

ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

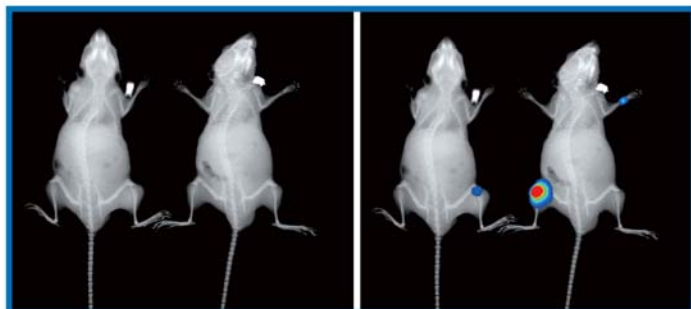


ACTA LABORATORIUM
ANIMALIS SCIENTIA SINICA

中国实验动物学报

ZHONGGUO SHIYAN DONGWU XUEBAO

第24卷 第1期 / Vol.24 No.1



数据库:

中国科学引文数据库CSCD

中文核心期刊要目总览

中国科技论文统计源期刊

世界卫生组织西太平洋地区医学索引

中国核心期刊(遴选)数据库

中国学术期刊综合评价数据库

中国生物医学文献数据库

万方数据资源系统中国数字化期刊群

美国化学文摘

主办单位:

中国实验动物学会

中国医学科学院医学实验动物研究所

ISSN 1005-4847



2016

1

中国实验动物学报

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

双月刊 1993 年 6 月创刊

第 24 卷 第 1 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
中国实验动物学报编辑委员会

出版与发行
中国实验动物学会
100021, 北京市朝阳区潘家园南里 5 号
电话: (010) 67779337
传真: (010) 67770690
E-mail: a67761337@126.com

网 址: <http://zgswdw.alljournal.ac.cn/sydwbyjx/ch/index.aspx>

照 排
同方知网(北京)技术有限公司

印 刷
北京昌平百善印刷厂

邮发代号
2-748

订 购
中国实验动物学报编辑部
100021, 北京市朝阳区潘家园南里 5 号

广告经营许可证号
京朝工商广字第 8131 号

定 价
每期 20.00 元, 全年 120.00 元

中国标准连续出版物号
ISSN 1005-4847
CN 11-2986/Q

2016 年版权归中国实验动物学会所有
本刊已加入万方数据网络、中国学术期刊(光盘版)电子杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国科学引文数据库、美国化学文摘、世界卫生组织西太平洋地区医学索引等数据库, 在本刊所支付的稿费中已包含上述网站著作权使用费。编辑部有复制权、发行权、汇编权以及信息网络传播权。
本刊电子版出版发行合作单位: 中邮阅读网: www.183read.com

本期执行主编 秦 川
本期责任编辑 李继平
英文编辑 周传农

目 次

研究报告

- 小鼠早期肺腺癌模型的病理学研究 肖时满, 李勇爱, 强金伟, 等(1)
- Rapid detection of *Shigella* and *Salmonella* in rhesus monkeys by loop-mediated isothermal amplification assay YE Li, WU Fang, WANG Yi-jia, et al(7)
- 人前列腺癌骨转移裸鼠移植模型的建立及其
循环肿瘤细胞的特性 张彩勤, 张海, 赵勇, 等(14)
- 小鼠原发性肝癌建模方法的优化 顾洪伟, 陈琦, 张炜, 等(20)
- 芍药苷对大鼠背根神经元细胞内 Ca^{2+} 的影响 黄鹤飞, 陈颖, 蔡维艳, 等(25)
- 阴虚动风证帕金森病异动症大鼠大麻素 CB1 受体变化
及复方地黄方的干预作用 滕龙, 洪芳, 何建成(31)
- Noggin* 基因沉默表达载体的构建及效果评价 马雨楠, 游颖, 孙兆增, 等(37)
- 一种牵张成骨大鼠实验模型的建立 曾景奇, 黄枫, 姜自伟, 等(43)
- 久泻灵颗粒对脾胃阳虚型溃疡性结肠炎大鼠
TLR4 及 NF- κ B p65 表达的影响 吴玉泓, 许雅清, 李海龙, 等(47)
- 利用心脏特异性 *CYP2E1* 基因修饰小鼠评价
药物心脏毒性的初步探索 裴彦宇, 孙井江, 赵显莉, 等(53)
- 外源性 β -NGF 调节骨改建过程中的可能作用机制
..... 茅传青, 卓丽莉, 王锦, 等(59)
- 两品系大鼠在经典条件反射和操作式条件反射中的行为学表现
..... 王克柱, 徐攀, 卢聪, 等(65)
- 利用多重荧光 STR 技术分析上海地区 7 品系常用
近交系小鼠核心群的遗传特性 倪丽莉, 赵丽亚, 赵立虎, 等(72)
- 雌性大鼠去卵巢模型中脑神经内分泌信号异常传导的机理
..... 侯雪芹, 李悦, 荣翠平, 等(80)
- 复合刺激创伤后应激障碍模型大鼠重要脑区的病理变化
..... 陈旺, 李陈成, 李森, 等(87)
- 两品系豚鼠屈光状态和眼球径的发展和比较 卫振, 张森, 蒋丽琴, 等(92)
- 研究进展**
- 新型七甲川菁染料用作肿瘤模型活体成像的研究进展
..... 王哲轩, 赵宁宁, 张彩勤, 等(97)
- 生物学标志物在心力衰竭早期诊断中作用的研究进展
..... 张辉, 周晓慧, 范慧敏, 等(102)
- P2Y₆ 受体生物学效应的研究进展 曾勇, 文爱珍, 王顺民, 等(107)
- 科技工作者科学道德规范 (30, 86)
- 深切缅怀旭日干院士 (封三)

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

Bimonthly, Established in June 1993

Volume 24 Number 1, February 29, 2016

Responsible Institution

China Association for Science and Tecnology

Sponsor

Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

Institute of Laboratory Animal Science, Chinese

Academy of Medical Sciences

Editor-in-Chief

QIN Chuan(秦川)

Editing

Editorial Office of ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District,

Beijing 100021

Tel: (010)67779337 Fax: (010)67770690

E-mail: a67761337@126.com

Publishing

Editorial Office of ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District,

Beijing 100021

Tel: (010)67779337 Fax: (010)67770690

E-mail: a67761337@126.com

Undertaker

Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences

Department of Laboratory Animal Sciences, Peking Union Medical College

Printing

Baishan Printing House of Changping, Beijing

Distributor and Mail-order

Editorial Office of ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District,

Beijing 100021

Tel: (010)67779337 Fax: (010)67770690

CSSN

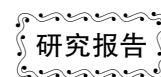
ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

Copyright 2014 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

CONTENTS IN BRIEF

- Pathological characterization of the early lung adenocarcinoma in a mouse model XIAO Shi-man, LI Yong-ai, QIANG Jin-wei, et al (1)
- Rapid detection of *Shigella* and *Salmonella* in rhesus monkeys by loop-mediated isothermal amplification assay YE Li, WU Fang, WANG Yi-jia, et al (7)
- Establishment of a nude mouse model of bone metastasis of human prostate cancer and the biological characteristics of circulating tumor cells ZHANG Cai-qin, ZHANG Hai, ZHAO Yong, et al (14)
- Optimization of the establishment method of mouse model of hepatocellular carcinoma GU HONG-wei, CHEN QI, ZHANG WEI, et al (20)
- Effect of paeoniflorin on the calcium concentration in rat dorsal root ganglion neurons HUANG He-fei; CHEN Ying; CAI Wei-yan; et al (25)
- Effects of compound rehmannia prescription on the cannabinoid receptor 1 in rats with wind syndrome due to deficiency of Yin in levodopa-induced dyskinesia (LID) in Parkinson's disease TENG Long, HONG Fang, HE Jian-cheng (31)
- Construction and evaluation of gene silencing vectors of *Noggin* MA Yu-nan, YOU Ying, SUN Zhao-zeng, et al (37)
- Establishment of a novel rat model of distraction osteogenesis ZENG Jing-qi, HUANG Feng, JIANG Zi-wei, et al (43)
- Effect of a Chinese medicine, Jiuxieling granules, on the expression of TLR4 and NF- κ B p65 in ulcerative colitis rats with spleen and kidney yang deficiency WU Yu-hong, XU Ya-qing, LI Hai-long, et al (47)
- Exploration of the use of heart-specific *CYP2E1* genetically modified mice in evaluation of drug-induced cardiotoxicity PEI Yan-yu, SUN Jing-jiang, ZHAO Xian-li, et al (53)
- Possible mechanism of bone remodeling during the process of bone healing via topical application of exogenous β -NGF MAO Chuan-qing, ZHUO Li-li, WANG Jin, et al (59)
- Behavioral differences of the Sprague-Dawley and Wistar rats in Pavlovian conditioning and reward operant conditioning WANG Ke-zhu, XU Pan, LU Cong, et al (65)
- Genetic characteristics of seven inbred mouse strains in core colonies from Shanghai analyzed using fluorescent multiplex STR NI Li-ju, ZHAO Li-ya, ZHAO Li-hu, et al (72)
- Mechanism of abnormal transduction of neuroendocrine signals in the brain of ovariectomized rat HOU Xue-qin, LI Yue, RONG Cui-ping, et al (80)
- Pathological changes in some important brain areas of rats with post-traumatic stress disorder induced by combined stress CHEN Wang, LI Chen-cheng, LI Sen, et al (87)
- Comparison of the refractive development and ocular growth between two strains of guinea pigs WEI Zhen, ZHANG Sen, JIANG Li-qin, et al (92)
- Advances in research of novel heptamethine cyanine dyes as a potential diagnostic agent for optical imaging of tumor models WANG Zhe-xuan, ZHAO Ning-ning, ZHANG Cai-qin, et al (97)
- Research progress of the role of biological markers in early diagnosis of heart failure ZHANG hui, ZHOU Xiao-hui, FAN Hui-min, et al (102)
- Research progress of the biological effect of P2Y₆ receptor ZENG Yong, WEN Ai-zhen, WANG Shun-min, et al (107)



小鼠早期肺腺癌模型的病理学研究

肖时满^{1△}, 李勇爱^{1△}, 强金伟^{1*}, 邓林¹, 张友元²

(1. 复旦大学附属金山医院 影像科, 上海 201508; 2. 复旦大学附属金山医院 病理科, 上海 201508)

【摘要】 目的 研究小鼠早期肺腺癌的病理学表现, 重点观察肿瘤生长类型和肿瘤-支气管关系。**方法** KM 小鼠 10 只每周皮下注射诱癌剂亚硝基胍(MNNG, 浓度 2.0 mg/mL) 0.2 mg, 连续 4 周。喂养至第 100 天时处死, 解剖肺叶并肉眼计数肿瘤, 甲醛固定后, 随机选择 100 个肿瘤石蜡包埋、3 μm 切片、HE 染色、光镜下观察和测量肿瘤的组织病理学类型、大小、形态、边缘、生长方式以及与支气管的关系。**结果** 肉眼共见 187 个肿瘤, 随机选取的 100 个病理证实均为肺腺癌。肿瘤大小 0.19 ~ 1.33 mm, 平均 0.48 mm。镜下见三种生长方式: 匍匐性、膨胀性和混合性, 数量分别为 6 个、28 个和 68 个; 平均大小分别为 0.34、0.54 mm 和 0.47 mm。100 个肿瘤中 96 个与支气管形成直接关系, 其中 13% 和 96% 的肿瘤分别与通气支气管和换气支气管有关。肿瘤中心部、周边部和外周部支气管的显示率分别为 19%、49% 和 96%; 平均直径分别为 67、91 μm 和 110 μm 。肿瘤生长遇支气管阻挡或沿支气管间扩展可形成分叶(33%)或毛刺(35%)。**结论** 小鼠早期肺腺癌生长方式及肿瘤-小支气管关系的病理学研究有助于我们加深对人早期肺腺癌相应 CT 表现的认识。

【关键词】 肺癌; 支气管; 小鼠; 病理学; 动物模型; CT 影像学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0001-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.001

Pathological characterization of the early lung adenocarcinoma in a mouse model

XIAO Shi-man¹, LI Yong-ai¹, QIANG Jin-wei^{1*}, DENG Lin¹, ZHANG You-yuan².

(1. Department of Radiology, 2. Department of Pathology, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201508, China)

【Abstract】 Objective To investigate the pathological characteristics of early lung adenocarcinoma in a mouse model with emphasis of the tumor growth patterns and tumor-bronchus's relationship. **Materials and Methods** Early lung adenocarcinoma was induced in 10 mice by administering 0.2 mL N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, 2.0 mg/mL) once weekly for 4 consecutive weeks. The mice were sacrificed at the 100th day. The lung specimens were fixed in 10% formalin solution. One hundred tumors were randomly sampled, embedded in paraffin, cut into 3- μm sections, stained with hematoxylin and eosin (HE) and evaluated by histopathology. Pathological type, location, size, shape, margin, growth pattern and tumor-bronchus relationship of the tumors were assessed. **Results** One hundred and eighty-seven tumors were found macroscopically in the 10 mice. All of the randomly selected 100 tumors were adenocarcinomas of a size of 0.19 to 1.33 mm (mean size of 0.48 mm). The tumors demonstrated three types of growth pattern: lepidic (n=6), expansile (n=26), and mixed (n=68). Their mean size was 0.34 mm, 0.54 mm and 0.47 mm, respectively. Ninety-six out of the 100 tumors had direct relation with the bronchioles, of which 13% with the conductive bronchioles and 96% with the ventilating bronchioles. There were bronchioles at the center of tumor in 19% of the tumors, at the outer area of tumor in 49% of the tumors, and at the periphery of tumor in 96% of the tumors. Lobulation (33%) and spiculation (35%) of the tumors were formed by the block of bronchioles or by the invasive growth between or along bronchioles. **Con-**

【基金项目】 国家自然科学基金(81171340); 上海市科委医学重点项目(10411956800)。

【作者简介】 肖时满(1985-), 男, 博士生, 研究方向: 胸腹部影像学; 李勇爱(1987-), 女, 硕士生, 研究方向: 胸腹部影像学。△共同第一作者。

【通讯作者】 强金伟(1962-), 男, 博士生导师, 研究方向: 胸腹部影像学。E-mail: dr.jinweiqiang@163.com

clusions Analyzing the pathological growth patterns and tumor-bronchus relationships in early mouse lung adenocarcinomas will help us to better understand the corresponding CT manifestations of human early lung adenocarcinoma.

【Key words】 Lung cancer; Bronchus; Mouse; Pathology; Animal model; CT imaging

Corresponding author: QIANG Jin-wei, E-mail: dr. jinweiqiang@163.com

肺癌的发病率及死亡率居各类癌症之首^[1]。肺腺癌为最常见的病理组织学亚型, 占所有肺癌近一半, 尤其是女性^[2,3]。CT 胸部筛查因可明显降低肺癌患者的死亡率正在成为体检常规^[4], 在高危人群肺癌的检出率为 1.3% ~ 4%, 其中绝大多数为肺腺癌, 并且半数以上为早期^[5,6]。这些早期小肺腺癌缺乏典型的影像学特征, 其诊断成为了一大难题, 患者常需长期随访, 承受巨大的精神、经济和 X 线辐射负担^[7,8]。

早期肺腺癌的 CT 表现可为纯磨玻璃、混合磨玻璃和实性结节, 具有不同的病理学基础^[7-10]。由于肿瘤源自肺泡或小气道上皮, 必然与气道形成一定的空间关系。研究表明了解肿瘤-支气管关系有助于确定肿瘤的良、恶性和细胞类型^[11-13]。但以前研究由于选取的肿瘤较大, 受 CT 分辨率和扫描层厚的限制, 仅显示了较大的支气管与肿瘤关系^[11,14]。虽然各向同性、更高分辨率多层螺旋 CT (MSCT) 有可能显示更小的支气管及其与肿瘤的关系^[15], 但临床实践中 MSCT 与病理对照受到很大的限制, 故早期小肺癌与小支气管的关系的病理基础还未完成阐明。我们应用小鼠模型, 研究早期肺腺癌的病理学表现, 以期加深对肿瘤生长方式及肿瘤-小支气管关系的认识。

1 材料与方法

1.1 小鼠早期肺癌模型的制作

SPF 级 KM 小鼠 10 只, 4 周龄, 18 ~ 22 g, 雌性, 购自上海杰思捷实验动物有限公司【SCXK(沪)2012-0006】。动物实验在上海市公共卫生临床中心实验动物部进行【SYXK(沪)2010-0098】。实验前适应饲养 1 周, 条件为: 23℃, 相对湿度 65% ~ 75%, 自由摄食、饮水。每周背部皮下注射诱癌剂 N-甲基-N-硝基-亚硝基胍溶液 (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG, 上海如吉生物公司), 剂量为 0.2 mL, 浓度 2.0 mg/mL, 连续注射 4 周。

1.2 肺癌病理标本的制作

腹腔注入浓度为 10 mg/mL 的氯胺酮溶液 0.02 mL 使小鼠麻醉, 沿中线剪开颈部皮肤, 分离气管; 在深吸气末结扎气管, 使肺部保持膨胀状态; 分离肺

脏; 大体检视计数肿瘤; 浸入 4% 的甲醛溶液中 24 h 以上。

随机选取 100 个肿瘤结节, 以其为中心切 3 mm 厚的组织块, 经脱水、浸蜡、包埋, 3 μ m 层厚切片, 从肿瘤出现到消失, 间隔 100 μ m 取材并编号; HE 染色和封片。

1.3 病理分析

光镜下分析肿瘤的组织学类型、位置分布、大小、边缘、生长方式以及与气道的空间关系等。

1.4 统计分析

采用 SPSS 20.0 统计学软件, Pearson 卡方比较肿瘤生长方式与支气管部位的关系, 比较混合性肿瘤的大小与支气管部位的关系, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肺肿瘤的病理学表现

肉眼共见的 187 个肿瘤, 从中随机选取的 100 个肿瘤病理观察证实均为肺腺癌。

2.1.1 部位

肿瘤均位于周围肺组织, 所有通气支气管 (叶-终末细支气管) 腔内未见明显支气管上皮增生及肿瘤形成, 仅见少数通气支气管与肿瘤相邻。所有换气支气管 (呼吸性支气管和肺泡管) 只是不同程度的被肿瘤包绕、压迫或侵占, 未见仅位于换气支气管腔内的肿瘤征象。

2.1.2 大小

直径 0.19 ~ 1.33 mm, 平均 0.48 mm。其中 ≤ 0.25 mm 肿瘤 7 个, 0.26 ~ 0.50 mm 65 个, 0.51 ~ 0.75 mm 18 个, 0.76 ~ 1.00 mm 8 个, > 1.00 mm 2 个。

2.1.3 生长方式

镜下可见三种生长方式: 匍匐性: 6 个, 大小 0.29 ~ 0.41 mm, 平均 0.34 mm, 肿瘤细胞沿着肺泡间隔匍匐性生长, 在间隔内堆积, 原肺泡构架保留完好, 但肺泡腔缩小 (图 1-A); 膨胀性: 26 个, 大小 0.19 ~ 1.33 mm, 平均 0.54 mm, 肺癌细胞呈堆积式膨胀性生长, 周边无匍匐性成分, 周边肿瘤组织内仍可见增厚的肺泡架构, 肺泡腔内填满来源于肺泡壁

的乳头状肿瘤(图 1-B);混合性:68 个,大小 0.19 ~ 1.10 mm,平均 0.47 mm,肿瘤内部呈膨胀性生长,周边部呈匍匐性生长。混合型中匍匐式成分 > 75%、50% ~ 75%、25% ~ 50% 和 < 25% 的肿瘤平均大小分别为 0.30、0.37、0.42、0.57 mm。膨胀性肿瘤和混合性肿瘤的膨胀性部分内可见“根须状”分支细裂隙,部分与瘤周支气管相通(图 1-C)。

2.2 肿瘤-支气管关系观察

2.2.1 肿瘤与通气细支气管关系

100 个肿瘤中见 13 个瘤(13%)与通气细支气管形成空间关系,其中 < 0.5 mm 的肿瘤(共 72 个)中 5 个瘤(7%)有关系支气管,形态均正常;0.5 ~ 1 mm 的肿瘤(共 26 个)有 6 个瘤(23%)有关系支气管,其中 4 个瘤支气管轻度受压;1 个瘤支气管形成深压迹;另 1 个瘤支气管腔被肿瘤截断;> 1 mm 的肿瘤(共 2 个)均有(100%)关系支气管,共见 3 支,其中 2 支气管被压扁,另 1 支管腔形态正常。

2.2.2 肿瘤与换气支气管关系

96 个(96%)肿瘤均可见一支或多支换气支气管与肿瘤形成一定的空间关系,其余 4 个肿瘤均小于 0.3 mm,位于胸膜旁,瘤内或瘤旁未见明确的换气支气管。96 个肿瘤共见 478 支换气支气管,其中 138 支位于肿瘤内部,340 支位于肿瘤外周。

2.2.3 肿瘤生长方式和大小与支气管关系

肿瘤生长方式和大小与支气管部位的关系见表 1、2。表 1 显示:(1)匍匐性肿瘤的任何部位均见支气管。(2)膨胀性肿瘤中心部未见支气管,周边部和外周部支气管见于 19% 和 96% 的肿瘤(图 1-D)。(3)混合性肿瘤的中心部、周边部和外周部支气管见于 21%、56% 和 96% 的肿瘤。(4)总体而言,肿瘤中心部、周边部和外周部支气管分别见于 20%、49% 和 96% 的肿瘤(图 1-E)。表 2 显示:肿瘤直径越大,中心部有支气管的比例越小,周边部比例越高,肿瘤外周部几乎总是有支气管。从中心部(15 支)、周边部(92 支)到外周部(233 支)支气管的平均直径逐渐增大,分别为 67、91 和 110 μm 。

表 1 肿瘤生长方式与支气管部位的关系

Tab. 1 Relationships between the growth patterns of tumors and bronchial locations

生长方式 Growth patterns	肿瘤数 (n = 100)	支气管部位 Bronchus locations in tumor			P 值 P value
		中心部 Center	周边部 Outer area	外周部 Periphery	
匍匐性 Lepidic	6	6(100%)	6(100%)	6(100%)	/
混合性 Mixed	68	14(21%)	38(56%)	65(96%)	0.000
膨胀性 Expansile	26	0(0%)	5(19%)	25(96%)	0.000
P 值 P value	/	0.000	0.000	0.000	/

表 2 混合性肿瘤大小与支气管部位关系

Tab. 2 Relationships between the size of mixed tumors and bronchial locations

肿瘤大小/mm Tumor sizes	肿瘤数 (n = 68)	支气管部位 Bronchus locations in tumor			P 值 P value
		中心部 Center	周边部 Outer area	外周部 Periphery	
0 - 0.5	50	11 (22%)	24 (48%)	47 (94%)	0.000
0.5 - 1.0	17	3 (17%)	13 (76%)	17 (100%)	0.000
1.0 - 1.5	1	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	0.223
P 值	/	0.000	0.000	0.000	/

2.3 肿瘤生长方式与分叶和毛刺的关系

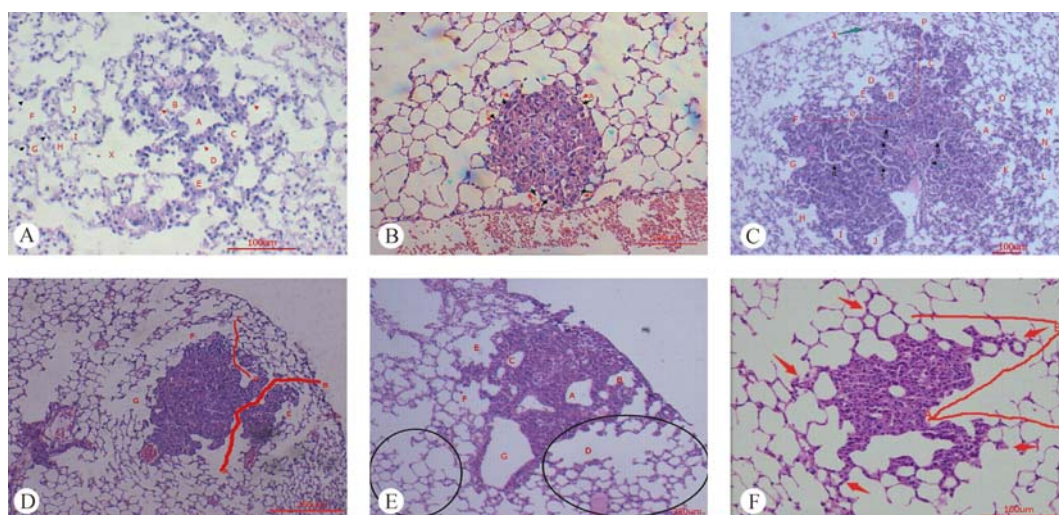
匍匐性和混合性肿瘤的边缘部沿肺泡间隔扩展,使肺泡间隔增厚,当生长遇到支气管时,先沿着管壁包绕生长,其中较大的支气管可阻挡肿瘤生长

而形成分叶;当肿瘤沿两支换气支气管之间扩展可呈尖角样而形成毛刺(图 1 - F)。肿瘤生长方式与分叶毛刺的关系见表 3。

表 3 肿瘤生长方式与分叶和毛刺的关系(单位:例)

Tab. 3 Relationships between the growth patterns of tumors and lobulation and spiculation

生长方式 Growth patterns	肿瘤数 Tumor number	分叶 Lobulation	毛刺 Spiculation
匍匐性 Lepidic	6	1(17%)	0(0)
混合性 Mixed	68	28(41%)	32(47%)
膨胀性 Expansile	26	4(15%)	3(12%)
合计 Total	100(100%)	33(33%)	35(35%)



注:A: 匍匐性生长肿瘤,肿瘤大小为0.3 mm。A 为肿瘤内肺泡管,B-E 为肿瘤内肺泡,可见肺泡间隔增厚,红色箭头示肿瘤内残留的正常肺泡扁平上皮细胞。左侧为正常肺组织;F 为肺泡管,G-J 为肺泡,黑箭头示正常肺泡扁平上皮细胞。X 为呼吸性细支气管。(H&E 染色, $\times 100$) B: 膨胀性生长肿瘤,肿瘤大小0.19 mm;A-F 为实性肿瘤组织周边的肺泡,黑箭头示突入肺泡腔内生长的肿瘤细胞团,呈结节样或乳头状,红箭头示肿瘤细胞周边的正常肺泡架构仍然完好,与肿瘤旁正常肺泡壁相同(绿箭头)。(H&E 染色, $\times 100$) C: 混合性生长肿瘤,肿瘤大小0.95 mm。R-W 示肿瘤中心部许多“根须”状裂隙,为残留的换气支气管,可见 S、U 与外界开放的支气管相通。A-Q 示肿瘤外周和内部的换气支气管,呈现各种不同的形状。X 示毛刺样肿瘤组织。FP 曲线段示肿瘤分叶。(H&E 染色, $\times 40$) D: 膨胀性生长肿瘤,大小0.65 mm。AB 线段示支气管通过肿瘤;CD 线段示支气管进入肿瘤后中断;E、F 和 G 为肿瘤旁的支气管。(H&E $\times 40$) E: 混合性生长肿瘤。A 为中心部支气管,B、C、D 为周边部支气管,E、F、G 为外周支气管。右侧圆圈内为匍匐式生长肿瘤组织,左侧圆圈内为正常组织结构。G 为肿瘤周边截断的支气管。(H&E $\times 40$) F: 混合性生长肿瘤。在生长过程中,遇到支气管(AB 线段)后绕开并沿着两侧的肺泡群内生长,形成肿瘤分叶和毛刺(红箭头)。(H&E 染色, $\times 40$)

图1 3种不同生长方式肿瘤

Note. A: A tumor with lepidic growth in a diameter of 0.3 mm. The letter A indicates an alveolar duct and B to E indicate the alveoli with thickened septum inside a tumor. The red arrowheads point at an residual normal alveolar epithelial cells. Left part of the figure shows a normal lung structure. F indicates an alveolar duct, and G-J indicate the alveoli. The black arrowheads point at the normal alveolar epithelial cells. X indicates a respiratory bronchiole. (H&E staining, $\times 100$) B: A tumor with expansile growth pattern, in a diameter of 0.19 mm. The letters A to F indicate alveoli in the periphery of the solid tumor. The black arrows point at an cluster of tumor cells infiltrating into the alveolar cavity and forming nodular or papillary structures. The red arrows point at an intact alveolar structure in the periphery of the tumor, showing the same structure as the normal alveolar structures adjacent to the tumor (green arrow). (H&E staining, $\times 100$) C: The tumor with mixed growth pattern in a diameter of 0.95 mm. The letters R to W point at the root-like fissures at the center of tumor, which are residual ventilating bronchioles. Some fissures are connecting to the outside bronchioles of the tumor (S and U). A-Q show the diverse shapes of the ventilating bronchioles at the outer and center of the tumor. X shows spiculate tumor tissue. FP curve shows lobulation of the tumor. (H&E $\times 40$) D: The tumor is of expansile growth in a diameter of 0.65 mm. Line AB shows a bronchiole passing through the tumor. Line CD shows an interrupted bronchiole inside the tumor. E, F and G are bronchioles adjacent to the tumor. (H&E staining, $\times 40$) E: The tumor is of mixed growth pattern. The letter A is a central bronchiole. B, C and D are outer bronchioles. E, F and G are peripheral bronchioles. The right circle indicates the tumor with lepidic growth pattern. The left circle indicates the normal lung tissue. G is a truncated outer bronchus. (H&E staining, $\times 40$) F: A tumor with mixed growth pattern. In the process of tumor growth, when the tumor grows to encounter with the bronchiole (line AB), it infiltrates around the bronchiole and along the alveolar clusters to form lobulation and spiculation (red arrows). (H&E staining, $\times 40$)

Fig. 1 Three types of the tumor growth patterns

3 讨论

小鼠肺腺癌模型也是肺癌模型中研究最多、应用最广的一类模型。我们在前期研究的基础上采用诱癌剂亚硝基胍成功建立了小鼠肺腺癌模型,在入药后 100 d 时肉眼可见所有小鼠有肿瘤生长。根据人类肺癌病理诊断标准,这些肿瘤均为肺腺癌,未见明显的癌前病变不典型腺瘤样增生,也未见人类原位腺癌典型的大头钉样细胞。

3.1 关于小鼠早期肺腺癌

虽然小鼠早期肺腺癌的诊断标准还未见报道,而且人类关于不典型腺瘤样增生和原位腺癌的标准也不能完全应用于小鼠肺癌,但肿瘤大小可作为早期肺腺癌的一个重要的指标。我们的前期研究对照了小鼠和人肺的直径和肺泡大小,发现两者大小均相差 20 倍,因此 0.5 mm 大小的小鼠肺癌相当于 10 mm 的人类肺癌,而且 CT 胸部筛查发现的结节中 97% 小于 10 mm^[5],故我们以 0.5 mm 大小作为小鼠早期肺腺癌的标准。本组肿瘤直径 0.19 ~ 1.33 mm,平均 0.48 mm,72% 的肿瘤小于 0.5 mm。

3.2 关于肺腺癌的来源部位

肺腺癌主要来自周围的肺组织,具体来说是指亚段以下细支气管上皮细胞来源的肿瘤。Sutherland 等^[16]用基因重组的腺病毒刺激基因工程小鼠的气道上皮,诱导出了不典型腺瘤样增生及肺腺癌,并证实了小鼠肺腺癌来源于终末细支气管到肺泡的上皮细胞。Desai 等^[17]也用基因工程的方法建立了一个肺腺癌模型,用免疫荧光法证实了肿瘤全部来自于肺泡上皮组织中的 T2 型祖细胞,后者在向 II 型肺泡细胞分化的过程中受到致癌因子的刺激就会发生不典型增生,并进一步形成肺腺癌。本研究显示:肿瘤细小时呈匍匐式沿肺泡间隔生长,逐渐在间隔内分层、堆积;所有通气支气管内均未见明显上皮异常增生及肿瘤形成;也未见仅位于换气支气管腔内的肿瘤,但可见其被肿瘤包绕、压迫或侵占;膨胀性生长的肿瘤内可见“根须状”分支裂隙,部分可见与瘤外支气管相通,我们认为系压闭的支气管残存腔隙,由此我们推测肿瘤也均来自于肺泡上皮。

3.3 关于腺癌的生长方式、分叶和支气管肿瘤关系

人类肺腺癌有三种生长方式:匍匐型、膨胀型性和混合型^[18-20]。本小鼠肺腺癌模型也见与人类相同的生长方式,其中匍匐型最小(平均 0.34 mm);膨胀型最大(平均 0.54 mm);混合型大小介于两者

间(平均 0.47 mm)。而且随着混合型肿瘤的增大,其匍匐性成分下降;膨胀性比例越大。其生长方式及其与肿瘤大小的关系与人类肺腺癌是相同的。

鉴于混合型肿瘤的匍匐式生长位于周边部、膨胀性生长位于中心的特点,在一定程度上可以说明:肿瘤早期呈匍匐型,肿瘤细胞沿肺泡间隔生长,遇到支气管腔时绕过后继续沿着前方的肺泡间隔爬行,这样就形成了包在肿瘤中心和周边部的含气支气管以及瘤周支气管;肿瘤进一步生长,中央部分开始呈现膨胀性生长,使得原来部位的支气管受压和缩小(平均 67 μm),直至被肿瘤压迫成“根须状”裂隙,使支气管显示率减少(21%);而肿瘤周边部受压较轻,支气管径仅轻度缩小(平均 91 μm),支气管的显示率为 56%;肿瘤越大,中心膨胀区越来越多时,中心部支气管消失、周边部显示进一步减少(19%);不论何种生长方式,肿瘤外周几乎均可见管径正常的瘤周支气管。我们的发现和推测与 CT 研究结果一致^[12, 13, 19],即含气支气管是肺腺癌的特征性征象。

肿瘤组织包绕支气管生长还可以部分解释分叶和毛刺现象,肿瘤细胞遇支气管阻挡沿支气管外壁纵轴方向爬行生长和横轴方向绕行,形成分叶和毛刺,其中以混合性肿瘤占绝大多数。

本研究有一些限度:首先,本模型完全匍匐型生长的肿瘤较少,观察时间点提前能否见到更多的该类肿瘤有待进一步研究。其次,小鼠原位腺癌缺乏病理学标准,我们采用 0.5 mm 作为早期肺腺癌的标准有一定的主观性。再次,我们未评估其他原因(如血管)导致的分叶和毛刺。

综上所述,我们用化学法诱导的小鼠早期肺腺癌模型,肿瘤源自肺泡上皮细胞,病理上呈现匍匐型、膨胀型和混合型三种生长方式,其生长方式与肿瘤大小、形态、边缘有关,肿瘤-支气管关系可反映肿瘤的病理基础。

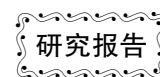
(致谢:本文小鼠肺癌病理诊断得到上海市胸科医院病理科邵晋晨副主任医师的大力支持,在此致谢!)

参 考 文 献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29.
- [2] Curado MP, Edwards B, Shin HR, et al. Cancer Incidence in Five Continents, Vol. IX [M]. Lyon: IARC Scientific Publications, 2007.
- [3] Lortet-Tieulent J, Soerjomataram I, Ferlay J, et al. International

- trends in lung cancer incidence by histological subtype; adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women [J]. *Lung Cancer*, 2014, 84(1): 13–22.
- [4] Henschke CI, Boffetta P, Gorlova O, et al. Assessment of lung-cancer mortality reduction from CT screening [J]. *Lung Cancer*, 2011, 71(3): 328–332.
- [5] Diederich S, Wormanns D, Semik M, et al. Screening for early lung cancer with low-dose spiral CT: prevalence in 817 asymptomatic smokers [J]. *Radiology*, 2002, 222(3): 773–781.
- [6] Swensen SJ, Jett JR, Hartman TE, et al. CT screening for lung cancer: five-year prospective experience [J]. *Radiology*, 2005, 235(1): 259–265.
- [7] Henschke CI, Yankelevitz DF, Yip R, et al. Lung cancers diagnosed at annual CT screening: volume doubling times [J]. *Radiology*, 2012, 263(2): 578–583.
- [8] Leef JL 3rd, Klein IS. The solitary pulmonary nodule [J]. *Radiol Clin North Am*, 2002, 40: 123–143.
- [9] Felix L, Serra-Tosio G, Lantuejoul S, et al. CT characteristics of resolving ground-glass opacities in a lung cancer screening programme [J]. *Eur J Radiol*, 2011, 77(3): 410–416.
- [10] Lee SM, Park CM, Goo JM, et al. Transient part-solid nodules detected at screening thin-section CT for lung cancer: comparison with persistent part-solid nodules [J]. *Radiology*, 2012, 255(1): 242–251.
- [11] Choi JA, Kim JH, Hong KT, et al. CT bronchus sign in malignant solitary pulmonary lesions: value in the prediction of cell type [J]. *Eur Radiol*, 2000, 10(8): 1304–1309.
- [12] Santos MK, Muley T, Warth A, et al. Morphological computed tomography features of surgically resectable pulmonary squamous cell carcinomas: impact on prognosis and comparison with adenocarcinomas [J]. *Eur J Radiol*, 2014, 83(7): 1275–1281.
- [13] Qiang JW, Zhou KR, Lu G, et al. The relationship between solitary pulmonary nodules and bronchi: multi-slice CT-pathological correlation [J]. *Clin Radiol*, 2004, 59(12): 1121–1127.
- [14] Lim HJ, Ahn S, Lee KS, et al. Persistent pure ground-glass opacity lung nodules ≥ 10 mm in diameter at CT scan: histopathologic comparisons and prognostic implications [J]. *Chest*, 2013, 144(4): 1291–1299.
- [15] Zhang Y, Qiang JW, Ye JD, et al. High resolution CT in differentiating minimally invasive component in early lung adenocarcinoma [J]. *Lung Cancer*, 2014, 84(3): 236–241.
- [16] 肖时满, 张玉, 强金伟. 小鼠早期肺腺癌模型的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(6): 227–232.
- [17] Sutherland KD, Song JY, Kwon MC, et al. Multiple cells-of-origin of mutant K-Ras-induced mouse lung adenocarcinoma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(13): 4952–4957.
- [18] Desai TJ, Brownfield DG, Krasnow MA. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer [J]. *Nature*, 2014, 507(7491): 190–194.
- [19] Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma [J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(2): 244–285.
- [20] Jiang B, Takashima S, Miyake C, et al. Thin-section CT findings in peripheral lung cancer of 3 cm or smaller: are there any characteristic features for predicting tumor histology or do they depend only on tumor size? [J]. *Acta Radiol*, 2014, 55(3): 302–308.

[收稿日期] 2015-11-26



Rapid detection of *Shigella* and *Salmonella* in rhesus monkeys by loop-mediated isothermal amplification assay

YE Li^{1 Δ}, WU Fang^{2 Δ}, WANG Yi-jia³, ZHENG Jun-wen³, FAN Jun-wen¹,
DING Ming¹, SHI Yan-sheng¹, ZHANG Xiao-fei^{4 *}, BAI Jie-ying^{1 *}

(1. Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100071, China.

2. the Sixth Clinical School, Capital Medical University, Beijing 100029.

3. Capital Normal University, Beijing, 100048. 4. Beijing Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 102600)

【Abstract】 Objective To establish a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detecting diarrhea pathogens (*Shigella* and *Salmonella*) in rhesus monkeys and evaluate the application of the LAMP method for detecting bacterial diseases in non-human primate laboratory animals. **Materials and Methods** A total of 205 fecal samples of rhesus monkeys were detected in this LAMP assay. The specificity and sensitivity of LAMP for *Shigella* and *Salmonella* were analyzed, and real-time polymerase chain reaction (REAL-TIME PCR) assay was employed as control. **Results** The LAMP method established here needed only 45 min to complete the reaction at 63°C. Its detection limit was 10 pg/μL and with a high specificity. The positive rate of *Shigella* and *Salmonella* was 1.5% and 6.3%, respectively. **Conclusions** Here we have established a fast and simple *Shigella* and *Salmonella* LAMP detection method that has strong specificity and high sensitivity and is suitable for rapid detection of bacterial disease in macaques. The development of this rapid detection kit is underway, and it will be helpful to the diarrhea detection.

【Key words】 *Shigella*; *Salmonella*; Loop-mediated isothermal amplification, LAMP; Rhesus monkey; Bacteria detection; Diarrhea
Corresponding author: BAI Jie-ying, E-mail: baijieying@126.com

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0007-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.002

There are hundreds of thousands of monkeys kept in cages in China as laboratory animals. According to the national rules, the monkeys should be healthy to be used in medical experiments. While many monkey farms were obsessed with diarrhea, which is common in captive Rhesus monkeys. The diarrhea is caused by bacterial infections, cage replacement, seasonal alternations, and so on. Bacterial infection is the most harmful cause, with *Shigella* and *Salmonella* as the most common diarrhea pathogens¹. These bacteria adversely affect the animals' physical health and may infect animal keepers and other staff members. The cur-

rent isolation and culturing method used for the routine diagnosis of these pathogens requires considerable time and effort. As a result, symptomatic medications cannot be promptly administered, which may result in illness delay and loss of optimal treatment timing. A monkey farm may shell out millions per year for the monkey death from diarrhea. Furthermore, blind medications can easily enhance the antimicrobial resistance of pathogens and increase difficulties in treatment. Therefore, a rapid and cheap detection technique of bacteria is urgently needed.

With the development of molecular techniques, a

【基金项目】 十二五后劲科研项目 (CWS11J092); 国家自然科学基金 (31272385); 十二五重大专项 (2011ZXJ09201-031); 北京市自然科学基金 (5152023)。

【作者简介】 叶莉 (1988-), 女, 研究实习员, 研究方向: 人兽共患病; 吴芳 (1992-), 女, 本科生。Δ 本文共同第一作者。

【通讯作者】 白杰英 (1977-), 男, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 人兽共患感染性疾病致病机理, E-MAIL: baijieying@126.com; 张小飞 (1978-), 女, 副研究员, 研究方向: 兽药安全与检测, E-MAIL: wangyizxf@163.com。

variety of methods such as polymerase chain reaction (PCR) and immunological methods are available to identify causative pathogens. However, these approaches require expensive equipment (PCR instrument and Multiskan Ascent) and skilled technicians. Therefore, a rapid, simple, and economical detection technique is needed for diagnosing diseases in captive rhesus monkeys.

The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique is based on the strand displacement reaction and stem-loop structure that amplifies the target gene fragment under isothermal conditions.² This method requires only a water bath and the result can be judged by naked eyes. The LAMP technique can be used in rapid diagnosis of different pathogens, and some researchers have already used this technique for bacterial detection.^{3,4} However, they were only able to obtain the LAMP reaction results using an electrophoresis map. These results are lack of real-time reaction

process monitoring. Furthermore, the risk of aerosol pollution exists in the laboratory. Therefore, no accurate judgment of the process could be made to date.

In the current study, we used a Loopamp® Real-time Turbidimeter LA-320C (Eiken Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan) to monitor the LAMP reactions in real time and established a method that can directly detect *Shigella* and *Salmonella* in rhesus monkey feces. This method may be helpful in monitoring the healthy status of non-human primate laboratory animals.

1 Materials and methods

1.1 Sample collection

A total of 205 fecal samples were collected from 4 primate centers located in 4 cities (Haikou, Nanning, Yibin and Beijing) (Fig. 1). Bacterial DNA was extracted from 1 mL of cultural suspension using TIANamp Bacteria DNA Kit (Tiagen, Beijing, China). DNA was extracted from 0.1 mg feces using CHLEX

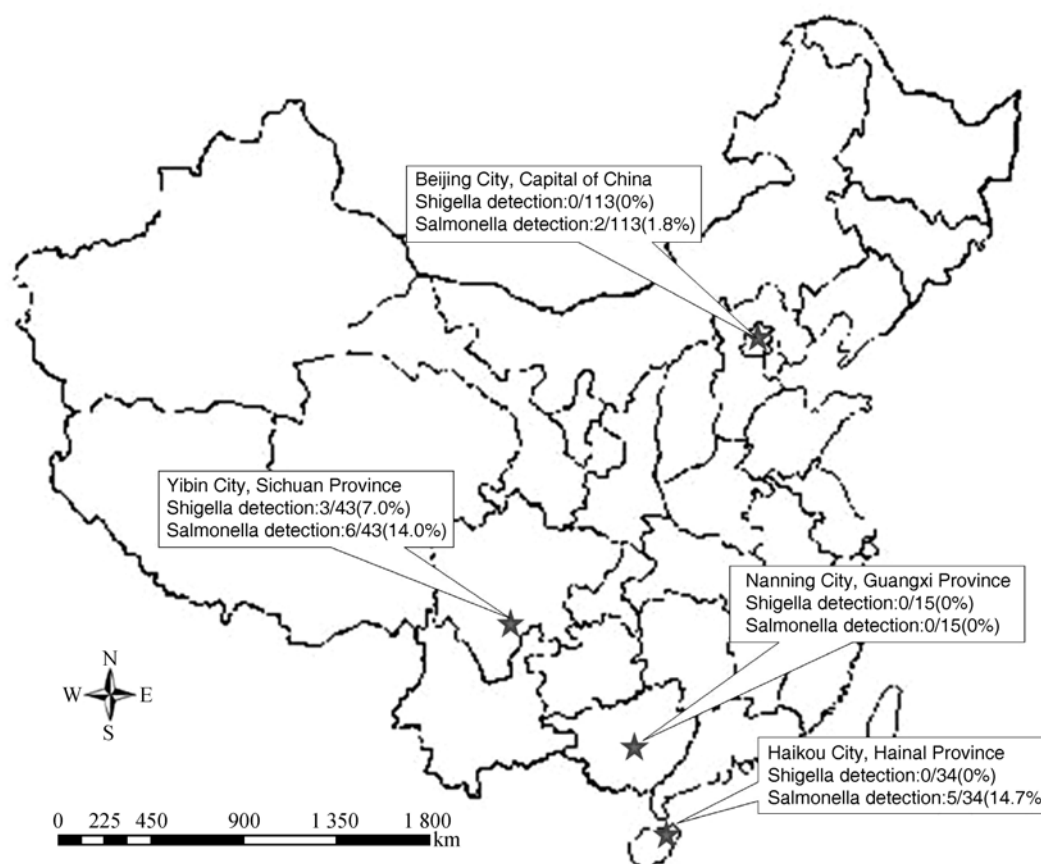


Fig. 1 Locations of the primate centers in China where macaques were investigated for *Shigella* and *Salmonella*.

A total of 205 rhesus macaques feces samples were collected from Haikou, Nanning, Yibin and Beijing Cities.

The results of positive rate of *Shigella* and *Salmonella* were shown in the picture.

reagent.

1.2 Bacterial strains and cultural conditions

Standard bacteria were purchased from the National Institutes for Food and Drug Control included *Salmonella enteritidis* (CMCC 50041), *Salmonella typhi* (CMCC 50071), *Salmonella Typhimurium* (CMCC 50115), *Shigella dysenteriae* (CMCC 51252), *Shigella flexneri* (CMCC 51571), *Shigella flexneri* (CMCC 1.1868), and *Escherichia coli* (CMCC 44102).

Our research complied with the protocols approved by the Animal Care and Use Committee of Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Sciences. This research adhered to the legal requirements of China as well as the American Society of Primatologists principles for the ethical treatment of primates.

1.3 Design of *Shigella* and *Salmonella* specific LAMP primers

According to the nucleotide sequences of *Shigella ipaH* gene (M76444.1) and *Salmonella invA* gene (NC_003197.1) that we retrieved from the GenBank database, LAMP primers were designed using Primer-Explorer (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>). Five groups of primers for these two bacteria were obtained: F3 and B3 (outer primers), FIP and BIP (inner primers), and LF or LB (loop primer).

1.4 LAMP reaction condition

The LAMP reactions were performed using a Loopamp DNA Amplification Kit (Eiken Chemical Co. Ltd. Tokyo). The reaction system (25 μ L) included the following: 2 $\times$ reaction mix (12.5 μ L), primer mix (4.6 μ L), Bst DNA polymerase (1 μ L), sample DNA (2 μ L), distilled water (4.9 μ L), and primer mix with F3, B3, FIP, BIP, and LF/LB in concentrations of 5, 5, 40, 40, and 20 pmol/ μ L, respectively. The reactions were performed in the Loopamp® Real-time Turbidimeter LA-320C (Eiken Chemical Co. Ltd.) for 60 min. The most optimal reaction temperature and primers were determined using a temperature gradient assay. Visual detection was performed using a fluorescent detection reagent (Eiken Chemical Co. Ltd.). The color change under normal conditions was recorded: a positive sample was green, while a nega-

tive sample was orange.

1.5 LAMP assay specificity

Shigella or *Salmonella* primers were used to detect standard bacteria (including CMCC 50041, 50071, 50115, 51252, 51571, 1.1868, and 44102). DNA was extracted as described earlier. All tests were performed in triplicate.

1.6 LAMP assay sensitivity

For the sensitivity tests, DNA mixes of *Shigella* (CMCC51252, 51571, and 1.1868) and *Salmonella* (CMCC50041, 50071, 50115) were serially diluted 10-fold with sterile water from 1.0×10^{-1} to 1.0×10^{-7} . All tests were performed in triplicate.

1.7 LAMP and real-time PCR detection

A total of 205 fecal samples from captive Rhesus monkey were examined using real-time PCR and the LAMP system which we developed for the detection of *Shigella* and *Salmonella*. Differences were found between these two methods.

2 Results

2.1 Specific LAMP primers of *Shigella* and *Salmonella*

The primer sets comprising the two outer primers (F3 and B3), two inner primers (FIP and BIP), and one loop primer (LF or LB) (Table 1) recognized six distinct regions on the *ipaH* of *Salmonella* and the *invA* of *Shigella* sequences. All of the primers were synthesized by Beijing AuGCT DNA-SYN Biotechnology (China).

2.2 LAMP reaction temperature

The reactions were performed in the real-time turbidimeter LA-320C at 60–64°C for 90 min. The machine detects the turbidity values every 6 s and indicates positive amplification when the turbidity values reach 0.1.^{5,6} The earliest reaction started at 63°C, and the optimal temperature of these two bacteria was 63°C (Fig. 2).

2.3 LAMP result judgment

Fluorescent detection reagent (1 μ L) was added to the *Shigella* and *Salmonella* reaction mixtures for visual detection by naked eyes. Positive amplification was green and negative amplification was orange (Fig.

3). The results also could be observed using a UV lamp (wavelength 240 – 260 nm or 350 – 370 nm), with a positive result of green and a negative result with no changes.

Tab. 1 The LAMP primer sequences of *Shigella* and *Salmonella*

Bacteria	Name of primer	Sequences of primers
<i>Shigella</i>	F3	ACATGAAGAGCATGCCAACA
	B3	TCCTCACAGCTCTCAGTGG
	FIP	AATCCGGAGGTATTGCCGTGCA CCTTTTCCGCGTTCCTTGA
	BIP	GTCGCTGCATGGCTGGA AAAAC GCAGCAACAGCGAAAGACT
	LF	ACGGTATCGGAAAGGCCG
<i>Salmonella</i>	F3	GAACGTGTCGCGGAAGTC
	B3	CGGCAATAGCGTCACCTT
	FIP	CCGGCCTTCAAATCGGCATCAAG CCCGATTTTCTCTGGATGG
	BIP	GAACGGCGAAGCGTACTGGA CATCGCACCGTCAAAGGAA
	LB	AAGGGAAAGCCAGCTTTACGG

Note. LAMP; loop-mediated isothermal amplification.

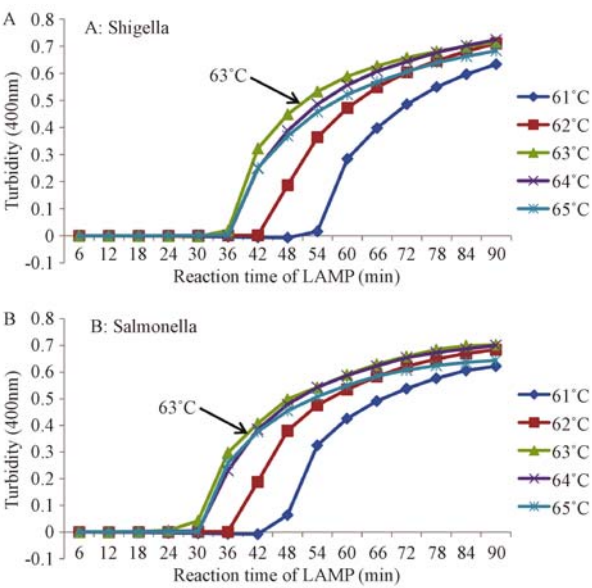


Fig. 2 The optimal temperature in detection of *Shigella* (A) and *Salmonella* (B), with LAMP reaction at 63°C.

2.4 Specificity and sensitivity of the *Shigella* and *Salmonella* specific LAMP assay

With the *Shigella* primer, the *Shigella* samples were positively amplified, while the *Salmonella* and *E. coli* samples were not (Fig. 4). The *Salmonella* detection results were the same. These results showed that the LAMP primers of *Shigella* and *Salmonella* had strong specificity.

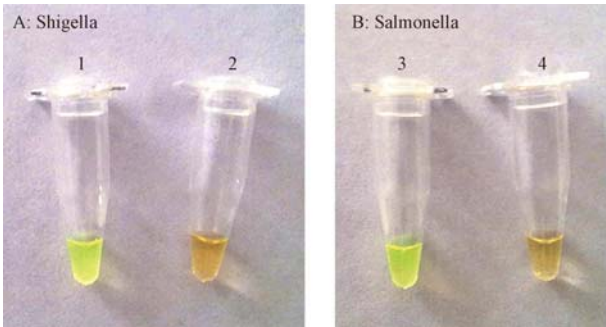


Fig. 3 Fluorescence detection of *Shigella* (left) and *Salmonella* (right) by the LAMP assay. Visual detection of *Shigella* (A) and *Salmonella* (B) in the LAMP products using fluorescence detection. 1 and 3: Positive LAMP reaction (green); 2 and 4: Negative LAMP reaction (orange).

Shigella and *Salmonella* mixture DNA samples (212.3 ng/μL and 185.7 ng/μL, respectively) were prepared for the sensitivity assay. The loopamp® real-time turbidimeter LA-320C curve analysis showed that all positive amplifications reached a velocity curve peak >0.1 within 60 min (Fig. 5 and 6). When the DNA template concentration decreased, the reaction rate constant and response slope was decreased and the peak time delayed. The minimum detectable limits for *Salmonella* and *Shigella* were both 10⁻⁵ (DNA concentration was approximately 10 pg/μL).

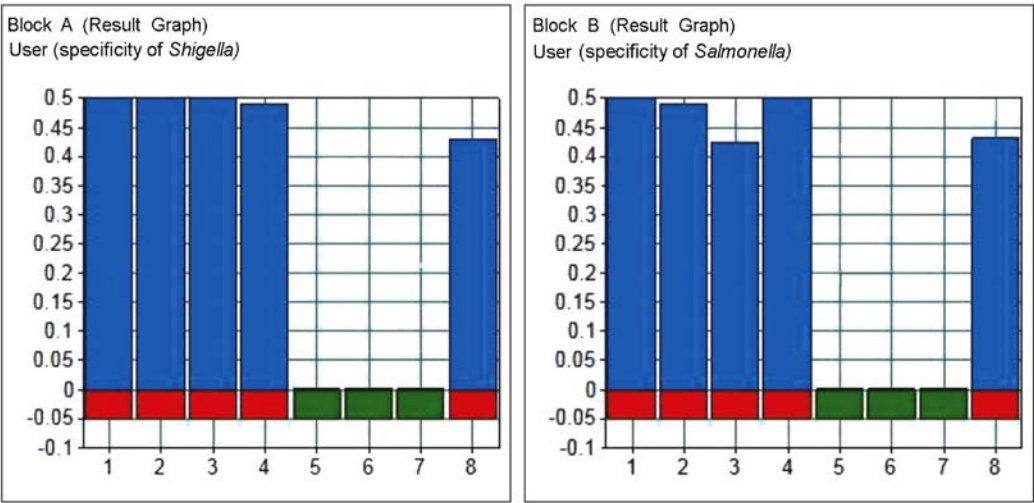


Fig. 4 Specificity of *Shigella* and *Salmonella*.

With the *Shigella* and *Salmonella* primers, the samples were positively amplified, while the control samples were not. (Block A) 1, *Salmonella* mix (including 50041, 50071, 50115); 2, 50041; 3, 50071; 4, 50115; 5, *Shigella* mix (including 51252, 51571, 1.1868); 6, 44102; 7, DEPC H₂O; 8, positive control. (Block B) 1, *Shigella* mix (including 51252, 51571, 1.1868); 2, 51252; 3, 51571; 4, 1.1868; 5, *Salmonella* mix (including 50041, 50071, 50115); 6, 44102; 7, DEPC H₂O; 8, positive control.

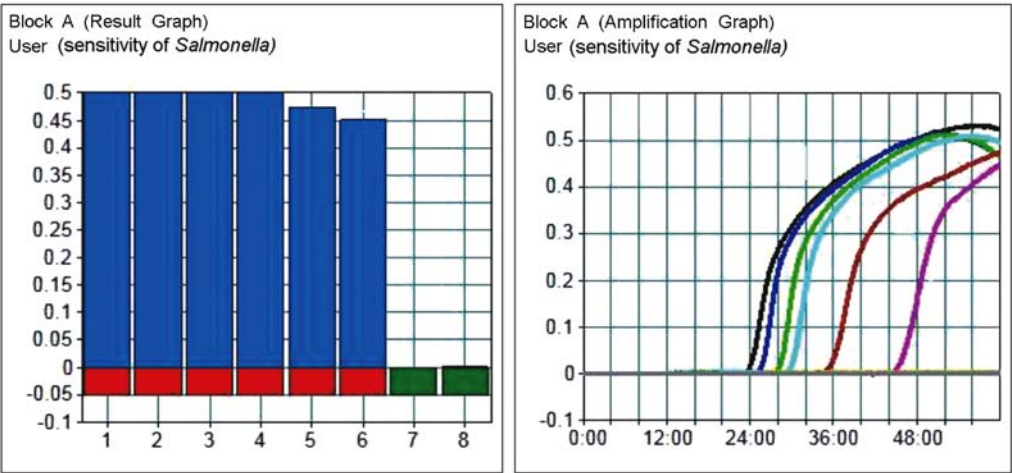


Fig. 5 Sensitivity of *Salmonella* in LAMP.

The minimum detectable limits for *Salmonella* was 10^{-5} (DNA concentration was approximately 10 pg/ μ L). CH1, 1.0; CH2 – CH8, $1.0 \times 10^{-1} - 1.0 \times 10^{-7}$.

2.5 Comparison of the LAMP and real-time PCR assay

In the 205 clinical fecal samples we collected from captive rhesus monkeys from 4 provinces in China, 3 were tested as positive for *Shigella* and 13 tested as

positive for *Salmonella* by LAMP and real-time PCR assay (Table 2, Fig. 1). No nonspecific amplification was observed. The LAMP and real-time PCR assays had the same positive detection rates of *Shigella* and *Salmonella*.

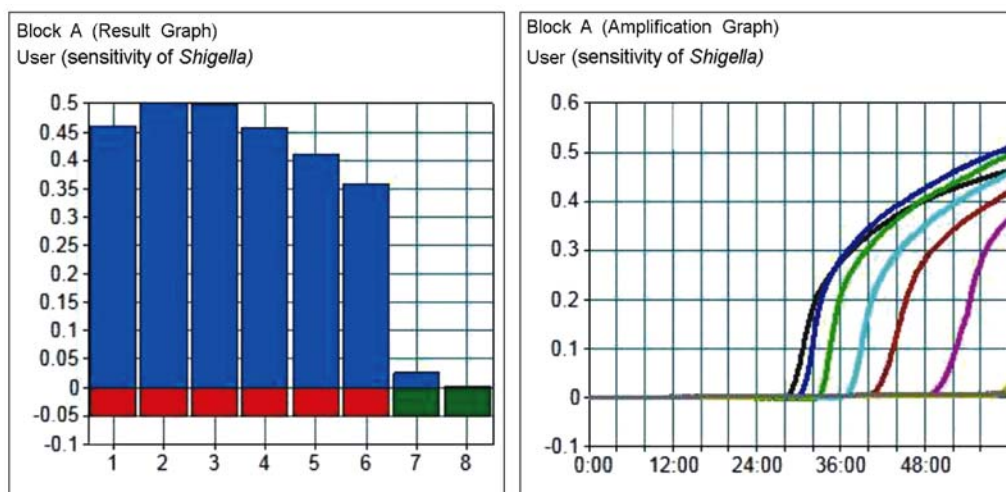


Fig. 6 Sensitivity of the detection of *Shigella* in LAMP.

The minimum detectable limit for *Shigella* was 10^{-5} (DNA concentration was approximately $10 \text{ pg}/\mu\text{L}$). CH1: 1.0; CH2 – CH8: $1.0 \times 10^{-1} - 1.0 \times 10^{-7}$.

Tab. 2 Positivity rates of the rhesus monkey fecal samples detected by LAMP and real-time PCR

Results	LAMP		Real-time PCR	
	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>
Positive	3	13	3	13
Total	205	205	205	205
Positivity rate (%)	1.5	6.3	1.5	6.3

Note. LAMP: loop-mediated isothermal amplification. PCR: polymerase chain reaction

3 Discussion

Shigella and *Salmonella* are the major pathogens leading to diarrhea in rhesus monkeys. These two bacteria are commonly detected using culturing, PCR,⁷ and enzyme-linked immunosorbent assay⁸ techniques, among others. However, culture requires 2 – 3 days, and PCR requires specific equipment and >2 h for detection. As such, these methods cannot rapidly detect bacterial diseases in laboratory animals. In contrast, LAMP, a new nucleic acid amplification reaction technique, is advantageous due to its fast and simple reaction conditions used for pathogen detection. In our study, results could be determined after the bacterial nucleic acids were allowed to react in this system at 63°C for 1 h. The LAMP approach is much faster than the traditional methods.

Most of the currently established LAMP reaction methods determine results using images from the UV analysis of agarose gel electrophoresis.⁹ Furthermore, only the final LAMP reaction result is analyzed, and the methods carry a risk of aerosol contamination in the

laboratory. Given the lack of real-time reaction monitoring, eliminating these interfering factors is quite difficult. In this study, we established a real-time LAMP method for detection of *Shigella* and *Salmonella*. The reaction progress was analyzed using a loopamp® real-time turbidimeter LA-320C (Eiken Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan). The instrument be used to automatically observe the reaction in real-time and exclude false-positive and non-specific reaction interference factors according to set analytical standards. In a sample analysis, when the reaction progressed to 24 min, generation of a precipitate was detected (Fig. 5). Analysis of the curves showed that the reaction peaked at 0.5, more than the default of 0.1 positive determination standards. During the efficient LAMP reaction, the amplified target sequence amount was enriched to a critical value and entered a higher reaction rate to achieve the reaction peak. Dilution of the template affected only the reaction starting time and not the reaction efficiency. Therefore, the sample reaction time was associated with the initial amount of DNA template used.

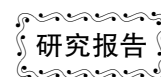
The lowest detection limit of PCR is 200 pg/ μ L commonly. However, in our study, the detection limits of *Shigella* and *Salmonella* were both 10 pg/ μ L, which indicated that the LAMP method had a higher sensitivity than PCR. In examination of the 205 fecal samples, the positive LAMP and PCR rates for *Shigella* and *Salmonella* were the same. These findings suggest that the LAMP method has the same sensitivity as real-time PCR for detecting *Shigella* and *Salmonella*, especially the former could be judged with eyes.

The two bacteria real-time LAMP detection methods established in this study are fast (completed within 1 h), sensitive (detection limit of approximately 10 pg/ μ L), with simple equipment requirements, and have simple experimental operation. In particular, this method has no side effect on animals and required only fecal sample collection. Our findings suggest that the LAMP method is properly applied for the diagnosis of the diarrhea pathogens in the rhesus monkeys. The LAMP primers designed in this assay are applying patients, and the development of a quick kit for macaque diarrhea detection is underway. This investment is scientific and economic for the macaque health maintaining and for the monkey farms.

参 考 文 献

- [1] Lu CP. Veterinary Microbiology. (4th ed.); Chinese Agriculture Publisher, 2007. (in Chinese)
- [2] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28: E63.
- [3] Zhu H, Lv JZ and Fan F. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of *E. coli* O157: H7 [J]. J Mol Diagn Ther 2010, 2: 98 – 101.
- [4] Wang ZR, Chen CF, Yang MF, et al. Development of multi-site loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Chin J Prevent Vet Med, 2010, 4: 009. (in Chinese)
- [5] Chen S, Ge B. Development of a toxR-based loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Vibrio parahaemolyticus* [J]. BMC Microbiol 2010; 10: 41.
- [6] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation [J]. Biochem Biophys Res Commun 2001; 289: 150 – 154.
- [7] Soria MC, Soria MA, Bueno DJ, et al. Comparison of 3 culture methods and PCR assays for *Salmonella gallinarum* and *Salmonella pullorum* detection in poultry feed [J]. Poult Sci, 2013, 92: 1505 – 1515.
- [8] Cho IH, Irudayaraj J. In-situ immuno-gold nanoparticle network ELISA biosensors for pathogen detection [J]. Int J Food Microbiol, 2013, 164: 70 – 75.
- [9] Okamura M, Ohba Y, Kikuchi S, et al. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid, sensitive, and specific detection of the O9 group of *Salmonella* in chickens [J]. Vet Microbiol, 2008, 132: 197 – 204.

