



中国科技论文统计源期刊

中文核心期刊要目总览

ISSN 1671-7856

CN 11-4822/R

ZHONGGUO BIJIAO YIXUE ZAZHI

中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

原名《中国实验动物学杂志》



2016 **3**

邮发代号: 82-917

第26卷 (第3期) Vol.26 No.3

ISSN 1671-7856

主办 中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所



9 771671 785145

中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

月刊 1991年3月创刊

第26卷 第3期 2016年3月31日出版

主管
中国科学技术协会

主办
中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所

主编
秦川

编辑
《中国比较医学杂志》编辑部

出版
中国实验动物学会

发行
《中国比较医学杂志》编辑部
100021,北京市朝阳区潘家园南里5号
电话:(010)67779337
传真:(010)67770690
E-mail:bjb@cnilas.org
http://zggydw.alljournal.ac.cn/
zgbjyxzz/ch/index.aspx

广告经营许可证
京朝工商广字第8131号

照排
同方知网(北京)技术有限公司

印刷
北京市百善印刷厂

邮发代号
82-917

定价
每期20.00元,全年240元

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

2016年版权归中国实验动物学会所有
本刊已入万方数据网络和中国学术期刊(光盘版)电子杂志、中文生物医学期刊全文数据库、中国实验动物信息网、中国实验动物学会网站和世界卫生组织西太平洋地区医学索引等网络文献数据库,如不同意自己论文入网,请在来稿中声明。编辑部支付的稿酬已包含上述网站著作权使用费。

本刊电子版出版发行合作伙伴:中邮阅读网;www.183read.com

本期执行主编 张连峰
本期责任编辑 周文君

目次

(本刊已入编“中文核心期刊要目总览”)

研究报告

- 尾吊小鼠感染空间诱变大肠杆菌炎症反应增强 姚静,程江,裴雪枫,等(1)
- 人工诱导树鼯乳腺肿瘤的病理分析 何保丽,夏厚军,角建林,等(6)
- 慢阻肺大鼠肺组织中树突状细胞表面因子的表达变化及CCL20抗体的干预作用 孙得胜,欧阳瑶,顾延会,等(11)
- 高脂饮食结合STZ诱导妊娠期糖尿病小鼠模型的建立 陈琳,黄小丽,杨亚旭,等(15)
- 大肠埃希菌致兔慢性输卵管炎症模型的建立 冯子聪,张昭,黎哲,等(19)
- 莫诺苷对脑缺血再灌注大鼠皮层肝细胞生长因子及血管性血友病因子表达的影响 魏仁平,孙芳玲,刘婷婷,等(24)
- 长爪沙鼠肝星状细胞的分离培养与鉴定 楼琦,李巍,石巧娟,等(29)
- 细辛脑注射剂异常毒性检查标准研究 邓莎,张德波,罗洁,等(35)
- 尼古丁抑制MIA诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡 韩贵宾,张寿,孙薇薇,等(40)
- 肺腺癌A549绿色荧光裸鼠模型中肿瘤血管内皮细胞来源初探 方天,胡若愚,胡文娟,等(46)
- Nrf2抗氧化通路在CCl₄所致大鼠急性肝损伤中的保护作用 周清平,蒋孝华,符小波(52)
- 立普妥对高糖诱导的HUVEC凋亡及PI3K/AKT/eNOS信号通路的影响 刘志辉(58)
- 灵芝酸A对人胶质瘤细胞U251细胞增殖、凋亡和侵袭的影响 刘海鹏,郑克彬,单小松(64)
- 伊维菌素原药对大鼠的亚急性吸入毒性研究 纪磊,岑江杰,林师道,等(70)

技术方法

- H-1细小病毒抗体ELISA检测方法的建立与应用 付瑞,李晓波,王淑菁,等(75)
- 提高大鼠子宫内膜异位症建模成功率的新方法 李龙卫,王艳云,陈琦,等(81)
- 微核试验的改进 马宝良,鲁克庆(86)

教育与科普

- 我们的“福音” 李楠,孙荣泽,王天奇,等(89)

广告

- (封二,封三,封底)

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly Established in March 1991 Volume 26 Number 3 March 31 2016

Responsible Institution

China Association for Science and Technology

Sponsor

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

Editing

Editorial Board of Chinese Journal of Comparative Medicine
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021
Tel: (010)67779337
Fax: (010)67770690
E-mail: bjb@cnilas.org
<http://zgsydw.alljournal.ac.cn/zgbjyxxx/ch/index.aspx>

Editor-in-Chief

QIN Chuan(秦川)

Publishing

Chinese Association for Laboratory Animal Sciences
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021
Tel: (010)67779337
Fax: (010)67770690
E-mail: bjb@cnilas.org

Printing

The Baishan Printing House of Changping, Beijing

Distributor

Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021
Tel: (010)67779337
Fax: (010)67770690
E-mail: bjb@cnilas.org

Mail-order

Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine

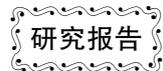
CSSN

ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

Copyright 2016 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

CONTENTS IN BRIEF

- Increased inflammatory reaction in tail-suspension mice infected by *E. coli* in spaceflight YAO Jing, CHENG Jiang, PEI Xue-feng, et al. (1)
- Pathological analysis of the induced breast tumor models in tree shrew HE Bao-li, XIAO Hou-jun, JIAO Jian-lin, et al. (6)
- Expression of the surface factors of dendritic cells in the lung tissues of rats with COPD and the effect of CCL20 antibody on it SUN De-sheng, OUYANG Yao, GU Yan-hui, et al. (11)
- High fat diet combined with streptozotocin-induced gestational diabetes mellitus on mice CHEN Lin, HUANG Xiao-li, YANG Ya-xu, et al. (15)
- The establishment of chronic salpingitis model of New Zealand rabbits caused by *Escherichia coli* FENG Zi-cong, ZHANG Zhao, LI Zhe, et al. (19)
- Effects of morroniside on the expression of the HGF and vWF in peri-infarct cortex after cerebral ischemia-reperfusion in rats WEI Ren-ping, SUN Fang-ling, LIU Ting-ting, et al. (24)
- Establishment of a primary culture protocol of Mongolian gerbil hepatic stellate cells LOU Qi, LI Wei, SHI Qiao-juan, et al. (29)
- Study on abnormal toxicity test standard of asarone injection preparation DENG Sha, ZHANG De-bo, LUO Jie, et al. (35)
- Inhibition of nicotine on apoptosis of chondrocytes induced by monosodium iodoacetate HAN Gui-bin, ZHANG Shou, SUN Wei-wei, et al. (40)
- Research on the source of endothelial cells in tumor vessels by A 549 tumor model with GFP nude mouse FANG Tian, HU Ruo-yu, HU Wen-juan, et al. (46)
- Effect of Nrf2 signal pathway on acute hepatotoxicity induced by CCl₄ in rat ZHOU Qing-ping, JIANG Xiao-hua, FU Xiao-bo (52)
- Effect of lipitor on high glucose-induced HUVEC apoptosis and PI3K/AKT/eNOS signal pathway LIU Zhi-hui (58)
- Effect of Ganoderma acid A to human glioma cells U251 cells on proliferation, apoptosis and invasion LIU Hai-peng, SHAN Xiao-song, ZHENG Ke-bin (64)
- Study on the subacute inhalation toxicity of ivermectin TC in rats JI Lei, CEN Jiang-jie, LIN Shi-dao, et al. (70)
- Establishment and application of ELISA method for H-1 parvovirus FU Rui, LI Xiao-bo, WANG Shu-jing, et al. (75)
- A new method for improving the success rate of the establishment of endometriosis models in rats LI Long-wei, WANG Yan-yun, CHEN Qi, et al. (81)
- Experience exchange in vitro micronucleus assay MA Bao-liang, LU Ke-qing (86)



尾吊小鼠感染空间诱变大肠杆菌炎症反应增强

姚 静¹, 程 江², 裴雪枫³, 王静宇⁴, 王俊锋⁵, 张学林⁵, 刘长庭⁵, 袁 明⁴

(1. 石河子大学医学院, 新疆 石河子 832000; 2. 石河子大学第一附属医院检验科, 新疆 石河子 832000; 3. 辽宁医学院, 辽宁 锦州 121001; 4. 中国航天员科研训练中心, 航天医学基础与应用国家重点实验室, 北京 100094; 5. 解放军总医院南楼呼吸科, 北京 100853)

【摘要】 目的 观察空间诱变大肠杆菌感染尾吊模拟失重小鼠后炎症反应变化。方法 将40只C57BL/6小鼠随机分为对照、对照染菌、尾吊及尾吊染菌组, 采用ELISA和RT-qPCR方法分别检测小鼠血浆和肠道组织中炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的含量及mRNA表达, HE染色观察小肠组织形态学的改变。结果 血浆炎症因子ELISA及肠道组织炎症因子PCR结果显示, 与对照组相比, 实验组小鼠血浆及肠道组织中炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的表达均升高, 且尾吊染菌组最为显著($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$); 小肠组织HE染色结果显示, 实验组小肠粘膜均出现不同程度的损伤, 且尾吊染菌组最为严重。结论 空间诱变大肠杆菌感染尾吊小鼠后可显著升高血浆及肠道组织中炎症因子表达, 导致更严重的肠道黏膜屏障受损, 提示尾吊模拟失重后感染空间诱变大肠杆菌可致机体的炎症反应增强。

【关键词】 空间诱变大肠杆菌; 模拟失重; 炎症因子; 肠道组织

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0001-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.03.001

Increased inflammatory reaction in tail-suspension mice infected by *E. coli* in spaceflight

YAO Jing¹, CHENG Jiang², PEI Xue-feng³, WANG Jing-yu⁴, WANG Jun-feng⁵,
ZHANG Xue-lin⁵, LIU Chang-ting⁵, YUAN Ming⁴

(1. The Medical College of Shihezi University, Xinjiang Shihezi 832000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Shihezi Medical University, Xinjiang Shihezi 832000, China; 3. Liaoning Medical College, Liaoning Jinzhou 121001, China; 4. The Key Laboratory of Space Medicine Fundamentals and Application, China Astronaut Research and Training Center, Beijing 100094, China; 5. Nanlou Respiratory Diseases Department, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【Abstract】 Objective To observe the changes of inflammatory reaction in tail-suspension mice after infected by *E. coli* in spaceflight. **Methods** 40 C57BL/6 mice were randomly divided into four groups: control group (Con), control + *E. coli* T1-13 group (Con + T1-13), tail suspension group (TS), tail suspension + *E. coli* T1-13 group (TS + T1-13). The inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6 production in plasma and mRNA level in intestinal tissue were detected by ELISA and RT-qPCR, and HE staining was used to represent the morphology changes in small intestine tissue. **Results** Compared with the control group, the expression of inflammatory cytokines in plasma and intestinal tissue of all

【基金项目】 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2014CB744404)。

【作者简介】 姚静(1988-),女,硕士,研究方向:临床分子生物学诊断,E-mail: yaojing_hnzz@163.com。

【通讯作者】 袁明(1977-),男,副研究员,博士,研究方向:空间生物学,E-mail: yuanming7711@aliyun.com;程江(1963-),男,教授,硕士,研究方向:实验室管理及分子生物学,E-mail: chengjiang1980@sina.com。

experimental groups were increased, and the TS + T1-13 group was most significant ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). HE staining showed that the small intestine mucosa in the experimental groups were damaged in different degrees, and the damage of TS + T1-13 group was most serious. **Conclusions** The *E. coli* from spaceflight increased significantly the expression of inflammatory cytokines in plasma and intestinal tissue from infected tail-suspension mice, and brought more serious damages to the small intestinal mucosal barrier, which suggested that the inflammatory reaction would be increased in tail-suspension mice infected by *E. coli* from spaceflight.

【Key words】 Space mutation *E. coli*; Simulated microgravity; Inflammatory cytokines; Intestinal tissue

随着我国载人航天事业的发展,尤其是后续载人空间站任务的实施,需要航天员在太空环境停留的时间越来越长。因此,对影响航天员健康的危险因素评估及防护措施研究就显得非常重要。航天员在飞行过程中可受到失重、辐射、超重、振动、噪声、心理紧张等多种不利因素的影响。这些因素会对机体造成损害,如出现空间运动病、肌肉萎缩、骨质脱钙、心血管功能失调等^[1-2]。也有研究显示,航天飞行可造成机体多项免疫学参数的改变,导致机体免疫功能降低,使得机体受感染的机会大大增加^[3]。同时在空间环境中,微生物出现毒力及耐药性的改变,除了腐蚀航天设备,也对航天员的健康产生巨大威胁^[4]。因此,研究失重/模拟失重下空间诱变菌感染所致炎症反应的机制,对于其有效防控具有重要意义。本研究采用前期筛选出的空间诱变大肠杆菌 T1-13 菌株,通过模拟失重小鼠感染模型,探讨空间诱变菌感染模拟失重小鼠对炎症反应的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 40 只 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠,体重 18 ~ 22 g,周龄 6 ~ 8 周,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】,实验在中国航天员科研训练中心实验动物中心【SYXK(军)2012-0020】开展,给予自由进食、饮水、 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 环境温度、每昼夜保持 12 h 光照与 12 h 黑暗交替循环条件下饲养。

1.1.2 空间诱变大肠杆菌菌株 空间诱变型大肠杆菌 T1-13 由解放军总医院南楼呼吸科提供,该菌株搭载神舟十号飞船在轨飞行 15 d,返回后测序分析发现存在耐药及毒力基因突变。

1.1.3 实验试剂和药物 炎症因子 ELISA 检测试剂盒,购自上海蓝基生物科技有限公司;TRIzol 试剂购自 invitrogen;反转录试剂盒、SYBR[®] Green 荧光定

量试剂盒购自大连宝生物公司。

1.1.4 仪器和设备 伯乐 Model680 酶标仪;电恒温培养箱;离心机;eppendorf realplex PCR 扩增仪;EDTA 抗凝真空采血管,一次性注射器,灌胃针等。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立及分组 将 40 只 C57BL/6 小鼠随机分为对照 (Con)、对照染菌 (Con + T1-13)、尾吊 (TS) 及尾吊染菌组 (TS + T1-13),每组 10 只。参照陈杰等^[5]改良的方法对小鼠进行头低位 30° 尾部悬吊 30 d 后,将 T1-13 菌株配置成 1.2×10^8 CFU/mL 溶菌液,以灌胃法^[6]对小鼠进行接种,0.2 mL/鼠。72 h 后 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠,进行后续试验。

1.2.2 ELISA 方法检测血浆炎症因子 试验当天以 1% 戊巴比妥钠 0.2 mL/鼠腹腔注射麻醉小鼠,消毒后于心脏搏动最强处迅速进行心脏采血,离心分离血浆,按 ELISA 试剂盒操作说明书分别检测血浆中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量。

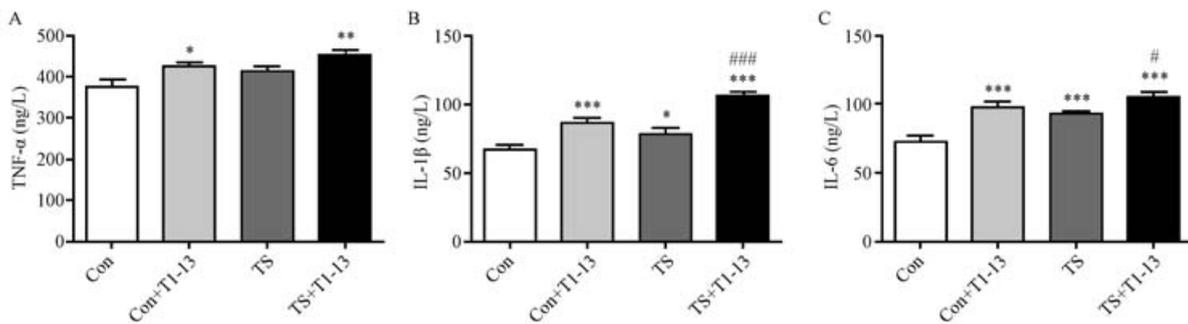
1.2.3 肠道组织形态学观察 心脏采血完毕后颈椎脱臼处死小鼠,消毒后暴露腹腔,无菌剪取小肠约 2 cm,清除肠内容物后置于 4% 多聚甲醛中固定 48 h,常规石蜡包埋、切片、HE 染色、封片,光学显微镜观察并拍照。

1.2.4 肠道组织炎症因子 mRNA 表达水平检测 TRIzol 法提取小肠组织总 RNA,按反转录试剂盒反转录为 cDNA 后,以其为模版进行 real-time PCR 分别检测小肠组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 的表达,引物序列见表 1。设置反应程序: 95°C 预变性 30 s; 95°C 变性 5 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 20 s, 40 个循环; 95°C 15 s, 60°C 15 s, 95°C 15 s 进行溶解曲线分析。

1.2.5 统计学处理 采用 GraphPad Prism5.0 分析软件对实验数据进行统计分析,组间比较采用 ANOVA,两两比较采用 Newman-Keuls 检验方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 实时荧光定量 PCR 扩增引物
Tab. 1 Primer pairs for the real-time PCR

基因	引物序列	产物长度 (bp)
Gene name	Sequence	Product length (bp)
TNF- α	Forward: 5' -CGAGTGACAAGCCTGTAGCC-3'	169
	Reverse: 5' -AAGAGAACCTGGGACTAGACAAG-3'	
IL-1 β	Forward: 5' -TGACGGACCCAAAAGATGAAGG-3'	172
	Reverse: 5' -CCACGGGAAAGACACAGGTAGC-3'	
IL-6	Forward: 5' -CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3'	102
	Reverse: 5' -TCCACGATTTCCCAGAGAAC-3'	
GAPDH	Forward: 5' -ACTCCACTCACGGCAAATTCA-3'	122
	Reverse: 5' -GGCCTCACCCATTTGATG-3'	



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 对照组; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs 尾吊组; $n = 10$ 。

图 1 血浆中炎症因子的含量

Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Con; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs TS; $n = 10$ 。

Fig. 1 Inflammatory cytokines production in plasma

2 结果

2.1 血浆中炎症因子的含量

与对照组相比, Con + T1 - 13 组血浆中 TNF- α ($P < 0.05$)、IL-1 β ($P < 0.001$)、IL-6 ($P < 0.001$) 含量均明显升高; TS 组血浆中 IL-1 β ($P < 0.05$) 和 IL-6 ($P < 0.001$) 含量明显升高, TNF- α 升高但无明显差异; TS + T1 - 13 组血浆中 TNF- α ($P < 0.01$)、IL-1 β ($P < 0.001$)、IL-6 ($P < 0.001$) 含量均明显升高, 且升高最为显著。与 TS 组相比, TS + T1-13 组血浆中 IL-1 β ($P < 0.001$) 和 IL-6 ($P < 0.05$) 含量明显升高, TNF- α 升高但无明显差异 (图 1)。

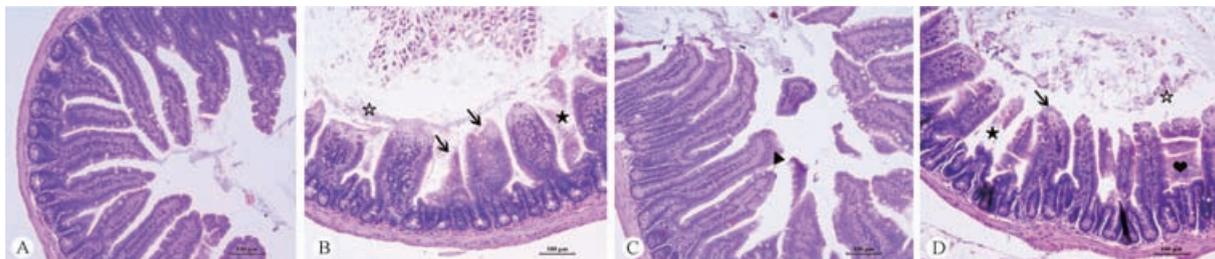
2.2 肠道组织形态学观察

组织形态学观察结果可见, 对照组小肠结构没有明显变化, 从黏膜层到浆膜层结构完整, 绒毛上皮细胞排列整齐 (图 2A)。与对照组相比, Con + T1 - 13 组小肠绒毛顶端坏死脱落, 有的地方整个绒毛坏死溶解, 绒毛肿胀, 固有层内可见炎性细胞浸润,

绒毛长度变小, 肠腔内可见少量脱落的细胞碎片 (图 2B); TS 组小肠绒毛上皮轻微增生 (图 2C); 与 Con + T1 - 13 组相比, TS + T1 - 13 组小肠绒毛出现类似病变, 而且肠绒毛坏死情况较为严重, 有的地方出现凝固性坏死, 有的地方出现溶解性坏死, 仅残存部分结构, 肠腔内出现大量坏死脱落的细胞碎片 (图 2D)。

2.3 肠道组织炎症因子 mRNA 水平的表达

与对照组相比, Con + T1 - 13 组小肠组织中 TNF- α ($P < 0.05$)、IL-1 β ($P < 0.01$)、IL-6 ($P < 0.05$) 表达均明显升高; TS 组小肠组织中 IL-6 ($P < 0.05$) 表达明显升高, TNF- α 和 IL-1 β 升高而无明显差异; TS + T1-13 组小肠组织中 TNF- α ($P < 0.001$)、IL-1 β ($P < 0.01$)、IL-6 ($P < 0.001$) 表达均明显升高, 且升高最为显著。与 TS 组相比, TS + T1 - 13 组小肠组织中 TNF- α ($P < 0.01$)、IL-1 β ($P < 0.01$) 表达明显升高, IL-6 升高而无明显差异 (图 3)。

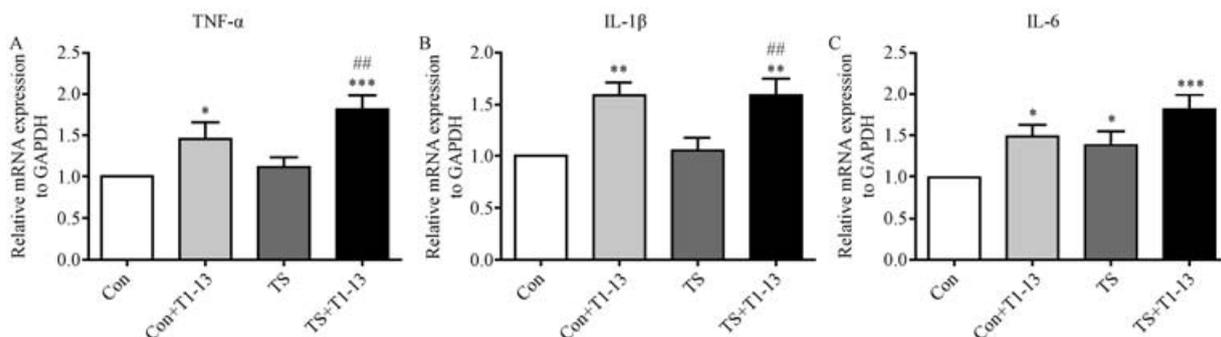


注: A: Con 组; B: Con + T1-13 组; C: TS 组; D: TS + T1-13 组。(↑绒毛顶端坏死脱落; ★绒毛坏死溶解; ☆坏死脱落细胞碎片; ▲绒毛上皮轻微增生; ♥凝固性坏死)。

图 2 小肠组织病理改变(HE 染色, ×20)

Note. A: Con; B: Con + T1-13; C: TS; D: TS + T1-13. (↑Necrosis in the top of intestinal villi; ★Necrolysis of intestinal villi; ☆cell debris from necrosis; ▲Slight hyperplasia of chorioepithelium; ♥Coagulative necrosis).

Fig. 2 Histopathological changes in small intestine tissue(HE staining, ×20)



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 对照组; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs 尾吊组; $n = 10$ 。

图 3 肠道组织炎症因子 mRNA 水平的表达

Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Con; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs TS; $n = 10$ 。

Fig. 3 mRNA expression level of inflammatory cytokines in intestinal tissue

3 讨论

人类在进行太空探索、执行空间任务过程中,常会受到失重、超重、辐射、震动、噪声等多种不利因素的影响。大量航天医学研究结果表明,失重可造成航天员的免疫功能下降,且随时间的延长而程度加重,从而导致机会性感染的机率增加,成为严重的健康风险及影响空间任务的主要障碍^[7]。同时,在载人航天活动中,一些正常定植的细菌会随着航天员或航空部件进入太空,并在太空舱内形成微生物群区。在特殊的空间环境下,微生物基因表达发生变化,毒力增加,生长速度加快,耐药性增强,使得机体受感染机会大大增加^[4,8-9]。大肠杆菌是哺乳动物常见的肠道正常寄生菌群,当机体免疫力低下、肠道正常菌群紊乱时可机会性致病,引起机体相应的肠道疾病。Raja Vukanti 等^[10]研究发现,在模拟失重条件下,大肠杆菌活力和生长速度明显加快,细菌代谢产物明显增多。

在一项模拟失重对小鼠 T 细胞亚群和某些细胞因子的影响的研究中发现^[11],尾部悬吊 7 d 后,小鼠 CD8⁺、CD4⁺ T 细胞数量明显降低,且 IL-6 活性呈增强趋势,另外一项长期飞行对机体免疫力影响的研究中发现^[12],不同时间的空间飞行后,血浆炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 均有不同程度的升高。我们参考既往已成功建立的多种地面模拟失重模型^[13],通过前期实验筛选出空间诱变型大肠杆菌 T1-13,感染模拟失重小鼠,建立模拟失重小鼠肠道感染模型,在尾吊 30 d 后染菌 3 d 观察血浆及肠道组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达,发现三种炎症因子在实验组中均升高,且 TS + T1-13 组最为显著,说明模拟失重及空间致病菌确可使机体免疫力下降、炎症反应增强,且三种炎症因子在全身感染性疾病和肠道黏膜免疫中均发挥重要作用。TNF- α 是由单核巨噬细胞产生的具有多种功能的细胞因子,在炎症的级联反应中首先被激活,并诱导 IL-1 β 、IL-6、IL-8 等的产生。当细菌感染时, TNF- α

水平迅速升高,但其高峰期时间较 IL-6 短,并很快下降至正常水平^[14]。在一项长期飞行的研究中发现,血浆中 TNF- α 在飞行中升高,飞行后较飞行前无明显改变^[12]。我们实验显示,TS 组 TNF- α 表达较对照组虽有升高,但不明显,认为与上述所述 TNF- α 表达峰值时间有关。另外,有研究表明暴露于不同时间的空间飞行,机体产生的免疫应答效应不尽相同,且免疫功能的恢复与飞行后返回地面的时间可能相关^[3,12]。

关于失重对机体消化系统的影响,有研究人员利用尾部悬吊大鼠模型,观察模拟失重 14 d 和 21 d 小肠组织结构,光镜和电镜结果均显示小肠黏膜绒毛和微绒毛稀少,变短变宽,表面积减少,小肠粘膜紧密连接蛋白表达减少,黏膜通透性增加,推测小肠粘膜微观结构的改变可能是航天员在航天飞行中出现消化系统不良症状的重要原因之一^[15]。我们在实验过程中观察小鼠状态,发现实验组小鼠均出现不同程度的厌食、消瘦、精神萎靡,进一步观察小肠组织结构,证实了模拟失重会改变肠道黏膜屏障的观点^[16]。另外在失重不良刺激作用下,胃肠道应激反应、蠕动紊乱、血管床淤血、微生态失调等一系列因素造成肠黏膜受损,细菌及其代谢产物由门静脉入血,导致机体出现全身炎症反应。

综上所述,空间诱变菌及模拟失重可使小鼠血浆及肠道组织中炎症因子表达升高、肠道黏膜屏障受损,提示空间环境较地面更易使机体炎症反应增强。

参考文献:

[1] Hirayanagi K, Iwase S, Kamiya A, *et al.* Functional Changes in Autonomic Nervous System and Baroreceptor Reflex Induced by 14 Days of 6 Degrees Head-Down Bed Rest [J]. *Eur J Appl Physiol*, 2004. 92(1-2): 160-167.

[2] Heralut S, Fomina G, Alferova I, *et al.* Cardiac, Arterial and Venous Adaptation to Weightlessness During 6-Month MIR Spaceflights with and without Thigh Cuffs (Bracelets) [J]. *Eur J Appl Physiol*, 2000. 81(5): 384-390.

[3] Crucian B, Stowe R, Quiariarte H, *et al.* Monocyte Phenotype and Cytokine Production Profiles are Dysregulated by Short-

Duration Spaceflight [J]. *Aviat Space Environ Med*, 2011. 82(9): 857-862.

[4] Wilson JW, Ott CM, Honer zu Bentrup K, *et al.* Space Flight Alters Bacterial Gene Expression and Virulence and Reveals a Role for Global Regulator Hfq [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007. 104(41): 16299-16304.

[5] 陈杰, 马进, 丁兆平, 等. 一种模拟长期失重影响的大鼠尾部悬吊模型[J]. *空间科学学报*, 1993(02): 159-162.

[6] 陈超, 郑成中. 致病性大肠杆菌胃肠感染小鼠模型血浆 Th1、Th2、Th17 淋巴细胞因子变化及意义[J]. *中国医药导报*, 2013(19): 37-39.

[7] Crucian B, Stowe R, Mehta S, *et al.* Immune System Dysregulation Occurs During Short Duration Spaceflight on Board the Space Shuttle [J]. *J Clin Immunol*, 2013. 33(2): 456-465.

[8] Rosenzweig JA, Abogunde O, Thomas K, *et al.* Spaceflight and Modeled Microgravity Effects on Microbial Growth and Virulence [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010. 85(4): 885-891.

[9] Charles D. Science on the Shuttle. Nasa's Busload of Science [J]. *Science*, 2011. 333(6038): 28-29.

[10] Vukanti R, Model MA, Leff LG. Effect of Modeled Reduced Gravity Conditions on Bacterial Morphology and Physiology [J]. *BMC Microbiol*, 2012. 12: 4.

[11] Wen XL, Yang GH, Wang T, *et al.* Effects of Simulated Weightlessness on T Cell Subpopulations and Activity of IL-2 and IL-6 in Mice [J]. *Space Med Med Eng (Beijing)*, 2001. 14(1): 60-62.

[12] Crucian BE, Zwart SR, Mehta S, *et al.* Plasma Cytokine Concentrations Indicate That *in vivo* Hormonal Regulation of Immunity is Altered During Long-Duration Spaceflight [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2014. 34(10): 778-786.

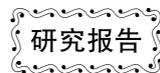
[13] 董丽, 王琼, 刘新民, 等. 地面模拟失重实验方法概况 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(05): 90-94.

[14] Panero A, Pacifico L, Rossi N, *et al.* Interleukin 6 in Neonates with Early and Late Onset Infection [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 1997. 16(4): 370-375.

[15] 陈英, 杨春敏, 毛高平, 等. 模拟失重大鼠小肠黏膜紧密连接蛋白表达的影响 [J]. *航天医学与医学工程*, 2011(05): 327-331.

[16] 白树民, 黄纪明, 朱德兵, 等. 模拟失重大鼠肠道菌群影响的研究 [J]. *中国微生态学杂志*, 2001(06): 20-21.

[修回日期] 2016-01-25



人工诱导树鼩乳腺肿瘤的病理分析

何保丽¹, 夏厚军², 角建林¹, 王春艳², 张海林²

(1. 昆明医科大学实验动物学部, 昆明 650500; 2. 中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223)

【摘要】 目的 建立树鼩乳腺肿瘤模型。方法 用DMBA联合人工合成孕激素MPA的方法, 挑选45只雌性树鼩, 随机分为3组。(1)DMBA组: 连续3次进行DMBA(20 mg/次)灌胃处理, 每周1次; (2)DMBA+MPA组: 每3周1次, 连续3次DMBA灌胃处理之后, 于树鼩背部左侧皮下第1次植入MPA缓释片剂(150 mg/片, 90 d缓释), 间隔3个月, 第2次植入MPA片; (3)正常对照组: 使用花生油进行灌胃处理, 每3周1次, 连续3次。实验处理后, 每周定期观察肿瘤发生情况, 共观察45周。采用HE染色对诱发肿瘤的病理类型进行鉴定。结果 DMBA能单独诱导树鼩特异的产生乳腺肿瘤, 诱发率为12%; 联合MPA皮下植入可以把DMBA诱导的乳腺肿瘤发病率提高到50%; 而对照组没有观察到乳腺肿瘤的发生。诱导的肿瘤主要为导管内乳头状瘤, 恶性程度低, 仅有一例为恶性程度高的浸润性导管癌。结论 所诱导的树鼩导管内乳头状瘤和浸润性导管癌均为人类共有的肿瘤病理类型。诱发肿瘤形态与自发肿瘤相似。

【关键词】 树鼩; 乳腺肿瘤; 模型, 动物

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0006-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.03.002

Pathological analysis of the induced breast tumor models in tree shrew

HE Bao-li¹, XIAO Hou-jun², JIAO Jian-lin¹, WANG Chun-yan², ZHANG Hai-lin²

(1. Department of Laboratory Animal Science, Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

2. Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China)

【Abstract】 Objective To establish a tree shrew mode of breast tumor. **Method** Forty-five 3 to 4 month-old female tree shrews were orally gavaged with 20 mg 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) or peanut oil per animal for three times. Following that, fifteen DMBA administrated tree shrews were implanted 90 day-release medroxyprogesterone acetate (MPA) pellets. The tree shrews were palpated once weekly to detect mammary tumors for 45 weeks after first DMBA administration. **Results** DMBA were able to induce breast tumors (12.5%) in tree shrews, and MPA increased the tumor incidence (50%) while no breast tumors were observed in the control group. Three induced breast tumors were intraductal papillary carcinomas and one was IDC by H&E stain. **Conclusion** All induced tumors are similar with spontaneous tumors in structure and molecular markers.

【Key words】 Tree shrew; Mammary tumor; Mmodel, animal

尽管早在1966年《Nature》就首次报道了一例树鼩自发性乳腺癌^[1], 国内夏厚军等^[2]报道了树鼩自发乳腺肿瘤的特征, 但自那以后, 极少见到学者

成功建立树鼩的乳腺癌模型研究报道。

二甲基苯蒽(7,12-dimethylbenz(a)anthracene, DMBA)是目前诱发乳腺肿瘤常用的化学致癌剂, 对

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31560613); 云南省应用基础研究昆医联合专项(2013FB126); 云南省应用基础研究计划(2013FZ071)。

【作者简介】 何保丽(1978-), 女, 博士, 从事人类疾病动物模型研究, Email: hbl117@sina.com。

乳腺的选择作用较强,特异性高达 70% ~ 80%^[3]。它是一种多环芳烃类化合物,经代谢产生致癌物,从而引起 DNA 损伤,基因突变,最终导致肿瘤生成。DMBA 所诱发的 SD 大鼠乳腺癌大多为 ER + / PR +^[4],表明雌激素和孕激素可以加速 DMBA 诱发的乳腺癌生长。研究证实醋酸甲羟孕酮(medroxyprogesterone acetate, MPA),一种人工合成的孕酮衍生物,能够加速大鼠^[5]或小鼠^[6]DMBA 诱发乳腺癌的速度。

DMBA 和 MPA 是否也能在树鼩中诱发乳腺肿瘤仍然是未知的,鉴于此,我们的实验首次尝试用 DMBA 和 MPA 诱导树鼩的乳腺肿瘤,分析不同诱导组的差异,以了解化学致癌剂对树鼩致乳腺肿瘤的情况,进一步探讨 DMBA 诱导的树鼩乳腺肿瘤模型是否适于人类乳腺肿瘤的研究,以期为人类乳腺肿瘤的研究提供新的动物模型。

1 材料和方法

1.1 动物及疼痛管理

实验用树鼩 45 只,雌性,3 ~ 4 月龄,由昆明医科大学实验动物学部提供【SCXK(滇)K2013 - 0002】,均为人工繁殖的子一代树鼩。所有树鼩饲养在普通级动物饲养室,饲喂树鼩专用的全价饲料,自由饮水。实验观察期限为 12 个月。动物实验在昆明医科大学动物实验室进行【SYXK(滇)2015 - 0002】。树鼩产生乳腺癌后,每天灌胃盐酸曲马多缓释片(2 mg/kg),以防止和缓解癌痛。

1.2 试剂

致癌剂 DMBA 购自美国 Sigma 公司,用花生油做为溶剂,DMBA 终浓度为 20 mg/mL。MPA 购自美国 Innovative Research of America,IRA)公司,规格为 150 mg/片,90 d 缓释片剂。

1.3 DMBA 诱导的树鼩乳腺肿瘤模型的建立

1.3.1 致癌剂灌胃和孕激素缓释片埋植

致癌剂 DMBA 和孕激素缓释片 MPA 联合诱导是建立乳腺癌动物模型的常用手段^[4]。我们拟选取 45 只子一代性成熟的雌性树鼩(3 ~ 4 个月),按体重随机分为 3 组,进行乳腺癌诱导实验。① DMBA + MPA 组:每 3 周 1 次,连续 3 次 DMBA 灌胃处理之后,于树鼩背部左侧皮下植入 MPA 缓释片剂(150 mg/片,90 d 缓释),间隔 3 个月植入第 2 次 MPA 片;② DMBA 组:连续 3 次进行 DMBA(20 mg/次)灌胃处理,每周 1 次;③ 正常对照组:使用花生

油进行灌胃处理。12 个月内观察树鼩乳腺癌发生情况。

1.3.2 树鼩乳腺肿瘤发生过程中的观察、记录及标本采集

在进行 DMBA 灌胃操作以后,每周观察树鼩乳腺部位肿瘤生长情况。当有可触肿瘤出现时,记录肿瘤的发现时间(潜伏期)、肿瘤大小和转移情况。每周测量肿瘤的长径和宽径,依照公式 $V = \pi LW^2/6$ 计算肿瘤的体积,制作肿瘤生长曲线图。在致癌过程中,记录树鼩死亡情况,制作生存曲线图。

树鼩乳腺标本的采集:灌胃 DMBA 后每周定期观察各组树鼩生长情况,观察各组树鼩肿瘤潜伏期(实验开始至肿瘤出现),肿瘤大小等,观察乳腺外观,发育情况,当肿瘤直径达到 2 cm 左右时将树鼩处死并解剖,将肿物完整切除,分别置于 10% 中性福尔马林溶液中固定、石蜡包埋、切片。其中当肿瘤出现破溃时则终止实验,并处死树鼩解剖,按实验结束统计。

1.3.3 树鼩乳腺肿瘤病理形态学分析

在诱导树鼩乳腺癌模型中,当肿瘤最长径达到 2 cm 左右,手术活取肿瘤组织,通过 HE 组织染色后鉴定树鼩乳腺肿瘤所属类型。HE 染色如下:切取肿瘤组织标本经甲醛固定,梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡,组织包埋,连续切片厚约 5 μm ,二甲苯脱蜡,无水酒精及各级酒精梯度水化,苏木素染色,1% 盐酸酒精分色,返蓝,0.5% 伊红染色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜 10 倍(低倍)物镜及 40 倍(高倍)物镜下观察,记录肿瘤的病理形态及恶性程度。

2 结果

2.1 DMBA 诱发乳腺肿瘤发生

由于树鼩是胆小易受惊的动物,应激性很强,有的树鼩在实验过程中因实验进行实验处理而死亡,尤其是在埋植 MPA 药片的时候。在实验结束时,DMBA + MPA 组有 6 只树鼩存活,DMBA 组有 8 只树鼩存活,对照组有 9 只树鼩存活。

DMBA 组有 1 只树鼩发生了肿瘤,树鼩肿瘤发生率为 12.5%;DMBA + MPA 组发生肿瘤的树鼩为 3 只,树鼩肿瘤发生比率为 50%;在对照组没有观察到肿瘤发生,肿瘤图片见图 1。与对照组相比,DMBA 处理组的肿瘤发生率并没有增加($P = 0.247, > 0.05$),而 DMBA + MPA 组的肿瘤发生率



注:A:在体乳腺肿瘤;B:离体肿瘤组织。

图1 DMBA 诱导的树鼩乳腺肿瘤

Note:A: Breast tumor in vivo; B: Tumor tissue in vitro.

Fig.1 DMBA-induced mammary tumors in tree shrews

显著提高 ($P = 0.018, < 0.05$); DMBA + MPA 组的肿瘤发生率与 DMBA 组相比没有显著差异 ($P = 0.124, > 0.05$)。肿瘤发生的潜伏期为 26 ~ 28 周, 第 1 只肿瘤发生在 DMBA 灌胃后第 25 周。

2.2 诱发乳腺肿瘤的病理类型

将这 4 个树鼩乳腺肿瘤进行 HE 染色后判断其所属类型(表 1), 共鉴定了 2 种类型, 即乳头状瘤和浸润性导管癌, 除 #7 外, 其它树鼩肿瘤均为导管内乳头状瘤, 属于良性肿瘤。#7 为浸润性导管癌 2 级, 属于恶性肿瘤。对照组 #3 仅为小叶增生。图 2 为各病理类型的代表性图片。导管内乳头状瘤显微镜下导管内可见乳头状结构, 乳头中轴见纤维及血管, 瘤细胞排列极性规则, 细胞无异型性。DMBA 诱导的两类乳腺肿瘤的形态结构与自发的相似。

图 2 为各病理类型的代表性图片。导管内乳头状瘤 (#12) 显微镜下结构与自发性导管内乳头状瘤极其一致, 乳头表面及腔面被覆双层上皮细胞, 内层为柱状上皮细胞, 胞浆较丰富, 外层为肌上皮细

胞, 其外包裹完整的基底膜。乳头中轴见纤维及血管, 瘤细胞排列极性规则, 细胞无异型性。#7 的浸润性导管癌也与自发导管癌在结构上比较一致, 瘤细胞充满多个扩张的导管内腔隙, 呈实性结构。瘤细胞较大, 形态多样, 异型性明显, 胞浆较丰富, 核仁大, 核膜厚, 核分裂象多见。依据腺管形成的程度、细胞核多形性及核分裂数的多少将此浸润性导管癌分为中度分化的 II 级。

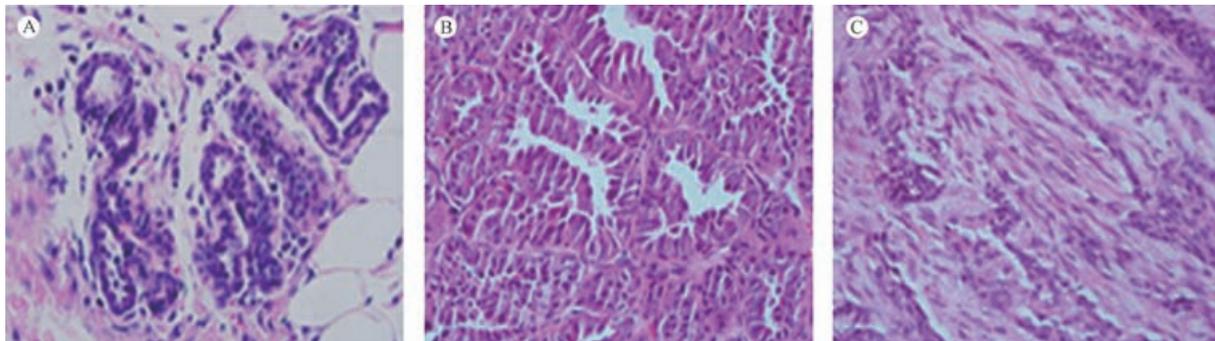
表 1 DMBA 诱导树鼩乳腺肿瘤的病理类型

Tab.1 Pathological types of DMBA-induced mammary tumors in tree shrews

组别 Group	编号 No.	HE 染色结果 H&E Result
DMBA + MPA	#7	浸润性导管癌 II 级
	#11	导管内乳头状瘤病
	#12	导管内乳头状瘤病
DMBA	#30	导管内乳头状瘤病

3 讨论

至今为止, 关于野生或人工驯养的树鼩人工诱



注:A:正常乳腺组织;B:导管内乳头状瘤($\times 40$);C:浸润性导管癌($\times 40$)。

图2 DMBA 诱发的肿瘤病理类型

Note:A: normal tissue; B: intraductal papillomas; C: invasive duct carcinoma.

Fig.2 Pathological types of DMBA-induced mammary tumors in tree shrews

导的肿瘤模型只有两个成功建立,一个是黄曲霉素 B1^[7]和 HBV^[8-9]联合诱导的肝癌模型,另一个是 2-羟基丙基亚硝酸胺(2, 2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine, DHPN)诱导的肺腺瘤模型^[10]。由于缺乏转移的和免疫缺陷的树鼩,我们不得不采用诱导时间很长的化学诱导法,DMBA^[11]和亚硝基甲基脲(N-methyl-nitrosourea, NMU)^[12]是在啮齿类动物乳腺诱导中常用的两种致癌剂。实验中所使用的致癌剂 DMBA 主要是通过微粒体的羟化酶系经过羟基化和环氧化等代谢过程产生最终致癌物^[13]。我们的研究选用了 DMBA 作为致癌剂,DMBA 由于不溶于水而必须用油或吐温溶解。DMBA 的给药方式可以通过灌胃^[14],也可以肌肉注射^[15],或者乳腺导管内注射^[16]。我们采用灌胃的方式进行给药。另外,越来越多的证据证明,在人类女性的雌激素联合孕酮的治疗中,长期的孕酮治疗增加乳腺癌的患病风险^[17]。有研究发现孕酮和它的衍生物 MPA 足以诱导乳腺癌^[18],而且,MPA 的致癌效应也被随后在大鼠、猫、狗和小鼠的研究所支持^[19],这些研究证实了 MPA 能加速乳腺癌的发生。本研究中,最早出现可触及的乳腺肿瘤的时间为实验处理后第 25 周,这一肿瘤潜伏期与大鼠的 11 周相差甚远,肿瘤诱发率也远低于大鼠(80%以上),与国内文献报道的注射法致癌不一致^[20-21]。出现这一情况的原因除了 DMBA 的给药方法不同以外,可能还跟动物种属差异也有较大的关系,由于种属不同,对致癌剂的敏感性也不一样。我们的研究中还发现 MPA 能够加速 DMBA 诱导的树鼩乳腺肿瘤的发生,并提高肿瘤发病率。DMBA 联合 MPA 诱导的树鼩乳腺肿瘤有两种类型,即导管内乳头状瘤和浸润性导管癌,其中,以导管内乳头状瘤为主,所诱导的乳腺肿瘤在组织形态、结构方面与自发乳腺肿瘤相似。DMBA 诱导啮齿类会产生多种类型器官的肿瘤,而在树鼩,DMBA 诱导树鼩产生的肿瘤集中在乳腺肿瘤,但大多是导管内乳头状瘤。虽说诱发树鼩肿瘤和自发的类型有相似之处,但与人高比例导管癌的情况有一定差异。

综上所述,采用 DMBA 灌胃的方法成功建立了树鼩的乳腺肿瘤模型,MPA 与 DMBA 联合使用可以促进树鼩乳腺肿瘤的发生。所诱导的导管内乳头状瘤和浸润性导管癌均为人类共有的肿瘤类型,但存在潜伏期长、肿瘤发生率低、主要病理类型为非浸润性导管癌的优点。这一方法所建立的肿瘤模

型其肿瘤是非常不规则的形状,很难定期监测肿瘤准确生长速度和体积,在以后的研究中,课题组将着力解决这一问题。该模型的成功建立,为研究人类乳腺肿瘤的发生、发展、预防及治疗提供了一个新的比啮齿类动物更高级的动物模型。

参考文献:

- [1] Elliot OS, Elliot MW, Lisco H. Breast cancer in a tree shrew (*Tupaia glis*) [J]. Nature. 1966, 211(5053):1105.
- [2] Xia HJ, Wang CY, Zhang HL, et al. Characterization of spontaneous breast tumor in tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. Dongwuxue Yanjiu 2012;33(1):55 - 59.
- [3] Wurz GT, Marchisano-Karpman C, DeGregorio MW. Ineffectiveness of American ginseng in the prevention of dimethylbenzanthracene-induced mammary tumors in mice [J]. Oncol Res. 2006, 16(6):251 - 260.
- [4] Gallo D, Ferrandina G, Giacomelli S, et al. Dietary soy modulation of biochemical parameters in DMBA-induced mammary tumors [J]. Cancer Lett. 2002, 186(1):43 - 48.
- [5] Benakanakere I, Besch-Williford C, Schnell J, et al. Natural and synthetic progestins accelerate 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-initiated mammary tumors and increase angiogenesis in Sprague-Dawley rats [J]. Clin Cancer Res. 2006, 12(13):4062 - 4071.
- [6] Aldaz CM, Liao QY, LaBate M, et al. Medroxyprogesterone acetate accelerates the development and increases the incidence of mouse mammary tumors induced by dimethylbenzanthracene [J]. Carcinogenesis. 1996, 17(9):2069 - 2072.
- [7] Reddy JK, Svoboda DJ, Rao MS. Induction of liver tumors by aflatoxin B1 in the tree shrew (*Tupaia glis*), a nonhuman primate [J]. Cancer research 1976, 36(1):151 - 160.
- [8] Park US, Su JJ, Ban KC, et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene in tree shrew hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus infection and intake of aflatoxin B1 [J]. Gene. 2000, 251(1):73 - 80.
- [9] Yan H, Zhong G, Xu G, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus [J]. Elife, 2012, 1:e00049.
- [10] Rao MS, Reddy JK. Carcinogenicity of 2, 2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine in the tree shrew (*Tupaia glis*): light and electron microscopic features of pulmonary adenomas [J]. Journal of the National Cancer Institute. 1980, 65(4):835 - 840.
- [11] Sasaki T, Uehara N, Yuri T. Mammary tumorigenesis and chemoprevention studies in carcinogen-treated rats [J]. Journal of mammary gland biology and neoplasia. 1996, 1(1):37 - 47.
- [12] Tsubura A, Lai YC, Miki H, et al. Animal models of N-Methyl-N-nitrosourea-induced mammary cancer and retinal degeneration with special emphasis on therapeutic trials [J]. In Vivo. 2011, 25(1):11 - 22.
- [13] Thonpson HJ, Meeker LD. Induction of mammary gland

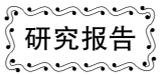
- carcinomas by the Subcutaneous injection-Methyl-nitrosourea [J]. *Cancer Res.* 1983,43: 1628 - 1629.
- [14] Benakanakere I, Besch-Williford C, Schnell J, *et al.* Natural and synthetic progestins accelerate 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-initiated mammary tumors and increase angiogenesis in Sprague-Dawley rats[J]. *Clinical cancer research ; an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006, 12(13): 4062 - 4071.
- [15] Labrie F, Li S, Labrie C, *et al.* Inhibitory effect of a steroidal antiestrogen (EM-170) on estrone-stimulated growth of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA)-induced mammary carcinoma in the rat [J]. *Breast cancer research and treatment* 1995, 33(3):237 - 244.
- [16] Terada S, Uchide K, Suzuki N, *et al.* Induction of ductal carcinomas by intraductal administration of 7, 12-dimethylbenz (a)anthracene in Wistar rats [J]. *Breast cancer research and treatment.* 1995, 34(1):35 - 43.
- [17] Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, *et al.* Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study [J]. *Lancet.* 2003, 362(9382):419 - 427.
- [18] Lanari C, Molinolo AA, Pasqualini CD, *et al.* Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice [J]. *Cancer letters.* 1986, 33(2):215 - 223.
- [19] Ohi Y, Yoshida H. Influence of estrogen and progesterone on the induction of mammary carcinomas by 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene in ovariectomized rats [J]. *Virchows Archiv B, Cell pathology including molecular pathology.* 1992, 62(6):365 - 370.
- [20] 姜军,陈意生,柳凤轩,等. 二甲基苯蒽诱导大鼠乳腺癌发生的组织形态学研究 [J]. *中国肿瘤临床.* 1998,25:436 - 438.
- [21] Xia HJ, Chen CS, He BL, *et al.* Progress of non-human primate animal models of cancers [J]. *Dongwuxue Yanjiu.* 2011;32(1):70 - 80.

