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 4

邮发代号：82-917
第26卷（第4期）Vol.26 No.4
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

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 4 期　2016 年 4 月 30 日出版

主　管
中国科学技术协会
主　办
中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所
主　编
秦　川
编　辑
《中国比较医学杂志》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://zgsydw. 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、中文生物医学期刊文献数据库、中国实验动物信息网、中国实验动物学会网站和世界卫生组织西太平洋地区医学索引等网络文献数据库,如不同意自己论文入网,请在来稿中声明。编辑部支付的稿酬已包含上述网站著作权使用费。
本刊电子版出版发行合作伙伴:中邮阅读网:www. 183read. com

本期执行主编　高　诚
本期责任编辑　吴漪丽

目　次

(本刊已入编“中文核心期刊要目总览”)

研究报告

Aβ1-40 侧脑室注射模拟阿尔茨海默病树鼩模型的核磁共振成像特征 …… 郑红,李树德,王振宇,等(1)
线粒体-细胞色素 C 途径在兔非酒精性脂肪肝肝细胞凋亡中的作用 …… 吴方,余陈欢,张欢欢,等(7)
右美托咪定对脓毒血症大鼠肾功能及紧密连接蛋白表达的影响 …… 李金洁,康吉龙,赵英,等(14)
Raf-1 基因重组腺病毒 siRNA 载体构建及其对大鼠心肌细胞肥大的影响 …… 郑亚萍,刘春杰 (18)
恒河猴幼猴出生后生长发育参数背景数据及其行为学特征 …… 梁志刚,吴明玲,曾利才,等(24)
主动脉弓狭窄致大鼠慢性心力衰竭模型的建立及病理过程观察 …… 奚晓青,陈小真,马全鑫,等(35)
CEMx174 细胞中 SAMHD1 蛋白表达与SIVmac239 病毒水平的相关性研究 …… 彭灵娟,丛喆,薛婧,等(41)
基于实时细胞分析技术检测前列腺癌细胞药物敏感性 …… 靳亚西,孙彩显,高虹,等(46)
腺相关病毒介导的狨猴 P53 基因沉默 … 石亮,张晨,向志光,等(53)
线粒体 DNA D-loop 区多态性与肝癌预后的研究…… 张凤宾,郭占军,吴忱思,等(58)

技术方法

改良的乳小鼠心肌细胞原代培养方法 … 吴丹,冯健,莫显刚,等(62)
猕猴全结肠内镜检查方法与观察 … 黄志寅,张琼英,王玉芳,等(68)
小型猪经颈静脉肝穿刺活检术的可行性探讨 …… 朱冰,李晓娟,吕飒,等(72)
改良组织块法分离培养兔成纤维样滑膜细胞 …… 陈芳,刘琴,王丽平,等(75)

综述与专论

小胶质细胞极化在多发性硬化发病中的作用机制研究进展 …… 张明,刘江红,洪浩, 等(79)

继续教育

基于从业人员培训的实验动物教学改革 …… 师长宏,张海,张彩勤,等(83)

标准专栏

实验动物 从业人员要求 …… (86)

广　告 …… (封二,封三,封底)

期刊基本参数:CN11 - 4822/R * 1991 * m * 大 16 * 92 * zh * p * ￥20. 00 * 2000 * 16 * 2016 - 4

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly **Established in March** 1991 **Volume** 26 **Number** 4 **April** 30 2016

Responsible Institution
China Associsation 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/zgbjyxzz/ch/index.aspx

Editor-in-Chief
QIN Chuan(秦川)

Publishing
Chinese Association for Laboratory Animal Sciences
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021
Tel:(010)67779337
Fax:(010)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

Analysis of the MRI characteristics in tree shrew model of Alzheimer's disease induced by intracerebroventricular injection of $A\beta_{1-40}$ ····· *ZHENG Hong, LI Shu-de, WANGI Zhen-yu, et al.* (1)

Effect of mitochondrial cytochrome c on hepatocyte apoptosis in non-alcoholic fatty liver disease in rabbits ····· *WU Fang, YU Chen-huan, ZHANG Huan-huan, et al.* (7)

Effect of dexmedetomidine on the renal function and expression of tight junction protein ZO-1 and occludin in the kidney of rats with septicopyemia ··· *Li Jin-jie, Kang Ji-long, Zhao Ying, et al.* (14)

Construction and effect of recombinant adenovirus vector containing siRNA targeting Raf-1 on cardiomyocyte hypertrophy in neonatal rats ····· *ZHENG Ya-Ping, LIU Chun-Jie* (18)

Growth and developmental parameters and behavioral characteristics of infant rhesus monkeys ····· *LIANG Zhi-gang, WU Ming-ling, ZENG Li-cai, et al.* (24)

Establishment of a rat model of chronic heart failure by transverse aortic constriction and observation of its pathological process ····· *XI Xiao-qing, CHEN Xiao-zhen, MA Quan-xin, et al.* (35)

Relationship between the SAMHD1 protein expression and the SIVmac239 viral level in CEMx174 cells ····· *PENG Ling-juan, CONG Zhe, XUE Jing, et al.* (41)

Assessment of drug sensitivity of the prostate cancer cells based on real-time cell analysis system ····· *JIN Ya-xi, SUN Cai-xian, GAO Hong, et al.* (46)

Adeno-associated virus vector mediated p53 gene silence in marmosets ····· *SHI Liang, ZHANG Chen, XIANG Zhi-guang, et al.* (53)

Investigation of the association between mitochondrial D-loop polymorphisms and hepatocellular carcinoma outcome ····· *ZHANG Feng-bin, GUO Zhan-jun, WU Chen-si, et al.* (58)

An improved method for primary culture of neonatal mouse cardiomyocytes ····· *WU Dan, FENG Jian, MO Xian-gang, et al.* (62)

Performance and colonoscopic observation in macaques ····· *HUANG Zhi-yin, ZHANG Qiong-ying, TANG Chuan-jun, et al.* (68)

Feasibility of transjugular liver biopsy in minipigs ····· *ZHU Bing, LI Xiao-juan, LV SA, et al.* (72)

Primary culture of rabbit fibroblast-like synoviocytes using an improved explant culture method ····· *CHEN Fang, LIU Qin, WANG Li-ping, et al.* (75)

Advances in research of the role of microglia polarization in the mechanisms of pathogenesis of multiple sclerosis ····· *ZHANG Ming, LIU Jiang-hong, HONG Hao, et al.* (79)

Teaching reform of laboratory animal science based on the training of practitioners ····· *SHI Chang-hong, ZHANG Hai, ZHANG Cai-qin, et al.* (83)

研究报告

$A\beta_{1-40}$ 侧脑室注射模拟阿尔茨海默病树鼩模型的核磁共振成像特征

郑 红[1],李树德[2],王振宇[3],薛整风[4],张荣平[5],角建林[1]

(1. 昆明医科大学实验动物学部,昆明,云南 650500; 2. 昆明医科大学基础医学院,昆明,云南 650500;
3. 昆明医科大学药学院,昆明,云南 650505;4. 扬州大学兽医学院,扬州,江苏 225009;
5. 昆明医科大学生物工程中心,昆明,云南 650031)

【摘要】 目的 分析阿尔茨海默病(AD)模型树鼩大脑影像学特征。**方法** 在脑立体定位仪上侧脑室注射 $A\beta_{1-40}$ 建立 AD 动物模型。经视觉-空间行为学检测确定模型成功后,用 MRI 作脑冠状面 T2 加权成像(T_2WI)和弥散张量成像(DTI)分析。**结果** 模型组模型组参考记忆错误(3 周, 4 周)和工作记忆错误(2 周, 3 周, 4 周)显著多于对照组($P < 0.05$)。模型组完成任务的时间(2 周, 3 周)显著多于对照组($P < 0.05$)。3 周起模型组树鼩单侧或双侧海马减小,相应侧脑室或双侧脑室增大。12 周时模型组树鼩双侧颞角宽度显著大于对照组和治疗组($P < 0.01$)。弥散张量成像扫描显示,模型组树鼩海马双侧表观弥散系数(ACD)大于对照组($P < 0.01$)。模型组胼胝体纤维束缺失严重。**结论** 侧脑室注射 $A\beta_{1-40}$ 可引起树鼩学习记忆障碍。MRI 能显示 AD 树鼩脑部的特征性改变,颞角宽度、海马 ADC 值、胼胝体纤维受损对痴呆的诊断有参考价值。

【关键词】 阿尔茨海默病;$A\beta_{1-40}$;树鼩;认知功能;核磁共振成像
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】**1671-7856(2016) 04-0001-06
doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2016.04.001

Analysis of the MRI characteristics in tree shrew model of Alzheimer's disease induced by intracerebroventricular injection of $A\beta_{1-40}$

ZHENG Hong[1], LI Shu-de[2], WANGI Zhen-yu[3], XUE Zheng-fong[4], ZHANG Rong-ping[5], JIAO Jian-lin[1]
(1. Department of Laboratory Animal Science, Kunming Medical University, Kunming 650500, China;
2. College of Basic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500;
3. Department of Pharmacology, Kunming Medical University, Kunming 650500;
4. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009;
5. Department of Biological Engineering, Kunming Medical University, Kunming 650031)

【Abstract】 Objective To analyze the neuroimaging changes of tree shrew models of Alzheimer's disease. **Methods** Nineteen healthy adult female tree shrews were randomly divided into control (5 animals) and model group (14 animals). The model of Alzheimer's disease was induced by intracerebroventricular injection of $A\beta_{1-40}$ using a stereotaxic devise and proved successfully by visuospatial congnitive task. The in vivo microstructural changes in the brain of tree shrew AD models and control group (0, 1, 2, 3, 4 weeks) were observed on 1.5T MRI (T_2WI), and on 7.0T MRI (12 week)(T_2WI, DTI).

[**基金项目**]国家科技支撑计划项目(2014BAI01B01);云南省科技厅应用基础研究联合专项项目(2012FB022);云南省应用基础研究昆医联合专项(2013FB126)。

[**作者简介**]郑红 (1969-), 女,高级实验师,硕士生导师,在读博士,研究方向: 疾病动物模型,E-mail: 847255170@qq.com。
[**通讯作者**]角建林 (1966-),男,高级实验师,学士,研究方向:树鼩标准化与疾病模型,E-mail: jiaojianlin66@163.com。

Results Reference memory errors were increased in the model group at 3 or 4 weeks ($P<0.05$), and so working memory errors ($P<0.05$) and period of time to perform ($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$) from 2 to 4 weeks. Thus the model was proved to be established successfully. T2WI test and DTI test were carried out. Hippocampus atrophy of the model group at 3 and 4 weeks was observed compared with that at 0 or 1 week or 2 weeks on a 1.5T Philips Gyroscan. Compared with the control group, the temporal horn width in the model group was significantly increased ($P<0.01$) at 12 weeks on a 7.0T Bruker Biospec Scanner. DTI test at 12 weeks showed that ADC of bilateral hippocampus was up-regulated in the model group ($P<0.01$). In the color coded orientation view, loss of the corpus callosum fibers was obvious in the model group.

Conclusions Intracerebroventricular injection of $A\beta_{1-40}$ can lead to learing and memory impairment in tree shrews. There are abnomal MRI signal changes in the brain, and the temporal horn width, hypocampal apparent diffusion coefficient (ADC) value and corpus callosum damage may provide reference value for the diagnosis of Alzheimer's disease.

【**Key words**】 Alzheimer's disease; $A\beta_{1-40}$; Tree shrews; Congnitive task; MRI; Diagnosis

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年人最常见的神经退行性疾病,痴呆患者中 60% 以上由 AD 导致[1]。约 1/9 的 65 岁以上老人有阿尔茨海默病,85 岁以上的老年人中约 50% 患有 AD[2]。AD 病人临床主要表现为进行性的记忆减退、认知功能障碍。病理学上的显著特征为老年斑、神经原纤维缠结、胆碱能神经元缺失[3]。但是,目前 AD 的病因学和发病机制尚不清楚;临床确诊多为中晚期;治疗药物仅能延缓病程,而不能治愈疾病。因此,开展 AD 早期研究、提高诊断的敏感性和准确性变得迫切和必要。

影像学在 AD 的早期诊断中最有意义,其中磁共振成像(MRI, magnetic resonance imaging)具有不受气体和骨伪影的干扰、多参数成像、软组织对比度高等诸多优势,因此,MRI 在 AD 的诊断中具有很高的价值。MRI 已广泛应用于研究人类和啮齿动物脑结构和功能,但是很少用于树鼩大脑。Ohl 等从 MRI T_2 加权成像(T_2 weight imaging, T_2WI)的数据获得树鼩海马体积,并揭示慢性心理应激树鼩海马体积减小[4,5]。Wang 等[6]改良了树鼩海马体积测量方法。MRI 是作为可重复使用,利于开展长期试验的神经解剖学研究方法,用于观察树鼩大脑具有可靠性。

本研究采用树鼩侧脑室内注射 $A\beta_{1-40}$ 建立 AD 模型,利用结构磁共振成像(structural MRI, sMRI)成像技术,对树鼩大脑海马和侧脑室进行观察,测量颞角宽度。利用弥散张量成像(diffusion tensor imaging, DTI)成像技术,观察颜色编码方向图(color coded orientation map, CCOM),测量表观扩散系数(apparent diffusion coefficient, ADC)值变化,为进一步利用磁共振技术研究 AD 进行了探索。

1 材料和方法

1.1 实验动物和设备

12 ~ 15 月龄雄性成年滇缅树鼩 19 只,来自昆明医科大学实验动物学部(生产许可证号 SCXK(滇)2013 - 0002)。树鼩分为对照组(5 只)、模型组(14 只)。模型组的 10 只为 $A\beta_{1-40}$ 高剂量组(2 μg/μL);中(1.6 μg/μL)、低(0.6 μg/μL)剂量组动物各 2 只,仅用于 DTI 观察。实验程序符合昆明医科大学动物实验伦理委员会的要求(KMMU 2015002),并遵守国际惯例。动物使用许可证为 SYXK(滇)2011 - 0004。

小动物磁共振成像仪(7.0T / 20 cm Bruker Biospec Scanner, 德国),小动物磁共振成像仪工作站图像分析软件(Paravision 5.0, Bruker Biospec, 德国),动物麻醉机(Matrx Vip 3000, 美国),超导磁共振扫描仪(Philips Gyroscan 1.5T, 荷兰)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备:树鼩用 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)肌内注射麻醉后,固定于脑立体定位仪。切开树鼩头顶正中皮肤,用 3% 过氧化氢(H_2O_2)水溶液擦拭软组织以充分暴露颅骨。选择右侧为注射部位,依照预实验结果,以 APO 平面前 2.0 mm(A2.0)、中线右侧 1.0 mm(R1.0)坐标处为穿刺点,用小电钻开颅。分别取孵育好的 $A\beta_{1-40}$(模型组)和磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)(对照组)8 μL 注射入树鼩侧脑室:垂直进针至硬膜下深约 5.0 mm(H5.0),缓慢推入液体,留针 10 min 后退针。消毒后缝合。

1.2.2 行为学评价:洞板法:树鼩经训练后用于行为学测试(造模 0 周、1 周、2 周、3 周、4 周)。每天 2 个实验,每个实验包括 3 次试验,其中前 2 次用红色胶带标记诱饵孔(视觉空间实验),第 3 次试验去除标记(空间实验)。第 2 个实验时,改变诱饵孔的位置,进行 2 次视觉空间试验和 1 次空间试验。实验

期间,通过视频纪录树鼩的行为。禁食后 2 h 进行视觉-空间任务。

1.2.3　核磁共振扫描:造模 0 周、1 周、3 周、4 周后,使用 1.5 T 超导磁共振扫描仪,小动物专用线圈,应用 TSE 序列 T2 WI (TR 3400 ~ 3700 ms, TE l10 ~ 120 ms)成像,行横轴位、矢状位及斜冠状位扫描。层厚 2.0 mm。核磁共振扫描前 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg) 和盐酸塞拉嗪注射液(0.1 mL/kg)肌内注射进行麻醉动物,扫描结束后每只动物肌肉注射尼可刹米注射液(0.15 mL/kg),促进其苏醒。

造模后 12 周使用小动物磁共振成像仪进行 MRI 检测。扫描前麻醉动物。扫描中进行吸入麻醉(1.5% ~2% 异氟烷混合氧气),根据动物心电监测情况,调整麻醉气体流量。扫描结束后注射苏醒剂。选用小鼠头颅线圈接收,依次进行树鼩大脑 T_2WI 及 DTI 扫描。T_2 成像采用 RARE 序列。成像参数为:重复时间(TR) = 6900 ms,回波时间(TE) = 12 ms,RARE 因子 = 8,视野(FOV) = 35 mm × 35 mm,层厚 = 0.5 mm,采样矩阵(matrix) = 256 × 256。弥散加权成像采集参数为重复时间(TR) = 7000 ms,回波时间(TE) = 26 ms,视野(FOV) = 35 mm × 35 mm,矩阵大小(matrix)为 128 × 128,冠状切片厚度为 1.0 mm,Δ = 14 ms,δ = 3 ms,梯度强度(GS) = 382.7 mT/m。

在正中矢状面上,以前联合最低点与上丘最高点为基线,进行横切面扫描。以平行于脑干中轴进行冠状面扫描。以通过中脑与脑桥的交界角为基点,在此冠状面上测定颞角宽度。

1.3　参数测量和统计

视觉-空间试验记录错误次数、重复次数、完成任务时间(s)。ADC 的测量应用 VnmrJ 3.1 软件进行图像拟合。手动画出感兴趣区(region of interest, ROI),选择海马部位为 ROI。采用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　行为学评价

2.1.1　完成空间任务的时间:洞板试验中,侧脑室注射 $A\beta_{1-40}$ 树鼩完成任务的时间增加。在 5 周的观察期中, 造模 2 周 ~4 周,模型组完成空间任务的时间显著多于对照组($P < 0.01$)。造模 0 周和 1 周时,2 组动物完成任务的时间差异没有显著性($P > 0.05$)(图 1)。

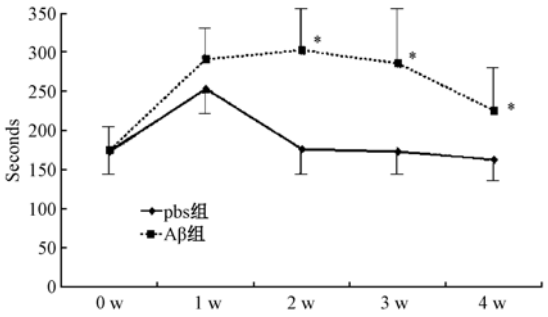


图 1　不同处理组完成空间任务的时间($^*P < 0.05$)

Fig. 1　Period of time to perform the task in each group on the modified holeboard

2.1.2　参考记忆错误:树鼩对非诱饵孔的访问,计为参考记忆错误。侧脑室注射 $A\beta_{1-40}$ 增加了树鼩参考记忆错误。造模 3 周 ~4 周,模型组动物错误次数显著高于对照组($P < 0.05$)。造模 0 周 ~2 周,模型组与对照组错误次数差异无显著性($P > 0.05$)(图 2)。

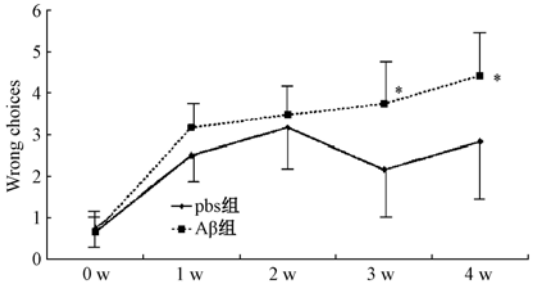


图 2　树鼩参考记忆错误($^*P < 0.05$)

Fig. 2　Reference memory errors in each group on the modified holeboard

2.1.3　工作记忆错误:树鼩对诱饵孔的重复访问,计为工作记忆错误。侧脑室注射 $A\beta_{1-40}$ 增加了树鼩工作记忆错误。造模 2 周 ~4 周,模型组动物重复次数显著高于对照组($P < 0.05$)。造模 0 周 ~1 周,2 组树鼩重复次数差异无显著性 ($P > 0.05$)(图 3)。

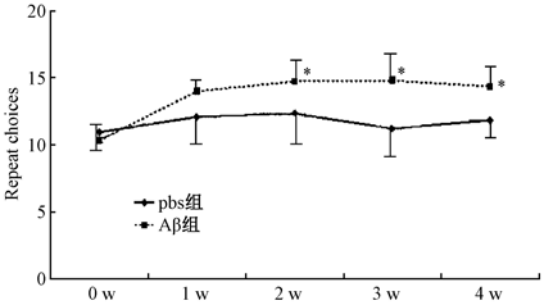


图 3　树鼩工作记忆错误($^*P < 0.05$)

Fig. 3　Working memory errors in each group on the modified holeboard

表 1 树鼩颞角宽度测量结果

Tab. 1 The temporal horn width of tree shrews in the two groups

颞角宽度(mm) Temporal horn width	对照组 Control	模型组 Model
右侧 Right	0.34 ± 0.06	1.58 ± 0.31 *
左侧 Left	0.38 ± 0.08	1.71 ± 0.40 *

(* P < 0.05)

表 2 树鼩表观弥散系数(ACD)值测量结果

Tab. 2 The temporal horn width of tree shrews in the two groups(* P < 0.05)

表观扩散系数 ACD(mm^2/s)	对照组 Control	模型组 Model
右侧 Right	(7.898 ± 0.985) × 10^{-4}	(16.650 ± 1.217) × 10^{-4} *
左侧 Left	(8.136 ± 1.125) × 10^{-4}	(16.939 ± 1.176) × 10^{-4} *

2.2 核磁共振扫描 T_2 加权成像(T_2WI)

1.5 T_2WI 显示,造模 0 周和 1 周树鼩双侧海马形态对称,侧脑室正常。3 周时模型组树鼩左侧或双侧海马形态减小,相应侧脑室或双侧脑室略大。4 周时模型组树鼩双侧海马形态减小,双侧脑室增大,皮层局部软化(图 4)。

7.0 T_2WI 显示,树鼩海马较大且分化良好,呈片层结构。海马结构的边界清晰,边界的主要标志结构为视束、胼胝体等。12 周时模型组树鼩双侧海马体积缩小,双侧脑室增宽(图 5)。12 周时模型组树鼩双侧颞角宽度显著大于对照组(P < 0.01)(表 1)。

2.3 7.0 T 核磁共振扫弥散张量成像扫描(DTI)

CCOM 显示,12 周时 2 组树鼩双侧大脑结构基本对称,对照组纤维束边缘较清楚,模型组较模糊(图 6)。与对照组比较,模型组胼胝体纤维束缺失严重。3 个剂量的模型组中,高剂量组以蓝紫色为主,中剂量组以蓝色为主,低剂量组以红绿色为主。树鼩胼胝体纤维束缺失严重程度依次为:高剂量大于中剂量,中剂量组大于低剂量(图 7)。12 周时模型组树鼩双侧表观弥散系数(ACD)大于对照组(P < 0.01)(表 2)。

3 讨论

$A\beta_{1-40}$脑内注射建立 AD 动物模型,具有可操作性、实用性、及成模间短等优点。方法包括脑室注射、海马注射、复合 AD 模型等[7]。侧脑室注射方式中,$A\beta_{1-40}$经侧脑室弥漫至全脑,较符合 AD 患者的自然病理过程,是临床前研究的重要模型[8]。从动物种属角度分析,目前使用最多的 AD 动物为啮齿类,但由于啮齿类与人类在进化地位上的差距,啮齿类模型的结构效度和预测效度存在局限性,在啮齿类动物模型的研究中有效的抗AD药物,对人

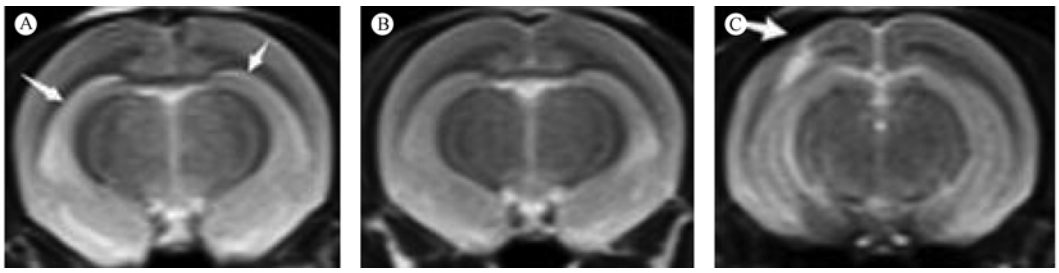


图 4 树鼩大脑冠状面 1.5 T_2WI: A 双侧脑室增大, B 正常大脑, C 顶叶皮层局限性软化

Fig. 4 T2-weighted anatomical images of selected coronal slices in the 1.5 T MRI

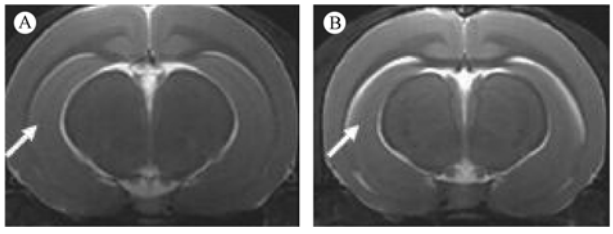


图 5 树鼩脑冠状面 7.0T 核磁共振 T_2 图像: A 对照组, B 模型组,

Fig. 5 T2-weighted anatomical images of selected coronal slices. A: A control animal; B: A model animal.

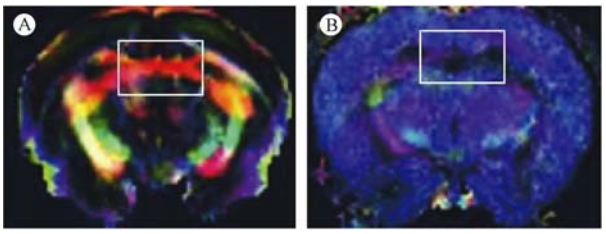


图 6 树鼩脑冠状面颜色编码方向图: A 对照组, B 模型组

红色为左右(内外)方向, 绿色为上下(背腹)方向, 蓝色为前后方向

Fig. 6 Color coded orientation map from representative animals. A: A control animal; B: A model animal.

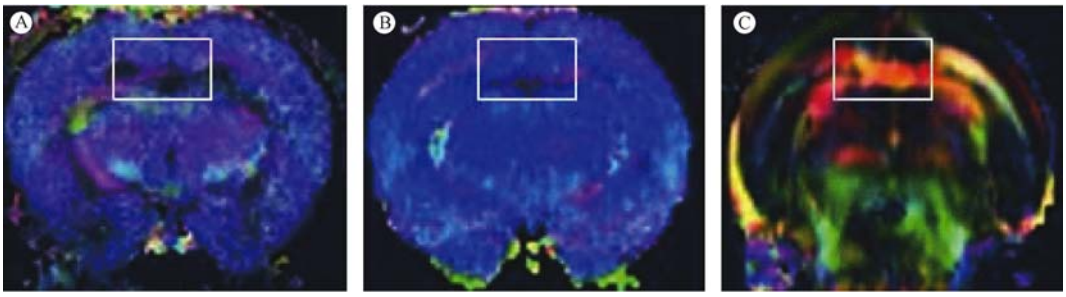


图 7　不同剂量 Aβ 树鼩脑冠状面颜色编码方向图：A 高剂量，B 中剂量，C 低剂量.

Fig. 7　CCOM from representative animals in three $A\beta_{1-40}$ doses.

A: A high dose animal; B: A moderate dose animal; C: A low dose animal.

类疗效不佳。非人灵长类动物猴等存在成本高，相关实验技术缺乏等缺陷。树鼩作为新型实验动物引起人们的关注。树鼩属于攀鼩目[9]，较啮齿类更接近灵长类目的动物，在人类精神和神经疾病的模拟方面，如心理应激、抑郁症、老年痴呆，较传统啮齿类动物存在潜在优势[10]。并且树鼩成年个体体型小、繁殖周期和生命周期短、养殖成本低、具备作为模型动物的条件[11]。但目前鲜见树鼩 AD 模型的报道。因此我们选择树鼩作为实验对象开展 AD 模型研究。

AD 患者最典型临床表现为严重的学习记忆功能衰退、判断分析能力下降、行为失常、甚至意识模糊[12]。因此学习记忆评价是 AD 的诊疗最重要指标。学习记忆行为测试也是评价模型动物认知功能的常用方法。在食物为诱饵的行为试验中动物对非诱饵孔的访问(错误选择)，动物回忆以前学过的诱饵孔信息，因此这类错误被视为参考记忆错误，而参考记忆主要与海马结构相关。动物对诱饵孔的重复访问(重复选择)说明树鼩没有同时记住非诱饵孔和诱饵孔序列，为工作记忆错误[13]。工作记忆是非海马依赖的，其核心是前额叶皮层[14]。本研究显示，造模后 3 周和 4 周，模型组参考记忆错误显著多于对照组($P<0.05$)。造模后 2 周 ~4 周，模型组工作记忆错误显著增加($P<0.05$)。说明脑室注射 Aβ 损伤树鼩的空间认知能力，因此可以认为这一模型是研究 AD 的较理想模型。

结构磁共振成像(sMRI)是一种最常用的反映大脑结构改变的影像技术，因其高分辨率及安全性，在 AD 的早期诊断中发挥重要作用。目前 AD 的结构影像学研究主要测量海马、内嗅皮质、杏仁核、内侧颞叶边缘系统的体积[15]。其中横向测量法研究不同个体在同一时间内的脑萎缩变化。主要采用像素定量法、目测法及体积测量法等。纵向测量法通常被用来评价疾病进展。本研究使用采用纵向法观察发现，采用 $A\beta_{1-40}$ 侧脑室注射后 3 周、4 周和 12 周，树鼩单侧或双侧海马海马形态减小，双侧脑室增大。与认知功能的减退相吻合。提示 sMRI 作为一种非介入、无辐射和分辨率高的探测技术，在 AD 研究中，有利于早期诊断。12 周时模型组树鼩双侧颞角宽度显著大于对照组和治疗组($P<0.01$)。提示颞角宽度是诊断 AD 的敏感指标，且颞角宽度线性测量操作简便易行的优势。

组织病理学研究显示 AD 不仅影响大脑灰质，白质区可见少突胶质细胞和轴索丢失、星形胶质细胞反应性增生[16]。白质异常可能发生在 AD 的早期阶段[17]，因此可以作为早期诊断标志物和治疗疗效的潜在指标。弥散张量成像(DTI)是一种可以评估脑白质结构完整性和连贯性的影像学技术，可以在三维空间内分析组织内水分子弥散特性。白质结构变化，引起水分子扩散方向和程度变化，DTI 的参数随之改变[18]。DTI 已经被证明是对白质损伤引起的微观结构变化的高度敏感[19]。研究发现 AD 患者下纵束、钩束、下额枕束 DTI 参数出现明显异常，表明可通过 DTI 检测白质纤维的病理改变，并可作为 AD 的生物标志物[20]。表观扩散系数(ADC)反映与扩散方向无关的扩散情况，可以体现脑组织微观结构变化。ADC 值升高与神经变性相关，神经变性、细胞缺失等引起水分子弥散增高，导致 ADC 值升高。在 AD 病人已观察到 ADC 增加[21]。尽管在 AD 患者的 DTI 研究越来越多，但在 AD 动物模型的研究是有限的。到目前为止，只有极少体内和一些体外 DTI 研究报道[22]。DTI AD 动物模型将有助于进一步了解相关的白质异常的病理显示技术。本研究观察到 Aβ 侧脑室注射后 AD 树鼩模型双侧

海马区的 ADC 值高于对照组,推测 ADC 值升高的原因是由于 Aβ 毒性作用导致海马区白质纤维束损伤、组织间隙增加、脑组织水分子扩散能力升高所致。

DTI 颜色编码方向图的 3 种颜色表示白质纤维束三维通路的不同排列:红色表示纤维束内外(左右,X 轴)方向,蓝色表示纤维束的前后(喙尾,Z 轴)方向,绿色表示纤维束的上下(背腹,Y 轴)方向[23]。本研究中模型组树鼩胼胝体纤维束缺失,与临床病人的情况相似。在 3 个剂量的模型组中,胼胝体纤维束的损伤呈现量效关系。提示树鼩可作为 DTI AD 动物模型进一步开展 AD 白质异常的相关研究。

本研究表明侧脑室注射 $A\beta_{1-40}$ 可引起树鼩学习记忆障碍并且探索 sMRI 和 DTI 在 AD 树鼩研究中的可行性。MRI 能显示 AD 树鼩脑部的特征性改变,颞角宽度、海马 ADC 值、胼胝体纤维受损对痴呆的诊断有参考价值。

参考文献:

[1] Polvikoski T, Sulkava R, Myllykangas L, et al. Prevalence of Alzheimer's disease in very elderly people: a prospective neuropathological study [J]. Neurology, 2001, 56: 1690 -1696.

[2] Alzheimer's Association. Alzheimer's disease facts and figures: Alzheimer's & dementia [J]. J Alzheimer's Assoc, 2014, 10 (2): e47 - e92.

[3] Lacalle MJ, Mateos JA, Guzman J, et al. Cerebral blood flow is an earlier indicator of perfusion abnormalities than cerebral blood volume in Alzheimer's disease [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2014, 58: 845 - 857.

[4]] Ohl F, Michaelis T, Fujimori H, et al. Volumetric MRI measure-ments of the tree shrew hippocampus [J]. J Neurosci Methods, 1999, 88: 189 - 193.

[5] Ohl F, Michaelis T, Vollmann-Honsdorf GK, et al. Effect of chronic psychosocial stress and long-term cortisol treatment on hippocampus-mediated memory and hippocampal volume: a pilot-study in tree shrews [J]. Psychoneuroendocrinology, 2000, 25: 357 - 363.

[6] Wang SX, Shan D, Dai JK, et al. Anatomical MRI templates of tree shrew brain for volumetric analysis and voxel-based morphometry [J]. J Neurosci Methods, 2013, 220: 9 - 17.

[7] 吴树亮, 金连弘, 李竹琴, 等. 阿尔茨海默氏病动物模型的建立 [J]. 解剖科学进展, 2004, 10(2): 109 - 111.

[8] Nitta A, Itch A, Hasegawa T, et al. β - amyloid protein-induced Alzheimer's desease animal model [J]. Neurosei Lett, 1994, 170(1): 63 - 66.

[9] 郑红, 牛世伟, 李进涛, 等. 成年中缅树鼩大脑 BDNF、trkB、ChAT mRNA 与蛋白的表达 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 251(2): 22 - 26.

[10] Previc FH. The dopaminergic mind in human evolution and history [M]. Cambridge, Cambridge University Press, 2009: 54 - 86.

[11] Rane V, Petruzzielio F, Kretz R, et al. Broad characterization of endogenous piptides in the tree shrew visal system [J]. J Proteomics, 2012, 765(9): 2526 - 2536.

[12] 樊惠,冯慧利,党惠子, 等. 初步探讨鸟嘌呤核苷、姜黄素对 AD 双转基因小鼠学习记忆的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2): 32 - 35.

[13] Danhlgren KN, Maneli AM, Stin WB, et al. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affects neuronal viability [J]. Biol Chem, 2002, 227 (35): 32046 - 32053.

[14] Green CT, Long DL, Green D, et al. Will working memory training generalize to improve off-task behavior in children with attention-deficit/hyperactivity disorde? [J]. Neurotherapeutics, 2012,9(3):639 - 648.

[15] 吴应行, 陈自谦. 阿尔茨海默病的多模态影像学研究进展 [J]. 医学综述, 2014, 20(11): 2033 - 2036.

[16] Sexton CE, Kalu UG, Filippini N, et al. A meta-analysis of diffusion tensor imaging in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2011, 32: 2325 - 2318.

[17] Hong YJ, Yoon B, Lim SC, et al. Microstructural changes in the hippocampus and posterior cingulatein mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a diffusion tensor imaging study [J]. Neurol Sci, 2013, 34: 1215 - 1221.

[18] 朱皓,高凯,张连峰. 阿尔兹海默病小鼠模型的磁共振影像学分析 [J]. 中国比较医学杂志,2012, 22(12): 48 - 53.

[19] Jones DK, Pierpaoli C. Confidence mapping in diffusion tensor magnetic resonance imaging tractography using a bootstrap approach [J]. Magn Reson Med, 2005, 53: 1143 - 1149.

[20] Kitamura S, Kiuchi K, Taoka T, et al. Longitudinal white matter changes in Alzheimer's disease: a tractography-based analysis study [J]. Brain Res, 2013, 1515: 12 - 18.

[21] Salat DH, Tuch DS, Kouwe AJ, et al. White matter pathology isolates the hippocampal formation in Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2010, 31: 244 - 256.

[22] Sun SW, Liang HF, Mei J, et al. In vivo diffusion tensor imaging of Aβ - induced white matter damage in mice [J]. J Alzheimer's Dis, 2014, 38: 93 - 101.

[23] Naggara O, Oppenheim C, Rieu D, et al. Diffusion tensor imaging in early Alzheimer's disease [J]. Psychiatry Res, 2006, 146: 243 - 249.

〔修回日期〕2015-12-27

研究报告

线粒体-细胞色素 C 途径在兔非酒精性脂肪肝肝细胞凋亡中的作用

吴 方[1],余陈欢[2],张欢欢[2],马 月[2],俞 冰[1],应华忠[2]

(1. 浙江中医药大学药学院,杭州 浙江 310053;2. 浙江省医学科学院
浙江省实验动物与安全性研究重点实验室,杭州 浙江 310013)

【摘要】 目的 探讨线粒体-细胞色素 C 途径在兔非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease,NAFLD)肝细胞凋亡中的作用。**方法** 雄性日本大耳兔 40 只,随机分为正常对照组(8 周)和 NAFLD 模型组(4、6、8 周组),每组各 10 只。模型组按 1.2 mL/kg 皮下注射花生油,2 次/周,建立日本大耳兔 NAFLD 模型。按各组时间点处死兔子,测定兔血清中生化指标水平;HE 染色观察肝组织病理形态改变,流式细胞仪检测肝细胞凋亡率;提取肝脏线粒体,分光光度法检测线粒体通透转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)的状态变化;免疫组织化学法检查 Bcl-2、Bax、细胞色素 C 和 caspase-3 在肝组织中的表达情况;Western blot 检测细胞色素 C 以及 caspase-3 含量变化。**结果** 与正常对照组相比,模型组肝脏脂质代谢指标和相关炎症因子表达水平升高,模型组肝细胞凋亡率与对照组比较显著增加($P<0.01$)。造模 4 周时出现肝功能损伤,脂质代谢紊乱,随着 NAFLD 病程的发展,Bcl-2、Bax、细胞色素 C 和 caspase-3 表达量逐渐增加,线粒体通透转换孔开放率随高脂饮食饲养时间延长明显增加($P<0.01$)。**结论** 线粒体-细胞色素 C 途径在 NAFLD 引起的肝细胞凋亡中起到了一定的调控作用。

【关键词】 非酒精性脂肪肝;凋亡;细胞色素 C;胱冬肽酶-3;线粒体通透转换孔;
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】**1671-7856(2016) 04-0007-07
doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2016.04.002

Effect of mitochondrial cytochrome c on hepatocyte apoptosis in non-alcoholic fatty liver disease in rabbits

WU Fang[1], YU Chen-huan[2], ZHANG Huan-huan[2], MA Yue[2], YU Bing[1], YING Hua-zhong[2]

(1. School of Pharmaceutics, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Zhejiang Key Laboratory of Experimental Animal and Safety Evaluation, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013)

【Abstract】 Objective To investigate the role of mitochondrial cytochrome c on hepatocyte apoptosis in non-alcoholic fatty liver disease in rabbits and its pathogenesis. **Methods** Forty Japanese white rabbits were randomly assigned to control group and model group. The model group was divided into three subgroups: 4-week, 6-week, and 8-week groups, with 10 rabbits in each group. The model groups were subcutaneously injected with peanut oil (1.2 mL/kg), twice a week for 4 weeks, 6 weeks or 8 weeks. The rabbits of all groups were killed at the right time. Serum samples were collected to detect the serum biochemical index levels. Liver tissue samples were taken for pathological observation using HE staining. The hepatocyte apoptosis index (AI) was measured by flow cytometry, and mitochondrial permeability

[**基金项目**]国家自然基金资助项目(81573591);浙江省科技计划项目(2011C37095)。
[**作者简介**]吴方(1989 -),男,研究方向:疾病动物模型研究。Email: hnwufang@163.com。
[**通讯作者**]应华忠(1968 -),男,研究方向:实验动物学。Email: fellycook2002@163.com。

transition pore (MPTP) was evaluated by ultraviolet spectrophotometry. Immunohistochemistry was employed to detect the hepatic expressions of Bcl-2, Bax, CYT C and caspase-3. Western blot was performed to detect the changes of CYT C and caspase-3 protein expressions. **Results** The model groups showed hepatic injury and high level of TC, TG, CRP, IL-6 and TNF-α beginning from 4 weeks. With the NAFLD process, the hepatocyte apoptosis index was significantly increased at 4-8 weeks and the MPTP was gradually increased. In the model group, hepatic Bcl-2, Bax, CYT C and caspase-3 expressions were increased steadily with the time passing. **Conclusions** NAFLD-induced liver damage is associated with apoptosis, and the mitochondrial cytochrome c-mediated apoptotic pathway plays a role in the occurrence of NAFLD.

【Key words】 Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD); Apoptosis; Cytochrome c; Caspase-3; Mitochondrial permeability transition pore (MPTP); Rabbit

非酒精性脂肪肝(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是临床现今常见非传染性肝病之一[1]。依据其病变肝组织炎症反应和纤维化的有无及发展程度,NAFLD 涵盖了单纯性脂肪肝以及由其演变的非酒精性脂肪肝炎、肝纤维化和肝硬化等疾病[2]。据报道随着生活水平的提高,我国 NAFLD 的患病率逐年增加,已成为我国第二大肝病[3],严重威胁人类健康,受到人们的普遍重视。

既往的研究已证实,肝细胞凋亡在 NAFLD 发生发展的各个阶段普遍存在[4,5]。细胞凋亡的表现形式是细胞核的变化,而细胞质中线粒体的变化则是引起凋亡的重要诱因。研究表明 NAFLD 患者存在线粒体超微结构的损伤[6],且随着病变程度加深,线粒体功能损伤越明显[7]。作为日益受到重视的细胞凋亡调控器,线粒体在细胞凋亡过程中的中心地位得到确认。目前 NAFLD 研究最常用的大鼠模型在血脂代谢方面也与人类 NAFLD 特征有所区别[8,9],课题组前期通过花生油皮下注射诱导日本大耳兔建立 NAFLD 动物模型,具有造模时短、成型快,肝脏取材量大,死亡率低等优点,可简化实验操作步骤,节约实验成本[10]。本研究通过建立日本大耳兔 NAFLD 模型,探讨线粒体-细胞色素 C 途径在非酒精性脂肪肝肝细胞凋亡中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性日本大耳兔 40 只,体重(2.0 ± 0.2) kg。由浙江省实验动物中心提供[SCXK(浙)2009 - 0039];所有实验在浙江省实验动物中心进行[SYXK(浙) 2008 - 0114]。

1.2 实验试剂、仪器

总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)检测试剂盒均购于南京建成生物工程研究所;线粒体抽提试剂盒购于北京达美基因有限公司;兔 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α) ELISA 试剂盒,均购于上海拜沃公司;花生油(饱和脂肪酸:单不饱和脂肪酸:多不饱和脂肪酸 = 0.27∶1∶1),购于东莞市鹏发粮油有限公司;其余所用试剂均为分析纯。

5424 型高速冷冻离心机,艾本德中国有限公司;723N 型可见分光光度计,上海精密科技有限公司;DM2500 型荧光显微镜成像系统,莱卡仪器有限公司;SPX-150B 型生化培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及造模:40 只日本大耳兔随机分为两组,分别为正常对照组和 NAFLD 模型组,其中正常对照组取 8 周为时相点,模型组取 4 周、6 周、8 周 3 个时相点,每个时相点各 10 只。模型组分别皮下注射花生油 4 周、6 周、8 周,2 次/周,每次 1.2 mL/kg,建立日本大耳兔 NAFLD 模型。正常对照组隔天注射同体积的生理盐水。

1.3.2 取材:于末次造模后禁食 12 h,取各相时点日本大耳兔,采用耳动脉取血,速眠新麻醉后颈动脉放血处死。3 500 r/min 离心 10 min 分离血清 -80℃保存备用。取同一部位肝组织置于 4% 中性甲醛中固定,用于病理切片,以试剂盒方法提取肝组织线粒体,其余肝组织置于 -80℃下保存备用。

1.3.3 指标测定:采用比色法测定血清 TC、TG 含量,ELISA 法测定血清 CRP、IL-6、TNF-α 含量,具体操作步骤均按说明书进行。流式细胞仪检测肝细胞凋亡率。

线粒体通透转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)的检测按试剂盒说明书进行,在分光光度计(440 nm)下获取 0 min、30 min 和 60 min 的吸光值(A),计算 A 比值,若 A 值比值降低,表明 MPTP 活性增强。

1.3.4 病理学观察:石蜡包埋的肝组织标本制备 4 μm 切片,依次用自来水和蒸馏水洗,苏木精液染核 5 min,再充分水洗和蒸馏水洗,然后用 Masson 丽春红酸性复红液染色 5 min,以 2% 冰醋酸水溶液浸洗片刻后再用 1% 磷钼酸水溶液分化 3 min,不经水洗,直接用苯胺蓝染 5 min,最后以 0.2% 冰醋酸溶液浸洗片刻,95% 酒精、无水酒精、二甲苯透明、中性树胶封固。在光镜下观察肝组织病理变化。

1.3.5 免疫组织化学分析:免疫组化观察 Bcl-2、Bax、细胞色素 C 和 caspase-3 在肝组织表达情况。石蜡包埋肝组织切片脱蜡至水;3% 过氧化氢孵育 37℃孵育 30 min 后,再用 5% ~10% 正常山羊血清封闭孵育后弃血清;滴加一抗工作液 37℃孵育 1 ~2 h,冲洗后滴加生物素标记二抗工作液,再冲洗后加适量碱性磷酸酶标记的链霉卵白素工作液,37℃孵育 30 min,最后冲洗加显色剂显色后充分冲洗复染脱水封片,光镜下观察。

1.3.6 Western-Blot 分析:取相同部位肝组织 200 mg 加入含蛋白酶抑制剂的 PBS 缓冲液,4℃匀浆,10 000 r/min离心 15 min 取上清液。上清蛋白定量,取 50 μg 蛋白,变性后行聚丙酰胺凝胶电泳,转至硝酸纤维膜,6% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,洗涤后加入兔抗鼠 caspase-3(1∶500)或细胞色素 C 抗体(1∶250),4℃过夜,洗涤,加入辣根过氧化酶结合的抗兔 IgG(1∶4000),化学发光试剂检测,X 线片显影。采用条带图像分析系统测定各条带灰度值,所测结果为扣除背景的积分光密度。

1.4 统计学方法

实验数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS 17.0 统计软件进行分析处理,组间有差异用 t 检验,组间没有差异用秩和检验。双变量正态分布资料采用 Pearson 相关分析,不服从双变量正态分布或等级变量资料相关性采用 Spearman 相关分析。

2 结果

2.1 血清生化指标的分析

与对照组相比较,模型组各时段血清中 TC、TG、CRP、IL-6、TNF-α 的值均升高,且显时间依赖性,到第 8 周达到最大值,差异有显著性($P < 0.01$),其中代表脂质代谢水平的 TC、TG 在第 4 周即出现显著升高($P < 0.01$),见表 1。表明造模 4 周后即出现肝脂质代谢紊乱,炎症因子表达上升,且随造模时间的延长而加重。

2.2 肝组织病理形态观察

对照组兔肝脏肉眼观察无明显异常,模型组兔第 4 周肝脏为色红,质脆。6 ~8 周肝脏被膜紧张、边缘圆钝、切面油腻、色淡黄,表面有花斑,质软。HE 染色检查,观察到正常对照组兔肝组织结构正常,细胞核大而清晰,胞质丰富,肝细胞无变性、坏死。模型组 4 周兔肝组织呈轻度脂肪病变,部分肝细胞胞浆内有大小不等的脂肪空泡;模型 6 周组兔肝组织细胞出现肿胀多于 4 周组,细胞核大小不均,被脂肪空泡挤向一侧;模型 8 周组绝大部分肝细胞有脂肪空泡(图 1)。表明随着造模时间的延长,兔肝细胞的病变程度进一步加重。

2.3 各组 MPTP 活性比较

在 30 min/0 min 和 60 min/0 min 的 OD 值比较中,模型组各个时相的 MPTP 活性随着时间的延长而增强,且与对照组比较差异具有显著性($P < 0.01$),表 2。

表 1 NAFLD 兔血清相关生化指标的变化(n = 10)

Tab. 1 Changes of biochemical indexes in the NAFLD rabbits

组别 Groups	总胆固醇 TC (mmol/L)	甘油三酯 TG (mmol/L)	C 反应蛋白 CRP (ng/L)	白介素-6 IL-6 (ng/L)	肿瘤坏死因子-α TNF-α (ng/L)
对照组 Control	0.51 ±0.09	1.73 ±0.39	125.8 ±12.0	0.40 ±0.03	34.3 ±3.9
4 周组 4 Weeks	0.86 ±0.20 **	3.09 ±0.80 **	132.1 ±16.8 *	0.91 ±0.10 **	36.7 ±5.8
6 周组 6 Weeks	0.99 ±0.23 **	2.92 ±0.76 **	131.4 ±7.22 **	0.95 ±0.11 **	38.0 ±3.1 *
8 周组 8 Weeks	1.32 ±0.45 **	3.63 ±0.59 **	140.3 ±11.6 **	1.01 ±0.14 **	40.4 ±3.1 **

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$。

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

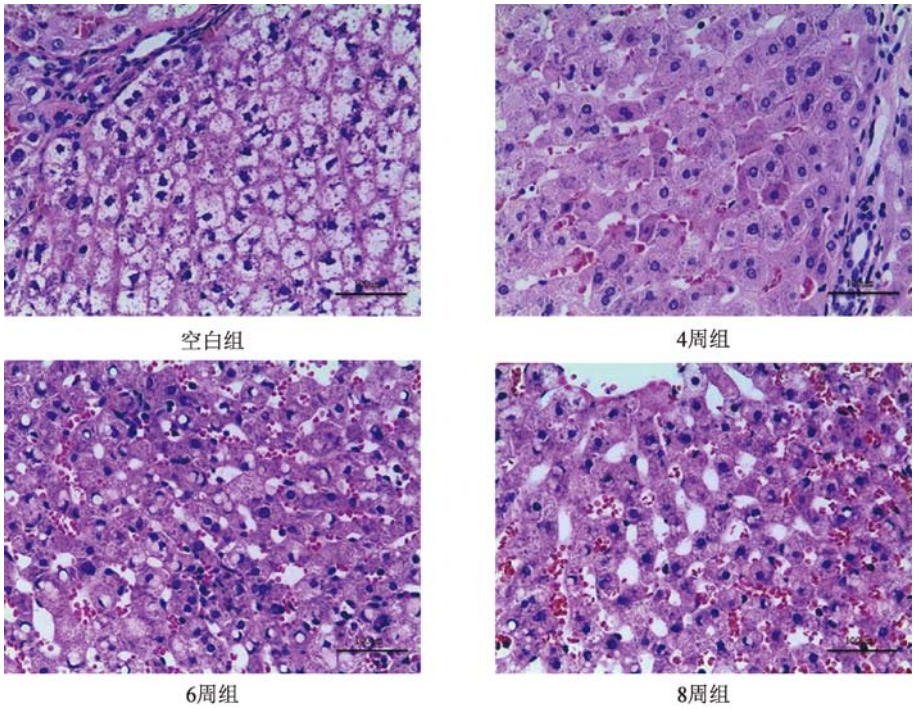


图 1 肝病理学变化(HE 染色,标尺 = 100 μm)

Fig. 1 Pathological changes of liver in the NAFLD rabbits (HE staining, Bar = 100 μm)

表 2 NAFLD 兔肝组织细胞 MPTP 的变化(n = 10)

Tab. 2 The changes of MPTP in the liver cells of NAFLD rabbits (n = 10)

组别 Groups	A 值(30 min/0 min) A value (30 min/0 min)	A 值(60 min/0 min) A value (60 min/0 min)
对照组 Control	0.984 ± 0.003	0.923 ± 0.000
4 周组 4 Weeks	0.904 ± 0.016 **	0.865 ± 0.006 **
6 周组 6 Weeks	0.873 ± 0.020 **	0.823 ± 0.013 **
8 周组 8 Weeks	0.859 ± 0.010 **	0.803 ± 0.022 **

注:与对照组比较,* P < 0.05, ** P < 0.01。

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

2.4 肝细胞凋亡检测

由图 2 流式细胞检测实验结果可知,在 0.8 mL/kg 花生油连续注射 4 周、6 周和 8 周后,肝细胞凋亡率分别为 13.0%、18.9% 和 23.1%,与空白对照组(凋亡率 3.0%)相比较,差异均具有明显的显著性(均 P < 0.01),并呈明显的量效关系,提示 0.8 mL/kg 花生油连续注射可诱导肝细胞的凋亡。

2.5 免疫组织化学分析

Bcl-2 主要在胞浆内着色,偶见核膜着色。4 周组 Bcl-2 与正常组相比不显著,棕黄色分布几乎一样多,随着时间的推进,6 周组和 8 周组的 Bcl-2 表达量有了明显的增加(图 3)。Bax 主要在胞浆内着色,模型组大鼠 Bax 的表达依时间的延长而递增。4 周组 Bax 主要在脂肪变性肝细胞呈棕黄色颗粒状;6 周组与 4 周组相比较阳性细胞数增多、染色加深;8 周组阳性细胞数进一步增多,在脂肪病变明显的肝细胞胞浆内呈黄褐色表达,而相对的脂肪病变程度轻的肝细胞则为黄棕色(图 4)。模型组大鼠随造模时间延长,肝脏病变加深,被染色阳性细胞数增多,颜色越深,肝组织 Bax 的表达量逐步升高。

正常组大鼠细胞色素 C 和 caspase-3 的表达为个别肝细胞胞浆内弱阳性表达;模型组 4 周可见肝小叶内散在阳性表达,呈棕黄色颗粒状;6 周组和 8 周组细胞色素 C 和 caspase-3 两者的阳性细胞显著增加,呈棕褐色片状强阳性表达,且分布与脂肪肝的严重程度相一致(图 5、6)。

