput sequencing, and the sequence analysis detected very small amount of *Salmonella* in the 42 samples, indicating that this detection method is stable, highly sensitive, and the limit of detection reached to 0-10² CFU. **Conclusions** We have established a complete

【基金项目】浙江省卫生高层次人才(2012F30026),浙江省科技厅院所专项(2016F30001)。

【作者简介】胡毅翔(1989-),男,硕士研究生,研究方向为中药药理学。Email: aahyxaa@163.com。

【通讯作者】应华忠(1968-),男,研究员,从事动物模型与比较医学研究。Email: YHZ0101@126.com。

detection system for detection of *Salmonella* in laboratory animals based on a high-throughput sequencing technology, This system can detect trace amounts of *Salmonella* in laboratory animals, and this detection method is stable and highly sensitive, which can be also used in detection of other kinds of pathogenic microorganism in laboratory animals.

【Key words】 *Salmonella*; Laboratory animal; High-throughput sequencing

沙门氏菌(*Salmonellae*)是一类可以引起沙门氏菌病的典型人畜共患病原菌,属肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*),兼性厌氧型革兰氏阴性菌^[1,2]。自 1885 年 Salmon 等分离得到猪霍乱沙门氏菌以来,目前已检出沙门氏菌血清型约 2 500 余种,其中我国发现的 100 多种^[3]。沙门氏菌在分类学上被分为两个种,分别为 *Salmonella enterica* 和 *Salmonella bongori*,可由多种途径向人类进行传播,进入人体后在肠道内寄生并繁殖,所产生的沙门氏菌内毒素能进入血液循环,引发肠道黏膜肿胀、脱落、甚至溃疡、坏死^[4]。在实验室研究方面,携带或者潜在携带沙门氏菌的实验动物不仅对实验人员造成潜在的传染隐患,也会对后续科学实验产生较大的影响,因此对于实验动物的沙门氏菌的检测尤为重要^[5]。

生化方法和免疫学方法是目前检测沙门氏菌的主要方法,但这类方法检验程序复杂繁琐,耗时长,部分检验过程及结果判定存在实验人员的主观判断,因此新的检测方法的引入势在必行^[6]。分子生物学方法具有快速、准确的优势,现已开始被大量的应用于检测病原微生物,主要涉及到的分子生物学技术主要包括 PCR 技术、基因芯片和环介导等温扩增技术(LAMP)等^[7,8]。近年来,高通量测序技术开始引入病原微生物检测领域,实现了更为高效的检测手段。本次研究主要采用的是 Illumina 的 Miseq 高通量测序平台,对于病原微生物检测该平台具有周期短、通量高、成本低、准确率高等优点^[9,10]。本实验以分子生物学技术方法为基础,采用 Miseq 高通量测序技术检测实验室用小鼠所携带的沙门氏菌,通过本次研究,建立了一套完整检测实验动物沙门氏菌的技术体系。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级 ICR 小鼠 42 只,体重 18 ~ 20 g,由浙江省医学科学院实验动物中心提供(实验动物生产许可证号为 SCXK(浙)2008-0034,使用许可证号为 SYXK(浙)2008-0114)。

1.2 菌株

鼠伤寒沙门氏菌冻干株(编号:TA98),甲型副

伤寒沙门氏菌冻干株(编号:CMCC(B)50093),肠炎沙门氏菌冻干株(编号:TDF918),志贺菌冻干株(编号:TG212)为本实验室冷冻保存。

1.3 药品和试剂

Premix Ex Taq™ Hot Start Version(日本 Takara 公司,批号 RR030A),DL2000 DNA Marker(日本 Takara 公司,批号 3427),Axygen PCR Clean Up Kit(美国 Axygen 公司,批号 AP-PCR-500),QubitdsDNA HS Assay Kit(美国 Invitrogen 公司,批号 Q32851),PrimeScript® RT reagent Kit(日本 Takara 公司,批号 DRR037A)。高通量测序试剂盒(Illumina,美国),Trizol reagent(Invitrogen,美国,批号 Q35438)。

1.4 主要仪器

Bioanalyzer 2100 生物分析仪(Agilent,美国);Hiseq 2500 高通量测序仪(Illumina,美国);荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad,美国);Qubit 2.0 核酸定量仪(Life Technologies,美国);组织研磨仪(TissueLyser, Qiagen,德国)。

1.5 实验方法

1.5.1 小鼠沙门氏菌模型的建立及样品收集:小鼠适应性饲养 3 d 后,随机分为 6 组:鼠伤寒沙门氏菌组(5 只)、甲型副伤寒沙门氏菌组(5 只)、志贺杆菌组(5 只)、肠炎沙门氏菌和甲型副伤寒沙门氏菌(5 只)、肠炎沙门氏菌组(18 只)、阴性对照组(4 只)。鼠伤寒沙门氏菌组每只小鼠灌服鼠伤寒沙门氏菌,甲型副伤寒沙门氏菌组每只小鼠灌服鼠伤寒沙门氏菌 0.2 mL (5×10^3 cfu/mL),志贺杆菌组每只小鼠灌服鼠伤寒沙门氏菌 0.2 mL (5×10^3 cfu/mL),肠炎沙门氏菌和甲型副伤寒沙门氏菌每只小鼠灌服肠炎沙门氏菌和甲型副伤寒沙门氏菌 0.2 mL (5×10^3 cfu/mL),肠炎沙门氏菌组每只小鼠灌服鼠伤寒沙门氏菌 0.2 mL (0 cfu/mL, 5×10^1 cfu/mL, 5×10^2 cfu/mL, 5×10^3 cfu/mL, 5×10^4 cfu/mL, 5×10^5 cfu/mL),每个浓度各 3 只,各组小鼠每隔 2 周灌胃 1 次,连续 3 次。取 60 mg 小鼠粪样置于 2 mL 离心管中,采用 PowerFecal DNA Isolation Kit 试剂盒(MoBio,美国)抽提 100 mg 小鼠粪便样本中微生物的总 DNA,操作步骤按照说明书进行,完成基因组 DNA 抽提后,放 -20℃ 保存备用,样品信息见表 1。

表 1 样品信息
Tab.1 Sample Information

| 样品名称 | 样品数(个) |
|---------------------------------|--------|
| 菌量 10^3 cfu 鼠伤寒沙门氏菌冻干株 | 5 |
| 菌量 10^3 cfu 甲型副伤寒沙门氏菌冻干株 | 5 |
| 菌量 10^3 cfu 志贺杆菌 | 5 |
| 菌量各 10^3 cfu 肠炎沙门氏菌和甲型副伤寒沙门氏菌 | 5 |
| 阴性对照样品 | 4 |
| 菌量 0 cfu 肠炎沙门氏菌 | 3 |
| 菌量 10^1 cfu 肠炎沙门氏菌 | 3 |
| 菌量 10^2 cfu 肠炎沙门氏菌 | 3 |
| 菌量 10^3 cfu 肠炎沙门氏菌 | 3 |
| 菌量 10^4 cfu 肠炎沙门氏菌 | 3 |
| 菌量 10^5 cfu 肠炎沙门氏菌 | 3 |

1.5.2 菌种分类优选区域选择:通过文献查找,针对沙门氏菌,寻找在研究范围内的几个菌种相互之间差异变化大的区域。NCBI 数据库中查找沙门氏菌典型菌株,以鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) 典型菌株 LT2、ST4/74 等作为研究对象。通过序列比对,去除经比对菌种间同源关系极高的区域,最终筛选得到 5 大类区域:①16S rDNA 区域,②23S rDNA 区域,③16S ~ 23S rDNA ISR,④23S ~ 5S rDNA ISR,⑤gyrB 优选区域。

1.5.3 通用引物设计及优化:针对①16S rDNA 区域,②23S rDNA 区域③16S ~ 23S rDNA ISR,④23S ~ 5S rDNA ISR,⑤gyrB 优选区域设计通用引物,通用引物在多个菌种中都能 PCR 扩增得到产物。对设计的引物进行引物测试,淘汰不能扩增的引物。在原有的通用引物基础上加上建库和测序需用到的接头序列(Linker),区分样本使用的正反向 Barcode 序列(Index),增加终文库均一性和丰富度的连接碱基(heterogeneity spacer),如此设计的引物长度在 90 bp ~ 97 bp 之间,该优化引物可直接用于建库,实际的建库工作需要一步 PCR 反应完成。优化引物设计图如图 1 所示:

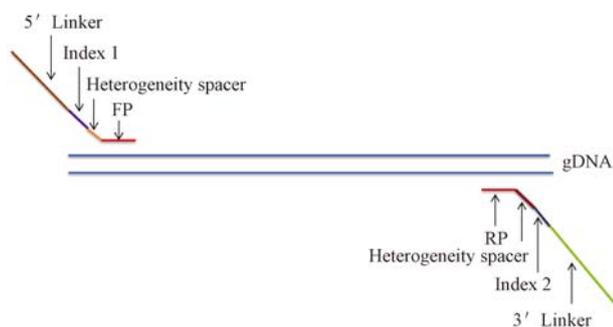


图 1 优化引物结构组成图

Fig.1 Diagram of optimization of the primer structure

1.5.4 沙门氏菌建库 PCR 条件摸索:建库 PCR 采

用的是 90 ~ 97 bp 长度的长链引物,这与普通 16 ~ 25 bp 的引物 PCR 扩增条件会有很多不同,长链引物扩增条件比普通引物扩增的条件要苛刻。建库 PCR 条件摸索:模板上样量、退火温度、循环、延伸时间,其中主要考查上样量和退火温度。(1)退火温度:考察的退火温度为 56℃、54℃、52℃。2)模板上样量:针对模板上样量设计 11 个模板浓度梯度实验,模板信息如表 1 所示。上样量共分为 12 个梯度,依次为 500、200、100、50、25、10、1 ng、100、10、1、100、10 fg。

