

ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

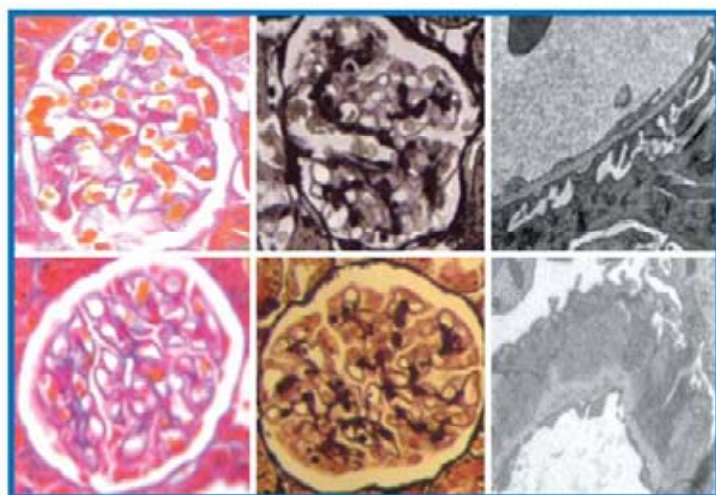


ACTA LABORATORIUM
ANIMALIS SCIENTIA SINICA

中国实验动物学报

ZHONGGUO SHIYAN DONGWU XUEBAO

第24卷 第3期 / Vol.24 No. 3



数据库:

中国科学引文数据库CSCD

中文核心期刊要目总览

中国科技论文统计源期刊

世界卫生组织西太平洋地区医学索引

中国核心期刊(遴选)数据库

中国学术期刊综合评价数据库

中国生物医学文献数据库

万方数据资源系统中国数字化期刊群

美国化学文摘

主办单位:

中国实验动物学会

中国医学科学院医学实验动物研究所

ISSN 1005-4847



9 771005 484140

2016

3

主管
中国科学技术协会

主办
中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所

主编
秦川

编辑
《中国实验动物学报》编辑委员会

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

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

照 排
同方知网(北京)技术有限公司

印 刷
北京昌平百善印刷厂

邮发代号
2-748

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

广告经营许可证号
京朝工商广字第 8131 号

定 价
每期 20.00 元, 全年 120.00 元

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

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

本期执行主编 赵德明
本期专题组织 高 诚
本期责任编辑 李继平
英文编辑 周传农

目 次

研究报告

- 孕前炔雌醇暴露对大鼠子代糖代谢变化和肝脏糖代谢相关基因表达的影响 徐凯旋, 李宁宁, 管磊剑, 等 (221)
- Caveolin-1 基因敲除小鼠子代基因型的鉴定及繁育方法 周胜强, 罗东, 黄素芬, 等 (228)
- 黄连解毒汤通过调节性 T 细胞产生抗动脉粥样硬化作用 周凤华, 程赛博, 张宇, 等 (233)
- 裸小鼠肝癌原位移植模型的建立 田树红, 王日起, 邢桂兰, 等 (239)
- 口服补液盐降低氯化锂-匹罗卡品惊厥持续状态大鼠死亡率的研究 韩慰, 蒋莉, 何蓉, 等 (243)
- 雄性裸鼯鼠可育个体与不可育个体生殖系统结构与功能差异初探 余琛琳, 林丽芳, 袁子彦, 等 (248)
- 慢性皮质酮处理对小鼠学习记忆和突触相关蛋白的影响 孙秀萍, 杨久山, 张楠, 等 (253)
- 小鼠异位肢体复合组织移植模型的建立 黄健兵, 徐高俊, 刘浩, 等 (258)
- 他克莫司对大鼠肝脏组织蛋白磷酸酶 2A 和 P-AKT 表达的影响 牛玉坚, 王德恩, 杨柳 (262)
- 人 IL-37b 基因真核表达载体的构建与表达 姚静, 程江, 裴雪枫, 等 (268)
- 牛体内囊胚经体外共培养诱导子宫内膜上皮细胞整合素 $\alpha v, \beta 3$ 基因差异的表达 倪菡曦, 倪和民, 潘兴乾, 等 (273)
- 玛咖提取物对小鼠毒性及免疫器官的影响 俞发荣, 张诗爽, 张振南, 等 (279)
- 纤溶系统对膜性肾病大鼠足细胞损伤的影响 Δ 梁静, 张渊, 曹灵, 等 (283)

专题研究

- 巴马猪 NK 细胞表型鉴定及猪 CIK 细胞诱导方法建立 祝明皓, 陆涛峰, 牛银杰, 等 (288)
- 仙台病毒 RT-LAMP 可视化检测方法的建立 周洁, 赵丽娟, 陶凌云, 等 (293)
- 无特定病原体金定鸭微卫星 DNA 遗传多样性分析 赵丽丽, 陆涛峰, 张晓萍, 等 (299)
- 肝腺杆菌感染对 BALB/c 小鼠免疫应答干扰的初步研究 冯洁, 张泉, 谢建云, 等 (304)
- 上海地区实验动物病原体感染指数分析 冯丽萍, 陶凌云, 周洁, 等 (309)

综述·进展

- 裸鼯鼠在生物医学研究中的应用前景 崔淑芳 (313)
- 抑郁症动物模型与其发病机制研究的进展 罕园园, 代解杰 (321)
- 严重的糖尿病血管病变的发生机制及其动物模型制作进展 冯丽帅, 马旭, 王建波 (327)

信息

- 北京积水潭医院投入使用欧标模式大动物笼舍 (232)

Δ 封面文章

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

Bimonthly, Established in June 1993

Volume 24 Number 3, March 30, 2016

Responsible Institution

China Association for Science and Tecnology

Sponsor

Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

Institute of Laboratory Animal Science, Chinese

Academy of Medical Sciences

Editor-in-Chief

QIN Chuan (秦川)

Editing

Editorial Office of ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District,

Beijing 100021

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

E-mail: a67761337@126. com

Publishing

Editorial Office of ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District,

Beijing 100021

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

E-mail: a67761337@126. com

Undertaker

Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences

Department of Laboratory Animal Sciences, Peking Union Medical College

Printing

Baishan Printing House of Changping, Beijing

Distributor and Mail-order

Editorial Office of ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District,

Beijing 100021

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

CSSN

ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

Copyright 2014 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

CONTENTS IN BRIEF

Pregestational ethinyl estradiol exposure leads to glucose homeostasis disruption and changes of expression of glucose-metabolism-related genes in rat offsprings *XU Kai-xuan, LI Ning-ning, GUAN Lei-jian, et al* (221)

Genotype identification and breeding method of caveolin-1 gene knockout mice *ZHOU Sheng-qiang, LUO Dong, HUANG Su-feng, et al* (228)

Anti-atherosclerotic effect of a Chinese medicine, Huanglian Jiedu Decoc-tion, mediated by regulatory T cells *ZHOU Feng-hua, CHENG Sai-bo, ZHANG Yu, et al* (233)

Establishment of an orthotopic implantation model of hepatocellular carcinoma in nude mice *TIAN Shu-hong, WANG Ri-chao, XING Gui-lan, et al* (239)

Mortality of rat models of LiCl-pilocarpine-induced status epilepticus can be reduced by oral rehydration salt solution *HAN Wei, JIANG Li, HE Rong, et al* (243)

Structural and functional differences of the reproductive system in fertile and infertile male naked mole rats *YU Chen-lin, LIN Li-fang, YUAN Zi-yan, et al* (248)

Effect of chronic corticosterone administration on the learning and memory and expression of synapse-related proteins in mice *SUN Xiu-ping, YANG Jiu-shan, ZHANG Nan, et al* (253)

Establishment of a mouse model of limb heterotopic composite tissue allograft transplantation *HUANG Jian-bing, XU Gao-jun, LIU Hao, et al* (258)

Effects of tacrolimus on the expression of protein phosphatase 2A and P-AKT in rat hepatocytes *NIU Yu-jian, WANG De-en, YANG Liu, et al* (262)

Construction and expression of eukaryotic expression vector of human IL-37b gene *YAO Jing, CHENG Jiang, PEI Xue-feng, et al* (268)

Differential expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ in bovine endometrial epithelial cells before and after co-culture with bovine blastocysts *NI Qian-lin, NI He-min, PAN Xing-qian, et al* (273)

Effect of Maca extract on the toxicity and immune organs in mice *YU Fa-rong, ZHANG Shi-shuang, ZHANG Zhen-nan, et al* (279)

Effect of fibrinolytic system on the podocyte injury in rats with membranous nephropathy *LIANG Jing, ZHANG Yuan, CAO Ling, et al* (283)

Isolation, phenotype identification and activation of natural killer (NK) cells in Bama miniature pigs *ZHU Ming-hao, LU Tao-feng, NIU Yin-jie, et al* (288)

Establishment of a visualized detection method of Sendai virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification *ZHOU Jie, ZHAO Li-juan, TAO Ling-yun, et al* (293)

Analysis of the DNA genetic diversity in SPF Jinding duck population *ZHAO Li-li, LU Tao-feng, ZHANG Xiao-ping, et al* (299)

Preliminary observation on the interference effect of *Helicobacter hepaticus* infection on the immune response in BALB/c mice *FENG Jie, ZHANG Quan, XIE Jian-yun, et al* (304)

Analysis of laboratory animal pathogen infection indexes in Shanghai area *FENG Li-ping, TAO Ling-yun, ZHOU Jie, et al* (309)

Application prospects of naked mole rats in biomedical research *CUI Shu-fang* (313)

Research progress in animal models and mechanism of depression *HAN Yuan-yuan, DAI Jie-jie* (321)

Mechanism and research progress of severe diabetic vasculopathy and related experimental animal studies *FENG Li-shuai, Ma Xu, WANG Jian-bo* (327)

孕前炔雌醇暴露对大鼠子代糖代谢变化和肝脏糖代谢相关基因表达的影响

徐凯旋, 李宁宁, 管磊剑, 夏彦恺, 吴笛*

(南京医科大学公共卫生学院卫生毒理学系, 江苏 南京 211166)

【摘要】 目的 以SD大鼠为模型, 观察孕前炔雌醇(ethinyl estradiol, EE)暴露对子代糖代谢变化和肝脏内与糖代谢相关基因表达的影响。**方法** 52只雌性大鼠随机分为4组: 对照组(芝麻油)、50、200、800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE组, 每天1次, 连续灌胃暴露15 d后受孕。在子代出生后第23天(postnatal day, P23)和P25分别进行口服葡萄糖耐量(OGTT)和胰岛素耐量(ITT)实验, 并用RT-PCR检测肝脏中糖代谢相关基因表达水平。**结果** 子代雌鼠OGTT: 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE组空腹血糖值显著低于对照组($P < 0.05$); 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE组第15 min血糖值显著高于对照组, 50、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE组($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), 50、800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE组2 h血糖值显著低于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。子代雄鼠OGTT: 在第15 min, 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE组血糖值显著高于对照组($P < 0.01$); 第30 min时, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE组血糖值显著低于对照组($P < 0.05$)。子代雌鼠ITT: 第15 min时, 50、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE组血糖值显著高于对照组($P < 0.001$, $P < 0.01$)。子代雄鼠ITT: 第30 min时 50、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE组血糖值显著高于对照组($P < 0.01$, $P < 0.01$)。子代雌鼠RT-PCR: 50、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE和800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE组 *Glut2* 和 *Lpk* mRNA表达水平显著低于对照组($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$); 50、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE组 *Gys2* mRNA表达水平显著低于对照组($P < 0.01$, $P < 0.01$)。子代雄鼠RT-PCR: 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE组 *G6pase* 和 *Pepck* mRNA表达水平显著高于对照组($P < 0.01$, $P < 0.01$), 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE组 *Glut2* mRNA表达水平相对于对照组显著降低($P < 0.01$), 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE组 *Gys2* mRNA表达水平显著高于对照组($P < 0.01$)。**结论** 孕前炔雌醇暴露会导致子代雌鼠葡萄糖耐量受损、子代出现胰岛素抵抗及肝脏内糖代谢相关基因表达异常。而且这些效应具有性别差异, 子代雌鼠对孕前EE暴露更敏感。

【关键词】 孕前; 炔雌醇; 糖代谢失衡; 肝脏

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0221-07

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.001

Pregestational ethinyl estradiol exposure leads to glucose homeostasis disruption and changes of expressions of glucose-metabolism-related genes in rat offsprings

XU Kai-xuan, LI Ning-ning, GUAN Lei-jian, XIA Yan-kai, WU Di*

(Department of Toxicology, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to observe pregestational ethinyl estradiol (EE)-exposure-induced glucose metabolism alterations and hepatic glucose-metabolism-related gene expression changes in the offsprings of SD rats. **Methods** Fifty-two female and 52 male SD rats were used in this study. The female rats were gavaged with sesame oil, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE for 15 consecutive days. After the end of exposure period, the female rats were mated with male rats and gave birth to next generation. The blood glucose and insulin tolerance in the offsprings were measured on postnatal days 23 (P23) and 25 (P25). The expressions of hepatic glucose-metabolism-related genes were measured by RT-PCR. **Results** In the female offsprings, the 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE group had significantly lower fasting

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(81470150); 江苏省高校自然科学研究计划项目(12KJB330001); 留学回国人员科研启动基金。

【作者简介】 徐凯旋(1988-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 生殖发育与内分泌毒理学。E-mail: xkx516@163.com。

【通讯作者】 吴笛(1977-), 女, 副教授, 博士, 主要研究方向: 生殖毒理学与神经内分泌毒理学。E-mail: diwu@njmu.edu.cn。

blood glucose level than that in the control group ($P < 0.05$). At 15 min after glucose administration, the blood glucose level in the 800 $\mu\text{g/kg}$ EE group was much higher than that in the control group, 50 $\mu\text{g/kg}$ and 200 $\mu\text{g/kg}$ EE groups ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$). At the time point of 2 h, the blood glucose level of the 50 $\mu\text{g/kg}$ and 800 $\mu\text{g/kg}$ EE groups were both significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The female offsprings in the 50 $\mu\text{g/kg}$ and 200 $\mu\text{g/kg}$ EE groups had significantly higher glucose level after insulin administration than that in the control group ($P < 0.001$, $P < 0.01$). In the male offsprings, the 800 $\mu\text{g/kg}$ EE group had a significantly higher blood glucose level than the control group at 15 min after glucose administration ($P < 0.01$), and the 200 $\mu\text{g/kg}$ EE group had a lower blood glucose level than the control at 30 min after glucose administration. In the male offsprings, the blood glucose level of 50 $\mu\text{g/kg}$ and 200 $\mu\text{g/kg}$ EE groups were much higher than that of the control group ($P < 0.01$, $P < 0.01$). In the female offsprings, *Glut2* and *Lpk* mRNA expressions in the 50 $\mu\text{g/kg}$, 200 $\mu\text{g/kg}$ and 800 $\mu\text{g/kg}$ EE groups were much lower than that in the control group ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$). *Gys2* mRNA expressions in the 50 $\mu\text{g/kg}$ and 200 $\mu\text{g/kg}$ EE groups were much lower than that in the control group ($P < 0.01$, $P < 0.01$). In the male offsprings, the 200 $\mu\text{g/kg}$ EE group had much higher *G6pase* and *Pepck* mRNA expression than in the control group ($P < 0.01$, $P < 0.01$). The *Glut2* mRNA expression in the 50 $\mu\text{g/kg}$ EE group was much lower than that in the control group ($P < 0.01$). The *Gys2* mRNA expression in the 800 $\mu\text{g/kg}$ EE group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). **Conclusions** Pregestational EE exposure can lead to impaired glucose tolerance and insulin resistance in female offspring and alterations of key hepatic glucose-metabolism-related gene expression, and these effects are sex-specific, and female offspring is more sensitive to pregestational EE exposure.

【Key words】 Pregestational; Ethinyl estradiol; Glucose metabolism imbalance; Liver

Corresponding author: WU Di, E-mail: diwu@njmu.edu.cn

炔雌醇 (ethinyl estradiol, EE) 是一种人工合成雌激素, 被广泛使用在药物制剂中, 是目前短效口服避孕药中的高效雌激素。在我国偏远乡村, 有 1% 的已婚妇女选择服用短效避孕药^[1], 但是在人口密集的沿海发达地区, 由于婚前对短期有效且可逆的避孕方法需求的增加, 服用含有 EE 避孕药的人群相对比较庞大。在我国, EE 更多地被用于调节女性正常生理周期、恢复流产后生理周期、辅助受孕、治疗痤疮和妇科疾病^[2,3], EE 非避孕性应用是避孕性应用的 21 倍^[4]。值得注意的是, 服用 EE 的女性人群相对年轻, 往往在短期内会有怀孕计划。那么, 最令人关心的是女性在孕前服用 EE 是否会给予子代健康发育带来不良影响。

EE 高效而且相对不易降解, 消除半衰期比较长 (36 ± 13) h, 长期定量服用很容易在体内积累, 也较容易引起妊娠早期暴露, 从而具有潜在的生殖发育毒性。所以, EE 作为雌激素内分泌干扰物代表, 被美国国家毒理学项目重点研究^[5]。但目前关于 EE 生殖发育毒性的报道很少。根据 2003 年国际上正式认可的 DOHaD 理论 (Developmental Origins of Health and Disease), 慢性代谢疾病如糖代谢稳态失衡和糖尿病的病因, 往往可以追溯到人类在早期发育过程中经历的不利因素^[6], 这些不利因素可引起子代出生后表型的改变, 如糖代谢失衡^[7], 很多动

物和人群研究已经发现孕期母体内环境对子代出生后的生长发育有影响^[8], 但是关于围孕期特别是孕前母体环境对后代出生后生长发育影响的研究刚刚开展。肝脏是糖代谢和脂代谢调节的重要器官^[9], 在稳定血糖、清除血氨和解毒方面有重要作用。因此我们建立了孕前 EE 暴露 SD 大鼠模型, 研究孕前 EE 暴露是否会影响子代健康发育, 尤其是糖代谢以及从肝脏角度探索子代糖代谢失衡的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雌鼠 SD 大鼠 52 只, 体重 230 ~ 250 g, 7 ~ 9 周龄, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪) 2012 - 0002】, SPF 级雄鼠 SD 大鼠 52 只, 体重 430 ~ 450 g, 12 ~ 14 周龄, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪) 2013 - 0018】, 均饲养于南京医科大学江宁校区动物中心屏障实验室【SYXK(苏) 2014 - 0009】, 环境温度: $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 相对湿度: 50% ~ 60%, 光照: 150 ~ 200 lx, 12 h/12 h 明暗交替, 噪音 < 50 db, 每个 IVC 笼内饲养 2 只大鼠, 自由饮食, 并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 实验试剂

Ethinylestradiol, 购自德国 Dr. Ehrenstorfer 标准品公司; 罗氏血糖试纸, 购自南京迈迪特生物化学有限公司; 中性胰岛素注射液, 购自江苏万邦生化医药股份有限公司; Trizol, 购自 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) 公司; 逆转录试剂盒、RNA 酶抑制剂 (RNasin) 和 SYBR Green PCR Master Mix reagent kits, 均购自 Takara 公司 (大连宝生物有限公司)。

1. 1. 3 实验仪器

罗氏卓越型血糖仪, 购自南京迈迪特生物化学有限公司; 台式低温高速离心机 (GS215R, 美国 Backman), 7900 型荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

1. 2 炔雌醇染毒

将 52 只雌鼠按照体重随机分为 4 组, 每组 13 只, 采取灌胃方法对 4 组大鼠分别给予芝麻油及 50、200 $\mu\text{g/kg}$ 和 800 $\mu\text{g/kg}$ EE 暴露, 每日一次, 连续暴露 15 d, 给药前禁食不禁水。

1. 3 大鼠交配及子代体重测定

大鼠连续 EE 暴露 15 d 后给予 15 d 的洗脱期, 之后雌雄按 1:1 的比例进行合笼交配, 每天上午 9:00–11:00 检查雌鼠阴栓脱落情况, 记观察到阴栓为怀孕第 1 天, 怀孕的母鼠单独饲养与鼠笼内, 给予不含雌激素的食物, 且每 5 d 记录 1 次体重。大鼠的妊娠期为 21 d, 在 19 d 左右密切观察大鼠分娩情况, 观察到子代出生记为出生后第 1 天 (postnatal day, P1), 对新生子代采取剪趾标记, 并在同组间交换不同窝别的子代以减少子代个体差异, 子代在出

生后第 22 天断奶, 第 25 天进行雌雄分笼。子代从 P4–P14, 每 2 d 称 1 次体重。

1. 4 子代葡萄糖耐量和胰岛素耐量测定

1. 4. 1 葡萄糖耐量实验

在子代 P23 前 1 d 晚上对子代 ($n = 8$) 禁食 12 ~ 14 h, 并在第 2 天早上 8 点按 2 g/kg 剂量给予子代灌胃 50% 葡萄糖, 尾尖采集 0、15、30、60、120 min 时间点的血糖并利用罗氏卓越型血糖仪记录数值, 绘制 OGTT 曲线。

1. 4. 2 胰岛素耐量实验

在子代 P25 前 1 d 晚上对子代 ($n = 8$) 禁食 12 ~ 14 h, 并在第 2 天早上 8 点按 0.75 IU/kg 剂量对子代腹腔注射胰岛素, 尾尖采集 0、15、30、60、120 min 时间点的血糖并记录血糖数值, 绘制 ITT 曲线。

1. 5 RT-PCR

1. 5. 1 子代肝脏总 RNA 提取

在抽提 RNA 之前, 所有需使用的器材、离心管及枪头等均需在 0.1% DEPC 水中浸泡 24 h, 烘干, 高压消毒去除 RNase 以后待用。称取各组子代肝脏 0.1 g 并超声, 接下来用 TRizol 试剂盒按产品说明书提取总 RNA。

1. 5. 2 引物设计

根据 GenBank 上提供的基因序列, 应用 Primer Premier 5.0 软件设计基因特异性引物。引物设计完成后, 通过 NCBI 对其特异性进行鉴定, 结果表明均具有良好的特异性 (表 1)。引物由上海捷瑞生物工程

工程有限公司合成。

表 1 肝脏内与糖代谢相关基因引物序列及反应条件

Tab. 1 Primer sequences and reaction conditions of glucose-related genes in the liver of rats			
引物 Primers	序列 (5'–3') Sequences (5'–3')	扩增长度/bp Amplified length /bp	退火温度/℃ Annealing temperature/℃
<i>Glut2-f</i>	CAGCACATACGACACCAGACG	123	58. 8
<i>Glut2-r</i>	CAAAGAACGAGGCGACCA		56. 9
<i>Gck-f</i>	GATGCTGGTCAAAGTGGGAGA	157	58. 7
<i>Gck-r</i>	CTGATGCTTGTC AAGGAAGTCA		56. 7
<i>Lpk-f</i>	ATGATGTGGATCGAAGGGTC	195	58. 8
<i>Lpk-r</i>	TGGGTTGAAAGAAATAGGCT		52. 5
<i>G6pase-f</i>	TTCTTCCTGTTTGGTTTCGC	167	56. 6
<i>G6pase-r</i>	AAGAGGGTCCCCAGGTTTT		56. 1
<i>Pepck-f</i>	AGCTGCATAATGGTCTGGACT	134	55. 2
<i>Pepck-r</i>	GCCGTCGCAGATGTGAATA		56. 8
<i>Gys2-f</i>	ACTCCAAACGGCTTGAACG	111	57. 4
<i>Gys2-r</i>	GCCATAGAAATGACCTCGAACA		57. 8
<i>Pygl-f</i>	ATCGTCACCTGCACTTCACTC	148	56. 4
<i>Pygl-r</i>	CTCTTGGGGCACTTGT CATAG		56. 1

1.6 统计分析

用统计学分析软件 SPSS 19.0 结合 Origin 对各项指标进行数据整理及分析,所有数据均行正态性、方差齐性检验,所有实验结果用均数 ± 标准误表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)比较各组间的差异后用 LSD 多重比较的方法进行两两比较,来判断是否有统计学显著差异。

2 结果

2.1 子代体重

母鼠孕前 EE 暴露后,观察子代出生后 P4-P14 体重变化,结果显示子代雌鼠在 P4 和 P10 组间体重差异有显著性($P < 0.05$,图 1A)。经 LSD 法比较发现在 P4,800 $\mu\text{g/kg}$ EE 组子代体重显著低于对照组($P < 0.01$,图 1A);在 P10,200 $\mu\text{g/kg}$ EE 和 800 $\mu\text{g/kg}$ EE 组子代体重显著高于对照组($P < 0.01$)。而对于子代雄鼠,在 P6,50 $\mu\text{g/kg}$ EE 组子代体重显著低于对照组($P < 0.01$,图 1B)。

2.2 子代葡萄糖耐量实验

子代雌鼠 OGTT 实验结果发现 P23 空腹血糖值组间存在差异($P < 0.05$,图 2A)。使用 LSD 法比较发现 200 $\mu\text{g/kg}$ EE 组子代空腹血糖值显著低于对照组($P < 0.05$,图 2A),说明 200 $\mu\text{g/kg}$ EE 暴露有可能导致子代代代谢失衡。在第 15 min,800 $\mu\text{g/kg}$ EE 组血糖值显著高于对照组,50 $\mu\text{g/kg}$ EE 和 200 $\mu\text{g/kg}$ EE 组($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$,图 2A);

但在 2 h,50 $\mu\text{g/kg}$ EE 和 800 $\mu\text{g/kg}$ EE 组血糖值却显著低于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$,图 2A),说明孕前 EE 暴露可使子代雌鼠糖耐量受损。

在子代雄鼠 OGTT 中,第 15 min、30 min 血糖水平组间差异有显著性($P < 0.05$,图 2B)。LSD 法两两比较发现,在第 15 min,800 $\mu\text{g/kg}$ EE 组血糖值显著高于对照组($P < 0.01$,图 2B);在第 30 min,200 $\mu\text{g/kg}$ EE 组血糖值显著低于对照组($P < 0.05$,图 2B)。然而在 2 h,EE 暴露组的血糖值和对照组相比差异无显著性($P > 0.05$,图 2B),说明较雌鼠而言,子代雄鼠的糖耐量可能未受损。

2.3 子代胰岛素耐量实验

在 P25,ITT 实验结果显示子代雌鼠和雄鼠对胰岛素的敏感性具有类似趋势。在雌鼠中,腹腔注射胰岛素后第 15 min,50 $\mu\text{g/kg}$ EE、200 $\mu\text{g/kg}$ EE 组血糖值显著高于对照组($P < 0.001$, $P < 0.01$,图 3A)。在子代雄鼠中,第 30 min 组间血糖水平差异有显著性($P < 0.05$,图 3B),LSD 法发现,50 $\mu\text{g/kg}$ EE 和 200 $\mu\text{g/kg}$ EE 组血糖值显著高于对照组($P < 0.01$, $P < 0.01$,图 3B),综上可说明 50 $\mu\text{g/kg}$ EE 和 200 $\mu\text{g/kg}$ EE 组子代经孕前 EE 暴露后有可能出现胰岛素抵抗现象。

2.4 RT-PCR

用 RT-PCR 的方法检测了肝脏内糖代谢相关基因 *Glut2*、*Gck*、*Lpk*、*G6pase*、*Pepck*、*Gys2* 和 *Pygl* mRNA 的相对表达水平。在子代雌鼠中,50、200 $\mu\text{g/kg}$ EE

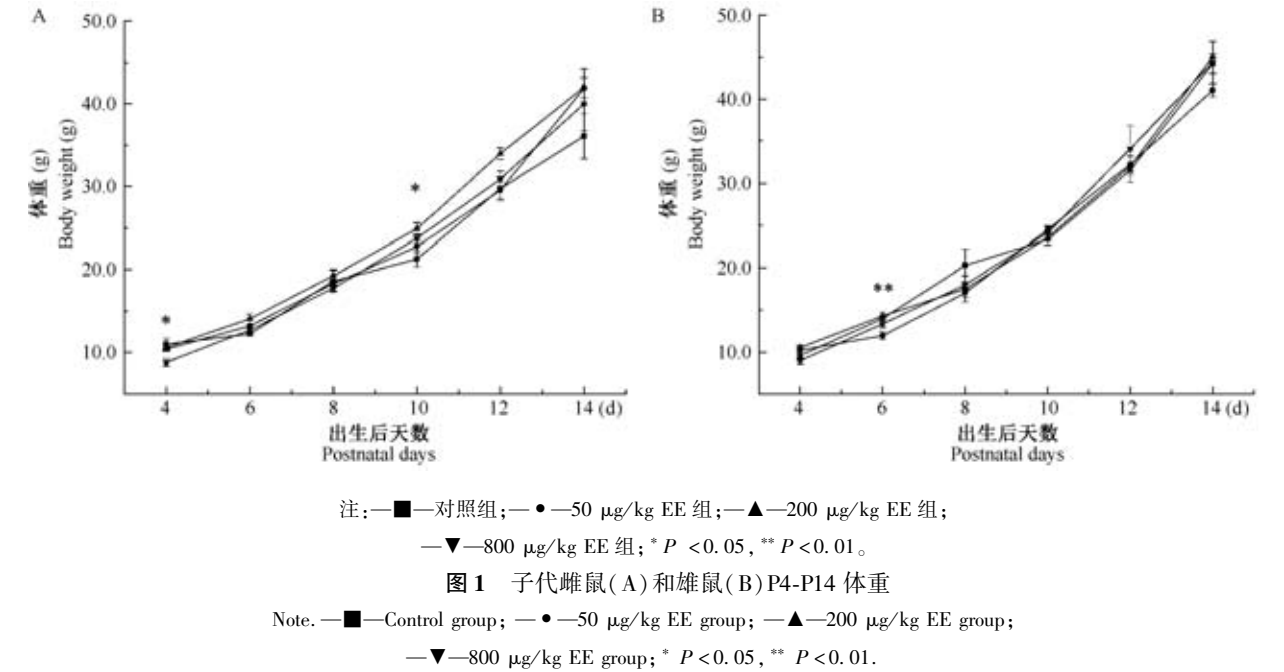
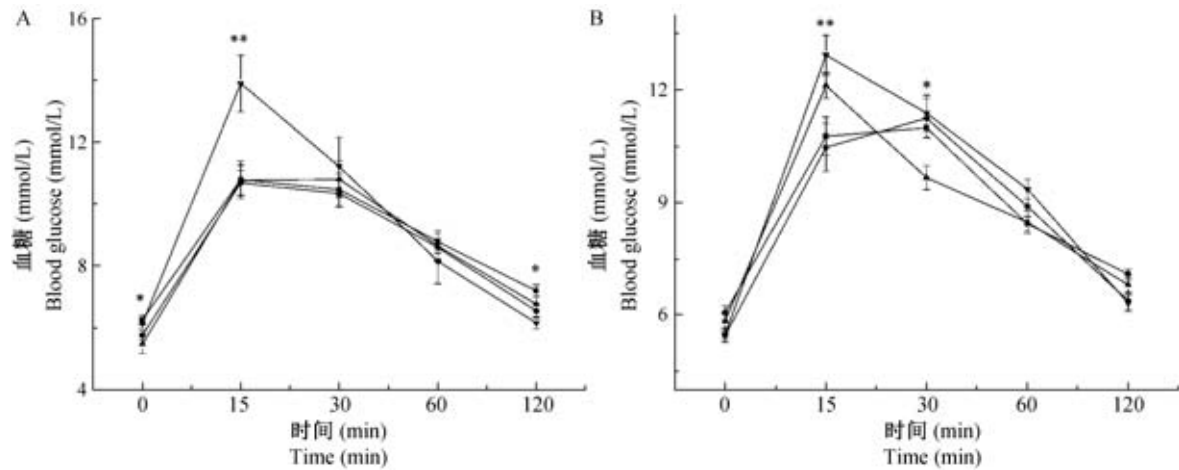
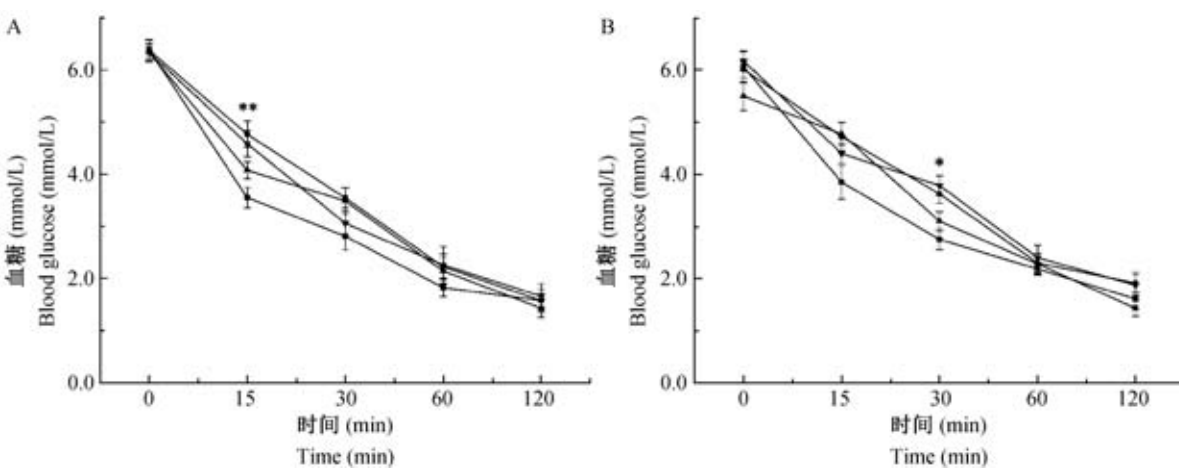


Fig. 1 Body weight of the female(A) and male(B) offsprings from P4 to P14



注：—■—对照组；—●—50 μg/kg EE 组；—▲—200 μg/kg EE 组；
—▼—800 μg/kg EE 组；* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。
图 2 子代雌鼠(A)和雄鼠(B)P23 葡萄糖耐量实验
Note. —■—Control group；—●—50 μg/kg EE group；
—▲—200 μg/kg EE group；—▼—800 μg/kg EE group；* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Results of glucose tolerance test in the female(A) and male(B) offsprings at P23



注：—■—对照组；—●—50 μg/kg EE 组；
—▲—200 μg/kg EE 组；—▼—800 μg/kg EE 组；* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。
图 3 子代雌鼠(A)和雄鼠(B)P25 胰岛素耐量实验
Note. A: Female offspring; B: Male offspring. —■—Control group. —●—50 μg/kg EE group.
—▲—200 μg/kg EE group. —▼—800 μg/kg EE group. * $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

Fig. 3 Results of insulin tolerance test in the female(A) and male(B) offsprings at P25

和 800 μg/kg EE 组 *Glut2* 和 *Lpk* 的表达水平相对于对照组显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$, 图 4A); 糖原合成相关酶 *Gys2* 基因表达水平在 50 μg/kg EE 和 200 μg/kg EE 组也显著低于对照组 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, 图 4A); 糖异生关键基因 *G6pase* 和 *Pepck*, *Gck* 和 *Pygl* 基因表达水平在对照组和剂量组中差异无显著性 ($P > 0.05$, 图 4A)。

在子代雄鼠中, 糖异生基因 *G6pase* 和 *Pepck* 表达水平在 200 μg/kg EE 组中相对于对照组显著增

高 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, 图 4B); 50 μg/kg EE 组 *Glut2* 表达水平相对于对照组显著降低 ($P < 0.01$, 图 4B); 糖原合成相关酶 *Pygl* 表达水平在 800 μg/kg EE 显著高于对照组 ($P < 0.01$, 图 4B)。

3 讨论

雌激素 (EE) 属于环境内分泌干扰物 (environmental endocrine disrupting chemicals, EDCs), 长期以来一直是口服避孕药中的重要激素, 由于 EE 在育

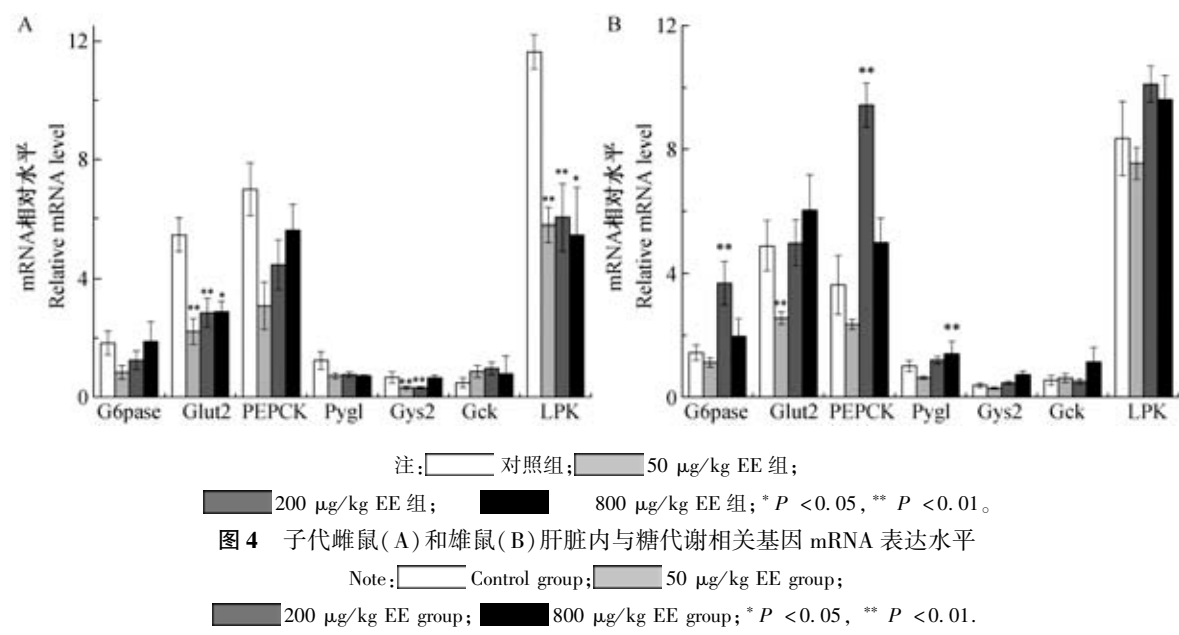


Fig. 4 The mRNA expression level of glucose metabolic-related genes of liver in the female(A) and male(B) offsprings

龄妇女中的广泛运用,其对于女性本身是具有安全性的^[2,3],但对后代是否具有毒性作用应该引起足够的重视。既往的动物实验主要着重于孕期以及哺乳期暴露 EE 对子代的影响,而关于孕前暴露 EE 的研究还较少,本实验选择 SD 大鼠孕前 EE 暴露模型,研究其对子代糖代谢的影响和肝脏内糖代谢相关基因 mRNA 的转录水平,进而探索子代糖代谢失衡的可能机制。

Ferguson 等^[10]研究发现 SD 大鼠在孕期第 6 ~ 21 天连续暴露 5 µg/kg 和 10 µg/kg EE,子代雌鼠和雄鼠体重较对照组均随年龄增加显著增高,与本实验子代雌鼠体重变化趋势类似(图 1A),却不同于子代雄鼠体重变化,推测可能与不同性别子代对 EE 的敏感性有关;Mandrup 等^[11]却发现 Wister 大鼠在孕期第 7 ~ 10 天暴露 0、5、15 和 50 µg/kg EE 导致 50 µg/kg 子代雄鼠 P6 体重下降,与我们的结果完全一致;在鲫鱼暴露 EE 模型中,亦发现体重下降现象^[12]。这些结果意味着孕前同孕期暴露 EE 在一定程度上都可导致子代体重变化,原因推测有可能与摄食量及代谢变化有关^[13]。

Lawrence 等^[14]研究的甲基炔诺酮(norgestrel/ethinyl estradiol;NEE)和 Kendig^[15]给 CD1 小鼠喂食含有炔雌醇的饲料,均发现子代糖耐量受损现象,说明 EE 在不同的种属中且与其他具有雌激素效应的短效避孕药一样,都可使子代糖耐量受损。本实验研究结果发现不同剂量的孕前 EE 暴露都可使子代糖耐量发生变化,但是糖耐量发生异常的时间点不

一样,这可能与不同性别子代体内的代谢功能和脂肪分布有关,因为雄鼠更倾向于改变皮下脂肪分布而非腹部脂肪^[15]。此种效应的差异与同样作为 EDCs 的双酚 A (bisphenol A, BPA) 有共同点,刘景丽等^[13]在 C57BL6 小鼠孕期及哺乳期不同阶段暴露 BPA,因给药的剂量、时间和对胰岛素具有的不同敏感性等^[16]原因均可使不同性别子代的葡萄糖耐量存在差异。

肝脏是调节糖代谢的主要器官, *Gck* 和 *Lpk* 均是肝脏糖酵解的关键酶,它们的表达或活性降低,将直接影响胰岛素在肝脏的利用以及葡萄糖在肝脏的吸收,导致葡萄糖耐量下降及胰岛素抵抗^[17]。 *Lpk* 是肝脏糖酵解三个关键的限速酶之一,且处于糖酵解过程的最后一步, *Lpk* 活性高,葡萄糖分解加快^[18], *Glut2* 可促进体内葡萄糖摄取且与葡萄糖敏感基因表达的调节密切相关^[19], *Glut2* 表达升高可促进葡萄糖转运,为肝糖原含量增加提供条件, *Glut2* 敲除的小鼠出现明显的高糖血症^[20]。本实验孕前 EE 暴露组子代雌鼠肝脏内 *Lpk* 和 *Glut2* 表达下调,可间接解释 50 µg/kg EE 和 800 µg/kg EE 组子代雌鼠 2 h 的血糖水平低于对照组的现象。而在子代雄鼠中, *Glut2* 在只 50 µg/kg EE 组中表达下调,与糖耐量结果不一致。在哺乳动物中,肝糖原生成对去除体内过量血糖起到关键的作用^[21],在子代雌鼠中, *Gys2* 作为肝糖原合成酶在 50 µg/kg EE 和 200 µg/kg EE 组中表达降低,说明在高剂量组中 *Gys2* 合成较少,葡萄糖转化为肝糖原的量较少,体

内血糖水平继而升高, 孕子代雌鼠胰岛素耐量实验结果一致。*Pepck* 和 *G6pase* 是糖异生的关键酶, *Pepck* 和 *G6pase* 表达上调可使血糖水平升高^[22], 我们的 IIT 结果显示 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 组血糖水平显著增高, 符合 *Pepck* 和 *G6pase* 表达上调的结果, 说明 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 孕前暴露确实会导致子代产生胰岛素抵抗。

综上所述, 孕前炔雌醇长期暴露会导致子代代谢失衡, 如葡萄糖耐量受损、出现胰岛素抵抗现象等, 结合肝脏内与糖代谢相关基因的表达, 可在一定程度上解释子代幼年期糖代谢失衡的现象, 继而为幼年期糖代谢失衡的发生发展提供新的理论依据, 最终为预防和控制 EE 引起的儿童高血糖提供直接依据。

参 考 文 献

- [1] He D, Zhang Y, Ji N, et al. A cross-sectional study of contraceptive use among married women living in rural China [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2012, 118(2): 129132.
- [2] 张春燕. 复方短效口服避孕药的非避孕作用临床应用及体会. 临床合理用药杂志 [J]. 2012, 5(5A): 107-108.
- [3] 付建红, 郭尚云. 人工流产后及时服用短效避孕药的临床观察 [J]. 中国妇幼保健. 2013, 28(17): 2744-2746.
- [4] 庞艳玉, 杨振宇, 曾涛. 我院门诊复方口服避孕药的非避孕性应用情况分析 [J]. 中国药理学杂志. 2012, 47(11): 878-879.
- [5] National Toxicology Program. Multigenerational reproductive toxicology study of ethinyl estradiol (CAS No. 57-63-6) in Sprague-Dawley rats [J]. Natl Toxicol Program Tech Rep Ser, 2010, (547): 1-312.
- [6] Gluckman PD, Hanson MA, Low FM. The role of developmental plasticity and epigenetics in human health [J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2011, 93(1): 12-18.
- [7] Zheng S, Rollet M, Pan YX. Protein restriction during gestation alters histone modifications at the glucose transporter 4 (GLUT4) promoter region and induces GLUT4 expression in skeletal muscle of female rat offspring [J]. J Nutr Biochem, 2012, 23(9): 1064-1071.
- [8] Galjaard S, Devlieger R, Van Assche FA. Fetal growth and developmental programming [J]. J Perinat Med, 2013, 41(1): 101-105.
- [9] Sesti G. Pathophysiology of insulin resistance [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2006, 20(4): 665-679.
- [10] Ferguson SA, Law CD, Kissling GE. Developmental treatment with ethinyl estradiol, but not bisphenol A, causes alterations in sexually dimorphic behaviors in male and female Sprague Dawley rats [J]. Toxicol Sci, 2014, 140(2): 374-392.
- [11] Mandrup KR, Jacobsen PR, Isling LK, et al. Effects of perinatal ethinyl estradiol exposure in male and female Wistar rats [J]. Reprod Toxicol, 2013, 42: 180-191.
- [12] Huang B, Sun W, Li X, et al. Effects and bioaccumulation of 17beta-estradiol and 17 alpha-ethynylestradiol following long-term exposure in crucian carp [J]. Ecotoxicol Environm Safety, 2015, 112: 169-176.
- [13] Liu J, Yu P, Qian W, et al. Perinatal bisphenol A exposure and adult glucose homeostasis: identifying critical windows of exposure [J]. PloS One, 2013, 8(5): e64143.
- [14] Olatunji LA, Oyeyipo IP, Usman TO. Effect of a high-fructose diet on glucose tolerance, plasma lipid and hemorheological parameters during oral contraceptive administration in female rats [J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2013, 54(1): 23-31.
- [15] Kendig EL, Buesing DR, Christie SM, et al. Estrogen-like disruptive effects of dietary exposure to bisphenol A or 17alpha-ethynylestradiol in CD1 mice [J]. Int Toxicol, 2012, 31(6): 537-550.
- [16] Lin Y, Wei J, Li YY, et al. Developmental exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate impairs endocrine pancreas and leads to long-term adverse effects on glucose homeostasis in the rat [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011, 301(3): 527-538.
- [17] Yarushkin AA, Kachaylo EM, Pustynnyak VO. The constitutive androstane receptor activator 4-[(4R,6R)-4,6-diphenyl-1,3-dioxan-2-yl]-N, N-dimethylaniline inhibits the gluconeogenic genes PEPCK and G6Pase through the suppression of HNF4alpha and FOXO1 transcriptional activity [J]. Br J Pharmacol, 2013, 168(8): 1923-1932.
- [18] Krivoruchko A, Storey KB. Activation of the carbohydrate response element binding protein (ChREBP) in response to anoxia in the turtle Trachemys scripta elegans [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(10): 3000-3005.
- [19] Thorens B. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis [J]. Diabetologia, 2015, 58(2): 221-232.
- [20] Guillam MT, Hümmler E, Schaerer E, et al. Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking GLUT2 [J]. Nat Genet, 1997, 17: 327-330.
- [21] Brunner Y, Schvartz D, Priego-Capote F, et al. Glucotoxicity and pancreatic proteomics [J]. J Proteomic, 2009, 71: 576-591.
- [22] Li X, Xu M, Wang F, et al. Interaction of ApoA-IV with NR4A1 and NR1D1 represses G6Pase and PEPCK transcription; nuclear receptor-mediated downregulation of hepatic gluconeogenesis in mice and a human hepatocyte cell line [J]. PloS One, 2015, 10(11): e0142098.

