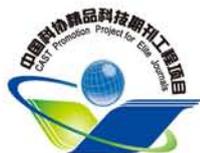


ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

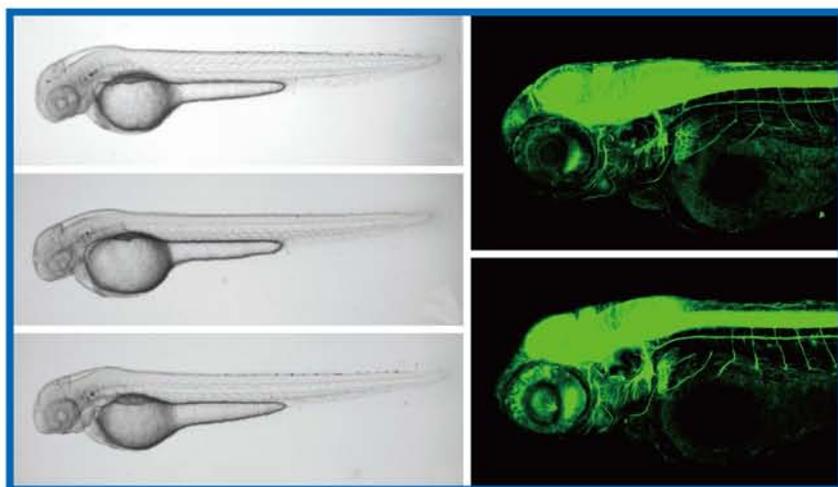


ACTA LABORATORIUM
ANIMALIS SCIENTIA SINICA

中国实验动物学报

ZHONGGUO SHIYAN DONGWU XUEBAO

第24卷 第6期 / Vol.24 No.6



数据库:

中国科学引文数据库CSCD
中文核心期刊要目总览(北大图书馆)
中国科技论文统计源期刊
世界卫生组织西太平洋地区医学索引
中国核心期刊(遴选)数据库
中国学术期刊综合评价数据库
中国生物医学文献数据库
万方数据资源系统中国数字化期刊群
美国化学文摘

主办单位:

中国实验动物学会

中国医学科学院医学实验动物研究所

ISSN 1005-4847



2016

6

中国实验动物学报

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

双月刊 1993年6月创刊

第24卷 第6期 2016年12月30日出版

主管 中国科学技术协会
主办 中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所
主编 秦川
编辑 《中国实验动物学报》编辑委员会
出版与发行 中国实验动物学会
100021,北京市朝阳区潘家园南里5号
电话:(010)67779337
传真:(010)67770690
E-mail: a67761337@126.com
网址: http://zggydw.alljournal.ac.cn/sydwbyjyx/ch/index.aspx
照排 同方知网(北京)技术有限公司
印刷 北京昌平百善印刷厂
邮发代号 2-748
订购 《中国实验动物学报》编辑部
100021,北京市朝阳区潘家园南里5号
广告经营许可证号 京朝工商广字第8131号
定价 每期20.00元,全年120.00元
中国标准连续出版物号
ISSN 1005-4847
CN 11-2986/Q
2016年版权归中国实验动物学会所有
本刊已加入万方数据网络、中国学术期刊(光盘版)电子杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国科学引文数据库、美国化学文摘、世界卫生组织西太平洋地区医学索引等数据库、中国实验动物信息网,在本刊所支付的稿费中已包含上述网站著作权使用费。编辑部有复制权、发行权、汇编权以及信息网络传播权。本刊电子版出版发行合作:中邮阅读网;www.183read.com
本期执行主编 黄 勃
本期责任编辑 李继平
英文编辑 周传农

目 次

卷终,本期附有总目次

研究报告	
斑马鱼 <i>sat1. a</i> 突变体的鉴定 Δ	万传璐,闫一芳,王鹏,等(551)
藏麻小型猪心梗模型的建立及梗死边缘区的 基因表达谱分析*	谭伟江,王静,李想,等(558)
七甲川菁近红外荧光染料对胃癌原位移植模型的靶向识别	赵勇,张彩勤,赵宁宁,等(567)
广西和云南树鼩群体遗传多样性的比较分析	唐艳萍,曹骥,杨香娣,等(572)
程序化冷冻前后小鼠孵化囊胚和休眠胚胎的 <i>Hba-α</i> 蛋白分布和差异表达	刘迪,倪和民,顾美超,等(579)
靶向抑制巨噬细胞 Act1 表达对溃疡性结肠炎的作用*	邹一贺,王丽京,邓慧君,等(585)
白色念珠菌经口感染 ICR 小鼠建立系统性感染模型*	罗银珠,潘金春,何丽芳,等(591)
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌系统性感染小鼠模型的制备*	邓少嫦,罗银珠,李航,等(596)
人参辅酶 Q ₁₀ 防晒霜对紫外线损伤小鼠的保护作用*	吴海游,邱楚群,梁美婷,等(601)
条件性感染金黄色葡萄球菌关节炎小鼠模型的建立和分析*	叶秋莹,李舸,罗银珠,等(607)
直接多肽结合试验组合人细胞系活化试验预测 皮肤致敏物的探讨	柯逸晖,陈彧,程树军,等(611)
枸杞多糖对自发乳腺癌 MMTV-PyMT 小鼠 肿瘤生长和转移的作用*	李媛媛,亓翠玲,周芷晴,等(618)
电针对 2 型糖尿病合并肾性高血压大鼠模型的疗效*	万斌,孙丽薇,刘蓉,等(622)
西藏小型猪 <i>IGF-1</i> 基因在不同生长发育阶段和 不同组织器官中的差异表达	田雨光,王玉珏,庞炜,等(628)
大鼠机械式胸外按压心肺复苏模型的建立	唐烽,安庆宝,付守芝,等(632)
凝血酶法致大鼠血液高凝态模型的建立	王立文,沈晓洁,吴倩,等(639)
高脂饲喂联合链脲佐菌素诱导的 Beagle 犬糖尿病模型	胡娟,杨扬,米本中,等(643)
高脂高铁致大鼠肝纤维化模型的初探	何宏星,陈洁,黄芳,等(648)
苯污染对大鼠肝肾功能及血核苷酸水平的影响	俞发荣,杨博,李登楼,等(654)
研究进展	
糖皮质激素诱导肾阳虚抑郁症动物模型研究进展	何书芬,居文政,胡浩彬,等(659)
miRNA 与热应激的关系及检测方法进展	郭文晋,连帅,李悦,等(666)
*:疾病动物模型;为了转化医学的技术创制	
Δ:封面文章	
总目次	(670)

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

Bimonthly, Established in June 1993

Volume 24 Number 6, December 30, 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

Editor-in-Chief

QIN Chuan(秦川)

Editing

Editorial Office of ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District,
Beijing 100021
Tel: (010)67779337 Fax: (010)67770690
E-mail: a67761337@126.com

Publishing

Editorial Office of ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District,
Beijing 100021
Tel: (010)67779337 Fax: (010)67770690
E-mail: a67761337@126.com

Undertaker

Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of
Medical Sciences
Department of Laboratory Animal Sciences, Peking Union
Medical College

Printing

Baishan Printing House of Changping, Beijing

Distributor and Mail-order

Editorial Office of ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District,
Beijing 100021
Tel: (010)67779337 Fax: (010)67770690

CSSN

ISSN 1005-4847
CN 11-2986/Q

Copyright 2014 by the Chinese Association for Laboratory
Animal Sciences

CONTENTS IN BRIEF

- Identification of a zebrafish *sat1. a* mutant
..... WAN Chuan-lu, YAN Yi-fang, WANG Peng, et al (551)
- Establishment of a myocardial infarction model and the gene expression profile in peri-infarct area in Juema minipigs
..... TAN Wei-jiang, WANG Jing, LI Xiang, et al (558)
- Tumor targeting of near-infrared fluorescence heptamethine cyanine dye in orthotopically transplanted gastric carcinoma in mice
..... ZHAO Yong, ZHANG Cai-qin, ZHAO Ning-ning, et al (567)
- Comparison of the genetic diversity between Guangxi and Yunnan tree shrew populations (*Tupaia belangeri chinensis*)
..... TANG Yan-ping, CAO Ji, YANG Xiang-di, et al (572)
- Distribution and differential expression of *Hba- α* in mouse normal hatched blastocysts and dormant embryos before and after cryopreservation
..... LIU Di, NI He-min, GU Mei-chao, WANG Li-hong, et al (579)
- Targeted suppression of Act1 in the macrophages ameliorates experimental ulcerative colitis in mice induced by dextran sodium sulfate
..... KUAI Yi-he, WANG Li-jing, DENG Hui-jun, et al (585)
- Establishment of a ICR mouse model of systemic *C. albicans* infection induced by oral inoculation
..... LUO Yin-zhu, PAN Jin-chun, HE Li-fang, et al (591)
- Preparation of a mouse model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection
..... DENG Shao-chang, LUO Yin-zhu, LI Hang, et al (596)
- Protective effect of ginseng co-enzyme Q₁₀ suncream on the ultraviolet radiation-induced skin damage in mice
..... WU Hai-you, QIU Chu-qun, LIANG Mei-ting, et al (601)
- Establishment and analysis of a mouse model of *Staphylococcus aureus*-induced arthritis
..... YE Qiu-ying, LI Ge, LUO Yin-zhu, et al (607)
- Preliminary study for integrating DPRA with h-CLAT to predict skin sensitizers
..... KE Yi-hui, CHEN Yu, CHENG Shu-jun (611)
- Inhibitory effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on tumor growth and metastasis in MMTV-PyMT mouse model of breast cancer
..... LI Yuan-yuan, QI Cui-ling, ZHOU Zhi-qing, et al (618)
- Effect of electroacupuncture on the rat model of type 2 diabetes mellitus combined with renal hypertension
..... WAN Bin, SUN Li-wei, LIU Rong, et al (622)
- Differential IGF-1 gene expression in various tissues at different developmental stages in Tibet minipigs
..... TIAN Yu-guang, WANG Yu-jue, PANG Wei, et al (628)
- Establishment of a rat model of cardiopulmonary resuscitation with mechanical chest compression
..... TANG Yi, AN Qing-bao, FU Shou-zhi, et al (632)
- Establishment of a rat model of blood hypercoagulable state caused by intravenous injection of thrombin
..... WANG Li-wen, SHEN Xiao-jie, WU Qian, et al (639)
- A beagle model of type 2 diabetes mellitus induced by high fat diet and low dose streptozotocin injection
..... HU Juan, YANG Yang, MI Ben-zhong, et al (643)
- A model of high fat and high iron-induced hepatic fibrosis in rats
..... HE Hong-xing, CHEN Jie, HUANG Fang, et al (648)
- Effects of benzene pollution on the liver and kidney function and blood nucleotide level in rats
..... YU Fa-rong, YANG Bo, LI Deng-lou, et al (654)
- Research progress of depression animal models with kidney-yang deficiency induced by glucocorticoid
..... HE Shu-fen, JU Wen-zheng, HU Hao-bin, et al (659)
- Development of detection methods and relationship between miRNA and heat stress
..... GUO Wen-jin, LIAN Shuai, LI Yue, et al (666)



斑马鱼*sat1.a*突变体的鉴定

万传璐¹, 闫一芳², 王鹏², 林宇², 曹羽², 王强^{2*}

(1. 安徽大学生命科学学院, 合肥 230601; 2. 中国科学院动物研究所膜生物学国家重点实验室, 北京 100101)

【摘要】目的 在我们的前期研究工作中,通过 *Tol2* 转座子介导的插入突变,筛选到了一批组织特异性表达绿色荧光蛋白 GFP 的斑马鱼品系。其中一个品系 *Tol2*:20141221*t* 的 GFP 在神经系统中表达,但还没有鉴定到 *Tol2* 转座子插入到基因组什么位置,造成了哪个基因的突变。本文的主要研究目标就是对这一由 *Tol2* 转座子插入诱导的斑马鱼突变品系进行鉴定。**方法** 使用交错式热不对称 PCR (thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR) 鉴定 *Tol2* 转座子插入的基因组位置;利用原位杂交检测被突变的基因的时空表达是否与该品系 GFP 表达具有一致性;筛选鉴定纯合体突变体,并进一步分析该基因突变造成的发育缺陷。**结果** 在该品系中,*Tol2* 转座子插入到了亚精胺/精胺 N1-乙酰基转移酶 1a (*spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1a*, *sat1.a*) 的第八个内含子区域,致使 *sat1.a* 基因转录提前终止。我们筛选到了 *sat1.a* 纯合突变体,但是没有检测到明显的发育缺陷。**结论** 筛选鉴定的 *Tol2* 转座子介导的斑马鱼 *sat1.a* 突变体没有明显的发育缺陷,但可以作为研究神经系统发育的有力工具。

【关键词】 斑马鱼; *Tol2* 转座子; *sat1.a*; 神经系统; 原位杂交

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0551-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.001

Identification of a zebrafish *sat1.a* mutant

WAN Chuan-lu¹, YAN Yi-fang², WANG Peng², LIN Yu², CAO Yu², WANG Qiang^{2*}

(1. School of Life Science, Anhui University, Hefei, 230601, China; 2. State Key Laboratory of Membrane Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101)

【Abstract】Objective In our previous study, we had generated various zebrafish mutant lines with tissue-specific GFP expression by *Tol2* transposon-mediated insertional mutagenesis. Among these mutants, the *Tol2*:20141221*t* line expresses GFP in nervous system, while the position within zebrafish genome where transposon inserted has not yet been identified. The aim of this study was to identify and analyze this genetically modified mutant. **Methods** The transgenic insertion loci in the genome of *Tol2*:20141221*t* line was identified by TAIL-PCR and the spatial and temporal expression profile of the affected gene was examined by *in situ* hybridization. Homozygous mutant of *Tol2*:20141221*t* was generated for exploring related developmental defects. **Results** *Tol2* transposon was inserted into the 8th intron region of *sat1.a* gene, and induced premature transcription termination. The maternal and zygotic mutants of *Tol2*:20141221*t* was generated, while without apparent developmental defects. **Conclusions** We have generated and identified the zebrafish *sat1.a* mutant mediated by *Tol2* transposon. This gene insertion mutant exhibits no obvious developmental abnormalities, but may serve as a powerful tool to study the development of nervous system.

【Key words】 Zebrafish; *Tol2* transposon; *sat1.a*; Nervous system; *in situ* hybridization

Corresponding author: WANG Qiang, E-mail: qiangwang@ioz.ac.cn

Tol2 转座子是 Inagaki 等^[1] 在青鳉鱼 (*Oryzias latipes*) 中发现的一种具有自主转座活性的转座子

元件,主要由末端倒位重复序列 (terminal inverted repeats, TIRs)、亚末端重复序列 (subterminal re-

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (No. 31271532) 资助。

[作者简介] 万传璐 (1988 -), 男, 硕士研究生, 研究方向: 发育生物学。Email: w.chl.chzhz@163.com

[通讯作者] 王强 (1975 -), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事发育信号转导的研究。Email: qiangwang@ioz.ac.cn

peats, SRs)、中间倒位重复序列(internal inverted repeats, IRs)、靶位重复序列(target site duplication)和转座酶基因(transposase gene)五个部分构成。Koi-chi 等^[2]在斑马鱼基因组本身没有 *Tol2* 转座子的情 况下,使用显微注射的方法向单细胞时期的斑马鱼 胚胎中注射带有 *Tol2* 的质粒(含有 TIRs 和 SRs 序 列)和体外合成的 *Tol2* 转座酶 mRNA,发现 *Tol2* 可 以通过发生转座而整合到斑马鱼基因组中,并且能 够遗传给子代。*Tol2* 转座子通过“剪切-粘贴”机 制整合到宿主染色体上,除了需要额外生成一个 8 bp 的靶位重复序列,基本不会引起靶位点的重排和修 饰^[2]。有报道称,*Tol2* 转座子可携带长达 11 kb 的外 源插入片段,而不引起其自身转座活性的降低^[3]。

基于 *Tol2* 的基因捕获技术是通过构造一个包 含外显子剪接接头、EGFP 编码序列及 SV40 polyA 序列的转座子基因捕获载体^[3],然后与体外合成的 *Tol2* 的转座酶 mRNA 共注射。转座子如果插到某 个基因的内含子中,EGFP 编码区与上游外显子发 生剪接,形成融合转录本,因此,EGFP 就会具有与 被捕获基因一致的表达谱^[4]。更为重要的是,*Tol2* 转座子在基因组的随机插入,会干扰被捕获基因的 正常剪接,致使其 mRNA 提前终止。进一步通过基 因鉴定和筛选获得纯合突变体,可以用于被捕获基 因的功能研究。

脊椎动物胚胎发育过程中受到多种基因和信号 通路的参与和调控。组织特异性表达的基因,往往 在相应组织器官形成和维持组织稳态中发挥重要 作用。本文鉴定到由 *Tol2* 转座子介导的基因捕获 技术捕获的 *sat1.a* 突变体。虽然我们没有发现 *sat1.a* 突变体存在明显的发育缺陷,但 *sat1.a* 在神经组织 特异表达的特点使得此突变体可以作为研究神经系 统发育的有力工具。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验所用野生型斑马鱼(*Danio rerio*)为 AB 品系;*Tol2*:20141221t 突变体是由本实验室在 AB 野 生型斑马鱼品系中经过 *Tol2* 转座子介导的基因捕 获获得。胚胎在 Holtfreter 缓冲液中 28.5℃ 培养至 所需时期^[5],斑马鱼幼鱼至成鱼养殖方法参见《The Zebrafish Book》(Westerfield M,2000)^[6]。

1.2 热不对称交错 PCR(TAIL-PCR)

TAIL-PCR 所需的基因组 DNA 由 *Tol2*:

20141221t 品系 F1 代剪尾(1~2 cm),使用快速碱 裂解法(去净水分后加入 10 μL 50 mmol/L NaOH, 经 95℃ 裂解 30 min,再加 1 μL 1 mol/L Tris-Cl 中 和)提取。TAIL-PCR 引物设计及实验方法参照以 前的报道^[7,8]。

1.3 探针制备和整胚原位杂交

以受精后 24 h 野生型胚胎基因组 DNA(单枚胚 胎经快速碱裂解法提取)为模板,以 *sat1.a* ProbeF: 5'-AACACCACCTCCATTGAGTTCT-3'; *sat1.a* Probe R:5'-CGATTTTCTCCGCAGTCCAAAC-3' 为引物,使用 2×Taq MasterMix(CW0682S,康为世纪)扩增出 目的片段,然后通过 T-A 克隆连接到 EZ-T 载体上。 相关质粒经线性化后,使用 RNA 合成试剂盒 ME- GAscript® Kit(AM1334, Ambion)制备反义 RNA 探 针。原位杂交实验操作参照以前的报道^[9]。

1.4 *sat1.a* 基因与 *Tol2* 转座子连锁分析

Tol2:20141221t 品系 F1 代自交后的胚胎中分 别挑选无荧光、弱荧光、强荧光胚胎个体,经快速碱 裂解法提取基因组 DNA。*Tol2* 转座子插入位点两 侧引物 *sat1.a* Insert F1:5'-GCGACTCATAAAGGTA- AGCCGA-3'; *sat1.a* Insert R1:5'-ACAGG- TATATTTCTCTCCACACCTC-3'; *Tol2*-3 (TAIL-PCR 引物):5'-CCT AAGTACTTGTACTTTCACTTG-3'。

1.5 体视显微镜及共聚焦显微镜拍摄

使用荧光体视显微镜(MZ10F, Leica),选择不同发育时期的 *Tol2*:20141221t 品系 F1 代杂合突变 体自交及 F2 代纯合突变体自交产生的胚胎拍摄; 用共聚焦显微镜(LSM 510 META, Zeiss),选取受精 后 72 h F2 代纯合突变体自交产生的胚胎活体拍 照,并以同时期杂合体胚胎为对照,比较二者神经系 统发育是否存在差异。

2 结果

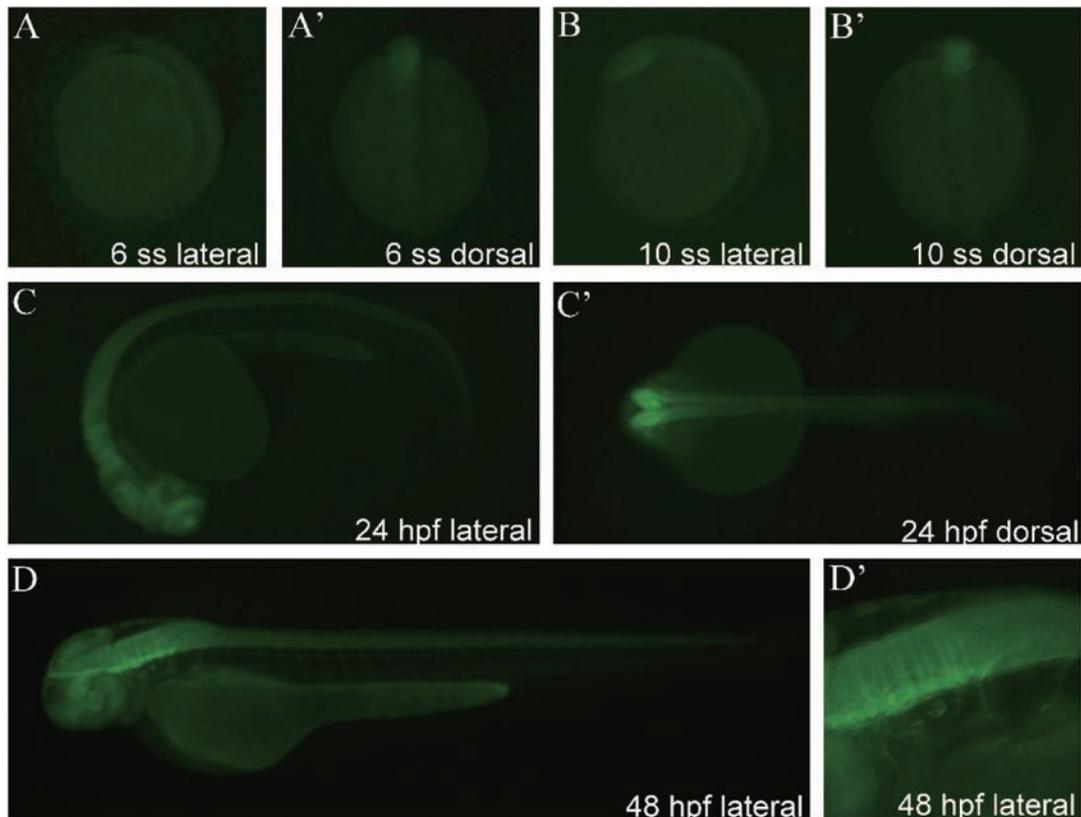
2.1 检测 *Tol2*:20141221t 品系胚胎中 GFP 在不同 发育时期的表达图式

在荧光体视显微镜下,选择 *Tol2*:20141221t 品 系 F1 代杂合突变体与野生型交配产生的有荧光的 胚胎,在 6 体节(6ss)、10 体节(10 ss)、受精后 24 h (24 hpf)、及受精后 48 h(48 hpf)等时期检测绿色荧 光蛋白的表达情况。

Tol2:20141221t 荧光表达起始于神经系统发育 初期,6 体节时期,我们可以看到有少量的荧光出 现,主要集中在胚胎头部(图 1-A 和 A');10 体节时

期,发现荧光由头部沿着体轴向尾部延伸,荧光区域进一步扩大(图 1-B 和 B');受精后 24 h 荧光已经扩展到整个体轴,在脑部(前脑、中脑、后脑)和脊椎上方的主要神经系统上表达(图 1-C),而在脊髓中

却没有表达(图 1-C');受精后 48 h 在脑部、咽部和躯干处可以非常明显的看到荧光特异表达在神经组织(图 1-D 和 D')。



注:(A, A')分别为 6 体节时期侧面观和背面观;(B, B')分别为 10 体节时期侧面观和背面观;(C, C')分别为受精后 24 h 的侧面观和背面观;(D)为受精后 48 h 侧面观;(D')为受精后 48 h 侧面观放大图。

图 1 *Tol2*:20141221*t* 品系在不同发育时期的 GFP 表达图式

Note: (A, A') 6 somite stage, lateral view and dorsal view; (B, B') 10 somite stage, lateral view and dorsal view; (C, C') 24 hpf, lateral view and dorsal view; (D) 48 hpf, lateral view; (D') Higher magnification of head region of the embryos at 48 hpf, lateral view.

Fig. 1 The GFP expression patterns of *Tol2*:0141221*t* line in different developmental stages

2.2 鉴定到 *Tol2*:20141221*t* 品系中 *Tol2* 转座子捕获到的基因为 *sat1.a*

TAIL-PCR 是一种染色体步移技术,利用随机简并引物与由已知序列设计的特异引物组合进行嵌套式 PCR,选择性扩增出特定序列的侧翼未知序列。

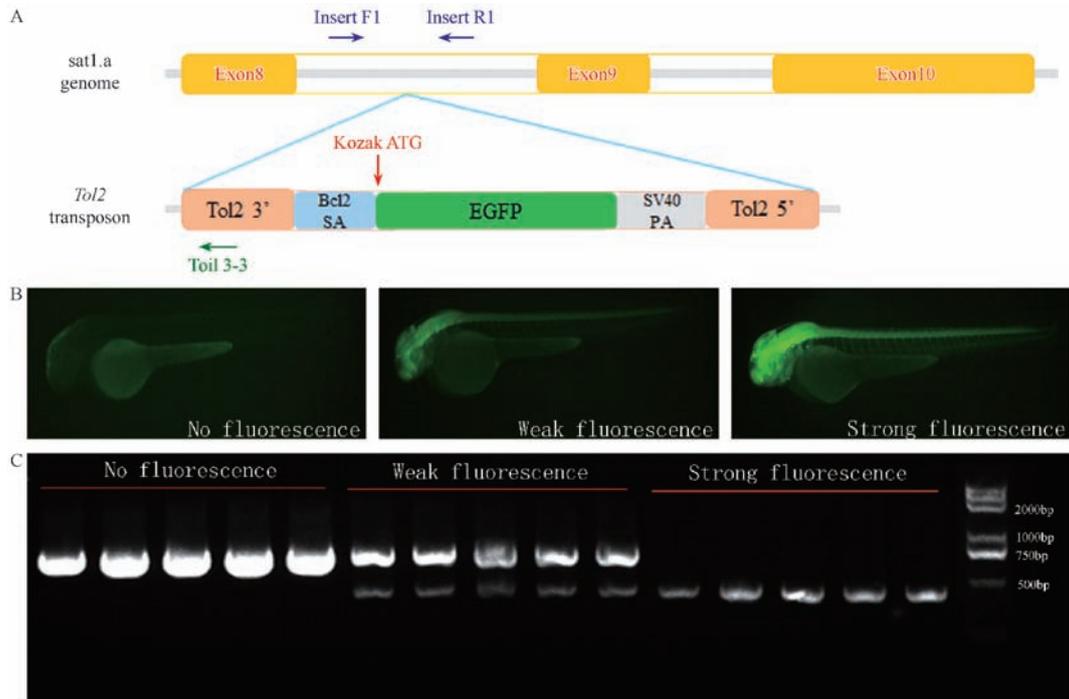
根据文献报道,我们使用 2 × Taq MasterMix 经过 3 轮嵌套 PCR,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,最终在 *Tol2* 5' end 方向获得一段 DNA 片段,以 *Toil* 5-3 (*Tol2* 转座子 3' 端第 3 轮特异引物)为引物测序。测序结果在 Ensembl 上比对,发现所得序列与 *sat1.a* 基因的匹配相似度为 100%,插入位点位于 *sat1.a* 基因的第 8 个内含子内部(图 2-A)。

为了进一步验证 *sat1.a* 基因内部确实插入了

Tol2 转座子,我们做了 *sat1.a* 基因与 *Tol2* 转座子的基因连锁分析实验。首先,在 *Tol2*:20141221*t* 品系 F1 代杂合突变体自交产生的斑马鱼胚胎无荧光、弱荧光和强荧光三种胚胎(图 2-B),数目比例大致为 1:2:1,符合孟德尔遗传定律。随后,我们使用 PCR 的方法对 *sat1.a* 基因与 *Tol2* 转座子进行了连锁分析。预先设计的引物按 1:1:1 加入 PCR 体系,Insert F1 和 Insert R1 可以扩增出野生型片段长度约为 750 bp 的片段,Insert F1 和 *Toil*3-3 可以扩增出突变型片段约 500 bp(图 2-A)。PCR 结果显示无荧光的胚胎只能扩增出野生型片段,强荧光的只能扩增到插入突变型片段,弱荧光既可以扩增出野生型片段也可以扩增出突变型片段(图 3-C)。

以上实验表明 *Tol2* 转座子和 *sat1.a* 基因在位置上是连锁的, *Tol2* 转座子确实是插入到 *sat1.a* 基

因内部, 而且根据 GFP 表达的有无和强弱可以区分野生型及杂合和纯合突变体胚胎。



注: (A) *Tol2* 转座子插入 *sat1.a* 基因的示意图及基因连锁分析引物位置; (B) *Tol2*:20141221t 系 F1 代自交, 受精后 48 h 的无荧光、弱荧光和强荧光胚胎; (C) 对无荧光、弱荧光和强荧光胚胎的基因连锁分析。

图 2 *Tol2*:20141221t 品系中 *Tol2* 转座子插入的基因为 *sat1.a*

Note: (A) The schematic diagram of *Tol2* transposon inserted into *sat1.a* gene and the primer loci we designed for gene linkage analysis; (B) The no fluorescence, weak fluorescence and strong fluorescence embryos at 48hpf; (C) Gene linkage analysis of *sat1.a* gene and *Tol2* transposon in the embryos with no fluorescence, weak fluorescence and strong fluorescence.

Fig. 2 Fluorescence intensity and gene linkage analysis

2.3 *sat1.a* 基因具有与 *Tol2*:20141221t 品系 GFP 相似的表达图式

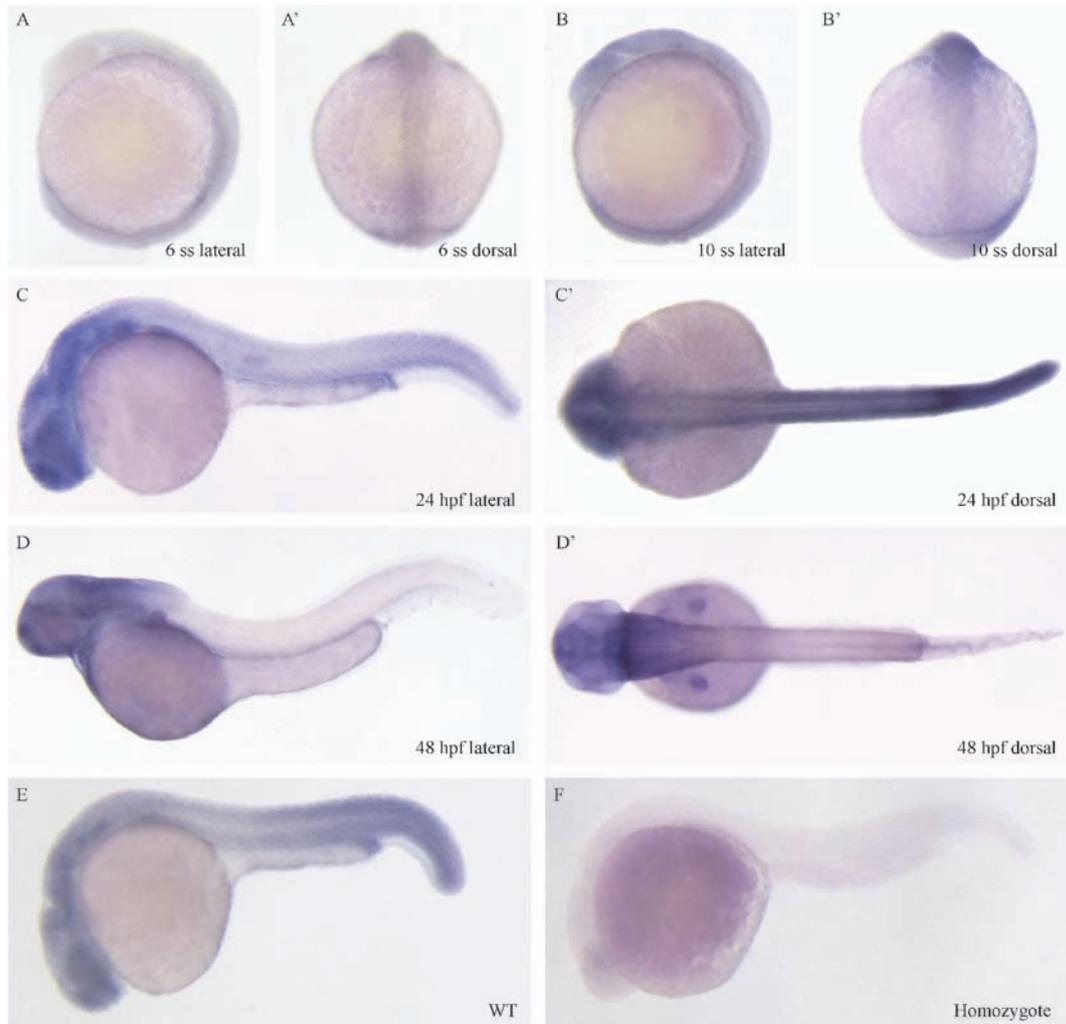
虽然通过基因连锁分析实验已经证明了 *Tol2*:20141221t 品系中 *Tol2* 转座子插入到 *sat1.a* 基因内部, 但是 *sat1.a* 基因的表达情况还不清楚。我们选择了 6 体节 (图 3-A 和 A')、10 体节 (图 3-B 和 B')、受精后 24 h (图 3-C 和 C') 和受精后 48 h (图 3-D 和 D') 的野生型胚胎, 通过原位杂交技术检测 *sat1.a* 基因的表达图式。通过与图 1 中 GFP 的表达进行比较, 发现 *sat1.a* 基因 mRNA 和 *Tol2*:20141221t 品系中 GFP 的表达在时间和空间上具有相似性。例如 10 体节时期在头部均检测到明显的信号 (图 3-B 和 B'); 受精后 24 h, GFP 和 *sat1.a* mRNA 主要位于正在发育的前脑、中脑、后脑以及脊椎上方的神经组织 (图 3-C 和 C')。但两者的表达也有明显的区别, 如在 6 体节时期 GFP 在头部有明显的表达, 而原位杂交显示 *sat1.a* 在此时期表达水平较低 (图 3-A 和 A'); 受精后 GFP 荧光表达在从

头部到躯干部的神经组织, 而原位杂交显示 *sat1.a* 只表达在头部 (图 3-D 和 D')。GFP 和 *sat1.a* mRNA 表达的差异可能是 *sat1.a* 与 GFP 蛋白的稳定性不同造成的。

另外, 我们还通过原位杂交比较了野生型和纯合突变体胚胎的 *sat1.a* mRNA 表达情况, 发现正常的野生型胚胎可以被染色而同时期纯合突变体无法被染色 (图 3-E 和 F)。推测可能是 *sat1.a* 纯合突变体中由于 *Tol2* 转座子的插入, 阻断了 *sat1.a* 基因中插入位点下游序列的转录, 而我们的设计的反义 mRNA 探针靶向的序列就位于这一区域。这些实验结果表明, *Tol2* 插入的基因为 *sat1.a*, 造成了 *sat1.a* mRNA 转录的提前终止。

2.4 *sat1.a* 突变体没有明显的发育缺陷

由于 *sat1.a* F1 代突变体自交产生的胚胎中, 其纯合突变体没有明显的发育缺陷。我们推测可能有母源的 *sat1.a* 发挥作用。因此, 我们进一步筛选出 F2 代纯合体。这些 F2 代纯合体自交产生的胚胎为



注:(A,A')分别为6体节时期侧面观和背面观;(B,B')分别为10体节时期侧面观和背面观;(C,C')分别为受精后24h的侧面观和背面观;(D,D')分别为受精后48h的侧面观和背面观;(E)为受精后22h野生型胚胎;(F)为受精后22h *sat1.a* 纯合突变体胚胎。

图3 整胚原位杂交显示 *sat1.a* 在不同发育时期的表达图式

Note. (A, A') 6-somite stage, lateral view and dorsal view; (B, B') 10-somite stage, lateral view and dorsal view; (C, C') 24 hpf, lateral view and dorsal view; (D, D') 48 hpf, lateral view and dorsal view; (E) 22 hpf, WT embryo; (F) 22 hpf stage, *sat1.a* homozygote mutant.

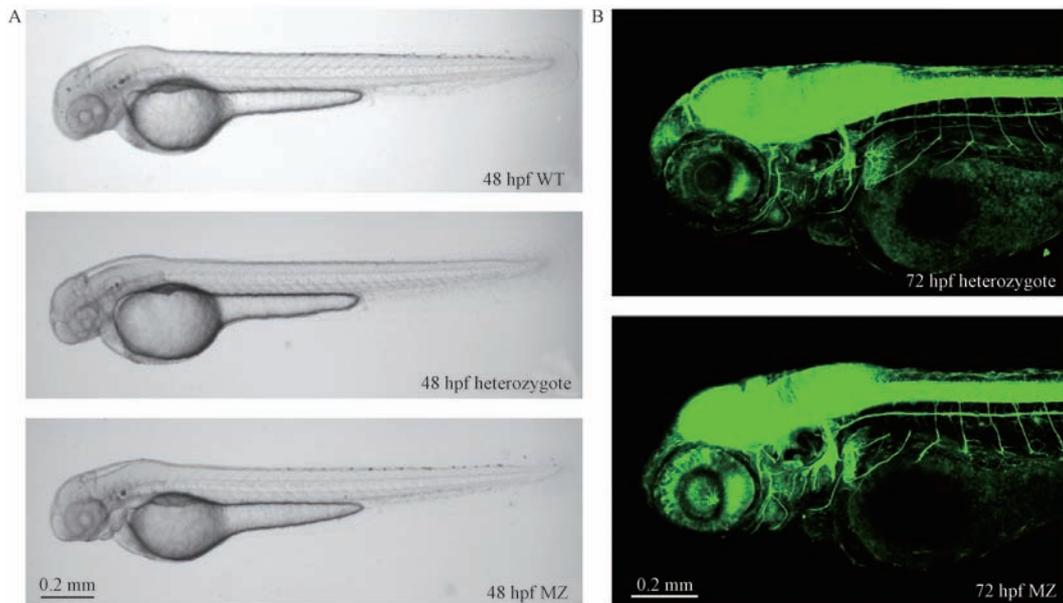
Fig. 3 The expression patterns of *sat1.a* in different developmental stages

F3代母源合子纯合突变体。与同一发育时期的野生型胚胎以及杂合突变体胚胎相比, *sat1.a* 母源合子纯合突变体(maternal and zygote, MZ)从形态上观察,也没有呈现显著的发育缺陷(图4-A)。因为GFP荧光特异表达在神经系统中,所以我们进一步检测了该纯合突变体神经系统是否存在发育缺陷。在共聚焦显微镜20倍物镜下观察受精后72h的母源合子纯合突变体体和杂合突变体胚胎,发现二者在脑部、咽部及躯干部的神经细胞在数量、分布及形态等各个方面并没有明显的区别(图4-B)。因此, *sat1.a* 突变体在早期胚胎发育过程中并没有明显的

缺陷。

3 讨论

精脒/精胺 N1-乙酰基转移酶(SAT 或 SSAT)由 *sat1* 基因编码^[10],是多胺分解代谢途径中的限速酶^[11],催化精脒和精胺的乙酰化,参与调节细胞内多胺的浓度及其转运出细胞,在维持体内多胺代谢平衡中起着重要作用^[12]。有报道称,SSAT的过表达可能会促进肿瘤发生^[13],而SSAT诱导型过表达会通过亚精胺和精胺的耗竭^[14-16],触发线粒体介导的肿瘤细胞凋亡^[17]。SSAT还可以通过多胺代谢循



注:(A)明场表型观察受精后 48 h 的野生型、杂合突变体和母源合子纯合突变体胚胎;(B)共聚焦显微镜下观察受精后 72 h 的杂合突变体和母源合子纯合突变体胚胎。

图 4 突变体表型分析

Note. (A)The phenotype observation of wild type embryo, heterozygote embryo and MZ mutant embryos 48 hpf in bright-field; (B)The confocal microscopic observation of heterozygote and MZ homozygote embryo at 72 hpf.

Fig. 4 Phenotypic analysis of the mutant

环影响成骨细胞的成骨机制和骨的重塑。在 SSAT 过表达小鼠中,受损的成骨会出现皮质壁变薄和骨小梁数量增加的现象^[18]。

SSAT 是脊椎动物所特有的。与哺乳动物相比,斑马鱼包含了 3 个同源基因,分别为 *sat1.a*、*sat1.b*、*sat1.c*^[19]。*sat1.a* 突变体胚胎没有明显的发育缺陷,可能是由于斑马鱼三个 SSAT 基因在胚胎发育过程中存在功能冗余性。因此,*sat1* 基因的发育功能还需进一步的实验验证,例如制备 *sat1.a*、*sat1.b*、*sat1.c* 三基因敲除的突变体。*sat1.a* 在神经组织中特异表达,是一个很好的分子标记,可以作为研究神经系统发育的有力工具。

此外,在自杀死亡的抑郁症患者的大脑中,发现额叶的部分区域 *sat1* 基因表达量降低^[20],这种基因表达的下调与 *sat1* 启动子区域序列插入/删除有关^[21],有研究表明,在这些自杀者的大脑中,发现有 miRNA 参与了 *sat1* 的转录后的调控^[22]。*sat1* 参与神经性疾病的功能与其在神经系统特异表达具有一致性。限于实验室的研究条件,我们并没有检测斑马鱼 *sat1.a* 突变体是否具有神经系统变异导致的行为异常。

参 考 文 献

[1] Inagaki H, Bessho Y, Koga A, et al. Expression of the tyrosi-

nase-encoding gene in a colorless melanophore mutant of the medaka fish, *Oryzias latipes* [J]. *Gene*, 1994, 150(2): 319 - 324.

[2] Kawakami K, Shima A, Kawakami N, et al. Identification of a functional transposase of the *Tol2* element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(21):11403 - 11408.

[3] Urasaki A, Morvan G, Kawakami K, et al. Functional dissection of the *Tol2* transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition [J]. *Genetics*, 2006, (2):639 - 649.

[4] Kawakami K, Takeda H, Mishina M, et al. A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish [J]. *Dev Cell*, 2004, 7(1): 133 - 144.

[5] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. *Dev Dyn*, 1995, 203(3):253 - 310.

[6] Westerfield M. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)* [M]. Univ of Oregon Press, Eugene, 2000.

[7] Parinov S, Kondrichin I, Korzh V, et al. *Tol2* transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes in vivo [J]. *Dev Dyn*, 2004, 231(2): 449 - 459.

[8] Liu YG, Whittier RF. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments

- from P1 and YAC clones for chromosome walking [J]. *Genomics*, 1995, 25:674 – 681.
- [9] 樊竑治, 彭忠禄, 谢华平, 等斑马鱼整体原位杂交的技术改良 [J]. *激光生物学*, 2010, 19(1): 115 – 119.
- [10] Bewley MC, Graziano V, Jiang J, et al. Structures of wild-type and mutant human spermidine/spermine N1-acetyltransferase, a potential therapeutic drug target [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 2063 – 2068.
- [11] Pegg AE. Spermidine/spermine-N(1)-acetyltransferase: a key metabolic regulator [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294: E995 – E1010.
- [12] Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism [J]. *Biochem J*, 2003, 376: 1 – 14.
- [13] Tucker JM, Murphy JT, Kisiel N, et al. Potent modulation of intestinal tumorigenesis in *Apc^{min/+}* mice by the polyamine catabolic enzyme spermidine/spermine N1-acetyltransferase [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 5390 – 5398.
- [14] Sun H, Liu B, Liu XX, et al. Adenovirus-mediated expression of SSAT inhibits colorectal cancer cell growth in vitro [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008 May, 29(5): 606 – 13.
- [15] Liu B, Xin JX, Liu XX, et al. Adenovirus vector-mediated up-regulation of spermidine/spermine N1-acetyltransferase impairs human gastric cancer growth in vitro and in vivo [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(11): 2126 – 2132.
- [16] Tian Y, Wang S, Wang B, et al. Overexpression of SSAT by DENSPM treatment induces cell detachment and apoptosis in glioblastoma [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27: 1227 – 1232.
- [17] Mandala S, Mandala A, Parka MH. Depletion of the polyamines spermidine and spermine by overexpression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1 (SAT1) leads to mitochondria-mediated apoptosis in mammalian [J]. *Cell Biochem J*, 2015, 468(3): 435 – 447.
- [18] Pimes-Karhu S, Määttä J, Uimari A, et al. Overexpression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase impairs osteoblastogenesis and alters mouse bone phenotype [J]. *Transgenic Res*, 2015, 24(2): 253 – 265.
- [19] Lien YC, Ou TY, Lin YT, et al. Duplication and diversification of the spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1 genes in zebrafish [J]. *PLoS One*. 2013, 8(1): e54017.
- [20] Sequeira A, Gwady FG, Casero RA Jr, et al. Implication of SSAT by gene expression and genetic variation in suicide and major depression [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2006, 63: 35 – 48.
- [21] Fiori LM1, Mechawar N, Turecki G. Identification and characterization of spermidine/spermine N1-acetyltransferase promoter variants in suicide completers [J]. *Biol Psychiatry*, 2009 Sep, 66(5): 460 – 467.
- [22] Lopez JP1, Fiori LM, Gross JA, et al. Regulatory role of miRNAs in polyamine gene expression in the prefrontal cortex of depressed suicide completers [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2014, 17(1): 23 – 32.

[收稿日期] 2016 – 04 – 28



蕨麻小型猪心肌梗模型的建立及梗死边缘区的基因表达谱分析

谭伟江^{1#}, 王静^{1#}, 李想^{1,2#}, 李小辉³, 雷迁⁴, 黄家园⁵, 龚宝勇¹,
李菁¹, 陈智英¹, 王剑¹, 陈小红¹, 王希龙¹, 杨丰华^{1*}, 黄韧^{1*}

(1. 广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广州 510633; 2. 广东药科大学, 广州 510006;
3. 暨南大学附属第一医院心外科, 广州 510632; 4. 四川省医学科学院, 四川省人民医院麻醉科, 成都 610072;
5. 复旦大学附属中山医院, 上海 200032)

【摘要】 目的 建立应用蕨麻小型猪建立心肌梗死(心梗)的造模方法和具有临床意义的模型指标, 探讨心梗边缘区的基因表达与代谢失偿的相关性。**方法** 选取13只雄性蕨麻小型猪, 随机分组, 其中假手术对照组和心梗手术组各5只, 不经任何手术处理的正常对照组3只。麻醉后在左前冠状动脉行靠近心尖的三分一降支主干支进行永久性结扎形成心肌缺血、梗死。术后4周进行心功能超声检测、采血并进行血清生化分析; 安乐死后取梗死边缘区进行病理和基因芯片分析。**结果** 超声图可见明显的心梗区域, 数据显示心梗手术组的收缩末期左心室腔射血分数及短轴缩短率较假手术组分别降低32%和40%; 血清中有谷草转氨酶、血清胆红素、乳酸脱氢酶等升高; 病理切片显示梗死边缘区域的心肌纤维断裂、溶解, 结缔组织增生, 中性粒细胞和淋巴细胞增多; 基因表达谱分析显示在梗死边缘区有2个调控心梗后重构和组织病理通路, 3个炎症和免疫调节通路, 8个脂肪、蛋白、糖能量代谢途径的基因表达有显著性改变。**结论** 成功建立了蕨麻小型猪的心梗模型, 其冠状动脉分支少, 便于手术且成模稳定性, 模型表征可与临床指标相吻合; 模型梗死边缘区的基因表达谱特征与临床上代谢失偿表现有相同变化趋势, 为心梗机理的研究提供了实验动物模型及心梗边缘区的具有参考价值的特征性改变。

【关键词】 蕨麻小型猪; 心肌梗死模型; 模型评价; 梗死边缘区; 基因表达谱

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0558-09

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.002

Establishment of a myocardial infarction model and the gene expression profile in peri-infarct area in Juema minipigs

TAN Wei-jiang^{1#}, WANG Jing^{1#}, LI Xiang^{1,2#}, LI Xiao-hui³, LEI Qian⁴, HUANG Jia-yuan⁵, GONG Bao-yong¹,
LI Jing¹, CHEN Zhi-ying¹, WANG Jian¹, CHEN Xiao-hong¹, WANG Xi-long¹, YANG Feng-hua^{1*}, HUANG Ren^{1*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory for Laboratory Animals, Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China; 2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510063; 3. Jinan University, Guangzhou, 510632; 4. Department of Anesthesiology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chendu 610072; 5. Zhongshan Hospital Fudan University, Shanghai 200032)

【Abstract】 Objective To establish a Juema minipig model of myocardial infarction, to evaluate the clinical indices in the model pigs, and to explore the relationship between gene expression and metabolic decompensation. **Methods**

[基金项目] 广东省科技专项(No. 2016A020216019); 广东省实验动物重点实验室(No. 2013A061402001); 国家自然科学基金-面上项目(No. 31572351); 广东省科技专项(No. 2015A030302035); 国家自然科学基金-青年科学基金项目(No. 81500281)。

[作者简介] 谭伟江(1992-), 男, 学士, 研究方向: 心血管生物学, Email: 836550767@qq.com; 王静, (1988-), 女, 硕士, 研究方向: 兽医药理学, Email: 454431684@qq.com; 李想(1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 心血管生物学, Email: 814736766@qq.com。

#对本文的贡献相同。

[通讯作者] 黄韧(1959-), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物学。Email: labking@sohu.com;

杨丰华(1970-), 女, 副研究员, 研究方向: 心血管生物学。Email: fenghua.yang@gdliami.com

13 male Juema minipigs were randomly divided into control (Sham, $n=5$), myocardial infarction (MI, $n=5$) and normal control (for evaluating the recovery condition after surgery, $n=3$) groups. In the MI group, the ligation was done at the left descending coronary artery around the 1/3 distance to heart apex. Four weeks after the surgery, the cardiac function and serum biochemistry was analyzed. The histological changes and gene expression profiles in the myocardium in the peri-infarct area were examined. **Results** Ultrasonic images showed that the infarction was formed, the ejection fraction and fraction shortening were significantly reduced in the MI group ($\sim 32\%$ and $\sim 40\%$ less than those of the sham group). Histological examination showed that myocardial fibers at the peri-infarct area were broken, dissolved, and there was connective tissue hyperplasia with increased neutrophil and lymphocyte infiltration. Microarray analysis revealed that two myocardial remodeling and pathology mediating pathways, three inflammation-related pathways, and 8 metabolic pathways (including fatty acid, amino acid, and glucose metabolic pathways) were significantly changed. **Conclusions** We have successfully established a Juema minipig model of myocardial infarction. The less branches of the left descending coronary artery allow us to establish a stable model by surgery with comparable characteristics in the clinic indices. The results of this study provides useful reference characteristics of an animal model with characteristic changes in the peri-infarct area.

【Key words】 Juema minipig; Myocardial infarction model; Model evaluation; Peri-infarct area; Gene expression profile

Corresponding author: HUANG Ren, Email: labking@sohu.com; YANG Feng-hua, Email: fenghua.yang@gd-lami.com

心脏在各种病因导致心肌缺血、心梗后,其进程最早激活的是代偿机制例如形成瘢痕组织、功能改变和心肌重构等。随着梗死边缘区往正常组织推进,越来越多组织失去正常功能,最终发生失代偿性心衰。在一项针对梗死边缘区的临床研究表明,改善梗死边缘区的代谢状况、减少组织病理改变是改善心脏功能的有效方式^[1]。临床诊治评价只能追踪电生理^[2]、影像学^[3]的改变,而无法实时评价病人的组织病理学和分子生物学指征,更无法提出梗死边缘区功能失代偿的诊治参数,因此,应用小型猪建立心梗和心衰模型是实验研究的必要途径,而且,利用实验模型分析梗死边缘区病理和分子变化对临床诊断评价具有直接应用价值。

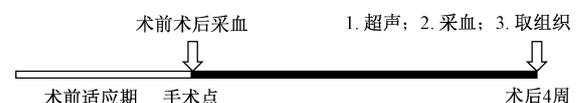
蕨麻小型猪原产甘肃南部,基因型稳定^[4],经本单位多年前引种成功后,封闭繁育和实验动物化,其生物学特性数据清楚^[4-6]。我们前期观察发现蕨麻小型猪的左前冠状动脉降支分支较少,个体之间的分布模式比较一致,与其他小型猪比较,更适合实行心梗手术。本研究报道蕨麻小型猪建立和心梗模型各项评价指标、梗死边缘区在功能失代偿之下的基因表达谱。

1 材料与方法

1.1 实验动物和实验流程

实验选用 13 只 20 ~ 25 kg 的普通级雄性蕨麻小型猪【SCXK(粤)2015-0036】,随机分为假手术对照组($n=5$)、心梗手术组($n=5$)及作为评价手术

后动物恢复状况的正常对照组 3 只。实验期间动物饲养于广东省实验动物监测所的 AAALAC 认证设施,手术在同设施内的无菌手术室实施。实验动物建模前在实验设施内进行两周环境驯化,建模成功后在设施内继续护理饲养 4 周直至组织采样。实验的总体流程如下。

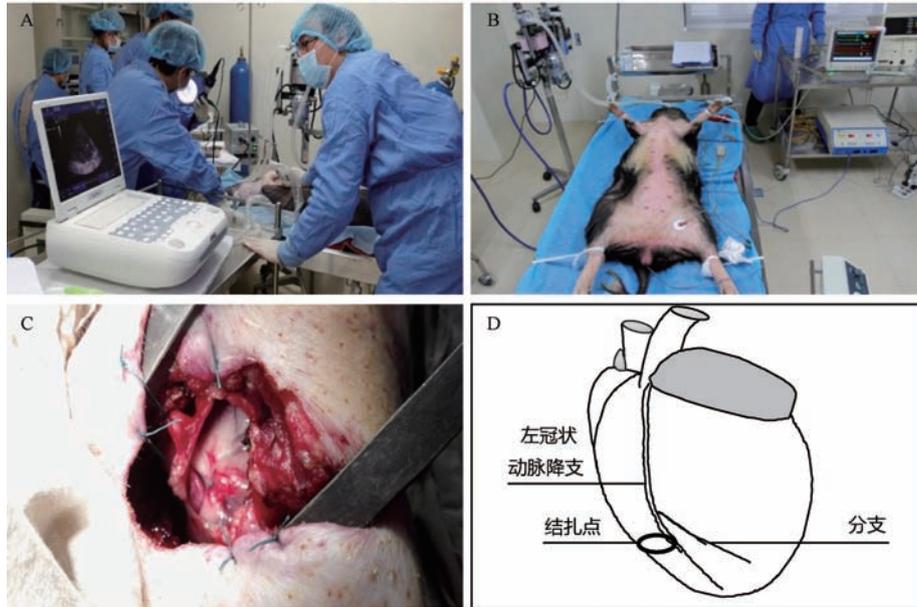


1.2 心梗手术建模及术后监护

实验动物诱导麻醉后使用 2% 七氟醚维持麻醉(建模示意图见图 1)。动物仰卧保定后在左侧第三肋间隙位置进行 7 ~ 10 cm 横切,逐层分离后暴露心脏并找到冠状动脉降支,在第一分支后靠近心尖三分之一处的主干进行永久性结扎;假手术组则打开胸腔并在近似位置放置缝线但不做结扎。术中使用 BeneViewT5 心电监护系统及 EDAN H100 监护仪监测动物基本生命体征。通过心电图 ST 段是否抬高来判断是否结扎成功。手术结束后采血并用血液流变仪测定血液粘稠度,获取 200/s(高切)、30/s(中切)、3/s(低切)三个切变率时的全血粘度。术后肌注青霉素预防术后感染。并使用身体质量指数(body mass index, 简称 BMI)对蕨麻小型猪的术后健康情况。BMI 的计算公式为:实验猪 BMI = 体重 kg/(身长 cm × 身长 cm)。

1.3 心脏超声功能检测

使用迈瑞 M7Vet 便携式彩色多普勒超声诊断



注:A. 超声操作;B. 术中动物的保定位置;C. 暴露左前冠状动脉降支及结扎位置;D. 结扎点示意图。

图1 左冠状动脉降支结扎建立心梗模型

Note. A. Ultrasound operation; B. The operative position; C. Exposure of the left descending coronary artery and suture site; D. Diagram of the ligation point.

Fig.1 Ligation of the left descending coronary artery to establish MI model.

系统(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)配置的 P7-3s 相控阵心脏探头(3~7 MHz)评价蕨麻小型猪心梗后的心脏功能。动物超声时使用氯胺酮 6 mg/kg 麻醉保定。在右侧肋间触摸到心脏跳动位置后放置探头获得四腔室图像,随后探头往心尖方向寻找心梗区域,采集 B 型和 M 型图。假手术对照组在心室乳头肌后采集图像。

1.4 血液生理生化指标检测

术后 4 周对假手术对照组和心梗手术组采血。血样静置于 4℃ 冰箱 2 h 后使用冷冻离心机在 3000 r/min 转速下离心 5 min,取上清液为测量使用的血清样本。血清生化值使用美国 Beckman 公司 LX20 全自动生化分析仪和 Beckman 公司的配套试剂。

1.5 组织取样和染色

术后第 4 周麻醉开胸取出假手术对照组和心梗手术组动物的心脏组织。在结扎线头附近颜色暗黑的室壁组织为梗死区;梗死往鲜红组织过渡的区域为梗死边缘区;远离梗死区域且颜色正常的组织确定为非梗死区。在梗死边缘区取 1 cm × 1 cm 组织块,放入冻存管中置于 -80℃ 超低温冰箱保存,供后续基因表达分析使用。供病理切片的每个组织块包括梗死区、梗死边缘区、非梗死区三部分,福尔马林固定后切片,使用 HE 和 Masson 染色法染色,显微

镜下观察梗死边缘区的病理改变。

1.6 基因芯片和基因表达谱分析

取三个假手术对照组和三个心梗手术组的梗死边缘区组织,两组的三个样品各自混合成一个样品,使用 TRIzol® Reagent(Fisher Scientific)试剂盒提取 RNA 后应用 NanoDrop ND-1000 测定 CyDye 和 RNA 的浓度。应用芯片 Bovine (v2) Gene Expression 4 × 44K Microarray (Agilent Technologies, USA) 和 Agilent 杂交程序确定基因的表达谱。对心梗组的梗死边缘区和对照组的正常组织进行差异基因数比照,随后对差异基因进行生物途径富集分析,用以评估心梗后基因表达改变的生物信号转导和代谢途径。基因芯片的技术服务由北京六合华大基因科技有限公司(BGI)提供。

1.7 统计学处理

数据表达为平均值 ± 标准误 (Mean ± SEM),使用 SPSS for Windows 13.0 统计软件处理,对两组间的数据进行比较和独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 判定为有统计学意义。

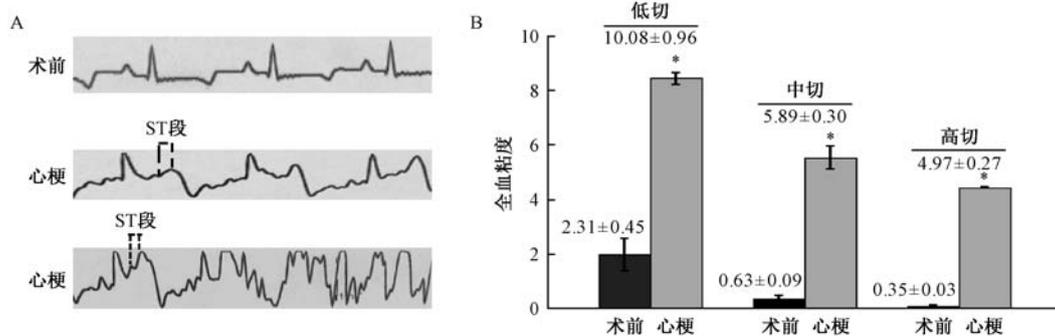
2 结果

2.1 术后蕨麻小型猪的生命特征

假手术对照组 ($n = 5$) 和心梗手术组 ($n = 5$) 的

蕨麻小型猪均存活。在左前冠状动脉降支结扎后心电图即刻显示 ST 段调高(图 2A),同时可见结扎点往心尖位置肌肉颜色变浅,全血粘度测量显示在高中低切不同切变率下血液粘稠度均显著上升(图 2B),这些指征表明结扎已致心肌缺血。评价实验

动物健康情况的 BMI 指数测量表明,10 只经历开胸手术的实验猪(包括假手术对照组和心梗手术组)与正常对照组相比,未见统计意义上的差别(21.01 ± 0.69 vs. 20.35 ± 1.0 , $P = 0.36$),表明手术对实验动物 4 周内的身体健康状况无明显影响。



注:A. 冠状动脉结扎后心电图监护显示抬高的 ST 段,并可能伴发短期室颤; B. 术后采血在不同切变率上的全血粘度。

* $P < 0.05$ 表示心梗手术后有显著差别, $n = 5$ 。

图 2 手术期间心电图监护和术后血液粘度

Note. A. ECG ST segment elevation after coronary artery ligation, and occasionally short-term fibrillation; B. Postoperative blood viscosity at different shear rates. * $P < 0.05$, significant differences between pre- and post-MI groups, $n = 5$.

Fig. 2 The intraoperative ECG monitoring and postoperative blood viscosity.

2.2 结扎后梗死区域形成并伴随着心脏收缩功能显著减弱

超声显示心梗手术组的心脏有不活动的梗死区域(图 3B,黄色箭头),各指标的测量值见表 1。结果表明心梗 4 周后,评价心功能的多项超声指标发生了明显的改变。心梗使左心室壁舒张末期的厚度从(0.73 ± 0.02) cm 增加到(0.85 ± 0.09) cm,并且收缩末期内径从(2.01 ± 0.12) cm 增加到(2.60 ± 0.18) cm。相对应的,心梗后左心室收缩末期容积

量也显著增加(26.65 ± 4.58 mL vs. 18.13 ± 2.78 mL,见图 3E),提示泵血不全。同时,心输出量从(7.60 ± 0.57) L/min 减少到(4.44 ± 0.31) L/min(图 3F),指示心脏收缩功能的射血分数从(71.77 ± 1.81)% 减少到(48.70 ± 3.76)%,短轴缩短率从(40.64 ± 1.50)% 减少到(24.21 ± 2.33)%。综合以上结果表明心梗后心脏收缩功能受损,心室发生了重构。

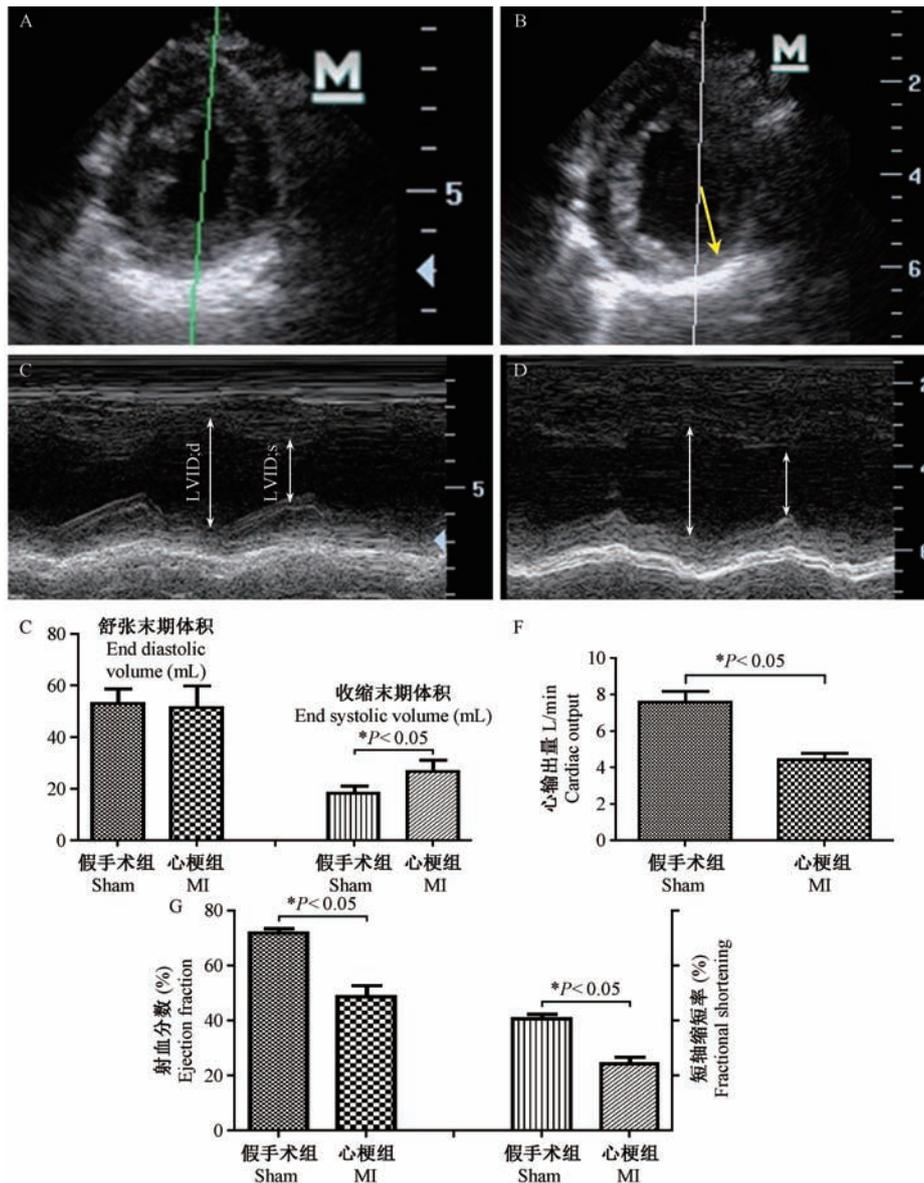
表 1 心脏超声功能评价结果($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab. 1 The evaluation results of echocardiography

心功能检测指标 Heart function indexes	假手术对照组 Sham	心梗手术组 MI
舒张末期左心室前壁厚度 IVSD (cm)	0.73 ± 0.02	0.85 ± 0.09
收缩末期左心室前壁厚度 IVS;s (cm)	1.04 ± 0.06	1.03 ± 0.10
舒张末期左心室后壁厚度 LVPW;s (cm)	0.68 ± 0.033	1.00 ± 0.09
收缩末期左心室后壁厚度 LVPW;s (cm)	1.02 ± 0.03	1.20 ± 0.11
舒张末期左心室内径 LVID;d (cm)	3.53 ± 0.12	3.44 ± 0.23
收缩末期左心室腔内径 LVID;s (cm)	2.01 ± 0.12	$2.60 \pm 0.18^*$
舒张末期左心室容量 EDV;d (mL)	53.05 ± 5.79	51.48 ± 8.27
收缩末期左心室容量 ESV;s (mL)	18.13 ± 2.78	$26.65 \pm 4.58^*$
心输出量 CO (L/min)	7.60 ± 0.57	$4.44 \pm 0.31^*$
射血分数 EF(%)	71.77 ± 1.81	$48.70 \pm 3.76^*$
短轴缩短率 FS (%)	40.64 ± 1.50	$24.21 \pm 2.33^*$
心跳 HR (Beats/min)	210 ± 10	214 ± 23

注: * $P < 0.05$, 表明假手术对照组和心梗手术组的数值差异有显著性。

Note. * $P < 0.05$, indicating significant differences were seen between the MI and Sham groups. MI, myocardial infarction.



注: A、C. 超声显示豚鼠的正常心脏 B 型和 M 型图; B、D. 超声显示心肌梗死术组的 B 型和 M 型图, 黄色箭头指示心肌梗死术组心脏的梗死区域位置; D 图明显可见左心室内径收缩末期显著增加; E. 收缩末期和舒张末期的血容量; F. 心输出量; G. 射血分数和短轴缩短率。LVID; d-舒张末期左室内径; LVID; s-收缩末期左室内径。* $P < 0.05$ 表示心肌梗死术组(标记为“心梗组”)较假手术对照组(标记为“假手术组”)差异有显著性, $n = 5$ 。

图 3 超声心功能评价

Note. A, C. Typical B- and M-mode images of the normal heart in the sham group (short axis); B, D. Typical B- and M-mode images in the MI group (short axis); the yellow arrow indicates the infarct area of the heart; D. Dilated internal diameter at the end of systolic state was seen; E. End diastolic and systolic blood volume; F. Cardiac output; G. Ejection fraction and fractional shortening. LVID; d: Left ventricular diastolic diameter at the end diastolic state; LVID; s: Left ventricular diameter at the end systolic state. * $P < 0.05$, significant differences between the Sham and MI groups, $n = 5$.

Fig. 3 Ultrasonic evaluation of the cardiac function

2.3 血清生化指标变化

术后 4 周, 血清生化值的部分指标发生改变, 见表 2。心梗手术组中谷草转氨酶为 (31.5 ± 2.58) 、血清总胆红素 $(4.5 \pm 0.14) \mu\text{mol/L}$ 、直接胆红素为

$(0.92 \pm 0.33) \mu\text{mol/L}$ 、肌酐 $(141.75 \pm 12.65) \mu\text{mol/L}$, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 其他血清生化值无明显改变。这些指标的改变提示了生理功能的改变有密切关系。

表 2 假手术对照组和心梗手术组的血清生化值($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab.2 Serum biochemical results of the sham and MI groups.

血清生化指标 Serum biochemical indexes	假手术对照组 Sham	心梗手术组 MI
谷丙转氨酶 ALT/U/L	46 ± 5.11	47.75 ± 7.88
谷草转氨酶 AST/U/L	25.25 ± 1.88	31.5 ± 2.58 *
总蛋白 TP/g/L	63.12 ± 0.138	60.17 ± 1.91
白蛋白 ALP/g/L	32.25 ± 0.77	23.77 ± 5.61
球蛋白 GLOB/g/L	30.87 ± 0.136	36.4 ± 6.03
总胆红素 TBIL/μmol/L	2.5 ± 0.47	4.5 ± 0.14 *
直接胆红素 D-BIL/μmol/L	0.025 ± 0.14	0.92 ± 0.33 *
碱性磷酸酶 ALP/IU/L	103 ± 19.3	104 ± 16.04
血糖 GLU/mmol/L	4.44 ± 0.36	5.96 ± 0.42
尿素氮 BUN/mmol/L	2.46 ± 0.17	2.89 ± 0.65
肌酐 CREA/μmol/L	92.75 ± 4.15	141.75 ± 12.65 *
总胆固醇 CHOL/mmol/L	2.37 ± 0.12	2.16 ± 0.06
甘油三酯 TG/mmol/L	0.48 ± 0.10	0.25 ± 0.05
高密度脂蛋白 HDL-C/mmol/L	1.05 ± 0.07	1.03 ± 0.07
极低密度脂蛋白 LDL-C/mmol/L	1.43 ± 0.06	1.29 ± 0.04
乳酸脱氢酶 LDH/U/L	384.75 ± 26.8	478.25 ± 49.58 *

注: * $P < 0.05$ 表示心梗手术组的数值较假手术对照组有明显差异。

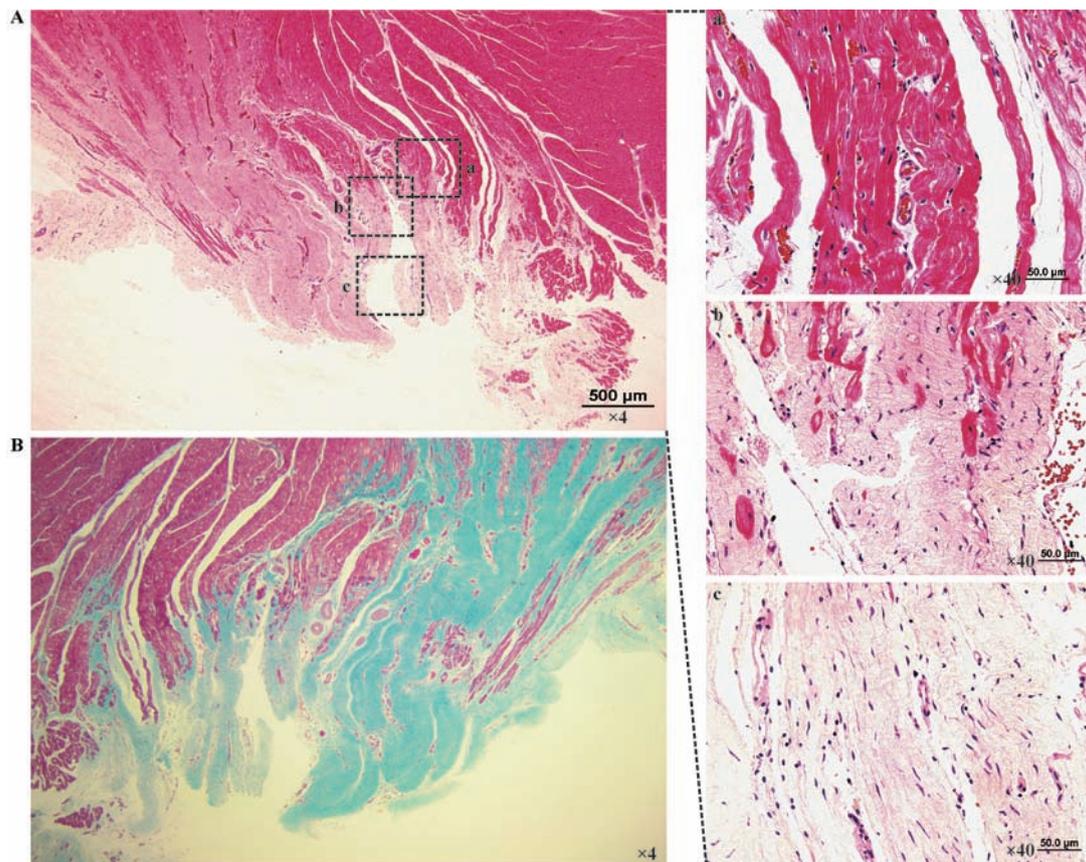
Note: * $P < 0.05$, significant differences were indicated between the MI and Sham groups.

2.4 心梗导致心肌纤维坏死、胶原纤维组织增生以及中性粒细胞和淋巴细胞增加

在 HE 染色切片上使用 4 倍物镜可观察到从非梗死区、梗死边缘区到梗死区组织变化的过渡(图 4A)。Masson 染色的梗死区可明显观察到纤维化的结缔组织(图 4B)。使用 40 倍物镜可清晰观察到梗死边缘区的心肌组织水肿、组织间隙增大,以及心肌纤维的断裂、溶解和结缔组织增生(图 4A, a-c)。同时,镜下可见中性粒细胞(图 5B、5C)、淋巴细胞增多的现象(图 5D),并有出血的病理特征(图 5B、5C)。

2.5 心梗后心肌重构调控、炎症和代谢通路基因的表达

基因表达差异分析表明心梗手术组心梗边缘区的有 2029 基因表达发生了显著改变,对这些差异基因进行生物途径富集分析,概要如下:(1) 调控心梗后心肌重构的信号通路激活和胞外基质-膜受体相互作用的改变,受影响的主要为构成心肌丝主要成分如肌动蛋白、肌球蛋白轻链、原肌球蛋白蛋白、整合素、



注:A. HE 染色。方框显示放大区域:(a) 非梗死区,心肌纤维形态正常,没有明显病变;(b) 边缘区,心肌纤维束断裂、坏死,胶原纤维增多;(c) 梗死区,不见心肌细胞,以瘢痕组织为主要特征。B. Masson 染显示增生的纤维(蓝色区域)。

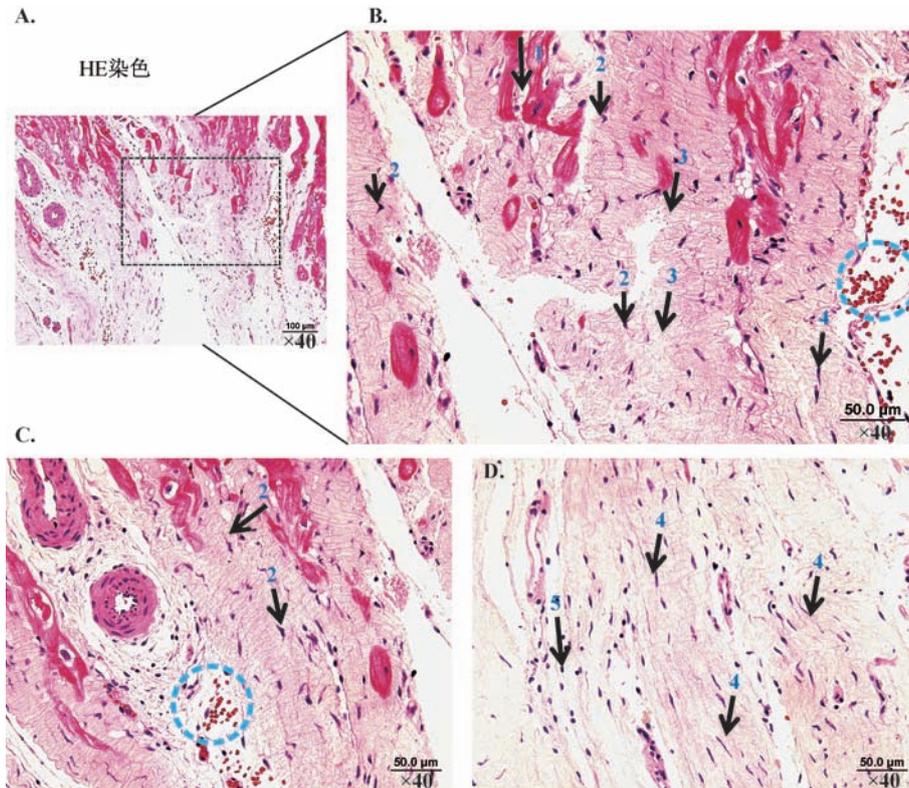
图 4 组织切片显示从非梗死区、梗死边缘区到梗死区的过渡

Note: A. HE staining. The rectangle shape shows the following magnified areas: (a) Non-infarct area, morphology of myocardial fibers appears normal, without obvious lesions; (b) Peri-infarct area, myocardial fiber breakage, necrosis, and collagen fibers are increased; (c) Infarct area, the cardiomyocytes are dissolved, fibrous scar is the main feature in this area. B. Masson staining shows hyperplasia of collagen fibers (blue).

