



中国科技论文统计源期刊  
中文核心期刊要目总览

ISSN 1671-7856  
CN 11-4822/R

ZHONGGUO BIJIAO YIXUE ZAZHI

# 中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

原名《中国实验动物学杂志》



2016 **2**

邮发代号: 82-917

第26卷(第2期) Vol.26 No.2

ISSN 1671-7856

主办 中国实验动物学会  
中国医学科学院医学实验动物研究所



9 771671 785145

# 中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

月刊 1991年3月创刊

第26卷 第2期 2016年2月29日出版

**主管**  
中国科学技术协会

**主办**  
中国实验动物学会  
中国医学科学院医学实验动物研究所

**主编**  
秦川

**编辑**  
《中国比较医学杂志》编辑部

**出版**  
中国实验动物学会

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

**广告经营许可证**  
京朝工商广字第8131号

**照排**  
同方知网(北京)技术有限公司

**印刷**  
北京市百善印刷厂

**邮发代号**  
82-917

**定价**  
每期20.00元,全年240元

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

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

## 目次

(本刊已入编“中文核心期刊要目总览”)

### “实验动物国家标准论坛”专题

- 浅谈实验动物微生物国家标准 ..... 魏强,秦川(1)
- 关于现行《国标》两个问题的思考 ..... 李秦,储文庆,孔椽飞,等(4)
- 我国实验用动物卫生相关法律法规与  
国际陆生动物卫生法典的内容比较 .....  
薛康宁,刘晓宇,赵赤鸿(7)
- 定义“SPF”级实验大小鼠和制定健康监测方案时  
需考虑的因素 ..... 周聪颖(12)
- 修订实验动物概念的定义对中国实验动物行业发展的  
重要性和意义探讨 ..... 金东庆,朱冠(22)
- 生物安全实验室病毒悬液灭活试验方法  
标准转化研究 ..... 邓阿妹,魏凤,吴佳,等(27)
- 实验动物国家标准中大小鼠微生物检测项目的考量 .....  
向志光,佟巍,张丽芳,等(33)
- 关于国家标准中实验大、小鼠细菌检测项目修改的建议 .....  
张丽芳(40)
- 关于实验动物国家标准病毒检测项目思考 ..... 佟巍(42)
- 实验动物微生物国家标准研讨会纪要 ..... 向志光(48)

### 研究报告

- DMBA/巴豆油二阶法联合NB-UVB照射构建  
小鼠皮肤鳞癌模型 ..... 吕超,刘保国,郑海萍,等(51)
- 靶向调控大鼠海马CNN3基因表达载体的  
构建及鉴定 ..... 孙俊梅,龙晶晶,韩雁冰,等(55)
- 针刺结合丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的  
保护作用 ..... 曾兆禄,韩继超,薛云,等(62)
- 子午沙鼠的室内繁殖特征 ..... 徐艺玫,廖力夫,史深,等(67)
- 强志组方对多发性抽动症复合恐惧行为  
大鼠的影响 ..... 金枝,阎兆君,李亚群,等(71)
- 犬副流感病毒的分离鉴定及部分基因序列分析 .....  
孙明,刘巧荣,秦亚嫒,等(77)

### 综述与专论

- 微核试验方法及应用研究进展 ..... 陈思,鲁克庆,马兴铭(83)

### 研究快报

- 警惕 Zika 病毒,公众无需恐慌 ..... 许黎黎,秦川(87)

### 广告

- 封二,封三,封底

期刊基本参数:CN11-4822/R\*1991\*m\*大16\*92\*zh\*p\*¥20.00\*2000\*18\*2016-2

---

---

# CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly    Established in March 1991    Volume 26    Number 2    February 29 2016

---

## Responsible Institution

China Association for Science and Technology

## Sponsor

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

## Editing

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

## Editor-in-Chief

QIN Chuan (秦川)

## Publishing

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

## Printing

The Baishan Printing House of Changping, Beijing

## Distributor

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

## Mail-order

Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine

## CSSN

ISSN 1671-7856  
CN 11-4822/R

Copyright 2016 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

## CONTENTS IN BRIEF

- Discussion of the microbes listed in the National Standard of Laboratory Animals ..... *Wei Qiang, QIN Cuan* ( 1 )
- Two considerations about the current National Standard of Laboratory Animal ..... *LI Qin, CHU Wen-qing, KONG Xiang-fei, et al.* ( 4 )
- Comparison of domestic laws and regulations related to experimental animals and international terrestrial animal health codes .....  
..... *XUE Kang-ning, LIU Xiao-yu, ZHAO Chi-hong* ( 7 )
- Factors to be considered when defining “SPF” and health monitoring programs in laboratory mice and rats ..... *Sonja T. Chou* (12)
- Necessity and importance of amendment of the key concepts of laboratory animals in China ..... *JIN Dong-qing, ZHU Guan* (22)
- Transformation and standardization of the inactivation test method for virus suspension in biosafety laboratory .....  
..... *DENG A-mei, WEI Feng, WU Jia, et al.* (27)
- A current consideration of the microbes listed in the National Standard of Laboratory Animals for mice and rats .....  
... *XIANG Zhi-guang, TONG Wei, ZHANG Li-fang, et al.* (33)
- Suggestion for modification of bacteriological quality monitoring of laboratory mice and rats in China ..... *ZHANG Li-fang* (40)
- Consideration of the virological items in the National Standard of Laboratory Animals ..... *TONG Wei* (42)
- Establishment of a mouse model of cutaneous squamous cell carcinoma induced by 7, 12-DMBA, croton oil and narrow-band ultraviolet B irradiation .....  
..... *LV Chao, LIU Bao-guo, ZHENG hai-ping, et al.* (51)
- Construction and identification of lentivirus-mediated vectors targeting CNN3 gene in the rat hippocampus .....  
... *SUN Jun-mei, LONG Jing-jing, HAN Yan-bing, et al.* (55)
- Neuroprotective effect of acupuncture combined with Danhong injection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats .....  
..... *ZENG Zhao-lu, HAN Ji-chao, XUE Yun, et al.* (62)
- Reproductive performance of indoor-housed *Meriones meridianus* .....  
..... *XU Yi-mei, LIAO Li-fu, SHI Shen, et al.* (67)
- Effect of “Qiangzhizufang” on the rat model of Tourette syndrome combined with fear ..... *JIN Zhi, YAN Zhao-jun, LI Ya-qun, et al.* (71)
- Isolation and identification of canine parainfluenza virus and partial gene sequence analysis of the isolate .....  
..... *SUN Ming, LIU Qiao-rong, QIN Ya-man, et al.* (77)
- Research progress of the methods and application of micronucleus assay .....  
..... *CHEN Si, LU Ke-qing, MA Xing-ming* (83)
- Bevigilant for Zika virus, no need to panic ..... *XU Li-li, Qin Chuan* (87)

## 实验动物国家标准论坛

**编者按:**实验动物相关国家标准于1994年颁布实施以来已经跨越21年,在促进我国实验动物质量提高,满足科学研究需要等方面起到了无可替代的作用。国标本身在伴随着实验动物整体发展而不断发展、提高的过程中,也发现了一些问题,诸如国标定位问题、实验动物等级问题、实验用动物标准、领域覆盖问题等等。本论坛拟就各种问题,组织国内外不同领域专家、学者广泛开展讨论,不设命题,自由撰文,以便集思广益,聆听各种观点、建议,为配合国家十三五和中长远科技发展计划,修订更科学、更严谨、更适用的实验动物国家标准做好前期工作。

“实验动物国家标准论坛”专题

# 浅谈实验动物微生物国家标准

魏 强, 秦 川

(北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,卫生部人类疾病比较医学重点实验室,国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,北京 100021)

**【摘要】** 1994年我国第一个国家标准《实验动物微生物学和寄生虫学监测等级》颁布实施以来已经跨越20年,使得微生物监测工作有了依据,在促进我国实验动物质量提高,满足科学研究需要等方面起到了无可替代的作用。国标本身在伴随着实验动物整体发展而不断发展、提高的过程中,也发现了一些问题,诸如定位问题、等级问题、检测频率问题等等。本文就以上问题,进行了分析,并提出一些观点和建议,供大家思考,以便集思广益,为配合国家十三五和中长远科技发展计划,修订更科学、更严谨、更适用的微生物标准做好前期工作。

**【关键词】** 动物实验;微生物标准

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0001-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.02.001

实验动物国家标准在实验动物质量提高、保障“标准化的实验动物”用于生命科学研究,特别是医学、医药、生物、兽医、比较医学、转化医学等等方面的研究起着其他手段不可替代的作用。我国实验动物标准制定工作在政府部门的关怀支持下,经过中国实验动物标准化委员会组织多种跨学科工作者的不断努力,取得了很大的发展,形成了一定的标准体系,尤其是1994、2001和2008~2011年国家实验动物微生物、寄生虫等级和检测标准的颁布,使我国实验动物质量保证有了纲领性文件,为我国实验动物质量稳步推进提供了有力的保障。但是,随着实验动物学科及相关学科的发展,特别是和国际实验动物资源的交换越加频繁,对现行版本的微生物国家标准,也提出了诸多建议、观点,本文就这些观点、建议做一些梳理,供大家思考,以便促进百

家争鸣,集思广益,为配合国家十三五和中长远科技发展计划,修订更科学、更严谨、更适用的微生物标准做好前期工作。

### 1 国家标准定位

实验动物法治化管理以1988年国家科委颁布的《实验动物管理条例》(众所周知的2号令)为标志,陆续颁布了《实验动物质量管理办法》、《实验动物许可证管理办法》以及各省市相关法规、政策等,这些法规、政策的颁布实施,确定了管理主体和管理体系,明确了管理措施和管理办法,使我国实验动物质量监管体系有了根本性的改变和改善。

实验动物国家标准,包括微生物和寄生虫标准在1994年的基础上,提高、修订,并将寄生虫标准独立,目前实施版为2008、2011年颁布版本。随着我

国实验动物科学发展,形成了具有我国特色的相关标准,促进了实验动物监测技术体系的发展,形成了一定的规模,并达到了一定的标准化水平,实验动物监测能力和检测技术也是围绕国家标准制订的内容开展工作。

因此,《实验动物 微生物学等级及监测》和《实验动物 寄生虫学等级及监测》标准作为强制性标准(2008年后改为大部分强制性标准),按照《实验动物管理条例》明确定位,将实验动物分成不同的四个等级,提供检测项目和方法,为我国实验动物依法管理提供了科学依据,从而保证我国实验动物整体水平的提高和满足生命科学发展的基本需要。

## 2 国家标准历史作用

实验动物国家标准在经过微生物、寄生虫检测技术经验积累多年后,1994年形成我国第一个标准《实验动物微生物学和寄生虫学监测等级》。监测工作有了依据,动物质量等级开始明确,不符合等级的动物不再被认可。实验用动物的概念随即拓展,动物实验室化的基础工作也引起重视。

2001年在《实验动物微生物学和寄生虫学监测等级》的基础上,结合学科概念,将与寄生虫学监测等级的有关内容分开,分别形成《实验动物 微生物学等级及监测》(GB14922.2-2001)、《实验动物微生物学检测方法》(GB/T14926.1-14926.64-2001)和《实验动物 寄生虫学等级及监测》(GB14922.1-2001)、《实验动物 寄生虫学检测方法》(GB/T18448.1-18448.10-2001)的独立标准。标准得到进一步优化,如删除了大、小鼠轮状病毒检测;取消了大、小鼠普通级动物等级,为提高动物质量,全面逐级取消普通级动物奠定基础。

2006年开始广泛征求各方意见和建议,修订时间跨度达5年之久,形成2011年版标准,使得微生物和寄生虫监测内容和技术达到统一、整体化要求,两者监测内容紧密配合,更适合学科要求。标准规定了实验动物微生物学、寄生虫学等级及监测,包括:实验动物微生物学、寄生虫学的等级分类,检测要求,检测程序,检测规则、方法,结果判定和报告等。标准取消了李斯特杆菌的检测项目,优化了部分检测方法,特别是犬相关病毒如犬细小病毒等疫苗免疫后70%阳性判为合格,更符合科学性和适用性。经过充分考虑,未增加诺如病毒等的检

测项目。

目前,根据以上国家标准,按照微生物、寄生虫对实验动物致病性和危害性的不同,以及是否存在于动物体内,将实验动物分成不同的四个等级。考虑各种实验动物质量控制的具体要求和情况不同,又进一步具体化:实验小鼠和大鼠的微生物学等级分为清洁级、无特定病原体级(SPF)和无菌级动物三个等级。豚鼠、地鼠和兔为四级。犬和猴分为普通级和SPF级。

从三次修订来看,第一次版本起到“从无到有”的历史作用,第二次修订主要起到精简、提高作用,第三次修订起到更规范、更科学、更适用的作用。总体是伴随着实验动物整体发展而不断发展、提高。

## 3 现状及问题

### 3.1 定位问题

国家标准是全国实施的标准,应该是准入性的基本标准,也可以理解为“最低限制”性标准。目前标准,既含有就高不就低的原则,又有“要符合中国国情”的成分。结果是,既有国家标准的理念,又有行业、企业标准的痕迹,处于高不成低不就的状态。

### 3.2 动物等级问题

目前将动物分为普通级、清洁级、无特定病原体级(SPF)和无菌级动物四个等级。一刀切起到了全国统一,同步推进的作用。但往往达不到要求,甚至采取不合适方法规避正常检测。规定普通动物不能用于实验,只用于教学,其实教学的概念包含动物实验。无菌级实验动物属于特殊用途动物,不应归为常规动物(悉生动物、无抗原动物)。特别是清洁级动物,是考虑国情的产物。

### 3.3 检测项目问题

有学者提出作为国标检测项目过高,如绿脓杆菌、金黄葡萄球菌项目,高于有些国家的机构检测项目,给动物进出口、资源交流带来“技术壁垒”,也可理解为自找麻烦。更有学者提出SPF概念应该遵循经典含义,即应按实验要求排除的病原,而不是盲目规定,限制动物使用;相反的,有学者提出检测项目不全,应增加诺如病毒,牛棒状杆菌等项目。并提出作为国家标准,检测的项目应该涵盖所有国外提倡排除的项目,这样做,将有力提高我国实验动物质量,凸显国家质量水平。

### 3.4 检测频率问题

大部分的意见是,国标不易规定所有的项目均

要求年检 4 次,应按病原特性进行检测。检测的方法应该增加病原检测的力度等。也有学者提出,一年检测 4 次实为不足,尤其是啮齿类动物,繁殖几代可能才检测到一次,漏检的几率会很大。

#### 4 思路和建议

综合以上观点,提出以下思路和建议,欢迎学者各尽所能,积极发表各种意见,为进一步配合国家十三五和中长远科技发展计划,修订更科学、更严谨、更适用的微生物标准做好前期工作。

(1) 建议取消现有的实验动物四个等级划分:4 个等级的划分,不符合所有动物特性和环境要求,也阻止了一些动物作为“实验动物”的资格,处于“实验用动物”的状态,既不科学,也不适用

(2) 建议制定实验动物微生物、寄生虫通用标

准,即 SPF 等级标准:将国标回归到基础定位,即所谓最低标准。病原检测项目即排除的病原重点分为 3 类:引起本动物疾病病原、人兽共患病病原、对实验明显有影响的病原。不再包含条件致病菌和环境指标性病原。

(3) 鼓励实验动物生产单位、企业制定“行业标准或企业标准”:作为国家标准的补充和提高,将更高要求留给生产单位、企业,鼓励他们自己制定检测项目多、实行动态监测的“行业标准或企业标准”,特别是关于悉生动物、无抗原动物和无菌动物相关标准,从标准方面鼓励竞争,促使他们提供更优质的实验动物。

[修回日期]2015-12-26



# 关于现行《国标》两个问题的思考

李 秦, 储文庆, 孔橡飞, 程云龙

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 中英合作 MOTAC 神经科学实验室,  
莫泰科生物技术咨询(北京)有限公司, 北京 100050)

**【摘要】** 大群饲养的实验用猴, B 病毒抗体阳性率高达 60% ~ 70%。现行《实验动物国家标准》规定, B 病毒为普通级实验猴必检项目, 并且要求“被测猴血清中的 BV 抗体”为阴性。作为国家标准, 如果脱离了该国行业的实情, 那就要权衡修订。实验动物饲料硬度/松脆度没能作为一个指标被列入《国标》, 而这个指标可以大大影响了实验动物饲料的摄入和受试动物的生理状况。建议将该指标吸纳进《国标》, 进行通盘考量。

**【关键词】** 猕猴; B 病毒; 饲料; 硬度/松脆度

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0004-03

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 02. 002

## Two considerations about the current National Standard of Laboratory Animals

LI Qin, CHU Wen-qing, KONG Xiang-fei, CHENG Yun-long

(Institute of Medical Laboratory Animal Science, Sino-British MOTAC Neuroscience Collaboration Lab,  
MOTAC Beijing Services Ltd. , Beijing 100050, China)

**【Abstract】** According the current National standard for laboratory animal, herpes B virus antibody must be tested and negative for all the breed/tested macaques, howere, in fact the positive rate is around 60 - 70% in breeding colony. Being the National Standard, if it is too far from the reality of the filed, weighing and changing should be made. Hardness/ crispness degree of laboratory animal diet never been considered as a listed value in the National Standard for Laboratory Animal to identify the quality of diet. In fact, this index affects a lot about daily diet intake and physiological status of laboratory animals. Hereby, the authors suggest to take the index into the National Standard, to assess the quality of laboratory animal diet in a more comprehensive way.

**【Key words】** Macaque; B virus; Diet; Hardness/ crispness degree

第 1 版《国标》诞生、贯彻、实施至今已经 31 年了。实验动物科学及其相关行业在《国标》的规范下, 得以健康发展和迅速扩大。但是, 具体执行的过程中, 还存在一些不如意之处。这里就自己感触较多的两个问题予以赘述。

### 1 实验用猴 B 病毒感染的问题

众所周知, 实验用猴(特别是食蟹猴、猕猴和红面猴)是生命科学研究中非常重要的实验动物。在我国有着非常丰富的实验用猴资源。近 35 年来, 全国各地相继建立了多家、各种规模的实验用猴繁育场。据不完全统计, 截止 2014 年末, 我国实验用猴

存栏量超过 30 万头。每年可使用和出口的指标达到 10 万头。表面上看,几乎所有的实验用猴企业和实验用猴单位都取得了动物质量合格证。

然而,还是让我们面对真正的流行病学现实吧。上世纪五六十年代,国外学者(Andrewes, C., 1964., Keeble 1960., Hartley 1964., Пилле 1965.)对野生实验用猴群进行 B 病毒感染流行病学调查的结果是病毒检出率 3% 左右, B 病毒抗体阳性率 10% 左右。但是,大群饲养的动物中 B 病毒抗体阳性率高达 60% ~ 70%。我国目前存栏的实验用猴, B 病毒抗体检测的情况怎么样呢? 报的都很低。但可以肯定的讲,阳性率只会高于这个数字。据业内人士估计,都在 80% 左右。原因很简单, B 病毒抗体阴性的,前些年都作为“优质商品猴”出口了。可以肯定地说,真正查的话,家家都有“B 病毒抗体阳性”的巨大烦恼。这个不争的事实甚至让那些来中国低价选购“优质商品猴资源”的“洋客商们”望而却步。我们国家的专家、学者、研究人员,有多少真正用上了“B 病毒抗体阴性”的实验用猴呢?

可是,我国现行《实验动物国家标准》,还不让给动物打疫苗、不是查抗原、而是查抗体……势必严重阻碍了实验用猴行业的发展。如果真正在所有实验用猴企业和实验用猴单位硬性强制落实《国标》的话,将在本行业产生巨大的资源浪费,甚至对该行业造成毁灭性打击。因为,《国标》中规定, B 病毒(猕猴疱疹病毒 1 型)为普通级实验猴必检项目,并且要求:检测判定的方法是“检测猴血清中的 BV 抗体”为阴性。如果检出阳性,还要建议隔离扑杀……也就是说,那会血流成河,然后家家停业! 相信谁也不愿看到,实验动物行业无猴可用、猴横遍野,这一可悲的现象出现。

为什么不换个角度考虑,做些利国利民利于行业发展的变通呢?

### 1.1 建议工作人员使用疫苗

组织专家,找到合适的疫苗,并且鼓励从业人员使用。目前各个实验用猴单位预防 B 病毒感染的“一般措施”都是:①新来实验用猴最好单笼关养,应仔细检查它们的唇缘和舌;②同有疑似 B 病毒病变的猴子或猴组织接触的人应带口罩和护目镜;③工作人员万一被疑似 B 病毒感染的猴子咬伤或抓伤,伤口应立即放血,用肥皂水充分洗涤,然后以碘酒或酒精消毒,病人观察三周(因 B 病毒病的潜伏期最长为 20 d)(Davidson, W. L. 等, 1960;

Perkine, F. T. 等, 1966); ④尽量不要徒手捕捉猴子,必要时可给动物注射麻醉剂和镇静剂,以利于实验操作,有开放性创伤的工作人员需待充分恢复后才能同猴子接触(Hartley, E. G., 1966)。所有这些“一般措施”,都是在被动应付,很实用,但完全不能从根本上解决问题。就是在被动观望病毒如何作为! 从上世纪 30 年代,出现第一例 B 病毒病患者至今,全球超过 43 例人感染猴 B 病毒的事件中, 2/3 集中在美国,其他则分布在加拿大和英国,几乎全部是白种人,亚太地区从未有过人感染猴 B 病毒的事件报道。30 多年来,我国的工作人员屡有被实验用猴咬伤抓伤的情况发生。但未发现过 B 病毒病,也未见到国内任何的报道。在目前尚无充分的证据证明“我国无 B 病毒感染”,或者说“黄种人很有可能对 B 病毒有天然抵抗力”的情况下,我们仍然不能麻痹大意。应该寻找适用的疫苗,保护所有从业人员。

### 1.2 给所有的实验用猴接种疫苗

试想,我国有大量的 B 病毒阳性实验用猴(将近 20 多万),它们的出路是什么? 为什么不考虑让它们彻底从病毒感染状态脱离出来? 为什么不通过疫苗接种主动把传播控制住? 无论我们主动防疫与否,为数巨大的 B 病毒抗体阳性动物都存在。“淘汰或扑杀”都不太现实。因此,从国情出发,在充分保护工作人员的前提下,在有条件和主动免疫保护的情况下,试行饲养及使用猴 B 病毒抗体阳性实验用猴,无可厚非。再说了,使用 B 病毒抗体阳性猴子,对科学研究造成的影响是有限的。对于有影响的研究就不要用了,就选择“B 病毒阴性猴”。事实上,许多科研单位和公司目前都在使用 B 病毒抗体阳性猴,这已成为行业的普遍而又无奈的现象。可以说, B 病毒抗体阳性猴,在目前条件下,给生命科学发展所做的贡献远大于 B 病毒阴性猴。

### 1.3 鼓励并帮助实验用猴企业逐渐建立真正的 B 病毒阴性猴群

一个行业标准的制定是为给行业的发展保驾护航,但其前提是适合这个行业,适合这个行业所处的国情。变化是这个世界发展的本质定律,行业标准也要因时因地制宜。等到时机成熟了,我们在修订《国标》,把我们的质量标准再提高一步,也未尝不可!

## 2 实验动物饲料的硬度/松脆度问题

所有饲料生产厂家,几乎完全依靠经验和售后

反馈的体会来调节这一指标。甚至可以说,这个指标是虚拟的,臆想的!这造成目前行业中各个企业关于饲料硬度/松脆度的标准不一。同种动物饲料在每个厂家生产的硬度有差异,不利于相关检验和管理,更不利于实验动物使用单位的选择。

经验告诉我们:有的啮齿类实验动物饲料硬度/松脆度较低,造成动物采食过量,动物生长曲线与标准生长曲线不符。更有甚者,造成大量“盗料”,引起饲料严重浪费。对于非人灵长类动物膨化饲料,有的硬度较高,松脆度不够,动物根本就咬不动。以至于它们拒绝采食,体质变差。

饲料作为实验动物最重要的摄入因素,可主宰研究的结果和导向。如果饲料有问题,将会给实验带来多大影响?这是不是就要求我们,尽可能细化《国标》。特别是在原有指标之外,增加硬度/松脆度这样的关键质量控制指标。

硬度/松脆度可以通过测定压碎力和脆碎度来衡量。具体做法都很简单而且很容易实现。比如,

用硬度仪、脆碎度检测仪来测定等。

鉴于饲料存在的硬度/松脆度问题,这里建议:(1)不同实验动物的饲料硬度/松脆度应该有所差异,具体应结合动物采食习性,口腔牙齿的结构做出相应调整。例如:啮齿类动物(大小鼠等)的门牙会不断的生长发育,因此需要有足够的硬度/松脆度来帮助啮齿类动物磨牙;非人灵长类(猕猴、食蟹猴等)实验动物采食挑剔,饲料的硬度/松脆度就要做出相应的调整。(2)应该针对同种动物的不同年龄段,为其制作不同硬度/松脆度的饲料。

一个成熟的行业《国标》,应该是科学的、规范的、具象化的、有实操性的。当然更是要符合国情的、与时俱进的。在实际操作的过程中,我们发现了一些问题。正是基于这些问题,呈请专家学者考虑并参与讨论。修改现行《国标》中有关内容。

[修回日期]2015-12-30



# 我国实验用动物卫生相关法律法规与 国际陆生动物卫生法典的内容比较

薛康宁, 刘晓宇, 赵赤鸿

(中国疾病预防控制中心, 北京 102206)

**【摘要】** 随着实验用动物这一概念的提出,相应的法律法规亟需制定,而目前我国专门针对“实验用动物”这一概念的卫生相关法律法规尚未被明确提出,使得实验用动物的使用与管理存在安全隐患。本文将《中华人民共和国动物防疫法》及《实验动物管理条例》与国际《陆生动物卫生法典》在内容上进行了比较,对我国实验用动物卫生相关工作提出建议。

**【关键词】** 实验用动物; 卫生法律; 比较

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0007-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.02.003

## Comparison of domestic laws and regulations related to experimental animals and international terrestrial animal health codes

XUE Kang-ning, LIU Xiao-yu, ZHAO Chi-hong

(Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

**【Abstract】** The concept of “experimental animals” has been raised up, while we still need relevant laws and regulations on experimental animals. Accordingly, a potential safety hazard may occur when using these animals. Here we compare the content of the “Animal Epidemic Prevention Law of the People’s Republic of China” and “Regulations for Experimental Animal Management”, with the “Terrestrial Animal Health Code” issued by International Organisation for Animal Health (Office International des Epizooties, OIE), in order to provide some advice to completing the relevant laws in China.

**【Key words】** Experimental animals; Health law; Comparison

目前我国实验用的动物包括实验动物与实验用动物。2013年版《实验动物管理条例》第一章第二条对实验动物进行了定义,指出实验动物,是指经人工饲养,对其携带的微生物实行控制,遗传背景明确或者来源清楚的,用于科学研究、教学、生产、检定以及其他科学实验的动物。但这个概念不

能满足目前科研教学过程中使用动物的定义。2014年颁布的《实验动物机构质量和能力的通用要求》(GB/T 27416-2014)对实验动物和实验用动物这两个概念进行了明确的定义,即实验动物(laboratory animals)是指按相关标准专门培育和饲养的旨在用于实验或用于其他科学目的的动物;实验用动物

**【基金项目】** 公益性行业科研专项(编号:201302006)。

**【作者简介】** 薛康宁(1986-),女,研究实习员,研究方向:实验动物兽医管理。Email: xuekn@chinacdc.cn。

**【通讯作者】** 赵赤鸿, Email: zhaoch@chinacdc.cn。

(experimental animals),是指用于实验的动物,包括实验动物,也包括畜养动物、野生动物等。同时还注明,实验动物需遗传背景明确或来源清楚,并对其携带的微生物、寄生虫和健康状态等实行控制;鉴于我国语言习惯,在无需特别区分时,广义的实验动物指实验用动物。这样,实验用动物有了属于其自身的定义,涉及的动物范围更加广泛。实际工作中,高校或科研机构的确会使用畜养动物,如牛、羊、猪等。但鉴于我国尚未有系统的、针对实验用动物的国家标准规范其携带的微生物、寄生虫和健康状态,使得这些动物的使用存在严重的安全隐患。

经搜集相关资料,发现我国目前专门以“实验用动物”为管理对象的卫生法律法规尚未被明确提出,但有针对包括“实验用动物”在内的畜养动物、野生动物卫生相关的法律,主要为《中华人民共和国动物防疫法》(以下简称防疫法)。针对实验动物的相关法规为《实验动物管理条例》(以下简称管理条例)。与我国相比,目前国际上通用的动物卫生相关法典为由世界动物卫生组织(International Organization for Animal Health,原 Office International des Epizooties, OIE)制定的《陆生动物卫生法典》(以下简称法典),其宗旨是通过详细规定进出口国家兽医当局采取的卫生措施,防止传播动物或人的病原体,确保动物(包括“实验用动物”在内的哺乳动物、禽和蜜蜂)及其产品在国际贸易中的卫生安全,并促进国际贸易<sup>[1]</sup>。根据 WTO 植物检疫及卫生措施协议(SPS 协议),WTO 成员国应将 OIE 内相

关的推荐规范与进口需求结合,《法典》因此是国际贸易中 WTO 法律体制中的一个关键部分<sup>[2]</sup>。故本文对《防疫法》、《管理条例》与国际《法典》的内容进行比较,以期对制定实验用动物的卫生法律及相关标准提供理论支撑。

## 1 法律法规介绍

### 1.1 《中华人民共和国动物防疫法》

《中华人民共和国动物防疫法》于 1997 年 7 月 3 日第八届全国人民代表大会常务委员会第二十六次会议通过;2015 年 4 月 24 日第十二届全国人民代表大会常务委员会第十四次会议《中国人民代表大会常务委员会关于修改〈中华人民共和国电力法〉等六部法律的决定》对其进行了第三次修订。主要内容见表 1。

### 1.2 《实验动物管理条例》

1988 年 10 月 31 日由国务院批准,1988 年 11 月 14 日国家科学技术委员会令第 2 号发布,根据 2011 年 1 月 8 日《国务院关于废止和修改部分行政法规的决定》进行第一次修订,根据 2013 年 7 月 18 日《国务院关于废止和修改部分行政法规的决定》进行第二次修订。主要内容见表 2。

### 1.3 《国际陆生动物卫生法典》

2015 年 5 月,第 24 版新修订的《法典》在第 83 届 OIE 全体大会上通过。共包含 15 项内容。见表 3<sup>[3]</sup>。

表 1 《中华人民共和国动物防疫法》内容简表

Tab. 1 Summary table of the contents of Animal Epidemic Prevention law of the People's Republic of China

框架	内容
总则	制定本法目的,适用范围,相关概念,疫病分类,动物防疫工作职能划分,奖励原则等。
动物疫病的预防	主要说明了国务院兽医主管部门及各级兽医主管部门在动物疫病预防方面的工作职能。
动物疫情的报告、通报和公布	主要说明了发生动物疫情时的报告、通报及公布程序。
动物疫病的控制和扑灭	主要说明了发生一类、二类及三类动物疫病时的控制扑灭措施。
动物和动物产品的检疫	明确动物卫生监督机构在动物和动物产品检疫工作方面的职责。
动物诊疗	从事动物诊疗机构应具备的条件,申请动物诊疗许可证的流程,动物诊疗许可证应载明的内容,执业兽医资格考试制度说明,及乡村兽医职能等。
监督管理	规范动物卫生监督机构工作人员的职能,明确监督检查任务的措施。
保障措施	强调政府部分应对动物防疫工作提供经济、技术及医疗保健保障。
法律责任	主要说明违反本法后的处分规定

表 2 《实验动物管理条例》内容简表

Tab. 2 Summary table of the contents of regulations for experimental animal management

框架	内容
总则	主要说明制定本条例的目的、适用范围、相关概念,说明了国家科学技术委员会主管全国实验动物工作,省、自治区、直辖市科学技术委员会主管本地区的实验动物工作,国务院各有关部门负责管理本部门的实验动物工作。国家实行实验动物的质量监督和质量合格认证制度。
实验动物的饲养管理	规范从事实验动物饲养工作单位的质量监测,饲养室与实验室设置管理,实验动物保种、饲养要求,将实验动物分为 4 级,并应按照相应的微生物控制标准进行管理,对饲料、饮水、垫料提出要求。
实验动物的检疫和传染病控制	对隔离检疫、预防接种进行了规定,对患有传染病以及可能被传染的实验动物的处理进行了程序性说明。
实验动物的应用	实验应选用合格的实验动物,实验动物应具备的资料,实验动物运输要求。
实验动物的进口与出口管理	进口实验动物应具备的资料,规定实验动物工作单位从国外进口实验动物原种,需做相应的登记,出口实验动物手续办理的批准流程等。
从事实验动物工作的人员 奖励与处罚	指出对从事实验动物工作的人员的要求 说明奖励与处罚规定。

表 3 《国际陆生动物卫生法典》内容简表

Tab. 3 Summary table for the contents of International Terrestrial Animal Health Code

框架	内容
动物疾病诊断监测与通告	对病原微生物的诊断、监测及通告的实施方法标准,包括了向 OIE 通告的程序,国际贸易的检测,以及一个国家、地区或区域的健康状态的评估程序。
风险分析	指导进口国在没有 OIE 提供建议的情况下对病原微生物或者商品进行风险分析。进口国应使用这些标准来判断进口措施。
兽医服务质量	用于建立、维持以及评估兽医服务,包括兽医立法和交流。这些标准用于支持兽医服务成员国满足它们促进陆生动物卫生与福利,兽医公共卫生的目标,同时建立并维持国际兽医证明的信任。
疾病预防与控制的一般建议	用于执行对病原微生物的预防与控制。提供了具体方法包括动物鉴定,可追溯性,分布区域,区域划分,动物尸体处理,消毒,灭虫与一般卫生程序。一些章节还介绍了适用于动物精子与胚胎收集的卫生程序。
运输方式,进出口程序与 兽医证明	贸易过程中的通用卫生方法。包括兽医证明以及适用于出口,运输与进口国家的方法。提供了国际贸易通用的兽医证明样本。
兽医公共卫生	提供动物产品系统的预防处理措施。这些措施用于支持成员国满足兽医公共卫生。包括活检与死后剖检,饲养危害的控制,动物产品水平上的生物安全,以及对动物耐药性的控制。
动物福利	动物福利实施方法。包括动物生产,运输,屠宰和流浪狗数量的控制,以及用于研究及教学的动物使用。
多种动物种类、牛、马、兔、羊、猪、蜜蜂、鸟类相关疾病	用于防止向进口国引入 OIE 所列出的疾病、传染病或者虫害等。考虑到了动物或动物产品的性质,区域,以及针对每种动物或动物产品的风险降低措施。

## 2 比较分析

### 2.1 制定目的比较

《防疫法》的目的是为了加强对我国动物防疫

活动的管理,预防、控制和扑灭我国发生的动物疫病,促进我国养殖业发展,保护我国人民健康,维护公共卫生安全,是从我国国情出发,针对动物疫病防控及扑灭工作而制定。

《管理条例》是为了加强我国实验动物管理工作,保证实验动物质量,适应科学研究、经济建设和发展的需要,其对象为我国实验动物的管理工作。

《法典》是通过详细规定进出口国家兽医当局采取的卫生措施,防止传播动物或人的病原体,确保动物及其产品在国际贸易中的卫生安全,并促进国际贸易,其使用对象是国际贸易组织中的相关成员国,立足于国际视角。

## 2.2 主要内容比较

比较《法典》、《防疫法》及《管理条例》主要内容,结果如表 4。

通过表 4 所列结果,结合表 1-3 的内容,可以发现,与《法典》相比,《检疫法》与《管理条例》更侧重政策性、原则性的规定,而《法典》在配套性规章及具体操作规范、技术标准方面的内容更丰富。如在《检疫法》第二章动物疫病的预防中,主要说明的是国务院兽医主管部门及各级兽医主管部门在动物疫病预防方面的工作职能,《法典》中涉及到动物疾病预防的内容在第四章,提供了动物鉴定,可追溯性,分布区域,区域划分,动物尸体处理,消毒,灭虫与一般卫生程序的具体方案,实用性较强。又如《检疫法》第三章,动物疫情的报告、通报和公布,主

要说明了发生动物疫情时的报告、通报及公布程序,相应的内容在《法典》中则是第一章,动物疾病诊断监测与通告,这一章提供了病原微生物的诊断、监测及通告的实施方法标准,还包括了向 OIE 通告的程序,国际贸易的检测,以及一个国家、地区或区域的健康状态的评估程序。

此外,《防疫法》与《管理条例》中缺少《法典》中含有的疾病诊断与监测,风险分析,运输方式,进出口程序与兽医证明,兽医服务质量、兽医公共卫生、动物福利、各种动物的传染性疾病的列举及防控治疗措施等内容。但《法典》缺少《防疫法》与《管理条例》中含有的动物疫病的扑灭、饲养管理等方面内容。

## 2.3 支持性技术文件比较

《法典》还将动物分类,并列出了相应的动物传染性疾病的,并配有支持性文件——《Terrestrial Manual》,提供了针对疾病的诊断及免疫标准,相比之下《防疫法》及《管理条例》未明确指出其支持性文件。虽然我国在动物检疫标准的制定与修订工作取得了一定成绩,但还未建立起与国际接轨的动物卫生标准体系,在技术水平和内容涵盖范围上还有很多不足<sup>[4]</sup>。

表 4 主要内容比较列表

Tab. 4 Comparative list of the main contents in the domestic laws and regulations, and international code

内容选项	相关内容选择		
	《法典》	《防疫法》	《管理条例》
动物疾病诊断、监测与通告	●		
风险分析	●		
兽医服务质量	●		
疾病预防与控制	●	●	
运输方式,进出口程序与兽医证明	●		
兽医公共卫生	●		
动物福利	●		
多种动物种类、牛、马、兔、羊、猪、蜜蜂、鸟类相关疾病	●		
动物疫情的报告、通报和公布		●	
动物疫病的扑灭		●	
动物和动物产品的检疫	●	●	
动物诊疗		●	
监督管理	●	●	
保障措施	●	●	
法律责任		●	
实验动物的饲养管理			●
实验动物的检疫和传染病控制			●
实验动物的应用			●
实验动物的进口与出口管理			●
从事实验动物工作的人员			●
奖励与处罚			●

注:●表示含有该内容,空白表示不含有该内容

Note. ● means containing this content, white space means the opposite.

## 2.4 兽医制度比较

《法典》明确官方兽医制度,其特点为<sup>[5]</sup>:(1)个人负责。即由国家任命和授权的官方兽医人员作为动物卫生监督执法的权力主体和责任主体,对动物和动物产品进行全过程、独立的卫生监管,对合格的动物及动物产品出具动物卫生证书并对检验检疫行为负责。(2)垂直管理。地方上的官方兽医直接代表国家对动物及动物产品进行监管,不受当地政治,经济等因素的影响。(3)全过程监管。(4)技术支持:有动物疫病诊断实验室体系为官方兽医提供技术保障。

与此相比,我国相关法律未明确官方兽医制度。如在《防疫法》中,动物疫病的预防主要涉及的部门是国务院兽医主管部门及各级兽医主管部门;动物及动物产品的检疫环节又涉及到动物卫生监督机构。又如在《管理条例》中,对于实验动物方面的工作又涉及到国家科学技术委员会,省、自治区、直辖市科学技术委员会和国务院各有关部门等。这种分段式的管理机制会导致各部门之间的职能交叉,易出现监管空白<sup>[5]</sup>。

## 3 建议

根据上述比较分析的内容,对我国实验用动物卫生相关工作提出以下建议:参考《法典》,结合我国实际情况,加快制定专门针对“实验用动物”的卫生相关法律法规及配套标准,改变目前我国只有“实验用动物”概念,却没有专门的、针对性较强的

相关法律法规现状。制定相应的动物疫病诊断、监测、预防与控制的国家标准,将法律法规与标准相结合,提高实操性及指导性,满足目前我国对实验用动物使用的需求。

加快兽医管理体制改革,根据实际情况,对现有动物防疫、检疫、监督等各类机构及其执法职能进行整合,借鉴国际上通用的官方兽医制度,明确各部门职能,避免监管空白。

完善实验室技术支持体系。制定实验用动物卫生相关法律法规及标准离不开科学实验的技术支持。如美国建立了国家动物卫生实验室,其主要作用即开展动物疫病监测,对疫病进行早期诊断识别。

### 参考文献:

- [1] 王仁华,陈向前,汪明. 国际动物卫生法典简介 [J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(1): 76-78.
- [2] <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-code/>.
- [3] <http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=guide.htm>.
- [4] 马贵平,史喜菊,李冰玲,等. 多种动物共患传染病诊断的国家标准、行业标准与国际标准的比较及适用性评估 [J]. 中国动物检疫, 2010, 27(10): 66-69.
- [5] 于海峰,刘杰,苏兰,等. 国际动物卫生监督模式与我国检疫监管模式的比较研究 [J]. 中国动物检疫, 2010, 27(5): 4-5, 11.

[修回日期]2015-12-26



# 定义“SPF”级实验大小鼠和 制定健康监测方案时需考虑的因素

周聪颖

(苏州药明康德新药开发股份有限公司, 苏州 215104)

**【摘要】** “无特定病原菌(SPF)”名词意味着排除了对宿主致病的特定的病原菌清单。许多机构在使用活体动物开展生物医学研究时,考虑到许多不同的因素,包括动物来源、设施布局、微生物学背景、工程技术标准、运行实践和试验需要,倾向于制定机构层面的生物排除清单。同样地,机构层面的健康监测方案的设计和实施也根据需求有所不同。相比之下,中国的实验动物生产者和使用受受制于国标,国标中根据动物健康分类建立了国家层面生物排除清单,同时也规定了特定的动物健康等级对应的详细的动物房工程设计标准。此外,本文还汇总了北美主要的啮齿类供应商的 SPF 清单,来提示实验动物使用者在评估自己的实验大小鼠的生物排除清单和制定机构层面的健康监测方案时应该考虑不同的因素,来确保动物种群的健康和科学的完整性。

**【关键词】** 无特定病原菌,生物排除,健康监测,考虑因素,大鼠,小鼠

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0012-10

doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2016.02.004

## Factors to be considered when defining “SPF” and health monitoring programs in laboratory mice and rats

Sonja T. Chou

(WuXi AppTec (Suzhou) Co., Ltd., Suzhou 215104, China)

**【Abstract】** The term “specific pathogen free” (SPF) implies the bioexclusion of a defined list of organisms that can cause disease in a host. Due to many different factors including animal source, vivarium layout, microbiological history, engineering standards, operation practice, and experimental needs, the bioexclusion list tends to be specific for many institutions using live animals in biomedical research. As such, the design and implementation of institution-specific health monitoring program can also vary based on needs. By comparison, laboratory animal producers and users in China are subject to GB regulations which have established a national bioexclusion list based on animal health categories, as well as set detailed engineering standards for vivarium operations based on specific animal health profiles. In addition to summarizing the SPF list of major rodent vendors in North America, the purpose of this article is to bring attention to the different factors animal users should take into consideration when evaluating one’s own bioexclusion list and designing institution-specific health monitoring program for laboratory mice and rats, in order to assure animal colony health and scientific integrity.

**【Key words】** Specific pathogen free; Bioexclusion; Health monitoring; Factors for considerations; Mice; Rats

### Introduction

The term “specific pathogen free” (SPF) implies

the exclusion of a defined list of organisms that can cause disease in a host. Within the field of laboratory animal science, this list generally includes viruses,

bacteria, fungi, and parasites with known potential to impact animal health, affect research outcome, or pose as an occupational health hazard. For the discussion purpose, this article will cover bioexclusion list for laboratory mice and rats only. The current body of literature related to pathogens of concern is continuing to increase over the years. Technical refinements in microbial detection methods have allowed scientists to identify infective or carrier-state animals with more ease. They can study the epidemiology and pathogenesis of the agent, investigate changes in the physiological and immunological systems through controlled infections, and assess how animal model performance might be altered. Interesting and unique clinical cases published by human and veterinary clinicians, as well as periodic discussion amongst field experts during laboratory animal science forums, also help to direct public attention to any new or re-emerging microbial agent of rodent colony health concern. All these knowledge has allowed the general laboratory animal users, including researchers, laboratory animal specialists, and vivarium managers, to make informed decisions when faced with the decision: to test/exclude or not to test/exclude? For purpose of keeping the scope of this article narrow, limitations with regards to different diagnostic assays are not discussed, but readers are encouraged to review current literature and consult area specialists when deciding which specific assays should be used.

### Consideration Factors for Setting Bioexclusion List

There can be differences in professional opinion on what microbial agents are of concern and therefore must be monitored and/or excluded from one's vivarium. All vivariums are structured and organized as microbiological units, with self-contained microbiological entity within a defined space. For example, a barrier facility within one or more rooms where personnel, equipment and animals move freely or where animals are kept in open cages; isolators or a group of microisolation cages where direct contact allows for horizontal transmission; single individually ventilated cage handled in a laminar flow cabinet

following strict hygienic measures<sup>[1]</sup>. Once the unit structure is identified, a biosecurity program can be defined, with the understanding that biosecurity breach and introduction of pathogens could result from introduction of other animals (e. g. different species, different animal sources), fomites (e. g. bedding and experimental equipment), human caretakers, feed, and water. Biological materials such as cell lines, antibodies, conditioned media, and serum have also been implicated as potential source of contamination in a vivarium<sup>[2]</sup>. Therefore, for institutions designing their surveillance program and defining their own SPF or bioexclusion list, one must also take into consideration the effect of each microbial agent on animal health, impact on biomedical research, species specificity, zoonotic potential, prevalence, host factors (e. g. immune status, genetic background), as well as past and current microbiological status of the animal housing environment<sup>[1]</sup>.

For obvious reasons, zoonotic agents are excluded from a vivarium unless research needs dictates otherwise, and that sufficient engineering controls with structural and resource support for containment are present. These pathogens are rarely found in purpose-bred rodent colonies, and most institutions check against these pathogens infrequently unless if working with wild-caught rodents or with biological materials. Institutions with researchers using immunodeficient and humanized rodent models for studying the immune system, xenotransplantation, and infectious disease models are encouraged to pay attention to potential introduction and amplification of microorganisms that are of rodent and human origin through biological materials.<sup>[3]</sup> For example, *Mycoplasma* spp. and viral contamination have been identified in tumor cell lines,<sup>[4,5]</sup> embryonic stem cells can be susceptible to persistent infection with mouse hepatitis virus and may produce viruses<sup>[6,7]</sup>, monoclonal antibody have been found to be contaminated with lactate dehydrogenase elevating virus<sup>[8]</sup>, murine germplasms can harbor mouse parvovirus,<sup>[9]</sup> and outbreaks of ectromelia linked to contaminated serum<sup>[10]</sup>.

In general, animal users are more concerned with

prevalent infectious agents that can overtly impact rodent colony health, cause inapparent infections that lead to changes of animal model phenotype or alters research data, and to some extent, opportunistic and emerging ( or re-emerging ) pathogens. Detailed descriptions of infectious diseases in mice and rats have been discussed at length in books and review papers, including clinical signs and impact on research<sup>[11-18]</sup>. Through regular review of current literature, laboratory animal veterinarians and vivarium managers gather pertinent information to help them allocate and concentrate health monitoring resources on higher risk, prevalent infectious agents, and monitor less frequently for the remaining, lower-risk agents. As example, Charles River's Research Animal Diagnostic Services presented retrospective data on the prevalence of pathogens identified in rodent samples submitted from pharmaceutical, biotechnology, academic, and government institutions to diagnostic labs in North America and Europe. In mice, commonly detected infectious agents include mouse norovirus, the parvoviruses, mouse hepatitis virus, rotavirus, Theiler's murine encephalitis virus, *Helicobacter* spp. *Pasteurella pneumotropica*, and pinworms. In rats, commonly detected infectious agents include *Pneumocystis carinii* ( previously termed " rat respiratory virus" ), parvoviruses ( rat minute virus, Kilham's rat virus, rat parvovirus, and Toolan's H-1 virus ), rat theilovirus, *Helicobacter* spp., *P. pneumotropica*, and pinworms. Although *Staphylococcus aureus* was also prevalent in samples from both rodent species, this bacteria is typically considered opportunistic and are of minimal health concern in immunocompetent colonies, while continued monitoring against *Corynebacterium bovis* by PCR assays and culture suggest this bacterium continues to be found in immunodeficient mouse colonies<sup>[19]</sup>.

In order to provide researchers with consistent, high quality animal models, laboratory rodent vendors will disclose their health monitoring program and define specific pathogens to be excluded. Influenced by production environment, vendors will classify the animals under different categories. For example,

barrier reared animals tend to be free from a specified list of pathogens, but otherwise have undefined microflora. On the other hand, gnotobiotics including axenic and defined flora animals have defined microbial status and maintained using aseptic techniques. Table 1 is a list of microbes typically screened by well known rodent vendors in North America<sup>[20-22]</sup>. Samples may be collected from colony animals and from environment, while sampling frequency ranged from monthly to annually depending on disease prevalence and biosecurity risk. Some microbial agents, if identified, require immediate recycling of the production unit. Some are considered opportunistic and are only of concern to specific types of animal models; therefore are excluded from gnotobiotic or isolator reared colonies only. Some are non-pathogenic and commensal organisms and are therefore monitored but not excluded. Tables 2 and 3 summarizes the bioexclusion list from three different global vendors of laboratory mice and rats with comparison with the most current Chinese GB requirements<sup>[20-24]</sup>.

With exception of axenic animals, all rodents carry with them a unique set of microflora from the environment they were born into. There will always be health risks, great or small, when exposing new animals to a different set of microflora within a new microbiological unit. Microorganisms that do not usually cause clinical signs in immunocompetent animals may cause disease in immunodeficient animals, or in animals whose resistance is lowered ( e. g. by other diseases, experimental procedures, drugs ). Genetically modified rodents may have unanticipated phenotypes including overt or subtle immunomodulation which result in disease induced by organisms thought to be commensal or previously unknown in that species.<sup>1</sup> Any organism has the potential to be an opportunist, provided that it finds a suitable host or favorable circumstances.