[收稿日期] 2016-04-08

Caveolin-1 基因敲除小鼠子代基因型的鉴定及繁育方法

周胜强¹, 罗东¹, 黄素芬¹, 易健², 刘柏炎^{1*}

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

【摘要】 目的 探讨小凹蛋白-1 (caveolin-1) 基因敲除小鼠的鉴定方法与最优繁育方式, 为深入研究 caveolin-1 在脑缺血损伤修复中的作用提供理想的动物模型。**方法** 将引进的 caveolin-1 基因敲除小鼠饲养于 SPF 级实验室, 煮沸裂解法提取鼠尾组织基因组 DNA, 根据美国杰克逊实验室 (Jackson Laboratory) 提供的引物序列进行 PCR 反应检测其基因型, 采用 caveolin-1^{+/+} 杂合子互交、杂合子与 caveolin-1^{-/-} 纯合子杂交 (正交及反交)、纯合子互交 4 种不同的交配方式, 观察亲代小鼠的受孕率、子代小鼠的外形特征及纯合率。**结果** 琼脂糖凝胶电泳显示 PCR 产物分子量大小约 200 bp 和 661 bp, 与预期的目的基因片段分子量大小一致, 成功鉴定了 caveolin-1 基因敲除小鼠的不同基因型; 不同交配方式的繁殖结果基本符合孟德尔遗传规律, 且雌性、雄性 caveolin-1^{-/-} 纯合鼠具有一定的繁殖能力, 三种不同基因型小鼠的外形特征无明显差异。**结论** 煮沸裂解法提取基因组 DNA, PCR 法能够快速可靠鉴定 caveolin-1 基因敲除小鼠的基因型; caveolin-1 杂合子小鼠互交与纯合子互相结合繁育方法可能是短期内获得足量纯合子子鼠与同源野生子鼠的较好方式。

【关键词】 小凹蛋白-1; 基因敲除; 小鼠; 鉴定; 繁育方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0228-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.002

Genotype identification and breeding method of caveolin-1 gene knockout mice

ZHOU Sheng-qiang¹, LUO Dong¹, HUANG Su-feng¹, YI Jian², LIU Bai-yan^{1*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007)

【Abstract】 Objective To investigate the identification and optimal breeding method of caveolin-1 knockout mice, and provide an ideal animal model for further study of the role of caveolin-1 in cerebral ischemic injury and repair. **Methods** The introduced caveolin-1 gene knockout mice were reared in the SPF laboratory and genomic DNA was extracted from mouse tail tissue by the method of boiling lysis. According to the primer sequences provided by the Jackson Laboratory of America for polymerase chain reaction (PCR) to detect the genotypes, with the four different ways of mating: caveolin-1^{+/+} heterozygote intercrossing, heterozygous and homozygous caveolin-1^{-/-} hybrid (orthogonal and pay) as well as homozygous intercrossing. The pregnancy rate, shape characteristics of the filial generation mice and homozygous rate of the parental mice were observed. **Results** Agarose gel electrophoresis results indicated that the size of molecular weight of the PCR products was about 200 bp and 661 bp, which were consistent with the expected target gene fragment, and identified caveolin-1 gene knockout mice of different genotypes successfully. The results of different mating patterns are basically in agreement with Mendel rule, and the female and male caveolin-1^{-/-} homozygous mice had a certain ability to reproduce, three different genotypes of mice had no significant differences between the shape features. **Conclusions** PCR can fast and reliably identify the genotypes of caveolin-1 knockout mice using genomic DNA through the method of boiling lysis. Combi-

【基金项目】 国家自然科学基金 (NO. 81273989); 湖南省教育厅创新平台项目 (NO. 12K089)。

【作者简介】 周胜强 (1988 -), 男, 博士研究生, 从事中医药防治脑血管疾病及神经干细胞研究。Email: 549160941@qq.com

【通讯作者】 刘柏炎 (1970 -), 男, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合防治脑血管疾病及神经干细胞研究。Email: liubaiyan@126.com

ning the breeding methods of intercrossing of caveolin-1 heterozygous mice and intercrossing of caveolin-1 homozygous mice may be a good way to obtain enough homozygous mice and homologous wild type mice in a short period.

[Key words] Caveolin-1; Gene knockout; Mice; Identification; Breeding methods

Corresponding author: LIU Bai-yan. E-mail: liubaiyan@126.com

基因敲除小鼠是建立在胚胎干细胞技术与基因同源重组或 TALEN、CRISPR/cas9 等技术上的一种定向改变生物活体遗传信息的转基因动物,是研究疾病的发病机制、分子基础及寻找合适药物靶标的重要工具^[1-2]。目前,通过对基因敲除小鼠的研究,许多与人类疾病相关新基因的功能得到了阐明,且与以往腺病毒或脂质体转染基因过表达系统和 SiRNA 干扰等基因沉默研究手段相比具有显著的优越性^[3]。

小凹蛋白-1(caveolin-1)是细胞质膜微囊(caveolae)的标志性蛋白^[4]。近年 caveolin-1 的研究主要集中在胆固醇转运、肿瘤发生与侵袭转移方面^[5-6],在神经生物学研究中尚处于起始阶段。研究发现,caveolin-1 在哺乳动物脑内多个部位均有表达,参与了脑的正常发育成熟及海马可塑性的调控^[7-8],能影响成年小鼠脑内室管膜下区(subventricular zone, SVZ)及海马齿状回颗粒下层(subgranular zone, SGZ)神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的增殖与分化^[9-10]。国外研究报道 caveolin-1 基因敲除加重了脑缺血损伤^[11],课题组前期研究发现缺血性脑损伤能上调大鼠脑内 caveolin-1 蛋白的表达^[12],但其机制尚不完全清楚。

由于转基因小鼠具有能够从动物整体水平上模拟相关基因在体内的功能等诸多优势,为了更好地研究 caveolin-1 蛋白在脑缺血损伤修复中的作用及机制,我们 2011 年从美国杰克逊实验室(Jackson Laboratory)成功引进了 SPF 级 caveolin-1 基因敲除杂合子小鼠,在湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心动物房内饲养,并成功进行了鉴定与不同繁育方法比较。现将该小鼠的基因型鉴定、繁育过程报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

Caveolin-1 基因敲除小鼠亲代购自美国 Jackson Laboratory (Maine, USA),批号:2909619,SPF 级,库存号:007083,品系名:B6. Cg-Cav1^{tm1Mls}/J,遗传背景:C57BL/6,基因型:杂合子 caveolin-1^{+/-}。小鼠

的月龄 2~3 月,体重(25±5)g。

1.1.2 主要仪器及试剂

PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:T100 thermal cycler),化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司,型号:XRS + Imager),台式高速冷冻离心机(德国 Hermle 公司,型号:Z32HK),核酸水平电泳仪(北京百晶生物技术有限公司,型号:BG-SUHWI-DI),超纯水机(上海摩勒科学仪器有限公司,型号:摩尔超纯水机动物型 5009-11-582);基因组 DNA 提取溶液(A 液:25 mM NaOH + 2 mM EDTA;B 液:40 mM Tris-HCl),DreamTaq Green PCR Master Mix (2×)(美国 Thermo Scientific 公司,批号:00220411),100 bp DNA ladder(北京 Solarbio 科技有限公司,批号:20141103),Biowest Regular Agarose G-10(广州翔博生物科技有限公司,批号:111910)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠饲养

Caveolin-1 基因敲除小鼠饲养在湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心独立通气笼盒(individually ventilated cages, IVC)系统中,环境温度控制在(24±0.5)℃,相对湿度 50%~60%,自由饮食进水,昼夜光照节律。采用斯莱康大小鼠繁殖饲料及灭菌垫料,二者均为 SPF 级,垫料每周更换 2 次,饮水为超纯水,每日补充饲料及饮水。饲养笼具及饮水瓶每次更换清洗后均使用 84 消毒液浸泡,自来水冲洗后高压灭菌处理。

1.2.2 繁育方法

先将 caveolin-1 基因敲除杂合子雄性与雌性小鼠按 1:1 搭配,繁殖多代子鼠后,再将不同基因型性成熟(8 周龄左右)雌雄小鼠按以下四种方式 1:1 合笼配种:caveolin-1^{+/-} ♂ 与 caveolin-1^{+/-} ♀,caveolin-1^{+/-} ♂ 与 caveolin-1^{-/-} ♀,caveolin-1^{-/-} ♂ 与 caveolin-1^{+/-} ♀,caveolin-1^{-/-} ♂ 与 caveolin-1^{-/-} ♀,每组配对 8 对,均交配两个月。

1.3 基因型鉴定

(1)鼠尾基因组 DNA 的提取:采用煮沸裂解法^[13]提取鼠尾组织基因组 DNA:剪取小鼠尾尖 0.3~0.5 cm,置于 0.2 mL PCR 管中,置冰上剪碎,加入 A 液 100 μL 浸没组织,PCR 仪 95℃加热

2 h,冷却后加入 B 液 100 μ L,吹打混匀,12 000 r/min,4℃ 离心 5 min,取上清基因组 DNA,4℃ 冰箱备用。

(2)PCR 扩增:引物序列由 Jackson Laboratory 提供, Wild type forward: 5'-GCACACCAAGGAGATT-GACC-3', Common: 5'-CTTGGCTGTCACCACACAC-3', Mutant reverse: 5'-CTCCAGACTGCCTTGGGAAAA-3',由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,为干粉状,稀释 100 倍后等体积混合后备用。PCR 反应体系为 20 μ L:2 $\times$ DreamTaq Green PCR Master Mix 10 μ L,模板 DNA 2 μ L,引物混合物 1 μ L,ddH₂O 7 μ L。采用 PCR 仪进行扩增,反应条件为预变性 95℃ 3 min,变性 95℃ 30 s,退火 60℃ 30 s,延伸 72℃ 45 s,循环 40 次,72℃ 5 min 终止反应。

(3)琼脂糖凝胶电泳:取 PCR 扩增产物 6 μ L,在 2% 琼脂糖凝胶中以 150 V 由负极向正极电泳 30 min,于化学发光凝胶成像系统中拍照观察。

(4)基因型结果判定:Common 和 mutant reverse 引物扩增产物长度为 200 bp 左右,为 KO 小鼠;wild type forward 和 common 引物扩增产物长度为 661 bp,为 WT 小鼠;两条电泳条带均存在的为 HET 小鼠。

1.4 不同繁殖方式繁育结果观察

交配后密切观察小鼠的受孕情况,计算其受孕率;从娩出后第 1~28 天每周定期观察其外形特征,离乳后剪尾检测其基因型,计算纯合率。

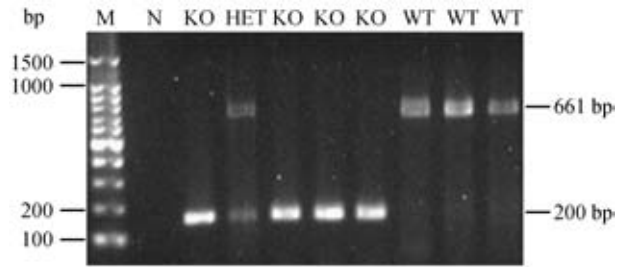
1.5 统计学方法

计量资料数据用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较,用单因素方差分析(One-way ANOVA)。计数资料组间比较,用 χ^2 检验。所有数据均用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 部分小鼠基因型鉴定结果

部分小鼠鼠尾基因组 DNA 扩增产物凝胶电泳结果(图 1):N 为阴性对照未见电泳条带,仅 200 bp 左右位置可见条带为 caveolin-1 基因敲除纯合子,仅 661 bp 位置可见条带为野生型,200 bp 左右和 661 bp 位置两条条带均可见为 caveolin-1 基因敲除杂合子。



注:M:Marker(100 bp DNA ladder);
N:阴性对照;KO:纯合子;HET:杂合子;WT:野生型。

图 1 部分小鼠基因型 PCR 鉴定结果
Note: M: Marker(100 bp DNA ladder) N: Negative control
KO: Homozygote. HET: Heterozygote. WT: Wild type.

Fig.1 Results of genotype
identification of some mice by PCR

2.2 不同繁殖方法繁育结果

Caveolin-1 基因敲除杂合子互交、杂合子与纯合子正交、反交以及纯合子互交,四种不同配种繁殖方式所产子代小鼠的基因型分布基本符合孟德尔遗传定律(表 1),其纯合率分别为 23.52%、47.36%、52.54%、100.00%。杂合子互交雌鼠受孕率为 100.00%,杂合子与纯合子正交、反交雌鼠受孕率均为 87.50%,纯合子互交雌鼠受孕率为 75.00%,杂合子互交种群与其余三种繁殖方式的雌鼠受孕率比较,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

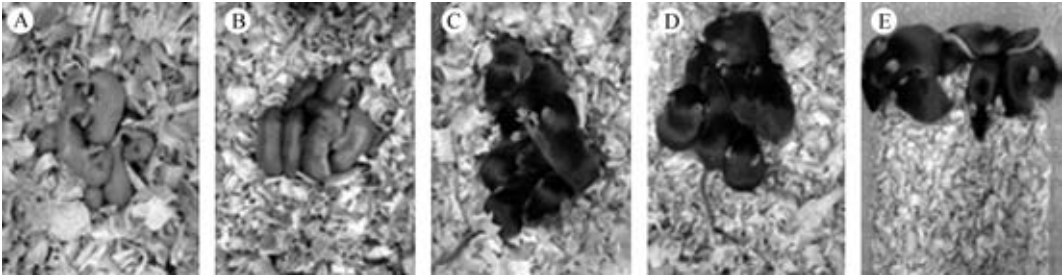
表 1 Caveolin-1 基因敲除小鼠不同繁殖方法繁育结果($n = 8$)						
Tab.1 Breeding results of different propagation method in the caveolin-1 gene knockout mice						
种群编号 Number	配种方式 Method $\delta \times \varphi$	子鼠基因型/只 Genotype/ n			合计/只 Total/ n	受孕率/% Pregnancy rate/%
		+/+	+/-	-/-		
1	+/- $\times$ +/-	19	33	16	68	100.00
2	+/- $\times$ -/-	0	30	27	57	87.50*
3	-/- $\times$ +/-	0	28	31	59	87.50*
4	-/- $\times$ -/-	0	0	30	70	75.00*

注:与种群编号 1 比较,* $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the population No. 1, * $P < 0.05$.

2.3 三种不同基因型小鼠外形特征

Caveolin-1 基因敲除杂合子小鼠互交所生子代新生幼鼠呈肉红色, 赤裸无毛, 两眼紧闭, 两耳粘贴在皮肤上, 尾短, 四肢不发达, 活动能力有限(图 2A)。7

日龄、14 日龄、21 日龄及 28 日龄不同基因型小鼠(经基因型鉴定存在 caveolin-1^{+/-} 杂合子、caveolin-1^{-/-} 纯合子、caveolin-1^{+/+} 野生型三种不同基因型)在外观形态上未见明显差异(图 2B、C、D、E)。



注: A:1 日龄子鼠; B:7 日龄子鼠;
C:14 日龄子鼠; D:21 日龄子鼠; E:28 日龄子鼠。

图 2 三种不同基因型不同日龄子鼠外形特征

Note: A: 1-day-old mouse. B: 7-day-old mouse. C: 14-day-old mouse. D: 21-day-old mouse. E: 28-day-old mouse.

Fig. 2 Appearance of three different genotypes of mice at different ages

3 讨论

Caveolae 是 20 世纪 50 年代由日本科学家 Yamada 发现并命名的细胞膜上烧瓶状凹陷, 大小约 50 ~ 100 nm, 在血管内皮细胞、脂肪细胞、平滑肌细胞等细胞上表达丰富, 在细胞的囊泡转运、胆固醇体内平衡以及细胞信号转导等生物学过程调控发挥着重要作用^[4, 14-15]。Caveolin-1 是 caveolae 的关键结构与功能蛋白, 肽链中间由疏水性的氨基酸形成一个发夹样结构将其锚定在细胞膜上, 而亲水性的 C 端和 N 端均朝向胞质, 在其 N 端包含了由 20 个氨基酸残基组成的脚手架区域(caveolin-1 scaffolding domain, CSD), caveolin-1 通过其 CSD 能够寡聚细胞内各种信号分子的催化亚基(如 Src 家族激酶、丝/苏氨酸激酶、G 蛋白、蛋白激酶 A、蛋白激酶 C、生长因子受体以及一氧化氮合成酶等), 对其活性状态起直接调节作用, 从而参与了细胞增殖分化、炎症反应等多种病理、生理过程^[16]。

基因型鉴定是进行基因敲除小鼠繁育保种的重要环节之一, 其方法主要包括传统的 Southern bolt 法和 PCR 法^[17]。本研究采用煮沸裂解法提取鼠尾组织基因组 DNA, 参照 Jackson Laboratory 提供的引物序列, 通过普通 PCR 扩增凝胶电泳成功鉴定出 caveolin-1 敲除鼠的基因型, 与用 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA、Southern bolt 法鉴定比较, 整个过程耗时较短、费用较低, 说明该方法可以作为检测 caveolin-1 敲除小鼠基因型的一种快速可靠方法。

基因敲除小鼠由于被敲除的基因功能各不相

同, 使得敲除小鼠的某些功能丧失, 可能造成生长发育或生殖功能障碍, 故在饲养繁殖及保种方面与普通实验小鼠相比有不同的要求^[18]。研究结果表明三种不同基因型小鼠在外观形态上未见明显差异, 与国外学者 Trushina 等^[6]报道的结果一致; Caveolin-1 基因敲除杂合子小鼠的繁殖能力未受影响, 根据孟德尔遗传定律, 采用杂合子互交, 子代小鼠可能出现纯合子(caveolin-1^{-/-})、杂合子(caveolin-1^{+/-})和野生型(caveolin-1^{+/+})三种基因型, 其比例接近 1:2:1, 获得的 caveolin-1^{-/-} 纯合子小鼠可用于实验研究, caveolin-1^{+/+} 野生型小鼠可用作阴性对照, caveolin-1^{+/-} 杂合子小鼠可用来保种, 因此, 该繁育方法能同时兼顾了实验与保种需求, 但纯合子获得率仅 50% 左右, 若短期内需要使用大量纯合子用于实验则无法提供; 纯合子的繁殖能力虽有所下降, 但尚未完全丧失, 具有一定的繁殖能力, 而纯合子互交所产子代纯合率为 100%, 无杂合子与野生型子鼠, 故短期内若需提高纯合子数量以及使用同源野生鼠用作实验, 采用杂合子互交与纯合子互相结合的繁育方法可能是一种较好的选择。通过一段时间的饲养鉴定、繁殖, 目前已获得了一定数量的 caveolin-1 基因敲除小鼠, 这为深入研究 caveolin-1 在脑缺血损伤修复中的作用及药物靶标的筛选提供了前期基础。

参 考 文 献

[1] Guan C, Ye C, Yang X, et al. A review of current large-scale mouse knockout efforts [J]. Genesis, 2010, 48(2): 73-85.
[2] 白敏, 李崎, 邵艳姣, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建定点

- 突变小鼠品系 [J]. 遗传, 2015, 37(10): 1029–1035.
- [3] 周仁鹏, 吴小山, 王志森, 等. ASIC1 基因敲除小鼠的繁殖及基因鉴定 [J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(9): 1341–1343.
- [4] Parat MO. The biology of caveolae: achievements and perspectives [J]. Int Rev Cell Mol Biol. 2009, 273:117–162.
- [5] Wang F, Gu H, Zhang D. Caveolin-1 and ATP binding cassette transporter A1 and G1-mediated cholesterol efflux [J]. Cardio Haematol Disorders-Drug Targets, 2014, 14(2): 142–148.
- [6] Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, et al. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly [J]. Cancer Metastasis Rev, 2008, 27(4): 715–735.
- [7] Trushina E, Du Charme J, Parisi J, et al. Neurological abnormalities in caveolin-1 knock out mice [J]. Behav Brain Res, 2006, 172(1): 24–32.
- [8] Gaudreault S B, Blain J F, Gratton J P, et al. A role for caveolin-1 in post-injury reactive neuronal plasticity [J]. J Neurochem, 2005, 92(4): 831–839.
- [9] Jasmin JF, Yang M, Iacovitti L, et al. Genetic ablation of caveolin-1 increases neural stem cell proliferation in the subventricular zone (SVZ) of the adult mouse brain [J]. Cell Cycle, 2009, 8(23): 3978–3983.
- [10] Li Y, Luo J, Lau W M, et al. Caveolin-1 plays a crucial role in inhibiting neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells via VEGF signaling-dependent pathway [J]. PloS One, 2011, 6(8): e22901.
- [11] Jasmin JF, Malhotra S, Singh Dhallu M, et al. Caveolin-1 deficiency increases cerebral ischemic injury [J]. Circ Res, 2007, 100(5): 721–729.
- [12] 刘柏炎, 沈剑刚, 蔡光先, 等. 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠脑内 caveolin-1、2 的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2008, 28(1): 22–24.
- [13] 于东明, 王思谦, 范媛媛, 等. 煮沸裂解法快速提取 Tg2576 小鼠 DNA [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2011, 14(24): 48–50.
- [14] Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae [J]. Nature Rev Mol Cell Biol. 2007, 8(3): 185–194.
- [15] Fang K, Fu W, Beardsley AR, et al. Overexpression of caveolin-1 inhibits endothelial cell proliferation by arresting the cell cycle at G0/G1 phase [J]. Cell Cycle, 2007, 6(2): 199–204.
- [16] Bucci M, Gratton J P, Rudic R D, et al. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation [J]. Nature Med, 2000, 6(12): 1362–1367.
- [17] Lee GS, Lee KY, Choi KC, et al. Phenotype of a calbindin-D9k gene knockout is compensated for by the induction of other calcium transporter genes in a mouse model [J]. J Bone Mineral Res, 2007, 22(12): 1968–1978.
- [18] 陈锡文, 管敏强, 陈通克, 等. ALK3 基因敲除小鼠的繁育及基因鉴定 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2009, 6(11): 78–79.

[收稿日期] 2015-12-11

信息

北京积水潭医院投入使用欧标模式大动物笼舍

随着实验动物科学的快速发展,“好的实验动物福利 = 好的科学研究结果”已经是国际科学界的共识。通过“中英实验动物福利国际论坛”学习诺和诺德中国区北京大动物实验室先进的饲养管理经验,北京市创伤骨科研究所对大动物饲养间按照欧洲标准进行了改建。现已通过验收,并于 2016 年 5 月迎来第一批比格实验用犬入住。

改建后新式笼舍设计科学,每个笼舍的面积为 1.98 平方米,动物生活在可以自由走动的围栏里,活动空间加大,安全,平时群居生活改善了实验动物的生存环境。①笼舍质量:采用 304 不锈钢表面喷砂工艺、自动引水系统、金刚砂耐磨防滑地面。②一舍多用,提高利用率:可按照不同的需求灵活拆卸,分别饲养犬、小型猪、羊三种动物。③符合 3R 原则:将原有的 31 个犬笼位减少成 16 只犬(或 16 只小型猪,或 8 只羊)的笼舍。④充分体现对实验动物的人文关怀:横向栏杆,以便于动物手术后借助栏杆的力量逐渐站立;犬的防滑高台跑道,以增加生活的趣味性;每两个笼舍之间都有 2 个活动门,以增加动物的活动空间;猪用开窗,以便于分栏饲养的猪有头脸部的亲密接触。此外,原有得天独厚的庭院条件,可以使动物白天在院子里自由活动。

经改建后,北京积水潭医院的大型实验动物(狗、小型猪、羊)将生活在国内、外实验动物界和骨科界先进的饲养环境中,对于提高骨科动物实验的科学研究结果在国际上的认可度、进一步提高北京积水潭医院的骨科动物实验的研究水平起到积极作用。

北京市创伤骨科研究所动物实验室 赵丹慧 阎国强 供稿

黄连解毒汤通过调节性 T 细胞产生 抗动脉粥样硬化作用

周凤华,程赛博,张宇,张蕾,贾钰华,赵丹丹,苏志杰

(南方医科大学中医药学院,广州 510515)

【摘要】 目的 观察黄连解毒汤(HLJDD)对 ApoE^{-/-}小鼠斑块、炎症因子及调节性 T 细胞(Tregs)的影响。**方法** 高脂饲料喂养雄性 ApoE^{-/-}小鼠建立动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)模型,40 只雄性 ApoE^{-/-}小鼠随机分为:模型组,辛伐他汀组,HLJDD 高、中、低剂量组($n = 8$)。HLJDD 灌胃剂量依次为:每日 3.5、7.0、14.0 g/(kg · bw),辛伐他汀灌胃剂量为每日 5 g/(kg · bw),另设 8 只同龄雄性 C57BL/6J 小鼠为对照组,喂以普通饲料,连续给药 16 周后处死小鼠。检测血脂水平,观察主动脉斑块形成情况;ELISA 法检测血清炎症因子水平;流式细胞术检测 Tregs 数量;RT-PCR 法检测 Foxp3 mRNA 水平。**结果** 与对照组相比,模型组中主动脉斑块明显,TC、TG 与 LDL-C 浓度显著升高,促炎因子超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、白介素-6(IL-6)与肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平显著升高,而 HDL-C、白介素-10(IL-10)、生长转化因子- β (TGF- β)、Foxp3 mRNA 水平显著降低,Tregs 数量减少,二者差异有显著性($P < 0.01$);HLJDD 能显著缩小主动脉斑块面积,降低血清 TC、TG 与 LDL-C,并降低 IL-6、hs-CRP 与 TNF- α 水平,增加血清 HDL-C、IL-10、TGF- β 及 Foxp3 mRNA 水平,并增加 Tregs 数量,与模型组相比差异有显著性($P < 0.01$)。**结论** HLJDD 可显著减轻 ApoE^{-/-}小鼠主动脉斑块损伤,可能与增加 Tregs 数量,从而降低血清炎症因子水平有关。

【关键词】 动脉粥样硬化;调节性 T 细胞;黄连解毒汤;白介素-10;生长转化因子- β ; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0233-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.003

Anti-atherosclerotic effect of a Chinese medicine, Huanglian Jiedu Decoction, mediated by regulatory T cells

ZHOU Feng-hua, CHENG Sai-bo, ZHANG Yu, ZHANG Lei,
JIA Yu-hua, ZHAO Dan-dan, SU Zhi-jie

(School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of a Chinese medicine, Huanglian Jiedu Decoction (HLJDD), on atherosclerotic plaque, inflammatory factors and regulatory T cells in ApoE^{-/-} mice. **Methods** High fat diet was given to ApoE^{-/-} mice to establish an atherosclerosis model. 40 male ApoE^{-/-} mice were randomly divided into five groups: model group, simvastatin group, low, moderate and high dose HLJDD groups ($n = 8$). HLJDD was intragastrically administered in a dose of 3.5, 7.0, or 14.0 g/(kg · bw) once daily for 16 weeks. The dose of simvastatin was 5.0 g/(kg · bw). Another 8 male C57BL/6J mice were taken as control group. At the end of the 29-week experiment, all of the mice were sacrificed. The aortic plaques, level of blood lipids, inflammatory factors, Tregs number and the level of Foxp3 mRNA were detected and analyzed by ELISA, flow cytometry and RT-PCR, respectively. **Results** Compared with the control group, the

【基金项目】国家自然科学基金(No.81403339);广东省自然科学基金博士启动项目(No.2014A030310150);广东省中医药管理局科研项目(No.20141186)

【通讯作者】周凤华(1986-),女,讲师,博士学位,从事缺血性心血管疾病的中医药防治研究。Email:wendyzhou515@126.com

aortic plaques were much larger in the model group, and the levels of TC, TG, LDL-C, IL-6, hs-CRP, and TNF- α were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$ for all). Meanwhile, the levels of HDL-C, IL-10, TGF- β and Foxp3 mRNA were much lower than those in the control group ($P < 0.01$ for all), and the Tregs numbers were less than that in the control group ($P < 0.01$). HLJDD regulated the blood lipids in ApoE $^{-/-}$ mice and decreased the levels of IL-6, hs-CRP, and TNF- α , however increased the levels of IL-10, TGF- β and Foxp3 mRNA. At the same time, it increased Tregs number in the ApoE $^{-/-}$ mice. Compared with the model group, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusions** HLJDD can significantly alleviate the aortic plaque damages in ApoE $^{-/-}$ mice. It may be related to the up-regulation of Tregs, which can lead to decrease the expression of serum pro-inflammatory factors such like IL-10, hs-CRP and TNF- α .

【Key words】 Atherosclerosis; Regulatory T cells; Huanglian Jiedu Decoction, Chinese medicine; IL-10; TGF- β ; Mice

Corresponding author: ZHOU Feng-hua, Email: wendyzhou515@126.com

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是多数心脑血管疾病的共同病理基础,其发病机制复杂。目前普遍认为,AS是发生在全身大中弹性动脉的慢性炎症性病变,免疫反应贯穿了AS发生发展的全过程。调节性T细胞(CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T regulatory cells, Tregs)是一类特殊亚群的T细胞,主要通过分泌白介素-10与转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)抑制炎症反应。已有研究证实,Tregs能显著延缓AS进展,但其机制尚未阐明^[1]。

黄连解毒汤(Huanglian Jiedu Decoction, HLJDD)出自《外台秘要》,主要由黄连、黄柏、栀子、黄芩四味中药组成,具有清热解毒之功效。研究表明,HLJDD能显著调节机体免疫功能,对热毒炽盛型感染性疾病疗效较好^[2]。中医认为热毒是AS的主要病理矛盾,因而清热解毒法是治疗AS性疾病的主要中医治法。本研究采用高脂喂养ApoE基因敲除(ApoE $^{-/-}$)小鼠建立AS模型,主要观察HLJDD对AS小鼠血脂、斑块及Tregs的影响,初步探讨HLJDD防治AS的药理机制。

1 材料与方法

1.1 动物及饲料

6周龄SPF级雄性ApoE基因敲除(ApoE $^{-/-}$)小鼠40只,同周龄C57BL/6J雄性小鼠8只,均由北京维通利华实验动物公司提供【SCXK(京)2012-0001】。高脂饲料配方:78.85%基础饲料+0.15%胆固醇+21%脂肪,由广东省医学实验中心提供【SCXK(粤)2013-0002】。动物实验在南方医科大学实验动物中心完成【SYXK(粤)2011-0074】。

1.2 药物与试剂

黄连解毒汤水煎剂由黄连、栀子、黄芩、黄柏组

成(3:3:2:2),南方医院药剂科代煎;辛伐他汀片购自杭州默沙东公司;血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒均购自南京建成生物公司;超敏C反应蛋白(hs-CRP)、白介素-6(IL-6)与肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-10与TGF- β 试剂盒均购自武汉华美生物公司;TRIzol、TaqMan Universal PCR Master Mix、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit、TaqMan MicroRNA Assays(Takara,日本)购自大连宝生物公司。

1.3 仪器

酶标定量测定仪(德国Thermo公司)、低温高速离心机(美国Thermo公司)、Leica超低温冰箱(美国Revco公司)、L420台式低速自动平衡离心机(湘仪仪器有限公司)、PL303电子天平(瑞士Mettler Toledo公司)、SDS电泳系统(北京君意东方有限公司)、Image Station 2000 MM成像系统(美国Kodak公司)、实时荧光定量PCR仪(德国Roche公司)。

1.4 方法

1.4.1 小鼠分组及AS模型建立

40只ApoE $^{-/-}$ 小鼠随机分为模型组,辛伐他汀组,HLJDD低、中、高剂量组,每组8只,高脂饲料喂养12周后开始药物干预。HLJDD组灌胃剂量依次为每日3.5、7.0、14.0 g/(kg·bw),辛伐他汀灌胃剂量为5 mg/(kg·d),模型组每日给予等体积生理盐水灌胃,药物连续干预16周。另取8只同周龄C57BL/6J雄性小鼠作为对照组,普通饲料喂养。

1.4.2 标本采集及处理

实验第29周处死小鼠,心脏穿刺采集血液标本,离心分离血清,检测小鼠血脂水平;取主动脉弓制作病理切片,HE染色观察血管内斑块;另每组取三条主动脉进行油红O染色,观察整条主动脉的斑

块形成情况;采用流式细胞术检测各组小鼠 Tregs 数量。

1.4.3 ELISA 法测血浆炎症因子水平

分离小鼠血浆,按照试剂盒说明书进行操作,分别计算各组小鼠 IL-6、hs-CRP、TNF-α、IL-10 及 TGF-β 浓度。

1.4.4 RT-PCR 检测

Foxp3 及内参引物由上海 Invitrogen 公司合成纯化。Foxp3 上游引物序列为 5'-ATGAAGAGCCTGCCTT GGT A-3',下游引物序列为 5'-CCAGATGT-TGTGGGTGAGTG-3';β-actin 上游引物 5'-CTGTC-CCTGTATGCCTCTG-3',下游 5'-ATGTCACG-CACGATTTCC-3'。提取血管总 RNA,并采用琼脂糖凝胶电泳检测其质量。合成 cDNA:反应体系由 14 μL 模板 RNA,2 μL enzyme mix 以及 5 × RT 缓冲液 4 μL 组成,42℃ 反应 1 h,95℃ 反应 5 min,即可得 cDNA。RT-PCR:反应体系分别为:cDNA 1 μL、2 × PCR 反应混合物 10 μL、引物 0.5 μL、H₂O 7.5 μL 及 20 × SYBR 1 μL。95℃ 反应 10 min,再转向 (95℃ 10 s、60℃ 1 min)共 40 个循环。目的基因与内参基因的相对表达量用 2^{-ΔΔCT}表示,重复 3 次。

1.5 统计分析

采用 SPSS20.0 软件对数据进行分析。计量资料数据以均数 ± 标准差表示。对符合正态分布和方差齐性的数据,采用 one-way ANOVA 方法分析;若不符合正态分布和方差齐性,则采用秩和检验。检验显著性水准 α = 0.05。

2 结果

2.1 小鼠体重及血脂

实验中发现对照组小鼠精神最佳,进食与活动量均正常,毛色有光泽。而模型组小鼠精神状态较差,进食量大,活动量小,体重增长最显著,毛发稀疏,缺少光泽。药物干预组小鼠精神较好,体重增加比模型组小,毛发有光泽。比较各组血脂水平发现,模型组 TG、TC 与 LDL-C 增高,HDL-C 明显降低,与对照组相比差异有显著性(P < 0.01,表 1)。辛伐他汀与 HLJDD 各组 TG、TC 与 LDL-C 有所降低,相反 HDL-C 浓度增加,其中,辛伐他汀与 HLJDD 高剂量组效果最明显,与模型组相比差异有显著性(P < 0.01,表 1)。提示,HLJDD 汤具有 ApoE^{-/-}小鼠调节血脂的功效。

表 1 各组小鼠体重及血脂水平($\bar{x} \pm s, n = 8, \text{mmol/L}$)
Tab.1 Body weight and level of blood lipoproteins in the mice

组别 Groups	体重/g Body weight	总胆固醇 TC	低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C	高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C	血清甘油三酯 TG
对照组 Control	31.32 ± 2.87 [#]	4.98 ± 0.57 [#]	0.92 ± 0.06 [#]	1.88 ± 0.37 [#]	2.18 ± 0.25 [#]
模型组 Model	43.85 ± 6.24 *	28.65 ± 3.74 *	4.33 ± 0.25 *	0.31 ± 0.09 *	24.01 ± 2.20 *
HLJDD Low dose	40.49 ± 3.77 *	22.65 ± 2.68 *	3.21 ± 0.37 *	0.56 ± 0.12 *	18.79 ± 1.97 *
HLJDD moderate dose	38.52 ± 5.38 *	17.53 ± 3.52 ^{#*}	1.98 ± 0.34 ^{#*}	0.83 ± 0.21 ^{#*}	14.72 ± 1.26 ^{#*}
HLJDD High dose	35.13 ± 4.26 [#]	13.65 ± 3.21 ^{#*}	1.51 ± 0.26 ^{#*}	1.29 ± 0.17 ^{#*}	10.85 ± 1.03 ^{#*}
辛伐他汀组 Simvastatin	41.48 ± 4.07 *	15.88 ± 1.99 ^{#*}	1.49 ± 0.31 ^{#*}	1.25 ± 0.23 ^{#*}	13.14 ± 0.85 ^{#*}

注:与模型组比较,[#]P < 0.01,与对照组比较,*P < 0.01。
Note. Compared with the model group, [#]P < 0.01; Compared with the control group, *P < 0.01.

2.2 病理形态学

对 ApoE^{-/-}小鼠整条主动脉进行油红 O 染色发现,对照组小鼠主动脉内膜光滑,无明显斑块形成,而模型组小鼠主动脉内膜出现多处肉眼可见的斑块,尤其是主动脉弓及分叉处。辛伐他汀及 HLJDD 组斑块有所减轻,斑块占主动脉的

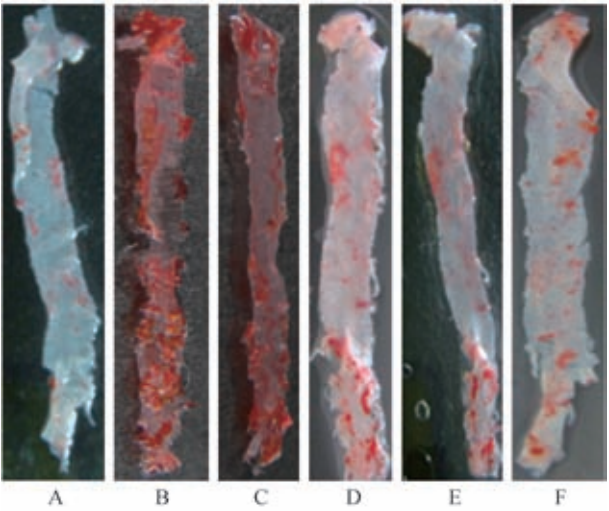
比例也显著低于模型组(P < 0.01,表 2 与图 1)。主动脉弓处的石蜡切片显示,辛伐他汀与 HLJDD 高剂量组斑块面积显著小于模型组,差异有显著性(P < 0.01,表 2 与图 2)。说明 HLJDD 与辛伐他汀都能显著抑制 AS 斑块发展,从而延缓 AS 进程。

2.3 炎症因子水平

模型组 hs-CRP、IL-6 与 TNF-α 水平较对照组显著升高,辛伐他汀与 HLJDD 中、高剂量能显著降低 hs-CRP、IL-6 与 TNF-α 水平,与模型组相比差异有显著性($P < 0.01$,表 3),HLJDD 高剂量组与辛伐他汀组差异无显著性($P > 0.05$)。提示 HLJDD 具有较好的抗炎作用。

2.4 Tregs 数量及 IL-10 与 TGF-β 水平

与对照相比,模型组 Tregs 数量显著降低,HLJDD 中、高剂量组显著增加了 Tregs 数量,差异有显著性($P < 0.01$,表 4)。分析各组小鼠 IL-10 与 TGF-β 水平发现,模型组小鼠 IL-10 与 TGF-β 浓度较对照组显著降低,HLJDD 高剂量组显著提高两者水平,与其他组相比差异均有显著性($P < 0.01$)。而模型组 Tregs 表面特异性标记物 Foxp3 mRNA 水平显著低于对照组,HLJDD 能显著增加 Foxp3 mRNA 水平,增加 Tregs 数量。提示 HLJDD 能增加 Tregs 数量,并促进其分泌 IL-10 与 TGF-β,发挥其抗炎作用。



注:A:对照组;B:模型组;C:辛伐他汀组;
D:HLJDD 低剂量组;E:HLJDD 中剂量组;F:HLJDD 高剂量组。

图1 各组主动脉斑块油红 O 染色

Note. Groups as follows; A: control; B: model;
C: simvastatin; D:HLJDD low dose, E: HLJDD moderate dose; F: HLJDD high dose.

Fig.1 Atherosclerotic plaques in the mouse aortas Oil red O staining

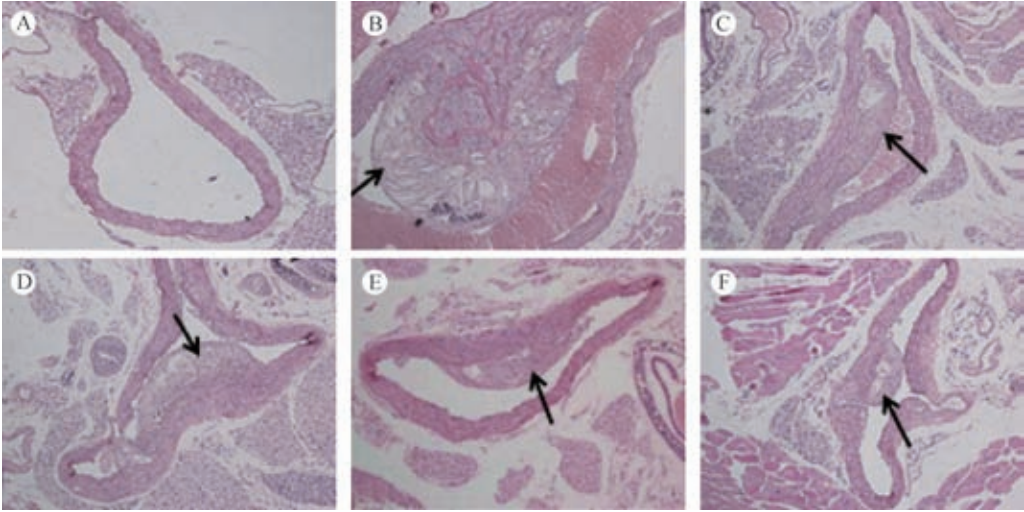


图2 各组主动脉斑块石蜡切片染色(分组同上,×200)

Fig.2 The atherosclerotic plaques in the mice aortas (groups as the above, HE staining ×200)

表2 各组小鼠主动脉斑块面积比例($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab.2 Ratios of plaque area in the mouse aortas

组别 Groups	主动脉 Aorta/%	主动脉弓 Aortic arch/%
对照组 Control	0	0
模型组 Model	33.19 ± 5.35 *	42.73 ± 8.62 *
HLJDD 低组 HLJDD low dose	18.43 ± 6.72 *	28.65 ± 2.68 # *
HLJDD 中组 HLJDD moderate dose	14.26 ± 4.22 **	20.36 ± 4.82 # *
HLJDD 高组 HLJDD high dose	10.37 ± 3.43 **	15.94 ± 3.57 # *
辛伐他汀组 Simvastatin	17.50 ± 4.03 **	33.18 ± 5.44 *

注:与模型组比较, # $P < 0.01$, 与对照组比较, * $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the model group, # $P < 0.01$; Compared with the control group, * $P < 0.01$.

表 3 各组小鼠血清炎症因子水平($\bar{x} \pm s, n = 8, \text{ng/mL}$)

Tab. 3 The levels of serum inflammation factors in the mice

组别 Groups	hs-CRP	IL-6	TNF- α
对照组 Control	132. 73 $\pm$ 6. 22 [#]	159. 62 $\pm$ 8. 93 [#]	55. 08 $\pm$ 4. 36 [#]
模型组 Model	296. 52 $\pm$ 10. 43 *	427. 58 $\pm$ 15. 33 *	163. 24 $\pm$ 7. 56 *
HLJDD 低组 Low dose HLJDD	233. 71 $\pm$ 7. 58 *	379. 32 $\pm$ 18. 44 *	134. 39 $\pm$ 7. 27 *
HLJDD 中组 Moderate dose HLJDD	198. 52 $\pm$ 9. 34 *	291. 49 $\pm$ 13. 26 ^{**}	118. 71 $\pm$ 5. 74 ^{**}
HLJDD 高组 High dose HLJDD	166. 13 $\pm$ 6. 73 [#]	213. 70 $\pm$ 15. 63 [#]	73. 51 $\pm$ 8. 23 [#]
辛伐他汀组 Simvastatin	158. 32 $\pm$ 9. 07 [#]	186. 53 $\pm$ 10. 19 [#]	82. 45 $\pm$ 6. 35 [#]

注:与模型组比较,[#] $P < 0. 01$,与对照组比较,^{*} $P < 0. 01$ 。
Note. Compared with the model group, [#] $P < 0. 01$; Compared with the control group, ^{*} $P < 0. 01$.

表 4 各组小鼠 Tregs 数量及 IL-10 与 TGF- β 水平($\bar{x} \pm s, n = 8, \text{ng/mL}$)

Tab. 4 The serum levels of IL-10, TGF β and Tregs in the mice

组别 Groups	Tregs /%	IL-10	TGF- β	Foxp3/ β -actin
对照组 Control	9. 64 $\pm$ 0. 59 [#]	295. 34 $\pm$ 12. 66 [#]	421. 26 $\pm$ 18. 65 [#]	0. 38 $\pm$ 0. 09 [#]
模型组 Model	4. 85 $\pm$ 0. 27 *	98. 16 $\pm$ 15. 48 *	148. 37 $\pm$ 10. 59 *	0. 16 $\pm$ 0. 05 *
HLJDD 低组 Low dose HLJDD	5. 57 $\pm$ 0. 42 *	132. 53 $\pm$ 8. 62 *	230. 19 $\pm$ 17. 72 *	0. 20 $\pm$ 0. 05 *
HLJDD 中组 Moderate dose HLJDD	6. 99 $\pm$ 0. 36 ^{**}	198. 49 $\pm$ 13. 82 ^{**}	331. 82 $\pm$ 11. 46 ^{**}	0. 25 $\pm$ 0. 06 ^{**}
HLJDD 高组 High dose HLJDD	8. 76 $\pm$ 0. 48 [#]	261. 73 $\pm$ 15. 25 [#]	378. 15 $\pm$ 15. 67 [#]	0. 34 $\pm$ 0. 04 [#]
辛伐他汀组 Simvastatin	8. 19 $\pm$ 0. 37 ^{**}	234. 58 $\pm$ 10. 93 ^{**}	362. 91 $\pm$ 18. 18 [#]	0. 28 $\pm$ 0. 07 ^{**}

注:与模型组比较,[#] $P < 0. 01$,与对照组比较,^{*} $P < 0. 01$ 。
Note. Compared with the model group, [#] $P < 0. 01$; Compared with the control group, ^{*} $P < 0. 01$.

3 讨论

本研究以高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠复制 AS 模型,以 HLJDD 高中低剂量连续干预小鼠 16 周,检测小鼠血脂、主动脉斑块、炎症因子水平及 Tregs 数量与功能。通过分析实验结果我们得出以下结论:(1) HLJDD 能显著降低 ApoE^{-/-}小鼠 TC、TG 与 LDL-C 水平,增高 HDL-C 水平,具有显著调节血脂水平的作用;(2) HLJDD 能显著缩小主动脉处的斑块面积,降低小鼠血清炎症因子 hs-CRP、IL-6 与 TNF- α 水平,通过抗炎机制来延缓 AS 斑块进展;(3) ApoE^{-/-}小鼠 Tregs 数量显著降低,IL-10 与 TGF- β 分泌减少,HLJDD 显著增加 Tregs 数量,促进 Tregs 分泌 IL-10 与 TGF- β ,从而起到抗炎作用。

免疫反应贯穿于 AS 全过程,并在其中起到重要作用,通过调节免疫功能可起到防治 AS 的功效^[3]。Tregs 是一类特殊类型的 T 细胞,在调节机体免疫系统平衡及控制自身免疫性疾病的进展中具有重要作用。ApoE^{-/-}小鼠体内 Tregs 的数量和功能均明显低于正常 C57BL/6J 小鼠,而且随着 AS 的进展,Tregs 的数量及其特异性标志物 Foxp3 的表达、分泌的 TGF- β 水平都显著下降^[1,4]。ACS 患者人群外周血中 Tregs 的数量也明显低于健康人群,而且 Tregs 数量的降低伴随人类 AS 发生和发展的各个阶

段^[5,6]。因此,内源性 Tregs 的数量和功能降低与 AS 的发生关系密切。在 ApoE^{-/-}小鼠中给予 Tregs 治疗可有效阻止小鼠斑块内 T 细胞和巨噬细胞浸润,显著降低斑块面积,从而阻止早期 AS 形成^[7]。本实验中,模型组 Tregs 数量显著低于对照组,而由其分泌的 IL-10 及 TGF- β 水平也显著降低,这与文献结果一致,说明 AS 小鼠体内呈现低水平的 Tregs。而 HLJDD 高剂量可显著增加 Tregs 数量,促进其分泌抗炎因子 IL-10 及 TGF- β ,从而减轻 AS 斑块的炎症反应,延缓 AS 斑块进展。这些结果都提示,对维持体内免疫稳态起重要作用的 Tregs 同样可以在抗 AS 方面发挥重要作用,通过提高体内 Tregs 的数量和功能,可有效抑制 T 细胞和巨噬细胞介导的免疫反应,最终逆转 AS 斑块进程^[8]。

虽然 AS 的病理机制十分复杂,但学者们普遍认为 AS 是一种慢性炎症性疾病,炎症反应是 AS 斑块形成、发展和最终破裂的关键环节^[9]。炎症的作用主要依赖于炎症细胞的浸润和促炎因子如 TNF- α 、IL-6、hs-CRP 等的产生和释放。效应性 T 细胞和巨噬细胞直接参与 AS 的炎症过程,产生大量促炎因子,而 Tregs 抑制 T 细胞的活化及其从外周组织向 AS 斑块的迁移^[10]。TNF- α 、IL-6 与 hs-CRP 等促炎因子无论在 AS 病人或 ApoE^{-/-}小鼠血清中均呈现较高的水平,它们也是炎症的血清标记物,通过检

测其浓度可快速了解机体炎症反应的程度。而主要由 Tregs 分泌的 IL-10 与 TGF- β 具有显著的抗炎作用,能有效抑制由促炎因子所激发的炎症反应,维持体内免疫功能的正常与稳定。IL-10 可抑制 IL-1、IL-6、TNF- α 、ICAM-1 等炎症因子的合成和释放,并促进其他抗炎因子的产生。IL-10 在 AS 的形成和稳定性方面起到重要的保护作用,IL-10 的缺失可加速 AS 的发展,促进血栓形成和斑块不稳定^[11]。LDLR^{-/-}小鼠体内过表达 IL-10 后,小鼠体内 AS 病变则受到明显抑制^[12]。TGF- β 信号通路的抑制则会诱导 T 细胞的活化及向 Th1、Th2 细胞分化,相应降低 Tregs 的细胞数量,减少其表面 Foxp3 的表达,同时减弱 Tregs 的抑制功能^[13]。因此,TGF- β 在维持 Tregs 的数量和功能方面也发挥了关键作用。研究表明,TGF- β 抑制斑块内炎症细胞的浸润,促进胶原的合成和平滑肌细胞分泌基质金属蛋白酶抑制剂;反之,TGF- β 信号通路的缺失则加重斑块内炎症反应,促进胶原降解,从而诱导斑块不稳定^[14]。

我们的结果也显示,ApoE^{-/-}小鼠血清 TNF- α 、IL-6 与 hs-CRP 水平显著高于正常的 C57BL/6J 小鼠,提示 ApoE^{-/-}小鼠体内存在较高水平的炎症反应。HLJDD 与辛伐他汀均能显著降低小鼠炎症因子水平,辛伐他汀的抗炎效果明显优于中药 HLJDD,但 HLJDD 调节 Tregs 数量及功能的作用显著优于辛伐他汀,说明 HLJDD 抗 AS 功效部分是通过调节 Tregs 实现的,但 HLJDD 如何调控 Tregs 数量及功能尚需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Mor A, Planer D, Luboshits G, et al. Role of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in experimental atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vase Biol*, 2007, 27: 893–900.
- [2] 魏玉芬. 黄连解毒汤对 CLP 诱导的脓毒症大鼠的保护作用及其代谢组学研究 [D]. 第二军医大学博士学位论文, 2014.
- [3] Usman A, Ribatti D, Sadat U, et al. From lipid retention to immune-mediate inflammation and associated angiogenesis in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2015, 22(8): 739–749.
- [4] de Boer OJ, van der Wal AC. FOXP3⁺ regulatory T cells in vulnerable atherosclerotic plaques [J]. *Int J Cardiol*, 2010, 145: 183–187.
- [5] de Boer OJ, van der Meer JJ, Teeling R, et al. Low numbers of FOXP3 positive regulatory T cells are present in all developmental stages of human atherosclerotic lesions [J]. *PLoS One*, 2007, 2(8): e779.
- [6] Zhu ZF, Meng K, Zhong YC, et al. Impaired Circulating CD4(+) LAP(+) regulatory T cells in patients with acute coronary syndrome and its mechanistic study [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88775.
- [7] Feng J, Zhang Z, Kong W, et al. Regulatory T cells ameliorate hyperhomocysteinaemia accelerated atherosclerosis in apoE^{-/-} mice [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 84: 155–163.
- [8] Goronzy JJ, Weyand CM. Immunosuppression in atherosclerosis: mobilizing the opposition within [J]. *Circulation*, 2006, 114: 1901–1904.
- [9] Ross R. Atherosclerosis — an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340: 115–126.
- [10] Kvakani H, Kleinewietfeld M, Qadri F, et al. Regulatory T cells ameliorate angiotensin II induced cardiac damage [J]. *Circulation*, 2009, 119: 2904–2912.
- [11] Ait-Oufella H, Wang Y, Herbin O, et al. Natural regulatory T cells limit angiotensin II-induced aneurysm formation and rupture in mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(10): 2374–2379.
- [12] Dietel B, Cicha I, Voskens CJ, et al. Decreased numbers of regulatory T cells are associated with human atherosclerotic lesion vulnerability and inversely correlate with infiltrated mature dendritic cells [J]. *Atherosclerosis*. 2013, 230(1): 92–99.
- [13] Ogawa C, Tone Y, Tsuda M, et al. TGF- β -mediated Foxp3 gene expression is cooperatively regulated by Stat5, Creb, and AP-1 through CNS2 [J]. *J Immunol*, 2014, 192(1): 475–483.
- [14] Li D, Liu Y, Chen J, et al. Suppression of atherogenesis by delivery of TGF β 1 using adeno-associated virus type 2 in LDLR knockout mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344: 701–707.