Fig.4 The transition from non-infarct area to infarct area

受磷蛋白等,以及细胞基质的改变(见表3);(2) 白细胞跨内皮迁移通路以及补体/凝血级联信号通路激活,包括磷脂酰肌醇3激酶、胶原蛋白VI/V,基质金属酶亚型2和亚型12,丝氨酸蛋白酶抑制蛋白(见表3),提示了组织炎症信号通路的激活,以及胞内外信号的串话;(3) 受影响的主要胞内信号通路是调控炎

症信号通路和脂代谢的PPAR(peroxisome proliferator-activated receptors,过氧化物酶体增殖物激活受体)信号通路(见表3);(4) 脂肪、糖、蛋白代谢能量的主要通路,如脂肪代谢、甘油酯代谢、糖酵解、三羧酸循环、丙酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢等均受影响(见表4),提示了能量代谢机能的受损。



注:A. 显示所放大观察的区域;B. 局部放大图A,指示心肌纤维断裂溶解(箭头1)、中性粒细胞增多(箭头2)、结缔组织增生(箭头3)和出血现象(圆形示意);C. 中性粒细胞和出血现象(箭头2和圆形区域);D. 成纤维细胞核(箭头4)和淋巴细胞(箭头5)。

图5 显示典型的梗死边缘区的组织变化

Note. A. The magnified observation area of the "B"; B. The magnified area from "A", indicating the dissolved myocardial fibers (arrow 1), neutrophils (arrow 2), connective tissues (arrow 3) and bleeding (circular); C. Neutrophils and bleeding (arrow 2 and circle); D. The nuclei of fibroblasts (arrow 4) and lymphocytes (arrow 5).

Fig. 5 Typical histological changes in the peri-infarct area

表3 基因表达谱分析获得的主要富集生物信号调控途径

Tab. 3 Main enrichment of biological signal regulation pathways from the gene expression profile analysis

生物通路 Biological pathways	包含的基因名(编号) Included genes (ID)
心脏重构性 Cardiac remodeling myopathy	SGCB(100135674)*; ACTC(1100152267); SGCA(100240723); MYL(2396690); TPM(2396693); LOC(396781396781); ITGB(3397063); TGFB(3397400); PLN(397421); TPM(4397608);
胞外基质-膜受体相互作用 ECM-receptor interaction	COL6A(3100101551); SDC(2100152754); THBS(3100155108); GP(9100216312); ITGB(3397063); VTN(397192); COL5A(2397532); COL5A(1397533); TN-X(445520); CD36(733702)
白细胞跨内皮迁移 Leukocyte transendothelial migration	GNAI1(100144419); ACTN2(100157406); THY1(100271931); MYL2(396690); VCAM(1396925); ITGB(2396943); PIK3CG(396979); MMP(2397391); CYBA(397507); MYLIP(474162); CXCL(12494460); MAPK(12574062)
补体与凝血级联 Complement and coagulation cascades	SERPINF(1100144304); LOC(100153504); THBD(100157642); CD(55396743); PLAU(396985); PLAT(397121); C1S(397274); CFH(397525); C7(397526); C1QA(445461); C4A(445467); C2(448981)
PPAR 信号通路 PPAR signaling pathway	AQP7(100126283); SCD5(100135661); GK(100233182); SCD(396670); OLR1(396724); ACADL(396931); ACADM(397104); LPL(397537); ADIPOQ(397660); CPT1B(399528); FABP3(399532); FABP4(399533); RXR(G(445465); ACSLA(448980); FABP7(574075); CD36(733702)

注:括号内为基因库的基因编号。

Note. In the bracket was the gene ID in the gene library.

表 4 基因表达谱分析获得的主要富集代谢途径

Tab. 4 Main enrichment metabolic pathways from gene expression profile analysis.

代谢通路 Metabolic pathways	包含的基因名(编号) Included genes (ID)
脂肪代谢 Fatty acid metabolism	ECI2(100134957); ACADL (396931); ACADS (396932); HADHA (397012); HADHB (397017); ACADM(397104); HADH(397604); CPT1B(399528); ACSL4 (448980); ALDH2 (733685)
甘油酯代谢 Glycerolipid metabolism	GPAT4 (100152836); AGPAT4 (100156632); LCLAT1 (100217396); GK (100233182); PPAP2C (100233200); AKR1B1(396816); LPL(397537); ALDH2 (733685)
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解 Valine, leucine and isoleucine degradation	MCEE (100037986); BCKDHA (100142666); BCKDHB (100142669); DBT (100156530); ACADS (396932); OXCT(1396978); HADHA(397012); HADHB(397017); ACADM(397104); DLD(397129); HADH(397604); ALDH2(733685);
精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	ARG2 (100155893); ACY1 (396930); GLUL (396944); GOT1 (396967); GOT2 (396968); CKM (397264); SAT1 (397645); MAOA (414424); CKMT2 (733602); ALDH2(733685)
糖酵解 Glycolysis/Gluconeogenesis	ACSS2 (100153866); PGAM2 (100188980); FBP1 (397038); DLAT (397054); DLD(397129); ENO3 (692156); PFKM(733601); ALDH2(733685)
柠檬酸循环 Citrate cycle (TCA cycle)	ACLY(100125957); IDH3A (100157242); ACO2 (396999); DLAT(397054); DLD(397129)
丙酸代谢 Propanoate metabolism	MCEE (100037986); ACSS2 (100153866); ACACB (100154993); HADHA (397012); ACADM (397104); ALDH2(733685);
丁酸代谢 Butanoate metabolism	ALDH5A1(100157072); ACADS(396932); OXCT1 (396978); HADHA(397012); HADH (397604); ALDH2(733685); CS (397519); IDH2(397603); SDHB(414412); IDH3B(733641)

注:括号内为基因库的基因编号。

Note: in the bracket for gene ID from the gene library.

3 讨论

本研究首次应用我国特有的蕨麻小型猪施行心肌梗死手术,造模 4 周时的心功能指标、血清生化值、心脏组织学病理变化以及各项参数与已有其他论文报道相近似^[7-9],表明造模成功。

我们结扎位置与所报道其他实验猪如苏中家猪或五指山等小型猪的心梗模型的相近,但不容易因手术因素诱发房、室颤及其导致的抢救无效死亡^[10,11]。并且实验动物健康指数跟正常对照组比较无明显差异,恢复状况和我们研究所的其他报道一致^[4],表明蕨麻猪比其他猪更适合用于建立心梗模型,并且此模型在药效学或疾病机制的研究上能够减少因为实验动物机能异常导致的结果偏差。

超声心动图作为临床评价心脏结构和功能的主要工具,也广泛应用于猪心梗模型的评价^[12-13]。在超声评价指标中常用射血分数和短轴缩短率来表征(指示)心脏收缩功能的降低程度,我们所获得的这两个指标与其他报道的范围一致,分别大约减少 32% 和 40%^[14-18],这些数值也与小鼠模型相近^[19,20]。因此,此模型建立有助于促进小鼠研究成果的比较和转化。此外,鉴于现有的猪心梗模型报道中评价心脏功能参数项目比医学临床少,除常用的射血分数和短轴缩短率外,本文也报道了左心室收缩和舒张末期的前后壁厚度、心室内径、血容量,

以及心输出量等测量参数,模型参数全面系统,更具临床转化应用价值。

梗死后心肌重构及至心衰是一个渐进性的复杂过程。本模型的心脏组织切片展示了从梗死区域、梗死边缘区到非梗死区域的改变,并且清楚观察到心梗边缘区相互交错的断裂纤维和增生胶原、水肿组织、浸润的单核细胞和淋巴细胞,体现了猪心梗模型适合病生病理过程和机理解释。

本研究对心脏梗死边缘区和正常组织的基因表达谱进行差异分析,发现心梗致心肌重构、炎症调节、代谢途径的重要改变。在心梗后心肌重构途径的数据分析中,首先,我们看到许多结构蛋白基因表达的改变包括以肌小节蛋白如肌动蛋白、肌球蛋白轻链、原肌球蛋白,以及控制与胞内钙离子浓度的受磷蛋白,这些蛋白与心脏的收缩功能直接相关。其次,我们发现胶原蛋白 VI、胶原蛋白 V 的基因表达也发生明显的改变,这些亦与重构有直接关系。第三,在心梗机理的研究中,比较一致的认为炎症在心梗后心肌的命运起到重要的作用^[21]。我们从基因谱中也观察到了 3 个与心梗炎症有密切关系的主要通路变化,其中有 PPAR,已知其既有炎症调节功能又有调控脂肪酸和葡萄糖的氧化底物转换的作用^[22],其激活可导致脂肪酸氧化和增加心肌脂毒性^[23]。最后,我们在本文中报道了 8 个代谢通路异常的数据,含糖、脂、蛋白质代谢异常。这可与其他

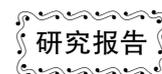
研究关于梗死区代谢异常的报道^[24]互为参考。

本研究所获得的基因表达改变的特征能够与模型心功能、血清生化、病理组织参数指标能够相互解释,例如重构通路的激活,此结果与超声评价中收缩末期测得的左心室有明显扩张相对应;白细胞跨内皮迁移通路以及补体/凝血级联信号通路激活,此发现和组织观察的出血和炎症有相对应的结果;胞外基质-膜受体作用通路的激活和组织学观察到的细胞大量坏死纤维化相对应;同时,心梗中基因表达谱的改变既是多方面的,也是相互关系的,例如,PPAR 的表达提示了其可能是心肌炎症病理变化与心肌代谢功能调节的串话的关键节点,对这些调控关系的深入了解,对心梗疾病的精准诊治及机理解释令人期待。

参 考 文 献

- [1] Fink GR, Herholz K, Pietrzyk U, et al. Peri-infarct perfusion in human ischemia; Its relation to tissue metabolism, morphology, and clinical outcome [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 1993, 3 (2): 123 - 131.
- [2] Figueras J, Cinca J, Santana L, et al. Peri-infarction zone at risk during the first 5 days after an acute transmural myocardial infarction: electrocardiographic evidence [J]. *Am J Cardiol.* 1984, 53(4): 433 - 438.
- [3] Matsumoto H, Matsuda T, Miyamoto K, et al. Peri-infarct zone on early contrast-enhanced CMR imaging in patients with acute myocardial infarction [J]. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2011, 4 (6): 610 - 618.
- [4] 闵凡贵, 潘金春, 王希龙, 等. 藏麻小型猪在广东地区的适应性观察 [J]. *家畜生态学报*, 2014, 35(7): 72 - 77.
- [5] 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.
- [6] 潘金春, 闵凡贵, 王希龙, 等. 藏麻小型猪主要脏器重量与体重的相关性分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(4): 19 - 22.
- [7] 顾晓龙, 黄军, 董正华, 等. 介入法建立比格犬和小型猪急性心肌梗死模型的对比研究 [J]. *重庆医学*, 2014, 43(9): 1090 - 1092.
- [8] 张晶, 傅向华, 贾辛未, 等. 小型猪急性心肌梗死后心力衰竭模型的构建 [J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(1): 33 - 36.
- [9] 顾晓龙, 黄军, 董正华, 等. 五指山小型猪急性心肌梗死合并急性心力衰竭模型的建立及评价 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33: 5932 - 5934.
- [10] 田玉龙, 钟红珊. 五指山小型猪在心血管系统疾病建模中的应用 [J]. *介入放射学杂志*, 2016, 25(4): 363 - 366.
- [11] 宋桂仙, 李小荣, 张凤祥, 等. 猪心肌梗死后室性心律失常模型建立方法的比较 [J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2012, 26(3): 246 - 249.
- [12] 张蕊, 王健, 薛继平, 等. 猪心肌梗死模型的建立以及心功能的超声评价 [J]. *山西医药杂志*, 2008, 37(21): 994 - 995.
- [13] 胡琼, 倪锐志. 超声心动图在猪心脏病模型中的应用进展 [J]. *医学综述*, 2011, 17(8): 1223 - 1226.
- [14] 吴剑, 蒲磊, 戴勇, 等. 前降支结扎构建滇南小耳猪心梗诱导的缺血性心脏病模型 [J]. *昆明医科大学学报*, 2016, 37 (6): 21 - 24.
- [15] 陈剑, 王庆慧, 尹帆, 等. 急性前壁心肌梗塞猪模型左室壁三维运动的相关研究 [J]. *昆明医科大学学报*, 2015, 36 (10): 9 - 12.
- [16] 赵国安, 孙海燕, 王显良, 等. 自体骨髓间充质干细胞移植对猪急性心肌梗死再灌注后心功能的影响 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2012, 41(5): 562 - 565.
- [17] 刘涛, 秦瑾, 刘正湘, 等. CD151 基因对心肌梗死心肌细胞凋亡和心功能的影响 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2009, 18(2): 117 - 122.
- [18] 易甫, 郭文怡, 吕安林, 等. 骨髓基质细胞结合血管内皮生长因子基因治疗猪慢性心肌缺血的疗效 [J]. *心血管康复医学杂志*, 2009, 18(4): 325 - 328, + 300.
- [19] Akhnokh MK, Yang FH, Samokhvalov V, et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase limits mitochondrial damage and preserves function following ischemic injury [J]. *Front Pharmacol.* 2016, 7: (242). 7: 133.
- [20] Kandalam V, Basu R, Abraham T, et al. TIMP2 deficiency accelerates adverse post-myocardial infarction remodeling because of enhanced MT1-MMP activity despite lack of MMP2 activation [J]. *Circ Res.* 2010, 106(4): 796 - 808.
- [21] Sanders LN, Schoenhard JA, Saleh MA, et al. BMP antagonist gremlin 2 limits inflammation after myocardial infarction [J]. *Circ Res.* 2016, 119(3): 434 - 449.
- [22] Razeghi P, Young ME, Abbasi S, et al. Hypoxia in vivo decreases peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated gene expression in rat heart [J]. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 287(1): 5 - 10.
- [23] Barger PM, Kelly DP. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism [J]. *Trends Cardiovasc Med.* 2000, 10(6): 238 - 245.
- [24] Hu Q, Wang X, Lee J, et al. Profound bioenergetic abnormalities in peri-infarct myocardial regions [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006, 291(2): H648 - 657.

[收稿日期] 2016 - 10 - 11



七甲川菁近红外荧光染料对胃癌原位移植模型的靶向识别

赵勇, 张彩勤, 赵宁宁, 谭邓旭, 赵亚, 张海, 师长宏*

(第四军医大学实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 目的 研究七甲川菁近红外荧光(NIRF)染料在胃癌原位移植模型活体成像中的应用效果。方法 将标记荧光酶素的人胃癌细胞系 HepG2 原位移植裸鼠建立肿瘤模型,同时诱发制备胃溃疡模型;对上述模型分别采用生物发光成像和 NIRF 成像,观察胃癌组织对近红外荧光染料的吸收;探索缺氧和阴离子转运肽(OATP)对胃癌组织吸收 NIRF 染料的影响,明确 NIRF 染料靶向识别肿瘤细胞的特异性。结果 NIRF 信号与生物发光信号在胃癌原位移植模型活体成像中具有较好的相关性。胃癌组织部位可获得较强的 NIRF 荧光信号,而胃溃疡部位未检测到荧光信号。缺氧能够增强胃癌细胞对 NIRF 染料的吸收,而阴离子转运肽特异性抑制剂磺溴酞钠(BSP)能够显著降低肿瘤细胞对 NIRF 染料的吸收。结论 七甲川菁近红外荧光染料能够靶向识别胃癌原位移植模型。

【关键词】 近红外荧光染料;胃癌;肿瘤原位移植模型;裸鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0567-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.003

Tumor targeting of near-infrared fluorescence heptamethine cyanine dye in orthotopically transplanted gastric carcinoma in mice

ZHAO Yong, ZHANG Cai-qin, ZHAO Ning-ning, TAN Deng-xu,
ZHAO Ya, ZHANG Hai, SHI Chang-hong*

(Laboratory Animal Center, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

【Abstract】 Objective To determine the target recognition ability of the near-infrared fluorescence (NIRF) heptamethine cyanine dye in mouse models of orthotopically transplanted gastric carcinoma with optical imaging. **Methods** The orthotopically transplanted model of gastric carcinoma was established by implantation of luciferase-tagged-HepG2 cells into the stomach in nude mice, and gastric ulcer model was induced by absolute ethanol. Both bioluminescence (BIL) signal and NIRF signal in those two animal models were observed with optical imaging respectively, and the absorption of NIRF dye in gastric carcinoma tissues was determined. We further explored the effect of hypoxia and OATP on the absorption of the NIRF dye in gastric carcinoma tissues. The specific targeting ability of NIRF dye to tumor cells was evaluated. **Result** A good positive correlation was observed between NIRF signal and BIL signal ($R^2 = 0.995$). Strong NIRF signal was observed in gastric carcinoma region, but no signal was found in the gastric ulcer model. Moreover, hypoxia further promoted the uptake of NIRF dye in gastric carcinoma, but OATP specific inhibitor BSP significantly reduced the absorption of NIRF dye in tumor cells. **Conclusions** The NIRF heptamethine cyanine dye can be applied to identify the orthotopically transplanted gastric carcinoma in nude mouse models.

【Key words】 Near-infrared fluorescent dye; Near-infrared fluorescence; Gastric cancer; Orthotopically transplanted tumor model; Nude mouse.

Corresponding author: SHI Chang-hong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31572340);陕西省统筹科技资源项目(2016FWPT-02)。

[作者简介] 赵勇(1982-),男,实验师,研究方向:人类疾病动物模型。Email: zhaoyong8@aliyun.com

[通讯作者] 师长宏(1973-),男,教授,博士生导师。Email: changhong@fmmu.edu.cn

近红外荧光(near infrared fluorescence, NIRF)染料吸收和发射光谱均位于近红外区(700 ~ 1000 nm),自发荧光低,但与化合物结合后可诱导较强的荧光^[1,2]。由于该类染料所产生的荧光组织穿透性强,目前已成为良好的影像探针,广泛应用于动物模型和人体的成像研究^[2]。前期我们实验室联合弗吉尼亚大学合成并筛选了一系列七甲川菁(heptamethine cyanine)近红外荧光染料,这类聚甲基菁染料的杂环化合物,是由甲基链组成的大 π 共轭体系,常见的有 IR-783 和 MHI-148^[3]。该类染料有着较高的体内消除率和较大的斯托克斯位移,不需要化学修饰,可直接被人胃癌肿瘤细胞吸收呈特异性聚集,从而用于胃癌裸鼠皮下移植模型活体成像^[4,5,6]。本研究为进一步明确该染料的肿瘤靶向性和组织穿透能力,制备了人胃癌裸鼠原位移植模型,测试该类染料对肿瘤的靶向识别能力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 雄性裸鼠 10 只,体重 20 ~ 25 g, 6 ~ 7 周龄。购自北京维通利华实验动物科技有限公司[SCXK(京)2012-0001],随机分为胃癌原位移植模型组和胃溃疡模型组。动物饲养在第四军医大学实验动物中心 SPF 级屏障环境中[SYXK(陕)2014-001]。

1.1.2 主要试剂和仪器

胃癌传代肿瘤细胞 SGC-7901,由第四军医大学实验动物中心保存,标记荧光素酶 luciferase 的 SGC-7901(luc-SGC-7901)细胞由腺病毒感染后制备^[7]。七甲川菁 NIRF 染料 IR-783 由美国 Cedars-Sinai Medical Center, Leland Chung 教授提供^[8]。水合氯醛浓度为 7 g/100 mL, DAPI 染色液由北京雷根生物技术有限公司提供。HIF1 α 兔抗人单克隆抗体购自艾博抗体上海贸易有限公司, OATP1B3 鼠抗人单克隆抗体购自 GeneTex 公司。

1.2 方法

1.2.1 人胃癌裸鼠原位移植模型和胃溃疡模型的制备

取 5 只 6 ~ 7 周龄雄性裸鼠,腹腔注射水合氯醛 100 μ L,浓度为 7 g/100 mL。用眼科剪从裸鼠腹中线开口,暴露完整胃,在胃底部进针达肌层,注射人

胃癌传代细胞 luc-SGC-7901,体积为 50 μ L,数量为 1×10^6 。将胃送回腹腔,手术缝合腹部肌层和皮肤。10 d 后裸鼠腹腔注射 NIRF 染料 IR-783,剂量为每只 10 μ mol,24 h 后,用 Caliper Lumina II 小动物光学成像系统测定肿瘤部位 NIRF 强度 ROI(regions of interest);同时腹腔注射荧光素酶底物,剂量为每只 1.5 mg,活体成像测定肿瘤部位生物发光强度并获得 ROI 值。每 5 d 测量一次,绘制荧光强度与生物发光强度的相关性曲线。同时,取 5 只 6 ~ 7 周龄裸鼠,禁食、禁水 12 h 后,灌胃 750 μ L 无水乙醇,连续 2 d,制备胃溃疡模型。按同样的方法注射 NIRF 染料 IR-783,并进行活体成像。

1.2.2 胃癌组织对 NIRF 染料的吸收

将人胃癌裸鼠原位移植模型和裸鼠胃溃疡模型分别处死,处死前 24 h 注射 IR-783,处死前 10 min 注射荧光素酶底物。将裸鼠的胃和心脏、肝、脾、肺、肾分别取出,在用 Caliper Lumina II 小动物光学成像系统测定肿瘤部位 NIRF 强度和生物发光信号(bioluminescence, BL)强度。

1.2.3 PDX 模型肿瘤组织免疫组织化学分析

取原位肿瘤移植模型的胃组织和胃溃疡模型的胃组织分别用 4% 多聚甲醛固定后,石蜡包埋,组织切片并进行 H&E 和免疫组织化学染色,一抗为 HIF1 α 兔抗人单克隆抗体和 OATP1B3 鼠抗人单克隆抗体,二抗分别为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔和羊抗鼠抗体。

1.2.4 缺氧和 OATP 抑制剂对胃癌细胞吸收 NIRF 染料的影响

将 HepG2 肿瘤细胞培养于 24 孔板内(1×10^6),37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,加入 IR-783,终浓度为 5 μ mol/L,在 1% O₂ 中培养 1 h,或加入 OATP 抑制剂 BSP(终浓度为 250 μ mol/L,购自 Sigma 公司)同样 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 洗去多余的染料,4% 多聚甲醛固定后, DAPI 染核。同样方法处理对照组,用配备有 ICG 滤光片的荧光显微镜观察。

2 结果

2.1 NIRF 信号与生物发光信号的相关性

将人胃癌细胞 luc-SGC-7901 接种裸鼠胃部后,分别进行 NIRF 和生物发光活体成像,测定不同时间点肿瘤部位 NIRF 强度与生物发光强度。结果见图 1,在不同时间点两种信号强度具有较好的相关性,拟合曲线中 R² 值达到 0.995。

2.2 胃癌原位移植模型与胃溃疡模型活体成像结果比较

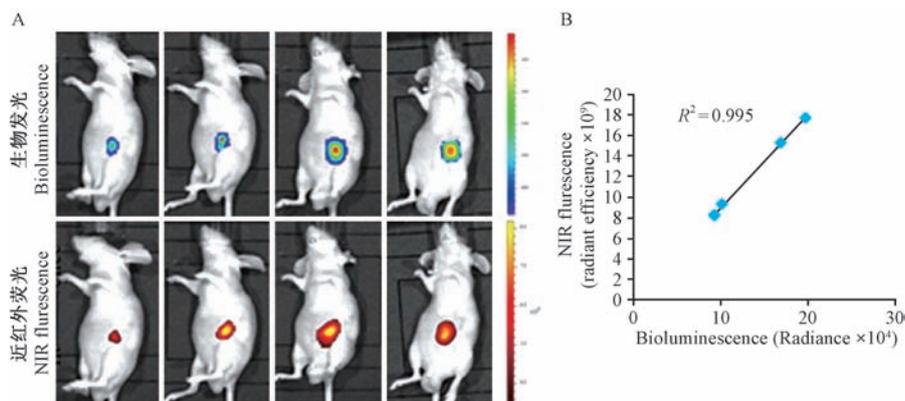
胃癌原位移植模型通过 NIRF 成像可在胃部获得较强的荧光信号,而胃溃疡模型并未检测到荧光信号。处死裸鼠后分离完整的胃,通过成像检测在胃部依旧可以发现荧光信号和生物发光信号,与发生溃疡的胃组织具有显著差别(图 2)。

2.3 NIRF 信号在胃癌组织中的分布

比较胃肿瘤组织与其他脏器 NIRF 信号强度,发现二者具有显著差异,生物发光与 NIRF 成像结果一致(见图 3)。

2.4 胃肿瘤组织和胃溃疡组织的病理形态

将胃癌模型和胃溃疡模型中的胃组织剥离后, PBS 冲洗,肉眼可看到肿瘤模型在胃部形成明显的隆起,呈肿瘤样结构,而溃疡模型在胃部形成炎细胞浸润,局部坏死和缺损。结果见图 4。

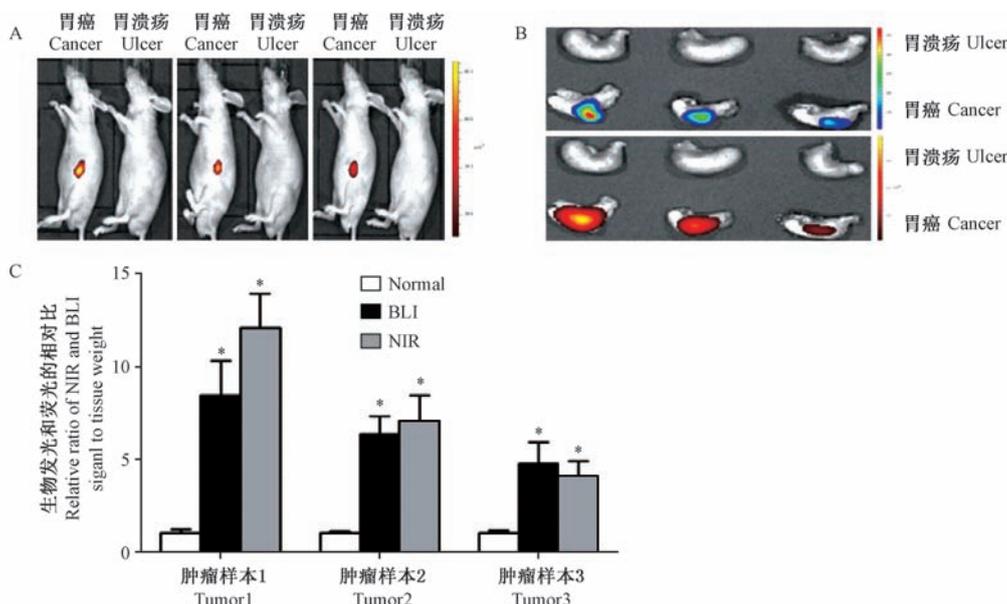


注:A. 胃癌细胞原位移植裸鼠不同时间点获取的生物发光 (bioluminescence) 信号和近红外荧光 (NIRF) 信号; B. 肿瘤部位生物发光和近红外荧光 ROI 值的相关性。

图 1 胃癌裸鼠原位移植模型中生物发光与近红外荧光信号的相关性

Note: A. BL signals and NIRF signals at different time points in the orthotopic gastric carcinoma model. B. Correlation of ROI value between BL and NIRF signal intensities.

Fig.1 Correlation between BL and NIRF imaging signals in the gastric cancer of nude mice.

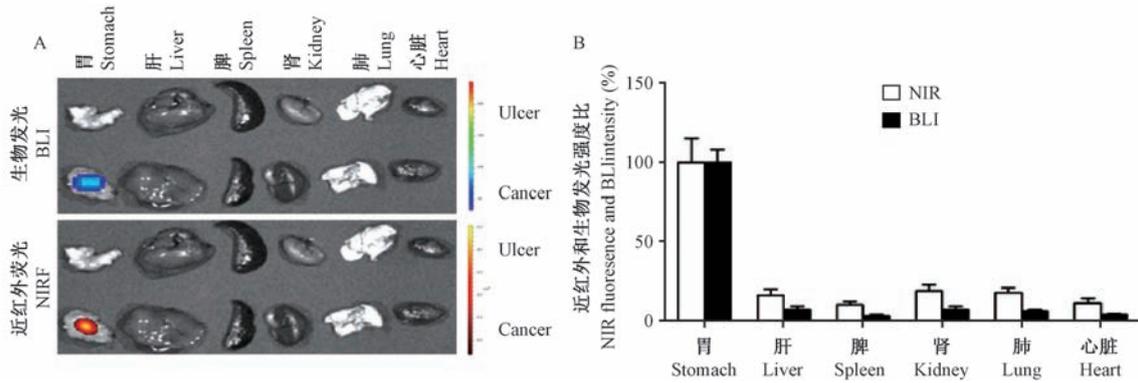


注:A. 胃癌和胃溃疡模型 NIRF 活体成像结果; B. 胃癌和胃溃疡组织 NIRF 成像和生物发光成像结果; C. 胃癌和胃溃疡组织成像结果比值。* $P < 0.05$ Vs 正常组。

图 2 胃癌和胃溃疡组织活体成像结果

Note. A. In vivo NIRF imaging results of gastric cancer and gastric ulcer tissues. B. Ex vivo NIRF and BL imaging results of gastric cancer and gastric ulcer tissue. C. Relative ratio of NIRF and BIL signals to tissue weight. * $P < 0.05$ Vs normal.

Fig.2 Comparison of the imaging results of gastric ulcers and gastric cancers.



注:A. 胃癌组织与肝、脾、肾、肺和心脏生物发光与荧光信号的成像结果; B. 胃癌组织与肝、脾、肾、肺和心脏生物发光与荧光信号的比值。

图 3 胃癌组织和胃炎组织体外成像结果比较

Note. A. *Ex vivo* BL and NIRF imaging of mice bearing orthotopic luc-tagged gastric carcinoma xenografts or gastric ulcer, including gastric carcinoma, liver, spleen, kidney, lung, and heart. B. Quantification of the BL and NIRF signal in the gastric cancer, liver, spleen, kidney, lung and heart.

Fig. 3 The imaging results of gastric carcinoma or gastric ulcer compared with other organ imaging results

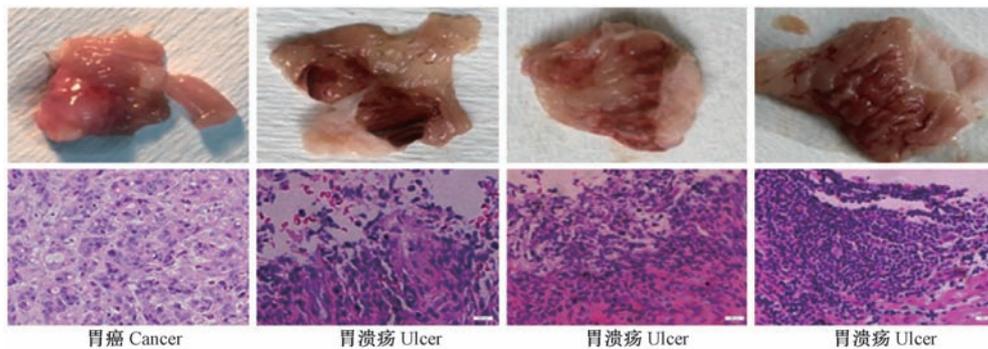


图 4 胃癌组织和胃溃疡组织的病理形态

Fig. 4 Pathology of gastric carcinoma and gastric ulcers

2.5 胃癌组织和胃溃疡组织的免疫组织化学结果

免疫组织化学检测胃癌组织和胃溃疡组织中 OATP1B3 和 HIF1 α 的表达,结果如图 5, OATP1B3 和 HIF1 α 在胃癌组织呈高表达,而在胃溃疡和正常胃组织中表达量较低,与肿瘤组织相比有显著差别。

2.6 缺氧和 OATP 调控胃癌肿瘤细胞对 IR-783 染料的吸收

缺氧和 OATP1B3 在调控肿瘤细胞特异性识别 NIRF 染料的过程中发挥了重要作用。培养的胃癌细胞在缺氧状况下对 NIRF 染料 IR-783 的吸收显著增加,而当加入 OATP 抑制剂 BSP 后胃肿瘤细胞对 IR-783 的吸收显著减弱,结果见图 6。

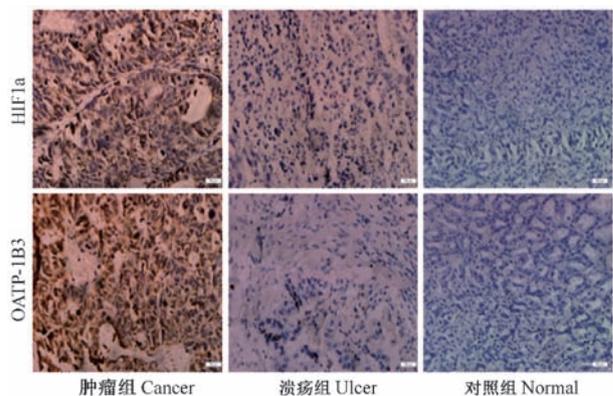
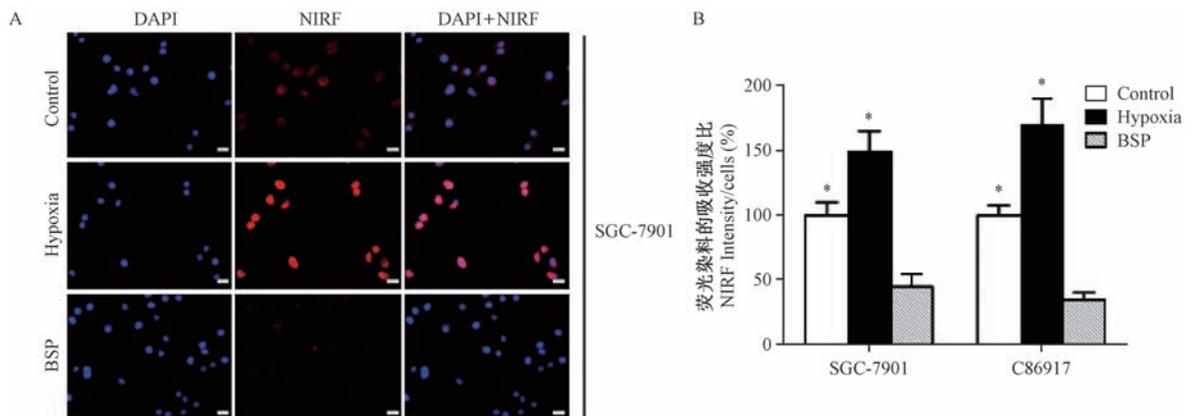


图 5 胃癌和溃疡组织中 OATP1B3 和 HIF1 α 的表达

Fig. 5 Expression of OATP1B3 and HIF1 α in the gastric carcinoma and gastric ulcer tissues



注:A. 缺氧促进肿瘤细胞对 IR-783 染料的吸收,OATP 抑制剂 BSP 减弱肿瘤细胞对 IR-783 染料的吸收;B. 肿瘤细胞对 IR-783 染料的吸收强度变化的比值。* $P < 0.05$ Vs 正常对照。

图 6 缺氧和 OATP 抑制剂对胃癌细胞吸收 NIRF 染料的影响

Note. A. Hypoxia promotes the uptake of IR-783 dye and OATP inhibitor BSP decreased the NIRF dyes accumulation in gastric cancer cells. B. The intensity ratio of IR-783 dye accumulation in gastric cancer cells under hypoxia or OATP inhibitor. * $P < 0.05$ Vs normal.

Fig. 6 The effect of hypoxia and OATP inhibitor on NIRF dye accumulation in gastric cancer cells

3 讨论

与传统的皮下移植模型相比,胃的原位移植较好的模拟了肿瘤发生的过程,形成的肿瘤组织结果与临床胃癌组织较为相似,用于近红外荧光染料的测试可以获得与临床相近的实验结果,从而验证了该类染料的特异性和可靠性^[9,10]。使用转染荧光素酶(luciferase)标记的传代肿瘤细胞接种裸鼠形成肿瘤移植模型,注射底物后检测生物发光信号,是肿瘤模型较常采用的活体成像技术,该方法特异性和灵敏度均较高^[11]。本研究将靶向近红外荧光活体成像技术与生物发光技术进行比较,两者呈现出较好的相关性。

常规近红外荧光染料需要结合特异性的靶片段才能识别肿瘤细胞,比如肿瘤特异性抗原、多肽、酶的底物和肿瘤标志物等^[9,11]。而本研究使用近红外荧光染料具有成像和靶分子的双重特性,不需连接靶向片段便可直接识别肿瘤细胞,避免了化学结合和繁琐的探针制备过程。前期实验证实该类七甲川菁染料特异性的聚集于肿瘤部位主要与肿瘤低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor1a, HIF1 α)和有机阴离子转移肽(organic anion transporter peptides, OATPs)相关^[12,13]。肿瘤细胞中缺氧和活化的 HIF1 α /OATPs 信号分子,提供了不同分子之间的调控作用,促进了 NIRF 染料的吸收。当我们将胃癌细胞培养于低氧环境时能显著促进肿瘤细胞对 NIRF 染料的吸收;相反,当加入 OATP 抑制剂 BSP

时,能够有效抑制肿瘤细胞对 NIRF 染料的吸收^[14],同时,通过免疫组织化学分析发现相比于胃溃疡,胃癌组织中 OATP1B3 和 HIF1 α 均呈高表达,从而进一步说明缺氧和活化的 HIF1 α /OATPs 信号分子调控了肿瘤对靶向 NIRF 染料的吸收。由于缺氧和 OATPs 的表达是肿瘤细胞中普遍存在的现象,推测该类染料也能广泛识别其他类型的肿瘤细胞^[15]。

参 考 文 献

- [1] Yang X, Shi C, Tong R, et al. Near IR heptamethine cyanine dye-mediated cancer imaging [J]. Clin Cancer Res. 2010, 16 (10): 2833 - 2844.
- [2] Gemeinhardt I, Puls D, Gemeinhardt O, et al. Near-infrared fluorescence imaging of experimentally collagen-induced arthritis in rats using the nonspecific dye tetrasulfocyanine in comparison with gadolinium-based contrast-enhanced magnetic resonance imaging, histology, and clinical score [J]. J Biomedl Optics. 2012;17(10):106008.
- [3] Yeh CS, Su CH, Ho WY, et al. Tumor targeting and MR imaging with lipophilic cyanine-mediated near-infrared responsive porous Gd silicate nanoparticles [J]. Biomaterials. 2013, 34 (22): 5677 - 5688.
- [4] Tummers QR, Boogerd LS, de Steur WO, et al. Near-infrared fluorescence sentinel lymph node detection in gastric cancer: A pilot study [J]. World J Gastroenterol. 2016, 22(13): 3644 - 3651.
- [5] Kim JS, Kodagahally R, Strekowski L, et al. A study of intramolecular H-complexes of novel bis(heptamethine cyanine) dyes [J]. Talanta. 2005, 67(5): 947 - 954.
- [6] Winstead AJ, Williams R, Hart K, et al. Microwave synthesis of near infrared heptamethine cyanine dye [J]. J Microw Power Electromagn Energy, 2008, 42(1): 35 - 41.

(下转第 578 页)

广西和云南树鼩群体遗传多样性的比较分析

唐艳萍, 曹骥*, 杨香娣, 杨春, 李瑗, 周玲丽, 罗旺, 邓玲, 王谷洋, 李科志

(广西医科大学附属肿瘤医院实验研究部, 南宁 530021)

【摘要】 目的 比较分析我国广西、云南两个树鼩群体的遗传差异和分化程度, 推动树鼩优良品系的培育和优化实验动物模型。方法 提取广西和云南各32只树鼩的全血基因组DNA, 分别采用9对荧光标记微卫星引物进行PCR扩增, 通过毛细管电泳技术检测扩增片段, 并利用POPGENE等软件比较两个树鼩群体的遗传相关指标。结果 广西和云南两个树鼩群体平均期望杂合度(H_e)为0.703, 平均多态信息含量(PIC)为0.725, F_{is} 均值 >0 。CCBL1B、CCDC61、EDA1和OPA3四个位点表现为极显著偏离哈迪-温伯格平衡。两群体的遗传距离及无偏遗传距离分别为1.277和1.268, 遗传相似系数约为0.28。遗传结构变异的分布情况显示61.57%的微卫星遗传变异来自于群体内部, 38.43%存在于群体之间。STRUCTURE分析发现广西和云南树鼩为中缅树鼩群体的两个不同的亚种。结论 广西和云南树鼩两个群体的遗传多样性都较丰富, 两个群体间具有较大的遗传差异和分化程度, 遗传变异主要来源于群体内部。

【关键词】 树鼩; 荧光标记; 微卫星; 遗传多样性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0572-07

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.004

Comparison of the genetic diversity between Guangxi and Yunnan tree shrew populations (*Tupaia belangeri chinensis*)

TANG Yan-ping, CAO Ji*, YANG Xiang-di, YANG Chun, LI Yuan,
ZHOU Ling-li, LUO Wang, DENG Ling, WANG Gu-yang, LI Ke-zhi

(Department of Experimental Research, Affiliated Cancer Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

【Abstract】 **Objective** To compare and analyze the genetic variation and differentiation of two tree shrew populations from Guangxi and Yunnan, to promote the breeding of fine strains of tree shrews and optimization of experimental animal models. **Methods** Sixty-four blood samples were collected and the gene DNA was extracted, 32 from the Guangxi and 32 from Yunnan populations. PCR amplification products of the nine fluorescent labeling simple sequence repeat (SSR) markers were detected by capillary electrophoresis technique and various bioinformatics software were used to analyze the genetic diversity of the two tree shrew populations (Guangxi group and Yunnan group). PCR amplification was performed using 9 fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers, the amplification products were detected by capillary electrophoresis technique, and various bioinformatics softwares such as Popgene were applied to analyze the genetic diversity of the two tree shrew populations. **Results** The average number of expected heterozygosity and polymorphism information content among the 9 microsatellite loci of Guangxi and Yunnan groups were 0.703 and 0.725, respectively. The mean value of F_{is} was >0 in both groups. The results of the tests on all the loci with Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium showed that four loci (CCBL1B, CCDC61, EDA1 and OPA3) in the two populations exhibited significant deviations ($P < 0.001$). The study also found the genetic similarity between the two populations was 0.28, while the genetic distance and unbiased genetic distance were 1.277 and 1.268, respectively. The results from AMOVA analysis

【基金项目】 国家自然科学基金项目(编号:81260080, 81460418); 广西自然科学基金项目(编号:2013GXNSFAA019210); 广西科技基础条件平台建设项目(编号:10-108-25, 11-31-03); 广西研究生教育创新计划资助项目(编号:YCSZ2015114)。

【作者简介】 唐艳萍(1986-), 女, 助理研究员, 研究方向: 医学实验动物学。E-mail: tangyanping1986@126.com。

【通讯作者】 曹骥(1973-), 男, 研究员, 研究方向: 树鼩肝炎模型的研究。E-mail: caojien@163.com

showed that 61.57% of genetic variation occurred within populations and 38.43% occurred among populations. Furthermore, structure analysis showed that the Guangxi and Yunnan populations studied in this study are divided into two single subspecies belonging to *Tupaia belangeri*. **Conclusions** Our results consistently indicate high genetic diversity of the two tree shrew populations, and their genetic variation is mainly of intra-populational origin.

【Key words】 Tree shrew; Fluorescent marker; Microsatellite DNA; Genetic diversity.

Corresponding author: CAO Ji. E-mail: caojien@163.com

树鼯是一种外貌形态与松鼠类似的低等灵长类动物,目前主要分布于南亚、东南亚、我国西南部和南部地区。王应祥等^[1]根据中缅树鼯的外形和头骨数据,将我国树鼯分为 6 个亚种,即滇西亚种、海南亚种、越北亚种、瑶山亚种、高黎贡山亚种和滇南亚种。刘瑞清等^[2]在树鼯染色体水平上的研究结果显示滇西亚种、越北亚种和瑶山亚种都是二倍体,并且这些亚种间的核型相似,该结果为树鼯的分类鉴定提供了细胞学依据。自 20 世纪 80 年代以来,以树鼯作为动物模型的医学生物学研究受到越来越多的关注。相比于其他灵长类动物,树鼯因其具有形体小、繁殖快、成本低等特点,已被广泛应用于病毒感染、代谢性疾病、肿瘤等方面的研究^[3]。然而目前实验中使用的树鼯遗传背景资料匮乏,尤其是亚种间的遗传差异和分化程度尚不清楚。

微卫星亦称简单重复序列,是以核苷酸为单位的 1~6 个碱基串联重复序列,具有多态性高以及保守性、共显性、重复性好等特点,被认为是目前研究种群遗传差异的理想分子标记,已被广泛应用于动植物遗传多样性、遗传结构、物种进化等方面的研究^[4]。近年来国内外学者已经开始通过筛选微卫星标记对中缅树鼯遗传多样性进行研究^[5-8],然而这些研究多数局限于单个中缅树鼯群体的遗传多样性,而比较分析树鼯亚种群体间的遗传差异和遗传结构鲜有报道。

本研究通过荧光标记微卫星技术,结合测序进行微卫星基因型判断,对来自广西的野生树鼯群体和云南昆明的人工饲养群体进行研究,比较分析两个树鼯群体的遗传多样性差异和遗传结构,为合理保护和开发利用树鼯种质资源提供科学的理论依据,同时也为培育优良的树鼯品系和建立实验动物模型积累遗传基础性数据。

1 材料与方法

1.1 动物来源

树鼯分别来源于广西融安县野生群和云南昆明动物研究所人工繁殖群,两个树鼯群体各随机选取 32 只,雌雄各半。饲养环境保持 20~25℃室温和

30%~60%湿度,每日清洁 2 次。

1.2 主要试剂及仪器

DNA 提取试剂盒(货号:DP348)、Taq 酶、微卫星上游荧光标记引物购自 Takara 公司;内标 LIZ 500、Hi-Di 甲酰胺购自美国 ABI 公司;PTC-200 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司;凝胶成像仪购自英国 Syngene 公司;ABI 3730XL 遗传分析仪购自美国 ABI 公司;电泳仪购自北京市六一仪器厂。

1.3 全血 DNA 提取和检测

分别对树鼯进行股静脉采血 1 mL,肝素钠抗凝,-20℃保存。基因组 DNA 的提取参考试剂盒的操作说明书。将 DNA 浓度稀释到 50~100 ng/μL,于 -20℃保存备用。用浓度为 0.8%~1%的琼脂糖电泳检测所提取的 DNA 样品,并检测其浓度和纯度,A260/A280 比值应为 1.7~1.9。

1.4 选择微卫星位点和设计筛选引物

通过 NCBI 中的 *Tupaia chinensis* 基因组数据库查找 SSR 位点,并参考国内外中缅树鼯微卫星位点的侧翼序列。首先筛选出 35 对微卫星引物进行 PCR 第一轮扩增(重复两次),用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测出有目的条带后,再进行第二轮的荧光标记 PCR 扩增,并予以鉴定。最后选择扩增比较稳定且条带比较清晰的 9 对微卫星引物用于微卫星遗传多样性分析。所有引物全部由深圳华大基因科技有限公司合成并进行荧光染料标记(FAM 蓝)。各微卫星位点引物序列相关信息见表 1。

1.5 多重 PCR 扩增

PCR 反应总体积 15 μL:10 × PCR buffer 1.5 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 1 μL, 上、下游引物 (10 mmol/L) 各为 0.5 μL, Taq DNA 聚合酶 0.25 μL, MgCl₂ (2.5 mmol/L) 2 μL, DNA 模板 (60 ng/μL) 1 μL, 加 ddH₂O 至反应终体积为 15 μL,再加 1~2 滴矿物油。PCR 扩增条件:95℃预变性 5 min,95℃变性 20 s,54~59℃退火 20 s,72℃延伸 30 s,10 个循环,95℃变性 20 s,54~59℃退火 20 s,72℃延伸 30 s,25 个循环,72℃延伸 30 min。取 2 μL PCR 扩增产物,2%琼脂糖凝胶电泳。

表 1 树鼩群体 9 个微卫星位点的相关信息及退火温度

Tab. 1 Information and annealing temperature on 9 microsatellite loci from the tree shrews

位点名称 Locus	片段大小 Size range	登录号 GenBank accession number	核心序列 Repeat motif	荧光标记 Fluorescent label	引物序列(5' - 3') Primer sequences (5' - 3')	退火温度 / °C Annealing temperature
CCBL1A	324 - 338	>gi1558064534;879582 - 925420	(AG) ₁₂	FAM	F:TCGCCCCTCACAACTATACC R:CCTCTCAGGTGGGCAAAGAA	58
CCBL1B	342 - 354	>gi1558064534;879582 - 925420	(AG) ₁₂	FAM	F:CTGCTGCACCAGGGAATAGG R:TGTGTCTGATGGCCCGTGAA	57
CCDC61	167 - 179	>gi1558068208;3985812 - 4010079	(AAT) ₇	FAM	F:GTGGCTTTGTTTTTGAAGCAGC R:CATTACGCTAACTACTGG	59
EDA1	489 - 529	>gi1557962798;c351759 - 266704	(ATTT) ₇	FAM	F:TCTCATGCCACGCTCTTTCCT R:CTCACTCTGTCCCTCT	55
OPA3	433 - 449	>gi1558068208;c3466190 - 3404814	(TTTG) ₆	FAM	F:GAAGGCAGTTACTTTCCCGC R:GGGTGGAACCTGATCCTCAAG	57
RALGPS1A	423 - 435	>gi1558064534;c2754549 - 2470366	(TTA) ₆	FAM	F:CCCCAAGTGAGGGCATTACA R:GCTGGTAGGCACTGCTACTG	54
SLC45A4	427 - 483	>gi1558065195;2077523 - 2150050	(TCTT) ₁₆	FAM	F:ATCCCACGTGCCACTTTGTA R:CCCTGGGAGGTGTGAAAACCT	58
TP53	177 - 203	>gi1558065239;842295 - 867393	(AG) ₉	FAM	F:AACATCCTGTCTGCTCCC R:GGTGAACAATGGAGC	56
TRIM23	171 - 183	>gi1557961907;c430891 - 390111	(ATTT) ₅	FAM	F:TCCAGCAACTTCTGAGTCCC R:AAGTGTACCCTCCCTAT	59

1.6 毛细管电泳检测扩增片段

取 PCR 产物 1 μ L, Liz 500 内标 0.8 μ L, Hi-Di 甲酰胺 8.0 μ L 充分混匀后, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 然后在 ABI3730XL 自动测序仪上进行毛细管电泳检测(本部分由深圳华大基因公司完成)。由 Genemarker V2.2.0 (SoftGenetics LLC, State College, PA) 软件自动生成各位点在每个样品上的图谱文件, 根据峰值图获取产物片段大小。

1.7 数据统计与分析方法

使用 CONVERT(version 1.31) 软件转化数据格式, 利用 Microsatellite Toolkit (version 3.1)、POP-GENE(version 1.32) 软件计算各基因座等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、Shannon 信息指数(I)等指标, 并计算 F-统计量(F_{is} , F_{it} , F_{st})。利用 FSTAT 2.9.3 软件计算各位点的等位基因丰富度(allele richness, AR)。多态信息含量(PIC)使用 PIC-CALC 软件计算。运用 GENEPOP4.0 软件检验各种群等位基因频率是否偏离哈温平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)。种群的瓶颈效应利用 BottlenecK 软件提供的 IAM、TPM、SMM 三个模型来检测, 设置 1000 个重复, 并通过 Wilcoxon 符号秩次检验(Wilcoxon signed-rank test)和符合检验(Sign test)分析杂合过度是否显著。利用 Arlequin 3.5.1 软件包中的分子变异分析软件(AMOVE)计算种群间和种群内的分

子遗传变异分布情况, 以及各种群间的遗传分化系数(F_{ST})和基因流(Nm)。使用 Structue 2.2 软件对所有个体的基因型进行贝叶斯聚类分析, 检测树鼩群体潜在的遗传结构。本研究 K 值设为 1~5, 使用混合模型(admixture model), 对每个 K 值重复运行 6 次, 预热 100,000 次并舍弃(burn-in 为 100,000), 随后进行 1,000,000 次重复正式计算(run-length 为 1,000,000)。根据每次运行不同的 K 值对应得 LnP(D)值计算 ΔK 值分析可能的遗传结构。

2 结果与分析

2.1 毛细管电泳检测结果

图 1、2 分别为广西、云南两个群体中的某个体在 EDA1 位点上的检测结果, 可看出 EDA1 位点在广西树鼩和云南树鼩 2 个样品中检测到的微卫星 DNA 产物片段大小(基因型)分别为 489/493 bp 和 493/502 bp。该位点都表现为双峰, 即为杂合子; 无其它非特异性扩增产物污染, 说明引物扩增特异性良好。

2.2 两个树鼩群体的遗传多样性

由表 2 可知广西树鼩群体的 N_e 、 H_e 、PIC 和 I 分别为 2.7422、0.5856、0.5201、1.0676, 都略高于云南树鼩群体(2.2939、0.4840、0.4195、0.8606); 对这两个群体进行配对 t 检验, 结果提示差异均无显著性

($P_{Ne} = 0.232$ 、 $P_{He} = 0.193$ 、 $P_{PIC} = 0.197$ 、 $P_I = 0.232$)。

对两个树鼩群体 9 个微卫星位点进行 HWE 平衡检测,结果显示 CCBL1B、CCDC61、EDA1 和 OPA3 这 4 个位点在两个树鼩群体都表现为极显著偏离

HWE 平衡 ($P < 0.01$); CCBL1A、RALGPS1A 和 SLC45A4 这 3 个位点在两个群体都处于平衡状态 ($P > 0.05$); TP53 和 TRIM23 两位点在云南树鼩表现为显著偏离平衡状态,而在广西树鼩中处于平衡状态。

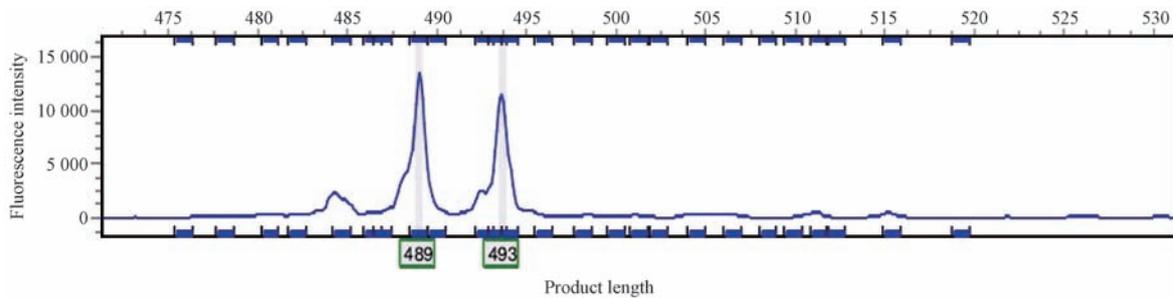


图 1 广西树鼩 EDA1 位点分型结果:489/493 bp

Fig.1 Results of EDA1 in Guangxi tree shrew individual genotypic alleles analyzed by the Genemarker:489/493 bp

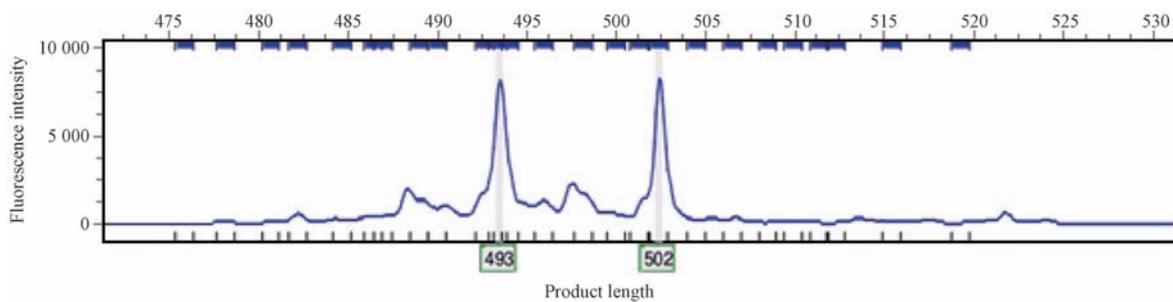


图 2 云南树鼩 EDA1(FAM)位点分型结果:493/502 bp

Fig.2 Result of EDA1 genotypic alleles analyzed by the Genemarker is 493/502 bp in the Yunnan tree shrew individuals

表 2 两个树鼩群体 9 个微卫星位点的遗传多态性及 Hardy-Weinberg 平衡检验

Tab.2 Genetic diversities and Hardy-Weinberg equilibrium test of 9 microsatellite loci in the two tree shrews populations

位点 Locus	广西 (GX) Guangxi (GX)						云南 (YN) Yunnan (YN)					
	有效等位基因 Ne	观测杂合度 Ho	期望杂合度 He	多态信息含量 PIC	香浓指数 I	PHW	有效等位基因 Ne	观测杂合度 Ho	期望杂合度 He	多态信息含量 PIC	香浓指数 I	PHW
CCBL1A	3.220	0.813	0.700	0.633	1.319	0.210	1.534	0.406	0.354	0.297	0.582	0.123
CCBL1B	2.149	0.219	0.543	0.474	0.910	0.000*	2.547	0.938	0.617	0.527	1.075	0.000*
CCDC61	2.779	0.125	0.650	0.576	1.204	0.000*	1.438	0.123	0.310	0.258	0.483	0.000*
EDA1	3.710	0.281	0.742	0.690	1.504	0.000*	1.932	0.147	0.490	0.366	0.676	0.000*
OPA3	2.359	1.000	0.585	0.486	0.934	0.000*	2.186	1.000	0.551	0.438	0.849	0.000*
RALGPS1A	2.092	0.531	0.530	0.465	0.894	0.064	1.255	0.188	0.206	0.197	0.485	0.228
SLC45A4	5.069	0.813	0.815	0.775	1.705	0.982	4.935	0.719	0.810	0.769	1.747	0.286
TP53	2.096	0.438	0.531	0.427	0.828	0.605	3.396	0.969	0.717	0.651	1.291	0.000*
TRIM23	1.205	0.125	0.173	0.155	0.311	0.228	1.421	0.156	0.301	0.272	0.560	0.004*
Mean	2.742	0.483	0.586	0.520	1.068		2.294	0.516	0.484	0.420	0.861	
St. Dev	1.134	0.327	0.185	0.179	0.415		1.202	0.423	0.206	0.194	0.434	

注:PHW, Hardy-Weinberg 平衡检验 P 值;*,显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ($P < 0.01$)。

Note. PHW, * P value from exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), showing significant departure from HWE ($P < 0.01$).

2.3 各微卫星位点遗传变异

在 64 个广西和云南的树鼩血样品中 9 个微卫

星位点共检测到 62 个等位基因,其中位点 TRIM23 的等位基因数最少(为 3 个);位点 SLC45A4 的等位

基因数最多(为 14 个)(见表 3)。每个基因座上的平均等位基因为 6.889 个。所有位点的 PIC 均大于 0.5,平均 PIC 为 0.725。各位点 H_o 和 H_e 分别在 0.141 ~ 1.000 和 0.241 ~ 0.907 之间,平均观测杂

合度和平均期望杂合度分别为 0.484 和 0.703。

F-stastic 统计结果(见表 3)显示 F_{is} 、 F_{it} 、 F_{st} 的变化范围分别为 $-0.788 \sim 0.868$ 、 $-0.302 \sim 0.913$ 和 $0.025 \sim 0.373$,平均为 0.080、0.306 和 0.235。

表 3 9 个微卫星位点的遗传特征

Tab.3 Genetic characteristics of 9 microsatellite loci used in this study

位点 Loci	等位 基因数、 N_a	有效 等位基 因数 N_e	观测 杂合 度 H_o	期望 杂合 度 H_e	多态 信息 含量 PIC	等位 基因 丰度 AR	香浓 指数 I	亚群 内近 交指数 F_{is}	总群 体内 近交 指数 F_{it}	种群 间分 化指 数 F_{st}
CCBL1A	7	3.170	0.609	0.690	0.731	5.878	1.377	-0.175	0.110	0.242
CCBL1B	7	4.559	0.578	0.787	0.755	6.485	1.649	-0.012	0.259	0.269
CCDC61	5	3.542	0.063	0.723	0.674	4.971	1.399	0.868	0.913	0.342
EDA1	9	5.082	0.141	0.810	0.776	7.849	1.783	0.768	0.825	0.245
OPA3	5	4.309	1.000	0.774	0.743	4.986	1.505	-0.788	-0.302	0.272
RALGPS1A	5	2.368	0.359	0.582	0.630	4.629	1.045	0.009	0.378	0.373
SLC45A4	14	10.002	0.766	0.907	0.895	12.824	2.419	0.043	0.149	0.111
TP53	7	5.185	0.703	0.814	0.780	6.871	1.753	-0.145	0.129	0.239
TRIM23	3	1.314	0.141	0.241	0.541	2.995	0.484	0.397	0.412	0.025
Mean	6.889	4.392	0.484	0.703	0.725	6.388	1.490	0.080	0.306	0.235

2.4 遗传距离和遗传分化

通过 Popgene 1.32 软件计算出广西和云南树鼩 Nei(1972) 遗传距离和遗传同一性分别为 1.2770 和 0.2789, Nei (1978) 无偏遗传距离和遗传同一性分别为 1.2680 和 0.2814。

利用 Arlequin 软件包中的 AMOVA 分析检测两个树鼩群体遗传结构变异分布情况,结果显示 61.57% 的微卫星遗传变异来自于群体内部, 38.43% 存在于群体之间,群体间已经产生了极显著的遗传分化 ($F_{st} = 0.3843, P = 0.0000$)。

2.5 遗传结构

通过 Structure 软件对两个树鼩群体的 64 个样本进行聚类分析,结果显示,当 $K = 2$ 时, ΔK 出现

明显拐点且取得最大值,提示本研究的两个树鼩群体的 64 个样品可划分为 2 个理论群,而且两个树鼩群体的个体遗传结构都相对独立的。

2.6 瓶颈效应分析结果

瓶颈效应分析结果(见表 4)显示,广西树鼩在 IAM 和 TPM 这两种模型下均偏离了突变-漂移平衡,表现出极其显著的杂合度过剩 ($P < 0.01$),但在 SMM 模型下未偏离突变-漂移平衡 ($P > 0.05$);而云南树鼩群体在 3 种突变模型下,虽然表现出杂合度过剩,但均未达到显著性的水平 ($P > 0.05$)。这些结果表明广西树鼩群体突变-漂变未达到平衡状态,该群体近期可能经历了瓶颈效应。

表 4 两个群体瓶颈效应检测

Tab.4 Bottleneck analysis in the two populations

种群 Populations	个体大小 Sample size	Sign test						Wilcoxon test (one tail for H excess)		
		IAM		TPM		SMM		IAM	TPM	SMM
		H_e/H_d	Prob.	H_e/H_d	Prob.	H_e/H_d	Prob.	Prob.	Prob.	Prob.
广西(GX)	32	8/1	0.0320 *	8/1	0.0470 *	5/4	0.5622	0.0020 *	0.0068 *	0.3262
云南(YN)	32	6/3	0.3037	5/4	0.6317	4/5	0.3368	0.1250	0.2852	0.6738

注: H_e/H_d : 杂合过剩位点数与杂合不足位点数之比; * 显著偏离平衡水平 ($P < 0.05$)。

Note. H_e/H_d : represents the ratio of the number of loci with a heterozygosity excess to the number with a heterozygosity deficiency. * Significant deviation at $P < 0.05$ from equilibrium (bottleneck) expectations.

3 讨论

在微卫星位点检测方法中,利用荧光标记微卫星-全自动分析技术较传统的银染法检测效率和灵敏度更高,不仅可得到清晰的图谱文件,而且可提高

分析结果的精确性。传统的聚丙烯酰胺凝胶电泳易受凝胶电压、时间、质量,尤其个人肉眼分辨能力等多方面影响,使实验结果的准确度受到极大的限制。而采用荧光标记微卫星-毛细管电泳法,利用测序仪自动收集和分析数据,具有简便快捷、实用、高

通量等优点,可明显提高工作效率并降低系统误差。

杂合度和 PIC 是反映群体内个体遗传变异程度的重要参数,其值越大说明遗传变异越高,反之越低。本研究两个群体平均 H_e 为 0.703,高于 Liu 等^[5]利用微卫星 DNA 对中缅树鼩遗传多态性的研究(0.616),而低于 Munshi-South 等^[6]对平原树鼩群体的研究(0.74),推测出现这种差异的原因可能与各自所采用的树鼩亚种、选择的微卫星标记以及检测手段不同有关。Botstein 等^[9]认为:当 $PIC > 0.5$ 时,为高度多态性位点;当 PIC 为 0.25 ~ 0.5 时,为中度多态性位点;当 $PIC < 0.25$ 时,则为低度多态性位点。本研究结果显示广西和云南树鼩群体平均 PIC 分别为 0.52 和 0.42,提示这两个树鼩群体的遗传多态性均较高。

Chen 等^[10]通过分析昆明周边野生树鼩 mtDNA 控制区序列片段之间的核苷酸差异,发现树鼩群体内存在个体遗传差异,表明中缅树鼩具有较高的遗传多样性。本研究的遗传多态性比较发现广西树鼩群体的平均 N_e 、 H_e 、 PIC 、 I 值都略高于云南树鼩群体,但差异不显著,表明两个树鼩群体都呈现出较丰富的遗传多样性,表现出比较好的资源种质状况,具有进一步选育的价值和潜力。而其差异的原因有可能是动物本源不一致:广西树鼩是野生的,云南树鼩是实验驯化的;导致差异的原因应当还与地理隔离有关。

总群体的遗传变异可以看成是群体内和群体间遗传变异的总和。一般用 F_{is} 、 F_{st} 来衡量群体内近交和群体间的遗传分化程度。 F_{is} ,即亚群内的近交系数,可用作衡量亚群体内偏离哈迪-温伯格平衡的程度。本研究发现 F_{is} 均值大于 0,说明树鼩群体总体上存在近亲交配,但群体内部分个体 F_{is} 小于 0,说明处于轻微的杂交状态。 F_{st} 反映的是亚群体间遗传分化程度。本研究发现两个种群的 F_{st} 均值为 0.2352,说明总体上群体间存在高度分化,而部分位点处于极度分化。

在没有突变、迁移、和人工选择的理想情况下,各群体应该处于一种遗传平衡状态,但由于干扰 HWE 平衡的因素太多,如非随机化交配、人工选择、基因突变、迁移和遗传漂变等,导致在自然界中符合 HWE 平衡定律的群体甚少。本实验两个树鼩群体的 HWE 平衡检测结果发现所筛选的大部分位点处于非平衡状态,说明两个树鼩群体遗传结构欠稳定,容易受到随机漂变、选择、突变等因素的影响。推测

本研究树鼩群体处于不平衡状态的主要原因是:第一,目前本课题组养殖树鼩规模较小,饲养繁育的雌雄树鼩数量不等,繁殖期间可能存在一雌多雄或一雄多雌交配;第二,群体内存在近亲交配,从而使部分稀有基因丢失;第三,在某种程度上存在人工选择的可能,而且本实验所选样品数量少,可能造成群体结构不完整,导致统计误差的可能。

遗传距离是衡量群体间、系统间遗传分化程度和遗传差异大小的主要指标。群体遗传距离与分化时间成正比,如果群体间的分化时间越长,遗传距离也就越大,反之亦然。黎家敏等^[11]报道采用随机扩增多态性 DNA 标记法研究云南滇西亚种树鼩的个体间遗传多样性,对 48 只树鼩进行 RAPD 扩增得到的遗传相似系数介于 0.73 ~ 0.91 之间,平均为 0.8307,个体间遗传距离在 0.09 ~ 0.27 之间,平均遗传距离为 0.1693,表明滇西亚种树鼩的个体之间差异很大。本研究发现广西和云南树鼩群体的 Nei (1972) 遗传距离及 Nei (1978) 无偏遗传距离分别为 1.277 和 1.268,而两个群体的遗传相似系数约为 0.28,表明了这两个群体间具有较大的遗传差异和分化程度。

本研究进一步分析两个树鼩群体遗传结构变异的分布情况发现 61.57% 的微卫星遗传变异来自于群体内部,38.43% 存在于群体之间,说明树鼩群体大部分遗传变异是由群体内的遗传变异引起的,但不可忽略群体间的遗传变异。

STRUCTURE 软件是基于个体遗传组成而进行的群体模拟分析,它不受各群体的样本大小的影响,常被认为是一种群体遗传结构分析的理想工具^[12, 13]。STRUCTURE 分析结果发现本研究观察的树鼩可划分为 2 个理论群,并且两群体之间不存在明显的杂交。说明广西和云南树鼩可能为中缅树鼩群体的两个不同的亚种,这可能与地理隔离使自然条件下的基因交流减少密切相关。此研究结果与分布于我国云南地区的树鼩亚种分类基本上是一致的^[1]。

瓶颈效应的发生可能主要与生态环境的破坏、种群繁衍缓慢、数量有限等有关^[14]。IAM 模型与 SMM 模型是基于不同突变-漂变假设条件下的两种极端模型,而 TPM 模型则是对前两者的综合模型。本研究结果显示在 IAM 和 TPM 假设模型下广西树鼩群体微卫星位点杂合度过剩显著,而云南树鼩群体在 3 种突变模型下均未达到显著性水平,表明广

西树鼯群体在近期很可能经历过瓶颈效应,从而推断其有效群体数量近几十年可能存在不同程度的下降。此结果表明十分有必要对广西树鼯群体进行合理管理和保护。

综上所述,本研究运用 9 个荧光标记微卫星对来源于广西和云南的树鼯群体进行遗传多样性检测,结果表明这两个群体的遗传多样性都较丰富,两个群体间具有较大的遗传差异和分化程度。这些数据为推动树鼯优良品系的培育和实验动物模型的创建奠定了基础。

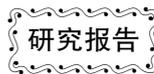
参 考 文 献

- [1] 王应祥. 中国树鼯的分类研究 [J]. 动物学研究, 1987, 8 (3): 213 - 230.
- [2] 刘瑞清, 陈玉泽. 树鼯(*Tupaia belangeri* Wagner)三个亚种的染色体比较研究 [J]. 动物学研究, 1989, 10 (3): 195 - 200, +273 - 274.
- [3] Cao J, Yang EB, Su JJ, et al. The tree shrews: adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research [J]. J Med Primatol, 2003, 32(3): 123 - 130.
- [4] Grover A, Sharma PC. Development and use of molecular markers: past and present [J]. Crit Rev Biotechnol, 2016, 36(2): 290 - 302.
- [5] Liu XH, Yao YG. Characterization of 12 polymorphic microsatellite markers in the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. Zoolog Res, 2013. 34(E2): E62 - 68.
- [6] Munshi-South J, Wilkinson GS. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci Bornean treeshrews (*Tupaia* spp.) [J]. Mol Ecol Notes, 2006, 6(3): 698 - 699.
- [7] 张媛, 李晓飞, 李振宇, 等. 滇西亚种树鼯微卫星分子标记的筛选 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(6): 36 - 41.
- [8] 李婧潇, 王新兴, 王文广, 等. 中缅树鼯微卫星分子标记的筛选 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(4): 312 - 315.
- [9] Botstein D, White RL, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Hum Genet, 1980, 32(3): 314 - 331.
- [10] Chen SY, Xu L, Lu LB, et al. Genetic diversity and matrilineal structure in Chinese tree shrews inhabiting Kunming, China [J]. Zoolog Res, 2011. 32(1): 17 - 23.
- [11] 黎家敏, 李海燕, 李婧潇, 等. 应用 RAPD 标记技术对树鼯遗传多样性的分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(2): 34 - 40.
- [12] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study [J]. Mol Ecol, 2005, 14(8): 2611 - 2620.
- [13] Perez - Alvarez MJ, Olavarria C, Moraga R, et al. Microsatellite markers reveal strong genetic structure in the endemic Chilean dolphin [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123956.
- [14] Gupta AK, Chauhan M, Bhardwaj A, et al. Microsatellite markers based genetic diversity and bottleneck studies in Zanskar pony [J]. Gene, 2012, 499(2): 357 - 361.
- [7] 张彩勤, 张海, 赵勇, 等. 近红外荧光染料 IR-783 介导的肿瘤成像 [J]. 中国实验动物学报. 2014, 22(2): 17 - 19.
- [8] Shao C, Liao CP, Hu P, et al. Detection of live circulating tumor cells by a class of near-infrared heptamethine carbocyanine dyes in patients with localized and metastatic prostate cancer [J]. PLoS One. 2014, 9(2): e88967.
- [9] 张彩勤, 赵勇, 张海, 等. 近红外荧光染料 MHI - 148 应用于肿瘤活体成像的初步研究 [J]. 科学技术与工程. 2014, 28: 179 - 182
- [10] 郑玲, 卢光明. 近红外荧光染料在肿瘤特异性成像中的研究 [J]. 临床放射学杂志. 2012, 31(6): 897 - 899
- [11] Close DM, Xu T, Saylor GS, et al. In vivo bioluminescent imaging (BLI): noninvasive visualization and interrogation of biological processes in living animals [J]. Sensors (Basel). 2011, 11(1): 180 - 206.
- [12] Popovic M, Zaja R, Smital T. Organic anion transporting polypeptides (OATP) in zebrafish (*Danio rerio*): Phylogenetic analysis and tissue distribution [J]. Comp Biochem Physiol Part A, Mol Integr Physiol. 2010, 155(3): 327 - 335.
- [13] Martinez-Becerra P, Briz O, Romero MR, et al. Further characterization of the electrogenicity and pH sensitivity of the human organic anion-transporting polypeptides OATP1B1 and OATP1B3 [J]. Mol Pharmacol. 2011, 79(3): 596 - 607.
- [14] Acharya MR, Karp JE, et al. Factors affecting the pharmacokinetic profile of MS-275, a novel histone deacetylase inhibitor, in patients with cancer [J]. Invest New Drugs. 2006, 24(5): 367 - 375.
- [15] Shi C, Wu JB, Pan D. Review on near-infrared heptamethine cyanine dyes as theranostic agents for tumor imaging, targeting, and photodynamic therapy [J]. J Biomed Opt. 2016, 21(5): 50901.

[收稿日期] 2016 - 06 - 06

[收稿日期] 2016 - 05 - 10

(上接第 571 页)



程序化冷冻前后小鼠孵化囊胚和休眠胚胎的 *Hba-α* 蛋白分布和差异表达

刘迪,倪和民,顾美超,李征,王力红,盛熙晖,齐晓龙,王相国,郭勇*

(北京农学院动物科学技术学院/兽医学(中医药)北京市重点实验室,北京 102206)

【摘要】 目的 利用程序化冷冻的方法,探究冷冻前、后小鼠孵化囊胚和休眠胚胎中 *Hba-α* 蛋白的分布和差异表达的变化,为今后开发和利用新型哺乳动物源抗冻蛋白提供理论依据。方法 从妊娠 d5 小鼠体内获取孵化囊胚;从小鼠延迟着床模型获取休眠胚胎,利用 Confocal 显微镜和 Western Blot 技术对程序化冷冻前、后的各组胚胎进行 *Hba-α* 蛋白的分布和表达检测。结果 孵化囊胚和休眠胚胎在程序化冷冻前、后均有 *Hba-α* 蛋白的表达;孵化囊胚经程序化冷冻后 *Hba-α* 蛋白的表达与冷冻前相比差异无显著性 ($P > 0.05$);冷冻前休眠胚胎与程序化冷冻前后的孵化囊胚相比,*Hba-α* 蛋白的表达量显著下调 ($P < 0.05$);冷冻后休眠胚胎 *Hba-α* 蛋白的表达量显著低于其他各组 ($P < 0.05$)。结论 程序化冷冻处理对小鼠休眠胚胎 *Hba-α* 蛋白的表达影响明显大于孵化囊胚;*Hba-α* 基因具有作为新型哺乳动物源抗冻蛋白的潜力。

【关键词】 小鼠;孵化囊胚;休眠胚胎;程序化冷冻;*Hba-α* 蛋白

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0579-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.005

Distribution and differential expression of *Hba-α* in mouse normal hatched blastocysts and dormant embryos before and after cryopreservation

LIU Di, NI He-min, GU Mei-chao, LI Zheng, WANG Li-hong, SHENG Xi-hui,
QI Xiao-long, WANG Xiang-guo, GUO Yong*

(1. College of Animal Science and Technology; 2. Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

【Abstract】 Objective This study is aimed to investigate the distribution and differential expression of *Hba-α* protein in mouse normal hatched blastocysts and dormant embryos before and after cryopreservation, and to provide theoretical basis of the development and use of new mammalian antifreeze proteins. **Methods** Normal hatched blastocysts were obtained from d5 pregnant mice while dormant embryos were collected from mouse delayed implantation models. Confocal microscopy and western blot were used to detect the differential expression of *Hba-α* protein among those groups. **Results** *Hba-α* protein expressed in mouse normal hatched blastocysts and dormant embryos before and after cryopreservation. There were no significant differences of expression of *Hba-α* protein between normal hatched blastocysts before and after cryopreservation ($P > 0.05$). Compared with the normal hatched blastocysts before and after cryopreservation, the expression of *Hba-α* protein in dormant embryos was significantly lower ($P < 0.05$). The expression of *Hba-α* protein in dormant embryos after cryopreservation was significantly lower than the other groups ($P < 0.05$). **Conclusions** The effect of cryopreservation on the expression of *Hba-α* protein in mouse dormant embryos is significantly higher than normal hatched blastocysts.

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(No. 31272526);2013年度北京市教委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(No. PXM2013_014207_000067)。

【作者简介】刘迪(1991-),女,硕士生,研究方向:动物产科及胚胎工程。E-mail: ardieliu@163.com

【通讯作者】郭勇,男,教授,研究方向:动物生殖生理与生物技术。E-mail: y63guo@126.com

Hba- α protein has a potential to be used as a novel mammalian-derived antifreeze protein.