Lastly, when defining an institution-specific bioexclusion list, one must consider the past and current microbiological status and the intended use within a microbiological unit. Table 4 lists a few high and low risk scenarios for introducing unwanted agents

into a microbiological unit<sup>[1]</sup>. With exception of breeding and maintaining axenic animals where the use of specialized equipment (e. g. isolators) and labor intensive procedures are necessary to accomplish this goal, once the primary housing space (e. g. cage level) has been occupied by live animals, it is unrealistic to expect a completely sterile environment. Furthermore, in the secondary space (e. g. room level), with continuous movement of personnel and equipments, it is not surprising to expect the presence of some level of environmental microbes. On the other hand, what specific environmental microbes are actually present, and whether they are detrimental to animal health or science, should be assessed based on scientific evidence and operation risk. For example, organisms such as *Pseudomonas aeruginosa* is currently listed as a pathogen to be excluded in SPF rodents following GB requirement. This agent is widespread in nature and abundant in soil and water, but rarely causes disease in animals and humans. Although it is not part of the indigenous microbiota of mice, it is commonly isolated from oropharynx and feces, especially in conventionally housed animals<sup>[12,15]</sup>. It may cause clinical disease in immunocompromised hosts, but has low significance in immunocompetent animals; therefore *P. aeruginosa* is often tolerated within commercial barrier facilities. Another example is *Staphylococcus* species, which commonly colonize the skin, mammary glands, mucous membranes, and gastrointestinal tract of man and animals. Surveys of staphylococcal carriage revealed cutaneous colonization of about 90% of healthy people and approximately 75% of conventional laboratory mice, with *S. epidermidis* being most predominant isolate from man, *S. xylosus* and *S. sciuri* from mice, and fewer than 10% carried *S. aureus*<sup>[25]</sup>. Several host factors, including age, physiologic state, and genotype, appear to increase the susceptibility of mice to staphylococcal infections, where *S. xylosus*, *S. epidermidis*, and *S. aureus* have all been isolated from dermal wounds. In general, staphylococci is considered as an opportunistic pathogen, as it harmlessly colonizes host tissue but is capable of proliferating and releasing virulence factors

once the epithelial barrier is breached and bacteria contaminate the wounded tissues<sup>[15]</sup>. If working with animal models with compromised immune system, then it may be desirable to reduce the presence of *pseudomonas* and *staphylococcus* from the animal colony. One should make sure that: 1) newly arrived animals are demonstrably negative; 2) the agents are not enzootically present within the receiving microbiological unit; 3) the agents are included in the health monitoring program for the microbiological unit; and 4) there is an action plan developed in case of identification of one or more agents on the bioexclusion list.

For rodent vendors in North America, viruses and pathogenic ecto- and endo-parasites are generally screened and excluded, while monitoring of other microbes does not necessarily equate with automatic exclusion.

### Consideration Factors when Designing a Health Monitoring Program

The goal of health monitoring is to detect a pre-determined list of excluded agents and see if the animal population being monitored meets the expected health specifications. There are multiple ways to design one's surveillance program; however, like all assays, none are perfect. The results from health testing provide insight into the microbial status of animals tested at a particular time. Take into context basic animal information such as clinical observations, husbandry practice, and experimental goals, it is the cumulative data from periodic testing of animals housed in a defined microbiologic unit over a longer period of time that proves more informative about the health profile of a population. Harmonization of health monitoring programs internationally have been discussed at international forums<sup>[1, 26-27]</sup>, but some researchers argued that such guidelines or recommendations are not feasible as no animal facilities are identical, different monitoring programs (e. g. agents to be monitored, frequency of testing) may be different between microbiological units within the same facility, and different approaches may be necessary when monitoring immunocompetent vs. immunodeficient animals.<sup>27</sup>

Never the less the guidelines and recommendations institution-specific health surveillance programs. serve as good starting points when developing

**Tab.1** Compilation of microbes typically monitored by rodent vendors in North America as part of rodent health quality assurance program<sup>[20-22]</sup>.

Microbial Agents Monitored	
Mice	Rats
Sendai virus (SEND) 仙台病毒	Sendai virus (SEND) 仙台病毒
Pneumonia virus of mice (PVM) 小鼠肺炎病毒	Pneumonia virus of mice (PVM) 小鼠肺炎病毒
Mouse hepatitis virus (MHV) 小鼠肝炎病毒	Sialodacryoadenitis/rat coronavirus (SDAV/RCV) 大鼠涎泪腺炎病毒/大鼠冠状病毒
Minute virus of mice (MVM) 小鼠微小病毒	Kilham rat virus (KRV) 大鼠细小病毒 RV 株
Mouse parvovirus (MPV) 小鼠细小病毒	Toolan's H-1 virus (H1) 大鼠细小病毒 H1 株
Murine norovirus (MNV) 鼠诺瓦克病毒	Rat parvovirus (RPV) 大鼠细小病毒
Theiler's mouse encephalomyelitis virus (GDVII) 小鼠脑脊髓炎病毒	Rat minute virus (RMV) 大鼠微小病毒
Reovirus 3 (REO3) 呼肠孤病毒 III 型	Reovirus 3 (REO3) 呼肠孤病毒 III 型
Mouse rotavirus (EDIM) 小鼠轮状病毒	Rat theilovirus (RTV) 泰勒病毒
Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒	Lymphocytic choriomeningitis virus (LCVM) 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒
Ectromelia virus (Mouse Pox) 鼠痘病毒	Hantaan virus (HANT) 汉坦病毒
Mouse adenovirus 1 and 2 (MAV) 小鼠腺病毒	Mouse adenovirus (MAV) 小鼠腺病毒
Mouse cytomegalovirus (MCMV) 小鼠巨细胞病毒	
Mouse pneumonitis virus (K) K 病毒	
Polyoma virus (POLY) 多瘤病毒	
Hantaan virus (HANT) 汉坦病毒	
Mouse thymic virus (MTLV) 小鼠胸腺病毒	
Lactate dehydrogenase elevating virus (LDV) 乳酸脱氢酶增高病毒	
<i>Beta hemolytic streptococcus</i> spp. 乙型溶血性链球菌	<i>Beta hemolytic Streptococcus</i> spp. 乙型溶血性链球菌
<i>Bordetella bronchiseptica</i> 支气管鲍特杆菌	<i>Bordetella bronchiseptica</i> 支气管鲍特杆菌
Cillia-associated respiratory bacillus (CAR bacillus) 呼吸道纤毛杆菌	Cillia-associated respiratory bacillus (CAR bacillus) 呼吸道纤毛杆菌
<i>Corynebacterium bovis</i> * 牛棒杆菌	<i>Corynebacterium bovis</i> * 牛棒杆菌
<i>Corynebacterium kutscheri</i> 鼠棒状杆菌	<i>Corynebacterium kutscheri</i> 鼠棒状杆菌
<i>Clostridium piliforme</i> 泰泽病原体	<i>Clostridium piliforme</i> 泰泽病原体
<i>Citrobacter rodentium</i> 枸橼酸杆菌	<i>Helicobacter bilis</i> 胆型螺旋杆菌
<i>Helicobacter bilis</i> 胆型螺旋杆菌	<i>Helicobacter hepaticus</i> 肝型螺杆菌
<i>Helicobacter hepaticus</i> 肝型螺杆菌	Other <i>Helicobacter</i> sp. 其他螺杆菌
Other <i>Helicobacter</i> sp. 其他螺杆菌	<i>Klebsiella oxytoca</i> 产酸克雷伯氏杆菌
<i>Klebsiella oxytoca</i> 产酸克雷伯氏杆菌	<i>Klebsiella pneumonia</i> 肺炎克雷伯氏杆菌
<i>Klebsiella pneumonia</i> 肺炎克雷伯氏杆菌	<i>Mycoplasma pulmonis</i> 支原体
<i>Mycoplasma pulmonis</i> 支原体	<i>Pasteurella multocida</i> 多杀巴斯德杆菌
<i>Pasteurella multocida</i> 多杀巴斯德杆菌	<i>Pasteurella pneumotropica</i> 嗜肺巴斯德杆菌
<i>Pasteurella pneumotropica</i> 嗜肺巴斯德杆菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 绿脓杆菌
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 绿脓杆菌	<i>Proteus mirabilis</i> * 奇异变形杆菌
<i>Proteus mirabilis</i> * 奇异变形杆菌	<i>Salmonella</i> spp. 沙门菌
<i>Salmonella</i> spp. 沙门菌	<i>Staphylococcus aureus</i> 金黄色葡萄球菌
<i>Staphylococcus aureus</i> 金黄色葡萄球菌	<i>Streptobacillus moniliformis</i> 念珠状链杆菌
<i>Streptobacillus moniliformis</i> 念珠状链杆菌	<i>Streptococcus pneumoniae</i> 肺炎链球菌
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 肺炎链球菌	<i>Pneumocystis carinii</i> ("RRV") 卡氏肺囊虫
<i>Pneumocystis</i> spp. * 肺孢子菌	Dermatophytes 皮肤病原真菌
Dermatophytes 皮肤病原真菌	
Ectoparasites <sup>a</sup> 体外寄生虫	Ectoparasites <sup>a</sup> 体外寄生虫
Endoparasites <sup>b</sup> 体内寄生虫	Endoparasites <sup>b</sup> 体内寄生虫
Protozoa <sup>c</sup> 原生动物	Protozoa <sup>c</sup> 单细胞生物
<i>Encephalitozoon cuniculi</i> (ECTRO) 兔脑原虫	<i>Encephalitozoon cuniculi</i> (ECTRO) 兔脑原虫
Pathology Necropsy and histopathology	Necropsy and histopathology

\* Tested in gnotobiotic or defined flora colonies

<sup>a</sup>Ectoparasites screened can include *Myobia musculi*, *Myocoptes musculus*, *Radfordia affinis*, etc.

<sup>b</sup>Endoparasites screened can include helminthes such as *Aspicularis tetraoptera* and *Syphacia* spp.

<sup>c</sup>Protozoa screened can include *Giardia muris* and *Spironucleus muris*, as well as non-pathogenic or commensal organisms such as *Entamoeba*, *Chilomastix*, *Hexamastix*, trichomonads, etc.

**Tab. 2** Summary of some vendor bioexclusion lists for laboratory mice based on health profile as compared with the GB testing requirements<sup>[20-24]</sup>.

Bioexclusion List	Vendor 1			Vendor 2		Vendor 3 <sup>®</sup>			GB 14922. 2 - 2011 14922. 1 - 2001	
	Barrier reared (VAF/Plus <sup>®</sup> )	Isolator reared (VAF/Elite <sup>®</sup> ) & immunodeficient	Murine pathogen free <sup>TM</sup>	Restricted flora <sup>TM</sup>	Excluded flora & defined flora	Bio-exclusion level	Barrier reared	Isolator reared	Clean	SPF
SEND	X	X	X	X	X	1	X	X	X	X
PVM	X	X	X	X	X	1	X	X	—	X
MHV	X	X	X	X	X	1	X	X	X	X
MMV	X	X	X	X	X	1	X	X	—	X
MPV	X	X	X	X	X	1	X	X	—	—
TMEV (GDVII)	X	X	X	X	X	1	X	X	—	0
REO3	X	X	X	X	X	1	X	X	—	X
EDIM	X	X	X	X	X	1	X	X	—	—
MAV	X	X	X	X	X	1	X	X	—	0
POLY	X	X	X	X	X	1	X	X	—	0
K	X	X	X	X	X	1	X	X	—	—
MCMV	X	X	X	X	X	1	X	X	—	—
MTLV	X	X	X	X	X	1	X	X	—	—
LCMV	X	X	X	X	X	1	X	X	0	0
HANT	X	X	X	X	X	1	X	X	0	0
ECTRO	X	X	X	X	X	1	X	X	X	X
LDV	X	X	X	X	X	1	X	X	—	—
MNV	X	X	X	X	X	1	X	X	—	—
<i>B. bronchiseptica</i>		X	X	X	X	3	X	X	—	—
<i>C. bovis</i>		X*		X	X	1	—	X	—	0
<i>C. kutscheri</i>	X	X	X	X	X	1	X	X	X	—
<i>C. rodentium</i>	X	X	X	X	X	1	X	X	—	—
<i>H. bilis</i>		X	X	X	X	1	X	X	—	—
<i>H. hepaticus</i>	X	X	X	X	X	1	X	X	—	—
<i>Helicobacter</i> sp.		X	X	X	X	1	X	X	—	—
<i>K. oxytoca</i>		X		X	X	3	X	X	—	—
<i>K. pneumoniae</i>		X		X	X	3	X	X	—	X
<i>P. multocida</i>		X			X <sup>^</sup>	1	X	X	—	—
<i>P. pneumotropica</i>		X	X	X	X	1	X	X	—	X
<i>P. mirabilis</i>		X			X	3	—	X	—	—
<i>P. aeruginosa</i>		X		X	X	2	X	X	—	X
<i>Salmonella</i> spp.	X	X	X	X	X	1	X	X	X	—
<i>Staph. aureus</i>		X		X	X	2	X	X	—	X
<i>S. moniliformis</i>	X	X	X	X	X	1	X	X	0	—
<i>Strep. pneumoniae</i>		X	X	X	X	1	X	X	—	0
<i>Beta hemolytic Strep.</i> spp.		X		X	X	3	X	X	—	0
<i>Pneumocystis</i> spp.		X	X	X	X	1	X	X	0	0
<i>C. piliforme</i>	X	X	X	X	X	1	X	X	X	X
CAR bacillus	X	X	X	X	X	1	X	X	—	—
<i>M. pulmonis</i>	X	X	X	X	X	1	X	X	X	X
Ectoparasites	X	X		X	X	1	X	X	X	X
Helminths	X	X	X	X	X	1	X	X	X	X
Other endoparasites			X	X	X	1 / 2	X <sup>#</sup>	X <sup>#</sup>	—	X <sup>a</sup>
Pathogenic protozoa	X	X	X	X	X	1	X	X	—	—
<i>E. cuniculi</i>	X	X	X	X	X	1	X	X	0	0
Dermatophytes						1	X	X	0	0
Non-spore forming rod bacteria					X <sup>^</sup>		N/A	N/A	—	—
Cocci bacteria					X <sup>^</sup>		N/A	N/A	—	—
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	—	—	—	—	—	N/A	—	—	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	—	—	—	—	—	N/A	—	—	0	0
<i>Escherichia coli</i>	—	—	—	—	—	N/A	—	—	0	0
<i>Toxoplasma gondii</i>	—	—	—	—	—	N/A	—	—	X	X

Notes. "X" - excluded; "—" - not tested; "\*" - exclusion in immunodeficient animals or gnotobiotic/defined flora colonies only; "^" - allowed in excluded flora colonies; <sup>®</sup> Vendor houses microbiologically defined rodent colonies within maximum security production barriers and flexible-film isolators; Bioexclusion levels "1" = excluded from all animals; "2" = excluded from immunodeficient animals, but not immunocompetent animals; "3" = excluded based on customer demand; "#" - endoparasites excluded in immunodeficient animals include *Chilomastix* sp. flagellates, *Entamoeba muris*, and trichomonads; "a" - flagellates and ciliates; "0" - when testing is required, colony must be negative; "N/A" - not applicable

**Tab. 3** Summary of some vendor bioexclusion lists for laboratory rats based on health profile as compared with the GB testing requirements<sup>[20-24]</sup>.

Bioexclusion List	Vendor 1			Vendor 2		Vendor 3 <sup>®</sup>			GB 14922. 2 - 2011 14922. 1 - 2001	
	Barrier reared (VAF/Plus <sup>®</sup> )	Isolator reared (VAF/Elite <sup>®</sup> ) & immunodeficient	Murine pathogen free <sup>TM</sup>	Restricted flora <sup>TM</sup>	Excluded flora & defined flora	Bio-exclusion level	Barrier reared	Isolator reared	Clean	SPF
SEND	X	X	X	X	X	1	X	X	X	X
PVM	X	X	X	X	X	1	X	X	—	X
SDAV/RCV	X	X	X	X	X	1	X	X	—	X
KRV	X	X	X	X	X	1	X	X	—	X
HI	X	X	X	X	X	1	X	X	—	X
RPV	X	X	X	X	X	1	X	X	—	—
RMV	X	X	X	X	X	1	X	X	—	—
REO3	X	X	X	X	X	1	X	X	—	X
RTV	X	X	X	X	X	1	X	X	—	—
LCMV	X	X	X	X	X	1	X	X	—	—
HANT	X	X	X	X	X	1	X	X	X	X
MAV	X	X	X	X	X	1	X	X	—	—
<i>B. bronchiseptica</i>			X	X	X	3	X	X	X	X
<i>C. bovis</i>		X	—	X	X	1	—	—	—	—
<i>C. kutscheri</i>	X	X	X	X	X	1	X	X	X	X
<i>H. bilis</i>			X	X	X	1	X	X	—	—
<i>H. hepaticus</i>	X	X	X	X	X	1	X	X	—	—
<i>Helicobacter</i> sp.			X	X	X	1	X	X	—	—
<i>K. oxytoca</i>		X		X	X	3	X	X	—	—
<i>K. pneumoniae</i>		X		X	X	3	X	X	—	X
<i>P. multocida</i>					X	1	X	X	—	—
<i>P. pneumotropica</i>		X	X	X	X	1	X	X	—	X
<i>P. mirabilis</i>		X			X	3	—	X	—	—
<i>P. aeruginosa</i>		X		X	X	2	X	X	—	X
<i>Salmonella</i> spp.	X	X	X	X	X	1	X	X	X	X
<i>Staph. aureus</i>		X		X	X	2	X	X	—	X
<i>S. moniliformis</i>	X	X	X	X	X	1	X	X	0	0
<i>Strep. pneumoniae</i>		X	X	X	X	1	X	X	—	0
<i>Beta hemolytic Strep.</i> spp.		X		X	X	3	X	X	—	0
<i>Pneumocystis carinii</i> (“RRV”)		X	X	X	X	1	X	X	0	0
<i>C. piliforme</i>	X	X	X	X	X	1	X	X	X	X
CAR bacillus	X	X	X	X	X	1	X	X	—	—
<i>M. pulmonis</i>	X	X	X	X	X	1	X	X	X	X
Ectoparasites		X	X	X	X	1	X	X	X	X
Helminths		X	X	X	X	1	X	X	X	X
Other endoparasites		X	X	X	X	1 / 2	X <sup>#</sup>	X <sup>#</sup>	—	X <sup>a</sup>
Pathogenic protozoa	X	X	X	X	X	1	X	X	—	—
<i>E. cuniculi</i>	X	X	X	X	X	1	X	X	0	0
Dermatophytes						1	X	X	0	0
Non-spore forming rod bacteria					X		N/A	N/A	—	—
Cocci bacteria					X		N/A	N/A	—	—
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0
<i>Toxoplasma gondii</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	X	X

Notes. “X” - excluded; “—” - not tested; “^” - allowed in excluded flora colonies; <sup>®</sup> Vendor houses microbiologically defined rodent colonies within maximum security production barriers and flexible-film isolators; Bioexclusion levels “1” = excluded from all animals; “2” = excluded from immunodeficient animals, but not immunocompetent animals; “3” = excluded based on customer demand; “#” - endoparasites excluded in immunodeficient animals include *Chilomastix* sp. flagellates, *Entamoeba muris*, and trichomonads; “a” - flagellates and ciliates; “0” - when testing is required, colony must be negative; “N/A” - not applicable

**Tab.4** High and low risk scenarios for introducing unwanted agents into a microbiological unit. <sup>[1]</sup>

## High risk scenarios:

- Frequent introduction of animals into the biological unit
- Units of varying microbiologic status with close proximity
- Combining of animals from different breeding colonies or vendors
- Movement of animals out of the unit for manipulation and subsequent return
- Inadequate pest control program resulting in insects or wild rodents in animal rooms or feed/bedding storage area
- Frequent introduction of biological materials originating from the same animal species housed in the unit
- Multipurpose facilities with different types of experimental manipulation
- Frequent entry of research personnel into the unit in addition to animal care staff
- Frequent turnover of animal care personnel working in the unit
- Shared equipment that cannot be disinfected easily

## Low risk scenarios:

- Closed breeding colonies
- All-in-all-out system for the microbiological unit
- Occasional introduction of new animals
- One or few types of experimental manipulation

Once a bioexclusion list has been developed, institutions could employ one or more approaches for sampling, including the use of sentinel animals with direct or indirect (e. g. via soiled bedding) exposure to colony animals, direct evaluation of feces/fur from colony animals, and direct evaluation of environment where pathogens will likely concentrate (e. g. filters, hoods, etc.)<sup>[28-30]</sup> Direct contact with the principal animals is the most efficient and reliable way to transmit infection to sentinels. If soiled-bedding sentinels are to be used, then several events need to occur in order for successful detection of infectious agents. In order for sentinels to become positive for an agent when tested, the colony animals must first be infected and be shedding an adequate amount (e. g. infectious dose) to be collected in bedding samples. The agent must remain infectious in soiled bedding, and sentinels must be susceptible. Sentinels must then self-inoculate with the infectious dose. Viruses must find the appropriate receptors on susceptible cells to replicate, and bacteria must compete with pre-existing flora. If the method of testing is by serology, then sufficient time must be waited for seroconversion to occur. Finally, conditions under which samples are collected, shipped, and tested, must be proper to avoid false positive or negative results<sup>[28]</sup>. For parasitology, traditional method of visual inspection can lack sensitivity, but could be compensated with increased sample size. On the other hand, contemporary PCR assays such as the high-density array of real-time PCR have adequate sensitivity to

detect diverse pathogens in heavily pooled specimens collected noninvasively from colony animals, including viruses, bacteria, parasites, and protozoa. PCR has gained popularity in recent years as a complementary tool to the traditional health monitoring program that employs serology, culture, and visual assessment of samples and/or animals<sup>[29]</sup>.

Sample size decision should be based on expected prevalence of infected (e. g. assay-positive) animals, not simply by the population size<sup>[31]</sup>. The binomial sampling formula suggested to ILAR Committee in 1976 assumes that the users have an idea of expected disease prevalence and animal population is  $> 100$ <sup>[1, 28, 31-32]</sup>. Detection of disease with a low tendency to spread, such as mouse parvovirus, requires a considerable number of animals, whereas highly infectious agents such as mouse hepatitis virus or Sendai virus require only a few animals<sup>[27]</sup>. Negative test results does not prove that the population is free of the agent; instead, they simply give the users a level of confidence that the prevalence of assay-positive animals in the population is below the assumed minimum. As prevalence of positive animals decreases, the sample size required to achieve that same level of confidence increases. As compared to open-top caging systems, it is important to note that housing systems and husbandry practice play an important role in disease transmission. As such, popular use of microisolation cages (e. g. individually ventilated cages) can actually make detection of a low prevalent pathogen more challenging by serving as its own biocontainment zone<sup>[30, 31]</sup>.

Frequency of sampling and testing should be driven by the historical rate of contaminations and the animal housing system. As examples, surveillance of commercial barrier rooms where viruses are the most frequent cause of adventitious infections, while contaminations with pathogenic bacteria and parasites are extremely rare, serology is performed more often than bacteriology and parasitology. On the other hand, gnotobiotic and immunodeficient colonies are typically maintained in isolators or in microisolation units to achieve high level of protection against opportunists, contamination with extraneous bacteria and fungi is much more common than viral and parasitic infestations, therefore bacteriology through culture and environmental swabs is done more frequently than serology and parasitology<sup>[31]</sup>. Generally institutions will conduct periodic testing (e. g. monthly, quarterly, annual) based on biosecurity risk assessment. Test parameters may be different at each time point, so long as the cumulative data is deemed adequate for providing vital information as to the animal colony health profile within the microbiological unit.

Finally, the choice of animals used for testing can be important for accurate health monitoring results. In general, immunocompetent animals are used for serologic monitoring, but institutions may choose to add immunodeficient mice to enhance the sensitivity of surveillance assays designed for the direct detection of infectious agents, such as PCR, bacteriology, or parasitology. Animal's age, sex, and genetics (e. g. different strains) may influence the susceptibility of infection and subsequent detection by different testing assays<sup>[1,33-36]</sup>. Outbred stocks are commonly used as sentinels because they are generally good serologic responders and are relatively inexpensive. Some inbred strains show partial or complete resistance to certain agents and should be avoided (e. g. C57BL/6 strains to MPV, SJL to respiratory strains of MHV)<sup>[35]</sup>; therefore, their appropriateness as sentinels should be carefully evaluated. Before placement of new sentinels into a health monitoring program, users should make sure that the animals are free of all infectious agents that would be of concern in the area that they are being

chosen to monitor. The easiest option is to use animals raised in isolators of defined health profile, sourced from reputable vendors with strict quality control programs. In addition to dedicated sentinels, testing clinically ill animals will often provide useful information about the overall health profile within the microbiological unit.

### Summary

Having a clearly defined and transparent health monitoring program will facilitate institutions in making informed decisions when introducing new animals into an established microbiological unit. It is not difficult for animal users to come up with a list of institution-specific microbial agents to exclude, including viruses, bacteria, fungi, and parasites that have known potential to impact animal and human health or confound research outcome. Many people look to major rodent vendors' microbial testing program and international guidelines for a list of organisms to monitor, but the need for monitoring opportunistic and commensal microbes will depend on several host and environmental factors. Similarly, detection assays of the agents can differ in sensitivity and specificity, which will influence the interpretation of the test results. Where appropriate, submission of biological samples for testing should be considered for a well-rounded health monitoring program. In the end, detection of an organism does not necessarily mean that it has to be eliminated, while a negative test result does not necessarily mean that the colony is free of the agent. Anyone charged with the responsibility of designing and implementing rodent health monitoring programs should have a sound understanding of rodent pathogens, take all of the aforementioned factors into consideration, and regularly review and adjust the health monitoring scheme as required, in order to ensure animal colony health and scientific integrity within the institution.

### Acknowledgment

The author wish to thank Xiaoqing Miao for his assistance with translation.

## 参考文献:

- [ 1 ] Mähler M, Berard M, Feinstein R, et al. FELASA Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units [J]. *Lab Anim*, 2014, 48: 178 – 192.
- [ 2 ] Treuting PM, Clifford CB, Sellers RS, et al. Of mice and microflora: considerations for genetically engineered mice [J]. *Vet Pathol*, 2012, 49: 44 – 63.
- [ 3 ] Nicklas W, Kraft V, and Meyer B. Contamination of transplantable tumors, cell lines, and monoclonal antibodies and rodent viruses [J]. *Lab Anim Sci*, 1993, 43: 296 – 300.
- [ 4 ] Nakai N, Kawaguchi C, Nawa K, et al. Detection and elimination of contaminating microorganisms in transplantable tumors and cell lines [J]. *Exp Anim*, 2000, 49: 309 – 313.
- [ 5 ] Peterson NC. From bench to cageside: risk assessment for rodent pathogen contamination of cells and biologics [J]. *ILAR J*, 2008, 49: 310 – 315.
- [ 6 ] Okumura A, Machii K, Azuma S. et al. Maintenance of pluripotency in mouse embryonic stem cells persistently infected with murine coronavirus [J]. *J Virol*, 1996, 70: 4146 – 4149.
- [ 7 ] Kyuwa S. Replication of murine coronaviruses in mouse embryonic stem cell lines in vitro [J]. *Exp Anim*, 1997, 46: 311 – 313.
- [ 8 ] Nicklas W, Giese M, Zawatzky R, et al. Contamination of a monoclonal antibody with LDH-virus causes interferon induction [J]. *Lab Anim Sci*, 1988, 38: 152 – 154.
- [ 9 ] Agca Y, Bauer BA, Johnson DK, et al. Detection of mouse parvovirus in *Mus musculus* gametes, embryos, and ovarian tissues by polymerase chain reaction assay [J]. *Comp Med*, 2007, 57: 51 – 56.
- [ 10 ] Lipman NS, Perkins S, Nguyen H, et al. Mousepox resulting from use of ectromelia virus-contaminated, imported mouse serum [J]. *Comp Med*, 2009, 59: 180 – 186.
- [ 11 ] Nicklas W, Homberger FR, Illgen-Wilcke B, et al. Implications of infectious agents on results of animal experiments [J]. *Lab Anim*, 1999, 33(suppl. 1): 39 – 87.
- [ 12 ] Percy DH, Barthold SW. Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits (3<sup>rd</sup> ed.) [M]. Ames, IA: Blackwell Publishing Ltd. 2007: 16 – 93, 126 – 169.
- [ 13 ] Institute of Laboratory Animal Resources (US). Committee on Infectious Diseases of Mice and Rats. Infectious Diseases of Mice and Rats [M]. Washington, DC: National Academy Press, 1991: 31 – 256.
- [ 14 ] Suckow MA, Weisbroth SH, and Franklin CL. (eds.) The Laboratory Rat (2<sup>nd</sup> ed.) [M]. Burlington, MA: Elsevier Academic Press, 2006: 339 – 478.
- [ 15 ] Fox JG, Barthold SW, Davison MT, et al. (eds.) The Mouse in Biomedical Research (2<sup>nd</sup> ed.) Volume II: Diseases [M]. Burlington, MA: Elsevier Academic Press, 2007: 1 – 580.
- [ 16 ] Baker DG. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1998, 11: 231 – 266.
- [ 17 ] Baker DG (ed.) Flynn's Parasites of Laboratory Animals (2<sup>nd</sup> ed.) [M]. Ames, IA: Wiley-Blackwell, Ltd. 2007: 303 – 397.
- [ 18 ] Franklin CL. Microbial considerations in genetically engineered mouse research [J]. *ILAR J*, 2006, 47: 141 – 155.
- [ 19 ] Pritchett – Corning KR, Cosentino J, Clifford CB. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats [J]. *Lab Anim*, 2009, 43: 165 – 173.
- [ 20 ] Charles River Technical Sheets available online at: <http://www.criver.com/files/pdfs/rms/hmssummary.aspx>, [http://www.criver.com/files/pdfs/rms/rms\\_lad\\_td\\_health\\_monitoring\\_of\\_immunodeficient\\_mi.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/rms/rms_lad_td_health_monitoring_of_immunodeficient_mi.aspx), and [http://www.criver.com/files/pdfs/rms/rms\\_lad\\_td\\_vaf\\_elite\\_animals.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/rms/rms_lad_td_vaf_elite_animals.aspx)
- [ 21 ] Taconic Health Standards Technical Sheets available online at: <http://www.taconic.com/quality/health-testing-program/health-standards>.
- [ 22 ] Harlan Rodent Health Monitoring Program Description available online at: <http://www.envigo.com/products-services/research-models-services/health-monitoring-reports>.
- [ 23 ] GB 14922.2. 实验动物微生物学等级及检测[S]. 2011.
- [ 24 ] GB 14922.1. 实验动物寄生虫学等级及检测[S]. 2001.
- [ 25 ] Nagase N, Sasaki A, Yamashita K, et al. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin [J]. *J Vet Med Sci*, 2002, 64: 245 – 250.
- [ 26 ] International Committee of the Institute for Laboratory Animal Research. Microbial status and genetic evaluation of mice and rats, proceedings of the 1999 US/Japan Conference [C]. Washington, DC: National Academy Press. 2000: 7 – 15.
- [ 27 ] Werner N. International harmonization of health monitoring [J]. *ILAR J*, 2008, 49: 338 – 346.
- [ 28 ] Clifford CB. Sampling Strategies and Limitations [C]. Presentation given at the 2012 ACLAM Forum, St. Pete Beach, FL. Slides available online at: [http://www.aclam.org/Content/files/files/Forum2012/ACLAM\\_Forum2012\\_Clifford-1.pdf](http://www.aclam.org/Content/files/files/Forum2012/ACLAM_Forum2012_Clifford-1.pdf)
- [ 29 ] Henderson KS, Perkins CL, Havens RB, et al. Efficacy of direct detection of pathogens in naturally infected mice by using a high-density PCR array [J]. *JAALAS*, 2013, 52: 763 – 772.
- [ 30 ] Compton SR, Homberger FR, Paturzo FX, et al. Efficacy of three microbiological monitoring methods in a ventilated cage rack [J]. *Comp Med*, 2004, 54: 382 – 392.
- [ 31 ] Shek WR. Role of housing modalities on management and surveillance strategies for adventitious agents of rodents [J]. *ILAR J*, 2008, 49: 316 – 325.
- [ 32 ] ILAR. Long-term holding of laboratory rodents. [J] *ILAR News*, 1976, 19: L1 – L25.
- [ 33 ] Besselsen DG, Wager AM, and Loganbill JK. Effect of mouse strain and age on detection of mouse parvovirus 1 by use of serologic testing and polymerase chain reaction analysis [J]. *Comp Med*, 2000, 50: 498 – 502.



# 修订实验动物概念的定义对中国实验动物行业发展的的重要性和意义探讨

金东庆<sup>1</sup>, 朱冠<sup>2</sup>

(1. 山东省实验动物中心/山东省医学科学院, 济南 250002; 2. Department of Veterinary Pathobiology, College of Veterinary Medicine & Biomedical Sciences, Texas A&M University, Texas 77843 - 4467, USA)

**【摘要】** 中国实验动物行业经过 30 多年的发展逐步形成一个独立的、完整的、封闭的生产、使用和管理体系, 科学准确的实验动物概念不仅对实验动物行业本身, 对动物生产和使用、保护、福利和伦理, 对生命科学及相关行业和产业, 科学普及和教育等事业都有着十分重要的意义和作用。通过我国实验动物的概念同美国的相比较, 发现我国实验动物的概念存在定义不到位, 范围不清晰, 界限模糊等问题, 造成生产、使用和管理中的一系列困惑和难题, 影响和限制了实验动物行业的发展, 也给相关行业带来了严重的后果和影响。因而适时修改实验动物概念的定义是必要的, 有着积极的、现实的、客观的作用和影响。

**【关键词】** 实验动物概念; 实验动物相关定义; 标准化; 行业发展影响

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0022-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 02. 005

## Necessity and importance of amendment of the key concepts of laboratory animals in China

JIN Dong-qing<sup>1</sup>, ZHU Guan<sup>2</sup>

(1. Shandong Laboratory Animal Center /Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 25002, China;  
2. Department of Veterinary Pathobiology, College of Veterinary Medicine & Biomedical Sciences, Texas A&M University, Texas 77843 - 4467, USA)

**【Abstract】** Laboratory animal industry forms an independent, comprehensive system responsible for the production, use and management of laboratory animals. Great advances have been made in this field in China over the more than thirty years of development. However, due to the great development and changes during this long time, there are also some issues which need to be amended and changed. To compare the concepts of experimental animals in China and developed countries such as USA. The key concepts on the laboratory animals are not well or clearly defined in the regulatory documents in China, which hinder the healthy development and effective regulation in this field, as well as the care and use of laboratory animals in research and education. In this article, we discuss the necessity of timely amendment and standardization of the key concepts and definitions related to laboratory animals, and the importance and impact of the key concepts on the development of animal industry in China.

**【Key words】** Laboratory Animal, concepts; Standardization of definitions; Impact on animal industry development

[基金项目] 国家外国专家局访问学者项目(编号:GG143700014)。

[通讯作者] 金东庆(1964-), 男, 研究员, 硕士, 研究方向: 实验动物, 13361036626, dongqing\_jin@foxmail.com。

实验动物科学是生命科学重要组成部分,同时也是生命科学发展的基础,为生命科学的发展提供了良好的保障和支持。实验动物源自自然界的动物,是动物学研究的一个分支,经过多年的实践和应用,已逐步发展成为一门独立的、完整的、封闭的生产、使用和管理体系。在这个体系下,实验动物同自然界的动物有着明显的区别,与野生动物、农业动物、水生动物有了很大的不同,实验动物科学同样也发展成为一门独立的学科,研究内容、方向、方式、应用、管理同其它相关学科形成了明显的区别和差异<sup>[1,2]</sup>。

实验动物学科是生命科学发展的基础,是由于其自身特点和区别于其它学科的特殊性决定的。生命科学是建立在科学、严谨的实验之上,通过各种形式的实验对未知的事实进行论证、验证,进而得出科学准确的数据以及在此基础上的科学结论,单凭论证和推理无法完成生命科学所需的依据和结论,生命科学有关的农业、医药、卫生、检验检疫、生物技术,无不与实验动物科学相关联,需要通过动物实验这个平台完成其数据和研究目的认证<sup>[3,4]</sup>。

实验动物学科发展的意义和目的只有一个,即通过各种方法和手段保证动物实验数据的准确性和可重复性,实验动物行业的发展也是紧紧围绕这一目的进行,相应的法律法规、制度和规范都是围着这个目的来制订,同时由于实验动物的特殊性,实验动物的福利和伦理提到了相应的高度,这也是实验动物行业的特殊性决定的<sup>[5]</sup>。

笔者有幸作为国家外派的高级访问学者到美国德克萨斯农工大学进行访问交流,得以结识从事实验动物的专家教授,实地看到美国实验动物事业的快速发展。并对中美实验动物各个方面的差异进行了认真细致的比较和研究,感到存在很多的差异,这些差异影响了我国实验动物行业的发展,而了解这些差异和不同,才能够更好的把握实验动物的发展方向,及时制订和修订相关的制度、规章和标准,得以推动我国实验动物事业健康科学的发展。

## 1 中美实验动物概念内涵和外延的差异

国内最新版本的国标及修订过的国标中实验动物的概念统一订正为“指经人工培育、对其携带的微生物和寄生虫实行控制,遗传背景明确或者来源清楚,用于科学研究、教学、生产、检定以及其他

科学实验的动物”<sup>[6,7]</sup>。这个概念总体上看包含四个方面的内容,即来源于人工培育,遗传背景明确或者来源清楚,对其携带的微生物和寄生虫实行控制,以及其作用和研究的目的。概念对“人工”这个词和内容进行强调和多层面的强化,首先是指来源于人工培育,遗传背景明确或者来源清楚,也进一步强化了人工培育的结果,提到遗传背景更是离不开人为的因素,控制携带的微生物和寄生虫是为对实验动物按照微生物和寄生虫的种类进行分级打基础,如何控制更是人为的作用。最后对实验动物的作用进行了界定,这个作用看是包括五个方面,实则四个方面的内容,即科学研究、教育、生产和检定,“以及其他科学实验的动物”符合我们汉语的语言习惯,通常会有一个类似的后缀,实际包含在科学研究之中,其他科学实验理应是科学研究的一部分。

美国实验动物的概念是如何定义的,美国 2012 年出版的第八版的“实验动物饲养管理和使用指南”<sup>[8]</sup> (Guide for the Care and Use of Laboratory animals, Eighth Edition) 是这样界定的:“laboratory animals (also referred to as animals) are generally defined as any vertebrate animal (i. e., traditional laboratory animals, agricultural animals, wildlife, and aquatic species) produced for or used in research, testing, or teaching”,译成中文就是“在科学研究、检验、教学中生产和使用的所有脊椎动物”,对动物加了个注解,即包括传统意义上的实验动物、农业动物、野生动物和水生物种。这个概念是以目的作为主要内容来界定实验动物的名称和含义的,把这类动物生产和使用的目的限定的十分清楚,即无论动物的来源、种类、水生、陆生,只要用于这三个目的的动物,通称为实验动物,纳入到实验动物的范围加以管理和控制(care 一词翻译成“饲养管理”值得推敲,简单翻译成饲养管理难以表达原意中伦理层面的关照、关爱的内涵)<sup>[9]</sup>。

从实验动物这个概念的不同可以看出,中美使用的实验动物的概念强调的重点不同,涵盖的内容相差甚远,动物的种类和包含的内容有了完全不同的含义。我国使用的实验动物的概念强调“人工”这个名词作为定语,不仅在培育上,在微生物和寄生虫控制、遗传背景明确和来源清楚都离不开人工,离不开人为的因素和影响。把这句话解读为“人为条件下,培育出的来源清楚、遗传背景明确,

控制微生物和寄生虫,用于科学研究、教学、生产、检定等目的的动物”可能更准确的表达了概念的含义,同样涵盖了原有的几层意思,表达的内容更易于理解。这个概念强调的是“人工”,或者说是人为,把动物范围限定的比较小,没有了“人工”的内容,不具备这几个先决条件,就不是实验动物的范畴,不属于实验动物领域,自然就不在实验动物的管理范围之内了,由此出现了“实验用动物”这个概念,并带来了“实验用动物”不是实验动物的后果和不利影响。

## 2 实验动物概念定义的不同带来的后果和影响

实验动物这个概念的定义在实际工作中有着十分重要的意义和作用,由于我们对实验动物的定义有些偏差,所以带来很多不利于实验动物事业发展的后果和影响。主要表现在以下几个方面:

### 2.1 管理中存在的问题

实验动物的特殊性要求对实验动物进行不同于其它用途的动物更为严格的管理,不仅表现在动物生产和使用的管理,保证动物实验结果准确性方面,而且还要保护和关爱实验动物,注重实验动物伦理。管理是以国家和地方的法律法规作为基础的,管理的范围和权限也是和内容息息相关的,从管理权限来看,不在管理范围的自然不能进行管理,脱离了管理的范围,否则就是越权,也不能按照实验动物的管理办法进行管理。

但在实际工作中出现的现实问题让管理部门难以处理,出现了所谓的“实验用动物”这一术语。如猫的使用,在国内许多制药厂需要用猫做实验,但由于猫的生物学特性,在人工条件下难以培育,一直没有专业的培育单位,也缺少相应的标准进行检验和级别的划分。实验动物使用单位申请实验动物使用许可证时,根据国家药典规定和自己的需求进行正常申请,但到了实验动物的主管部门省市科技厅(局)因实验动物的定义没有涵盖这种动物,只能将其去除,成为管理和使用单位的空白点,出现使用单位在用,管理部门知情而不能管理的现象。同样的情况出现在牛、羊、猪等动物品种,形成了管理部门无法管,使用单位需要作为实验动物正常使用,严重影响国家实验动物管理的严肃性。

### 2.2 实验动物概念的不清晰给实际工作中带来极大的困惑和不便

客观上看,概念定义中的“人工”是没有实际意

义的,我们实验动物概念中的人工的作用是不需要过分强调的,实际上无论实验动物学科还是其他生命科学,大多数学科的建立和发展都是在人工的条件下完成的,或者是在人为控制的条件下完成并用于人类生活和实践。实验动物学科也不例外,所有的生产和使用条件都是在人为控制的条件下完成。在这个概念定义中,明示的隐藏的都是人工或者人为,其实是个大家已经达成共识的内容。实验动物概念的不清晰给生产和使用单位带来了很大的困惑,实验用动物不是实验动物不仅给工作带来不便,更是给一些突发事件的处理带来一系列的后患。

典型案例是东北农业大学发生的羊感染人事件的处理上,更多地暴露出因实验动物概念定义出现的管理和应用中的问题。由于使用的羊不属于实验动物,缺少按照实验动物管理的模式进行科学规范的管理,造成羊未经检疫进入实验室,导致有关师生发病并带来严重后果,形成了高等教育和科学研究中出现的不科学事故,受害的师生以及受处分的领导都成了实验动物概念不清晰和不准确的牺牲品。

### 2.3 给人员培训带来十分不利影响

在国内通行的实验动物从业人员上岗培训中,首先会用很大精力去解释实验动物这个概念,其中会对实验动物与野生动物、农业动物、经济动物包括实验用动物的区别进行解释,给那些从事非实验动物的科技人员带来困惑和不理解,即使从事本行业多年的工作人员对这个概念有时也会产生困惑。用于实验的动物不是实验动物,而仅仅是列入国标的用于实验的动物才是实验动物,而这个差别仅仅是应为一个概念的定义所致,导致了整个实验动物行业从管理到应用的不便和混乱。

### 2.4 科学普及活动中的困惑

为了推动科技发展,提高全民尊重科学、尊重知识的意识,各种社会机构会组织各种形式的科学普及活动,旨在普及科学知识,让人们更多的了解科学知识。就实验动物的科普活动来说,大家会经常提到实验用动物这个概念,而用现在的解释很难让大众明白,更不用说对这个概念的科学性进行了了解<sup>[10]</sup>。

## 3 重新修订实验动物概念意义重大

在多年的发展中,实验动物行业逐渐形成了一套从生产到使用的运转体系,包括政府部门监督管

理,这套体系经过不断的修正,运行是正常有序的,保证了实验动物行业的正常发展,在实际工作中发挥了巨大的作用,影响和引导了其它行业的发展。准确定位和定义会在现有基础上,更好的发挥作用,符合实验动物行业的需要,把符合实验动物要求的动物全部纳入实验动物的范围,用已经建立起来的制度和体系进行管理,保证所有符合实验动物要求的动物都能在规范条件下生产和使用,开展相应的实验,达到实验动物行业为其它行业服务的目的,更好地提供坚强有力的保障。

### 3.1 修订实验动物概念的定义是科学发展和学科建设的需要

实验动物是生命科学的一个分支,也是一门独立的学科,在当今社会发展中起着越来越重要的作用。实验动物这个名词的定义决定着这个学科的范围,决定着这个学科的发展,对其它学科的发展有着重大的影响。要把实验动物这个专业术语的定义放到科学的高度来认真对待和认识,使其有个准确的定位,更能准确的反映出实验动物行业的内涵和外延。目前概念的定义,难以涵盖实验动物真正的内涵,难以包含实验动物行业的全部内容,制订出动物标准,人为的提升到实验动物的序列,是与不是之间仅仅是因为没有把这种动物前置几个标准和规则,而不去考虑动物的作用和使用的目的。实际工作中存在的实验用动物非实验动物的现象是对科学概念的嘲讽,是对科学的挑战。因此修订实验动物概念,补充其内容,使这个概念更完善、更完整,是对实验动物学科的尊重,也是对实验动物行业的保护,是符合科学发展规律的。行业的发展需要一个准确的定义和定位。

### 3.2 实验动物是生命科学的基础,作为基础行业准确定位和定义尤其重要

进入 21 世纪,生命科学迅猛发展,农业、医药和教育等相关行业都有着突飞猛进的势头,为人类的生存和发展提供无限的生机,取得了惊人的成绩。作为基础行业的实验动物,其发展既为生命科学的发展提供了帮助,也影响和限制着生命科学的发展,更需要用科学的、准确的定位适应生命科学的发展,尽快实现科学化、制度化和法制化建设的目标,不能停留在一个有缺陷不完整的运行状态。

### 3.3 实验动物管理需要一个准确的定位和定义

中国、美国以及其他国家对实验动物的管理有着不同的模式,但不同的模式下,加强和控制实验

动物使用是共同的目标,这其中既有保障实验动物的福利和伦理的要求,也有保障动物实验数据准确和可重复性的需要,提高利用动物开展实验的效率和效果,重视利用法律、法规、标准等各种手段强化管理是各个国家通用的办法。中国实验动物行业发展历史较短,管理方式符合中国国情,适合中国的现实,在实际应用中也不断优化管理方案,保证实验动物行业的顺利发展,但是从现实看也存在严重的问题。

面临的“实验用动物”不是实验动物的现状,主要是实验动物概念的定义所致,入口太严,人为的提高了实验动物的准入标准,造成该管的不能管、无法管,才导致了东北农业大学的悲剧。这个问题在实际工作中已经出现,就需要我们找出原因,尽快解决这个问题,这样才能使我国实验动物行业得到更有效的管理,行业才能更快更健康的发展。

### 3.4 修订实验动物概念是落实实验动物福利和伦理的需要

实验动物之所以要加强管理,提供良好的设施和条件,提供充足的食物和饮水,提供足够的活动空间,除了动物实验的需要之外,保证动物的福利和伦理也是个重要的因素。众所周知,实验动物同农业动物、野生动物、经济动物等有着明显的不同,实验动物的生活周期不固定,忍受人为带来的痛苦和悲伤,无法享受生存时期自然状态下的阳光和大自然的新鲜空气,随时遭受给药、手术、杀戮等人为的处置,其命运同野生动物、农业动物有着天壤之别。在这种状态下生存的动物需要一个尽可能适合动物生存的环境,需要一个伦理方面的关心和照顾,尽可能的减少、优化和替代动物的使用。列入实验动物序列才能得到这些保障,才能得到各个层面的监督管理,未能列入序列的动物难以得到实验动物管理中提到的道德伦理层面的监管,其生存和使用难以有福利和伦理方面的保障,成为既没有阳光和空气的自然享受,也没有实验动物所能得到的动物福利和伦理保护,从这个意义上看对这些动物也是不公平的。

### 3.5 科学普及和专业培训的需要

在社会活动中,我们在普及科学知识的时候,以及我们正常开展的专业的从业人员培训中,经常会遇到的就是实验用动物和实验动物的区别这个貌似简单的问题,这个问题不仅让从业人员一头雾水,更是让社会各界人士难以理解,这个现象非常

普遍,其原因就是概念的模糊和定义的不准确。这个问题也让一些关心实验动物行业发展的有识之士因对这个行业的不了解、不理解而退避三舍,难以提供必要的帮助和支持。进入这个行业的从业人员大多不是从事实验动物或者是动物学专业的人员,入门的第一课就是一个概念的混淆,首先需要掌握的就是这两个概念的区别,更可怕的是对那些涉及到这两个概念的从业人员,更是带来困惑,一样的环境、一样的实验、有的是实验动物,而有的竟然不是,实在是难以理解。

#### 4 修订实验动物概念带来的问题探讨

由此看来,中美实验动物概念的区别,不仅是包含的动物种类和数量的不同,评价标准的不同。它们之间的区别是多方面多层次的,体现在管理模式的不同,评价标准的差异,动物福利和伦理重视程度的差异,政府管理模式的不同等。从科学以及科学发展观的角度看,美国实验动物的概念更合理、更科学、更准确、更客观。中国实验动物的概念中人为的因素多、政府的行为多、脱离现实的成分多。重新修订中国的实验动物概念意义重大,实验动物行业的发展离不开一个准确的定义和定位,迫切需要一个准确、客观、科学的定义。

在实际工作中,由于扩展范围进入实验动物序列的动物可以通过制订企业标准、地方标准逐步升级为国家标准的方式方法完善,这种方法在不少省市已经开始使用,并收到明显的效果。管理部门只需加强监督管理,管理模式没有太大变化,管理成本没有太多增加。国家科技部作为实验动物的主管部门,有必要尽快组织有关学者专家,对相应的法律法规、规章制度、国家标准进行重新修订,让实

验动物早日并入实验动物序列加以有效的管理和规范,重视实验动物福利和伦理,切实做好真正意义上的善待实验动物,为我国实验动物行业的发展做出积极的贡献。在现有基础上解决好实验动物行业的地位和定位,是我国实验动物行业发展尽快和国际标准接轨,尽快发展壮大实验动物行业,为生命科学的发展做好服务,都将产生深远的和历史的意义。

#### 参考文献:

- [1] 李根平, 邵军石, 李学勇, 等. 实验动物管理和使用手册 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2010: 2-5.
- [2] 陶雨风, 刘忠华, 毕玉春, 等. 国内外实验动物管理体制及法规条例的比较[J]. 实验动物科学, 2011, 28(4): 46-51.
- [3] 窦如海, 金东庆, 刘兆平, 等. 实验动物与动物实验技术 [M]. 济南: 山东科技出版社, 2006: 2-4.
- [4] 王漪, 等我国实验动物科学技术的基础和前言[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(10,11): 61-65.
- [5] 金东庆, 王可洲, 崔明勇, 等. 《实验动物环境设施设计与管理》[M]. 北京: 蓝天出版社, 2012: 1-14.
- [6] 中国医学科学院医学实验动物研究所, 中国质检出版社第一编辑室. 实验动物标准汇编 [S]. 北京: 中国质检出版社/中国标准出版社, 2011: 383.
- [7] 中华人民共和国住房和城乡建设部、中华人民共和国质量监督检验检疫总局. 实验动物设施建筑技术规范 [S]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2008.
- [8] National Research Council of the National Academies, Guide for the Care and Use of Laboratory Animal, Eighth Edition [M]. USA: the National Academies Press, 2011.
- [9] 王建飞, 周艳, 刘吉宏, 等译. 《实验动物饲养管理和使用指南》[M], 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 7.
- [10] 杨志伟. 中国实验动物产业化发展探讨[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(10,11): 76-80.