2.6 Western blot 分析

模型组与正常组 caspase-3 和细胞色素 C 蛋白的 Western blot 检测结果见图 7,1 至 4 依次为正常组、4 周组、6 周组和 8 周组。以各待测条带与其相应内参 actin 蛋白的灰度值比值做统计分析,结果显示,模型组与正常组相比 caspase-3 和细胞色素 C 蛋

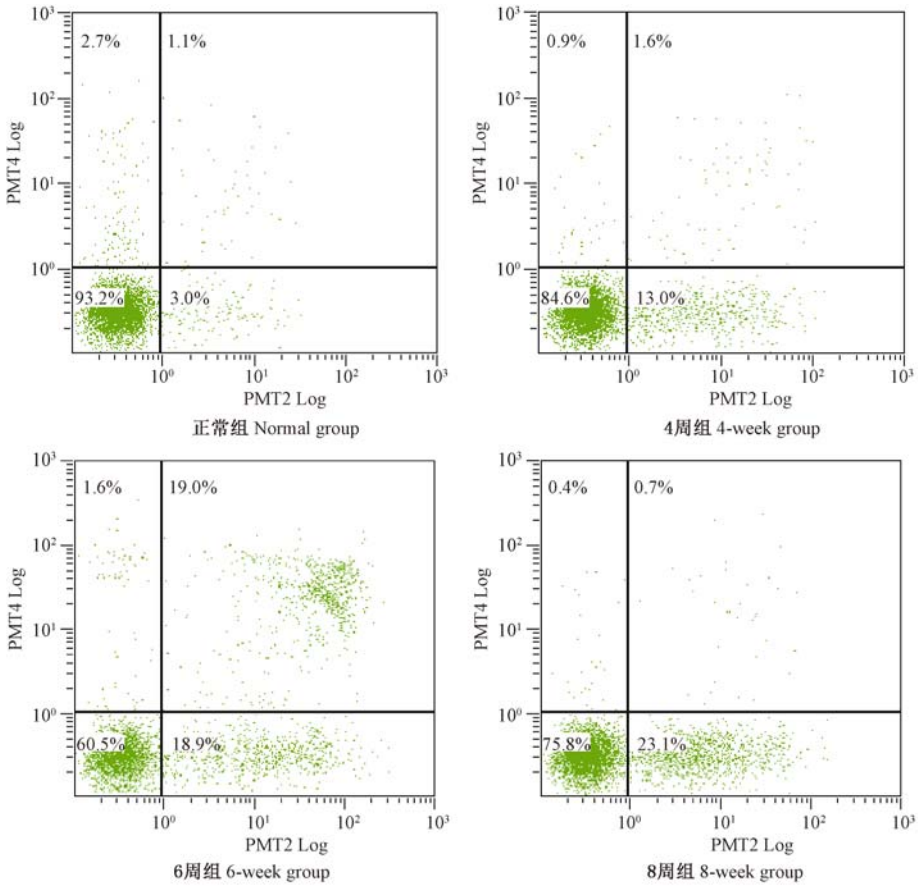


图 2　流式细胞术检测肝细胞凋亡率

Fig. 2　The apoptosis rate of hepatocytes detected by flow cytometry

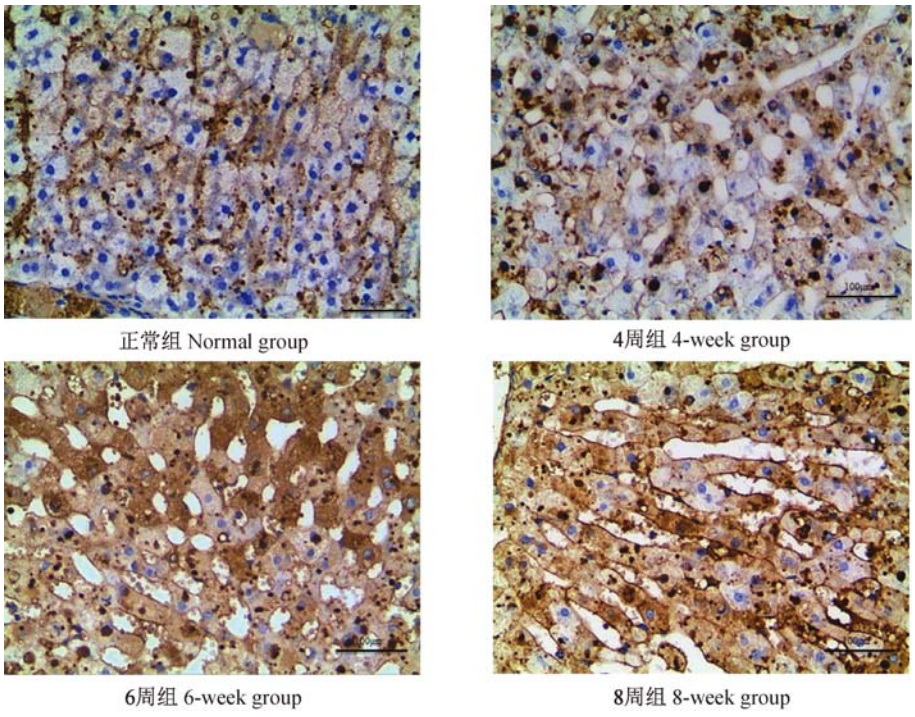


图 3　Bcl2 在各组动物肝组织表达情况(标尺 = 100 μm)

Fig. 3　The expression of Bcl-2 in the liver of the NALFD rabbits. (Bar = 100 μm)

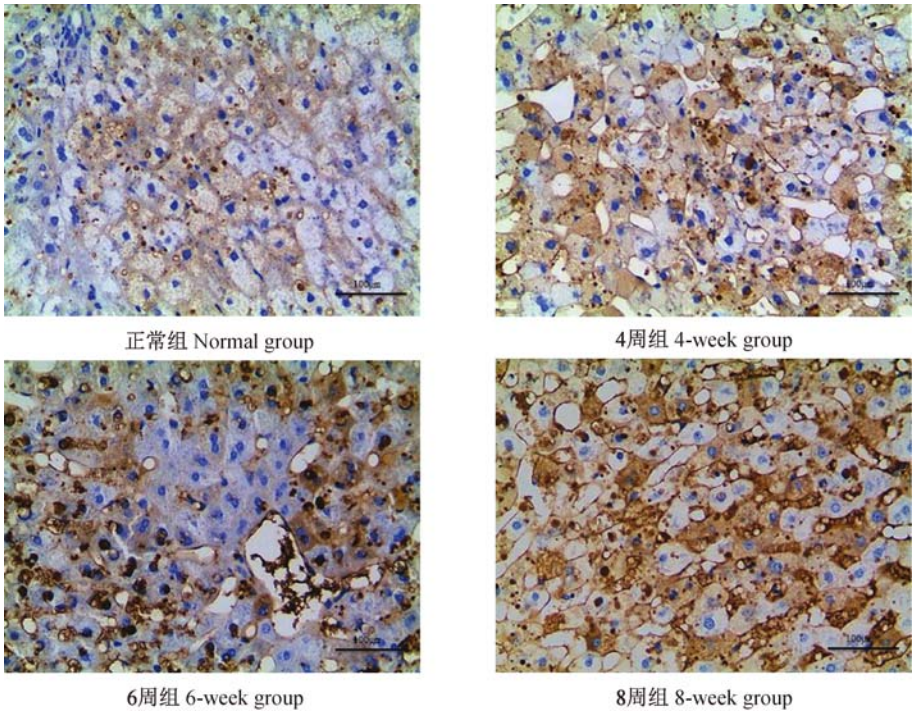


图 4 Bax 在各组动物肝组织表达情况(标尺 = 100 μm)

Fig. 4 The expression of Bax in the liver tissue of the NALFD rabbits. (Bar = 100 μm)

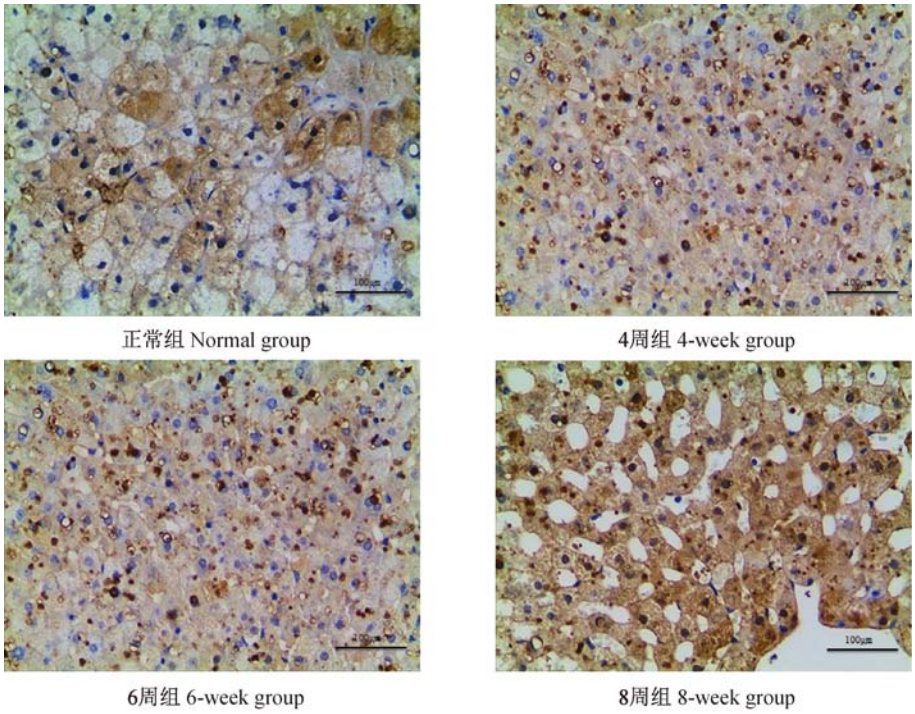


图 5 细胞色素 C 在各组动物肝组织表达情况(标尺 = 100 μm)

Fig. 5 Expression of cytochrome c in the liver tissue of the NALFD rabbits. (Bar = 100 μm)

白表达明显增加,随脂肪肝程度的加重,逐渐增高。

3 讨论

细胞凋亡是受细胞内源性基因、酶和信号传导途径等共同调控的一个激活过程,胱冬肽酶(caspase)处于细胞凋亡过程中的关键地位[11]。Caspase-3 作为细胞凋亡信号的执行者,它的激活可诱导细胞凋亡的发生,在细胞凋亡早期的启动与执

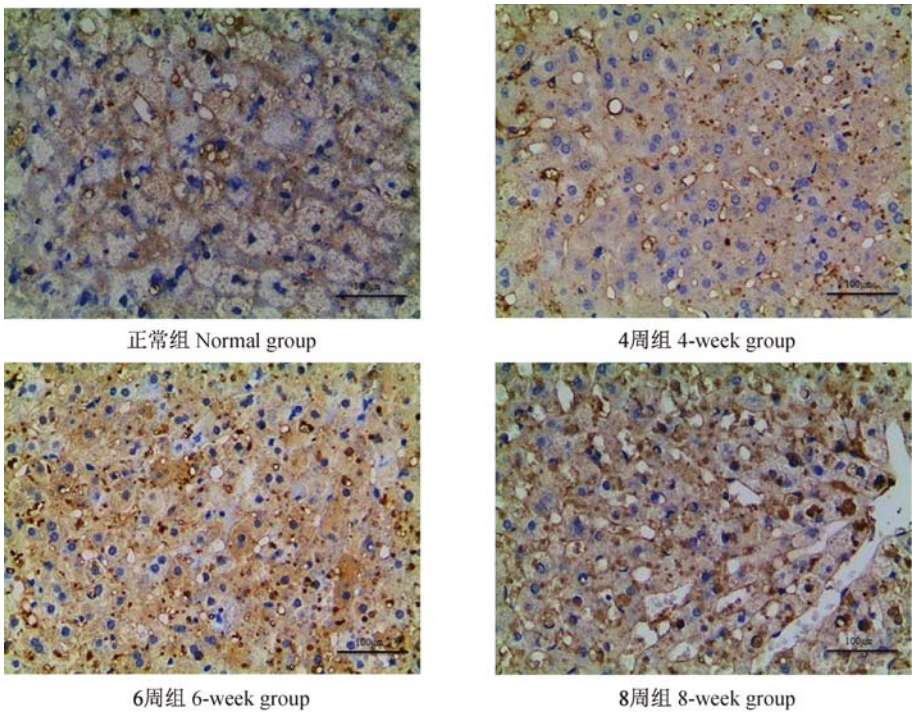
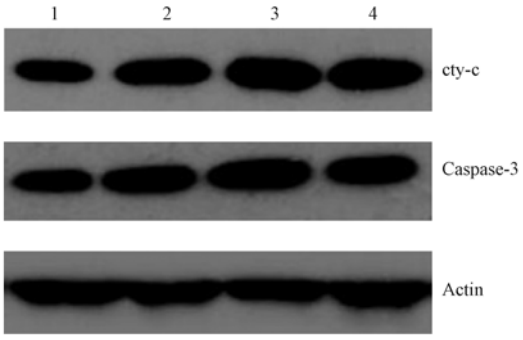


图 6　Caspase-3 在各组动物肝组织表达情况(标尺 = 100 μm)

Fig. 6　Expression of caspase-3 in the liver tissue of NALFD rabbits. (Bar = 100 μm)



1 ~ 4 依次为正常组、4 周组、6 周组和 8 周组

图 7　Caspase-3 和细胞色素 C 蛋白的表达

Fig. 7　Expression of caspase-3 and cytochrome c proteins in each group of the rabbits.

行过程中起着重要作用。此外,在细胞凋亡过程中, MPTP 的异常开放可导致线粒体电子传递链和氧化磷酸化解耦联、ATP 衰竭、线粒体肿胀及内膜嵴消失,从而促使细胞色素 C 和相关凋亡诱导因子从线粒体释放至细胞质,活化凋亡蛋白家族的主要成员胱冬肽酶,触发瀑布式级联反应,诱导细胞凋亡[12]。

本实验成功建立兔 NAFLD 模型,流式细胞术发现肝细胞凋亡指数与 NAFLD 模型中肝脏脂肪病变及炎症程度成正相关,随着脂肪肝程度以及肝细胞炎症、坏死的加重,其肝细胞凋亡指数显著增高,与国外研究的结果相一致[5,7]。MPTP 开放增加幅度与肝脏病变程度成正相关。免疫组化及 Western blot 显示 Bcl-2、Bax 蛋白在 NAFLD 肝细胞中的表达与正常对照组比较均有所增加,二者被诱导活化;但 Bax 较 Bcl-2 蛋白的表达量增加明显,Bcl-2/Bax 比值进行性降低。可推测 Bax 蛋白上调以及 Bcl-2/Bax 比例失调可能是 MPTP 开放、线粒体损伤,促使肝细胞凋亡的重要原因之一。另外,Caspase-3 和细胞色素 C 的表达量随 NAFLD 病程的发展而升高,提示 caspase-3 被激活以及由 MPTP 开放引起的细胞色素 C 的释放增加与非酒精性脂肪肝引起的肝细胞凋亡密切相关,参与了非酒精性脂肪肝的发生和发展。上述阐明了线粒体-细胞色素 C 途径在非酒精性脂肪肝兔肝细胞凋亡中的作用,为进一步探明 NAFLD 可能的发病机制,阻断 NAFLD 进展提供了理论依据。

参考文献:

[1] Farrell GC, Wong VWS, Chitturi S. NAFLD in Asia—as common and important as in the West [J]. Nature Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(5): 307.

[2] Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: a massive problem [J]. Clin Med, 2011, 11(2): 176 - 178.

[3] 杨玉琴, 冯洁, 柏熊, 等. 东方田鼠非酒精性脂肪肝模型的

(下转第 23 页)

研究报告

右美托咪定对脓毒血症大鼠肾功能及紧密连接蛋白表达的影响

李金洁[1],康吉龙[1],赵 英[2],赵 颖[3]

(1. 延边大学临床学院, 延吉 吉林 133002;2. 沈阳军区总医院心内科,沈阳 辽宁 110016;
3. 吉林大学第一医院肾病科,长春 吉林 130021)

【摘要】 目的 探讨右美托咪定对脓毒血症大鼠肾功能及紧密连接蛋白表达的影响。**方法** SD 大鼠 30 只,随机分为右美托咪定处理组(Dex 组)、脓毒血症模型组(M 组)、生理盐水对照组(C 组),每组 10 只。Dex 组大鼠静脉注射脂多糖(LPS)5 mg/kg,之后泵注 Dex 7 μg/ kg,15 min 后调整剂量为 5 μg/ kg·h,持续泵注 30 min;模型组按同样方法给予 LPS 后泵注生理盐水;C 组始终采用上述方法给予生理盐水。24 h 后取血液分离血浆,多功能生化仪检测肌酐(Scr)和尿素氮(BUN)含量;ELISA 检测 IL-1β 和 TNF-α 含量;Western blot 检测肾组织中紧密连接蛋白 ZO-1 和 occludin 的表达变化。**结果** 与 C 组相比,模型组损伤较重,可见大量炎性细胞浸润,有肾小球肾炎表现,而 Dex 组未见明显的炎症细胞,细胞异常较少,与模型组相比,损伤减轻。肾功能及炎性因子检测结果显示,与 C 组比较,各组血浆中 Scr、BUN、IL-1β 和 TNF-α 含量均显著升高($P<0.05$),ZO-1 和 occludin 蛋白表达水平均下降($P<0.05$);与模型组比较,Dex 组各项指标均明显降低($P<0.05$),ZO-1 和 occludin 蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。**结论** 右美托咪定可改善脓毒血症所致的急性肾损伤的肾功能,抑制炎症反应,提升紧密连接蛋白,对肾脏有一定的保护作用。

【关键词】 右美托咪定;脓毒血症;肾功能;紧密连接蛋白
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】**1671-7856(2016) 04-0014-04
doi: 10.3969.j.issn.1671 – 7856.2016.04.003

Effect of dexmedetomidine on the renal function and expression of tight junction protein ZO-1 and occludin in the kidney of rats with septicopyemia

Li Jin-jie [1], Kang Ji-long[1], Zhao Ying[2], Zhao Ying [3]

(1. Yanbian University, Yanbian, Jilin 133002, China; 2. Shenyang Military General Hospital of Shenyang District, Shenyang 110016; 3. the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of dexmedetomidine on the renal function and the expression of tight junction protein ZO-1 and occluding in the kidney of rats with septicopyemia induced by lipopolysaccharide. **Methods** Thirty adult male SD rats were randomly divided into 3 groups (n = 10 each): control group(group C), LPS group (group M), and dexmedetomidine group (group Dex). In the groups Dex and LPS, the rats were infused with saline and lipopolysaccharide (5 mg/kg, i.v.) respectively. In the Dex group, after intravenous injection of lipopolysaccharide (5 mg/kg), the rats were firstly infused the loaded dose of dexmedetomidine (7 μg/kg) for 15 minutes, and then changed to

[作者简介]李金洁(1994 –),女,主要研究方向:麻醉学,E-mail: lijinjie1994@163.com。
[通讯作者]康吉龙, 1961 年 12 月,硕士,主任医师,麻醉科副主任,麻醉学专业,E-mail: 15526770722@163.com。

5 μg/kg·min for 30 minutes. Blood samples were collected at 24 h later for measuring TNF-α, IL-1β, Scr and BUN. The kidney tissues were examined by histopathology. The expression of ZO-1 and occludin was detected by Western blot. **Results** Compared with the group C, the kidney tissue of group M was extensively damaged with tubular dilatation and inflammation, while reduced in the group Dex. Compared with the group C, the expressions of Scr, BUN, IL-1β and TNF-α were all enhanced in the groups M and Dex ($P < 0.05$), while the inflammatory factors in the group Dex were significantly lower than those of the group M ($P < 0.05$). The **Results** The Western blot analysis showed that the expressions of protein ZO-1 and occludin in the group Dex were significantly higher than those of the group M ($P < 0.05$). **Conclusions** Dexmedetomidine can improve the renal function of rats with septicopyemia, inhibit the acute renal injury and inflammation, increase the expression of protein ZO-1, and exert certain protective effect on the kidneys.

【**Key words**】 Dexmedetomidine; Septicopyemia; Renal function; Occludin; ZO-1; Kidney; Rat

脓毒血症(septicopyemia)亦称脓毒症,是指由微生物及其毒素等产物所引起的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)[1,2]。临床中由脓毒血症引发的急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是 ICU 的一个严重医疗问题,死亡率高达 70%[3]。目前,有关 AKI 的防治尚缺少行之有效的技术和方法,致使脓毒血症患者 AKI 的发病率和死亡率居高不下。研究表明右美托咪定(dexmedetomidine, Dex)属于 α_2-肾上腺素能受体(α_2-AR)激动剂,具镇静、镇痛和稳定循环的作用,且在缺血再灌注等多种手术方法中对心、脑、肾、肺等重要脏器还有保护作用[4],但其潜在的分子机制仍不清楚。本研究建立脓毒血症大鼠模型,同时给予 Dex 干预,对比观察大鼠血浆中肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、白介素-1β(IL-1β)和肿瘤坏死因子 α(TNF-α)的含量变化以及肾组织中紧密连接蛋白 ZO-1 和 occludin 的表达变化,旨在观察 Dex 对脓毒血症大鼠急性肾损伤的保护作用,初步探讨其作用机制,为临床防治脓毒血症损伤提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

选取健康雄性 SD 大鼠 30 只,体重 220 ~ 280 g,由延边大学实验动物室提供,严格按照延边大学实验动物管理办法进行实验,动物生产许可证号【SCXK(吉)2011 - 0009】;使用许可证号【SYXK(吉)2011 - 0007】。将大鼠随机分为右美托咪定后处理组(Dex 组)、脓毒血症模型组(M 组)、生理盐水对照组(C 组),每组 10 只。

1.2 脓毒血症大鼠模型的建立

各组大鼠于造模前禁食水 6 h,腹腔注射 10% 水合氯醛行麻醉处理,仰卧位固定;Dex 组大鼠静脉注射脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(LPS from Escherichia coli 0111:B4, Sigma, L2630)5 mg/kg,之后泵注 Dex 7 μg/kg,15 min 后调整剂量为 5 μg/kg·h,持续泵注 30 min;模型组按同样方法给予 LPS 后泵注生理盐水;C 组始终采用上述方法给予生理盐水。

1.3 样本采集与检测

各组于 LPS 注入 24 h 后,水合氯醛麻醉,股动脉放血处死,取血液分离血浆,一部分送检验科用检测肌酐(Scr)和尿素氮(BUN)含量,另一部分用 ELISA 试剂盒(美国 R&D)检测血浆中 IL-1β 和 TNF-α 含量;取一侧肾组织,一部分固定于福尔马林中,常规石蜡包埋切片,HE 染色观察肾脏组织学变化;另一部分肾脏加 RIPA 裂解液,冰上超声裂解,用 Western blot 法检测肾脏中 ZO-1 和 Occludin 蛋白的表达情况。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

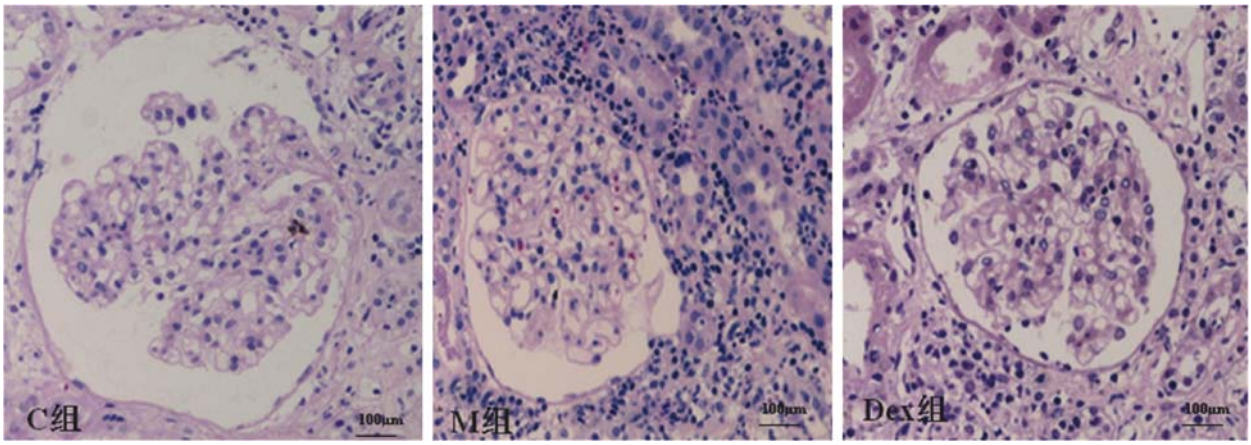
2 结果

2.1 肾脏病理组织学变化

C 组肾脏未见明显病理组织学变化,与其相比,模型组肾脏损伤较重,可见大量炎性细胞浸润,有肾小球肾炎表现;而 Dex 组肾脏未见明显的炎症细胞,细胞异常较少,与模型组相比,损伤减轻(图 1)。

2.2 各组肾功能检测结果

血浆肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)检测结果如表 1 所示,与 C 组相比,Dex 组和模型组中 Scr 和 BUN 含量显著升高($P < 0.05$);但 Dex 组中 Scr 和 BUN 含量显著低于模型组($P < 0.05$)。



注:C 组对照组,注射生理盐水;M 组模型组,注射 LPS;Dex 组给予 LPS 后注射右美托咪定

图 1 肾脏 HE 染色结果 ×200(标尺 =100μm)

Note. C: Control group, saline; M: Model group, injected LPS;
Dex: The rats in the Dex group were given dexmedetomidine after LPS injection

Fig. 1 Histological changes of the rat kidneys. HE staining, ×200(Bar = 100 μm)

表 1 肾功能检测结果

Tab. 1 Results of renal function tests

组别 Groups	肌酐(μmol/L) Scr(μmol/L)	尿素氮(mmol/L) BUN(mmol/L)
C 组 Group C	40. 21 ±6. 31	6. 01 ±0. 41
模型组 Group M	130. 34 ±11. 39 *	28. 56 ±4. 34 *
Dex 组 Group Dex	80. 29 ±10. 12 * △	19. 15 ±5. 08 * △

注:与 C 组比较,* P □ 0. 05;与模型组比较,△ P <0. 05

Note. * P < 0. 05, compared with the control group; △ P < 0. 05, compared with the model group.

2. 3 各组炎症因子检测结果

各组炎症因子检测结果如表 2 所示,与 C 组相比,Dex 组和模型组中 IL-1β 和 TNF-α 含量显著升高(P <0. 05);但 Dex 组中 IL-1β 和 TNF-α 含量显著低于模型组(P <0. 05)。

表 2 炎症因子检测结果

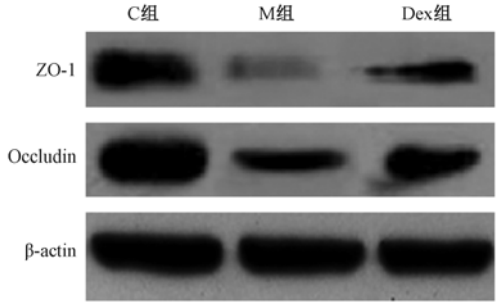
Tab. 2 Results of detection of inflammatory cytokines

组别 Groups	白介素-1β IL-1β(ng/L)	肿瘤坏死因子 α TNF-α(ng/L)
C 组 Group C	73. 56 ±12. 15	63. 17 ±12. 13
模型组 Group M	165. 34 ±21. 17 *	147. 59 ±22. 38 *
Dex 组 Group Dex	112. 69 ±17. 81 * △	97. 69 ±16. 28 * △

注:与 C 组比较,* P <0. 05;与模型组比较,△ P <0. 05

2. 4 ZO-1 和 Occludin 的表达

与 C 组比较,各实验组 ZO-1 和 occludin 蛋白表达水平均下降(P <0. 05)。与模型组比较,Dex 组 ZO-1 和 occludin 蛋白表达水平均升高(P <0. 05),见图 2 和表 3。



注:C 组对照组,注射生理盐水;M 组模型组,注射 LPS;
Dex 组给予 LPS 后注射右美托咪定

图 2 各组肾脏 ZO-1 和 occludin 表达检测

Note. C: Control group, saline; M: Model group, injected with LPS;
Dex: Group Dex was given dexmedetomidine after LPS injection.

Fig. 2 The expression of ZO-1 and occludin in each group

表 3 各组大鼠肾组织 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达的变化($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The expressions of ZO-1 and occludin in each group

组别 Groups	ZO-1	Occludin
C 组 Group C	0. 66 ±0. 10	0. 85 ±0. 11
模型组 Group M	0. 21 ±0. 04 *	0. 36 ±0. 05 *
Dex 组 Group Dex	0. 48 ±0. 06 * △	0. 64 ±0. 06 * △

注:与 C 组比较,* P <0. 05;与模型组比较,△ P <0. 05

Note. * P < 0. 05, compared with the control group; △ P < 0. 05, compared with the model group.

3 讨论

脓毒血症是由多种感染因素诱发引起的剧烈的全身炎症反应综合征,是一种全身化脓性疾病。脓毒血症病情较为凶险,可引起多种脏器的损伤,病死率极高,对人类健康造成了巨大威胁。在各类脏器损伤中,肾脏的损伤十分常见[5, 6]。本实验参考文献[7],将 LPS 注射大鼠建立脓毒血症模型,大鼠 24 h 后死亡率高,IL-1β 和 TNF-α 炎症因子表达增强,心脏、肺脏、肠、肾脏等器官均有不同程度损伤,可见本实验成功建立脓毒血症大鼠模型。目前研究表明,由脓毒血症引发急性肾损伤(AKI)的主要机制是肾脏的自身调节出现障碍,使肾脏出现"压力灌注—流量灌注分离"现象;而炎症反应和多聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)过度活化也参与了 AKI 的发病[5, 8, 9]。寻找能够抑制炎症反应和调节肾灌注的措施对于降低感染性休克致 AKI 的发生具有重要意义。

Dex 可通过抑制去甲肾上腺素的释放,调节交感神经张力和肾血管阻力并抑制血管加压素分泌,改善肾血流、增加肾小球滤过率和产生利尿作用,从而保护了肾组织细胞和肾功能[10]。Dahmani 等[11]研究结果显示,Dex 可通过改善肾脏外层髓质血流而降低造影剂导致小鼠的肾脏损伤。此外,Dex 还可激动肾小管上皮细胞的 a2AR 受体,而抑制抗利尿激素的释放,增加利钠多肽释放和肾小球滤过,同时降低循环血浆 NE 水平,使肾脏血管扩张、血流量增加,从而达到肾脏的保护作用[12]。临床上通常采用 BUN 和 Scr 来评估患者肾功能,BUN 和 Scr 值在正常范围内表明肾脏可以排出体内废物,维持内环境稳定,当肾脏发生损伤时,这两个指标会出现异常。本研究在建立脓毒血症大鼠模型的基础上给予 Dex 干预,从病理组织学和血浆中 BUN 和 Scr 指标变化来评估肾功能,结果模型组肾脏损伤较重,Dex 干预后异常细胞明显减少,在一定程度上减轻 LPS 致大鼠近端和远端小管超微结构的改变,且 BUN 和 Scr 浓度明显降低。提示 Dex 对脓毒血症大鼠肾功能有一定的保护作用。

脓毒血症上皮细胞是细胞因子作用的靶点,LPS 可致管周毛细血管功能障碍及肾小管上皮细胞损伤。有研究显示,Dex 可通过抑制脱乙酰基酶组蛋白 HDAC2 和 HDAC5 表达,从而减少促炎细胞因子,降低炎症反应,而提高脓毒血症大鼠的生存率[13]。持续输注 Dex 可减轻肾缺血/再灌注(I/R)损伤,提高对肾损伤的耐受性[14, 15]。本研究表明,Dex 可减轻 LPS 所致血清炎性因子 TNF-α 和 IL-6 水平的升高,提示 Dex 对脓毒症诱发的炎性反应有一定的抑制作用。

紧密连接在肾发育过程—肾单位形成中发挥重要的作用。研究表明,在缺血性损伤、自由基损伤及 ATP 缺失的情况下,各种组织的紧密连接蛋白断裂,表达发生改变,且紧密连接蛋白调控肾小管细胞旁通透性。ZO-1 作为紧密连接的组织者,可介导信号转导和蛋白间的相互作用;Occludin 与其对细胞膜的调节有关,可增加其对低分子量分子的细胞旁通透性[16, 17]。本研究结果表明,脓毒血症大鼠肾组织紧密连接蛋白 ZO-1 和 occludin 的表达明显下降,而一定剂量的 Dex 在一定程度上可上调由脓毒血症致大鼠肾组织紧密连接蛋白 ZO-1 和 occludin 的表达。

综上所述,Dex 可减轻脓毒血症引起的肾组织炎症反应,改善肾功能,且上调肾组织紧密连接蛋白 ZO-1 和 occludin 蛋白的表达,上调肾组织紧密连接蛋白表达可能是其发挥的保护作用的机制之一。

参考文献:

[1] Zullo JA, Fan J, Azar TT, et al. Exocytosis of endothelial lysosome-related organelles hair-Triggers a patchy loss of glycocalyx at the onset of sepsis[J]. Am J Pathol, 2016, 186(2): 248 – 258

[2] 李鸿,贾丙申. 激素合并内毒素诱导大鼠股骨头坏死扫描电镜观察[J]. 中国比较医学杂志,2007, (05): 256 – 258.

[3] Wong DM, Wilkins PA. Defining the systemic inflammatory response syndrome in equine neonates[J]. Vet Clin North Am Equine Pract. 2015, 31(3): 463 – 481.

[4] Li Y, He R, Chen S, et al. Effect of dexmedetomidine on early postoperative cognitive dysfunction and peri-operative inflammation in elderly patients undergoing laparoscopic cholecystectomy[J]. Exp Ther Med, 2015, 10(5): 1635 – 1642.

[5] 王春雨,凡春玲,罗晓红,等. 内毒素致多脏器功能障碍综合征绵羊模型的建立[J]. 中国比较医学杂志,2011, (08): 49 – 52.

[6] 王喆,郭广进,熊敏,等. 急性低压缺氧对大鼠肾组织中生化指标变化的研究[J]. 中国比较医学杂志,2014, (03): 30 – 33.

[7] 孟建中,郭爱华,李丹丹,等. 盐酸法舒地尔防治脓毒血症大鼠急性肾损伤的实验研究[J]. 生物医学工程研究,2010, (03): 197 – 201.

(下转第 45 页)

研究报告

Raf-1 基因重组腺病毒 siRNA 载体构建及其对大鼠心肌细胞肥大的影响

郑亚萍[1],刘春杰[2]

(漯河医学高等专科学校 1. 生理教研室,2. 药理教研室, 河南 漯河 462002)

【摘要】 **目的** 构建特异性抑制大鼠 Raf-1 基因的重组腺病毒载体,并将其体外转导大鼠心肌细胞中进行功能鉴定。**方法** 合成针对大鼠 Raf-1 的靶序列及阴性对照序列,经退火形成的 DNA 双链定向克隆到穿梭质粒 pAdTrackCMV 中获得 pAdTrack-siRaf-1 质粒,PmeI 线性化后在 BJ5183 细菌中与 pAdEasy-1 骨架质粒进行同源重组获得 pAd-siRaf-1 质粒,后转染 HEK293 细胞,包装获得 pAd-siRaf-1 腺病毒颗粒,继而感染原代培养的心肌细胞,通过 Western blot 方法检测 siRNA 对 Raf-1、NF-κB 基因的抑制效率,液体闪烁计数仪测定^{3}H-亮氨酸([^{3}H]-leu)掺入率,用 HJ2000 图像分析系统测定细胞表面积。**结果** 重组腺病毒载体经酶切、鉴定正确, 制备的病毒感染效率高, 携带 Raf-1 的病毒颗粒能够在蛋白水平有效抑制 Ang II 诱导心肌细胞 Raf-1 的表达、细胞表面积及[^{3}H]-leu 的增加并下调 Raf-1、NF-κB 表达。**结论** 成功构建了 pAd-siRaf-1 重组腺病毒载体,并在 HEK293 细胞中包装成重组腺病毒,转染心肌细胞后能有效抑制 Raf-1、NF-κB 表达,抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大。

【关键词】 Raf-1;小干扰 RNA;重组腺病毒载体;心肌细胞;大鼠

【中图分类号】R-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2016) 04-0018-06

doi: 10.3969.j.issn.1671 -7856.2016.04.004

Construction and effect of recombinant adenovirus vector containing siRNA targeting Raf-1 on cardiomyocyte hypertrophy in neonatal rats

ZHENG Ya-Ping[1], LIU Chun-Jie[2]

(1. Department of Physiology, 2. Department of Pharmacology, Luohe Medical College, Luohe, Henan 462002, China)

【Abstract】 **Objective** To construct an adenovirus vector expressing small interfering RNA (siRNA) targeting to rat Raf-1 gene and identify its function in cardiomyocytes. **Methods** The siRNA containing DNA sequence targeting to Raf-1 and its negative control sequence were designed, synthesized, annealed and subcloned into adenoviral shuttle vector pAdTrack-CMV. The recombinant adenovirus vector pAd-siRaf-1 was obtained by homologous recombination with pAdTrack-siRaf-1 linearized by PmeI and pAdeasy-1 in bacteria BJ5183, then transfected into HEK293 cells to package the adenovirus. Cardiomyocytes were infected with the adenovirus pAd-siRaf-1, and the expressions of Raf-1 and NF-κB protein were detected by Western blotting. [^{3}H]-leu incorporation was evaluated by scintillation. The surface area of cardiomyocytes was measured using a HJ2000 image analysis system. **Results** The adenovirus vectors were verified by enzyme digestion and DNA sequencing. Compared with the Ang II group, Raf-1 and NF-κB expression, the surface area and [^{3}H]-leu incorporation of cardiomyocytes were significantly decreased in cardiomyocytes infected with the adenovirus PAd-siRaf-1. **Conclusions** A recombinant adenovirus vector containing rat siRaf-1 gene is successfully constructed. It can effectively reduce Raf-1 and NF-κB expression and cardiomyocyte hypertrophy induced by Ang II.

[**基金项目**]河南省教育厅青年骨干教师资助项目(No. 2013GGJS-271)。

[**通讯作者**]郑亚萍(1976 -),女,硕士,副教授,研究方向:循环生理学。

【Key words】 Raf-1; siRNA; Recombinant adenovirus vector; Cardiomyocytes; Rat

Raf-1 蛋白是由 raf 基因编码的蛋白产物,可通过 Raf-1 蛋白激酶磷酸化而激活,Raf-1 蛋白激酶是 RAF/NF-κB 等信号传导途径中的重要信号分子,被激活的 Raf-1 过表达与细胞增殖、应激甚至与凋亡密切相关[1,2],但目前 Raf-1 对心肌肥厚中的作用还存在一定的争议。研究显示 RAS/RAF/MEK/ERK 信号通路对大鼠心肌有明显的促肥厚效应,但也有报道提示抑制 RAS/RAF 激活并不能减轻心肌细胞肥大反应[3,4]。另一方面,目前在心肌肥大细胞模型中,暂无明确研究证明 NF-κB 与心肌细胞肥大的关系,且 RAF/NF-κB 等信号传导途径对心肌肥大的作用也少见报道,尚需进一步研究。本研究的目的在于拟构建大鼠 Raf-1siRNA 腺病毒载体,转染后观察其对 Raf-1 蛋白表达的影响,并通过在基因水平沉默技术研究 Raf-1 及 RAF/NF-κB 等信号传导途径对心肌细胞肥大的影响,为探讨 Raf-1 对心肌肥厚的作用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

出生 2 ~ 3 d SD 乳鼠,由河南省实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(豫)2010 - 0002,使用许可证号:SYXK(豫)2011 - 0001。

1.2 材料及试剂

穿梭质粒 pAdTrackCMV 质粒、腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 购自 Stratagene 公司、293 细胞株购自 Invitrogen 公司、感受态大肠埃希菌 DH5a 及 BJ5183 菌种来自本实验室留存;PacI、PmeI、Kpn Ⅰ和 Bgl II 酶购自 New England Biolabs 公司,Raf-1 克隆抗体、NF-κB 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,[^{3}H]-亮氨酸([^{3}H]-Leu)购于中国原子能研究院。

1.3 心肌细胞的培养及鉴定

取出生后 2 d ~ 3 d 的 SD 乳鼠,在无菌条件下取出心室并剪碎,在 0.1% 胰酶消化后收集细胞,离心弃上清液,将所得全部细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液重悬,置于二氧化碳培养箱中孵育,采用差速贴壁获得心肌细胞,免疫组化染色显示 α-横纹肌肌动蛋白阳性率。

1.4 Raf-1 基因重组腺病毒 siRNA 载体构建

1.4.1 Raf-1 siRNA 序列的设计:从 GenBank 中获得 SD 大鼠基因核苷酸序列(NM_012639.2),通过 http://sirna.wi.mit.edu/home.php 辅助设计出 3 条靶序列,1. siRaf-1-1 (1612 - 1630):TTCCAGATGTTCCAGCTAA;2. siRaf-1-2(776 - 794):ATGGATTTCGAT GTC AGAC;3. siRaf-1-3(2067 - 2085) AGTCAAAGAAGAAAGGCCT,将所选取的序列进行 Blast,未发现同源序列,另设 siRNA 阴性对照(与人类及其他哺乳动物非同源的无关序列)。人工合成针对 Raf-1 不同靶序列的 3 对及 siRNA 阴性对照序列 1 对引物,每对互补的单链模板 DNA 在正义链的 5' 端引入 Kpn Ⅰ酶切位点、在反义链的 5' 端引入 Bgl Ⅱ酶切位点,环(Loop)的序列为 5'-GCAAGAG -3'(表 1)。

1.4.2 重组腺病毒载体 pAd-Raf-1-siRNA 的构建及鉴定:合成四对寡核苷酸经 95℃退火后形成双链寡核苷酸,与 Kpn I 和 Bgl II 双酶切 pAdTrackCMV 质粒连接,转入大肠埃希菌 DH5a 转化,通过卡那霉素筛选并挑取单个菌落进行培养,抽提质粒后分别进行酶切鉴定和测序鉴定。用 PmeI 对 pAdTrack-siRaf-1 和阴性对照 pAdTrack-siCon 穿梭载体进行线性化,CIP 去磷酸化后,在大肠杆菌 BJ5183 中与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 进行同源重组,获取 pAd-siRaf-1 及 pAd-siCon 用带有卡那霉素(50 μg/mL)的 LB 平板进行筛选相对分子质量大于 pAdeasy-1

表 1 Raf-1 和阴性对照 siRNA 模板 DNA 序列

Tab. 1 Sequences of the Raf-1 and negative control siRNA template DNA

靶位点 Target site	SiRNA 模板序列 SiRNA template sequence
siRaf-1-1	F:5'-GTACTTCCAGATGTTCCAGCTAAGCAAGAGTTAGCTGGAACATCTGGAATTTTTG-3'
	R:5'-GATCCAAAAATTCCAGATGTTCCAGCTAACTCTTGCTTAGCTGGAACATCTGGAA-3'
siRaf-1-2	F:5'-GTACATGGATTTCGATGTCAGACGCAAGAGGTCTGACATCGAAATCCATTTTTTG-3'
	R:5'-GATCCAAAAAATGGATTTCGATGTCAGACCTCTTGCGTCTGACATCGAAATCCAT-3'
siRaf-1-3	F:5'-GTACAGTCAAAGAAGAAAGGCCTGCAAGAGAGGCCTTTCTTCTTTGACTTTTTTG-3'
	R:5'-GATCCAAAAAAGTCAAAGAAGAAAGGCCTCTCTTGCAGGCCTTTCTTCTTTGACT-3'
Negative control(siCon)	F:5'-GTACTTCTCCGAACGTGTCACGTGCAAGAGACGTGACACGTTCGGAGAATTTTTG-3'
	R:5'-GATCCAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTCTCTTGCACGTGACACGTTCGGAGAA-3'

质粒, PacI 酶切鉴定。

1.4.3 腺病毒的包装、扩增和滴度测定:重组腺病毒载体经 PacI 酶切、乙醇纯化后, Lipofectamine 2 000转染入 293 细胞中。培养 5 d ~ 7 d 后可见细胞出现贴壁细胞变圆, 肿胀,即病变效应(cytopathic effect, CPE), 待观察到 90% 以上细胞出现 CPE,将细胞在 -70 ℃和 37 ℃反复冻融 3 次, 3 000 r/min 离心 5 min, 收集原代病毒上清液,经反复“感染-冻融-收集”,扩增重组腺病毒至第四代后, 合并浓缩病毒液,进行病毒的滴度测定,病毒滴度(Pfu/mL) = 10^7 × 平均 GFP 阳性的细胞数/视野(100)

1.5 心肌细胞培养、鉴定

取出生 2 d ~ 3 d 的 SD 乳鼠,在无菌条件下取出心室,剪碎、0.1% 胰酶消化,收集细胞,离心弃上清液,将所得全部细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬,置于二氧化碳培养箱中孵育。根据心肌细胞和成纤维细胞贴壁时间不同,采用差速贴壁 1.5 h,获得心肌细胞。免疫组化染色(S-P 法)观察 α-横纹肌肌动蛋白反应。

1.6 Western blot 检测 siRaf-1、NF-κB 在肥大心肌细胞中的表达

胰酶消化细胞后, 以每孔 1.5 × 10^5/孔的心肌细胞数接种 6 孔板,用获得重组腺病毒按 50MOI 的量分别感染心肌细胞的同时加用 10^{-7} mol/L Ang II,另设 Ang II 组(单用 10^{-7}mol/Lang II)及空白心肌细胞组(不加处理因素),48 h 收集细胞后提取各组细胞的蛋白质,电泳、转膜后加封闭液,室温封闭 60 min;加入稀释 1∶2 000 Anti-rat Raf-1、1∶500 NF-κB 一抗孵育,4℃ 摇床过夜;洗涤 3 次用封闭液 1∶5 000 稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗, 37℃孵育 1 h;漂洗后加显色剂,避光显色 2 min ~ 5 min,条带出现,终止反应,以 β-actin 为内参,进行比较。

1.7 心肌细胞大小测定

每孔 1.5 × 10^5/孔的心肌细胞数接种 6 孔板,用获得重组腺病毒按 50MOI 的量分别感染心肌细胞的同时加用 10^{-7} mol/L Ang II,另设 Ang II 组(单用 10^{-7}mol/Lang II)及空白心肌细胞组(不加处理因素),胰酶消化脱落细胞后用相差显微镜拍照,每孔取 10 个视野,每视野取 10 个细胞,用 HJ2000 图像分析系统测定细胞表面积,取平均值。

1.8 心肌细胞 [^{3}H]-Leu 掺入率测定

加药物干预的同时加入[^{3}H]-Leu(3.7 × 104 Bq/孔),培养 48 h 后用 PBS 液充分冲洗,再将细胞收集于玻璃纤维滤膜上,用预冷的 10% 三氯乙酸和 PBS 冲洗,裂解液裂解细胞 30 min,收集细胞裂解液置于含闪烁液的液闪杯中, 用液体闪烁仪测定放射性强度(dpm)。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 描述,组间比较采用方差分析,$P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 重组腺病毒载体的构建及鉴定

四对 siRNA 单链寡核苷酸成功退火, 合成四个双链 DNA 模板,得到约 100 bp 的两个片段。抽提 pAdTrack-siRaf-1 和 pAdTrack-siCon 质粒后分别进行 Kpn I 和 Bgl II 双酶切鉴定,出现约 9 000 bp 和小于 100 bp 两片段(图 1);将构建成功的穿梭质粒与腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 在 BJ5183 细菌中进行同源重组, 成功重组的腺病毒载体经 PacI 酶切后应出现一条大于 23 kb,另一条带约为 4.3 kb(图 2), 测序鉴定明 3 个针对不同靶序列的 Raf-1 及阴性对照表达载体正确无误。

2.2 重组腺病毒的包装、扩增及滴度测定

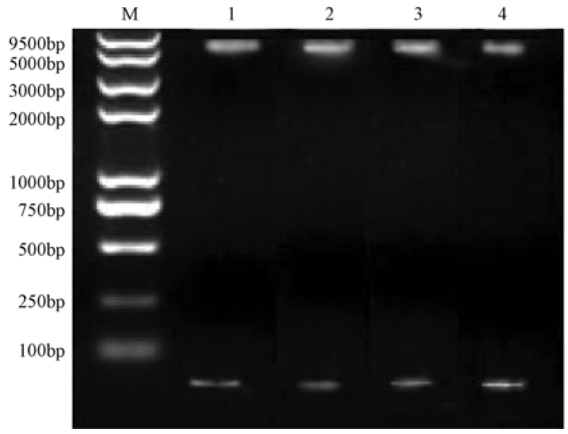
pAd-siRaf-1 及 pAd-siCon 转染包装细胞 293 细胞,转染 2 d 后,倒置荧光显微镜下可观察到绿色荧光蛋白的表达,培养细胞 10 d 后可观察到 90% 以上细胞表达绿色荧光蛋白(图 3)。收集、重复感染 293 细胞扩增病毒后, 用 GFP 阳性细胞计数法进行滴度测定, 病毒滴度分别为 3.8 × 10^{10} pfu/mL 和 3.5 × 10^{10} pfu/mL。

2.3 心肌细胞鉴定

心肌细胞形态不规则,有多个伪足伸出;免疫组化染色显示,α-横纹肌肌动蛋白呈阳性反应即为心肌细胞,取 20 个视野统计心肌细胞阳性率测得心肌细胞阳性率达 96.2%(图 4、图 5)。

2.4 pAd-siRaf-1 表达重组腺病毒病毒对 Ang II 诱导的心肌细胞表面积、[^{3}H]-Leu 掺入率及 Raf-1、NF-κB 蛋白表达的影响

Ang II 组心肌细胞表面积、[^{3}H]-Leu 掺入率及 Raf-1、NF-κB 蛋白表达显著高于空白对照组(均 $P < 0.01$); siRaf-1-1 ~ 3 重组腺病毒组心肌细胞表面积、[^{3}H]-Leu 掺入率及 Raf-1 蛋白表达明显低于 Ang II 组(均 $P < 0.05$);pAd-siCon 与空白对照组相比无明显差异(图 6,表 1)。



1. pAdTrack-siCon; 2. pAdTrack-siRaf-1-1;
3. pAdTrack-siRaf-1-2; 4. pAdTrack-siRaf-1-3

图 1　Kpn Ⅰ和 Bgl Ⅱ双酶切鉴定重组穿梭质粒

1. pAd-siCon; 2. pAd-siRaf-1-1; 3. pAd-siRaf-1-2; 4. pAdT-siRaf-1-3

Fig. 1　pAdTrack-siRaf-1 identified by Kpn I and Bgl II digestion

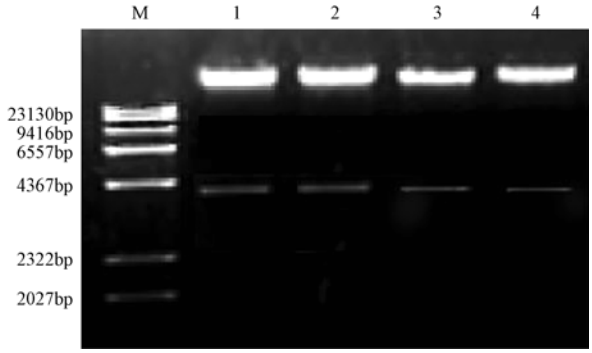
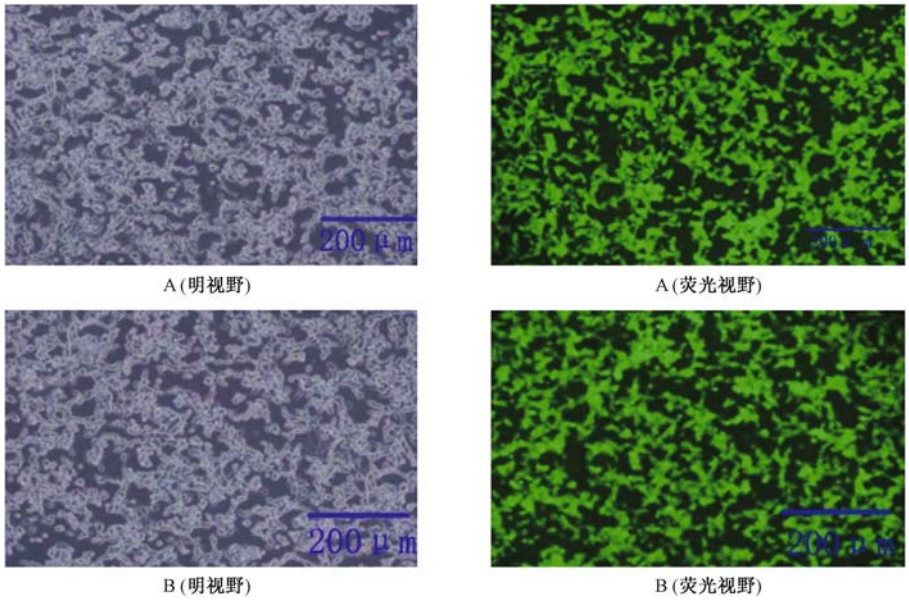


图 2　PacI 酶切鉴定重组腺病毒载体

Fig. 2　pAd-siRaf-1 identified by PacI digestion



A. pAd-siRaf-1; B. pAd-siCon

图 3　pAd-siRaf-1 及 pAd-siCon 重组腺病毒包装和转导 293 细胞(标尺 = 200μm)

Fig. 3　pAd-siRaf-1 and pAd-siCon recombinant adenovirus packaged and transduced into 293 cells (Bar = 200)

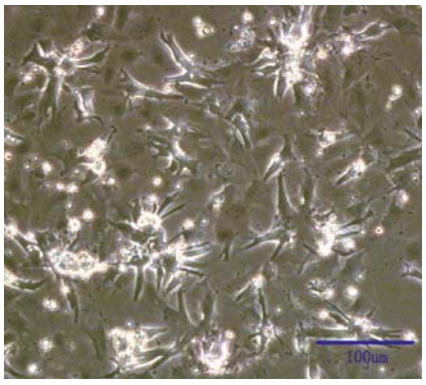


图 4　培养 3 d 的心肌细胞(标尺 = 100 μm)

Fig. 4　Cardiomyocytes cultured for 3 days(Bar = 100 μm)

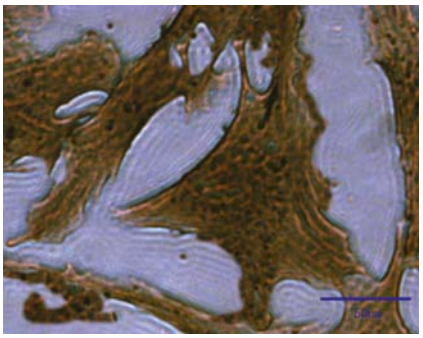


图 5　心肌细胞 S-P 染色(标尺 = 50 μm)

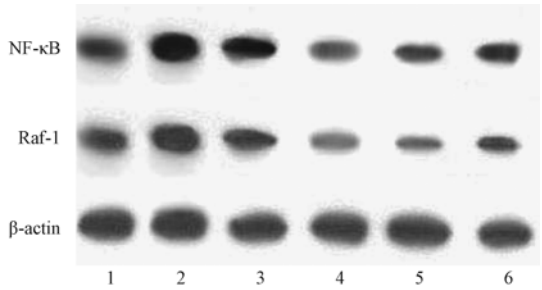
Fig. 5　Cardiomyocytes with S-P staining(Bar = 50 μm)

表 2 重组腺病毒对心肌细胞 Raf-1, NF-κB 蛋白表达、表面积及[^{3}H]-leu 掺入率的影响

Tab. 2 Effect of recombinant adenovirus on the expression of Raf-1 and NF-κB proteins, the surface area and [^{3}H]-leu incorporation of the cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	细胞表面积 Surface area(μm^2)	[^{3}H]-leu 掺入率 [^{3}H]-leu incorporation (dpm)	Raf-1 蛋白表达 Expression of Raf-1 protein	NF-κB 蛋白表达 Expression of NF-κB protein
Control	567.48 ± 6.24	151.23 ± 11.34	0.53 ± 0.04	0.74 ± 0.04
Ang II	1421.17 ± 13.83 **	387.47 ± 21.13 **	0.91 ± 0.07 **	1.51 ± 0.11 **
Ang II + pAd-siCon	1572.38 ± 9.24 **	359.68 ± 14.31 **	0.86 ± 0.03 ##	1.35 ± 0.08 **
Ang II + pAd-siRaf-1-1	738.22 ± 9.39 *##	212.41 ± 16.21 *##	0.29 ± 0.02 *##	0.51 ± 0.06 *##
Ang II + pAd-siRaf-1-2	1092.24 ± 15.32 *#	317.58 ± 18.48 *#	0.35 ± 0.05 *##	0.64 ± 0.05 ##
Ang II + pAd-siRaf-1-3	1191.41 ± 16.52 *#	328.24 ± 13.22 *#	0.55 ± 0.04 ##	0.75 ± 0.07 ##

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Compared with the control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ Compared with the Ang IIgroup.