[收稿日期] 2015-09-09



人前列腺癌骨转移裸鼠移植模型的建立 及其循环肿瘤细胞的特性

张彩勤, 张海, 赵勇, 白冰, 刘佩娟, 师长宏*

(第四军医大学实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 目的 利用裸鼠移植模型研究雄激素阻断对人前列腺癌骨转移发生的影响,并初步探索肿瘤转移过程中循环肿瘤细胞(CTCs)的生物学特性。**方法** 将 40 只裸鼠随机平分为两组,一组裸鼠手术切除睾丸以阻断雄激素的分泌,另一组为正常对照。心脏注射绿色荧光蛋白和荧光素酶双标的人前列腺癌细胞 PC3-Luc-GFP,剂量为每只 $1 \times 10^6/50 \mu\text{L}$,制备实验用骨转移模型。通过小动物活体成像系统检测人前列腺癌骨转移模型的建立;将发现转移的骨组织切片进行 HE 染色分析,并分离转移模型中 CTCs,通过 Western blot 检测 CTC 中转移相关分子 RANKL 和 TOPK 的表达。**结果** 成功建立了前列腺癌骨转移模型,切除睾丸组的骨转移发生率为 2/13 (15.38%),而正常对照组的骨转移发生率为 5/14 (35.71%);再次重复裸鼠移植模型的建立,合并两次动物实验结果得出:切除睾丸组的骨转移发生率为 3/26 (11.54%),而正常对照组的骨转移发生率为 10/27 (37.04%),两组间差异有显著性($P < 0.05$);CTCs 中 RANKL 和 TOPK 表达量均明显高于原始的前列腺癌细胞。**结论** 在裸鼠移植模型中阻断雄激素能显著降低前列腺癌骨转移的发生率。CTC 的转移能力高于原始的前列腺癌细胞。

【关键词】 前列腺癌;骨转移模型;裸鼠模型;睾丸切除;循环肿瘤细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0014-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.003

Establishment of a nude mouse model of bone metastasis of human prostate cancer and the biological characteristics of circulating tumor cells

ZHANG Cai-qin, ZHANG Hai, ZHAO Yong, BAI Bing, LIU Pei-juan, SHI Chang-hong*

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

【Abstract】 Objective To study the influence of androgen deprivation on prostate cancer bone metastasis in nude mouse models and to explore the biological characteristics of circulating tumor cells during tumor metastasis. **Methods** Forty male 6-7-week old nude mice were randomly divided into two groups: the castration group and untreated normal control group. All the nude mice were injected intracardially human prostate cancer PC3-Luc-GFP cells (labeled with GFP and Luc) in a dose of $1 \times 10^6/50 \mu\text{L}/\text{mouse}$ to establish the bone metastasis models. The resulted cancer bone metastasis was confirmed by detection of Luc signal using a small animal optical imaging system. Bone tissue samples were fixed with 4% paraformaldehyde and pathological examination using HE staining was performed. Circulating tumor cells (CTCs) were isolated from the periphery blood collected by heart puncture. The expression of metastasis-associated molecules TOPK and RANKL of CTCs was detected by Western blot assay. **Results** The nude mouse model of human prostate cancer bone metastasis was successfully established. The incidence rate of bone metastasis in the castration group was 2/13 (15.38%), while that of the normal control group was 5/14 = 35.71%. The xenograft models were prepared twice and the results of the two experiments were pooled together, showing a bone metastasis incidence rate of 11.54% (3/26) in the castration group and 37.04% (10/27) in the normal control group ($P < 0.05$). The expressions of TOPK and RANKL of CTCs were signif-

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31572340);军队实验动物专项课题(SYDW2014-002)。

[作者简介] 张彩勤(1981-),女,讲师,研究方向:人类疾病动物模型。

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

icantly higher than that in the original prostate cancer cells. **Conclusions** Castration can significantly reduce the incidence of prostate cancer bone metastases in nude mouse models. Metastatic potential of CTCs is significantly higher than that of the original prostate cancer cells.

[Key words] Prostate cancer; Bone metastasis; Nude mouse model; Castration; Circulating tumor cells

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

近年来,前列腺癌发病率在我国呈上升趋势^[1],发生转移是前列腺癌(prostate cancer, Pca)的重要临床特征和致死原因^[2],尤其是骨转移和淋巴结转移的发生,但确切的转移机制并不是十分清楚^[7]。研究发现 Pca 的转移与雄激素-雄激素受体(AR)的调控失衡密切相关。自 Huggins 等^[6]发现 Pca 具有雄激素依赖性后,雄激素阻断法(ADT)便成为治疗 Pca 的主要手段之一,但应用 ADT 疗法后,肿瘤细胞对雄激素去除的敏感性会逐渐消失,最终会发展为雄激素非依赖型前列腺癌(HRPC)。

在肿瘤转移的过程中,从原始的肿瘤细胞生成的血液循环中的肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs),能够随血液循环侵袭任何组织器官,使之发生癌变^[3]。因此,在临床上进行病人 CTCs 的监测是非常重要的。进一步研究 CTCs 的特性,可能阐明在中、高危 Pca 患者中肿瘤发展的机制^[4-5]。基于此,本实验室在建立人 Pca 裸鼠移植模型的基础上,研究雄激素阻断对 Pca 骨转移发生的影响,初步探索骨转移模型中 CTC 的生物学特性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

BALB/c 裸鼠,雄性,6~7 周,40 只,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2012-0001],饲养于第四军医大学实验动物中心[SYXK(军)2012-0023]。

1.1.2 仪器设备

Olympus IX71 荧光显微镜;RC2 啮齿动物气体麻醉机(购于北京博益伟业仪器有限公司);Caliper Lumina II 小动物光学成像系统;X-Ray 小动物活体成像系统(Camrestream, in-vivo MS FX PRO);FC2 凝胶成像仪(美国,Alpha)。

1.1.3 试剂

人前列腺癌细胞系 PC3 由美国 Prof. Leland Chung (Cedars-Sinai Medical Center) 馈赠。RPMI-1640 培养液、胎牛血清等购自 Hyclone。慢病毒介导的 Luc-GFP-Puro 转染细胞试剂盒由汉恒生物科

技有限公司提供。 β -actin、TOPK 和 RANKL 抗体由 Abcam 公司生产。BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司,麻醉剂异氟烷由鲁南贝特制药有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 人前列腺癌细胞的标记与培养

将对数生长期的 PC3 细胞接种至 6 孔板,浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,培养 24 h 后,弃去原有培养液,加入 1 mL 预先混匀的完全培养基和 Polybrene 混合物(终浓度 $6 \mu\text{g}/\text{mL}$),再将带有 Luc-GFP 基因的慢病毒原液($1 \times 10^8 \text{ TU}/\text{mL}$)按照 1:100(细胞:病毒)的比例加入细胞培养孔中,轻轻混匀,37℃感染 4 h 后补齐培养基至 3 mL。感染后第 2 天,弃去含病毒的培养液,换上新鲜的完全培养基,继续 37℃培养。感染 48 h 后换上含 puromycin(终浓度 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$)的新鲜培养基,筛选获得稳定转染 Luc-GFP 的 PC3 细胞株,命名为 PC3-Luc-GFP 细胞。

1.2.2 裸鼠的睾丸切除术

40 只雄性裸鼠随机分为两组,每组 20 只。其中一组进行睾丸切除术,方法为使用小动物麻醉机将裸鼠麻醉后,在阴囊两侧分别剪开一个小口,挤出两侧的整个睾丸及附睾部分,在睾丸根部使用缝合线进行结扎并剪断,缝合手术切口。另一组为正常未处理对照。

1.2.3 人前列腺癌骨转移模型的建立

睾丸切除术完成一周后,将 Pca 细胞 PC3-Luc-GFP 心脏注射两组所有裸鼠,剂量为每只 $1 \times 10^6/50 \mu\text{L}$ 。心脏注射是在麻醉(使用小动物麻醉机)的状态下进行。

1.2.4 人前列腺癌骨转移模型的检测

心脏注射肿瘤细胞 3 周后,开始使用 Caliper Lumina II 小动物光学成像系统进行肿瘤转移影像检测一次。检测之前裸鼠腹腔注射 luciferase 的底物(每只 3 mg),作用 10 min 后,使用 Caliper Lumina II 小动物光学成像系统进行 luciferase 信号的影像检测,以确定是否发生骨转移,将发现转移信号的裸鼠通过小动物活体成像系统进行 X-线骨骼检测。

1.2.5 骨转移模型裸鼠血循环中肿瘤细胞(CTCs)

的分离培养

将小动物活体成像仪检测到 Pca 发生骨转移的裸鼠,通过心脏采集全血每只 100 μL ,使用红细胞裂解液将全血中红细胞裂解 15 min, 1000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,使用无菌 PBS 洗涤沉淀 3 次,最后将沉淀使用含 10% FBS 的 1640 培养基重悬,加入培养瓶中进行培养。大约培养 1 周后即可见到较明显的细胞克隆出现,再进行细胞扩增培养。

1.2.6 前列腺癌骨转移模型裸鼠的解剖及肿瘤病理形态学分析

将采用小动物活体成像仪检测到有 luciferase 信号的裸鼠安乐死后,进行大体解剖,观察各个脏器和组织有无病变。并将检测到 luciferase 信号的部位,剔除表皮和多余的肌肉组织,选取骨及附近组织,用 4% 多聚甲醛进行固定。将固定后的骨组织使用脱钙液进行 4 周的脱钙,再制备组织切片并进行 HE 染色。

1.2.7 Western blot 检测循环肿瘤细胞 (CTCs) 中的转移相关分子

将扩增培养的 CTCs 接种至 6 孔板中,培养 24 h,细胞生长至对数期后,弃去培养上清液,使用 PBS 清洗两遍,每孔加入 50 μL 的 RIPA 裂解液(含有蛋白酶抑制剂 PMSF),在冰上裂解 30 min,收集细胞裂解液,12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测 CTCs 中总蛋白的含量,并进行 SDS-PAGE 电泳,转膜后使用 10% 的脱脂奶粉进行室温封闭 2 h,分别孵育抗 TOPK 和 RANKL 蛋白的抗体,4℃ 过夜后,使用 TBST 洗去一抗,室温孵育二抗 2 h,使用 TBST 洗去二抗,在 FC2 凝胶成像仪中进行目的条带的显影。

2 结果

2.1 人前列腺癌骨转移模型的建立及检测

裸鼠心脏注射 Pca 细胞 PC3-Luc-GFP 约 4 周后,通过活体成像检测体内 luciferase 信号,结果如图 1 所示。20 只正常对照组裸鼠中 5 只发现骨转移信号,9 只裸鼠在体内未发现 luciferase 信号,其余 6 只在心脏注射后短期内死亡,骨转移发生率为 5/14 (35.71%);切除睾丸组 20 只裸鼠中,只有 2 只裸鼠发现骨转移信号,11 只裸鼠在体内未发现 luciferase 信号,其余 7 只在心脏注射后短期内死亡,骨转移率为 2/13 (15.38%)。对照组和实验组肿瘤

活体成像持续观察 3 个月。肿瘤转移主要分布在裸鼠后肢和下颌部位。选择有转移信号的两只裸鼠,使用另外一套小动物活体成像系统进行 X-Ray 检测进一步明确前列腺癌骨转移瘤的发生部位,如图 2 所示,在裸鼠的后肢股关节处可见明显的破骨现象(见图 2A)以及 luciferase 信号(见图 2B)。

再次使用 40 只裸鼠重复人 Pca 骨转移裸鼠移植模型的建立实验,第 2 次得出结果为:切除睾丸组的骨转移发生率为 1/13 (7.69%),而正常对照组的骨转移发生率仍为 5/13 (38.46%)。将两次模型建立的数据进行合并后,通过医学统计学的四格表卡方检验,两组间骨转移率有显著差别($P < 0.05$)。

2.2 前列腺癌骨转移模型裸鼠的解剖及肿瘤病理形态学分析

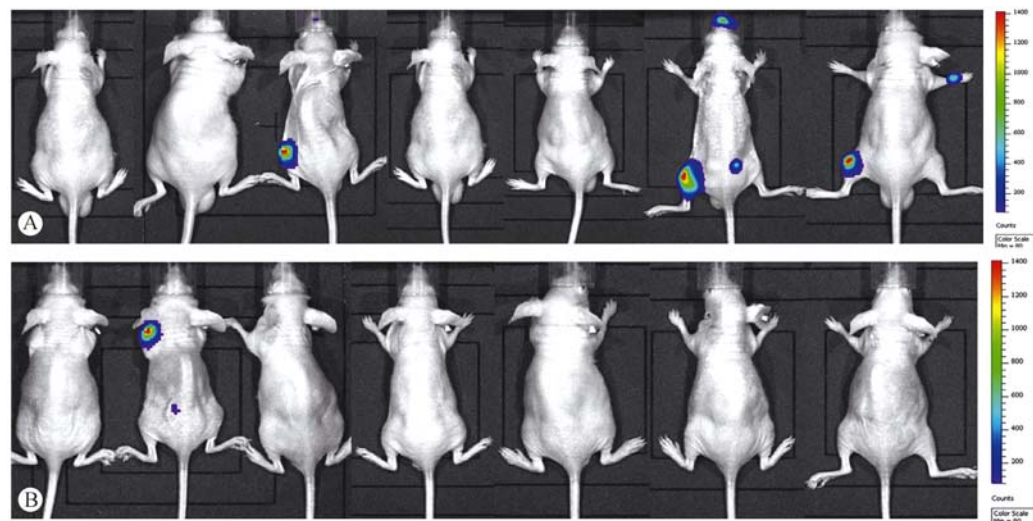
个别裸鼠在有 luciferase 信号的肢关节处形成肉眼可见的转移瘤(见图 3),处死后进行大体解剖依次观察心、肺、肝、脾等各个脏器组织均未发现明显的病理变化,所有脏器制备石蜡切片 HE 染色后未发现肿瘤细胞。将分离到有 luciferase 信号的后肢骨组织脱钙后石蜡包埋,切片后进行 HE 染色,光镜下可清晰观察到骨髓腔内充满了肿瘤细胞(见图 4),与原发的 PC3 肿瘤细胞形态相似。

2.3 Western blot 检测循环肿瘤细胞中的转移相关分子

Western blot 结果见图 5,无论是从对照组还是从睾丸切除组分离培养的 CTC 细胞中均检测到 RANKL 和 TOPK 蛋白的表达,且显著高于原始 PC3-Luc-GFP 细胞的表达量。

3 讨论

前列腺癌骨转移动物模型是探索前列腺癌转移发生机制和研究新型药物的重要基础。目前建立前列腺癌转移模型的方法主要是用建系的肿瘤细胞进行异种移植。常用三种前列腺癌细胞株,分别是 PC3、LNCaP 和 DU145,其中 PC3 是来自于前列腺癌病人的骨转移癌细胞,移植成瘤率相对较高。移植常选用免疫缺陷小鼠,包括裸鼠、SCID 小鼠等。按照移植方法的不同,可分为皮下接种、原位接种和血管内接种等^[8]。本研究选用的细胞株为 PC3,接种方法是血管内心脏内注射肿瘤细胞,相比其他移植方法,具有较高的骨转移成功率。

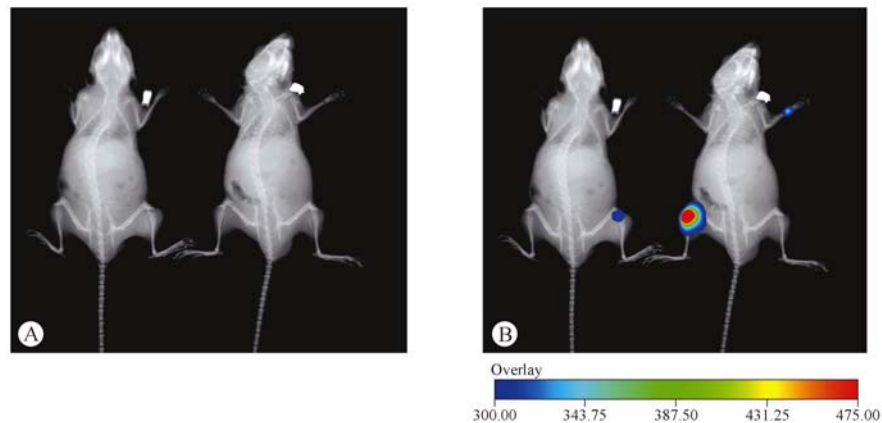


注:A. 正常对照组裸鼠;B. 切除睾丸组裸鼠。

图 1 人前列腺癌裸鼠骨转移模型活体成像 luciferase 信号检测结果

Note. A: Normal control group of nude mice; B: Castration group of nude mice.

Fig. 1 The luciferase signal of human prostate cancer bone metastasis model was detected by a small animal optical imaging system



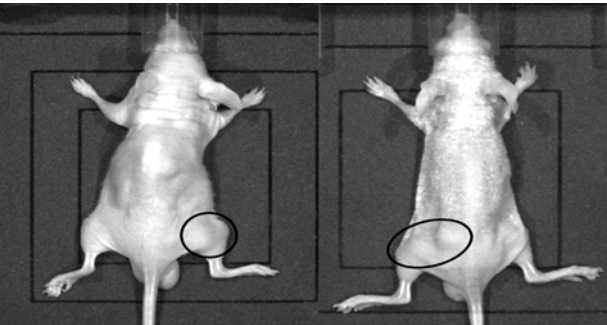
注:A;X-Ray 结果,在 Luc 信号处可见溶骨现象;B;X-Ray 和 Luc 信号的重叠结果。

图 2 正常对照组两只裸鼠的前列腺癌骨转移 X-Ray 和 Luc 信号检测结果

Note. A: The X-ray result of two bone metastasis models, showing osteolysis in the corresponding location with luciferase signal.

B: The merge result of X-ray and luciferase signals.

Fig. 2 X-Ray and luciferase signals detected in two bone metastasis model mice of the normal group



注:图中黑色圈出的部位是肉眼突出的部位。

图 3 前列腺癌骨转移模型裸鼠的外观

Note. The visible protruding metastatic tumor mass in the black circle.

Fig. 3 The gross appearance of prostate cancer bone metastasis in nude mice

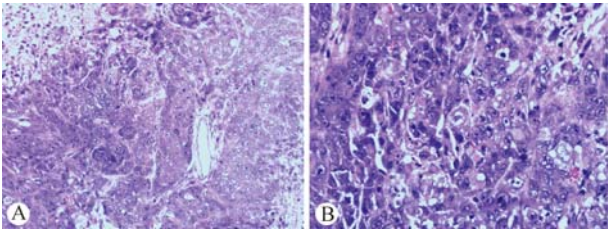
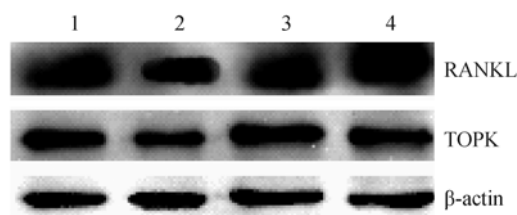


图 4 裸鼠后肢骨转移组织 HE 染色病理结果(A. $\times 10$; B. $\times 20$)

Fig. 4 The pathological changes of prostate cancer bone metastasis tissue in the hind legs of nude mice

裸鼠皮下注射前列腺肿瘤细胞很难发生骨转移,原位注射常常会在未发生骨转移前,由于局部肿



注:1. 睾丸切除组 Pca 骨转移模型 CTCs;

2. PC3-Luc-GFP 细胞对照;

3,4. 未切除睾丸组 Pca 骨转移模型 CTCs。

图 5 Western blot 检测转移相关分子 RANKL 和 TOPK 的表达

Note. 1. CTCs of bone metastasis models in the castration group. 2. The control of PC3-Luc-GFP cells. 3-4. The CTCs of bone metastasis models in the normal group.

Fig. 5 Expressions of RANKL and TOPK in the CTCs determined by Western blot analysis

瘤的形成而导致动物死亡。心脏注射是建立前列腺癌骨转移模型比较常用的方法,此方法能模拟肿瘤细胞通过血循环后形成转移灶的过程,与患者原发的骨转移灶无论生长状况还是扫描形态都非常相似^[9]。但由于血液动力学和血管解剖学的问题,心脏注射瘤细胞制备的转移模型和自然情况下自发性转移有一定的不同。因此,我们在结果分析中一定要注意区别实验模型和自发模型的不同。本研究将标记的前列腺癌细胞 PC3-Luc-GFP 注射入裸鼠心腔内,肿瘤细胞会随血液循环流向全身,较快发生转移。采用小动物光学成像系统,能敏感地检测到肿瘤转移部位的 luciferase 信号,直观地反映 CTCs 在裸鼠体内的聚集点。再结合 X-Ray 活体成像,可监测到肿瘤转移部位骨组织的变化,进一步取骨组织进行 HE 染色确认肿瘤转移的发生^[10]。但心脏注射也存在一定的风险,极易发生心脏穿透或空气栓塞后导致动物死亡,另外,心脏注射时常发生肿瘤细胞漏入胸腔,在胸腔内形成实体肿瘤,压迫裸鼠的心脏和肺脏造成死亡,因此,如果在三周内胸腔形成较强 luciferase 信号,可能是肿瘤细胞的漏入,注意与骨转移的鉴别。

骨转移模型裸鼠的大体解剖未见其他脏器的病变或肿瘤转移,只见在裸鼠的肢关节处或颌面部出现明显的突起,突起处骨组织的病理分析结果为肿瘤细胞的聚集。结果表明前列腺癌细胞 PC3-Luc-GFP 通过血循环并没有在心、肺、肝、脾等脏器组织出现富集而致转移灶。此结果也与其他 Pca 骨转移模型的制备基本相符^[8-9]。

T-LAK 细胞起源的蛋白激酶 (T-LAK cell-origi-

nated protein kinase, TOPK) 属于双重特定的丝氨酸/苏氨酸激酶 MAPKK 家族^[11],在结直肠癌、乳腺癌和黑色素瘤等组织中高表达,而在正常组织中低表达或不表达。研究发现 TOPK 在肿瘤的发生发展中发挥了重要作用^[12-14],并已被证实是肺癌的转移促进激酶^[15]。RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand) 是肿瘤坏死因子超家族成员之一,属 II 型跨膜蛋白,主要存在于成骨细胞、骨髓基质细胞、树突状细胞和 T 淋巴细胞中,在骨组织中高表达。RANKL 和它的配体 RANK 结合,促进破骨细胞的分化和成熟^[16]。研究显示骨髓微环境中 RANKL 的大量表达在肿瘤细胞特异性骨转移中发挥了重要作用,可作为肿瘤细胞骨转移的组织特异性因子^[17-19]。本研究从前列腺癌骨转移模型中分离的 CTCs 检测到 TOPK 和 RANKL 的表达,且显著高于原始肿瘤细胞,这与文献报道^[17-19]相符,说明 CTC 细胞的转移潜能进一步提升。

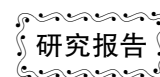
本研究中综合先后两次模型建立动物实验的结果,切除睾丸组的裸鼠模型骨转移发生率为 3/26 (11.54%),而正常对照裸鼠组的骨转移发生率为 10/27 = 37.04%,使用四格表卡方检验得出两组间有显著差别 ($P < 0.05$),具有统计学意义。同时,骨转移发生时间快 (3 周时即发生转移),转移广泛,遍及裸鼠后肢和上颌部,且具有明显的破骨现象。PC3 为雄激素非依赖性 (AI) 前列腺癌细胞,不含有内源性的雄激素受体,具有中等强度的转移潜能。AR 在雄激素非依赖型前列腺癌中的作用至今仍未明了。文献报道^[20]前列腺癌细胞株 22Rv1 为雄激素非依赖型,但在雄激素缺乏时仍可增殖,在体内它们对雄激素仍有反应,雄激素存在时能更快增殖。本研究结果与 22Rv1 株的报道一致,分析原因可能是在体内实验中,内源性 AR 通过相关信号通路调控了 PC3 细胞的转移潜能,相关分子机制需要做进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Sim HG, Cheng CW. Changing demography of prostate cancer in Asia[J]. Eur J Cancer, 2005, 41(6):834-845.
- [2] Gupta GP. Cancer metastasis: building a framework[J]. Cell, 2006, 127: 679-695.
- [3] Marian L, Katarina K, Vladimir B. Essentials of circulating tumor cells for clinical research and practice[J]. Oncology/Hematology, 2013, 88:338-356.
- [4] Ide H, Lu Y, Tanaka T, et al. Circulating tumor cell count during zoledronic acid treatment in men with metastatic prostate cancer: a pilot study[J]. Prostate Int. 2014; 2:147-151.

- [5] Carvalho FL, Simons BW, Antonarakis ES, et al. Tumorigenic potential of circulating prostate tumor cells [J]. *Oncotarget*, 2013, 4:413 – 421.
- [6] Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate [J]. *Cancer Res*, 1941, 1:293 – 297.
- [7] Clarke NW, Hart CA, Brown MD. Molecular mechanisms of metastasis in prostate cancer [J]. *Asian J Androl*, 2009, 11(1):57 – 67.
- [8] 刘福英. 肿瘤骨转移动物模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(7):1 – 4.
- [9] 廖辉, 陈安民, 郭风劲, 等. 人前列腺癌骨转移动物模型的建立 [J]. *华中科技大学学报 (医学版)*, 2007, 36(1):63 – 66.
- [10] 李珂, 赵光, 高春芳, 等. 小动物活体成像技术的应用进展 [J]. *实用医药杂志*, 2012, 29(01):81 – 83.
- [11] Abe Y, Matsumoto S, Kito K, et al. Cloning and expression of a novel MAPKK-like protein kinase, lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase, specifically expressed in the testis and activated lymphoid cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 21525 – 21531.
- [12] Zhu F, Zykova TA, Kang BS, et al. Bidirectional signals transduced by TOPK-ERK interaction increase tumorigenesis of HCT116 colorectal cancer cells [J]. *Gastroenterology*, 2007, 133:219 – 231.
- [13] Eliane JP, Repollet M, Luker KE, et al. Monitoring serial changes in circulating human breast cancer cells in murine xenograft models [J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 5529 – 5532.
- [14] Ryu B, Kim DS, Deluca AM, et al. Comprehensive expression profiling of tumor cell lines identifies molecular signatures of melanoma progression [J]. *PLoS ONE*. 2007, 2:e594.
- [15] Shi MC, Chen JY, Wu YC, et al. TOPK/PBK promotes cell migration via modulation of the PI3K/PTEN/AKT pathway and is associated with poor prognosis in lung cancer [J]. *Oncogene*, 2012, 31:2389 – 2400.
- [16] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation [J]. *Nature*, 2003, 423:33 – 342.
- [17] Santini D, Perrone G, Roato I, et al. Expression pattern of receptor activator of NFB (RANK) in a series of primary solid tumors and related bone metastases [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(3):780 – 784.
- [18] Sabbota AL, Kim HR, Zhe X, et al. Sheckling of RANKL by tumor-associated MT1-MMP activates Src-dependent prostate cancer cell migration [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(13):5558 – 5566.
- [19] Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL [J]. *Nature*, 2006, 440(7084):692 – 696.
- [20] 王潇然, 王伟华. 激素非依赖性前列腺癌分子机制进展 [J]. *中国老年学杂志*. 2011, 4(31):1282 – 1284.

[收稿日期] 2015-10-22



小鼠原发性肝癌建模方法的优化

顾洪伟, 陈琦, 张炜, 李玉桑*, 唐和斌

(中南民族大学药学院药理学研究室, 武汉 430074)

【摘要】 目的 建立良好、快捷、稳定的小鼠原发性肝癌模型。**方法** 将 128 只雄性 KM 小鼠随机均分为 8 组: 正常组给予自由饮食; 二乙基亚硝胺(DEN)水溶液组每天给予含 DEN(16.5 mg/kg)的水溶液; 高剂量 DEN 麻油组(7 次/周、3 次/周、1 次/周), 经口给予含 DEN(16.5 mg/kg)的麻油溶液; 而低剂量 DEN 麻油组、nano-DEN 组、纳米载体组则分别每周经口给予含 DEN(8.25 mg/kg)的麻油溶液和 nano-DEN 或同量的纳米载体。20 周后, 处死小鼠, 取肝脏标本, 固定后行 HE 染色。**结果** (1) 含 DEN 的各组小鼠均出现不同程度毛色枯燥、无光泽、行动迟缓、体重增长缓慢; (2) 20 周时, 同 DEN 水溶液组, 高剂量 DEN 麻油组小鼠均出现肿瘤, 且其 1 次/周的小鼠死亡率较低; (3) Nano-DEN 组小鼠无死亡, 且其肝脏损伤的 HE 评分较低剂量 DEN 麻油组严重。**结论** DEN 溶于麻油的经口给药增加了小鼠服药的顺应性, 长期低频率给药能大大降低造模过程中的死亡率。而 DEN 的纳米微乳制剂, 能增强对肝脏的损伤程度。

【关键词】 二乙基亚硝胺; 原发性肝癌; 纳米二乙基亚硝胺

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0020-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.004

Optimization of the establishment method of mouse model of hepatocellular carcinoma

GU HONG-wei, CHEN QI, ZHANG WEI, LI Yu-sang*, TANG He-bin

(Department of Pharmacology, College of Pharmacy, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

【Abstract】 Objective To develop an efficient, fast and stable establishment method of mouse model of hepatocellular carcinoma. **Methods** 128 healthy Kunming male mice were equally divided into eight groups: normal group supplied with routine drinking water and food; diethylnitrosamine (DEN)-water group received 16.5 mg/kg DEN in drinking water every day; high-dose DEN-oil groups received orally 16.5 mg/kg of DEN oil solution once, 3 times and 7 times per week, respectively; low-dose DEN-oil group and nano-DEN group received orally 8.25 mg/kg DEN in oil or in nano-vehicle every week, while nano-vehicle group received only an equal amount of nano-vehicle. After twenty weeks, all mice were sacrificed. The paraffin-embedded mouse liver specimens were examined by pathology using HE staining. **Results** (1) The mice treated with DEN solution showed dry and dull hair, slow movement and slow weight-gain to a varying degree. (2) At the twentieth week, both the DEN-water group and high-dose DEN-oil group showed tumors, and the mortality of high-dose DEN-oil group (once per week) was low. (3) There was no death of mice in the nano-DEN group, and the pathological examination revealed more serious liver injury in the nano-DEN group than in the low-dose DEN-oil group (once per week). **Conclusions** Oral administration of DEN-oil improved the dietary compliance of mice, and the mortality can be reduced significantly by long-term low frequency DEN administration. Microemulsion preparation of DEN dissolved in oil may enhance the DEN-induced liver damage.

【Key words】 Diethylnitrosamine; Hepatocellular carcinoma; Nano-diethylnitrosamine

Corresponding author: LI Yu-sang, E-mail: liys2006@mail.scuec.edu.cn

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目 (No. 81101538; No. 81573887); 中南民族大学中央高校科研基金 (No. CZZ15007); 湖北省自然科学基金项目 (No. 2015CFB496)。

【作者简介】 顾洪伟 (1990 -), 男, 硕士研究生, 专业: 中药药理。E-mail: ghw901025@126.com

【通讯作者】 李玉桑 (1972 -), 女, 教授, 研究方向: 原发性肝癌的形成机制与药物干预。E-mail: liys2006@mail.scuec.edu.cn

原发性肝癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一,在我国其发病率和死亡率均为世界首位,是严重危害健康的重大疾病^[1]。遗憾的是其发生机制尚未完全阐明。因此,深入研究肝癌的发病机制,通过明确其发病机理来寻找防治肝癌的有效手段,是改善人类健康的重大科学问题之一^[2]。

要研究肝癌的发生机制,首先要建立与人类肝癌自然发生过程相似的动物模型。常见的肝癌动物模型有:自发性肝癌模型、移植型肝癌模型、转基因肝癌模型、化学诱发性肝癌模型。自发性肝癌由于发生情况不均,很难在短时间内获得大量类似的肿瘤学材料,且观察时间长,实验耗费较大,故在实际科研工作中较少使用。移植性肝癌模型操作繁杂,成功率依赖于技术的成熟性,因此较难获得;转基因动物肝癌模型制作技术要求极高,价格昂贵,国内开展的研究尚较少;化学诱发性肝癌模型操作简便,稳定性强,成本低,且能较好的模拟人类肝癌的自然病理过程,制作方法简单,是最常用的建模方法之一^[3]。化学诱发型肝癌模型最经典方法的是将二乙基亚硝胺(DEN)溶于水中,给予小鼠自由饮用^[4]。本实验改变了给药方式,即将 DEN 溶于麻油中经口给药,并探讨了不同给药频率对小鼠死亡率的影响。

随着纳米技术的快速发展,纳米材料因其具有靶向定位、缓释控释药物、载药量高、提高药物吸收率等优点而在药物传输、癌症治疗、基因治疗等领域得到广泛应用^[5-8]。但是利用其负面生物效应,在造模领域的应用却未见报道,本实验期望通过 DEN 纳米化,以达到缓释及增强对肝脏损伤的作用,从而在短时间内建立原发性肝癌的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 KM 小鼠,6~8 周龄,体重 18~22 g,购自湖北省实验动物研究中心[SCXK(鄂)2008-0005],动物实验内容及操作均获中南民族大学动物实验伦理委员会审批许可后[2012-SCUEC-AEC-002],在中南民族大学药学院 SPF 级屏障实验设施中进行[SYXK(鄂)2014-0078]。实验前适应性喂养 1 周,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。对小鼠的处理符合 2006 年中国科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[9]。

1.2 试剂与仪器

二乙基亚硝胺(DEN,淡黄色液体,密度为 0.94 g/mL)购自“梯希爱”上海化成工业发展有限公司;麻油购自武汉福达食用油调料有限公司;苏木精购自南京建成科技有限公司;伊红购自美国 Amresco 公司;多聚甲醛、无水乙醇、二甲苯购自国药集团化学试剂有限公司。TP1020 脱水机(德国 Leica 公司);EG0050H 石蜡包埋机(德国 Leica 公司);RM2265 切片机(德国 Leica 公司);ALC-210.3 型电子分析天平(德国 Acculab 公司);Nikon 50i 显微成像系统(日本 Nikon 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 诱癌剂配制

取 347.5 μ L(即 330 mg)的 DEN 原液,加至 5000 mL 无菌蒸馏水中,即 66 μ g/mL 的 DEN 水溶液为 DEN 水溶组小鼠的饮用水;取 0.5 mL(即 470 mg)的 DEN 原液加至 10.9 mL 麻油中,即 41.25 mg/mL 的 DEN 麻油溶液做高剂量 DEN 麻油组小鼠的诱癌剂;取 0.25 mL(即 235 mg)的 DEN 原液加至 11.1 mL 麻油中,即 20.625 mg/mL 的 DEN 麻油溶液做低剂量 DEN 麻油组小鼠的诱癌剂;Nano-DEN 及纳米载体由华中科技大学纳米中心赵小静博士制备(将 4% 的 DEN 溶于 15.6% 的麻油中,再加入 1.2% 蛋黄卵磷脂,溶解混匀,制成油相;将 1% Tween 80 和 2.25% 甘油加入 75.55% 的水中,制成水相;60℃ 条件下,油相滴入水相中,搅拌 15 min;然后 10 000 r/min 高剪切 2 min;最后 100 Mpa 高压均质 5 次即得到 nano-DEN。纳米载体油相为 1.2% 蛋黄卵磷脂溶于 20% 的麻油中,其余步骤与 nano-DEN 的制备相同),nano-DEN 终浓度为含 20.625 mg/mL DEN。

1.3.2 分组与 DEN 及 nano-DEN 诱导肝癌

将 128 只 KM 小鼠预饲养适应环境一周后分笼饲养,随机取 16 只作为正常组,常规自由饮水。其余小鼠随机均分为 7 组,每组 16 只小鼠:二乙基亚硝胺(DEN)水溶组每天按体重给予 16.5 mg/kg(即 2.5 mL/10 g)的 DEN 水溶液,且每天以普通过滤水补充不足;经口高剂量组(7 次/周、3 次/周、1 次/周)每周按体重经口给予 16.5 mg/kg(即 4 μ L/10g)的 DEN 麻油溶液;而经口低剂量组(1 次/周)、纳米载体组(1 次/周)、nano-DEN 组(1 次/周)则分别每周按体重经口给予 8.25 mg/kg(即 4 μ L/10g)的 DEN 麻油溶液、纳米载体、nano-DEN。连续造模 20

周后,各组剩余小鼠腹腔注射戊巴比妥钠,深度麻醉后快速脱臼处死,打开腹腔,取肝脏、肺和肾脏,取部分肝脏组织保存于 -80°C 冰箱中用于后续检测。

1.3.3 小鼠行为学及肝脏大体观

每天观察小鼠精神状态,饮食状况,被毛变化,并每周称重,记录每组小鼠死亡数;造模 20 周后,观察各组剩余小鼠肝脏的形态、颜色、质地和肉眼可见的肝表面癌结节数;计算小鼠存活率,存活率 = 每组存活的小鼠数/各组小鼠总数 $\times 100\%$ 。

1.3.4 病理观察

切取所有实验组小鼠(包括前期死亡)的肝脏右叶,4%多聚甲醛溶液固定 24 h,常规石蜡包埋,切片机制成 $4\ \mu\text{m}$ 连续石蜡切片;同步烤片,然后脱蜡,梯度酒精水化,苏木精-伊红染色(hematoxylin and eosin, HE)染色。梯度酒精脱水,二甲苯透明,树脂封片;光镜下胞质染为红色,细胞核染为蓝色。

1.4 统计学处理

所有数据采用 GraphPad Prism 5.0.1 科学统计绘图软件进行分析,并以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用双向方差分析(one-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

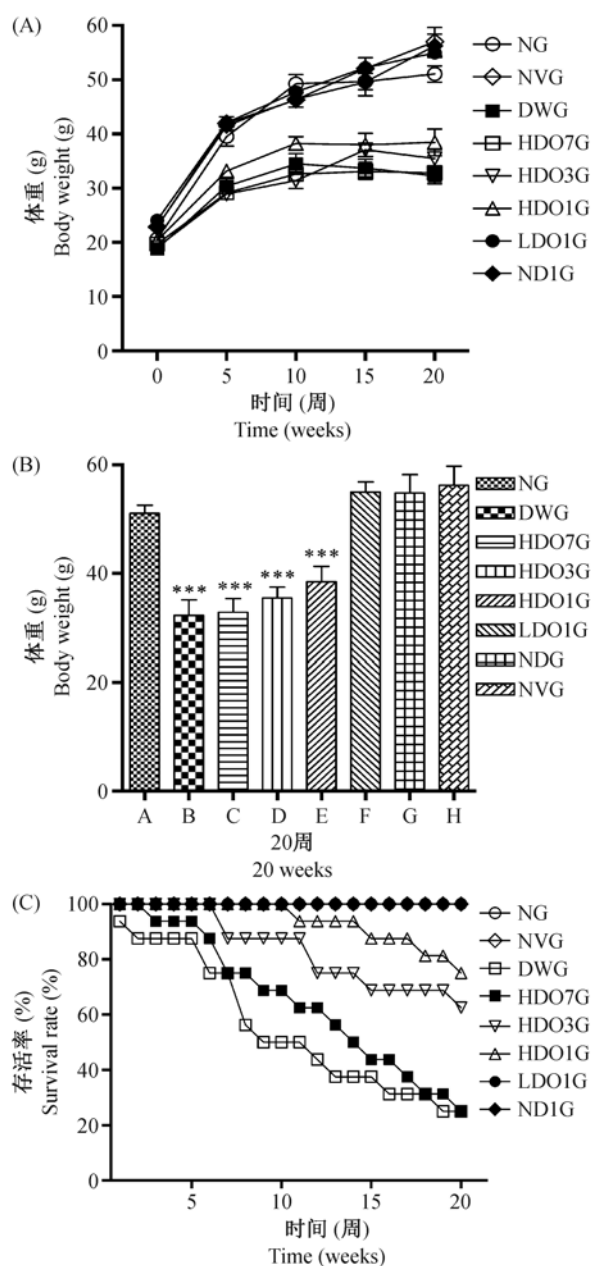
2.1 各组小鼠行为学及体重变化

正常组及纳米载体组小鼠活泼好动、反应灵活、皮毛光泽,其余各组小鼠均出现不同程度毛色枯燥、发黄、无光泽、行动迟缓。且随着给药频率和给药剂量的增加,小鼠症状加重。与正常组相比,纳米载体组、低剂量 DEN 麻油组、nano-DEN 组小鼠体重无明显差异,而 DEN 水溶组及高剂量 DEN 麻油组小鼠体重均明显低于正常组小鼠。各组体重变化,见图 1 A, B。

2.2 各组小鼠存活率

造模过程中,正常组、纳米载体组、低剂量 DEN 麻油组、nano-DEN 组均未出现小鼠死亡,未发现原发性肝癌的发生。20 周时,DEN 水溶组小鼠的死亡率为 75%(图 1 C),存活 4 只小鼠均有肉眼可见肿瘤结节;高剂量 DEN 麻油(7 次/周)组小鼠死亡率为 75%,存活 4 只小鼠均有肉眼可见肿瘤结节;高剂量 DEN 麻油(3 次/周)组小鼠的死亡率为 37.5%,存活 10 只小鼠中有 5 只肉眼可见肿瘤结节,有 1 只小鼠虽未见肉眼肿瘤结节,但镜下可见肿瘤结节;高剂量 DEN 麻油(1 次/周)组小鼠的死亡率为 25%,存活 12

只小鼠中有 5 只肉眼可见肿瘤结节。



注: A. 正常组(NG); B. DEN 水溶组(DWG); C. 高剂量 DEN 麻油每周 7 次组(HDO7G); D. 高剂量 DEN 麻油每周 3 次组(HDO3G); E. 高剂量 DEN 麻油每周 1 次组(HDO1G); F. 低剂量 DEN 麻油每周 1 次组(LDO1G); G. 纳米载体组(NVG); H. 纳米 DEN 每周 1 次组(NDG)。与正常组比较, $***P < 0.001$ 。

图 1 诱癌过程中各组小鼠的体重变化及死亡率

Note. NG: Normal group; NVG: Nano-vehicle group; HDO7G: High-dose DEN-oil (7 times per week) group; HDO3G: High-dose DEN-oil (3 times per week) group; HDO1G: High-dose DEN-oil (once per week) group; LDO1G: Low-dose DEN-oil (once per week) group; ND1G: Nano-DEN (once per week) group. $***P < 0.001$, compared with the normal group.

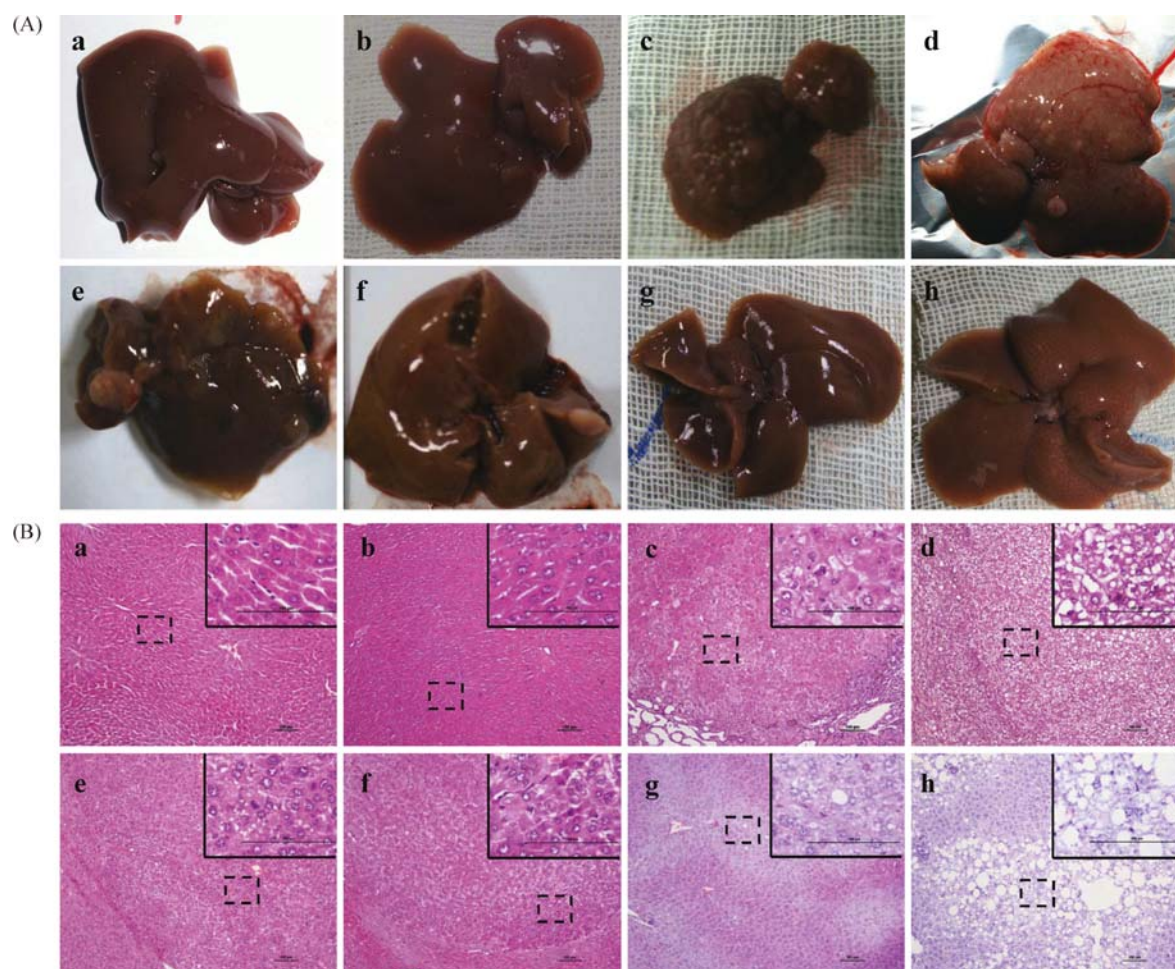
Fig. 1 The changes of body weight (A, B) and survival rates (C) of mice in various groups during the liver carcinogenesis.

2.3 小鼠肝脏肉眼和病理观察

肝脏组织标本的肉眼观察,正常组及纳米载体组小鼠肝脏色泽鲜红,表面光滑,质地柔软,未见任何病变,见图 2 A(a, b)。而前期死亡小鼠大体检查则见其肝脏肿大、颜色偏黄,部分可见边缘发黑。水溶 DEN 及高剂量 DEN 麻油组肉眼可见的肿瘤结节。小鼠肝脏表面较多结节,表面粗糙,色彩暗淡,可见多个大小不一的灰白色圆形结节,见图 2A(c, d, e, f)。另有小鼠肉眼未见肝脏肿瘤结节,但肝脏表面粗糙,颜色暗淡。Nano-DEN 组小鼠肝脏体积增大,肉眼可见白色颗粒,见图 2A(h)。其余

脏器肉眼观未见其他肿瘤结节发生。

光镜下观察,正常及纳米载体组小鼠肝细胞排列整齐,核大小一致,且分布均匀,肝细胞索围绕中央静脉,呈放射状分布,肝窦清晰,见图 2B(a, b)。而前期死亡小鼠肝组织镜检则可见急性大面积肝细胞肿胀、坏死,尚未见肿瘤形成。DEN 水溶及高剂量 DEN 麻油组小鼠,明显可见具有被膜形成的结节灶,细胞排列结构紊乱,大小、形态各异,染色质明显增粗,胞质丰富,可见病理性核分裂像,分化较差的肝细胞内可见巨核,表明细胞异型性明显,见图 2B(c, d, e, f)。低剂量 DEN 麻油组及 nano-DEN 组



注:(A)和(B)中,a. 正常组;b. 纳米载体组;c. DEN 水溶组;d. 高剂量 DEN 麻油每周 7 次组;e. 高剂量 DEN 麻油每周 3 次组;f. 高剂量 DEN 麻油每周 1 次组;g. 低剂量 DEN 麻油每周 1 次组;h. 纳米 DEN 每周 1 次组。(B)中标尺为 100 μm ,右上角为黑框中所示局部图($\times 100$)的放大图($\times 400$)。

图 2 20 周时,各组小鼠肝脏肉眼观及肝脏组织病理学观

Note. (A, B) a: Normal group; b: Nano-vehicle group; c: High-dose DEN-oil (7 times per week) group; d: High-dose DEN-oil (3 times per week) group; f: High-dose DEN-oil (once per week) group; g: Low-dose DEN-oil (once per week) group; h: Nano-DEN (once per week) group. (B) Part of the arbor (stippled outline, $\times 100$) is shown enlarged in the inset ($\times 400$) in the top right-hand corner, Scale bar = 100 μm .

Fig. 2 Representative pictures of the gross liver appearance (A) and their histological images (B) (HE staining) from various groups at the 20th week.

出现肝细胞变性坏死,炎细胞浸润,大量空泡脂肪变性,且 nano-DEN 组较经口低剂量组严重,见图 2B(g, h)。

3 讨论

化学诱导型肝癌模型是研究肝癌最好的模型之一, DEN 是迄今应用最广泛的一种化学诱导型肝癌模型制剂^[10]。并且亚硝胺类化合物普遍存在于谷物、牛奶、干酪、烟酒、熏肉、烤肉、海鱼、罐装食品以及饮水中^[11]。传统造模方法将 DEN 溶于水中,给予小鼠自由饮用,但是往往实验周期比较长,个体差异大,且死亡率高^[12]。实验过程中,由于多种条件的限制,尤其是实践方面,死亡率方面的制约,要求我们必须建立更好、更快的造模方法。本实验的研究思路围绕该目的所展开。

本实验发现,传统造模方法即将 DEN 溶于水中给予小鼠自由饮用,小鼠顺应性差,个体差异大,且死亡率高。通过将 DEN 溶于麻油经口给药增加了小鼠服药的顺应性,克服了 DEN 水溶造模小鼠之间的个体差异。二十周时, DEN 水溶组及经口高剂量组小鼠肉眼均可见肿瘤结节,但 1 次/周经口给药组小鼠死亡率最低,即长期低频给药能大大降低造模过程中的死亡率。

为了更好地模拟人们可能因长期接触环境中有毒、有害化学物质,以及长期服用肝毒性药物造成肝脏损伤甚至肝癌的情况,本实验设立了低剂量 DEN 麻油组及 nano-DEN 组。二十周时,低剂量 DEN 麻油组及 nano-DEN 组小鼠肝脏均见细胞坏死,炎细胞浸润及脂肪化,且 nano-DEN 组较低剂量 DEN 麻油组严重。表明 DEN 经纳米化后对肝脏产生更为严重的损伤。Nano-DEN 有望作为建立原发性肝癌更好的诱导剂。

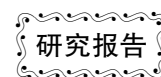
理想的肝癌动物模型应与人类大多数肝癌病理组织类型相一致,具有合适的肿瘤体积、生长速度和存活时间,肿瘤的组织类型、生物学特点应相对稳定,操作简便,复制迅速,成功率高,重复性好^[13]。本实验采用实验室广泛使用的 KM 小鼠,以 DEN 为诱癌剂,通过经口给药,20 周时成功建立了小鼠原发性肝癌模型,并克服了 DEN 水溶造模的缺陷。由

于诱导肝癌是通过小剂量长时间的刺激肝脏癌变,一般实验时间需要 18~24 周,而将 DEN 纳米化后,能增强 DEN 对肝脏的损伤作用,因此 nano-DEN 有望在更短时间内建立原发性肝癌动物模型。

参 考 文 献

- [1] Song P, Tang W, Tamura S, et al. The management of hepatocellular carcinoma in Asia: A guideline combining quantitative and qualitative evaluation [J]. Biosci Trends, 2010, 6: 283–287.
- [2] Tang ZY, Ye SL, Liu YK, et al. A decade's studies on metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2004, 130: 187–196.
- [3] 刘煌, 刘静. 肝癌动物模型的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(12): 1275–1278.
- [4] Shen T, Khor SC, Zhou F, et al. Chemoprevention by lipid-soluble tea polyphenols in diethylnitrosamine/phenobarbital-induced hepatic pre-cancer lesions [J]. Anticancer Res, 2014, 34(2): 683–693.
- [5] Qu L, Cao WB, Xing GG, et al. Study of rare earth encapsulated carbon nanomolecules for biomedical uses [J]. J Alloy Compound, 2006, 408–412.
- [6] Tang N, Du G, Wang N, et al. Improving penetration in tumors with nanoassemblies of phospholipids and doxorubicin [J]. J Natl Cancer Inst, 2007, 99(13): 1004–1015.
- [7] Zhao XJ, Chen Q, Tang HB, et al. Codelivery of doxorubicin and curcumin with lipid nanoparticles results in improved efficacy of chemotherapy in liver cancer [J]. Int J Nanomed, 2015, 10: 257–270.
- [8] Li Z, Zhu S, Gan K, et al. Poly-L-lysine-modified silica nanoparticles: a potential oral gene delivery system [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2005, 5(8): 1199–1203.
- [9] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见 [S]. 2006–09–30.
- [10] Ogawa. Molecular pathology of early stage chemically induced hepatocarcinogenesis [J]. Pathol Int, 2009, 59(9): 605–622.
- [11] 曾瑶池, 胡敏予. 食物中 N-亚硝基化合物与肿瘤关系的研究进展 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(2): 151–155.
- [12] 张立洁, 杨春. 化学性药物诱发肝癌模型的研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2009, 38(6): 12–14.
- [13] 王楚盈, 李超英, 张大方. 肝靶向动物模型研究与展望 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(2): 63–67.

[收稿日期] 2015-09-01



芍药苷对大鼠背根神经元细胞内 Ca^{2+} 的影响

黄鹤飞¹, 陈颖², 蔡维艳², 李玉洁², 杨庆², 李琦², 隋峰²,
刘思思³, 朱晓新^{2*}, 陈涛^{1*}

(1. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069)

【摘要】 目的 建立一种评价芍药苷对大鼠背根神经节神经元细胞内游离 Ca^{2+} 浓度影响的方法。**方法** 显微解剖获取大鼠背根神经节(DRG), 通过胰蛋白酶消化, 过筛, 用 DF-12 和抗有丝分裂培养液交替培养纯化, 获得原代大鼠 DRG 神经元细胞, 并采用细胞免疫荧光技术测定 DRG 神经元细胞纯度; 采用激光共聚焦显微成像技术, 观察细胞内 Ca^{2+} 荧光强度的变化, 并对 Ca^{2+} 荧光强度变化率进行分析, 探讨芍药苷对 DRG 细胞内游离钙离子浓度及辣椒素受体的影响。**结果** 采用上述方法分离得到的 DRG 细胞纯度可高达 95% 以上, 辣椒平可通过阻断辣椒素激活的瞬时受体电位通道的作用而抑制细胞内 Ca^{2+} 的增加。芍药苷表现出与辣椒平类似的作用, 可以阻断细胞外 Ca^{2+} 内流。**结论** 芍药苷可能是通过作用于 TRPV1 通道, 而抑制 DRG 细胞内 Ca^{2+} 大量增加, 本方法可以用于评价药物对大鼠 DRG 细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响。

【关键词】 背根神经节; 神经元; Ca^{2+} ; 芍药苷; 辣椒素受体; 大鼠; 疼痛

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0025-06

Doi: 10. 3969/j. issn. 1005 - 4847. 2016. 01. 005

Effect of paeoniflorin on the calcium concentration in rat dorsal root ganglion neurons

HUANG He-fei¹, CHEN Ying², CAI Wei-yan², LI Yu-jie², YANG Qing², LI Qi²,
SUI Feng², LIU Si-si³, ZHU Xiao-xin², CHEN Tao¹

(1. School of Medicine, China Three Gorges University, Yichang 443002, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700;
3. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069)

【Abstract】 Objective To establish a method to evaluate the effect of paeoniflorin (PF) on free calcium (Ca^{2+}) concentration in dorsal root ganglion (DRG) neurons in rats. **Methods** DRGs were obtained by microdissection, then were digested by trypsin and sieved. The dissociated neurons were alternately cultured and purified with DF-12 and anti-mitotic culture medium to obtain primary rat DRG neurons, and the purity of DRG neurons was measured by immunofluorescence technique. The fluorescence intensity of Ca^{2+} in DRGs was observed by laser confocal microscopy (LSCM) imaging, and the changes of fluorescence intensity were analyzed to explore the effects of PF on DRG intracellular free calcium concentration and capsaicin receptor. **Results** The purity of DRG cells isolated by the above mentioned method was up to 95%. Capsazepine (CAP) inhibited the increase of intracellular Ca^{2+} by blocking the capsaicin-activated transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). PF exhibited the influx of extracellular Ca^{2+} . **Conclusions** We would hypothesize that PF probably inhibits the significant increase of Ca^{2+} in DRG cells by acting on TRPV1 channel, and the method established in

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(编号:81403171); 中国中医科学院中药研究所自选课题(编号:zz2014024、zz2014068、QZPT001)。

[作者简介] 黄鹤飞(1989-), 女, 硕士研究生, 专业: 药理学。Email: hhflying7@163.com

[通讯作者] 朱晓新(1959-), 男, 研究员, 研究方向: 中药药理学和中药药代动力学, Tel: 010-64056154, E-mail: zhuxiaoxin@icmm.ac.cn;
陈涛(1962-), 男, 教授, 研究方向: 中药药理学以及恶性肿瘤的中医基础理论和防治机理研究, Tel: 0717-6397378, E-mail: chentao@ctgu.edu.cn。

this study can be used to evaluate the effects of drugs on Ca^{2+} concentration in rat dorsal root ganglion neurons.

[Key words] Dorsal root ganglion; Neurons; Ca^{2+} ; Paeoniflorin; Capsaicin receptor; Pain; Rat

Corresponding author: ZHU Xiao-xin, E-mail: zhuxiaoxin@icmm.ac.cn; CHEN Tao, E-mail: chentao@ctgu.edu.cn

背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 作为初级传入神经元胞体所在的部位, 其神经元是躯体及内脏感觉信息传导的通路, 在神经病理性疼痛的发生和维持中起着重要的作用。DRG 神经元由大小不同、电生理特征各异的大、中和小神经元组成, 体外原代培养的 DRG 神经元与活体 DRG 神经元十分相似, 不仅能分泌传递感觉信息的神经调质和递质, 可被低浓度辣椒素 (capsaicin, CAP) 和缓激肽刺激兴奋^[1], 被前列腺素 E2 敏感化^[2], 还含有突触前调质的相关受体以及大量离子通路^[3], 可以广泛应用于离子通道、感觉生理学和疼痛相关机理研究。

对于肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 病人的继发性痛敏, CAP 可通过增强 DRG 瞬时受体电位通道 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1) 的作用加剧对温度的痛觉过敏^[4]。TRPV1 由 6 个跨膜蛋白 (S1 ~ S6) 组成^[6], S5 和 S6 之间有一孔道区域, 激活开放后, 主要是大量的 Ca^{2+} 内流, 伴有极少量的 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Cs^{+} ^[5]。多种介质如内源性大麻素类物质、前列腺素、缓激肽都参与了 TRPV1 的激活, 导致局部感觉神经递质的释放, 并进一步激活效应细胞受体。TRPV1 拮抗剂辣椒平 (capsazepine, CPZ) 可使痛觉过敏减弱, 表明 TRPV1 的上调和敏感化在疼痛感觉的产生中有重要作用^[6]。因此, DRG 细胞内游离钙 Ca^{2+} 与神经兴奋性及突触间信号传递密切相关。外界各种刺激会导致胞质 Ca^{2+} 浓度的变化, 胞内 Ca^{2+} 水平高低直接影响着疼痛阈值^[7]。神经元细胞内 Ca^{2+} 参与疼痛信息的调控^[8]。 Ca^{2+} 通道在损伤区及神经节胞体的异常分布是导致各类神经纤维产生异位点活动的主要因素, 应用合适的 Ca^{2+} 通道阻滞剂, 可有效阻止神经损伤后慢性痛的产生和抑制慢性痛^[9]。

白芍是一味常用中药, 具治胸腹胁肋疼痛, 泻痢腹痛等功效。芍药苷 (paeoniflorin, PF) 为白芍中一种单萜类糖苷的主要成分, 有抑制细胞内钙超载和抗神经毒性等活性^[10]。PF 对大鼠离体肠管和体胃运动亦呈抑制作用, 并对抗毛果芸香碱所致离体肠管痉挛及催产素引起的子宫收缩, 具有解痉、抗炎、镇静止痛等功效^[11]。研究表明, PF 可能是在临床上用于减轻 IBS 患者内脏疼痛的一种潜在的药

物^[12], 对内脏痛觉过敏大鼠表现出镇痛作用。但是 PF 有关钙信号转导与病理性疼痛的关系尚不清楚, PF 对 DRG 细胞内游离 Ca^{2+} 的影响及作用机制尚未见报道。

近年来, 激光共聚焦显微镜因为具有不损伤细胞同时对活组织、活细胞进行观察和测量^[13] 的优势, 在医学和生物学研究方面的应用越来越广泛。本研究采用原代分离纯化的 DRG 神经元细胞, 利用细胞免疫荧光技术对 DRG 神经元细胞进行了鉴定, 选用新一代钙离子荧光探针试剂 Fluo 4-AM, 采用激光共聚焦显微成像技术, 观察药物对细胞内 Ca^{2+} 荧光强度的变化, 并对 Ca^{2+} 荧光强度变化率进行分析, 探讨 PF 对 DRG 细胞内游离钙离子浓度及 CPZ 受体的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物

4 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠 10 只, 体重 90 ~ 110 g, 来源于中国食品药品检定研究院【SCXK (京) 2014-0013】。在中国中医科学院中药研究所动物室屏障环境【SYXK (京) 2010-0034】进行实验, 实验过程按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀, 并通过中国中医科学院中药研究所动物实验伦理审查 (编号 20150410-01)。

1.1.2 仪器

SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台 (苏州净化设备有限公司), MCO-20AC 细胞培养箱 (日本 Sanyo 公司), HZQ-X100 恒温振荡培养箱 (太仓市实验设备厂), FV1000 型激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus)。

1.1.3 试剂

芍药苷 (中国食品药品检定研究院)、辣椒平 (MedChemExpress)、辣椒素 (MedChemExpress)、Fluo 4-AM (DonjinDo)、ionomycin (碧云天)、EGTA (DonjinDo)、Leibovitz L-15 medium 培养基 (Thermo Scientific HyClone)、Neurobasal (Gibco)、B-27 (Gibco)、神经生长因子 (NGF, Sigma)、L-glutamine (Gibco)、胰蛋白酶 (trypsin, HyClone)、5-氟-2-脱氧尿嘧啶核苷 (Sigma)、尿苷 (Sigma)、I 型鼠尾胶原 (Solar-

bio)、HBSS(Solarbio)、封闭用正常山羊血清工作液(康为世纪)、兔神经生长相关蛋白(GAP)-43 多克隆抗体(abcam)、山羊抗兔 IgG/FITC 标记(中杉)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠背根神经节(DRG)神经元细胞的培养与鉴定

取 90~110g 雄性 SD 大鼠,麻醉后取出胸腰段脊柱,并于体视显微镜下由椎管内侧逐个取出神经节及相连的神经根(前、后)根,置于 4℃ 的 L-15 培养液中剪碎。然后将 DRGs 转移到青霉素瓶,加入 0.25% 的胰蛋白酶在振荡培养箱中消化 45 min (37℃, 50 r/min),用 FBS 终止消化,吹打细胞悬液,70 目细胞筛过滤,收集滤液,然后 1000 r/min 离心 5 min,用常规培养基(含 Neurobasal 培养基、2% B-27, 100 μg/LNGF, 2 mmol/L 的谷氨酰胺)重悬细胞,以 5×10^5 个/mL 密度接种于包被 I 型鼠尾胶原的激光共聚焦小皿中,放入 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。用常规培养基培养 24h 后,更换抗有丝分裂培养液(在常规培养基的基础上加入 10^{-5} mol/L 的 5-氟-2-脱氧尿嘧啶核苷酸和 10^{-5} mol/L 的尿苷)培养 3d,再次更换常规培养基培养。

取培养 5 d 的 DRGn,吸除培养液,PBS 清洗 2 次,多聚甲醛(40 g/L)室温下固定 1 h,用 PBS 洗 3 次,换入山羊血清(40 ml/L)室温孵育 30 min;然后吸除血清,加入抗 GAP-43 兔多克隆抗体(1:300)孵育,4℃ 过夜后,PBS 冲洗 3 次;滴加山羊抗兔 IgG/FITC 荧光二抗,37℃ 避光孵育 1 h,PBS 洗 3 次;滴加 DAPI 避光孵育 1~2 min,PBS 洗 1 遍;于激光共聚焦显微镜下观察。放大 200 倍下随机选取 5 个视野,计数细胞总数和 DRG 神经元数量,最后算出 DRG 神经元纯度(纯度 = DRG 神经元细胞总数/细胞总数)。

1.2.2 激光共聚焦显微成像法检测 DRG 内 Ca²⁺ 浓度

取培养 5~6 d 的 DRG 神经元细胞用于实验,吸除培养基,使用 HBSS 溶液洗涤细胞 3 次。然后用 5 μmol/L Fluo 4-AM 染色。放培养箱中孵育 30 min。

随后用 HBSS 漂洗 3 遍。然后加入 1 mL 无钙镁 HBSS 溶液,保存在 37℃ 培养箱中待测量。用激光共聚焦显微镜(吸收波长 488 nm,发射波长 526 nm),扫描细胞内 Ca²⁺ 的荧光强度的变化。

在没有加任何药物刺激的情况下直接成像,记

录荧光强度值 F_0 。在测定 F_0 值后,直接在共聚焦皿中加入 20 μL Ca²⁺ 载体 ionomycin (2 μg/mL),作用 10 min 使细胞内尚未与 Ca²⁺ 结合的 Fluo 4 被 Ca²⁺ 完全饱和。然后对同一视场成像,并实时观察以测量出其最大荧光强度 $F_{\max}$ 。在测定值后,加入 20 μL Ca²⁺ 螯合剂 EGTA (2 μg/mL) 作用 10 min 使 Fluo 4 完全游离。然后对同一个视场成像,并实时观察以测量出其最小荧光强度 $F_{\min}$ 。

1.2.3 DRG 细胞 Ca²⁺ 浓度的定量分析

单波长荧光检测技术测定神经元胞内游离态 Ca²⁺ 浓度 $[Ca^{2+}]_i$ ^[14],其定量关系式如下,

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F} \quad (1)$$

其中, K_d 为 Fluo 4-AM 与 Ca²⁺ 反应的解离常数,生理条件下为 360 nmol/L。 F 是 DRG 神经元仅加载 Fluo 4-AM 染料的荧光信号。 $F_{\max}$ 是 Fluo4 全部与 Ca²⁺ 结合时的荧光强度(可以在终溶液中加入适量的 Ca²⁺ 载体使胞内 Ca²⁺ 饱和), $F_{\min}$ 是 Fluo4 完全未结合 Ca²⁺ 时的荧光强度。

1.2.4 PF 及 CPZ 对 DRG 神经元细胞 Ca²⁺ 浓度的影响

用培养 5~6 d 的 DRGn 细胞进行扫描,单次循环扫描时间为 40 s,扫描次数为 60 次。点击 XY Repeat 按钮开始多点扫描。培养皿内含有 900 μL 的细胞外液,在第三次扫描结束时加入 100 μL 的药物,继续扫描,扫描结束后选择对同一个视场成像,一般同时选择一个视野内 5 个形态完整,大小基本一致的 DRGn 细胞单独测定其荧光亮度的变化,记录各细胞内荧光强度数值。每皿内只加一次药物溶液,加药时间及位置保持一致。所加 CPZ 和 CAP 使药物终浓度依次为 20、1 μmol/L,PF 终浓度依次为 1、5 μmol/L。

1.2.5 CPZ 和 PF 对 CAP 诱导的大鼠 DRG 细胞内游离钙离子增加的抑制作用

用 20 μmol/L 的 CPZ 或 PF 预孵育 30 min 后,加入 5 μmol/L Fluo 4-AM 孵育 30 min;用 HBSS 漂洗 3 遍后加入 0.9 mL 无钙镁 HBSS 溶液,按照 1.2.4 项下方法用 LSCM 进行扫描,在第三次扫描结束时加入 0.1 mL CAP,扫描结束后选择对同一个视场成像,同时选择一个视野内 3 个形态完整,大小基本一致的 DRGn 细胞单独测定其荧光亮度的变化,记录各细胞内荧光强度数值

2 结果

2.1 免疫细胞化学染色鉴定 DRG 神经元及纯度测定

如图 1 所示,原代培养获得的 DRG 神经元大小基本一致,纯度可达到 95% 以上,结果重现性良好。

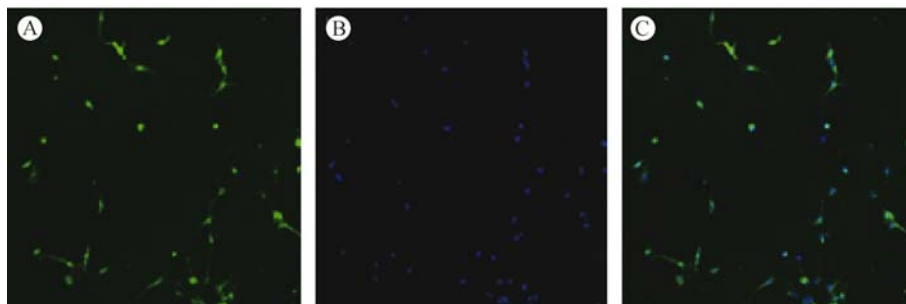
2.2 Ca^{2+} 的激光共聚焦显微成像分析

在没有加任何药物刺激的情况下直接成像,发现 $5 \mu\text{mol/L}$ Fluo 4 负载 DRG 神经元的相对荧光强度可呈现整个神经元细胞轮廓(图 2),得到荧光强度 F_0 。加入 Ca^{2+} 载体 ionomycin 作用 10 min 后,发现同一细胞的相对荧光值明显增强,得最大荧光强度 F_{max} 。再加入 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 作用 10 min 后,可以看到 DRG 神经元的相对荧光强度比加入 Ca^{2+} 载体时明显减弱,并且比未加药剂前的 Ca^{2+} 荧光强度相对降低,测量出其最小荧光强度 F_{min} 。根据公式(1)获得 DRG 神经元细胞中游离态 Ca^{2+} 浓度为 $(152.19 \pm 20) \text{ nmol/L}$ 。所采用的激光共聚焦显微

成像与定量分析方法实现了对 DRG 细胞内 Ca^{2+} 浓度的定量测量。

2.3 PF 及 CPZ 对 DRG 神经元细胞 Ca^{2+} 浓度的影响

根据 DRG 细胞荧光信号的激光显微扫描数值,采用 F/F_0 比值的方法表示单个 DRG 细胞内钙离子荧光强度的变化,其中: F 为加入药品溶液后胞内荧光强度的峰值, F_0 为加药前胞内荧光强度均值。每组在同一视野至少选择 5 个结构完整、大小合适的 DRG 细胞统计荧光强度。实验数据统计以平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SEM) 表示,实验数据用 Olympus FV10-ASW 2.0 Viewer 软件进行分析。对各组数据分别进行 t 检验,以 $P < 0.05$ 作为差异有显著性的检验标准。 n 表示测试细胞数。从大鼠 DRG 细胞内荧光强度变化率结果可发现:给予 $1 \mu\text{mol/L}$ CAP 后,DRG 细胞内 Ca^{2+} 浓度显著增加;而加入 $20 \mu\text{mol/L}$ CPZ 和 $1 \mu\text{mol/L}$ 和 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 PF 后 DRG 细胞内 Ca^{2+} 浓度有显著降低的趋势。



注 A: 山羊抗兔 IgG/FITC 荧光二抗显色; B: DAPI 染核; C: A + B。

图 1 免疫细胞化学染色鉴定 DRG 神经元细胞 ($\times 200$)

Note. A: Staining using goat anti-rabbit IgG / FITC fluorescent secondary antibodies; B: DAPI stained cell nuclei; C: A + B.