[修回日期]2015-12-30



# 生物安全实验室病毒悬液灭活试验方法标准转化研究

邓阿妹<sup>1</sup>, 魏 凤<sup>1</sup>, 吴 佳<sup>2</sup>, 马海霞<sup>2</sup>, 袁志明<sup>2</sup>

(1. 中国科学院武汉文献情报中心, 武汉 430071; 2. 中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

**【摘要】** 化学消毒剂常用于病毒的灭活和实验室环境的消毒, 其对病毒灭活的效果及评价直接影响实验室的生物安全。鉴于目前我国尚缺乏对化学消毒剂杀病毒效果的评价标准, 本文在对欧盟现行的化学消毒剂杀病毒定量悬浮试验标准的研究分析的基础上, 结合我国生物安全实验室的管理现状, 提出了欧盟现行标准转化的方案。建议以包括高致病性病毒的替代病毒在内的6种病毒作为试验用的模式病毒, 同时增加残留化学消毒剂的去除方法和试验结果95%置信区间计算方法内容。该建议提高了标准的科学性和可操作性, 并为我国实验室消毒灭菌标准制定提供了参考。

**【关键词】** 病毒灭活; 化学消毒剂; 生物安全; 标准; 定量悬浮试验; 杀病毒效果评估

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0027-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.02.006

## Transformation and standardization of the inactivation test method for virus suspension in biosafety laboratory

DENG A-mei<sup>1</sup>, WEI Feng<sup>1</sup>, WU Jia<sup>2</sup>, MA Hai-xia<sup>2</sup>, YUAN Zhi-ming<sup>2</sup>

(1. Wuhan Library, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China;

2. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

**【Abstract】** Chemical disinfectants are generally used for virus inactivation and environment disinfection in biosafety laboratory, and the efficacy and evaluation of the disinfection are critical to ensure the laboratory biosafety. However, there is a current lack of applied standard to evaluate the virucidal efficacy of chemical disinfectants in our country. In this paper, a European Union standard “*Method and Requirements of Virucidal Quantitative Suspension Test Method for Chemical Disinfectants Used in Human Medicine*” was analyzed and a standard transformation scheme has been proposed. It is suggested that the model viruses should be increased from 3 to 6, including the surrogate viruses to substitute highly pathogenic viruses, and that the method to remove the residual chemical disinfectant and the calculation of 95% confidence interval should be incorporated into the standard. The suggestion will improve the scientific and operational standards related to disinfection and sterilization in biosafety laboratory in China.

**【Key words】** Virus inactivation; Chemical disinfectant; Biosafety; Standard; Quantitative suspension test; Virucidal effect evaluation

生物安全实验室活动涉及对包括病毒在内的多种高致病性病原微生物的操作和研究。采取消毒措施对被病毒污染的环境、仪器设备、实验废弃物及人体表面的消毒是避免实验室工作人员感染

**【基金项目】** “十二五”国家卫生行业专项项目(2012ZX10004403); 国家自然科学基金项目(71103178); 中国科学院优秀人才择优支持项目; 武汉市科技项目“武汉市新发传染病与生物安全重点实验室”(201261638501)。

**【作者简介】** 邓阿妹(1981-), 女, 博士, 助理研究员, 主要研究方向: 标准情报的研究与分析。E-mail: dengam@mail.whlib.ac.cn。

**【通讯作者】** 袁志明, E-mail: yzm@pentium.whiov.ac.cn。

和病毒向实验室外环境泄露的重要手段。消毒方法不当极易造成人员的感染和病毒的传播,从而导致极其严重的生物安全事故。2004 年北京发生了实验室 SARS 冠状病毒感染事件。事后查明,是由于采用未经论证和效果验证的非典病毒灭活方法,在不符防护要求的普通实验室内操作冠状病毒感染材料造成的<sup>[1]</sup>。因此,做好消毒工作对于生物安全实验室的正常运行和人员的安全具有非常重要的意义。

利用化学消毒剂对病毒污染物进行消毒需要对病毒灭活的效果进行正确、科学的评价。目前,国际上主要采用病毒悬液灭活试验法和病毒载体灭活试验法在实验室条件下对化学消毒剂的杀病毒活性进行检测和评估,其中病毒悬液灭活试验法因操作相对容易而成为最常使用的方法<sup>[2-4]</sup>。病毒悬液灭活试验法是在实验室中模拟实际使用条件对化学消毒剂杀病毒悬液的活性进行测试和验证,其结果可作为实际生活中选择化学消毒剂和评估杀病毒效果的主要参考依据。一些国家已将该方法作为标准推出以规范对该方法的使用,如欧盟标准 NF EN 14476 “化学消毒剂和防腐剂—人类医学中化学消毒剂和防腐剂的杀病毒定量悬浮试验—试验方法和要求”就是一个在欧盟被广泛使用、同时也被国际社会接受的标准。随着科学技术的进步和研究的深入,人们对于病毒性质和传播机制的了解逐步加深,这为病毒悬液灭活试验方法标准的改进和优化提供了有利条件。

基于中法生物安全标准化领域的研究与合作,本研究针对化学消毒剂杀病毒定量悬浮试验这一方法标准开展相关分析和研究,希望通过调研和追踪该方法的最新研究进展发现标准存在的不足,并提出改进建议,为我国制定杀毒灭菌相关标准提供参考。

## 1 研究目标和方法

本研究的研究目标有 3 点:(1)对法国欧盟标准 NF EN 14476 “化学消毒剂和防腐剂—人类医学中化学消毒剂和防腐剂的杀病毒定量悬浮试验—试验方法和要求(第 2 阶段第 1 步)”<sup>[5]</sup>的内容进行深入分析。该标准由欧盟委员会于 2005 年发布并被法国转化为国家标准。在内容上,该标准包括了“范围”、“规范性引用标准”、“术语和定义”、“试验要求”、“材料和试剂”、“试验方法”、“用于指定

病毒的试验程序”、“试验数据的计算”、“试验结果的表示”和“附录”等 10 个部分。通过对标准内容的深度分析,全面掌握标准涉及的关键信息;(2)通过检索分析的方法,利用 Web of Science 数据库对相关论文进行检索。Web of Science 数据库收录了从 1970 年至今的 8000 多种世界范围内最具有影响力的、经同行专家评审的高质量的期刊。本研究利用“disinfectant”、“virus inactivation”、“virucidal activity”、“quantitative suspension test”等关键词对该数据库中 2005 至 2015 年 10 年间全球发表的消毒灭菌相关论文进行检索。通过文献调研的方法对检索到的科技文献加以深度分析和研究,联合专家咨询的方法以期详细掌握化学消毒剂杀病毒悬液试验方法的研究进展。(3)掌握化学消毒剂杀病毒定量悬浮试验方法标准在相关国家的应用状况。

通过以上 3 个目标的研究和分析,将掌握的该领域的研究进展与法国欧盟标准 NF EN 14476 开展比对分析,结合对标准实际应用情况的调研,对标准的内容给出改进和完善的建议。

## 2 标准 NF EN 14476 内容解析

标准 NF EN 14476 规定了化学消毒剂杀病毒定量悬浮试验的方法和最低要求,篇幅较长、内容较多、信息量大。需对内容的关键信息进行总结和提炼,以便于同文献中的相关信息进行比对分析。现将该标准内容的关键信息及特点进行总结,如表 1。

标准 NF EN 14476 从制定到现在已过去 10 多年,上述表中涉及的一些技术和方法是当时科学研究所取得的成果,代表着当时科学技术的水平,该标准的提出和制定也是根据当时的科学研究的状况和实际的需求。随着时代的发展和科技的进步,该标准涉及的方法和技术是否落后?该标准是否还适用于当今的科学研究?是否能满足当今实际工作的需要?这些都是必须思考的问题。

## 3 标准 NF EN 14476 的分析和优化

根据对文献信息的深度挖掘和分析,化学消毒剂杀病毒悬液试验方法在试验模式病毒的种类、试验病毒的替代病毒、残留化学消毒剂的去除方法、对照和对比试验的设置及试验结果的计算和分析等方面均取得了新的研究进展和成效。针对标准 NF EN 14476,可以在这些方面对其进行优化,下面展开具体论述。

表 1 法国欧盟标准 NF EN 14476 内容关键信息总结

章节	关键信息	要求
范围	化学消毒剂的使用状态 化学消毒剂的适用范围 干扰物质	用硬水或水稀释形成的均一稳定的液体形态 仪器设备、手和表面的消毒 牛血清白蛋白和红细胞
材料和试剂	试验病毒的种类 试验病毒的浓度 消毒剂的配制 消毒剂的浓度设置	腺病毒、脊髓灰质炎病毒和细小病毒 不低于 $10^8$ TCID <sub>50</sub> /mL 配制浓度应为使用浓度的 1.25 倍 2 个使用浓度和 1 个无效浓度
试验方法	试验温度 反应混合物体系 残留消毒剂活性去除方法 病毒滴度的测定方法	化学消毒剂: $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; 化学-热消毒: $40^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$ 1 mL 干扰物质 + 1 mL 试验病毒悬液 + 8 mL 试验消毒剂溶液 物理稀释法和分子筛法 量子试验法和空斑试验法
结果的计算	计算方法 试验消毒剂合格的条件	$\log N_0 - \log N_x$ $\log N_0 - \log N_x \geq 4$

注:  $N_0$ : 未经消毒剂处理的阳性病毒对照的滴度值;  $N_x$ : 消毒剂处理的病毒滴度值

表 2 法国欧盟标准 NF EN 14476 试验模式病毒优化前后对比

优化前的试验模式病毒(毒株)		优化后的试验模式病毒(毒株)	
化学消毒剂	类型 1 脊髓灰质炎病毒(LSc-2ab) 类型 5 腺病毒(Adenoid 75)	化学消毒剂	类型 1 脊髓灰质炎病毒(LSc-2ab) 类型 5 腺病毒(Adenoid 75) VACV(Elstree) BVDV(NADL) SV 40(777)
化学-热消毒	牛细小病毒(Haden)	化学-热消毒	牛细小病毒(Haden)

### 3.1 试验模式病毒的种类分析

在实验室环境下进行化学消毒剂杀病毒定量悬浮试验时,设定试验的模式病毒非常必要。由于病毒种类繁多、性质各异,任何实验室都无法达到条件来测试所有消毒剂对全部已知病毒的杀灭活性,因此需采用模式病毒进行试验。试验模式病毒需具备安全性高、稳定性高、可操作性强、易增殖等特点。目前,世界上对于模式病毒没有统一的规定,各国都在积极寻找各种核酸类型的病毒作为试验的模式病毒。

标准 NF EN 14476 规定的试验模式病毒有 3 种,分别是作为无包膜 RNA 病毒类代表的类型 1 脊髓灰质炎病毒(毒株为 LSc-2ab)、作为无包膜 DNA 病毒类代表的类型 5 腺病毒(毒株为 adenoid 75 和 ATCC VR-5)和作为耐热病毒类代表的牛细小病毒(毒株为 Haden 和 ATCC VR-767)。根据有无包膜结构,病毒分为包膜病毒和无包膜病毒两大类。包膜结构对化学消毒剂比较敏感,一般认为,无包膜病毒对化学消毒剂的抵抗力强于包膜病毒,如果化学消毒剂对无包膜病毒具有杀灭活性,那么它对包膜病毒也应具有杀灭活性。但是,由于病毒性质的巨大差异,事实情况却并非如此,例如,含乙醇或甲醛的消毒剂可将无包膜的脊髓灰质炎病毒灭活,却不能将包膜病毒 SV40 灭活。事实上,除了无包膜

病毒之外,包膜病毒也可以作为试验的模式病毒。痘苗病毒(VACV)、牛病毒性腹泻病毒(BVDV)和猴多瘤病毒 40(SV40)拥有模式病毒要求的诸多特点,具备作为模式病毒的潜力。为此,研究者们开展了大量的研究工作,从实践上证明了这 3 种包膜病毒作为模式病毒的可行性<sup>[6-11]</sup>。

标准 NF EN 14476 仅将无包膜病毒作为试验的模式病毒,忽视了包膜病毒作为模式病毒的必要性,从这一点来说,该标准不够科学和严谨。因此,应对标准 NF EN 14476 的试验模式病毒的种类进行扩充,在已有模式病毒的基础上将 VACV、BVDV 和 SV40 作为评估化学消毒剂对包膜病毒杀灭活性的模式病毒。标准 NF EN 14476 试验模式病毒优化前后对比见表 2 所示。

### 3.2 试验病毒的替代病毒分析

在实际生活中,存在一些如乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、诺如病毒、SARS 冠状病毒(SARS-CoV)等流行度高、致病性强、危害性大的病毒,给人类的健康造成了极大威胁。实验室条件下检验化学消毒剂对这类高危病毒的杀灭活性时,仅使用模式病毒是不够的。直接利用这些病毒作为试验病毒理论上是最科学的,但是,由于这些病毒具有极强的感染性和致病性,而且还存在体外增殖困难的缺点,在实际操作上是不可行的。为

表 3 化学消毒剂杀病毒活性的试验病毒与替代病毒

试验病毒(英文缩写)	替代病毒(英文缩写)
乙型肝炎病毒(HBV)	鸭乙型肝炎病毒(DHBV)
丙型肝炎病毒(HCV)	牛病毒性腹泻病毒(BVDV)
人诺如病毒	鼠诺如病毒(MNV);猫杯状病毒(FCV)
SARS 冠状病毒(SARS-CoV)	牛冠状病毒(BCV);禽传染性支气管炎病毒(IBV)
痘苗病毒(VACV)	改良安卡拉痘苗病毒(MVA)

了解决这些问题,学者们开展了替代病毒的研究,以期发现或改造一些与这些病毒结构和属性类似、对人体不致病或致病性较弱且易于体外增殖的病毒来代替高致病性病毒开展试验。研究者们发现,可用鸭乙型肝炎病毒(DHBV)代替 HBV<sup>[12]</sup>、用 BVDV 代替 HCV<sup>[13]</sup>、用鼠诺如病毒(MNV)或猫杯状病毒(FCV)代替人诺如病毒<sup>[14,15]</sup>、用牛冠状病毒(BCV)或禽传染性支气管炎病毒(IBV)代替 SARS-CoV<sup>[16]</sup>开展化学消毒剂对以上高危病毒杀灭活性的试验。另外,虽然要求试验模式病毒对人体应具有安全性,但实际上,一些模式病毒仍可以使人体致病,寻找更加安全的模式病毒替代它们也是研究者们关心的问题<sup>[17]</sup>。改良安卡拉痘苗病毒(MVA)是痘苗病毒经过人工改造后的变体,丧失了对人体的感染能力。有研究表明,改良安卡拉痘苗病毒可以作为痘苗病毒理想的替代物<sup>[18]</sup>。目前,研究者们还没有寻找到合适的病毒来替代脊灰病毒作为模式病毒,这将是未来研究工作需要解决的问题。标准 NF EN 14476 没有涉及试验病毒的替代病毒,有必要依据以上研究结果对其进行补充和完善。以上病毒及替代病毒总结如表 3。

### 3.3 残留化学消毒剂的去除分析

试验过程中残留的化学消毒剂会使细胞培养物中毒,导致试验结果的可靠性降低,因此有必要将其去除。标准 NF EN 14476 中,对毒性较低的化学消毒剂采用稀释法将其去除,对毒性较高且稀释法无法取得理想效果的化学消毒剂,采用 Sephadex™ LH-20 凝胶过滤技术将其去除。标准 NF EN 14476 涉及的这两种方法在实际应用上都存在缺陷。由于化学消毒剂种类繁多、性质复杂,对毒性较低的化学消毒剂仅采用稀释法往往达不到预期的去除效果,且稀释过程还会延长化学消毒剂和病毒的接触时间。另外,利用 Sephadex™ LH-20 凝胶去除毒性较高的化学消毒剂也存在以下两点弊端:(1)去除过程耗时长,至少需要 2 min 甚至更长时间,这明显延长了病毒与化学消毒剂的接触时间;(2)适用化学消毒剂的范围较小,仅适用于少数的化学消毒剂,对大部分的化学消毒剂都不适用。

鉴于以上问题,有学者建议采用中和稀释法去除低毒性的化学消毒剂,即先用中和剂中和,再用稀释法进行连续稀释,即可实现残留化学消毒剂的有效去除<sup>[19]</sup>。此外,法国学者介绍了两种新型凝胶 Sephadex™ G-10 和 Sephadex™ G-25 在去除高毒性化学消毒剂上的应用,这两种凝胶相比 Sephadex™ LH-20 凝胶具有明显优势,不仅适用于绝大多数的化学消毒剂,而且去除过程仅需 1 min,另外,使用成本也较低<sup>[20]</sup>。

标准 NF EN 14476 在残留化学消毒剂去除上仅涉及两种物理方法,且这两种方法在使用上均存在缺陷。因此,应对标准 NF EN 14476 的该部分内容进行补充和完善,在兼顾物理方法和化学方法的同时,还应考虑两种新型凝胶 Sephadex™ G-10 和 Sephadex™ G-25 的应用。

### 3.4 对照和对比实验的设置分析

为了试验结果的可靠性和真实性,也为了便于对意外结果的分析,在试验过程中需设置多组对照和对比试验。就化学消毒剂杀病毒定量悬浮试验来说,需设置的对照实验包括评估化学消毒剂杀病毒活性的病毒对照实验、评估干扰物对病毒感染性影响的实验、评估干扰物对细胞影响的实验、评估化学消毒剂对细胞毒性的实验、评估稀释过程对病毒感染性影响的实验及甲醛对照实验。标准 NF EN 14476 虽在部分章节零星地提到了对照实验的设置,但缺少对这些对照进行系统性的归纳,且描述也不够详尽和全面,使标准的使用者对需要设置哪些对照实验及如何设置没有一个很清晰的理解。因此,应考虑在标准 NF EN 14476 内容上设立一个单独章节,对所需的对照实验进行系统条理的归纳和总结,并对设置方法做详细的说明,使标准的使用者能够快速准确地理解并掌握对照实验的设置方法。

### 3.5 试验结果的计算分析

标准 NF EN 14476 要求,对试验结果进行计算时,只需计算出未经化学消毒剂处理的病毒阳性对照的滴度对数值( $\log N_0$ )和反应混合物在各接触时间点的病毒滴度的对数值( $\log N_x$ ),根据两者的差值

( $\log N_0 - \log N_x$ ) 对结果进行分析和判断。如果该差值不低于 4 说明试验化学消毒剂对试验病毒具有杀灭活性,该化学消毒剂实验室试验合格;反之则说明试验化学消毒剂对试验病毒不具有杀灭活性,该化学消毒剂实验室试验不合格。但是,由于每次试验存在随机误差,仅计算病毒滴度的对数值是不够的。研究者越来越倾向于对实验结果置信区间的计算<sup>[21]</sup>。基于置信区间的结果分析能够真正地反映化学消毒剂实际杀病毒活性的不确定度,使试验结果更加科学、严谨、可信。标准 NF EN 14476 对试验结果的计算要求较简单,不够科学严谨。因此,对标准 NF EN 14476 该部分内容进行补充和完善时,应要求每次试验不仅需计算出病毒的滴度值,还需对结果进行 95 % 置信区间的计算。

#### 4 对我国相关生物安全工作的启示与建议

根据以上研究,针对我国相关的生物安全工作,给出以下建议:(1)重视生物安全实验室消毒灭菌技术方法标准和消毒灭菌效果评价方法标准的制订,完善生物安全实验室消毒灭菌方法及评价体系。不仅需要制定针对不同危险等级病毒的多种消毒灭菌方法,还需考虑空气、管道、仪器设备、防护服等被病毒污染的介质的消毒灭菌的特殊要求。建立健全消毒灭菌效果评价方法体系,指导化学消毒剂科学、合理、安全的使用,规范消毒灭菌方法的正确实施。此外,应加强对实验室工作人员消毒灭菌方法技术的培训和指导,增强工作人员的安全防范意识,提高个人的安全防护知识水平和突发事件处理技能。管理者应不断完善实验室生物安全防范措施,强化生物安全管理能力,提高生物安全管理水平。(2)加强顶层设计,统筹规划和协调,重视建立生物安全技术的研发体系,提高我国生物安全技术的研发水平和生物安全产品的国际竞争力。首先应加强生物安全领域的基础研究,包括病毒基本性质和传播致病机制的研究、环境风险的起因和性质研究、风险评估和风险管理的技术研究、实验室安全操作的技术研究、病原微生物专用检测技术及专用检测设备的研究等。此外,还应重视对高等级生物安全技术的研发,包括高致病性病原体隔离与防护技术的研究,比如结构气密性、风量控制、差压控制等技术的研究;化学淋浴消毒和连续消毒等新型消毒方法及消毒效果评价的技术研究;正压防护服、呼吸防护装置等高等级生物防护装备系统的

研究等。(3)加强生物安全的国际合作与交流,了解世界生物安全的发展动态和趋势,吸取国际生物安全事件的惨痛教训,吸收和引进国际先进的生物安全技术和方法。学习和借鉴国外在管理、监测、评估等方面的成功经验,提升我国的生物安全管理能力。加强对外宣传,树立我国生物安全管理的良好形象,保障我国生物技术从研究开发到生产应用对外合作的广泛开展。根据生物安全技术发展的特点和趋势,结合我国国情,规划我国生物安全的发展战略、优先行动和重点项目,以完善我国的生物安全体系和提升我国生物安全的国际化水平。

#### 5 总结

本研究针对法国欧盟标准 NF EN 14476 内容的改进和完善开展了分析和研究工作,根据研究结果,对标准的内容给出以下几点优化建议:

(1)原标准中试验模式病毒的种类可由 3 种(脊灰病毒、腺病毒和牛细小病毒)增加至 6 种(脊灰病毒、腺病毒、痘苗病毒、牛病毒性腹泻病毒、猴多瘤病毒和细小病毒),以满足病毒对化学消毒剂抵抗力多样性的试验需求;

(2)在原标准的基础上,可增加实验危险病毒的替代病毒选项,增加试验方法的灵活性、适应性、实用性和安全性;

(3)原标准提到的残留化学消毒剂去除方法已经不太适用于当前复杂多变的病毒环境和日益增多的各式化学消毒剂制品,建议在原标准单纯物理稀释法的基础上增加化学中和方法,并考虑两种方法的融合交叉使用。此外,建议使用两种新型凝胶技术 Sephadex™ G-10 和 Sephadex™ G-25 对残留的高毒性化学消毒剂进行去除;

(4)在原标准的基础上可增加全面且详细的对照和对比实验信息,如评估化学消毒剂杀病毒活性的对照实验、评估干扰物对病毒感染性影响的对照实验、评估干扰物对细胞影响的对照实验、评估化学消毒剂对细胞毒性的对照实验、评估稀释过程对病毒影响的对照实验及证明试验病毒适用性的甲醛对照实验,以增强试验体系的科学性和严谨性;

(5)在试验结果的计算和分析方面,建议在原标准方法的基础上增加对试验数据的 95 % 置信区间的计算,以提高结果分析的准确性和科学性。

上述的分析研究结果将为我国制定符合国家发展状况、先进的消毒灭菌方法标准提供借鉴和参

考,以促进我国的生物安全标准化水平,帮助我国生物安全技术和水平管理的进一步提高。因此,我国不仅要加强生物安全相关技术的研发和应用布局,也应及时对现有标准进行内容更新和完善,将最新的研究成果加以应用和推广,满足我国当前生物安全技术的需求。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 李俊勇, 赵文红, 杨智明. 吸取 SARS 实验室感染教训预防鼠疫实验室感染发生 [J]. 医学动物防制, 2006, 22(2): 85 - 86.
- [ 2 ] 帖金凤, 张文福. 病毒灭活检测技术的研究进展 [J]. 中国消毒学杂志, 2005, 22(4): 450 - 452.
- [ 3 ] Sattar SA, Springthorpe VS, Adegbunrin O, et al. A disc-based quantitative carrier test method to assess the virucidal activity of chemical germicides [J]. J Virol Methods, 2003, 112: 3 - 12.
- [ 4 ] Moce-Llivina L, Papageorgiou GT, Jofre J. A membrane-based quantitative carrier test to assess the virucidal activity of disinfectants and persistence of viruses on porous fomites [J]. J Virological Methods, 2006, 135: 49 - 55.
- [ 5 ] AFNOR, 2007. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area - Test method and requirements (Phase 2/ Step 1) [S]. NF EN 14476: 2005 + A1; 2007
- [ 6 ] Kampf G, Steinmann J, Rabenau H. Suitability of vaccinia virus and bovine viral diarrhea virus (BVDV) for determining activities of three commonly-used alcohol-based hand rubs against enveloped viruses [J]. BMC Infect Dis, 2007, 7: 5.
- [ 7 ] Heinzl M, Kyas A, Weide M, et al. Evaluation of the virucidal performance of domestic laundry procedures [J]. Int J Hyg Environ Health, 2010, 213: 334 - 337.
- [ 8 ] Sauerbrei A, Wutzler P. Virucidal efficacy of povidone-iodine-containing disinfectants [J]. Lett Appl Microbiol, 2010, 51: 158 - 163.
- [ 9 ] Steinmann J, Paulmann D, Becker B, et al. Comparison of virucidal activity of alcohol-based hand sanitizers versus antimicrobial hand soaps in vitro and in vivo [J]. J Hosp Infect, 2012, 82: 277 - 280.
- [ 10 ] Steinmann J, Becker B, Bischoff B, et al. Virucidal activity of 2 alcohol-based formulations proposed as hand rubs by the World Health Organization [J]. Am J Infect Control, 2010, 38: 66 - 68.
- [ 11 ] Sauerbrei A, Schacke M, Glück B, et al. Does limited virucidal activity of biocides include duck hepatitis B virucidal action? [J]. BMC Infect Dis, 2012, 12: 276 - 282.
- [ 12 ] Sauerbrei A, Schacke M, Gluck B, et al. Validation of biocides against duck hepatitis B virus as a surrogate virus for human hepatitis B virus [J]. J Hosp Infect, 2006, 64: 358 - 365.
- [ 13 ] Buckwold VE, Beer BE, Donis RO. Bovine viral diarrhea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents [J]. Antiviral Res, 2003, 60: 1 - 15.
- [ 14 ] Belliot G, Lavaux A, Souihel D, et al. Use of murine norovirus as a surrogate to evaluate resistance of human norovirus to disinfectants [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(10): 3315 - 3318.
- [ 15 ] Gehrke C, Steinmann J, Goroncy-Bernes P. Inactivation of feline calicivirus, a surrogate of norovirus (formerly Norwalk-like viruses) by different types of alcohol in vitro and in vivo [J]. J Hosp Infect, 2004, 56(1): 49 - 55.
- [ 16 ] Steinmann J. Surrogate viruses for testing virucidal efficacy of chemical disinfectants [J]. J Hosp Infect, 2004, 56: S49 - S54.
- [ 17 ] WHO global action plan for laboratory containment of wild polioviruses. Second edition [M]. WHO/V. B/03.11. ORIGINAL; ENGLISH. World Health Organization. 2003.
- [ 18 ] S. Hartnack, Essbauer S, Truyen U. Substitution of Vaccinia Virus Elstree by Modified Vaccinia Virus Ankara to test the Virucidal Efficacy of Chemical Disinfectants [J]. Zoonoses Pub Health. 2008; 55: 99 - 105.
- [ 19 ] 张文福. 病毒灭活检验技术 [J]. 中国消毒学杂志, 2004, 21(3): 260 - 261.
- [ 20 ] Geller C, Fontanay S, Finance C, et al. A new Sephadex™-based method for removing microbicidal and cytotoxic residues when testing antiseptics against viruses: Experiments with a human coronavirus as a model [J]. J Virol Methods, 2009, 159: 217 - 226.
- [ 21 ] Steinmann J, Wolff MH. Testing virucidal activity in Germany: an update [J]. GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär, 2007, 2(1): 1863 - 5245.

[ 修回日期 ] 2015-12-24



# 实验动物国家标准中大小鼠微生物检测项目的考量

向志光, 佟巍, 张丽芳, 孔琪, 魏强

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021)

**【摘要】** 本文对我国现行实验动物微生物国家标准中小鼠和大鼠涉及的微生物进行了回顾性分析, 考量病原微生物的感染谱, 病原对实验动物自身的危害, 病原对科学研究的影响水平以及国内外病原微生物的流行情况, 以期为我国实验动物国家标准的修订提供一些参考。

**【关键词】** 实验动物国家标准, SPF

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0033-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.02.007

## A current consideration of the microbes listed in the *National Standard of Laboratory Animals for mice and rats*

XIANG Zhi-guang, TONG Wei, ZHANG Li-fang, KONG Qi, WEI Qiang  
Institute of Laboratory Animals, CAMS/PUMC

**【Abstract】** In this paper, some items about the microbes listed in the current *National Standard of Laboratory Animals* were reviewed, including their host spectrum, impact of infection on the animals, their interference on research works and their epidemiology in laboratory animals. This paper may provide some clues for the update of our *National Standard of Laboratory Animals*.

**【Key words】** National Standard of Laboratory Animals; SPF; Microbes; Infection

### 1 我国实验动物国家标准设立的背景与意义

生命科学研究中使用的实验动物是人类疾病研究的替难者。为得到可靠的实验数据, 实验动物自身的质量需要得到有效的控制。因此, 实验动物的质量保障研究一直是实验动物科学的研究重点。

国外实验动物学科发展较早, 其实验动物产业较早开始市场化发展, 市场竞争机制促使企业提高实验动物产品质量。为了提高自身实验动物的质量, 各企业均制定了各自企业的实验动物质量控制

标准。国外并没有一个国家针对实验动物制定国家标准。但是一些实验动物的社会组织, 比如美国的实验动物学会、欧洲的 FELASA 组织, 他们对实验动物的质量控制提出了建议或指南<sup>[1]</sup>, 对实验动物繁育和使用机构的实验动物的使用具有一定的指导意义。

我国的实验动物学科和实验动物产业起步较晚。在我国实验动物行业发展的早期, 实验动物自身的质量, 特别是微生物质量没有保障, 这一状况严重的阻碍了我国实验动物行业的健康发展, 也使得实验动物科学对整个生命科学研究的支撑作用

[作者简介] 向志光(1980-), 男, 副研究员, 研究方向: 实验动物质量控制。

[通讯作者] 魏强, 研究员, E-mail: weiqiang0430@cnilas.org。

打了折扣。为了提高实验动物本身的质量,我国在 1994 年以国家标准的形式为实验动物的生产和使用单位提出了实验动物质量控制的要求。在过去的 20 多年间,我国的实验动物国家标准的制定与实施,无疑为我国实验动物质量提高起到积极促进作用,同时也使得我国的实验动物的质量保障研究得到长足发展。

实验动物的质量标准在国家标准层面上不应该是一成不变的。随着实验动物科学的发展,我国的实验动物国家标准也经历了多次修订。我国实验动物国家标准的变化也反映了我国实验动物科学与产业的进步。应该明确的是,我国的实验动物国家标准从其起草制定开始,其目的就是为了提高我国实验动物的质量,更好的为我国的生命科学研究服务。国家标准一方面可以对实验动物生产机构的产品提出质量要求,包括实验动物的稳定性以及安全性,保障使用者的利益;同时我国的实验动物国家标准也是指导实验动物生产和使用机构科学使用和管理实验动物的规范性指南。

## 2 实验动物国家标准中动物微生物携带状态的等级划分

目前,我国的实验动物国家标准在微生物和寄生虫的控制方面将动物进行了分级。目前的标准分为普通级、清洁级、无特定病原体级以及无菌级。对于无菌动物的定义比较好理解,在这种动物体内和体外不应存在任何微生物和寄生虫。但是对于其他 3 个级别的定义在现行的国家标准中仍有待商榷。

按照现行的国家标准,普通级实验动物区别于野生动物的地方在于排除了人兽共患病原体 and 动物烈性传染性病原体。而清洁级增加排除对动物危害大的病原体和对科学研究干扰大的病原体。在这两个等级中人兽共患病原体必须排除,应该说所有应用于科学研究的动物都需要对人兽共患病原体加以控制。随后的两个概念动物烈性传染性病原体和对动物危害大的病原体,这两个概念如何理解,涉及的病原体如何区分? 现行的国家标准中大鼠和小鼠不包括普通级动物,而对于犬和猴又没有清洁级动物这个类别,同时使用四个级别的动物包括了豚鼠、地鼠和兔。对于一些对动物危害大的病原体,在哪类科学研究中可以作为实验材料的实验动物携带呢? 而对科学研究干扰大的病原体,这个概念出现在了清洁级动物和 SPF 级动物的排除

范围,这些概念该如何界定?

这里需要界定两个概念。第一,病原体对动物的危害。动物的烈性传染病对动物的危害可想而知,不仅对动物个体本身存在影响,更是对动物群体产生影响。所有的实验动物均应排除,而其他的病原体,作为微生物和寄生虫,都是感染性的,只是烈性程度可能在一定条件下存在差异。但是对于实验动物的影响会存在差异,有些病原体的感染虽不会引起动物的大量死亡,但会对动物的基本生命体征产生影响,这些病原体在应用于科学研究的实验动物中也需要排除。在一定的历史阶段,由于我国的实验动物学科和产业水平的限制,我们可能无法要求排除这些病原体,但是随着科学的进步,所有对科学研究产生影响的病原体均应该得到有效控制。第二个概念是对科学实验动物干扰。在排除了对大部分科学研究都有危害的病原体后,剩余的干扰动物实验的病原体就有了危害程度上和危害倾向性上的差异。某些病原体对于动物的影响是有组织、器官或是系统倾向性的,因此在研究这些系统的生命现象时,这类病原就需要排除;而有些病原体,仅仅对某些品系的动物有影响,比如免疫缺陷的动物,或是基因修饰的动物,某些病原在其他品系动物呈现潜伏感染不致病的,在这些动物中就成为了致病因素。因此这些病原在特殊条件下就需要排除。

这里就有了另外一个概念,排除特定病原体的动物(SPF)。实际上目前国家标准中的普通级动物和清洁级动物也是排除了特定微生物的动物,也可以成为 SPF 动物,只是特定微生物的选择有一定局限性。而目前国家标准中的 SPF 级动物选择排除的病原体项目也仅仅是增加了几个检测项目。在排除病原体项目的选择上目前我们的国家标准是单一的,但是随着科学的发展,这种单一标准似乎存在一些问题:列入国家标准的一些病原对某类实验干扰不大,排除这些病原无疑增加了生产和使用成本;更多的是,我们有些研究需要排除一些病原,但是这些病原体又没有列入我们的国家标准中。因此对于 SPF 的定义在国家标准中不应该是特定的,应该给予使用者一定的选择性。这种选择的标准可以有两个,一个是动物品系的要求,例如对于免疫缺陷动物,需要排除更多的条件致病微生物;第二个是使用的需求,对于不同的实验目的,有选择的排除病原项目。因此,对于 SPF 的定义,我们

的国家标准应该给出选择性的指导意见。

对于我们的国家标准,业界存在两种声音,一种认为我们的国家标准应该仅仅设定那些严重干扰动物实验的病原,或者是降低标准;另一种认为我们国家标准的病原覆盖范围还不完善,应该增加国外普查的病原,或者可以认为是提高标准。实际上这两种意见可以统一起来。对于人兽共患病原体、对动物危害严重的病原体、对大多数实验有严重干扰的病原体,所有应用于科学研究的实验动物中必须排除。排除上述 3 类病原体的出发点在于保障从业人员的自身健康;保证实验动物的健康,防止疫病,维护实验动物福利;为了科学研究的准确性,提供实验动物质量。排除这类病原体应该是实验动物质量的最低要求,因此作为国家标准,应该是强制执行的标准。对于特殊品系的动物,以及有特殊应用的动物,应该单独制定排除病原范围,这类动物不应该再执行单一的标准,SPF 动物的定义应该多元化。

### 3 我国国家标准排除病原项目与国际实验动物机构排除项目的区别

国外并没有对实验动物的质量以国家标准的形式进行约束。国外不同的实验动物生产机构各自执行企业标准,以实验动物自身的质量应对市场竞争。近年来,我国的实验动物产业得到较好的发展,北京、上海、广东等地有一些实验动物生产机构形成了较大规模,各企业自身也制定了企业标准,也以实验动物自身的质量参与市场竞争。但目前我国的实验动物行业的大环境仍存在诸多问题,仍需要行政部门的监管。我国的实验动物国家标准与国际组织的推荐性的标准以及企业标准有什么不同呢?

目前国际上重要的实验动物生产机构 Charles River 公司对小鼠可排除 20 种病毒、15 种细菌,大鼠可排除 14 种病毒、16 种细菌。Taconic 公司啮齿动物可排除 21 种细菌、23 种病毒及 16 种寄生虫。而 Jackson Laboratory 小鼠排除的病原涵盖 18 种病毒、16 种细菌和 8 种寄生虫。这些病原检测项目表明了生产企业的技术能力,是企业核心竞争力的体现。

一些国外企业检测的病原体如奇异变形杆菌 (*Proteus spp*),产酸克雷伯杆菌 (*Klebsiella oxytoca*),牛棒状杆菌 (*Corynebacterium bovis*), CAR 杆菌

(Cilia-associated respiratory bacillus),肝螺杆菌 (*Helicobacter hepaticus*),胆螺杆菌 (*Helicobacter bilis*);病毒如小鼠轮状病毒(mouse rotavirus),K 病毒(K virus),小鼠巨细胞病毒(mouse cytomegalovirus),小鼠胸腺病毒(mouse thymic virus),小鼠诺如病毒(murine norovirus),小鼠微小病毒(mouse parvovirus)等,我国现行国家标准中并没有涉及,但列入这些企业标准中的病原并非必须排除。某些病原体对于动物的影响目前仍未确认。以小鼠诺如病毒 MNV 为例,MNV 被这些机构列入了检测项目,MNV 在欧美国家的动物种群中检出率比较高,MNV 又对某些免疫缺陷动物有影响,出于多方面原因,MNV 被这些企业列为排查目标微生物,也被 FELASA 组织作为推荐检测病原<sup>[1]</sup>。但是 MNV 对于免疫功能完全的动物没有明显影响,我们的实验研究发现正常途径动物难以感染该病毒(未发表数据)。我检测实验室对大群的实验动物血清学抽样检测未能发现 MNV 抗体的存在,只在一些研究机构的动物样品中发现了 MNV 抗体阳性,分析原因也多出于动物的国际交流<sup>[2]</sup>。因此,笔者认为 MNV 目前没有必要列入我国的国家标准进行强制要求。

我国的实验动物国家标准一方面规定了实验动物的国家规范,实际上还是企业和诸多检测单位参考的标准,因此,不仅要考虑病原的危害性,同时还要参考我国国内该病原的流行情况,有些病原虽然对动物有一定危害,然而感染频率较低,如果列入强制标准,无疑会增加社会经济负担。因此各实验动物生产和使用单位对于此类病原可考虑自身情况,安排监控,可不再作为国家标准要求的检测项目。

### 4 目前我国实验动物国家标准中小鼠、大鼠排除病原项目的回顾性考量

是否把某一病原体纳入实验动物健康监测范围,需要考量的因素有很多,包括:病原的感染范围,该病原是否主要感染啮齿动物,是否也感染人类;病原的传播途径,判定病原的易感性;病原对于动物的损害,是否存在大范围流行性感染的可能;感染的临床症状,是否引起动物疾病;对于动物代谢、免疫或生理过程的影响水平;动物感染该病原对于科学研究的影响。

表 1 部分列入我国现行国家标准中的病原回顾性分析

病原名称	感染谱与感染方式	对动物健康的影响	对动物实验的影响	国内外感染流行情况	备注
沙门菌	具有广泛的宿主谱,能引起人和各种动物的沙门菌病,人畜共患病病原;沙门菌经粪口途径传播。	多表现为是隐性感染;年幼动物感染引发败血症、胃肠炎等组织局部炎症;感染成年动物引起散发性或局限性沙门菌病;可导致怀孕动物流产;啮齿类发病呈急性暴发型,特别是幼鼠较严重。主要表现为腹泻、消瘦,约一周死亡 <sup>[3,4]</sup> 。	沙门菌的感染引起动物血糖水平降低,同时降低血液生化酶类的水平;在感染性疾病的研究中沙门菌的潜伏感染增加了动物的死亡率;肿瘤移植实验中影响移植瘤的生长速率 <sup>[3,4]</sup> 。	检出率极低 <sup>[5]</sup>	
鼠棒状杆菌	啮齿动物专性寄生菌;经粪口途径传播。	免疫功能健全动物呈隐性感染;免疫功能障碍导致带菌动物发病,主要表现为脓毒败血症造成的全身多脏器脓肿,在大鼠,脓肿主要形成在肺脏,而小鼠得脓肿多发生在肾脏和肝脏;不同品系的动物对于该细菌的感染抵抗能力存在差异 <sup>[3,4]</sup> 。	合并感染其他病原体(如 Ect 病毒)时,会出现明显症状;干扰感染性动物实验;该菌可刺激 Th-1 细胞分泌 IL-2 和 IFN-gamma,影响动物的免疫应答;干扰动物肿瘤实验 <sup>[3,4]</sup> 。	检出率极低 <sup>[5]</sup>	
肺炎原体	感染小鼠,大鼠,可感染人类;经子宫内以及呼吸道传播	侵袭动物呼吸道黏膜上皮,以及中耳和生殖道,单独感染时无临床表现;其他病原协同感染,或不利环境因素(如过高的氨浓度、营养缺乏),可引起急性支气管炎;也可引起结膜炎、中耳炎等;生殖道感染影响动物受精 <sup>[3,4]</sup> 。	干扰肿瘤发生、发展;引起大鼠神经性炎症,也引起气管周围组织神经纤维的退行性减少;可触发呼吸道上皮细胞分泌过氧化酶,改变离子通道,造成粘膜损伤;干扰营养学、老年医学、行为学研究;引起淋巴细胞水平升高;干扰生殖医学研究 <sup>[3,4]</sup> 。	欧美小鼠检出率 0.01%;大鼠阳性率为 0.06%~0.23% <sup>[5]</sup> ;北京 2012 抽查小鼠感染率为 0.7% <sup>[6]</sup> 。	使用培养、核酸检测、血清学多种方法检出率不同。
金黄色葡萄球菌	自然界广泛分布;宿主为各种温血动物;可通过受损的皮肤以及黏膜侵入机体。	条件致病菌。一般不引起动物疾病;当动物生理状况异常,如压力或免疫抑制,该菌可致病;大鼠和小鼠可出现尾部损伤,皮肤溃疡等状况;该菌感染多表现为化脓性炎症,受累器官也可涉及呼吸道、肺、结膜等 <sup>[3,4]</sup> 。	感染致大鼠活跃度降低;感染大鼠血浆纤维蛋白原血糖、水平发生改变,血液总白细胞数量发生变化;金黄色葡萄球菌可以调动嗜中性粒细胞,活化细胞介导的免疫效应,诱发并产生多种毒素,对受感染动物的免疫系统具有严重干扰作用 <sup>[3,4]</sup> 。	欧美小鼠的携带率为 6%~11%,大鼠的携带率 23%~30% <sup>[5]</sup> ;在我国大部分地区的大小鼠中多有检出 <sup>[6-11]</sup> 。	
绿脓杆菌	自然界广泛分布,在正常人与动物肠道和皮肤上亦有存在;主要通过接触和空气传播。	条件致病菌,对于免疫功能健全动物该菌并不致病;以继发感染或混合感染致病,中耳炎、内耳炎;免疫缺陷动物感染绿脓杆菌表现为团缩、反应迟缓、呼吸急促、竖毛、消瘦、面部歪斜、身体打转,某些动物死亡;绿脓杆菌感染皮肤,可引起动物局部皮肤脱毛、溃疡。血行播散,易侵扰肺部,出现化脓性炎症;不同品系的近交系动物对绿脓杆菌的易感性存在差异,BALB/c 小鼠对于绿脓杆菌的肺部感染存在抵抗能力,而 DBA/2 小鼠却比较敏感。	绿脓杆菌感染可调动细胞免疫和体液免疫;该菌感染产生的外毒素具有超抗原作用;动物进行射线照射、环磷酰胺给药,CMV 感染等实验,该菌感染会引起动物过早死亡;绿脓杆菌感染加重某些致病状态 <sup>[3,4]</sup> 。	欧美数据缺少;在我国大部分地区的大小鼠中多有检出 <sup>[6-11]</sup> 。	欧美绿脓杆菌未列入排查名录。
嗜肺巴氏杆菌	大多数啮齿类动物携带此菌,该菌感染爆发仅见于大鼠和免疫功能受限的小鼠;嗜肺巴氏杆菌通过接触传播。	正常存在于动物的鼻、咽,犬的嘴和喉部。该菌是条件致病菌,以隐性感染为主;在动物免疫机制受到抑制和应激因子的作用时引起流行;动物感染嗜肺巴氏杆菌多无明显症状,偶见病症仅限于皮肤及其附属组织,也可引发眼部炎症,结膜炎等 <sup>[3,4]</sup> 。	受影响的主要是大鼠,感染受累器官为皮肤,因此涉及皮肤及相关组织的研究会受到影响 <sup>[3,4]</sup> 。	欧美小鼠的感染率 13%,大鼠的感染率接近 5% <sup>[5]</sup> ;在我国大部分地区的大小鼠中均有不同程度检出 <sup>[6-11]</sup> 。	