1. 对照组;2. AngⅡ组;3. AngⅡ + pAd-siCon group; 4 ~ 6. AngⅡ + pAd-siRaf-1-1 ~ 3 组

图 6 重组腺病毒对心肌细胞中 Raf-1 及 NF-κB 蛋白表达的影响

Fig. 6 The expression of Raf-1 and NF-κB after the cardiomyocytes were transduced with pAd-siRaf-1 and pAd-siCon recombinant adenovirus

3 讨论

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种新近发展起来的能有效阻断基因表达的技术。本研究以含有表达绿色荧光蛋白基因的 pAdTrack-CMV 为穿梭载体, 能方便的观察转染效果,利用缺失了腺病毒 E1 区基因骨架质粒 pAdeasy-1, 避免腺病毒对靶细胞的损害;采用细菌内同源重组 AdEasy 系统,构建针对 Raf-1 基因的 siRNA 重组腺病毒载体,应用基因转染技术, 将其转染入 293 细胞, 在该细胞中成功地包装成含 siRaf-1 的腺病毒颗粒后, 经纯化浓缩, 滴度达到 3.8×10^{10} pfu /mL,转导入大鼠心肌细胞,有效地沉默了 Raf-1 的表达,而无关序列构建的阴性对照病毒, 转染效率与干扰病毒相当, 但不影响 Raf-1 表达。

心肌肥厚是心室重构的重要病理学特征,与心肌缺血、心力衰竭等的发生发展密切相关,心肌细胞是心肌肥厚的主要效应细胞,表现为心肌细胞肥大。Raf-1 蛋白是由 raf 基因编码的蛋白产物,由 648 个氨基酸组成,有多个丝氨酸磷酸化位点和酪氨酸磷酸化位点[5,6], RAS/RAF/MEK/ERK 信号转导过程与细胞生长、细胞周期停滞有关,对培养心肌细胞的肥厚反应有重要的调节作用[7], 但也有报道提示抑制 RAS/RAF 激活并不能减轻心肌细胞肥大反应。本实验通过构建 Raf-1 基因重组腺病毒 siRNA 研究其对心肌肥大的影响,发现 pAd-siRaf-1-1 ~ 3 重组腺病毒均能显著抑制 AngⅡ诱导的心肌细胞表面积及[^{3}H]-Leu 掺入率,提示 pAd-siRaf-1 重组腺病毒确具有抗心肌细胞肥大的作用,从基因水平证实 Raf-1 对心肌细胞肥大具有促进作用。

NF-κB 为转录因子蛋白家族成员,静息状态下, NF-κB 与其抑制蛋白以非活性的形式存在于胞浆中。当细胞因子、LPS 等刺激时, NF-κB 激酶复合物 IKKs (κB kinases)被激活, 使 κB 经快速磷酸化、泛素化后降解, 暴露出 NF-κB 的 DNA 结合域, NF-κB 发生核移位并与相应靶基因上特定的 κB 序列结合, 启动靶基因的转录[8], Raf- 1/MEK / MAPK 是激活 IKK 的主要信号通路[9,10]。研究表明 NF-κB 的激活参与糖尿病患者心肌细胞的凋亡,且其对细胞凋亡的调控作用在早期有抑制细胞凋亡而随着时间推移, NF-κB 的增多也引起了大量炎性因子的产生,其诱导细胞凋亡的作用增强,故细胞凋亡增多。大鼠心肌纤维化模型及体外培养的心肌成纤维细胞研究均证实,抑制 NF-κB 可以抑制成纤维细胞的增殖,进而抑制心肌纤维化[11,12], RAF/NF-κB 信号转导对心肌肥厚的作用尚不明确。本实验结果显示 Raf-1 基因重组腺病毒 siRNA 载体的能显著下调心肌细胞 Raf-1 及 NF-κB 蛋白表达, pAd-siRaf-1-1 的作用较 pAd-siRaf-1-2 ~ 3 作用更为明显,说明 pAd-siRaf-1 对心肌肥大的抑制作用与下调 Raf-1 表达,进而抑制 NF-κB 表达有关,且对心肌细胞沉默 Raf-1 作用肥大抑制效果最佳的为 pAd-

siRaf-1-1,证实 RAF/NF-κB 信号转导在心肌肥厚的过程中不仅有成纤维细胞增殖的参与,心肌细胞肥大参与了此过程。

总之,Raf-1 腺病毒 siRNA 能有效抑制心肌肥大,且其机制与下调 Raf-1 蛋白,进而抑制 RAF/NF-κB 信号转导有关,通过在基因水平高选择性地阻断 Raf-1、NF-κB 的药物也为治疗心肌肥厚提供了新思路。

参考文献:

[1] Robbs BK, Lucena PI, Viola JP. The transcription factor NFAT1 induces apoptosis through cooperation with Ras/Raf/MEK/ERK pathway and upregulation of TNF-α expression [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1833(8): 2016 – 2028.

[2] Lv C, Sun W, Sun H, et al. Asperolide A, a marine-derived tetranorditerpenoid, induces G2/M arrest in human NCI-H460 lung carcinoma cells, is mediated by p53-p21 stabilization and modulated by Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway [J]. Mar Drugs, 2013, 11(2): 316 – 331.

[3] Yamaguchi O, Watanabe T, Nishida K, et al. Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis[J]. J Clin Invest,2004,114(7):937 – 943.

[4] Clerk A, Bogoyevitch MA, Andersson MB, et al. Differential activation of protein kinase C isoforms by endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts [J]. J Biol Chem, 1994, 269: 32848 – 32857.

[5] Lorenz K, Schmitt J P, Vidal M, et al. Cardiac hypertrophy: targeting Raf/MEK/ERK1/2 sign-aling[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009,41(12):2351 – 2355.

[6] Pfleiderer P, Sumandea MP, Rybin VO, et al. Raf-1: a novel cardiac troponin T kinase[J]. J Muscle Res Cell Motil. 2009, 30(1 – 2): 67 – 72.

[7] 屈春生, 陈莉萍, 李道麟. 替米沙坦对大鼠心肌肥厚组织中 Raf/ MEK/ ERK 信号通路的影响 [J]. 重庆医科大学学报, 2013, 38(11): 1344 – 1347.

[8] Lee M, Kim JY, Anderson WB, et al. Src tyrosine kinase inhibitor PP2 markedly enhances Ras-independent activation of Raf-1 protein kinase by phorbolmyristate ace-tate and H_2O_2[J]. J Biol Chem, 2004, 279(47): 48692 – 48701.

[9] Hamid T, Gu Y, Ortines RV, et al. Divergent tumor necrosis factor receptor related remodeling responses in heart failure: role of nuclear factor-kappa B and inflammatory activation [J]. Circulation, 2009, 119: 1386 – 1397.

[10] 祝文静, 刘畅, 孟林燕, 等. 核因子-κB 和 caspase-3 在高糖诱导的心肌细胞代谢记忆中的表达 [J]. 广东医学, 2012, 33: 323 – 325.

[11] Wu M, Han M, Li J, et al. 17beta-estradiol inhibits angiotensin II induced cardiac myofibroblast differentiation [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 616: 155 – 159.

[12] Young D, Popovic ZB, Jones WK, et al. Blockade of NF-kappaB using I kappa B alpha dominant-negative mice ameliorates cardiac hypertrophy in myotrophin-overexpressed transgenic mice [J]. J Mol Biol, 2008, 381(3): 559 – 568.

〔修回日期〕2016-02-22

(上接第 13 页)

建立 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(2): 34 – 39.

[4] Daugherity EK, Balmus G, Saei AA, et al. The DNA damage checkpoint protein ATM promotes hepatocellular apoptosis and fibrosis in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease [J]. Cell Cycle, 2012, 11(10): 1918 – 1928.

[5] Cheng Q, Li N, Chen MQ, et al. Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular apoptosis by interacting with TNF-α and IL-6 in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis in rats [J]. Digest Dis Sci, 2013, 58(10): 2895 – 2902.

[6] Kathirvel E, Morgan K, French SW, et al. Acetyl-l-carnitine and lipoic acid improve mitochondrial abnormalities and serum levels of liver enzymes in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Nutrit Res, 2013, 33(11): 932 – 941.

[7] García RC, Baulies A, Mari M, et al. Mitochondrial dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: Cause or consequence? [J]. Free Radical Res, 2013, 47 (11): 854 – 868.

[8] 郑全喜, 王昆, 刘超. 非酒精性脂肪肝病动物模型的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 357 – 360.

[9] 楼琦, 石巧娟, 郭红刚, 等. 非酒精性脂肪肝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): 7 – 10.

[10] 邓丽丽, 藏家娜, 应华忠, 等. 热休克蛋白 70 在兔非酒精性脂肪肝纤维化过程中的作用[J]. 实验动物与比较医学, 2014, 34(2): 107 – 111.

[11] Thapaliya S, Wree A, Povero D, *et al.* Caspase 3 inactivation protects against hepatic cell death and ameliorates fibrogenesis in a diet-induced NASH model [J]. Digest Dis Sci, 2014, 59: 1197 – 1206.

[12] Cavalcanti BC, Costa PM, Carvalho AA, et al. Involvement of intrinsic mitochondrial pathway in neosergeolide-induced apoptosis of human HL-60 leukemia cells: the role of mitochondrial permeability transition pore and DNA damage [J]. Pharmaceut Biol, 2012, 50(8): 980 – 993.

〔修回日期〕2016-01-22

研究报告

恒河猴幼猴出生后生长发育参数背景数据及其行为学特征

梁志刚[1],吴明玲[2],曾利才[2],姚尊伟[2],易思瑞[2],李　蓉[2],曹　东[2],毕凤均[2],龚 立[2],曾　文[1,2]

(1. 四川抗菌素工业研究所,成都　610052;2. 四川普莱美生物科技集团有限公司,成都　610041)

【摘要】　目的　研究恒河猴幼猴出生后 12 个月的生长发育变化特征及神经行为学特征,建立生长发育参数背景参考数据。**方法**　选取单笼条件下出生的、遗传背景清晰、出生天数明确的 18 只(雄性 11 只,雌性 7 只)恒河猴幼猴,于出生后第 1 天至 360 天每月进行体重、身高、头围、胸围、前肢长、后肢长、冠臀长,尾长及肛门生殖器距离等生长发育指标的测量,出生后第 28、175 和 360 天进行血液学、血液生化学和淋巴细胞亚群分析检测,出生后第 208 天进行手指迷路测试。**结果**　体重呈线性增长,性别间差异无显著性($P > 0.05$);形态发育指标中除肛门生殖器距离雄性显著大于雌性外($P < 0.01$),其余指标在各检测点性别间差异均无显著性($P > 0.05$);血液学各指标性别间差异无显著性($P > 0.05$),出生后第 175 和 360 天的 RBC 和 HGB 显著高于第 28 天($P < 0.05$);与出生后第 28 天相比,血液生化学中 TP 和 BUN 水平在出生后第 175 和 360 天均显著升高($P < 0.01$),ALP 虽表现为降低,但差异不显著($P > 0.05$);与出生后第 28 天相比,淋巴细胞亚群中 $CD4^+$ 及 $CD4^+/CD8^+$ 比值在出生后第 175 和 360 天均显著降低($P < 0.01$),而 $CD8^+$ 比例显著升高($P < 0.01$);手指迷路测试中,学习期幼猴完成任务 2 所需测试次数显著多于其他任务,且雌性显著少于雄性($P < 0.05$),其余任务性别间差异无显著性($P > 0.05$);记忆期连续 2 天随机测试雌性幼猴的正确率均显著高于雄性幼猴($P < 0.05$)。**结论**　体重及形态发育指标与出生天数呈线性增长,血液学、血液生化学和淋巴细胞亚群指标中 RBC、HGB、LYMPH、TP、BUN、ALP、$CD4^+$、$CD8^+$ 及 $CD4^+/CD8^+$ 等出现了与幼猴器官系统生长发育相关的改变,在药物评价中应重点关注,手指迷路测试提示雌性幼猴逆转学习能力及长期记忆优于雄性幼猴。本研究建立了恒河猴幼猴出生后 12 个月生长发育参数的背景数据及神经行为学特征,为恒河猴生殖发育毒性评价提供了参考依据及数据支持。

【关键词】　恒河猴;幼猴;生殖发育毒性;背景数据;手指迷路

【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2016) 04-0024-11

doi: 10.3969.j.issn.1671 – 7856.2016.04.005

Growth and developmental parameters and behavioral characteristics of infant rhesus monkeys

LIANG Zhi-gang[1], WU Ming-ling[2], ZENG Li-cai[2], YAO Zun-wei[2], YI Si-rui[2], LI Rong[2], CAO Dong[2], BI Feng-jun[2], GONG Li[2], ZENG Wen[1,2]

(1. Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu 610052, China;
2. Sichuan Primed Bio-Tech Group Co., Ltd, Chengdu 610041, China)

[**基金项目**] 四川省科技计划项目青年基金(2015JQ0059);四川省科技计划项目支撑计划(2015SZ0012)。

[**作者简介**]梁志刚(1988 –),男,硕士研究生,药理毒理学。E-mail: liangzhigang88@163.com。

[**通讯作者**]曾文(1970 –),女,博士,主要从事非人灵长类疾病模型及转化医学研究。E-mail: zengwen10@vip.163.com。

【Abstract】 **Objective** To explore the growth and developmental parameters and behavioral characteristics of rhesus monkeys during the first year of birth and to establish the background data. **Methods** A total of 18 (♂ = 11, ♀ = 7) infant rhesus monkeys born from individually caged mothers and with known genetic background and postnatal days were monitored monthly for body weight, body height, head circumference, chest circumference, forelimb length, hind limb length, crown-rump length, tail length and anal-genital distance from postnatal day (PND) 1 to 360, while hematology, blood chemistry and lymphocyte subsets were examined on PND 28, 175 and 360, and finger maze test was carried out on PND 208. **Results** The body weight showed linear growth with no significant difference between genders ($P > 0.05$). Except for the anal-genital distance of male infants was significantly greater than that of female infants ($P < 0.01$), no significant differences were observed between sexes in other morphological parameters. No significant differences of hematology were seen between genders ($P > 0.05$). Compared with that at PND28, TP and BUN were significantly increased ($P < 0.01$) while ALP decreased with no significant difference ($P > 0.05$) at PND 175 and 360. Compared with that at PND28, $CD4^+$ and $CD4^+/CD8^+$ were significantly decreased ($P < 0.01$) while $CD8^+$ significantly increased ($P < 0.01$) at PND175 and 360. The number of sessions to solve task 2 in learning test was significantly greater than other tasks with females significantly less than males ($P < 0.05$). The females had higher correct rate than males in the 2-day random memory test ($P < 0.05$). **Conclusions** Body weight and morphological parameters show a linear growth. The PND. The RBC, HGB, LYMPH, TP, BUN, ALP, $CD4^+$, $CD8^+$ and $CD4^+/CD8^+$ in hematology, blood chemistry and lymphocyte subsets show relevant changes to the growth and development of organs and systems in infants, which should be highly concerned in drug evaluation. The finger maze test indicates that female infants have better reversal learning and long-term memory than male infants. Background data and behavioral characteristics of infant rhesus monkeys during the first 12 months of birth are established in this study, which provide useful reference and support the evaluation of developmental and reproductive toxicity of drugs in rhesus monkeys.

【Key words】 Rhesus monkey; Infant; Developmental toxicity; Reproductive toxicity; Behavioral characteristics; Background data; Finger maze test

生殖发育毒性(developmental and reproductive toxicity, DART)评价是药物临床前安全性评价的重要组成部分,常用的评价模型为大鼠、小鼠以及家兔[1,2]。由于大多数生物技术药物在种属特异性、免疫原性、药理学活性及体内代谢分布等方面都与小分子药物存在显著差异[3],因此在开展此类药物的 DART 评价时通常选用具有药理学相关性且与人类更加接近的非人灵长类(non-human primates, NHPs)[4-7]。

近年来由于生物技术药物的快速发展,利用 NHPs 进行生殖发育毒性评价已越来越普遍[8-12]。恒河猴是中国境内分布最多最广的非人灵长类动物[13],其作为药物 DART 评价中最常用的 NHPs 之一[14-16],在新药安全性评价中扮演着重要角色。近几年提出的“强化的”出生前后发育毒性试验(enhanced pre- and postnatal development, ePPND)不仅可减少整体动物的使用,同时也能保证每组有足够的动物数以完成对妊娠中晚期暴露的功能性评价[17-19]。其产后观察期最常见为 6 ~ 12 个月[20],评价终点主要包括幼猴出生后的临床观察、体重及形态发育监测、行为学测试,神经和免疫系统评价等[21]。然而,目前正常恒河猴幼猴生长发育的数据往往因为观测指标或观测时间有限[22,23],往往不能全面地反映其正常的生长发育情况,从而无法为药物 DART 评价提供足够的参考信息。

本研究旨在通过动态监测单笼饲养条件下出生的、遗传背景清晰、且出生天数明确的正常恒河猴幼猴出生后 12 个月的体重、形态发育、血液学、血液生化学、淋巴细胞亚群及手指迷路测试的数据,明确其生长发育变化特征及神经行为学特征并建立背景数据,为恒河猴用于生物技术药物 DART 评价提供参考依据和数据支持。

1 材料和方法

1.1 F1 动物选择

我们前期的研究工作已经完成了妊娠猴的诊断及生理学特征背景数据的建立[24,25]。前期入选普通级性成熟的 96 只健康雌性恒河猴,体重 5.0 ~ 8.5 kg,与 16 只健康雄性恒河猴(结核杆菌、寄生虫、沙门氏菌属、志贺菌属以及带状疱疹 B 病毒查均为阴性),体重 5.0 ~ 12.0 kg,采用后宫式交配法(雄∶雌 = 1∶6)同笼交配 7 d。同笼第 18 天,雌猴肌肉注射氯胺酮注射液镇静后,行腹部 B 超妊娠诊断,以发现孕囊为确诊怀孕,共得到孕猴 28 只,并进

行单笼饲养(规格:100 cm × 90 cm × 110 cm)。妊娠期间通过 B 超动态监测妊娠状态及胚胎/胎儿的存活状态,并监测胚胎/胎儿的头围、冠臀长和心率以评价胎儿宫内发育情况。用于交配的恒河猴均由雅安普莱美生物科技有限公司提供,生产许可证为 SCXK(川)2014 - 027,使用许可证为 SYXK(川)2014 - 186。

孕猴自然分娩,分娩当天确认幼猴存活状态,并记为幼猴出生第 0 天(postnatal day 0, PND0)。在排除宫内发育不良、死产、疾病和弃婴等异常动物后,共入选 18 只(雄性 11 只,雌性 7 只)正常恒河猴幼猴。所有动物均饲养于环境受控的动物房,室温 16℃ ~ 26℃,相对湿度 40 % ~70 %,换气次数每小时 8 ~ 10 次,每日 12 h/12 h 交替照明。幼猴离乳前由母猴抚养,出生第 180 天离乳,随机分笼后人工饲养于单笼,并按照少食多餐,营养均衡的原则给食,并配以适量果蔬,自由饮水,以保证幼猴的正常生长发育。

1.2 实验材料

B 型超声检测仪(迈瑞 DP50-Vet)、电子称重显示器(友声 XK3123)、软尺、全自动五分类血液分析仪(Sysmex XT-2000i)、全自动生化分析仪(Beckman Coulter Synchron CX4 PRO)、高速冷冻离心机(Thermo Scientific Sorvall ST16R)、流式细胞仪(BD Accuri C6)、湘仪 L-550 低速离心机、移液器(Eppendorf)、一次性真空采血管(河北鑫乐科技有限公司)、一次性真空采血针(上海康浓医疗器械有限公司)、流式管(BD Falcon)、美国贝克曼库尔特配套生化检测试剂、小鼠抗人 CD3-PerCP、CD4-FITC、CD8-PE、CD20-APC 抗体(BD Biosciences)、红细胞裂解液(eBioscience)、磷酸盐缓冲液(Lonza)、盐酸氯胺酮注射液(Bioniche Teoranta)、手指迷路装置、苹果。

1.3 实验方法

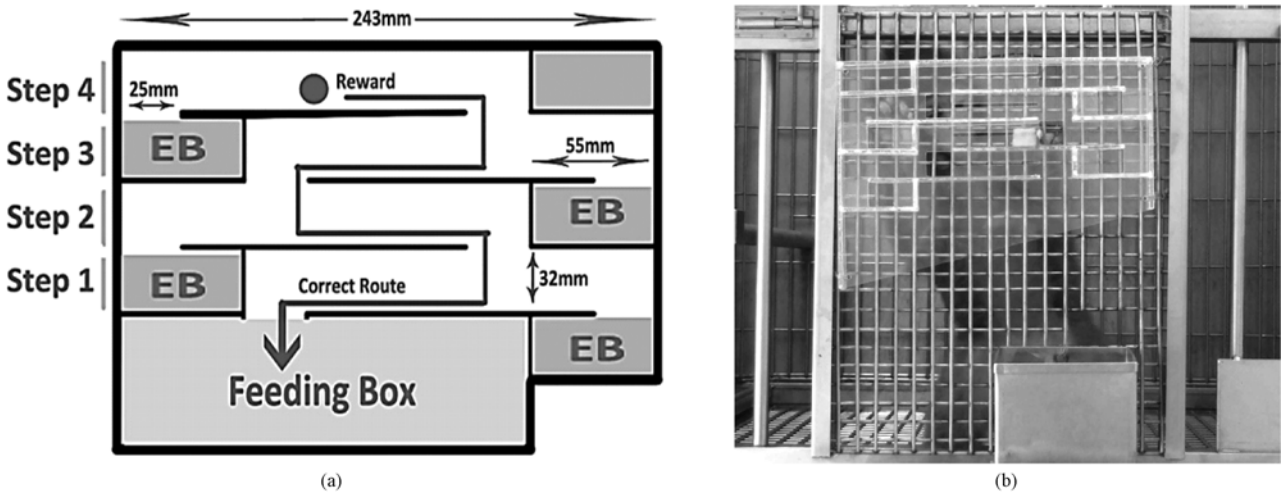
1.3.1 临床观察:幼猴出生后于每天上午下午观察两次,包括一般状态、摄食量、饮水量,粪便情况以及母子间行为,如理毛、哺乳及社会探索等并观察有无弃婴行为的发生。

1.3.2 体重与形态发育指标测量:幼猴于 PND1、30、60、90、120、150、180、210、240、270、300,330 及 360 进行体重和形态发育指标的测定。形态发育指标的测量方法参考邹如金等[26]和崔伟等[22]的报道,包括:头围(head circumference, HC)、胸围(chest circumference, CC)、前肢长(forelimb length, FLL)、后肢长(hind limb length, HLL)、冠臀长(crown-rump length, CRL)、身高(body height, BH),尾长(tail length, TL)以及肛门生殖器距离(anal-genital distance, AGD)。

1.3.3 幼猴血样采集及检测:幼猴于 PND28、175 及 360 日晨经后肢静脉采集血液 2 mL。其中 1 mL 全血 EDTA-K2 抗凝后用于血液学及淋巴细胞亚群检测,剩余 1 mL 全血以 5 000 r/min 离心 10 min 后分离血清用于血液生化学检测。

血液学检测指标包括:红细胞计数(RBC)、血红蛋白含量(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)、白细胞计数(WBC)、淋巴细胞计数(LYMPH)、中性粒细胞计数(NEUT)、单核细胞计数(MONO),血小板计数(PLT)和平均血小板体积(MPV)。血液生化学指标包括:总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、谷氨酰转肽酶(GGT)、胆固醇(CHOL)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)、血糖(GLU)、血尿素氮(BUN)、肌酐(CR),尿酸(UA)和肌酸激酶(CK)。淋巴细胞亚群指标包括:$CD3^+$(T 淋巴细胞)、$CD4^+$(辅助/诱导 T 淋巴细胞),$CD8^+$(抑制/细胞毒 T 淋巴细胞)及 $CD20^+$(B 淋巴细胞)。

1.3.4 手指迷路测试:幼猴于 PND208 进行手指迷路测试,测试方法及测试装置(图 1)参考 Tsuchida 等[27]和 Negishi 等[28]的报道。迷路由 4 段组成,每段设有降落口和误差口,以苹果作为报酬,幼猴用手指将苹果成功地移动到降落口,最后可以从食盒获得苹果报酬。测试由适应期、学习期和记忆期组成,每天上午下午完成两部分测试,每部分测试包含 15 次试验。适应期幼猴须适应测试装置和测试人员,以能迅速(< 2 s)从食盒(或测试人员手中)取回苹果作为进入学习期的标准。学习期测试依次由任务 1、2、3、4 组成,分别对应测试装置的第 1、2、3、4 步。在任务 1 开始前,苹果被放置于装置第 1 步,幼猴需在避免将苹果落入误差盒的前提下,将苹果移至食盒并迅速取回。幼猴成功取回苹果(试验正确)或将苹果落入误差盒(试验错误)记为 1 次试验完成,当幼猴在连续的两部分测试中,每部分均完成 ≥ 14 次正确试验时方可进入下一任务,在



注:(a) 手指迷路测试装置示意图,开放区域为迷路部分,灰色区域为误差盒(EB)和食盒(feeding box),报酬(reward)为一小块苹果,从下往上依次为测试第 1、2、3、4 步;(b) 一只幼猴正在进行手指迷路测试。

图 1　4 步非校正法手指迷路测试

Note. (a) Schematic diagram of the finger maze test apparatus. Open area: maze section, shaded area: error box (EB) and feeding box, reward: a piece of apple, from the bottom: step 1, step 2, step 3, and step 4; (b) Photograph of an infant monkey trying the finger maze test to obtain a reward.

Fig. 1　Four-step non-correction-method-type finger maze test

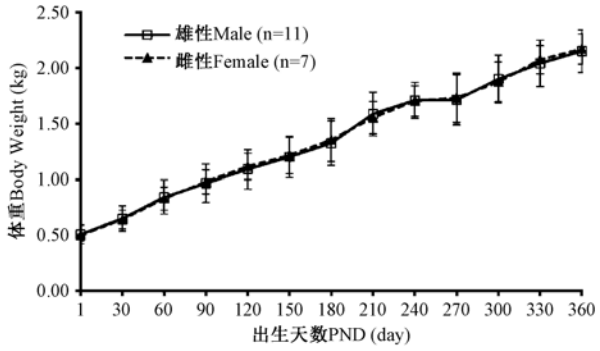


图 2　雌、雄恒河猴幼猴出生后体重变化情况

Fig. 2　Changes of body weight of the male and female infant rhesus monkeys

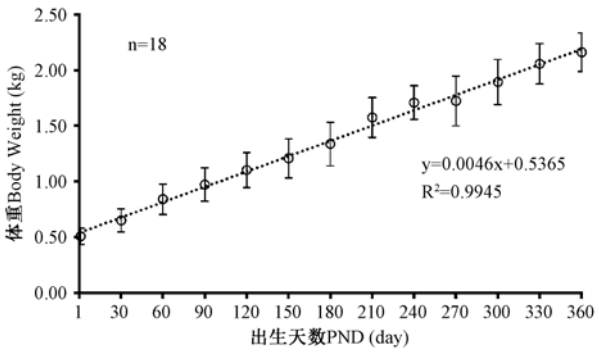


图 3　恒河猴幼猴出生后体重与出生后天数的关系

Fig. 3　Relation between body weight and postnatal days in the infant rhesus monkeys

完成全部 4 个任务后整个学习期结束。记忆期测试在学习期结束 2 个月后的连续 2 d 进行,每天各完成一部分测试,每部分测试包含 16 次试验,苹果由测试人员随机放置,每步放置 4 个。学习期及记忆期测试时记录幼猴正确和错误试验的次数。

1.3.5　统计方法:所有数据均采用"$\bar{x} \pm s$"表示,数据分析采用 IBM SPSS Statistics 20.0 完成,图表绘制采用 Microsoft Excel 2013 完成。不同检测时间点的数据比较运用单因素方差进行分析,不同性别的数据比较运用独立样本 t 检验进行分析,$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义,$P < 0.01$ 表示差异具有高度统计学意义。

2　结果

2.1　体重

雌、雄恒河猴幼猴出生后 12 个月的体重变化情况见表 1,性别间无显著差异($P > 0.05$)。对雌、雄幼猴不同检测时间点的体重进行作图分析(图 2),可见雌、雄幼猴的体重随出生天数的增加而增加,且雌、雄幼猴间体重呈同步增长($r = 0.999$)。进一步对所有幼猴的体重(y)与出生天数(x)进行线性回归分析,得到关系式 $y = 0.0046x + 0.5365$,$R^2 = 0.9945$(图 3)。

2.2　形态发育

雌、雄恒河猴幼猴出生后各形态发育指标变化

情况见表 1,各指标均呈线性增长。除肛门生殖器距离表现为雄性显著大于雌性外($P<0.01$),其余指标在各检测点性别间差异均无显著性($P>0.05$)。各指标中身高增长最快,约 0.0668 cm/d,且与后肢长增长显著相关($r=0.999$);而肛门生殖器距离增长最慢,雄性约 0.0066 cm/d,雌性约 0.0019 cm/d。

2.3 血液学与血液生化学

雌、雄恒河猴幼猴的血液学与血液生化学指标变化情况见表 2、表 3。与 PND28 相比,血液学指标中 RBC、HGB 和 MCHC 在 PND175 和 360 显著升高($P<0.05$),MCV、MCH 显著降低($P<0.05$),HCT 无显著变化($P>0.05$);WBC、LYMPH 及 NEUT 在 PND175 显著升高($P<0.01$);PLT 及 MPV 在 PND360 显著降低($P<0.01$)。血液学各指标在 PND28、175 和 360 性别间差异无显著性($P>0.05$)。与 PND28 相比,血液生化学指标中 TP、ALT 和 BUN 在 PND175 及 360 均显著升高($P<0.05$),ALB 在 PND360 显著升高($P<0.01$);AST、ALP、CR 和 LDL 的变化不显著($P>0.05$)。雌性幼猴的 CHOL 在 PND360 低于雄性幼猴($P=0.034$)而 TG 则高于雄性幼猴($P=0.015$),其余指标性别间差异不显著($P>0.05$)。

2.4 淋巴细胞亚群分析(免疫表型检测)

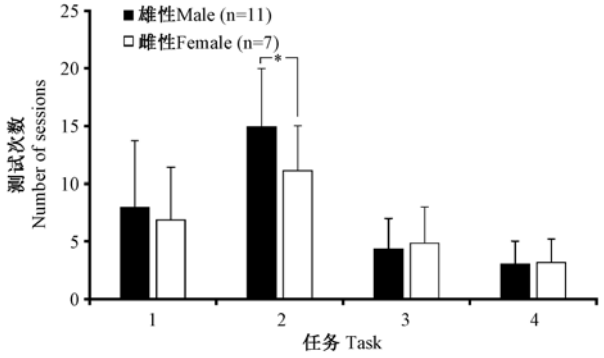
雌、雄恒河猴幼猴淋巴细胞亚群的变化情况见表 4。与 PND28 相比,$CD4^+$ 和 $CD4^+/CD8^+$ 在 PND175 及 360 显著降低,而 $CD8^+$ 显著升高($P<0.01$);$CD3^+$ 在 PND175 显著降低($P<0.05$);$CD20^+$ 在各检测点均无显著变化($P>0.05$)。雌性幼猴的 $CD8^+$ 在 PND28 显著低于雄性幼猴($P=0.001$),$CD20^+$ 则高于雄性幼猴($P=0.037$),而 $CD4^+/CD8^+$ 在 PND28 及 360 均高于雄性幼猴($P=0.001$, $P=0.024$)。

2.5 手指迷路测试

雌、雄恒河猴幼猴手指迷路测试结果见图 4、图 5。在学习期测试中,完成 4 项任务所需测试次数由多到少依次为:任务 2 > 任务 1 > 任务 3 > 任务 4,完成任务 2 所需的测试次数显著多于任务 1、3 和 4($P<0.01$),完成任务 1 所需测试次数显著多于任务 3 和 4($P<0.05$),完成任务 3 和 4 所需测试次数间差异无显著性($P>0.05$);除雄性完成任务 2 所需测试次数显著多于雌性外($P<0.05$),完成其余任务所需测试次数性别间差异无显著性($P>0.05$)。在学习期结束 2 个月后的连续 2 天随机测试中,第 2 天较第 1 天的正确率升高,但差异无显著性($P>0.05$);而雌性幼猴的正确率在测试第 1 天和第 2 天均显著高于雄性幼猴($P<0.05$)。

3 讨论

建立正常恒河猴幼猴出生后 12 个月的生长发育背景数据对恒河猴用于生物技术药物 DART 评价有着重要意义。体重及形态发育数据可为评价药物子宫内暴露提供重要信息,血液学、血液生化学数据可评估药物对子代各器官系统生长发育的影响以及评价组织器官的生理状态,而免疫表型及学习能力和记忆力的数据对评价药物对免疫系统和神经系统功能发育的影响也有着重要意义。

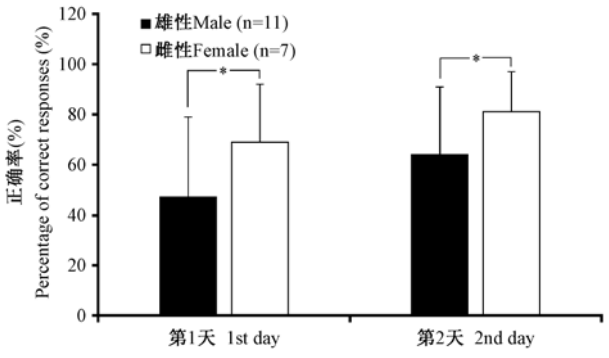


注:与雄性比,* $P<0.05$。

图 4 雌、雄恒河猴幼猴完成学习期各项任务所需的测试次数

Note. Compared with the males, * $P<0.05$.

Fig. 4 Number of sessions for the male and female infant rhesus monkeys to solve each task in the learning test



注:与雄性比,* $P<0.05$。

图 5 雌、雄恒河猴幼猴记忆期测试的正确率

Note. Compared with the male, * $P<0.05$.

Fig. 5 The correct rate of memory test in the male and female infant rhesus monkeys

表 1 雌、雄恒河猴幼猴体重及形态发育指标变化情况

Tab. 1 Changes of body weight and morphological development parameters of the male and female infant rhesus monkeys

出生天数 PND (day)	体重 BW (kg)	身高 BH (cm)	冠臀长 CRL (cm)	前肢长 FLL (cm)	后肢长 HLL (cm)	头围 HC (cm)	胸围 CC (cm)	尾长 TL (cm)	肛门生殖器距离 AGD (cm)
雄性 Male (n = 11)									
1	0.51 ± 0.09	28.6 ± 1.2	17.9 ± 1.1	16.3 ± 1.1	18.2 ± 1.2	19.7 ± 0.7	15.2 ± 1.0	9.8 ± 0.8	3.2 ± 0.4
30	0.65 ± 0.11	33.0 ± 1.8	21.1 ± 1.4	18.0 ± 1.1	20.0 ± 1.3	20.8 ± 0.7	16.6 ± 1.3	11.2 ± 1.1	3.5 ± 0.2
60	0.84 ± 0.15	36.9 ± 2.4	23.3 ± 1.7	19.6 ± 1.3	22.4 ± 1.5	21.7 ± 0.9	17.5 ± 1.5	12.4 ± 1.0	4.1 ± 0.3
90	0.97 ± 0.17	39.8 ± 2.2	24.6 ± 2.0	21.1 ± 1.6	24.3 ± 1.5	22.5 ± 0.8	18.7 ± 1.4	13.2 ± 1.1	4.4 ± 0.3
120	1.09 ± 0.18	41.8 ± 2.6	26.1 ± 2.1	22.1 ± 1.5	25.2 ± 1.3	22.8 ± 0.6	19.1 ± 1.6	13.5 ± 1.1	4.5 ± 0.4
150	1.20 ± 0.18	43.7 ± 2.2	27.1 ± 1.6	22.7 ± 1.1	26.1 ± 1.2	23.1 ± 0.6	20.1 ± 1.1	13.8 ± 1.1	4.8 ± 0.4
180	1.32 ± 0.20	45.8 ± 2.3	27.6 ± 1.4	23.3 ± 1.1	27.0 ± 1.3	23.3 ± 0.6	20.7 ± 1.3	14.1 ± 1.3	4.9 ± 0.3
210	1.59 ± 0.20	46.7 ± 1.9	28.2 ± 1.3	23.8 ± 1.2	27.5 ± 1.4	23.4 ± 0.7	22.5 ± 1.6	14.3 ± 1.3	5.0 ± 0.5
240	1.71 ± 0.16	48.2 ± 1.9	28.9 ± 1.1	24.1 ± 1.3	27.9 ± 1.3	23.6 ± 0.7	23.4 ± 1.3	14.3 ± 1.3	5.0 ± 0.5
270	1.71 ± 0.23	48.7 ± 1.9	29.3 ± 1.0	24.2 ± 1.2	28.1 ± 1.4	23.8 ± 0.9	23.7 ± 1.0	14.3 ± 1.4	5.1 ± 0.6
300	1.90 ± 0.22	49.7 ± 1.7	29.4 ± 1.3	24.6 ± 1.1	28.6 ± 1.2	23.9 ± 0.9	23.8 ± 1.9	14.4 ± 1.3	5.1 ± 0.5
330	2.04 ± 0.21	50.8 ± 2.9	30.9 ± 1.9	25.0 ± 1.4	29.2 ± 1.6	24.0 ± 0.8	24.1 ± 1.6	14.5 ± 1.5	5.0 ± 0.5
360	2.15 ± 0.19	52.9 ± 2.4	32.2 ± 1.6	26.4 ± 1.5	30.5 ± 1.7	24.7 ± 0.8	25.4 ± 1.7	15.1 ± 1.5	5.5 ± 0.6
雌性 Female (n = 7)									
1	0.50 ± 0.05	29.3 ± 1.8	18.3 ± 1.2	16.2 ± 0.8	18.1 ± 1.0	19.6 ± 1.2	14.9 ± 1.1	9.9 ± 1.1	1.7 ± 0.4
30	0.64 ± 0.08	32.8 ± 1.6	20.7 ± 1.0	17.6 ± 0.6	19.7 ± 0.6	20.2 ± 0.4	16.2 ± 0.7	11.1 ± 1.0	1.6 ± 0.3
60	0.83 ± 0.10	37.0 ± 1.3	23.0 ± 1.0	19.1 ± 0.6	22.0 ± 0.6	21.5 ± 0.4	17.4 ± 0.9	12.0 ± 1.2	1.6 ± 0.3
90	0.98 ± 0.11	40.1 ± 1.8	24.3 ± 0.9	20.7 ± 0.8	24.0 ± 0.6	22.3 ± 0.7	18.6 ± 0.8	12.7 ± 1.1	1.6 ± 0.3
120	1.12 ± 0.12	42.1 ± 1.3	25.8 ± 1.0	21.8 ± 0.7	25.4 ± 0.5	22.8 ± 0.5	19.1 ± 0.9	13.2 ± 1.3	1.8 ± 0.4
150	1.21 ± 0.16	44.4 ± 1.1	26.9 ± 1.0	22.5 ± 0.8	26.2 ± 0.8	22.9 ± 0.7	20.3 ± 1.2	13.4 ± 1.4	2.0 ± 0.3
180	1.35 ± 0.19	45.9 ± 1.2	27.8 ± 0.6	23.2 ± 0.6	27.0 ± 0.8	23.3 ± 0.5	20.8 ± 1.3	13.8 ± 1.4	2.1 ± 0.3
210	1.55 ± 0.15	47.2 ± 1.9	28.6 ± 1.3	23.7 ± 1.0	27.6 ± 1.0	23.5 ± 0.4	22.2 ± 1.1	13.7 ± 1.3	2.2 ± 0.4
240	1.71 ± 0.14	48.1 ± 1.7	28.9 ± 1.3	23.9 ± 0.9	27.9 ± 0.9	23.5 ± 0.4	23.4 ± 0.9	13.8 ± 1.3	2.3 ± 0.3
270	1.73 ± 0.22	49.1 ± 1.8	29.2 ± 1.2	24.1 ± 0.9	28.4 ± 0.9	23.5 ± 0.4	23.4 ± 1.5	13.8 ± 1.4	2.3 ± 0.3
300	1.88 ± 0.18	50.2 ± 1.6	29.6 ± 1.1	24.6 ± 0.9	28.9 ± 1.0	23.8 ± 0.3	23.6 ± 1.2	13.9 ± 1.3	2.3 ± 0.3
330	2.08 ± 0.13	51.4 ± 1.8	31.2 ± 1.3	25.0 ± 0.9	29.5 ± 0.8	24.2 ± 0.5	24.9 ± 1.2	14.1 ± 1.4	2.3 ± 0.3
360	2.17 ± 0.14	53.2 ± 1.7	32.0 ± 1.2	26.1 ± 0.9	30.4 ± 0.6	24.4 ± 0.5	25.4 ± 0.9	14.4 ± 1.2	2.4 ± 0.4

表 2 雌、雄恒河猴幼猴血液学指标变化情况

Tab. 2 Hematological changes of the infant male and female rhesus monkeys

	雄性 Male ($n=11$)			雌性 Female ($n=7$)			合计 Both genders ($n=18$)		
	PND28	PND175	PND360	PND28	PND175	PND360	PND28	PND175	PND360
红细胞 RBC (10^9/L)	4.87±0.52	5.55±0.50	5.42±0.76	4.86±0.40	5.61±0.63	5.15±0.45	4.87±0.48	5.58±0.56 **	5.31±0.67 **
血红蛋白 HGB (g/L)	123±14	133±14	132±15	120±12	135±15	126±12	122±14	134±15 **	129±14 *
红细胞压积 HCT (%)	39.1±4.3	39.5±3.5	39.4±5.7	38.4±3.1	39.5±3.1	37.6±3.1	38.8±3.9	39.5±3.3	38.7±4.9
平均红细胞体积 MCV (FL)	80.4±3.3	71.5±6.9	72.5±2.5	79.0±3.0	71.1±7.8	73.1±3.0	79.8±3.3	71.3±7.3 **	72.8±2.7 **
平均红细胞血红蛋白量 MCH (pg)	25.2±1.4	24.0±2.2	23.7±1.6	24.7±1.7	24.1±2.2	24.3±1.6	25.0±1.5	24.0±2.2 *	23.9±1.6 **
平均红细胞血红蛋白浓度 MCHC (g/L)	313±8	337±26	326±19	313±12	341±24	332±21	313±10	338±25 **	329±20 **
白细胞 WBC (10^{12}/L)	6.92±2.61	10.89±2.77	8.00±2.75	7.46±2.98	11.44±2.76	9.28±2.35	7.14±2.78	11.12±2.78 **	8.52±2.67
淋巴细胞 LYMPH (10^9/L)	4.09±2.19	6.33±2.35	3.98±1.87	4.14±2.54	5.71±1.56	4.29±1.12	4.11±2.34	6.07±2.08 **	4.11±1.62
中性粒细胞 NEUT (10^9/L)	1.98±0.85	3.38±1.44	2.05±0.92	2.25±1.03	3.85±1.89	2.52±0.75	2.10±0.94	3.57±1.66 **	2.23±0.89
单核细胞 MONO (10^9/L)	0.98±0.56	1.46±0.62	2.02±1.37	1.16±0.55	1.53±0.55	2.17±1.43	1.05±0.56	1.49±0.60 **	2.08±1.39 **
血小板 PLT (10^9/L)	361±101	362±91	310±96	385±72	359±109	259±87	371±91	360±99	289±96 **
平均血小板体积 MPV (FL)	10.3±1.1	10.3±3.3	9.5±1.4	10.4±0.9	9.5±2.1	9.2±1.2	10.3±1.0	10.0±2.9	9.4±1.3 **

注：与 PND28 比，* $P<0.05$，** $P<0.01$。

Note. Compared with the PND28 monkeys, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

表 3 雌、雄恒河猴幼猴血液生化学指标变化情况

Tab. 3 Changes of blood biochemical parameters in the male and female infant rhesus monkeys

	雄性 Male (n = 11)			雌性 Female (n = 7)			合计 Both genders (n = 18)		
	PND28	PND175	PND360	PND28	PND175	PND360	PND28	PND175	PND360
总蛋白 TP (g/L)	59.9 ±4.9	68.0 ±4.0	68.9 ±4.3	58.8 ±4.0	68.3 ±6.5	69.7 ±3.1	59.4 ±4.6	68.1 ±5.2 **	69.2 ±3.9 **
白蛋白 ALB (g/L)	32.2 ±1.5	33.2 ±3.1	36.9 ±2.4	32.8 ±2.0	33.3 ±3.9	37.3 ±2.8	32.4 ±1.7	33.2 ±3.5	37.0 ±2.6 **
总胆红素 TBIL (μmol/L)	6.6 ±1.6	3.9 ±2.0	6.0 ±1.2	6.3 ±1.8	4.0 ±1.4	6.4 ±1.2	6.5 ±1.7	3.9 ±1.8 **	6.2 ±1.2
直接胆红素 DBIL (μmol/L)	0.9 ±0.8	0.6 ±0.6	0.8 ±0.5	0.8 ±0.6	0.4 ±0.3	0.9 ±0.6	0.9 ±0.7	0.6 ±0.5 *	0.9 ±0.5
谷草转氨酶 AST (IU/L)	33.2 ±9.8	31.4 ±10.0	31.2 ±5.7	35.2 ±11.2	34.0 ±14.0	34.7 ±6.2	34.1 ±10.5	31.4 ±11.9	32.6 ±6.1
谷丙转氨酶 ALT (IU/L)	21.1 ±10.1	26.2 ±11.4	32.1 ±5.8	22.8 ±4.5	29.5 ±20.5	37.7 ±14.0	21.8 ±8.4	26.2 ±15.9 *	34.4 ±10.4 **
碱性磷酸酶 ALP (IU/L)	776.9 ±472.4	706.6 ±171.2	711.5 ±143.5	872.7 ±312.2	782.7 ±136.2	771.9 ±225.2	803.9 ±435.5	706.6 ±162.1	736.3 ±183.9
谷氨酰转肽酶 GGT (IU/L)	133.5 ±33.6	95.0 ±28.3	80.7 ±22.1	142.8 ±34.4	97.5 ±28.9	80.6 ±14.9	137.3 ±34.3	95.0 ±28.6 **	80.6 ±19.4 **
胆固醇 CHOL (mmol/L)	4.15 ±1.23	5.12 ±1.10	3.31 ±0.52	4.16 ±1.27	4.74 ±0.76	2.98 ±0.41 #	4.15 ±1.24	5.12 ±0.99 **	3.17 ±0.50 **
甘油三酯 TG (mmol/L)	1.30 ±0.83	0.50 ±0.23	0.49 ±0.16	1.25 ±0.92	0.53 ±0.22	0.63 ±0.14 #	1.28 ±0.87	0.50 ±0.23 **	0.55 ±0.17 **
高密度脂蛋白 HDL (mmol/L)	1.80 ±0.35	2.18 ±0.51	1.41 ±0.31	1.73 ±0.39	2.13 ±0.34	1.30 ±0.21	1.77 ±0.37	2.18 ±0.44 **	1.37 ±0.28 **
低密度脂蛋白 LDL (mmol/L)	1.63 ±0.88	2.07 ±0.70	1.57 ±0.37	1.68 ±0.67	1.93 ±0.47	1.36 ±0.23	1.65 ±0.80	2.07 ±0.62	1.49 ±0.34
血糖 GLU (mmol/L)	5.49 ±0.98	5.84 ±1.23	4.72 ±0.74	5.47 ±0.64	5.38 ±0.73	4.41 ±0.62	5.48 ±0.86	5.84 ±1.08	4.59 ±0.71 **
血尿素氮 BUN (mmol/L)	3.9 ±1.2	5.4 ±1.3	6.6 ±1.8	3.5 ±0.7	4.8 ±0.8	6.0 ±1.7	3.7 ±1.1	5.4 ±1.2	6.4 ±1.8 **
肌酐 CR (mmol/L)	37.1 ±13.4	38.6 ±14.5	37.1 ±10.0	36.6 ±11.7	38.0 ±14.4	35.5 ±11.9	36.9 ±12.7	38.6 ±14.4	36.4 ±10.8
尿酸 UA (μmol/L)	16.7 ±4.0	14.8 ±2.9	12.1 ±2.4	13.8 ±1.3	13.1 ±2.7	11.1 ±2.0	15.9 ±3.7	14.8 ±2.9 *	11.7 ±2.3 **
肌酸激酶 CK (IU/L)	251.9 ±132.6	243.0 ±194.3	103.7 ±42.0	205.7 ±66.7	280.3 ±167.6	109.4 ±39.0	233.0 ±112.7	243.0 ±184.5	105.9 ±40.9 **

注：与雄性比，# P < 0.05；与 PND28 比，* P < 0.05，** P < 0.01。

Note. Compared with the male monkeys, # P < 0.05; Compared with the PND28 monkeys, * P < 0.05, ** P < 0.01.

表 4 雌、雄恒河猴幼猴淋巴细胞亚群比例变化情况

Tab. 4 Changes of the proportion of lymphocyte subsets in the male and female rhesus monkeys

	雄性 Male (n = 11)			雌性 Female (n = 7)			合计 Both genders (n = 18)		
	PND28	PND175	PND360	PND28	PND175	PND360	PND28	PND175	PND360
$CD3^+$ (%)	64.88 ±10.78	59.91 ±8.28	58.65 ±9.14	60.89 ±10.95	56.60 ±11.87	60.88 ±10.12	63.24 ±11.02	58.55 ±10.04 *	59.57 ±9.62
$CD4^+$ (%)	42.08 ±8.89	33.07 ±6.52	31.43 ±6.90	44.97 ±9.33	33.28 ±9.47	36.03 ±9.39	43.27 ±9.19	33.16 ±7.87 **	33.32 ±8.33 **
$CD8^+$ (%)	20.63 ±6.40	26.19 ±5.43	24.04 ±6.50	14.76 ±3.03 ##	22.38 ±7.37	21.31 ±6.70	18.22 ±6.02	24.62 ±6.57 **	22.92 ±6.72 **
$CD20^+$ (%)	22.22 ±8.95	23.21 ±8.44	24.18 ±8.48	28.22 ±7.17 #	26.05 ±10.32	23.01 ±7.93	24.69 ±8.78	24.37 ±9.36	23.70 ±8.28
$CD4^+/CD8^+$ ratio	2.28 ±0.78	1.25 ±0.49	1.42 ±0.49	3.12 ±0.72 ##	1.57 ±0.50	1.84 ±0.76 #	2.63 ±0.86	1.38 ±0.52 **	1.59 ±0.65 **

注：与雄性比，# P < 0.05，## P < 0.01；与 PND28 比，* P < 0.05，** P < 0.01。

Note. Compared with the males, # P < 0.05, ## P < 0.01; compared with the PND28 monkeys, * P < 0.05, ** P < 0.01.