[收稿日期] 2015-12-08

裸小鼠肝癌原位移植模型的建立

田树红,王日超,邢桂兰,肖敏,符健*

(海南医学院 海南省药物安全性评价研究中心,海口 571199)

【摘要】 目的 建立一种 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植模型。**方法** 采用异氟烷气化对实验动物进行全身麻醉,分别用“包埋法”和“夹心法”建立 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植瘤模型。手术后用小动物活体成像系统对肿瘤组织的生长情况进行检测,4 周后对肝及肿瘤组织进行组织病理学检查。**结果** 采用夹心法建立的肝癌原位移植 BALB/c 裸小鼠模型,具有操作时间短,难度低,成瘤率高的特点,肿瘤组织生长良好,在腹腔内未出现肿瘤广泛种植现象,组织病理学检查无异常,动物死亡率低等特点。**结论** 与包埋法相比,夹心法更具优势,可快速制备大批量小鼠肝癌原位移植模型,为肝癌原位药效学及其他研究提供更便利的平台。

【关键词】 BALB/c 裸鼠;肝癌;原位移植;小动物活体成像系统

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0239-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.004

Establishment of an orthotopic implantation model of hepatocellular carcinoma in nude mice

TIAN Shu-hong, WANG Ri-chao, XING Gui-lan, XIAO Min, FU Jian*

(Hainan Research Center for Drug Safety Evaluation, Hainan Medical College, Haikou 571199, China)

【Abstract】 Objective To establish a new orthotopic implantation model of hepatocellular carcinoma in BALB/c nude mice. **Methods** The nude mice were under general anesthesia with isoflurane inhalation. Hepatocellular carcinoma was induced by subcutaneous inoculation of human hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells in nude mice. The orthotopic implantation model of hepatocellular carcinoma in nude mice was established by orthotopic implantation of small pieces of the liver cancer tissues into the mouse liver by either a sandwich method or embedding method. The post-operative tumor growth was determined by a small animal in vivo imaging system. Histopathological examination of the liver and tumor tissues was performed at four weeks after modelling. **Results** The orthotopic hepatocellular carcinoma model of nude mice established by the sandwich method had several distinct advantages: shorter operative time, less operational difficulties, with a high rate of tumor formation, no wide-spread peritoneal tumor dissemination, well-preserved tumor histological structure, and low animal mortality. **Conclusions** Compared with the embedding method, the sandwich method can save much time for preparation of this orthotopic implantation model of hepatocellular carcinoma in nude mice, and provide a more convenient platform for research of liver cancer pharmacodynamics and other biological studies.

【Key words】 BALB/c nude mice; Liver cancer; Orthotopic implantation; Small animals living imaging system

Corresponding author: FU Jian, Email: Fujian.hnmc@163.com

2015年2月3日,世界卫生组织(World Health Organization, WHO)发表了《全球癌症报告2014》,研究称2012年全球癌症患者和死亡病例都在急剧

增加,新增癌症病例有近50%出现在亚洲,而中国占了其中的大部分。“国际癌症研究中心(International Agency for Research on Cancer, IARC)”报告

【基金项目】国家自然科学基金资助项目(NO 81160408)。

【作者简介】田树红(1980-),男,助理研究员,硕士,主要从事药理学与毒理学、抗肿瘤药效学研究。

【通讯作者】符健,(1960-),男,博士,教授,研究方向:药理毒理学,E-mail: Fujian.hnmc@163.com, Tel:0898-66982118

预测全球癌症病例将呈现急剧增长态势,将由 2012 年的 1400 万人(死亡 820 万人)逐年递增至 2025 年的 1900 万人,预计到 2035 年将达到 2400 万人。2014 年中国卫生统计提要数据表明,肝癌高居各种恶性肿瘤相关死亡原因的总体第 2 位。在全球范围内,每年约有 75 万新增肝癌病例,同时又有约 70 万例肝癌死亡病例,其中我国所占比例超过 50%^[1]。

肝癌具有恶性程度高、治疗复杂和生存时间短等特点,是目前临床上最常见的恶性肿瘤之一,目前,常见的肝癌移植模型按接种部位分主要有皮下移植和原位移植,按接种类型又可分为细胞混悬液法和肿瘤组织块法^[2]。常见的肿瘤组织块原位移植模型的建立方法(包埋法)是用套管针在动物肝脏扎入约 2~3 mm 深,塞入肿瘤组织块(约 1~2 mm³),无菌干棉签按压止血或用医用止血贴止血,逐层缝合皮肤^[3-4]。但由于动物肝脏比较脆弱,操作过程中容易造成肝脏大量出血,操作时间较长,在大批量建立该模型时需要耗费大量的时间和精力。因此,本研究建立了一种新的 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植模型,即夹心法。该方法具有操作简单、手术时间短、成瘤率高、肿瘤组织生长良好和动物死亡率低等特点。此外,在动物腹腔内未出现肿瘤广泛种植现象,组织病理学检查无异常。能为大批量制备肝癌原位模型节约大量时间,为肝癌原位药效学及其他研究提供更便利和有效的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物与实验分组

SPF 级 BALB/c 裸小鼠,6~8 周龄,雄性,体重 18~22 g,购于广东省医学实验动物中心【SCXK(粤)2013-0002】。实验地点为海南省药物安全性评价研究中心【SYXK(琼)2012-0013】。皮下移植模型使用了 4 只裸小鼠,30 只裸小鼠用于肝癌原位移植模型的建立,分为包埋法和夹心法模型组,每组 15 只。

1.2 肿瘤细胞株、实验器材、试剂及主要仪器

生物发光标记的肿瘤细胞株人肝癌细胞 Bel-7402 购自上海乐晨生物科技有限公司。手术器械:手术剪,弯镊,直镊,持针钳,缝合针(4×10),0#缝合线;试剂:异氟烷购自 RWD,瑞沃德公司,D-荧光素钾盐购自 Synchem 公司,PBS 缓冲液、RPMI 1640 培养液和胰酶消化液购自 Gibco 公司,胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司;主要仪器:IVIS Ki-

netic 小动物活体成像系统购于美国 Caliper 精诺真公司;VIP 3000 型气体麻醉系统购于 Matrx 公司;BX41 显微镜系统购于奥林巴斯公司。

1.3 术前麻醉

在建立肝癌原位移植模型时需要使用气体麻醉系统^[5]将裸小鼠进行术前麻醉,麻醉剂为异氟烷。该麻醉系统是用具有一定气压的纯氧气带动异氟烷,形成气化的异氟烷和氧气的混合气体。将裸小鼠放入一个相对密闭的透明有机材料制作的盒子内,然后持续通入该混合气体。

1.4 肝癌皮下移植模型的建立

将体外培养好的肝癌细胞 Bel-7402 用无菌 PBS 缓冲液冲洗 2 次,再用无菌 PBS 缓冲液制备成浓度为 10⁷ 个细胞/mL 的细胞混悬液。取 0.2 mL 该细胞混悬液,接种于 4 只裸小鼠右侧腋窝皮下,待成瘤后备用。

1.5 肝癌原位移植模型的建立

建立肝癌原位模型时,将动物分为包埋法组和夹心法组,每组各 15 只。其主要操作步骤如下:取生长良好的皮下移植瘤,用眼科剪剪成大小约为 2 mm×2 mm×1 mm 的肿瘤组织块备用。实验采用 Matrx VIP 3000 型气体麻醉系统对实验动物进行气体麻醉,麻醉剂为异氟烷。该麻醉系统有 1 根通向小动物活体成像系统的管路,以确保动物在活体成像仪内进行发光检测时能持续麻醉。将此管路改造成一个独立的麻醉装置,用于动物手术时的持续麻醉。动物麻醉后,取仰卧位,用组织剪逐层剪开皮肤,开口长度约为 1 cm,暴露出肝脏。包埋方法是在肝左叶中间部位轻轻戳一个约 3 mm 深度的隧道,用无菌棉签局部轻压止血,将准备好的人癌组织小心塞入,再用棉签轻压止血,亦可用生物胶(OB 胶)粘合伤口^[6-9];夹心法是用 0#手术线将肿瘤组织块直接缝在肝右叶内侧:先用带缝合线的缝合针(4×10)穿过肿瘤组织,再从肝右叶内侧穿至外侧,然后打一个手术结,轻轻拉紧,剪断手术线即可。这样肿瘤组织刚好可以夹在肝右叶和肝左叶之间,不会与其他组织黏连,最后逐层缝合好腹腔,创口消毒,小心饲养。

1.6 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植肿瘤生长情况的检测

目前,小动物原位移植癌在体检测方法是先将肿瘤细胞进行荧光标记或生物发光标记,再把标记好的肿瘤细胞移植到动物体内,然后通过小动物活

体成像系统进行在体检测^[10-12]。本研究是将生物发光标记好的肝癌细胞 Bel-7402 制备成细胞混悬液,接种到 BALB/c 裸小鼠皮下,待成瘤后挑选生长良好的实体瘤,制备成肿瘤组织块原位接种于动物肝脏部位,检测时腹腔注射 30 mg/mL 的底物 D-荧光素钾盐,注射体积为 0.1 mL/10 g 体重,5~10 min 后用小动物活体成像系统进行生物发光检测。

1.7 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植肿瘤组织病理检查

小鼠肝癌原位移植 4 周时,颈椎脱臼处死,取肿瘤组织,4% (mL/mL) 甲醛溶液固定,修块、脱水、浸蜡、包埋、切片,HE 染色,镜下观察肿瘤细胞的生长情况。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对所得数据进行单因素方差分析,计算结果用($\bar{x} \pm s$)形式表示, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植模型的建立

在采用包埋法和夹心法制备肝癌原位移植模型时,对两者所需的手术时间、死亡动物数和肿瘤脱落数进行了比较,包埋法完成 1 只动物的手术时间为 8~10 min,夹心法则只需要 4~5 min,在时间上比前者缩短了近 1 倍。这主要是因为包埋法需要在肝脏上开一个小洞,在整个操作过程中容易造成动物

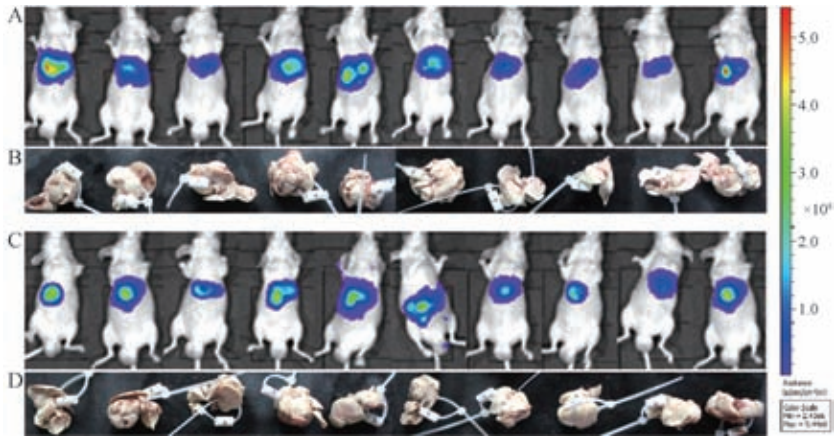
肝脏大量失血,止血时间过长,而且操作不便。夹心法只需将肿瘤组织块小心缝挂在肝右叶内侧即可,基本上不用止血。在实验过程中,包埋法由于动物失血过多而死亡 2 只,肿瘤脱落到腹腔 2 只,手术时间为(9.3 ± 1.4) min,而夹心法接种动物均存活且未出现肿瘤组织块脱落。此外,夹心法手术时间为(4.6 ± 0.7) min,与包埋法比较差异有显著性($P < 0.01$)。

2.2 小动物活体成像系统检测小鼠肝癌原位移植肿瘤生长情况

建立小鼠肝癌原位移植模型后,用小动物活体成像系统对动物体内肿瘤生长情况进行实时监控。图 1 中 A 和 C 为模型建立 4 周时的肿瘤在体生物发光检测,只有活的肿瘤细胞才能被检测到。图 1 中 B 和 D 为动物肝脏及实体瘤。结果表明,用新方法建立的 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植模型与常用的方法比较,肿瘤生长良好,无明显差异,成瘤率均为 100%,且均未形成肿瘤在腹腔内广泛种植的现象。

2.3 常用方法和新方法建立小鼠肝癌原位移植瘤病理检查

BX41 显微镜系统 100 倍光镜下观察肿瘤组织标本,结果表明,包埋法和夹心法建立的小鼠肝癌原位移植瘤肿瘤细胞及组织生长良好,未出现坏死,细胞形态一致,癌细胞成癌巢状分布,癌巢周围为纤维结缔组织(图 2)。

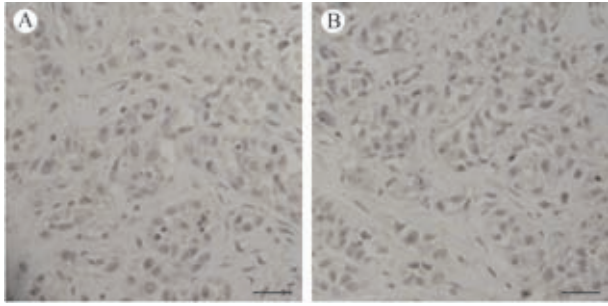


注: A 和 C 分别为包埋法和夹心法建立 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植模型的小动物活体成像检测图,右边的颜色棒说明不同颜色代表不同数量的肿瘤细胞,从下到上表示肿瘤细胞的数量越来越多;B 和 D 分别为包埋法和夹心法建立的 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植实体瘤。

图 1 荷瘤裸小鼠的生物发光检测和实体瘤

Note. A and C: The orthotopic transplantation tumor models were established by embedding and sandwich, respectively. The color bar at right shows numbers of tumor cells by different colors representing the increasing numbers of tumor cells from bottom to top. B and D: The solid tumor models established by embedding and Sandwich, respectively.

Fig. 1 Bioluminescence detection of the solid tumors of tumor-bearing nude mice



注: A 和 B 分别为包埋法和夹心法建立 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植瘤的病理照片。两种方法建立的肝癌原位癌实体瘤生长良好, 癌细胞形态一致, 成巢状分布, 未出现坏死。

图 2 实体瘤组织病理切片观察(HE 染色, $\times 100$)

Note. A and B are the pathological picture of orthotopic transplantation hepatocellular carcinoma in the mice generated by embedding and sandwich, respectively. Both the two types of tumors grow well, show uniform cancer cells, form nest distribution, and without necrosis.

Fig. 2 Histological appearance of the solid tumor tissues. HE staining, $\times 100$

3 讨论

在动物麻醉时, 由于常用的麻醉剂如戊巴比妥钠、水合氯醛、乌拉坦和氯醛糖等麻醉时间过长(2~4 h), 因此, 我们采用气体麻醉系统对实验动物进行麻醉, 麻醉剂为异氟烷。与常用的这些麻醉剂相比, 异氟烷麻醉具有麻醉条件简单, 麻醉深浅度可以随时进行控制, 麻醉动物苏醒快, 使用成本不高, 动物不易发生死亡等特点。在刚开始麻醉时可将麻醉范围调至最大使动物迅速麻醉, 待动物被麻醉时, 再将麻醉范围调至适中, 一般调至中间范围。

在建立细胞混悬液皮下移植瘤模型时, 细胞浓度不宜过小, 一般为 $10^6 \sim 10^7$ 个细胞/mL^[8,10]。如果是贴壁细胞, 1 瓶规格为 25 cm² 的细胞培养瓶长满约 90% 时, 细胞消化离心后用 0.9% (g/mL) 氯化钠注射液稀释到 0.2 mL, 接种 1 只动物腋窝皮下; 如果是悬浮肿瘤细胞, 可根据离心收集后沉淀于离心管底部的细胞体积进行初步判断。

建立肝癌原位癌模型是将肿瘤组织块直接接种于动物的肝脏部位。因此, 首先应选择生长良好的皮下移植瘤。皮下移植瘤的生长时间不宜过长, 一般选用接种后 4 周的实体瘤, 如果生长时间过长(如 6~8 周)则肿瘤内部组织会出现坏死, 这样的肿瘤组织接种到原位时会出现生长缓慢或生长不良。其次, 应尽量使肿瘤组织块大小保持一致, 这样可以使原位接种后肿瘤组织生长大小控制在一定的范围内。另外, 在将肿瘤组织缝挂于左、右肝叶直接

时, 缝线不能拉得太紧, 否则容易撕裂肝脏, 造成肝脏大量失血。在建立肝癌原位移植模型时, 我们也采用过细胞混悬液注射法, 细胞浓度约为 10^6 个细胞/mL, 但成瘤率较低, 仅为 60%, 而且成瘤所需时间也较组织块法长, 建议可将细胞浓度增加至 $10^7 \sim 10^8$ 个细胞/mL。

在使用皮下移植瘤动物模型进行药效学评价时, 在给药过程中可根据测量肿瘤体积来计算相对肿瘤增殖率 $T/C(\%) = TRTV/CRTV \times 100\%$ 。(TRTV: 治疗组 RTV, CRTV: 溶媒对照 RTV。RTV = V_t/V_0)。其中 V_0 为分组给药时(即 d0)测量所得肿瘤体积, V_t 为每一次测量时的肿瘤体积。疗效评价标准: $T/C\% > 40\%$ 为无效; $T/C\% \leq 40\%$, 并经统计学处理 $P < 0.05$ 为有效。然而这种方法由于实体瘤的不规则性和测量时的人为误差, 得出的结果不够精确, 误差较大, 可靠性也大为降低。在使用原位癌动物模型进行评价时, 通常需要先对肿瘤细胞进行荧光标记或生物发光标记, 接入原位后再用小动物活体成像系统进行检测和分析, 可对存活肿瘤细胞的多少进行量化分析, 结果更为精确和可靠。在原位移植瘤试验中, 通常对肿瘤细胞进行生物发光标记, 因为荧光在体内更容易受到动物组织自发荧光的干扰, 而且荧光在体内的穿透力会受到一定程度的影响。

目前, 国内外所采用的裸小鼠肝癌原位移植模型主要是包埋法和细胞混悬液接种法^[2]。但是这些方法都有各自的缺点: 包埋法溶液造成动物肝脏大量出血并引起动物死亡, 手术时间较长, 具有较大的操作难度, 在人员有限的情况下不适用于制备大批量的肝癌原位移植动物模型; 细胞混悬液接种法成瘤率较低, 且形成实体瘤时间较长, 肿瘤生长较慢, 并且注入肝脏的细胞混悬液溶液溢出, 造成肿瘤腹腔内广泛种植。通过比较分析, 我们所建立的夹心法是一种比包埋法操作更加简便、高效, 重现性更好的 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植模型。该方法除了具有操作简单、手术时间短、成瘤率高、肿瘤组织生长良好和动物死亡率低等特点以外, 在手术时不会造成动物肝脏大量出血, 如果操作熟练, 几乎不会造成肝脏出血现象。动物出血少, 术后恢复就很快, 死亡率也会大大降低。此外, 在接种过程中要注意将待接种的肿瘤组织块用 0.9% (g/mL) 氯化钠注射液或 PBS 缓冲液漂洗 2~3 次, 在接种时肿瘤组

(下转第 137 页)

口服补液盐降低氯化锂-匹罗卡品惊厥持续状态大鼠死亡率的研究

韩慰, 蒋莉*, 何蓉, 宋晓洁, 程莉

(重庆医科大学附属儿童医院神经内科, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室,
儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014)

【摘要】 目的 探讨通过胃管灌胃改良口服补液盐(oral rehydration salts, ORS)降低氯化锂-匹罗卡品诱发惊厥持续状态(status epilepticus, SE)模型的死亡率的方法。**方法** 选用成年组(60 d)SD大鼠30只和幼年组(20 d)SD大鼠45只,随机分为成年SE+ORS组、成年SE组、幼年SE+ORS组、幼年SE组、幼年血糖组各15只。经腹腔注射氯化锂和匹罗卡品,诱发大鼠惊厥发作,惊厥60 min后,给予安定止惊。各ORS组于SE后1、12、24 h根据不同年龄予以不同剂量改良ORS灌胃。其余各组不给予处理。记录实验大鼠惊厥发作情况,惊厥前后体重变化及死亡情况;血糖测定组于SE后8 h取血检测血糖,探索降低该模型死亡率的方法。**结果** (1)各组惊厥后体重均降低,约占体重的5%~8%。(2)氯化锂-匹罗卡品惊厥持续状态模型死亡率较高,幼年组40.00%,成年组57.14%;死亡发生时间集中在惊厥后24 h内,72 h后死亡数趋于平稳。(3)SE后实验大鼠血糖明显降低,给予ORS液灌胃后,血糖趋于正常水平。(4)以改良ORS灌胃后,幼年组和成年组72 h内死亡率明显降低。**结论** SE后改良ORS液灌胃有效改善实验动物死亡率,是有效提高其生存率的方法。

【关键词】 氯化锂-匹罗卡品;惊厥持续状态模型;大鼠;死亡率

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0243-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.005

Mortality of rat models of LiCl-pilocarpine-induced status epilepticus can be reduced by oral rehydration salt solution

HAN Wei, JIANG Li*, HE Rong, SONG Xiao-jie, CHENG Li

(Department of Neurology, Children Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

【Abstract】 Objective To explore a new method of reducing the mortality of rat models of LiCl-pilocarpine-induced status epilepticus (SE) by oral gavage of rehydration salts (ORS) liquid. **Methods** Forty-five young SD rats (20-day-old) and 30 adult SD rats (60-day-old) were enrolled in this study. They were randomly divided into five groups; the adult SE rats received ORS gavage (adult SE + ORS), adult SE rats (adult SE) and young SE rats received ORS gavage (young SE + ORS), young SE rats (young SE) and young blood glucose group. Seizures were induced in both young and adult SE groups with i. p. LiCl-pilocarpine was injected i. p. to induce SE, which was interrupted by diazepam at 60 minutes after SE onset. ORS gavage was conducted in all the ORS groups in different doses according to their ages at 1 hour, 12 hours or 24 hours after the onset of SE. The other groups were not given any treatment. The latency of seizure onset, changes in body weight, level of blood glucose at 8 hours after SE onset and finally the death rate of the rats were recorded. **Results** (1) The body weight of the rats with seizures was reduced by 5%~8%. (2) The mortality rate of the SE groups was high, especially at 24 hours after the SE onset, which was 40% in the young group and 57% in the adult group. (3) The blood glu-

【基金项目】国家自然科学基金(NO. 81371452);重庆市科委自然科学基金重点项目(cstc2013jjB0031);教育部博士点基金课题(20125503110011)。

【作者简介】韩慰(1990-),女,研究生,研究方向:小儿神经疾病 Email: hanweitqx@126.com

【通讯作者】蒋莉(1964-),女,教授,研究方向:小儿神经系统疾病 Email: dr_jiangli@126.com

cose level was significantly decreased in the SE rats, and ORS gavage made the blood glucose returning to normal in the SE rats. (4) ORS gavage apparently decreased the mortality rate of young and adult groups during the 72 hours after seizure onset. **Conclusions** ORS gavage effectively reduces the mortality of SE rats, and is an effective method to improve the survival of SE rats.

【Key words】 LiCl-pilocarpine; Statue epilepticus; Rat; Mortality

Corresponding author: Jiang Li, Email: dr_jiangli@126.com

氯化锂-匹罗卡品诱发大鼠惊厥持续状态模型具有与人类颞叶癫痫相似的行为和脑电图改变,是研究惊厥持续状态较为理想的动物模型。由于惊厥持续状态要求足够长的发作时间,实验大鼠的死亡率高,国内外学者从匹罗卡品剂量的选择、使用 M 胆碱能样受体拮抗剂进行预处理、采用不同止惊剂适时中止发作等方面对该模型进行改良^[1-4],但实验动物急性期死亡率仍可高达 55%^[5]。

目前的改良方法多集中在惊厥发作期如何止惊,而在惊厥后处理方面研究甚少。惊厥持续状态可造成全身缺氧致代谢性酸中毒、糖代谢紊乱、脱水、窒息等病理生理改变。惊厥持续状态大鼠予以止惊剂后处于昏睡状态,而清醒后活动减少、反应迟钝、精神欠佳,进食能力减弱、体重明显减少。我们认为这可能是造成惊厥后急性期大鼠死亡的重要原因。因此,惊厥后处理对降低其死亡率有重要意义。

口服补液盐(oral rehydration salts, ORS),简称 ORS 液。本实验用改良的 ORS 液纠正大鼠惊厥持续状态后水盐代谢紊乱,补充血糖,探讨能否降低急性期实验大鼠死亡率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组

20 日龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 75 只,其中,体重在 35~52 g 的 45 只;体重在 180~230 g 的 30 只,均来源于重庆医科大学实验动物中心【SCXK(渝)2012-0001】,在重庆医科大学附属儿童医院动物中心 SPF 级屏障实验设施中进行【SYXK(渝)2012-0015】。

根据大鼠日龄和 SE 后是否用改良 ORS 处理采用随机数字法分为以下 5 个组:成年 SE + ORS 组、成年 SE 组、幼年 SE + ORS 组、幼年 SE 组、幼年血糖测定组各 15 只。其中血糖测定组又分 3 个亚组,分别是正常对照组、SE 组、SE + ORS 组各 5 只。

1.1.2 试剂

氯化锂、匹罗卡品(美国 Sigma-Aldrich 公司);

硫酸阿托品、安定(天津金耀氨基酸有限公司);口服补液盐 III(ORS)液(西安安健药业有限公司),每袋成分:氯化钠 0.65 g、枸橼酸钠 0.725 g、氯化钾 0.375 g、无水葡萄糖 3.375 g。实验用改良配方:葡萄糖 10 g + 1 袋 ORS + 250 mL 蒸馏水。

1.2 模型建立方法

采用氯化锂-匹罗卡品建立惊厥持续状态模型,幼年组(20 d)、成年组均在腹腔注射氯化锂 127 mg/kg,18~20 h 后,分别采用腹腔注射匹罗卡品 30、50 mg/kg。按照 Racine^[6]分级法进行惊厥分级,当发作达到 IV 级或 V 级并持续 60 min 为惊厥持续状态,惊厥发作 15 min 后腹腔注射硫酸阿托品(10 mg/kg)拮抗其 M 胆碱能样作用,发作 60 min 后给予安定(10 mg/kg)止惊。腹腔注射匹罗卡品 30 min 后,未达到 IV 级发作者,等量追加 1 次,若仍未达到 IV 级发作者退出实验。血糖组的对照组,予以腹腔注射等量生理盐水。

幼年和成年 SE + ORS 组的实验大鼠均于 SE 后 1、12、24 h 以改良 ORS 液灌胃,剂量分别以每只 0.5、2.0 mL。血糖(SE + ORS)组于 SE 后 1 h 灌胃改良 ORS 液,剂量为每只 0.5 mL。其余实验大鼠不给予该处理。SE 前后各组均用普通饲料喂养。记录各组实验大鼠惊厥前后体重及发作情况,分别以 SE 后 1、12、24、48、72、96、120 h 等 7 个时间点观察各组实验动物死亡数。血糖组于 SE 后 12 h 采用眼底静脉取血方法取血约 1 mL,然后离心取血清送本院检验科检测血糖。

1.3 统计学方法

用 SPSS17.0 软件包对数据进行统计学处理,所有计量资料均用均数 ± 标准差表示,各组实验动物的死亡率采用卡方检验,惊厥前后体重均值比较采用配对 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

腹腔注射匹罗卡品后,各组实验大鼠均出现相似的表现,即不同程度的胆碱能反应:流涎、稀便、结膜充血出血、全身湿润等;以及不同程度的痫性发作

表现:早期出现竖毛、搔抓症状,后出现面部抽搐、节律性点头和咀嚼,继之出现双侧前肢抬起阵挛,全身强直阵挛伴站立和跌倒、翻滚甚至尖叫等。

2.1 惊厥发作情况

各组大鼠均在匹罗卡品注射后 30 min 左右达到 V 级发作。幼年组注射安定后 1~11 min 完全止惊,成年组约在给药后 1~28 min 终止发作。各组惊厥发作情况详见表 1。幼年 SE + ORS 组有 1 只实验大鼠在达到 V 级发作后持续 20 min 后死亡,成功建模 14 只。幼年 SE 组 15 只实验大鼠均造模成功。成年 SE + ORS 组成年造模 13 只,其中 1 只在

达到 V 级发作后 27 min 后死亡,另 1 只实验大鼠腹腔注射匹罗卡品后出现搔抓、点头症状,但 30 min 后未达到 IV 级发作,等量追加 1 次,30 min 后仍未达到 IV 级发作故退出实验。成年 SE 组有 1 只大鼠达到 V 级发作后持续 38 min 后死亡,成功造模 14 只。血糖测定组 10 只幼年大鼠造模成功。

2.2 体重变化

各组实验大鼠惊厥前后体重均减轻(详见表 2),幼年组减轻占惊厥前体重的 7%~8%,成年组体重减轻惊厥前体重的 5% 左右。造模前后体重差异有显著性($P<0.001$)。

表 1 各组实验动物惊厥持续状态发作情况($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Status epilepticus in the experimental rats						
组别 Groups	动物数 Number of rats	惊厥潜伏时间/ min Seizure latency	未成功诱发惊厥数 Number of onset failure	达到 IV 级发作未持续 60 min Number of rats lasting <60 min	安定控制惊厥发作时间/ min Time of seizure controlled by diazepam	成功建模数 Number of successful models
幼年 SE + ORS 组 Young SE + ORS	15	30.08 ± 9.42	0	1	5.84 ± 2.84	14
幼年 SE 组 Young SE	15	30.65 ± 8.43	0	0	5.74 ± 2.35	15
成年 SE + ORS Adult SE + ORS	15	41.21 ± 16.64	1	1	12.45 ± 9.44	13
成年 SE 组 Adult SE	15	39.04 ± 17.03	0	1	12.07 ± 9.32	14
血糖组 Blood glucose	10	36.06 ± 9.95	0	0	6.01 ± 2.83	10

表 2 各组实验动物惊厥前后体重变化情况($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Changes of body weight of the rats before and after status epilepticus				
组别 Groups	惊厥前 体重/ g Body weight before seizure	惊厥后 体重/ g Body weight after seizure	减少体重/ g Body weight loss	减少体重占惊厥前 体重百分比/% Body weight loss/b. w. before seizure
幼年 SE + ORS 组 Young SE + ORS	41.62 ± 3.34	38.72 ± 3.12 *	2.96 ± 0.94	7.11
幼年 SE 组 Young SE	41.60 ± 4.46	38.23 ± 4.31 *	3.36 ± 0.88	8.09
成年 SE + ORS 组 Adult SE + ORS	212.09 ± 20.65	200.46 ± 21.79 *	10.38 ± 6.74	4.94
成年 SE 组 Adult SE	221.70 ± 21.87	210.11 ± 21.43 *	11.59 ± 6.18	5.23

注: * 惊厥前体重与惊厥后体重相比, $P<0.001$ 。
Note. * $P<0.001$, comparison between the body weights before and after seizure.

2.3 死亡情况

SE 后 1、12、24、48、72、96、120 h 等 7 个时间点观察各组实验动物死亡数、记录死亡时间及死亡率。幼年组共死亡 7 只,成年组共死亡 10 只。幼年 SE + ORS 组和成年 SE + ORS 组死亡率分别为 7.14%

和 15.38%,明显低于幼年 SE 组、成年 SE 组。另外,幼年 SE 组与 SE + ORS 组、成年 SE 组与 SE + ORS 组之间死亡率差异具有显著性($P<0.05$),各组实验大鼠死亡情况及死亡率见表 3。

表 3 各组实验动物死亡情况

Tab.3 Mortality of the experimental animals

组别 Groups	不同死亡时间死亡数/ <i>n</i> Mortality at different times							死亡数/ <i>n</i> Death	死亡发生 时间/h Times of death after seizure	死亡率/% Mortality rate
	1 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h			
幼年 SE + ORS 组 Young SE + ORS	1	2	2	1	0	0	0	1	12	7.14 [▲]
幼年 SE 组 Young SE	0	0	0	1	0	0	0	6	15.34 ± 6.24	40.00
成年 SE + ORS 组 Adult SE + ORS	0	0	0	0	2	0	0	2	72	15.38 [*]
成年 SE 组 Adults SE	1	1	3	2	1	0	0	8	31.62 ± 22.87	57.14

注: [▲] Young SE + ORS 与 Young SE 组死亡率比较 $P < 0.05$, ^{*} Adult SE + ORS 与 Adult SE 组死亡率比较 $P < 0.05$ 。
Note. [▲] $P < 0.05$, comparison between young SE + ORS and young SE groups; ^{*} $P < 0.05$, comparison between adult SE + ORS and adult SE groups.

2.4 血糖水平

SE 组血糖 (4.69 ± 0.59 mmol/L) 较对照组 (9.37 ± 3.09 mmol/L) 明显降低,与对照组差异具有显著性 ($P < 0.01$); SE + ORS 组 (7.12 ± 2.13 mmol/L) 血糖高于 SE 组、稍低于正常对照组,与对照组血糖差异无显著性 ($P > 0.05$),与 SE 组血糖差异具有显著性 ($P < 0.05$)。

3 讨论

惊厥持续状态(status epilepticus, SE),是神经系统常见危重症,可导致惊厥性脑损伤,继发癫痫、认知障碍等后遗症。目前临床上尚没有有效的观察指标和方法,主要借助于对动物惊厥模型的研究。氯化锂-匹罗卡品诱发大鼠惊厥持续状态模型是公认的较理想的动物模型。

本研究中,幼年组死亡率达到 40%,成年组甚至达 57.4%。这对需要观察惊厥后远期实验指标的研究造成了较大的工作量、较高的经济费用,且实验一致性较低。

目前的改良方法多集中在惊厥发作期如何止惊,而在惊厥后处理方面研究甚少。本研究发现,尽管应用阿托品拮抗 M 胆碱能作用,成年组体重减轻量从胡越等^[2]研究发现的每只 30 ~ 50 g 减少至 10 ~ 20 g,但是体重仍然是明显减少的,约占体重的 5%,而幼年组减少量甚至占体重 7% ~ 8%。从实验大鼠惊厥发作时腺体分泌增加,出现流涎、稀便、全身毛湿润等表现可见,惊厥持续状态后大鼠体重减轻最可能是由于体液丢失造成。而机体处于脱水、电解质紊乱的病理状态,这可能是 SE 后急性期实验大鼠死亡的原因之一,因此 SE 后给予补液对

提供大鼠生存率具有重要意义。

另外,本研究发现无论是幼年组还是成年组 SE 后死亡发生时间多集中在 SE 后 72 h 内,尤其是 SE 后 24 h 内,与王东梅等^[7]的报道一致。由于幼年较成年大鼠惊厥易感且耐受性更好,因此本实验对幼年大鼠 SE 后 8 h 血糖情况作了检测发现,SE 后实验大鼠血糖水平较正常对照组明显降低。我们认为虽然 SE 后有效止惊,但是一方面实验大鼠精神尚未恢复,另一方面由于强直阵挛发作时间长,有些实验大鼠自主活动严重受损,在 SE 后 24 h 内进食能力减弱造成低血糖可能是死亡原因之一。

ORS 液是临床上较常用的口服补液盐,对轻、中度脱水,补充钠、钾、氯、具有治疗作用。改良的 ORS 液即加入葡萄糖,配置成 5% 葡萄糖-ORS 液,在 SE 后 1,12,24 h 根据不同年龄大鼠的胃内容量给予不同剂量灌胃后发现:(1) SE 后以改良 ORS 液灌胃可以有效升高 SE 后血糖水平,甚至接近正常水平。(2) SE 后给予改良 ORS 液补液可以降低实验大鼠死亡率,幼年组降至 7.14%,成年组降至 15.38%,显著低于 Goodman 等^[8]发现的通过改良该模型止惊方法后的死亡率 45%。本改良方法并没有改变该模型的病理基础,Lemos 等^[9]认为大剂量匹罗卡品诱导的癫痫状态持续 60 min 者,100% 产生反复自发性癫痫,尽管张小东等^[4]通过重复低剂量注射匹罗卡品降低死亡率 9.7%,接近本研究结果,但慢性癫痫的发生率却低于该模型。(3) 改良 ORS 液主要改善 SE 后实验大鼠急性期(72 h)死亡情况,尤其是 48 h 之内,48 h 之后,实验大鼠进食能力基本恢复。

因此,氯化锂-匹罗卡品诱导的大鼠惊厥持续状

态模型中,除了重复低剂量注射匹罗卡品、联用胆碱受体拮抗剂以及根据实验需要选择适当的止惊剂来提高大鼠存活率以外,对 SE 后纠正水电解质平衡的紊乱,预防低血糖对降低实验大鼠 SE 后急性期死亡率具有重要意义。SE 后 24 h 内用改良 ORS 液灌胃能有效改善实验动物死亡率,是有效提高其生存率的方法。

参 考 文 献

[1] Glien M, Brandt C, Potschka H, et al. Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy [J]. *Epilepsy Res*, 2001, 46(1): 111 - 119.

[2] 胡越, 蒋莉. 控制氯化锂-匹罗卡品诱发惊厥持续状态发作的实验研究[J]. *儿科学杂志*, 2003, 9(4): 5 - 8.

[3] 陈子怡, 陈树达, 周瑛倩, 等. 匹罗卡品诱发癫痫持续状态模型的改良和鉴定[J]. *解剖学研究*, 2011, 33(2): 131 - 134.

[4] 张小东, 黄敏, 许可, 等. 氯化锂-重复低剂量匹罗卡品致大

鼠癫痫模型制作[J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(1): 63 - 65.

[5] Curia G, Longo D, Biagini G, et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy [J]. *Neurosci Methods*, 2008, 172(2): 143 - 157.

[6] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure [J]. *Electroenceph Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 281 - 294.

[7] 王冬梅, 孙艺平, 徐静, 等. 降低氯化锂-匹罗卡品大鼠癫痫模型死亡率的实验研究[J]. *大连医科大学学报*. 2010, 32(2): 177 - 178.

[8] Goodman JH. Experimental models of status epilepticus [M]. CRC Press; Boca Raton, 1998. 95 - 102.

[9] Lemos T, Cavalheiro EA. Suppression of pilocarpine induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats [J]. *Exp Brain Res*, 1995, 102(3): 423 - 428.

[收稿日期] 2015-12-29

(上接第 132 页)

织块要避免与接种部位以外的组织和器官接触,以确保肿瘤接种部位的一致性,避免肿瘤在动物腹腔内出现广泛种植。夹心法能为大批量制备肝癌原位模型节约大量时间,为肝癌原位药效学及其他生物学研究提供更便利和有效的动物模型。

参 考 文 献

[1] Yang L, Xu J, Ou D, et al. Hepatectomy for huge hepatocellular carcinoma: single institute's experience [J]. *World J Surg*. 2013, 37(9): 2189 - 2196.

[2] Zhou GX, Gao C, Xu P, et al. Replication Methodology of Animal Models for Human Disease[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technological Literature Press, 2008.

[3] 陶莹,于玮,王珏,等. 裸鼠人肝癌原位移植瘤模型的建立[J]. *北京医学*, 2012, 34(12): 1065 - 1067.

[4] 陈爽, 谢艳, 王春晖, 等. 奥曲肽致裸鼠肝癌原位移植瘤坏死的实验研究[J]. *癌症*, 2009, 28(7): 673 - 678.

[5] 贺仕才, 仇广林, 王泽兴, 等. 小鼠左肺原位移植模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(2): 115 - 118.

[6] 陶文照, 何德华, 康俊升, 等. 裸小鼠人肝癌移植瘤组织的体内侵袭和转移的病理观察 [J]. *第二军医大学学报*, 1989,

10: 9 - 13.

[7] 张海英, 李艳茹, 王健君, 等. 小鼠原位移植性肝癌模型的建立及生物学特性[J]. *吉林大学学报*, 2009, 35(1): 5 - 9.

[8] 熊伟, 任正刚, 刘珊, 等. 奥沙利铂化疗对荧光 HepG2 肝癌细胞裸鼠原位移植瘤侵袭转移潜能的影响 [J]. *昆明医科大学学报*, 2015, 36(8): 6 - 8.

[9] Yamauchi K, Yang M, Hayashi K, et al. Induction of cancer metastasis by cyclophosphamide pretreatment of host mice: an opposite effect of chemotherapy [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(2): 516 - 520.

[10] 孙萍, 王怡, 孙志东, 等. 利用萤光素酶标记的肿瘤细胞建立肝癌原位移植模型及其活体成像[J]. *生物技术通讯*, 2008, 19(3): 383 - 385.

[11] 曹阳, 韩炜, 刘洋, 等. 活体荧光成像对裸鼠肝癌细胞系 MHCC97-H 原位移植模型的动态量化分析 [J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(7): 1232 - 1234.

[12] 陈惠, 李坤雨, 陈斐, 等. 用于活体成像的小鼠肝癌移植瘤模型的建立[J]. *兰州大学学报 (医学版)*, 2012, 38(1): 10 - 15.

[收稿日期] 2015-11-23

雄性裸鼹鼠可育个体与不可育个体生殖系统 结构与功能差异初探

余琛琳, 林丽芳, 袁子彦, 赵善民, 汤球, 孙伟, 蔡丽萍, 徐晨, 崔淑芳*

(第二军医大学实验动物中心, 上海 200433)

【摘要】 目的 观察和分析雄性裸鼹鼠中可育个体和不可育个体生殖系统结构和功能的差异, 初步探索雄性不可育个体不能繁育后代的原因。**方法** 雄性裸鼹鼠可育个体和不可育个体各 5 只, 先采集一侧睾丸和附睾组织, 称重后换算脏器系数; 再采集另一侧睾丸组织, 用中性甲醛溶液进行固定后制备组织切片; 取另一侧附睾用作精子计数、精子活动度的测定; 采集血清测定血清中黄体生成素 (LH) 和睾酮 (T) 浓度。**结果** 与可育个体组相比较, 不可育个体组的睾丸重量下降 ($P < 0.05$), 附睾重量显著下降 ($P < 0.01$), 且睾丸系数和附睾系数均显著下降 ($P < 0.01$); 精子数量显著减少 ($P < 0.01$), 精子活动度也显著减弱 ($P < 0.01$); 血清黄体生成素和睾酮水平均显著降低 ($P < 0.01$); 睾丸组织切片观察显示, 不可育个体各级生精细胞严重脱落, 排列混乱无序, 支持细胞和间质细胞均有减少。**结论** 雄性裸鼹鼠不可育个体生殖系统存在睾丸和附睾萎缩、生精功能下降和性激素分泌减少等现象。

【关键词】 裸鼹鼠; 可育个体; 不可育个体; 雄性生殖系统; 精子发生; 黄体生成素; 睾酮

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0248-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.006

Structural and functional differences of the reproductive system in fertile and infertile male naked mole rats

YU Chen-lin, LIN Li-fang, YUAN Zi-yan, ZHAO Shan-min, TANG Qiu, SUN Wei,
CAI Li-ping, XU Chen, CUI Shu-fang*

(Laboratory Animal Center, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to observe and analyze the differences of reproductive system in fertile and infertile male naked mole rats. **Methods** Five fertile and 5 infertile 2-5-year old male naked mole rats were used in this study. The testis and epididymis on one side were collected, weighted, and measured to get their viscera coefficient. The other side testicle was collected and fixed in neutral formalin solution for histological examination. The other side epididymis was used to examine the sperm count and sperm activity. Serum of the naked mole rats was collected to measure the level of luteinizing hormone (LH) and testosterone (T). **Results** Compared with the fertile group, the testis weight of infertile group was significantly decreased ($P < 0.05$), their epididymis weight, testicular coefficient and the epididymis coefficient were all significantly decreased ($P < 0.01$), all their sperm count and sperm activity and their LH and T levels were significantly decreased ($P < 0.01$ for all). Pathological examination of the testicular tissues of the fertile group showed that many types of spermatogenic cells were seriously detached, the numbers of Sertoli cells and stromal cells were decreased. Mature sperms in the seminiferous tubules were highly decreased in number or even completely disappeared.

【基金项目】 国家科技支撑计划 (No. 2015BAI09B02); 2014 年度军队实验动物专项科研课题 [No. SYDW(2014)005 号]、No. SYDW(2014)007 号] 联合资助。

【作者简介】 余琛琳, 女 (1981 -), 硕士, 讲师。

【通讯作者】 崔淑芳, 教授, Email: youngstar_sf@163.com

Conclusions Compared with the fertile individuals, the reproductive system of infertile male naked mole rats presents structural atrophy and declined function.