病原名称	感染谱与感染方式	对动物健康的影响	对动物实验的影响	国内外感染流行情况	备注
啮齿柠檬酸杆菌	自然宿主为小鼠；通过粪口途径传播。	条件致病菌,对于免疫功能健全的成年小鼠,该菌感染多无明显症状；可造成乳鼠中等死亡率,当对小鼠使用针对革兰氏阴性菌的抗生素时,啮齿柠檬酸杆菌会在小鼠小肠富集；感染动物受累器官为大肠。病征表现为黑色粪便不成形,动物脱水；造成动物直肠脱垂,可引起传染性鼠结肠增生症,该菌感染,动物的繁殖和生长均受影响；免疫功能受损的小鼠感染该菌可致病、致死 <sup>[3,4]</sup> 。	该菌感染会造成动物实验的致病状态加重；可改变小鼠诱导性大肠肿瘤形成过程,啮齿柠檬酸杆菌引起鼠结肠增生与瘤生成类似,会干扰肿瘤研究；啮齿柠檬酸杆菌感染干扰小鼠肠道的细胞因子水平 <sup>[3,4]</sup> 。	感染率极低 <sup>[5]</sup>	
泰泽病原体	可感染大鼠、小鼠、豚鼠、地鼠和兔等多种动物,仅有 1 位 HIV 感染者发现了该病原的感染,非人兽共患病病原体。	多呈隐性感染；肿瘤接种、免疫抑制剂、X 射线、机体抵抗力下降,应激反应等均可诱导动物发病,引起动物厌食、腹泻,回肠增生性炎症,肠系膜淋巴结病变,导致动物出血性坏死性肠炎,尤其是回肠、盲肠、近端结肠的充血、水肿、坏死,引起肝脏、心脏原位坏死性病灶；不同品系的动物对泰泽病原体的敏感性有差异 <sup>[3,4]</sup> 。	泰泽病原体对于免疫系统的影响体现在感染对中性粒细胞和 NK 细胞的消耗,特别是幼年小鼠；对 SD 大鼠的基本生理状态也有影响；干扰药理学、毒理学实验研究；干扰感染性研究 <sup>[3,4]</sup> 。	国外仍有检出,小鼠检出较少,大鼠、家兔检出率稍高 <sup>[5]</sup> ；北京 2011 年抽查泰泽病原体的检出率小鼠为 1.1%,大鼠为 1.7% <sup>[6]</sup> 。	
支气管鲍特杆菌	感染多种哺乳动物；经气溶胶传播。	主要引起犬、兔、猪呼吸道的不显性感染及急性、慢性炎症 <sup>[3,4]</sup> ；对大、小鼠的影响报道缺乏。	缺少文献报道。	欧美检出率低 <sup>[5]</sup> ；我国近年无流行报道,检测机构无检出报道。	
仙台病毒	可感染小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠；经气溶胶传播。	多呈隐性感染；病毒可在鼠群中长期存在。与其他病原体的合并感染时(如肺炎支原体、CAR 菌),可表现出临床症状,患鼠常表现被毛粗乱、弓背、呼吸困难、眼角有分泌物、发育不良、消瘦等症状,新生乳鼠死亡率增高。病理改变包括呼吸道上皮的坏死性炎症,坏死性或化脓性的支气管炎,以及间质性肺炎；不同品系小鼠对 SV 病毒的易感性不同 <sup>[3,4]</sup> 。	感染会影响某些动物的寿命；导致呼吸上皮细胞分裂增加,细支气管肥大细胞数目增多,缺氧状态可导致幼年大鼠出现肺水肿；感染仙台病毒后 NK 细胞的细胞毒性作用增加,肿瘤坏死因子、干扰素等细胞因子升高,对于免疫系统的影响是长时期的；仙台病毒感染 C57BL6 小鼠可诱发呼吸道的强 CD4 + and CD8 + T 细胞反应,其杀伤性 T 细胞的数量增多 20 倍,而巨噬细胞的功能却受限,使动物外伤的愈合速度降低 <sup>[3,4]</sup> 。	欧美小鼠检出率极低,大鼠检出率 0.01 - 0.51% <sup>[5]</sup> ；我国实验小鼠和大鼠的仙台病毒的检出率仍较高,感染率 1 - 8% 变动,且无变化趋势 <sup>[6-11]</sup> 。	
淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒	人兽共患病；接触传播。	小鼠感染表现大脑型,内脏型和迟发型三种病型；大脑型:小鼠表现呆滞,被毛粗乱,弓背、消瘦,常见结膜炎和面部水肿。特征表现是倒提时头部震颤,肢体惊厥,后肢强直性伸展。出现症状后多死亡；内脏型:感染小鼠被毛粗乱,部分小鼠出现腹水；迟发型:患鼠表现被毛粗乱、弓背、体重减轻、蛋白尿、腹水、行为异常、生长缓慢、产仔减少、寿命缩短等症状 <sup>[3,4]</sup> 。	影响细胞免疫及体液免疫,抑制脾脏 T 细胞的增值,导致长时间的免疫抑制；同时引起杀伤性 T 细胞多克隆激活；LCMV 感染可加强 IL-12 介导的免疫毒性,影响干扰素表达；干扰肿瘤实验产生,提高了某些移植瘤细胞的移植易感率；感染可导致动物生长激素缺失 <sup>[3,4]</sup> 。	欧美大鼠检出率极低,小鼠检出率 0.01 - 0.02% <sup>[5]</sup> ；我国小鼠和大鼠中均有不同程度检出 <sup>[6-11]</sup> 。	
鼠痘病毒	小鼠烈性传染病；可经呼吸道和消化道感染。	多呈暴发流行,致死率较高；感染特征为头面部肿胀、睑缘炎、脚肿、断尾或脱脚,呈多组织、器官受损；不同品系小鼠的易感性差异大 <sup>[3,4]</sup> 。	Ect 病毒表达一种 IFN-g 的可溶性受体,抑制干扰素的抗病毒活性,干扰相关实验研究 <sup>[3,4]</sup> 。	欧美小鼠检出率约 0.02% <sup>[5]</sup> ；我国小鼠仍有不同程度检出 <sup>[6-11]</sup> 。	

病原名称	感染谱与感染方式	对动物健康的影响	对动物实验的影响	国内外感染流行情况	备注
小鼠肝炎病毒	自然感染只发生于小鼠； 消化道传播。	多呈隐性感染；病毒可在鼠群中长期存在；可引起新生小鼠腹泻，致死；免疫缺陷动物感染表现为消耗性疾病状态，导致动物肝脏、脾脏、淋巴器官等严重损伤，引起坏死性脑炎，神经性脱髓鞘作用。而肠道嗜性的病毒其损伤主要发生于消化道 <sup>[3,4]</sup> 。	感染影响肝脏酶的水平，各种蛋白和检测标志物的合成发生改变，MHV 可诱导甲胎蛋白的表达； 可导致动物贫血，血小板减少 白细胞减少的血象变化； MHV 感染使肿瘤的侵袭的模式发生变化，可导致动物对来源肿瘤细胞的抵抗，对诱癌剂的反应也发生变化； MHV 感染动物对 PVM 和仙台病毒的敏感性降低，提高了动物对沙门氏菌的抗力； MHV 感染影响动物的免疫系统 <sup>[3,4]</sup> 。	欧美小鼠检出率约 1% ~ 3% <sup>[5]</sup> ；我国小鼠有不同程度检出 <sup>[6-11]</sup> 。	
汉坦病毒	人兽共患病原体； 通过接触和气溶胶途径进行传播	大鼠和小鼠感染病毒后一般无临床症状； 小鼠乳鼠对病毒易感 <sup>[3,4]</sup> 。	缺少研究数据 <sup>[3,4]</sup> 。	欧美小鼠检出率极低，大鼠检出率在欧洲的感染率约为 0.01% ~ 1.09% <sup>[5]</sup> ；我国小鼠种群感染鲜见报道，野鼠仍是 HV 的疫源 <sup>[9]</sup> 。	
大鼠冠状病毒/涎腺炎病毒	大鼠为自然宿主； 通过接触和气溶胶传播。	多为隐性感染，感染乳鼠可引起轻微的结膜炎，也可引起一过性的呼吸道症状；感染鼠临床表现颈部肿大、打喷嚏、畏光、流出淡红色鼻分泌物等症状，眼睛损害的发病率在慢性感染的鼠中较高。在急性感染期，还可发生局灶性支气管炎，细支气管炎和肺炎；感染动物大体解剖观察可见一侧或双侧颌下腺、腮腺、颈部淋巴结肿大，有时可见出血点和出血斑；眶内和眶外泪腺水肿；胸腺萎缩，肺部可见灰白色病灶 <sup>[3,4]</sup> 。	感染影响大鼠出生率和生长速率； 感染将影响涉及眼、唾液腺、泪腺以及呼吸系统的研究，涉及动物嗅觉的研究也会受到影响； 病毒具有免疫调节效应。可致大鼠肺泡巨噬细胞白细胞介素分泌降低； 骨髓细胞移植，RCV/SDAV 感染提高了免疫排斥效应； RCV/SDAV 感染提高肺支原体在大鼠气管的附着，加重下呼吸道病灶； 干扰大鼠肿瘤学实验研究 <sup>[3,4]</sup> 。	欧美大鼠检出率约 0.28% ~ 0.61% <sup>[5]</sup> ；我国偶有检出 <sup>[6-11]</sup> 。	
小鼠肺炎病毒	自然宿主为小鼠、大鼠、仓鼠以及豚鼠等啮齿类动物； 经呼吸道传播。	动物感染该病毒的症状短时自限，免疫功能健全的地位多无症状，也无携带病毒的状态存在；免疫缺陷动物可诱发肺炎，感染小鼠表现食欲下降，被毛粗乱，消瘦，弓背，呼吸急促，耳、尾发绀等症状，多在感染后 12 ~ 13d 死亡，组织病理学观察特征性病变为肺泡严重充血、水肿，肺泡壁增厚，肺泡腔中含有粘性液体 <sup>[3,4]</sup> 。	免疫缺陷动物感染 PVM 肺脏组织结构发生改变，会对吸入毒理学，肺细胞动力学、代谢学以及免疫学等实验研究产生干扰 <sup>[3,4]</sup> 。	欧美小鼠检出率约 0.01%；大鼠检出率约 0.06% ~ 1.24% <sup>[5]</sup> ；我国小鼠检出率在 1 ~ 3% <sup>[6-11]</sup> 。	
呼肠病毒 III 型病毒	具有广泛的宿主范围； 可通过消化道和呼吸道等途径传播	Reo-3 感染免疫功能正常的动物多不引起临床症状； 急性病例主要见于新生乳鼠和断乳小鼠，主要表现为脂肪性下痢、黄疸、消瘦，脱毛，结膜炎、油样毛皮，运动失调，后期表现震颤和麻痹。慢性病例多见于成年小鼠； 病理变化主要表现为肝炎、脑炎和胰腺炎。油性被毛效应和脂肪性下痢是 Reo-3 感染的特征症状 <sup>[3,4]</sup> 。	Reo-3 感染主要调动体液免疫，但细胞免疫也参与抗病毒免疫。免疫缺陷动物对该病原更为易感。 病毒感染干扰肿瘤研究，导致移植腹水瘤细胞的溶解，与化疗药物发生协同作用，对鼠原肿瘤产生抵抗，也增强了抗肿瘤免疫。 感染其它病原感染实验，Reo-3 感染干扰金黄色葡萄球菌在动物肺部的清除； Reo-3 在啮齿类动物的污染会对肠道等消化系统的研究产生干扰，对于免疫系统有影响，因此对多种研究均有一定的干扰作用 <sup>[3,4]</sup> 。	欧美国国家对于 Reo-3 的调查小鼠与大鼠的感染率都很低 <sup>[5]</sup> 。我国实验动物 Reo-3 的检出率仍较高 <sup>[6-11]</sup> 。	

表 1 列出的病原体有些属于人兽共患的病原体,例如沙门氏菌、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒、汉坦病毒。这些病原体目前在大鼠和小鼠的调查中感染率并不高,但是由于它们具有感染从业人员的风险,因此必须列为实验动物排查的病原。有些病原体属于动物的烈性病原体,如 Ect 鼠痘病毒,这样的病原体也需要在动物种群中做适当监控。

大部分病原体对于免疫功能健全的动物并没有明显致病作用,但是对于科学研究的干扰程度存在差异。泰泽病原体目前在实验动物中仍有一定检出率,而且对于实验研究的干扰较为显著;肺支原体情况类似,动物感染有一定检出率,对多种研究产生干扰;类似情况也包括小鼠肝炎病毒和仙台病毒。而某些病原对于科学研究的影响是局限性的,如嗜肺巴氏杆菌主要影响大鼠,感染受累器官为皮肤,因此涉及皮肤及相关组织的研究会受到影响。

有些病原体属于条件致病菌,例如金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌等。这些病原体在自然环境中广泛存在,因此实验动物设施在控制这些病原时较为困难,而且动物携带这些病原体多无明显症状,且对于科学研究的干扰是有限的。因此这类病原体可以作为环境监控的指标,对于实验动物质量要求严格的实验设施可以将此类病原体列入监控范围。

仍有许多新发现的病原体,比如啮齿类动物的细小病毒,这类病原体包含很多种,它们是否需要列入实验动物质量控制的范围仍需要更多的研究以及数据支持。

如果某病原属于人兽共患病原,并且啮齿类动物容易携带,这样的病原应该例行检测;如果该病原对于动物的健康有严重影响,会造成动物的疫病,那么这样的病原也应该检测;而有些病原对于大多数研究存在证据充分的干扰风险,这样的病原也应该纳入到国家标准中对所有动物进行监测。某些病原体可能仅对某一类型的研究存在干扰风险,或是仅对某一类或是品系的动物有影响,或者仅是一种条件致病的病原,这样的病原可以在特定的条件下选择性的进行检测。

国家标准不同于企业标准,列入国家标准中的病原体也应不同于各个设施自行制定的实验动物质控计划中的病原列表。实验动物由于不同于普通的动物,因此也不能仅仅排查动物疫病,只符合动物检疫的要求。我国实验动物国家标准的意义

在于最终提高我国实验动物这一特殊商品的质量,并以此提升我国的实验动物产业发展,提高我国科研水平。我国的国家标准还具有引导性,很多机构将国家标准作为各自单位的质量控制标准,而且许多科研人员对于实验动物认识不多,对于 SPF 等级的动物的认识也是不全面的。因此设定我国实验动物国家标准既要考虑强制性要求,同时也要做好推荐性指导。

#### 参考文献:

- [1] FELASA working group on revision of guidelines for health monitoring of rodents and rabbits, Mähler Convenor M, Berard M, Feinstein R, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units [J]. *Lab Anim*, 2014, 48(3): 178-192.
- [2] Xiang Z, Tian S, Tong W, et al. MNV primarily surveillance by a recombination VP1-derived ELISA in Beijing area in China [J]. *J Immunol Methods*, 2014, 408: 70-77.
- [3] National Research Council. Infectious diseases of mice and rats: a report of the Institute of Laboratory Animal Resources Committee on Infectious Diseases of Mice and Rats [M]. National Academy Press, Washington, D. C. 1991.
- [4] Baker DG. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1998, 11(2): 231-266.
- [5] Pritchett-Corning KR, Cosentino J, Clifford CB. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats [J]. *Lab Animals*, 2009, 43: 165-173.
- [6] 魏杰, 林建伟, 付瑞, 等. 2009-2013 年北京地区实验动物质量抽检结果分析 [J]. *实验动物科学*, 2014, 31(2): 1-6.
- [7] 葛文平, 张旭, 高翔, 等. 我国商业化 SPF 级小鼠病原体污染分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 12(3): 65-68.
- [8] 王吉, 卫礼, 巩薇, 等. 2003-2007 年我国实验小鼠病毒抗体检测结果与分析 [J]. *实验动物与比较医学*, 2008, 28(6): 394-396.
- [9] 刘忠华, 黄韧, 刘香梅, 等. 广东省部分地区啮齿类实验动物汉坦病毒血清学调查 [J]. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(11): 1059.
- [10] 覃迪, 蔡亮, 湛志飞, 等. 湖南省 2006-2010 年实验动物微生物质量监测结果分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(3): 69-73.
- [11] 戴德芳, 张红, 刘运芝, 等. 湖南省 2004-2006 年实验动物病毒学质量监测结果分析 [J]. *实验动物与比较医学*, 2007, 27(1): 57-59.

[修回日期]2015-12-26



# 关于国家标准中实验大、小鼠细菌检测项目修改的建议

张丽芳

(中国医学科学院 北京协和医学院医学实验动物研究所, 北京 100021)

**【摘要】** 本文在分析国外实验动物细菌质量监测标准的基础上,对我国国家标准中实验大、小鼠细菌检测项目的修改提出了建议。

**【关键词】** 细菌学;检测;大鼠;小鼠

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0040-02

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 02. 008

## Suggestion for modification of bacteriological quality monitoring of laboratory mice and rats in China

ZHANG Li-fang

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China)

**【Abstract】** Based on the analysis of the standards of bacteriological quality monitoring of laboratory animals in developed countries, this paper provides suggestion for modification of bacteriological quality monitoring of laboratory mice and rats in China.

**【Key words】** Quality monitoring; Bacteriology; Laboratory mice; Laboratory rats

实验动物细菌质量控制标准是实验动物管理中极其重要的一环,直接关系到动物实验的准确性、实验动物福利和工作人员的健康,同时,它也代表着我国实验动物科学发展的水平。因此在制定时也应考虑到国际上其他国家标准制定的内容,尽可能与世界各国标准相一致,使我国标准进到国际水平。

国外一般不制定实验动物质量以及相关支撑条件的国家标准,对实验动物微生物质量控制也没有统一标准,但他们的核心检测病原是一致的<sup>[1-6]</sup>。本文比较了国外各大实验动物检测机构设定的细菌检测项目,对我国国家标准中实验大、小鼠细菌检测项目的设定提出以下建议:

### 1 去除假结核耶尔森菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) 和小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*) 检测项目

假结核耶尔森菌广泛分布于各种水体及土壤等环境中,宿主非常广泛,许多家畜或野生动物包括冷血脊椎动物等都具有不同程度的致病力。自然感染途径主要是消化道,人类感染主要是通过接触被感染动物粪便污染的食物和水,以及与动物的直接接触造成的。对人类可致急性肠系膜淋巴结肠炎、肠炎、结节性红斑和败血症等4种临床表现。实验动物中对豚鼠可引起自然流行性疾病,是豚鼠重要的致病菌<sup>[7]</sup>。

小肠结肠炎耶尔森菌几乎遍布世界各地,具有广泛的宿主性。主要通过消化道传播。人类可致

[通讯作者]张丽芳,女,硕士,研究方向:实验动物细菌学. E-mail: zhanglifanghl@aliyun.com。

婴幼儿腹泻,成人主要引起回肠炎和结节性红斑病,甚至败血症死亡。对家畜一般无致病性,但可引起绵羊、山羊及猪的腹泻,还可致绵羊流产。扁桃腺带菌猪是人类感染本菌的主要传染源和宿主<sup>[7]</sup>。

我国国家标准病原菌检测项目的制定主要基于以下三个方面的考虑:(1)排除人兽共患病病原和动物烈性传染病病原。(2)对动物危害大和科学研究干扰大的病原。(3)条件致病菌。

当评价某一病原菌的风险时,历史数据和文献是主要的参考资料。上述两菌是重要的人畜共患菌,但文献中未见实验大、小鼠感染这两种细菌并导致临床症状的报道,也未有实验研究影响及宿主的代谢、免疫或生理过程影响的报道。

国外实验动物检测机构 Charles River Laboratory, Taconic, The Jackson Laboratory, 欧洲实验动物科学协会联合会 (FELASA), Harlan Laboratories, 日本实验动物中央研究所等大、小鼠细菌检测项目中均不含有假结核耶尔森菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) 和小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*) 这两种细菌<sup>[2-6]</sup>, 故建议去除假结核耶尔森菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) 和小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*) 检测项目。

## 2 去除大肠埃希菌 O115 a, C, K(B) *Escherichia coli* O115 a, C, K(B) 检测项目。

1960 年代和 1970 年代相继在美国、日本暴发流行以小鼠降结肠严重增厚为病理特征的传染性鼠结肠增生症,造成乳鼠极高死亡率<sup>[8]</sup>, 日本将分离到的病原命名为大肠埃希菌 O115 a, C, K(B) (*Escherichia coli* O115 a, C, K(B)), 而美国将分离到的病原命名为弗氏柠檬酸杆菌 4280 (*Citrobacter freundii* 4280)。柠檬酸杆菌属的成员原来分别包含在沙门氏菌属和埃希氏菌属中,1954 年开始列为独立的柠檬酸杆菌属,1993 年 Brenner 等应用 DNA 杂交技术对本菌属各种代表株重新进行分类,将此病原定义为啮齿柠檬酸杆菌 (*Citrobacter rodentium*, *C. rodentium*), 分类学上属于肠杆菌科 (Enterobacteriaceae), 柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*)<sup>[9,10]</sup>。中国国家标准细菌检测项目大肠埃希菌 O115 a, C, K(B) *Escherichia coli* O115 a, C, K(B) 一直沿用日本旧称,而日本已将此称呼弃

用,改为啮齿柠檬酸杆菌 (*Citrobacter rodentium*, *C. rodentium*), 国外各大检测实验机构也用啮齿类柠檬酸杆菌 (*Citrobacter rodentium*) 替代。

啮齿类柠檬酸杆菌 (*Citrobacter rodentium*), 是柠檬酸杆菌属中唯一分离自小鼠的基因种。该菌的自然宿主为小鼠,通过粪口途径传播。多对 2~3 周龄乳鼠致病,特征性病变是结肠增生,其它临床症状不典型,如腹泻、体重下降、生长迟缓等。对研究影响的报道很少,仅限于感染小鼠大肠粘膜上皮细胞动力学改变,对 1,2-二甲胂的易感性增加,肿瘤诱导的潜伏期缩短,加速 1,2-二甲胂的致癌作用。活体动物检测兼顾到血清抗体的检测,送检动物多为 6 周龄以上,且近年来国内外均未见小鼠感染报道,故建议常规检测中可以去除大肠埃希菌 O115 a, C, K(B) *Escherichia coli* O115 a, C; K(B) 即啮齿柠檬酸杆菌 (*Citrobacter rodentium*, *C. rodentium*) 检测项目。

### 参考文献:

- [1] GB 14922.2-2011 中华人民共和国国家标准 实验动物 微生物学等级及监测 [S]. 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 2011.
- [2] <http://www.criver.com/customer-service/resources/infectious> [OL].
- [3] <https://www.jax.org/jax-mice-and-services> [OL].
- [4] <http://www.envigo.com/resources/health-monitoring-reports/envigo-66-rodent-health-procedures/> [OL].
- [5] <http://www.taconic.com/quality/health-testing-program/health-standards/> [OL].
- [6] Mähler M (Convenor), M Berard, R Feinstein, et al. Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. [J]. Lab Anim, 2014, 48(3): 178-192.
- [7] 陆承平. 兽医微生物学(第4版) [M]. 北京:中国农业出版社, 2007: 113-120.
- [8] Brithold SW, Coleman GL, Blatt PN, et al. The etiology of transmissible murine colonic hyperplasia [J]. Lab Anim Sci, 1976, 26: 889-894.
- [9] 赵克义, 阚方奇, 李景学, 等. 柠檬酸杆菌的分类近况 [J]. 中国卫生检验杂志, 2001, 11(2): 252-253.
- [10] Schauer DB, Zabel BA, Pedraza IF, et al. Genetic and biochemical characterization of *Citrobacter rodentium* sp. nov [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(8): 2064-2068.

[修回日期]2015-12-25



# 关于实验动物国家标准病毒检测项目思考

佟巍

(中国医学科学院 北京协和医学院 医学实验动物研究所, 北京 100021)

**【摘要】** 通过多年的检测实践,笔者建议:①我国国家标准参照国外实验动物质量标准设置我国特有的“核心检测项目”及“备选检测项目”质量标准。即:将现行国家标准检测内容设置为“核心检测项目”,“核心检测项目”中保留原有的“必检项目”(即“●”)及“必要时检测项目”(即“○”);将国家标准中未涉及的病毒检测内容设置为“备选检测项”。②目前“核心检测项目”中大鼠 HV 及小鼠 Ect 由“必检项目”调整为“必要时检测项目”;大鼠增加对 LCMV 的检测要求,设置为“必要时检测项目”;取消“核心检测项目”中对 TMEV 病毒的检测要求,将该病毒调整为“备选检测项目”清单中。

**【关键词】** 实验动物;病毒学检测

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0042-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.02.009

## Consideration of the virological items in the National Standard of Laboratory Animals

TONG Wei

(Institute of Laboratory Animals, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

**【Abstract】** Based on the practice in laboratory animal monitoring, the following issues are suggested: (1) The core items and candidate items should be separated in the National Standard; (2) Hantaan virus and Ect virus should be omitted in the core list for mice; LCMV should be monitored as a candidate item for rats; TMEV should be listed as candidate item.

**【Key words】** Laboratory animals, Virological monitoring

在生命科学研究迅猛发展的今天,实验动物作为最精密的实验“仪器”,其标准化要求显得更为重要,并被世界范围的科研工作者们所重视。

### 1 国内外实验动物质量检测概况

生命科学研究深入发展同时对实验动物质量提出更高要求。一些发达国家及地区实验动物机构建议实验动物生产和使用单位在制定健康监测方案时不仅要考虑实验动物等级标准,而且还应根据自身实际情况,制定个性化的健康监测方案。

欧洲实验动物科学协会联合会(FELASA)每隔几年更新一版最新的啮齿类、家兔繁殖和实验单元的健康监测指导意见<sup>[1]</sup>。指导意见在全球范围内得到广泛的使用,成为实验动物生产和使用单位健康监测的行动指南。该指导意见 2014 版涵盖的病毒检测项目小鼠 19 个、大鼠 12 个,具体见表 1、表 2<sup>[1]</sup>。FELASA 强调其指导意见是健康监测的最低要求。

美国 Charles River 是全球最有实力的实验动物产品和技术服务提供商,其健康监测理念具有很高

[通讯作者]佟巍(1972-),女,主管技师,实验动物病毒学免疫学。E-mail: twtongwei@sina.com。

的参考价值。目前该实验室健康监测方案涉及病毒检测项目小鼠 18 项,大鼠 13 项,具体见表 1、表 2。强调指出要根据实际情况制定适合的健康监测方案<sup>[2]</sup>。

日本实验动物中央研究所(ICLAS)亦对实验动物健康检测方案进行了调整,将实验小鼠病毒检测项目 20 种及大鼠病毒检测项目 12 种,分为核心检测项目(小鼠 5 种,包括:SV、Ect、LCMV、MHV、HV;大鼠 3 种,包括:SV、HV、SDAV。)和备选的检测项目(小鼠 13 种,包括:Mad(FL)、Mad(K87)、GD7/TMEV、MVM、PVM、Reo-3、EDIM、KV、mouse cytomegalovirus、MPV、MTLV、MNV、POLY;大鼠 9 种,包括:Mad(FL)、Mad(K87)、GD7、MVM、PVM、Reo-3、H-1、KRV、RPV)。他们还将感染性病原分为 A、B、C、D、E 五类,涉及病毒的有三类:A 人兽共患

病,2 种(LCMV、HV);B 实验动物烈性传染病,3 种(Ect、MHV、SV);C 隐性感染性疾病,15 种(EDIM/Rota、LDHV、MAd、MCMV、GD7/TMEV、MNV、POLY、PVM、Reo-3、MVM、KRV、H-1、MPV、RPV、SDAV)。检测内容基本涵盖了 Charles River Laboratories 的病毒检测内容。还有其他国家及地区检测清单中没有的检测项目(鼠星状病毒 murine astrovirus)。(http://www.iclasmonic.jp/microbiology/inspection/mouse.html)

我国实验动物国家标准(GB14922.2-2011)规定实验小鼠病毒检测项目 11 种,其中必检项目 6 种(Ect、MHV、SV、PVM、Reo-3、MVM),必要时检测项目 5 种(LCMV、HV、GD7/TMEV、MAd、POLY);大鼠病毒检测项目 8 种(HV、SV、PVM、Reo-3、H-1/KRV、RCV/SDAV),全部为必检项目<sup>[3]</sup>。

表 1 国内外实验小鼠病毒检测项目  
Tab.1 Virological items for laboratory mice

小鼠检测项目 Items for mice	中国实验动物国家标准 National standards, China	日本实验动物中央研究所 ICLAS	美国 Charles River Laboratories	欧洲 FELASA
淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)	●	●	●	●
汉坦病毒 Hantaan virus (HV)	●	●	●	●
小鼠痘病毒 Ectromelia virus (ECT)	●	●	●	●
小鼠肝炎病 Mouse hepatitis virus (MHV)	●	●	●	●
仙台病毒 Sendai virus (SV)	●	●	●	●
小鼠肺炎病毒 Pneumonia virus of mice (PVM)	●	●	●	●
呼肠孤病毒 III Respiratory enteric orphan virus III (Reo-3)	●	●	●	●
脑脊髓炎病毒 Encephalomyelitis virus (TMEV/GD7)	●	●	●	●
小鼠腺病毒 Mouse adenovirus (Mad)				
小鼠腺病毒 FL 株 Mouse adenovirus (Mad-1)	●	●	●	●
小鼠腺病毒 K87 株 Mouse adenovirus (Mad-2)		●		●
细小病毒 Parvoviruses				
小鼠细小病毒 Minute virus of mice (MVM)	●	●	●	●
小鼠微小病毒 Mouse parvovirus (MPV)	/	●	●	●
多瘤病毒 Polyoma virus (POLY)	●	●	●	●
小鼠轮状病毒 Epizootic diarrhea of infant mice (EDIM/MRV)	/	●	●	●
小鼠胸腺病毒 Thymic virus of mice (MTLV/THY/MTV)	/	●	●	●
小鼠唾液腺巨胞病毒 Mouse cytomegalovirus (MCMV)	/	●	●	●
K 病毒 Mouse pneumonitis virus (KV)	/	●	●	●
鼠诺沃克类病毒 Mouse norovirus (MNV)	/	●	●	●
乳酸脱氢酶增高病毒 Lactate dehydrogenase elevating virus (LDHV)	/	●	●	●
鼠星状病毒 Murine astrovirus	/	●	/	/

表 2 国内外实验大鼠病毒检测项目  
Tab. 2 Virological items for laboratory rats in China and abroad

大鼠检测项目 Items for rats	中国实验动物 国家标准 National standards, China	日本实验动物 中央研究所 ICLAS	美国 Charles River Laboratories	欧洲 FELASA
淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 Lymphocytic choriomeningitis virus(LCMV)	/	/	●	/
汉坦病毒 Hantaan virus(HV)	●	●	●	●
仙台病毒 Sendai virus(SV)	●	●	●	●
呼肠孤病毒 III Respiratory enteric orphan virus III(Reo-3)	●	●	●	●
小鼠肺炎病毒 Pneumonia virus of mice(PVM)	●	●	●	●
细小病毒 Parvoviruses				
大鼠细小病毒 H-1 株 Toolan's H-1 parvovirus(TH1)	●	●	●	●
大鼠细小病毒 RV 株 Kilham's rat virus(KRV/RV)		●	●	●
大鼠微小病毒 Rat minute virus(RMV)	/	/	●	●
大鼠细小病毒 Rat parvovirus(RPV)	/	●	●	●
小鼠细小病毒 Minute virus of mice(MVM)	/	●	/	/
唾液眼泪腺炎病毒 Sialodacryoadenitis virus(SDAV)	●	●	●	●
大鼠冠状病毒 Rat coronavirus, RCV		/		
脑脊髓炎病毒 Encephalomyelitis virus(RTV/ GD7)	/	●	●	●
大鼠呼吸道病毒 Rat respiratory virus (RRV)	/	/	●	/
小鼠腺病毒 Mouse adenovirus(Mad)				
小鼠腺病毒 FL 株 Mouse adenovirus(Mad-1)	/	●	●	●
小鼠腺病毒 K87 株 Mouse adenovirus(Mad-2)		●		●

## 2 病毒病原对动物健康及实验研究的影响

早在 1991 年美国《Biology and Life Sciences - Lab Animal Research》就不同感染性疾病对实验研究带来的影响进行了阐述。1998 年美国《Clinical Microbiology Reviews》亦对同样问题进行了论述。他们均就不同病原对动物机体功能系统带来的危害进行了详尽说明<sup>[4-6]</sup>。见表 3。

### 2.1 呼吸系统疾病是小鼠、大鼠最常见健康问题

实验小鼠、大鼠呼吸道病毒病原为 SV、PVM、RCV、KV。常为隐性感染导致亚临床症状,实验条件下也可导致疾病的发生。通常与其它病原微生物合并感染后导致严重呼吸道疾病。SV 感染易感小鼠或免疫缺陷鼠可导致疾病甚至死亡,是重要的实验鼠群的病毒性传染病之一,干扰生理、病理、免疫学及肿瘤学方面的研究;PVM 是重要的呼吸道病毒,自然条件下可感染实验鼠,对免疫缺陷鼠具有致病性,主要干扰生理、病理及肿瘤学方面的研究;RCV 是感染率最高以及严重干扰实验,胸腺缺如大鼠更为易感;KV 实验小鼠中较为少见,实验感染裸鼠可致病。

### 2.2 消化系统疾病在小鼠和大鼠中极为常见

乳鼠或幼鼠感染病原体会对消化系统带来最严重的影响,产生明显的临床症状。当它们离乳或刚刚成年后临床症状可能已不存在,也可能出现更加明显消化道疾病临床症状(例如腹泻和生长阻滞)而未被发现。这些病毒病原包括:MCMV、RCMV、MPV、MTV、SDAV、MHV、MRV/EDIM、RRV、Reo-3、Adenoviruses 等。SDAV、MHV 成年鼠常为隐性感染,新生鼠感染死亡率极高,是感染率最高以及严重干扰实验的病原体,干扰肿瘤学、免疫学、生理学及生殖技术方面的实验研究;MRV/EDIM 只对新生小鼠致病;大鼠感染 Reo-3 非常少见,一旦感染可能会干扰肿瘤移植和利用这些动物细胞进行的体外试验;曾有 RRV 感染导致消化系统疾病的报道;RCMV 感染在实验鼠中极为罕见,野生鼠中较为常见,可以通过潜伏感染大鼠器官移植转移到受体大鼠器官;MTV 可通过亚临床感染小鼠组织感染幼鼠对实验造成复杂的影响;MCMV 未见自然感染报道,实验接种该病毒可引起严重干扰免疫反应;MPV 是感染实验小鼠非常重要的病原体之一,病毒感染免疫活性的小鼠后病毒可在胰腺、小肠淋巴器官,肝脏中复制,并可能持续几个星期,病毒感染免疫缺陷小鼠后病毒可在机体内广泛存在;腺病毒

(adenoviruses) 包括 K87 及 FL 株(也称为 MAd-1 及 MAd-2), MAd-1 感染可对成年小鼠造成广泛持久的病变。

### 2.3 皮肤和关节异常在实验鼠群中较为常见

可造成实验鼠皮肤和关节异常的病毒病原有: Ect、RPV、mouse papule virus 和 MMTV。Ect 感染常为亚临床活动性, 易感动物感染几乎全部死亡, 是重要的小鼠烈性传染病, 污染的动物组织及生物制品是实验室内传播的主要方式; RPV 实验鼠群中较少见, 可隐性感染, 易感动物感染死亡率几乎 50%, 大鼠感染可造成肺、皮肤、肺及皮肤三种类型的损害; Mouse papule virus 患病小鼠在脚和尾巴出现中央缩进或类似酒窝的丘疹, 患处水肿和充血, 皮肤损伤类似的鼠痘; MMTV 高度致癌, 是导致小鼠乳腺瘤的病毒。

### 2.4 某些病原将机体的造血系统作为它们的主要目标组织

它们包括: LCMV、LDHV、MuLVs。LCMV 是非常重要的畜共患传染病病原, 尽管传统被认为是中枢神经系统的主要病原体, 实际上该病原主要损害的是机体的造血系统, 主要影响免疫学、生理学和生理机能方面的研究; LDHV 是小鼠肿瘤组织的常见污染物, 感染鼠血清乳酸酶可增加 5~10 倍; MuLVs 是一群基因相关的病毒被统称为小鼠白血病病毒, 许多近交系小鼠敏感, 与肿瘤发生相关。

### 2.5 影响中枢神经系统的病毒是 TMEV/GD7

少有自然感染, 实验鼠感染该病毒出现类似人类感染脊髓灰质炎病毒的表现。

### 2.6 对机体多系统造成损害的病毒病原有: KRV、H-1、MVM、MHV、POLY、HV、SDAV、MNV

KRV 及 H-1 是细胞及生物制品的常见污染物, 很少有自然感染, 感染可能会干扰胎儿发育导致畸形发生; MVM 在小鼠中流行较为广泛, 是移植肿瘤及敏感动物细胞系的常见污染物, 感染对于大多数的研究几乎没有意义, 但对小鼠移植肿瘤、白血病和体外免疫测定等研究非常重要。常会干扰病理学、免疫学、生理学、细胞生物学、发育学及肿瘤学等方面的研究; POLY 也是移植肿瘤及细胞系的常见污染物, 自然感染免疫正常鼠对实验影响可能较小, 没有 POLY 污染的鼠群一旦感染新生鼠可引起肿瘤广泛分布造成免疫力低下从而影响实验; HV 是最重要的人畜共患病之一, 可造成实验大鼠持久的亚临床感染, 导致严重疾病; MNV 在实验鼠群中

感染率较高, 免疫健全小鼠感染不引起临床症状, 一些品系的免疫缺陷鼠可引起感言、间质性肺炎、脑炎等, 从而影响实验。

## 3 关于健康检测计划的制定

似乎制定更为全面的健康监测方案, 采用更严格的微生物控制水平, 才是实验动物健康以及动物实验可重复性的重要保证。然而在实际工作中, 经济成本、可操作性以及对实验动物自然状态模拟等因素是必须考虑的问题。因此, 采用最严格的微生物控制水平排除所有病原, 使用最高级别的实验动物并不一定是最适合的<sup>[7,8]</sup>。

对于动物饲养机构来说, 采用最严格的控制措施的确会浪费很多资源。实际上, 有些病原体是相当难以清除的, 一些动物设施实验动物鼠群中存在一种或几种病原感染的现象, 所以彻底消除这些病原体是不现实的, 应优先消除人兽共患病、动物烈性传染病以及对研究数据影响较大的病原体。并且, 在有可能根除某病原时对其监测才有意义<sup>[7,8]</sup>。

对于实验动物使用者来说, 实验动物健康监测方案应根据研究目的来制定, 不同类型的科研项目不应使用同一种健康监测方案。实验人员应首先该考虑研究项目需要选择何种级别的实验动物, 还要考虑需排除哪些可能干扰实验的其它病原以及实验设施或本地区的病原流行情况, 才能制定更为科学的健康检测及监测方案<sup>[7,8]</sup>。

## 4 对现行国标检测项目的建议

目前, 我国实验动物国家标准 (GB14922.2-2011) 病毒检测与欧美日等国家和地区相比, 涉及的检测项目相对较少, 一些新兴的影响实验动物及动物实验的传染性病原未能涉及。

笔者建议, 设置我国特有的核心检测项目(包括人兽共患病及实验动物烈性传染病, 为最低检测要求)及“备选检测项目”(主要是隐性感染性病原, 根据需要进行选择)。借鉴这样的分类方法既便于实验动物工作者识别病原危害程度及可能存在潜在影响的因素, 设计出符合实际需要的健康监测计划, 又可为实验动物商品化、国际化以及科研信息的交流提供必要的保障。“备选检测项目”可根据需要从中选择, 不做强制要求。“备选检测项目”应包含尽可能多的检测内容, 提供更为广泛的健康监测范围, 最大程度地满足不同实验需要。

表 3 影响实验动物小鼠、大鼠质量的病毒病原  
Tab. 3 Virological pathogens for laboratory mice and rats

病原种类 Pathogens		宿主范围 Hosts	重要程度 Importance
<b>损害呼吸系统的病毒病原</b>			
Sendai Virus (SV)	仙台病毒	大鼠、小鼠、仓鼠、豚鼠*	非常高
Rat Coronavirus (RCV)	大鼠冠状病毒	大鼠、小鼠**	高
Pneumonia virus of mice (PVM)	小鼠肺炎病毒	大鼠、小鼠、仓鼠	低
K Virus (KV)	K 病毒	小鼠	非常低
<b>损害消化系统的病毒病原</b>			
Mouse cytomegalovirus (MCMV)	小鼠巨细胞病毒	野生小鼠	低
Rat cytomegalovirus (RCMV)	大鼠巨细胞病毒	野生大鼠	低
Mouse parvovirus type 1 (MPV)	小鼠细小病毒	小鼠	高
Mouse thymic virus (MTV)	小鼠胸腺病毒	野生及实验小鼠	不确定,可能低
Sialodacryoadenitis Virus (SDAV)	大鼠涎泪腺炎病毒	大鼠、小鼠	高
Mouse hepatitis virus (MHV)	小鼠肝炎病毒	乳大鼠、小鼠	非常高
Mouse rotavirus (MRV)/Epizootic diarrhea of infant mice (EDIM)	小鼠轮状病毒	小鼠	低
Rat rotavirus-like agent (RRV)	大鼠轮状病毒	大鼠、人类	不确定
Reovirus-3 (Reo-3)	呼肠孤病毒 III	小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠	低
Adenoviruses	腺病毒	大鼠、小鼠	低
<b>损害皮肤和关节的病毒病原</b>			
Ectromelia virus (Ect)	鼠痘病毒	小鼠	高
Poxvirus in rats (RPV)	大鼠痘病毒	大鼠、小鼠、野生啮齿类、猫科动物、人	不确定
Mouse papule virus	小鼠丘疹病毒	小鼠	非常低
Mouse mammary tumor virus (MMTV)	小鼠乳腺瘤病毒	实验小家鼠、野生小家鼠	/
<b>损害造血系统的病毒病原</b>			
Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)	淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒	大鼠、野生小鼠、实验小鼠、叙利亚仓鼠、人类、猴、狗、兔、豚鼠、鸡	非常高
Lactic dehydrogenase-elevating virus (LDHV)	乳酸脱氢酶增高病毒	小鼠	非常高
Murine leukemia viruses (MuLVs)	小鼠白血病病毒	实验小家鼠、野生小家鼠、新生小鼠、大鼠、仓鼠	高
<b>损害中枢神经系统的病毒病原</b>			
Theiler's virus (TMEV/GD7)	脑脊髓炎病毒	大鼠、小鼠	低
<b>造成多系统损害的病毒病原</b>			
Adenoviruses	腺病毒	(同上)	
Ectromelia virus (Ect)	鼠痘病毒	(同上)	
Kilham rat virus (KRV)	大鼠细小病毒 KRV 株	实验大鼠、野生大鼠、仓鼠	低
H-1 virus (H-1)	大鼠细小病毒 H-1 株	实验大鼠、野生大鼠、仓鼠	低
Minute virus of mice (MVM)	小鼠细小病毒	野生小鼠、实验小鼠	高
Mouse hepatitis virus (MHV)	小鼠肝炎病毒	(同上)	
Polyoma virus (POLY)	多瘤病毒	野生小鼠、实验小鼠	低
Hantaviruses (HV)	汉坦病毒	几乎所有的小型哺乳类、人类	高
Sialodacryoadenitis virus (SDAV)	大鼠涎泪腺炎病毒	(同上)	
Murine norovirus (MNV)	鼠诺如病毒	小鼠	高

备注: \* 存在感染的可能; \*\* 敏感;

另外,通过回顾十余年来我实验动物质量检测中心对二十余家实验动物饲养及使用单位的大鼠、小鼠活体及血清样本的检测结果,通过查阅十余年来我国部分检测实验室的大鼠、小鼠病毒检测报告,发现大鼠 HV 病毒、小鼠 Ect 病毒、GD7/TMEV 病毒抗体检出率呈极低水平或未曾检出,在普通实验大鼠血清样品抽查过程中发现有人兽共患病 LCMV 病毒的检出<sup>[9]</sup>。

综上所述,作者建议实验动物国家标准的等级标准中,调整大鼠 HV 及小鼠 Ect 由“必检项目”(即“●”)调整为“必要时检测的项目”(即“○”);在大鼠“核心检测项目”清单中增加对 LCMV 的检测要求,设置为“必要时检测项目”(即,“○”);取消对 TMEV 病毒的检测要求,将该病毒列至“备选检测项目”清单中。见表 4、表 5。

表 4 实验动物大鼠、小鼠病毒检测项目之——核心检测项目

Tab. 4 The core items for laboratory mice and rats

动物等级		病毒检测项目		动物种类	
				小鼠	大鼠
无菌动物	无特定病原体动物	清洁级	淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)	○	○
			汉坦病毒(HV)	○	●
			鼠痘病毒(Ect.)	○	
			小鼠肝炎病毒(MHV)	●	
			仙台病毒(SV)	●	●
			小鼠肺炎病毒(PVM)	●	●
			呼肠孤病毒Ⅲ型(Reo-3)	●	●
			小鼠细小病毒(MVM)	●	
			小鼠腺病毒(Mad)	○	
			多瘤病毒(POLY)	○	
			大鼠细小病毒 RV 株/大鼠细小病毒 H-1 株(KRV/H-1)		●
			大鼠冠状病毒/大鼠涎腺炎病毒(RCV/SDAV)		●
		未检出上述全部病原。			

注:●必须检测项目,要求阴性;○必要时检查项目,要求阴性。

表 5 实验动物大鼠、小鼠病毒检测项目之——备选检测项目

Tab. 5 The candidate items for laboratory mice and rats

病原种类		动物种类	
		小鼠	大鼠
<b>损害呼吸系统的病毒病原</b>			
K Virus (KV)	K 病毒	▲	
<b>损害消化系统的病毒病原</b>			
Mouse cytomegalovirus (MCMV)	小鼠巨细胞病毒	▲	
Rat cytomegalovirus (RCMV)	大鼠巨细胞病毒		▲
Mouse parvovirus typy 1 (MPV)	小鼠细小病毒	▲	
Mouse thymic virus(MTLV/THY/MTV)	小鼠胸腺病毒	▲	
Mouse Rotavirus(MRV)/ Epizootic diarrhea of infant mice (EDIM)	小鼠轮状病毒	▲	
Rat rotavirus-like agent(RRV)	大鼠轮状病毒		▲
<b>损害皮肤和关节的病毒病原</b>			
Poxvirus in rats(RPV)	大鼠痘病毒		▲
Mouse papule virus	小鼠丘疹病毒	▲	
Mouse mammary tumor virus (MMTV)	小鼠乳腺瘤病毒	▲	
<b>损害造血系统的病毒病原</b>			
Lactic dehydrogenase-elevating virus (LDHV)	乳酸脱氢酶增高病毒	▲	
Murine leukemia viruses (MuLVs)	小鼠白血病病毒	▲	
<b>损害中枢神经系统的病毒病原</b>			
Theiler's virus(TMEV/GD7)	脑脊髓炎病毒	▲	▲
<b>造成多系统损害的病毒病原</b>			
Murine norovirus(MNV)	鼠诺如病毒	▲	

注:根据实验需要,选择需要排除的病毒病原。备注:表格中“▲”的检测项目为日本 ICLAS、美国 Charles River Laboratories、欧洲 FELASA 没有列出的检测项目。

参考文献:

[ 1 ] Mähler (Convenor) M, Berard M, Feinstein R, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units [J]. Lab Anim Published Online, February 4, 2014,48(3):178-192.

[ 2 ] Clifford CB. Routine Health Monitoring of Charles River Rodent Barrier Production Colonie in Europe and North America [S]. Charles River Research Models. Technical Sheet. Charles River 2014, Laboratory International, Inc. <http://www.criver.com/files/pdfs/rms/hmsummary.aspx>

[ 3 ] GB/T14922.2-2001. 实验动物微生物学等级及监测[S]. 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 2011:1-6.