1.5.5 高通量测序体系的特异性和敏感性检测:42 个检测样本的建库后采用 Illumina Miseq 高通量测序平台进行高通量测序。随后对高质量序列进行提取,提取方法: Miseq 测序得到的 PE reads 首先根据 overlap 关系进行拼接,将成对的 reads 拼接成一条序列,同时对 reads 质量和 merge 的效果进行质量质控和过滤,去除序列末端的后引物和接头序列、多碱基 N、polyA/T 尾巴及低质量碱基;去除所得序列的 barcode 标签序列、前引物序列;丢弃长度短于 200 bp、模糊碱基数 > 0、序列平均质量低于 20 的序列。高通量测序结果与样本信息进行对比,评价高通量测序体系检测沙门氏菌的特异性和敏感性。

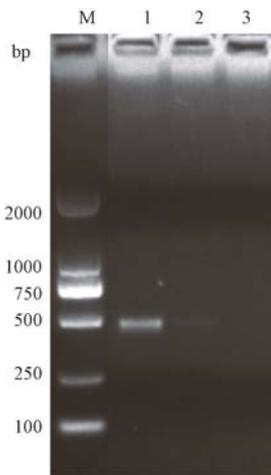
2 结果

2.1 通用引物设计及引物测试

针对①16S rDNA 区域,②23S rDNA 区域,③16S ~ 23S rDNA ISR,④23S ~ 5S rDNA ISR,⑤gyrB 优选区域各设计 3 对通用引物。经过测试,16S rDNA、23S rDNA、gyrB 各有一对引物通过测试。但分析后发现 16S rDNA、23S rDNA 的引物实际建库测序的结果与设计时的有偏差,它无法区分样品中的肠炎沙门氏菌。最后确定沙门氏菌的菌种分类优选区域为 gyrB 基因引物(表 2)。gyrB 基因通用引物引物测试电泳结果如图 2 所示,由于 gyrB 基因不仅存在于沙门氏菌中,在志贺杆菌、大肠杆菌等肠科杆菌中都存在该基因,因此样品中只要有以上任一菌种,都能扩增出目的条带。引物主要是优势扩增沙门氏菌,但是该引物对于其他沙门氏菌和肠科杆菌的模板 DNA 还是有微弱的结合能力,因此即使是沙门氏菌阴性样品,也能够扩增得到目的条带。针对 gyrB 基因设计的 1 对引物(测试了鼠伤寒沙门氏菌和志贺杆菌其中的两个样本),条带单一,

表 2 *gyrB* 基因通用引物基本信息
Tab. 2 Basic information of the universal primer for *gyrB* gene

| <i>gyrB</i> 引物 | 通用引物序列 (5' - 3') | 片段长度 (bp) |
|----------------|----------------------|-----------|
| FP | AACCACGGCAATCAGACCTT | 456 |
| RP | AGCCACGAAACCTTCACYA | |



M-DL2000 marker 1-鼠伤寒沙门氏菌样本
2-志贺杆菌样本 3-无模板阴性对照
图 2 *gyrB* 基因通用引物引物测试电泳图
M-DL2000 marker. 1: Salmonella typhimurium sample;
2: Shigella sample; 3: Negative control.

Fig. 2 Electrophoregram of the universal primers for *GyrB* gene

条带大小约为 456 bp,通过电泳图可以看到此对引物对沙门菌的 *gyrB* 基因优势扩增,条带较亮,对属于肠杆菌属的志贺杆菌的 *gyrB* 基因扩增能力有很大程度降低,条带较淡。

2.2 沙门氏菌建库 PCR 条件优化

2.2.1 退火温度:第 1 轮 PCR,退火温度 56℃,无扩增条带,未成功;第 2 轮 PCR,退火温度 54℃,无扩增条带,未成功;第 3 轮 PCR,退火温度 52℃,有扩增条带,成功。

2.2.2 模板上样量:针对模板上样量设计一个模板浓度梯度实验,共分为 12 个梯度,依次为 500、200、100、50、25、10、1 ng、100、10、1、100、10 fg,实验结果如下电泳图 3。通过以上模板浓度梯度实验,可以发现模板在 10 ng ~ 200 ng 范围内,都能扩增得到目的片段。为了保证最后的产物有足够的量,也就是要保证目的条带足够亮,选择较为合适的模板浓度 150 ng 作为体系最终的模板浓度。总结沙门氏菌 *gyrB* 基因建库 PCR 体系为 DNA 150 ng, Premix Ex Taq 12.5 μL, 上下游优化引物 (10 pmol / μL) 各 2.5 μL, 补充 ddH₂O 至 20 μL; PCR 最佳反应条件为: 98℃ 预变性 30 s; 98℃ 变性 10 s, 52℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 10

min,共 40 个循环; 72℃ 再延伸 5 min。



M: DL2000 marker
模板量为 1: 500 ng; 2: 200 ng; 3: 100 ng; 4: 50 ng; 5: 25 ng;
6: 10 ng; 7: 1 ng; 8: 100 pg; 9: 10 pg; 10: 1 pg; 11: 100 fg; 12: 10 fg。

图 3 沙门氏菌模板浓度梯度实验电泳结果图

M: DL2000 Marker.
Loading quantity of samples. 1: 500 ng; 2: 200 ng;
3: 100 ng; 4: 50 ng; 5: 25 ng; 6: 10 ng; 7: 1 ng;
8: 100 pg; 9: 10 pg; 10: 1 pg; 11: 100 fg; 12: 10 fg.

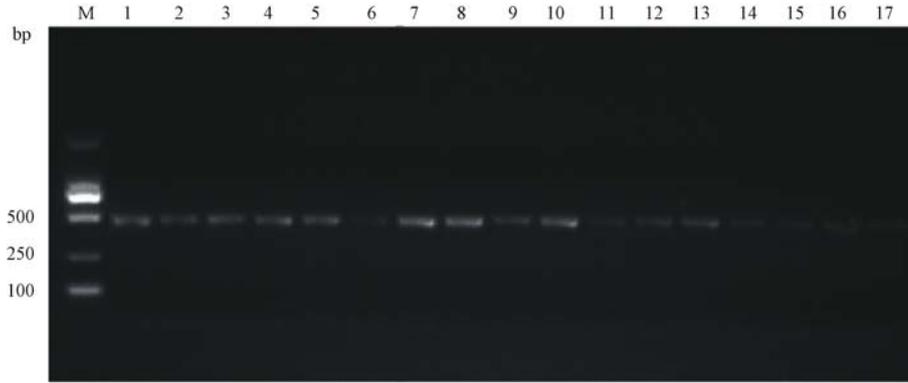
Fig. 3 Results of concentration gradient experiment of the Salmonella templates

2.3 样本正式建库

采用以上摸索得到的建库 PCR 条件将所有样品进行建库,建库 PCR 结果如图 4 ~ 6 所示。结果显示,42 个样本建库成功,均可得到 456 bp 大小的目的条带。

2.4 检测结果的准确性、特异性及重复性分析

42 个样本的高通量测序检测结果如表 3 所示,各样本检测到的主体菌种与目的菌种基本上一致的。通过测序的方法在样品中存在的极微量的菌种也被检测到,因此在一些样品中除了要检测的主体菌种外,还存在极微量拷贝数的其他沙门氏菌菌种。在志贺杆菌中,特别设置了一个志贺杆菌的数据库用于 19 ~ 23 号样品的比对,发现无法检测到该菌种,说明设计的引物可以特异扩增沙门氏菌。在混合菌种中,该引物能将两种不同的菌种进行区分。针对肠炎沙门氏菌设置的 cfu 梯度,从检测的结果可以看出,在 0 ~ 10² 的 cfu 范围内,也能检出,在其他 cfu 梯度样品中都能稳定检出,准确性及灵敏度高,各平行样本之间的检测结果一致,说明该方法具有较高重复性。通过高通量测序技术能够将检测出极微量的沙门氏菌,并能沙门氏菌很好的区分出来。