[修回日期] 2015 - 12 - 25

(下接第 15 页)

- [9] Cirone M, Conte V, Farina A, *et al.* HHV-8 reduces dendritic cell migration through down-regulation of cell-surfaceCCR6 and CCR7 and cytoskeleton reorganization [J]. *Virology* 2012; 9: 92.
- [10] Demedts IK, Bracke KR, Van Pottelberge G, *et al.* Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175 (10): 998 - 1005.
- [11] 顾延会,欧阳瑶. 烟熏联合脂多糖制备大鼠慢性阻塞性肺疾病动物模型 [J]. *重庆医学*, 2012, 41(13): 1295 - 1296.
- [12] Vestbo J, Hurd S S, Agustí A G, *et al.* Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187(4): 347 - 365.
- [13] 汪珊珊,汪电雷,陶秀华,等. 脂多糖诱导的慢性阻塞性肺病模型大鼠肺支气管上皮 MRP1 功能分析 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22 (3):30 - 34.
- [14] Manuel A Silva, Monica Porras, Jennifer Jury, *et al.* Characterization of Ileal Dendritic Cell Distribution in a Rat Model of Acute and Chronic Inflammation [J]. *Inflamm Bowel Dis* 2006, 12: 457 - 470.
- [15] Lara E Kallal, Matthew A Schaller, Dennis M. Lindell, *et al.* CCL20/CCR6 blockade enhances immunity to RSV by impairing recruitment of DC [J]. *Eur. J. Immunol*, 2010, 40: 1042 - 1052.
- [16] 郭佳,黄建华. 小鼠树突状细胞亚群与 T 细胞关系的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2006, 14 (3):236 - 240.
- [17] Liao S, Ding T, Rao X, *et al.* Cigarette smoke affects dendritic cell maturation in the small airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Mol Biol Rep* 2015, 11: 219 - 225.
- [18] López-Cotarelo P, Escribano-Díaz C, González-Bethencourt IL, *et al.* A novel MEK-ERK-AMPK signaling axis controls chemokine receptor CCR7-dependent survival in human mature dendritic cells [J]. *J Biol Chem.* 2015 290(2):827 - 840.

[修回日期] 2016 - 01 - 25



慢阻肺大鼠肺组织中树突状细胞表面因子的表达变化及 CCL20 抗体的干预作用

孙得胜^{1,2}, 欧阳瑶¹, 顾延会¹

(1. 遵义医学院附属医院 呼吸一科, 贵州 遵义 563003; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 呼吸与危重症医学科, 卫生部呼吸系统疾病重点实验室, 武汉 430030)

【摘要】 目的 了解树突状细胞表面因子 OX62、CD83 在慢阻肺大鼠肺部的表达变化, 并探讨 CCL20 抗体的干预作用。方法 选用 30 只健康 Wistar 大鼠, 随机分为健康对照组(10 只)、慢阻肺模型组(10 只)、CCL20 单抗组(10 只), 用气道内注入脂多糖(共 2 次)联合烟雾刺激(约 28 d)的方法诱导慢阻肺模型。在实验初始对单抗组大鼠以 CCL20 单克隆抗体腹腔注射一次。在第 29 天取大鼠的肺组织观察其病理学改变, 用免疫组织化学技术检测肺部树突状细胞(DC)的表面因子 OX62、CD83 的表达变化。**结果** 模型组大鼠肺组织 HE 染色符合气道炎症和肺气肿的表现, CCL20 单抗组大鼠肺部病理表现比慢阻肺组明显减轻。与健康对照组相比, 慢阻肺模型组大鼠的肺组织中 OX62 的表达比对照组明显增多($P < 0.05$), 而在 CCL20 单抗组低于慢阻肺组($P < 0.05$)。慢阻肺模型组大鼠肺组织中 CD83 的表达比对照组少($P < 0.05$), 而在慢阻肺组与 CCL20 单抗组之间则没有明显的差异($P > 0.05$)。**结论** 慢阻肺的发病可能与肺部 OX62 的表达增多及 CD83 的表达减少有关, 使用 CCL20 单抗能部分地抑制这一效应。

【关键词】 慢阻肺; 树突状细胞; CCL20 单抗; OX62; CD83

【中图分类号】 R563.3 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0011-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.03.003

Expression of the surface factors of dendritic cells in the lung tissues of rats with COPD and the effect of CCL20 antibody on it

SUN De-sheng^{1,2}, OUYANG Yao¹, GU Yan-hui¹

(1. Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Guizhou Zunyi 563003, China;

2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Key Laboratory of Pulmonary Diseases of Health Ministry, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China.)

【Abstract】 Objective To understand the expression of OX62 and CD83 in the lungs of rats with COPD, and to investigate the effect of the CCL20 monoclonal antibody on it. **Methods** A total of 30 rats were randomly divided into three groups: normal, model, and CCL20 antibody treated. COPD was induced by cigarette smoke exposure 28 days and LPS solution injection twice. The rats were injected with CCL20 antibody in the last group on the first day. The rats were sacrificed on the 29th day. We investigated the pathomorphology of their lungs by HE staining and evaluated the DC distribution in their lungs by immunohistochemistry. **Results** The HE staining results of the COPD models are consistent with the typical pathological features of COPD patients, the lung pathology in CCL20 group was significantly attenuated than

【基金项目】 国家自然科学基金(81460008)。

【作者简介】 孙得胜(1980-),男,主治医师,博士生,主要研究方向:慢性阻塞性肺疾病的发病机制。E-mail: sun_desheng@163.com。

【通讯作者】 欧阳瑶(1965-),女,主任医师,教授,主要研究方向:慢性阻塞性肺疾病的基础与临床。E-mail: ouyangyao116@sohu.com。

that in the COPD group. Compared with healthy control group, the OX62 + DCs in the COPD model group was significantly increased ($P < 0.05$), and the CCL20 group was lower than that in the COPD group ($P < 0.05$). The CD83 + DCs of COPD group was lower than that in healthy control group ($P < 0.05$), and the difference was not statistically significant between COPD and CCL20 treated group ($P > 0.05$). **Conclusion** The pathogenesis of COPD may be related to the increase of OX62 + DC and the decrease of CD83 + DC, and this effect could be partly inhibited by CCL20 antibody.

【Key words】 COPD; Dendritic cell; CCL20 antibody; OX62; CD83

自 1679 年 Bonet 以“庞大容量的肺”描述慢性阻塞性肺疾病(简称慢阻肺, COPD)到近年 GOLD (The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, 慢阻肺全球倡议)对慢阻肺最新定义的认识,气道和肺组织对有害气体或颗粒的异常炎症反应被认为是其重要特征^[1],且越来越多的研究提示慢阻肺也可能是一种自身免疫性疾病^[2],有学者发现在其发病过程中有免疫细胞被募集到肺^[3]。慢阻肺中的免疫应答是在特定的抗原驱使下完成的^[3-4],同时它受到树突状细胞(dendritic cell, DC)的严密调控^[5-6]。DC 环绕气道形成敏感的防御体系,在外来抗原侵袭机体时,它们从完好的上皮组织移行到受侵袭的部位并摄取这些抗原^[7],DC 表面受体在信号刺激下介导了此过程^[8]。DC 继续迁移到局部引流淋巴结,提呈所摄取的抗原给相关的 T 细胞。相应的炎症反应就是在这些 T 淋巴细胞的介导下发生的。DC 的迁移是趋化作用的结果,在它们的趋化因子与相关的受体间的相互作用下完成^[9]。CCL20 是未成熟树突状细胞(imature DC, iDC)的主要趋化因子,当气道发生炎症反应的时候,表达于气道上皮的 CCL20 大量增加^[10],它与受体间的相互作用被认为是 iDC 被募集于气道的一个可能的重要机制。

我们通过香烟烟雾刺激和气道内注入细菌内毒素脂多糖(LPS)制备大鼠慢阻肺模型,分别检测 DC 的表面因子 OX62 和 CD83 在肺组织中的表达,并通过阻断 CCL20 观察抗 CCL20 干预对慢阻肺大鼠的治疗效果。

1 材料和方法

1.1 实验材料

清洁级 Wistar 雄性大鼠(共 30 只),鼠龄 8 周,体重 200 ~ 220 g,由重庆市第三军医大学大坪医院实验动物中心提供【SCXK(渝)2014 - 0005】。二部法抗兔/鼠通用型免疫组化试剂盒(上海基因科技公司),小鼠抗大鼠 OX62 单克隆抗体(美国 R&D Systems 公司),兔抗-CD83 多克隆抗体(北京博奥森

生物技术公司),大鼠 CCL20 单克隆抗体(美国 R&D Systems 公司),羊抗鼠 IgG-HRP(北京爱普华美生物科技公司),脂多糖(美国 Sigma 公司),香烟(黄果树牌,烟气烟碱 1.0 mg 焦油 11 mg 一氧化碳量 13 mg 贵州中烟工业有限公司)。

1.2 模型的建立

实验在遵义医学院进行【SYXK(黔)2014 - 003】将大鼠随机分为健康对照组、慢阻肺模型组和 CCL20 单抗干预组(每组 10 只)。使用香烟烟雾刺激和气道内注入脂多糖的方法制备慢阻肺模型^[11]:后两组大鼠于第 1 天和第 15 天气道内注入脂多糖溶液(200 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$);第 2 ~ 28 天(第 15 天除外)于造模箱(由玻璃制成,25 cm \times 35 cm \times 80 cm,箱顶有直径约 2 cm 的通气孔,箱中部从下向上有两排铁网,铁网间摆放并点燃香烟)内被动吸烟(每天 2 次,每次燃 12 支香烟)。当日 2 次被动吸烟造模间隔 2 h,健康对照组不予上述处理。CCL20 单抗组大鼠第 1 天注脂多糖前用 CCL20 单克隆抗体(100 $\mu\text{g}/\text{只}$)腹腔注射。

1.3 标本采集

第 29 天分别选取两组大鼠麻醉后开胸,剪取左肺予多聚甲醛固定,制作石蜡标本及病理切片,并行 HE 染色及免疫组化实验。取右肺各叶放入低温冷冻管,并保存备用。

1.4 指标检测

观察模型组大鼠肺组织 HE 染色切片是否有慢支炎、肺气肿的病理表现,CCL20 单抗组的病理改变是否有所减轻。免疫组化实验的切片于光镜下选阳性表达最强的 5 个视野,计算机采图后输入软件 IPWIN 60 中分析,计算积分值光密度(IOD),每幅图使用此软件分析 3 次。在同一切片中随机选取 5 个不同视野,分别测得积分光密度值,以其平均值代表样本中 OX62 或 CD83 的表达水平。

1.5 数据分析

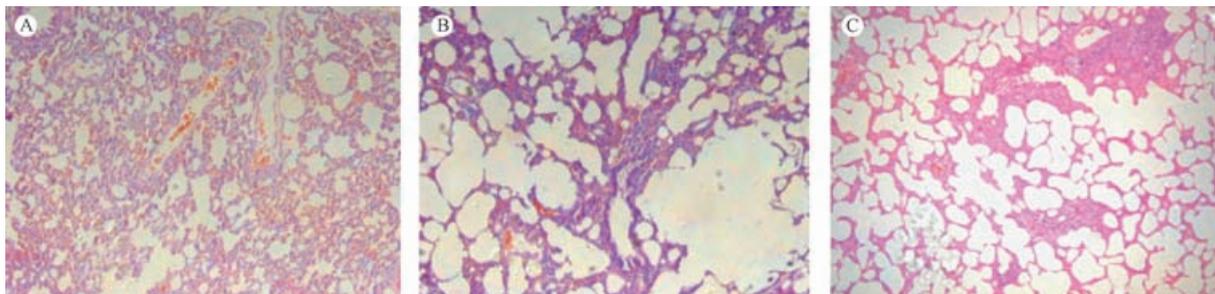
计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有独立的实验至少重复 3 次。统计学分析用 SPSS19.0 统计软件完成,用单因素方差分析的方法比较各组间样本均数,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组大鼠肺组织的病理表现

对照组:肺泡结构完整连续,未见炎性细胞浸润,符合正常肺组织病理表现。慢阻肺模型组:肺

泡间隔内可看到毛细血管扩张充血,伴炎性细胞浸润,部分肺泡间隔断裂、融合,呈“慢支炎、肺气肿”改变,符合慢阻肺的典型病理特点。CCL20 单抗组:肺泡间隔增宽,伴有炎细胞浸润,部分肺泡腔略扩大,但病变程度明显比慢阻肺组减轻(图 1)



注:A. 对照组;B. 慢阻肺组;C. CCL20 单抗组。

图 1 肺组织病理表现($\times 10$)

Note: A (controls); B (COPD models); C (CCL20 monoclonal antibody treated group).

Fig. 1 Photomicrographs of haematoxylin and eosin stained lung tissue ($\times 10$)

2.2 三组大鼠肺组织中 OX62 和 CD83 的表达

OX62 和 CD83 的免疫组化阳性染色主要表达于 DC 的胞浆,广泛分布于肺泡以及气道周围的相关淋巴组织和血管附近。慢阻肺模型组大鼠的肺组织 OX62 表达比对照组显著增多($P < 0.05$),而 CCL20 单抗组的 OX62 表达比慢阻肺模型组显著减少($P < 0.05$)。慢阻肺模型组大鼠的肺组织中 CD83 的表达比健康对照组显著减少($P < 0.05$),而与 CCL20 单抗组相比,无明显差异($P > 0.05$)(图 2/表 1)

大鼠肺组织病理表现与早期文献报道一致^[11-13],符合慢阻肺肺组织的典型病理特点,CCL20 单抗干预组大鼠肺组织的病理改变比慢阻肺模型组显著减轻。

本实验显示,慢阻肺模型组大鼠肺组织中 DC 的表面因子 OX62 的表达比对照组显著增加。OX62 是大鼠 DC 的标志物^[14],CCL20 是未成熟 DC (immature DC, iDC) 的趋化因子^[15],当气道发生炎症反应的时候,在 CCL20 等趋化因子作用下,部分 iDC 向肺部迁移^[16],故而引起肺部 DC 增多、OX62 的表达增加。实验还发现 CCL20 单抗组 OX62 的表达比慢阻肺模型组减少($P < 0.05$),这很可能由于部分 CCL20 与注射到体内的 CCL20 抗体结合,从而使对 DC 发挥趋化作用的 CCL20 减少,使肺部 OX62 的表达减少,同时也使病情减轻。

表 1 OX62 和 CD83 在三组大鼠肺组织中的表达($n = 10$)

Tab. 1 Expression of OX62 and CD83 in lung tissues of rats in the three groups($n = 10$)

组别 Groups	积分光密度(IOD)	
	OX62	CD83
健康对照组 Controls	17.07 \pm 3.31	43.43 \pm 14.33
慢阻肺模型组 COPD models	73.45 \pm 5.42*	14.76 \pm 5.58*
CCL20 单抗组 CCL20 group	37.58 \pm 3.79#	24.25 \pm 8.81

注: * 与健康对照组比较, $P < 0.05$; # 与慢阻肺模型组比较, $P < 0.05$ 。

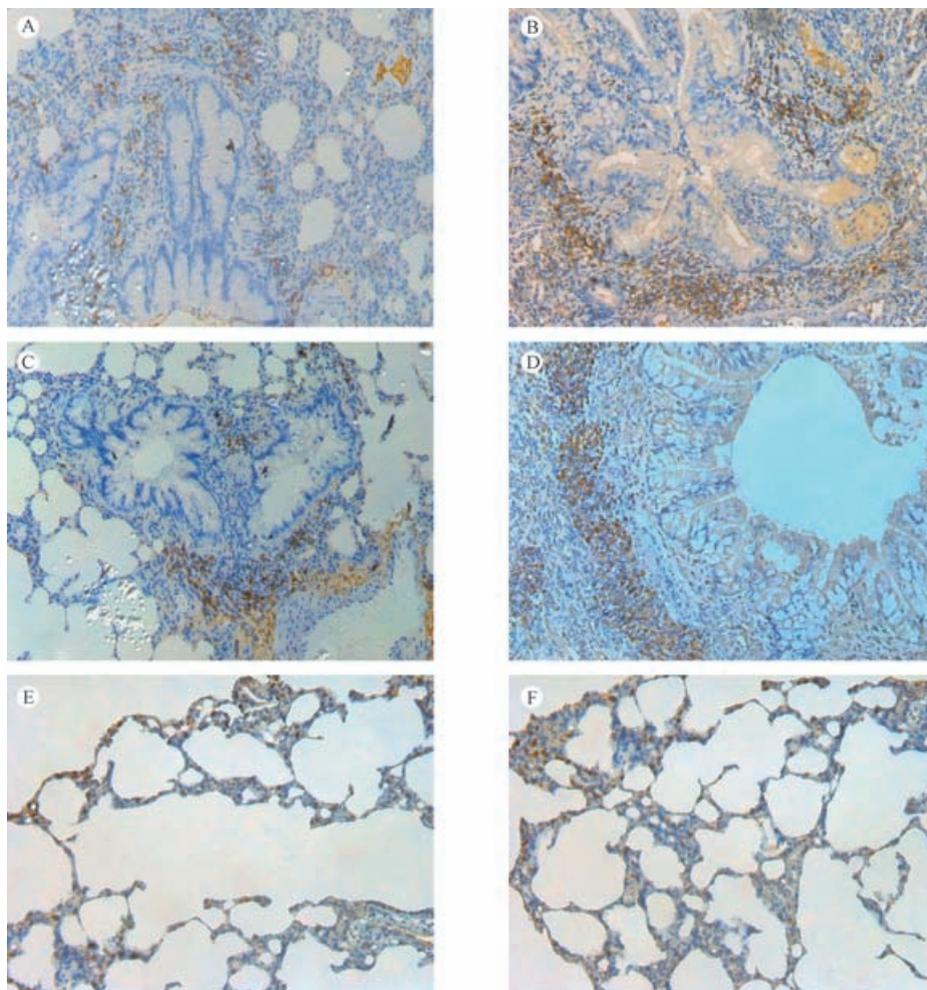
Note: Compared with the control group * $P < 0.05$; compared with the COPD model group # $P < 0.05$.

3 讨论

慢阻肺是一种严重危及人类健康的气道慢性炎症性疾病,具有病程长、难治愈、易复发的特点,以逐渐进展、不完全可逆的气流受限为特征^[12],吸烟和感染被公认是引起它发生发展的最主要的环境因素。我们对大鼠进行烟雾刺激并注射脂多糖诱发感染以模拟这种病理生理过程,4 周后模型组

本研究显示,慢阻肺模型组大鼠的肺组织中 CD83 的表达比健康对照组显著减少。CD83 是成熟 DC(mDC)的标志物^[17],这也许与肺部 mDC 在慢阻肺的发病过程中向局部引流淋巴结发生迁移有关^[18]。CCL20 单抗组与慢阻肺模型组相比,CD83 在肺组织中的表达无明显差异($P > 0.05$)。考虑到 CCL20 是 iDC 的趋化因子,而 mDC 的迁移在其他趋化因子的作用下完成,故单抗组大鼠体内注入 CCL20 单抗后并未对 mDC 产生直接影响,从而该组大鼠肺组织中 CD83 的表达与慢阻肺组无明显差异。

综上所述,我们通过实验发现慢阻肺的发病可



注:A. 正常对照组 OX62; B. 慢阻肺模型组 OX62; C. CCL20 单抗组 OX62; D. 正常对照组 CD83; E. 慢阻肺模型组 CD83; F. CCL20 单抗组 CD83。

图 2 各组大鼠免疫组化染色表现(×20)

Note: A. OX62 expression in the controls; B. OX62 expression in the COPD models; C. OX62 expression in the CCL20 monoclonal antibody treated group; D. CD83 expression in the controls; E. CD83 expression in the COPD models; F. CD83 expression in the CCL20 monoclonal antibody treated group.

Fig. 2 Immunohistochemical staining of the rats in each group (×20)

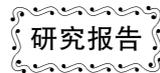
能与肺部 OX62 表达的增多及 CD83 表达的减少有关,使用 CCL20 单抗干预治疗能部分地缓解这种改变,从病理结果来看,其对慢阻肺的气道炎症及病理损害过程有一定的抑制或延缓作用。

参考文献:

- [1] Kim V, Criner GJ. Chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Crit Care Med 2013; 187: 228 - 237.
- [2] Brusselle G G, Joos G F, Bracke K R. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Lancet, 2011, 378(49):1015 - 1026.
- [3] Givi ME, Folkerts G, Wagenaar GTM, et al. Cigarette smoke differentially modulates dendritic cell maturation and function in time[J]. Respiratory Research. 2015;16:131 - 140.
- [4] Tanrıverdi H, Örnek T, Erboylu F, et al. Comparison of diagnostic

values of procalcitonin, C-reactive protein and blood neutrophil/lymphocyte ratio levels in predicting bacterial infection in hospitalized patients with acute exacerbations of COPD[J]. Wien Klin Wochenschr. 2015; 127:756 - 763.

- [5] Givi ME, Redegeld FA, Folkerts G, et al. Dendritic cells in pathogenesis of COPD [J]. Curr Pharm Des 2012; 18: 2329 - 2335.
- [6] Steinman RM. Decisions about Dendritic Cells: Past, Present, and Future[J]. Ann Rev Immunol 2012; 30: 1 - 22.
- [7] Blank F, Rothen-Rutishauser B, Gehr P. Dendritic cells and macrophages form a transepithelial network against foreign particulate antigens[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007, 36 (6):669 - 677.
- [8] Welte T, Miravittles M. Viral, bacterial or both? Regardless, we need to treat infection in COPD[J]. Eur Respir J. 2014; 44 (1):11 - 13.



高脂饮食结合 STZ 诱导妊娠期糖尿病小鼠模型的建立

陈琳¹, 黄小丽¹, 杨亚旭¹, 周美佳¹, 郝臻凤², 孔桂美¹, 胡荣¹, 卜平¹

(1. 扬州大学医学院, 江苏 扬州 2225000; 2. 泰兴市人民医院, 江苏 泰州 225300)

【摘要】 目的 探讨稳定、可靠与妊娠期胰岛素抵抗相似的小鼠模型建立方法。方法 将 60 只 SPF 级 5 周龄 KM 小鼠随机分为高脂饮食组和普食组, 高脂饮食组高脂饲料喂养 4 周后, 按雌雄 1:1 合笼, 在雌鼠阴道看到阴道栓定位妊娠第一天。妊娠成功后, 按 30 mg/kg 间隔 24 h 腹腔注射, 共注射 3 次, 对照组注射等量的柠檬酸缓冲液(0.1 mol/L, pH=4.2)。于造模成功后的第 3、7、14 及 19 天记录小鼠的随机血糖, 体重, 以及 24 h 的饮水量和摄食量。ELISA 检测血清中 INS、ADP、LEP 和 CRP 因子的浓度。结果 孕鼠在造模成功后出现明显饮水量、摄食量、尿量增多症状, 饮水量、摄食量与对照组相比有显著差异($P < 0.01$), 造模组血糖 > 11.1 mmol/L, 明显高于对照组。GDM 组 INS(1.50 ± 0.25) $\mu\text{u/L}$, ADP(0.65 ± 0.13) $\mu\text{g/L}$, LEP(1.60 ± 0.12) $\mu\text{g/L}$, CRP(37.54 ± 4.70) $\mu\text{g/L}$, 与对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。产后, 小鼠血糖恢复到正常水平。结论 高脂饮食结合小剂量 STZ 多次诱导的方法能够建立的 GDM 模型且符合人类妊娠期糖尿病病理性胰岛素抵抗的特征。

【关键词】 妊娠期糖尿病; 高脂饮食; 链脲佐菌素; 模型; 小鼠

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0015-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.03.004

High fat diet combined with streptozotocin-induced gestational diabetes mellitus on mice

CHEN Lin¹, HUANG Xiao-li¹, YANG Ya-xu¹, ZHOU Mei-jia¹, HAO Zhen-feng², KONG Gui-mei¹, HU Rong¹, BO Ping¹

(1. School of Medicine, Yangzhou University, Jiangsu Yangzhou 225000, China;

2. Taixing People's Hospital, Jiangsu Taizhou 225300, China)

【Abstract】 Objective To explore a gestational insulin resistance mice model establishing method, which is steady, reliable and similar to human being. **Method** Female KM mice at 5 weeks were randomly divided into high fat diet group ($n=30$) and normal diet group ($n=30$). High fat diet group was exposed to high diet for 4 weeks, and then male and female were mated ($n:n=1:1$) Then the pregnancy mice were intraperitoneal injected with 30 mg/kg/d STZ during the first 3 days, the control group was injected with equal dosage of citrate buffer solution(0.1 mol/L, pH=4.2) for 3 days. Their blood glucose, body weight, the amount of food intake and water intake were recorded at 3, 7, 14 and 19 d of the GDM model respectively. The serum INS, ADP, LEP, CRP were measured by ELISA. **Results** We successfully made the GDM mice model, and the pregnant mice showed significant signs of polyuria, polydipsia, hyperphagia and weight loss compared to the control model ($P < 0.01$). The blood glucose of GDM mice > 11.1 mmol/L, the serum cytokines (INS(1.50 ± 0.25) $\mu\text{u/L}$, ADP(0.65 ± 0.13) $\mu\text{g/L}$, LEP(1.60 ± 0.12) $\mu\text{g/L}$, CRP(37.54 ± 4.70) $\mu\text{g/L}$

【基金项目】国家自然科学基金资助项目(81272537;30801497);江苏省高校自然科学基金资助项目(11KJB360010);扬州大学“新世纪人才工程”资助(2012)。

【作者简介】陈琳(1991-),女,硕士,专业:药剂学。E-mail: chenlin910107@163.com。

【通讯作者】孔桂美(1978-),女,副教授,研究方向:肿瘤防治及人类疾病动物模型研究。E-mail: gmkong@yzu.edu.cn;胡荣(1957-),女,教授,研究方向:药剂学及中药药剂学。E-mail: 398563432@qq.com。

L) of GDM mice were significant difference compared to the control model ($P < 0.01$). Postpartum, the GDM mice blood glucose returned to the normal level. **Conclusion** Gestational diabetes mellitus mice model can be successfully developed by high fat diet with low dose STZ and three times induce, which preferable mimics the characteristic of gestational pathologic insulin resistance in human beings.

【Key words】 Gestational diabetes mellitus; High fat diet; Streptozotocin; Model; Mice

妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 系指在妊娠期首次发现或发生的糖代谢异常, 是孕期常见的并发症之一。GDM 对孕妇、胎儿, 甚至新生儿、婴儿等产生许多不良影响, 增加了巨大儿、畸形胎儿及死胎的发生率, 也增加了 II 型糖尿病家族史的妇女患心血管疾病的风险。由于妊娠期的特殊性, 使很多有创性研究无法展开, 在一定程度上限制了对 GDM 病理生理等方面的深入研究, 因此 GDM 动物实验模型的建立有助于对 GDM 更进一步的研究。目前国内外建立糖尿病动物模型已有很多成熟的方法, 但制作 GDM 的动物模型截止今日尚无成熟的办法。胰岛素抵抗 (IR) 被认为是 GDM 发生的病理生理基础^[1], 而在众多影响胰岛素抵抗的众多因素中, 饮食结构中脂肪比例增加是形成肥胖和胰岛素抵抗的重要因素^[2]。链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 是目前广泛用于建立糖尿病动物模型的化学诱导剂^[3]。本研究我们结合妊娠期的特殊性, 以及以往建立糖尿病模型的方法, 采用高脂饮食诱导结合小剂量 STZ 多次诱导的方法建立 GDM 的动物模型, 并通过血糖的测定, 血清中与糖尿病相关的炎症因子含量的测定等指标来确定模型建立情况。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 4 周龄 KM 小鼠 60 只 (雌雄各半), 体重 18 ~ 22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK (京) 2012 - 0001】。小鼠饲养环境为扬州大学比较医学中心【SYXK (苏) 2012 - 0029】, 按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 实验试剂

链脲佐菌素 STZ (美国 Sigma 公司), 柠檬酸 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), 柠檬酸钠 ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) (国药集团), 高脂饲料 (上海普路腾生物科技有限公司), 血糖仪和试纸 (三诺生物传感股份有限公司), 胰岛素 (insulin, INS)、脂联素 (adiponectin, ADP)、瘦素 (leptin, LEP)、C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 因子的酶联免疫吸附试验盒 (ELISA) (上海丰翔生物科技有限公司)。

1.3 造模方法

KM 小鼠适应性饲养一周后, 随机分为两组高脂饮食组和普通饮食组, 每组 30 只。高脂饲料在普通饲料的基础上添加猪油、蔗糖、酪蛋白和麦芽糊精等, 供能比例分别为脂肪 45%, 粗蛋白 19%, 碳水化合物 36%。喂养 4 周后, 小鼠达 9 周龄, 按雌雄 1 : 1 合笼, 在雌鼠阴道看到阴道栓定为妊娠第 1 天, 取合笼后 3 d 内见栓的定为同一实验批次, 造模组 3 d 内 16 只妊娠成功, 对照组 22 只妊娠成功。妊娠成功后, 给予 STZ 新鲜溶液 (溶于现配制的柠檬酸缓冲溶液中), 根据预实验摸索的条件 30 mg/kg 间隔 24 h 腹腔注射, 共注射 3 次, 对照组注射等量的柠檬酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH = 4.2)。模型成功判定标准: 孕鼠随机血糖 > 11.1 mmol/L。

1.4 检测及观察指标

①观察各组小鼠的一般情况, 分别于高脂饲料喂养前及喂养 4 周后记录小鼠体重, 并分别在造模成功后的第 3、7、14、19 天记录小鼠的体重, 以及 24 h 的饮水量和摄食量。②通过剪尾法用血糖仪检测各组孕鼠造模成功后第 3、7、14 及 19 天的血糖。③血清的采集: 采用内眦取血的方法于妊娠第 18 天采血, 3000 r/min 离心 10 min, 分离血清。采用酶联免疫吸附试验法 (ELISA) 测定, 酶联免疫吸附试验法应用双抗夹心法测定样本中的因子水平, 实验时按照试剂盒中说明书的步骤分别测定血清中 INS、ADP、LEP、CRP 因子的浓度。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 17.0 版本软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况观察

高脂饲料喂养 4 周后小鼠体重增长较快, 与普食组有显著差异 ($P < 0.01$), 高脂 4 周时, 高脂组与普食组的血糖值无显著差异。30 mg/kg STZ 小剂量多次注射造模成功后 (血糖 > 11.1 mmol/L) 于第 3 天开始出现饮水量、摄食量及尿量增多, 明显消瘦, 毛发渐无光泽, 且摄食量与饮水量与对照组相比有显著差异 ($P < 0.01$) (表 1)。

表 1 高脂饮食诱导前后小鼠体重以及成模后 24 h 饮水量、摄食量的变化**Tab. 1** Changes in body weight, 24 h water intake, 24 h food intake of mice with different diets in different groups

组别 (Group)	高脂前体重 BW before high diets (g)	4 周后体重 BW after high diets for 4 weeks (g)	摄食量 Food intake (g/24h)	饮水量 Water intake (g/24h)
造模组 (GDM)	20.4 ± 3.9	38.9 ± 4.3 [△]	19.9 ± 0.28 [△]	28.8 ± 0.74 [△]
对照组 (Control)	22.6 ± 3.5	34.7 ± 2.8	15.5 ± 5.2	19.2 ± 6.6

注: $\Delta P < 0.01$ vs 对照组。Note: $\Delta P < 0.01$ vs control groups.**表 2** 妊娠期糖尿病小鼠与对照组血糖比较 (mmol/L)**Tab. 2** Blood glucose levels in different groups (mmol/L)

组别 (Group)	高脂前 Before high diets	高脂后 After high diets	3 days	7 days	14 days	妊娠结束 Pregnancy terminations
造模组 (GDM)	6.2 ± 1.4	6.1 ± 0.7	13.5 ± 1.2 [△]	14.2 ± 5.8 [△]	13.6 ± 2.8 [△]	6.6 ± 1.9
对照组 (Control)	6.6 ± 0.9	5.8 ± 0.9	5.2 ± 0.8	6.2 ± 1.0	6.4 ± 0.6	6.6 ± 2.4

注: $\Delta P < 0.01$ vs 对照组。Note: $\Delta P < 0.01$ vs control groups.**表 3** 造模组和对照组 INS、ADP、LEP 和 CRP 水平比较**Tab. 3** Comparison of levels of INS, ADP, LEP, CRP in different groups

组别 (Group)	数量 n	INS (Mu/L)	ADP (μg/L)	LEP (μg/L)	CRP (μg/L)
造模组 (GDM)	10	1.50 ± 0.25 [△]	0.65 ± 0.13 [△]	1.60 ± 0.12 [△]	37.54 ± 4.70 [△]
对照组 (Control)	10	0.47 ± 0.08	1.53 ± 0.33	0.49 ± 0.28	18.29 ± 3.81

注: $\Delta P < 0.01$ vs 对照组。Note: $\Delta P < 0.01$ vs control groups.

2.2 KM 小鼠模型稳定性及血糖变化比较

高脂饲料喂养 4 周后,高脂组与普食组血糖并无统计学差异,于是在妊娠成功后,进行 30 mg/kg STZ 小剂量诱导 3 次,每次间隔 24 h,造模组 16 只小鼠 10 只造模成功,成模率约 60%,无死亡,与对照组孕鼠相比血糖值明显升高 ($P < 0.01$) (表 2),随着妊娠的进展并无降低,直至妊娠结束血糖恢复正常水平。

2.3 小鼠血清中 INS、ADP、LEP、CRP 因子的浓度

酶联免疫吸附试验法 (ELISA) 结果表明,造模组血清中 INS、ADP、LEP、CRP 因子的含量与对照组相比差异显著 (表 3)。

3 讨论

目前建立 II 型糖尿病动物模型的方法有很多种,运用较为广泛的是通过链脲佐菌素或四氧嘧啶破坏胰岛 β 细胞。而肥胖是 GDM 发生的高危因素,胰岛素抵抗是 GDM 发生的病理生理基础。通过高脂饲料诱导复制胰岛素抵抗大鼠模型成功的例子很多^[4-6],为我们建立妊娠期糖尿病动物模型提供了借鉴。张婕等^[7]在确定小鼠受孕成功之日

起采用高糖高脂饮食诱导建立妊娠期模型,但是鉴于小鼠妊娠时间短,只有 19~21 d,短期高糖高脂饲料诱导并不能达到升高血糖的效果。姜骊^[8]、李强^[9]等分别采用高脂饮食结合一次性注射 STZ 的方法建立 II 型糖尿病小鼠模型,对此我们也在预实验中进行了尝试,但是因为可能外在因素差异,并没有达到预期的实验效果,所以我们采用高脂饲料诱导结合小剂量多次注射 STZ 的方法建立妊娠期糖尿病小鼠模型。本实验方案是通过预试的,尤其是 STZ 的诱导剂量,剂量过大可以引起明显的胰岛 β 细胞受损,血糖明显升高,建立的是 I 型糖尿病,死亡率也较高。剂量过低,血糖没有变化。因此,预实验是必需的。

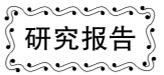
GDM 的 IR 程度高于正常妊娠妇女,所以胰岛素分泌能力也代偿性增加,因此 GDM 的胰岛素水平高于正常妇女。诸多证据表明,在 IR 发展至 GDM 的过程中,炎症反应扮演了重要角色,CRP 是导致炎症反应的重要因子,最近研究发现 CRP 作为一种炎症因子与妊娠生理和病理关系较为密切。CRP 为妊娠期糖尿病 (GDM) 早期发现与预防提供了一个新靶点^[10-12]。糖代谢异常的孕妇孕期体重增加和脂肪过度积累,增加的体脂合成了更多的瘦

素,以及更强的 IR 及代偿性胰岛素分泌增加,形成高胰岛素血症,促进瘦素合成^[13-14]。脂联素是脂肪组织产生的对抗 IR 与炎症反应的一种蛋白质,GDM 的脂联素水平是降低的,它与 TNF- α 和瘦素呈负相关^[15-17]。本实验通过高脂饮食诱导结合小剂量 STZ 多次诱导后,小鼠的摄食量、饮水量、尿量明显增多,血糖、胰岛素水平、血清中 C 反应蛋白、瘦素水平明显升高,脂联素水平明显下降,产后血糖恢复正常水平,符合人类妊娠期糖尿病的主要表型特征和相似的发病过程,说明高脂饮食诱导结合小剂量 STZ 多次诱导是一种理想的建立妊娠期糖尿病模型的方法,为研究妊娠期糖尿病提供了可靠的研究媒介,使得产科临床无法开展的操作成为可能。

参考文献:

- [1] 张娅,徐先明. 妊娠期糖尿病病因学研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2013,29(4):299-302.
- [2] Morens C, Sirot V, Scheurink AJ, *et al.* Low carbohydrate diets affect energy balance and fuel homeostasis differentially in lean and obese rats[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, 291(1):R1622-R1629.
- [3] Matteucci E, Giampietro O. Proposal open for discussion Defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research[J]. *J E thnopharmacol*, 2008, 118(3):163-172.
- [4] 吴晏,韩静,黄黎明,等. 高脂喂养合并小剂量链脲佐菌素建立 2 型糖尿病大鼠模型[J]. 中国实验动物学报,2012,20(2):11-15.
- [5] 周迎生,高妍,李斌,等. 高脂喂养联合链脲佐菌素注射的糖尿病大鼠模型特征[J]. 中国实验动物学报,2005,13(3):154-158.
- [6] 张丽丽,黄亚娟,葛声,等. 高脂饮食诱导妊娠期胰岛素抵抗大鼠糖代谢特征[J]. 现代妇产科进展,2009,18(6):446-449.
- [7] 张婕,王琦,杨建军,等. 高脂高糖饮食诱导妊娠糖尿病小鼠模型的建立[J]. 宁夏医科大学学报,2013,35(7):756-758.
- [8] 姜骊,陈辉,何勇,等. 高脂饮食加低剂量链脲毒素建立小鼠 2 型糖尿病模型[J]. 中国比较医学杂志,2010,20(3):35-38.
- [9] 李强,丁实,周剑宇,等. 高脂饮食合并不同剂量 STZ 建立小鼠 2 型糖尿病模型[J]. 承德医学院学报,2013,30(1):1:5-7.
- [10] 韩姮,牛秀敏. C 反应蛋白与妊娠期糖尿病的研究进展[J]. 国外医学妇产科学分册,2006,33(1):20-23.
- [11] Myles W, Kar en H, Laura S, *et al.* First-trimester c-reactive protein and subse-quent gestational diaetes[J]. *Diabetes Care*, 2003(6), 26: 819-824.
- [12] Retnakaran R, Hanley A J, Raif N, *et al.* C-reactive protein and gestational diabetes: the central role of maternal obesity [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(8): 3507-3512.
- [13] Qiu C, Will iams M A, Vadachkor ia S, *et al.* Increased maternal plasma leptin in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus [J]. *Obstet Gynecol*, 2004, 103(3):519-525.
- [14] Kautzky W A, Pacini G, Tura A, *et al.* Increased plasma leptin in gestational diabetes[J]. *Diabetologia*, 2001, 44(2):164-172.
- [15] 周桂菊,丛林. 脂联素与妊娠关系的研究进展[J]. 国外医学妇产科学分册,2007,34(3):159-161.
- [16] Ranh eim T, Haugen F, Staf f A C, *et al.* Adiponectin is reduced in gestational diabetes mellitus in normal weight women [J]. *Acta Obstet Gynecology Scand*, 2004, 83(4):341-347.
- [17] Williams M A, Qiu C, Muy R, *et al.* Plasma adiponectin concentrations in early pregnancy and sub sequent risk of gestational diabetes mellitus[J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(7):2306-2311.

[修回日期] 2016-01-13



大肠埃希菌致兔慢性输卵管炎症模型的建立

冯子聪¹, 张 昭², 黎 哲², 冯博仪¹, 陈思艾¹, 李君宇¹, 肖小敏²

(1. 暨南大学国际学院临床医学系, 广州 510000; 2. 暨南大学附属第一医院妇产科, 广州 510000)

【摘要】 目的 利用大肠埃希菌建立新西兰兔输卵管慢性炎症模型。方法 制备 3×10^9 /mL 的混合菌液(大肠埃希菌;金葡菌;链球菌按 2:1:1 体积混合)和 3×10^8 /mL 大肠埃希菌混悬液。18 只新西兰雌兔随机分三组,其中正常组 2 只、混合菌液实验组 8 只、大肠埃希菌液实验组 8 只。通过经阴道宫腔插管灌注术分别将混合菌液和大肠埃希菌液注入两组实验兔体内。于菌液宫腔灌注术后第 5、10、15、20 天观察大体标本及光镜下输卵管炎症形成情况。**结果** 混合菌液组和大肠埃希菌液组兔均于灌注术第 15 天呈慢性输卵管炎症改变。**结论** 两种建模方法均具有接近人体感染途径、成模率高、操作简便的优点,是建立输卵管慢性炎症动物模型的有效方法。

【关键词】 慢性输卵管炎症模型;混合菌液;大肠埃希菌液;经阴道宫腔内插管灌注术;

【中图分类号】 Q-31 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0019-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.03.005

The establishment of chronic salpingitis model of New Zealand rabbits caused by *Escherichia coli*

FENG Zi-cong¹, ZHANG Zhao², LI Zhe², FENG Bo-yi¹, CHEN Si-ai¹,
LI Jun-yu¹, XIAO Xiao-min²

(1. Clinical Medicine, International School, Jinan University, Guangzhou 510000, China;

2. Obstetrics and Gynecology Department, First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the possibility of utilizing the mixed bacteria liquid and the *Escherichia coli* (*E. coli*) liquid to establish the chronic salpingitis model of New Zealand rabbits, respectively. **Methods** Taken as the study object, the un-pregnant New Zealand rabbits (4 ~ 5 years old) were randomly divided into three groups; the normal group, the mixed bacteria experimental group and the *E. coli* experimental group. The trans-vaginal intrauterine intubation operation was performed for the injection of the mixed bacteria liquid and the *E. coli* liquid. Visual observation was to evaluate the gross pathological changes of the salpingitis and the pelvic cavity. HE staining and the light microscope were used to observe the micro-pathological changes of salpingitis. **Results** On the 15th day after modeling, increased pelvic effusion, dense peritoneal adhesion, interstitial hyperplasia and infiltration of lymphocytes were observed in both experimental groups. **Conclusion** Through the trans-vaginal intrauterine intubation operation, the chronic salpingitis model of New Zealand rabbits could be successfully established either by using the mixed bacteria liquid or by using the *E. coli* liquid.

【Key words】 Chronic salpingitis model; Mixed bacteria liquid; *E. coli* liquid; Trans-vaginal intrauterine intubation operation

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81370676);暨南大学国家级大学生创新项目(201310559069);广东省科技计划项目(2012B32000007);广州市科技计划项目(7411785665675)。

【作者简介】 冯子聪(1992-),男,本科生,研究方向:妇产科学;张昭(1984-),女,主治医师,博士,研究方向:妇产科学。两者为共同第一作者。

【通讯作者】 肖小敏(1962-),女,教授,博士,研究方向:围产医学。

在进行动物实验以探讨输卵管炎症性不孕的治疗方法时,首先必须选择一种输卵管结构和功能与人类相近的动物制作相应疾病的动物模型。新西兰兔不仅其输卵管结构与人类输卵管结构相似,而且具有便于实验操作,价格便宜,饲养容易等特点,因此本研究以其为研究对象,制作输卵管慢性炎症模型。在建模效果相似的前提下,相对于混合菌液,单一菌液具有细菌用量少,配制更简便,细菌活力影响小等优点。因此,本节分别使用混合菌液与大肠埃希菌液两种方法制备新西兰兔输卵管模型,以探讨选择新西兰兔慢性输卵管炎模型建立的具体可行方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级新西兰雌兔 18 只(4~5 月龄,未孕,体重 $2.5 \text{ kg} \pm 250 \text{ g}$)由广州中医药大学动物实验中心提供【SCXK(粤)2009-0023】。无菌手术在广州中医药大学动物实验中心无菌实验室进行【SYXK(粤)2013-0001】。购回后在动物实验中心饲养 1 周,以适应环境。18 只清洁级新西兰雌兔按体重由低到高依次编号:1~18 号,根据 SPSS 完全随机设计的分组方法将 18 只新西兰兔随机分 3 组,分别为正常组 2 只、混合菌液实验组 8 只、大肠埃希菌液实验组 8 只。

1.2 细菌混悬液的制备

大肠埃希菌(ATCC25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)、乙型溶血性链球菌(ATCC21059),均由广州市暨南大学医学院微生物教研室提供、培养。将这三种细菌原液分别加入生理盐水稀释浓度至 $3 \times 10^9/\text{mL}$ ^[1],然后大肠埃希菌:金葡菌:链球菌按 2:1:1 体积的比例混合,制备成混合细菌混悬液备用。另将大肠埃希菌 $3 \times 10^9/\text{mL}$ 浓度的菌液加入生理盐水制备成 $3 \times 10^8/\text{mL}$ 大肠埃希菌混悬液备用(制模用细菌悬液均为即用即配,以避免菌液浓度明显改变)。

1.3 新西兰兔造模

步骤:(1)实验前 6 h 每只兔于后肢外侧肌肉丰富处肌内注射 HCG 80 国际单位^[2-3]。(2)经阴道宫腔内插管灌注术:3%戊巴比妥钠溶液按 $1 \text{ mL}/\text{kg}$ 予耳缘静脉注射麻醉兔后,固定并暴露外阴,将一次性无菌 6 号小儿吸痰管插入兔泌尿生殖口内约 $8 \sim 10 \text{ cm}$ ^[3-4];回抽未见液体,证明插管顺利进入宫

腔。混合菌液组 8 只兔均予插管内灌注混合菌液(每兔按 $1 \text{ mL}/\text{kg}$ 的灌液量,取 $3 \times 10^9/\text{mL}$ 混合菌液 1 mL 加入生理盐水调至相应的灌液量);大肠埃希菌液组 8 只兔则予插管内灌注大肠埃希菌液(每兔按 $1 \text{ mL}/\text{kg}$ 的灌液量,取 $3 \times 10^8/\text{mL}$ 大肠埃希菌液 1 mL 加入生理盐水调至相应的灌液量)。灌菌液后抬高兔臀静置 3 min 后放回饲养笼。(3)术后于第 5、10、15、20 天两个实验组分别随机处死 2 只兔,正常组兔于肌注 HCG 后第 20 天处死,取输卵管标本备检。

1.4 观察项目

1.4.1 肉眼观察:

输卵管外观形态改变、与周围组织器官粘连情况以及腹腔有无积液等情况。

1.4.2 输卵管通畅情况观察:

距宫角约 1 cm 处用动脉夹夹闭子宫腔,自宫角处向输卵管方向进针,用 5% 亚甲蓝溶液 2 mL 向输卵管内注射。通畅程度判断:(1)通畅,即注射过程中无阻力,伞端见亚甲蓝液体溢出;(2)通而不畅,即注射过程中有阻力,加压后阻力减少,伞端可见亚甲蓝液体溢出;(3)不通,即注射过程中阻力大,加压后阻力无减少,伞端未见亚甲蓝液体溢出。

1.4.3 盆腔粘连情况:

参考 Nair 等^[5]制定的 5 级分类法,完全无粘连为 0 级,计 0 分;内脏间或内脏与腹壁间 1 条粘连带为 I 级,计 1 分;内脏间或内脏与腹壁间 2 条粘连带为 II 级,计 2 分;多于 2 条粘连带而内脏未直接粘连至腹壁为 III 级,计 3 分;内脏直接粘连到腹壁,不管粘连带多少为 IV 级,计 4 分。

1.4.4 光镜下病理改变:

观察完后,取双侧输卵管-子宫交界部,近端、远端各一段,用 4% 多聚甲醛固定,常规切片,HE 染色,光镜下观察病理改变。

2 结果

3 组兔共 18 只均存活,两组模型兔外观及分泌物均未见明显异常。制模过程未使用抗生素和其他药物。

2.1 各组新西兰兔输卵管大体观察比较

正常组兔盆腔未见异常。生殖器官包括阴道、双角子宫、输卵管和卵巢。输卵管外观光滑,呈粉红色,峡部管腔内径约 $0.5 \sim 1 \text{ mm}$,壶腹部管腔内径约 $1 \sim 2 \text{ mm}$ 。于造模第 5 天,混合菌液组和大肠

表 1 造模不同时期输卵管通畅情况及粘连情况
Tab. 1 The patency and adhesion of oviduct in different periods

	正常 Normal	第 5 天 5 th day		第 10 天 10 th day		第 15 天 15 th day		第 20 天 20 th day	
		混合菌 Mixed	大肠埃希菌 <i>E. coli</i>	混合菌 Mixed	大肠埃希菌 <i>E. coli</i>	混合菌 Mixed	大肠埃希菌 <i>E. coli</i>	混合菌 Mixed	大肠埃希菌 <i>E. coli</i>
输卵管通畅情况 Patency of oviduct	+, +	±, -	±, ±	±, -	+, +	±, -	+, -	±, -	±, -
盆腔粘连评分 Score of pelvic adhesion	0	1	0	2	0	1	1	1	1
	0	1	1	1	1	1	0	0	0

注：“+”为通畅；“-”为不通；“±”为通而不畅。

Note：“+”：Patent，“-”：Obstructed，“±”：Passable.