【Key words】 Mouse; Blastocysts; Dormant embryo; cryopreservation; *Hba- α* protein

Corresponding author: GUO Yong. E-mail: y63guo@126.com

随着低温冷冻保存技术研究的不断深入,哺乳动物胚胎冷冻技术也在逐步优化和革新^[1-3]。为使胚胎的冷冻保存技术更加稳定高效,学者们在努力改进冷冻方法和程序的同时,也在不断发掘更好的抗冻保护剂,其中包括抗冻蛋白。抗冻蛋白(AFP)最早是在昆虫当中发现,1964年 Ramsay 在黄粉甲幼虫中发现一种冰点低于熔点的物质,1968年 Grimstone 通过实验证明这种物质是蛋白质。鱼类抗冻蛋白是 1969 年 Devries 在南极 Mcmurdo 海峡一种叫做 *Notothenioid* 的极地鱼体内发现的^[4],这类抗冻蛋白也成为迄今为止研究最广泛的一类抗冻蛋白^[5]。应用鱼类抗冻蛋白已成功实现牛、羊胚胎及猪卵母细胞的玻璃化冷冻。有报道表明,在常规冷冻方法中使用鱼类抗冻蛋白对小鼠囊胚没有影响,且在牛囊胚的玻璃化冷冻中使用植物抗冻蛋白,并没有提高解冻后的胚胎成活率^[6-9]。费云标等^[10]给猪的扩张、孵化囊胚添加植物抗冻蛋白,可提高其冷冻-解冻后胚胎的体外存活率。但是,迄今为止,尚未发现有关哺乳动物源抗冻蛋白的报道。

一直以来,哺乳动物胚胎延迟植入的机理都是生殖生物学领域的研究热点,胚胎的植入与其后续正常的生长发育息息相关。然而,虽然动物胚胎冷冻保存技术有了日新月异的发展,但是,针对哺乳动物休眠胚胎低温保存的研究却鲜有报道。本实验室早期研究发现:经程序化冷冻处理的小鼠休眠胚胎存活率显著高于孵化囊胚,说明休眠胚胎具有更好的抗冻性,且在后续基因芯片扫描结果中进一步发现:*Hba- α* (血红蛋白 α 链)基因在休眠胚胎冷冻前后表达具有明显差异^[11],且两者在亚细胞结构上也存在一定差异^[12]。血红蛋白由 4 条肽链构成, α 和 β 链各 2 条,小鼠的血红蛋白 α 亚基含 142 个氨基酸。有研究证实,加入 Hb 的培养基可促进小鼠着床前各阶段胚胎的发育^[13-14],即在第 2 次卵裂前的自身基因组激活,发育至 8-细胞阶段,以及桑椹胚到囊胚的转化过程中血红蛋白均发挥促进小鼠胚胎发育的功能。这些研究结果均提示:血红蛋白在胚胎发育过程中具有重要作用。据报道,生存在南极零度以下极寒环境中的抗冻鱼(*notothenioid fish*),其血细胞数量显著减少,Hb 的含量也明显降低^[15]。绝大多数南极抗冻鱼的 Hb 为单体形式,而不是脊

椎动物 Hb 通常的四聚体结构^[16],这暗示了低浓度的 *Hba- α* 本身可能就具有一定的抗冻功能,而并不需要组装成完整的 Hb 蛋白。

综上所述,本研究拟从 *Hba- α* 具有的潜在抗冻功能角度,利用程序化冷冻的方法,探究冷冻前后小鼠孵化囊胚和休眠胚胎中 *Hba- α* 蛋白的分布和差异表达情况,旨在阐明休眠胚胎具有更强抗冻性的原因,为今后开发和利用新型哺乳动物源抗冻蛋白提供理论依据。这或许将在一定程度上颠覆低温生物学领域针对胚胎冷冻技术的传统革新方式—添加外源抗冻保护剂,而是从调控胚胎本身代谢水平和物质合成的角度对冷冻过程中即将带来的刺激采取预防和保护措施,尽可能降低外源人工合成物质对胚胎造成的化学毒害作用,进而避免冷冻保存对胚胎后续生长发育产生的不可预知的风险。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验选用 10~12 周龄性成熟,体重为 28 g 左右的 ICR 系雌性小鼠,购自北京维通利华实验动物科技有限公司【SCXK(京)2012-0001】,实验在北京农学院屏障动物实验设施进行【SYXK(京)2010-0003】,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 实验试剂

胚胎冷冻保护剂,购自 ICP Bio Reproduction,货号:101129;兔抗鼠 *Hba- α* 多克隆抗体,购自 Santa Cruz Biotechnology,货号:sc-21005;驴抗兔 FITC 标签 IgG 抗体,购自 Abcam,货号:ab6798;HRP 标签抗兔 IgG,购自 Cell Signaling Technology,货号:7074;核染料 Hoechst3342,购自 Bisbenzimidazole,货号:B2261;哺乳动物蛋白抽提试剂盒,购自康为世纪,货号:CW0889S;TBST(pH8.0, 10 \times),购自康为世纪,货号:CW0043S。

1.3 实验仪器

CO₂ 培养箱:Thermo 371;普通光学显微镜:Nikon YS2-H;胚胎冷冻仪:Cryobath;电子天平:北京赛多利斯仪器系统有限公司,BS124S;台面式 pH/ISE 测试仪:Thermo 868;精密加热板:贝达仪器公司,MEH-2;掌心离心机:Bratt,美国;四孔水浴锅:北京

长安科学仪器厂, HH. S1-Ni; 体视显微镜: 江南显微镜厂, XTB-1; 超净工作台: 上海智城分析仪器制造有限公司; 移液器: 北京百晶移液器(1 mL、200 μ L、100 μ L、10 μ L); 离心机: Beckman Coulter, Allegra 64R Centrifuge; 脱色摇床: 其林贝尔, TS1000; 计时器、培养皿、EP 离心管、PVDF 膜等。

1.4 实验方法及分组

1.4.1 超排处理

选择阴门淡粉色的雌鼠, 当日晚 8 点腹腔注射 PMSG 10IU/只, 48 h 后注射 hCG 10 IU/只, 随后立即与性成熟公鼠 1:1 合笼过夜, 次日早 8 点检查交配情况, 有阴栓雌鼠可用于后续实验。

1.4.2 孵化囊胚的获取

于见栓 d5 上午 8 点脱颈法处死小鼠, 取下小鼠两侧子宫, 用 PBS 工作液冲洗回收子宫中的孵化囊胚。回收的胚胎用 PBS 工作液洗涤 3 遍后进行程序化冷冻及解冻处理(详见 1.4.4), 随后移入高压过的 EP 管中, -80°C 冰箱储存。

1.4.3 休眠胚胎的获取

于见栓 d4 上午 8~9 点摘除小鼠双侧卵巢(保留输卵管), 随后连续 3 d 在其颈部皮下注射 0.2 mg/mL 孕酮 0.1 mL/只, 术后第 4 天早 8 点从双侧子宫角回收休眠胚胎。洗涤、处理及储存方法同 1.4.2。

1.4.4 胚胎的程序化冷冻及冷冻后胚胎的收集

将获取的新鲜胚胎用 PBS 工作液洗涤 2 遍, 然后三步法脱去 PBS 再放到冷冻液中平衡 5 min, 用 0.25 mL 塑料麦管装取胚胎。装好的麦管置于冷冻仪中, 以 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度降到 -5°C , 平衡 10 min, 期间用预冷的镊子夹住装有胚胎的麦管上端冷冻液处 3~5 s 出现冰晶即植冰完成, 然后再平衡 10 min, 以 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度降至 -35°C 。解冻时把冷冻麦管从液氮中取出, 室温下轻轻晃动 5~10 s 后, 投入 35°C 水中 10~15 s 取出。剪掉麦管两端栓部, 将细管里的胚胎置于表面皿中, 按三步法脱去冷冻液。将收集的胚胎用 PBS 工作液洗涤 2 次放入 CO_2 培养箱中复苏培养 2 h 后用于后续实验。

1.4.5 Confocal 检测 *Hba- α* 蛋白在胚胎上的分布

①固定: 将洗涤后的胚胎迅速置于 3.7% 甲醛-PBS 溶液中室温固定 15~30 min; ②清洗: 固定后的胚胎用 0.1% BSA-PBS 室温下洗涤 3 次, 每次 10 min; ③通透: 用 2.5% Tween 20-PBS 室温通透 5 min; ④清洗: 用 0.1% BSA-PBS 充分洗涤 5~6 次, 每次 5 min; ⑤一抗孵育: 将胚胎置于稀释好的 *Hba-*

α 一抗中 4°C 过夜; ⑥清洗: 用 0.2% Triton X-100, 0.1% BSA-PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min; ⑦二抗孵育: 将胚胎置于稀释好的 FITC 标签二抗中, 37°C 孵育 1 h; ⑧清洗: 用 0.2% Triton X-100, 0.1% BSA-PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min; ⑨染核: 充分洗涤的胚胎在染核液 Hoechst33342 中染色 3~5 min 后迅速移入 0.1% BSA-PBS 中; ⑩将胚胎及少量液体置于酒精洗涤过的洁净载玻片中心区域, 小心盖上盖玻片注意不要将胚胎压扁; ⑪用透明指甲油小心将盖玻片的四周封闭, 以防止液体挥发, 尽快置于共聚焦仪器中成像。

1.4.6 Western Blot 检测胚胎冷冻前后 *Hba- α* 蛋白的表达变化

①将收集到的胚胎从 -80°C 冰箱取出, 按 100 枚胚胎/10 μ L 裂解液的比例加入蛋白抽提液; ②冰上孵育 30~40 min, 使胚胎蛋白充分被抽提出来; ③ 12 000 r/min, 4°C 离心 5 min 后吸取上清, 加入等体积 $2 \times$ Laemmli sample buffer; ④ 98°C 处理 8~10 min, 待冷却至室温后上样; ⑤ 12% SDS-PAGE 分离凝胶进行电泳分析, 电泳结束后将蛋白转移至 PVDF 膜上; ⑥膜在 5% 脱脂奶粉-TBST 中室温封闭 2 h; ⑦将膜置于稀释好的兔抗小鼠 *Hba- α* 一抗中 4°C 过夜孵育; ⑧在 $1 \times$ TBST 中洗涤 3 次, 每次 15 min; ⑨将膜转移至带有 HRP 标签的二抗中 37°C 孵育 1 h; ⑩重复 8, 常规 ECL 化学显色后立即放入凝胶成像仪。

1.4.7 图像分析

用 Image J 软件进行灰度值分析, 对信号表达进行比较。

1.4.8 统计方法

用 SPSS 22.0 对数据进行单因素方差分析(结果采用平均数 \pm 标准差表示), $P < 0.05$ 代表数据间差异显著。

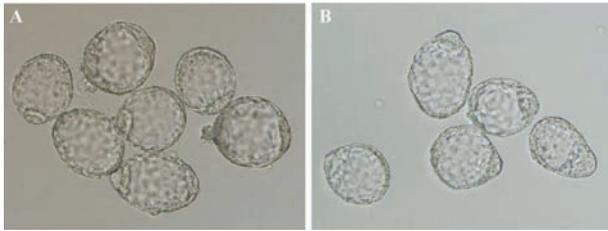
2 结果

2.1 小鼠孵化囊胚和休眠胚胎

体内获取的小鼠妊娠 d5 孵化囊胚与休眠胚胎(图 1), 胚胎整体形态完好, 内细胞团与滋养外胚层轮廓结构清晰, 可用于后续实验。

2.2 程序化冷冻前后 *Hba- α* 在胚胎中的分布情况

如图 2 所示, confocal 结果表明, 在程序化冷冻前后的小鼠孵化囊胚和休眠胚胎中均存在 *Hba- α* 蛋白的分布表达。

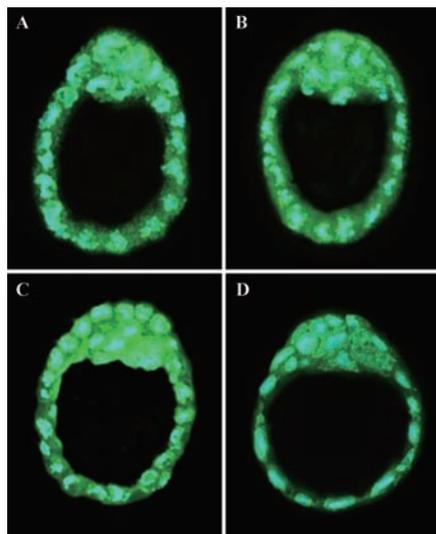


注:A. 孵化囊胚;B. 休眠胚胎。

图1 小鼠孵化囊胚和休眠胚胎

Note. A: Normal hatched blastocysts; B: Dormant embryos.

Fig.1 Normal hatched blastocysts and dormant embryos of mice



注:A. 孵化囊胚冷冻前;B. 休眠胚胎冷冻前;C. 孵化囊胚冷冻后;D. 休眠胚胎冷冻后。绿色荧光代表 *Hba-α* 蛋白分布区域;蓝色荧光代表细胞核位置。

图2 *Hba-α* 蛋白在各组胚胎中的分布表达情况

Note. A. Normal blastocysts, before cryopreservation; B. Dormant embryos, before cryopreservation; C. Normal blastocysts, after cryopreservation; D. Dormant embryos, after cryopreservation. Green fluorescent signal indicates the region of *Hba-α* protein. Blue fluorescent signal indicates the location of cell nuclei.

Fig.2 Distribution of *Hba-α* protein in the embryos of each group

2.3 Western blot 检测结果

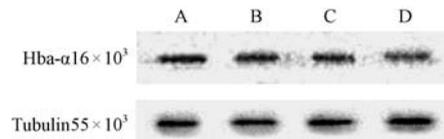
2.3.1 凝胶成像显影图

该实验重复 3 次,从凝胶成像结果可看出,看家基因 *Tubulin* 表达稳定,表明提取的胚胎蛋白质量较好。见图 3。

2.3.2 Western blot 分析结果

凝胶成像所得图片用 Image J 软件分析得到灰度值。利用 SPSS 22.0 软件中的 ANOVA 单因素方差分析处理灰度值数据,结果如图 4 所示:程序化冷冻前后的小鼠孵化囊胚和休眠胚胎均能检测到

Hba-α 蛋白的表达;程序化冷冻前后孵化囊胚(组 A 和组 B) *Hba-α* 蛋白的表达变化差异无显著性 ($P > 0.05$);冷冻前休眠胚胎(组 C)与程序化冷冻前后的孵化囊胚(组 A 和组 B)相比 *Hba-α* 蛋白表达量显著下调 ($P < 0.05$);冷冻后休眠胚胎(组 D)的 *Hba-α* 蛋白的表达量显著低于其他各组 ($P < 0.05$)。

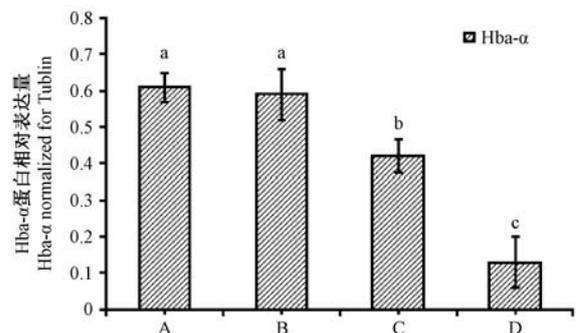


注:A. 冷冻前孵化囊胚;B. 冷冻后孵化囊胚;C. 冷冻前休眠囊胚;D. 冷冻后休眠囊胚。

图3 Western blot 检测 *Hba-α* 蛋白在各组胚胎中的相对表达量

Note. A. Normal hatched blastocysts, before cryopreservation; B. Normal hatched blastocysts, after cryopreservation; C. Dormant blastocysts, before preservation; D. Dormant blastocysts, after cryopreservation.

Fig.3 Western blot analysis of the relative expression of *Hba-α* protein in the blastocysts



注:A. 冷冻前孵化囊胚;B. 冷冻后孵化囊胚;C. 冷冻前休眠囊胚;D. 冷冻后休眠囊胚。上标相同字母表示差异无显著性, $P > 0.05$; 不同字母表示差异有显著性, $P < 0.05$ 。

图4 Western blot 检测 *Hba-α* 蛋白相对表达量分析图

Note. A. Normal hatched blastocysts, before cryopreservation; B. Normal hatched blastocysts, after cryopreservation; C. Dormant blastocysts, before cryopreservation; D. Dormant blastocysts, after cryopreservation. The same letters indicate non-significant differences among them ($P > 0.05$). The different letters indicate a significant difference among them ($P < 0.05$).

Fig.4 Western blot analysis of the relative expression of *Hba-α*

3 讨论

目前,有关抗冻蛋白发挥作用的机制主要存在

以下几种假说:吸附抑制学说、“晶格匹配/占有”模型、“偶极子-偶极子”假说、氢原子结合模型、刚体能量学说和冰核抑制学说^[17]。无论是哪种假说,围绕的核心都是抗冻蛋白如何降低进而避免在冷冻及解冻过程中冰晶形成对胚胎造成的物理损伤。近些年来,低温生物学先驱们将研究重点放在抗冻蛋白间、抗冻蛋白与细胞膜间以及抗冻蛋白与冰晶复合体间相互作用的具体机制上,旨在寻求新的低温生物保存技术的突破口^[18-20]。

过去一直认为,动物 Hb 的生物学功能仅限于运输和储存氧气。然而,近十几年的研究结果发现,脊椎动物的 Hb 除运输和储存氧气外,还具有调节 pH 值、控制体内一氧化氮水平、参与免疫反应等多种生物学功能^[21-23]。一些低等脊椎动物由于长期处于极端的生存环境,其 Hb 的含量与结构在进化中发生了显著的变化。在 Hb 含量上,南极冰鱼(Channichthyidae)是目前发现的惟一不含有 Hb 的脊椎动物,与早期胚胎类似,其血液、鳃和内脏均是无色的,血液的氧运载能力也只有一般鱼类的 10%^[24],这恰恰与我们实验结果中休眠胚胎在冷冻前后 Hba- α 蛋白表达均显著下调相一致。

程序化冷冻前后的小鼠正常孵化囊胚和休眠胚胎均能检测到 Hba- α 蛋白的表达,充分表明 Hba- α 在早期胚胎发育过程中具有重要作用,同时验证了本实验室前期研究中基因芯片的扫描筛选结果。

该实验结果显示,程序化冷冻前后孵化囊胚(组 A 和组 B) Hba- α 蛋白的表达变化差异不显著($P > 0.05$),说明对于正常孵化并即将进入着床窗口期的小鼠胚胎,低温刺激对其 Hba- α 蛋白的表达调控并未产生实质性的影响。这个时期的胚胎充分调动自身机制与母体建立物质和信息上的联系,为着床作好准备。此时的寒冷刺激会扰乱胚胎的正常着床程序,胚胎无法对突然产生的环境变化做出快速调整反应, Hba- α 蛋白的表达量也就无法在短时间内被调节。脊椎动物 Hb 中的一些基因能结合 H^+ , 是一种 H^+ 缓冲物质,因此在运输 CO_2 的过程中 Hb 和 HCO_3^- 对血液的酸碱平衡能起到重要的缓冲作用^[25]。无脊椎动物 Hb 作为体液的主要蛋白质组分,可能也参与了体液酸碱平衡的调节^[26]。鉴于 Hb 除运输氧外,还具有维持血液酸碱平衡即调节血液 pH 值的功能,胚胎 Hba- α 蛋白的表达变化或许与低温造成的内环境改变有关。

冷冻前小鼠休眠胚胎(组 C)与程序化冷冻前

后的孵化囊胚(组 A 和组 B)相比,其 Hba- α 蛋白表达量均显著下调($P < 0.05$),表明低水平 Hba- α 蛋白含量可能有利于休眠胚胎抵御冷冻打击。早先关于小鼠休眠胚胎的研究表明,处于延迟着床状态的胚胎,与其对应时期处于正常发育过程中的胚胎相比,存在相当数量的差异表达基因^[27]。这些基因使胚胎在母体还未调整至着床最佳状态前,维持稳定的代谢状态,待条件适宜时重新恢复正常发育^[28]。通常来说 Hba- α 作为血红蛋白的组成元件短暂存在于红细胞当中,承担着储存并运输氧气的任务,关于 Hba- α 最早出现于哪个时期的小鼠胚胎并无明确的文献记载,可以假设在胚胎时期这一功能已进入其原始的物质准备阶段,在胚胎休眠的过程中,胚胎代谢速率减慢,需氧量降低, Hba- α 蛋白合成量也随之下降,这可能就是休眠胚胎中 Hba- α 蛋白表达低于正常胚胎的原因。Trewitt 等^[29]发现摇蚊(*Chironomus thummi*)幼虫血淋巴中的 Hb 可能具有类卵黄蛋白原的功能,该蛋白不仅能够运输和储存氧气,可能还具有卵黄储存功能^[30-31]。假设小鼠早期胚胎中 Hba- α 也具有一定的营养作用,低温刺激可能会调动某种产能机制,将 Hba- α 蛋白分解以产生热量抵御寒冷。

冷冻后休眠胚胎(组 D)的 Hba- α 蛋白表达量显著低于其他各组($P < 0.05$),表明处于休眠状态的胚胎时刻关注自身所处环境的变化,即便是微小的改变都会使其内部调节机制迅速做出相应的反应,在程序化冷冻开始阶段,胚胎受到寒冷刺激(冷冻打击),胚胎为了保护自身结构和功能的完整性,降低代谢速率,停止不必要的蛋白合成和加工,这时 Hba- α 蛋白由于其特殊的功能性,表达量急剧下降,水平远远低于孵化囊胚和冷冻前的休眠胚胎。

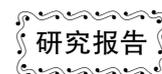
由此可见, Hba- α 基因对于胚胎在冷冻刺激下发生的自身调控具有不可忽视的作用。胚胎 Hba- α 蛋白的下调可能在一定范围内增强胚胎的抗冻性,这一作用的具体机制尚不清楚,需在下一步的探究实验中通过添加或导入外源 Hba- α 重组蛋白或相应抑制剂加以分析和阐明。

参 考 文 献

- [1] Whittingham DG. Survival of mouse embryos after freezing and thawing[J]. Nature, 1971, 233: 125-126.
- [2] Wilmut I, Rowson LE. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos [J]. Vet Rec. 1973, 92:686-690.
- [3] Willadsen SM, Polge C, Rowson LE. et al. Deep freezing of sheep embryos [J]. J Reprod Fertil, 1976, 46:151-154.

- [4] 姚佳. 抗冻蛋白及其抗冻机理研究进展[J]. 四川畜牧兽医, 2013,04(总 271):30-32.
- [5] Hardison RC. A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist and bacteria[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996,93(12): 5675-5679.
- [6] Lim JM, Hansel W. Improved development of in vitro-derived bovine embryos by use of a nitric oxide scavenger in a cumulus-granulosa cell coculture system [J]. Mol Reprod, 1998,50: 45-43.
- [7] Lim JM, Mei Y, Chen B, et al. Development of bovine IVF oocytes cultured in medium supplemented with a nitric oxide scavenger or inhibitor in a coculture system [J]. Theriogenology, 1999,51: 941-949.
- [8] Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation[J]. Hum Reprod Update, 2006,12:731-746.
- [9] Ruud JT. Vertebrates without erythrocytes and blood pigment [J]. Nature,1954,173(4410):848-850.
- [10] 费云标,魏令波,高素琴. 添加植物抗冻蛋白提高猪胚胎冷冻保存成活率的初步试验[J]. 黑龙江动物繁殖,1995,3(2):21-23.
- [11] 张劭侯,刘云海,倪和民,等. 经程序化冷冻的小鼠休眠胚胎的基因表达谱差异分析[J]. 中国实验动物学报,2012,20(5):15-20.
- [12] 顾美超,卢天罡,刘云海,等. 冻融后小鼠休眠胚胎超微结构变化的研究[J]. 中国实验动物学报,2014,22(3):53-56.
- [13] Park SE, Chung HM, Ko JJ, et al. Embryotropic role of hemoglobin and ethylenediaminetetraacetic acid in preimplantation development of ICR mouse 1-cell embryos [J]. Fertil Steril. 2000,74:996-1000.
- [14] Park SE, Chung HM, Cha KY, et al. Establishment of an animal embryo culture system containing various embryotropins and its efficacy for culturing ICR mouse one-cell embryos derived in vivo or in vitro [J]. Fertil Steril. 2001,76:167-174.
- [15] Wells RMG, Ashby MD, Duncan SJ, et al. Comparative studies of the erythrocytes and hemoglobins in nototheniid fishes from Antarctica[J]. J Fish Biol,1980,17(5):517-527.
- [16] Verde C, Lecointre G, diPrisco G. The phylogeny of polar fishes and the structure, function and molecular evolution of hemoglobin [J]. Polar Biol,2007,30(5):523-539.
- [17] 汪少芸,李晓坤,周焱富,等. 抗冻蛋白的作用机制及基因工程研究进展[J]. 北京工商大学学报,2012,30(2):58-62.
- [18] 谢秀杰,贾宗超,魏群. 抗冻蛋白结构与抗冻机制[J]. 细胞生物化学杂志,2005,27:5-8.
- [19] 樊绍刚,张党权,邓顺阳,等. 抗冻蛋白和冰核蛋白对植物抗冻性能的作用机制[J]. 经济林研究,2009,27(2):125-130.
- [20] Yu SO, Brown A, Iddleton AJ, et al. Ice restructuring inhibition activities in antifreeze proteins with distinct differences in thermal hysteresis [J]. Cryobiology, 2010,61:327-334.
- [21] Hausladen A, Grow A, Stamler JS. Nitrosative stress: Metabolic pathway involving the flavin hemoglobin [J]. Proc Natl Acad Sci U S A,1998,95(24):14100-14105.
- [22] Antonini E, Brunori M. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands [M]. Amsterdam; North Holland,1971,21:436.
- [23] Perutz MF, Steinrauf LK, Stockell A, et al. Chemical and crystallographic study of the two fractions of adult horse hemoglobin [J]. J Mol Biol,1959,1(4-5):402-404.
- [24] Ruud JT. Vertebrates without erythrocytes and blood pigment [J]. Nature,1954,173(4410):848-850.
- [25] Buttari B, Profumo E, Tagliani A. Free hemoglobin: A chemotactic stimulus for the innate immunity [C]. Abstracts 77th Congress of the European Atherosclerosis Society, 2008,9(1):14.
- [26] Toulmond A. Properties and functions of extracellular heme pigments [J]. Adv Comp Environ Physiol,1992,13(3):231-256.
- [27] Paria B, Das SK, Andrews GK, et al. Expression of the epidermal growth factor receptor gene is regulated in mouse blastocysts during delayed implantation [J]. Proc Nat Acad Sci U S A. 1993,90(1):55-59.
- [28] Paria, B, Huet-Hudson Y, Dey S. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus [J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 1993,90(21):10159-10162.
- [29] Trewitt PM, Boyer DR, Bergtrom G. Characterization of maternal hemoglobins in the eggs and embryos of *Chironomus thummi* [J]. Insect Physiol,1986,32(11):963-969.
- [30] Fabb SA, Cheong MF, Lee BTO, et al. A sex-influenced protein in *Chironomus* (Diptera) [J]. Insect Biochem,1990,20(2):135-140.
- [31] Chen ZZ, FabbSA, Martin J. Comparison of a gene for a possible sex-influenced protein in *Chironomus* and *Kiefferulus* [J]. Genes Ecosyst,1999:49-55.

[收稿日期] 2016-07-18



靶向抑制巨噬细胞 Act1 表达对溃疡性结肠炎的作用

郜一贺¹, 王丽京¹, 邓慧君², 陈佳园², 顾取良^{1*}

(广东药科大学 1. 基础学院血管生物学研究所; 2. 健康学院, 广州 510006)

【摘要】 目的 探讨巨噬细胞 NF- κ B 活化因子 1 (nuclear factor kappa B activator 1, Act1) 在炎症性肠病中的作用。方法 以巨噬细胞 Act1 表达被靶向抑制的小鼠 (anti-Act1) 为研究对象, 利用葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 诱导溃疡性结肠炎模型, 通过检测小鼠体重变化、便血情况、粪便黏稠度等进行疾病活动指数评分, 对结肠组织进行 HE 染色评价炎症严重程度, 免疫组化方法分析白细胞和巨噬细胞等的浸润情况并用 RT-qPCR 法检测相关细胞因子的表达变化。结果 在 DSS 诱导 7 d 后与 C57 小鼠相比, anti-Act1 小鼠结肠炎症指标评分较低, 巨噬细胞等浸润数量较少, TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 mRNA 表达较低。结论 靶向抑制巨噬细胞 Act1 表达能够减轻 DSS 诱导的溃疡性结肠炎。

【关键词】 Act1; 基因工程小鼠; 溃疡性结肠炎; 巨噬细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0585-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.006

Targeted suppression of Act1 in the macrophages ameliorates experimental ulcerative colitis in mice induced by dextran sodium sulfate

KUAI Yi-he¹, WANG Li-jing¹, DENG Hui-jun², CHEN Jia-yuan², GU Qu-liang^{1*}

(1. Vascular Biology Research Institute, School of Basic Sciences, 2. School of Health Sciences, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Objective To investigate the role of macrophage-derived Act1 (nuclear factor kappa B activator 1) in the inflammatory bowel disease. **Methods** Genetically engineered mice carrying targeted suppression of Act1 in the macrophages (Anti-Act1) were used for the dextran sodium sulfate (DSS)-induced ulcerative colitis. The severity of colitis was assessed by weight loss, stool consistency, fecal blood index, colorectal length and H&E histology. The infiltration of CD45⁺ leukocytes and CD68⁺ macrophages in the inflammatory intestine was observed by immunohistochemical staining and expression levels of mRNA for inflammatory cytokines in colon tissues were analyzed by RT-qPCR. **Results** As compared with C57 mice, the anti-Act1 mice exhibited less severe acute colitis following DSS treatment, with reduced CD45⁺ leukocyte and CD68⁺ macrophage infiltrates in the colon tissue. Inflamed colons of the anti-Act1 mice expressed lower mRNA levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6. **Conclusions** Targeted suppression of Act1 in the macrophages ameliorates dextran sodium sulfate-induced intestinal inflammation.

【Key words】 Act1; Genetically engineered mouse; Ulcerative colitis; Macrophage

Corresponding author: GU Qu-liang. E-mail: qlgu@gdpu.edu.cn

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 和克罗恩病 (Crohn's diseases, CD)。目前认为 IBD 发病是遗

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (编号: 31471290)。

[作者简介] 郜一贺 (1991 -), 女, 硕士研究生, 专业: 病理生理学。Email: guiyihe1234@163.com

[通讯作者] 顾取良 (1979 -), 女, 副教授, 研究方向: 肠道炎症与肿瘤分子生物学。Email: qlgu@gdpu.edu.cn

传、环境、感染和免疫等多因素相互作用所致,其中肠道黏膜免疫异常导致的炎症反应起着重要作用^[1]。肠道黏膜巨噬细胞既是一种固有免疫细胞,也作为重要的内在免疫调节者在刺激后续的适应性免疫中起着关键性的作用。越来越多的研究显示巨噬细胞参与了 IBD 的发生发展,在活动性 IBD 患者的肠道黏膜中巨噬细胞的数量明显增加^[2,3]。

核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)在炎症反应和宿主免疫起着重要作用,是 IBD 发生发展中一种重要的转录因子,参与免疫反应早期和炎症反应各阶段的多种因子基因表达均受 NF- κ B 调控,包括 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、COX2、趋化因子、集落刺激因子等^[4]。Act1 是 NF- κ B 活化因子 1(nuclear factor kappa B activator 1)^[5],又称为 TRAF3 作用蛋白 2、CIKS(connection to I κ B kinase and stress-activated protein kinases)。Act1 在不同细胞的免疫反应中发挥了双重作用,既可作用于 T 细胞和 B 细胞介导的免疫反应,又是 IL-17 信号通路必需的衔接蛋白,参与 IL-17 介导的 NF- κ B 通路的活化及炎症反应^[6-8]。

葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)诱导的小鼠炎症性肠病模型,常出现以血便、肠道黏膜溃疡和粒细胞浸润为特征的结肠炎症,其病理改变接近人类 UC^[9,10]。研究表明,上皮细胞特异性缺失 Act1 的小鼠对 DSS 诱导结肠炎的敏感性降低^[8]。鉴于巨噬细胞及 NF- κ B 转录因子在 IBD 中的作用,本研究以巨噬细胞 Act1 表达被靶向抑制的小鼠(anti-Act1)为研究对象,利用 DSS 诱导 UC 模型,探讨巨噬细胞 Act1 在 UC 中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠(简称 C57)购自广东省医学实验动物中心【SCXK(粤)2013-0002】,anti-Act1 小鼠由中国科学院上海细胞生物研究所构建(C57BL/6 背景)赠送^[11],雄性,各 10 只,体重 18~22 g,8 周龄。实验在广东药科大学进行【SYXK(粤)2012-0125】。

1.2 anti-Act1 小鼠的鉴定

剪取鼠尾组织,提取基因组 DNA,PCR 扩增目的片段,PCR 上游引物为:5'-CTG GTG CAG ACA GCC TAG CTG-3',下游引物为:5'-CCT GCG AGC TAA AGT CCT GGA-3'(Invitrogen)。PCR 产物电泳

后观察条带大小,阳性扩增条带为 250 bp。对 DNA 鉴定阳性的小鼠,采用免疫荧光法检测巨噬细胞上 Act1 的表达情况,所用抗体为兔抗鼠 CD68(Proteintech)、Act1(Santa Cruz)、FITC 荧光标记二抗(Life Technologies)。荧光显微镜拍摄记录分析。

1.3 DSS 诱导小鼠 UC 模型的建立

将 C57 和 anti-Act1 雄性小鼠各 10 只,随机分为对照组和实验组,每组 5 只,参考 Cooper 等^[10]的方法建立急性 UC 模型,即实验组小鼠自由饮用 2% DSS(MW 36 × 10³ ~ 50 × 10³, MP Biomedicals)水溶液连续 7 d,每隔一天更换新鲜的 DSS 溶液,对照组小鼠饮用蒸馏水代替 DSS 溶液。实验期间每天监测小鼠体重变化,观察粪便性状、黏稠度,联苯胺法检测大便隐血情况,比较各组小鼠结肠炎症程度^[12]。

1.4 结肠组织病理形态学评分

DSS 诱导 UC 模型第 7 天,处死小鼠,取肛门末端直肠至远端盲肠间的组织,测量结直肠长度后,纵向剖开平铺在滤纸上,4% 多聚甲醛过夜固定,卷肠、脱水后石蜡包埋,切片,HE 染色,显微镜下观察结肠组织损坏及炎症浸润程度。病理组织学评分分为 5 级:0 分:正常结肠黏膜;1 分:隐窝腺体丢失 1/3;2 分:隐窝腺体丢失 2/3;3 分:隐窝腺体全部丢失,黏膜上皮完整,伴有轻度炎症细胞浸润;4 分:黏膜上皮糜烂、破坏,伴有炎症细胞浸润^[10-12]。

1.5 免疫组化法检测结肠组织 CD45、CD68 表达

常规石蜡组织切片,高温高压抗原修复,3% H₂O₂/甲醇灭活过氧化物酶,10% BSA 封闭,一抗为兔抗鼠 CD45(Proteintech)、兔抗鼠 CD68(Proteintech),DAB 显色,苏木素复染。光学显微镜拍摄记录分析。

1.6 RT-qPCR 法检测结肠组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达

采用 TRIzol 试剂(Invitrogen)分别提取对照组和实验组的 C57 和 anti-Act1 小鼠结肠组织总 RNA,经紫外分光光度法检测纯度并定量后,再按 RT-qPCR 试剂盒(Takara)说明书操作。各引物序列如下,以 GAPDH 为内参:

GADPH-F5' - GGTGAAGGTCGCTGTGAACG -3',
GADPH-R5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGTG -3';
TNF- α -F5'-CAGGCGGTGCCATATGCTC-3',
TNF- α -R5'-CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG-3';
IL-1 β -F5'-GCAACTGTTCTGAACTCAACT-3',

IL-1 β -R5'-ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT-3';
 IL-6-F5'-TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC-3',
 IL-6-R5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'。

1.7 数据统计学处理

实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 Graph Pad Prism 5 软件进行统计分析。多组间比较采用一维方差分析,两组间比较采用配对 *t* 检验统计分析。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Anti-Act1 小鼠的鉴定

Anti-Act1 小鼠基因型鉴定的 PCR 扩增产物为约 250 bp 大小的条带,野生型小鼠无此特异性扩增条带。即 1、2 为 anti-Act1 小鼠,3、4 为野生型(图 1)。免疫荧光分析结果(图 2)显示,在 C57 小鼠结肠组织中,巨噬细胞标记物 CD68 和 Act1 均有表达,且存在大量共定位;而在 DNA 鉴定阳性的小鼠结肠组织中,巨噬细胞标记物 CD68 表达但 Act1 表达量明显减少,且二者共定位甚少,进一步表明 anti-Act1 小鼠中巨噬细胞 Act1 表达被靶向抑制。

2.2 靶向抑制巨噬细胞 Act1 对 DSS 诱导 UC 小鼠体重、疾病活动指数和结直肠长度的影响

与对照组相比,2% DSS 连续诱导 UC 7 d 时,小鼠体重明显下降,出现腹泻、粪便隐血程度加重,取材测量结直肠长度,结直肠明显缩短。与 C57 小鼠相比,anti-Act1 小鼠体重变化百分比(A)、粪便粘稠度(B)、便血程度(C)和结直肠长度变化(D)等各项结肠炎指标均减轻(图 3)。

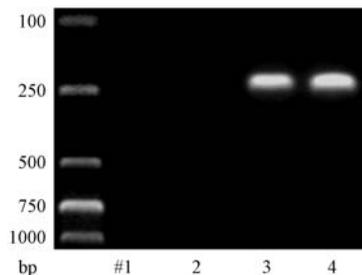


图 1 Anti-Act1 小鼠基因型鉴定

Fig. 1 Genotype characterization of the anti-Act1 mouse

2.3 靶向抑制巨噬细胞 Act1 对 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织病理学形态的影响

建模第 7 天取材进行病理组织分析发现,对照组小鼠结肠组织腺体和上皮组织结构完整;实验组 DSS 诱导后,C57 小鼠结肠组织黏膜层出现大量炎症细胞浸润,并且伴有明显的腺体溶解及腺体上皮细胞增生,anti-Act1 小鼠则组织结构相对较完整,炎症细胞浸润较少,部分腺体发生溶解(图 4)。对结肠分段进行病理组织学评分结果显示,靶向抑制巨噬细胞 Act1 对 DSS 所致横结肠(Trans)和远端结肠(Dist)的炎症减轻作用更显著,对近端结肠(Prox)也有一定的保护作用。

2.4 靶向抑制巨噬细胞 Act1 对 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织炎症细胞浸润的影响

免疫组化结果显示,DSS 诱导 UC 模型小鼠的结肠组织中白细胞标记物 CD45 和单核-巨噬细胞标记物 CD68 主要表达于间质;与 C57 小鼠相比,anti-Act1 小鼠这两种标记物的表达量明显减少,提示白细胞和

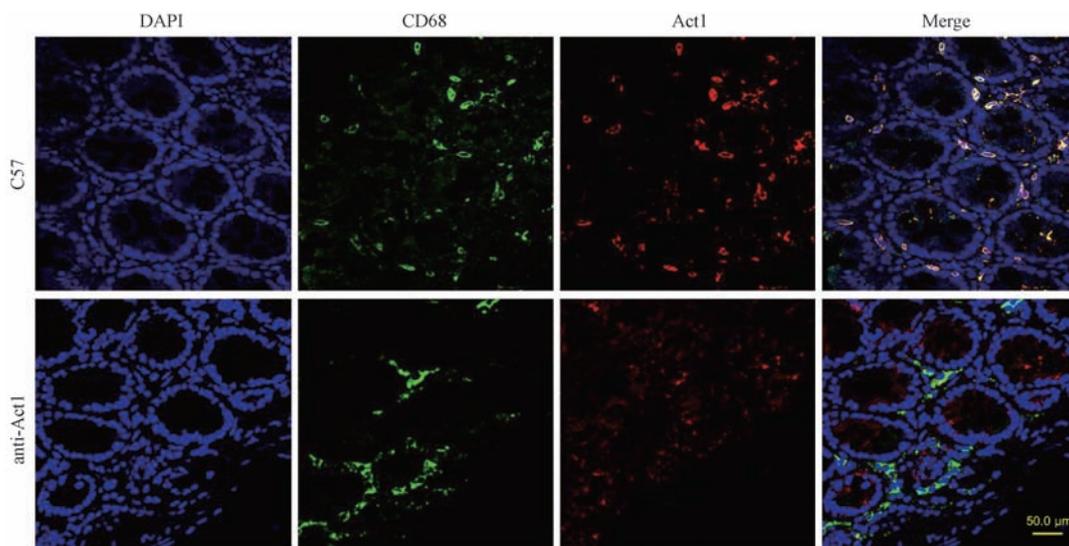


图 2 免疫荧光法检测小鼠结肠组织巨噬细胞 Act1 表达

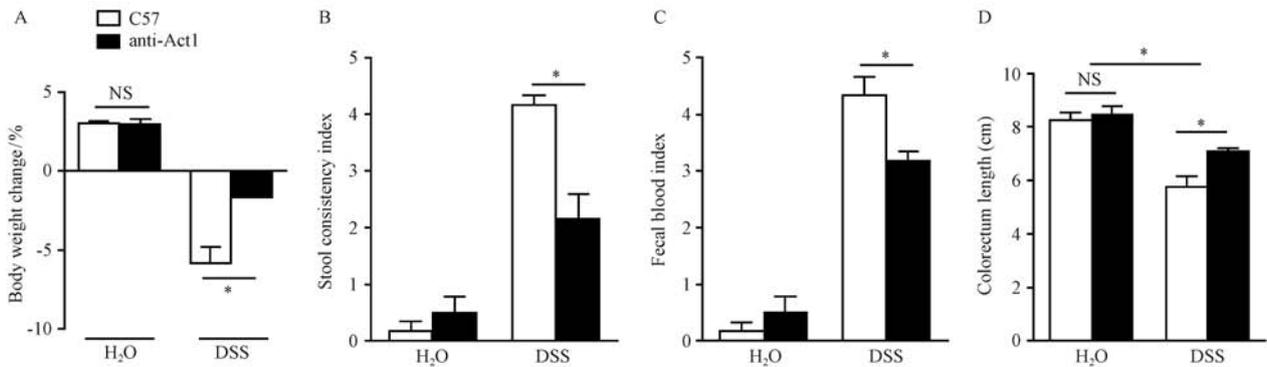
Fig. 2 Act1 expression on macrophages in the colon tissues detected by immunofluorescence

巨噬细胞在炎症部位浸润明显减少(图5)。

2.5 靶向抑制巨噬细胞 Act1 对 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达的影响

RT-qPCR 结果显示, DSS 诱导 UC 模型中两组

小鼠的结肠组织中 TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达均高于正常饮水对照组 ($P < 0.05$), IL-6 mRNA 表达升高仅见于 C57 小鼠; 实验组 anti-Act1 小鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达均低于实验组 C57 小鼠 ($P < 0.05$) (图6)。



注: A. 体重下降百分比; B. 粪便粘稠度; C. 便血程度; D. 结肠长度。

图3 C57 和 anti-Act1 小鼠各项肠炎指标

Fig.3 Colitis severity of C57 and anti-Act1 mice assessed by weight loss (A), stool consistency (B), fecal blood index (C) and colorectal length (D)

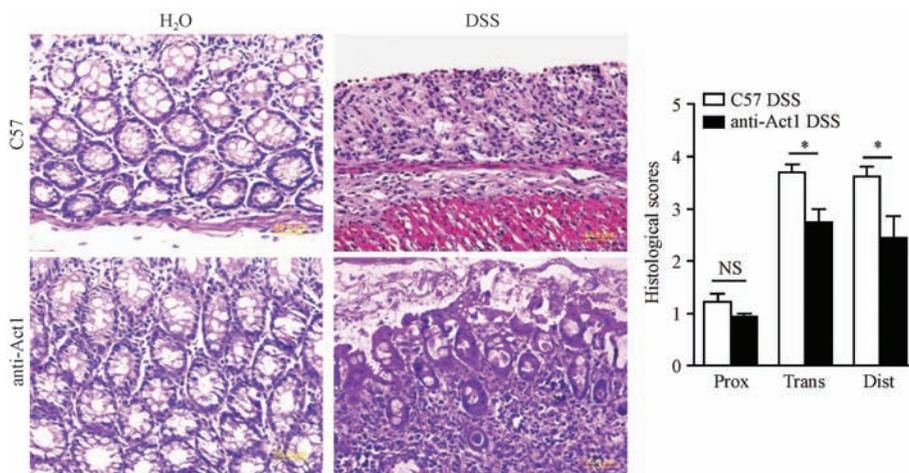


图4 C57 和 anti-Act1 小鼠结肠组织病理学分析

Fig.4 Histopathological changes in the colon tissues of C57 and anti-Act1 mice

3 讨论

肠道黏膜免疫功能紊乱目前被认为是 IBD 肠道炎症发生的主要机制, 免疫细胞以及与之相关的多种细胞因子成为当前 IBD 研究热点。巨噬细胞作为肠道免疫系统的主要细胞, 在静息状态时发挥监控感染、调节细胞更新、创伤修复和组织重构等作用, 维持肠道稳态。而在肠道黏膜损伤-修复平衡被打破时, 巨噬细胞异常激活, 介导促炎反应^[1]。NF- κ B 作为一种重要的转录因子, 是多种促炎细胞因子表达和分泌的强效诱导者。有研究发现, IBD 患者

肠道黏膜巨噬细胞中存在明显 NF- κ B 信号通路的活化^[13]。Act1 作为 NF- κ B 信号通路的活化因子被发现, 后续研究表明 Act1 亦是 IL-17 信号通路必需的衔接蛋白, 也参与 IL-17 介导的 NF- κ B 等信号通路的活化。研究发现, IBD 患者比正常人群的结直肠组织存在更多巨噬细胞浸润, 且血清 IL-17 水平升高^[14]。这提示 Act1 在 IBD 发生发展中可能发挥重要作用。

研究显示, 特异性敲除星形胶质细胞 Act1 可以减轻小鼠实验性自身免疫性脑脊髓膜炎严重程度; Act1 缺失明显抑制 IL-25 诱导的 Th2 型细胞因子 IL-

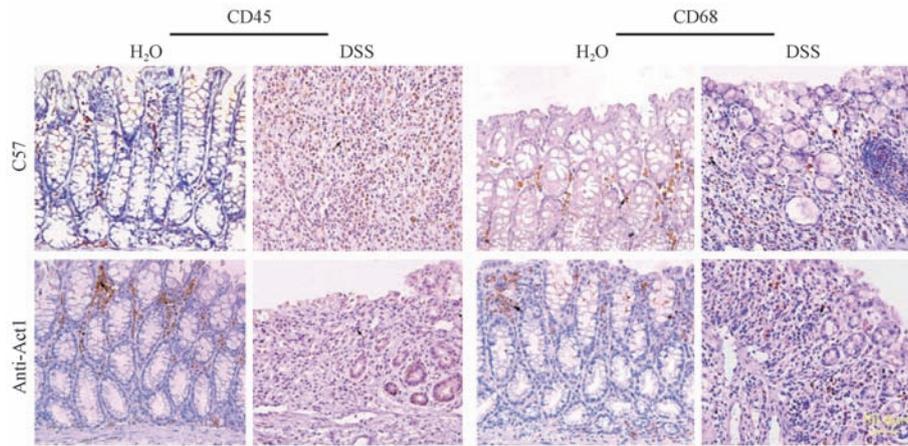


图 5 C57 和 anti-Act1 小鼠结肠炎症细胞浸润情况

Fig. 5 Inflammatory cell infiltration in the colon tissues of C57 and anti-Act1 mice

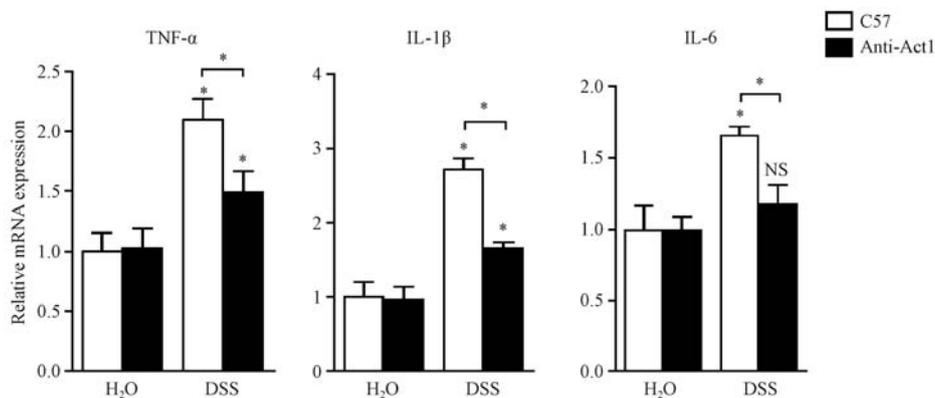


图 6 C57 和 anti-Act1 小鼠结肠组织炎症因子 mRNA 表达变化

Fig. 6 Changes of the colonic expression of mRNA for target genes in the anti-Act1 mice

4、IL-5、IL-13 和趋化因子的表达,从而减少过敏原诱发的嗜酸性粒细胞增多;上皮细胞特异性 Act1 缺失减轻了 IL-25 引发的 Th2 型免疫反应和肺部炎症^[15]。在上皮细胞特异性缺失 Act1 的小鼠中,DSS 诱导的结肠炎严重程度明显减轻^[8]。

本实验利用巨噬细胞 Act1 表达被靶向抑制的小鼠,探讨研究与 NF- κ B 活化相关的 Act1 在对 UC 的影响。结果显示,巨噬细胞 Act1 表达被抑制后,DSS 诱导的结肠炎严重程度明显减轻。同时,炎症部位白细胞和巨噬细胞的浸润明显减少,TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 表达明显低于相应的 C57 小鼠。其中,IL-1 β 是诱导 IBD 肠道炎症的重要细胞因子之一。有研究报道,IBD 患者血清和肠黏膜固有层单核细胞分泌 IL-1 β 明显增加。IL-6 在 IBD 肠道炎症和免疫反应中起放大效应,患者血清和肠黏膜 IL-6 水平显著高于对照。此外,活化的 M2 型巨噬细胞可通过激活 NF- κ B 信号通路,引起 TNF- α 和 IL-6 等炎症因子上调^[2]。本研究结果中 anti-Act1 小鼠在 DSS

诱导后 IL-6 mRNA 表达有所升高但没有统计学差异,亦有类似的研究报道,IL-17 基因敲除的小鼠在 DSS 诱导时肠炎加重但 IL-6 mRNA 表达没有变化^[16]。对此,我们将在蛋白水平检测 IL-6 表达变化,进一步检测其他促炎因子和抑炎因子的表达变化,同时也提示抑制巨噬细胞 Act1 表达对炎症微环境的影响可能是不仅与炎症因子的表达改变有关,还存在其他作用机制。

由于巨噬细胞是一种异质性、可塑性较强的免疫细胞,不同组织微环境对其增殖、分化、激活和极化产生不同影响,使其呈现出不同表型,发挥不同生物学功能。正常肠黏膜巨噬细胞的极化表型与其他组织有一定差异,并对于维持肠道健康具有重要意义。而 IBD 患者体内巨噬细胞功能常有不同程度受损,极化表型发生改变,导致免疫异常^[17]。本研究中关于靶向抑制巨噬细胞 Act1 表达降低结肠对 DSS 敏感性的机制尚不明确,是通过直接抑制 NF- κ B 信号活化而减轻炎症还是 Act1 表达抑制影响了

巨噬细胞的极化,仍有待进一步研究揭示。

参 考 文 献

- [1] Al-Ghadban S, Kaissi S, Homaidan FR, et al. Cross-talk between intestinal epithelial cells and immune cells in inflammatory bowel disease [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29783.
- [2] Singh UP, Singh NP, Murphy EA, et al. Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients [J]. *Cytokine*, 2016, 77: 44-49.
- [3] Wang, W, Li X, Zheng D, et al. Dynamic changes and functions of macrophages and M1/M2 subpopulations during ulcerative colitis-associated carcinogenesis in an AOM/DSS mouse model [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(4): 2397-2406.
- [4] McDaniel DK, Eden K, Ringel VM, et al. Emerging roles for noncanonical NF- κ B signaling in the modulation of inflammatory bowel disease pathobiology [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2016, 22(9): 2265-2279.
- [5] Li X, Commane M, Nie H, et al. Act1, an NF- κ B-activating protein [J]. *PNAS*, 2000, 97(19): 10489-10493.
- [6] Sønder SU, Saret S, Tang W, et al. IL-17-induced NF- κ B activation via CIKS/Act1: physiologic significance and signaling mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(15): 12881-12890.
- [7] Hartupée J, Liu C, Novotny M, et al. IL-17 signaling for mRNA stabilization does not require TNF receptor-associated factor 6 [J]. *J Immunol*, 2009, 182(3): 1660-1666.
- [8] Qian, Y, Liu C, Hartupée J, et al. The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(3): 247-256.
- [9] 张忠, 程富胜, 贾宁, 等. 小鼠溃疡性结肠炎模型的建立及病理组织学比较[J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(6): 69-72.
- [10] Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis [J]. *Lab Invest*, 1993, 69(2): 238-249.
- [11] 李艺丹. 第一部分: 核定位 Act1 介导组蛋白 H3 第 14 位赖氨酸乙酰化和组织因子的转录调控; 第二部分: 穿心莲内酯 (Andro) 抗炎与抗血栓机制的研究 [D]. 中国科学院研究生院, 2009.
- [12] Murano M, Maemura K, Hirata I, et al. Therapeutic effect of intracolonic administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS) - induced colitis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 120(1): 51-58.
- [13] Andresen L, Jørgensen VL, Perner A, et al. Activation of nuclear factor kappaB in colonic mucosa from patients with collagenous and ulcerative colitis [J]. *Gut*, 2005, 54(4): 503-509.
- [14] Fujino S, Andoh A, Bamba S, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease [J]. *Gut*, 2003, 52(1): 65-70.
- [15] Swaidani S, Bulek K, Kang Z, et al. The critical role of epithelial-derived Act1 in IL-17- and IL-25-mediated pulmonary inflammation [J]. *J Immunol*, 2009, 182(3): 1631-1640.
- [16] Nishikawa K, Seo N, Torii M, et al. Interleukin-17 induces an atypical M2-like macrophage subpopulation that regulates intestinal inflammation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108494.
- [17] Cosín-Roger J, Ortiz-Masió D, Calatayud S, et al. The activation of Wnt signaling by a STAT6-dependent macrophage phenotype promotes mucosal repair in murine IBD [J]. *Mucosal Immunol*, 2016, 9(4): 986-998.

[收稿日期] 2016-10-09



白色念珠菌经口感染 ICR 小鼠建立系统性感染模型

罗银珠^{1,2}, 潘金春^{1,2}, 何丽芳^{1,2}, 闵凡贵^{1,2}, 叶秋莹³,
陈锐^{1,2}, 吴玉娥^{1,2}, 黄韧^{1,2}, 张钰^{1,2*}

(1. 广东省实验动物监测所, 广州 510663; 2. 广东省实验动物重点实验室, 广州 510663; 3. 广东药学院, 广州 510224)

【摘要】 目的 探究白色念珠菌(*C. albicans*)经口感染 ICR 小鼠建立系统性感染模型, 观察 *C. albicans* 经黏膜感染后在小鼠体内组织增殖及分布规律。**方法** 46 只 ICR 雄性小鼠随机分为模型组 A($n=20$)、模型组 B($n=20$)、对照组($n=6$)。模型组采用棉签法口腔接种 *C. albicans* (7×10^6 cfu/mL), 对照组同方法接种等容积生理盐水。模型组 A 小鼠用于临床、生存、剖检观察试验; 模型组 B 接种后第 3、5、7 天随机解剖 5 只小鼠用于组织载菌量和病理检验(对照组每个时间点解剖 2 只), 活菌平板计数法检测小鼠组织载菌量, 光镜观察小鼠舌、胃、肝、肾病理组织学变化。**结果** 模型组小鼠接种后第 3 天舌面出现明显白斑并随时间加重引起死亡, 第 5 天小鼠死亡率超过 50%, 第 7 天死亡率达 100%, 并能从舌(87.5%)、胃(87.5%)及内脏组织肝(54.5%)、肾(50.5%)、肺(20%)和心脏(4%)中分离到 *C. albicans*, 显微镜观察在舌、食道、胃、肝、肾存在菌丝的增殖, 对照组未见 *C. albicans* 生长, 提示模型组小鼠因 *C. albicans* 黏膜感染引起小鼠播散性的系统性感染。**结论** *C. albicans* 可在一定条件下突破黏膜免疫屏障引起小鼠机会性系统性感染, 从而加重感染死亡。

【关键词】 白色念珠菌; 小鼠口腔; 黏膜模型; 系统性感染; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0591-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.007

Establishment of a ICR mouse model of systemic *C. albicans* infection induced by oral inoculation

LUO Yin-zhu^{1,2}, PAN Jin-chun^{1,2}, HE Li-fang^{1,2}, MIN Fan-gui^{1,2},
YE Qiu-ying³, CHEN Rui^{1,2}, WU Yu-e^{1,2}, HUANG Ren^{1,2}, ZHANG Yu^{1,2*}

(1. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663; 3. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510224)

【Abstract】 Objective To establish a mouse model of systemic *C. albicans* infection by oral inoculation of the pathogen and observe the proliferation and distribution of *C. albicans* in vivo tissues. **Methods** Male ICR mice ($n=46$) were used as the experiment group ($n=40$) and blank group ($n=6$). Cotton swabs with *C. albicans* were used to infect the mice (7×10^6 CFU/mL), and the blank group with saline. The mice of the experiment group were randomly divided into two groups: model group A for clinical assessment ($n=20$) and model group B for tissue fungal burden detection ($n=20$). Clinical score, survival and autopsy were carried out among the model group A. Five mice were randomly killed from the model group B at 3 d, 5 d and 7 d after infection, respectively (blank group killed 2 mice each time). Microbial load tablet method was used to detect the tissue fungal burdens in different tissues, meanwhile samples of tongue, esophagus, stomach, liver, kidney, lung of infected mice were taken for pathological examination. **Results** White spot appeared on the surface of tongue since 3 d postinfection and increased with time and finally caused death. The mortality reached over 50% at 5 d. *C. albicans* was not only detected from the tongue (87.5%), stomach (87.5%), liver (54.5%), kidney (50.5%), lung (20%) and heart (4%), but also was microscopically seen mycelia proliferation in the tongue, stomach,

[基金项目] 广东省科技计划项目(编号:2014A010107018)。

[作者简介] 罗银珠(1983-), 女, 兽医师, 研究方向: 病原学及实验动物模型研究。E-mail: agluo122@sina.com

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

liver, and kidney, yet not seen in the control group, showing that *C. albicans* caused disseminated systemic infection through mucosal infection in mice. **Conclusions** *C. albicans* can induce opportunistic systemic infection by breakthrough the mucosal immune barrier, so as to increase the infection to death.

【Key words】 *Candida albicans*. Oral cavity; Mucosal infection; Systemic infection; Mouse
Corresponding author: ZHANG Yu. E-mail: zhangyuzh@hotmail.com

口腔念珠菌病已成为世界范围内日益严重的院内口腔感染性真菌性疾病,其中白色念珠菌(*Candida albicans*, *C. albicans*)是主要致病病原,感染比例占口腔念珠菌病的 50% 以上^[1-4]。*C. albicans* 是一种人类共生的二相性微生物,可以在皮肤、黏膜表面、肠胃消化道和女性泌尿生殖系统存在,当机体免疫力降低或环境改变时可由共生酵母相发芽转变为毒力更强的菌丝相,从而引起侵袭性的白色念珠菌病^[5-8]。近年来,随着抗生素、免疫抑制剂、器官移植、导管介入等治疗手段的广泛应用及一些肿瘤、血液病、获得性免疫缺陷病等严重疾病的发生率升高,由念珠菌黏膜感染引起患者系统性念珠菌病报道增多^[9, 10]。*C. albicans* 感染模型、毒力因子及与宿主相互作用等研究不断深入^[11-17],但小鼠黏膜感染念珠菌引起播散性系统性感染的报道却不多,本研究旨在对 *C. albicans* 口腔黏膜接种引起的小鼠机会性系统性感染进行研究和阐述,为进一步研究 *C. albicans* 黏膜感染机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物、分组及前处理

SPF 级 ICR 雄性小鼠,46 只,5 周龄,体重 24 ~ 26 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】,饲养于广东省实验动物监测所二级生物安全负压感染实验室内【SYXK(粤)2012-0122】,实行光照/黑暗各 12 h 昼夜循环,自由进食,动物实验开展经广东省实验动物监测所动物使用和管理委员会审批。

动物使用前以棉拭子涂抹口腔黏膜后作 *C. albicans* 培养,筛选出 *C. albicans* 培养阴性动物做为实验动物。动物分为模型组(40 只)和空白组(6 只)。模型组平分 A, B 两组,均使用 *C. albicans* 口腔棉签法感染,模型组 A 于生存率、体重及口腔打分,模型组 B 用于载菌量及病理检测,为避免动物感染过程中出现死亡而导致数据丢失,模型组 B 感染数量比计划采样量(15 只)多 5 只。空白组小鼠同方法感染等容积生理盐水并进行与实验组相同的实验项。所有动物感染前 1 d 醋酸泼尼松 100 mg/

kg 肌注,同时 0.08% 盐酸四环素连续饮水给药至感染后第 3 天。动物口腔感染操作前用 1.5% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(加热保温,麻醉时长 1.5 h)。

1.2 菌株及菌体悬液制备

C. albicans SC5314 株(ATCC: MYA-2876)为中国科学院微生物研究所张立新博士馈赠。从 -80℃ 冰箱取出菌液,接种到固体 YEPD 平板上,30℃ 培养 36 h 后,挑选单个菌落于液体 YEPD 中,30℃ 摇床培养 24 h,180 r/min。将扩大培养好的菌液离心,沉淀用生理盐水重悬洗涤 3 次,最后用生理盐水调整浓度至 7×10^6 CFU/mL,备用。

1.3 动物口腔黏膜接种

参考文献^[14, 18],动物麻醉后,用灭菌棉签在配制好的菌液中浸泡 3 min,放置到实验鼠小鼠口腔内(对照组以灭菌生理盐水代替),轻轻旋转使棉签表面菌液充分接触口腔上颚,脸颊及舌面,并停留口腔 1.5 h。

1.4 感染程度评价

1.4.1 临床评分及生存观察

模型组 A 小鼠每天进行口腔评分、称重、死亡情况及临床表现记录。口腔打分标准:正常,0 分;少量白斑(<20%),1 分;中量白斑(21% < 90%),2 分;大量白斑 > 91% 尚可开口采食,3 分;大量白斑 > 91% 且口腔黏糊,难开口,流涎明显,4 分。

1.4.2 载菌量检测

模型组 B 小鼠感染后第 3、5、7 天分别随机解剖 5 只小鼠,麻醉后无菌取组织(舌、胃、肝、肾、心脏、肺)放于灭菌离心管内,-20℃ 保存备用。组织载菌量测定:将组织称重后放到装有 1 mL 灭菌生理盐水研磨器内,研磨 30 s 后,倍比稀释后,取 100 μL 混悬液涂到固体 YEPD 平板,每个浓度做 2 个平行板,30℃ 培养 36 h 后数菌落数。对死亡小鼠进行尸检。

1.4.3 病理检测

模型组 B 感染小鼠解剖做载菌量检测的同时,各取舌、食道、胃、肝、肾组织用 4% 多聚甲醛固定 24 h,再按常规步骤制作石蜡切片,采用 HE 染色和 PAS 染色,光学显微镜下观察拍照。

1.5 数据处理及统计分析

实验结束,口腔临床打分及体重结果以 $\bar{x} \pm s$ 表

示,组织载菌量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraphPad Prim 5.01 进行数据处理及图表形成。

2 结果

2.1 口腔黏膜感染小鼠临床变化和评价

感染后 2 d 小鼠舌头出现少量淀粉样白斑,3 d

口腔白斑明显(见图 1B),到 5 d 口腔白斑占据舌面 90% 以上(见图 1C),实验后期大部分鼠口腔打分超过 3 分(见图 2A),小鼠表现出口腔有唾液流出到口腔周围,小鼠口腔干燥,采食、吞咽乃至张口难,精神萎靡,体重降低(见图 2B),接种后第 5 天死亡率达到 50% 以上,第 7 天达 100% (见图 2C)。

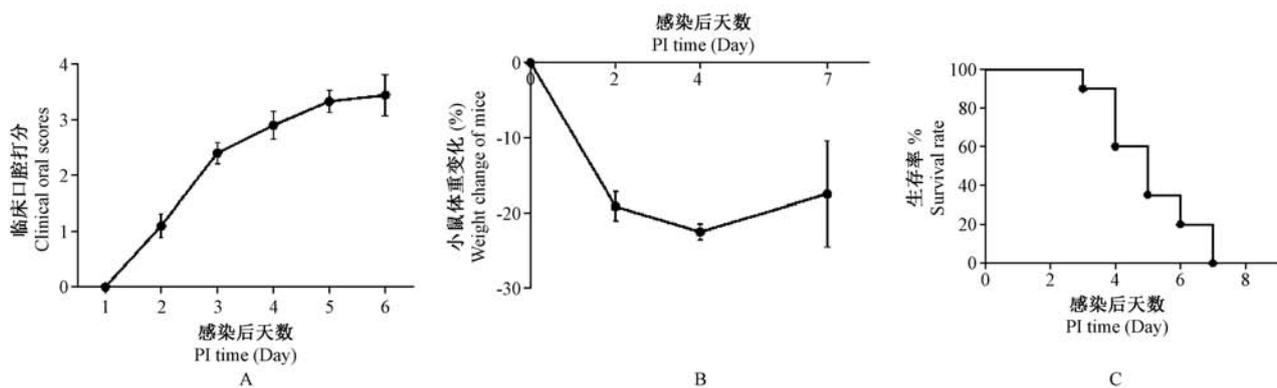


注:A:对照组小鼠;B&C:感染小鼠(3 d,5 d)。

图 1 *C. albicans* 口腔黏膜感染小鼠舌头白斑

Note. A: Mice of the control group. B&C: Experimental group(3 d,5 d).

Fig. 1 Gross appearance of tongue leukoplakia in the mice induced by oral mucosal *C. albicans* infection



注:PI:感染后;A:口腔临床打分;B:体重变化曲线;C:生存曲线。

图 2 *C. albicans* 口腔黏膜感染小鼠临床评价($\bar{x} = s x, n = 20$)

Note. PI: Postinfection evaluation of the orally infected mice. A: Oral clinical scores. B: The body weight change curve. C: The survival curve

Fig. 2 Clinical assessment of the mice infected by oral mucosal inoculation of *C. albicans*

2.2 口腔黏膜感染小鼠组织载菌量检测

接种后第 3、5、7 天,*C. albicans* 在舌和胃中均能检出较高浓度的载菌量,但在舌上的定值从第 3 天到第 7 天呈减少趋势,而胃内载菌量则维持在一定水平。肾与肝也检测到一定量的 *C. albicans*,载菌量低于胃和舌(见图 3)。舌与胃的检出率均为 87.5% (21/24)。此外,每个时间点个别鼠内的肾、肝、肺、心脏检出了 *C. albicans*,检出率分别为 54.5% (12/22), 50.0% (12/24), 20.0% (5/25), 4.0% (1/25),说明菌已从黏膜扩散到了内脏组织。

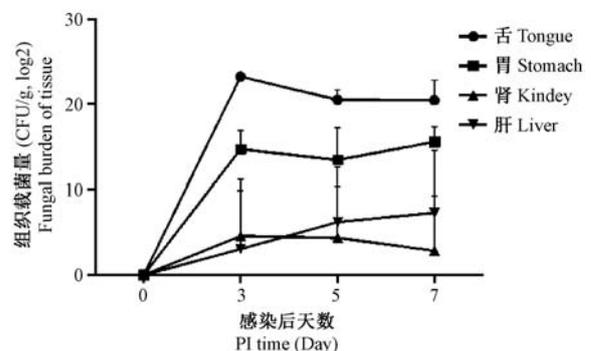


图 3 *C. albicans* 口腔黏膜感染小鼠载菌量检测($\bar{x} = S \bar{x}, n = 5/\text{时间点}$)

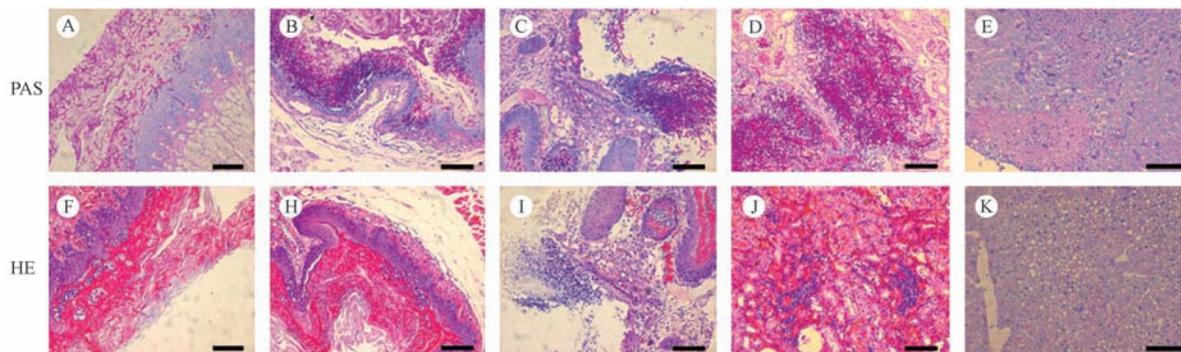
Fig. 3 Fungal burdens of the mice infected by oral mucosal inoculation of *C. albicans*

模型组 B 一共感染 20 只小鼠,除在感染后 4 d 和 6 d 死亡 5 只小鼠,3 d 和 5 d 均为活剖小鼠,7 d 3 只为活剖,2 只为死亡鼠(死亡时间 1~2 h)。

2.3 口腔黏膜感染小鼠组织病理学检查

选择检出阳性菌的模型组 B 动物的部分组织

进行 HE 和 PAS 染色,显示,大量酵母型和菌丝型菌体侵袭舌、食道、胃黏膜表面,偶尔见菌丝相 *C. albicans* 侵袭黏膜下层,肾脏与肝也可见到菌丝的定殖;HE 染色结果显示以中性粒细胞和巨噬细胞为主的炎性细胞浸润。见图 4。



注:A-E:依次为舌、食道、胃、肾、肝 PAS 染色;F-J:对应组织的 HE 染色。

图 4 *C. albicans* 口腔黏膜感染小鼠组织 PAS/HE 染色(标尺 = 100 μm)

Note. A-E:Tongue, esophagus, stomach, kidney, and liver, PAS staining. F-J:The same organs, HE staining.

Fig. 4 PAS/HE staining of different organ tissues of the mice infected by oral mucosal inoculation of *C. albicans*

3 讨论

念珠菌在口腔中存在可以表现为无临床症状的健康带菌者或有临床体征的口腔念珠菌病。在口腔念珠菌病中,白念珠菌引起的感染占 65% 左右^[19]。本研究选用 *C. albicans* SC5314 株作为建立口腔念珠菌黏膜感染模型的目标菌株,以便更客观了解与临床相近的典型口腔念珠菌病的发生与发展过程。*C. albicans* 以共生酵母相存在于健康人群中的黏膜表面,有研究表明^[20, 21],口腔念珠菌病的发病机制受到很多因素影响,既与念珠菌本身的形态、菌的数量、菌体表面结构及粘附力有关,还与宿主的防御机制有关。宿主的防御机制包括局部机械性及全身因素如上皮屏障、口腔菌丛相互作用和稳定、口腔分泌液、内分泌、营养因素、免疫功能、抗生素和激素的使用、化疗和放疗以及恶性疾病等。本研究模拟临床条件对模型小鼠进行醋酸泼尼松肌肉注射及四环素饮水,制造便于 *C. albicans* 粘附的宿主环境。根据 *C. albicans* 在营养丰富的培养基中繁殖一代需至少 1.5 h 特征^[22],本研究在感染初期,对带菌棉签在模型小鼠口腔停留时间控制在 1.5 h,以便菌体成功粘附并繁殖。

研究显示,小鼠感染 *C. albicans* 后第 3 天 *C. albicans* 成功定殖口腔黏膜并逐渐形成典型淀粉样白斑。病原菌借助宿主吞咽,饮水等进入到食道和胃等消化道管腔。与此同时,*C. albicans* 在感染后 3 d

可在感染鼠肝、肾等内脏组织检测到阳性菌,表明病原菌已成功突破小鼠消化道黏膜上皮屏障,通过血液或淋巴循环等进入动物体内引起播散性系统性感染。*C. albicans* 毒素及其分泌的蛋白酶是促进菌粘附、入侵、炎症坏死及血管通透性增加的重要帮凶,可致宿主死亡。Moyes 等的最新研究^[20]显示念珠菌在与宿主上皮细胞相互作用时可产生一种假丝酵母细胞溶解酶(candidalysin)的毒素,在念珠菌黏膜感染中起了重要作用,以上因素综合作用下导致 *C. albicans* 在本实验中出现了突破消化系统黏膜屏障后进入机体内循环系统引起系统性感染。小鼠口腔和全身念珠菌病模型与人类念珠菌病非常相似,中性粒细胞和巨噬细胞在宿主抗念珠菌感染中起到重要的第一道防线,本实验结果显示各组织出现大量的单核细胞浸润现象与此理论吻合。结合本次实验的载菌量及病理组织学结果,发现肾与肝是 *C. albicans* 重要的内脏组织靶器官,这与吴玉娥等^[17]念珠菌系统性感染模型结果相吻合。值得注意的是,病原菌入侵到感染鼠内脏器官呈现机会性扩散,有约 94.1% 小鼠出现 3 个组织同时出现菌体检测阳性(舌、胃、肝及舌、胃、肾),4 个组织同时出现菌体检测阳性约为 33.4% (舌、胃、肝、肾及舌、胃、肝、肺),约有 8.3% 小鼠能从肾与肝内脏组织检出阳性菌而在黏膜感染部位无检测到阳性菌,以上情况提示白色念珠菌由黏膜感染入侵蔓延至系统感染过程中与动物个体的免疫机能、黏膜特征或黏膜上皮微

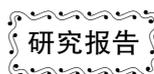
生物菌群等差异而有所不同,具体机制仍需进一步研究。

综上所述,本实验证实了白色念珠菌口腔黏膜感染有系统扩散的现象和事实,揭示 *C. albicans* 可在特殊条件下(如宿主免疫力低下或免疫抑制)突破宿主在抗念珠菌感染的先天免疫系统及适应性免疫系统屏障引起机会性系统性感染,为研究 *C. albicans* 口腔黏膜性感染与系统性感染相互关系提供实验依据,也为白色念珠菌经口感染 ICR 小鼠建立系统性感染模型的研究提供新的视野。

参 考 文 献

- [1] Doi AM, Pignatari AC, Edmond MB, et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian National Surveillance Program [J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0146909.
- [2] Barchiesi F, Orsetti E, Gesuita R, et al. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia in a tertiary referral center in Italy from 2010 to 2014 [J]. Infection, 2016, 44(2): 205 - 213.
- [3] Tadec L, Talarmin JP, Gastinne T, et al. Epidemiology, risk factor, species distribution, antifungal resistance and outcome of Candidemia at a single French hospital: a 7-year study [J]. Mycoses, 2016, 59(5): 296 - 303.
- [4] Luzzati R, Cavinato S, Deiana ML, et al. Epidemiology and outcome of nosocomial candidemia in elderly patients admitted prevalently in medical wards [J]. Aging Clin Exp Res, 2015, 27(2): 131 - 137.
- [5] Freire F, Ferraresi C, Jorge AO, et al. Photodynamic therapy of oral Candida infection in a mouse model [J]. J Photochem Photobiol B Biol, 2016, 159: 161 - 168.
- [6] Nilsby I, Norden A. Studies of the occurrence of Candida albicans [J]. Acta Med Scand, 1949, 133(5): 340 - 345.
- [7] Valentincic M. [Candida albicans] [J]. Prir Clovek Zdravje, 1951, 6(1-2): 47 - 48.
- [8] Corcelle L. Keratitis caused by Candida albicans [J]. Bull Soc Ophthalmol Fr, 1957, 11(9): 618 - 20.
- [9] Salvatori O, Puri S, Tati S, et al. Innate immunity and saliva in Candida albicans-mediated oral diseases [J]. J Dent Res, 2016, 95(4): 365 - 371.
- [10] Ramla S, Sharma V, Patel M. Influence of cancer treatment on the Candida albicans isolated from the oral cavities of cancer patients. Supportive care in cancer [J]. Support Care Cancer, 2016, 24(6): 2429 - 2436.
- [11] Rahman D, Mistry M, Thavaraj S, et al. Murine model of concurrent oral and vaginal Candida albicans colonization [J]. Methods Mol Biol, 2012, 845: 527 - 535.
- [12] Rahman D, Mistry M, Thavaraj S, et al. Murine model of concurrent oral and vaginal Candida albicans colonization to study epithelial host-pathogen interactions [J]. Microbes Infect, 2007, 9(5): 615 - 622.
- [13] Yoshioka H, Ito-Kuwa S, Nakamura K, et al. [Virulence of Candida dubliniensis in comparison with Candida albicans using an experimental model of mouse oral candidiasis [J]. Med Mycol J, 2012, 53(2): 135 - 145.
- [14] Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush [J]. Microbiol Immunol, 2003, 47(5): 321 - 326.
- [15] Tashiro M, Kimura S, Tateda K, et al. Pravastatin inhibits farnesol production in Candida albicans and improves survival in a mouse model of systemic candidiasis [J]. Med Mycol, 2012, 50(4): 353 - 360.
- [16] Luisa Gil M, Murciano C, Yanez A, et al. Role of Toll-like receptors in systemic Candida albicans infections [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2016, 21: 278 - 302.
- [17] 吴玉娥, 李航, 陈梅玲, 等. 系统性念珠菌感染小鼠模型的制备 [J]. 中国实验动物学报, 2015, (03): 301 - 305.
- [18] Solis NV, Filler SG. Mouse model of oropharyngeal candidiasis [J]. Nat Protoc, 2012, 7(4): 637 - 642.
- [19] 孙康德, 张家胜, 陈旭, 等. 口腔白念珠菌 3 种致病相关分泌型水解酶检测方法的建立及应用 [J]. 检验医学, 2016, 31(5): 355 - 358.
- [20] Moyes DL, Wilson D, Richardson JP, et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection [J]. Nature, 2016, 532(7597): 64 - 66.
- [21] 李丹, 崔凡, 熊俊浩. 白念珠菌对宿主的黏附机制 [J]. 中国真菌学杂志, 2014(5): 316 - 320.
- [22] 徐岩英, 胡碧琼. 口腔念珠菌及其致病性的研究 [J]. 中华口腔医学杂志, 1997(3): 52 - 54.