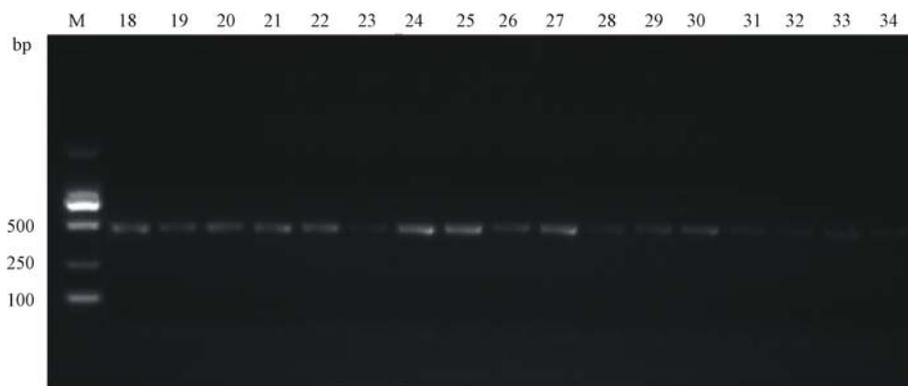


M: DL2000 marker 1-17 ;1-17 号样本

图 4 1-17 号样本建库 PCR 电泳图

M: DL2000 marker 1-17 ; Sample 1-17

Fig. 4 PCR electrophoregram of the sequencing library of samples 1-17



M: DL2000 marker. 18-34;18-34 号样本

图 5 18-34 号样本建库 PCR 电泳图

M: DL2000 marker. 18-34; Samples 18-34

Fig. 5 PCR electrophoregram of the sequencing library of samples 18-34

表 3 沙门氏菌样本的数据分析结果

Tab. 3 Analysis results of the Salmonella samples

| 样品编号 | 目的菌种 | 检测到的主体菌种 | 检测到的其他菌种 | 样品编号 | 目的菌种 | 检测到的主体菌种 | 检测到的其他菌种 |
|------|---------|---------------|--------------|------|------------------------|---------------|--------------|
| 1 | ST | ST | | 22 | SA & SE | SA & SE | |
| 2 | ST | ST | SA(极微量) | 23 | SA & SE | SA & SE | |
| 3 | ST | ST | | 24 | Control | No hits found | |
| 4 | ST | ST | | 25 | 0 cfu SE | No hits found | |
| 5 | ST | ST | | 26 | 0 cfu SE | No hits found | SE(极微量) |
| 6 | Control | No hits found | | 27 | 0 cfu SE | No hits found | SE(极微量) |
| 7 | SA | SA | | 28 | 10 ¹ cfu SE | SE(极微量) | |
| 8 | SA | SA | | 29 | 10 ¹ cfu SE | No hits found | |
| 9 | SA | SA | ST(极微量) | 30 | 10 ¹ cfu SE | No hits found | |
| 10 | SA | SA | ST(极微量) | 31 | 10 ² cfu SE | SE(极微量) | |
| 11 | SA | SA | | 32 | 10 ² cfu SE | SE | |
| 12 | Control | No hits found | SA & ST(极微量) | 33 | 10 ² cfu SE | No hits found | |
| 1111 | | | | | | | |
| 13 | SH | SH | | 34 | 10 ³ cfu SE | SE | SA & SE(极微量) |
| 14 | SH | SH | SA(极微量) | 35 | 10 ³ cfu SE | SE | |
| 15 | SH | SH | | 36 | 10 ³ cfu SE | SE | |
| 16 | SH | SH | | 37 | 10 ⁴ cfu SE | SE | SA(极微量) |
| 17 | SH | SH | | 38 | 10 ⁴ cfu SE | SE | |
| 18 | Control | No hits found | SA & SE(极微量) | 39 | 10 ⁴ cfu SE | SE | |
| 19 | SA & SE | SA & SE | | 40 | 10 ⁵ cfu SE | SE | |
| 20 | SA & SE | SA & SE | | 41 | 10 ⁵ cfu SE | SE | |
| 21 | SA & SE | SA & SE | | 42 | 10 ⁵ cfu SE | SE | |

注: ST; *Salmonella enterica* serovar Typhimurium; 鼠伤寒沙门氏菌; SA; *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A; 甲型副伤寒沙门氏菌; SE; *Salmonella enterica* serovar Enteritidis; 肠炎沙门氏菌; SH; *Shigella*; 志贺菌



M: DL2000 marker. 35-42: 35-42 号样本

图 6 35-42 号样本建库 PCR 电泳图

M: DL2000 marker. 35-42: Sample 35-42

Fig. 6 PCR electrophoregram of the sequencing library of samples 35-42

3 讨论

人畜共患病是指由同一种病原体引起,流行病学上相互关联,在人类和动物之间自然传播的疫病。其病原包括病毒、细菌、支原体、螺旋体、立克次氏体、衣原体、真菌、寄生虫等。这类疾病的特性在于很不容易消灭。因此这些病原微生物的存在会对人类健康、畜牧业安全生产、畜产品安全和公共卫生造成重大危害^[11]。沙门氏菌是一类可以引起沙门氏菌病的典型人畜共患病原菌,并且在实验动物中十分常见,可感染实验人员并对实验结果造成不可预估的影响,因此对于沙门氏菌的检测就变得尤为重要。

如今,分子生物学技术已越来越多的被应用于菌种鉴定,比如现在较为成熟的 16S rDNA 细菌菌种鉴定技术,ITS 区真菌菌种鉴定技术等等,都体现出了简便、快速、高效的特点。菌种鉴定到属的级别还是相对较容易的,现在也有很多技术可以达成,但是想要鉴定到种、亚种甚至是菌株的水平,鉴定的困难程度就要提高很多。16S rDNA 能很好的将菌种鉴定到属的层面,但是由于 16S rDNA 的进化速度非常慢,即太保守,虽对种系有一定的区分能力,但是难以区分某些种系非常接近的菌种及同一菌种的不同菌株。23S rDNA 也可用于菌种鉴定,有些学者认为其系统进化分析能力甚至比 16S rDNA 更强,但是由于 23S rDNA 的分子大小较大,因此它的使用也受到了限制^[12,13]。核糖体基因间隔区(intergenic spacer region, ISR)为 rDNA 区域之间高度可变的区域,它的进化速度远远的高于 rDNA 区域,可以用于菌种间的鉴别。ISR 区域主要有 16S

~23S rDNA ISR 区域和 23S ~ 5S rDNA ISR 区域。ISR 区域碱基变化程度与 rDNA 区域的程度相差不多,它优于 rDNA 区域的原因主要是该区域存在片段插入或缺失,导致片段大小的变化从而产生了种间和种内差异^[14]。Morales 等还发现 23S ~ 5S rDNA ISR 区域比 16S ~ 23S rDNA ISR 区域具有更好的菌种区分能力^[15]。然而,在某种程度上,ISR 区域的种系鉴别能力也因其高度变异性和高度进化率而受到限制。

细菌中的一些基因也可以作为系统发育标记基因,比如 *gyrB* 基因,该基因编码 DNA 解旋酶(*gyrase*)的 B 亚单位,具有 DNA 依赖的 ATP 酶活性,催化 ATP 的水解。Fukushima 应用 *gyrB* 基因对大肠埃希菌、沙门氏菌和志贺杆菌进行系统发育分析,证实了 *gyrB* 基因优于 16S rDNA 基因^[14]。由于 *gyrB* 基因的进化速度比 16S rDNA 等其他基因快,因此更适用于亲缘关系较近的种内及种间的鉴定和分类。

在本研究中,针对 16S rDNA、3S rDN、16S ~ 23S rDNA IS、23S ~ 5S rDNA IS、*gyrB* 优选区域设计通用引物,对各个引物进行测试分析,最终筛选发现沙门氏菌的菌种分类优选区域为 *gyrB* 基因,*gyrB* 基因引物序列 FP 5'-AACCACCGCAATCAGACCTT-3', RP 5'-AGCCACGAAACCTTCACYA-3'。优化扩增条件并建库,利用 Illumina 高通量测序技术检测区分 42 个样本进行通过高通量测序和序列分析,能够检测出样本中极微量的沙门氏菌,检测方法稳定,检测限可达 0 ~ 10² 的 cfu,检测方法稳定性好,灵敏度高,可沿用至其他科学研究用的动物(如大鼠、豚鼠、家兔等)病原微生物的检测,同时还可将该实验体系应用于其他种类病原微生物的检测。

参考文献:

- [1] 王军,郑增忍,王晶钰. 动物源性食品中沙门氏菌的风险评估[J]. 中国动物检疫, 2007, 24(4): 23-25.
- [2] 张嘉宁,藏富妍,顾为望. 应用 PCR 法检测小鼠沙门氏菌[J]. 中国比较医学杂志, 1999, 9(1): 45-47.
- [3] McGuinness S, McCabe E, O'Regan E, et al. Development and validation of a rapid real-time PCR based method for the specific detection of Salmonella on fresh meat [J]. Meat Sci, 2009, 83(3): 555-562.
- [4] Liu FP, Tong HM. *GyrA* and *ParC* gene mutation of clinically isolated fluoroquinolone-resistant strain of salmonella [J]. J Northeast Agr Univ, 2006, 13(1): 47-50.
- [5] Yan SS, Pendrak ML, Abela-Ridder B, et al. An overview of Salmonella typing — public health perspectives [J]. Clin Appl Immunol Rev, 2003, 4(3): 189-204.

- [6] 范媛媛, 郑冰, 王树祥, 等. 一种新型培养基在沙门氏菌检测中的效果评价 [J]. 食品工业科技, 2008, 8: 415-417.
- [7] 杨保伟, 盛敏, 席美丽, 等. 食源性沙门氏菌耐药性检测及相关质粒 [J]. 微生物学报, 2008, 48(8): 1006-1012.
- [8] He LL, Sok D, Azadnia P, et al. Toward a more accurate view of human B-cell repertoire by next-generation sequencing, unbiased repertoire capture and single-molecule barcoding [J]. Sci Rep, 2014, 4: 67-78.
- [9] Weinstein JA, Jiang N, White III RA, et al. High-throughput sequencing of the Zebrafish antibody repertoire [J]. Science, 2009, 324(5928): 807-810.
- [10] DeKosky BJ, Ippolito GC, Deschner RP, et al. High-throughput sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire [J]. Nat Biotech, 2013, 31(2): 166-169.
- [11] 王章云, 滕焕昭, 李柏桂, 等. 肠炎沙门氏菌引起的食物中毒细菌学调查 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(3): 115.
- [12] Henrik C, Steen N, John EO. Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on rRNA sequences [J]. Int J Systematic Bacteriol, 1998, 48: 605-610.
- [13] Sara PL, Francisco R, Ruiting L. Variation of the ribosomal operon 16S-23S gene spacer region in representatives of *Salmonella enterica* subspecies [J]. J Bacteriol, 1998, 180(8): 2144-2151.
- [14] Cesar AM, Richard G, Jean G. Linkage of avian and reproductive tract tropism with sequence divergence adjacent to the 5S ribosomal subunit *rrfH* of *Salmonella enterica* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2006, 264: 48-58.
- [15] Fukushima M, Kakinuma R. Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(8): 2779-2785.