本研究通过对正常恒河猴幼猴出生后 12 个月的体重和形态发育指标的动态监测发现,除雄性肛门生殖器距离显著大于雌性外,其余指标性别间均无显著差异,且幼猴的体重及各形态发育指标与出生天数呈线性增长关系。提示在药物 DART 评价中,若幼猴体重及形态发育指标(肛门生殖器距离除外)在 12 个月的观察期内出现显著的性别差异,或与预期体重及形态发育指标相比显著增加或降低时,可提示与药物导致的幼猴发育障碍有关。形态发育指标中身高增长最快,且与后肢长骨的增长密切相关,提示幼猴处于长骨迅速增长的时期,而肛门生殖器距离增长最慢,可能与幼猴体内缺乏性激素刺激有关。此外,头围可反映脑及颅骨的发育,胸围可反映肺及胸廓的发育,且胸围的增长速度大于头围[29]。幼猴出生时胸围平均约 15.1 cm,比头围平均小 4.6 cm,至出生后 330 d 超过头围,若该交叉点延迟,可提示幼猴营养不良或药物导致发育迟缓[29]。

国内外关于恒河猴血液学及血液生化学的数据已有较多报道[30-36],但大多都针对青少年或成年恒河猴,关于幼年恒河猴特别是用于 DART 评价的出生后 12 个月内的幼年恒河猴的数据则较缺乏。本研究通过对恒河猴幼猴出生后 28、175 和 360 天的血液学、血液生化学的测定发现,血液学各指标性别间差异不明显。PND28 的 RBC 和 HGB 水平显著低于 PND175 和 PND360,且低于 Smucny 等[31]报道的成年恒河猴的 RBC 水平,提示幼猴出生后可能存在造血功能的增强。HCT 无显著变化,MCV、MCH 和 MCHC 的变化与 RBC 和 HGB 升高有关。幼猴 LYMPH 水平比周建华等[34]报道的成年恒河猴高,与人类婴幼儿报道一致[37],且表现为 PND175 升高,而 PND360 又回到与 PND28 相当的水平,可能与幼猴免疫系统的发育有关。与 PND28 相比,TP、ALB 和 BUN 水平在 PND175 及 360 均升高,提示幼猴可能处于生长发育旺盛时期,其蛋白质合成与分解均增加。本研究中幼猴的 ALP 水平显著高于 Smucny[31]等和周建华等[34]报道的成年恒河猴的 ALP 水平,这一现象与人类的报道相似[38],因 ALP 与骨的形成有关,其水平会随着个体的生长发育而逐渐降低,Lee 等[36]在青少年恒河猴中也发现了类似的现象。其余指标的变化不具有生理学意义。

目前关于 NHPs 免疫系统发育的报道主要集中在幼猴出生前[39-41],而幼猴出生后的报道则较缺乏。虽然在出生时 NHPs 与人类的免疫系统在形态结构和细胞组成方面就已发展得较为完善,但其功能仍需在出生后阶段发育成熟[39,40]。因此现有的报道中,绝大部分单克隆抗体类药物的 DART 评价都会对免疫系统功能进行评估[8-11,42]。本研究中幼猴 $CD4^+$ 及 $CD4^+/CD8^+$ 在 PND175 和 360 显著高于 PND28,而 $CD8^+$ 则显著低于 PND28,与 Bowman 等[42]报道的幼猴在 PND30、180 及 360 的变化一致,可能与幼猴细胞免疫功能的发育有关。本研究中 PND175 及 PND360 的 $CD3^+$ 较 PND28 降低,$CD20^+$ 则相对稳定,而 Martin 等[10]、Enright 等[11]和 Bowman 等[42]报道的正常幼猴的 $CD3^+$ 则有不同程度升高,$CD20^+$ 有不同程度的降低,可能与恒河猴和食蟹猴之间的种属间差异有关。

学习能力及记忆力评价是 DART 神经行为学评价的重要组成部分[21],也是药物发育神经毒性评价的重要内容[43]。手指迷路测试作为评价学习能力和记忆力的一种快速而简便的方法,已被列入儿科药物非临床安全性评价指南作为药物评价的参考方法[44]。本研究通过手指迷路测试对恒河猴幼猴的学习能力及记忆力评价,发现幼猴学习期完成任务 2 所需测试次数显著多于其他任务,提示任务 2 的难度最大,测试时出现错误的次数最多,与 Tsuchida 等[27]报道的一致。其主要原因一方面在于任务 2 移动苹果的方向与任务 1 恰好相反,要在测试初期判断移动苹果的正确方向对幼猴有一定的难度;另一方面是因为任务 2 涉及到对幼猴逆转学习能力及空间辨别能力的测试。雌性幼猴完成任务 2 所需的测试次数显著少于雄性幼猴,而其他任务性别间无显著差异,提示雌性幼猴的逆转学习能力可能优于雄性幼猴。学习期测试结束 2 个月后连续 2 d 的随机测试属于对幼猴长期记忆的测试,雌性幼猴 2 d 测试的正确率均显著高于雄性幼猴,提示雌性幼猴的长期记忆可能优于雄性幼猴,与人类女性的记忆力优于男性的报道一致[45]。雌、雄幼猴记忆力测试第 2 天的正确率均较第 1 天升高,与 Inoue 等[44]的报道一致,可能与第 1 天的测试内容促进了幼猴长期记忆的回忆和再认或与第 1 天测试强化了长期记忆有关,具体原因有待进一步研究。

综上所述,本研究通过对 18 只单笼饲养条件下出生的、遗传背景清晰、出生天数明确的恒河猴幼猴体重和形态发育指标的连续监测,获得了幼猴出生后 12 个月的体重及形态发育指标的动态数据,并

发现体重及形态发育指标与出生天数呈线性增长，且性别间无差异，为评价幼猴出生后生长发育情况提供了依据，同时也为 DART 试验中评价药物对幼猴生长发育的影响提供了参考数据。通过对出生后第 28、175 和 360 天的血液学、血液生化学和淋巴细胞亚群的测定分析，发现 RBC 和 HGB 的升高可能与幼猴出生后造血功能增强有关，LYMPH 的变化及其水平高于成年猴可能与幼猴免疫系统的发育有关，TP、ALB 和 BUN 升高可能与幼猴代谢旺盛、蛋白质合成和分解增加有关，ALP 显著高于成年猴可能与幼猴骨骼的生长发育旺盛有关，$CD4^+$、$CD4^+/CD8^+$的升高及 $CD3^+$、$CD8^+$的降低可能与幼猴细胞免疫功能的发育有关，提示在药物 DART 评价中，要特别关注上述指标的变化，并区分这些变化是否由药物引起。通过出生后第 208 天的手指迷路测试对幼猴的学习能力及记忆力评价，发现雌性幼猴的逆转学习能力及长期记忆均优于雄性幼猴，提示在药物 DART 评价中同样需要注意对这种正常的生理差异与药物导致的差异进行区分。本研究建立了恒河猴幼猴出生后的生长发育背景参数，明确了各生长发育指标的变化特征及神经行为学特征，为恒河猴用于生殖发育毒性研究提供了参考依据和数据支持。

参考文献：

[1] 国家食品药品监督管理局. 药物生殖毒性研究技术指导原则[M]. 北京：中国医药科技出版社，2006－2007：143－68.

[2] Faqi AS. A critical evaluation of developmental and reproductive toxicology in nonhuman primates [J]. Systems biol Reprod Med, 2012, 58(1): 23－32.

[3] Buckley LA, Benson K, Davis-Bruno K, et al. Nonclinical aspects of biopharmaceutical development: discussion of case studies at a PhRMA-FDA workshop [J]. Int J Toxicol, 2008, 27(4): 303－312.

[4] 魏振年. 猕猴的生殖生理及科研应用 [J]. 动物学杂志, 1988, 23(6): 46－50.

[5] Gibbs RA, Rogers J, Katze MG, et al. Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome [J]. Science, 2007, 316(5822): 222－234.

[6] Chapman K, Pullen N, Graham M, et al. Preclinical safety testing of monoclonal antibodies: the significance of species relevance [J]. Nature Rev Drug Discov, 2007, 6(2): 120－126.

[7] Weinbauer GF, Frings W, Fuchs A, et al. Reproductive/developmental toxicity assessment of biopharmaceuticals in nonhuman primates [M]. Pharmaceut Sci Encycl, Wiley online Library, 2010. DOI: 10.1002/9780470571224.pse177

[8] Martin PL, Oneda S, Treacy G. Effects of an anti-TNF-α monoclonal antibody, administered throughout pregnancy and lactation, on the development of the macaque immune system [J]. Am J Reprod Immunol, 2007, 58(2): 138－149.

[9] Wehner NG, Shopp G, Oneda S, et al. Embryo/fetal development in cynomolgus monkeys exposed to natalizumab, an α4 integrin inhibitor [J]. Birth Defects Res Part B: Dev Reprod Toxicol, 2009, 86(2): 117－130.

[10] Martin PL, Sachs C, Imai N, et al. Development in the cynomolgus macaque following administration of ustekinumab, a human anti-il-12/23p40 monoclonal antibody, during pregnancy and lactation [J]. Birth Defects Res Part B: Dev Reprod Toxicol, 2010, 89(5): 351－363.

[11] Enright BP, Tornesi B, Weinbauer GF, et al. Pre-and postnatal development in the cynomolgus monkey following administration of ABT-874, a human anti-IL-12/23p40 monoclonal antibody [J]. Birth Defects Res Part B: Dev Reprod Toxicol, 2012, 95(6): 431－443.

[12] Boyce RW, Varela A, Chouinard L, et al. Infant cynomolgus monkeys exposed to denosumab in utero exhibit an osteoclast-poor osteopetrotic-like skeletal phenotype at birth and in the early postnatal period [J]. Bone, 2014, 64: 314－325.

[13] 曾文. 恒河猴川西亚种生物学特性背景数据建立及在新药评估中的应用研究 [D]. 四川农业大学, 2010.

[14] Buse E, Habermann G, Osterburg I, et al. Reproductive/developmental toxicity and immunotoxicity assessment in the nonhuman primate model [J]. Toxicology, 2003, 185(3): 221－227.

[15] Martin PL, Weinbauer GF. Developmental toxicity testing of biopharmaceuticals in nonhuman primates: previous experience and future directions [J]. Int J Toxicol, 2010, 29(6): 552－568.

[16] Faqi AS. A primate as an animal model for reproductive and developmental toxicity testing [J]. Reprod Dev Toxicol, 2011, 207－218.

[17] Stewart J. Developmental toxicity testing of monoclonal antibodies: an enhanced pre-and postnatal study design option [J]. Reprod Toxicol, 2009, 28(2): 220－225.

[18] Weinbauer GF, Fuchs A, Niehaus M, et al. The enhanced pre-and postnatal study for nonhuman primates: Update and perspectives [J]. Birth Defects Res Part C: Embryo Today: Rev, 2011, 93(4): 324－333.

[19] Weinbauer GF, Luft J, Fuchs A. The enhanced pre-and postnatal development study for monoclonal antibodies [M]// Teratogenicity Testing. Humana Press, 2013: 185－200.

[20] 袁芳，潘晓靓，林海霞，等. 非人灵长类模型在生殖发育毒性评价中的应用 [J]. 中国新药杂志, 2012, 9: 012.

[21] Chellman GJ, Bussiere JL, Makori N, et al. Developmental and reproductive toxicology studies in nonhuman primates [J]. Birth Defects Res Part B: Dev Reprod Toxicol, 2009, 86(6): 446－462.

[22] 崔伟，李春花，匡德宣，等. 人工繁育恒河猴婴猴生长发育

指标的测定分析［J］. 中国比较医学杂志, 2007, 17(12): 734 - 736.

［23］ 范春梅, 李志雄, 周建华. 猕猴新生仔猴发育指标的建立［J］. 福建畜牧兽医, 2008, 30(2): 24 - 24.

［24］ 吴明玲. 妊娠恒河猴器官形成期至分娩母体—胎儿发育临床参数的变化特征［D］. 四川抗菌素工业研究所, 2015.

［25］ Wu ML, Gong L, Qian C, et al. Characteristics of blood chemistry, hematology, and lymphocyte subsets in pregnant rhesus monkeys［J］. Chin J Nat Med, 2015, 13(6): 409 - 414.

［26］ 邹如金, 杨上川, 季维智. 滇金丝猴幼仔的生长发育［J］. 四川动物, 1999, 18(1): 12 - 14.

［27］ Tsuchida J, Kawasaki K, Sankai T, et al. New type of puzzle-task finger maze learning in Macaca fascicularis［J］. Int J Primatol, 2003, 24(2): 261 - 270.

［28］ Negishi T, Shimomura H, Koyama T, et al. Gestational and lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin affects social behaviors between developing rhesus monkeys (Macaca mulatta)［J］. Toxicol Lett, 2006, 160(3): 233 - 244.

［29］ 李慧萍, 赖永洪. 婴儿胸围/头围比的动态变化及其意义初探［J］. 广州医学院学报, 1996 (4): 14 - 17.

［30］ 代解杰, 唐东红, 鲁帅尧, 等. 人工饲养条件下恒河猴血液学, 血液生化正常参考值测定及分析［J］. 中国实验动物学报, 2005, 8(4): 224 - 230.

［31］ Smucny DA, Allison DB, Ingram DK, et al. Changes in blood chemistry and hematology variables during aging in captive rhesus macaques (Macaca mulatta)［J］. J Medl Primatol, 2001, 30(3): 161 - 173.

［32］ Hassimoto M, Harada T, Harada T. Changes in hematology, biochemical values, and restraint ECG of rhesus monkeys (Macaca mulatta) following 6-month laboratory acclimation［J］. J Med Primatol, 2004, 33(4): 175 - 186.

［33］ 季芳, 饶军华, 刘晓明. 人工饲养恒河猴血液生化正常参考值的测定与分析［J］. 中国比较医学杂志, 2006, 16(6): 345 - 349.

［34］ 周建华, 范春梅, 李志雄. 恒河猴血液细胞, 生化和凝血功能正常参考指标的测定［J］. 福建畜牧兽医, 2006, 28(4): 6 - 9.

［35］ Chen Y, Qin S, Ding Y, et al. Reference values of clinical chemistry and hematology parameters in rhesus monkeys (Macaca mulatta)［J］. Xenotransplantation, 2009, 16(6): 496 - 501.

［36］ Lee JI, Shin JS, Lee JE, et al. Reference values of hematology, chemistry, electrolytes, blood gas, coagulation time, and urinalysis in the Chinese rhesus macaques (Macaca mulatta)［J］. Xenotransplantation, 2012, 19(4): 244 - 248.

［37］ Luster MI, Johnson VJ, Yucesoy B, et al. Biomarkers to assess potential developmental immunotoxicity in children［J］. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 206(2): 229 - 236.

［38］ Van Hoof VO, Hoylaerts MF, Geryl H, et al. Age and sex distribution of alkaline phosphatase isoenzymes by agarose electrophoresis［J］. Clin Chem, 1990, 36(6): 875 - 878.

［39］ Hendrickx AG, Makori N, Peterson P. The nonhuman primate as a model of developmental immunotoxicity［J］. Human Exp Toxicol, 2002, 21(9 - 10): 537 - 542.

［40］ Buse E. Development of the immune system in the cynomolgus monkey: the appropriate model in human targeted toxicology?［J］. J Immunotoxicol, 2005, 2(4): 211 - 216.

［41］ 林志, 崔岚, 黄瑛, 等. 非人灵长类动物主要免疫器官及免疫细胞的研究进展［J］. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(4): 751 - 754.

［42］ Bowman CJ, Evans M, Cummings T, et al. Developmental toxicity assessment of tanezumab, an anti-nerve growth factor monoclonal antibody, in Cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis)［J］. Reprod Toxicol, 2014, 53:105 - 118.

［43］ Ladics GS, Chapin RE, Hastings KL, et al. Developmental toxicology evaluations—issues with including neurotoxicology and immunotoxicology assessments in reproductive toxicology studies［J］. Toxicol Sci, 2005, 88(1): 24 - 29.

［44］ Inoue A, Arima A, Kato H, et al. Utility of finger maze test for learning and memory abilities in infants of cynomolgus monkeys exposed to thiamazole［J］. Cong Anomal, 2014, 54(4): 220 - 224.

［45］ Halpern DF, LaMay ML. The smarter sex: a critical review of sex differences in intelligence［J］. Educ Psychol Rev, 2000, 12(2): 229 - 246.

〔修回日期〕2016-01-13

研究报告

主动脉弓狭窄致大鼠慢性心力衰竭模型的建立及病理过程观察

奚晓青,陈小真,马全鑫,张利棕,方明笋,陈 诚,蔡月琴,陈民利

(浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究中心,杭州 310053)

【摘要】 目的 观察主动脉弓狭窄致大鼠心力衰竭的病理过程变化。**方法** 沿胸骨剪断大鼠左侧第二根肋骨开胸,于头臂干和左颈总动脉之间行主动脉弓缩窄术(transverse aortic constriction,TAC)建立慢性心力衰竭模型 24 只,另取大鼠 8 只行假手术。假手术组于术后 12 周,模型组分别在 TAC 术后 4 周、8 周、12 周时进行超声心动、血流动力学检测和 N 端前脑钠素(N-terminal pro-brain natriuretic peptide,NT-proBNP)测定,并进行心肌组织病理学观察。**结果** 模型组在 TAC 术后 4 周时 NT-proBNP 显著增加、8 周达到峰值($P<0.05$)、12 周时呈下降趋势;超声心动图结果显示,模型组 TAC 术后 4 周时射血分数(ejection fraction,EF)、短轴率(fraction shortening,FS)显著升高、左心室收缩末期容积(left ventricular end systolic volume,LVESV)显著减小($P<0.05$),8 周时 EF 显著升高($P<0.05$),12 周时 EF 显著降低、左心室舒张末期容积(left ventricular end diastolic volume,LVEDV)、LVESV 显著增加($P<0.05$);血流动力学检测显示,模型组在 TAC 术后左室最大收缩速率(left ventricular pressure maximal rate of rise, dp/dtmax)降低、左室最大舒张速率(left ventricular pressure maximal rate of fall, - dp/dtmax)升高($P<0.05$);病理学观察显示,模型组 TAC 术后 4 周时心肌细胞肥大、排列紊乱,8 周时心肌间结缔组织增生、炎症细胞浸润,12 周时心肌细胞凋亡、胶原纤维沉积。**结论** 主动脉弓狭窄致大鼠心力衰竭模型在 TAC 术后 4 周时心肌出现代偿性肥厚,8 周时心肌出现失代偿的初期反应,12 周时出现心肌纤维化,形成不可逆的心力衰竭。

【关键词】 慢性心力衰竭;主动脉弓狭窄;病理过程;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】**1671-7856(2016) 04-0035-06

doi: 10.3969.j.issn.1671 -7856.2016.04.006

Establishment of a rat model of chronic heart failure by transverse aortic constriction and observation of its pathological process

XI Xiao-qing, CHEN Xiao-zhen, MA Quan-xin, ZHANG Li-zong,
FANG Ming-sun, CHEN Cheng, CAI Yue-qin, CHEN Min-li
(Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Objective To observe the pathological changes of heart failure caused by transverse aortic constriction in rats. **Methods** Partial thoracotomy was performed to the second rib and the transverse aortic constriction was performed between the innominate and left carotid arteries to establish a model of heart failure in 24 rats. The same operation was performed on another 8 rats, except for the ligation of the transverse aorta. Echocardiographic assessment, hemodynamic measurement, myocardial histopathological examination and NT-proBNP measurement were performed to the sham group at

[**基金项目**]国家卫生和计划生育委员会科研基金(编号:2016149056);比较医学创新团队(编号:XTD201301)。
[**作者简介**]奚晓青(1990 -),女,硕士生,研究方向:中药药理与比较医学,E-mail: xixiaoqing163@163.com。
[**通讯作者**]陈民利(1963 -),女,教授、硕士,研究方向:实验动物与比较医学,E-mail: cmli991@aliyun.com。

12 weeks and model group at 4 weeks, 8 weeks, 12 weeks after the operation. **Result** At 4 weeks after the operation, NT-proBNP, EF, FS and -dp/dtmax of the model group was significantly increased and LVESV, +dp/dtmax of the model group were significantly decreased ($P<0.05$). At 8 weeks after the operation, EF and -dp/dtmax of the model group were increased and +dp/dtmax of the model group was significantly decreased ($P<0.05$). At 12 weeks after the operation, NT-proBNP, EF and +dp/dtmax of the model group were decreased, and LVESV, LVEDV and -dp/dtmax of the model group were increased ($P<0.05$). The cardiomyocytes became hypertrophic and lined up in disorder at 4 weeks after the operation. Pathologic examination of the myocardial tissue showed connective tissue proliferation and inflammatory cell infiltration at 8 weeks after the operation, and cardiomyocyte apoptosis and collagen fiber deposition at 12 weeks after the operation. **Conclusions** Transverse aortic constriction induces heart failure in rats. The pathological processes are compensatory hypertrophy at 4 weeks after the operation, initial reaction of decompensation at 8 weeks after the operation, and heart failure at 12 weeks after the operation.

【**Key words**】 Chronic heart failure; Transverse aortic constriction; Pathological process; Rats

心力衰竭是各种心脏疾病致心功能不全的临床综合征,也是大多数心血管疾病的最终归宿。目前全球心力衰竭患者的数量已高达 2250 万,并且以每年 200 万的速度快速递增,心力衰竭的高患病率和高死亡率使它成为一个全球性难题[1]。主动脉弓缩窄术(transverse aortic constriction,TAC)致左室肥厚模型与人类心力衰竭病理过程类似,是一种理想的动物模型[2]。但目前各类文献报道 TAC 术后形成心力衰竭的进程不一[3,4],且心力衰竭各个时期的病理特点尚不明确。因此,本文对主动脉弓缩窄致大鼠心力衰竭的病理过程进行了观察和分析。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,体重 220 ~ 250 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司【SCXK(沪)2012 -0002】;实验动物使用许可证:【SYXK(浙)2013 -184】,环境温度:(22 ±2)℃,相对湿度 50% ~60%,光照 12 h/12 h 明暗交替;每笼 3 只饲养,自由饮食;并按实验动物使用的"3R"原则给以人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

异氟烷,购自深圳市华宝医疗用品工贸发展有限公司;乌拉坦,购自上海国药集团化学试剂有限公司;大鼠 N 端前脑钠素(N-terminal pro-brain natriuretic peptide,NT-proBNP)ELISA 试剂盒,购自杭州诚维生物有限公司。

小动物麻醉呼吸机(美国 Hallowell 公司),Vevo2100 小动物超声影像系统(加拿大 Visual Sonics 公司),MPA2000 生理信号记录仪(上海奥尔科特生物科技有限公司),Thermo 光谱扫描多功能酶标仪(美国 Thermo 公司),Nano Zoomer2.0RS 数字切片扫描设备(日本滨松公司)。

1.3 实验方法

取雄性 SD 大鼠 40 只,适应性饲养 1 周后,行主动脉弓狭窄手术[5,6]。术前禁食不禁水 10 h ~ 12 h,将大鼠诱导麻醉后,剃掉胸部被毛,并固定于 45°斜式固定台,进行气管插管,然后将动物固定于保温台,外接小动物麻醉呼吸机辅助呼吸。碘伏消毒胸部术区,剪断大鼠左侧第二根肋骨逐层开胸,并用撑开器撑开切口,充分暴露胸腺,依次分离胸腺、主动脉弓,用 3 -0 号缝线包绕过主动脉弓后壁,从头臂干和左颈总动脉之间探出。将外径为 0.9 mm 的自制"L"型针平行置于主动脉弓上方,结扎后将"L"型针缓慢取出,逐层关闭胸腔,消毒切口。术后 3 d 肌肉注射 100 000U 青霉素,并每天观察动物状况。另取大鼠 8 只行假手术,其它步骤相同但不缩窄主动脉弓。将术后存活大鼠模型 24 只,分别在 TAC 术后 4 周、8 周、12 周时各取 8 只,进行超声心动、血流动力学检测。检测结束后,取血分离血清,采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中 NT-proBNP 的含量,并进行心肌组织病理学观察。

1.4 指标观察

1.4.1 小动物超声心动图的测定:模型组在 TAC 术后 4 周、8 周、12 周时各取 8 只,假手术组术后 12 周时,进行超声心动图检测,具体方法:将大鼠进行异氟烷吸入麻醉后,仰卧固定,用高分辨率小动物超声影像系统,探头频率 21 MHz,取左胸骨旁的短轴切面,在二尖瓣腱索水平记录 M 型超声心动图,分别测量左室舒张末期室间隔厚度(left ventricular end-diastolic interventricular septal thickness,IVSd)、左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter,LVIDd)、左室后壁舒张末期厚度(left ventricular end-diastolic posterior wall thickness,

LVPWd)、左室收缩末期室间隔厚度(left ventricular end-systolic interventricular septal thickness, IVSs)、左室收缩末期内径(left ventricular end-systolic diameter, LVIDs)、左室后壁收缩末期厚度(left vebtricular end-systolic posterior wall thickness, LVPWs),计算射血分数(ejection fraction, EF)、短轴率(fraction shortening, FS)、左心室舒张末期容积(left ventricular end diastolic volume, LVEDV)、左心室收缩末期容积(left ventricular end systolic volume, LVESV),在连续 3 个心动周期上测量各指标并取其平均值。

1.4.2 血流动力学各项指标的测定:腹腔注射 20% 乌拉坦麻醉大鼠(5 mL/kg),将微型导管连接压力换能器经右颈总动脉进行插管,另一端连接生理信号记录仪。当微型导管进入左心室后,稳定 5 min 再测量左室收缩末压(left ventricular end-systolic pressure, LVESP)、左室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)、左心室最大收缩速率(left ventricular pressure maximal rate of rise, + dp/dtmax)、左心室最大舒张速率(left ventricular pressure maximal rate of fall, - dp/dtmax)等血流动力学指标。

1.4.3 病理组织学检测:检测结束后,处死动物,开胸取心脏,经 4% 甲醛固定,乙醇梯度脱水,石蜡包埋,切片,行 HE 染色和 Masson 染色,光学显微镜观察病理变化。

1.5 统计学方法

实验数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析。计量资料组间比较采用 One-way ANOVA(单因素方差分析)检验。$P < 0.05$,表示统计学有意义。

2 结果

2.1 TAC 大鼠的存活率及并发症

我们在实验中观察到,主动脉弓缩窄术术中及术后死亡原因主要是主动脉弓破裂、结扎过紧形成急性心肌缺血、肺部损伤导致呼吸不畅。手术操作过程中及术后 24 h 内死亡 3 只,成活 29 只,存活率约为 90.6%;术后 3 d 内死亡 2 只,存活 27 只,存活率为 84.4%;术后 4 周,死亡 2 只,存活 25 只,存活率为 78.1%。术后 4 周,假手术组死亡 0 只,存活 8 只动物。

2.2 TAC 术后不同时期大鼠血清 NT-proBNP 水平变化

与假手术组相比,模型组 TAC 术后 4 周、8 周时血清 NT-proBNP 显著增加($P < 0.05$),且 8 周时血清 NT-proBNP 达到峰值;12 周时血清 NT-proBNP 降低,与假手术组比较无显著差异($P > 0.05$)(表 1)。

2.3 TAC 术后不同时期大鼠的超声心动图变化

与假手术组比较,模型组 TAC 术后 4 周时 IVSd、IVSs、LVPWd、LVPWs 显著增厚(图 1)、LVIDs 显著减小、计算值 EF、FS 显著升高、LVESV 显著降低($P < 0.05$)。8 周时 IVSd、IVSs、LVPWs 显著增厚、计算值 EF 显著升高($P < 0.05$)。12 周时 IVSs 显著增厚、LVIDd 和 LVIDs 显著增加、计算值 EF 显著降低、LVEDV 和 LVESV 显著扩增($P < 0.05$)(表 2)。

与模型组 TAC 术后 4 周比较,8 周时各项指标差异无显著性($P > 0.05$)。与 TAC 术后 4 周、8 周比较,12 周时 LVIDd、LVIDs、LVEDV、LVESV 显著增加、LVPWs 显著变薄($P < 0.05$),EF 和 FS 显著降低($P < 0.05$)(表 2)。

2.4 TAC 术后不同时期大鼠的血流动力学变化

与假手术组比较,模型组 TAC 术后 4 周时 + dp/dtmax 显著降低、- dp/dtmax 显著升高($P < 0.05$)。8 周时 HR、LVESP、+ dp/dtmax 显著降低、- dp/dtmax 显著升高($P < 0.05$)。12 周时 HR、+ dp/dtmax 显著降低、- dp/dtmax 显著增高($P < 0.05$)。

与模型组 TAC 术后 4 周比较,8 周时 HR、+ dp/dtmax 显著降低($P < 0.05$)。与 TAC 术后 4 周和 8 周比较,12 周时 HR 显著降低($P < 0.05$)(表 3)。

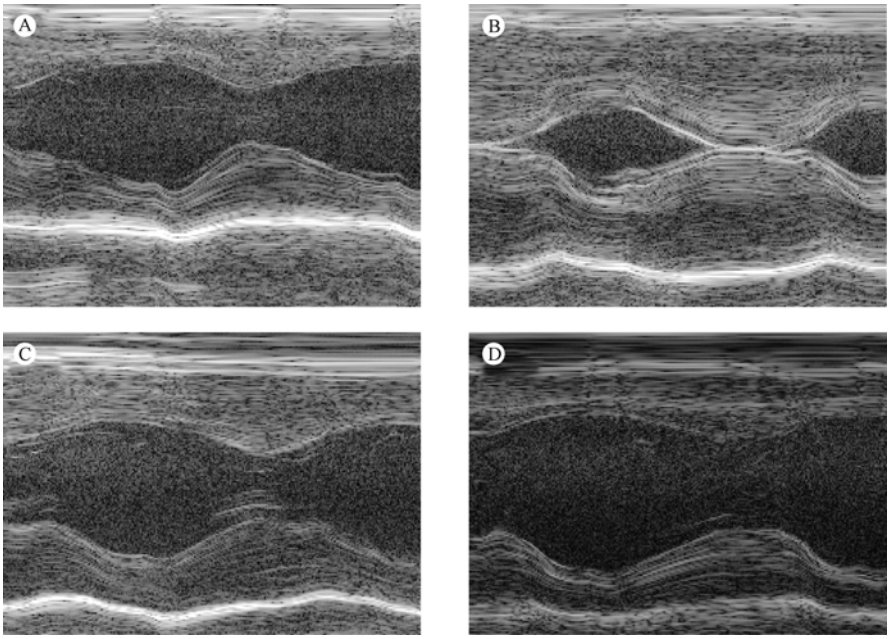
表 1 TAC 术后不同时期大鼠 NT-proBNP 水平变化($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Changes of serum NT-proBNP levels of the rats at different time points after transverse aortic constriction

组 别 Groups	假手术组 Sham-operation group	TAC 4 周 TAC 4 weeks	TAC 8 周 TAC 8 weeks	TAC 12 周 TAC 12 weeks
N 端前脑钠素 NT-proBNP(pg/mL)	357.63 ± 60.60	511.39 ± 66.12 *	542.33 ± 166.39 *	438.84 ± 41.72

注:*:与假手术组相比,$P < 0.05$。

Note. *: Compared with the sham-operation group, $P < 0.05$.



注:A:假手术组;B:TAC 4 周;C:TAC 8 周 D:TAC 12 周

图 1 TAC 术后不同时期大鼠的超声心动图

Note. A: Sham-operation group; B: TAC 4 weeks; C: TAC 8 weeks; D: TAC 12 weeks

Fig. 1 Echocardiographic assessment of the rats at different time points after transverse aortic constriction

2.5 TAC 术后不同时期大鼠的心肌组织病理学变化

通过 HE 染色可见,假手术组心肌细胞排列整齐清晰,细胞核呈椭圆形,位于细胞中央,闰盘呈深红色线状,形如阶梯,横贯心肌细胞,心肌细胞之间有薄层结缔组织。模型组 TAC 术后 4 周时心肌细胞肥大、肌纤维增粗,细胞核增大,排列紊乱,血管外膜结缔组织增生,边缘心肌纤维间炎症细胞浸润并向心扩散。8 周时心肌细胞排列杂乱,胞质明显增多,心肌细胞之间无明显界限,心肌纤维外的成纤维细胞增多,大量炎症细胞浸润,血管基膜增厚,管腔狭窄。12 周时,大量心肌细胞凝固性坏死并伴有空泡变性,部分心肌组织消失(图 2)。

通过 Masson 染色可见,假手术组与 TAC 术后 4 周模型的心肌组织中未见胶原纤维着色, 8 周时心肌边缘染色异常, 12 周时胶原纤维沉积,大面积心肌呈现蓝色(图 2)。

3 讨论

本实验用主动脉弓缩窄术(TAC)致大鼠心力衰竭,在 TAC 术后 4 周出现心肌肥大,8 周出现心肌失代偿初期反应,12 周时心肌出现不可逆的心力衰竭,呈现渐行性心衰过程,符合临床还原压力超负荷导致心肌代偿性肥大到失代偿性心力衰竭病理生理发展过程。

NT-proBNP 主要来源于心室,其释放与心室扩张和压力超负荷相关联[7,8],现作为心脏功能不全的标志物,主要用于心力衰竭的临床诊断、疗效评价和预后判断。本实验结果发现,模型组 TAC 术后 + dp/dtmax 显著降低、- dp/dtmax 升高,并出现 TAC 术后 4 周时血清 NT-proBNP 显著升高,术后 8 周时血清 NT-proBNP 达到峰值,提示长期的血流动力学负荷导致心肌功能严重障碍。但本模型在 TAC 术后 12 周时出现血清 NT-proBNP 减少,与临床现象有一定差异[9],这可能与心肌细胞大面积凋亡有关。进一步病理检测发现 TAC 术后 12 周心肌细胞大面积凋亡、坏死,而 NT-proBNP 主要来源于心室,推测在 TAC 术后 12 周时,可能由于心肌细胞大面积凋亡、坏死而导致 NT-proBNP 分泌减少。

超声心动图为慢性心力衰竭重要的检查手段,能为测评心力衰竭的严重程度提供依据。本实验结果显示模型组 TAC 术后 4 周时左室后壁收缩末期厚度(LVPWs)、左室后壁舒张末期厚度(LVPWd)、室间隔收缩末期厚度(IVSs)、室间隔舒张末期厚度(IVSd)显著增厚,左室收缩末期容积(LVESV)、左室舒张末期容积(LVEDV)显著缩小,射血分数(EF)显著升高。表明 TAC 术后 4 周时各室壁增厚,心室腔减小,心脏收缩舒张功能受损,心

表 2 TAC 术后不同时期大鼠的超声心动图指标变化($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Changes of cardiac ultrasonic parameters of the rats at different time points after transverse aortic constriction

组 别 Groups	左室舒张末期室间隔厚度 IVSd(mm)	左室收缩末期室间隔厚度 IVSs (mm)	左室舒张末期内径 LVIDd (mm)	左室收缩末期内径 LVIDs (mm)	左室后壁舒张期厚度 LVPWd (mm)	左室后壁收缩期厚度 LVPWs (mm)	射血分数 EF (%)	短轴率 FS (%)	左心室舒张期容积 LVEDV (mL)	左心室收缩期容积 LVESV (mL)
假手术组 Sham-operation group	1.96 ± 0.22	2.98 ± 0.49	6.52 ± 0.72	3.48 ± 0.67	1.99 ± 0.29	3.39 ± 0.26	76.97 ± 5.51	46.90 ± 5.04	220.65 ± 55.75	52.63 ± 25.11
TAC 4 周 TAC 4 weeks	3.30 ± 0.67[a]	4.89 ± 1.10[a]	5.73 ± 0.82	1.87 ± 1.32[a]	2.81 ± 0.74[a]	5.09 ± 0.97[a]	91.35 ± 9.31[a]	69.27 ± 18.34[a]	165.47 ± 55.15	18.12 ± 22.07[a]
TAC 8 周 TAC 8 weeks	2.61 ± 0.18[a,]	4.32 ± 0.36[a]	6.57 ± 0.69	2.85 ± 0.39	2.52 ± 0.29	4.46 ± 0.3[a]	86.08 ± 1.64[a]	56.69 ± 1.88[a]	223.59 ± 53.71	31.59 ± 10.92
TAC 12 周 TAC 12 weeks	2.49 ± 0.28[b]	4.01 ± 0.24[a]	8.14 ± 0.98[a,b,c]	5.24 ± 0.68[a,b,c]	1.99 ± 0.14[b]	2.92 ± 0.42[b,c]	63.34 ± 1.39[a,b,c]	35.72 ± 0.76[b,c]	362.56 ± 92.78[a,b,c]	113.75 ± 38.25[a,b,c]

注:a:与假手术组比较, $P < 0.05$;b:与 TAC 术后 4 周比较,$P < 0.05$;c:与 TAC 术后 8 周比较,$P < 0.05$。

Note. a:Compared with the sham-operation group , $P < 0.05$; b: Compared with the TAC 4 weeks, $P < 0.05$; c:Compared with the TAC 8 weeks, $P < 0.05$.

表 3 TAC 术后不同时期大鼠左心室心功能变化($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The left heart function in the rats at different time points after transverse aortic constriction

组别 Groups	心率 HR(bpm)	左室收缩末期压 LVESP (mmHg)	左室舒张末期压 LVEDP (mmHg)	左室最大收缩速率 +dp/dtmax (mmHg/s)	左室最大舒张速率 −dp/dtmax (mmHg/s)
假手术组 Sham-operation group	430 ± 19	156. 48 ± 14. 690	0. 5 ± 1. 84	12202. 36 ± 1657. 41	−8321. 67 ± 663. 6
TAC 4 周 TAC 4 weeks	396 ± 69	171. 69 ± 60. 78	−0. 19 ± 3. 26	8108. 81 ± 2659. 23[a]	−6771. 49 ± 1648. 45[a]
TAC 8 周 TAC8 weeks	286 ± 27[a,b]	130. 21 ± 10. 28[a]	1. 85 ± 4. 20	5825. 33 ± 650. 54[a,b]	−5405. 21 ± 902. 70[a]
TAC 12 周 TAC 12 weeks	245 ± 5[a,b,c]	132. 00 ± 25. 43	−2. 52 ± 2. 45	5220. 13 ± 1618. 03[a]	−5425. 97 ± 1521. 11[a]

注:a:与假手术组比较, $P<0.05$;b:与 TAC 4 周比较,$P<0.05$;c:与 TAC 8 周比较,$P<0.05$。

Note. a: Compared with the sham-operation group, $P<0.05$; b: Compared with the TAC 4 weeks, $P<0.05$; c: Compared with the TAC 8 weeks, $P<0.05$.

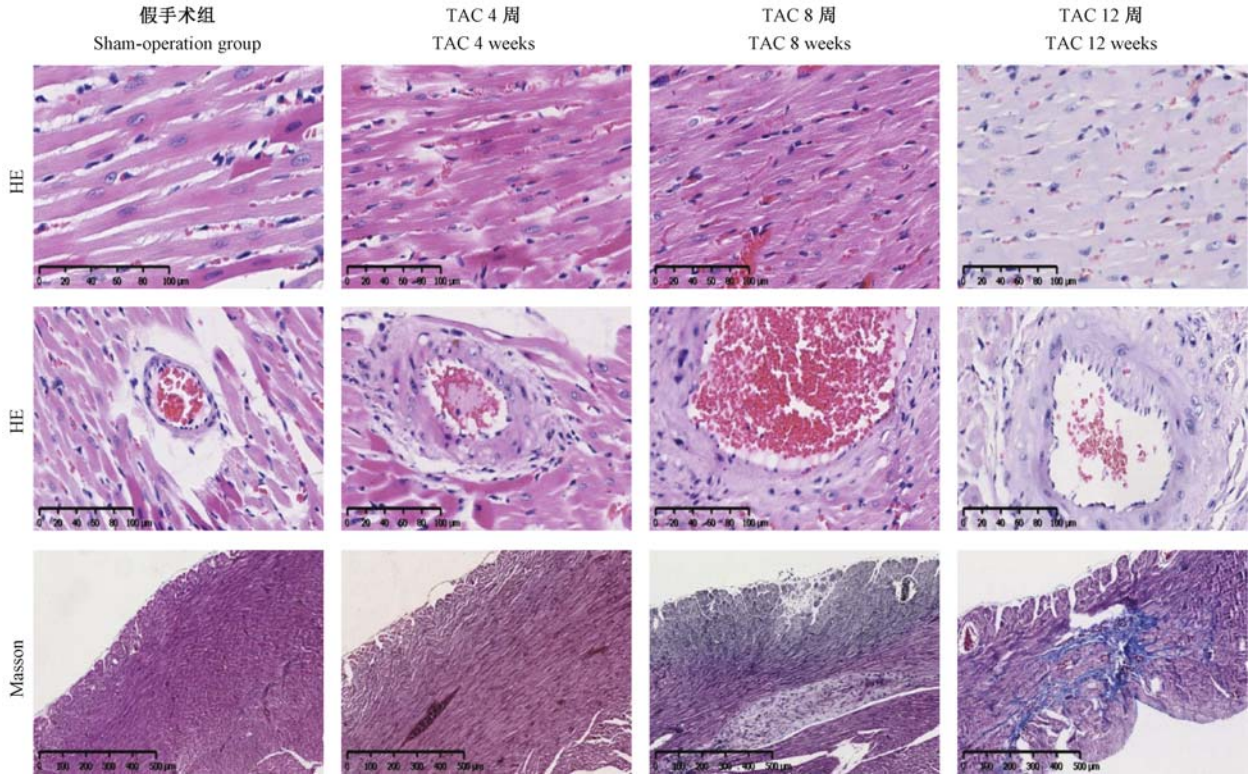


图 2 不同时期大鼠心肌组织的 HE 染色与 Masson 染色

Fig. 2 Morphological changes of the rat myocardium at different time points. H&E staining and Masson's staining

肌形成代偿性肥厚。代偿性心肌肥厚在最初是有益的,因为它补偿了心肌梗死后功能的丧失[10]。但长时间的血流动力学负荷,自适性心肌肥大的心室半径增加,室壁压力增加,心室需氧量也增加,最终导致心脏功能障碍[11],形成不可逆的心力衰竭。在 TAC 术后 8 周时各指标变化有所缓解,提示心肌可能出现失代偿的初期反应,各心室壁无进一步增厚,但心功能进一步受损。在 TAC 术后 12 周时,LVIDs、LVIDd、IVSs、IVSd 相较于 4 周、8 周而言变薄,LVEDV、LVESV 显著扩增,EF 显著降低,与文献报道[12]一致。表明在 TAC 术后 12 周时慢性心力衰竭已发展至完全失代偿。

心肌组织病理学显示 TAC 术后 4 周心肌细胞横截面积增加,细胞核增大,其心肌增厚情况与超声心动图显示结果一致。8 周时,成纤维细胞增生,大量炎症细胞浸润,属于心肌肥厚的病变表现。12 周时,心肌细胞凝固性坏死,心肌间质胶原纤维沉

(下转第 85 页)

研究报告

CEMx174 细胞中 SAMHD1 蛋白表达与 SIVmac239 病毒水平的相关性研究

彭灵娟，丛　喆，薛　婧，宋铭晶，魏　强

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

【摘要】　目的　研究 SIV 在感染 CEMx174 细胞过程中，SAMHD1 在基因和蛋白水平的变化与病毒水平之间的相关性。**方法**　SIVmac239 病毒感染 CEMx174 细胞后，每天收集上清和细胞，应用 TaqMan 探针实时荧光定量 RT-PCR 方法，检测细胞内 SAMHD1 mRNA 的相对表达量的变化；用 Western blot 检测 SAMHD1 蛋白与 SIVmac239 P27 蛋白表达量的变化，并分析其相关性。**结果**　CEMx174 细胞感染 SIVmac239 后，细胞中的 SAMHD1 mRNA 基于内参基因 GAPDH 的相对表达量逐渐增加，前 3 d 分别增加了 14%，16%，42%，随后开始迅速增加，第 4 天达到了 200%，第 6 天更是达到了 890%；细胞中 SAMHD1 蛋白的表达量在感染后第 1、2 天时变化不大，随后逐渐降低，到第 5、6 天时，几乎检测不到，呈现逐渐下降的趋势。**结论**　CEMx174 细胞感染 SIVmac239 后，SAMHD1 基因表达上调，与上清中病毒载量水平正相关，细胞内 SAMHD1 蛋白水平与 SIVmac239 P27 蛋白水平呈负相关。

【关键词】　SAMHD1；HIV-1；SIV；实时荧光定量 RT-PCR

【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2016) 04-0041-05

doi：10.3969.j.issn.1671－7856.2016.04.007

Relationship between the SAMHD1 protein expression and the SIVmac239 viral level in CEMx174 cells

PENG Ling-juan, CONG Zhe, XUE Jing, SONG Ming-jing, WEI Qiang

(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC) &Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】　Objective　To explore the relationship between protein levels of SAMHD1 expression with viral load of SIV in the SIVmac239-infected CEMx174 cells. **Methods**　CEMx174 cells were infected with SIVmac239, and the cells and supernatant were collected daily for analysis. The viral loads and the SAMHD1 mRNA level were detected by real-time RT-PCR and the level of P27 and SAMHD1 proteins were detected by Western blotting. **Results**　The mRNA level of intracellular SAMHD1 gene was increased and SAMHD1 protein decreased gradually when CEMx174 cells were infected with SIVmac239. **Conclusions**　There is a positive correlation between viral load in the supernatant and the mRNA level of SAMHD1, and a negative correlation between the increase of P27 protein and the decrease of SAMHD1 protein in the SIVmac239-infected CEMx174 cells.

[**基金项目**]国家十二五科技重大专项课题（2013ZX10004608－003 和 2012ZX10004501－001）。

[**作者简介**]彭灵娟（1991－），女，硕士研究生，专业：动物学，从事实验动物病毒学研究工作。

[**通讯作者**]魏强（1964－），男，研究员，博士生导师，研究方向：实验动物病毒学。E-mail：weiqiang0430@cnilas.org。

【Key words】 SAMHD1; HIV-1; SIV; Real-time RT-PCR

SAMHD1 是近年来新发现的抗艾滋病毒(HIV)的天然蛋白质分子,早期研究表明,SAMHD1 蛋白作为限制因子,在髓系树突细胞、巨噬细胞和静息 $CD4^+$ T 细胞中,发挥 dNTPase 功能,通过降低胞内 dNTP 水平,阻止 HIV-1 病毒早期复制[1],但在感染的活化 $CD4^+$ T 细胞中,却不能发挥抗病毒作用[2]。本研究使用 SIV 病毒感染 CEMx174 细胞,研究在活化的 T 细胞感染过程中,SAMHD1 在基因和蛋白水平的变化与病毒水平之间的相关性,以期为 SAMHD1 在活化细胞中的抗病毒作用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和病毒:CEMx174 细胞:由 T 淋巴细胞干细胞系 CEMR.3 和 B 淋巴细胞干细胞系 721.174 杂交而成的细胞系,病毒感染该种细胞后能表现出明显的细胞病变的融合现象。毒株:SIVmac239,由本实验室保存。CEMx174 细胞滴定病毒滴度为 $4 \times 10^5 TCID_{50}/mL$。

1.1.2 主要试剂盒:QIAamp RNA Blood Mini Kit 购自 Qiagen 公司(Cat No. 52304),TaqMan RNA-to-CT-1-Step Kit 购自 Applied Biosystems 公司(Cat No. 4392938)。

1.2 引物和探针

利用 Primer Express 3.0 软件设计 SAMHD1 mRNA (NCBI: NM_001271642)和内参 GAPDH 的实时荧光定量 RT-PCR 引物和 MGB 探针,Invitrogen 公司合成(表 1)。反应体系总体积 20 μL,内含:引物 F 和 R 各 0.5 μL、TaqMan® RT-PCR Mix(2 ×)缓冲液 10 μL、TaqMan® RT Enzyme Mix(40 ×)0.3 μL、probe 0.3 μL、DEPC-H_2O 3.4 μL、5 μL 的模板 RNA。反应条件为 48℃ 30 min、95℃ 10 min、94℃ 15 s(×40)、60℃ 60 s(×40)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞感染:在 3 mL 状态良好的 3×10^7 个 CEMx174 细胞悬液中,加入 SIVmac239 病毒原液 100 μL,37℃ 孵育 2 h,补足 RPMI1640 生长液至 30 mL。

1.3.2 样本收集和处理:在 CEMx174 细胞感染 SIVmac239 病毒后的第 0、1、2、3、4、5、6 天,分别取 4 mL 的细胞悬液,离心。提取上清液中病毒 RNA,real-time RT-PCR 检测病毒载量水平变化[3]。

离心后的细胞沉淀,一半用来提取细胞 RNA,在 mRNA 水平检测 SAMHD1 的表达量的变化,即采用荧光定量 RT-PCR 检测获得的 CT 值,利用 △△CT 法,即 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 计算各个时间点的样本基于内参基因 GAPDH 的相对表达量[4]。另一半细胞裂解,提取蛋白,利用 Western blot 检测 SAMHD1 蛋白的表达量和病毒的 p27 蛋白的表达量的变化[5]。

1.4 统计学方法

应用统计学软件 GraphPad Prism 5.0 数据统计软件处理数据。

2 结果

2.1 细胞病变

在 CEMx174 细胞感染 SIVmac239 病毒后细胞状态发生改变,会出现明显细胞融合。在感染后第 3 天就可看到早期融合细胞的产生(图 1B),在第 6 天,镜下观察有大量的融合细胞产生(图 1C)。

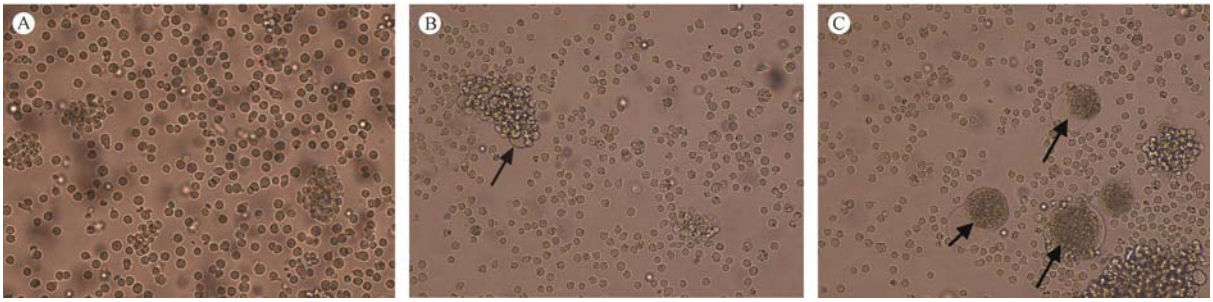
2.2 SIVmac239 感染 CEMx174 细胞中的 SAMHD1 mRNA 相对表达量与病毒载量之间的相关性分析

SIVmac239 感染 CEMx174 细胞后,感染上清液中的病毒 RNA 水平逐渐升高,从第 1 天的 1×10^4 copies/mL 左右,到第 6 天增长到 1×10^8 copies/mL(图 2A)。CEMx174 细胞中的 SAMHD1 mRNA 基于

表 1 Real-time RT-PCR 测定的 PCR 扩增引物和探针

Tab. 1 Primers and probes used for the real-time RT-PCR detection

目的基因 Genes	引物和探针名称 Primers and probes	序列(5'→3') Sequences	长度 Length
SAMHD1	SAMHD1 F	CCTCTCCTCGTCCGAATCATT	21bp
	SAMHD1 R	CCCAGCTGTTTGATGTATCGAA	22bp
	S- Probe	CACACCTCAATTTCAACG	18bp
GAPDH	GAPDH F	GACCACAGTCCATGCCATCA	20bp
	GAPDH R	CATCACGCCACAGTTTCCC	19bp
	G- Probe	ACCCAGAAGACTGTGGATGGCCCC	24bp

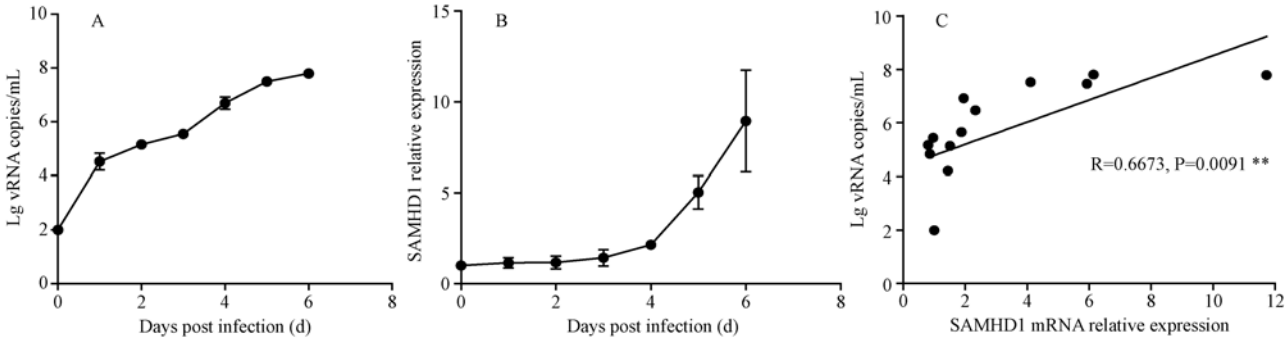


注：指细胞融合泡的位置；A：正常 CEMx174 细胞形态；B：SIVmac239 病毒感染 CEMx174 细胞第 3 天时细胞形态；C：SIVmac239 病毒感染 CEMx174 细胞第 6 天时细胞形态

图 1　SIVmac239 病毒感染 CEMx174 细胞后产生细胞病变

Note.：The site of cell fusion bulbs；A：Normal CEMx174 cells；B：The CPE of CEMx174 cells 3 days post infection with SIVmac239；C：The CPE of CEMx174 cells 6 days post infection with SIVmac239

Fig. 1　The cytopathic effect (CPE) of CEMx174 cells infected with SIVmac239



注：A：培养上清中病毒载量的变化；B：SIVmac239 感染 CEMx174 细胞中的 SAMHD1 mRNA 相对表达量变化；C：SAMHD1 mRNA 的相对表达量和病毒载量相关性分析

图 2　SIVmac239 感染 CEMx174 细胞中 SAMHD1 mRNA 相对表达量和上清中病毒载量的变化及两者之间相关性分析

Note. A：The changes of viral loads；B：The change of SAMHD1 mRNA relative expression；C：The correlation between viral loads and SAMHD1 mRNA relative expression

Fig. 2　The relationship between the relative expression of SAMHD1 mRNA and the viral RNA level in SIVmac239-infected CEMx174 cells

参内基因 GAPDH 的相对表达量，在前 3 d 分别比第 0 天增加了 14%，16%，42%，呈现缓慢增加趋势。随后开始迅速增加，第 4 天达到了 200%，第 6 天更是达到了 890%（图 2B）。

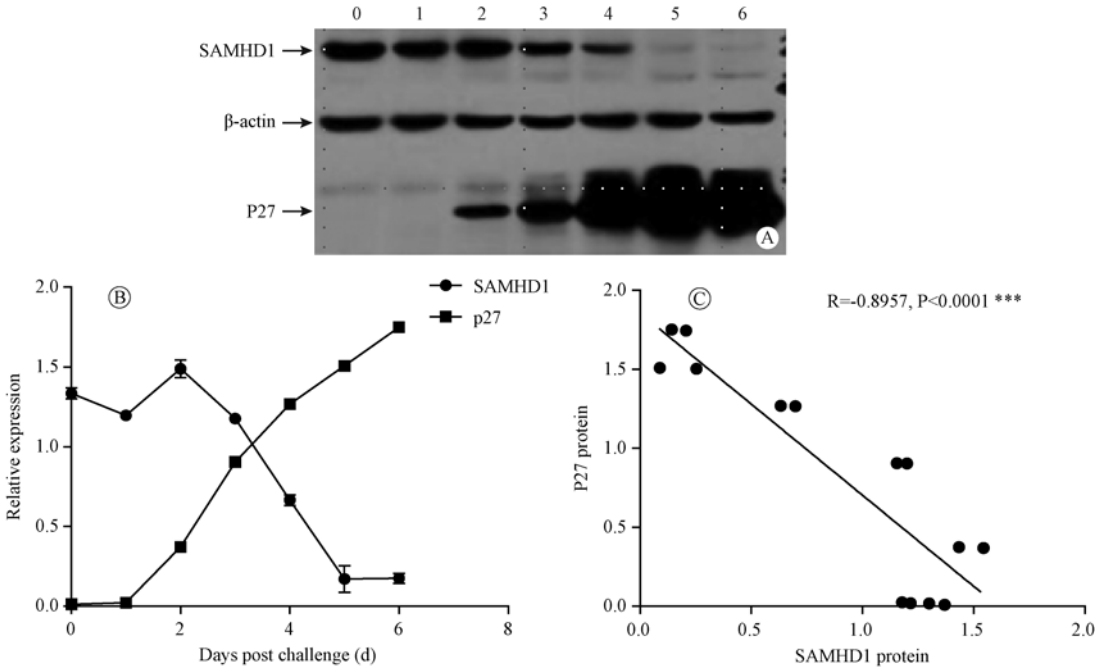
SAMHD1 mRNA 相对表达量与培养上清中病毒 RNA 载量呈正相关，$R = 0.6673$，$P < 0.01$；（图 2C）。

2.3　SIVmac239 感染 CEMx174 细胞中的 SAMHD1 和 P27 蛋白表达水平变化

CEMx174 细胞感染 SIVmac239 后，细胞中 SAMHD1 蛋白的表达量在第 1、2 天时变化不大，随后逐渐降低，到第 5、6 天时，几乎检测不到（图 3A）。在整个感染过程中，SAMHD1 蛋白的表达量总体呈现逐渐下降的趋势。而细胞中 SIV 病毒 P27 蛋白的含量却呈现逐渐递增的趋势。在感染后的第 2 天已经可以检测到 P27 蛋白，之后 4 d 表达量持续增加。SIVmac239 病毒的 P27 蛋白与 SAMHD1 蛋白的表达量呈显著负相关，$R = -0.8957$，$P < 0.0001$。

3　讨论

早期研究表明，SAMHD1 做为天然抗艾滋病毒的蛋白质分子，在髓系树突细胞、巨噬细胞和 $CD4^+$ 静息 T 细胞中，通过降低胞内 dNTP 水平，阻止 HIV-1 病毒早期复制[6]，低的 dNTP 水平被认为是 SAMHD1 蛋白抑制病毒复制的重要指标。然而，WY Gao 等人[7,8]发现活化的 $CD4^+$ T 细胞感染后，dNTP 含量没有明显下降，且显著高于静息细胞中 dNTP 水平，因此认为在活化的 T 细胞中，SAMHD1 蛋白不具有抗病毒作用。然而最新研究表明，SAMHD1 蛋白除了通过降解 dNTP 来发挥抑制病毒复制的作用，还能发挥 RNase 的功能来抗病毒



注:A:Western Blotting 电泳结果;B:SIVmac239 病毒感染 CEMx174 细胞蛋白检测;
C:SAMHD1 与病毒 P27 蛋白相关性分析

图 3 SIVmac239 病毒感染 CEMx174 细胞中的 SAMHD1、P27 蛋白表达量检测及相关性分析

Note. A: Western blot showing expression of SIV P27 and SAMHD1 in SIV-infected CEMx174 cells; B: The relative expression of SIV P27 and SAMHD1 in SIV-infected CEMx174 cells; C: The correlation between SAMHD1 protein and P27 protein

Fig. 3 The correlation between the expression of SAMHD1 protein and the P27 protein in SIVmac239-infected CEMx174 cells

[7,9,10]。因此,在活化的 CD4$^+$ T 细胞中,dNTP 的含量比较高,并不能说明 SAMHD1 蛋白就没有发挥抗病毒功能。

CEMx174 细胞是由 T 淋巴细胞干细胞系 CEMR. 3 和 B 淋巴细胞干细胞系 721. 174 杂交而成的细胞系,被 SIV 病毒感染后能产生明显的细胞病变。本研究中,CEMx174 细胞感染 SIVmac239 病毒后,随着培养上清液中的病毒载量快速升高,细胞中病毒 P27 蛋白的表达水平也增加迅速。而 SAMHD1 的 mRNA 相对表达量在 4 d 后显著增加,与病毒载量呈正相关,可见细胞在感染过程中,上调了 SAMHD1 基因的表达;与之相反的是细胞中 SAMHD1 蛋白表达量从 4 d 后逐渐下降,第 5 ~ 6 天时基本检测不到,与 SIV 病毒 P27 蛋白量呈显著负相关。

前期研究表明,一些慢病毒如 HIV-2 和 SIV,可以编码 Vpx 蛋白来抑制细胞内抗病毒复制的蛋白。HIV-2 和一些 SIV 编码的 Vpx 蛋白,通过加载 SAMHD1 蛋白到 CRL4DCAF1E3 泛素连接酶上诱导 SAMHD1 蛋白酶体降解,通过降解 SAMHD1 蛋白可以促进 HIV-1 病毒的反转录产物 cDNA 的积累,同时也明显促进人的单核细胞、及其来源的树突细胞和巨噬细胞的 HIV-1 的感染[11]。在其他 SAMHD1 限制感染的细胞,如星形胶质细胞中,Vpx 也能发挥降解 SAMHD1 功能,促进这些细胞的感染[12]。本研究使用的 CEMx174 细胞中的 SAMHD1 蛋白表达量的降低,可能与 SIVmac239 病毒产生的 Vpx 蛋白降解 SAMHD1 蛋白有关。SAMHD1 蛋白在活化的细胞中是否发挥抗病毒的功能有待进一步证实,但本研究中发现感染 SIV 的 CEMx174 细胞 SAMHD1 基因上调,蛋白含量下降,说明 SAMHD1 在感染过程中是起作用的。广谱表达的 SAMHD1 蛋白可能具有广谱的抗病毒作用,不只是在静息 CD4$^+$T 细胞或髓系细胞中发挥作用。

参考文献:

[1] Shingai M, Welbourn S, Brenchley JM, et al. The expression of functional Vpx during athogenic SIVmac infections of rhesus macaques suppresses SAMHD1 in CD4$^+$ memory T cells [J]. PLoS Pathog, 2015, 11(5): 1 - 23.