[收稿日期] 2016 - 07 - 08



耐甲氧西林金黄色葡萄球菌系统性感染 小鼠模型的制备

邓少嫦, 罗银珠, 李航, 贾欢欢, 何丽芳, 龚宝勇, 曾业文, 吴玉娥*

(广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广州 510663)

【摘要】 目的 采用临床分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)感染ICR小鼠,建立MRSA系统性感染小鼠模型。方法 采用连续3 d腹腔注射环磷酰胺(100 mg/kg)进行免疫抑制后,将浓度为 1×10^7 cfu/mL的MRSA菌液经尾静脉接种ICR小鼠,通过生存分析、外周血白细胞计数、组织载菌量和病理学检查对模型进行评价。结果 MRSA接种后第2天小鼠开始死亡,14 d内累积死亡率达60%;外周血白细胞总数显著升高,细菌在多个器官定植,载菌量由高到低依次是肾、关节、肺、肝和脑,肾载菌量高达 10^9 CFU/g,关节、肺、肝和脑的载菌量范围在 $10^4 \sim 10^9$ CFU/g。病理观察显示肾、心脏、肺、肝、脑和关节多器官感染的组织病理学改变。结论 采用环磷酰胺免疫抑制后静脉接种MRSA的方法首次成功建立MRSA系统性感染小鼠模型,该模型可应用于MRSA发病机理及药物筛选等研究领域。

【关键词】 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;动物模型;小鼠;感染

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0596-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.008

Preparation of a mouse model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection

DENG Shao-chang, LUO Yin-zhu, LI Hang, JIA Huan-huan, HE Li-fang,
GONG Bao-yong, ZENG Ye-wen, WU Yu-e*

(Guangdong Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China)

【Abstract】 Objective To establish a mouse model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) systemic infection with a MRSA strain isolated from clinical samples. **Methods** Forty-four ICR mice were randomly divided into experimental group (28 mice) and control group (16 mice). The mice were infected with MRSA (1×10^7 CFU/mL) by tail vein injection after the mice were treated with cyclophosphamide (100 mg/kg) i. p. for immunosuppression. Survival analysis, peripheral blood white blood cell count, tissue bacterial loads and pathological examination were used to evaluate the models. **Results** At 2 days after MRSA infection, the treated mice began to die and the cumulative mortality rate reached to 60% at 14 days post-infection. The peripheral blood leukocyte count was significantly increased. MRSA test was positive in the kidneys, joints, lung, liver and brain. The bacterial loads in kidneys reached to 10^9 CFU/g in joints, lung, liver and brain reached to 10^4 to 10^9 CFU/g. Histopathological changes of multiple organ infection were observed in the kidney, heart, lung, liver, brain and joint tissues. **Conclusions** We have successfully established a mouse model of MRSA systemic infections. It can be a useful model for the study on pathogenesis and new drug development and so on of MRSA infection.

【Key words】 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA); Animal model; Mouse; Infection, systemic
Corresponding author: WU Yu-e. E-mail: wye@gdlami.com

[基金项目] 广东省科技计划项目资助(No. 2013B010102006, No. 2014A010107018)。

[作者简介] 邓少嫦(1979-),女,主管药师,研究方向:实验动物与比较医学。E-mail: dsc@gdlami.com

[通讯作者] 吴玉娥(1978-),女,副主任药师,研究方向:实验动物疾病模型。E-mail: wye@gdlami.com

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), 自从 1961 年被第一次发现以来, 已经成为世界范围内日益增长的感染病原体^[1-2]。在美国, MRSA 菌株占有所有分离到的金葡萄菌的 50% 以上^[3]。我国 2015 年全国细菌耐药监测报告显示, MRSA 全国检出率为 35.8%^[4]。MRSA 的多重耐药以及耐药性的快速变迁给感染控制带来困难, 导致死亡率增高、住院时间延长、治疗费用增加^[5]。目前, MRSA 已经成为全世界范围内的一大公众健康问题。本研究在 ICR 小鼠免疫低下模型的基础上, 给予小鼠尾静脉注射接种 MRSA, 旨在建立免疫抑制状态下 MRSA 系统性感染模型, 进而模拟临床上 MRSA 在人体的感染情况, 为 MRSA 发病机理及药物筛选等研究提供模型。

1 材料与方法

1.1 菌株

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA), 编号为 40C5, 由广东省中医院惠赠, 本实验室保存。细菌培养及药敏定量结果显示, 该菌为耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌, 对所有 β -内酰胺类抗生素耐药。

1.2 实验小鼠

SPF 级雄性 ICR 小鼠, 5 周龄, 体重 (27 ± 2) g, 购于北京维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2012-0001】。动物实验在负压感染动物实验室进行【SYXK(粤)2012-0122】。动物实验开展经广东省实验动物监测所动物使用和管理委员会审批(IACUC2015042)。

1.3 试剂和仪器

注射用环磷酰胺(Baxter Oncology GmbH, 5F063A), 培养皿(广州迪景, BAP-150814), 培养箱(江南仪器厂, MJX-250), 血液分析仪(希森美康, XT-2000i), 脱水机(Leica, TP1020), 石蜡包埋机(Leica, EG1150), 切片机(Leica, RM2255), 生物荧光显微镜(Leica, DM2500)。

1.4 菌株制备

1.4.1 菌体培养保存

将保存有金黄色葡萄球菌的菌片用无菌镊子加入到少量胰蛋白大豆肉汤液体培养基(3~5 mL)中, 37℃ 培养 24 h; 取出扩增后的金黄色葡萄球菌液体培养基, 用接种环挑取少量菌液, 划线至血平板

上, 37℃ 培养 24 h; 刮取表面菌株至小牛血清, 混匀后分装至冻存管, -80℃ 冷冻保存备用。

1.4.2 接菌前浓度调整

于 -80℃ 冰箱内取出备用菌液, 解冻后用接种环挑取少量菌液划线至血平板上, 37℃ 培养 24 h。刮取平板菌落, 用生理盐水洗 3 次, 采用比浊法, 用生理盐水配成 2 个麦氏单位浓度(约 4×10^8 CFU/mL)的菌液, 按照预计接菌浓度对菌液进行梯度稀释。留取 1 mL 稀释后的菌液, 用于确定实际接菌浓度。

1.4.3 确定实际菌液浓度

菌液经 10 倍梯度稀释, 选择三个稀释度的菌液, 分别取 0.2 mL 加入固体无菌血平板, 使用灭菌的玻璃涂棒涂布均匀。37℃ 培养箱培养 24 h, 计算菌落数目, 菌落数在 30~300 之间的稀释度有效。按下面公式计算出菌液的含菌数: 每毫升原菌液活菌数 = 同一稀释度 3 个重复平皿菌落平均数 \times 稀释倍数 \times 5。

1.5 分组及处理

44 只 ICR 小鼠随机分为模型组(共 28 只, 其中 8 只用于观察生存情况及体重变化, 20 只用于组织取材)和对照组(16 只)。两组分别在接种 MRSA 前三天连续给环磷酰胺(100 mg/kg, 腹腔注射, 1 次/24 h, 共 3 次), 使小鼠处于免疫抑制状态。小鼠腹腔注射环磷酰胺后第 4 天, 外周血白细胞数降到最低, 是理想的接种感染时间。采用 1 mL 注射器, 每只小鼠经尾静脉接种浓度 1×10^7 CFU/mL 的菌液进行感染, 接种剂量根据小鼠体重进行换算, 每 20 g 小鼠接种 0.2 mL, 模型对照组小鼠给予生理盐水。

MRSA 接种当天记为第 0 天, 接种后每天观察小鼠临床表现并称重, 连续观察 14 d。当发现下列情况中任何两项时, 安乐死小鼠, 以减少对其的疼痛和应激。①弓背、被毛松乱; ②体重下降超过起始体重的 20%; ③体温降低, 触之冰冷; ④活动明显减少; ⑤不能进食; ⑥斜颈或原地打转。在进行生存观察时, 将安乐死小鼠死亡时间记录到下一天, 采用生存曲线对感染小鼠的生存情况进行描述。

分别在 MRSA 接种后第 2、4、8、14 天每组安乐死小鼠 4 只, 取血液进行血常规检测, 取肺、肾、肝、脑和关节一半进行组织载菌量检测, 一半用于病理学观察。因心脏体积较小, 本研究仅进行病理学观察。

1.6 组织载菌量检测

小鼠各脏器称重后加入 1 mL 无菌生理盐水研磨成匀浆液,进行 10 倍梯度稀释,选择适当的稀释浓度,取 0.2 mL 接种于血培养基,37℃ 培养箱培养 24 h,进行菌落计数。菌落数在 30 ~ 300 之间的匀浆液稀释度有效。计算组织的载菌量 logCFU/g。见公式:

$$\text{CFU/g} = [3 \text{ 个培养基的 CFU 的平均数} \times 5 \times \text{匀浆液体积 (mL)} \times \text{稀释倍数}] / \text{组织重量 (g)}$$

1.7 组织病理学检测

取小鼠主要脏器(心脏、肝、肺、肾)、脑和关节,中性甲醛溶液固定后进行常规病理切片,行 HE 染色,光学显微镜下观察。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 16.0 进行统计分析,两组间比较用 independent-samples *t* test 检验,生存比较用 Log-rank test 检验, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生存情况

小鼠接种 MRSA(1×10^7 CFU/mL)后第 2 天出现死亡,MRSA 组和对照组小鼠死亡情况(死亡数/观察数)分别为 5/8、0/8。采用生存曲线对两组小鼠的生存情况进行描述和分析,两组小鼠中位生存间分别是 7 d(MRSA)和 14 d(control)。采用 Log-rank test 统计方法对生存曲线进行比较分析,MRSA 组和对照组比较差异有显著性($P < 0.01$),见图 1 所示。

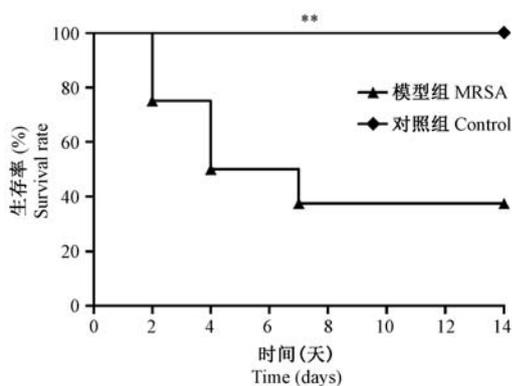


图 1 小鼠接种 MRSA 后的生存情况 ($n = 8$)

Fig. 1 Mouse survival curves after MRSA inoculation

2.2 体重变化

感染小鼠从接种后第 1 天开始出现体重降低,在接种后第 3 天体重降到最低点,随后存活小鼠体重开

始回升,至观察期第 14 天小鼠体重接近接种前水平。对照组小鼠体重呈逐渐升高表现,见图 2 所示。

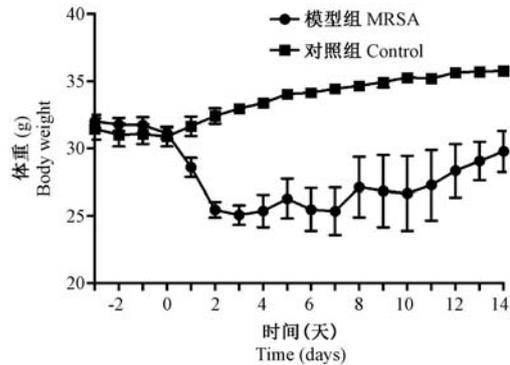


图 2 小鼠接种 MRSA 后的体重变化 ($n = 8$)

Fig. 2 Body weight changes of the mice after MRSA inoculation

2.3 外周血白细胞计数变化

根据前期实验结果,我们选择免疫抑制后白细胞计数最低点(CY 给药后第 4 天)进行 MRSA 接种^[6]。MRSA 组小鼠自接种后第 4 天开始出现白细胞总数急剧升高,接种后第 8 天达到高峰 [$(46.8 \pm 30.5) \times 10^9$ 个/L],随后逐渐回落,至接种后第 14 天回复到正常水平 [$(7.0 \sim 8.0) \times 10^9$ 个/L]。对照组小鼠外周血白细胞总数在整个观察期内逐渐回复,至接种后第 14 天回复到正常水平,见图 3 所示。

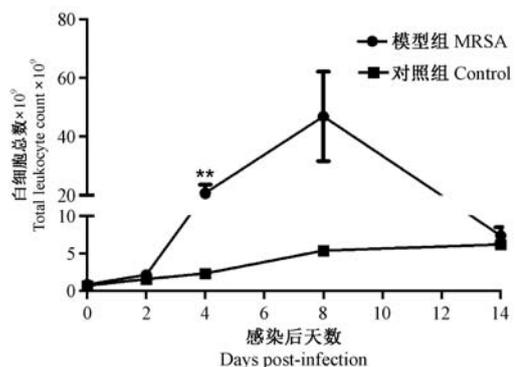


图 3 小鼠接种 MRSA 后的外周血白细胞总数变化 ($n = 4$)

Fig. 3 Total leukocyte counts in MRSA treated mice

2.4 组织载菌量

MRSA 静脉感染小鼠,组织载菌量脏器分布由高到低分别是肾、关节、肺、肝和脑。小鼠感染后第 4 天组织载菌量达高峰,以肾载菌量最高,可达到 10^9 CFU/g,脑组织载菌量最低在 10^4 CFU/g。随着感染时间延后,各组织载菌量逐渐下降,至感染后第

14 天,除肾和关节仍保持较高载菌量 (10^5 CFU/g) 外,肝、肺和脑组织几乎无菌落生长,见图 4 所示。

2.5 组织病理变化

病理组织学观察显示多器官系统性金黄色葡萄球菌感染的病理组织学改变。心肌纤维内可见多个细菌感染灶,较多中性粒细胞浸润;肝汇管区周边可见灶状中性粒细胞浸润;肺泡间隔见较多中性粒细胞浸润;肾皮质、髓质内可见多个细菌感染灶,周边可见大量中性粒细胞浸润;脑室周边可见灶状淋巴细胞浸润;关节滑膜增生,内可见大量中性粒细胞浸润,见图 5 所示。

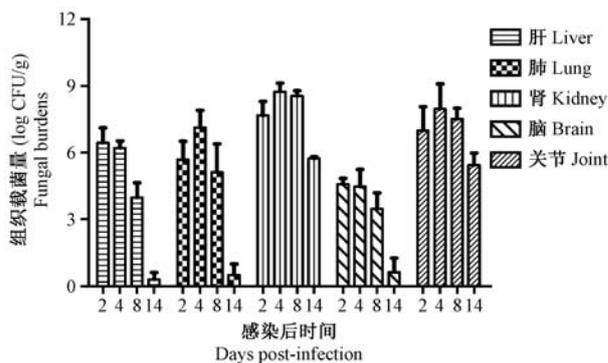
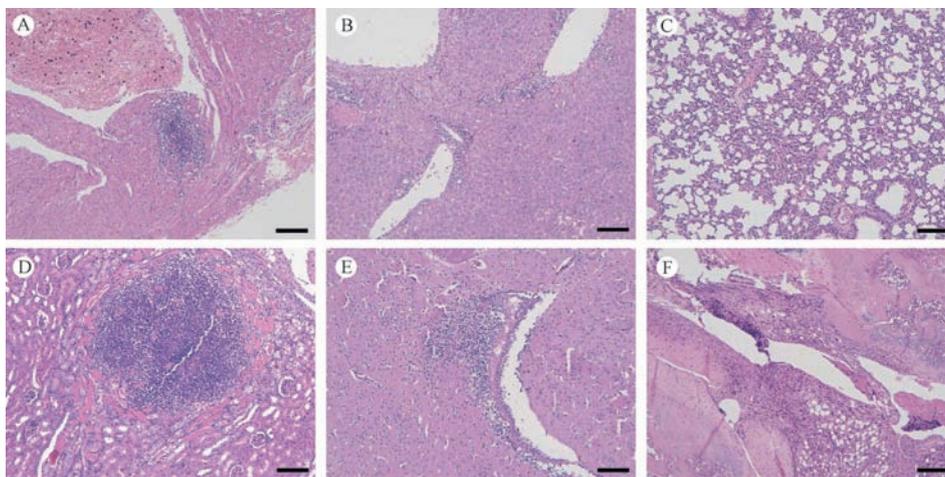


图 4 小鼠静脉接种 MRSA 后各脏器组织载菌量变化 ($n=4$)

Fig. 4 Dynamic changes of tissue bacterial burdens after MRSA inoculation



注:A, B, C, D, E 和 F 分别为心脏,肝,肺,肾,脑和关节的 H. E. 染色切片,标尺 = 200 μ m。

图 5 小鼠接种 MRSA 后组织器官病理改变

Note. A, B, C, D, E, and F: The heart, liver, lung, kidney, brain and joint, respectively. The scale bar in the lower right corner is 200 μ m.

Fig. 5 Histological findings of the MRSA-infected mice. HE staining.

3 讨论

MRSA 是医院及社区常见的致病菌,由于其多重耐药性及高致死率,MRSA 感染已经成为医学界的一个普遍难题^[5],建立 MRSA 感染动物模型,成为研究其致病机制和开发新型抗菌药的重要基础。

目前金黄色葡萄球菌动物模型造模感染途径主要有以下几种:呼吸道感染、局部皮肤损伤、经腹腔感染和血液感染等。建模过程几乎都采用免疫正常小鼠,此现状之下存在两个方面的不足。首先,金黄色葡萄球菌为机会性致病菌,当个体免疫功能下降时或皮肤及黏膜出现破损时才易于侵入机体导致感染发生。临床研究显示高龄患者免疫功能减退,抗感染能力低下,某些基础疾病导致机体重要器官功

能障碍和细胞免疫功能降低是诱发 MRSA 感染的重要原因^[7]。因此,利用正常小鼠造模不能较好地模拟人体临床感染背景条件。本研究在 MRSA 感染小鼠模型的建立过程中采用了环磷酰胺免疫抑制的方法,更好地模拟了 MRSA 的临床致病条件。其次,小鼠正常免疫状态下接种金黄色葡萄球菌,剂量低难以引起疾病表现,固在造模中大都采用高的接种剂量,通常在 $10^8 \sim 10^{10}$ 三个数量级之间^[8-11]。本研究建立经环磷酰胺免疫抑制后再经静脉接种 MRSA 的方法,采用较低的接菌剂量 (1×10^7 CFU/mL) 即可引起小鼠死亡和全身多器官播散感染,更好地模拟了人感染 MRSA 的临床疾病特征。我们通过多次试验证明该方法具质量可控,易重复的优点。

已有研究表明金黄色葡萄球菌静脉注射感染小

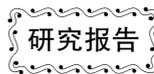
鼠,细菌更易于在肾定植,引起肾感染,肾细菌载量可达 $10^7 \sim 10^8$ CFU/组织^[12]。本研究通过免疫抑制后静脉接种的方法使大量 MRSA 通过尾静脉进入循环系统,造成小鼠菌血症,引发多器官感染。组织载菌量结果显示肾、关节、肺、肝和脑 5 个组织中以肾载菌量最高,在感染后第 4 天达到 10^9 CFU/g,病理观察结果也证实肾存在多个细菌感染灶,该实验结果说明我们的造模方法更好地体现了 MRSA 感染后器官组织的系统感染。

MRSA 引起的临床感染部位还包括骨和关节感染^[13]。国内现有文献报道的 MRSA 动物模型中未见有采用静脉接种途径进行骨和关节感染的研究。在本研究建立的感染模型中,我们发现 80% 的小鼠出现关节炎症状,表现为腕、踝关节红肿及功能障碍,严重者影响小鼠正常爬行。关节组织载菌量在整个观察期内均呈现较高水平,病理观察亦见关节滑膜增生、中性粒细胞浸润的关节炎表现。该研究结果表明细菌已通过血液播散至软骨组织,引起关节感染,此现象在国内 MRSA 静脉感染小鼠模型中为首次报道,也体现了我们的模型更全面地模拟了 MRSA 的临床感染特征,可以同时应用于感染性关节炎的发病机理及药物筛选研究。

参 考 文 献

- [1] Mera RM, Suaya JA, Amrine-Madsen H, et al. Increasing role of *Staphylococcus aureus* and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States: a 10-year trend of replacement and expansion [J]. *Microb Drug Resist*, 2011, 17(2): 321-328.
- [2] Sun DD, Ma XX, Hu J, et al. Epidemiological and molecular characterization of community and hospital acquired *Staphylococcus aureus* strains prevailing in Shenyang, Northeastern China [J]. *Braz J Infect Dis*, 2013, 17(6): 682-690.
- [3] Jones RN, Castanheira M, Fau-Hu B, et al. Update of contemporary antimicrobial resistance rates across China: reference testing results for 12 medical centers(2011) [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013, 77: 258-266.
- [4] 全国细菌耐药监测网. 2015 年全国细菌耐药监测报告 [J]. *中国职业药师*, 2016, 13(3): 3-8.
- [5] Macedo-Vinas M, De Angelis G, Rohner P, et al. Burden of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections at a Swiss University hospital: excess length of stay and costs [J]. *J Hosp Infect*, 2013, 84(2): 132-137.
- [6] 吴玉娥,李航,陈梅玲,等. 系统性念珠菌感染小鼠模型的制备 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(3): 301-305.
- [7] 虞亦鸣. 医院内 MRSA 感染危险因素分析及毒力耐药基因检测 [D]. 苏州大学, 2016, 博士学位论文.
- [8] 王星,周文江,沈艳,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌肺炎小鼠感染模型的建立与评估 [J]. *中国抗生素杂志*, 2011, 36(8): 617-620.
- [9] 孙琦,王湘雨,陈诗琪,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌小鼠腹膜炎模型的建立 [J]. *生命科学研究*, 2015, 19(1): 54-58.
- [10] 陈雪雨. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)致 SKH-1 无毛小鼠感染模型的实验研究 [D]. 复旦大学, 2012, 硕士学位论文.
- [11] 王婷婷,左钱飞,刘开云,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌小鼠全身感染模型的建立与评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(6): 61-64.
- [12] Marra A. Animal models in drug development for MRSA [J]. *Methods Mol Biol (Clifton, N. J.)*, 2014, 1085: 333-345.
- [13] Morgan DS, Fisher D, Merianos A, et al. An 18 year clinical review of septic arthritis from tropical Australia [J]. *Epidemiol Infect*. 1996, 117(3): 423-428.

[收稿日期] 2016-10-08



人参辅酶 Q₁₀ 防晒霜对紫外线损伤小鼠的保护作用

吴海游¹, 邱楚群¹, 梁美婷¹, 郑静彬¹, 胡紫薇¹, 吕思敏², 吴铁^{1,2}

(1. 广东医科大学药学院, 广东 东莞 523808;

2. 广东医科大学-广东润和生物科技有限公司辅酶 Q₁₀ 联合研究中心, 广东 东莞 523808)

【摘要】 目的 研究人参辅酶 Q₁₀ 防晒霜对紫外线损伤小鼠的保护作用。方法 36 只小鼠随机分组, 皮肤脱毛后分别涂抹相应霜剂, 正常对照组不做任何处理, 其他组进行紫外线照射, 连续 8 周后, 小鼠眼球取血处死进行指标检测。结果 与正常组小鼠比较, 模型组小鼠皮肤粗糙有皱纹、且角质层脱落, T-SOD 与 GSH-Px 活力均明显下降, 白细胞数与 MDA 含量明显增高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 人参辅酶 Q₁₀ 防晒霜组小鼠皮肤光滑、角质层没有脱落, T-SOD 活力、红细胞与血红蛋白含量上升, 白细胞数量、MDA 含量与明显下降 ($P < 0.05$), 阳性对照组小鼠皮肤光滑、角质层没有脱落, GSH-Px 活力上升, 白细胞数量、MDA 含量下降 ($P < 0.05$)。结论 人参辅酶 Q₁₀ 防晒霜具有抗紫外线损伤的作用, 其预防效果与甲氧基肉桂酸辛酯辅酶 Q₁₀ 霜剂相当。

【关键词】 人参皂苷; 紫外线损伤; 血细胞; 血清生化指标; HE 染色

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0601-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.009

Protective effect of ginseng co-enzyme Q₁₀ suncream on the ultraviolet radiation-induced skin damage in mice

WU Hai-you¹, QIU Chu-qun¹, LIANG Mei-ting¹, ZHENG Jing-bin¹,
HU Zi-wei¹, LV Si-min², WU Tie^{1,2}

(1. School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan Guangdong 523808, China;

2. The Joint Center of Guangdong Medical University and Guangdong Runhe Biotechnology Company for Co-Enzyme Q₁₀ Research; Dongguan Guangdong 523808, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect of ginseng co-enzyme Q₁₀ suncream on the skin damage caused by ultraviolet (UV) radiation in mice. **Methods** 36 mice were randomly assigned to four groups. The mice were shaved on the back and the left untreated side was taken as control group, or was treated with UV as model group. Before treated with UV, the mice were painted with suncream containing ginseng co-enzyme Q₁₀, or octyl methoxycinnamate as positive controls. The mice were treated for 8 weeks. At the end of the experiment, blood samples of all mice were collected from the eyes, then subjected to cell counting or biochemical measurements, and skin samples were cut for pathological examination. **Results** Compared with the control group, there was a significant increase in white blood cell counts ($P < 0.05$) and MDA content ($P < 0.05$), and declined serum levels of SOD ($P < 0.05$) and GSH-Px ($P < 0.05$) in the model group, and the skin was rough and wrinkled with stratum corneum exfoliation. Compared with the model group, the mice of ginseng co-enzyme Q₁₀ suncream group had significantly lower white blood cell count ($P < 0.05$) and MDA content ($P < 0.05$), and increased serum levels of T-SOD ($P < 0.05$) and red blood cell counts ($P < 0.05$). The skin had no rough-

【基金项目】 广东医科大学-广东润和生物科技有限公司辅酶 Q₁₀ 联合研究中心专项资金资助(编号:2XX14002)。

【作者简介】 吴海游(1990-), 男, 硕士研究生, 专业: 药理学。E-mail: Wuhy_2014@163.com

【通讯作者】 吴铁(1955-), 男, 教授, 研究方向: 药理学。E-mail: Wutie2@163.com

ness and wrinkles and without stratum corneum exfoliation. Compared with the model group, the positive control group showed significantly decreased white blood cell count ($P < 0.05$) and MDA content ($P < 0.05$), and increased serum levels of GSH-Px ($P < 0.05$). The skin had no roughness and wrinkles and no stratum corneum exfoliation. However, there was no significant difference between the ginseng co-enzyme Q_{10} suncream group and positive control group. **Conclusions** Ginseng co-enzyme Q_{10} suncream shows satisfactory preventive effects on the UV radiation-induced skin damage in mice, similar to the preventive effects of the octyl methoxycinnamate-containing suncream.

【Key words】 Ginseng co-enzyme Q_{10} ; Ultraviolet damage, skin; Biochemical indicator; Blood cells; Pathology; mice

Corresponding author: WU Tie. E-mail: E-mail: Wutie2@163.com

人参是我国名贵中药材,化学成分复杂,生物活性广泛,但研究表明人参皂苷是其主要有效成分,约占 4%^[1]。近几年来,人参皂苷的药效学作用及其作用机制被广泛研究,其中人参皂苷 Rb1 对成纤维细胞基质金属蛋白酶的表达有显著抑制作用,可以通过调节成纤维细胞 MMPs 活性防治皮肤光老化的发生^[2]。中波紫外线照射导致角质形成细胞存活率降低、细胞核损伤,但应用人参皂苷后发现其可拮抗这种损伤,起到保护作用,这与人参皂苷清除辐射产生的反应性氧中间产物(ROI)有关^[3,4]。王红丽等^[5]研究发现高浓度人参皂苷能使衰老模型小鼠皮肤中 SOD 活力、轻脯氨酸含量明显升高,MDA 含量显著降低,血中 CAT、GSH-Px 活力显著升高,表明人参皂苷具有明确的抗氧化的作用,可能有助于修复组织的氧化损伤。然而人参皂苷在抗紫外线损伤方面上,到目前为止还未见报道。另外,辅酶 Q_{10} 作为一种抗氧化剂,能抑制皮肤成纤维细胞内胶原激酶的表达,减少皮肤胶原的降解,可阻断由光老化引起的多方面损伤^[6-8]。甲氧基肉桂酸辛酯作为紫外线吸收剂,也能减轻紫外线辐射对机体造成的损伤,对机体起到保护作用。本实验采用一种新的研究思路,观察人参辅酶 Q_{10} 霜剂外用对紫外线照射导致小鼠皮肤损伤后皮肤病理学、血细胞及血清生化指标等的影响,探讨人参皂苷能否替代甲氧基肉桂酸辛酯的抗紫外线作用,为防晒化妆品提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

36 只 SPF 级 3 月龄雌性 KM 小鼠,体重(27.66 ± 0.56) g,由南方医科大学实验动物中心提供【SCXK(粤)2011-0015】。小鼠造模给药与组织取材于广东医学院实验动物中心进行【SYXK(粤)2015-0147】。

1.1.2 试剂与器材

人参皂苷、甲氧基肉桂酸辛酯:由广东润和生物科技有限公司提供;丙二醛(MDA)测试盒、超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测试盒与伊红-苏木素(HE)染色试剂盒:购于南京建成公司;UVB 紫外灯及 ST-513 型紫外线辐照计:购于台湾先驰光电公司;XFA6130 型动物血液细胞分析仪:购于南京普朗公司;另外,酶标仪(中国普朗公司)、漩涡振荡器(中国其林贝尔仪器制造厂)、微量移液器(美国 Thermo 公司)、冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)等设备均由本实验室提供。

1.1.3 防晒霜的配制

人参辅酶 Q_{10} 防晒霜和阳性对照含甲氧基肉桂酸辛酯辅酶 Q_{10} 防晒霜根据本项目前期申报的发明专利(专利申请号 201510430436.9)的配方进行配制。人参辅酶 Q_{10} 防晒霜含有人参皂苷 0.5%,阳性对照药含甲氧基肉桂酸辛酯 5%,两种制剂均含 1% 辅酶 Q_{10} ,空白霜剂不含人参皂苷与甲氧基肉桂酸辛酯,也不含辅酶 Q_{10} ,以上防晒霜均由本课题组提供。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

实验开始前,将 36 只 KM 小鼠进行背部脱毛,采用石蜡松香 1:1 比例融解成脱毛液进行脱毛,脱毛面积为 2 cm × 3 cm,然后再将小鼠随机分成 4 组,每组 9 只,分别为正常(CON)组、模型(MOL)组、人参辅酶 Q_{10} 防晒霜(GSS)组、阳性对照(POS)组。

1.2.2 最小红斑量预测与实验造模

小鼠除去背部毛发后,检查试验部位皮肤完好,无损伤及异常者用于实验。每次照射前紫外灯先预热 15 min,然后在距离动物皮肤 30 cm 处进行紫外照射,用紫外线强度辐射计测得照射高度处的紫外线强度与小鼠皮肤出现红斑的最短时间,再根据公

式计算出最小红斑量^[9]。实验期间,正常组小鼠脱毛后不作任何处理,其余组小鼠涂抹相应的霜剂 30 min 后进行紫外线照射,照射剂量为最小红斑量,每天 1 次,连持 8 周^[10-12]。

1.2.3 小鼠皮肤病理学切片染色

实验结束后,剪下小鼠背部脱毛部位皮肤进行多聚甲醛固定,石蜡包埋与 HE 染色,详细方法参照伊红-苏木素(HE)染色试剂盒说明书。

1.2.4 小鼠血细胞的测量

实验结束后,小鼠眼球取血并处死,取小鼠全血约 2 mL,其中 1 mL 用 EDTA 抗凝管承接,用于血细胞测量,另 1 mL 用普通离心管承接,用于血清生化指标测量。用血细胞分析仪进行血细胞的测量,分别检测血液中的白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血小板(PLT)、血红蛋白(HGB)。

1.2.5 小鼠血清生化指标的测量

取下全血后,将装有 1 mL 血液的普通离心管放入 -20℃ 冰箱中存放 1 h,再 4 g 皮肤组织 12 000 r/min 离心 15 min,取离心管上层血清,参照试剂盒提

供的检测方法对血清丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等指标,以酶标仪检测其吸光度,计算其含量。

1.2.6 数据处理

参数值用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 软件对数据进行方差分析及组间比较。

2 结果

2.1 各组小鼠实验前及实验后的体重变化

各组小鼠实验前及实验后的体重变化见表 1。如表 1 所示,与 CON 组相比,MOL 组小鼠体重在第 5 周以后逐渐出现差异($P < 0.05$),差异有显著性;与 MOL 组比较,GSS 组小鼠体重在第 3 周、第 5 周差异有显著性($P < 0.05$);POS 组小鼠体重在第 5 周、第 7 周差异有显著性($P < 0.05$)。整个实验过程中,各组小鼠都出现增重现象,其中 POS 组小鼠增重量最高,为 21.1%,MOL 组小鼠增重量最低,为 18.6%,CON 组与 GSS 组小鼠增重量分别为 19.7%、20.3%。

表 1 各组小鼠实验前及实验后的体重变化($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Tab. 1 Changes of body weight in the mice of different groups

组别 Groups	第 1 周 Week 1	第 3 周 Week 3	第 5 周 Week 5	第 7 周 Week 7	第 8 周 Week 8
正常组 CON	29.34 ± 0.46	28.65 ± 0.68	32.56 ± 0.28	34.88 ± 0.33	36.54 ± 0.70
模型组 MOL	27.74 ± 0.75	28.71 ± 0.73	30.91 ± 0.65*	32.83 ± 0.80*	34.10 ± 0.77*
人参皂苷组 GSS	28.28 ± 0.43	30.70 ± 0.42#	33.51 ± 0.57##	33.33 ± 0.61	35.48 ± 0.56
阳性对照组 POS	28.27 ± 0.48	30.37 ± 0.39	33.58 ± 0.61#	34.35 ± 0.65#	35.81 ± 0.57

注:与空白组比较* $P < 0.05$,与模型组比较# $P < 0.05$,## $P < 0.02$ 。

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the MOL group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.02$.

2.2 小鼠最小红斑量测定与皮肤外观学观

各组小鼠皮肤组织外观学观察见图 1。小鼠在紫外线光强度为 1522.7 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 时,背部皮肤出现红斑的最短时间约 30 min,小鼠最小红斑量为 2.74 J/cm^2 。实验中发现,空白组小鼠背部皮肤红润光滑,表皮细嫩,没有皮屑脱落;模型组小鼠背部皮肤泛红,有红斑出现,表皮粗糙有皮屑脱落,同时皮纹加深且有皮肤皱纹出现;人参皂苷防晒霜组小鼠背部皮肤略显红斑,表皮比较平滑没有皮屑脱落,没有出现皮纹加深与皱纹现象;阳性对照药组小鼠背部皮肤表皮平滑,也没有出现皮纹加深与皱纹现象。

2.3 小鼠皮肤组织形态学观察

各组小鼠皮肤组织形态学观察见图 2。从图 2

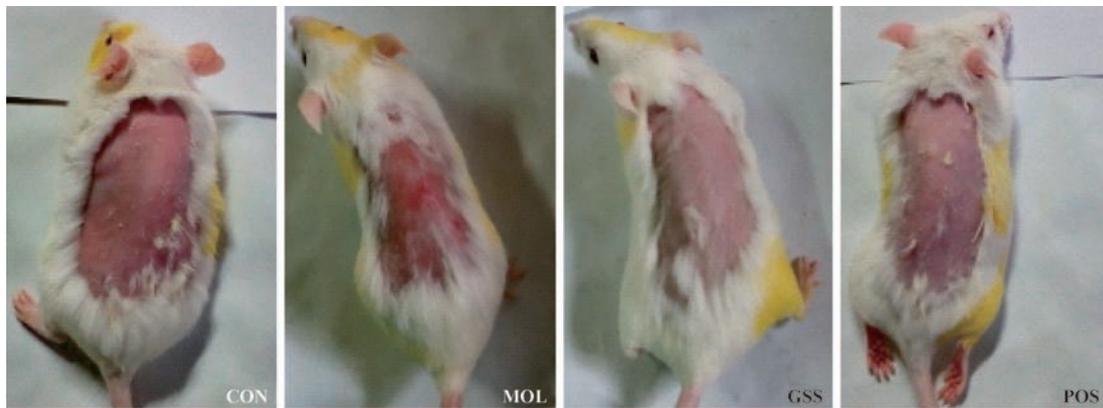
看出,CON 组小鼠的皮肤表皮厚度较薄,角质层没有脱落的现象,在真皮层中,乳头层薄且网织层没有交织在一起;MOL 组小鼠皮肤表皮厚度较厚,角质层脱落,在真皮层中,乳头层比较厚、网织层交织在一起;GSS 组小鼠皮肤厚度与基质组相差不大,在表皮中角质层比较完整没有出现严重的脱落现象;在真皮层中,网织层没有交织在一起;POS 组小鼠皮肤厚度与基质组相差不大,角质层完整没有脱落,在真皮层中,网织层没有交织在一起。

2.4 小鼠血细胞的测量结果

各组小鼠白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血小板(PLT)、血红蛋白(HGB)测量结果见表 2。从表 2 可以看出,与 CON 组比较,MOL 组小鼠白细胞数量

明显增多,差异有显著性($P < 0.05$),红细胞、血小板、血红蛋白含量增多,差异无显著性;与 MOL 组比较,GSS 组小鼠白细胞明显下降,差异有显著性($P < 0.05$),红细胞与血红蛋白含量上升,差异有显著

性($P < 0.02$),血小板数量上升,差异无显著性;与 MOL 组比较,POS 组小鼠白细胞明显下降,差异有显著性($P < 0.05$),红细胞、血小板、血红蛋白含量增多,但差异无显著性。

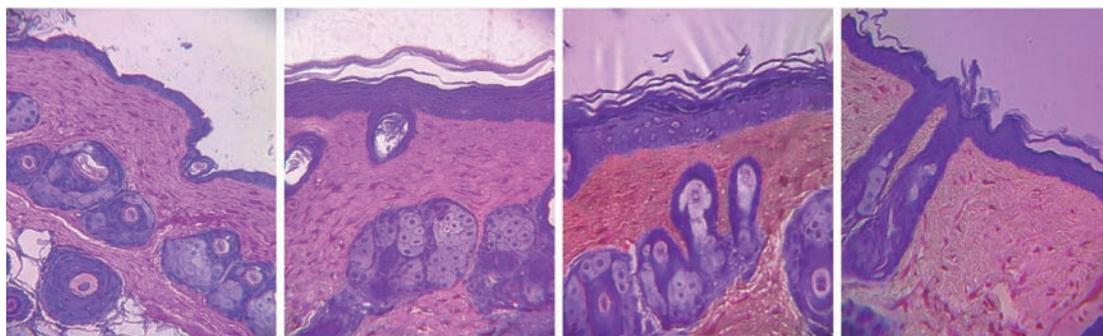


注:从左至右依次为 CON、MOL、GSS、POS 组。

图 1 小鼠皮肤外观变化

Note: From the left to right: mice of the CON, MOL, GSS and POS groups.

Fig. 1 Changes of gross appearance of the mouse skin.



注:从左至右依次为 CON、MOL、GSS、POS 组。

图 2 小鼠皮肤的组织学改变(HE 染色 $\times 20$)

Note: From the left to right: the CON, MOL, GSS and POS groups. HE staining

Fig. 2 Histological changes of the mouse skin

表 2 各组小鼠血细胞数量($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Tab. 2 Blood cell counts of the mice

组别 Groups	白细胞/ $10^9/L$ WBC	红细胞/ $10^{12}/L$ RBC	血小板/ $10^9/L$ PLT	血红蛋白/ g/L HGB
正常组 CON	5.37 ± 0.84	9.67 ± 1.18	161.68 ± 28.29	164.05 ± 28.50
模型组 MOL	$9.38 \pm 1.44^*$	11.58 ± 2.20	164.74 ± 20.02	177.40 ± 27.15
人参皂苷组 GSS	$4.94 \pm 0.48^{\#}$	$17.37 \pm 3.65^{\#\#}$	174.80 ± 23.74	$217.42 \pm 30.17^{\#\#}$
阳性对照组 POS	$3.83 \pm 0.87^{\#\#}$	12.73 ± 3.61	129.18 ± 18.32	177.75 ± 28.96

注:与空白组比较 $^*P < 0.05$,与模型组比较 $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.02$ 。

Note. Compared with the CON group, $^*P < 0.05$. Compared with the MOL group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.02$.

2.5 小鼠血清生化指标的测量结果

各组小鼠血清丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测量结果见表 3。从表 3 可以看出,与 CON 组比较,MOL 组小

鼠 MDA 含量明显增高,差异有显著性($P < 0.02$),T-SOD 含量明显下降,差异有显著性($P < 0.02$),GSH-Px 含量明显下降,差异有显著性($P < 0.05$);与 MOL 组比较,GSS 组小鼠 MDA 含量明显下降,差

异有显著性($P < 0.05$), T-SOD 含量明显上升, 差异有显著性($P < 0.02$), GSH-Px 含量明显上升, 但差异无显著性; 与 MOL 组比较, POS 组小鼠 MDA 含量

降低, 差异有显著性, T-SOD 含量上升, 差异无显著性, GSH-Px 含量明显上升, 差异有显著性($P < 0.05$)。

表 3 各组小鼠血清生化指标($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Tab. 3 Results of blood biochemistry indexes in mice of different groups

组别 Groups	丙二醛/nmol/mL MDA	超氧化物歧化酶/U/mL T-SOD	谷胱甘肽过氧化物酶/ $\mu\text{mol/L}$ GSH-Px
正常组 CON	6.46 \pm 0.49	181.78 \pm 18.51	1208.85 \pm 126.84
模型组 MOL	8.94 \pm 0.74 **	158.33 \pm 20.42 **	972.37 \pm 128.85 *
人参皂苷组 GSS	7.11 \pm 0.97 #	179.76 \pm 20.02 #	1056.51 \pm 155.16
阳性对照组 POS	7.02 \pm 0.91 #	164.87 \pm 23.81	1241.89 \pm 182.16 #

注: 与空白组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.02$, 与模型组比较 # $P < 0.05$, ## $P < 0.02$ 。

Note. Compared with the CON group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.02$. Compared with the MOL group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.02$.

3 讨论

太阳光紫外线是导致皮肤日晒伤、光老化及皮肤癌的重要因素^[13]。本实验模拟太阳光紫外线对脱毛小鼠进行紫外照射, 实验结束后发现, 甲氧基肉桂酸辛酯辅酶 Q₁₀ 霜剂组小鼠的损伤症状好转, 从背部皮肤外观看小鼠皮肤平滑, 没有出现皮纹加深与皱纹现象, 从病理切片看小鼠皮肤角质层没有脱落, 结构较完整。在血细胞方面, 小鼠白细胞数量明显下降, 且红细胞数量与血红蛋白含量也相应上升; 在血清生化指标上, 小鼠丙二醛含量也明显下降, 远远低于模型组小鼠值, 同时超氧化物歧化酶与谷胱甘肽过氧化物酶活力也得到相应提升, 与正常小鼠值相接近, 这预示着甲氧基肉桂酸辛酯辅酶 Q₁₀ 防晒霜具有明显的抗紫外线作用。其中甲氧基肉桂酸辛酯作为紫外线吸收剂, 具有非常好的吸收紫外线效果, 由于其苯环和羰基能形成共轭键, 使得在紫外区有较高的吸收系数, 从而起到防晒作用^[14,15], 目前是化妆品行业使用最广泛的紫外线吸收剂^[16]。另外辅酶 Q₁₀ 作为一种抗氧化剂能起到保护作用, 彭亮等^[17]报道辅酶 Q₁₀ 能使大鼠血清、脑和肝组织中的 MDA 含量呈不同程度下降, SOD 和 GSH-Px 活性呈不同程度升高, 脑和肝组织中 Lip 不同程度下降。辅酶 Q₁₀ 还能清除由紫外线辐射造成的氧自由基与抑制基质金属蛋白酶的表达, 王小雪等^[18]研究发现辅酶 Q₁₀ 微乳可降低 UVA、UVB 照射后的皮肤成纤维细胞、表皮细胞中的 ROS、MMP-1 水平。甲氧基肉桂酸辛酯辅酶 Q₁₀ 防晒霜含有 5% 甲氧基肉桂酸辛酯与 1% 辅酶 Q₁₀, 小剂量甲氧基肉桂酸辛酯在发挥抗紫外线的同时, 还能节约资源减少成本, 另外辅酶 Q₁₀ 作为机体不可或缺的物质, 在清除自由基与提升抗氧化酶活性的同时, 也能补充机体辅酶

Q₁₀ 含量, 甲氧基肉桂酸辛酯、辅酶 Q₁₀ 起到了一种协同效应, 充分发挥各自作用。

在同等紫外线照射条件下, 小鼠给予人参辅酶 Q₁₀ 防晒霜后, 小鼠背部皮肤略显红斑, 表面平滑没有皮屑脱落, 没有出现皮纹加深与皱纹现象, 病理学切片也显示小鼠皮肤角质层完整没有脱落, 与模型组小鼠比较症状明显好转; 在血细胞方面, 小鼠白细胞数量明显下降, 同时红细胞数量与血红蛋白含量上升, 与正常小鼠血细胞数量相接近; 在血清生化指标上, 小鼠 MDA 含量也明显下降, 远远低于模型组小鼠值, SOD 与 GSH-Px 酶活力也得到相应提升, 与正常小鼠血清生化指标值相接近。结果表明, 人参辅酶 Q₁₀ 防晒霜同样具有明显的抗紫外线作用。人参是我国名贵中药材已得到广泛应用, 李连昆等^[19]发现人参茎叶总皂苷均对衰老皮肤的胶原纤维和弹力纤维有保护作用。赵自明等^[20]指出人参皂苷能有效的提高红细胞、肝和骨骼肌 SOD 的活性, 降低 MDA 的含量, 增强机体抗氧化的能力, 能有效的清除机体里过多的自由基和阻止自由基的过度产生。人参皂苷的抗氧化保护皮肤损伤免受作用的作用已得到肯定, 然而在结合辅酶 Q₁₀ 抗氧化与清除氧自由基作用的同时^[17,18], 人参辅酶 Q₁₀ 防晒霜表现出了明显的抗紫外线作用, 与甲氧基肉桂酸辛酯辅酶 Q₁₀ 防晒霜防晒效果相当, 这也说明人参皂苷能可替代甲氧基肉桂酸辛酯而发挥抗紫外线作用。然而已有报道长时间应用紫外线遮光剂可引起使用者皮肤光敏反应^[21], 用人参皂苷代替甲氧基肉桂酸辛酯后, 在发挥防晒作用的同时, 人参皂苷的在其他方面的作用也将得到应用, 因此人参辅酶 Q₁₀ 防晒霜具有非常广泛的应用前景。

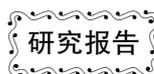
通过紫外线照射导致小鼠皮肤损伤的实验观察到, 本实验应用的人参辅酶 Q₁₀ 防晒霜可对紫外线

损伤小鼠白细胞增高具有降低作用,同时也具有减少血清中丙二醛含量与提升超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活力的作用,提示人参辅酶 Q₁₀ 防晒霜具有抗小鼠紫外线损伤的作用。

参 考 文 献

- [1] 曲桂武,夏学超,潘丽丽,等. 8 种人参皂苷在人参全草中的分布情况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015,21(17):52-55.
- [2] 程基众,刘国红,黄吉春,等. 人参皂首 Rb1 与芳维甲酸乙酯对光老化皮肤真皮成纤维细胞基质金属蛋白酶影响的比较研究[J]. 时珍国医国药, 2006,17(9):1672-1673.
- [3] 程俊霖,管晓琳,朱玲,等. 人参皂苷对衰老小鼠皮肤和人角质形成细胞的抗衰老研究[J]. 四川生理科学杂志, 2005,27(3):134.
- [4] 金光辉,刘树铮,刘扬,等. 人参皂苷对紫外辐射致皮肤角质形成细胞损伤的保护作用[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2002,22(6):420-421.
- [5] 王红丽,吴铁,吴志华,等. 人参皂苷抗皮肤衰老作用实验研究[J]. 广东药学院学报, 2003,19(1):25-27.
- [6] Choi BS, Song HS, Kim HR, et al. Effect of coenzyme Q₁₀ on cutaneous healing in skin-incised mice[J]. ArchPharmac Res, 2009,32(6):907-913.
- [7] Puizina-Ivic N. Skin aging[J]. Acta Dermatoven APA 2008,17:47-54.
- [8] 徐彩菊,孟佳,傅剑云,等. 辅酶 Q₁₀ 在免疫调节中的作用[J]. 中国卫生检验杂志, 2007,17(2):222-224.
- [9] 胡聪,孙丽蕴. 紫外线最小红斑量的检测及其影响因素[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2015,29(4):434-426.
- [10] 司晓青. 芦丁抗紫外线照射所致皮肤光损伤的防护作用及其机制的研究[D]. 山东大学, 2011.
- [11] 王红丽,吴铁,吴志华,等. 小鼠亚急性性皮肤衰老模型的建立[J]. 中国药理学杂志, 2003,38(10):763-765.
- [12] 邵琮琰,王平,任金平,等. 皮肤光老化动物模型的建立和超微结构观[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2016,30(8):462-466.
- [13] Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2004,195(3):298-308.
- [14] 杨艳伟,刘思然,罗嵩,等. 化妆品中防晒剂使用情况调查[J]. 环境卫生杂志, 2015,5(2):139-143.
- [15] 高立雪,张卫强,喻晓毅. 防晒化妆品中的防晒剂使用频度分析[J]. 现代预防医学, 2011,38(7):1324-1325.
- [16] 戎伟. 紫外光谱法初步评价 46 种防晒剂的防晒效果[J]. 香料香精化妆品, 2015,(3):53-58.
- [17] 彭亮,姚思宇,何励,等. 辅酶 Q₁₀ 对自然衰老大鼠的抗氧化作用研究[J]. 实用预防医学, 2012,18(6):378-380.
- [18] 王小雪,党磊,张美姿,等. 辅酶 Q₁₀ 纳米微乳的制备及其体外抗紫外辐射研究[J]. 中国医药导报, 2015,12(34):33-37.
- [19] 李连昆,程俊霖,赵妍妍,等. 人参茎叶总皂苷原纤维和弹力纤维的保护作用[J]. 四川生理科学杂志, 2007,29(1):26-27.
- [20] 赵自明,潘华山,冯毅琳,等. 人参皂苷 Rg1 抗氧化能力的实验研究[J]. 江西中医学院学报, 2009,21(1):36-38.
- [21] 严淑贤. 由 UVB(4-甲酰苯亚甲基樟脑/甲氧基肉桂酸辛酯)和 UVA(苯酮-3/甲氧基二苯甲酰甲烷丁酯)混合遮光剂引起的光变应性接触性皮炎[J]. 国外医学皮肤性病学分册, 1999,25(1):49-50.

[收稿日期] 2016-10-08



条件性感染金黄色葡萄球菌关节炎小鼠模型的建立和分析

叶秋莹^{2,1}, 李舸¹, 罗银珠¹, 刘书华¹, 李韵峰¹, 贾欢欢¹,
吴玉娥¹, 张钰^{1*}, 王晖^{2*}

(1. 广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广州 510663; 2. 广东药科大学中药学院, 广州 51006)

【摘要】 目的 建立与分析条件性感染金黄色葡萄球菌感染关节炎模型, 为关节炎机理研究及药物开发提供动物模型。方法 先对小鼠进行环磷酰胺免疫抑制处理, 再尾静脉接种金黄色葡萄球菌, 通过关节表观特征观察、关节炎指数分析和病理观察评分对模型进行评价。结果 接种后第1天开始, 小鼠关节部位轻微肿胀, 关节组织病变由少量滑膜增生且排列疏松紊乱, 发展至滑膜增厚, 往关节腔内延伸生长, 中性粒细胞浸润增多等病理变化。结论 成功建立条件性感染SA模型, 能在较短时间内模拟人关节炎的临床症状和病程发展, 且在感染和免疫机理方面体现了人关节炎发病病因。

【关键词】 关节炎; 小鼠模型; 金黄色葡萄球菌感染; 炎症

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0607-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.010

Establishment and analysis of a mouse model of *Staphylococcus aureus*-induced arthritis

YE Qiu-ying^{1,2}, LI Ge¹, LUO Yin-zhu¹, LIU Shu-hua¹,
LI Yun-feng¹, JIA Huan-huan¹, WU Yu-e¹, ZHANG Yu^{1*}, WANG Hui^{2*}

(1. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Key Laboratory of Experimental Animals, Guangzhou 510663, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Objective To establish and analyze a mouse model of *Staphylococcus aureus*-induced arthritis (*Staphylococcus aureus* septic arthritis, SA), and provide an animal model for arthritis mechanism research and drug development. **Methods** Mice were immunosuppressed with cyclophosphamide, then intravenously inoculated with *Staphylococcus aureus*. The gross characteristics of the joints were observed, the arthritis indexes were analyzed, and the pathological scores of the model mice were evaluated. **Results** From the first day after bacterial inoculation, the mouse joints were swollen. Pathological examination revealed lesions varying from mild and disarranged joint synovial hyperplasia to synovial thickening and intra-articular invasion, and increased neutrophil infiltration. **Conclusions** A mouse model of *Staphylococcus aureus*-induced arthritis is successfully established in this study. This model can be developed in a relatively short time, can not only simulate the clinical symptoms and signs and disease progression of human arthritis, but also to a certain extent reflects the etiology, infection and immunological mechanisms of human arthritis.

【Key words】 Arthritis; Mouse model; *Staphylococcus aureus* infection; Inflammation

[基金项目] 广东省科技计划项目(2013B040400007, 2014A030304029, 2013B010102006)。

[作者简介] 叶秋莹(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理学。E-mail: 812317730@qq.com

[通讯作者] 王晖, 男, 教授, E-mail: gdwanghui2006@126.com; 张钰, 女, 研究员, E-mail: Zhangyugzh@hotmail.com

Corresponding author: WANG Hui, E-mail: gdwanghui2006@126.com; ZHANG Yu, Email: Zhangyugzh@hotmail.com

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 是一种普遍存在的革兰阳性球菌, 对人和动物具有很强的致病作用^[1-2], 当免疫功能降低时, 体内定植的菌株可导致局部化脓性感染, 也是化脓性关节炎最常见的病原菌。炎症性关节炎 (inflammatory arthritis) 是以多关节炎为主要表现的全身性疾病^[3]。在发病过程中, 往往伴随着滑膜的持续性增生、炎症细胞浸润、软骨及骨的破坏等临床病理学特征, 但是, 其疾病发生发展和持续的时间长。如何建立成模时间短或能更好地演化关节炎病程且与关节炎临床诊治指标衔接的模型具有重要的价值。因此, 本文对采用优化的建模方法建立条件性感染金黄色葡萄球菌关节炎小鼠模型 (*Staphylococcus aureus* septic arthritis, SA), 对其进行临床指标分析评价, 探讨该模型在关节炎疾病研究中的优缺点及其应用。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级 ICR 雌性小鼠 20 只, 5 周龄, 购自于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】, 均饲养于广东省实验动物监测所动物实验室【SYXK(粤)2012-0122】。动物实验前适应性喂养 1 周, 采用自由饮水、采食的饲养方式。动物房温度、湿度分别维持在 20~26℃、40%~70% 左右。

环磷酰胺 (安道生公司); 金黄色葡萄球菌 (M39B8) 由广东省中医院检验科惠赠; HI1220 烘片机、HI1210 摊片机、TP1020 自动脱水机、EG1150 组织包埋机、RM2255 旋转切片机和显微镜 (德国 Leica)。

1.2 方法

1.2.1 模型的建立

通过参考文献^[4-5], 改良了造模方法。实验前处理: 感染前 3 d 进行免疫抑制处理, 每天注射环磷酰胺腹腔 (100 mg/kg), 1 次/24 h, 共注射 3 次。免疫抑制处理后, 尾静脉接种 5×10^6 CFU/mL 金黄色葡萄球菌敏感菌悬液 (0.2 mL/只)。

1.2.2 炎症指数评分

SA 模型组于接种后, 每日对小鼠进行炎症指数评分。

关节炎指数 (arthritis index, AI) 评分标准^[6]: ①脚部关节没有红肿为 0 分; ②小趾关节轻微红肿为 1 分; ③趾关节和足跖肿胀为 2 分; ④踝关节以下的足爪肿胀为 3 分。四肢得分相加为该小鼠关节炎总评分。

1.2.3 病理学观察及评分^[7-8]

于模型 AI 评分为最高峰时期剖杀小鼠。具体操作如下: 沿腿根部剪下病变小鼠后腿, 除去病变关节的皮毛和多余的皮下组织, 保留膝关节, 4% 甲醛固定 48 h, 10% EDTA 脱钙液脱钙 1 个月, 每 2 d 换一次脱钙液。常规梯度酒精脱水、二甲苯透明, 石蜡包埋, 制备 4 μm 片厚的病理切片。HE 染色后显微镜下观察关节组织病理改变, 包括关节周围炎症, 滑膜增生、软骨及骨质破坏程度, 并进行病理损伤评分。

1.2.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计量资料数据以均数 ± 标准差表示。

2 结果

2.1 模型临床特征观察及评分

在实验过程中, SA 模型小鼠出现爬行减缓, 运动功能受损, 采食、饮水量减少等症状, 甚至出现动物死亡现象。SA 模型小鼠在接种后 1 d 出现关节轻微肿胀, 3 d 时, 足爪肿胀程度最为严重, 关节炎指数达到最高, 之后, 小鼠关节肿胀程度逐渐减轻, 至 10 d 时, 关节炎指数评分恢复正常。见图 1、2。

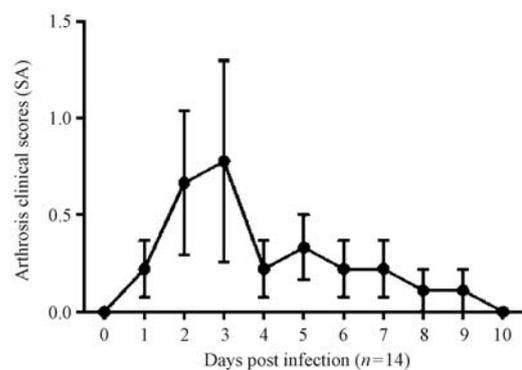


图 1 小鼠关节炎评分指数

Fig. 1 Scores of arthritis indexes in the mice

2.2 组织病理学观察

显微镜检 SA 模型小鼠关节由少量滑膜增生且排列疏散、紊乱, 发展至高峰期滑膜增厚, 往关节腔

内延伸生长,且出现淤血、水肿、中性粒细胞浸润增多,但随着时间延长,滑膜增生速度逐渐减缓,仍见少量中性粒细胞等炎症细胞浸润。根据病理损伤评分标准对病理切片分析,得出 SA 模型小鼠滑膜细胞增殖、炎症细胞浸润、骨质侵蚀评分分别为(2 ± 0)、(1.6 ± 0.5774)、(2.5 ± 0.5774)。病理切片结果见图 3。

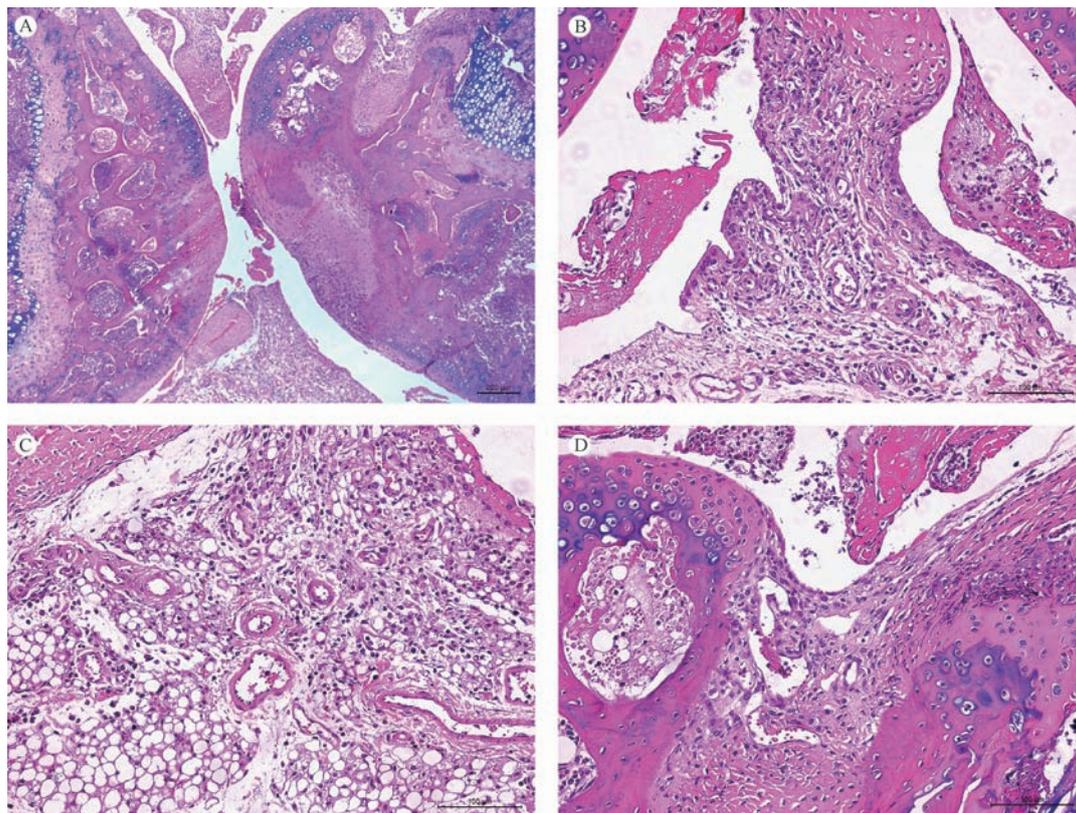


图 2 小鼠后爪肿胀程度

Fig. 2 Swollen hind paw of a mouse

3 讨论

本研究对现有 SA 造模方法进行优化,改进成为条件性感染金黄色葡萄球菌感染关节炎小鼠模型。先对小鼠进行免疫抑制处理,再接种金葡菌进行造模,结果发现该模型小鼠发病时间相比于其他关节炎模型和未经过免疫抑制处理的 SA 小鼠模型快,实验耗时短,且能较快模拟出临床关节炎疾病的病程。而现有的 SA 小鼠模型,感染后的临床症状、病理学变化随着实验周期延长更加严重,病程发展较缓慢。本文选取关节外观观察、关节肿胀评分、组织病理学观察三方面临床评价指标,对所建立的条件性感染 SA 小鼠模型进行评价,结果发现模型小鼠的临床症状、病理学变化都比较符合临床急性风湿性关节炎的特点^[9],出现以红肿热痛的为主要表现,滑膜充血水肿增厚,炎症细胞(多以中性粒细胞为主)浸润,滑膜反折处向关节软骨表面延伸,侵蚀破坏关节软骨和软骨下骨质等临床病理变化,但不遗留关节强直和畸形,表明成功地建立了条件性感



注:A. 低倍镜下观察到膝关节($\times 50$),其中 B:滑膜增生($\times 200$);C:炎症细胞浸润($\times 200$);D:骨侵蚀($\times 200$)。

图 3 小鼠膝关节病理组织学

Note. A. The knee joint observed under low magnification ($\times 50$). B. Synovial hyperplasia ($\times 200$).

C. Inflammatory cell infiltration ($\times 200$). D. Bone erosion ($\times 200$).

Fig. 3 Histological changes of the mouse knee-joints

染 SA 小鼠模型。

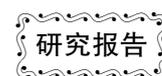
金黄色葡萄球菌在免疫抑制情况下,致病作用将会增强,是导致感染性关节炎(SA)产生的常见原因之一^[10]。相关文献报道,金葡菌的表面有不同类型的胶原蛋白,该蛋白是机体中各结缔组织的主要结构基质,由特定的基质金属蛋白酶(MMPs)降解形成的^[11]。MMPs 能协助清理细菌感染,引发免疫反应,但过多的 MMPs 可导致软组织、结缔组织结构的破坏,引起基质降解和关节破坏^[12-13]。有研究结果表明,关节滑膜面的组织病理学变化也表明,注射侧关节的病变程度明显比对侧关节严重,说明金黄色葡萄球菌在小鼠关节炎的发生、发展中也发挥了一定的直接作用^[11]。所以,本文所创建的方法及模型,可以从感染和免疫机理方面较好体现了人关节炎发病的病因,也能表现人关节炎的病程发展。

此外,根据本实验模型小鼠病理模型的评价结果,该模型小鼠还具有自限性,因其随着实验周期延长,浸入关节腔的细菌被机体内固有免疫细胞快速清除后,关节炎症状能明显减轻甚至消退。但是,模型发病率偏低,稳定性差是该模型的不足之处,且建模过程中需要调整接种细菌浓度、动物死亡和关节炎症状出现之间的平衡关系。依本实验结果分析,为关节炎致病机制研究及临床治疗药物研发奠定了重要的实验基础和提供了良好的动物模型。

参 考 文 献

- [1] Shawna FG, Scott DK, Frank RD. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* immune evasion and virulence [J]. *Mol Med*, 2010, 88(2): 109-114.
- [2] 金涛,李璐,金卉,等. 金黄色葡萄球菌感染致化脓性关节炎的临床研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(19): 4418-4420.
- [3] Raatz Y, Ibrahim S, Feldmann M, et al. Gene expression profiling and functional analysis of angiogenic markers in murine collagen-induced arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14: 1-18.
- [4] Josefsson E, Tarkowski A. *Staphylococcus aureus*-induced inflammation and bone destruction in experimental models of septic arthritis [J]. *Periodont Res*, 1999, 34: 387-392.
- [5] Na M, Jarneborn A, Ali A. Deficiency of the complement component 3 but not factor B aggravates *Staphylococcus aureus* septic arthritis in mice [J]. *Infect Immunity*, 2016, 84: 930-939.
- [6] Bruns L, Frey O, Morawietz L. Immunization with an immunodominant self-peptide derived from glucose-6-phosphate isomerase induces arthritis in DBA/1 mice [J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 11(4): 1-11.
- [7] Gjertsson I, Lagerquist MK, Kristiansson E. Estradiol ameliorates arthritis and protects against systemic bone loss in *Staphylococcus aureus* infection in mice [J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14: 1-8.
- [8] Tsubaki T, Arita N, Kawakami T, et al. Characterization of histopathology and gene-expression profiles of synovitis in early rheumatoid arthritis using targeted biopsy specimens [J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(4): 825-836.
- [9] Kanangat S, Postlethwaite A, Hasty K, et al. Induction of multiple matrix metalloproteinases in human dermal and synovial fibroblasts by *Staphylococcus aureus*: implications in the pathogenesis of septic arthritis and other soft tissue infections [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(6): 1-14.
- [10] Elkington PT, O'Kane CM, Friedland JS. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease [J]. *Clin Exp Immunol*, 2005, 142(1): 12-20.
- [11] Dinjaski N, Fernández-Gutiérrez M, Selvam S, et al. PHACOS, a functionalized bacterial polyester with bactericidal activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(1): 14-24.
- [12] 斯日古楞,么宏强,员宝山. 小鼠金黄色葡萄球菌性关节炎模型的建立及其病理学研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2013, (05): 84-85 + 167.
- [13] Kanangat S, Postlethwaite A, Hasty K. Induction of multiple matrix metalloproteinases in human dermal and synovial fibroblasts by *Staphylococcus aureus*: implications in the pathogenesis of septic arthritis and other soft tissue infections [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(6): 1-14.

[收稿日期] 2016-10-08



直接多肽结合试验组合人细胞系活化 试验预测皮肤致敏物的探讨

柯逸晖^{1,2}, 陈彧^{2,3}, 程树军², 徐嘉婷³, 谈伟君^{1*}

(1. 广东药科大学, 广州 510006; 2. 广东出入境检验检疫局技术中心, 广州 510623;
3. 广州市华代生物科技有限公司, 广州 510535)

【摘要】 目的 建立直接多肽结合试验(DPRA)和人细胞系活化试验(h-CLAT)的皮肤致敏组合检测方法,对化学品及植物提取物的致敏性进行初筛。方法 选择12种化学品和7种植物提取物为受试物,把不同受试物分别与两种肽(半胱氨酸肽和赖氨酸肽)共孵育24 h,采用高效液相色谱法分析反应后多肽消耗。同时将不同浓度的受试物与体外培养的人急性单核细胞白血病细胞(THP-1)共孵育24 h,通过流式细胞仪检测暴露后细胞表面标志物CD86和CD54的变化。再进一步比较DPRA和h-CLAT预测结果的一致性。结果 DPRA方法和h-CLAT方法准确区分了12种化学品的皮肤致敏性,其中2种判定为阴性,10种判定为阳性,两种方法检测结果一致。DPRA对植物提取物致敏性的预测中,除绿茶提取物无法判定外,其余6种均为皮肤致敏疑似物质。h-CLAT预测中,除绿茶提取物、马齿苋提取物和人参果提取物为非致敏物,其余4种植物提取物为致敏物。DPRA与h-CLAT预测的一致性为0.57。结论 DPRA与h-CLAT的简单组合可以实现对单一化合物的准确预测,对于复杂混合物可实现初步预测,确认需要进一步组合其他方法。

【关键词】 直接多肽结合试验;人细胞系活化试验;皮肤致敏;替代方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0611-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.011

Preliminary study for integrating DPRA with h-CLAT to predict skin sensitizers

KE Yi-hui^{1,2}, CHEN Yu^{2,3}, CHENG Shu-jun², XU Jia-ting³, TAN Wei-jun^{1*}

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623; 3. Guangzhou Chn-Alt Biotech. Ltd., Guangzhou 510535)

【Abstract】 Objective To establish a detection method integrating DPRA (direct peptide reactivity assay) with h-CLAT (human cell line activation test) to screen the skin sensitization potency of chemicals and plant extracts. **Methods** 12 chemicals and 7 plant extracts were chosen as the test substances. Firstly, the test substances were incubated together with two different peptides (cysteine and lysine) respectively for reaction for 24 h. The peptide consumptions were analyzed by HPLC. Simultaneously, THP-1 cells were cultured in vitro and then exposed to different concentrations of test substances for 24 h to examine the cell viability, cell surface markers CD54 and CD86 were assessed by flow cytometry. The predicting results were compared further between DPRA and h-CLAT. **Results** 12 chemicals were distinguished correctly by DPRA classified as 2 non-sensitizers and 10 sensitizers. The results of DPRA were in accordance with h-CLAT. Predicting the sensitization potency of plant extracts by DPRA showed that 6 plant extracts were determined as suspected sensitizers except for green tea extract. But using the method of h-CLAT, 4 plant extracts were examined as suspected sensitizers

[基金项目] 广东省科技计划项目(编号:2012B020316003,2015A030402005)。

[作者简介] 柯逸晖(1991-),女,硕士研究生,研究方向:皮肤致敏替代方法研究与验证。

[通讯作者] 谈伟君,教授,硕士生导师。E-mail: weijunt0726@163.com

except for green tea extract, herba portulacae extract and ginseng fruit extract. The coherence of DPRA and h-CLAT was 0.57. **Conclusion** This detection method integrating DPRA with h-CLAT can predict single compound accurately. As for complex compound, it can achieve preliminary prediction and need other integrating methods to make a further identification.