埃希菌液组均呈现腹膜充血、盆腔膜性粘连，腹腔积液等急性盆腔炎改变，而双侧输卵管则出现系膜血管充血，管壁水肿增粗等急性炎症反应。造模后第 10 天，两组模型兔均见盆腔充血，仍可见盆腔膜性粘连，盆腔积液较第 5 天时明显减少，输卵管系膜血管充血，管腔稍增粗、扭曲。造模后第 15 天，两组模型兔均见腹膜炎充血，盆腔见少量清亮积液，腹膜粘连较第 5、10 天时致密，输卵管增粗、扭曲、僵硬或肿胀，内有淡黄色积液。制模第 20 天，两组模型兔均见腹膜炎充血，盆腔见清亮积液，可见致密腹膜粘连，输卵管增粗、扭曲、僵硬或肿胀，内有淡黄色积液(表 1)。

2.2 各组新西兰兔输卵管光镜下观察比较

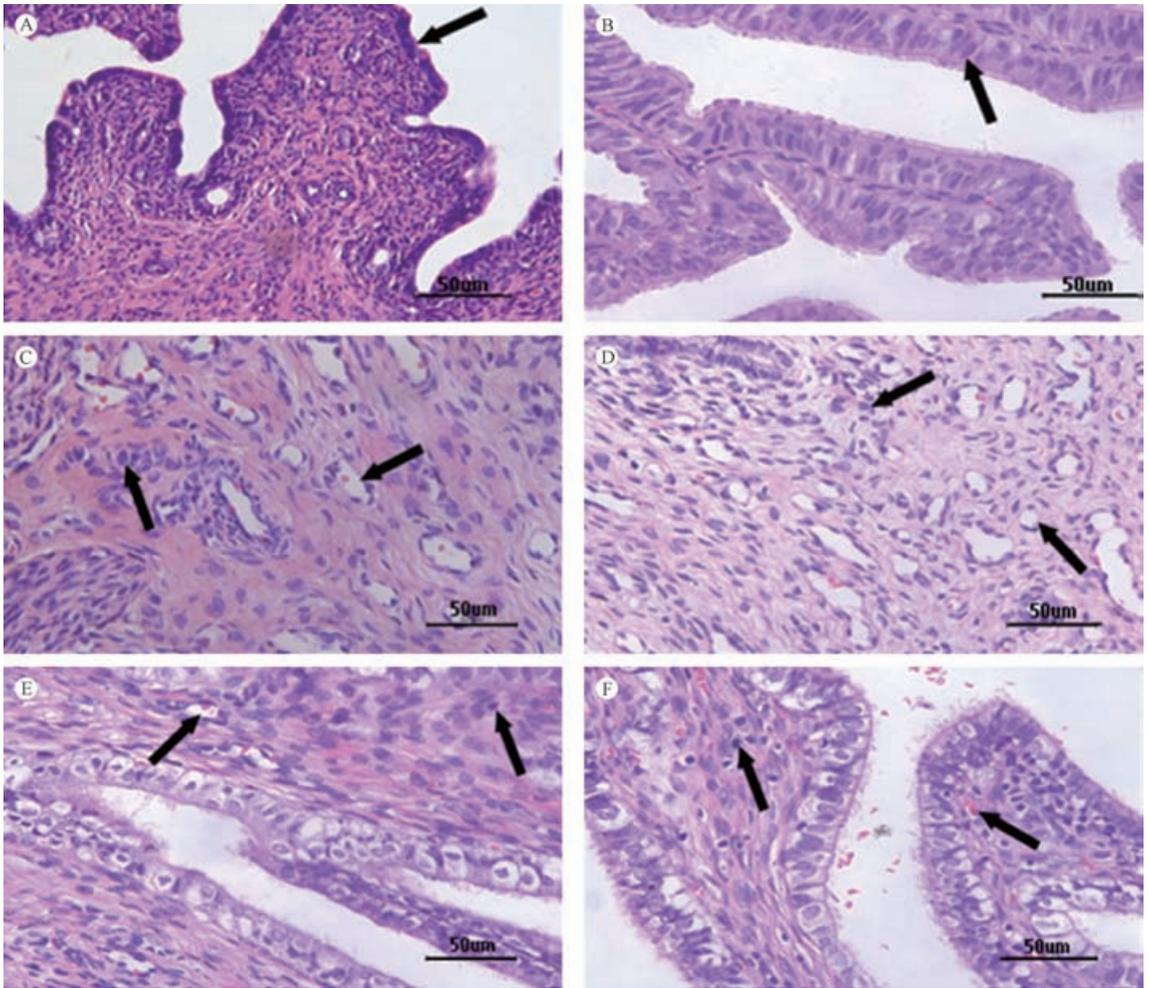
正常组兔输卵管间质部，镜下可见管腔通畅，结构清晰，粘膜皱褶低矮且二级分支不明显，皱褶被覆粘膜为单层柱状上皮，上皮纤毛短小，粘膜下间质未见明显血管增生，粘膜下层间质和肌层比例约 1:1(图 1A)。输卵管壶腹部粘膜皱褶丰富，二级分支多，皱褶被覆粘膜为单层高柱状上皮，上皮纤毛丰富整齐，粘膜下层间质少且无明显血管增生(图 1B)。于造模第 5 天，混合菌液组和大肠埃希菌液组模型兔输卵管均呈典型急性炎症改变：输卵管上皮坏死脱落，管腔内大量炎性细胞渗出，间质充血，管壁全层大量中性粒细胞浸润。造模第 10 天的病理与第 5 天基本相似，皆呈急性炎症改变，但间质充血减轻，中性粒细胞浸润稍减少。造模第 15 天，两组模型兔输卵管镜下均呈典型慢性炎症改变：输卵管间质部可见管腔狭窄，粘膜皱褶变平；粘膜下间质增生，厚度大于全层 2/3，间质血管增生明显；淋巴细胞散在浸润全层(图 1C,D)。输卵管壶腹部粘膜皱褶尚丰富，二级减少分支；上皮纤毛凌乱、稀疏、短小或缺如，高柱状上皮变立方上皮且胞核排列不规整；粘膜下层间质增生，间质血管增生；淋巴

细胞散在或局灶浸润(图 1E,F)。制模第 20 天两组模型兔输卵管镜下所见与第 15 天时相似。

3 讨论

输卵管炎性动物模型的建立，是研究输卵管性不孕、盆腔炎症等疾病的基础。目前制作输卵管炎症阻塞动物模型的方法主要有物理、化学、生物学方法 3 种^[6-7]。物理、化学方法包括机械夹闭损伤、电热、激光、苯酚等药物灼伤等，虽然均有大量报道能制成慢性炎症损伤输卵管的模型，但是其致炎途径和人类发生输卵管的途径差异很大，因此这些建模方法现在已被大部分实验摒弃。生物方法即采用细菌、沙眼衣原体、支原体等病原微生物注入输卵管内引起其炎性反应^[8-10]，这种方法基本接近人类输卵管炎症感染的途径，能更真实的在动物体内还原人类输卵管炎症的实际情况，在这种成模方法下建立的输卵管炎症模型研究结果更具有说服力。

在建立输卵管炎的动物模型实验操作中，大部分学者采用开腹后将一定浓度的病原微生物混悬液直接自宫角向一侧输卵管内注射的方法^[10-14]。该方法对动物的损伤大，动物接受手术后应激反应重，易加重腹盆腔感染情况及出现手术并发症、败血症等意外情况，造成动物死亡，降低成模率。申刚等^[1]在数字减影血管造影(digital subtraction angiography, DSA)引导下经子宫输卵管插管介入途径，将金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌和大肠埃希菌的混合菌混悬液经导管注入输卵管，建成新西兰兔输卵管慢性炎症模型。但是 DSA 费用昂贵，显然不能作为常规建模手段。李俊良等^[3]应用金葡菌和大肠埃希菌混合菌液采用直接宫腔插管灌注的方法同样成功制备兔输卵管炎症模型。该方法试验器材简便、便宜，操作简单，对实验动物损



注:A. 正常输卵管间质部($\times 20$)箭头所示为单层柱状上皮;B. 正常输卵管壶腹部($\times 20$)箭头所示为单层高柱状上皮;C. 建模第 15 天输卵管间质部($\times 40$)(大肠埃希菌组)箭头所示分别为增生的血管和浸润的淋巴细胞(从左到右);D. 建模第 15 天输卵管间质部($\times 40$)(混合菌组)箭头所示分别为增生的血管和浸润的淋巴细胞(从左到右);E. 建模第 15 天输卵管壶腹部($\times 40$)(大肠埃希菌组)箭头所示分别为增生的血管和浸润的淋巴细胞(从左到右);F. 建模第 15 天输卵管壶腹部($\times 40$)(混合菌组)箭头所示分别为浸润的淋巴细胞和增生的血管(从左到右)。

图 1 各组新西兰兔输卵管光镜下病理学改变比较

Note: A. Normal interstitial part ($\times 20$) The arrow indicated simple columnar epithelium; B. Normal ampullary part ($\times 20$) The arrow indicated simple tall columnar epithelium; C. Model's interstitial part on the 15th day ($\times 40$) (*E. coli* group) The arrows from left to right indicated the infiltrating lymphocyte and the proliferating vessel, respectively; D. Model's interstitial part on the 15th day ($\times 40$) (Mixed group) The arrows from left to right indicated the infiltrating lymphocyte and the proliferating vessel, respectively; E. Model's ampullary part on the 15th day ($\times 40$) (*E. coli* group) The arrows from left to right indicated the proliferating vessel and the infiltrating lymphocyte, respectively; F. Model's ampullary part on the 15th day ($\times 40$) (Mixed group) The arrows from left to right indicated the infiltrating lymphocyte and the proliferating vessel, respectively.

Fig. 1 Comparison of the pathological changes of oviducts among different groups under light microscope

伤小,接种细菌后动物死亡率低,因此本研究建立新西兰兔输卵管慢性炎症模型时亦采用此法。

在本研究中分别采用 3×10^9 /mL 的混合菌混悬液(大肠埃希菌:金葡菌:链球菌以 2:1:1 体积混合)和 3×10^8 /mL 的大肠埃希菌混悬液对新西兰雌兔进行经阴道宫腔插管灌注。两种菌液灌注后,均在第 5 天时光镜下观察到输卵管上皮脱落,坏死,管

腔内大量炎性细胞渗出,间质充血,管壁全层大量中性粒细胞浸润等典型急性炎症的表现;在第 15 天时观察到输卵管管腔狭窄,粘膜皱褶减少,粘膜下间质增生,间质血管增生,淋巴细胞浸润,上皮纤毛凌乱、稀疏、短小或缺如等典型慢性炎症的表现。这与李俊良等^[3]报道的输卵管炎症动物模型 14 d 前均为急性炎症,15 d 开始出现慢性炎症至 49 d 完

全建成慢性炎症模型相比有时间上的差别。但与申刚等^[1]报道的新西兰兔输卵管炎症建模于第 5 天出现急性炎症,第 15 天出现慢性炎症相似。考虑其原因可能有:病原菌侵入机体能否致病,与细菌的毒力、侵入机体的数量、侵入门户以及机体的免疫力、环境因素等密切相关。另外各种常规实验操作和不同的饲养环境对实验动物的神经内分泌、免疫、血液生理等指标亦有不同程度的影响^[15]。

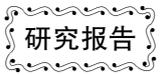
对比混合菌液和大肠埃希菌液两组动物模型,在第 15 天时,虽然混合菌液组兔的盆腔粘连情况、镜下见淋巴细胞浸润和间质增生情况等均较大肠杆菌组兔严重,但是大肠埃希菌组兔的输卵管镜下亦能呈现典型慢性炎症的表现。且 $3 \times 10^8/\text{mL}$ 的大肠埃希菌混悬液与 $3 \times 10^9/\text{mL}$ 的混合菌混悬液相比具有细菌浓度低、细菌用量少、配制更简便、细菌活力受影响小等优点。但就模拟输卵管的混合细菌逆行感染条件而言,混合菌混悬液则更具相似性。

因此综上所述,采用 $3 \times 10^8/\text{mL}$ 的大肠埃希菌混悬液或 $3 \times 10^9/\text{mL}$ 的大肠埃希菌:金葡菌:链球菌以 2:1:1 体积混合的细菌混悬液进行经阴道宫腔插管灌注的方法均能在灌注术后第 15 天建立新西兰兔输卵管慢性炎症的模型。两种建模方法均具有接近人体感染途径、成模率高、操作简便的优点,是建立输卵管慢性炎症动物模型的有效方法。

参考文献:

- [1] 申刚,谭小云,陈德基,等. 经阴道介入途径建立输卵管炎性阻塞动物模型[J]. 生殖与避孕, 2012, (4): 217-221.
- [2] 余明君. 诱导獭兔发情的方法[J]. 农业知识, 2008, (30): 42.
- [3] 李俊良,刘恒,王建六,等. 兔盆腔炎性疾病后遗症模型的制备[J]. 国际妇产科学杂志, 2011, (6): 517-519.
- [4] 孔祥峰,胡元亮,郭振环,等. 家兔子宫内膜炎模型的建立和临床病理学观察[J]. 中国实验动物学报, 2006, 14 (3): 213-216.
- [5] Nair SK, Bhat IK, Aurora AL. Role of proteolytic enzyme in the prevention of postoperative intraperitoneal adhesions [J]. Arch Surg. 1974, 108(6): 849-853.
- [6] 黄艳娟,严英,周伟生. 生物方法制作输卵管炎性阻塞动物模型的研究进展[J]. 中华生物医学工程杂志, 2010, 16(6): 597-599.
- [7] 高慧. 盆腔炎及输卵管炎性阻塞的动物模型演变概述[J]. 实用中医药杂志, 1999, (10): 45-46.
- [8] 李莉,郝秋芳. 巨噬细胞分泌的效应分子在小鼠急性输卵管炎中的变化[J]. 中国急救医学, 2000, (4): 200.
- [9] Cox SM, Faro S, Dodson MG, et al. Role of Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis in intraabdominal abscess formation in the rat [J]. J Reprod Med. 1991, 36(3): 202-205.
- [10] Pearlman MD, Mcneeley SG, Frank TS, et al. Antiendotoxin antibody is protective against tubal damage in an Escherichia coli rabbit salpingitis model [J]. Am J Obstet Gynecol. 1994, 171(6): 1588-1593.
- [11] Laufer N, Simon A, Schenker JG, et al. Fallopian tubal mucosal damage induced experimentally by *Escherichia coli* in the rabbit. A scanning electron microscopic study [J]. Pathol Res Pract. 1984, 178(6): 605-610.
- [12] 赵广兴,王春田,马宝璋,等. 大鼠输卵管炎性不孕症模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(1): 22-25.
- [13] 徐桂中,张欣,侯一平,等. 金黄色葡萄球菌致小鼠慢性输卵管炎性不孕模型制作[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(3): 6-9.
- [14] Pearlman MD, Mcneeley SG, Frank TS, et al. Antiendotoxin antibody is protective against tubal damage in an Escherichia coli rabbit salpingitis model [J]. Am J Obstet Gynecol. 1994, 171(6): 1588-1593.
- [15] 刘丽. 炎克宁对大鼠输卵管阻塞性不孕模型作用机理的研究[D]. 黑龙江中医药大学, 2004.

[修回日期]2015-11-12



莫诺昔对脑缺血再灌注大鼠皮层肝细胞生长因子及血管性血友病因子表达的影响

魏仁平^{1,2}, 孙芳玲², 刘婷婷², 程 华², 艾厚喜²,
郭德玉², 田 欣², 祝自新², 王宇峰², 郑文荣², 王 文^{1,2,3}

(1. 河北北方学院, 河北 张家口 075000; 2. 首都医科大学宣武医院实验动物室, 北京市老年病医疗研究中心, 北京 100053; 3. 北京市脑重大疾病研究院, 北京 100069)

【摘要】 目的 研究莫诺昔对脑缺血再灌注7 d大鼠患侧皮层肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)及血管性血友病因子(von willebrand factor, vWF)表达的影响。方法 25只健康成年雄性Sprague-Dawley (SD)大鼠采用改良Zealanga线栓法制备大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型, 术后随机分为假手术组、模型组、莫诺昔小剂量组、中剂量组及大剂量组, 每组5只。造模后3 h按照30, 90, 270 mg/kg剂量每天一次灌胃给予莫诺昔。免疫印迹法和免疫荧光法分别检测莫诺昔对脑缺血再灌注7 d大鼠患侧皮层HGF及vWF表达的影响。结果 脑缺血再灌注7 d后, 免疫印迹法显示, 与假手术组相比, 模型组HGF蛋白表达显著升高($P < 0.01$); 同模型组相比, 莫诺昔给药组(30 mg/kg, 90 mg/kg, 270 mg/kg)HGF蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。免疫荧光法显示, 与假手术组相比, 模型组vWF表达显著升高($P < 0.001$); 同模型组相比, 莫诺昔中、大剂量组(90 mg/kg, 270 mg/kg)vWF表达显著升高($P < 0.01$, $P < 0.001$)。结论 莫诺昔可以上调HGF及vWF在脑内的表达, 促进局灶性脑缺血大鼠血管新生。

【关键词】 莫诺昔; 脑缺血再灌注; 免疫印迹; 免疫荧光; HGF; vWF

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0024-05

doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2016.03.006

Effects of morroniside on the expression of the HGF and vWF in peri-infarct cortex after cerebral ischemia-reperfusion in rats

WEI Ren-ping^{1,2}, SUN Fang-ling², LIU Ting-ting², CHENG Hua¹, AI Hou-xi², GUO De-yu²,
TIAN Xin², ZHU Zi-xin², WANG Yu-feng², ZHENG Wen-rong², WANG-Wen^{1,2,3}

(1. Hebei North University, Hebei Zhangjiakou 075000, China; 2. Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Key Laboratory for Neurodegenerative Diseases of Ministry of Education, Beijing 100053, China;
3. Beijing Institute for Brain Disorders, Beijing 100069, China)

【Abstract】 Objective To study the effects of morroniside on the expression of the HGF and vWF of the ischemic ipsilateral cortex 7 days after ischemia reperfusion. **Methods** 25 male Sprague-Dawley rats were subjected to MCAO model with modified Zea Longa's method, then randomly divided into sham group ($n = 5$), ischemia group ($n = 5$), and morroniside groups (low, medium, and high dosage groups, $n = 5$). Morroniside were then administered intragastrically

【基金项目】 国家自然科学基金(81373994;81173575);“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09102201-106)。

【作者简介】 魏仁平(1988-),女,硕士生,主要研究方向:神经药理。E-mail: weirenping1@126.com。

【通讯作者】 王文(1968-),男,研究员,研究方向:神经药理,中药药理。E-mail: lzwang@163.com。

once a day at dose of 30 mg/kg, 90 mg/kg and 270 mg/kg after operation. The expression of HGF and vWF of the ischemic ipsilateral cortex were detected by western blotting and Immunofluorescence 7 days after ischemia-reperfusion.

Results Compared with the sham group, the expression of HGF in ischemia group increased significantly ($P < 0.01$) 7 days after MCAO. Compared with the ischemia group, the expression of HGF in the morroniside groups (30 mg/kg, 90mg/kg, 270 mg/kg) showed significant increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). Compared with the sham group, the expression of vWF in ischemia group increased significantly ($P < 0.001$). Compared with the ischemia group, the expression of vWF in the morroniside groups (90 mg/kg, 270 mg/kg) showed significant increased ($P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** Morroniside could increase the expression of HGF and vWF in the ischemic ipsilateral cortex, romoting the process of angiogenesis in focal cerebral ischemia rat.

[Key words] Morroniside; Cerebral ischemia-reperfusion; Western blotting; Immunofluorescence; HGF; VWF

成年动物缺血性脑损伤后可使神经血管单位的微环境改变,能够诱导血管发生,但所诱发的神经血管因子的高表达只是在短时间内有明显变化,自体应激产生血管新生过程短暂,不足以恢复神经血管单元稳态,因此需要通过外源性药物等作用增强和加速内源性脑神经血管稳态重构,促进血管新生。肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 是一种多肽生长因子,能特异性的促进内皮细胞增殖^[1],进而促进缺血组织的血管新生。因此 HGF 可作为一种有效的促血管新生因子和神经保护因子,对缺血性脑损伤后的血管新生和神经发生等起重要作用^[2]。血管性血友病因子 (von willebrand factor, vWF) 是由血管内皮细胞及巨核细胞合成和分泌,是一种存在于血浆、内皮细胞表面的糖蛋白,可作为血管内皮细胞的标记物^[3]。

药物莫诺昔是从中药山茱萸中分离得到的单体化合物。前期研究发现,莫诺昔能减小局灶性脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积、促进内源性的神经干细胞增殖、促进血管生成素 1 (Ang-1) 及其受体 (Tie-2) 的表达^[4-8],促进血管新生。本研究采用 MCAO 模型观察脑缺血再灌注 7 d 后患侧皮层 HGF 及 vWF 的表达变化,进一步探讨莫诺昔对缺血性脑损伤后血管新生的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂

尼龙栓线,直径 0.26 mm (2634 - 100):北京沙东生物技术有限公司;超声波细胞破碎粉碎机:JY92-II 型,宁波市新芝科技研究所;电泳仪和小型垂直电泳槽:美国 Biorad 公司;高分辨率多模式分子成像系统:美国 Carestream Health 公司;全波长酶标仪:美国 Thermo Fisher 公司。HGF 抗体:Abcam; β -actin 抗体:中山金桥;vWF 抗体:Millipore;CY3-标

记荧光二抗:Invitrogen。

化合物莫诺昔,白色结晶,由宣武医院药物研究室自行从山茱萸中提取制备,高效液相色谱仪对组分进行分析 (C18 柱,柱温 35℃,乙腈 - 水混合 (15:85) 洗脱糖苷类,流速 1.0 mL/min,检测波长 240 nm),纯度 98.5%。

1.2 实验动物分组及给药

SPF 级健康成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠 25 只,体重 260 ~ 280 g,购于北京维通利华实验动物中心【SCXK (京) 2006 - 0009】,由首都医科大学宣武医院 SPF 级实验动物室常规饲养【SYXK (京) 2010 - 0013】,预适应环境 1 周后进行实验,环境温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$,湿度 $55 \pm 5\%$ 。将大鼠编号 1 ~ 25 只,用随机数字表法分为假手术组、模型组、莫诺昔小 (30 mg/kg)、中 (90 mg/kg)、大 (270 mg/kg) 剂量组,共 5 组,每组 5 只。莫诺昔溶于蒸馏水, MCAO 造模后 3 h 按照 30、90、270 mg/kg 剂量每天一次灌胃给药,连续给药 7 d。假手术组和模型组给予等体积的蒸馏水。

1.3 MCAO 模型制备及行为学评分

模型的制备参照 Longa 法^[9]并稍加改进。本实验经过首都医科大学宣武医院伦理委员会评估,尊重实验中动物的福利。大鼠术前禁食不禁水 12 h。称重后将体重在 260 ~ 280 g 之间的大鼠用 10% 水合氯醛 4 mL/kg 进行腹腔注射麻醉。将麻醉后的大鼠仰卧置于手术操作台上,用安尔碘进行颈部周围消毒。在大鼠右侧颈部切口约 2 cm 后,对肌肉及筋膜进行分离,注意避开甲状腺。暴露右侧颈总动脉 (common carotid artery, CCA),分离出右侧颈内动脉 (internal carotid artery, ICA) 和颈外动脉 (external carotid artery, ECA)。结扎 ECA 接近分叉处及 CCA 近心端,用动脉夹夹闭 ICA,在 CCA 用眼科剪剪一个斜行的细小切口,将栓线小心插入,缓慢轻推栓

线进入 ICA,直到产生阻挡感,说明栓线已经经 CCA 分叉处,通过 ICA 入颅进入了大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA),到达了大脑前动脉(anterior cerebral artery, ACA)起始部,阻断 MCA 的所有血供,造成了大脑中动脉阻塞。缝合肌肉,并在创口处涂少量青霉素,以预防伤口感染。栓塞 30 min 后,用眼科镊缓慢向外拔出栓线,实现再灌注。假手术组大鼠不插入栓线,其余操作与 MCAO 手术组相同。

MCAO 手术后的动物置于温控毯上 36.5℃ ~ 37.5℃ 保暖,直至动物苏醒后观察其行为。采用 Ludmila Belayev 12 分评分法进行术后行为学评分^[10]:1)提尾悬空试验:无明显神经功能缺失为 0 分,梗死对侧肢体屈曲为 1 分,侧推试验阳性为 2 分。2)前肢放置试验:A 视觉亚试验:实验者将动物握于手中,使其前爪悬空,让动物位于桌子前方,自桌面上方 10 cm 处向桌面缓慢斜线靠近,大鼠正常反应为前肢即抓向桌面,损伤大鼠则表现为肢体反应延迟。0 分:动物肢体放置反应正常;1 分:反应延迟但不超过 2 s;2 分:反应延迟且超过 2 s。侧方刺激,让动物位于桌子侧方,实验检测方法及评分标准同前方刺激。B 触觉亚实验:将动物双眼遮住,并使其前爪悬空,用其前爪背刺轻触桌面,刺激深度仅达皮肤和毛发,动物反应及评分同视觉试验,触觉刺激同样分前方和侧方刺激。C 本体觉亚实验:操作及评分同触觉亚实验,仅刺激深度不同,本体觉亚实验给予前爪较大压力,刺激深达肌肉及关节。评分 4 ~ 10 分为造模成功,选择入组。采用差额补充方法补足各组设计所需大鼠数量。

1.4 Westernblotting 分析 HGF 蛋白表达

造模 7 d 后将大鼠用 10% 水合氯醛 400 mg/kg 腹腔注射麻醉,迅速剥离大脑并将脑膜剥去,取出患侧皮层包入锡箔纸中,放入液氮中冻存片刻后,于 -80℃ 保存。取出患侧皮层于 5 mL EP 管中称重,加入预冷的裂解液 7 μL/mg 新鲜组织、PMSF 1 μL/100 μL RIPA,冰上充分超声粉碎。4℃ 12000 r/min 离心 30 min,取上清。采用 BCA 法定量蛋白浓度,并加入裂解液,调节各组总蛋白浓度一致。总蛋白加入 5 × 上样缓冲液 1:4 稀释,95℃ 变性 10 min。

取新鲜大鼠患侧皮层脑组织裂解提取蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳(分离胶 10%,浓缩胶 5%),每孔加入 50 μg 样品,先恒压 60 V 电泳 60 min;然后恒

压 90V 电泳至分离胶底部,电转移到硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入 1:1000 稀释的兔抗大鼠 HGF 单克隆抗体,4℃ 过夜, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,再加入 1:2000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP,室温摇床孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, ECL 试剂显色、曝光并拍照,以 β-actin 作为内参,将曝光后的图片导入软件 Quantity One 中分析。实验重复 3 次。

1.5 免疫荧光分析 vWF 表达水平

1.5.1 灌注及大脑切片

10% 水合氯醛 4 mL/kg 腹腔注射麻醉,固定四肢,迅速开胸暴露心脏,从左心室插管至主动脉根部,在右心耳剪开一小口做出口。快速灌注生理盐水,待右心耳流出液无色透明时,换 4% 多聚甲醛 150 mL 快速灌注,之后稍减慢灌注速度至动物四肢变硬。30 min 后断头取脑,将脑组织浸于 4% 多聚甲醛中。固定完全后,将脑标本从后固定液中取出,进行冠状面冰冻切片,厚度为 40 μm。

1.5.2 免疫荧光染色

大脑切片用 0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;置 0.1% Triton 破膜 20 min, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;加入 10% 正常山羊血清,室温孵育 2 h,倾去;分别加入 1:200 的 vWF 一抗,4℃ 孵育 24 h, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;加入 CY3-标记山羊抗鼠 IgG,室温孵育 2 h, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;滴一滴封片剂封片,晾干;正置荧光显微镜观察并摄片,采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件计算 vWF 阳性血管的数目。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm \text{SEM}$ 表示。应用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),采用 Scheffe 法进行组间两两比较,以 $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫印迹法观察莫诺昔对缺血性脑损伤后 HGF 表达的影响

脑缺血再灌注 7 d 后,与假手术组相比,模型组 HGF 蛋白表达显著升高($P < 0.01$);同模型组大鼠相比,莫诺昔给药小剂量组(30 mg/kg) HGF 蛋白表达水平提高,具有统计学意义($P < 0.05$);莫诺昔中剂量组(90 mg/kg)和大剂量组(270 mg/kg) HGF 蛋白表达显著升高($P < 0.01, P < 0.01$)(图 1,表 1)。

表 1 免疫印迹法检测 HGF 表达变化统计结果

Tab.1 The statistical results of HGF expression changed by western blot

组别 Group	HGF/ β -actin (Mean \pm SEM)	P 值 p value
假手术组 (sham)	0.3384 \pm 0.0096	0.001
模型组 (model)	0.5295 \pm 0.0233 ^{##}	-
莫诺昔小剂量组 (30 mg/kg) Morrionside (30 mg/kg)	0.6333 \pm 0.0263 *	0.044
莫诺昔中剂量组 (90 mg/kg) Morrionside (90 mg/kg)	0.6960 \pm 0.0137 **	0.002
莫诺昔大剂量组 (270 mg/kg) Morrionside (270 mg/kg)	0.8391 \pm 0.0182 ***	0.000

注: n = 5, Meam \pm S. E. M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 与模型组相比; ^{##} $P < 0.01$ 与假手术组相比。

Note: n = 5, Meam \pm S. E. M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. model; ^{##} $P < 0.01$ vs. sham.

2.2 免疫荧光法观察莫诺昔对缺血性脑损伤后 vWF 阳性血管数目的影响

vWF 免疫荧光染色结果显示: 局灶性脑缺血后 7 d, 模型组梗死灶周围可以看见一些清晰的 vWF 阳性血管结构 (图 2B), 莫诺昔给药中剂量组 (90 mg/kg, 图 2D) 和大剂量组 (图 2E) 的 vWF 阳性血管数量明显增多。对 vWF 阳性血管数量进行统计, 结果显示, 与假手术组相比, 模型组 vWF 阳性血管数量显著增加 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 莫诺昔中、大剂量组 (90 mg/kg、270 mg/kg) 的 vWF 阳性血管数量显著增多 ($P < 0.01$, $P < 0.001$); 莫诺昔小剂量组 (30 mg/kg) vWF 阳性血管数量与模型组比无明显差别 (图 2, 表 2)。

表 2 免疫荧光检测 vWF 血管数量统计结果

Tab.2 The statistical results of vWF vessels tested by immunofluorescence

组别 Group	vWF vessels/mm ² (Mean \pm SEM)	P 值 p value
假手术组 (Sham)	10.2000 \pm 0.8602	0.000
模型组 (Model)	29.4000 \pm 2.9428 ^{###}	-
莫诺昔小剂量组 (30 mg/kg) Morrionside (30 mg/kg)	31.4000 \pm 1.1662	1.000
莫诺昔中剂量组 (90 mg/kg) Morrionside (90 mg/kg)	48.8000 \pm 2.1541 **	0.01
莫诺昔大剂量组 (270 mg/kg) Morrionside (270 mg/kg)	63.8000 \pm 1.8547 ***	0.000

注: n = 5, Meam \pm S. E. M. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 与模型组相比; ^{###} $P < 0.001$ 与假手术组相比。

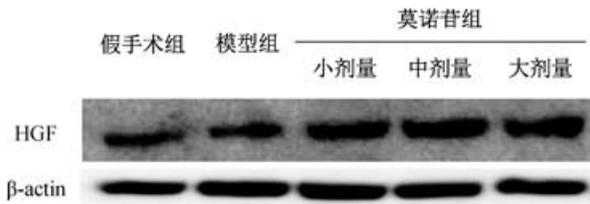
Note: n = 5, Meam \pm S. E. M. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. model; ^{###} $P < 0.001$ vs. sham.

3 讨论

脑卒中因其高致残率及高死亡率已严重威胁人类健康, 成为我国居民第二死因和成人第一位致残原因^[11]。其中, 缺血性脑卒中, 在中国脑血管疾病中居第一位^[12], 因此一直以来是临床研究的热点。对于缺血性脑卒中来说, 脑血管重塑过程依赖于局部产生的血管生长因子, 当局部组织损伤后, 刺激血管生长因子释放, 然后到达预先存在的血管内皮细胞, 刺激其发生一系列生物活性和表型的改变, 进而使血管芽生, 形成有功能腔的导管^[13]。新生的血管可为神经发生提供神经营养因子, 并为新生的神经细胞迁移到缺血周边区域提供依附的支架, 是梗死周边区域脑组织抗损伤和神经元修复的结构基础^[14-16]。此外, 有研究表明缺血性脑损伤患者脑内新生血管密度与患者的存活时间存在相关性, 新生血管密度增加多的患者, 预后较好^[17]。

肝细胞生长因子 HGF 等能通过不同的分子途径促进内皮细胞的分裂和增殖从而促进缺血组织的血管新生^[18]。Miyagawa^[19] 等将载有 HGF 基因的质粒转染入小鼠心梗心肌, 发现能活化转录因子 ETs, 使梗死范围减少, 梗死区血管新生较单纯心肌细胞移植组显著增加。HGF 过表达能刺激血管新生和侧支血管形成^[20]。可见, HGF 在新生血管形成过程中发挥重要的作用。并且不论在体内还是体外试验, HGF 的促血管生成活性已被证实比 VEGF 及 bFGF 更强一些^[21-22]。

vWF 是一种大分子糖蛋白, 内皮细胞是血浆 vWF 的主要合成场所。vWF 在成人糖尿病和心血管疾病中表达升高, vWF 水平升高是内皮细胞损伤



注: A: 假手术组; B: 模型组; C: 莫诺昔小剂量组 (30 mg/kg); D: 莫诺昔中剂量组 (90 mg/kg); E: 莫诺昔大剂量组 (270 mg/kg)。

图 2 各组大鼠患侧皮层 vWF 免疫荧光染色 ($\times 20$ 标尺 = 50 μ m)

Note: A: sham group; B: model group; C: low morrionside group (30 mg/kg); D: middle morrionside group (90 mg/kg); E: high morrionside group (270 mg/kg).

Fig. 2 vWF expressions in the ischemic ipsilateral cortex of the rats in each group strained by immunofluorescence ($\times 20$ Bar = 50 μ m)

或激活的标志^[23]。vWF 是血管内皮细胞 (vascular endothelial cells, VEC) 特异性标志之一^[24], 因此常用来鉴定 VEC, 检测血管新生。

本研究发现, 在大鼠局灶性脑缺血再灌注 7 d 时, 模型组患侧皮层 HGF、vWF 表达明显上调, 提示缺血性脑损伤使脑梗死边缘区神经血管微环境改变, 诱导 HGF 的表达短时间内升高, 血管数量增加。而灌胃给予莫诺昔后, HGF、vWF 表达水平比模型组进一步提高, 且升高水平与莫诺昔给药剂量表现出正相关趋势, 表明莫诺昔能促进缺血性脑损伤后 HGF 的表达增强, 促进内皮细胞增殖, 进而促进血管新生。结合前期的研究, 莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠血管新生相关因子血管生成素 1 及其受体 Tie-2 具有显著的促进作用^[13], 我们推测莫诺昔通过促进 HGF 表达, 改善神经血管修复的微环境, 进而发挥促血管新生的作用。

参考文献:

[1] Yu F, Lin Y, Zhan T, *et al.* HGF expression induced by HIF-1 α promote the proliferation and tube formation of endothelial progenitor cells[J]. *Cell Biol Int*, 2015, 39(3): 310-317.

[2] Sobrino MN, Rosell A, Guillaumon M, *et al.* A large screening of angiogenesis biomarkers and their association with neurological outcome after ischemic stroke[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 216: 205-211.

[3] Du R, Wang Y, Teng JF, *et al.* Effect of integrin combined laminin on peripheral blood vessel of cerebral infarction and endogenous nerve regeneration [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2015, 29(1): 167-174.

[4] 艾厚喜, 李蕾, 许栋明, 等. 莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠皮层总抗氧化能力影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2009, 15(9): 833-834.

[5] 艾厚喜, 汪莹, 许栋明, 等. 莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠皮层 IL-1 β 的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2010, 16(10): 928-930.

[6] 汪莹, 高东明, 许栋明, 等. 莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠 caspase-3 活化程度的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2010, 16(9): 801-802.

[7] Fang-Ling Sun, Wen Wang, Wei Zuo, *et al.* Promoting neurogenesis via Wnt/ β -catenin signaling pathway accounts for the neurorestorative effects of morroniside against cerebral ischemia injury [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2014, 738: 214-221.

[8] 刘婷婷, 孙芳玲, 程华, 等. 莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠血管生成素 1 及其受体 Tie-2 的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2015, 21(1): 9-11.

[9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats[J]. *Stroke*,

1989, 20(1): 84-91.

[10] Belayev L, Alonso OF, Busto R, *et al.* Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model[J]. *Stroke*, 1996, 27(9): 1616-1622.

[11] Feigin VL, Global and regional burden of stroke during 1990-2010; findings from the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2014, 383(9913): 245-254.

[12] Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA, *et al.* Mechanisms, challenges and opportunities in stroke [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4(5): 399-415.

[13] Paola Chiodelli. Heparin/Heparan sulfate proteoglycans glycomic interactome in angiogenesis: biological implications and therapeutical use[J]. *Molecules*, 2015, 20(4): 6342-6388.

[14] Goldman SA, Chen Z. Perivascular instruction of cell genesis and fate in the adult brain[J]. *Nat Neurosci*, 2011, 14: 1382-1389.

[15] Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, *et al.* A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery [J]. *J Neurosci*, 2006, 26: 1269-1274.

[16] Wang L, Chopp M, Gregg SR, *et al.* Neural progenitor cells treated with epo induce angiogenesis through the production of vegf[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28: 1361-1368.

[17] Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, *et al.* A Neurovascular niche for neurogenesis after stroke[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(50): 13007-13016.

[18] Cao Z, Wang X. The endocrine role between β cells and intraslet endothelial cells[J]. *Endocr J*, 2014, 61(7): 647-654.

[19] Pyun WB, Hahn W, Kim DS, *et al.* Naked DNA expressing two isoforms of hepatocyte growth factor induces collateral artery augmentation in a rabbit model of limb ischemia[J]. *Gene Ther*, 2010, 17(12): 1442-1452.

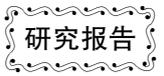
[20] Miyagawa S, Sawa Y, Taketani S, *et al.* Myocardial regeneration therapy for heart failure: hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty [J]. *Circulation*, 2002, 105(21): 2556-2562.

[21] Fumihiro Sanada, Yoshiaki Taniyama, Junya Azuma, *et al.* Therapeutic Angiogenesis by Gene Therapy for Critical Limb Ischemia; Choice of Biological Agent [J]. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem*, 2014, 14(1): 32-39.

[22] Nakamura M, Takahashi T, Matsui H, *et al.* TAlteration of angiogenesis in *Helicobacter heilmannii*-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: interaction with c-Met and hepatocyte growth factor[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 29(4): 70-76.

[23] Lip GY, Blann A. Von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders [J]? *Cardiovasc Res*, 1997, 34(2): 255-265.

[24] Jaffe EA, Nachman RL, Becher CG, *et al.* Cultured of human endothelial cells derived from umbilical vein. Identification by morphologic and immunologic criteria[J]. *J Clin Invest*, 1973, 52: 2745-2756.



长爪沙鼠肝星状细胞的分离培养与鉴定

楼琦, 李巍, 石巧娟, 卢领群, 郭红刚, 杜江涛, 萨晓婴

(浙江省医学科学院实验动物中心, 浙江省实验动物与安全性研究重点实验室, 杭州 310010)

【摘要】 目的 探索长爪沙鼠稳定、经济的肝星状细胞分离和培养方法, 为深入探讨长爪沙鼠肝纤维化的细胞机制提供技术支撑。方法 取成年雄性长爪沙鼠, 用链蛋白酶、胶原酶及 DNA 酶体内门静脉灌注消化长爪沙鼠肝脏细胞, 经 Nycodenz 密度梯度离心, 分离肝星状细胞。台盼蓝拒染实验鉴定细胞活力, α -SMA, Desmin 免疫细胞化学染色鉴定细胞性质。结果 肝星状细胞得率为 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ /肝。肝星状细胞存活率在 90% 以上。原代培养 3 d α -SMA 阳性细胞达 75% 以上, 传代培养后, α -SMA, Desmin 阳性达 100%。结论 成功建立了稳定可靠的长爪沙鼠肝星状细胞分离培养方法, 为肝脏相关疾病研究和防治药物的开发提供了技术支持。

【关键词】 长爪沙鼠; 肝星状细胞; 细胞分离; 原代培养

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0029-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.03.007

Establishment of a primary culture protocol of Mongolian gerbil hepatic stellate cells

LOU Qi, LI Wei, SHI Qiao-juan, LU Ling-qun, GUO Hong-gang, DU Jiang-tao, SA Xiao-ying
(Experimental Animal Center, Zhejiang Academy of Medical Sciences,
Zhejiang experimental animal and safety research key laboratory, Hangzhou 310013, China)

【Abstract】 Objective To investigate the method to isolate and culture hepatic stellate cells (HSCs) for studying the cellular mechanisms of hepatic fibrosis. **Methods** HSCs were isolated by nycodenz density gradient centrifugation after the hepatocytes obtained from adult male gerbils were digested with pronase, collagenase and DNase, infused via portal vein. The cell viability was determined by trypan blue exclusion test. The purity of HSCs was identified by detecting α -SMA, desmin immunohistochemical staining. **Results** The yield rate of HSCs was $0.5 \sim 1 \times 10^7$ per gerbil liver, and the cell viability was more than 90%. The percentage of α -SMA-positive cells was more than 75% after 3 days primary culture and almost 100% cells were α -SMA and desmin positive in passage culture. **Conclusion** The successful protocol of primary culture of Mongolian gerbil HSC provide a technical support for research of relevant liver diseases and drug development in the future.

【Key words】 Mongolian gerbil; Hepatic stellate cell; Cell isolation; Primary culture

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC), 又称储脂细胞(fat-store cell, FSC)、间质细胞和 Ito 细胞, 主要分布于肝细胞与肝窦内皮细胞之间的窦周隙

内(Disse 间隙)^[1-2]。HSC 在肝纤维化的发生发展中具有核心作用, 是促进肝纤维化发展的主要因素^[3]。静息状态的 HSC 主要参与维生素 A 的代谢

[基金项目] 国家自然科学基金(31301933); 浙江省科技计划项目(2013C37012, 2013C37013, 2014C27013)。

[通讯作者] 萨晓婴, E-mail: saxiaoyin@163.com。

调节,当肝脏受到化学、物理及生物因素刺激而发生损伤后,HSC 发生增殖并被活化,合成以胶原蛋白为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)及各类细胞因子如 MMPs、TNF- α 等,参与受损肝组织的修复。刺激持续发生时,HSC 大量激活,引发 ECM 的合成与降解失衡,进而导致肝脏内结缔组织异常沉积,发生肝纤维化^[4]。

长爪沙鼠在单纯高脂饮食喂养下,可发生非酒精性脂肪肝系列病变。在经历了纤维化^[5-8]发展的经典模式“胶原带-桥接纤维化-假小叶”后,最终可形成肝硬化^[9],其疾病谱与人类脂肪肝极为接近^[10]。因此长爪沙鼠是肝纤维化研究方面很有价值的模型动物。HSC 已成为国内外学者研究肝纤维化的热点^[11-12],建立稳定、经济的分离和培养 HSC 方法是研究肝纤维化的基础。目前针对大、小鼠分离培养 HSC 的方法已经较为成熟^[13-15],但是国内尚无关于长爪沙鼠 HSC 的研究,而国外也尚未建立完善的培养体系。本文旨在 Friedman 等的基础上进行改良,建立适合长爪沙鼠肝星状细胞的培养体系,为从细胞和分子水平进一步研究长爪沙鼠肝纤维化形成的机制奠定坚实的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物准备

雄性长爪沙鼠,浙江省实验动物中心提供【SCXK(浙)2014-0001】,实验在本中心进行【SYXK(浙)2014-0008】体重 50~70 g,常规饲料喂养,正常饮水。在分离 HSCs 前 2 周每天 V itamin A 20 U/10 g 体重灌胃^[16-17]。

1.1.2 主要试剂

链霉菌蛋白酶 E (Pronase E), IV 型胶原酶 (Type IV collagenase), DNase、Nycodenz、6-联脒-2-苯基吡啶 (DAPI) 购自 Sigma 公司; DMEM 培养液购自 Invitrogen 公司; 胎牛血清为杭州四季青公司产品。Hank's 液为自配溶液。封闭用羊血清、羊抗兔 IgG、HRP 标记卵裂白霉素为中国北京中杉金桥公司生产。兔抗 Desmin、 α -SMA 一抗购自美国 Santa Cruz 公司。异硫氰酸荧光素 FITC 标记的羊抗兔 IgG、Cy3 偶联的羊抗兔 IgG 均购自美国 Chemicon 公司。

1.1.3 主要仪器

正置荧光显微镜 (Olympus BX51)、超速离心机

(BECKMAN COULTER, J-26 XPI)、普通倒置显微镜 (Nicon TS100)、CO₂ 培养箱 (Forma Scentific)、洁净工作台 (苏州苏洁净化设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 肝星状细胞的分离制备

肝星状细胞的分离采用改良的 Friedman 方法,长爪沙鼠术前禁食 8 h,自由饮水。用水合氯醛 (400 mg/kg) 腹腔内注射麻醉长爪沙鼠。胸腹部剃毛,皮肤消毒。仰卧位固定,大十字开腹,上至剑突,下至耻骨联合,左右至两侧腋中线。皮瓣外翻固定扩创,显露腹腔所有脏器。将小肠翻至鼠体左侧,游离肝脏,在右肾静脉上方游离肝下下腔静脉。下压肝脏剪断镰状韧带至肝上下腔静脉。游离腹主动脉,穿刺针穿刺,注入 4℃ Hank's 液 (内含肝素 25 U/mL) 20 mL,夹闭胸主动脉同时切开肝下下腔静脉与破心,尽量将肝脏内淤积的红细胞冲出。待肝脏颜色变成土黄色时,结扎肝上下腔静脉,行门静脉插管固定,取下肝脏,冲洗肝脏表面。4℃ Hank's 液 20 mL 行门静脉灌注肝脏,完成后肝脏移入 37℃ 水浴中的 250 mL 烧杯,继续循环灌注预温至 37℃ 的联合酶液 50 mL (含 0.05% 链酶蛋白酶、0.1% 胶原酶及 0.001% DNase),消化肝脏 10 min。在培养皿中去除肝包膜和 Glisson 鞘。将肝脏粉碎成糊状,放入含 0.05% 链酶蛋白酶、0.1% 胶原酶、0.001% DNaseI (V/V) 的 Hank's 中,37℃ 水浴用镊子搅拌 10~15 min,使肝组织充分消化。在消化好的肝组织中加入 50 mL 4℃ Hank's 液,用 100 目钢丝筛过滤。滤过的肝组织装入 50 mL 离心管中,加 Hank's 液至 50 mL,1815 r/min 离心 10 min。取沉淀重悬于 50 mL Hank's 液中,再次 1815 r/min 离心 10 min。取沉淀加 Hank's 液 5 mL 重悬,吸取 1 mL 置于 10 mL 玻璃离心管中,加入 1.5 mL 的 20% Nycodenz 液混匀,按此比例分装完全沉淀,每管液面覆盖 2 mL Hank's 液,2400 r/min,4℃ 离心 18 min,轻轻取出,不要摇动液面,可见在 Hank's 液下有一混浊带。用 16 号针头插入液面下此处抽吸混浊带于 10 mL 离心管。加 DMEM 培养液,1924 r/min 离心 10 min,沉淀重悬于 10 mL 左右 DMEM 培养液中,加入 10% 胎牛血清。细胞计数并且行台盼蓝拒染试验,判断活力。

1.2.2 细胞培养

将细胞以 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ mL 的密度接种到 50 mL 细胞培养液中,在 37℃、体积分数为 5%

CO₂、95% 潮湿空气的 CO₂ 恒温培养箱里培养。培养 1 d 后首次换液, 以后视情况每 2 ~ 3 d 换液一次。做免疫细胞化学检测时, 可将细胞接种于内有玻片的 6 孔板中。当细胞融合度达到 80% ~ 90% 左右可进行传代。传代时按常规使用 0.125% 胰酶消化。

1.2.3 细胞鉴定

细胞活力测定: 吸取 180 μL 细胞悬液置于载玻片上, 加入 20 μL 0.4% 的台盼蓝溶液, 混匀并在显微镜下观察细胞。未被台盼蓝染色者为活细胞。光镜下观察细胞形态, 细胞计数, 计算细胞得率及存活率。

细胞性质鉴定: (1) 荧光显微镜下观察, 当激发波长为 325 nm 时出现的自发荧光细胞即为分离的肝星状细胞, 用 DAPI 复染。(2) 细胞爬片用油红 O 直接染色 45 min, 双蒸水漂洗后用苏木素染细胞核, 2 min 后用双蒸水清洗, 镜下观察。(3) 细胞爬片经固定, PBS 清洗, 羊血清封闭, 用兔抗 α-SMA 一抗, 联合羊抗兔 IgG (二抗) 及 HRP 标记卵裂白霉素 (三抗), 进行 DAB 法免疫细胞化学染色。另有细胞爬片经固定、PBS 清洗、羊血清封闭, 用兔抗 Desmin (α-SMA) 一抗, Cy3 (FITC) 荧光标记二抗孵育后, DAPI 染色后, 荧光显微镜下观察分析^[19]。

2 结果

2.1 HSC 的存活率与收率

采用 Nycodenz 密度梯度离心法分离长爪沙鼠 HSC, 长爪沙鼠平均体重为 60 g, 每只鼠肝的细胞收率约为 $(0.5 \sim 1) \times 10^7$ 个。根据台盼蓝拒染试验, 细胞活力为 (98.6)%。

2.2 HSC 的形态观察

在普通光学倒置显微镜下观察, 新鲜分离的 HSC 由于富含脂滴, 具有很强的折光性, 呈现透亮、立体感较强的小圆球状 (图 1)。细胞在 325 nm 波长紫外光的激发下自发绿色荧光 (图 6)。细胞在接种后 30 ~ 60 min 出现贴壁, 培养 24 h 后 85% 细胞贴壁 (图 2), 72 h 贴壁细胞呈现出梭形, 多边形 (图 3), 普通光镜下观察油红染色结果表明, 红色脂滴主要分布于胞浆内 (图 4)。5 ~ 7 d 后, 细胞继续伸展, 绝大多数细胞呈星形, 部分细胞出现片状融合 (图 5); 10 ~ 11 d 左右融合达到 80% ~ 90%, 细胞铺满瓶底可以传代。传代后 1 d 细胞表现为活化表型。

2.3 HSC 鉴定



图 1 长爪沙鼠 HSCs 原代培养 2h 贴壁, 含折光颗粒的 HSC (×10)

Fig. 1 Gerbils hepatic stellate cells in primary culture, adherence happened in 2 hours, including the refractive index particles HSC (×10)

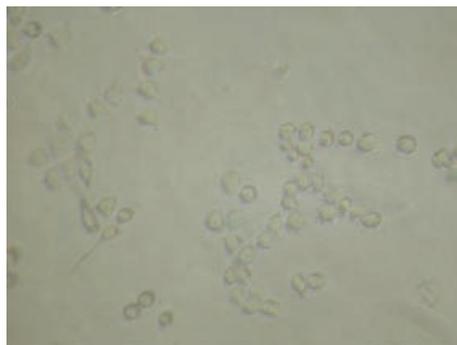


图 2 长爪沙鼠 HSCs 原代培养 24h 生长状况 (×20)

Fig. 2 Gerbils hepatic stellate cells' growth status in primary culture for in 24 hours (×20)

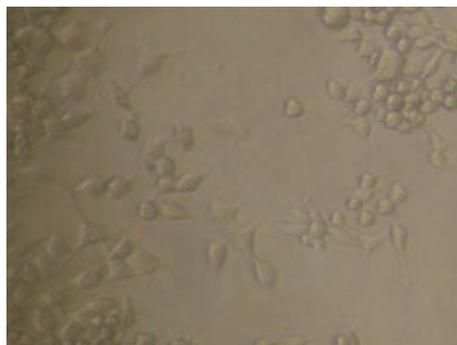


图 3 长爪沙鼠 HSCs 原代培养 3 d 呈局灶性生长 (×20)

Fig. 3 Gerbils hepatic stellate cells' focal growth status in primary culture for in 3 days (×20)

免疫细胞化学检测显示, 贴壁 24 h 的 α-平滑肌动蛋白 (α-SMA) 呈阴性, 原代培养 3 d 后, α-SMA 阳性率为 75% (图 7)。肝星状细胞消化传代后, 细胞表现为活化状态, 免疫荧光检测显示 Desmin (图 8) 和 α-SMA (图 9) 阳性染色达到 100%, 胞浆呈颗粒状或弥漫着色。

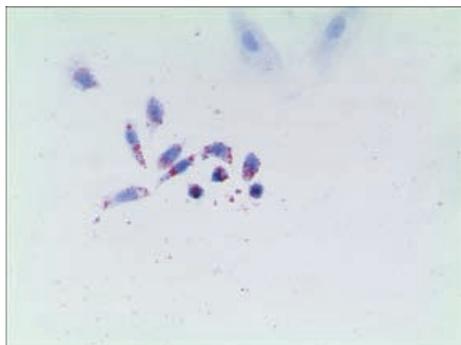


图 4 长爪沙鼠 HSCs 培养至第 3 天行油红染色(×20)

Fig. 4 Gerbils hepatic stellate cells in primary culture for in 3 days, oil red O staining(×20)

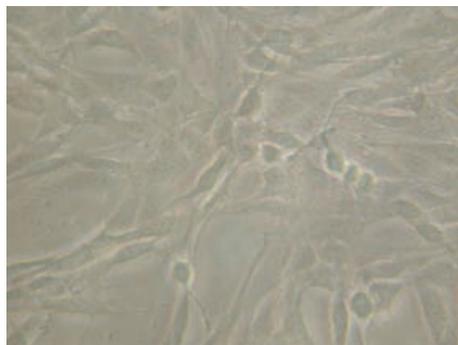


图 5 长爪沙鼠 HSCs 原代培养 7 d 呈纤维细胞样形态(×20)

Fig. 5 Gerbils hepatic stellate cells in primary culture for in 7 days, fibroblast morphology(×20)

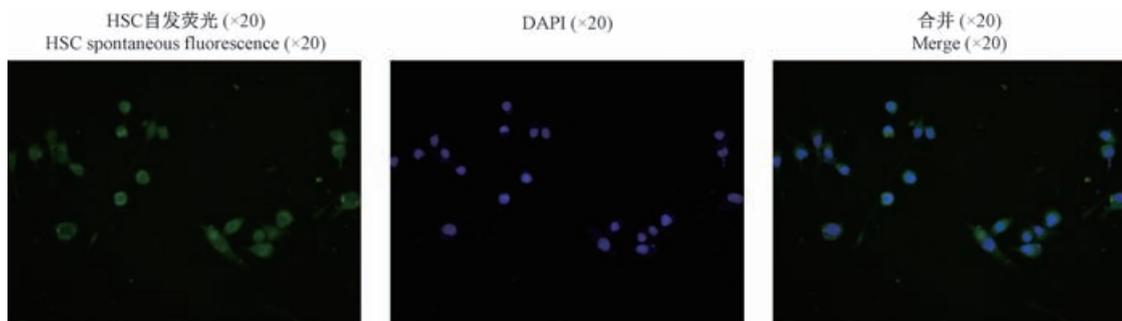


图 6 HSC 自发荧光(×20)

Fig. 6 HSC spontaneous fluorescence(×20)