Fig. 1 Immunocytochemical identification of the rat DRG neurons ($\times 200$)

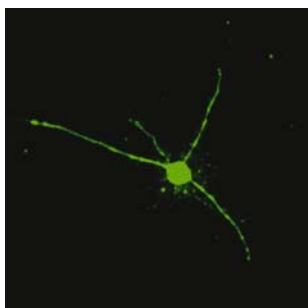
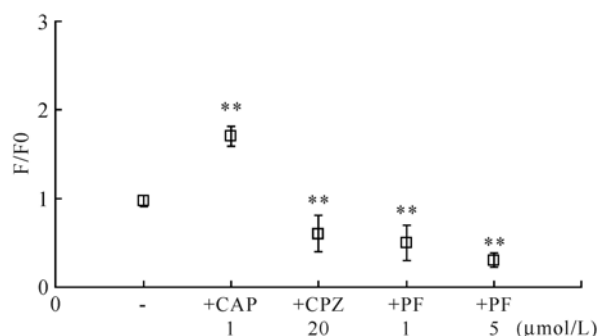


图 2 大鼠 DRG 神经元细胞中 Ca^{2+} 的激光共聚焦显微图像 ($\times 400$)

Fig. 2 Confocal imaging of Ca^{2+} in a rat DRG cell ($\times 400$)



注: ** 与不加入药物的对照组比较 $P < 0.01$ 。 $n = 5$ 。

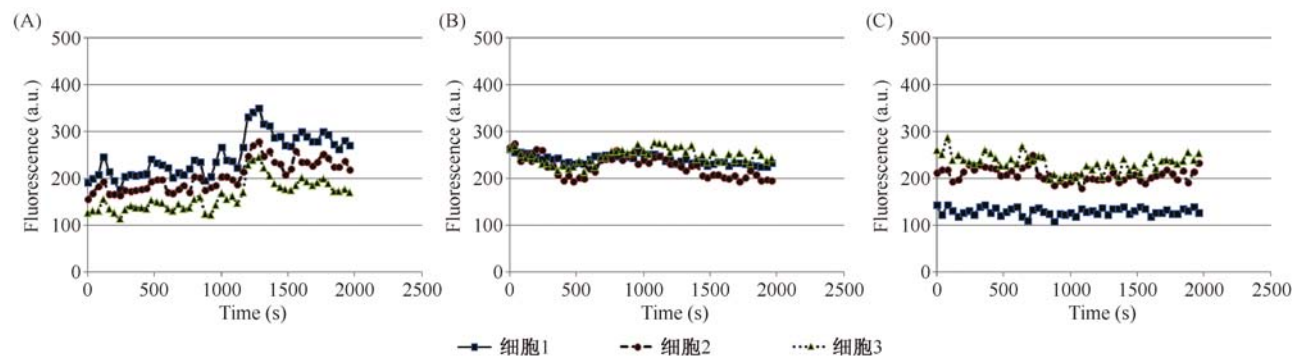
图 3 药物对 DRG 神经元细胞 Ca^{2+} 浓度的影响

Note. ** Compared with the control group without addition of drug, $P < 0.01$, $n = 5$.

Fig. 3 Effect of drugs on the concentration of Ca^{2+} in the rat DRG neurons

2.4 CPZ 和 PF 对 CAP 诱导的大鼠 DRG 细胞内游离钙离子增加的抑制作用

用空白或含药物的 HBSS 培养液预孵育后,再加 TRPV1 激动剂 CAP,比较了同一视野下 3 个细胞结构完整、大小均一,初始荧光强度在 100 ~ 300 a.u. 范围内的 DRG 细胞内 Ca^{2+} 荧光强度的变化结果



注: A: 对照组; B: 辣椒平给药组; C: 芍药苷给药组。

图 4 药物预孵育对 CAP 诱导的大鼠 DRG 细胞内游离钙离子增加的抑制作用

Note. A: Control; B: CPZ; C: PF.

Fig. 4 Effect of drugs on CPZ-induced intracellular Ca^{2+} increase in the rat DRG neurons

3 讨论

细胞内 Ca^{2+} 在中枢神经系统功能及疼痛机制中起着重要作用,参与神经信号的传递和神经递质的释放。PF 是毛茛科植物芍药中的主要活性成分之一,有解痉镇痛、抗炎等作用,其作用机制尚未明确,有研究显示其可能主要通过作用于 Ca^{2+} 通道等发挥神经保护作用^[15]。对肠易激综合征这种以腹痛、腹泻以及排便习惯改变为主要特征的疾病的研究认为,胃肠道动力异常和内脏痛觉高敏感是主要的病理生理学基础^[16]。存在于背根神经节和三叉神经节,感受并传递伤害性冲动的伤害性感受器可将伤害性信息传递给中枢,产生痛觉及不适感。而 TRPV1 就是机体一个重要的伤害感受分子,广泛存在于这些感受器上参与中枢和外周水平疼痛的形成。因此,TRPV1 有可能成为 IBS 内脏伤害性疼痛调节中极具前景的治疗靶点,TRPV1 拮抗剂的体外筛选可有助于选择减低大鼠内脏敏感性的药物。因此,我们在本研究中采用 PF 为示范性活性成分,通过探索药物对 DRG 细胞内游离钙离子浓度的影响,以及对 TRPV1 通道激动剂 CAP 诱导的 DRG 细胞内 Ca^{2+} 浓度增加的抑制作用,建立一种体外的从中药活性成分中筛选 TRPV1 拮抗剂的方法,为治疗 IBS 的中药的物质基础研究提供参考。外界的各种

可发现:与直接加入的 CAP 后 DRG 细胞内游离钙离子浓度明显升高(图 4A)相比,在预孵育 CPZ 后再加入 CAP,细胞内游离钙离子浓度没有变化(图 4B);用 PF 预孵育后再加入 CAP 也表现出类似的趋势(图 4C)。

刺激会导致 DRG 细胞内 Ca^{2+} 浓度及其空间分布发生变化,本研究中 5 $\mu\text{mol/L}$ Fluo 4 负载 DRG 神经元后,其相对荧光强度可清晰的呈现整个神经元细胞轮廓,计算得到的静息状态的 DRG 细胞内 Ca^{2+} 浓度为 $(152.19 \pm 20) \text{ nmol/L}$,与文献采用 Fluo 2 测量得到的 100 ~ 125 nmol/L,从 Fluo 3 测量得到的 $(129.7 \pm 21) \text{ nmol/L}$ 基本接近。

由于低浓度 CAP ($\text{ED}_{50} < 1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$) 可激活 DRG 神经元表达的 TRPV1 受体而导致 Ca^{2+} 内流,而高浓度的 CAP ($3 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) 可对感觉神经元产生毒性作用^[17]。在本体外模型中,采用了 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 CAP 作为 TRPV1 激动剂,在给药后 DRG 细胞内 Ca^{2+} 逐渐增高,到 20 ~ 25 min 达到峰值;而 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 TRPV1 拮抗剂 CPZ 能在给药后 40 min 内显著起到抑制作用。在本模型中选择筛选的中药活性成分的浓度范围限制在 0.1 ~ 5 $\mu\text{mol/L}$ 。

综上所述,PF 可能通过影响神经元细胞内 TRPV1 通道,起 Ca^{2+} 通道阻滞剂样作用,降低 IBS 患者神经病理性疼痛。本研究建立的评价药物对大鼠 DRG 细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响方法可能成为一种治疗肠易激综合征的药物筛选方法。

参 考 文 献

- [1] 杨向东,刘花香,刘真,等. 辣椒素对背根神经节神经元钙离子浓度和线粒体膜电位的影响[J]. 山东大学学报(医学

- 版), 2008, 46(3): 264–267.
- [2] St-Jacques B, Ma WY. Peripheral prostaglandin E2 prolongs the sensitization of nociceptive dorsal root ganglion neurons possibly by facilitating the synthesis and anterograde axonal trafficking of EP4 receptors[J]. *Exp Neurol*, 2014, 261(0): 354–366.
- [3] Nazıroğlu M, Övey İS. Involvement of apoptosis and calcium accumulation through TRPV1 channels in neurobiology of epilepsy[J]. *Neuroscience*, 2015, 293: 55–66.
- [4] Albin KC, Carstens MI, Carstens E. Modulation of oral heat and cold pain by irritant chemicals[J]. *Chem Senses*, 2008, 33(1): 3–15.
- [5] Cortright DN, Szallasi A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1[J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271(10): 1814–1819.
- [6] Ro JY, Lee JS, Zhang Y. Activation of TRPV1 and TRPA1 leads to muscle nociception and mechanical hyperalgesia[J]. *Pain*, 2009, 144(3): 270–277.
- [7] Ghosh A, Greenberg ME. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences[J]. *Science*, 1995, 268(5208): 239–247.
- [8] 陈蓓蕾, 于布为. 钙离子在疼痛和抗伤害性感受中的作用[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2006, 27(3): 170–173.
- [9] 谢益宽. 慢性病的发病机理[J]. *医学研究通讯*, 1999, 28(2): 1–32.
- [10] 郑世存, 李晓宇, 欧阳兵, 等. 芍药苷药理作用研究新进展[J]. *中国药物警戒*, 2012, 9(2): 100–103.
- [11] 韩连凤. 中药白芍的止痛作用[J]. *黑龙江医药*, 2006, 19(3): 219.
- [12] Zhang XJ, Li Z, Leung WM, et al. The analgesic effect of paeoniflorin on neonatal maternal separation-induced visceral hyperalgesia in rats[J]. *J Pain*, 2008, 9(6): 497–505.
- [13] 吴莹, 陈向阳, 玄子男, 等. HPLC、HPLC-MS 在经方成分分析及 Co-IP、激光共聚焦在经方药理机制研究中的应用[J]. *世界中医药*, 2015, 10(1): 7–12.
- [14] 张小玲, 鲍霞, 贾宏瑛, 等. 细胞 Ca^{2+} 测定研究进展[J]. *咸阳师范学院学报*, 2002, 17(6): 19–26.
- [15] 胡增晓. 芍药苷作用于神经系统的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(3): 297–301.
- [16] 樊江波, 畅洪昇, 董世芬, 等. 慢性应激致肠易激综合征大鼠模型的建立与评价[J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(2): 91–95.
- [17] Chard PS, Bleakman D, Savidge JR, et al. Capsaicin-induced neurotoxicity in cultured dorsal root ganglion neurons: Involvement of calcium-activated proteases[J]. *Neuroscience*, 1995, 65(4): 1099–1108.

[收稿日期] 2015-08-04

科技工作者科学道德规范(二)

学术不端行为

第十八条 学术不端行为是指,在科学研究和学术活动中的各种造假、抄袭、剽窃和其他违背科学共同体惯例的行为。

第十九条 故意做出错误的陈述,捏造数据或结果,破坏原始数据的完整性,篡改实验记录和图片,在项目申请、成果申报、求职和提职申请中做虚假的陈述,提供虚假获奖证书、论文发表证明、文献引用证明等。

第二十条 侵犯或损害他人著作权,故意省略参考他人出版物,抄袭他人作品,篡改他人作品的内容;未经授权,利用被自己审阅的手稿或资助申请中的信息,将他人未公开的作品或研究计划发表或透露给他人或为己所用;把成就归功于对研究没有贡献的人,将对研究工作做出实质性贡献的人排除在作者名单之外,僭越或无理要求著者或合著者身份。

第二十一条 成果发表时一稿多投。

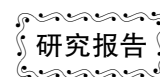
第二十二条 采用不正当手段干扰和妨碍他人研究活动,包括故意毁坏或扣压他人研究活动中必需的仪器设备、文献资料,以及其它与科研有关的财物;故意拖延对他人项目或成果的审查、评价时间,或提出无法证明的论断;对竞争项目或结果的审查设置障碍。

第二十三条 参与或与他人合谋隐匿学术劣迹,包括参与他人的学术造假,与他人合谋隐藏其不端行为,监察失职,以及对投诉人打击报复。

第二十四条 参与与自己专业无关的评审及审稿工作;在各类项目评审、机构评估、出版物或研究报告审阅、奖项评定时,出于直接、间接或潜在的利益冲突而作出违背客观、准确、公正的评价;绕过评审组织机构与评议对象直接接触,收取评审对象的馈赠。

第二十五条 以学术团体、专家的名义参与商业广告宣传。

(待续)



阴虚动风证帕金森病异动症大鼠大麻素 CB1 受体变化及复方地黄方的干预作用

滕龙^{1,2}, 洪芳¹, 何建成¹

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 浙江医院, 浙江, 杭州 310013)

【摘要】 目的 探讨阴虚动风证帕金森病(PD)异动症(LID)大鼠纹状体内大麻素 CB1 受体的表达及复方地黄方的干预作用。方法 采用 6-羟基多巴胺(6-OHDA)偏侧损毁黑质制备帕金森病大鼠模型,进一步腹腔注射左旋多巴+苄丝肼(50 mg/kg 左旋多巴和 12.5 mg/kg 苄丝肼)制备 LID 大鼠模型,并随机分为 LID 组、复方地黄方组,另取正常对照组、假手术组大鼠为对照,每组 6 只。分别在 4 周、6 周进行神经行为学检测后,处死大鼠并取纹状体,应用 Western blot 法测定各组大鼠纹状体内大麻素 CB1 受体的表达情况。结果 LID 大鼠随造模时间延长,AIM 评分呈增加趋势($P < 0.05$),旋转启动时间呈缩短趋势($P > 0.05$),旋转持续时间呈增加趋势($P < 0.01$),剂峰旋转圈数呈减少趋势($P > 0.05$),复方地黄方可改善上述变化。LID 大鼠大麻素 CB1 受体表达增加,且随造模时间延长呈现减少趋势($P < 0.01$),而复方地黄方干预后大麻素 CB1 受体的表达呈现逐渐增加的趋势($P < 0.01$)。结论 LID 模型大鼠大麻素 CB1 受体的含量明显升高,其变化能够较好的反映阴虚动风证的严重程度,复方地黄方干预 LID 模型大鼠可能是通过激活纹状体内大麻素 CB1 受体,抑制兴奋性氨基酸(主要是谷氨酸)的释放和诱导细胞发生级联反应来减弱神经元的兴奋性,从而起到减轻 L-dopa 的兴奋毒性的作用。

【关键词】 帕金森病;异动症;阴虚动风证;大麻素 CB1 受体;复方地黄方

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0031-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.006

Effects of compound rehmannia prescription on the cannabinoid receptor 1 in rats with wind syndrome due to deficiency of Yin in levodopa-induced dyskinesia (LID) in Parkinson's disease

TENG Long^{1,2}, HONG Fang¹, HE Jian-cheng¹

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;
2. Zhejiang Hospital, Hanzhou 310013, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect of compound rehmannia prescription on cannabinoid receptor 1 in the rats with wind syndrome due to deficiency of Yin in levodopa-induced dyskinesia (LID) in Parkinson's disease. **Method** A unilateral injection of 6-hydroxydopamine into the substantia nigra was performed to establish a Sprague-Dawley rat model of Parkinson's disease. The models were intraperitoneally injected with 50 mg/kg levodopa and 12.5 mg/kg benserazide for two weeks to prepare LID models with Wind syndrome due to deficiency of Yin. The models were randomly divided into LID group and compound rehmannia prescription groups. Moreover, the normal group and sham-operated group were set

【基金项目】 国家自然科学基金(30973722);上海市科技支撑中药新药研究与开发项目(F50102);上海市卫生局中医药科研基金(2012J009A);上海市卫生计生委科研基金(20144Y0151);浙江省中医药优秀青年人才基金项目(2016ZQ005);上海中医药大学预算内科科研项目(2013JW25)。

【作者简介】 滕龙(1985-),男,医学硕士,主要从事中医证候研究。

【通讯作者】 何建成(1966-),男,教授,博士生导师,从事中医四诊、证候及心脑血管疾病的基础与临床研究。E-mail: hje8163@163.com。

up, 6 rats in each group. Neurological behavior was tested after treatment for four weeks and six weeks, respectively. Then the rats were sacrificed, the brain was removed immediately and the corpus striatum was dissected out. The expression of cannabinoid receptor 1 was examined by Western blotting. **Result** With the prolonged time of levodopa treatment, the LID rats with wind syndrome due to deficiency of yin showed an increasing tendency of AIM scores ($P < 0.05$), shortening of the rotation start time ($P > 0.05$), a tendency of increased duration of continuous rotation time ($P < 0.01$) and a reducing tendency of peak rotation rate ($P > 0.05$). Compound rehmannia prescription improved the above mentioned neurological behavior. The expression of cannabinoid receptor 1 showed an increasing tendency in the LID groups compared with that in the normal groups. But with the prolonging time of levodopa treatment, the expression of cannabinoid receptor 1 in the LID groups showed a decreasing tendency ($P < 0.01$). The expression of cannabinoid receptor 1 had an increasing tendency after the treatment with compound rehmannia prescription ($P < 0.01$). **Conclusions** The expression of cannabinoid receptor 1 has an increasing tendency in LID rats with wind syndrome due to deficiency of yin. The changes can well reflect the severity of wind syndrome due to deficiency of yin. We would hypothesize that the treatment with compound rehmannia prescription may activate the cannabinoid receptor 1 in LID rats, inhibiting the release of excitatory amino acids, decreasing the excitability of neurons and inducing cell cascade, and finally reduce the excitatory toxicity of levodopa.

【Key words】 Parkinson's Disease; Levodopa-induced dyskinesia; Wind syndrome due to deficiency of yin; Cannabinoid receptor 1; Compound rehmannia prescription

Corresponding author: HE Jian-cheng, E-mail: hjc8163@163.com

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是好发于中老年人的中枢神经退行性疾病,主要病理改变是脑中黑质致密部多巴胺(dopamine, DA)能神经元退行性变,临床上以静止性震颤、运动迟缓、肌张力增高和姿势平衡障碍为典型症候群。左旋多巴(L-dopa)是治疗PD的“金标准”药物,但长期使用可引起各种运动并发症,较为突出者如异动症(levodopa-induced dyskinesia, LID),给PD患者的生活带来了很大的困扰^[1-2]。中医学的研究成果和可靠的疗效为PD患者的临床治疗带来了一线曙光。众多的研究证明,中医药不仅可以提高PD的临床疗效,同时可降低L-dopa诱发的LID等并发症^[3]。我们前期遵循循证医学原则,从文献整理入手,发现PD及LID在中医学中以阴虚动风证为多^[4],复方地黄方便是以此为理论依据,并结合临床体会,研制而成的具有滋肾补肝、平肝熄风等作用治疗PD及LID的中药复方(已获国家发明专利,ZL200810043734.2),临床应用取得了满意疗效^[5-6]。

我们课题组前期曾采用2点法偏侧注射6-OH-DA损毁黑质,进一步腹腔注射L-dopa+苄丝肼2周,成功制备了阴虚动风证帕金森病LID大鼠模型^[7],并在此基础上开展了相关机理和物质基础的研究。新近的研究发现,以大麻素系统为代表的非多巴胺代偿机制在PD及其LID的发生发展过程中起着重要作用,大麻素CB1受体的研究得到了国内外学者的极大关注^[8]。本研究在前期研究的基础上,研究大麻素CB1受体在PD异动症模型大鼠纹

状体内的表达及复方地黄方的干预作用,籍以探寻中医药治疗PD及LID机理及内在基础,为今后的临床研究提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF级SD大鼠,4~6周龄,雄性,体重180~200 g,120只,来源于上海中医药大学实验动物中心【SCXK(沪)2012-0002】。动物饲养在上海中医药大学实验动物中心,恒温(23 ± 2)℃,相对湿度60%~65%,动物摄食、饮水及活动自由。无菌手术在上海中医药大学实验动物中心进行【SYXK(沪)2014-0008】,并按实验动物使用的3R原则给予人道的关怀。

1.1.2 主要药物

6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA):美国Sigma公司产品;阿扑吗啡(apomorphine, APO):美国Sigma公司产品;抗坏血酸:美国Sigma公司产品;美国Sigma公司产品;左旋多巴干粉:美国Sigma公司产品(批号:192K1885);苄丝肼:美国Sigma公司产品(批号:BCBB8323)。复方地黄方(由熟地黄、白芍、钩藤、丹参、全蝎等组成)。按既定工艺煎煮成汤药,浓度为5.18 g/mL,由上海雷允上药材有限公司代加工。大鼠中药的每日用量,按孙瑞元方法计算^[9]。DB = DA × KB/KA, DB:标准体重大鼠每日用量,DA:标准体重成人每日用量,

KB:大鼠剂量折算系数(7),KA:成人剂量折算系数(388)。即:大鼠每日用量 $DB = DA \times 7/388$ 。

1.1.3 主要试剂

抗体(anti-cannabinoid receptor 1):美国 Abcam 公司产品(货号:ab23703); β -actin(内参):美国 CST 公司产品(货号:#4970);山羊抗兔二抗:碧云天公司产品。

1.1.4 主要仪器

大鼠脑立体定位仪:RWD-68003 型,深圳瑞沃德生命科技有限公司;分析天平:Sartorius Analytic, 910324;Western blot 电泳及转膜装置:美国 Bio-Rad 公司;超速离心机:LE80K 型,Beckman 公司产品。

1.2 阴虚动风证 LID 大鼠模型制备

动物术前按常规进行行为测试,确认无异常旋转行为后,用 3%戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉。然后将大鼠固定于脑立体定位仪上,头部去毛,苯扎溴铵(商品名:新洁尔灭)常规消毒。无菌条件下,沿正中中线切开大鼠颅顶皮肤,剥离骨膜,暴露前囟。以前囟为准,根据包新民等^[10]著大鼠脑立体定位图谱,确定右侧黑质二坐标:①前囟后 5.2 mm,正中右侧 1.0 mm,硬膜下 9.0 mm。②前囟后 5.2 mm,正中右侧 2.5 mm,硬膜下 8.5 mm。用颅骨钻于手术要求部位小心钻开颅骨,用 5 μ L 微量进样器将 6-OHDA(溶于含 0.2% 维生素 C 的生理盐水中,即称量药品抗坏血酸 0.001 g,溶于生理盐水 0.5 mL 中)注入右侧黑质部(以 1.0 mm/min 速度缓慢进针),每孔 3 μ L,注射速度为 1 μ L/min,注射完毕后留针 5 min,然后以 1.0 mm/min 速度缓慢退针。手术完成后,用医用明胶海绵填塞颅骨孔,缝合切口皮肤,肌肉注射庆大霉素 7 d,待动物清醒后放回饲养笼中饲养。假手术组只注射 0.2% 维生素 C 的生理盐水,正常对照组只捆绑动物,不作任何处理。10 d 后,以腹腔注射 APO 0.5 mg/kg 诱发大鼠向一侧旋转,记录开始旋转至 30 min 内的旋转圈数,以旋转圈数平均 > 每分钟 7 次者为合格的 PD 模型^[11]。

将成功 PD 模型大鼠给予腹腔注射 L-dopa + 苄丝肼(50 mg/kg L-dopa 和 12.5 mg/kg 苄丝肼,即 L-dopa 和苄丝肼溶于含 0.05% 的乙醇和 0.1% 的抗坏血酸的注射用水中,配成 10 mg/mL),每日两次,连续 2 周。正常对照组、假手术组给予腹腔注射等量的含 0.05% 的乙醇和 0.1% 的抗坏血酸的注射用水,每日两次,连续 2 周。2 周后诱发动动物,具有典

型 AIM(AIM 评分大于 20 分)表现,且 APO 诱导大鼠对侧旋转圈数增加者,为阴虚动风证 LID 模型^[12]。

1.3 分组及给药

1.3.1 分组方法

采用区层随机法,将阴虚动风证 LID 模型大鼠随机分为 4 组:阴虚动风证 LID4 周、6 周模型组、复方地黄方 4 周、6 周组,每组各 6 只。另取正常对照 4 周、6 周组、假手术 4 周、6 周组,每组各 6 只。

1.3.2 给药方法

阴虚动风证 LID 模型组大鼠在腹腔注射 L-dopa + 苄丝肼(50 mg/kg L-dopa 和 12.5 mg/mL 苄丝肼)的基础上给予生理盐水灌胃;复方地黄方组大鼠在腹腔注射 L-dopa + 苄丝肼的基础上给予中药复方地黄方灌胃;正常对照组、假手术组给予腹腔注射等量的含 0.05% 的乙醇和 0.1% 的抗坏血酸的注射用水的基础上给予生理盐水灌胃。每次每鼠灌胃量为 2 mL,每日 1 次,分别连续用药 4 周、6 周。

1.3.3 样本处理

(1)取大鼠纹状体

每组大鼠进行最后一次行为学检测后,给 3%戊巴比妥钠进行麻醉,迅速开颅取脑,在冰上小心分离纹状体并称重,分别置于事先准备好的冻存管中,投入液氮罐中快速冷冻,后存放于 -80℃ 冰箱中保存,备用。

(2)实验步骤

实验步骤主要有提取总蛋白,配制分离胶和堆积胶,加样,电泳,转膜,封闭,加入抗体,显影,分析。

1.4 观察指标

1.4.1 阴虚动风证 LID 大鼠神经行为学观察

LID 大鼠模型的行为学观察内容主要有异常不自主动作(abnormal involuntary movement, AIM)评分、旋转启动时间、剂峰旋转圈数、旋转持续时间。

(1)AIM 评分

大鼠于注射 L-dopa 4 周、6 周后进行 AIM 评分,每次评定结果由经用药后每间隔 35 min 的 AIM 总分数组成,每次连续评定 4 组数据,持续 140 min,4 次评分之和为最终得分。

(2)L-dopa 诱导后对侧旋转行为的评定

大鼠在腹腔注射 L-dopa 一日量后进行行为学观察,记录应用 L-dopa 后旋转启动时间、剂峰旋转圈数以及旋转持续时间。

1.4.2 阴虚动风证 LID 大鼠纹状体内大麻素 CB1

受体的变化

应用 Western blot 法和测定各组大鼠纹状体内大麻素 CB1 受体的表达情况。

1.5 统计学处理方法

所有资料均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 16.0 版软件对数据进行齐性检验及分析,采用单因素方差分析(ANOVA),4 周与 6 周比较,使用 T 检验处理实验数据。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 阴虚动风证 LID 模型大鼠神经行为学的变化及复方地黄方的干预作用

阴虚动风证 LID 模型大鼠随造模时间的延长,其 AIM 评分呈逐渐增加的趋势,造模 6 周与 4 周时

相比,差异有显著性($P < 0.05$);复方地黄方干预 4 周、6 周后,与 LID 模型组相比较,差异有显著性($P < 0.001$)。复方地黄方组随着干预时间的延长,旋转启动时间呈逐渐增加的趋势,6 周时与 4 周时相比较,差异有显著性($P < 0.05$);复方地黄方组干预 6 周与 LID 模型组 6 周相比较,差异有显著性($P < 0.01$)。

阴虚动风证 LID 模型大鼠旋转持续时间随造模时间的延长,有增加的趋势,造模 6 周与造模 4 周相比较,持续时间有增加,差异有显著性($P < 0.01$);复方地黄方组随干预时间的延长,大鼠旋转持续时间呈逐渐缩短趋势,6 周与 4 周比较,差异有显著性($P < 0.01$);复方地黄方干预 4 周、6 周后与 LID 模型组相比较,差异有显著性($P < 0.01$, 或 $P < 0.001$)。见表 1。

表 1 复方地黄方干预后阴虚动风证 LID 模型大鼠神经行为学的变化($n, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of the compound formula rehmannia on the activities of AIM, time (seconds) to commencement of rotational behavior, the duration (minutes) of rotational behavior, the number of peak rotations to the contralateral side in the Parkinson's disease rats with levodopa-induced dyskinesia with Yin deficiency stirring wind pattern($n, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	AIM 评分 Involuntary movement scores (AIM)		旋转启动时间 Time to commencement of rotational behavior (seconds)		旋转持续时间 Duration of rotational behavior (minutes)		剂峰旋转圈数 Number of peak rotations to the contralateral side (rotations/5 minutes)	
	4 周 4 weeks	6 周 6 weeks	4 周 4 weeks	6 周 6 weeks	4 周 4 weeks	6 周 6 weeks	4 周 4 weeks	6 周 6 weeks
正常对照组 Control	0	0	0	0	0	0	0	0
假手术组 Sham operated	0	0	0	0	0	0	0	0
LID 模型组 Model	39.17 ± 4.69	45.33 ± 2.50 [◆]	333.50 ± 142.11	227.33 ± 132.88	212.08 ± 43.59	226.33 ± 11.55 ^{◆◆}	196.00 ± 63.50	158.17 ± 82.54
复方地黄方组 Compound Formula Rehmannia	28.83 ± 5.95 [■]	24.33 ± 5.20 [■]	354.17 ± 241.27	534.33 ± 289.97 ^{■◆}	167.50 ± 22.87 [■]	124.33 ± 16.48 ^{■◆◆}	137.17 ± 85.13	134.33 ± 89.87

注:组间比较;与 LID 模型组比较;■ $P < 0.01$ ■■ $P < 0.001$;组内比较;与 4 周组比较;◆ $P < 0.05$ ◆◆ $P < 0.01$ 。

Note. Intergroup comparison; vs. the model group; ■ $P < 0.01$ ■■ $P < 0.001$. Intragroup comparison; vs. the 4 weeks group after treatment; ◆ $P < 0.05$ ◆◆ $P < 0.01$.

2.2 复方地黄方干预后阴虚动风证 LID 模型大鼠纹状体内 CB1 受体表达情况

阴虚动风证 LID 模型组大鼠纹状体内 CB1 受体与内参蛋白条带密度比值较正常对照组、假手术组相比较,均明显升高,差异有显著性($P < 0.001$);阴虚动风证 LID 模型 6 周组较 4 周组相比较,大鼠纹状体内 CB1 受体与内参蛋白条带密度比值明显

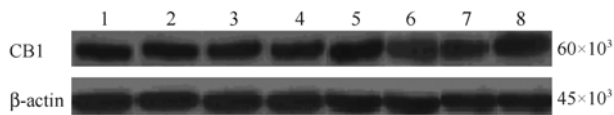
降低,差异有显著性($P < 0.001$)。复方地黄方 4 周组与 LID 模型 4 周组比较,差异有显著性($P < 0.01$);复方地黄方 6 周组与 LID 模型 6 周组比较,差异有显著性($P < 0.001$)。复方地黄方 6 周组较 4 周组相比较,大鼠纹状体内 CB1 受体与内参蛋白条带密度比值升高趋势更明显,差异有显著性($P < 0.001$)。见表 2、图 1。

表 2 复方地黄方干预后 LID 模型大鼠纹状体内 CB1/GAPDH 的比较($\bar{x} \pm s, n=6$)**Tab. 2** Effect of compound formula rehmannia on the CB1/GAPDH level in the corpus striatum of levodopa-induced dyskinetic rats($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Groups	4 周 4 weeks	6 周 6 weeks
正常对照组 Control	0.480 ± 0.026	0.481 ± 0.029
假手术组 Sham operated	0.480 ± 0.029	0.480 ± 0.031
LID 模型组 Model	0.724 ± 0.012 ■▲	0.650 ± 0.012 ■▲●
复方地黄方组 Compound formula rehmannia	0.779 ± 0.025 ■▲★	0.929 ± 0.035 ■▲★★●

注:组间比较:与正常对照组比较:■ $P < 0.001$;与假手术组比较:▲ $P < 0.001$;与 LID 模型组比较:★ $P < 0.01$ ★★ $P < 0.001$ 。组内比较:与 4 周组比较:● $P < 0.001$ 。

Note. Intergroup comparison: vs. the control group: ■ $P < 0.001$; vs. the sham operated group: ▲ $P < 0.001$; vs. the model group: ★ $P < 0.01$ ★★ $P < 0.001$. Intragroup comparison: vs. the 4 week group: ● $P < 0.001$.



注:1:正常对照 4 周组;2:正常对照 6 周组;3:假手术 4 周组;4:假手术 6 周组;5:LID 模型 4 周组;6:LID 模型 6 周组;7:复方地黄方 4 周;8:复方地黄方 6 周组。

图 1 Western blot 法显示各组大鼠纹状体内 CB1 受体表达量的变化

Note. 1: Control group at 4 weeks after treatment; 2: Control group at 6 weeks after treatment; 3: Sham operated group at 4 weeks after treatment; 4: Sham operated group at 6 weeks after treatment; 5: Model group at 4 weeks after treatment; 6: Model group at 6 weeks after treatment; 7: Compound formula rehmannia group at 4 weeks after treatment; 8: Compound formula rehmannia group at 6 weeks after treatment.

Fig. 1 Western blot shows the changes of CB1 receptor expression in the rats of each group

3 讨论

LID 模型大鼠出现不自主的神经行为学表现是 L-dopa 产生神经毒性的结果。我们的实验研究也证实了 L-dopa 具有神经毒性。最近的大量研究表明,PD 及 LID 的发生与大麻素受体的改变关系密切^[13]。目前已知的大麻素受体主要分为 CB1 和 CB2 两种受体,两者均为 G 蛋白偶联受体^[14]。CB1 受体主要分布在中枢神经系统(主要在基底节区含量丰富),并在 GABA 及谷氨酸神经元突触末梢表达。其配体为 eCB,主要由突触后神经元按需合成,并且与经典的突触传递相反的方式作用于突触前膜的 CB1 受体,反馈性的抑制突触前的 GABA 及谷氨酸神经递质的释放,对运动活动进行调控^[15]。PD

和 LID 模型大鼠其表现出的神经行为学变化与纹状体内 CB1 受体的表达密切相关。当 CB1 受体被激活后,会明显改善帕金森病 LID 大鼠的神经行为学表现,神经行为学的严重程度与纹状体内 CB1 受体的表达呈现负相关。神经行为学表现越严重,其纹状体内 CB1 受体的表达越低。反之,神经行为学表现越轻,其纹状体内 CB1 受体的表达越高。

有报道显示,当长期使用 L-dopa 来治疗的 PD 动物模型诱发 LID 后,纹状体内 CB1 受体信号传导与 PD 相比较呈现减弱的趋势^[16-17]。已有研究显示^[18-19],LID 时大鼠脑内 CB1 受体的表达发生了改变,主要表现损毁侧纹状体内 CB1 受体的表达较 PD 相比较呈降低趋势。本实验研究亦发现阴虚动风证 LID 模型大鼠在纹状体内大麻素 CB1 受体的表达呈现上调趋势,但随着造模时间的延长,其纹状体内大麻素 CB1 受体表达呈现下调趋势。这与文献研究^[20]结果一致。L-dopa 由于其半衰期较短,其波动性也较大,这种非生理性的波动性刺激,随着治疗时间的延长可能会引起中型多棘神经元所介导信号通路的改变,并直接影响到直接和间接通路,导致纹状体内谷氨酸系统过度活化^[21],引起大麻素 CB1 受体代偿性增多。

本研究在前期研究的基础上,应用治疗 PD 及 LID 的有效方——复方地黄方进行干预研究,复方地黄方中熟地黄补肾益精,滋阴养血,固本培元为君药。白芍养肝血,滋肝阴,柔肝气,为养血濡筋,缓急止颤之良药;钩藤熄风定惊,化痰舒筋。白芍与钩藤等同用,共为臣药,可助君药滋阴养血、熄风平肝。丹参养血、活血、化瘀。石菖蒲能提高血脑屏障通透性,起到醒脑开窍、引药入脑的作用。全方共奏滋补

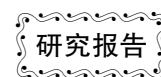
肝肾,平肝熄风、化痰祛瘀、解毒散结之功效^[22]。我们的研究发现,复方地黄方组大鼠纹状体内 CB1 受体的表达较 LID 模型组呈升高趋势,并且随着复方地黄方干预时间的延长,大鼠纹状体内 CB1 受体升高趋势更明显。我们推测复方地黄方可能通过激活纹状体内大麻素 CB1 受体,使 CB1 受体的表达升高,进而抑制兴奋性氨基酸(主要是谷氨酸)的释放,从而减轻了兴奋性毒性的结果^[23]。复方地黄方也可能是通过增加纹状体内大麻素 CB1 系统的信号传导来调节直接通路和间接通路失衡的状态,起到内源性保护的作用。

总之,阴虚动风证 LID 时,模型大鼠处于 L-dopa 反复波动性刺激 DA 受体的过程中,可导致皮质纹状体 Glu 受体磷酸化, Glu 投射超敏,兴奋性毒性增加,大麻素 CB1 受体的信号传导相对减弱,共同促使运动并发症的发生,使得模型大鼠产生神经行为学表现。以滋阴熄风为主的中药复方地黄方对阴虚动风证帕金森病 LID 模型大鼠能够明显缓解其的动风特征,能明显清除自由基和降低兴奋性毒性,从而起到“减毒增效”的作用。

参 考 文 献

- [1] Pezzoli G, Zili M. Levodopa in Parkinson's disease: from the past to the future [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2010, 11(4): 627-635.
- [2] Sethi KD. The impact of levodopa on quality of life in patients with Parkinson disease [J]. *Neurologist*, 2010, 16(2): 76-83.
- [3] He JC, Yuan CX, Wei HC, et al. Treatment of Parkinson's disease [J]. *J Trad Chin Med*, 2004, 24(4): 303-308.
- [4] 盛慧敏,何建成,王文武,等. 帕金森病中医证候的现代文献研究 [J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(4): 967-969.
- [5] 何建成. 帕金森病中医药治疗的再思考—兼谈“滋肾平肝,活血化痰,蠲痰散结”是帕金森病的基本治法 [J]. *中医药通报*, 2005, 4(1): 12-14.
- [6] 葛晶,何建成,袁灿兴. 滋补肝肾法治疗帕金森病的临床疗效观察及机理探讨 [J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(12): 3070-3072.
- [7] 冉秋,何建成. 一体化病证结合帕金森病大鼠模型中医证候属性研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(6): 465-471.
- [8] 滕龙,何建成. 大麻素受体与帕金森病及异动症相关性研究进展 [J]. *国际老年学杂志*, 2012, 33(5): 215-219.
- [9] 孙瑞元. 定量药理学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1987: 247.
- [10] 包新民,舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱 [M]. 北京,人民卫生出版社, 1991: 49-58.
- [11] Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons [J]. *Eur J Pharmacol*, 1968, 5(1): 107-110.
- [12] 丁宏娟,何建成,王文武. 不同剂量左旋多巴对帕金森病大鼠神经行为学的影响 [J]. *西安交通大学学报:医学版*, 2011, 32(1): 93-96, 106.
- [13] García-Arencibia M, González S, de Lago E, et al. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties [J]. *Brain Res*, 2007, 1134(1): 162-170.
- [14] 陈子晞. 内源性大麻素系统与帕金森病 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2008, 25(2): 248-249.
- [15] 马雅萍,刘振国. 大麻素系统与帕金森病及其运动并发症关系的研究进展 [J]. 2008, 16(1): 99-104.
- [16] Picconi B, Paille V, Ghiglieri V, et al. L-dopa dosage is critically involved in dyskinesia via loss of synaptic depotentiation [J]. *Neurobiol Dis*, 2008, 29(2): 327-335.
- [17] Brochie JM. CB1 cannabinoid receptor signaling in Parkinson's disease [J]. *Current Opin Pharmacol*, 2003, 3(1): 54-61.
- [18] 巴茂文,刘振国,孔敏,等. 左旋多巴诱发 PD 大鼠异动症模型的建立和评价 [J]. *上海交通大学学报医学版*, 2006, 26(7): 810-812.
- [19] 马雅萍,宋璐,刘振国. 大麻素受体 1 在帕金森病大鼠基底节表达的研究 [J]. *中国临床神经科学*, 2008, 16(3): 231-236.
- [20] 马雅萍. 大麻素 CB1 受体在帕金森病运动并发症发病机制中作用的实验研究 [D]. 上海:上海交通大学, 2008.
- [21] Ba MW, Kong M, Yang HQ, et al. Changes in subcellular distribution and phosphorylation of GluR1 in lesioned striatum of 6-OHDA-lesioned and L-dopa-treated rats [J]. *Neurochem Res*. 2006, 31(11): 1337-1347.
- [22] 滕龙,洪芳,何建成. 阴虚动风证帕金森病异动症模型大鼠的氧化应激反应及复方地黄方的干预作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(1): 25-29.
- [23] Marsicano G, Goodenough S, Monory K, et al. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity [J]. *Science*, 2003, 302(5642): 84-88.

[收稿日期] 2015-09-16



Noggin 基因沉默表达载体的构建及效果评价

马雨楠, 游颖, 孙兆增*, 曾林*

(军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

【摘要】 目的 构建慢病毒介导的 *Noggin*RNAi 干扰序列, 并分析这些干扰序列对 *Noggin* 基因的沉默效果。**方法** 针对目的基因 *Noggin* 的 mRNA 设计四条干扰序列, 并将这些序列连接到 Lenti-KD 慢病毒载体, 将重组质粒瞬时转染 HEK-293T 包装细胞, 获得重组慢病毒。将重组病毒感染 MC3T3-E1 细胞, 利用 puromycin 进行筛选, 获得稳定表达细胞系。通过实时荧光定量 PCR 和 Western blot 技术分析不同干扰序列的干扰效果。**结果** 实时荧光定量 PCR 结果显示, 四种干扰序列对 *Noggin* 基因的表达都有一定的沉默效果, 但只有 shNoggin-1 ($P < 0.01$) 对其表达影响显著。Western blot 结果显示, 四种干扰序列中只有 shNoggin-1 ($P < 0.01$) 对 *Noggin* 的表达蛋白具有显著的降低作用。**结论** 获得了一种 *Noggin* 基因的干扰序列, 该序列能够干扰 *Noggin* 基因 mRNA 的稳定性, 从而影响蛋白的表达。该干扰序列可以用于部分敲除 *Noggin* 基因, 从而用于研究 *Noggin* 基因的功能。

【关键词】 *Noggin* 基因; 基因沉默; 表达载体; *Uncv* 无毛小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0037-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.007

Construction and evaluation of gene silencing vectors of *Noggin*

MA Yu-nan, YOU Ying, SUN Zhao-zeng*, ZENG Lin*

(Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

【Abstract】 Objective To construct the retroviral-mediated short hairpin RNA (shRNA) expression vectors of *Noggin*, and to analyze the silencing effect of the shRNA. **Methods** Four interference sequences were designed based on *Noggin* mRNA, and connected to Lenti-KD vectors. The recombinant plasmids were transiently transfected into HEK-293T cells, and finally obtained the recombinant virus. Then MC3T3-E1 cells were infected with the recombinant virus and screened by puromycin. The gene silencing effect of shRNA was evaluated using RT-PCR and Western blot. **Results** RT-PCR results showed that all the four interference sequences had silencing effect on the expression of *Noggin*, but only shNoggin-1 ($P < 0.01$) was different significantly. Western blot results showed that among the four interference sequences, only shNoggin-1 ($P < 0.01$) showed a significantly lowering effect on the expression of *Noggin*. **Conclusions** One interference sequence of *Noggin* gene is obtained, which can interfere the stability of mRNA of the *Noggin* gene, by affecting the protein expression. It is useful for the further study of unknown biological function of *Noggin*.

【Key words】 *Noggin*; Gene silencing; Expression vector; *Uncv* hairless mice

Corresponding author: ZENG Lin, E-mail: zenglin1965@126.com. SUN Zhao-zeng, Email: laxszz@aliyun.com

Uncv 无毛小鼠是由于常染色体基因突变导致其毛囊发育缺陷而产生的无毛性状。毛囊发育受多种基因、多条信号通路的协同调控, 主要包括 BMP、

Wnt 和 Notch 等信号通路。*Uncv* 突变引起的小鼠毛囊发育缺陷是有助于研究毛囊发育调控的关键因素。而已有研究资料表明 *Noggin* 基因在毛囊的发

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(31030058), 国家科技支撑计划(2011BA115B03)。

[作者简介] 马雨楠(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 实验动物学。E-mail: mynrr324@126.com。

[通讯作者] 曾林(1965-), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物科学, E-mail: zenglin1965@126.com;

孙兆增(1977-), 男, 副研究员, 研究方向: 实验动物分子遗传学, Email: laxszz@aliyun.com。

育过程中发挥了重要作用^[1]。

Noggin 基因最初分离自非洲爪蟾的胚胎,将其 mRNA 注射至爪蟾胚胎,使其头部显著增大,由此命名(美国俚语中 *Noggin* 为“头,脑袋”的涵义)^[2]。在体内 *Noggin* 基因对多个系统的发育和重塑的调控有着重要作用。*Noggin* 与骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)高度结合,阻止其与相应受体的结合,直接拮抗 BMP-2、-4、-7,从而抑制 BMP 作用的信号转导通路^[3]。

本实验借助慢病毒介导的 RNAi 重组载体,对 *Noggin* 基因进行 RNA 干扰,筛选出有效的沉默表达载体,以便于研究 *Noggin* 基因对毛囊形态发育相关信号通路的影响。特别是研究 *Uncv* 无毛小鼠毛囊发育信号通路的调控,分析其在毛囊发育调控中的作用和机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

EndoFree plasmid ezFlow mini kit(PD1220-02)、Gel extraction kit DC3511-01)、EZgeneTM tissue RNA kKit(R6311-01)为 Biomiga 品牌产品,DNA ligation kit(D6022)、PrimeScript RT reagent kit(RR047A)、SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 为 Takara 品牌产品,Puromycin(J593)为 Amresco 品牌产品,胎牛血清、DMEM 高糖培养基、0.05% EDTA 胰酶为 HyClone 品牌产品,lipofectamine 2000 转染试剂、高糖 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's)培养基、DMSO 为 Invitrogen 品牌产品,4 × SDS 上样缓冲液、1 × PBS 缓

冲液、1 mol/L Tris-Cl、1.5 mol/L Tris-Cl 为 Solarbio 品牌产品,抗 *Noggin* 兔多克隆抗体(ab16054)为 Abcam 品牌产品,HRP 标记山羊抗兔二抗(CW0103)、HRP 标记山羊抗小鼠二抗(CW0102)、抗 β -actin 鼠单克隆抗体(CW0096)、BCA 蛋白定量试剂盒(CW0014)为康为世纪品牌产品,酵母粉、胰蛋白酶、NaCl 等均为国产试剂。

1.1.2 菌种及细胞株

Lenti-KD 载体、pMD2.0G 质粒、psPAX2 质粒和 HEK293T 细胞由本实验室冻存,MC3T3-E1 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。实验于军事医学科学院实验动物中心屏障动物实验室进行【SYXK(军)2012-004】。

1.2 实验方法

1.2.1 慢病毒介导的 *Noggin* 基因 RNAi 重组载体的构建

(1) *Noggin* 基因 shRNA 靶序列的设计

根据 siRNA 的设计原则,针对目的基因 *Noggin* 的序列,设计四条 shRNA 环形序列。利用网站(<http://www.lifetechnologies.com/cn/zh/home/life-science/rnai.html>)设计出两条互补的小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)的模板序列,并以基因 mRNA 为模板设计合成二条 RNAi 特异性靶向序列。采用 Blast 软件对选择的靶序列进行同源分析,排除 shRNA 特异性抑制其他基因片段的情况。再在两条互补的碱基序列的 5' 端分别加入限制性内切酶 *Bam*HI、限制性内切酶 *Eco*RI 的酶切位点。设计的四条 shRNA 寡核苷酸序列见表 1。

表 1 shRNA 寡核苷酸序列表

Tab.1 shRNA oligonucleotide sequence list

名称 Names	序列 Sequences
shRNA-1-forward	5'-GATCCgctgaggaggaagttacagatCTTCCTGTCAGAatctgtaacttctcctcagcTTTTG-3'
shRNA-1-reverse	5'-AATTCAAAAAgctgaggaggaagttacagatTCTGACAGGAAGatctgtaacttctcctcagcG-3'
shRNA-2-forward	5'-GATCCcctaaggagaaggatctgaaCTTCCTGTCAGAttcagatccttctccttagggTTTGTG-3'
shRNA-2-reverse	5'-AATTCAAAAAccctaaggagaaggatctgaaTCTGACAGGAAGttcagatccttctccttagggG-3'
shRNA-3-forward	5'-GATCCcgccagcactatctacacatCTTCCTGTCAGAatgtgtagatagtgctggccgTTTGTG-3'
shRNA-3-reverse	5'-AATTCAAAAAcggccagcactatctacacatTCTGACAGGAAGatgtgtagatagtgctggccgG-3'
shRNA-4-forward	5'-GATCCcgagatcaaaggctggagttCTTCCTGTCAGAaactccagccctttagctcgtTTTGTG-3'
shRNA-4-reverse	5'-AATTCAAAAAcagatcaaaggctggagttTCTGACAGGAAGaactccagccctttagctcgtG-3'

(2) shRNA 载体的构建

设计的寡核苷酸单链由 Invitrogen 公司合成,经退火反应使其变为双链。用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切载体质粒 Lenti-KD,将目的片段进行回

收。用 DNA ligation kit 试剂盒连接酶切后的载体片段与退火后的双链 DNA。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,涂到氨苄青霉素平板上培养过夜,菌液 PCR 筛选出阳性克隆由华大公司进行测序。PCR 引物见表 2。

表 2 引物序列表

Tab. 2 Primer sequence list

名称 Names	序列 Sequences
KD-forward	5'-AATGCTCTTTGGATTGGGAATCTTAT-3'
KD-reverse	5'-TGCTCTAACCAGAGAGACCCAGTA-3'
Noggin-forward	5'-GCAAGAAACAGCGCCTGAGC-3'
Noggin-reverse	5'-GAAGCAGCTGCCACCTTCA-3'
Actin-forward	5'-GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT-3'
Actin-reverse	5'-GACCCATTCCCACCATCACA-3'

(3) 慢病毒包装

包装病毒前,种植 293T 细胞 $7 \times 10^5/60$ mm 平皿,种植 5 个平皿,其中一个准备包装对照病毒 shMock,其内所含序列不针对目的基因,没有敲低效果。shMock 内所含序列为 GATCCCCTAAGGTTA-AGTCGCCCTCGCTTCCTGTCAGACGAGGGCGACTTAACCTTAGGTTTTTG。用 lipofectamine 2000 转染试剂进行细胞转染,质粒 pMD2.0G 和 psPAX2 各 $1 \mu\text{g}$ 分别加上质粒 Lenti-KD shMock、shNoggin-1、shNoggin-2、shNoggin-3、shNoggin-4 $1 \mu\text{g}$,进行病毒包装,培养 3 d,收集上清。

(4) 稳定细胞系建立

感染前,种植 MC3T3-E1 细胞 $2 \times 10^5/\text{孔}$ 于六孔板。过夜培养后,换含病毒液的培养基 (1.5 mL 培养基含 polybrene $15 \mu\text{g}$ + 病毒液 $200 \mu\text{L}$),感染过夜。换新鲜培养基培养 48 ~ 72 h,通过荧光显微镜,观察病毒感染情况。之后进行药物筛选,加入 puromycin ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 终浓度)。亲代细胞加入 puromycin 的已经死亡,病毒感染的细胞,仍大部分存活,收获细胞,进行 Western blot 鉴定。

1.2.2 Noggin 基因沉默表达效果的鉴定

(1) 实时荧光定量 PCR 检测 Noggin 基因干涉效果

根据 GenBank 中 β -actin 基因和 Noggin 基因编码区序列,通过 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计,和 NCBI 中 Blast 序列比对功能,初步检测引物的特异性。引物序列见表 1.2。用 Ezgene™ Tissue RNA Kit 试剂盒提取样本中总 RNA,测定 RNA 浓度后,用 PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒进行反转录。按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂说明书进行扩增。扩增程序为 95°C 60 s, (95°C 15 s, 60°C 15 s, 72°C 45 s) $\times 40$ 个循环,每组样本均设 3 次重复。由溶解曲线判定 PCR 反应的特异性,根据标准曲线以及荧光曲线的 Ct 值计算定量结果。使用 SAS 统计软件处理实验数据,得到四条干扰序列对

目的基因 mRNA 的敲低效果。

(2) Western blot 检测 Noggin 干扰效果

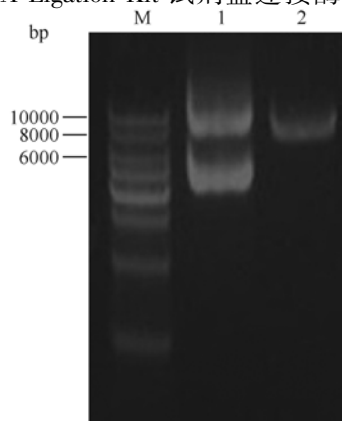
向收取的细胞沉淀中加入混好蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,充分吹打混匀,置于冰上裂解 20 min, $14\,000 \text{ r}/\text{min}$ 4°C 离心 10 min,吸取上清液。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,加适量 $4 \times \text{SDS}$ 上样缓冲液,煮沸 10 min。待配制好的 12% SDS-PAGE 凝胶干后,每孔加入等质量蛋白,最左侧加入彩色预染蛋白 marker,恒压 100 V 电泳后,恒流 250 mA 转膜。封闭 1 h (封闭液用 5% 脱脂奶粉),按需要裁膜,目的蛋白膜加入 1:1000 稀释的抗 Noggin 兔多克隆抗体,内参蛋白膜加入 1:5000 稀释的抗 β -actin 鼠单克隆抗体, 4°C 孵育过夜。用 TBST 洗膜三次,每次 8 min。分别加入对应的 1:8000 稀释的二抗,室温孵育 1.5 h。同样用 TBST 洗膜三次,每次 8 min。将膜拼好后,逐滴加混合好的发光 AB 液,反应 1 min 后去除即可显影。

2 结果

2.1 PCR 鉴定构建的 shRNA 载体

用限制性内切酶 BamHI 和 EcoRI 对载体质粒 Lenti-KD 进行双酶切鉴定,得到目的片段 (图 1)。目的片段大小在 6000 ~ 8000 bp,与预期结果 7853 bp 基本符合。酶切前由于质粒的超螺旋,会看到两条带,经过酶切质粒被线性化,而酶切切下的片段很小,电泳看不到。将 shRNA 克隆入 EcoRI 和 BamHI 双酶切产生的切口。

用 DNA Ligation Kit 试剂盒连接酶切后回收的



注: M: 1 kb ladder marker; 1: Lenti-KD 质粒;
2: BamHI, EcoRI 双酶切后的质粒。

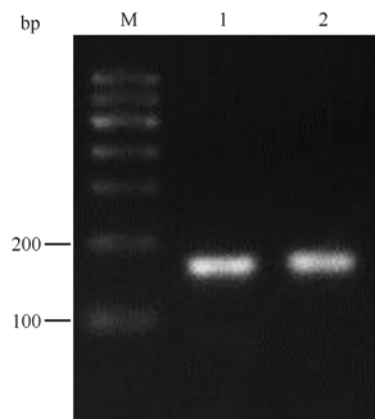
图 1 Lenti-KD 载体双酶切鉴定

Note. M: 1 kb ladder marker; 1: Lenti-KD plasmid;

2: The product of plasmid Lenti-KD digestion with BamHI and EcoRI.

Fig. 1 Enzyme digestion analysis of the plasmid Lenti-KD

载体片段与退火后的双链 DNA, 将连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞, 用菌液 PCR 方法筛选出阳性克隆(图 2), 阳性克隆得到 170 bp 的 PCR 产物, 阴性克隆得到 105 bp 的产物, 或者因为重组没有产物。筛选出的阳性克隆送华大公司测序进行进一步的验证, 测序结果正确。



注: M: 700 DNA marker; 1, 2: 重组质粒阳性克隆。

图 2 重组质粒 PCR 鉴定结果

Note. M: 700 DNA marker;

1, 2: The PCR product of recombinant plasmid.

Fig. 2 The PCR products of recombinant plasmid

2.2 包装的慢病毒感染 MC3T3-E1 细胞荧光观察

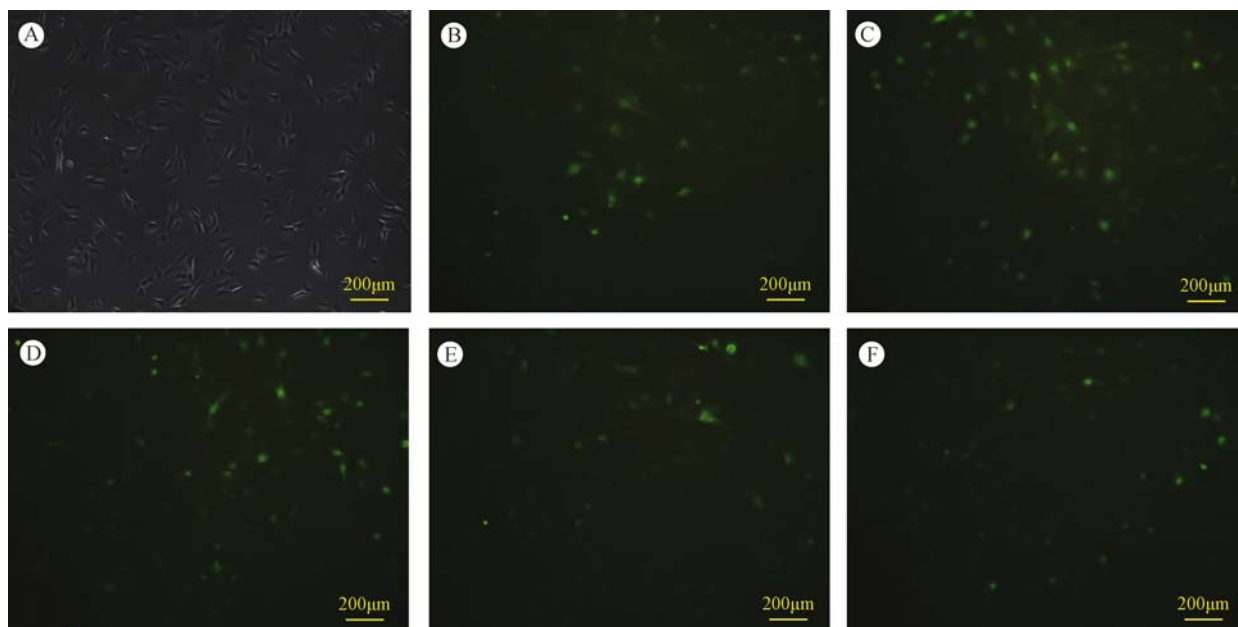
用 293T 细胞包装的慢病毒感染 MC3T3-E1 细胞, 感染过夜, 换新鲜培养基培养 48 ~ 72 h 后, 通过荧光显微镜, 观察病毒感染情况(图 3)。可以明显观察到荧光, 表明感染成功。之后进行药物筛选, 得到稳定细胞系。

2.3 实时荧光定量 PCR 检测 *Noggin* 基因干涉效果

通过 IQ5 荧光定量 PCR 仪自带软件的数据以 β -actin 为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法处理数据和 Graph-PAAd Prism 5 软件作图, 结合 SAS 9.2 分析软件得到以下数据(图 4), 表明 shNoggin-1 ($P < 0.01$) 差异有显著性、shNoggin-2 ($0.01 < P < 0.05$) 和 shNoggin-3 ($P < 0.05$) 差异有显著性、shNoggin-4 ($P > 0.05$) 差异无显著性, 其中 shNoggin-1 干涉效果最佳。

2.4 Western Blot 检测 *Noggin* 干扰效果

RNAi 在哺乳动物的细胞中是由于靶基因 mRNA 水平的降低引起靶蛋白表达水平的降低。为了确定干涉后蛋白表达变化是否与 mRNA 表达相似, 选择 *Noggin* 多克隆抗体, 用 Western blot 的方法分析蛋白表达水平的变化(图 5 A), 并通过 Photoshop 7.0 灰度分析软件, 结合 SAS 9.2 分析软件得到以

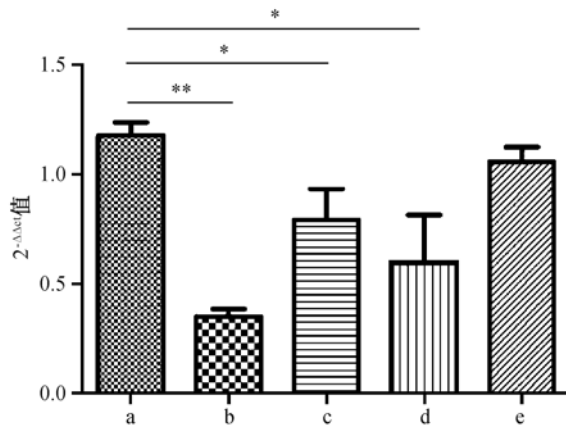


注: A: 正常 MC3T3-E1 细胞; B: 阴性对照病毒 shMock 感染 MC3T3-E1 细胞; C-F: 病毒 shNoggin-1、shNoggin-2、shNoggin-3、shNoggin-4 感染 MC3T3-E1 细胞。

图 3 慢病毒感染 MC3T3-E1 细胞荧光观察($\times 100$)

Note. A: MC3T3-E1 Cells; B: MC3T3-E1 cells with negative virus infection; C-F: MC3T3-E1 cells infected with different viruses (c: shNoggin-1; d: shNoggin-2; e: shNoggin-3; f: shNoggin-4).

Fig. 3 Fluorescence observation of the MC3T3-E1 cells infected with Lenti virus($\times 100$)



注: a; shMock 阴性对照; b-e; 干扰序列 shNoggin-1、shNoggin-2、shNoggin-3、shNoggin-4; ** $P < 0.01$ 与 shMock 阴性对照组相比差异有显著性, * $P < 0.05$ 与 shMock 阴性对照组相比差异有显著性。

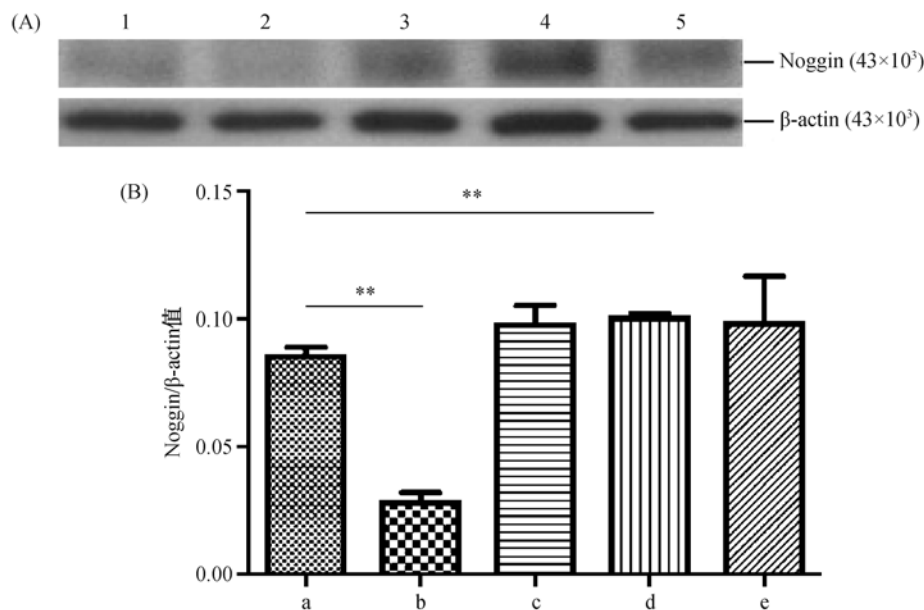
图 4 实时荧光定量 PCR 检测 *Noggin* 基因干扰效果
Note. a: Negative sequence; b-e: Different Interference sequences (b: shNoggin-1; c: shNoggin-2; d: shNoggin-3; e: shNoggin-4); ** $P < 0.01$ means extremely significant difference compared with the negative control, * $P < 0.05$ means significant difference compared with the negative control.