【Key words】 Direct peptide reactivity assay, DPRA; Human cell line activation test, h-CLAT; Skin sensitization; Alternative method

Corresponding author: Tan Wei-jun. E-mail: weijunt0726@163.com

过敏性接触性皮炎 (allergic contact dermatitis, ACD) 是皮肤重复接触某种外源物质产生的免疫介导的皮肤反应。ACD 通常引起局部皮肤的红肿、肿胀和瘙痒,严重影响生活质量^[1]。因此,有必要进行皮肤致敏测试,以满足化学品、日化产品和其他皮肤接触产品风险评估和毒性评价的需求^[2]。评估化学物皮肤致敏的传统方法是豚鼠试验和小鼠局部淋巴结试验 (local lymph node assay, LLNA)。由于欧盟等国家已经禁止化妆品及化妆品组份的动物试验,因此非动物实验方法的研发和应用显得尤其重要^[3]。另一方面,21 世纪毒性测试 (Toxicity Testing in the 21st Century, TT21C) 呼吁采用人来源的组织或细胞进行毒理学效应的研究,进而提出基于有害结局通路 (adverse outcome pathway, AOP) 的概念^[4,5]。皮肤致敏的 AOP 通路,其分子起始事件是外源物质与皮肤蛋白共价结合形成半抗原,随后触发 2 个细胞水平的关键事件,即角质细胞炎症反应和树突状细胞的激活。其后,活化的树突状细胞迁移至局部淋巴结,将部分半抗原化学物转至初始型 T 淋巴细胞,最终导致记忆 T 细胞的增殖和分化这一组织水平关键事件的发生。当皮肤再次接触致敏物时进入激发阶段,导致 ACD 的有害结局。基于该 AOP 框架建立的直接多肽结合试验 (direct peptide reactivity assay, DPRA),角质细胞 ARE-Nrf2 荧光素酶检测方法 (KeratinSensTM) 和人细胞系活化试验 (human cell line activation test, h-CLAT) 已于近两年被 OECD 认可为标准方法^[6-9]。

皮肤致敏的替代方法主要针对 AOP 通路中的不同关键事件点建立评估方式,单一方法存在局限性,且预测精确度可能低于体内 LLNA 法。因此,尝试建立多种替代方法的组合模型以减少单一方法的不足是下一步研究的热点,虽然有研究初步建立了预测单一化合物致敏的组合方法,但还没有用于混合物致敏筛查的报道^[5]。植物提取物由于原料获取多样、提取工艺和组份复杂不可避免地具有致敏性,采用组合模型能提高预测的准确性。本研究尝

试建立 DPRA 和 h-CLAT 两种方法的简单组合,用于单一化学品和复杂物质的致敏能力预测。探索替代方法组合应用的模型,并对植物原料的安全评价提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

人工合成多肽半胱氨酸肽 (Ac-RFAACAA-COOH) (纯度为 90% ~ 95%) 和赖氨酸肽 (Ac-RFAAKAA-COOH) (纯度为 90% ~ 95%),购自广州市华代生物科技有限公司。乙腈为色谱纯,三氟乙酸 (TFA)、磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、乙酸铵、氨水为分析纯。

RPMH1640 培养基、胎牛血清 (FBS)、 β -巯基乙醇、4-羟乙基哌嗪乙磺酸、青霉素、链霉素、二甲亚砜 (DMSO) 和牛血清白蛋白 (BSA) 均购自 Sigma 公司;校准珠、球蛋白阻断剂、7-氨基放线菌素-D (7AAD)、FITC 标记的小鼠单克隆 CD86 抗体、PE 标记的小鼠单克隆 CD54 抗体、FITC 标记的小鼠 IgG1、PE 标记的小鼠 IgG1 均购自 BD 公司。

1.1.2 标准物质和测试样品

十二烷基硫酸钠 (SLS)、乳酸、丁香酚、柠檬醛、肉桂醛、苯乙醛、没食子酸丙酯、马来酸酐、苯醌、2,4-二硝基氯苯、甲醛、2,3-丁二酮,均购买自 Sigma 公司;测试样品:当归提取物、黄芩提取物、人参果提取物、积雪草提取物、金缕梅提取物、马齿苋提取物和绿茶提取物来自某生物公司馈赠。

1.1.3 仪器

高效液相色谱仪 (Waters Alliance 2695)、色谱柱 (Agilent Zorbax SB-C18 2.1 mm \times 100 mm \times 3.5 micron)、保护柱 Phenomenex C18 2.0 mm \times 100 mm \times 3 micron)、全波长酶标仪 (Thermo Scientific)、流式细胞仪 (美国 BD)。

1.2 方法

1.2.1 DPRA 方法

(1) 受试物处理

受试物溶解首选乙腈。若不溶解,可尝试溶于水、1:1水和乙腈混合液、异丙醇、丙酮、1:1丙酮和乙腈混合液,或者溶于 300 μL 二甲亚砜,2700 μL 乙腈稀释,或者溶于 1500 μL 二甲亚砜,1500 μL 乙腈稀释。样品不完全溶解时可采用超声处理,时间 ≤ 1 min。

(2) 溶液配制

配制 100 mmol/L pH 7.5 的磷酸缓冲溶液;配制 100 mmol/L pH 10.2 的乙酸铵溶液;HPLC 流动相 A 相(1.0 mL TFA 加入 1 L 色谱级水相中)和 B 相(0.85 mL TFA 加入 1 L 色谱级乙腈中)。

(3) 多肽处理

配制 0.667 mmol/L 的赖氨酸肽溶液:称取 15 mg 赖氨酸肽溶于 28.96 mL 上述乙酸铵溶液中;配

制 0.667 mmol/L 的半胱氨酸肽溶液:称取 15 mg 半胱氨酸肽溶于 29.90 mL 上述磷酸缓冲溶液中。

(4) 标准品处理

稀释液配制:8 mL 乙酸铵缓冲液和 8 mL 磷酸盐缓冲液,再各加入 2 mL 乙腈,充分混匀,配制 10 mL 稀释缓冲液。标准母液配制:取 1600 mL 0.667 mmol/L 多肽溶液加入 400 μL 乙腈;用上述对应的稀释溶液将标准母液配制成 0, 0.0167、0.0334、0.0667、0.1335、0.267、0.534 mmol/L 的标准溶液用于绘制标准曲线。

(5) 空白对照、共洗脱体系及样品体系

取 1 mL 进样瓶若干,按表 1 加入试剂,轻轻混匀,记录时间。盖紧瓶盖,置于 HPLC 进样器,避光,25 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h。样品于反应 24 h 后开始 HPLC 分析。

表 1 空白对照、共洗脱体系及样品体系配制表

Tab.1 Preparation of reference control, co-elution and samples

1:10 比例 半胱氨酸肽 1:10 ratio, Cysteine peptide 0.5 mmol/L 多肽,5 mmol/L 受试物 0.5 mmol/L peptide, 5 mmol/L test chemical	1:50 比例 赖氨酸肽 1:50 ratio, Lysine peptide 0.5 mmol/L 多肽,25 mmol/L 受试物 0.5 mmol/L peptide, 25 mmol/L test chemical
750 μL 半胱氨酸溶液(共洗脱对照用 pH 7.5 磷酸盐缓冲液) 750 μL Cysteine peptide solution (or pH 7.5 phosphate buffer for co-elution controls) 200 μL 乙腈 200 μL Acetonitrile 50 μL 受试物溶液(空白对照为溶剂) 50 μL Test chemical solution (or solvent for reference controls)	750 μL 赖氨酸溶液(共洗脱对照用 pH 10.2 乙酸铵缓冲液) 750 μL Lysine peptide solution (or pH10.2 ammonium acetate buffer for co-elution controls) 250 μL 受试物溶液(空白对照为溶剂) 250 μL Test chemical solution (or solvent for reference controls)

(6) HPLC 条件

用 50% 流动相 A 和 50% 流动相 B 平衡色谱柱至少 2 h,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流速 0.35 mL/min。梯度洗脱条件为:流量为 0.35 mL/min,乙腈梯度在 10 min 内从 10% 上升到 25%,在 11 min 时上升至 90%,13.5 min 时下降至 10%;相反,水梯度在 10 min 内从 90% 下降至 75%,在 11 min 时下降至 10%,13.5 min 时上升至 90%,在 20 min 时结束。

(7) 数据处理

利用 HPLC 得到的反应前后的峰面积差,计算多肽的消除率。消除率 = $[1 - (\text{多肽反应的峰面积} / \text{空白对照 C 的多肽峰面积})] \times 100\%$

(8) 预测模型

DPRA 预测模型如下:当受试物不与两种肽发生共洗脱时,则计算两种肽消除率的均值,0% \leq 平均值 $\leq 6.38\%$,反应程度为无或较弱,为非致敏物;6.38% $<$ 平均值 $\leq 22.62\%$ 、22.62% $<$ 平均值 $\leq 42.47\%$ 、42.47% $<$ 平均值 $\leq 100\%$,均为致敏物,反应程度分别为低、中、高。当受试物仅与赖氨酸肽发

生共洗脱,则用半胱氨酸的消除率进行判断,0% \leq 平均值 $\leq 13.89\%$,反应程度为无或较弱,为非致敏物;13.89% $<$ 平均值 $\leq 23.09\%$ 、23.09% $<$ 平均值 $\leq 98.24\%$ 、98.24% $<$ 平均值 $\leq 100\%$,均为致敏物,反应程度分别为低、中、高。当受试物与赖氨酸、半胱氨酸均发生共洗脱,则该物质无法判断。

1.2.2 h-CLAT 方法

(1) 细胞培养

用含 10% FBS 的 RPMI-1640 细胞培养液常规培养 THP-1 细胞,保持细胞悬浮状态,一次复苏细胞最多使用 2 个月,且传代次数不能超过 30 次。细胞密度维持在 $(0.1 \sim 0.8) \times 10^6 / \text{mL}$ 。

(2) 受试物主要溶解体系为 DMSO 和生理盐水。

(3) 流式细胞术检测细胞毒性

将培养的 THP-1 细胞离心和去上清,用新鲜完全培养基重悬细胞,浓度为 $2 \times 10^6 / \text{mL}$,吸取 500 μL 重悬液接种至 24 孔细胞培养板中。每种受试物测试 8 个浓度,每个浓度相差的倍数为 2,每孔添加 500 μL ,每种物质设 3 个平行。置于培养箱中孵育

24 h,然后将受试物连同细胞从 24 孔板分别转移至对应 EP 管中,离心沉淀细胞,弃上清液后用 FACS 缓冲液(PBS + 0.1% BSA)清洗细胞一次,再次离心收集细胞。将 FACS 缓冲液配制相应浓度的染料(5 μ L 7AAD + 95 μ L FACS 缓冲液),每支 EP 管添加 100 μ L,常温、暗室下作用 10 min。将 EP 管中的细胞使用 FACS 缓冲液清洗 2 次,再用 500 μ L FACS 缓冲液重悬细胞移入 5 mL 流式管中。一次流式进样 10 000 个细胞,流式仪检测并计算 IC50(使 50% 细胞活性抑制的受试物浓度)和 CV75(使 75% 细胞存活受试物浓度)。

(4) CD86/CD54 表达检测

用上述方法接种细胞至 24 孔板。受试物暴露时以引起 CV75 为最高浓度,1:1.2 为稀释比往后添加 5 个浓度。每次实验设置 3 组对照,分别为 DMSO 对照组、培养基对照组和 DNCB 阳性对照组。将配好的受试物吸取 500 μ L 加到 24 孔板,置于培养箱孵育 24 h。将受试物连同细胞从 24 孔板分别转移至对应 EP 管中,离心收集细胞。再用 FACS 缓冲液(PBS + 0.1% BSA)清洗一次,离心收集细胞。随后使用 FcR 阻断剂,将离心获得的细胞进行阻断。将得到的细胞平均分配至 3 个 1 mL EP 管中,每管大约 3×10^5 个细胞。FITC-CD86 抗体、PE-CD54 抗体、同行对照 FITC-IgG1 和 PE-IgG1、7AAD 分别根据试剂盒标明的浓度进行配制。每个 EP 管加入 50 μ L 含有抗体的 FACS 缓冲液,2 ~ 8 $^{\circ}$ C 环境、暗室染色 30 min。再用 FACS 缓冲液清洗 2 次,再用 500 μ L FACS 缓冲液重悬细胞并移入 5 mL 流式管,使用流式细胞仪检测蛋白标志物。

(5) 结果处理

利用流式细胞术检测到的相对荧光强度值(RFI)计算有效作用浓度(EC),FITC-CD86 用 EC150,PE-CD54 用 EC200。分两种情况处理:

首先,当阳性值出现时,从最低浓度开始计算,满足阳性标准的第一个浓度设置为 A 浓度,随后根据下述原则选择下一个浓度为 B 浓度:第二个浓度的 RFI 值比第一个浓度的 RFI 值至少高 10%,否则用第三个浓度的 RFI 值,直到符合大于 10% 的标准。

1)若 A 浓度的 RFI 大于 150 或 200,B 浓度的 RFI 小于 150 或 200,则:

$$EC150 = B_{\text{剂量}} + \left[\frac{150 - BRFI}{(A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{\text{剂量}} - B_{\text{剂量}})} \right]$$

$$EC200 = B_{\text{剂量}} + \left[\frac{200 - BRFI}{(A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{\text{剂量}} - B_{\text{剂量}})} \right]$$

2)若 A 浓度和 B 浓度的 RFI 均大于 150 或 200,则:

$$EC150 = 2^{\left\{ \log_2(B_{\text{剂量}}) + \frac{150 - B_{RFI}}{A_{RFI} - B_{RFI}} \times [\log_2(A_{\text{剂量}}) - \log_2(B_{\text{剂量}})] \right\}}$$

$$EC200 = 2^{\left\{ \log_2(B_{\text{剂量}}) + \frac{200 - B_{RFI}}{A_{RFI} - B_{RFI}} \times [\log_2(A_{\text{剂量}}) - \log_2(B_{\text{剂量}})] \right\}}$$

(6) 预测模型

受试物浓度 > IC₅₀ 前提下,至少 2 次实验结果中,对于 FITC-CD86,若 RFI_{CD86} \geq 150,该物质为阳性致敏物;对于 PE-CD54,若 RFI_{CD54} \geq 200,该物质为阳性致敏物。即 RFI_{CD86} \geq 150 和(或)RFI_{CD54} \geq 200,该物质都为阳性致敏物。

1.3 统计方法

数据采用均数 \pm 标准差表示,采用 SAS 9.4 统计软件比较两种方法结果的一致性,即 Kappa 值。

2 结果

2.1 化学品对两种肽的消除结果

表 3 数据显示,12 种化学品中,乳酸和十二烷基硫酸钠对两种多肽的消除率均值均小于 6.38%,可判定为非致敏物;其他 10 种化学品对多肽消除率均值均大于 6.38%,可判定为致敏物,反应等级不同。

2.2 DPRA 与 LLNA 分类比较

根据替代方法的验证原则,把化学物质的 DPRA 分类与 LLNA 分类进行比较见表 2,结果显示,物质被分为非致敏物的灵敏度、特异度和准确度均达到 100%,其次是被分类为高致敏性物质,灵敏度、特异度和准确度分别为 60%、40% 和 60%。经统计分析,一致性检验结果显示, $P > 0.05$,Kappa = 0.57,说明 DPRA 分类与 LLNA 分类基本一致。

2.3 DPRA 与 h-CLAT 比较

h-CLAT 实验中 10 种物质 CD54 和 CD86 表达学科建设显示,乳酸和十二烷基硫酸钠的 RFI 值中,CD86 小于 150,CD54 小于 200;马来酸酐 RFI 值中,CD86 小于 150,CD54 大于 200;其他物质 RFI 值的 CD86 和 CD54 均大于 150 和 200。DPRA 结果显示,乳酸和十二烷基硫酸钠对两种肽的消除率均值均小于 6.38%,其他物质均大于 6.38%。h-CLAT 与 DPRA 化学品致敏性数据比较见表 3。经统计分析,一致性检验结果显示, $P > 0.05$,Kappa = 1,说明 h-CLAT 和 DPRA 判断的结果完全一致。

表 2 DPRA 预测模型与 LLNA 分类比较

Tab. 2 Comparison of DPRA prediction model and LLNA class

方法 Method	非致敏物 (无/弱) Non-sensitizer (No or minimal)	致敏物(低) Sensitizer (Low)	致敏物(中) Sensitizer (Moderate)	致敏物(高) Sensitizer (High)	灵敏度/% Sensitivity	特异度/% Specificity	准确度/% Accuracy
无 Non-sensitizer	2	0	0	0	100	100	100
致敏物(低) Sensitizer (weak)	0	1	0	1	50	50	50
致敏物(中等) Sensitizer (moderate)	0	1	0	2	0	0	0
致敏物(强、极强) Sensitizer (strong, extreme)	0	0	2	3	60	40	60

表 3 h-CLAT 和 DPRA 数据比较

Tab. 3 Comparison of h-CLAT and DPRA

化学品 Chemicals	h-CLAT/ $\mu\text{g}/\text{mL}$				结果 Results	DPRA/%			结果 Results
	IC ₅₀	CV ₇₅	EC150	EC200		半胱氨酸 消除率 Cysteine depletion	赖氨酸 消除率 Lysine depletion	消除 率均值 Average depletion	
乳酸 Lactic acid	4001.10 ± 120.34	3010.08 ± 120.29	<150	<200	N	1.92 ± 0.13	0.23 ± 0.15	1.07 ± 0.13	N
十二烷基硫酸钠 Sodium lauryl sulfate(SLS)	78.15 ± 2.49	60.55 ± 3.49	<150	<200	N	6.61 ± 1.5	5.17 ± 1.15	5.90 ± 1.31	N
肉桂醛 Cinnamaldehyde	487.59 ± 10.29	384 ± 15.93	19.56 ± 8.79	12.22 ± 5.78	P	82.95 ± 12.42	56.64 ± 9.71	69.7 ± 11.02	P
柠檬醛 Citral	39.46 ± 1.09	27.2 ± 3.49	22.30 ± 1.28	12.56 ± 3.49	P	24.46 ± 4.28	12.92 ± 2.64	18.69 ± 0.87	P
丁香酚 Eugenol	429.09 ± 12.98	310.11 ± 10.21	160.75 ± 5.99	140.11 ± 15.89	P	31.98 ± 2.89	9.99 ± 1.26	20.99 ± 1.52	P
苯乙醛 Phenylacetaldehyde	39.00 ± 2.09	20.2 ± 4.56	12.4 ± 0.34	21.08 ± 1.28	P	96.97 ± 3.37	52.88 ± 9.11	74.93 ± 5.19	P
没食子酸丙酯 Propyl gallate	378.22 ± 17.65	131.09 ± 8.78	108.67 ± 12.11	109.02 ± 17.22	P	30.34 ± 1.70	34.88 ± 8.08	32.61 ± 2.27	P
马来酸酐 Maleic anhydride	875.34 ± 29.09	702.12 ± 14.09	—	280.40 ± 13.33	P	96.77 ± 3.42	55.81 ± 5.52	74.81 ± 4.73	P
苯醌 Benzoquinone	4.33 ± 0.98	6.37 ± 0.91	5.5 ± 1.67	3.78 ± 0.98	P	84.44 ± 3.88	93.71 ± 3.76	89.08 ± 3.41	P
2,4-二硝基氯苯 2,4-Dinitrochlorobenzene	9.89 ± 0.87	6.54 ± 1.23	2.89 ± 1.15	2.12 ± 0.94	P	100.00 ± 0.00	21.33 ± 1.93	60.67 ± 0.96	P

注:—,结果无法计算。N:阴性;P:阳性。

Note. — the result cannot be calculated. N: negative; P: positive

2.4 DPRA 和 h-CLAT 检测植物提取物

DPRA 联合 h-CLAT 对 7 种植物提取物的致敏性检测结果见表 4。DPRA 实验结果表明,绿茶提取物由于与半胱氨酸肽发生共洗脱,因此无法对其消除率均值进行计算和判断。其余 6 种植物提取物对两种肽的消除率均值均大于 6.38%,可判定为致敏

物,其中,黄芩提取物对两种肽消除率均值达 96.29%,致敏性最强。h-CLAT 实验结果表明,除绿茶提取物、马齿苋提取物和人参果提取物为非致敏物,其余 4 种植物提取物为致敏物。经统计分析,一致性检验结果显示, $P > 0.05$, Kappa = 0.57,说明 h-CLAT 和 DPRA 判断的结果基本一致。

表 4 植物提取物 DPRA 和 h-CLAT 检测结果

Tab. 4 DPRA and h-CLAT detection results of the plant extracts

植物提取物 Plant extracts	h-CLAT/ $\mu\text{g/mL}$				结果 Result	DPRA/%			结果 Result
	IC ₅₀	CV ₇₅	EC150	EC200		半胱氨酸 消除率 Cysteine depletion	赖氨酸 消除率 Lysine depletion	消除率 均值 Average depletion	
马齿苋提取物 Herba portulacae extract	97.08 ± 23.45	78.98 ± 19.09	<150	<200	N	2.23 ± 0.11	9.94 ± 0.85	6.09 ± 0.23	N
人参果提取物 Ginseng fruit extract	30.12 ± 4.55	14.33 ± 3.98	<150	<200	N	14.47 ± 4.54	41.18 ± 0.88	27.83 ± 0.44	P
金缕梅提取物 Hamamelis mollis Oliver extract	189.34 ± 39.33	160.22 ± 30.28	89.63 ± 14.54	57.11 ± 16.39	P	90.34 ± 12.33	7.08 ± 2.34	48.81 ± 9.68	P
当归提取物 Angelica sinensis extract	40.18 ± 3.54	38.77 ± 8.19	19.40 ± 5.55	—	P	64.91 ± 5.09	83.67 ± 11.88	74.29 ± 8.21	P
黄芩提取物 Scutellaria baicalensis Georgi extract	9.13 ± 0.98	8.19 ± 1.12	—	4.04 ± 0.11	P	96.11 ± 7.99	96.47 ± 9.09	96.29 ± 8.96	P
积雪草提取物 Centella extract	90.09 ± 10.23	45.55 ± 2.33	35.69 ± 12.34	55.54 ± 15.07	P	99.96 ± 2.90	37.88 ± 1.43	68.92 ± 3.04	P
绿茶提取物 Green tea extract	109.01 ± 11.20	99.45 ± 14.43	<150	<200	N	* *	71.55 ± 1.09	—	/

注: ** : 提取物与多肽发生共洗脱, — : 结果无法计算, / : 无法判断。N: 阴性; P: 阳性。

Note: ** : Plant extract co-elute with peptide. — : Result cannot be calculated. / : Cannot be judged. N: Negative; P: Positive

3 讨论

皮肤致敏的 AOP 通路是从分子起始事件、关键事件到有害结局的连续发生过程。DPRA 主要针对 AOP 通路的第一步,即物质渗透皮肤后与皮肤蛋白的结合反应^[8,10]。研究表明大多数化学致敏原(半抗原)都是亲电性的,能与氨基酸的亲核中心结合反应。据此原理,设计了半胱氨酸肽和赖氨酸肽两种多肽,通过化学物质与多肽共孵育,采用高效液相色谱法检测多肽的消耗。验证研究表明,与 LLNA 结果相比,DPRA 的预测敏感性为 80%,特异性为 77%^[8],因此可用于化学物的初筛。本研究检测了指南推荐的 12 种参考化学物质,对 2 种非致敏物和 10 种致敏物实现正确区分,首次在国内建立了 DPRA 方法。

h-CLAT 方法主要针对 AOP 通路的第二步,即外源致敏物引起树突状细胞反应的关键细胞事件,表现为细胞表面特征标志物的上调。验证研究表明,与 LLNA 结果相比,h-CLAT 其敏感性为 93%,特异性为 66%^[9],因此可用于化学物的初筛。本研究检测了 12 种参考化学物质,对 2 种非致敏物和 10 种致敏物实现正确区分,进一步建立了应用两种体外方法预测复杂物质的能力。

在植物提取物的开发过程中,潜在的致敏原是

不可忽视的危害因素。如何把用于单一化合物预测的替代方法用于复杂体系的预测是替代方法应用亟需解决的问题。许多学者尝试建立组合模型,如 h-CLAT-DPRA-DEREK 整合试验策略^[11], DPRA-hCLAT 组合、皮肤模型-hCLAT 组合、计算机定量结构活性关系(quantitative structure-activity relationship, QSAR)-DPRA 组合、贝叶氏模型等。对于单一化合物,REACH 法规认为如果 AOP 通路中已有 1-2 个关键事件数据足以进行致敏风险评估,则不需要再进行其他关键事件的实验^[5]。

本研究尝试建立 DPRA 和 h-CLAT 组合的简单筛查体系,分别对 7 种植物提取物的致敏性进行检测,DPRA 结果显示,除了绿茶提取物无法得到判定之外,其他的植物提取物均有不同程度的致敏性。h-CLAT 结果显示除绿茶提取物、马齿苋提取物和人参果提取物为非致敏物,其余 4 种植物提取物为致敏物。进一步分析表明,黄芩提取物的主要成分为黄芩苷,是一种黄酮类化合物,具有致敏作用^[12]。当归提取物主要活性成分为阿魏酸、藁本内脂、正丁烯酰内脂和烟酸等^[13],可能存在人群皮肤致敏性。

研究结果初步表明组合方法对于植物提取物出现阳性结果的证据较充分,本研究所选提取物排除了原料处理、提取工艺、溶剂选择和质量控制等方面的非特征性因素,因此推测原料本身组分导致的致

敏感可能性较充分。如果两种体外方法的测试结果均为阴性,则不能得出真阴性的结论,因为可能存在物质浓度过低无法达到检测阈值的情况,因此,针对假阴性比较高的情况,可通过浓缩或单相分离的方式,提高组份的含量进一步测试。

本研究建立了简单的筛查体系,初步可用于以下三种情形的预测:①经两种替代方法测试均为阴性的植物提取物,可预测为无致敏性,可进入下一阶段开发;②经两种替代方法测试均为阳性的植物提取物,初步判定具有致敏性,可根据实际情况决定是否进一步致敏成份分析,或改善提取工艺进一步测试,或开发价值不高而终止投入;③如果两种替代方法结果不一致,可联合第三种替代方法或进行经典动物实验,确认是否为致敏物。总之,组合 DPRA 和 h-CLAT 两种替代方法可弥补单一方法对于混合物检测的局限性,同时也为植物原料安全评价提供了皮肤致敏的初筛方法。

参 考 文 献

- [1] Kimber I, Basketter DA, Gerberick GF, et al. Chemical allergy: Translating biology into hazard characterization [J]. *Toxicology*. 2011, 120: 238 - 268.
- [2] Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, et al. Integrated decision strategies for skin sensitization hazard [J]. *Toxicology*. 2015, 36 (9): 1150 - 1162.
- [3] 程树军, 焦红. 实验动物替代方法原理与应用 [M], 北京: 科学出版社, 2010.
- [4] Villeneuve DL, Crump D, Garcia-Reyero N, et al. Adverse outcome pathway (AOP) development I: strategies and principles [J]. *Toxicol Sci*, 2014, 142(2): 312 - 320.
- [5] 瞿小婷, 程树军, 秦瑶, 等. 有害结局通路指南及毒性测试应用分析 [J]. *日用化学品工业*, 2016, 46(8): 473 - 478.
- [6] OECD. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 2: Use of the AOP to Develop Chemical Categories and Integrated Assessment and Testing Approaches. Series on Testing and Assessment No. 168 [R]. Paris, 2012.
- [7] 陈或, 喻欢, 程树军, 等. 基于有害结局通路原理的皮肤致敏测试替代方法进展 [J]. *日用化学品科学*, 2016, 39(4): 4 - 9.
- [8] OECD. Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) [S]. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. 2015.
- [9] OECD. Test. No. 442E: In Vitro Skin Sensitization. Human cell line Activity (h-CLAT) [S]. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. 2016.
- [10] Gerberick G, Vassallo J, Foertsch L, et al. Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach [J]. *Toxicology*. 2007, 97(2): 417 - 427.
- [11] Natsch A, Ryan CA, Foertsch L, et al. A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation [J]. *Toxicology*. 2013, 33: 1337 - 1352.
- [12] 田锋奇. 黄芩苷的致过敏作用机制 [D]. 郑州: 郑州大学, 2007.
- [13] 高向东, 吴梧桐. 当归及其成分阿魏酸对小鼠免疫功能的影响 [J]. *中国生化药物杂志*, 1994, 15(2): 107 - 110.

[收稿日期] 2016 - 10 - 09



枸杞多糖对自发乳腺癌 MMTV-PyMT 小鼠肿瘤生长和转移的作用

李媛媛¹, 亓翠玲², 周芷晴¹, 杜标炎¹, 李嘉琳², 李梦诗², 何彦丽^{1*}

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 广东药科大学, 广州 510006)

【摘要】 目的 以 MMTV-PyMT 小鼠为乳腺癌模型探讨枸杞多糖对乳腺癌生长和转移的作用。方法 扩群鉴定转基因自发乳腺癌 MMTV-PyMT 小鼠, 将阳性雌性小鼠随机分为 LBP 组和对照组, 每组 8 只, 小鼠 8 周龄时给药, LBP 组给予 LBP (50 mg/kg, 腹腔注射) 治疗, 对照组给予生理盐水, 每 2 d 给药一次测量肿瘤体积一次, 4 周后脱臼处死, 肺 Bouin's 溶液固定后观察肺表面转移结节数目, 肿瘤组织固定包埋后免疫组化法检测肿瘤细胞增殖及血管密度。结果 MMTV-PyMT 阳性小鼠成瘤率 100%, 与对照组相比, LBP 组的肿瘤重量 (4.208 ± 0.4463 g) 明显地比对照组 (6.477 ± 0.3724 g) 轻, 肿瘤体积也明显比对照组小; LBP 组肺表面结节数目 (12 ± 1.155 个) 明显比对照组 (20 ± 2.745 个) 少, 免疫组化染色结果显示 LBP 组肿瘤组织中细胞增殖数目及微血管密度明显比对照组少。结论 枸杞多糖可通过抑制 MMTV-PyMT 小鼠乳腺癌的生长和转移, 并抑制肿瘤细胞增殖和血管新生, MMTV-PyMT 小鼠可作为乳腺癌肺转移模型运用于抗肿瘤药物研究。

【关键词】 MMTV-PyMT 小鼠; 枸杞多糖; 肿瘤转移; 肿瘤生长

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0618-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.012

Inhibitory effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on tumor growth and metastasis in MMTV-PyMT mouse model of breast cancer

LI Yuan-yuan¹, QI Cui-ling², ZHOU Zhi-qing¹, DU Biao-yan¹,
LI Jia-ling², LI Meng-shi², HE Yan-li^{1*}.

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Objective To investigate the inhibitory effect of *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP) on the tumor growth and metastasis in MMTV-PyMT mouse model of breast cancer. **Methods** The population of MMTV-PyMT transgenic mice was expanded and identified. 8-week old MMTV-PyMT-positive female mice were randomly divided into LBP group and control group, 8 mice in each group. The mice of LBP group were given LBP treatment (50 mg/kg, i. p.), and the control group was given normal saline in the same volume, once every 2 days for 4 weeks. The tumor size was measured every two days. The mice were killed at 4 weeks after treatment, the lungs were removed and fixed in Bouin's solution to observe the number of metastatic nodules, and tumor tissues were used for immunohistochemical examination of tumor cell proliferation and vascular density. **Results** The tumor formation rate was 100% in the MMTV-PyMT-positive mice. The tumor weight of LBP group was 4.208 ± 0.4463 g, significantly lower than the 6.477 ± 0.3724 g in the control group ($P < 0.005$). The number of pulmonary nodules of the LBP group was 12 ± 1.155 , significantly less than that of the control group (20 ± 2.745) ($P < 0.05$). The immunohistochemical examination using Ki67 and CD31 staining showed that tumor cell proliferation and microvessel density of the LBP group were significantly less than the NS group. **Conclusions** LBP

[基金项目] 广州中医药大学“薪火计划”资助项目 (XH20140102)。

[作者简介] 李媛媛, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药抗肿瘤药理。E-mail: yuanyuan_li108@163.com

[通讯作者] 何彦丽, E-mail: yanlihe16@163.com

inhibits breast cancer growth and metastasis through the inhibitory effect on tumor growth and metastasis, inhibition of tumor cell proliferation and angiogenesis in MMTV-PyMT mice. These mice can be used as an ideal model for studies on antitumor drug development for the treatment of breast cancer lung metastasis.

【Key words】 MMTV-PyMT mouse; *Lycium barbarum* polysaccharide; Tumor metastasis, lung; Tumor growth
Corresponding author: HE Yan-li. E-mail: yanlihe16@163.com

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,并且其发病率逐年上升。乳腺癌癌细胞易穿透基底膜进入血液和淋巴道,发生远端转移,并导致术后复发,严重威胁乳腺癌患者生命健康。乳腺癌 MMTV-PyMT 转基因小鼠为浸润性导管癌小鼠^[1],12 周龄时出现肺转移,其肿瘤病理进程与乳腺癌患者相似^[2]。本实验根据 MMTV-PyMT 转基因小鼠乳腺癌发病情况及组织病理学的特点,观察枸杞多糖对乳腺癌及乳腺癌肺转移的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

MMTV-PyMT 小鼠购自美国 Jackson 实验室,品系名称为 FVB/N-Tg(MMTV-PyVT)634Mul/J,共 3 只(1 雄,2 雌),8~12 周龄用于扩群。

1.1.2 饲养环境

饲养于广州市广东药科大学动物中心【SYXK(粤)2012-0125】SPF 的环境中,饲养密度 ≤ 6 只/笼,室温 22~28℃,相对湿度 50%~70%,昼夜明暗光照时间(12 h 明/12 h 暗)。饲料购自广东省动物中心,经⁶⁰Co 辐照灭菌;饮用水为城市普通居民用水,经高压灭菌。

1.1.3 主要药物及试剂

枸杞多糖(质量分数为 60%)购自中国西安开来生物工程有限公司;CD31 抗体(ab28364)购于美国 Abcam 公司;Ki67 抗体,抗鼠二抗、抗兔二抗购自中国北京中杉金桥生物技术公司;PCR 引物由中国广州英潍捷基公司合成;PCR Mix(K1082)购自美国 Thermo 公司;DAB(8059p)购自美国 CST 公司。

1.1.4 主要仪器

石蜡切片机购于徕卡公司,Olympus 显微镜、显微数码图像技术购于 Olympus 公司,VMC64S7 型独立送回风净化笼具购于苏杭实验动物设备厂;PCR 仪购于美国应用生物系统公司。

1.2 方法

1.2.1 MMTV-PyMT 小鼠繁育

用引种的乳腺癌 MMTV-PyMT 转基因雄性小鼠,目的基因为杂合子(+/-)和正常雌性成年小

鼠 FVB(+ / +)以 1:2 的比例杂交,F1 代中既有 MMTV-PyMT 小鼠,也有正常 FVB 小鼠,进行全同胞兄妹交配,扩大种群。

1.2.2 转基因检测

小鼠 4 周时剪取小鼠足趾进行编号并提取 DNA,用 PCR 法进行基因检测,阳性小鼠扩增条带在 556 bp,详细引物序列及反应条件见文献^[2],反应同时设阴性对照组及阳性组。

1.2.3 小鼠给药及一般情况观察

将 MMTV-PyMT 小鼠随机分为给药组(LBP)和对照组(NS),每组各 8 只。小鼠从 8 周给予枸杞多糖(50 mg/kg)(根据本实验室之前治疗小鼠肝癌的剂量)^[3]和生理盐水治疗,1 次/2 日,治疗 4 周,每隔 1 d 用游标卡尺测量肿块的长径 A(mm)及短径 B(mm),计算肿瘤体积,并绘制肿瘤生长曲线,治疗 4 周后将小鼠乙醚麻醉并脱臼处死,分离肿瘤,取出各脏器。

1.2.4 组织病理学改变观察

各组切取部分肿瘤组织,4% 中性甲醛固定,常规石蜡包埋,HE 染色,观察肿瘤组织病理学改变。

1.2.5 免疫组化染色

①常规切片、脱蜡,PBS 洗 3 次,每次 5 min;②柠檬酸钠(pH 6.0)高温高压修复 8 min;③放入 3% H₂O₂ 甲醇溶液 37℃ 浸泡 30 min,PBS 再洗 3 次,每次 5 min;④组织上加 10% BSA 于 37℃ 进行封闭 60 min 后;⑤加一抗 CD31 或 Ki67 置于 4℃ 过夜;⑥第 2 天将组织切片从封闭盒中拿出,PBS 洗 3 次,每次 5 min;⑦于组织上加上二抗于室温孵育 1 h,然后 PBS 洗 3 次,每次 5 min;⑧DAB 显色,苏木素复染 30 s,流水返蓝,常规脱水;⑨晾干后组织上滴加适量中性树胶,盖上盖玻片,自然晾干。

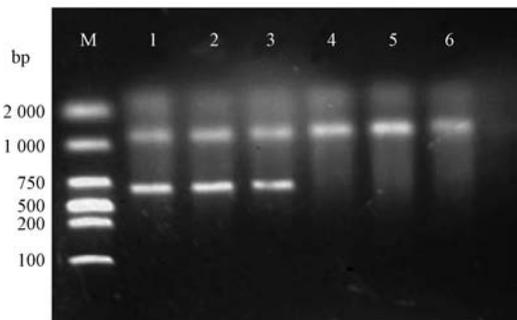
1.2.6 统计学方法处理

采用 Image-Pro Plus 6.0 (IPP) 统计软件包和 Graph-Pad 软件包处理,计量资料间比较采用两独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠鉴定结果

MMTV-PyMT 小鼠在 556 bp 条带处出现阳性条带,对照 FVB 为阴性,结果见图 1。



注:1-3 为 MMTV-PyMT 阳性小鼠(556 bp),4-6 号为阴性 FVB 鼠。

图 1 MMTV-PyMT 小鼠鉴定电泳图

Note. Line 1,2,3 are MMTV-PyMT-positive mice,
Line 4,5,6 are FVB-negative mice.

Fig.1 Electrophoretic identification of the MMTV-PyMT mice.

2.2 LBP 对 MMTV-PyMT 小鼠肿瘤体积及重量的影响

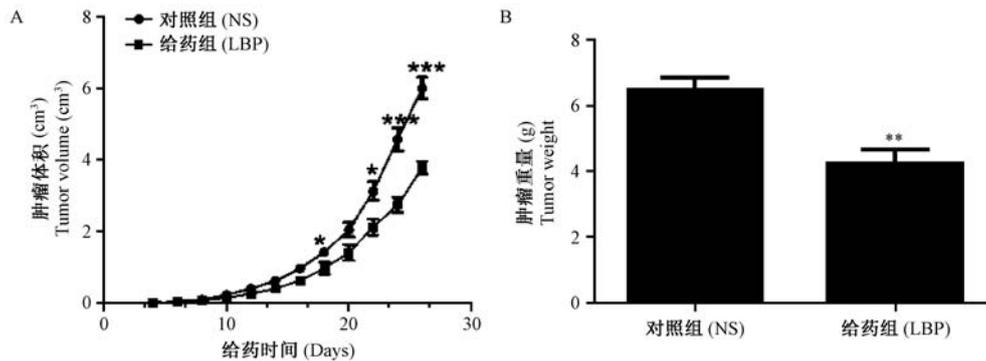
治疗期间,小鼠无死亡,成瘤率 100%。与模型组相比,结果显示:LBP 组肿瘤体积小于 NS 组(图 2A),LBP 组肿瘤重量(4.208 ± 0.4463 g)明显低于 NS 组(6.477 ± 0.3724 g)(图 2B)。

2.3 LBP 对 MMTV 小鼠肺表面转移结节数目的影响

MMTV 小鼠治疗结束后,乙醚麻醉脱臼处死,取出肺,Bouin's 溶液固定 24 h,观察并记录肺表面的肿瘤转移灶数目,LBP 组肺转移结节数(12 ± 1.155 个)少于 NS 组(20 ± 2.745 个)。(见图 3)。

2.4 LBP 对 MMTV 小鼠肿瘤细胞增殖的作用

肿瘤组织包埋后,切片做 Ki67 免疫组化染色,检测 LBP 对肿瘤细胞增殖活性的影响,Ki67 阳性部位为细胞核着色,每个组织随机挑选 5 个视野,每个视野内阳性细胞个数与总细胞个数比值为该区域的肿瘤细胞增殖率,NS 组肿瘤细胞增殖率为(48.58 ± 3.051)% (n = 8),LBP 组为(30.32 ± 4.218)% (n = 8),LBP 组肿瘤细胞增殖明显少于 NS 组,差异有显著性(P < 0.005)。(见图 4)。



注:LBP 组相对于 NS 组 * P < 0.05; ** P < 0.01; ***P < 0.001。(下同)。

图 2 LBP 对 MMTV 小鼠肿瘤的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. Compared the LBP group with NS group, * P < 0.05; ** P < 0.01; ***P < 0.001. (The same as in the following figures).

Fig.2 Influence of LBP on the tumor of MMTV mice

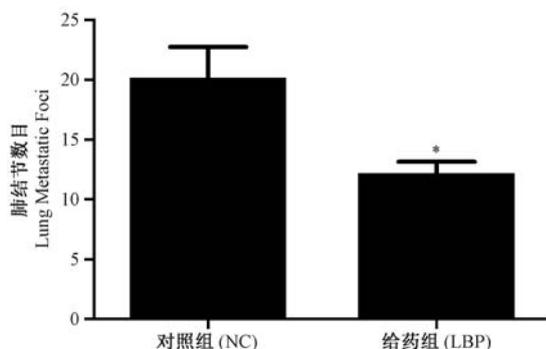


图 3 LBP 给药组和 NC 组转移肺结节数($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig.3 The numbers of lung metastatic foci in the NC and LBP groups.

2.5 LBP 对 MMTV 小鼠肿瘤血管形成的作用

通过 Ki67 免疫组化学染色结果,初步判断 LBP

可抑制自发乳腺癌细胞增殖活性,为进一步了解 LBP 对肿瘤组织间质血管生成是否产生影响,随机对乳腺癌组织切片进行了 CD31 免疫组化染色,每个肿瘤组织随机选取 5 个视野,由同一人数出每个视野中血管数目,LBP 组肿瘤的微血管密度为(32.0 ± 4.342)% (n = 8),NS 组减低为(15.63 ± 3.56)% (n = 8),两组间比较差异具有显著性(P < 0.05)。(见图 5)。

3 讨论

枸杞多糖是从枸杞中提取而得到的水溶性多糖,由阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖、鼠李糖等六种单糖组成,具有增强免疫力,降血糖、降血脂、抗肿瘤、抗衰老等多种药理作用和生理功能^[4]。

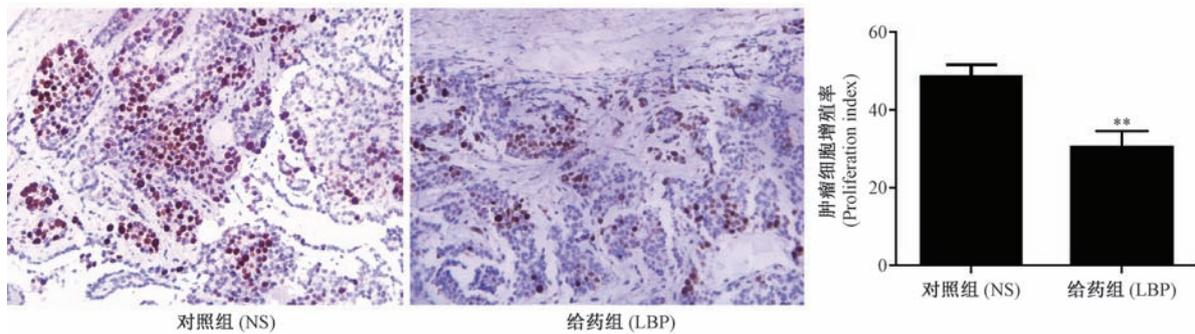


图 4 LBP 组和 NS 组肿瘤细胞增殖的病理学表现 (Ki67, ×400)

Fig. 4 Pathological changes of tumor cell proliferation in the LBP and NS groups

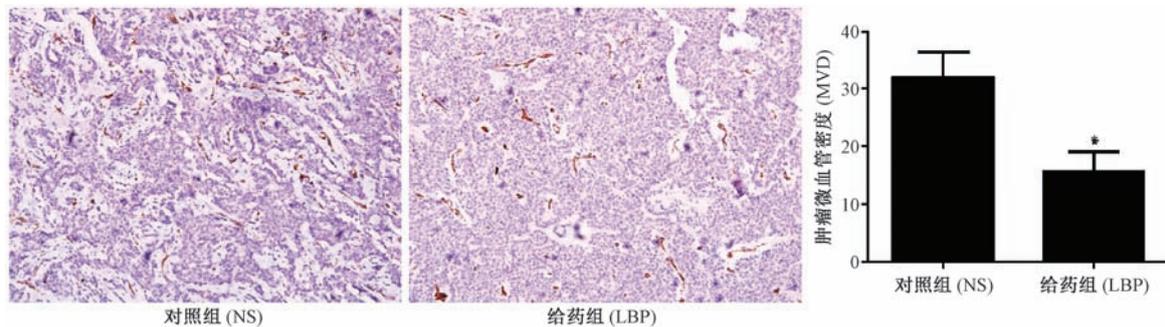


图 5 LBP 组和 NS 组肿瘤微血管形成病理表现 (CD31, ×200)

Fig. 5 Pathological changes of angiogenesis manifestation of the LBP and NS groups

有文献报道枸杞多糖能显著抑制人前列腺癌 PC-3 细胞的生长^[5], 而尹逊天等^[6]发现枸杞多糖能够抑制人脐静脉细胞的迁移和增殖, 并能够抑制血管形成。枸杞多糖对乳腺癌作用的研究报道并不多, 仅有的报道显示枸杞多糖通过下调乳腺癌细胞 MCF7 血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达, 从而抑制血管形成^[7]。

本研究采用 MMTV-PyMT 小鼠作为实验动物, 研究枸杞多糖对肿瘤生长及转移的影响。乳腺癌 MMTV-PyMT 转基因小鼠从第 9 周出现可触及的肿瘤, 随着小鼠周龄的增加, 肿瘤的数目和体积逐渐增多, 约 13 周时 5 对乳房全部发瘤, 11 周左右出现肺转移瘤, 14 周左右小鼠状态转差, 活动能力下降, 通常 15 周时大部分荷瘤鼠死亡, 到 17 周全部小鼠死亡; 组织病理学检查示 9 周龄 MMTV-PyMT 小鼠肺部未出现明显的乳腺癌肿瘤转移灶, 但其原位乳腺癌肿瘤细胞已突破基底膜, 12 周龄时肺表面及内部出现大量的乳腺癌肿瘤转移灶, 15 周龄时肺表面及内部的肿瘤转移灶更大, 且肿瘤转移灶内出现部分坏死^[2]。MMTV-PyMT 小鼠肿瘤病理进程与患者乳腺癌进程相似。

本课题组前期研究发现枸杞多糖可下调荷瘤小鼠血清及肿瘤组织中 VEGF 的表达^[8], 而本实验通过对自发性乳腺癌 MMTV-PyMT 小鼠的研究发现,

枸杞多糖体内给药能够抑制 MMTV-PyMT 小鼠肿瘤的生长, 降低肺转移结节数目; 免疫组化染色显示枸杞多糖可抑制肿瘤细胞的增殖和肿瘤间质血管的形成。MMTV-PyMT 小鼠可稳定自发乳腺肿瘤, 繁殖能力强, 为抗肿瘤药物提供了良好的动物模型。

参 考 文 献

- [1] Lopez JI, Camenisch TD, Stevens MV, et al. CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(15): 6755-6763.
- [2] 余锦雯, 亓翠玲, 杨永霞, 等. 乳腺癌 MMTV-PyMT 转基因小鼠模型的生物学特性及病理学研究 [J]. *广东药学院学报*, 2011, 27(2): 178-182.
- [3] 胡妮, 杜标炎, 谭宇蕙, 等. 从诱导树突状细胞成熟角度探讨枸杞多糖联合 CXC 趋化因子配体 10 抗癌作用机制 [J]. *广州中医药大学学报* 2015, 32(4): 641-646.
- [4] 孙桂菊, 左平国. 枸杞多糖功效研究及应用状况 [J]. *东南大学学报(医学版)*, 2010, 29(2): 209-215.
- [5] 崔晓燕, 罗琼, 杨明亮, 等. 枸杞多糖对人前列腺癌 PC-3 细胞凋亡的影响 [J]. *毒理学杂志*. 2006, 20(4): 221-223.
- [6] 尹逊天, 王巍, 朱玉峰, 等. 枸杞多糖对人脐静脉血管内皮细胞的增殖、迁移及血管形成的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(4): 1819-1822.
- [7] 黄旭. 乳腺癌相关疲劳及枸杞多糖作用靶点和机制的研究 [D]. 哈尔滨医科大学 2011, 1-100.
- [8] 何彦丽, 应逸, 王斌, 等. 枸杞多糖对荷瘤小鼠免疫抑制因子 VEGF、TGF- β 1 水平的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2005, 21(5): 950-952.

[收稿日期] 2016-10-09

电针对2型糖尿病合并肾性高血压大鼠模型的疗效

万斌¹, 孙丽薇², 刘蓉¹, 李洪涛^{1*}, 顾为望^{3*}

(1. 广州医科大学附属第一医院, 广州呼吸疾病研究所呼吸疾病国家重点实验室, 广州 510120;
2. 中山大学医学院遗传学教研室, 广州 510080; 3. 南方医科大学实验动物中心, 广州 510515)

【摘要】 目的 观察电针对2型糖尿病合并肾性高血压大鼠模型的疗效,并探索其可能的作用机制,进一步完善针灸在临床急、慢性疾病中的应用。**方法** 将50只Wistar大鼠随机选择10只作为空白组,余下40只用于模型制作,并随机均分为单纯糖尿病组、单纯肾性高血压组、复合模型电针组、复合模型未电针组。大鼠高脂高糖膳食4周后,予快速腹腔注射链脲佐菌素(STZ),制作成单纯2型糖尿病模型,待模型血糖稳定,再用改良的“两肾一夹法”结扎大鼠单侧肾动脉,造成肾动脉狭窄,形成肾性高血压。最后获得稳定的2型糖尿病合并肾性高血压病的复合模型。其中除复合模型未电针组大鼠不予电针治疗外,其余各组大鼠均给予两个周期(2周)的电针治疗。最后,检测各组大鼠电针前后的血压(BP)、空腹血糖(FBG)、血肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)、糖化血红蛋白(GHbA1c)、肾素(PRA)及血管紧张素II(Ang II)值的变化。**结果** 电针2周后,复合模型电针组与复合模型未电针组相比,BP、FBG、GHbA1c、PRA、Ang II值均降低($P < 0.01$),但Cr和BUN值变化不明显($P > 0.05$)。**结论** 电针刺激2型糖尿病合并肾性高血压模型大鼠的双侧足三里穴,能使复合模型大鼠的血糖和血压降低至正常水平,且经单次电针刺激后2-3天内,复合模型大鼠的血糖和血压均能稳定在治疗后水平。另外,针灸疗法较其他治疗方法还具有经济、安全、无副作用等优点,更适合应用于2型糖尿病合并肾性高血压病的早期临床治疗及基础研究。

【关键词】 电针; 糖尿病; 肾性高血压病; 足三里; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0622-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.013

Effect of electroacupuncture on the rat model of type 2 diabetes mellitus combined with renal hypertension

WAN Bin¹, SUN Li-wei², LIU Rong¹, LI Hong-tao^{1*}, GU Wei-wang^{3*}

(1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Institute of Respiratory Diseases, State Key Laboratory of Respiratory Diseases, Guangzhou 510120, China; 2. Department of Medical Genetics, Zhongshan Medical College of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080;
3. Laboratory Animal Center, Southern Medical University, Guangzhou 510515)

【Abstract】 Objective To observe the therapeutic effect of acupuncture therapy for the rat model of type 2 diabetes mellitus (T2DM) combined with renal hypertension and try to explore its mechanism. **Methods** We randomly select 10 Wistar rats as the blank group and 40 rats were used to make the model groups, which were divided into simple diabetes group, simple renal hypertension group, the compound group with electroacupuncture and the compound group without electroacupuncture, with 10 rats in each group. After a high fat and sugar diet for 4 weeks, the Wistar rats were given streptozotocin i. p. injection to establish models of type 2 diabetes mellitus. Renal hypertension was developed by the “2K1C” improved method to make unilateral renal artery ligation-induced renal artery stenosis. Then, electroacupuncture treatment was performed on the rats for 2 weeks except the compound group without electroacupuncture. The changes of values of BP, FBG, Cr, BUN, glycosylated hemoglobin, renin and Ang II were recorded and analyzed. **Results** The values of BP, FBG,

[基金项目] 广东省科技基础条件建设项目(编号: 2014A030304069; 2015A030303016)。

[作者简介] 万斌(1989-),男,湖南常德人,硕士,主要从事疾病模型及比较医学研究, E-mail: wanb-smu@qq.com

[通讯作者] 李洪涛,教授, E-mail: gyhongtao@126.com; 顾为望,教授, E-mail: guww100@163.com

Cr, BUN, glycated hemoglobin, renin and Ang II in the compound group with electroacupuncture showed a significant reduction compared with the compound group without electroacupuncture after 2 weeks ($P < 0.01$), but there was no obvious changes in the values of Cr and BUN ($P > 0.05$). **Conclusions** The blood glucose and blood pressure in the rat model of compound group can be reduced to a normal level with continuous electroacupuncture at bilateral acupoints Zusanli, and it can also be kept at a stable level after single electroacupuncture for 2–3 days. The acupuncture therapy is more suitable for early clinical treatment and can be used in basic research with advantages of economic, safe, no side effect and so on.

【Key words】 Electroacupuncture; Type 2 diabetes mellitus; Renal hypertension; Acupoint ST36 (Zusanli); Rat
Corresponding author: LI Hong-tao, E-mail: gyhongtao@126.com; GU Wei-wang, E-mail: guww100@163.com

糖尿病是临床常见的慢性代谢性疾病,主要表现为“三多一少”的症状和体征。按发病类型,临床上一般将其分为 1 型和 2 型两大类,其中又以 2 型为主。持续的高血糖和长期代谢紊乱可导致全身多个组织器官损伤或功能障碍。当血栓停留在肾动脉可导致肾动脉主干或分支狭窄、阻塞,使肾血流量减少从而引起肾性高血压,持续的肾性高血压又能很快导致急慢性的肾衰竭^[1]。当前,临床治疗糖尿病和肾性高血压病的方法较多,但治疗效果却因人而异,病人往往因个人原因或药物副作用而停止服药,从而达不到临床要求的规律治疗的目的,所以针对 2 型糖尿病合并肾性高血压病早期,寻找一个既能降血糖同时又能控制血压的方法将是临床迫切需要的。因此本研究采用高频电针刺激复合模型大鼠双侧足三里穴,来治疗 2 型糖尿病合并肾性高血压病的方法将为临床上该类疾病的早期治疗及基础研究提供一个新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 雄性大鼠,50 只,8~10 月龄,体重为 360~380 g,由南方医科大学实验动物中心提供【SCXK[粤]2011-0015】,符合国际动物伦理学标准。大鼠饲养于南方医科大学实验动物中心 SPF 级动物实验室【SYXK(粤)2011-0074】,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 实验试剂及仪器

链脲佐菌素:(美国 Sigma 公司);胆固醇、胆酸钠等:(河南祥盛公司);大鼠糖化血红蛋白(GHbA1c)、肾素(PRA)、血管紧张素 II(Ang II) ELISA 试剂盒(上海广锐生物科技有限公司)等。

1.3 主要仪器及设备

针灸针:北京汉医医疗器械;电针仪:华佗牌 SDZ-II 型;大鼠针灸固定板;手术缝合针线及器械;玻璃分针;PH 值测试仪:德国赛多利斯公司;稳豪型血糖仪及

试纸:美国强生公司;酶标仪:美国赛默飞公司;CODA 无创血压测定分析系统:Kent Scientific 公司等。

1.4 方法

1.4.1 实验分组及模型建立

将 50 只大鼠随机均分为空白组、单纯糖尿病组、单纯肾性高血压组、复合模型电针组和复合模型未电针组。肾性高血压组大鼠行改良的“两肾一夹法”造模。单纯糖尿病组大鼠需高脂高糖膳食 4 周后,予 28 mg/kg 剂量的链脲菌素(streptozotocin, STZ)溶液腹腔注射造模^[2-4]。复合模型大鼠在单纯糖尿病模型的基础上,行改良的“两肾一夹法”造模^[5-7]。

将各组大鼠(除复合模型未电针组)分别固定在针灸固定板上,用刮毛刀除去大鼠两腿外侧部毛发,使用半寸针灸针针刺大鼠双侧足三里穴(图 1 和图 2),进针深度约 7 mm 左右(大鼠足三里穴位于后腿外侧,胫骨嵴的外侧中间)^[8]。SDZ-II 型电针仪连于两侧针柄上,在高频的连续波强度下,持续脉冲 20 min/d,电针 6 d 后停 1 d,7 d 为一个治疗周期,整个实验进行 2 个治疗周期(2 周)。每个治疗周期完成后各大鼠均需测量 BP、FBG、GHbA1c、PRA、Ang II 值,实验完成后处死大鼠,下腔静脉采血测血清 Cr、BUN 值,分别取胰腺、肾做病理学检查。

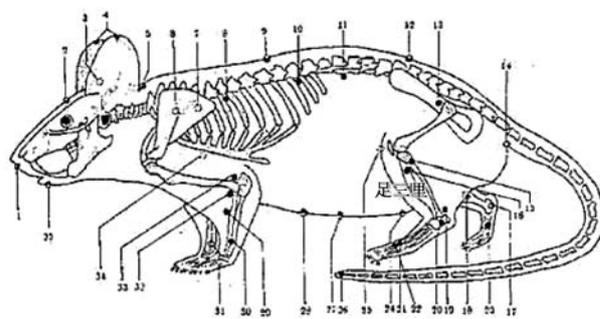


图 1 大鼠全身穴位图(编号 16 为足三里穴)

Fig.1 Location of acupoints all over the body in the rat (No. 16 represents Zusanli acupoint)

1.4.2 一般行为观察

所有大鼠均用干性饲养笼饲养,观察大鼠精神



图 2 电针大鼠双侧足三里穴

Fig. 2 Electroacupuncture at bilateral acupoints Zusanli of the rats

状态、体重变化、大小便情况等。

1.4.3 FBG 及血压值测定

测定各组大鼠在电针前、电针后 1 周和 2 周的 FBG 值及 BP 值。FBG 值测定:大鼠禁食 12 h 后,经尾静脉采血,予快速血糖仪测得;BP 值的测定:采用 CODA 无创血压测定分析系统测量各组大鼠的 BP 值。每只大鼠均重复测量 3 次后取平均值作为最后血压值。

1.4.4 GHbA1c、PRA、Ang II 值测定

ELISA 试剂盒测定各组大鼠在电针前、电针后 1 周和 2 周的 GHbA1c、PRA、Ang II 值。

1.4.5 Cr、BUN 值测定

电针前,麻醉大鼠,用毛细吸管从大鼠眼眶静脉丛采血 3 mL,分离血清,全自动血液生化分析仪测得各组大鼠电针前的 Cr、BUN 值;电针干预 2 周后,麻醉大鼠,开腹从下腔静脉采血 3 mL,分离血清,测得各组大鼠电针后的 Cr、BUN 值。

1.4.6 组织病理学观察

电针前,随机抽取部分复合模型大鼠,麻醉后开腹,取其胰腺和肾进行 HE 染色。电针 2 周后,所有大鼠均麻醉采血,取胰腺、肾组织,进行 HE 染色。观察电针前后各组大鼠胰腺和肾组织病理学变化。

1.5 统计学分析方法

两组间的均数比较采用两独立样本 t 检验,不同组间的均数比较均采用重复测量的方差分析。统计结果用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,检验的显著性水平为 $P < 0.05$,所有分析均采用 SPSS 21.0 统计软件。

2 结果

2.1 一般行为观察

空白组及单纯肾性高血压组大鼠,精神状态良

好,毛发顺滑干净有光泽,体重随饲养周期增大;而其他三组大鼠体重增长较慢,甚至部分出现体重减轻;另外,复合模型未电针组大鼠与其他组大鼠相比,精神更易紧张,毛发缺少光泽,局部变黄易脱落,抓持时遗尿排便现象较普遍,大便质软甚至稀便,腐臭味明显,尿量及粪量均增加。

2.2 大鼠 FBG 和 BP 值变化

2.2.1 FBG 值变化

不同组间的 FBG 值差异均有显著性 ($P < 0.05$)。电针 1 周后,单纯糖尿病组和复合模型电针组与电针前相比,两组大鼠空腹血糖均出现明显下降 ($P < 0.01$);电针 2 周后,单纯糖尿病组和复合模型电针组大鼠与电针前相比,空腹血糖也出现了明显下降 ($P < 0.01$)。空白组、单纯肾性高血压组及复合模型未电针组电针前后,大鼠空腹血糖值均无明显差异 ($P > 0.05$)。

2.2.2 BP 值变化

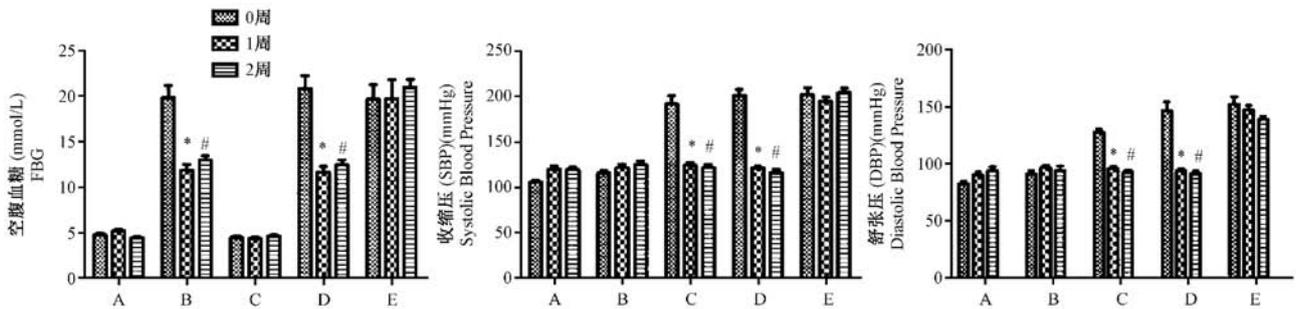
不同组间的 BP 值均有差异 ($P < 0.05$)。电针 1 周后,单纯肾性高血压组和复合模型电针组大鼠与电针前相比,收缩压及舒张压均有显著差异 ($P < 0.01$);电针 2 周后,单纯肾性高血压组和复合模型电针组大鼠与电针前相比,收缩压及舒张压也均有显著差异 ($P < 0.01$)。而空白组、单纯糖尿病组及复合模型未电针组之间收缩压和舒张压均无明显差异 ($P > 0.05$)。(图 3)。

2.3 大鼠 GHbA1c、PRA、Ang II 值的变化

所有大鼠眼眶静脉采血后,分离血清。测定各组大鼠电针前,1 周后及 2 周的 GHbA1c、PRA、Ang II 值。不同组间的 GHbA1c、PRA、Ang II 值均有差异 ($P < 0.05$)。电针 1 周后,单纯糖尿病组和复合模型电针组与电针前相比,两组大鼠 GHbA1c 水平均出现明显下降 ($P < 0.01$);电针 2 周后,单纯糖尿病组和复合模型电针组大鼠与电针前相比,GHbA1c 水平也出现了明显下降 ($P < 0.01$);另外,电针 1 周后,单纯肾性高血压组和复合模型电针组与电针前相比,两组大鼠 PRA、Ang II 水平也均出现明显下降 ($P < 0.01$);电针 2 周后,单纯糖尿病组和复合模型电针组大鼠与电针前相比,PRA、AngII 水平明显下降 ($P < 0.01$) (图 4)。

2.4 BUN、Cr 值比较

电针前与电针后 2 周各组之间的肾功能 (BUN、Cr) 均无明显差异 ($P > 0.05$) (表 1)。

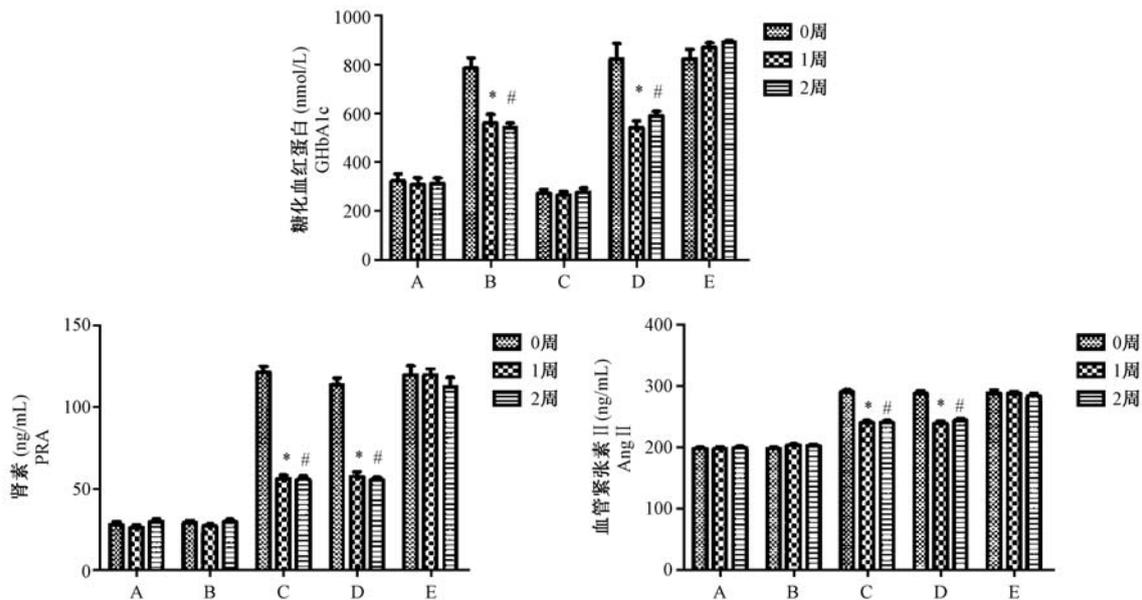


注:A. 空白组;B. 单纯糖尿病组;C. 单纯肾性高血压组;D. 复合模型电针组;E. 复合模型未电针组。(图4同)。与空白组及单纯肾性高血压组比较,空腹血糖(FBG) * $P < 0.01$;且# $P < 0.01$;与空白组及单纯糖尿病组比较,收缩压(SBP)、舒张压(DBP) * $P < 0.01$;且# $P < 0.01$ 。

图3 电针前后各组大鼠空腹血糖、血压值变化

Note. A. Blank group; B. Simple diabetes group; C. Simple renal hypertension group; D. Compound group with electroacupuncture; E. Compound group without electroacupuncture. (The same as in the following Fig. 4). Compared with the blank group and simple renal hypertension group, the changes of FBG show significant differences (* $P < 0.01$; # $P < 0.01$). Compared with the blank group and simple diabetes group, the change of SBP and DBP show significant differences (* $P < 0.01$; # $P < 0.01$).

Fig. 3 Changes of the values of FBG and BP after electroacupuncture in each group



注:与空白组及单纯肾性高血压组比较,糖化血红蛋白、肾素、血管紧张素 II 水平 * $P < 0.01$;且# $P < 0.01$ 。

图4 电针前后各组大鼠血清 GhbA1c、PRA、Ang II 值变化

Note. Compared with the blank group and simple renal hypertension group, the changes of serum glycosylated hemoglobin, renin and Ang II show significant differences, * $P < 0.01$; # $P < 0.01$.

Fig. 4 Changes of the values of serum GhbA1c, PRA, Ang II after electroacupuncture in each group

表1 不同组别的大鼠电针前与电针后2周肾功能指标的变化(BUN、Cr) (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

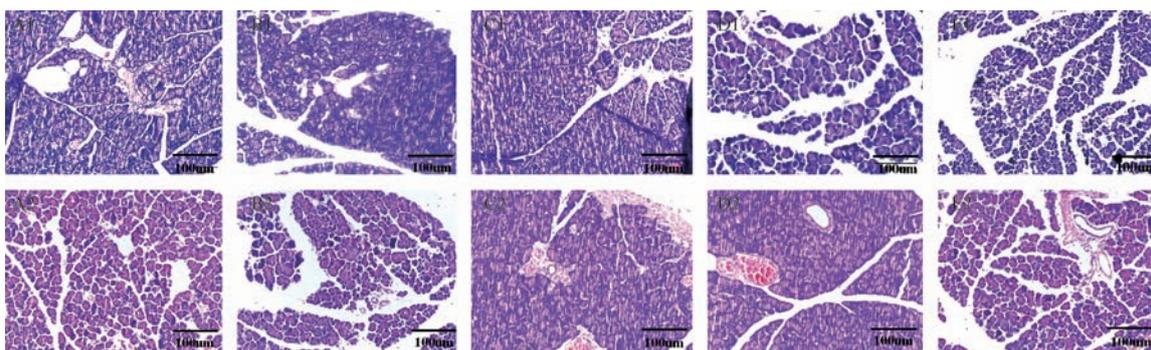
Tab. 1 Changes of the functional parameters in kidneys among different groups before and 2 weeks after electroacupuncture

组别/ Groups	0周 0 week		2周 2 weeks	
	BUN	Cr	BUN	Cr
空白组 Blank group	6.41 ± 0.63	32.80 ± 7.86	6.12 ± 0.86	34.24 ± 5.40
单纯糖尿病组 Simple diabetes group	6.30 ± 0.87	31.56 ± 5.36	6.65 ± 1.07	35.41 ± 5.22
单纯肾性高血压组 Simple renal hypertension group	6.26 ± 1.01	32.60 ± 6.61	6.49 ± 0.96	37.23 ± 6.16
复合模型电针组	6.30 ± 1.11	38.20 ± 7.26	6.32 ± 0.92	36.96 ± 8.23
复合模型未电针组	6.65 ± 0.95	31.55 ± 4.16	6.38 ± 0.99	33.37 ± 5.36
Compound group without electroacupuncture				

2.5 病理学观察

2.5.1 胰腺 HE 染色

电针前与电针 2 周后各组大鼠胰腺的病理学改变。结果显示:空白组和单纯肾性高血压组大鼠在电针前后胰岛细胞形态未发生改变,细胞数量多且胞浆丰富;而在其余三组中,电针前后均有胰岛细胞形态改变,表现为胰岛细胞体积增大及不同程度的空泡变性,同时部分胰岛细胞还见核固缩坏死,但是复合模型未电针组大鼠的胰岛萎缩坏死程度明显较单纯糖尿病组和复合模型电针组的大鼠更重(图 5)。



注:编号 A1、B1、C1、D1、E1 分别代表空白组、单纯糖尿病组、单纯肾性高血压组、复合模型电针组和复合模型未电针组大鼠的电针前胰腺 HE 染色结果;编号 A2、B2、C2、D2、E2 分别代表电针 2 周后的胰腺 HE 染色结果。(图 6 同)。

图 5 电针前与电针 2 周后各组大鼠胰腺的病理学改变(×200)

Note. No. A1, B1, C1, D1, E1 represent pancreatic tissues in the blank, simple diabetes, simple renal hypertension, the compound group with electroacupuncture and the compound group without electroacupuncture before electroacupuncture, respectively. No. A2, B2, C2, D2, E2 represent the pancreatic tissues at 2 weeks after electroacupuncture. (The same as in the following Fig. 6) HE staining, ×200

Fig. 5 Pathological changes of the pancreas in each group before and at 2 weeks after electroacupuncture

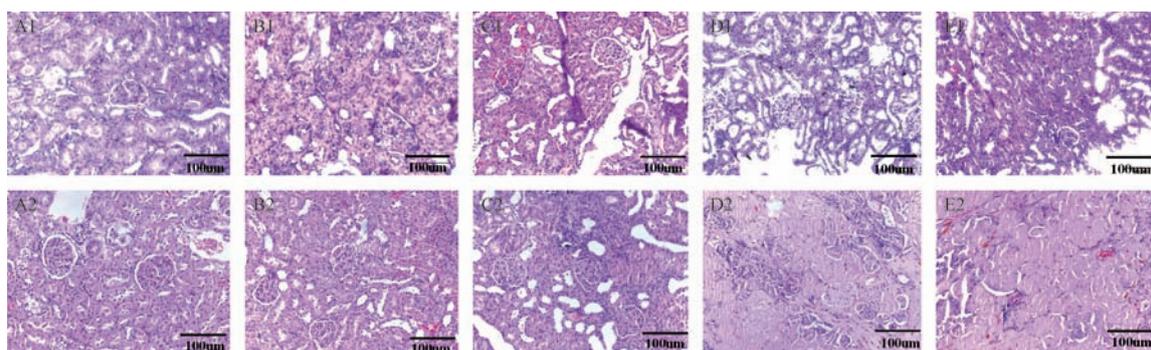


图 6 电针前与电针 2 周后各组大鼠左肾的病理学改变(×200)

Fig. 6 Pathological changes of the left kidney in each group before and 2 weeks after electroacupuncture.

3 讨论

糖尿病(DM)是一种临床常见的慢性病,按其发病类型,可将其分为 1 型和 2 型两大类。2 型糖尿病的发病人群以中老年为主,常易导致各器官的急、慢性并发症。持续进展性的高血糖和长期的代

2.5.2 肾脏的 HE 染色

电针前与电针 2 周后各组大鼠肾脏的病理学改变。结果显示:电针前后单纯肾性高血压组、复合模型电针组及复合模型未电针组大鼠的左侧肾小管及肾小球均出现不同程度的萎缩,肾小管萎缩、消失较明显,同时伴有肾间质纤维化,但复合模型未电针组大鼠的左肾萎缩较其余两组更明显;另外,这三组大鼠的右侧肾脏均发现明显的代偿性增大,表现为肾小管细胞增生、肥大为主。而空白组和单纯糖尿病组的大鼠电针前后均未见明显的肾脏病变(图 6)。

谢紊乱可导致动脉粥样硬化和血管狭窄,而肾动脉狭窄,肾血流量减少又能激活肾素血管紧张素醛固酮系统,使血压持续升高,最终形成急慢性肾衰竭^[9-10]。

现今临床治疗糖尿病和高血压的方法仅仅是通过药物对症治疗,但是从多年的临床观察来看,其治

疗效果却不甚满意,甚至会产生多种或轻或重的并发症。针灸疗法是一种中医疗法被认为是一种经济、环保、无毒、实用、副作用少的治疗手段,并且它对某些代谢性疾病及慢性病的疗效显著,并能达到增加患者生存率及生活质量,降低严重并发症的发生率的作用^[11-12]。

实验中选用 8~10 月龄的中年大鼠进行实验,能更好的模拟出人类 2 型糖尿病发病年龄的特点,运用本实验方法建立的 2 型糖尿病合并肾性高血压的大鼠模型,存活率及成模率均较高。另一方面,实验中当针灸刺激复合模型大鼠两侧足三里穴后,复合模型大鼠的 GHbA1c、PRA、Ang II 水平均降低,而三者又都是维持机体血糖或血压的重要物质,针灸后三者水平降低,表明针灸对糖尿病和高血压病的进展起到了良好的干预作用。同时,针灸治疗能减少患者长期服药而产生的并发症,更容易被病人接受。

综上所述,本实验通过给予 2 型糖尿病合并肾性高血压大鼠电针治疗,一定程度上对 2 型糖尿病合并肾性高血压病的进展起到了干预作用,同时各种检测结果也均与该病临床治疗结果相符。所以本实验的进行,可为 2 型糖尿病合并肾性高血压疾病的早期临床治疗研究及基础研究提供一个可靠的新方法。

参 考 文 献

- [1] Liu Y, Liu Y, Li HY, et al. Effect and mechanisms of zinc supplementation in protecting against diabetic cardiomyopathy in a rat model of type 2 diabetes [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2015, 15 (1): 14-20.
- [2] Nekoeian AA, Khalili A, Khosravi MB, et al. Oleuropein offers Cardioprotection in rats with simultaneous type 2 diabetes and renal Hypertension [J]. *Indian J Pharmacol*, 2014, 46(4): 398-403.
- [3] Bhandari U, Kumar V, Kumar P, et al. Protective effect of pioglitazone on cardiomyocyte apoptosis in low dose streptozotocin and high fat diet induced type 2 diabetes in rats [J]. *Indian J Med Res*, 2015, 142(5): 598-605.
- [4] Santuzzi CH, Tiradentes RV, Mengal V, et al. Combined aliskiren and L-arginine treatment has anti-hypertensive effects and prevents vascular endothelial dysfunction in a model of renovascular hypertension [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2015, 48(1): 65-76.
- [5] 秦秋华, 蒋伟哲, 施晓霞, 等. 肾性高血压大鼠模型制备方法的改进 [J]. *广西医科大学学报*, 2011, 28(5): 671-673.
- [6] 万斌, 孙丽薇, 张巧香, 等. 2 型糖尿病合并肾性高血压模型的建立及评价 [J]. *动物医学进展*, 2016, 37(5): 53-59.
- [7] Zeinivand M, Rahmani MR, Allatavakoli M, et al. Effect of co-administration of morphine and nicotine on cardiovascular function in two-kidney one clip hypertensive (2K1C) rats [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2013, 13(3): 140-145.
- [8] Tzeng CY, Lee YC, Ho TY, et al. Intracellular signaling pathways associated with the glucose-lowering effect of ST36 electroacupuncture in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Acup Med*, 2015, 33(5): 395-399.
- [9] Nair AR, Ebenezer PJ, Saini Y, et al. Angiotensin II-induced hypertensive renal inflammation is mediated through HMGB1-TLR4 signaling in rat tubulo-epithelial cells. *Experimental Cell Research* [J]. 2015, 335(2): 38-247.
- [10] Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Diabetes mellitus and renal failure: Prevention and management [J]. *J Res Med Sci*, 2015, 20(11): 1112-1120.
- [11] Su Z, Robinson A, Hu L, et al. Acupuncture plus low-frequency electrical stimulation attenuates diabetic myopathy by enhancing muscle regeneration [J]. *PLoS One*. 2015, 10(7): e0134511.
- [12] Chung JY, Yoo DY, Im W, et al. Electroacupuncture at the Zusanli and Baihui acupoints ameliorates type-2 diabetes-induced reductions in proliferating cells and differentiated neuroblasts in the hippocampal dentate gyrus with increasing brain-derived neurotrophic factor levels [J]. *J Vet Med Sci*, 2015, 77(2): 167-173.

[收稿日期] 2016-10-09



西藏小型猪 *IGF-1* 基因在不同生长发育阶段和不同组织器官中的差异表达

田雨光, 王玉珏, 庞炜, 岳敏*

(南方医科大学实验动物中心暨比较医学研究所, 广州 510515)

【摘要】 目的 测定西藏小型猪的 *IGF-1* 基因在不同年龄阶段、不同组织中的表达分布情况, 为未来的研究提供基础数据。方法 采用实时荧光定量 PCR 技术, 以 GAPDH 基因为内参照, 检测了 *IGF-1* 基因在西藏小型猪不同组织和不同生长阶段间的表达变化。结果 (1) *IGF-1* 基因表达的时序性研究表明在 0、0.25、0.5、1、2 岁时肌肉组织的表达量最低, 在 0、0.25、0.5 岁时皮肤组织中表达量最高, 在 0.1、2、3 岁时肝组织的表达量最高。(2) *IGF-1* 基因在 7 个不同组织中均有表达, 0.25 岁时其在表达丰度由高到低依次为: 皮肤、肺、肝、肾、脾、心脏和肌肉。且在皮肤中的表达量最高且极显著高于其他各组织 ($P < 0.01$)。同时在不同年龄阶段的表达中, *IGF-1* 基因 0.25 岁时在各组织中的表达均达到峰值。结论 西藏小型猪的 *IGF-1* 基因的表达呈现出明显的时空特异性。

【关键词】 *IGF-1* 基因; 西藏小型猪; 实时荧光定量 PCR

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0628-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.014

Differential *IGF-1* gene expression in various tissues at different developmental stages in Tibet minipigs

TIAN Yu-guang, WANG Yu-jue, PANG Wei, YUE Min*

(Center of Laboratory Animal and Institute of Comparative Medicine of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

【Abstract】 **Objective** To determine the expression and distribution of *IGF-1* gene in different tissues of Tibet minipigs at different ages. **Methods** The changes of *IGF-1* gene expression in different tissues and different growth stages of Tibet minipigs were detected by quantitative real-time fluorescence PCR technology and GAPDH gene was used as the reference. **Results** (1) The study of sequential expression of *IGF-1* gene showed that the lowest expression of *IGF-1* gene in muscle tissue was at 0, 0.25, 0.5, 1, and 2 years of age, whereas the highest expression of *IGF-1* gene in skin tissue was at 0, 0.25, 0.5 years of age and the highest expression of *IGF-1* gene in liver tissue was at 0.1, 2, 3 years of age. (2) *IGF-1* gene was expressed in all the 7 examined tissues, and its expression level was in the following decreasing order: skin, lung, liver, kidney, spleen, heart and muscle at 0.25 years of age. The expression of *IGF-1* gene in the skin was significantly higher than in other organ tissues ($P < 0.01$). **Conclusions** The expression of *IGF-1* gene of Tibet minipigs showed obvious temporal and spatial specificity.