[Key words] Naked mole rat; Fertile individuals; Infertile individuals; Reproductive system; Spermatogenesis; Luteinizing hormone; Testosterone

Corresponding author: CUI Shu-fang, Email: youngstar_sf@163.com

裸鼹鼠 (*Heterocephalus glaber*, naked mole rat, NMR) 是一种近年来备受世界各国科研工作者关注的新型实验用动物^[1], 在动物学分类位置上属于哺乳纲、啮齿目、豪猪亚目、滨鼠科、裸鼹鼠属、裸鼹鼠种, 其产于非洲肯尼亚、索马里、埃塞俄比亚等地, 终生生活在地下 2 m 的洞穴中, 以刨取泥土中的植物根茎为食^[2,3]。成年动物体重约为 30 ~ 50 g, 体型较小, 外观全身几乎无毛; 门齿暴露于口腔之外, 用于刨掘泥土和啃食食物; 由于地洞中常年昏暗无光, 其眼睛高度退化, 视力几乎丧失, 体表有 40 多根触毛分布于身体两侧与嘴巴附近, 以感受周围环境。

裸鼹鼠虽为哺乳动物, 其种群却像蚂蚁和蜜蜂等昆虫一样行真社会性生活方式, 野生状态下一个洞穴中常有 300 多只裸鼹鼠共同生活, 其中只有 1 只称为鼠王的雌鼠和 1 ~ 3 只雄鼠能够繁殖后代, 其余皆为工鼠, 工鼠失去生殖能力^[4,5]。在实验室饲养条件下, 当数个裸鼹鼠个体一起繁殖饲养时, 繁育情况也是如此。因此, 本研究拟对雄性裸鼹鼠可育个体和不可育个体的生殖系统的形态结构、精子发生、数目及活力、相关性激素等进行比较研究, 以期初步探索裸鼹鼠雄性不育个体生殖系统方面的缺陷, 为后期繁育提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择本中心饲养的已交配并成功繁育后代的雄性裸鼹鼠 5 只、已交配过但未成功繁育后代的雄性裸鼹鼠 5 只, 年龄范围为 2 ~ 5 年, 各项生理指标均健康正常; 可育个体分别编号为 1 ~ 5 号, 不可育个体分别编号为 6 ~ 10 号。

1.2 裸鼹鼠睾丸和附睾脏器系数的测定

动物称量体重后, 腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠 (注射剂量为 10 mL/kg 体重) 进行麻醉。待动物麻醉完全后 (立即眼眶采血用于性激素的测定), 将其仰卧固定于解剖板上, 首先用 75% 酒精棉球擦拭腹部开口部位进行皮肤消毒, 继而剪开腹壁, 暴露生殖系统。无菌术分离一侧睾丸和附睾立即置于生理盐

水中, 用眼科剪剔除睾丸和附睾周围的结缔组织及脂肪组织^[6,7], 并用生理盐水冲洗干净, 滤纸吸干水分后称量脏器重量, 再根据以下公式计算睾丸及附睾脏器系数:

睾丸脏器系数 (%) = [睾丸重量 (g) / NMR 体重 (g)] × 100%

附睾脏器系数 (%) = [附睾重量 (g) / NMR 体重 (g)] × 100%

1.3 睾丸组织形态学观察

采集裸鼹鼠一侧新鲜睾丸组织, 用生理盐水洗净残余血迹, 并用眼科剪剔除睾丸周围的结缔组织及脂肪组织后, 即刻放入预先备好的 10% 中性福尔马林溶液中进行组织固定。组织固定 24 h 后, 依次浸入 95% 乙醇、无水乙醇溶液进行脱水, 继而依次浸入二甲苯: 无水乙醇 (V: V = 1: 1) 和纯二甲苯溶液中进行透明, 最后将组织进行石蜡包埋, 用于切片、HE 染色后, 显微镜下观察睾丸的组织结构形态。

1.4 精子计数、精子活动度的测定

1.4.1 精子计数

将采集的裸鼹鼠一侧附睾组织置于 1 mL 生理盐水中, 用眼科剪将附睾纵向剪 1 ~ 2 刀, 用吸管轻柔吹打数次, 静止 3 ~ 5 min, 形成精子悬液。然后将精子悬液放入三气培养箱中, 35℃ 恒温孵育 25 ~ 30 min, 让精子能够从附睾组织中充分游离出来。吸取精子悬液 1 滴到血细胞计数板上, 盖上盖玻片, 静置约 2 min 后进行精子计数, 计数 5 个中方格内精子数, 计算精子悬液中精子的数量^[8]。

1.4.2 精子活动度测定

取一滴裸鼹鼠精子悬液置于清洁载玻片上, 静置约 2 min, 按文献方法^[9], 在镜下连续计数 200 个精子中向前活动的精子数, 并进行分级: A 级呈快速、直线向前运动, 表明精子活动很好; B 级呈慢速或迟钝的向前直线运动, 表明精子活动较好; C 级呈向前曲线运动, 表明精子活动力一般; D 级呈不活动或只在原地蠕动, 表明精子活动能力差。按照公式 [精子活动度 (%) = (A + B + C) / (A + B + C + D) × 100%] 推算单侧附睾精子悬液中的精子活动度。

1.5 相关性激素的测定

所有裸鼯鼠麻醉完全后,在采集睾丸和附睾组织前,进行眼眶采血,全血于室温放置 2 h 后于 2 ~ 8℃、1000 r/min 离心 15 min,取上清用放射免疫法进行血清黄体生成素(luteinizing hormone, LH)和睾酮(testosterone, T)浓度的测定^[10,11]。

1.6 统计学处理

采集的实验数据,均利用 SPSS 17.0 统计软件进行分析处理。所得数据均以(均数 ± 标准差)表示,组间比较采用 *t* 检验,当 *P* < 0.05 时,组间差异

表 1 可育个体与不可育个体的睾丸重量、附睾重量、体重以及睾丸和附睾系数的比较($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab.1 Comparison of the weight of testis, epididymis and body, testicular coefficient, and epididymis coefficient between fertile and infertile naked mole rats					
雄性裸鼯鼠 Male naked mole rats	睾丸重量/g Weight of testis	附睾重量/g Weight of epididymis	体重/g Body weight	睾丸系数/% Testicular coefficient	附睾系数/% Epididymis coefficient
可育个体 Fertile individuals	0.0362 ± 0.0065	0.0018 ± 0.0003	38.6661 ± 3.5168	0.0934 ± 0.0110	0.0046 ± 0.0005
不可育个体 Infertile individuals	0.0265 ± 0.0036 *	0.0011 ± 0.0001 **	35.7804 ± 3.5601	0.0741 ± 0.0079 **	0.0030 ± 0.0003 **

注: * 与可育个体组比较, *P* < 0.05; ** 与可育个体组比较, *P* < 0.01。
Note. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01, compared with the fertile group.

2.2 睾丸组织形态学观察

经镜下观察发现,裸鼯鼠可育个体睾丸的被膜光滑完整,曲细精管横切面可观察到各种不同发育阶段的生精细胞,如精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞,而且中间腔隙中有较多成熟精子;生精小管壁上还附着一种不规则的长椎体形细胞,顶部伸向腔面,即为支持细胞;曲细精管外有成群间质细胞,体积较大,呈圆形或椭圆形,核圆形,细胞质嗜酸性(如图 1A 所示)。而不可育个体睾丸的被膜有断裂现象,曲细精管横切面可见其明显萎缩,细胞间出现大量空泡,生精细胞严重脱落,管腔内成

为有统计学意义。

2 结果

2.1 雄性可育个体与不可育个体睾丸和附睾脏器系数比

经比较分析发现,不可育个体的睾丸重量低于可育个体(*P* < 0.05),附睾重量显著低于可育个体,且睾丸系数百分比和附睾系数百分比均显著低于可育个体(*P* < 0.01)(如表 1 所示)。

熟精子明显变少;支持细胞也有脱落现象,只有基膜裸露;曲细精管外间质疏松,间质细胞数量减少(如图 1B 所示)。

2.3 精子计数、精子活动度的测定

经比较分析发现,不可育个体附睾的精子数量显著低于可育个体(*P* < 0.01),同时精子活动度也显著低于可育个体(*P* < 0.01)(如表 2 所示)。

2.4 相关性激素浓度测定

经比较分析发现,不可育个体的血清黄体生成素浓度显著低于可育个体(*P* < 0.01),同时睾酮浓度也显著低于可育个体(*P* < 0.01)(如表 3 所示)。

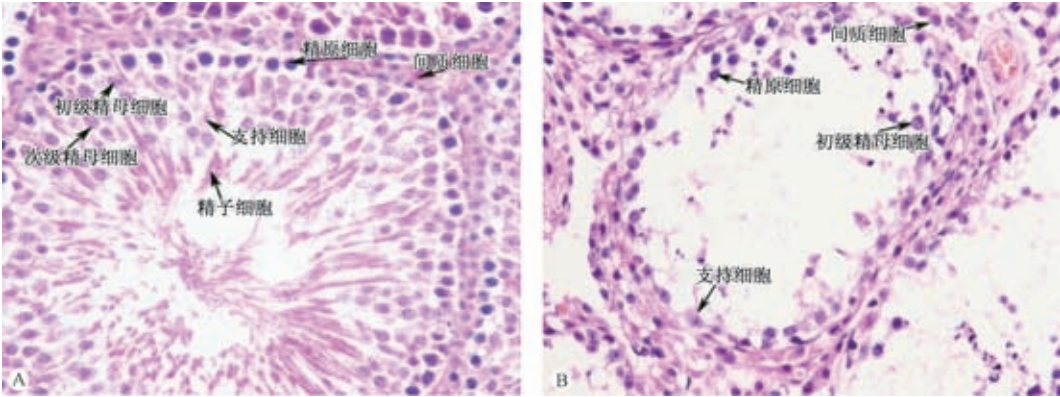


图 1 可育个体 (A) 和不可育个体 (B) 的睾丸曲细精管横切面组织形态(×200)
Fig.1 Histology of the seminiferous tubules of fertile (A) and infertile (B) individuals(×200)

表 2 可育个体与不可育个体的精子计数和精子活动度的比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab.2 Comparison of the sperm count and sperm activity between fertile and infertile individuals

雄性裸鼯鼠 Male naked mole rats	精子计数 $\times 10^6/\text{mL}$ Sperm count	精子活动度/% Sperm activity
可育个体 Fertile individuals	8.26 $\pm$ 0.137	50.92 $\pm$ 11.79
不可育个体 Infertility individuals	1.80 $\pm$ 0.43 **	10.42 $\pm$ 14.91 **

注: * 与可育个体组比较, $P<0.05$; ** 与可育个体组比较, $P<0.01$ 。
Note. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with the fertile group.

表 3 可育个体与不可育个体的血清黄体生成素和睾酮浓度的比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab.3 Comparison of serum LH and T levels between the fertile and infertile individuals

雄性裸鼯鼠 Male naked mole rat	黄体生成素 LH mIU/mL	睾酮 T ng/mL
可育个体 Fertile individuals	19.78 $\pm$ 3.32	26.04 $\pm$ 5.50
不可育个体 Infertile individuals	4.56 $\pm$ 0.55 **	5.84 $\pm$ 2.94 **

注: * 与可育个体组比较, $P<0.05$; ** 与可育个体组比较, $P<0.01$ 。
Note. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with the fertile group.

3 讨论

哺乳动物的雄性生殖系统包括睾丸、附睾、输精管以及发达的辅助性腺,其中,睾丸是雄性生殖系统最重要的器官,主要发挥合成与分泌雄性激素、产生精子的功能,在动物的性别分化、个体发育、维持繁育功能等方面均具有极为重要的作用。附睾也是雄性生殖系统中重要的器官,对于精子的成熟、贮存和保护起决定作用^[12]。

中心课题组在前期研究与观察过程中,发现裸鼯鼠雄性生殖系统和其他哺乳动物略有差异:首先其生殖系统包括睾丸组织,全部器官均位于腹腔内,没有像其他雄性动物那样有明显的阴囊存在;其次,其附睾体积非常小,仅仅为一小段细管状结构蜿蜒折叠,附着于睾丸尾部;再者,裸鼯鼠生殖系统未发现精囊腺、前列腺和尿道球腺等辅助性腺。

一般认为脏器系数下降意味着该器官出现了萎缩或退化性变化^[13]。睾丸和附睾是精子生成和成熟的场所,睾丸和附睾组织的重量和脏器系数的变化,一定程度上可以反映其受损或者退化情况。本研究发现,与裸鼯鼠雄性可育个体相比,不可育个体不论是睾丸重量($P<0.05$)、附睾重量($P<0.01$),

还是睾丸脏器系数($P<0.01$)、附睾脏器系数($P<0.01$),均有显著下降,从脏器实质性角度说明,不可育个体的生殖器官确实存在萎缩或退化的现象。

经组织形态学观察发现,不可育个体的生精单位—睾丸曲细精管出现明显的病理变化。首先,不可育个体的各级生精细胞不再有序排列,而是出现大量脱落、萎缩现象,腔隙中成熟精子的数量明显减少。其次,曲细精管基膜上的支持细胞也有脱落和减少现象。而正常的睾丸组织中,支持细胞底部会相互紧贴,参与形成血睾屏障^[14];同时还有分泌运送精子的液体、雄性激素结合蛋白、抑制素、性激素、少量雌性激素,以及营养和支持各级生精细胞的功能^[15],因此一旦支持细胞减少,将会严重影响睾丸的生精作用。第三,曲细精管外的间质细胞数目也有减少,而间质细胞可分泌睾酮,促进精子发生和雄性生殖器官发育^[16],因此,间质细胞数量减少也会影响雄性动物个体的生殖功能。

精液质量分析是评价雄性动物生殖能力常用的方法之一,可以通过精子计数、观测精子活动力等,检测和分析精子的数量和质量,并由此推测雄性动物个体的生育能力。足够数量的精子数是维持雄性动物生育能力的重要前提,在评价雄性机体生殖能力方面,精子计数的差异比其他指标更为敏感,因此是评价雄性生殖能力的重要指标。本研究发现,裸鼯鼠不可育个体精子数目相较于可育个体减少了约 4 倍($P<0.01$),表明不可育个体精子发生过程可能受到了严重的抑制或者损伤。雄性动物的生育能力与其受精能力密切相关,而精子具备很好的活动力,是完成受精过程的基础,因而精子活动度是进行雄性机体育育能力的重要评价指标,同时也是检测精子运动能力以及评价成熟精子功能的重要指标之一^[17]。本研究中发现,裸鼯鼠不可育个体精子活动速度明显低于可育个体($P<0.01$)。由此可见,雄性裸鼯鼠不可育个体,不仅产生的精子数目明显不足,而且活力也不足以完成受精过程。

睾丸的生精过程和各种激素水平的稳定主要通过下丘脑—腺垂体—睾丸轴进行调节^[18]。首先,由下丘脑分泌的促性腺激素释放激素,经由垂体门脉系统直达腺垂体;再作用于腺垂体并促进其合成和分泌卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)和黄体生成素(LH)。其中,LH 主要作用于间质细胞,可以刺激间质细胞的发育并促进其分泌睾酮(T),因而对雄性生殖系统的发育和维持具有重要

意义。睾酮是睾丸分泌的主要雄性激素之一,也是雄性动物最重要的雄性激素,对维持雄性附属性腺及性器官的成熟具有重要作用。因此,LH 和 T 都是从激素水平评价雄性动物生殖能力的可靠指标。本研究中裸鼯鼠雄性不可育个体 LH 和 T 均显著低于可育个体($P < 0.01$),说明雄性裸鼯鼠不可育个体在生殖系统发育和雄性激素合成与分泌等方面也存在缺陷。

综上所述,本研究从裸鼯鼠雄性生殖系统的脏器系数、组织形态学、精子数量和活动度,以及相关激素水平等几个方面证实,裸鼯鼠不可育个体雄性生殖系统存在组织结构萎缩、功能衰退等现象。与此同时,关于裸鼯鼠雄性个体可育或不可育的相关机制值得深入探讨,本中心也正在相关研究。

参 考 文 献

- [1] 赵善民,崔淑芳. 裸鼯鼠生物学特性的研究进展 [J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33 (5): 400 - 405.
- [2] Jarvis JU. Eusociality in a mammal: cooperative breeding in naked mole-rat colonies [J]. Science, 1981, 212 (4494): 571 - 573.
- [3] Sherman PW, Jennifer J, Richard A. The Biology of the Naked Mole-rat [M]. Princeton University Press, 1992: 433 - 434.
- [4] Faulkes CG, Abbott DH, Jarvis JU. Social suppression of reproduction in male naked mole-rats, *Heterocephalus glaber* [J]. J Reprod Fertil, 1991, 91(2): 593 - 604.
- [5] Faulkes CG, Abbott DH. Social control of reproduction in breeding and non-breeding male naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*) [J]. J Reprod Fertil, 1991, 93(2): 427 - 435.
- [6] 徐艺玫,廖力夫,王莹,等. 补光对越冬灰仓鼠体重、主要器官指数及精子数量的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(1): 53 - 57.
- [7] 文端成,戴丽军,彭杰,等. 长爪沙鼠精子的显微结构观察 [J]. 中国实验动物学报, 2002, 10(1): 57 - 60.
- [8] 李文娟,王晋. 间歇低氧对小鼠精子生成数量及活力的影响 [J]. 中国继续医学教育, 2015, 18: 82 - 83.
- [9] 李海山,马明月,张玉敏,等. 丙烯腈对小鼠精子生产的影响 [J]. 中国工业医学杂志, 1999, 12(6): 333 - 334.
- [10] Faulkes CG, Abbott DH. Evidence that primer pheromones do not cause social suppression of reproduction in male and female naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*) [J]. J Reprod Fertil, 1993, 99(1): 225 - 230.
- [11] Faulkes CG, Abbott DH, Jarvis JU. Social suppression of ovarian cyclicity in captive and wild colonies of naked mole-rats, *Heterocephalus glaber* [J]. J Reprod Fert, 1990, 88(2): 559 - 568.
- [12] 谢淑武,马丽,刘向云,等. 度他雄胺对大鼠附睾精子成熟和生育的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(4): 309 - 314.
- [13] 马秀兰,宋淑云,叶建新,等. 对成年大鼠脏器系数的探讨 [J]. 动物学杂志, 1996, 31(3): 25 - 26.
- [14] Lee NP, Cheng CY. Adaptors, junction dynamics, and spermatogenesis [J]. Biol Reprod, 2004, 71(2): 392 - 404.
- [15] Syed V, Hecht NB. Disruption of germ cell-Sertoli cell interactions leads to spermatogenic defects [J]. Mol Cell Endocrinol, 2002, 186(2): 155 - 157.
- [16] Alexandrova ML, Bochev PG. Reduced extracellular phagocyte oxidative activity, antioxidant level changes and increased oxidative damage in healthy human blood as a function of age [J]. Age (Dordr), 2009, 31(2): 99 - 107.
- [17] Jeong SH, Kim B Y, Kang HG, et al. Effects of butyrate hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats [J]. Toxicology, 2005, 208(1): 49 - 62.
- [18] 姚慧娟,徐嘉兴,马尚清,等. 雌、雄大鼠去势对 HPA 轴分泌功能影响的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(1): 97 - 100.

[收稿日期] 2015-11-15

慢性皮质酮处理对小鼠学习记忆和突触相关蛋白的影响

孙秀萍¹, 杨久山², 张楠¹, 宋铭晶¹, 秦川^{1*}

(1. 北京协和医学院比较医学中心 中国医学科学院北京协和医学院实验动物研究所, 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动物模型三级实验室, 北京 100021;
2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250014)

【摘要】 目的 建立饮入方式, 慢性给予皮质酮, 观察皮质酮对学习记忆和突触相关蛋白的影响。**方法** C57BL/6J 雄性小鼠随机分为正常组和皮质酮组, 每组 10 只。皮质酮组饮用含皮质酮的 0.45% 羟丙基- β -环糊精溶液, 5 mg/(kg·d)。正常组动物给予 0.45% 羟丙基- β -环糊精溶液。造模 35 d 后, 进行社会识别实验和水迷宫实验。行为学实验结束后, 动物断头取海马, 应用 western blot 进行突触相关蛋白测定。**结果** 社会识别实验显示, 正常组和皮质酮组对刺激鼠笼的嗅闻时间均比空鼠笼长 ($P < 0.05$)。对照组对刺激鼠 2 的嗅闻时间比刺激鼠 1 长 ($P < 0.05$)。皮质酮组对刺激鼠 2 的嗅闻时间与对刺激鼠 1 的嗅闻时间差异无显著性。水迷宫实验定位航行结果显示, 皮质酮组学习能力下降, 寻台潜伏期延长 ($P < 0.05$)。空间探索结果显示, 皮质酮组穿台次数、进入实台象限的次数和实台象限路程均明显减少 ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$)。Western blot 结果显示, 皮质酮组突触后致密物质 (postsynaptic density, PSD-95)、突触素 (synapsin-1, Syn-1) 和磷酸化细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 表达明显下降 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 通过饮入方式, 慢性给予皮质酮, 动物出现社会记忆和空间学习记忆障碍, 可能与海马突触相关蛋白表达下降, 突触功能受损有关。

【关键词】 皮质酮; 学习记忆; 突触蛋白; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0253-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.007

Effect of chronic corticosterone administration on the learning and memory and expression of synapse-related proteins in mice

SUN Xiu-ping¹, YANG Jiu-shan², ZHANG Nan¹, SONG Ming-jing¹, QIN Chuan^{1*}

(1. Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College, and Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China; 2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of chronic corticosterone administration on learning and memory and expression of synapse-related proteins in mice. **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into control and corticosterone (CORT) groups (10 mice per group). CORT was dissolved in the vehicle (0.45% hydroxypropyl- β -cyclodextrin, β -CD). Corticosterone (5 mg/kg/day) was orally administered in drinking water for 35 days. The control mice received vehicle (β -CD) in drinking water during the entire experiment. Social discrimination test and Morris water test were applied to evaluate the learning and memory impairment of the model mice. **Results** Both the mice of control and CORT groups were more interested in social (stranger cage) than the non-social (empty cage) experience. The control

【基金项目】 北京市自然科学基金资助项目 (资助编号: 7142105); 国家自然科学基金 (资助编号: 31301890)。

【作者简介】 孙秀萍 (1974 -), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 神经精神疾病药理及方法学

【通讯作者】 秦川, 博士生导师, E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn

group increased the time spent with an unfamiliar mouse (stranger 2 cage). The mice of CORT group were not able to discriminate between an unfamiliar (stranger 2) and the familiar mouse (stranger 1). In the Morris water maze test, in contrast to the first 3 days, an increase in latency to reach the hidden platform ($P < 0.05$) was observed on day 4 in the CORT group compared with the mice of control group. CORT-treated mice showed a statistically significant decrease in the frequency in the platform, frequency in the target quadrant and distance in the target quadrant ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$) compared with the control group. The western blot analysis showed a notably decreased expression of PSD95, Syn-1 and p-erk in hippocampus in the mice of CORT group compared with the control group. **Conclusions** Chronic administration of corticosterone induces learning and memory impairment and decreases the expression of synapse-related proteins.

【Key words】 Corticosterone; Learning; Memory; Synapse-related protein; Mice

Corresponding author: QIN Chuan, Email: qinchuan@pumc.edu.cn

研究表明,慢性应激影响人的学习记忆功能^[1]。长期应激引起下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA)负反馈失调,促使体内糖皮质激素释放。糖皮质激素受体在海马高密度表达^[2]。长期、高水平的糖皮质激素激活海马糖皮质激素受体,通过一系列神经生化机制,导致海马受损,出现空间学习记忆障碍。物理应激方式如束缚、强迫游泳等被广泛应用于慢性应激致学习记忆障碍的研究。但物理应激容易引起动物的适应性,表现为糖皮质激素在应激初期升高,而中后期趋于降低的趋势,从而不能恰当反应应激因素对学习记忆的影响^[3]。啮齿类动物的糖皮质激素称为皮质酮(corticosterone, CORT)。通过皮下注射、饮入皮质酮等人为方式,增加动物体内的皮质酮水平,可以模拟应激引起海马功能和结构受损,用于应激致学习记忆障碍的研究^[4]。该模型操作简单,并且避免了物理应激的适应性现象。近年来,神经突触功能失调和结构受损成为学习记忆障碍病理基础的研究热点^[5]。分子生物学的研究揭示学习记忆障碍与突触相关蛋白表达紊乱有关。本研究通过饮入方式,给予小鼠皮质酮,观察皮质酮对小鼠学习记忆行为及海马突触相关蛋白的影响。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF级C57BL/6J雄性小鼠,20只,2月龄,体重22~25 g。由北京华阜康生物科技股份有限公司提供【SCXK(京)2014-0004】。动物自由进食进水,室内温度:23~25℃,相对湿度:(55±10)%。维持12 h光照/12 h黑暗的昼夜节律。动物适应环境一周进行实验。

1.2 仪器

动物行为学视频跟踪系统(Noldus Information

Technology, EthoVision XT, The Netherlands))

1.3 药物

皮质酮(Sigma, 27840),羟丙基-β-环糊精溶液(山东滨州智源生物科技有限公司)。

1.4 实验方法

动物随机分为正常组和皮质酮组,每组10只,5只/笼。皮质酮组参照文献^[6],将皮质酮溶于0.45%羟丙基-β-环糊精溶液中,每日35 μg/mL(相当于5 mg/kg),避光,动物在造模和行为学检测期间连续饮用。正常组动物给予0.45%羟丙基-β-环糊精溶液。造模35 d后,进行社会识别实验和水迷宫实验。行为学实验结束后,每组取3只动物,断头取海马,应用western blot进行突触相关蛋白测定。

1.4.1 社会识别实验

动物在测试房间适应1 h后,进行社会识别实验。实验在中国医学科学院医学实验动物所进行【SYXK(京)2014-0029】。分为适应阶段、社交实验阶段和社会新奇实验阶段。根据文献^[6],首先将动物置于50 cm × 50 cm × 50 cm的方形敞箱中,自由适应5 min。社交实验阶段,在敞箱的一个角落放置一空鼠笼,其对角角落放置一相同鼠笼,鼠笼内放置一只刺激鼠1(stranger 1)。将实验鼠放入敞箱,应用EthoVision XT行为轨迹跟踪系统,记录10 min内实验鼠接触空鼠笼和刺激鼠笼的时间。实验结束,将实验鼠取出。社会新奇实验:在空鼠笼放入另外一只新的刺激鼠2(stranger 2),重新放入实验鼠,记录10 min内实验鼠接触刺激鼠1和刺激鼠2的时间。鼠笼上有圆孔,实验鼠和刺激鼠可以通过嗅觉接触。接触行为表现为主动嗅闻(sniffing),定义为实验鼠的鼻尖距离鼠笼2 cm以内范围。实验结束,将实验鼠取出,归笼。

1.4.2 水迷宫实验

水迷宫实验装置为一个圆形不锈钢水池,直径

为 100 cm,高 50 cm,将水池等分为 4 个象限,平台象限的中央放置直径为 9 cm,高 27 cm 的圆形平台,整个实验期间其位置保持不变。水中加入奶粉,水温 25℃。动物在测试房间适应 1 h 后,进行水迷宫实验。根据文献^[7],水迷宫实验过程分为可视平台实验、定位航行(隐藏平台)实验和空间探索实验三个阶段。第 1 天,进行可视平台实验,平台露出水面 1 cm,每只动物从三个象限(平台象限除外),面壁放入水中,游泳 1 min。定位航行实验:第 2~5 天进行定位航行实验。平台位于水面以下约 1 cm。动物从三个象限(平台象限除外)入水,共游泳 3 次。每次 1 min。动物找到平台并停留 5 s,或测试时间到,实验自动停止。不论动物是否找到平台,一次游泳结束,均将动物引导至平台,停留 10 s。空间探索实验:定位航行实验结束 24 h 后,撤除平台。将动物从对角象限(与实台象限相对应的象限)放入水中,观察 1 min 内动物在实台象限的停留时间、穿台次数、游泳路程等。

1.4.3 突触相关蛋白测定

应用 western blot 方法,每 10 mg 组织加 100 μL 预冷的裂解液,冰上裂解 30 min。12 000 r/min,4℃

离心,20 min。取上清液,用 BCA 法测定蛋白浓度。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜(300 mA,2 h)。5%小牛血清封闭 1 h。一抗孵育过夜,加入 HRP 标记的二抗。GADPH 稀释浓度为 1:1000。ECL 试剂盒显色。应用 Image J 软件进行统计分析。

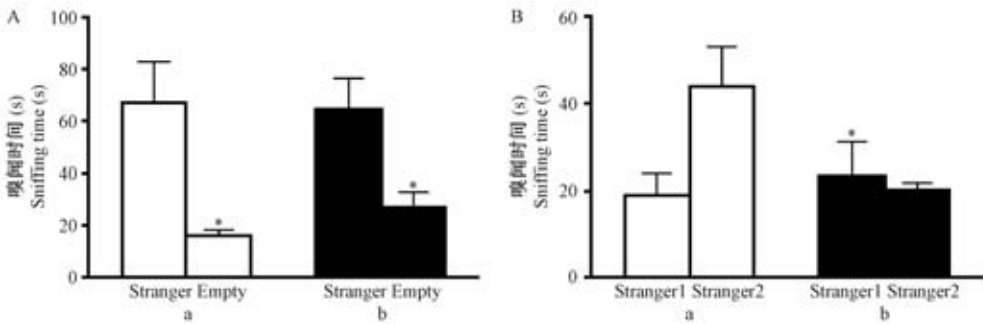
1.5 统计学处理

实验结果以均数 ± 标准误(mean ± SEM)表示。采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。采用单样本 K-S 检验进行正态分布检验,正态分布数据采用独立样本 T 检。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 皮质酮模型对社会识别实验的影响

如图 1A 所示,社交实验中,正常组和皮质酮组对刺激鼠笼的嗅闻时间均比空鼠笼长,并具有显著性差异($P < 0.05$)。如图 1B 所示,社会新奇实验中,对照组对刺激鼠 2 的嗅闻时间长,与刺激鼠 1 相比,差异具有显著性。皮质酮组对刺激鼠 2 的嗅闻时间与对刺激鼠 1 的嗅闻时间差异无显著性。



注:与正常组比较,* $P < 0.05$ 。a. 正常组;b. 模型组。

图 1 皮质酮模型对社会识别实验的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$ 。a. Control group;b. CORT group.

Fig. 1 Effect of corticosterone on social discrimination in the mice

2.2 皮质酮模型对水迷宫实验的影响

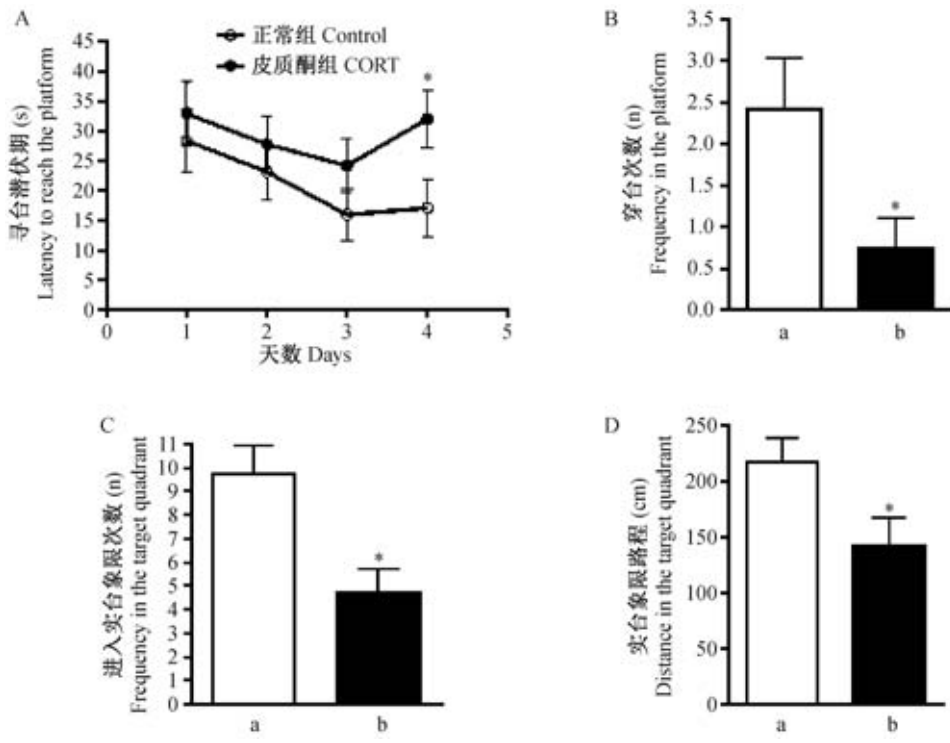
定位航行实验结果(图 2A)显示,随着训练时间的延长,正常组和皮质酮组寻台潜伏期均逐渐缩短,正常组缩短更明显,至第 4 天时,皮质酮组学习能力进一步下降,寻台潜伏期延长,与对照组相比,差异有显著性($P < 0.05$)。空间探索实验结果(图 2B、C、D)所示,皮质酮组穿台次数明显下降,与正常组比较,差异具有显著性($P < 0.05$)。同时,进入实台象限的次数和在实台象限的路程均明显减少,与正常组比较,差异具有显著性($P < 0.05, P < 0.05$)。

2.3 皮质酮模型对突触素及 PSD95 蛋白表达影响

如图 3 所示,皮质酮组 PSD95、Syn-1 蛋白和 p-ERK 表达明显下降,与正常组比较,差异具有显著性($P < 0.01, P < 0.01, P < 0.05$)。

3 讨论

慢性给予动物皮质酮,既模拟物理应激引起的 HPA 轴负反馈失调等病理过程,又避免了物理应激引起的适应性现象,是近年来研究应激所致神经精神障碍的常用模型。本研究将皮质酮溶于羟丙基-

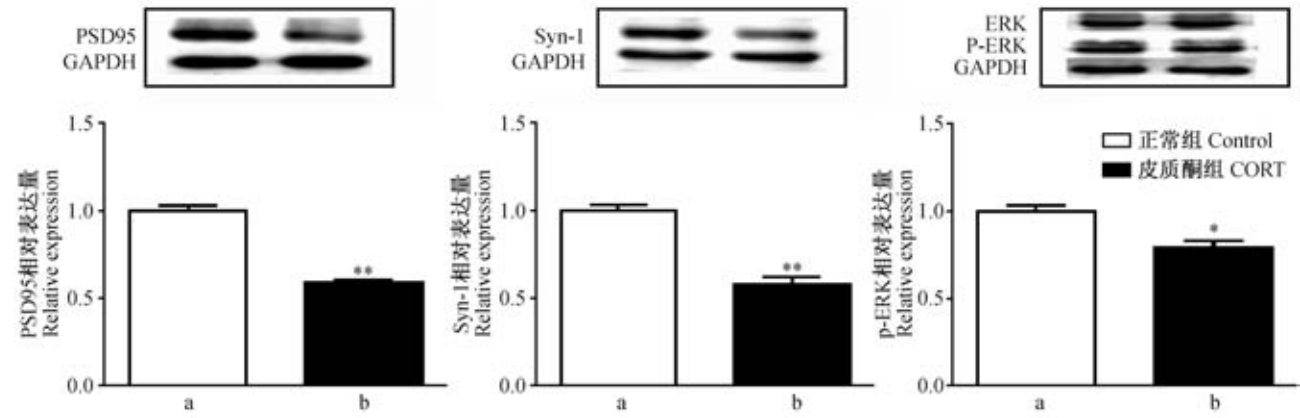


注:与正常组比较, * $P < 0.05$ 。a. 正常组;b. 模型组。

图 2 皮质酮模型对水迷宫实验的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. a. Control group;b. CORT group.

Fig. 2 Effect of corticosterone on the Morris water maze test of the mice



注:与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。a. 正常组;b. 模型组。

图 3 皮质酮模型对突触相关蛋白表达的影响 (mean $\pm$ SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与正常组比较)

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. a. Control group;b. CORT group.

Fig. 3 Effect of corticosterone on the expression of synapse-related proteins. (mean $\pm$ SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the control group)

β -环糊精溶液,增加皮质酮的溶解度。通过饮入方式造模,与皮下注射方式比较,操作简单,同时避免了皮下注射导致局部皮肤溃烂等现象。与皮下注射可精确控制每只动物皮质酮用量不同,本研究基于动物饮水状况正常,皮质酮应用剂量为每日 35 $\mu\text{g}/$

mL,折合动物的摄入量约为每日 5 mg/kg。

社会识别实验分为适应、社交实验 (sociability test) 和社会新奇实验 (social novelty test) 三个阶段,主要用于动物社会记忆 (social memory) 的检测^[8]。该实验基于动物的社交能力,因此,动物适应实验环

境后,进行社交实验。正常动物可以区分空笼和刺激鼠笼(社会刺激, stranger 1),对刺激鼠笼探索更多。本研究结果表明,正常组和皮质酮组均可以区分空笼和刺激鼠笼,表现为对刺激鼠笼嗅闻时间更长,提示皮质酮并未损伤小鼠的社交能力。社会新奇实验阶段,将另外一只动物(stranger 2)放入空鼠笼。正常动物可以区分 stranger 1 和 stranger 2,而对新的刺激鼠(stranger 2)探索更多,提示动物具有完善的社会记忆功能。皮质酮是否损害动物的社会记忆功能,目前尚未见报道。本研究表明,正常组动物对 stranger 2 嗅闻时间更长,表现出完善的社会记忆功能,而皮质酮组对 stranger 1 和 stranger 2 的嗅闻时间没有明显差异,提示皮质酮可能损伤了动物的社会记忆功能。水迷宫实验主要用于考察动物海马依赖的空间学习记忆能力^[9]。本研究可视平台实验显示,正常组和皮质酮组寻台潜伏期和到达平台的路程无显著性差异(数据未公示),提示两组动物寻找平台动机相同。定位航行阶段,皮质酮组寻台潜伏期比正常组长,并在第四天时出现显著性差异,提示皮质酮损伤了动物的学习能力。空间探索实验结果显示,皮质酮组穿台次数明显降低,在实台象限的路程和进入实台象限的次数少于正常组,提示皮质酮损伤了动物的空间学习记忆能力,与文献报道结果一致^[4]。

突触是脑内神经信息传递的关键结构,与学习记忆等过程紧密相关^[10]。在应激条件下,皮质酮水平升高,可导致海马神经元突触形态结构发生变化,突触密度减少,树突棘和树突分支减少,从而导致学习记忆障碍^[11]。突触前和突触后的特异性蛋白如突触素、突触后致密物质(postsynaptic density, PSD-95)等的表达水平可反应突触的状态,已成为研究海马突触可塑性的标志性蛋白^[12]。本研究表明,皮质酮组突触素和 PSD-95 表达显著降低,提示在皮质酮的作用下,海马突触功能下降,可能是其学习记忆功能障碍的病理基础之一。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是丝裂素活化蛋白激酶家族的重要成员,调节海马突触可塑性,与学习记忆过程密切相关。本研究表明,皮质酮组磷酸化 ERK 水平显著降低,提示皮质酮所致学习记忆障碍可能与 ERK 信号转导通路活化受到抑

制,海马突触受损有关。

通过饮入方式,慢性给予皮质酮,动物表现为社会记忆和空间学习记忆障碍,其病理基础可能与 ERK 信号转导通路活化受到抑制,突触素和 PSD-95 表达水平降低,海马突触结构和功能受损有关。

参 考 文 献

- [1] 李亚, 孔宏, 宋倩, 等. 慢性应激对大鼠空间学习记忆及海马和前脑皮层突触体膜流动性的影响[J]. 心理学报. 2010, 35(2): 235-240.
- [2] 马强, 王福庄, 赵彤, 等. 皮质酮对大鼠海马脑片 ca1 区长时程增强效应的影响[J]. 中国应用生理学杂志. 2003, 19(1): 97-98.
- [3] Naert G, Ixart G, Maurice T, et al. Brain-derived neurotrophic factor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptation processes in a depressive-like state induced by chronic restraint stress[J]. Mol Cell Neurosci. 2011, 46(1): 55-66.
- [4] Darcet F, Mendez-David I, Tritschler L, et al. Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression[J]. Front Behav Neurosci. 2014, 8(136): 1-13.
- [5] 陈伟恒, 陶长路, 时美玉, 等. 突触可塑性与脑疾病的神经发育基础[J]. 生命科学. 2014, 26(6): 583-592.
- [6] Ter Horst J P, van der Mark M, Kentrop J, et al. Deletion of the forebrain mineralocorticoid receptor impairs social discrimination and decision-making in male, but not in female mice[J]. Front Behav Neurosci. 2014, 8(26): 1-11.
- [7] Cuadrado-Tejedor Mar, Ricobaraza A, Del Río J, et al. Chronic mild stress in mice promotes cognitive impairment and Cdk5-dependent tau hyperphosphorylation[J]. Behav Brain Res. 2011, 220(2): 338-343.
- [8] Faizi M, Bader PL, Saw N, et al. Thy1-Happ (Lond/Swe +) mouse model of Alzheimer's disease displays broad behavioral deficits in sensorimotor, cognitive and social function[J]. Brain Behav. 2012, 2(2): 142-154.
- [9] Bromley-Brits K, Deng Y, Song WH, et al. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer disease model mice[J]. J Vis Exp, 2011, (53): e2920.
- [10] 李莹超. 应激影响海马依赖的学习记忆的分子机制研究[D]. 中国科学技术大学, 2014.
- [11] 陈琳, 杜力军, 赵玉男. 糖皮质激素与海马结构可塑性[J]. 神经药理学. 2011, 1(2): 58-64.
- [12] 洪乐鹏, 龙大宏, 冷小龙. 痴呆模型鼠海马突触素改变及其与学习记忆的关系[J]. 广州医学院学报. 2003, 31(4): 43-46.

[收稿日期] 2015-10-15

小鼠异位肢体复合组织移植模型的建立

黄健兵, 徐高俊, 刘浩, 梅举, 丁芳宝*

(上海交通大学医学院附属新华医院心胸外科, 上海 200092)

【摘要】 目的 建立稳定的小鼠异位肢体复合组织移植模型。**方法** 选用25对C57BL/6小鼠行同品系异位肢体复合组织移植手术。取供体小鼠后肢,于腹股沟韧带下缘起沿股动脉、股静脉向上游离,电凝切断除股静脉、股动脉外所有分枝血管至髂外动脉、髂外静脉,断髂外动脉、髂外静脉后,横断股骨、股部肌肉。将供体髂外动脉、髂外静脉分别与受体小鼠右侧颈总动脉、颈外静脉行端侧吻合。连续缝合供体皮缘于受体皮肤切缘固定肢体。于供肢胫骨远端关节处切断,结扎残端。**结果** 手术成功率76%,总手术时间(87.1 ± 10.1) min,供体获取时间(23.8 ± 4.9) min,血管吻合时间(55.3 ± 9.6) min。**结论** 小鼠异位肢体复合组织移植成功率较高,稳定可靠,是一种新的研究移植免疫的理想动物模型。

【关键词】 小鼠;肢体;复合组织;移植;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0258-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.008

Establishment of a mouse model of limb heterotopic composite tissue allograft transplantation

HUANG Jian-bing, XU Gao-jun, LIU Hao, MEI Ju, DING Fang-bao*

(Department of Cardiothoracic Surgery, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

【Abstract】 Objective To establish a stable mouse model of limb heterotopic composite tissue allograft transplantation. **Methods** 25 pairs of C57BL/6 mice were used for this limb heterotopic allograft transplantation experiment. The hind legs were taken from the donor mice. A transverse incision was made at the level of inguinal ligament to expose and mobilize the femoral vessels up to the external iliac vessels. All branches to the external iliac artery and vein were cut off by electrocoagulation. To cut off the external iliac artery and external iliac vein, and to transect the femur, thigh muscles and skin. The donor external iliac artery-external iliac vein anastomosis was performed in end-to-side fashion with recipient mice's right common carotid artery and jugular vein, respectively. Continuously suture the donor skin to the recipient skin incisional margin to fix the limb. Cut off the donor limb's distal tibial joint, and ligate the stump. **Results** The success rate of the heterotopic limb transplantation operation was 76%. The total operation time was 87.1 ± 10.1 minutes, and the vessel anastomosis time was 55.3 ± 9.6 minutes. **Conclusions** This mouse model of limb heterotopic limb composite tissue allograft transplantation shows a high success rate of the surgical operation, and is stable and reliable. It is a new ideal model for studies on transplantation immunology.

【Key words】 Mice; Limb; Composite tissue; Transplantation; Animal model

Corresponding author: DING Fang-bao, Email: 40821247@qq.com

[基金项目] 上海市科委科技项目(15411952600)。

[作者简介] 黄健兵(1979-),男,博士研究生,主治医师,专业:心胸外科。Email: jb4480@163.com

[通讯作者] 丁芳宝(1969-),男,硕士生导师,主任医师,专业:心胸外科。Email: 40821247@qq.com

随着转基因技术的发展,转基因动物器官移植模型成为从分子水平研究移植免疫的新手段。小鼠的基因型相对容易控制,各种纯系小鼠的成功繁殖等有利因素,使小鼠模型在移植免疫方面占据不可替代的地位。随着移植免疫研究的进展,复合组织移植模型的运用逐步受到重视,但目前国内尚未有较成熟的复合组织移植的小鼠模型报道。因各型小鼠具有相似的解剖结构,在模型的建立上操作相同,为避免不同基因小鼠间组织移植的免疫排斥影响,我们选择基因型基本相同的近交系小鼠探索复合组织移植的可能性。笔者在参考国外文献的基础上,通过不断的摸索与练习,成功建立了小鼠异位肢体复合组织移植模型,简便易行,成功率高。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

清洁级雌性 C57BL/6 (H2b) 小鼠 50 只,6~8 周龄,体重 16~22 g,购自上海交通大学医学院实验动物科学部[SCXK(沪)2013-0021],并在上海交通大学医学院附属新华医院动物实验室[SYXK(沪)2013-0106]完成实验。50 只小鼠随机分 25 对作异位肢体移植。实验过程按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀,并通过上海交通大学医学院附属新华医院医学伦理委员会的动物实验伦理审查(编号:XHEC-F-2016-004)。

1.2 手术器械及试剂

手术显微镜(上海医用光学仪器厂);血管夹(Accurate Surgical & Scientific Instruments 公司);显微持针器(Eriem Surgical 公司);显微剪刀和镊子(Fine Science Tools 公司);11/0 带针缝线(Crown-jun)和 4/0 医用丝线(上海金环医用缝线厂);戊巴比妥钠和肝素钠(上海医药集团公司)。手术操作均在 10~25 倍显微镜下完成。

1.3 手术方法

1.3.1 供体手术

麻醉采用腹腔注射 0.65% 戊巴比妥钠(0.01 mL/g)。剃除腹部、左后肢、左背部毛,小鼠取仰卧位固定四肢远端,术野消毒。沿左腹股沟韧带方向横行切开左后肢皮肤,垂直此切口斜向上切开腹腔,充分显露股动静脉、髂动静脉,自腹股沟韧带水平起逐步向腹腔游离、电凝切断除股静脉、股动脉外所有分枝血管,股动脉向上游离范围至髂外动脉下二分之一,股静脉向上游离至腹股沟韧带以上即可。游

离完成后,用显微血管夹阻断腹主动脉,在血管夹下方用 30G 针头斜行向下穿刺腹主动脉,灌注 4℃ 肝素生理盐水(10 U/mL) 1 mL。于髂外动脉下二分之一处断动脉,于腹股沟韧带水平上方断静脉,获取血管蒂。于股骨中段横断股骨,切断股部肌肉、背侧皮肤,获取后肢放入 4℃ 肝素生理盐水(10 U/mL)中备用。

1.3.2 受体手术

小鼠腹腔注射 0.65% 戊巴比妥钠(0.01 mL/g)麻醉后剃右侧颈、胸部毛,取仰卧位固定,头端朝向术者。术野消毒。作颈部偏右侧竖切口切开皮肤,游离右侧颈外静脉、颈总动脉。先使用显微弯血管夹侧方阻断颈外静脉(图 1),切开后与供体髂静脉行端侧吻合,吻合方法为:将供肢放于术野右侧,于吻合口上下两端各缝一针打结牵引固定血管,以上端缝线连续缝合右侧血管壁至下端后,绕过下端再连续向上缝合至上端与上端打结线,尾部打结完成静脉吻合。取另一显微弯血管夹侧方阻断颈总动脉(图 1),切开颈总动脉侧壁,与供体髂动脉行端侧吻合,吻合方法为:先于吻合口上端间断缝合一针,打结固定后,向下连续缝合右侧壁至下端后向上连续缝合左侧壁至上端与线尾打结。吻合完成后先开放静脉血管夹,后开放动脉血管夹,可见供体动脉搏动。将供肢皮缘与受体切口皮缘连续缝合固定供肢。于供肢胫骨远端关节处切断,结扎残端,使残端皮肤完全包埋骨性断端。

1.4 术后处理

术后,将小鼠置于 37℃ 暖箱内复温,自由活动后放回笼内,正常进食水。每天观察小鼠活动情况、移植肢体存活情况。

2 结果

供体手术时间为(23.8 ± 4.9) min,动、静脉吻合时间(55.3 ± 9.6) min,总手术时间为(87.1 ± 10.1) min。术后所有受体小鼠存活良好,活动无影响。四个移植肢体术后第 2 天出现干结、脱水表现,至第 5 天供肢干结、坏死明显,解剖提示动脉吻合口血栓形成。两个小鼠供肢出现明显肿胀,一周后出现坏死,解剖提示静脉吻合口血栓形成,血液回流不畅。其余小鼠供肢成活良好,供肢皮肤有毛生长(见图 2)。术后 3 周移植肢体存活率 76%。3 周后取成活供肢作病理检查(见图 3)证实肌肉存活良好。

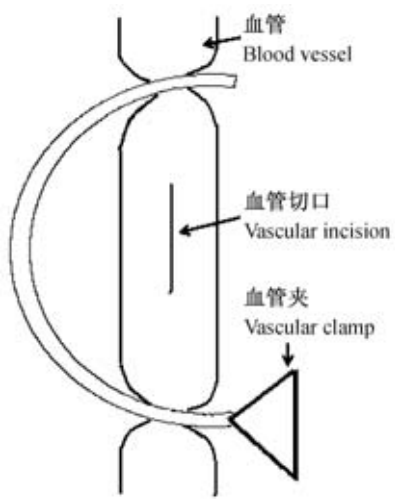


图 1 阻断血管方法示意图
Fig.1 Schematic diagram of the block method of the blood vessels

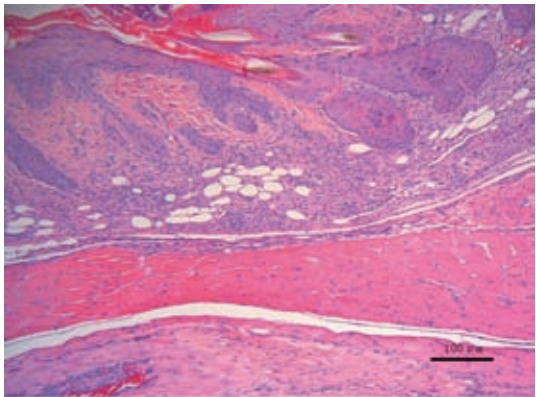


图 3 小鼠异位肢体移植后 3 周肌肉组织 HE 染色图片 (×100)
Fig.3 Histological appearance of the muscle tissue at 3 weeks after the limb allograft transplantation. (×100)

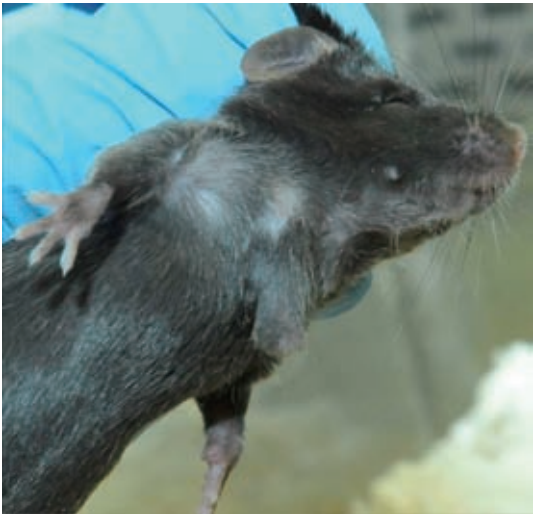


图 2 小鼠颈部肢体移植后 3 周
Fig.2 Gross appearance of limb allograft transplantation in the neck at 3 weeks after the operation.