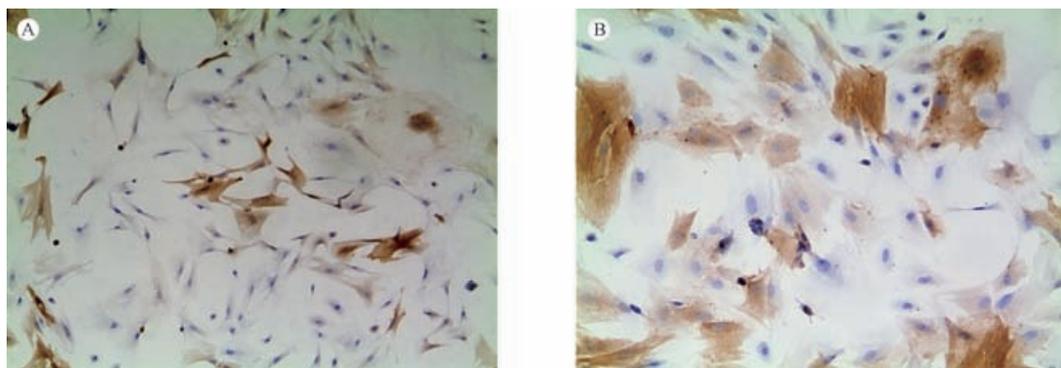


图 7 长爪沙鼠 HSCs 培养至第 3 天行 α -SMA 免疫细胞化学染色(A×20, B×40)

Fig. 7 Gerbils hepatic stellate cells in primary culture for in 5 days, positive staining with labeled antibody against α -SMA, A(A×20, B×40)

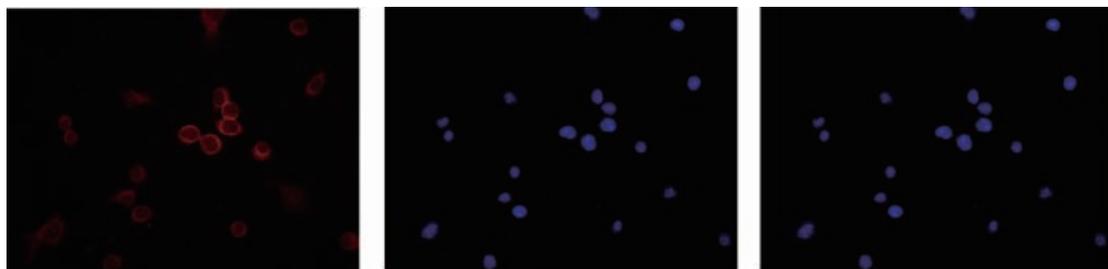


图 8 Desmin 免疫荧光染色(传代后 24h)

Fig. 8 Desmin immunofluorescence stain

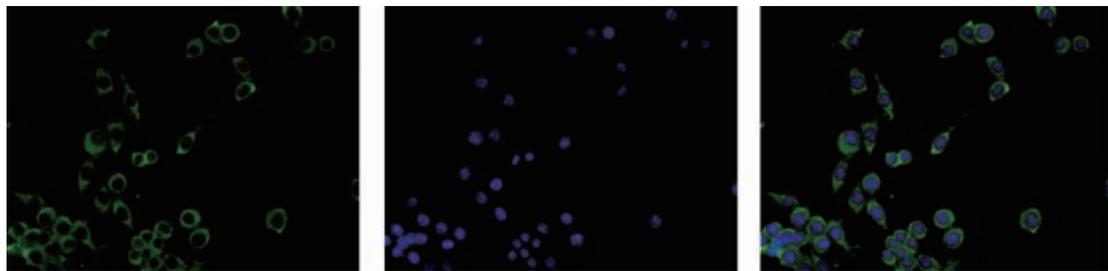


图9 α -SMA 免疫荧光染色 (传代后 24h)

Fig.9 α -SMA immunofluorescence stain

3 讨论

HSC 是肝内的一种非实质细胞,激活的 HSC 是合成、分泌 ECM 的主要来源,在肝纤维化的病程进展中处于重要地位。如前所述,长爪沙鼠脂质代谢模式与人类相仿,对高脂饮食敏感,相对于大、小鼠,容易形成肝纤维化,被认为是肝纤维化模型研究的理想动物。因此长爪沙鼠 HSC 的分离培养将为肝纤维化的发病机制研究及其逆转治疗奠定基础。

国内外关于大、小鼠 HSC 分离培养的方法报道很多,但有关长爪沙鼠 HSC 的分离培养体系的建立尚属首次。我们参照 Friendman^[18]的方法,并经过改良,反复试验,最终形成一套适用于长爪沙鼠的经济、合理、方便的 HSC 提取方法,有关经验总结如下:(1)长爪沙鼠的选择与预处理:本课题组所保存的封闭群有部分沙鼠具有自发性肥胖症状,即 3 月龄后,体态明显偏胖,体重较同龄鼠明显偏高,故本实验中选择 60 g 左右的长爪沙鼠,性别不限,并预先用维生素 A 灌胃处理,确保肝星状细胞具有一定的浮力,以便在密度梯度离心时,能较好地与其他细胞分离。(2)灌注方法的改良:我们在原位灌注方法的基础上^[19-20],进行了改良,采用肝脏体外循环灌注的方法,具体如下:用 4℃ 的预灌注液腹主动脉灌注,灌注液可以通过门静脉与肝动脉进入肝脏,肝内血细胞冲洗得相对较为干净,低温灌注可以减少肝热缺血对肝脏的损伤。取下肝脏后,行门静脉插管固定再行灌注与肝表面清洗,尽可能的减少血细胞对消化酶活性产生不良影响。在整个灌注过程中亦应避免气泡进入肝内血管导致的灌注不充分。(3)酶消化中的注意事项:肝脏消化是否适度,是影响细胞得率及活力的关键因素。本法采用离体酶消化法。该方法主要有以下 3 个优点:a. 肝脏局部容易实现温度控制,肝脏在 37℃ 水浴中进

行灌注,使肝脏与肝内酶消化液保持在 37℃,可以保证酶的活性,可以减少消化时间。b. 可避免原位酶消化法中由于肝脏侧枝循环丰富导致的酶用量增加,成本增高。c. 在保证门静脉插管良好同时,适当的阻断肝下腔静脉,让酶消化液在肝内形成高压,消化酶通过门脉系统均匀地作用于肝组织,可提高酶的使用率。在本方法中所用的各消化酶的配比为:胶原酶:DNA 酶:链蛋白酶 = 0.1% : 0.001% : 0.05%,胶原酶主要用于消化肝脏内胶原,DNA 酶可降解肝实质细胞破裂后释放的 DNA,减少细胞间的粘连,而链蛋白酶主要用于去除肝细胞,提高 HSC 的浓度。消化酶务必在临用前配置,并且浓度准确。(4)分离介质的选择与添加:由于 HSC 富含脂滴,细胞密度在所有肝细胞中最低,故可采用密度梯度离心的方法分离 HSC,因此,分离介质的选择在 HSC 的分离纯化中亦是十分重要。常用的分离介质有 Metrizamidee, Percoll, Nycodenz^[21-22]。我们通过预实验发现 Metrizamidee, Percoll 较难形成明显的条带,且需要高速离心,而 Nycodenz 分层稳定,配置简单,因此我们采用 Nycodenz 作为分离介质,其常用浓度为 18%,但该浓度离心后 HSC 细胞层不集中,而用 20% 的浓度较为理想,重复性好,故在本实验中采用 20% Nycodenz 作为分离介质。Nycodenz 的添加方法有 2 种^[23-25],第一种是悬浮法,即将 Nycodenz 置于管底,轻轻覆盖上相应体积的细胞悬液,形成不能混匀的两个液层,第二种是混匀法,即将细胞悬液与 Nycodenz 混匀,再在上面覆盖少量的细胞培养液,或 Hank's,本课题组经比较选择了混匀法,该法密度梯度离心后,细胞数量多,条带较为集中。(5)其他:消化好的肝组织粘稠度很高,不易过滤,影响 HSC 的收率和活力,因此过滤时,我们加入 4℃ Hank's 液,不仅降低细胞悬液的粘稠度,同时也可以降低链蛋白酶活性,减少对 HSC 的毒性作用,促使 HSC 的收率、纯度和活力大

大提高。

总之,本课题组经多次实验摸索出这一套长爪沙鼠肝星状细胞分离培养方法,本方法不需要昂贵的试剂和特殊的仪器设备,单层密度梯度离心一步法即可分离纯化 HSC,且细胞收率亦较高,适于推广应用,为进一步研究肝星状细胞在肝损伤后细胞基质的沉积及纤维化的形成机制奠定了基础。

参考文献:

[1] Senoo H, Yoshikawa K, Morii M, *et al.* Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative—past, present and future[J]. *Cell Biol Int*, 2010,34(12):1247-1272.

[2] Zurlinden J. The tangled roots of medication errors [J]. *Nurs Spectr (Wash D C)*, 1997,7(2): 14.

[3] Tang Y. Curcumin targets multiple pathways to halt hepatic stellate cell activation; updated mechanisms in vitro and in vivo [J]. *Dig Dis Sci*, 2015, 60(6): 1554-1564.

[4] Nishikawa H., Osaki Y. Liver Cirrhosis: Evaluation, Nutritional Status, and Prognosis [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: p. 872152.

[5] 李巍,石巧娟,郭红刚,等. 动态分析沙鼠非酒精性脂肪肝病形成及生化影响[J]. *中国比较医学杂志*,2011,21(8):44-48.

[6] 李巍,石巧娟,郭红刚,等. 三种啮齿类动物非酒精性脂肪肝病形成及机制探讨[J]. *中国实验动物学报*,2012,20(1):76-80.

[7] 楼琦,石巧娟,郭红刚,等. 非酒精性脂肪大鼠脂质代谢及病理变化的动态观察[J]. *中国比较医学杂志*,2012,22(3):5-11.

[8] Ying HZ, Liu YH, Yu B, *et al.* Dietary quercetin ameliorates nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fat diet in gerbils [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013,52: 53-60.

[9] 俞建顺,严茂祥,王德军,等. 高脂饮食对长爪沙鼠生化及主要脏器组织病理学的影响[J]. *中国比较医学杂志*,2015,25(4):38-43,47.

[10] 钟民涛,黄敏,王钜,等. 长爪沙鼠脂代谢的研究进展[J]. *实验动物科学与管理*,2006,23(1):42-46.

[11] Delire BP,Starkel, Leclercq I, Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development[J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2015,3(1): 53-66.

[12] Lepreux S, A. Desmouliere. Human liver myofibroblasts during

development and diseases with a focus on portal (myo)fibroblasts [J]. *Front Physiol*, 2015, 6: 173.

[13] He J, Gong J, Ding Q, *et al.* Suppressive effect of SATB1 on hepatic stellate cell activation and liver fibrosis in rats[J]. *FEBS Lett*, 2015,589(12): 1359-1368.

[14] Wang Q, Dai X, Yang W, *et al.* Caffeine protects against alcohol-induced liver fibrosis by dampening the cAMP/PKA/CREB pathway in rat hepatic stellate cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015,25(2):340-352.

[15] Mederacke I. Dapito DH, Affò S, *et al.* High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers[J]. *Nat Protoc*, 2015,10(2): 305-315.

[16] Riccalton-Banks L, Bhandari R, Fry J, *et al.* A simple method for the simultaneous isolation of stellate cells and hepatocytes from rat liver tissue[J]. *Mol Cell Biochem*, 2003, 248(1-2): 97-102.

[17] Riccalton-Banks L, Liew C, Bhandari R, *et al.* Long-term culture of functional liver tissue; three-dimensional coculture of primary hepatocytes and stellate cells[J]. *Tissue Eng*, 2003, 9(3): 401-410.

[18] Rockey DC Boyles JK, Gabbiani G, *et al.* Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture [J]. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 1992,24(2): 193-203.

[19] Knook D L,Seffelaar AM, de Leeuw AM. Fat-storing cells of the rat liver. Their isolation and purification [J]. *Exp Cell Res*, 1982,139(2): 468-471.

[20] Tacke F, Weiskirchen R. Update on hepatic stellate cells; pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, 6(1): 67-80.

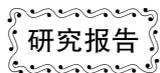
[21] Herrmann J, Gressner AM, Weiskirchen R. Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function[J]? *J Cell Mol Med*, 2007. 11(4): 704-722.

[22] Bartneck M, Warzecha KT, Tag CG, *et al.* Isolation and time lapse microscopy of highly pure hepatic stellate cells[J]. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2015;2015: 417023.

[23] Maschmeyer P, Flach M, Winau F. Seven steps to stellate cells [J]. *J Vis Exp*, 2011(51).

[24] Weiskirchen R, Gressner AM. Isolation and culture of hepatic stellate cells Methods[J]. *Mol Med*, 2005,117: 99-113.

[修回日期]2015-12-30



细辛脑注射制剂异常毒性检查标准研究

邓 莎,张德波,罗 洁,郑娇娇,郑 萍,蒲旭峰

(成都市食品药品检验研究院,成都 610045)

【摘要】 目的 测定细辛脑注射制剂静脉给药的小鼠 LD_{50} 值,同时起草本品异常毒性检查标准。方法 采用加权回归机率单位法(Bliss法)对小鼠静脉给药测定 LD_{50} 值,同时按照《中国药典》2010年版要求确定异常毒性检查限值,起草异常毒性标准。结果 测定细辛脑注射制剂的小鼠 LD_{50} 为 51.9 - 153.1 mg/kg,为标准中拟增加异常毒性检查项,异常毒性检查项的限值建议定为 15 mg/kg,按此限值检查结果符合规定。结论 细辛脑注射制剂毒性较大,各企业生产工艺不同毒性也差异较大,为减少本品临床使用不良反应的发生,应在其质量标准中增加异常毒性检查项。

【关键词】 细辛脑;异常毒性; LD_{50} ;限值;标准

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0035-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.03.008

Study on abnormal toxicity test standard of asarone injection preparation

DENG Sha, ZHANG De-bo, LUO Jie, ZHENG Jiao-jiao, ZHENG Ping, PU Xu-feng
(ChengDu Institutes for Food and Drug Control, ChengDu 610045, China)

【Abstract】 Objective To measure the lethal dosage values (LD_{50}) of i. v. asarone injection for mice and to establish a standard for abnormal toxicity test of asarone injection to potentially reduce the occurrence of adverse drug reaction. **Methods** To obtain the LD_{50} value, a weighted linear probit regression method (Bliss method) is employed. The limit of abnormal toxicity test is determined according to Appendix XI C in its 2010 edition of the Chinese pharmacopoeia. **Results** It is found that the LD_{50} of intravenously asarone injection in mice ranges from 51.9 to 153.1 mg/kg. The abnormal toxicity test should be added as an additional item in the standard. **Conclusions** Based on analyses in this study, an appropriate limit of abnormal toxicity test is 15 mg/kg, which is also in line with current medical standard in China.

【Key words】 Asarone; Abnormal toxicity; LD_{50} ; Limit value; Standard

细辛脑主要存在于天南星科植物石菖蒲(*acorus graninues soland*)等植物的挥发油中。我国从七十年代开展对石菖蒲的药理、毒理作用以及有效成分的提取、合成等方面的研究取得了重大的进展,进入80年代后,我国人工合成 α -细辛脑成功,陆续制成片剂、胶囊剂和注射剂投放市场。细辛脑有很强的药理活性,具有抗菌消炎、止咳、祛痰、平

喘、镇静、解痉、抗惊厥、抗癫痫等药理作用。近年来,不乏发生细辛脑注射剂的不良反应/事件,其不良反应/事件主要为全身性损害、皮肤及其附件损害、胃肠系统损害等^[1-3]。细辛脑注射剂质量标准繁多,且质量标准要求较低,国内外药典尚未收载该品种。现行标准中安全性检查项个别标准只收载了热原或细菌内毒素检查项,按照化学药品注射

【基金项目】 中央补助地方经费项目(食药监办药化监[2014]61号)。

【作者简介】 邓莎(1982-),女,硕士生,主管药师,专业:药理学。E-mail:ds88884@sina.com。

剂安全性检查法应用指导原则的建议,考虑到其在生产过程中引入或其它原因所致的毒性,故拟增加异常毒性检查项,开展了本品 LD₅₀测定,并根据测定值确定了异常毒性检查限值,建立了异常毒性检查标准。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药品 共 15 批细辛脑注射制剂,包括注射用细辛脑 6 批(企业 1,批号 1403063、1303211;企业 2,批号 1308271;企业 3,批号 20140304、20140505;企业 4,批号 1312231;企业 5,131108A1、140403E1;企业 6,12140306、12140307);细辛脑注射液 9 批(企业 1,批号 1402053、1402273;企业 2,批号 1312175、1311265;企业 7,批号 140507、130601;企业 8,批号 131015、131024;企业 9,批号 130902、131202;企业 10,批号 1311090、1311060;企业 11,批号 131002、131005;企业 12,批号 140317、140319;企业 13,批号 140401、140507)。

1.1.2 仪器 电子秤 PB1501-S 分辨值 0.1 g (Mettler Toledo Group);高压灭菌器 HV-110 (HIRAYAMA);十段编程鼓风干燥箱 ZRD-A7140 (上海智城分析仪器制造有限公司)。用具:鼠盒、试管架、秒表、天平、75%酒精棉球、镊子、鼠固定器、烧杯、注射针头、注射器。

1.1.3 试剂 5%葡萄糖注射液,规格:250 mL;批号:A14050206-1,有效期至 2017 年 4 月,四川科伦药业股份有限公司。10%葡萄糖注射液,规格:500 mL,批号:14032567,有效期至 2016 年 3 月 24 日,四川美大康佳乐药业有限公司。灭菌注射用水,规格:500 mL,批号:130726103,有效期至 2015 年 7 月 26 日,四川美大康佳乐药业有限公司。

1.1.4 动物 昆明种小鼠清洁级 825 只,4 周龄,体重 17~21 g,雌雄各半,雌性无孕,由成都生物制品研究所有限责任公司提供【SCXK(川)2011-008】;小鼠雌雄分开饲养,每笼 5 只。实验动物在成都市食品药品监督管理局药理实验洁净动物室进行实验以及观察和饲养【SYXK(川)2014-097】。该项实验通过成都市食品药品监督管理局实验动物伦理委员会批准,审查编号为:2014-003;并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。饲料,全价颗粒饲料,四川省实验动物专委会养殖场提供,其质量符合 GB14924.1-2001《实验动物配合饲料通

用质量标准》。

1.2 方法

1.2.1 急性毒性测定(LD₅₀测定)

采用加权回归机率单位法(Bliss 法)^[4],对每一企业不同制剂,用 5% 或 10% 葡萄糖注射液溶解并配制成一系列不同浓度供试液进行预试,找出动物全死与全不死剂量,通过预试结果设计正式试验的剂量。取禁食不禁水 8 h 的健康活泼、体重为 19~21 g 小鼠静脉注射给药,随机分为 5 组,每组 10 只,雌雄各半,每只小鼠静脉注射 0.8 mL,立即观察记录,共观察 7 d。

1.2.2 异常毒性标准起草^[7]

1.2.2.1 剂量设定

《中国药典》2010 年版二部附录 XI X M“化学药品注射剂安全性检查法应用指导原则”异常毒性检查项下对限值设定的规定^[5],同时考虑标准的普遍适用性,取本品 6 个较小 LD₅₀ 值(51.86-72.40 mg/kg)的平均值的可信限下限的 1/4 作为设定异常毒性限值的参考值。该值为 14.67 mg/kg,取整数为 15 mg/kg。异常毒性检查时供试液配制成 0.6 mg/mL,每只小鼠静脉注射 0.5 mL。

1.2.2.2 供试液的溶血与凝聚考查^[8]

取家兔心脏血,脱纤,离心洗涤至上清液不显红色,取分离红细胞用氯化钠注射液配成 2% 的混悬液备用。取各企业的细辛脑注射制剂,加 5% 或 10% 葡萄糖注射液溶解并配制成 0.6 mg/mL 的溶液,按照我国现行标准规定的方法进行溶血与凝聚常规检验,依法操作(表 1)。

1.2.2.3 标准起草

异常毒性 取本品,用 5% 或 10% 葡萄糖注射液制成每 1 mL 含细辛脑 0.6 mg 的溶液,依法检查(中国药典 2010 年版二部附录 XI C)^[4-6],按静脉注射法给药,应符合规定。

1.2.2.4 样品异常毒性常规检查

取每一企业样品 1 批(共 15 批),分别用 5% 葡萄糖注射液制成每 1 mL 含细辛脑 0.6 mg 的溶液作为供试液。

取禁食不禁水 8 h,体重为 17~20 g 的健康活泼小鼠,静脉注射给药,注射剂量为每只小鼠注射 0.5 mL,注射速度为 5 s,每一批样品共注射 5 只。注射毕立即观察,记录动物出现的毒性反应,共观察 48 h。

表 1 细辛脑注射制剂溶血与凝聚检验加样方法

Tab. 1 Asarone injection preparation hemolysis and coagulation test methods

试管编号 No.	1	2	3	4	5	6
供试液 Test solution (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3	/	/
0.9% 氯化钠注射液 0.9% NaCl injection (mL)	2.2	2.2	2.2	4.7	2.5	/
2% 兔红细胞混悬液 2% Rabbit red blood cell suspension liquid (mL)	2.5	2.5	2.5	/	2.5	2.5
纯化水 Purified water (mL)	/	/	/	/	/	2.5

表 2 细辛脑注射制剂急性毒性 (LD₅₀) 测定结果

Tab. 2 Acute toxicity (LD₅₀) results of asarone injection preparation

序号 No	生产企业 Company	样品名称 Sample name	批号 Batch	样品规格 Size	测定的 LD ₅₀ (mg/kg) LD ₅₀
1	企业 2 Co. 2	细辛脑注射液 Asarone injection	1312175	2ml:8mg	51.86
2	企业 9 Co. 9		130902	2ml:8mg	57.30
3	企业 10 Co. 10		1311090	2ml:8mg	60.34
4	企业 8 Co. 8		131015	2ml:8mg	71.80
5	企业 13 Co. 13		140401	2ml:8mg	72.40
6	企业 7 Co. 7		140507	2ml:8mg	106.58
7	企业 1 Co. 1		1402053	2ml:8mg	113.55
8	企业 12 Co. 12		140319	2ml:8mg	123.25
9	企业 11 Co. 11		131002	2ml:8mg	123.15
10	企业 5 Co. 5		131108A1	8mg	56.98
11	企业 2 Co. 2	注射用细辛脑 Asarone for Injection	1308271	16mg	126.12
12	企业 4 Co. 4		1312231	8mg	148.29
13	企业 3 Co. 3		20140304	16mg	148.64
14	企业 1 Co. 1		1403063	16mg	153.06
15	企业 6 Co. 6		12140306	8mg	153.10

1.3 统计分析

采用加权回归机率单位法 (Bliss 法) 对小鼠静脉给药测定 LD₅₀ 值^[4]。

2 结果

2.1 急性毒性测定 (LD₅₀ 测定)

表 2 显示, 每一企业的细辛脑注射制剂均测出了 LD₅₀。其结果: 细辛脑注射液 LD₅₀ 为 51.9 ~ 123.2 mg/kg; 注射用细辛脑 LD₅₀ 为 57.0 ~ 153.1 mg/kg。

2.2 异常毒性标准起草

2.2.1 供试液的溶血与凝聚考查

试验结果, 阴性和阳性对照管均成立, 供试品管上层液与供试液颜色对照管 (第 4 管) 的溶液颜色接近, 所有供试液均未引起溶血与凝聚作用。即本品异常毒性检查的 0.6 mg/mL 供试液不会引起溶血与凝聚作用。

2.2.2 样品异常毒性常规检查

表 3 显示, 15 批细辛脑注射制剂静脉注射后, 动物均无明显异常反应, 也未见死亡, 观察 48 h 动

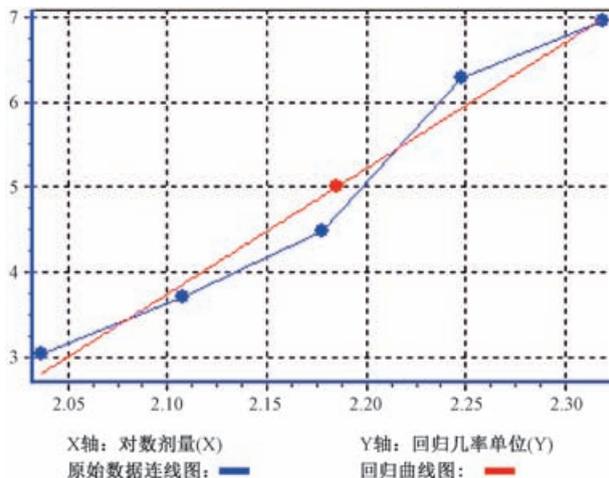


图 1 注射用细辛脑 LD₅₀ 测定计算图 (企业 1, 16 mg, 1403063)

Fig. 1 The determination of asarone for injection LD₅₀ calculation chart (Co. 1, 16mg, 1403063)

物均存活, 健康活泼。实验认为, 各企业生产的细辛脑注射制剂异常毒性检查能够满足本研究起草的标准要求。

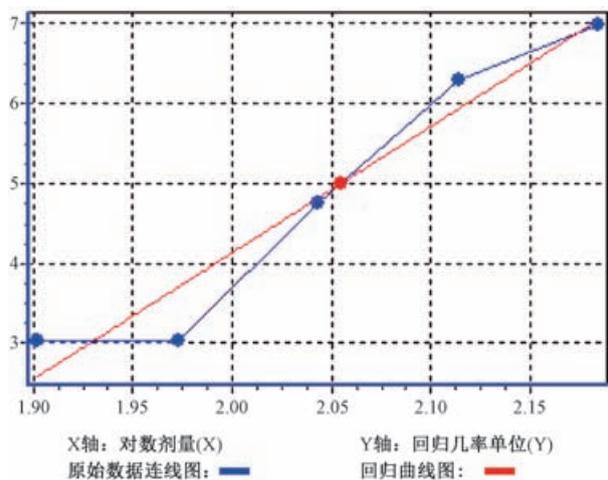


图2 细辛脑注射液 LD₅₀测定计算图

(企业 1, 2 mL:8 mg, 1402053)

Fig. 2 The determination of asarone injection LD₅₀ calculation chart (Co. 1, 2 mL:8 mg, 1402053)

3 讨论

本研究是 2014 年我院承担的 2014 年国家药品计划抽检“细辛脑注射剂”研究,共抽取了国内 13 家企业的细辛脑注射液和注射用细辛脑 126 批样品。本研究主要是考查细辛脑注射剂毒性情况,同时建立异常毒性检查标准。

本品临床使用说明书中标注测定 LD₅₀小鼠口服为 680.5 ± 41.4 mg/kg,腹腔注射为 388.7 ± 28.5 mg/kg。此二种测定方法与本品临床静脉给药方法不一致,其结果不能代表本品的真实毒性。本研究采用静脉给药法测定 LD₅₀为 51.9 ~ 153.1 mg/kg,与说明书中的值差别较大。《中国药典》2010 年版二部附录 XI X M“化学药品注射剂安全性检查法应用指导原则”关于异常毒性检查的剂量设定,建议限值至少应小于 LD₁ 可信限下限的 1/3 (建议采用 1/3 - 1/6); 如难以计算最低致死量,可采用小于

表 3 异常毒性检验记录表

Tab. 3 Abnormal toxicity test record

序号 No.	生产 企业 Co.	样品 Sample	批号 Batch.	样品 规格 size	注射后动物出现的反应观察 The reaction of animals appear after injection						
					眼球突出 Protopsis	呼吸急 促或困难 Breath difficulty	行动失调 Action disorders	昏倒 Faint	麻痹 Paralysis	痉挛 Spasm	惊厥 Convulsions
1	企业 2 Co. 2	细辛 脑注 射液 Asarone injection	1311265	2ml:8mg	-	-	-	-	-	-	-
2	企业 9 Co. 9		131202	2ml:8mg	-	-	-	-	-	-	-
3	企业 10 Co. 10		1311060	2ml:8mg	-	-	-	-	-	-	-
4	企业 8 Co. 8		131024	2ml:8mg	-	-	-	-	-	-	-
5	企业 13 Co. 13		140507	2ml:8mg	-	-	-	-	-	-	-
6	企业 7 Co. 7		130601	2ml:8mg	-	-	-	-	-	-	-
7	企业 1 Co. 1		1402273	2ml:8mg	-	-	-	-	-	-	-
8	企业 12 Co. 12		140317	2ml:8mg	-	-	-	-	-	-	-
9	企业 11 Co. 11		131005	2ml:8mg	-	-	-	-	-	-	-
10	企业 5 Co. 5		140403E1	8mg	-	-	-	-	-	-	-
11	企业 2 Co. 2		1308271	16mg	-	-	-	-	-	-	-
12	企业 4 Co. 4		1312231	8mg	-	-	-	-	-	-	-
13	企业 3 Co. 3		20140505	16mg	-	-	-	-	-	-	-
14	企业 1 Co. 1		1303211	16mg	-	-	-	-	-	-	-
15	企业 6 Co. 6		12140307	8mg	-	-	-	-	-	-	-

注:(+)为正反应;(-)为无反应。

Note:(+) represents a positive reaction;(-) represents no reaction.

LD₅₀ 可信限下限的 1/4 (建议采用 1/4 - 1/8); 如半数致死量与临床体重剂量之比小于 20, 可采用可信限下限的 1/4 或 LD₁ 可信限下限的 1/3。本研究在起草细辛脑注射制剂的异常毒性标准时, 设定剂量为 6 个较低 LD₅₀ 值平均值的可信限下限的 1/4, 与其他较大 LD₅₀ 值平均值的可信限下限的 1/8 基本相当, 符合药典以上规定要求^[5]。在对细辛脑注射制剂异常毒性标准研究中, 采用小鼠为受试动物, 确定了异常毒性检查限值, 该限值为本品临床成人一日最大用药剂量的 30 倍。通过测定的 LD₅₀, 按照药典要求起草了异常毒性标准, 使用 15 批样品进行常规检验验证, 注射后动物基本上无异常反应, 供试品均能符合起草的异常毒性检查标准要求。

在进行急性毒性测定时, 供试液的配制均是以主药细辛脑的量来配制, 稀释液采用与临床用药一致的 5% 或 10% 的葡萄糖注射液。小鼠在静脉注射供试液后, 主要表现为惊厥、小便失禁、全身歪倒、呼吸急促、匍匐少动、竖毛、死亡等, 毒性较大, 但各企业的产品毒性又有较大区别, 或同一企业的不同剂型毒性有较大差别, 可能是由于制剂添加的辅料多少不同而引起。细辛脑注射制剂, 各个企业的生产工艺不尽相同, 添加了较多的赋形剂, 主要包括吐温 80、乙醇、丙二醇、聚乙二醇 400、苯甲醇等, 但不排除主药细辛脑产生了协同毒性作用^[2]。本品毒性较大, 建立异常毒性检查标准, 既可以通过标准来检查异常毒性物质是否超标, 也可考查产品中

辅料是否过量添加, 因为添加过量的辅料也可能引起毒性增加。

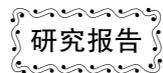
起草标准时, 对异常毒性检查的供试液进行溶血与凝聚考查, 是为了考查供试液是否会引起强烈的溶血与凝聚作用, 以避免异常毒性检查时动物发生的反应是由于供试液有较强的溶血与凝聚作用引起。

本文对所有企业的名称均使用代号处理。

参考文献:

- [1] 韩颖. 52 例细辛脑注射剂不良反应分析[J]. 统计与管理, 2014, 3: 55 - 56.
- [2] 李蓓. 细辛脑注射液致不良反应 50 例分析[J]. 中国医药导刊, 2013, 15(6): 1059 - 1060.
- [3] 孙春艳, 赵亚萍, 郭江红. 细辛脑注射剂质量评价与标准现状分析[J]. 中国药品标准, 2012, 13(3): 181 - 184.
- [4] 中国药典. 二部[S]. 2010: 附录 99 - 102.
- [5] 中国药典. 二部[S]. 2010: 附录 212 - 215.
- [6] 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规范(2010 年版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 310 - 325.
- [7] 张德波. 利福平注射液生物安全性检查标准研究[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(5): 515 - 518.
- [8] 张良, 蒲旭峰, 张德波. 注射用头孢地嗪钠生物安全性检查标准研究[J]. 成都医学院学报, 2014, 9(3): 281 - 285.

[修回日期] 2015 - 01 - 05



尼古丁抑制 MIA 诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡

韩贵宾, 张 寿, 孙薇薇, 钟海波, 陈建强, 范忠诚

(海口市人民医院骨科中心, 海口 570208)

【摘要】 目的 探讨尼古丁抑制碘乙酸钠(MIA)诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡。方法 酶消化法分离大鼠原代软骨细胞,并用 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol/L 尼古丁处理细胞 48 h,随后实验分为 5 组,除正常组外,其余 4 组皆用 4 μ M MIA 处理 24 h,并给予尼古丁。MTT 法检测各组软骨细胞活力;Annexin V-FITC/PI 流式双染细胞术检测各组软骨细胞凋亡;分光光度法检测各组软骨细胞中含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase 3)活性;Western blot 分析磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)激活状况及下游靶分子 Bax, Bcl-2 的表达情况。结果 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁显著促进大鼠软骨细胞活力($P < 0.05$), 10^{-5} mol/L 尼古丁显著降低大鼠软骨细胞活力($P < 0.05$), 10^{-8} mol/L 尼古丁对大鼠软骨细胞活力无影响($P > 0.05$)。 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能剂量依赖性的提高 MIA 诱导的大鼠软骨细胞活力,并抑制 MIA 诱导的大鼠软骨细胞凋亡及 Caspase 3 活性($P < 0.05$); 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能提高 PI3K 表达及 AKT 磷酸化水平,并下调促 Bax 表达,上调 Bcl-2 表达($P < 0.05$)。结论 一定剂量尼古丁能显著的抑制 MIA 诱导的大鼠软骨细胞凋亡,可能与 PI3K/AKT 信号通路有关。

【关键词】 关键词 尼古丁;骨关节炎;软骨细胞;凋亡

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0040-00

doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2016.03.009

Inhibition of nicotine on apoptosis of chondrocytes induced by monosodium iodoacetate

HAN Gui-bin, ZHANG Shou, SUN Wei-wei, ZHONG Hai-tao,
CHEN Jian-qiang, FAN Zhong-cheng

【Abstract】 Objective To explore inhibition of nicotine on apoptosis of chondrocytes induced by monosodium iodoacetate (MIA). **Methods** Rat primary chondrocytes were isolated by enzyme digestion, and the cells were treated with 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol/L nicotine for 48 h. The cases were randomly divided into five groups, except for normal group, the other four groups were treated with 4 μ mol/L MIA 24 h, and three groups were treated 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L nicotine. The viability of chondrocytes was detected by MTT assay. The apoptosis of chondrocytes was examined by Annexin V-FITC/PI flow dual-staining method. The activity of cysteinyl aspartate specific proteinase 3 (Caspase 3) was measured by spectrophotography method. The activation of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) and the expression of down-stream molecule Bax, Bcl-2 was assayed by western blot. **Results** 10^{-7} , 10^{-6} mol/L nicotine increased chondrocytes' viability ($P < 0.05$), 10^{-5} mol/L nicotine reduced chondrocytes' viability ($P < 0.05$), and 10^{-8} mol/L nicotine didn't effect on chondrocytes' viability ($P > 0.05$). 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L nicotine could increase

[基金项目]海南省卫生厅基金资助项目(琼卫-2013 资助-036 号)。

[作者简介]韩贵宾(1974-),男,硕士,副主任医师,研究方向:关节外科。E-mail:hanguibin456@163.com。

[通讯作者]张寿,Email:shouzhang456@163.com。

MIA-induced chondrocytes' viability ($P < 0.05$), suppress MIA-induced chondrocytes' apoptosis and the activity of MIA-induced Caspase 3 ($P < 0.05$). Moreover, 10^{-7} , 10^{-6} mol/L nicotine could increase the expression of PI3K and phosphorylation of AKT ($P < 0.05$), down-regulate the expression of Bax and up-regulate the expression of Bcl-2 in MIA-induced rat chondrocytes ($P < 0.05$). **Conclusion** These results suggested nicotine could exert anti-apoptosis in MIA-induced rat chondrocytes, which might be related to PI3K/AKT signal pathway.

【Key words】 Nicotine; Osteoarthritis; Chondrocytes; Apoptosis

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种慢性退行性骨关节疾病, 其中软骨病变是骨关节炎的中心环节^[1]。软骨细胞是软骨中唯一细胞结构, 一旦软骨细胞死亡, 只能缓慢再生甚至无法再生, 而软骨细胞的死亡又破坏了胞外基质合成及降解的平衡, 从而进一步加剧 OA^[2]。软骨细胞的凋亡受多种信号通路调节, 其中包括 PI3K/AKT, 此通路的持续激活, 能使软骨细胞维持增殖活力, 并调节下游靶基因 Bax, Bcl-2 及 Caspase 3 的表达^[3]。

一定剂量尼古丁能显著促进包括软骨细胞在内的多种细胞的增殖活力。如 Liu 等^[4]报道在碘乙酸钠 (MIA) 诱导的骨关节炎大鼠中, 尼古丁通过与乙酰胆碱受体 $\alpha 7$ 结合, 从而改善大鼠大体及病理形态, 并抑制大鼠软骨细胞凋亡。Zheng 等^[5]通过 MTT 及 DAPI 实验证实 10^{-7} M 尼古丁能显著抑制白介素-1 β (IL-1 β) 诱导的大鼠软骨细胞凋亡。但尼古丁对于软骨细胞凋亡的抑制作用机制尚未见报道, 因此本文旨在考察尼古丁是否能通过 PI3K/AKT 信号通路从而阻断 MIA 诱导的软骨细胞凋亡。

1 材料和方法

1.1 药品和试剂

尼古丁购自美国 sigma 公司, 批号: 4408; 兔抗 Bax, Bcl-2, PI3K, AKT, p-AKT, GDAPH 抗体购自 Epitomics 公司; Annexin V-FITC/PI 流式双染细胞, Caspase 3 检测试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司; 胎牛血清, DMEM/F-12 培养基, 二型胶原酶, 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 购自 Gibco 公司。

1.2 大鼠软骨细胞的制备^[6]

无菌环境下, 刮取 100 g 左右 SD 大鼠 (购于上海斯莱克实验动物有限公司【SCXK (沪 2012 - 0002)】) 双侧膝关节胫骨坪、髌骨内侧透明软骨, 剪碎至 1 mm^3 大小。依次用 0.25% 的胰蛋白酶及 0.2% 的胶原酶消化。得到单细胞悬液, 用 DMEM/F-12 培养基重悬细胞 (含 20% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素, 100 U/mL 链霉素), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 培养箱中培养, 约 5~6 d 细胞开始融合, 实验使用第 2

~3 代细胞。

1.3 软骨细胞活力检测 (MTT 法)

将第 2~3 代软骨细胞进行消化, 并调整细胞浓度为 1×10^5 个细胞/mL, 接种, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 培养箱中培养 24 h。加入含 5% 胎牛血清的 DMEM/F-12 (含 4 $\mu\text{mol/L}$ MIA 及 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol/L 尼古丁) 培养基, 继续培养 24 h, 每孔加 MTT (5 mg/mL) 20 μL , 4 h 后, 弃上清, 并每孔加入 DMSO 150 μL , 10 min 后, 酶标仪 570 nm 处测定 OD 值, 以 OD 值代表细胞活力。

1.4 Annexin V-FITC 流式细胞法检测软骨细胞凋亡

将第 2~3 代软骨细胞进行消化, 调整细胞浓度为 2×10^5 个细胞/mL, 接种, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 培养箱中培养 24 h。加入含 5% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基、尼古丁 (终浓度为 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L) 和 MIA (终浓度为 4 $\mu\text{mol/L}$), 继续培养 48 h 后, 按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书的方法, 用 0.25% 的胰蛋白酶 (不含 EDTA) 消化, PBS 洗涤, 2000 r/min 离心 5 min, 收集细胞; 加入 Binding Buffer 500 μL 悬浮细胞, 随后加入 Annexin V-FITC 5 μL 混匀后, 加入 PI 5 μL , 混匀, 于室温避光反应 5~15 min, 在 1 h 内进行流式细胞仪检测。

1.5 Caspase 3 活性检测

将第 2~3 代软骨细胞进行消化, 调整细胞浓度为 2×10^5 个细胞/mL, 接种, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 培养箱中培养 24 h。加入含 5% 小牛血清的 DMEM/F-12 培养基、尼古丁 (终浓度为 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L) 和 MIA (终浓度为 4 $\mu\text{mol/L}$), 继续培养 48 h。按 Caspase 3 分光光度法检测试剂盒进行检测。

1.6 Western blotting

收集处理过的样本, 加入裂解液裂解, 离心, 获得蛋白样品。用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。蛋白上样, 跑 SDS 凝胶电泳, 转膜, 封闭, 加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日加二抗孵育后曝光。用 "Quantity One" 软件对各蛋白条带灰度值进行统计。

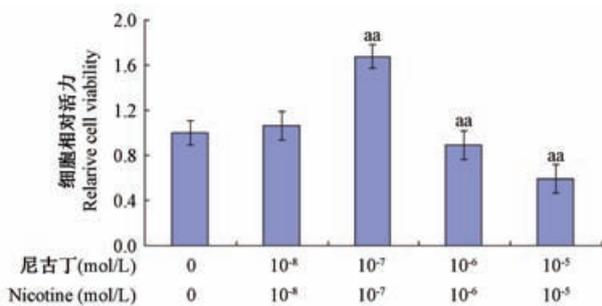
1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,分析组间差异的显著性。 $P < 0.05$ 时表示两组间差异在统计学上有显著性意义。

2 结果

2.1 尼古丁对大鼠软骨细胞活力的影响

如图 1 所示, 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能显著提高软骨细胞活力,差异具有统计学意义($P < 0.01$); 而 10^{-5} mol/L 尼古丁对软骨细胞活力具有显著抑制作用,差异具有统计学意义($P < 0.01$); 10^{-8} mol/L 尼古丁对软骨细胞活力影响不大($P > 0.05$)。



注:与正常组比较, $^{aa}P < 0.01$ 。

图 1 尼古丁对大鼠软骨细胞活力的影响

Note: Compared with normal control group, $^{aa}P < 0.01$.

Fig. 1 Effect of nicotine on rat chondrocytes viability

2.2 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞活力的影响

如图 2 所示, $4 \mu\text{mol/L}$ MIA 显著抑制软骨细胞活力,而 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能显著提高 MIA 诱导的软骨细胞活力,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞凋亡的影响

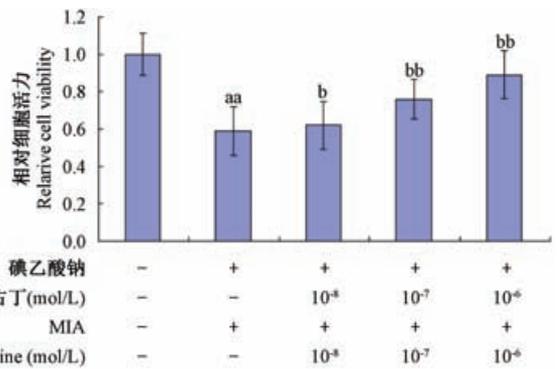
如图 3 所示, $4 \mu\text{mol/L}$ MIA 显著促进软骨细胞凋亡,而 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能显著抑制 MIA 诱导的软骨细胞凋亡。

2.4 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞 PI3K/AKT 信号通路的影响

如图 4 所示, $4 \mu\text{mol/L}$ MIA 显著抑制 PI3K 表达和 AKT 的磷酸化程度,而 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能提高 PI3K 表达, 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能提高 AKT 磷酸化水平,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞 Bax 及 Bcl-2 表达的影响

如图 5 所示, $4 \mu\text{mol/L}$ MIA 显著提高 Bax 表达,抑制 Bcl-2 表达,而 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能



注:与正常组比较, $^{aa}P < 0.05$;与模型组比较, $^{bb}P < 0.05$, $^{bb}P < 0.01$ 。

图 2 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞活力的影响

Note: Compared with normal control group, $^{aa}P < 0.01$; Compared with model group, $^{bb}P < 0.01$.

Fig. 2 Effect of nicotine on viability of rat chondrocytes induced by MIA

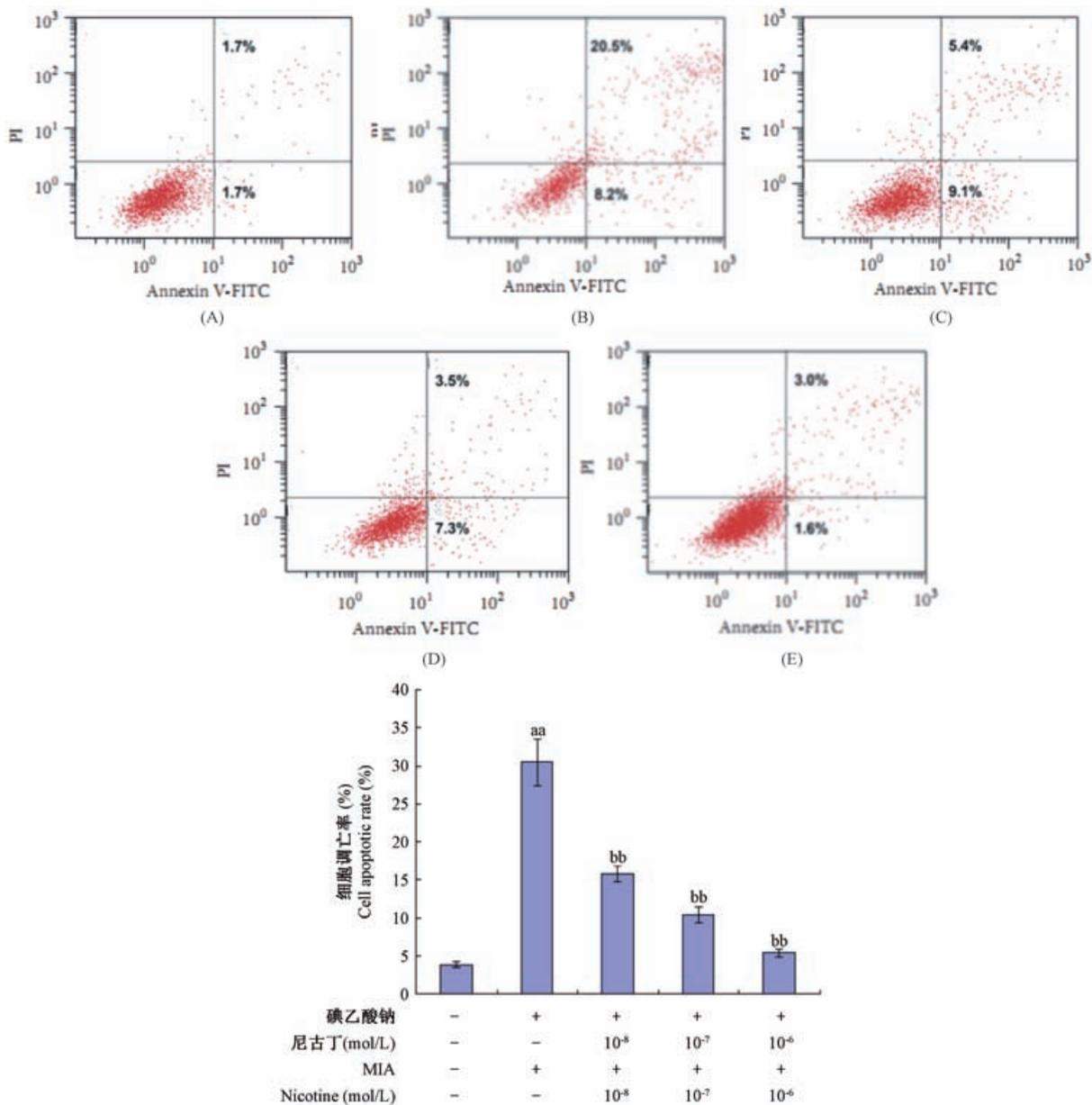
下调 Bax 表达,上调 Bcl-2 表达,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.6 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞 Caspase 3 活性的影响

如图 6 所示, $4 \mu\text{mol/L}$ MIA 显著提高软骨细胞 Caspase 3 活性,而 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能显著抑制 MIA 诱导的软骨细胞 Caspase 3 活性,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。

3 结论

Ying 等^[7]研究结果表明 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能促进骨髓干细胞增殖并向软骨细胞分化,并随着时间延长能逐渐诱导二型胶原蛋白的表达,而 10^{-5} mol/L 尼古丁可显著的抑制骨髓干细胞增殖。Schraufstatter 等^[8]报道 10^{-5} mol/L 尼古丁会导致人间充质干细胞的凋亡。说明不同剂量尼古丁对细胞增殖活力影响具有显著差异,本实验研究表明 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁能显著提高软骨细胞活力,而 10^{-5} mol/L 尼古丁对软骨细胞活力具有显著抑制作用,与上述报道一致,说明在一定浓度范围内尼古丁对大鼠软骨细胞增殖具有显著促进作用。而多种因素可引起软骨细胞损伤乃至死亡,如软骨表面应力异常,细胞因子(如 IL-1 β , TNF- α 等)的作用,NO、能量代谢抑制剂(如 MIA)等。其中 MIA 为糖酵解途径中 3-磷酸甘油醛脱氢酶抑制剂,通过抑制细胞能量代谢而导致细胞因供养不足而死亡^[9]。MIA 体外刺激 24 h,亦能造成大鼠软骨细胞的死



注:与正常组比较,^{aa} $P < 0.05$;与模型组比较,^{bb} $P < 0.01$ 。A:正常组;B:模型组(4 $\mu\text{mol/L}$ MIA);

C:10⁻⁸ mol/L 尼古丁 + 4 $\mu\text{mol/L}$ MIA;D:10⁻⁷ mol/L 尼古丁 + 4 $\mu\text{mol/L}$ MIA;E:10⁻⁶ mol/L 尼古丁 + 4 $\mu\text{mol/L}$ MIA。

图 3 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞凋亡的影响

Note:Compared with normal control group, ^{aa} $P < 0.01$; Compared with model group, ^{bb} $P < 0.01$ 。A: normal control group;

B: model group; C: 10⁻⁸ mol/L nicotine + 4 $\mu\text{mol/L}$ MIA; D: 10⁻⁷ mol/L nicotine + 4 $\mu\text{mol/L}$ MIA; E: 10⁻⁶ mol/L nicotine + 4 $\mu\text{mol/L}$ MIA。

Fig. 3 Effect of nicotine on apoptosis of rat chondrocytes induced by MIA

亡^[10-11]。本实验亦表明 MIA 诱导 24 h 会降低软骨细胞活力,并使细胞凋亡显著。且 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ mol/L 尼古丁能显著抑制 MIA 诱导的细胞凋亡作用,与 Zheng 等^[5]观点一致。

正常生理状态下,关节软骨细胞凋亡与增殖处于动态平衡,而在 OA 等病理状态下,软骨细胞凋亡占主要方面,且关节软骨细胞凋亡的异常会引起 OA。PI3K/AKT 信号通路在 OA 软骨细胞凋亡的发

生发展过程中起着重要的作用^[3]。PI3K 是一种胞内磷脂酰肌醇激酶,具有脂类激酶活性和蛋白激酶活性,其代谢产物 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2)和 1,4,5-三磷酸肌醇(PIP3)可以激活 AKT 蛋白上的丝氨酸或苏氨酸磷酸化位点,从而调节细胞增殖和凋亡相关基因的表达。PI3K/AKT 信号通路调节众多靶分子表达,如 Bax, Bcl-2, Caspase 3 等,调节软骨细胞凋亡活动^[3]。PI3K 抑制剂 LY294002 加入到

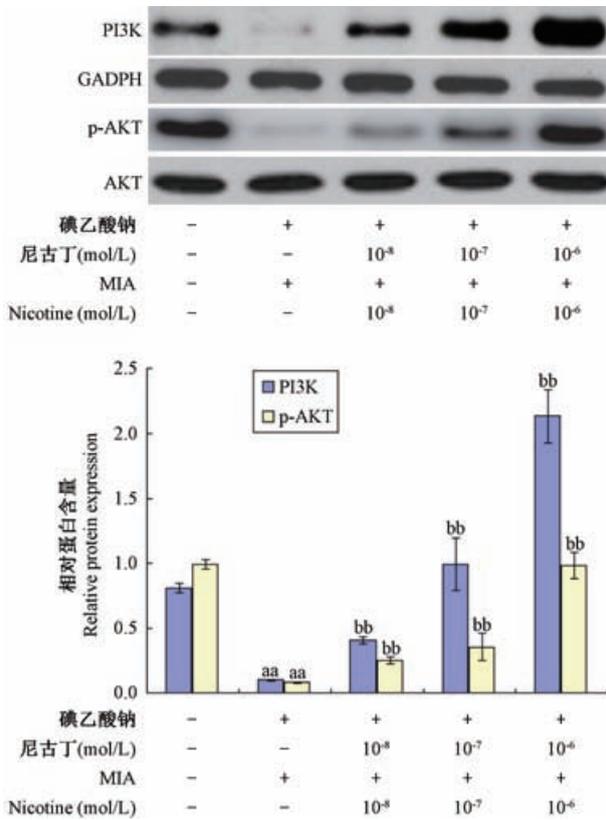


图 4 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞 PI3K/AKT 信号通路的影响与正常组比较, ^{aa} $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{bb} $P < 0.01$

Fig. 4 Effect of nicotine on PI3K/AKT signal pathway in rat chondrocytes induced by MIA Compared with normal control group, ^{aa} $P < 0.01$; Compared with model group, ^{bb} $P < 0.01$

大鼠胫骨软骨细胞中,使软骨细胞凋亡数目增多,且软骨细胞生长缓慢^[12]。胰岛素生长因子-1 通过激活兔软骨细胞 PI3K/AKT 信号通路拮抗软骨细胞凋亡,而 PI3K 抑制剂 LY294002 加入使软骨细胞凋亡数目增加^[13]。这些提示 PI3K/AKT 途径是抗软骨细胞凋亡作用的重要途径。并且李舒洁等^[14]研究表明,MIA 促使大鼠软骨细胞凋亡的同时,伴随着 AKT 磷酸化水平的降低,Bax 表达量的提高及 Bcl-2 表达量的降低。本研究也发现,在 MIA 诱导的 OA 软骨细胞中,PI3K 表达及 AKT 磷酸化程度下降,而 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁显著促进 PI3K 表达及 AKT 磷酸化。Nishioka 等^[15]研究结果也表明尼古丁可通过激活 PI3K/Akt 信号通路来抵抗肺癌细胞凋亡。说明尼古丁可通过 PI3K/AKT 信号通路来抵抗 MIA 诱导的软骨细胞凋亡。

软骨细胞的凋亡受凋亡基因的严格控制,如

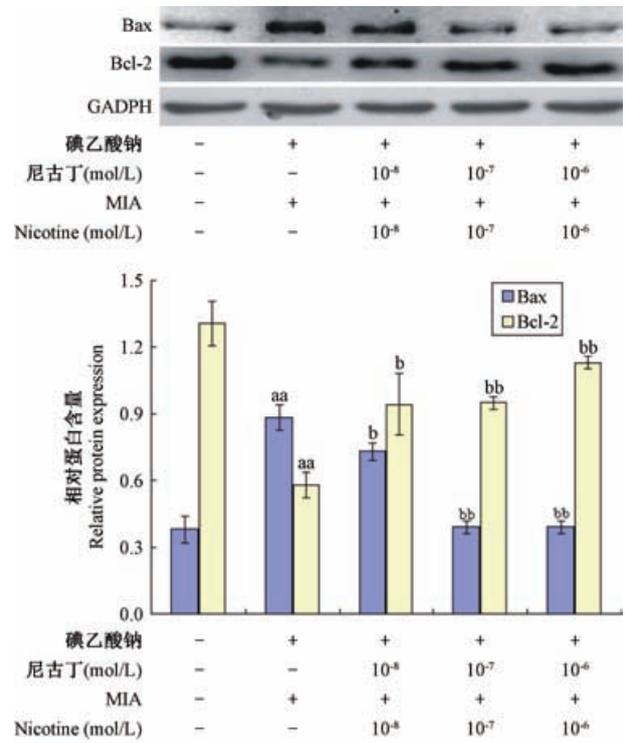


图 5 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞 Bax 及 Bcl-2 表达的影响与正常组比较, ^{aa} $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{bb} $P < 0.01$

Fig. 5 Effect of nicotine on the expression of Bax and Bcl-2 in rat chondrocytes induced by MIA Compared with normal control group, ^{aa} $P < 0.01$; Compared with model group, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$

Bcl-2 家族,能与 Bax 亚家族成员,相互作用,启动软骨细胞内的凋亡信号转导。在关节炎患者血清中,Bax 含量显著上升,Bcl-2 含量下降^[16],通过上调 Bcl-2 表达,下调 Bax 表达,能显著抑制软骨细胞凋亡^[17],本研究结果也显示 MIA 能上调软骨细胞的 Bax 表达,下调 Bcl-2 表达,而 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁减弱 MIA 诱导的这种变化。Caspase 是一类进化上保守的天冬氨酸蛋白酶家族,依赖 Caspase 的信号途径是细胞凋亡的主要途径。Caspase 3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 或 Ac-DMQD-CHO 在体外证实能抑制由胶原酶引起的软骨细胞凋亡^[18]。碘乙酸钠能诱导大鼠软骨细胞凋亡,与促进 Caspase 3 的活化有关^[19]。本研究发现,在 MIA 诱导的软骨细胞中 Caspase 3 活性显著提高, 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁可显著降低 Caspase 3 活性。

综上所述, 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁具有保护软骨细胞作用,可抑制 MIA 诱导的软骨细胞凋亡并抑制 Caspase 3 活性, 10^{-7} , 10^{-6} mol/L 尼古丁

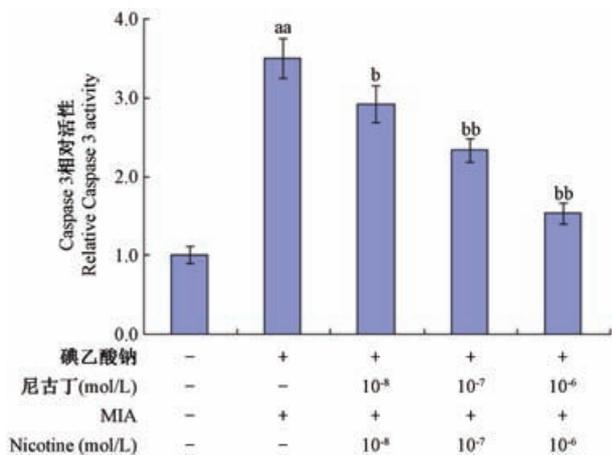


图 6 尼古丁对 MIA 诱导的软骨细胞 Caspase 3 活性的影响与正常组比较, ^{aa} $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$

Fig. 6 Effect of nicotine on the activity of Caspase 3 in rat chondrocytes induced by MIA Compared with normal control group, ^{aa} $P < 0.01$; Compared with model group, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$

可下调 Bax 表达, 上调 Bcl-2 表达, 并抑制 PI3K 表达及 AKT 磷酸化水平。

参考文献:

[1] 谢辉晋, 杜远立. 骨关节炎相关细胞因子作用机制研究进展 [J]. 重庆医学, 2011, 40(4): 395 - 398.