【Key words】 *IGF-1* gene; Tibet minipigs; Quantitative real-time PCR

Corresponding author: Yue Min. E-mail: 343779791@qq.com

胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor-1, *IGF-1*) 又名生长介素, 是一种多肽生长因子, 在神经系统成熟和正常生长发育过程中发挥重要作用^[1]。其多效性包括抑制凋亡, 维持神经元生长, 调节脑屏障通透性及神经元兴奋性, 促进细胞分化, 促神经生成, 参与脑血管发生等^[2]。*IGF-1* 是一种

用^[1]。其多效性包括抑制凋亡, 维持神经元生长, 调节脑屏障通透性及神经元兴奋性, 促进细胞分化, 促神经生成, 参与脑血管发生等^[2]。*IGF-1* 是一种

【基金项目】 2015 科研助手项目 (C1032246); 广东省医学科研基金 (编号: A2016255); 广东省科技计划项目 (编号 2016A030303008)。

【作者简介】 田雨光 (1987 -), 男, 实验师, 研究方向: 比较医学和人类疾病动物模型。E-mail: 471977663@qq.com

【通讯作者】 岳敏 (1982 -), 女, 实验师。研究方向: 比较医学和人类疾病动物模型。E-mail: 343779791@qq.com

单链碱性多肽分子,它是由 70 个氨基酸组成,分子量是 7649。*IGF-1* 可以由体内多种细胞分泌,常常通过旁分泌、自分泌和内分泌等多种机制发挥作用,并且可与 *IGF-1* 受体 (*IGF-1R*) 结合^[3]。2008 年窦全林等^[4]建立了快速检测 *IGF-1* 基因表达量的方法,该方法采用实时荧光定量 PCR SYBR Green I 荧光染料法,选取藏系绵羊皮肤细胞中 *IGF-1* 基因作为研究对象,对其基因表达水平进行了相对定量分析。通过该方法检测出了 *IGF-1* 基因在藏系绵羊皮肤细胞中的相对表达量。2011 年呼正祥等^[5]为了探讨 *IGF-1* 基因对于雄性动物睾丸组织发育的影响,采用 real-time RT-PCR 方法研究了 *IGF-1* 基因在军牧 1 号白猪不同发育阶段睾丸组织的表达规律。研究结果显示在不同发育阶段的睾丸组织中 *IGF-1* 均可表达,但是不同发育时期 *IGF-1* 的表达量有显著差异,6 月龄时(性成熟阶段)表达量最高。2012 年,刘海英等^[6]采用实时荧光定量 PCR 技术对产绒期辽宁绒山羊和非产绒期皮肤中 *IGF-1* 基因的表达进行了测定。结果发现在辽宁绒山羊皮肤中 *IGF-1* mRNA 的表达量在产绒期均明显高于非产绒期。2013 年,常明雪等^[7]采用实时荧光定量 PCR 法检测 *IGF-1* 基因的发育性变化,并进行品种间比较。结果发现 0~56 日龄期间,金定鸭和高邮鸭肝脏 *IGF-1* 基因表达量均呈先升后降的趋势,56 日龄时高邮鸭肝脏 *IGF-1* 基因表达量极显著高于金定鸭、高邮鸭和金定鸭肝脏。

实时荧光定量 PCR 是在普通 PCR 定性技术基础上发展起来的核酸定量技术。它利用荧光信号的变化实时检测 PCR 扩增反应中每一个循环扩增产物量的变化,通过 *Ct* 值和标准曲线的分析对起始模板进行定量分析^[8]。本实验是通过实时的荧光定量 PCR 技术,对西藏小型猪 0 岁(1 日龄)、0.1 岁(36 日龄)、0.25 岁(90 日龄)、0.5 岁(180 日龄)、1 岁(360 日龄)、2 岁(720 日龄)、3 岁(1080 日龄)不同组织的 *IGF-1* 基因进行表达测定分析,从而明确 *IGF-1* 基因在西藏小型猪随着年龄增长在不同部位的表达趋势。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选取 0 岁(1 日龄)、0.1 岁(36 日龄)、0.25 岁(90 日龄)、0.5 岁(180 日龄)、1 岁(360 日龄)、2 岁

(720 日龄)、3 岁(1080 日龄)的西藏小型猪各 3 只,均购于南方医科大学实验动物中心【SCXK(粤)2011-0015】。常规屠宰后,立即取其心脏、肝、脾、肺、肾、肌肉、皮肤组织,立即放入去除 RNA 酶的 1.5 mL EP 管中,迅速投入液氮中备用。组织取自南方医科大学实验动物中心西藏小型猪【SYXK(粤)2011-0074】。

1.1.2 主要试剂和仪器

PrimeScript RT-PCR Kit、SYBR Premix Dimer-Eraser (Perfect Real Time) 购自 Takara 公司。无水乙醇、三氯甲烷、异丙醇,购自广东省化学试剂工程技术研究开发中心。引物由 Invitrogen 广州分公司合成。DEPC 处理水:1000 mL ddH₂O 中加入 0.1 mL DEPC,于 37℃ 过夜温育后高压灭菌。TRIZOL reagent,购自 Invitrogen 公司。水平电泳仪(美国伯乐),凝胶成像系统(杭州朗基科学仪器有限公司),高温烤箱(上海一恒科学仪器有限公司),荧光定量 PCR 仪(美国伯乐),紫外分光光度计(美国热电),恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取及质量测定

采用酚-氯仿一步法提取各组织中的 RNA,紫外分光光度计测定浓度。

1.2.2 反转录

使用 Takara SYBR Premix DimerEraser (Perfect Real Time) 试剂盒进行 RT-PCR 反应。反应体系为 20 μL:包括 5 × PrimeScript Buffer 4 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix1 1 μL, Oligo Dt Primer (50 μmol/L) 1 μL, Random 6 mers (100 μmol/L) 1 μL, Total RNA 1 μg, 加 RNase Free H₂O 到 20 μL。反应液配制在冰上进行。反转录反应条件为:37℃ 15 min(反转录反应),85℃ 5 s(反转录酶的失活反应)。

1.2.3 引物设计及 PCR 扩增条件

根据 GenBank 上猪的 *IGF-1* 基因 (NM_214256.1)、*GAPDH* 基因 (AF017079) 设计引物,以样品的 cDNA 第一链为模版,扩增 *IGF-1* 基因 (F: 5'-AAGGCTCAGAAGGAAGTA-3'; R: 5'-CAGTGGCAT-GTCATTCTT-3'), 以 *GAPDH* (F: 5'-TTGGCTACAG-CAACAGGG-3'; R: 5'-CTGGGATGGAACTGGAAGT-3') 作为内参。于冰上避光加样操作,混匀,瞬时离心进行 PCR 扩增。荧光定量 PCR 反应步骤见表 1。

表 1 西藏小型猪 *IGF-1* 基因荧光定量 PCR 反应步骤Tab. 1 The real-time PCR reaction program of Tibet mini-pigs *IGF-1* gene

反应步骤 Cycling Steps	温度/°C Temperature	时间/s Time	循环次数 Cycles
激活 Enzyme activation	95	30	1
变性 Denaturation	95	1 ~ 5	30 ~ 40
退火/延伸 Annealing/extension	55 ~ 60	1 ~ 5	
溶解 Melt curve	65 ~ 95 (in 0.5 inc.)	2 ~ 5 sec/step	1

1.3 荧光定量数据处理及统计学分析

分别在不同的时间点选择样本,每个样本 3 个复孔。利用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行重复测量数据的方差分析。

2 结果

2.1 组织样品中总 RNA 的提取

采用琼脂糖凝胶电泳分析鉴定所取各样本,图 1 结果显示 18S 和 28S 条带清晰,可见 RNA 具有较好的完整性。

2.2 西藏小型猪 *IGF-1* 基因的实时荧光定量 PCR 检测分析

IGF-1 和 *GAPDH* 基因的扩增曲线及融解曲线如图 2。扩增曲线标准,基线期、对数期和平台期三阶段分期明显,融解曲线均在一条直线上,图形为平滑的单峰

曲线,且 T_m 温度附近无杂峰,表明引物特异性较好。

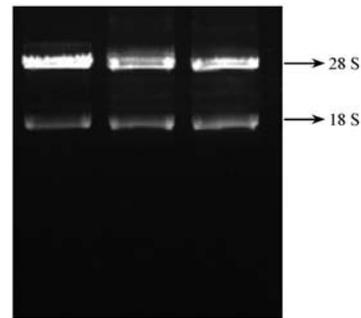
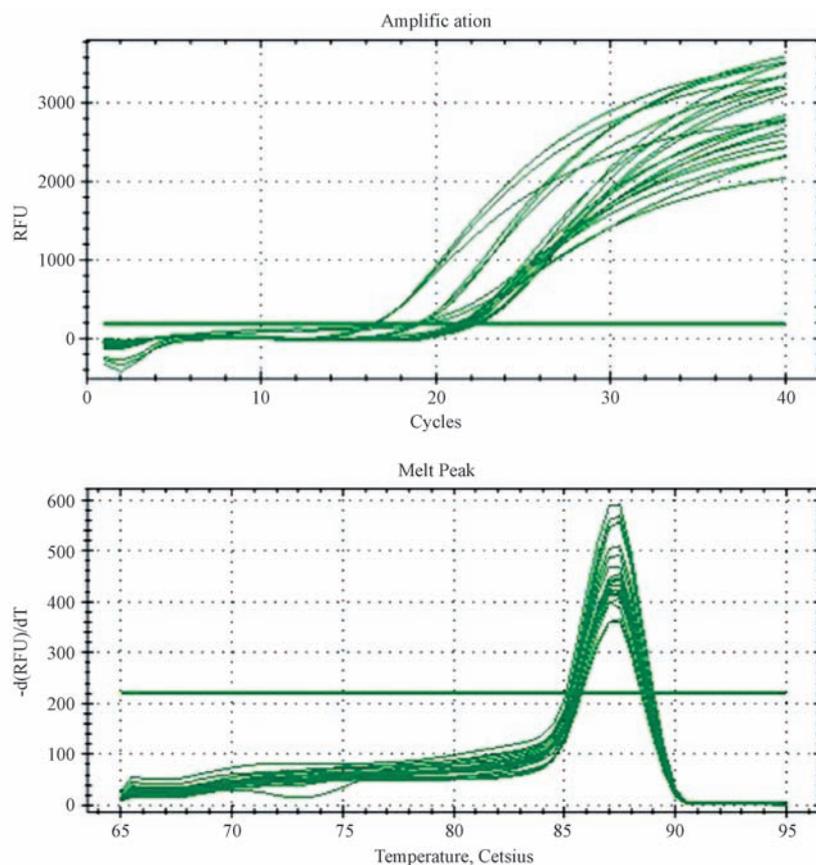


图 1 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram showing the detection of total RNA

2.3 *IGF-1* 基因在不同脏器及不同年龄阶段的组织表达分析

以 *GAPDH* 为内参,根据组织内基因扩增的域值

图 2 西藏小型猪 *IGF-1* 基因片段实时定量扩增曲线和融解曲线Fig. 2 Amplification plots and dissociation curves of Tibet mini-pig *IGF-1* gene

循环数(Ct 值),计算三种基因的 mRNA 相对表达水平。从表 2 中可以看出,在不同脏器的表达中,IGF-1 基因在 0、0.25、0.5、1、2 岁时肌肉组织的表达量最低,在 0、0.25、0.5 岁时皮肤组织中表达量最高,在 0.1、2、3 岁时肝脏组织的表达量最高。从表 3 中可以

看出,在不同年龄阶段的表达中,IGF-1 基因在 0.25 岁时达到峰值。所以西藏小型猪的生长相关基因的表达呈现出明显的时空特异性。经统计学分析发现西藏小型猪 IGF-1 基因在不同脏器中的表达差异有显著性($P < 0.05$),在不同年龄阶段差异均有显著性($P < 0.05$)。

表 2 西藏小型猪胰岛素样生长因-1 子在不同脏器中的 mRNA 相对表达($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Relative expression of IGF-1 mRNA in different organs of the Tibet mini-pigs

脏器 Organs	年龄(岁) Age (years)						
	0	0.1	0.25	0.5	1	2	3
心脏 Heart	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
肝 Liver	1.51 ± 0.37	17.26 ± 2.19	6.68 ± 2.49	10.94 ± 1.24	2.44 ± 0.33	41.50 ± 10.00	30.13 ± 6.53
脾 Spleen	1.42 ± 0.38	0.41 ± 0.14	5.38 ± 0.76	1.93 ± 0.30	0.74 ± 0.20	2.41 ± 0.15	4.15 ± 0.65
肺 Lung	0.82 ± 0.05	0.36 ± 0.17	26.44 ± 3.45	12.71 ± 1.79	6.10 ± 0.99	4.38 ± 0.64	9.01 ± 5.45
肾 Kidney	1.40 ± 0.39	0.18 ± 0.05	5.48 ± 0.71	1.02 ± 0.17	0.79 ± 0.32	2.45 ± 0.53	1.67 ± 0.24
肌肉 Muscle	0.21 ± 0.13	0.57 ± 0.25	0.19 ± 0.02	0.16 ± 0.10	0.13 ± 0.11	0.17 ± 0.07	5.44 ± 1.22
皮肤 Skin	3.99 ± 0.95	0.95 ± 0.27	76.63 ± 3.99	24.43 ± 7.71	2.38 ± 0.29	19.43 ± 3.35	0.41 ± 0.38

表 3 西藏小型猪胰岛素样生长因-1 子在不同年龄阶段中的 mRNA 相对表达($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Relative expression of IGF-1 mRNA in various organ tissues of the Tibet mini-pigs in different ages

脏器 Organs	年龄(岁) Age (years)						
	0	0.1	0.25	0.5	1	2	3
心脏 Heart	1.00 ± 0.00	8.82 ± 0.42	93.62 ± 3.91	1.92 ± 0.62	1.38 ± 0.33	1.58 ± 0.11	0.26 ± 0.09
肝 Liver	1.00 ± 0.00	153.82 ± 12.65	1239.35 ± 61.96	27.23 ± 2.00	4.09 ± 0.38	13.30 ± 0.90	7.65 ± 0.72
脾 Spleen	1.00 ± 0.00	3.39 ± 0.06	236.68 ± 24.15	2.44 ± 0.41	0.73 ± 0.19	0.74 ± 0.13	0.61 ± 0.10
肺 Lung	1.00 ± 0.00	4.42 ± 0.86	1294.42 ± 222.69	28.50 ± 1.18	15.13 ± 1.40	2.97 ± 0.09	3.59 ± 0.40
肾 Kidney	1.00 ± 0.00	3.73 ± 0.79	2578.03 ± 209.91	2.63 ± 0.65	1.75 ± 0.55	2.74 ± 0.28	0.24 ± 0.09
肌肉 Muscle	1.00 ± 0.00	18.36 ± 0.85	121.20 ± 6.00	2.04 ± 0.12	1.22 ± 0.49	0.37 ± 0.06	0.32 ± 0.02
皮肤 Skin	1.00 ± 0.00	2.27 ± 0.16	1220.25 ± 59.39	11.50 ± 1.39	0.91 ± 0.15	0.37 ± 0.08	0.69 ± 0.11

3 讨论

本研究通过实时荧光定量 PCR 测定了西藏小型猪的 IGF-1 基因在不同年龄阶段不同组织中的表达分布情况。IGF-1 基因在动物体内的表达受到了各种因素的影响,包括生长发育的阶段,体内多种激素的调控等。邓景致在 2012 年利用了实时荧光定量的方法,对 6 月龄版纳猪的 IGF-1 基因在肝组织、肌肉组织中的表达情况进行了研究,发现 IGF-1 基因在肝组织中的表达要高于肌肉组织中的表达。我们的研究发现:(1) IGF-1 基因表达的时序性在 0、0.25、0.5、1、2 岁时肌肉组织的表达量最低,在 0、0.25、0.5 岁时皮肤组织中表达量最高,在 0.1、2、3 岁时肝组织的表达量最高。(2) IGF-1 基因在 7 个不同组织中均有表达,0.25 岁时其在表达丰度由高到低依次为:皮肤、肺、肝、肾、脾、心脏和肌肉。且在皮肤中的表达量最高且极显著高于其他各组织($P < 0.01$)。同时在不同年龄阶段的表达中,IGF-1 基因 0.25 岁时在各组织中的表达均达到峰值。综上所述,西藏小型猪的 IGF-1 基因的表达呈现出明显的时空特异性,可以为未来的研究提供基础数据。

and differentiation into cholinergic neurons [J]. Neuroreport, 2006, 17(13): 1433 - 1436.

[2] Kishaba Y, Matsubara D, Niki T. Heterogeneous expression of nestin in myofibroblasts of various human tissues [J]. Pathol Int. 2010, 60(5): 378 - 385.

[3] 王玉珏,田雨光,顾为望,等. 西藏小型猪 IGF-1 基因的克隆测序分析 [J]. 中国实验动物学报,2015,23(1): 46 - 48.

[4] 窦全林,杨发龙,王杰,等. 藏系绵羊 IGF-1 基因表达水平的实时荧光定量 PCR 检测 [J]. 动物医学进展,2008,29(7): 27 - 30.

[5] 呼正祥,张金玉,孙博兴,等. 军牧 1 号公猪睾丸组织不同发育时期 IGF-1 基因表达量研究 [J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版),2011,32(2): 6 - 10.

[6] 刘海英,宋先忱,姚玉园,等. IGF-1 和 IGF-1R 基因在辽宁绒山羊皮肤组织中的表达 [J]. 黑龙江畜牧兽医,2012 年专辑, (11): 156 - 158.

[7] 常明雪,朱文奇,章玲玲等. 不同日龄鸭肝脏中 IGF-1 及 IGF-1R 基因表达规律的研究 [J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2013,34(1): 23 - 27.

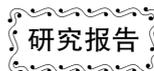
[8] Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, et al. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies [J]. Methods, 2001, 25(4): 443 - 451.

[9] 岳敏,田雨光,万斌,等. 生长激素受体基因突变对西藏藏猪生长迟缓的影响 [J]. 畜牧兽医学报,2016, 47(5): 882 - 887.

参 考 文 献

[1] Wang TT, Jing AH, Luo XY, et al. Neural stem cells isolation

[收稿日期] 2016 - 04 - 26



大鼠机械式胸外按压心肺复苏模型的建立

唐恽¹, 安庆宝¹, 付守芝², 蔡卫斌³, 王友炜¹, 马石楠¹, 胡小刚¹, 刘欣^{1*}

(1. 湖北医药学院, 湖北 十堰 442000; 2. 武汉市第三医院, 武汉 430073; 3. 中山大学, 广州 510000)

【摘要】 目的 探索用机械式胸外按压复制大鼠心肺复苏 (cardiopulmonary resuscitation, CPR) 模型的可行方法。方法 成年雄性 SD 大鼠, 随机分为对照组 ($n=6$) 与模型组 ($n=10$)。10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后行气管插管和左侧股动脉插管。在监测心电图与动脉血压条件下, 模型组行气管阻塞 (tracheal obstruction, TO), 心脏骤停 (cardiac arrest, CA) 出现 2 min 用呼吸机辅助和自制动物胸外按压仪行 CPR。结果 模型组 TO 后迅速出现自主呼吸停止, 紫绀, 心律失常, 4~5 min 出现心脏停搏, 动脉收缩压降至 40 mmHg 以下, 脉压消失, CA 出现。2 min 后给予 CPR, 8 只大鼠自主循环恢复 (return of spontaneous circulation, ROSC), 并出现一过性再灌注心律失常, 6 只大鼠恢复意识并存活 24 h。血液生化分析提示模型组大鼠存在电解质紊乱、酸中毒、肾功能损害、心肌酶谱升高。病理学切片观察发现模型组大鼠心肌横纹溶解, 肾小球无复流, 神经元减少, 肺淤血等器官损害。结论 机械式胸外按压可以提供 CA 大鼠 CPR 所需的基本心输出量, 可以成功建立大鼠 CPR 模型。

【关键词】 大鼠; 心脏骤停; 心肺复苏; 机械式胸外按压

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0632-08

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.015

Establishment of a rat model of cardiopulmonary resuscitation with mechanical chest compression

TANG Yi¹, AN Qing-bao¹, FU Shou-zhi², CAI Wei-bin³,
WANG You-wei¹, MA Shi-nan¹, HU Xiao-gang¹, LIU Xin^{1*}

(1. Hubei University of Medicine, Shiyan Hubei, 442000, China;
2. Wuhan Third Hospital, Wuhan 430073; 3. Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006.)

【Abstract】 Objective To explore the feasibility of mechanical chest compression to establish a rat model of cardiopulmonary resuscitation (CPR). **Methods** 4-month old healthy male Sprague Dawley rats were randomly divided into control group ($n=6$) and model group ($n=10$). After induction of anaesthesia with 10% chloralhydrate (3 ml/kg, i. p.), tracheal intubation and left femoral artery cannulation were performed. Under electrocardiographic and artery blood pressure monitoring, tracheal obstruction (TO) was performed to rats in model group. At 2 min after the cardiac arrest (CA) occurred, CPRs were administered to the rats using a self-made animal chest compressor, which provided chest-compression at a rate of 200 bpm. **Results** Shortly after TO, rats in the model group had respiratory arrest, cyanosis and arrhythmia. Electrocardiography indicated that CA occurred within 4–5 min, with a decreased artery systolic blood pressure (<40 mmHg) and a zero pulse pressure. Return of spontaneous circulation (ROSC) after the CPR was successfully achieved in 8 rats (80%), with a transient reperfusion arrhythmia. Finally, 60% of the rats ($n=6$) recovered to consciousness and survived for 24 hrs. The serum biochemical analysis indicated that there were electrolyte disturbances, acidosis, impaired renal functions and increased myocardial enzyme spectrum. Pathological examination revealed cardiac rhab-

[基金项目] 湖北省自然科学基金 (编号:2011CDC003); 湖北省教育厅 (编号:B20122421); 湖北医药学院优秀中青年创新团队项目 (编号:2011CXZ02); 十堰市科技局 (编号:ZD11005)。

[作者简介] 唐恽, 助理实验师, 从事人类疾病实验动物模型制作、鉴定和发病机理研究工作。E-mail: 289597557@qq.com

[通讯作者] 刘欣, 从事人类疾病实验动物模型制作、鉴定和发病机理研究工作。E-mail: 39263564@qq.com

domyolysis, no-reflow phenomenon in renal glomeruli, decrease of neurons and pulmonary congestion in the model group rats. **Conclusions** Mechanical chest compression can provide minimal cardiac output for the requirement of CPR in cardiac arrest rats. It is feasible to establish rat CPR model with the mechanical chest compression.

【Key words】 Rat; Cardiac arrest; Cardiopulmonary resuscitation; Mechanical chest compression

Corresponding author: LIU Xin. Email: 289597557@qq.com

心脏骤停 (cardiac arrest, CA) 是临床上最凶险、最危重的突发病情。全国每年约有 50 万人死于 CA。因此,有效及时的心肺复苏 (cardiopulmonary resuscitation, CPR) 对于挽救 CA 患者的生命至关重要。随着急救医学,特别是电除颤技术的发展,CPR 的成功率已经获得明显的提高。据北美的统计,全美国每年 30 余万例突发 CA 病例中,约 17% 的患者可以生存至出院^[1]。

及时有效的胸外按压,是除原发病治疗和人工通气外,CPR 能否成功的最关键因素,甚至比电除颤更为重要^[2]。传统的 CPR 由施救者徒手进行胸外按压,其疗效很大程度上依赖施救者的训练程度、手法技巧和经验水平。缺乏专业训练的人员实施徒手 CPR 成功率低。即使是经验丰富的专家施救,徒手按压也只能提供约 30% 的正常心排出量^[3],同时仍然不可避免地存在按压深度不易控制、频率快慢不一,中断频繁,操作者疲劳等不足。

上述不足可以通过机械装置予以克服。理论上,机械式胸外按压频率稳定,深度一致,不会疲劳,特别适合需要长时间救治,或是需要转运的患者。研究表明,与徒手胸外按压相比,机械式胸外按压可改善器官灌注压力,提高脑血流量和更高的呼气末的二氧化碳浓度^[4-6]。近年医疗器械厂商陆续研制出多款机械式胸外按压仪器,如 LUCAS 系列(瑞典),美 Thumper 系列(美国)心肺复苏仪等,已经在临床上被广泛使用。机械式胸外按压目前正逐步取代徒手胸外按压,成为有条件的医疗机构的首选。

然而目前在文献报道中,大多数 CPR 的动物实验研究仍然采用徒手胸外按压,机械式胸外按压造模的报道较少。本研究采用自制动物胸外按压仪,对窒息法所致的 CA 大鼠实施机械式胸外按压的 CPR,模型取得成功。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4 月龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 16 只,体重(300 ± 25) g,由湖北医药学院实验动物中心[SCXK(鄂)2016-0008]提供。动物实验在湖北医药学院实验动

物中心屏障环境[SYXK(鄂)2016-0031]内完成。

1.2 自制动物胸外按压仪

该装置由本课题组自行设计开发,由按压部分和控制器分组成,用压缩空气驱动。压缩空气经减压阀控制压力(<200 KPa)后,进入控制器。控制器由脉冲器、线圈和电磁阀组成。脉冲器向线圈输出正负向交替的脉冲信号,线圈控制电磁阀。电磁阀的开闭决定了上、下通气道的气流方向。上、下通气道与按压器的气缸连接,气流推动活塞向上或向下运动,带动按压锤按压动物胸腔或复位。上、下限位片决定活塞向上、下运动的幅度,即动物胸腔的按压深度(图 1)。经测试,该动物胸外按压仪可稳定提供固定节律(100 ~ 400 bpm,可调)和固定深度(1 ~ 5 cm,可调)的持续按压,运转良好。

1.3 模型建立

实验采用成组设计。SD 大鼠随机分为模型组($n=10$)与假手术组($n=6$)。10% 水合氯醛(Sigma 公司)腹腔注射麻醉(3 mL/kg)。无菌条件下气管插管,接动物呼吸机(成都泰盟 HX-300S)辅助通气(潮气量 15 mL,吸呼比 1:1,频率 50 breaths/min)。四肢安置电极,左侧股动脉插管,接压力换能器,生物信号记录系统(成都泰盟 BL420S)记录心电图(参数设置:增益 1 mV,时间常数 0.1 s,高频滤波 100 Hz)和动脉血压(参数设置:增益 20 mV,时间常数 DL,高频滤波 20 Hz)。上述操作完成后,将动物静置 15 min,使其血压、心率稳定。

参考发表文献,用窒息法成功构建大鼠心脏停搏模型^[7]。夹闭模型组动物气管,以动脉收缩压(systolic blood pressure, SBP)低于 40 mmHg 作为 CA。CA 2 min 后行 CPR:恢复机械通气,胸外按压仪提供机械式胸外按压(频率为 200 bpm,深度为胸廓厚度的 1/3),持续按压至自主循环恢复(return of spontaneous circulation, ROSC)。ROSC 15 min 后从动脉插管处抽取动脉血 2 mL,化验血液生化和心肌酶谱。注射等体积生理盐水以补偿血容量。待动物出现抵抗呼吸后试脱呼吸机。如自主呼吸平稳,可拔管,缝合伤口。如连续按压 15 min 仍无 ROSC,视为 CPR 失败。

假手术组按相同方案执行麻醉,气管插管,股动脉插管,记录血压。在相同时点取动脉血,以及拔管,缝合。

1.4 病理学分析

手术后存活动物于 ROSC 24 h 后处死,4% 多聚甲醛 PBS (pH 7.4) 灌注固定 40 min。取心、肾、脑、肺组织,4 °C 后固定过夜。70% ~ 100 % 梯度酒精脱水,二甲苯浸泡,石蜡包埋,切 5 μm 薄片。苏木精-伊红 (H&E) 染色,光学显微镜照像分析。

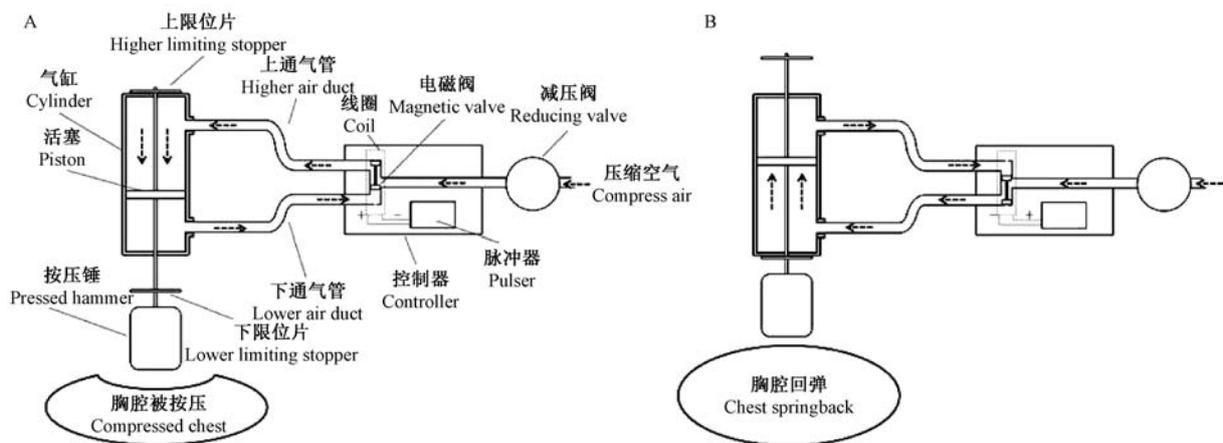
1.5 统计学分析

采用两样本均数 t 检验比较模型组与对照组血液分析指标, $P < 0.05$ 为有统计学差异。统计分析软件 SPSS 12 辅助运算。

2 结果

2.1 动物实验

大鼠麻醉、插管后,记录到血压基础水平为 130/90 mmHg 左右,心率 300 bpm。模型组与对照组无统计学差异 (表 1)。对照组从插管至撤管缝合,血压、心电图基本保持稳定。



注:压缩空气经减压阀控制压力后,进入控制器。脉冲器输出正负交替的脉冲信号(200 次/分)给线圈,线圈控制电磁阀交替开闭上、下通气管,决定气流方向和活塞上下运动,带动按压锤按压/释放。A: 脉冲器输出正向脉冲,上通气管进气,下通气管排气,活塞向下运动,动物胸腔被按压。B: 脉冲器输出负向脉冲,下通气管进气,上通气管排气,活塞向上,动物胸腔回弹。

图 1 自制动物胸外按压仪原理示意图

Note. The piston is driven up and down by compressed air flowing through the electromagnetic valve. The pulser provides a pulsed current to the coil which controls the switch open and close of the valve. A: When the impulse device outputs a positive pulse, the higher air duct intake, the lower air duct exhaust, the piston move downward, an animal thoracic cavity is pressed. B: When the impulse device outputs a negative pulse, the lower air duct intake, the higher air duct exhaust, the piston move upward, the animal thoracic cavity is rebound.

Fig. 1 Illustration of the animal chest compressor.

表 1 两组大鼠基础生理参数 ($\bar{x} \pm s$)

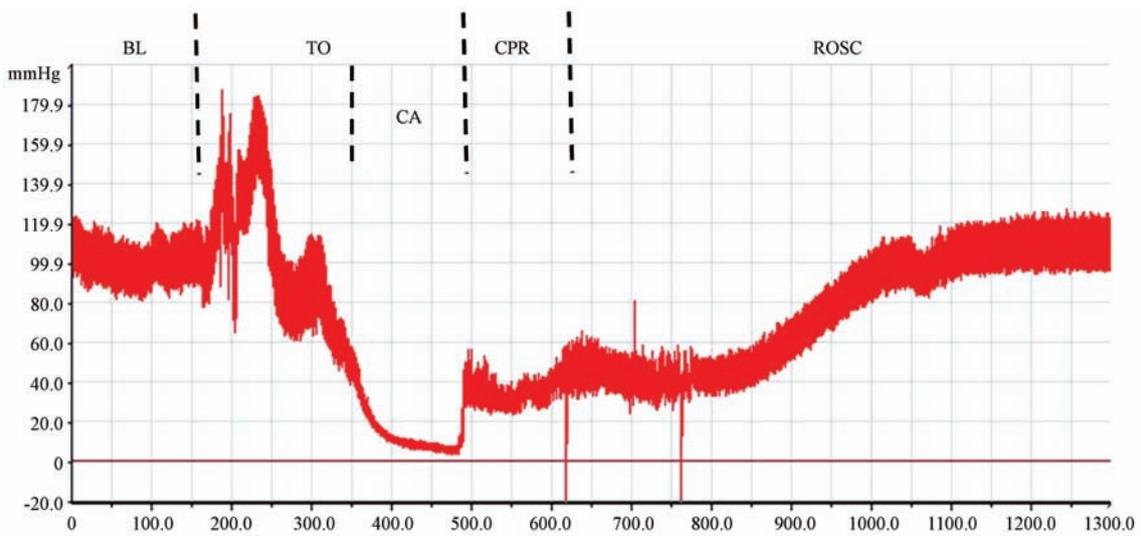
Tab. 1 Basic physiological variables of rats in the two groups

分组 Group	体重/g Body weight	收缩压/mmHg SBP	舒张压/mmHg DBP	脉压差/mmHg PP	心率/bpm HR
对照组 control	311.0 \pm 7.9	130.8 \pm 25.2	88.3 \pm 19.2	42.5 \pm 9.1	317.0 \pm 22.8
模型组 model	312.3 \pm 11.4	131.5 \pm 16.8	93.0 \pm 15.0	38.5 \pm 5.8	316.7 \pm 22.8

模型组大鼠插管后血压平稳 (图 2 BL), 心率呈窦性, 300 ~ 350 bpm (图 3a)。气管夹闭后大鼠立刻出现剧烈挣扎, 试图张口呼吸, 血压短暂上升 (图 2 TO)。1 min 后挣扎及呼吸运动停止, 动物口唇黏膜、肢端出现明显紫绀, 血压开始下降。夹闭气管 2 ~ 3 min, 心电图出现, 房室分离、频发室早等心律失常。4 ~ 5 min, 出现窦性停搏, 心电呈长时间直线, 偶发缓慢交界性或室性逸搏, 30 ~ 50 bpm (图 3b)。

收缩压骤降至 40 mmHg 以下, 脉压消失 (图 2 CA)。此时记为 CA 开始。CA 出现 2 min 后开始 CPR。胸外按压仪提供的机械式胸外按压使血压迅速恢复到 60/25 mmHg 左右 (图 2 CPR), 紫绀开始减轻。10 例模型组大鼠中, 8 例成功恢复自主心跳。从开始按压到 ROSC, 平均时间为 260 s。ROSC 后大鼠血压稳定上升, 脉压增大, 10 min 后恢复至基础血压水平 (图 2 ROSC)。2 例 CPR 15 min 后仍无自主心

跳而死亡。

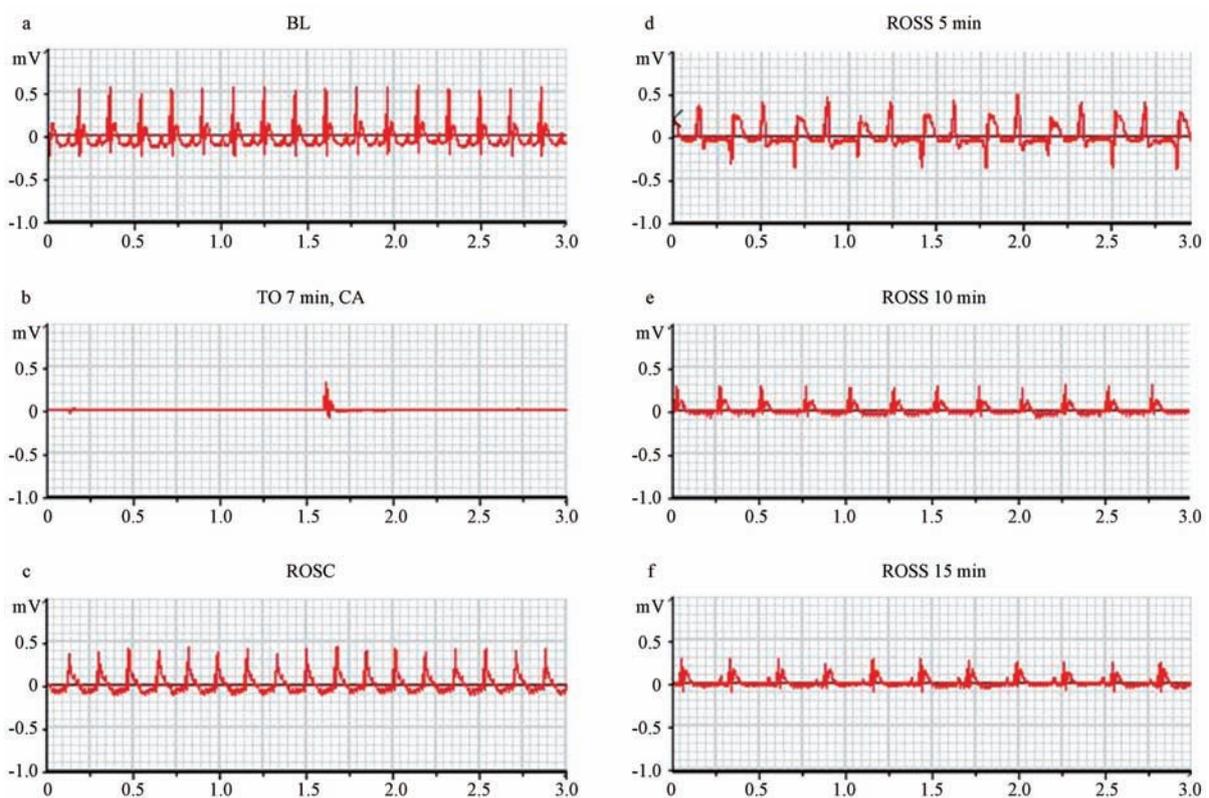


注:BL: 术前基础水平;TO: 气道阻塞;CPR: 心肺复苏;CA: 心跳骤停;ROSC: 自主循环恢复。

图 2 实验组大鼠血压变化

Note. BL: Base level;TO: Tracheal obstruction;CA: Cardiac arrest; CPR: Cardiopulmonary resuscitation;ROSC: Return of spontaneous circulation.

Fig. 2 The blood pressure of a rat in model group.



注:a: 术前基础水平 (BL);b: 气管阻塞 (TO) 7 min, 心跳骤停 (CA) 发生;c: 心肺复苏 (CPR) 5 min, 自主循环恢复 (ROSC);d-f: ROSC 后 5 min (d), 10 min (e) 与 15 min (f)。

图 3 实验组大鼠心电图变化

Note. a: The preoperative base level (BL); b: Tracheal obstruction (TO) for 7 minutes, cardiac arrest (CA) occurred; c: Cardiac arrest (CA) for 5 minutes, return of spontaneous circulation (ROSC); d-f: At 5 minutes (d), 10 minutes (e) and 15 minutes (f) after ROSC.

Fig. 3 Typical ECGs of a rat in the model group.

成功 ROSC 的大鼠 ($n = 8$), 自主心跳恢复时, 心电图均呈现窦性心律, 心率 310 bpm 左右 (图 3c)。ROSC 5 min 左右, 所有大鼠均出现心律失常, 以频发室早和室早二联律为主 (图 3d)。符合再灌注心律失常表现。持续 4~5 min 后心律失常消失, 恢复窦性心律, 但心率和 QRS 电压均偏低 (图 3e, f)。符合再灌注后心肌顿抑的表现。

所有恢复自主心跳的大鼠, 在 ROSC 后 20 min 左右出现自主抵抗呼吸, 呼吸机撤机后自主呼吸均匀平稳。拔管、缝合后, 其中 2 例大鼠未能苏醒, 于术后 2 h 内死亡。其余 6 例术后 60 min 左右苏醒, 存活至术后 24 h 取材。

2.2 血液生化分析

电解质分析发现 (表 2), 与对照组相比, 模型组大鼠术后血磷浓度显著升高近一倍 ($+96.2\%$, $P <$

0.01), 血钾、血镁分别升高 15.8% 与 46.0% , 但统计学分析未见显著性差异。血钠、氯、钙无明显差异。

间隙模型组血碳酸氢根下降 47.1% , 阴离子升高 48.6% , 差异有显著性 ($P < 0.01$)。符合代谢性酸中毒表现。

肾功能分析, 模型组血肌酐显著升高 26.2% ($P < 0.05$), 肾小球率过滤显著降低 62.3% ($P < 0.05$), 血尿酸显著升高约 1.5 倍 ($+153.1\%$, $P < 0.01$), 血尿素氮、血糖、血渗透压无明显变化。

心肌酶谱分析, 模型组肌酸激酶显著升高约 3 倍 ($+309.5\%$, $P < 0.05$), 羟丁酸脱氢酶显著升高约 12 倍 ($+1194.0\%$, $P < 0.01$), 肌酸激酶同工酶显著升高 3.6 倍 ($+365.0\%$, $P < 0.05$), 乳酸脱氢酶显著升高约 11 倍 ($+1100.4\%$, $P < 0.01$)。提示模型组出现严重心肌损伤。

表 2 两组大鼠术后血生化分析比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of post-operative biochemical data between the two groups

指标 Items	单位 Unit	对照组 Control	模型组 Model	P 值 p value
钾 K	mmol/L	4.80 ± 1.20	5.56 ± 0.87	0.29
钠 Na	mmol/L	141.77 ± 2.91	142.93 ± 4.49	0.70
氯 Cl	mmol/L	102.07 ± 1.76	100.10 ± 3.09	0.34
钙 Ca	mmol/L	2.21 ± 0.12	2.30 ± 0.12	0.32
磷 P	mmol/L	1.86 ± 0.49	3.65 ± 0.83**	<0.01
镁 Mg	mmol/L	0.76 ± 0.13	1.11 ± 0.27	0.08
碳酸氢根 HCO ₃ ⁻	mmol/L	23.01 ± 0.16	12.17 ± 2.25**	<0.01
阴离子间隙 AG	mmol/L	23.60 ± 2.45	35.06 ± 4.42**	<0.01
尿素氮 Bun	mmol/L	7.35 ± 0.52	8.30 ± 0.93	0.14
肌苷 Scr	μmol/L	43.33 ± 7.81	54.69 ± 5.76*	0.03
尿酸 UA	μmol/L	110.10 ± 63.04	278.67 ± 64.20**	<0.01
肾小球滤过率 GFR	m/min	6199.67 ± 3523.30	2340.17 ± 1028.09*	0.03
葡萄糖 Glu	mmol/L	17.30 ± 2.00	20.06 ± 8.56	0.61
渗透压 Mosm	msm/L	298.67 ± 3.30	303.20 ± 4.89	0.18
乳酸 LA	mg/dL	56.03 ± 11.15	119.2 ± 11.96**	<0.01
超敏 C 反应蛋白 CRP	mg/L	0.40 ± 0.26	0.30 ± 0.09	0.41
肌酸激酶 CK	IU/L	1798.00 ± 472.22	7362.50 ± 1881.11**	<0.01
羟丁酸脱氢酶 HBDH	IU/L	113.00 ± 17.32	1462.17 ± 773.52*	0.02
肌酸激酶同工酶 CKMB	U/L	563.00 ± 112.66	2617.67 ± 570.20**	<0.01
乳酸脱氢酶 LDH	IU/L	553.67 ± 18.23	6646.50 ± 3148.68**	<0.01

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

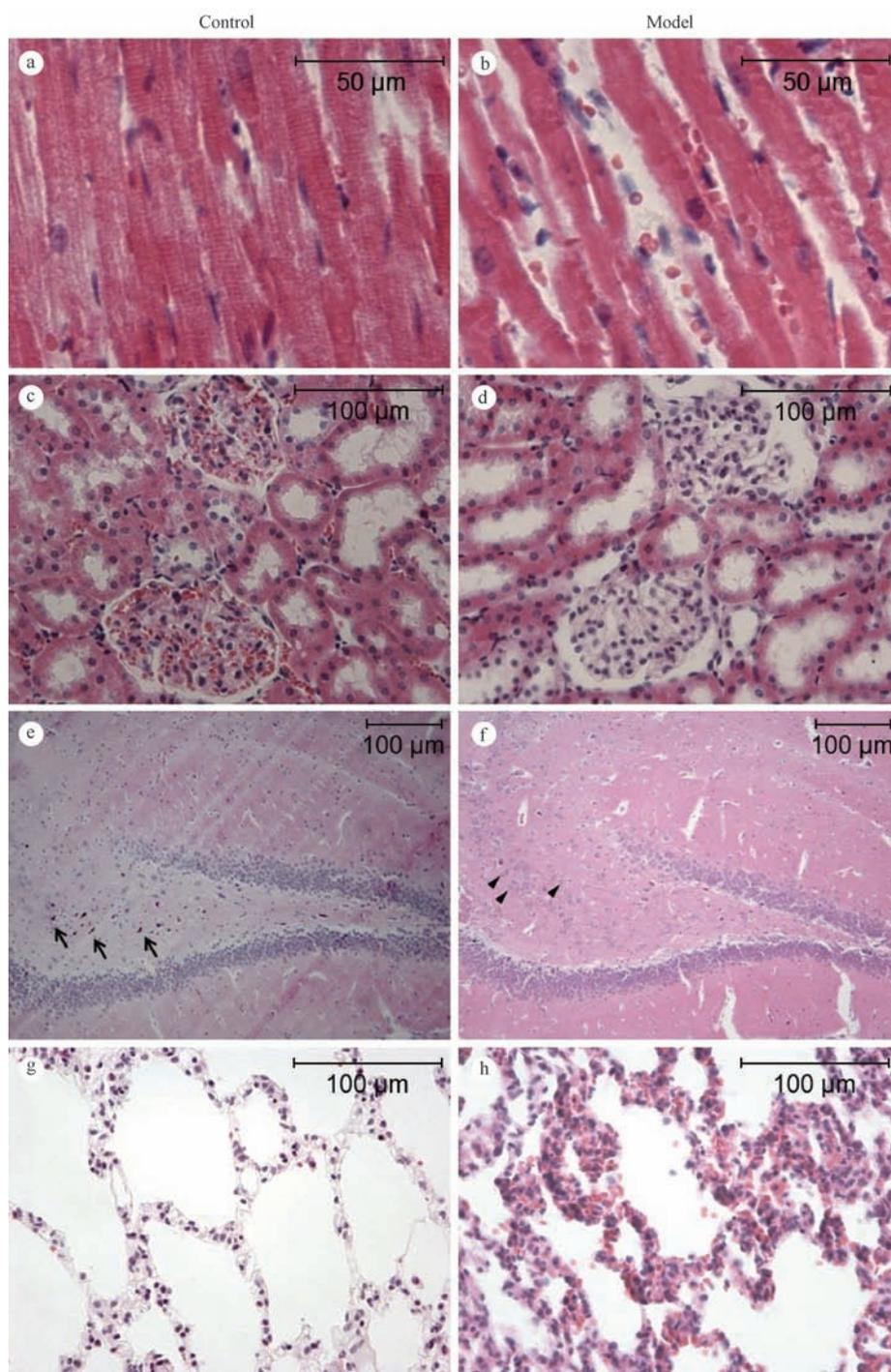
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.3 病理学分析

实验组存活大鼠 ($n = 6$) 中, 肉眼观双肺和肝脏全部可见明显点状和斑状出血灶。双肾见片状苍白灶 ($n = 3$) 或全肾苍白 ($n = 3$)。心脏和脑组织肉眼观无明显异常。

对照组心肌纤维形态、排列正常, 可见清晰横纹 (图 4a); 模型组心肌, 肌纤维紊乱、肿胀, 横纹消失 (图 4b), 提示心肌严重受损。对照组肾皮质可见肾

小球充盈, 内有大量红细胞 (图 4c); 模型组肾小球内塌陷, 无血细胞灌注 (图 4d), 提示肾脏存在无复流现象。对照组海马 DG 区分子层可见散在神经元, 呈树突状, 胞质嗜碱性 (图 4e); 模型组海马 DG 区神经元明显减少, 神经胶质细胞胞质肿胀 (图 4f), 提示存在脑损害。对照组肺泡清晰, 无细胞及填充物 (图 4g); 模型组肺泡内见大量血细胞渗出 (图 4h), 符合休克肺的病理改变。



注:a: 对照组心肌;b: 模型组心肌;c: 对照组肾皮质;d: 模型组肾皮质;e: 对照组海马 DG 区, 箭头指示神经元;f: 模型组海马 DG 区;g: 对照组肺组织;h: 模型组肺组织。

图 4 大鼠组织石蜡切片 H&E 染色

Note. a: Myocardium of a control rat. b: Myocardium of a model group. c: Renal cortex of a control rat. d: Renal cortex of a model rat. e: Dentate gyrus in a control rat. Arrows indicate neurons. f: Dentate gyrus of a model rat. g: Lung tissue of a control rat. h: Lung tissue of a model rat.

Fig. 4 Histological changes in some organ tissues of the rats. H&E staining

3 讨论

胸外按压是 CPR 的关键环节。高质量的胸外按压需要足够的按压深度,适当恒定的按压频率,充分的胸廓回弹,尽可能不中断^[8]。完全满足这些要求对徒手按压而言是非常困难的,但对机械按压而言,则是可以实现的。

遗憾的是,最新研究表明,现阶段机械式胸外按压的有效性并不优于徒手胸外按压。Rubertsson 等^[9]研究了 2008 年 1 月至 2013 年 2 月间,从 6 个欧洲急救中心例 2589 名的在院外 CA 病例,其中 1289 例接受徒手胸外按压,另 1300 例为机械式胸外按压,两组患者均按指南要求吸氧和用药。最终两组患者在 4 h 存活率,6 个月生存率和神经功能评分等方面均无明显差别。这说明目前临床采用的机械式胸外按压还有待进一步完善。例如需要在个性化等方面进行深入研究:针对不同原始疾病,不同 CA 类型、阶段,不同个体状态进一步细化施救方案。这些研究需要相应的动物模型平台予以支撑。

目前 CPR 研究中较常采用的模型动物是猪、犬、羊等大型动物。大型动物体积与人类接近,对缺血、缺氧损害的耐受性较好,成功率高。但另一方面,大型动物也存在基因背景复杂,个体间差异大,相关试剂、抗体缺乏,成本高昂等不足。实际上,大鼠也是 CPR 研究非常理想的模型动物。大鼠除基础心率(260 ~ 450 bpm)显著快于人类外,其他主要血流动力学生理指标,如平均血压(80 ~ 100 mmHg)、右心房压(-2 ~ 8 mmHg)、冠脉灌注压(80 ~ 85 mmHg)等均与人类接近^[10]。与大型动物相比,大鼠具有基因背景明确,个体差异小,容易实现方案标准化,相关试剂、抗体非常丰富等突出优点。此外,目前国内外已培育出数千种转基因大鼠和基因敲除大鼠,可进行深入的机制研究。这些优势都是大型动物研究无法比拟的。

为了规范 CPR 的动物实验,美国心脏病学会等 8 个组织联合制定了复苏实验研究 Utstein-style 指南^[11],根据不同的 CA 发病机制,规范了不同的造模方案,包括:压迫心底血管丛法、电流致颤法、过量氯化钾注射法和窒息法,分别用于复制电机械分离、室颤、心脏停搏和缺氧导致的 CA^[12]。

目前的 CA 动物模型采用最多的是电流致颤法。室颤是心源性 CA 最常见的类型,也是针对性治疗手段较多,抢救成功率相对较高的类型。本研

究未采用电流致颤法是因为大鼠基础心率较快,室颤后即使不给予胸外按压,也可以出现心律自发转复。不便于衡量评价胸外按压的效果。窒息法也是较早应用的 CA 造模方法之一。此方法很好地模拟出气道异物、自缢、缺氧等常见的非心源性 CA,主要呈现为心脏停搏^[13]。在临床 CA 病例中,停搏比室颤抢救难度更大,死亡率更高。这是因为停搏通常意味着心肌广泛严重受损。而目前心肺复苏指南中,大多数抢救措施,如电除颤、利多卡因注射等,主要是为了消除室颤。对于停搏,只能通过尽量优化通气-按压方案,尽可能有效地恢复心脏以及全身器官的血流供应,最大限度地挽救受损心肌细胞。

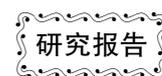
本研究选择窒息法建立 CA。受试大鼠出现自主心跳呼吸停止,有效循环丧失,脉压消失,处于临床死亡状态。术后血液生化提示电解质紊乱、酸中毒、肾功能受损、心肌酶谱显著上升;病理学观察到心肌横纹溶解、肾小球无复流现象、脑损害、肺淤血等严重系统性缺血损害,证明模型大鼠出现与 CA 患者类似的临床表现,CA 模型成功。而给予机械式胸外按压和人工通气后,CA 大鼠收缩压迅速恢复到 60 mmHg 以上,脉压恢复,大多数大鼠最终恢复心跳、自主呼吸血压和意识,并且按压锤有海绵包裹,在按压过程中有缓冲作用,大鼠均未出现因胸外器械按压所致的胸骨或肋骨骨折。说明动物胸外按压仪运转良好,所提供的机械式胸外按压能够满足最基本的心射泵血要求。我们的研究充分证明机械式胸外按压可以用于大鼠 CPR 造模。

与徒手按压造模相比,机械式按压造模除了更接近临床上日益增多的机械式按压抢救外,还具有实验条件一致,结果稳定可靠,可重复性好等优点。为进一步优化 CPR 方案,试验各种急救药物,防治缺血-再灌注损伤,以及探讨机制等深入研究创造了良好的实验平台。

参 考 文 献

- [1] Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al: Heart disease and stroke statistics—2013 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation* 2013, 127(1):e6-e245.
- [2] Ristagno G, Tang W, Chang YT, et al. The quality of chest compressions during cardiopulmonary resuscitation overrides importance of timing of defibrillation [J]. *Chest* 2007, 132(1):70-75.
- [3] Rubertsson S, Grenvik A, Zengulis V, et al. Systemic perfusion pressure and blood flow before and after administration of epinephrine during experimental cardiopulmonary resuscitation [J]. *Crit Care Med* 1995, 23(12):1984-1996.

(下转第 658 页)



凝血酶法致大鼠血液高凝态模型的建立

王立文¹, 沈晓洁^{1*}, 吴倩^{2*}, 嵇莹莹², 龚国清²

(1. 无锡卫生高等职业技术学校护理系, 江苏 无锡 214028; 2. 中国药科大学药学院药理学系, 南京 210009)

【摘要】 目的 探索静脉注射凝血酶造成大鼠高凝态模型, 为高凝态的研究提供合适动物模型。方法 SD大鼠分为六组, 分别于股静脉恒速注射生理盐水和2.5、5、10、20、40 U/kg 凝血酶溶液, 5 min内采血测活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、纤维蛋白原(fibrinogen, FIB), 并观察大鼠死亡情况以确定最佳凝血酶剂量。在此基础上, 以最佳剂量凝血酶溶液股静脉注射给予大鼠, 分别于0、10、30、60、120、180、300 s采血测 APTT、PT、FIB 以确定最佳采血时间。最后将大鼠分为生理盐水组与凝血酶组(最佳凝血酶剂量和采血时间), 采集血样测定 APTT、PT、FIB 以及全血粘度。结果 10 U/kg 凝血酶组大鼠血浆 APTT、PT 明显缩短, FIB 明显升高, 且大鼠死亡率低。注射凝血酶后 60 s 大鼠血浆 APTT、PT 缩短最多, FIB 含量升至最高。同生理盐水组相比, 凝血酶组大鼠血浆 PT、APTT 显著缩短, FIB、全血粘度显著增大, 且差异有显著性($P < 0.05$)。结论 注射凝血酶溶液可复制大鼠血液高凝态模型, 最佳凝血酶剂量为 10 U/kg, 凝血酶浓度为 2 U/mL, 最佳采血测试时间为 60 s。

【关键词】 大鼠; 高凝态; 凝血酶; 静脉注射; 股静脉

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0639-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.016

Establishment of a rat model of blood hypercoagulable state caused by intravenous injection of thrombin

WANG Li-wen¹, SHEN Xiao-jie^{1*}, WU Qian^{2*}, JI Ying-ying², GONG Guo-qing²

(1. Department of Nursing, Wuxi Healthcare Vocational Technology School, Wuxi, Jiangsu 214028, China;

2. Faculty of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to establish a rat model of blood hypercoagulable state by intravenous injection of thrombin and to provide a model for researches on hypercoagulable state. **Methods** Rats were divided into six groups and were injected with normal saline and 2.5, 5, 10, 20, 40 U/kg thrombin solution through the femoral vein, respectively. Then, blood was drawn to test the activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT) and fibrinogen (FIB), and to observe the death rate of rats in these groups to verify the optimal dosage. On this basis, rats were injected thrombin of the best dose through the femoral vein, and blood samples were collected at 0, 10, 30, 60, 120, 180, 300 (s) to test APTT and PT and FIB for determining the best time for blood sampling. At last, the rats were divided into control group and thrombin group to inject normal saline or thrombin solution in the best dose via the femoral vein, and blood was taken at the best time to test APTT, PT, FIB and whole blood viscosity. **Results** APTT and PT values of the 10 U/kg thrombin group were the shortest, and FIB value of this group was the highest among these groups. APTT and PT values of blood sample collected at about 60 s after thrombin injection were the shortest, and FIB value was the highest. Compared with the control group, PT and APTT values of the thrombin group were shorter ($P < 0.05$), and blood viscosity and FIB were higher ($P < 0.05$). **Conclusions** Injecting thrombin solution into the femoral vein can be used to establish a rat model of hypercoagulable state. The best dose of thrombin solution is 10 U/kg in a concentration of 2 U/mL. The best time to collect blood sample is 60 s.

[基金项目] 无锡市医院管理中心科研项目(YGZXMI533)。

[作者简介] 王立文(1968-), 男, 副教授, 研究方向: 外科学。

[通讯作者] 沈晓洁, wxwxsxj@sina.com; 吴倩, wuqianepu2011@163.com

【Key words】 Rat; Hypercoagulable state; Thrombin; Intravenous injection; Femoral vein

Corresponding author: SHEN Xiao-jie, Email: wxwxsxj@sina.com; WU Qian, Email: wuqiancpu2011@163.com.

高凝状态(hypercoagulation state)是指多种因素引起的凝血与抗凝系统失调的病理过程,血液凝固性提高,具有血栓形成的趋势^[1],其特征有血液流变学异常、微循环障碍、血液凝固性升高等^[2]。凝血酶作用于凝血过程的最后环节,不需其他凝血因子参与,使纤维蛋白原向纤维蛋白转化,网状的纤维蛋白中沉积着其他血液成分,形成胶体状态的纤维蛋白凝块,从而形成血栓^[3]。在以往研究中发现,大剂量凝血酶可致家兔血小板计数降低^[4],血小板聚集、纤维蛋白大量生成而形成血液高凝状态,但未见在大鼠上用此复制高凝态的报道。本研究以凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)及全血粘度为评价指标,通过股静脉注射不同剂量的凝血酶,确定最佳剂量及采血样时间,从而建立大鼠血液高凝态模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

清洁级 SD 大鼠 72 只,雌雄各半,体重(220 ± 20)g,由浙江省实验动物中心提供[SCXK(浙)2014-0001]。所有动物于实验开始一周前开始适应新环境,昼夜明暗交替时间 12 h/12 h,自由饮水取食,温度 20 ~ 26℃,相对湿度 45% ~ 75%。

1.1.2 试剂及主要仪器

凝血酶冻干粉(规格:500 U/瓶,湖南一格制药有限公司,批号 130722-2)。凝血酶溶液配制:凝血酶冻干粉溶于 62.5 mL 生理盐水配制成 8 U/mL 凝血酶溶液;取 8 U/mL 凝血酶溶液 10 mL 加入 10 mL 生理盐水得 4 U/mL 凝血酶溶液,同法配制 2、1、0.5 U/mL 凝血酶溶液。

水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号:20150303),氯化钠(南京化学试剂一厂,批号:02081625),二水合柠檬酸三钠(南京化学试剂有限公司,批号:14061111286),FIB 试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20140103),APTT 试剂盒(上海太阳生物技术有限公司,批号:118120),PT 试剂盒(上海太阳生物技术有限公司,批号:105272);分析天平(上海海桥精密仪器公司),台式离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司),AYW8003 半自动凝血分析仪(南京瑞麦科技开发有限公司),WZ-50C6 微量注射泵

(浙江史密斯医学仪器有限公司),SA-5600 自动血流变测试仪(北京赛科希德科技发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 凝血酶剂量的确定

大鼠 48 只随机分为 6 组,雌雄各半,麻醉后分离股静脉和颈总动脉插管,股静脉插管通过注射器与微量注射泵相连。将 0.5、1、2、4、8 U/mL 凝血酶溶液分别按 2.5、5、10、20、40 U/kg 剂量通过微量注射泵自股静脉注射入大鼠体内,注射速度为 6 mL/min,生理盐水组大鼠以相同速度注射生理盐水。于注射凝血酶(生理盐水)后 5 min 内自颈总动脉采集血样,置于枸橼酸钠抗凝处理的离心管内制备血浆样品,用于测定 PT、APTT 以及 FIB。

1.2.2 采血时间的确定

大鼠 8 只,雌雄各半,分离股静脉以最佳剂量注射相应浓度凝血酶溶液,于颈总动脉采集血样,采血时间点为注射后 0、10、30、60、120、180、300 s。血样用枸橼酸钠抗凝处理,离心得血浆样品,分别测定 APTT、PT 以及 FIB 指标,确定最佳采血时间点。

1.2.3 高凝态模型建立

大鼠 16 只,雌雄各半,随机分为生理盐水组和凝血酶组,分别于股静脉注射生理盐水和最适浓度凝血酶溶液。于最佳采血时间取血,血样分为两份,分别置于含枸橼酸钠离心管制备血浆样品以及含 EDTA 离心管内制备全血样品。血浆样品用于测定 PT、APTT 及 FIB,全血样品用于血液流变学的测定。

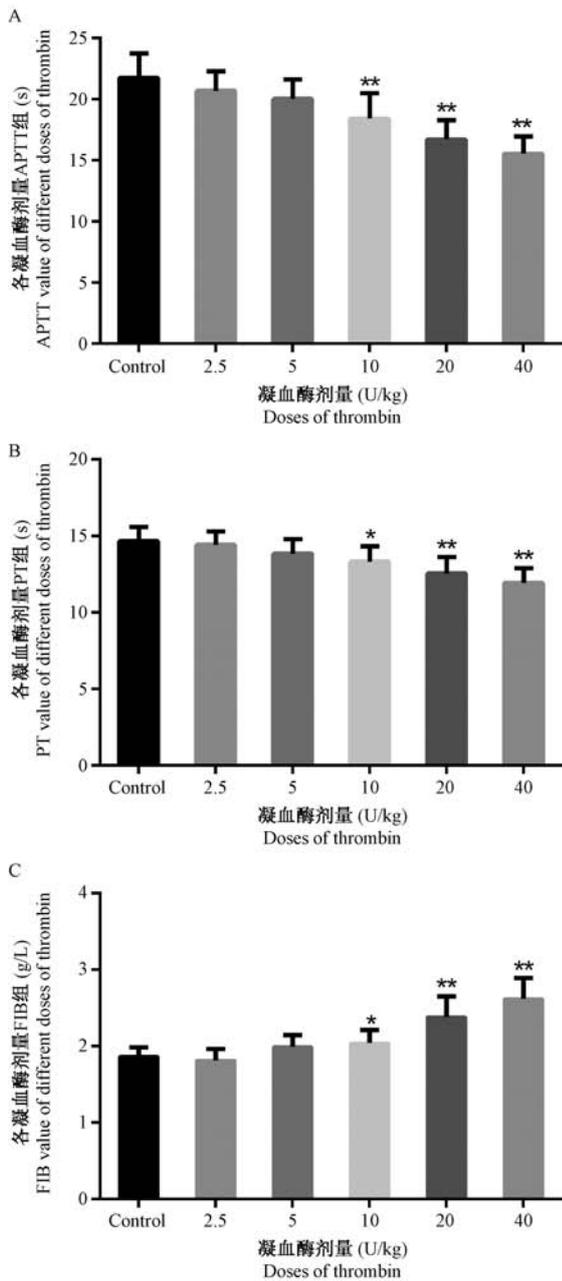
1.3 统计学处理

数据采用 SPSS 19.0 进行统计学分析,所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为有显著统计学意义。

2 结果

2.1 凝血酶剂量

各剂量凝血酶处理后大鼠血浆 APTT、PT、FIB 变化如图 1(A、B、C)所示,随凝血酶剂量升高,APTT、PT 值随之缩短,FIB 含量随之升高,且凝血酶 10、20、40 U/kg 剂量组的 APTT、PT 较生理盐水组显著缩短($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、FIB 显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。表 1 为注射各剂量凝血酶后大鼠的死亡情况,当凝血酶剂量升至 10 U/kg 时,采血过程中大鼠出现死亡现象,在 20 与 40 U/kg 剂量组死亡率较高。



注:A:APTT;B:PT;C:FIB。同生理盐水组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 1 注射不同剂量凝血酶后大鼠血浆 APTT、PT、FIB 值

Note. A: APTT; B: PT; C: FIB. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fig. 1 Values of plasma APTT, PT and FIB in the rats after injecting different doses of thrombin

表 1 注射不同剂量凝血酶后大鼠死亡情况 ($n = 8$)

Tab.1 The death rates of rats after injection of different doses of thrombin

凝血酶剂量/U/kg Dose of thrombin	死亡数/只 Number of dead rats	死亡率/% Death rate
生理盐水 Saline	0	0
2.5	0	0
5	0	0
10	1	12.5
20	3	37.5
40	4	50

2.2 采血时间

图 2 为注射 10 U/kg 凝血酶后各时间点大鼠血浆 APTT、PT 和 FIB 值,在注射凝血酶后 60 s 内,APTT、PT 逐渐缩短,FIB 含量逐渐升高;在 60 s 后,APTT、PT 逐渐延长,FIB 含量逐渐降低。且在 60 s 时 APTT、PT 值降至最低,FIB 含量升至最高。

2.3 模型建立

表 2 为注射生理盐水及 10 U/kg 凝血酶后 60 s 时采血所测得的血浆 PT、APTT 及 FIB 结果,表 3 为全血粘度结果。同生理盐水组相比,凝血酶组 PT、APTT 降低且均有统计学差异($P < 0.05$),FIB 升高、全血粘度增大且亦有统计学差异($P < 0.05$)。

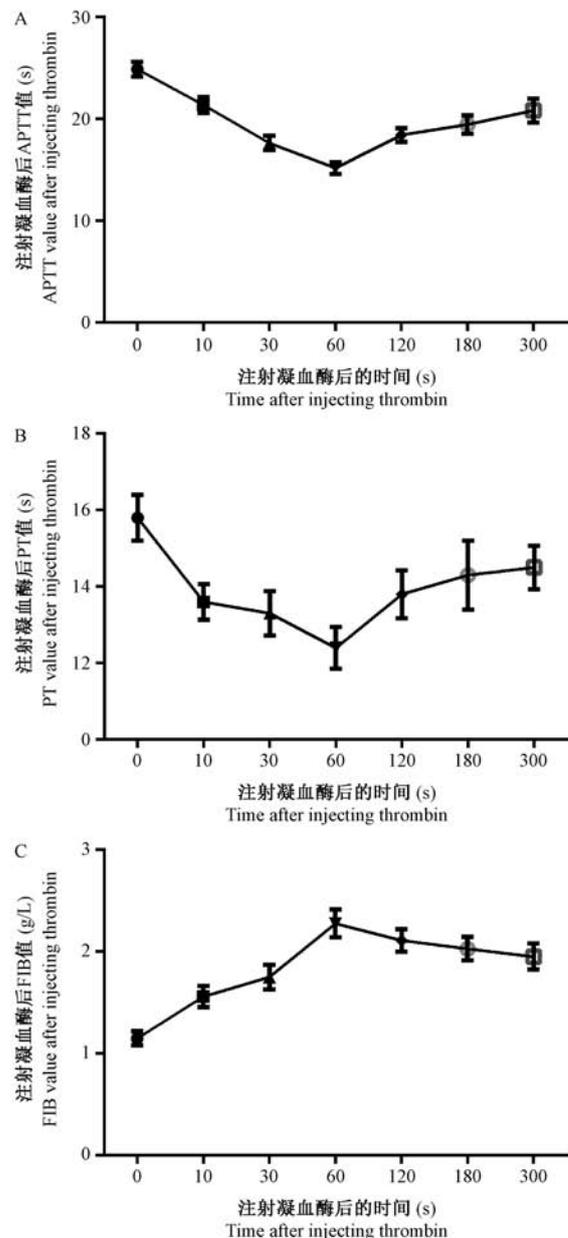


图 2 注射 10 U/kg 凝血酶后各时间点大鼠血浆 APTT(A)、PT(B)、FIB(C)值

Fig. 2 Values of plasma APTT, PT and FIB in the rats at different time points after 10 U/kg thrombin injection

表 2 注射 10 U/kg 凝血酶或生理盐水后大鼠血浆 PT、APTT、FIB($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab. 2 The values of plasma PT, APTT and FIB in the rats after injection of 10 U/kg thrombin solution and normal saline

组别 Group	PT/s	APTT/s	FIB/g/L
生理盐水组 Control group	15.13 ± 0.83	24.73 ± 2.45	1.14 ± 0.25
凝血酶组(10 U/kg) Thrombin group	14.07 ± 0.65 *	17.60 ± 1.95 **	2.02 ± 0.14 *

注:与生理盐水组对比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

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

表 3 注射 10 U/kg 凝血酶或生理盐水后大鼠全血粘度($\bar{x} \pm s, n = 8, s$)

Tab. 3 Whole blood viscosity of blood in the rats after injection of 10 U/kg thrombin solution and normal saline

组别 Groups	200	100	30	5
生理盐水组 Control group	5.64 ± 0.34	6.01 ± 0.64	7.26 ± 0.82	15.60 ± 2.03
凝血酶组(10U/kg) Thrombin group	5.69 ± 0.69	7.03 ± 0.67 **	8.73 ± 1.27 *	18.53 ± 1.27 **

注:与生理盐水组对比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

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

3 讨论

凝血是生理性止血的重要环节,对人体健康和生命至关重要。凝血可以有助于伤口的愈合以及防止过度出血,但在某些病理状态下的凝血则加重疾病风险^[5],与此同时高凝态和血栓常常伴随疾病产生。临床研究发现,在儿童川崎病中,高脂血症既可加重心脏病的发病风险,又会促进血液高凝态的形成^[6];在糖尿病肾病中,血浆 VWF 升高、ADAMTS13 酶水平降低所致的血液高凝状态会加重糖尿病肾病的心血管疾病风险^[7];在肿瘤疾病中,癌症易继发血液高凝态甚至血栓形成,而血小板激活、凝血和纤溶功能紊乱对于肿瘤的生长、分化、血管生成和转移亦有促进作用^[8]。在临床前研究中,建立动物高凝态模型,既有助于筛选抗凝药物以预防血栓疾病及其他疾病的辅助治疗,又有利于对高凝态形成机制的深入研究。

凝血酶(凝血因子 IIa)是一种由基因编码的丝氨酸蛋白酶,它是凝血酶原裂解的产物,通过凝血级联反应抑制血液的流失^[9]。凝血酶作为强效血小板活化物质,通过作用于血小板膜上糖蛋白 Iba (GPIIb)及蛋白酶活化受体(PAR)1 和 PAR4 将信号传递给血小板,从而诱导血小板聚集反应^[10]。因此,凝血酶在凝血过程中起着至关重要的作用,它通过激活血小板、促进纤维蛋白原向纤维蛋白的转化过程发挥其促凝作用。过往研究当中发现,大剂量凝血酶可使家兔血小板计数降低^[4]、血小板聚集、纤维蛋白大量生成而促使血液转变为高凝状态,由此提示凝血酶可作为动物高凝态模型的造模工具。

目前高凝态模型如急性血瘀模型、气虚血瘀模型、高脂寒凝模型等^[11],虽能复制高凝态模型,但造模时间较长、对动物损伤极大,动物耐受性差,所以制作方法简单、对动物损伤小的实验模型很有必要。研究发现,快速静脉注射大剂量凝血酶可使血小板计数在 5 min 之内显著降低^[4]。通过注射凝血酶,可以使血小板高度聚集、纤维蛋白原转化为纤维蛋

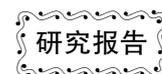
白,促进血液高凝态的形成,以此构建动物模型。

本研究表明,大鼠股静脉快速注射 10 U/kg 凝血酶后,血液在 60 s 左右时处于高凝状态,其血浆 APTT、PT 显著缩短,FIB 含量显著升高,全血粘度增大。与目前现有的其他模型比较,该方法简单易行,耗时短,较好地复制大鼠高凝状态,可作为研究抗凝药物、高凝态机制的理想模型。

参 考 文 献

- [1] 游莉,冷平,邓富贵. 血栓前状态实验室检查的国内研究现状[J]. 四川省卫生管理干部学院学报, 2003, 22(1): 36-38.
- [2] 孙丽清,林玉仙,林信恒. 凝血酶应用于鼻科止血 65 例[J]. 医药导报, 1998, 18(4): 247.
- [3] 李学荣,李荣亨,徐丹. 复元胶囊对气虚血瘀证模型大鼠血液高凝状态的影响[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(1): 140-141.
- [4] Davis RB, Palmer MJ. Thrombocytopenia and release of platelet amines induced by thrombin and bacterial lipopolysaccharide. Observations after infusion of low molecular weight dextran [J]. Br J Exp Pathol, 1965, 46(5): 554-63.
- [5] 史健硕,谭伟强,崔欢,等. 凝血酶受体拮抗剂在抗血栓方面的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2014, 24(2): 129-137.
- [6] Chen X, Zhao ZW, Li L, et al. Hypercoagulation and elevation of blood triglycerides are characteristics of Kawasaki disease [J]. Lipids Health Dis, 2015, 14: 166.
- [7] Domingueti CP, Dusse LM, Carvalho Md, et al. Hypercoagulability and cardiovascular disease in diabetic nephropathy [J]. Clin Chim Acta. 2013, 415: 279-285.
- [8] Ventura JS, Faria F, Batista IF, et al. A Kunitz-type FXa inhibitor affects tumor progression, hypercoagulable state and triggers apoptosis [J]. Biomed Pharmacother, 2013, 67: 192-196.
- [9] Sato N, Ichikawa J, Wako M, et al. Thrombin induced by the extrinsic pathway and PAR-1 regulated inflammation at the site of fracture repair [J]. Bone, 2016, 83: 23-34.
- [10] Carrim N, Arthur JF, Hamilton JR, et al. Thrombin-induced reactive oxygen species generation in platelets: A novel role for protease-activated receptor 4 and GPIIb [J]. Redox Biol, 2015, 6: 640-647.
- [11] 宋程程,王志斌,苏斌,等. 常用大鼠血瘀证模型的研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(2): 94-98.

[收稿日期] 2016-05-30



高脂饲喂联合链脲佐菌素诱导的 Beagle 犬 糖尿病模型

胡娟^{1#}, 杨扬^{1#}, 米本中¹, 韦莉¹, 徐嘉红², 樵星芳^{1*}

(1. 重庆市中药研究院实验动物研究所, 重庆 400065; 2. 重庆市中药研究院科研处, 重庆 400065)

【摘要】 目的 应用高脂饲喂联合链脲佐菌素(STZ)构建 Beagle 犬 T2DM 模型,并观察其相关特征。方法 将普通级雄性 Beagle 犬 30 只随机分为 3 组:对照组,高脂组,糖尿病模型组,每组 10 只。糖尿病模型组饲喂高脂饲料同时在饲喂 2 个月时注射 STZ;高脂组饲喂高脂饲料;对照组饲喂普通饲料,连续饲喂 5 个月。定期测定动物 Lee 指数、空腹血糖、胰岛素、尿糖,并在 3 月时进行 OGTT 试验,试验结束后进行血脂等血液生化检测和肝、胰腺组织病理检查。**结果** 高脂组和糖尿病模型组高脂饲养 2 个月后 Lee 指数显著增加($P < 0.01$),并出现高胰岛素血症和胰岛素抵抗伴血脂异常;糖尿病模型组 STZ 注射后空腹血糖显著升高($P < 0.01$),且持续 3 个月维持在高血糖水平;而高脂组的空腹血糖无明显变化($P > 0.05$),糖尿病模型组 OGTT 试验 3 h 血糖值 $> 11.1 \text{ mmol/L}$,且 3 h 未恢复,胰腺组织病理学检查出现一定程度的损伤和病变。**结论** 高脂饲料饲喂诱导 Beagle 犬胰岛素抵抗和高血脂症,但未能形成高血糖状态,而高脂饲料饲喂联合注射 STZ 后 Beagle 犬在出现高血脂症的同时发生胰岛素抵抗,与人类 T2DM 的胰岛素抵抗伴高血糖、高胰岛素血症和高血脂等典型症状相似。

【关键词】 2 型糖尿病;Beagle 犬;高脂饲料;链脲佐菌素;胰岛素抵抗

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0643-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.017

A beagle model of type 2 diabetes mellitus induced by high fat diet and low dose streptozotocin injection

HU Juan^{1#}, YANG Yang^{1#}, MI Ben-zhong¹, WEI Li¹,
XU Jia-hong², QIAO Xing-fang^{1*}

(1. Laboratory Animal Institute, 2. Department of Scientific Research Management, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

【Abstract】 Objective To investigate the changes of relevant characteristics in the Beagle model of type 2 diabetes mellitus (T2DM) induced by high fat diet and low dose streptozotocin (STZ) injection. **Methods** Thirty male Beagles were randomly divided into three groups: (1) Control group ($n = 10$), fed with a standard chow. (2) High fat diet group ($n = 10$), fed with high fat diet. (3) Model group ($n = 10$), fed with high fat diet for two months and then given STZ injection. Lee index, fasting blood glucose, serum insulin levels, urine glucose and blood biochemical indexes were regularly detected. Oral glucose tolerance test (OGTT) and histopathological examination were performed. **Results** After treatment for two months, the insulin resistance and dyslipidemia appeared and Lee index significantly increased in the high fat diet group and model group ($P < 0.01$). In the diabetic beagles, fasting blood glucose levels were prominently increased ($P < 0.01$), as compared with the control group and high fat diet group, and held on a high blood glucose level for three

【基金项目】 重庆市应用开发计划项目(编号: cstc2013yykfB110003、cstc2013yykfC10005); 重庆市社会民生科技创新专项(编号: cstc2015shmszx10010)。

【作者简介】 胡娟(1985-),女,助理研究员,研究方向:模型动物与药理毒理学。Email: 361316920@qq.com。

杨扬(1983-),女,助理研究员,研究方向:实验动物与预防兽医学。Email: 499502522@qq.com。#共同第一作者

【通讯作者】 樵星芳,女,副研究员,研究方向:实验动物与动物模型。Email: 745647159@qq.com

months. Among the three groups, the dogs with OGTT values > 11.1 mmol/L and were not restored at three hours, showed some pancreatic histological damages and diseases. **Conclusions** A beagle model of type 2 diabetes mellitus is constructed, exhibiting some characteristics of human type 2 diabetes mellitus such as hyperglycemia, hyperinsulinism, dyslipidemia and other typical features.