Fig. 4 Identification of *Noggin* gene interference effect using RT-PCR

下数据(图 5 B)。Western blot 结果显示,设计的 4 条干扰序列中, shNoggin-1 ($P < 0.01$) 差异有显著性, shNoggin-2 和 shNoggin-4 ($P > 0.05$) 差异无显著性, shNoggin-3 ($P < 0.01$) 虽差异极显著但并非表达量下降,其中 shNoggin-1 干扰序列的干扰效率最高,与实时定量 PCR 的结果相似。

3 讨论

在体内 *Noggin* 基因对多个系统的发育和重塑的调控有着重要作用。*Noggin* 与 BMP 高度结合,阻止其与相应受体的结合,从而抑制 BMP 作用的信号转导通路, BMP 主要是通过经典的 Smad 路径传导信息,发挥其生物学作用^[4]。BMP 家族成员参与毛囊发育的各个环节,主要起抑制作用。*Noggin* 基因在 BMP 信号通路中通过抑制 BMP 信号,促进毛囊的发育; *Noggin*-Shh 信号能调节毛发的形态,能促进诱导毛囊的生长^[1]。BMP 信号通过调节细胞周期循环调节胚胎和神经组织发育^[5]; 其抑制剂 *Noggin* 在神经系统发育及分化中也有重要作用,能促使脑及神经组织的发育,且在背侧中胚层缺失时直接诱发出神经组织,因而 *Noggin* 被认为是较有前途的内



注: A: 1: shMock 阴性对照; 2-5: 干扰序列 shNoggin-1、shNoggin-2、shNoggin-3、shNoggin-4; B: a: shMock 阴性对照; b-e: 干扰序列 shNoggin-1、shNoggin-2、shNoggin-3、shNoggin-4; ** $P < 0.01$ 与 shMock 阴性对照组相比差异有显著性。

图 5 Western Blot 检测 *Noggin* 干扰效果

Note. A: 1: Negative sequence; 2-5: Different Interference sequences (2: shNoggin-1; 3: shNoggin-2; 4: shNoggin-3; 5: shNoggin-4). B: a: Negative sequence; b-e: Different Interference sequences (b: shNoggin-1; c: shNoggin-2; d: shNoggin-3; e: shNoggin-4); ** $P < 0.01$ means extremely significant difference compared with negative control.

Fig. 5 Identification of *Noggin* interference effect using Western blot

源神经信号^[6]。*Noggin* 是骨骼系统发育所必需的重要调控基因,人们研究发现正常的关节、韧带、软骨形成需要正确而适当的 *Noggin* 及 BMPs/CDMP 表达^[7,8]。此外已有的研究显示,以 BMP 抑制剂 *Noggin* 干预 MC3T3-E1 细胞,并加机械离心力刺激后,抑制了 Runx2 的表达,阻断 BMP 信号通路^[9],提示 MC3T3-E1 细胞与 BMP 信号通路密切相关。为了便于敲低 *Noggin* 后对 BMP 信号通路的研究,我们选用 MC3T3-E1 细胞获得能有效抑制 *Noggin* 基因表达的稳定细胞系。

RNA 干扰是最初由 Andrew 发现线虫体内 mRNA 由特异的双链 RNA 介导产生降解,基因表达受其正义 RNA 抑制的现象^[10]。Tuschl^[11]发现 RNA 干扰能够特异性高效沉默哺乳动物细胞内靶基因。RNAi 是 Dicer 酶在胞质中剪切长双链 RNA 生成 21–25nt 的双螺旋分子 siRNA,其双螺旋结构能被参与 RNA 干扰的分子特异识别,其中一条单链能与 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)结合形成蛋白复合物,该复合物可切断与 siRNA 互补的 mRNA 分子或靶基因翻译的过程,进而抑制相应基因在细胞内的表达^[12]。因此, RNAi 近些年多用于未知基因生物学功能的研究,迅速成为发展前景广阔且实用的生物技术。本实验利用 RNA 干扰技术对 *Noggin* 基因进行 RNA 干扰,从而研究 *Noggin* 基因对毛囊干细胞形态、分化和对相关信号通路的影响,分析其在毛囊发育调控中的作用和机理。

慢病毒载体是一种复制缺陷性逆转录病毒载体,具有可插入细胞基因组、稳定表达、持续时间长、对细胞活性要求低、包装周期短等优点,因此成为携带干扰 RNA 的理想载体^[13],使 RNAi 干扰作用持久性表达。siRNA 技术是利用具有同源性的双链 RNA 诱导沉默序列特异的目的基因,并迅速阻断该基因的活性,从而观察该基因对细胞的影响。近年来,有关慢病毒载体介导 RNAi 的相关研究^[14]逐渐展现在研究内源性基因功能和基因治疗中该技术的重要作用。本实验所采用的慢病毒载体 Lenti-KD,以其自身 RNA 为模板在宿主细胞内反转录合成 cDNA,再以后者为模板合成双链 DNA,环化,整合在宿主细胞的染色体内,进而能够得到长期的表达。

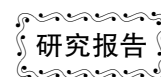
本研究成功构建了小鼠 *Noggin* 基因慢病毒介导的 RNAi 载体,并转染小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞,得到有效抑制 *Noggin* 基因表达的稳定细胞株,为后续研究 *Noggin* 基因对毛囊形态发育的相关信号通路的影响,分析其在毛囊发育和调控中的作用和机

理提供依据。结果发现,sh*Noggin*-1 干扰效率最高,其明显下调了 MC3T3-E1 细胞中 *Noggin* mRNA 和蛋白的表达,与对照组之间差异有显著性($P < 0.01$)。干扰载体构建成功,为进一步检测敲低 *Noggin* 基因对相关信号通路的影响提供基础。

参 考 文 献

- [1] Song K, Krause C, Shi S, et al. Identification of a key residue mediating bone morphogenetic protein (BMP)-6 resistance to noggin inhibition allows for engineered BMPs with superior agonist activity[J]. J Biol Chem, 2010, 285(16): 12169–12180.
- [2] Smith WC, Harland RM. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos[J]. Cell, 1992, 70(5): 829–840.
- [3] Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM. The Spemann organizer signal Noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4[J]. Cell, 1996, 86(4): 599–606.
- [4] Islam SS, Mokhtari RB, Kumar S, et al. Spatio-temporal distribution of Smads and role of Smads/TGF- β /BMP-4 in the regulation of mouse bladder organogenesis[J]. PLoS ONE, 2013; 8(4): 61340.
- [5] Oshimori N, Fuchs E. Paracrine TGF- β signaling counterbalances BMP-mediated repression in hair follicle stem cell activation[J]. Cell Stem Cell, 2012, 10(1): 63–75.
- [6] Lamb TM, Knecht AK, Smith WC, et al. Neural induction by the secreted polypeptide Noggin [J]. Science, 1993, 262(5134): 713–718.
- [7] Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, et al. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton [J]. Science, 1998, 281(5368): 1455–1457.
- [8] Li CH, Yang X, He YJ, et al. Bone morphogenetic protein-9 induces osteogenic differentiation of rat dental follicle stem cells in P38 and ERK1/2 MAPK dependent manner[J]. Int J Med Sci, 2012, 9(10): 862–871.
- [9] 关键, 程宗生, 王健平, 等. 成骨细胞中 Runx2 对机械离心力刺激的响应 [J]. 华西口腔医学杂志, 2010, 28(1): 38–40, 44.
- [10] Fire A, Xu S, Mello CC, et al. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391(6669): 806–811.
- [11] Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in post transcriptional gene silencing in plants [J]. Science, 1999, 286(544): 950–952.
- [12] Novina CD, Sharp PA. The RNAi revolution [J]. Nature, 2004, 430(6996): 161–164.
- [13] Wizniewski M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector mediated drug inducible RNA interference [J]. J Virol, 2003, 77(16): 8957–8961.
- [14] Hui EK, Yap EM, An DS, et al. Inhibition of influenza virus matrix (M1) protein expression and virus replication by U6 promoter driven and lentivirus mediated delivery of siRNA [J]. J Gen Virol, 2004, 85 (Pt7): 1877–1884.

[收稿日期] 2015-07-14



一种牵张成骨大鼠实验模型的建立

曾景奇¹, 黄枫², 姜自伟^{2*}, 王凡¹, 李悦², 虎群胜¹

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

【摘要】 目的 建立一种新型 SD 大鼠胫骨牵张成骨模型的方法。**方法** 40 只雄性 SD 大鼠右侧胫骨截骨并短缩 4 mm, 以自行研究设计的环状牵张外固定器固定, 于骨折修复期予以牵张外固定器恢复胫骨高度, 术后通过大体观察、影像学观察以及组织形态学方法观察截骨部位的愈合与恢复情况。**结果** 术后外固定器稳定有效, 对大鼠功能活动无明显影响。胫骨高度恢复, 骨性愈合。**结论** 实验所建立的大鼠胫骨牵张成骨模型可靠实用, 具有可重复性。

【关键词】 牵张成骨; SD 大鼠; 实验模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0043-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.008

Establishment of a novel rat model of distraction osteogenesis

ZENG Jing-qi¹, HUANG Feng², JIANG Zi-wei^{2*}, WANG Fan¹, LI Yue², HU Qun-sheng¹

(1. Guangzhou University of Chinese medicine, Guangzhou 510006, China.

2. the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405)

【Abstract】 Objective To establish a new model of distraction osteogenesis in rat tibia. **Methods** A customized external fixation device was attached to the right tibia of 40 male Sprague-Dawley rats. A 4-mm bone block was resected and the tibia was shortened. To investigate the bone healing during the distraction osteogenesis period and reconstruction period, and general observation, x-ray analysis, and histological examination were performed. **Results** The device was stable and effective without hindrance. The tibia length was recovered and bone union was achieved. **Conclusions** A novel Sprague-Dawley rat model of distraction osteogenesis in tibia is successfully established, and this is a reliable, practical and reproducible model.

【Key words】 Distraction osteogenesis; Sprague-Dawley rats. Animal model

Corresponding author: JIANG Zi-wei, E-mail: ainemylyy@qq.com

牵张成骨(distraction osteogenesis, DO)是指通过对骨切开后仍保留骨膜及软组织及血供的骨段, 利用牵张装置按一定的速度和频率牵开, 促使牵张间隙中新骨形成, 从而达到延长或增宽骨骼外科技术。其基本原理是当机体组织受到缓慢而稳定的牵引和张力时, 细胞的增殖与合成功能随即被激活, 从而促进组织的再生^[1]。牵张成骨技术由于具有无需植骨, 手术操作简单, 创伤和风险小, 成骨期抗感染能力强, 成骨质量好, 软、硬组织同期修复等普通

骨折固定技术无法比拟的优点, 已逐渐成为研究和应用的热点^[2]。由此可见, 建立一种有效的牵张成骨动物模型, 通过动物实验推断和证实牵张成骨的机理及影响因素, 对临床具有相当重要的指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级成年雄性 SD 大鼠 40 只, 购自广州中医

[基金项目] 国家自然科学基金(编号: 81403413)。

[作者简介] 曾景奇(1984-), 男, 博士研究生, 专业: 中医骨伤科学。Email: 846484577@qq.com

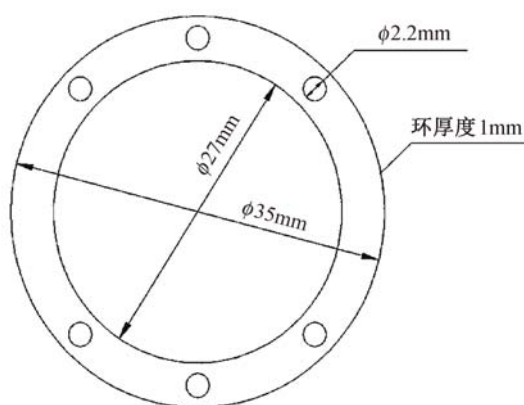
[通讯作者] 姜自伟(1980-), 男, 副主任医师, 专业: 骨与关节损伤。Email: ainemylyy@163.com

药大学实验动物中心【SCXK(粤)2013-0020】, 2~3 月龄, 约 260~280 g, 在广州中医药大学第一附属医院 SPF 级实验设施中进行实验操作【SYXK(粤)2013-0092】, 常规饮食, 光照保持昼夜节律各 12 h, 温度控制在 24~26℃, 相对湿度控制在 50%~70%。并按照实验动物的 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 主要仪器

自制的大鼠胫骨环状外固定器(自制专利)(图

1), 电钻(博世电动工具有限公司, 上海), 定制 0.5 mm 克氏针(天津丰翼), 电动理发器(杭州科美), 游标卡尺(台湾宝工); Olympus-BX53 生物显微镜(日本奥林巴斯); Leica TP1020 半自动台式组织脱水机(Leica Biosystems, 德国), KD-BM 生物组织包埋机(浙江金华科迪仪器设备有限公司), KD-202 石蜡切片机(浙江金华科迪仪器设备有限公司), Leica Autostainer XL 自动染色机(Leica Biosystems, 德国)。



注: 环状压片 4 枚; 25 mm M2 螺钉 4 枚; 5 mm M2 螺钉 4 枚; M2 螺母 16 枚; 0.5 mm 克氏针 4 枚。

图 1 自制大鼠胫骨环状外固定器

Note. Four circle plates; Four 25 mm M2 screws; Four 5 mm M2 screws; Sixteen M2 nuts; Four 0.5 mm Kirschner wires

Fig. 1 The customized external fixation device for tibia of rats

1.2 方法

1.2.1 术前准备

禁食 24 h 不禁水, 术前称重, 5% 水合氯醛麻醉, 用量 6 mg/kg, 右下肢用理发器备皮后反复用 75% 酒精消毒, 备 8 万单位庆大霉素用 250 mL 生理盐水稀释用于冲洗。

1.2.2 手术步骤

助手双手轻柔固定大鼠右侧膝关节及踝关节, 轻轻牵引皮肤。术者取体表标志: 胫骨弧度顶点, 直切口约 1 cm, 钝性分离浅筋膜, 肌间隙处轻轻牵开, 暴露胫骨, 纵向切开骨膜 0.5 cm。沿肌间隙深入探查胫骨后方的腓骨, 剪刀剪断腓骨。丝线缝合切口皮肤。

首先置第一枚环形压片, 电钻装 0.5 克氏针, 胫骨上段前内侧 45° 垂直于胫骨轴线进针, 穿透双侧皮质, 对侧出针。同法用第 2 根克氏针与第一根冠状面成角 30°~45°, 靠近第 1 根进针点穿入。置第二枚环形压片, 用短螺钉固定两压片及其之间的交

叉克氏针, 调整位置, 尽量使大鼠小腿中轴与环形压片中轴重合。

置第三枚环形压片, 上述方法在胫骨中段穿入克氏针 2 枚后置第四枚压片。用长螺钉将固定好的远近两端压片链接。

支架固定牢靠后, 胫骨前端切口拆线, 重新暴露胫骨, 以电钻 1 mm 钻头在胫骨中点穿孔若干(同时用庆大霉素冲洗冷却), 剪开筛孔状胫骨, 测量截骨长度约 4 mm。修剪皮质缘。通过螺钉缩短两端环形压片的距离, 使胫骨截骨断端对合压紧, 拧紧长螺钉螺母。对合满意, 冲洗缝合, 消毒(图 2)。

1.2.3 术后处理

4 万单位青霉素肌注, 连用 3 d。术后禁食 12 h, 不禁水。术后 7 d 内单笼饲养至下肢消肿行走。

1.2.4 牵张

静止期 7 d 后开始通过远端长螺杆螺钉延长, 0.2 mm/d, 连续延长 20 d, 共 4 mm, 恢复胫骨高度。

2 结果

40 只雄性大鼠手术后均能正常饮食排便,伤口愈合良好,手术时间: (87 ± 11.58) min; 术后患肢消肿时间: (3.8 ± 1.45) d, 消肿后大鼠肢体活动正常,均未出现伤口感染、肌肉萎缩等并发症。牵张期及固定期内外固定器稳定牢靠,未见断端及针孔松动,胫骨大体位置符合生理状态,外固定器对大鼠功能活动无明显影响。

2.1 组织切片

术后 60 d 拆除外固定架,取大鼠右侧胫骨,去掉克氏针固定端两侧骨质,仅留牵张成骨区域,置

4% 中性甲醛溶液中固定 48 h, 于 Plank 脱钙液中脱钙 24 h, 流水冲洗 24 h, 全自动脱水机内脱水、透明、浸蜡, 石蜡包埋, 切片, 切片厚度 $5 \mu\text{m}$, 全自动染色机内行 HE 染色。显微镜下观察发现牵张成骨区域纤维骨痂形成, 出现少量软骨, 部分纤维骨痂被类骨质替代, 逐渐形成编织骨 (图 3)。

2.2 影像学

X 线片 (广州中医药大学第一附属医院影像科, 柯达 DR7500, 管电压 50 kV, 毫安秒 4 mA) (图 4) 术后 2 d 见断端对合良好, 2 周后可见实验大鼠胫骨断端原始骨痂填充。牵张期 20 d 后, 胫骨高度恢复。术后 8 周后断端有连续骨痂通过, 骨性愈合。



注: A: 用克氏针及环状压片固定胫骨; B: 截断腓骨; C: 游标卡尺确定胫骨截骨长度 4 mm; D: 术后功能活动。

图 2 手术步骤

Note. A: Holding tibia with Kirschner wires and circle plates. B: Fibula osteotomy. C: To confirm the 4-mm bone block was resected from tibia with a Vernier caliper. D: Functional activity after operation

Fig. 2 Illustration of the operating procedure

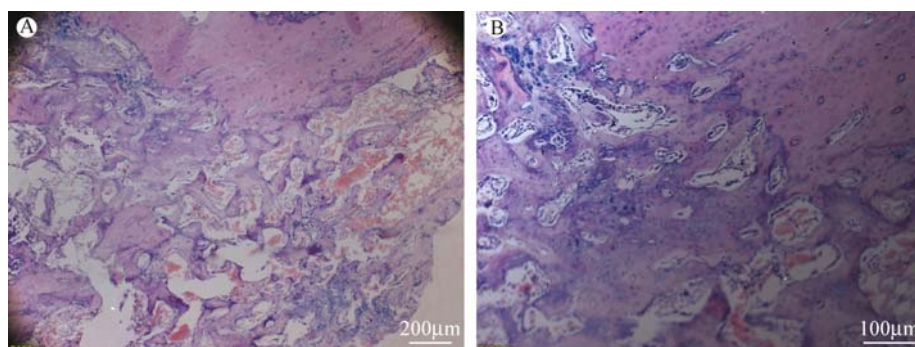
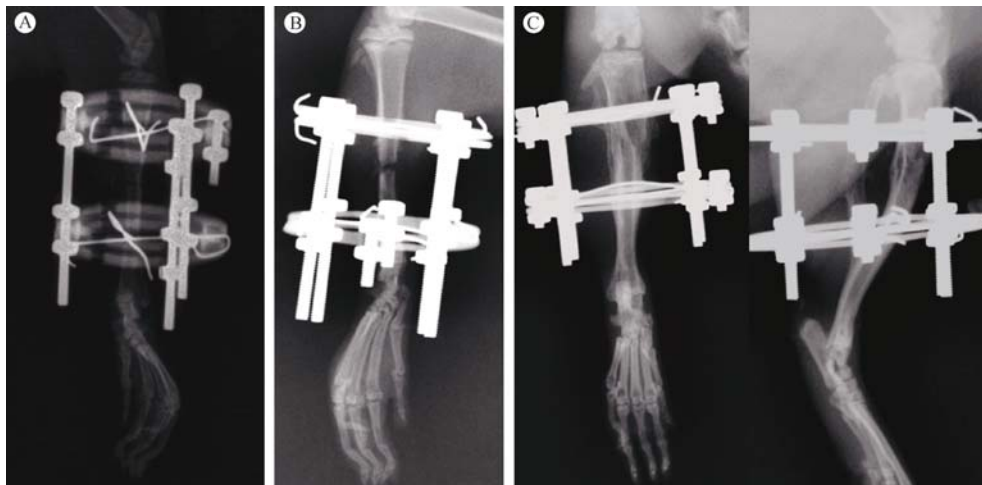


图 3 组织切片 HE 染色结果 (A. $\times 40$; B. $\times 100$)

Fig. 3 Histological pictures of the bone structure



注:A:术后 2 d;B:术后 14 d;C:术后 60 d。

图 4 X 线结果

Note. A: 2 days after operation. B: 14 days after operation. C: 60 days after operation.

Fig. 4 Results of X-ray examination

3 讨论

目前牵张成骨研究的热门集中在口腔颌面科方面,动物如犬、山羊、兔等^[3-5]。对于负重长骨的大鼠牵张成骨模型,由于大鼠本身体格较小,并且生长过程中体型变化较大,规格没有统一的标准。作者前期实验中尝试了文献中提到过的各种规格外固定器如 Tay 等^[6]设计的固定器,发现对于成年雄性 SD 大鼠,外固定环过小会导致小腿软组织嵌顿,术后肿胀持续,不利于功能活动,影响造模效果。分析目前已有的外固定器,主要问题集中在以下几个方面:①器械复杂,金属环的结构不是规整的圆或方形结构,需要重新造模,大范围的成批应用标准难以统一,工作量较大,后期调整牵引长度不易控制;②器械过重,术后可能影响大鼠的活动;③操作复杂,大鼠小腿本身操作范围局限,十分考验设计以及术者的操作技术,造模成功率无法保证。

根据以上结论,我们重新设计和尝试,最后实施在 SD 大鼠上,极大程度避免了以上问题,也是本实验成功的原因,本方法的优势体现在:①器械简单;②器械较轻,重量不超过 10 g,术后不影响大鼠的活动;③操作相对简单,经试验证明 3 个月后亦牢固无松动。④切口较小,手术损伤较小,术后大部分 3 d 之内消肿,活动自如。

研究表明^[7,8],牵张成骨过程中,牵张器稳定性较好,可以很好地诱导新骨形成,而且经过 10 周的固定期后可彻底完成骨改建。反之,若牵张器稳定性差,则将导致胶原介体的形成及骨改建的滞后。

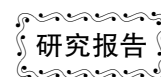
本次实验通过观察大鼠的步态可以发现患处并无假关节形成,牵张时检查亦未发现针口及支架松动的迹象,最后的 X 线片中断端成功完成骨改建可间接证明器械的牢固可靠。总之,本实验中本实验采用的手术方式及术后处理均能被 SD 大鼠很好耐受,且具有相对简单,损伤较小等优势,本方法的大鼠胫骨牵张成骨模型成功率较高,具有很好的可重复性。

(致谢:本实验由广州中医药大学国家重点学科中医骨伤科学实验室提供技术及部分科研试剂耗材支持。)

参 考 文 献

- [1] 孙溪饶. 牵引速率及频率对牵张成骨的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(41): 7727-7730.
- [2] Rubio-Bueno P, Naval L, Rodriguez Campo F, et al. Internal distraction osteogenesis with a unidirectional device for reconstruction of mandibular segmental defects [J]. Oral Maxillofac Surg. 2005, 63(5): 598-608.
- [3] 魏奉才, 张东, 刘少华, 等. 兔双侧下颌骨牵张成骨实验动物模型的建立 [J]. 上海口腔医学, 2004, 13(6): 502-505.
- [4] 郑晓辉, 田卫东, 龙洁, 等. 山羊下颌骨牵张成骨术的实验研究 [J]. 四川大学学报: 医学版, 2005, 36(3): 386-389.
- [5] 吴琳, 王禄增, 哈斯达来, 等. 应力对大段骨缺损修复影响的实验兔模型探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(1): 26-29.
- [6] Tay BK, Le AX, Gould SE, et al. Histochemical and molecular analyses of distraction osteogenesis in a mouse model [J]. Orthop Res, 1998, 16(5): 636-640.
- [7] Klotch DW, Ganey TM, Slater-Haase A, et al. Assessment of bone formation during osteoneogenesis: a canine model [J]. Otolaryngol Head-Neck Surg, 1995, 112(2): 291-302.
- [8] Costantino PD, Friedman CD, Shindo ML, et al. Experimental mandibular regrowth by distraction osteogenesis: long-term results [J]. Arch Otolaryngol Head-Neck Surg, 1993, 119(5): B511-516.

[收稿日期] 2015-08-23



久泻灵颗粒对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠 TLR4 及 NF- κ B p65 表达的影响

吴玉泓^{1,2}, 许雅清¹, 李海龙^{1,2}, 蔺兴遥¹, 程小丽¹, 明海霞¹, 张磊¹

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000;

2. 甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室; 甘肃省中药新产品创制工程实验室, 兰州 730000)

【摘要】 目的 探讨久泻灵颗粒对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织中 TLR4、NF- κ B p65 蛋白基因的表达式的影响。**方法** 通过灌服大黄水煎液, 肌肉注射氢化可的松并结合 TNBS(2,4,6-三硝基苯磺酸)混合乙醇灌肠建立动物模型。将 90 只大鼠随机分为空白组、模型组、久泻灵颗粒治疗 7、14、21 d 组及阳性对照(SASP)组, 用药治疗后采用免疫组化 SP 法和 RT-qPCR 法分别检测大鼠结肠组织中 TLR4、NF- κ B p65 蛋白和基因的表达。**结果** 结肠黏膜形态学评分结果显示, 各治疗组评分均有降低, 差异有显著性($P < 0.01$); 免疫组化 SP 法结果显示: TLR4、NF- κ B p65 在模型组大鼠中表达均显著增强($P < 0.01$); 药物干预后各治疗组大鼠 TLR4、NF- κ B p65 表达均减弱($P < 0.05$); RT-qPCR 法结果显示: 与空白组比较, 模型组大鼠 TLR4、NF- κ B p65 表达增强($P < 0.01$); 与模型组比较, 治疗后各组大鼠 TLR4、NF- κ B p65 表达减弱($P < 0.05$)。**结论** 久泻灵颗粒可减轻结肠黏膜炎症反应, 起到修复黏膜的作用, 其原因与降低脾肾阳虚型 UC 模型大鼠结肠组织中 TLR4、NF- κ B p65 基因的转录和蛋白的表达有关。

【关键词】 溃疡性结肠炎; 脾肾阳虚; TLR4; NF- κ B p65; 久泻灵颗粒; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0047-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.009

Effect of a Chinese medicine, Jiuxieling granules, on the expression of TLR4 and NF- κ B p65 in ulcerative colitis rats with spleen and kidney yang deficiency

WU Yu-hong^{1,2}, XU Ya-qing¹, LI Hai-long^{1,2}, LIN Xing-yao¹, CHENG Xiao-li¹, MING Hai-xia¹, ZHANG Lei¹

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Key Laboratory of Traditional Chinese Herbs and Prescription Innovation and Transformation of Gansu Province; Gansu Province Chinese Medicine New Products Engineering Laboratory, Lanzhou 730000)

【Abstract】 Objective To explore the effects of a Chinese medicine, Jiuxieling granules, on the expression of TLR4 and NF- κ B p65 mRNA and proteins in ulcerative colitis model rats with spleen and kidney yang deficiency. **Methods** The rat model of ulcerative colitis with spleen and kidney yang deficiency was established by oral administration of rhubarb decoction, intramuscular injection of hydrocortisone and TNBS (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid) combined with ethanol enema. All the 90 rats were randomly divided into blank control group, UC model of spleen kidney yang deficiency group, and Jiuxieling granules treatment groups for 7 days, 14 days and 21 days, respectively, and positive control group (SASP). After all the rats were killed and colon samples were collected, the expression of TLR4 and NF- κ B p65 mRNA and proteins of colon tissues were detected by RT-qPCR and SP immunohistochemical. **Results** The results of immunohistochemical assay indicated that expressions of TLR4 and NF- κ B p65 in the UC model group were significantly enhanced,

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号:81260520)。

[作者简介] 吴玉泓(1967-), 男, 博士, 硕士生导师。研究方向: 中医病证结合动物模型及治则治法研究。Email: 172924249@qq.com

when compared with that of the blank group ($P < 0.01$). After treatment, the expressions of TLR4 and NF- κ B p65 in all treatment groups were significantly decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The RT-qPCR assay results indicated that the expressions of TLR4 and NF- κ B p65 in the UC model group were significantly enhanced when compared with that of the blank group ($P < 0.01$). After treatment, the expressions of TLR4 and NF- κ B p65 in all treatment groups were reduced ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusions** Jiuxieling granules can alleviate the mucosal inflammation and facilitate the mucosal repair. The main reasons of which may be associated with reduction of TLR4 and NF- κ B p65 gene transcription and protein expression in the ulcerative colitis model rats with spleen and kidney yang deficiency.

【Key words】 Ulcerative colitis; Yang deficiency of spleen and kidney; TLR4; NF- κ B p65; Jiuxieling granules; Rats

Corresponding author: WU Y-hong, E-mail: 172924249@QQ.com

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种慢性、反复发作性的非特异性肠道炎症性疾病, 临床主要表现为腹痛、腹泻、黏液脓血便以及里急后重, 以形成肠黏膜、黏膜下层的炎症和溃疡为特征, 发生癌变的几率大^[1], 尤其是有结直肠癌家族史的患者, 同时还会引发严重的并发症^[2]。近几年研究发现中医药以及中西医结合治疗 UC 疗效甚好, 使用中医药可以改善患者的溃疡症状和结肠黏膜的微循环, 不良反应小、复发率低、远期疗效高, 具有很好的推广与研究开发价值^[3]。而我们在与 UC 中医证候类型相关的文献研究中发现, 脾肾阳虚证在众多证型中位列第四, 属临床常见证、多发证。本课题从此证着手, 选择四神丸加理中丸进行干预, 从基因和蛋白质的角度, 通过分子生物学手段和方法, 对久泻灵颗粒治疗脾肾阳虚型 UC 进行进一步的探讨, 阐明温补脾肾法治疗 UC 的作用机制及久泻灵颗粒组方用药对机体肠黏膜的免疫调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 90 只, 周龄 6~7 周, 体重 (180 ± 20) g, 雌雄各半, 由甘肃中医药大学实验动物中心提供【SCXK(甘)2011-0001】。动物实验操作在甘肃中医药大学实验动物中心进行【SYXK(甘)2011-0001】。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀【2014-041】。

1.1.2 药品及试剂

久泻灵颗粒 (甘肃众友健康医药股份有限公司加工)、大黄水煎液 (甘肃中医学院附属医院中药房)、三硝基苯磺酸 (Sigma 公司, 批号 111M5001V)、

氢化可的松注射液 (天津药业焦作有限公司, 批号 13060211)、柳氮磺胺吡啶肠溶片 (上海信谊制药公司, 批号 120915)、浓缩型 DAB 溶液、DAB 底物液 (北京中杉金桥, 批号 K146720D)、兔 SP 检测试剂盒 (中杉金桥, 批号 14188A03)、Mouse anti-NF κ B p65 (中杉金桥, 批号 A-0814)、Rabbit anti-TLR4 (博士德生物技术公司, 批号 217847)、反转录试剂盒 (德国罗氏试剂, 批号 14854823)、基因上下游引物 (大连宝生物工程有限公司)、Bioneer 扩增试剂盒 (上海 Bioneer Trade 有限公司)。

1.1.3 主要实验仪器

高速冷冻离心机 (Biofuge-Stratos)、匀浆、美国 Bio-Rad 实时荧光定量 PCR 仪 (CFX96)、成都泰盟 BI-2000 医学图像分析系统 (成都泰盟科技有限公司)、山东易创 MIE 图像处理系统 (山东易创电子有限公司)、显微镜 (日本 Olympus, CX21 型)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备

适应性饲养 1 周后, 根据随机数字表法将 90 只 Wistar 大鼠按照体重及雌雄分为 6 组, 每组 15 只。

参考文献方法^[4-5]重建动物模型。①“脾虚”模型: 空白组大鼠给以蒸馏水每只 2 mL/d 灌胃, 其余各组大鼠上午给以大黄水煎液灌胃, 每只 2 mL/d, 下午给以蒸馏水灌胃每只 2 mL/d, 连续 14 d。②“脾肾阳虚”模型: 在脾虚模型基础上进行, 于第 15 天在除空白组外的其余大鼠左右肢臀部交替肌肉注射氢化可的松 25 mg/(kg·d), 并给以蒸馏水灌胃每只 2 mL/d, 连续 10 d, 第 25 天禁食不禁水。③“UC”模型: 第 26 天用 100 mg/kg TNBS 加 50% 乙醇 0.25 mL 混合剂灌肠, 空白组用等体积蒸馏水灌肠。

1.2.2 给药方法

造模成功后, 空白组和模型组给予 0.2 g/kg 生

理盐水灌胃,久泻灵颗粒治疗 7、14、21 d 组以 0.2 g/kg 中药药剂灌胃,阳性对照组给予 0.2 g/kg 的柳氮磺胺吡啶肠溶片溶液灌胃,每只 2 mL。等效剂量以成人常规剂量按人与动物体型系数折算,灌胃容积为 1 mL/100 g 体重,连续 3 周。

1.2.3 标本采集

空白组、模型组、阳性对照组大鼠于造模 21 d 末,久泻灵颗粒各治疗组大鼠于造模 7、14、21 d 末禁食不禁水 24 h,水合氯醛麻醉后对大鼠剖腹截取整个结肠组织并沿纵轴剪开,生理盐水清洗干净,装于做标记的离心管中,−80℃ 保存,用于后续检测。

1.2.4 指标检测

(1) 免疫组化法检测 TLR4、NF-κB p65 蛋白的表达

免疫组化步骤:① 石蜡切片,脱蜡至水(有需要抗原修复的在此步骤后进行)。② 3% H_2O_2 去离子水孵育 10 min, PBS 冲洗, 3 min × 3 次→滴加封闭液,孵育 10 min。③ 滴加 TLR4、NF-κBp65 抗体, 37℃ 孵育 30 min, 4℃ 过夜, PBS 冲洗 3 min × 3 次。④ 滴加生物素化山羊抗兔 IgG, 37℃ 培养箱中孵育 15 min, PBS 冲洗 3 min × 3 次。⑤ 滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液, 37℃ 孵育 15 min, PBS 冲洗 3 min × 3 次。⑥ 滴加 DAB 液体, 室温下显色, 自来水充分冲洗。⑦ 苏木素轻度复染 3 min, 自来水充分冲洗, 盐酸酒精分化, 自来水返蓝。⑧ 脱水透明。⑨ 中性树胶封片。⑩ 采用医学图像分析系统, 光镜下观察, 每组选取 8 张切片, 每张切片选取 6 个视野, 进行积分光密度值分析。

(2) RT-qPCR 法检测 TLR4、NF-κBp 65 mRNA 的表达

① 常规抽提各组大鼠结肠黏膜总 RNA 并反转录合成 cDNA。② 引物序列见表 1。③ PCR 扩增反应:反应体系为 2 × Greenstar Master Mix 加 5 μL, 上下游引物各加 1 μL, DNA 模板 1 μL, 双蒸水 2 μL。反应条件为 Stage 1:预变性 Repeat:1, 95℃, 10 min; Stage 2:PCR 反应 Repeat:42, 95℃, 10 s→55℃, 30 s; Stage 3:Dissociation。④ 将 PCR 扩增仪得出的各组 Ct 值输入 Excel 表中, $\Delta Ct = \text{目的基因 Ct 值} - \text{内参基因 Ct 值}$, 相对定量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, 每个样本重复三孔, 取均值计算 Ct 值。选用数学和三角里的 Power 公式。

表 1 各基因引物的核酸序列

Tab. 1 Nucleic acid sequences of the gene primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'–3') Primer sequences
β-actin-F	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA
β-actin-R	GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG
TLR4-F	CTCACAACTTCAGTGGCTGGATTTA
TLR4-R	GTCTCCACAGCCACCAGATTCTC
NF-κB p65-F	GGCAGCACTCCTTATCAAC
NF-κB p65-R	GGTGTCTGTCCTCCATCGTAG

1.2.5 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件处理数据, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 选用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般生存状况

空白组大鼠始终表现为反应敏捷, 饮食量正常, 活动情况无异常, 毛发浓密柔顺伴有光泽, 粪便为棕褐色颗粒。模型组则多数在第 5 天后天开始出现蜷卧、眯眼等部分症状, 第 10 天后症状开始明显, 大鼠蜷卧扎堆, 食量减少, 体重开始减轻, 便形质软, 部分动物眯眼弓背, 游泳耐力下降。往后动物症状逐渐加重, 体重明显减轻, 便形稀溏, 肛周污秽, 少食怠动, 畏寒, 成群蜷缩或弓背, 毛发失去光泽而枯槁疏散等脾肾阳虚症状。治疗组第 6 天出现轻度蜷卧、眯眼, 第 13 天后出现少食怠动、体重下降、便形质软、游泳耐力减轻等, 治疗至 16 d 后上述症状开始减轻或消失, 表现为反应较为灵敏, 活动及饮食量增加, 粪便部分呈颗粒状, 眯眼弓背消失, 游泳耐力较前提高(其中模型组死亡 3 只, 治疗 7 d; 治疗 14 d 组各死亡 1 只, 治疗 21 d 组死亡 2 只)。

2.2 大鼠结肠黏膜形态学变化

表 2 各组大鼠结肠黏膜形态学评分结果显示:与空白组比较, 模型组大鼠黏膜损伤评分明显升高, 差异有显著性 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 其余各治疗组评分均有降低, 差异有显著性 ($P < 0.01$), 且以治疗 21 d 组效果最为明显; 与治疗 21 d 组比较, 阳性对照组差异无显著性 ($P > 0.05$)。

2.3 大鼠结肠中 TLR4、NF-κB p65 的基因表达

表 3 可以看出:与空白组比较, 模型组大鼠结肠组织中 TLR4、NF-κB p65 基因表达量都明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各治疗组大鼠结肠组织 TLR4、NF-κB p65 基因表达量则有所下降, 治疗 21 d 组效果显著 ($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠结肠黏膜组织损伤评分($\bar{x} \pm s$)
Tab. 2 The scores of colon mucosa damage in the rats

组别 Groups	动物数 Animal numbers	剂量 g/kg Dose	黏膜损伤评分 Mucosal damage scores
空白组 Blank group	15	—	0.5 ± 0.418
模型组 Model group	10	—	6.1 ± 0.579 [△]
治疗 7 d 组 Treatment for 7 days group	11	6.75	3.5 ± 0.857 ^{*#}
治疗 14 d 组 Treatment for 14 days group	11	6.75	3.3 ± 0.378 ^{*#}
治疗 21 d 组 Treatment for 21 days group	10	6.75	2.9 ± 0.850 [*]
阳性组 Positive group	150.2	3.1 ± 0.849 [*]	

注:与空白组比较, [△] $P < 0.01$;与模型组比较, ^{*} $P < 0.01$,与治疗 21 d 组比较, [#] $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the blank group, $P < 0.01$; Compared with the model group, $*P < 0.01$; Compared with the 21 days treatment group, $^{\#}P < 0.05$.

表 3 各组大鼠结肠组织 TLR4、NF-κB p65 基因表达量($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)
Tab. 3 The expressions of TLR4 and NF-κB p65 mRNA in colon mucosa tissue of the rats

组别 Groups	剂量(g/kg) dose	TLR4	NF-κB p65
空白组 Blank group	—	0.215 ± 0.024	0.319 ± 0.028
模型组 Model group	—	1.0 ± 0.00 [△]	1.0 ± 0.00 [△]
治疗 7 d 组 Treatment for 7 days group	6.75	0.604 ± 0.023 ^{*▲}	0.864 ± 0.252 ^{*▲}
治疗 14 d 组 Treatment for 7 days group	6.75	0.603 ± 0.005 ^{*▲}	0.849 ± 0.149 ^{*▲}
治疗 21 d 组 Treatment for 7 days group	6.75	0.419 ± 0.017 [#]	0.562 ± 0.019 [#]
阳性组 Positive group	0.2	0.458 ± 0.057 [*]	0.669 ± 0.182 ^{*▲}

注:与空白组比较, [△] $P < 0.01$;与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$;与治疗 21 d 组比较, [▲] $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the blank group, $^{\Delta}P < 0.01$; compared with the model group, $*P < 0.05$, $^{\#}P < 0.01$; Compared with the 21 days treatment group, $^{\blacktriangle}P < 0.05$.

2.4 大鼠结肠中 TLR4、NF-κB p65 的蛋白表达

2.4.1 大鼠结肠组织 TLR4、NF-κBp65 表达

(1) 空白组: TLR4: 无阳性表达, 表达呈阴性; NF-κB p65: 阳性细胞有微弱表达(如图 1A、A1)。

(2) 模型组: TLR4: 表达呈胞质阳性, 分布于肠黏膜上皮及固有层, 胞质可见黄色颗粒, 表达强于空白组; NF-κB p65: 阳性表达于黏膜上皮, 固有层单个核细胞, 胞质胞膜均有黄色颗粒, 表达强于空白组(如图 1B、B1)。

(3) 治疗 7 d 组: TLR4: 少量阳性细胞散在分布于组织黏膜层、黏膜下层, 中等强度表达, 偶见于黏膜腺体; NF-κB p65: 仍见大量阳性表达(如图 1C、C1)。

(4) 治疗 14 d 组: TLR4: 组织黏膜层见少量 TLR4 阳性细胞, 接近肠腔处呈中等强度表达; NF-κB p65: 整个组织中阳性表达相对减弱, 黄色颗粒减

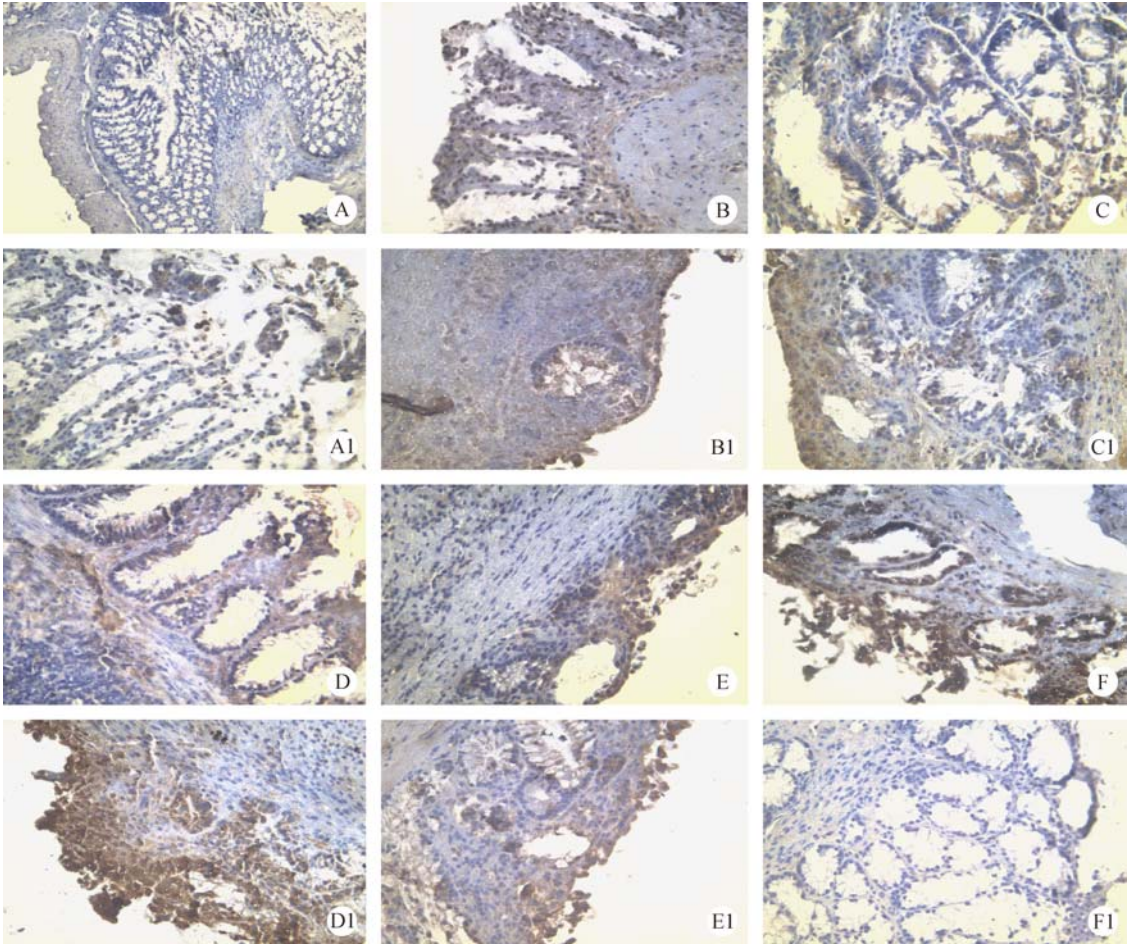
少, 但仍可见阳性表达在上皮高于固有层(如图 1D、D1)。

(5) 治疗 21 d 组: TLR4: 阳性表达基本呈阴性, 仅有个别散在浸润细胞; NF-κB p65: 黏膜上皮及固有层单个核细胞中存在阳性表达, 呈现弱阳性(如图 1E、E1)。

(6) 阳性对照组: TLR4: 个别散在的弱阳性表达; NF-κB p65: 阳性细胞微弱表达, 胞质内偶见黄色颗粒(如图 1F、F1)。

2.4.2 大鼠结肠组织 TLR4、NF-κB p65 平均灰度值

表 4 结果显示: 与空白组比较, 模型组大鼠 TLR4、NF-κB p65 表达明显增强($P < 0.01$), 差异有显著性; 与模型组比较, 治疗 7、14、21 d 组和阳性对照组 TLR4、NF-κB p65 表达减弱, 差异有显著性($P < 0.05$), 且治疗 21 d 组表达最为明显($P < 0.01$)。



注: A、A1 空白组; B、B1 模型组; C、C1 治疗 7 d 组; D、D1 治疗 14 d 组; E、E1 治疗 21 d 组; F、F1 阳性组

图 1 TLR4 及 NF-κB p65 免疫组化结果(×40)

Note. A. A1. Blank group. B. B1. Model group. C. C1. Treatment group at 7 days. D. D1. Treatment group at 14 days. E. E1. Treatment group at 21 days. F. F1. Positive group.

Fig. 1 TLR4 and Appendix 2 NF-κB p65 immunohistochemical results (×40)

表 4 各组大鼠结肠黏膜 TLR4、NF-κB p65 平均灰度值 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 The average grey values of TLR4 and NF-κB p65 in the colon mucosa tissue of the rats.

组别 Groups	动物数 Animal numbers	剂量(g/kg) doses	TLR4	NF-κB p65
空白组 Blank group	15	—	46.201 ± 9.613	121.865 ± 7.542
模型组 Model group	10	—	68.571 ± 9.106 [△]	311.257 ± 7.530 [△]
治疗 7 天组 Treatment for 7 days group	11	6.75	65.841 ± 5.512 ^{*##}	301.250 ± 8.184 ^{*##}
治疗 14 天组 Treatment for 14 days group	11	6.75	58.819 ± 8.011 ^{*▲}	301.186 ± 9.163 ^{*##}
治疗 21 天组 Treatment for 21 days group	10	6.75	50.165 ± 9.035 [#]	287.306 ± 8.586 [#]
阳性组 Positive group	15	0.2	58.363 ± 7.279 ^{*▲}	298.122 ± 7.821 ^{*▲}

注:与空白组比较,[△] $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$;与治疗 21 天组比较,[▲] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the blank group, [△] $P < 0.01$; Compared with the model group, ^{*} $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$; compared with 21 days treatment group, [▲] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

3 讨论

本课题采用病证结合方法建立脾肾阳虚型 UC

大鼠模型,久泻灵颗粒加以干预,从大肠组织形态学变化、蛋白质组学研究和现代中药基因组学的角度,来观察久泻灵颗粒对脾肾阳虚型 UC 模型大鼠组织

中蛋白基因 TLR4、NF- κ B p65 表达的影响,进一步验证 TLR4、NF- κ B p65 与脾肾阳虚型 UC 的发病有着密切的关系。

本研究所使用的久泻灵颗粒是自拟方药,由理中丸加四神丸组成,具备阴阳调理、温肠补肾、止泻利湿、燮理虚实的功效,本方配伍精悍得体,整个方药十分鲜明的体现出辛开、苦降,寒热、攻涩并施、协调升降气机这几大特征。药物包括人参、白术、补骨脂、肉豆蔻、干姜、吴茱萸和五味子八味。方中补骨脂性味辛、苦,大温,补命门火以温脾阳,以此达到治“肾泻”的规则;白术,归经为脾、胃经,拥有补益脾气、燥湿、利尿等多个功效,炒白术能加强补气健脾止泻的功效,它被誉为“健脾益气的第一要药”,与人参共同健脾益气;三味药共行温补脾肾、补虚治本之效;肉豆蔻则祛湿利浊攻邪,还能行气,并且可以温中散寒、温脾暖肾,它与人参、白术共奏行补之效;吴茱萸、干姜温中散寒;治标又以五味子涩肠止泻,这几味药可以说是并收敛耗散之正气。诸药合用,以达到内外合治,标本兼顾之意,其配伍正中病机,在临床上疗效显著。

TOLL 样受体在 1997 年被 Medzhitov 等^[6]发现。TLRs 能够和病原识别模式分子结合^[7],激活下游信号转导分子,从而激活 NF- κ B,使得炎症介质得以表达,直接影响免疫反应的强度大小。正常的肠黏膜上皮细胞微量表达 TLR4,但是在 UC 患者的肠黏膜上 TLR4 过度表达,与 UC 患者全结肠里是否有炎症或是没有炎症关系不大,同时处于非活动期的 UC 上皮细胞里同样能找到 TLR4 阳性表达,另外 UC 患者的肠壁固有层也有大量 TLR4 表达。NF- κ B 在 UC 发病过程中占枢纽性的角色,它是各种致病因子释放和表达的关键^[8-9]。NF- κ B 通过调节炎症介质、细胞因子之基因转录的过程,从而使胞质内处于游离状态的 NF- κ B 移位到胞核,与 NF- κ B 位点相结合,启动炎症反应基因转录过程,继而生成更多反应蛋白^[10],来参与炎症免疫反应。p65 在组织中的表达,特别是在细胞核中的表达能够间接的反映了 NF- κ B 的活性^[11],因此 TLR4、NF- κ B p65 是药物治

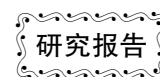
疗 UC 的重要靶点。

本课题实验结果表明久泻灵颗粒降低了 UC 模型大鼠结肠黏膜中 TLR4、NF- κ B p65 蛋白和基因的表达,且差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),证实了此方药能够通过终止或抑制炎症反应的相关基因转录、蛋白表达,进一步减少炎症因子的释放,以此来减轻炎症反应对结肠黏膜的损伤,同时还能促进结肠黏膜的修复,促进机体的免疫平衡,且随着用药时间的延长,治疗效果越佳。

参 考 文 献

- [1] 李艳萍. 溃疡性结肠炎癌变机制的研究与结直肠息肉危险因素分析 [D]. 北京协和医学院, 2014.
- [2] 肖观景. 中医辨证治疗溃疡性结肠炎的临床分析 [J]. 中国医药指南, 2013, 11(1): 596-597.
- [3] 魏桂双. 中药治疗溃疡性结肠炎疗效观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(13): 1434-1436.
- [4] 陈贤坤, 王立峰, 赵慧, 等. 强肌健力方对脾肾两虚大鼠细胞因子水平的影响 [J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(3): 282-283.
- [5] 赵海梅, 刘端勇, 汤菲, 等. 四神丸对小鼠溃疡性结肠炎结肠黏膜修复的保护机制研究 [J]. 中成药, 2009, 31(12): 1935-1937.
- [6] Medzhitov R, Preston-Hurlburt, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity [J]. Nature, 1997, 388(664): 394-397.
- [7] 陈晓, 王启之. Toll 样受体 4 的信号转导与溃疡性结肠炎的研究进展 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2010, 19(1): 87-89.
- [8] Grivennikov SI, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer [J]. Cytok Growth, 2010, 21(1): 11-19.
- [9] Caamano J, Hunter CA. NF- κ B family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions [J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15: 414-429.
- [10] 赵烽, 室田诚逸, 森田育男, 等. NF- κ B 与疾病 [J]. 生命科学, 2001, 13(1): 11-13.
- [11] Rogler G, Brand K, Vogt D, et al. Nuclear factor κ B is activated in macrophage and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa [J]. Gastroenterology. 1998, 115(2): 357-369.

[收稿日期] 2015-07-22



利用心脏特异性 *CYP2E1* 基因修饰小鼠评价药物心脏毒性的初步探索

裴彦宇, 孙井江, 赵显莉, 贺银丽, 魏若尧, 高虹*

(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】 目的 使用两种心脏特异性 *CYP2E1* 基因修饰小鼠来评价药物西布曲明 (sibutramine) 的心脏毒性作用, 选择出在评价药物的心脏毒性中具有更高敏感性的动物模型。**方法** 8 周龄雄性 Tg(+) 型小鼠、sTg(+) 型小鼠、野生型 *C57BL/6* 小鼠 (WT), 各 50 只, 分别随机分成 5 组, 每组 10 只, 溶媒对照组 (灌胃给予纯净饮用水) 及 4 个实验组 (50、100、150、300 mg/kg 西布曲明)。给药过程中进行一般症状观察以及存活率的测定; 给药 15 d 后取血并解剖取心脏, 测定各组实验小鼠血生化心脏损伤指标: 乳酸脱氢酶 (LDH), 肌酸激酶 (CK), 肌酸激酶同工酶 (CK-MB)。并进行病理组织学检查, 免疫组织化学方法观察心脏组织缝隙蛋白 43 (connexin 43, CX43) 的表达情况。**结果** (1) 血生化指标显示, 在给药剂量 50 mg/kg 和 100 mg/kg 时, Tg(+) 型小鼠均显著高于 WT 型小鼠 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 在给药剂量 50、100 和 150 mg/kg 时, Tg(+) 型小鼠均显著高于 sTg(+) 型小鼠 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 而在给药剂量 300 mg/kg 时, Tg(+) 型小鼠均显著低于 WT 和 sTg(+) 型小鼠 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且 sTg(+) 型小鼠减小的程度最小。(2) 病理组织学结果显示, Tg(+) 和 WT 型小鼠各个给药组均表现出心脏损伤的迹象。(3) 免疫组织化学染色显示, 随着给药剂量的加大, Tg(+), sTg(+) 和 WT 型三种小鼠 CX43 在心肌细胞闰盘处的表达数量均逐渐下降, 且染色颜色逐渐变浅; 而 CX43 在心肌细胞闰盘处的表达数量下降程度和染色颜色变浅程度由高到低分别为, Tg(+) 型小鼠, 其次是 WT 型小鼠, sTg(+) 型小鼠。**结论** Tg(+) 型小鼠在评价药物潜在心脏毒性试验中可能比 WT 型小鼠具有更高的敏感性, 而 sTg(+) 型小鼠则是很好的心脏毒性保护模型。

【关键词】 细胞色素 P450 2E1; 基因修饰; 西布曲明; 药物毒性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0053-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.010

Exploration of the use of heart-specific *CYP2E1* genetically modified mice in evaluation of drug-induced cardiotoxicity

PEI Yan-yu, SUN Jing-jiang, ZHAO Xian-li, HE Yin-li, WEI Ruo-yao, GAO Hong*

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

【Abstract】 Objective To select more sensitive animal model to evaluate the cardiotoxicity of drugs, we used the heart-specific *CYP2E1* genetically modified mice (α -MHC *CYP2E1* transgenic mice [Tg(+) mice] and α -MHC *CYP2E1* silencing transgenic mice [sTg(+) mice]) to evaluate the drug sibutramine-induced cardiotoxicity. **Methods** The 8-week old male Tg(+), sTg(+), and *C57BL/6* mice (wild type, WT), 50 mice in each group, were randomly divided into 5 groups: the solvent control group (intragastric gavage of pure drinking water), and the four sibutramine (50 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg and 300 mg/kg) treatment groups, respectively. The general condition of the mice was observed

[基金项目] 十二五重大新药创制科技项目 (编号:2013ZX09302302)。

[作者简介] 裴彦宇 (1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事药物临床前安全性评价研究。

[通讯作者] 高虹 (1968-), 女, 硕士生导师, 从事药物临床前安全性评价研究。E-mail: gaoh@cnilas.org

and the survival rate was determined during the drug treatment period. At 15 days after the sibutramine administration, the blood biochemical indicators of cardiotoxicity lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), and creatine kinase isoenzyme (CK-MB) were assessed, and then the mice were sacrificed and heart tissue samples were taken for pathological examination and immunohistochemical observation of the expression of connexin 43 (CX43). **Results** (1) The blood biochemical indicators in the sibutramine 50 mg/kg and 100 mg/kg Tg(+) treated mice were significantly higher than those in the WT mice ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and significantly higher in the 50 mg/kg, 100 mg/kg and 150 mg/kg sibutramine treated Tg(+) mice than in the sTg(+) mice ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). However, when the sibutramine was given at a dose of 300 mg/kg, the values of those indicators in the Tg(+) mice were significantly lower than that in the WT and sTg(+) mice ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), with the lowest level in the sTg(+) mice. (2) The pathological examination revealed cardiotoxic changes in the Tg(+) and WT mice. (3) The immunohistochemical analysis showed that alongside with the increasing drug dose, the expression of CX43 was decreased in the intercalated disks of cardiomyocytes in the Tg(+), sTg(+) and WT mice, and the color staining intensity was mostly decreased in an order of Tg(+) > WT > sTg(+) mice. **Conclusions** Tg(+) mice may have a higher sensitivity in the evaluation of potential cardiotoxicity than WT mice, and sTg(+) mouse is a good model of protection against cardiotoxicity.

[Key words] Cytochrome P450 2E1; Gene modification; Sibutramine; Drug toxicity

Corresponding author: GAO Hong, E-mail: gaoh@cnilas.org

细胞色素 P450 2E1 (cytochrome P2E1, CYP2E1) 是细胞色素 P450 混合功能氧化酶系的重要成员之一,参与机体内许多内外源性物质的代谢与活化^[1]。CYP2E1 主要分布于肝脏,同时在肝外组织如心脏、肾脏等处也有高表达^[2]。一直以来,心脏毒性都是药物临床前和药物临床检验和防治的重点,选择一种理想的药物评价模型是决定药物安全性评价效果的关键因素之一^[3]。本实验选用的两种心脏特异性 CYP2E1 基因修饰小鼠[(心脏特异性 CYP2E1 转基因小鼠, α -MHC CYP2E1 transgenic mice, Tg(+)) 和心脏特异性 CYP2E1 基因沉默小鼠, α -MHC CYP2E1 silence mice, sTg(+)], 来进行药物西布曲明心脏毒性评价的初步探索,以期选择一种敏感性更高的基因修饰动物模型,为评价具有潜在心脏毒性药物的临床前安全性寻找一种更加快速、灵敏、准确的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 Tg(+) 和 sTg(+) 各 50 只,8 周龄,20~25 g 左右,均由中国医学科学院医学实验动物研究所遗传中心构建;雄性 WT 50 只,8 周龄,SPF 级,20~25 g 左右,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】。动物饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所 SPF 级环境中【SYXK(京)2014-002】,温度范围 22~26℃,相对湿度 40%~70%,换气次数 15 次/h,照明 > 200 lx,12/12h 明暗交替,自由进食、饮水。

1.2 仪器和试剂

全自动生化分析仪(日本日立公司,7100 型);光学显微镜(Olympus, BX50);西布曲明(分析纯,阿拉丁试剂公司);兔抗小鼠 CX43 抗体(Affinity, AF0137);PV-9001 辣根酶标记抗兔 IgG 聚合物(中杉金桥, K152708B);进口羊血清工作液(中杉金桥, 15A92605)。

1.3 动物分组及给药方案

8 周龄 Tg(+), sTg(+) 和 WT 型小鼠分别随机分为溶媒对照组、给药组 1、给药组 2、给药组 3、给药组 4,每组 10 只,ig 给药。各组小鼠给药组给予西布曲明的剂量分别为给药组 1(50 mg/kg)、给药组 2(100 mg/kg)、给药组 3(150 mg/kg)、给药组 4(300 mg/kg);溶媒对照组给予等剂量的纯净水,连续 15 d,每日一次,给药时间为每日 9:00~11:00。西布曲明用纯净水溶解,每只动物灌胃体积为 0.2 mL/10(g·bw)。

1.4 大体观察和生存率测定

每日定时观察小鼠的外观和行为(包括小鼠的精神状态、皮肤毛发、眼睛和黏膜的变化、活动情况、呼吸状况、死亡情况及其他异常表现)、分泌物和排泄物等。末次给药结束后,记录各组小鼠的死亡数,并计算死亡率。

1.5 血液生化学指标检测

实验小鼠末次给药后,禁食不禁水 12~18 h,0.3% 戊巴比妥钠麻醉后取全血 300~500 μ L,静置 30~60 min 后,离心 10 min,取上层血清于日立 7100 生化自动分析仪上检测心脏的血液生化学指

标。

1.6 心脏组织病理学检查

小鼠心脏组织分别经 4 % 中性甲醛固定、修块、梯度酒精脱水、石蜡包埋切片(5 μm), HE 染色, 封片后光学显微镜观察并拍照。

1.7 免疫组织化学检测

脱蜡、水化组织切片后依次进行抗原修复、3% H_2O_2 去除内源性过氧化物酶活性、正常羊血清封闭、CX43 一抗 (1:100)、二抗、DAB 显色、苏木素复染、自来水充分冲洗、脱水、透明、封片。2 h 后置于光学显微镜下观察。

1.8 统计学分析

实验结果数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 20.0 统计软件分析。统计学方法为 t 检验。 $P < 0.05$ 表示有统计学差异, $P < 0.01$ 表示有显著统计学差异。

2 结果

2.1 大体观察和生存率测定

整个实验过程中各给药组有不同程度的死亡现象发生, 同时 Tg(+) 型小鼠在给药组 4 (300 mg/kg) 时有个别小鼠出现精神萎靡等异常现象。

在相同饲养条件下, Tg(+), sTg(+) 和 WT 型小鼠的溶媒对照组、给药组 1 (50 mg/kg)、给药组 2 (100 mg/kg)、给药组 3 (150 mg/kg) 均无死亡现象; 而给药组 4 (300 mg/kg) 至给药结束时, 死亡率分别达到 70%、60%、30% (见图 1)。

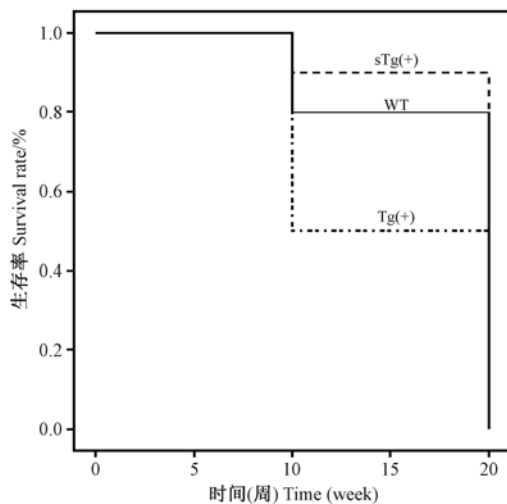


图 1 300 mg/kg 剂量时 WT、Tg(+), sTg(+) 型小鼠的生存情况

Fig. 1 The survival curves of WT, Tg(+) and sTg(+) mice treated with 300 mg/kg sibutramine

2.2 血液生化学指标检测

Tg(+), sTg(+) 和 WT 型小鼠在给药剂量 50 mg/kg 和 100 mg/kg 时, Tg(+) 型小鼠的 CK、LDH、CK-MB 均显著高于 WT 型小鼠 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, $n = 10$); 在给药剂量 50、100 和 150 mg/kg 时, Tg(+) 型小鼠的各指标均显著高于 sTg(+) 型小鼠 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, $n = 10$) (表 1)。在给药剂量为 300 mg/kg 时, Tg(+) 型小鼠的 CK、LDH、CK-MB 均十分显著低于其自身溶媒对照组 ($P < 0.01$, $n = 3$); 并均低于 WT 和 sTg(+) 型小鼠 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, $n = 3$) (表 1)。同时结合三种小鼠的生存率, 分析 Tg(+) 和 WT 型小鼠在给药剂量为 300 mg/kg 时可能发生了恶病质, 且 Tg(+) 型小鼠更为严重, 而 sTg(+) 型小鼠尚未完全发生这种现象, 提示 Tg(+) 型小鼠比 WT 型小鼠对药物的心脏毒性作用更为敏感, 且 sTg(+) 型小鼠可能是一个心脏保护模型。

2.3 心脏组织病理学检测

当给药剂量为 50、100、150 mg/kg 时, HE 染色可见部分 Tg(+) 型小鼠出现少数心肌细胞颗粒变性、空泡变性及嗜酸性变性 (见图 2 B1、B2、B3); 当给药剂量为 100、150 mg/kg 时, HE 染色可见部分 WT 型小鼠出现少数心肌细胞颗粒变性或空泡变性 (见图 2 A2、A3); 当给药剂量为 300 mg/kg 时, HE 染色可见几乎全部 WT 和 Tg(+) 型小鼠出现心肌细胞颗粒变性或空泡变性 (见图 2 A4、B4)。而溶媒对照组以及 sTg(+) 型小鼠各个给药组的心内外膜、心肌膜结构清晰, 心肌纤维着色均匀, 胞界清楚, 间质未见异常。

2.4 免疫组织化学检测

Tg(+), sTg(+) 和 WT 型三种小鼠的溶媒对照组的 CX43 蛋白在心肌细胞闰盘处的表达均清晰有序, 表达数量多, 且染色颜色深; 随着给药剂量的加大, 三种小鼠的 CX43 抗体在心肌细胞闰盘处的表达数量均有不同程度的下降, 且染色颜色变浅。同时, 在相同的给药剂量下, CX43 抗体在心肌细胞闰盘处的表达数量下降程度和染色颜色变浅程度依次是: Tg(+) 型 > WT 型 > sTg(+) 型小鼠 (见图 3)。

表 1 各组小鼠血生化心脏损伤指标 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Blood biochemical indicators of heart function in the mice of each group

品系 Strains	组别 Groups	CK	LDH	CK-MB
WT	溶媒对照组 Solvent control group	1051.83 ± 446.19	392.00 ± 114.20	294.74 ± 87.33
	给药组 1 Treatment group 1	924.50 ± 326.72	434.3 ± 53.14	288.86 ± 50.61
	给药组 2 Treatment group 2	824.00 ± 288.18	350.11 ± 55.37	272.18 ± 58.24
	给药组 3 Treatment group 3	893.56 ± 407.24	534.33 ± 136.3 **	381.17 ± 66.3 *
	给药组 4 Treatment group 4	359.78 ± 113.35 **	480.89 ± 146.94 **	306.73 ± 75.05 **
Tg(+)	溶媒对照组 Solvent control group	1272.10 ± 373.80	495.7 ± 97.43	395.05 ± 70.99
	给药组 1 Treatment group 1	1398.90 ± 347.97 ## ▲▲	649 ± 70.12 ## ▲▲	395.14 ± 52.61 ## ▲▲
	给药组 2 Treatment group 2	1183.80 ± 332.98 # ▲▲	475.8 ± 43.84 # ▲▲	367.2 ± 40.47 # ▲▲
	给药组 3 Treatment group 3	1243.70 ± 565.46 ▲▲	507.2 ± 93.25 ▲▲	339.64 ± 45.75 ▲
	给药组 4 Treatment group 4	295.60 ± 218.75 ** ▲▲	364.8 ± 133.93 ** ▲	205.25 ± 75.41 ** ## ▲
sTg(+)	溶媒对照组 Solvent control group	1066.00 ± 382.27	469.33 ± 136.13	364.38 ± 91.33
	给药组 1 Treatment group 1	975.50 ± 382.27	453 ± 136.13	310.85 ± 91.33
	给药组 2 Treatment group 2	929.60 ± 196.38	459.6 ± 64.55	294.52 ± 27.49
	给药组 3 Treatment group 3	892.33 ± 604.22	379 ± 103.48	257.13 ± 84.38
	给药组 4 Treatment group 4	949.00 ± 388.42 ##	433.5 ± 84.44	276.42 ± 160.84 #

注:相同基因型小鼠与各自溶媒对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 相同给药剂量时 Tg(+) 和 sTg(+) 分别与 WT 小鼠比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 相同给药剂量时 Tg(+) 与 sTg(+) 比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$ 。
Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the solvent control group in the same genotype of mice. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, the Tg(+) and sTg(+) mice compared with the WT mice treated with the same dose of sibutramine. ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$, the Tg(+) mice compared with the sTg(+) mice treated with the same dose of sibutramine.