[2] Ryoo J, Oh C, Choi J, et al. The ribonuclease activity of

SAMHD1 is required for HIV - 1 restriction [J]. Nat Med, 2014, 20(8): 936 - 941.
[3] Hofmann-Lehmann R, Swenerton RK, Liska V, et al. Sensitive and robust one-tube real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction to quantify SIV RNA load: comparison of one- versus two-enzyme systems [J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2000, 16(13): 1247 - 1257.
[4] Zhang R, Bloch N, Nguyen LA, et al. SAMHD1 restricts HIV-1 replication and regulates inter- feron production in mouse myeloid cells [J]. PLoS ONE, 2014, 9(2): 1 - 10.
[5] Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, et al. SAMHD1 is the dendritic and myeloid - cell - specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx [J]. Nature, 2011, 474(7353): 654 - 657.
[6] Ballana 1 E, Esté JA. SAMHD1: at the crossroads of cell proliferation, immune responses, and virus restriction [J]. Trends Microbiol, 2015, 23(11): 680 - 692.
[7] Gao WY, Cara A, Gallo RC, et al. Low levels of deoxynucleotides in peripheral blood lymphocytes: a strategy to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(19): 8925 - 8928.
[8] Wu L. SAMHD1: a new contributor to HIV-1 restriction in resting CD4+ T-cells [J]. Retrovirology, 2012, 23(9): 88.
[9] Goncalves A, Kavayel E, Rice GI, et al. SAMHD1 is a nucleic-acid binding protein that is mislocalized due to Aicardi-Goutieres syndrome-associated mutations [J]. Hum Mutat, 2012, 33(7): 1116 - 1122.
[10] Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates [J]. Nat Immunol, 2012, 13(3): 223 - 228.
[11] Baldauf HM, Pan X, Erikson E, et al. SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells [J]. Nat Mad, 2012, 18(11): 1682 - 1687.
[12] Ayinde D, Casartelli N, Schwartz O. Restricting HIV the SAMHD1 way: through nucleotide starvation [J]. Nat Rev Microbiol, 2012, 10(10): 675 - 680.

〔修回日期〕2016-02-01

(上接第 17 页)

[8] Cooper D S, Claes D, Goldstein S L, et al. Follow-Up renal assessment of injury long-term after acute kidney injury (FRAIL-AKI)[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2016, 11(1): 21 - 29.
[9] Clement J. Considerations about a Chinese vaccine preventing a national form of epidemic acute kidney injury (AKI)[J]. Infect Dis (Lond), 2015, 135(12): 1 - 3.
[10] Sun Y, Gao Q, Wu N, et al. Protective effects of dexmedetomidine on intestinal ischemia-reperfusion injury [J]. Exp Ther Med, 2015, 10(2): 647 - 652.
[11] Dahmani S, Rouelle D, Gressens P, et al. Characterization of the postconditioning effect of dexmedetomidine in mouse organotypic hippocampal slice cultures exposed to oxygen and glucose deprivation[J]. Anesthesiology, 2010, 112(2): 373 - 383.
[12] Stoetzer C, Reuter S, Doll T, et al. Inhibition of the cardiac Na channel alpha-subunit Nav1.5 by propofol and dexmedetomidine [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2016, 389(3): 315 - 325.
[13] Yao H, Chi X, Jin Y, et al. Dexmedetomidine Inhibits TLR4/NF-kappaB Activation and reduces acute kidney injury after orthotopic autologous liver transplantation in rats [J]. Sci Rep, 2015, 5: 16849.
[14] 陈克研,张毅男,刁玉刚,周锦,张铁铮. 右美托咪定抑制肾缺血/再灌注炎性反应[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(53): 9189 - 9195.
[15] 李新灵,雷钟,杜靖,等. 不同剂量右美托咪定对大鼠肾缺血再灌注后心肌组织损伤的影响[J]. 医学研究生学报, 2015, (8): 809 - 814.
[16] Miao Y S, Zhao Y Y, Zhao L N, et al. MiR-18a increased the permeability of BTB via RUNX1 mediated down-regulation of ZO-1, occludin and claudin-5 [J]. Cell Signal, 2015, 27(1): 156 - 167.
[17] Cai H, Liu W, Xue Y, et al. Roundabout 4 regulates blood-tumor barrier permeability through the modulation of ZO-1, Occludin, and Claudin-5 expression [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2015, 74(1): 25 - 37.

〔修回日期〕2016-02-22

更 正

《中国比较医学杂志》2016 年 (26)卷第 2 期首篇(1 - 3 页)文章:"浅谈实验动物微生物国家标准",原作者为"魏强,秦川",现作者更正为"魏强"。特此更正。

研究报告

基于实时细胞分析技术检测前列腺癌细胞药物敏感性

靳亚西,孙彩显,高　虹,张连峰,张　丽

(中国医学科学院,北京协和医学院,医学实验动物研究所,卫生部人类疾病比较医学重点实验室,北京　100021)

【摘要】 **目的**　基于实时细胞分析技术发展,以更加简便稳定的方法进行药物敏感性评估,为前列腺癌临床治疗提供参考。**方法**　选取 VCaP、DU145、PC-3、PC-3M-2B4 和 PC-3M-IE8 五株人前列腺癌细胞,选用多西他赛、卡巴他赛和醋酸阿比特龙三种前列腺癌治疗药物,分别梯度浓度给药,利用 RTCA 检测给药前后的细胞生长情况,确定药物对前列腺癌细胞的半抑制浓度(IC50)。**结果**　多西他赛对 VCaP、DU145、PC-3、PC-3M-2B4、PC-3M-IE8 五种细胞系 24 h 的 IC50 分别为 8.81 nmol/L、11.61 nmol/L、1.78 nmol/L、1.44 nmol/L、8.69 nmol/L。卡巴他赛 24 h 的 IC50 依次为 3.73 nmol/L、3.96 nmol/L、10.41 nmol/L、5.43 nmol/L、7.37 nmol/L。醋酸阿比特龙 24 h 的 IC50 依次为 8.34 μmol/L、8.60 μmol/L、24.20 μmol/L、8.59 μmol/L、13.21 μmol/L。**结论**　PC-3M-2B4 及 DU145、VCaP 及 PC-3 可作为多西他赛、卡巴他赛及醋酸阿比特龙的对照,建立体外筛选药物的细胞模型,为临床推广提供参考。

【关键词】 前列腺癌;化疗药物;实时细胞分析;药物敏感性
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2016) 04-0046-07
doi: 10.3969.j.issn.1671－7856.2016.04.008

Assessment of drug sensitivity of the prostate cancer cells based on real-time cell analysis system

JIN Ya-xi, SUN Cai-xian, GAO Hong, ZHANG Lian-feng, ZHANG Li
(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 **Objective**　To develop a more convenient and stable method for assessment of drug sensitivity of prostate cancer based on real-time cell analysis system as a reference for clinical treatment. **Methods**　Human prostate cancer VCaP, DU145, PC-3, PC-3M-2B4 and PC-3M-IE8 cells were chosen to detect the sensitivity to three drugs, docetaxel, cabazitaxel and abiraterone acetate. Serial dilutions of the three drugs were used to treat the cell culture for 24 hours. The drug-induced effects on the cell lines after an incubation of 24 hours were recorded by the real-time cell analysis system to determine the half maximal inhibitory concentration (IC50). **Results**　Docetaxel showd IC50 of 8.81 nmol/L, 11.61 nmol/L, 1.78 nmol/L, 1.44 nmol/L, 8.69 nmol/L for VCaP, DU145, PC-3, PC-3M-2B4, PC-3M-IE8 cells, respectively. Cabazitaxel showed IC50 of 3.73 nmol/L, 3.96 nmol/L, 10.41 nmol/L, 5.43 nmol/L, and 7.37 nmol/L, respectively, for the five cell lines. Abiraterone acetate showed IC50 of 8.34 μmol/L, 8.60 μmol/L, 24.20 μmol/L, 8.59 μmol/L, and 13.21 μmol/L for the five cell lines. **Conclusions**　PC-3M-2B4 and DU145, VCaP and PC-3 cells

[基金项目]卫生行业科研专项 (201402001)。
[作者简介]靳亚西,女,硕士生,研究方向:比较医学。E-mail: Jinyaxi@yeah.net。
[通讯作者]张丽(1981－),女,助理研究员,研究方向:比较医学。E-mail: zhangl@cnilas.org。

can be used as control for docetaxel, cabazitaxel and abiraterone acetate to establish cell models for the drug screening in vitro and to provide reference for clinical applications.

【Key words】 Prostate cancer; Chemotherapy drugs; Real-time cell analysis system; Drug sensitivity

前列腺癌是指发生在前列腺的上皮性恶性肿瘤,是一种常见的影响男性健康的疾病[1]。前列腺癌常见的治疗方法包括内分泌治疗、前列腺癌根治术、放射治疗及化学药物治疗等。手术治疗只适用于癌症早期患者,激素治疗初期效果较好,然而在经过 18 ~ 24 月的治疗后,大部分患者会发展成为去势抵抗性前列腺癌(castration-resistant prostate cancer, CRPC)[2,3]。CRPC 患者的特征包括前列腺特异性抗原水平升高、血清睾酮的水平在去势范围内(< 50 ng/dL)[4]。一旦发展为 CRPC,中位生存期大约为 16 ~ 18 个月[5]。

因此,化疗仍然是治疗 CRPC 的最重要的手段,对化疗药物的正确选择将直接影响疗效。不同病人对不同药物敏感性不同,治疗前对药物敏感性进行评估,可以为临床治疗提供参考,提高治疗效果,而发展简便稳定的评估方法是对临床患者药物敏感性评估的关键。

由于分子生物学、细胞生物学技术的不断发展,现已发展出体内和体外两大系列 10 多种药敏试验方法。目前肿瘤药敏实验有单细胞体外培养法、人肿瘤细胞原代裸鼠移植瘤模型法、胶原凝胶包埋培养法、微组织块培养法等方法[6]。然而,体内肿瘤药敏试验大多周期长,费用高,成功率低,不易在临床药敏试验中推广。体外肿瘤药敏试验目前最常用的 MTT 法虽然简便,并可同时进行多种化疗药物的敏感性检测[7],但是细胞用量大,且只能观察实验终点[8]。而近年发展起来的实时细胞分析系统(real-time cell analysis system, RTCA)是一种通过检测培养环境中阻抗的变化而动态监测细胞生长情况的技术,与传统方法相比,有耗时短、细胞用量少、高通量和操作简单便捷等优点[9]。因此,RTCA 能更加快速简便且实时动态地观察到细胞对药物的反应,制作药物应答依赖性曲线,更加真实反应药物对肿瘤细胞生长与活性的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

VCaP 人前列腺癌腰椎转移细胞、DU145 人前列腺癌脑转移细胞、PC-3 人前列腺癌骨转移细胞、PC-3M-2B4 和 PC-3M-IE8 人前列腺癌上皮细胞,均购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心,采用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI-1640 培养基,于 5% CO_2,37℃细胞培养箱内常规培养。实验前 1 d 进行细胞传代,细胞满度在 60% ~80% 之间,收集细胞制备细胞悬液,浓度为 5 x 10^5 cells/mL,接种在 E-plate 16 检测板上进行细胞生长和药物敏感性分析。

1.2 药物

多西他赛(Selleckchem 公司)溶于 DMSO 中,并稀释一万倍于 RPMI-1640 中成为 1 μmol/L 的储液;卡巴他赛(西安天丰生物科技有限公司)溶于乙醇中,并稀释一万倍于 RPMI-1640 中成为 500 nmol/L 的储液;醋酸阿比特龙(武汉贝尔卡生物医药有限公司)溶于乙醇中并稀释 10 倍于 RPMI-1640 中成为 1 mmol/L 的储液;分装存于 -20℃备用。

1.3 RTCA 实时细胞分析

实时细胞分析系统采用 xCELLigence 细胞功能分析仪 DP 系统,购自艾森生物(杭州)有限公司,用于细胞增殖分析。检测板 E-Plate 16 的底部整合有微金电子传感器芯片,当贴壁生长在微电极表面的细胞引起电极界面阻抗的改变时,该阻抗值的变化直接反映细胞的生物学状态。其主要分析参数为细胞指数(cell index),与细胞覆盖面积成正比。

检测板每孔加入 50 μL 培养基,放入 RTCA Station(艾森生物)中测定基线,保证每孔接触正常并且细胞指数在正常值之内。取制备好的前列腺癌细胞悬液,分别以每孔 1×10^3 个、2.5×10^3 个、5×10^3 个、1×10^4 个接种于检测板 E-Plate 16 中,在超净台中静置 30 min 后,置于培养箱中的 RTCA 工作站中,每隔 15 min 记录细胞指数,总时长 96 h[10]。

1.4 RTCA 药物敏感性评价

取对数生长期的前列腺癌细胞,分别以每孔 5×10^3 个(VCaP、PC-3、PC-3M-2B4)和每孔 1×10^4 个(DU145、PC-3M-IE8)接种于检测板 E-Plate 16 中,放到培养箱中的 RTCA Station 中培养并检测,24 h 后添加药物。使实验组药物终浓度为:多西他赛:0.1、0.5、1、10、50、100(nmol/L),卡巴他赛:0.5、1、2、5、10、50(nmol/L),醋酸阿比特龙:5、10、25(μmol/L);对照组中加入无药物的溶解液,空白组

中加入 RPMI-1640 培养基。给药后继续在 RTCA Station 中进行培养并检测。药物作用 24 h 后,分析药物半数抑制浓度[11]。

1.5 统计学方法

使用 RTCA Software 2.0 系统软件和 Student's *t-tests* 分析处理数据,实验数据以平均数 ± 标准差表示,$n=6$, $*P<0.05$ 为差异有显著性。

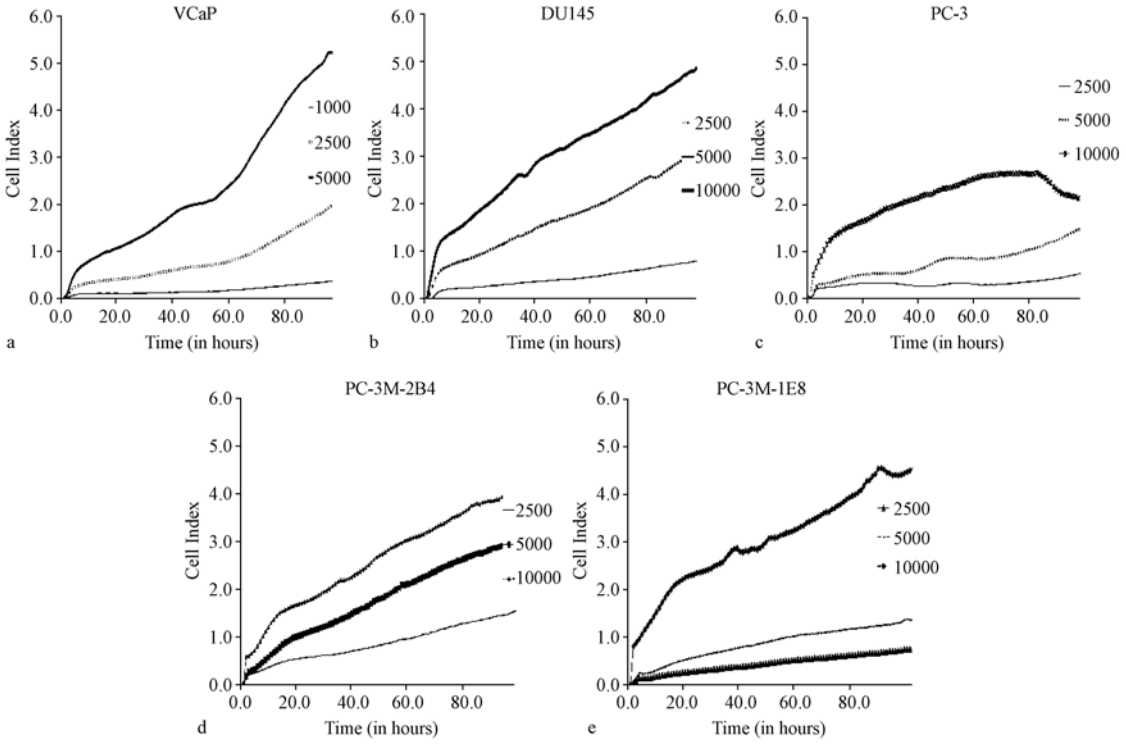
2 结果

2.1 细胞最佳接种量确定

五株前列腺癌细胞,均制备细胞悬液,梯度稀释,采用每孔 1×10^3 个、2.5×10^3 个、5×10^3 个、1×10^4 个不同接种量,接种于检测板 E-plate 16 中,检测 96 h 内细胞指数变化,观察细胞的生长增殖过程。如图 1 所示,以 96 h 内形成最佳 S 型增值曲线为标准,VCaP 最佳接种量为每孔 5×10^3 个,DU145 最佳接种量为每孔 1×10^4 个,PC-3 最佳接种量为每孔 5×10^3 个,PC-3M-2B4 最佳接种量为每孔 5×10^3 个,PC-3M-IE8 最佳接种量为每孔 1×10^4 个。

2.2 前列腺癌细胞对多西他赛敏感性对比分析

取对数生长期的前列腺癌细胞,按上述实验确定的最佳接种浓度,VCaP、PC-3、PC-3M-2B4 以 5×10^3 个细胞/孔,DU145、PC-3M-IE8 以 1×10^4 个细胞/孔接种于检测板 E-Plate 16 中,培养 24 h 后给药,RTCA 分析细胞增殖曲线。多西他赛药物终浓度分别为 0.1 nmol/L、0.5 nmol/L、1 nmol/L、10 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L。另设药物溶剂对照和空白对照。给药后继续培养并检测 CI 变化(图



注:五种前列腺癌细胞分别接种于检测板中,观察细胞的生长曲线,细胞指数(Cell index,CI 值)与细胞数量成正比,细胞量越多,CI 值越高。由于细胞增殖的特点,当在孔中细胞数目达到一定数量,即细胞增殖即进入平台期,CI 值也不再增加,因此细胞增殖曲线会成 S 型变化。a, VCaP 增值曲线;b, DU145 增值曲线; c,PC-3 增值曲线; d,PC-3M-2B4 增值曲线;e,PC-3M-IE8 增值曲线。

图 1 前列腺癌 5 种细胞系 96 h 增殖曲线

Note. Cells of the five cell lines are seeded in the E-plate16 wells. The CI (cell index) values reflecting the cell activities are recorded by the RTCA. The CI value is proportional to the cell number, the more amount of cells, the higher the CI value is. Because of the characteristics of cell proliferation, when the number of cells in the hole reaches a certain amount, there is a platform period, the CI value no longer increases any more, so the cell proliferation curve may be changed into "S". a: the cell proliferation curve of VCaP cells; b: the cell proliferation curve of DU145 cells; c: the cell proliferation curve of PC-3 cells; d: the cell proliferation curve of PC-3M-2B4 cells; e: the cell proliferation curve of PC-3M-IE8 cells.

Fig. 1 The cell proliferation curves of the five prostate cancer cell lines cultured for 96 hours

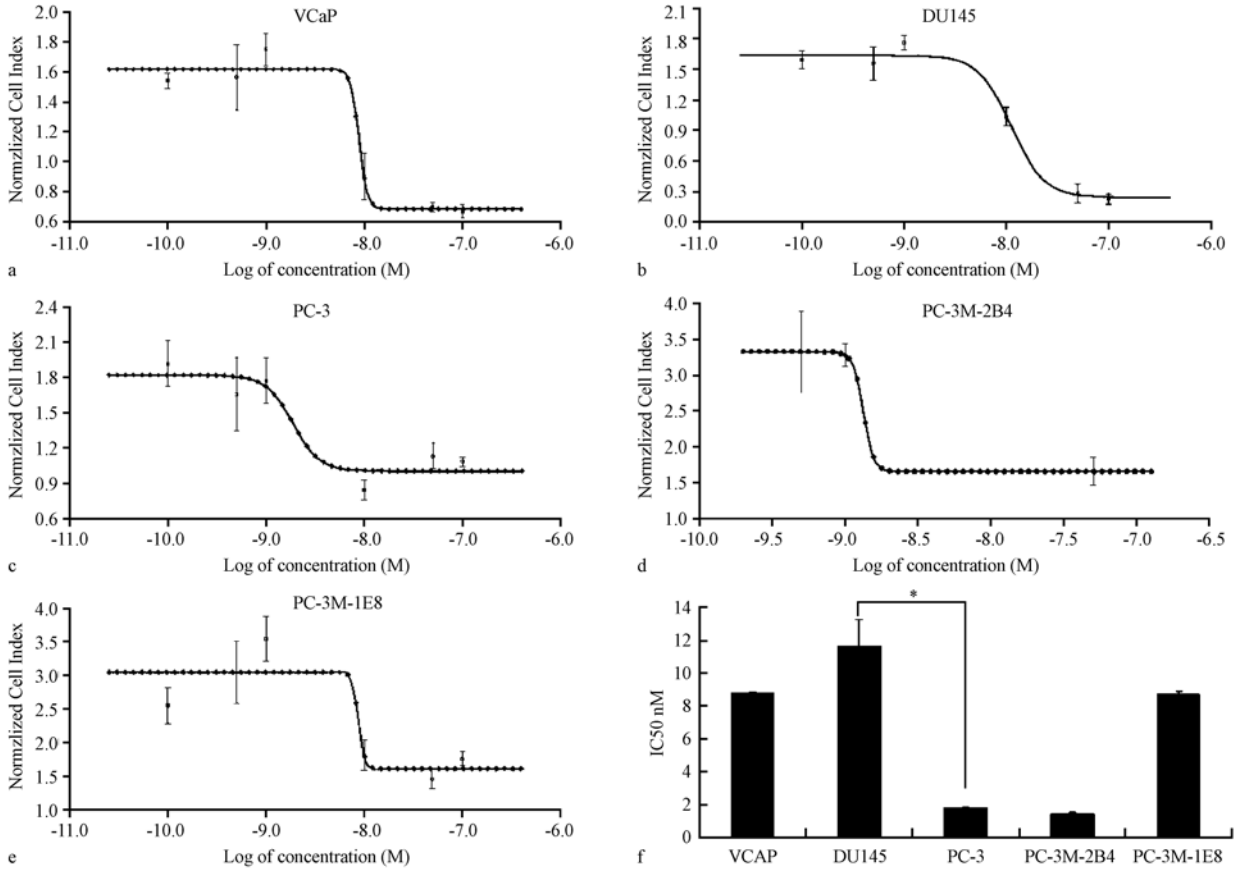
2a-e)。结果表明多西他赛对 VCaP、DU145、PC-3、PC-3M-2B4、PC-3M-IE8 五种细胞系 24 h 的 IC50 分别为（8.81 ±0.06）nmol/L,（11.61 ±1.67）nmol/L,(1.78n ±0.13）nmol/L,(1.44 ±0.10）nmol/L,（8.69 ±0.22）nmol/L。其中 PC-3 和 PC-3M-2B4 对多西他赛最敏感敏感,而 DU145 最不敏感,VCaP 和 PC-3M-IE8 中度敏感。

2.3　前列腺癌细胞对卡巴他赛敏感性对比分析

取对数生长期的前列腺癌细胞,按上述实验确定的最佳接种浓度,VCaP、PC-3、PC-3M-2B4 以 5×10^3 个细胞/孔,DU145、PC-3M-IE8 以 1×10^4 个细胞/孔接种于检测板 E-Plate 16 中,培养 24 h 后给药,RTCA 分析细胞增殖曲线。卡巴他赛药物终浓度分别为 0.5 nmol/L、1 nmol/L、2 nmol/L、5 nmol/L、10 nmol/L、50 nmol/L。另设药物溶剂对照和空白对照。给药后继续培养并检测 CI 变化(图 3a-e)。结果表明卡巴他赛对 VCaP、DU145、PC-3、PC-3M-2B4、PC-3M-IE8 五种细胞系 24 h 的 IC50 分别为（3.73 ±0.25）nmol/L,（3.96 ±0.13）nmol/L,（10.41 ±0.35）nmol/L,(5.43 ±0.21）nmol/L,（7.37 ±0.06）nmol/L。其中 VCaP 和 DU145 对卡巴他赛最敏感敏感,而 PC-3 最不敏感, PC-3M-2B4 和 PC-3M-IE8 中度敏感。

2.4　前列腺癌细胞对醋酸阿比特龙敏感性对比分析

取对数生长期的前列腺癌细胞,按上述实验确定的最佳接种浓度,VCaP、PC-3、PC-3M-2B4 以 5×10^3 个细胞/孔,DU145、PC-3M-IE8 以 1×10^4 个细胞/孔接种于检测板 E-Plate 16 中,培养 24 h 后给药,RTCA 分析细胞增殖曲线。醋酸阿比特龙药物

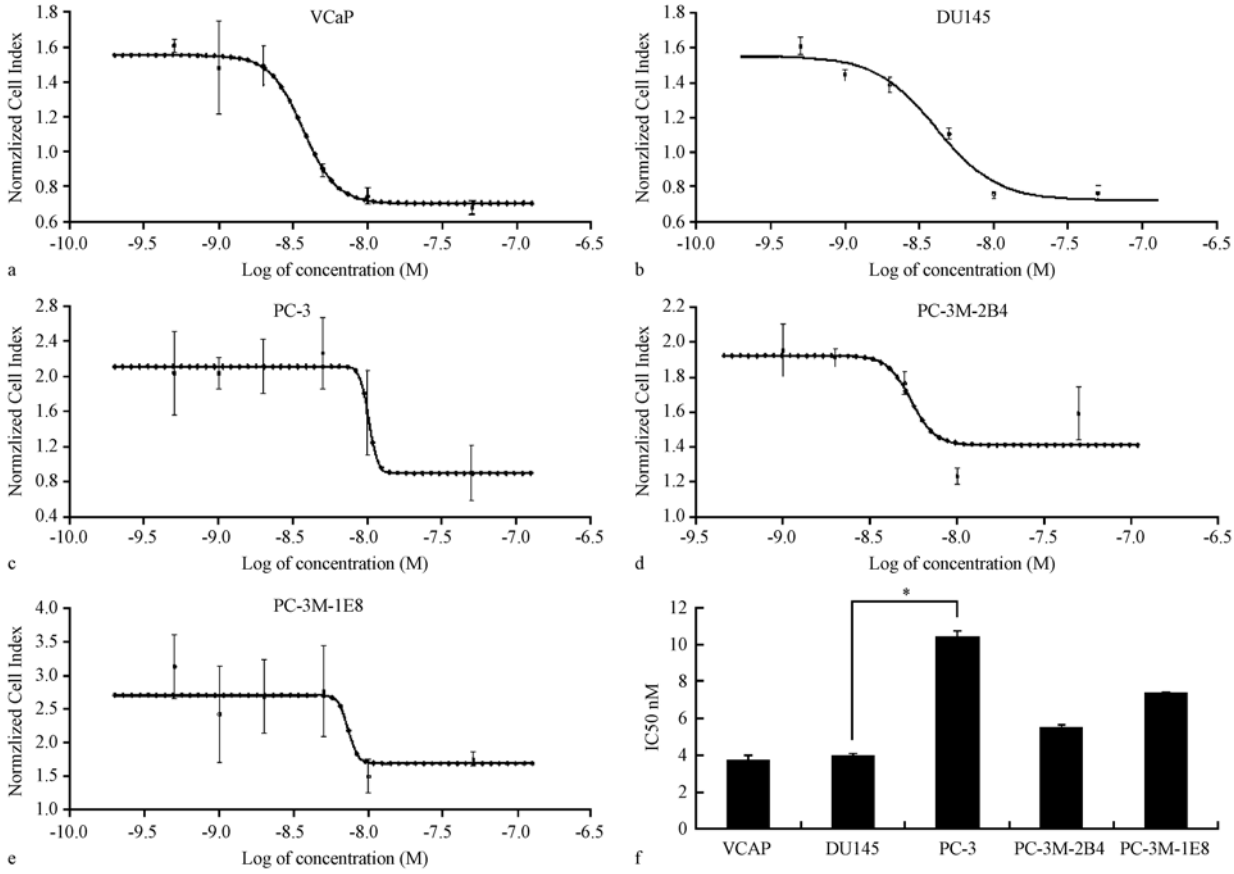


注:a,多西他赛对 VCaP 的 IC50 为 8.81 nmol/L;b,多西他赛对 DU145 的 IC50 为 11.61 nmol/L;c,多西他赛对 PC-3 的 IC50 为 1.78 nmol/L;d,多西他赛对 PC-3M-2B4 的 IC50 为 1.44 nmol/L;e,多西他赛对 PC-3M-IE8 的 IC50 为 8.69 nmol/L; f, 多西他赛对五株细胞的 IC50 统计学比较。N = 6, $^*P < 0.05$。

图 2　前列腺癌 5 种细胞对多西他赛剂量反应曲线(变斜率)

Note. a: Docetaxel showed IC50 of 8.81 nmol/L for VCaP cells; b: Docetaxel showed IC50 of 11.61 nmol/L for DU145 cells; c: Docetaxel showed IC50 of 1.78 nmol/L for PC-3 cells; d: Docetaxel showed IC50 of 1.44 nmol/L for PC-3M-2B4 cells; e: Docetaxel showed IC50 of 8.69 nmol/L for PC-3M-IE8 cells; f: Statistical comparison of IC50 of docetaxel for the five cell lines. N = 6, $^*P < 0.05$.

Fig. 2　Sigmoidal dose-response (wariable slope) curve of docetaxel for the 5 prostate cancer cell lines



注:a,卡巴他赛对 VCaP 的 IC50 为 3.73nmol/L;b,卡巴他赛对 DU145 的 IC50 为 3.96 nmol/L;c,卡巴他赛对 PC-3 的 IC50 为 10.41 nmol/L;d,卡巴他赛对 PC-3M-2B4 的 IC50 为 5.43 nmol/L;e,卡巴他赛对 PC-3M-IE8 的 IC50 为 7.37 nmol/L。$^{*}P<0.05$。f,卡巴他赛对五株细胞的 IC50 统计学比较。n=6, $^{*}P<0.05$。

图 3 前列腺癌 5 种细胞对卡巴他赛剂量反应曲线(变斜率)

Note. a: Cabazitaxel showed IC50 of 3.73 nmol/L for VCaP cells; b: Cabazitaxel showed IC50 of 3.96 nmol/L for DU145 cells; c: Cabazitaxel showed IC50 of 10.41 nmol/L for PC-3 cells; d: Cabazitaxel showed IC50 of 5.43 nmol/L for PC-3M-2B4 cells; e: Cabazitaxel showed IC50 of 7.37 nmol/L for PC-3M-IE8 cells; f: Statistical comparison of IC50 of cabazitaxel for the five cell lines. n=6, $^{*}P<0.05$.

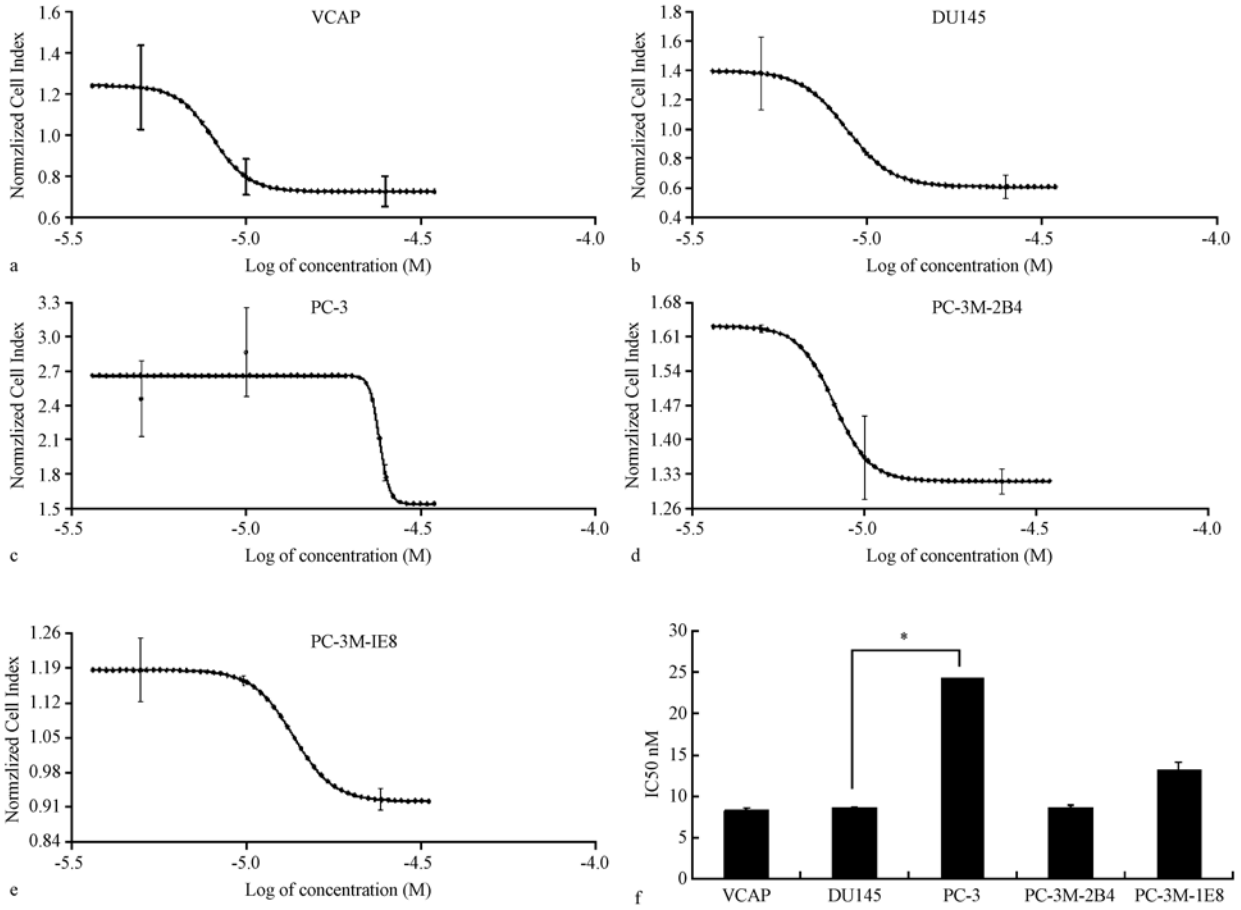
Fig. 3 Sigmoidal dose-response (wariable slope) curve of cabazitaxel for the 5 prostate cancer cell lines

终浓度分别为 5、10、25(μmol/L)。另设药物溶剂对照和空白对照。给药后继续培养并检测 CI 变化(图 4a-e)。结果表明醋酸阿比特龙对 VCaP、DU145、PC-3、PC-3M-2B4、PC-3M-IE8 五种细胞系 24 h 的 IC50 分别为(8.34±0.24)μmol/L、(8.60±0.15)μmol/L、(24.20±0.09)μmol/L、(8.59±0.32)μmol/L、(13.21±0.95)μmol/L。其中 VCaP、DU145 和 PC-3M-B4 对醋酸阿比特龙最敏感敏感,而 PC-3 最不敏感, PC-3M-IE8 中度敏感。

3 讨论

实时细胞分析系统是可实现实时监测、高信息量、高灵敏度和高准确性细胞分析的新技术。通过嵌在检测板 E-plate 16 上孔底的微电子感应器阻抗变化感受细胞的有无以及贴壁、黏附和生长程度的改变。在细胞毒性检测中,可实时、直观的反映细胞增殖、存活、凋亡、形态变化等细胞生物学变化[6]。基于实时细胞分析系统优势,该技术在基础生命科学领域具有广泛的应用,如细胞质量控制、细胞毒性检测、细胞粘附和细胞伸展以及临床药物开发、高通量药物筛选等[12]。本研究将实时细胞分析系统应用于前列腺癌细胞药物敏感性实验当中,选用 3 种前列腺癌化疗药物,对 5 种前列腺癌细胞系的药物敏感性进行对比分析,证明该方法真实有效且更加简单灵敏,可以应用于临床患者药物敏感性评价。

化学治疗是治疗肿瘤的一种重要手段。但由于遗传背景的差异,患者对化疗的反应各不相同,



注：a，醋酸阿比特龙对 VCaP 的 IC50 为 8. 34μmol/L；b，醋酸阿比特龙对 DU145 的 IC50 为 8. 60 μmol/L；c，醋酸阿比特龙对 PC-3 的 IC50 为 24. 20 μmol/L；d，醋酸阿比特龙对 PC-3M-2B4 的 IC50 为 8. 59 μmol/L；e，醋酸阿比特龙对 PC-3M-IE8 的 IC50 为 13. 21 μmol/L。f，醋酸阿比特龙对五株细胞的 IC50 统计学比较。n = 6，$^{*}P < 0.05$。

图 4　前列腺癌 5 种细胞对醋酸阿比特龙剂量反应曲线（变斜率）

Note. a: Abiraterone acetate showed IC50 of 8. 34 μmol/L for VCaP cells; b: Abiraterone acetate showed IC50 of 8. 60 μmol/L for DU145 cells; c: Abiraterone acetate showed IC50 of 24. 20 μmol/L for PC-3 cells; d: Abiraterone acetate showed IC50 of 8. 59 μmol/L for PC-3M-2B4 cells; e: Abiraterone acetate showed IC50 of 13. 21 μmol/L for PC-3M-IE8 cells; f: statistical comparison of IC50 of Abiraterone Acetate for five cell lines. n = 6, $^{*}P < 0.05$.

Fig. 4　Sigmoidal dose-response (wariable slope) curre of abiraterone acetate for the 5 prostate cancer cell lines

有的患者经化疗后可达到完全缓解，有的却表现为无效甚至病情进展[13-15]。不同种类的肿瘤，对抗癌药物的敏感性不同，即使同一种类型的肿瘤，甚至其临床分期、病理类型、患者基本状态也相同，不同的患者对药物的敏感性及预后也不相同，这就决定了必须化疗药物个体化[16]。在治疗前或治疗过程中进行肿瘤药敏试验对于化疗药物的选择和制订化疗的策略有着十分重要的意义，为实现化疗药物的个体化提供依据[17-20]。

目前治疗前列腺癌的主要药物是多西他赛，主要作用于细胞微管，通过阻碍细胞有丝分裂，进而引起细胞凋亡，是治疗 CRPC 患者的一线用药[21]；卡巴他赛是第二代紫杉醇类抗肿瘤药，同样具有抑制微管的作用，并且对多西他赛耐药患者有良好疗效[22]；醋酸阿比特龙是一种细胞色素氧化酶 CYP17 的高选择性不可逆强效抑制剂，能显著降低 CRPC 患者体内的睾丸酮水平。III 期随机对照研究证实对于多西他赛失败的 CRPC，醋酸阿比特龙联合泼尼松可以显著提高 PSA 缓解率，肿瘤客观缓解率，延长肿瘤进展时间和总生存时间，为多西他赛失败的 CRPC 提供了新的治疗方法，且安全性好[23]。

本实验采用实时细胞分析技术检测了 3 种常用化疗药物对 5 种前列腺癌细胞的体外抑制率。结果证明，PC-3M-2B4 对多西他赛敏感性最强，而 DU145 敏感性最差；VCaP 对卡巴他赛敏感性最强，而 PC-3 敏感性最差；VCaP 对醋酸阿比特龙敏感性最强，而

PC-3 敏感性最差。可将 PC-3M-2B4 作为高度敏感对照,DU145 作为不敏感对照,建立对多西他赛的体外药物筛选体系;可将 VCaP 作为高度敏感对照,PC-3 作为不敏感对照,建立对卡巴他赛及醋酸阿比特龙的体外药物筛选体系,具有向临床推广,进行个体化药物敏感性实验的价值。且本实验结果与已有研究具有一致性[24]。另有其他多项研究证明,RTCA 在药物敏感性实验中具有可靠性,与传统的 MTT 等方法测定的结果吻合[25-29]。

参考文献:

[1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[2] Crawford ED, Eisenberger MA, McLeod DG, et al. A controlled trial of leuprolide with and without flutamide in prostatic carcinoma [J]. N Engl J Med, 1989, 321(7): 419-424.

[3] Eisenberger MA, Blumenstein BA, Crawford ED, et al. Bilateral orchiectomy with or without flutamide for metastatic prostate cancer [J]. N Engl J Med, 1998, 339(15): 1036-1042.

[4] Suzman DL, Antonarakis ES. Castration-resistant prostate cancer: latest evidence and therapeutic implications [J]. Ther Adv Med Oncol, 2014, 6(4): 167-179.

[5] Pienta KJ, Bradley D. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(6): 1665-1671.

[6] 沈续松. 肿瘤药敏试验方法的研究进展 [J]. 肿瘤研究与临床, 2012, 1: 64-66.

[7] 杨善民, 郑耘, 颜江华, 等. MTT 法检测裸鼠实体瘤药物敏感试验研究 [J]. 中国实验动物学报, 1996, 1: 21-26.

[8] 米彦军,张传钊, 符立梧. 肿瘤药敏试验指导个体化治疗的研究进展 [J]. 药学学报 Acta Pharmaceut Sin, 2009, 44(11): 1187-1192.

[9] Marlina S, Shu MH, AbuBakar S, et al. Development of a real-time cell analysing (RTCA) method as a fast and accurate screen for the selection of chikungunya virus replication inhibitors [J]. Parasit Vectors, 2015, 8: 579.

[10] 唐莉莉, 曾祥斌, 卢国栋, 等. 番茄红素对人前列腺癌细胞(DU145)生长抑制的离体和整体水平研究 [J]. 毒理学杂志, 2001, 1: 1-4.

[11] Pawar VK, Gupta S, Singh Y, et al. Pluronic F-127 stabilised docetaxel nanocrystals improve apoptosis by mitochondrial depolarization in breast cancer cells: Pharmacokinetics and toxicity assessment[J]. J Biomed Nanotechnol. 2015, 11(10): 1747-1763.

[12] Xi Z, Khare S, Cheung A, et al. Mode of action classification of chemicals using multi-concentration time-dependent cellular response profiles [J]. Comput Biol Chem, 2014, 49: 23-35.

[13] Topol EJ. Individualized medicine from prewomb to tomb [J]. Cell, 2014, 157(1): 241-253.

[14] Shastry BS. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine [J]. Pharmacogenomics J, 2006, 6(1): 16-21.

[15] Ogino S, Galon J, Fuchs CS, et al. Cancer immunology—analysis of host and tumor factors for personalized medicine [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2011, 8(12): 711-719.

[16] Samson DJ, Seidenfeld J, Ziegler K, et al. Chemotherapy sensitivity and resistance assays: a systematic review [J]. J Clin Oncol, 2004, 22(17): 3618-3630.

[17] Michalski CW, Erkan M, Sauliunaite D, et al. Ex vivo chemosensitivity testing and gene expression profiling predict response towards adjuvant gemcitabine treatment in pancreatic cancer [J]. Br J Cancer, 2008, 99(5): 760-767.

[18] Singh B, Li R, Xu L, et al. Prediction of survival in patients with head and neck cancer using the histoculture drug response assay [J]. Head Neck, 2002, 24(5): 437-442.

[19] Hudson TJ. Genome variation and personalized cancer medicine [J]. J Intern Med, 2013, 274(5): 440-450.

[20] Ogino S, Fuchs CS, Giovannucci E. How many molecular subtypes? Implications of the unique tumor principle in personalized medicine [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2012, 12(6): 621-628.

[21] Galsky MD, Vogelzang NJ. Docetaxel-based combination therapy for castration-resistant prostate cancer [J]. Ann Oncol, 2010, 21(11): 2135-2144.

[22] Hwang C. Overcoming docetaxel resistance in prostate cancer: a perspective review [J]. Ther Adv Med Oncol, 2012, 4(6): 329-340.

[23] Gartrell BA, Saad F. Abiraterone in the management of castration-resistant prostate cancer prior to chemotherapy [J]. Ther Adv Urol, 2015, 7(4): 194-202.

[24] Ting HJ, Hsu J, Bao BY, et al. Docetaxel-induced growth inhibition and apoptosis in androgen independent prostate cancer cells are enhanced by 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 [J]. Cancer Lett, 2007, 247(1): 122-129.

[25] Quereda JJ, Martínez-Alarcón L, Mendoça L, et al. Validation of xCELLigence real-time cell analyzer to assess compatibility in xenotransplantation with pig-to-baboon model [J]. Transplant Proc, 2010, 42(8): 3239-3243.

[26] Dürr S, Lyer S, Mann J, et al. Real-time cell analysis of human cancer cell lines after chemotherapy with functionalized magnetic nanoparticles [J]. Anticancer Res, 2012, 32(5): 1983-1989.

[27] Xing JZ, Zhu L, Jackson JA, et al. Dynamic monitoring of cytotoxicity on microelectronic sensors [J]. Chem Res Toxicol, 2005, 18(2): 154-161.

[28] Atienzar FA, Tilmant K, Gerets HH, et al. The use of real-time cell analyzer technology in drug discovery: defining optimal cell culture conditions and assay reproducibility with different adherent cellular models [J]. J Biomol Screen, 2011, 16(6): 575-587.

[29] Cheah SC, Appleton DR, Lee ST, et al. Panduratin A inhibits the growth of A549 cells through induction of apoptosis and inhibition of NF-kappaB translocation [J]. Molecules, 2011, 16(3): 2583-2598.

〔修回日期〕2016-02-19

研究报告

腺相关病毒介导的狨猴 P53 基因沉默

石 亮[1],张 晨[2],向志光[1],邓仪晨[1],苏静芬[1],刘云波[1]

(1. 中国医学科学院医学实验动物研究所,北京 100021;2. 北京大学生命科学学院,北京 100871)

【摘要】 目的 在细胞和整体动物水平,利用 RNA 干扰技术下调绒猴 p53 基因表达。**方法** 对狨猴 p53 基因做生物信息学分析,针对靶序列设计 shRNA 干扰序列,构建在腺相关病毒载体上,转染非洲绿猴肾细胞(cos-7),在细胞水平用荧光定量 PCR 检测 p53mRNA 抑制效果,以 Western blot 方法检测 p53 蛋白水平表达变化;优选 shRNA 干扰序列,包装含 shRNA 干扰序列的 8 型腺相关病毒,静脉注射感染狨猴;手术取少量肝脏组织,用 Western blot 和免疫组化方法检测 p53 蛋白水平的变化。**结果** 细胞水平研究发现 2 个有效 RNA 干扰靶点,mRNA 干扰效率分别为(82.7 ±8.1)% 和(80.7 ±7.5)% ($P < 0.05$);蛋白表达下调(77.3 ±11.5)% 和(73.7 ±10.7)% ($P < 0.05$);2 只绒猴感染病毒后,经活体荧光成像分析可见病毒在肝脏、睾丸、颈部等位置分布,狨猴肝脏 P53 蛋白经 Western blot、免疫组化分析未见明显变化。**结论** 本研究在细胞水平实现绒猴 P53 基因表达下调,但整体动物水平狨猴肝脏 P53 蛋白表达未发现明显变化;今后需在感染方式等方面做进一步优化。

【关键词】 AAV8;P53;RNA 干扰;狨猴

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】**1671-7856(2016) 04-0053-05

doi: 10.3969.j.issn.1671 -7856.2016.04.009

Adeno-associated virus mediated p53 gene silence in marmosets

SHI Liang[1], ZHANG Chen[2], XIANG Zhi-guang[1], DENG Yi-chen[1], SU Jing-fen[1], LIU Yun-bo[1]

(Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China;
2. College of Life Science, Peking University, Beijing 100871)

【Abstract】 Objective To decrease the p53 gene expression at cellular and animal levels in marmoset using RNA interference technique. **Methods** The shRNA interference sequences were designed and inserted into the adeno-associated virus vector plasmid after bioinformatics analysis. The plasmids were transfected into African green monkey kidney cos-7 cells. The suppression of p53 mRNA was detected by real-time PCR, and the changes of p53 protein expression were detected by Western bolt. The adeno-associated virus-8 was injected through the hind leg vein. The changes of p53 protein expression in the liver tissue was detected by Western blot and immunohistochemistry. **Results** We screened two RNA interference effective arget sequences. The expression of p53 mRNA was suppressed (82.7 ±8.1)% and (80.7 ±7.5)%, respectively ($P < 0.05$), and the expression of p53 protein was decreased (77.3 ±11.5)% and (73.7 ±10.7)%, respectively ($P < 0.05$). The two marmosets after virus infection showed that there were virus distributions in the liver, testes, and neck detected by in vivo fluorescence imaging. The expression of p53 in the marmoset liver was detected by western blot, immunohistochemistry analysis showing no obvious changes. **Conclusions** In the present study, the decrease of P53 gene expression at cellular level is achieved, however, the liver P53 protein in the marmoset liver is not significantly changes. Further optimization of the way of infection is needed in the future.