[2] Tong P, Xu S, Cao G, *et al.* Chondroprotective activity of a detoxicated traditional Chinese medicine (FuZi) of Aconitum carmichaeli Debx against severe-stage osteoarthritis model induced by mono-iodoacetate [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(1): 740 - 744.

[3] Huang Y, Wu D, Fan W. Protection of ginsenoside Rg1 on chondrocyte from IL-1beta-induced mitochondria-activated apoptosis through PI3K/Akt signaling [J]. Mol Cell Biochem, 2014, 392(1-2): 249 - 257.

[4] Liu Y, Wu D, Song F, *et al.* Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors prevents monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(2): 627 - 638.

[5] Zheng X, Xia C, Chen Z, *et al.* Requirement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway for the effect of nicotine on interleukin-1beta-induced chondrocyte apoptosis in a rat model of osteoarthritis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 423(3): 606 - 612.

[6] Zhang X, Xu X, Xu T, *et al.* beta-Ecdysterone suppresses interleukin-1beta-induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes via inhibition of NF-kappaB signaling pathway [J]. Drug Dev Res, 2014, 75(3): 195 - 201.

[7] Ying XZ, Peng L, Cheng SW, *et al.* [Effects of nicotine on bone marrow stromal cells proliferation and differentiation of chondrocyte in vitro] [J]. Zhongguo Gu Shang, 2011, 24(11): 935 - 938.

[8] Schraufstatter IU, Discipio RG, Khaldoyanidi SK. Alpha 7 subunit of nAChR regulates migration of human mesenchymal stem cells [J]. J Stem Cells, 2009, 4(4): 203 - 215.

[9] Grossin L, Cournil-Henrionnet C, Pinzano A, *et al.* Gene transfer with HSP 70 in rat chondrocytes confers cytoprotection in vitro and during experimental osteoarthritis [J]. FASEB J, 2006, 20(1): 65 - 75.

[10] Liu Y, Wu D, Song F, *et al.* Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors prevents monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(2): 627 - 638.

[11] Tong P, Xu S, Cao G, *et al.* Chondroprotective activity of a detoxicated traditional Chinese medicine (FuZi) of Aconitum carmichaeli Debx against severe-stage osteoarthritis model induced by mono-iodoacetate [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(1): 740 - 744.

[12] Ulici V, Hoenselaar KD, Gillespie JR, *et al.* The PI3K pathway regulates endochondral bone growth through control of hypertrophic chondrocyte differentiation [J]. BMC Dev Biol, 2008, 8: 40.

[13] Wang L, Shao YY, Ballock RT. Thyroid hormone-mediated growth and differentiation of growth plate chondrocytes involves IGF-1 modulation of beta-catenin signaling [J]. J Bone Miner Res, 2010, 25(5): 1138 - 1146.

[14] 李淑洁, 陈秀娟, 任艳红, 等. 牛膝提取物对碘乙酸钠诱导的软骨细胞保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(14): 132 - 135.

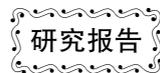
[15] Nishioka T, Guo J, Yamamoto D, *et al.* Nicotine, through upregulating pro-survival signaling, cooperates with NNK to promote transformation [J]. J Cell Biochem, 2010, 109(1): 152 - 161.

[16] 邢国胜, 赵文君, 张凯, 等. 姜黄素对类风湿关节炎患者滑膜细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(11): 872 - 875.

[17] Zhang XH, Xu XX, Xu T. Ginsenoside Ro suppresses interleukin-1beta-induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes by inhibiting NF-kappaB [J]. Chin J Nat Med, 2015, 13(4): 283 - 289.

[18] Nuttall ME, Nadeau DP, Fisher PW, *et al.* Inhibition of caspase-3-like activity prevents apoptosis while retaining functionality of human chondrocytes in vitro [J]. J Orthop Res, 2000, 18(3): 356 - 363.

[19] 姜丽平, 李龙婕, 宫德正, 等. 碘乙酸钠诱导原代大鼠软骨细胞凋亡 [J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(2): 247 - 253.



肺腺癌 A 549 绿色荧光裸鼠模型中 肿瘤血管内皮细胞来源初探

方 天¹, 胡若愚², 胡文娟¹, 刘 彪¹, 尤金炜¹, 恽时锋¹

(1. 南京军区南京总医院比较医学科, 南京 210002; 2. 东南大学附属中大医院胸心外科, 南京 210002)

【摘要】 **目的** 建立绿色荧光裸小鼠皮下接种肺腺癌 A 549 模型, 研究肺腺癌肿瘤血管生成过程中血管内皮细胞的来源。**方法** 建立肺腺癌 A 549 皮下接种 GFP 裸小鼠模型, 应用免疫荧光染色法进行 CD 31 染色, 标记肿瘤血管; 采用荧光显微镜观察并拍摄肿瘤组织冰冻切片; 免疫组化检测肿瘤组织血管中内皮细胞内 GFP 表达。**结果** 免疫荧光实验结果显示: GFP 蛋白和 CD 31 蛋白可共表达于部分间质血管; 部分血管表达 CD 31 蛋白而不表达 GFP 蛋白。免疫组化实验结果: 肿瘤组织中部分间质细胞的细胞质和内皮细胞的细胞质表达 GFP 蛋白。**结论** 组成肿瘤新生血管的内皮细胞部分来源于裸鼠体内, 部分来源于肿瘤细胞。

【关键词】 肺腺癌 A 549; 血管生成; 内皮细胞; 肿瘤干细胞

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0046-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 03. 010

Research on the source of endothelial cells in tumor vessels by A 549 tumor model with GFP nude mouse

FANG Tian¹, HU Ruo-yu², HU Wen-juan¹, LIU Biao¹, YOU Jin-Wei¹, YUN Shi-feng¹

(1. Department of Comparative Medicine, National Science Education Base, Nanjing 210002, China,

2. Department of thoracic surgery, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210002, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the source of endothelial cells in tumor vessels by A 549 tumor model with GFP nude mouse. **Methods** To establish the A 549 lung cancer models with GFP nude mice, expression of CD 31 was determined by immunofluorescence to label tumor vessels; to observe and take a picture of the tumor frozen section by confocal microscopy and invert microscope; expression of GFP in tumor vessels was determined by immunohistochemistry. **Result** The results of immunofluorescence showed: Tumor interstitial vascular endothelial cells or endothelial cells clusters and micro-vascular lumen size and shape are clearly visible by immunofluorescence, and part of vessels with no obvious lumen or irregular lumen. We can see green fluorescent in tumor cells of tumor tissue and endothelial cells which form of tumor vessels. The results of immunohistochemistry showed: expression of GFP was determined in cytoplasm of tumor stromal cells and endothelial cells in tumor vessels. **Conclusion** The endothelial cells which formed tumor neovessels that derived from GFP nude mice partly and the other part derived from tumor cells.

【Key words】 A 549; Vascularization; Endothelial cells; Carcinoma stem cells

[作者简介] 方天(1984 -), 女, 硕士, 南京军区南京总医院比较医学科技师, Email: Fangtianlove@126.com。

[通讯作者] 恽时锋(1965 -), 男, 博士, 主任技师, 教授, 研究生导师, 从事医学实验动物学工作, Email: yunshifeng1@163.com。

肿瘤的生成、转移与肿瘤新的血管生成关系密切,肿瘤血管生成一直是人们认识肿瘤生长进程和进行肿瘤治疗的一个重要途径^[1]。近年来,血管靶向药物对于肿瘤治疗有一定疗效^[2],但抗肿瘤血管靶向药物耐药或者疗效不佳(20%~37%)^[3]。最近研究发现,肿瘤内发生染色体变异的内皮细胞是由肿瘤干细胞分化而来,这可能是肿瘤血管生成的另一种重要方式^[4]。肿瘤干细胞的异质性,可塑性导致其功能的多样性,它通过各种方式为肿瘤提供全面的生长所需营养及其他条件^[5-6]。在肺腺癌的研究中,肿瘤干细胞与宿主裸鼠体细胞到底谁是肿瘤血管的主要来源是认识肺腺癌血管新生的重要课题。本实验将对此作初步探索,找出组成肿瘤新生血管的内皮细胞的来源,从而为肺腺癌肿瘤血管治疗提供新的治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 实验动物和主要试剂

实验动物采用 SPF 级 5~6 周龄绿色荧光(GFP)裸小鼠 12 只,雄性。GFP 裸小鼠由本科室选育【SCXK(军)2012-0047】;实验室【SYXK(军)2012-0014】。主要试剂和仪器:肺腺癌 A 549 来自本院肿瘤科馈赠。胎牛血清、RPMI-1640 培养液和 0.25% 胰蛋白酶均购自 GIBCO 公司。CD 31 多克隆抗体(Abcam 公司),山羊抗兔 CY3(谷歌生物);GFP 抗体,即 ANTI-EGFP,(博奥森公司);DAPI(谷歌生物);抗荧光淬灭封片剂(谷歌生物)。组化试剂盒 DAB 显色剂(DAKO 公司);病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);倒置荧光显微镜(日本尼康公司)。

1.2 肺腺癌 A 549 皮下接种 GFP 裸小鼠模型的制备

GFP 裸小鼠是将 GFP 基因导入 BALB/c-nu/nu 小鼠而得。具体培育过程:通过(GFP)C57BL/6 转基因小鼠与 BALB/c 裸小鼠进行杂交,获得子一代(F1),选取 F1 代小鼠进行自交,产生子二代(F2)代,从 F2 代中选择带绿色荧光的雄性裸小鼠与雌性荧光杂合子,进行全同胞交配,获得的荧光裸小鼠再与 BALB/c 小鼠进行回交,回交后代再自交,产生子三代(F3),F3 代回交后代再自交,产生子四代(F4),如此重复,直至十五代(F15),便可成功选育出在体内能稳定表达 GFP 的绿色荧光裸小鼠。

肺腺癌 A 549 细胞株培养在完全培养基中

(1640 培养液 + 10% 胎牛血清, pH 7.2),置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱内,每天更换培养液,细胞培养至 80%~90% 融合率,0.25% 胰蛋白酶消化传代。接种于生长状况良好的 5~6 周龄 GFP 裸小鼠,共 10 只。待移植肿瘤直径 1~2 cm 时,无痛处死荷瘤 GFP 裸小鼠,取移植肿瘤块放置福尔马林浸泡待用。

1.3 免疫荧光检测内皮细胞表明蛋白的表达

从荷瘤 GFP 裸小鼠体内,在无菌条件下取肿瘤组织块,4% 多聚甲醛浸泡 24 h,30% 蔗糖脱水 48 h,OCT 包埋保存于 -80℃,制作冷冻切片。按照常规荧光免疫步骤检测肿瘤组织块中内皮细胞的分子标记物 CD31 的表达情况,简要如下:4℃ 丙酮固定 15 min,PBS 液漂洗,山羊血清封闭,倾去,勿洗。滴加兔抗鼠多克隆抗体 CD 31(1:50)到切片上,4℃ 孵育过夜;PBS 充分漂洗后加入 CY3 山羊抗兔 IgG(1:300),37℃ 孵育,PBS 漂洗;DAPI 复染细胞核;抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察 CD 31 和 GFP 蛋白表达情况。

1.4 免疫组化检测肿瘤组织中 GFP 蛋白的表达

制作冰冻切片步骤同上。常规免疫组化检测肿瘤组织中 GFP 蛋白的表达,简要步骤:抗原修复,血清封闭;滴加 ANTI-EGFP(1:200),切片平放于湿盒内 4℃ 孵育过夜。滴加 HRP(1:200)山羊抗兔的 IgG 覆盖于组织上。DAB 显色;复染细胞核;脱水封片,中性树脂封片。倒置显微镜镜检,图像采集分析。

2 结果

2.1 免疫荧光检测结果

从肿瘤组织切片免疫荧光染色结果看出:血管标记物 CD 31 多克隆抗体免疫荧光染色标记肺腺癌 A549 皮下接种肿瘤组织,DAPI 染核(图 1A、D、G),倒置荧光显微镜观察结果:内皮细胞分子标记物 CD31 蛋白在肺腺癌肿瘤间质血管有强烈的阳性表达,显示 CY3 红色荧光信号,红色荧光信号显示出肿瘤组织间质的血管内皮细胞或者内皮细胞簇包裹形成微血管管腔,并且管腔大小以及形态均清晰可见,但还有部分红色荧光信号显示无明显管腔形态或管腔不规则(图 1B、E、H)。而 GFP 蛋白则显示 GFP 绿色荧光信号,即肿瘤组织中部分肿瘤间质细胞和部分围成血管的内皮细胞有绿色荧光(图 1C、F、I)。进一步采用荧光显微镜观察未进行 CD 31

染色的肿瘤组织冰冻切片,肿瘤组织中 GFP 表达得出同样结论:有部分血管管腔中的内皮细胞表达 GFP,而大部分血管管腔中内皮细胞不表达 GFP(图 2)。肿瘤组织块间质血管侧面剖面免疫荧光染色结果显示:CD 31 有强烈的阳性染色,血管管腔显示

CY3 红色荧光信号(图 3B),而显示出的 GFP 绿色荧光信号则相对很弱(图 3C),这表示组成肿瘤组织间质血管的内皮细胞只有一部分表达 GFP,且表达 GFP 的内皮细胞来源于肿瘤宿主动物即 GFP 裸小鼠。

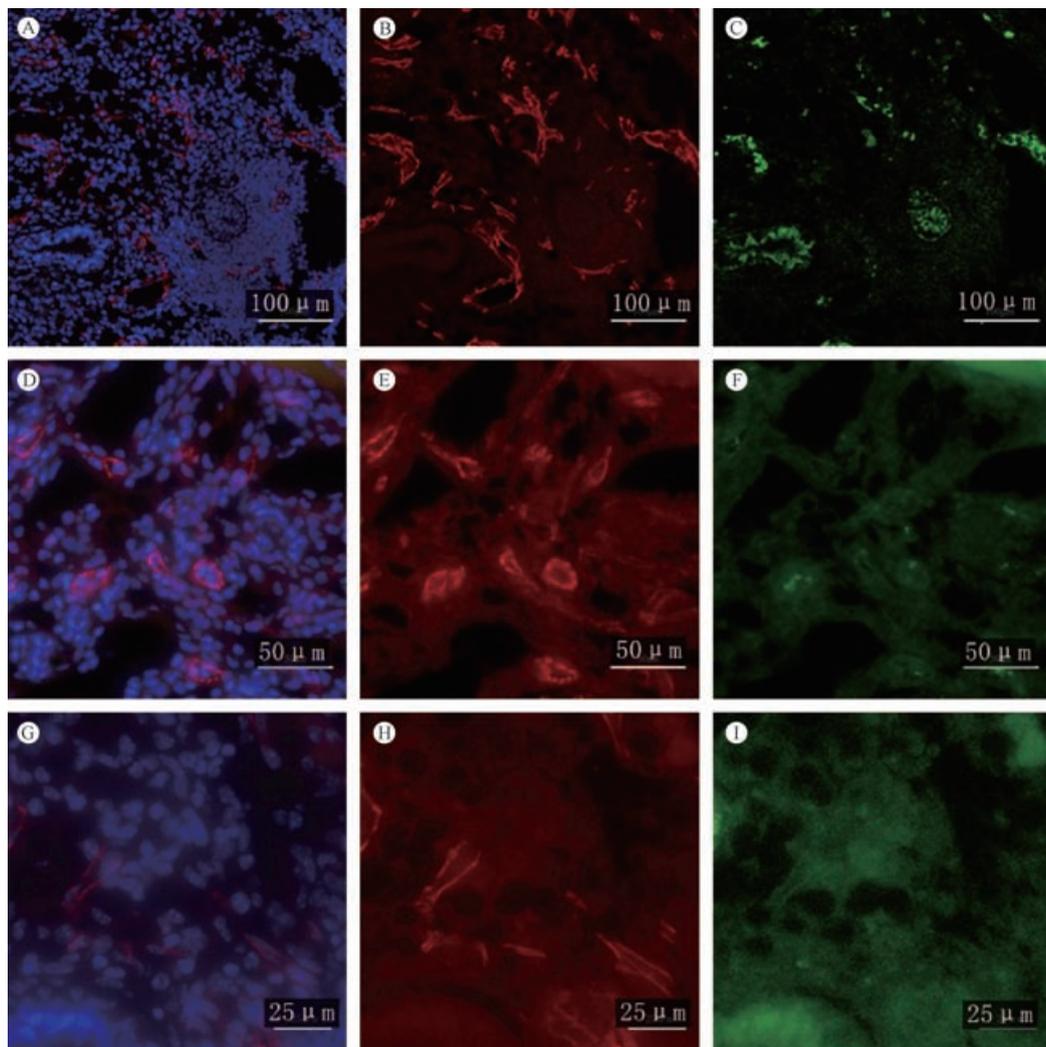


图 1 CD 31 蛋白和 GFP 蛋白在肿瘤组织中的表达

注:A、D、G 为 DAPI(蓝色荧光信号) + CD 31 蛋白标记(红色);B、E、H 为 CD 31 蛋白单标(红色);
C、F、I 为 GFP 蛋白表达(绿色)。

Fig. 1 Expression of CD 31 and GFP on tumor frozen section

A、D、G Labeled with CD 31 + DAPI; B、E、H Labeled with CD 31; C、F、I Expression of GFP.

2.2 免疫组化检测结果

由 GFP 单克隆抗体免疫组织化学染色结果表明,肿瘤组织中部分肿瘤细胞的细胞质和组成肿瘤血管的内皮细胞的细胞质表达绿色荧光蛋白(即 GFP,图 3 D、E、F),这一结果与免疫荧光实验中荧光显微镜下观察到肿瘤组织冰冻切片发出 GFP 绿色信号荧光的结果一致(图 1 C、F、I;图 2B、D;图 3C),这表明肿瘤组织冰冻切片中肿瘤间质及间质

血管管腔均有 GFP 蛋白表达,即免疫荧光实验中所发出的绿色荧光由绿色荧光蛋白发出的特异性绿色荧光。这一结果说明,荧光裸鼠体内正常成体细胞在特定条件下定向分化为内皮祖细胞或内皮细胞参与肿瘤组织中的血管新生。

3 讨论

血管生成是肿瘤生长、侵袭、转移和复发的基

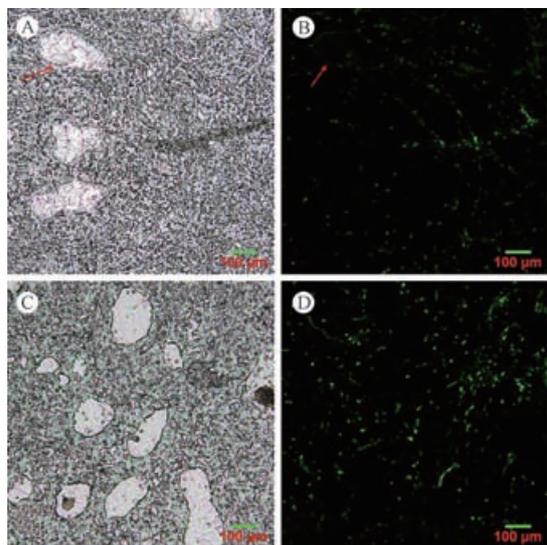


图 2 肿瘤组织冰冻切片中 GFP 表达

Fig. 2 Expression of GFP on tumor frozen section

基础^[7]。当肿瘤体积增长大于一定大小时,在没有新生血管长入的条件下,肿瘤组织大多保持静止状态或者退化^[8]。新生血管长入肿瘤组织以后血液供应丰富,这是因为新生血管为肿瘤组织提供足够的营养、氧气和大量的生长因子,从而促使肿瘤迅速

生长。同时,血管生成也与肿瘤转移有着密切的关系,肿瘤新生血管不成熟,肿瘤细胞更加容易穿透微血管壁发生转移;肿瘤新生血管形成后,淋巴回流增加,肿瘤细胞通过淋巴管系统转移,也是促使肿瘤转移的重要影响因素^[9]。经典的血管生成是指由内皮细胞排列围成内皮依赖性血管,即血管壁由分化成熟的内皮细胞(endothelial cells, EC)覆盖,该理论认为肿瘤细胞不参与血管壁的构成,此种生成方式一般包括出芽式血管生成、套入式血管生成^[10]。而 Maniotis 等^[11]对此有相反的观点,通过对人眼葡萄膜黑色素瘤进行深入的研究,Maniotis 等首先明确提出肿瘤细胞自身也能形成血管管道从而为肿瘤提供血供。另外,意大利国家卫生所的研究者们发现相同基因组改变的胶质瘤细胞样本中肿瘤衍生血管细胞的数值约为 20% ~ 90%,它们之间存在明显的差异^[12],这表明其中很大一部分组成肿瘤血管的内皮细胞是肿瘤来源的。因此,我们想在肺腺癌的研究中,首先找出组成肿瘤新生血管的内皮细胞的来源,从而阻断新的血管生成、毁坏现有的血管从根本上让肿瘤挨饿不能吸取营养和相关生长因子,达到抑制癌症的发展和转移的目的。

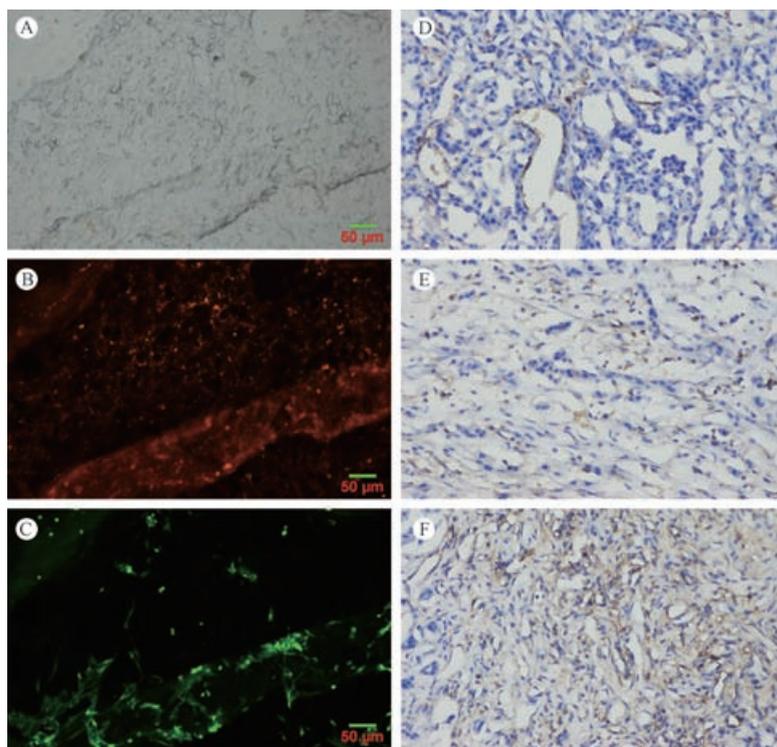


图 3 A、B、C 肿瘤组织冰冻切片中 CD31 和 GFP 的表达;

D、E、F 免疫组化染色检测肿瘤组织冰冻切片 GFP 蛋白的表达(×20)

Fig. 3 A、B、C Expression of CD 31 and GFP on tumor frozen section;

D、E、F Expression of GFP in tumor frozen section was detected by immunohistochemistry

为了研究肺腺癌肿瘤组织中内皮细胞的来源,本研究利用本实验室选育的绿色荧光(GFP)裸鼠建立肺腺癌细胞 A549 皮下接种模型,取完整肿瘤组织块制作冰冻切片,再利用肿瘤血管标志物 CD31 多克隆抗体对肺腺癌 A549 皮下接种肿瘤组织冰冻切片进行免疫荧光染色标记,结合荧光显微拍摄,观察并拍摄 CD 31 和 GFP 在肿瘤血管中的表达情况。本实验室科研人员于 2005 年从美国 Jackson 实验室引进表达 GFP 的 C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP) 10sb/J 小鼠,与普通 BALB/c 裸小鼠进行杂交繁育,选育出 GFP 裸小鼠。利用 GFP 裸小鼠具有 T 细胞功能缺陷和系统表达 GFP 的双重特点,跟踪正常体细胞和/或肿瘤细胞在体内的走向及发展,结合现代分子影像学技术,研究癌细胞以及宿主动物之间的关系。在荧光显微镜下,本实验室培育的 GFP 裸小鼠大部分器官都表达绿色荧光,包括心脏、肺脏、脾脏、胰腺、食管、胃和十二指肠,其中皮肤、血细胞、肌肉也表达绿色荧光;该 GFP 转基因裸小鼠既保留了裸小鼠的生物学特性,在全身组织器官中又能稳定表达 GFP。本实验即是利用其血管内皮细胞(EC)表达强烈信号的绿色荧光蛋白,使其肿瘤组织内的血管在荧光显微镜下清晰可见,结合内皮细胞标记物 CD31 标记 GFP 裸小鼠肺腺癌模型肿瘤血管来研究肺腺癌组成新生肿瘤血管的内皮细胞来源。实验结果显示:内皮细胞分子标记物 CD31 蛋白在肺腺癌肿瘤间质血管有强烈的阳性表达,显示 CY3 红色荧光信号,红色荧光信号显示出肿瘤组织间质的血管内皮细胞或者内皮细胞簇包裹形成微血管管腔,并且微血管管腔大小以及形态均清晰可见,但部分红色荧光信号显示无明显管腔或管腔不规则。而 GFP 表达结果则显示出肿瘤组织中部分肿瘤细胞和部分围成血管的内皮细胞有绿色荧光,即表达绿色荧光蛋白,进一步由 GFP 但克隆抗体免疫组织化学染色结果证实,肿瘤组织在免疫荧光实验中所观察到的绿色荧光信号确实特异性的,是由绿色荧光蛋白发出的。这一结果说明,荧光裸鼠体内正常成体细胞在特定条件下定向分化为内皮祖细胞或内皮细胞参与肿瘤组织中的血管新生。而有部分血管管腔中内皮细胞不表达 GFP,则说明部分组成血管的内皮细胞来自肿瘤细胞 A549 细胞,这些细胞内不表达 GFP,这一结果有力的支持了肿瘤干细胞有可能向血管内皮细胞方向分化的理论,其机制需要进一步深入研究。

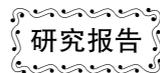
随着肿瘤研究的不断深入,目前肿瘤生物学的研究中最具有吸引力的是肿瘤干细胞(carcinoma stem cells, CSCs)的理论,该理论认为肿瘤具有自我更新、分化潜能和侵袭能力等方面的诱导性和可逆性。成体细胞的可塑性是生物体内普遍存在的现象,现已发现多种成体干细胞在特定条件下可定向分化为内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)或内皮细胞(EC)参与血管新生。Shen 等^[13]的研究提示在某些条件的诱导下,肿瘤干细胞有可能向血管内皮细胞方向分化,其机制可能是通过改变局部微环境(如上皮间质转化),以有利于后续血管新生^[14]。Yao 等^[15]认为肿瘤微环境决定了肿瘤干细胞的可塑性,从而使肿瘤细胞模仿血管管道的而形成血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)。肿瘤的维持、生长和转移依赖于血管生成,血管生成为靶点的治疗方法是近年来生物医学研究中重要的领域^[16-17]。据报道,目前血管内皮生长因子(VEGF)是已知最强的促血管生成因子^[18],多种肿瘤研究已经证实阻断 VEGF 信号通路能够降低肿瘤组织中的微血管密度,从而达到抑制肿瘤的生长目的^[19]。临床上抗 VEGF 治疗方法主要是通过联合化疗或者放疗发挥抗癌作用^[20]。由于不同类型的肿瘤抗 VEGF 疗效不一,抗 VEGF 治疗法经常发生耐药^[21-23],这或许与 Dll4-Notch 信号通路有关^[24]。联合采用 DBZ 或者 DAPT(γ -分泌酶抑制剂)阻断 Notch 信号,或许能够提高 VEGF 抑制剂的疗效,并与之产生抗肿瘤协同效应。本文作者拟在此篇论文研究结论,即肿瘤干细胞有可能向功能性血管内皮细胞方向分化的理论基础上,进一步在机制上阐明 VEGF 抑制剂和 γ -分泌酶抑制剂等如何阻断血管生成因子通路,从而阻止肿瘤血管的生成。

参考文献:

- [1] Goh PP, Sze DM, Roufogalis BD. Molecular and cellular regulators of cancer angiogenesis[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2007, 7: 743 - 758.
- [2] Kos M, Dabrowski A. Tumours angiogenesis - the function of VEGF and BFGF in colorectal cancer[J]. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowsk*, 2002, 57: 556 - 561.
- [3] Rodrigues FJ, Orr BA, Ligon KL, *et al.* Neoplastic cells are a rare component in human glioblastoma microvasculature [J]. *Oncotarget*, 2012, 3: 98 - 106.
- [4] Butler JM, Kobayashi H, Rafii S. Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10: 138 - 146.

- [5] Nagy JA, Chang SH, Shih SC, *et al.* Heterogeneity of the tumor vasculature[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2010, 36: 321 – 331.
- [6] Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic disease [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10: 417 – 427.
- [7] Ferrara N, Gerber H P, Couter J. The biology of VEGF and its receptors[J]. *Nat Med*, 2003, 9 (6) : 669 – 676.
- [8] Nesbit M. Abrogation of tumor vasculature using gene therapy [J]. *Cancer metastasis Rev*, 2000, 19 (1/2) : 45 – 49.
- [9] Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets[J]. *Nat MED*, 2011, 17(11) : 1359 – 1730.
- [10] Liu J, Huang J, Yao WY, *et al.* the origins of vascularization in tumors[J]. *Front Biosci*, 2012, 17 (1) : 2559 – 2565.
- [11] Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, *et al.* Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro; vasculogenic mimicry [J]. *Am J Pathol*, 1999, 155 (3) : 739 – 752.
- [12] Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, *et al.* Tumor vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells[J]. *Nature*, 2010, 468(7325) : 824 – 828.
- [13] Shen R, Ye Y, Chen L, *et al.* Precancerous stem cells can serve as tumor vasculogenic progenitor [J]. *Plos One*, 2008, 3 (2) : 641 – 652.
- [14] Krohn A, Song YH, Muehlberg F, *et al.* CXCR4 receptor positive spheroid forming cell are responsible for tumor invasion in vitro[J]. *Cancer Lett*, 2009, 280(1) : 65 – 71.
- [15] Yao XH, Ping YF. Contribution of cancer stem cells to tumor vasculo-genic mimicry [J]. *Protein cell*, 2011, 2 (4) : 266 – 272.
- [16] Rosca EV, Koskimoki JE, Rivera CG, *et al.* Anti-angiogenic peptides for cancer therapeutics [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, 12(8) : 1101 – 1116.
- [17] Goel S, Duda DG, Xu L, *et al.* Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases [J]. *Cancer Lett*, 2011, 91 (3) : 1071 – 1121.
- [18] Shojaei F. Anti-angiogenic in cancer : Current challenges and future perspectives [J]. *Cancer Lett*, 2012, 320 (2) : 130 – 137.
- [19] Sitohy B, Nagy JA, Dvorak HF. Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer : Reassessing the target[J]. *Cancer Res*, 2012, 72 (8) : 1909 – 1914.
- [20] Goel S, Wong AH, Jain RK. Vascular normalization as a therapeutic strategy for malignant and nonmalignant disease[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2 (3) : 1 – 23.
- [21] Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8(8) : 592 – 603.
- [22] Kerbel RS. Molecular origins of cancer ; tumor angiogenic[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358, (19) : 2039 – 2049.
- [23] Kieran MW, Kalluri R, Cho YJ. The VEGF pathway in cancer and disease : responses, resistance, and path forward[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2 (12) : 1 – 17.
- [24] Liu SK, Bham SA, Fokas E, *et al.* Delta-like ligand 4-notch blockade and tumor radiation response[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2011, 103 (23) : 1778 – 1798.

[修回日期] 2016 – 01 – 13



Nrf2 抗氧化通路在 CCl₄ 所致大鼠急性肝损伤中的保护作用

周清平¹, 蒋孝华¹, 符小波²

(1. 南华大学附一医院感染科, 湖南 衡阳 421001; 2. 湖南耒阳市人民医院神经内科, 湖南 耒阳 421800)

【摘要】 目的 研究 Nrf2 氧化损伤通路在 CCl₄ 所致大鼠急性肝损伤中的保护作用。方法 将 20 只雄性 Wistar 大鼠随机分为溶剂对照组和 CCl₄ 组, 每组 10 只, 另选 10 只雄性 Wistar 大鼠, 通过载体进行转基因大鼠雄原核显微注射, 获得了目的基因 Nrf2-tk 整合与特异表达的转基因大鼠, 作为 CCl₄ + Nrf2 整合组。溶剂对照组静脉给予 1% 聚山梨酯-80, 共 4 d, CCl₄ 组和 Nrf2-tk 整合组静脉给予 1% 聚山梨酯-80, 共 4 d, 第 4 天给予 1% 聚山梨酯-80 30 min 后, 静脉给予 7.5 mg/kg CCl₄, 24 h 后处死大鼠。测定血清中 AST、ALT 和 LDH 的水平, 分别测定肝脏组织中 MDA、GSH、GSSG 的含量, 并计算 GSH/GSSG 比值。留取肝脏组织, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光学显微镜下观察肝脏组织的病理变化。**结果** 和溶剂对照组相比, CCl₄ 组大鼠的血清 AST、ALT 和 LDH 的水平明显升高 ($P < 0.05$), Nrf2-tk 转基因组大鼠的 AST、ALT 和 LDH 的水平亦有轻度升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。肝脏的 MDA 含量以及 GSH/GSSG 比值显示 Nrf2-tk 整合组可以有效降低 CCl₄ 造成的脂质过氧化损伤和谷胱甘肽的消耗, 肝脏病理观察结果显示和 CCl₄ 组相比, Nrf2-tk 整合组明显减轻了 CCl₄ 造成的损伤。**结论** Nrf2 抗氧化损伤通路在 CCl₄ 所致大鼠急性肝损伤中的起着重要的保护作用。

【关键词】 Nrf2; 转基因大鼠; 四氯化碳; 急性肝损伤

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0052-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 03. 011

Effect of Nrf2 signal pathway on acute hepatotoxicity induced by CCl₄ in rat

ZHOU Qing-ping¹, JIANG Xiao-hua¹, FU Xiao-bo²

(1. Department of infectious diseases of the First Affiliated Hospital of University of South China, Hunan Hengyang 421001, China; 2. Department of Internal Medicine of the People's Hospital, Hunan Leiyang 421800, China)

【Abstract】 Objective To determine the effect of Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) on acute hepatotoxicity induced by CCl₄ in male rat. **Methods** 20 male Wistar rats were randomly divided into control group and CCl₄ group, 10 rats in each group, another 10 male Wistar rats were transgenic rats microinjection through the carrier, obtained the Nrf2-tk gene integration and specific transgenic rats, as the CCl₄ + Nrf2 integration group. The groups was given 1% polysorbate 80 for 4 days, Then the CCl₄ and CCl₄ + Nrf2 integration group were intraperitoneally injected with a single dose of CCl₄ 7.5 mg · kg⁻¹ and were killed 24 h after CCl₄ injection. The serum chemical parameters including aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) were measured. Also malonaldehyde (MDA), glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG) levels in the liver as well as glutathione (GSH) /oxidized glutathione (GSSG) ratios were detected. Histopathologic changes in the liver were examined. **Results** F1 generation TK transgenic rats in liver and testis and other tissues and organs were not detected the transcription of Nrf2-tk, indicating that Nrf2-tk expression in tissues is specific good. Nrf2 significantly reduced serum AST, ALT and LDH levels in a dose-dependent manner. The results of MDA levels and GSH/GSSG ratios in liver and kidney showed that Nrf2

reduced CCl₄-induced hepatic lipid peroxidation, and ameliorated glutathione depletion. The histopathologic results showed that Nrf2 restrained liver and kidney damage induced by CCl₄. **Conclusion** Nrf2 can effectively protect male rat from acute hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by CCl₄.

【Key words】 Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2); Transgenic rat models; CCl₄; Acute hepatotoxicity induced

核转录因子 Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 是机体对抗氧化应激的主要调控因子^[1]。其通过与抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 结合调控下游抗氧化酶和 II 相解毒酶基因的转录活性, 增强细胞清除活性氧自由基的能力, 从而降低氧化应激对细胞、组织及器官造成损伤^[2]。目前, Nrf2 抗氧化损伤通路在急性肝损伤中的保护作用的研究还较少, 我们拟通过以四氯化碳 (CCl₄) 损伤大鼠为研究对象, 通过血液的生化检查, 肝脏组织的病理形态学分析来研究 Nrf2 抗氧化损伤通路在急性肝损伤中的保护作用。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

山羊抗人 Nrf2 多克隆抗体, 大鼠抗人 Nrf2 单克隆抗体, 大鼠抗人 β actin 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司, Lipofectamine 2000 脂质体, MTT 粉末, 免疫组化 SP 试剂盒, DAB 显色试剂盒均购自北京中杉生物技术公司。pLLtk 真核表达载体、RPMI Medium 1640 培养基, pSV2neo 筛选质粒购于美国 Invitrogen 公司, PTC200 PCR 扩增仪, Westernblot 转印仪, 蛋白电泳仪购自美国 BioRad 公司。另备酶标仪, 漩涡振荡器, 24 孔板, OMEM 培养液, DMSO, 移液枪等。

1.2 大鼠 Palb/Ealb 驱动 Nrf2 载体表达

本研究选择大鼠血清白蛋白基因启动子 (ALB gene promoter, Palb) 与位于 Palb 上游的增强子 (ALB gene enhancer, Ealb) 作为调控元件驱动目的基因 Nrf2 的表达。引进了通过 PCR 获得的含 Kozak 序列的 Nrf2 与不含该序列的 Nrf2 构建载体 pLLtk 与 pLLtk cut, 转染细胞 HepG2 与 HC11, 进一步提高了表达。

1.3 划痕实验检测转染细胞迁移

用 marker 笔在 6 孔板背后均匀划横线, 大约每隔 0.5 ~ 1 cm 一道, 横穿过孔。每孔至少穿过 2 条线。在空中加入约 5×10^5 个细胞, 24 h 后用移液枪头垂直于背后的横线划痕, 用 PBS 洗细胞洗 3 次,

去除划下的细胞, 加入有 Nrf2 基因的无血清培养基, 放入 37℃ 5% CO 培养箱, 培养, 拍照。使用透射电镜观察、照相。

1.4 Nrf2-tk 转基因大鼠的产生

选取 7 ~ 8 周的 Wistar 大鼠, 雄性, 共 20 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK (京) 2012 - 0001】。选择重组载体 pLLtk, 经过两步纯化, 并通过雄原核显微注射技术作用于大鼠, 获得了目的基因 Nrf2-tk 整合与特异表达的转基因大鼠, PCR, Western-blot, 定量 PCR 检测转基因的整合。用 Nrf2-tk 抗兔多克隆抗体对转基因大鼠肝脏切片进行免疫组织化学分析^[3]。

1.5 动物分组及给药方案

另选将 20 只 7 ~ 8 周的 Wistar 大鼠, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK (京) 2012 - 0019】。雄性, 将其随机分为溶剂对照组和 CCl₄ 组, 每组 10 只。将造模成功的 Nrf2-tk 转基因大鼠, 作为 Nrf2-tk 整合组。溶剂对照组静脉给予 1% 聚山梨酯 - 80, 共 4 d, CCl₄ 组和 Nrf2-tk 整合组静脉给予 1% 聚山梨酯 - 80, 4 d, 第 4 天给予 1% 聚山梨酯 - 80 30 min 后, 静脉给予 7.5 mg/kg CCl₄。

1.6 检测指标

经静脉给予 CCl₄ 24 h 后, 将 3 组大鼠内眦静脉取血, 制备血清, 测定血清化学指标 AST、ALT 和 LDH 的水平, 血清化学指标通过 HITACHI 7020 型自动生化分析仪测定。内眦静脉取血后处死大鼠, 取出肝脏称重, 分别切取 50 mg 组织制作组织匀浆, 使用 TBA 法测定肝脏组织中 MDA 含量; 另取 50 mg 组织制作组织匀浆, 使用改良 Hisson 法测定肝脏组织中 GSH、GSSG, 计算 GSH/GSSG 比值。留取肝脏左叶, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光学显微镜下观察肝脏组织的病理变化。

1.7 统计分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 18.0 统计学软件采用单因素方差分析对所得实验数据进行分析, $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

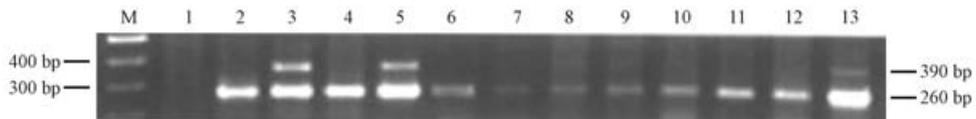
2.1 20 只大鼠通过雄原核显微注射技术成功建立

7 只原代转基因大鼠模型,整合率为 35% (7/20)。定量 PCR 对转基因的拷贝数进行精确定量,可知 7 只建模成功的转基因大鼠其后代均为多拷贝重复,且拷贝数在各家系不相同,但同一家系转基因的拷贝数是相同的。

2.2 Western-blotting 分析

Nrf2-tk 转基因大鼠的整合与多拷贝重复基因的连接方式,结果表明:7 只转基因大鼠外源基因整

合方式以多拷贝头尾串联连接为主。Real-time PCR 分析转基因大鼠 Nrf2-tk 的转录,除肝脏与睾丸外其他组织与器官均没检测到 Nrf2-tk 的转录,说明 Nrf2-tk 的表达具有良好的组织特异性。用 Nrf2-tk 抗兔多克隆抗体对 tk5F1tk455 大鼠肝脏切片进行棉衣组织化学分析,发现 Nrf2-tk 在部分肝实质细胞内表达,表达细胞占总肝细胞的 55% ~ 75% (图 1)。



注:M:100bp ladder,1:空白对照,2:Hep-G2 细胞(未转染),3:Hep-G2 转染 pCMV-tk,4:Hep-G2 转染 pLL-tk,5. Hep-G2 转染 pLL-tk cut, 6. HC-11 细胞(未转染),7. HC-11 转染 pCMV-tk,8. HC-11 转染 pLL-tk,9. HC-11 转染 pLL-tk cut。

图 1 Real-time PCR 分析 Nrf2-tk mRNA 的表达

Note: M:100bp ladder, 1: blank control, 2:Hep-G2 cells (without transfection) and 3:Hep-G2 transfection of pCMV-tk. 4:Hep-G2 transfection of pLL-tk, 5. Hep-G2 transfection of pLL-tk cut, 6. HC-11 cells (without transfection) 7. HC-11 transfection of pCMV-tk. 8. HC-11 transfection of pLL-tk, 9. HC-11 transfection of pLL-tk.

Fig.1 Analysis of the expression of mRNA Nrf2-tk by Real-time PCR

2.3 Real-time PCR 结果显示

阳性对照质粒 pCMV-tk, PLLtk 与 PLLtk cut 转染 Hep-G2 细胞有 390 bp 的 Nrf2-tk DNA 特异性扩增条带,而阴性对照未转染 Hep-G2 细胞和空白对照没有特异性扩增条带。HC-11 细胞经转染后,仅阳性质粒 pCMV-tk 转染细胞出现 390 bp 的 Nrf2-tk DNA 特异性扩增条带。495 bp 的对照组 GAPDH 条带在所有细胞样本均出现,空白对照无。表明质粒

pLLtk 与 pLLtk cut 具有 Nrf2-tk mRNA 组织特异性转录活性。

2.4 3 组大鼠血清生化指标结果

CCl₄组大鼠经静脉给予 CCl₄ 7.5 mg/kg 后,血清中 AST,ALT,LDH 水平升高,与溶剂对照组比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与 CCl₄组比较,Nrf2-tk 转基因组 AST,ALT,LDH 水平明显下降($P < 0.01$)(表 1)。

表 1 3 组大鼠血清生化指标结果($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Biochemical indexes of serum in 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AST/IU/L	ALT/IU/L	LDH/IU/L
溶剂对照组	10	102 ± 19	38 ± 5.4	251 ± 53
CCl ₄ 组	10	1163 ± 393 a	1748 ± 402 a	3273 ± 1082 a
CCl ₄ + Nrf2 整合组	7	204 ± 104 b	158 ± 104 b	1293 ± 301 b

注:与溶剂对照组比较,a; $P < 0.01$;与 CCl₄ 组比较,b; $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the solvent control group, a; $P < 0.01$; compared with the CCl₄ group, b; $P < 0.01$.

2.5 3 组大鼠肝脏 MDA 和 GSH/GSSG 的比值

与溶剂对照组比较,CCl₄ 组肝脏组织中的 MDA 水平明显升高,GSH/GSSG 比值明显下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与 CCl₄ 组比较,CCl₄ + Nrf2 转染组肝脏组织 MDA 水平明显下降,肝脏组织 GSH/GSSG 比值明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)(表 2)。

表 2 3 组大鼠肝脏 MDA 和 GSH/GSSG 的比值

Tab.2 The ratio of MDA and GSH/GSSG in liver of 3 groups

组别	n	MDA/ μmol/g	GSH/GSSH
溶剂对照组	10	0.26 ± 0.12	5.74 ± 0.62
CCl ₄ 组	10	0.72 ± 0.27 a	3.83 ± 0.83
CCl ₄ + Nrf2 转染组	7	0.47 ± 0.12 c	5.47 ± 0.74 d

注:与溶剂对照组比较,a; $P < 0.05$,b; $P < 0.01$,与 CCl₄ 组比较,c; $P < 0.05$,d; $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the solvent control group, a; $P < 0.01$; compared with the CCl₄ group, b; $P < 0.01$.