3 讨论

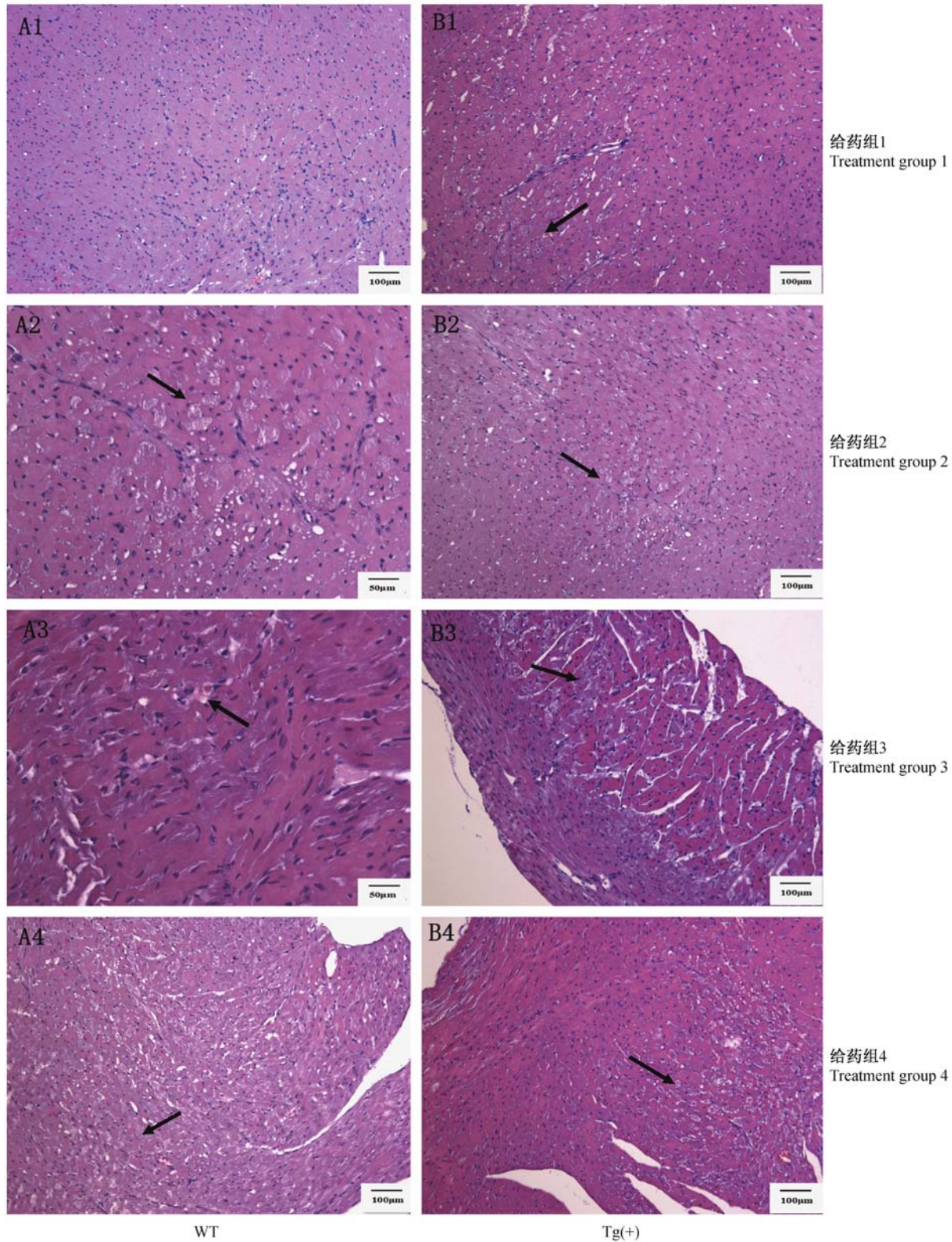
在新药研究开发中,临床前药物安全性评价是决定新药能否进入临床试验的关键因素之一。药物的毒性反应是临床前安全性评价的主要研究内容,其中高达 26% 的毒性反应是心血管毒性^[4]。目前,外源性药物导致心脏毒性的作用机制主要有氧化应激反应、脂质过氧化反应和免疫炎症反应等。

CYP2E1 是机体参与内外源性物质催化作用的一类重要的氧化代谢酶,同时产生活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS),引发氧化应激反应、炎症反应和细胞凋亡等过程,进而对机体产生毒性^[5]。国内外许多研究已将其应用于 CYP2E1 的代谢机制以及 CYP2E1 基因有关的疾病如脂肪性肝病的病理机制研究中^[6],但目前却鲜见将 CYP2E1 基因修饰小鼠应用于药物毒性评价中的报道。

西布曲明于 1997 年上市,主要是通过抑制中枢神经细胞对去甲肾上腺素和 5-羟色胺的再摄取来降低食欲,达到减肥的效果^[7],因西布曲明具有潜在的心血管系统毒性,而且减肥治疗的风险远大于效益^[8],并于 2010 年在世界各国相继撤市。有研究表明,西布曲明灌胃给药对小鼠的半数致死量 LD₅₀ 为 98.8 ~ 125.1 mg/kg^[9],故本实验采用 50、100、150 及 300 mg/kg 4 个给药剂量来进行探索。

心脏生化损伤指标(LDH、CK、CK-MB)作为心脏特异酶类标志物,其在血清中的活性变化可以反映心脏功能的好坏和心肌细胞结构的完好程度。从本实验心脏损伤血生化指标结果来看,在给药剂量为 50 mg/kg 和 100 mg/kg 时,Tg(+)型小鼠的心脏损伤指标最高,而在给药剂量为 300 mg/kg 时,Tg(+)型小鼠的心脏损伤指标最低,且均有统计学意义。同时,Tg(+)、sTg(+)和 WT 型三种小鼠在给药剂量为 300 mg/kg 时死亡率分别达到 70%、60%、30%,提示在给药剂量为 300 mg/kg 时,Tg(+)型小鼠的心脏组织已出现严重毒性。说明 Tg(+)型小鼠能够更敏感地从血生化指标来反映心脏结构和功能,提示 Tg(+)型小鼠比 WT 型小鼠及 sTg(+)型小鼠对药物的心脏毒性作用更为敏感,且 sTg(+)型小鼠可能是一个心脏保护模型。

心脏组织 HE 染色可见 Tg(+)和 WT 型小鼠只有部分的少数心肌细胞存在病理改变,且 sTg(+)型小鼠的心肌结构未见异常。CX43 是一种主要存在于心脏组织心室肌的闰盘上的缝隙连接蛋白,其正常表达与分布决定了心脏缝隙连接通道的正常电活动以及心肌的正常舒缩^[10]。本实验选用 CX43 抗体对各组小鼠的心脏进行免疫组织化学染色,验证 CX43 是否在心脏中表达异常。CX43 表达数量和染色程度的差异证实了 CX43 在心脏组织中表达数量的异常与西布曲明引起的心脏毒性有密切

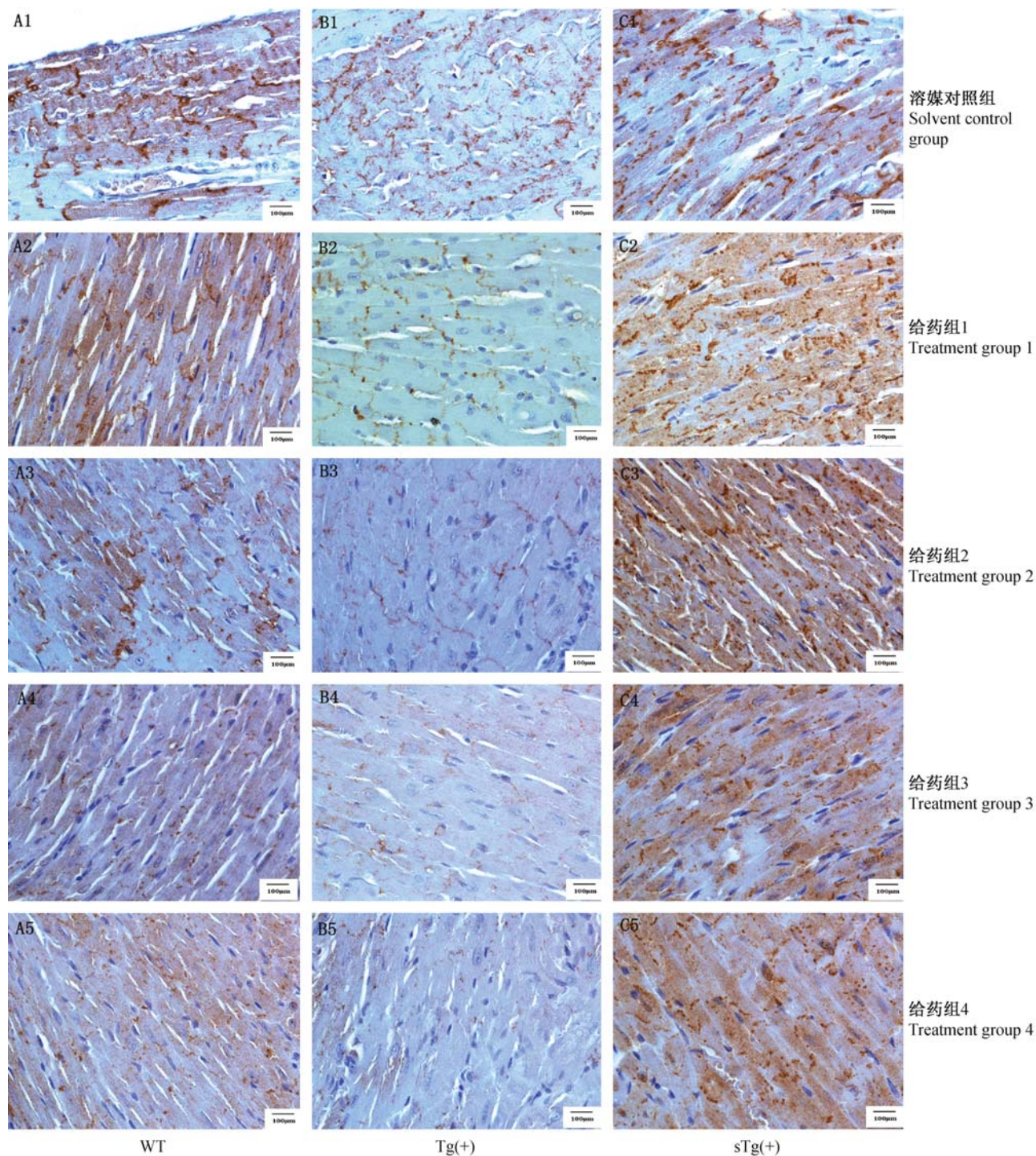


注: A1 - A4: WT 型给药组 1、给药组 2、给药组 3、给药组 4; B1 - B4: TG(+) 型小鼠给药组 1、给药组 2、给药组 3、给药组 4;
↑: 心肌细胞发生颗粒变性、空泡变性和嗜酸性变形等病理变化(A2、A3: ×200, A1、B1、B2、B3、A4、B4: ×100)。

图 2 各组小鼠的心脏组织病理学变化(HE 染色)

Note. A1 - A4: Treatment groups 1, 2, 3 and 4 of WT mice; B1 - B4: Treatment groups 1, 2, 3, 4 of TG(+) mice. ↑: Granular degeneration, vacuolization and acidophilic degeneration of cardiomyocytes (A2, A3: ×200, A1, B1, B2, B3, A4, B4: ×100).

Fig. 2 Pathological changes of the heart tissue of mice in each group(HE staining)



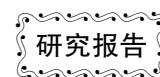
注: A1 - A5: WT 型溶媒对照组、给药组 1、给药组 2、给药组 3、给药组 4; B1 - B5: TG(+) 型溶媒对照组、给药组 1、给药组 2、给药组 3、给药组 4; C1 - C5: sTG(+) 型溶媒对照组、给药组 1、给药组 2、给药组 3、给药组 4。

图 3 各组小鼠心脏组织中 CX43 的表达(×400)

Note. A1 - A5: Solvent control group and treatment groups 1, 2, 3, and 4 of the WT mice;
B1 - B4: Solvent control group and treatment groups 1, 2, 3, and 4 of the TG(+) mice;
C1 - C5: Solvent control group and treatment groups 1, 2, 3, and 4 of the sTG(+) mice.

Fig. 3 Expression of connexin 43 in the mouse heart tissue of each group (×400)

(下转第 79 页)



外源性 β -NGF 调节骨改建过程中的可能作用机制

茅传青, 卓丽莉, 王锦, 王承勇, 卢萌, 陈伟辉*

(福建医科大学附属协和医院口腔颌面外科, 福州市 350001)

【摘要】 目的 探讨外源性的 β -NGF 在骨缺损愈合过程中对骨改建可能作用机制。**方法** 利用外科手术方法切取 SD 大鼠颅骨顶部左右两侧的骨质, 建立配对大鼠颅骨标准骨缺损局部持续灌注 β -NGF 给药模型。通过免疫组织化学技术检测骨缺损区组织中 BMP-2 的表达水平以及特殊染色技术 (TRAP 染色) 检测骨缺损区组织中抗酒石酸碱性磷酸酶的表达水平, 通过图像处理软件 IPP6.0 分别测定两者积分光密度值 (IOD), 以探讨 BMP-2 与破骨细胞活性在 β -NGF 调节新骨形成和改建过程中的可能作用机制。**结果** 实验组 BMP-2 免疫组化染色阳性表达水平在 14 d 时 IOD 值明显高于对照组, 且差异有显著性 ($P < 0.05$); TRAP 染色结果显示: 实验组骨吸收的活性在第 7, 21, 28 天三个时间点上明显低于对照组, 且差异有显著性 ($P < 0.05$)。**结论** 外源性的 β -NGF 在骨缺损修复过程中具有重要的调节作用, 其可能是通过促进 BMP-2 表达和抑制破骨细胞的活性以抑制骨吸收。

【关键词】 骨形态蛋白 2; TRAP 染色; 骨改建; 破骨细胞; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0059-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.011

Possible mechanism of bone remodeling during the process of bone healing via topical application of exogenous β -NGF

MAO Chuan-qing, ZHUO Li-li, WANG Jin, WANG Cheng-yong, LU Meng, CHEN Wei-hui*

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Union Hospital Affiliated to
Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of bone remodeling during the process of bone defect healing via topical application of exogenous β -NGF. **Methods** Thirty healthy male Sprague-Dawley rats were used in this study. Two 5-mm diameter bilateral bone defects were created on the parietal bone. The right side was given 10 μ g β -NGF/PBS solution (experimental group) and the left side was given only PBS solution (control group) via an osmotic pump for 7 days. Expression levels of BMP-2 and tartrate-resistant alkaline phosphatase (TRAP) at postoperative 3, 7, 14, 21 and 28 days were detected using immunohistochemical staining and semi-quantitatively analyzed with integral optical density (IOD). **Results** Immunohistochemistry showed that the expression levels of BMP-2 (IOD values) in the experimental group were significantly higher ($P < 0.05$) than that of the control group at postoperative day 14. Special TRAP staining results showed that the activities of osteoclasts in the experimental group was significantly decreased compared with that of the control group ($P < 0.05$) at postoperative day 7, 21 and 28. **Conclusions** The results of this study indicate that topical application of exogenous β -NGF plays an important role in bone remodeling during the process of bone defect healing, which may be through increased production of BMP-2 and inhibition of osteoclast activity.

【Key words】 Bone morphogenetic proteins-2; Trap staining; Bone defect remodeling; Osteoclasts; Rats

Corresponding author: CHEN Wei-hui, Email: dr_whchen@yahoo.com

[基金项目] 福建杰出青年基金 (编号 2012J06017); 国家自然科学基金 (编号 31070838); 福建省卫生厅青年基金 (编号 2012-1-20)。

[作者简介] 茅传青 (1988 -), 男, 硕士研究生, 专业: 口腔临床医学相关研究。E-mail: 344083604@qq.com。

[通讯作者] 陈伟辉 (1974 -), 男, 博士研究生, 副教授, 研究方向: 口腔临床相关研究。Tel: 13365910826, E-mail: dr_whchen@yahoo.com。

骨愈合、骨形成以及骨改建,是一个复杂而有序的生物学过程,受到细胞因子、生长因子等多种因素的调节。众多生长因子中,骨形成蛋白家族(bone morphogenetic proteins, BMPs)在骨愈合、骨形成及骨改建过程中发挥重要的作用^[1, 2],研究证实,在众多骨形态发生蛋白中,骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)是唯一一个能单独诱导骨形成的局部生长因子^[3],其对成骨活性具有强大的促进作用,能够募集间充质细胞,并诱导血管周围的间充质细胞转化为软骨及成骨细胞,骨细胞通过合成骨胶原,最后形成骨组织^[4-6];同时 BMP-2 还能够协调其他调节因子参与骨组织形成,从而诱导骨形成和修复骨缺损。

骨改建是由成骨细胞介导的成骨过程与破骨细胞介导的骨吸收过程共同协同调节完成。Suda 等^[7]在 1992 年就发现破骨细胞是来自造血干细胞的多核细胞,并且目前研究一致认为破骨细胞是能够进行骨吸收的唯一细胞。破骨细胞的活性在新骨形成和骨改建中起着重要的作用,破骨细胞附着在骨吸收区域形成骨陷窝,骨陷窝中的低 pH 值即可溶解无机矿物质,而破骨细胞分泌的溶酶体半胱氨酸蛋白酶和金属蛋白酶则能够降解有机基质。破骨细胞对骨折区域的骨吸收仅需 3~5 周的时间,而成骨细胞对骨折区域进行骨重建则需要 3 个月左右的时间。

我们课题组的前期实验结果已经证实:外源性的 β -神经生长因子(β -NGF)参与调节骨缺损区新骨形成及骨改建,在骨缺损修复过程中, β -NGF 对新骨形成起到促进作用(结果未发表)。为此,本课题进一步探讨外源性的 β -NGF 调节骨改建是否是通过调控 BMP-2 的合成及破骨细胞的活性而实现的。

1 材料与方法

1.1 实验动物

30 只清洁级雄性成年 SD 大鼠,体重(325 ± 25)g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供【SCXK(沪)2012-0002】。实验在福建医科大学进行【SYXK(闽)2014-0003】;在实验过程中对动物的处置依照中国科学技术部发布的指导性意见执行^[8]。

1.2 主要试剂

β -NGF(Sigma 公司,美国);I 型胶原骨粉(登腾,韩国);Evan's blue 染料(Sigma 公司,美国);Alzet Brain Infusion Kits 2(Alzet 公司,美国);Alzet

Osmotic Pump 型号 2001(Alzet 公司,美国);BMP-2 一抗(Abcam 公司,美国);TRAP 试剂盒(Sigma 公司,美国)PV-9001 二抗(中杉金桥,中国)。

1.3 方法

1.3.1 动物模型及标本处理

大鼠颅骨骨缺损区外源性 β -NGF 导入模型的建立:采用文献^[9]方法,将 30 只 SD 大鼠随机分为 3、7、14、21 和 28 d 组,每组 6 只。所有样本采取自身对照,左侧设为对照组,右侧设为 β -NGF 实验组。按照产品使用说明书上操作说明进行 Alzet 微渗透泵与 Alzet 脑灌注试剂盒药物的装配及各个部件的组装。实验组微渗透泵内为 200 μ L 含有 10 μ g β -NGF + 196 μ L PBS + 1% Evens blue 混合液,对照组为仅含有 1% Evens blue 的 PBS 混合液。10% 水合氯醛腹腔注射麻醉 SD 大鼠,用外径为 5 mm 的环切刀在矢状缝两侧顶骨区域左右对称地制备 2 个大小为 5 mm 直径的骨缺损模型,骨缺损区填入 I 型胶原骨粉,将灌注好的微渗透泵安置于皮下,实验侧及对照侧以 1.0 μ L/h 持续导入 1 周。在设定的时间点术后 3、7、14、21 和 28 d 处死各组大鼠,4% 多聚甲醛内灌注后切取颅骨缺损区标本。中性 10% EDTA 25 $^{\circ}$ C 恒温下脱钙,组织块取材后经固定,石蜡包埋切片 4 μ m。

1.3.2 免疫组化技术检测 BMP-2 表达

石蜡切片在 79 $^{\circ}$ C 的烤箱中放置 20 min,经过二甲苯及梯度乙醇水化后,对组织抗原进行修复(50% 丙三醇水溶液 120 $^{\circ}$ C 20 min)。3% 过氧化氢室温下孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶的活性。PBS 冲洗 3 $\times$ 3 min,每张切片加 50 μ L 的 1:250 BMP-2 抗体,37 $^{\circ}$ C 水浴下孵育 60 min。PBS 冲洗 3 $\times$ 2 min。甩去 PBS 液,每张切片加 50 μ L 二抗,37 $^{\circ}$ C 水浴下孵育 20 min。PBS 冲洗 3 $\times$ 2 min。每张切片加 100 μ L 新鲜配制的 DAB 显色液,作用 1 min,显微镜下观察。流水冲洗,苏木素复染细胞核,脱水透明,中性树胶封固。

1.3.3 TRAP 染色

依照试剂说明书配制 TRAP 反应试剂及阴性对照试剂。将两组试剂加入染缸中,水浴加热至 37 $^{\circ}$ C。脱蜡水化后的玻片浸入试剂中孵育 1 h,注意避光及密封。流水冲洗,苏木精复染细胞核。晾干,中性树胶封片。

1.3.4 染色后样本图像分析

所有染色切片在相同条件下,选取靠近骨缺损区边缘两侧及中央区三个视野对骨缺损区进行图像

采集。通过统计骨缺损区域内 3 个视野的 BMP-2、TRAP 阳性表达的积分光密度(Integral optical density; IOD)平均值以评价其各自的表达水平。所得数据通过使用 Excel 2007 软件建立数据库,用 SPSS 19.0 对所得的指标进行配对 T 检验统计分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 BMP-2 染色后样本图像观察及分析

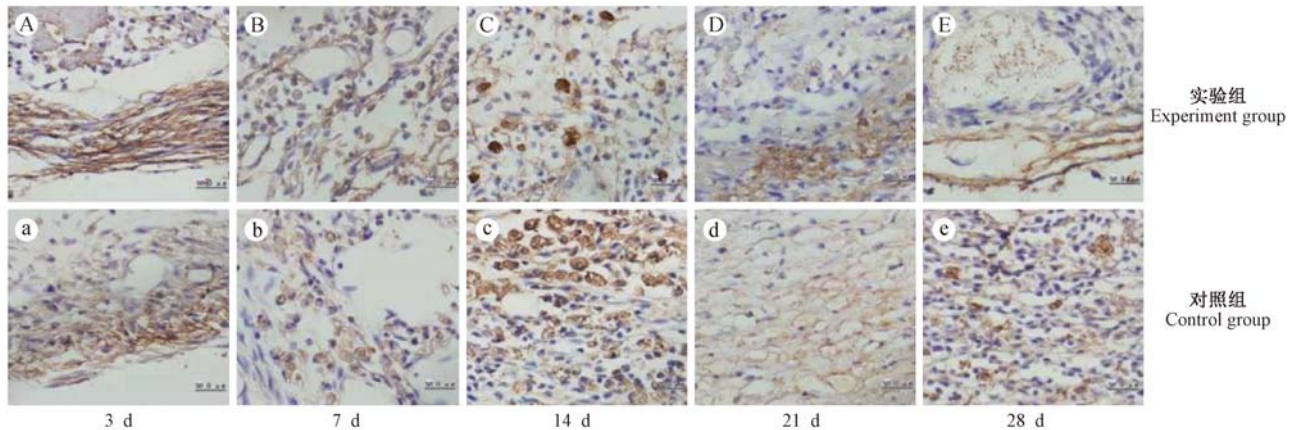


图 1 各组骨缺损区形态学观察(BMP-2 免疫组化染色 $\times 400$)

Fig. 1 The morphological changes of bone defects, BMP-2 IHC staining at different time points($\times 400$)

2.1.2 BMP-2 表达的统计学分析

通过 IPP 6.0 图像处理软件对 BMP-2 的阳性表达积分光密度值进行统计,结果显示(如图 2):3、7 d 实验组与对照组 BMP-2 的阳性表达量无明显差别,且 3 d 至 7 d 期间 BMP-2 阳性表达无明显增长。14 d 组 BMP-2 的阳性表达积分光密度值明显升高,且实验组阳性表达量高于对照组,两者差别具有统计学意义($P < 0.05$)。21、28 d 组 BMP-2 的阳性表达逐渐降低至 3 d 水平,且两组之间无显著性差异。从整体来看,在骨缺损区早期,BMP-2 表达增加缓慢,14 d 时表达量接近峰值,21 d 时又逐渐降至初始水平。

2.2 TRAP 染色图像观察及分析

2.2.1 TRAP 染色图像观察

图 3 显示,术后 3 d 实验组与对照组基本上无 TRAP 阳性表达。7 d 组,对照组 TRAP 染色阳性强度较实验组强,且在血管周围出现强阳性染色。14 d 实验组与对照组 TRAP 染色阳性表达均较 7 d 组弱。21 d 组 TRAP 染色阳性水平与 14 d 组相比无明显减弱,且对照组 TRAP 染色阳性水平较实验组强。28 d 实验组阳性染色程度较 21 d 组有所减弱,

2.1.1 BMP-2 染色图像观察

图 1 显示:3 d 组,实验组与对照组 BMP-2 阳性表达无明显区别,阳性表达均位于硬脑膜上。7 d 组,BMP-2 阳性表达可见在血管周围的间充质细胞的细胞质中首先开始有表达,血管壁也可见阳性表达。14 d 组,BMP-2 阳性表达在成纤维细胞、间充质细胞及骨基质中有表达。21 d 组,BMP-2 阳性表达只在成纤维细胞及骨基质中有表达。28 d 组与 21 d 组表达情况基本相同。

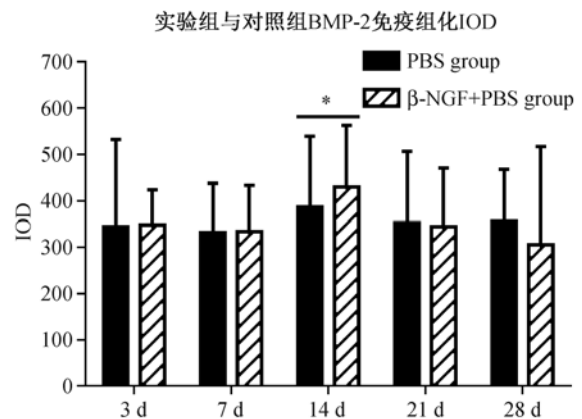


图 2 实验组与对照组 BMP-2 免疫组化

积分吸光度值 ($n = 5/6$; *: $P < 0.05$)

Fig. 2 The IOD of BMP-2 immunoreactivity in experimental group and control group ($n = 5/6$; *: $P < 0.05$)

且此时对照组的 TRAP 染色阳性程度较实验组强。

2.2.2 TRAP 统计分析结果

从图 4 可以看出,术后 3 d 骨缺损区基本无 TRAP 阳性表达,且对照组与实验组两者差别无统计学意义。术后 7 d,TRAP 阳性表达达到高峰,实验组阳性表达水平较对照组弱($P < 0.05$)。术后 14

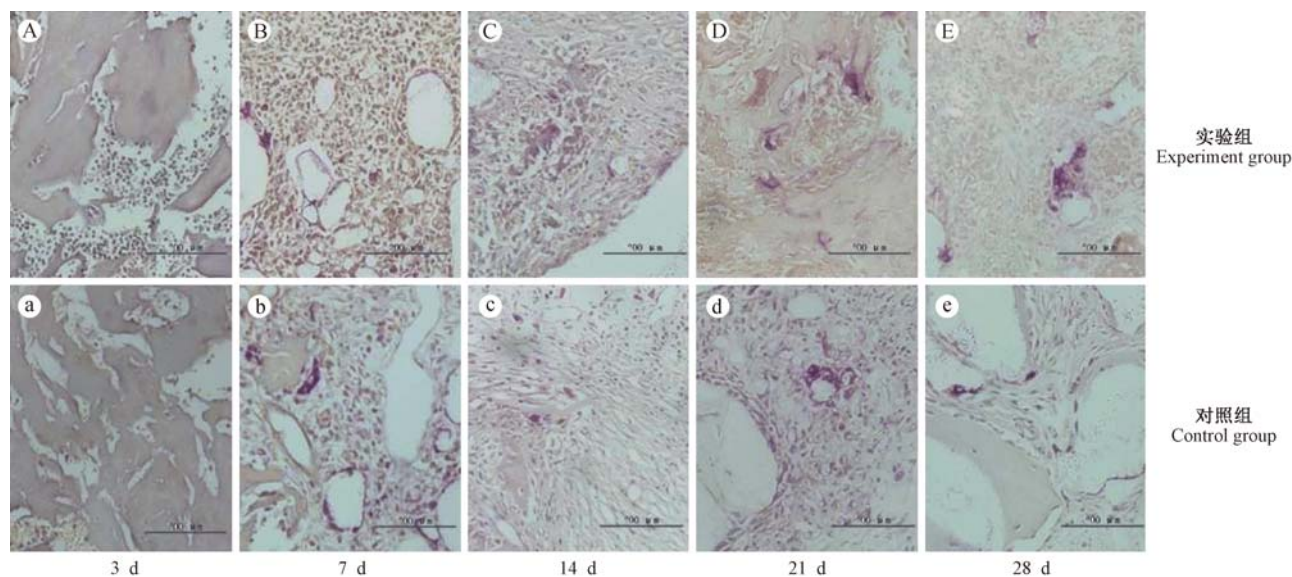


图3 各组骨缺损区形态学观察 (TRAP 特殊染色, $\times 200$)

Fig. 3 The morphological of changes bone defects at different time points. (Trap staining, $\times 200$)

d, 实验组与对照组 TRAP 染色阳性表达开始明显减弱 ($P > 0.05$)。术后 21 d, 对照组 TRAP 染色阳性积分光密度值较术后 14 d 稍有所提升, 但实验组稍减弱, 此时实验组与对照组两者差异有显著性 ($P < 0.05$)。术后 28 d, 对照组与实验组 TRAP 染色阳性程度较 21 d 组均减弱, 但对照组强于实验组 ($P < 0.05$)。结合我们前期实验结果 (结果发表中), 在骨缺损初期, 骨吸收活动即开始, 虽然在术后 3 d 时, 我们未能观察到 TRAP 染色阳性表达; 但是术后 7 d 时骨缺损区中破骨细胞的活性达到最强, 14 d 开始减弱, 而 21、28 d 开始趋于稳定, 这一结果与我们前期实验结果相一致。

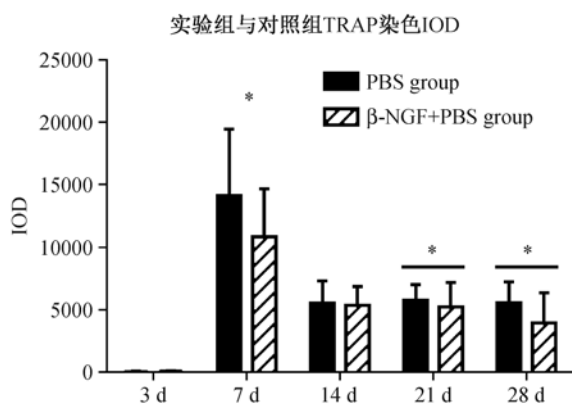


图4 实验组与对照组 TRAP 染色积分吸光度值 ($n = 5/6$; *: $P < 0.05$)

Fig. 4 The IOD of trap staining in experimental group and control group ($n = 5/6$; *: $P < 0.05$)

3 讨论

骨改建是骨形成、骨吸收两者相互作用、相互协调的过程。我们前期已经通过利用在大鼠颅骨上建立标准骨缺损局部早期持续灌注 β -NGF 给药模型, 证实了外源性导入 β -NGF 能够促进骨愈合过程中新骨形成以及骨改建; 但 β -NGF 是通过何种作用机制对骨形成与骨吸收进行调控的尚缺乏清楚的认识。

Urist 等^[10]在 1965 年首先发现了 BMP, 他们认为 BMP 能够诱导骨生长。研究表明: BMP 通过影响软骨内成骨和膜内成骨来完成骨诱导^[11, 12]。成熟的成骨细胞内几乎所有的 BMP 都能够增强碱性磷酸酶活性。BMP-2 诱导成骨作用在近年的研究中又进一步被证实^[13, 14]。

研究证实, BMP-2 在与其他调节因子共同作用下能够更好地诱导新骨形成, β -NGF 能够协同 BMP-2 诱导形成新骨^[15]。此外, Lonn 等^[16]发现 BMP 又能够增加 NGF 的转录。而 NGF 与 BMP-2 的协同作用并不是直接的相互影响, 而是通过肿瘤坏死因子来传递的^[17]。众多研究证实, β -NGF 与 BMP-2 都能够促进新骨的形成^[18, 19], β -NGF 又能够与 BMP-2 协同促进骨的形成。 β -NGF 是否能够通过促进 BMP-2 从而促进成骨活性, 是本文的探讨重点。

本课题通过建立大鼠颅骨标准骨缺损局部早期持续灌注 β -NGF 给药模型, 在术后 3、7 d, BMP-2 稳

定在同一个水平,且 $P > 0.05$;骨缺损修复过程可分为炎症反应期,软骨痂期,硬骨痂期和骨改建期,结合前期实验的 HE 结果,我们认为此时,骨缺损尚处于炎症反应期,主要表现为炎性肉芽组织,故 BMP-2 表达较少;并且这一结果与我们前期实验测量新骨体积分数时,发现实验组与对照组在 3 d 组与 7 d 组两者新骨形成并无明显差异的结果相一致。到 14 d 组, BMP-2 出现峰值,实验组合成 BMP-2 量比对照组多,且 $P < 0.05$,而 21、28 d 组, BMP-2 的量开始减少,实验组与对照组无统计学意义。这与其他学者研究发现的在骨折发生后第二周 BMP-2 的表达达到峰值,第三周降至正常水平的结果相一致^[20]。从 14 d 的结果可知, β -NGF 对 BMP-2 的表达具有促进作用。且结合我们前期的实验结果来看,实验组的成骨量明显比对照组多。也就证实了, β -NGF 能够协同 BMP-2 增强其对新骨形成的调节。

众所周知,新骨的形成与改建受到破骨细胞活性的调节作用。破骨细胞的数目相较成骨细胞数量是非常少,平均 2~3 个/ mm^3 。即便如此,如果破骨细胞的分化发生障碍或是其数量出现减少,将会导致骨质疏松等疾病;而如果其数量增加或是功能亢进,则会引起骨质疏松。这也就表明了破骨细胞在新骨形成与骨改建平衡方面起到了重要的作用。1984 年有实验模拟了体外的骨吸收模型,虽然它存在了一定的局限性,但是为我们研究骨吸收的细胞机制提供了一个良好的模型^[21, 22]。骨吸收周期如下:首先破骨细胞迁徙至所需要吸收的位点,附着在骨表面;破骨细胞产生极化,并形成骨吸收陷窝;破骨细胞溶解无机矿物质,降解有机基质;清除骨吸收陷窝内的降解物质;最后破骨细胞凋亡或是回归到非吸收的阶段。骨改建的过程被认为是一个缓慢的过程,而破骨细胞却能够快速激活,并调动钙离子和造血干细胞往往仅需几分钟到几小时^[23, 24]。因此,要促进新骨形成与骨改建,就必须能够抑制破骨细胞的活性,使骨改建的平衡向成骨方向倾斜。骨折愈合的研究发现: β -NGF 作为骨吸收的抑制剂, β -NGF 能抑制破骨细胞的活性,减少骨断端的羟脯氨酸和钙的排泄,从而减少骨组织成分的丢失,并且能够增加新骨形成,加速骨折的愈合^[25],其作用机制很可能是骨折发生后骨折部位发生强烈的炎症反应, β -NGF 通过调节骨折愈合过程中的炎性细胞和炎性介质,减轻炎症反应,从而促进骨折愈合^[26]。

TRAP 为破骨细胞和骨吸收的良好标志物。最

近的研究表明, TRAP 能够参与 OPN 的去磷酸化,调控破骨细胞表面的 $\alpha_v\beta_3$ 与 OPN 相结合,从而影响破骨细胞的迁徙、粘附^[27]。因此,本实验通过 TRAP 特殊染色来标记破骨细胞,并观察其活性变化。本实验结果表明,术后 7 d 实验组与对照组的破骨细胞活性均达到最高,这与前人的研究结果一致^[28]。实验组由于外源性 β -NGF 的导入,具有活性的破骨细胞的数量明显较空白对照组的少,说明骨缺损区在骨改建早期过程中 β -NGF 能够抑制破骨细胞的数量增加;再者,其也可能是 β -NGF 通过调节骨折愈合过程中的炎性细胞和炎性介质,减轻炎症反应,从而促进骨折愈合^[26]。14 d 起,骨缺损区的破骨细胞数量明显开始下降, BMP-2 的阳性表达结果达到最强,说明骨缺损修复开始向成骨方向倾斜,破骨细胞开始凋亡。21 d 与 28 d,实验组的破骨细胞数量均较对照组少,结合前期实验结果实验组新骨形成的量高于对照组,我们认为一方面 β -NGF 有可能会通过相关生长因子作用抑制了炎症反应进而直接促进了破骨细胞的凋亡;再者, β -NGF 通过促进新骨形成导致实验组骨缺损区域中新骨形成的面积高于对照组^[29],进而间接导致对照组的 TRAP 阳性表达高于对照组。综上所述; β -NGF 不仅能够早期的抑制破骨细胞的生长,在骨吸收周期末还能够促进破骨细胞的凋亡。

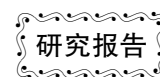
在建立大鼠颅骨标准骨缺损局部早期持续灌注 β -NGF 给药模型的基础上,通过检测骨愈合不同时期 BMP-2 的表达以及破骨细胞的活性,结果表明 β -NGF 能够通过促进 BMP-2 的合成对新骨形成进行调节,同时 β -NGF 能够抑制破骨细胞的活性从而抑制骨吸收。 β -NGF 分别通过对成骨活性的调节及对骨吸收的抑制两方面来调节骨改建。

参 考 文 献

- [1] Goldring MB, Goldring SR. Skeletal tissue response to cytokines [J]. Clin Orthop Relat Res, 1990, 258: 245-278.
- [2] Tacchetti C, Quarto R, Nitsch L, et al. In vitro morphogenesis of chick embryo hypertrophic cartilage [J]. J Cell Biol, 1987, 105(2): 999-1006.
- [3] Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications [J]. J Bone Joint Surg Am, 2002, 84-A(6): 1032-1044.
- [4] Sciadini MF, Johnson KD. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model [J]. J Orthop Res, 2000, 18(2): 289-302.
- [5] Bouxsein ML, Turek TJ, Blake C A, et al. Recombinant human

- bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2001, 83(8): 1219–1230.
- [6] Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, et al. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1992, 74(5): 659–670.
- [7] Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation [J]. *Endocr Rev*, 1992, 13(1): 66–80.
- [8] 中华人民共和国科技部. 关于善待实验动物的指导性意见 [S]. online, 2006.09.30. http://www.most.gov.cn/fggw/zfwj/zfwj2006/200609/t20060930_54389.htm
- [9] 陈伟辉, 卓丽莉, 茅传青. 大鼠颅骨缺损局部持续灌注 β -NGF 给药模型的建立 [J]. *福建医科大学学报*, 2014, 9(2): 19–21.
- [10] Urist MR. Bone: formation by autoinduction [J]. *Science* 1965. 150(3698): 893–899.
- [11] Desimone DP, Reddi AH. Influence of vitamin A on matrix-induced endochondral bone formation [J]. *Calcif Tissue Int*, 1983, 35(6): 732–739.
- [12] Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes [J]. *Int Rev Cytol*, 1976, 47: 327–359.
- [13] Kim MG, Shin DM, Lee SW. The healing of critical-sized bone defect of rat zygomatic arch with particulate bone graft and bone morphogenetic protein-2 [J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2010, 63(3): 459–466.
- [14] Deconde AS, Sidell D, Lee M, et al. Bone morphogenetic protein-2-impregnated biomimetic scaffolds successfully induce bone healing in a marginal mandibular defect [J]. *Laryngoscope*, 2013, 123(5): 1149–1155.
- [15] 贝朝涌, 林卓峰, 杨志, 等. NGF 对骨折愈合影响的研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2009, 23(5): 570–576.
- [16] Lonn P, Zaia K, Israelsson C, et al. BMP enhances transcriptional responses to NGF during PC12 cell differentiation [J]. *Neurochem Res*, 2005, 30(6–7): 753–765.
- [17] Hattori A, Tsujimoto M, Hayashi K, et al. Bone morphogenetic protein-2 is markedly synergistic with tumor necrosis factor in stimulating the production of nerve growth factor in fibroblasts [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1996, 38(6): 1095–1101.
- [18] Letic-gavrilovic A, Piattelli A, Abe K. Nerve growth factor beta (NGF beta) delivery via a collagen/hydroxyapatite (Col/HAp) composite and its effects on new bone ingrowth [J]. 2003, 14(2): 95–102.
- [19] Lee SS, Huang BJ, Kaltz SR, et al. Bone regeneration with low dose BMP-2 amplified by biomimetic supramolecular nanofibers within collagen scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(2): 452–459.
- [20] Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, et al. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing [J]. *J Orthop Res*, 1995, 13(3): 357–367.
- [21] Boyde A, Ali NN, Jones SJ. Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro [J]. *Br Dent J*, 1984, 156(6): 216–220.
- [22] Chambers TJ, Revell PA, Fuller K, et al. Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts [J]. *J Cell Sci*, 1984, 66: 383–399.
- [23] Kollet O, Dar A, Shvitiel S, et al. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells [J]. *Nat Med*, 2006, 12(6): 657–664.
- [24] Miller SC. Rapid activation of the medullary bone osteoclast cell surface by parathyroid hormone [J]. *J Cell Biol*, 1978, 76(3): 615–618.
- [25] Lyritis SG, Boscainos PJ. Calcitonin effects on cartilage and fracture healing [J]. 2001, 2(2): 137–142.
- [26] Sun W, Sun C, Lin H, et al. The effect of collagen-binding NGF-beta on the promotion of sciatic nerve regeneration in a rat sciatic nerve crush injury model [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(27): 4649–4656.
- [27] EK-rylander B, Flores M, Wendle M, et al. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(21): 14853–14856.
- [28] Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, et al. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2003, 14(3): 251–262.
- [29] 莫勇军, 杨志, 赵劲民, 等. NGF 促进骨折愈合的适宜浓度初步研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2011, 25(5): 575–581.

[收稿日期] 2015-09-19



两品系大鼠在经典条件反射和操作式条件反射中的行为学表现

王克柱¹, 徐攀¹, 卢聪¹, 陈怡西¹, 谢磊¹, 李莹辉², 曲丽娜², 刘新民^{1*}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所药理毒理中心, 北京 100193; 2. 中国航天员科研训练中心, 北京 100193)

【摘要】 目的 探讨 SD、Wistar 两种品系大鼠在经典条件反射和操作式条件反射中行为学表现差异, 为研究脑的高级功能建立稳定的条件反射动物模型提供实验动物选择依据。**方法** 选择 8 周龄的正常 SD 和 Wistar 大鼠, 分别进行奖赏训练、单次操作训练、连续多次操作训练三种检测模式, 研究 SD、Wistar 大鼠学习记忆能力。**结果** 奖赏训练中, SD 大鼠的鼻触次数显著性增多 (vs. Wistar, $P < 0.05$); 单次操作训练中, 与 SD 大鼠比较, Wistar 大鼠的总踏板次数 (LPs)、比率 (cLP/LP) 显著升高 ($P < 0.05$), 总鼻触次数 (NPs) 于第 5 天差异有显著性, 踏板潜伏期明显降低 ($P < 0.05$), 踏板速率则显著性的升高 ($P < 0.05$)。连续多次操作训练中, Wistar 大鼠鼻触次数显著性升高 ($P < 0.05$), 踏板次数、奖赏次数均增多, 反应准确率也高于 SD 大鼠, 但组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。**结论** 经典条件反射阶段 SD 大鼠对饮水盒的探索能力强, 表现出对奖赏物质较强的兴趣; 而在奖赏操作条件反射阶段 Wistar 大鼠的表现优于 SD 大鼠。

【关键词】 经典条件反射; 操作式条件反射; SD 大鼠; Wistar 大鼠; 学习记忆

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0065-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.012

Behavioral differences of the Sprague-Dawley and Wistar rats in Pavlovian conditioning and reward operant conditioning

WANG Ke-zhu¹, XU Pan¹, LU Cong¹, CHEN Yi-xi¹, XIE Lei¹, LI Ying-hui², QU Li-na², LIU Xin-min^{1*}

(1. Research Center for Pharmacology & Toxicology, Institute of Medicinal Plant Development (IMPLAD), Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

2. Astronaut Center of China, Beijing 100193)

【Abstract】 Objective To explore the behavioral differences of Sprague-Dawley (SD) and Wistar rats in Pavlovian conditioning and reward operant conditioning task, and provide a good reference for selection of experimental animals in establishing the animal models of conditional reflex for studying higher brain functions. **Methods** Healthy 8-week-old SD and Wistar rats were used in this study. Single operant task and continuous operation training task, and multiple operation training task were used to assess the learning and memory ability of the SD and Wistar rats. **Results** Significant difference was found in the Pavlovian conditioning. SD rats performed more nose pokes (NPs) ($P < 0.05$) vs. Wistar rats. There were significant differences during a single operation task. Wistar rats performed significantly more total lever presses (LPs) ($P < 0.05$) and cLP/LP ($P < 0.05$) vs. SD rats, and there was obvious increase in total nose pokes (NPs) ($P < 0.05$) on the fifth day. The two indicators, the lever pressing rate and the latency of the first lever pressing could explain objectively the rat learning and memory abilities. The latency of the first lever pressing in the Wistar rats was significantly shorter than that of SD rats ($P < 0.05$), while the lever pressing rate obviously higher ($P < 0.05$). In the continuous operation training task, the Wistar rats showed significantly higher nose pokes (vs. SD rats, $P < 0.05$); and also had higher lever

【基金项目】 中长期航天飞行所致应激损伤评价与防护关键技术研究 (BWS11J052), 模拟失重认知功能受损动物模型的建立 (SMFA10K01), 科技部重大新药创制 (2013ZX09201022)。

【作者简介】 王克柱 (1986 -), 男, 博士研究生, 研究方向: 中药神经药理。E-mail: wangkezhu0628@163.com

【通讯作者】 刘新民, 博士生导师, E-mail: Liuxinmin@hotmail.com

presses, reward earned, and correct accuracy rate, but with no significant difference between them. **Conclusions** Wistar rats exhibit excellently in a single operation task and continuous operation training task, while SD rats show better performance in Pavlovian conditioning.

【Key words】 Pavlovian conditioning; Operant conditioning; Reward; Sprague-Dawley rats; Wistar rats; Learning and memory ability

Corresponding author: LIU Xin-min, E-mail: Liuxinmin@hotmail.com

随着分子生物学的迅猛发展,研究脑的高级机能的神经生物学机制已转向微观的分子、细胞水平,而建立一种稳定可靠的实验动物模型同样是必不可少的。利用动物建立不同的条件反射模型已经成为研究脑的高级机能经常采用的一种方法和手段。条件反射是广泛采用的动物行为研究模式,包括经典的条件反射和操作条件反射^[1-2]。条件反射需要对不同条件性刺激(conditional stimulus, CS)之间的相互关联与自身行为(response)及其后果(outcome)之间的因果联系的进行学习^[3-4]。操作式条件反射又包括奖励性和惩罚性操作条件反射,而奖励性操作式条件反射测试系统是被广泛使用的行为学装置,包括刺激信号、操作机构和奖励物质,而动物在操作测试箱中的行为表现可以从多个方面反映动物的兴趣、注意、决策、反应、选择和目标导向等认知功能^[5-9]。奖励性操作条件反射是一种正性增强的条件反射记忆,而基于奖赏效应的学习记忆行为评价技术由于其对动物心理和身体的伤害较小,符合动物伦理的 3R 原则之一,正被国际医学界所接受^[10-11]。

目前随着我国的脑计划的即将实施,利用奖励性操作条件反射进行脑高级功能研究必将成为热门领域,但由于动物行为学受到的影响因素较多,包括噪声、光线、动物的运输时间长短以及实验动物品系、周龄等,并且操作条件反射任务中使用大鼠居多,因此本实验选择国内较常用的 SD 和 Wistar 两种品系大鼠,利用灯光(S)、踏板(R)和食物(O)相结合的方法,建立大鼠经典的奖赏条件反射、单次踏板操作条件反射(fixed ratio = 1)、连续多次踏板操作条件反射等实验模式,比较两种品系大鼠在上述实验模式中的行为学表现,从而为进一步研究脑的高级功能-学习记忆和运动控制、以及药物筛选等提供实验动物选择的依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠及雄性 Wistar 大鼠各 8 只,

均为 8 周龄,体重 300 g 左右,购自北京维通利华实验动物科技有限公司【SCXK(京)2012-0001】。实验室安静,温度恒温保持在(24 ± 3)℃,12 h 照明/12 h 黑暗环境(8:30-20:30 亮灯),饲养期间给予标准饲料及纯净水。所有动物实验均在中国医学科学院药用植物研究所与中国航天员科研训练中心共建的航天医学国家重点实验室-动物行为学实验室实施【SYXK(京)2008-0019】,并遵守国际实验动物伦理学要求。

1.2 实验仪器^[12]

奖励性操作式条件反射检测分析处理系统,由中国医学科学院药用植物研究所与中国航天员科研训练中心联合研制。测试系统包括 4 个测试箱(350 mm × 450 mm × 780 mm(l × w × h))。测试箱分为嵌套的内外两部分,内箱尺寸为 300 mm × 300 mm × 550 mm(l × w × h),壁中布有红外发光阵列用于消除图像采集时噪声干扰并提高暗环境时图像清晰度。内侧壁安装有 2 套奖赏装置、踏板装置以及三色信号灯,左右对称。奖赏装置旁各 2.5 cm 处安装宽度为 4 cm 的踏板装置,踏板上方各有一个三色信号灯(红、黄、蓝)。内箱的顶部安装有 CCD 摄像装置和环境光源,可以实时监控动物在测试箱内暗环境下的行为活动。底部为栅间距 d = 10 mm 的不锈钢栅。钢栅可连接 12V 电源,电流通过时可提供惩罚性的非条件刺激(选配)。内室下方为活动抽屉,用以收集动物的排泄物。

1.3 实验方法

1.3.1 饮食限制与双瓶喂养

动物在奖赏训练前 10 d 进行饮食限制,其方法采用双瓶喂养的方法,即给予动物两瓶饮水,其中一瓶为 30 mL 的 8% 蔗糖水,另一瓶为 30 mL 的纯净水,两瓶饮水每天位置对换,以免动物偏爱其中某一方位。饮水控制的同时,每只大鼠每天给予鼠粮 14 g,连续饮食限制 10 d,目的是使限食后的动物体重达到未限食动物体重的 80% ~ 85%^[2,6],此时动物寻找食物的动机最大,同时又没有影响动物正常的营养需求。

1.3.2 经典的奖赏条件反射

动物第 9 天进行为期 1 d 的适应训练,即动物自由探索测试箱,奖赏装置每 (60 ± 10) s 自动给予 1 滴 (0.2 mL) 20% 蔗糖水,实验时间 30 min。第 10 天动物开始进行为期 7 d 的奖赏训练。奖赏训练过程蓝色信号灯交替出现,每次亮灯 10 s,此时动物探索饮水盒时自动触发红外感应装置,发出信号至计算机,并反馈到奖赏装置自动给予一滴奖赏物质,我们将此定义为正确鼻触反应;10 s 之后信号灯熄灭,试验进入间隔期 (30 ± 5) s,若此时动物进行探索饮水盒,将没有奖赏物质的获得,同样系统也会记录其鼻触反应,我们将其定义为错误鼻触反应。每天训练 20 min,连续训练 7 d。

1.3.3 奖励性操作条件反射实验

自 18 d 起进行连续 10 d 的单次操作训练(fixed ratio = 1)。打开软件控制单个踏板伸出,训练过程中踏板保持伸出状态。动物完成一次踏板操作后,蓝色信号灯亮灯 10 s,然后动物即可获得一次奖赏物质。此阶段是在已形成奖赏条件反射的基础上增加踏板操作,训练动物对踏板(R)-信号灯(S)-奖赏(O)进行关联并形成稳定的奖赏操作条件反射。每天训练时间 30 min,训练终止条件为实验时间到或者动物在 30 min 内连续踏板 50 次。动物在连续 3 d 的训练中以踏板操作 50 次结束实验,被视为动物已习得奖赏操作条件反射。

1.3.4 连续多次操作能力测试

动物习得奖赏操作条件反射后进行连续 6 d 的多次连续踏板操作测试,即获得一次奖赏物质所需要进行的踏板操作为 2 次或者 4 次。连续 2 次或 4 次踏板操作的时间间隔分别为 2 s 或 4 s,动物在规

定时间内连续踏板 2 次或者 4 次,蓝色信号灯亮灯 10 s,动物即可获得一次奖赏物质,否则重新计次。实验时长为 30 min,训练终止条件为实验时间到或动物在 30 min 内连续踏板 50 次。实验过程中记录动物获得的奖赏次数、踏板操作次数、鼻触次数等。

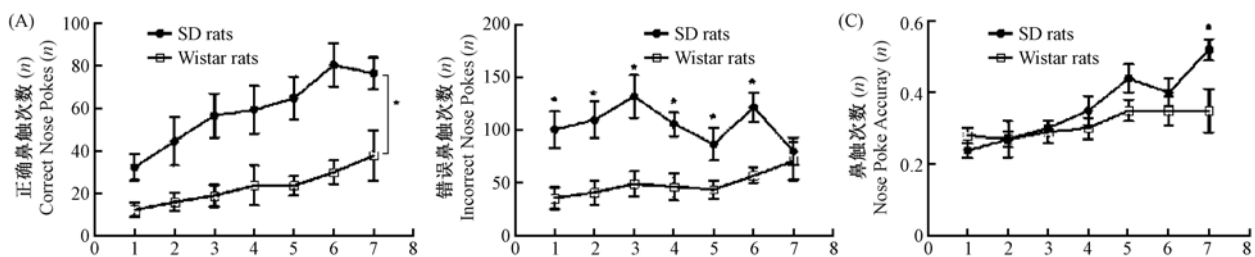
1.4 数据分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析。试验数据以均值 $\pm$ 标准误的形式表示,各组间数据用单因素方差分析判断其统计学意义,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性, $P < 0.01$ 表示差异有极显著性。

2 结果

2.1 经典的奖赏条件反射

在奖赏训练阶段,随着训练周期的延长,SD 和 Wistar 大鼠的正确鼻触次数(correct nose pokes, cNPs)均持续上升;而错误鼻触次数(incorrect nose pokes, iNPs),SD 大鼠在第 1 天到第 3 天持续性增加,而在第 4 天后明显的下降,Wistar 大鼠在整个奖赏训练过程中基本保持不变;鼻触正确率也随着训练的增加而逐渐升高,基于上述结果表明两种品系的大鼠(SD 和 Wistar)均可以将信号灯(stimuli)-奖赏物质(outcome)形成关联,形成稳定的奖赏条件反射。两种品系大鼠比较发现,SD 大鼠的 cNPs 和 iNPs 均显著性高于 Wistar 大鼠($P < 0.05$)。通过公式 $p = \text{cNPs} / (\text{cNPs} + \text{iNPs})$ 计算出鼻触正确率,能够反映出大鼠在奖赏训练中的学习效率,从图 1 看出,在奖赏训练第 7 天,SD 大鼠与 Wistar 大鼠比较出现显著性差异($P < 0.05$)。以上结果说明了 SD 大鼠在经典条件反射学习效率方面优于 Wistar 大鼠。



注:A:正确鼻触次数;B:错误鼻触次数;C:鼻触正确率,与 Wistar 大鼠比较,* $P < 0.05$ 差异有显著性。

图 1 Wistar 与 SD 大鼠经典的奖赏条件反射比较($n = 8$, mean $\pm$ SEM)

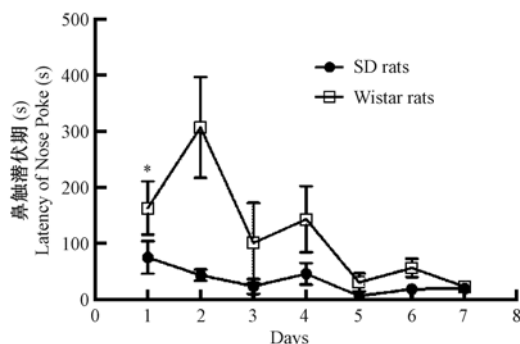
Note. Correct nose pokes; B: Incorrect nose pokes; C: Accuracy of nose pokes. * $P < 0.05$, compared with the Wistar rats.

Fig. 1 Comparison of reward conditioning acquisition of the Wistar and SD rats($n = 8$, mean $\pm$ SEM)

实验开始后动物首次作出鼻触反应的时间即为鼻触潜伏期($T_{\text{NPLatency}}$),反映出动物对 S-O 关联的记忆程度,同时又可以反映动物运动的敏捷性。从

图 2 看出,随着训练周期的增加, $T_{\text{NPLatency}}$ 逐渐下降;与 Wistar 大鼠比较,SD 大鼠的 $T_{\text{NPLatency}}$ 明显较低,在第 1 天表现出显著性差异($P < 0.05$)。图 3 是动物

在奖赏训练过程中运动轨迹热点图,从图中可以看出,SD 和 Wistar 大鼠的运动路程差异无显著性。



注:与 SD 大鼠比较, * $P < 0.05$ 差异有显著性。

图 2 Wistar 与 SD 大鼠在奖励性条件反射鼻触潜伏期的比较 ($n = 8$, mean $\pm$ SEM)

Note. * $P < 0.05$, compared with the SD rats.

Fig. 2 Comparison of the nose poke latency in Pavlovian conditioning acquisition of Wistar and SD rats

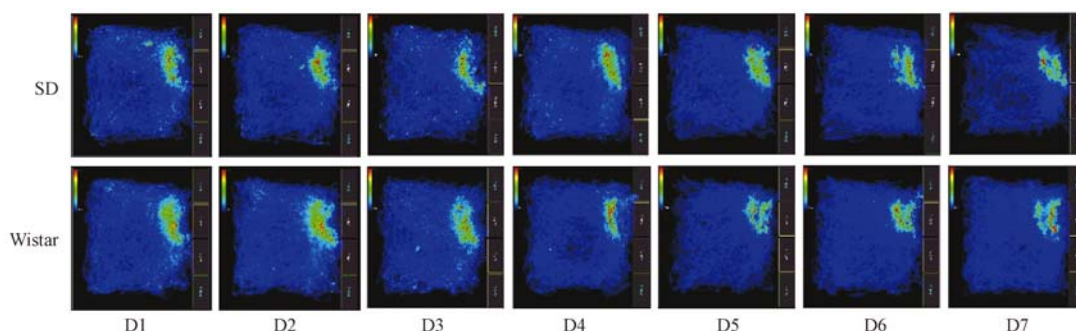


图 3 Wistar 与 SD 大鼠在奖赏训练运动轨迹热点图

Fig. 3 The hot map of trajectory in Pavlovian conditioning acquisition of Wistar and SD rats

与 $T_{NPLatency}$ 相似,踏板操作潜伏期 ($T_{LP Latency}$) 通过考察动物对踏板操作 (response)-奖赏物质 (outcome) 的关联程度来反映动物的奖赏操作的学习记忆能力, $T_{LP Latency}$ 越短,则说明奖赏操作学习能力越好。图 5 看出, Wistar 大鼠表现出的 $T_{LP Latency}$ 明显的低于 SD 大鼠 ($P < 0.05$)。图 6 表示动物在奖赏操作训练中运动轨迹热点图,与 SD 大鼠比较, Wistar 大鼠的运动路程显著性小于 SD 大鼠。

2.3 连续多次操作能力测试

图 7 显示在连续多次操作任务中,与 SD 大鼠比较, Wistar 大鼠的总踏板次数 (total lever presses, TLPs) 较高,但差异无显著性 ($P > 0.05$);总鼻触次数 (total nose pokes, TNPs) 在 4、5、7 d 差异有显著性 ($P < 0.05$);而奖赏物质 (rewards, Rs) 的获得两种品系大鼠则差异无显著性。在比值 (R/LP)、 NP/LP 、

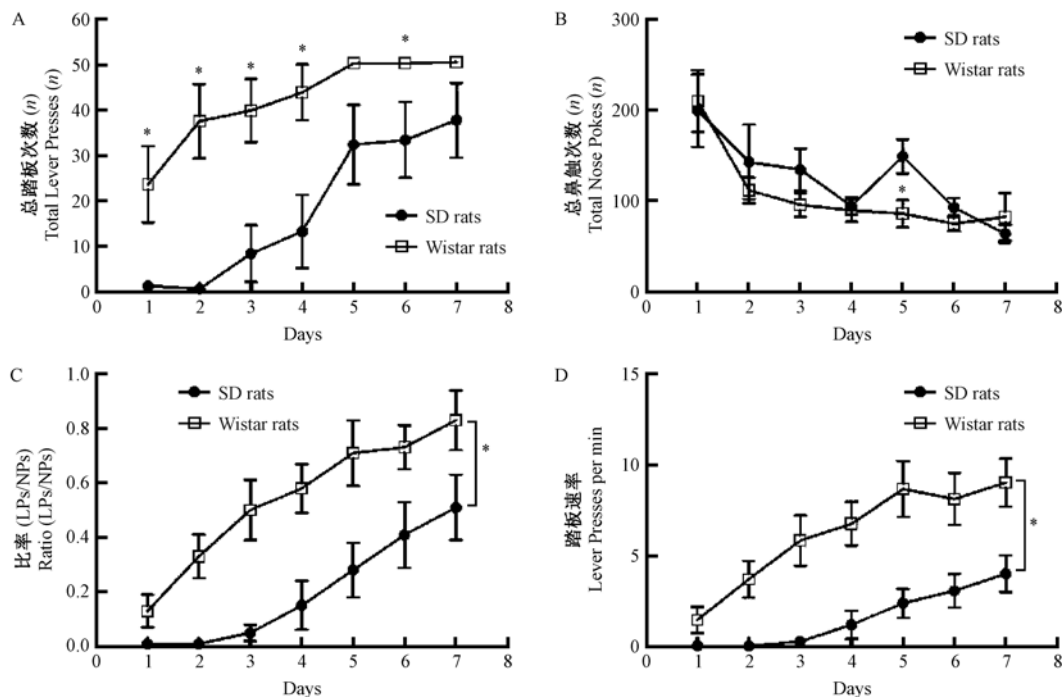
2.2 奖赏操作训练

动物习得奖赏条件反射后即可进行奖赏操作训练,由图 4 看出,随着训练时间的递增,两种品系大鼠的踏板次数 (lever presses, LPs) 逐渐增加;由于动物逐步习得踏板操作 (R)-信号灯、(S)-奖赏物质与 (O) 三者的关联,无效鼻触减少,因此总鼻触次数 (total nose pokes, NPs) 呈现下降趋势。Wistar 与 SD 大鼠比较发现, Wistar 大鼠的 LPs、比率 (LPs/NPs , LNP) 显著性高于 SD 大鼠 ($P < 0.05$),而 NPs 基本与 SD 大鼠保持一致 (除 5 d 差异有显著性)。图 4 (d) 表示的是动物踏板操作速率,与 SD 大鼠比较, Wistar 大鼠的每分钟踏板次数表现出差异有显著性 ($P < 0.05$)。上述结果表明, Wistar 大鼠在奖赏操作训练的速率和准确率方面均优于 SD 大鼠。

R/NP 等指标上 Wistar 大鼠与 SD 大鼠比较差异均无显著性 ($P > 0.05$)。

3 讨论

经典条件反射和操作式条件反射广泛应用于研究学习记忆和脑的高级功能 (如反应、选择、注意、决策等) 的神经机制。操作式条件反射提供了一种目标引导行为 (goal-directed behavior) 的行为学研究模型。操作式条件反射的学习过程可以分为目标导向性和习惯化学习两种,持续的或特殊强化模式的训练会逐渐形成习惯化行为,不受奖赏物质激励价值贬值 (outcome devaluation) 和奖赏物质回报率降低 (contingency degradation) 的影响^[2,13]。研究表明,在较高比率的操作模式中能形成目标导向行为,而较低比率的操作模式中易于形成习惯行为。



注: A: 总踏板次数; B: 总鼻触次数; C: 踏板次数与鼻触次数的比值; D: 踏板速率。

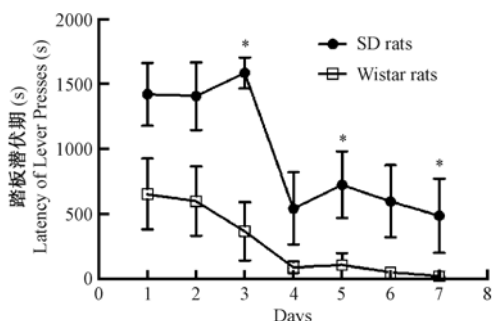
与 SD 大鼠比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 差异有显著性。

图 4 Wistar 与 SD 大鼠在奖赏操作获得能力的比较 ($n = 8$, mean $\pm$ SEM)

Note. A: Total lever presses; B: Total nose pokes; C: The LPs/NPs ratio; D: Lever press rate.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the SD rats.