【Key words】 AAV8 virus; p53; RNA interference; Marmoset

[基金项目]国家科技支撑计划(No.2014BAI03B01)。

[作者简介]石亮(1988 -),男,硕士研究生,研究方向:实验动物学。

[通讯作者]刘云波,男,教授,研究方向:实验动物学。E-mail:yunboliu@126.com。

RNAi 技术可以特异性剔除或关闭特定基因的表达,广泛应用于基因功能研究与基因治疗领域。利用 RNAi 的方法已经成功在啮齿类动物的受精卵中下调基因的表达,建立相关的动物模型[1],但是在狨猴上还没有相应研究。腺相关病毒(adeno-associated virus,AAV)是一种重要的基因载体,主要用于基因治疗、基因功能研究、动物模型建立,相对慢病毒、腺病毒等病毒载体有着它独特的优点,安全性高、免疫原性低、长期表达等[2]。可以利用 AAV 介导 RNA 干扰实现动物水平基因表达的改变。P53 是一种重要的肿瘤抑制基因。在所有恶性肿瘤中,50% 以上会出现该基因的突变,他们中的大多数是错义突变进而减少 p53 肿瘤抑制活性。研究表明 p53 除了具有肿瘤抑制功能外,还参与细胞凋亡、细胞周期阻滞、DNA 损伤修复、调节机体代谢、参与免疫反应等多种生理过程[3]。相关的研究主要集中在啮齿类动物,但由于与人亲缘性较远,应用受到许多因素的限制。狨猴是一种很小的非人灵长类动物,其生理学、行为学以及细胞因子激素水平等与人非常相似。因此研究非人灵长类动物基因调控对于基因功能与疾病治疗具有重要意义。在细胞水平上的验证,由于狨猴细胞系较少且转染效率不高,选用 cos-7 细胞,设计的干扰靶点序列与非洲绿猴 p53 基因完全同源[4]。本实验利用 RNAi 技术,以 AAV 为载体,希望在狨猴体内下调 p53 蛋白,进而研究 p53 基因及下游相关基因功能,以期建立一种非人灵长类动物的基因调控的策略。

1 材料和方法

1.1 实验动物

狨猴 3 只,体重分别为 345 g、355 g、360 g,年龄分别为 2 岁 9 月、3 岁 1 月、3 岁 3 月,全部雄性,由中国医学科学院医学实验动物研究所北方资源中心提供。饲养条件:温度 25℃ ~30℃,湿度 45% ~80%,12 h 照明/12 h 黑暗(8:00 ~20:00 亮灯),单笼饲养,自由饮水,早晚喂食,中午喂食水果。

1.2 P53 基因 shRNA 干扰载体构建

根据狨猴 p53 基因的序列,依照 shRNA 的设计原则在 Life Technology 在线设计若干靶点的 shRNA 序列。将目的片段构建载体质粒 PAAV-luciferase-shRNA 上,转化,酶切鉴定,测序。测序引物为 U6-F:5'-TACGATACAAGGCTGTTAGAGAG-3'。对照组选用不和任何基因同源性的 Scramble 序列。

1.3 荧光定量 PCR

提取总的 RNA,逆转录后进行 SYBR-Green 法荧光定量 PCR。P53 基因所用引物为 F:5'-CCCTTCCCAGAAAACCTACC-3',R:5'-CTCCGTCATGTGCTGTGACT-3'预计扩增出 220 bp 的目的片段,内参基因 GAPDH 所用引物 F:5'-ACATCATCCCTGCCTCTACTGG-3',R:5'-AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGTC-3,扩增产物长度 260 bp[5]。PCR 反应程序:95℃ 预变性 3 min,94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s共 40 个循环。同一样品做三次重复,采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 进行结果分析。

1.4 Western Blot

裂解细胞或组织,测定浓度,取相同量蛋白与 buffer 混匀,沸水煮 5 min 变性,电泳,转膜,封闭,一抗 4°C 孵育过夜,二抗室温 1 h,进行曝光。最后结果用 Image J 软件对图像进行灰度分析。

1.5 AAV8 的包装

AAV 载体质粒、包装质粒和辅助质粒(8 型)三质粒法共转染 293T 细胞。收集细胞和培养上清液,离心弃除杂质,过滤除菌,浓缩,纯化,QPCR 测定病毒滴度,-80℃ 保存备用。

1.6 病毒注射动物

一只作为对照组,注射含有 scramble 序列的对照病毒。两只作为实验组,注射含有 shRNA1 的病毒。按照其体重以 2×10^{12} vg/kg 后肢静脉注射[6]。在注射后的 1 d、1 周、2 周、3 周进行活体荧光成像检测,监测病毒的侵嗜情况。四周后,盐酸氯胺酮(3 mg/kg)肌内注射麻醉动物,手术取米粒般大小的肝脏组织。Western blot 和免疫组化方法检测肝脏 p53 蛋白水平的变化情况。

1.7 免疫组织化学染色

石蜡切片脱蜡至水,3% H_2O_2 室温孵育 10 min,PBS 浸泡 5 min,0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲液微波炉修复,5% 山羊血清封闭 30 min,滴加一抗(p53 抗体,1:100)37℃ 孵育 2 h,PBS 冲洗,先后滴加适量二抗工作液 I 和 II,PBS 冲洗。DAB 显色,自来水冲洗,复染,脱水,透明,封片。

1.8 统计学方法

用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,$P<0.05$ 表示差异显著性。

2 结果

2.1 腺相关病毒 shRNA 干扰载体构建

根据狨猴 p53 基因序列信息和 shRNA 干扰序列设计基本原则,设计出两个有效靶点。靶点序列与我们在细胞水平验证的非洲绿猴 p53 基因完全同源。具体序列信息和对应狨猴 p53 基因的位置见表 1。

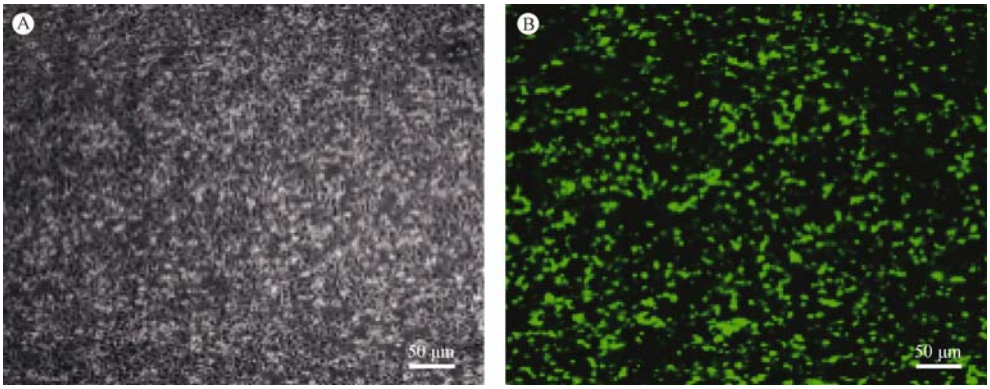
表 1　P53 基因的 RNA 干扰序列

Tab. 1　The RNA interference sequences of p53 gene

分组 Groups	序列(5'-3') Sequences	区域 Regions	位置 Positions
ShRNA 1	CGGCGCACAGAGGAAGAGAAT	ORF	1045-1065 bp
ShRNA 2	GGTGGATGATTTGATGCTATC	ORF	312-332 bp
Scramble	GCTCGCCTGTCTACTAACTAA	-	-

注:用 scramble 阴性对照,它的序列不与任何基因同源。

Note. The control scramble sequences have no homology with others.



注:A:普通显微镜下 B:荧光显微镜下

图 1　质粒转染 48 h 后荧光表达图(×40,标尺=50 μm)

Note. A: Under an ordinary microscope. B: Under a fluorescent microscope.

Fig. 1　The fluorescence image of plasmid expression at 48 hours after transfection. (×40, Bar = 50 μm)

2.2　细胞水平 p53 基因沉默效率检测

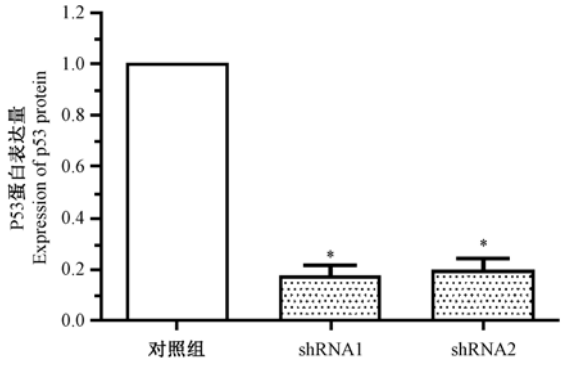
为验证设计的靶点序列的有效性,转染干扰序列的质粒 48 h 后,对照质粒中含有 GFP 报告基因,在荧光显微镜下验证转染效率,证明构建的含干扰序列的质粒成功进入细胞,可以进行后续实验,见图 1。

荧光定量 PCR 结果采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 进行分析。如图 2 所示,对应的 2 个靶点序列 p53 基因 mRNA 表达量均显著下降($P<0.05$)。其中 shRNA1 mRNA 水平沉默效率(82.7±8.1)%, shRNA2 mRNA 水平沉默效率为(80.7±7.5)%。两个靶点对 p53 基因在 mRNA 水平均有明显的沉默效率。

Western blot 结果用 Image J 软件对图像进行灰度分析。如图 3 所示,对应的 2 个靶点序列 p53 蛋白表达量均显著下降($P<0.05$)。其中 shRNA1 蛋白水平沉默效率(77.3±11.5)%, shRNA2 蛋白水平沉默效率为(73.7±10.7)%。两个靶点对 p53 蛋白有明显的降低,蛋白水平和 mRNA 水平检测结果基本保持一致。

2.3　活体荧光成像

活体荧光成像技术检测病毒在狨猴体内的侵嗜情况。见图 4,上下两只实验组动物都注射含有 PAAV-luciferase-shRNA 病毒。可以发现注射病毒后 1 d 睾丸处就有少量荧光,1 周后颈部位置也出现荧光,3 周后可以看见后肢大腿、颈部、睾丸、腹部等都有不同程度的荧光。证明病毒进入对应位置,相应荧光位置有高效的侵嗜性,可以推测肝脏有病毒的侵嗜。



注:* 代表与对照组比较 $P<0.05$

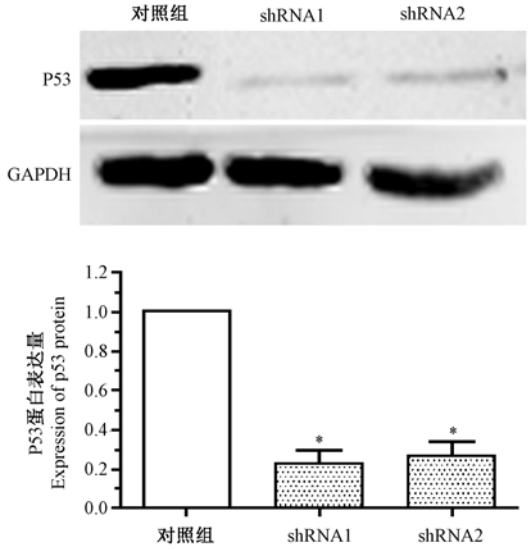
图 2　P53 基因 mRNA 表达

Note. * compared with the control group ($P<0.05$)

Fig. 2　The mRNA expression of P53 gene

2.4　肝脏组织 p53 基因沉默效率检测

免疫组化方法检测实验组与对照组 p53 蛋白的变化,如图 5 所示,p53 蛋白在正常的肝脏组织中表达很低,只有少量肝脏细胞有核染色,实验组和对



注:A:Western blot 图 B:灰度扫描分析图

* 代表与对照组比较 $P<0.05$

图 3 P53 蛋白表达

Note. A: Western blot image. B: The results of gray scale analysis.

* Compared with the control group ($P<0.05$).

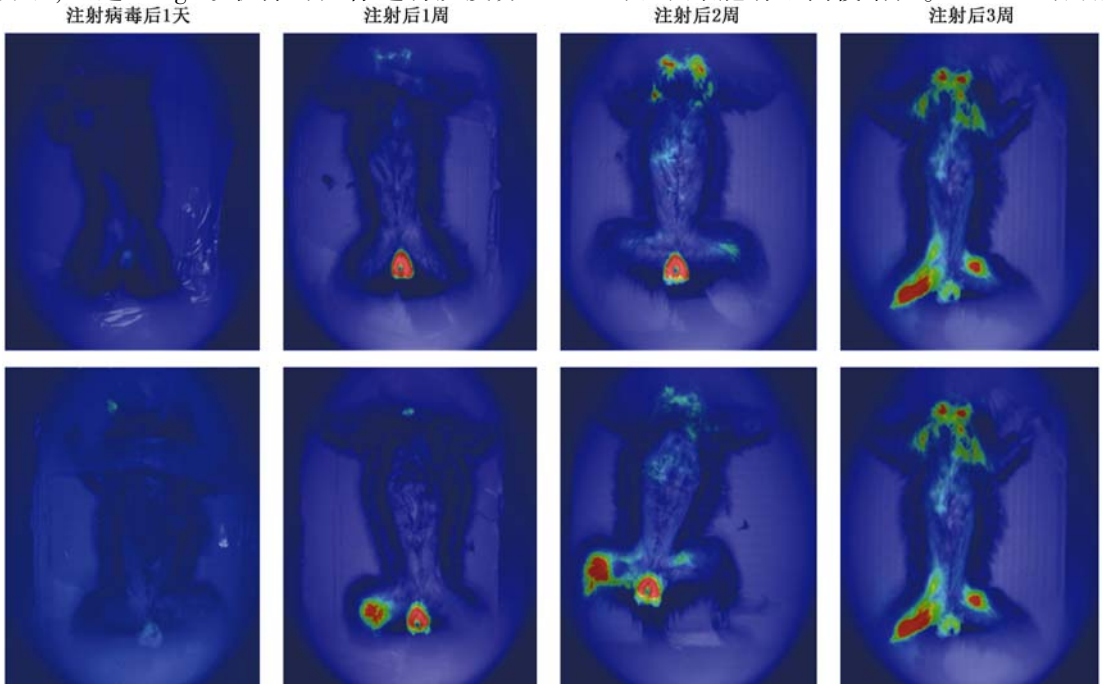
Fig. 3 The expression of p53 protein

照组没有表现出明显差异。采用 Western blot 方法分别检测实验组和对照组中 p53 蛋白水平的变化。如图 6 所示,通过 Image J 软件对图像进行灰度分析,实验组 p53 蛋白水平沉默效率为(7.3 ± 8.9)%,两组比较差异无统计学意义($P>0.05$)不能证明有蛋白水平变化。

3 讨论

狨猴是最小型的实验灵长类动物,其体型小、繁殖快、遗传进化及生理生化方面与人类相近,是人类疾病研究的理想实验动物之一,常用于神经科学、免疫学、药物毒理、肿瘤等方面研究[7]。目前利用灵长类动物建立稳定的基因调控方法还面临巨大的困难,如基因敲除方法面临阳性打靶率低和移植成活率不高以及缺陷基因造成胚胎致死。本研究希望利用 RNAi 技术在狨猴体内实现 p53 基因表达的下调。在细胞水平的验证,由于狨猴的细胞系较少并且体外转染效率较低,所以选用 cos-7 细胞,设计的靶点序列在狨猴和非洲绿猴都完全同源,都位于 p53 基因的开放阅读框中。

AAV 由于其安全性好、宿主细胞范围广(分裂和非分裂细胞)、免疫源性低、在体内表达外源基因时间长等特点[8],被视为最有前途的基因转移载体之一。目前 AAV 有几十种不同的血清型,各个血清型对组织细胞有不同侵嗜性。AAV-8 对肝脏、肌肉

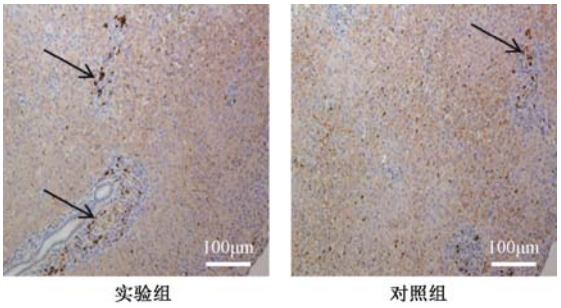


注:不同的荧光颜色代表病毒侵嗜程度,红色 > 黄色 > 绿色,颜色越深代表病毒侵嗜程度越高

图 4 注射病毒后活体荧光图像(标尺 = 500 μm)

Note. Fluorescent colors represent the degree of invaded viruses: red > yellow > green, the deeper color means a higher degree virus invasion. (Bar = 50 μm)

Fig. 4 In vivo fluorescence imaging after injection of virus



注：箭头所指为 p53 蛋白的免疫组化染色

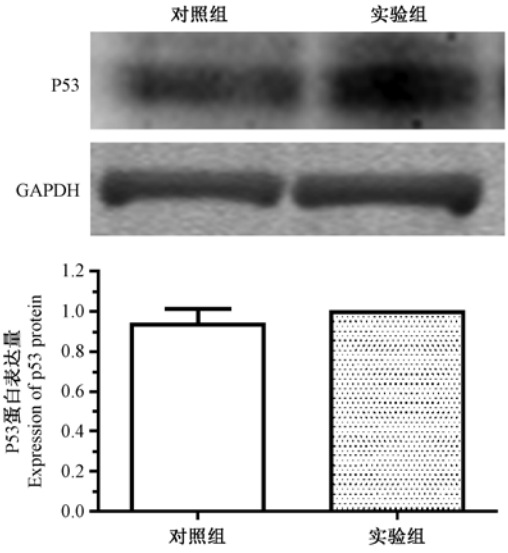
图 5　狨猴肝脏组织 p53 蛋白免疫组化图

（×40，标尺 = 100 μm）

Note. The arrows indicate P53 protein immunohistochemical staining

Fig. 5　The p53 protein in the marmoset liver.

（×40, Bar = 100 μm）



注：A：Western blot 图　B：灰度扫描结果分析图

#代表与对照组比较 $P > 0.05$，无统计学意义

图 6　注射病毒后狨猴肝脏 p53 蛋白表达

Note. A: Western blot image. B: The results of gray scale analysis.

Compared with the control group ($P > 0.05$)

Fig. 6　The expression of liver p53 protein after injection of virus

等有很强的亲和性，活体荧光成像的结果与前期研究基本相同[9]。肝脏部位只有少量荧光，可能由于荧光透射性较弱或者病毒注射量偏少。手术取少量肝脏组织，不会造成动物的死亡而进行后续研究。在肝脏中没有检测到 p53 蛋白的变化，后续需要在感染方式与序列靶点做进一步优化，以及处死动物检测睾丸、大腿肌肉、颈部等位置 p53 蛋白是否变化。

综上所述，本研究以 RNA 干扰技术为基础，利用 8 型腺相关病毒作为载体，在细胞水平实现了 p53 蛋白的降低，在狨猴动物水平的研究还需优化条件与完善策略。

致谢：感谢中国医学科学院医学实验动物研究所检测中心佟巍老师，刘先菊老师提供指导，感谢中国医学科学院医学实验动物所北方资源中心尚海全、肖冲、马喜山等老师在实验操作的帮助。

参考文献：

[1] Murai S, Katagiri Y, Yamashita S. Maturation-associated Dbf4 expression is essential for mouse zygotic DNA replication [J]. Dev Growth Differ, 2014, 56(9): 625 – 639.

[2] Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV in clinical trials [J]. Curr Gene Ther, 2011, 11(4): 321 – 330.

[3] Kamada R, Toguchi Y, Nomura T, et al. Tetramer formation of tumor suppressor protein p53: structure, function, and applications [J]. Biopolymers, 2015. (Accepted article and published online)

[4] 苏静芬，张晨，李雨函，等. 恒河猴 p53 基因沉默靶点在细胞水平的验证 [J]. 中国比较医学杂志，2014，24(08)：7 – 10.

[5] Zhou HW, Lou SQ, Zhang K. Recovery of function in osteoarthritic chondrocytes induced by p16INK4a-specific siRNA in vitro [J]. Rheumatology (Oxford), 2004, 43(5): 555 – 568.

[6] Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H, et al. Robust long-term transduction of common marmoset neuromuscular tissue with rAAV1 and rAAV9 [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2013, 2: e95.

[7] Okano H, Hikishima K, Iriki A, et al. The common marmoset as a novel animal model system for biomedical and neuroscience research applications [J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2012, 17(6): 336 – 340.

[8] Miyake K, Miyake N, Yamazaki Y, et al. Serotype-independent method of recombinant adeno-associated virus (AAV) vector production and purification [J]. J Nippon Med Sch, 2012, 79(6): 394 – 402.

[9] Borel F, Kay MA, Mueller C. Recombinant AAV as a platform for translating the therapeutic potential of RNA interference [J]. Mol Ther, 2014, 22(4): 692 – 701.

〔修回日期〕2016-02-25

研究报告

线粒体 DNA D-loop 区多态性与肝癌预后的研究

张风宾,郭占军,吴忱思,张瑞星

(河北医科大学第四医院消化内科,石家庄 050011)

【摘要】 **目的** 通过对线粒体 DNA D-loop 区的碱基测序,了解其多态性及突变情况,并探讨其与肝癌发病机率及预后的关系。**方法** 提取 49 个乙型肝炎后肝癌病人的肝癌组织,癌旁组织和血液中的线粒体 DNA,用测序法测定线粒体 DNA D-loop 区的碱基序列,了解其单核苷酸多态性和变异情况,并分析其与肝癌发病率及 2 年生存率的关系。**结果** 通过观察发现,肝癌病 mtDNA 突变情况与肝癌预后无明确相关,而 1 个 SNP 位点(核苷酸 150 C/T)与肝癌的生存期之间存在统计学上的显著差异。经 COX 回归分析,发现 150 位点为肝癌预后的独立危险因素;150C 的患者生存期显著短于 150T 的生存期(相对危险度,0.246;95% CI,0.070 - 0.861; $P = 0.028$)。**结论** 通过分析在线粒体 DNAD - loop 区的多态性,可以帮助筛别预后不良的肝癌患者。

【关键词】 肝细胞肝癌;线粒体 DNA D-loop;突变;单核苷酸多态性

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2016) 04-0058-04

doi: 10.3969.j.issn.1671 - 7856.2016.04.010

Investigation of the association between mitochondrial D-loop polymorphisms and hepatocellular carcinoma outcome

ZHANG Feng-bin, GUO Zhan-jun, WU Chen-si, ZHANG Rui-xing

(Department of Gastroenterology and Hepatology, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the accumulation of mutations and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the displacement loop (D-loop) of mitochondrial DNA (mtDNA) might be associated with cancer risk and disease outcome. **Methods** We obtained cancerous and noncancerous liver tissues from 49 HBV-related HCC patients at the Fourth Hospital of Hebei Medical University. mtDNA of the liver tissues was extracted with Mitochondrial DNA Extraction Kit. Mutation and polymorphism were confirmed by repeated analysis. We assessed the prediction power of D-loop SNPs in hepatocellular carcinoma (HCC) patients. **Results** No mutation in these HCC patients had prediction power for post-operational survival, whereas one SNP site (nucleotide 150 C/T) was identified by the log-rank test for statistically significant prediction of HCC survival. In an overall multivariate analysis, allele 150 was identified as an independent predictor of HCC outcome. The length of survival of patients with allele 150C was significantly shorter than that of patients with allele 150T (relative risk, 0.246; 95% CI, 0.070 - 0.861; $P = 0.028$). **Conclusions** The analysis of genetic polymorphisms in the mitochondrial D-loop helps to identify patient subgroups at high risk of a poor disease outcome.

【**Key words**】 Hepatocellular carcinoma, HCC; Mitochondrial D-loop; Mutation; Single nucleotide polymorphisms, SNP; Survival analysis

[基金项目]河北省科技厅资助项目,项目编号:132777185。

[通讯作者]张风宾(1981 -)男,主治医师,硕士研究生学历,主要研究方向为消化道肿瘤, Email: zhangfengbin1981@163.com

肝细胞肝癌是常见恶性肿瘤之一,在世界范围内,是男性第五大好发肿瘤,是女性第七常见肿瘤[1],是第二常见的死亡病因[2],每年有将近 50 万的病人死于肝癌[2]。肝癌在中国也是常见肿瘤,中国每年肝癌的发病率和死亡率分别为 29.9/100 000 和 27.7/100 000[3]。危险因素包括 B 型、C 型肝炎病毒和酒精滥用[4]。乙型肝炎病毒感染在我国是一非常严重的问题,因我国有 9 千 3 百万的乙型肝炎病毒携带者,2 千万的慢性乙型肝炎患者[5]。酒精滥用在中国也逐年上升,6.6% 的男性和 0.1% 的女性诊断为酒精滥用[6]。许多患者进展为肝病,如酒精性肝炎和肝硬化,直至肝癌。虽然随着检查手段的改善,肝癌已能较早发现;但因其复发率较高,肝癌患者的预后仍然较差。虽然现在已明确许多因素,如肿瘤的数目、大小,数量,细胞分化程度,门脉瘤栓和肝脏炎症程度,都与肝癌的复发与预后相关,但对于过氧化损伤与肝癌的预后关系,则研究较少[7,8]。肝炎病毒感染和酒精滥用导致肝细胞内氧化损伤加重,进而导致 DNA 的变化包括线粒体 DNA 的不稳定性[9-11]。线粒体基因体是长 16 kb 闭环双链,含有 37 个基因,包括 2 个 rRNA 和 22 tRNA[12]。因为线粒体 DNA 产生 ROS 并且缺少 DNA 修复功能,所以线粒体 DNA 比核 DNA 更容易损伤[13]。在许多癌症中,包括肝炎病毒导致的肝癌中,DNA 突变频发于线粒体 DNA 的非编码区域,称作 D-loop 区[12、14、15],其包含有 1122 bp (nucleotides 16,024-16,569 and 1-576; www. mitomap. org). 因其含有复制的起始链和转录的主要启动子[16],所以它对线粒体基因组的复制和表达有着重要的调节作用。D-loop 区的序列变化在多种肿瘤中被发现,但是因为没有测定血液标本的序列,所以这些序列变化代表体细胞变异还是单核苷酸多态性还是未知。虽然目前有一些研究通过测定血 DNA 发现了一些 SNPs(single nucleotide polymorphism,下同)位点,但现在几乎没有 SNPs 被筛选出来以预测癌症的发病风险及预后[17-19]。本研究中,通过测定肝癌患者的外周血、癌旁及肝癌组织中的 mtDNA D-loop 区 DNA 序列,发现了 92 个 SNPs 和 25 个突变位点,并通过与正常对照组比较,筛查出了与肝癌预后相关的 SNPs 位点[16],并证实了这些突变和 SNPs 与肝癌预后的预测强度。

1 材料和方法

1.1 组织标本和线粒体 DNA 的提取

收集河北医科大学第四医院肝胆外科 49 例肝癌病人(所有患者的肝功能属 Child-Pugh 分级 A 或 B,肝总胆红素水平 <301 mol/ L)的癌组织、癌旁组织和血液,立即放 -70℃存放。所有病人标本的收集经过河北医科大学第四医院伦理委员会批准。用 Mitochondrial DNA Extraction Kit (Genmed Scientific Inc, Shanghai, China)提取线粒体 DNA,所有线粒体 DNA 放 -20℃存放备用。

1.2 PCR 扩增和 DNA 测序

D-loop 用正义引物 5'-CCCCATGCTTACAAGCAAGT-3'和反义引物 5'-GCTTTGAGGAGGTAAGCTAC-3'扩增[31],PCR 试剂盒采用 PCR Master Mix Kit (Promega, Madison, WI),通过 PCR System 9700 Thermocycle (Applied Biosystem, Foster City, CA)扩增。PCR 产品经净化处理后用 Abiprism Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystem)进行测序分析。如果同病人癌组织和血液及癌旁组织比较有序列变化,这种变化就定义为变异。

1.3 统计学方法

应用 Kaplan-Meier、log-rank test 和 Cox 回归分析对数据进行处理。所有的统计处理操作均应用 SPSS 11.5 软件 (SPSS Company, Chicago, IL),P 值小于 0.05 定义为有统计意义。

2 结果

49 例患者中临床分期一期 13 人,二期 36 人;所有病人在肝癌切除术后均未接受放化疗等辅助治疗。我们对 49 例入组病人每 3 月进行一次随访,得到了 2 年生存情况。2 年之内共 27 例患者死亡。收集的临床资料使用 Kaplan-Meier 和 log-rank 处理。结果显示:患者的性别、年龄、Child 分级和肿瘤数目与 2 年生存率无统计学意义;而肿瘤分期、肿瘤大小和门脉瘤栓则差异存在显著性(表 1)。与预期相符,不同分期患者的 2 年生存率具有明显差别,肿瘤分期 I 期的为 76.9%,而 II 期仅有 33.3%;差异具有显著性(P <0.05);肿瘤直径 >5 cm 的生存期明显短于肿瘤直径 <5 cm 患者;合并有门脉瘤栓的患者均在随访期内死亡。以上数据表明,肿瘤分期、肿瘤大小和门脉瘤栓为影响肝癌预后的危险因素。

我们检测了 92 个 SNPs 与肝癌生存期之间的关系,在每个 SNP 位点,49 例患者被分为 2 组,经 Kaplan-Meier 生存分析发现,在 150 位点,存在 2 年

生存率的显著差异,150C 的生存期显著短于 150T (P = 0.028)(图 1),我们发现此位点与肝癌预后相关。为了进一步分析 150 位点、肿瘤分期、肿瘤大小、门脉瘤栓这 4 个可能因素对患者预后的影响,我们将其引入 COX 比例风险模型,多因素分析显示,150 位点和门脉瘤栓是影响预后的独立因素(表 2)。150C 基因型的患者 2 年生存期显著短于 150T (相对危险度,0.246;95% CI,0.070 – 0.861; P = 0.028)。以上数据提示 150 位点的基因型对肝癌的生存期具有显著影响。

3 讨论

mtDNA D-loop 区的 SNPs 和突变位点已经用来预测肝癌的发病情况[16]。本研究通过对 mtDNA (碱基 16190 – 583)的测序进一步研究了 SNPs 和突变位点与肝癌术后生存期的关系,发现 150 (C/T) 位点与 2 年生存率有关,多因素分析显示,150(C/T)是影响预后的独立因素,D-loop 区不同的 SNPs 在肝癌的发生发展过程中具有不同的作用,150 位点位于高突变 1 区(HV2),而以前我们发现的与食管鳞状细胞癌相关的位点位于高变 1 区[19]。在这些突变热点区域,肿瘤和生殖细胞的 mtDNA 都极易发生突变,其中的原因还不得而知。但我们的研究提示其在肿瘤预后方面具有重要作用。150C 患者的生存期明显较短且生存曲线下降迅速(图 1),但其中的原因需要进一步研究。

表 1 患者基本临床资料

Tab. 1 Clinical data of the HBV-HCC patients

预后因素 Prognostic factors		例数 No. of cases	2 年生存率(%) 2-year survival rate (%)	p p-value
性别 Gender				0.271
男 Male		43	41.9	
女 Female		6	66.7	
年龄 Age (years)				0.773
≤55		27	40.7	
>55		22	50.0	
分期 TNM classification				
	Ⅰ	13	76.9	0.010
	Ⅱ	36	33.3	
门脉瘤栓 Portal vein tumor thrombus				0.000
	有 Yes	10	0.0	
	无 No	39	56.4	
Child 分级 Child-Pugh grade (B/A)				0.884
	A	47	44.7	
	B	2	50.0	
AFP				0.128
	<200 μg/L	17	58.8	
	≥200 μg/L	32	37.5	
肿瘤大小 Tumor size				
	<5 cm	7	85.7	0.030
	≥5 cm	42	38.1	
肿瘤数目 Number of tumors				0.289
单个 Single		40	47.5	
多个 Multiple		9	33.3	

表 2 预后相关资料多因素分析

Tab. 2 Multivariate analysis of the prognostic information

公式中的变量 Variables in the equation								
	β 值 B	标准误 SE	卡方值 Wald	自由度 df	P 值 Sig.	OR 值 Exp (B)	95% 可信区间 95.0% CI for Exp(B) Lower 下限	Upper 上限
肿瘤大小 Tumor size	1.278	1.229	1.080	1	.299	3.589	.323	39.935
临床分期 TNM classification	.389	.756	.265	1	.607	1.476	.335	6.497
门脉瘤栓 Portal vein tumor thrombus	.928	.428	4.695	1	.030	2.530	1.093	5.857
位点 150 150T/C	–1.404	.640	4.814	1	.028	.246	.070	.861

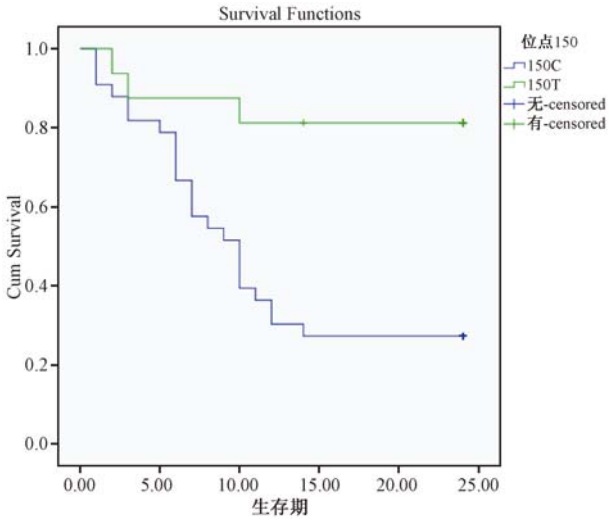


图 1　150 位点生存分析

Fig. 1　Cumulative survival of patients with 150 locus tumors

mtDNA D-loop 区是线粒体基因组复制和表达的重要调控区,这一区域的 SNPs 可能影响 mtDNA 的复制,从而影响呼吸链的功能,使细胞能量供应发生障碍,产生大量的活性氧。活性氧可以对细胞核基因组产生损害从而导致肿瘤的发生[20]。线粒体单倍型类群 H 和 U 提供了杂合细胞体模型[21],已经证实这些人的遗传变异情况是由于氧化磷酸化功能不同而引起。与以前报道相符,本研究发现 TNM 分期、门静脉瘤栓、肿瘤大小和肝细胞肝癌的预后相关,依据 2015 NCCN 临床指南,直径 <3 cm 的肿瘤是适于手术切除的,但我们也切除较大直径的肿瘤,毕竟大多数患者就诊时肿瘤直径已超过 3 厘米。我们的数据显示,对于肿瘤直径 <5 cm 的患者,行肝癌切除 2 年生存率可以达到 80%。

参考文献:

[1] Bosetti C, Turati F, La Vecchia C. Hepatocellular carcinoma epidemiology [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2014, 28(5): 753 – 770.

[2] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): E359 – E386.

[3] 王永川, 魏丽娟, 刘俊田, 等. 发达与发展中国家癌症发病率与死亡率的比较与分析 [J]. 中国肿瘤临床, 2012, 39: 679 – 682.

[4] Caldwell S, Park SH. The epidemiology of hepatocellular cancer from the perspectives of public health problem to tumor biology [J]. J Gastroenterol, 2009, 44(Suppl 19): 96 – 101.

[5] Lu FM, Zhuang H. Management of hepatitis B in China [J]. Chin. Med, 2009, 122: 3 – 4.

[6] Lu L, Wang X. Drug addition in China [J]. Ann NY Acad Sci, 2008, 1141: 304 – 317.

[7] Maki A, Kono H, Gupta M, et al. Predictive power of biomarkers of oxidative stress and inflammation in patients with hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma [J]. Ann Surg Oncol, 2007, 14: 1182 – 1190.

[8] 裴广军, 付莉, 崔亚玲, 等. 中国人群饮酒与原发性肝癌关系的 Meta 分析 [J]. 现代预防医学, 2008, 35: 2626 – 2627.

[9] 邓敬桓, 秦雪. 原发性肝癌发生机制的研究进展 [J]. 环境与健康杂志, 2007, 24: 924 – 926.

[10] Ribes J, Clèries R, Esteban L, et al. The influence of alcohol consumption and hepatitis B and C infections on the risk of liver cancer in Europe [J]. J Hepatol, 2008, 49: 233 – 242.

[11] Lin CW, Lin CC, Mo LR, et al. Heavy alcohol consumption increases the incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-related cirrhosis [J]. J Hepatol, 2013, 58: 730 – 735.

[12] Lee HC, Yin PH, Lin JC, et al. Mitochondrial genome instability and mt DNA depletion in human cancers [J]. Ann New York Acad Sci, 2005, 1042: 109 – 122.

[13] Taylor R, Wturnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease]J]. Nat Rev Genet, 2005, 6(5): 389 – 402.

[14] Nashikawa M, Nishiguchi S, Shiomi S, et al. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Res, 2001, 61: 1843 – 1845.

[15] Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Nomoto S, et al. Identification of a mononucleotide repeat as a major target for mitochondrial DNA alterations in human tumors [J]. Cancer Res, 2001, 61: 7015 – 7019.

[16] Zhang RX, Zhang FB, Wang CJ, et al. Identification of sequence polymorphism in the D-loop region of mitochondrial DNA as a risk factor for hepatocellular carcinoma with distinct etiology [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29(1): 130.

[17] Navaglia F, Basso D, Fogar P, et al. Mitochondrial DNA D-loop in pancreatic cancer: somatic mutations are epiphenomena while the germline 16519 T variant worsens metabolism and outcome [J]. Am J Clin Pathol, 2006, 126: 593 – 601.

[18] Wang L, McDonnell SK, Hebbring SJ, et al. Polymorphisms in mitochondrial genes and prostate cancer risk [J]. Cancer Epidemiol Biomark Prev, 2008, 17: 3558 – 3566.

[19] Zhang R, Wang R, Zhang F, et al. Single nucleotide polymorphisms in the mitochondrial displacement loop and outcome of esophageal squamous cell carcinoma [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29: 155.

[20] Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91: 10771 – 10778.

[21] Gomez-Duran A, Pacheu-Grau D, Lopez-Gallardao E, et al. Unmasking the cause of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups [J], Hum Mol Genet, 2010, 19: 3343 – 3353.

〔修回日期〕2016-02-24

技术方法

改良的乳小鼠心肌细胞原代培养方法

吴 丹[1],冯 健[1],莫显刚[2],刘应才[1]

(1. 西南医科大学附属医院心血管内科,四川 泸州 646000;2. 贵阳医学院附属医院老年病科,贵州 贵阳 550004)

【摘要】 目的 建立一种稳定而快速的乳小鼠心肌细胞的原代培养方法。**方法** 用多聚赖氨酸预包被处理培养皿,采用两步法(0.25% 胰酶 4℃过夜,0.5 mg/mL – 1.0 mg/mL II 型胶原酶 + 5 mg/mL 白蛋白的胶原消化液 37℃短时多次消化),通过差速贴壁 70 min + 5-溴脱氧尿嘧啶的使用来纯化心肌细胞。倒置相差显微镜下观察心肌细胞形态变化,台盼蓝染色法检测细胞存活率,α-actinin 特异性免疫荧光染色鉴定心肌细胞并计算纯度。**结果** 心肌细胞形态良好,自发搏动,细胞成活率可达到 98%,纯度可达到 95%。**结论** 本方法培养的心肌细胞存活率高,纯度高,是一种理想的心肌细胞原代培养方法。

【关键词】 乳小鼠;心肌细胞;原代培养

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】**1671-7856(2016) 04-0062-06

doi: 10.3969.j.issn.1671 – 7856.2016.04.011

An improved method for primary culture of neonatal mouse cardiomyocytes

WU Dan[1], FENG Jian[1], MO Xian-gang[2], LIU Ying -cai[1]

(1. Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Southest Medical University, Luzhou Sichuan 646000, China;
2. Department of Geriatrics, the Hospital Affiliated to Guiyang Medical College, Guiyang 550004)

【Abstract】 Objective To establish a stable and fast method for primary culture of mouse cardiomyocytes. **Methods** Dishes were coated with polylysine firstly. A two-step approach was used to isolate and digest mouse cardiomyocytes cells (0.25% trypsin in 4°C overnight and 0.5 mg/mL to 1.0 mg/mL collagenase + 5 mg/mL albumin collagen digestion liquid in 37° C for short-time digestion), then the cardiomyocytes were purified through differential adhesion for 70 min and 5- bromodeoxyuridine (BrdU). The cell morphology was observed under an inverted microscope. The survival rate of cardiacmyocytes was detected by trypan-blue staining and their purity was identified by α-actinin immunofluorescence staining. **Results** The cardiomyocytes were in good shape and pulsed spontaneously. The survival rate of the cardiomyocytes reached 98% and the purity was 95%. **Conclusions** This method described in this study is an ideal method for primary culture of mouse cardiomyocytes with a high survival rate and high purity.

【Key words】 Neonatal mouse; Cardiomyocytes; Primary cell culture

目前,对于心血管疾病机制的研究,在器官与组织水平上,通过基因敲除和转基因小鼠建立的心血管动物模型作出了极大的贡献;在细胞分子水平上,原代培养心肌细胞作为一种体外实验研究模型无可替代,它既能够排除神经、体液、内分泌等因素的干扰而单独地观察研究心脏的发育以及心血管疾病的发生、发展机制[1],同时具有自发搏动性,保持了其在体内的许多结构和功能。关于啮齿类动

[基金项目]国家自然科学基金(编号:31300946,31260250),泸州市人民政府 – 泸州医学院科技战略合作科技项目(2013LZLY-J22)。

[作者简介]吴丹(1991 –)女,硕士研究生,研究方向:冠心病的基础与临床,Email:15681536087@163.com。

[通讯作者]冯健(1982 –)男,主治医师,博士,研究方向:冠心病的基础与临床,Email:415623fj@163.com。

物心肌细胞培养要追溯到 20 世纪 60 年代,Harary and Farley[2]首次从成年大鼠分离培养出心肌细胞。近些年来,大鼠心肌细胞的分离和培养技术越来越成熟,然而小鼠心肌细胞的分离与培养却十分困难,由于心肌细胞为高度分化的近终末细胞[3],丧失增殖分裂分化能力等特点,并且心肌细胞的培养存在存活率低、活力差、纯度低、易于污染等问题,本实验基于以往乳鼠心肌细胞的分离培养的经验和方法加以改进[4,5],建立了一种新型的乳小鼠心肌细胞的原代培养方法,此方法高效,稳定,能获得大量的心肌细胞,活力好、存活率高、纯度高。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料:出生 0 ~ 3 d 的乳小鼠,雌雄不限,SPF 级 , 生产许可证:SCXK(川) 2013 - 17,使用许可证:SYXK(川)2013 - 181。由四川医科大学实验动物中心提供。CO_2 培养箱,超净工作台,恒温水浴箱,显微眼科手术剪刀、镊子三套,倒置相差显微镜,倒置荧光显微镜,恒温离心机,澳洲胎牛血清(Bovogen),多聚赖氨酸,DMEM/F12 培养基(Hyclone),胰酶,II 型胶原酶(Gibico),5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)(Sigma),青链霉素双抗,40 g/L 多聚甲醛,Triton X-100 (Amresco),α-actinin (博士德),Dylight488 标记的抗小鼠 IgG (博士德),DAPI (Beyotime)。

1.1.2 试剂的配制:配制含 10% 胎牛血清,1% 青链霉素双抗的高糖 DMEM/F12 完全培养液,用完全培养液配制胶原消化液(0.5 mg/mL - 1.0 mg/mL II 型胶原酶 + 5 mg/mL 白蛋白)。

1.2 实验方法

1.2.1 乳小鼠心肌细胞的分离、纯化和培养:

1.2.1.1 心肌组织的分离:取出生 0 ~ 3 d 的乳小鼠 20 只,浸泡于 75% 的酒精中 8 ~ 10 s 消毒后迅速送入超净工作台,将其固定于无菌泡沫板上,用眼科剪将乳小鼠胸骨正中偏左的皮肤剪开,用镊子分离皮肤,充分暴露胸部,换另一把眼科剪做一纵向切口打开胸腔,尽量不要超出第一次剪开的皮肤范围,忌打开腹腔,以免引起污染,根据心脏的搏动,顺势将心脏挤出。

取心脏放入冰冷的 PBS 缓冲液中吹打清洗,尽量将红细胞清洗干净,用眼科镊辅助眼科剪将多余的心房及周围肺组织等去除,随后将心脏移到另一个干净的培养皿,将心脏剪裂 2 ~ 3 下(裂而不断的程度即可),共清洗 3 遍。(此步骤在冰上操作)。

1.2.1.2 心肌细胞的分离与培养:将心脏组织吸入玻璃培养瓶中,加入 0.25% 胰酶(含 EDTA)10 mL,静置,4°C 过夜(12 ~ 16 h)。第 2 天,取出过夜的心脏组织,加入完全培养液 10 mL,37° C 恒温水浴 5 min,中止胰酶的消化作用;弃去上清液,加入胶原消化液 10 mL(注意弃上清液时勿把心脏组织吸走)。置于 37° C 的恒温水浴箱,1 min 用手轻摇。弃上清液,将心脏组织移入另一个培养瓶中加入 12 mL胶原消化液,置于 37°C 恒温水浴箱上,用手轻摇 30 min,将上清液移入新的离心管中。重复消化 3 ~ 4 次,仅见絮状样物质即心肌组织消化彻底。将收集的上清液离心 1 000 r/min 5 min,弃上清液,加完全培养液 30 mL,轻轻拍打管壁使得细胞悬浮于其中,随后接种在 100 mm 培养皿中,放于 37°C、5% CO_2 培养箱中孵育 70 min,差速贴壁以除去成纤维细胞和内皮细胞等非心肌细胞。轻轻吸出细胞悬液,台盼蓝染液染色计数,根据不同的实验目的用完全培养基调整细胞密度,加入 BrdU 使其在培养液的终浓度为 0.1 mmol/L,轻轻混匀后,将其接种到在事先用多聚赖氨酸预包被处理过的 6 孔板中,37°C、5% CO_2 培养箱中孵育 48 h 后,换无 BrdU 的完全培养基,以后每隔 48 h 换液 1 次。

1.2.2 台盼蓝染色检测细胞存活率:取心肌细胞悬液 90 μL 加入 0.4% 台盼蓝染液 10 μL 均匀混合,静置 3 min 左右后,取 1 ~ 2 滴已混匀的细胞悬液沿着盖玻片边缘滴入,将计数板放置于倒置相差显微镜下观察计数,未着上色折光性强的圆形细胞为活的心肌细胞,染成蓝色的为死细胞。随机取 4 个视野进行细胞计数,计数心肌细胞的存活率(%) = 活细胞数/(活细胞数 + 死细胞数) × 100%,重复计数计算 5 次。

1.2.3 心肌细胞搏动和形态学观察:将心肌细胞接种到多聚赖氨酸预包被处理过的 100 mm 培养皿中培养贴壁后,倒置相差显微镜下观察心肌细胞的搏动频率、节律、强度,以判断心肌细胞的活力,观察心肌细胞的生长状态、形态学变化并拍照。

1.2.4 心肌细胞纯度鉴定(α-actinin 免疫荧光染色):将心肌细胞以 1 ~ 2 × 10^5 的密度接种于预先放有经多聚赖氨酸预包被处理过的无菌玻片的 24 孔板中,制成细胞爬片;贴壁培养 48 h 后取出爬片,用 0.01 mmol/L 的 PBS 缓冲液漂洗 3 次,(每次

表 1 心肌细胞存活率的测定

Tab. 1 Determination of the survival rate of cardiomyocytes

实验次数 Experiment times	死细胞数 Dead cell number	总细胞数 Total cell number	细胞存活率% Cell survival rate %
1	2	105	98.10
2	2	109	98.17
3	1	97	98.96
4	2	104	98.07
5	1	99	98.98

2 min);以 40 g/L 的多聚甲醛固定液固定 5 ~ 10 min,每孔加 0.5 mL,吸去固定液,用 0.01 mmol/L 的 PBS 缓冲液漂洗 3 次,每次 2 min;用 3% Triton X-100 室温打孔通透 30 min,吸去通透液, 0.01 mmol/L 的 PBS 缓冲液漂洗 3 次,每次 2 min(避免晃动);加入 200 μL 5% 白蛋白 37 度孵育 60 min,甩去多余液体,不洗;取 1∶100 稀释的 200 μL α-actinin 抗体滴加到接种有心肌细胞的盖玻片上,4°C 冰箱过夜,用 0.01 mmol/L 的 PBS 缓冲液漂洗 3 次,每次 2 min;滴加 1∶100 稀释的 Dylight488 标记的抗小鼠 IgG 室温避光孵育 60 min,用 0.01 mmol/L 的 PBS 缓冲液漂洗 3 次,每次 2 min;用 DAPI 染液进行染核,室温避光孵育 3 ~ 5 min,0.01 mmol/L 的 PBS 缓冲液漂洗 3 次,每次 2 min;用吸水纸吸干爬片上的液体,滴加含抗荧光猝灭剂的封片液封片。荧光显微镜下观察采集图像,免疫荧光染色阳性的为心肌细胞,随机取 10 个高倍镜下视野计数阳性细胞数目及细胞总数,重复 5 次(阳性细胞率 = 阳性细胞数目/细胞总数 × 100%)。

2 结果

2.1 心肌细胞分离纯化、存活率测定及比较

实验显示,用多聚赖氨酸预包被处理培养皿,采用两步法(0.25% 胰酶 4°C 过夜,0.5 mg/mL - 1.0 mg/mL II 型胶原酶 + 5 mg/mL 白蛋白的胶原消化液 37°C 短时多次消化),可以获得大量的心肌细胞,台盼蓝染色检测细胞存活率可达 98% 以上(表 1),明显比传统混合酶消化法(78.18%)、两步法(90.47%)分离培养的心肌细胞存活率高(图 1)。此方法简便、经济、细胞贴壁培养好,利用差速贴壁法[6]除去成纤维细胞等非心肌细胞以及加入化学试剂 BrdU 抑制残余成纤维细胞的生长增殖[7],在培养 2 ~ 5 d 后观察视野中绝大多数细胞为搏动的心肌细胞或者连接成片的心肌细胞团,未见明显的成纤维细胞等非心肌细胞生长增殖。

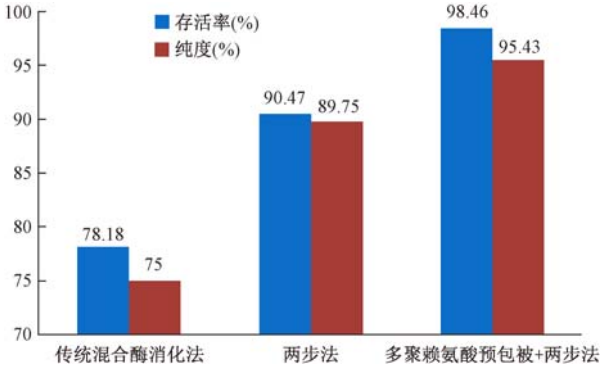


图 1 3 种方法培养心肌细胞的存活率及纯度比较

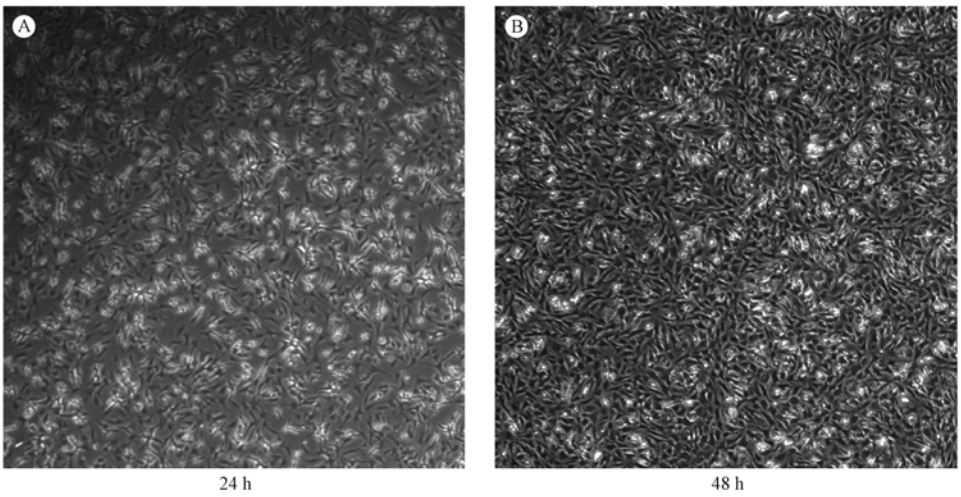
Fig. 1 Survival rates and purity of the cardiomyocytes cultured by 3 methods.