2.6 3 组大鼠肝脏大体检查

肉眼观察可见溶剂对照组大鼠肝脏湿润有光泽,呈红褐色。CCl₄ 组大鼠肝脏失去光泽,颜色灰暗。CCl₄ + Nrf2 转染组大鼠肝脏病变明显减轻,颜色趋于良好。

2.7 组织学观察

溶剂对照组大鼠,肝小叶轮廓清晰,肝组织以中央静脉为中心呈条索状向四周放射状排列,肝细

胞排列整齐,肝细胞未见变性、坏死及脂肪变性(图 1A)。CCl₄ 组可观察到肝组织损伤,肝细胞浊肿、气球样变性,以肝小叶中央静脉为中心的坏死,肝小叶内可见灶性坏死区,可见多量的凋亡细胞(图 1B, D, 图 2A-C)。与 CCl₄ 组比较,CCl₄ + Nrf2 整合组肝脏细胞结构破坏程度较轻,变性坏死细胞较少,整体情况优于 CCl₄ 组(图 1C)。

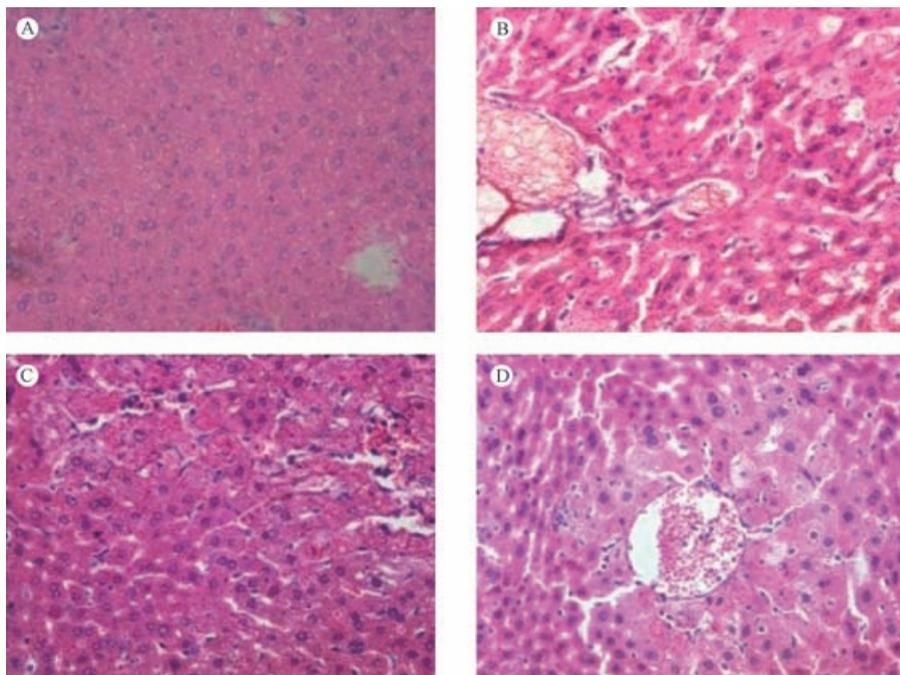


图 2 3 组大鼠肝组织病理切片(HE × 40)

Fig. 2 Pathological sections of rat liver tissue in 3 groups(HE × 40)

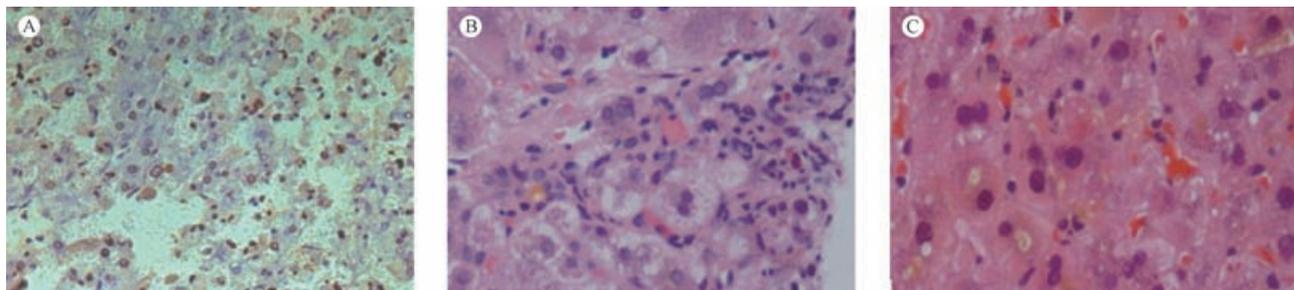


图 3 CCl₄ 组大鼠肝组织病理切片:点状或病灶性坏死,炎性细胞浸润,有凋亡细胞存在,肝细胞增生。(HE × 40)

Fig. 3 Rat liver tissue pathology in CCl₄ group: Point or focal necrosis, inflammatory cell infiltration, cell apoptosis and proliferation liver cell proliferation. (HE × 40)

3 讨论

肝脏疾病作为人类最常见的疾病之一,对人类健康和社会造成严峻威胁。肝脏损伤是各种肝脏疾病的病变结果,其防治是现代医学的重大课题^[4]。因此通过建立肝损伤动物模型,研究肝病的

发生发展的机制,探索肝损伤的治疗方向,具有重要的临床意义^[5-6]。近年来,转基因动物技术在人类肝脏疾病模型建立中发挥了重要的作用。通过转基因技术,可以选择性的杀死动物体的某些特定类型的细胞,从而模仿某种疾病^[7-8]。基于以上研究,本研究拟通过载体将基因 Nrf2 整合入大鼠模

型,制作出特异表达的转基因大鼠,并进一步通过注射 CCl₄ 诱导 Nrf2-tk 转基因大鼠的肝脏损伤,进而明确 Nrf2 氧化损伤通路在 CCl₄ 所致大鼠急性肝损伤中的保护作用。

Nrf2/ARE 是近年新发现的机体抵抗内外氧化和化学等刺激的防御性转导通路^[9-10]。氧化应激作用下, Nrf2 可启动 ARE 调控的 II 相解毒酶及抗氧化酶的表达,如谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、血红素氧合酶-1(HO-1)等,从而增加细胞对氧化应激的抗性,为肝脏疾病的发生发展起到积极的防护作用^[9-10]。研究发现,在 Nrf2 敲除的大鼠中,正常情况和诱导情况下的 II 相酶水平如 GST、NQO1、γ-GCS 显著减少。

在本研究中,我们通过雄原核显微注射技术成功建立了原代 Nrf2 转基因大鼠模型^[11-12],随后我们采用 RT-PCR 分析转基因大鼠 Nrf2-tk 的转录,除肝脏与睾丸外其他组织与器官均没检测到 Nrf2-tk 的转录,说明 Nrf2-tk 的表达具有良好的组织特异性。用 Nrf2-tk 抗兔多克隆抗体对 tk5F1tk455 大鼠肝脏切片进行棉衣组织化学分析,发现 Nrf2-tk 在部分肝实质细胞内表达,表达细胞占总肝细胞的 55%~75%,证明 Nrf2 转基因大鼠模型建立良好。

CCl₄ 是经典的肝毒物,其病变主要引起中央静脉周围肝细胞坏死,纤维增生为窦隙为主^[13-14]。本研究中,CCl₄ 组大鼠给予 CCl₄ 24 h 后,其体重下降,肝体比、肾体比增加,血清中 AST,ALT 和 LDH 水平显著上升,肝脏组织病理学改变明显,表明 CCl₄ 对大鼠造成了急性的肝脏损伤。与 CCl₄ 组比较,CCl₄ + Nrf2 整合组 AST,ALT 和 LDH 水平较低,差异有统计学意义。在 CCl₄ + Nrf2 整合组大鼠肝脏的病理学观察中,细胞结构明显优于 CCl₄ 组,细胞坏死减少,组织结构清晰。表明 Nrf2 转基因大鼠可以有效地减弱 CCl₄ 对肝脏造成的损伤。

MDA 是组织中不饱和脂肪酸氧化的最终产物,GSH/GSSG 比值反映了组织抵御氧化性损伤的水平,两者是常用的抗氧化指标^[15-16]。在本研究中,给予 CCl₄ 24 h 后,大鼠肝脏组织中 MDA 水平明显升高,GSH/GSSG 比值明显降低都说明了 CCl₄ 对大鼠的肝脏产生了氧化性损伤。而 CCl₄ + Nrf2 整合组大鼠肝脏组织中 MDA 水平与 CCl₄ 组比较,明显降低;GSH/GSSG 比值与 CCl₄ 组比较,明显升高。提示 Nrf2 可诱导体内 GSH 的合成,进而抑制 CCl₄ 对肝脏造成的损伤^[17]。

经 CCl₄ 处理后,对 3 组大鼠肝脏组织进行病理形态学分析组织学观察,可见 CCl₄ 组可观察到肝组织损伤,肝细胞浊肿、气球样变性,以肝小叶中央静脉为中心的坏死,肝小叶内可见灶性坏死区,可见多量的凋亡细胞。与 CCl₄ 组比较,CCl₄ + Nrf2 整合组肝脏细胞结构破坏程度较轻,变性坏死细胞较少,整体情况优于 CCl₄ 组。以上结果表明 Nrf2-tk 转基因大鼠可有效减轻生理功能与形态学改变的肝脏损伤。

综上所述,根据本研究得到的结果,可以推测 Nrf2/ARE 抗氧化通路可通过调动机体的抗氧化体系来抑制 CCl₄ 对大鼠的肝脏产生的损伤,但对于 Nrf2/ARE 通路是否还存在其他的途径来发挥对肝脏的保护作用仍需要进一步探索。本研究成果为探讨肝病的发病机制提供了科学数据,为肝脏疾病诊断和治疗的研究奠定了基础^[18-19]。

参考文献:

- [1] Jarup L. Cadmium overload and toxicity [J]. *Nephrol Dial Transplant*,2002,17(2):35-39.
- [2] Siu ER, Mruk DD, Porto CS, et al. Cadmium-induced testicular injury [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2009,238(3):240-249.
- [3] Uchida H, Kurata Y, Hiratsuka H, et al. The effects of a vitamin D-deficient diet on chronic cadmium exposure in rats [J]. *Toxicol Pathol*,2010,38(5):730-737.
- [4] 赵世峰,薛毅琰,李新建. 醋酐酚诱导急性肝损害模型的建立 [J]. *中华实验外科杂志*,2000,17(2):192-197.
- [5] 赖力英,杨旭,许向青,等. 四氯化碳诱导大鼠急性肝功能衰竭动物模型的建立 [J]. *中国现代医学杂志*,2005,15(11):1655-1660.
- [6] 黄正明,杨新波,曹文斌,等. 化学性以及免疫性肝损伤模型的方法学研究 [J]. *解放军药理学学报*,2005,21(1):42.
- [7] 禄保平,杨晓娜,许家燕. 应用四环素灌胃建立急性肝损伤模型 [J]. *南京医科大学学报*,2008,26(8):671-677.
- [8] 禄保平,杨晓娜,许家艳. 异烟肼灌胃建立大鼠急性肝损伤模型的研究 [J]. *中国医药生物技术*,2007,2(4):286-291.
- [9] SRIRAJ P, BOONMARS T, BOONJARASPINO S, et al. Effect of curcumin on pathogenesis of hamster-opisthorchiasis through apoptosis-related gene expression [J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*,2009,40(6):1208-1215.
- [10] KHOR TO, YU S, BARVE A, et al. Dietary feeding of dibenzoyl-methane inhibits prostate cancer in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model [J]. *Cancer Res*,2009,69(17):7096-7102.
- [11] Li CH, Piao DM, Xu W X, et al. Morphological and serum hyaluronic acid, laminin and type IV collagen in dimethylnitrosamine,2005,11(48):7620-7625.
- [12] THIMMULAPPA RK, RANGASAMY T, ALAM J, et al.

- Dibenzoyl-methane activates Nrf2-dependent detoxification pathway and inhibits benzo(a)pyrene induced DNA adducts in lungs[J]. *Med Chem*,2008,4(5): 473-481.
- [13] CHEUNG KL, KHOR TO, HUANG MT, *et al.* Differential in vivo mechanism of chemoprevention of tumor formation in azoxymethane/dextran sodium sulfate rat by PEITC and DBM [J]. *Carcinogenesis*,2010,31(5): 880-885.
- [14] Horn T L, Bhattacharjee A, Schook L B. Altered Hepatic mRNA expression of apoptotic genes during Dimethylnitrosamine Exposure [J]. *Toxicological Sciences*,2010,57(2):240-245.
- [15] Dojka M, Nimmo M. Marginal zinc deficiency increased the susceptibility to acute lipopolysaccharide injury in rats [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*,2009, 231:553-559.
- [16] Song Z Y, Deaciuc I, Song M, *et al.* Silymarin protects against acute ethanol d hepatotoxicity in rat[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2010,30:407-413.
- [17] Horn T L, Bhattacharjee A, Schook L B. Altered Hepatic mRNA expression of apoptotic genes during Dimethylnitrosamine Exposure [J]. *Toxicological Sciences*,2010,57(2):240-245.
- [18] 庞战军,周玫,陈瑗. 自由基医学研究方法[M]. 北京:人民卫生出版社,2000: 62-64.
- [19] 程明亮,杨长青. 肝纤维化的基础研究及临床[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:366-368.

[修回日期]2016-01-12

中国实验动物学会 2016 年部分活动计划

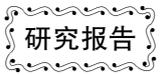
活动名称	时间	地点
第三届中英实验动物福利伦理国际论坛	2016. 3. 15 - 2016. 3. 17	安徽巢湖
实验动物生物安全培训	2016. 4	湖北武汉
第 63 届日本实验动物学会年会	2016. 5. 17 - 2016. 5. 21	日本
第 13 届欧洲实验动物学会联合会	2016. 6. 12 - 2016. 6. 18	比利时
实验动物专业技术人员等级认可培训	2016. 7 - 2016. 9	网络或待定
第十二届中国实验动物学会年会	2016. 9	广西
实验动物福利伦理培训	2016. 9	广西
实验动物标准宣贯培训	2016. 10	北京
第七届亚洲实验动物学会联合会	2016. 11. 5 - 2016. 11. 9	新加坡

以上各项活动具体安排以正式通知为准,详情请关注学会网站,即日起接收报名,欢迎来电咨询。

中国实验动物学会 秘书处

学会网址:<http://www.calas.org.cn/>

咨询电话:01067781534 67763674



立普妥对高糖诱导的 HUVEC 凋亡及 PI3K/AKT/eNOS 信号通路的影响

刘志辉

(江西省景德镇市第一人民医院心内科,江西 景德镇 333000)

【摘要】 目的 探讨立普妥对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的凋亡及对磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)/内皮型一氧化氮(eNOS)信号通路的影响。**方法** 实验分为正常组,模型组(33.3 mol/L 葡萄糖),立普妥组(33.3 mol/L 葡萄糖+0.1,1,10 μ mol/L);MTT 法检测各组 HUVEC 活力;倒置显微镜拍照检测各组 HUVEC 形态;Annexin V-FITC/PI 流式双染法检测各组 HUVEC 凋亡;Gries 法检测各组 HUVEC 上清 NO 含量;Western blot 分析 PI3K/AKT 激活状况及 eNOS 的表达情况。**结果** 与正常组比较,高糖组中 HUVEC 皱缩,变圆变亮,细胞活力降低,细胞早期凋亡和晚期凋亡率显著提高,NO 含量及 eNOS、PI3K 表达量及 AKT 磷酸化程度降低,差异均具有显著性($P < 0.05$);与模型组比较,1,10 μ mol/L 立普妥组中 HUVEC 形态恢复,细胞活力上升,PI3K 表达量提高,差异均具有显著性($P < 0.05$);0.1,1,10 μ mol/L 立普妥组 HUVEC 凋亡程度下降,NO 含量、eNOS 表达量提高,AKT 磷酸化水平上升,差异均具有显著性($P < 0.05$)。**结论** 立普妥可抵抗高糖诱导的 HUVEC 凋亡,是通过激活 PI3K/AKT/eNOS 信号通路实现的。

【关键词】 立普妥;人脐静脉内皮细胞(HUVEC);凋亡;PI3K/AKT/eNOS 信号通路

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0058-06

doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2016.03.012

Effect of lipitor on high glucose-induced HUVEC apoptosis and PI3K/AKT/eNOS signal pathway

LIU Zhi-hui

(Department Cardiovascular of the First People's Hospital, Jingdezhen, Jiangxi Jingdezhen 333000, China)

【Abstract】 Objectives To explore effect of lipitor on apoptosis and phosphatidyl inositol-3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/endothelial nitric oxide synthase (eNOS) signal pathway in high glucose-induced human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). **Methods** The cases were randomly divided into normal control group, model control group (33.3 mol/L glucose), lipitor low, medium, high-dose group (0.1,1,10 μ mol/L lipitor). The viability of HUVEC was detected by MTT assay. The morphology of HUVEC was photographed by inverted microscope. The apoptosis of HUVEC was examined by Annexin V-FITC/PI flow dual-staining method. The concentration of NO in HUVEC supernatant was examined by Gries method. The activation of PI3K/AKT and expression of eNOS was assayed by western blot. **Results** HUVEC was shrinkage, rounded and brighten, the viability of HUVEC decreased, early and late apoptosis rate of HUVEC increased significantly, the level of NO, eNOS, PI3K and AKT phosphorylation also reduced in model control group ($P < 0.01$). 1, 10 μ mol/L lipitor improved HUVEC morphology, increased HUVEC' viability and expression of PI3K ($P < 0.05$). 0.1,1,10 μ mol/L lipitor suppressed HUVEC' apoptosis, increased the concentration of NO, expression of eNOS and phosphorylation of AKT ($P < 0.05$). **Conclusion** These results suggested lipitor exert anti-apoptosis in high glucose-induced HUVEC, which might be related to PI3K/AKT/eNOS signal pathway.

【Key words】 Lipitor; HUVEC; Apoptosis; PI3K/AKT/eNOS signal pathway

糖尿病(diabetes mellitus)是一种以慢性高血糖为特征的内分泌疾病,其并发症涉及心、眼、肾,糖尿病足和神经病变,这些都和血管损伤有关^[1]。血管内皮在维持正常的血流速度及血管张力,氧化应激,抑制血管炎症等方面具有重要作用。且糖尿病的预后及并发症的发生和发展与整体血糖水平的升高密切相关^[2]。因此,进一步深入研究高血糖引起的内皮细胞凋亡的机制对防治糖尿病血管病变具有重要的临床意义。

立普妥,又称阿托伐他汀钙片,是 3-羟基-3 甲基戊二酰辅酶 A 还原酶选择性抑制剂,可通过降低肝脏中胆固醇及脂质蛋白合成量来达到调节脂代谢目的,已大量用于临床糖尿病,冠心病的治疗。如立普妥通过调节脂代谢对 2 型糖尿病合并急性脑梗死患者具有治疗作用^[3]。立普妥可通过提高维生素 D 水平及骨密度含量来治疗老年 2 型糖尿病患者^[4]。通过超声能观察到立普妥可以逆转 2 型糖尿病患者动脉粥样硬化斑块^[5]。不同剂量立普妥对老年急性冠状动脉综合征患者有显著治疗作用^[6]。并且立普妥对同型半胱氨酸^[7],氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)^[8],肿瘤坏死因子- α ^[9],高糖^[10]诱导的 HUVEC 凋亡,但具体机制未知,因此本文在此基础探讨立普妥对高糖诱导的 HUVEC 凋亡抑制作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

人脐静脉内皮细胞(HUVEC)购自美国标准生物物品收藏中心,货号:C-1161,培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。立普妥,由辉瑞制药提供,批号:95837021。葡萄糖购自阿拉丁,批号:G116307;兔抗 eNOS, AKT, p-AKT, PI3K, GADPH 单克隆抗体购自杭州 Epitomics 公司;NO 检测试剂盒,Annexin V-FITC 流式细胞检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所,批号分别为:S0021, C1063;胎牛血清,DMEM 培养基,四甲基偶氮唑盐(MTT)购自美国 Gibco 公司。

1.2 分组方法

将 HUVEC 分为 3 组,即正常组:正常 HUVEC,模型组:33.3 mol/L 葡萄糖,立普妥组:33.3 mol/L 葡萄糖 + 0.1, 1, 10 μ mol/L 立普妥。

1.3 细胞活力检测(MTT 法)

将处于生长对数期的 HUVEC 消化,并调整细

胞浓度,接种于 96 孔板,按 1.2 分组方法进行给药,继续培养 24 h,并倒置显微镜下拍照,后每孔加 MTT(5 mg/mL)20 μ L,4 h 后,弃上清,并每孔加入 DMSO 150 μ L,10 min 后,酶标仪 570 nm 处测定 OD 值。

1.4 Annexin V-FITC 流式细胞法检测细胞凋亡

将处于生长对数期的 HUVEC,消化,细胞浓度调整为 8×10^3 个细胞/ml,接种于 6 孔板,按 1.2 分组方法进行给药,继续培养 48 h 后,按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书的方法,用 0.25% 的胰蛋白酶(不含 EDTA)消化,PBS 洗涤,2000 r/min 离心 5 min,收集细胞;加入 Binding Buffer 500 μ L 悬浮细胞,随后加入 Annexin V-FITC 5 μ L 混匀后,加入 PI 5 μ L,混匀,于室温避光反应 5 ~ 15 min,在 1 h 内进行流式细胞仪检测。

1.5 细胞内 NO 含量

将处于生长对数期的 HUVEC,消化,细胞浓度调整为 8×10^3 个细胞/mL,接种于 6 孔板,按 1.2 分组方法进行给药,培养 48 h,后离心收集细胞,反复冻融,使细胞内容物流出,取上清检测 NO 含量,按照试剂盒说明书进行操作。

1.6 Westernblotting

将处于生长对数期的 HUVEC,消化,细胞浓度调整为 8×10^3 个细胞/mL,接种于 6 孔板,按 1.2 分组方法进行给药,培养 48 h。收集细胞样本,加入 RAPI 裂解液裂解细胞,离心,获得蛋白样品。用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。蛋白上样,跑 SDS 凝胶电泳,湿法转膜,脱脂奶粉封闭,加入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 洗涤三次。次日加二抗室温孵育 2 h, PBS 洗涤三次,Biorad 系统曝光。用“Quantity one”软件对蛋白灰度值进行分析。

1.7 统计学分析

数据通过 SPSS17.0 进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验分析组间差异的显著性。 $P < 0.05$ 表示两组间差异有统计学意义。

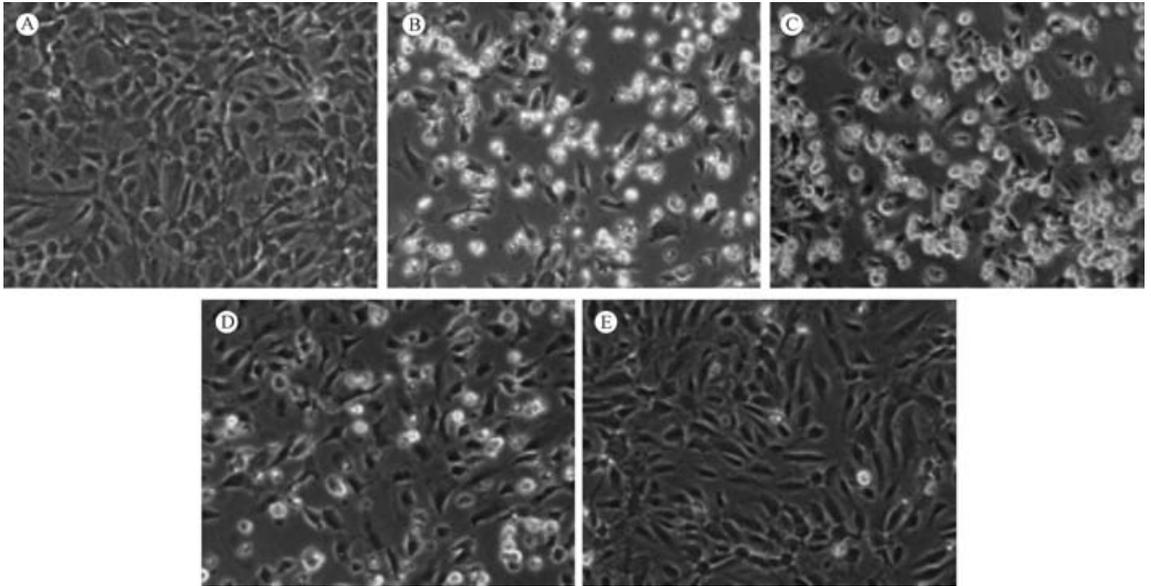
2 结果

2.1 立普妥对高糖诱导的 HUVEC 细胞形态及活力的影响

如图 1 所示,与正常组比较,模型组中 HUVEC 细胞皱缩,细胞变圆变亮;与模型组比较,1, 10 μ mol/L 立普妥组中细胞形态恢复。如图 2 所示,与正常组比较,模型组中 HUVEC 细胞活力下降,具有

显著性差异 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ 立普妥组细胞活力提高, 具有显著性差异 ($P <$

0.05)。说明 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ 立普妥能显著抑制高糖诱导的 HUVEC 细胞形态异常及活力下降。

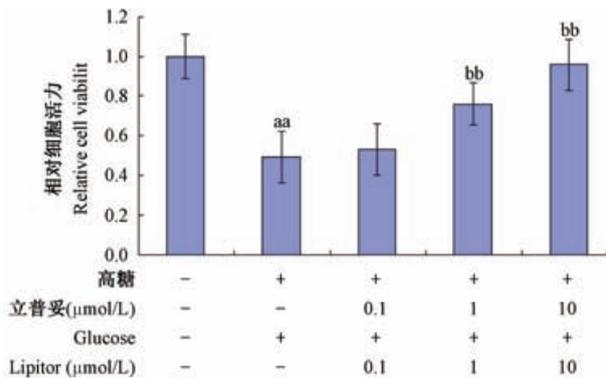


注: A: 正常组; B: 模型组; C: 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 立普妥组; D: 1 $\mu\text{mol/L}$ 立普妥组; E: 10 $\mu\text{mol/L}$ 立普妥组。

图 1 立普妥对高糖诱导的 HUVEC 细胞形态的影响

Note: A: normal group; B: model group; C: 0.1 $\mu\text{mol/L}$ lipitor; D: 1 $\mu\text{mol/L}$ lipitor; E: 10 $\mu\text{mol/L}$ lipitor.

Fig. 1 Effect of lipitor on morphology of HUVEC



注: 与正常组比较, ^{aa} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{bb} $P < 0.01$ 。

图 2 立普妥对高糖诱导的 HUVEC 活力的影响

Note: Compared with normal group, ^{aa} $P < 0.01$;

Compared with model group, ^{bb} $P < 0.01$.

Fig. 2 Effect of lipitor on viability of HUVEC

induced by high glucose

2.2 立普妥对高糖诱导的 HUVEC 凋亡的影响

如表 1 所示, 与正常组比较, 模型组中 HUVEC 早期凋亡和晚期凋亡细胞数目显著提高, 具有显著性差异 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ 立普妥组 HUVEC 早期凋亡和晚期凋亡数目都显著降低, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

表 1 立普妥对高糖诱导的 HUVEC 凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of lipitor on apoptosis of HUVEC

induced by high glucose ($\bar{x} \pm s$)			
组别	剂量 ($\mu\text{mol/L}$)	早期凋亡 (%)	晚期凋亡 (%)
正常组	-	0.52 \pm 0.13	2.57 \pm 0.19
模型组 (33.3 M)	-	8.78 \pm 0.55 ^{aa}	34.41 \pm 3.09 ^{aa}
立普妥组	0.1	7.98 \pm 1.21 ^b	26.22 \pm 2.99 ^b
	1	6.59 \pm 0.59 ^{bb}	15.84 \pm 1.67 ^{bb}
	10	3.22 \pm 0.30 ^{bb}	9.78 \pm 0.55 ^{bb}

注: 与正常组比较, ^{aa} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$ 。
Note: Compared with normal group, ^{aa} $P < 0.01$; Compared with model group, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$.

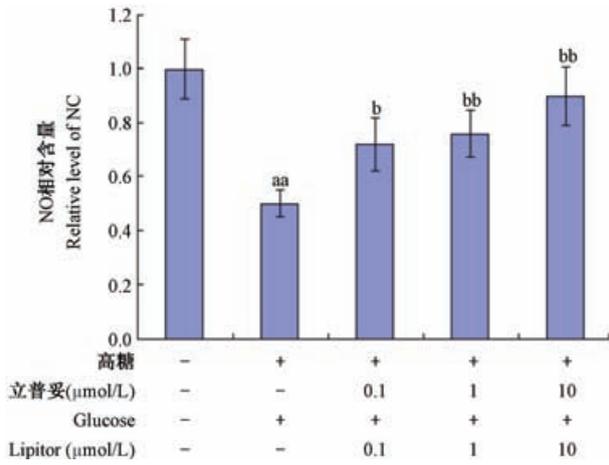
2.3 立普妥对高糖诱导的 HUVEC 中 NO 含量的影响

如图 3 所示, 与正常组比较, 模型组中 NO 含量下降, 具有显著性差异 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ 立普妥组中 NO 含量显著提高, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.5 立普妥对高糖诱导的 HUVEC 中 PI3K/AKT 信号通路的影响

如图 4 所示, 与正常组比较, 模型组中 PI3K 表达及 AKT 磷酸化程度降低, 具有显著性差异 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ 立普妥组 PI3K 表达量显著提高, 具有显著性差异 ($P < 0.01$); 0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ 立普妥组 AKT 磷酸化水平显著提高, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.6 立普妥对高糖诱导的 HUVEC 中 eNOS 表达



注:与正常组比较, ^{aa} $P < 0.01$;
与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$ 。

图3 立普妥对高糖诱导的HUVEC中NO含量的影响

Note: Compared with normal group, ^{aa} $P < 0.01$;
Compared with model group, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$ 。

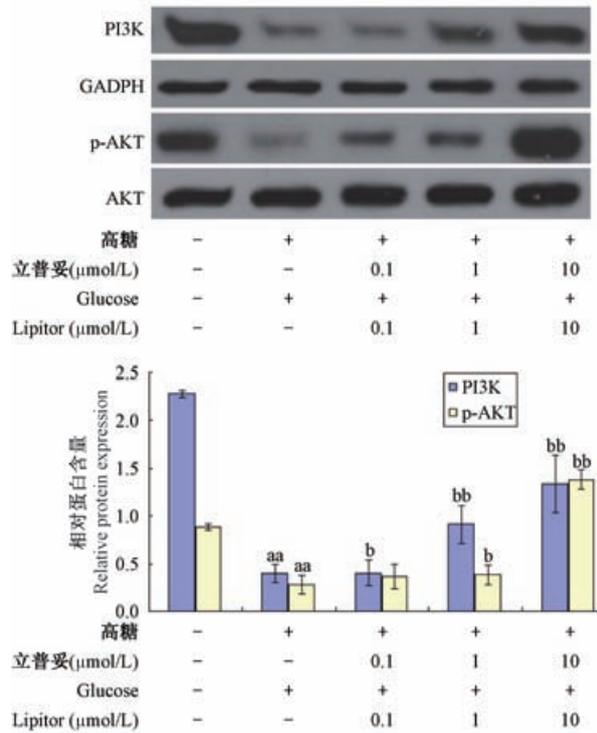
Fig.3 Effect of lipitor on level of NO in HVEC induced by high glucose

量的影响

如图5所示,与正常组比较,模型组中eNOS表达量降低,具有显著性差异($P < 0.01$);与模型组比较,0.1,1,10 μmol/L立普妥组中eNOS表达量显著提高,具有显著性差异($P < 0.01$)。

3 讨论

糖尿病心血管病变始于内皮细胞功能紊乱,内皮细胞功能紊乱以内皮细胞凋亡加速,内皮细胞分泌因子失衡,内皮细胞与白细胞反应增多等主要表现。内皮细胞作为血管的机械屏障受损,成为内皮细胞功能紊乱的主要表现。并且糖尿病患者大血管病变危险性增高与高糖所导致的血管内皮细胞功能受损及内皮细胞凋亡有关。细胞凋亡具有典型的生化和形态学改变,主要表现为细胞膜出现囊泡、膜磷脂不对称消失、细胞膜皱缩、核固缩、DNA有序片段化等。Song^[11],Chen等^[12]实验发现在高糖环境下,HUVEC细胞凋亡显著。本实验发现与上述报告一致,即高浓度葡萄糖作为诱导剂,可使HUVEC细胞皱缩,细胞变圆变亮,细胞凋亡率提高。立普妥对同型半胱氨酸^[7],氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)^[8],肿瘤坏死因子- α ^[9]诱导的HUVEC凋亡。立普妥能立普妥亦能减轻ox-LDL诱导的人微血管内皮细胞损伤^[13]。本实验也发现一定剂量立普妥能显著抑制高糖诱导的HUVEC细胞凋亡,并



注:与正常组比较, ^{aa} $P < 0.01$;
与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$ 。

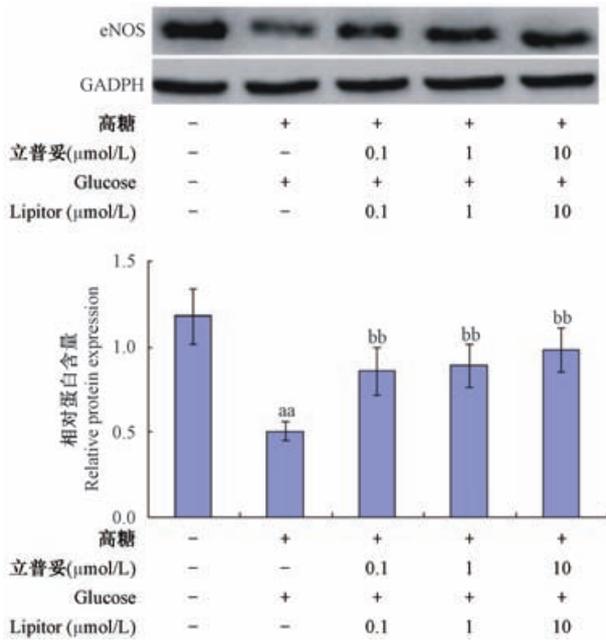
图4 立普妥对高糖诱导的HUVEC中PI3K/AKT信号通路的影响

Note: Compared with normal group, ^{aa} $P < 0.01$;
Compared with model group, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$ 。

Fig.4 Effect of lipitor on PI3K/AKT signal pathway in HVEC induced by high glucose

改善细胞形态,与谢彬等^[10]观点一致。

高糖会使血管内皮依赖性血管舒张功能减退,血流速度下降,且血管舒张功能与血糖浓度负相关,提示高浓度的葡萄糖可诱导血管内皮细胞功能的异常^[2]。NO是源于内皮细胞一种血管保护因子,广泛分布于各种组织,在信息传递,心肺功能,脏器血流调节等方面具有重要作用。正常生理条件下,由内皮型一氧化氮合酶(eNOS)催化产生,在高糖等条件下所产生的大量超氧阴离子可抑制eNOS的生物活性,使NO生成减少,抑制NO生物活性,使NO的血管保护作用减弱,因此改善血管内皮形态及NO及其合酶的含量具有重要意义。替米沙坦联合立普妥能改善糖尿病大鼠内皮形态及功能^[14]。立普妥可通过提高NO含量来保护ox-LDL诱导的HUVEC缝隙连接,从而发挥抗动脉粥样硬化作用^[8]。立普妥联合氨氯地平能抑制ox-LDL诱导的HUVEC内皮细胞损伤,与上调eNOS表达有关^[15]。立普妥能通过提高NO含量来抑制ox-LDL



注:与正常组比较,^{aa} $P < 0.01$;与模型组比较,^{bb} $P < 0.01$ 。

图5 立普妥对高糖诱导的 HUVEC 中 eNOS 表达量的影响

Note: Compared with normal group, ^{aa} $P < 0.01$;

Compared with model group, ^{bb} $P < 0.01$.

Fig. 5 Effect of lipitor on the expression of eNOS in HVEC induced by high glucose

诱导的 HUVEC 损伤^[16]。立普妥能够促进 eNOS 蛋白及 mRNA 表达,减少 ox-LDL 诱导的副作用,并可以选择性地维持 NO 介导的内皮依赖性动脉松弛^[17]。与上述报告一致,本实验也发现高糖诱导使 NO 及 eNOS 含量显著下降,给予一定剂量立普妥能使 NO 含量及 eNOS 表达量显著上升,说明立普妥可通过刺激 NO 表达来改善内皮功能。

磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (AKT) 信号通路参与内皮细胞增殖、分化、凋亡、NO 分泌等多种细胞功能的调节。HUVEC 的凋亡与 PI3K/AKT 信号通路密切相关^[18]。高糖诱导的 HUVEC 凋亡是通过 PI3K/AKT 信号通路实现的^[19-20]。因此激活 PI3K/AKT 信号通路一定程度上可维持 HUVEC 细胞活性。并且已报道立普妥可以通过激活 PI3K/AKT 通路来抑制谷氨酸诱导的大鼠神经元损伤^[21]。立普妥可通过激活 PI3K/AKT 信号通路来 GK 大鼠心肌缺血再灌注损伤^[22]。立普妥可通过激活 PI3K/AKT/GSK3 β 信号通路来减轻缺血复合冷应激诱导的大鼠心肌损伤^[23]。立普妥可以通过激活 PI3K/AKT/mTOR 通路来刺激大鼠皮质神经元突起生长^[24]。与上述报告类似,本实验也发现高糖诱导使 PI3K 表达量及 AKT 磷酸化水平显著降

低,给予一定剂量立普妥能使 PI3K 表达量及 AKT 磷酸化水平显著提高,说明立普妥可通过激活 PI3K/AKT 信号通路来维持内皮细胞存活。

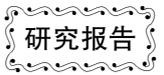
糖尿病造成 PI3K/AKT 信号级联的失活,eNOS 是调控内皮源性一氧化氮产生的关键酶,亦受 PI3K/AKT 信号通路调控。高胰岛素可通过 PI3K/AKT/eNOS 信号通路损伤 HUVEC,产生胰岛素抵抗等代谢综合征及 2 型糖尿病^[25]。胰高血糖素样肽-1 能减轻高糖引起的 HUVEC 凋亡,与激活 PI3K/AKT/eNOS 信号通路有关^[26]。骨钙蛋白可通过激活 PI3K/AKT/eNOS 通路减轻高脂饮食诱导的内皮依赖性舒张损伤^[27]。罗格列酮^[28], α -亚麻酸^[29]可通过 PI3K/AKT/eNOS 信号通路抑制高糖诱导的 HUVEC 凋亡。从而进一步说明,立普妥也是通过 PI3K/AKT/eNOS 信号通路减轻高糖诱导的 HUVEC 凋亡。

综上所述,立普妥可抑制高糖诱导的 HUVEC 细胞凋亡,并提高细胞活力改善细胞形态,与激活 PI3K/AKT/eNOS 信号通路有关。

参考文献:

- [1] Sardar P, Udell JA, Chatterjee S, *et al.* Effect of intensive versus standard blood glucose control in patients with type 2 diabetes mellitus in different regions of the world: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *J Am Heart Assoc*, 2015, 4(5).
- [2] Stubbs B, Vancampfort D, De Hert M, *et al.* The prevalence and predictors of type two diabetes mellitus in people with schizophrenia: a systematic review and comparative meta-analysis [J]. *Acta Psychiatr Scand*, 2015.
- [3] 李运成. 阿托伐他汀对 2 型糖尿病合并急性脑梗死患者血清内脂素的干预作用 [J]. *中国实用医药*, 2014, 9(31): 131-132.
- [4] 郭雅卿, 赵丹宁, 巩建萍, 等. 不同剂量阿托伐他汀对老年 2 型糖尿病患者维生素 D 和骨密度的影响 [J]. *中国全科医学*, 2011, 14(7A): 2169-2171.
- [5] 张建新. 超声观察立普妥逆转 2 型糖尿病患者动脉硬化斑块的疗效评价 [J]. *中国医学工程*, 2012, 20(10): 148-149.
- [6] 刘骁. 不同剂量阿托伐他汀对老年 ACS 患者血浆 hs-CRP 及 NT-proBNP 表达的影响 [J]. *重庆医学*, 2014, 43(12): 1532-1533.
- [7] 李录, 邱荣荣, 贾绍斌, 等. 阿托伐他汀调节 Bcl-2/Bax 蛋白表达抑制同型半胱氨酸诱导内皮细胞凋亡 [J]. *中国现代医学杂志*, 2014, 24(30): 24-27.
- [8] 张秀梅, 于晓玲, 申玉超, 等. 阿托伐他汀对 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞缝隙连接的影响 [J]. *中国药房*, 2013, 24(5): 412-415.
- [9] 牛荣华, 毛德军, 臧运华, 等. 阿托伐他汀下调肿瘤坏死因子-

- α 诱导的人脐静脉内皮细胞 CD40 配体的表达[J]. 现代免疫学, 2014, 34(3): 237 - 241.
- [10] 谢彬, 吕湛, 苟连平, 等. 阿托伐他汀通过调节 Bcl-2/Bax 蛋白表达抑制高糖诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(12): 943 - 947.
- [11] Song H, Wu F, Zhang Y, *et al.* Irisin promotes human umbilical vein endothelial cell proliferation through the ERK signaling pathway and partly suppresses high glucose-induced apoptosis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110273.
- [12] Hou Q, Lei M, Hu K, *et al.* The effects of high glucose levels on reactive oxygen species-induced apoptosis and involved signaling in human vascular endothelial cells [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2015, 15(2): 140 - 146.
- [13] 李敏, 孙玲, 李红玲, 等. 阿托伐他汀减轻氧化型低密度脂蛋白导致的人微血管内皮细胞活化和损伤[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(5): 679 - 683.
- [14] 吴仕平, 陈明. 替米沙坦联合阿托伐他汀对糖尿病大鼠内皮细胞形态、功能的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(7): 542 - 546.
- [15] 高艳芳, 汤嘉宁. 阿托伐他汀与氨氯地平对 ox-LDL 损伤的人脐静脉内皮细胞 LOX-1 和 eNOS 表达的影响[J]. 中国药物与临床, 2012, 12(7): 884 - 886.
- [16] 李艳伟, 于晓玲, 申玉超. 阿托伐他汀对 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞中 Wnt 信号通路及相关因子表达的影响[J]. 中国药房, 2014, 25(17): 1574 - 1577.
- [17] Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species [J]. *Hypertension*, 2001, 37(6): 1450 - 1457.
- [18] Li P, Guo X, Lei P, *et al.* PI3K/Akt/uncoupling protein 2 signaling pathway may be involved in cell senescence and apoptosis induced by angiotensin II in human vascular endothelial cells [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(10): 6931 - 6937.
- [19] Chen HF, Liu SJ, Chen G. Heat shock protein 27 phosphorylation in the proliferation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by high glucose through the phosphoinositide 3kinase/Akt and extracellular signalregulated kinase 1/2 pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2): 1504 - 1508.
- [20] Sheu ML, Ho FM, Yang RS, *et al.* High glucose induces human endothelial cell apoptosis through a phosphoinositide 3-kinase-regulated cyclooxygenase-2 pathway [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(3): 539 - 545.
- [21] 丁奇, 董燕, 金英, 等. 阿托伐他汀对谷氨酸引起大鼠神经元损伤保护作用机制的研究[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(12): 1635 - 1640.
- [22] 程振东, 吴灵振, 郭进建, 等. 阿托伐他汀后处理对 GK 大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(8): 709 - 713.
- [23] 黄茶花, 谢遥, 黄晓, 等. 阿托伐他汀减轻缺血复合冷应激诱导的大鼠心肌损伤[J]. 基础医学与临床, 2011(11): 1200 - 1204.
- [24] 屈文慧, 郁盛雪, 隋海娟, 等. 阿托伐他汀通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号转导而促进神经元突起生长[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(2): 150 - 155.
- [25] Madonna R, De Caterina R. Prolonged exposure to high insulin impairs the endothelial PI3-kinase/Akt/nitric oxide signalling [J]. *Thromb Haemost*, 2009, 101(2): 345 - 350.
- [26] Yuan X, Chen K, He H, *et al.* [Effect of GLP-1 on high glucose-induced human umbilical vein endothelial cell apoptosis and mechanism] [J]. *Zhongnan Daxue Xuebao Yixue Ban*, 2013, 38(10): 1029 - 1034.
- [27] Dou J, Li H, Ma X, *et al.* Osteocalcin attenuates high fat diet-induced impairment of endothelium-dependent relaxation through Akt/eNOS-dependent pathway [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2014, 13: 74.
- [28] Wu J, Lei MX, Xie XY, *et al.* Rosiglitazone inhibits high glucose-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells through the PI3K/Akt/eNOS pathway [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2009, 87(7): 549 - 555.
- [29] Zhang W, Wang R, Han SF, *et al.* Alpha-linolenic acid attenuates high glucose-induced apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells via PI3K/Akt/eNOS pathway [J]. *Nutrition*, 2007, 23(10): 762 - 770.



灵芝酸 A 对人胶质瘤细胞 U251 细胞增殖、 凋亡和侵袭的影响

刘海鹏, 郑克彬, 单小松

(河北大学附属医院, 神经外科, 河北 保定 071000)

【摘要】 目的 探讨灵芝酸 A 对人胶质瘤细胞 U251 细胞凋亡、侵袭及 KDR 表达的影响。**方法** 制备灵芝酸 A, 以人胶质瘤细胞 U251 细胞为研究对象, 根据细胞培养液所含灵芝酸 A 的不同浓度, 将实验分为空白对照组(等量细 PBS)、灵芝酸 A 低浓度组(0.1 mmol/L)和高浓度组(0.5 mmol/L)。用 RT-PCR 和 Western blot 法分别从 mRNA 水平和蛋白水平检测 KDR 基因的表达, CCK-8 法测定细胞体外增殖能力, 流式细胞技术(flow cytometry, FCM)检测各组细胞周期和凋亡情况, TUNEL 染色检测各组细胞的的凋亡, 细胞侵袭小室法检测各组细胞的体外侵袭力。**结果** RT-PCR 和 Western blot 显示, 灵芝酸 A 高浓度组和低浓度组较空白对照组的 KDR mRNA 和蛋白表达都明显下降; 灵芝酸 A 高浓度组和低浓度组细胞的生长速度明显减慢, 降低 G1 期细胞比例, S 期和 G2/M 期比例增高; 与空白对照组相比, 高浓度组和低浓度组细胞的凋亡率明显升高($P < 0.01$), 增殖、侵袭能力显著下降($P < 0.05$); 高浓度组和低浓度组细胞相比促进凋亡和抑制 KDR 表达的作用更明显($P < 0.05$)。**结论** 灵芝酸 A 可诱导人胶质瘤细胞 U251 细胞凋亡, 抑制其增殖和侵袭能力, 并能抑制 KdrDR mRNA 和蛋白的表达, 提示这可能是其抗肿瘤的作用机制之一。

【关键词】 灵芝酸 A; 胶质瘤细胞; 血管内皮生长因子受体; 细胞周期; 凋亡

【中图分类号】 R739.45 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0064-06

doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2016.03.013

Effect of Ganoderma acid A to human glioma cells U251 cells on proliferation, apoptosis and invasion

LIU Hai-peng, SHAN Xiao-song, ZHENG Ke-bin

(Affiliated Hospital of Hebei University, neurosurgery department, Hebei Baoding 071000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of ganoderic acid A (GA-A) on apoptosis, invasion and KDR expression of human U251 cells. **Methods** Ganoderic acid A (GA-A) was prepared, human U251 cells were treated with 0.1, and 0.5 mmol/L GA-A, and the experiment was divided into blank control, low concentration and high concentration group. The expressions of KDR mRNA and KDR protein was assayed by RT-PCR and Western blot. The effect of GA-A on the proliferation and invasion capability of U251 cells was determined by CCK-8 and transwell assay in vitro, respectively. Flow cytometry was used to detect the influence of GA-A on the cell cycle and apoptosis of U251 cells, and TUNEL staining was detected the cell apoptosis too. **Results** Compared with the control group, KDR mRNA and protein expression of high concentration and low concentration group were significantly decreased ($P < 0.05$), GA-A can

[作者简介] 刘海鹏(1980-),男,硕士生,研究方向:胶质瘤,邮箱:liuhaipengzlj@163.com。

[通讯作者] 单小松, E-mail: zhjianjun_123@163.com。

significantly reduce the cell growth rate, reduce the proportion of cells in G1 phase and increase the proportion of S phase and G2 / M phase, cells apoptosis was significantly increased in the high concentration and low concentration group ($P < 0.01$), and cells proliferation and invasion was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with low concentration group, the high concentration group induce cell apoptosis and inhibit the expression of KDR more significant ($P < 0.05$).

Conclusions Ganoderma acid A can induce apoptosis in U251 cells, inhibit proliferation and invasion, and can inhibit the expression of KDR mRNA and protein, which may be one of the mechanisms of anti-tumor.