Fig. 4 Comparison of the reward operation conditioning acquisition of Wistar and SD rats ($n = 8$, mean $\pm$ SEM)



注: 与 SD 大鼠比较, * $P < 0.05$ 差异有显著性。

图 5 Wistar 与 SD 大鼠在奖赏操作条件反射中踏板潜伏期的比较 ($n = 8$, mean $\pm$ SEM)

Note. * $P < 0.05$, compared with the SD rats.

Fig. 5 Comparison of the latency of lever pressing in reward operation conditioning of the Wistar and SD rats ($n = 8$, mean $\pm$ SEM)

动物行为学实验由于受到的影响因素较多, 应激、动物品系、周龄、昼夜节律变化等均可以影响行为学结果, 使动物实验结果失去重复性。SD 和 Wistar 均属于远交系封闭群白色大鼠, 是国际和国内临床前实验研究常用的动物品系。Wistar 大鼠由

1907 年美国 Wistar 研究所育成, 是我国引进最早、使用最广泛, 数量最多的品种。性情温顺, 对传染病抵抗力强, 目前是神经-内分泌实验研究中最常用的动物品系。SD 大鼠原产于亚洲中部及原苏联部分的温暖地区, 目前已应用于生命科学研究的各个领域, 尤其在肿瘤学、药理学、内分泌学、营养学方面应用最为广泛。研究发现, SD 大鼠的神经系统与人类相似, 广泛应用于高级神经活动的研究, 如奖励和惩罚实验、迷宫实验、饮酒实验以及神经官能症、精神发育阻滞的研究。本实验中设置了经典条件反射、单次操作训练和连续多次操作学习模式, 对比分析不同品系大鼠在经典条件反射、单次操作反应和复杂操作能力测试的行为表现。

文献报道, 8 周龄的 Wistar 大鼠踏板操作反应灵敏, 形成操作条件反射的速度和效率均高于 SD 大鼠; 12 周龄的 SD 和 Wistar 大鼠均能稳定形成操作条件反射, 差异无显著性。石哲^[14]研究大鼠信号辨识能力时发现, 12 周龄的 SD 和 Wistar 大鼠在正确操作反应率、正确反应次数等指标并无显著性差异。本实验的经典条件反射实验结果表明, 随着训练周期的增加, 动物在经典条件反射学习中表现出对饮

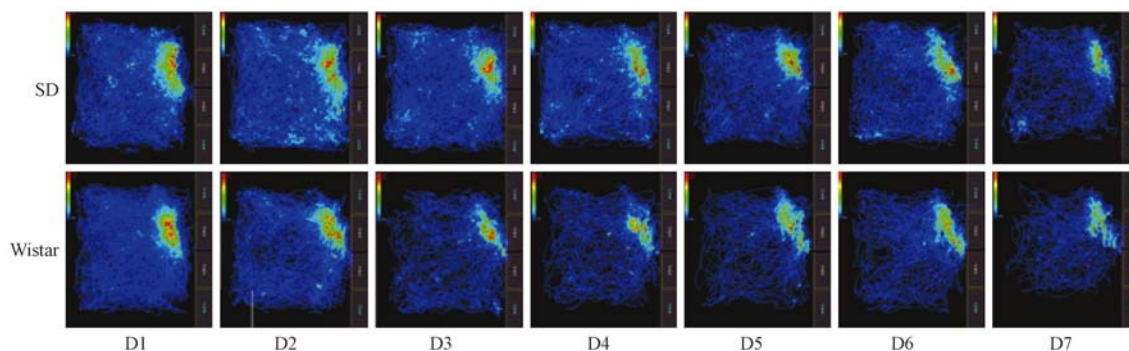
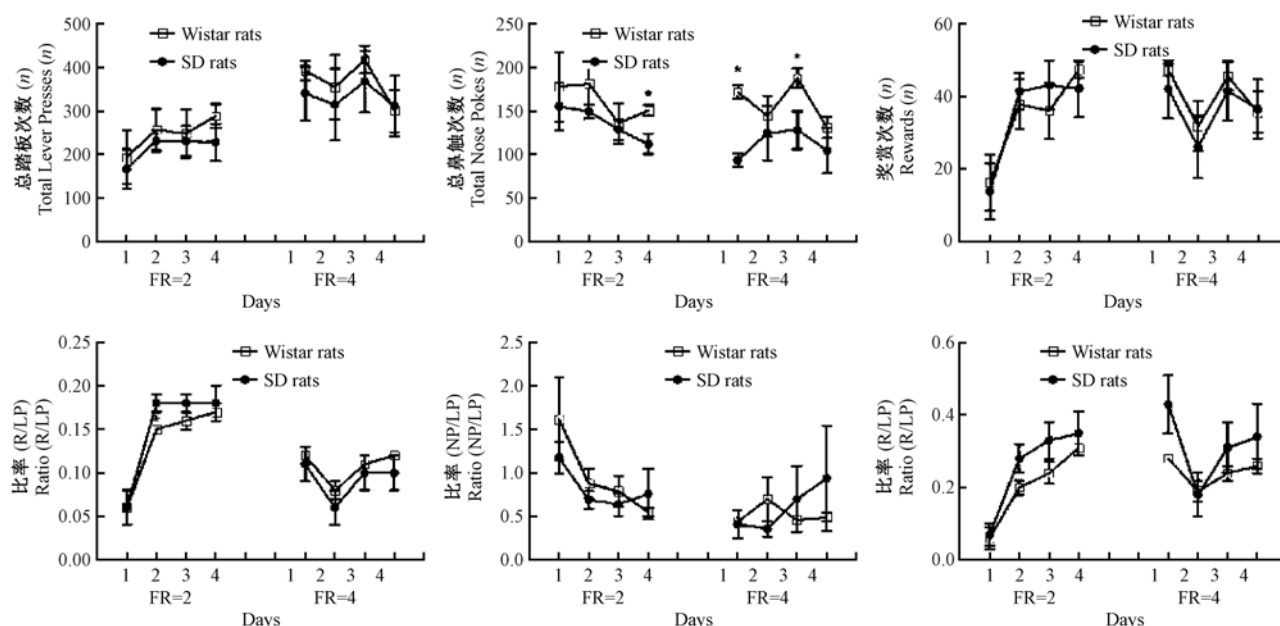


图 6 Wistar 与 SD 大鼠在奖赏操作训练运动轨迹热点图 ($n=8$, mean $\pm$ SEM)

Fig. 6 The hot map of trajectory in reward operation conditioning acquisition of Wistar and SD rats



注:与 SD 大鼠比较, * $P < 0.05$ 差异有显著性。

图 7 Wistar 与 SD 大鼠在连续多次操作能力的比较 ($n=8$, mean $\pm$ SEM)

Note. * $P < 0.05$, compared with SD rats.

Fig. 7 Comparison of continuous operation ability of the Wistar and SD rats ($n=8$, mean $\pm$ SEM)

水盒探索活动(鼻触反应)增加。大鼠的鼻触反应能够反映出动物对奖赏物质的兴趣程度以及对刺激信号的反应能力,而兴趣和反应是动物进行踏板操作的基础。SD 大鼠的正确鼻触次数、鼻触正确率显著性高于 Wistar 大鼠,说明 SD 大鼠对奖赏物质的兴趣程度较高,同时对灯光刺激信号的反应强烈。在操作反应训练中,增加踏板操作,需要动物主动探索,积累经验,获得强化形成操作条件反射。增加获得奖赏的踏板次数可以降低奖赏物质激励价值和获得奖赏回报率,直接影响动物的正确操作反应。本实验结果发现,单次踏板操作模式中,Wistar 大鼠踏板操作次数显著性高于 SD 大鼠,而鼻触次数则无明显差异,因此正确反应率较高。在连续多次操作

能力测试中,要求大鼠在限定的时间内完成设定次数的连续踏板操作以获得奖赏物质。Wistar 大鼠的鼻触次数、正确踏板次数、奖赏次数较高,因此正确反应较高。

条件反射方法应用于研究药物对高级神经活动的影响具有几个方面的优点:(1)通过变更刺激信号、操作模式与强化反应,形成在同一动物身上形成不同的条件反射的复合实验,可以观察药物对高级神经活动的选择性作用;(2)通过脑部自身刺激实验还能将药物与作用部位联系起来,研究药物的作用机制^[15];(3)定量比较不同药物对不同实验模式的影响,能够反应出药物药效强度,敏感性好;(4)目前奖励性操作条件反射已实现自动化和智能化,

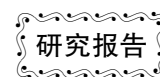
可同时进行 4 个样本的检测,大大节省了人力,提高了药物筛选的效率^[14]。

综上所述,本实验中经典条件反射阶段 SD 大鼠对饮水盒的探索能力强,表现出对奖赏物质较强的兴趣;而在奖励性操作条件反射阶段, Wistar 的操作能力优于 SD 大鼠,因此 Wistar 大鼠可能更适合于操作式条件反射的研究。

参 考 文 献

- [1] Holland PC. Brain mechanisms for changes in processing of conditioned stimuli in Pavlovian conditioning: Implications for behavior theory[J]. *Animal Learn Behav*, 1997, 25 (4): 373 – 399.
- [2] Shi Z, Sun X, Liu X, et al. Evaluation of an AB (1–40)-induced cognitive deficit in rat using a reward-directed instrumental learning task [J]. *Behav Brain Res*, 2012, 34(2): 323 – 333.
- [3] Winocur G. A comparison of normal old rats and young adult rats with lesions to the hippocampus or prefrontal cortex on a test of matching-to-sample [J]. *Neuropsychologia*, 1992, 30 (9): 769 – 781.
- [4] Luu TT, Pirogovsky E, et al. Age-related changes in contextual associative learning [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2008, 89 (1): 81 – 85.
- [5] Ostlund SB, Balleine BW. Differential involvement of the basolateral amygdala and mediodorsal thalamus in instrumental action selection [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(17): 4398 – 4405.
- [6] Ostlund SB, Balleine BW. Lesions of medial prefrontal cortex disrupt the acquisition but not the expression of goal-directed learning [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(34): 7763 – 7770.
- [7] Schwabe L, Wolf OT. Stress-induced modulation of instrumental behavior: from goal-directed to habitual control of action [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 219: 321 – 328.
- [8] Steele-Russell I, Russell MI, Castiglioni JA, et al. Selective attention and Pavlovian conditioning [J]. *Exp Brain Res*, 2006, 173: 587 – 602.
- [9] Simon NW, Gilbert RJ, Mayse JD, et al. Balancing risk and reward: a rat model of risky decision-making [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2009, 34(10): 2208 – 2217.
- [10] Berridge KC, Kringelbach ML. Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals [J]. *Psychopharmacology*, 2008, (Berl) 199(3): 457 – 480.
- [11] 石哲, 陈善广, 陈玲玲, 等. 奖励性操作式条件反射任务在大鼠学习记忆研究中的应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(4): 9 – 15.
- [12] 陈铃铃, 石哲, 陈善广. 奖励性操作条件反射实时测试分析处理系统研制 [J]. *航天医学与医学工程*, 2013, 26(4): 278 – 282.
- [13] Oler JA, Markus EJ. Age-related deficits in the ability to encode contextual change: a place cell analysis [J]. *Hippocampus*, 2000, 10: 338 – 350.
- [14] 石哲. 基于奖励性操作式条件反射的益智复方中药药效评价方法研究 [C]. 北京协和医学院中国医学科学院, 北京, 中国. 2012.
- [15] 邹罔, 金国章, 胥彬. 操作式条件反射在神经药理学中的应用 [J]. *生理科学进展*, 1963, 5(1): 58 – 66.

[收稿日期] 2015-07-21



利用多重荧光 STR 技术分析上海地区 7 品系 常用近交系小鼠核心群的遗传特性

倪丽菊¹, 赵丽亚², 赵立虎³, 赵莹², 高诚^{1*}

(1. 上海实验动物研究中心, 上海 201203; 2. 上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 上海 201203;
3. 上海斯莱克实验动物有限责任公司, 上海 201615)

【摘要】 目的 比较上海地区 7 品系常用近交系小鼠核心群的遗传特性。**方法** 将筛选到的 48 对多态性丰富的微卫星引物组合优化, 形成 11 组多重荧光 PCR 引物混合体系, 对来自上海地区两大实验小鼠供应商的 7 品系近交系小鼠核心群的 DNA 样进行分型检测。利用遗传分析软件进行数据分析。**结果** 来自两大供应商的 7 品系近交系小鼠在 48 个微卫星位点上都为纯合子。同一种群内小鼠的 STR 位点结果均一致; 不同种群小鼠无论品系是否相同, 相互间均存在 STR 位点差异。但相同品系不同种群近交系小鼠间的遗传距离与不同品系小鼠种群间的遗传距离相比均较近。在 UPGMA 聚类树中, 相同品系的不同种群均首先两两聚成一类。C57BL/6 小鼠与其他 6 品系小鼠的亲缘关系均较远。**结论** 上海地区不同供应商的 7 品系近交系小鼠核心群间均存在 STR 位点差异。

【关键词】 近交系小鼠; 微卫星; 多重 PCR; 遗传特性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0072-08

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.013

Genetic characteristics of seven inbred mouse strains in core colonies from Shanghai analyzed using fluorescent multiplex STR

NI Li-ju¹, ZHAO Li-ya², ZHAO Li-hu³, ZHAO Ying², GAO Cheng^{1*}

(1. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China;

2. Sino-British SIPPR/BK Laboratory Animal Ltd. Co.,

Shanghai 201203; 3. Shanghai SLAC Laboratory Animal Ltd. Co., Shanghai 201615)

【Abstract】 Objective To analyze the genetic characteristics of seven frequently-used inbred mouse strains in core colonies from Shanghai suppliers. **Methods** 48 pairs of microsatellite primers with high polymorphism were screened out and combined into 11 sets of multiplex PCR primer mix labelled with two dyes (FAM and HEX). By these primer mix, the DNA samples of the seven strains were genotyped. The genotyping data were analyzed using statistical software. **Results** All the 48 microsatellite loci were homozygous for all inbred mice of the seven strains. On each microsatellite locus, the PCR results of the mice in the same population showed monomorphism, and that of the mice in different populations showed polymorphism, whether the populations were of the same strain or not. But the genetic distances between the populations of the same strain were all closer than that of different strains. The phylogenetic tree showed that the populations of the same strain were first get into one cluster. The genetic relationship between the strains of C57BL/6 and other six strains were all far. **Conclusions** Genetic differences exist on 48 microsatellite loci between the core colonies of seven inbred mouse strains from two suppliers in Shanghai.

[基金项目] 上海市科委基金项目 (No. 12140900402)。

[作者简介] 倪丽菊, 副研究员, 研究方向: 实验动物遗传学。E-mail: niliju@163.com

[通讯作者] 高诚, 研究员, E-mail: gaochengdgb@126.com

【Key words】 Inbred mice; Microsatellite; Multiplex PCR; Genetic characteristics

Corresponding author: GAO Cheng, E-mail: gaochengdgb@126.com

近交系小鼠作为一种重要的实验动物因具有高度的遗传同一性,被广泛应用于现代生物医学研究中,其遗传质量直接影响到动物实验的准确性、重复性和科学性。定期对其进行遗传监测是保证其遗传质量的重要措施。利用微卫星标记对小鼠进行遗传检测近年来国内有较多报道^[1-7],但各位学者所选微卫星位点的位置和数量各不相同,检测方法也有所不同,尚处于摸索阶段。对微卫星的有效筛选和高效利用是微卫星检测技术的关键。本研究将高通量的多重荧光 PCR 方法应用到小鼠微卫星检测技术中,利用筛选到的 48 个微卫星标记对上海地区两大实验小鼠供应商的 7 品系常用近交系小鼠核心群进行比较分析,以了解目前上海地区近交系小鼠种质资源的遗传特性。

1 材料与方法

1.1 DNA 样本

选择常用的 7 品系近交系小鼠, DBA/2Slac、BALB/cAnSlac、C3H/HeJSlac、C57BL/6JSlac、CBA/JSlac、FVB/NJSlac、129/S3Slac 的 DNA 样由上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2012-0002】提供, DBA/2Bkl、BALB/cBkl、C3H/HeBkl、C57BL/6Bkl、CBA/CaBkl、FVB/NJBkl、129/SvEvBrd/Bkl 的 DNA 样由上海西普尔-必凯实验动物有限公司【SCXK(沪)2013-0016】提供。将各 DNA 样浓度稀释至 25~50 ng/ μ L, -20℃ 冷冻保存

备用。所用近交系小鼠均为核心群动物, SPF 级。各单位每品系各选 6~8 只,雌雄各半。

1.2 微卫星位点的选取

参考 MMDBJ 数据库 (Mouse Microsatellite Data Base of Japan) (<http://www.shigen.nig.ac.jp/mouse/mmdbj/top.jsp>) 及文献^[8,9],选取在不同小鼠品系间多态信息丰富的位点,均匀分布于 19 条常染色体和 X 染色体,每条染色体选 2~3 位点。

1.3 试剂

微卫星扩增试剂 Type-itTM Microsatellite PCR Kit 购自 Qiagen 公司。各微卫星位点上游 PCR 引物的 5' 端用 FAM 或 HEX 荧光染料标记,所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成与标记,具体引物信息见表 1。

1.4 基因组 STR 的 PCR 分型

将筛选的 48 个 STR 位点根据产物大小、引物扩增效率和荧光标记的不同,组合成 11 组 3~5 重荧光 PCR 分型方案对两家单位的 7 品系小鼠 DNA 共计 111 份样品(必凯 56 份,斯莱克 55 份)进行分型。PCR 反应体系为 10 μ L: 2 $\times$ Type-it Multiplex PCR Master Mix 5 μ L,多重引物混合液适量,5 $\times$ Q-Solution 2 μ L,模板 DNA 75 ng, RNase-free water 补足 10 μ L。反应程序: 95℃ 热激活 5 min, 95℃ 变性 30 s, 60℃ 复性 90 s, 72℃ 延伸 30 s, 循环 28 次,最后 60℃ 延伸 30 min。

表 1 48 个小鼠微卫星位点的荧光标记引物信息

Tab. 1 The primer information of 48 mouse microsatellites

序号 No.	位点 Loci	MGI 位置 (cM) MGI position (cM)	引物序列 (5'—3') Primer sequence (5'—3')	染料 Dye
1	D1Mit58	8.30	GGACTGGCAATCCTCTTGTC GCACGTTAGAGAGTGGGCTC	HEX
2	D1mit22	32.8	TCTGTTCCCTCTACACACATGC CTACCATGCTTACCTAGGTCCTG	HEX
3	D1Mit206	95.80	TGAGGCACCTTTGTATTTCAGC CCAGATGCTTTGAACATTCTCC	HEX
4	D2Mit367	26.2	GCCTGTGCTAAAAAGAGGTC GCCCTGAGAACTACCCTCCT	FAM
5	D2Mit101	52.5	ATAATTCCTGATTGCTGTTTGTC ACATGAAGCCTAGAGGTCG	FAM
6	D2Nds3	73.0	CCAAGCTTCCTTGTCGAAGTA AAGCCCAAAGTCCATCAGTGG	FAM
7	D3Mit22	33.7	AAGGATTGAAGAATGGTTGGG AATCAGCGATTTCAGCACG	FAM

序号 No.	位点 Loci	MGI 位置 (cM) MGI position (cM)	引物序列 (5'—3') Primer sequence (5'—3')	染料 Dye
8	D3Mit311	45.2	CGCCTGCTGCTAGTGCTG CAGTGACTTAAGTACCCCTGACTCC	HEX
9	D3Mit18	76.2	GAACAGTTCCCAGGTCCTCA CTGCCTTTAAATTCTGTCAACC	HEX
10	D4Mit166	44.5	AGTTTCCTTTCTTCTACTTGTGTG AGGGCATAGGAACTTTCAGG	HEX
11	D4Mit37	56.5	GGAAGACAAACAGTAGTGTTGG TGCCATAACAACCATGGCTA	HEX
12	D5Mit387	15.0	CCCCATGTATCTCTAGATTAACAATG GCACTCGTGTACATAACCAATAAC	FAM
13	D5Mit20	52.0	TGAATCTGTGGCCAAATGAA CTTTGCCAGAGCAGCCAT	HEX
14	D5Mit101	81.0	GGGATGACGTTTGAGTTGT CTGCTTGGGATGTGGGTC	HEX
15	D6Mit166	0.6	CATTTATTTTATTGATGGATGTGTG GTTGTCTTATGGCTGCCATG	FAM
16	D6Mit304	75.0	TGGATATTCAAACACAACCTGAAGC ATTCTCTTTAAGGACCTCTATTATCG	FAM
17	D7Mit84	28.4	AACTTGCCAGCCATGGTAAG AGTTAGAAGACCCACCTAAATCC	FAM
18	D7Mit262	49.9	TCTCTAGATAGAGAGCCTTAAACGTG CTCTCTTGAGTCTGTTGTTTGTAGTG	FAM
19	D7Mit259	72.0	CCCCTCCTCTGACCTCTT GTCTCCATGGGAACCACACT	FAM
20	D8Mit4	14.0	CCAACTCATCCCCAAAGGTA GTATGTTCAAGGCTGGGCAT	FAM
21	D8Mit11	46.0	GCAGCAGTGGTAGCAAAATAGC CTTAATCAGCAATCCTTGACACC	HEX
22	D8Mit245	72.0	TCCTAGGATTTGTCTAAGTTAGGTCC TCTGATATTGTTACTGGGTAAAGTGC	FAM
23	D9Mit224	17.0	AATAAATGAATGCTTACAGGAGCA TGGGGCTCAGAAAATGATTG	FAM
24	D9Mit110	48.0	CCAGAAGGGGTGTGTTTTCG CTACCCCTCCTTTCTAGTTTTGTCC	HEX
25	D10Mit279	2.0	ACAATATTGGCTATCCTCTTACACC TTCTGCAGTGCATCACAACA	FAM
26	D10Mit15	35.0	ATGCGTACAGGCAAAACACC GCTACATTGGTCTGTGACGC	FAM
27	D11Mit71	11.0	GCCATACCTGGTAGCGTGT AATTTTCAGATGTAGCCATAAGCC	HEX
28	D11Mit4	37.0	CAGTGGGTCATCAGTACAGCA AAGCCAGCCCAGTCTTCATA	FAM
29	D11Mit124	57.8	CCGGGATGAGAGACCTAACA CTGTGGGCTGTGGAAGACTT	FAM
30	D12Mit136	13.0	TTTAATTTTGTAGTGGGTTTGGC TTGCTACATGTACACTGATCTCCA	FAM
31	D12Mit141	55.0	TAGGCAAAATTCATTCTCTTACTTTAGG GTGAGTCCATTGTCTGTAAGATGG	HEX
32	D13Mit117	19.0	TGGTGAACCTGATGGACG TTGCCTGCAAGTACCCTCT	FAM
33	D13Mit30	52.0	TTTTTGATGTGTATGCTTGTGG AAAGAGAAGACGGGAGGAG	FAM
34	D14Nds1	2.5	TGCTGGCTAGGAATAAACAGA AGGGAATTCATGTTTCAGGATA	HEX

序号 No.	位点 Loci	MGI 位置 (cM) MGI position (cM)	引物序列 (5'—3') Primer sequence (5'—3')	染料 Dye
35	D14Mit62	18.5	AGGACTCAATGAGCAGGAA ACTCTCCTGCCACCCCTC	HEX
36	D15Mit270	28.4	ATGAGGCTCAATAAGATAAGATGTG GTTGCTACTGTAAATGTCTCCTGTG	HEX
37	D15Mit241	50.2	TCCATCTACCTCATGTGCACA AAAGATTTTCATTCTTCAAATGCA	FAM
38	D15Mit79	66.2	CGAAACATTTGGGCACCTTG CCCCATTCTGAGTCTCTTG	FAM
39	D16Mit38	28.5	GGGAGGTAGACTAGCAACATGG AATGAAATACACATACCCACATGC	FAM
40	D16Mit51	66.75	CCTCAGGTCACTCAGGATTTAA CCTGTTCAACCTCTCCACAT	FAM
41	D17Mit31	18.8	TGTTGGAGCTGAATACACGC CCCCAAATTGATCTGGTGCT	HEX
42	D17Mit123	56.7	CACAAGGAGGGAGCCTGTAG CACCGTAAGAGTCTAATAATAAGGGG	HEX
43	D18Mit31	4.0	AGCAGGAAGACCATGAGTATAAGG TGCTGGCATGAGACAAGTTC	FAM
44	D18Mit51	37.0	AACATGGTGGAAACCACTACC AAGGGAAAGTCACCACATGC	HEX
45	D19Mit7	48.0	TCCCTTCCCACAGATAACATG CTCATGCTFGCACGCATAGT	HEX
46	D19Mit119	27.5	CACCCACATACCTTGATT CTCTCTTTATCTCTCTCTCTCT	FAM
47	DXMit48	14.2	ACCTCCCCCTGCATTACTCT TTCTCCAGAATCCATGCTCC	FAM
48	DXMit220	66.6	AGGATAAGACAATTTAGGGACTGG CTTAGGTTCTTGTTTTATTGAACACA	HEX

1.5 PCR 产物检测

将多重荧光 PCR 产物通过 ABI3730 测序仪的毛细管凝胶电泳进行扫描检测, ROX 标记的标准分子量片段^[10]为内参, 用 Gene Scan 3.1 软件收集测序仪毛细管凝胶电泳的数据, 用 Gene Mapper 软件分析各位点的片段大小。

1.6 统计分析

根据 Nei 的公式计算各品系小鼠间的遗传距离。

$$D_A = 1 - \frac{1}{r} \sum_{j=1}^r \sum_{i=1}^{m_j} \sqrt{x_{ij}y_{ij}}$$

其中: r : 微卫星座位数目; m_j : 第 j 微卫星座位所具有的等位基因数目; x_{ij} 、 y_{ij} : 分别为 x 群体、 y 群体第 j 微卫星座位第 i 等位基因的基因频率。最后, 用 MEGA 软件中的非加权组平均法 (unweighted pair group method with arithmetic means, UPMGA) 进行聚类分析, 构建聚类关系树。

2 结果

2.1 微卫星多重荧光 PCR 产物的毛细管凝胶电泳

将 48 个微卫星位点组合成 11 组多重荧光 PCR 分型方案对 7 品系 111 只近交系小鼠 DNA 样进行扩增, 产物经毛细管凝胶电泳扫描检测。图 1 为 1 只 C3H/HeBkl 小鼠在 D18Mit31、D16Mit38、D11Mit4、D5Mit20、D8Mit11 等 5 个微卫星位点上的多重 PCR 产物的扫描结果。

2.2 48 个微卫星位点的 PCR 分型结果

本实验选取的两家单位 7 品系近交系小鼠在 48 个微卫星位点的扩增结果 (见表 2) 显示都为纯合子。不同品系的近交系小鼠在各位点上表现出良好的多态性, 等位基因数为 2—7 个。同一单位的同品系小鼠在 48 个微卫星位点上的扩增结果均一致, 在种群内表现为单态性。同品系小鼠在不同单位种群间存在差异, 其中差异最大的是 CBA/CaBkl 和 CBA/JSlac, 两种群 CBA 小鼠在 16 个微卫星位点上存在差异; 其次是 C57BL/6Bkl 和 C57BL/6JSlac, 两种群 C57BL/6 小鼠在 10 个位点上存在差异; 差异最小的是 FVB/NJBkl 和 FVB/NJSlac, 两种群 FVB 小鼠只在 1 个微卫星位点上有差异。

表 2 48 个微卫星标记在各品系小鼠种群中的分型结果(bp)

Tab. 2 Results of 48 microsatellites in the 7 strains of inbred mice

位点 Loci	DBA/ 2Bkl	DBA/ 2Slac	BALB/ cBkl	BALB/ cAnSlac	C3H/ HeBkl	C3H/ HeJSlac	C57BL/ 6Bkl	C57BL/ 6JSlac	CBA/ CaBkl	CBA/ JSlac	FVB/ NJBkl	FVB/ NJSIac	129/Sv EvBrdBkl	129/ S3Slac
D1Mit58	258	258	262	262	258	258	256	256	258	258	262	262	262	262
D1mit22	132	132	138	138	134	134	132	132	132	132	132	132	132	132
D1Mit206	109	109	113	113	113	113	117	123	113	109	113	113	113	113
D2Mit367	158	158	145	145	145	145	145	148	145	145	158	158	145	145
D2Mit101	188	188	188	188	213	213	190	190	213	213	190	190	218	218
D2Nds3	262	262	421	421	262	262	262	262	262	262	259	259	259	259
D3Mit22	231	231	219	219	237	237	237	237	237	231	219	219	219	219
D3Mit311	121	121	111	111	113	113	113	121	113	113	121	121	113	113
D3Mit18	232	232	218	220	220	218	234	232	220	216	214	214	220	218
D4Mit166	200	200	185	185	185	185	198	200	200	185	200	200	174	174
D4Mit37	217	217	225	225	225	225	235	235	225	225	225	225	235	235
D5Mit387	174	174	181	181	181	181	174	174	181	183	181	181	176	176
D5Mit20	139	139	126	126	139	139	151	151	126	139	126	126	142	142
D5Mit101	128	128	114	114	114	114	128	128	128	128	114	114	126	126
D6Mit166	118	118	110	114	112	110	99	99	114	114	118	118	114	114
D6Mit304	113	113	105	105	113	113	113	113	103	103	103	103	105	105
D7Mit84	184	184	184	184	172	172	166	166	172	172	166	166	172	172
D7Mit262	92	92	107	107	92	92	107	107	92	92	107	107	92	92
D7Mit259	150	150	128	128	150	150	146	146	150	150	148	148	144	144
D8Mit4	191	191	197	197	191	191	158	158	197	197	197	197	158	158
D8Mit11	217	217	219	219	217	215	219	221	217	217	219	219	219	219
D8Mit245	101	101	103	103	103	103	101	101	101	101	101	101	101	101
D9Mit224	89	89	93	93	95	93	104	104	93	100	93	93	93	93
D9Mit110	152	152	159	159	159	165	150	150	146	146	154	154	148	148
D10Mit279	277	277	269	269	277	277	271	271	269	277	271	271	274	274
D10Mit15	182	182	170	170	174	174	170	174	174	170	178	178	174	174
D11Mit71	211	211	225	225	235	235	211	211	211	211	241	241	NULL	241
D11Mit4	287	287	244	244	244	244	250	250	297	244	250	250	297	297
D11Mit124	121	121	123	123	121	121	116	116	123	123	121	121	121	121
D12Mit136	185	185	210	215	206	210	142	142	210	215	195	191	193	193
D12Mit141	149	149	137	137	135	135	137	137	135	135	137	137	137	137
D13Mit117	119	119	125	125	125	125	133	119	125	125	100	100	100	100
D13Mit30	152	152	152	152	152	152	147	147	152	152	152	152	152	152
D14Nds1	192	192	186	186	178	178	176	176	194	194	186	186	186	186
D14Mit62	134	134	137	137	137	137	122	122	137	137	141	141	137	137
D15Mit270	189	191	177	177	177	177	197	197	177	177	197	197	197	197
D15Mit241	90	90	94	94	98	98	98	98	100	98	90	90	94	94
D15Mit79	103	103	112	112	105	105	108	108	105	105	103	103	112	112
D16Mit38	187	187	187	187	179	179	185	185	181	179	179	179	179	179
D16Mit51	160	160	160	160	158	158	160	158	162	162	166	166	160	160
D17Mit31	164	164	164	164	135	135	156	156	135	135	156	156	156	156
D17Mit123	150	148	134	134	148	148	131	129	148	136	144	144	148	148
D18Mit31	116	116	112	112	112	112	114	114	112	112	116	116	110	110
D18Mit51	194	194	152	152	200	198	198	198	200	NULL	198	198	194	194
D19Mit7	114	114	114	114	114	114	116	116	114	114	116	116	114	114
D19Mit119	266	266	274	274	266	266	256	256	266	266	266	266	270	270
DXMit48	103	103	99	99	103	103	105	105	99	103	99	99	99	99
DXMit220	120	120	127	125	120	120	122	122	120	120	120	120	120	120

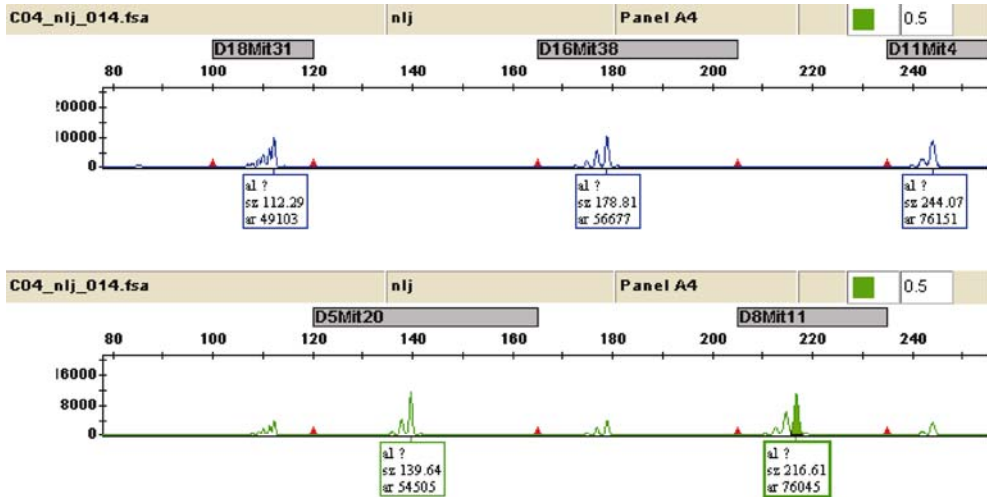


图 1 C3H/HeBkl 小鼠的一个 5 重荧光 PCR 产物的电泳扫描结果

Fig. 1 The electrophoresis results of C3H/HeBkl mouse prouducts in a 5-plex fluorescent-PCR

2.3 各种群近交系小鼠间的遗传距离分析

基于等位基因频率计算出来自两单位的 7 品系近交系小鼠共计 14 个种群间的 Nei 遗传距离,如表 3 所示。不同单位种群的同品系小鼠间的遗传距离均较近,最近的是 FVB/NJBkl 与 FVB/NJSlac 之间,

遗传距离为 0.0208;最远的是 CBA/CaBkl 和 CBA/JSlac 之间,遗传距离为 0.3333。不同品系小鼠种群间的遗传距离均较远,最远的是 C57BL/6JSlac 与 BALB/cBkl 之间和 C57BL/6JSlac 与 BALB/cAnSlac 之间,遗传距离均为 0.9583。

表 3 14 个近交系小鼠种群间的遗传距离及等位基因有差异的微卫星位点数目

Tab. 3 The genetic distance (below diagonal) and number of microsatellite loci with different alleles (above diagonal) between the 14 populations of inbred mice

位点 Loci	DBA/ 2/Bkl	DBA/ 2Slac	BALB/ c/Bkl	BALB/ cAnSlac	C3H/ He/Bkl	C3H/ HeJSlac	C57BL/ 6/Bkl	C57BL/ 6JSlac	CBA/ Ca/Bkl	CBA/ JSlac	FVB/ NJ/Bkl	FVB/ NJSlac	129/SvEv Brd/Bkl	129/S3 Slac
DBA/2/Bkl	—	2	41	41	33	34	40	37	34	30	35	35	39	39
DBA/2Slac	0.0417	—	41	41	32	33	40	37	33	30	35	35	38	30
BALB/c/Bkl	0.8542	0.8542	—	3	33	30	42	46	31	35	33	33	32	31
BALB/cAnSlac	0.8542	0.8542	0.1042	—	32	33	42	46	30	33	33	33	30	31
C3H/He/Bkl	0.6875	0.6667	0.6875	0.6667	—	7	42	42	20	20	39	39	34	35
C3H/HeJSlac	0.7083	0.6875	0.6250	0.6875	0.1458	—	41	41	21	21	37	37	34	33
C57BL/6/Bkl	0.8333	0.8333	0.8750	0.8750	0.8750	0.8542	—	10	30	39	35	35	37	37
C57BL/6JSlac	0.7708	0.7708	0.9583	0.9583	0.8750	0.8542	0.2083	—	40	42	34	34	40	40
CBA/Ca/Bkl	0.7083	0.6875	0.6458	0.6250	0.4167	0.4375	0.8333	0.8333	—	16	34	34	30	31
CBA/JSlac	0.6250	0.6250	0.7292	0.6875	0.4167	0.4375	0.8125	0.8750	0.3333	—	39	39	36	36
FVB/NJ/Bkl	0.7292	0.7292	0.6875	0.6875	0.8125	0.7708	0.7292	0.7083	0.7083	0.8125	—	1	30	29
FVB/NJSlac	0.7292	0.7292	0.6875	0.6875	0.8125	0.7708	0.7292	0.7083	0.7083	0.8125	0.0208	—	30	29
129/SvEvBrd /Bkl	0.8125	0.7917	0.6667	0.6250	0.7083	0.7083	0.7708	0.8333	0.6250	0.7500	0.6250	0.6250	—	2
129/S3Slac	0.8125	0.7917	0.6458	0.6458	0.7292	0.6875	0.7708	0.8333	0.6458	0.7500	0.6042	0.6042	0.0417	—

2.4 各种群近交系小鼠的聚类分析

根据 Nei 遗传距离,用 UPGMA 法构建的聚类树结果如图 2 所示,不同单位种群的同品系近交系小鼠均因亲缘关系最近,首先聚成一类。不同品系的近交系小鼠间,FVB 与 129 首先聚在一起,再与 BALB/c 聚成一支;C3H 与 CBA 聚在一起后,再与 DNA/2 聚成一支;两组分支聚在一起后,最后与 C57BL/6 聚类,由此可见,C57BL/6 小鼠与其他 6

品系小鼠的亲缘关系均较远。

3 讨论

近年来,微卫星标记因具有分布广、数量多、多态性高、具共显性等优点,被作为一种重要、成熟的遗传工具广泛应用于各类实验动物的遗传检测研究中。

目前,微卫星 DNA 扩增产物的电泳分型方法有琼脂糖电泳、聚丙烯酰胺电泳、毛细管凝胶电泳等。

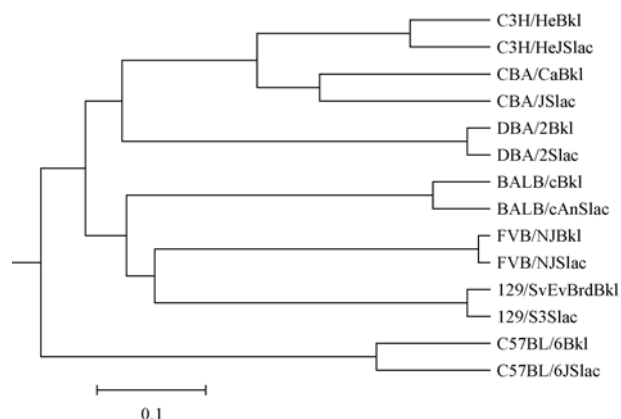


图 2 基于 Nei 遗传距离构建的 14 个近交系小鼠种群的 UPGMA 聚类树

Fig. 2 The UPGMA clustering tree based on Nei's genetic distance for 14 populations of the inbred mice

琼脂糖电泳操作简单,但由于 STR 扩增产物多数集中在 100 ~ 200 bp 之间而且某些等位基因大小比较接近,随着电泳时间的增加,一些小片段扩增产物的条带易模糊,琼脂糖凝胶的分辨率低,不能准确区分不同大小的等位基因。聚丙烯酰胺电泳是应用较多的微卫星产物分型检测方法,分辨率高,可以分辨出长度差为 1 ~ 2 bp 的 DNA 片段,但制胶和染色操作步骤繁琐,耗时、耗力、非自动化,在大规模多批次的数据收集和分析时存在相当大的难度,而且经常会有影子带的产生干扰结果的判断。DNA 全自动测序仪的毛细管凝胶电泳技术是近年来快速发展和具有广泛应用前景的新技术,该技术将荧光标记的 PCR 产物和标准分子量样品(内参)在同一毛细管中进行电泳,DNA 分析仪将结果自动记录在计算机上,利用片段分析软件进行图像收集和分析,精确计算出微卫星等位基因片段的大小。毛细管凝胶电泳检测 PCR 产物具有微量、高度自动化、结果更加准确等明显优势,是今后微卫星检测的发展方向。本研究将多重荧光 PCR 检测方法和毛细管凝胶电泳应用到了到微卫星的分型检测中,将筛选到的 48 个微卫星位点组合成 11 组多重 PCR 分型方案。该方案是在同一个 PCR 反应体系中对同一样本采用 3 ~ 5 种引物同时进行扩增检测,将实验成本降低至近四分之一,同时减少了操作时间,提高了实验效率。微卫星的多重荧光 PCR 检测技术可以有效降低成本、提高通量,使小鼠微卫星遗传检测更为简单、经济、高效和准确,可满足规模化检测的需要。

本研究建立的微卫星多重荧光 PCR 分型方案含 48 个微卫星位点,覆盖了小鼠 1 - 19 号常染色体和

X 染色体,能够较全面地从分子水平反映各品系独特的遗传概貌,可用于常用近交系小鼠种群的遗传特性分析、日常遗传质量监测、品系鉴定等。如用于品系鉴定,一组含 5 个微卫星位点的多重 PCR 反应(如图 1)即可将这 7 品系区分开。

对上海地区两大实验小鼠供应商的 7 品系近交系小鼠核心群的微卫星分析发现,两家单位各自的 7 品系小鼠种群在 48 个微卫星位点上的基因纯合度都为 100%,说明这些品系的核心群动物保持着良好的遗传稳定性。比较两家单位的 7 品系近交系小鼠共计 14 个核心群在 48 个微卫星位点上的扩增结果发现,各种群之间都有部分位点的结果存在差异,具有差异的位点数在 2 - 46 个之间。同品系近交系小鼠的不同单位种群间有差异的位点数均较少、遗传距离均较近,其中差异最大的是 CBA/CaBkl 和 CBA/JSlac,其次是 C57BL/6Bkl 和 C57BL/6JSlac,这与本课题组其他研究人员用 51 个 SNP 位点分析相同 DNA 样本的结果(另文发表)一致。作者认为,同品系不同单位种群近交系小鼠间 STR 位点存在差异的原因,一是由亚系不同导致,如 CBA/CaBkl 和 CBA/JSlac;二是由两家单位同一品系小鼠的引种单位不同引起,两个引种单位的小鼠在长期的培育过程中出现了遗传分化。不同品系的近交系小鼠种群在这 48 个位点上有着丰富的多态性,等位基因数为 2 - 7 个,以含 3 - 4 个等位基因的位点居多,达三分之二以上。不同品系的近交系小鼠中, C57BL/6JSlac 与 BALB/cBkl、BALB/cSlac 间差异最大,均有 46 个位点存在差异,遗传距离亦最远,表明 C57BL/6 小鼠与 BALB/c 小鼠间的亲缘关系最远,这与韩喜彬等^[1]用 10 个微卫星位点对辽宁省 BALB/c、C57BL/6、C57BL/10、DBA/2、FVB/N、129 等 6 品系常用近交系小鼠进行遗传质量分析时发现的结果一致。C3H/HeBkl 与 CBA/CaBkl、CBA/JSlac 间差异最小,遗传距离最近。

研究表明,上海地区两大供应商的 DBA/2、BALB/c、C3H/He、C57BL/6、CBA、FVB/NJ、129 等 7 品系小鼠核心群的遗传特性是有差异的,本研究为相关小鼠品系积累了遗传背景资料,建立的多重荧光 STR 技术可以从 DNA 水平对实验小鼠进行快速高通量的遗传监测。

(致谢:感谢上海斯莱克实验动物有限责任公司、上海西普尔-必凯实验动物有限公司为本研究提供近交系小鼠 DNA 样品。)

参 考 文 献

- [1] 韩喜彬, 苏玉虹, 巴彩凤, 等. 辽宁省 6 种常用近交系小鼠 10 个微卫星位点的遗传质量检测报告 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(5): 22–25.
- [2] 薛敬礼, 金玫蕾, 祝庆蕃. 近交系小鼠核心群和生产群遗传质量监测 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2006, 41(5): 859–861.
- [3] 商海涛, 魏泓, 岳秉飞, 等. 应用微卫星标记对三个昆明小鼠封闭群的遗传学研究 [J]. 实验动物科学, 2009, 26(2): 1–6.
- [4] 吴宝金, 茅慧华, 朱洪, 等. 小鼠 39 个微卫星的 PCR 条件及其运用 [J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(4): 216–220.
- [5] 王越甲, 杨伟峰, 车路平, 等. 利用优选的微卫星标记建立常用大小鼠品系的遗传监测体系 [J]. 实验动物科学, 2014, 31(3): 5–9, 14.
- [6] 牛屹东, 梁署龙. 三个近交系 C57BL/6J 小鼠群体微卫星遗传变异分析 [J]. 动物学研究, 2008, 29(6): 599–602.
- [7] 谢建云, 邵伟娟, 胡建华, 等. 微卫星技术对近交系小鼠遗传质量的分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(9): 511–515.
- [8] Schalkwyk LC, Jung M, Daser A, et al. Panel of microsatellite markers for whole-genome scans and radiation hybrid mapping and a mouse family tree [J]. Genome Res, 1999, 9: 878–887.
- [9] Nitzki F, Kruger AK, Wojnowski L, et al. Identification of a genetic contamination in a commercial mouse strain using two panels of polymorphic markers [J]. Lab Animals, 2007, 41: 218–228.
- [10] De Woody AJ, Schupp J, Kenefic L, et al. Universal method for producing ROX-labeled size standards suitable for automated genotyping [J]. Biotechniques, 2004, 37(3): 348–352.

[收稿日期] 2015-07-24

(上接第 58 页)

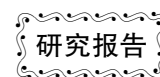
关系,三种小鼠的死亡与心脏系统传导阻滞引起的心律失常等有关,且 Tg(+)型小鼠对药物引起的心脏毒性比 WT 型小鼠更为敏感,而 sTg(+)型小鼠则是一个很好的心脏保护模型。

基因修饰动物模型是国内外实验室研究的热点,本实验中 Tg(+)型小鼠不仅可以更真实地评价药物的毒性作用,而且相对于 WT 型小鼠,在具有潜在心脏毒性作用的药物毒性评价中灵敏性更高,有望在心血管系统的药物安全性评价中广泛应用,提高药物临床前评价结果与临床的相关性,减少临床用药风险。

参 考 文 献

- [1] Knockaert L, Descatoire V, Vadrot N, et al. Mitochondrial CYP2E1 is sufficient to mediate oxidative stress and cytotoxicity induced by ethanol and acetaminophen [J]. Toxicol in Vitro, 2011, 25(2): 475–484.
- [2] Neafsey P, Ginsberg G, Hattis D, et al. Genetic polymorphism in CYP2E1: population distribution of CYP2E1 activity [J]. Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2009, 12(5–6): 362–388.
- [3] Pugsley MK, Gallacher DJ, Towart R, et al. Methods in safety pharmacology in focus [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2008, 58(2): 69–71.
- [4] Foster WR, Chen SJ, He A, et al. A retrospective analysis of toxicogenomics in the safety assessment of drug candidates [J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(5): 621–635.
- [5] O'Shea D, Davis SN, Kim RB, et al. Effect of fasting and obesity in humans on the 6-hydroxylation of chlorzoxazone: a putative probe of CYP2E1 activity [J]. Clin Pharmacol Ther, 1994, 56(4): 359–367.
- [6] Kathirvel E, Chen P, Morgan K, et al. Oxidative stress and regulation of anti-oxidant enzymes in cytochrome P4502E1 transgenic mouse model of non-alcoholic fatty liver [J]. Gastroenterol Hepatol, 2010, 25(6): 1136–1143.
- [7] Scheen AJ. Controversy about the cardiovascular safety of sibutramine [J]. Drug Safety, 2010, 33(7): 615–618.
- [8] Scheen AJ. Sibutramine on cardiovascular outcome [J]. Diabetes Care, 2011, 34(Suppl 2): S114–119.
- [9] Chen GL, Li L, Yan SX, et al. Anti-obesity effect of sibutramine hydrochloride in alimentary obesity rats [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2003, 8(1): 55–58.
- [10] Kieken F, Mutsaers N, Dolmatova E, et al. Structural and molecular mechanisms of gap junction remodeling in epicardial border zone myocytes following myocardial infarction [J]. Circ Res, 2009, 104(9): 1104–1112.

[收稿日期] 2015-09-09



雌性大鼠去卵巢模型中脑神经内分泌 信号异常传导的机理

侯雪芹^{1*}, 李悦², 荣翠平³, 黄莉², 邱建利²,

(1. 泰山医学院, 山东 泰安 271016; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405; 3. 桂林医学院, 广西 桂林 541004)

【摘要】 目的 比较正常大鼠和去卵巢大鼠脑内主要神经信息分子的种类和含量,以观察生理和病理状态下,神经内分泌信号传导通路的异同,初步探讨卵巢(雌激素)对神经内分泌信号传导机制。**方法** 观察大鼠脑组织神经元细胞病理形态,运用高效液相色谱-荧光检测器定量检测不同脑区及血清中肾上腺素(E)、去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)、5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)及高香草酸(HVA)的含量变化。**结果** 脑组织HE染色显示OVX组大鼠脑内神经元退化比假手术组明显。与假手术组相比,OVX组大鼠的NE、E含量降低,差异具有统计学意义的区域分别为海马和血清;HVA在丘脑中含量比假手术组升高;DA含量在皮质区比假手术组下降。与假手术组比较,OVX组在海马和小脑区5-HT含量上升,而5-HIAA含量下降;在皮质、丘脑和血清中,OVX组5-HT含量较假手术组下降,而5-HIAA含量升高。**结论** 去卵巢大鼠的雌激素水平低下状态可能引起脑组织携带的主要信息分子(经典神经递质、氨基酸类递质)释放或合成发生异常,因此去卵巢模型大鼠可以作为一种神经内分泌信号异常的载体,为围绝经期综合症的信号传导的研究提供了一种新的思路和方法。

【关键词】 去卵巢大鼠模型;神经递质;信号转导;高效液相色谱-荧光检测器

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0080-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.014

Mechanism of abnormal transduction of neuroendocrine signals in the brain of ovariectomized rat

HOU Xue-qin^{1*}, LI Yue², RONG Cui-ping³, HUANG Li², QIU Jian-li²

(1. Taishan Medical University, Tai'an, Shandong 271016; 2. the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405. 3. Guilin Medical College, Guilin 541004)

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of ovariectomy on signal transduction of neuroendocrine signals in the rat brain. **Methods** Twenty-four healthy SPF 2-month-old female Sprague-Dawley rats were randomly divided into ovariectomized group and sham-operated group (n = 12). Morphological changes of the brain neurons were examined by pathology using HE staining. The content of epinephrine (E), norepinephrine (NE), dopamine (DA), 5-hydroxytryptamine (5-HT), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) and homovanillic acid (HVA) in plasma and different brain regions were detected by high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** Pathological examination showed obvious neuron degeneration in the brain of OVX rats. Compared with the sham-operated group, contents of NE and E in the OVX group were lower, especially in the hippocampus and serum. In the OVX rats, HVA level in the thalamus was higher than that in the sham-operated group, while DA content in the cortex was lower. 5-HT was higher in the hippocampus and cerebellum of OVX group when compared with the sham-operated group, and a lower level was observed in the cortex, thalamus and serum. Moreover, the changes of 5-HIAA was in contrary to that of 5-HT. **Conclusions** Declined secretion of estrogen after ovariectomy induces abnormal synthesis and secretion of main signal molecules (classic neurotransmitters and amino acids)

【基金项目】 高等学校博士学科点专项科研基金(20114425110001);山东省高等学校科技计划基金(J14LM03)。

【通讯作者】 侯雪芹(1985-),女,博士,讲师,研究方向:脑病的临床与实验研究。E-mail: houxueqin09@163.com

in the brain tissue. Thus, being a model with abnormal neuroendocrine signaling, the OVX rat provides new ideas and methods for research of signal transduction in peri-menopausal syndrome.

【Key words】 Ovariectomy; Neurotransmitter; Signal transduction; Pathology; High performance liquid chromatography; Peri-menopausal syndrome; Rat

Corresponding author: HOU Xue-qin, E-mail: houxueqin09@163.com

雌性大鼠去卵巢模型 (ovariectomized, OVX) 是基于围绝经期或绝经后妇女因雌激素水平下降而建立的动物模型^[1], 其特点是简单易行, 不需要特殊设备, 既可预防给药, 亦可治疗给药, 又可广泛应用于药理、药效学的研究。由于雌激素功能广泛, 其缺乏可导致其他系统的改变, 作用不是单一且稳定^[2]。因此 OVX 模型为目前多研究领域应用最广泛的模型之一。雌激素不仅具有调整和控制生殖和生长系统的作用, 还在神经系统中发挥重要作用, 尤其在神经系统发育、神经保护和促进等方面^[3], 但其具体作用机制迄今尚不清楚。近来出现了单胺类神经递质代谢异常与雌激素密切相关的新理论, 提示去卵巢模型大鼠可以作为脑神经内分泌信号异常新模型。为了进一步研究去卵巢引起的雌激素分泌不足导致脑内与生殖相关的神经回路紊乱的作用机制, 我们设计了本文的实验。同时也为探讨雌激素与抑郁症发病机制的研究者提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2 月龄雌性 SD 大鼠 24 只, SPF 级, 体重 180 ~ 220 g, 由广东省医学实验动物中心提供【SCXK(粤) 2008-0002】。饲养在广州中医药大学三元里校区实验动物中心 SPF 级动物房【SYXK(粤) 2013-0085】。

1.2 实验试剂及仪器

注射用青霉素钠(华北制药股份有限公司, 批准文号: 国药准字 H13020655, 批号 J3048403), 规格: 160 万单位/瓶。左旋多巴 (L-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA)、去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE)、肾上腺素 (epinephrine, E)、多巴胺 (dopamine, DA)、5-羟色胺 (serotonin hydrochloride, 5-HT)、5-羟色胺 (5-hydroxyindole-3-acetic acid, 5-HIAA)、高香草酸 (homovanillic acid, HVA) 标准品 (纯度均高于 99%, 美国 Sigma 公司); 柠檬酸、乙酸钠、1-庚烷磺酸钠、乙二胺四乙酸二钠 (Na₂EDTA)、三乙胺、L-半胱氨酸、高氯酸均为分析纯; 甲醇为色谱纯, 水为二次去离子水。

超低温冰箱: Forma Scientific; 高速离心机: 贝克曼 Microfuge Lite; 脱水机: Leica TP1020; 包埋机: LEICA EG1160; 切片机: Leica RM2135; 图像采集设备: Leica DM4000B 显微镜; 色谱仪和荧光检测器: Waters 2695, Waters 2475 Multi λ fluorescence detector; 反相色谱柱 Nova-pak C18 (150 $\times$ 4.6 mm, 粒径 5 μ m)。

1.3 方法

1.3.1 大鼠卵巢切除模型建立

2 月龄雌性 SD 大鼠 24 只, 正常饲养 1 个月后, 体重分层后随机分为假手术组、模型组 (OVX 组), 每组各 12 只动物。手术操作步骤: 禁食 12 h, 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔麻醉后, 无菌条件下采用背侧双切口暴露双侧卵巢, 假手术组仅切除卵巢周围少量脂肪组织, 模型组切除双侧卵巢; 术后 3 d 予注射用青霉素钠肌肉注射, 4 万 U/天, 预防切口感染。造模后 3 个月取材进行指标检测。

1.3.2 脑组织形态学观察

大鼠经 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔麻醉后, 开胸心脏灌流, 断头取脑组织, 10% 甲醛固定 24 h。组织修块后, 按常规方法脱水、浸蜡、石蜡包埋及切片, 最后行 HE 染色。

1.3.3 脑组织和血清神经递质检测

(1) 脑组织和血清取材

腹腔麻醉大鼠, 经腹主动脉采血后迅速将大鼠断头, 取新鲜脑组织, 在冰上分离脑组织的海马、皮质、丘脑和小脑, 立即置于 -80℃ 保存备用; 血液样品于 4℃ 静置 30 min 后, 4℃, 3000 r/min 离心 30 min, 留取血清备用。其中脑区取材参照大鼠立体定位图谱第三版。

(2) 标准品配制

精确称取神经递质标准品, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 加入标准品溶剂振荡使其溶解并定容, 分别制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的标准品储备液, 于 4℃ 冰箱中保存, 使用时用标准品溶剂逐级稀释至所需浓度^[4]。

(3) 样品处理

样品处理参考赵燕燕等^[4]的方法。

(4) 色谱条件

Waters 2475 Multi λ fluorescence detector, 反相色谱柱 Nova-pak C18 (150 $\times$ 4.6 mm, 粒径 5 μ m), 流动相为柠檬酸-乙酸钠缓冲液 (50 mmol/L 柠檬酸、50 mmol/L 乙酸钠 0.5 mmol/L 1-庚烷磺酸钠、5 mmol/L 三乙胺、0.5 mmol/L Na₂EDTA)-甲醇 (95:5, v/v) (pH 3.8); 流速 1.0 mL/min; 进样量 20 μ L; 发射波长 330 nm, 激发波长 280 nm^[5]。

1.4 统计学分析方法

应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑组织病理形态的比较

脑组织经 HE 染色后呈现的病理形态如图 1 所示, 大鼠海马 HE 染色表明, 假手术组的大鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区锥体细胞均排列整齐, 细胞的结构都完整, 形态正常; OVX 组的大鼠海马 CA1 区锥

体细胞排列凌乱, 细胞的体积缩小, 细胞核固缩, 胞浆浓缩, 出现形态异常。OVX 组的大鼠皮质和丘脑区具有明显地神经元凋亡迹象, 出现大量的神经元坏死 (红色神经元), 胞质嗜酸性增强, 细胞核固缩, 溶解, 消失; 组织变得结构疏松, 呈现空隙状或形成空腔, 其中不乏有泡沫细胞浸润。而假手术组组织结构较致密, 细胞空隙较少, 其结果表明去卵巢能够加速雌性大鼠脑内神经元衰老。

2.2 脑组织及血清中单胺类神经递质的测定

实验结果显示: OVX 组大鼠的 NE、E 含量比假手术组降低, 差异具有统计学意义的区域分别为海马和血清; NE、E 的代谢产物 HVA 仅在丘脑中检出, 且其含量比假手术组升高。DA 主要在皮质检出, OVX 组 DA 含量比假手术组下降。5-HT 与其代谢产物 5-HIAA 呈现相反的变化趋势; 在海马和小脑区, 与假手术组比较, OVX 组 5-HT 含量上升, 而 5-HIAA 含量下降; 在皮质、丘脑和血清中, OVX 组 5-HT 含量较假手术组下降, 而 5-HIAA 含量升高 (见表 1)。

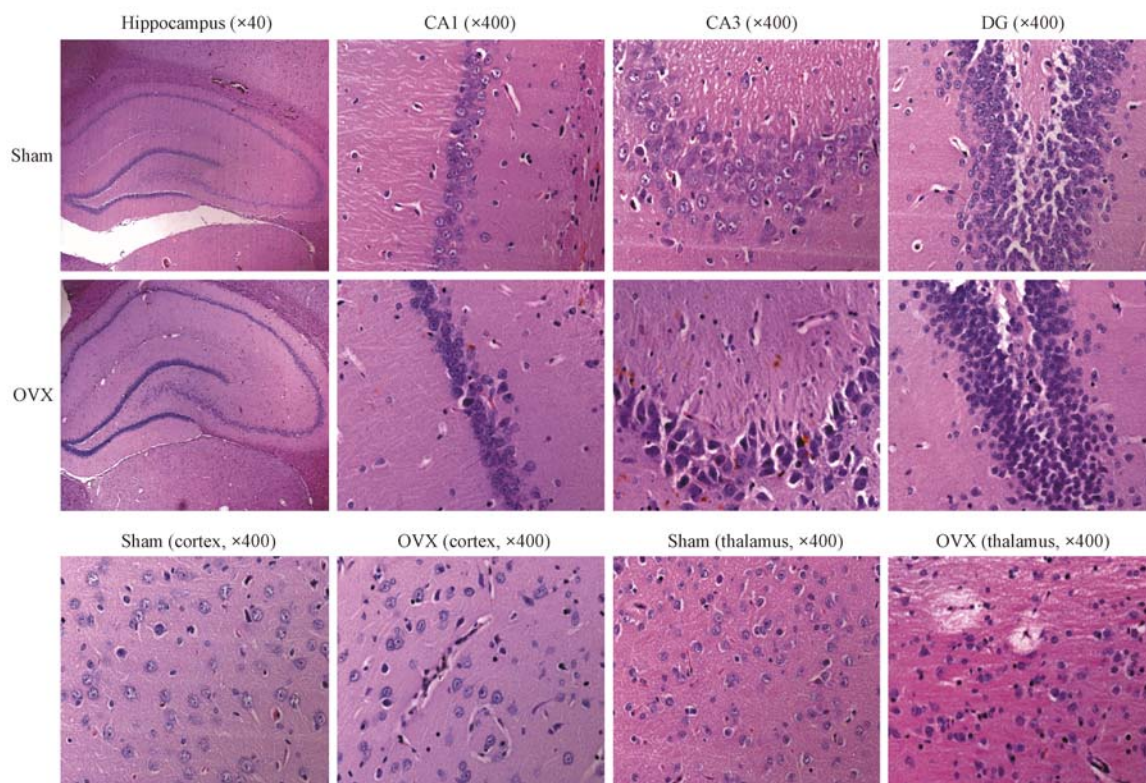


图 1 假手术和去卵巢大鼠脑组织病理形态对照图

Fig. 1 Histopathological observation of the brain tissues of ovariectomized and sham-operated rats.