2.2 心肌细胞形态学观察及比较

刚分离消化下来的心肌细胞悬浮于细胞液中呈圆形或者椭圆形,培养 2 ~ 4 h 后细胞开始贴壁生长,刚开始细胞呈单个、圆形,6 ~ 8 h 后偶见单个心肌细胞搏动,搏动频率较慢,呈梭形。24 h 后细胞几乎完全贴壁且均匀分布,伸出伪足,呈梭形、星形或不规则多边形(图 2A),细胞搏动明显,频率和节律不一致,约 60 ~ 100 次/min 不等;48 h 后细胞伸出的伪足相互形成交联,成簇成团,交织密集呈网状(图 2B),呈同步收缩,约 120 ~ 140 次/min。通过多聚赖氨酸预包被培养皿 + 两步法分离培养的心肌细胞数目明显比传统混合酶消化法、两步法分离培养的心肌细胞数目多(图 3)。

2.3 心肌细胞纯度鉴定及比较

在倒置荧光显微镜下可见:在胞浆中辅肌动蛋白(α-actinin)特异性染成绿色为免疫荧光染色阳性, DAPI 染色的细胞核呈蓝色(图 4,5),证实是心肌细胞;细胞胞浆不着色,胞核呈蓝色的为非心肌细胞。结果显示 95% 以上的细胞中 α-actinin 染色都为阳性(表 2),纯度明显高于传统混合酶消化法(75%)、两步法(89.75%)分离培养的心肌细胞(图 1,5),可见该方法分离培养得到的心肌细胞纯度高,少见其他非心肌细胞的生长。

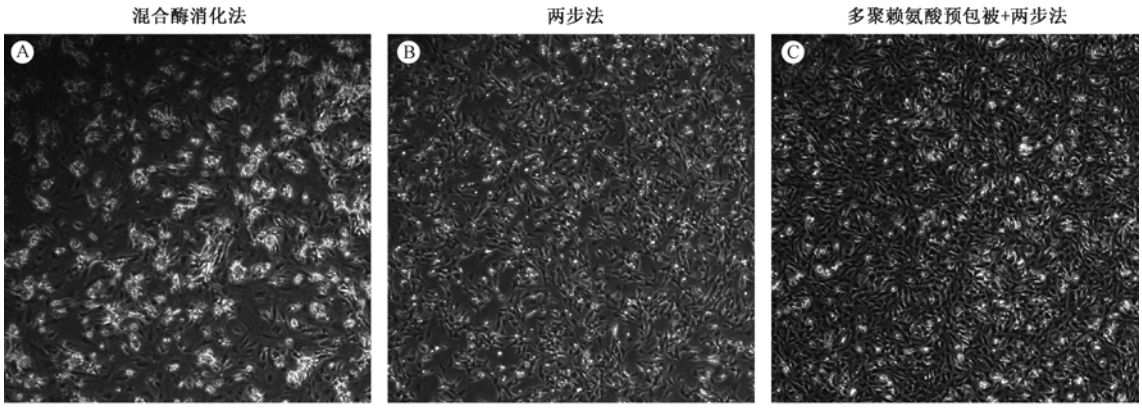


A 为培养 24 h 后心肌细胞,B 为培养 48 h 后心肌细胞

图 2　普通光学显微镜下心肌细胞(标尺 =200 μm)

(A) Cardiomyocytes cultured for 24 hours; (B) Cardiomyocytes cultured for 48 hours

Fig. 2　Cardiomyocytes observed under a light microscope (Bar = 200 μm)



A 为混合酶消化法,B 为两步法,C 为多聚赖氨酸预包被 + 两步法

图 3　普通光学显微镜下 3 种方法分别培养 48h 的心肌细胞(标尺 =200 μm)

(A) Traditional mixed enzyme digestion method; (B) Two-step method;

(C) The polylysine pre-packs culture dish + two-step method

Fig. 3　Cardiomyocytes cultured for 48 hours in 3 methods, observed under a light microscope (Bar = 200 μm)

表 2　心肌细胞纯度($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

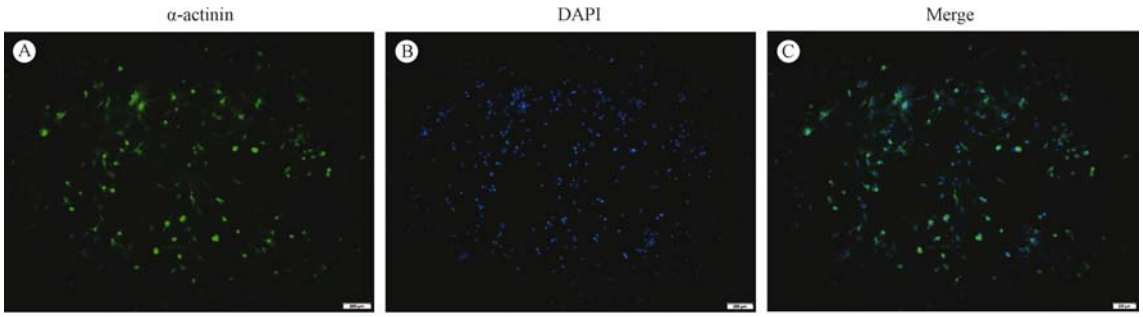
Tab. 2　Purity of the cardiomyocytes($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

实验次数 Experiment times	心肌细胞纯度/% Purity of cardiomyocytes/%
1	95.31 ± 1.45
2	95.52 ± 2.01
3	95.28 ± 1.83
4	95.44 ± 1.95
5	95.61 ± 2.31

3　讨论

近年来,关于心血管疾病研究的各领域,基于心肌细胞原代培养技术的信号通路、离子通道、基因表达等方面的探索研究,在细胞与分子水平揭示心血管疾病的发生发展及防治机制起着不可替代的作用。心肌细胞原代培养俨然已成为心血管研究中的一种根本方法和重要技术。目前,对于成年鼠心肌细胞的原代培养技术相对难度系数大,因此,乳鼠心肌细胞的原代培养技术更加应用广泛。然而,乳鼠心肌细胞的原代培养各个过程极易受各种处理因素及相关操作水平的干扰,一直存在心肌细胞的贴壁率低、成活率低、搏动率少以及纯度低等诸多不足,这些将会对随后的相关实验结果造成较大的影响,因此如何使消化分离下来的心肌细胞达到理想的成活率、纯度是亟待解决的瓶颈问题。

心肌细胞的培养方法主要包括组织块贴壁法

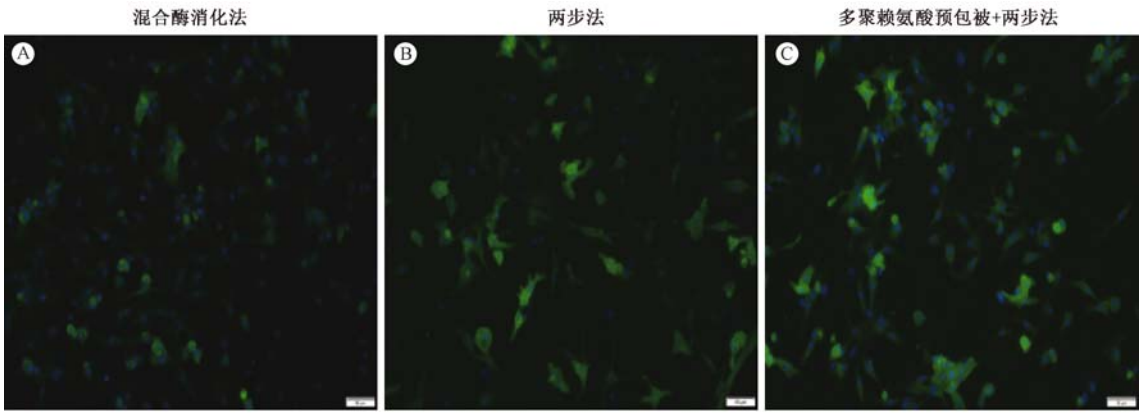


A 绿色为辅肌动蛋白特异性染色,B 蓝色为 DAPI 染色的细胞核,C 为辅肌动蛋白特异性染色与细胞核 DPAI 染色重叠图片。

图 4 心肌细胞的免疫荧光鉴定(标尺 = 200 μm)

(A) Green is α-actinin specific staining; (B) Blue is the DAPI-stained cell nucleus; (C) Overlapping image of specific staining with α-actinin and DPAI-stained cell nucleus.

Fig. 4 Immunofluorescence identification of the cardiomyocytes (Bar = 200 μm)



A 为混合酶消化法,B 为两步法,C 为多聚赖氨酸预包被 + 两步法

图 5 3 种方法分别培养的心肌细胞(标尺 = 100 μm)

(A) Traditional mixed enzyme digestion method; (B) Two-step method; (C) The polylysine pre-packs culture dish + two-step method

Fig. 5 Morphology of the cardiomyocytes cultured by the 3 methods (Bar = 100 μm)

和酶消化分离法两种[8]。组织块贴壁法[9]虽然操作简便,经济,但由于组织块贴壁不良、培养周期长、含大量成纤维细胞等非心肌细胞且不是每一块组织都能长出细胞,成功率低,现在已几乎不用。酶消化分离法主要使用的酶是胰酶和胶原酶,胰酶不仅对组织间蛋白成分起分解作用还对细胞膜蛋白、胞内的微管微丝有很强的破坏作用,因此单独的胰酶长时间的消化造成大量的心肌细胞丧失贴壁和自发搏动的能力,极大的影响细胞的活力和存活率,此外经胰酶消化处理后的组织可释放出大量的絮状般胶原蛋白,难以将上清液分离开,获得的心肌细胞数目少且活力差。胶原酶主要是对细胞与细胞间的胶原纤维起分解作用,适当的应用胶原酶可将成团的心肌细胞充分分散开从而增加心肌细胞消化数目,其作用力缓和,对心肌细胞损伤小,但是难以完全消化。目前,大多数采用的是传统混合酶(胰酶 + 胶原酶)消化[10,11],尽管分离消化下来的细胞数目多,但是仍存在细胞贴壁不佳、活性不好以及纯度不高等问题。

本文观察了传统混合酶消化法、二步法及多聚赖氨酸预包被处理 + 二步法分离培养的心肌细胞,结果显示不论是存活率还是细胞纯度二步法(0.25% 胰酶 4°C 过夜,0.5 mg/mL – 1.0 mg/mL II 型胶原酶 + 5 mg/mL 白蛋白的胶原消化液 37°C 短时多次消化)分离培养的心肌细胞远远优于传统混合酶消化法,而在二步法的基础上,将培养皿进行多聚赖氨酸预包被处理后,不仅可以获得更多的心肌细胞,而且细胞贴壁更好、成活率更高,形态结构正常,搏动好,纯度更高。

(1)多聚赖氨酸预包被处理培养皿:由于小鼠的心肌细胞比较脆弱易损[12],在实验的各个步骤中分离消化时间和力度把握不佳,就会出现细胞贴壁

不佳甚至几乎不贴壁的现象,因此,用细胞外基质组分(如胶原蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白、复合细胞外基质蛋白或者人工基质如多聚赖氨酸)来预包被细胞培养皿可促进心肌细胞贴壁生长[13]。

(2)0.25% 胰酶(含 EDTA)4°C 过夜:EDTA 是钙离子的螯合剂,一种非酶性消化物,主要作用是破坏细胞间的连接,在胰酶中加 EDTA 可增强胰酶的消化作用,降低对细胞的损害,具有更佳的消化效果,而胰酶在 37°C,pH 8.0 条件下消化作用最强,严重破坏心肌细胞,4°C 条件过夜下可抑制胰酶的活性。加入 0.25% 胰酶(含 EDTA)4°C 过夜对心肌组织进行预消化,既能温和缓慢地分解消化组织间蛋白,使紧密的组织结构变得疏松,也不会对细胞本身造成损伤破坏,提高细胞成活率。

(3)用完全培养液来配胶原消化液,既能终止胰酶对组织细胞蛋白的再消化,又能为细胞生存提供营养成分,避免在消化过程中造成对细胞的损害或者活力降低。由于乳小鼠心肌细胞对酶的消化特别敏感,如果酶的浓度过高或者用量过大,细胞将会丧失贴壁和搏动的能力,造成细胞成活率降低,但浓度过低,消化不足时,细胞将会聚集成团,造成细胞密度急剧减少,无法满足后续实验要求。Ⅱ型胶原酶的浓度控制在 0.5mg/mL ~ 1.0 mg/mL 可达到理想的消化,在胶原酶中加入白蛋白(5 mg/ml),保护细胞,提高消化分离的细胞质量。

(4)37°C 短时多次消化,不仅可让胶原酶充分消化组织,以便获得足够数目的心肌细胞,而且可降低因长时间的消化造成对细胞的损伤,避免出现消化过度以及随之而来的细胞贴壁差,成活率低,搏动少,纯度低等问题。由于小鼠心肌细胞比较脆弱,分离消化过程中,不宜用玻璃棒进行搅拌消化或吸管吹打消化,振荡力度不宜过大,每次都应在 37℃恒温水浴轻轻震荡下消化,以提高心肌细胞的获得率。此外,温度超过 37℃时不但大大降低酶的活性,也会大大的降低细胞的活力;消化酶的作用时间对心肌细胞的获得有很大影响,一般消化 3 ~ 5 次,每次消化时间应控制在 8 min 以内,消化时间过长、次数过多,则获得的心肌细胞活力不佳,贴壁不良;时间过短,次数过少,消化不足,则获得的心肌细胞量少。此外,应避免产生气泡,因为气泡的表面张力会牵拉损伤细胞。

本实验通过长期反复的实践证明,应用多聚赖氨酸预包被处理培养皿 + 两步法分离消化心脏组织,联合差速贴壁法(贴壁 70 min) + 化学试剂抑制法(在培养基中加 0.1 mmol/LBrdU)纯化心肌细胞,能够建立一种理想的乳小鼠心肌细胞原代培养方法,有助于心肌细胞形态、电生理、生化、分子生物学及生物力学等方面实验的开展,满足心血管疾病基础与临床研究。

参考文献:

[1] Hadad I, Veithen A, Springael JY, et al. Stroma cell-derived factor-1α signaling enhances calcium transients and beating frequency in rat neonatal cardiomyocytes[J]. Plos ONE, 2013, 8(2): e56007.

[2] Harary I, Farley B. In vitro studies of single isolated beating heart cells [J]. Science, 1960, 131(3414): 1674 - 1675.

[3] Anderson PA, Greig A, Mark TM, et al. Molecular basis of human cardiac troponin T isoforms expressed in the developing, adult, and failing heart [J]. Circ Res, 1995, 76(4): 681 - 686.

[4] 朱晓丽, 王丽, 马依彤, 等. 乳鼠心肌细胞和心肌成纤维细胞体外分离培养方法的优化 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 01: 90 - 99.

[5] Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer [J]. Mol Cell Cardiol, 2011, 51(3): 288 - 298.

[6] 庞勇军, 孙莉, 谢文娟, 等. 新生大鼠心肌细胞分离、纯化及培养方法的改进[J]. 上海交通大学学报:医学版, 2011, 31(4): 520 - 523.

[7] Chiu CZ, Wang BW, Chung TH, et al. Angiotensin II and the ERK pathway mediate the induction of myocardin by hypoxia in cultured rat neonatal cardiomyocytes [J]. Clin Sci (Lond), 2010, 119(7): 273 - 82.

[8] 司徒镇强. 细胞培养 [M]. 第 2 版. 北京: 世界图书出版社, 2007: 54 - 57.

[9] 王琼, 郭勇, 余鸿,. 乳鼠心肌细胞酶消化培养和贴块培养法的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 01: 38 - 40.

[10] 辛毅, 许秀芳, 黄益民, 等. 乳小鼠心肌成纤维细胞和心肌细胞的分离培养及荧光鉴定 [J]. 新乡医学院学报, 2011, 28(5): 541 - 546.

[11] 阳海鹰, 丁巍, 丁爱石,. 新生小鼠心肌细胞培养模型的建立及其在毒性评价研究中的应用[J]. 军事医学科学院院刊, 2010, 34(1): 30 - 33.

[12] 王丽娟, 贾大林, 齐国先. 成年小鼠心肌细胞的分离培养及鉴定 [J]. 中国实验动物学报, 2007, 03: 175 - 178.

[13] Nawroth JC, Lee H, Feinberg AW, et al. A tissue-engineered jellyfish with biomimetic propulsion [J]. Nat Biotechnol, 2012, 30(8): 792 - 797.

〔修回日期〕2015-12-15

技术方法

猕猴全结肠内镜检查方法与观察

黄志寅[1],张琼英[1],王玉芳[1],冯 哲[1],赵旭东[2],吕龙宝[2],陈文雄[2],
唐川君[1],龚 慧[1],胡 兵[1],唐承薇[1],谭庆华[1]

(1. 四川大学 华西医院 消化内科,成都 610041;2. 中国科学院昆明动物研究所实验动物中心,昆明 650223)

【摘要】 腹泻是猕猴常见肠道症状,相关肠道病变资料多源于猕猴尸检,尚无成功肠镜检查报告。本文旨在建立猕猴全结肠内镜检查方法及获得猕猴全结肠内镜图像。8 只猕猴无 >2 月的慢性腹泻史,管喂芒硝后,结肠清洁度符合内镜观察需求。采用电子消化内镜对猕猴全结肠进行观察,操作时间约 10 ~ 20 min/只。4 只动物结肠无明显异常病变,仅部分结构与人类有轻微差异。在 4 只 <1 d 轻泻的猕猴中,内镜观察到结肠小片糜烂及溃疡,其中 1 只存在明显狭窄。术中及术后 1 周均无动物死亡。本文建立的猕猴全结肠内镜检查安全有效,对及时诊治猕猴结肠炎、评估药物干预疗效及提供优质实验动物具有重要意义。

【关键词】 猕猴;结肠内镜;结肠清洁度;内镜结肠图像; 腹泻
【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2016) 04-0068-04
doi: 10. 3969. j. issn. 1671 – 7856. 2016. 04. 012

Performance and colonoscopic observation in macaques

HUANG Zhi-yin[1], ZHANG Qiong-ying[1], WANG Yu-fang[1], FENG Zhe [1], ZHAO Xu-dong[2],
LV Long-bao[2], CHEN Wen-xiong[2], TANG Chuan-jun[1], GONG Hui[1], HU Bing[1], TANG Chen-wei[1], TAN Qing-hua[1]
(Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China.
2. China Academy of Sciences Kunming Institute of Zoology, Kunming 650223)

【Abstract】 Diarrhea is a common intestinal symptom in macaque. The corresponding intestinal lesions of macaque are mainly described at autopsy but less observed by colonoscopy. The aim of this study was to develop a colonoscopic technique and to obtain endoscopic images of the entire colon in macaques. Eight healthy adult macaques (5 males and 3 females) without diarrhea for 2 months, were fed Glauber's salt through nasogastric tubes. The colon cleanliness was well matched to the endoscopic observation of macaque colon. The procedure took 10 – 20 min for each animal. There was no obvious abnormality in the colon of four animals except some slight differences of mucosal structure from that of human beings. Small pieces of erosion and ulcer in the colons were observed in four macaques which presented mild diarrhea for less than 1 day, while a severe stenosis was observed in one of those four macaques. No animal died during and one week after the endoscopic procedure. Colonoscopy may safely performed in macaques. The images taken by colonoscopy may be important to establish diagnosis and treatment of colitis in macaques in time and to evaluate the efficacy of drug intervention as well. This technique is also helpful to provide qualified macaques for scientific researches.

【Key words】 Macaque; Colonoscopy; Colon cleanliness; Endoscopic image, colon; Diarrhea

[基金项目]国家自然科学基金国家(地区)合作与交流项目 GZ1065。
[作者简介]黄志寅,男,医师,本科,研究方向: 消化系统疾病。
[通讯作者]谭庆华,男,教授,博士,研究方向: 消化系统疾病。

结肠炎是猕猴的常见疾病,其腹泻症状与肠道病变并不完全相符,部分有腹泻猕猴的结肠黏膜不一定出现糜烂、溃疡等病变,甚至正常,而无腹泻症状猕猴的肠黏膜也不一定完全正常。结肠内镜检查在诊治各种人类结肠病变中发挥了非常重要的作用。

本研究旨在建立猕猴全结肠内镜检查方法,并观察猕猴结肠的内镜下形态,为猕猴消化道疾病诊治及合格动物模型建立,提供先进可靠的方法。

1 材料和方法

1.1 受试动物

成年猕猴 8 只,雄性 5 只,雌性 3 只,体重为 4 ~ 5 kg,由中国科学院昆明动物研究所灵长类研究中心提供,实验动物生产许可证:SCXK(颠)K2013 - 0005。所有动物检疫均合格,无大于 2 月的慢性腹泻史,其中 4 只动物轻泻小于 1 d,另 4 只无腹泻症状。8 只动物营养状态均中等。实验动物使用许可证: SYXK(颠)K2013 - 0012。

1.2 内镜设备及相关药物

胃镜 GIF-Q260J(日本,Olympus 公司),图像采集设备 IMH-20(日本,Olympus 公司),全自动内镜消毒机(日本,Olympus 公司)。胃镜及全自动内镜消毒机专用于动物检查。复方氯胺酮(100 mg/支,江苏恒瑞医药股份有限公司),硫酸钠($Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$,芒硝,四川川眉芒硝有限责任公司),肠道准备前以 0.2 g/mL 浓度溶于饮用纯净水。肠镜检查在昆明动物研究所灵长类研究中心内完成肠道准备。

猕猴禁食 12 h,肠镜检查前 3 h 通过胃管注入芒硝溶液 50 mL(0.2g/mL),此后每半小时管喂 50 mL 纯净水,管喂水总量 150 mL(图 1)。待猕猴排泄粪便呈清水样后,即可开始肠镜检查。将镜下观察肠道粪水情况分为 3 个等级:I 级,全肠道无粪渣,只有少量清澈的液体;II 级,肠腔内有少量粪渣及或大量黄色粪水,经吸引器能吸尽,不影响镜下粘膜观察及治疗;III 级,肠腔内有大量粪渣或块状大便,经吸引器不能吸尽,不能完成全结肠检查[1]。I 级和 II 级视为肠道准备清洁,III 级视为不洁。

1.3 结肠内镜操作方法

术前采用全自动消毒机对内镜及其附件常规消毒备用。对猕猴采用复方氯胺酮(6 mg/kg)肌内注射麻醉,待猕猴肌肉松弛,睫毛反射消失后,将动物左侧卧位置于检查台上。检查者立于猕猴右侧,单人操作[2]。内镜前端用石蜡油润滑后,通过肛门进入猕猴肠道,依次通过直肠、乙状结肠、降结肠、横结肠、升结肠,回盲部,最终到达末段回肠。检查全程录像、采集图片。肠道内镜检查结束后,将动物放回笼内,待其自然苏醒。

2 结果

2.1 猕猴肠道准备

8 只猕猴管喂芒硝及纯净饮用水后,未发生呕吐及误呛。管喂芒硝后猕猴首次排大便时间为(40 ±10) min;3 h 时,大便均呈清水样,无动物因严重脱水需要补液治疗。内镜观察,5 只猕猴肠道残余粪水量为 I 级,另 3 只则为 II 级。均能完成全结肠检查。

2.2 结肠内镜检查

使用胃镜(GIF-Q260J)单人操作,通过短缩肠管方法,完成猕猴的全结肠内镜检查。操作方法基本与人体内检查相同,因猕猴乙状结肠长度(平均 16 cm)[3]明显短于人类乙状结肠,因此在乙状结肠无需反复旋镜短缩,找准肠腔走形保持肠镜轴位,徐徐进镜即可。在进镜约 60 ~ 70 cm 即可到达回盲部,将镜身前端调整至回盲瓣的前唇和后唇之间,轻轻上打螺旋,分开前后唇进入末段回肠。每只猕猴全程肠镜操作时间约 10 ~ 20 min;肠道残余粪水量为 II 级者,体重较轻的猕猴,操作时间较长。

2.3 猕猴内镜下的正常结肠形态

内镜观察到 4 只动物的结肠无明显异常病变,其中 1 只动物镜检前有小于 1 d 的轻泻。当内镜到达回盲部时,内镜下测量全结肠长度约为 60 ~ 70 cm。直肠呈细长管状,肠壁光滑,未见与人类相似的亨氏瓣(图 1)。乙状结肠长度在内镜下测量约 10 cm,管腔狭窄弯曲,无半月皱襞(图 1)。

降结肠为全结肠中长度最长的一段肠管,内镜下测量约为 30 cm,其半月皱襞细而矮(图 2)。横结肠腔管径较大,游离度较大,半月皱襞高而厚,以结肠带附着部位为顶点呈三角形(图 2)。结肠肝曲及脾曲均可见到蓝紫色肝脏及脾脏透见像。升结肠管腔由远端向近端逐渐变宽,高而厚的皱襞呈正三角形(图 2)。

盲肠是猕猴全结肠管腔最粗大部分,其管腔直径(4 cm)约乙状结肠及直肠的 3 倍,呈类圆锥形。与人类不同的是,盲肠尖端未见阑尾孔。回盲瓣位

于盲肠侧壁上,与人类略有差异的是,扁圆形的开口由前后唇围成(图 3)。内镜通过回盲瓣开口进入末段回肠,在窄带光谱成像技术(narrow band imaging,NBI)下,可见小肠绒毛样上皮结构,未见 Peyer 淋巴结(图 3)。

2.4 猕猴结肠炎的内镜下表现

在 4 只轻泻小于 1 d 的猕猴中,内镜检查发现直肠至横结肠有散在分布的糜烂病灶,长径约 0.3 cm ~ 0.6 cm /个,触之易出血(图 4)。其中 1 只动物除上述病变外,肠道残余粪水量为 II 级,因节段黏膜水肿,进镜困难,升结肠存在明显狭窄,镜身不能通过,未能抵达回盲部。

2.5 猕猴全结肠内镜检查安全性

8 只猕猴在肠镜检查期间处于良好的麻醉状态,未追加复方氯胺酮剂量。心肺功能正常,气道无阻塞。进镜及退镜过程中可有少许黏膜擦伤及出血,无穿孔及大量出血。内镜检查结束至动物苏醒平均约(14 ±4) min。术后 1 h,动物开始进食。术后 1 周内,动物进食、大便及活动无明显异常。

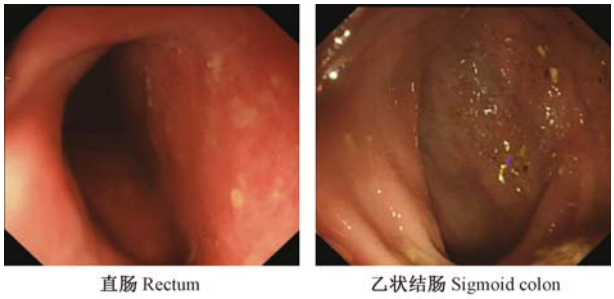


图 1 内镜下观察的猕猴直肠与乙状结肠

Fig. 1 Endoscopic appearance of the rectum and sigmoid colon of a macaque

图 2 内镜下观察的猕猴降结肠、横结肠与升结肠

Fig. 2 Endoscopic appearance of the descending, transverse and ascending colon of a macaque

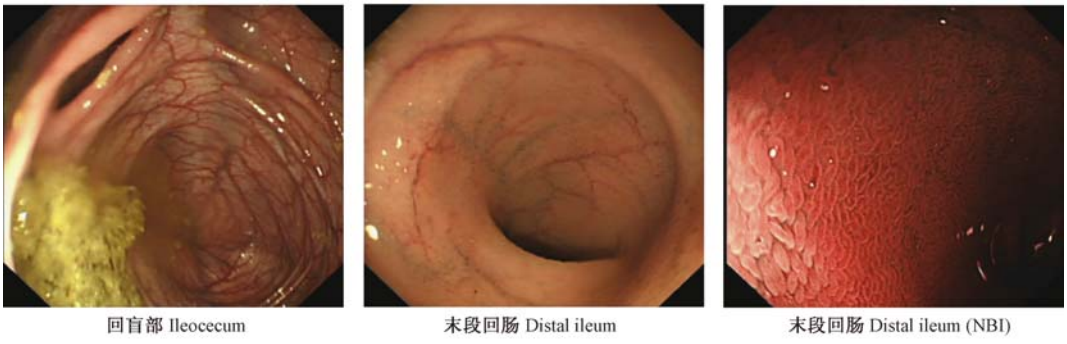


图 3 内镜下观察的猕猴回盲部与末段回肠

Fig. 3 Endoscopic appearance of the ileocecum, distal segment of ileum and narrow-band imaging of the distal segment of ileum of a macaque

3 讨论

猕猴作为非人灵长类动物,遗传物质与人类非常接近,而且数量较多,分布较广。作为人类的实验替代品是最理想的实验动物。近年来国内外应用猕猴建立了如 AIDS 等各种动物模型[4],进行神经生理学、疫苗制备、转基因研究、血液学、病毒学、免疫学、肿瘤学等生物医学研究,优质的实验动物

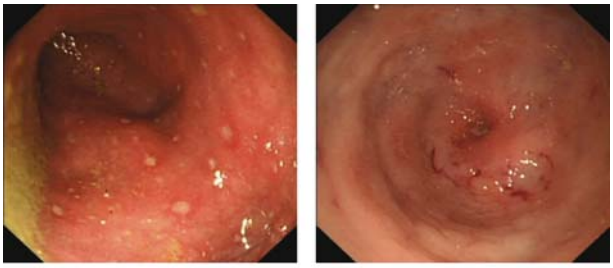


图 4　内镜下观察的猕猴结肠病变

Fig. 4　Colon alterations of macaques observed by colonoscopy

需求日益增加[5]。然而,不明原因慢性腹泻在大型灵长类研究基地的年发病率高达 5%,占腹泻猕猴的 25%[6],对非人灵长类动物模型建立及药物代谢研究都极为不利。迄今为止,多数文献的数据来自猕猴死后尸检[7],难以适应该病的及时诊治、前瞻性科学研究等需求。肠镜对于人类结直肠疾病诊治发挥了重大作用,虽有文献探讨过猕猴肠镜检查的方法及效果,但因没有成功洗肠,观察困难,实验动物均在肠镜后死亡[8],建立猕猴肠镜检查方法因此具有重要意义。

清洁肠道是进行内镜检查前的一项重要工作。猕猴与人不同,难以主动饮入洗肠液,这是以往文献中肠镜前洗肠困难的原因。本研究采用管喂洗肠液,插管操作简便易行,所有动物未出现呕吐、反流误吸、窒息、以及上消化道出血等症状。芒硝作为我国传统中药,主要成分是 $NaSO_4 \cdot aSO_2O$。口服后其硫酸根不易为肠道吸收,在肠腔形成高渗状态,使肠腔水分增加造成机械性刺激,促进肠蠕动而起导泻作用[9]。本研究表明,给猕猴管喂芒硝,肠道清洁程度基本达到 I ~ II 级,效果好、无明显不良反应。

与以往猕猴肠镜检查不同的是,本研究采用 GIF-Q260J 胃镜而非肠镜,镜身硬度适宜于小个体型的操作。当遇到肠腔狭窄时,GIF-Q260J 胃镜不能通过,提示今后应准备鼻胃镜,以应对类似情况。由于猕猴个体较小,也许对用鼻胃镜检查结肠更为恰当,但尚需进一步尝试与总结操作经验。

猕猴与人同属灵长类,内镜下的结肠结构存在一些差异。人类的结肠带在乙状结肠与直肠移行部消失,结肠带使结肠壁形成袋状,腔内可见半月皱襞及亨氏瓣。直肠的 3 个亨氏瓣对于在直肠内判断腹膜翻转部位及与乙状结肠交界部位具有重要作用。猕猴直肠未见亨氏瓣、乙状结肠无半月皱襞,提示猕猴的结肠带可能在降结肠远端消失。

阑尾一直被认为是人类进化过程中退化的一个器官。但近年的研究表明,阑尾与机体的系列免疫功能有关,在维持肠道健康方面具有重要作用。阑尾被认为是肠道共生菌的贮存地,当肠内共生菌群失衡时,贮存于阑尾的共生菌将迅速予以补充,促进肠道正常菌群恢复。阑尾切除术后患者中,溃疡性结肠炎发生率明显降低[10]。我们在猕猴肠镜检查中未发现猕猴有阑尾。以往猕猴大体解剖时,也未发现猕猴有阑尾[3]。这是否与猕猴虽可反复发生结肠炎,但却难以进展为炎症性肠病有关? 如果缺少阑尾对炎症性肠病的发生是保护性因素,猕猴的肠黏膜免疫值得深入研究。通过肠镜在末段回肠进行检查并活检,可能是重要的研究手段。本文所建立的猕猴肠镜检查方法因此更显必要。

总之,肠镜检查对于了解猕猴肠道病变是一种行之有效而安全的方法。能够在不处死实验动物的情况下,完成全结肠及部分末段回肠的观察,取得活体组织标本。也可在治疗后反复进行结肠镜检查,观察治疗效果。

参考文献:

[1] 宁俊容. 中药芒硝洗肠法与甘露醇洗肠法在肠镜诊疗前肠道准备中的临床研究[J]. 中国实用医药. 2012,7: 125.

[2] 岩男泰, 寺井毅. 图解大肠镜单人操作法[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,2008:41 - 49.

[3] 叶智彰,彭燕章,张耀平. 猕猴解剖[M]. 北京:科学出版社,1985:148 - 152.

[4] Ortiz AM, Klase ZA, DiNapoli SR, et al. IL - 21 and probiotic therapy improve Th17 frequencies, microbial translocation, and microbiome in ARV-treated, SIV-infected macaques [M]. Mucosal Immunol. 2015; doi: 10. 1038/mi. 2015. 75.

[5] 郅琦, 陈永昌, 陈学进. 猕猴在生物医学研究中的应用[J]. 上海实验动物科学,2003, 23: 59 - 62.

[6] Ardeshir A, Oslund KL, Ventimiglia F, et al. Idiopathic microscopic colitis of rhesus macaques: quantitative assessment of colonic mucosa [J]. Anat Rec (Hoboken),2013, 296: 1169 - 1179.

[7] 罗其胜, 王庆玲, 李松珍, 等. 猕猴疾病尸检材料的分析[J]. 中国兽医科技. 1989, 2: 42.

[8] 张虹雨, 范晓娜, 黄敏, 等. 猕猴结肠镜下活检组织病理学观察[J]. 中国比较医学杂志. 2010; 20: 67.

[9] 王霞, 许行. 不同药物用于老年患者结肠镜检查前肠道准备的临床观察[J]. 中华保健医学杂志. 2008, 10: 357 - 358.

[10] Sahami S, Kooij IA, Meijer SL, et al. The link between the appendix and ulcerative colitis: clinical relevance and potential immunological mechanisms [J]. Am J Gastroenterol. 2015; doi: 10. 1038/ajg. 2015. 301.

〔修回日期〕2015-12-12

技术方法

小型猪经颈静脉肝穿刺活检术的可行性探讨

朱　冰[1],李晓娟[2],吕　飒[1],游绍莉[1],李瑞生[2]

(1. 解放军第 302 医院肝衰竭诊疗与研究中心,北京　100039;2. 解放军第 302 医院临床研究管理中心,北京　100039)

【摘要】 **目的**　探讨采用美国 Cook 公司 LABS 200 肝内穿刺活检针套装行经颈静脉肝穿刺活检术(TJLB)的可行性和安全性。**方法**　利用影像学技术对 5 只小型猪行 TJLB 活检术,在术中密切观察穿刺路径,并进行肝脏组织活检样本的采集。**结果**　5 只小型猪行 TJLB 术均成功地采集了肝脏组织的活检样本,且无相关并发症,均取得足够多的肝组织,可以进行相关病理学的分析。**结论**　采用 Cook 公司 LABS 200 肝内穿刺活检针套装在小型猪上行 TJLB 术安全可行,为临床进一步的应用提供技术支持。

【关键词】 小型猪;经颈静脉肝穿刺活检术;介入放射学
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2016) 04-0072-03
doi: 10. 3969. j. issn. 1671 – 7856. 2016. 04. 013

Feasibility of transjugular liver biopsy in minipigs

ZHU Bing[1], LI Xiao-juan[2], LV SA[1], YOU Shao-li[1], LI Rui-sheng[2]
(1. Liver Failure Treatment and Research Center, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China.
2. Research Center for Clinical Medicine, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

【**Abstract**】 **Objective**　To evaluate the feasibility and safety of transjugular liver biopsy(TJLB) by using the LABS 200 liver access and biopsy set (Cook Inc, USA). **Methods**　Five minipigs were operated though TJLB puncture under the imaging guidance. The liver biopsies were analyzed by histological examination. **Results**　Technical success of TJLB was achieved in all the 5 minipigs. No procedure-related complications occurred, and sufficient amount of specimen for histological examination was obtained in all cases. **Conclusions**　Our preliminary results indicate that transjugular liver biopsy with the use of Cook LABS 200 liver access and biopsy set is clinically safe and feasible, and provide technical support for its clinical application.

【**Key words**】 Minipig; Transjugular liver biopsy; Interventional radiology

随着国内外肝脏疾病的日益增多,肝组织活检在肝脏疾病的诊断和治疗中起到非常重要的作用。其中经皮肝穿刺活检技术(PLB)是目前应用较为广泛的方法,但是对于有大量腹腔积液及严重凝血功能异常的患者,应用 PLB 发生腹腔内出血的风险很高[1,2]。在这种情况下,经颈静脉肝穿刺活检术(TJLB)作为一种理想的替代和补充方法应运而生[3]。虽然 TJLB 在国外已成为常规技术,但由于 TJLB 的器械一直未正式进入国内市场,国内有关该方法的临床应用和报道较少[4],为了更好地开展临床应用和治疗研究,本实验采用美国 Cook 公司 LABS 200 肝内穿刺活检针套装对 5 只小型猪行

[基金项目]北京市科委计划课题项目(Z141100002114038)和院内课题项目(YNKT007)。
[作者简介]朱冰(1979 –),男,博士,主治医师,E-mail: zhubing302@163. com;李晓娟(1980 –),女,硕士;并列第一作者。
[通讯作者]游绍莉(1972 –)女,硕士,主任医师,主要从事临床肝病方面研究;李瑞生(1969 –),男,博士,副研究员,主要从事人类疾病动物模型研究,E-mail: lrsheng@sohu. com。

TJLB,旨在探讨和观察 TJLB 的安全性和可行性,为今后临床上开始应用 TJLB 方法提供可靠的实验基础和支持。

1　材料和方法

1.1　实验动物及实验器械

成年健康实验猪 5 头,雄性,体重为 40 ~ 50 kg,购自北京科宇动物养殖中心许可证号:SCXK(京)2012 - 0004。Liver Access and Biopsy Needle Set (LABS 200)购自 Cook Medical,速眠新(1.5 mL/支)购自军事医学科学院军事兽医研究所。本实验室具有普通级实验动物使用许可证号:SYXK(军)2012 - 0009。

1.2　术前准备及麻醉

术前小型猪需提前禁食禁水 8 h,麻醉时先用速眠新和安定 1:1 配合,按每公斤体重 0.3 ~ 0.5 mL 肌内注射,诱导后再用戊巴比妥钠按 0.2 ~ 0.3 mL/kg 静脉给予,这种麻醉方式更优于丙泊酚[5],同时观察小型猪进入麻醉后的状态,然后用纱布将舌头置于口侧边,以防发生窒息,术中密切观察小型猪的呼吸、脉搏,右后肢静脉保留置针,以便及时补充麻醉剂以维持其手术。

1.3　穿刺活检过程

TJLB 需要有经验的介入科医生进行操作,首先分离小型猪右侧颈静脉,以 19G 穿刺针穿刺右侧颈内静脉,然后引入 0.018 或 0.035 导丝,并置入 7 cm 长 9F 血管鞘。透视下,导管导丝配合将导管鞘经右心房进入下腔静脉;首先行下腔静脉 DSA 造影确认无明显下腔静脉狭窄,再将导管鞘进入肝静脉,再造影确认肝静脉无明显狭窄闭塞;将导管鞘头端进一步深入肝右静脉远端、距离下腔静脉 3 ~ 4 cm 处,经鞘引入 7F 肝穿活检针,旋转导管鞘头端指向正下方,开启活检枪完成肝实质活检,并退出活检针。视获得肝组织大小决定是否再次获取肝组织,最后行肝静脉造影排除明显异常。

1.4　术后监测

TJLB 术后,拔出穿刺针,逐层缝合组织至皮肤,给予抗生素以防发生感染,密切观察术后小型猪的脉搏和呼吸直至麻醉苏醒,每天观察小型猪的生活状态和伤口愈合情况。

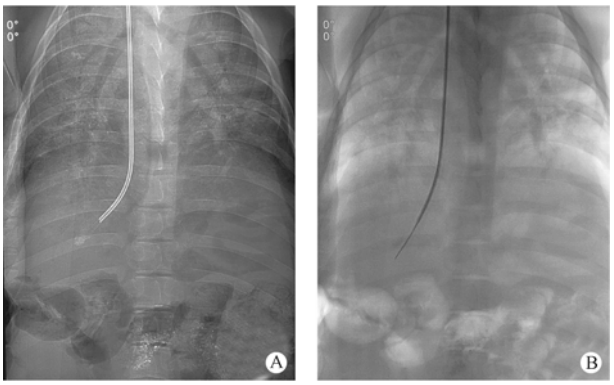
2　结果

2.1　TJLB 术前准备结果

5 头小型猪均采用速眠新和安定诱导麻醉,然后用戊巴比妥钠静脉麻醉,其麻醉深度恰到好处,并适合行 TJLB。逐层分离小型猪皮肤、筋膜,成功分离可见右侧颈静脉。

2.2　TJLB 术在影像学下观察的结果

5 头小型猪经 Cook 公司 LABS 200 肝内穿刺活检针套装行 TJLB 术,在手术过程中,穿刺针顺利到达肝脏组织,造影显示血管均无狭窄(图 1A)。随后打开活检针,顺利采集肝脏活组织(图 1B)。



注:A 造影确认进入肝右静脉;B 开启活检枪获取肝组织

图 1　TJLB 术中观察结果

Note. A: Access to the right hepatic vein.

B: Opening the biopsy gun to take liver tissue

Fig. 1　The results of intraoperative observation in TJLB

2.3　TJLB 术后肝组织病理结果和小型猪术后观察结果

TJLB 术后将 5 头小型猪成功采集到的肝组织进行了病理组织学分析,结果显示为正常肝脏病理学结果:肝小叶结构清晰,肝索排列规则且以中心静脉放射排列,肝细胞未见任何异常。TJLB 术后采用逐层缝合,同时给予一定的抗生素以防感染。小型猪于术后第 2 天已全部恢复,并能正常行走和采食,生长状态良好,无任何不良反应,其伤口愈合好未见感染。

3　讨论

肝组织病理活检是肝脏病变诊断的金标准,在肝脏疾病的诊断和治疗中起到非常关键性的作用,对疾病诊断、分级、分期、疗效判定及预后都有十分重要的参考价值[6]。临床上获取肝脏组织的方法非常多,主要有开腹肝活检、经腹腔镜肝穿刺活检、PLB 和 TJLB 等等[7],而 PLB 因其简单易行、费用低廉普遍公认为首选的方法,但患者如果伴有凝血障碍或中重度腹水、重度肥胖、肝脏萎缩等并发症,采

取 PLB 方法会出现出血的风险[8],因此目前一致建议对此类患者可行 TJLB 术。虽然 TJLB 较 PLB 操作复杂,还需要训练有素的医务人员,花费时间长,费用高,但对于上述一些特殊患者来说却是一种更安全的替代技术,可减少患者发生风险的可能性,成功获得肝组织进行病理学诊断以确定下一步的治疗方案[9]。另外,经颈静脉进行肝组织活检还可以进行肝静脉造影,测量肝静脉压力以及肝静脉楔压等指标[10]。

国内有关 TJLB 的报道较少,罗泽龙等[4]报道了采用美国 Cook 公司 LABS 100 肝内穿刺活检针套装对 12 例患者行 TJLB 证实其安全可行。而本实验采用美国 Cook 公司新一代的 LABS 200 产品在影像学技术的配合下对 5 只小型猪进行肝内穿刺活检针套装实验,在穿刺过程中,需要注意穿刺针的尖端不要太接近肝被膜,因此本实验选择了小型猪的肝右静脉能够更好地控制穿刺针尖端与肝被膜的距离确保安全。临床上常推荐进行 3 次肝活检,但是 2 次肝活检就足够满足临床实验诊断[11],而选择 2 次还是 3 次肝活检取决于介入放射医生观察前两次标本大小及碎片程度,来决定是否再取 1 次,标本的长度至少要 1 cm[12]。本实验由于是在探讨 TJLB 的可行性,因此对小型猪成功地采集了 3 次肝组织,采集的肝脏组织需要进行不同的染色来诊断疾病,有报道称最少需要 6 组汇管区对急慢性肝病进行诊断并分级[13],本实验为健康的小型猪,因此采用了普通的 HE 染色来观察肝脏组织的变化[14,15],结果均呈现正常肝组织的病理状态。小型猪术后恢复良好,第 2 天可以行走和采食,伤口愈合良好无任何并发症出现,说明对小型猪行 TJLB 术是成功的、安全可行的。

因此,本实验在影像学技术的配合下采用美国 Cook 公司 LABS 200 肝内穿刺活检针套装对小型猪行 TJLB 术是成功的,说明 TJLB 术在小型猪上具有一定的可行性,这也将为此技术可以放心地应用于临床治疗和诊断当中提供了科学而又坚实的技术支持。

参考文献:

[1] Kis B, Pamarthi V, Fan CM, et al. Safety and utility of transjugular liver biopsy in hematopoietic stem cell transplant recipients [J]. J Vasc Interv Radiol, 2013, 24(1): 85 - 89.

[2] Cholongitas E, Burroughs AK. Liver: transjugular liver biopsy yields high-quality samples [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012, 9(9): 491 - 492.

[3] Pathak K, Gopinath M, Salgotra KR. Transjugular liver biopsy [J]. Med J Armed Forces India, 2013, 69(4): 384 - 387.

[4] 罗泽龙, 冯超, 赵剑波. 经颈静脉肝穿刺活检术 12 例 [J]. 介入放射学杂志, 2015, 24(5): 446 - 448.

[5] 王洋, 陈克研, 张贺, 等. 丙泊酚静脉麻醉与异氟醚吸入麻醉在巴马小型猪实验中的比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(7): 25 - 28.

[6] Sporea I, Popescu A, Sirli R. Why, who and how should perform liver biopsy in chronic liver diseases? [J]. World J Gastroenterol, 2008,14: 3396 - 3402.

[7] Beckmann MG, Bahr MJ, Hadem J, et al. Clinical relevance of transjugular liver biopsy in comparison with percutaneous and laparoscopic liver biopsy [J]. Gastroenterol Res Pract, 2009: 947014.

[8] 高海军, 陈光, 蔡金贞, 等. 经颈静脉肝活检在肝移植术后患者中的应用 [J]. 实用器官移植电子杂志, 2014, 2(1): 16 - 19.

[9] Procopet B, Bureau C, Métivier S, et al. Tolerance of liver biopsy in a tertiary care center: comparison of the percutaneous and the transvenous route in 143 prospectively followed patients [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2012, 24(10): 1209 - 1213.

[10] 高海军. 经颈静脉肝活检技术应用进展 [J]. 实用器官移植电子杂志, 2015, 3(2): 121 - 124.

[11] Miraglia R, Maruzzelli L, Minervini MI, et al. Transjugular liver biopsy in liver transplant patients using an 18-gauge automated core biopsy needle [J]. Eur J Radiol, 2011, 80(3): e269 - 272.

[12] Hardman RL, Perrich KD, Silas AM. Single-institution Results of image-guided nonplugged percutaneous versus transjugular liver biopsy [J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2011, 34(2): 369 - 375.

[13] Kalambokis G, Manousou P, Vibhakorn S, et al. Transjugular liver biopsy - indications, adequacy, quality of specimens, and complications - a systematic review [J]. J Hepatol, 2007, 47(2): 284 - 294.

[14] 李晓娟, 汤紫荣, 李蓓, 等. 近交系小鼠移植性肝癌模型建立及对比分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(9): 42 - 45.

[15] 白云峰, 李晓娟, 李永纲, 等. 近交系小鼠酒精性脂肪肝模型建立的分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(1): 8 - 11.

〔修回日期〕2015-12-16

技术方法

改良组织块法分离培养兔成纤维样滑膜细胞

陈 芳[1],刘 琴[1],王丽平[1],陈利峰[2],张 宜[1]

(1. 解放军广州军区武汉总医院医学实验科,武汉 430070;
2. 解放军广州军区武汉总医院中西医结合科,武汉 430070)

【摘要】 **目的** 通过改良组织块细胞培养法,建立一种简单,可行的兔成纤维样滑膜细胞体外培养方法。**方法** 无菌条件下取正常兔膝关节滑膜组织,剔净后剪成碎块,用灭菌滤纸吸掉组织上附着的水分,碎片接种于培养皿,观察细胞生长状况及形态特征。取第 3 代对数期细胞,用 CCK-8 法绘制其生长曲线,并用免疫荧光法检测波形蛋白的表达情况。**结果** 体外培养的兔成纤维样滑膜细胞形态为长梭形纤维样,细胞生长力较旺盛,生长曲线为典型的"S"型,免疫荧光检测显示第 3 代细胞强表达波形蛋白。**结论** 改良组织块法可以分离培养出兔成纤样维滑膜细胞,方法简便,成功率高,满足实验要求。

【关键词】 改良组织块法;兔成纤维滑膜细胞;分离;培养
【中图分类号】R-332 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2016) 04-0075-04
doi: 10. 3969. j. issn. 1671 – 7856. 2016. 04. 014

Primary culture of rabbit fibroblast-like synoviocytes using an improved explant culture method

CHEN Fang[1], LIU Qin[1], WANG Li-ping[1], CHEN Li-feng[2], ZHANG Yi[1]
(1. Department of Medical Experiments, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China;
2. Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China)

【**Abstract**】 **Objective** To establish an easier and better method for primary culture of rabbit fibroblast-like synoviocytes(FLS) by modified tissue cell culture. **Method** Healthy rabbit joint synovial layers were cut into small pieces and siphoned off water attached on the tissue with sterile filter paper and then cultured. The growth status and morphology were observed. The growth curve of the 3rd passage cells was measured by CCK-8 assay, and the expression of vimentin was detected by immunocytochemistry. **Results** The FLS cultured in vitro exhibited a spindle-shaped appearance and could rapidly expand. The cell growth curve was typical of S type, and the cells highly expressed vimentin. **Conclusions** Primary culture of rabbit FLS by the improved explant culture method is successfully established. The method is simple and highly efficient. It provideds a new method for isolation of FLS.

【**Key words**】 Improved explant culture method; Rabbit fibroblast-like synoviocytes; Isolation; Culture

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以多关节滑膜炎为主要特征的慢性、系统性自身免疫性疾病,其确切的病因还不完全确定,该病主要侵犯全身各处关节,致残率很高,严重危害着人类健康。关节囊分为内外两层,外层为结缔组织,内层较疏松,称为滑膜,滑膜表面有 2 ~ 4 层扁平或

[作者简介]陈芳(1979 –),女,主要研究方向:细胞生物学及药效学研究,E-mail:wpcf401717@163. com。
[通讯作者]张宜(1966 –),男,主任药师,主要研究方向:药剂学及药物信息学研究,E-mail: hbpizy@tom. com。

立方形的上皮样结缔组织细胞,即为滑膜细胞,成纤维细胞样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)为滑膜中最主要的细胞,它参与滑膜增生和组织蛋白酶的分泌,与 RA 晚期关节损伤有着密切的关系[1,2]。关节滑膜是 RA 发病的靶器官,滑膜过度增生、增厚是造成关节损伤的主要病理基础之一[3,4]。因此,建立 FLS 的体外培养方法是探寻 RA 发病机制与体外筛选药物的重要手段。本研究应用改良组织块法,体外分离培养兔成纤维样滑膜细胞,并从细胞形态学、波形蛋白免疫荧光染色等方面予以鉴定,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

试剂及仪器	来源
DMEM 高糖培养基	Hyclone
胎牛血清	杭州四季青生物工程材料有限公司
胰酶	碧云天
青霉素-链霉素双抗	Hyclone
PBS	Hyclone
CCK-8	碧云天
小鼠 Vimentin 抗体	武汉博士德生物工程有限公司
倒置显微镜	日本奥林巴斯
CO_2 细胞培养箱	日本 SANYO 仪器 MCO-175
生物安全柜	海尔
倒置荧光显微镜	日本奥林巴斯
细胞计数器	香港基因生物医学科技有限公司
酶标分析仪	深圳雷杜生命科学股份有限公司

实验动物:健康新西兰大白兔 3 只,雌雄不限,体质量 2.5 ~ 3.0 kg,清洁级,由武汉市新洲区万千佳禾实验动物养殖场提供【SCXK(鄂)2011 - 0011】,本实验在广州军区武汉总医院医学实验科动物实验设施内进行【SYXK(鄂)2014 - 0082】。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

1.2 方法

1.2.1 成纤维样滑膜细胞的分离培养:新西兰大白兔一只,耳缘静脉注射空气处死。75% 酒精浸湿膝关节,去皮,1% 碘伏与 75% 酒精依次消毒,分离肌肉,露出膝盖骨,继续向下分离,找出关节囊,用手术剪分离关节囊的滑膜层和纤维层,取出平滑光亮的滑膜层组织,将滑膜组织放入含 100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素的 PBS 中。移入超净台中,用含 100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素的 PBS 洗 3 次,用灭菌滤纸吸掉组织上附着的水分,剪成 1 ~5 mm^3 大小,置入 3.5 cm 平皿中,每皿 7 ~ 8 块滑膜组织块,温箱内放置 5 min 后,加入 1 mL 含 100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素、10% 胎牛血清的 DMEM-H 培养液,放入 37℃、5% CO_2 培养箱内培养。培养 24 h 后每皿轻轻补加 1 mL 含 100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素、10% 胎牛血清的 DMEM-H 培养液,倒置显微镜下观察细胞的生长形态并照相。4 ~5 d 后进行首次换液,12 ~ 14 d 后细胞达到 90% 融合,用含 0.25% EDTA 的胰酶进行 1∶2传代。

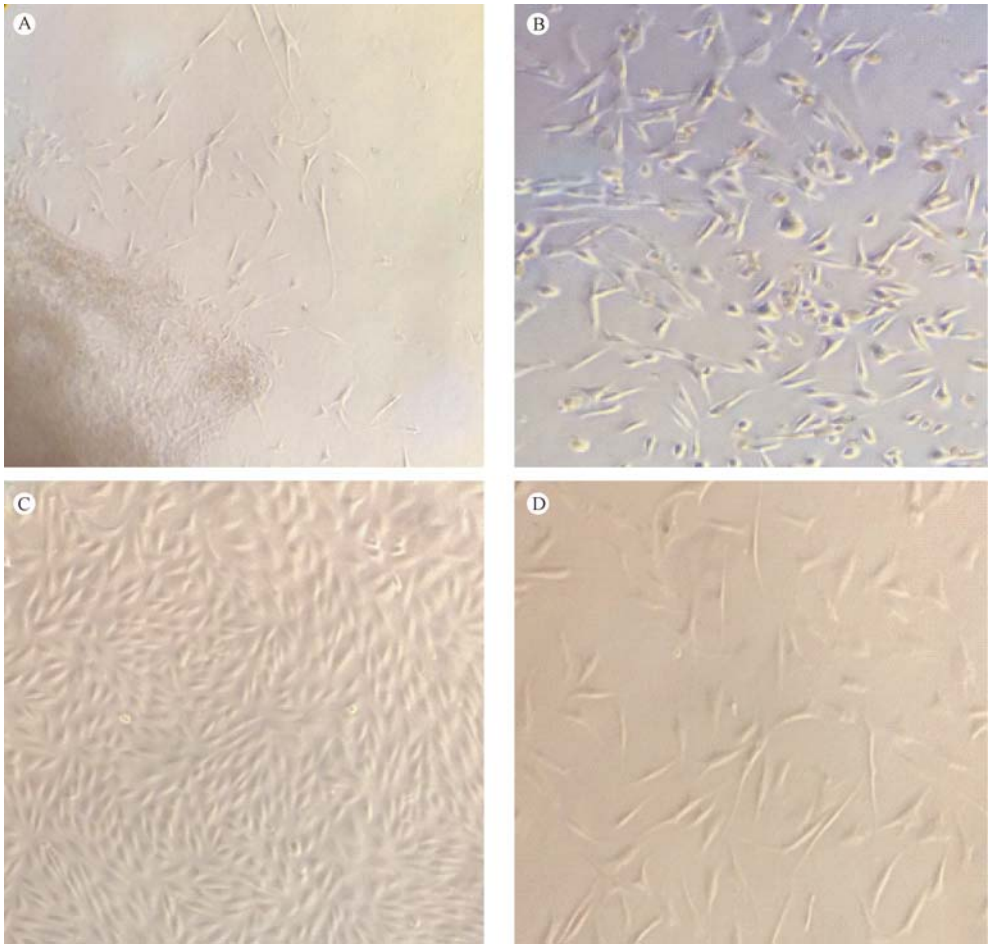
1.2.2 细胞生长曲线的测定:取第 3 代细胞,按 1×10^3/孔接种到 96 孔培养板内,每组设置 5 个复孔,放在 37℃、5% CO_2 培养箱内培养,分别于培养 1、2、3、4、5、6、7d 后随机取出一组,按照 CCK-8 试剂盒操作说明,在酶标仪上检测每孔 A 值,绘制细胞生长曲线。

1.2.3 细胞鉴定:取第 3 代细胞,按 1×10^5/孔接种含有爬片的 6 孔板中,细胞培养 48 h 后,吸出培养液,用 PBS 洗 2 遍,加入 4% 多聚甲醛固定液于 4℃固定 30 min。PBS 洗 3 次,0.5% Triton X-100 室温通透 20 min。PBS 浸洗玻片 3 次,每次 3 min,吸水纸吸干 PBS,在玻片上滴加山羊血清,室温封闭 30 min。吸水纸吸掉封闭液,不洗,滴加足够量的 vimentin 一抗(1∶100稀释)并放入湿盒,4℃孵育过夜。PBS 洗 3 次,吸水纸吸干爬片上多余液体,滴加稀释好的荧光(Cy3)标记羊抗小鼠 IgG(1∶100 稀释),湿盒中 20℃ ~37℃孵育 1 h,PBS 洗 3 次。滴加 DAPI 避光孵育 5 min,进行染核,PBST 5 min × 4 次洗去多余的 DAPI。用吸水纸吸干爬片上的液体,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,然后在荧光显微镜下观察采集图像。

2 结果

2.1 细胞形态观察

改良组织块贴壁接种 3 ~4 d 后,在光学显微镜下可见组织块周围有大量的亮点,少量细胞生长,有长梭形、圆形和不规则的多角形,但以长梭形为主(图 1A)。7 ~ 8 d 后,在光学显微镜下可见大量细胞生长,细胞形态以长梭形为主,仍然存在少数多角形和圆形细胞(图 1B)。9 ~ 10 d 后用 1 mL 枪头轻轻吸出组织块。15 ~ 20 d,细胞数量明显增多,达到 90% 融合,形态为以典型的长梭形为主(图 1C)。培养出来的细胞传至 P3 时,可见成纤维细胞样细胞多为长梭形且分布均匀(图 1D)。



注:A. 原代培养 3 ~4 d;B. 原代培养 7 ~8 d;C. 原代培养 15 ~20 d;D. 第 3 代细胞。

图 1　原代兔成纤维样滑膜细胞培养(×10)

Note: A. Primary culture for 3 -4 days; B. Primary culture for 7 -8 days; C. Primary culture for 15 -20 days; D. The third passage cells.