【Key words】 Diabetes mellitus; Beagle model; High fat diet; Streptozotocin; Insulin resistance

Corresponding author: QIAO Xing-fang. E-mail: 745647159@qq.com

现代生活模式使糖尿病的发病率日趋升高,成为一种全球流行性疾病,而 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM) 的发生率就占糖尿病患者的 90% 以上,因此进行 T2DM 相关研究具有一定意义^[1]。建立稳定、可靠的糖尿病动物模型是研究 T2DM 发病机制和临床防治的基础,目前国内外关于 T2DM 动物模型的研究大多使用大、小鼠等啮齿类小型实验动物,而关于犬 T2DM 模型研究的报道却较为少见^[2]。本试验选用 Beagle 犬作为试验动物,在高脂饲养诱导胰岛素抵抗的基础上,联合小剂量链脲佐菌素(STZ)注射复制出发病机制类似于人类 T2DM 的 Beagle 犬模型,并研究其相关临床特征及生理生化特点,为 T2DM 的防治研究提供一种稳定、可靠的动物模型。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物与实验环境

普通级 Beagle 犬 30 只,6~12 月龄,雄性,重庆市中药研究院实验动物研究所提供【SCXK(渝)2012-0006】。饲养于重庆市中药研究院实验动物研究所 Beagle 犬普通环境【SYXK(渝)2012-0003】。每笼 1 只饲养,每日定时定量喂食,自由饮水;并按实验动物使用的“3R”原则给以人道主义关怀。

1.1.2 试剂

链脲佐菌素(STZ),批号 20140323,购于 Sigma 公司;犬胰岛素 ELISA 试剂盒,型号 SU10186,批号 20140615,购于上海逸晗生物科技有限公司;稳豪倍优型血糖仪,序列号 CNFNROGW,强生(中国)医疗器材有限公司生产;稳豪型血糖试纸,批号 3914611,强生(中国)医疗器材有限公司生产。

1.1.3 高脂饲料

犬高脂高热量饲料:在标准犬饲料的基础上添加 10% 猪油、10% 蛋黄粉、2.5% 胆固醇、1.5% 胆酸钠。

1.2 方 法

1.2.1 动物分组与造模

将雄性 Beagle 犬 30 只随机分为 3 组:对照组,高脂组,糖尿病模型组,每组 10 只。糖尿病模型组,饲喂高脂饲料同时在饲喂 2 个月时注射 STZ 22 mg/kg,高脂组饲喂高脂饲料,对照组饲喂普通饲料,连续饲喂 5 个月。

造模:试验 2 月末,禁食不禁水 12 h,从 Beagle 犬小隐静脉一次性静脉推注浓度为 62.5 mg/mL 的 STZ-柠檬酸溶液 0.352 mL/kg,推注剂量均 22 mg/kg,3~4 min 内推注完成。

1.2.2 Lee 指数测定

每月测动物体重、鼻肛体长,并计算 Lee 指数

$$(\text{肥胖评定指数}) = \frac{\sqrt[3]{\text{体重}(\text{g})}}{\text{体长}(\text{cm})} \times 10^3。$$

1.2.3 空腹血糖、胰岛素、胰岛抵抗指数测定

禁食不禁水 10~12 h 采血测空腹血糖、胰岛素,计算胰岛素抵抗指数 = (空腹胰岛素 × 空腹血糖)/22.5。

1.2.4 OGTT 检查

试验第 3 个月末,进行口服葡萄糖耐量试验,按 2.5 g/kg 剂量经胃管灌注 50% 葡萄糖,以葡萄糖灌注结束时为零点,于 0、30、60、90、120、180 min 采血测定血糖。

1.2.5 血液生化指标测定

试验结束后取后肢静脉血测定丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、胆碱酯酶、淀粉酶等血液生化指标。

1.2.6 晨尿尿糖检测

收集动物晨尿后 1 h 内用尿糖试纸测定试验动物晨尿的尿糖情况。

1.2.7 病理检查

将试验动物麻醉后颈动脉放血处死,采集肝脏、胰腺,4% 甲醛固定,常规石蜡切片,HE 染色,镜检观察病变情况。

1.2.8 数据统计

数据按组别以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,采用 SPSS for Windows 19.0 进行单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 Lee 指数

高脂饲养 2 个月后, 糖尿病模型组和高脂组

Lee 指数显著高于对照组 ($P < 0.05$), 提示高脂高热量饮食引发了动物肥胖; 糖尿病模型组在 4 月末注射开始消瘦, Lee 指数低于高脂组但仍高于正常对照组。(见表 1)。

表 1 各组 Beagle 犬不同时期的 Lee 指数 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Lee indexes of the Beagles in each group at different time points

分组 Groups	试验前 Before experiment	2 个月 2 months	STZ 注射后 1 月 1 month after STZ injection	STZ 注射后 2 月 2 months after STZ injection	STZ 注射后 3 月 3 months after STZ injection
对照组 Control	305.98 ± 12.77	321.98 ± 11.64	327.66 ± 12.03	331.14 ± 13.57	336.27 ± 15.83
高脂组 HF	308.45 ± 10.69	357.83 ± 15.17*	376.41 ± 14.74**	382.29 ± 16.32**	398.73 ± 13.29**
糖尿病模型组 DM	307.96 ± 10.33	351.67 ± 13.49*	360.74 ± 19.79*	353.62 ± 12.74 ^{△△}	346.96 ± 14.95 [△]

注: 与正常对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与高脂对照组相比, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ 。(下表同)

Note: [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$, compared with the high fat diet group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the control group. (The same in the following tables)

2.2 空腹血糖、胰岛素、胰岛抵抗指数

由表 2 及图 1、2 可见, 与对照组比较, 糖尿病模型组在 STZ 注射后 1 个月空腹血糖显著升高 ($P < 0.01$), STZ 注射后 2 个月略有下降但仍保持在高血糖状态, STZ 注射后 3 个月基本稳定, 具有较好的持续稳定性, 但高脂组的空腹血糖未见明显变化 ($P >$

0.05)。高脂组和糖尿病模型组经 2 个月高脂饲养后空腹胰岛素和胰岛抵抗指数显著增高 ($P < 0.01$), 产生了胰岛抵抗, 糖尿病模型组在 STZ 注射后 1 个月时空腹胰岛素略有下降, 但胰岛抵抗更为显著。见表 2。

表 2 各组 Beagle 犬不同时期的空腹血糖 (FBG, mmol/L)

Tab. 2 Fasting blood glucose of the Beagles in each group at different time points

分组 Groups	试验前 Before experiment	2 个月 2 months	STZ 注射后 1 月 1 month after STZ injection	STZ 注射后 2 月 2 months after STZ injection	STZ 注射后 3 月 3 months after STZ injection
对照组 Control	5.13 ± 0.41	5.04 ± 0.72	5.37 ± 0.68	5.29 ± 0.93	5.34 ± 0.77
高脂组 HF	5.25 ± 0.07	5.75 ± 0.32	5.94 ± 0.86	5.87 ± 0.86	6.03 ± 0.98
糖尿病模型组 DM	5.04 ± 0.33	5.52 ± 0.49	15.74 ± 1.79** ^{△△}	12.62 ± 2.74** ^{△△}	12.96 ± 2.95** ^{△△}

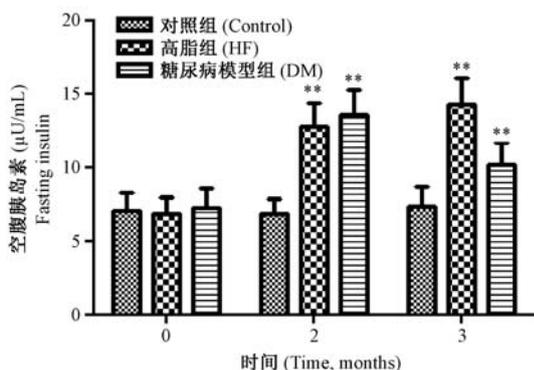


图 1 各组 Beagle 犬不同时期的空腹胰岛素

Fig. 1 Fasting insulin of the Beagles in each group at different times

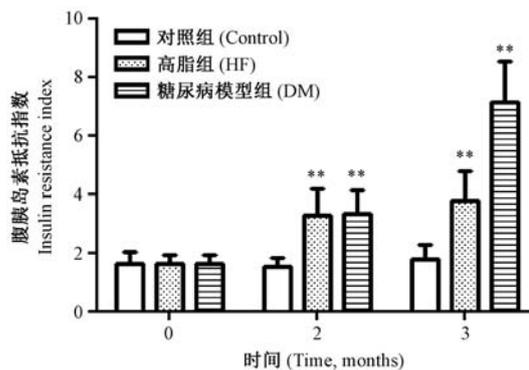


图 2 各组 Beagle 犬不同时期的胰岛素抵抗指数

Fig. 2 Insulin resistance index of the Beagles in each group at different times

2.3 OGTT

造模型 3 个月时的 OGTT 检测结果, 与对照组比较, 糖尿病模型组各时段的血糖值显著高 ($P < 0.05$), 而高脂组的糖耐量无明显影响, 糖尿病模型组的糖耐量明显受损, 血糖值高于 11.1 mmol/L, 且

给糖后 3 h 仍未恢复, 见图 3。

2.4 血液生化指标

试验结束后对照组各项血液生化指标未见显著变化, 与对照组比较, 糖尿病模型组和高脂组胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇均显著升高 ($P < 0.01$), 糖

尿病模型组甘油三酯显著升高 ($P < 0.05$), 出现明显的血脂异常; 糖尿病模型组丙氨酸氨基转移酶和天门冬氨酸氨基转移酶显著升高 ($P < 0.01$), 淀粉酶显著降低 ($P < 0.05$); 高脂组丙氨酸氨基转移酶和天门冬氨酸氨基转移酶显著升高 ($P < 0.05$)。各组的胆碱酯酶、尿素和肌酐均无明显差异 ($P > 0.05$)。见表 3, 4。

2.5 晨尿尿糖检测

对照组和高脂组试验期间尿糖检测均为阴性, 糖尿病模型组在 STZ 注射后第 3、4、5 月的检测结果均呈“++”或“+++”, 提示出现较严重的尿糖。

2.6 病理检查

由图 4 显示, 对照组胰腺、肝脏以及高脂组胰腺未见明显病变, 糖尿病模型组胰腺腺泡局灶萎缩, 胰岛数量略少, 出现一定程度的病变和损伤。高脂组肝细胞出现广泛脂肪变性, 糖尿病模型组肝细胞明显增大, 细胞结构广泛疏松, 出现较明显

损伤和病变。

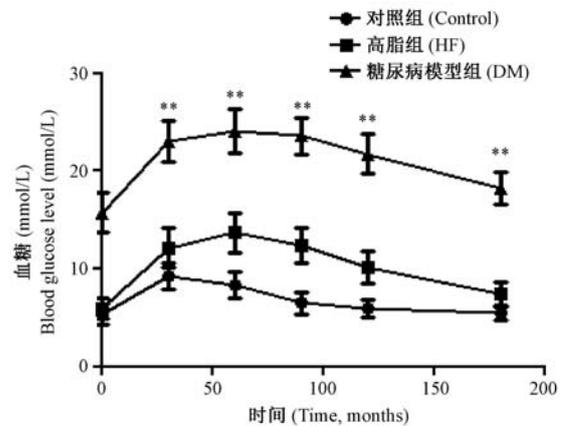


图 3 各组 Beagle 犬糖耐量试验

Fig. 3 Oral glucose tolerance test of the Beagles in each group

表 3 Beagle 犬在试验观察期结束后的血脂四项 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Tab. 3 Lipid content of the Beagles at the end of observation period

分组 Groups	胆固醇 Cholesterol	甘油三酯 Triglycerides	高密度脂蛋白胆固醇 High-density lipoprotein cholesterol	低密度脂蛋白胆固醇 Low-density lipoprotein cholesterol
对照组 Control	4.26 ± 0.53	0.65 ± 0.05	3.32 ± 0.16	0.94 ± 0.18
高脂对照组 HF	9.21 ± 1.11 **	0.78 ± 0.13	3.17 ± 0.34	2.31 ± 0.53 **
糖尿病模型组 DM	11.97 ± 2.73 **	0.83 ± 0.21 *	2.92 ± 0.52	2.86 ± 0.55 **

表 4 Beagle 犬在试验观察期结束后的生化指标 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Biochemical indicators of the Beagles at the end of observation period

分组 Groups	丙氨酸氨基 转移酶 U/L Alanine aminotransferase	天门冬氨酸氨基 转移酶 U/L Aspartate aminotransferase	胆碱酯酶 U/L Cholinesterase	尿素 /mmol/L Urea	肌酐 μmol/L Creatinine	淀粉酶 U/L Amylase
对照组 Control	33.46 ± 5.53	31.6 ± 3.5	3786 ± 697.88	6.04 ± 0.86	82 ± 8.05	861.7 ± 135.07
高脂对照组 HF	59.21 ± 7.11 *	43.5 ± 6.3 *	3613.2 ± 618.37	5.4 ± 1.05	79.2 ± 5.97	872.34 ± 103.13
糖尿病模型组 DM	76.97 ± 12.73 **Δ	119.52 ± 11.2 **Δ	3723.04 ± 2234.83	5.78 ± 0.95	83.82 ± 6.45	694.68 ± 132.34 * Δ

3 讨论

环境和遗传因素是导致糖尿病发病的主要原因, 国际糖尿病联盟 (IDF) 认为肥胖是 T2DM 发病的中心环节。肥胖会引发胰岛素抵抗, 出现胰腺 β 细胞胰岛素分泌功能代偿, 同时出现高血脂和高血糖, 进一步影响胰腺 β 细胞功能, 造成胰岛素分泌功能失代偿, 逐渐发展成糖耐量异常, 最后发展为糖尿病^[3,4]。研究证明, 利用高脂饲养诱导胰岛素抵抗后再结合 STZ 注射破坏胰腺 β 细胞复制的 T2DM 动物模型发病机制类似于人类 T2DM, 成模率高、稳定、重复性好。因此高脂饲养结合 STZ 注射成为目前 T2DM 动物模型构建较为经典的方法之一, 而高

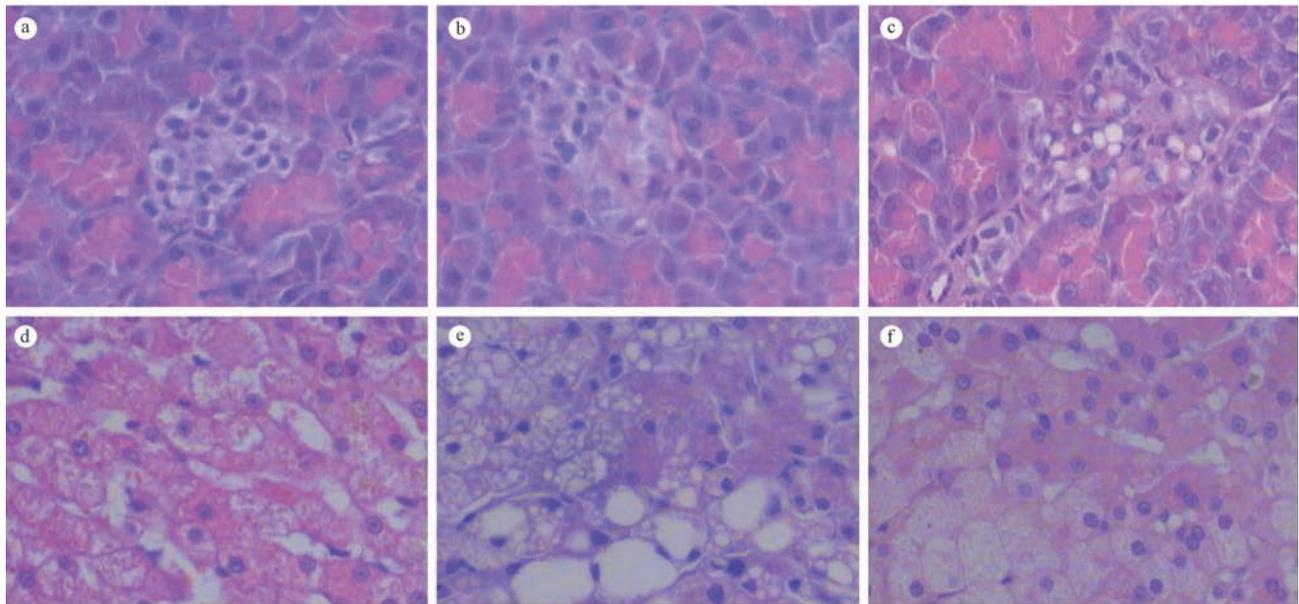
脂饮食的设计和 STZ 给药剂量的选择对造模成功与否尤为关键^[5,6]。

本研究应用高脂饲养诱导 Beagle 犬出现胰岛素抵抗并伴发高血脂症, 联合 22 mg/kg STZ 注射成功诱导 Beagle 犬糖尿病模型, 造模成功率达 9/10。临床特征观察结果显示, 糖尿病模型组和高脂组经过 2 个月高脂饲养 Lee 指数显著增高, 出现高胆固醇和高密度脂蛋白, 说明出现了脂代谢紊乱; 空腹胰岛素水平提高, 胰岛抵抗指数增大, 提示出现了胰岛素抵抗。STZ 注射后糖尿病模型组空腹血糖 > 7.0 mmol/L, 且持续 3 个月维持在高血糖水平; OGTT 试验模型组 3 h 血糖 > 11.1 mmol/L, 且 3 h 未恢复; 空腹胰岛素水平虽然有一定程度下降, 但胰岛抵

抗显著增加;胰腺组织病理学检查,胰腺组织出现一定程度的损伤和病变。

本次试验构建的 Beagle 犬具备高血糖,尿糖阳性,高胰岛素症,血脂异常等典型的人类 T2DM 特征,说明成功构建了 Beagle 犬 T2DM 模

型^[7-10]。此外,胰腺 HE 染色显示胰腺损伤和病变略比预期严重,提示 STZ 给药剂量可能偏高,下一步研究将延长高脂饲养时间并在现基础上略降 STZ 给药剂量,探索更适宜的高脂饮食设计和 STZ 给药剂量。



注:a. 对照组胰腺; b. 高脂组胰腺; c. 糖尿病模型组胰腺; d. 对照组肝脏; e. 高脂组肝脏; f. 糖尿病模型组肝脏。

图 4 Beagle 犬胰腺、肝脏组织 HE 染色结果(×560)

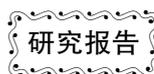
Note:a. Pancreas of a control dog. b. Pancreas of a dog in the high fat diet group; c. Pancreas of a dog in the diabetes group; d. Liver of a control dog. e. Liver of a dog in the high fat diet group. f. Liver of a dog in the diabetes group.

Fig. 4 Histological changes in the pancreatic and liver tissues of the Beagles. HE staining

参 考 文 献

- [1] 陈永欣, 韦锦斌. 链脲佐菌素诱导大鼠 2 型糖尿病并发症模型研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(3):63-66.
- [2] 叶圣涛, 傅红兴, 朱靓靓, 等. 糖尿病犬模型造模前后血液生化指标的比较及治疗分析[J]. 中国医药科学, 2014, 15(2):22-23.
- [3] 付峻林, 朱惠明, 郑丽, 等. 实验性 Beagle 犬肥胖症并 2 型糖尿病模型的建立[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(24):2534-2539.
- [4] 周迎生, 高妍, 李斌, 等. 高脂喂养联合链脲佐菌素注射的糖尿病大鼠模型特征[J]. 中国实验动物学报, 2015, 13(2):154-158.
- [5] Wang HJ, Jin YX, Shen W, et al. Low dose streptozotocin (STZ) combined with high energy intake can effectively induce type 2 diabetes through altering the related gene expression[J]. Asia Pac J Clin Nutr, 2007, 16(1):412-417.
- [6] 鲁帅尧, 占龙, 杨凤梅, 等. 实验性 2 型糖尿病恒河猴模型的构建及其部分临床特征分析[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(6):1-5.
- [7] 杨架林, 李果, 刘优萍, 等. 长期高脂饮食加小剂量链脲佐菌素建立人类普通 2 型糖尿病大鼠模型的研究[J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(3):138-141.
- [8] 杨凤梅, 李艳艳, 鲁帅尧, 等. 实验性高脂血症恒河猴模型的初步建立及分析[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(9):31-35.
- [9] 李艳艳, 和占龙, 赵远, 等. 高脂血症恒河猴血清 RETN 与血脂的相关性分析[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(11):33-36.
- [10] 崔永春, 李凯, 张宏, 等. 一次性静脉注射高剂量链脲佐菌素建立 1 型糖尿病小型猪模型[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(4):12-15.

[收稿日期] 2016-06-02



高脂高铁致大鼠肝纤维化模型的初探

何宏星¹, 陈洁^{2*}, 黄芳², 王成艳¹, 林艳婷¹, 华逸凡²

(1. 福建医科大学动物中心, 福州 350108; 2. 福建医科大学公共卫生学院, 福州 350108)

【摘要】 目的 验证铁是否能够加速大鼠肝脏纤维化的进程。方法 大鼠分为对照组、高脂组、高铁组、高脂高铁组、高脂去铁组, 每组 24 只。分别自由摄取普通饲料和高脂饲料的同时, 高铁组、高脂高铁组大鼠隔天肌注右旋糖酐铁 50 mg/kg; 高脂去铁组大鼠处死前一个月尾静脉注射甲磺酸去铁铵 30 mg/kg, 3 次/周; 干预第 4、5、6 月分别选取 8 只大鼠, 检测透明质酸 (hyaluronic acid, HA)、IV 型胶原 (collagen type IV, COL-IV)、层粘连蛋白 (laminin, LN)、III 型前胶原 (procollagen III, PC III); Masson 染色观测肝脏病理改变。结果 干预第 5 个月高脂高铁组 HA 水平高于对照组与高脂组; 第 6 个月高脂高铁组 COL-IV、LN 水平高于高脂组, 干预第 6 个月高脂高铁组血清 PC III 水平达到高脂饲料组的 1.63 倍。第 6 个月高脂高铁组肝脏标本 Masson 染色见显著的胶原沉积, 但其他组未见胶原沉积。结论 铁可加速高脂所致的大鼠肝脏纤维化进程。

【关键词】 肝纤维化; 大鼠; 高脂; 铁

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0648-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.018

A model of high fat and high iron-induced hepatic fibrosis in rats

HE Hong-xing¹, CHEN Jie², HUANG Fang², WANG Cheng-yan¹,
LIN Yan-ting¹, HUA Yi-fan²

(1. Laboratory Animal Center, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China;
2. School of Public Health, Fujian Medical University, Fuzhou 350108)

【Abstract】 Objective To verify whether iron can accelerate the process of liver fibrosis in rats. **Methods** The rats were divided into control group, high fat diet group, high iron group, high fat diet and high iron group, high fat diet and de-iron group, each with 24 rats. The rats were allowed to freely take normal diet and high fat diet, while the high iron rats, high-fat diet plus high iron rats received intramuscular injection of 50 mg/kg iron dextran every other day; high-fat diet plus de-iron group rats received tail intravenous injection of 30 mg/kg deferoxamine one month before death, 3 times/week. 8 rats were selected at 4th, 5th, 6th month of intervention, to detect serum hyaluronic Acid (HA), collagen type IV (COL-IV), laminin (LN), procollagen III (PC III), and observe pathological changes in the liver with Masson staining. **Results** At 5th month of intervention, serum HA level of the high-fat diet plus high iron group was significantly higher than those of high fat diet group and control group. At 6th month of intervention, serum COL-IV and LN levels of the high-fat diet plus high iron group were significantly higher than those of the high fat diet group. At 6th month, serum PC III level was 1.63 time of those of the high fat diet group. At the 6th month, liver tissue of high fat diet plus high iron group appeared collagen deposition revealed by Masson staining, which was not the case in other groups. **Conclusions** Iron can accelerate high fat-induced liver fibrosis.

【Key words】 Hepatic fibrosis; Rats; High fat; Iron

Corresponding author: CHEN jie. E-mail: 147767579@qq.com

[基金项目] 福建省科技厅计划重点项目资助基金 (编号: 2013Y0087); 福建省科技平台建设 (编号: 2014Y2010)。

[作者简介] 何宏星 (1976 -), 男, 实验师, 研究方向: 实验动物和动物实验管理。Email: hhx761115@sina.com

[通讯作者] 陈洁 (1979 -), 女, 讲师, 研究方向: 营养与慢性病。Email: 147767579@qq.com

肝纤维化是乙型肝炎等慢性肝病向肝硬化发展的一个必经的漫长病理过程,改善或者稳定肝纤维化的程度对慢性肝病的治疗,预防肝硬化、肝癌具有重要的临床意义。目前肝纤维化的发生机制尚未完全阐明。

研究表明,过量的脂肪摄入可引起脂肪变性,继而引发炎症和/或纤维化。随着生活水平的不断提高,与糖尿病、肥胖、高脂血症等代谢综合征相关的非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)的发病日益增多。其发病初期较为隐匿,无典型的临床症状,但其将逐渐发展为肝纤维化,是非饮酒者发生肝硬化甚至肝癌的重要原因之一^[1,2]。目前尚缺乏一个较好的 NASH 致肝纤维化动物模型,因而对 NASH 并发肝纤维化的机制也缺乏深入研究。本研究希望通过给予高铁从而加速高脂大鼠肝纤维化的进程并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲料

清洁级雄性 SD 大鼠 120 只,体重 200~220 g,均来自福建医科大学实验动物中心【SCXK(闽)2012-0001】,由福建医科大学实验动物中心饲养【SYXK(闽)2012-0001】,昼夜节律 12 h/12 h。高脂饲料配方为:玉米 22.2%、小麦 10.0%、鸡肉粉 25.0%、动物预混料 4.0%、石粉 0.3%、多维 0.3%、蔗糖 20.0%、猪油 15.0%、胆固醇 1.0%、胆盐 0.2%、食盐 0.02%;普通饲料为啮齿类动物标准颗粒饲料(委托江苏协同医药生物工程有限责任公司制作)。本实验所有操作均符合中华人民共和国《实验动物管理条例》。

1.2 主要实验试剂和设备

右旋糖酐铁注射液(iron dextran):广西化工研究院;甲磺酸去铁铵(deferoxamine mesylate):瑞士诺华制药;III型前胶原 ELISA 检测试剂盒、IV型胶原 ELISA 检测试剂盒、层粘连蛋白 ELISA 检测试剂盒、透明质酸酶 ELISA 检测试剂盒:武汉基因美生物科技有限公司;Masson 染色试剂盒:福州 phygene 生物科技有限公司。

电子天平(BS224s):赛多利斯科学仪器(北)有限公司;4℃低温冰箱:中国海尔集团;-80℃超低温冰箱:美国 Thermo 公司;电脑生物组织自动脱水机:孝感市宏业医用仪器有限公司;生物组织包埋机:孝感市宏业医用仪器有限公司;组织摊片机:德国 Slee

公司;全自动轮转式切片机 RM2255:德国徕卡仪器有限公司;图像分析显微镜:日本 Olympus 公司。

1.3 实验步骤

适应性喂养 3 d 后,将大鼠按照体重区组随机分为以下五组:对照组、高脂组、高铁组、高脂高铁组、高脂去铁组,每组 24 只。对照组、高铁组大鼠自由摄食正常饲料;高脂组、高脂高铁组、高脂去铁组大鼠自由摄食高脂饲料;高铁组、高脂高铁组大鼠隔天选择大鼠后腿肌注右旋糖酐铁 50 mg/kg,左右侧后腿替换;高脂去铁组大鼠处死前一个月尾静脉注射甲磺酸去铁铵,每次 30 mg/kg,3 次/周;干预第 4、5、6 月各组分别选取 8 只大鼠,称量体重,以 30 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉大鼠,腹主动脉取血,血液静置 1 h 后,3000 r/min,离心 10 min,制备血清;颈椎脱臼处死大鼠,解剖,获取肝脏。

称量肝重,计算肝体比,肝体比=(肝脏湿重/体重)×100。测定血清透明质酸(hyaluronic acid, HA)、IV型胶原(collagen type IV, COL-IV)、层粘连蛋白(laminin, LN)、III型前胶原(Procollagen III, PCIII);检测按照相关试剂盒说明书操作。取大鼠肝脏右叶,常规固定、脱水、包埋、切片,Masson 染色观察病理变化。

1.4 统计学处理

实验结果采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用 SPSS 18.0 软件进行统计处理,多组间均数差异性比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)、LSD 检验(方差齐性)和 Tamhane's s(方差不齐)。分析比较各实验组之间差异显著性, $P < 0.05$ 为差异有显著性。检验水准 $\alpha = 0.05$,所有分析结果取双侧 P 值,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。干预时间与组别之间的协同关系检验采用重复测量检验。

2 结果

2.1 一般情况

对照组大鼠毛色有光泽,活泼好动,食量正常;高铁组、高脂高铁组大鼠耳缘及黏膜色泽加深,高脂组、高脂高铁组、高脂去铁组大鼠体毛发黄,油腻,行动较为迟缓。

2.2 不同干预时间各组大鼠肝体比的变化

干预时间影响大鼠肝体比值($F = 34.000, P = 0.001$),干预时间和处理因素之间存在着协同效应($F = 70.000, P < 0.001$)。

干预 4、5 个月后,较之对照组,高脂组、高脂高

铁组和高脂去铁组的肝体比值均上升, 差异有显著性 (P 均 < 0.01); 而干预 6 个月后, 高脂高铁组的肝

体比下降, 与高脂组相比, 高脂高铁组肝体比值下降, 差异有显著性 ($P = 0.015$)。见表 1。

表 1 不同干预时间各组肝体比的变化 ($\%$, $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Tab.1 Liver/body ratio in the intervention group at various time points

组别 Groups	4 个月 4th month	5 个月 5th month	6 个月 6th month
对照组 Control	3.521 \pm 0.101	3.594 \pm 0.214	3.609 \pm 0.164
高脂组 High fat	3.728 \pm 0.174 *	4.021 \pm 0.192 *	4.076 \pm 0.148 *
高铁组 High iron	3.674 \pm 0.228	3.740 \pm 0.202 #	3.788 \pm 0.105 #
高脂高铁组 High fat and high iron	4.069 \pm 0.210 ** Δ	4.069 \pm 0.193 * Δ	3.451 \pm 0.368 #
高脂去铁组 High fat and removing iron	3.861 \pm 0.161 **	4.011 \pm 0.212 * Δ	4.015 \pm 0.292 **

注: * 表示与对照组相比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$); # 表示与高脂组相比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$); Δ 表示与高铁组相比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$); ** 表示与高脂高铁组相比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。 (下表同)。

Note: * compared with the control group, the difference has statistical significance ($P < 0.05$); # compared with the high fat group, the difference is statistically significant ($P < 0.05$); Δ compared with the high iron group, the difference has statistical significance ($P < 0.05$) ** compared with the high lipid high iron group, the difference is statistically significant ($P < 0.05$). (The same in the following tables).

2.3 大鼠肝脏纤维化血清相关指标检测

2.3.1 大鼠肝脏纤维化指标 HA 的结果

干预时间对 HA 的水平有影响 ($F = 272.003$, $P < 0.001$); 干预时间与不同的处理因素之间具有协同效应 ($F = 8.139$, $P < 0.001$); 干预 5 个月后, 高脂高铁组 HA 的水平与对照组、高脂组、高铁组比较, 差异有显著性 (P 均 < 0.01); 干预 6 个月后, 高脂高铁组 HA 水平持续升高, 而高脂组、高铁组、高脂高铁组, 高脂去铁组的 HA 水平亦升高, 与对照组相比较, 差异均具有显著性 (P 均 < 0.05)。见表 2。

表 2 不同干预时间各组大鼠血清 HA 值的变化 (ng/L , $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Tab.2 Serum AST levels in the rats after intervention for 4, 5 and 6 months

组别 Groups	4 个月 4th month	5 个月 5th month	6 个月 6th month
对照组 Control	282.726 \pm 49.004	332.893 \pm 25.188	388.514 \pm 21.092
高脂组 High fat	327.016 \pm 34.590	376.993 \pm 66.555	528.216 \pm 64.196 *
高铁组 High iron	330.928 \pm 43.107	336.224 \pm 28.784	503.308 \pm 35.195 *
高脂高铁组 High fat and high iron	323.049 \pm 65.089	438.412 \pm 41.147 ** Δ	583.317 \pm 25.640 * Δ
高脂去铁组 High fat and removing iron	274.159 \pm 63.780 Δ	305.557 \pm 65.217 #**	533.783 \pm 47.646 *

表 3 不同干预时间各组大鼠血清 COL-IV 值的变化 ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Tab.3 Serum COL-IV levels in the rats after intervention for 4, 5 and 6 months

组别 Groups	4 个月 4th month	5 个月 5th month	6 个月 6th month
对照组 Control	39.085 \pm 6.718	38.443 \pm 9.352	42.077 \pm 7.685
高脂组 High fat	44.316 \pm 14.674	58.887 \pm 10.399 *	58.775 \pm 11.881 *
高铁组 High iron	42.750 \pm 10.068	54.391 \pm 8.180 *	59.898 \pm 9.425 *
高脂高铁组 High fat and high iron	57.153 \pm 16.311 * Δ	64.045 \pm 9.346 *	74.699 \pm 13.206 ** Δ
高脂去铁组 High fat and removing iron	45.433 \pm 16.155	43.696 \pm 14.923 #**	46.692 \pm 5.999 # Δ **

2.3.3 大鼠肝脏纤维化指标 LN 的结果

根据重复测量结果显示: 干预时间对 LN 的水平有影响 ($F = 23.505$, $P < 0.001$); 干预时间与不同的处理因素之间具有协同效应 ($F = 4.259$, $P < 0.001$); 干预 6 个月后, 与对照组相比较, 高脂组、高

2.3.2 大鼠肝脏纤维化指标 COL-IV 的结果

根据重复测量结果显示: 干预时间对 COL-IV 的水平有影响 ($F = 9.027$, $P < 0.001$); 干预时间与不同的处理因素之间不具有协同效应 ($F = 1.372$, $P = 0.224$); 干预 5 个月后, 较之对照组, 高脂组、高铁组、高脂高铁组 COL-IV 的水平升高, 差异均有显著性 ($P = 0.001$, $P = 0.005$, $P < 0.001$); 干预 6 个月后, 高脂高铁组的 COL-IV 水平均持续升高; 较之高脂组、高铁组, 高脂高铁组 COL-IV 水平上升, 差异均具有显著性 ($P = 0.003$, $P = 0.005$)。见表 3。

脂高铁组的 LN 水平均升高, 差异均有显著性 ($P = 0.011$, $P < 0.001$)。较之高脂组, 高脂高铁组 LN 水平升高显著, 差异有显著性 ($P = 0.0025$, $P = 0.007$)。见表 4。

2.3.4 大鼠肝脏纤维化指标 PC III 的结果

根据重复测量结果显示:干预时间对 PCIII 的水平有影响($F = 34.000, P < 0.001$);干预时间与不同的处理因素之间具有协同效应($F = 70.000, P < 0.001$);干预 4 个月,与高脂组、高铁组相比,高脂高铁组 PCIII 值分别上升了 55.42%、60.82%,差异有显著性(P 均 < 0.001);干预 5 个月,与高脂组相比,

高脂高铁组 PCIII 值上升了 25.52%;与高铁组相比,高脂高铁组 PCIII 值的上升,差异也有显著性(P 均 < 0.001);干预 6 个月后,较之高脂组,高脂高铁组 PCIII 值上升了 63.42%,差异有显著性($P < 0.001, P = 0.006$);与高铁组相比,高脂高铁组 PCIII 值的上升,差异有显著性。见表 5。

表 4 不同干预时间各组大鼠血清 LN 值的变化($\mu\text{g/L}, \bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab. 4 Serum LN levels in the rats after intervention for 4, 5 and 6 months

组别 Groups	4 个月 4th month	5 个月 5th month	6 个月 6th month
对照组 Control	405.376 \pm 111.992	388.526 \pm 86.582	422.625 \pm 77.586
高脂组 High fat	383.164 \pm 56.429	421.987 \pm 79.173	548.855 \pm 130.467 *
高铁组 High iron	380.745 \pm 71.126	416.181 \pm 71.064	460.096 \pm 92.644
高脂高铁组 High fat and high iron	371.195 \pm 83.907	437.876 \pm 111.165	658.026 \pm 82.877 *# Δ
高脂去铁组 High fat and removing iron	373.245 \pm 49.233	406.583 \pm 66.630	415.998 \pm 71.534#

表 5 不同干预时间各组大鼠血清 PCIII 值的变化($\text{ng/L}, \bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab. 5 Serum PCIII levels in the rats after intervention for 4, 5 and 6 months

组别 Groups	4 个月 4th month	5 个月 5th month	6 个月 6th month
对照组 Control	349.189 \pm 31.462	400.775 \pm 24.972	393.124 \pm 25.170
高脂组 High fat	475.056 \pm 60.238 *	683.817 \pm 40.197 *	911.515 \pm 97.949 *
高铁组 High iron	459.086 \pm 45.460 *	671.719 \pm 50.614 *	826.550 \pm 87.921 *
高脂高铁组 High fat and high iron	738.297 \pm 46.944 *# Δ	858.295 \pm 55.466 *# Δ	1489.631 \pm 65.566 *# Δ
高脂去铁组 High fat removing iron	481.185 \pm 41.954 *#	556.307 \pm 59.839 *# Δ *	777.469 \pm 138.230 *#

2.4 大鼠肝脏病理检测

2.4.1 肝脏大体病理情况

干预 4、5、6 个月后,正常组大鼠肝脏色泽红润,表面光滑无结节,质地柔软,肝脏边缘锐利。干预 4、5 个月后,高铁组大鼠肝脏颜色加深,表面无结节,干预 6 个月后,个别大鼠肝脏肝叶边缘有灶状颜色变浅,质地变硬;高脂组与高脂去铁组干预 4、5、6 个月大鼠肝脏体积增大,肝叶变厚,颜色变浅发黄,质地饱满,肝脏边缘变钝,切面油腻,未见结节与灶状改变。高脂高铁组干预 4、5 个月后,大鼠肝脏体积变大,肝叶变厚,色泽变深,颜色介于高铁组与高脂组之间,质地变硬,表面可见细小的颗粒状结构;干预 6 个月后,肝脏体积变小,色泽较干预 4、5 个月变浅,肝脏质地进一步变硬,表面更为粗糙,有 5 只大鼠的肝脏可见灶状的纤维化病变。

2.4.2 肝脏 Masson 染色病理情况

干预 4、5、6 个月后,对照组大鼠肝脏肝小叶结构正常,可见肝索结构,血管壁可见少量胶原纤维。

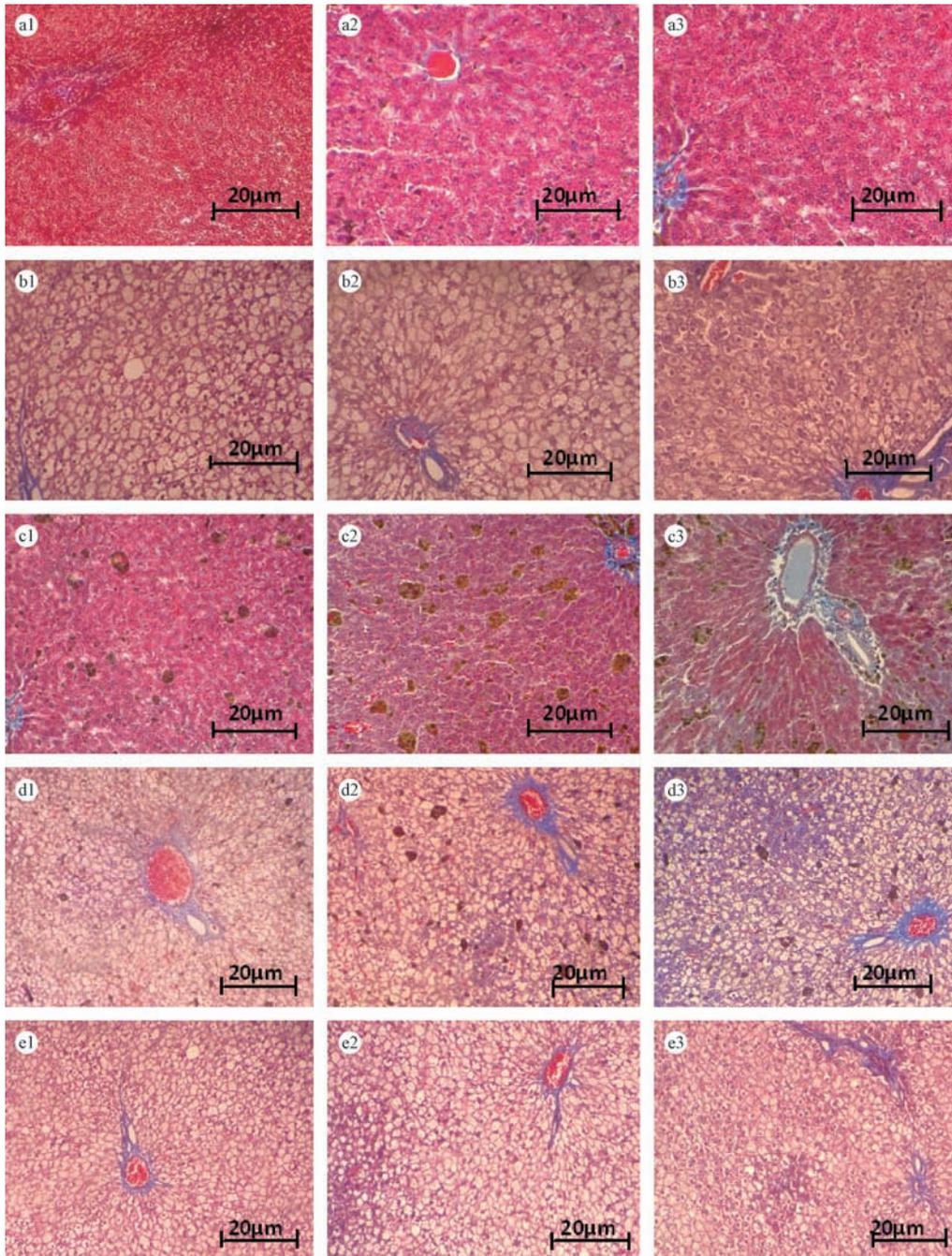
高脂组、高脂去铁组干预后可见肝小叶结构紊乱,肝脏细胞广泛性的脂肪变性、呈现空泡状,细胞核被挤占至细胞边缘,可见肝脏细胞的坏死,伴有较多的炎性细胞浸润。

高铁组干预 4、5 个月后,可见肝细胞的坏死,伴有较多的炎性细胞浸润,可见棕黄色较为粗大的折光颗粒—含铁血黄素颗粒,胶原纤维仍然局限于血管壁周围;干预 6 个月后,肝索结构中可见胶原纤维的沉积。

高脂高铁组大鼠病理标本镜下可见肝脏细胞广泛性的脂肪变性及含铁血黄素颗粒,干预 5 个月出现少量蓝色胶原染色,多集中于汇管区,随着干预时间的延长,干预 6 个月后,肝脏沉积的胶原逐渐增多,汇管区扩大,较粗的纤维间隔形成,并向外延伸分隔肝小叶。见图 1。

3 讨论

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)的激活是肝纤维化形成的关键。激活的星状细胞,合成大量的胶原、蛋白多糖和糖蛋白的细胞外基质(ECM)。检测各种 ECM 及其代谢产物在血清中的含量有助于判断肝纤维化的程度。本次研究提示干预 4、5、6 个月后,高脂高铁组的血清肝纤维化指标 HA、COL-IV、LN、PCIII 较之单纯高脂组及单纯高铁组均有明显的上升;医学界推荐肝脏病理检测是肝脏纤维化诊断的“金标准”^[3,4],纤维化的发生和程



注: a1: 对照组(干预 4 个月); a2: 对照组(干预 5 个月); a3: 对照组(干预 6 个月)。

b1: 高脂组(干预 4 个月); b2: 高脂组(干预 5 个月); b3: 高脂组(干预 6 个月)。

c1: 高铁组(干预 4 个月); c2: 高铁组(干预 5 个月); c3: 高铁组(干预 6 个月)。

d1: 高脂高铁组(干预 4 个月); d2: 高脂高铁组(干预 5 个月); d3: 高脂高铁组(干预 6 个月)。

e1: 高脂去铁组(干预 4 个月); e2: 高脂去铁组(干预 5 个月); e3: 高脂去铁组(干预 6 个月)。

图 1 不同干预时间各组大鼠肝脏镜下病理结构图(×400)

Note. a1: Control group, 4th month; a2: Control group, 5th month; a3: Control group, 6th month;

b1: High fat group, 4th month; b2: High fat group, 5th month; b3: High fat group, 6th month;

c1: High iron group, 4th month; c2: High iron group, 5th month; c3: High iron group, 6th month;

d1: High fat and high iron group, 4th month; d2: High fat and high iron group, 5th month;

d3: High fat and high iron group, 6th month; e1: High fat and removing iron group, 4th month;

e2: High fat removing iron group, 5th month; e3: High fat and removing iron group, 6th month.

Fig. 1 Histological changes in the liver tissues of rats in each group at intervention for 4, 5, 6 months. Masson staining

度主要依据胶原纤维染色来进行判定。Masson 染色是胶原纤维染色中最经典的一种方法,高脂高铁组镜下除了可见棕黄色的含铁血黄素颗粒外,干预 6 个月后,肝脏可见大量的蓝色胶原纤维的沉积,部分肝脏出现较粗的纤维间隔,并向外延伸分隔肝小叶,结合大体标本可见的肝脏体积缩小,质地变硬,表面粗糙,出现细小的颗粒状结构,而其他各组未出现如此典型的病理改变,上述结果均说明高脂高铁组发生了肝脏纤维化,且其程度较其他干预组更为显著。Padda 研究^[5]认为高脂引起的铁代谢紊乱不足以加速肝脏纤维化,这与本研究在前期预实验阶段干预 12 周未见肝纤维化表现相似,故将干预时间延长,干预 24 周后,出现明显的肝纤维化改变;目前肝纤维化动物模型的造模方法主要有以下几种^[6]:四氯化碳、半乳糖胺、乙醇、二甲基亚硝胺等化学物质诱导肝纤维化;以人血清白蛋白、猪血清白蛋白、牛血清白蛋白等异种血清诱导免疫性肝纤维化模型和胆总管结扎制造胆汁性肝纤维化模型。在高脂膳食的同时给予铁剂补充的复合造模方式较之上述造模方式,其与人类营养代谢紊乱相关的非酒精性肝炎致肝纤维化的病理过程更为贴近,且造模方法简单,动物死亡率低,为研究 NASH 引发肝纤维化的机制提供良好动物模型。

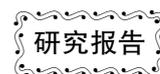
甲磺酸去铁胺作为铁中毒的解毒剂,与 Fe^{3+} 形成络合物将铁排出体外^[5]。219 例 β -地中海贫血病人通过三年或以上去铁药物 deferasirox 的治疗,可以逆转或稳定肝纤维化^[6]。高脂去铁组在高脂饲

料喂养的同时,我们以甲磺酸去铁胺作为去铁的处理手段,从血清肝纤维化指标来看,甲磺酸去铁胺的确具有一定的抗纤维化作用。

参 考 文 献

- [1] 江远,张玲,何金洋,等. 在二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化时铁超载和脂肪堆积的作用[J]. 中西医结合肝病杂志, 2009, 9(2): 102 - 105.
- [2] Chiang DJ, Pritchard MT, Nagy LE. Obesity, diabetes mellitus, and liver fibrosis [J]. Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol. 2011, 300(5): G697 - G702.
- [3] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 中华传染病杂志, 2011, 29(2): 65 - 80.
- [4] European Association For The study of The Liver. EASL clinical Practice Guidelines; management of chronic hepatitis B [J]. J Hepatol, 2009, 50(2): 227 - 242.
- [5] Padda RS, Gkouvatso K, Guido M, et al. A high-fat diet modulates iron metabolism but does not promote liver fibrosis in hemochromatotic $\text{Hjv}^{-/-}$ mice [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2015, 308(4): G251 - 261.
- [6] 李志刚,杨晋翔,张伟,等. 肝纤维化实验动物模型的建立与评价[J]. 北京中医药大学学报(中医临床版), 2009, 16(4): 43 - 46.
- [7] 张春彦,雷鸿丽. 去铁胺治疗血色病 1 例 [J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(20): 182 - 183.
- [8] Deugnier Y, Turlin B, Ropert M, et al. Improvement in liver pathology of patients with thalassemia treated with deferasirox for at least 3 years [J]. Gastroenterology, 2011, 141: 1202 - 1211

[收稿日期] 2016 - 05 - 06



苯污染对大鼠肝肾功能及血核苷酸水平的影响

俞发荣, 杨博, 李登楼, 张诗爽, 薛源, 连秀珍, 谢明仁*

(甘肃省证据科学技术研究与应用重点实验室 甘肃政法学院, 兰州 730070)

【摘要】 目的 探索苯对 Wistar 大鼠肝肾功能及血核苷酸水平的影响。方法 给予 Wistar 大鼠不同浓度苯 21 d, 用全自动生化仪检测血液不同成分的水平, 用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血液中环磷酸腺苷 (cAMP)、环磷酸鸟苷 (cGMP) 和热休克蛋白-70 (HSP-70) 的水平。结果 给予 Wistar 大鼠不同苯剂量 0.19、0.38、0.76 g/(kg·bw), 连续 21 d, 动物血浆中总胆红素水平比对照组升高了 134.40%、173.63%、254.75%, 谷草转氨酶升高了 70.76%、85.44%、106.61%, 肌酐升高了 24.54%、67.46%、84.50%, 肌酸激酶升高了 151.35%、180.85%、245.54%, 尿素 [0.38、0.76 g/(kg·bw) 组] 升高了 0.48%、23.43%; 丙氨酸转氨酶水平超过了检测值上限, 均为 1185.60%; cAMP 水平比对照组升高了 41.84%、264.02%、314.23%, cGMP 升高了 31.29%、40.46%、272.14%, HSP-70 升高了 82.11%、187.37%、1484.21%; 淀粉酶水平比对照组分别降低了 62.03%、63.66%、64.45%。结论 苯污染使血液中 cAMP 和 cGMP 比值发生变化, 引起新陈代谢的紊乱, 导致肝肾功能损伤或病变。

【关键词】 苯; 血液; 环磷酸腺苷; 环磷酸鸟苷; 热休克蛋白-70; Wistar 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0654-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.019

Effects of benzene pollution on the liver and kidney function and blood nucleotide level in rats

YU Fa-rong, YANG Bo, LI Deng-lou, ZHANG Shi-shuang,
XUE Yuan, LIAN Xiu-zhen, XIE Ming-ren*

Key Laboratory of Evidence of Science and Technology Research and Application,
Gansu Institute of Political Science and Law, Lanzhou 730070, China

【Abstract】 Objective The aim of the present study is to investigate the effect of benzene on the liver and kidney function and blood nucleotide level in Wistar rats. **Methods** The Wistar rats were treated with benzene (0.19, 0.38, 0.76 g/kg body weight) for 21 days. Different blood components were detected by an automatic biochemical analyzer. The blood cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and heat shock protein-70 (HSP-70) levels were determined by enzyme linked immunosorbent assay method (ELISA). **Results** When Wistar rats were administered with benzene at the of 0.19, 0.38, or 0.76 g/kg body weight for 21 days, the total serum bilirubin level was increased than the control group by 134.40%, 173.63% and 254.75%, respectively; aspartate aminotransferase (AST) was increased by 70.76%, 85.44% and 106.61%, creatinine was increased by 24.54%, 67.46% and 84.50%, creatine kinase was increased by 151.35%, 180.85% and 245.54%, urea (0.38 and 0.76 g/kg body weight groups) was increased by 0.48% and 23.43%; alanine transaminase level exceeded the upper limit of the readings, (1185.60%); cAMP level was increased by 41.84%, 264.02% and 314.23%, respectively, cGMP was increased by

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (编号:31060283); 甘肃省基础研究创新群体项目 (编号:145RJIA333); 兰州市科技计划项目 (2014-1-182; 2015-3-80); 甘肃省教育厅创新团队项目; 西北民族地区侦查理论与实务研究中心资助; 兰州市人才创新创业项目; 甘肃政法学院重大科研项目。

【作者简介】 俞发荣 (1959-), 男, 博士, 研究员。研究方向: 法医学、社会环境压力对人类健康的影响、药理学和毒理学实验及实验动物学。E-mail: tim9898@163.com

【通讯作者】 谢明仁 (1977-), 男, 硕士, 讲师, 研究方向: 物证科学技术。E-mail: xmr7600@gsli.edu.cn

31.29% , 40.46% and 272.14% , HSP-70 was increased by 82.11% , 187.37% and 1484.21% ; amylase level was reduced by 62.03% , 63.66% and 62.03% , respectively , than the control group. **Conclusion** Our results demonstrate that benzene pollution affects the plasma cAMP and cGMP ratio , causing metabolic changes even structural damages in liver and kidney function.

【Key words】 Benzene; Blood; cAMP; cGMP; HSP-70; Wistar rats

Corresponding author: XIE Min-ren. E-mail: xmr7600@gsli.edu.cn

据世界卫生组织(WTO)调查报告结果,世界30%新建和重建的建筑物中均发现有苯,苯污染被世界卫生组织列为人类健康的十大危害之一^[1]。近年来,发展中国家有近300万例死亡可能由室内空气污染所致,全球约4%的疾病与室内环境有关^[2]。鉴于苯污染的社会普遍性和对健康的严重危害性,在提倡绿色生活、低碳环境的同时,加强预防保护措施更为必要。为了探索苯污染对人类健康的影响及其机制,用Wistar大鼠为实验对象,对苯的毒性作用进行了实验研究,为苯的合理应用、研究预防苯污染中毒和环境治理提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF级Wistar雄性大鼠40只,体重180~190g,购于甘肃省中医学院科研实验中心【SCXK(甘)2015-0001】。全部实验均在甘肃省证据科学技术研究与应用重点实验室SPF级动物实验室完成【SYXK(甘)2015-0006】。

1.1.2 试剂和仪器

苯:分析纯A.R,天津市东丽区天大化学试剂厂生产,实验时用菜籽油稀释成所需浓度;金龙鱼菜籽油:陕西省咸阳市兴平食品工业园生产;cAMP、cGMP、HSP-70试剂盒:上海生物科技开发公司生产;生化分析仪:SMT-100VET,成都斯马特科技有限公司生产;离心机,Minir12K,湖南湘立科学仪器有限公司生产;酶标仪:Thermo Scientific MK3型酶标仪,赛默飞世尔(上海)仪器有限公司生产;37℃电热恒温培养箱:HH.BLL.360-S-II,上海跃进医疗器械厂生产;移液器:0.1-10 μL,5-50 μL,100-200 μL,Transerpettes产品。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和给药

将40只Wistar大鼠随机分为4组,每组10只。按苯对大鼠半数致死量LD₅₀3.80g/(kg·bw)的1/5、1/10、1/20给药量分组。低剂量组:灌胃(ig)苯

0.19g/(kg·bw);中剂量组:ig苯0.38g/(kg·bw);高剂量组:ig苯0.76g/(kg·bw);对照组:给予等量的菜籽油。每天称重,观察动物活动状态,连续给药21d。

1.2.2 动物血液采集检测

末次给药后次日,乙醚吸入麻醉,打开胸腔,从心脏左心室抽血,入EDTA管中,离心2000r/min,15min,取血浆,用全自动生化仪测血液成分,用cAMP、cGMP、HSP-70试剂盒检测其含量。

1.2.3 统计学处理

实验数据采用SPSS 17.0软件进行统计学处理。苯对动物血液成分水平的影响用百分比表示,组间差异采用单因素方差分析,用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物的一般状况

给药第7天后,0.38、0.76g/(kg·bw)动物出现活动迟缓,体重减轻,体毛失去光泽、倒竖。

2.2 苯对大鼠血液成分水平影响的检测结果

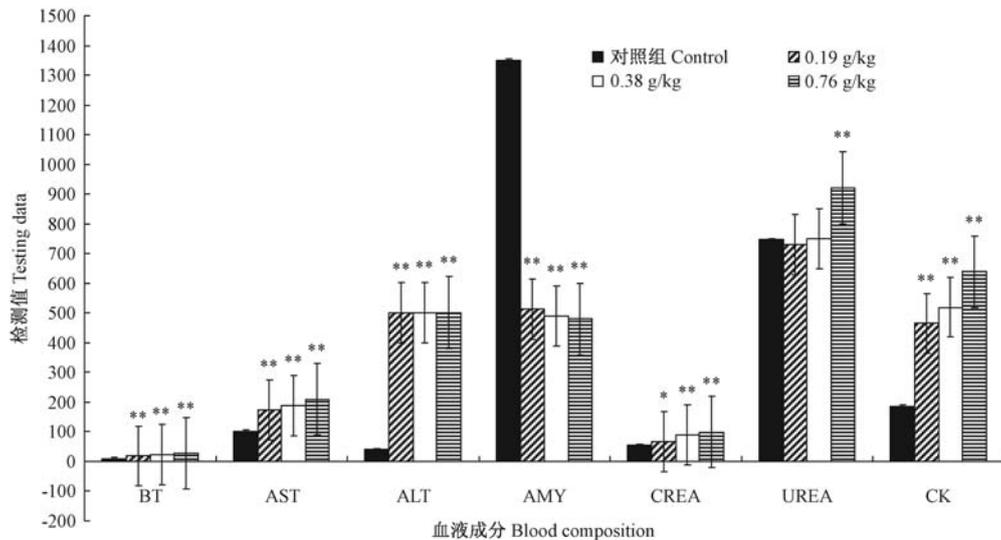
连续给予Wistar大鼠苯0.19、0.38、0.76g/(kg·bw)21d,采血检测,动物血总胆红素水平比对照组分别升高了134.40%、173.63%、254.75%,谷草转氨酶分别升高了70.76%、85.44%、106.61%,各组丙氨酸转氨酶水平超过了检测值上限,均为1185.60%,肌酐分别升高了24.54%、67.46%、84.50%,肌酸激酶分别升高了151.35%、180.85%、245.54%,尿素[0.38、0.76g/(kg·bw)组]分别升高了0.48%、23.43%;淀粉酶水平分别降低了62.03%、63.66%、64.45%。图1。

2.3 苯对大鼠血液cAMP水平的影响

连续给予Wistar大鼠苯0.19、0.38、0.76g/(kg·bw)21d,采血检测cAMP水平。

2.3.1 cAMP标准曲线的直线回归方程

以cAMP标准液浓度为横坐标,吸光度(A)为纵坐标做标准曲线和标准曲线的直线回归方程。结果见图2。



注: BT: 总胆红素 (100 $\mu\text{mol/L}$); AST: 谷草转氨酶 (U/L); ALT: 丙氨酸转氨酶 (U/L); AMY: 淀粉酶 ($\mu\text{mol/L}$); CREA: 肌酐 (10 $\mu\text{mol/L}$); UREA: 尿素 (100 $\mu\text{mol/L}$); CK: 肌酸激酶 (U/L)。与对照组比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 苯对 Wistar 大鼠血液成分的影响

Note. BT: Total serum bilirubin (100 $\mu\text{mol/L}$); AST: Aspartate aminotransferase (U/L); ALT: Alanine transaminase (U/L); AMY: Amylase ($\mu\text{mol/L}$); CREA: Creatinine (10 $\mu\text{mol/L}$); UREA: Urea (100 $\mu\text{mol/L}$); CK: Creatine kinase (U/L). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. the control group.

Fig. 1 Effect of benzene on blood component levels in the Wistar rats

2.3.2 Wistar 大鼠血液中 cAMP 水平检测结果

将动物血液样本 A 值代入直线回归方程, 计算出 cAMP 水平。连续给予 Wistar 大鼠苯 0.19、0.38、0.76 g/(kg·bw) 21 d, 大鼠血液中 cAMP 水平比对照组分别升高了 41.84%、264.02%、314.23%。结果见图 3。

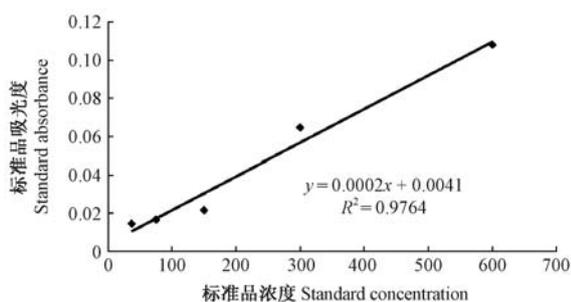


图 2 cAMP 标准曲线的直线回归方程

Fig. 2 Standard curve of linear regression equation for cAMP

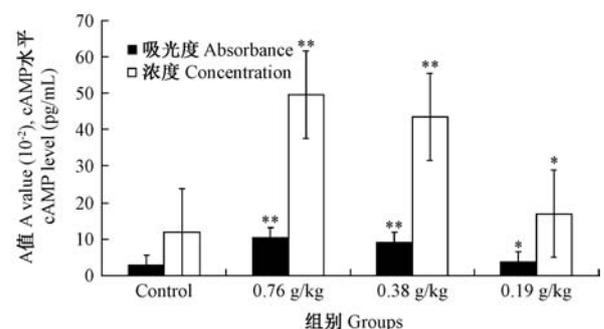
2.4 苯对大鼠血液 cGMP 水平的影响

2.4.1 cGMP 标准曲线的直线回归方程

以 cGMP 标准液浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标做标准曲线和标准曲线的直线回归方程。结果见图 4。

2.4.2 Wistar 大鼠血液中 cGMP 水平检测结果

将动物血液样本 A 值代入直线回归方程, 计算



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

图 3 苯对 Wistar 大鼠血 cAMP 水平的影响

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

Fig. 3 Effect of benzene on blood cAMP level in the rats

出 cGMP 水平。连续给予 Wistar 大鼠苯 0.19、0.38、0.76 g/(kg·bw) 21 d, 大鼠血液中 cGMP 水平比对照组分别升高了 31.29%、40.46%、272.14%。图 5。

2.5 苯对大鼠血液 HSP-70 水平的影响

2.5.1 HSP-70 标准曲线的直线回归方程

以 HSP-70 标准液浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标做标准曲线和标准曲线的直线回归方程。结果见图 6。

2.5.2 Wistar 大鼠血液中 HSP-70 水平检测结果

将动物血液样本 A 值代入直线回归方程, 计算

出 HSP-70 水平。连续给予 Wistar 大鼠苯 0.19、0.38、0.76 g/(kg·bw) 21 d, 血液中 HSP-70 水平比对照组分别升高了 82.11%、187.37%、1484.21%。见图 7。

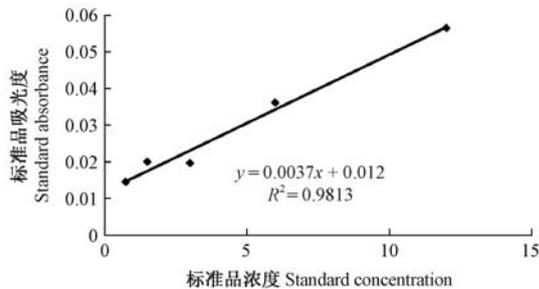
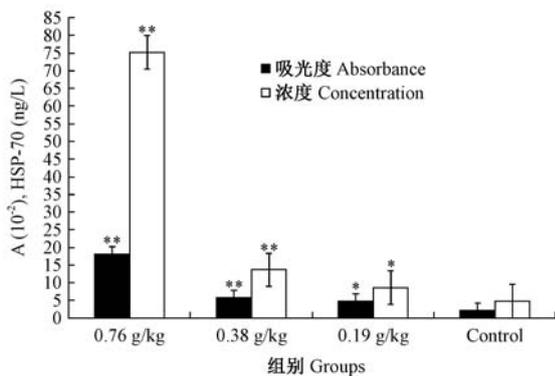


图 4 cGMP 标准曲线的直线回归方程

Fig. 4 Standard curve of linear regression equation for GMP



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

图 5 苯对 Wistar 大鼠血液 cGMP 水平的影响

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

Fig. 5 Effect of benzene on blood cGMP level in the Wistar rats

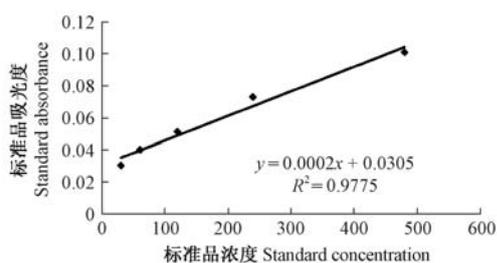
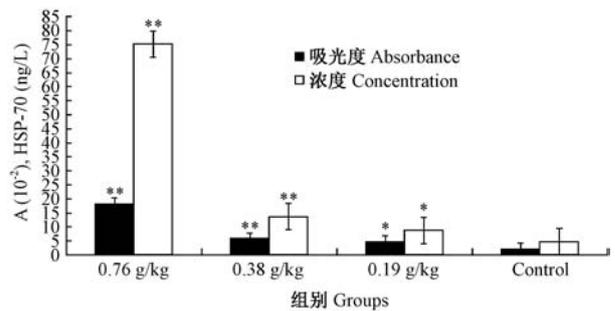


图 6 HSP-70 标准曲线的直线回归方程

Fig. 6 Standard curve of linear regression equation for HSP-70

3 讨论

苯污染严重影响人类的健康^[3]和生育^[4]。长期接触低浓度苯会出现头痛、头晕^[5]、胸闷、记忆减退、睡眠障碍^[6], 血液中丙氨酸转氨酶(ALT)^[7]、碱性磷酸酶(ALP)^[8]、总胆红素^[9]、尿素氮(BUN)、肌酐^[5]比未接触人群显著升高。动物实验结果表明,



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

图 7 苯对 Wistar 大鼠血液 HSP-70 水平的影响

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

Fig. 7 Effect of benzene on blood HSP-70 level in the rats

连续给予 Wistar 大鼠不同浓度苯 21 d, 动物出现活动迟缓, 体重减轻, 体毛失去光泽、倒竖, 表现出明显的毒性作用。血液中总胆红素、谷草转氨酶、丙氨酸转氨酶、肌酐、肌酸激酶、尿素和 cAMP、cGMP、HSP-70 水平显著升高($P < 0.01$)。转氨酶是人体新陈代谢过程中必不可少的“催化剂”, 主要存在于肝细胞内。当肝细胞发生炎症、坏死、中毒等造成肝细胞受损时, 转氨酶便会释放到血液里, 使血清转氨酶升高。因此, 转氨酶水平可以比较敏感地监测到肝脏是否受到损害。当肝细胞受损时, 肝脏将间接胆红素转化为直接胆红素的能力下降, 引起总胆红素升高。丙氨酸氨基转移酶主要存在于肝细胞质中, 谷草转氨酶存在于细胞核中, 当二者均偏高时, 提示肝细胞损害较为明显。血肌酐水平是衡量肾功能的主要指标之一, 血肌酐偏高意味着肾脏可能出现损伤。体内的肌酐主要是由肌肉产生, 通过肾脏排泄。一般情况下, 肌酐的生成量是恒定的, 血肌酐水平的高低主要取决于肾脏排出肌酐的多少。尿素氮和血肌酐同是肾功能的两个最重要的指标, 尿素氮数值的高低反映着肾脏功能的状况。肾功能损伤, 尿素氮不能较好地随尿排出, 蓄积于血液中使尿素氮数值升高。cAMP 是生物体内最重要的一种调控信号分子。cAMP 的主要功能是激活 cAMP-依赖蛋白激酶。当细胞受到外界刺激时, 胞外信号分子首先与受体结合形成复合体, 然后激活细胞膜上的 G 蛋白, 被激活的 G 蛋白再激活细胞膜上的腺苷酸环化酶(AC), 催化 ATP 而生成 cAMP。生成的 cAMP 作为第二信使(second messenger)通过激活 cAMP 依赖性蛋白激酶(PKA), 使靶细胞蛋白磷酸化, 从而调节细胞反应。cAMP 和 cGMP 是相互拮抗的物质, 在正常生理状态下, 血浆中的 cAMP 和 cGMP 浓

度的比值保持相对恒定,二者浓度发生变化,可引起新陈代谢的紊乱,导致机体损伤或病变。HSP-70 是广泛存在于生物界的一类具有高度保守性的蛋白质,当细胞在受到某些不利因素(如高热、感染、缺血、缺氧、寒冷、饥饿、创伤及化学物质中毒等)刺激时,会迅速短暂地大量合成,并通过与细胞内部分变性的蛋白质结合,协助其复性或将其运送至溶酶体降解而发挥细胞保护功能。

实验结果发现,给予 Wistar 大鼠不同浓度苯,血液中 HSP-70 水平均比对照组升高。实验结果提示,HSP-70 水平升高,一方面保护肝脏免受苯的损伤,另一方面使已损伤的组织得以修复。

上述结果表明,苯污染使血液成分水平、cAMP 和 cGMP 比值发生明显地改变,引起新陈代谢紊乱,导致肝、肾功能损伤。实验结果为我国现行的苯职业性接触限值的修订提供了参考数据,对苯作业人员的健康监护具有一定的参考价值。

参 考 文 献

- [1] 俞发荣,李登楼,谢明仁. 苯污染对人类健康影响研究进展 [J]. 生态科学,2016, 35(2): 195 - 198.
- [2] Su J, Li Q, Liang GQ, et al. Effects of occupational exposure to low concentration of benzene series on serum oxidative stress levels in gas station workers [J]. J Environ Health, 2014, 31(3): 242 - 244.
- [3] 陈自然,凌均超,朱志良,等. 深圳市龙华新区低浓度苯职业危害现状分析 [J]. 实用预防医学,2015,22(6): 724 - 726.
- [4] Katukam V, Kulakarni M, Syed R, et al. Effect of benzene exposure on fertility of male workers employed in bulk drug industries [J]. Genet Testing Molec Biomark, 2012, 16(6): 592 - 597.
- [5] Ma Q, Dong SQ. Influence of long-term exposure to low concentration of benzene, toluene and xylene on the health of workers in an electrical apparatus company [J]. Occup Health, 2013, 29(22): 2969 - 2971.
- [6] 陈铿铿,黄振烈,赖关朝,等. 低水平职业性苯接触人群健康效应及生物标志物研究 [J]. 中国职业医学, 2015,42(6): 601 - 606.
- [7] Ning F, He BX, Jiang GG. Ultrasonographic and serum biochemical studies on liver damage of workers exposed to mixed benzene in low concentration [J]. Occup Health, 2015, 31(5): 598 - 600.
- [8] Egemen D, Ferda A. Effect of benzene on liver functions in rats [J]. Environ Monit Assess, 2009, 154, (1): 23 - 27.
- [9] 杜娟,陈长喜,张燕鸣,等. 低剂量苯及苯系物接触对肝功能指标的相关性研究 [J]. 现代实用医学 2016,28(1): 53 - 54.
- [4] Steen S, Liao Q, Pierre L, et al. Evaluation of LUCAS, a new device for automatic mechanical compression and active decompression resuscitation [J]. Resuscitation 2002, 55(3): 285 - 299.
- [5] Rubertsson S, Karlsten R. Increased cortical cerebral blood flow with LUCAS; a new device for mechanical chest compressions compared to standard external compressions during experimental cardiopulmonary resuscitation [J]. Resuscitation 2005, 65(3): 357 - 363.
- [6] Axelsson C, Karlsson T, Axelsson AB, et al. Mechanical active compression-decompression cardiopulmonary resuscitation (ACD-CPR) versus manual CPR according to pressure of end tidal carbon dioxide (P(ET)CO₂) during CPR in out-of-hospital cardiac arrest (OHCA) [J]. Resuscitation 2009, 80(10): 1099 - 1103.
- [7] Gray WA, Capone RJ, Most AS. Unsuccessful emergency medical resuscitation—are continued efforts in the emergency department justified? [J]. N Engl J Med 1991, 325(20): 1393 - 1398.
- [8] 丘佩青. 心肺复苏成败原因的探讨 [J]. 中国医药导报. 2012, 9(18): 165 - 167.
- [9] Rubertsson S, Lindgren E, Smekal D, et al. Mechanical chest compressions and simultaneous defibrillation vs conventional cardiopulmonary resuscitation in out-of-hospital cardiac arrest: The LINC Randomized Trial [J]. JAMA 2014, 311(1): 53 - 61.
- [10] Popp E, Vogel P, Teschendorf P, et al. Vasopressors are essential during cardiopulmonary resuscitation in rats: Is vasopressin superior to adrenaline? [J]. Resuscitation 2007, 72(1): 137 - 144.
- [11] Idris AH, Becker LB, Ornato JP, et al. Utstein-style guidelines for uniform reporting of laboratory CPR research. A statement for healthcare professionals from a Task Force of the American Heart Association, the American College of Emergency Physicians, the American College of Cardiology, the European Resuscitation Council, the Heart and Stroke Foundation of Canada, the Institute of Critical Care Medicine, the Safar Center for Resuscitation Research, and the Society for Academic Emergency Medicine [J]. Resuscitation 1996, 33(1): 69 - 84.
- [12] 田欣,王晶,赵芯晨,等. 2月龄和4月龄大鼠制备心肺复苏模型后神经功能评价及亚组评分的比较 [J]. 中国比较医学杂志. 2014, 24(9): 53 - 58.
- [13] 朱军方,韶符,姜骏,等. 窒息法与室颤法心肺复苏动物模型比较研究 [J]. 中华急诊医学杂志, 2011, 20(1): 14 - 19.

[收稿日期] 2016-06-30

[收稿日期] 2016-03-08



糖皮质激素诱导肾阳虚抑郁症动物模型研究进展

何书芬¹, 居文政^{1*}, 胡浩彬², 孙冰婷¹, 张倩¹

(1. 南京中医药大学附属医院, 南京 210029; 2. 江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210008)

【摘要】 临床上, 肾阳虚是抑郁症患者的主要中医证型之一, 针对肾阳虚抑郁症患者采用温补肾阳的方法取得较好疗效, 但针对肾阳虚型抑郁症动物模型的复制方法尚无明确统一的规定和标准, 为肾阳虚型抑郁症的研究带来困扰, 因此, 为了进一步完善肾阳虚型抑郁症动物模型的复制方法, 现对近十五年来采用糖皮质激素类药物诱导的肾阳虚型抑郁症动物模型的造模方法及评价指标进行系统分析, 比较异同, 为肾阳虚抑郁症的合理造模提供参考依据。

【关键词】 抑郁症; 肾阳虚; 动物模型; 糖皮质激素

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0659-07

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.020

Research progress of depression animal models with kidney-yang deficiency induced by glucocorticoid

HE Shu-fen¹, JU Wen-zheng^{1*}, HU Hao-bin², SUN Bing-ting¹, ZHANG Qian¹

(1. Department of Clinical Pharmacology, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;
2. Mesothecium, Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China)

【Abstract】 Clinically, kidney-yang deficiency is one of the main TCM syndromes in patients with major depressive disorder. Warming yang and reinforcing kidney as a therapeutic measure for the treatment of depressive disorder has achieved good clinical curative effect. However, there are some problems on the study of kidney-yang deficiency depression. One of the reasons is that the establishment methods of depression animal model with kidney-yang deficiency are not unified. In order to provide reference and further improve the replication method of depression animal models with kidney-yang deficiency, we systematically collected and analyzed the experiment results published in the past 15 years about the depression animal model with kidney-yang deficiency induced by glucocorticoid hormone drugs and find out their similarities and differences.

【Key words】 Depression; Kidney-yang deficiency; Animal model; Glucocorticoid

Corresponding author: JU Wen-zheng. E-mail: wzhju333@163.com

抑郁症(depression)是一种常见的精神疾病,主要表现为情绪低落、兴趣减低、反应迟钝,饮食、睡眠差,严重者可出现自杀念头和行为。中医认为抑郁症涉及七情抑郁,脏腑功能紊乱,气血津液失调、阴阳寒热失和等诸多因素,对抑郁症证型及病机有不同认识,但作为同一个病,抑郁症也存在共性病机,基于《易经》提出“阳主动”、“肾阳为一身元阳之

根”的理论,认为抑郁症实证,以肾阳郁闭为共性,近年来中医临床辨治抑郁症逐渐开始重视温补肾阳,并取得较好疗效,临床实践发现逍遥散加温补肾阳药的抗抑郁作用强于单用逍遥散或其他配伍宁神、活血、化痰药物组^[1],交泰丸治疗更年期抑郁症取得满意疗效^[2],山西省著名中医李可用四逆汤加减治疗100多例抑郁症^[3]。大量的动物实验从“以药

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81573685);江苏省中医药领军人才项目(LJ200906);重大新药创制(2012ZX09303009-002)。

【作者简介】 何书芬(1989-),女,硕士研究生,研究方向:中药临床药理。E-mail: 1097089864@qq.com

【通讯作者】 居文政(1965-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:中药临床药物代谢动力学。E-mail: wzhju333@163.com

测证”的角度研究发现温补肾阳药物能有效改善模型动物抑郁状态,为肾阳不足是抑郁症发病的基础病机的论点提供了佐证依据。

糖皮质激素类药物诱导的肾阳虚抑郁动物模型应用较为广泛,糖皮质激素类药物造模是一种新型有效的抑郁症动物模型^[4],摄入一定量的外源性糖皮质激素可使垂体前叶的促肾上腺皮质激素的释放减少,动物出现一系列的“耗竭”现象,与阳虚证的临床表现极为相似。然而目前在动物造模方面存在的主要问题是,在药物种类、给药途径、用药剂量、造模时间和评价指标上差异较大,缺乏统一和标准化,为实验和临床研究带来一定的困扰。本文使用 Web of Science、PubMed 生物学、EBSCO + MEDLINE 数据库的相应期刊网站下载全文,中国知网、万方数据知识服务平台,主要搜集了 2001 ~ 2016 年间收录的约 90 篇关于抑郁症、肾阳虚及肾阳虚型抑郁症的文献,就目前使用频率较高的皮质酮模型和氢化可的松模型进行比较分析,为制定规范统一的造模方法和评价指标提供参考。

1 造模方法

1.1 皮质酮动物模型方法

皮质酮(corticosterone)是一种皮质激素类二十一碳甾体激素,是目前肾阳虚、抑郁症造模使用频率较高的药物。目前采用皮质酮造模,给药方式主要包括皮下注射^[5-15]、口服^[10,12,16-20]、缓释微丸包埋手术^[10,21],另外还有腹腔注射^[23]、灌胃^[22]等。溶剂主要为生理盐水,此外还有二甲基亚砷^[8,14,15,22]、豆油^[6]、芝麻油^[10]、橄榄油^[7,9,11]、吐温-80^[15,22]、 β -环糊精^[18-20]。研究对象包括大鼠^[5-11]和小鼠^[12-23],基于已查阅文献,进行统计分析,结果显示在动物选择上,近 36% 的研究选择大鼠为实验对象,雌雄比例约为 2:5;64% 的研究选择小鼠为实验对象,雌雄比例约 1:9。目前肾阳虚型抑郁症的实验研究仍以雄性动物为主,大量实验研究表明雄性的动物对药物反应敏感,行为表现和病理变化程度均优于雌性。在饲养方式上,组养和孤养方式所占比例各半,饲养方式不同对模型动物的影响及程度尚无具体文献报道。皮质酮给药方式多样,约有 50% 的研究选择皮下注射给药,30% 选择口服给药,9% 选择缓释微丸包埋手术给药,灌胃和腹腔注射给药方式占据比例较低。

肾阳虚型抑郁症的形成是一个缓慢的过程,有

别于急性应激引起与肾阳虚抑郁症相似表现的应激动物模型,皮质酮造模时间 2 ~ 7 周不等,给药剂量采取对模型动物的总给药剂量进行分析的方式,即总给药剂量(mg/kg) = 实际每天给药剂量(mg/kg) × 造模天数(d),依据总给药剂量,分析其在 6 个区间(0 ~ 150、150 ~ 300、300 ~ 450、450 ~ 600、600 ~ 750、750 ~ 900 mg/kg)的分布,从结果可知(图 1),6 个剂量区间所占比例相对均衡,其中 600 ~ 750 mg/kg 和 750 ~ 900 mg/kg 所占比例相对较高,从给药周期分析结果可知(图 2),造模时间为 3 周的所占比例最高,为 39.1%。

1.2 可的松动物模型方法

氢化可的松是天然存在的糖皮质激素,也可人工合成,是目前肾阳虚、抑郁症动物造模的首选药。目前用于造模的药物种类和剂型主要有氢化可的松注射液^[24-37]、注射用氢化可的松琥珀酸钠粉针剂^[38-40]、醋酸可的松^[41,42]、醋酸氢化可的松^[41]等,给药方式主要有皮下注射^[24,25]、肌肉注射^[26-33,38-42]、腹腔注射^[34-36]及静脉滴注^[37]。基于已查阅文献,进行统计分析,结果显示 90% 研究选择雄性大鼠为实验对象,饲养方式上,组养/孤养约为 5/1,目前尚无文献明确报道饲养方式对造模的影响。可的松类药物的给药方式多样,约有 76% 的研究选择肌肉注射方式给药,12% 的研究采用腹腔注射给药,8% 的研究采用皮下注射给药,仅有一例采用静脉滴注的方式给药^[37]。

氢化可的松类动物模型的造模时间 1 ~ 4 周不等,基于 6 个区间(0 ~ 125、125 ~ 250、250 ~ 375、375 ~ 500、500 ~ 625、625 ~ 750 mg/kg)对造模总给药剂量进行分析,即总给药剂量(mg/kg) = 实际每天给药剂量(mg/kg) × 造模天数(d),结果显示(图 3),总给药剂量主要分布在 125 ~ 250 mg/kg 和 250 ~ 375 mg/kg 两段区间内,所占比例分别为 33.3% 和 29.2%。从造模周期的分析结果可知(图 4),造模周期为 2 周的所占比例最高为 43.5%,次之为造模 3 周,约占 26.1%。

2 评价指标

不论采用何种药物造模,最终都是为了成功的模拟肾阳虚型抑郁症的症状,目前评价模型的方法主要包括行为学指标检测和生化指标检测。

2.1 行为学测试

肾阳虚抑郁症的行为学测试项目主要包括强迫

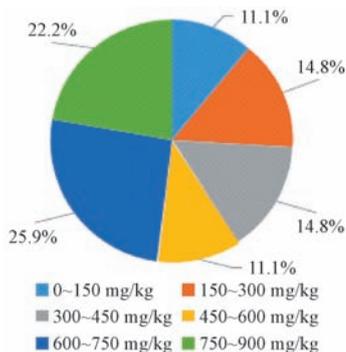


图 1 总给药剂量

Fig. 1 Total drug doses

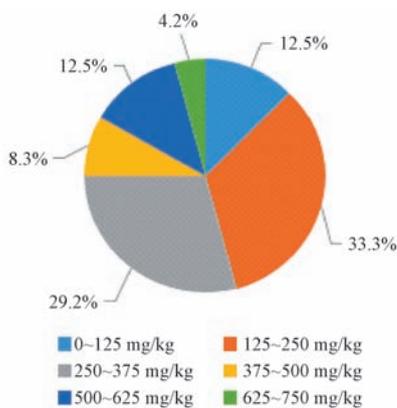


图 3 总给药剂量

Fig. 3 Total drug doses

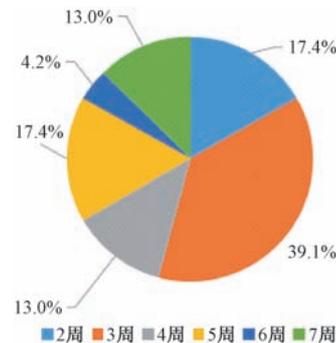


图 2 造模周期

Fig. 2 Time course of modelling

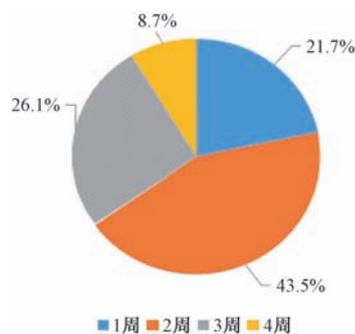


图 4 造模周期

Fig. 4 Time course of modelling

游泳实验、糖水偏好实验、旷场实验、悬尾实验、旋转实验、高架迷宫实验、新奇觅食潜伏期实验等。强迫游泳实验、悬尾实验、旋转实验用于测试动物在一个无可回避的压迫环境下表现出的行为绝望状态；糖水偏好实验被普遍用来检测啮齿类动物对奖赏的反应性，评价动物的快感缺失与否；旷场实验、高架迷宫实验、新奇觅食潜伏期实验用于评价动物在新异环境中的自主行为，探究行为与紧张度，考察动物的焦虑状态，Y-迷宫实验用于评价动物的学习记忆能力。然而通过查阅文献发现，肾阳虚型抑郁症动物模型在某些检测项目上结果存在明显差异(表 1)。

从表 1 可知，耗竭现象、糖水偏好、旷场实验、悬尾实验、旋转实验、高架迷宫实验、新奇觅食潜伏期实验及 Y-迷宫实验的测试结果基本一致，符合肾阳虚型抑郁症的行为学表现。模型动物体重变化趋势差异明显，大部分研究结果显示，与正常组相比较，模型组体重减轻，少数研究显示模型组体重并无明显差异^[10,17]或增加^[12,21]。强迫游泳实验的结果也不一致，大部分的结果显示模型动物的不动时间延长，另有部分结果显示不动时间减少^[10,12,17]，体重变化和强迫游戏实验的结果不一致现象的具体原因

有待进一步的实验研究。

2.2 生化指标测试

行为学测试能从动物的症状体征直接反映造模是否成功，生化指标测试可以在生理病理方面评价造模结果，因此行为学测试结合生化指标测试作为模型评价标准能够真实反映模型的病症。关于肾阳虚型抑郁症的病理变化研究较多(表 2)，由表可知，糖皮质激素诱导的肾阳虚型抑郁症动物模型病理学检查显示脏器系数均下降；性功能减退，睾酮含量降低，雌二醇含量升高；下丘脑-垂体-肾上腺轴功能低下，ACTH、CRH、17-OHCS、cAMP/cGMP 值降低，BUN、Scr 含量增加；脑神经受抑制，pAMPK、GR、BDNF、SYP 的表达均不同程度降低。然而促甲状腺激素(TSH)、T4、皮质酮、皮质醇、血糖及单胺类神经递质的检测结果存在差异，已有文献证实皮质酮或可的松诱导的肾阳虚型抑郁动物模型会导致外源性糖皮质激素在体内蓄积，且含量变化与肾上腺的病理改变状况不同步，认为血清皮质醇含量对于氢化可的松肾阳虚模型的辨证是非必须的^[26]。而 TSH、T4 及血糖的变化有待进一步的研究证实。

表 1 行为学测试

Tab.1 Behavioral tests

检测项目 Test items	结果(与正常组相比较) Test results (Compared with the normal group)	
耗竭现象 Depletion phenomenon	√ [11,25-27,29,31,32,35,36-38,40-42,44,]	× [41]
体重 Body weight	↓ ** [11,13,15,23,36], ↓ * [24], ↓ [7,25,27,29,32,35,38,40,42,44]	↑ [12,21] → [10,17]
强迫游泳(不动时间) Forced swim test (immobile time)	↓ [10,12,17]	↑ ** [11,13,16,28,45], ↑ * [10,15], ↑ [5,10,21,44]
糖水偏好 Sucrose preference test	↓ ** [9,11,13,16,23,28,31], ↓ * [24], ↓ [21]	
旷场实验(自主活动能力) Open field test (locomotor activity)	↓ ** [11,19,23], ↓ * [24], ↓ [18,21,28,31,44]	→ [10]
悬尾实验(不动时间) Tail suspension test (immobile time)		↑ * [15,22]
旋转实验(在杆时间) Rotarod test (time spent on the rod)		↑ ** [5]
高架迷宫实验(开臂时间) Elevated maze test (time in open arm)	↓ [12]	
新奇觅食潜伏期实验 Novelty suppressed feeding		↑ [18]
心率变异性参数 Heart rate variability parameters		TP ↑ LF ↑ [46]
Y-迷宫(学习记忆成绩) Y-type maze test (learning and memory score)	↓ * [48], ↓ ** [51]	
黑白箱实验(在白箱时间) Light-dark box (time in light side)	↓ * [45]	→ [21]

注:√:表现出耗竭现象;×:未表现出耗竭现象;↓:与空白对照组比较,结果降低(** $P < 0.01$; * $P < 0.05$);↑:与空白对照组比较,结果增加(** $P < 0.01$; * $P < 0.05$);→:结果与空白对照组比较无显著差异;TP:总功率;LF:低频率。

Note. √:show depletion phenomenon;×:no depletion phenomenon;↓:compared with the control group, the results were decreased(** $P < 0.01$; * $P < 0.05$);↑:compared with the control group, the results were increased(** $P < 0.01$; * $P < 0.05$);→:compared with the control group, no significant differences;TP:total power;LF:low frequency.