2.3 线性关系

分别精密吸取浓度为 2、4、10、20、40、80、160、400、800 ng/mL 的 NE、E、DA、5-HT、5-HIAA 和 HVA 系列对照品溶液各 20 μL,注入色谱仪并记录色谱

图,以进样浓度 (ng/mL) 为横坐标,峰面积值为纵坐标,计算出 NE 和 E 线性回归方程、相关系数,结果见表 2。

表 1 去卵巢大鼠不同脑区及血清内神经递质的含量($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Tab. 1 Contents of neurotransmitters in the rat brain regions and serum($\bar{x} \pm s, n = 7$)

部位 Tissues	神经递质 Neurotransmitters	神经递质浓度 (ng/mg 组织, ng/mL 血清) Contents of neurotransmitters (tissue ng/mg, serum ng/mL)		<i>t</i>	<i>P</i>
		假手术组 Sham group	OVX 组 OVX group		
海马 Hippocampus	NE	2. 113 ± 0. 136	1. 731 ± 0. 266	-2. 555	0. 043
	E	0. 602 ± 0. 237	0. 413 ± 0. 137	-1. 353	0. 234
	DA	0	0	-	-
	5-HT	0. 030 ± 0. 006	0. 061 ± 0. 040	1. 565	0. 212
	5-HIAA	1. 604 ± 0. 115	1. 312 ± 0. 099	-3. 501	0. 017
	HVA	0	0	-	-
皮质 Cortex	NE	1. 152 ± 0. 543	0. 843 ± 0. 226	-0. 910	0. 405
	E	0. 722 ± 0. 265	0. 676 ± 0. 260	-0. 250	0. 811
	DA	0. 363 ± 0. 338	0. 248 ± 0. 152	0. 620	0. 558
	5-HT	0. 023 ± 0. 010	0. 016 ± 0. 012	1. 013	0. 350
	5-HIAA	1. 042 ± 0. 252	1. 048 ± 0. 102	-0. 046	0. 965
	HVA	0	0	-	-
丘脑 Thalamus	NE	1. 900 ± 0. 143	1. 512 ± 0. 488	-1. 528	0. 177
	E	0. 241 ± 0. 070	0. 416 ± 0. 159	2. 046	0. 111
	DA	0	0	-	-
	5-HT	0. 054 ± 0. 020	0. 081 ± 0. 021	-1. 954	0. 092
	5-HIAA	2. 531 ± 0. 531	2. 240 ± 0. 528	-0. 821	0. 439
	HVA	0. 058 ± 0. 042	0. 115 ± 0. 038	-2. 106	0. 073
小脑 Cerebellum	NE	1. 310 ± 0. 480	1. 012 ± 0. 283	1. 069	0. 326
	E	0. 296 ± 0. 042	0. 291 ± 0. 003	-0. 204	0. 846
	DA	0	0	-	-
	5-HT	0. 012 ± 0. 002	0. 009 ± 0. 001	2. 289	0. 048
	5-HIAA	0. 352 ± 0. 264	0. 658 ± 0. 125	2. 100	0. 080
	HVA	0	0	-	-
血清 Serum	NE	0. 226 ± 0. 058	0. 220 ± 0. 091	0. 164	0. 873
	E	0. 233 ± 0. 070	0. 065 ± 0. 011	6. 219	0. 001
	DA	0	0	-	-
	5-HT	0	0	-	-
	5-HIAA	0. 267 ± 0. 050	0. 511 ± 0. 075	-6. 965	0. 000
	HVA	0	0	-	-

表 2 6 种神经递质标准曲线回归方程及线性范围

Tab. 2 Regression equations and linear range of standard curves of 6 neurotransmitters

神经递质 Neurotransmitters	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation	线性范围 (μg/mL) Linear range (μg/mL)
去甲肾上腺素 NE	y = 19612783 x + 180484	0. 9999	0. 00625 - 1. 6
肾上腺素 E	y = 56714004 x + 80110	0. 9996	0. 00625 - 0. 8
多巴胺 DA	y = 30616663 x + 437319	0. 9998	0. 015625 - 2. 0
5-羟色胺 5-HT	y = 103935331 x + 74277	0. 9999	0. 00125 - 0. 16
5-羟基吲哚乙酸 HIAA	y = 17807503 x + 104921	0. 9999	0. 015625 - 2. 0
高香草酸 HVA	y = 5283375 x + 15592	0. 9999	0. 048828 - 3. 125

2.4 色谱分离和保留时间

标准液和样品中的神经递质 (NE、E、DA、5-HT、DOPAC、5-HIAA、HAV) 的峰之间分离较好, 保留时

间分别在 9.830、11.154、15.280、16.98、23.276、26.046 min 和 34.211 min 左右, 脑组织匀浆和血清中杂质峰对结果无干扰, 色谱图见图 2 和图 3。

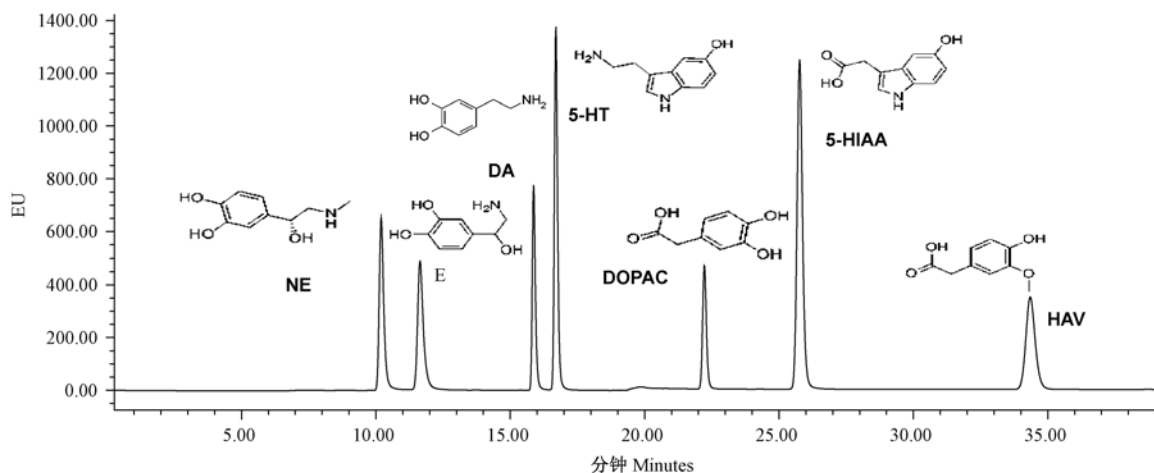


图 2 7 种单胺类神经递质混合标准溶液色谱图

Fig. 2 Chromatograms of the standard mixed solution of 7 monoamine neurotransmitters

3 讨论

大量的研究表明, 雌性大鼠卵巢切除造成的模型能够正确模拟女性雌激素低落引起的综合疾病特征, 是研究绝经后骨质疏松症^[6]、老年痴呆症^[7]、抑郁症^[8]、妇科相关疾病等的优秀模型。将 3 月龄或 6 月龄雌性大鼠卵巢切除后 3 个月, 可检测到 OVX 大鼠血清中雌二醇水平可下降约 22%^[9] 甚至 89%^[10], 提示去卵巢大鼠模型能较好的模拟雌激素水平下降。本文以卵巢功能的退行性改变为中心环节, 研究雌激素不足时脑内与生殖相关的神经回路的变化^[11], 揭示女性生殖内分泌功能失调时, 脑内神经元细胞出现死亡, 直接或间接地影响携带的神经内分泌调节的信息传导至下丘脑, 可导致 GnRH 细胞上转导异常内分泌信号^[12], 使其与认知功能相关的神经回路中断, 加速脑部衰老的进程。参与神经内分泌信号传导的物质包括单胺氧化酶、神经肽和神经递质。神经递质包括去甲肾上腺素 (NE)、肾上腺素 (E)、多巴胺 (DA)、5-羟色胺 (5-HT)、5-羟吲哚乙酸 (5-HIAA) 和高香草酸 (HVA) 等, 是调节神经中枢生理活动的重要物质。测定脑组织中神经递质的含量, 可为多种疾病的诊断和治疗以及精神疾病的机制研究提供依据。

NE、E 参与学习记忆、觉醒和睡眠、精神活动、心脑血管活动等的调节, 与人类的行为有密切关系, 是参与老年性痴呆发病的重要神经递质。DA 除了具

有运动控制功能外, 还参与调节情感思维、神经内分泌等, DA 功能的失活将导致抑郁症的发病^[13]; 5-HT 在人类情绪、认知等方面也起着重要作用。肖爱娇等^[14] 研究发现, 抑郁症模型大鼠血清雌二醇水平下降, 海马 5-HT 及 5-HIAA 含量减少, 不仅支持了抑郁症发病的 5-HT 功能降低假说, 还提示雌激素水平与海马 5-HT 之间可能存在作用链。本研究显示, 与假手术组相比, OVX 组大鼠海马中 NE 及 5-HT 代谢产物 5-HIAA 均明显下降, 提示该去卵巢大鼠中枢 NE 和 5-HT 功能下降, 可作为老年性痴呆或抑郁症模型进行药物筛选研究。单胺氧化酶是催化 5-HT 生成 5-HIAA 的关键酶, 本实验发现外周血清 5-HIAA 明显升高, 与中枢 5-HIAA 变化相反, 可能与单胺氧化酶在中枢和外周的活性程度不同有关。

通过比较正常大鼠和去卵巢大鼠脑内主要神经信息分子的种类和含量, 结果与范红霞等^[15] 报道的较一致, 提示该模型可作为以卵巢功能的退行性改变为中心的更年期综合征模型, 进而研究该病产生的一系列综合症候群。因神经功能紊乱是更年期综合征的主要表现, 神经递质的变化能够更好的成为探讨更年期综合征发病的机理。

OVX 模型病理切片的研究表明海马 CA1 区神经元损伤严重, 锥体细胞排列凌乱, 丘脑区有明显地神经元凋亡迹象, 出现大量的神经元坏死。该区单胺类神经递质减少, 相应受体的敏感性改变, 递质系统间失衡。神经内分泌不足会导致神经系统的退化

性疾病,能够较好的模拟如老年性痴呆等具有女性发病倾向的疾病。同时,由于该模型具有简单易行

的特点,既可预防给药,也可治疗给药,尤其适合复方多靶点的新药研发。

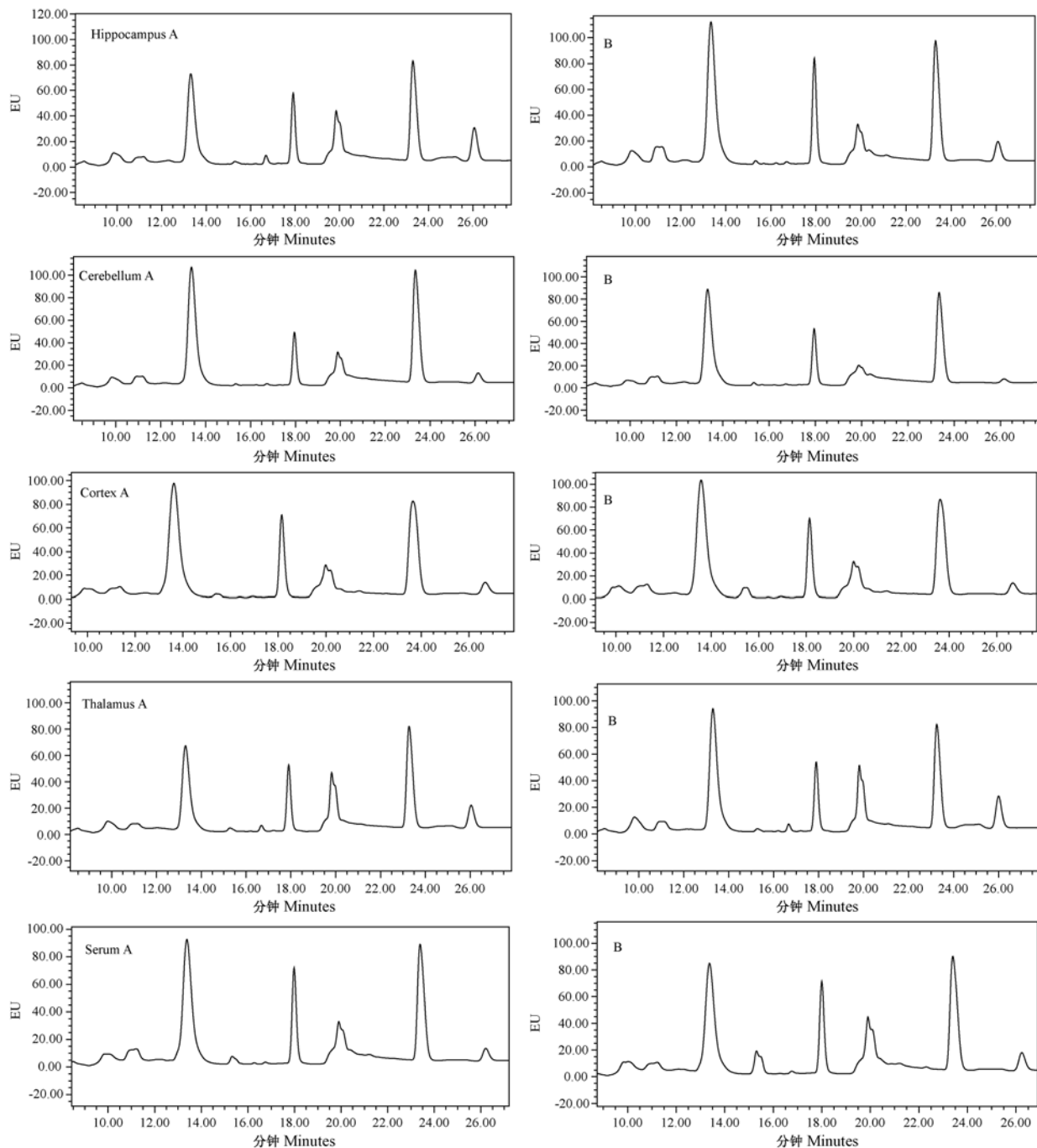


图3 大鼠脑组织匀浆及血清样品色谱图

注:A.假手术组,B.OVX组

Fig. 3 Chromatograms of the rat brain homogenate and serum samples.

A. Sham-operated group; B. Ovariectomized group.

参考文献

- [1] Singh M, Meyer EM, Millard WJ, et al. Ovarian steroid deprivation results in a reversible learning impairment and compromised cholinergic function in female SD rats [J]. Brain Res, 1994, 644: 305-312.
- [2] 田方泽, 畅洪昇, 周静洋, 等. 去卵巢所致老年痴呆模型的研究探讨 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16 (06): 1406-1410.
- [3] Greendale GA, Huang MH, Wight RG, et al. Effects of the menopause transition and hormone use on cognitive performance

- in midlife women [J]. *Neurology*, 2009, 72 (21): 1850 - 1857.
- [4] 姜迎. 情志因素对去卵巢大鼠脑神经递质、内分泌的影响及中药的干预作用 [D]. 广州中医药大学, 2011.
- [5] 赵燕燕, 刘丽艳, 韩媛媛, 等. 高效液相色谱-荧光检测法同时测定大鼠不同脑区中的 8 种单胺类神经递质 [J]. *色谱*, 2011, 29(2): 146 - 151.
- [6] 谢肇, 李起鸿, 孟萍, 等. 去卵巢大鼠骨质疏松模型的特点 [J]. *中国临床康复*, 2006, 10(28): 79 - 81.
- [7] Zhang X, Wang J, Xing Y, et al. Effects of ginsenoside rg1 or 17beta-estradiol on a cognitively impaired, ovariectomized rat model of Alzheimer's disease [J]. *Neuroscience*, 2012, 220: 191 - 200.
- [8] Huang H, Zhao J, Jiang L, et al. Paeoniflorin improves menopause depression in ovariectomized rats under chronic unpredictable mild stress [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(4): 5103 - 5111.
- [9] 张永忠, 余龙江, 敖明章. 玛咖醇提取物对去卵巢大鼠内分泌激素及血脂水平的影响 [J]. *中国新药杂志*, 2008, 17(24): 2112 - 2114, 2121.
- [10] 李海, 陈建海, 王金花, 等. 山茶籽对去卵巢大鼠子宫和相关激素水平的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(19): 4783 - 4785.
- [11] 陈多, 张冉, 吴春福, 等. 雌激素改善学习记忆的机制 [J]. *分子科学学报*, 2002, 18(4): 230 - 234.
- [12] 管枫, 马淑兰, 陈伯英. 电针对去卵巢大鼠下丘脑神经内分泌信号传导的影响 [J]. *中西医结合学报*, 2009, 7(6): 563 - 568.
- [13] 汪涛, 秦锋. 逍遥散对产后抑郁大鼠海马中单胺类神经递质含量的影响 [J]. *中西医结合学报*, 2010, 8(11): 1075 - 1079.
- [14] 肖爱娇, 闵建新, 王莉, 等. 抑郁症模型大鼠血清雌激素水平与海马 5-HT 含量之间的关系 [J]. *天津医药*, 2009, 37(11): 944 - 947, 993.
- [15] 范红霞, 林琼霞. 补肾健脾方对去卵巢大鼠脑组织中单胺类神经递质含量的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2008, 26(3): 632 - 633.

[收稿日期] 2015-11-04

科技工作者科学道德规范(三)

学术道德规范

第五条 进行学术研究应检索相关文献或了解相关研究成果,在发表论文或以其他方式报告科研成果中引用他人论点时必须尊重知识产权,如实标出。

第六条 尊重研究对象(包括人类和非人类研究对象)。在涉及人体的研究中,必须保护受试人合法权益和个人隐私并保障知情同意权。

第七条 在课题申报、项目设计、数据资料的采集与分析、公布科研成果,确认科研工作参与人员的贡献等方面,遵守诚实客观原则。对已发表研究成果中出现的错误和失误,应以适当的方式予以公开和承认。

第八条 诚实严谨地与他人合作。耐心诚恳地对待学术批评和质疑。

第九条 公开研究成果、统计数据等,必须实事求是、完整准确。

第十条 搜集、发表数据要确保有效性和准确性,保证实验记录和数据完整、真实和安全,以备考查。

第十一条 对研究成果做出实质性贡献的专业人员拥有著作权。仅对研究项目进行过一般性管理或辅助工作者,不享有著作权。

第十二条 合作完成成果,应按照对研究成果的贡献大小的顺序署名(有署名惯例或约定的除外)。署名人应对本人作出贡献的部分负责,发表前应由本人审阅并署名。

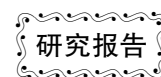
第十三条 科研新成果在学术期刊或学术会议上发表前(有合同限制的除外),不应先向媒体或公众发布。

第十四条 不得利用科研活动谋取不正当利益。正确对待科研活动中存在的直接、间接或潜在的利益关系。

第十五条 科技工作者有义务负责任地普及科学技术知识,传播科学思想、科学方法。反对捏造与事实不符的科技事件,及对科技事件进行新闻炒作。

第十六条 抵制一切违反科学道德的研究活动。如发现该工作存在弊端或危害,应自觉暂缓或调整、甚至终止,并向该研究的主管部门通告。

第十七条 在研究生和青年研究人员的培养中,应传授科学道德准则和行为规范。选拔学术带头人和有关科技人才,应将科学道德与学风作为重要依据之一。



复合刺激创伤后应激障碍模型大鼠 重要脑区的病理变化

陈旺^{1,2}, 李陈成^{1,2}, 李森², 冯东亮³, 洪有建^{1,2}, 南伟³, 江龙^{1,2}, 黄显凯^{1*}, 伍亚民²

- (1. 第三军医大学大坪医院 野战外科研究所创伤外科, 重庆 400042;
2. 第三军医大学大坪医院 野战外科研究所第三研究室, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042;
3. 兰州大学第二临床医学院骨科, 兰州 730030)

【摘要】 目的 研究复合刺激创伤后应激障碍(PTSD)模型大鼠重要脑区的病理变化。**方法** 成年SD雌性大鼠20只,随机分为正常组、模型组,每组10只。模型组按复合刺激方法建立PTSD大鼠模型,4周后对两组大鼠行高架十字迷宫和Morris水迷宫检测;行为检测结束后对大鼠大脑皮层和海马CA1、CA2、CA3区和齿状回进行HE染色和Nissl染色,观察其病理变化特点。**结果** 正常组大脑皮层和海马各区细胞形态规则、分布均匀,核仁及边界清晰,胞质尼氏体丰富,无明显神经元变性坏死;模型组大脑皮层细胞形态较规则、分布均匀,无明显病理改变;海马CA1、CA3区细胞形态不规则,排列紊乱,细胞间隙增大,细胞数量减少,有较多空泡样细胞病变,CA3区更为明显;CA2区细胞排列较规则,分布较均匀;齿状回可见部分细胞排列疏松、细胞间隙增大、尼氏体数量减少。**结论** PTSD模型大鼠海马CA1、CA3区和齿状回均有不同程度的病理改变,为探讨PTSD患者的病理机制提供了实验依据。

【关键词】 创伤后应激障碍;大脑皮层;海马;病理学;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0087-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.016

Pathological changes in some important brain areas of rats with post-traumatic stress disorder induced by combined stress

CHEN Wang¹, LI Chen-cheng¹, LI Sen², FENG Dong-liang², HONG You-jian¹, NAN Wei²,
JIANG Long¹, HUANG Xian-kai^{1*}, WU Ya-min¹

- (1. Department of Traumatology, Research Institute of Surgery/Daping Hospital,
2. Third Department of Research Institute of Surgery/Daping Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China;
3. Department of Orthopedics, the Second Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730030)

【Abstract】 Objective To study the pathological changes in some important brain areas of rats with post-traumatic stress disorder (PTSD) induced by combined stress. **Methods** Twenty healthy adult female SD rats were randomly divided into normal group and model group, with 10 rats in each group. The PTSD model was established by combined stress. After 4 weeks, the rat behaviors of the two groups were tested by elevated plus maze and Morris water maze. After the test, samples of the cerebral cortex, areas of CA1, CA2, CA3 and hippocampal dentate gyrus were taken for pathological examination using HE and Nissl staining. **Results** In the normal group, the cell morphology and distribution were regular and the cell nucleoli were clear in the cerebral cortex and hippocampus, cytoplasmic Nissl bodies were abundant, and there were no

[基金项目] 全军医药卫生科研基金(08G096)。

[作者简介] 陈旺(1989-),男,硕士研究生,研究方向:PTSD的防治。E-mail: 453777442@qq.com

[通讯作者] 黄显凯,主任医师、教授、博士、硕士生导师,研究方向:严重创伤救治。E-mail: hxkai123@sina.com

obvious neuronal degeneration and necrosis. In the model group, the cell morphology and distribution in the CA1 and CA3 areas were irregular, with increased cell gaps, and in addition, there were some pathological changes of physaliferous cells, especially in the CA3 area. The cell morphology and distribution in the CA2 area were regular. In the dentate gyrus, some cells arranged loosely, the cell gap was widened, and the amount of Nissl bodies was decreased. **Conclusions** There are some pathological changes in the hippocampal CA1, CA3 and dentate gyrus in rat models of post-traumatic stress disorder, and they will provide an experimental basis for studying the pathological mechanism of PTSD patients.

【Key words】 Post-traumatic stress disorder; Cerebral cortex; Hippocampus; Pathology; Rats

Corresponding author: HUANG Xian-kai, E-mail: hxkai123@sina.com

复合刺激(combined stress, CS)模型是一种新的创伤后应激障碍(post-traumatic stress disorder, PTSD)动物模型,与经典的连续单一应激模型(single-prolonged stress, SPS)比较:前者在禁锢时给予不可逃避的电刺激,能更好的模拟现实环境中多种应激因素的作用,且在强迫游泳后省去了乙醚麻醉的步骤,避免了乙醚对大脑的直接影响。因此,CS模型在造模方法上能更好模拟人类发生 PTSD 的状况。目前有报道 PTSD 患者可能存在重要脑区的实质性损害,但尚存争议,并没有 PTSD 患者大脑的直接病理学证据。但这种模型大鼠重要脑区是否存在病理改变也不确定,相关研究的报道很少。为此,本实验重点观察 CS 模型大鼠重要脑区的病理变化特点,为研究 PTSD 的病理机制提供实验证据。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 雌性大鼠 20 只,体重 190 ~ 200 g,购于第三军医大学大坪医院实验动物中心【SCXK(渝)2012-0005】。实验在第三军医大学大坪医院野战外科研究所【SYXK(军)2012-0037】进行,环境为室温(20 ± 2)℃,湿度(55 ~ 60)%,动物分笼饲养,自由进食水。将 20 只大鼠随机分为正常组和模型组,每组 10 只,适应性喂养一周后开始实验。本研究得到第三军医大学动物管理委员会批准(SYXK-PLA-20120031),实验设计和操作均按减少动物使用数量和减轻动物受伤害的原则进行。

1.1.2 主要仪器及试剂

高架十字迷宫(垂直方向为开臂 $\times$ 50 cm,水平方向为闭臂 $\times$ 50 cm,中央为 10 cm $\times$ 10 cm 正方形区域),水迷宫(直径 135 cm,高 80 cm 的圆柱形水池),Smart 行为轨迹分析系统(San Diego Instrument,美国),DCR-TRV318 红外摄像机(Sony 公司,

日本),大鼠玻璃禁锢器,HE 染色试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司),尼氏染液(南京建成生物工程研究所有限公司)。

1.2 PTSD 动物模型的建立

采用赵中兴^[1]所用的复合刺激(CS)模型,方法如下:用玻璃禁锢器将大鼠禁锢 2 h,期间给予大鼠足部电击(4 mA, 60 V)持续 2 s,电击间隔时间为 30 ~ 120 s,禁锢结束后将大鼠取出进行力竭式游泳(大鼠放弃挣扎沉入水底 10 s 视为力竭),造模结束后将大鼠放回原笼内喂养,喂养条件不变。

1.3 行为学检测

1.3.1 高架十字迷宫

将大鼠放入迷宫中央使其头正对其中一个开臂,同时 Smart 软件记录大鼠在 5 min 内进入开臂和闭臂次数总和以及在闭臂停留时间百分比,以此来反映大鼠的焦虑性。每只大鼠实验完毕后均需清理迷宫内的粪便和尿液,并用 75% 酒精擦拭迷宫,防止对下一只大鼠行为检测产生影响。

1.3.2 水迷宫

将水迷宫的四个象限定义为东(E)、南(S)、西(W)、北(N)四个象限,于各自象限的池臂上放置四种不同颜色的标记物,作为大鼠的视觉参照。将平台(40 cm 高)放入水迷宫的西南象限,水池内注入自来水至水深超过平台 2 cm,为防止大鼠看见水下平台将墨汁倒入水池内,调节水温在 22 ~ 25℃ 之间。

1.3.3 定位航行实验

历时 4 d,每只大鼠每天训练 4 次,第 1 天按 E $\rightarrow$ S $\rightarrow$ W $\rightarrow$ N 的顺序将大鼠沿池壁头朝上轻轻放入水中,同时 Smart 软件记录大鼠的行为轨迹,若大鼠找到水下平台则记录自动终止,若大鼠在 1 min 内仍未找到水下平台,则人为诱导其找到平台并在平台上休息 20 s。每只大鼠训练完后均需清理水池内的粪便。第 2 天按 S $\rightarrow$ W $\rightarrow$ N $\rightarrow$ E 的顺序开始训练,以此类推。

1.3.4 空间探索实验

训练结束后的第 2 天,取走水下平台,将大鼠沿原平台所在象限的对侧象限放入水池内,同时 Smart 软件记录大鼠在 1 min 内的行为轨迹,每只大鼠实验完后均需清理水池内的粪便。通过分析大鼠在 1 min 内穿越平台次数和在靶象限停留时间来反映大鼠的空间记忆能力。

1.4 HE 染色和 Nissl 染色

大鼠行为检测结束后,用 1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉两组大鼠。麻醉起效后,仰卧固定,立即剖开胸腔暴露心脏,剪开右心耳,在左心室剪开一个小口,仅容灌注针头进入,针头经切口进入左心室到达升主动脉,灌注生理盐水直至右心耳流出无色液体,然后以 4% 多聚甲醛灌注直至灌注液进入大鼠大脑,抽动完全停止,全身组织变硬后方可取脑。将取出的脑组织在 4% 多聚甲醛中固定 2 d,随后冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片(HE 染色 5 μm , 尼氏染色 10 μm)、染色。分别对两组大鼠的大脑皮层和海马 CA1、CA2、CA3 区和齿状回进行 HE 染色和 Nissl

染色,显微镜在 200 倍下观察其病理变化特点。

1.5 统计学方法

数据统计采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计软件进行数据分析,两组间数据的比较采用独立样本 t 检验,检验水准 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 高架十字迷宫

与正常组比较,模型组大鼠进入开臂和闭臂次数,闭臂停留时间百分比均增多,差异有显著统计学意义($P < 0.01$),提示模型组大鼠活动性减少,焦虑性增加(见表 1、图 1)。

2.2 水迷宫

与正常组比较,模型组大鼠穿越平台次数和靶象限停留时间百分比均减少,差异有显著性($P < 0.01$),提示模型组大鼠空间记忆能力受损(见表 2、图 2)。

表 1 高架十字迷宫的比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 Comparison of the results of elevated plus maze test

组别 Groups	进入开臂和闭臂次数 Numbers of entering into open arms and closed arms	闭臂停留时间百分比 Percentage of residence time in closed arms
正常组 Control group	12.80 $\pm$ 2.78	64.75 $\pm$ 8.81
模型组 Model group	9.20 $\pm$ 1.40 *	76.00 $\pm$ 9.93 *

注:与正常组相比,* $P < 0.01$ 。

Note. * $P < 0.01$, vs. the control group.

表 2 Morris 水迷宫空间探索实验的比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 2 Comparison of space exploration test in the Morris water maze

组别 Groups	穿越平台次数 Numbers of platform crossing	靶象限停留时间百分比 Percentage of residence time in target zone
正常组 Control group	3.10 $\pm$ 1.19	36.33 $\pm$ 3.25
模型组 Model group	1.50 $\pm$ 0.85 *	28.46 $\pm$ 3.69 *

注:与正常组相比,* $P < 0.01$ 。

Note. * $P < 0.01$, vs. the control group.

2.3 重要脑区病理染色

两组大鼠大脑皮层,海马 CA1、CA2、CA3 区和齿状回 HE 染色和 Nissl 染色结果如下:正常组大脑皮层和海马各区细胞形态规则、分布均匀、排列紧密,核仁及边界清晰,胞质尼氏体丰富,无明显神经元变性坏死;模型组大鼠大脑皮层细胞形态较规则、分布均匀,无明显病理改变;但模型组大鼠海马细胞结构层变薄,CA1、CA3 区椎体细胞形态不规则,排列紊乱,细胞间隙增大,细胞数量减少,有较多空泡样细胞病变,CA3 区更为明显;CA2 区细胞排列较规则,分布较均匀;齿状回可见部分细胞排列疏松、细胞间隙增

大,尼氏体数量减少(见图 3)。

3 讨论

PTSD 是延迟出现和长期存在的精神障碍,其核心症状表现为再体验、高警觉和回避^[2]。当今社会,自然灾害、战争、恐怖袭击、重大交通事故等频繁发生,使 PTSD 的患病率持续升高。研究发现,8%~9% 的人在一生中的某些时候会遭遇比较强烈的应激事件,最终有可能发展成 PTSD^[3,4]。PTSD 由于其病程长、治疗困难、预后不佳,已成为社会的沉重负担,受到越来越多的重视。

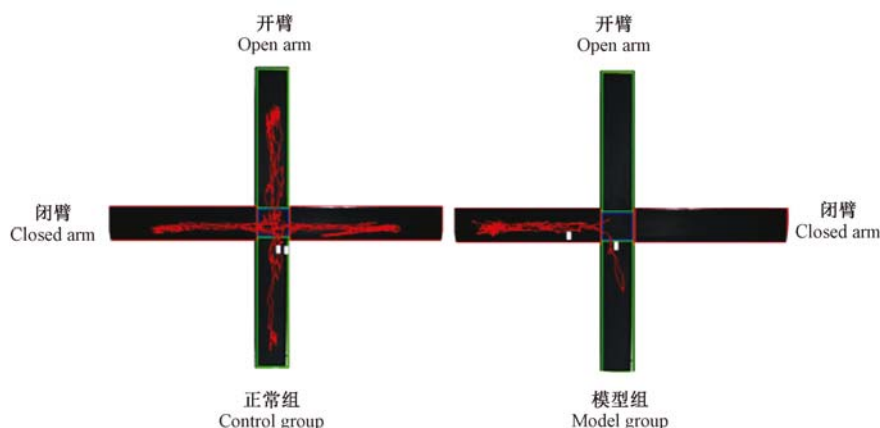


图 1 大鼠高架十字迷宫 5 min 的行为轨迹

Fig. 1 The behavior trace of rats tested by elevated plus maze for 5 minutes

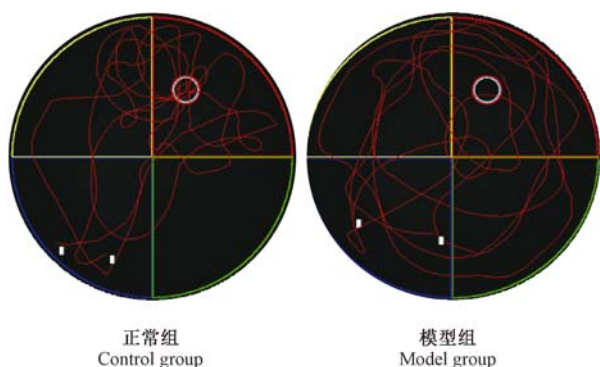


图 2 大鼠空间探索实验 1 min 的行为轨迹

Fig. 2 The behavior trace of rats on space exploration test for one minute.

目前国内外对 PTSD 发生机制的研究已引起广泛关注, fMRI 等影像学检测提示 PTSD 患者可能有重要脑区的损害, 但尚存争议。因此, 通过动物实验来模拟、探索 PTSD 发生的特点、机制十分必要。在本模型中, CS 大鼠能很好复制出 PTSD 样行为表现, 通过对其重要脑区的病理进行直接观察, 发现 CS 模型大鼠 HE 染色后海马 CA1 和 CA3 区呈现出一定的病理改变, 可见细胞排列紊乱, 部分细胞核碎裂、溶解, 空泡细胞形成。尼氏小体与神经元的功能密切相关, 当神经元变性时, 尼氏小体会变小甚至消失, 尼氏小体的数量直接反映了神经元内的蛋白合成功能^[11]。CS 模型大鼠 Nissl 染色后可见 CA1 和 CA3 区的尼氏小体排列紊乱、数量明显减少、颜色变浅, CA3 区更为明显。另外, 齿状回的某些区域也出现了尼氏小体排列疏松、数量减少的现象。

海马是大脑边缘系统的一部分, 其最显著的特点是神经元紧密排列, 使其结构层次分明、边界清晰, 因此在 PTSD 脑结构的研究中得到了最多的关注。海

马的主要结构有三层, 即多形层、椎体层和分子层, 齿状回则主要分为多形层、颗粒层和分子层。海马各个区域的细胞类型也是不同的: CA1 区的椎体细胞比较小, CA3 区的椎体细胞较大, A2 区介于 CA1 区和 CA3 区之间, 由大小不等的椎体细胞组成。

海马有很多重要的生理功能, 它影响着躯体活动和行为、内分泌功能的调节、自主神经功能以及学习记忆。海马在动物的学习和记忆中发挥着重要作用, 尤其是 CA3 区, 对空间记忆的辨别至关重要^[5]。研究发现, 当海马受到损伤后将影响短时记忆向长时记忆的转化^[6]。海马对应激非常敏感, 极易受到应激的损伤。研究发现, 适当的应激有利于学习记忆的改善, 对大脑退化有积极的防治作用^[7]; 而强烈的应激事件则会损害其学习记忆功能^[8]。海马长时程增强 (LTP) 是学习记忆的神经学基础, Sousa 等^[9]认为应激能抑制 CA1 区和齿状回诱发 LTP, 而 Kadar 等^[10]则认为应激能抑制 CA3 区和齿状回诱发 LTP。

综上所述, CS 模型大鼠海马的不同区域均发生了不同程度的病理改变, 海马 CA1、CA3、齿状回等区受损明显, 导致较多神经元的变性坏死, 这在一定程度上可以解释其在进行高架十字迷宫和水迷宫时的行为表现。本实验结果提示: PTSD 模型大鼠同样存在重要脑区的病理性损害, 为探讨 PTSD 患者的发病机制提供了重要的实验依据。但此模型对大脑产生的应激损伤可能不仅仅在于海马, PTSD 影响的另外一个重要脑区是杏仁核, 但由于其体积太小、位置隐匿, 在研究中有一定的困难, 本次实验尚未对其进行观察, CS 模型大鼠杏仁核是否存在病理损害有待以后深入研究。

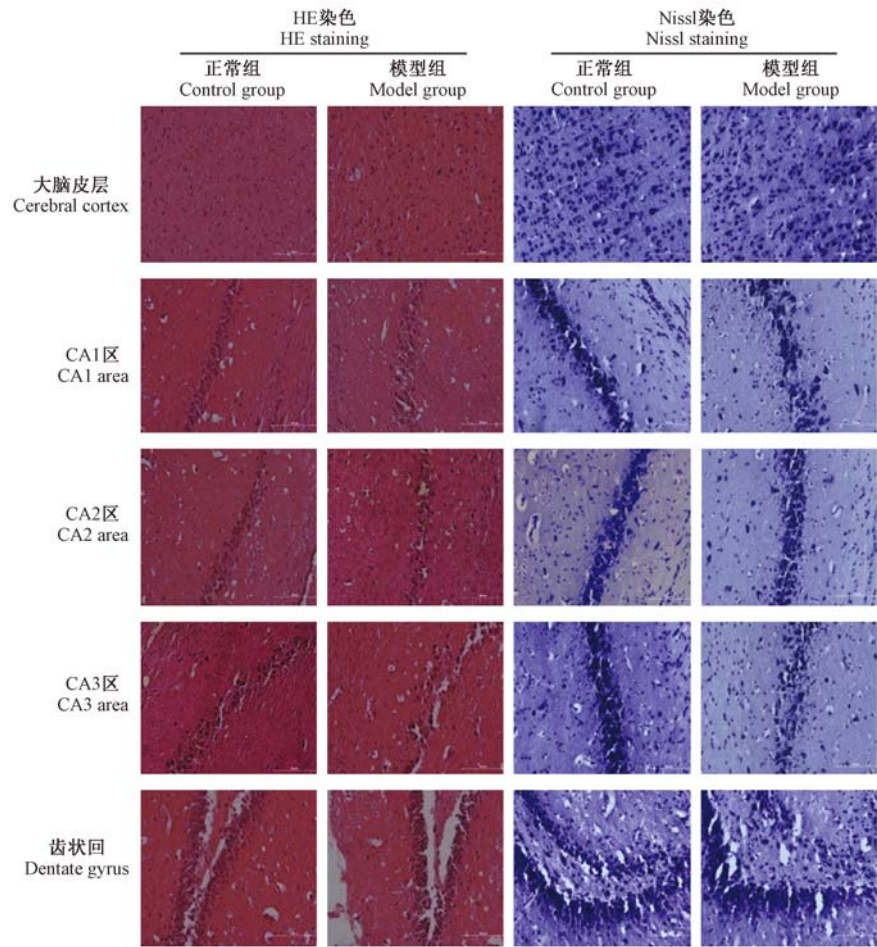


图 3 大鼠重要脑区的组织学改变(HE 与 Nissl 染色, ×200)

Fig.3 Histological changes in the brain areas of rats. HE and Nissl staining. ×200

参 考 文 献

[1] 赵中兴, 伍亚民. 一种新的大鼠创伤后应激障碍模型的建立及其行为学检测 [J]. 第三军医大学学报, 2012, 34 (10): 928 - 932.

[2] Liberzon I, Sripada CS. The functional neuroanatomy of PTSD: a critical review [J]. Progr Brain Res, 2008, 167: 151 - 169.

[3] Hidalgo R, Davidson J. Posttraumatic stress disorder: epidemiology and health-related considerations [J]. J Clin Psychiatry, 2000, 61 (suppl 7): 5 - 13.

[4] Yule W. Posttraumatic stress disorder in the general population and in children [J]. J Clin Psychiatry, 2001, 62 (suppl 17): 23 - 28.

[5] 库宝善. 加压素与学习记忆 [J]. 生理科学进展, 1981, 12 (1): 79.

[6] Rauch SL, Shin LM, Segal E, et al. Selectively reduced regional cortical volumes in post-traumatic stress disorder [J]. Neuroreport, 2003, 14 (7): 913 - 916.

[7] Fordyce DE, Wehner JM. Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice [J]. Brain Res, 1993, 619: 111 - 119.

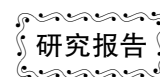
[8] Quervain DJD, Roozendaal B, Mcgaugh JL. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory [J]. Nature Int Weekly J Sci, 1998, 394 (6695): 787 - 790.

[9] Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, et al. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement [J]. Neuroscience, 2000, 97 (2): 253 - 266.

[10] Kadar T, Dachir S, Shukitt-Hale B, et al. Sub-regional hippocampal vulnerability in various animal models leading to cognitive dysfunction [J]. J Neural Transm, 1998, 105 (8 - 9): 987 - 1004.

[11] 郭以河, 赵梅兰, 彭瑞云, 等. 尼氏小体染色方法的改进及其在神经病理学研究中的应用 [J]. 实用医技杂志, 2003, 10 (6): 605 - 606.

[收稿日期] 2015-08-06



两品系豚鼠屈光状态和眼球径的发展和比较

卫振¹, 张森², 蒋丽琴², 陈雁虹¹, 吴凯¹, 谢敏¹, 刘迪文^{1*}, 谢强敏¹

(1. 浙江大学实验动物中心, 杭州 310058; 2. 温州医科大学, 温州 325035)

【摘要】 目的 了解断奶后 Zmu-1:DHP 和 DHP 两个品系豚鼠屈光状态和眼球径的发展规律。**方法** 首先进行 3 周龄两品系豚鼠屈光检测, 然后选择 Zmu-1:DHP 品系豚鼠 12 只, DHP 品系 8 只, 按品系分成两组。在 4 ~ 12 周龄, 每隔一周检测屈光度、眼轴长和角膜曲率等参数。**结果** 3 周龄, 327 只 Zmu-1:DHP 品系豚鼠, 屈光度为 -5.19 ± 3.92 D, 近视率达 85.1%; 而 117 只 DHP 品系豚鼠屈光度为 2.13 ± 4.40 D, 近视率仅为 22.6%。4 ~ 12 周龄, Zmu-1:DHP 品系豚鼠近视不断加深, 屈光参差 >1.5 D; DHP 品系豚鼠屈光发育稳定。*t*-检验, Zmu-1:DHP 品系豚鼠眼轴长度、玻璃体腔深度显著高于 DHP 品系, 视力低于 DHP 品系。多因素方差分析, Zmu-1:DHP 品系豚鼠散光随时间变化显著 ($P < 0.01$), 而 DHP 品系不显著 ($P = 0.07$)。相关性分析, Zmu-1:DHP 品系豚鼠屈光状态与眼轴长相关系数为 -0.79 ($P < 0.01$)、与玻璃体腔深度相关系数为 -0.75 ($P < 0.01$); 而 DHP 品系相应相关系数为 -0.19 ($P = 0.09$) 和 -0.34 ($P < 0.01$)。**结论** Zmu-1:DHP 品系豚鼠近视高发, 正视化过程难以完成, 其近视与眼轴长度和玻璃体腔深度高度相关。

【关键词】 豚鼠; 近视; 屈光; 眼轴长; 角膜曲率

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0092-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.016

Comparison of the refractive development and ocular growth between two strains of guinea pigs

WEI Zhen¹, ZHANG Sen², JIANG Li-qin², CHEN Yan-hong¹, WU Kai¹, XIE Min¹, LIU Di-wen^{1*}, XIE Qiang-min¹

(1. Laboratory Animal Center of Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2. Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035)

【Abstract】 Object To compare the refractive development and axial eye growth between Zmu-1:DHP and DHP guinea pig strains after weaning. **Methods** After screening of the refractive status of two strains of guinea pigs at 3 weeks of age, twelve Zmu-1:DHP guinea pigs and eight DHP guinea pigs were chosen. Each group underwent a series of ocular measurements at five time-points (4, 6, 8, 10 and 12 weeks), including refraction, axial length, corneal curvature and other ocular parameters. **Results** The refraction of 3-week old Zmu-1:DHP strain ($n = 327$) was -5.19 ± 3.92 D with a myopic rate of 85.1%. While the refraction of DHP strain guinea pigs ($n = 117$) was 2.13 ± 4.40 D with a myopic rate of 22.6%. From 4 to 12 weeks of age, the guinea pigs of Zmu-1:DHP strain developed toward more myopic, their anisometropia was larger than 1.5 D. The DHP strain had a stable refractive state. The Zmu-1:DHP guinea pig strain had larger axial length and vitreous thickness than strain DHP (*t*-test; $P < 0.01$), and the DHP guinea pig strain had better vision ($P < 0.01$). Astigmatism of Zmu-1:DHP strain guinea pigs changed significantly from 4 to 12 weeks (ANOVA; $P < 0.01$), while DHP strain did not (ANOVA; $P = 0.07$). In the Zmu-1:DHP strain, the refractive status had significant correlation with axial length ($r = -0.785$, $P < 0.01$) and vitreous chamber depth ($r = -0.754$, $P < 0.01$). In the DHP strain, the correlation coefficients were -0.19 ($P = 0.089$) and -0.34 ($P < 0.01$). **Conclusions** Zmu-1:DHP strain guinea pigs have a higher rate of spontaneous myopia than DHP strain. The emmetropization is disrupted. This myopia is highly correla-

[基金项目] 浙江省公益性技术应用研究计划(2012C37085), 浙江省医药卫生科技计划(2014KYB074)。

[作者简介] 卫振(1982-), 男, 硕士。研究方向, 实验动物模型与动物实验。Email: mudi001@126.com。

[通讯作者] 刘迪文, 研究员。研究方向, 实验动物学。Email: liudiwen2004@163.com。

ted with axial length and vitreous chamber depth.

【Key words】 Guinea pig; Myopia; Refraction; Axial length; Corneal curvature

Corresponding author: LIU Di-wen, E-mail: liudiwen2004@163.com

豚鼠是进行近视研究常用的实验动物。相对于鸡、小鼠和灵长类,豚鼠有性情温顺、价格低,容易进行屈光状态和眼球径测定等优点。离焦诱导(lens-induced)^[1]、形觉剥夺(form-deprivation)^[2,3]和光线诱导^[4,5]等近视造模方法在豚鼠上的应用日趋成熟。豚鼠基因组草图也已经完成(<http://genome.ucsc.edu/index.html>),为基因方面的研究提供了方便的平台。目前,针对不同豚鼠品系屈光性状进行比较,对不同模型进行评估的研究还很有限。Zmu-1;DHP 是浙江大学实验动物中心经过 20 多年近交选育的豚鼠品系,我们在实验中发现,相对于其他品系,该品系自发性近视高发^[6,7]。为了解 Zmu-1;DHP 豚鼠品系的屈光发展规律,本文选择 Zmu-1;DHP 和 DHP 两个豚鼠品系互为对照,对断奶后两个豚鼠品系的屈光状态和眼球径进行测定和分析。从而,为豚鼠近视模型的建立和相关研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 Zmu-1;DHP 和 DHP 豚鼠,3 周龄,体重 140–180 g,购自浙江大学实验动物中心[SCXK(浙)2012–0052],动物实验内容及操作均获浙江大学动物实验伦理委员会审批许可[ZJU2015–496–04],在浙江大学实验动物中心清洁级屏障实验设施中进行[SYXK(浙)2012–0178]。

1.2 主要仪器

红外偏心摄影验光仪(eccentric infrared photoretinoscope, EIR),实验室自行搭建;角膜曲率计(OM. 4, Topcon, Japan),实验室改良^[8];A 超测定仪(AVISO Echograph Class I-Type Bat, Quantel Medical, Clermont-Ferrand, France);条栅视力计,实验室自主研制^[9]。

1.3 实验方法

1.3.1 屈光度测定

在暗室中,将豚鼠置于检测台上,待测眼对准验光仪的光源。调整豚鼠位置使 Purkinje 影像位于瞳孔中央,待瞳孔和屈光状态稳定时,记录屈光值。连续测量三次,取平均值。

1.3.2 眼轴长、前房深度、晶体厚度和玻璃体腔深度测定

豚鼠眼睛滴入一滴 0.5% 盐酸丙美卡因(Alcon, Puurs, Belgium),使用 A 超探头测量眼轴长等性状。设置超声在眼球内不同介质的传播速度,前房 1557.5 m/s,晶状体 1723.3 m/s,玻璃体 1540 m/s。每眼重复测量 10 次,取平均值。

1.3.3 曲率测定

一人固定豚鼠,另一人操作改良角膜曲率计,使光标清晰,并且呈正圆形,然后调整曲率计进行读数。每只眼连续测量 3 次,记录水平和垂直 2 条子午线的度数,测量时间控制在 5 min 之内^[8]。

1.3.4 视力测定

将豚鼠放于条栅视力计转鼓中央的台上,通过豚鼠视动反应来测量其条栅视力^[9]。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件,品系、眼别、周龄等因素对屈光性状的影响采用多因素方差分析,多重比较使用 Post Hoc,两组间比较采用 *t*-test,相关性分析采用 correlation analysis。

2 结果

2.1 两个品系豚鼠 3 周龄时屈光状态

3 周龄, Zmu-1;DHP 和 DHP 两个品系豚鼠屈光度统计见表 1。

2.2 两个品系豚鼠 4~12 周龄的屈光发育和眼球生长情况

分别在 4、6、8、10 和 12 周龄时,两个品系豚鼠组间屈光状态、眼轴长和玻璃体腔深度差异极显著($P < 0.01$), Zmu-1;DHP 品系豚鼠的眼轴长和玻璃体腔深度高于 DHP 品系($P < 0.01$)。两个品系豚鼠 4~12 周龄测定的屈光参数见表 2。

2.3 两个品系豚鼠 4~12 周龄屈光参数变化

多因素方差分析,眼别对各个屈光参数影响均不显著,而年龄、品系影响显著,不同测定方向对曲率值影响显著。4~12 周龄, Zmu-1;DHP 品系豚鼠屈光状态随周龄变化差异有显著性($P < 0.01$)。随着周龄的增长,其近视度数不断加深,但增速放缓。Post Hoc 分析,8、10、12 周屈光度极显著高于 4 周龄($P < 0.01$),10、12 周龄屈光度显著高于 6 周龄($P < 0.05$)。DHP 品系豚鼠屈光度随周龄变化差异无显著性($P = 0.97$),各周龄间未出现显著差异。屈

光状态变化见图 1。周龄对 Zmu-1;DHP 和 DHP 两个品系豚鼠屈光参差变化影响差异均无显著性 ($P = 0.64, 0.53$)。多重比较,两品系内不同周龄间均未见显著性差异。Zmu-1;DHP 品系豚鼠各个周龄屈光参差 > 1.5 D, DHP 品系各周龄均未达到。4 ~

12 周内,两个品系豚鼠眼轴长增长极显著。Zmu-1;DHP 豚鼠品系,每个周龄都比前一周龄增长达到显著或者极显著水平。DHP 豚鼠品系,8 到 10 周龄眼轴增长差异无显著性 ($P = 0.07$),其他周龄增长极显著,眼轴长变化见图 2。

表 1 3 周龄 Zmu-1;DHP 和 DHP 品系豚鼠屈光度比较

Tab. 1 Comparison of refractive powers between the 3-week-old Zmu-1;DHP and DHP guinea pigs

品系 Strains	样本数 No.	屈光度 (D) Dioptry	近视/% Myopia/%	屈光参差 ≥ 1.5 D/% Anisometropia /%
Zmu-1;DHP	327	-5.19 ± 3.92	85.12	69.23
DHP	117	$2.13 \pm 4.40^{**}$	22.65	45.87

注: ** 表示组间差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note. ** indicates significant difference at the level of 0.01.

表 2 Zmu-1;DHP 和 DHP 品系豚鼠 4 ~ 12 周龄屈光度、曲率和眼轴组分比较

Tab. 2 Comparison of diopter, corneal curvature and axial components between the Zmu-1;DHP and DHP guinea pig strains at 4 ~ 12 weeks of age

屈光参数 Ocular parameter	品系 Strains	4 周 4 weeks	6 周 6 weeks	8 周 8 weeks	10 周 10 weeks	12 周 12 weeks
屈光度 Diopter	I ($n = 12$)	-9.09 ± 4.36	-11.91 ± 5.38	-14.42 ± 6.12	-15.36 ± 6.65	-16.25 ± 7.76
	II ($n = 8$)	$4.47 \pm 1.23^{**}$	$4.45 \pm 1.24^{**}$	$3.95 \pm 0.86^{**}$	$4.28 \pm 1.14^{**}$	$4.23 \pm 0.82^{**}$
屈光参差 Anisometropia	I ($n = 12$)	1.65 ± 1.85	2.10 ± 2.34	3.04 ± 2.96	2.60 ± 2.55	2.88 ± 2.69
	II ($n = 8$)	1.25 ± 1.40	1.47 ± 0.82	0.84 ± 0.61	1.13 ± 1.13	$0.78 \pm 0.63^*$
眼轴长 AL	I ($n = 12$)	8.45 ± 0.17	8.73 ± 0.20	8.96 ± 0.19	9.08 ± 0.24	9.29 ± 0.29
	II ($n = 8$)	$8.14 \pm 0.09^{**}$	$8.28 \pm 0.08^{**}$	$8.48 \pm 0.09^{**}$	$8.67 \pm 0.07^{**}$	$8.75 \pm 0.08^{**}$
曲率 1 CRC 1	I ($n = 12$)	3.48 ± 0.07	3.60 ± 0.08	3.69 ± 0.07	3.75 ± 0.09	3.79 ± 0.10
	II ($n = 8$)	3.52 ± 0.08	3.58 ± 0.08	3.74 ± 0.07	$3.82 \pm 0.09^*$	$3.90 \pm 0.09^{**}$
曲率 2 CRC 2	I ($n = 12$)	3.42 ± 0.09	3.52 ± 0.10	3.60 ± 0.09	3.62 ± 0.09	3.75 ± 0.09
	II ($n = 8$)	3.41 ± 0.05	3.54 ± 0.10	3.66 ± 0.10	$3.74 \pm 0.09^{**}$	$3.85 \pm 0.08^{**}$
散光 stigmatism	I ($n = 12$)	2.20 ± 1.32	2.31 ± 1.60	2.48 ± 1.49	3.38 ± 1.64	1.58 ± 1.83
	II ($n = 8$)	$3.24 \pm 1.65^*$	2.04 ± 1.56	2.20 ± 1.16	$1.85 \pm 1.10^{**}$	2.14 ± 1.60
前房深度 ACD	I ($n = 12$)	1.05 ± 0.07	1.11 ± 0.07	1.12 ± 0.07	1.14 ± 0.06	1.17 ± 0.07
	II ($n = 8$)	$1.10 \pm 0.05^*$	1.09 ± 0.04	1.12 ± 0.05	$1.19 \pm 0.05^{**}$	1.17 ± 0.08
晶体厚度 LT	I ($n = 12$)	3.86 ± 0.08	4.01 ± 0.07	4.16 ± 0.08	4.30 ± 0.12	4.40 ± 0.09
	II ($n = 8$)	3.83 ± 0.07	3.99 ± 0.07	4.14 ± 0.07	$4.22 \pm 0.07^*$	$4.30 \pm 0.07^{**}$
玻璃体腔深度 VCD	I ($n = 12$)	3.54 ± 0.17	3.61 ± 0.20	3.68 ± 0.19	3.70 ± 0.24	3.73 ± 0.25
	II ($n = 8$)	$3.21 \pm 0.07^{**}$	$3.20 \pm 0.08^{**}$	$3.21 \pm 0.08^{**}$	$3.27 \pm 0.07^{**}$	$3.27 \pm 0.05^{**}$

注: (1) 品系 I, 表示 Zmu-1;DHP 品系, 品系 II 表示 DHP 品系; (2) 曲率 1 为与子午线相同方向的眼球曲率, 曲率 2 为与子午线垂直方向的眼球曲率; (3) AL: Axial length; CRC: Radius of corneal curvature; ACD: Anterior chamber dept; LT: Lens thickness; VCD: Vitreous chamber depth; (4) ** 表示组间差异极显著 ($P < 0.01$), * 表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note. (1) Strain I: means Zmu-1;DHP; strain II, means DHP; (2) Corneal curvature 1: Corneal curvature of the horizontal meridian; corneal curvature 2: Corneal curvature of the vertical meridian; (3) AL: Axial length; CRC: Radius of corneal curvature; ACD: Anterior chamber depth; LT: Lens thickness; VCD: Vitreous chamber depth; (4) ** indicates significant difference at the level of 0.01, * indicates significant difference at the level of 0.05.

多因素方差分析,不同轴向对曲率测定值影响显著,因此,分别统计分析两个轴向的曲率,而未采用两者平均值进行分析。4 ~ 12 周龄,两个豚鼠品系在两个轴向的曲率增长极显著 ($P < 0.01$),两个品系豚鼠在子午线方向上测定的曲率值大于垂直方向。4 ~ 12 周龄,Zmu-1;DHP 品系豚鼠散光随周龄变化差异有显著性 ($P < 0.05$),而 DHP 品系差异无显著性 ($P = 0.07$)。

曲率变化见图 3。

2.4 两个品系豚鼠屈光状态与其他性状的相关性分析

结合散点图,对两个品系豚鼠屈光状态与曲率和眼轴各组分作偏相关分析 (partial correlation analysis),见表 3。另外,曲率 1 和曲率 2 高度相关,在 Zmu-1;DHP 和 DHP 品系相关系数分别为 0.88 和 0.92 ($P < 0.01$)。

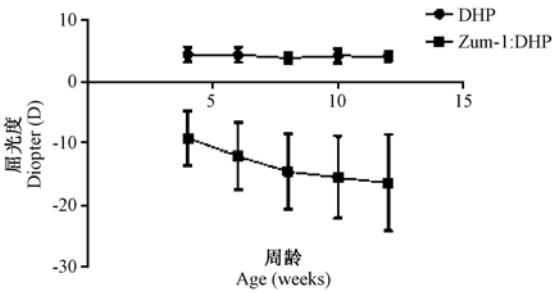


图 1 4~12 周龄间的屈光发育
Fig. 1 The refractive development of the guinea pigs at 4~12 weeks of age

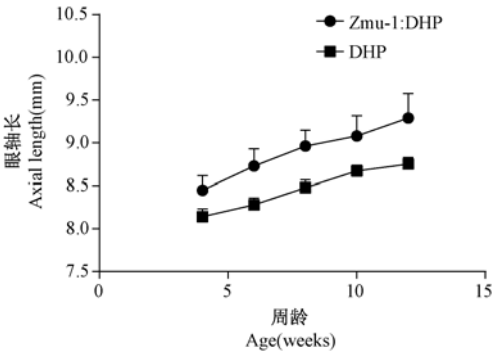


图 2 4~12 周龄眼轴长变化
Fig. 2 Changes of the eye axial length in the guinea pigs at 4~12 weeks of age

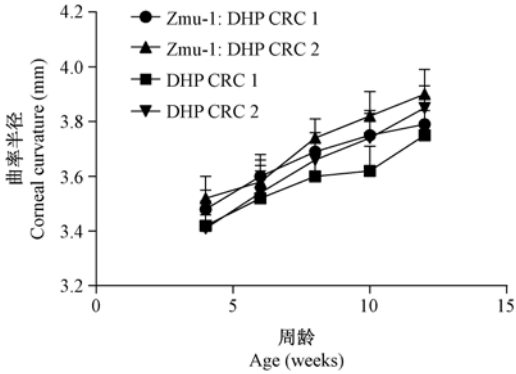


图 3 4~12 周龄角膜曲率变化
Fig. 3 Changes of the corneal curvature in the guinea pigs at 4~12 weeks of age

2.5 两个品系豚鼠视力

随着年龄的增长,两个品系豚鼠视力均下降。其中,DHP 品系下降显著($P < 0.01$),见表 4。

3 讨论

3.1 品系对豚鼠屈光性状的影响

本文对断奶后 Zmu-1:DHP 和 DHP 两个豚鼠品系进行屈光状态的测定分析,发现两品系表现迥异。Zmu-1:DHP 品系豚鼠,3 周龄近视自发率为 85.1%,4~12 周龄,近视不断加深,不能够完成正视觉化过程;屈光参差超过 1.5 D,达到了病理性的标

表 3 Zmu-1:DHP 和 DHP 豚鼠屈光状态与曲率和眼轴各组分的相关性分析

Tab. 3 The correlation between the diopter, corneal curvature and axial components in the Zmu-1:DHP and DHP strains

屈光度 Refraction		眼轴长 AL	曲率 1 CRC 1	曲率 2 CRC 2	前房深度 ACD	晶体厚度 LT	玻璃体腔深度 VCD
屈光度 a	r	-0.79	0.06	0.31	-0.26	-0.3	-0.75
Refraction a	p	0	0.5	0	0.01	0	0
屈光度 b	r	-0.19	-0.04	0.16	-0.06	-0.12	-0.34
Refraction b	p	0.09	0.72	0.16	0.6	0.31	0

注释:(1) r 表示相关系数, p 表示显著性概率;(2)屈光度 a 表示 Zmu-1:DHP 品系的屈光度,屈光度 b 表示 DHP 品系的屈光度。
Note. (1) r means correlation coefficient, p means significant level; (2) Refraction a means refraction of the Zmu-1:DHP strain; Refraction b means refraction of the DHP strain.

表 4 两个品系豚鼠视力比较

Tab. 4 Comparison of grating acuity between the two guinea pig strains

品系 Strains	3 周龄 3 weeks	12 周 12 weeks
DHP	2.78 ± 0.48	2.10 ± 0.79
Zmu-1:DHP	$1.51 \pm 1.29^{**}$	$1.20 \pm 0.98^{**}$

注: ** 表示组间差异有显著性($P < 0.01$)。
Note. ** indicates significant difference at the level of 0.01.

准。DHP 品系,近视低发,屈光度发展稳定。Jiang^[6]曾报道白化的豚鼠品系 2 周龄近视率为 70.1%,对照有色品系近视率为 28.6%;经过 2~4 周离焦诱导,白化的近视豚鼠变得比有色的近视豚鼠更加近视;经过 2~4 周形觉剥夺诱导,有色的近

视豚鼠的近视进一步加深,而白化的近视豚鼠却不能^[7]。Jodi^[10]研究来航鸡的屈光发育规律发现,白来航鸡孵化第 6 天,屈光度为 -1.9D,28 d 时为 -2.6 D,未能完成正视觉化,而对照组正常来航鸡孵化后第 6 天为 5.1 D,28 d 时为 0.5 D,基本完成正视觉化。王瑞卿^[11]对英国种短毛三色豚鼠进行检影测定,出生时为远视 5.25 ± 0.22 D,到 11 周时近视为 1.34 ± 0.61 D,完成正视觉化。本实验使用自行搭建的红外偏光验光仪测定 DHP 豚鼠,4~12 周龄屈光度基本稳定,10、12 周龄屈光度为 4.28 ± 1.14 D 和 4.23 ± 0.82 D。Zhou^[8]曾报道认为正常的豚鼠 3

周龄已经完成正视化。不同的豚鼠品系屈光性状可能存在不同,这一现象在小鼠近视模型中也存在。Machelle^[12]分析使用小鼠进行近视研究的文献,发现相同年龄的 C57BL/6J 小鼠在不同实验室测定的屈光度差距很大。这提示我们在制作近视动物模型开展相关研究时,一定要选择遗传背景清楚,繁育规范的实验动物。Zmu-1;DHP 品系豚鼠近视高发,为近视机理研究提供了一种很好的自发性动物模型。

3.2 眼球性状对 Zmu-1;DHP 品系豚鼠屈光度的影响

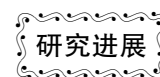
本实验相关性分析,Zmu-1;DHP 品系豚鼠的屈光状态与眼轴长高度负相关,相关系数 $-0.79 (P < 0.01)$;屈光度与子午线垂直方向的眼球曲率相关系数为 $0.31 (P < 0.01)$,而与子午线方向眼球曲率相关系数为 $0.062 (P = 0.50)$ 。DHP 品系豚鼠屈光状态与眼轴长、曲率相关系数较小。可以推测,Zmu-1;DHP 品系豚鼠的近视与眼轴长高度负相关,与曲率的相关性较小,为眼球前后径生长过快的轴性近视。Zmu-1;DHP 品系豚鼠的屈光状态与玻璃体腔深度相关系数 $-0.75 (P < 0.01)$,远高于前房深度(相关系数 -0.30)和晶体厚度(相关系数 -0.30)。DHP 品系豚鼠的屈光度与玻璃体腔深度相关系数 $-0.34 (P < 0.01)$,而与前房深度(相关系数 -0.06)、晶体厚度(相关系数 -0.12)相关性不显著。可以推测,豚鼠屈光的变化与玻璃体腔深度的增加密切相关,近视品系 Zmu-1;DHP 相关性更高。相关研究有王瑞卿^[11]发现正常幼年豚鼠正视化过程主要与玻璃体腔深度的变化相关。Louis Tong^[13]采用多元回归分析新加坡学生近视情况,认为近视与玻璃体腔深度的过度增长相关。McBrien^[14]研究认为,眼球结构改变造成成年人的近视和近视加深的主要结构因素是玻璃体腔深度的延长。Rabsilber^[15]调查分析认为在正视和近视人群中,前方深度没有差异。Zmu-1;DHP 品系豚鼠的近视可能是眼轴长的过度生长,特别是玻璃体腔深度的过度增加造成,而角膜曲率、前房深度和晶体厚度对其的影响较小。相对于实验诱导的眼球生长加速模型,其可以作为自然动物模型,对眼球生长过快致病理性近视,进行眼球生长调控的分子机理研究。

参 考 文 献

[1] Howlett MH, McFadden SA. Spectacle lens compensation in the

- pigmented guinea pig [J]. *Vision Res*, 2009, 49(2): 219–27.
- [2] Lu F, Zhou XT, Zhao HL, et al. Axial myopia induced by a monocularly-deprived facemask in guinea pigs: a non-invasive and effective model [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 82(4): 628–636.
- [3] Howlett MH, McFadden SA. Form-deprivation myopia in the guinea pig (*Cavia porcellus*) [J]. *Vision Res*, 2006, 46(1–2): 267–283.
- [4] 邸悦, 刘睿, 褚仁远, 等. 频闪光诱导光觉异常性豚鼠近视模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, 820(4): 48–52.
- [5] Di Y, Liu R, Chu RY, et al. Myopia induced by flickering light in guinea pigs: a detailed assessment on susceptibility of different frequencies [J]. *Int J Ophthalmol*. 2013, 6(2): 115–119.
- [6] Jiang L1, Schaeffel F, Zhou X, et al. Spontaneous axial myopia and emmetropization in a strain of wild-type guinea pig (*Cavia porcellus*) [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009, 50(3): 1013–1019.
- [7] Jiang L1, Long K, Schaeffel F, et al. Disruption of emmetropization and high susceptibility to deprivation myopia in albino guinea pigs [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011, 52(9): 6124–6132.
- [8] Zhou X1, Qu J, Xie R, et al. Normal development of refractive state and ocular dimensions in guinea pigs [J]. *Vision Res*. 2006, 46(18): 2815–2823.
- [9] 施明光, 蒋丽琴, 周纯. 学龄前儿童的条栅视力观察 [J]. *中华眼科杂志*, 2006, 9: 788–791.
- [10] Rymer J, Choh V, Bharadwaj S, et al. The albino chick as a model for studying ocular developmental anomalies, including refractive errors, associated with albinism [J]. *Exp Eye Res*, 2007, 85(4): 431–442.
- [11] 王瑞卿, 赵海岚, 胡娱新, 等. 正常幼年豚鼠视觉发育的正视化过程 [J]. *吉林大学学报:医学版*, 2008, 34(1): 19–23.
- [12] Pardue MT, Stone RA, Iuvone PM. Investigating mechanisms of myopia in mice [J]. *Exp Eye Res*. 2013, 114: 96–105.
- [13] Tong L, Wong EH, Chan YH, et al. A multiple regression approach to study optical components of myopia in Singapore school children [J]. *Ophthalmol Physiol Opt*. 2002, 22(1): 32–37.
- [14] McBrien NA, Adams DW. A longitudinal investigation of adult-onset and adult-progression of myopia in an occupational group. Refractive and biometric findings [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997, 38(2): 321–333.
- [15] Rabsilber TM, Becker KA, Frisch IB, et al. Anterior chamber depth in relation to refractive status measured with the Orbscan II Topography System [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2003, 29(11): 2115–2121.

[收稿日期] 2015-11-30



新型七甲川菁染料用作肿瘤模型活体成像的研究进展

王哲轩^{1,2}, 赵宁宁², 张彩勤², 李卓昊¹, 师长宏^{2*}

(第四军医大学, 1. 学员旅四营十五连, 2. 实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 一种近红外荧光(NIRF)七甲川菁染料不需要化学修饰,可直接被肿瘤细胞吸收呈特异性聚集,从而可用于肿瘤活体成像。这种染料在肿瘤细胞与正常细胞之间的摄取差异可能是由于特异型有机阴离子转运肽的作用,并受到低氧条件控制。这些特性将会拓展 NIRF 类染料在肿瘤成像研究中的应用。

【关键词】 近红外荧光;七甲川菁染料;肿瘤靶向性;活体成像;有机阴离子转运肽

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0097-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.017

Advances in research of novel heptamethine cyanine dyes as a potential diagnostic agent for optical imaging of tumor models

WANG Zhe-xuan^{1,2}, ZHAO Ning-ning², ZHANG Cai-qin², LI Zhuo-hao¹, SHI Chang-hong^{2*}

(1. Student Brigade of the Forth Battalion, 15th Company;

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

【Abstract】 A class of near infrared fluorescence (NIRF) heptamethine cyanine dyes, in their native form without chemical conjugation, can be taken up and accumulated specifically in cancer cells and used for tumors imaging. The different uptake of the dyes into cancer but not normal cells is possible due to the presence of specific isoforms of organic anion-transporting peptides (OATPs), and regulated by hypoxia. These advances have widely extended current application of NIRF imaging in cancer diagnosis.