Fig. 1　Primary culture of rabbit fibroblast-like synoviocytes(×10)

2.2　免疫荧光观察

免疫荧光检测结果显示,改良组织块法分离得到的细胞表达中胚层组织特征性波形蛋白,用千屏图像采集系统分析细胞的阳性率达 98% 以上(图 2)。

2.3　细胞生长曲线

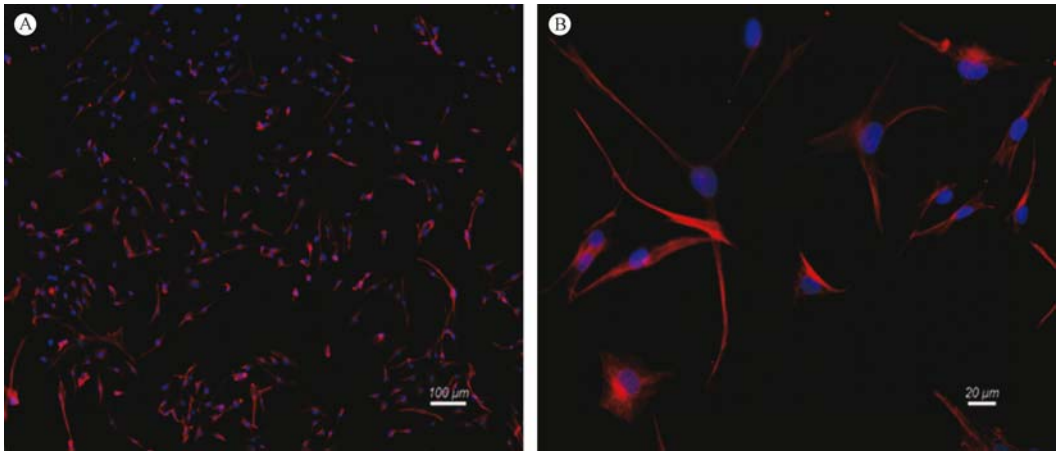


图 2　免疫荧光检测兔成纤维样滑膜细胞胞浆中波形蛋白表达情况(A ×10;B ×40)

Fig. 2　The expression of vimentin in rabbit fibroblast-like synoviocytes by immunofluorescence staining(A ×10; B ×40)

通过 CCK-8 法检测 P3 兔成纤维样滑膜细胞增殖能力，绘制出来的细胞生长曲线呈现典型的“S”形(图 3)。传代后第一天细胞数量有所减少，经过 2 d 潜伏期后在 4 d 进入对数生长期，随着培养时间的增加而增殖，第 7 天进入平台期后，细胞生长稳定，最后达到衰老。

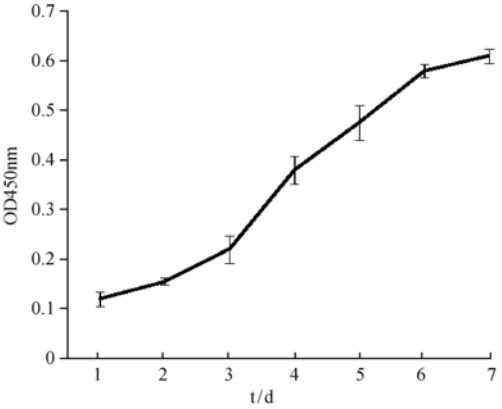


图 3 兔成纤维样滑膜细胞生长曲线

Fig. 3 The growth curve of rabbit fibroblast-like synoviocytes

3 讨论

原代细胞培养主要有机械分散法、组织块培养法和酶消化法。本实验在传统的组织块培养法的基础上进行改进，从新西兰大白兔膝关节中分离得到滑膜组织，剪成 1 ~ 5 mm^3 大小，在组织块置于 3.5 cm 培养皿之前，用灭菌滤纸吸掉组织上附着的水分，温箱内放置 5 min 后，加入 1 mL 含 100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素、10% 胎牛血清的 DMEM-H 培养液，放入 37℃、5% CO_2 培养箱内培养。培养 24 h 后每皿轻轻补加 1 mL 含 100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素、10% 胎牛血清的 DMEM-H 培养液，37℃，5% CO_2 条件下培养，3 ~ 4 d 后，在光镜下可见组织块边缘有很多圆形的亮点，长出少数细胞形态多为典型的长梭形，偶见多角形和圆形，15 ~ 20 d 即可达到 90% 融合，细胞形态以典型的长梭形为主。通过胰蛋白酶消化传代后，大量成纤维细胞样细胞均匀分布。本实验培养出的第 3 代兔成纤维样滑膜细胞呈现典型的“S”形，与文献报道一致[5]。传至 5 ~ 6 代后，细胞逐渐老化，7 ~ 8 代后活性几乎丧失，老化停止增殖，建议采用 3 ~ 4 代细胞进行相关实验。

成纤维样滑膜细胞细胞表面标记物有：尿二苷磷酸葡萄糖脱氢酶(uridine diphosphoglucose dehydrogenase, UDPGD)，钙粘蛋白-11(cadherin-11)，CD14，CD44，促衰变因子(decay accelerating factor, DAF/CD55/mAb67)，脯氨酸羟化酶、Thy-1/CD90，血管细胞粘附因子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1/CD106)，波形蛋白(vimentin)等，其中 vimentin、Thy-1/CD90、脯氨酸羟化酶是各种成纤维细胞的标记物[6-8]。实验选用最常用波形蛋白来鉴定成纤维样滑膜细胞。通过免疫荧光检测结果显示 P3 兔成纤维滑膜细胞表达 vimentin，与袁琴等人报道的相符[9]。

滑膜细胞主要包括巨噬样滑膜细胞和成纤维样滑膜细胞，其中主要为成纤维样滑膜细胞[10]。原代培养细胞多利用自然纯化法获得较高纯度的细胞，即利用成纤维样滑膜细胞可以贴壁生长、贴壁能力较强、增殖速度较快的特性，通过优势生长、多次消化传代来去除非成纤维型细胞和不健康的成纤维细胞，从而获得较高纯度的成纤维样滑膜细胞[11]。千屏图像采集系统分析免疫荧光检测结果发现 vimentin 的阳性率高达 98%，与丁娟等人分离的人成纤维样滑膜细胞 vimentin 阳性率相符[12]，说明通过多次传代可以得到高纯度的兔成纤维样滑膜细胞。

该实验采用改良组织块法成功分离培养出兔成纤维样滑膜细胞，与传统的组织块贴壁法相比，最大的优点就是大大缩短了组织块贴壁时间且操作简单，组织块置于培养皿之前进行了吸水处理后，只需要放置培养箱 5 min 后，就可以很牢固贴在培养皿上，之后加一半培养液即可，24 h 候后补加剩下的一半培养液就行了，而传统组织块法由于没有进行吸水处理，组织块贴壁时间需要 2 ~ 4 h，并且贴得不够牢固，稍微操作不当组织块就会漂浮起来，就很难长出细胞。但在采用改良组织块法分离培养兔成纤维滑膜细胞的过程中也有一些注意事项：(1)取材比较繁琐所耗时间过长，取材必须保证无菌操作下进行，实验前应进行严格消毒；(2)由于取材时间较长，最好在冰块上取材，这样温度恒定不丧失组织块细胞活性，取材后立即进行培养；(3)滑膜组织块的接种量是也是成功培养出兔成纤维滑膜细胞的关键，如一个 3.5 cm 培养皿加入 7 ~ 8 块剪碎的组织块即可，太多组织块，没有细胞生长的空间，太少组织块，细胞的量太少，满足不了后续实验。(4)由于滑膜位于关节囊的内层，在取材的过程中操作要特别仔细和小心，否则很容易取错滑膜，导致杂细胞过多，实验不成功。(下转第 85 页)

综述与专论

小胶质细胞极化在多发性硬化发病中的作用机制研究进展

张 明[1,2],刘江红[2],洪 浩[1], 尹琳琳[2]

(1. 中国药科大学药理学教研室,南京 210009;2. 首都医科大学宣武医院,北京 100053)

【摘要】 多发性硬化(multiple sclerosis,MS)是一种以中枢神经系统(central nervous system,CNS)炎症反应和髓鞘脱失为主要病理特征的自身免疫性疾病,具有青壮年高发、致残率高等特点,具体发病机制尚不明确。研究发现,MS 发病时 CNS 固有的免疫细胞—小胶质细胞向促炎态 M1 型极化,导致体内小胶质细胞 M1/M2 比率失衡,形成 CNS 促炎态的微环境,损害神经组织。受损神经组织进一步促进小胶质细胞极化,构成恶性循环,最终加重病情。小胶质细胞极化状态失衡是启动 MS 的关键病因,为此,本文将综述近年来国内外小胶质细胞在 MS 发病中作用机制的研究进展,旨在为进一步阐明 MS 发病机制及寻找潜在的治疗靶点提供借鉴。

【关键词】 小胶质细胞极化;多发性硬化;中枢炎症反应

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2016) 04-0079-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 – 7856. 2016. 04. 015

Advances in research of the role of microglia polarization in the mechanisms of pathogenesis of multiple sclerosis

ZHANG Ming[1,2], LIU Jiang-hong[2], HONG Hao[1], YIN Lin-lin[2]

(1. Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;
2. Department of Pharmacology, Xuan Wu Hospital of Capital Medical University, Beijing, 100053)

【Abstract】 Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system (CNS) characterized by demyelination and inflammation lesions. MS predominantly affects young adults with a high incidence of disability. However, the exact pathogenesis of MS is still not clear. Studies found that microglia polarization tending to pro-inflammatory M1-like state during the onset of MS, causing the M1/M2 ratio imbalance, forming pro-inflammatory microenvironment state, and which further leading to nervous tissue damage ultimately. Microglia polarization may be considered as the initiator of pathologic alterations by releasing pro-inflammatory cytokines and secondarily trigger the initial microglia response. Given the pivotal role of imbalanced microglia polarization in MS initiation, a critical review of microglia polarization is presented here, in order to elucidate the pathogenesis of MS and highlight the noteworthy candidate therapeutic targets for clinic treatment.

【Key words】 Microglia polarization; Multiple sclerosis; Central inflammatory reaction; Pathogenesis; Treatment

---

[基金项目]国家自然科学基金项目(81273497,81301208),北京市卫生系统高层次卫生技术人才 – 学科骨干(2014 – 3 – 052)。

[作者简介]张明(1989 –),女,硕士研究生,研究方向:神经药理学研究。电话:(010) 83198881,E-mail: mingzhangmingzhang@126. com。

[通讯作者]尹琳琳(1977 –),女,博士,副研究员,研究方向:中枢神经炎症的药物干预策略。电话:(010)83198881,E-mail: yinll913@126. com;洪浩(1962 –),男,博士,教授,研究方向: 神经与内分泌药理学。电话:(025)86185227,E-mail: haohongchina@hotmail. com。

近年研究发现,小胶质细胞几乎参与所有神经退行性疾病的病理过程,如多发性硬化(multiple sclerosis, MS)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、脑缺血等[1,2],并已成为新的研究热点和药物作用靶标。小胶质细胞是中枢神经系统中主要的免疫监视细胞,疾病发生时活化的小胶质细胞显著增多,且活化态的小胶质细胞可分泌大量促炎因子及神经毒物,如 IL-1β、TNF-α、IL-6、ROS、NO 等[3]。多发性硬化(MS)是一种主要累及中枢白质的慢性自身免疫性疾病,炎性浸润和髓鞘脱失是其主要病理特征,具体发病机制尚不明确,是目前导致青壮年肢体残疾的第二大诱因(仅次于脑外伤)。该病所致的认知、运动、感觉等功能障碍,给病人身体、心理造成极大的伤害,同时也给家庭、社会带来沉重的经济压力和心理负担。因此,深入探索 MS 的发病机制,发掘有效的药物作用靶点,缓解 MS 患者病情,减轻患者家庭和社会负担,具有广阔的应用前景。本文通过分析、归纳近年来国内外小胶质细胞在 MS 或者拟 MS 的实验动物模型—实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)中作用机制的报道,旨在为进一步阐明 MS 的发病机制及寻找潜在治疗靶点提供借鉴。

1 小胶质细胞的特征及其极化

Del Rio Hortega 在 1932 年首次报道 CNS 中小胶质细胞的存在,进一步研究发现,小胶质细胞相当于哺乳动物 CNS 中的巨噬细胞,约占 CNS 细胞总数的 12%,与外周巨噬细胞极其相似,但由于 CNS 独特的生理环境,使得小胶质细胞在形态和某些功能上与外周巨噬细胞之间存在明显差异[4]。

1.1 小胶质细胞的特征

小胶质细胞属 CNS 中固有的免疫细胞,也是中枢神经炎症反应的主要参与细胞,能够维持 CNS 内环境稳态,包括免疫调节、碎屑清除,损伤修复等过程,其在 MS 的发生、发展中扮演重要角色[5]。最新研究发现,CNS 的硬脑膜窦存在与外周淋巴管相通的运输淋巴细胞和脑脊液的淋巴管[6],否定了国际上一直公认的 CNS 独立于外周免疫系统而具有免疫豁免权的认识,这一发现提示外周淋巴细胞参与 CNS 的免疫反应。但在维持 CNS 免疫平衡的过程中,特别是在炎症反应早期,小胶质细胞仍占主导作用。

在生理状态下,小胶质细胞是 CNS 的"巡查员",时刻监测 CNS 环境变化,以应对体内外各种应激刺激[1]。一旦识别异物或有害刺激(如感染、创伤、毒性刺激等),小胶质细胞迅速活化。一方面,活化的小胶质细胞通过增殖、抗原呈递、分泌促炎因子等募集更多小胶质细胞或者外周巨噬细胞"抵达"病灶,引发炎症反应,并释放大量的炎症因子如 IL-1β、IL-6、IL-12、TNF-α 以及 ROS、NO、超氧化物、谷氨酸盐等神经物质,杀死病原微生物等异物[7]。此外,活化态的小胶质细胞吞噬能力大大增强,能够及时吞噬并清除体内外异物、碎屑等。另一方面,小胶质细胞还可通过自分泌或旁分泌途径[8],分泌抗炎产物 IL-4、IL-10 等,抑制促炎因子和神经物质的过度生成,分泌营养因子促进机体的自我修复,维持 CNS 正常的微环境[9]。随着研究的深入,人类对小胶质细胞的形态结构与相应功能的研究取得了实质性进展,将活化态的小胶质细胞主要分为两大亚型。

1.2 小胶质细胞的极化

1.2.1 经典活化态(classical activation, M1 型):诱导小胶质细胞呈 M1 型的信号分子很多[5],最经典的诱导剂是脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)[10],其次,外周血液中的活性成分如免疫球蛋白、补体等也可透过血脑屏障,刺激小胶质细胞向 M1 型极化。该极化过程主要通过 TLR 家族的 TLR4 受体介导[11,12],且小胶质细胞表达 TLR1 - TLR9,这些受体几乎能够识别所有的细胞和病毒刺激。活化后的小胶质细胞由静息态的分枝状转变为胞体变大、突起变少的阿米巴状活化态,且细胞表面的 MHC-II、清道夫受体、辅助刺激蛋白(CD40)的表达上调,增强其抗原呈递能力,激活辅助 Th1 细胞介导的免疫反应;其特异性的分子标志物 CD86、CD16/32、iNOS 等表达上调[5,16]。此外,M1 型小胶质细胞还释放一系列的促炎因子(IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23, TNF-α)、趋化因子、氧化还原分子(NADPH 氧化酶, 吞噬作用氧化酶,诱导型一氧化氮合酶)、NO 等参与机体的炎症反应[13-14],对神经系统造成一定程度损害的同时,还能及时杀死外周入侵的异物,或者清理机体自身的异常蛋白、碎屑,维持 CNS 相对稳定[5]。

1.2.2 可替代活化态(alternative activation, M2 型):Arg1、CD206、FIZZ-1、YM-1 是 M2 型小胶质细胞的标志物[15,16]。M2 型小胶质细胞在免疫调节、

炎症抑制、组织重构、血管再生中发挥重要作用。M2 型可分为若干亚型,当 IL-4、IL-13 联合使用,可以诱导具有长时程修复功能的 M2a 亚型,该亚型通过 IL-4 受体抑制 M1 型活化后的 NF-kB 信号通路。Fcγ 受体、TLRs 和免疫复合物诱导的 M2b 亚型高表达 IL-10,低表达 IL-12,同时,MHC-II、CD86 表达也会上调,说明 M2b 保留了刺激 T 细胞活化的能力,可能是小胶质细胞活化的中间态。糖皮质激素以及特定的抗炎因子 IL-10、TGF-β 诱导 M2c 亚型主要参与炎症反应下调后组织的修复与重构。其他细胞因子 IL-3、IL-21、IL-33,趋化因子 CCL2、CXCL4 等也能诱导小胶质细胞向 M2 型极化。M2 型小胶质细胞分泌抗炎因子(IL-10、IL-13、TGF-β)、神经营养因子(IGF-1、BDNF、VEGF、EGF)等减轻炎症反应,钝化促炎态细胞,促进损伤修复,保护神经元,从而维持中枢内环境的稳定[17]。M1、M2 是小胶质细胞活化的两个极端,在复杂的体内环境中,不排除活化中间态小胶质细胞的存在。值得一提的是,小胶质细胞是可塑性极强的多功能细胞,其活化态并不是始终固定在某一种极化态,而是处于不断的动态变化中。研究显示,在一些静息态或者分支杆菌感染的巨噬细胞中可以检测到 M2 型的主要标志物之一 -Arg1 的表达[18]。也有研究发现,M2b 亚型可以转化为 M1 和 M2a/b 的过渡态[19]。这些研究提示,小胶质细胞 M1 和 M2 型之间存在相互转化的可能性,在 M1 型小胶质细胞过度活化的 CNS 退行性疾病中,促进 M1 型小胶质细胞向 M2 型的转化,或者促进小胶质细胞向抗炎态 M2 型的极化,维持 M1/M2 相对平衡,是一个潜在的药物作用靶点。

2 小胶质细胞极化与 MS 病变

MS 是一种主要累及中枢白质的自身免疫性疾病[20]。MS 患者尸检发现:中枢白质病灶周围有大量淋巴细胞和活化的巨噬细胞浸润,提示 MS 病变与中枢炎症反应密切相关。

2.1 MS 病变与中枢炎症反应

生理状态下,炎症是机体及时应对体内外异物的侵袭、维持内环境动态平衡的一种重要自我保护机制。而病理状态下,长期、慢性炎症反应诱导大量小胶质细胞向促炎态 M1 型极化,并抑制小胶质细胞向 M2 型极化,破坏 M1/M2 的相对平衡[21],生成大量的神经毒物,损伤神经组织,破坏血脑屏障,使外周的免疫细胞、蛋白、补体等大量涌入中枢,加剧 CNS 炎症反应,使病情恶化,这一现象可能是复发缓解型多发性硬化(relapsing-remitting multiple sclerosis, RRMS)患者病情呈缓解-复发且逐渐加重的主要病理机制。M2 型小胶质细胞缺失导致损伤的组织不能及时被修复或者清除,从而诱发更大面积的次发损伤,且不利于神经营养因子 IGF-1、BDNF 等的生成。因此,调节小胶质细胞的极化状态,有助于缓解 MS 患者的病情。

2.2 MS 病变与小胶质细胞极化

MS 患者尸检样本 CNS 病灶可见大量活化的小胶质细胞,细胞内 iNOS、COX2 的表达显著增高,进而释放大量的神经毒物 NO、ROS 等;实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)动物模型研究发现,CNS 病变周围的小胶质细胞增殖及其溶酶体活性均增强[22]。中枢浸润的活化 Th1 细胞分泌的 IFN-γ 是 M1 型细胞的强效诱导剂,在 MS 炎症反应的初始阶段,小胶质细胞倾向于向 M1 型极化,并抑制其向 M2 型极化。在 MS 病人外周血中,可以检测到相应炎症因子表达的上调。此外,M1 型小胶质细胞分泌的神经毒性因子可抑制少突胶质细胞前体细胞增殖和向成熟少突胶质细胞的分化,引发髓鞘脱失[23]。在 MS 病人,促进形成 M2 型极化的脑内微环境有助于缓解病情。例如,用于治疗 RRMS 的药物-格拉替雷通过诱导 Th1 向 Th2 转变,促进抗炎相关因子的表达,从而治疗疾病。因此,抑制小胶质细胞向 M1 型极化,促进其向抗炎态 M2 型极化,是干预 MS 病变的一个有效的靶标。

3 小结与展望

MS 是一种极其复杂的神经退行性疾病[24],现有的研究尚不能确定 MS 病变与炎症反应的因果关系。但能够肯定的是,适度的抑制小胶质细胞向 M1 型极化,并促进其向 M2 型极化,维持脑内 M1/M2 比率的相对平衡,能够减轻 MS 病人的临床症状,延缓病情的发展。其可能的作用机制如下:(1)钝化促炎态 M1 型小胶质细胞,减少 NO、ROS 等神经毒物以及促炎因子生成,减轻神经损伤;(2)促进 M2 型小胶质细胞活化,释放大量的抗炎因子,对抗炎症因子的神经毒性作用,减少 CNS 损伤;再者,增强小胶质细胞/巨噬细胞的吞噬能力,及时清除死亡的细胞或者碎屑[25];(3)M2 型小胶质细胞释放的

IGF1、PDGF-α、BDNF 等营养因子以及 TGF-β、IL10，能够促进损伤修复、再生，保持神经细胞功能的完整性[26]。值得一提的是，M2 型小胶质细胞/巨噬细胞同样也是一把双刃剑，过度活化将引起组织纤维化、促进瘢痕形成[11]；Arg1 催化的代谢产物—聚胺生成过多时，将募集大量巨噬细胞、诱发炎症反应。因此，小胶质细胞向 M2 型极化并不是在任何环境下都是有益的，如何适度调节其极化程度，尚需对活化态小胶质细胞的功能特征进行更深入的研究。

参考文献：

[1] Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease—a double-edged sword [J]. Neuron, 2002, 35(3): 419 – 432.

[2] Centonze D, Muzio L, Rossi S, et al. The link between inflammation and neurodegeneration in MS [J]. Cell Death Differenti, 2010, 17(7): 1083 – 1089.

[3] Chhor V, Le Charpentier T, LebonS, et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia *in vitro*[J]. Brain Behav Immun, 2013, 32: 73 – 81.

[4] Michael W. Salter, Beggs S. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS [J]. Cell, 2014, 158(1): 15 – 17.

[5] Garden GA, Möller T. Microglia biology in health and disease [J]. Neuroimmune Pharmacol, 2006, 1(2): 127 – 137.

[6] Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels [J]. Nature, 2015, 523(7560): 337 – 341.

[7] Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms [J]. Nat Rev Neurosci, 2007, 8(1): 57 – 69.

[8] Shin WH, Lee DY, Park KW, et al. Microglia expressing interleukin-13 undergo cell death and contribute to neuronal survival *in vivo* [J]. Glia, 2004, 46(2):142 – 152.

[9] Xin J, Wainwright DA, Mesnard NA, et al. IL-10 within the CNS is necessary for CD4 + T cells to mediate neuroprotection [J]. Brain Behav Immun, 2011, 25(5): 820 – 829.

[10] Rivest S. Molecular insights on the cerebral innate immune system [J]. Brain Behav Immun, 2003, 17(1): 13 – 19.

[11] Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states [J]. Br J Pharmacol, 2015: 2 – 16.

[12] Burguillos MA, Svensson M, Schulte T, et al. Microglia-secreted galectin-3 acts as a Toll-like receptor 4 ligand and contributes to microglial activation [J]. Cell Rep, 2015, 2(12): 1626 – 1638.

[13] von Bernhardi R, Eugenín-von Bernhardi L, Eugenín J. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration [J]. Front Aging Neurosci, 2015, 7: 124.

[14] Li Cao, Cheng He. Polarization of macrophages and microglia in inflammatory demyelination [J]. Neurosci Bull, 2013, 29(2): 192 – 194.

[15] David S, Kroner A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury [J]. Nature Rev Neurosci, 2011, 12(7): 391 – 395.

[16] 方雪，谭卫星，何成，等. MicroRNA 调控小胶质细胞极化在神经系统疾病中的作用和机制研究进展 [J]. 生理学报，2015，67(1): 33 – 37.

[17] Ajami B, Bennett JL, Krieger C, et al. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life [J]. Nat Neurosci, 2007, 10(12): 538 – 1543.

[18] Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development [J]. Science, 2011, 333(6048): 1456 – 1458.

[19] Lisi L, Stigliano E, Lauriola L, et al. Proinflammatory-activated glioma cells induce a switch in microglial polarization and activation status, from a predominant M2b phenotype to a mixture of M1 and M2a/B polarized cells [J]. ASN Neuro, 2014, 6(3): 171 – 183.

[20] Breij EC, Brink BP, Veerhuis R, et al. Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis [J]. Ann Neurol, 2008, 63(1): 421 – 427.

[21] Mills CD. M1 and M2 Macrophages: oracles of health and disease [J]. Crit Rev Immunol, 2012, 32(6): 476 – 477.

[22] Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism [J]. Progress Neurobiol, 2005, 76 (2): 79 – 81.

[23] Rawji KS, Yong VW. The benefits and detriments of macrophages/microglia in models of multiple sclerosis [J]. Clin Dev Immunol, 2013, 2013: 948976.

[24] Compston A, Coles A. Multiple sclerosis [J]. Lancet, 2008, 372: 1502 – 1517.

[25] Neumann H, Kotter MR, Franklin RJM. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration [J]. Brain, 2009, 132(Pt 2): 288 – 295.

[26] Miron VE, Boyd A, Zhao JW, et al. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination [J]. Nat Neurosci, 2013, 16(9): 1211 – 1218.

〔修回日期〕2015-12-29

继续教育

基于从业人员培训的实验动物教学改革

师长宏,张 海, 张彩勤, 赵 勇, 白 冰

(第四军医大学实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 按照国家相关法规制度将实验动物从业人员培训纳入到实验动物教学改革中。通过调整培训内容,完善授课方式和典型动物模型范例的应用实现培训模式的转变;采取基础理论加实践操作考核的方式,增强学员独立思考和动手操作的能力;通过课堂讲授、实验教学、质量考核和跟踪调查四个方面实现对对培训教学质量的过程评估,从而建立了基于从业人员培训的实验动物学教学改革。

【关键词】 实验动物学;从业人员;培训;教学改革

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2016) 04-0083-03

doi: 10.3969.j.issn.1671 -7856. 2016.04.016

Teaching reform of laboratory animal science based on the training of practitioners

SHI Chang-hong, ZHANG Hai, ZHANG Cai-qin, ZHAO Yong, BAI Bing

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

【Abstract】 According to relevant national laws and regulations, practitioner training was included into laboratory animal science teaching reform. By adjusting the training content and teaching method and use of animal models of typical human diseases, the transformation of training mode was realized and improved. By the assessment of basic theory in combination with practical operation, the thinking ability and hands-on skill of the practitioners are much improved. Through classroom instruction, experimental teaching, quality assessment and tracking survey, the evaluating process of the training quality of training teaching is performed. Therefore, the teaching reform of the laboratory animal science based on the training of practitioners is established.

【Key words】 Laboratory animal science; Practitioners; Training; Teaching reform

实验动物学是研究实验动物和动物实验的一门边缘性、基础性、综合性学科,是生命科学研究的基础和重要支撑条件[1,2]。实验动物学在我国起步较晚,涉及医学、农学、药学和生命科学等不同领域。各个院校人才培养需求不同,教学水平层次不齐,课程设置缺乏统一标准,教学模式尚处于摸索阶段,尚未形成科学的课程体系。国家颁布实施的《实验动物管理办法(试行)》、《实验动物许可证管理办法》和军队颁布实施的《军队从事实验动物科技人员的培训和考核管理办法(试行)》都明确要求从事动物实验工作的人员必须参加实验动物学的专业培训,完成相应的继续教育课程[3]。基于此,我教研室前期在进行实验动物学教学改革的基础上,应用推广从业人员培训机制,激发学员学习兴趣,提高学员实验动物学相关的综合素质和创新能力,满足多样化人才培养的需求[4]。教学改革的内容主要涉及培训内容的选择、授课方式的调整、典型案例的应用、考核方式的改革和评价体系的完善

[基金项目]陕西省实验动物科技平台建设基金资助项目(编号:2012FWPT-03)。

[通讯作者]师长宏(1973 -),男,博士,教授,研究方向:肿瘤动物模型。Email: changhong@fmmu.edu.cn。

五个方面。

1 培训内容的选择

按照国家《实验动物管理办法(试行)》和《实验动物许可证管理办法》的相关要求,在《实验动物学》教学中,加入动物实验从业人员专业培训内容,选择《北京市实验动物从业人员上岗培训教材》,重点宣传国家有关实验动物的法规制度,介绍实验动物的管理、常规动物实验技术和实验动物福利伦理,在此基础上根据培训人员的需求,每年设定相应的专题,邀请实验动物学科不同领域专家集中进行讲座授课。并积极收集学员意见和建议及时更新授课内容,紧跟实验动物学科发展前沿。

2 培训授课方式

依托教研室实验动物人才、技术和资源优势,结合实际工作需求,每月在动物中心举办培训班一期,主要面向在校学员、企业、和大专院校的科技人员,凡涉及动物实验均必须参加培训。授课采用 PPT 进行,理论课安排 2 个学时,依据学员知识掌握的情况,再安排 2 个学时在动物中心内参观见学,熟悉实验动物的饲养管理和动物实验的具体流程,掌握动物实验室内工作的 SOP。对于计划进入屏障系统开展动物实验的人员,详细介绍设施内部的具体工作流程,熟悉人流、物流和动物流的进出次序,同时介绍设施内应急预案模式,确保每个学员的规范化操作,确保实验动物设施的安全运转。

3 典型案例的应用

教研室围绕动物模型研究,建立教学兴科研,科研促教学发展的教学-科研互利模式。先后建立了 20 多种可用于人类疾病发病机制研究和临床药物筛选的动物模型[5,6],这些模型标准化程度高,与临床疾病具有良好的相似性,稳定可靠,已成为示范化教学的典型案例。比如大鼠应激性胃溃疡模型、小鼠肝癌皮下移植模型和豚鼠过敏模型等。同时,教研室建立了一系列规范化的动物实验检测技术,包括猫降压实验、小鼠急性毒性实验和家兔热源实验等。将这些实验模型成功应用到培训操作教学中,介绍模型的制备原理,制备方法和实际应用,并指导学员实际操作。标准化的动物模型和规范化的动物实验检测技术使枯燥的实验动物教学与人体疾病直接联系起来,激发了学员的学习兴趣,为提高医学实验动物学教学质量提供了良好的技术支撑,实现了教学与科研互利发展的良好局面。

4 考核方式

传统的实验动物学培训考核大多选择理论考试,这种考核方式限制了学员独立思考和动手操作能力的提高。我们实际教学中将考核内容分为基础理论和实践操作两部分,理论考核主要是通过填空、选择、名词解释和简述形式进行,占总成绩的 70%;实践操作部分,主要是对学员掌握动物实验的基本技能进行考核,占总成绩的 30%。据此,教研室建立了专业培训教室,分为两个单元,一是理论课教室,配备多媒体授课系统,考核学员对实验动物学基础理论的掌握,基础法规制度的贯彻落实;二是动物实验操作教室,主要是对学员实验操作技能进行培训,重点掌握常用动物实验技术与方法,考核学员的实际操作应用能力。教研室引进了北京市实验动物从业人员培训考核系统,在理论课多媒体教室安装了 30 套电脑,通过人机对话的方式,完成理论考核。实验操作主要是完成大小鼠的抓取、固定、麻醉和体液的采集等基本技术方法的培训和考核。

5 培训的评价与完善

注重教学的过程管理,从课堂讲授、实验教学、质量考核及跟踪调查四个方面对教学质量进行评估,制定了实验动物学师资培训规划和考核办法,设计了教员课堂授课质量评分表,涉及备课情况、课堂讲述、语言表达、板书课件的应用、师生互动、为人师表以及课堂反馈等内容,分析查找影响教学质量的重要因素,有针对性的加以改进、调整和优化,促进课程教学质量的调整提高。在学员中进行问卷调查,对教学效果进行初步评价,根据学员反馈的意见和建议及时完善现有的培训模式。分析查找影响教学质量的重要因素,有针对性的加以改进、调整和优化,促进课程教学质量的调整提高。

该教学改革自推广应用以来,已在陕西省举办 8 期实验动物从业人员培训班,采用常规培训加专题讲座,培训专业技术人员 700 多名。教研室分别在西安、兰州和乌鲁木齐三地的部队单位推广应用该培训模式,各举办培训班 2 期,培训军队实验动物从业人员 1000 余名。此项教学改革是对传统实验动物教学的有效补充和完善,激发了学员的学习兴

趣,增强了实验动物学教学的应用性。

参考文献:

[1] 田枫, 康爱君, 郑振辉. 不同层次需求的实验动物学教学特点[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(9): 78-82.

[2] 王大鹏, 周丽君. 实验动物学与转化医学[J]. 转化医学杂志, 2013, 12(6):382-394.

[3] 师长宏, 张海, 王四旺,等. 四阶段四层次医学实验动物学教学模式的建立[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(26): 5160-5162.

[4] 师长宏, 张海, 王四旺, 等. 三维医学实验动物学教学体系的建立[J]. 基础医学教育, 2012, 14(4): 289-290.

[5] 王芳. 医学实验动物学实验教学与科研的有机结合[J]. 基础医学教育, 2013, 5(11): 1016-1017.

[6] 江鹰, 张彩勤, 师长宏. 科研模型促实验动物学教学的探索[J]. 中华高血压杂志, 2015, 23(2): 528-529.

〔修回日期〕2015-11-16

(上接第 40 页)

积,心肌严重纤维化,导致心肌顺应性下降,形成不可逆的心力衰竭。

参考文献:

[1] Kim TT, Dyck JR. Is AMPK the savior of the failing heart?[J]. Trends Endocrinol Metab, 2015, 26(1): 40-48.

[2] 刘宝辉, 李明凯, 罗晓星, 等. 心力衰竭实验动物模型构建方法研究[J]. 中国心血管杂志, 2013, 18(3): 233-236.

[3] 芦玲巧, 曾翔俊, 郝刚. 大鼠心力衰竭模型的构建与鉴定[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(8): 22-25.

[4] 焦宏, 王晓玲, 陈彦静, 等. 参麦注射液对肥厚心肌大鼠左心室乳头肌电活动的影响[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(15): 2956-2959.

[5] deAlmeida AC, van Oort RJ, Wehrens XH. Transverse aortic constriction in mice[J]. J Vis Exp, 2010, 38: 1729.

[6] 廉洪建, 冯玄超, 啜文静, 等. 创伤较小的小鼠主动脉弓缩窄术的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(2): 42-45.

[7] Hall C. NT-ProBNP: the mechanism behind the marker[J]. J Cardiac Fail, 2005, 11(5): 81-83.

[8] Grewal J, McKelvie R, Lonn E, et al. BNP and NT-proBNP predict echocardiographic severity of diastolic dysfunction[J]. Eur J Heart Fail, 2008, 10(3): 252-259.

[9] McDonagh TA, Holmer S, Raymond I, et al. NT-proBNP and the diagnosis of heart failure: a pooled analysis of three European epidemiological studies[J]. Eur J Heart Fail, 2004, 6(3): 269-273.

[10] Gajarsa JJ, Kloner RA. Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities[J]. Heart Failure Rev, 2011, 16(1): 13-21.

[11] Wollert KC, Drexler H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis[J]. Heart Fail Rev, 2002, 7(4): 317-325.

[12] Liu L, Wang C, Sun D, et al. Calhex231 ameliorates cardiac hypertrophy by inhibiting cellular autophagy in vivo and in vitro[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 36(4): 1597-1612.

〔修回日期〕2016-01-12

(上接第 78 页)

参考文献:

[1] 邹仲之,等. 组织学与胚胎学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2004:54-55.

[2] Turner JD, Filer A. The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis pathogenesis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2015,27(2):175-182.

[3] 张晓明,陈飞虎,黄学应,等. 佐剂性关节炎大鼠成纤维样滑膜细胞的体外培养与鉴定[J]. 解剖学杂志,2007,30(6):770-773.

[4] 谈益芬,唐艳丽,王胜香,等. 中药组方 NDRF 对佐剂性关节炎家兔滑膜 MMP-3、VEGF 分子及其 mRNA 的影响[J]. 中国免疫学杂志,2014,30(1):57-59.

[5] 秦苏萍,孙德旭,李慧,等. CIA 大鼠滑膜成纤维细胞的原代培养及鉴定[J]. 免疫学杂志, 2014, 30(12):1096-1099.

[6] 蔡文虹,孙保东,张宝凤,等. 两种方法分离培养类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞的比较[J]. 中国当代医药, 2012, 19(21):13-19.

[7] Zong M, Lu T, Fan S, et al. Glucose-6-phosphate isomerase promotes the proliferation and inhibits the apoptosis in fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2015,17(1):100.

[8] RosengrenS, BoyleDL, FiresteinGS. Acquistion, culture and phenotyping of synovial fibroblasts[J]. Mehods Mol Med,2007; 135:365-375.

[9] 袁琴,阚卫兵,宋朋飞,等. 大鼠膝骨关节炎滑膜细胞原代培养[J]. 现代生物医学展,2012,12(2):253-290.

[10] 蒋明,朱立平,林孝义. 风湿病学[M]. 北京:科学出版社, 1995:774-775.

[11] 司徒镇强,吴军正,等. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版西安公司,2009:65-67.

[12] 丁娟,王志军, 董晓薇,等. RA 滑膜成纤维细胞的原代培养及鉴定[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(36):7008-7011.

〔修回日期〕2016-01-13

ICS 65.020.30
B 44

中 国 实 验 动 物 学 会 团 体 标 准

T/CALAS 1－2016

实 验 动 物　从 业 人员 要 求

Laboratory Animals-Requirement for Laboratory Animal Practitioner

2015－12－25 发布　　2016－01－01 实施

中国实验动物学会　发布

标准专栏

前 言

本标准按 GB1.1 – 2009 给出的规则编写。

本标准制定的目的是规范实验动物从业人员分类,加强实验动物从业人员岗位和等级技能培训及资格评定工作。

本标准附录为资料性附录。

本标准由全国实验动物标准化技术委员会(SAC/TC281)提出

本标准由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会技术归口。

本标准由全国实验动物标准化技术委员会负责组织起草。

本标准起草单位:中国医学科学院医学实验动物研究所、中国农业大学、中国医科大学、首都医科大学、南京医科大学。

本标准主要起草人:秦川、赵德明、郑志红、魏强、王钜、陈振文、肖杭、孔琪。

本标准于 2016 年 1 月首次发布。

实验动物 从业人员要求

1 范围

本标准规定了实验动物从业人员的分类、资格要求、资格培训及评定、管理要求等的通用要求。

本标准适用于实验动物从业人员的资格评定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改(不包括堪误的内容)或修订版均不适用于本标准。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

3 术语和定义

3.1 实验动物从业人员 laboratory animal practitioner

从事实验动物或动物实验相关工作的各类人员,包括研究人员、技术人员、管理人员、实验动物医师、辅助人员、阶段性从业人员。

3.2 资格培训 certification training

实验动物从业人员为获得本标准中的各类从业人员相关资格进行的专业培训。

3.3 资格证书 certificate

实验动物从业人员经过实验动物相关机构资格培训,经考试合格后,获得的资格证明。

3.4 实验动物技术人员 laboratory animal technician

从事实验动物饲育、动物实验技术工作的人员。

3.5 实验动物管理人员 manager of laboratory animal resource

从事实验动物和动物实验设施运行及资源管理工作的人员。

3.6 实验动物医师 laboratory animal veterinarian

从事实验动物疾病预防、诊断和治疗,护理和动物福利相关工作的人员。

3.7 实验动物研究人员 laboratory animal researcher

从事实验动物科学、技术研究工作的人员。

3.8 实验动物辅助人员 laboratory animal assistant support practitioner

从事实验动物设施、设备运行维护、相关产品生产、运输、经营和废弃物处理等工作的人员。

3.9 实验动物阶段性从业人员 laboratory animal phased practitioner

工作中的某个阶段(通常为一年以内)从事实验动物或动物实验的医师、进修生等人员。

4 从业人员分类

根据实验动物从业人员所从事工作的性质分

为以下六类：

4.1 实验动物技术人员系列

4.1.1 实验动物助理技师(assistant laboratory animal technician, ALAT)

4.1.2 实验动物技师(laboratory animal technician, LAT)

4.1.3 实验动物技术专家(laboratory animal technologist, LATG)

4.2 实验动物管理人员系列

4.2.1 实验动物管理师(manager of laboratory animal resource, MAR)

4.2.2 实验动物高级管理师(senior manager of laboratory animal resource, SMAR)

4.3 实验动物医师系列

4.3.1 实验动物助理医师(assistant laboratory animal veterinarian, ALAV)

4.3.2 实验动物医师(laboratory animal veterinarian, LAV)

4.3.3 实验动物高级医师(senior laboratory animal veterinarian, SLAV)

4.4 实验动物研究人员系列

4.4.1 实验动物初级研究员(junior laboratory animal researcher, JLAR)

4.4.2 实验动物中级研究员(laboratory animal researcher, LAR)

4.4.3 实验动物高级研究员(senior laboratory animal researcher, SLAR)

4.5 实验动物辅助人员(laboratory animal assistant support practitioner, LASP)

4.6 实验动物阶段性从业人员(laboratory animal phased practitioner, LAPP)

5 从业人员资格要求

5.1 基本要求

5.1.1 遵守实验动物相关法律法规。

5.1.2 受过相应的专业教育和培训。

5.1.3 符合实验动物从业人员健康要求。

5.1.4 获得实验动物从业人员岗位证书。

5.2 工作年限及考试要求

5.2.1 实验动物技术人员系列

5.2.1.1 实验动物助理技师，需具备下列条件之一：

a)具有中专及以下学历，从事实验动物领域工作 2 年及以上，并通过 A-1 类考试；

b)具有大专及以上学历，通过 A-1 类考试。

5.2.1.2 实验动物技师，需具备下列条件之一：

a)获得实验动物助理技师证书后，继续从事实验动物领域工作 2 年及以上，并通过实验动物技术人员 A-2 类考试；

b)具有生物、医学类相关专业本科学历，从事实验动物领域工作半年及以上，通过实验动物技术人员 A-2 类考试。

5.2.1.3 实验动物技术专家，需具备下列条件之一：

a)具有大专及以上学历，获得实验动物技师证书后，继续从事实验动物领域工作 2 年及以上，并通过实验动物技术人员 A-3 类考试；

b)具有生物类、医学类相关专业研究生学历(学位)，从事实验动物领域工作 2 年及以上，并通过实验动物技术人员 A-3 类考试。

5.2.2 实验动物管理人员系列

5.2.2.1 实验动物管理师，需具备下列条件之一：

a)具有本科学历，从事实验动物领域工作 5 年及以上，其中从事实验动物管理工作 3 年及以上，并通过实验动物管理人员 B-1 类考试；

b)具有管理类、生物类、医学类相关专业研究生学历(学位)，从事实验动物领域工作 3 年及以上，其中从事实验动物管理工作 2 年及以上，并通过实验动物管理人员 B-1 类考试；

5.2.2.2 实验动物高级管理师：具有本科及以上学历，获得实验动物管理师证书后，继续从事实验动物管理工作 3 年及以上，并通过实验动物管理人员 B-2 类考试。

5.2.3 实验动物医师系列

5.2.3.1 实验动物助理医师：具有兽医学相关专业专科以上学历的人员，从事实验动物工作 1 年以上，通过实验动物医师 C-1 类考试。

5.2.3.2 实验动物医师，需具备下列条件之一：

a) 获得实验动物助理医师证书或国家执业助理兽医师证书后，从事实验动物工作 2 年以上，通过实验动物医师 C-2 类考试；

b)具有兽医学相关专业本科及以上学历或获得国家执业兽医师证书后，从事实验动物工作 1 年以上，通过实验动物医师 C-2 类考试；

5.2.3.3 实验动物高级医师：获得实验动物医师证书后，继续从事实验动物工作 3 年以上，通过实验动

物医师 C-3 类考试。

5.2.4 实验动物研究人员系列

5.2.4.1 实验动物初级研究员:获得国家认可的研究实习员或其他等同水平的职称后,通过实验动物研究人员 D-1 类考试;

5.2.4.2 实验动物中级研究员:获得实验动物初级研究员证书后,继续从事实验动物工作 2 年以上,通过实验动物研究人员 D-2 类考试;

5.2.4.3 实验动物高级研究员:获得实验动物中级研究员证书后,继续从事实验动物工作 2 年以上,通过实验动物研究人员 D-3 类考试;

5.2.5 实验动物辅助人员,需具备下列条件:

a) 经过实验动物基础知识及基本技能培训;

b) 获得所从事职业的基本技能资格证书。

5.2.6 实验动物阶段性从业人员,需具备下列条件:

a) 经过实验动物基础知识及基本技能培训;

b) 获得所从事职业的阶段性从业人员资格证书。

* 5.2 中的工作年限可累积,考试分类见附录 1。

5.3 能力要求

5.3.1 实验动物技术人员系列

5.3.1.1 实验动物助理技师:掌握实验动物学及动物福利基础知识,实验动物饲养基本技能,了解实验动物健康、疾病预防与控制、设施管理、动物实验的准备等基本技能。

5.3.1.2 实验动物技师:掌握实验动物的繁育和动物实验基本操作技术,熟悉实验动物健康、疾病预防与控制、动物福利、设施管理、疾病模型动物基本概念和特征、饲育环境的检测技术等知识。

5.3.1.3 实验动物技术专家,需具备下列能力要求:

a)掌握实验动物科学基础理论;

b)掌握实验动物各品系饲育、保种技术、生物学特性和常用动物实验操作技术;

c)熟练掌握和运用实验动物健康、疾病预防与控制、动物福利、设施管理等知识,并具有解决工作中遇到实际问题的能力;

d)具有一定的组织、管理与培训实验动物助理技师和技师的能力。

5.3.2 实验动物管理人员系列

5.3.2.1 实验动物管理师,需具备下列能力要求:

a)掌握实验动物科学的基础知识和常规实践操作技能;

b)掌握实验动物福利、伦理和法规相关知识;

c)掌握实验动物设施运行管理与维护的基本知识和基本技能,并具有解决常见问题的管理能力;

d)具有管理实验动物和技术人员及实验动物环境设施的能力,有能力对实验动物从业人员进行培训。

5.3.2.2 实验动物高级管理师,需具备下列能力要求:

a)能够运用实验动物科学的理论知识和实践操作技能组织管理实验动物繁育、保种、育种、生产供应、动物实验及实验动物质量控制等;

b)掌握并运用实验动物福利、伦理和法规相关知识进行相应的管理工作;

c)熟练掌握实验动物设施运行管理与维护知识和技能,并具有解决实际问题的组织、管理能力;

d)有能力对实验动物从业人员进行相关的培训、人员调配及组织实施;

e)能够承担或参与实验动物相关课题研究。

5.3.3 实验动物医师系列

5.3.3.1 实验动物助理医师,需具备下列能力要求:

a)了解实验动物学及相关学科基础知识;

b)了解实验动物福利、伦理和法规相关知识;

c)熟悉实验动物疾病的诊断、监测、预防和治疗;

d)掌握实验动物保定和操作,安死术以及其他方法。

5.3.3.2 实验动物医师,需具备下列能力要求:

a)掌握实验动物学及相关学科基础知识;

b)掌握实验动物福利、伦理和法规相关知识;

c)掌握实验动物疾病的诊断、监测、预防、治疗;

d)监督指导实验动物保定和操作,安死术以及其他方法的监督和指导。

5.3.3.3 实验动物高级医师,需具备下列能力要求:

a)掌握实验动物学及相关学科基础知识;掌握实验动物福利、伦理和法规相关知识;对实验动物疾病进行诊断、监测、预防、治疗、处置及相应的组织实施;

b)监督指导实验动物相关操作;

c)为实验动物研究人员提供专业指导及培训。

5.3.4 实验动物研究人员系列

5.3.4.1 实验动物初级研究员,需具备下列能力要求:

a)了解实验动物一般生物学特性、饲养、微生物学、疾病学等基本相关知识;

b)了解实验动物福利、伦理和法规相关知识;

c)掌握动物实验基础理论知识及实验操作技术。

5.3.4.2 实验动物中级研究员,需具备下列能力要求:

a)掌握实验动物一般生物学特性、饲养、微生物学、疾病学等基本相关知识;

b)掌握实验动物福利、伦理和法规相关知识;

c)掌握动物实验基础理论知识及实验操作技术。

D)具有参与完成实验动物相关课题研究的能力。

5.3.4.3 实验动物高级研究员,需具备下列能力要求:

a)熟练掌握实验动物学及相关学科基础知识,了解实验动物科学发展的前沿知识,科学地开展实验动物及动物实验研究;

b)具有独立承担实验动物相关课题研究的能力,能够独立进行科研设计、课题实施,并为实验动物研究人员提供专业指导及培训等。

5.3.5 实验动物辅助人员:熟练掌握相关专业技术领域知识和技能并具有解决实际问题的实践能力。

5.3.6 实验动物阶段性从业人员,需具备下列能力要求:

a) 了解实验动物基础知识;

b) 掌握所从事职业的基本技能。

6 资格培训及评定

6.1 资格培训

6.1.1 培训机构:各级实验动物从业人员培训机构经国家级实验动物学会审批、认可后,方可开展实验动物从业人员资格培训。

6.1.2 培训对象:拟申请各级职业资格的实验动物从业人员。

6.1.3 培训考试:国家级实验动物学会组织从业人员资格考试。

6.2 资格评定

6.2.1 国家级实验动物学会负责实验动物从业人员职业资格的评定及证书的颁发。

6.2.2 国家级实验动物学会应针对不同分类、不同级别的从业人员制定每年需完成的继续教育学分的要求。

6.2.3 继续教育的形式:国家级、省级相关专业的继续教育、会议及培训。

7 管理要求

7.1 国家级实验动物学会是实验动物从业人员职业资格培训及评定的行业主管机构。

7.2 国家级实验动物学会负责对培训机构进行评估和认证以及培训课程的制定。

附录 1 实验动物从业人员等级考试分类(资料性附录)

从业人员分类	资格名称	考试类别
实验动物技术人员系列	实验动物助理技师	A-1 类考试
	实验动物技师	A-2 类考试
	实验动物技术专家	A-3 类考试
实验动物管理人员系列	实验动物管理师	B-1 类考试
	实验动物高级管理师	B-2 类考试
实验动物医师系列	实验动物助理医师	C-1 类考试
	实验动物医师	C-2 类考试
	实验动物高级医师	C-3 类考试
实验动物研究人员系列	实验动物初级研究员	D-1 类考试
	实验动物中级研究员	D-2 类考试
	实验动物高级研究员	D-3 类考试

注:每类从业人员的具体要求和考试内容由中国实验动物学会另文制定。