表 2 生化指标检测

Tab.2 Results of biochemical detection

指标 Indexes	检测项目 Test items	结果(与正常组相比较) Test results (Compared with the normal group)	
病理学检查 Pathological examination	脾脏系数 Spleen coefficient	↓ ** [27], ↓ [12,44]	
	肾脏系数 Kidney coefficient	↓ ** [27,45], ↓ [7,12,21,41,44]	
	胸腺系数 Thymus coefficient	↓ [7,12,44]	
下丘脑-垂体-肾上腺轴 Hypothalamic-pituitary-adrenal axis	促肾上腺皮质激素 Adrenocorticotrophic hormone	↓ [6,38]	
	促肾上腺皮质激素释放激素 Corticotropin releasing hormone	↓ ** [43], ↓ [6]	
	皮质酮 Corticosterone	↓ ** [22,41,45], ↓ [6,10]	↑ ** [13,21] → [38]
	皮质醇 Cortisol	↓ [7]	↑ [7,26,41] → [41]
下丘脑-垂体-甲状腺轴 Hypothalamic-pituitary-thyroid axis	促甲状腺激素 Thyroid-stimulating hormone	↓ [40,42]	↑ ** [27]
	三碘甲状腺原氨酸 triiodothyronine, 甲状腺素 Thyroxine	↓ [27,32,40,42]	↑ [40]
	血清尿素氮 Blood urea nitrogen		↑ ** [27], ↑ [32]
肾功能 Renal function	肌酐 Serum creatinine		↑ ** [27], ↑ [32]
	17-羟皮质类固醇 17-hydroxycorticosteroids	↓ * [40], ↓ [32]	
性功能 Sexual function	睾酮 Testosterone	↓ [29,32]	
	雌二醇 Estradiol		↑ [29,32]

	FK506 结合蛋白表达 FK506 binding protein expression		↑ * [9]
蛋白表达 Protein expression	pAMPK 表达 pAMPK expression	↓ [8]	
	GR 表达 Glucocorticoid receptor expression	↓ [8,24]	
	BDNF 表达 Brain derived neurotrophic factor expression	↓ ** [13], ↓ [16]	
	突触素表达 Synaptophysin expression	↓ ** [13]	
能量代谢 Energy metabolism	血糖 Blood glucose、脑糖原 Brain glycogen	↓ * [13]	↑ [12]
	甘油三酯 Triglyceride		↑ * [47]
氧化代谢系统 Oxidative metabolism system	总胆固醇 Total cholesterol	↓ * [47]	
	超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase	↓ * [48]	
	丙二醛 Malonyldialdehyde		↑ * [48]
中枢神经系统 Central nervous system	5-羟色胺 Serotonin	↓ ** [51]	↑ ** [49]、↑ * [50]
	多巴胺 Dopamine	↓ ** [51]	↑ ** [49]、↑ ** [50]
	去甲肾上腺素 Norepinephrine	↓ ** [51]	↑ ** [49]
	3,4-二羟基苯乙酸 3,4-dihydroxyphenylacetic acid		↑ ** [49]
	5-羟基吲哚乙酸 5-hydroxyindoleacetic acid	↓ ** [51]	↑ ** [49]
植物神经系统 Peripheral nervous system	环磷酸腺苷/环磷酸鸟苷 cAMP/cGMP	↓ [31,38]	

注: ↓:与空白对照组比较,结果降低 (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$); ↑:与空白对照组比较,结果增加 (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$); →:结果与空白对照组比较无显著差异。

Note. ↓:compared with the control group, the results were decreased (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$); ↑:compared with the control group, the results were increased (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$); →:compared with the control group, no significant differences.

3 讨论

糖皮质激素诱导的肾阳虚抑郁症动物模型已较为广泛的应用于实验研究,近年来,糖皮质激素造模的使用药物、给药方式、给药剂量及成模时间等一直在变化,而且大量的实验研究观察了肾阳虚型抑郁症模型几乎全身所有系统的变化,包括模型虚寒型的外观形态表现,机体代谢水平下降,免疫功能下降,广泛的器官病理损害,中枢神经系统和植物神经系统功能的改变,体内各种激素含量、脂质过氧化物的增加和自由基清除系统功能的低下等方面都有不同程度的变化。

在肾阳虚型抑郁症模型复制方面,分析发现,皮质酮动物模型复制方法的给药剂量差异较大:0.375~40 mg/(kg·d),造模周期 2~7 周不等,氢化可的松模型的给药剂量 5~50 mg/(kg·d)不等,造模周期 1~4 周不等,实验研究发现不同的给药剂量及造模周期不同,模型动物的肾阳虚抑郁程度不同^[13~15,31,32],系统地研究不同病理程度的肾阳虚抑郁动物模型有助于筛选出针对不同病理阶段的最佳药物及治疗剂量,为临床治疗不同阶段肾阳虚型抑郁症提供参考依据。

在模型评价方面,包括行为学测试指标和生化检测指标,肾阳虚型抑郁症动物模型在行为学测试中表现出耗竭现象,体重降低,强迫游泳实验、悬尾实验的不动时间延长,糖水偏好程度降低,旷场实验

的自主活动能力下降,旋转实验的在杆时间、高架迷宫实验中开臂的时间及 Y 迷宫的学习记忆成绩均下降,新奇觅食的潜伏期及心率变异性参数均增加,这些现象符合肾阳虚抑郁症患者表现出的精神运动改变、心境低落、悲观绝望、兴趣减退,缺乏主动性,认知功能损害,交感神经和副交感神经受损等,表明模型动物出现肾阳虚抑郁状态。然而有部分文献结果显示,与对照组相比,模型动物的体重没有明显变化或体重增加,与临床治疗中发现少数患者出现食欲增强、体重增加一致,其中的原因有待进一步的研究。肾阳虚型抑郁症动物模型在生化指标测试中表现出脏器病变,ACTH、CRH、BUN、Ser 和 17-OHCS 均呈现升高或降低趋势,性激素和环核苷酸水平均受到影响,脑组织和神经传导蛋白的表达降低,此外,甘油三酯和丙二醛的含量增加,总胆固醇和 SOD 含量降低。生化指标检测结果与临床检测结果基本一致,但文献报道的单胺类神经递质的检测结果不一致,黄兆胜^[51]的实验结果显示单胺类神经递质的含量降低,与抑郁症经典的单胺类假说一致,而蔡定芳^[49]和吴勇^[50]的实验结果均表明单胺类神经递质的含量升高,已有研究证实,外源性糖皮质激素(GC)反馈抑制下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴的同时,激活下丘脑等单胺类神经递质的分泌,单胺类神经递质与 GC 之间存在负反馈联系,而且单胺类递质的升高程度非常敏感地受循环 GC 的影响,因此蔡定芳^[49]和吴勇^[50]给予动物 GC 药物一段时间后,次日

立即采血检测,此时外源性 GC 含量仍较高,引起下丘脑等单胺类神经递质含量升高,而停药一段时间后,单胺类物质代谢系统受损,因此,检测到血液中单胺类神经递质及其代谢产物的含量均降低^[51],与临床肾虚抑郁症患者的检测结果一致,同时也从生化角度揭示了糖皮质激素诱导抑郁模型前期表现为“肾阴虚”,后期表现为“肾阳虚”特点。

由于查阅的文献有限,无法对动物模型的所有受影响系统进行分析比较,有待后期实验研究进一步的完善。肾阳虚型抑郁症模型几乎全身所有系统都有变化,随着新的生化指标和治疗靶标的不断发现,有助于更加深入认识肾阳虚型抑郁症的病理生理机制,科学指导动物造模、实验研究以及临床治疗。

参 考 文 献

- [1] 岳广欣,黄启福,陈家旭. 温阳解郁不同配伍组方抗抑郁效果观察 [J]. 世界中西医结合杂志, 2007, 2(6): 326-328.
- [2] 全世建,林杏娥,黎同明,等. 交泰丸的研究综述 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(5): 419-420.
- [3] 田原. 人体阳气与疾病 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 211-212.
- [4] Gregus A, Wintink AJ, Davis AC, et al. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats [J]. Behav Brain Res, 2005, 156(1): 105-114.
- [5] Iijima M, Ito A, Kurosu S, et al. Pharmacological characterization of repeated corticosterone injection-induced depression model in rats [J]. Brain Res, 2010, 9: 75-80.
- [6] 小岛晓,蔡定芳,沈自尹,等. 养命酒对皮质酮大鼠下丘脑-垂体-肾上腺-免疫轴的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(9): 676.
- [7] 周文江,姚菊芳,彭秀华,等. 肾阳虚证大鼠模型的建立 [J]. 实验动物与比较医学, 2007, 27(4): 242-243.
- [8] 袁世英. AMPK 信号通路在大鼠慢性糖皮质激素应激中的作用及机制 [D]. 湖北: 华中科技大学, 2013.
- [9] 陈姣,楚世峰,李婧,等. FK506 binding protein 51 参与糖皮质激素介导的抑郁样行为的发生 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(3): 407-412.
- [10] Kott JM, Mooney-Leber SM, Shoubah FA, et al. Effectiveness of different corticosterone administration methods to elevate corticosterone serum levels, induce depressive-like behavior, and affect neurogenesis levels in female rats [J]. Neuroscience, 2016; 312: 201-214.
- [11] 江泳. 抑郁症肾阳不足基础病机的探讨 [D]. 四川, 成都中医药大学, 2009.
- [12] van Donkelaar EL, Vaessen KRD, Pawlusi JL, et al. Long-term corticosterone exposure decreases insulin sensitivity and induces depressive-like behaviour in the C57BL/6NCRl Mouse [J]. PLoS One. 2014, 9: e106960.
- [13] 张绘宇,赵玉男,王中立. 慢性皮质酮注射对小鼠抑郁样行为及脑糖原水平的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(5): 828-833.
- [14] 戴建国,王中立,陈琳,等. 助阳宁神方拮抗皮质酮致抑郁作用机制实验研究 [J]. 东南大学学报(医学版), 2012, 31(2): 170-173.
- [15] Zhao YN, Ma R, Shen J. et al. A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 581:113-120.
- [16] Gourley SL, Kiraly DD, Howell JL, et al. Acute hippocampal BDNF restores motivational and forced swim performance after corticosterone [J]. Biol Psychiatry, 2008, 64(10): 884-890.
- [17] Mei L, Mochizuki M, Hasegawa N. Pycnogenol ameliorates depression-like behavior in repeated corticosterone-induced depression mice model [J]. Biomed Res Int, 2014; 942927.
- [18] David DJ, Samuels BA, Rainer Q, et al. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression [J]. Neuron. 2009, 62: 479-493.
- [19] Rainer Q, Lin X, Guilloux JP, ET al. Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety [J]. Int J Neuropsychopharmacol. 2012, 15: 321-335.
- [20] Khalid A, Ki BS, Chung MK, ET al. Tracing the evolution of multi-scale functional networks in a mouse model of depression using persistent brain network homology [J]. NeuroImage. 2014, 101: 351-363.
- [21] Sturm M, Becker A, Schroeder A, et al. Effect of chronic corticosterone application on depression-like behavior in C57BL/6N and C57BL/6J mice [J]. Genes Brain Behav, 2015, 14: 292-300.
- [22] Rosa PB, Ribeiro CM, Bettio LEB, et al. Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2014, 127: 1-6.
- [23] 彭军波,季丽莉,金雪花,等. 糖皮质激素注射建立小鼠行为抑郁症模型 [J]. 解剖学研究, 2012, 34(2): 86-88.
- [24] 董瑞婕,吴爱勤. 注射糖皮质激素和慢性束缚应激抑郁样大鼠模型比较及其机制探讨 [J]. 上海精神医学, 2009, 21(2): 71-73.
- [25] 张杰,李浸,彭锦,等. 基于右归饮与肾阳虚证方证相应关系探寻肾阳虚证标志蛋白质的初步研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(3): 230-232.
- [26] 孙琪,郭学军,谢玲玲,等. 氢化考的松肾阳虚证大鼠模型血清皮质醇动态观察 [C]. 第四届中南地区实验动物科技交流会. 2004: 501-505.
- [27] 王朝霞. 公驼宝克对肾阳虚大鼠的影响 [D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2011.
- [28] 陈嵘,秦竹,吴施国,等. 桂附地黄丸对肾阳虚抑郁症大鼠行为学改变的影响 [J]. 新中医, 2013, 45(4): 165-168.
- [29] 闵友江,严振国,杨华元,等. 基于氢化可的松动物模型的针刺效应影响因素的定性定量初步研究 [C]. 2011 中国针灸学会年会论文集. 2011: 82-91.
- [30] 张奥. 动物模型行为实验对“肾虚致恐”的证明 [J]. 国际中

- 医中药杂志, 2013, 35(9): 792-795.
- [31] 包祖晓, 赵国平, 何贵平, 等. 肝肾阳虚型抑郁症大鼠模型的建立与评价 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(1): 42-45.
- [32] 肖静, 何立群, 高建东, 等. 腺嘌呤与氢化可的松大鼠肾虚模型造模方法比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(3): 77-80.
- [33] 邵命海, 肖静, 王毅兴, 等. 从“肾主生殖”角度评价腺嘌呤与氢化可的松诱导的肾阳虚模型 [J]. 上海中医药杂志, 2008, 42(2): 57-59.
- [34] 高岗. 肾虚证代谢组学及六味地黄汤的干预研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2009.
- [35] 邹忠杰, 龚梦鹃, 谢媛媛, 等. 氢化可的松诱导的肾阳虚大鼠尿液代谢组学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 133-136.
- [36] 石丽霞, 刘晓敏, 张振家, 等. 肾衰康口服液对肾虚模型小鼠的影响 [J]. 医药导报, 2012, 31(9/0): 1122-1124.
- [37] 陶秀梅. “肾阳虚”模型及证候的代谢组学研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2009.
- [38] 姜春燕, 谭勇, 王秀, 等. 大鼠肾阳虚证的代谢组学研究 [J]. 国际中医中药杂志, 2009, 11, 31(6): 487-489.
- [39] 薛春苗, 张冰, 金锐, 等. 糖皮质激素诱导大鼠不同状态下 CYP3A 和 GST 活性变化研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(11): 1204-1206.
- [40] 刘欣, 张冰, 刘小青, 等. 氢化可的松诱导大鼠类阳虚状态的动态观察 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(1): 126-128.
- [41] 杨学海, 彭国瑞, 许志奇, 等. 不同糖皮质激素所致“阳虚”动物模型的实验研究——血浆皮质醇、皮质酮含量变化的观察 [J]. 核技术, 1984, 7(2): 66-67.
- [42] 王建红, 伍庆华, 刘海云, 等. 肾阳虚大鼠垂体-甲状腺轴功能动态分析 [J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(6): 751-752.
- [43] 蒋淑君, 孙建荣, 王涛, 等. 山茱萸提取物对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴的影响 [J]. 滨州医学院报, 2008, 31(3): 179-181.
- [44] 冯海莲, 黄秀梅, 王宁萍. 考察复方锁阳胶囊的温肾助阳作用 [J]. 中成药, 2005, 27(1): 103-105.
- [45] Murray F, Smith DW, Hutson PH. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviors in mice [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 583: 115-127.
- [46] 陈益丹, 沈蓉, 张志雄. 氢化可的松“虚证”模型大鼠的心率变异性研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2007, 21(1): 40-42.
- [47] 李敏, 张冰, 刘小青. 仙茅对类虚寒大鼠物质代谢及内分泌水平影响的实验研究 [J]. 中成药, 2012, 34(6): 1011-1014.
- [48] 刘向前, 刘能保, 张敏海, 等. 维生素 C、E 对氢化可的松所致大鼠学习记忆功能损伤的保护作用 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2002, 31(3): 238-241.
- [49] 蔡定芳, 陈晓红, 刘彦芳, 等. 外源性糖皮质激素对大鼠下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 1997, 13(6): 589-592.
- [50] 吴勇, 李政木, 卓廉佳, 等. 肾气丸“阴中求阳”配伍对肾阳虚大鼠下丘脑多巴胺及五羟色胺含量的影响 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2387-2388.
- [51] 黄兆胜, 刘明平, 孙维广, 等. 养寿丹对阿尔茨海默病肾阳虚大鼠脑神经递质的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(1): 26-28.

[收稿日期] 2016-03-02



miRNA 与热应激的关系及检测方法进展

郭文晋, 连帅, 李悦, 翟骏飞, 张宇辰, 郭景茹, 计红, 甄莉, 杨焕民**

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江 大庆 163000)

【摘要】 热应激是机体长期暴露在热环境中无法充分将体内的热散出而导致机体温度失衡的一种状态。随着 miRNA 检测技术的进步, 许多学者发现, 热应激会导致 miRNA 的表达量发生变化。miRNA 可以通过结合其靶基因, 抑制 miRNA 靶基因的表达, 从而在调控机体生命活动和抗热应激中发挥重要作用。

【关键词】 热应激; miRNA; 靶基因; 抗热应激

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0666-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.021

Development of detection methods and relationship between miRNA and heat stress

GUO Wen-jin, LIAN Shuai, LI Yue, ZHAI Jun-fei, ZHANG Yu-chen,
GUO Jing-ru, JI Hong, ZHEN Li, YANG Huan-min**

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi Agricultural University,
Daqing Heilongjiang 163000, China)

【Abstract】 Heat stress which leads to a state of temperature imbalance caused by long-term exposure of the body in a thermal environment and the body could not adequately dissipate heat. With the progress of the miRNA measurement technology, many scholars had found that heat stress can lead to a change in the miRNA. expression miRNA can bind its target genes to inhibit the expression of its target genes. That made miRNA to play an important role in the regulation of the body's life activities and anti-heat stress.

【Key words】 Heat Stress; miRNA; Target genes; Anti-heat stress

Corresponding author: YANG Huan-min, E-mail: yanghuanmin@alixun.com

热应激是机体长期暴露在热环境中无法充分将体内的热散出而导致机体温度失衡的一种状态^[1]。目前全球变暖日益严重,尤其在夏天,动植物很难忍受长时间的高温炙烤,炎热会导致动物中暑、免疫功能下降和生产性能降低,引起植物缺水、干枯甚至死亡,所以热应激的分子水平研究是非常必要的,只有明晰热应激的具体机制才能有针对性的研究相应的抗热应激药物,从而缓解当前热应激对于动植物的不利影响。自1993年Lee等^[2]在秀丽线虫体内发现 miRNA 开始,人们对于 miRNA 功能的探索

就从没有停止过,miRNA 作为一种活跃的小分子非编码 RNA 在许多生命活动中都扮演着重要的角色。众多研究证实 miRNA 与热应激密切相关^[3],在调控机体生长发育中有重要作用。miRNA 这些机制和作用的发现都是依靠着成熟的 miRNA 试验技术,miRNA 的试验技术多是由 RNA 技术发展来的,但是随着人们越来越多的认识到 miRNA 的特殊性,原有的 RNA 试验方法越来越难以满足人们对 miRNA 的探索需求,许多新的研究技术逐渐走进人们的视野。这些新技术为探索 miRNA 在热应激中的分子

【基金项目】 国家自然科学基金项目资助(批准号:31372398);教育部博士点导师基金(编号:20132305110004);黑龙江省自然科学基金面上项目(C2015041);黑龙江省教育厅重点实验室开放课题(AMKL201302)。

【作者简介】 郭文晋(1990-),男,硕士研究生,专业:动物应激生理学。E-mail: guowenjin2008@126.com

【通讯作者】 杨焕民(1956-),男,教授,研究方向,动物应激生理学 E-mail: yanghuanmin@alixun.com

机制奠定了基础。

1 miRNA 与热应激

近年来对于 miRNA 与热应激之间关系的探索越来越多,许多学者认识到 miRNA 在热应激发生机制、抗热应激和热应激标志物筛选中的巨大潜在意义。2012 年 Chen 等^[4]应用深度测序技术对热应激下的毛白杨进行了全基因组测序,共鉴定出来自 30 个 miRNA 家族的 134 种保守 miRNA 和来自 14 个 miRNA 家族中的 16 种未知 miRNA。在这些 miRNA 中共有 52 种 miRNA 出现了调节异常,其中上调的 miRNA 有 41 种,下调的 miRNA 有 11 种;对比同年在毛白杨冷应激的研究结果发现有些 miRNA 在两种条件下都出现了上调比如 pto-miR-167 和 pto-miR-1450^[5],还有一些出现了相反的调节趋势比如 pto-miR-171,这表明有些 miRNA 在不同温度应激中可能扮演着不同的调控角色,而有些 miRNA 在不同温度应激中所负责调控的生物学功能可能是相同的,其调控作用也是相似的。

2012 年 Yu 等^[6]对芜菁热刺激 1 h(46℃)之后进行深度测序发现,芜菁至少有 35 种保守的 miRNA 家族与拟南芥相似,其中五个 miRNA 家族与热应激有关,对这 5 种 miRNA 进行 RNA 印迹杂交和 RT-PCR 检测发现 bra-miR-398a 和 bra-miR-398b 出现了热抑制,其靶基因为 BracCSD1,而 bra-miR-156h 和 bra-miR-156g 则出现了热诱导情况,其靶基因 BracSPL2 出现了下调的情况,表明 miRNA 可能在热应激时对芜菁起到一定调控作用,扩大了我们对于植物中 miRNA 调控作用的研究视角。2014 年 Li 等^[7]通过对热处理水稻和正常水稻进行深度测序发现了 294 种保守的 miRNA 和 539 种新的 miRNA,其中有 26 种 miRNA 表达下调,21 种 miRNA 表达上调,通过对其中表达差异最为显著的五种 miRNA 进行 qRT-PCR 验证,发现 miR-529 在热应激水稻中出现了极显著($P < 0.01$)下调,这与 Gupta 等^[8]的研究正好互相印证,Gupta 等发现 miR-529 在冷应激中表达量极显著($P < 0.01$)上调,说明 miR-529 是一种温度敏感的 miRNA,且具有一定的保守性,再通过对 miR-529 的靶基因进行生物信息学分析发现,其中一些靶基因集中在细胞生长、发育和凋亡的整个过程中,可以说参与了整个植物体的生长发育过程,对于调控机体的抗热应激作用具有重大意义。这一发现使得人们逐渐认识到 miRNA 在热应激中特异性作用。

miRNA 不仅在植物热应激中发挥作用,在动物

热应激中的研究也有很多,2013 年,ISlam 等^[9]应用微流体芯片技术对热耐受小鼠和非热耐受小鼠测序共发现 61 种特异性的 miRNA 和 3081 种 mRNA,将 miRNA 和 mRNA 的测序结果进行合并分析发现 8 种与耐热相关的 miRNA,其中 miR-199a-3p 和 miR-34a-5p 表达最为显著。Zheng 等^[10]在 2014 年发现热应激荷斯坦奶牛血清中保守的 486 个 miRNA 中有 52 个出现差异表达,通过 qRT-PCR 和深度测序法验证的 12 个 miRNA 中有 8 个 miRNA(miR-19a、miR-19b、miR-27b、miR-30a-5p、miR-181a、miR-181b、miR-345-3 和 miR-1246)表达量显著升高,这些 miRNA 所调控的 mRNA 都集中在与应激和免疫相关的信号通路上,这一研究表明 miRNA 与热应激密切相关,其靶基因信号通路的研究能够很好证明 miRNA 在热应激中重要调节作用,也为未来荷斯坦奶牛热应激的研究指明了方向。2015 年 Morey 等^[11]发现热应激发生时 miR-23a 能够调控 CDK5 的表达,miR-23a 表达量的降低使 CDK5 蛋白的表达量升高以抵抗热应激反应,CDK5 是一种细胞周期素依赖蛋白,主要调控细胞运动功能和起到细胞抗损伤的作用,miRNA 的这种调控功能证实了其在细胞水平抗热应激的重要作用,对于后期抗热应激药物的研发和制备指明了方向。2015 年 Tang 等^[12]从蛋白水平揭示了肉鸡热应激的调控机制,其整个调控网络中绝大部分蛋白的 mRNA 被 miRNA 所调控着,miRNA 在其中扮演着非常重要的调控角色,蛋白水平热应激机制的发现可以说为未来 miRNA 水平的热应激研究奠定了基础。热应激不仅在动植物中有所研究,在微生物中 miRNA 的抗热应激作用也不可忽视,最近就有研究表明热应激益生菌中 IL-10 表达量与 miR-27a 密切相关^[13],这一研究更是将 miRNA、热应激与免疫联系起来,从 miRNA 角度揭示了一部分热应激引起免疫功能异常的机制。

2 热应激中 miRNA 分子机制的研究方法

miRNA 与热应激的密切关系驱使着越来越多的人对其进行探索和研究,如何科学的进行 miRNA 的探索成了必须的研究课题,miRNA 的研究主要包括 miRNA 的定量检测、靶基因预测和靶基因验证,通过这三步可以筛选出热应激时 miRNA 的靶基因,从而确定 miRNA 的作用机制和抗热应激意义。

2.1 miRNA 的定量检测

2.1.1 Northern blotting

Ferdinando Fiumara 等在 2015 年应用此种方法

对 miR-22 的表达水平进行了检测。Northern blotting 是一种经典的检验 miRNA 的方法,它能够检测各个组织和器官中 RNA 的量、大小以及估计其丰度,此方法灵敏度高,通过结合 RNA marker 可以检测出 miRNA 片段的大小,能够排除实验中其他小分子 RNA 的干扰,但是此方法对样品的要求量高,步骤繁琐^[14]。

2.1.2 微阵列芯片技术(Microarray)

也叫基因芯片技术,是一种平面的基质载体,上面规则地、特异性地吸附着基因或者基因产物,并且通过与荧光标记过的样本杂交,产生荧光信号,根据荧光信号的强弱即可判断对应基因的表达丰度。此方法的检测样本量大但是信息的稳定性和可重复性差,不能区分高度相似的 miRNA^[15]。

2.1.3 原位杂交

该技术可以更加直观的观测到 miRNA 的表达时间、表达分布范围和具体位置等。但是由于 miRNA 分子太小,需要对传统的原位杂交技术进行改进,以增加其亲和性和结合牢固性,防止洗脱过程中出现分子丢失,造成结果不准确^[16]。

2.1.4 qRT-PCR

Zerlinger 等^[17]应用 qRT-PCR 的方法对血清中的癌症标志物进行筛选。实时荧光定量 PCR 技术的灵敏度和特异性都很强,对于低表达的 miRNA 也能高效的检测出来,适用于高通量筛选,但是经过 PCR 扩增后很容易造成 miRNA 表达量失真,也无法预测未知的 miRNA,国内大多数实验室都在采用这种方法,qRT-PCR 法也是最简单的检测 miRNA 的方法之一。

2.1.5 高通量测序技术 (high throughput sequencing, HTS)

又叫下一代测序技术 (next-generation sequencing technology, NGS) 或者深度测序 (deep sequencing),这一技术能够直接对样本中特定大小的 miRNA 进行高通量测序,可以在无需任何 miRNA 序列信息的前提下研究 miRNA 的表达谱,并发现和鉴定新的 miRNA,是目前应用最广泛的 miRNA 筛选技术。这一技术的诞生可以说是基因组学研究领域的一个具有里程碑意义的事件^[18],也促使广大科研工作者们大批量的筛选热应激中表达异常的 miRNA,从而为后续对 miRNA 分子机制的研究奠定了基础。

2.1.6 电化学技术

Tian 等^[19]在 2015 年设计了一种超灵敏电化学技术,这种检测方法通过设计固相 RCA 的方法,将纳米碳管作为固体基质,上面集成一个发夹结构的

探针去识别 miRNA。这是一种新兴的 miRNA 检测技术,非常适合 miRNA 标志物的筛选具有极高的特异性和灵敏度,这种方法能够检测 miRNA 的序列其检测极限是 1.2fM。

2.1.7 微流控芯片技术

是一种新型的 miRNA 检测技术,与传统方法相比其所需时间大大减少,能够准确快速的在 20 min 内对未标记的 miRNA 进行检测,适用于 POC 诊断^[20],这一技术的发展对于寻找热应激标志物和快速确定动植物热应激状态有重要意义。

2.2 miRNA 靶基因的筛选

通过上述试验方法对 miRNA 进行定量检测以后就可以把表达量有差异的 miRNA 进行生物信息学分析,通过预测软件和 miRNA 数据库,对所得 miRNA 进行分析和预测,预测的主要内容是靶基因的结合性和热稳定性等,比较常见的 miRNA 预测软件是 miRanda、TargetScan、miRNA.org、Pictar 和 miR-Walk 等等。由于预测软件的敏感度和特异性都有待改善,很多时候给出的靶基因非常多而且很难筛选,我们可以通过试验的方法对 miRNA 的靶基因进行进一步验证,利用 miRNA 与其靶基因呈负相关的特性,通过过表达或者抑制 miRNA 以观察其靶基因的表达情况,将呈负相关的靶基因进行筛选和统计,再根据其生物学功能选出目标靶基因^[21]。

2.3 miRNA 靶基因的验证

靶基因的验证是 miRNA 机制研究中最困难的一个阶段,根据所预测靶基因的自由能结合能力以及生物学功能,选出符合标准的目标靶基因进行靶基因验证。

2.3.1 双荧光素酶报告基因

目前,最常用且有效的方法就是双荧光素酶报告基因 (dual luciferase reporter, DLR)^[22],通过构建含有荧光素酶的载体将 miRNA 与靶基因结合,根据 miRNA 与靶基因的结合效率来判断两者是否能够结合。

2.3.2 miRNA 交联和免疫沉淀反应 (miR-CLIP)

一种可以捕捉 miRNA 瞬时表达量的方法,这种方法已经在希拉细胞 (HeLa cells) 上建立,为了寻找 miR-106a 的靶基因,这种方法不仅证实了许多在 TargetScan 上预测到的 miR-106a 的靶基因,还发现了许多新的靶基因^[23]。这一技术的发明与发现为大规模研究 miRNA 的抗热应激机制提供了有效的途径。

3 结论与展望

近五年来,大量高通量测序技术在 miRNA 与热应激研究中的应用,使得人们对 miRNA 在不同物种间表达情况以及它们的特异性调节功能有了一个全新的认识。综合众多热应激相关的研究成果不难发现,miRNA 与热应激密切相关,机体内外环境温度升高会影响自身 miRNA 的表达量,从而实现其对靶基因和靶蛋白的调控,进而影响机体热应激时的状态,可以说环境温度的升高决定着 miRNA 表达的特异性、时序性和集中性^[24]。虽然目前 miRNA 与热应激的研究越来越多,但是对于 miRNA 是如何在热应激中发挥作用的人们还是知之甚少。相信随着分子生物学技术的日益发展,热应激与 miRNA 之间的作用关系终将被揭开,而这些基础研究也为明晰热应激机制和筛选热应激标志物奠定了坚实的基础。

参 考 文 献

- [1] Bernabucci U, Biffani S, Buggiotti L, et al. The effects of heat stress in Italian Holstein dairy cattle[J]. J Dairy Sci, 2014, 97(1): 471–486.
- [2] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. Lee, RC, et al. ELEGANS heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-4 [J]. Cell, 1995, 75: 843–854.
- [3] Zhang R, Zhang Q, Niu J, et al. Screening of microRNAs associated with Alzheimer's disease using oxidative stress cell model and different strains of senescence accelerated mice[J]. J Neurol Sci, 2014, 338(1–2): 57–64.
- [4] Chen L, Ren Y, Zhang Y, et al. Genome-wide identification and expression analysis of heat-responsive and novel microRNAs in Populus tomentosa [J]. Gene, 2012, 504(2): 160–165.
- [5] Chen L, Zhang Y, Ren Y, et al. Genome-wide identification of cold-responsive and new microRNAs in Populus tomentosa by high-throughput sequencing [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 417(2): 892–896.
- [6] Yu X, Wang H, Lu Y, et al. Identification of conserved and novel microRNAs that are responsive to heat stress in Brassica rapa [J]. J Exp Botany, 2012, 63(2): 1025–1038.
- [7] Li J, Wu L Q, Zheng W Y, et al. Genome-wide identification of microRNAs responsive to high temperature in rice (Oryza sativa) by high-throughput deep sequencing [J]. J Agronomy Crop Sci, 2014, 201(5): 379–388.
- [8] Gupta OP, Meena NL, Sharma I, et al. Differential regulation of microRNAs in response to osmotic, salt and cold stresses in wheat [J]. Mol Biol Reports, 2014, 41(7): 4623–4629.
- [9] Islam A, Deuster PA, Devaney JM, et al. An exploration of heat tolerance in mice utilizing mRNA and microRNA expression analysis [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e72258.
- [10] Zheng Y, Chen K, Zheng X, et al. Identification and bioinformatics analysis of microRNAs associated with stress and immune response in serum of heat-stressed and normal Holstein cows[J]. Cell Stress Chaperones, 2014, 19(6): 973–981.
- [11] Morey TM, Roufayel R, Johnston DS, et al. Heat shock inhibition of CDK5 increases NOXA levels through miR-23a repression [J]. J Biol Chem, 2015, 290(18): 11443–11454.
- [12] Tang XF, Meng QS, Gao J, et al. Label-free quantitative analysis of changes in broiler liver proteins under heat stress using SWATH-MS technology [J]. Sci Reports, 2015, Article number 15119.
- [13] Demont A, Hacini-Rachinel F, Doucet-Ladevèze R, et al. Live and heat-treated probiotics differently modulate IL10 mRNA stabilization and microRNA expression [J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 137(4): 1264–1267.
- [14] Fiumara F, Rajasethupathy P, Antonov I, et al. MicroRNA-22 gates long-term heterosynaptic plasticity in Aplysia through presynaptic regulation of CPEB and downstream targets [J]. Cell reports, 2015, 11(12): 1866–1875.
- [15] Woolley AT. ABC Spotlight on emerging microRNA analysis methods [J]. Analyt Bioanal Chem, 2015, 407(22): 6579–6581.
- [16] Li J, Li X, Li Y, et al. Cell-specific detection of miR-375 down-regulation for predicting the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma by miRNA in situ hybridization [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53582.
- [17] Zeringer EM, Rai AJ, DeCastro J, et al. A complete workflow for high throughput isolation of serum microRNAs and downstream analysis by qRT-PCR; application to cancer biomarker discovery [J]. Cancer Res, 2015, 75(15 Suppl): 3387–3387.
- [18] Itesako T, Seki N, Yoshino H, et al. The microRNA expression signature of bladder cancer by deep sequencing: the functional significance of the miR-195/497 cluster [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e84311.
- [19] Tian Q, Wang Y, Deng R, et al. Carbon nanotube enhanced label-free detection of microRNAs based on hairpin probe triggered solid-phase rolling-circle amplification [J]. Nanoscale, 2015, 7(3): 987–993.
- [20] Ishihara R, Hasegawa K, Hosokawa K, et al. Multiplex microRNA detection on a power-free microfluidic chip with laminar flow-assisted dendritic amplification [J]. Analyt Sci, 2015, 31(7): 573–576.
- [21] Doecke JD, Chekouo TT, Stingo F, et al. miRNA target gene identification: Sourcing miRNA target gene relationships for the analyses of TCGA Illumina MiSeq and RNA-Seq HiSeq platform data [J]. Int J Human Genet, 2014, 14: 17–22.
- [22] Wolter JM, Kotagama K, Babb CS, et al. Detection of miRNA targets in high-throughput using the 3' LIFE assay [J]. J Vis Exp, 2015 (99): e52647.
- [23] Grimson A. Noncoding RNA: Linking microRNAs to their targets [J]. Nat Chem Biol, 2015, 11(2): 100–101.
- [24] Dalmay T. Mechanism of miRNA-mediated repression of mRNA translation. [J]. Essays Biochem, 2013, 54: 29–38.

[收稿日期] 2016–05–24

《中国实验动物学报》2016 目次索引

2016 年 第 24 卷 1~6 期

第 1 期

小鼠早期肺腺癌模型的病理学研究 肖时满,李勇爱,强金伟,等(1)

Rapid detection of *Shigella* and *Salmonella* in rhesus monkeys by loop-mediated isothermal amplification assay YE Li, WU Fang, WANG Yi-jia, et al(7)

人前列腺癌骨转移裸鼠移植模型的建立及其循环肿瘤细胞的特性 张彩勤,张海,赵勇,等(14)

小鼠原发性肝癌建模方法的优化 顾洪伟,陈琦,张炜,等(20)

芍药苷对大鼠背根神经元细胞内 Ca²⁺ 的影响 黄鹤飞,陈颖,蔡维艳,等(25)

阴虚动风证帕金森病异动症大鼠大麻素 CB1 受体变化及复方地黄方的干预作用 滕龙,洪芳,何建成(31)

Noggin 基因沉默表达载体的构建及效果评价 马雨楠,游颖,孙兆增,等(37)

一种牵张成骨大鼠实验模型的建立 曾景奇,黄枫,姜自伟,等(43)

久泻灵颗粒对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠 TLR4 及 NF-κB p65 表达的影响 吴玉泓,许雅清,李海龙,等(47)

利用心脏特异性 *CYP2E1* 基因修饰小鼠评价药物心脏毒性的初步探索 裴彦宇,孙井江,赵显莉,等(53)

外源性 β-NGF 调节骨改建过程中的可能作用机制 茅传青,卓丽莉,王锦,等(59)

两品系大鼠在经典条件反射和操作式条件反射中的行为学表现 王克柱,徐攀,卢聪,等(65)

利用多重荧光 STR 技术分析上海地区 7 品系常用近交系小鼠核心群的遗传特性 倪丽菊,赵丽亚,赵立虎,等(72)

雌性大鼠去卵巢模型中脑神经内分泌信号异常传导的机理 侯雪芹,李悦,荣翠平,等(80)

复合刺激创伤后应激障碍模型大鼠重要脑区的病理变化 陈旺,李陈成,李森,等(87)

两品系豚鼠屈光状态和眼球径的发展和比较 卫振,张森,蒋丽琴,等(92)

新型七甲川菁染料用作肿瘤模型活体成像的研究进展 王哲轩,赵宁宁,张彩勤,等(97)

生物学标志物在心力衰竭早期诊断中作用的研究进展 张辉,周晓慧,范慧敏,等(102)

P2Y₆ 受体生物学效应的研究进展 曾勇,文爱珍,王顺民,等(107)

第 2 期

糖尿病合并冠心病 ZDF 大鼠模型的构建 朱超,朱莹莹,李二妮,等(111)

脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠模型的建立 吴玉泓,许雅清,李海龙等(116)

四种常用实验麻醉药物对大鼠心血管系统的影响 孙安会,谷捷,吴涛,等(120)

胚胎干细胞对孕鼠缺血受损心肌的修复作用 王宏茂,邱彬,邓然,等(127)

Alb-cre/DTR 小鼠可诱导性肝损伤模型的建立 任晓楠,任蓉蓉,刘雪,等(134)

苯胺致小鼠肝细胞和淋巴细胞 DNA 损伤及其修复效应 边高鹏,刘瑞祥,史宝忠,等(139)

三个品系小鼠流感病毒气溶胶感染模型比较 杨玉琴,徐春华,朱召芹,等(145)

橙皮苷对小鼠抗氧化作用及抗氧化酶基因表达的影响 田美杰,孙英健,官佳懿,等(150)

小鼠脓毒症模型的建立和评价 荆喜中,贾欢欢,罗挺,等(158)

恒河猴和树鼯角膜内皮细胞的比较分析 吴敏,李娜,孙晓梅,等(164)

小鼠冷冻胚胎和精子 SNP 遗传鉴定方法的建立 徐伟,晁天柱,刘丽均,等(169)

重组腺病毒介导脂联素基因对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化的作用机制 王雪梅,魏琴,张春,等(175)

实验小鼠呼肠孤病毒 III 型抗体的实验室检测能力验证结果评价 王吉,付瑞,李晓波,等(183)

兔出血症病毒抗体的实验室检测能力验证结果评价 付瑞,王洪,王淑菁,等(188)

实验动物中沙门菌的实验室检测能力验证的结果与分析 邢进,冯育芳,王洪,等(191)

实验动物金黄色葡萄球菌的实验室检测能力验证结果评价
 冯育芳, 邢进, 付瑞, 等(195)

实验小鼠肾匀浆中苹果酸酶-1 和异柠檬酸脱氢酶-1
 实验室检测能力验证结果评价
 王洪, 魏杰, 于鹏丽, 等(199)

实验小鼠肾匀浆中酯酶-3 的实验室测定能力验证结果评价
 魏杰, 王洪, 巩薇, 等(204)

成年生长激素缺乏动物模型与骨代谢相关研究进展
 袁人飞, 邓伟民, 韩丽萍, 等(208)

小鼠肝癌模型研究进展 ... 李顺, 陈丽香, 彭秀华, 等(213)

薄型子宫内膜模型的动物选择及其造模方法改进
 许春燕, 宋阳, 李坤寅, 等(217)

第 3 期

孕前炔雌醇暴露对大鼠子代糖代谢变化和肝脏
 糖代谢相关基因表达的影响
 徐凯旋, 李宁宁, 管磊剑, 等(221)

Caveolin-1 基因敲除小鼠子代基因型的鉴定及繁育方法 ...
 周胜强, 罗东, 黄素芬, 等(228)

黄连解毒汤通过调节性 T 细胞产生抗动脉粥样硬化作用
 周凤华, 程赛博, 张宇, 等(233)

裸小鼠肝癌原位移植模型的建立
 田树红, 王日超, 邢桂兰, 等(239)

口服补液盐降低氯化锂-匹罗卡品惊厥持续状态
 大鼠死亡率的研究 韩慰, 蒋莉, 何蓉, 等(243)

雄性裸鼯鼠可育个体与不可育个体生殖系统
 结构与功能差异初探
 余琛琳, 林丽芳, 袁子彦, 等(248)

慢性皮质酮处理对小鼠学习记忆和突触相关蛋白的影响 ...
 孙秀萍, 杨久山, 张楠, 等(253)

小鼠异位肢体复合组织移植模型的建立
 黄健兵, 徐高俊, 刘浩, 等(258)

他克莫司对大鼠肝脏组织蛋白磷酸酶 2A 和 P-AKT 表达的
 影响 牛玉坚, 王德恩, 杨柳(262)

人 IL-37b 基因真核表达载体的构建与表达
 姚静, 程江, 裴雪枫, 等(268)

牛体内囊胚经体外共培养诱导子宫内膜上皮细胞
 整合素 $\alpha v, \beta 3$ 基因差异的表达
 倪茜曦, 倪和民, 潘兴乾, 等(273)

玛咖提取物对小鼠毒性及免疫器官的影响
 俞发荣, 张诗爽, 张振南, 等(279)

纤溶系统对膜性肾病大鼠足细胞损伤的影响 Δ
 梁静, 张渊, 曹灵, 等(283)

巴马猪 NK 细胞表型鉴定及猪 CIK 细胞诱导方法建立
 祝明皓, 陆涛峰, 牛银杰, 等(288)

仙台病毒 RT-LAMP 可视化检测方法的建立
 周洁, 赵丽娟, 陶凌云, 等(293)

无特定病原体金定鸭卫星 DNA 遗传多样性分析
 赵丽丽, 陆涛峰, 张晓萍, 等(299)

肝螺杆菌感染对 BALB/c 小鼠免疫应答干扰的初步研究 ...
 冯洁, 张泉, 谢建云, 等(304)

上海地区实验动物病原体感染指数分析
 冯丽萍, 陶凌云, 周洁, 等(309)

裸鼯鼠在生物医学研究中的应用前景 崔淑芳(313)

抑郁症动物模型与其发病机制研究的进展
 罕园园, 代解杰(321)

严重的糖尿病血管病变的发生机制及其动物模型制作进展
 冯丽帅, 马旭, 王建波(327)

第 4 期

Pin1 在皮肤组织中的表达以及可诱导转基因小鼠模型的建
 立 向建, 陈鹏, 张莉, 等(333)

基于 CRISPR/Cas9 技术构建严重联合免疫缺陷小鼠
 赵亚, 李红武, 师宏宏, 等(339)

黄鱼裸裂尻鱼 *MSTN* 基因 RNA 干扰研究
 孔庆辉, 晁燕, 夏明哲, 等(344)

斑马鱼核纤层蛋白 Lamins 的生物信息学分析
 张衡璐, 黄惠敏, 叶芝旭, 等(351)

Helq 对干细胞多能性影响的研究 Δ
 万聪, 黄亚萍, 汪妹, 等(358)

小鼠气管平滑肌原代细胞的分离、培养与鉴定
 叶致豪, 许文豪, 刘庆华, 等(364)

基因敲入小鼠甲亢性低钾型周期性麻痹模型的评价
 智红叶, 徐宏燕, 陈瑛瑛, 等(369)

GGTA1^{-/-} 五指山小型猪 SLA I 类基因分子特征
 及与 HLA 相似性分析
 蒋应弟, 曾国敏, 石宁宁, 等(375)

6 周自由转轮运动对高脂饲养雄性大鼠性激素及
 下丘脑-垂体-睾丸轴的影响
 赵岩, 孙景权, 谢敏豪, 等(381)

无菌猪生长、血液以及脏器相关指标的测定
 孙静, 杜蕾, 丁玉春, 等(388)

稳定的大鼠大脑中动脉栓塞脑梗死模型的建立
 包新杰, 李雪元, 左赋兴, 等(395)

颈总动脉穿刺法制备大鼠大脑中动脉栓塞模型
 刘华, 刘月美, 关芮, 等(399)

M4 受体阻滞剂 MT3 抑制豚鼠形觉剥夺性近视的探讨
 李涛, 周晓东, 李炳, 等(403)

基因治疗与传统非手术治疗对产后压力性尿失禁
 模型大鼠的作用比较
 程明军, 曹云桂, 丁景新, 等(408)

前扣带皮层区域磷酸激酶 Czeta 在弗氏完全佐剂
 致炎性痛大鼠情绪反应中的作用
 杜俊英, 温存, 邵晓梅, 等(414)

糖尿病大鼠的 SOD 活性与抗氧化剂治疗对机体
 抗氧化状态的影响 周玉, 王伶俐, 黄杨, 等(422)

地鳖多糖提取物的体内外抗氧化作用
 谢梦蕊, 邱思奇, 沈红(427)

斑马鱼血栓模型的建立与冠心宁片的干预作用……………
 …………… 王木兰,潘永明,金敏,等(432)
 干细胞与转化医学研究进展浅析……………
 …………… 高舒平,曲春辉,周瑞,等(439)

第 5 期

斑马鱼胚胎胚特异表达基因的鉴定……………
 …………… 万传璐,闫一芳,曹羽,等(441)
 基因沉默组织型转谷氨酰胺酶抑制
 SaOS-2 细胞成骨分化……………
 …………… 余慧镭,殷晓雪,陈仲强,等(448)
 比较谷氨酸引起两品种大鼠培养星形胶质细胞
 肿胀的差异^A…………… 师忠芳,徐立新,卢易,等(454)
 芍药苷对哮喘模型小鼠气道炎症趋化因子及受体
 的干预作用…………… 刘家齐,赵正晓,魏颖,等(460)
 葛根素上调 miR-155-3p 降低内脏脂肪素诱导人脐静脉
 内皮细胞损伤…………… 周凤华,黄志勇,张蕾,等(465)
 广西巴马小型猪 2 型糖尿病模型骨骼肌糖代谢
 及能量代谢相关基因的表达差异……………
 …………… 严雪瑜,蒋钦杨,吴延军,等(470)
 Noggin 基因沉默对 BMP 和 Wnt 信号通路表达的影响……………
 …………… 马雨楠,游颖,沈欢欢,等(475)
 每周单次皮下注射 rhPTH(1-34) 促进大鼠的骨折愈合……………
 …………… 马腾,张稳,郭琦,等(481)
 小剂量多次注射链脲佐菌素建立糖尿病早期
 视网膜病变动物模型……………
 …………… 朱华,李彦红,徐艳峰,等(487)
 裸鼠肺癌脑转移模型中血脑屏障超微结构的观察……………
 …………… 陈愉生,涂洵崴,俞梅娥,等(494)
 封闭群子午沙鼠的寄生虫感染及药物净化效果……………
 …………… 徐艺玫,王新国,史深,等(499)
 基于 OPG/RANK/RANKL 系统比较研究前肢畸形
 WHBE 兔骨代谢特征…………… 吕建敏,陈方明,陈诚(503)
 Lewis 大鼠下丘脑中肾阳虚相关 mRNA 表达
 及超微结构观察…………… 张利棕,方明笋,杨伟吉,等(551)
 子宫腺肌病小鼠的药物疗效及其疼痛机制……………
 …………… 李清,王杰玉,张晓丹,等(516)
 文蛤肉水解液的致突变性…………… 高梅,曹冲,王功霞,等(521)
 NOD/SCID 雌性小鼠动情周期的观察……………
 …………… 甄玉花,宋阳,关永格,等(526)
 MicroRNA-424 在肿瘤发生中的作用和机制研究进展……………
 …………… 刘萍,赵海革,罗玉敏(529)
 靶向基因修饰技术在免疫缺陷动物模型研究中的应用进展
 …………… 信吉阁,曾养志(535)
 阿尔茨海默病与 PRNP 突变体小鼠动物模型……………
 …………… 赵进,蔡兆伟,管峰(541)
 无菌猪的研究进展…………… 杜蕾,孙静,葛良鹏,等(546)

第 6 期

斑马鱼 *sat1. a* 突变体的鉴定……………
 …………… 万传璐,闫一芳,王鹏,等(551)
 蕨麻小型猪心梗模型的建立及梗死边缘区的
 基因表达谱分析*…………… 谭伟江,王静,李想,等(558)
 七甲川菁近红外荧光染料对胃癌原位移植模型的靶向识别
 …………… 赵勇,张彩勤,赵宁宁,等(567)
 广西和云南树鼯群体遗传多样性的比较分析……………
 …………… 唐艳萍,曹骥,杨香娣,等(572)
 程序化冷冻前后小鼠孵化囊胚和休眠胚胎的
 Hba- α 蛋白分布和差异表达……………
 …………… 刘迪,倪和民,顾美超,等(579)
 靶向抑制巨噬细胞 Act1 表达对溃疡性结肠炎的作用*……………
 …………… 邹一贺,王丽京,邓慧君,等(585)
 白色念珠菌经口感染 ICR 小鼠建立系统性感染模型*……………
 …………… 罗银珠,潘金春,何丽芳,等(591)
 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌系统性感染小鼠模型的制备*……………
 …………… 邓少嫦,罗银珠,李航,等(596)
 人参辅酶 Q₁₀ 防晒霜对紫外线损伤小鼠的保护作用*……………
 …………… 吴海游,邱楚群,梁美婷,等(601)
 条件性感染金黄色葡萄球菌关节炎小鼠模型的建立和分
 析*…………… 叶秋莹,李舸,罗银珠,等(607)
 直接多肽结合试验组合人细胞系活化试验预测皮肤致敏物
 的探讨…………… 柯逸晖,陈彧,程树军,等(611)
 枸杞多糖对自发乳腺癌 MMTV-PyMT 小鼠
 肿瘤生长和转移的作用*……………
 …………… 李媛媛,亓翠玲,周芷晴,等(618)
 电针对 2 型糖尿病合并肾性高血压大鼠模型的疗效*……………
 …………… 万斌,孙丽薇,刘蓉,等(622)
 西藏小型猪 IGF-1 基因在不同生长发育阶段和
 不同组织器官中的差异表达……………
 …………… 田雨光,王玉珏,庞炜,等(628)
 大鼠机械式胸外按压心肺复苏模型的建立……………
 …………… 唐恽,安庆宝,付守芝,等(632)
 凝血酶法致大鼠血液高凝态模型的建立……………
 …………… 王立文,沈晓洁,吴倩,等(639)
 高脂饲喂联合链脲佐菌素诱导的 Beagle 犬糖尿病模型……………
 …………… 胡娟,杨扬,米本中,等(643)
 高脂高铁致大鼠肝纤维化模型的初探……………
 …………… 何宏星,陈洁,黄芳,等(648)
 苯污染对大鼠肝肾功能及血核苷酸水平的影响……………
 …………… 俞发荣,杨博,李登楼,等(654)
 糖皮质激素诱导肾阳虚抑郁症动物模型研究进展……………
 …………… 何书芬,居文政,胡浩彬,等(659)
 miRNA 与热应激的关系及检测方法进展……………
 …………… 郭文晋,连帅,李悦,等(666)

《ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA》
CUMMULATIVE TABLE OF CONTENTS

Vol. 24 No. 1 – 6 2016

No. 1

Pathological characterization of the early lung adenocarcinoma in a mouse model
XIAO Shi-man, LI Yong-ai, QIANG Jin-wei, et al(1)

Rapid detection of *Shigella* and *Salmonella* in rhesus monkeys by loop-mediated isothermal amplification assay
YE Li, WU Fang, WANG Yi-jia, et al(7)

Establishment of a nude mouse model of bone metastasis of human prostate cancer and the biological characteristics of circulating tumor cells
ZHANG Cai-qin, ZHANG Hai, ZHAO Yong, et al(14)

Optimization of the establishment method of mouse model of hepatocellular carcinoma
GU HONG-wei, CHEN QI, ZHANG WEI, et al(20)

Effect of paeoniflorin on the calcium concentration in rat dorsal root ganglion neurons
HUANG He-fei; CHEN Ying; CAI Wei-yan; et al(25)

Effects of compound rehmannia prescription on the cannabinoid receptor 1 in rats with wind syndrome due to deficiency of Yin in levodopa-induced dyskinesia (LID) in Parkinson's disease
TENG Long, HONG Fang, HE Jian-cheng(31)

Construction and evaluation of gene silencing vectors of *Noggin*
MA Yu-nan, YOU Ying, SUN Zhao-zeng, et al(37)

Establishment of a novel rat model of distraction osteogenesis
ZENG Jing-qi, HUANG Feng, JIANG Zi-wei, et al(43)

Effect of a Chinese medicine, Jiuxieling granules, on the expression of TLR4 and NF- κ B p65 in ulcerative colitis rats with spleen and kidney yang deficiency
WU Yu-hong, XU Ya-qing, LI Hai-long, et al(47)

Exploration of the use of heart-specific *CYP2E1* genetically modified mice in evaluation of drug-induced cardiotoxicity ...
PEI Yan-yu, SUN Jing-jiang, ZHAO Xian-li, et al(53)

Possible mechanism of bone remodeling during the process of bone healing via topical application of exogenous β -NGF
MAO Chuan-qing, ZHUO Li-li, WANG Jin, et al(59)

Behavioral differences of the Sprague-Dawley and Wistar rats in Pavlovian conditioning and reward operant conditioning
WANG Ke-zhu, XU Pan, LU Cong, et al(65)

Genetic characteristics of seven inbred mouse strains in core colonies from Shanghai analyzed using fluorescent multiplex STR ...
NI Li-ju, ZHAO Li-ya, ZHAO Li-hu, et al(72)

Mechanism of abnormal transduction of neuroendocrine signals in the brain of ovariectomized rat
HOU Xue-qin, LI Yue, RONG Cui-ping, et al(80)

Pathological changes in some important brain areas of rats with post-traumatic stress disorder induced by combined stress
CHEN Wang, LI Chen-cheng, LI Sen, et al(87)

Comparison of the refractive development and ocular growth between two strains of guinea pigs
WEI Zhen, ZHANG Sen, JIANG Li-qin, et al(92)

Advances in research of novel heptamethine cyanine dyes as a potential diagnostic agent for optical imaging of tumor models
WANG Zhe-xuan, ZHAO Ning-ning, ZHANG Cai-qin, et al(97)

Research progress of the role of biological markers in early diagnosis of heart failure
ZHANG hui, ZHOU Xiao-hui, FAN Hui-min, et al(102)

Research progress of the biological effect of P2Y₆ receptor ...
ZENG Yong, WEN Ai-zhen, WANG Shun-min, et al(107)

No. 2

Establishment of a Zuker diabetic fatty rat model of type II diabetic coronary heart disease
ZHU Chao, ZHU Ying-ying, LI Er-ni, et al(111)

Preparation of a rat model of ulcerative colitis with spleen and kidney Yang deficiency
WU Yu-hong, XU Ya-qing, LI Hai-long, et al(116)

Impact of four anesthetic drugs commonly used in animal experiments on the cardiovascular system in rats
SUN An-hui, GU Jie, WU Tao, et al(120)

Repairing effect of embryonic stem cells on injured maternal myocardium in pregnant mice
WANG Hong-mao, QIU Bin, DENG-Ran, et al(127)

Establishment of an Alb-cre/DTR mouse model of inducible liver injury
REN Xiao-nan, REN Rong-rong, LIU Xue, et al(134)

DNA damages in mouse hepatocytes and lymphocytes induced by aniline and their repair dynamics
BIAN Gao-peng, LIU Rui-xiang, SHI Bao-zhong, et al(139)

Comparison of three mouse models infected with influenza virus by aerosol
YANG Yu-qin1, XU Chun-hua1, ZHU Zhao-qin1, et al(145)

Effect of hesperidin on the antioxidant activity and antioxidant enzyme gene expression in mice
TIAN Mei-jie, SUN Ying-jian, GUAN Jia-yi, et al(150)

- Establishment and evaluation of a mouse model of sepsis
JING Xi-zhong, JIA Huan-huan, LUO Ting, et al(158)
- Comparison of the corneal endothelial cells of rhesus monkeys and tree shrews
 *WU Min, LI Na, SUN Xiao-mei, et al*(164)
- Establishment of a SNP genetic identification method for frozen embryos and sperm of inbred mice
 *XU Wei, CHAO Tian-zhu, LIU Li-jun, et al*(169)
- Mechanism of the effect of rAd-APN gene on atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice
WANG Xue-mei, WEI Qin, DUAN Ming-jun, et al(175)
- Evaluation of the detection proficiency of laboratories testing of mammalian orthoreovirus 3 antibody in laboratory mice ...
 *WANG Ji, FU Rui, LI Xiao-bo, et al*(183)
- Evaluation of the proficiency of the laboratories for detection of rabbit hemorrhagic disease virus antibody
FU Rui, WANG Hong, WANG Shu-jing, et al(188)
- Results and analysis of the proficiency of laboratories in detection of salmonella in laboratory animals
XING Jin, FENG Yu-fang, WANG Hong, et al(191)
- Evaluation of the ability to detect to detect *Staphylococcus aureus* in experimental animal laboratories
 *FENG Yu-fang, XING Jin, FU Rui, et al*(195)
- Laboratory proficiency evaluation of the detection ability of malic enzyme 1 and isocitrate dehydrogenase 1 in mouse kidneys
 *WANG Hong, WEI Jie, YU Peng-li, et al*(199)
- Proficiency evaluation of laboratories for the detection of esterase-3 in the kidneys of laboratory mice
 *WEI Jie, WANG Hong, GONG Wei, et al*(204)
- Research progress of adult animal models of growth hormone deficiency and bone metabolism
YUAN Ren-fei, DENG Wei-min, HAN Li-ping, et al(208)
- A brief review on the progress of mouse models of liver cancer ...
 ... *LI Shun, CHEN Li-xiang, PENG Xiu-hua, et al*(213)
- Animal selection for thin endometrium model and improved technique for its establishment
XU Chun-yan, SONG Yang, LI Kun-yin, et al(217)
- ticus can be reduced by oral rehydration salt solution ...
 *HAN Wei, JIANG Li, HE Rong, et al*(243)
- Structural and functional differences of the reproductive system in fertile and infertile male naked mole rats
YU Chen-lin, LIN Li-fang, YUAN Zi-yan, et al(248)
- Effect of chronic corticosterone administration on the learning and memory and expression of synapse-related proteins in mice
SUN Xiu-ping, YANG Jiu-shan, ZHANG Nan, et al(253)
- Establishment of a mouse model of limb heterotopic composite tissue allograft transplantation
HUANG Jian-bing, XU Gao-jun, LIU Hao, et al(258)
- Effects of tacrolimus on the expression of protein phosphatase 2A and P-AKT in rat hepatocytes
NIU Yu-jian, WANG De-en, YANG Liu, et al(262)
- Construction and expression of eukaryotic expression vector of human IL-37b gene
YAO Jing, CHENG Jiang, PEI Xue-feng, et al(268)
- Differential expression of integrin $\alpha v, \beta 3$ in bovine endometrial epithelial cells before and after co-culture with bovine blastocysts
NI Qian-lin, NI He-min, PAN Xing-qian, et al(273)
- Effect of Maca extract on the toxicity and immune organs in mice
YU Fa-rong, ZHANG Shi-shuang, ZHANG Zhen-nan, et al(279)
- Effect of fibrinolytic system on the podocyte injury in rats with membranous nephropathy
LIANG Jing, ZHANG Yuan, CAO Ling, et al(283)
- Isolation, phenotype identification and activation of natural killer (NK) cells in Bama miniature pigs
ZHU Ming-hao, LU Tao-feng, NIU Yin-jie, et al(288)
- Establishment of a visualized detection method of Sendai virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification
ZHOU Jie, ZHAO Li-juan, TAO Ling-yun, et al(293)
- Analysis of the DNA genetic diversity in SPF Jinding duck population
ZHAO Li-li, LU Tao-feng, ZHANG Xiao-ping, et al(299)
- Preliminary observation on the interference effect of *Helicobacter hepaticus* infection on the immune response in BALB/c mice
FENG Jie, ZHANG Quan, XIE Jian-yun, et al(304)
- Analysis of laboratory animal pathogen infection indexes in Shanghai area
FENG Li-ping, TAO Ling-yun, ZHOU Jie, et al(309)
- Application prospects of naked mole rats in biomedical research
 *CUI Shu-fang*(313)
- Research progress in animal models and mechanism of depression
 *HAN Yuan-yuan, DAI Jie-jie* (321)
- Mechanism and research progress of severe diabetic vasculopathy and related experimental animal studies
 *FENG Li-shuai, Ma Xu, WANG Jian-bo*(327)

No. 3

No. 4

- Pregestational ethinyl estradiol exposure leads to glucose homeostasis disruption and changes of expression of glucose-metabolism-related genes in rat offsprings
XU Kai-xuan, LI Ning-ning, GUAN Lei-jian, et al(221)
- Genotype identification and breeding method of caveolin-1 gene knockout mice
ZHOU Sheng-qiang, LUO Dong, HUANG Su-feng, et al(228)
- Anti-atherosclerotic effect of a Chinese medicine, Huanglian Jiedu Decoction, mediated by regulatory T cells
ZHOU Feng-hua, CHENG Sai-bo, ZHANG Yu, et al(233)
- Establishment of an orthotopic implantation model of hepatocellular carcinoma in nude mice
TIAN Shu-hong, WANG Ri-chao, XING Gui-lan, et al(239)
- Mortality of rat models of LiCl-pilocarpine-induced status epilep-

- Pin1 expression in the skin and establishment of an inducible

transgenic mouse model
 XIANG Jian, CHEN Peng, ZHANG Li, et al(333)
 Construction of severe combined immunodeficiency mice based
 on CRISPR/Cas9 technology
 ZHAO Ya, LI Hong-wu, SHI Chang-hong, et al(339)
 Inhibitory effect of RNA interference of *MSTN* gene expression
 on the downstream genes in *Schizopygopsis pylzovi*
 KONG Qing-Hui, CHAO Yan, XIA Ming-Zhe, et al(344)
 Bioinformatic analysis of the sequences of lamins from different
 species
 ZHANG Heng-lu, HUANG Hui-min, YE Zhi-xu, et al(351)
 Exploration of the effect of *Helq* gene on stem cell pluripotency
 ... WAN Cong, HUANG Ya-ping, WANG Mei, et al(358)
 Isolation, culture and identification of primary airway smooth
 muscle cells from mice
 YE Zhi-hao, XU Wen-hao, LIU Qing-hua, et al(364)
 Evaluation of the CaV1.1-R528H gene knock-in mouse model of
 thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis
 ZHI Hong-ye, XU Hong-yan, CHEN Ying-ying, et al(369)
 Characterization of swine leukocyte antigen class I genes and ho-
 mology analysis of the similarity to HLA in *GGTA1*^{-/-}
 Wuzhishan minipigs
 JIANG Ying-di, ZENG Guo-min, SHI Ning-ning, et al(375)
 Effects of 6-week voluntary wheel exercise on sex-hormones and
 hypothalamic- pituitary-testicular axis in high-fat fed SD
 rats
 ZHAO Yan, SUN Jing-quan, XIE Min-hao, et al(381)
 Measurement of body weight, blood parameters and main organ
 coefficients of germ-free piglets
 ... SUN Jing, DU Lei, CAO Hao-ran, et al(388)
 Establishment of a stable rat model of middle cerebral artery oc-
 clusion
 BAO Xin-jie, LI Xue-yuan, ZUO Fu-xin, et al(395)
 A modified method for common carotid artery puncture in the es-
 tablishment of a rat model of middle cerebral artery occlu-
 sion ... LIU Hua, LIU Yue-mei, GUAN Rui, et al(399)
 Preliminary study of the inhibitory effect of selective M4 musca-
 rinic receptor antagonist MT3 on form deprivation myopia in
 guinea pigs
 ... LI Tao, ZHOU Xiao-dong, LI Bing, et al(403)
 Comparison of the therapeutic effect of TGF-β1 gene therapy and
 traditional nonsurgical treatment on the rat model of post-
 partum stress urinary incontinence
 CHENG Ming-jun, CAO Yungui, DING Jing-xin, et al(408)
 The role of PKCzeta-expression in the anterior cingulate cortex in
 emotional response to complete Freund's adjuvant-induced
 inflammatory pain
 DU Jun-ying, WEN Cun, SHAO Xiao-mei, et al(414)
 Effect of anti-oxidant treatment on the expression and activity of
 SOD in diabetic rats
 ... ZHOU Yu, WANG Ling-li, HUANG Yang, (422)
 Antioxidant effects of polysaccharide extraction from *Eupolypha-
 ga sinensis* Walker (ESW) *in vitro* and *in vivo*
 ... XIE Meng-rui, QIU Si-qi, SHEN Hong(427)
 Establishment of a zebrafish model of thrombosis and the inter-

vention effect of Guanxinning tablet
 WANG Mu-lan, PAN Yong-ming, JIN Min, et al(432)
 Advances in stem cell research and translational medicine ...
 ... GAO Shu-ping, QU Chun-hui, ZHOU Rui, et al(439)

No. 5

Identification of zebrafish shield organizer-specific genes
 ... WAN Chuan-lu, Yan Yi-fang, CAO Yu, et al(441)
 Knockdown of tissue transglutaminase in SaOS-2 cell line inhib-
 its its osteoblastic differentiation and mineralization
 YU Hui-lei, YIN Xiao-xue, CHEN Zhong-qiang, et al(448)
 Comparison of the differences in glutamate-induced astrocyte
 swelling between Wistar and Sprague-Dawley rats
 ... SHI Zhong-fang, XU Li-xin, LU Yi, et al(454)
 Inhibitory effect of paeoniflorin on inflammatory chemokines and
 their receptor in a mouse model of asthma
 LIU Jia-qi, ZHAO Zheng-xiao, WEI Ying, et al(460)
 Puerarin alleviates HUVEC injury induced by visfatin through
 up-regulating miR-155-3p
 ZHOU Feng-hua, HUANG Zhi-yong, ZHANG Lei, et al(465)
 Expression of skeletal muscle glucose and energy metabolism-re-
 lated genes in Guangxi Bama minipigs with type 2 diabetes
 mellitus
 YAN Xue-yu, JIANG Qin-yang, WU Yan-jun, et al(470)
 Effect of *Noggin* silencing on the BMP and Wnt signaling path-
 ways
 MA Yu-nan, YOU Ying, SHEN Huan-huan, et al(475)
 Once-weekly subcutaneous injection of recombinant human para-
 thyroid hormone (1-34) promotes the bone fracture healing
 in rats ... MA Teng, ZHANG Weng, GUO Qi, et al(481)
 Establishment of a rat model of early diabetic retinopathy in-
 duced by multiple low-dose streptozotocin injection
 ... ZHU Hua, LI Yan-hong, XU Yan-feng, et al(487)
 Ultrastructural observation of blood-brain barrier in the nude
 mouse model of brain metastases from lung cancer
 CHEN Yu-sheng, TU Xun-wei, YU Mei-e, et al(494)
 Parasitic infection in a closed group of outbred *Meriones meridia-
 nus* and results of parasite eradication
 XU Yi-mei, WANG Xin-guo, SHI Shen, et al(499)
 Comparative study on the characteristics of bone metabolism in
 forelimb malformation WHBE rabbits via the OPG/RANK/
 RANKL system
 LV Jian-min, CHEN Fang-ming, CHEN Cheng(503)
 Changes of the mRNA expression of "kidney yang deficiency" -
 related genes and ultrastructural observation of the hypo-
 thalamus in Lewis rats
 ZHANG Li-zong, FANG Ming-sun, YANG Wei-ji, et al(511)
 Drug therapy and mechanism of pain in mice with induced ade-
 nomyosis
 LI Qing, WANG Jie-yu, ZHANG Xiao-dan, et al(516)
 Mutagenicity evaluation of the hydrolysate of *Meretrix meretrix*
 Linnaeus soft tissue
 GAO Mei, CAO Chong, WANG Gong-xia, et al(521)

- Observation of the estrous cycle in female NOD/SCID mice ...
 ZHEN Yu-hua, SONG Yang, GUAN Yong-ge, et al(526)
- Progress in research on the role of microRNA-424 in carcinogenesis and its related mechanism ...
 LIU Ping, ZHAO Hai-ping, LUO Yu-min(529)
- Research progress of immunodeficient animal models using gene modification techniques ...
 XIN Ji-ge, ZENG Yang-zhi(535)
- Alzheimer's disease and PRNP mutational mouse models ...
 ZHAO Jin, CAI Zhao-wei, GUAN Feng(541)
- Advances in research on germ-free pig models ...
 DU Lei, SUN Jing, GE Liang-peng, et al(546)
- No. 6**
- Identification of a zebrafish *sat1. a* mutant ...
 WAN Chuan-lu, YAN Yi-fang, WANG Peng, et al(551)
- Establishment of a myocardial infarction model and the gene expression profile in peri-infarct area in Juema minipigs ...
 TAN Wei-jiang, WANG Jing, LI Xiang, et al(558)
- Tumor targeting of near-infrared fluorescence heptamethine cyanine dye in orthotopically transplanted gastric carcinoma in mice ...
 ZHAO Yong, ZHANG Cai-qin, ZHAO Ning-ning, et al(567)
- Comparison of the genetic diversity between Guangxi and Yunnan tree shrew populations (*Tupaia belangeri chinensis*) ...
 TANG Yan-ping, CAO Ji, YANG Xiang-di, et al(572)
- Distribution and differential expression of *Hba- α* in mouse normal hatched blastocysts and dormant embryos before and after cryopreservation ...
 LIU Di, NI He-min, GU Mei-chao, WANG Li-hong, et al(579)
- Targeted suppression of Act1 in the macrophages ameliorates experimental ulcerative colitis in mice induced by dextran sodium sulfate ...
 KUAI Yi-he, WANG Li-jing, DENG Hui-jun, et al(585)
- Establishment of a ICR mouse model of systemic *C. albicans* infection induced by oral inoculation ...
 LUO Yin-zhu, PAN Jin-chun, HE Li-fang, et al(591)
- Preparation of a mouse model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection ...
 DENG Shao-chang, LUO Yin-zhu, LI Hang, et al(596)
- Protective effect of ginseng co-enzyme Q₁₀ suncream on the ultraviolet radiation-induced skin damage in mice ...
 WU Hai-you, QIU Chu-qun, LIANG Mei-ting, et al(601)
- Establishment and analysis of a mouse model of *Staphylococcus aureus*-induced arthritis ...
 YE Qiu-ying, LI Ge, LUO Yin-zhu, et al(607)
- Preliminary study for integrating DPRA with h-CLAT to predict skin sensitizers ...
 KE Yi-hui, CHEN Yu, CHENG Shu-jun(611)
- Inhibitory effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on tumor growth and metastasis in MMTV-PyMT mouse models of breast cancer ...
 LI Yuan-yuan, QI Cui-ling, ZHOU Zhi-qing, et al(618)
- Effect of electroacupuncture on the rat model of type 2 diabetes mellitus combined with renal hypertension ...
 WAN Bin, SUN Li-wei, LIU Rong, et al(622)
- Differential IGF-1 gene expression in various tissues at different developmental stages in Tibet minipigs ...
 TIAN Yu-guang, WANG Yu-jue, PANG Wei, et al(628)
- Establishment of a rat model of cardiopulmonary resuscitation with mechanical chest compression ...
 TANG Yi, AN Qing-bao, FU Shou-zhi, et al(632)
- Establishment of a rat model of blood hypercoagulable state caused by intravenous injection of thrombin ...
 WANG Liwen, SHEN Xiao-jie, WU Qian, et al(639)
- A beagle model of type 2 diabetes mellitus induced by high fat diet and low dose streptozotocin injection ...
 HU Juan, YANG Yang, MI Ben-zhong, et al(643)
- A model of high fat and high iron-induced hepatic fibrosis in rats ...
 HE Hong-xing, CHEN Jie, HUANG Fang, et al(648)
- Effects of benzene pollution on the liver and kidney function and blood nucleotide level in rats ...
 YU Fa-rong, YANG Bo, LI Deng-lou, et al(654)
- Research progress of depression animal models with kidney-yang deficiency induced by glucocorticoid ...
 HE Shu-fen, JU Wen-zheng, HU Hao-bin, et al(659)
- Development of detection methods and relationship between miRNA and heat stress ...
 GUO Wen-jin, LIAN Shuai, LI Yue, et al(666)