(下转第 61 页)

# 实验动物微生物国家标准研讨会纪要

向志光

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京 100021)

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2016) 02-0048-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.02.010

我国的实验动物国家标准于1994年制定,其后进行了2次修订。现行实验动物微生物国家标准于2011年颁布实施。随着实验动物科学及相关学科的发展,我国的实验动物国家标准需要适时更新。为此中国实验动物学会2015年11月份在石家庄市召开了实验动物微生物国家标准研讨会,旨在对实验动物微生物国家标准做充分的研讨,为国家标准的修订做出准备。

此次研讨会与会代表分别来自实验动物的管理机构、实验动物专业研究机构、高校以及研究所、实验动物生产单位等,代表覆盖了实验动物领域的各个环节。会议邀请了药明康德的周聪颖博士、清华大学的常在博士、中国医学科学院医学实验动物研究所的秦川教授和魏强教授做了专题报告。

来自药明康德的周聪颖博士首先就“SPF”级动物的定义以及实验大小鼠制定健康监测方案时需考虑的因素进行了阐述。周博士熟悉国外实验动物的管理方式,她介绍无特定病原菌(SPF)名词意味着排除了对宿主致病的特定的病原菌清单,在国外SPF并没有一个统一的规定,也没有统一的标准来遵守。各个不同的实验动物设施均根据各个设施的实际自行制定SPF动物需要排除病原体的清单。被列入SPF列表的病原体基本属于3个种类:人兽共患病原,引起动物疾病的病原,对研究产生干扰的病原。周博士列举了引起实验动物种群病原感染的诸多因素,并对因生物材料移植来源的携带病原体进行了较为详细阐述。

周博士介绍,在国外最初设定SPF标准的多是实验动物的生产单位。为了表明自身产品的质量,

实验动物生产厂家将各自的实验动物健康监测数据对用户公开,并根据客户的实际需求对动物产品进行了分类,这种分类多是根据设施来源,比如屏障设施或是隔离包(器)生产的动物,它们的微生物等级因为环境不同,所以控制的项目也有一定差别。客户可以根据自己的需要选择合适的实验动物。某一实验所用动物是否需要排除某一病原体,或是在某一设施制定自己的SPF标准时,使用者需要自行做出评估。

周博士比较了我国国家标准列出的病原与国外大部分实验动物生产机构的异同。对于国外监测而未列入我国国家标准的病原体,她列举了小鼠诺如病毒、螺杆菌属细菌和牛棒状杆菌进行了具体分析。是否需要将某一病原列入SPF列表受到具体情况的影响,设施本身的水平、研究的具体内容、所用动物的品系等均是考量因素。

周博士强调了内部监控计划制定的重要性。各个实验动物设施需要根据各自的病原感染风险制定监控计划,动物流动性低的设施检测频率可以适当降低,而动物流动性高,感染风险高的设施就应该制定更为严格的监控计划。在具体检测方式上周博士介绍了采样的策略,对于感染率不同的病原体,应该制定不同的抽样数,以保障不漏检。她对于哨兵动物的实验也做出了介绍。然而对于阴性检测报告的理解,也只是表示在动物群中的患病率(阳性动物)低于假设患病率。

最后,周博士阐述了对于动物实验结果的理解,如,阴性测试结果也并不一定表示动物群里没有病源。报告结束后与会专家与周博士交流了国

外实验动物排除病原的基础研究概况。周博士介绍了大多排除病原体对于动物以及动物实验的影响的研究也并不充分,不同的实验动物设施也多采用实验动物供应商提供的病原列表,这种做法是一种保守的处理方式。

清华大学的常在博士就国外部分动物设施小鼠微生物和寄生虫质量分析进行了报告。清华大学每年从国外不同机构进口多个批次的实验动物,在进口文件中实验动物提供方给出了动物清晰的微生物背景。对于实验动物携带的病原体它们并不回避。例如绿脓杆菌、MNV 等病原体在进口动物中也多有携带。当动物提供方给出清晰的微生物背景资料后,动物接受单位就更清楚该如何处置。如果携带病原对于实验研究没有明确影响,且该动物不需繁殖,可以在一定区域直接进行实验,但如果携带的某些病原对于其设施是需要排除的,这样的动物就需要进行净化处置。

来自中国医学科学院医学实验动物研究所的魏强教授作为现行实验动物微生物国家标准的起草人之一,对我国的实验动物微生物国家标准进行了回顾性介绍。魏教授介绍了我国国家标准的制定与修订,从三次版本来看,第一次版本起到“从无到有”的历史作用,第二次修订主要起到精简、提高作用,第三次修订起到更规范、更科学、更适用的作用。总体是伴随着实验动物整体发展而不断发展、提高。

国家标准是全国实施的标准,应该是准入性的基本标准,也可以理解为“最低限制”性标准。目前标准既含有就高不就低的原则,又有“要符合中国国情”的成分,比如清洁级动物。结果是,既有国家标准的理念,又有行业、企业标准的痕迹,处于高不成低不就的状态。

魏教授建议取消现有的实验动物四个等级划分:4 个等级的划分不符合所有动物特性和环境要求,也阻止了一些动物作为“实验动物”的资格,处于“实验用动物”的状态,既不科学,也不适用。

建议制定实验动物微生物、寄生虫通用标准,即 SPF 等级标准:将国标回归到基础定位,即所谓最低标准。病原检测项目即排除的病原重点分为 3 类:引起本动物疾病病原、人兽共患病病原、对实验明显有影响的病原。不再包含条件致病菌和环境指标性病原。

秦川教授对标准体系作用和改革方面做了系

统阐述。目前实验动物标准体系建设不健全,局限于质量标准;实验动物标准化水平不高,存在质量不合格动物;实验动物标准检测成本偏高,限制行业发展;实验动物质量检测试剂缺乏,增加检测难度;实验动物质量重检测而轻监测,实验动物标准化研究的投入严重不足,对实验动物标准化重要性认识有待提高,从事实验动物标准化的人才缺乏,教育培训不足,这些现状制约着生命科学和生物医药等相关学科和产业的发展。国家科技部、质检总局和标准委等有关部门把建成符合经济社会和科技发展的新型技术标准体系作为改革的主要内容之一,提出要加强强制性标准,完善推荐性标准,培育和发展社会团体标准,改革企业标准备案制度,使强标更强,推标更优,团标更活,企标更高。

迎合国家政府职能改革的契机,实验动物领域需要进行团体标准制定的工作。团体标准是为满足市场、科技快速变化及多样性需求,由专业领域内具有影响力并具备相应能力的社会组织和技术联盟制定的标准。

团体标准以实验动物行业发展与市场需求为导向、由中国实验动物学会主导制定。团体标准是对国家标准的有益补充、后备军。团体标准成熟以后可以转化为国家标准。鼓励团体制定高于政府标准的一般产品与服务的竞争性标准,以体现产业发展需求与技术先进性,凝聚产业链、提升产品和服务的竞争力。团体标准应能够促进产品和服务的交互性,保证不在制定目的或实施效果上给国际或国内贸易制造不必要障碍、阻碍竞争性技术和创新发展。在今后的工作中,中国实验动物学会倡议专家做好实验动物标准化体系建设,不仅要维护实验动物的国家标准,同时也要积极参与到实验动物团体标准的制定工作中。

之后与会专家就我国的实验动物微生物国家标准进行了热烈讨论。讨论的议题集中在以下几个方面:

## 1 国家标准中实验动物微生物等级设立的问题

大部分与会专家认为我国的普通级、清洁级、或是 SPF 级都选择性的排除了一些特定的微生物,原则上讲都属于 SPF 动物。但是作为不同级别再进行分类是由于我国的具体国情决定的。随着时代变革,一些不合理的问题需要解决。广东实验动物监察所的黄韧研究员认为实验动物的等级标准

需要改革,特别是无菌动物这一特殊动物,没有必要列入国家等级标准。对于改革后可能存在的问题,黄韧研究员列举了一个很好的例子,猴的质量控制标准中,猴 B 病毒作为人兽共患病必须排除,但是我国猴群 B 病毒的感染率在 30% ~ 60%。标准在实际应用中存在操作困难。他还建议针对不同动物进行标准的编制,方便标准的动态维护。

来自军事医学科学院的范薇教授提出了我国的国家法规规定了实验动物的四个等级,国家标准作为法规的解释性文件应服从于法规。秦川教授、魏强教授、岳秉飞研究员介绍目前国家的法规也在修订过程中,国家标准的再次修改可以配合法规的修订。

## 2 增加我国实验动物基本数据的基础研究的需求问题

孙德明教授表示了对我国实验动物领域基础研究的担忧。他认为我国目前对于实验动物的基础研究不重视,很多文件都照搬国外的数据,对于我国实验动物的基本数据缺乏调查研究。在讨论会上,广东实验动物监察所的张钰研究员介绍了他们对于非屏障设施啮齿动物微生物携带情况的调查,而且来自新疆实验动物中心的廖力夫主任也介绍了中国疾控系统对于野鼠的调查情况,为我国实验动物的基础研究提出了思路。秦川教授作为中国实验动物学会的理事长,介绍了学会设立实验动物国家标准相关研究的基金支持情况,并在研讨会上鼓励与会专家积极参与实验动物基础研究。

## 3 实验动物必须排除病原项目的选择问题

对于实验动物必须排除的病原项目,多数与会专家同意对人兽共患病、动物致病病原以及严重干扰科学研究的病原排除的标准。来自中检院的岳秉飞研究员呼吁将一些在此标准之外的病原列为必要时检测的项目。来自山东省实验动物中心的金东庆研究员表达了对于减少检测项目的担忧,实验动物生产企业的动物质量目前更多的是依靠国家标准的强制执行。商业企业的利益驱动下,国家

标准中检测项目的减少有可能会导导致实验动物质量下降。

## 4 教学用动物的使用和管理的问题

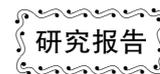
多位来自教学单位的专家表达了对于教学中实验动物使用的困惑。一方面啮齿类动物不再有普通级动物,而教学示教多在开放的普通设施进行,这类动物实验该如何界定?而涉及一些未列入国家标准的动物种类,如羊等,由于没有国家标准,动物的生产单位无实验动物生产许可证,动物的来源无法进行质量控制。多位专家对这样状况进行了讨论。与会专家多认为实验动物并不一定都是列入目前国家标准的动物。对于这些动物的管理,动物的基本防疫法规有借鉴作用。对于教学过程中动物的使用,必须做好风险控制,只要做好风险的评估,并采用有效措施,这些风险就可以在很大程度上避免。

## 5 实验动物微生物与寄生虫检测技术方法的问题

与会人员对于实验动物的质量检测结果的认识表达了一些看法。有些人认为某次实验动物检测不合格,而再次送样病原不再检出,因此怀疑检测方法的准确性。多位专家解释了不同检测方法的灵敏度和特异性的局限性,但是检测机构的专家表示了它们签发阳性报告的慎重,阳性结果均需要重复实验再次证明后才会出具报告。一旦报告阳性,该动物种群就不能排除该类病原体的感染可能性。而没有检出却不能代表这个动物种群没有该病原的感染。

秦川教授之后也提到了对于从业人员的职业技能培训的问题,为了提高从业人员的技术水平,从事实验动物质量检测的技术人员需要进行职业培训,以提高质量检测工作的技术水平。

本次会议收集到各方面专家对于实验动物国家标准再次修订的意见和建议,这些意见和建议将会促进我国实验动物微生物国家标准的完善与提高。



# DMBA/巴豆油二阶法联合 NB-UVB 照射构建小鼠皮肤鳞癌模型

吕超<sup>1</sup>, 刘保国<sup>2</sup>, 郑海萍<sup>2</sup>, 刘青<sup>2</sup>, 李志峰<sup>2</sup>, 顾静<sup>1</sup>, 周萌<sup>1</sup>

(1. 承德医学院研究生院,承德,河北 067000;2. 河北工程大学附属医院,邯郸,河北 056002)

**【摘要】** 目的 用二甲基苯并蒽(DMBA)/巴豆油二阶法联合 NB-UVB 照射,构建皮肤鳞状细胞癌小鼠模型。方法 将 50 只 BALB/c 小鼠,随机分为 3 组:A 组外涂 DMBA/巴豆油;B 组照射 NB-UVB;C 组外涂 DMBA/巴豆油,联合 NB-UVB 照射。实验过程中定期观察小鼠的一般情况和实验部位皮肤的变化,于第 5、10、15、20 周统计各组小鼠的存活率及成瘤率。第 20 周时取小鼠皮损组织进行病理检查。结果 第 5 周末,部分 C 组小鼠出现直径 $\geq 1$  mm 的丘疹,第 20 周后,三组成瘤率分别为 86.67%、7.14%、94.12%;SCC 发生率分别为:13.34%、0%、70.59%。结论 DMBA/巴豆油二阶法联合 NB-UVB 构建小鼠皮肤鳞癌模型较单独应用 DMBA/巴豆油二阶法或 NB-UVB 照射成瘤时间短,成瘤率和 SCC 发生率高。

**【关键词】** 鳞状细胞癌;二甲基苯并蒽;巴豆油;模型;动物

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0051-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.02.011

## Establishment of a mouse model of cutaneous squamous cell carcinoma induced by 7,12-DMBA, croton oil and narrow-band ultraviolet B irradiation

LV Chao<sup>1</sup>, LIU Bao-guo<sup>2</sup>, ZHENG hai-ping<sup>2</sup>, LIU Qing<sup>2</sup>, LI Zhi-feng<sup>2</sup>, GU Jing<sup>1</sup>, ZHOU Meng<sup>1</sup>

(1. Postgraduate Department of Chengde Medical College, Chengde 067000, China;

2. Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056000)

**【Abstract】 Objective** To establish a mouse model of cutaneous squamous cell carcinoma induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (7,12-DMBA)/croton oil and narrow-band ultraviolet B (NB-UVB) irradiation. **Methods** A total of fifty 6-8-week old BALB/c mice (male:female 1:1) were randomly divided into three experimental groups. The group A was treated with chemical carcinogens alone, group B was treated with NB-UVB alone, and group C was treated with chemical carcinogens plus NB-UVB. The general status and skin appearance of mice were observed during the experiment. The survival rate and tumor formation rate of each group was calculated at weeks 5, 10, 15, and 20. Pathological examination was carried out to observe the histological changes of skin lesions. **Results** Papules measuring  $\geq 1$  mm in diameter began to develop in some mice of the group C at 5 weeks after the first treatment with chemical carcinogens. The tumor formation rates at 20 weeks after treatment were 86.67%, 7.14%, 94.12% in the groups A, B, C, respectively. Pathological examination revealed characteristic changes of squamous cell carcinoma in 13.34%, 0%,

**【基金项目】**河北省卫计委 2015 年度医学科学研究重点课题(编号:20150074);河北省政府资助临床医学优秀人才培养项目(编号:361037)。

**【作者简介】**吕超(1989-),女,研究方向:光与皮肤病研究。E-mail: nokky1@163.com。

**【通讯作者】**刘保国(1966-),男,研究方向:光与皮肤病研究。E-mail: lbq66@163.com。

70.59% of the mice in the group A, B, C, respectively. **Conclusions** Establishment of a mouse model of cutaneous squamous cell carcinoma induced by 7,12-DMBA/croton oil and NB-UVB is a better method than treated with chemical carcinogens alone or NB-UVB alone. This method can increase the tumor formation rate and incidence rate of SCC, and within a shorter period.

**【Key words】** Squamous cell carcinoma; 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, 7,12-DMBA; Croton oil; Narrow-band ultraviolet B irradiation; Mouse models

皮肤鳞状细胞癌是人类皮肤较为常见的肿瘤之一,其发生与紫外线中的 UVB 诱导<sup>[1]</sup>、病毒感染、接触焦油衍生物、放射线、砷剂等物质有关,探讨鳞癌的发生机制、防治以及预后都具有重要意义。本实验通过探讨如何建立一个成瘤速度快,荷瘤率高,稳定性好,可行性高的小鼠皮肤鳞癌模型,为皮肤鳞状细胞癌的进一步研究提供实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及实验环境

BALB/c 小鼠 50 只,SPF 级,雌、雄各半,6~8 周龄,体重在 16~18 g 左右,从北京维通利华实验动物技术有限公司引进[实验动物生产许可证号:SCXK(京)2012-0001],由河北省邯郸市康业制药有限公司动物实验中心负责饲养[实验动物使用许可证号:SYXK(冀)2012-0001]。本单位动物伦理委员会批准号为 20150406。实验前适应周围环境 1 周,动物饲养室为清洁级,室温 20~24℃,给予 BALB/c 小鼠专用饲料和普通水饲养。

### 1.2 仪器与试剂

脱毛剂:硫化钠、洗衣粉、淀粉按 3:1:7 的比例混合,并加水兑成乳胶状;诱癌剂:二甲基苯并蒽(DMBA, Sigma 公司)与丙酮液配制成 0.75 g/L 的 DMBA 丙酮液,巴豆油(Sigma 公司)与丙酮液配制成 0.25% 的巴豆油丙酮液。SH-4 B 型紫外线光疗仪(产品标准号:YZB/沪 4663-26-2012),辐照强度值 13.4 mW/cm<sup>2</sup>,波长 311~313 nm,上海希格玛公司产品。

### 1.3 动物实验

1.3.1 动物分组:各组小鼠的体重及周龄的平均值通过方差分析,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。实验小鼠以数字编码随机分成 3 组:A 组(15 只):仅外涂 DMBA/巴豆油;B 组(15 只):仅照射 NB-UVB;C 组(20 只):外涂 DMBA/巴豆油联合 NB-UVB 照射。

1.3.2 模型构建阶段:A 组小鼠在实验的第 1、5、10 天,分别将 200  $\mu$ L DMBA 丙酮液涂抹于背部脱

去毛发处,每次涂药前 1 d 进行皮肤脱毛处理,从第 3 周开始每周四、周日涂抹 200  $\mu$ L 巴豆油丙酮液。B 组从第 3 周开始进行 NB-UVB 照射,每周进行脱毛 1 次,照光时将小鼠固定于底径 10 cm 的敞口密闭器具内,照射距离 20 cm,分别于每周一、二、三、五、六 5 d 进行,起始剂量为 0.5 J/cm<sup>2</sup>,逐次递增,每周增加 0.1 J/cm<sup>2</sup>,至第 20 周照射剂量为 2.2 J/cm<sup>2</sup> 时停止,累计剂量为 119 J/cm<sup>2</sup>。C 组小鼠在实验的第 1、5、10 天,分别将 200  $\mu$ L DMBA 丙酮液涂抹于背部脱去毛发处,每次涂药前 1 d 进行皮肤脱毛处理,从第 3 周开始每周四和周日涂抹 200  $\mu$ L 巴豆油丙酮液,每周脱毛一次,每周其余 5 d 进行 NB-UVB 照射,照射条件、起始剂量、累计剂量等与 B 组相同。

1.3.3 肿瘤计数:采用数码相机拍摄小鼠背部皮肤的变化,记录直径  $\geq 1$  mm 且持续时间  $\geq 2$  周的新生物,每周观察各组小鼠荷瘤数和直径的变化。

1.3.4 病理学检查:第 20 周末肉眼观察小鼠成瘤情况,并统计成瘤率及存活率,局部固定小鼠,在利多卡因局麻下切取瘤体。置于 4% 中性甲醛液中固定,进行石蜡包埋、切片,HE 染色,针对病理学结果进行分析。

1.3.5 统计学方法:应用统计学软件 SPSS 17.0 进行数据处理。小鼠荷瘤率及皮肤鳞癌发生率使用卡方检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组荷瘤小鼠和荷瘤率

从第 5 周末开始,C 组部分小鼠皮肤开始出现直径  $\geq 1$  mm 的丘疹,且新生物随着时间逐渐增大,数量渐增多,且部分皮损相互融合。每组小鼠的荷瘤比例及各组小鼠荷瘤的瘤体数逐渐增多,分别见于表 1、2。每组小鼠荷瘤比例 = 每组荷瘤小鼠只数/每组小鼠存活只数,成瘤率 = 各组成瘤小鼠数/该组存活小鼠数  $\times 100\%$ , SCC 发生率 = 各组小鼠 SCC 发生总数/该组存活小鼠数  $\times 100\%$ 。各组成瘤率分别为 86.67%、7.14%、94.12%;SCC 发

生率分别为:13.34%、0%、70.59%。

表 1 各组小鼠荷瘤比例

Tab. 1 The proportion of tumor-bearing mice in each group

组别 Groups	第 5 周 5 weeks	第 10 周 10 weeks	第 15 周 15 weeks	第 20 周 20 weeks
A 组 Group A	0/15	2/15	12/15	13/15
B 组 Group B	0/15	0/15	1/14	1/14
C 组 Group C	3/20	12/18	15/17	16/17

注:第 10 周时 A 组、C 组荷瘤率比较,  $P < 0.05$ ; 第 15 周、20 周  $P > 0.05$

Note. Compared the group A with group C,  $P < 0.05$ ;  $P > 0.05$  at 15 weeks and 20 weeks.

表 2 各组小鼠荷瘤总个数

Tab. 2 The total number of tumor-bearing mice in each group

组别 Groups	第 5 周 5 weeks	第 10 周 10 weeks	第 15 周 15 weeks	第 20 周 20 weeks
A 组 Group A	0	2	12	16
B 组 Group B	0	0	1	1
C 组 Group C	3	10	17	26

表 3 各组小鼠瘤组织病理改变

Tab. 3 Pathological changes of mice in each group

组别 Groups	正常 Normal	良性增生 Benign hyperplasia	异型增生 Dysplasia	SCC Squamous cell carcinoma
A 组 Group A	13.33%	53.33%	20%	13.33%
B 组 Group B	92.86%	7.14%	0	0
C 组 Group C	5.88%	5.88%	17.65%	70.59%

注:第 20 周时 A 组、C 组 SCC 发生率比较,  $P < 0.05$

Note. Compared the group A with group C at 20 weeks,  $P < 0.05$ .

### 3 讨论

皮肤是肿瘤好发部位,其发生与人们的生活方式、空气污染以及外界环境中所接触到的砷剂等化学物质等有关,目前我国恶性皮肤肿瘤的发病率呈上升趋势<sup>[2]</sup>。作为皮肤恶性肿瘤中较为常见的皮肤鳞癌,已得到越来越多学者的关注和研究。DMBA 是存在于大气、空气、水、烟尘、土壤中的一种多环芳香烃,已广泛应用于国内胰腺癌、乳腺癌、颌下腺腺癌等动物模型的建立<sup>[3-5]</sup>。目前,DMBA/巴豆油作为国内构建小鼠皮肤癌的主要造模方法之一,在印度、马来西亚等国家皮肤肿瘤的研究中也得到广泛应用<sup>[6-7]</sup>。紫外线辐射能够导致 DNA 光损伤,从而引起基因突变、免疫抑制等一系列反应,导致皮肤鳞状细胞癌的发生和发展。王秀丽等人

### 2.2 小鼠肿瘤生长情况

C 组于第 5 周后皮肤开始出现直径  $\geq 1$  mm 的丘疹,A 组、B 组分别于第 6 周、第 12 周后部分小鼠才出现类似新生物,随着实验的进行,新生物表面逐渐形成斑块、结节、疣状增生、溃疡或基底浸润,表面糜烂或有坏死组织。实验期间,由于对环境不耐受死亡 1 只,脱毛手法错误死亡 1 只,脱毛膏配置不合格引起小鼠死亡 2 只,诱癌中后期小鼠出现明显消瘦、体重下降等恶病质体质,暂无死亡。

### 2.3 小鼠肿瘤组织病理学改变

根据小鼠瘤组织病理学表现,将其划分为正常、良性、异型增生、SCC,见表 3。正常小鼠皮肤组织结构完整,表皮、真皮及皮下组织层次清晰,随着实验周期的延长,小鼠皮肤组织逐渐出现角化过度,棘层肥厚,表皮呈簇状向下延伸,鳞状细胞侵入真皮,见图 1、2;高倍镜下呈现非典型角质形成细胞增生,细胞核大小不等,染色质丰富等表现,见图 3,部分高分化鳞癌可见角珠形成,见图 4。

在应用日光模拟器模拟日光照射 SKH-1 无毛小鼠构建鳞癌小鼠模型的过程中发现紫外线照射能够诱导 SKH-1 无毛小鼠的皮肤组织增生,而且皮损严重程度随着照射剂量累积而逐渐加重<sup>[1]</sup>。Kunisada M 等<sup>[8]</sup>通过研究日光导致皮肤肿瘤中最重要的成分,发现窄谱 UVB 更易导致皮肤癌。文献报道应用 DMBA/巴豆油单独构建皮肤鳞癌模型需要 24 周的时间<sup>[9]</sup>。单独用 NB-UVB 作为光源,每周照射 5 次,构建模型也需要 28 周的时间<sup>[10]</sup>,应用日光模拟器造模到 20 周时成瘤率为 39.3%,鳞癌发生率为 60%<sup>[1]</sup>。本模型在早期采用 DMBA 外涂,促癌期使用巴豆油以及窄谱 UVB 共同作用,20 周荷瘤率达到了 94.12%,鳞癌发生率达到了 70.59%,成功的缩短了造模周期。尽管 A、C 两组小鼠荷瘤率无明显差异,但组织病理学显示 A 组诱发的鳞癌数与 C

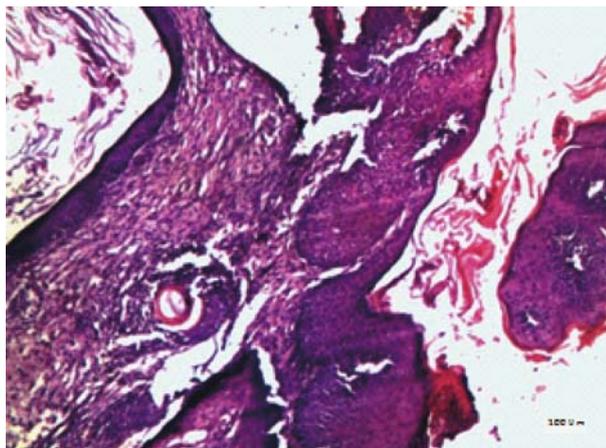


图 1 鳞状细胞侵入真皮,角化过度  
(HE,  $\times 100$ ), 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ )

Fig. 1 Squamous cell invasion of the dermis and hyperkeratosis. (Bar = 100  $\mu\text{m}$ )

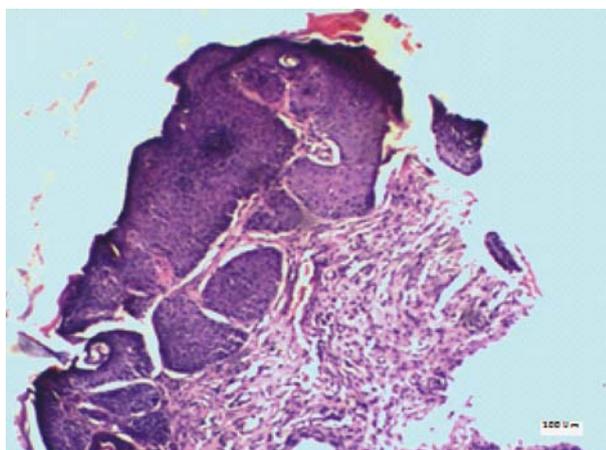


图 2 棘层肥厚,表皮呈簇状向下延伸  
(HE,  $\times 100$ , 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ )

Fig. 2 Epidermal acanthosis and the epidermis clustered with a downward extension. (Bar = 100  $\mu\text{m}$ )

组相比有差异显著性,  $P < 0.05$ , 这可能与 DMBA、巴豆油和窄谱 UVB 的联合作用有关, 即与物理、化学因素的协同作用机制有关。这与皮肤鳞癌高危人群所接触到的致病因素, 如长期、高强度照射紫外线, DMBA、砷剂等环境污染因素共同作用的机制相似。这提示我们在预防皮肤鳞癌的过程中, 要尽量避免长期、高强度的暴露于紫外光下, 尤其是起重要作用的窄谱 UVB, 同时还要防止和减少促癌因素, 如环境中存在的 DMBA、巴豆油等致癌剂。

本次试验通过比较 DMBA/巴豆油二阶段法、紫外光、NB-UVB 等常见的构建皮肤肿瘤模型的方法, 发现 DMBA/巴豆油二阶段法联合 NB-UVB 构建皮肤鳞癌模型的优越性, 为进一步研究人类皮肤鳞状细

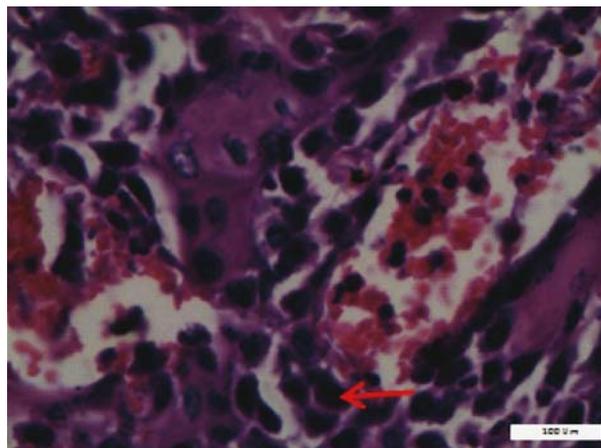


图 3 非典型角质形成细胞增生, 细胞核大小不等, 染色质丰富 (HE,  $\times 400$ , 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ )

Fig. 3 Atypical keratinocytes proliferation, cell nucleus ranging in size and rich in chromatin (Bar = 100  $\mu\text{m}$ )

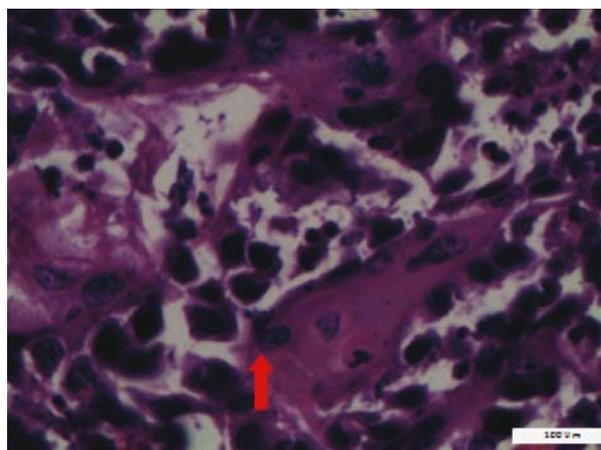


图 4 瘤细胞异型性明显, 有角珠形成  
(HE,  $\times 400$ , 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ )

Fig. 4 Marked cytological atypia with keratin pearls (Bar = 100  $\mu\text{m}$ )

胞癌的发生机制、发展规律、防治措施提供了更好的模型构建方法。

#### 参考文献:

- [1] 吕婷, 王秀丽, 周文江, 等. 紫外线所致皮肤鳞状细胞癌小鼠模型的建立 [J]. 中华皮肤科杂志, 2011, 44(3): 174-177.
- [2] 张淑娟, 刘宁, 代晓明, 等. 皮肤鳞癌动物模型构建 [J]. 昆明医学院学报, 2009, S2: 75-79.
- [3] Zhao JA, Chen JJ, Ju YC, et al. The effect of childbirth on carcinogenesis of DMBA-induced breast cancer in female SD rats [J]. 癌症, 2011, 11: 779-785.

(下转第 61 页)



# 靶向调控大鼠海马 CNN3 基因表达载体的构建及鉴定

孙俊梅<sup>1</sup>, 龙晶晶<sup>1</sup>, 韩雁冰<sup>1</sup>, 蔡雪梅<sup>2</sup>, 陆地<sup>3</sup>, 边立功<sup>3</sup>, 郭家智<sup>3</sup>, 李梅<sup>1</sup>

(昆明医科大学第一附属医院 1. 神经内科; 2. 检验科, 昆明 650031;  
3. 昆明医科大学生物医学工程研究中心, 昆明 650500)

**【摘要】目的** 建立可调控大鼠局部脑区 CNN3 基因表达的技术, 为进一步研究 CNN3 基因参与脑内病理生理过程奠定基础。**方法** 设计并合成针对 CNN3 基因的全长编码序列 cDNA 和 3 条 shRNA 干扰靶点序列, 利用基因工程技术构建 CNN3-OE 和 3 个 CNN3-shRNA 慢病毒载体, 在立体定位仪引导下注入大鼠海马, 采用蛋白免疫印迹技术筛选 CNN3 基因的最佳沉默序列, 并找出重组表达和沉默慢病毒载体调控海马 CNN3 基因的变化规律。**结果** CNN3-OE 和 3 个 CNN3-shRNA 慢病毒干扰载体均构建成功, 转染后 8 周内对海马 CNN3 基因水平有一定调控作用, 其中 CNN3-shRNA2 载体组在转染后的 8 周内海马 CNN3 基因编码蛋白 calponin-3 水平显著性下调, 最高抑制率为 73.26%; CNN3-OE 慢病毒载体组中海马 calponin-3 蛋白水平具有统计学意义的升高仅在转染后第 14 天, 上调率为 93.88%。**结论** 通过定位注射 CNN3-OE 和 CNN3-shRNA 慢病毒载体可在体调控局部脑区 CNN3 基因表达, 为后续的机制研究和开拓疾病防治新途径奠定基础。

**【关键词】** CNN3; 基因; 沉默; 重组; 慢病毒载体

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0055-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.02.012

## Construction and identification of lentivirus-mediated vectors targeting CNN3 gene in the rat hippocampus

SUN Jun-mei<sup>1</sup>, LONG Jing-jing<sup>1</sup>, HAN Yan-bing<sup>1</sup>, CAI Xue-mei<sup>2</sup>, LU Di<sup>3</sup>, BIAN Li-gong<sup>3</sup>, GUO ia-Zhi<sup>3</sup>, LI Mei<sup>1</sup>  
(1. Department of Neurology, 2. Department of Clinical Laboratory,  
First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, 650031, China;  
3. Biomedical Engineering Research Center, Kunming Medical University, Kunming, 650500)

**【Abstract】Objective** To establish a method focusing on regulation of CNN3 gene in the rat hippocampus and help to explore the role of CNN3 gene played in the brain physiology and pathology. **Methods** One cDNA sequence and three shRNAs targeting CNN3 gene were designed and synthesized. The recombinant lentivirus-mediated expressing and three short hairpin RNA (shRNA) vectors targeting CNN3 gene in the rats were constructed with engineering technology. All recombinant vectors were intravenously injected into rats hippocampi guided by stereotaxic apparatus. Western blot was performed to explore the best shRNA and to study the changes of CNN3 gene in the rat hippocampus after transfection with the silence and over-expressed vectors. **Results** The lentivirus-mediated vector expressing CNN3-OE and three shRNA vectors targeting CNN3 gene were successfully constructed. Within eight weeks after transfection, the vectors of CNN3-OE and three CNN3-shRNAs changed the expression of CNN3 gene in the rat hippocampus, in particular, all the protein levels

[基金项目] 国家自然科学基金地区基金(81260199); 云南省科技厅-昆明医科大学联合基金(2012FB030); 云南省卫生科技计划项目(2012WS0002)。

[作者简介] 孙俊梅(1989-), 女, 研究生, 专业: 神经病学。E-mail: 675181708@QQ.com。

[通讯作者] 韩雁冰(1972-), 女, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 癫痫的发病机制和临床防治。E-mail: ynhyb@163.com。

of calponin-3 encoded by CNN3 gene were significantly down-regulated along with the time, with the highest inhibitory rate of 73.6% in the CNN3-shRNA2 group. Significant up-regulation of calponin-3 protein level by 93.88%, was found only on the 14th day after transfection. **Conclusions** Lentivirus-mediated vectors of CNN3-OE and CNN3-shRNAs may regulate in vivo the CNN3 gene level in the local brain region of rats via stereotactic injection. The study lays a foundation for disease prevention and treatment in the future.

**【Key words】** CNN3; Gene; Silencing; Recombination; Lentiviral vector

1995 年 Maguchi 等<sup>[1]</sup>首次分离出 CNN3 基因,其编码的 calponin-3 蛋白可与肌动蛋白、钙调蛋白、肌钙蛋白和原肌球蛋白结合,不仅分布在肝、肺、肾、肌肉、皮肤、卵巢<sup>[2-5]</sup>,还是 calponin 家族中唯一分布在中枢神经系统的的一个亚型,在大脑、小脑和脑血管均有表达<sup>[6-8]</sup>,尤其是近年来研究显示 CNN3 基因及 calponin-3 蛋白异常可能改变大脑海马内神经元形态,甚至导致突触重塑<sup>[9,10]</sup>。本课题组前期研究也观察到 CNN3 基因和 calponin-3 蛋白在癫痫患者及大鼠大脑海马组织和脑脊液内表达水平显著升高,提示可能参与癫痫发生,但具体机制尚未阐明<sup>[11]</sup>。其中的一个重要原因就是目前尚未建立可靶向沉默或过表达活体动物局部脑区的 CNN3 基因可靠技术。倘若能定向定量在体调控实验动物脑内 CNN3 基因表达水平,将对阐明 CNN3 基因功能、深入研究其在突触重塑及癫痫等脑内病理生理过程中的确切作用及开辟新的治疗途径等具有重要意义。因此我们将构建针对大鼠 CNN3 基因的 shRNA 及过表达 (OE) 慢病毒载体,再通过活体定位局部注射靶向沉默或上调大鼠海马 CNN3 基因表达水平,并进行验证。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

感受态细胞 DH5 $\alpha$ 、pGMLV-sc5 RNAi 慢病毒载体、293T 细胞(上海吉满基因技术有限公司);PCR 用试剂 primer(上海生工生物工程有限公司);Taq polymerase(美国 NEB 公司);Qiagen 质粒大抽试剂盒(德国 Qiagen 公司);LB 培养基(Alpha Aeser);BSA、DMSO、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>(美国 Sigma 公司);胎牛血清、DMEM、胰酶(美国 Gibco 公司);琼脂糖(美国 Bio-Rad 公司);T4 DNA ligase、T4 DNA ligase buffer、DNA ladder、BamH I、EcoR I、Xba I、Xho I (Fermentas);RIPA(强)裂解液、PMSF(100 mM)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 CNN3 过表达 (CNN3-OE) 慢病毒载体的制备:

1.2.1.1 引物设计与合成:在 NCBI 中找到 CNN3 基因序列并确定所用载体 pGMLV-PA6。引物序列上游为:5'-CCG GAATTC GCCACC ATGGAC TACAAGGACGATGACGACAAGACCCACTTCAACAA GGGCC-3',下游为:5'-CG GGATCC CTAGTAAT CGATGCCCTGGTTCG-3',引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2.1.2 构建步骤:①利用 T4 连接酶在 22℃ 连接 pGMLV-PA6 载体与目的片段 60 min。②将连接产物转化入制备好的感受态细胞对长出的单克隆菌落先进行 PCR 鉴定,PCR 鉴定阳性菌落进行测序鉴定。

#### 1.2.2 RNA 干扰 CNN3 慢病毒载体的制备:

1.2.2.1 CNN3 基因 shRNA 表达模板序列设计与合成:在 GenBank 网站中查询到目的基因 CNN3 的 mRNA,参考 RNA 干扰序列设计原则,根据我们的设计经验和设计软件进行评估测定,设计 3 个 RNA 干扰靶点序列,并合成 3 对 shRNA 寡聚单链 DNA,序列如下:CNN3-ShRNA1-1:5'-gatccGCAGACTGCAAAACCCCTTTGATTCAAGAGATCAAAGGGTTTGTCA GTCTGCTTTTTTg-3',CNN3-ShRNA1-2:5'-aattcAAA AAAGCAGACTGACAAACCCTTTGATCTCTTGAATCAAAGGGTTTGTCTGACTCTGCg-3';CNN3-ShRNA2-1:5'-gatccGGAGAACATCGGCAACTTTATAGAGAACTTATAAGTTGCCGATGTTCTCC TTTTTTg-3',CNN3-ShRNA2-2:5'-aattcAAAAAAGGAGAACATCGGCAACTTTATAAGTTCTCTATAAAGTTG CCGATGTTCTCCg-3';CNN3-ShRNA3-1:5'-gatcc GGCCAAAGTGTAATCGGTTTAAAGACTTTAAACCGATTACACTTTGG CCTTTTTTg-3',CNN3-ShRNA3-2:5'-aattcAAAAA GGCCAAAGTGTAATCGGTTTAAAGTTCTCTTAAACC GATTACACTTTGGCCg-3'。

1.2.2.2 shRNA 慢病毒载体的构建与鉴定:①用无菌的 TE buffer 稀释引物使终浓度为 100  $\mu$ mol/L。分别吸取 10  $\mu$ L 的上下游引物混合并吹打均匀放入

PCR 管内,94℃水浴缓慢退火冷却至室温。②质粒用 BamH I、EcoR I 双酶切,0.8%琼脂糖凝胶电泳,回收大片段。③在 25℃中,利用 T4 连接酶将退火产物和线性化质粒载体 pGMLV-SC5 连接过夜。④连接产物转化至感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,经菌液 PCR 鉴定阳性菌落进行测序和比对分析。

1.2.3 慢病毒质粒的包装和滴度测定:转染前 1 d,将已经长好的 293T 细胞以合适的比例传代到 10 cm 培养皿中,转染前 1~2 h 将需要转染的细胞换新鲜的培养基,按 shRNA 转染体系:DMEM 1 mL、shRNA 10  $\mu$ g、Lenti-HGMix 10  $\mu$ L、HG transgene reagent 60  $\mu$ L;过表达转染体系:DMEM 1 mL、过表达慢病毒质粒 10  $\mu$ g、Lenti-HGMix 10  $\mu$ L、HG transgene reagent 60  $\mu$ L 混合均匀,室温放置 15~20 min,将混合液分别滴入 293T 细胞中,混匀后置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。转染 10~12 h 后加 100 \* enhancing buffer 促进转染,接着 8 h 后更换新鲜培养基,继续培养 48 h 后,收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液。病毒浓缩纯化使用离心超滤装置(美国 Millipore 公司),浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液,分装后保存于 -80℃。取其中 1 支使用逐孔稀释滴度测定法进行病毒生物学滴度测定,并计算病毒滴度。

1.2.4 CNN3 基因沉默/过表达鼠模型的建立:

1.2.4.1 实验动物:实验鼠购自成都达硕实验动物有限公司(动物生产许可证号:SCXK(川)2013-24),均为 SPF 级、健康雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠,6 周龄,体重 180~220 g,随机分为空 pGMLV-SC5 载体(shRNA 阴性对照)组,干扰序列 1 的慢病毒载体简称为 shRNA1 组,干扰序列 2 的慢病毒载体简称为 shRNA2 组,干扰序列 3 的慢病毒载体简称为 shRNA3 组,空 pGMLV-PA6 载体(过表达阴性对照)组,CNN3-OE 组简称 OE 组。

1.2.4.2 慢病毒载体转染:通过立体定位注射方法将 3 个 CNN3-shRNA、CNN3-OE 慢病毒载体及各自对照的空载体转染至各组实验鼠海马。按 0.4 mL/100 g 剂量的 7.2% 的水合氯醛注入大鼠腹腔,待麻醉生效后将大鼠头部固定在立体定位仪上,备皮、暴露骨缝,用 3% 的双氧水止血洗洁。参考大鼠立体定位图谱,把前囟定为零点,设定前囟后 3.6 mm、中线旁开 2 mm 处为海马穿刺靶点。将电钻自穿刺靶点处钻开颅骨,用微量进样器抽取 2  $\mu$ L 慢病毒浓缩液并将其在立体定位仪上固定好,自钻孔部位缓

慢进针至颅骨表面下 3.5 mm,匀速缓慢(0.2  $\mu$ L/min)注入慢病毒载体,注射完毕后针头留置 10 min,再缓慢拔出。同样的方法进行对侧海马的注射结束后缝合切口,手术后大鼠自由进食和休息。

1.2.5 检测慢病毒载体转染效率:采用免疫印迹(Western blot)实验对各组慢病毒载体转染后实验鼠海马的 CNN3 基因调控蛋白 calponin-3 进行定量。首先在注射慢病毒载体后的第 1、3、7、10、14 天,随机从 shRNA1、shRNA2、shRNA3、OE 及 2 个对照组中抽取实验鼠处死后分离出海马,用 RIPA 裂解液(含 PMSF,体积之比为 RIPA:PMSF = 100:1)按每 100 mg 组织加 1 mL RIPA 裂解液的比例,在冰上匀浆约 30 min,然后 4℃下 12 000 r/min 离心 15 min 取上清液,用 BCA 法测定蛋白浓度,使用 Image J 软件分析处理,取  $\beta$ -actin 作为内参,用 calponin-3 与  $\beta$ -actin 的光密度比值表示 calponin-3 蛋白的相对表达量。然后通过统计学方法将 3 个 CNN3-shRNA 组和 shRNA 阴性对照组的实验结果进行两两比较,找出沉默大鼠海马 CNN3 基因的最佳 shRNA 干扰序列。

为明确 CNN3 基因沉默/过表达效果持续时长,延长转染最佳 shRNA 干扰和过表达慢病毒载体的观察时间,在第 1、2、4、6、8 周时处死取材,Western blot 定量检测各时间点中实验鼠海马 calponin-3 蛋白表达量。

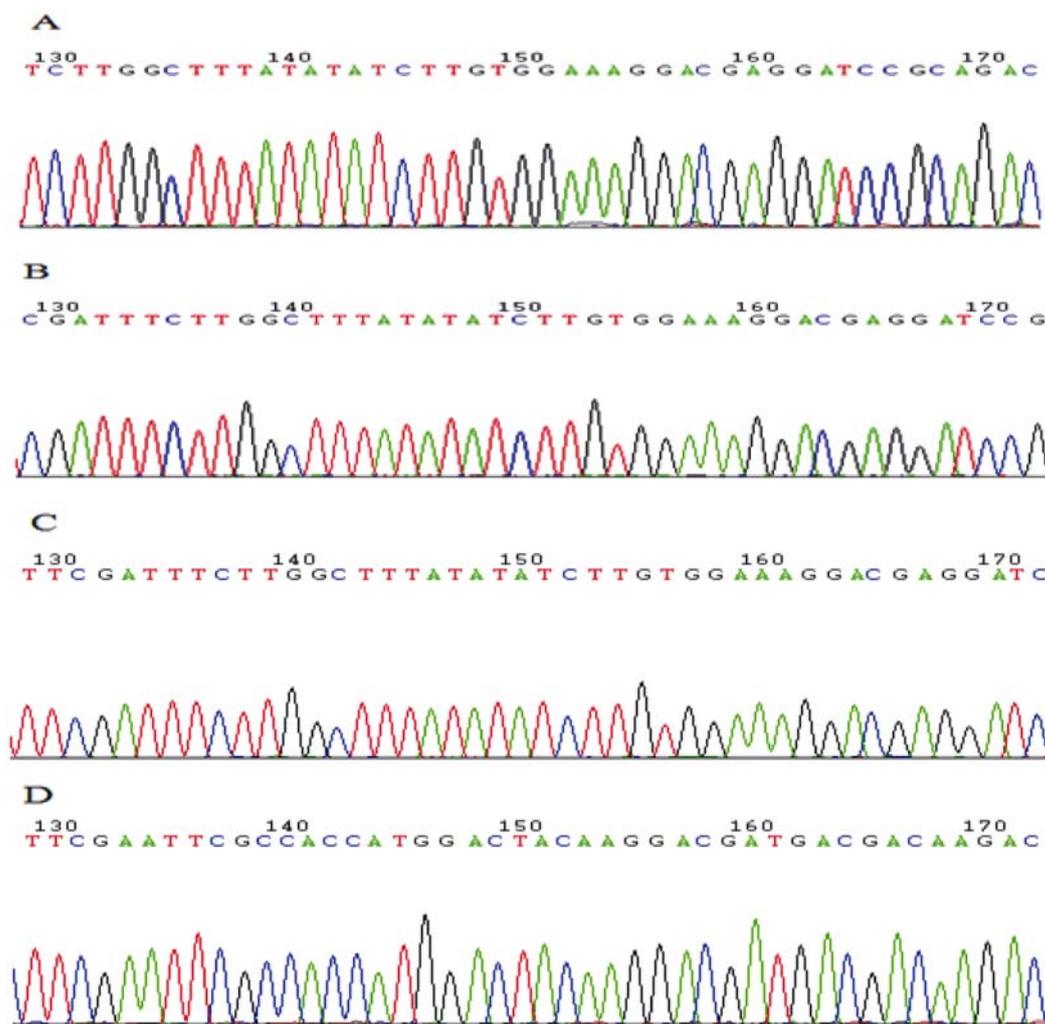
### 1.3 统计学方法

因所有试验都重复 3 次,为避免每次 Western blot 实验曝光时造成的条带深浅不一干扰,我们将 3 次实验结果进行归一化处理后再采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。多组多重比较使用 One-way ANOVA 单因素方差分析,方差齐时使用 LSD 统计方法进行组间两两比较差异有无统计学意义, $P < 0.05$  时判为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 基因测序分析

经过比对,3 个 shRNA 重组克隆中插入的片段序列与设计的 oligo 序列完全一致,无碱基缺失或错误(图 1A-C),表明 CNN3-shRNA1、CNN3-shRNA2 和 CNN3-shRNA3 慢病毒载体均构建成功。CNN3-OE 慢病毒载体中插入片段序列与目的片段序列完全一致,无碱基缺失或错误(图 1D),表明过表达慢病毒载体也成功构建。



注:A 图为 CNN3-shRNA1 慢病毒载体,B 图为 CNN3-shRNA2 慢病毒载体,  
C 图为 CNN3-shRNA3 慢病毒载体,D 图为 CNN3-OE 慢病毒载体。

图 1 慢病毒载体的测序结果

Note. A indicates CNN3-shRNA1 vector; B indicates CNN3-shRNA2 vector;  
C indicates CNN3-shRNA3 vector; A indicates CNN3-OE vector.

Fig. 1 Sequencing results of the lentiviral vectors targeted CNN3 gene.

## 2.2 慢病毒滴度的测定

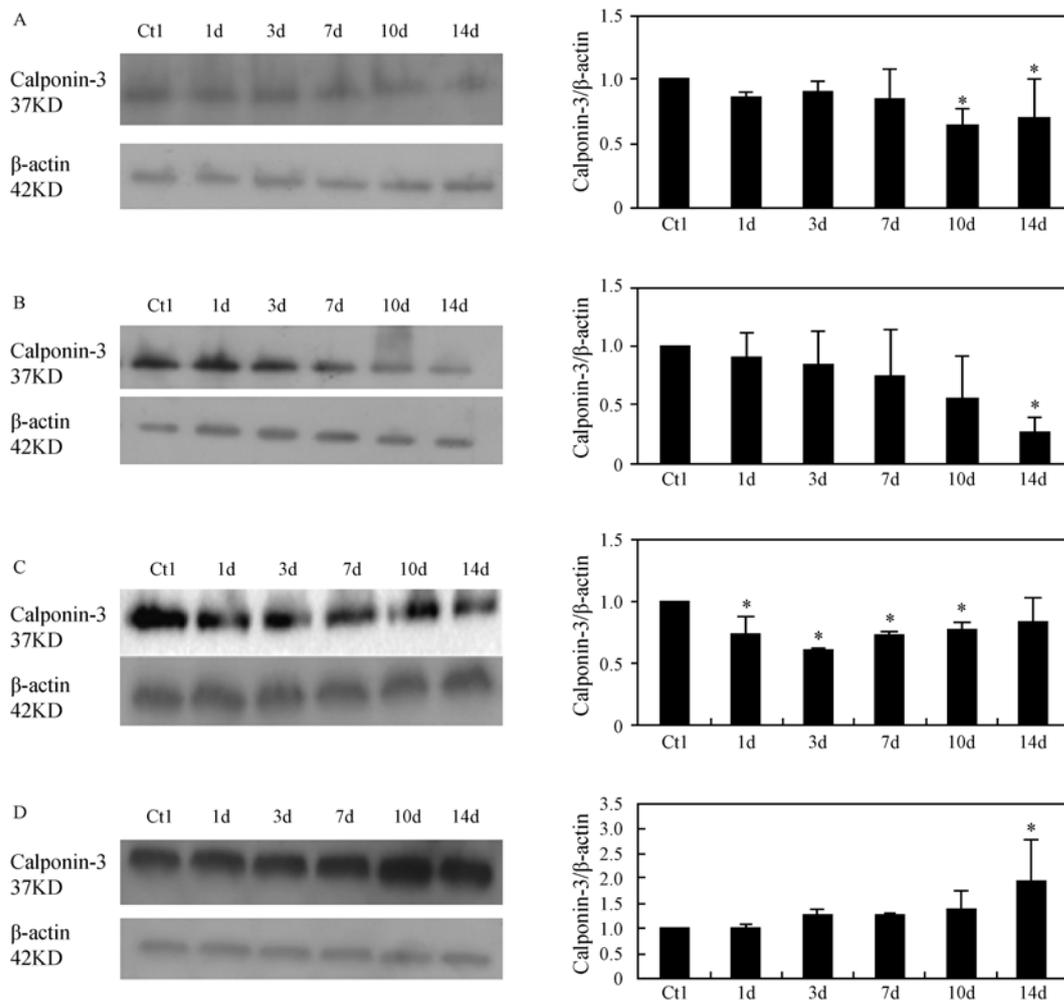
经荧光计数法测得重组慢病毒 CNN3-shRNA1、CNN3-shRNA2、CNN3-shRNA3 的滴度均为  $2 \times 10^9$  TU/mL,慢病毒 CNN3-OE 的滴度是  $2 \times 10^8$  TU/mL, CNN3-shRNA 和 CNN3-OE 的阴性对照空载体病毒的滴度均为  $2 \times 10^8$  TU/mL。

## 2.3 Western blot 实验结果

首先对比了 CNN3-shRNA1、CNN3-shRNA2、CNN3-shRNA3、CNN3-OE 慢病毒载体与相应的对照空载体分别被转染到 SD 大鼠海马后 1、3、7、10 和 14 d 的 calponin-3 与内参的光密度比值。结果显示:与对照组相比,转染后 14 d 内 3 个 shRNA 组海马的 calponin-3 蛋白水平均下调,尤其是在转染后

第 10、14 和 3 天, shRNA1、shRNA2、shRNA3 对 calponin-3 表达的抑制程度最高,分别达到 36.78%、73.26%、39.96%,均具有统计学意义。此外,shRNA2 组海马的 calponin-3 蛋白水平在慢病毒载体转染后呈进行性降低,而 shRNA1 和 shRNA3 组的 calponin-3 蛋白抑制反应不稳定(图 2A-C);过表达的 OE 组的 calponin-3 蛋白在慢病毒转染后表达水平呈进行性升高,在第 14 天时达到最高,较对照组升高 93.88%,两组间具有显著性差异( $P < 0.05$ )(图 2D)。

基于 14 d 内针对 CNN3 基因 ShRNA2 组和 OE 组的 calponin-3 蛋白降解/上调幅度最大,均明显超过 50%,而且此效应似与时长呈负/正相关(图 2B,



注:A 图为 CNN3-shRNA1 慢病毒载体组与空 pGMLV-SC5 载体转染组比较;B 图为 CNN3-shRNA2 慢病毒载体组与 pGMLV-SC5 载体转染组比较;C 图为 CNN3-shRNA3 慢病毒载体组与 pGMLV-SC5 载体转染组比较;D 图为 CNN3-OE 慢病毒载体组与空 pGMLV-PA6 载体转染组比较。左图均为代表性的 Western blot 结果图,右图均为统计分析结果。Ctl:阴性对照组; \*:  $p < 0.05$ 。

**图 2** 各种慢病毒载体转染 14 天内后实验鼠海马 calponin-3 蛋白的表达变化。

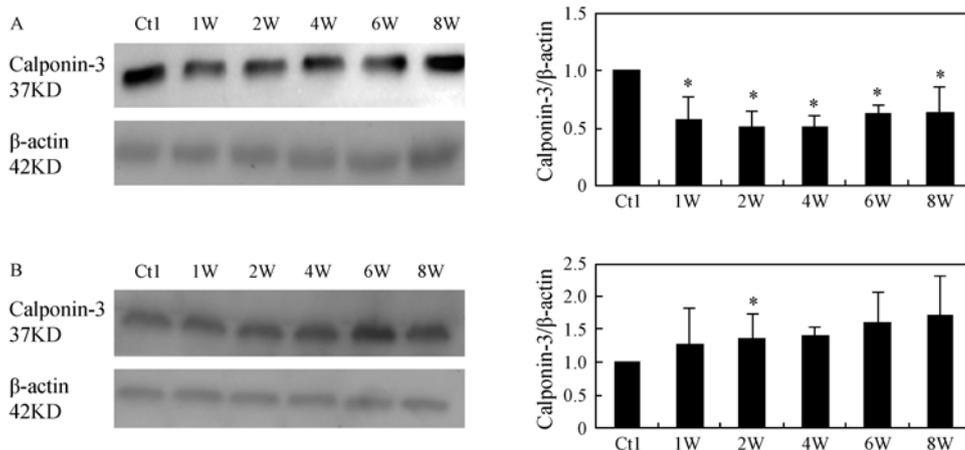
Note. (A) shows CNN3-shRNA1 vs. the control pGMLV-SC5 vector; (B) shows CNN3-shRNA2 vs. the control pGMLV-SC5 vector; (C) shows CNN3-shRNA3 vs. the control pGMLV-SC5 vector; (D) shows CNN3-OE vs. the control pGMLV-PA6 vector. The left figures show the representative results of Western blot. The right figures are the results of statistical analysis. Ctl; negative control; \*:  $P < 0.05$ .