[修回日期]2016-03-08

(上接第 71 页)

3 分析与讨论

野百合碱可引起大鼠肺血管内皮损伤、血管重构,进而导致肺血管阻力增加,肺动脉高压形成,这与人肺动脉高压发病的病理生理机制类似^[2]。异丙肾上腺素为受体激动剂,对心肌的正性变力和变时作用可使心肌收缩力增强,心率加快,致使心肌细胞肥大,胶原纤维增生,产生心肌肥厚^[3]。但是,采用野百合碱联合异丙肾上腺素共同作用于大鼠的报道罕见,本研究发现:药物使用剂量越大,对大鼠心、肺组织破坏就越严重,大鼠的死亡率也随之上升;但如果注射药物剂量低,作用效果不明显。采用一次性注射野百合碱 55 mg/kg 联合 8 mg/kg 异丙肾上腺素连续注射 1 周,既保证了大鼠的存活率,又保证了肺动脉高压的成功形成。

本实验中,野百合碱联合异丙肾上腺素共同作用注射 6 周后,与空白对照组相比,中剂量组大鼠平均肺动脉压、右心室内压均明显升高($P < 0.05$),平均肺动脉压大大超过 25 mmHg,达到了重度以上肺动脉高压的标准,这其中也可能与生物信号采集仪的设定标准有一定的关系,也与信号采集连接导管有关系。

肺动脉高压早期,右心室尚能代偿,舒张末期压仍正常,但随着病情的进展,特别是急性加重期,肺动脉压持续升高且严重,超过右心室的负荷,右心失代偿,右心排血量下降,右室收缩末期残留血量增加,舒张末期压增高,促使右心室肥厚,严重时甚至出现右心室功能衰竭。野百合碱进入大鼠体内后,在肝脏多功能氧化酶系作用下,转化为野百合吡咯而后损伤

肺血管内皮细胞,引起肺动脉平滑肌细胞增殖,最终导致肺动脉高压,继发右心室肥厚,是常用的右室肥厚病理模型^[4,5]。本研究通过注射野百合碱联合异丙肾上腺素的作用,使心肌肥厚的作用十分明显,与空白对照组比较,中剂量组心系数增加($P < 0.01$)。中剂量组大鼠右心室肥厚指数比空白对照组增加($P < 0.05$),说明野百合碱和异丙肾上腺素能对大鼠产生肺动脉高压,导致心气虚弱。

致谢:贵州医科大学机能实验室提供了 BL-420 生物信号采集仪,张金娟老师对本 PE-10 管的自备和大鼠静脉插管的悉心指导,在此一并致以衷心的感谢。

参考文献:

- [1] 袁平, 吴文汇, 刘崇, 等. 改良心导管测定大鼠肺血管阻力的方法 [J]. 中华心血管病杂志, 2011, 39(10): 901-904.
- [2] Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, et al. Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats [J]. Circ Res, 2004, 94(3): 385-393.
- [3] Bos R, Mougnot N, Findji L, et al. Inhibition of catecholamine-induced cardiac fibrosis by an aldosterone antagonist [J]. Cardiovasc Pharmacol, 2005, 45(1): 8-13.
- [4] Boor PJ, Gotlieb AI, Joseph EC, et al. Chemical-induced vasculature injury [J]. Toxicol Applied Pharmacol, 1995, 132(2): 177-195.
- [5] Naito Y, Hosokawa M, Hao H, et al. Impact of dietary iron restriction on the development of monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling and right ventricular failure in rats [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 436(2): 145-151.

[修回日期]2016-05-09



一种简易小鼠尾静脉注射固定法——笼盖压制法

李轶惊, 张娜, 田枫

(北京大学医学部实验动物科学部, 北京 100191)

【摘要】 目的 介绍一种简便易行的小鼠尾静脉注射固定方法。方法 20只 BALB/C 雄性荷瘤裸鼠, 由实验员 A 和实验员 B 用笼盖压制法固定小鼠进行尾静脉注射, 观察注射完成时间和成功率。结果 两位实验员 100% 均可完成尾静脉注射。结论 笼盖压制法为小鼠进行尾静脉注射提供了一种简易方法, 特别对于特殊形态的小鼠进行尾静脉注射更加有效。

【关键词】 小鼠; 尾静脉注射; 固定; 笼盖压制法

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0079-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.015

A simple fixing method for tail vein injection in mice —cage lid pressing method

LI Yi-jing, ZHANG Na, TIAN Feng

(Department of Laboratory Animal Science, Peking University Health Center, Beijing 100191, China)

【Abstract】 Objective To introduce a simple fixing method for tail vein injection in mice. **Methods** Twenty tumor-bearing male BALB/c nude mice were used in this study. Tail vein injection was performed to these mice by two laboratory technicians A and B, respectively. The injection time and success rate were recorded and analyzed. **Results** Mouse tail vein injection was successfully completed by the two technicians with the cage lid pressing method. **Conclusions** Cage lid pressing method is a simple method for tail vein injection in mice, especially provides a more efficient method for those special form of mice.

【Key words】 Mice; Tail vein injection; Fixing method; Cage lid pressing method

大、小鼠尾静脉注射是一种常用的动物技术, 注射工作顺利完成与否和固定方法的选择密切相关。而且如果要在短时间内对大量动物同时给药, 特别是对尾静脉注射而言, 方便、恰当的动物固定方法是非常重要的^[1]。一般情况下, 大多实验者选择使用商品化的固定器固定小鼠, 见图 1, 是将固定器打开, 左手拎鼠尾至于固定器中, 关闭固定器。在实际工作摸索出一种简便易行的小鼠

尾静脉注射固定方法, 即笼盖压制法, 亦有相关文献对此方法进行报道^[2]。笼盖压制法是用右手打开笼盖, 左手持鼠尾, 将动物放在鼠盒中只留鼠尾, 关闭笼盖, 右手涂抹酒精对鼠尾注射部位消毒, 并进行静脉注射, 见图 2。本文以荷瘤裸鼠实验为例, 介绍笼盖压制法在小鼠尾静脉注射中的应用。

[基金项目] 北京高等学校青年英才计划项目(编号: YETP0057)。

[作者简介] 李轶惊(1984-), 女, 技师, 专业: 动物实验及管理。E-mail: 434362038@qq.com。

[通讯作者] 田枫(1973-), 女, 博士, 副主任技师, 研究方向: 实验动物研究与管理方面研究。E-mail: fengtian_38@163.com。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:SPF 级 BALB/C 裸鼠,20 只,雄性,16 g~20 g,购自北京大学医学部实验动物科学部,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2011-0012。饲养于北京大学医学部实验动物科学部屏障环境中,使用许可证号:SYXK(京)2011-0039。饲喂全价 SPF 级大、小鼠繁殖饲料,由北京科澳协力饲料有限公司生产。20 只裸鼠腋下接种肺癌细胞,待肿瘤长到约 80 cm³ 时开始进行尾静脉注射,

1.1.2 试剂:0.9% 氯化钠注射液,石家庄四药有限公司,批号为 141231425。BD 1 mL 一次性使用无菌注射器带注射针,碧迪医疗器械(上海)有限公司经销,批号为 4345295。

1.2 方法

实验分为 2 组,每组 10 只小鼠,分别由技术熟练的实验员 A 和实验员 B 按标准操作规程应用笼盖压制法对小鼠进行尾静脉注射,每次每只小鼠注射 100 μ L 0.9% 氯化钠注射液,注射完成注意用干棉球压迫止血。每次注射记录完成尾静脉注射的时间,并观察注射成功率。完成时间数据以时间的均值及标准差表示。实验操作过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

2 结果

实验员 A 和实验员 B 使用笼盖压制法均能 100% 完成尾静脉注射,完成时间见表 1。

表 1 笼盖压制法完成尾静脉注射的时间及成功率($\bar{x} \pm s, s$)

Tab.1 Cage lid pressing method for tail vein injection in completing time($\bar{x} \pm s, s$)

| 组别 Groups | 注射所用时间 Time of injection | 成功率(%) Success rate |
|-----------------------|-----------------------------|------------------------|
| 实验员 A Technician A | 300.7 \pm 8.1 | 100 |
| 实验员 B Technician B | 295.3 \pm 7.2 | 100 |

3 讨论

动物实验中最基本的实验技术,如抓取与固定方法、给药方法等,虽然已经有较完整的实验方法,但在实际工作中操作者往往会摸索出更有效的实验技巧^[3-5]。

大、小鼠尾静脉注射法由于其在体内吸收快,剂量明确等优点,往往被实验者所选用。尾静脉注射操作过程中,选对良好的固定方法,是保证实验顺利完成的重要基础。有关动物实验的相关教材中通常将固定器固定法作为常用的方法介绍给读者^[1],但是小鼠传统固定器多采用金属或有机玻璃等制成,自己加工制做不易,购买成本较高,部分文献报道的新型小鼠固定装置则制作较为复杂,且不易清洗^[6]。而且我们在以往的工作中发现传统固定器固定方法存在一些弊端,如由于每次注射,要开关固定器就相对耽误时间。而且固定器相对单一的尺寸设计对于不同品系、不同模型的小鼠适应性也较差。在操作过程中,固定过松,小鼠容易调转身体起不到固定作用,而固定过紧又容易造成小鼠窒息死亡。另外,有的固定器为不锈钢材质,不利于观察小鼠注射药物后的状态。

由于工作中经常需要对大量小鼠进行尾静脉注射,简便快捷的固定方法是非常重要的。亦有其他文献报道一些改进的或自制的尾静脉注射装置供大家参考^[7-8]。为此,我们探索使用笼盖压制法固定小鼠,由于不需要开关固定器,达到了省时省力的目的,能够在短时间内对大批实验小鼠进行安全,快速的尾静脉注射。同时对于个别体重过大 DB/DB 小鼠或荷瘤鼠等特殊形态的小鼠亦可以起到良好的固定效果,并便于观察被试动物对于药物的应激反应。本文的实验结果仅我们每年数万次小鼠尾静脉操作中的一个实例。

由于实验选择的有特殊代表性的荷瘤小鼠,结果显示笼盖压制法的确对于体积较大或荷瘤小鼠的固定更显示其独有的优点,与固定器法相比,不再受固定器尺寸的影响。但是笼盖压制法对于需多次重复尾静脉注射实验不太适宜。由于多次尾静脉注射时,此种固定方法尾静脉不易看清,影响注射效果。另外需要指出的是笼盖压制法的使用也可能与实验人员的习惯性有关,若比较习惯使用这种方法,则会比较便捷;若不习惯使用笼盖压制法则可能在完成尾静脉注射的时间上比传统固定器法要慢。由于我们实验技术人员均能较适应这种固定方法,因此在用时上较短。如果新的操作人员可能需要一定的时间磨合才可在较短的时间完成静脉注射。