3 讨论

随着机械化、工业化社会的形成,各种复合组织损伤时有发生,对复合组织的修复要求日趋受到重视,但复合组织移植的免疫排斥问题还需要更多的研究^[1]。皮肤、肌肉甚至骨骼复合组织的移植免疫研究尚未广泛开展,而缺乏稳定的复合组织移植模型可能是限制其研究的原因之一。因此,稳定的复合组织移植的动物模型的建立,对开展移植免疫研究至关重要。相对于大鼠及其他大动物而言,小鼠有其不可替代的优点:人们对小鼠基因组特征的认识比大鼠及其他任何大动物都清楚,转基因小鼠种

系较纯,已有大量的纯种小鼠及单抗可用,而有些蛋白成分如酶或趋化因子只能通过特定细菌或细胞分泌产生,产量非常少,无法批量用于大动物甚至大鼠。但由于小鼠体积和重量小,手术操作难度大,常见的小鼠移植模型多限于相对较大血管吻合的模型,如心脏移植、肾移植、肝移植等^[2-4]。1999 年 Zhang 等^[5]报道了原位小鼠肢体移植模型,但因为其较低的成功率,及受体小鼠创伤大、耐受性差限制了其发展。2001 年 Thomas 等^[6]报道了异位小鼠肢体移植模型,成功率有了明显的提高,小鼠的耐受也有改善,但其移植供体组织为较小的肢体皮片、肌肉或部分骨性组织,难以完整体现复合组织移植免疫过程。同时由于肢体血管细小,手术难度大,成功率低等,限制了小鼠肢体移植模型的发展,此后国外相继有少数几个较大的研究中心报道了涉及小鼠肢体复合组织移植模型的研究^[7-11],而国内尚未见相关报道。但国外已有的报道多使用较少的供体肢体组织,或行原位移植、腹部移植等,受体小鼠耐受较差,或受体小鼠易自行咬到供体组织影响实验。我们在参考国外相关文献的基础上,通过摸索与练习,成功建立了异位小鼠肢体复合组织移植模型。本模型设计的优点有:移植血管使用端侧吻合方法,不阻断受体小鼠原有的血供,避免对受体小鼠血流的影响。移植肢体位于受体小鼠颈部,不影响受体小鼠的正常活动,且无明显疼痛刺激,受体小鼠耐受性好。同时受体小鼠无法咬到位于颈部的供体组织,可较好的保护移植植物。

本模型建立的几点体会:取供体时,关键需要保护供体血管无损伤,且要注意处理分支时可靠电凝,

防止移植后分支血管出血。供体血管切断的位置在腹股沟韧带以上,其血管径明显较腹股沟韧带下方股动脉、股静脉粗,便于后期血管吻合。在吻合血管时,受体血管切口略大于供体血管开口径。因静脉壁很薄,有张力牵拉时很难分辨前后血管壁,在开始缝合时先在上下两端各缝一针作牵引,缝合过程中血管端间断冲生理盐水使血管腔鼓起后便于分辨血管壁,连续缝合完打结前,轻拉吻合口,使吻合口充分展开,缝线自然舒展,打结时线结靠上即可,防止用力拉线导致吻合口狭窄。动脉吻合时,注意修剪干净吻合口附近血管外膜,缝合时防止外膜组织入吻合口,导致术后血栓形成,缝合完打结时勿过于用力致吻合口狭窄。

缝合完供体皮肤后,于供肢胫骨远端关节处切断,如果血管吻合良好,可见残端出血。结扎残端时,注意使皮肤完整包埋骨性断端,否则后期胫骨由残端穿出,致局部组织坏死。切除供体远端肢体可较好的减少对受体小鼠活动的影响,同时不影响供肢复合组织的免疫学研究。

总之,小鼠异位肢体复合组织移植模型有一定的技术难度,对实验室条件、实验者显微外科技术要求较高,但通过适当的练习,可以建立稳定的复合组织移植模型,有助于对移植免疫机制进行更深的研究。

参 考 文 献

[1] Lin CH, Zhang W, Ng TW, et al. Vascularized osteomyocutaneous allografts are permissive to tolerance by induction-based immunomodulatory therapy [J]. Am J Transplant, 2013, 13: 2161

- 2168.
[2] 鲍春荣, 梅举, 丁芳宝, 等. 小鼠腹腔异位心脏移植模型制作方法的改进 [J]. 上海交通大学学报医学版, 2014, 34: 1100 - 1103.
[3] 傅宇阳, 何晓顺, 陈剑琳, 等. 小鼠肾移植模型的建立 [J]. 中华显微外科杂志, 2003, 26: 213 - 214.
[4] 黄德荣, 吴忠均, 郑树森, 等. 小鼠原位肝移植模型建立方法的改良研究 [J]. 解放军医学杂志, 2009, 34: 1070 - 1072.
[5] Zhang F, Shi DY, Kryger Z, et al. Development of a mouse limb transplantation model [J]. Microsurgery, 1999, 19: 209 - 213
[6] Tung THH, Mohanakumar T, Mackinnon SE. Development of a mouse model for heterotopic limb and composite-tissue transplantation [J]. J Reconstr Microsurg, 2001, 17: 267 - 273.
[7] Foster RD, Liu T. Orthotopic hindlimb transplantation in the mouse [J]. J Reconstr Microsurg, 2003, 19: 49 - 54.
[8] Tung TH, Mackinnon S, Mohanakumar T. Long-term limb allograft survival using anti-CD40L antibody in a murine model [J]. Transplantation, 2003, 75: 644 - 650.
[9] Tung TH, Mackinnon S, Mohanakumar T. Prolonged limb allograft survival with CD40 costimulation blockade, T-cell depletion, and megadose donor bone-marrow transfusion [J]. Microsurgery, 2005, 25: 624 - 631.
[10] Sucher R, Lin CH, Zanoun R, et al. Mouse hind limb transplantation: a new composite tissue allotransplantation model using nonsuture supermicrosurgery [J]. Transplantation, 2010, 90: 1374 - 1380.
[11] Yan Y, Johnson PJ, Glaus SW, et al. A novel model for evaluating nerve regeneration in the composite tissue transplant: the murine heterotopic limb transplant [J]. Hand, 2011, 6: 304 - 312.

[收稿日期] 2015-10-27

他克莫司对大鼠肝脏组织蛋白磷酸酶 2A 和 P-AKT 表达的影响

牛玉坚¹, 王德恩², 杨柳², 陈新国¹, 王宏宇², 徐春^{2*}

(1. 武警总医院器官移植科, 北京 100039; 2. 武警总医院内分泌科, 北京 100039)

【摘要】 目的 通过观察他克莫司对大鼠血糖、胰岛素水平、肝脏组织蛋白磷酸酶 2A 和磷酸化 AKT 表达的影响, 进一步探究他克莫司导致血糖升高的机制。**方法** 将 60 只雄性 SD 大鼠(89.83 ± 4.44 g) 随机均分为 2 组, 他克莫司组($n=40$), 每日空腹(禁食水 8 h)灌胃给药, 剂量为 $4 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$; 对照组($n=20$), 每日空腹灌胃给予等量生理盐水, 每月测量大鼠体重、空腹血糖。5 个月后处死大鼠, 心脏穿刺取血, 取胰腺组织和肝脏组织, 测大鼠血清胰岛素水平, 行胰腺组织病理组织学观察, 并对肝脏行组织处理和免疫组织化学技术检测肝细胞质中蛋白磷酸酶 2A 和磷酸化 AKT 的表达。**结果** 用药 2 个月后, 他克莫司组大鼠的血糖水平明显高于对照组($P < 0.05$), 他克莫司组大鼠的胰岛素分泌指数、胰岛素敏感指数均明显低于对照组($P < 0.05$); 胰岛素抵抗指数明显增高($P < 0.05$)。他克莫司组大鼠与对照组相比, 其肝细胞质内 PP2A 表达明显增加, 磷酸化的 AKT 表达明显减少。**结论** 他克莫司导致胰岛细胞坏死, 胰岛细胞数量减少, 胰岛素的分泌降低、胰岛素敏感性下降、胰岛素抵抗增加, 从而导致大鼠血糖升高。他克莫司增加大鼠肝脏组织 PP2A 的表达, 减少肝脏组织磷酸化的 AKT 的表达, 可能通过 PI3K/AKT 信号转导途径参与胰岛细胞凋亡和胰岛素抵抗, 引起血糖的升高。

【关键词】 移植后糖尿病; 大鼠; 他克莫司; 磷酸化-AKT; 蛋白磷酸酶 2A

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0262-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.009

Effects of tacrolimus on the expression of protein phosphatase 2A and P-AKT in rat hepatocytes

NIU Yu-jian¹, WANG De-en², YANG Liu², CHEN Xin-guo¹, WANG Hong-yu², XU Chun^{2*}

(1. Department of Organ Transplantation, 2. Department of Endocrinology, the General Hospital of the Armed Police Forces, Beijing 100039, China)

【Abstract】 Objective To observe the effects of tacrolimus on blood glucose, insulin, expressions of protein phosphatase 2A and P-AKT in rats in order to explore the mechanism of hyperglycemic action of tacrolimus. **Methods** Sixty male SD rats (body weight 89.83 ± 4.44 g) were randomly divided into tacrolimus group ($n=40$) and control group ($n=20$). The rats in the tacrolimus group were administrated with tacrolimus $4 \text{ mg}/\text{kg}$ daily. The rats in the control group were given the same amount of normal drinking water daily. The rat body weight, fasting blood glucose concentration and blood concentration of tacrolimus were measured monthly. All rats were killed at 5 months after the tacrolimus administration. The serum insulin levels were detected by radioimmunoassay method. The expressions of PP2A and P-AKT in liver tissues were assessed by immunohistochemistry. **Results** After two months of administration, the blood glucose levels in the tacrolimus group were significantly higher than those in the control group. The HOMA-IR in tacrolimus group was signif-

【基金项目】 武警总医院科研项目(编号: WZ20130104)。

【作者简介】 牛玉坚(1966-), 男, 主任医师, 专业: 器官移植。Email: niuyujian@aliyun.com

【通讯作者】 徐春(1967-), 女, 主任医师, 硕士研究生导师, 专业: 内分泌代谢疾病。Email: wjxuchun@sina.com

icantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). ISI was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). Immunohistochemical examination showed that the expression of PP2A in hepatocytes in the tacrolimus group was increased compared with the control group, while expression of P-AKT in hepatocytes of the tacrolimus group was decreased than that in the control group. **Conclusions** Tacrolimus can induce necrosis of islet cells, decrease of the amount of islet cells and insulin secretion, decrease of sensitivity to insulin, and increase the resistance to insulin, therefore, leading to increase the blood glucose level in rats. The expression of PP2A in hepatocytes in the tacrolimus group is increased, while the expression of P-AKT is decreased. Interfering of insulin signal transduction pathways may be involved in the hyperglycemic effects of tacrolimus.

【Key words】 Post-transplantation diabetes mellitus; Rat; Tacrolimus; P-AKT; Phosphatase 2A

Corresponding author: XU Chun, Email: wjxuchun@sina.com

随着科学技术以及医疗水平的不断改进,合理选择器官移植术后免疫抑制的治疗方案是手术成功的重要环节,其中钙调磷酸酶抑制剂(calcineurin inhibitors, CNI)的代表药物为环孢素 A(cyclosporin A, CsA)和他克莫司(Tacrolimus),它们明显减少排斥反应的发生率,提高患者的存活率。随着器官移植术后患者生存期延长和生活质量的提高,与免疫抑制药物相关的并发症,尤其是移植后糖尿病(post-transplantation diabetes mellitus, PTDM)的发生越来越多地引起了人们的重视。大量临床研究表明钙调磷酸酶抑制剂可导致移植后糖尿病的发生^[1],他克莫司比环孢素更容易导致 PTDM^[2]。他克莫司引起糖代谢异常的机制十分复杂,至今尚未完全阐明。目前研究发现,他克莫司引起糖代谢异常的机制主要包括胰岛素分泌减少和胰岛素抵抗^[3],他克莫司通过诱导人类胰岛 β 细胞凋亡^[4]。大量研究证实,胰岛细胞凋亡和胰岛素抵抗与 PI3K/AKT 信号传导通路密切相关,AKT 处于 PI3K/AKT 信号传导通路的中心位置。蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 是一种丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 蛋白磷酸酶,使蛋白质 Ser/Thr 残基脱磷酸化,PP2A 使磷酸化 Akt 脱磷酸化而失去活性,因此是胰岛素信号通路的负调节因子,PP2A 的异常激活/高表达或异常低活性/低表达都将严重干扰胰岛素信号通路。钙调神经磷酸酶又称蛋白磷酸酶 2B (PP2B),是另一种类型的 Ser/Thr 磷酸酶,与 PP2A 同属于磷酸化蛋白磷酸酶,它是一类 Ca^{2+} 、钙调素激活的蛋白磷酸酶。PP2B 同样也对 p-Akt 脱磷酸化,PP2B 的脱磷酸化作用可以使 p-Akt 耗竭而影响它的核转位,因此,PP2B 与 PP2A 共同影响着 Akt 磷酸化水平^[5]。由此推测:钙调神经磷酸酶抑制剂(PP2B 抑制剂)他克莫司干扰了 PP2A 进而影响胰岛素信号通路包括 P-AKT 脱磷酸化,导致糖代谢的异常。本

研究试图以 PP2A 为桥梁,探讨钙调神经抑制剂他克莫司导致血糖升高的机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只,体重(89.83 ± 4.44) g。来源于军事医学科学院实验动物中心【SCXK(军) 2014-003】,组织取材于武警总医院医学实验中心进行。

1.2 分组

将大鼠按随机数字表法均分为两组(他克莫司组和对照组),苦味酸染色标记。他克莫司组(40 只),每日空腹(禁食、水 8 h)灌胃给药,剂量为 $4 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$;对照组(20 只),每日空腹灌胃给予等量生理盐水,两组大鼠均在用药 1 h 后再行喂食。实验过程中他克莫司组因灌胃损伤致死 5 只。

1.3 试剂

他克莫司胶囊、4% 多聚甲醛、二甲苯、柠檬酸修复液、石蜡、蛋白甘油、苏木素、伊红、苦味酸、10% 的水合氯醛、生理盐水、蒸馏水、乙醇、免疫组化检测盒、抗 P-AKT 抗体、抗 PP2A 抗体。血清胰岛素放免检测试剂盒。

1.4 数据测定

每月测量大鼠体重,断尾取血,用快速干化学法测定空腹血糖。

每月末将他克莫司组在空腹状态下处死随机处死 5 只大鼠,心脏穿刺取血 2 mL,并置于常温凝固,以 3000 r/min 速度离心 15 min 后取血清,用化学发光法测定他克莫司血药浓度。

用药 5 个月后,全部大鼠在空腹状态下处死,心脏穿刺取血 2 mL,并置于常温凝固,以 3000 r/min 速度离心 15 min 后取血清,采用放射免疫分析法测定血清胰岛素(INS)水平,用化学发光法测定他克

莫司血药浓度。

1.5 胰腺组织的病理学检查

1.5.1 制备石蜡切片

(1)将切块的胰腺组织浸渍于 4% 多聚甲醛固定液中固定;(2)流水冲洗固定好的胰腺组织;(3)梯度乙醇脱水;(4)二甲苯透明胰腺组织;(5)浸蜡;(6)包埋;(7)切片。

1.5.2 染色

(1)贴片与烤片;(2)二甲苯透明剂切片脱蜡;(3)梯度乙醇水化;(4)染色;(5)梯度乙醇切片脱水;(6)透明和封片。

1.6 肝脏组织 PP2A 和 P-AKT 的表达

1.6.1 制备肝脏组织石蜡切片

过程同胰腺组织。

1.6.2 免疫组织化学检测 PP2A 和 P-AKT 的表达

(1)贴片与烤片;(2)二甲苯透明剂切片脱蜡;(3)梯度乙醇水化;(4)蒸馏水洗 5 min;(5)抗原修复;(6)蒸馏水洗 5 min;(7)PBS 洗 3 次,每次各 5 min;(8)3% H₂O₂ PBS 溶液阻断内源性过氧化物酶 10 min;(9)PBS 洗 3 次,每次各 5 min;(10)将一抗滴加,并置于 37℃ 下孵育 60 min。在实验对照组中用 PBS 代替一抗,重复以上步骤;(11)PBS 洗 3 次,每次各 5 min;(12)将山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体滴加,并置于 37℃ 下孵育 40 min;(13)PBS 洗 3 次,每次各 5 min;(14)DAB 显色液显色 3 min,显微镜下控制反应,并用自来水冲洗终止反应;(15)Harris 苏木素液复染细胞核 1 min;(16)切片脱水;(17)透明和封片;(18)镜下观察结果。

1.6.3 阳性标记的形态特征和判断

免疫组化结果分析①将每一视野下阳性细胞按照百分比(%)分 5 成级。0 分为:无阳性细胞为。1 分为:阳性细胞≤10%。2 分为:11%~50%。3 分为:51%~75%。4 分为:>75%。②将每个细胞的着色强度分为 4 级。0 分为无色。1 分为淡黄色。2

分为棕黄色。3 分为棕褐色。③标本的阳性细胞百分比积分乘以颜色的强度积分>3 分可确定为阳性。

1.7 统计学处理

利用空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)和空腹胰岛素(fasting plasma insulin, FINS),稳态模型法计算胰岛素分泌指数(homeostasis model assessment of insulin secretion, HOMA-β)值、胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI)和胰岛素抵抗指数(insulin resistance index, HOMA-IR)。ln 为自然对数,胰岛素单位为 mU/L (1 mU/L = 25 ng/mL),血糖单位为 mmol/L。HOMA-β = 20 × FINS/(FBG-3.5);ISI = ln (1/FBG × FINS);HOMA-IR: FBG × FINS/22.5。数据均采用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计整合分析。(1)两组大鼠的体重、血糖以及胰岛素分泌指数、胰岛素敏感指数和胰岛素抵抗指数的比较采用独立样本 T 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异有显著性;(2)两组大鼠 P-AKT 表达强度结果比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异有显著性统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠体重的比较

他克莫司组与对照组大鼠的体重均呈持续增长,在第 1、2 月时,两组大鼠体重差异无显著性($P > 0.05$),第 3、4、5 个月时,他克莫司组大鼠的体重明显低于对照组,且两者的差异有显著性($P < 0.05$),见表 1。

2.2 两组大鼠血糖水平的比较

大鼠于空腹状态行尾静脉穿刺取血测定血糖水平。在用药后第 3 个月末,他克莫司组大鼠血糖水平>7.0 mmol/L,成功诱导出糖尿病。

表 1 用药期间每月末两组大鼠体重的比较/g

Tab.1 Comparison of body weights between the two groups					
组别 Groups	1 月末 The end of 1 st month	2 月末 The end of 2 nd month	3 月末 The end of 3 rd month	4 月末 The end of 4 th month	5 月末 The end of 5 th month
他克莫司组 Tacrolimus group	134.47 ± 5.68	185.64 ± 14.37	250.13 ± 18.72 *	258.63 ± 23.86 *	278.36 ± 22.81 *
对照组 Control group	127.35 ± 6.42	178.65 ± 18.95	262.64 ± 27.89	291.13 ± 14.38	311.77 ± 14.02

注: * 与对照组相比, $P < 0.05$ 。
Note. * vs. the control group, $P < 0.05$.

他克莫司组大鼠血糖水平呈现明显上升趋势。在用药第 1、2 个月,他克莫司组与对照组两组的空腹血糖水平无显著差异($P > 0.05$);第 3、4、5 月时,

他克莫司组大鼠的空腹血糖水平明显高于对照组,且差异有显著性($P < 0.05$)(见表 2)。

表 2 用药期间每月末两组大鼠血糖的比较(单位:mmol/L)

Tab.2 Comparison of blood glucose levels between the two groups

组别 Groups	1 月末 End of the 1 st month	2 月末 End of the 2 nd month	3 月末 End of the 3 rd month	4 月末 End of the 4 th month	5 月末 End of the 5 th month
他克莫司组 Tacrolimus group	4.61 ± 0.29	5.46 ± 0.29	8.13 ± 0.67 *	8.37 ± 0.78 *	8.96 ± 0.80 *
对照组 Control group	4.53 ± 0.56	5.20 ± 0.47	4.76 ± 0.27	4.99 ± 0.29	5.25 ± 0.31

注: * 与对照组相比, $P < 0.05$ 。
Note. * vs control group, $P < 0.05$.

2.3 大鼠他克莫司血药浓度的测定

每月测定他克莫司组大鼠他克莫司的血药浓度,浓度值维持在(8.59 ± 0.59) ng/mL。

2.4 两组大鼠胰岛素分泌指数、胰岛素敏感指数和胰岛素抵抗指数的比较

用药 5 个月后,于空腹状态下处死全部大鼠,采用放射免疫分析法测定 INS 水平,结合空腹血糖分别计算两组大鼠的胰岛素分泌指数、胰岛素敏感指数和胰岛素抵抗指数。利用 SPSS 软件分析示:他克莫司组大鼠的胰岛素敏感指数和胰岛素抵抗指数均明显低于对照组,且差有显著性($P < 0.01$),胰岛素分泌指数也低于对照组,差异有显著性($P < 0.05$)(见表 3)。

表 3 两组大鼠胰岛素敏感指数、分泌指数和抵抗指数的比较

Tab.3 Comparison of HOMA-IR, HOMA-β and ISI of the two groups

组别 Groups	抵抗指数 HOMA-IR *	分泌指数 HOMA-β [#]	敏感指数 ISI *
他克莫司组 Tacrolimus group	4.59	46.16	0.22
对照组 Control group	3.37	164.69	1.00

注: * 与对照组相比, $P < 0.01$, #与对照组相比, $P < 0.05$ 。
Note. * vs. the control group, $P < 0.01$, #vs. the control group, $P < 0.05$.

2.5 大鼠胰腺病理学改变

用 40 倍光学显微镜观察两组大鼠胰腺病理切片:对照组大鼠胰腺导管清楚可见,腺泡细胞罗列整齐,细胞基底可见明显的等大的细胞核,核仁清晰,胰岛细胞染色较浅,染色均匀(见图 1);他克莫司组大鼠胰腺导管不清,腺泡细胞罗列整齐,胰岛细胞数量显著减少,细胞胞质内存在多数不等的空泡,细胞核染色欠匀称,部分细胞胞核消失,可见坏死细胞

(见图 2)。

2.6 大鼠肝脏 PP2A 和 P-AKT 表达水平

他克莫司组大鼠肝脏标本中 PP2A C 阳性率为 80%,对照组 PP2A C 阳性率为 10%, $\chi^2 = 17.0707$ ($P < 0.005$),两组差异有显著性(图 3,4)。他克莫司组 P-AKT 的阳性率为 10%,对照组为 100%, $\chi^2 = 32.727$, $P < 0.001$,差异有显著性(图 5,6)。

3 讨论

本研究将他克莫司组的大鼠血液药物浓度控制在 6 ~ 10 μg/L 之间,这是目前临床维持免疫抑制作用最有效药物浓度,我们观察到他克莫司组大鼠空腹血糖水平上升,HOMA-IR 上升,ISI 下降,提示长期服用他克莫司可以引起血糖升高,胰岛素分泌不足和胰岛素抵抗同时存在于他克莫司引起的糖尿病模型中。这与我们以往的研究结果相同^[6,7]。关于他克莫司引起胰岛素分泌不足的机制已有很多研究,一致的观点是:他克莫司对胰岛 β 细胞具有直接损害,使胰岛 β 细胞发生凋亡、胞质空泡形成和坏死。他克莫司在转录水平抑制胰岛素的合成,在转录后水平抑制胰岛素释放。他克莫司导致胰岛素抵抗的机制尚不清楚。导致机体发 IR 的原因有:肥胖、炎症反应、氧化应激、线粒体功能障碍、微量元素缺乏、丙型肝炎等。高脂饮食喂养的胰岛素抵抗大鼠,其内脏脂肪细胞的 PP2A 的表达明显增加,P-AKT 和 IRS-1 明显的减少^[8]。众多的研究发现在上述引起胰岛素抵抗的情况下,均有 PP2A 的参与^[9-12]。本研究提示他克莫司引起肝脏组织中 PP2A C 表达水平的增加,说明 PP2A 在 PP2B 抑制剂(钙调磷酸酶抑制剂)导致的糖代谢紊乱的过程中起一定的作用。

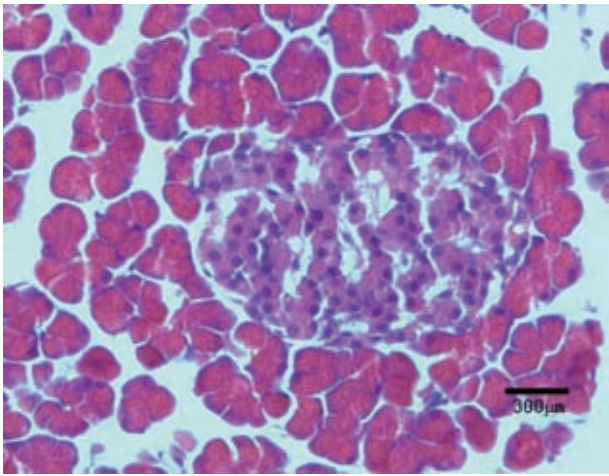


图 1 对照组大鼠胰腺的组织学形态(HE 染色)

Fig. 1 Histology of the pancreas of a control rat. HE staining

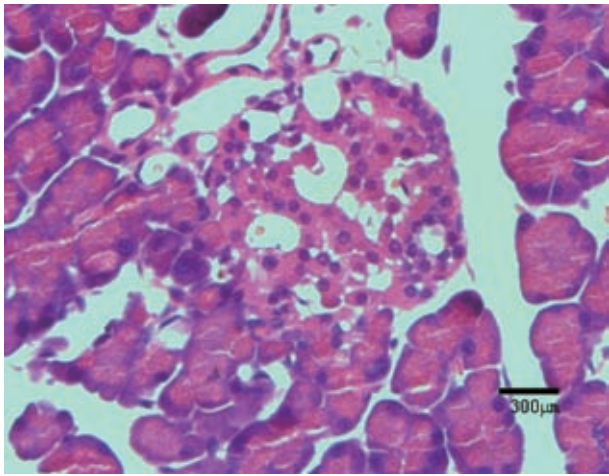


图 2 他克莫司组大鼠胰腺的病理学改变(HE 染色)

Fig. 2 Pathological changes of the pancreas in a tacrolimus-treated rat (HE staining)

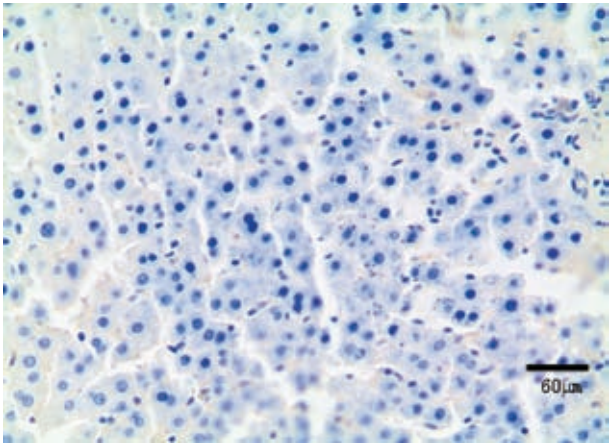


图 3 对照组大鼠肝脏组织 PP2A 的表达(SP 免疫组化染色)

Fig. 3 Expression of PP2A in a control rat liver tissue.

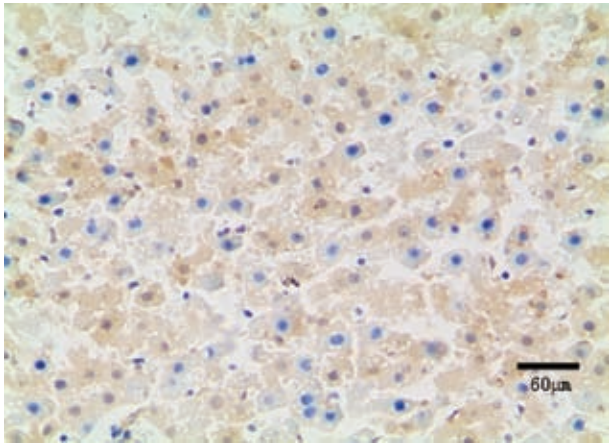


图 4 对照组大鼠肝脏组织 PP2A 的表达(SP 免疫组化染色)

Fig. 4 Expression of PP2A in a control rat liver tissue. Immunohistochemical SP staining.

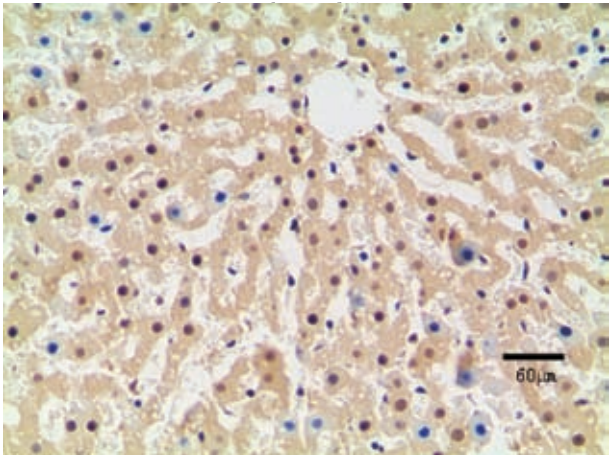


图 5 对照组大鼠肝脏组织 P-AKT 的表达(SP 免疫组化染色)

Fig. 5 Expression of P-AKT in a control rat liver tissue. Immunohistochemical SP staining.

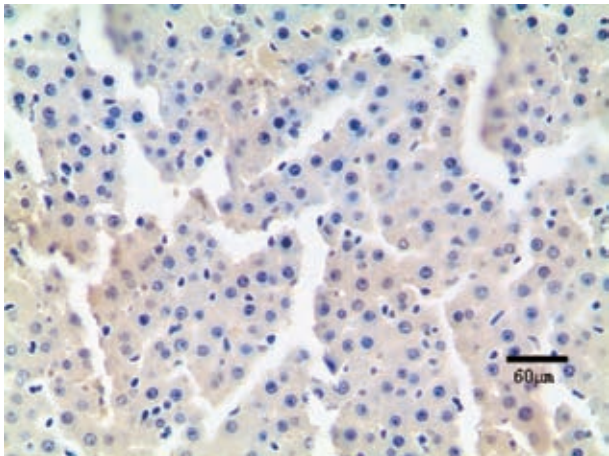


图 6 他克莫司组大鼠肝脏组织 P-AKT 的表达(SP 免疫组化染色)

Fig. 6 Expression of P-AKT in a tacrolimus-treated rat liver tissue. Immunohistochemical SP staining.

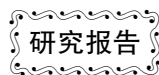
PI3K/AKT 信号转导通路是脂肪、肝脏、骨骼肌等胰岛素靶组织维持正常糖代谢的重要调节通路,丝/苏氨酸激酶(serine/threonine kinase, AKT)与 IR 的发生发展密切相关^[13],且在胰岛 β 细胞的生存和复制过程中至关重要^[14]。研究证实,AKT 通过多种方式来发挥调控血糖的作用。(1)与胰岛 β 细胞凋亡的关系。PI3K/AKT 信号转导通路作为胰岛素的主要下游分子通路,它具有抗凋亡和促凋亡的双重调节作用,其中以抗细胞凋亡作用为主^[15]。(2)与胰岛素抵抗的关系。在 IR 状态时,胰岛素刺激对 PI3K/AKT 信号传导通路的作用明显下调^[16]。Joanne 等研究敲除 AKT2 基因的小鼠,发现其肝脏和骨骼肌等胰岛素靶器官对胰岛素的反应较正常小鼠存在不同程度的减弱,提示了 AKT2 是正常糖代谢平衡所必需的基因^[17]。(3)与胰岛素分泌的关系。对剔除胰岛素受体的大鼠给予葡萄糖刺激,发现大鼠无法做出有效应答,随着大鼠的年龄增长,胰岛体积、 β 细胞数量和胰岛素分泌水平同时降低。由此可见,AKT 在调节血糖水平的过程中至关重要。本研究发现他克莫司组大鼠肝脏组织磷酸化 AKT 表达明显受到抑制。试验推断,他克莫司可能是通过促进 PP2A 的表达,使 AKT 去磷酸化失活,从而阻断胰岛素信号通路(PI3K/AKT 信号传导通路),导致高血糖的发生。

他克莫司导致胰岛细胞坏死、空泡样变,减少胰岛素的分泌、降低胰岛素敏感性、增加胰岛素抵抗,导致大鼠血糖升高。他克莫司导致大鼠肝脏 PP2A 的表达,使 AKT 去磷酸化而失活,阻断 PI3K/AKT 信号的转导,导致胰岛细胞凋亡和胰岛素抵抗的发生。

参 考 文 献

- [1] Mazali FC, Lalli CA, Alves Filho G, et al. Posttransplant diabetes mellitus: incidence and risk factors [J]. Transplant Proc, 2008, 40(3): 764–766.
- [2] Shah T, Kasravi A, Huang E, et al. Risk factors for development of new-onset diabetes mellitus after kidney transplantation [J]. Transplantation, 2006, 82(12): 1673–1676.
- [3] Meier M, Nitschke M, Weidtmann B, et al. Slowing the progression of chronic allograft nephropathy by conversion from cyclosporine to tacrolimus: a randomized controlled trial [J]. Transplantation, 2006, 81(7): 1035–1040.
- [4] Soleimanpour S, Crutchlow MF, Ferrari AM, et al. Calcineurin signaling regulates human islet β -cell survival [J]. J Biol Chem, 2010, 285(51): 40050–40059.
- [5] Mistafa O, Aram G, Sandeep K, et al. Purinergic receptor-mediated rapid depletion of nuclear phosphorylated Akt depends on pleckstrin homology domain leucine-rich repeat phosphatase, calcineurin, protein phosphatase 2A, and PTEN phosphatases [J]. Biol Chem, 2010, 285: 27900–27910.
- [6] 滕雅芹, 牛玉坚, 徐春, 等. 他克莫司对大鼠血糖的影响及其机制的探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(2): 74–77.
- [7] Niu YJ, Shen ZY, Xu C, et al. Establishment of tacrolimus-induced diabetes in rat model and assessment of clinical treatments for post-transplant diabetes mellitus [J]. Clin Lab, 2013, 59: 869–873.
- [8] Hye-seung J, Hwang K. High-fat diet alters PP2A, TC10, and CIP4 expression in visceral adipose tissue of rats [J]. Obesity, 2008, 16(6): 1226–1231.
- [9] Cohen PT, Philp A, Vázquez-Martin C. Protein phosphatase 4 — from obscurity to vital functions [J]. FEBS Lett, 2005, 579(15): 3278–3286.
- [10] Yan L, Guo S, Brault M, et al. The B55 α -containing PP2A holoenzyme dephosphorylates FOXO1 in islet β -cells under oxidative stress [J]. J Biochem, 2012, 444(2): 239–247.
- [11] Galbo T, Olsen GS, Quistorff B, et al. Free fatty acid-induced PP2A hyperactivity selectively impairs hepatic insulin action on glucose metabolism [J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27424.
- [12] Ziegler E, Filer LJ (Editors). Present Knowledge in Nutrition 7th Edition [M]. International Life Science Institute Foundation, 1996, 11(2): 282–282.
- [13] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway [J]. Science, 2002, 296(5573): 1655–1657.
- [14] Lingohr MK, Buettner R, Rhodes CJ. Pancreatic beta-cell growth and survival — a role in obesity-linked type 2 diabetes [J]. Trends Mol Med, 2002, 8(8): 375–384.
- [15] Dudek H, Datta SR, Franke TF, et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase AKT [J]. Science, 1997, 275(5300): 661–665.
- [16] Cusi K, Maezono K, Oaman A, et al. Insulin resistance differentially affects the PI3-kinase-and MAP kinase-mediated signaling in human muscle [J]. J Clin Invest, 2000, 105(3): 311–320.
- [17] Cho H, Mu J, Kim JK, et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus like syndrome in mice lacking the protein kinase AKT2 (PKB β) [J]. Science, 2001, 292(5522): 1728–1731.

[收稿日期] 2016-01-06



人 IL-37b 基因真核表达载体的构建与表达

姚静¹, 程江^{2*}, 裴雪枫³, 王静宇⁴, 袁明^{4*}

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

【摘要】 目的 构建 pEGFP-N1/IL-37b 真核表达载体, 并检测其在 THP-1 细胞中的表达情况。**方法** 从人 PBMCs 中提取总 RNA, 利用 RT-qPCR 技术扩增出 IL-37b 基因编码区序列, 克隆至 pEGFP-N1 真核表达载体, 将构建的重组质粒 pEGFP-N1/IL-37b 转染到 THP-1 细胞中, 通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测 IL-37 的表达。**结果** 双酶切及基因测序结果显示 IL-37b 基因正确插入真核表达载体 pEGFP-N1 中; RT-qPCR 和 Western blot 结果显示转染 THP-1 细胞后, IL-37 表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。**结论** 成功构建了新型抗炎因子 IL-37 真核表达载体 pEGFP-N1/IL-37b, 为进一步研究 IL-37 功能及与相关疾病的关系奠定基础。

【关键词】 白细胞介素-37; 基因克隆; 真核表达载体; THP-1 细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0268-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.010

Construction and expression of eukaryotic expression vector of human IL-37b gene

YAO Jing¹, CHENG Jiang^{2*}, PEI Xue-feng³, WANG Jing-yu⁴, YUAN Ming^{4*}

(1. Medical College of Shihezi University, Shihezi 832000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Shihezi Medical University, Shihezi 832000; 3. Liaoning Medical College, Jinzhou 121001;
4. Key Laboratory of Space Medicine Fundamentals and Application,
China Astronaut Research and Training Center, Beijing 100094)

【Abstract】 Objective To construct the eukaryotic expression vector pEGFP-N1/IL-37b and analyze the expression of IL-37 gene in THP-1 cells. **Methods** Total RNA was extracted from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and the coding region of IL-37b gene was amplified by RT-qPCR. Then, the gene was cloned into pEGFP-N1 eukaryotic expression vector. After transfected the recombinant plasmid into THP-1 cells, the expression of IL-37 was detected by RT-qPCR and Western blot. **Results** Double restriction enzyme digestion and gene sequencing showed that IL-37b gene was correctly inserted into the eukaryotic expression vector pEGFP-N1. RT-qPCR and Western blot showed that the IL-37 expression level was increased significantly ($P < 0.01$) after transfection in THP-1 cells. **Conclusions** We successfully constructed a novel anti-inflammatory cytokine IL-37 eukaryotic expression vector pEGFP-N1/IL-37b, which lays a foundation for further study on IL-37 functions and its association with related diseases.

【Key words】 Interlukin-37; Gene cloning; Eukaryotic expression vector; THP-1 cells

Corresponding author: YUAN Ming, E-mail: yuanming7711@aliyun.com; CHENG Jiang, E-mail: chengjiang1980@sina.com

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

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

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

IL-37 作为 IL-1 家族 11 个成员之一,最初是由 Kumar 等^[1]于 2000 年利用计算机进行生物信息学分析时发现的,并命名为 IL-1H4。后由 Dunn 等^[2]于 2001 年命名为 IL-1F7。2010 年, Nold 等^[3]正式将 IL-1F7 更名为 IL-37。IL-37 基因位于人类第二号染色体上,共有五种不同的剪切亚型,即 IL-37a ~ e,其中 IL-37b 是五种亚型中分子量最大的一个^[4, 5]。IL-37 具有广泛的炎症抑制作用,可抑制外周血单个核细胞、树突状细胞、巨噬细胞及上皮细胞等细胞炎症因子的产生^[3, 6],另外在感染性休克、系统性红斑狼疮、炎症性肠病、肝损伤、肝癌等疾病中发挥重要作用^[3, 7-10]。本实验利用基因工程相关技术,从人外周血单个核细胞中成功克隆出 IL-37b 全长编码区序列,并构建了其真核表达载体,且成功在 THP-1 细胞中实现了过表达,为进一步研究 IL-37 的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血液标本

5 mL 人外周血由本实验室课题组成员提供。

1.1.2 质粒、菌株及细胞

pEGFP-N1 质粒、THP-1 细胞由本实验室保存;转化态 *E. coli* DH5 α 购自康为世纪。

1.1.3 主要试剂

淋巴细胞分离液、LPS 购自 Sigma;Pfu DNA 聚合酶、质粒抽提试剂盒、胶回收及 DNA 产物纯化试剂盒购自康为世纪;限制性内切酶 *Bam*HI 及 *Eco*RI、T4 DNA 连接酶购自 NEB;反转录试剂盒、SYBR[®] Green 荧光定量试剂盒购自 TaKaRa;TRIzol 试剂购自 Invitrogen;IL-37 单克隆抗体购自 Abcam (ab57187);GAPDH 单克隆抗体购自 CST(D16H11);胎牛血清、RPMI1640 及 Opti-MEM 培养基购自 Gibco;EntransterTM-D4000 转染试剂购自 Engreen。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成

分离健康人新鲜外周血单个核细胞于含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中,加入 1 μ g/mL 刺激浓度的 LPS,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,收集细胞。用 TRIzol 法对所收集的细胞进行总 RNA 提取,用反转录试剂盒进行 RT-PCR 合成 cDNA。

1.2.2 目的基因的扩增

根据 GenBank 中 IL-37b (NM_014439.3) 的序

列分别设计用于扩增 CDs 全长 (660 bp) 的上下游引物,上游: 5'-TCGAATTCTTGAAAATGTCCTTTGTGGGG G-3', 下游: 5'-AAGGATCCATATCGCTGAC-CTCACTGGGGCT-3' (下划线分别为 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切位点)。以合成的 cDNA 为模板,用上述引物及 Pfu DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,反应条件如下^[11]: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min、94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、60 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析回收纯化。

1.2.3 真核表达载体 pEGFP-N1/IL-37b 的构建

用限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Bam*HI 分别对回收的 PCR 产物和 pEGFP-N1 空载体进行 37 $^{\circ}$ C 双酶切过夜,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分析回收纯化后,在 T4 DNA 连接酶作用下 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,转化液涂布于含卡那霉素的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,次日随机挑取 8 个平板上单克隆菌落进行菌落 PCR,筛选阳性单克隆菌落扩增提取质粒,进一步对质粒进行双酶切及测序鉴定。

1.2.4 THP-1 细胞的培养及转染

复苏 THP-1 细胞于含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,次日换液,之后每隔 3 ~ 4 d 进行传代培养,待细胞密度至 70% 左右时,按照 EntransterTM-D4000 转染说明书操作,培养 72 h 后,给予 1 μ g/mL 的 LPS 刺激细胞,继续培养 8 h,离心收集细胞。

1.2.5 重组质粒在 THP-1 细胞中的表达及检测

分别提取 THP-1 细胞总 RNA 和总蛋白,采用 RT-qPCR 和 Western blot 方法检测转染前后 THP-1 细胞中 IL-37 mRNA 和蛋白水平的变化。相关引物序列见表 1。

1.2.6 统计分析

实验数据采用 SPSS 17.0 进行统计学分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,图表采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行绘制分析。

2 结果

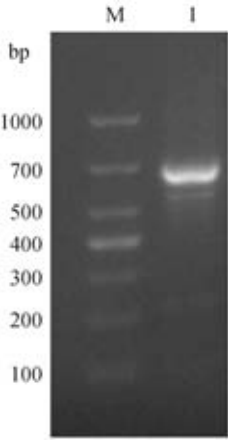
2.1 IL-37b 基因扩增产物的鉴定

IL-37b 基因 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,可见两条略小于 700 bp 且大小相近的一明一暗条带 (见图 1),大小与预期相符。

表 1 实时荧光定量 PCR 扩增引物

Tab.1 Primer pairs for the real-time PCR

基因 Gene name	引物序列 Sequence	产物长度/bp Product length
IL-37b	Forward: 5'-CTTAGAAGACCCGGCTGGAAG-3'	145
	Reverse: 5'-GTCCAGGACCAGTACTTTGTGA-3'	
GAPDH	Forward: 5'-CGGATTTGGTCTGATTGGG-3'	216
	Reverse: 5'-TCTCGCTCCTGGAAGATGG-3'	



注: M: Marker; 1: PCR 产物。

图 1 IL-37b 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Note. M: Marker; 1: PCR products.

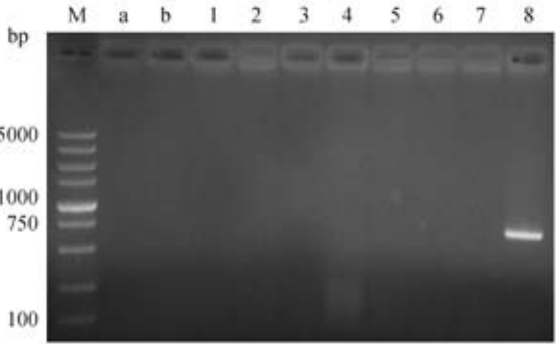
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of IL-37b PCR products.