【Key words】 Ganoderma acid A; Glioma cells; Vascular endothelial growth factor receptor; Cell cycle; Apoptosis

灵芝又称仙草,属于担子菌纲多孔菌科(Polyporaceae)灵芝属,有提高机体免疫力、降压调脂及抗肿瘤等多种药用价值,目前已引起医疗界的广泛关注,尤其是其在抗肿瘤方面^[1]。研究发现,其抗肿瘤的主要成分是从灵芝孢子粉中提取的灵芝酸 A^[2-3]。神经胶质瘤又称胶质细胞瘤,是原发性中枢神经系统肿瘤中最常见的类型,约占所有颅内原发肿瘤的一半^[4]。目前关于灵芝酸 A 治疗神经胶质瘤的研究颇多,但主要局限于抗肿瘤机制方面,在药理作用及疗效方面还有待进一步的研究^[5-6]。血管内皮生长因子受体 II 激酶功能区受体(vascular endothelial growth factor II, VEGFR2/kinase domain receptor, KDR)在许多类型肿瘤中高表达,其阻滞剂可调节胶质细胞瘤等多种恶性肿瘤生长^[7-8]。本文主要研究灵芝酸 A 对人胶质瘤 U251 细胞的生物学影响及 KDR 表达的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

实验于 2013 年 8 月 - 2015 年 8 月在河北医科大学动物实验室完成,人胶质瘤细胞系(U251)来源北京大学医学部病理教研室提供,并由本实验室冻存;DMEM、磷酸盐缓冲液(phosphatic buffered saline, PBS)、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司;TRIzol 购自 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒购自上海 Best-Bio 贝博公司;荧光定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司、DNA Marker 购自广州东盛生物科技有限公司;Western blot 及苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、IP 细胞裂解液、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×)、BCA 蛋白浓度测试试剂盒(增强型)、20×TBS 缓冲液等均购自江苏碧云天生物技术研究;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;碘化丙锭 PI 和 RNase 酶购自 Sigma 公司;流式细胞仪购自美国 BD 公司;凋亡试剂盒购自南京凯基科技发展有限公司;灵芝酸 A 购于大连美仑生物技术有限公司;

KDR 和 GAPDH 基因的引物由上海吉玛制药公司合成并通过测序验证;兔抗人 KDR 单克隆抗体、鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组

将培养于含 10% 小牛血清、100 U/mL 左氧氟沙星的 DMEM 培养基中的人胶质瘤细胞株 U251 细胞,置于 37℃ 5% CO₂ 密闭式孵箱内培养、传代。把用 50 mmol/L 甲醇溶解好的灵芝酸 A 放于 4℃ 的冰箱中保存。依据灵芝酸 A 的浓度不同分为低浓度组(0.1 mmol/L)、高浓度组(0.5 mmol/L)和对照组(1% 甲醇 0.2 mL)。将 3 组细胞放于 37℃ 的孵箱内培养,取对数生长期细胞用于后续实验。

1.2.2 RT-PCR 检测 KDR mRNA 表达

用 TRIzol 试剂盒提取培养 48 h 后 U251 细胞的总 RNA 量,并进行反转录。Primer Primer 5.0 软件设计引物, KDR 上游引物: 5'-CTGGCATGGTCTCTGTGAAGCA-3', 下游引物: 5'-AATACCAGTGGATGTGATGCGG-3', 扩增产物 795 bp; 内参照 GAPDH 上游引物: 5'-CGTGAAGGACTCATGACCA-3', 下游引物: 5'-TCCAGGGGCTTACTCCTTG-3', 扩增产物为 509 bp。PCR 反应条件为 94℃ 变性 2 min、62℃ 退火 1 min、72℃ 延伸 1 min, 循环 35 次, 再于 72℃ 延伸 8 min。经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳并用凝胶成像仪观察结果, UVI 凝胶成像系统摄像, Image-Pro Plus 7.0 软件分析条带灰度值, KDR/GAPDH 比值代表 KDR mRNA 的相对表达量。

1.2.3 Western blotting 检测 KDR 蛋白表达

提取培养 48 h 后各组的总蛋白并测定蛋白浓度。将 50 μg 总蛋白进行上样, 8% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳、湿转法转膜并用 10% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入 KDR、GAPDH(1:800 稀释), 于摇床上 4℃ 孵育过夜。用三乙醇胺缓冲盐溶液洗涤 3 次, 每次 10 min, 洗膜后加入二抗(1:5000)。最后暗室曝光, 用

超敏 ECL 化学发光试剂检测蛋白条带, 获取图像并进行条带灰度值分析, 目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.2.4 CCK8 法检测 U251 细胞的增殖

将 U251 细胞按 4000 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板上, 加入含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基 200 μ L, 每组设 5 个复孔, 另设空白孔作为对照。每孔加入 CCK-8 20 μ L, 培养箱孵育 4 h 后, 酶标仪检测 490 nm 处的吸光度 (D) 值, 取 5 个复孔的平均数, 绘制生长曲线。

1.2.5 Transwell 小室侵袭实验

将 Matrigel 按 50 μ g/孔的浓度置于聚碳酸酯微孔滤膜上进行聚合, 每孔下室中加入 10% 的胎牛血清做条件培养液, 上室加入 U251 细胞悬液 100 μ L, 培养箱中培养 24 h 后取出, 进行固定、染色并光镜下计数膜下表面的细胞。每张微孔膜计数 5 个随机视野的穿膜细胞数, 计算平均数。每组设置 3 个小室, 重复实验 3 次。细胞侵袭率 (%) = 穿膜细胞数/上室中接种的细胞总数 \times 100%

1.2.6 细胞周期检测

将细胞进行胰酶消化、PBS 冲洗、70% 乙醇固定, 4 $^{\circ}$ C 过夜。用 PBS 冲洗, 将细胞混合成 1.0×10^5 /mL 的细胞悬液, 并以细胞悬液: PI = 1:1 加入适量 PI 液, 4 $^{\circ}$ C 下避光孵育 30 min, 300 目筛网过滤; 流式细胞仪分析 DNA 含量, 软件分析 G1、S、G2/M 各期的细胞数及所占比例。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞凋亡

转染 72 h 后, 将细胞用不含 EDTA 的胰酶消化, 消化完全后移入 Ep 管, 4 $^{\circ}$ C、2 000 r/min, 离心 5 min, 弃上清。PBS 洗涤 2 次, 加入 500 μ L buffer, 5 μ L Annexin V-FITC, 混匀; 加 5 μ L PI 混匀后室温、避光反应 5 ~ 15 min; 1 h 内用流式细胞仪检测 (激发波长 Ex = 488 nm, 发射波长 Em = 530 nm)。

1.2.8 TUNEL 染色

细胞分组后 72 h, 行 U251 细胞爬片并弃培养液, 自然晾干; 4% 多聚甲醛溶液固定, 在室温下用新鲜配制的 3% H2O2 进行处理, 0.1% TritonX-100 (溶于 0.1% 枸橼酸钠溶液) 打孔, 行显色、复染、脱水、透明、封片及观察。每张切片观察 3 个视野, 每个视野连续计数 300 个细胞, 凋亡细胞百分比即为凋亡指数 (m)。AI (%) = 凋亡细胞数/总细胞数 \times 100%。

1.3 统计学处理

应用 SPSS16.0 统计软件进行分析, 细胞凋亡计量资料两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 灵芝酸 A 降低 KDR mRNA 的表达水平

RT-PCR 结果显示, 经相关干预后 U251 细胞 KDR mRNA 水平高浓度组 < 低浓度组 < 空白对照组, 且任意两组间的比较均满足上述关系, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。由此说明低浓度和高浓度的灵芝酸 A 均能抑制 KDR mRNA 的表达, 且高浓度的抑制效果更明显 (图 1)。

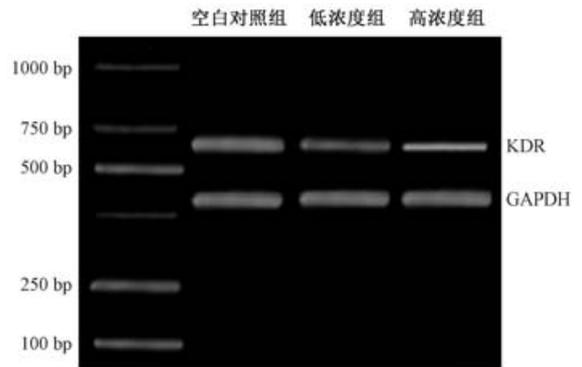


图 1 各组 KDR mRNA 的表达水平

Fig. 1 KDR mRNA expression level of each group

2.2 灵芝酸 A 降低 KDR 蛋白的表达水平

表达量与空白对照组相比明显降低, 且差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 而低浓度组与空白对照组间相比 KDR 蛋白的表达量亦明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明低浓度和高浓度的灵芝酸 A 均能抑制 KDR 蛋白的表达, 且随浓度的升高抑制效果更明显 (图 2)。

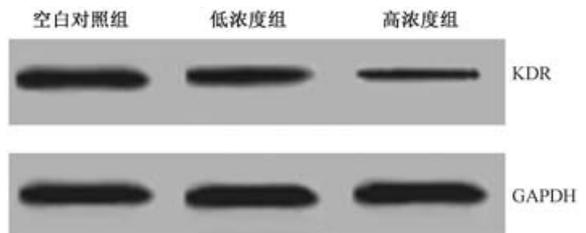


图 2 各组 KDR 蛋白的表达水平

Fig. 2 KDR expression levels of each group

2.3 CCK-8 法检测 U251 细胞增殖情况

CCK-8 法检测结果表明, 3 组在 490 nm 处的 A 值在转染后 24、48、72、96 和 120 h 时的大小依次是

空白对照组 > 低浓度组 > 高浓度组, 且任意两组间比较均成立, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。绘制的生长曲线示, 高浓度组较空白对照组和低浓度组曲线明显降低 (表 1), 差异有统计学意义 ($P <$

0.05), 低浓度组较空白对照组曲线亦降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。表明灵芝酸 A 抑制 U251 细胞增殖, 且随浓度升高抑制作用更明显。

表 1 三组细胞各时间点细胞活力的比较 490 nm ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab.1 Comparison of cell viability between three groups of cells at different time points 490 nm ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
空白对照组	0.41 ± 0.04	0.63 ± 0.02	1.44 ± 0.07	1.86 ± 0.16	2.92 ± 0.27
低浓度组	0.36 ± 0.02	0.45 ± 0.05	1.08 ± 0.13	1.43 ± 0.12	2.14 ± 0.15
高浓度组	0.24 ± 0.03	0.31 ± 0.04	0.62 ± 0.08	0.97 ± 0.14	1.38 ± 0.12

注, Note: $P < 0.05$

2.4 灵芝酸 A 降低细胞体外侵袭力降低

3 组穿过滤过膜的细胞数依次为: 空白对照组 > 低浓度组 > 高浓度组, 且差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。实验结果表明灵芝酸 A 可以抑制 U251 细胞的体外侵袭力, 且随浓度的升高抑制作用增强。

2.5 流式细胞术检测细胞周期

由图 3 及表 2 可知, 与空白对照组相比, 低浓度组和高浓度组 G1 期细胞比例均明显降低 ($P < 0.05$), 且高浓度组较低浓度组明显 ($P < 0.05$); 而 S、G₂/M 期细胞比例则明显升高 ($P < 0.05$)。

表 2 各组细胞周期分布及凋亡率 (%)

Tab.2 Cell cycle distribution and apoptosis rate (%)

组别	G1 期	S 期	G ₂ /M 期
空白对照组	63.91 ± 1.21	29.61 ± 1.12	7.68 ± 0.44
低浓度组	48.39 ± 1.24	40.13 ± 0.91	10.54 ± 0.50
高浓度组	31.69 ± 0.52	49.36 ± 0.73	18.75 ± 0.73

注, Note: $P < 0.05$

2.6 流式细胞术检测细胞凋亡

流式细胞仪检测的 DNA 直方图显示: 3 组细胞凋亡率依次为高浓度组 > 低浓度组 > 对照组, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明灵芝酸 A 可以明

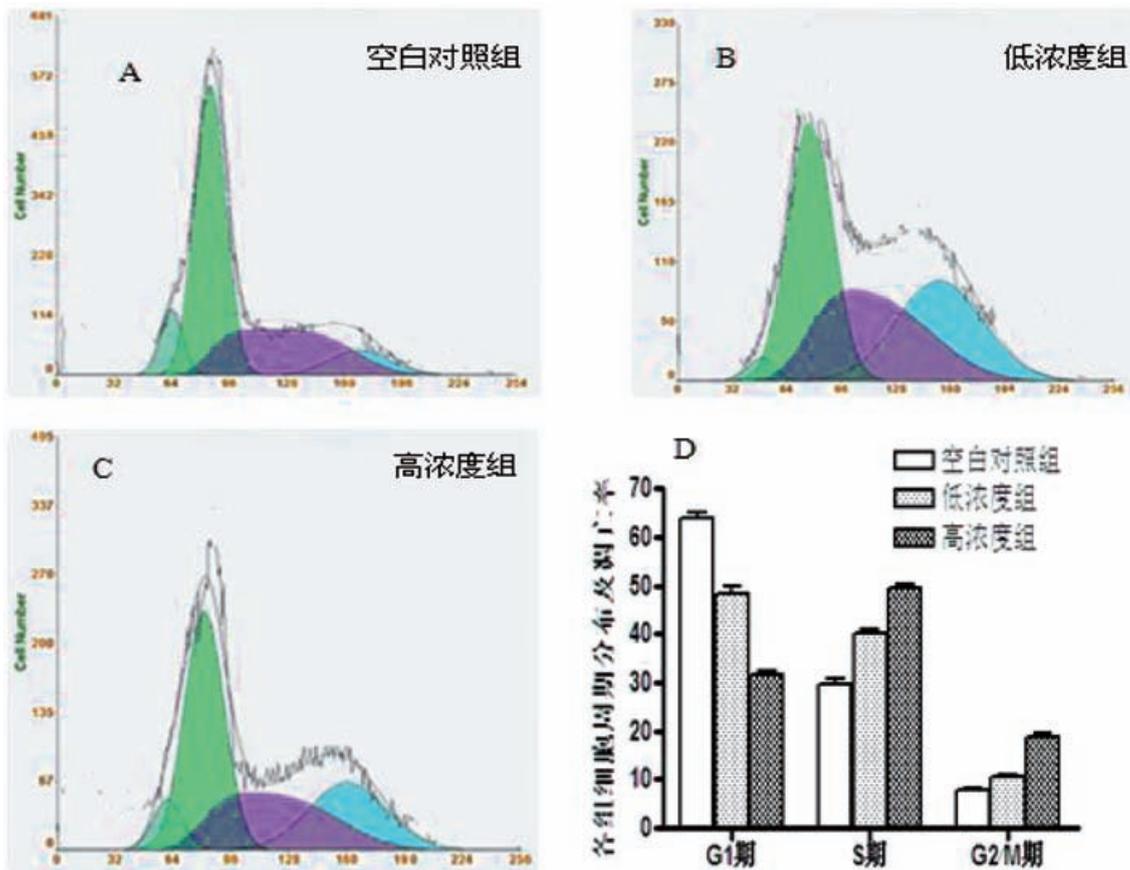


图 3 不同组 G1、S、G₂ 期的比较

Fig.3 G1, S, G₂ phase comparison of different group

显促进 U251 细胞的凋亡,且随浓度的增加而增强(图 4)。

2.7 TUNEL 染色观察细胞凋亡

TUNEL 染色观察细胞凋亡结果显示,3 组中均出现细胞核被染成棕黄色的 U251 凋亡细胞,且 3

组细胞凋亡数依次为高浓度组 > 低浓度组 > 对照组,且差异有统计学意义($P < 0.05$),表明灵芝酸 A 可以明显促进 U251 细胞的凋亡,且随浓度的增加而增强(图 5)。

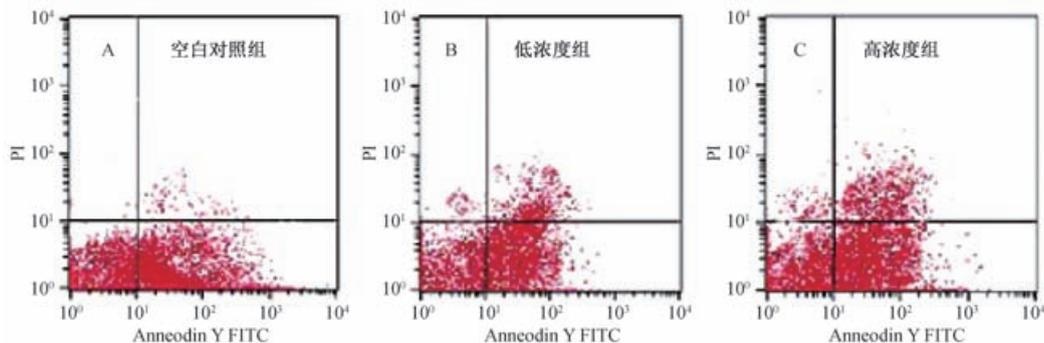


图 4 流式细胞术检测各组细胞凋亡

Fig. 4 Cell apoptosis was detected by flow cytometry of each group

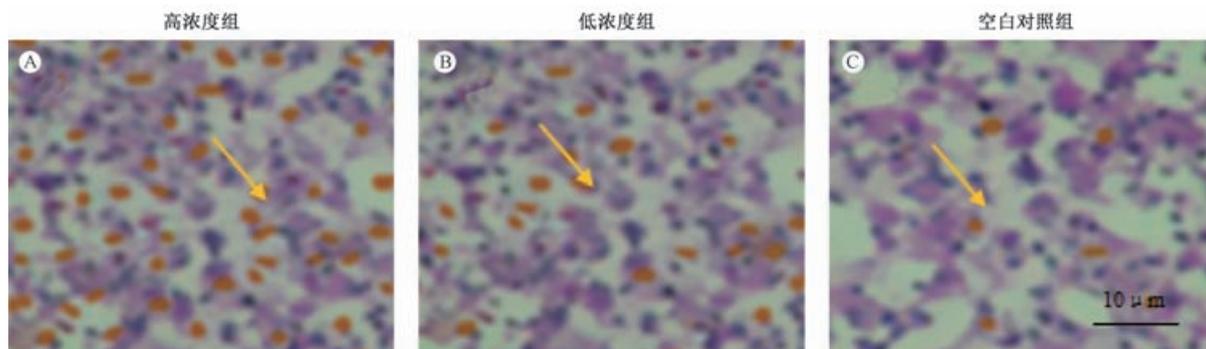


图 5 TUNEL 染色观察各组细胞凋亡

Fig. 5 TUNEL staining of each group

3 讨论

神经胶质瘤是原发性中枢神经系统肿瘤中最常见的类型,迄今为止病因尚未阐明。虽然临床上手术、药物及放化疗等各种治疗手段,但其病死率、复发率仍居高不下,寻求新的、有效的治疗手段已成为了当务之急^[9-10]。

自上世纪 80 年代以来,灵芝治疗肿瘤的确切机制已引起了医务工作者的广泛兴趣。研究发现,灵芝酸能激活可直接破坏肿瘤细胞核形成的蛋白酶,且抑瘤效果与其含量有明显依赖性^[11-12]。与本项研究结果相一致。本实验研究表明灵芝酸 A 高浓度组和低浓度组较空白对照组的 KDR mRNA 和蛋白表达均明显下降,证明灵芝酸 A 在调节肿瘤细胞的增殖力和侵袭力,促进细胞凋亡方面起到关键作用,提示调控 KDR 基因可能直接或间接地参与人胶

质瘤 U251 细胞周期的调控和凋亡,其基因的表达水平改变与肿瘤细胞侵袭力关系密切^[13-14]。可能是其抑瘤作用的潜在机制之一。

人体是一个有机的整体,体外实验不可能做到完全模拟人体生理情况,因此灵芝酸 A 对人胶质瘤的疗效尚需临床应用数据进行综合分析。目前,从分子机制探讨灵芝酸 A 的抗肿瘤作用尚处于探索阶段,对于恶性肿瘤的治疗效果也尚处于观察阶段,需要我们继续进行深入的研究以期早日攻克人胶质瘤这一疾病。

参考文献:

- [1] Reis FS, Lima RT, Morales P, *et al.* Methanolic extract of ganoderma lucidum induces autophagy of AGS human gastric tumor cells[J]. *Molecules*, 2015, 20(10):17872-17882.
- [2] Yao X, Li G, Xu H, *et al.* Inhibition of the JAK-STAT3 signaling pathway by ganoderic acid A enhances chemosensitivity

- of HepG2 cells to cisplatin[J]. *Planta Med*, 2012, 78(16): 1740-1748.
- [3] Yajima Y, Miyazaki M, Okita N, *et al.* Production of Ginkgo leaf-shaped basidiocarps of the Lingzhi or Reishi Medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes), containing high levels of α - and β -D-glucan and ganoderic acid A [J]. *Int J Med Mushrooms*, 2013, 15(2):175-182
- [4] Srinivasan K, Thomas B. Teaching neuroimages: optic nerve glioma with perineural arachnoid gliomatosis in a patient with neurofibromatosis-1[J]. *Neurology*, 2015, 84(13):e97.
- [5] Ameri A. Ganoderic Acid in the treatment of prostate cancer[J]. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, 2012, 7(3):85-86.
- [6] Liu RM, Li YB, Zhong JJ. Cytotoxic and pro-apoptotic effects of novel ganoderic acid derivatives on human cervical cancer cells in vitro[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 681(1-3):23-33.
- [7] Song J, Song Y, Guo W, *et al.* Regulatory roles of KDR antisense oligonucleotide on the proliferation of human prostate cancer cell line PC-3[J]. *Journal of Buon*, 2014, 19(3):770-774.
- [8] 张家文, 冯晓源, 姚振威, 等. CT 灌注成像与大鼠 C6 胶质瘤 CD105 表达的相关性[J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(03): 27-30, 69, 后插 5 页.
- [9] 左龙, 赵越, 李怀业, 等. 磁共振示踪法定量测量大鼠 C6 胶质瘤模型细胞外间隙扩散参数[J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(12):1-7.
- [10] 王晓武, 李康, 丁桂荣, 等. SD 大鼠与 Wistar 大鼠脑胶质瘤动物模型的建立及比较[J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(05) 8-11.
- [11] 黄书铭, 杨新林, 王帮武, 等. 灵芝醇溶性酸性组分的抗肿瘤作用[J]. *天然产物研究与开发*, 2004, 16(2):146-148.
- [12] 唐文. 灵芝酸 T 提高多药耐药性肿瘤细胞对阿霉素敏感性的初步研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2013, 25(8):1052-1055.
- [13] 吕贤荣, 丁苏明, 李国涛, 等. 体外 MTT 法对灵芝酸抗人乳腺癌细胞株 MCF-7 作用的评估[J]. *医学信息*, 2014, 27(11): 92-92.
- [14] 邵建立, 李志忠, 焦根龙, 等. 灵芝酸 A 对人骨肉瘤细胞增殖、凋亡和迁移的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2015, 35(5):619-624.

[修回日期]2016-01-20

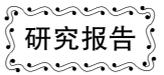
(下接第 74 页)

道,伊维菌素与 P-糖蛋白抑制剂联合使用时,会对雄鼠生殖系统造成影响^[8];对雄性大白鼠经口灌胃给予伊维菌素达到一定剂量时,可引起大白鼠睾丸及附睾脏器系数下降^[9];对雄性鲫鱼空腹灌给予伊维菌素时,雄性鲫生殖腺指数(GSI)下降^[10],而本次研究未观察到雄性大鼠睾丸脏器系数下降,这可能与给药途径不同有关。伊维菌素的经口与吸入毒性差异很大,说明暴露途径非常重要,在伊维菌素使用上要着重避免经消化道接触,兽医或动物医院在使用伊维菌素时,要严格保管,防止丢失。

参考文献:

- [1] 国家技术监督局. GB15670-1995. 农药登记毒理学试验方法[S].
- [2] OECD. OECD Guideline for Testing of Chemicals, 412 Subacute Inhalation Toxicity; 28-Day Study[S]. Paris: OECD, 2009.
- [3] David W F. Analytical profiles of drug substances, Ivermectin [J]. 1988, 17:155.
- [4] 吴中兴, 钱益新. 伊维菌素的药效、药理和临床研究[J]. *热带病与寄生虫学*, 2003, 1(3):184-187.
- [5] 黄清臻. 新型杀虫杀蛾剂-伊维菌素[J]. *中华卫生杀虫药械*, 2003, 9(3):75-76.
- [6] 徐楷, 王巧玲. 兽用伊维菌素研究进展[J]. *国外畜牧学-猪与禽*, 2011, 31(1):85-86.
- [7] 刘长令. 世界农药大全-杀虫剂卷[M]. 北京:化学工业出版社, 2012:71-74.
- [8] Abeer FE, Ibrahim ME. Effect of ivermectin on male fertility and its interaction with P-glycoprotein inhibitor (verapamil) in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2008, 26:206-211.
- [9] 姜晓文, 冯国锋, 徐明星. 伊维菌素对雄性大白鼠生育功能的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(6):174-175.
- [10] 王荻, 李绍戊, 耿龙武, 等. 伊维菌素对雄性鲫的生殖毒性评价[J]. *应用生态学报*, 2015, 26(10):3174-3180.

[修回日期]2016-01-19



伊维菌素原药对大鼠的亚急性吸入毒性研究

纪磊, 岑江杰, 林师道, 胡成云, 方华, 徐剑, 陈杰

(浙江省化工研究院有限公司, 杭州 310023)

【摘要】 目的 研究伊维菌素原药对大鼠亚急性吸入毒性, 求出最大无作用剂量。方法 采用 SPF 级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 共 72 只, 随机分成 6 组, 每组 12 只, 雌雄各半。设 190、380、750 mg/m³ 等 3 个剂量组和 1 个溶剂对照组 (0.03% 吐温-80 溶液), 另设 1 个空白对照和 1 个附加组 (750 mg/m³)。采用动式 (口鼻式) 吸入染毒, 每天染毒 1 次, 持续 4 h, 每周染毒 5 d, 直至 28 d, 附加组动物停止染毒后继续观察 14 d。试验结束后, 分别对动物作血液常规、生化、体重及脏器系数等测定, 并进行组织病理学检查。**结果** 750 mg/m³ 剂量组雌雄大鼠在染毒后期出现被毛蓬松、呆滞、流涎、震颤等中毒反应。750 mg/m³ 剂量组雌鼠食物利用率下降, 血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 水平升高 ($P < 0.01$), 肝脏器系数 (脏体比) 升高 ($P < 0.05$), 且病理组织学检查发现部分大鼠肝细胞混浊肿胀现象; 750 mg/m³ 剂量组雄鼠染毒第 4 周的体重下降, 血清尿素氮 (BUN) 和 ALT 水平升高 ($P < 0.01$), 总胆固醇 (CHOL) 水平下降 ($P < 0.05$)。**结论** 伊维菌素原药对大鼠亚急性吸入毒性试验的最大无作用剂量雌、雄性均为 380 mg/m³ (4 h/d)。

【关键词】 伊维菌素原药; 亚急性吸入毒性; 最大无作用剂量

【中图分类号】 R114 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0070-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.03.014

Study on the subacute inhalation toxicity of ivermectin TC in rats

Ji Lei, Cen Jiang-jie, Lin Shi-dao, Hu Cheng-yun, Fang Hua, Xu Jian, Chen Jie
(Zhejiang Research Institute of Chemical Industry, Hangzhou 310023, China)

【Abstract】 Objective To study the subacute inhalation toxicity of Ivermectin TC, and obtain its non-observed adverse effect level (NOAEL). **Methods** It was performed on the doses of Ivermectin TC 190, 380, 750 mg/m³, the solvent control group (0.03% Tween-80 solution), the control group and additional group (there were 6 female and 6 male Sprague-Dawley rats for each group). The animals inhaled with nose-only exposure for 4 weeks (4 h/d, 5 d/week). The additional group should be observed another 14 days after exposing. At the end of experiment, the rats were killed, the routine and biochemical detection, the body weight and organ to body weight ratios were all measured. **Results** In the high exposure group, clinical signs of rats included hair fluffy, dull, salivation, tremors were recorded at the exposure period; in female rats, feed efficiency was decreased, ALT and liver to body weight ratio were increased; in male rats, BUN and ALT were increased, CHOL and body weight for the 4th week were decreased. Histopathological examinations revealed that swelling in the liver cell was seen in some female rats at high exposure group. **Conclusion** The results suggested that the NOAEL of Ivermectin TC in SD rats was 380 mg/m³ (4 h/d for 28 days).

【Key words】 Ivermectin TC; Subacute inhalation toxicity; NOAEL

伊维菌素 (ivermectin, IVM) 是由阿维链霉菌发酵产生的半合成大环内酯类多组分抗生素, 自 1981

年投入市场作为兽用驱虫药后,IVM 因其高效及安全的杀虫效果,已被广泛应用于杀灭寄生在家畜及水产动物等体内的线虫和节肢动物。但即便如此,随着伊维菌素市场需求量的不断增大,其对健康的影响仍应该受到重视。目前伊维菌素的毒性文献报道较少,为了解较长时间暴露伊维菌素可能引起的毒性效应,我们根据国家标准 GB15670-1995《农药登记毒理学试验方法》并参考经济合作与发展组织(OECD)化学品测试方法^[1-2]对伊维菌素的大鼠亚急性吸入毒性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 受试物

伊维菌素原药,本白色粉末,无刺激性气味,难溶于水,含量为 90%,由浙江某农药公司提供。

1.2 仪器

HOPE-8052 型吸入染毒装置、美普达 UV-6100 紫外可见分光光度计、日立 7020 型全自动血生化分析仪、MEK-7222K 全自动血细胞分析仪、优利特-200 自动尿液分析仪、Thermo Shandon Excelsior 脱水机、Thermo Shandon HistoCentre 2 石蜡包埋机、Leica RM2235 轮转式切片机。

1.3 动物及环境

试验采用 72 只 SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,雌鼠体重 184~203 g,雄鼠体重 198~211 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司【SCXK(沪)2008-0016】提供。本研究在本机构动物实验设施中进行【SYXK(浙)2009-0125】,动物房内通风 10~12 次/h,人工照明,12 h/12 h 明暗交替,室温 20℃~26℃,相对湿度 40%~70%,动物单独编号,同性别 2 只一笼,饲养于不锈钢笼具内,动物自由摄食,饮用灭菌水,饲料为全价营养辐照饲料。本研究编号为 APS2013120258A,经过实验动物管理小组审核批准后实施,按实验动物使用的 3R 原则给予实验动物人道关怀。

1.4 剂量设计

预先进行大鼠急性吸入毒性试验和 3 周反复吸入毒性试验,得出伊维菌素原药急性吸入 LD₅₀(吸入 4 h)为 3690(2710-5010)mg/m³。3 周反复吸入试验显示:在 380 mg/m³ 剂量条件下动物无明显中毒症状及体重和进食量无明显差异,在 750 mg/m³ 剂量条件下,第 5 天起动物开始出现流涎、被毛潮湿等中毒症状,在染毒结束回笼 2 h 后逐渐恢复,次日

染毒前症状基本消失。3 周染毒期间动物无死亡。因此正式试验中,将动物按体重随机分成 190、380、750 mg/m³ 等 3 个剂量组,1 个溶剂对照组(0.03% 吐温-80 溶液)、1 个空白对照组和 1 个附加组(750 mg/m³),每组 12 只,雌雄各半。

1.5 供试品配制

供试品先加入 1% 吐温-80 进行乳化,用蒸馏水配成不同浓度乳化液,作为各剂量组和附加组的试验用液。空白对照组不使用任何溶剂和供试品,吸入染毒直接通空气。溶剂对照组采用 0.03% 吐温-80 蒸馏水溶液,其它条件同试验组。

1.6 染毒方法

采用 HOPE-8052 型动式吸入(口鼻式)染毒装置,染毒装置柜体容积为 0.06 m³。大鼠用固定器固定后插于染毒柜上,仅暴露口鼻。设定染毒装置参数:药物流速 1.3 mL/min、进气流速 2.2 m³/h、染毒时间 4 h。用磁力搅拌器低速搅拌受试液,启动染毒装置,发生气溶胶。染毒期间染毒柜内保持温度在 20℃~26℃、氧含量不低于 19%,染毒期间动物禁食、禁水,染毒结束,取出动物回笼、自由进食饮水。每天连续经呼吸道吸入染毒 4 h,每周染毒 5 d,直至 28 d,附加组动物在染毒结束后继续观察 2 周。

1.7 浓度测定

在染毒柜内动物呼吸带,用大气采样机串联气泡吸收管(以 10 mL 甲醇为吸收液)采集 5 L(流量 1 L/min、采集时间 5 min)染毒气溶胶,应用紫外分光光度法(以受试物为标样,以 245 nm 为测定波长),于第 1、2、3、4、5、15、22、28 天,每天 3 次,采样测定动物呼吸道染毒浓度,平均值为实测浓度。

1.8 观察指标

1.8.1 一般指标:试验期间每日观察大鼠的活动和中毒症状,并进行周进食量和周体重变化的记录,并测定食物利用率。

1.8.2 血生化和血常规测定:于试验结束时,各组大鼠经眼眶静脉采血,进行血液生化和血常规测定。血液生化指标包括丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)、总胆红素(TBIL)、白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)、总胆固醇(CHOL)、胆碱酯酶(CHE)、血糖(GLU)等。血常规指标包括白细胞计数(WBC)及其分类、红细胞计数(RBC)、血红蛋白浓度(HGB)、红细胞压积(HCT)、平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白量(MCH)、平均

红细胞血红蛋白浓度 (MCHC)、红细胞分布宽度 (RDW)、血小板计数 (PLT)、平均血小板体积 (MPV)、血小板分布宽度 (PDW)、血小板压积 (PCT) 等。

1.8.3 尿常规测定: 试验结束前 1 d 留取 6 h 尿液进行尿常规测定, 指标包括尿 pH 值、亚硝酸盐 (NIT)、蛋白质 (PRO)、糖 (GLU)、维生素 C (VC)、隐血 (BLD)、比重 (SG)、胆红素 (BIL)、尿胆原 (URO)、酮体 (KET)、白细胞计数 (WBC) 等。

1.8.4 脏器系数及病理检查: 试验结束动物进行大体解剖, 检查各脏器肉眼可见病变, 称取脑、心、肺、肝、脾、肾、肾上腺、睾丸和卵巢等脏器湿重, 计算脏器系数。对溶剂对照组、空白对照组、高剂量组及附加组动物主要脏器以及大体解剖时发现的异常组织取样固定于 15% 中性甲醛溶液, 作组织病理学检查。

1.9 统计学方法

应用 SPSS 软件进行统计分析, 所有计数数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 One-Way ANOVA 的 Dunnett-t 检验或/和 Kruskal-Wallis 秩和检验来检验各染毒组均数与溶剂对照组比较是否具有显著性差异, $P < 0.05$ 则判定差异有统计学意义。

2 结果

2.1 受试物染毒浓度实测结果

表 1 伊维菌素原药对大鼠体重变化和食物利用率的影响

Tab.1 Effects of Ivermectin TC on body weight and feed efficiency in the rat

性别 Sex	组别 Group	染毒前 Before exposure	染 毒 期 (周) Exposure period(week)						平均食物 利用率 (%) Feed efficiency
			1	2	3	4	5	6	
雌 Female	空白对照 Negative control	195 ± 8	213 ± 8	229 ± 13	239 ± 11	247 ± 14	-	-	9.27 ± 2.72
	溶剂对照 Solvent control group	193 ± 9	210 ± 8	221 ± 9	240 ± 12	249 ± 10	-	-	9.43 ± 1.80
	190 mg/m ³	194 ± 8	215 ± 11	228 ± 12	233 ± 13	240 ± 16	-	-	8.44 ± 2.53
	380mg/m ³	195 ± 6	207 ± 10	221 ± 12	227 ± 16	236 ± 15	-	-	7.50 ± 2.67
	750mg/m ³	195 ± 8	205 ± 7	222 ± 12	234 ± 17	228 ± 21	-	-	5.94 ± 4.11**
	750mg/m ³ (附加组) Additional group	194 ± 7	206 ± 7	226 ± 14	232 ± 7	243 ± 14	256 ± 10	274 ± 10	9.40 ± 2.36
雄 Male	空白对照 Negative control	204 ± 5	241 ± 4	285 ± 6	305 ± 10	325 ± 9	-	-	17.06 ± 0.96
	溶剂对照 Solvent control group	205 ± 5	242 ± 14	271 ± 8	311 ± 22	327 ± 20	-	-	15.54 ± 2.03
	190 mg/m ³	204 ± 6	245 ± 12	281 ± 15	311 ± 14	331 ± 19	-	-	18.42 ± 2.33
	380mg/m ³	205 ± 6	239 ± 9	275 ± 9	314 ± 16	335 ± 20	-	-	18.63 ± 2.22
	750mg/m ³	205 ± 6	235 ± 15	264 ± 8	308 ± 13	293 ± 28**	-	-	12.62 ± 3.75
	750mg/m ³ (附加组) Additional group	205 ± 5	235 ± 9	259 ± 20	288 ± 21	302 ± 20*	336 ± 23	365 ± 23	15.54 ± 3.68

注: 与溶剂对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

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

在染毒期间实测动物呼吸带受试物浓度 24 次, 测得 190、380、750 mg/m³ 和附加组的受试物平均浓度分别为 184、380、739、741 mg/m³。

2.2 一般状况、进食量及体重检查

750 mg/m³ 剂量组雄鼠体重与溶剂对照组相比下降, 差异与有极显著性意义 ($P < 0.01$), 其余各组动物体重与溶剂对照组相比无明显差异 ($P > 0.05$)。各组进食量与溶剂对照组相比无明显差异 ($P > 0.05$), 750 mg/m³ 剂量组雌鼠的食物利用率与溶剂对照组相比下降, 差异有极显著性意义 ($P < 0.01$) (表 1)。750 mg/m³ 剂量组和附加组在染毒的第 15 ~ 26 天相继观察到个别或部分动物出现被毛蓬松、流涎、被毛潮湿、俯卧及震颤症状。上述症状在动物染毒结束回笼 2 h 后开始缓解, 次日染毒前均恢复正常。其他剂量组和对照组动物均未观察到中毒症状。附加组动物中毒症状在 2 周观察恢复期开始后 2 ~ 3 d 消失, 亦未见死亡。

2.3 血液生化测定

血液生化测定显示染毒结束 750 mg/m³ 剂量组雌雄大鼠的 ALT 水平显著高于溶剂对照组 ($P < 0.01$); 雄鼠的 BUN 水平显著高于溶剂对照组 ($P < 0.01$); 雄鼠的 CHOL 水平低于溶剂对照组 ($P < 0.05$), 其他血液生化指标未见异常改变 (表 2)。

表 2 伊维菌素原药对大鼠血液生化指标的影响
Tab. 2 Effects of Ivermectin TC on blood biochemical index in the rat

性别 Sex	组别 Group	动物数 Number of rat	ALT (U/L)	BUN (mmol/L)	CHOL (mmol/L)
雌 Female	空白对照 Negative control	6	53 ± 8	7.82 ± 0.85	1.93 ± 0.25
	溶剂对照 Solvent control group	6	55 ± 5	9.21 ± 1.02	1.94 ± 0.21
	190 mg/m ³	6	56 ± 9	8.32 ± 0.21	2.27 ± 0.29
	380mg/m ³	6	60 ± 8	9.84 ± 1.13	2.36 ± 0.46
	750mg/m ³	6	91 ± 33 **	9.85 ± 0.51	2.12 ± 0.64
	750mg/m ³ (附加组) Additional group	6	46 ± 8	7.08 ± 0.80 **	2.16 ± 0.29
雄 Male	空白对照 Negative control	6	74 ± 16	8.30 ± 1.31	1.70 ± 0.24
	溶剂对照 Solvent control group	6	63 ± 11	8.31 ± 1.69	1.88 ± 0.26
	190 mg/m ³	6	64 ± 6	8.55 ± 0.83	1.84 ± 0.13
	380mg/m ³	6	66 ± 12	8.31 ± 0.51	2.16 ± 0.34
	750mg/m ³	6	85 ± 42 **	10.47 ± 1.92 **	1.44 ± 0.34 *
	750mg/m ³ (附加组) Additional group	6	55 ± 8	6.54 ± 0.85 **	1.65 ± 0.26

注:与溶剂对照组相比, * P < 0.05, ** P < 0.01。

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

表 3 伊维菌素原药对大鼠脏器系数的影响
Tab. 3 Effects of Ivermectin TC on organ indexes in the rat

性别 Sex	组别 Group	动物数 Number of rat	脑 Brain	心 Heart	肺 Lung	肝 Liver	脾 Spleen	肾 Kidney	肾上腺 Adrenal	卵巢 (睾丸) Testicle
雌 Female	空白对照 Negative control	6	0.77 ± 0.06	0.34 ± 0.02	0.40 ± 0.02	3.67 ± 0.20	0.23 ± 0.03	0.67 ± 0.05	0.029 ± 0.005	0.035 ± 0.007
	溶剂对照 Solvent control group	6	0.77 ± 0.05	0.33 ± 0.02	0.40 ± 0.03	3.43 ± 0.28	0.19 ± 0.03	0.72 ± 0.05	0.029 ± 0.003	0.039 ± 0.006
	190 mg/m ³	6	0.80 ± 0.07	0.33 ± 0.02	0.40 ± 0.04	3.73 ± 0.15	0.19 ± 0.02	0.72 ± 0.03	0.027 ± 0.001	0.039 ± 0.006
	380mg/m ³	6	0.80 ± 0.05	0.33 ± 0.01	0.40 ± 0.04	3.85 ± 0.25	0.20 ± 0.03	0.72 ± 0.04	0.032 ± 0.003	0.036 ± 0.007
	750mg/m ³	6	0.83 ± 0.06	0.34 ± 0.02	0.40 ± 0.01	3.95 ± 0.36 *	0.20 ± 0.01	0.76 ± 0.04	0.003 ± 0.006	0.035 ± 0.008
	750mg/m ³ (附加组) Additional group	6	0.69 ± 0.07	0.32 ± 0.03	0.38 ± 0.22	3.36 ± 0.52	0.19 ± 0.03	0.67 ± 0.06	0.027 ± 0.003	0.035 ± 0.003
雌 Female	空白对照 Negative control	6	0.64 ± 0.05	0.31 ± 0.02	0.35 ± 0.02	3.44 ± 0.24	0.18 ± 0.03	0.68 ± 0.09	0.017 ± 0.002	0.91 ± 0.07
	溶剂对照 Solvent control group	6	0.63 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.35 ± 0.03	3.40 ± 0.16	0.18 ± 0.03	0.74 ± 0.04	0.017 ± 0.002	0.96 ± 0.07
	190 mg/m ³	6	0.64 ± 0.05	0.32 ± 0.01	0.33 ± 0.02	3.44 ± 0.13	0.19 ± 0.02	0.70 ± 0.07	0.078 ± 0.002	0.97 ± 0.03
	380mg/m ³	6	0.62 ± 0.05	0.32 ± 0.02	0.32 ± 0.01	3.50 ± 0.13	0.18 ± 0.01	0.72 ± 0.04	0.017 ± 0.003	0.89 ± 0.06
	750mg/m ³	6	0.70 ± 0.07	0.34 ± 0.01	0.35 ± 0.03	3.39 ± 0.30	0.19 ± 0.04	0.79 ± 0.05	0.022 ± 0.004	1.04 ± 0.10
	750mg/m ³ (附加组) Additional group	6	0.57 ± 0.03	0.33 ± 0.04	0.32 ± 0.03	3.38 ± 0.34	0.19 ± 0.02	0.70 ± 0.03	0.017 ± 0.001	0.77 ± 0.03

注:与溶剂对照组相比, * P < 0.05。

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

2.4 血常规测定

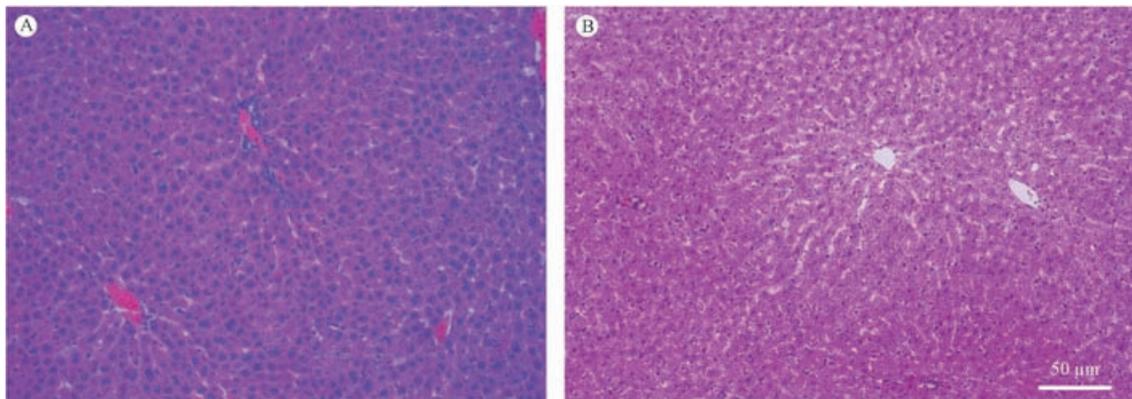
血常规测定显示染毒结束 190 mg/m³ 剂量组雄鼠 RBC 和 HGB 水平高于溶剂对照组 ($P < 0.05$), 但与空白对照组相比差异无显著性, 且在本实验室检测值正常范围内, 故无临床意义; 雌鼠的血液学指标均未见异常改变。

2.5 尿常规测定

尿常规检测结果显示各剂量组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.6 脏器系数和病理学检查

染毒结束时, 动物大体解剖显示, 190 mg/m³ 剂量组 1 例雄鼠右肾缺如, 左肾大, 其余均未见肿瘤及其它肉眼可见的病变。脏器系数结果表明, 750 mg/m³ 剂量组雌鼠肝脏脏器系数高于溶剂对照组雌鼠, 有显著性差异 ($P < 0.05$) (表 3)。病理组织学检查发现, 750 mg/m³ 剂量组部分雌鼠肝脏出现肝细胞混浊肿胀现象 (图 1)。其它动物受检脏器均未见有意义的组织病理学改变。



注: A. 溶剂对照组雌性大鼠肝脏, 无异常; B. 750mg/m³ 剂量组雌性大鼠肝脏, 肝细胞混浊肿胀。

图 1 伊维菌素引起高剂量组雌性大鼠肝脏混浊肿胀 (HE × 10)

Note: A. In the solvent control group, there was no abnormal liver in the female rat;

B. In the high dose group of 750mg/m³, Hepatic cell cloudy swelling was observed in the female rat.

Fig. 1 Ivermectin caused by high dose group of female rat liver cloudy swelling (HE × 10)

3 讨论

伊维菌素的作用机制在于: 药物与虫体细胞上的特异性高、亲和力强的位点结合, 影响虫体细胞膜中的谷氨酸钠离子通道对氯离子的通透性, 进而引起抑制性神经递质 γ -氨基丁酸 (GABA) 的释放增加, GABA 作用于突触前的神经末梢, 减少兴奋性递质的释放, 使突触后膜产生兴奋性突触后电位减少, 突触后神经元因膜电位的去极化程度达不到阈值而不能进入兴奋状态, 从而引起抑制而使虫体麻痹、死亡^[3-7]。此次实验研究我们对大鼠进行反复吸入伊维菌素原药 28 d 后, 发现: 在 750 mg/m³ 剂量组, 雌雄大鼠在染毒后期出现被毛蓬松、呆滞、流涎、震颤等中毒反应, 雌鼠食物利用率下降、血液 ALT 水平与肝脏体比升高, 且病理组织学检查发现部分大鼠肝细胞混浊肿胀现象; 雄鼠血液 ALT 和 BUN 水平升高, 第 4 周体重和 CHOL 水平下降。在 750 mg/m³ 以下剂量组动物均未发现有意义的改变。附加组 (750 mg/m³) 动物在停止染毒后 14 d 观察期内体重、食物利用率以及血生化水平等指标均

恢复正常。在本试验条件下, 伊维菌素原药对大鼠亚急性吸入毒性试验的最大无作用剂量雌、雄性均为 380 mg/m³ (4 h/d)。在反复吸入 750 mg/m³ 伊维菌素后, 雌雄大鼠血液 ALT 水平上升, 雄鼠 BUN 水平上升, 雌鼠肝脏体比升高, 且病理检查肝脏有肝细胞混浊肿胀现象, 因此初步判断肝脏可能是伊维菌素作用靶器官。本试验结果为安全评价伊维菌素原药的亚急性吸入毒性提供了有价值的毒理学资料, 并为慢性毒性试验剂量设计提供良好参考。

有文献报道^[6], 伊维菌素的药动学显示, 给药途径 (经口或皮下注射)、动物种类对趋杀体内外寄生虫的疗效没有影响, 均吸收迅速, 分布广泛, 对动物经口服用 (犬、猪) 或皮下注射 (牛、羊), 生物利用度均可达 95%。伊维菌素原药对大鼠急性经口 LD₅₀ (mg/kg): 雄 11.6, 雌 24.6 - 41.6^[7], 按 GB15670 - 1995^[1] 判定, 伊维菌素属高毒。而我们测得伊维菌素原药对大鼠急性吸入 LC₅₀ (吸入 4 h) 为 3690 (2710 - 5010) mg/m³, 属低毒。还有文献报

(上转第 69 页)



H-1 细小病毒抗体 ELISA 检测方法的建立与应用

付 瑞, 李晓波, 王淑菁, 王 吉, 卫 礼, 巩 薇, 岳秉飞, 贺争鸣

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

【摘要】 目的 建立 H-1 细小病毒抗体的 ELISA 检测方法, 并进行初步应用。方法 采用大鼠神经胶质瘤细胞 C6 培养大鼠 H-1 细小病毒, 制备包被抗原, 采用纯化后抗原建立该病毒的 ELISA 检测方法; 将建立的方法与国外同类试剂盒进行比对, 考察该方法的特异性和灵敏度。同时, 应用该方法对 35 份大鼠血清进行检测。结果 所建立的方法可检测出稀释 1280 倍的阳性血清; 与犬细小病毒、小鼠微小病毒和猪细小病毒阳性血清均无交叉反应; 与大鼠细小 KRV 病毒有交叉反应; 对 35 份大鼠血清进行检测, 结果均为阴性, 与国外同类试剂盒结果一致。结论 所建立的 H-1 细小病毒 ELISA 检测方法具有良好的种属特异性和灵敏度, 可用于大鼠血清中 H-1 细小病毒抗体检测。

【关键词】 H-1 细小病毒; ELISA; 抗体检测

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0075-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 03. 015

Establishment and application of ELISA method for H-1 parvovirus

FU Rui, LI Xiao-bo, WANG Shu-jing, WANG Ji, WEI Li, GONG Wei, YUE Bing-fei, HE Zheng-ming

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To establish ELISA method for H-1 parvovirus, and to apply it in detection. **Method** Cultured the H-1 parvovirus in rat glioma cell line C6, prepared the viral antigen for coating. Used the purified viral antigen to establish the ELISA method, and compared the ELISA method with the ELISA kit from XpressBio company. Then applied the ELISA method in detection of 35 rat serums. **Results** The positive serum which be diluted to 1280 can be detected by the ELISA method, there have not cross reaction with positive serum of CPV, MVM and PPV, but there has cross reaction with KRV. 35 pieces of rat serums were detected by the ELISA method, they were all negative, the results were consistent with the kit from XpressBio company. **Conclusions** The sensitivity and species specificity of the ELISA method for H-1 parvovirus were suitable, the method can be used in detection of H-1 parvovirus in rat serum.

【Key words】 H-1 parvovirus; ELISA; Detection of antibody

大鼠细小病毒(Rat parvovirus, RPV)是对实验大鼠危害最为严重的病毒之一。成年大鼠感染多无临床症状,免疫抑制等因素可激发本病。RPV还可污染肿瘤移植物和细胞系,对实验研究产生严重

干扰^[1]。Toolan^[2]从经大鼠传代的人肿瘤细胞系(HEP-1)分离到第2株大鼠细小病毒,通常称为H-1细小病毒,又称Toolan病毒。H-1细小病毒属于细小病毒科,其天然宿主为大鼠,病毒粒子直径为

【基金项目】 国家科技支撑计划“实验用动物病原分子生物学快速检测新技术研究与应用”(2015BAI07B02)。

【作者简介】 付瑞(1978-),男,副研究员,研究方向:实验动物病毒学,Email: furui78@126.com。

【通讯作者】 贺争鸣(1957-),男,研究员,研究方向:实验动物微生物学,Email: zhengminghe57@163.com。

20 ~ 25 nm, 为无囊膜单链 DNA 病毒, 其核酸约为 5100 nt^[3]。

我国实验动物国家标准(GB 14922. 2-2011)规定大鼠细小病毒 KRV 和 H-1 株为 SPF 实验大鼠病毒的必检项目。本研究采用可传代的大鼠神经胶质瘤细胞 C6 培养 H-1 细小病毒^[4], 从而建立了 H-1 细小病毒抗体的 ELISA 检测方法。

1 材料和方法

1.1 毒株和细胞

H-1 细小病毒购自美国标准培养物保存中心(ATCC, VR-356), 大鼠神经胶质瘤细胞 C6 中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 其它试剂及样品

商品化 H-1 ELISA 抗体检测试剂盒购自美国 XpressBio 公司; 猪细小病毒、小鼠微小病毒和犬细小病毒阴阳对照血清均为科室制备保存; 山羊抗大鼠 IgG-HRP、山羊抗小鼠 IgG-HRP、山羊抗猪 IgG-HRP 和山羊抗犬 IgG-HRP 均购自 KPL 公司; DMEM 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司; 35 份清洁级与 SPF 级大鼠血清样本来自北京地区实验动物监督检查收集样品。

1.3 病毒培养

将 C6 细胞按照 6×10^4 个/mL 的浓度接种于细胞培养瓶, 采用含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养及培养 6 h 后将 H-1 病毒液以 0.02 MOI 的比例加入培养瓶中。置含有 5% 二氧化碳的 37℃ 培养箱中培养 36 h, 待细胞长满单层后, 弃去瓶中培养液, 加入等体积的含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 继续培养 36 h, 完全病变的病毒冻存于 -70℃ 保存。

1.4 病毒滴定

将 C6 细胞按照 6×10^4 个/mL 的浓度接种于 96 孔细胞培养板, 培养 6 h 后将 H-1 病毒液以 10^{-1} ~ 10^{-11} 作系列倍比稀释, 依次加入培养有 C6 细胞的 96 孔细胞培养板(1 ~ 11 列), 每个稀释度接种 1 列(8 孔), 第 12 列不加病毒, 作为细胞对照。置含有 5% 二氧化碳的 37℃ 培养箱中观察 10 d, 记录结果。

1.5 抗原的制备及纯化

正常抗原: C6 细胞按照 6×10^4 个/mL 的浓度接种于细胞培养瓶, 待长满单层后, 用 10% ATV 常规法消化, PBS 洗涤, 1000 r/min 离心 10 min, 沉淀溶于适量 PBS 冻融 3 次后, 超声破碎, 10000 r/min

离心 30 min, 取上清, 测定蛋白含量。分装后作为正常抗原冻存于 -70℃ 备用。

特异抗原: 收获 H-1 病毒, 于 4℃, 10000 r/min 离心 1 h, 取上清于 4℃, 40000 r/min 离心 3 h, 收集沉淀于适量 PBS 中。超声破碎后, 再经 20% 蔗糖离心, 采用紫外分光光度法测定抗原蛋白含量。分装后作为正常抗原冻存于 -70℃ 备用。

1.6 毒种的 PCR 鉴定

常规方法提取病毒 DNA, 进行 PCR 扩增, 琼脂糖电泳后应能观察到 183 bp 的可见目的条带。PCR 产物送测序, 测序结果与 NCBI 核酸数据库比对。

1.7 判断标准的确定

依据实验动物国家标准选择 OD₄₉₀ 来读取吸光度。在阴、阳对照血清成立的情况下, 待检血清特异抗原孔 A 值 ≥ 0.2 、待检血清特异抗原孔 A 值/阴性对照特异抗原孔 A 值(P/N 值) ≥ 2.1 , 判为阳性。

1.8 正常抗原与特异抗原、酶结合物最佳工作浓度的确定

将阳性血清、阴性血清、包被抗原、HRP 标记的山羊抗大鼠 IgG 进行系列倍比稀释, 根据方阵滴定法确定试验的最适工作条件。

1.9 精密性测定

取阴性血清与阳性血清各一份, 1:40 稀释后, 各用一块纯化后 H-1 细小病毒包被的 96 孔板测定。得到的结果分别计算平均值及标准差, 计算板内变异系数(CV)。

1.10 特异性测定

用已建立的 ELISA 法和 XpressBio 公司检测试剂盒分别检测大鼠细小 KRV 病毒、小鼠微小病毒(MVM)、犬细小病毒(CPV)和猪细小病毒(PPV)阴、阳性血清, 同时设 H-1 病毒标准阴、阳性血清对照。

1.11 重复性测定

取纯化后 H-1 抗原包被的 96 孔板, 分别对 20 份血清(其中阴性血清 15 份, 阳性血清 5 份)重复测定三次, 计算结果的符合率。

1.12 稳定性测定

用纯化后 H-1 抗原包被 96 孔 ELISA 板 11 块, 其中一块保存于 4℃, 其余 10 块置于 37℃, 分别于第 1-10 天每天取出一块放 4℃ 保存, 同时检测同一批 15 份阴性血清和 5 份阳性血清。

1.13 敏感性测定

将 H-1 阳性对照血清 1:40 至 1:2560 系列稀释后,用所建立的 ELISA 方法检测,以确定所建立方法的敏感性。

1.14 与商品化试剂盒的比较

用购自 XpressBio 公司的 Toolan's H-1 Virus Rat 检测试剂盒与本研究所建立的 ELISA 方法同时检测 20 份大鼠血清(其中 15 份阴性血清,5 份阳性血清),对所建立的 ELISA 检测方法进行验证。

1.15 H-1ELISA 抗体检测方法的应用

用所建立的方法检测来自北京地区实验动物监督检验的 35 份大鼠血清。

2 结果

2.1 病毒培养结果

病毒经 C6 细胞培养 72 h 后完全病变,正常细胞对照与病变细胞结果见图 1 与图 2。



图 1 正常 C6 细胞培养 72 h 后
Fig.1 C6 cell was cultured 72 h



图 2 H-1 培养 72 h 后
Fig.2 H-1 virus was cultured 72 h

2.2 病毒滴定结果

采用 C6 细胞 96 孔细胞病变法对 H-1 细小病毒进行滴定,重复测定二次滴定结果按照 Karber 法计

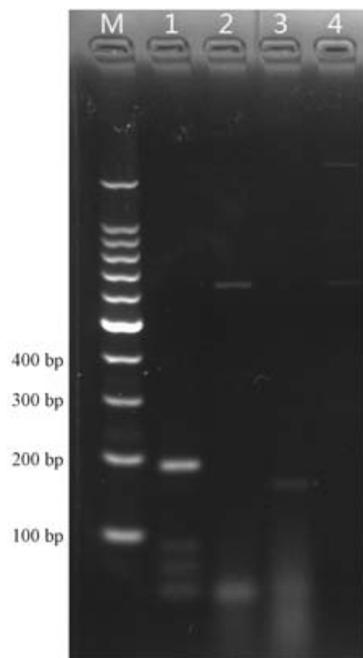
算。(Karber 法是计算病毒感染力的一种方法,其公式为: $LgTCID_{50} = L-d(S-0.5)$ 其中: L = 最高稀释度的对数; d = 稀释对数之间的差; s = 阳性孔比率总和),H-1 细小病毒滴度为 $6.5 LgTCID_{50}/0.1 mL$ 。

2.3 抗原的制备和纯化

分别制备和纯化 C6 细胞和 H-1 细小病毒作为正常抗原和特异抗原,采用分光光度法测定正常抗原和特异抗原的浓度,其中 C6 细胞正常抗原浓度为 $0.509 mg/mL$;H-1 细小病毒特异抗原浓度为 $6.597 mg/mL$ 。

2.4 毒种的 PCR 鉴定

用建立的 PCR 方法分别扩增 H-1、KRV、小鼠微小病毒(MVM)、猪细小病毒(PPV),结果显示,在以 H-1 为模板时出现 183 bp 的单一目的条带,以 KRV、小鼠微小病毒(MVM)、猪细小病毒(PPV)为模板时无目的条带出现(图 3)。



注:M:100 bp marker;1:H-1 病毒;2:KRV 病毒;
3:小鼠微小病毒;4:猪细小病毒。

图 3 H-1 细小病毒株 PCR 特异性结果

Note:M:100 bp marker;1:H-1; 2:KRV; 3:MVM; 4:PPV.