**Fig. 2** Changes of the expression of calponin-3 protein in the hippocampus of rats within 14 days after transfection with various lentiviral vectors targeted CNN3 gene.

2D), 因此将这两组的观察时间延长至转染后 8 周。结果显示, CNN3-ShRNA2 慢病毒载体对 CNN3 基因的抑制效果可持续到 8 周, 且各时间点的 calponin-3 蛋白变化差异均具有显著性。CNN3-OE 慢病毒载体的过表达效果也可持续 8 周, 但统计学分析结果显示仅在第 14 天时过表达效应与对照组相比具有显著性差异(图 3)。

### 3 讨论

自 CNN3 基因及其编码蛋白 calponin-3 被发现以来, 各国研究者开展了机制研究, 但除 Flemming 等采用基因敲除鼠研究 B 细胞发育<sup>[5]</sup>外, 其余都是构建慢病毒载体后转染神经元、表皮成纤维母细胞、胎盘滋养层、肌原细胞等细胞模型<sup>[2-4,10]</sup>。然而脑部结构相当复杂, 仅脑细胞就有上百亿, 脑细胞又分为神经元和神经胶质细胞两大类, 相互之间还



注:A 图为 CNN3-shRNA2 慢病毒载体组与空 pGMLV-SC5 载体转染组比较;B 图为 CNN3-OE 慢病毒载体组与空 pGMLV-PA6 载体转染组比较。左图均为代表性的 Western blot 结果图,右图均为统计分析结果。Ctl:阴性对照组; \*:  $p < 0.05$ 。

**图 3** CNN3-shRNA2 和 CNN3-OE 慢病毒载体转染 1~8 周后 calponin-3 蛋白的表达变化。

Note. (A) shows CNN3-shRNA2 vs. the control pGMLV-SC5 vector; (B) shows CNN3-OE vs. the control pGMLV-PA6 vector. The left figures show the representative results of Western blot.

The right figures are the results of statistical analysis. Ctl: negative control; \*:  $P < 0.05$ .

**Fig. 3** Changes of the expression of calponin-3 protein in the hippocampus of rats from 1-8 weeks after transfection with the lentiviral vectors of CNN3-shRNA2 or CNN3-OE.

形成多种已知和未知的功能连接,所以仅有神经元模型远不能满足基因功能研究的需要,还需建立实验动物模型以模拟各种生理病理过程<sup>[12,13]</sup>。在本研究中,我们设计、构建大鼠 CNN3 基因的沉默及过表达慢病毒载体后,在立体定位仪引导下进行活体定位注射,使大鼠海马 calponin-3 蛋白表达水平显著下降/上调 50% 以上,且这种高效的干扰效应一直持续到第 8 周,表明该技术完全适用于动物模型的基因功能研究。

脂质体法、电转法和以腺病毒或慢病毒为载体的感染法是将外源性基因导入体外培养细胞的 4 种常用方法。脂质体法、电转法和腺病毒载体感染法这 3 种方法在原代细胞、干细胞、悬浮细胞中的感染效率极低,而且仅能瞬时感染,无法使目的基因在目的细胞持久表达或维持干扰的效果,故不适用于体内实验。而慢病毒载体的出现较好地解决了上述问题:首先,慢病毒对神经元等非常难转染的细胞依旧有较高的转染效率;其次,慢病毒载体上含有抗生素标记基因,通过抗生素筛选即可获得稳定株,利于下游实验的进行;更为重要的是,慢病毒可将外源性基因有效地整合到宿主染色体上从而达到持久性表达,适合活体动物模型的基因操作,因此尽管我们选择的 CNN3 基因靶点序列和其他课题组报道的都不一样,但是将其克隆入 shRNA/过表

达慢病毒载体后,均成功沉默/上调大鼠脑内 CNN3 基因,而且在转染后 8 周基因沉默/过表达的效应仍持续存在,为后续实验提供稳定的 CNN3 基因干扰动物模型。此外,与基因敲除/敲入通过改变 DNA 序列来达到基因功能的“全或无”不同<sup>[14]</sup>,基因沉默/过表达技术不改变 DNA 序列,可将基因水平调控在更多水平,最重要的是该技术操作更简单、费用更低,对开展基因功能学的动物研究和开辟新的基因治疗方法更为实用。

#### 参考文献:

- [1] Maguchi M, Nishida W, Kohara K, et al. Molecular cloning and gene mapping of human basic and acidic calponins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 217(1): 238-244.
- [2] Shibukawa Y, Yamazaki N, Daimon E, et al. Rock-dependent calponin 3 phosphorylation regulates myoblast fusion [J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(5): 633-648.
- [3] Shibukawa Y, Yamazaki N, Kumasawa K, et al. Calponin 3 regulates actin cytoskeleton rearrangement in trophoblastic cell fusion [J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(22): 3973-3984.
- [4] Daimon E, Shibukawa Y, Wada Y. Calponin 3 regulates stress fiber formation in dermal fibroblasts during wound healing [J]. *Arch Dermatol Res*, 2013, 305(7): 571-584.
- [5] Flemming A, Huang QQ, Jin JP, et al. A conditional knockout mouse model reveals that calponin-3 is dispensable for early B cell development [J]. *Plos ONE*, 2015, 10(6): e0128385.
- [6] Rozenblum G T, Gimona M. Calponins: adaptable modular

- regulators of the actin cytoskeleton [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(10): 1990–1995.
- [ 7 ] Trabelsiterzidis H, Fattoum AA, Dessi F, et al. Expression of an acidic isoform of calponin in rat brain; western blots on one- or two-dimensional gels and immuno-localization in cultured cells [J]. *Biochem J*, 1995, 306: 211–215.
- [ 8 ] Kreipke CW, Rafols JA. Calponin control of cerebrovascular reactivity; therapeutic implications in brain trauma [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(2): 262–269.
- [ 9 ] Ferhat L, Esclapez M, Represa A, et al. Increased levels of acidic calponin during dendritic spine plasticity after pilocarpin-induced seizures [J]. *Hippocampus*, 2003, 13(7): 845–858.
- [ 10 ] Rami G, Caillard O, Medina I, et al. Change in the shape and density of dendritic spines caused by overexpression of acidic calponin in cultured hippocampal neurons [J]. *Hippocampus*, 2006, 16(2): 183–197.
- [ 11 ] Han Y, Yin H, Xu Y, et al. Increased expression of calponin-3 in epileptic patients and experimental rats [J]. *Exp Neurol*, 2012, 233(1): 430–437.
- [ 12 ] Tsai HH, Li HL, Luis C, et al. Regional astrocyte allocation regulates CNS synaptogenesis and repair [J]. *Science*, 2012, 337(6092): 358–362.
- [ 13 ] Molofsky AV, Kelley KW, Tsai HH, et al. Astrocyte-encoded positional cues maintain sensorimotor circuit integrity [J]. *Nature*, 2014, 509(7499): 189–194.
- [ 14 ] 石宏, 何伟, 王晓宇, 等. TRPV1 和 ASIC3 基因敲除小鼠的寿命观察 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(10): 78–81.
- [ 修回日期 ] 2015-11-23

## (上接第 21 页)

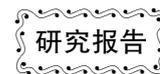
- [ 34 ] Thomas ML, Morse BC, O' Malley J, et al. Gender influences infectivity in C57BL/6 mice exposed to mouse minute virus [J]. *Comp Med*, 2007, 57: 74–81.
- [ 35 ] Pritchett-Corning K, Shek WR, Henderson KS, et al. Companion guide to rodent health surveillance for research facilities [M]. Wilmington, MA: Charles River, 2009: 3–18.
- [ 修回日期 ] 2015-11-23

## (上接第 47 页)

- [ 4 ] Baker DG. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1998; 11(2): 231–266.
- [ 5 ] Infectious Diseases of Mice and Rats Committee on Infectious Diseases of Mice and Rats, Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. Infectious Diseases of Mice and Rats [M]. National Academy Press, Washington, D. C. 1991. ISBN: 0–309–55692–9. <http://www.nap.edu/catalog/1429.html>.
- [ 6 ] Microbial and Phenotypic Definition of Rats and Mice: Proceedings of the 1998 US/Japan Conference [C]. International Committee of the Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council. ISBN: 0–309–52018–5, (1999). <http://www.nap.edu/catalog/9617.html>.
- [ 7 ] 庞万勇, 贺争鸣. 实验用生物样品的啮齿类微生物污染的检测管理中国比较医学杂志 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(10): 94–98.
- [ 8 ] 范文平, 贺争鸣. 西方国家实验动物健康监测的理念 [J]. *实验动物科学*, 2011, 23(43): 62–67.
- [ 9 ] 佟巍, 乔红伟, 魏强, 等. 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒在实验大鼠中的感染状况 [J]. *医学动物防治*, 2010, 27(4): 46–48.
- [ 修回日期 ] 2015-12-27

## (上接第 54 页)

- [ 4 ] 李静蔚, 宋爱莉, 刘晓菲. DMBA 诱导大鼠乳腺癌前病变动物模型研究概况 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2009, 03: 234–237.
- [ 5 ] 陈玲, 武和明, 万飞. 二甲基苯丙萘诱发大鼠颌下腺腺癌的实验研究 [J]. *口腔医学研究*, 2009, 03: 267–270.
- [ 6 ] Subramanian V, Vellaichamy E. Atrial natriuretic peptide (ANP) inhibits DMBA/croton oil induced skin tumor growth by modulating NF- $\kappa$ B, MMPs, and infiltrating mast cells in swiss albino mice. *Eur J Pharmacol*. 2014, 740: 388–397.
- [ 7 ] Roslida A, Fezah O, Yeong LT. Suppression of DMBA/croton oil-induced mouse skin tumor promotion by *Ardisia Crispa* root hexane extract [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011, 12(3): 665–669.
- [ 8 ] Kunisada M1, Kumimoto H, Ishizaki K, et al. Narrow-band UVB induces more carcinogenic skin tumors than broad-band UVB through the formation of cyclobutane pyrimidine dimer [J]. *J Invest Dermatol*. 2007, 127(12): 2865–2871.
- [ 9 ] Bhattacharyya SS, Paul S, Dutta S, et al. 东莨菪亭(7-羟基-6-甲氧基香豆素)对 7,12-二甲基苯并蒽诱导的皮肤乳头状瘤小鼠相关关键信号蛋白的影响 [J]. *中西医结合学报*. 2010, 08(07): 645–654.
- [ 10 ] Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, et al. Angiotensin-like protein 2 is an important facilitator of inflammatory carcinogenesis and metastasis [J]. *Cancer Res*. 2011, 71(24): 7502–7512.
- [ 修回日期 ] 2015–12–25



# 针刺结合丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

曾兆禄<sup>1</sup>, 韩继超<sup>2</sup>, 薛云<sup>3</sup>, 马玉奎<sup>3</sup>

(1. 山东省临朐县人民医院, 临朐, 山东 262600; 2. 济南市第一人民医院, 济南, 山东 250011;  
3. 山东省药学院, 济南, 山东 250033)

**【摘要】** 目的 研究针刺结合丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤有无保护作用。方法 采用大脑中动脉内栓线阻断法(MCAO)制备大鼠大脑中动脉脑缺血再灌注损伤模型,缺血2 h后将线拔出实现再灌注,分别于再灌注后立刻静脉注射丹红注射液2 mL/kg,并针刺百会、足三里,每天1次,连续3 d,72 h后采用Zea-Longa的5级4分制评分方法进行神经功能评分,TTC染色法测定脑梗死面积,Western blot法检测缺血侧脑皮层中Bcl-2与Bax的蛋白表达。结果 与模型和单用丹红注射液组比较,针刺结合丹红注射液治疗后大鼠神经功能缺陷评分明显降低,脑梗死面积减少,Bcl-2的蛋白表达增多,Bax蛋白表达减少。结论 针刺结合丹红注射液比单用丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤具有更明显的保护作用。

**【关键词】** 针刺;脑缺血再灌注损伤;Bcl-2;Bax

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0062-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.02.013

## Neuroprotective effect of acupuncture combined with Danhong injection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats

ZENG Zhao-lu<sup>1</sup>, HAN Ji-chao<sup>2</sup>, XUE Yun<sup>3</sup>, MA Yu-kui<sup>3</sup>

(1. People's Hospital of Linqu County, Shandong Linqu 262600, China;

2. the first People's Hospital of Jinan, Jinan 250011; 3. Shandong Pharmaceutical Academy, Jinan 250033)

**【Abstract】 Objective** To investigate the neuroprotective effect of acupuncture combined with a Chinese medicine, Danhong injection, on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. **Methods** Middle cerebral artery (MCA) occlusion was prepared by putting a nylon suture in the MCA. The MCA blood flow in the animals was restored at two hours after the MCA occlusion by withdrawing the suture to the external carotid artery (ECA). The acupoints "Baihui" (DU20) and "Zusanli" (ST36) were acupunctured and stimulated by twirling the acupuncture needle after reperfusion, and the rats were also administered with Danhong injection by intravenous injection, once every day for three days. Zea-Longa scores were recorded to assess the changes of neurological function. The rats were sacrificed at 72 h after reperfusion. Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining was used to measure cerebral infarction size. Western blot was used to test the level of Bcl-2 and Bax in the ischemic penumbra. **Results** The acupuncture combined with Danhong injection treatment group displayed markedly lower neurologic deficit scores, reduced ischemic infarct surface, increased expression

[作者简介] 曾兆禄(1971-),男,主管药师,本科,研究方向:针灸理疗。

[通讯作者] 马玉奎(1975-),男,副主任药师,博士,研究方向:新药药理毒理评价。E-mail: yukuima@sina.com。

of Bcl-2 protein, and reduced expression of Bax protein, compared with those in the model group and Danhong injection alone group. **Conclusions** Acupuncture combined with Danhong injection show more significant neuroprotective effect than Danhong injection treatment alone on rat models of cerebral ischemia/reperfusion injury.

**【Key words】** Acupuncture; Danhong injection; Cerebral ischemia/reperfusion injury; B cell lymphoma/leukemia-2; Bcl-2-associated protein

临床上对于缺血性脑血管病的首要治疗原则是尽早重建血液再灌,恢复脑部的血氧供应,使缺血脑组织重新获得营养物质供应并及时地将有害的代谢产物清除掉。重建血液再灌,一方面可使缺血的脑组织及时得到血氧供应,抑制受损脑组织神经细胞死亡,有利于神经元功能的恢复;另一方面可进一步加重缺血脑组织的病理损害,使病情恶化,引起脑缺血再灌注损伤,故防止再灌注损伤是目前治疗缺血性脑血管疾病的重要环节和瓶颈<sup>[1]</sup>。丹红注射液是从丹参和红花中提取的含有丹参素、丹参酚 A 等成分的中药注射液,具有抗炎抗氧化及神经保护作用,临床上被广泛用于急性缺血性脑病<sup>[2]</sup>。但是缺血性脑病发病机理比较复杂,单用一种药物难以取得满意的疗效。针灸作为一种中医疗治方法已经在脑血管病治疗中得到应用<sup>[3]</sup>,但单用疗效有限,治疗作用难以得到证实,这也直接影响了该方法在临床上的应用。本文采用针刺结合丹红注射液的方法研究其对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用,为临床推广应用提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物及饲养环境:SD 大鼠(SCXK(京)2012-0001),雄性,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。SPF 级环境饲养,室温(20~26)℃,湿度 40%~70%,日温差≤4℃,昼夜明暗交替时间 12 h/12 h。实验动物使用许可证号:SYXK(鲁)2014 0008。

1.1.2 药品与试剂:丹红注射液(菏泽步长制药有限公司提供,批号 130808);Western blot 用抗体 Bcl-2, Bax, GAPDH(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司提供);红四氮唑(TTC)(天津市科密欧化学试剂开发中心提供,批号 20100413)。

1.1.3 仪器:HC-3018R 型高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司制造);封膜机(美国 Fisher Scientific 制造);SSW-600-2S 型电热恒温水槽(上海博迅实业有限公司医疗设备厂制造);微量加样器(美国艾本德公司制造)。

### 1.2 方法

1.2.1 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的建立<sup>[4]</sup>:大鼠造模前禁食 24 h 不禁水,采用腹腔注射 350 mg/kg 的 10% 水合氯醛麻醉后将大鼠仰卧固定于手术台上,剪去切口部位的被毛,切开颈部正中部位的皮肤,分离暴露右侧颈总动脉(CCA),向上分离右颈外动脉(ECA)远端 1 cm,结扎 ECA 分支,在近 CCA 分叉处结扎 ECA,用动脉夹夹闭 CCA 近心端,用眼科剪在 ECA 结扎处与分叉处之间做一切口,将栓线自切口处插入,收紧线结,将动脉夹松开,将尼龙线顺 ECA 经颈内动脉(ICA)慢慢送入颅内,插入深度为(18.5±0.5)mm,阻断 MCA 的血供,收紧丝线,将线尾端暴露于切口外,层层缝合切口。阻断血流 2 h 后,同法将再次麻醉大鼠,将尼龙线栓慢慢退出至有阻力感,使其头端回到 CCA 分叉处,大脑中动脉重新获得血液供应,实现再灌注,剪断线栓,完成 MCAO 模型制备。假手术组仅进行右侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉的分离,不进行栓塞。

1.2.2 动物分组及给药:选取造模成功大鼠 40 只,按照神经功能缺陷评分均衡原则分为 4 组,分别为假手术组、模型组、丹红注射液 2 mL/kg 组和针刺结合丹红注射液 2 mL/kg 组,造模后丹红注射液组静脉给予丹红注射液,另一组给予丹红注射液后针刺百会穴和左侧足三里穴,得气后接脉冲电疗仪,采用疏密波,频率 2~100 Hz,强度 2 mA,每次 20 min<sup>[5]</sup>。每天给药或针刺 1 次,连续 3 d。假手术组和模型组给予相同容积的生理盐水。

1.2.3 神经功能缺陷评分:脑缺血 2 h 再灌注 72 h 后,参考 Zea-Longa<sup>[4]</sup>的评分标准对实验大鼠进行 5 级 4 分制神经功能评分,各个分值之间按照观察的具体情况可增减 0.5 分。评分标准为 0 分:未观察到明显的神经功能缺失症状;1 分:提尾悬空时梗死半球对侧前肢不能完全伸展;2 分:行走时向偏瘫侧及左侧旋转;3 分:自主运动时向左侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识水平降低。MCAO 模型组 1-3 分提示模型复制成功,0 分、4 分或死亡者剔除。

1.2.4 脑缺血面积测定<sup>[6]</sup>:10% 水合氯醛腹腔注

射麻醉大鼠后,打开胸腔暴露心脏,用 4℃ 预冷生理盐水快速进行心脏灌注。取脑经生理盐水漂洗后置 -20℃ 冰箱中冷冻 10 min,然后将以 2 mm 为间隔进行脑组织冠状切片,置于 2% TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)生理盐水溶液中,37℃ 避光染色 30 min。待显色后置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 后对采用图像处理软件(Adobe Photoshop 7.0)对缺血面积进行处理和统计,计算缺血面积。最终脑缺血面积以占总面积的百分率表示。

1.2.5 Western blot 检测大鼠缺血侧脑皮质 Bcl-2、Bax 蛋白水平:取 50 mg 脑组织,剪碎,用预冷 PBS 液洗涤两遍,加入 300 μL RIPA 组织裂解液和 3 μL PMSF,超声波粉碎,置冰上裂解 20 min。4℃ 离心,15 000 r/min,20 min。吸取上清液采用 BCA 法测定组织蛋白浓度。用 12% 分离胶和 5% 积层胶灌胶后,将凝胶置电泳槽中,上下游均加入电泳缓冲液。取蛋白样品上样。Bcl-2、Bax 每孔均上样 50 μg,同时对称上样 marker。电泳开始电压为 30 V,当溴酚蓝进入分离胶后,将电压调至 100 V,电泳 3.5 h 后切断电源。取下凝胶用于转膜。分别剪取 6 块滤纸和 1 块硝酸纤维素膜(NC 膜),浸入转移缓冲液中将塑料架放入含有转移缓冲液的托盘中,按负极到正极的顺序将转移海绵,滤纸,PAGE 胶,NC 膜,滤纸,转移海绵依次放置在塑料架上,夹上转移夹,放入转移槽中。胶靠负极,NC 膜靠正极。接通电源,电压 100 V,冷室转膜 1 h。转移结束后,将 NC 膜浸入丽春红染液中染色后将 NC 膜放入培养皿中,加 5% 脱脂奶粉,4℃ 封闭过夜。平皿中加入一抗,放入 NC 膜,4℃ 摇床过夜后加二抗反应。反应完毕后将 ECL 显色液加到 NC 膜的正面,反应 1 min,进入暗室,将 NC 膜放入 Kodak 增感屏,于 NC 膜正上方放置胶片,曝光,显影,定影。显影后可见密度强度不同的条带。将显色的胶片图像输入凝胶分析系统,应用 ID Image Analysis Software 进行表达强度测定。

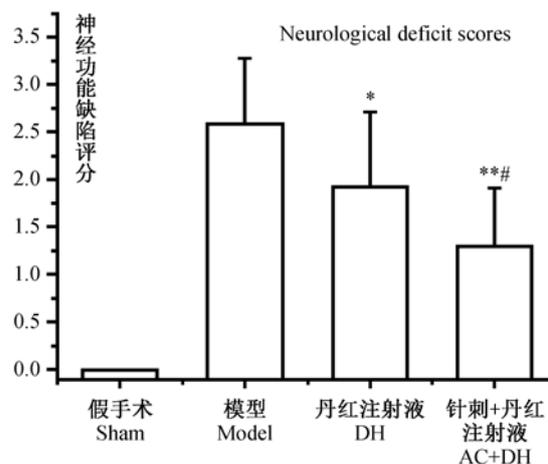
1.2.6 统计学方法:采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。各组数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 针刺结合丹红注射液对 MCAO 大鼠神经功能缺陷评分的影响

与模型组比较,给予丹红注射液后大鼠的神经功能缺陷有一定程度减轻,而结合针刺后神经功能

缺陷明显减轻,与模型组和单用丹红注射液组比较差异均有显著性( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),说明针刺结合丹红注射液能明显改善模型大鼠神经功能缺陷,其效果好于单用丹红注射液。见图 1。



\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 模型组; #  $P < 0.05$  vs. 丹红注射液组

图 1 针刺结合丹红注射液对 MCAO 大鼠神经功能缺陷评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Note. DH: Danhong injection group. AC + DH:

Acupuncture plus Danhong injection. The same as below.

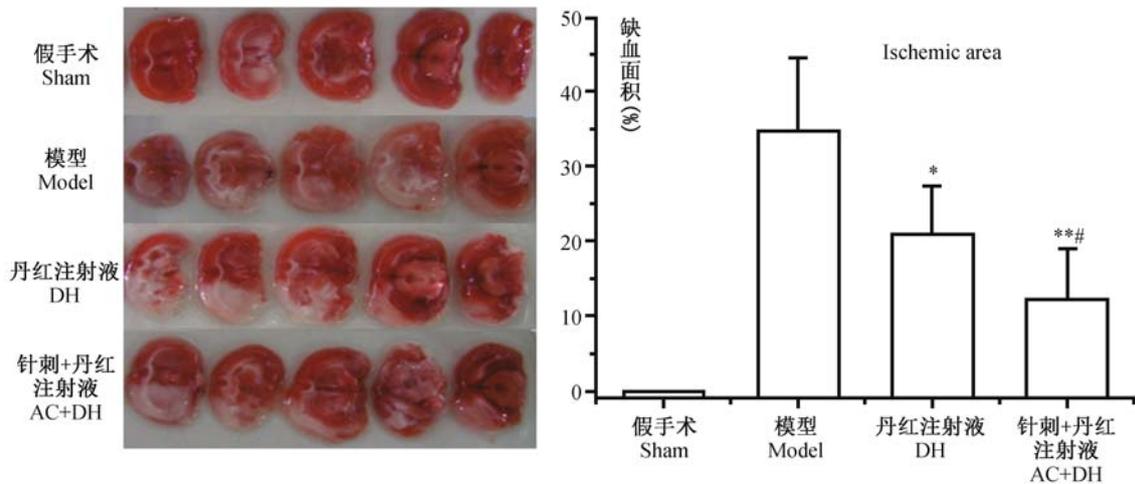
Fig. 1 The effects of acupuncture combined with Danhong injection on the neurological deficit scores of the rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ ).

### 2.2 针刺结合丹红注射液对 MCAO 大鼠脑缺血面积的影响

与模型组比较,给予丹红注射液后大鼠脑缺血面积减少,而结合针刺后脑缺血面积减少更明显,与模型组和单用丹红注射液组比较差异均有显著性( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),说明针刺结合丹红注射液能明显抑制模型大鼠脑缺血,其效果好于单用丹红注射液,见图 2。

### 2.3 针刺结合丹红注射液对 MCAO 大鼠缺血侧脑皮质区 Bcl-2/Bax 蛋白表达水平的影响

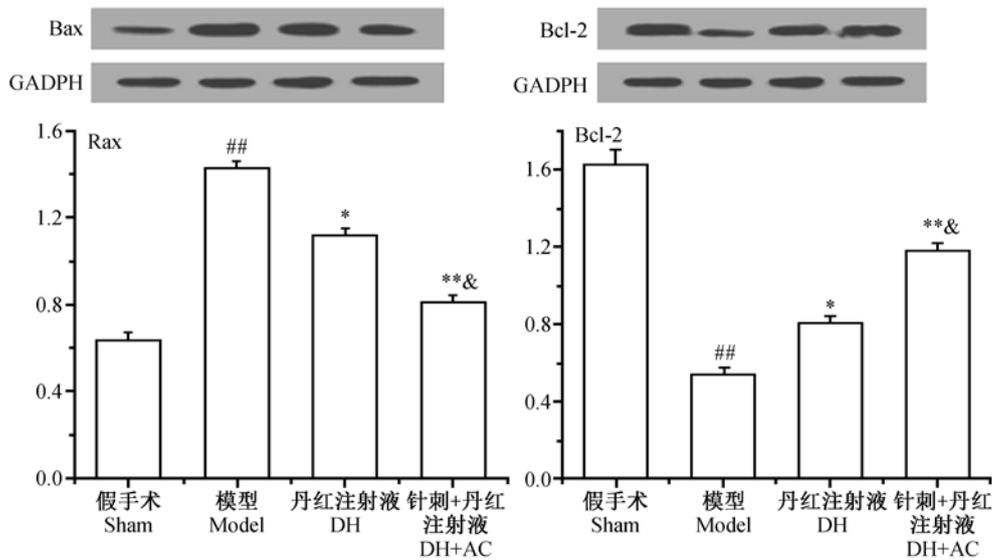
与模型组比较,给予丹红注射液后大鼠脑缺血侧皮质区 Bcl-2 蛋白表达增加,Bax 蛋白表达降低( $P < 0.05$ ),而结合针刺后脑缺血皮质区 Bcl-2 蛋白表达增加更明显,Bax 蛋白表达降低更显著( $P < 0.01$ ),与模型组和单用丹红注射液组比较差异均有显著性( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),说明针刺结合丹红注射液能更明显抑制模型大鼠脑缺血侧皮质区凋亡相关蛋白的表达,其效果好于单用丹红注射液,见图 3。



\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. 模型组; # $P < 0.05$  vs. 丹红注射液组

图 2 针刺结合丹红注射液对 MCAO 大鼠脑缺血面积的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 2 The effects of acupuncture combined with Danhong injection on infarct volume in the rat brains ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ ).



( $\bar{x} \pm s, n = 5$ ) \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. 模型组; ## $P < 0.01$  vs. 假手术组; & $P < 0.05$ , vs. 丹红注射液组

图 3 针刺结合丹红注射液对 MCAO 大鼠缺血侧脑皮质区 Bcl-2/Bax 蛋白表达水平的影响

Fig. 3 Effect of acupuncture combined with Danhong Injection on Bcl-2 and Bax expression levels in the ischemic penumbra cortex. ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

### 3 讨论

大脑中动脉栓塞 (MCAO) 模型是目前用来评价急性慢性脑缺血再灌注损伤药物最为经典的模型, 此模型与人类脑卒中病理生理过程最为接近。通过闭塞大脑中动脉 2 h 后再复灌, 使大脑中动脉供应区的血流先减少或全无后再恢复血液和氧气供

应, 造成脑组织缺血缺氧, 能量代谢障碍, 导致神经细胞坏死或凋亡, 与临床局灶性脑缺血的发病过程和机制基本类似。此模型可以用来定性、定量地观察缺血脑组织的病理生理变化和评价治疗的疗效。神经功能缺陷评分和脑梗死面积是评价脑缺血再灌注损伤程度的重要指标之一。以往研究发现, Bcl-2 表达高低与脑缺血再灌注损伤的严重程度密

切相关,在缺血再灌注损伤的动物模型中,Bcl-2 表达量与神经细胞凋亡数量呈负相关,Bcl-2 基因被敲除后,神经功能缺陷变严重,梗死面积会扩大,会加剧脑缺血再灌注后的神经细胞损伤<sup>[7]</sup>。Bax 被称为“死亡基因”,表达过多则促进细胞凋亡,加重缺血再灌注损伤。故脑缺血再灌注损伤后 Bcl-2 和 Bax 表达的比例决定着细胞在凋亡信号的作用下是否出现凋亡及凋亡的发生率,当 Bax 蛋白表达占优势时促进细胞发生凋亡,而当 Bcl-2 蛋白表达占优势时则抑制细胞凋亡<sup>[8]</sup>。

本实验采用了 Zea-Longa 评分法对神经功能缺陷进行评分,采用可以快速对梗塞范围能够直观定量的 TTC 染色法对梗死区域进行检测,Western blot 法检测了模型大鼠缺血侧脑皮质区 Bcl-2 和 Bax 蛋白水平,探讨针刺结合丹红注射液对脑缺血再灌注的神经保护作用。结果显示与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺陷评分明显升高,脑缺血面积明显增加,脑组织内 Bax 蛋白表达显著升高,而 Bcl-2 蛋白表达显著降低,此实验结果与文献报道一致<sup>[9]</sup>,充分证实了模型复制成功。与模型组比较,丹红注射液组大鼠神经功能缺陷评分降低,缺血面积减少,脑缺血皮质中 Bcl-2 蛋白表达升高,而 Bax 蛋白表达降低。同时应用针刺后,以上指标的变化更明显,且与丹红注射液组比较均有显著性差异。以上结果提示,丹红注射液对脑缺血再灌注损伤具有一定的保护作用,但结合针刺后效果更明显,故临床上对于脑缺血性疾病的治疗可静脉滴注丹红

注射液后再给予针刺治疗,可进一步提高疗效。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion — from mechanism to translation [J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1391 - 1401.
- [ 2 ] 曹向阳, 徐建辉, 曹彪. 丹红注射液的临床应用研究进展 [J]. *中西医结合心血管病杂志*, 2011, 8(3): 349 - 351.
- [ 3 ] 曹健, 周美启. 近三年针刺防治脑血管疾病作用机制研究概况 [J]. *安徽中医学院学报*, 2008, 27(5): 61 - 64.
- [ 4 ] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84 - 91.
- [ 5 ] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 中国中医药出版社, 2008: (2): 255 - 256.
- [ 6 ] Hou J, Tian J, Jiang W, et al. Therapeutic effects of SMND-309, a new metabolite of salvianolic acid B, on experimental liver fibrosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 650(1): 390 - 395.
- [ 7 ] Antezana DF, Clatterbuek RE, Alkayed NJ, et al. High-dose ibuprofen for reduction of striatal infarcts during middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *J Neurosurg*, 2003, 98(4): 860 - 866.
- [ 8 ] Li JS, Zhang W, Kang ZM, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning reduces chemia reperfusion injury by inhibition of apoptosis via mitochondrial pathway in rat brain [J]. *Neuroscience*, 2009, 159(4): 309 - 1315.
- [ 9 ] He Y, Wan HT, Du YG, et al. Protective effect of Danhong injection on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(2): 387 - 394.

[ 修回日期 ] 2015-11-17



## 子午沙鼠的室内繁殖特征

徐艺玫<sup>1</sup>, 廖力夫<sup>1</sup>, 史深<sup>1</sup>, 叶尔兰<sup>2</sup>, 罗芸<sup>1</sup>, 赵红琼<sup>2</sup>,

(1. 新疆实验动物研究中心, 乌鲁木齐 830002; 2. 新疆农业大学, 畜牧科学院, 乌鲁木齐 830002)

**【摘要】** 目的 了解和掌握子午沙鼠在实验室内繁殖特征。方法 根据1996~2002年实验室饲养的子午沙鼠记录数据, 推导雌雄体的性成熟期和雌体妊娠期, 统计分析不同胎次和月份每窝产仔数、离乳数、成活率和性比结果。结果 雌雄体的性成熟期分别为(109.3±21.0)d和(106.3±21.7)d, 妊娠期为(21.3±1.4)d; 1~7胎各胎次之间出生数和离乳数差异不显著( $P>0.05$ ), 而第4胎和第6胎的成活率低于平均胎仔数, 但差异无显著性( $P>0.05$ ); 1~7胎之间雌雄百分比差异没有显著性( $P>0.05$ ), 各胎次平均雌雄比例为1.4:1.0。在12个月份中, 9月~11月停止繁殖, 其它各月份之间每窝出生数之间差异不显著( $P>0.05$ ), 每窝离乳数和成活率在部分月份之间差异有显著性( $P<0.05$ )。结论 与野生子午沙鼠繁殖数据比较, 实验室驯化对子午沙鼠繁殖有影响, 主要为季节繁殖提前到12月, 繁殖窝数增加1~2窝。本结果为该鼠种实验动物化研究提供参考。

**【关键词】** 子午沙鼠; 繁殖; 性成熟期; 成活率; 性别

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0067-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.02.014

## Reproductive performance of indoor-housed *Meriones meridianus*

XU Yi-mei<sup>1</sup>, LIAO Li-fu<sup>1</sup>, SHI Shen<sup>1</sup>, YE Er-lan<sup>2</sup>, LUO Yun<sup>1</sup>, ZHAO Hong-qiong<sup>2</sup>

(1. Center for Laboratory Animal Research of Xinjiang, Urumqi 830002, China.

2. Agricultural University of Xinjiang, Academy of Animal Husbandry Sciences, Urumqi 830002)

**【Abstract】** **Objective** The purpose of this study was to investigate the reproductive characteristics of indoor-housed *Meriones meridianus*. **Methods** According to the data of *Meriones meridianus* from 1996 to 2002 in the Center for Laboratory Animal research of Xinjiang, the sexual maturity period of male and female animals, the gestation period of female animals, the litter size, weaning rate, survival rate, sex ratio per month and different fetal times were statistically analyzed. **Results** Sexual maturity period of male and female animals was 109.3±21.0 days and 106.3±21.7 days, and gestation period of female animals was 21.3±1.4 days. The litter size, weaning rate of different fetal times showed no significant difference compared between those of the first to seventh litter ( $P>0.05$ ), and the survival rate of fourth and sixth litter were lower than that of the average offspring per litter, but the difference was no significant ( $P>0.05$ ). The sex ratio of from first to sixth litter indicated no significant difference ( $P>0.05$ ), and the average proportion of male and female was 1.4:1.0. During a year, the animals almost stopped to reproduce from September to November, however, the differences of litter size between the other months were statistically not significant ( $P>0.05$ ), the weaning rate and survival rate per month suggested a significant difference ( $P<0.05$ ) between some of the months. **Conclusions** Compared with the background data of wild *Meriones meridianus*, the laboratory reproduction of *Meriones meridianus* show some differences, mainly, the season of breeding is shifted to December, and the number of reproduction increased by one or two litters. Our results provide useful reference for laboratory animalization of *Meriones meridianus*.

[基金项目] 国家自然科学基金(编号:31460579)。

[作者简介] 徐艺玫(1973-), 女, 研究方向: 实验动物管理与动物模型。E-mail: xymeimei@163.com。

[通讯作者] 廖力夫(1957-), 男, 研究方向: 鼠类控制与驯化 Email: Liaolif@21cn.com。

【Key words】 *Meriones meridianus*; Breeding; Sexual maturity period; Survival rate; gender; Indoor housing

子午沙鼠 (*Meriones meridianus*) 属啮齿目 (*Rodentia*), 仓鼠科 (*Cricetidae*), 沙鼠亚科 (*Gerbillinae*), 沙鼠属 (*Meriones*) 小型啮齿动物, 分布于欧亚大陆中部荒漠、半荒漠区, 子午沙鼠是沙鼠种类中分布最广的鼠种之一<sup>[1]</sup>, 亚种分类不下十种<sup>[2]</sup>。目前实验室繁殖的是叶氏亚种 (*M. meridianus*, Jie Wang 1964)<sup>[1,3]</sup> 和叶城亚种 (*M. m. cryptorhinus* Blanford 1875)<sup>[4,5]</sup>, 前者体重只有后者体重三分之二, 体长在 105 ~ 155 mm, 体躯背面毛浅棕黄色至沙黄色, 基部暗灰色, 中段沙黄色, 毛尖黑色; 腹面从毛基到毛尖为纯白色或黑色; 尾毛上下一色棕黄或棕色, 有的尾下面稍淡或杂生白毛。在沙鼠属中, 子午沙鼠具有体积小、性情温和、繁殖力强、性成熟早、易驯养等特点<sup>[5]</sup>。虽然子午沙鼠人工驯化已有 20 多年, 并已成功开展了多项动物实验研究<sup>[3,6-9]</sup>, 但到目前为止, 尚无子午沙鼠叶氏亚种的详细实验室内繁殖的相关报道。本文就新疆实验动物研究中心 1996 ~ 2002 年子午沙鼠叶氏亚种繁殖和发育等情况进行统计和分析, 以期为该鼠的实验动物化和生物学研究提供基础资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物来源及饲养过程

子午沙鼠叶氏亚种 13 只 (7 ♀, 6 ♂), 1996 年捕捉于新疆吐鲁番盆地, 饲养在新疆实验动物研究中心动物饲养室内。饲养环境温度 18℃ ~ 23℃, 相对湿度 30% ~ 50%, 光照与黑暗的比为 12:12 光循环。饲养室定期清扫消毒, 保持空气流通。野外捕获的子午沙鼠配对中易发生打斗, 造成受伤或死亡, 所以配对时选择一雌一雄或二雌一雄配对, 观察几个小时如没有打斗, 可以确定并填写记录。子午沙鼠的繁殖卡片记录包括编号、出生年月日、合笼日期、配对日期、产仔日期、产仔数、成活数和性别等。

### 1.2 饲料和垫料

饲料为新疆实验动物研究中心提供的鼠繁殖饲料 (饲料生产许可证号: SCXK (新) 2002 - 0002, 其中每公斤粗蛋白 ≥ 200 g, 粗脂肪 ≥ 40 g, 粗纤维 ≤ 50 g 等); 垫料为新疆实验动物研究中心提供的木屑垫料; 饮用水为自制纯化水。饲料经传递窗消毒后使用; 垫料、纯化水经蒸汽高压消毒后使用。

### 1.3 统计指标及方法

数据来源于 1996 年 - 2002 年间新疆实验动物研究中心饲养繁殖子午沙鼠, 主要指标: (1) 窝仔数: 指每窝产仔数 (只/窝); (2) 胎仔数: 指每只雌体解剖看到的子宫斑或胚胎数 (个/只); (3) 离乳数: 指 20 d ~ 30 d 断奶时每窝成活的幼鼠数量; (4) 成活率: 离乳数/出生数 × 100%; (5) 妊娠期: 指每只雌体受孕后至胎仔出生的时期; (6) 雄体性成熟期: 指雄体自出生到具有正常繁殖能力的发育阶段; (7) 雌体性成熟期: 指雌体出生到具有正常繁殖能力的发育阶段。统计结果以平均值 ± 标准误 (Mean ± SEM) 表示, 各指标之间差异比较用 SPSS 16.0 软件进行统计, 差异显著具有统计学意义用  $P < 0.05$  表示。

## 2 结果

### 2.1 妊娠期

16 窝统计结果显示, 平均妊娠期为 (21.3 ± 1.4) d, 其中产后孕占 12.6% (16/127)。

### 2.2 雄体性成熟期

16 只雄体统计结果显示, 平均雄体性成熟为 (106.3 ± 21.7) d (65 ~ 134)。

### 2.3 雌体性成熟期

13 只雌体统计结果显示, 平均雌体性成熟为 (109.3 ± 21.0) d (65 ~ 144)。

### 2.4 窝仔数分布状况

218 窝繁殖结果显示 (表 1), 4 只/窝所占比例最高, 达 22.48%, 其次为 3、5 和 6 只/窝。

表 1 子午沙鼠室内繁殖产仔数分布比例  
Tab. 1 Distribution and proportion of litter size of *M. meridianus* in indoor breeding

只/窝 Num/Litter	窝数 Number	比例 (%) Ratio
1	22	2.75
2	20	9.17
3	40	18.35
4	49	22.48
5	40	18.35
6	30	13.76
7	13	5.96
8	4	1.83
合计 total	218	100

**表 2** 胎次对实验室繁殖的子午沙鼠的出生数量、离乳数和成活率的影响

**Tab. 2** The effect of birth order on the birth number, weaning number and survival rate of *M. meridianus* in indoor breeding

胎次 Parity	样本量(n) Sample size	平均值 ± 标准差 (mean ± sem)		
		出生数* Birth number	离乳数* Weaning number	成活率* survival rate
第 1 胎 First	157	4.0 ± 0.1	2.5 ± 0.2	62.8 ± 3.4
第 2 胎 Second	104	4.2 ± 0.1	2.6 ± 0.2	59.4 ± 4.2
第 3 胎 Third	60	4.0 ± 0.3	2.4 ± 0.3	60.2 ± 8.2
第 4 胎 Fourth	39	4.2 ± 0.3	1.9 ± 0.3	45.7 ± 7.2
第 5 胎 Fifth	20	4.4 ± 0.0	2.4 ± 0.0	63.1 ± 10
第 6 胎 Sixth	10	4.9 ± 0.0	2.3 ± 1.0	45.2 ± 13
第 7 胎 Seventh	5	5.2 ± 1.0	3.6 ± 1.0	73.3 ± 19

\*:各胎次之间出生数量,离乳数和成活率差异无显著性( $P > 0.05$ )。

Note. No significant differences between the birth numbers, weaning numbers, survival rates among different parities ( $P > 0.05$ ).

**表 3** 月份对室内子午沙鼠出生数量、离乳数和成活率的影响

**Tab. 3** The effect of the month on the birth number, weaning number and survival rate of *M. meridianus* in indoor breeding

月份 Month	繁殖雌鼠数(只) Number of breeding females (n)	只/窝 (Number / litter)		平均成活率(%) Average survival rate(%)
		平均窝出生数 Average number of a litter	平均离乳数 Average weaning number	
1 月	35	4.5	1.7	42.4 <sup>3,4,5,6,7</sup>
2 月	77	4.2	2.6	60.6
3 月	46	4.0	2.7	64.7 <sup>1</sup>
4 月	50	4.4	2.2	46.5 <sup>1,5,7</sup>
5 月	51	4.1	2.71	64.8 <sup>1,4</sup>
6 月	60	4.0	2.3	62.2 <sup>1</sup>
7 月	51	3.9	2.61	68.1 <sup>1,4</sup>
8 月	22	4.5	3.01	67.7
9 月	1	2.0	2.0	100.0
10 月	0	0	0	0
11 月	0	0	0	0
12 月	19	4.1	1.8	49.8

注:上标数字表示同相应月份(除了9月~11月外)差异显著( $P < 0.05$ )。

Note. Superscript numbers indicate that the same corresponding months (except from September to November) with significant difference ( $P < 0.05$ ).

### 2.5 胎次对窝仔数、离乳数和成活率的影响

各胎次间每窝出生数量和离乳数量差异无显著性( $P > 0.05$ ),窝出生数量和离乳数均值分别为  $4.1 \pm 0.1$  只/窝和  $2.4 \pm 0.1$  只/窝,结果见表 2。第 4 和第 6 胎次的成活率明显低于其它胎次,差异无显著性( $P > 0.05$ ),7 个胎次平均成活率为  $59.5 \pm 2.3\%$ ,结果见表 3。

### 2.6 胎次对性别的影响

如图 1 所示,各胎次雌雄之间差异无显著性( $P > 0.05$ ),雌雄比为 1.4:1.0,雌性明显大于雄性。

### 2.7 季节对繁殖和成活率的影响

结果显示(表 2),每年 2 月和 6 月各有一个繁殖高峰期,9 月份仅有 1 只子午沙鼠产仔,10 月和 11 月份停止繁殖。除了 9 月~11 月外,各月份之间每窝出生数量之间差异不显著( $P > 0.05$ ),而每胎离乳数和成活率在部分月份之间有显著差异( $P < 0.05$ ),平均成活率为  $59.5 \pm 2.3\%$ ,其中 12 月,1 月和 4 月的成活率低于 50%。

## 3 讨论

### 3.1 子午沙鼠妊娠期和性成熟期的判定

本实验所得到的 21.3 d 妊娠期与蒋卫等<sup>[4]</sup>对子午沙鼠叶城亚种的结果(29.7 d)相差较大,可能是蒋卫等<sup>[4]</sup>以配对日到产仔日的间隔时间为依据,而本实验是以雌体子午沙鼠生产两窝间隔日的最短时间为依据,即产后孕,用产后孕作为妊娠的起始日,得到的妊娠期结果应该更准确。

影响观察性成熟的因素较多,在繁殖期,雄体或雌体任何一方没有进入繁殖状态,或一方没有性成熟,配对后不可能怀孕,因此本文以雄体出生日到配对后,雌体产仔日期的最短间隔时间减去妊娠期作为雄体的性成熟期,以雌体出生日至配对后,雌体产仔日期的最短间隔时间减去妊娠期作为雌体性成熟期。从野外解剖的子午沙鼠繁殖<sup>[13]</sup>记录结果看,每年夏末部分当年早春出生的个体参与当年繁殖的现象,可以作为验证本实验雌雄个体性成熟的野外依据。

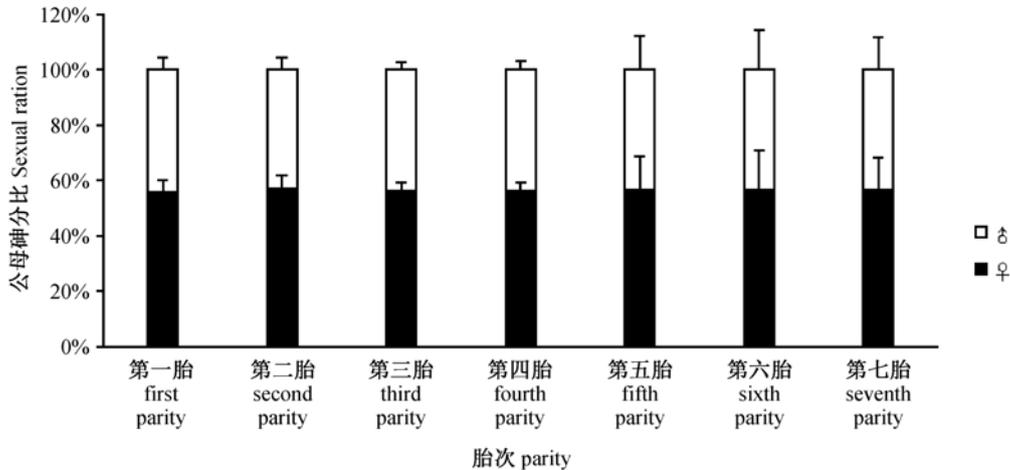


图 1 胎次对性别的影响

Fig. 1 The effect of birth order on the gender of *M. meridianus*

### 3.2 子午沙鼠窝仔数与胎仔数的区别

1996~2002 年实验室共繁殖子午沙鼠叶氏亚种 901 只,窝仔数范围为 1-8 只,平均窝仔数为 4.1 只,明显少于内蒙古北部草原(6.04 只)<sup>[6]</sup>、宁夏灵武县(5.47 只)<sup>[7]</sup>、内蒙西部荒漠(5.12 只)<sup>[11]</sup>、蒙古国境内(5.0 只)<sup>[12]</sup>和甘肃(4.9 只)<sup>[12]</sup>等野外调查的胎仔数结果<sup>[15]</sup>,其差异主要是实验室是以窝仔数来衡量,主要观察每窝实际出生幼体数量,死胎或吸收胎数量一般无法获得,而野外是以解剖的子宫斑或胚胎数为准,死胎或吸收胎数据都能得到,也就是胎仔数为观察依据,因此才会出现胎仔数高于窝仔数的结果。

### 3.3 室内繁殖和野外繁殖的比较

从野生环境获得的子午沙鼠繁殖规律看,每年 2 月(春季)开始繁殖,10 月(秋季)有少量个体参与繁殖,且各地的繁殖时间略有差别,成体一般每年繁殖 2-3 窝,4 月和 7 月各有一个繁殖高峰,6 月下旬的妊娠率较低<sup>[10-13,16]</sup>。与野生环境的子午沙鼠繁殖规律比较,实验室内的子午沙鼠繁殖时间明显提前,每年 12 月开始繁殖,两个繁殖高峰分别各提前 2 个月(2 月份)和 1 个月(6 月份),只有 10 和 11 月份没繁殖个体。因实验室环境和饲养条件比较稳定,各月份的平均成活率较接近,为 59.5%,只有 12 月,1 月和 4 月的成活率低于 50%。从年繁殖窝数看,室内一般可繁殖 3 窝,多的可以繁殖 5 窝,明显高于野生环境的繁殖窝数。

#### 参考文献:

[1] 张荣祖. 中国哺乳动物分布 [M]. 北京:中国林业出版社.