2.2 重组质粒的鉴定

重组质粒单克隆菌落 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳显示, 8 号菌落在略小于 750 bp 处有一明亮的特异性条带(见图 2), 对其进行增菌提取质粒, 进一步双酶切(*Eco*RI/*Bam*HI), 产物琼脂糖凝胶电泳显示, 可见约 4700 bp 的载体片段和 660 bp 左右的目的基因片段(见图 3), 大小与预期相符。DNA 测序结果显示, 构建的重组质粒 pEGFP-N1/IL-37b 中含有 IL-37b 的全长序列(660 bp), Blast 同源性分析显示, 与 GenBank 中登录的 IL-37b (NM_014439.3) 序列相比, 发现有两处碱基存在差异, 即 G/T 和 A/G(见图 4), 经查证是单核苷酸多态性(SNP)。

2.3 IL-37b 在 THP-1 细胞中的表达

重组质粒 pEGFP-N1/IL-37b 转染 THP-1 细胞后, RT-qPCR 检测结果显示(见图 5), IL-37b 表达较对照组明显升高($P < 0.01$), 且给予 LPS 刺激后, 差异有显著性($P < 0.001$)。Western blot 检测结果显示(见图 6), 在 50×10^3 左右处可见特异性条带, 与预期结果相符; 对条带进行光密度量化分析结果显示, IL-37 表达转染组较对照组明显升高($P < 0.01$)。



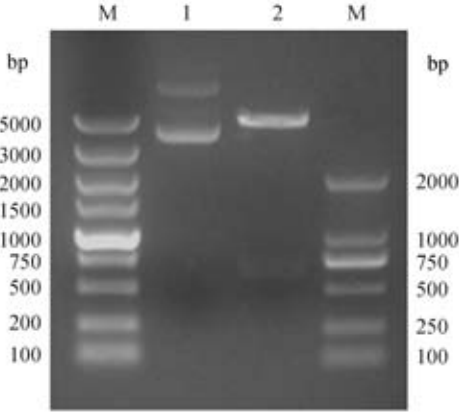
注: M: Marker; a ~ b: 阴性克隆菌落 PCR 产物;
1 ~ 8: 阳性克隆菌落 PCR 产物。

图 2 菌落 PCR 琼脂糖凝胶电泳

Note. M: Marker; a ~ b: Negative control;

1 ~ 8: Positive colony PCR products.

Fig.2 PCR agarose gel electrophoresis of the bacterial colonies



注: M: Marker; 1: 阴性对照;
2: pEGFP-N1/IL-37b 双酶切产物。

图 3 pEGFP-N1/IL-37b 双酶切产物琼脂糖凝胶电泳

Note. M: Marker; 1: Negative control; 2: Restriction enzyme digestion products of pEGFP-N1/IL-37b.

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of restriction enzyme digestion products of pEGFP-N1/IL-37b.

3 讨论

IL-1 超家族共有 11 个成员, 绝大多数是促炎性细胞因子, 其中 7 个为激动剂(IL-1 α 、IL-1 β 、IL-18、IL-33、IL-36 α 、IL-36 β 、IL-36 γ), 2 个为天然的受体拮

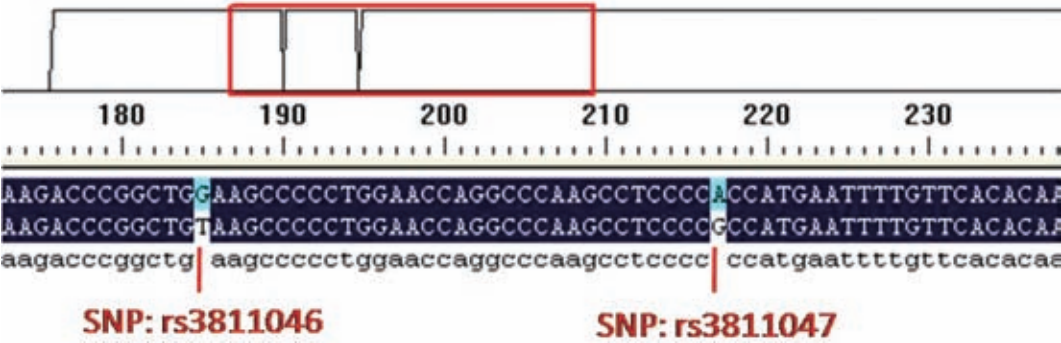
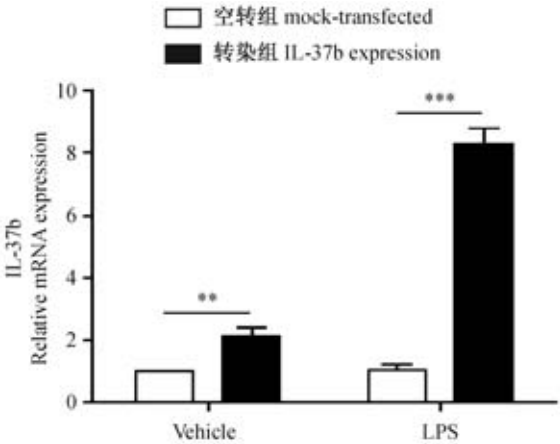


图 4 DNA 序列比对分析部分结果

Fig.4 Analysis of DNA sequence alignment.

抗剂(IL-1Ra、IL-36Ra)。IL-37 作为第 7 个成员,是一种天然的免疫抑制物,IL-37 作为一种天然的免疫抑制物,可由 TLRs 配体以及一些促炎性细胞因子(IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 等)刺激的人外周血单个核细胞(PBMCs)、树突状细胞(DCs)诱导产生,能够抑制多种炎症因子的表达。IL-37 基因共有 6 个外显子,通过不同的剪切,形成 5 个剪切亚型(IL-37a-e),但是不同的剪切亚型具有组织特异性,如 IL-37a、b、c 主要表达于淋巴结、胸腺、骨髓、肺、睾丸、胎盘、子宫、皮肤、结肠、NK 细胞、单核细胞、角蛋白细胞和受刺激的 B 细胞中,而 IL-37d、e 只表达与骨髓和睾丸中;大脑中仅表达 IL-37a,肾脏中仅表达 IL-37b,心脏中仅表达 IL-37c^[4]。值得一提的是,IL-37 是目前鼠科同系物中唯一没有发现的 IL-1 家族成员^[12]。

IL-37b 是五种亚型中分子量最大的一个,包含除 3 号外显子以外的其他 5 个外显子^[4, 5],且 1 号外显子可编码 caspase-1 酶切位点,IL-37b 前体经

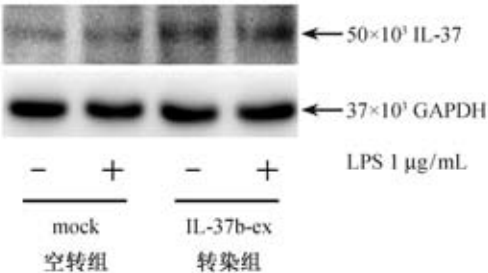


注:转染组与空转组相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 5 THP-1 细胞中 IL-37b 基因 mRNA 水平的表达

Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ for IL-37b expression vs. mock-transfected.

Fig.5 IL-37b mRNA expression level in the THP-1 cells



注:转染组与空转组相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 6 THP-1 细胞中 IL-37 蛋白水平的表达

Note. Electrophoresis (left) and quantification (right)

representation of Western blot. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ for IL-37b expression vs. mock-transfected.

Fig.6 IL-37 protein expression levels in the THP-1 cells

caspase-1 切割活化后进入细胞核内参与转录调控,实验结果也证实在 caspase-1 催化活性缺失后,IL-37b 的入核能力丧失,同时其炎症抑制作用下降^[13]。然而,入核参与转录调控并不是 IL-37 发挥负向调节作用的唯一方式。研究者发现重组 IL-37 能够有效抑制脂多糖(LPS)引起的 IL-6 和 IL-1 α 的产生,以及胞内蛋白激酶 JNK、MAPK(p38)、ERK 的磷酸化,从而实现抑制炎症信号的传导,由此证明分泌到胞外的 IL-37 也具有抑制炎症的作用^[14]。此外 IL-37 还可通过与 IL-18R α 结合,进一步募集 IL-1R8,形成一个三聚体装配在细胞表面,抑制 LPS 与其受体 TLR4 的结合,从而抑制炎症反应^[15]。在免疫调节方面,IL-37 可抑制树突状细胞的成熟,使其维持在半成熟状态,从而不能有效地发挥其在免疫应答中捕获、处理和呈递抗原的作用,抑制免疫系统识别并且靶标新抗原的能力^[6]。

一些动物实验已经证实,IL-37 在疾病的进展中,起到保护作用,如在脂多糖(LPS)诱导的感染性休克、葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎、刀豆素 A(ConA)诱导的肝炎、烟曲霉菌诱导的肺部真菌感染中,发现 IL-37 转基因小鼠的全身炎症反应、局部器官组织的损伤程度较野生对照小鼠减轻、炎症因子的产生减少^[3, 8, 9, 16]。另外一些来源于临床样本的研究结果分析显示^[17],不同的炎症性疾病及自身免疫性疾病中,IL-37 的表达有不同程度的上调或下调。

基于 IL-37 潜在的临床应用价值,本实验室从 LPS 刺激的 PBMCs 中成功克隆出大 IL-37b 全长序列,通过琼脂糖凝胶电泳,发现在略小于 700 bp 处有上下两条大小相近的一明一暗条带,根据文献报道^[4],PBMCs 中可表达 IL-37b 和 IL-37c 两种剪切亚型,因此我们考虑明亮且分子量稍大的条带为 IL-37b,而另一条灰暗且分子量略小的为 IL-37c。对 IL-37b 进行胶回收及后续实验,将 IL-37b 编码区全长序列克隆入真核表达载体 pEGFP-N1,该载体含有 SV40 和 CMV 启动子及绿色荧光蛋白 GFP,具有稳定表达、利于检测基因转染效率等优点。经酶切及测序鉴定,发现与 GenBank 中登录的 IL-37b(NM_014439.3)序列有两处碱基存在差异,即 GGA/GTA(甘氨酸/缬氨酸)和 ACC/GCC(苏氨酸/丙氨酸),经查证均为该基因的两处单核苷酸多态性(SNP:rs3811046 和 rs3811047)。进一步转染 THP-1 细胞,检测到无论是否给与 LPS 刺激,IL-37 表达均显著升高,成功地实现了其在 THP-1 细胞中的过表达,为后续研究 IL-37 与其他免疫调节细胞因子相互作用的分子机制及与相关疾病的关系奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Kumar S, McDonnell PC, Lehr R, et al. Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family[J]. J Biol Chem, 2000. 275(14): 10308 - 10314.
- [2] Dunn E, Sims JE, Nicklin MJ, et al. Annotating genes with potential roles in the immune system: six new members of the IL-1 family[J]. Trends Immunol, 2001. 22(10): 533 - 536.
- [3] Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, et al. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity[J]. Nat Immunol, 2010. 11(11): 1014 - 1022.
- [4] Boraschi D, Lucchesi D, Hainzl S, et al. IL-37: A new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family[J]. Eur Cytokine Netw, 2011. 22(3): 127 - 147.
- [5] Banchereau J, Pascual V, O'Garra A. From IL-2 to IL-37: The expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines[J]. Nat Immunol, 2012. 13(10): 925 - 931.
- [6] Luo Y, Cai X, Liu S, et al. Suppression of antigen-specific adaptive immunity by IL-37 via induction of tolerogenic dendritic cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(42): 15178 - 15183.
- [7] Ye L, Ji L, Wen Z, et al. IL-37 Inhibits the production of inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus: its correlation with disease activity[J]. J Transl Med, 2014. 12: 69.
- [8] McNamee EN, Masterson JC, Jedlicka P, et al. Interleukin-37 expression protects mice from colitis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(40): 16711 - 16716.
- [9] Bulau AM, Fink M, Maucksch C, et al. In vivo expression of interleukin-37 reduces local and systemic inflammation in concanavalin A-induced hepatitis[J]. Scient World J, 2011. 11: 2480 - 2490.
- [10] Zhao JJ, Pan QZ, Pan K, et al. Interleukin-37 mediates the anti-tumor activity in hepatocellular carcinoma: role for CD57⁺ NK cells[J]. Sci Rep, 2014. 4: 5177.
- [11] 严磊, 李晶, 赵婷婷, 等. 大鼠 CBI 基因真核表达载体的构建及其对 CaSki 细胞凋亡的影响[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(02): 153 - 158.
- [12] Bufler P, Azam T, Gamboni-Robertson F, et al. A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(21): 13723 - 13728.
- [13] Bulau AM, Nold MF, Li S, et al. Role of caspase-1 in nuclear translocation of IL-37, release of the cytokine, and IL-37 inhibition of innate immune responses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(7): 2650 - 2655.
- [14] Li S, Neff CP, Barber K, et al. Extracellular forms of IL-37 inhibit innate inflammation in vitro and in vivo but require the IL-1 family decoy receptor IL-1R8[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. 112(8): 2497 - 2502.
- [15] Nold-Petry CA, Lo CY, Rudloff I, et al. IL-37 Requires the receptors IL-18R α and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction[J]. Nat Immunol, 2015. 16(4): 354 - 365.
- [16] Moretti S, Bozza S, Oikonomou V, et al. IL-37 inhibits inflammasome activation and disease severity in murine aspergillosis[J]. PLoS Pathog, 2014. 10(11): e1004462.
- [17] Chen HM, Fujita M. IL-37: a new player in immune tolerance[J]. Cytokine, 2015. 72(1): 113 - 114.

牛体内囊胚经体外共培养诱导子宫内膜上皮细胞 整合素 $\alpha_v\beta_3$ 基因差异的表达

倪茜麟, 倪和民, 潘兴乾, 齐晓龙, 盛熙晖, 邢书涵, 刘云海, 郭勇*

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

【摘要】 目的 利用牛体内胚胎与其子宫内膜上皮细胞体外共培养的方式, 探究共培养前、后子宫内膜上皮细胞中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 基因差异表达的变化, 为今后建立快捷有效的牛子宫容受态预判方法提供参考。**方法** 将体内冲出的牛囊胚与原代培养并传代纯化至第5代的牛子宫内膜上皮细胞进行24 h体外共培养, 利用RT-PCR技术对共培养前、后的子宫内膜上皮细胞进行 $\alpha_v\beta_3$ 基因的表达检测。**结果** RT-PCR检测结果显示, 共培养前、后均有整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的表达; 共培养I组(囊胚组), 其共培养后诱导整合素 $\alpha_v\beta_3$ 基因的表达与未共培养对照组二者之间差异无显著性 ($P > 0.05$); 共培养II组(孵化囊胚组), 其共培养后整合素 $\alpha_v\beta_3$ 基因的表达显著高于对照组和共培养I组 ($P < 0.05$)。**结论** 牛体内孵化囊胚经体外共培养诱导牛子宫内膜上皮细胞表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的效果, 明显优于早期囊胚; 整合素 $\alpha_v\beta_3$ 基因具有作为牛子宫容受态体外检测标志的潜力。

【关键词】 牛; 体内胚胎; 子宫内膜上皮细胞; 共培养; $\alpha_v\beta_3$ 基因

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0273-07

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.011

Differential expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ in bovine endometrial epithelial cells before and after co-culture with bovine blastocysts

NI Qian-lin, NI He-min, PAN Xing-qian, QI Xiao-long, SHENG Xi-hui,
XING Shu-han, LIU Yun-hai, GUO Yong*

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

【Abstract】 Objective To investigate the differential expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ on bovine endometrial epithelial cells before and after co-culture with bovine blastocysts, and to explore whether this specific signal might be applied as a new marker for identifying the bovine uterine receptivity. **Methods** The in vivo bovine embryos were co-cultured with their endometrial epithelial cells for 24 h, then, RT-PCR was used to detect the differential expression of $\alpha_v\beta_3$ among those groups. **Result** The results showed that $\alpha_v\beta_3$ can be expressed on bovine endometrial epithelial cells both before and after co-culture with their in vivo embryos. There were no significant differences of expression of $\alpha_v\beta_3$ between Group I (only bovine blastocyst) and the control one ($P > 0.05$), but there were significant differences of $\alpha_v\beta_3$ among Group II (the hatched bovine blastocyst), and Group I, the control one ($P < 0.05$). **Conclusions** The in vivo hatched bovine blastocysts are more suitable for induction of integrin $\alpha_v\beta_3$ in bovine endometrial epithelial cells after their co-culture than that of co-cultured with early stage blastocyst. Integrin $\alpha_v\beta_3$ might be applied as a new molecular marker for detecting bovine uterine receptive status of the bovine endometrium.

【基金项目】 2013年度北京市教委北京市属高等学校创新团队建设与教师职业发展计划项目(No. PXM2013_014207_000067); 国家自然科学基金面上项目(No. 31272526)。

【作者简介】 倪茜麟(1990-), 女, 硕士生, 研究方向: 动物产科及胚胎工程。E-mail: niqianlin@sina.com

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

【Key words】 Bovine; In vivo hatched blastocyst; Co-culture; Endometrial epithelial cells; Integrin $\alpha_v\beta_3$ gene
Corresponding author: GUO Yong. E-mail: y63guo@126.com

家畜胚胎移植技术可显著提高良种母畜的繁殖效率,但移植后其胚胎着床率偏低的问题却一直影响着该技术的实际应用、推广效果^[1]。在牛的妊娠过程中,大约有一半的胚胎在第 8~17 天之间发生着床失败,其原因普遍认为是由于孕体与子宫间交流不足所致^[2]。有研究表明,胚胎的附植是通过母体子宫与胚胎之间的双向沟通(cross-talking)而建立起来的^[3]。因此,通过对动物胚胎早期着床机理的研究,将有助于认识母体与胚胎间的相互作用机理及相关的调节机制,并为日后人为调控母畜子宫生理状态,以及进一步提高体外制备家畜胚胎的移植妊娠率提供理论基础。

目前,公认的反刍动物胚胎源信号仅有 IFN- τ 一种^[4],与此同时,与妊娠相关并在母畜子宫内膜上皮细胞中表达的基因簇,也逐渐被人们发现并得到关注,现已知的主要基因包括:整联蛋白、骨桥蛋白、ISG15 以及白细胞介素等^[5,6]。其中整合素主要参与调控细胞间的粘附,迁移等过程^[7],是一种以异二聚体形态存在的细胞表面糖蛋白,由两种非共价连接的亚基 α 和 β 组成,被认为是动物细胞间最重要的连接细胞外基质与细胞内骨架的受体^[8]。人们最早在人类子宫内膜上皮细胞中发现了整合素,并有研究显示:整合素 $\alpha_v\beta_3$ (由编码构成该整合素蛋白的 2 个不同亚基的 2 个不同基因的表达产物组成)的表达量在妊娠期会大幅上升,因此推测其可能与胚胎着床有关。目前,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 已成为判断人类子宫建立容受态的标志之一。此外,国外近年来有报道指出,在牛、羊等反刍动物的子宫内膜上皮细胞中也检测到了整合素的表达,但是有关利用反刍动物体内胚胎,进行其相应子宫内膜细胞体外共培养,以及体外诱导相关子宫源基因差异变化的研究,尚未见任何报道。目前对于反刍动物子宫内膜上皮细胞中整合素的表达规律及调控机理仍不明确。

有鉴于此,本实验将体内冲胚获得的牛体内胚胎,经与其子宫内膜上皮细胞体外共培养之后,利用 RT-PCR 技术检测共培养前、后整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在牛子宫内膜上皮细胞中的差异表达情况,为今后有效建立牛的子宫容受态体外(快速)检测体系提供一些参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验选用生殖器官正常且未受孕的小牛子宫,取自河北省大厂县屠宰场。于屠宰场取下保存于 25~30℃ 且含有双抗(青霉素 100 IU/mL 和链霉素 100 IU/mL)的钙镁水中,保证 4 h 内运回实验室。牛体内胚胎:购自北京奶牛中心(编号:021-10012)。

1.2 实验试剂

胎牛血清(Gibco)、DMEM、DPBS、NEAA、EAA、丙酮酸钠、胰蛋白酶(TE)、二甲基亚砜(DMSO)、青霉素(penicillin)、链霉素等均购自 Sigma 公司;SDS(十二烷基硫酸钠)、EDTANa 购自北京奇华盛;Trizol(Invitrogen);EDTANa₂(北京奇华盛);50 * TAE buffer(博迈德生物);异丙醇、无水乙醇、三氯甲烷均购自北京化工厂;M-MLV RT 试剂盒、GV-1、DNA MarkerMix E、琼脂糖凝胶均购自北京赛百盛公司。

1.3 实验仪器

体视显微镜:江南 XTB-1;倒置显微镜:江南;培养箱:Thermo CO₂ 培养箱,371;电子天平:西德, Sartorius BS124S;超净工作台:苏州市医用净化设备厂;掌心离心机:北京医用离心机 LDZ4-0.8。

1.4 实验方法及分组

1.4.1 牛子宫内膜组织的分离、原代培养

①将带回的子宫用预先加热到 37℃ 且含有双抗的钙镁水清洗至无血无杂质;②根据实验需求,取适量的子宫角,纵向剖开,用 PBS 清洗 2~3 遍;③用剪刀、镊子及刀片将外层脂肪等剥离,留下最内层半透明状内膜上皮,PBS 冲洗 6~8 遍至无细碎组织掉落;④将其剪成 1 mm² 的小块,DPBS 清洗数遍至上清透亮;⑤取约 200 mL 的组织块悬液以小滴的形式均匀接种于 6 cm 培养皿中,植块间距约在 0.3 cm,然后补充 DMEM (20% FBS)液 500 mL,轻摇培养皿,使组织块均匀的平铺于培养皿上(液体很薄,但一定要铺满全皿);⑥培养于 5% CO₂, 37℃ 的培养箱中;⑦约 5~10 d 后,组织边缘有细胞长出。

1.4.2 牛子宫内膜细胞传代培养

①自接种后每 48 h 换一次液,待汇合度达到 90% 时,利用胰酶消化法进行传代;②吸去皿中的培养液,挑除组织块;③加入 1 mL 0.25 % 胰酶,放入

37℃ 培养箱中消化 8 ~ 12 min, 期间可拿出培养箱在倒置显微镜下观察, 若细胞大部分变圆, 则应立即加入 1 mL DMEM (10% FBS) 终止消化; ④利用移液枪轻轻吹打培养皿底部, 使细胞漂浮, 后吸取细胞悬浊液于 1.5 L 离心管中, 3000 r/min, 离心 3 min, 弃上清; ⑤加入 1 mL DMEM 轻轻吹打混匀, 接种到新的培养皿中, 置于培养箱中继续培养。

1.4.3 牛子宫内膜细胞的冻存与复苏

①子宫内膜传至第 3 代, 若暂不进行共培养实验, 则将其冻存。②吸出培养液, DPBS 缓冲液清洗两遍, 胰酶消化; ③细胞变圆后, 移入离心管, 离心 3000 r/min, 3 min, 弃上清, 加入 1 mL 预先配置好的冻存液, 混匀后转移至冻存管; ④放入冻存盒中, -80℃ 冰箱 18 h, 转入液氮, 可长期保存。当准备进行共培养时, 对第 3 代冻存的细胞进行复苏。

①将细胞从液氮中取出, 迅速放入 37℃ 的温水中进行解冻, 边水浴加热边晃动, 当内容物完全呈液态时即可, 总时间不超过 2 min; ②酒精擦拭冻存管外部, 细胞液移入 1.5 mL EP 管中, 离心 3000 r/min, 3 min, 弃上清; ③加入 DMEM (10% FBS) 培养液轻轻吹打混匀, 接种于四孔板中, 待汇合度达到 85% 以上即可使用。

1.4.4 牛体内胚胎的解冻复苏

①预先准备好 37℃ 的温水, 室温保持在 25 ~ 28℃, 将液氮中保存的胚胎管取出, 空气浴 5 s, 37℃ 水浴 10 s, 见管内乳白色变为透明色液体即可; ②拔出棉塞, 将胚胎打入培养液中, 观察形态是否完整; ③捡入 Hepes 清洗 2 ~ 3 遍, CR₂ 后期液润洗 2 ~ 3 遍后, 入滴培养; ④观察 12 h, 若胚胎有扩张, 则可以进行后续实验。

1.4.5 牛体内胚胎与牛子宫上皮细胞共培养

①细胞传入四孔板培养至第 5 代, 汇合度达到 85% 以上, 可进行后续实验; ②在共培养前 2 h, 换上含有 20% FBS 的 CR₂ 后期培养液; ③复苏五枚牛体内囊胚, 培养 12 h 后观察, 选取形态良好的大腔囊胚与牛子宫上皮细胞共培养, 一孔一囊胚, 用 CR₂ 后期培养液培养于 37℃, 5% CO₂ 的环境中 24 h; ④实验重复五次, 每次三枚胚胎分别与一孔上皮细胞共培养; ⑤设对照组为未共培养的牛子宫上皮细胞。

1.4.6 共培养后子宫内膜细胞总 RNA 提取及相关基因的表达检测

①检出囊胚, 细胞用 DPBS 洗 2 遍, 加入 500 μL TRIzol, 若不能立即提取, 放入 -80℃ 冰箱保存; ②提取时, 常温融化, 冰上静置 5 min, 加入 200 μL 氯仿, 颠倒混匀 10 次, 冰上静置 5 min, 4℃ 高速离心, 12 000 r/min, 10 min; ③取上层液相移入新 EP 管中, 加入 500 μL 异丙醇, 颠倒混匀 10 次, 冰上静置 10 min, 4℃ 高速离心, 12 000 r/min, 10 min; ④离心后, 可见管底有极少量沉淀, 弃上清, 加入 1 mL 85% 的冰乙醇, 4℃ 高速离心, 10 500 r/min, 5 min; ⑤弃上清, 晾干 5 min, 加入 ddH₂O 溶解 RNA 样品, 测定总 RNA 浓度及纯度; ⑥合格样品进行 10 倍稀释作为检测模板, 反应体系及程序如下: 95℃ 5 min; 95℃ 45 s; 55℃ 45 s; 72℃ 1 min, 共 30 个循环后, 进行 72℃ 延伸 5 min; 以 β-actin 作为内参; ⑦扩增引物由英俊生物公司合成。αv 的上游引物 5'-gagct-gagaacaacggctcc-3', 下游引物 5'-atccccgttcgtgatgagat-3'; β3 的上游引物 5'-cagagggtggtttgatgcc-3', 下游引物 5'-catcattgggctggacgatg-3', β-actin 的上游引物 5'-cctggcgccattcacgaaactac-3', 下游引物 5'-actcctgcttgatccactc-3'; ⑧制备 2% 琼脂糖凝胶, 每孔加入 7 μL 的 PCR 产物, 在 120 V/cm 的恒定电压下电泳 20 min, 放入凝胶成像仪观察, 拍照。

1.4.7 图像分析

用 ImageJ 软件进行灰度值分析, 对信号表达进行比较。

1.4.8 统计方法

用 SPSS 19.0-for Windows 进行数据单因素方差分析(数据相关分析结果采用平均数 ± 标准差表示)。平行对比, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 牛子宫内壁上皮细胞

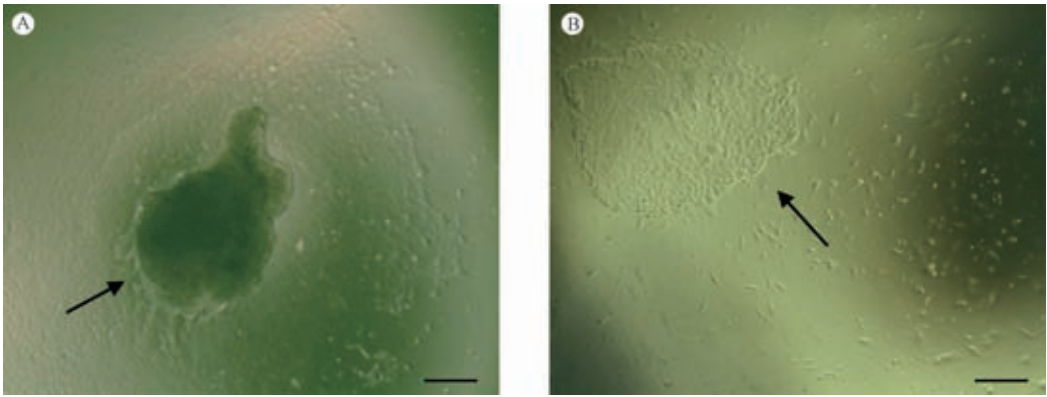
体外培养的牛子宫内壁上皮原代细胞(图 1)与传代细胞(图 2), 长势良好, 可进行后续实验。

2.2 解冻的体内胚胎

刚复苏时, 内细胞团聚集在一起, 无明显空腔; 待培养 12 h 后, 囊胚恢复扩张状态, 腔体清晰可见, 结构完整, 说明情况良好, 可用于后续实验(见图 3)。

2.3 共培养

如图 4 所示, 共培养时间为 24 h, 胚胎稍有扩张, 囊胚腔变大, 透明带变薄。

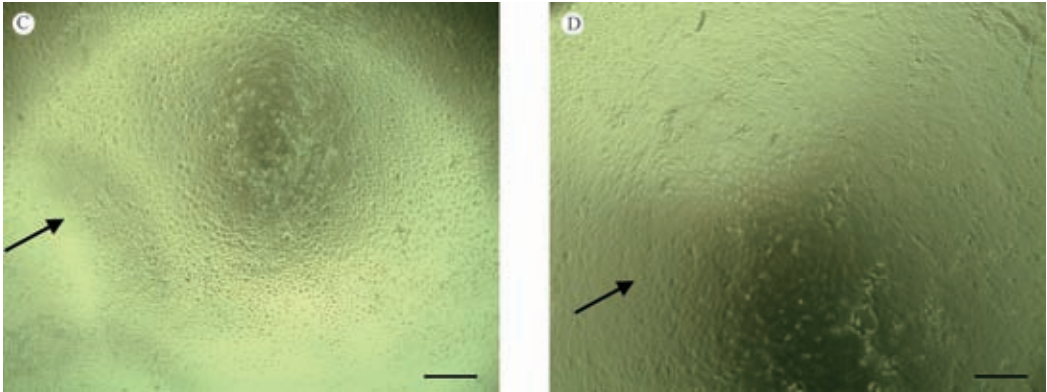


注:A. 箭头所指为子宫内组织块;B. 箭头所指为原代子宫内上皮细胞。

图 1 组织块接种第 10 天的原代细胞 (bar = 60 μm , 10 $\times$ 20)

Note. Arrow A indicates bovine uterine tissue bloc. Arrow B indicates the original generation of bovine endometrial epithelial cells.

Fig. 1 Primary bovine uterine endometrial epithelial cells derived from the tissue block cultured for 10 days (bar = 60 μm , 10 $\times$ 20)

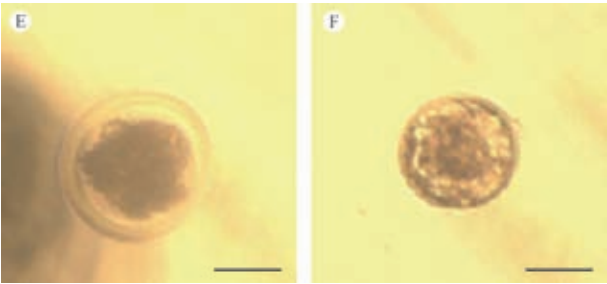


注:C. 箭头所指为 1 代子宫内上皮细胞;D. 箭头所指为 4 代子宫内上皮细胞。

图 2 子宫内上皮传代细胞 (bar = 60 μm , 10 $\times$ 20)

Note. Arrow C and D indicate bovine endometrial epithelial cells.

Fig. 2 Passaged bovine endometrial epithelium cells (bar = 60 μm , 10 $\times$ 20)

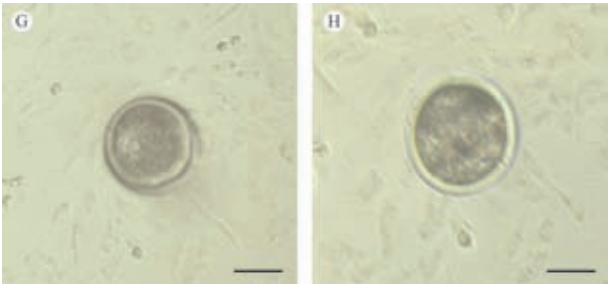


注:E. 为刚解冻的牛桑葚胚;F. 为体外培养 12 h 的牛早期囊胚。

图 3 解冻后的牛体内胚胎 (bar = 80 μm , 10 $\times$ 40)

Note. E indicates a bovine morula; F indicates an early bovine blastocyst after being in vitro cultured for 12 h.

Fig. 3 In vivo bovine embryos after freezing-thawing (bar = 80 μm , 10 $\times$ 40)



注:G. 刚进行共培养的牛囊胚;H. 共培养 24 h 后的牛囊胚。

图 4 共培养前、后的牛体内胚胎 (bar = 80 μm , 10 $\times$ 40)

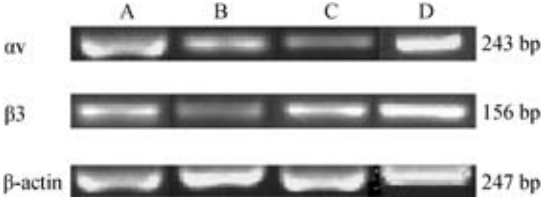
Note. G indicates a bovine blastocyst co-cultured with endometrial epithelial cells at the beginning. H indicates bovine blastocyst co-cultured with endometrial epithelial cells for 24 h.

Fig. 4 Bovine blastocysts before and after co-culture with endometrial epithelial cell for 24 hours (bar = 80 μm , 10 $\times$ 40)

2.4 子宫内膜上皮细胞 $\alpha v, \beta 3$ 共培养前、后的 RT-PCR 检测结果

2.4.1 凝胶成像

每个 PCR 实验各重复 5 次,从电泳结果看出,看家基因 β -actin 正常表达,表明提取的总 RNA 经反转后,可稳定用于后续实验。见图 5。



注:A. 阳性对照; B. 对照组;
C. 共培养 I 组; D. 共培养 II 组。

图 5 单枚牛体内胚胎与其子宫内膜上皮细胞共培养 24 h 前、后 $\alpha v, \beta 3$ 基因的差异表达情况

Note. A. Positive control sample; B. Control group;
C. Co-culture group I; D. Co-culture group II

Fig. 5 Differential expression of integrin $\alpha v, \beta 3$ after in vivo bovine blastosysts being co-cultured with endometrial epithelial cells

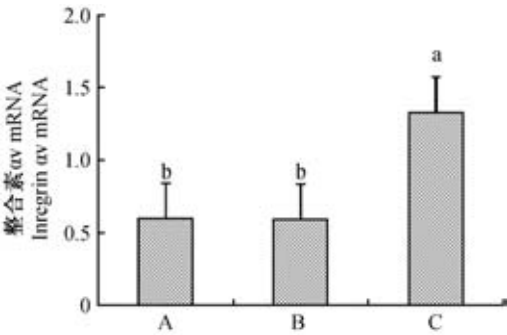
2.4.2 灰度值分析结果

每组实验平行重复 5 次,凝胶成像所得的图片用 ImageJ 软件分析得到灰度值。利用 SPSS 19.0 软件中的 ANOVA 单因素方差分析处理灰度值数据,结果如图 6,图 7 所示;共培养前、后均有整合素 $\alpha v, \beta 3$ 的表达;共培养 I 组(未孵化囊胚组),其共培养后整合素 $\alpha v, \beta 3$ 的表达变化与未共培养对照组相比,差异无显著性($P > 0.05$);共培养 II 组为孵化囊胚组,其共培养后整合素 $\alpha v, \beta 3$ 的表达显著高于未共培养对照组和共培养 I 组($P < 0.05$)。

3 讨论

哺乳动物胚胎着床的过程是通过胚胎与母体子宫间正常的信息交流实现的。不仅需要良好质量的胚胎,也需要母体子宫处于容受态,才能接受附植,否则就会发生妊娠失败。整合素属于粘附蛋白家族因子,主要参与细胞间的粘附,迁移过程。在反刍动物的胚胎着床过程中,大量涉及细胞的粘附,增殖,分化与迁移。因此,我们猜想,整合素可能参与了反刍动物的胚胎着床过程,本试验欲通过体外共培养模型来探究其整合素在胚胎附植中的变化,并对未来体外检测子宫容受态的工作提供实践基础。

20 世纪后期, Fisher 及 Sueoka^[9,10] 两个团队首先在人类的子宫内膜上皮细胞中发现了整合素的表



注: A. 为共培养组; B. 共培养 I 组; C. 共培养 II 组;
上标相同字母表示差异无显著性, $P > 0.05$ 不同字母表示差异有显著性, $P < 0.05$ (下同)。

图 6 牛体内囊胚与子宫内膜共培养 24 h 前后 αv 相对灰度值比较

Note. A: Control group. B: Co-culture group I. C: Co-culture group II.

The same superscript letters indicate non-significant difference ($P > 0.05$). The different superscript letters indicate a significant difference ($P < 0.05$) (same as below).

Fig. 6 Comparison of the mRNA levels of integrin αv mRNA in endometrial epithelial cells before and after co-culture with the bovine blastocyst for 24 h

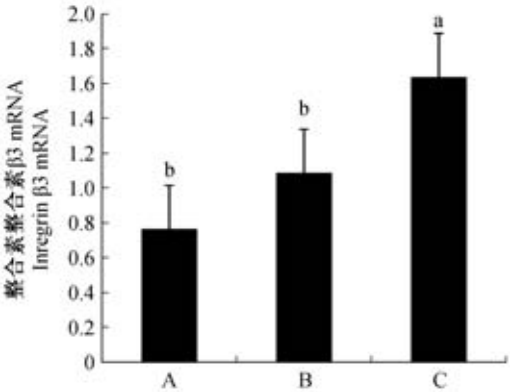


图 7 牛体内囊胚与子宫内膜共培养 24 h 前后 $\beta 3$ 相对灰度值比较

Fig. 7 Comparison of the mRNA level of integrin $\beta 3$ in the endometrial epithelial cells before and after co-culture with bovine blastocyst for 24 h.

达,并证实其参与了子宫容受态的建立,随后, Johnson、Burghardt 等^[11,12] 分别在绵羊和猪的子宫内膜细胞中发现了整合素的表达。1995 年, MacLaren 与 Wildeman^[13-15] 最早在牛的胚胎上检测到了整合素亚基 $\beta 1$, 然而其 α 配体尚不明确,并最终发现,整合素表达于植入期牛子宫胚胎界面,以及整个妊娠中期的胎盘细胞表面。近几年, Zeiler^[16], Nardo 等^[17] 在研究中发现,牛子宫内膜上皮细胞中有整合素 $\alpha v, \beta 3$ 的表达,子宫基质成纤维细胞中有 $\alpha 6 \beta 1$ 的

表达,其中,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在胚泡着床的整个时期都表达。这与我们的试验结果相吻合。有趣的是,我们还发现,虽然前期报道指出整合素 $\alpha_v\beta_3$ 属于一个结合体,但胚胎体外(共培养)诱导试验结果却显示: $\alpha_v\beta_3$ 亚基并没有呈现出相同的变化规律,这可能提示子宫内膜中起到附植关键作用的整合素受体类型,不止 $\alpha_v\beta_3$ 一个,且在着床过程中,可能存在部分变构的现象,即亚基与配体间的亲和力发生了变化。另一方面,我们的实验结果显示:经体外共培养诱导处理后,牛孵化胚胎组整合素表达的增幅远高于未孵化胚胎组。这与 Robert 等^[18] 的牛体内胚胎相关实验结果存在一定差异,他们首先在牛的桑葚胚及后期囊胚滋养层细胞中检测到 IFN- τ ,它于妊娠的第 6 或 7 天,即囊胚腔出现扩张时开始表达,此后,随着囊胚的孵化,IFN- τ 分泌量急剧上升,并于妊娠第 14 ~ 16 天达到高峰,并持续到第 19 ~ 21 天。2015 年, Bao^[19] 团队发现 IFN- τ 可上调钙粘蛋白的表达,2016 年 2 月, Keeley^[16] 团队再次证实钙粘蛋白与整合素间有紧密的相互调节作用,而在本实验中,我们发现:整合素明显上升的趋势是在孵化囊胚组,与其滋养层细胞自身 IFN- τ 大量分泌的时间相吻合。因此可以推测:整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的上调是由于 IFN- τ 在囊胚孵化前后的差异分泌所造成的,这也预示着 $\alpha_v\beta_3$ 具有作为牛子宫容受态体外检测标志基因的潜力。

参 考 文 献

- [1] Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation [J]. Hum Reprod Update, 2006, 12: 731 - 746.
- [2] Spencer TE, Hayashi K, Hu J, et al. Comparative developmental biology of the mammalian uteri. In: Schatten G (ed.): Current Topics in Developmental Biology [M]. Burlington, MA: Elsevier, 2005, 68: 85 - 122.
- [3] MacIntyre DM, Lim HC, Ryan K, et al. Implantation-associated changes in bovine uterine expression of integrins and extracellular matrix [J]. Biol Reprod, 2002, 66: 1430 - 1436.
- [4] Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA. Interferons and uterine receptivity [J]. Semin Reprod Med, 2009, 27(1): 90 - 102.
- [5] Bartol FF, Wiley AA, Floyd JG, et al. Uterine differentiation as a foundation for subsequent fertility [J]. Reprod Fertl Suppl, 1999, 54: 287 - 302.
- [6] Chung TW, Park MJ, Kim HS, et al. Integrin $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ are required for leukemia inhibitory factor mediated the adhesion of trophoblast cells to the endometrial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun. 2016, 469(4): 936 - 940.
- [7] Mui KL, Chen CS, Assoian RK. The mechanical regulation of integrin-cadherin crosstalk organizes cells, signaling and forces [J]. J Cell Sci, 2016, 129: 1093 - 1100.
- [8] 刘能辉. OPN 和 integrin β_3 在围植入期小鼠子宫内膜中的表达及其抗体对着床的影响 [D]. 中南大学, 2008.
- [9] Fisher SJ, Damsky CH. Human cytotrophoblast invasion [J]. Semin Cell Biol, 1993, 4: 183 - 188.
- [10] Sueoka K, Shiokawa S, Miyazaki T, et al. Integrins and reproductive physiology: expression and modulation in fertilization, embryogenesis, and implantation [J]. Fertil Steril, 1997, 67: 799 - 811.
- [11] Johnson GA, FW Bazer, LA Jaeger, et al. Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep [J]. Biol Reprod, 2001, 6(5): 820 - 828.
- [12] Burghardt RC, Johnson GA, Jaeger LA, et al. Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals [J]. Cells Tissues Organs, 2007, 172: 202 - 217.
- [13] Hernandez-Nieto CA, Soto Cossio LE, Basurto Diaz D. Assisted hatching for improving embryo implantation [J]. Ginecol Obstet Mex, 2015, 83(4): 232 - 239.
- [14] Pfarrer C, Hirsch P, Guillomot M, et al. Interaction of integrin receptors with extracellular matrix is involved in trophoblast giant cell migration in bovine placentomes [J]. Placenta, 2003; 4: 588 - 597.
- [15] MacLaren LA, Wildeman AG. Fibronectin receptors in preimplantation development: cloning, expression, and localization of the α_5 and β_1 integrin subunits in bovine trophoblast [J]. Biol Reprod, 1995, 5(3): 153 - 165.
- [16] Zeiler M, Leiser R, Johnson GA, et al. Development of an in vitro model for bovine placentation: a comparison of the in vivo and in vitro expression of integrins and components of extracellular matrix in bovine placental cells [J]. Cells Tissues Organs, 2007, 186(4): 229 - 242.
- [17] Nardo LG, Bartoloni G, Di Memurio S, et al. Expression of $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_4\beta_1$ integrins throughout the putative window of implantation in a cohort of healthy fertile women [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2002, 81(8): 753 - 758.
- [18] Pfarrer CD. Characterization of the bovin placenta by cytoskeleton, integrin receptors, and extracellular matrix [J]. In: Michael J. Soares, Joan S. Hunt (Ed.). Placenta and Trophoblast, Methods and Protocols Volume 1. Humana Press, Totowa New Jersey. 2006, 121: 323 - 335.
- [19] Bao ZJ, Zhao S, Haq IU, et al. Recombinant bovine interferon - τ enhances in vitro development of bovine embryos by upregulating expression of connexin 43 and E-cadherin [J]. J Dairy Sci, 2015, 97: 6917 - 6925.

[收稿日期] 2016-02-29

玛咖提取物对小鼠毒性及免疫器官的影响

俞发荣, 张诗爽, 张振南*, 连秀珍, 谢明仁, 李登楼, 杨博

(甘肃省证据科学技术研究与应用重点实验室, 甘肃政法学院, 兰州 730070)

【摘要】 目的 探讨玛咖提取物对小鼠毒性及免疫器官的影响。**方法** 给予 BALB/c 小鼠玛咖提取物 15 d, 观察玛咖对小鼠的毒性作用, 称量胸腺和脾重量。**结果** 24 h 内小鼠口服累计剂量为 320 g/(kg·bw), 未见动物出现任何毒性反应。给予玛咖提取物 16.0、32.0、64.0 g/(kg·bw) 15 d, 胸腺重量比对照组分别增加了 36.84%、89.47%、107.89%, 脾脏重量分别增加了 44.83%、62.01%、89.66%, 小鼠碳粒廓清指数分别增加了 30.85%、42.55%、54.79%, 血清溶血素值分别增加了 11.64%、20.03%、31.51%, 与对照组相比, 差异有显著性 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。**结论** 玛咖提取物具有增加免疫器官重量和提高免疫功能的作用, 且毒性较低。

【关键词】 玛咖提取物; 免疫器官; 毒性作用; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0279-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.012

Effect of Maca extract on the toxicity and immune organs in mice

YU Fa-rong, ZHANG Shi-shuang, ZHANG Zhen-nan*, LIAN Xiu-zhen, XIE Ming-ren, LI Deng-lou, YANG Bo

(Key Laboratory of Evidence of Science and Technology Research and Application,
Gansu Province Institute of Political Science and Law, Lanzhou 730070, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of Maca extract on toxicity and immune organs in mice. **Methods** One hundred and fifty SPF BALB/c mice (male: female = 1:1, body weight 20–22 g) were used in this study. The mice received Maca extract for 15 days, and the maca toxic effect on mice, and the thymus and spleen weights were observed. **Results** At 24 hours after oral administration of Maca extract in an accumulated dose of 320 g/kg·bw, no toxic response was seen in the mice. After administration of Maca extract in a dose of 16.0, 32.0, and 64.0 g/kg·bw for 15 days, the thymus weight was increased by 36.84%, 89.47% and 107.89%, respectively, the spleen weight was increased by 44.83%, 62.01%, and 89.66%, respectively, the carbon clearance index was increased by 30.85%, 30.85% and 42.55%, respectively, and the serum hemolysin value was increased by 11.64%, 20.03% and 31.51%, respectively, in the experimental mice, significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$ for all). **Conclusions** Maca extract exerts an enhancing effect on the immune organ weights and improve the immune function, and is associated with a lower toxicity.

【Key words】 Maca extract; Immune organs; Toxic effect; Mice

Corresponding author: ZHANG Zhen-nan, E-mail: zzn@gsli.edu.cn

玛咖 (Maca), 十字花科 (Brassicaceae) 独行菜属 (*Lepidium*) 植物, 原产于海拔 3500 ~ 4500 m 的南

美安第斯山区。玛咖在南美的食用历史已经有 5800 多年, 是一种纯天然食品, 营养成份丰富, 有

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (编号:31060283); 国家社会科学基金项目 (编号:07BSH054); 甘肃省基础研究创新群体项目 (编号:145RJIA333); 甘肃省科技支撑计划-社会发展类项目 (编号:1304FKCA082); 甘肃政法学院重点项目 (编号:GZF2014XZDLW17); 兰州市科技计划资助项目 (项目编号:2014-1-128)。

【作者简介】 俞发荣 (1959–), 男, 博士, 研究员。研究方向: 法医学、社会环境压力对人类健康的影响、药理学和毒理学实验及实验动物学。E-mail: tim9898@163.com.

【通讯作者】 张振南, E-mail: zzn@gsli.edu.cn.