这里将最常使用的固定器固定法与本实验应用的笼盖压制法从安全性、观察性、适用范围、消毒

性、交叉污染、费用、快捷性、多次注射的重复性八个方面进行了比较,见表 2,供实验人员试具体实验

条件选择应用。



图 1 固定器固定法

Fig. 1 Traditional fixing device



图 2 笼盖压制法

Fig. 2 Cage lid pressing method

表 2 固定器固定法与笼盖压制法的比较

Tab. 2 Comparison between traditional fixing and cage lid pressing methods

| 固定方法 Fixing methods | 安全性 Safty | | 观察性 Observability | 适用范围 Applicability | 消毒性 Disinfection | 交叉污染 Cross contamination | 费用 Expenses | 快捷性 Rapidity | 多次注射 重复性 Repeatability |
|--|---|----------------------|---|--|------------------------------|---|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| | 对小鼠 For mice | 对操作者 For operator | | | | | | | |
| 固定器固定法 Traditional Fixing device | 固定过紧 易窒息 Too tight fixing may cause suffocation | 安全 Safe | 固定过紧,不 利于观察应激 反应 Inconvenient observation | 适用范围相对 较小 Relatively small applicability | 易于消毒 Easy to disinfect | 不会交叉 污染 No cross contamination | 较贵 More expensive | 相对费时 Relativetime -consuming | 最佳 Best |
| 笼盖压制固定 法 Cage lid pressing | 安全 Safe | 安全 Safe | 利于观察反应 convenient observation | 适用范围较为 宽泛 Relatively wide applicability | 易于消毒 Easy to disinfect | 不会交叉 污染 No cross contamination | 无额外费 用 No more expense | 简便 Simple | 不好 Not good |

4 结论

综上所述,笼盖压制法用于小鼠的尾静脉注射的固定是切实可行的,特别是对特殊形态的小鼠进行尾静脉注射时可起到较好的固定效果。

参考文献:

[1] 郑振辉,周淑佩,彭双清. 实用医学实验动物学 [M]. 北京: 北京大学医学出版社,2008: 289.
 [2] 王玖恒,张园,谭乐诚,等. 一种小鼠尾静脉注射的新方法 [J]. 广西中医学院学报,2012,15(2): 155 - 156.
 [3] 姜骊,陈辉,何勇. 一种新的大鼠灌胃方法——侧抓灌胃法

[J]. 实验动物科学, 2011, 28(6): 62 - 63
 [4] 陈霆,李枫棣,邓巍,等. 小鼠内眦静脉丛注射与尾静脉注射比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(1): 72 - 73.
 [5] 刘保新,陈廖斌,汪晖. 介绍一种简易的大鼠固定装置 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(3): 75 - 76.
 [6] 刘辉,康白. 小鼠固定器的制作与应用 [J]. 临床和实验医学杂志,2010,9(3): 227 - 228.
 [7] 施文,孙永强. 小鼠尾静脉注射和采血简易固定装置的制作和使用方法 [J]. 免疫学杂志,2011,27(9): 807 - 808.
 [8] 苏丽娜,郭剑伟,饶光玲. 小鼠尾静脉注射与断头取血实验技术的改进 [J]. 大理学院学报,2010,9(6): 25 - 27.

[修回日期]2016 - 08 - 15



一种小鼠尾静脉注射的操作方法

余涛¹, 曾阳¹, 孙玉侠¹, 宋永朋³, 唐勋²

(1. 青海师范大学, 西宁 青海 810008; 2. 甘肃农业大学, 兰州 甘肃 730070;
3. 青海省轻工业研究所, 西宁, 青海 810000)

【摘要】 目的 为小鼠尾静脉注射提供一种实用的装置与使用方法。方法 利用自制装置上的恒温部分、照明部分以及固定部分进行小鼠尾静脉注射操作, 对比使用装置进行操作前后注射的难易程度及完成时间的差别。结果 使用自制装置进行尾静脉注射更准确更快速。结论 该自制装置在小鼠尾静脉注射操作过程中能明显提高注射成功率, 缩短注射时间。

【关键词】 小鼠; 尾静脉注射; 自制装置

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0082-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.016

A new device and method for tail vein injection in mice

YU Tao¹, ZENG Yang¹, SUN Yu-xia¹, SONG Yong-peng³, TANG Xun²

(1. Qinghai Normal University, Xining, 810008, China; 2. Gansu Agricultural University, Lanzhou, 730070;
3. Qinghai Light Industry Institute, Xining 810000)

【Abstract】 Objective To provide a device and an effective method for tail vein injection in mice. **Methods** Doing the tail vein injection in mice with the self-designed device which is consisted of constant temperature part, lighting part and holding part. The difficulty and time of injection with and without the device were compared. **Results** It was faster and more accurate to perform the tail vein injection in mice with this self-designed device. **Conclusion** Using this self-designed device can significantly improve the efficiency and save the injection time.

【Key words】 Mice; Intravenous injection; Tail vein injection device

小鼠为最常用的实验动物之一, 常被用于药理、毒理、肿瘤实验以及各种急、慢性实验。小鼠的给药方式主要有灌胃给药、腹腔注射、皮下注射、尾静脉注射等。尾静脉注射是一项重要的给药方法。目前用来进行小鼠尾静脉注射一般都是采用筒形结构的装置, 利用温水浸泡或者酒精擦拭等方法舒张尾静脉再进行注射的方法^[1-5]。由于小鼠体型较

小, 容易扭动身躯, 加之小鼠尾部静脉血管较细, 这就导致了常规固定装置难以准确完成尾静脉注射。本文中, 作者根据小鼠习性以及小鼠尾静脉注射的一些心得, 在现有的小鼠固定器的基础上对其进行了一些改进, 能够显著提高小鼠尾静脉注射的准确率, 减少操作时间。

【基金项目】 国家自然科学基金(编号:81460652); 青海省自然科学基金(编号:2015-ZJ-907); 青藏高原药用动植物资源重点实验室(2014-z-y25)。

【作者简介】 余涛(1992-), 男, 在读研究生, 研究方向: 药物植物资源。E-mail: 214989260@qq.com。

【通讯作者】 曾阳(1964-), 男, 教授, 研究方向: 高原药用动植物资源研究与开发。E-mail: zy-3@263.net。

1 材料和方法

1.1 材料

本方法使用到的材料为自制小鼠尾静脉注射装置、成年昆明种小鼠、1 mL 注射器和脱脂棉。

1.2 小鼠尾静脉注射装置的结构

本方法所涉及的一种小鼠尾静脉注射装置,其结构见图 1 和图 2。

1.3 小鼠尾静脉注射装置的操作

(1)使用前检查本装置加热隔层中是否注满导热液体(如蒸馏水),检查无误后打开本装置电源开关,设定温度为(40~45)℃^[5,6],打开恒温系统开关,对装置进行预热(15~20)min;(2)将装入小鼠的固定器嵌入箱体,调节限位条的螺旋杆将小鼠固定,同时将小鼠尾部用固定簧片固定在注射台斜面上,使小鼠一侧的尾静脉朝上;(3)打开照明系统开

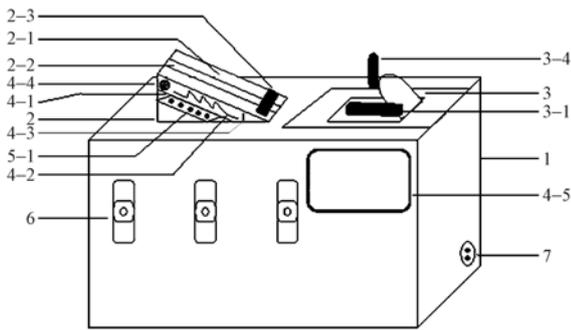
关,观察小鼠尾静脉舒张状况,调整小鼠尾巴的位置待其尾静脉在灯光照射下清楚可见时,进行尾静脉注射操作;(4)完成 1 只小鼠的尾静脉注射后,将小鼠固定器取下,另一个装好小鼠的固定器重新嵌入箱体,重复上述步骤 1~3。

2 结果

在室温相同的情况下,自然光照射下的小鼠尾静脉不能清楚看见,对于注射位置不能准确把握,如图 3;采用本装置对小鼠尾静脉进行保温及集中照明,可以清楚地看到尾静脉,如图 4,这对于注射操作提供了极大的便利,提高了注射准确性及速度。

3 讨论

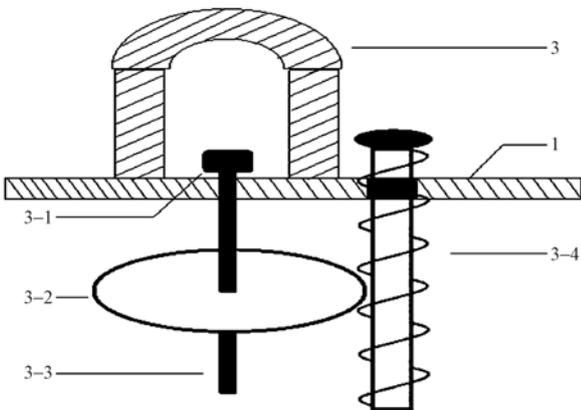
采用传统方式进行尾静脉注射操作时,环境温度对于小鼠尾静脉舒张程度有很大的影响,通常用



1.箱体 2.注射台 2-1.不透光固定条 2-2.注射凹槽 2-3.固定簧片
3.嵌入式小鼠固定器 3-1.小鼠躯体限位条 3-2.齿轮 3-3.连杆 3-4.螺旋杆
4.恒温系统 4-1.加热隔层 4-2.加热丝 4-3.温度感应探头 4-4.注水孔
4-5.温度控制器 5.照明系统 5-1.LED灯珠 6.开关 7.电源插口

图 1 装置主体结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the astructure of the device



1.箱体 3.嵌入式小鼠固定器 3-1.小鼠躯体限位条
3-2.齿轮 3-3.连杆 3-4.螺旋杆

图 2 小鼠固定器结构示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the astructure of the mouse holder