1997:219-221.

- [2] 王延正. 陕西啮齿动物志 [M]. 西安:陕西师范大学出版社. 1992:140-143.
- [3] 廖力夫,黎唯. 温度光照条件对灰仓鼠和子午沙鼠的繁殖影响 [J]. 上海实验动物科学, 1999, 19(2):27-29.
- [4] 蒋卫,郑强,张兰英. 人工饲养条件下子午沙鼠的繁殖特征 [J]. 兽类学报, 1995, 15(1):75-76.
- [5] 孟雁,关崇谦,周宝忠. 子午沙鼠实验室人工饲养繁殖初探 [J]. 中国实验动物学杂志, 1991, 3(3.4):284.
- [6] 赵素元,廖力夫,邹林樾. 子午沙鼠感染戊型肝炎病毒传代的实验研究 [J]. 中国媒介生物学及其控制杂志, 2001, 12(3):215-217.
- [7] 伊斯拉音,焦伟,廖力夫,等. 子午沙鼠和灰仓鼠实验感染多房棘球蚴的比较观察 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1998, 16(2):130-132.
- [8] 伊斯拉音,焦伟,廖力夫,等. 子午沙鼠和草原兔尾鼠实验感染细粒棘球蚴和多房棘球蚴的实验研究 [J]. 地方病通报, 2000, 15(3):71-74.
- [9] 陈亮,易成朋,谢其鑫,等. 放射治疗对子午沙鼠骨棘球蚴囊病理改变的影响 [J]. 中华地方病学杂志, 2013, 32(4):389-394.
- [10] 周宗汉,刘昌威,罗远才. 河西荒漠子午沙鼠的生态学初步观察 [J]. 四川动物, 1985, (1):10-13.
- [11] 宋恺,刘荣堂. 子午沙鼠的生态研究 [J]. 兽类学报, 1984, 4(4):291-300.
- [12] 赵肯堂. 子午沙鼠的繁殖调查 [J]. 四川动物, 1985, 2:17-19.
- [13] 李枝林,秦长育,韩建芳. 子午沙鼠生态学的初步研究 [J]. 兽类学报, 1988, 8(1):43-48.
- [14] 林纪春,张晓雪,王诚,等. 子午沙鼠生命表和繁殖的研究 [J]. 地方病通报, 2006, 21(2):5-7.
- [15] 周延林,王利民,鲍伟东,等. 子午沙鼠种群繁殖特征分析 [J]. 兽类学报, 1999, 19(1):62-67.
- [16] 张福顺,付和平,武晓东,等. 荒漠区子午沙鼠种群数量动态及其预测 [J]. 草业科学, 2011, 28(3):454-458.

[修回日期]2015-12-17



# 强志组方对多发性抽动症复合恐惧行为大鼠的影响

金 枝<sup>1</sup>, 阎兆君<sup>2</sup>, 李亚群<sup>1</sup>, 赵兴友<sup>1</sup>, 吴金勇<sup>2</sup>, 裘雷鸣<sup>2</sup>

(1. 山东中医药大学, 济南 250000; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250000)

**【摘要】** 目的 探究强志组方治疗多发性抽动症(TS)复合恐惧行为的作用机制。方法 腹腔注射亚氨基二丙腈(IDPN)建立TS大鼠模型后,进一步声电刺激建立TS复合恐惧大鼠模型,给予不同药物灌胃治疗后,采用旷场试验、行为学检测大鼠行为变化,高效液相法(HPLC)检测脑组织中多巴胺(DA)的含量,免疫组织化学法检测酪氨酸羟化酶(TH)的含量,RT-PCR检测TH mRNA的表达。结果 与正常对照组相比,模型对照组刻板行为、运动行为增加,冻结时间延长,脑组织中DA、TH、TH mRNA含量无明显变化;与模型对照组相比,强志组方组刻板行为、运动行为减少,冻结时间缩短,脑组织中DA、TH、TH mRNA含量减少。结论 强志组方可改善模型大鼠抽动复合恐惧行为,其作用机制可能是通过下调TH mRNA表达,降低TH含量,减少DA合成实现的。

**【关键词】** 强志组方;多发性抽动症;恐惧行为;多巴胺;酪氨酸羟化酶;

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0071-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.02.015

## Effect of “Qiangzhizufang” on the rat model of Tourette syndrome combined with fear

JIN Zhi<sup>1</sup>, YAN Zhao-jun<sup>2</sup>, LI Ya-qun<sup>1</sup>, ZHAO Xing-you<sup>1</sup>, WU Jin-yong<sup>2</sup>, XI Lei-ming<sup>2</sup>

(1. Shandong University of TCM, Jinan 250014, China; 2. Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250014)

**【Abstract】 Objective** To explore the functional mechanism of a Chinese medicine compound “Qiangzhizufang” on rat model of Tourette syndrome (TS) combined with fear. **Methods** The rat model of TS combined with fear was established by intraperitoneal injection of 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN) combined with acoustic stimulation. After giving different drug lavage treatment, the changes of behavior of the rat models were assessed by field test and behavior test. The content of DA, TH and TH mRNA in the brain tissue was detected by HPLC, immunohistochemistry and RT-PCR, separately. **Results** Compared with the normal control group, stereotyped behavior and exercise behavior were increased, freezing time prolonged, but the content of DA, TH and TH mRNA in the brain tissue were not obviously changed in the model control group. Compared with the model control group, the stereotyped behavior and exercise behavior were decreased, content of DA, TH and TH mRNA in the brain tissue was decreased in the “Qiangzhizufang” group. **Conclusions** The Chinese medicine compound “Qiangzhizufang” can improve the behavior in rat models of TS combined with fear. This effect may be realized through down-regulating TH mRNA expression, reducing the content of TH, and reducing the dopamine synthesis.

**【Key words】** Qiangzhizufang, a Chinese medicine compound; Tourette syndrome, TS; Fear behavior; Dopamine; (DA); Tyrosine hydroxylase (TH); Brain; Rat

[基金项目] 山东省科技发展计划项目(编号:2009GG20002048)。

[作者简介] 金枝(1986-),女,研究方向:中医儿科学。E-mail: jinzi-1986@163.com。

[通讯作者] 阎兆君(1963-),男,研究方向:中医儿科学。Email: yanzhaojun7790@sina.com。

多发性抽动症(Tourette syndrome, TS)是儿童时期常见的精神行为性疾病,且在疾病的发生和发展过程中常常伴随恐惧行为等临床表现<sup>[1]</sup>。目前本病的发病机制仍不十分明确,普遍认为本病的发病与神经递质系统的异常有关。部分研究表明患儿脑纹状体存在多巴胺(dopamine, DA)活动过度现象<sup>[2]</sup>。酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)是 DA 合成过程中的限速酶,其含量影响 DA 的生成,两者之间密切关系。强志组方由巴戟天、制远志、茯神、清半夏、天麻、山药、大枣等药物组成,具有强志定意,安神助勇之效,临床上用于治疗多发性抽动症,已取得显著疗效<sup>[3]</sup>。本研究基于 3,3'-氨基二丙腈((3,3'-iminodipropionitrile, IDPN)诱导的 TS 大鼠模型,与恐惧行为模型相复合建立复合大鼠模型,观察强志组方对大鼠模型行为学及脑组织中 DA、TH、TH mRNA 的影响,以探讨强志组方的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及实验环境

SD 雄性大鼠,48 只,体重(200 ± 20)g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号为 SCXK(京)2014-0004,质量合格证号 11401300018142。实验在山东中医药大学附属医院动物实验室进行,许可证号:SYXK(鲁)2011 0019。

### 1.2 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(Agilent),用于含量测定。RM 2235 转轮式切片机(Leica)、TP 1020 自动脱水机(Leica)、ST 5020 多功能染色机(Leica)用于免疫组化检测。ABI7500 PCR 仪(AB & Invitrogen)用于 PCR 检测。

强志组方是由巴戟天、制远志、茯神、清半夏、天麻、山药、大枣等药物组成,购自山东中医药大学附属医院药剂科。硫必利片,购自江苏恩华药业集团有限公司,批号为 201306181。IDPN 购自 Sigma 公司。DA、NE 标准品均购自中国药品生物制品检定所。一抗 Rb a tyrosine hydroxylase 购自北京博奥森生物技术有限公司。SP 检测试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。TRIZol、逆转录试剂盒购、荧光定量试剂盒购自于天根生化科技有限公司。

### 1.3 动物实验

1.3.1 造模方法:大鼠适应性喂养 1 周,腹腔注射

IDPN,300 mg/kg,1 次/d,连续注射 7 d,诱导大鼠出现抽动症状。抽动造模完成后,适应性喂养 1 周。将大鼠单独放入声电刺激仪,前 5 min 为适应期,之后给予 2 S 噪声信号(“滴滴”两声)并紧跟 1 S 电击(2 mA),间隔 1 min,每天 30 次,共 5 d。第 6、7 天实验只予噪音信号,不予电击;声电刺激连续重复 3 周。

1.3.2 分组与给药:大鼠随机分为正常对照组、TS 复合恐惧行为组(简称模型对照组)、强志组方组(5 g/kg)、硫比利组(25 mg/kg),每组 12 只。连续灌服 4 周,正常对照组、模型对照组同时灌服等量生理盐水。末次给药后禁食不禁水 24 h,断头取脑,冰盒上快速剥离大鼠脑组织,拍照,电子天平称重,分装后冷冻保存待检测。

1.3.3 旷场试验:旷场试验综合评价抽动行为与恐惧行为。将动物置于旷场试验箱中(长×宽×高:100×100×50)cm,周壁为黑色,底面分成面积相等的 25 方格的旷场里。摄像记录动物 5 min 的行为,以穿越底面的格数为水平活动得分,以直立抬首的次数为垂直活动得分,旷场实验得分为两者之和。行为评定采用盲法,由 2 名观察者观看录像后评分,取其平均值,电脑记录其活动轨迹。

1.3.4 刻板行为与运动行为测试:在安静、避光环境下,将大鼠放置于旷场试验箱中适应 5 min,按照文献<sup>[4]</sup>中对 TS 大鼠模型刻板行为的评分方法,在末次给药 1 h 后,进行双盲观察 1 h,每 5 min 记录 1 次,并统计其总分平均值。评分标准见表 1。在进行刻板行为测试同时进行运动行为测试。按照文献方法<sup>[4]</sup>,在末次给药 1 h 后,进行双盲观察 1 h,每 5 min 记录 1 次,并统计其总分。评分标准见表 2。

表 1 刻板行为测试评分标准

评分 Scores	刻板行为 Stereotyped behavior
0 分	无刻板行为
1 分	旋转行为
2 分	头和颈部的上下运动过多
3 分	头、颈部的上下运动过多加旋转行为
4 分	头向侧摆合并头和颈部的上下运动过多

表 2 运动行为测试评分标准

评分 Scores	运动行为 Exercise behavior
0 分	安静或正常活动
1 分	过度兴奋
2 分	探究行为增加
3 分	跑
4 分	跑和跳

1.3.5 恐惧行为检测: 恐惧行为学检测通过冻结时间判定。模型对照组大鼠在第 6、7 天实验噪音后出现冻结姿势 (freezing posture), 表现为静止、呆滞、蜷缩、蹲伏等, 期间仅有呼吸和轻微摇摆运动。其总时间称为冻结时间 (freezing time), 冻结时间总时间(单位: s) 即为大鼠恐惧行为学得分。行为评定采用盲法, 单位以秒来计算。每测定完 1 组大鼠, 氨水清洁自主活动箱中大鼠排泄物, 以消除对下只鼠自主活动的影响。

1.3.6 脑组织中单胺类神经递质 DA 检测: 取脑组织 100 mg 放入玻璃匀浆器中, 加入高氯酸 500 mg, 充分匀浆, 离心(12 000 r/min, 15 min, 4℃), 仔细收集上清液, 经 0.20 μm 滤器过滤后取 20 μL 注入高效液相色谱仪中。色谱条件: 固定相分析柱为 C18 反相色谱柱(250 × 4.6 mm), 流动相组成 A 为 0.02 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液, B 为乙腈。流速为 1 mL/min。柱温保持在 35℃, 荧光检测器波长设置为: 激发波长 280 nm, 荧光波长 315 nm, 以峰面积定量, 根据标准曲线计算出大鼠脑组织内 DA 含量。

1.3.7 脑组织中 TH 的检测: 免疫组织化学法检测大鼠脑组织中 TH。大鼠脑组织用 4% 中性甲醛固定 24 h, 石蜡包埋, 切片, 常规脱蜡至水, 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min。含 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的去离子水孵育 15 min, 以消除内源性过氧化物酶活性。滴加试剂 A(蓝色液体)室温孵育 15 min, 倾去液体。滴加一抗, 4℃ 过夜。第 2 天取出后室温平衡 10 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。滴加试剂 B(黄色液体), 37℃ 孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。滴加试剂 C(橙色液体), 37℃ 孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。DAB 显色试剂盒显色, 自来水充分浸泡冲洗, 苏木素染液复染 5 s, 脱水至透明, 中性树脂胶封片。同时 PBS 代替一抗作为阴性对照, 显微镜下观察细胞胞质或胞浆呈棕色或者棕黄色颗粒为阳性, 不显色为阴性。每组选取 10 张片, 光学显微镜 200 倍随机选取 10 个不重叠视野, 采用 Leica Qwin V3 图像分析软件, 对染色结果进行评分, 在 200 倍镜下随机选取 4 个视野, 进行灰度值测定, 取平均值。

1.3.8 脑组织中 TH mRNA 的检测: RT-PCR 检测脑组织中 TH mRNA 的含量。(1) TRIzol 试剂提取总 RNA: 取脑组织 100 mg, 液氮冷冻后低温充分研磨, 加入 1 mL TRIzol 试剂, 静置 5 min, 加入氯仿 0.2 mL 混匀后室温放置 3 min, 离心(4℃, 12 000

r/min) 取上清液 0.5 mL, 加入异丙醇 0.5 mL 混匀后室温沉淀 10 min, 离心(4℃, 12 000 r/min) 弃上清液, 加入 75% 乙醇(DEPC 水配置) 混匀, 离心(4℃, 7 500 r/min) 弃上清液, 沉淀(即模板 RNA) 略干后加入 DEPC 水 20 μL 备用。(2) RT 反应得 cDNA 模板: 将 10 × RT Mix 2 μL、Super pure dNTPs 2 μL、Oligo-(Dt)<sub>15</sub> 2 μL、Quant Reverse Transcriptase 1 μL 震荡混合均匀后加 RNase-free 双蒸 H<sub>2</sub>O 及模板 RNA, 保持总体积为 20 μL, 涡旋震荡混合均匀简单离心收集管壁残余液体, 37℃ 孵育 60 min, 得到逆转录产物 cDNA。(3) 使用 SYBR Green I master mix 试剂盒进行 PCR 扩增: SYBR Green PCR Master Mix 10 μL、上游引物 2 μL、下游引物 2 μL、模板 2 μL、dd H<sub>2</sub>O 4 μL(总计 20 μL), 均匀混合后入 PCR 仪进行扩增反应, 测定 TH mRNA 浓度。其中上游引物为 GCAGCCCTACCAAGATCAAA, 下游引物为 CGCTGGATACGAGAGGCATA。

#### 1.4 统计学方法

所有实验数据均以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 17.0 进行统计分析。计量资料组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 强志组方对复合大鼠模型自主活动的影响

与正常对照组相比, 模型对照组自主活动减少 ( $P < 0.05$ ); 与模型对照组相比, 硫必利组、强志组方组大鼠自主活动增多 ( $P < 0.05$ ); 与硫必利组相比, 强志组方组无明显变化 ( $P > 0.05$ )。(图 1)。

### 2.2 强志组方对复合大鼠模型刻板行为、运动行为的影响

与正常对照组相比, 模型对照组全部造模完成后刻板行为、运动行为增多 ( $P < 0.05$ ); 与模型对照组相比, 硫必利组、强志组方组刻板行为、运动行为均减少 ( $P < 0.05$ ); 与硫必利组相比, 强志组方组治疗刻板行为作用明显 ( $P < 0.05$ ), 治疗运动行为硫必利效果明显 ( $P < 0.05$ )。(图 2、图 3)。

### 2.3 强志组方对复合大鼠模型恐惧行为的影响

与正常对照组相比, 模型对照组全部造模完成后冻结时间延长 ( $P < 0.05$ ); 与模型对照组相比, 硫必利组、强志组方冻结时间缩短 ( $P < 0.05$ ); 与硫必利组相比, 强志组方组冻结时间明显缩短 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。

### 2.4 强志组方对复合大鼠模型脑组织内 DA 影

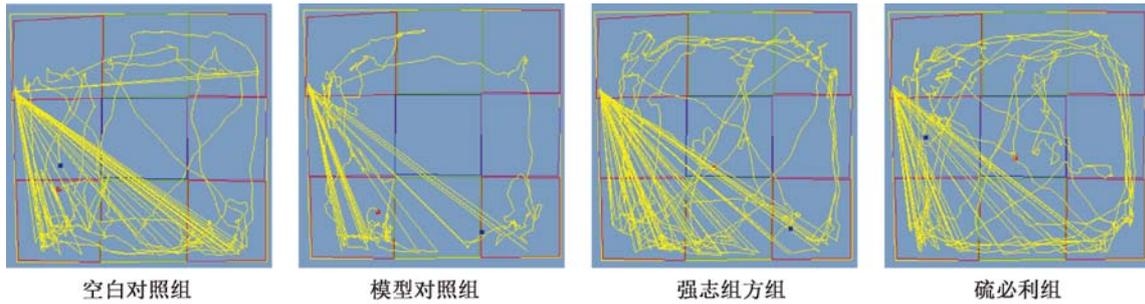


图 1 强志组方对大鼠模型自主行为的影响

Fig. 1 Effects of “Qiangzhizufang” on autonomous behavior in the model rats

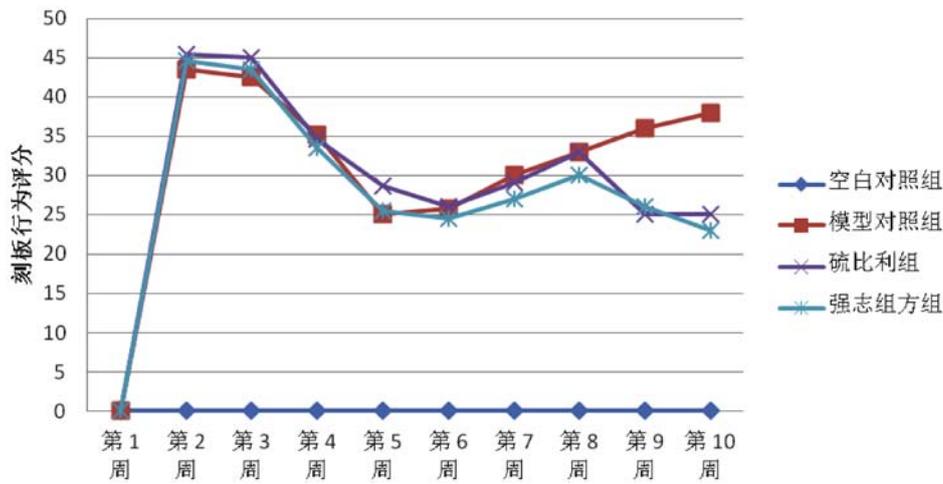


图 2 强志组方对大鼠模型刻板行为的影响

Fig. 2 The effects of “Qiangzhizufang” on stereotyped behavior in the model rats

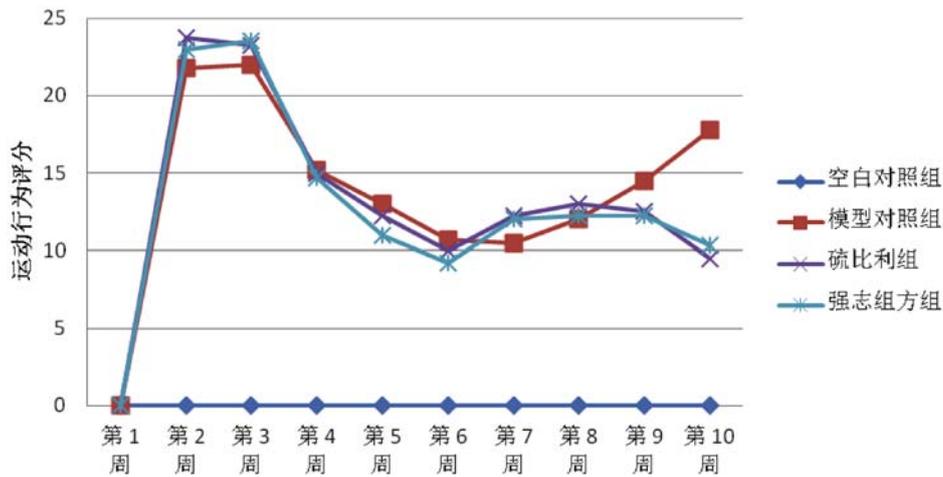


图 3 强志组方对大鼠模型运动行为的影响

Fig. 3 The effects of “Qiangzhizufang” on exercise behavior in the model rats

响

与正常对照组相比,模型对照组大鼠脑组织中 DA 含量无明显变化 ( $P > 0.05$ );与模型对照组相比,强志组方组大鼠脑组织中 DA 含量降低 ( $P < 0.05$ ) (表 3)。

### 2.5 强志组方对复合大鼠模型脑组织内 TH 的影响

应用 SP 染色方法观察各组大鼠脑组织中 TH 阳性率的变化,图 5 为各组大鼠脑组织 TH 免疫组化染色图片。与正常对照组相比,模型对照组大鼠脑组织中 TH 阳性率无明显变化 ( $P > 0.05$ );与模型对照组相比,强志组方组大鼠脑组织中 TH 阳性率降低 ( $P < 0.05$ ) (表 3)。

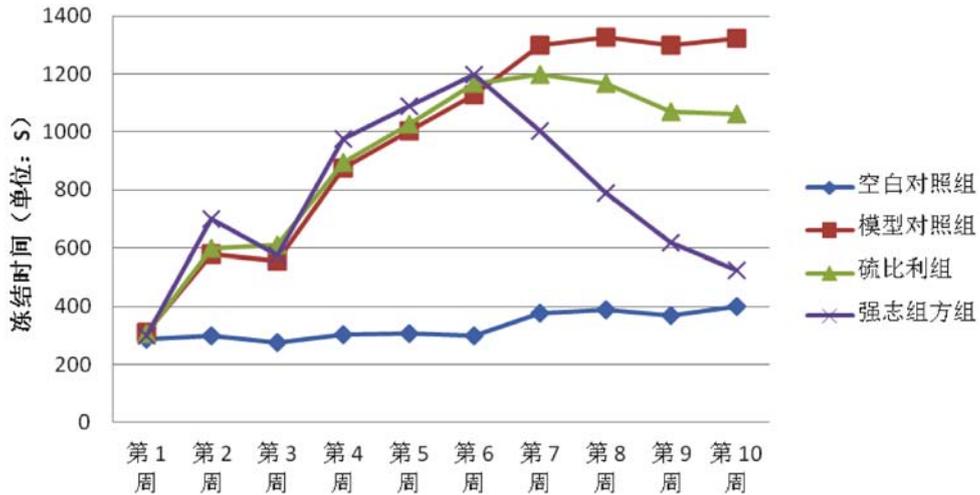


图 4 强志组方对大鼠模型冻结时间的影响

Fig. 4 The effects of “Qiangzhizufang” on freezing time in the model rats

表 3 强志组方对大鼠模型脑组织中 DA、TH、TH mRNA 含量的影响

Tab. 3 The effects of “Qiangzhizufang” on DA, TH, TH mRNA expression in the model rat brain tissue

组别 Groups	剂量 Doses	多巴胺 DA	酪氨酸羟化酶 TH	酪氨酸羟化酶 mRNA TH mRNA
正常对照组 Normal control	—	43.69 ± 8.52	203.07 ± 14.37	1.95 ± 0.20
模型对照组 Model control	—	42.12 ± 7.111 <sup>(1)</sup>	201.21 ± 20.421 <sup>(1)</sup>	1.99 ± 0.891 <sup>(1)</sup>
硫比利组 Tiapride	25 mg/kg	45.77 ± 8.28	206.36 ± 32.55	2.03 ± 0.19
强志组方组 Qiangzhizufang	5 g/kg	35.20 ± 9.462 <sup>(2)</sup>	167.42 ± 18.592 <sup>(2)</sup>	1.55 ± 1.212 <sup>(2)</sup>

注:与正常对照组相比,<sup>(1)</sup> $P > 0.05$ ;与模型对照组相比,<sup>(2)</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the normal control group, <sup>(1)</sup> $P > 0.05$ ; Compared with the model control group, <sup>(2)</sup> $P < 0.05$ .

### 2.6 强志组方对复合大鼠模型脑组织中 TH mRNA 的影响

与正常对照组相比,模型对照组大鼠脑组织中 TH mRNA 含量无明显变化 ( $P > 0.05$ );与模型对照组相比,强志组方组脑组织中 TH mRNA 含量降低 ( $P < 0.05$ ) (表 3)。

### 3 讨论

TS 属中医学抽搐、慢惊风等范畴,是儿童时期常见的精神行为性疾病。临床观察发现 TS 的抽动动作不自主、无目的、重复,发作时可受意识控制暂时停止抽动,但不能持久,缺乏控制力是本病的特点,且在疾病的发生和发展过程中常常伴随恐惧行

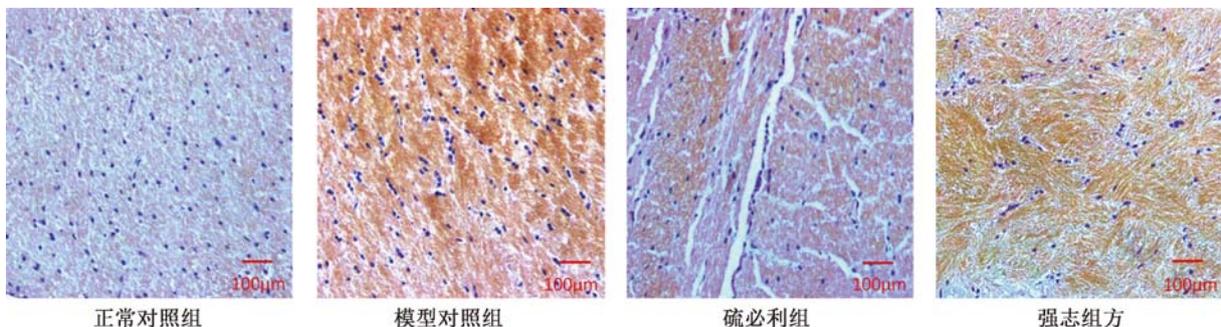


图 5 大鼠脑组织免疫组化染色图片 (标尺 = 100 µm)

Fig. 5 The immunohistochemistry in brain tissue of model rats (Bar = 100 µm)

为等临床表现<sup>[1]</sup>。通讯作者认为疾病的发生与肾志不足相关,自拟强志组方治疗本病,临床取得明显疗效<sup>[3]</sup>。

目前 TS 动物模型的行为学体现不全面,仅能部分模拟临床 TS 患儿的行为学和神经生化方面的改变<sup>[5-7]</sup>。IDPN 腹腔注射诱导建立 TS 大鼠模型被公认是理想的 TS 动物模型之一,目前已被广泛用于 TS 发病机制及药物作用机制的研究<sup>[8,9]</sup>。实验发现, IDPN 连续腹腔注射 7 d 后,大鼠刻板行为、运动行为增多,与文献描述一致<sup>[10]</sup>,标志造模成功。后与恐惧模型复合,采用声电诱导建立恐惧模型,自主活动减少,刻板行为、运动行为减少,冻结时间明显延长,与文献描述一致<sup>[11,12]</sup>,标志恐惧造模成功。本研究针对 TS 动物模型局限性,提出将 TS 大鼠模型与恐惧大鼠模型相复合,建立 TS 复合大鼠模型,考察强志组方治疗效用与作用机制。与空白对照组相比,模型对照组自主活动减少,刻板行为、运动行为增多,冻结时间延长,标志 TS 造模与恐惧造模均成功复制。该复合模型既模拟了患儿的抽动行为,又模拟了患儿常常伴有的恐惧行为,可以较为综合的评价药物的治疗效果。与模型对照组相比,强志组方组、硫必利组自主活动增加,刻板行为、运动行为明显减少,表明硫必利与强志组方均可治疗抽动症状;与模型对照组相比,强志组方组冻结时间缩短,而硫必利组无明显改变,表明强志组方可缓解恐惧行为,而硫必利则无此方面作用。另外与硫必利组相比,强志组方组一般情况较好,体重增加明显,提示强志组方具有疗效好,不良反应少的优点。

TS 的发病机制尚未完全明确<sup>[13]</sup>,普遍认为此病的发生可能是由遗传、免疫、神经生物、心理、社会、感染、创伤、及药物滥用等因素单独或联合致病的结果<sup>[12]</sup>。其中,从神经生物学角度探讨的神经生化学说最受关注<sup>[14]</sup>。目前众多研究者认为此病的发生与 DA 系统的亢进有关,研究方向主要集中在 DA 异常分泌和 DA 受体超敏感方面<sup>[7]</sup>。而神经递质的合成、储存、释放或降解的任何环节受到干扰,或递质受体的功能异常,均可导致相应的神经精神功能的改变,如恐惧行为产生<sup>[15-16]</sup>。本研究中,与正常对照组相比,模型对照组中 DA 含量无明显改变;与模型对照组相比,强志组方组 DA 含量下降。本研究中选用 IDPN 腹腔注射建立 TS 大鼠模型,关于其 DA 含量变化,文献报道不一致<sup>[17]</sup>,普遍认为

其可导致 DA 含量下降或保持不变<sup>[18-20]</sup>。采用声电刺激建立恐惧大鼠模型,可导致 DA 含量应激性升高<sup>[21]</sup>。本研究中 DA 含量无明显改变,猜测可能是由于其 IDPN 诱导建立 TS 模型导致 DA 含量下降,而后又进行声电刺激诱导建立恐惧模型导致 DA 含量应激性升高,两者最终相抵导致含量无明显变化。与模型对照组相比,强志组方组 DA 含量下降,硫必利组 DA 含量无明显变化,因此推测强志组方与硫必利作用机制可能存在不同。TS 的发生主要认为 DA 异常分泌增加和 DA 受体超敏感方面<sup>[7]</sup>,硫必利是多巴胺受体阻滞剂,因而考虑强志组方发挥作用可能是通过减少 DA 异常分泌而实现的。恐惧状态下 DA 含量升高<sup>[20]</sup>,硫必利与多巴胺受体结合发挥治疗作用而不具备减少 DA 含量的作用,从而可治疗 TS 而不能改善恐惧行为,由此推测强志组方通过减少 DA 含量而发挥治疗 TS 和恐惧作用的。

多巴胺神经元摄取血液中的酪氨酸,酪氨酸在 TH 的催化下生成多巴,再经多巴胺脱羧酶作用生成 DA。其过程中 TH 是 DA 生物合成过程的限速酶,TH 的含量影响 DA 的合成。本研究中,与空白对照组相比,模型对照组 TH 无明显变化;与模型对照组相比,强志组方组 TH 含量下降,其变化趋势与各组 DA 含量变化趋势一致,TH mRNA 变化趋势与 TH 变化趋势一致,由此推测强志组方可能是通过减少 TH mRNA 的表达,降低 TH 含量,影响 DA 合成的。

综上所述,强志组方能改善复合模型大鼠抽动行为、恐惧行为,其作用机制可能是通过下调 TH mRNA 的表达,降低 TH 的含量,从而影响 DA 含量而实现的。疾病的发生与诸多因素相关,强志组方是否存在其他作用机制还有待更深入的研究。

#### 参考文献:

- [1] 刘智胜. 小儿多发性抽动症 [M]. 北京:人民卫生出版社. 2002: 92-92.
- [2] Houeto JL, Gire P. Tics and Tourette syndrome: diagnosis, course and treatment principles [J]. Presse Med, 2008, 37 (2): 263-270.
- [3] 阎兆君, 孙聪玲, 王晶. 多发性抽动症中医临床辨证现状与思考 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2007, 5(1): 14-15.
- [4] Diamond BI, Reyes MG, Borison R. A new animal model for Tourette syndrome [J]. Adv Neurol, 1982, 35: 221-225.



# 犬副流感病毒的分离鉴定及部分基因序列分析

孙明<sup>1</sup>, 刘巧荣<sup>1</sup>, 秦亚嫒<sup>1</sup>, 邓小雨<sup>1</sup>, 杨欣艳<sup>1</sup>, 刘伯华<sup>1</sup>, 陈西钊<sup>1,2</sup>

(1. 北京世纪元亨动物防疫技术有限公司, 北京 100085; 2. 中国动物疫病预防控制中心, 北京 100125)

**【摘要】** 目的 分离并鉴定犬副流感病毒 (canine parainfluenza virus, CPIV), 并对该病毒 N、HN 和 F 基因进行序列分析, 研究其遗传变异情况; 为 CPIV 诊断、治疗以及预防奠定分子生物学基础。方法 用 Vero 细胞接种感染 CPIV 阳性犬肺组织, 盲传 3 代, 观察病变情况, 收集 72 h 培养液进行 PCR 鉴定、血凝特性以及形态学观察。同时, 用 3 对特异性引物, 扩增 N、HN 和 F 全基因, 进行序列测定和分析, 并制作系统进化树。结果 从犬肺中成功分离出一株犬副流感病毒, 并命名为 QF20100726。该病毒能凝集豚鼠、猪、鸡和人 O 型血, 电镜观察病毒呈圆形、长丝状等形态多样、大小不等的颗粒状; 序列分析表明, 与人源、犬源等 10 株有代表性的副流感病毒基因相比, N 基因核苷酸同源率为 95.7% ~ 99.8%, 氨基酸同源率为 97.4% ~ 99.6%, 其中有两处氨基酸发生新的变异, 分别是第 257 位由 V 变成了 A, 第 301 位由 A 变成了 T; HN 基因核苷酸同源率为 95.5 ~ 99.8%, 氨基酸同源率为 96.3 ~ 99.6%, F 基因核苷酸同源率为 94.7% ~ 99.6%, 氨基酸同源率为 95.6% ~ 99.3%。有两处发生特异变异, 分别是第 56 位由 T 变成了 S, 89 位由 T 变成了 M。结论 成功分离犬副流感病毒 QF20100726 分离株, 其血凝特性及超微形态特征均符合 CPIV 特性, N、HN 和 F 全基因生物进化树显示, 该分离株与犬副流感病毒分离株 08-1990 (登录号: KC237063) 亲缘关系最近; N 基因氨基酸在第 257 位 (由 V 变成了 A) 和第 301 位 (由 A 变成了 T), F 基因氨基酸在第 56 位 (由 T 变成了 S) 和 89 位 (由 T 变成了 M) 发生了特异性变异。这些数据将为 CPIV 的防控奠定基础。

**【关键词】** CPIV; 病毒分离; 序列分析

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0077-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.02.016

## Isolation and identification of canine parainfluenza virus and partial gene sequence analysis of the isolate

SUN Ming<sup>1</sup>, LIU Qiao-rong<sup>1</sup>, QIN Ya-man<sup>1</sup>, DENG Xiao-yu<sup>1</sup>, YANG Xin-yan<sup>1</sup>, LIU Bo-hua, CHEN Xi-Zhao<sup>1,2</sup>

(1. Beijing ANHEAL Laboratories Co. Ltd, Beijing 100094, China; 2. China Animal Disease Control Center, Beijing 100125)

**【Abstract】 Objective** To isolate and identify canine parainfluenza virus (CPIV) from the a dog suspected of CPIV infection, then to analyze the gene sequence variation of N, HN and F genes and provide a molecular biology basis for the diagnosis, treatment, prevention and control of CPIV infection. **Methods** Samples of the lung tissue was taken from a dead dog suspected of CPIV infection, and were inoculated into Vero cells. CPE were observed after three blind passages, then the cell culture fluid after 72-hour-cultuere was assayed for further PCR identification, blood coagulation characteristics and morphological observation. Moreover, 3 pairs of oligonucleotide primers were designed, and N, HN and F complete genes of CPIV were amplified by RT-PCR from positive CPIV culture fluid. The genetic variation of the three genes were further analyzed by biological software, and phylogenetic trees were produced. **Results** One strain of CPIV was

[作者简介] 孙明 (1963 -), 男, 博士, 研究方向: 分子病毒学诊断技术。Email: sunming@anheal.com。

[通讯作者] 陈西钊 (1965 -), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 动物传染病与预防兽医学。Email: chenxizhao@anheal.com。

isolated and named QF20100726. The results showed that the CPIV strain could agglutinate Guinea pig, pig, chicken and human o type blood cells, and had the basic ultrastructural characteristics of parainfluenza virus. Compared with 10 representative CPIV genes, N, HN and F gene phylogenetic analysis of the QF20100726 CPIV gene showed 95.7% to 99.8%, 94.7% to 99.6% and 94.7% to 99.6% nucleotide identity, respectively, and 97.4% to 99.6%, 96.3 to 99.6%, 95.6% to 99.3% amino acid identity, respectively. Of these aa substitutions, 2 substitutions (V208A, A301T) occurred in the N open reading frame (ORF), and 2 substitutions (T56S, T89M) occurred in the F open reading frame (ORF). **Conclusions** One strain QF20100726 of CPIV is successfully isolated, and the phylogenetic trees of N, HN and F genes from the QF20100726 CPIV strain show close phylogenetic relationship with other CPIV isolates. The data provide a valuable molecular biology basis for the studies on prevention and control of CPIV infection.

**【Key words】** CPIV, Viral isolation, Sequence analysis

犬副流感病毒感染 (canine parainfluenza virus infection) 是由犬副流感病毒 (canine parainfluenza virus, CPIV) 引起的犬的一种接触性传染病, 主要表现为发热、流涕和咳嗽。CPIV 是犬传染性呼吸系统疾病 (即“犬窝咳”) 的主要病源之一<sup>[1]</sup>。常引起犬的支气管炎和支气管肺炎, 损害呼吸道上皮细胞, 给其他病原体的感染创造了条件<sup>[2,3]</sup>。1967 年 Binn 等用犬肾细胞首次从患有呼吸道病的犬体内分离到犬副流感病毒, 此后在世界各地均有 CPIV 的报道, 严重影响着世界各国养犬业的发展。

CPIV 是单股、不分节段的负链 RNA 病毒, 约为 15246 bp<sup>[4]</sup>。CPIV 基因组主要编码 6 种蛋白: 大蛋白 (L)、血凝素神经氨酸酶 (HN)、核衣壳蛋白 (NP)、融合蛋白 (F)、磷蛋白 (P) 和基质蛋白 (M), 其中 NP 蛋白是核衣壳蛋白的主要成分, 与病毒 RNA 直接结合, 高度保守, 在病毒感染时可引起强烈的抗体反应, HN 蛋白和 F 蛋白突出于囊膜形成纤突, 分别介导病毒吸附和穿入细胞。

该病毒在分类上属副粘病毒科 (*Paramyxoviridae*), 副粘病毒亚科 (*Paramyxovirinae*) 茹布拉病毒属 (*Rubulavirus*)。与同属的猴病毒 V 型 (SV5)、人 SV5 分离株及人副流感病毒-II 型 (hPIV-II) 抗原性密切相关<sup>[5]</sup>。目前, 市场虽有此类疫苗, 该病仍然时有发生, 可能与该病毒的不断变异有关, 故分离当前的流行变异株, 了解序列变异情况对于预防该病的流行、诊断和治疗等具有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 病料

临床诊断犬副流感病毒病死京巴犬, 年龄约 1 岁。临床表现为患犬精神萎靡、不喜食; 咳嗽、流涕、喘息等呼吸道症状, 伴有发烧。治疗无效死亡, 取肺脏进行处理。

### 1.2 细胞系

Vero 细胞为本实验室保存。

### 1.3 载体、菌株、试剂

pGEM-T-easy 购自 Promega 公司。DH5a 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。氨苄青霉素、购自 Sigma 公司。病毒 RNA 提取试剂盒和胶回收试剂盒均购自 Omega 公司。DMEM 培养液、新生牛血清为 Gibco 产品。

### 1.4 病毒分离

参照白文彬等介绍的方法<sup>[6]</sup>, 进行病毒分离, 并将病毒命名为 QF20100726。

### 1.5 病毒鉴定

1.5.1 血凝试验: 参考姚火春介绍的方法<sup>[7]</sup>, 分别采集豚鼠、鸡、猪抗凝血, 用 PBS (pH 7.4) 洗涤红细胞四次, 1 500 rpm 离心 10 min, 用 PBS (pH 7.2) 配成 1% 红细胞悬液进行血凝试验 (HA)。

1.5.2 RT-PCR 鉴定: 用引物对: 5'-AGTCAGAGTAGTTCAATAAGGACCTATC-3' 和 5'-TGGTGAATTGAGATGGACTTCAGG-3' 对所分离的病毒进行 RT-PCR 鉴定, 扩增程序: 42°C 45 min, 95°C 3 min, 95°C 30 sec, 55°C 45 sec, 72°C 1.5 min, 35 个循环后 72°C 延伸 10 min。

1.5.3 病毒的电镜观察: 参考殷震、金昌德等介绍的方法<sup>[3,8]</sup>, 对细胞培养液负染色, 进行电镜观察。

### 1.6 N、HN 和 F 基因的克隆测序

1.6.1 引物设计与合成: 依据 GenB 上的 CPIV 基因组序列, 分别针对 N 基因、HN 基因和 F 基因设计了引物。如下:

N1: 5'-AGTCAGAGTAGTTCAATAAGGACCTATC-3'  
N2: 5'-TGGTGAATTGAGATGGACTTCAGG-3'  
HN1: 5'-TTGCTGTCCTAACACCTGCTATAG-3'  
HN2: 5'-TGGTGAATTGAGATGGACTTCAGG-3'  
F1: 5'-CCAATAACTGGAATCACCAGCTTG-3'

F2:5'-CGAGACGGTCTTTCAATACTAGTTTC-3'

三对引物分别可扩增大小为 1 678 bp、1 964 bp、和 1 830 bp 的片段。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.6.2 扩增及克隆:

1.6.2.1 病毒 RNA 的提取: 参照 Omega 公司的病毒 RNA 提取试剂盒操作说明提取 PRV 总 DNA。

1.6.2.2 RT-PCR 扩增: 42℃ 45 min, 95℃ 3 min, 95℃ 30 s, 55℃ 45 s, 72℃ 2 min, 35 个循环后 72℃ 延伸 10 min。

1.6.2.3 PCR 产物电泳、克隆和序列测定: PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 用 Omega 公司胶回收试剂盒回收 PCR 产物, 克隆到 pGEM-T-easy, 经 PCR 鉴定阳性的重组质粒送上海英骏生物技术有限公司测序。

2 结果

2.1 病毒分离培养

病料接种到 Vero 细胞第 5 代 24 h 后出现典型细胞病变, 至第 5 天收毒时, 大部分细胞融合, 裂解

死亡, 培养液中碎片增多, 相同条件下的正常细胞无此变化(图 1 和图 2)。

2.2 血凝试验

病毒在 25℃ 条件能凝集豚鼠、猪、鸡和人 O 型红细胞。

2.3 RT-PCR 鉴定结果

对 Vero 细胞培养病毒进行犬副流感病毒的 RT-PCR 检测, 结果显示, Vero 细胞培养的病毒为 CPIV 阳性。

2.4 电镜观察

电镜照片显示, CPIV 为圆形, 有囊膜, 直径 80 nm 左右, 囊膜上有直径 8 nm ~ 10 nm 的纤突。病毒因囊膜的破损而形态不规则, 呈多形性、长丝状等长丝状核衣壳见图 3。

2.5 N、HN 和 F 基因克隆、测序

用设计的 N、F 和 HN 基因引物扩增的产物经琼脂糖电泳显示, 分别可见约 1 680 bp、1 970 bp、和 1 830 bp 左右的 3 个基因片段(图 4), 大小与 N、F 和 HN 蛋白基因相符, 预测结果证实所克隆的基因正确。

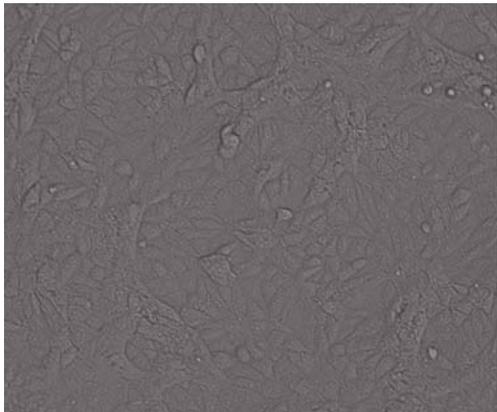


图 1 正常对照 vero 细胞  
Fig.1 Normal control vero cells

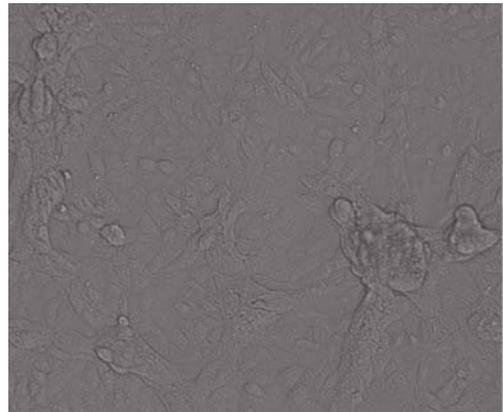


图 2 CPIV 接种 vero 后 24 h 细胞变化  
Fig.2 Vero cells at 24 hours after CPIV inoculation

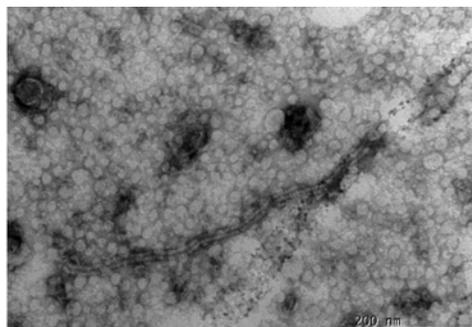
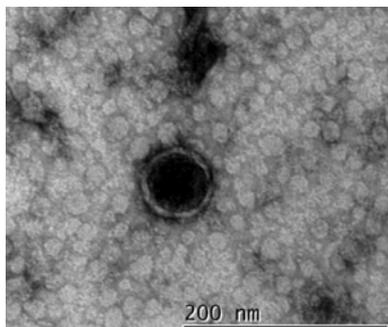
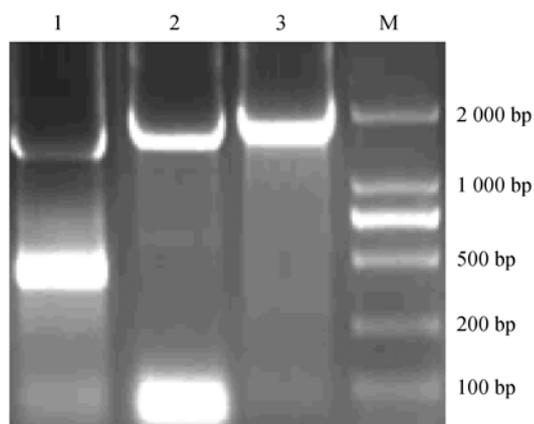


图 3 电镜下不同形态的病毒粒子(标尺 = 200 nm)  
Fig.3 Different morphology of the virus particles observed under electron microscope(Bar = 200 nm)



1. N 基因, 2. F 基因, 3. HN 基因 M. Marker

图 4 N、F 和 HN 基因扩增

1. N gene, 2. F gene, 3. HN gene, M. marker

Fig. 4 Amplification of N, F and HN genes

## 2.6 N 序列同源性分析

与人源、犬源等 10 株有代表性的副流感病毒 N 基因相比,核苷酸同源性为 95.7% ~ 99.8%,氨基酸同源性为 97.4% ~ 99.6%。其中有两处氨基酸发生新的变异,分别是第 257 位由 V 变成了 A,第 301 位由 A 变成了 T。其中与人源副流感病毒分离株 LN(登录号:JQ743324)同源性最低为 97.4%,与犬源副流感病毒分离株 08-1990(登录号:KC237063)和 D277(登录号:KC237065)同源性最高均为 99.6%。用 DNAMAN 生物软件绘制系统进化树见图 5。