“南美人参”之誉,传统上用于强壮身体,提高生育力,改善性功能,抗抑郁,抗贫血等。从 20 世纪 60 年代初期到 80 年代,关于玛咖植物学和药用价值的研究逐步系统化,玛咖的一些传统作用得到德国和北美植物学研究者的科学验证,尤其是 20 世纪 80 年代以后,随着玛咖的营养和药用价值被欧美科学家揭示,联合国粮农组织(FAO)给予玛咖很高的评价并将其大力推广。在中、南美洲国家、如厄瓜多尔、秘鲁、墨西哥等国玛咖作为民间药物用于增强精力、提高生育力、缓解更年期综合症、抑郁症、哮喘症和促进伤口愈合等。在美国、欧洲、日本、台湾、澳大利亚等国际科学研究者也加快了对玛咖化学成分、药效药理研究的步伐,每年都在不断揭开产生玛咖神奇功效的神秘面纱,给玛咖具有独特药效的医药产品的开发奠定了坚实的基础。近年来,随着植物药的开发和人民生活水平的提高,玛咖因其具有良好的保健功能和多方面的奇特功效,越来越受到人们的广泛关注,复合保健茶^[1]、保健饮料^[2]及食品胶囊^[3]相继面市,为保障人们身体健康,有必要对玛咖的食品安全质量^[4]、毒性作用以及对免疫器官的影响进行实验研究,以期为玛咖的开发利用提供科学的参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

玛咖提取物:称取云南玉龙雪山产的玛咖块根 200 g,加水 800 mL,得煎液 600 mL,再隔水加热浓缩为 50 mL(含生药 4 g/mL),实验时用蒸馏水稀释成所需浓度。

实验动物及实验环境:SPF 级 BALB/c 品系小鼠,150 只(雌雄各半),体重 20~22 g,购于甘肃省中医学院科研实验中心[SCXK(甘)2011-0001]。全部实验均在甘肃省证据科学技术研究与应用重点实验室 SPF 级动物实验室完成[SYXK(甘)2015-0006]。

1.2 玛咖提取物毒性实验

1.2.1 半数致死量(LD₅₀)测定

BALB/c 小鼠在独立通气笼(individual ventilated cages,IVC)内饲养,自由饮水进食,人工光照 12 h。实验室温度 20~22℃,IVC 内温度(22±0.2)℃,湿度 55%~65%,适应 7 d。按照《中药药理研究方法学》“孙氏综合法(改进寇氏法)”将 50 只 BALB/c 小鼠(雌雄各半)随机分为 5 组,每组 10

只,组间剂量比值为 1:0.8。给药前禁食 12 h,不禁水。经一次灌胃(ig)给药,给药容积为 0.2 mL/10 g 体重,给药后连续观察 7 d。

1.2.2 最大耐受量(MTD)测定

取 20 只 BALB/c 小鼠(雌雄各半),给药前禁食 12 h,不禁水。在 24 h 内灌胃(ig)给药 4 次,每次给药 80.00 g/(kg·bw),累计给药 320.0 g/(kg·bw)。给药后连续观察 7 d。

1.3 玛咖提取物对小鼠免疫器官的影响

选取 BALB/c 小鼠 80 只(雌雄各半)。随机分为 4 组,每组 20 只(雌雄各半)。对照组:正常饲养,灌胃(ig)等量蒸馏水;给药前禁食 12 h,不禁水。玛咖提取物组(高剂量组:给予最大耐受量的 1/5 玛咖提取物 64.0 g/(kg·bw);中剂量组:给予最大耐受量的 1/10 玛咖提取物 32.0 g/(kg·bw);低剂量组:给予最大耐受量的 1/20 玛咖提取物 16.0 g/(kg·bw)),连续给药 15 d。第 16 天,各组取 10 只 BALB/c 小鼠,尾 i.v. 1:10 印度墨汁 0.1 mL/10 g 体重,5 min 和 10 min 分别从眼底取血 20 μL 加入 2 mL Na₂CO₃(1 g/L)溶液中混匀,置 680 nm 处测定吸收值,计算廓清指数(K);各组另 10 只 BALB/c 小鼠按 0.2 mL/20 g 体重给予 5% 鸡红细胞悬液(ip)致敏,第 23 天摘眼球采血,测 A 值,并计算血清半数溶血素值(HC₅₀)。

$$H_{50} = \frac{\text{样品 A 值}}{\text{对照管 A 值}} \times \text{稀释倍数}$$

上述动物实验结束时均用乙醚麻醉,无痛死亡后,剥去胸腺、脾称重,计算 10 g 体重器官指数(器官重/10 g 体重)。

1.4 统计学分析

实验数据采用 SPSS 17.0 软件单因素方差分析进行统计学处理,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 玛咖提取物毒性实验

对玛咖提取物进行小鼠急性毒性实验,按 80.0 g/(kg·bw)灌胃给药,未测出半数致死量(LD₅₀)值。在小鼠可接受的最大容积下进行最大耐受量(MTD)实验,结果在 24 h 内小鼠口服累计剂量为 320 g/(kg·bw),未见动物出现任何中毒症状。

2.2 玛咖提取物对小鼠免疫器官的影响

2.2.1 玛咖提取物对小鼠胸腺和脾重量的影响

给予 BALB/c 小鼠玛咖提取物 16.0、32.0、64.0

g/(kg·bw) 15 d, 胸腺重量比对照组分别增加了 36.84%、89.47%、107.89%, 脾重量比对照组分别增加了 44.83%、62.01%、89.66% (图 1)。

2.2.2 玛咖提取物对小鼠免疫功能的影响

给予玛咖提取物 16.0、32.0、64.0 g/(kg·bw) 15 d, 小鼠碳粒廓清指数比对照组分别增加了 30.85%、42.55%、54.79%, 血清溶血素值比对照组分别增加了 11.64%、20.03%、31.51%, 与对照组相比, 差异有显著性 ($P < 0.05 \sim 0.01$) (图 2)。

3 讨论

近年来, 玛咖的功效及营养价值^[5]等相继被发掘出来^[6]。研究发现, 玛咖具有强壮身体、改善性功能^[7], 增强性行为^[8]、治疗抑郁症^[9]、减轻疲劳^[10]、提高记忆能力^[11]等功能, 是一种药食两用植物资源^[12]。给予志愿者玛咖提取物和安慰剂, 采用双盲法研究发现, 玛咖能显著提高男性精子数量^[13], 降低血糖水平^[14], 改善女性生殖功能^[15], 提

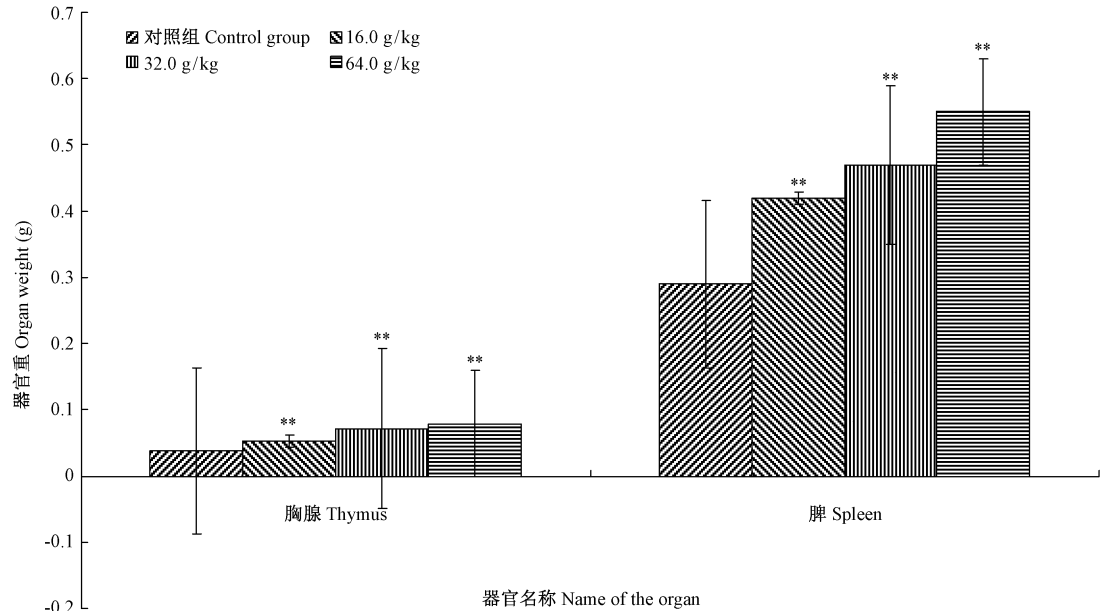


图 1 玛咖提取物对小鼠胸腺和脾重量的影响 (与对照组比: ** $P < 0.01$)

Fig.1 Effect of Maca extract on weight of thymus and spleen in the mice (** $P < 0.01$ vs. the control group)

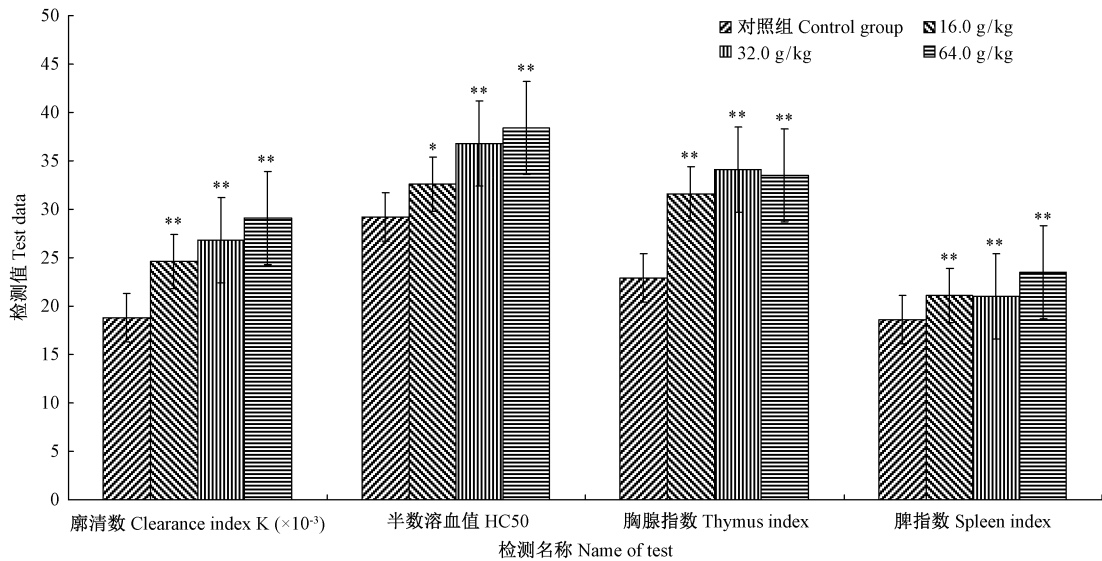


图 2 玛咖提取物对小鼠免疫功能的影响 (与对照组比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.2 Effects of maca extract on immune function of the mice (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. the control group)

高雌激素水平^[16],减轻女性更年期症状,用玛咖天然植物替代激素疗法^[17]。生活在高海拔(4000 m 以上)地区的人食用玛咖,可抑制高海拔诱导血白细胞介素-6 水平升高^[18],保护免疫系统免受损伤。有关玛咖毒性方面的研究,Chung 等^[19]将玛咖水提取物 5 g/(kg · bw) 给予成年大鼠,未出现毒性反应,各组织器官重量与对照组差异无显著性($P > 0.05$)。急性毒性实验发现,按 80.0 g/(kg · bw) 灌胃给药,未测出小鼠半数致死量(LD₅₀)值,在小鼠可接受的最大容积下进行最大耐受量(MTD)实验,结果在 24 h 内小鼠口服累计量达 320.0 g/(kg · bw),未见动物出现任何中毒症状。给予 BALB/c 小鼠不同剂量的玛咖提取物,胸腺重量、脾重量、碳粒廓清指数、血清溶血素值均显著增加,与对照组相比,差异有显著性($P < 0.05 \sim 0.01$)。实验结果表明,云南玉龙雪山玛咖按急性毒性分级标准评价属无毒级植物;该玛咖提取物具有增加免疫器官重量、提高免疫功能的作用。

参 考 文 献

- [1] 寇灿,樊丹敏,王石华,等. 玛咖复合保健茶饮料的研制[J]. 食品工业, 2015, 36(6): 204-206.
- [2] 孟庆玲. 秘鲁玛咖饮料家族的新星[J]. 食品安全导刊, 2015, 17: 74-75.
- [3] 曹庆穗,褚芳,张红梅,等. 一种以玛咖超细粉为主要原料的保健食品胶囊研制[J]. 江苏农业科学, 2015, 42(12): 314-315.
- [4] 许敏,徐丽,宋晖,等. 玛咖的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(7): 2775-2782.
- [5] 李玉龙,张雪,刘清波,等. 玛咖功能与营养成分研究进展及发展前景[J]. 现代农业科技 2015, 21: 289-292.
- [6] 聂东升,戚飞,李颂,等. 玛咖对性功能影响及相关健康功效研究进展[J]. 中国性科学 2013, 22(9): 10-12.
- [7] 李诗,阚红金,华玉祥,等. 玛咖复方醇提物对改善小鼠性功能及抗疲劳功能的影响[J]. 药物生物技术 2015, 22(3): 229-232.
- [8] Lavana A, Vazquez R, Palma IM, et al. "Effect of supplementation with maca (*Lepidium meyenii*) in libido and semen characteristics in hair sheep rams (*Ovis aries*) [J]. Boletín Latinoam Caribe Plantas Med Aromát, 2013, 12, (3): 238-242.
- [9] Gustavo FG, Leonidas V, Manuel G, et al. Maca (*Lepidium meyenii* Walp), a review of its biological properties [J]. Revista Peruana Med Exp Salud Publica, 2014, 31(1): 100-110.
- [10] 胡远,李兴平,周毅,等. 引种玛咖的抗疲劳实验研究[J]. 华西药理学杂志, 2015, 30(4): 440-441.
- [11] 郑慧婷. 玛咖提取物对氢溴酸东莨菪碱所致小鼠记忆获得障碍模型学习能力的影响[J]. 中医学报, 2015, 30(8): 1170-1172.
- [12] 查圣华. 玛咖,一种新资源食品在我国的发展前景食品研究与开发[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(22): 1-4.
- [13] Ingrid M, Tomas F, Michaela K, et al. Effect of *Lepidium meyenii* Walp. on semen parameters and serum hormone levels in healthy adult men: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study [J]. Evidence-based Compl Altern Med, 2015, 15(1): 1-6.
- [14] Gustavo FG, Cynthia GC, Manuel G. A mixture of extracts from Peruvian plants (black maca and yacon) improves sperm count and reduced glycemia in mice with streptozotocin-induced diabetes [J]. Toxicol Mechan Methods, 2013, 23(7): 509-518.
- [15] Christina MD, Pamela JS, Rosemary SW, et al. A double-blind placebo-controlled trial of maca root as treatment for antidepressant-induced sexual dysfunction in women [J]. 2015, 9(1): 1-9.
- [16] Uchiyama F, Jikyo T, Takeda R, et al. *Lepidium meyenii* (Maca) enhances the serum levels of luteinising hormone in female rats [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(2): 897-902.
- [17] Henry O, Meissner HW, Reich B, et al. Therapeutic effects of pre-gelatinized maca (*lepidium peruvianum chacon*) used as a non-hormonal alternative to HRT in perimenopausal women - clinical pilot study [J]. Int J Biomed Sci, 2006, 2(2): 143-159.
- [18] Gustavo FG, Manuel G, Ivan LR. Role of maca (*lepidium meyenii*) consumption on serum interleukin-6 levels and health status in populations living in the Peruvian central Andes over 4000 m of altitude [J]. Plant Foods Human Nutrit, 2013, 68(4): 347-351.
- [19] Chung F, Rubio J, Gonzales C, et al. Dose-response effects of *Lepidium meyenii* (Maca) aqueous extract on testicular function and weight of different organs in adult rats [J]. J Ethnopharmacol, 2005, 98(1-2): 143-147.

[收稿日期] 2016-01-14

纤溶系统对膜性肾病大鼠足细胞损伤的影响

梁静¹, 张渊², 曹灵³, 孟祥龙¹, 王莉^{2*}

(1. 四川省医学科学院·四川省人民医院城东病区肾脏科, 成都 610110; 2. 四川省医学科学院·四川省人民医院肾脏科, 成都 610072; 3. 泸州医学院附属医院肾病内科, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨早期预防纤溶紊乱对防止 MN 进展有重要意义。**方法** 按改良 Border 法制作 MN 大鼠模型, 正式免疫第 1、2、3、4 周末检测全血 uPA、tPA 及 PAI-1 的表达水平; 取大鼠肾组织进行光镜、电镜观察肾组织病理学改变; 采用免疫组化方法检测肾足细胞 nephrin、WT1 蛋白表达含量, 并进行相关性分析。**结果** 与正常组及干预组大鼠相比, 模型组大鼠的全血 uPA、tPA 水平明显减少, 而 PAI-1 水平明显增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 电镜显示肾小球足细胞广泛足突融合至消失; GBM 基质出现“钉样突起”, 肾间质纤维化程度较重。肾小球足细胞分布区 WT-1 和 nephrin 蛋白表达下调, 其中 nephrin 蛋白表达量变化有统计学意义 ($P < 0.01$)。相关性分析显示, 大鼠全血 tPA 和 uPA 水平与肾组织 nephrin 蛋白的表达变化呈正相关, 全血 PAI-1 水平与肾组织 nephrin 蛋白的表达变化呈现负相关。**结论** 在 MN 发展中, 纤溶系统对足细胞损伤凋亡具有重要意义, 早期评估预测 MN 足细胞损伤情况或可为防治早期 MN 步入终末期肾脏病找到又一治疗靶点, 亦可为临床研究治疗 MN 的药物提供新的思路。

【关键词】 膜性肾病; 足细胞; Nephrin; WT-1; 纤溶系统

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0283-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.013

Effect of fibrinolytic system on the podocyte injury in rats with membranous nephropathy

LIANG Jing¹, ZHANG Yuan², CAO Ling³, MENG Xiang-long¹, WANG Li^{2*}

(1. Department of Nephrology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital East Branch, Chengdu 610110, China; 2. Department of Nephrology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072; 3. Department of Nephrology, Affiliated Hospital to Luzhou Medical College, Luzhou 646000)

【Abstract】 Objective To observe the expression of uPA, tPA and PAI-1 in whole blood of rat membranous nephropathy (MN) models induced by cationic bovine serum albumin (C-BSA), and to explore the effect of fibrinolytic system on podocyte apoptosis and pathological changes. To explore the possible preventive and therapeutic effects and the possible mechanisms of early prevention of fibrinolysis. **Methods** We developed a MN model with the modified Border method. At the end of the 1st, 2nd, 3th, and 4th week of immunization, respectively, the levels of whole blood uPA, tPA and PAI-1 were determined by ELISA. The rat kidney tissues were examined by light microscopy and electron microscopy to identify the pathological changes. The expression levels of nephrin and WT1 were detected with immunofluorescence staining and their correlation was analyzed. **Results** Compared the treatment group with control group, the levels of whole blood uPA, tPA and PAI-1 of the model group were decreased, while PAI-1 was elevated, showing a significant difference ($P < 0.05$). The degree of renal interstitial fibrosis was more serious. Correlation analysis showed that the whole blood tPA and uPA levels were positively correlated with the changes of nephrin protein expression in the kidney tissue, while the whole blood PAI-1 level was negatively correlated with the nephrin protein expression in the kidney tissue. **Conclusions** In the process of MN development, the fibrinolytic system may have important significance for podocyte apoptosis. Determination

【基金项目】 四川省卫生厅科研课题(编号:110238)。

【作者简介】 梁静(1981-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事肾脏纤维化相关疾病的研究。Email: liangjing9743@163.com。

【通讯作者】 王莉(1962-), 女, 博士, 主任医师, 从事各种肾脏疾病的诊断及血液透析、腹膜透析技术的研究。Email: scwangli62@163.com。

of early phase of MN podocyte injury may be another therapy target for prevention of the disease development, and then provide new ideas for clinical research and drug development for MN.

[Key words] Kidney; Membranous nephropathy; Podocyte; Nephrin; WT-1; Fibrinolytic system; Rats; Pathology

Corresponding author: WANG Li, Email: scwangli62@163.com

膜性肾病(membranous nephropathy, MN)是一种非炎症性肾小球疾病,表现为肾小球细胞外基质合成与降解失衡而导致的肾小球基底膜普遍增厚及肾小球硬化。纤溶系统在膜性肾病的发生发展中发挥重要的作用^[1]。作为纤溶系统中重要的活性物质,血浆中组织型纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator, tPA)及其抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)之间的动态平衡,尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)等物质对维持微血管的正常生理功能起重要作用^[2]。本研究通过构建大鼠膜性肾病模型,对膜性肾病血清 uPA、tPA、PAI-1 的变化情况及其对足细胞损伤凋亡的影响及肾脏病理的影响进行了探讨,旨在为临床预测 MN 足细胞损伤及预后提供科学的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂

兔抗大鼠 nephrin 抗体、兔抗大鼠 WT1 多克隆抗体均购自 Santa Cruz 公司;阳离子化牛血清蛋白(C-BSA)购自 Chondrex 公司;低分子肝素速碧林购自杭州寒诺菲圣德拉堡民生制药有限公司;大鼠 uPA ELISA 试剂盒购自 Elabscience 公司;大鼠 tPA ELISA 试剂盒购自 Elabscience 公司;大鼠 PAI-1 ELISA 试剂盒购自 Elabscience 公司。

1.1.2 动物及分组

由四川省人民医院实验动物研究所提供雄性、清洁级 SD 大鼠 30 只,体重为(200 ± 20)g,动物适应环境 7 d,将尿蛋白为阴性者随机分为正常组和模型组,正常组 10 只;模型组 10 只;干预组 10 只。

1.2 方法

1.2.1 C-BSA 肾炎模型制作

采用改良版 Border 法^[3],取 C-BSA 1mL 溶解于 0.5 mL 生理盐水中,与等量不完全弗氏佐剂充分乳化,在大鼠颈背部,腹股沟等皮下多点注射,1 周后通过连续 4 周隔日尾静脉注射 C-BSA (16 mg/kg)制作大鼠膜性肾病模型作为模型组,正常组隔日尾静脉注射 1 mL 生理盐水(NS)代替 C-BSA。干预组参照说明书及相关文献^[3]每日分两次皮下注射给

予低分子肝素治疗,确定剂量为 450 U/kg。模型组及正常对照组每日两次皮下注射给予同等剂量的生理盐水。

1.2.2 标本收集

各组大鼠于实验第 1、2、3、4 周末各取 4 只用颈动脉托管法取血各 6 mL 后 4℃ 离心分离血清, -20℃ 冰箱保存以供测定血清 uPa、tPa、PAI-1;第 4 周末对各组大鼠杀检,肾脏取下后剥离肾包膜,取一部分肾组织迅速置于液氮,之后转入 -80℃ 保存;其余肾组织用 4% 多聚甲醛固定,经脱水、透明、浸蜡制成 3 μm 切片备用。

1.2.3 肾脏组织病理形态学

取部分肾脏石蜡切片,分别进行 PASM 染色、Masson 染色^[4],高倍光镜及电镜下观察大鼠肾组织的病理形态学变化。

1.2.4 肾脏组织病理学图像分析

使用 Meta Morph 图像分析系统在 400 倍光镜下随机选取 10 个视野测定每组 PASM 染色切片的肾小球系膜阳性目标吸光度(A)。使用 HMIAS-2000 高清晰彩色病理图文报告分析系统在 400 倍光镜下选取 10 个皮质视野进行拍照,取平均值计算纤维化面积占整个视野间质面积(肾小球、肾小管及血管面积不计算在内)的比值。

1.2.5 免疫组织化学检查

采用 SP 法,石蜡包埋的切片常规脱蜡至水,抗原热修复,体积分数为 3% 的 H₂O₂ 阻断清除内源性过氧化物酶;正常山羊血清封闭液 30℃ 恒温封闭 30 min,分别用抗体效价为 1:100 μL 的兔抗大鼠 nephrin、WT1 多克隆抗体,4℃ 孵育过夜,滴加生物素标记的抗兔抗体(原液),30℃ 孵育 40 min,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(原液),30℃ 孵育 40 min;最后加 DAB 显色,显微镜下控制显色反应,苏木素复染,中性树胶封片。以肾实质细胞胞质内棕褐色颗粒为阳性,采用 GD-8 病理彩色图像分析处理系统进行分析。

1.2.6 ELISA

血清 uPa、tPa、PAI-1 的检测严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

1.3 数据统计

全部数据采用 SPSS 17.0 for Windows 软件包统计分析,结果用均数 ± 标准差表示,各组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。相关性分析采用线性分析法。

2 结果

2.1 一般指标变化

与正常组相比,模型组血清 uPa 和 tPa 水平明显下降,PAI-1 显著上升,差异有统计学意义($P < 0.05$);两组间比较,模型组血清 uPa 从第 1 周开始显著低于正常组,血清 tPa 水平从第 2 周开始显著低于正常组,血清 PAI-1 从第 2 周开始显著高于正常组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。肝素干预

组一般指标与正常组相似,从第二周开始,模型组较干预组各指标差异有显著性($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 模型组大鼠肾组织病理形态学观察

光镜下可见正常组肾组织病理学检测未见异常;干预组大鼠肾组织病理学检测亦未见明显异常;模型组 HE 染色可见肾小球明显肿大,部分肾小管上皮细胞肿胀,肾间质纤维化程度严重;Masson 染色结果显示嗜复红蛋白有明显沉积;PASM 染色显示 GBM、TBM 显示弥漫性增厚,出现“梯状”外观。电镜观察显示正常组肾组织超微结构正常;模型组肾组织出现明显病理损害,肾小球上皮下可见电子致密物沉积,“钉突”明显可见,肾小球足细胞广泛足突融合甚至消失。见图 1、2。

表 1 各组大鼠血清 uPa、tPa、PAI-1 水平的比较($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

Tab.1 Comparison of serum levels of uPa, tPa, and PAI-1 in the rats

指标 Indexes	周 Weeks	正常组 Normal group	模型组 Model group	干预组 Intervention group
uPa	1	1.13 ± 0.06	0.86 ± 0.04 [*]	1.05 ± 0.03
	2	1.14 ± 0.08	0.71 ± 0.03 ^{*#}	1.06 ± 0.04
	3	1.07 ± 0.02	0.62 ± 0.01 ^{*#}	1.01 ± 0.06
	4	1.03 ± 0.05	0.55 ± 0.01 ^{*#}	0.92 ± 0.12
tPa	1	2.87 ± 0.12	2.58 ± 0.09	2.83 ± 0.21
	2	2.67 ± 0.11	2.36 ± 0.04 ^{*#}	2.62 ± 0.09
	3	2.91 ± 0.07	1.92 ± 0.07 ^{*#}	2.81 ± 0.13
	4	2.83 ± 0.16	1.70 ± 0.08 ^{*#}	2.61 ± 0.06
PAI-1	1	21.85 ± 2.14	22.69 ± 1.53	21.87 ± 3.13
	2	20.64 ± 1.46	23.24 ± 1.08 ^{*#}	20.94 ± 1.47
	3	20.69 ± 1.38	26.51 ± 1.14 ^{*#}	21.74 ± 1.95
	4	22.47 ± 0.42	29.62 ± 1.95 ^{*#}	22.83 ± 0.85

注: * 与正常组相比, $P < 0.05$; # 与干预组相比, $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, $^* P < 0.05$; Compared with the intervention group, $^{\#} P < 0.05$.

2.3 大鼠肾间质纤维化面积

模型组肾组织的纤维化面积为 (28.21 ± 11.53)%, 正常组为 (12.63 ± 5.42)%, 干预组为 (13.12 ± 3.51)%; 与正常组相比,模型组面积更大,差异有显著性($P < 0.01$)。相关性分析显示,大

鼠全血 tPA 和 uPA 水平与肾间质纤维化面积呈现负相关($r = -0.8654, P < 0.05$; $r = -0.8243, P < 0.05$),全血 PAI-1 水平与肾间质纤维化面积呈现正相关($r = 0.8324, P < 0.05$)。

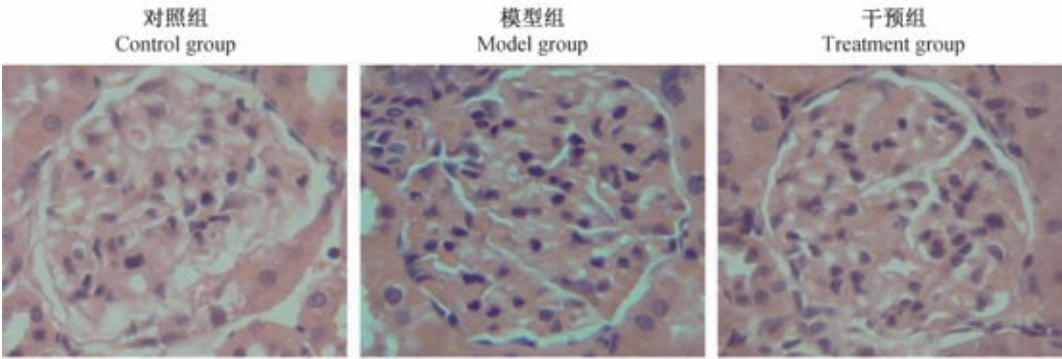
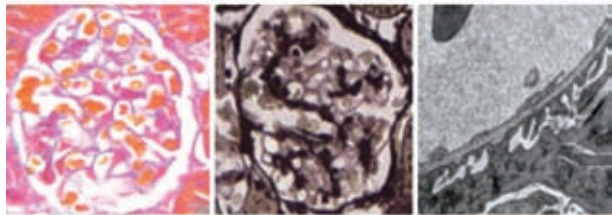


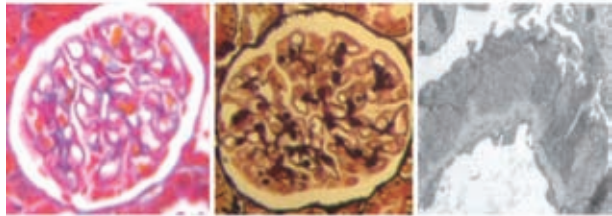
图 1 大鼠肾组织病理形态学变化 ×400; HE 染色

Fig.1 Pathological changes in the rat kidney tissues HE staining ×400

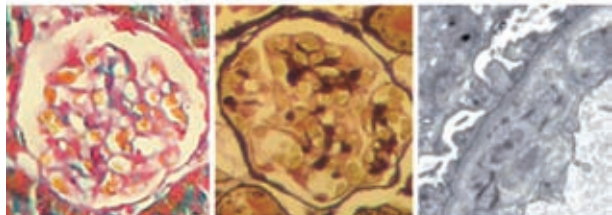
正常组 Control group



模型组 Model group



干预组 Treatment group



注:从左到右依次为 Masson 染色(×400)、PASM 染色(×400)、电镜(×20 000)。

图 2 肾组织病理形态学观察

Note. Pathological changes of the rat kidneys. Masson staining, ×400; PASM staining, ×400; Electron microscopy, ×20 000.

Fig. 2 Pathological observation of the kidney tissues

2.4 肾组织 WT1 蛋白和 nephrin 蛋白的表达变化

正常组肾组织切片中可见 nephrin 呈浅棕色染色沿肾小球毛细血管襻呈均匀、线状分布,肾小管有少量分布;干预组亦未见明显异常;模型组 4 周时 nephrin 表达较正常组显著减少,表达不均,稀疏,部

分区域表达消失,较正常组及模型组差异有显著性($P < 0.01$),WT1 于 MN4 周末时在足细胞核的表达呈深棕色粗大颗粒,与正常组及干预组比较差异无显著性($P > 0.05$)(见表 2、图 3)。

2.5 肾组织 Nephrin 蛋白、WT1 蛋白与全血 tPA、uPA、PAI-1 相关性分析

相关性分析显示,模型组大鼠全血 tPA 和 uPA 水平与肾组织 Nephrin 蛋白的表达变化呈正相关($r = 0.8264, P < 0.05; r = 0.8483, P < 0.05$),全血 PAI-1 水平与肾组织 nephrin 蛋白的表达变化呈现负相关($r = -0.8152, P < 0.05$)。全血 tPA 和 uPA、PAI-1 水平与肾组织 WT1 蛋白的表达变化则无明显相关($r_1 = 0.2372, r_2 = 0.2531, r_3 = 0.2483$;均 $P > 0.05$)。

表 2 4 周末各组肾组织 nephrin、WT1 的表达($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 2 Expression level of nephrin and WT1 in the kidney tissues at the end of 4th week

组别 Groups	Nephrin	WT1
正常组 Normal	12.35 ± 3.78	25.45 ± 11.37
模型组 Model	5.62 ± 2.03 * #	22.60 ± 14.16
干预组 Intervention	12.06 ± 4.23	25.14 ± 6.25

注:模型组与正常组比较, * $P < 0.05$;模型组与干预组相比, # $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, * $P < 0.05$; Compared with the intervention group, # $P < 0.05$.

3 讨论

MN 是一种常见的肾小球疾病,是成人肾病综合征最常见的病因,在原发性肾小球疾病导致的终末期肾病中是第二位或第三位的常见原因。其主要的病理改变是肾小球基底膜上皮下免疫复合物沉积伴 GBM 弥漫性增厚,临床表现为大量蛋白尿或者肾

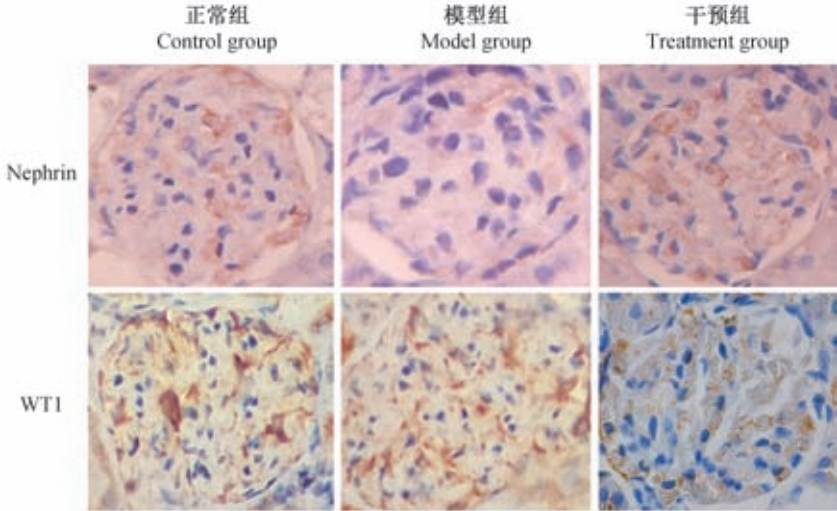


图 3 4 周末两组肾组织 nephrin、WT1 的表达情况

Fig. 3 Expression of nephrin and WT1 in the kidney tissues at the end of 4th week

病综合征,常有高凝状态存在,肾小球硬化、纤维化为各型肾小球疾病终末阶段所常见^[1]。纤溶系统在膜性肾病的发生发展中发挥重要的作用。作为纤溶系统中重要的活性物质,tPA 和 uPA 均能激活纤溶酶原,也是人类血液中仅有的两种纤溶酶原激活物,与 uPA 相比,tPA 结构上的赖氨酸结合部位使其可特异性结合于纤维蛋白血凝块上,进而增加了溶血功能。uPA 在各组织中广泛存在,尤其常见于结缔组织或细胞外组织,可局部活化细胞外间质中的纤溶酶原,形成纤溶酶进而降解大多数糖蛋白^[3]。

PAI-1(纤溶酶原激活物抑制剂-1)是一种单链糖蛋白,相对分子质量 52×10^3 ,含 379 个氨基酸,属丝氨酸蛋白酶抑制物家族^[5]。其主要作用是通过与 PA 形成不可逆的复合物而灭活 tPA(组织型纤溶酶原激活物)的活性,而在病理条件下高表达的 PAI-1 还能灭活 uPA(尿激酶型纤溶酶原激活物)的活性,从而使纤维蛋白因无法降解而在组织中沉积下来,并导致细胞外基质合成增加、降解抑制,进而导致组织纤维化^[5]。

本实验研究结果显示,从第二周末起,与正常组及干预组相比,模型组膜性肾病大鼠的血清 tPA 和 uPA 水平出现明显下降,而 PAI-1 水平则明显上升;相关性分析及各组细胞损伤及调亡的差异提示早期预防纤溶紊乱对防止 MN 进展有重要意义。

膜性肾病的一个重要特征是足细胞损伤。足细胞在膜性肾病病理状态各种损伤因素作用下可能发生若干足细胞特异蛋白分子(nephrin、WT-1 等)表达的下调以及形态学变化,如细胞调亡等^[6]。作为一种高度分化成熟的细胞,足细胞的分裂增殖能力不强,因此足细胞的减少和丢失可作为反映肾小球损伤严重程度和肾硬化进展的重要观测指标及预测指标。Nephrin 是近几年来在足细胞裂孔膜上发现的第一个跨膜糖蛋白,它特异地表达在足细胞的裂孔膜上,对于维持正常的肾小球滤过功能具有重大意义^[7]。有研究发现 nephrin 参与足细胞的重要功能,目前多数研究者认为 nephrin 的减少与蛋白尿的发生关系密切^[7-8]。足细胞特异性蛋白 WT1(Wilms Tumor-1)是一种锌指样转录因子,定位于表达在足细胞核,它是足细胞特异性标志之一^[9-10]。研究发现在局灶节段性肾小球硬化(FSGS)中,WT1 表达下降^[11],本实验免疫组化实验结果显示,MN 模型大鼠中 nephrin 和 WT1 蛋白的表达均明显减少,而 nephrin 蛋白表达的下调更为显著,差异有统计学意义,这与足细胞相对数目和密度的逐渐下调呈正相关关系,而干预组 nephrin 和 WT1 蛋白表达水平及足细胞数目及密度均较正常组无明显差异,相关性分析提示 nephrin 和

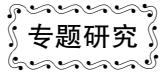
WT1 蛋白的表达在维持足细胞数量中可能起重要作用,而足细胞 nephrin 和 WT1 蛋白表达的减少或可作为足细胞调亡的标志,进而作为反映肾小球损伤严重程度和肾硬化进展的重要观测指标及预测指标。

综上,在大鼠 MN 模型构建的早期(第一周)即检测到纤溶系统的重要组成物质 tPA、uPA 的明显下调而 PAI-1 表达则明显上调,这与足细胞 nephrin 和 WT1 蛋白表达下调,足细胞调亡加剧等趋势保持一致,干预治疗及相关性分析提示早期通过监测血浆中纤溶系统动态变化初步估计足细胞损伤调亡情况是可行的,本研究从分子水平揭示 MN 从蛋白尿到足细胞损害肾小球硬化的发病机制。

参 考 文 献

- [1] Wang J, Zhu P, Cui Z, et al. Clinical features and outcomes in patients with membranous nephropathy and crescent formation [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(50): e2294.
- [2] Kunamneni A, Durvasula R. Streptokinase-A drug for thrombolytic therapy: a patent review [J]. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 2014, 9(2): 106–121.
- [3] 张燕. 膜性肾病大鼠足细胞转分化情况及川芎嗪对其影响的实验研究[D]. 泸州:泸州医学院,2011:15–17.
- [4] Meyer-Schwesinger C, Meyer TN, Sievert H, et al. Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 activity induces polyubiquitin accumulation in podocytes and increases proteinuria in rat membranous nephropathy [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(5): 2044–2057.
- [5] Treweek AT, Maskrey BH, Hickson K, et al. Iodixanol has a favourable fibrinolytic profile compared to iohexol in cardiac patients undergoing elective angiography: A double-blind, randomized, parallel group study [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147196.
- [6] PLOS ONE Staff. Correction: Endocytosed $\beta 2$ -microglobulin amyloid fibrils induce necrosis and apoptosis of rabbit synovial fibroblasts by disrupting endosomal/lysosomal membranes: A novel mechanism on the cytotoxicity of amyloid fibrils [J]. *PLoS One*, 2015, 0141631.
- [7] 杨维娜,任淑婷,钱亦华,等. 阿霉素肾病大鼠肾小球中足细胞数量及 nephrin、VEGF 的表达变化 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2010, 41(3): 458–463.
- [8] 李秋月,李六生,李桂霞,等. 坎地沙坦对糖尿病肾病大鼠足细胞 Nephrin、Podocin 和 CD2AP 表达的影响 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2012, 41(3): 310–314.
- [9] Sangkhathat S, Maneechay W, Chaiyapan W, et al. Association of Wilms' tumor 1 gene single-nucleotide polymorphism rs16754 with colorectal cancer [J]. *Mol Clin Oncol*, 2015, 3(6): 1401–1405.
- [10] Shimodaira S, Sano K, Hirabayashi K, et al. Dendritic cell-based adjuvant vaccination targeting Wilms' Tumor 1 in patients with advanced colorectal cancer [J]. *Vaccines (Basel)*, 2015, 3(4): 1004–1018.
- [11] Iijima K, Someya T, Ito S, et al. Focal segmental glomerulosclerosis in patients with complete deletion of one WT1 allele [J]. *Pediatrics*, 2012, 129(6): e1621–5.

[收稿日期] 2016-02-23



巴马猪 NK 细胞表型鉴定及猪 CIK 细胞诱导方法建立

祝明皓^{1,2}, 陆涛峰², 牛银杰², 赵丽丽², 陈洪岩^{2*}

(1. 东北农业大学, 哈尔滨 150030; 2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001)

【摘要】 目的 获得巴马猪外周血淋巴细胞中 NK 细胞的表型及比例的数据, 建立一种高效率猪 CIK (cytokine-induced killer) 细胞体外诱导培养的方法。**方法** 分离巴马小型猪外周血淋巴细胞, 通过检测 $CD2^+/CD8^+/CD3^-$ 细胞以表征猪 NK 细胞的表型; 通过优化诱导培养条件, 提高诱导淋巴细胞中 CIK 的比例, 建立高效率 CIK 细胞体外诱导方法。**结果** 利用优化的诱导培养条件, 在诱导培养第 5 天时 $CD3^-/CD2^+/CD8^+$ 的 NK 细胞的比例可高达 43.63%, 较最初分离时 NK 细胞比例提升了 5.59 倍; 细胞增殖活性实验表明诱导培养第 5 天时可见明显的 3 个荧光峰, 表明诱导后细胞发生了 3 次分裂, 理论上较最初分离增加了 8 倍; 诱导细胞的 qPCR 表型分析表明该细胞群体在诱导培养第 5 天时相关的表面标志有明显的上升也与流式分析结果一致。**结论** 建立了高效的猪 CIK 细胞体外诱导培养的方法。

【关键词】 巴马小型猪; NK 细胞; CIK 细胞; 表型鉴定

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0288-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.014

Isolation, phenotype identification and activation of natural killer (NK) cells in Bama miniature pigs

ZHU Ming-hao^{1,2}, LU Tao-feng², NIU Yin-jie²,
ZHAO Li-li², CHEN Hong-yan^{2*}

(1. Northeast Agricultural University, Harbin, 150001, China; 2. State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Harbin 150001, China)

【Abstract】 Objective To describe the phenotype of NK cells in Bama miniature pigs, and establish an efficient activation and culture method for porcine cytokine-induced killer (CIK) cells *in vitro*. **Methods** The porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Percoll gradient centrifugation, and the phenotype of NK cells was tested by detecting the $CD2^+/CD8^+/CD3^-$ cell compartment. To establish an efficient activation and culture method for porcine CIK cells, we optimized the culture conditions to improve the CIK activation efficiency. **Results** Using the optimized induction culture conditions, the ratio of CIK ($CD2^+/CD8^+/CD3^-$) cells was up to 43.63% at the fifth day, approximately 5.59 times increased compared with the initially separated PBMCs. Cell proliferation experiments showed that three obvious fluorescence peaks were observed on the fifth day. The results indicated that the induced CIK cells underwent three times cell division, in theory, about increased 8-fold compared with the initial separation of PBMCs. Furthermore, the qRT-PCR result of the surface markers of porcine NK cells also showed a similar variation tendency as the flow cytometry results. **Conclusions** Our findings demonstrate the successful establishment of an efficient activation and culture method for porcine CIK cells *in vitro*.

【Key words】 Bama miniature pig; Natural killer cells; Cytokine-induced killer cells; Phenotype identification

Corresponding author: CHEN Hong-yan, E-mail: chenhongyan@caas.cn.

【基金项目】 哈尔滨市科技平台建设项目 (编号: 2014QA3BN002)。

【作者简介】 祝明皓 (1990 -), 男, 硕士研究生。研究方向: 动物学。E-mail: 15804635767@139.com

【通讯作者】 陈洪岩 (1963 -), 男, 研究员。研究方向: 实验动物学。E-mail: chenhongyan@caas.cn.