图 3 自然光线下的鼠尾

Fig. 3 The mouse tail seen under normal light



图 4 使用本装置时的小鼠尾部

Fig. 4 The mouse tail seen in the device

(40~45)℃的温水浸泡^[7]小鼠尾部或者用 70% 左右的乙醇^[3]擦拭来扩张小鼠的尾静脉,然后需要将小鼠尾部擦干再进行注射操作。采用本装置对小鼠进行尾静脉注射时,只需提前预热好装置,然后将小鼠尾部直接嵌入到注射凹槽里,利用斜面下部的固定簧片对小鼠尾巴根部进行轻微压迫,既起到了固定作用,也能对血管中的血液流动形成一定的阻碍,使尾静脉舒张;在恒温系统和照明系统的辅助下能清楚地看到小鼠尾静脉,操作快速简单,对于环境温度没有很大的要求。

在注射操作前对小鼠进行牢固可靠的固定是尾静脉注射成功的一个重要条件。传统的固定方式一般是采用筒形容器来限制小鼠的躯体,在筒形容器的两端分别开口作为小鼠的呼吸孔和尾部预留孔。该方法容易导致小鼠躯干扭动,易对其尾部造成伤害进而影响尾静脉注射的操作。本装置借鉴传统固定方式,在小鼠固定器中内置了一个小鼠限位条,通过一侧的螺杆来对其进行高度调节,对小鼠的胸腹部进行限位固定,能适应不同体型的小鼠同时又能避免小鼠躯体扭动造成的伤害;此外,在小鼠固定器的后部还设有一个 30°~40°倾角的注射台,注射台的斜面上有顺尾部方向的注射凹槽,斜面下部有一个固定簧片,配合上部的另一个固定簧片,能对小鼠尾部进行可靠的固定。需要注意的是在固定小鼠尾部时需将小鼠尾部轻微翻转以使一侧的尾静脉朝斜上的角度,该角度既能让尾静脉在灯光照射下清楚显现又能使尾静脉注射操作顺利进行。

一般进行小鼠尾静脉注射操作时,在使用筒形容器固定了小鼠躯体之后,实验操作者用左手的手指相互配合将小鼠尾部拉直并固定,右手持 1 mL 注射器使针头和小鼠尾静脉呈近平行(小于 15°)角度,从小鼠尾部 1/3 处进入其中,回抽注射器有回血后表明刺入成功即可进行药物推注^[5,8-9]。应用该方法进行尾静脉操作时手指拉拽小鼠尾部的力度

不好掌握,容易对小鼠尾部造成伤害,且尾部与注射器针头的角度不好控制,尤其对于新手来说更是如此。角度不合适容易造成针头穿透血管而导致注射失败。通过多次试验,最终确定本装置注射台的倾角在 30°~40°为宜,该角度最适合手持注射器进行注射操作。加之注射台上的注射凹槽、固定簧片以及改进的小鼠固定器多方位地对小鼠进行固定,使得注射操作更加稳定快速。

传统注射操作时,1 只小鼠注射完后从固定器中释放出来,再用同一个固定器固定下 1 只小鼠,在连续操作方面有诸多不便。改进后的小鼠固定器设计成嵌入式,能够快速从该装置的面板上固定或取下,在实验过程中准备多个小鼠固定器就能实现小鼠尾静脉注射操作的快速连续进行,进一步地提高了实验效率。

参考文献:

- [1] 余涛,曾阳,孙玉侠,等. 一种小鼠尾静脉注射装置 [P]. 中国, 201520319833.4[P]. 2015-11-04.
- [2] 陈育尧,黄雪玲. 小鼠尾静脉注射法 [J]. 毒理学杂志, 2008; 22(04): 311-312.
- [3] 侯春梅,韩笑,张及禄,等. 小鼠尾静脉注射的操作体会 [J]. 军事医学,2011; 35(04): 321.
- [4] 施文,孙永强. 小鼠尾静脉注射和采血简易固定装置的制作和使用方法 [J]. 免疫学杂志,2011; 27(9): 807-808.
- [5] 王玖恒,张园,谭乐诚,等. 一种小鼠尾静脉注射的新方法 [J]. 广西中医学院学报,2012; 15(02): 155-156.
- [6] 蔡陈之,陈凯琳. 小鼠尾静脉注射的几点体会 [J]. 科技向导, 2010; (06): 41.
- [7] 苏丽娜,郭剑伟,饶光玲,等. 小鼠尾静脉注射与断头取血实验技术的改进 [J]. 大理学院学报, 2010; 9(6): 25-27.
- [8] 嵇承栋,熊源长,郭旋,等. 实验大鼠固定装置的设计及尾静脉注射的方法研究 [J]. 中国基层医药,2013; 20(22): 3371-3372.
- [9] 高润娣. “桑拿”式小鼠尾静脉注射的方法 [J]. 解剖学杂志,2014; 37(06): 827-828.

[修回日期]2016-06-20



中国实验动物从业人员的编制

孔琪^{1,2}, 郑志红³, 魏强¹, 秦川^{1,2}

(1. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021;
2. 全国实验动物标准化技术委员会, 北京 100021; 3. 中国医科大学实验动物部, 沈阳 110001)

【摘要】 实验动物科学发展对生物医学、药学等领域研究起到支撑作用, 是衡量一个国家科技水平的重要标志。从业人员素质直接影响实验动物行业发展的速度和质量。本标准制定的目的是规范实验动物从业人员要求, 加强培训和资质认证工作, 以推动从业人员素质提高。

【关键词】 实验动物; 从业人员; 标准; 教育; 培训

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0085-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.017

Establishment of the Standard for Laboratory Animal Practitioner in China

KONG Qi^{1,2}, ZHENG Zhi-hong³, WEI Qiang¹, QIN Chuan^{1,2}

(1. Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College; 2. National Technical Committee 281 on Laboratory Animal Science of Standardization Administration of China, Beijing, 100021, China;
3. Department of Laboratory Animal, China Medical University, Shenyang 110001)

【Abstract】 The development of laboratory animal science plays a supporting role in the biomedical field, pharmacy and other fields. It is an important symbol to measure the level of science and technology in each countries in the world. The quality of employees directly affects the speed and quality of the development of laboratory animal industry. The purpose of this standard is to regulate the requirements of animal practitioners, to strengthen the training and qualification certification, and to promote the quality of employees.

【Key words】 Laboratory animal, Practitioner, Standard, Education, Training

1 编制背景

经过30多年的发展,中国的实验动物从业人员达30万人以上,其中在实验动物专业机构工作的从业人员在两万人以上,其他为从事动物实验的从业人员。国内不少省市都开展了实验动物从业人员教育培训工作,并开发了在线考试系统^[1-8]。国家科技部设立课题,资助建立了中国实验动物人才培

训考核信息系统,并开始投入使用^[9]。

实验动物从业人员专业背景较杂,有医学、药学、中医药学、兽医学、生物学等学科,实验动物专业的人员极少,绝大多数从业人员对实验动物科学缺乏系统的了解。实验动物从业人员普遍面临以下问题:第一,实验动物从业人员缺乏所从事岗位的职业技能;第二,实验动物机构缺乏对从业人员专业技能培训;第三,现有的专业培训缺乏针对性、

【基金项目】 中央科研基本业务费(DWS201515);国家卫生计生委行业科研专项(201302006)。

【作者简介】 孔琪(1978-),助理研究员,主要研究方向为实验动物标准化、信息化。E-mail:latc281@163.com。

【通讯作者】 秦川,研究员,博士生导师,主要研究方向为实验病理学。E-mail:qinchuan@pumc.edu.cn。

实用性;第四,实验动物从业人员队伍的规模越来越大,但是没有被收入国家职业名录,实验动物从业人员晋升职称面临困难;第五,实验动物从业人员大多缺乏本专业的系统教育,行业内也缺少针对各类从业人员的专业培训机构,导致实验动物从业人员缺乏行业认同感。中国需要对实验动物从业人员进行分类,有针对性的开展技术培训并认定其资质。

制定本标准是基于实验动物行业的工作性质需要,是为了提升实验动物从业人员职业素养和技能水平。其目的不是为了与单位职称挂钩,也不是单纯为了提升从业人员的工资水平。实验动物从业人员资格培训和资质认定是一个行业技能证明,也是这个职业继续学习的需要。本标准参考了美国、欧盟、日本等国家实验动物从业人员分类和资质认定的资料。

2 法规依据

《实验动物管理条例》(国家科委 2 号令)第二十七条规定,“地方各级实验动物工作的主管部门,对从事实验动物工作的各类人员,应逐步实行资格认可制度”。条例要求:(1)对实验动物从业人员实施资格认可;(2)实行资格认可的对象是从事实验动物工作的各类人员,应该对从业人员分类认可^[10]。本标准的制定可为国家实验动物主管部门制定《实验动物从业人员管理办法》提供标准依据。

《实验动物质量管理办法》第十条之 6.0 规定“具有保证正常生产和保证动物质量的专业技术人员,熟练技术工人及检测人员,所有人员持证上岗”。第十一条之 4.0 规定“有经过专业培训的实验动物饲养和动物实验人员”^[11]。

根据国家劳动和社会保障部颁布的《国家职业标准制定技术规程》规定:“各职业的等级划分应按照从业人员的职业活动范围、工作责任和工作难度来确定。根据实际情况,可不设立高等级或低等级。”^[12]”

3 内容编制

3.1 从业人员分类

根据实验动物从业人员职能划分,参考美国、欧盟等国的分类情况,中国实验动物从业人员分为实验动物技术人员、实验动物管理人员、实验动物医师、实验动物研究人员、实验动物辅助人员、实验

动物阶段性从业人员六大类(表 1)。

中国自然科学体系的从业人员一般分为研究系列和实验系列,本标准中相应设为实验动物研究人员和技术人员。实验动物技术人员、研究人员和实验动物医师根据实际需要和国家职业分类特点设为初、中、高三级。实验动物管理人员根据实际需要设为管理师和高级管理师两级。增设了实验动物辅助人员、实验动物阶段性从业人员,未做分级要求(表 1)。

表 1, A、B、C、D 类考试中字母只是一个分类代码,具体的考试要求和内容由国家级实验动物学会制定。参考来源中所对应的欧美国家标准类别,也只是参考,结合中国现状,并非完全照搬,不可直接等同^[13-20]。本标准中的人员分类尽量做到有参考,结合中国现状,可以不断完善。