【Key words】 Near infrared fluorescence; Heptamethine cyanine dyes; Tumor target; Optical imaging; Organic anion-transporting peptides (OATPs); Cancer detection; Diagnosis

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

1 概述

近红外荧光染料(near infrared fluorescent dye, NIRF)是一类聚甲基菁染料的杂环化合物,它是由两端或中间的杂环、芳环与分子内部的多次甲基链组成的一个大 π 共轭体系,常见的两种 NIRF 染料 IR-783 和 MHI-148 结构如图 1^[1]。该类染料有着较高的体内消除率和较大的斯托克斯位移,能够诱发产生范围在 700 ~ 1000 nm 之间的强荧光,为肿瘤诊断提供了可能性^[2]。该类染料应用于体内成像,显示出诸多优势,比如能够标记配体、产生信号强、组

织吸收好等;可以和不同的成像染料联合使用;背景自发荧光低^[3-4]。吖啶菁绿(ICG)是目前唯一被美国 FDA 批准可用于临床医学诊断的 NIRF 染料,它已被广泛应用于鉴别良性或恶性肿瘤。常规 NIRF 染料一般需要与肿瘤细胞特异靶向配体结合才能用于肿瘤成像,靶向配体种类多种多样,包括代谢底物^[5]、细胞表面肽^[6]、生长因子^[7]、抗体^[8]以及肿瘤细胞表面特异性抗原等^[9]。因为靶向配体不同,而肿瘤细胞又具有异质性,所以只有一些特异型肿瘤细胞才能被该类染料识别。另外,配体与肿瘤细胞的化学结合可能会改变这类染料用于成像的靶向

[基金项目]国家自然科学基金项目(31572340)军队实验动物专项课题(SYDW2014-002)。

[作者简介]王哲轩(1994-),男,五年制临床医学专业学员,主要开展肿瘤动物模型的科研工作。Email: 546193064@qq.com。

[通讯作者]师长宏(1973-),男,博士,教授,研究方向:肿瘤动物模型。Email: changhong@fmmu.edu.cn。

性^[10]。

研究发现了一组近红外荧光七甲川菁染料兼具成像和特异性靶向定位的双重功能,可用于肿瘤的活体成像。比如 IR-780^[11]、IR-783^[12]、IR-808^[13] 和 MHI-148^[14] 等。这些染料可直接被肿瘤细胞而非正

常细胞吸收,并集聚于线粒体和溶酶体中,不需要化学修饰便直接可识别肿瘤细胞。这类染料自发荧光低,但当它们与生物分子结合时,由于化学修饰便激发出较强的荧光。小鼠实验已证实这些染料细胞毒性较低^[15],应用于临床具有较好的安全性。

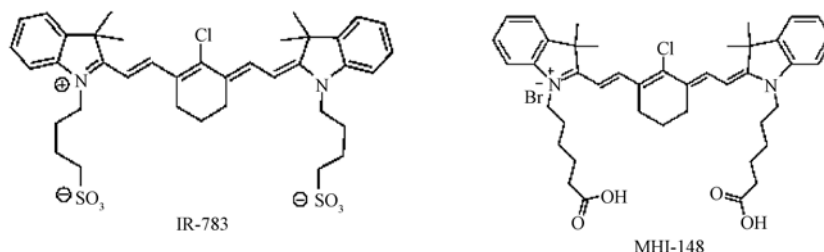


图 1 NIRF 染料的基本化学结构

Fig. 1 The chemical structure of NIRF dyes IR-783 and MHI-148.

2 七甲川菁染料的理化特性

七甲川菁染料是由多聚甲炔构成的一个共振结构,两侧分别由一个氮原子参与形成共轭杂环。传统的花青染料光稳定性差,有自聚集效应并且在水溶液中光量子产率低。为了解决这些问题,人们尝试对这些染料进行结构修饰^[16]。比如,在花青染料的多聚甲基炔链中引入环己烯基,其光稳定性和荧光强度都有了显著提升。当引入了硫酸基团后,不仅有效避免了荧光信号的减弱,而且还可以减少染料的自聚集效应。结构中的多聚甲炔链可以抑制内部能量转换和二聚体化,增加荧光信号的强度和稳定性^[15,17]。一般化学结构中多聚甲炔链越长其结构越不稳定,但是移入环类基团,就可以提升结构的强度,减少内部能量转化而增加内部量子的产率。

已报道的七甲川菁染料 MHI-148 的侧链是羧基,可以与化疗药物或同位素结合,其体内的清除较慢^[15]。IR-780 的侧链是烷基,不易进行结构修饰。IR-780 和 MHI-148 都是脂溶性复合物,具有一定毒性,体内使用受限^[11]。IR-783 的侧链是磺酸基,有着较好的水溶性和较低的毒性,但在体内清除较快,且不易进行结构修饰^[15,18]。理想的 NIRF 染料应兼具上述三种染料的优点,克服相应的缺点。不仅要能被肿瘤细胞直接靶向识别,而且还要有一定的水溶性和脂溶性,在体内清除效率适当,还易于进行结构修饰,如便于标记探针、放射性核素、化疗药物等,从而提高识别肿瘤细胞的敏感性。比如可以设计合成一种新型 NIRF 染料,一侧为 IR-783 的磺酸基,另一侧为 MHI-148 的羧基。

3 NIRF 染料的肿瘤靶向定位

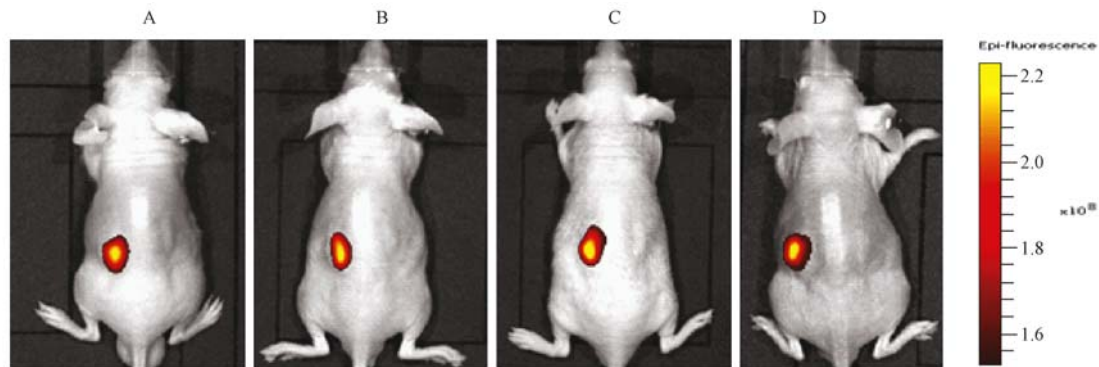
常规的 NIRF 染料需要经过化学修饰后才能进行肿瘤成像。只有极少部分有机近红外染料可直接靶向定位特异性肿瘤细胞。如近红外手性卟啉光学成像试剂 Pz247,不需要与配体结合,就能在人乳腺癌的异种移植模型中直接识别肿瘤细胞^[19]。一类 NIRF 七甲川菁染料可直接被裸鼠体内原发灶或继发灶中肿瘤细胞特异性摄取并聚集。这类 NIRF 染料已被证实能被多种不同类型肿瘤细胞而非正常细胞特异吸收,也包括循环肿瘤细胞(CTC)、异种移植肿瘤和原发性肿瘤等^[20]。在临床工作中,这些具有肿瘤成像和靶向定位双重特性的染料,为监测肿瘤生长和在外科手术中辨别肿瘤手术切缘提供了可能性。通过实时 NIRF 成像,可以明确肿瘤组织病变边缘的精确位置,因而降低了漏检阳性位点的可能性,提升了肿瘤外科手术的治疗效果^[21]。手术切除肝转移瘤时,通过 NIRF 成像,可以鉴别肝脏的良恶性病灶,尤其用于检测小于 5 mm 的转移瘤具有明显的优势^[22]。

为了评估 NIRF 染料在大型动物体内的肿瘤特异性靶向能力,选择自发性肿瘤犬作为模型,通过光学成像和 PET/CT 扫描两种方式同时来判定 NIRF 染料的摄取和聚集特性。由于犬的原发和继发性肿瘤的发展过程和人体十分相似^[23],因此,该实验进一步确认了 NIRF 染料在肿瘤成像中的特异性,为其临床应用提供了可行性。NIRF 染料 MHI-148 已被直接应用于临床肿瘤标本的成像。手术切除肾细胞癌(RCC)患者整个肾脏后,立刻用 MHI-148 染料灌注切下的肾脏,并随后用于体外 NIRF 成像。肿

瘤组织摄取的 MHI-148 染料强度比正常组织多出了 6 倍^[24]。病理分析确认荧光信号部位即为肿瘤发生部位。这是一个 NIRF 染料应用于临床的典型例子。同类染料 ICG 已在膀胱癌根治性切除术中用于检查膀胱癌的前哨淋巴结是否发生转移。

NIRF 成像可以探查实体肿瘤,也可以检测细胞间液中的肿瘤细胞。因为 NIRF 信号很容易从深层组织中捕获,通过 NIRF 成像来分析胸腹腔液中的

恶性肿瘤细胞将是一个快速有效的方法^[12,25]。将临床新鲜的肿瘤标本移植到裸鼠肾包膜建立 PDX (patient-derived tumor xenograft) 模型,可以使用七甲川菁染料进行活体成像确认该部位肿瘤的形成^[26]。使用该方法,已经筛选出多个不同类型的 PDX 模型,包括胃癌、肝细胞癌、膀胱癌和肾癌(图 2)。在移植部位均可早期检测到较强的 NIRF 信号,通过 H&E 染色病理检查进一步确认了肿瘤组织的形态。



注:A, 胃癌; B, 肝癌; C, 膀胱癌; D, 肾癌。

图 2 裸鼠肾包膜移植建立的不同类型 PDX 模型进行 NIRF 成像

Note. A, gastric cancer; B, liver cancer; C, bladder cancer; and D, renal cancer.

Fig. 2 NIRF imaging of different PDX models with subrenal capsule xenografts in nude mice

4 近红外荧光染料结合同位素成像

核素成像用于肿瘤的探查具有较多的优势,但该类探针用于 PET 示踪时常表现出半衰期短、空间分辨率低和射线下暴露等缺点,而且高基础代谢率的组织如大脑会摄取较多的核素^[27]。NIRF 染料可以直接靶向定位肿瘤细胞,所以, NIRF 联合同位素成像将可能替代传统的核素成像用于肿瘤的早期诊断^[28]。核素标记 NIRF 染料,可以提升该类染料探查深层组织内肿瘤的敏感性。比如将高表达 RNKL 的人前列腺癌细胞 LNCaP 皮下接种裸鼠制备移植模型,使用七甲川菁染料 PC-1001 进行活体成像发现了裸鼠体表的两处肿瘤,而 PC-1001/PET 成像则可以探查到一个更深部位的肿瘤^[20]。多种 PET 示踪元素已经被应用在 NIRF 核素成像的实验性肿瘤模型上,包括¹⁸F、¹¹C、^{99m}Tc、⁶⁴Cu 和¹¹¹In^[29-32]等。

最近有人合成了一种用于乳腺癌 PET 成像的 PET/NIRF 探针 PC-1001/⁶⁴Cu,该探针由 NIRF 染料 PC-1001 和⁶⁴Cu 经化学修饰合成^[33],在人乳腺癌细胞和裸鼠移植模型中均表现出较高的肿瘤特异性摄取率和聚集特性,而正常组织摄取率较低。由于使用 PET 成像和生产⁶⁴Cu 同位素的回旋加速器具有

高昂的成本,相比之下,具有肿瘤靶向定位特性的 SPECT/NIRF 探针^{99m}Tc-PC1007 具有较好的优势,它由 NIRF 染料 PC-1007 和^{99m}Tc 化学修饰合成。这种探针在肿瘤细胞和移植模型上均表现出较好的靶向性,并能在肿瘤部位特异性聚集^[30]。为了进一步评估 NIRF 染料在大型动物体内的肿瘤特异性靶向能力,PC-1001/⁶⁸Ga 成功应用于自发肿瘤犬的 PET 和荧光成像,PET/CT 图像显示出了 NIRF 染料聚集部位,病理分析确认了二者的一致性^[26]。用放射性同位素标记糖基化葡聚糖衍生物,再用作 NIRF 成像和 SPECT/CT 扫描可用于前哨淋巴结的探查 (SLND)。一项研究选择了 32 个乳腺癌患者,使用放射性核素结合近红外荧光成像的方法能够识别出所有人的前哨淋巴结^[34]。这种 NIRF/核素成像方法简易方便且结果准确。

5 七甲川菁染料靶向识别肿瘤细胞的机制

肿瘤组织缺氧环境是调控七甲川菁染料特异性识别肿瘤细胞的重要机制^[24,26],而 ICG 染料识别肿瘤细胞主要通过与血浆蛋白质结合来实现^[35]。没有证据显示 ICG 特性性吸收与肿瘤组织缺氧环境

有直接关联。在裸鼠肿瘤移植模型的活体成像中, ICG 只有相对较低的肿瘤组织/背景组织 (tumor-to-background ratio) 比率, 24h 时维持在 1.4 – 1.7 之间^[36], 而 MHI-148 的比率却高达 9.1, 当与缺氧相关的 HIF1 α 蛋白高表达时, 该比率可进一步提升 2 倍, 这也是七甲川菁类染料相比于其他 NIRF 染料在肿瘤成像中的优势所在。有机阴离子转运肽 (OATPs) 可能也在转运七甲川菁染料进入肿瘤细胞的过程中起到重要作用^[11, 24, 26, 37]。OATPs 介导两性化合物的细胞转运, 包括药物和其他一些外源性物质^[38, 39]。目前已报道的人类 OATPs 有 11 种, 按其氨基酸序列的同源性被分成 6 个家族^[40]。其中 OATP1B3 可有效调控七甲川菁染料 IR-780 和 IR-783 在肿瘤细胞内的转运, 如果使用 OATP1B3 竞争性抑制药物—BSP (bromsulphthalein), 可明显减弱肿瘤细胞对 NIRF 染料的特异性摄取^[24, 26, 41]。

缺氧是肿瘤组织普遍存在的现象, 通常与新陈代谢、血管形成、肿瘤转移和药物抗性的形成等密切相关^[42, 43]。文献报道 HIF1 α 直接促进了 OATP1B3 的表达。在组织缺氧的条件下, HIF1 α 的活性核蛋白与 OATP1B3 启动子中的 HRE 相互作用, 增强了 OATP1B3 基因的转录功能。而在有氧的环境中, HIF1 α 通过 PHD/VHL 途径迅速被降解而变得不稳定^[44], 这也是正常组织 OATP1B3 处于较低水平的主要原因。因此, 正常组织和细胞中 HIF1 α /OATPs 信号失活, 转运和集聚 NIR 染料的能力减弱。当使用 HIF1 α 稳定剂 (DMOG 和氯化钴) 时, 可以促进肿瘤细胞内 OATP1B3 的转录, 增强肿瘤细胞对 NIRF 染料的吸收; 与此相反, 当抑制肿瘤细胞内 HIF1 α 水平时, OATP1B3 和 OATP2B1 表达降低, 对 NIRF 染料的吸收减弱^[24, 26]。尽管上述结论是从前列腺癌细胞和肿瘤移植模型中获得, 但由于组织缺氧和 HIF1 α /OATPs 信号的活化是大部分肿瘤细胞中普遍存在的现象, 可以通过进一步测试 NIRF 染料结合其他肿瘤细胞的能力, 建立基于 NIRF 染料的活体成像技术直接用于不同类型肿瘤模型的检测。

6 结论和展望

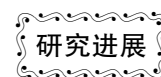
七甲川菁染料兼具肿瘤成像和靶分子的双重功能, 基于该类染料 NIRF 活体成像技术已成功应用于肿瘤模型的检测, 但应用于临床前仍面临诸多问题。如, 现有的七甲川菁染料通透性和敏感性需要进一步提升; 还需要通过化学修饰来进一步增强它的靶

向性; 还需要调整染料的脂溶性和水溶性, 使其能更有效地穿透细胞膜识别胞内分子; 需要进一步降低染料与血液蛋白的非共价结合, 以降低背景的干扰; 染料的细胞毒性和安全性等均需要进一步确认。

参 考 文 献

- [1] Yeh CS, Su CH, Ho WY, et al. Tumor targeting and MR imaging with lipophilic cyanine-mediated near-infrared responsive porous Gd silicate nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2013, 34 (22): 5677 – 5688.
- [2] Frangioni JV. In vivo near-infrared fluorescence imaging [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7(5): 626 – 634.
- [3] Redy-Keisar O, Ferber S, Satchi-Fainaro R, et al. NIR fluorogenic dye as a modular platform for prodrug assembly: real-time in vivo monitoring of drug release [J]. *Chem Med Chem*, 2015, 10(6): 999 – 1007.
- [4] Mieszawska AJ, Kim Y, Gianella A, et al. Synthesis of polymer-lipid nanoparticles for image-guided delivery of dual modality therapy [J]. *Bioconjug Chem*, 2013, 24(9): 1429 – 1434.
- [5] Andreev OA, Dupuy AD, Segala M, et al. Mechanism and uses of a membrane peptide that targets tumors and other acidic tissues in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(19): 7893 – 7898.
- [6] Choi HS, Gibbs SL, Lee JH, et al. Targeted zwitterionic near-infrared fluorophores for improved optical imaging [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(2): 148 – 153.
- [7] Keereweer S, Mol IM, Kerrebijn JD, et al. Targeting integrins and enhanced permeability and retention (EPR) effect for optical imaging of oral cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2012, 105(7): 714 – 718.
- [8] Xu M, Rettig MP, Sudlow G, et al. Preclinical evaluation of Mab CC188 for ovarian cancer imaging [J]. *Int J Cancer*, 2012, 131: 1351 – 1359.
- [9] Gao J, Chen K, Miao Z, et al. Affibody-based nanoprobes for HER2-expressing cell and tumor imaging [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(8): 2141 – 2148.
- [10] Luo S, Zhang E, Su Y, et al. A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(29): 7127 – 7138.
- [11] Yi X, Yan F, Wang F, et al. IR-780 dye for near-infrared fluorescence imaging in prostate cancer [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 511 – 517.
- [12] Shao C, Liao CP, Hu P, et al. Detection of live circulating tumor cells by a class of near-infrared heptamethine carbocyanine dyes in patients with localized and metastatic prostate cancer [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(2): e88967.
- [13] Luo S, Tan X, Qi Q, et al. A multifunctional heptamethine near-infrared dye for cancer theranosis [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(9): 2244 – 2251.
- [14] Yang X, Shao C, Wang R, et al. Optical imaging of kidney cancer with novel near infrared heptamethine carbocyanine fluorescent

- dyes [J]. J Urol, 2013, 189(2): 702–710.
- [15] Yang X, Shi C, Tong R, et al. Near IR heptamethine cyanine dye-mediated cancer imaging [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(10): 2833–2844.
- [16] James NS, Chen Y, Joshi P, et al. Evaluation of polymethine dyes as potential probes for near infrared fluorescence imaging of tumors: part-I [J]. Theranostics, 2013, 3(9): 692–702.
- [17] Zhang C, Wang S, Xiao J, et al. Sentinel lymph node mapping by a near-infrared fluorescent heptamethine dye [J]. Biomaterials, 2010, 31(7): 1911–1917.
- [18] Wu JB, Lin TP, Gallagher JD, et al. Monoamine oxidase A inhibitor—near-infrared dye conjugate reduces prostate tumor growth [J]. J Am Chem Soc, 2015, 137(6): 2366–2374.
- [19] Trivedi ER, Harney AS, Olive MB, et al. Chiral porphyrazine near-IR optical imaging agent exhibiting preferential tumor accumulation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(4): 1284–1288.
- [20] Wu J, Pan D, Chung LW. Near-infrared fluorescence and nuclear imaging and targeting of prostate cancer [J]. Transl Androl Urol, 2013, 2(3): 254–264.
- [21] Hill TK, Abdulahad A, Kelkar SS, et al. Indocyanine green-loaded nanoparticles for image-guided tumor surgery [J]. Bioconjug Chem, 2015, 26(2): 294–303.
- [22] van der Vorst JR, Schaafsma BE, Verbeek FP, et al. Near-infrared fluorescence sentinel lymph node mapping of the oral cavity in head and neck cancer patients [J]. Oral Oncol, 2013, 49(1): 15–19.
- [23] Leroy BE, Northrup N. Prostate cancer in dogs: comparative and clinical aspects [J]. Vet J, 2009, 180(2): 149–162.
- [24] Wu JB, Shao C, Li X, et al. Near-infrared fluorescence imaging of cancer mediated by tumor hypoxia and HIF1 α /OATPs signaling axis [J]. Biomaterials, 2014, 35(28): 8175–8185.
- [25] Tian Y, Sun J, Yan H, et al. A rapid and convenient method for detecting a broad spectrum of malignant cells from malignant pleuroperitoneal effusion of patients using a multifunctional NIR heptamethine dye [J]. Analyst, 2015, 140(3): 750–755.
- [26] Shi C, Wu JB, Chu GC, et al. Heptamethine carbocyanine dye-mediated near-infrared imaging of canine and human cancers through the HIF-1 α /OATPs signaling axis [J]. Oncotarget, 2014, 5(20): 10114–10126.
- [27] Pysz MA, Gambhir SS, Willmann JK. Molecular imaging: current status and emerging strategies [J]. Clin Radiol, 2010, 65(7): 500–516.
- [28] Kim JS, Kim YH, Kim JH, et al. Development and in vivo imaging of a PET/MRI nanoprobe with enhanced NIR fluorescence by dye encapsulation [J]. Nanomedicine, (Lond) 2012, 7(2): 219–229.
- [29] Hong Y, Zhu H, Hu J, et al. Synthesis and radiolabeling of (111)In-core-cross linked polymeric micelle-octreotide for near-infrared fluoroscopy and single photon emission computed tomography imaging [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24(12): 2781–2785.
- [30] Zhang Y, Xiao L, Popovic K, et al. Novel cancer-targeting SPECT/NIRF dual-modality imaging probe (99m)Tc-PC-1007: synthesis and biological evaluation [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2013, 23(23): 6350–6354.
- [31] Lütje S, Rijpkema M, Goldenberg DM, et al. Pretargeted dual-modality immuno-SPECT and near-infrared fluorescence imaging for image-guided surgery of prostate cancer [J]. Cancer Res, 2014, 74(21): 6216–6223.
- [32] Azhdarinia A, Ghosh P, Ghosh S, et al. Dual-labeling strategies for nuclear and fluorescence molecular imaging: a review and analysis [J]. Mol Imaging Biol, 2012, 14(3): 261–276.
- [33] Xiao L, Zhang Y, Yue W, et al. Heptamethine cyanine based (64)Cu-PET probe PC-1001 for cancer imaging: synthesis and in vivo evaluation [J]. Nucl Med Biol, 2013, 40(3): 351–360.
- [34] Schaafsma BE, Verbeek FP, Rietbergen DD, et al. Clinical trial of combined radio- and fluorescence-guided sentinel lymph node biopsy in breast cancer [J]. Br J Surg, 2013, 100(8): 1037–1044.
- [35] Hirche C, Murawa D, Mohr Z, et al. ICG fluorescence-guided sentinel node biopsy for axillary nodal staging in breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 121(2): 373–378.
- [36] Kosaka N, Mitsunaga M, Longmire MR, et al. Near infrared fluorescence-guided real-time endoscopic detection of peritoneal ovarian cancer nodules using intravenously injected indocyanine green [J]. Int J Cancer, 2011, 129(7): 1671–1677.
- [37] Zhang E, Luo S, Tan X, et al. Mechanistic study of IR-780 dye as a potential tumor targeting and drug delivery agent [J]. Biomaterials, 2014, 35(2): 771–778.
- [38] Liu T, Li Q. Organic anion-transporting polypeptides: a novel approach for cancer therapy [J]. J Drug Target, 2014, 22(1): 14–22.
- [39] Tamai I, Nakanishi T. OATP transporter-mediated drug absorption and interaction [J]. Curr Opin Pharmacol, 2013, 3(6): 859–863.
- [40] Obaidat A, Roth M, Hagenbuch B. The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2012, 52: 135–151.
- [41] Yuan J, Yi X, Yan F, et al. Nearinfrared fluorescence imaging of prostate cancer using heptamethine carbocyanine dyes [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(2): 821–828.
- [42] Liao J, Qian F, Tchabo N, et al. Ovarian cancer spheroid cells with stem cell-like properties contribute to tumor generation, metastasis and chemotherapy resistance through hypoxia-resistant metabolism [J]. PLoS ONE, 2014, 9(1): e84941.
- [43] Gilkes DM, Semenza GL. Role of hypoxia-inducible factors in breast cancer metastasis [J]. Future Oncol, 2013, 9(11): 1623–1636.
- [44] Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway [J]. Mol Cell, 2008, 30(4): 393–402.



生物学标志物在心力衰竭早期诊断中作用的研究进展

张辉¹, 周晓慧^{2*}, 范慧敏^{1,2}, 刘中民^{1,2*}

(1. 同济大学附属东方医院心外科, 上海 200120; 2. 同济大学附属东方医院, 心衰研究所, 上海 200120)

【摘要】 心力衰竭是各种心脏疾病的最后阶段, 心力衰竭早期阶段选取适当的生物学标志物, 对心衰识别、风险评估和患者管理都具有重要的临床意义。本文主要对近年文献报道的心肌应激标志物、心肌损伤相关的标志物、细胞外基质、循环中的微小 RNA 和炎症因子等在心衰的早期诊断中的重要作用做一综述, 并评价了这些标志物在早期心衰诊断、预防和患者管理中的价值。

【关键词】 心力衰竭; 生物学标志物; 诊断; 预后

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0102-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.018

Research progress of the role of biological markers in early diagnosis of heart failure

ZHANG hui¹, ZHOU Xiao-hui^{2*}, FAN Hui-min^{1,2}, LIU Zhong-min^{1,2*}

(1. Department of Cardiac Surgery, 2. Research Institute of Heart Failure, East Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200120, China)

【Abstract】 Heart failure (HF) is the final stage of various cardiac diseases. It's important to use appropriate biomarkers for identifying heart failure in the early stage, managing patients, and optimizing risk stratification in clinical setting. This review summarizes the important roles of markers related to cardiac stress, myocardial injury, extracellular matrix, micro RNA and inflammatory factors which were reported in literatures in recent years, and assessed their clinical value in the early diagnosis and prevention of heart failure.

【Key words】 Heart failure; Biomarkers; Diagnosis; Prognosis

Corresponding author: LIU Zhong-min, E-mail: liu.zhongmin@tongji.edu.cn or ZHOU Xiao-hui, E-mail: xhzhou100@hotmail.com

心血管疾病目前是发达国家人口最主要的死亡原因, 其中心力衰竭 (HF) 是各种心脏疾病的最后阶段。在美国, 目前有近 600 万人患有心脏衰竭^[1], 在大于 65 岁的患者中, 急性心脏衰竭 (AHF) 是住院治疗的首要原因^[2]。美国每年与心衰相关的医疗费用约为 209 亿美元^[3]。这种复杂的综合症正在成为一个公共健康问题, 尤其是在老龄化人口中。要建立诊断、治疗和预后策略, 可靠的识别心衰的生物学标志物是必要的。理想的标志物应满足一定的标准: 1) 非侵入性的样品采集途径, 2) 高度的敏感性

和特异性, 3) 可用于检测该疾病的早期阶段, 4) 能灵敏地反应病情变化, 5) 样品内长半衰期, 6) 满足临床需要的快速测量系统, 7) 较低的成本。

近年的研究发现: 心肌应激标志物、心肌损伤标志物和细胞外基质循环中的微小 RNA 等在心衰的早期诊断中发挥重要作用。

1 心肌应激标志物

1.1 B 型利钠肽

B 型利钠肽 (B-type natriuretic peptide, BNP), 是

【基金项目】 国家自然科学基金 (81170084, 81470393; 81370434, 81400363, 81170084); 上海市领军人才 (2012053); 上海市浦东新区卫生和计划生育委员会 (PWZxq2014-01); 上海市浦东新区科委 (Pkj2013-z3)。

【作者简介】 张辉 (1988 -), 男, 住院医师, 硕士研究生, 研究方向: 糖尿病的心肌保护。

【通讯作者】 刘中民 E-mail: liu.zhongmin@tongji.edu.cn; 周晓慧 E-mail: xhzhou100@hotmail.com

一种心脏激素,被确认为利钠肽家族的第二复合物,主要在心室机械收缩负荷过重时分泌,扩张血管,减少肾素和醛固酮分泌。心功能逐渐下降时,心室壁压的升高和神经内分泌的激活促进了心室肌细胞对 BNP 的分泌。

血清 BNP 水平可以提供预后信息。Burke 等^[4]指出,对于不同病因引起的和不同左室收缩功能障碍程度的患者,BNP 血清浓度的测定已被证明是用于识别各种心脏疾病患者的一个非常有效的筛选技术,而左室收缩功能障碍具有发展成可证实性心脏衰竭和心血管事件的风险。在二尖瓣关闭不全的患者中,无论瓣膜返流的程度如何,BNP 水平的升高均与心源性死亡和充血性心脏衰竭的发生相关,血 BNP 水平诊断症状性、无症状性和舒张性心衰时的分界值分别为大于 100、大于 75、大于 300 pg/mL。至今,有研究已经报道了 BNP 在心衰诊断和预后判断中的作用^[5]。Sonoda^[6]认为,BNP 作为一种行之有效的诊断标记物,可用于充血性心衰危险分层、预后以及治疗。

除了血清 BNP 水平的预后价值,BNP 浓度的动态监测可能有利于进一步的危险分层。在缬沙坦心力衰竭试验(Val-HeFT)中^[7,8],有 4305 例患者参与其中,研究结果显示 BNP 的动态变化与患者的死亡率和发病率有关,血清 BNP 水平从基线至第 4 和 12 个月下降百分比最大的患者,首次事件发生率和死亡率也最低;而 BNP 增加百分比最大的患者死亡率和首次发病事件最高。这些结果对临床治疗的潜在性帮助,可能会激发临床医生对 BNP 连续测量的兴趣,以引导和改善心脏衰竭的治疗。虽然已经有心衰患者监测 BNP 水平的相关报道^[9],但是利钠肽连续测量是否有益于心衰患者的健康管理,仍然存有争议。

1.2 氨基末端 B 型利钠肽

氨基末端 B 型利钠肽(amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide, NT-proBNP),在心肌细胞受机械拉伸刺激时合成和分泌增多。在分泌过程中,前肽被拆分为具有生物活性的 BNP,和激素原 NT-proBNP。

衰竭的心脏中,心室的 NT-proBNP 合成显著增加。根据 Yancy CW 等的报道,用于管理心衰患者的 2013 年 ACC/AHA 指南就建议,把 NT-proBNP 作为诊断和建立慢性心脏衰竭预后的 I 类指标,和指导循证治疗的 IIa 级指标^[10]。纽约心功能分级

(NYHA) I、II、III、IV 级的患者 NT-proBNP 分别为 (102 ± 50) 、 (380 ± 110) 、 (800 ± 230) 、 (1350 ± 415) pg/mL ($P < 0.05$), NT-proBNP 与心衰严重程度呈正相关。此外,考虑到心衰患者病因及左室收缩功能障碍程度的不确定性,诸如 PRIDE(急诊科呼吸困难病人的 ProBNP 水平调查)等研究,建议把 NT-proBNP 对心脏衰竭的诊断设定在最高级别。Keiichi Hirono 等^[11]则指出,相对于 BNP 的短半衰期,NT-BNP 前体在体外环境中较稳定,因此认为 NT-BNP 前体在评价心脏衰竭时比 BNP 更有价值。值得提出的是,一项 PRIDE 的子研究表明,在同时诊断为心衰和肾衰的患者中,NT-proBNP 的灵敏性和特异性都有下降^[47]。与 BNP 相比,NT-proBNP 在血清中的浓度也更容易受到肾功能的影响。

1.3 ST2

ST2 是白细胞介素(IL-1)受体家族的成员,包括跨膜型(ST2L)和可溶型(sST2)。多项临床研究表明^[12],高浓度的 sST2 与患者发生急性心肌梗死, HF^[13-17]和呼吸困难^[18,19]等不良事件的发生率相关联。此外,Bayes-Genis^[20]研究表明,ST2 在 CHF 中的远期独立预后价值超过了多种传统因子,与其他标志物如 BNP 和 NT-proBNP 相比, sST2 不受年龄、肾功能或者体质量指数的影响。Weinberg^[21]发现,早期急性心肌梗死患者的血清中可检测到一过性 sST2,且 ST2 的水平与射血分数呈负相关。此外,在体外实验中,生物力学的刺激可以诱导 ST2 的产生,这与机械收缩可以刺激 BNP 的产生相类似^[21]。虽然 ST2 还没有广泛用于临床,但例如 Damien 等^[48]在对布鲁塞尔 137 位收缩性心力衰竭患者进行追踪随访时发现, sST2 中位数在心力衰竭患者中是 43.8 ng/mL,而在纽约心功能 II 级患者 36.5 ng/mL,在心功能 III 级患者是 54.3 ng/mL,心功能 IV 级患者是 72.2 ng/mL,证实了 sST2 与心力衰竭的严重程度呈正相关。

1.4 Galectin-3

半乳糖凝集素 3,是半乳糖凝集素家族的一个成员,参与炎症和纤维化等多种生理和病理过程,并在 HF 进展中发挥关键作用。多项研究已评估了 galectin-3 及其预后价值。van Kimmenade 等^[23]发现,在 240 例稳定的慢性心衰患者中,血浆 galectin-3 水平与预后密切相关。在另一项试验中,Savarese 等^[24]对 599 例急诊科呼吸困难患者的数据进行了受试者处理特征分析。结果显示,具有较高的血浆半乳糖凝集素-

3 水平的患者,与 NT-proBNP 组相比,在 2 个月内的死亡率也更高。Lok 等^[22]发现,galectin-3 水平可以直接反应心肌纤维化的程度,不会因为心衰的失代偿而发生急剧变化。大多数情况下,血清 galectin-3 一旦升高就会保持在高水平,并不会受到医疗处理的影响。检测血清 galectin-3 水平有助于心衰患者的预后、危险分层和管理。

2 心肌损伤标志物

2.1 肌钙蛋白

心脏特异性肌钙蛋白 I 和 T 是心肌细胞收缩装置的一部分,在心肌损伤后被释放到循环系统中^[25],心脏衰竭的进程与心肌细胞的逐渐丧失有关,临床上表现为不断增加的血清肌钙蛋白水平。全美急性失代偿性心衰登记(Acute Decompensated Heart Failure National Registry, ADHERE)^[26]显示,67 924 例因急性失代偿而入院的心衰患者,其中 4240 例(6.2%)在入院时肌钙蛋白呈阳性,包括肌钙蛋白 T 或 I。以人群为基础的达拉斯心脏研究(The Dallas Heart Study)^[27-30],使用更为灵敏的检测手段,结果显示在 25% 的大体人群中,肌钙蛋白 T 是可检测的,而肌钙蛋白 T 阳性多与左心室肥厚及收缩功能障碍,以及高度全因死亡率或心血管死亡率相关。

2.2 心型脂肪酸结合蛋白(Heart-type fatty acid binding protein, H-FABP)

H-FABP 是低相对分子质量($14 \times 10^3 \sim 15 \times 10^3$)的非酶蛋白,存在于细胞质中,可以转运长链脂肪酸进入心肌细胞。当心肌细胞受损时,H-FABP 被迅速释放到循环系统中^[31]。已经证明,晚期心衰患者的血清 H-FABP 水平增加,H-FABP 为心肌细胞损伤和慢性心衰预后的标志物^[32]。Niizeki 等^[33]连续检测了 126 个心衰患者入院时的血清 H-FABP 和肌钙蛋白 T 水平,表明 HFABP 在确定高风险患者比肌钙蛋白 T 具有更大的预测能力。

但是,应该指出的是,大样本实验($n = 2,099$)显示,H-FABP 的水平受到年龄、性别、肥胖和肾功能的影响^[34]。因此,在合理评估 H-FABP 的参考价值时,应该考虑到这些因素的影响。

3 细胞外基质

血浆中的基质金属蛋白酶(metalloproteinases, MMP)是细胞外基质降解的关键因素,在心脏衰竭

时升高。根据作用底物以及片断同源性,将 MMPs 分为 6 类,为胶原酶、明胶酶、基质降解素、基质溶解素、furin 活化的 MMP 和其他分泌型 MMP。

MMPs 家族已分离鉴别出 26 个成员,编号分别为 MMP1 ~ 26。其中,Framingham 心脏研究(The Framingham Heart Study)^[35]发现,血浆 MMP-9 水平与左室舒张末期内径和心室壁厚度的增加相关,这表明血浆 MMP-9 的水平可能为心肌细胞外基质降解和左室重构的标志物。Radauceanu 等^[36]则测定了 1009 名参加“依那西普细胞因子拮抗在心室功能障碍中的作用(RECOVER)”试验的患者血清中 III 型胶原的氨基末端肽、MMP-1 和白细胞介素水平,表明过多的细胞外基质降解与心脏重构、心功能恶化和较差的心脏衰竭预后有关。

4 循环中的微小 RNA

已经有报道指出^[37],微小 RNA(miRNA)在心衰患者中的表达有差异性,对心脏所必需的各种细胞过程具有调控作用。另一方面,也有文献指出,miRNA 可在血浆中稳定存在^[38]。因为它们可在循环中被识别,miRNA 作为心血管疾病的新型生物标志物,引起了学者们的广泛兴趣^[39]。

Tijssen 等^[40]指出,在心衰患者血液中,miR423-5p 的浓度较高,并且与心脏衰竭的诊断和严重程度有关。Goren 等^[41]细致检测了 186 个 miRNAs 的表达水平后指出,miR423-5p、miR320a、miR22 和 miR92b 在心脏衰竭病人血循环中的水平明显增加。另外一些 miRNA 如 miR195 等也被发现与心衰的诊断有关。Ellis 等^[42]则证实,miRNA 可诊断性应用于鉴别诊断心脏衰竭和非心脏衰竭性呼吸困难的病人。但对于心衰患者血液中上述 miRNA 具体浓度与心衰严重程度分级的关系,还有待研究测定。

5 炎症因子

C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)炎性系统的激活在心脏衰竭的发病机制中起着重要作用,心衰患者血浆中升高的 TNF- α 和 IL 与心脏功能的下降有关,并可以对患者的发病率和死亡率提供重要的预测信息^[43,44]。CRP 是其中之一,肝脏 CRP 的产生过程受多种细胞因子的影响,其中最主要的刺激因子为 IL-6。已经有报道指出,高灵敏度的 CRP 检测对心脏衰竭患者的预后具有独立的诊断价值。Kamioka 等^[45]曾探究过,心脏再同步治疗(cardiac

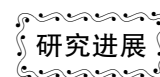
resynchronization therapy, CRT) 植入前, 高灵敏度的 CRP 检测方式能够预测患者对 CRT 的反应和严重心脏衰竭的心源性死亡率, 与对 CRT 有反应的患者相比, 未应答者的 CRP 水平显著升高 ($P < 0.01$)。

在心衰衰竭早期阶段选取适当的生物学标志物, 对诊断疾病, 评估风险, 以及管理患者都具有重要的临床意义。本文介绍了一些传统的标志物, 和某些反映心肌应激, 心肌损伤, 以及细胞外基质和 microRNAs 变化的新兴标志物。随着这些新兴的生物学标志物的发现, 新颖的检测策略对于确保心衰患者获得及时诊断和有效治疗, 以及进行合理的疾病管理均具有重要的临床意义。比如 sST2 在心衰衰竭的诊断应用中, 尤其是预后方面, 联合 NT-proBNP 有更高的预测价值, 有助于提高其危险分层。但目前对生物学标志物的认识和了解仍有局限性, 比如 NT-proBNP 在血清中的浓度很容易受到肾功能的影响, 心衰患者血液中某些 miRNA 具体浓度与心衰严重程度分级的关系也不甚明了, 这一定程度上限制了临床工作中更高效的使用这些心衰标志物。此外, 随着心衰机制研究的免疫学发展, T 细胞等炎症细胞在左室重构和心衰进展中的作用也开始被逐渐重视^[46], 因此一些特异性的细胞, 细胞因子或者趋化因子等的标志物也可能会体现出一定的临床研究和应用价值, 从而丰富和补充心衰标志物的种类, 帮助心衰患者的诊疗管理。

参 考 文 献

- [1] Cuyjet AB, Akinboboye O. Acute heart failure in the African American patient [J]. J Card Fail. 2014, 20(7): 533–540.
- [2] Giamouzis G, Kalogeropoulos A, Georgiopoulou V, et al. Hospitalization epidemic in patients with heart failure; risk factors, risk prediction, knowledge gaps, and future directions [J]. J Card Fail. 2011, 17(1): 54–75.
- [3] Heidenreich PA, Albert NM, Allen LA, et al. Forecasting the impact of heart failure in the United States; a policy statement from the American Heart Association [J]. Circ Heart Fail, 2013, 6: 606e19.
- [4] Burke MA, Cotts WC. Interpretation of B-type natriuretic peptide in cardiac disease and other comorbid conditions [J]. Heart Fail Rev, 2007, 12: 23–36.
- [5] Koglin J, Pehlivanli S, Schwaiblmair M, et al. Role of brain natriuretic peptide in risk stratification of patients with congestive heart failure [J]. J Am Coll Cardiol, 2001, 38: 1934–1941.
- [6] Sonoda H, Ohte N, Goto T, et al. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels identifying left ventricular diastolic dysfunction in patients with preserved ejection fraction [J]. Circ J, 2002, 76: 2599–2605.
- [7] Anand IS, Fisher LD, Chiang YT, et al. Changes in brain natriuretic peptide and norepinephrine over time and mortality and morbidity in the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). Circ J, 2003, 107: 1278–1283.
- [8] Felker GM, Hasselblad V, Hernandez AF, et al. Biomarker-guided therapy in chronic heart failure; a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Am Heart J, 2009, 158: 422–430.
- [9] Troughton RW, Frampton CM, Yandle TG, et al. Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations [J]. Lancet 2000; 355: 1126–1130.
- [10] Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B et al. ACCF/AHA guideline for the management of heart failure; executive summary; a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines [J]. Circ J, 2013, 128(16): 1810–1852.
- [11] Hirono K, Sekine M, Shiba N, et al. (2014) N-terminal pro-brain natriuretic peptide as a predictor of reoperation in children with surgically corrected tetralogy of Fallot [J]. Circ J, 2014, 78(3): 693–700.
- [12] Sabatine MS, Morrow DA, Higgins LJ, et al. Complementary roles for biomarkers of biomechanical strain ST2 and N-terminal prohormone B-type natriuretic peptide in patients with ST-elevation myocardial infarction [J]. Circ J, 2008, 117: 1936–1944.
- [13] Rehman SU, Mueller T, Januzzi JL Jr. Characteristics of the novel interleukin family biomarker ST2 in patients with acute heart failure [J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 52: 1458–1465.
- [14] Pascual-Figal DA, Manzano-Fernandez S, Boronat M, et al. Soluble ST2, high-sensitivity troponin T- and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide; complementary role for risk stratification in acutely decompensated heart failure [J]. Eur J Heart Fail, 2011, 13: 718–725.
- [15] Boissot S, Beede J, Isakson S, et al. Serial sampling of ST2 predicts 90-day mortality following destabilized heart failure [J]. J Card Fail, 2008, 14: 732–738.
- [16] Mueller T, Dieplinger B, Gegenhuber A, et al. Increased plasma concentrations of soluble ST2 are predictive for 1-year mortality in patients with acute destabilized heart failure [J]. Clin Chem, 2008, 54: 752–756.
- [17] Ky B, French B, McCloskey K, et al. High-sensitivity ST2 for prediction of adverse outcomes in chronic heart failure [J]. Circ Heart Fail, 2011, 4: 180–187.
- [18] Januzzi JL Jr, Peacock WF, Maisel AS, et al. Measurement of the interleukin family member ST2 in patients with acute dyspnea; results from the PRIDE (Pro-Brain Natriuretic Peptide Investigation of Dyspnea in the Emergency Department) study [J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 50: 607–613.
- [19] Socrates T, deFilippi C, Reichlin T, et al. Interleukin family member ST2 and mortality in acute dyspnea [J]. J Intern Med, 2010, 268: 493–500.

- [20] Bayes-Genis A, de Antonio M, Vila J, et al. Head-to-head comparison of 2 myocardial fibrosis biomarkers for long-term heart failure risk stratification: ST2 versus galectin-3 [J]. *J Am Coll Cardiol*. 2014, 63(2):158–166.
- [21] Weinberg EO, Shimp M, Hurwitz S, et al. Identification of serum soluble ST2 receptor as a novel heart failure biomarker [J]. *Circ J*, 2003, 107: 721–726.
- [22] Lok DJ, Van Der Meer P, de la Porte PW, et al. Prognostic value of galectin-3, a novel marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study [J]. *Clin Res Cardiol*. 2010, 99(5): 323–328.
- [23] van Kimmenade RR, Januzzi JL Jr, Ellinor PT, et al. Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure [J]. *J Am Coll Cardiol*. 2006, 48(6): 1217–1224.
- [24] Savarese G, Trimarco B, Dellegrottaglie S, et al. Natriuretic peptide-guided therapy in chronic heart failure: a meta-analysis of 2,686 patients in 12 randomized trials [J]. *PLoS ONE*. 2013, 8(3): e58287
- [25] Omland T. New features of troponin testing in different clinical settings [J]. *J Intern Med*, 2010, 268(3): 207–217.
- [26] Peacock WF 4th, De Marco T, Fonarow GC, et al. Cardiac troponin and outcome in acute heart failure [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358: 2117–2126.
- [27] de Lemos JA, Drazner MH, Omland T, et al. Association of troponin T detected with a highly sensitive assay and cardiac structure and mortality risk in the general population [J]. *JAMA*, 2010, 304: 2503–2512.
- [28] Roongsritong C, Warraich I, Bradley C. et al. Common causes of troponin elevations in the absence of acute myocardial infarction: Incidence and clinical significance [J]. *Chest*, 2004, 125: 1877–1884.
- [29] Agewall S, Giannitsis E, Jernberg T, et al. Troponin elevation in coronary vs. non-coronary disease [J]. *Eur Heart J*, 2011, 32: 404–411.
- [30] Nakamura Y, Yoshihisa A, Takiguchi M, et al. High-sensitivity cardiac troponin T predicts non-cardiac mortality in heart failure [J]. *Circ J*, 2014, 78: 890–895.
- [31] Glatz JF, Klein AH, van Nieuwenhoven FA, et al. Fatty-acid-binding protein as a plasma marker for the estimation of myocardial infarct size in humans [J]. *Br Heart J*, 1994, 71: 135–140.
- [32] Arimoto T, Takeishi Y, Shiga R, et al. Prognostic value of elevated circulating heart-type fatty acid binding protein in patients with congestive heart failure [J]. *J Card Fail*, 2005, 11: 56–60.
- [33] Niizeki T, Takeishi Y, Arimoto T, et al. Heart-type fatty acid-binding protein is more sensitive than troponin T to detect the ongoing myocardial damage in chronic heart failure patients [J]. *J Card Fail*, 2007, 13: 120–127.
- [34] Niizeki T, Takeishi Y, Takabatake N, et al. Circulating levels of heart-type fatty acid-binding protein in a general Japanese population: effects of age, gender, and physiologic characteristics [J]. *Circ J*, 2007, 71: 1452–1457.
- [35] Sundstrom J, Evans JC, Benjamin EJ, et al. Relations of plasma matrix metalloproteinase-9 to clinical cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures: the Framingham Heart Study [J]. *Circ J*, 2004, 109: 2850–2856.
- [36] Radauceanu A, Ducki C, Virion JM, et al. Extracellular matrix turnover and inflammatory markers independently predict functional status and outcome in chronic heart failure [J]. *J Card Fail*, 2008, 14: 467–474.
- [37] van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 18255–18260.
- [38] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 10513–10518.
- [39] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases [J]. *Cell Res*, 2008, 18: 997–1006.
- [40] Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure [J]. *Circ Res*, 2010, 106: 1035–1039.
- [41] Goren Y, Kushnir M, Zafir B, et al. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure [J]. *Eur J Heart Fail*, 2012, 14: 147–154.
- [42] Ellis KL, Cameron VA, Troughton RW, et al. Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients [J]. *Eur J Heart Fail*, 2013, 15: 1138–1147
- [43] Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, et al. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure [J]. *Circ J*, 2000, 102: 3060–3067.
- [44] Kinugawa T, Kato M, Yamamoto K, et al. Proinflammatory cytokine activation is linked to apoptotic mediator, soluble Fas level in patients with chronic heart failure [J]. *Int Heart J*, 2012, 53: 182–186.
- [45] Kamioka M, Suzuki H, Yamada S, et al. High sensitivity C-reactive protein predicts nonresponders and cardiac deaths in severe heart failure patients after CRT implantation [J]. *Int Heart J*, 2012, 53: 306–312.
- [46] Nevers T, Salvador AM, Grodecki-Pena A, et al. Left ventricular t-cell recruitment contributes to the pathogenesis of heart failure [J]. *Circ Heart Fail*, 2015, 8(4): 776–787.
- [47] Januzzi J, Camargo C, Anwaruddin S, et al. The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study [J]. *Am J Cardiol*, 2005, 95: 948–954.
- [48] Damien G, Thibault L, Sylvie AA, et al. (2014) Increased soluble ST2 is a stronger predictor of long-term cardiovascular death than natriuretic peptides in heart failure patients with reduced ejection fraction [J]. *Int J Cardiol*, 2014, 172(1): 250–252.



P2Y₆ 受体生物学效应的研究进展

曾勇, 文爱珍, 王顺民, 刘丹, 谭元生*

(湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

【摘要】 嘌呤受体分为 P1 和 P2 受体两大类, 其中, P2 受体又分为配体门控离子通道型受体 (P2X 受体) 和 G 蛋白偶联型受体 (P2Y 受体)。P2Y₆ 受体是 P2Y 家族中的一员, P2Y₆ 受体参与心血管疾病、内分泌疾病及神经病变等疾病的发生。随着氯吡格雷 (P2Y₁₂ 受体阻断剂) 等嘌呤受体阻断剂被 FDA 批准应用于临床, 且表现出良好的疗效, P2Y₆ 受体的生物学效应的研究, 亦成为人们开展针对 P2Y 受体的新型靶向性药物研究的热点之一。基于分子生物学技术的发展, P2Y₆ 受体生物学效应的研究取得了显著进展。

【关键词】 P2Y₆ 受体; 生物学效应; 进展

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0107-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.019

Research progress of the biological effect of P2Y₆ receptor

ZENG Yong, WEN Ai-zhen, WANG Shun-min, LIU Dan, TAN Yuan-sheng*

(the First Affiliated Hospital of Hunan University of TCM, Changsha 410007, China)

【Abstract】 Purine receptors are divided into P1 and P2 receptors. P2 receptors are divided into the ligand gated ion channel receptor (P2X receptor) and G protein coupled receptor (P2Y receptor). The P2Y₆ receptor is a member of the P2Y family, P2Y₆ receptors are involved in cardiovascular diseases, endocrine diseases and neuropathy diseases, etc. With clopidogrel (P2Y₁₂ receptor antagonist) and other purine receptor blocker approved by the FDA for clinical application, and showed good efficacy, study on biological effect of P2Y₆ receptor also becomes one of the hot researches to new drug target for the P2Y receptor. Based on the development of molecular biological techniques, the research on biological effect of P2Y₆ receptor achieved significant advances.

【Key words】 P2Y receptors; Biological effect; Progress

Corresponding author: TAN Yuan-sheng, E-mail: tys702@126.com

嘌呤受体分为 P1 和 P2 受体两大类。其中, P2 受体又分为配体门控离子通道型受体 (P2X 受体) 和 G 蛋白偶联型受体 (P2Y 受体)。P2Y₆ 受体是 P2Y 家族中的一员, 广泛分布于机体各组织。P2Y₆ 受体的内源性配体是胞外核苷酸分子, 主要包括: 三磷酸腺苷 (ATP)、二磷酸腺苷 (ADP)、三磷酸尿苷 (UTP) 和二磷酸尿苷 (UDP) 及其衍生物。生理状态下, 胞外核苷酸分子的浓度维持在很低状态, 而胞内

浓度明显高于胞外; 病理状态下, 如缺氧、炎症、损伤等, 细胞可以通过自分泌、旁分泌或泄漏等形式, 将胞内的核苷酸释放至细胞外激活 P2Y₆ 受体, 产生生物学效应。随着氯吡格雷 (P2Y₁₂ 受体阻断剂) 等嘌呤受体阻断剂成功被 FDA 批准应用于临床, 且表现出良好疗效^[1]。P2Y₆ 受体生物学效应的研究成为开展针对 P2Y 受体的新型靶向性药物研究热点。

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (项目编号: 81473616); 湖南省科学技术厅科技计划重点项目 (项目编号: 2013SK2025); 中医内科学部共建教育部重点实验室开放基金资助项目 (ZYNK201507); 湖南省中医药科研计划重点项目 (201534)。

【作者简介】 曾勇, 男, 医学硕士, 医师, 从事心血管疾病的防治研究。E-mail: 781920555@qq.com

【通讯作者】 谭元生 男, 医学博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 致力于心血管疾病的防治研究。E-mail: tys702@126.com

1 心血管系统

1.1 促进血管炎性病变发生

在 TNF- α 或 LPS 刺激下,血管内皮细胞上 P2Y₆ 受体选择性上调表达,而非其他 P2Y 或 P2X 受体, P2Y₆ 受体激活 NF- κ B 通路诱导白细胞介素-8 (IL-8) 和血管细胞粘附分子-1 表达,促进血管炎症反应发生^[2];同时, P2Y₆ 受体能增强巨噬细胞促炎作用,促进动脉粥样硬化形成及动脉瘤等血管性疾病的形成^[3]。

1.2 介导 VSMC 收缩与增殖

早前 Wang 等^[4] 研究发现 P2X₁、P2Y₂ 和 P2Y₆ 是血管平滑肌细胞 (VSMC) 表达最多的嘌呤受体,可能介导了平滑肌细胞的收缩及增殖。2008 年, Bobbert 等^[5] 研究表明通过激活 P2Y 受体,引起 Ras-Raf-MEK-ERK1/2 的级联刺激,促进 VSMC 的增殖。Govindan 等^[6] 进行了进一步研究证实 P2Y₆ 是促进 VSMC 收缩与增殖的受体之一。

1.3 促进心肌纤维化

压力负荷 (如高血压) 刺激心肌细胞, ATP、UDP 等核苷酸经 P_{2u} 离子通道释放到胞外,刺激心肌细胞的 P2Y₆ 受体,通过偶联的 G12/13 蛋白激活 Rho 途径,调节纤维化因子的表达 (如 CTGF 和 TGF- β), 进而促进下游 I/III 型胶原蛋白的表达,促进心肌纤维化的产生^[7]。

2 调节小胶质细胞功能

刺激小胶质细胞 P2Y₆ 受体能显著增强其对损伤神经元细胞的吞噬作用^[8],抑制 UDP/P2Y₆ 信号通路则能阻止体内外小神经胶质细胞的吞噬作用,有效阻止神经元缺失和死亡^[9]。经 LPS 处理的混合培养的星形胶质细胞和小神经胶质细胞中, UTP 迅速转变为 UDP 激活 P2Y₆ 受体从而诱导小神经胶质细胞 NO 的释放,NO 通过控制星形胶质细胞的增殖和阻止过度的聚集而致使其凋亡^[10]。用 UTP 刺激原代培养的大鼠脊髓小胶质细胞, UTP 可通过刺激 P2Y₆ 受体通过磷脂酶 C (PLC) 介导的细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 或 p38 蛋白磷酸化和随后的 NF- κ B 激活诱导大鼠脊髓小胶质细胞产生 MCP-1^[11]。

脊髓 P2Y₆ 存在于脊髓小胶质细胞,而 P2Y₁₁ 受体同时还存在于脊髓星形胶质细胞,在脊髓神经损伤大鼠体内这两种受体皆上调,脊髓 P2Y₆ 和 P2Y₁₁ 受体参与神经性疼痛的维持^[12],而 Syhr 等^[13] 通过

全身或鞘内注射 P2Y₆ 受体的阻滞剂 (MRS2578), 结果发现并未影响到损伤所诱导的小鼠神经性疼痛行为,因此认为相比于其他嘌呤受体亚型, P2Y₆ 受体严格意义上说未参与神经损伤所诱导的神经性疼痛的过程,并不支持上述观点。

3 呼吸系统

3.1 促进气道炎症发生及维持

在气道上皮细胞, P2Y₆ 诱导巨噬细胞炎性蛋白 20 (CCL20) 趋化因子表达,并且这种作用能被 P38 抑制剂显著性阻断,因此认为 P2Y₆ 受体通过激活丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)/P38 通路诱导 CCL20 的表达^[13],气道炎症反应过程中,核苷酸释放激活 P2Y₆ 受体,引起至少 2 种促炎因子的产生 (IL-6 和 IL-8),该过程是 Ca²⁺ 依赖性的,而非 cAMP/PKA 通路。这种炎症因子的分泌和“炎症网络”的形成在维持气道炎症性疾病中扮演者重要的角色^[15]。

3.2 促进肺癌细胞损伤修复

研究发现^[16]:人肺癌 A549 细胞上 P2Y₆ 受体呈高表达,而 P2Y₁₂ 受体表达非常弱,使用 P2Y₆ 受体阻断剂 (MRS2578) 及基因敲除 P2Y₆ 受体的基因后,暴露于 γ 射线的肿瘤细胞生存率明显下降,进一步证实激活 P2Y₆ 受体后是通过 ERK1/2 通路而促进暴露于 γ 射线的肿瘤细胞 DNA 损伤修复的。另外,激活气道腔面上皮 P2Y₆ 受体能促进电解质的分泌运输^[17]。

4 促进小肠炎症发生及黏膜修复

小肠上皮细胞上调表达 P2Y₆ 受体, P2Y₆ 受体通过活化 ERK1/2 调节 IL-8 分泌,进而促进中性粒细胞的迁移,促进小肠炎症反应发生^[18]。细胞损伤和 UDP 释放使得 P2Y₆ 受体的表达增加,损伤诱导的 UDP 释放,激活肠道上皮细胞 P2Y₆ 受体,介导 TGF- β 的从头合成,为肠道黏膜修复发挥积极的补给作用^[19]。

5 调节膀胱功能

刺激膀胱平滑肌细胞 P2Y₆ 受体能通过 PLC/IP3 信号通路调节膀胱平滑肌的收缩^[20]。在麻醉小鼠体内,膀胱上皮细胞通过释放 ATP 激活 P2Y₆ 受体能提高膀胱的排空频率^[21],膀胱上皮细胞是通过泛连接蛋白-1 管道释放 ATP 激活 P2Y₆ 受

体使膀胱收缩频率增加^[22]。

6 抑制骨骼肌细胞凋亡

实验证实 TNF- α 诱导小鼠骨骼肌细胞凋亡与 NF- κ B 的活化相关^[23], 激活 P2Y₆ 受体能降低 TNF- α 诱导的 NF- κ B 提升作用而间接发挥抑制细胞凋亡的作用^[24]。进一步研究发现内源性 UDP 和合成激动剂 MRS2693 浓度依赖性保护小鼠骨骼肌细胞凋亡, P2Y₆ 阻断剂能阻止这种保护作用^[25]。

7 其他

另外, 激活 P2Y₆ 受体能调节磷脂酶 D 的活性及磷脂酸生成, 且阻断磷脂酶 D 途径后细胞能通过其他途径促进磷脂酸的生成^[26]; 用 UDP 激活 P2Y₆ 受体能有效保护小鼠感染水疱性口炎病毒^[27]; P2Y₆ 受体能调节白细胞对 CCL2 的反应能力^[28]; 激活 P2Y₆ 能够刺激胰岛素的分泌^[29]; 以巨噬细胞为研究对象, P2Y₆ 相对于其他 P2Y 嘌呤受体成员, 在巨噬细胞中呈高表达, 调控多种促炎症因子如单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、肿瘤坏死因子- α 和炎症蛋白-1 α /p 等的转录表达, 进一步研究表明, P2Y₆ 主要通过 MEK1/2-ERK1/2MAPK ~ API 信号通路从转录水平上调 MCP-1 表达, 而非 P38、c-Jun 氨基末端激酶或 NF- κ B 通路^[30]。

8 结语

综上所述, P2Y₆ 受体的过度激活会引起严重的生理功能障碍和疾病, P2Y₆ 受体参与心血管疾病、神经病变、呼吸系统疾病及胃肠道疾病等的发生。其中, P2Y₆ 受体介导细胞外核苷酸的活动, 以参与心血管疾病的发生发展最为重要, 体现在促进血管炎症反应、增强血管张力、促进平滑肌细胞的收缩与增殖等方面, 因此寻找 P2Y₆ 受体阻断剂的研究可能成为未来心血管疾病药物研究领域的一大热点。同时, P2Y₆ 受体广泛调控各种炎症因子的表达及炎症反应, 且与其他受体 (CysLT1R 和 C5aR 受体) 协同调节炎症因子的表达^[31], 为开展抗炎症药物研究提供了新的靶点。此外, 激活 P2Y₆ 受体能刺激胰岛素的分泌, 相应受体的激动剂和拮抗剂具有开发成治疗糖尿病药物的前景。因此, 研究 P2Y₆ 受体的生物学效应具有重要的理论和应用价值。未来关于 P2Y₆ 受体生物学效应的研究应倾向于在明确其生物学效应后, 对其生物学效应进行进一步筛选, 确

证其在某一领域的实用价值。

参 考 文 献

- [1] Paikin JS, Eikelboom JW, Cairns JA, et al. New antithrombotic agents - insights from clinical trials [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2010, 7(9): 498 - 509.
- [2] Riegel AK, Faigle M, Zug S, et al. Selective induction of endothelial P2Y₆ nucleotide receptor promotes vascular inflammation [J]. *Blood*, 2011, 117(8): 2548 - 2555.
- [3] Garcia RA1, Yan M1, Search D1, et al. P2Y₆ receptor potentiates pro-inflammatory responses in macrophages and exhibits differential roles in atherosclerotic lesion development [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(10): e111385.
- [4] Wang L, Karlsson L, Moses S, et al. P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002, 40(6): 841 - 853.
- [5] Bobbert P, Schlüter H, Schultheiss HP, et al. Diadenosine polyphosphates Ap3A and Ap4A, but not Ap5A or Ap6A induce proliferation of vascular smooth muscle cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(10): 1966 - 1973.
- [6] Govindan S, Taylor EJ, Taylor CW. Ca²⁺ signalling by P2Y receptors in cultured rat aortic smooth muscle cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 160(8): 1953 - 1962.
- [7] Nishida M, Sato Y, Uemura A, et al. P2Y₆ receptor-G α 12/13 signalling in cardiomyocytes triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis [J]. *EMBO J*, 2008, 27(23): 3104 - 3115.
- [8] Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, et al. UDP acting at P2Y₆ receptors is a mediator of microglial phagocytosis [J]. *Nature*, 2007, 446(7139): 1091 - 1095.
- [9] Neher JJ, Neniskyte U, Hornik T, et al. Inhibition of UDP/P2Y₆ purinergic signaling prevents phagocytosis of viable neurons by activated microglia in vitro and in vivo [J]. *Glia*, 2014, 62(9): 1463 - 1475.
- [10] Quintas C, Pinho D, Pereira C, et al. Microglia P2Y₆ receptors mediate nitric oxide release and astrocyte apoptosis [J]. *J Neuroinflammation*, 2014, 11: 141.
- [11] Morioka N, Tokuhara M, Harano S, et al. The activation of P2Y₆ receptor in cultured spinal microglia induces the production of CCL2 through the MAP kinases-NF- κ B pathway [J]. *Neuropharmacology*, 2013, 75(2): 116 - 125.
- [12] Barragán-Iglesias P, Pineda-Farias JB, Cervantes-Durán C, et al. Role of spinal P2Y₆ and P2Y₁₁ receptors in neuropathic pain in rats; possible involvement of glial cells [J]. *Mol Pain*, 2014, 10: 29.
- [13] Syhr KM, Kallenborn-Gerhardt W, Lu R, et al. Lack of effect of a P2Y₆ receptor antagonist on neuropathic pain behavior in mice [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2014, 124: 389 - 395.
- [14] Marcet B, Horckmans M, Libert F, et al. Extracellular nucleotides regulate CCL20 release from human primary airway epithelial cells, monocytes and monocyte-derived dendritic cells [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 211(3): 716 - 727.
- [15] Hao Y, Liang JF, Chow AW, et al. P2Y₆ receptor-mediated

- proinflammatory signaling in human bronchial epithelia [J]. PLoS ONE, 2014, 9(9): e106235.
- [16] Ide S, Nishimaki N, Tsukimoto M, et al. Purine receptor P2Y6 mediates cellular response to γ -ray-induced DNA damage [J]. J Toxicol Sci, 2014, 39(1): 15–23.
- [17] Schreiber R, Kunzelmann K. Purinergic P2Y6 receptors induce Ca^{2+} and CFTR dependent Cl-secretion in mouse trachea [J]. Cell Physiol Biochem, 2005, 16(13): 99–108.
- [18] Grbic DM, Degagné E, Langlois C, et al. Intestinal inflammation increases the expression of the P2Y6 receptor on epithelial cells and the release of CXC chemokine ligand 8 by UDP [J]. J Immunol, 2008, 180(4): 2659–2668.
- [19] Nakamura T, Murata T, Hori M, et al. UDP induces intestinal epithelial migration via the P2Y6 receptor [J]. Br J Pharmacol, 2013, 170(4): 883–892.
- [20] Yu W, Sun X, Robson SC, et al. Extracellular UDP enhances P2X-mediated bladder smooth muscle contractility via P2Y6 activation of the phospholipase C/inositol trisphosphate pathway [J]. FASEB J, 2013, 27(5): 1895–1903.
- [21] Carneiro I, Timóteo MA, Silva I, et al. Activation of P2Y6 receptors increases the voiding frequency in anaesthetized rats by releasing ATP from the bladder urothelium [J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(14): 3404–3419.
- [22] Timóteo MA, Carneiro I, Silva I, et al. ATP released via pannexin-1 hemichannels mediates bladder overactivity triggered by urothelial P2Y6 receptors [J]. Biochem Pharmacol, 2014, 87(2): 371–379.
- [23] Stewart CE, Newcomb PV, Holly JM. Multifaceted roles of TNF- α in myoblast destruction: a multitude of signal transduction pathways [J]. J Cell Physiol, 2004, 198(2): 237–247.
- [24] Zheng J, Wang R, Zambraski E, et al. A novel protective action of adenosine A3 receptors; attenuation of skeletal muscle ischemia and reperfusion injury [J]. Am J Physiol, 2007, 293: 3685–3691.
- [25] Mamedova LK, Wang R, Besada P. Attenuation of apoptosis in vitro and ischemia/reperfusion injury in vivo in mouse skeletal muscle by P2Y6 receptor activation [J]. Pharmacol Res, 2008, 58(34): 232–239.
- [26] Scott SA, Xiang Y, Mathews TP, et al. Regulation of phospholipase D activity and phosphatidic acid production after purinergic P2Y6 receptor stimulation [J]. J Biol Chem, 2013, 288(28): 20477–20487.
- [27] Li R, Tan B, Yan Y, et al. Extracellular UDP and P2Y6 function as a danger signal to protect mice from vesicular stomatitis virus infection through an increase in IFN- β production [J]. J Immunol, 2014, 193(9): 4515–4526.
- [28] Campwala H, Sexton DW, Crossman DC, et al. P2Y6 receptor inhibition perturbs CCL2-evoked signalling in human monocytic and peripheral blood mononuclear cells [J]. J Cell Sci, 2014, 127(22): 4964–4973.
- [29] Petit P, Lajoix AD, Gross R. P2 purinergic signalling in the pancreatic beta-cell; control of insulin secretion and pharmacology [J]. Eur J Pharm Sci, 2009, 37(2): 67–75.
- [30] Zhang Z, Wang Z, Ren H, et al. P2Y6 agonist uridine 5'-diphosphate promotes host defense against bacterial infection via monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocytes/macrophages recruitment [J]. J Immunol, 2011, 186(9): 5376–5387.
- [31] Jiang Y, Borrelli L, Bacskaí BJ, et al. P2Y6 receptors require an intact cysteinyl leukotriene synthetic and signaling system to induce survival and activation of mast cells [J]. J Immunol, 2009, 182(2): 1129–1137.

[收稿日期] 2015-09-06