Fig.3 Specificity of H-1 Virus PCR

以 H-1 DNA 为模板,能扩增到 183 bp 的可见目的条带,PCR 产物送生工测序,测序结果与 NCBI 核酸数据库比对,与 H-1 细小病毒同源性达到 97%。

2.5 最佳工作条件确定

采用棋盘滴定法确定 H-1 细小病毒 ELISA 方法中正常抗原、特异抗原及 HRP 标记山羊抗大鼠

IgG 最佳工作浓度,其中正常抗原工作浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,特异抗原工作浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,HRP 标记山羊抗大鼠 IgG 工作稀释度为 1:10000。

2.6 精密性测定

取阴性血清与阳性血清各一份,1:40 稀释后,各用一块纯化后 H-1 细小病毒包被的 96 孔板测定。得到的结果分别计算平均值及标准差,计算板内变异系数(CV),经计算,阴性血清与阳性血清 CV 值均小于 15% (表 1)。

表 1 H-1 细小病毒 ELISA 方法精密性检测

Tab.1 The precision of ELISA method for H-1 parvovirus

	阴性血清 (Negative serum)	阳性血清 (Positive serum)
平均值 (Mean)	0.0738	1.826
标准差 (standard deviation)	0.0074	0.201
$X \pm 2SD$	0.0738 ± 0.0074	1.826 ± 0.201
板内变异系数 (Coefficient of variation)	10.04%	11.0%

2.7 特异性测定

用已建立的 ELISA 法和 XpressBio 公司的 H-1 检测试剂盒分别检测大鼠细小 KRV 病毒、小鼠微小病毒 (MVM)、犬细小病毒 (CPV) 和猪细小病毒 (PPV) 阴、阳性血清,同时设 H-1 病毒标准阴、阳性血清对照。结果显示 H-1 细小病毒和 KRV 病毒阳性血清检测为阳性,其余病毒阴性及阳性血清检测均为阴性,所建立的 H-1 细小病毒 ELISA 方法有良好的种属特异性(表 2)。

表 2 H-1 细小病毒 ELISA 方法特异性试验结果

Tab.2 The specificity of ELISA method for H-1 parvovirus

阴、阳对照血清 (Negative and positive control serum)	H-1MVMCPVPPV						KRV			
	N/C	P/C	N/C	P/C	N/C	P/C	N/C	P/C	N/C	P/C
正抗 OD ₄₉₀ (C6 antigen)	0.076	0.069	0.039	0.023	0.041	0.052	0.057	0.043	0.052	0.009
特抗 OD ₄₉₀ (Viral antigen)	0.106	1.768	0.051	0.067	0.049	0.074	0.069	0.097	0.093	0.897

表 3 H-1 细小病毒 ELISA 方法重复性检测

Tab.3 Repeatability of ELISA method for H-1 parvovirus

	阴性血清 (Negative serum)			阳性血清 (Positive serum)		
	1	2	3	1	2	3
血清份数 (Serums numbers)	15	15	15	5	5	5
符合份数 (Coincidence numbers)	15	15	15	5	5	5
百分率 (%) (percentage)	100	100	100	100	100	100

2.8 检测方法重复性测定

将 15 份阴性血清和 5 份阳性血清 1:40 稀释后,重复测定三次,经计算分析三次测定的总符合率为 100%。三次测定阴性血清与阳性血清各自的符合率见表 3。

2.9 检测方法稳定性测定

37℃ 放置 0~10 d 的 H-1 细小病毒包被 11 块抗原包被板,同时检测阳性血清 5 份,阴性血清 15 份。比较检测结果的 P/N 值(表 4)。其中阴性血清 P/N 值均小于 2.1,阳性血清 P/N 值均大于 2.1,符合判断标准。

2.10 检测方法敏感性测定

用所建立的 ELISA 方法检测经倍比稀释的阳性血清,以确定该方法的敏感性(表 5)。经检测,阳性血清进行 1280 倍稀释后 P/N 值仍大于 2.1,该方法敏感性为 1:1280。

2.11 与商品化试剂盒的比较

用所建立的 H-1 细小病毒 ELISA 检测方法 with XpressBio 公司的 H-1 ELISA 检测试剂盒同时对 15 份阴性血清和 5 份阳性血清进行检测,检测结果显示所建立的方法与商品化试剂盒的符合率为 100% (表 6)。

2.12 H-1 细小病毒 ELISA 检测方法的初步应用

采用建立的 H-1 细小病毒 ELISA 检测方法检测 XpressBio 公司 H-1 试剂盒检测为阴性的大鼠血清 35 份,经检测均为阴性。

表 4 H-1 细小病毒 ELISA 方法稳定性检测
Tab. 4 Stability of ELISA method for H-1 parvovirus

血清编号 (Numbers of serum)	37℃ 放置时间(d) (The period of 37℃)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.89	0.73	0.91	1.01	0.66	0.82	0.96	0.59	0.77	0.41	0.55
2	0.73	0.74	0.88	0.81	0.56	0.65	0.91	0.59	0.83	0.48	0.64
3	0.83	0.74	0.96	0.78	0.60	0.72	0.99	0.64	0.97	0.46	0.59
4	0.69	0.62	0.75	0.49	0.50	0.48	0.72	0.47	0.84	0.42	0.62
5	1.07	0.99	1.21	1.15	0.78	0.97	1.22	0.83	1.27	0.61	0.78
6	1.20	1.08	1.33	1.36	0.84	1.12	1.38	0.77	1.33	0.71	0.88
7	0.93	0.74	1.21	1.02	0.62	0.74	1.06	0.55	0.89	0.54	0.69
8	0.46	0.67	0.61	0.69	0.34	0.47	0.71	0.47	0.50	0.35	0.34
9	0.86	0.73	0.97	0.85	0.71	0.93	0.91	0.67	0.86	0.47	0.60
10	0.84	0.66	0.94	1.02	0.66	0.83	1.09	0.72	0.84	0.42	0.58
11	0.96	0.71	1.12	1.05	0.81	1.03	1.18	0.76	0.96	0.46	0.69
12	0.79	0.70	1.03	0.81	0.61	0.77	1.32	0.68	0.79	0.45	0.64
13	1.24	1.01	1.48	1.34	0.91	1.18	1.65	1.05	1.24	0.65	0.92
14	1.17	1.07	1.60	1.28	0.94	1.15	1.51	0.94	1.17	0.69	0.99
15	0.97	0.96	1.12	1.23	0.71	0.99	1.10	0.66	0.97	0.62	0.69
16	21.79	20.30	20.39	16.57	13.17	14.26	19.37	13.78	20.80	13.88	12.59
17	22.19	19.08	20.18	16.05	13.44	14.03	19.31	12.45	18.66	13.40	12.42
18	18.43	18.82	18.93	15.78	13.40	14.05	21.88	12.70	13.14	12.27	11.92
19	16.33	20.84	19.25	15.81	12.17	13.96	21.10	12.49	10.79	12.24	11.80
20	20.46	19.16	18.48	15.70	14.88	13.04	21.57	12.30	7.30	11.97	12.07

表 5 H-1 细小病毒 ELISA 方法敏感性测定
Tab. 5 Sensitivity of ELISA method for H-1 parvovirus

	阳性血清稀释度(Dilution of positive serum)						
	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560
OD 值 (OD value)	1.973	1.666	1.231	1.135	0.958	0.438	0.149
P/N 值 (P/N value)	28.19	23.80	17.59	16.21	13.69	6.00	1.66

表 6 两种 ELISA 检测试剂结果比较
Tab. 6 Comparison of two kinds of ELISA methods

样品编号 (Number of samples)	预期结果 (Predict results)	H-1 细小病毒 ELISA 方法 (ELISA for H-1 parvovirus)			XpressBio 公司 ELISA 方法 (ELISA of XpressBio company)		
		OD 值 (OD value)	P/N 值 (P/N value)	检测结果 (results)	OD 值 (OD value)	P/N 值 (P/N value)	检测结果 (results)
1	阴性	0.110	1.57	阴性	0.148	1.40	阴性
2	阴性	0.079	1.13	阴性	0.136	1.28	阴性
3	阴性	0.053	0.76	阴性	0.126	1.19	阴性
4	阴性	0.070	1.00	阴性	0.142	1.34	阴性
5	阴性	0.067	0.96	阴性	0.144	1.36	阴性
6	阴性	0.057	0.81	阴性	0.122	1.15	阴性
7	阴性	0.076	1.09	阴性	0.122	1.15	阴性
8	阴性	0.077	1.10	阴性	0.113	1.07	阴性
9	阴性	0.080	1.14	阴性	0.093	0.88	阴性
10	阴性	0.053	0.76	阴性	0.117	1.10	阴性
11	阴性	0.053	0.76	阴性	0.136	1.28	阴性
12	阴性	0.052	0.74	阴性	0.116	1.09	阴性
13	阴性	0.059	0.84	阴性	0.092	0.87	阴性
14	阴性	0.048	0.69	阴性	0.111	1.05	阴性
15	阴性	0.050	0.71	阴性	0.119	1.12	阴性
16	阳性	1.525	16.94	阳性	1.456	19.95	阳性
17	阳性	1.553	17.26	阳性	1.306	17.89	阳性
18	阳性	1.290	14.33	阳性	0.920	12.60	阳性
19	阳性	1.143	12.70	阳性	0.755	10.34	阳性
20	阳性	1.432	15.91	阳性	0.511	7.00	阳性

3 讨论

GB/T 14926. 31 - 2001 中建议采用大鼠胚胎原代细胞(primary rat embryo cells, RE)培养 H-1 病毒。用 RE 细胞培养 H-1 病毒,费时、费力、易污染,并需要使用大量怀孕大鼠,在给 H-1 病毒的培养带来了诸多困难的同时也不符合动物福利的原则。刘先菊等^[4]报导可通过大鼠神经胶质瘤细胞 C6 可传代培养 H-1 细小病毒,为该病毒的大规模培养与制备提供了基础。

本研究首次建立了通过传代细胞培养 H-1 细小病毒的 ELISA 检测方法。采用大鼠脑胶质瘤细胞 C6 对 H-1 细小病毒进行培养,得到病毒滴度为 6.5LgTCID₅₀/0.1 mL 的病毒。该病毒经 PCR 方法验证为 H-1 细小病毒,与 NCBI 的序列进行比对,符合率为 97%。通过对获得的病毒进行超速离心和蔗糖梯度密度离心进行纯化,得到纯化的 H-1 细小病毒抗原,抗原浓度为 6.597 mg/mL。用该抗原作为包被抗原,建立 H-1 细小病毒的全病毒 ELISA 抗体检测方法。通过对方法的敏感性、稳定性、重复性、特异性和精确性进行验证,确定该方法可检测出大于 1:1280 稀释的阳性血清,37℃ 放置 10 d 不影响其检测效果。所建立的检测方法 with XpressBio 公司的 H-1 检测试剂盒均与犬细小病毒、猪细小病毒和小鼠细小病毒阳性血清间无交叉反

应,但两种方法均与大鼠细小病毒 KRV 有交叉反应,经 NCBI 比对, H-1 细小病毒与大鼠细小病毒 KRV 的序列同源性达到 90%,其中两种病毒非结构蛋白 NS-1 同源性为 99%,非结构蛋白 NS-2 同源性为 98%,结构蛋白 VP-1 同源性为 81%,结构蛋白 VP-2 同源性为 78%,通过序列比对说明 H-1 细小病毒和 KRV 细小病毒之间具有交叉抗原,需要针对两种病毒结构蛋白的差异分别建立检测方法来进行区分,有待进一步研究。

本方法的建立,可有效补充国家标准中 H-1 细小病毒检测方法,并可代替国外同类试剂盒对大鼠血清中 H-1 细小病毒抗体进行检测。

参考文献:

- [1] 田克恭. 实验动物病毒性疾病[M]. 北京: 农业出版社. 1992: 126 - 132.
- [2] 田克恭, 贺争鸣, 刘群, 等. 实验动物疫病学[M]. 北京: 中国农业出版社. 2014: 205.
- [3] Karsten Geletnek, Andreas D. Hartkopf, Robert Krempien, *et al.* Therapeutic implications of the enhanced short and long-term cytotoxicity of radiation treatment followed by oncolytic parvovirus H-1 infection in high-grade glioma cells [J]. *Bioengineered Bugs*, 2010, 1: 429 - 433.
- [4] 刘先菊, 佟巍, 张丽芳, 等. 大鼠细小病毒 H-1 株培养方法的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19: 495 - 498.

[修回日期]2015 - 11 - 08



提高大鼠子宫内膜异位症建模成功率的新方法

李龙卫,王艳云,陈琦,王亚萍,韩璐

(大连医科大学附属妇产医院暨大连市妇幼保健院,辽宁大连 116033)

【摘要】 目的 为子宫内膜异位症治疗新方法的研究提供理想的动物模型。方法 取64只性成熟、未孕、动情周期规律的SD大鼠,于动情期在腹膜、皮下利用“刀划法”行自体子宫内膜移植,术后4周比较两移植部位建模情况。结果 大鼠动情期自体子宫内膜移植总体成功率为93.3%,其中腹膜移植成功率为51.7%,皮下移植成功率为88.3%,两者比较差异有统计学意义;比较两部位异位病灶的体积,差异无统计学意义。结论 利用“刀划法”建立大鼠子宫内膜异位症模型成功率较高,皮下移植比腹膜移植成功率高。

【关键词】 子宫内膜异位症;模型;动物;动情期;啮齿

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0081-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.03.016

A new method for improving the success rate of the establishment of endometriosis models in rats

LI Long-wei, WANG Yan-yun, CHEN Qi, WANG Ya-ping, HAN Lu

(The Maternity Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian Maternal and Child Health Hospital, Liaoning Dalian 116033, China)

【Abstract】 Objective To provide ideal endometriosis animal models for research new treatment methods. **Methods** 64 Sexual mature without pregnant SD rats who has regular oestrous cycle were underwent operation that autologous endometrium were transplanted to peritoneum and subcutaneous with lancet gently cut tissue of where to transplant in the rut, and compared the model of peritoneum and subcutaneous after 4 weeks. **Results** The general success rate of autologous endometrium transplantation in rat estrus was 93.3%, and the peritoneum transplantation success rate was 51.7%, subcutaneous was 88.3%, the difference of the two place transplantation has statistical significance. Compare the two parts of volume of endometriosis, there was no statistically significant difference. **Conclusion** Using the lancet to establish the endometriosis model has a high success rate, and subcutaneous model is better than peritoneum.

【Key words】 Endometriosis; Model, animal; Estrus; Rodentia

子宫内膜异位症是女性常见良性疾病,近年来发病率呈明显上升趋势,因其在临床行为学上具有类似恶性肿瘤的种植、侵袭、远处转移等特点,影响育龄女性的心理健康及生活质量^[1],使得内异症成

为妇科研究领域的热点课题之一,减少内异症复发的新药也不断研发中,而良好的子宫内膜异位症模型有助于新的治疗方法的研究。因此,此研究旨在探索一种操作简单、成功率高且无人干扰动物激

[作者简介]李龙卫(1987-),女,住院医师,硕士,妇产科,E-mail: longwei198787@163.com。

[通讯作者]韩璐,女,教授,硕士生导师,E-mail: 13940801858@163.com。

素水平的子宫内膜异位症模型的建立方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

性成熟未交配清洁级 SD 雌性大鼠 65 只,鼠龄 60 ± 5 d,体重 200 ± 25 g,来源于大连医科大学实验动物中心【SCXK(辽)2013-0003】。标准光照周期(14 h 光照、10 h 黑夜)、室内温度($20 \pm 2^\circ\text{C}$)、湿度 40%~60%、标准饲料和水。无菌手术在大连医科大学动物实验室进行实验进行【SYXK(辽)2013-0006】。

1.2 器械及药品

普通眼科手术器械,电子游标卡尺,5% 水合氯醛,硫酸庆大霉素注射液,硫酸阿托品注射液,生理盐水,医用酒精,载玻片,复合碘消毒棉签及碘伏棉球,无菌敷料包,强生 4-0 可吸收缝线及华利康 4# 和 7# 丝线。

1.3 子宫内膜异位症模型的建立

每日晨 8:00 做阴道分泌物涂片检查,65 只大鼠中,动情周期规律的有 64 只,约为 3~5 d;动情周期不规律的有 1 只。于动情期分别进行手术。手术室室温 25°C ,电子消毒灭菌器行空气消毒。

手术当日,欲行手术的大鼠禁食水,术前称重,5% 水合氯醛按照 7 mL/kg 的用量腹腔内注射麻醉。麻醉成功后,于手术准备区腹部用备皮刀备皮,仰卧位固定大鼠四肢于手术台上,碘伏棉球消毒两次,铺无菌巾,于尿道口上 1 cm 沿腹正中线做 2~3 cm 纵切口,逐层入腹。探及左侧子宫,上距卵巢约 1 cm,下至子宫分叉处以上,结扎剪取约 2~2.5 cm 子宫,沿系膜纵行剖开,自一角用无齿镊钳夹子宫内膜,齿镊钳夹子宫浆膜层,“撕脱法”分离子宫内膜并残留少许肌层组织。将内膜剪成约 $5 \times 5\text{ mm}$ 的小段,临时置于腹腔内。腹膜移植:翻开一侧腹膜,寻找远离切口且有血管分支走行处用柳叶刀轻轻划毛腹膜,取小段的子宫内膜,将内膜面向腹膜,4-0 可吸收线固定四角(不宜形成张力),同法处理另一侧。皮下移植:锐性沿大鼠皮肤与肌层间隙分离出狭长“隧道”,亦找血管分支走行处用柳叶刀轻轻划毛肌层一侧,将内膜段的内膜面向肌层展平,无需缝合,同法处理对侧。腹腔内留置 0.4 mL(1.6 万单位)庆大霉素后分两层关腹。用碘伏将切口周围血渍擦净,切口包扎,单独置于干净饲养笼中,于婴儿抢救床保温直至苏醒。

术后第一日查看有无排便,予食水,肌注庆大霉素 0.1 mL/d 连续 3 d,若有嗝咬缝线导致皮肤缝合口裂开,可每日碘伏棉签消毒切口,并适当延长抗生素用药时间。

建模成功的评定标准:(1)建模成功肉眼观察标准:见到原部位移植物形成透明、半透明囊肿或紫蓝色结节;(2)镜下病理检查诊断标准:移植物已生长成一个或数个腔样结构,腔内面的上皮、固有膜及固有膜的基质细胞、腺体样结构与在位子宫内膜相似,腔内可有分泌物和炎细胞存在,可见泡沫细胞反应,陈旧性出血,内膜上皮及上皮下可见少量含铁血黄素颗粒状沉积。腹膜移植有一处成模即算为成功,皮下移植亦如此。

1.4 观察指标

建模后第 4 周再次开腹手术,观察腹膜移植及皮下移植的成模情况;电子游标卡尺测量子宫内膜异位病灶的长、宽和高,并计算其体积(V)= $0.52 \times \text{长} \times \text{宽} \times \text{高}^{[2-3]}$;比较腹膜及皮下的建模成功率和病灶体积大小有无差异。

1.5 统计学处理

数据采用 SPSS13.0 统计软件进行处理,计数资料用 χ^2 检验(1/5 以上格子的期望频数小于 5,改用 Fisher 确切概率检验),计量资料进行对数转换,满足正态分布后使用方差分析,以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠存活及成模情况

64 只建模大鼠,有 3 只因麻醉导致呼吸道分泌物过多,手术当日窒息死亡;1 只术后第 5 天,因咬断皮肤缝线,于麻醉缝合后死亡。存活 60 只大鼠,4 周后再次剖腹探查。

成活异位病灶多呈椭球状或半球状,少数为不规则肾形或三角形,表面有血管生成,直径 2~8.7 mm 不等,质地软,囊内有透明液体或紫蓝色液体,腹膜病灶表面多与大网膜或肠管粘连(图 1D),总体建模成功率为 93.3% (56/60)。

组织学观察可见:异位病灶与子宫内膜结构基本一致,但间质层偏薄,腺体少,囊泡外周可见少量肌层组织残留(图 2B、C)。紫蓝色结节(图 1C)经组织学证实为异位病灶,腔内含中性粒细胞和泡沫细胞。可能与建模时刀划出血有关。

将咬断缝线再次麻醉缝合后死亡的大鼠解剖

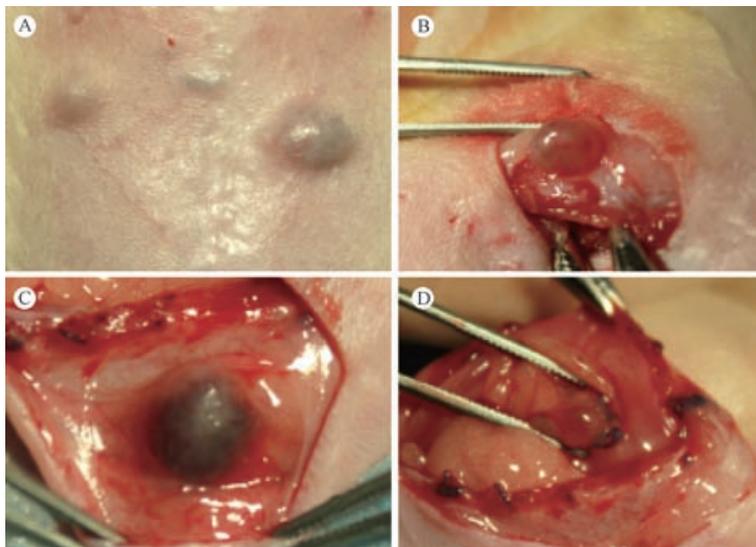
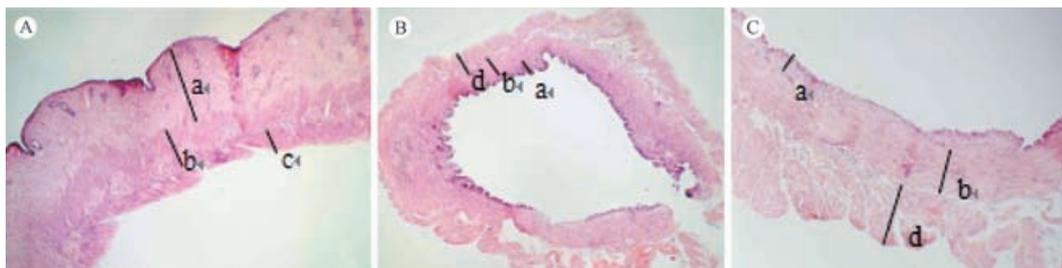


图 1 子宫内膜异位症病灶

Fig. 1 Endometriosis lesions



注:A. 子宫剖面图(×4);B. 子宫内膜异位灶剖面图(×4);C. 子宫内膜异位灶剖面图(×10);a. 子宫内膜层;b. 肌层;c. 浆膜层;d. 增生组织。

图 2 大鼠子宫及子宫内膜异位症病灶 HE 染色切片

Note: A. Uterine section, ×4; B. Endometriosis lesions section, ×4; C. Endometriosis lesions section, ×10; a. Endometrium; b. Myometrium; c. Serosa; d. Hyperplasia tissue.

Fig. 2 Rat uterus and Endometriosis lesions HE staining

表 1 建模大鼠腹膜移植与皮下移植成功率比较(%)

Tab. 1 The comparison of success rate between peritoneal transplantation and subcutaneous transplantation in rats(%)

移植部位 Transplantation site	改进前 Before improvement (n = 15)	改进后 After improvement (n = 45)	总体 Total (n = 60)
腹膜成功率 Peritoneal success rate	20.0(3/15)	62.2(28/45)	51.7(31/60)
皮下成功率 Subcutaneous success rate	86.6(13/15)	88.9(40/45)	88.3(53/60)
χ^2 值	13.393	8.663	15.404
P 值	0.001	0.003	0.000

发现,皮下移植子宫内膜已基本成活,腹膜移植子宫内膜因缝合存在张力,未成活。此后的 45 只大鼠行建模手术时,移植到腹膜的子宫内膜均采用无张力缝合。

腹膜移植成功 31 例,成功率 51.7%(31/60);皮下移植成功 53 例,成功率 88.3%(53/60);两部

位建模成功率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$) (表 1)。

2.2 腹膜及皮下异位病灶体积比较

建模后第四周再次开腹,测量异位病灶体积,腹膜移植病灶的中位体积为 14.70(2.18,126.15) mm^3 ,皮下移植病灶的中位体积为 18.54(1.04,

249.02) mm³, 两部位病灶体积差异无统计学意义 ($P=0.609$)。

3 讨论

子宫内异位症是由子宫内膜组织(腺体和间质)在子宫体以外的部位生长、蔓延形成,以卵巢最为多见。1921 年 sampsons 首先提出异位种植学说,1984 年 Jone 等^[4-5]据此学说用动情期 SD 大鼠通过自体子宫内膜移植法建立内异症模型,亦有报道使用手术方法建立灵长类子宫内膜异位症动物模型,但由于此类动物费用昂贵、饲养要求高,使其应用受到限制。而大鼠自发性排卵、周期规律、费用较低,且大鼠子宫内膜异位症模型与人类子宫内膜异位症在组织学特点、炎症免疫等方面较相似,使其成为研究子宫内膜异位症治疗新方法的较理想动物模型^[6]。

文献报道的大鼠子宫内膜异位症建模成功率不尽相同,约 60%~90%,Do Amaral 等^[7]用自体移植法建立 Wistar 大鼠腹膜子宫内膜异位模型,移植时子宫内膜面向腹腔内缝合,术后 30 d (N1 = 15) 成膜率 83.3%, 术后 60 d (N2 = 15) 成膜率 71.4%, 两组病灶大小、数目差异无统计学意义。子宫内膜异位症为雌激素依赖性疾病,张颖等^[8]的研究术前术后均外源性给予雌激素,每日肌注雌二醇 0.1 mg/kg,建模成功率约为 90%。Pereira 等^[9]的研究显示建模时使用雌激素,可使异位病灶的湿重和干重显著增大。Ozer 等^[10]将 Wistar 大鼠带有肌层组织的子宫内膜缝合到血运较丰富的腹膜上,观察 14 d, EMs 造模成功率约为 89.6% (43/48), 整个建模过程未使用激素类药物。此次研究建模过程亦未使用雌激素,总体建模成功率为 93.3%。外源性雌激素的使用虽然可以简化大鼠建模过程,提高建模成功率,但动物内异症模型的建立,部分是用于研发新药的疗效的观察,给予外源性雌激素的建模并非正常生理状态,对于内异症治疗新方法的安全性评估是否会造成本文所述,目前尚没有相关报道。

卵巢型子宫内膜异位症可能发病机制之一为卵泡排出后卵巢的创面会有利于逆流的子宫内膜腺上皮和间质细胞种植,基于这一理论,本次子宫内膜异位模型的建立,首次采用“刀划法”,即选取腹膜及肌层表面有血管分支走行处,用柳叶刀轻轻划毛后再移植子宫内膜,术中操作注意刀划不宜过深,不能切断血管。其总体建模成功率为 93.3%,

在大鼠内异症建模已有报道的成功率中处于较高水平。

广泛粘连导致肠梗阻和感染是建模大鼠死亡的主要原因,哈春芳等^[11]实验中肠梗阻发生率为 10.81%,感染率为 29.72%。手术大鼠当日晨需禁食水,肠道空虚不仅易于手术操作,还可减少肠梗阻的发生,能有效减少大鼠死亡。手术器械消毒、术中无菌操作严格,可以减少盆腔脓肿的发生,减少大鼠死亡。术后拭净腹部切口周围的血迹,可以减少大鼠嗝咬缝线,术后 7 d 内一旦发现咬线现象,应每日消毒腹切口,并适当延长抗生素的使用,不建议再次麻醉缝合,以免大鼠不能耐受麻醉死亡。术时或术后苏醒期若发现大鼠眼部分泌物增多,呼吸时间闻及湿啰音,应及时给予 0.1 mg 硫酸阿托品肌肉注射,可有效减少腺体分泌,减少窒息死亡的发生;术后苏醒期应将大鼠置于恒温保暖处,也可在笼底铺加热垫。

已有文献报道中认为腹膜移植及皮下移植建模成功率差异无统计学意义^[12-13],但本研究中腹膜移植成功率明显低于皮下移植,差异有统计学意义。分析原因,可能与腹腔内免疫监视、免疫杀伤细胞对异位内膜的清除作用较皮下强有关。且皮下移植无需缝合固定,能缩短手术时间,减少缝线引起的排异反应,提高建模成功率。另皮下异位病灶位置表浅,便于观察,可不必二次开腹,通过触摸腹部便可判断建模是否成功,能有效减少动物死亡。在用药治疗子宫内膜异位症的过程中,便于每日观察病灶变化,判断用药效果。

综上所述,使用“刀划法”建立皮下子宫内膜异位症模型,比腹膜移植建模成功率高,且无需外源给予雌激素,便能达到与激素建模相当的成功率,是一种提高大鼠子宫内膜异位症建模成功率的新方法,能为探索子宫内膜异位症治疗新方案提供理想的动物模型。

参考文献:

- [1] Nnoaham KE, Hummelshoj L, Webster P, et al. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries[J]. *Fertil Steril*, 2011, 96(2): 366-373.
- [2] 宋淑芳,尹利荣,齐之迎. 来曲唑治疗大鼠子宫内膜异位症模型作用及机制的研究[J]. *现代妇产科进展*, 2011, 20(1): 35-38.
- [3] Zulfikaroglu E, Islimy M, Aydin M, et al. Efficacy of anti-tumor necrosis factor therapy on endometriosis in an experimental

- rat model[J]. Arch Gynecol Obstet, 2011, 283(4): 799 - 804.
- [4] Harirchian P, Gashaw I, Lipskind ST, *et al.* Lesion kinetics in a nonhuman primate model of endometriosis [J]. Hum Reprod, 2012, 27(8): 2341 - 2351.
- [5] Donnez O, Van Langendonck A, Defrere S, *et al.* Induction of endometriotic nodules in an experimental baboon model mimicking human deep nodular lesions[J]. Fertil Steril, 2013, 99(3): 783 - 789.
- [6] Greaves E, Cousins FL, Murray A, *et al.* A novel mouse model of endometriosis mimics human phenotype and reveals insights into the inflammatory contribution of shed endometrium[J]. Am J Pathol, 2014, 184(7): 1930 - 1939.
- [7] Do Amaral VF, Dal Lago EA, Kondo W, *et al.* Development of an experimental model of endometriosis in rats[J]. Rev Col Bras Cir, 2009, 36(3): 250 - 255.
- [8] 张颖, 曹洪, 张昌军, 等. 改良大鼠子宫内膜异位症模型的建立及微血管密度观察[J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(1): 56 - 58.
- [9] Pereira FE, Almeida PR, Dias BH, *et al.* Development of a subcutaneous endometriosis rat model [J]. Acta Cir Bras, 2015, 30(1): 6 - 12.
- [10] Ozer H, Boztosun A, Acmaz G, *et al.* The efficacy of bevacizumab, sorafenib, and retinoic acid on rat endometriosis model[J]. Reprod Sci, 2013, 20(1): 26 - 32.
- [11] 哈春芳, 肖成明, 张晟宁, 等. 开放法大鼠子宫内膜异位症模型的建立与评价[J]. 山东大学学报: 医学版, 2011, 49(1): 62 - 66.
- [12] 胡春萍, 王志刚, 季夏芸, 等. 大鼠子宫异位症模型建立方法的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(10): 44 - 46.
- [13] 彭艳, 何援利. 大鼠子宫内膜异位症动物模型建立方法的比较[J]. 重庆医学, 2012, 41(25): 2619 - 2620.

[修回日期] 2015 - 11 - 12



微核试验的改进

马宝良¹, 鲁克庆²

(1. 兰州大学第二医院泌尿外科研究所, 甘肃省泌尿系统疾病研究重点实验室, 兰州 730030;
2. 甘肃省泌尿系统疾病临床医学中心, 兰州 730030)

【摘要】 目的 将传统的骨髓采集方法与改良的方法进行比较, 明确两种方法在细胞数量、组织污染情况和涂片染色背景的差异, 为以后微核试验的应用提供参考。**方法** 将处死小鼠的胸骨取出, 一部分, 使用传统的骨髓采集方法, 将小鼠的骨髓挤压于含胎牛血清的载玻片上, 常规涂片; 另一部分, 用1 mL注射器抽取胎牛血清100 μ L刺入胸骨中, 将骨髓冲出, 涂环形薄片。**结果** 两种方法均能达到实验要求, 但是改良骨髓采集法, 采集的细胞数量更多, 组织污染细胞少, 制片背景更加清晰。**结论** 与传统的骨髓采集方法相比较, 改良的骨髓采集法更具优势, 使微核试验的细胞计数简易。

【关键词】 骨髓采集; 胎牛血清; 细胞; 小鼠

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0086-03

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 03. 017

Experience exchange in vitro micronucleus assay

MA Bao-liang¹, LU Ke-qing²

(1. Institute of Urology, Second Hospital, Lanzhou University, Gansu Provincial Key Laboratory of Urological Diseases, Lanzhou 730030, China; 2. Gansu Nephro-Urological Clinical Center, Lanzhou 730030, China)

【Abstract】 Objective To compare the conventional marrow collection with new marrow collection, in the number of cell, other tissues pollution and the background of the smear, providing the reference for future micronucleus test. **Methods** The mice was euthanasia and the sternums were taken. One group, using the conventional method of marrow collection, squeezing the marrow to the slide with fetal bovine serum; the other group, using 1-mL injector extracting fetal bovine serum 100 μ L, injecting into mice sternums and rushing out the bone marrow for circle smear. **Results** Two methods can meet the requirement of test, but the new marrow collection can acquire more number of cells, less the tissues pollution and more clear in the background of smear. **Conclusions** Comparing with the conventional marrow collection, the new method has more superiority to simplify the next cell counting.

【Key words】 Marrow collection; Fetal bovine serum; Cell; Mice

微核是存在于细胞核以外的异常染色体或染色体片段, 与细胞核的染色一致, 直径小于主核的1/3, 能够被光学显微镜观察。当外来有害因素(物理, 化学, 生物)作用于细胞后, 染色体发生断裂或

丢失, 细胞胞浆中出现一个或多个小核, 这些微核是检测遗传毒的一种重要的手段。微核试验是一种检测基因染色体断裂或丢失的一种基本的遗传学毒性试验, 它主要是应用于检测药物和化学物质

对基因的损伤,明确这些物质的遗传毒性,目前的微核试验已经应用于环境卫生、临床疾病和病毒的遗传毒性的检测^[1]。对于能够引起染色体断裂和有丝分裂紊乱的药物、射线、疾病均可以使用微核试验进行检测^[2],微核试验是最为公认的遗传毒性检测方法。

在药物临床前期的遗传毒性检测过程中,推荐使用的动物为啮齿类,以大小鼠最为常用^[3],以骨髓染色计数微核细胞数为公认的检测手段,但是小鼠的骨髓腔较细,无法直接抽取,因此骨髓的采集成为实验成败的关键性的一步。如采集的细胞存在较多的杂质或其他细胞如脂肪细胞,将会为后续的细胞计数增加难度,或是无法进行计数。目前推荐的两种方法,一种是胸骨^[4]取材,使用钳子将胸骨中的骨髓挤出骨髓腔,另为一种采集股骨的骨髓^[4-6],用 1 mL 的注射器吸胎牛血清将骨髓冲出,反复吹打过滤或离心制成悬液,涂片。但是两种采集制片方法均容易受到杂质和其他细胞的污染,对于操作者的要求较高。我们在进行微核试验的过程中,为了克服污染问题,探讨了一种新的骨髓采集方式,骨髓的采集部位为胸骨,使用 1 mL 的注射器改带 5 号钢化针头吸入胎牛血清后穿刺入骨髓腔中,冲出骨髓,涂环形薄片,显微镜下评估细胞数后,自然干燥,甲醇固定,Giemsa 染色。

1 材料和方法

1.1 动物

清洁级的昆明小鼠 12 只,体重 18 ~ 21 g,1.5 月龄,购于甘肃省中医药大学动物实验中心【SCXK(甘)2011-0006】,饲养于其屏障动物实验设施【SYXK(甘)2011-0002】。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。随机分成 A、B 两组,每组 6 只。A 组使用传统的方法采集骨髓;B 组采用改良的采集方法采集骨髓。

1.2 仪器和试剂

剪刀、镊子、止血钳、1 mL 注射器、钢化针头、胎牛血清、光学显微镜、载玻片、Giemsa 染液

1.3 方法

A 组:最后一次染毒后,在确定时间行 3% 戊巴比妥钠麻醉小鼠后,迅速剪取其胸骨,剔去肌肉,用干净纱布擦拭,剪去每节骨骺端,用小型弯止血钳挤出骨髓液,点在载玻片一端预先滴好的一滴胎牛血清中。混匀后推片。长度为 2 ~ 3 cm。

B 组:3% 戊巴比妥钠麻醉小鼠后,迅速剪去其胸骨,剔去肌肉。用微湿润或干燥的脱脂棉签擦拭,除去胸骨周围残留的肌肉组织,以上步骤均在滤纸上操作。用规格为 5 号钢化针头、1 mL 一次性无菌注射器吸取 100 μ L 的胎牛血清,在近剑突段剪去软骨段至显露骨髓处。从远软骨段的一侧骨骺端用 5 号针头垂直穿刺进入骨膜后水平继续穿刺至针头微外显,倒针至穿刺点 1/3 处,打出针内少量胎牛血清冲出腔内骨髓,点在洁净的载玻片上,用针头环形涂直径为 1 cm 的圆形薄片即可。对中间段胸骨,可剪去每节骨骺端,将针头直接从骨髓腔隙边穿刺边回抽骨髓,然后轻轻打出吸取的骨髓滴 1 小滴在载玻片上,用针头环形涂直径为 1 cm 的薄片即可。

1.4 染色:使用磷酸盐缓冲液,将 Giemsa 染液配成 10% 的应用液,染色 10 min。

2 结果

涂好的湿片可在显微镜下及时直接观察,分别在 $\times 20$ 、 $\times 40$ 物镜下看细胞分布及相对密度。以尿沉渣镜检细胞数的标准为参考^[7],将 $\times 20$ 物镜下细胞分布均匀,细胞数满视野(++++);在 $\times 40$ 物镜下细胞分布均匀,细胞数达 50 ~ 100 个/视野。染色后油镜下细胞数可达到 30 ~ 50 个/视野为制片合格。在油镜下按一定顺序进行 PCE 和微核计数。PCE 细胞呈灰蓝色、成熟红细胞呈橘黄色。微核多数为圆形,边缘整齐,嗜色性与核质一致,呈紫红色或蓝紫色。PCE 细胞中微核多为一个,也可有两个或以上微核,此时仍按有微核的 PCE 计算。

3 讨论

微核试验是细胞基因损伤检测的生物学标志之一^[8],小鼠骨髓微核实验是最常用的微核实验。美国食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA),欧洲药监局(European medicines agency, EMA)等部门均要求:基因毒性的检测为药物安全性评估的必须一部分^[9]。在过去的几十年里,此实验被广泛应用于药品、食品等的遗传毒性的检测,以及环境污染的检测、临床疾病的诊断等。但是如何获取满意的骨髓涂片,进行有效的细胞计数,仍有一定的困难。

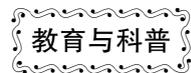
我们采用穿刺取骨髓细胞和挤压取骨髓细胞,

都能获得满意的细胞数。但挤压后点滴采集的骨髓,虽然方法相对容易和迅速获得骨髓细胞,但因挤压过程中在胸骨上残留很少的组织细胞等也会一起被点滴收集,有一定的组织污染,增加额外的细胞背景。穿刺法或抽吸骨髓法可很好地减少污染,相对显示好的细胞染色背景。另我们借鉴血液制片厚滴法^[7]和细菌涂片技术中菌落制片方法^[10],采取环形涂直径为 1 cm 的圆形骨髓细胞薄片,较常规推片制片技术,在获取骨髓细胞量一定的情况下,通过减小制片面积,增加细胞密度,还可在显微镜下及时直接评估采集的骨髓细胞数,对细胞量少的制片补充穿刺一次增加细胞量。

参考文献:

- [1] Araldi RP, de Melo TC, Mendes TB, *et al.* Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review [J]. *Retour Au Numéro*, 2015, 72:74 - 82; 2015, 72:74 - 82.
- [2] Samanta S, Dey P. Micronucleus and its applications [J]. *Diagnostic cytopathology*, 2012, 40(1):84 - 90.
- [3] Araldi RP, Rechiutti BM, Mendes TB, *et al.* Mutagenic potential of *Cordia ecalyculata* alone and in association with *Spirulina maxima* for their evaluation as candidate anti-obesity drugs [J]. *Genetics and molecular research*, 2014, 13(3):5207 - 5220.
- [4] 师长宏,冯秀亮,张海. 基础动物实验技术与方法 [M]. 西安:第四军医大学出版社,2011. 56 - 57
- [5] 白殿卿,郑颖. 藏药旺拉毒理学安全性试验研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2007, 12(7):740 - 742
- [6] 刘仕杰,方展强. 流式细胞仪筛选环磷酸胺诱导骨髓嗜多染红细胞微核的技术方法 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(3):53 - 59
- [7] 李其英,徐勉忠,孔祥云. 实用临床医学检验 [M]. 武汉:湖北人民出版社, 1980. 133.
- [8] Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, *et al.* Report from the in vitro micronucleus assay working group [J]. *Mutation research*, 2003, 540(2):153 - 163.
- [9] Massey ED, Hinchliffe S. 2-Aminoanthracene, diethylstilboestrol and vinblastine tested in the in vitro mammalian cell micronucleus test at British American Tobacco UK in support of the OECD draft Test Guideline 487 [J]. *Mutation research* 2010, 702(2):208 - 211.
- [10] 倪语星,尚红. 临床微生物学与检验(第 4 版) [M]. 北京:人民卫生出版社, 2007. 39.

[修回日期] 2016 - 01 - 13



“我们”的福音

——实验动物福利伦理法规与标准

李楠¹, 孙荣泽², 王天奇¹, 何嘉玲¹, 暴国¹, 张长勇¹, 刘静¹ 孙德明¹

(1. 国家卫生计生委科学技术研究所, 北京 100081;
2. 武汉大学医学院, 武汉 430071)

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2016) 03-0089-02
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.03.018

“一个国家的伟大可视其如何对待动物加以衡量。”——甘地。

提起实验动物,我们先来说说动物实验,大多数人会想,不就是给实验动物打针,灌药或者解剖么?实际上远比这个复杂的多,动物实验是为了获得有关生物学、医学等方面的新知识或想得到某些预期的目的或结果而以实验动物为载体的科学研究,从而帮助人类揭示生命的本质和规律^[1]。动物实验在医学上、农学、药学生物科学、生物学等各个方面扮演者重要角色。

为什么要用实验动物做实验呢?这其中有很多的奥秘呢。大家也许不知道,实验动物具有生物体的完整性和系统性,所以任何一个外来刺激会引起实验动物全身各个系统出现连锁反应。因为实验动物的这个特性,我们把它称为活的“精密仪器”。实验动物为我们人类的发展做出了极大的牺牲,因此在研究过程中应该最大限度的去关爱实验动物,感受实验动物“内心感受”,满足实验动物健康、快乐的外部条件,是实验动物福利所包含的基本内容^[2,5]。为此,人们为了关爱实验动物,保障实验动物的基本权利,还专门制定了保护实验动物的法规和标准,这真是实验动物界的福音。

“福音”的起源和发展

早在19世纪初期,欧洲的一些有识之士把同情的目光投向动物,想通过法律来解决这个道德问题。曾有人在英国国会上提出过禁止虐待动物的提案,提案在当时背景下,被议院否决,也受到了很多人的嘲笑。但是随着时间的推移,人们关于动物

福利的思考也渐渐日趋成熟。在1822年,“人道的迪克”马丁,提出了禁止虐待动物的提案——“马丁法令”获得了通过。这是首次以法律条文的形式规定了动物的利益,保护动物权利,是动物保护史上的一座里程碑。随即,在全球掀起了防止虐待动物的浪潮,自1980年以后,欧盟及美国、澳大利亚、加拿大等国先后都进行了动物福利方面的立法。动物福利组织在世界范围内蓬勃发展起来,在WTO中也写入了动物福利条款了。人类对待动物的态度从此开始了微妙的变化。

“福音”的内容

为了更好的保护实验动物,英国的动物学家William Russell和生物学家Rex Burch,提出了著名的动物实验“3R”原则(the 3R principles):

1、替代(replacement)是指用无知觉的物质替代有知觉活的较高等级动物。

2、减少(reduction)是指为获得特定数量及准确的信息,尽量减少动物使用的数量。

3、优化(refinement)是指对不得以使用的动物,应尽量减低非人道方法的使用频率或危害程度^[3]。

在1965年,Brambell提出了动物福利的核心内容,即五大自由:动物享有不受饥渴的自由;动物享有生活舒适的自由;动物享有不受痛苦伤害和疾病的自由;保证动物表达天性的自由;具有享受生活无恐惧和无悲伤的自由。

3R原则和动物的五大自由共同组成了日后国际上较为公认的动物福利伦理审查的基本要素。总而言之,实验动物福利的核心保障就是保证全体

实验动物的健康和快乐。

“福音”国内外进展

在保护动物福利方面,欧美各国在科学、社会、法律多重推动下取得了较好的成果,其中法律法规的不断完善,起到了保驾护航的作用。比如,欧盟发布了《欧洲公约》,美国的《动物福利法》等。我国的实验动物福利法起步较晚,但是,用二十年的时间走完了欧美等发达国家半个世纪的路程。与发达国家相比,我国实验动物的整体水平略有些落后,但是,在实验动物法发展过程中吸收了大量发达国家的精髓,同时具有我国特色,对于实验动物伦理审查和管理有着严格的法律规定,如科学技术行政部主管的管理体系、许可证制度、严格的质量控制标准、各个省市具有各自的保护动物福利地方法规,如北京、湖北、云南、黑龙江和广东^[4-5]。

2013 年,我国首个实验动物福利伦理全国性专业组织中国实验动物学会实验动物福利伦理委员会正式成立,我国实验动物福利伦理事业得到了飞速的发展。2014 年,中国举办了首届实验动物福利伦理国际论坛。2015 年,中国实验动物学会实验动物福利伦理委员会制定的我国第一部实验动物福利伦理国际标准,国家标准花委员会批准立项,并在第两届中英实验动物福利伦理国际论坛上,获得国际学界的高度称赞^[4]。

由于法律、标准的不断建立及完善,其强大的约束力,使得实验动物的福利伦理不再是空洞的口号,并把保护动物福利伦理真正的践行到了相关国家部门的工作中去。

在人类探索生命科学的奥秘、推动生物学发展过程中,大部分都需要利用动物实验来获得科技进步和突破,包括获得诺贝尔奖的科技成就。实验动物是重要的基础和支撑条件,因此,重视实验动物福利可以保证生物医学的研究成果更具有客观性、准确性和可重复性,使我国的生物医学研究等科技成果更好的走向世界,与国际接轨^[6]。

重视实验动物福利也是人与自然协调发展的需要。对于强大的人类,实验动物是弱者。如何对待弱者,可暴露一个人、一个国家的道德水准。实验动物福利伦理水平本质上反映的是人的职业道德。然而,不断完善的实验动物福利伦理法规与标准,则是人们不能逾越的底线,更是实验动物真正的福音。

参考文献:

- [1] 秦川. 医学实验动物学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008.
- [2] SINGER P. 动物研究中的伦理学问题[M]. 中国医学伦理学,2004,17(2):31-34,36.
- [3] 孙德明. 中英第一届实验动物福利伦理国际论坛论文集[C]. 北京:2014. 102-122.
- [4] 孙德明. 中英第二届实验动物福利伦理国际论坛论文集[C]. 北京:2015. 154-164.
- [5] 孙德明,李根平,陈振文,郑振辉. 实验动物从业人员上岗培训手册[M]. 北京:中国农业大学出版社,2011.
- [6] 荣瑞章,孙德明,贺争鸣等. 实验动物的奥秘[M]. 北京:北京科学技术出版社. 2014.

[修回日期]2015-05-25