## 2.7 F 基因序列同源性分析

与人源、犬源等 10 株有代表性的副流感病毒 F 基因相比。核苷酸同源性为 94.7% ~ 99.6%,氨基酸同源性为 95.6% ~ 99.3%。有两处发生特异变异,分别是 56 位由 T 变成了 S,89 位由 T 变成了 M。其中与人源副流感病毒分离株 LN(登录号:JQ743324)同源性最低为 95.6%,与犬源副流感病毒分离株 08-1990(登录号:KC237063)同源性最高为 99.3%。F 基因系统进化树显示,该分离株与分离株 D277 和 08-1990 在一个分支上(图 6)。

## 2.6 HN 基因序列同源性分析

与人源、犬源等 10 株有代表性的副流感病毒 H 基因相比,核苷酸同源性为 95.5 ~ 99.8%,氨基酸同源性为 96.3 ~ 99.6%,其中与人源副流感病毒分离株 LN(登录号:JQ743324)同源性最低为 95.5%,与犬源副流感病毒分离株 D277(登录号:KC237065)同源性最高为 99.6%。HN 基因系统进化树显示,该分离株与 D277 和 08-1990 分离株在

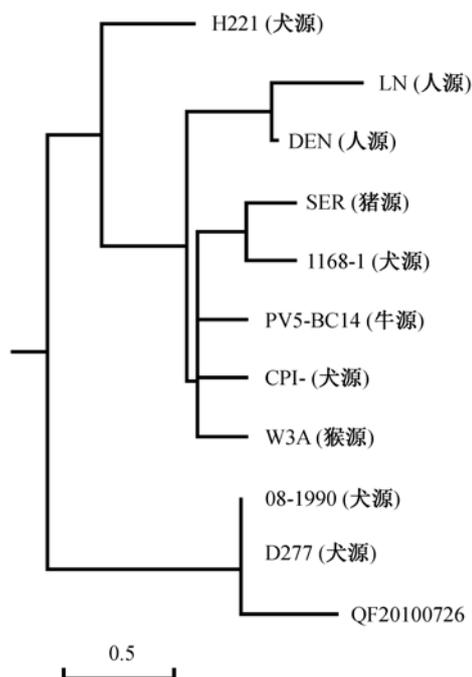


图 5 N 基因系统进化树

Fig. 5 The phylogenetic tree based on N gene

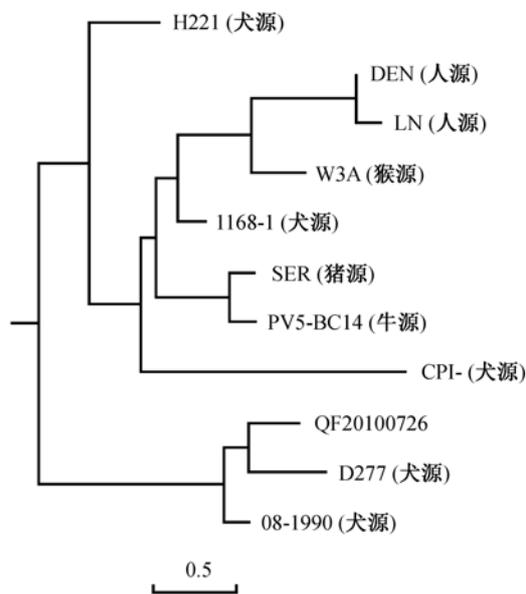


图 6 F 基因系统进化树

Fig. 6 The phylogenetic tree based on F gene

一个分支上(图 7)。

## 3 讨论

血清学调查表明,CPiV 在世界各国普遍存在<sup>[9-11]</sup>,是危害犬业重要传染病之一。该病毒广泛感染玩赏犬、实验犬、警犬和军犬。主要表现为发热、流涕和咳嗽,在军犬和警犬中可导致嗅觉障碍。

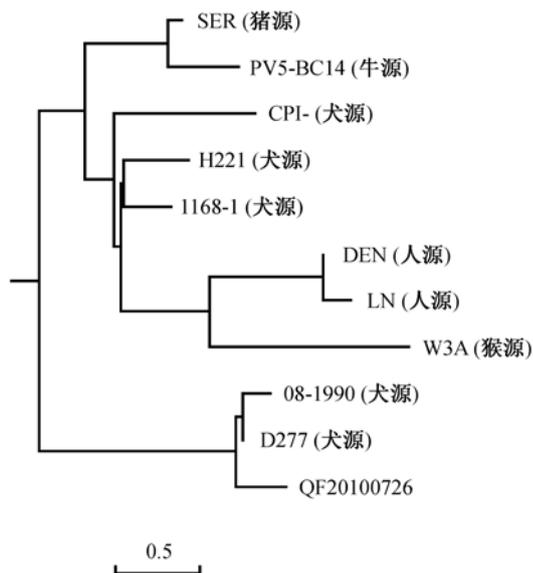


图 7 HN 基因系统进化分析

Fig. 7 The phylogenetic tree based on HN gene

另外 CPIV 也可引起急性脑脊髓炎和脑内积水, 临床表现为后驱麻痹和运动失调等症状, 严重危害犬类的健康生长。近年来, 随着养犬业的不断扩大, 犬副流感病毒感染越来越受到人们的重视。北京某动物医院诊治一例临床诊断为疑似 CPIV 感染京巴犬, 表现为精神萎靡、不喜食; 咳嗽、流涕、喘息等呼吸道症状, 伴有发烧, 治疗无效死亡。自然条件下犬单独感染 CPIV 的情况不为多见, 究其死亡原因, 可能与细菌、支原体和病毒等混合感染有关<sup>[12]</sup>。为了分析 CPIV 变异情况, 本研究从此患犬肺脏组织中分离得到一株 CPIV, 命名为 QF20100706, 并对其部分基因序列进行分析, 研究基因变异情况。

该病毒在 4℃ 条件下能凝集豚鼠、猪、鸡和人“O”型红细胞, 这与 CPIV 血凝特性一致<sup>[13]</sup>; 4℃ 或 25℃ 条件下能凝集鸡、猪、兔、犬、豚鼠、羊、人“O”型红细胞; 电镜观察期超微结构呈圆形、长丝状等不规则形态, 与金昌德报道的一致<sup>[10]</sup>。

本研究从患犬组织中分离 CPIV, 并对 N、HN 和 F 基因进行扩增和测序, 分析其变异情况。核苷酸和氨基酸同源性分析和系统进化关系显示, 与 10 株有代表性的副流感病毒 N 基因相比, 核苷酸同源性为 95.7% ~ 99.8%, 氨基酸同源性为 97.4% ~ 99.6%。其中有两处氨基酸发生新的变异, 分别是第 257 位由 V 变成了 A, 第 301 位由 A 变成了 T。其中与人源副流感病毒分离株 LN (登录号: JQ743324) 同源性最低为 97.4%, 与犬源副流感病毒分离株 08 - 1990 (登录号: KC237063) 同源性最

高为 99.6%。HN 基因分析显示, 与 10 株有代表性的副流感病毒 H 基因相比, 核苷酸同源性为 95.5 ~ 99.8%, 氨基酸同源性为 96.3 ~ 99.6%, 其中与人源副流感病毒分离株 LN (登录号: JQ743324) 同源性最低为 95.5%, 与犬源副流感病毒分离株 D277 (登录号: KC237065) 同源性最高为 99.6%。与 10 株有代表性的副流感病毒 F 基因相比, 该毒株 F 基因核苷酸同源性为 94.7% ~ 99.6%, 氨基酸同源性为 95.6% ~ 99.3%。有两处发生特异变异, 分别是 56 位由 T 变成了 S, 89 位由 T 变成了 M。其中与人源副流感病毒分离株 LN (登录号: JQ743324) 同源性最低为 95.6%, 与犬源副流感病毒分离株 08 - 1990 (登录号: KC237063) 同源性最高为 99.6%。F 基因的遗传变异对于 CPIV 的预防有着重要影响, 特别是重要抗原位点的变化可能导致疫苗的免疫保护不全面, 那么本分离株 F 基因的变异是否能导致疫苗的免疫保护不全或者增加 CPIV 毒力变化值得进一步研究。N、HN 和 F 基因序列分析还表明, 犬副流感病毒流行毒株之间、氨基酸序列之间变化不大, 但与其他相关毒株间差异相对较大, 这与李长磊等研究结果一致<sup>[14]</sup>。

成功分离一株犬副流感病毒, 该病毒在 25℃ 条件能吸附豚鼠、鸡、猪和人 O 型血红细胞。电镜观察显示病毒为圆形、长丝状等形态多样, 大小不等的病毒粒子。N、HN 和 F 基因序列分析显示, 该分离株与犬副流感病毒分离株 08 - 1990 (登录号: KC237063) 亲缘关系最近; N 基因氨基酸在第 257 位 (由 V 变成了 A) 和第 301 位 (由 A 变成了 T), F 基因氨基酸在第 56 位 (由 T 变成了 S) 和 89 位 (由 T 变成了 M) 发生了特异性变异。

参考文献:

[ 1 ] Appel MJ. Virus Infections of Carnivores [ M ]. New York. Elsevier Science Publishing Co. Inc. 1987: 125 - 132.  
 [ 2 ] Damian M, Morales E, Salas G, et al. Immunohistochemical detection of antigens of distemper, adenovirus and parainfluenza viruses in domestic dogs with pneumonia [ J ]. J Comp Pathol, 2005, 133(4): 289 - 293.  
 [ 3 ] 金昌德, 李六金, 李秦, 等. 犬副流感病毒弱毒株的分离与鉴定 [ J ]. 第四军医大学学报, 2000, 21(6): 721 - 724.  
 [ 4 ] Lamb R, Kolakofsky D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM. Fields Virology [ M ]. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 2001: 1305 - 1340.  
 [ 5 ] Ueland K. Serological, bacteriological and clinical observations on an outbreak of canine infectious tracheobronchitis in Norway

- [J]. *Vet Rec*, 1990, 126: 481-483.
- [6] 白文彬, 于康震. 动物传染病诊断学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 106-110.
- [7] 姚火春. 兽医微生物学实验指导 (第 2 版) [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 105-107.
- [8] 殷震, 刘景华主编. 动物病毒学 (第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 750-751.
- [9] 闫喜军, 夏咸柱, 柴秀丽, 等. 犬副流感病毒血清抗体流行病学调查 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2001, (5): 75-76.
- [10] Englund L, Jacobs AA, Klingeborn B, et al. Seroepidemiological survey of *Bordetella bronchiseptica* and canine parainfluenza-2 virus in dogs in Sweden [J]. *Vet Rec*, 2003, 152(9): 251-254.
- [11] Ellis J, Anseeuw E, Gow S. et al. Seroepidemiology of respiratory (group 2) canine coronavirus, canine parainfluenza virus, and *Bordetella bronchiseptica* infections in urban dogs in a humane shelter and in rural dogs in small communities [J]. *Can Vet J*, 2011, 52(8): 861-868.
- [12] 刘腾飞. 犬副流感病毒的检测和 NP 基因的克隆、表达及其重组蛋白的免疫活性的研究 [D]. 乌鲁木齐, 新疆农业大学, 2010: 1-2.
- [13] 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所. 兽医微生物学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 414-415.
- [14] 李长磊, 赵福广, 于亚洲. 犬副流感病毒的分离鉴定及 F 基因的遗传分析 [J]. 经济动物学报, 2013, 17(2): 86-89.

[修回日期]2015-12-24

## (上接第 76 页)

- [5] Thomas DL, Susan H F. Neurobiological basis of serotonin-dopamine antagonists in the treatment of Gilles de la Tourette syndrome [J]. *Progr Brain Res*, 2008, 172: 495-513.
- [6] 王梦雨, 郑毅, 崔永华. 抽动秽语综合征动物实验模型研究进展 [J]. 中国健康心理学杂志, 2014, 22(10): 1598-1600.
- [7] 车立纯. 抽动障碍动物模型研究进展 [J]. 中国儿童保健杂志, 2013, 21(6): 615-617.
- [8] Soler MC, Vilardosa U, Saldana RS, et al. Loss of neurofilaments in the neuromuscular junction in a rat model of proximal axonopathy [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2012, 38(1): 61-71.
- [9] 刘智胜. 小儿多发性抽动症 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 237-238.
- [10] 卫利, 王素梅, 陈自佳, 等. 化学因素诱发的多发性抽动症动物模型比较研究 [J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2010, 19(8): 683-686.
- [11] 董秋安, 刘晓伟. 恐惧应激大鼠行为学评估及比较 [J]. 黑龙江中医药, 2014, 43(1): 44-45.
- [12] 刘佳佳, 潘霄, 严进, 等. 大鼠恐惧应激模型的建立及指标筛选 [J]. 实用医药杂志, 2011, 28(5): 447-450.
- [13] 齐越, 魏小维. 多发性抽动症发病相关因素的研究进展 [J]. 中国儿童保健杂志, 2013, 21(6): 618-619.
- [14] 段玲玲, 张骠. 小儿多发性抽动症中枢神经生化介质研究进展 [J]. 江西中医药, 2008, 39(11): 78-80.
- [15] 董秋安, 刘晓伟, 许丽, 等. 惊恐应激对大鼠下丘脑单胺类递质的影响及中药干预 [J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(12): 1652-1653.
- [16] 谢忠礼, 李杰, 王兴华. 加味四逆散对慢性应激模型大鼠下丘脑单胺类神经递质的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(1): 50-52.
- [17] 王道涵, 王素梅, 卫利, 等. 健脾止动汤对多发性抽动症模型小鼠纹状体多巴胺及其受体含量的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(7): 452-455.
- [18] 杜淑娟, 彭贝如, 陈秀梅. 益智宁神口服液对抽动秽语综合征模型大鼠神经生物学和行为学的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2012, 24(7): 358-360.
- [19] 朱先康, 韩新民, 王敏华. 定抽颗粒治疗小儿多发性抽动症的临床及实验研究 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(2): 399-402.
- [20] 张如意, 张丽, 艾厚喜, 等. 金童颗粒治疗拟抽动秽语综合征模型大鼠的药理机制研究 [J]. 中国康复理论与实践, 2010, 16(10): 910-912.
- [21] Inglis FM, Moghaddam B. Dopaminergic innervation of the amygdala highly responsive to stress [J]. *Neurochem*, 1999, 72: 1088-1094.

[修回日期]2015-12-25



# 微核试验方法及应用研究进展

陈思<sup>1,3</sup>, 鲁克庆<sup>2</sup>, 马兴铭<sup>3</sup>

(1. 兰州大学第二医院检验中心; 2. 甘肃省泌尿系疾病临床医学中心; 3. 兰州大学基础医学院, 兰州 730030)

**【摘要】** 微核(micronucleus, MN)试验,作为一种常规的基因毒性检测方法,已经得到了广泛的应用。其检测的标本也从骨髓扩展到血液和组织。除常规的药物基因毒性检测外,在基因改变性疾病的诊断,疗效的评估和预防等方面具有重要的作用。另外,微核试验也是药品,保健品注册上市的安全检测的一项重要指标。本文就目前的微核试验的染色方法以及疾病和病毒学等领域的应用加以综述。

**【关键词】** 微核试验;基因毒;疾病

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0083-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 02. 017

## Research progress of the methods and applications of micronucleus assay

CHEN Si, LU Ke-qing, MA Xing-ming

(1. Department of Medical laboratory, Second Hospital of Lanzhou University, 2. Gansu Urological Clinical Center, 3. School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730030, China)

**【Abstract】** Micronucleus (MN) assay as a routine examination for genotoxicity has been widely used. The testing specimens were taken from bone marrow and extended from blood and tissues. In addition to testing genotoxicity of drugs, it is also applied in disease diagnosis for genetic mutation, evaluation of curative effectiveness and disease prevention. Moreover, MN assay is also an important safety indicator for drugs and health foods registration. This review will discuss the staining method of MN test and its application in the field of diseases and virology.

**【Key words】** Micronucleus assay; Genotoxicity; Disease

微核(micronucleus, MN)是一种独立于主核之外的核小体,存在于细胞质中,体积大约为主核的1/16到1/3,其染色与主核相一致,通过染色可以在光学显微镜下观察到。微核的形成是由于基因组的不稳定性和染色体的损伤有关。因此,可用于辅助诊断某些基因改变导致的疾病或遗传病。肿瘤作为一种公认的基因突变性疾病,它的治疗、诊断和预防仍是医学界的一大挑战,MN可以作为一种生物标记用来预测早期的癌前病变,对高风险人群

进行普查,具有重要的应用价值<sup>[1-3]</sup>。MN实验作为一种快速、简便、经济的基因毒性检测方法,已成为遗传毒性检测的常规检测手段。美国食品药品监督管理局(Food and Drug administration, FDA),欧洲药监局(European Medicines Agency, EMA)等部门均要求:基因毒性的检测应为药物安全性评估的必须一部分<sup>[4]</sup>。微核试验也是我国药物遗传毒性研究技术指导原则和国际人用药品注册技术要求协调会(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of

[作者简介]陈思(1977-),女,在读研究生,主要从事医学检验。Email: lncsi@126.com。

[通讯作者]马兴铭,教授,博导,主要从事医学免疫学研究。Email: maxm@lzu.edu.cn。

Pharmaceuticals for Human Use, ICH) 新药遗传毒性评价指导原则共同推荐的遗传毒性检测方法之一。卫生部《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)和《食品安全毒理学评价程序和检验方法规范》中均要求保健食品和具有保健作用的药品进行安全性评价时必须进行遗传毒性试验的毒理学研究。

在过去的几十年内,微核试验的应用不再局限于药物的遗传毒性的检测,已扩大到环境污染的检测、临床疾病的诊断和治疗后的评估、病毒学等相关领域,本文就目前微核试验的方法和微核试验的应用加以综述。

### 1 微核形成的机制

MN 的形成主要有两种机制,一种是染色体的断裂,另外一种是有丝分裂过程的紊乱<sup>[5]</sup>。当正常的个体暴露于污染的环境,放射或服用致畸药物和有毒化学物等条件下,均可促进 MN 的形成。另外,慢性炎症<sup>[6]</sup>、癌前病变<sup>[7,8]</sup>、肿瘤<sup>[9]</sup>和一些其它的基因遗传性疾病<sup>[10]</sup>均可以引起 MN 的增加。此外,病毒的感染也是 MN 形成的一个重要的原因。另外,使用抗着丝粒抗体可以是细胞的有丝分裂过程紊乱,促进 MN 的形成<sup>[11]</sup>。

### 2 微核试验的方法

MN 实验的取材可以是骨髓、组织上皮细胞、血液中的淋巴细胞。骨髓的取材一般适用于小鼠的微核试验,染毒方式一般有两种:一是单剂量给药后 24~48 h 内取材;二是多次染毒,在最后一次给药后 18~24 h 内取材。给药的方案应超过 1 d,计数大约 2 000 个嗜多染红细胞(PCE),观察微核细胞的比例<sup>[11]</sup>。血液中淋巴细胞 MN 的检测<sup>[12]</sup>,将采到的全血置于肝素抗凝管中,在培养箱中培养 44 h,然后加入细胞松弛素-B 后,对全血进行染毒,继续培养 72 h 后,离心去除上清液,然后加入 0.075 mmol/L 的 KCl 混匀后,加入 1.5 mL 固定液(甲醇和冰醋酸),离心去除上清液,再次加入 3 mL 的固定液,离心去除上清液,将 0.5 mL 的固定液吹散后滴片,10% 的 Giemsa 液染色 10~15 min,晾干待测。组织中的微核试验<sup>[13]</sup>,将所需组织取出后,使用蛋白溶解酶(胶原酶)分离细胞,进行染色,以小鼠的肝组织为例:将 1 g 左右的肝脏切碎,然后用 100 U/mL 的胶原酶分离肝细胞,分离后的肝细胞固定于 4% 的甲醛溶液固定液中,使用 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  吖

橙或 10% 的 4,6-二咪基-2-苯基吡啶进行染色。欧洲替代试验有效性验证中心(European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM)证实体外微核试验可以替代体外染色体畸变试验用于遗传毒性检测<sup>[14]</sup>。近年来,自动化检测技术在体外微核试验中探索性应用取得了进步,已应用于微核自动化计数,流式细胞术<sup>[15]</sup>、计算机图像分析系统<sup>[16,17]</sup>、激光扫描细胞仪<sup>[18]</sup>、高分辨率荧光细胞成像<sup>[19]</sup>检测计数等,使体外微核试验操作更简单、快速,结果更准确、客观。

### 3 微核实验的方法评估

在细胞之中,胞质中核小体的出现并不一定是微核细胞,它应该与凋亡细胞和坏死细胞细胞核溶解造成的 MN 相区别。微核细胞的特征包括:核小体的位置靠近主核,一般为细胞膜和细胞核中间的细胞质内;大小约为主核的 1/16 到 1/3;染色与主核相一致或比主核染色更深;形态为圆形或椭圆形;MN 的数量一般少于 3 个。另外,MN 细胞的细胞膜完整,主核清晰。凋亡的细胞细胞膜完整,无明显的主核,核小体数量超过 3 个以上<sup>[5]</sup>。坏死细胞细胞膜不完整,细胞核结构破坏,核小体出现于胞浆中,形态不规则。在进行微核试验时,微核细胞的计数应注意与坏死和凋亡的细胞相区别,以免造成实验结果的假阳性,影响实验结果的准确性。

### 4 微核实验的应用

微核试验主要应用于药物的遗传毒性检测和环境化学致畸物质的检测<sup>[20]</sup>。Cigerci 等<sup>[21]</sup>使用微核试验的方法评估了氯化钴(cobalt chloride,  $\text{CoCl}_2$ )在环境污染中的危害,发现  $\text{CoCl}_2$  能够损伤 DNA,造成染色体的断裂。Valdiglesias 等<sup>[22]</sup>比较了正常人与体弱人群之间外周血中微核细胞的比例差异,但结果没有统计学意义。Recio 等<sup>[23]</sup>检测了乙基甲磺酸(ethylmethane sulfonate, EMS)、丙烯酰胺(acrylamide, ACM)、环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)、长春新碱(vincristine sulfate, VS)四中物质在遗传学中的作用,结果显示在 ACM、EMS、CP 给药之后微核细胞的比例升高,VS 结果阴性。另外,在评估放射性遗传物质的损伤方面也有重要的作用。随着基因组学研究的进展,发现许多疾病的发生与基因的突变,染色体的缺失或基因修复机制的受损有关,从基因水平上来寻找病因,诊断和监控疾病。

另外,在病毒学中,微核试验也是检测病毒是否能够导致基因突变的一种重要方法,能够明确病毒是否具有基因毒性<sup>[24]</sup>,为某些病毒感染性疾病的预防提供指导。

#### 4.1 疾病的诊断和预防

4.1.1 在肿瘤中的应用:与正常的细胞和良性病变相比,恶性肿瘤的基因组不稳定,基因修复机制受到损伤,突变率明显增加<sup>[25]</sup>。将人子宫颈癌和正常的宫颈组织或炎性病变的组织相比,子宫颈癌组织中,微核细胞的比例明显增加,并且不同级别的子宫颈癌,MN 细胞的比例也有明显的不同<sup>[26, 27]</sup>。另外,乳腺导管癌与乳腺的良性病变相比,MN 细胞的比例存在明显的差异,并且不同级别的乳腺导管癌,MN 细胞的数量也存在明显的不同<sup>[28]</sup>。Arora 等<sup>[29]</sup>的研究表明在非典型尿路上皮癌中,MN 的比例也明显的提高。为此,MN 可以作为尿路上皮癌的一种辅助性诊断方法。另外在癌前病变,MN 的比例也明显的增加<sup>[8]</sup>。为此,它可以作为癌前病变的一个筛查指标。放疗后,早期的 MN 的比例明显的增加<sup>[30]</sup>,肿瘤进行 MN 检测时,应在放射治疗之前,以免造成数据的假阳性。

4.1.2 自身免疫性疾病:在自身免疫性疾病之中,自身抗体的产生扮演着重要的角色,它是检测、诊断、评估和分类自身免疫性疾病的重要标志,最新的研究表明:自身抗体可以诱发染色体的断裂<sup>[26]</sup>。此外,在自身免疫性疾病中,慢性炎症和氧化还原平衡的失调也发挥着重要的作用,它们也是诱发染色体断裂,促进 MN 形成的重要原因之一<sup>[31]</sup>。在器官组织特异性疾病之中,糖尿病(Diabetes mellitus, DM)是最为典型的一种,在 2007 年的研究发现:与正常人相比,DM 的病人血中淋巴细胞中 MN 比例的增加,与 1 型糖尿病相比,2 型糖尿病中 MN 细胞的比例更高,但是给予叶酸 30 天后,MN 的比例明显的降低了<sup>[32]</sup>。在系统性组织特异性疾病中,系统性红斑狼疮(SLE)的病人,与正常人的口腔颊粘膜的细胞涂片分析中,MN 细胞的比例也是升高的<sup>[33]</sup>。此外,Karaman 等的研究表明在风湿性关节炎病人的血中淋巴细胞 MN 的比例明显增加<sup>[31]</sup>。因此,MN 有可能成为自身免疫性疾病的辅助诊断和复发监控和疗效评估的重要生物靶标之一<sup>[34]</sup>。

#### 4.2 在病毒学中的应用

MN 实验在病毒学中,也具有广泛的应用,在 EB 病毒的研究中发现,MN 细胞的比例明显的增

加<sup>[35]</sup>。Cassel AP 等人的研究发现 HPV 感染的女性患者,在子宫颈涂片和外周血中的 MN 的比例也是明显增加的<sup>[36]</sup>,这可能与 HPV 产生的癌蛋白 E6 和 E7 的诱导相关<sup>[37]</sup>。

#### 5 展望

MN 的形成并不一定是受到外界环境的刺激引起的,在生理情况下,也可产生,在各种实验之中已被证实。MN 的形成也可能来源于细胞有丝分裂从 G0 到 G1 期过程之中,双链 DNA 断裂的生理性损伤,为此在正常的细胞之中,也可以出现 MN,会造成一定的假阳性率的出现,所以只有当 MN 的比例明显增加升高时,才能说明存在基因毒性,另外微核试验的检验标准没有准确的定义,无比较精确的范围,这是其重要的缺点之一。尽管如此,微核试验以其简单、快速、经济的优势广泛的应用于药品基因毒性的检测;多种自身疾病的辅助诊断、预防复发和疗效的评估;恶性肿瘤和癌前病变辅助性的诊断;另外在环境污染和病毒学引起的染色体的突变的研究中,也广泛应用。

#### 参考文献:

- [1] Nersisyan AK. Possible role of the micronucleus assay in diagnostics and secondary prevention of cervix cancer: a minireview [J]. *Tsitolog Genet*, 2007, 41(5): 64-66.
- [2] Varga D, Hoegel J, Maier C, et al. On the difference of micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes between breast cancer patients and controls [J]. *Mutagenesis*, 2006, 21(5): 313-320.
- [3] Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(3): 625-631.
- [4] Snyder RD, Green JW. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals [J]. *Mutat Res*, 2001, 488(2): 151-169.
- [5] Samanta S, Dey P. Micronucleus and its applications [J]. *Diagn Cytopathol*, 2012, 40(1): 84-90.
- [6] Holland N, Harmatz P, Golden D. Cytogenetic damage in blood lymphocytes and exfoliated epithelial cells of children with inflammatory bowel disease [J]. *Pediatr Res*, 2007, 61(2): 209-214.
- [7] Ribeiro DA. Risk assessment of oral cancer in patients with precancerous states of the oral cavity using micromicronucleus test and challenge assay [J]. *Oral Oncol*, 2008, *Oral Oncol*, 2008, 44(7): 716-717.
- [8] Samanta S, Dey P, Gupta N, et al. Micronucleus in atypical squamous cell of undetermined significance [J]. *Diagn Cytopathol*, 2011, 39(4): 242-244.

- [ 9 ] Kaur J, Dey P. Micronucleus to distinguish adenocarcinoma from reactive mesothelial cell in effusion fluid [J]. *Diagn Cytopathol*, 2010, 38(3): 177–179.
- [ 10 ] Thomas P, Harvey S, Gruner T, et al. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls J]. *Mutat Res*, 2008, 638(1–2): 37–47.
- [ 11 ] Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation [J]. *Mutat Res*, 2000, 455(1–2): 155–166.
- [ 12 ] 潘丽波, 张金良, 刘玲, 等. 人外周血淋巴细胞微核试验在局部流域水环境遗传毒性检测中的应用 [J]. *环境与健康杂志*, 2013, 5(30): 399–402.
- [ 13 ] Takayanagi T, Takashima R, Wako Y, et al. Repeated dose liver micronucleus assay using clofibrate in young adult rats [J]. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutag*, 2015, 780–781: 117–122.
- [ 14 ] Corvi R, Albertini S, Hartung T, et al. ECVAM retrospective validation of in vitro micronucleus test (MNT) [J]. *Mutagenesis*, 2008, 23(4): 271–283.
- [ 15 ] 欧红梅, 周长慧, 涂宏刚, 等. 流式细胞术检测体外微核方法的建立 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2015, 27(1): 39–43.
- [ 16 ] Friauff W, Martus HJ, Suter W, et al. Automatic analysis of the micronucleus test in primary human lymphocytes using image analysis [J]. *Mutagenesis*, 2013, 28(1): 15–23.
- [ 17 ] Lyulko OV, Garty G, Randers-Pehrson G, et al. Fast image analysis for the micronucleus assay in a fully automated high-throughput biodosimetry system [J]. *Radiat Res*, 2014, 181(2): 146–161.
- [ 18 ] Pozarowski P, Holden E, Darzynkiewicz Z. Laser scanning cytometry: principles and applications-an update [J]. *Methods Mol Biol (Clifton, NJ)*, 2013, 931: 187–212.
- [ 19 ] Shibai-Ogata A, Kakinuma C, Hioki T et al. Evaluation of high-throughput screening for in vitro micronucleus test using fluorescence-based cell imaging [J]. *Mutagenesis*, 2011, 26(6): 709–719.
- [ 20 ] Massey ED, Hinchliffe S. 2-Aminoanthracene, diethylstilboestrol and vinblastine tested in the in vitro mammalian cell micronucleus test at British American Tobacco UK in support of the OECD draft Test Guideline 487 [J]. *Mutat Res*, 2010, 702(2): 208–211.
- [ 21 ] Cigerci IH, Ali MM, Kaygisiz SY, et al. Genotoxicity assessment of cobalt chloride in *Eisenia hortensis* earthworms coelomocytes by comet assay and micronucleus test [J]. *Chemosphere*, 2016, 144: 754–757.
- [ 22 ] Valdiglesias V, Bonassi S, Dell'Armi V, et al. Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and frailty status in elderly. A lack of association with clinical features [J]. *Mutat Res*, 2015, 780: 47–54.
- [ 23 ] Recio L, Hobbs C, Caspary W, et al. Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and comet assay protocol [J]. *J Toxicol Sci*, 2010, 35(2): 149–162.
- [ 24 ] Cortes-Gutierrez EI, Davila-Rodriguez MI, Vargas-Villarreal J, et al. Association between human papilloma virus-type infections with micronuclei frequencies [J]. *Prague Med Report*, 2010, 111(1): 35–41.
- [ 25 ] Terradas M, Martin M, Tusell L, et al. Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? [J]. *Mutat Res*, 2010, 705(1): 60–67.
- [ 26 ] Gayathri B, Kalyani R, Hemalatha A, et al. Significance of micronucleus in cervical intraepithelial lesions and carcinoma [J]. *J Cytol*, 2012, 29(4): 236–240.
- [ 27 ] Samanta S, Dey P, Nijhawan R. Micronucleus in cervical intraepithelial lesions and carcinoma [J]. *Acta cytologica*, 2011, 55(1): 42–47.
- [ 28 ] Samanta S, Dey P, Nijhawan R. The role of micronucleus scoring in fine needle aspirates of ductal carcinoma of the breast [J]. *Cytopathology*, 2011, 22(2): 111–114.
- [ 29 ] Arora SK, Dey P, Saikia UN. Micronucleus in atypical urothelial cells [J]. *Diagn Cytopathol*, 2010, 38(11): 811–813.
- [ 30 ] Cao J, Liu Y, Sun H, et al. Chromosomal aberrations, DNA strand breaks and gene mutations in nasopharyngeal cancer patients undergoing radiation therapy [J]. *Mutat Res*, 2002, 504(1–2): 85–90.
- [ 31 ] Karaman A, Binici DN, Melikoglu MA. Comet assay and analysis of micronucleus formation in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Mutat Res*, 2011, 721(1): 1–5.
- [ 32 ] Zuniga-Gonzalez GM, Batista-Gonzalez CM, Gomez-Meda BC, et al. Micronuclei in diabetes: folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model [J]. *Mut Res*, 2007, 634(1–2): 126–134.
- [ 33 ] Al-Rawi ZS, Gorial FI, Tawfiq RF, et al. Brief report: a novel application of buccal micronucleus cytome assay in systemic lupus erythematosus; a case-control study [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(10): 2837–2841.
- [ 34 ] Torres-Bugarin O, Macriz Romero N, Ramos Ibarra ML, et al. Genotoxic effect in autoimmune diseases evaluated by the micronucleus test assay: our experience and literature review [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 194031.
- [ 35 ] Ilyinskikh NN, Isaeva TM, Ivanchuk, II, et al. Frequencies of micronucleated lymphocytes and Epstein-Barr virus contamination in Altai region residents living near the Semipalatinsk atomic testing ground [J]. *Environ Mol Mutag*, 1998, 31(1): 11–17.
- [ 36 ] Cassel AP, Barcellos RB, da Silva CM, et al. Association between human papillomavirus (HPV) DNA and micronuclei in normal cervical cytology [J]. *Genet Mol Biol*, 2014, 37(2): 360–363.
- [ 37 ] Duensing S, Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(23): 7075–7082.



# 警惕 Zika 病毒, 公众无需恐慌

许黎黎, 秦川

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021)

**【摘要】** 2015年底至今, Zika病毒在多国流行, 关注升温。Zika病毒感染为伊蚊传播疾病, 极有可能与新生儿小头畸形症有关, WHO建议孕妇要特别注意防止蚊虫叮咬。目前, 除台湾省出现一例泰国籍输入病例外, 我国大陆地区还没有 Zika病毒感染的病例报道。伊蚊在我国台湾、海南、广东、广西、云南、福建等地在内的北纬25度以南的亚热带地区广泛存在, 这些地区具有 Zika病毒感染扩散的潜在风险。我们已提前做好资源和技术储备, 应对可能出现的输入性病例, 公众无需过于恐慌。

**【关键词】** Zika病毒; 伊蚊; 动物模型; 技术储备

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0087-04

doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2016.02.018

## Be vigilant for Zika virus, no need to panic

XU Li-li, QIN Chuan

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medicine Centre, Peking Union Medical Collage (PUMC), Beijing 100021, China)

**【Abstract】** The outbreaks of Zika virus infection in different regions of the world underscore the potential for the virus to spread further in the Americas and beyond. Zika is a mosquito-borne Flavivirus and is transmitted by Aedes spp. mosquitoes. It has been reported recently that Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly, and WHO encourages pregnant women in countries at risk MUST protecting themselves from mosquito bites. Until now, there is no imported case in China. We have established resource and technology storage to reply to the potential Zika cases in the future, therefore, people do not need to panic in China.

**【Key words】** Zika virus; Aedes spp. Mosquitoes; Animal model; Technology storage

2015年12月1日, 世界卫生组织、泛美卫生组织发布了关于寨卡病毒(Zika virus)的全球警告。在警告中, 世界卫生组织第一次正式承认, 在巴西传播的 Zika病毒可能与新生儿小头畸形症有关, 并建议孕妇要特别注意防止蚊虫叮咬。Zika病毒感染为伊蚊传播疾病, 目前除台湾省出现一例泰国籍输入病例外, 我国大陆地区还没有 Zika病毒感染的病例报道。然而, 伊蚊在包括台湾、海南、广东、广

西、云南、福建等地在内的我国北纬25度以南的亚热带地区广泛存在, 这些地区具有 Zika病毒感染扩散的潜在风险, 且该病目前没有疫苗预防, 也没有特效药物治疗。我国科研工作者已未雨绸缪的对 Zika病毒的易感宿主、动物模型、检测手段等进行了技术储备, 充分应对可能出现的输入性感染病例, 此外, Zika病毒仅能在人体内引起自限性疾病, 人感染后可获得持久的终生免疫, 目前尚无患者死

**【基金项目】** 十三五科技重大专项(2016ZX10004-501-003-010); 国家自然科学基金(31370203); 卫计委公益性行业专项(201402001)。

**【作者简介】** 许黎黎, 副教授, 硕士生导师。E-mail: xull@cnilas.org。

**【通讯作者】** 秦川, 教授, 博士生导师。E-mail: qinchuan@cnilas.org。

亡的报道,因此公众不必过于恐慌。但前往 Zika 病毒流行的国家或地区旅游时,务必要做好防蚊措施以防止被叮咬。

## 1 Zika 病毒简介

“Zika”是乌干达语,意为“杂草”。1947 年,一只生长于乌干达草丛中、准备用于黄热病研究的恒河猴(*Rhesus macaque*)出现发热的症状,研究者从这只猴子血清中分离到一种病毒,于 1952 年正式命名为 Zika 病毒。1954 年,尼日利亚首次证实了 3 例人 Zika 病毒感染病例<sup>[1]</sup>。Zika 病毒从被发现至 2007 年以前,被证实的人类感染病例仅 14 例。2007 年 4-7 月,位于西太平洋密克罗尼西亚的雅浦(Yap)岛上 185 例患者感染了 Zika 病毒,成为有史以来最大的一次 Zika 病毒人类感染疫情<sup>[2]</sup>,从此,Zika 病毒开始在非洲和亚洲以外的多国流行<sup>[3]</sup>。2007 年以后,泰国、柬埔寨、印度尼西亚等国出现一些散发病例,但均未引起大规模流行疫情。2014 年以来,Zika 病毒再次受到人们关注。2013~2014 年,法属波利尼西亚约 11% 的居民被感染。2015 年已经在 9 个国家发现了感染 Zika 病毒的病例,分别是巴西、智利的复活节岛、哥伦比亚、萨尔瓦多、危地马拉、墨西哥、巴拉圭、苏里南和委内瑞拉。台湾“卫福部疾管署”2016 年 1 月 20 日发布岛内首例 Zika 病毒境外移入个案,患者为 24 岁泰籍男子,于 1 月 10 日入境时因发烧被拦检,检验确定感染 Zika 病毒。目前该患者状况稳定,恢复情形良好。台湾疾管署已将 Zika 病毒感染列为第二类法定传染病,同时提升中南美与加勒比海地区旅游疫情建议为警示(Alert);东南亚的柬埔寨、印度尼西亚、泰国、马来西亚、菲律宾及马尔地夫为注意(Watch)。

Zika 病毒为单股正链 RNA 病毒,属于黄病毒科(Flaviviridae)、黄病毒属(Flavivirus),主要通过伊蚊(*Aedes spp.*)叮咬在人和动物间传播,属于人畜共患疾病。除人类和蚊子外,Zika 病毒还可感染以猴子为代表的非人灵长类,并在非洲和亚洲南部的一些国家和地区的猴子中广泛流行<sup>[4]</sup>。

Zika 病毒感染为自限性疾病,人被带毒伊蚊叮咬后,潜伏期达 3-12 天,四分之一的病人可能不会出现任何症状,通常出现的轻微症状可持续 2-7 天,其临床表现与登革热和基孔肯雅热等其他虫媒病毒感染类似,主要包括轻度发热、头痛、疲乏、皮

疹、关节痛、结膜炎、手掌和足底红肿、口唇干裂、舌红如草莓等,在临床诊断时很容易造成误诊,通常需要实验室血清学检测才能确诊<sup>[5]</sup>。有报道称在 2013~2014 年爆发于法属波利尼西亚的 Zika 疫情中,有患者出现以格林巴氏综合征为代表的神经系统及自身免疫系统方面的并发症<sup>[6]</sup>。然而,由于 Zika 病毒和其他黄病毒属成员具有共同的传播途径,因此存在共感染从而引发重症的可能性。

2015 年,巴西东北部集中爆发的新生儿小头畸形症,被证实极有可能与感染 Zika 病毒有关。WHO 报道称,截至 12 月 5 日,巴西 422 个县市报告了 1761 例小头畸形新生儿(其中 19 例死亡)。另外,有报道称 Zika 病毒还具有性传播的可能性<sup>[7]</sup>。

研究表明,人被带毒伊蚊叮咬后,病毒首先感染叮咬处的树突细胞,然后进入淋巴结和血液进行增殖。与其他黄病毒不同的是,Zika 病毒能够在细胞核内复制<sup>[8]</sup>。

## 2 Zika 病毒感染动物模型

目前尚无 Zika 病毒感染动物模型的相关报道,由于其与同为黄病毒属成员的登革热病毒在传播途径、自然宿主、所引起的临床症状等方面均较为相似,因此,登革热的动物模型情况对于我们建立 Zika 病毒动物模型很有借鉴意义。

免疫系统完整的成熟小鼠感染登革热后不会出现人类登革热的临床症状,而是发展为嗜神经疾病,对于 Zika 病毒而言,目前暂无法推测感染正常小鼠后的表现。缺失 IFN-I 型免疫系统的小鼠,如 IFN- $\alpha/\beta$  受体基因敲除小鼠,可被登革热病毒感染并出现致死症状,IFN- $\alpha/\beta$  受体基因敲除小鼠还被证实感染埃博拉病毒后也能导致致死症状的出现,而免疫系统完整的成熟小鼠对埃博拉病毒是完全不易感的。因此,IFN- $\alpha/\beta$  受体基因敲除小鼠已被普遍认为是建立对正常小鼠不易感的病原动物模型的理想候选动物,当 Zika 病毒无法建立免疫系统完整的成熟小鼠模型时,我们可使用 IFN- $\alpha/\beta$  受体基因敲除小鼠进行尝试。

开发临床病例表征与人类更接近的协同杂交(Collaborative Cross, CC)小鼠资源是目前建立疾病动物模型的研究热点和切入口。一项在 47 个 CC 小鼠种系中测试埃博拉病毒引发的宿主应答的研究证实,不同小鼠品系感染病毒后表现出的症状存在较大差异,从轻症到致死表现都存在,这些小鼠

很好的模拟了人类患者的不同病理过程。CC 小鼠包括数百种基因型不同的小鼠系,它们来自于八个原始种系:五个实验室品种(C57BL/6J, A/J, 129S1/SvImJ, NOD/ShiLtJ, NZO/H1LtJ)和三个源自野生小鼠的近交系(CAST/EiJ, PWK/PhJ, WSB/EiJ)。CC 小鼠能体现不同小鼠亚种的遗传学变异,其单核苷酸多态性是传统实验室小鼠的四倍。因此,使用不同品系的 CC 小鼠来验证其对 Zika 病毒的易感性,是建立轻症和重症 Zika 小鼠模型的最佳途径。

此外,以猴子为代表的非人灵长类是 Zika 病毒的自然宿主,因此也是研究 Zika 病毒感染的优良动物模型,它们在临床表征、组织病理等方面都与人类极为类似。在选择一种合适的非人灵长类模型时,动物的品种、性别、年龄,以及攻毒的途径、剂量,都必须列入重点挑选及考虑范围之内,因为这都是影响实验结果的关键因素。

### 3 Zika 病毒感染的预防、治疗、和实验室检测

目前除台湾省出现一例泰国籍输入病例外,我国大陆地区还没有 Zika 病毒感染的病例报道,但尚无临床可用的 Zika 病毒特异性疫苗。Zika 病毒感染的预防措施与登革热相似,主要是消灭蚊虫,防止蚊虫叮咬。伊蚊为 Zika 病毒的最主要传播宿主,其主要分布于我国北纬 25 度以南的地区,包括台湾、海南、广东、广西、云南、福建等地,最易在室内外的积水中孳生。因此,要进一步加强宣传教育,提高居民防蚊灭蚊意识,翻盆倒罐,清除积水,及其他消毒、灭蚊的工作。同时,去疫情流行的国家或地区旅游时,应做好个人防护,防止蚊虫叮咬,包括穿着浅色长袖衣裤、身体裸露部位涂抹含有避蚊胺、派卡瑞丁、IR3535、柠檬胺等成分的防蚊水、睡觉时支起蚊帐等。如有发热、头痛以及红疹等症状或体征,应在入境时主动向口岸检验检疫机构申报,并尽快就医,就诊时应告知医师旅行史等相关讯息。若已确诊,发病一周内应尽量避免被蚊虫叮咬,防止疾病的进一步扩散。对于孕妇而言,建议应尽量减少甚至避免前往疫情地区的可能性。

对于存在 Zika 病毒潜在感染风险的国家 and 地区,WHO 于 2015 年 11 月发出呼吁,提出以下建议<sup>[5]</sup>:(1)由于 Zika 病毒感染后的临床表现与其他虫媒病毒类似,应进一步提高实验室病原体的诊断及确诊能力;(2)建立针对出现神经系统及自身免

疫系统方面并发症的监测体系;(3)进一步优化加强政府宣传策略,提高居民防蚊灭蚊意识。

目前尚无针对 Zika 病毒感染的特效药物治疗方法,发病后主要为对症治疗,注意休息、多饮水,可服用对乙酰氨基酚或扑热息痛减轻发热和疼痛症状,在排除感染登革热之前,禁止服用非甾体类抗炎药,避免发生出血。

在进行临床诊断时,需与登革热、螺旋体病、疟疾、立克次体病、A 组链球菌感染、风疹、麻疹、细小病毒、肠道病毒、腺病毒和甲病毒属(基孔肯雅病、玛雅罗热、拉沙热、巴马森林病毒和辛德毕斯病毒)等鉴别诊断。目前主要的实验室诊断技术包括:

(1)RT-PCR:发病一周内,大部分患者血清中可检测出 Zika 病毒核酸。

(2)IgM 和中和抗体:在发病一周左右形成,但与其他黄病毒属成员,如登革热、西尼罗病毒等有交叉反应。

(3)蚀斑减少中和试验(plaque reduction neutralization):能够识别 Zika 病毒特异性中和抗体,避免其他黄病毒属成员交叉反应。

### 4 面对输入性 Zika 病毒感染的潜在威胁,我们已经做好哪些应急储备工作?

公共卫生事关国民健康维护、社会和谐稳定、国家安全强大、民族生存繁衍。美国国家卫生研究院过敏症和传染病研究所的科学家们在 2016 年 1 月份的《新英格兰医学杂志》(New England Journal of Medicine)上发表评述称:“Zika 病毒就摆在我们面前,随时可能形成传染性疾病大爆发的新局面。曾经相对不太重视的虫媒病毒大多局限于偏远的生态境地,如今却扩散为多发态势。对此我们必须赶紧着手相关的工作:病毒、生态学、昆虫学,以及病毒的储存宿主。当然还要制定更完善的公共卫生政策,控制虫媒病的扩散”<sup>[9]</sup>。

SARS 爆发至今已过去 12 年,这也是我国卫生应急防控能力飞速发展的 12 年,我国应对新发再发传染病的预防与控制能力得到了长足的发展,未雨绸缪地开展针对具有潜在输入威胁的传染病的技术储备,是我国公共卫生体系的战略需求,也是疾控部门和科研工作者应尽的社会责任。从 2015 年 12 月 1 日 WHO 发布关于 Zika 病毒的全球预警通告至今,以中国医学科学院医学实验动物研究所为代表的科研工作者在病毒的宿主、动物模型、实验室检测方法等方面均进行了相应的技术储备,具体

包括:

(1) 宿主: 已对 Zika 的自然宿主伊蚊 (*Aedes spp.*)、易感细胞白纹伊蚊 (*Ae. albopictus*) C6/36 细胞进行了资源及接种技术储备, 已参考登革热建立了乳鼠病毒分离技术储备, 用于病毒的扩增培养;

(2) 动物模型: 已对易感动物恒河猴、IFN- $\alpha/\beta$  受体敲除小鼠及多品系 CC 小鼠进行了资源储备, 能具备一定规模的供应能力, 用于病毒致病性研究, 及相关药物、疫苗的有效性评价;

(3) 实验室检测技术, 已对针对临床及动物模型 (主要为以小鼠为代表的啮齿类和恒河猴) 感染 Zika 病毒的灵敏、特异的 Real-time PCR 检测引物和探针进行了资源及技术储备, 用于临床样本及动物模型中 Zika 病毒的检测与鉴定。

基于以上储备工作, 在同时做好出入境监测工作的基础上, 我们有信心在面对可能输入的 Zika 病例时, 在成功狙击埃博拉、中东呼吸综合征等输入性新发再发传染病的经验积累上, 科学、有序、从容的应对, 向我国人民、向全世界交出令人满意的业绩。广大群众也应相信国家政府已全面提升的传染病应急处置能力, 不传谣不恐慌, 传递正能量。

参考文献:

[ 1 ] Dick GW, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus. I. Isolations

and serological specificity [ J ]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1952, 46(5): 509-520.

[ 2 ] Duffy MR, Chen TH, Hancock WT. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia [ J ]. N Engl J Med, 2009, 360(24): 2536-2543.

[ 3 ] Hayes EB. Zika virus outside Africa [ J ]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(9): 1347-1350.

[ 4 ] Kirya BG. A yellow fever epizootic in Zika forest, Uganda, during 1972: Part 1: Virus isolation and sentinel monkeys [ J ]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1977, 71(3): 254-260.

[ 5 ] WHO. Zika virus outbreaks in the Americas [ J ]. Wkly Epidemiol Rec, 2015, 90(45): 609-610.

[ 6 ] Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013 [ J ]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(6): 1085-1086.

[ 7 ] Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA [ J ]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(5): 880-882.

[ 8 ] Buckley A, Gould EA. Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with Zika or Langkat virus [ J ]. J Gen Virol, 1988, 69 ( Pt 8 ): 1913-1920.

[ 9 ] Fauci A. S. Morens DM. Zika Virus in the Americas - Yet Another Arbovirus Threat [ J ]. N Engl J Med, 2016, Jan 13. [ Epub ahead of print ]

[ 修回日期 ] 2016-01-25