3.1.1 实验动物技术人员:指从事实验动物饲养、动物实验技术工作的人员。分为初、中、高三级,不设技术工人。分别是实验动物助理技师(Assistant Laboratory Animal Technician, ALAT);实验动物技师(Laboratory Animal Technician, LAT);实验动物技术专家(Laboratory Animal Technologist, LATG)。技术工人经过培训考核后直接评定实验动物助理技师。国家职业名录里的医学实验动物饲养工(初、中、高)已经不符合中国现状和行业发展需要,可由此系列替代。该分类主要参考了美国实验动物学会(AALAS)的分类标准中的 ALAT、LAT、LATG,有较为成熟的培训资料和资质水平评价指标作为参考。

3.1.2 实验动物管理人员:指从事实验动物和动物实验设施运行及资源管理工作的人员。分为两级,实验动物管理师和高级管理师。实验动物管理师主要参考美国实验动物学会(AALAS)设立的实验动物资源管理经理(the Certified Manager Animal Resources, CMAR)。考虑到管理人员还要有上升空间,所以增加了实验动物高级管理师,相当于专家级别的实验动物管理师。

3.1.3 实验动物医师:指从事实验动物疾病预防、诊断和治疗,护理和动物福利相关工作的人员。按照中国职业通用分类法,分为三级,实验动物助理医师、实验动物医师和实验动物高级医师。该分类结合国情,参考了中国执业兽医师、执业医师和美国、欧盟、日本的国家实验动物医师培训和认证资料。本标准中实验动物助理医师相当于执业助理兽医师,实验动物医师相当于执业兽医师,实验动

物高级医师是专家级别的实验动物医师,相当于欧美国家实验动物医学学会的“认证医师”(Diplomate)。

3.1.4 实验动物研究人员:指从事实验动物科学、技术研究工作的人员。按照中国职业通用分类法,分为三级,实验动物初级研究员(相当于研究实习员)、实验动物中级研究员(相当于助理研究员)和实验动物高级研究员(相当于副高级和高级研究员)。该分类参考了欧盟实验动物学会联合会(FELASA)的动物实验人员(Category B)、动物实验指导人员(Category C)和实验动物专家(Category D)系列。

3.1.5 实验动物辅助人员:指从事实验动物设施、设备运行维护、相关产品生产、运输、经营和废弃物处理等工作的人员。又可以分为技术工人系列和工程师系列,包括锅炉工、电工、网络工程师等工种。国家有统一的职业资格考试,通常不会跟实验动物直接接触,故在本标准中不做培训和考试要求。

3.1.6 实验动物阶段性从业人员:指在工作中的某个阶段(通常为 1 年以内)从事实验动物或动物实验的医师、进修生等人员。临时从事实验动物行业工作 1 年以内的人员,主要为因工作需要,暂时或偶尔开展动物实验的人员。欧盟各国任何参与或接触到动物实验的研究人员、学生都要获得 FELASA

的认证。这类人员虽然不是长期从事实验动物工作,但是规模庞大,有必要单列。

3.2 从业人员资格要求

3.2.1 基本要求:根据中国各地区实验动物从业人员的基本现状制定。

3.2.2 工作年限、考试要求及能力要求:

3.2.2.1 实验动物技术人员:主要参考美国实验动物技术人员资格要求。由于中国实验动物发展尚处于起步阶段,结合全国实验动物从业人员的基本状况,对实验动物技师要求相对较低,要求已经获得实验动物助理技师的人员,从事实验动物工作 2 年及以上,通过相应考试,或无助理技师证,但具有本科学历,具有实验动物工作经历半年及以上,并通过相应考试,即可获得实验动物技师证书。

考虑到未来职业发展需要,对各类从业人员中的最高级资质的学历要求较高,例如本标准要求具有实验动物技师证书,同时具有大专及以上学历(美国要求具有高中学历就可以),继续从事实验动物工作 2 年及以上,或有研究生学历,从事实验动物工作 2 年及以上,通过相应考试才可获得实验动物技术专家证书,其他分类人员资质要求也采纳了类似的原则。表 2 列出实验动物技术人员各级别的能力要求。

表 1 中国实验动物从业人员分类

| 从业人员分类 | 资格名称 | 考试要求 | 参考来源 |
|-------------|-----------------|---------|-----------------------|
| 实验动物技术人员 | 实验动物助理技师(ALAT) | A-1 类考试 | ALAT(美国 AALAS) |
| | 实验动物技师(LAT) | A-2 类考试 | LAT(美国 AALAS) |
| | 实验动物技术专家(LATG) | A-3 类考试 | LATG(美国 AALAS) |
| 实验动物管理人员 | 实验动物管理师(MAR) | B-1 类考试 | CMAR(美国 AALAS) |
| | 实验动物高级管理师(SMAR) | B-2 类考试 | 自设类别 |
| 实验动物医师 | 实验动物助理医师(ALAV) | C-1 类考试 | 中国执业助理兽医师 |
| | 实验动物医师(LAV) | C-2 类考试 | 中国执业兽医师 |
| | 实验动物高级医师(SLAV) | C-3 类考试 | Diplomate(美国 ACLAM) |
| 实验动物研究人员 | 实验动物初级研究员(JLAR) | D-1 类考试 | Category B(欧盟 FELASA) |
| | 实验动物中级研究员(LAR) | D-2 类考试 | Category C(欧盟 FELASA) |
| | 实验动物高级研究员(SLAR) | D-3 类考试 | Category D(欧盟 FELASA) |
| 实验动物辅助人员 | 技术工人系列、工程师系列 | 不做要求 | 自设类别 |
| 实验动物阶段性从业人员 | 医师、进修生、研究生等 | 不做要求 | 自设类别 |

注:AALAS;美国实验动物学会(American Association for Laboratory Animal Science);ACLAM;美国实验动物医学学会(American College of Laboratory Animal Medicine);FELASA;欧盟实验动物学会联合会(Federation for Laboratory Animal Science Associations)。

表 2 中国实验动物技术人员的能力要求

| 资格名称 | 考试要求 | 能力要求 |
|----------------|---------|---|
| 实验动物助理技师(ALAT) | A-1 类考试 | 掌握实验动物学及动物福利基础知识,实验动物饲养基本技能,了解实验动物健康、疾病预防与控制、设施管理、动物实验的准备等基本技能。 |
| 实验动物技师(LAT) | A-2 类考试 | 掌握实验动物的繁育和动物实验基本操作技术,熟悉实验动物健康、疾病预防与控制、动物福利、设施管理、疾病模型动物基本概念和特征、饲养环境的检测技术等知识。 |
| 实验动物技术专家(LATG) | A-3 类考试 | 在实验动物技师的基础上,更进一步,并具有一定的组织、管理与培训实验动物助理技师和技师的能力。 |

3.2.2.2 实验动物管理人员:实验动物管理师参考美国实验动物管理人员(CMAR)资格要求。本标准制定时将研究生和本科生有所区别,本科生年限要求同 CMAR,研究生学历工作年限缩减,要求从事实验动物工作 3 年,管理工作 2 年,并通过相应考试即可获得实验动物管理师证书。对实验动物管理师,增加了具有对实验动物设施运行管理与维护的基本知识和基本技能,以及解决常见问题的管理能力的要求。

实验动物高级管理师:考虑到管理人员还需要上升的空间,所以增加实验动物高级管理师,即在实验动物管理师的基础上继续从事实验动物管理工作 3 年及以上的,通过相应考试即可晋升为实验动物高级管理师,年限条件相当于技术或管理岗位的副高级工作年限。对实验动物高级管理师,增加了具有对实验动物从业人员进行相关的培训、人员调配及组织实施的能力和承担或参与实验动物相关课题研究能力的要求。

3.2.2.3 实验动物医师:结合美国实验动物医师从业资格要求、分类方式,美国实验动物医学会有证会员的资质要求以及中国兽医分类要求,将实验动物医师分为实验动物助理医师、实验动物医师和实验动物高级医师三类。

本标准中实验动物医师的年限和资质要求设立如下:

(1)实验动物助理医师:参考美国兽医技术员学历要求,即具有兽医学相关专业专科以上学历的人员,从事实验动物工作 1 年以上,并通过相应考试。

(2)实验动物医师:参考中国医师和兽医职业医师考试资格要求,依据学历不同设立不同工作年限的要求,并在此基础上通过相应的考试。

①获得实验动物助理医师证书或国家执业助理兽医师证书后,从事实验动物工作 2 年以上并通过相应考试;②具有兽医学相关专业本科及以上学历或获得国家执业兽医师后,从事实验动物工作 1 年以上,并通过相应考试;

(3)实验动物高级医师:工作年限相当于美国实验动物医学会的认证医师,但本标准的起点稍低,为后续提升预留了空间。即获得实验动物医师证书后,继续从事实验动物工作 3 年以上并通过相应考试即可获得实验动物高级医师证书。

实验动物医师能力要求参考美国实验动物医

学会考试要求,以下几个方面为基础:

①实验动物学及相关学科基础知识;②实验动物福利、伦理和法规相关知识;③实验动物疾病的诊断、监测、预防、治疗;④实验动物操作技术。不同级别要求掌握的程度逐级提高,实验动物高级医师应具备为实验动物从业人员提供专业指导及培训的能力。

3.2.2.4 实验动物研究人员:实验动物初级研究员要求在获得专业技术职称的基础上通过相应的实验动物专业考试,中级和高级研究员要求在获得技术职称的基础上有 2 年实验动物工作经历并通过相应考试。实验动物研究人员的年限和资质要求方面参考欧盟实验动物学会联合会(FELASA)制定的 Category C-科学家(能够指导动物实验)和 Category D-专家(实验动物专家)的相关要求。实验动物中级研究员参考 Category C 的相关要求,实验动物高级研究员参考 Category D 的相关要求^[16-17]。

实验动物研究人员需要以下几方面为基础:

①实验动物一般生物学特性、饲养、微生物学、疾病学等基本相关知识;②实验动物福利、伦理和法规相关知识;③动物实验基础理论知识及实验操作技术。

要求掌握的程度也是逐级升高,实验动物高级研究员应具备独立承担实验动物相关课题研究的能力,能够独立进行科研设计、课题实施,并为实验动物研究人员提供专业指导及培训等。

3.2.2.5 实验动物辅助人员:

依据从事的专业不同要求其通过国家统一的职业资格考试。辅助人员通常不会直接接触实验动物,故在本标准中只要求经过实验动物基础知识及基本技能培训,不做实验动物方面考试要求。要求熟练掌握相关专业领域知识和技能并具有解决实际问题的能力。

3.2.2.6 实验动物阶段性从业人员:由于是暂时性接触动物实验,因此只要求经过实验动物基础知识及基本技能培训并获得所从事职业的阶段性从业人员资格证书。要求了解实验动物基本知识,掌握所从事职业的基本技能即可。

3.3 资格培训及评定

3.3.1 资格培训:为了确保实验动物从业人员资格培训的灵活性和有效性,明确了国家级实验动物学会具有对各级实验动物培训机构的审批权,经审批合格的培训机构方可进行实验动物从业人员资格

培训及考试。培训机构的资质要求由国家级实验动物学会制定。

3.3.2 资格评定:从业人员经过资格培训及考试后,最终的资格评定及证书颁发由国家级实验动物学会统一执行,有利于统一监管。资格晋升评定机构应针对不同分类、不同级别的从业人员制定每年需完成的继续教育学分的要求,作为推动从业人员提升专业能力的形式和手段。继续教育的形式灵活,包括国家级、省级相关专业的继续教育、会议及培训,从业人员易于完成。

3.4 管理要求

3.4.1 标准中明确规定了国家级实验动物学会为实验动物从业人员职业培训和职业技能鉴定、考核和颁发证书的行业主管机构。

3.4.2 为了确保实验动物从业人员职业培训和职业技能鉴定、考核等的公平化、合理化和规范化,国家级实验动物学会负责对培训机构进行评估和认证以及培训课程的制定。

4 存在争议

4.1 实验动物技术人员系列分类

有专家建议将实验动物技术人员分为实验动物技术人员和动物实验技术人员,每类人员再分为初、中、高三级。也有专家建议实验动物技术人员统一分初、中、高三级。无论实验动物还是动物实验,技术人员都是掌握基本的实验动物理论知识,掌握和从事一些基本的饲养和实验操作,复杂深入的开展动物实验的多数是研究人员。后一种技术人员分类方式与美国的技术人员分类相似,美国实验动物技术人员的这种分类、考核及管理也比较成熟,因此最终实验动物技术人员分类借鉴了美国实验动物技术人员的分类方式。

4.2 实验动物医师的命名及分类

关于“实验动物医师”名称,有专家建议改为“实验动物兽医师”,经反复讨论决定采用“实验动物医师”。原因:第一,兽为带皮毛哺乳动物的总称,兽医主要学习畜禽动物疾病,对实验动物小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠、兔、犬、猴等的疾病涉及不多,实验动物还包括水生动物、模式动物、媒介生物等超出兽医诊疗范围外的物种,应与兽医区分对待;第二,实验动物应用主要在医学领域(80%),从事实验动物医师的兽医人员还需要了解医学和实验动物医学知识,且容易被医学领域接受;第三,实验动

物医师对应的学科是实验动物医学(Laboratory Animal Medicine);第四,兽医包括宠物医师、畜牧兽医,并非给动物看病的都叫兽医。无论是兽医还是人医,都属于大医学范畴,诊疗对象不同而已。

关于实验动物医师分类,有专家建议参考美国实验动物医师分类要求,分为一类。经过反复讨论,参考美国实验动物医学会有证会员的资质要求以及中国兽医分类要求,将实验动物医师分为实验动物助理、实验动物医师和实验动物高级兽医师三类。便于今后与中国的职业标准对接。

4.3 实验动物助理技师学历要求

有专家对实验动物助理技师具有中专及以下学历提出疑问,相当于对实验动物助理技师没有学历要求。该设置是考虑到全国东西部差异现状,还有部分实验动物饲养人员为小学、初中水平。这么规定是为了放开门槛,鼓励中专以下学历者寻求技术培训机会,提高技术水平。学历要求只是一个方面,还需要经过培训和考试才能获得实验动物助理技师的资格,对于没有经过专业教育的从业人员,考试会严格把关。

4.4 从业人员资质证书的有效期

有专家建议设置证书有效期,比如5年。参考农业部《执业兽医管理办法》和《中华人民共和国执业医师法》规定,暂时不设有有效期要求。而是要求每年至少接受一次继续教育活动来维持资格的有效性,违反此要求,资格自动失效。

5 未来展望

21世纪最重要的是人才。以提高实验动物工作者和实验动物使用者的管理、兽医、实验动物技术培训为重点的职业培训,在欧美十分广泛,在提高实验动物学整体水平方面起到了很好的作用。中国实验动物从业人员在职业培训方面专业教育水平低、规模小,继续教育机会少,技能培训不完善,高水平人才教育缺乏,资质认证体系不完善。这已经严重影响了中国实验动物行业健康发展,进而影响了实验动物行业对生物医药、人类健康、食品安全等相关行业发展的支撑作用。

中国实验动物学会正在建立不同层次人才培养体系,已经开展了中级实验动物技师培训和资质认证工作。以后逐渐扩展到初级、高级实验动物技师,实验动物医师,实验动物管理师等技术培训和资质认证。北京、湖北、江苏等地也在此方面进行

了有益的尝试。科技部在科技支撑计划中支持过实验动物人才体系建设。

人才是实验动物学发展的基础,国际同行之间的竞争,很大程度上是人才竞争。在建立中国符合国际标准的实验动物学和产业过程中,不仅需要具有较强专业知识的高级管理人才、实验动物资源开发人才、质量检测人才,还需要建立中国实验动物标准化的研究人才。同时,更需要培养与造就前沿科研领域进行创造性研究的实验动物顶尖人才。建立中国特色的实验动物从业人员分类培养体系迫在眉睫。本标准的制定,为中国实验动物从业人员分类和等级培训指明了方向,必将在规范实验动物从业人员分类和针对不同人群开展专业技能培训发挥重要作用。

参考文献:

- [1] 李志满,柳怀玉,洪花,等. 关于实验动物从业人员岗位培训的几点建议[J]. 实验动物科学, 2011, 28(5):48-50.
- [2] 郑红,角建林,沈培清. 云南实验动物从业人员培训与教育的探讨[J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(1):46-48.
- [3] 胡娟峰,战大伟,江其辉,等. 实验动物从业人员培训的思考与展望[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(12):785-787.
- [4] 徐增年,刘福英,李兴琴,等. 河北省实验动物从业人员现状及教育培训对策[J]. 实验动物科学, 2010, 27(5):59-61.
- [5] 王锡乐,迟晓丽,刘文菊,等. 实验动物从业人员培训考核系统的应用与推广[J]. 实验动物科学, 2015, 32(6):50-54.
- [6] 周娉,徐琳本. 湖南省实验动物从业人员教育培训现状及对策[J]. 实验动物科学, 2013-12-28
- [7] 吴培林,褚晓峰,吴宝金,等. 浙江省实验动物从业人员培训基地建设与实践[J]. 医学教育探索, 2010, 09(6):859-861.
- [8] 刘万策,王晓明,李会萍,等. 实验动物从业人员培训考试系统的设计[J]. 科技信息, 2013(16):78-79.
- [9] 李根平,吕建,贺争鸣,等. 中国实验动物人才培训考核信息系统的建立研究[J]. 实验动物科学, 2012, 29(4):47-49.
- [10] 国家科委. 实验动物管理条例(国家科委 2 号令) [OL] (2016-04-06). http://www.gov.cn/gongbao/content/2011/content_1860757.htm.
- [11] 国家科委. 实验动物质量管理办法 [OL] (2016-04-06). <http://www.most.gov.cn/kjzc/gjkjzc/kjtjybz/201308/P020130823579541563126.pdf>.
- [12] 国家劳动和社会保障部. 国家职业标准制定技术规程 [OL] (2016-04-06). <http://jnjd.mca.gov.cn/article/zyjd/zybz/201302/20130200420843.shtml>.
- [13] FELASA Accreditation Board for Education and Training (E&T) Board. FELASA 2015 Recommendations for the Accreditation of Education and Training Courses in Laboratory Animal Science [OL] (2016-04-06). http://www.felasa.eu/media/uploads/E&T_Recommendations_Accreditation_Revised_20150601.pdf.
- [14] Convenor J, Bukelskiene V, Chambrier P, et al. FELASA recommendations for the education and training of laboratory animal technicians: Category A [J]. *Laboratory Animals*, 2010, 44: 163-169.
- [15] Nevalainen T, Dontas I, Forslid A, et al. Recommendations for education and training: Categories B [J]. *Laboratory Animals*, 2000, 34(3):35-42.
- [16] FELASA. FELASA recommendations on the education and training of persons working with laboratory animals: Categories A and C. Reports of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on Education accepted by the FELASA Board of Management [J]. *Laboratory Animals*, 1995, 29(2):121-131.
- [17] Nevalainen T, Berge E, Gallix P, et al. Guidelines for education of specialists in LAS: category D [J]. *Laboratory Animals*, 1999, 33:1-15.
- [18] Management Certification [OL] (2016-04-06). https://www.aalas.org/certification/management-certification#.VwdeNFR6_b1
- [19] Hickman D, King-Herbert A, Murphy SJ. The Laboratory Animal Boards Study Group: A Multifaceted Tool for Preparation for the American College for Laboratory Medicine Board Examination [J]. *J Am Assoc Lab Animal Sci*, 2006, 45(4):33-39.
- [20] AALAS: Technician Certification. [OL] (2016-04-06). https://www.aalas.org/certification/technician-certification#.VwdeEIR6_b0.

[修回日期] 2016-06-20