NK 细胞,即自然杀伤细胞,是机体重要的免疫细胞,具有杀伤性强、杀伤效果高效、可直接杀死癌细胞等特点,NK 细胞的靶细胞主要有某些肿瘤细胞、病毒感染细胞、某些自身组织细胞和寄生虫等^[1]。NK 细胞现已被越来越多地应用于各种临床研究之中,尤其是对人类及啮齿类的研究较为透彻。但某些大型动物如猪、牛等,其细胞表征与啮齿类相比差异很大^[5],目前临床研究也相对较少,因此能建立一种能够高效地分离猪 NK 细胞并使其能在体外稳定增殖的方法便尤为方便重要。

通过细胞因子而诱导细胞培养的方法在近些年中已有大量报道,而目前人的 CIK 细胞已研发成功并投入到临床应用。该细胞的培养方法是通过在无血清的悬浮细胞培养基中,分别在不同培养时期加入 CD3、IFN- γ 以及 IL-2 等细胞因子,以达到增强细胞杀伤性、促进细胞体外增殖的目的^[2-5]。根据已有报道,通过该方法培养的杀伤细胞可在体外连续培养 20 d 左右,增殖约 15 代左右,是在短时间内大量获得杀伤性细胞的有效方法。

本实验旨在对猪 NK 细胞进行体外诱导培养并进一步对其条件进行优化,以提高 NK 细胞比例。在细胞生长过程中,对 CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻ 表型的猪 NK 细胞的数量比例进行流式检测^[6]。细胞培养过程中每天对细胞留样并提取 RNA,并根据 Talker 与 Gerner 的研究方法^[7,8],对各个时期猪 CIK 细胞的 CD2、CD3、CD8 α 、SLA-DRA 和 PRF1 这五种表面标志用荧光定量 RT-PCR 的方法进行表型鉴定^[8]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Percoll 细胞分离液购自于 Sigma 公司, RPMI 1640 培养液购自于 Gibco 公司, KBM581 培养液购自于 Corning 公司, 双抗由本研究所提供。人 CD3 单抗由博士德生物提供, IFN- γ 与 IL-2 诱导素购自于双鹭药业。Anti-CD2 (Apc) 抗体, Anti-CD3 (FITC) 抗体, Anti-CD8 (PE-cy5) 抗体均购自于 Abcam 公司。CFDA-SE 荧光染料购自于 KeyGen 公司, TransScript Green Two-Step qRT-PCR SuperMix 试剂盒由 Transgen 公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 猪外周血淋巴细胞分离及表型鉴定

从颈静脉采集巴马小型猪血液,加入到含有枸橼酸钠抗凝剂的离心管中。采用 Percoll (1.110 ng/L) 密度梯度离心法分离外周血淋巴细胞^[9,10], 收集淋巴细胞层,用 PBS 洗涤 2 次,加入适量细胞培养

液重悬,利用流式抗体 CD2、CD3、CD8 对细胞进行标记,用流式细胞仪检测各种表面标志的表达情况,实验方法参照表型分析部分。

1.2.2 细胞因子刺激及体外培养

在最初分离的外周血淋巴细胞按 1000 U/mL 的终浓度加入 IFN- γ ,置于培养箱中培养 24 h,次日按终浓度补加 CD3 50 ng/mL 和 IL-2 1000 U/mL。每 2~3 d 观察 CIK 细胞,并添加完全培养基和 IL-2 (终浓度 1000 U/mL)^[5,6]。培养过程中,对每天的细胞进行一次 200 μ L 的样本留取,用于表面标志的鉴定。为优化培养条件,本实验选择了 KBM581 无血清培养基和 1640 培养基 + 5% FBS 进行对比体外培养,以选取最合适的培养液。

1.2.3 细胞增殖活性检测

将最初分离出的外周血淋巴细胞留取一部分,用 CFDA-SE 以 1:1000 的比例对细胞进行染色。加入荧光指示剂后 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 即可完成染色^[7]。之后用 PBS 将细胞悬浮清洗两次,离心条件同之前步骤,最后按照 1.2.2 方法进行诱导培养。诱导培养的细胞分别在 1、3、5、7、9 d 取适量细胞样品,通过流式细胞仪检测细胞增殖状况。本实验同时对用 1640 和 KBM581 培养液培养的细胞进行染色,分别在相同时间点对其增殖状况进行检测,以便更直接准确地判断细胞诱导增殖的最适培养体系。

1.2.4 细胞表型分析

(1) 流式细胞仪检测 CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻ 细胞比例

在猪外周血淋巴细胞诱导培养过程中,分别在培养的第 1、3、5、7、9 天对细胞取样,按照比例 1:100 加入流式抗体 CD2、CD3、CD8 对细胞进行标记,每次标记过程中都进行四组染色标记,分别为三种标签的单独标记及三种标签的共同标记,标记方法如下:首先吸取适量细胞培养液,600 g 离心 15 min,弃上清后用适量 PBS 悬浮清洗细胞,再次 600 g 离心 15 min,之后用 5% BSA 悬浮细胞,室温封闭 1 h,按上述条件离心,加入适量 PBS 悬浮细胞,并根据需求加入不同抗体对细胞进行荧光标记,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后,离心,并用 PBS 清洗两次,最后再用适量 PBS 重悬细胞,过 300 目细胞筛后将样品转移至流式管中,通过流式细胞仪检测表型为 CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻ 的 NK 细胞比例变化情况。

(2) 荧光定量 RT-PCR 检测细胞表型

首先以 Talker 等人研究报道为参考,在 NCBI 查获要检测的 CD2、CD3、CD8 α 、SLA-DRA 和 PRF1 五种基因 CDS 序列,并合成引物,再以韩建强等^[11]为参

考,合成 GAPDH 单拷贝基因引物^[8],待合成出可扩增出单一基因片段的全部引物后,以之前取得的 1 ~ 9 d 细胞样品提取的 RNA 为模板,根据所购买的试剂盒说明书分别用上述引物进行细胞表型的 qRT-PCR 检测。每个基因表达量原始数据,经处理后得到相对表达量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,用于后续数据分析。

2 结果与分析

2.1 巴马猪 NK 细胞的表型分析

分离巴马猪外周血淋巴细胞,利用流式抗体

CD2、CD3、CD8 对细胞进行标记,利用流式细胞仪检测各种表面标志的表达情况,结果如图 1 所致。结果表明,新鲜分离的外周血淋巴细胞中,淋巴细胞约占总细胞含量的 26.4%,淋巴细胞中 CD2⁺细胞的比例约为 41.54%、CD3⁺细胞的比例约为 26.89%、CD8⁺细胞的比例约为 34.83%,CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻细胞的比例约为 7.82%。CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻细胞被认为是猪 NK 细胞的典型表型,因此,本研究中测得的巴马猪 NK 细胞约占总淋巴细胞的 7.82%。

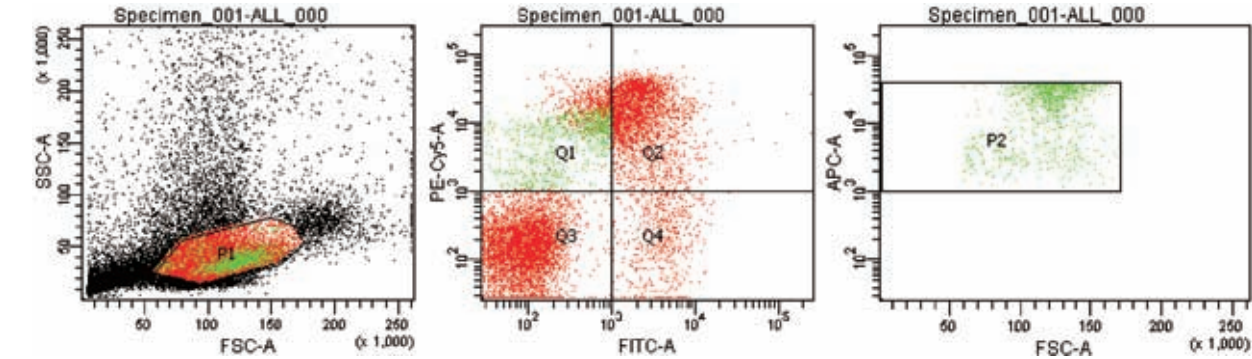
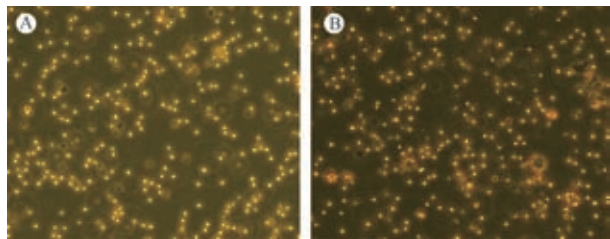


图 1 巴马猪外周血淋巴细胞表型分析
Fig.1 Phenotype identification of PBMCs in the Bama miniature pigs

2.2 巴马猪 CIK 细胞体外诱导培养方法的建立

2.2.1 培养体系优化

将分离得到的淋巴细胞进行诱导,采用不同的培养体系,“1640 培养液 + 5% FBS”和“KBM581 无血清培养液”,分别对细胞进行培养,每天观察细胞形态,并对细胞的生长状况进行记录,绘制生长曲线。结果表明,两种培养液培养得到的细胞在前期培养过程中(1 ~ 6 d)在形态上差异不显著(如图 2),但在体外培养的后期(7 d 以后)KBM581 培养的细胞的凋亡速度和细胞碎片数量明显较 1640 培养多。



注:A. 1640 培养体系培养 3 d;
B. KBM581 培养体系培养 3 d。

图 2 巴马猪 CIK 细胞形态(×200)

Note. A. Cells cultured in 1640 medium for 3 days.
B. Cells cultured in KBM581 medium for 3 days.

Fig.2 Morphology of cytokine-induced killer cells in the Bama miniature pigs(×200)

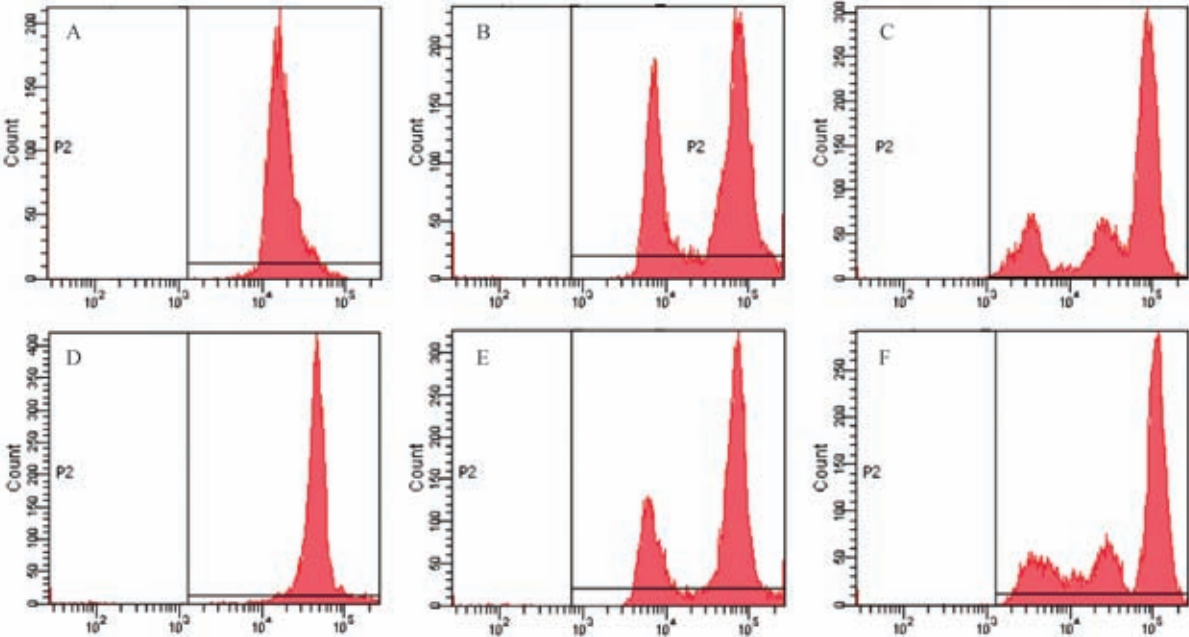
2.2.2 巴马猪 CIK 细胞增殖

选择同一批分离的外周血淋巴细胞,分别用“1640 培养液 + 5% FBS”和“KBM581 无血清培养液”进行培养,按照 1.2.2 的方法诱导产生的 CIK 细胞和按照 1.2.3 的方法用 CDFA-SE 标记细胞,分别在培养的第 1、3、5 天进行细胞取样,并通过流式细胞仪检测细胞增殖情况(如图 3 所示)。实验结果表明,两种培养体系得到结果基本一致,在诱导培养第 5 天时均可见明显的 3 个荧光峰,表明诱导后细胞发生了 3 次分裂,理论上较最初分离增加了 8 倍。

2.3 细胞表型分析

2.3.1 流式细胞仪检测 CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻细胞比例变化

分离巴马猪外周血淋巴细胞,选择 1640 培养体系进行 CIK 细胞诱导培养,分别在培养的第 1、3、5、7、9 天对细胞取样,用 CD2、CD3、CD8 对细胞进行标记,利用流式细胞术分析猪 CIK 细胞在培养过程中的比例变化,结果如图 4 所示。实验结果表明,新鲜分离的淋巴细胞中具有 NK 细胞表型的细胞占 7.81%,诱导培养第 3 天开始,CIK 细胞比例明显上升,到第 5 天达到顶峰,其占总细胞 43.63%,较最初分离时相比细胞比例提升了 5.59 倍,继续之后细胞比例趋于平稳,在第 7 天之后 NK 细胞比例略有下降。

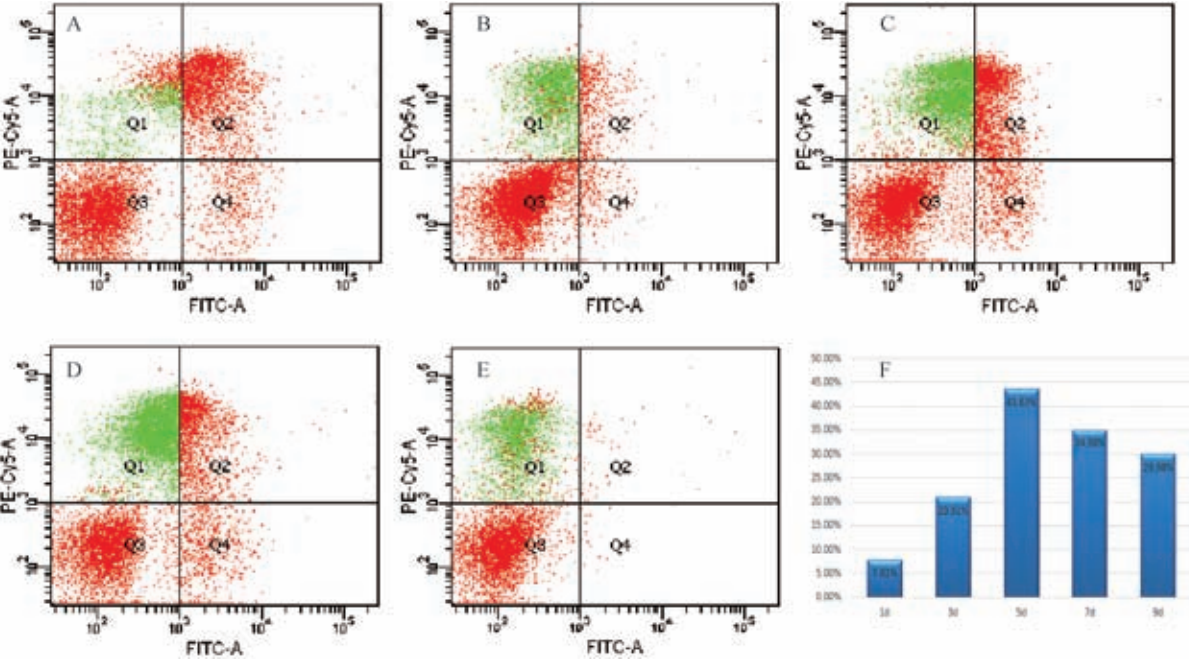


注:A~C 分别为 1640 培养体系分别培养 1、3、5 d 用流式测得的细胞增殖结果;D~F 分别为 KBM581 培养体系分别培养 1、3、5 d 用流式测得的细胞增殖结果。

图 3 巴马猪 CIK 细胞增殖活性分析

Note. A-C: CIK cells cultured in 1640 medium for 1, 3 and 5 days; D-F: CIK cells cultured in KBM581 medium for 1, 3 and 5 days.

Fig. 3 Analysis of the proliferation activity of CIK cells in the Bama miniature pigs



注:A~E 分别为 CIK 诱导培养过程中不同时间(1、3、5、7、9 d)具有 NK 细胞表型($CD2^{+}/CD8^{+}/CD3^{-}$)的细胞比例变化情况;F 图为 $CD2^{+}/CD8^{+}/CD3^{-}$ 细胞数据统计结果。

图 4 巴马猪 CIK 细胞培养过程比例变化分析

Note. A-E, Cultured in 1640 medium for 1, 3, 5, 7 and 9 days; F: Statistical results of the $CD2^{+}/CD8^{+}/CD3^{-}$ cells.

Fig. 4 Changes of the ratio of $CD2^{+}/CD8^{+}/CD3^{-}$ cells of the Bama miniature pigs during the culture process

2.3.2 qRT-PCR 检测 CIK 细胞表型
分离巴马猪外周血淋巴细胞,选择 1640 培养体系进行 CIK 细胞诱导培养,分别在培养的第 1、3、5、7、9 天对细胞取样,进行荧光定量 RT-PCR 反应,检

测猪 NK 细胞表面标志 CD2、CD3、CD8 α 、SLA-DRA 和 PRF1 五个基因的表达变化情况,统计各个基因与内参的 Ct 值,对数据进行均一化处理,计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,绘制曲线,所检测的数据在 1~9 d 变化结果如图 5 所示。结果表明,在细胞培养初期,由于诱导因子的加入,各 NK 细胞相关表型基因的表达量开始上升,在 5 d 达到顶峰,在 6 d 之后呈下降趋势,说明在第 5 天细胞群体有明显增殖,各种表面 marker 表达都在此时增强,此结果与流式结果一致,表明在体外使用细胞因子诱导巴马猪外周血淋巴细胞能够使具有 NK 细胞表型的细胞类群的比例明显提高。

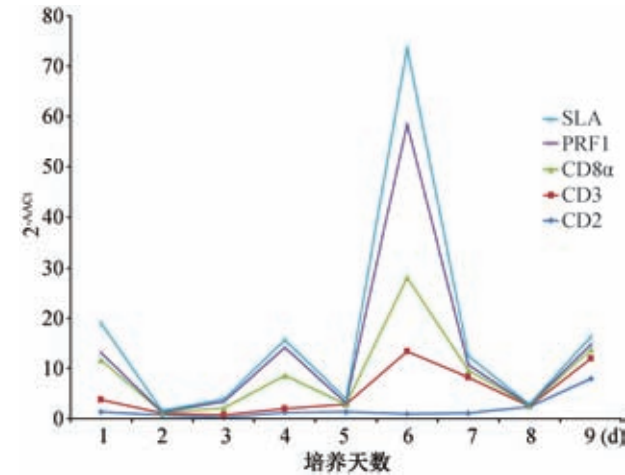


图 5 qRT-PCR 检测 CIK 细胞表型

Fig. 5 Phenotype analysis of the surface markers of porcine NK cells detected by qRT-PCR

3 讨论

本研究首先测定了新鲜分离的猪外周血淋巴细胞中 NK 细胞(CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻)的比例,通过流式细胞仪检测的结果显示,当巴马猪外周血淋巴细胞刚被分离出时, NK 细胞约占总淋巴细胞的 7.82%,本结果可以为猪 NK 细胞研究提供参考。

接下来,本研究比较了两种培养体系培养效果,结果显示“1640 培养液 + 5% FBS”和“KBM581 无血清培养液”两种培养体系在培养 7 d 内,在增殖活性和细胞表型上差异不显著,但是在 7 d 之后,“1640 培养液 + 5% FBS”的培养体系培养的细胞状况要明显好于“KBM581 无血清培养液”体系的细胞,通过镜下观察细胞数量以及细胞形态均一程度便可较明显的体现出来。两种培养体系的主要差异在于培养体系中是否含有血清,因此,可以根据实验目的而选择不同的培养体系来达到实验效果。更重要的是本研究探索了一种无血清培养体系,对于利用该细胞进行实验过程中,实验条件的精细化控制具有探索性意义。

最后,通过对所分离培养的 NK 细胞每天进行的检测结果发现,利用我们建立的细胞诱导培养的方法可以使猪外周血淋巴细胞中具有 NK 细胞表型的细胞数量在第 5 天时达到巅峰,占总淋巴细胞的 43.63%,较最初分离时 NK 细胞比例提升了 5.59 倍,而淋巴细胞总体数量也增长近 8 倍,因此,可利用此方法为体外细胞免疫试验提供足够量的 NK 细胞表型的细胞。NK 细胞是固有免疫应答中一类十分重要的淋巴细胞,可通过选择性识别、杀伤低表达 MHC I 类分子的肿瘤细胞,抑制肿瘤细胞的生长和转移,有效地清除肿瘤进而在机体抗肿瘤免疫和炎症反应中发挥关键性作用。静止 NK 细胞具有一定的杀伤活性,若 NK 细胞的有效活化,可显著增强其对肿瘤细胞的杀伤作用。本研究尝试了一种体外显著提高猪 NK 细胞的诱导培养方法,可以为抗肿瘤免疫及其机制研究提供足够量的效应细胞,也可以为病原微生物引起的体外细胞免疫和免疫逃逸研究提供良好的研究思路。

参 考 文 献

- [1] 彭六生. NK 细胞在胃癌中的应答调控及作用研究 [D]. 第三军医大学, 2014.
- [2] 刘军权, 朱云, 陈复兴, 等. 不同刺激因子对人 CIK 细胞功能影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 04:1021-1026.
- [3] 祝仲珍, 王占科, 傅颖媛. 肿瘤患者自体外周血 CIK/DC-CIK 细胞培养制备技术及临床应用研究进展 [J]. 实验与检验医学, 2015, 03: 300-303.
- [4] 贺孟来. CIK 细胞制备方法的研究进展 [J]. 中国医药指南, 2011, 13:208-209.
- [5] Pintaric M, Gerner W, A. Saalmuller A. Synergistic effects of IL-2, IL-12 and IL-18 on cytolytic activity, perforin expression and IFN-gamma production of porcine natural killer cells [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2008. 121(1-2): 68-82.
- [6] Thierry A, Robin A, Giraud S, et al. Identification of invariant natural killer T cells in porcine peripheral blood [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2012. 149(3-4): 272-279.
- [7] Talker SC, Käser T, Reutner K, et al. Phenotypic maturation of porcine NK- and T-cell subsets [J]. Dev Comp Immunol, 2013, 40: 51-68.
- [8] Gerner W, Kaser T, Saalmuller A. Porcine T lymphocytes and NK cells—an update [J]. Dev Comp Immunol, 2009. 33(3): 310-320.
- [9] 张素华, 林丹丹, 张美娟, 等. Ficoll 密度梯度离心法分离猪外周血单个核细胞条件的探讨 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2007, 19(3):192-195.
- [10] 桑明, 代明, 周立, 等. 恒河猴外周血单核巨噬细胞体外培养方法的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(1): 18-24
- [11] 韩建强, 许文花, 高斌. 猪 GAPDH 基因实时荧光定量 PCR 方法的建立 [J]. 西南农业学报, 2010, 23(4): 1282-1285.

仙台病毒 RT-LAMP 可视化检测方法的建立

周洁¹, 赵丽娟^{1,2}, 陶凌云¹, 倪丽菊¹, 高诚^{1*}, 陈洪岩^{3*}

(1. 上海实验动物研究中心, 上海 201203; 2. 扬州大学兽医学院, 扬州 225009;
3. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心, 哈尔滨 150001)

【摘要】 目的 建立一种快捷、灵敏的检测方法, 即反转录-环介导等温扩增方 (RT-LAMP) 用于仙台病毒 (SeV) 的检测。**方法** 根据 GenBank 公布的 SeV 序列 (DQ219803.1), 在其保守区域设计了六套 LAMP 引物, 利用 LAMP Real-Time Turbidimeter LA-320C 仪监测反应进程并筛选最佳引物、反应条件, 建立对 SeV 核酸进行特异性扩增的 RT-LAMP 检测方法, 并可通过加入目测荧光检测试剂肉眼判断结果。对所建立的方法进行了敏感性、特异性评估并对 92 份样品进行了检测。**结果** 该方法在 63℃ 恒温下作用 60 min, SeV RNA 获得了高效率的特异性扩增, 与其余常见小鼠病毒无交叉反应; 最低检出量为 2.1 TCID₅₀ SeV, 比 RT-PCR 方法高 10² 倍; 肉眼判断结果与 Real-Time Turbidimeter LA-320 仪监测结果一致; 通过对 92 份样品的 RT-LAMP, RT-PCR 和间接 ELISA 方法的检测比对, 三者符合率为 100%。**结论** 建立的 SV RT-LAMP 检测方法具有快速、特异、灵敏, 操作简单的特点, 具有良好的应用前景。

【关键词】 仙台病毒; RT-LAMP; 实时监控; 快速检测

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0293-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.015

Establishment of a visualized detection method of Sendai virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification

ZHOU Jie¹, ZHAO Li-juan^{1,2}, TAO Ling-yun¹, NI Li-ju¹, GAO Cheng^{1*}, CHEN Hong-yan^{3*}

(1. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China; 2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009; 3. Experimental Animal Center, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001)

【Abstract】 Objective To establish a simple and sensitive detection method of Sendai virus (SeV) by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) technique. **Methods** According to the published GenBank sequences (DQ219803.1), six pairs of primers were designed targeting the conserved region of SeV. The amplification products were detected with a LAMP real-time Turbidimeter. (LA-302). Through optimizing the LAMP primers and reaction conditions, a rapid and specific detection method of SeV was established. Meanwhile, the amplified products were colored by fluorescence detection reagent after completion of the reaction, so that the amplification could be visualized and detected by naked eyes. Then, methodological evaluation of the RT-LAMP was tested. **Results** The method of RT-LAMP showed a highly efficient amplification for SeV viral target gene which was performed at 63℃ for 60 min with the LAMP real-time Turbidimeter (LA-302). The detection limit was 2.1 TCID₅₀, 100 times higher than that of RT-PCR, and no cross-reaction with other RNA and DNA viruses of mice was observed. The results of SeV LAMP reaction was visualized and the tube could be directly observed by naked eyes with the addition of fluorescence detection reagent. The results were consistent with the results detected by real-time turbidimeter. 92 clinical samples were detected by RT-LAMP, RT-PCR and indi-

【基金项目】 上海市科委科技创新行动计划 (11140901000); 上海市科委研发平台专项 (15DZ2292400)。

【作者简介】 周洁 (1978 -), 女, 博士, 副研究员, 主要从事动物病毒分子生物学及免疫学方面的研究。Email: zhoujie0526@163.com。

【通讯作者】 高诚 (1961 -), 男, 研究员。Email: gaochengdgb@126.com。陈洪岩 (1963 -), 男, 研究员。Email: chenhongyan@caas.cn。

rect ELISA, and the coincidence rate was 100%. **Conclusions** This established SeV RT-LAMP detection method is fast, specific, highly sensitive, easy to perform under simple conditions, and is suitable for rapid detection of Sendai virus.

【Key words】 Sendai Virus; RT-LAMP; Real time; Rapid detection

Corresponding author: GAO Cheng, E-mail: gaochengdgb@126.com; CHEN Hong-yan, Email: chenhongyan@caas.cn

仙台病毒(Sendai virus, SeV)又名 hemagglutinating virus of Japan(HVJ),是引起啮齿类动物呼吸系统疾病的主要病原之一,一年四季均可发病,但以春季多发,具有传染性强等特点,在多数情况下呈隐性感染,难以从群体中清除。鼠群感染后可导致孕鼠繁殖率下降,新生仔死亡率增加。SeV 是清洁级及以上等级实验用鼠的必检项目,同时它也可感染灵长类动物^[1,2]。目前 SeV 项目的检测普遍采用国标推荐的间接 ELISA 方法检测血清抗体,ELISA 方法具有快捷、方便、敏感、易于大批量检测和标准化等优点,无疑是较为理想的检测方法,在今后相当长一段时间内,间接 ELISA 方法还将是实验动物病毒检测的主流。但该方法不适用于裸小鼠和转基因小鼠的检测。裸小鼠即无胸腺的免疫缺陷小鼠,是医学生物学研究领域不可缺少的实验动物模型,特别是在肿瘤学、免疫学、药品与生物制品的安全性评价及有效药品的筛选等实验方面有着特殊的价值^[3]。因裸小鼠有免疫缺陷,因此感染病毒后不易产生抗体,用 ELISA 方法检测裸鼠的病毒抗体易产生假阴性。在我们日常检测工作中还发现转基因小鼠存在非特异性抗体增高的现象,即特异性抗原孔 A 值增高的同时,对照孔的 A 值也同时增高,说明用间接 ELISA 方法检测转基因小鼠病毒抗体的本底值较高,易产生假阳性。因此亟需建立一种高效、便捷、稳定的直接检测抗原的方法,以便应用于所有类型小鼠的检测。

环介导恒温扩增法(即 LAMP 法)是日本学者 Notomi 等^[4]在 2000 年发明一种新型的核酸扩增新技术。其特点是针对靶基因的 6 个区域设计 4~6 条特异引物,利用一种链置换 DNA 聚合酶在等温条件(63℃左右)下作用 30~60 min,即可完成核酸的扩增反应。其扩增效率可达到 $10^9 \sim 10^{10}$ 个拷贝数量级。与常规 PCR 相比,不需要模板的热变性、温度循环、电泳及紫外观察等过程。LAMP 技术自开发以来已广泛应用于细菌、病毒的定性定量检测,临床疾病的诊断,动植物中致病微生物的检测,胚胎性别鉴定等相关领域^[5-8],由于 LAMP 反应产生副产物焦磷酸镁白色沉淀,其浊度与所含的 DNA 量成正比,根据这一特性,日本研制出专门用于 LAMP 检测

的实时监控浊度仪,可以实现对 LAMP 扩增过程的全程实时监控^[9]。本研究利用 LAMP Real Time Turbidimeter LA-320 仪实时监测 RT-LAMP 反应进程,筛选到最佳反应体系,建立了针对 SeV 的 RT-LAMP 检测方法。所建立反应体系具有良好的特异性,敏感快捷,其结果分析与肉眼可视化判定的一致性,具有推广应用的前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒及待检材料

BHK-21 细胞、SeV 病毒天津株、小鼠细小病毒(MVM)、鼠痘病毒(Ect)、小鼠肺炎病毒(PVM)、呼肠孤病毒 3 型(Reo-3)和小鼠肝炎病毒(MHV)种毒均购自中国药品生物制品检定所,由上海实验动物研究中心增殖保存;现地试验样品为上海实验动物质量监督检验站检测的客户送检样品,采样在上海实验动物质量监督检验站屏障动物实验设施进行【SYXK(沪)2013-0056】。

1.1.2 主要试剂及仪器

胎牛血清(Gibco)、QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen);Loopamp RNA Amplification Kit、Loopamp® Fluorescence Detection Reagent、Loopamp® Reaction Tube Detection Reagent、LAMP real-time turbidimeter (LA-302)仪(日本荣研株式会社)。

1.2 实验方法

1.2.1 病毒核酸的提取

用 QIAamp Viral RNA Kit 试剂盒提取总 RNA, QIAamp® DNA Mini Kit 试剂盒提取总 DNA,具体操作方法参照说明书。

1.2.2 引物设计与合成

参照 GenBank 中 SeV 的全基因组序列(DQ219803.1),用 BioEdit 软件进行分析后选择 120nt-1694nt 的 NP 基因保守区,利用在线软件 Primer Explorer V4 设计六套引物(包括外引物 F3/B3 和内引物 FIP 和 BIP),利用 LAMP real time turbidimeter LA-302 对不同引物对的反应进程和结果进行监测、筛选,并确定引物混合液的反应比例。

1.2.3 SeVRT-LAMP 检测反应体系的建立

根据 Loopamp RNA Amplification Kit 说明书,摸索 SeVRT-LAMP 的反应体系中各组分的浓度及比例,将含有反应液的反应管至于 LAMP real-time turbidimeter LA-302 仪器中进行等温扩增,根据该仪器预设的参考标准,设定反应速度曲线峰值超过 0.1 时判为阳性。

1.2.4 SeV RT-LAMP 反应产物的鉴定

(1)SeV RT-LAMP 产物的 LAMP real-time turbidimeter LA-302 仪鉴定:提取 SeV 细胞培养物总 RNA,用已建立的 SeV RT-LAMP 检测,同时提取 BHK-21 正常细胞作为阴性对照。利用 LAMP real-time turbidimeter LA-302 仪实时监测反应情况,以图文的形式显示反应过程中各反应速率和时间。设定有效反应时间为 1 h,即在 1 h 内当 LAMP real-time turbidimeter LA-302 仪分析线形图的线形峰值超过预定标准 0.1 时,柱形图底部显示为红色,即反应判为阳性,其中蓝色部分代表反应产物的量,数值越高表示产物的量越大。

(2)SeV RT-LAMP 产物的可视化鉴定:在反应管中预先加入荧光目视检测试剂(fluorescence detection reagent),待反应结束后用肉眼观察反应液颜色变化。阳性样品的反应液颜色呈绿色荧光,阴性无色透明。

1.2.5 SeV RT-LAMP 的特异性试验

取 SeV、MHV、Ect、PVM、MVM 和 Reo-3 等几种小鼠常见病毒的细胞培养物,用 1.2.1 的方法提取各自核酸,采用所建立的 SeV RT-LAMP 方法的引物进行特异性实验。

1.2.6 SeV RT-LAMP 的敏感度试验

将提取的 SeV RNA 进行 10 倍比稀释为 10⁰ ~

10⁻⁶的 7 个稀释度,用所建立的方法进行扩增,监测实时扩增曲线。同时针对仙台病毒保守基因 NP 蛋白序列设计 PCR 引物如下(产物长度为 766 bp):

F: 5'-GGAGTAAACGCCGATGTCAAA-3'
R: 5'-GCTGCATTGCCTTGTCTCTGTA-3'

将倍比稀释 7 个样本进行 RT-PCR 扩增,对两种方法的结果进行比较。

1.2.7 SeV RT-LAMP 的现地试验

对本站送检的 92 份小鼠样品采集全血,提取核酸用所建立的 RT-LAMP 方法、RT-PCR 以及间接 ELISA 诊断试剂盒进行检测,比较三种方法的试验结果。

2 结果

2.1 SeV RT-LAMP 引物的筛选及反应体系建立

用在线软件 Primer Explorer V4 设计 6 套引物,按照 Loopamp RNA

Amplification Kit 设定 25 μL 反应体系:2 × 反应缓冲液(RM) 12.5 μL、FIP(40 pmol/L) 1 μL、BIP(40 pmol/L) 1 μL、F3(5 pmol/L) 1 μL、B3(5 pmol/L) 1 μL、酶溶液(EM) 1 μL、去离子水 2.5 μL、SeV-A RNA 模板 5 μL。LAMP real-time Turbidimeter LA-302 仪 63℃ 扩增时间 1 h。浊度仪实时跟踪结果柱状图(见图 1)显示 Block A 中的 1、2 和 3 号孔扩增反应明显,4、5 和 6 号孔有不同程度的扩增,阴性对照无扩增反应。而浊度仪实时跟踪结果曲线图显示仅 1、2 和 3 号孔在 60 min 内出现了阳性峰值,且以 1 号孔扩增效率最高,因此选定 1 号孔对应引物为本方法的工作引物(表 1)。

表 1 SeV RT-LAMP 引物序列
Tab.1 Sequences of the primers used for RT-LAMP detection of SeV

引物 Primers	序列 Sequences
F3	5'-CATCTTAATAACGGGTGCTG-3'
B3	5'-CCAATAGGTCATGTCAACTGTA-3'
FIP	5'-TGTGATTTCCAAATCCAAAGTGGATATAATGGAATCTCCACAGGA-3'
BIP	5'-ACAAATTGATCTATGATCCCGATCCGACATCTCTGACCTTGCTAA-3'

2.2 SeV RT-LAMP 的可视化鉴定比较

从仪器监控的反应进程(见图 2)可见,SeV 反应体系在 32 min 左右启动,峰值超过 0.1,阴性对照无反应,结果与预期相符。反应结束后用肉眼观察,SeV 的反应颜色呈绿色荧光,阴性对照无色透明(见图 3),与 real-time turbidimeter LA-302 仪监测结果一致,

表明添加 FD 后所呈现的颜色反应具有特异性。

2.3 SeV RT-LAMP 的特异性试验

以 SeV 为阳性对照,RNA 洗脱液为阴性对照,检测 PVM、Reo-3、MHV、MVM 和 Ect 等病毒,结果(见图 4)显示只有 SeV 检测结果为阳性,其余病毒均为阴性,表明所选引物对 SeV 具有强特异性。

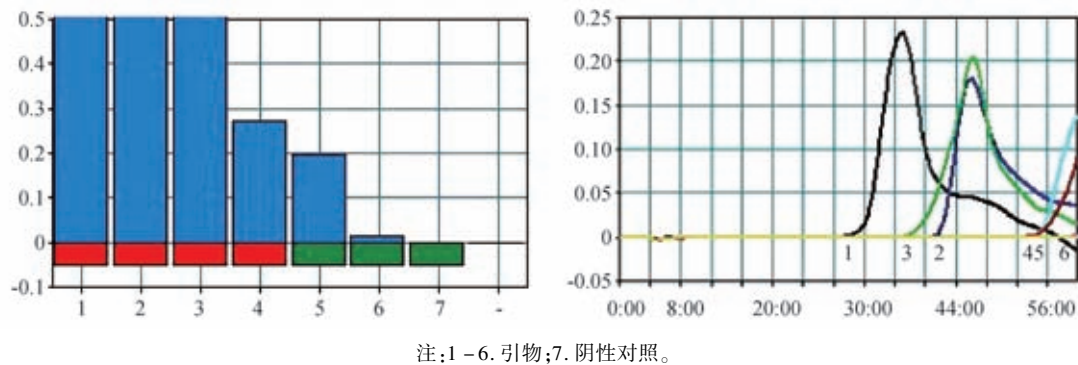
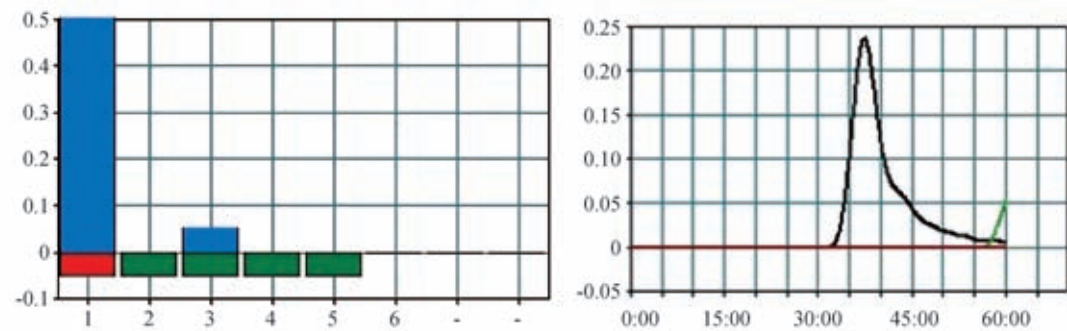


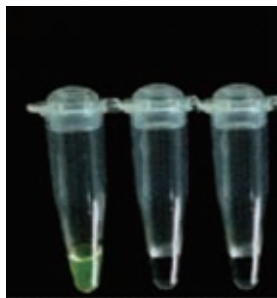
图1 SeV RT-LAMP 引物的 Real Time Turbidimeter LA-302 仪筛选结果
Note: 1-6. Primers; 7. Negative control.

Fig. 1 Screening results of SeV RT-LAMP primers by real-time turbidimeter LA-302



注: 1. SeV 细胞培养物; 2. 阴性对照; 3. BHK-21 正常细胞对照。
图2 SeV RT-LAMP 产物的 real-timeLA-320 Turbidimeter 仪鉴定分析
Note. 1. SeV strains; 2. Negative control; 2. BHK-21 cell lines.

Fig. 2 Analysis of the SeV RT-LAMP products identified by real-time turbidimeter



注: 1. SeV 细胞培养物; 2. BHK-21 正常细胞对照;
3. 阴性对照。

图3 RT-LAMP 反应体系加入目测荧光染料显色

Note. 1. SeV strains; 2. BHK-21 cell lines; 3. Negative control.

Fig. 3 Visualization of the RT-LAMP reaction products by fluorescence detection reagent

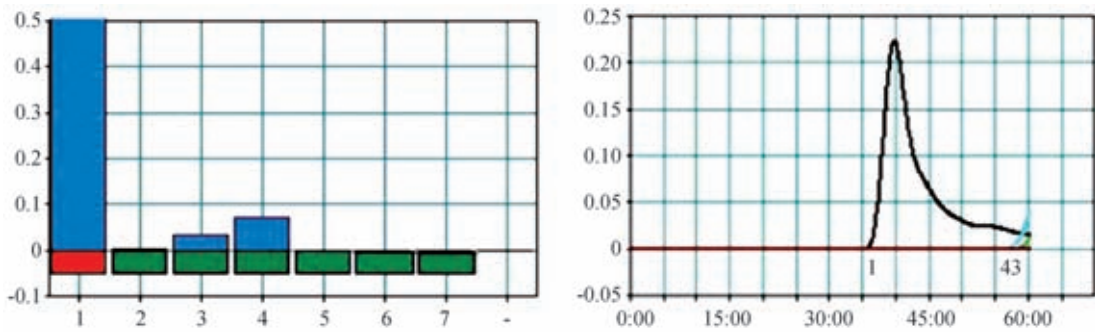
2.4 SeV RT-LAMP 的灵敏度试验

提取病毒滴度为 0.21×10^5 TCID₅₀ 的 SeV 细胞培养物中总 RNA,测定其浓度为 86 ng/ μ L,进行 10 倍比稀释为 $10^0 \sim 10^{-6}$ 的 7 个稀释度,用所建立的 SeV RT-LAMP 方法进行扩增,LAMP Real Time Tur-

bidimeter (LA-302) 的监测曲线(见图 5)显示,1 号孔到 3 号孔都有显著的扩增,4 号孔有一定程度的扩增。在 1 h 时间内,随着模板浓度的降低,扩增时间逐渐延后,但扩增斜率基本保持不变,4 号孔相对较为滞后,在 68 min 左右峰值超过 0.1。结果显示 4 号孔即 8.6×10^{-3} ng/ μ L 为其最低检出量。上述 7 份样品的 RT-PCR 检测结果(见图 6),当 RNA 浓度稀释至 0.86 ng/ μ L 时 RT-PCR 方法能检出,经测序证实检出片段正确。由此可见 RT-LAMP 方法的敏感性明显高于 RT-PCR 方法。

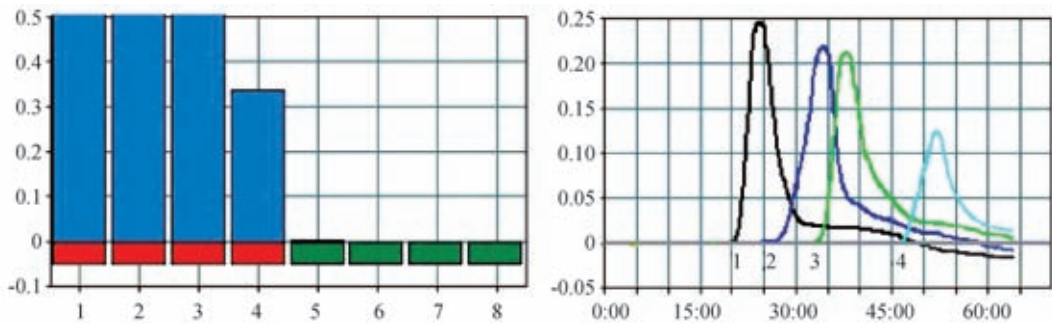
2.5 SeV RT-LAMP 的现地试验

上海实验动物质量监督检验站送检的 92 份小鼠样品采集全血,提取核酸用所建立的 RT-LAMP 方法、RT-PCR 进行检测,血清用间接 ELISA 诊断试剂盒进行检测,其中 RT-LAMP 和 RT-PCR 方法各检出阳性 4 份,二者符合率 100%;间接 ELISA 方法根据 EBI 试剂盒说明书判定标准检出阳性 4 份,弱阳性 1 份(判为疑似),用中国生物药品鉴定所小鼠仙台病毒试剂盒重复检测检出阳性样品为 4 份,与其



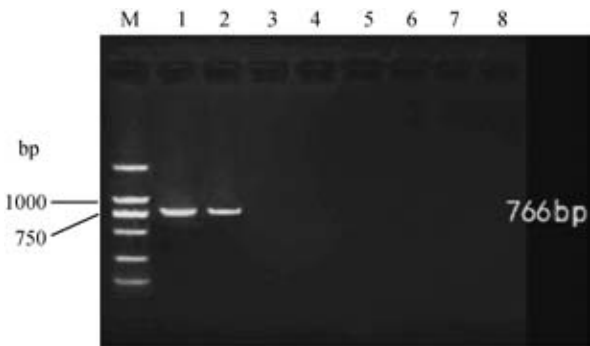
注：1. SeV；2. MHV；3. Ect；4. PVM；5. MVM；6. Reo-3；7. 阴性对照。
图 4 特异性试验 SeV LAMP 的 Real Time Turbidimeter LA-302 分析
Note. 1: SeV; 2: MHV; 3: Ect; 4: PVM; 5: MVM; 6: Reo-3; 7: Negative control.

Fig. 4 Specific test of SeV LAMP with a LA-320 real-time turbidimeter



注：1 ~ 7. $10^0 \sim 10^{-6}$ 稀释度的 SeV；8. 阴性对照。
图 5 不同稀释度的 SeV RT-LAMP Real Time Turbidimeter (LA-302) 分析
Note. 1 ~ 7: $10^0 \sim 10^{-6}$ serial dilutions of SeV; 8: Negative control.

Fig. 5 Validation of SeV RT-LAMP assay by serial dilutions of virus with a turbidimeter (LA-320)



注：M. DL2000 marker; 1 ~ 7. $10^0 \sim 10^{-6}$ 稀释度的 SeV；8. 阴性对照。
图 6 不同稀释度 SeV 的 RT-PCR 检测
Note. M. DL2000 marker; 1 ~ 7. $10^0 \sim 10^{-6}$ serial dilutions of SeV; 8. Negative control.

Fig. 6 RT-PCR detection of of SeV in different dilutions

余两种方法符合率 100%，经过对样品编号核实，EBI 试剂盒检出弱阳性样品为转基因小鼠，其弱阳性结果可能为非特异性本底增高。从反应时间看，所建 RT-LAMP 方法全程反应仅 1 h，其效率远远超过其余两种方法。

3 讨论

核酸检测对于仙台病毒早期检测以及转基因小鼠、免疫缺陷小鼠的检测等有着重要的意义，本研究旨在通过建立一种新型的核酸检测方法，从而让仙台病毒在实验动物质量监控领域的检测变得更为精准便捷。LAMP 方法相比较传统 PCR 而言有着检测更迅速、灵敏，适用于各种实验条件（尤其是县市基层）的快速检测使用等优点，因而有很大潜力。

由于 LAMP 反应高效的特点，一般在较低的反应速率下仍可产生大量的产物，而低反应速率和 LAMP 反应的原理矛盾，属于假阳性反应。目前多数建立的 LAMP 反应方法多采用琼脂糖凝胶电泳紫外线分析显像来判定结果，只能分析 LAMP 反应的最终结果，且存在气溶胶污染实验室的危险，由于缺乏对反应的实时监控很难排除这些干扰因素，不能对检测结果做出准确的判定^[10]。而本研究在建立方法的过程中采用 real-time Turbidimeter (LA-320) 混浊仪进行实时监控。其原理是通过加热使 LAMP

反应进行,同时在反应管一侧装有 650 nm 的发光二极管(LED),控制入射光强度,在其相对一侧装有光电二极管(photodiode,PD),检测射光强度,由于 LAMP 反应中生成副产物白色硫酸镁沉淀,造成光强度差异。在计算机联机软件上,通过调整反应基线和每 6 s 检测一次浊度,用自动设定临界值的方式由 LAMP real-time turbidimeter (LA-302) 仪给出的 Ct 值与 RNA 的拷贝数之间存在较好的线性关系。当实时浊度判断曲线超过阈值时即判断为阳性,否则为阴性,因此,这种方式不但可以实时监控,也可以进行模板核酸的定量^[9,11,12]。使用该仪器可以直观、实时的观察反应的进行情况,并通过设置分析标准可以排除假阳性和非特异反应等干扰因素,同时也可避免 LAMP 产物开盖电泳检测对实验室污染的威胁。

与早期核酸检测方法相比,RT-LAMP 可通过一步法完成且反应在等温条件下进行,没有核酸的变复性过程,既节省了时间又减少了 RNA 酶和扩增核酸的污染机会^[13]。更重要的是,扩增反应只有在六条引物完全与识别的靶序列中八个结合区匹配的情况下才能顺利进行,所有这些特性在很大程度上减少了扩增反应背景,使检测特异性得到改善^[14]。

引物的设计及筛选是成功建立 RT-LAMP 方法的关键,本实验针对仙台病毒 N 基因的保守序列设计了 6 组引物,扩增结果显示其中 4 组引物均可用于检测,根据实时监控曲线最终确定了启动时间最早峰值最高的 1 号引物组为最优引物。敏感性与特异性实验结果显示对于仙台病毒的检测,RT-LAMP 扩增敏感性比 RT-PCR 扩增技术提高了 2 个数量级,且特异性良好,与常见的几种小鼠病毒均不发生交叉反应。LAMP 扩增过程中产生大量的焦磷酸镁沉淀使反应液呈现浑浊,在反应管中预先加入荧光目视检测试剂,阳性样品呈现肉眼可见的绿色荧光,可直接观察无需琼脂糖凝胶电泳从而进一步防止气溶胶的污染。

本实验用所建立的方法与间接 ELISA 方法及 RT-PCR 方法对上海市质量监督检验站送检的 92 份小鼠样品同时检测并对结果进行了比较。三种方法的阳性检出率 100% 符合,但由于样品数量(尤其是阳性样品的数量)有限,并不能完全体现统计学价值,在今后 SeV 的检测工作中将继续进行 RT-LAMP 与其余检测方法的比较研究。任何一种方法都具优缺点,间接 ELISA 方法检测血清中抗体,简便快捷,可以满足常规动物检测需要;而 RT-LAMP

和 RT-PCR 检测抗原,因此对于发病早期尚未产生抗体的动物、免疫缺陷不易产生抗体的动物以及在检测时易发生 A 本底值升高的转基因动物,采用抗原检测方法更为准确。LAMP 法最大的弊端在于实验中对于污染控制要求极为严格,本研究所建立方法采用浊度仪实时监控并用目测法判定结果,尽量降低了开盖跑胶造成污染的可能性,该方法操作简便、敏感性特异性好,便于推广,进一步优化、完善后在仙台病毒的检测方面有一定应用潜力。

参 考 文 献

- [1] 田克恭. 实验动物病毒性疾病[M]. 北京:农业出版社,1991. 57-64.
- [2] 刘春燕, 张媛媛, 姚薇, 等. 仙台病毒在儿童急性呼吸道感染中的血清学调查[J]. 天津医科大学学报, 2004, 10(3): 378-379.
- [3] 李厚达. 实验动物学[M]. 北京:中国农业科学出版社. 2003.
- [4] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucl Acids Res, 2000, 28(12): E63.
- [5] 秦智锋, 曾少灵, 阮周曦, 等. 口蹄疫病毒 RT-Lamp 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(5): 375-378.
- [6] Boubourakas IN, Fukuta S, Kyriakopoulou PE, et al. Sensitive and rapid detection of peach latent mosaic viroid by the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. J Virol Methods, 2009, 160(1-2): 63-68.
- [7] 王建峰, 黄素文, 刘思国, 等. 牛副结核分枝杆菌 LAMP 快速检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(7): 555-557.
- [8] 赵丽娟, 周洁, 高诚, 等. 环介导等温扩增技术及其应用[J]. 实验动物与比较医学, 2014, 34(2): 162-166.
- [9] Mori Y, Kitao M, Tomita N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA[J]. J Biochem Bioph Methods, 2004, 59: 145-157.
- [10] 刘业兵, 张磊, 宁宜宝, 等. 猪细小病毒 LAMP 检测方法的建立[J]. 中国农业科学, 2010, 43(14): 3012-3018.
- [11] Fukuda S, Takao S, Kuwayama M, et al. Rapid detection of norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44, 1376-1381.
- [12] Parida M, Posadas G, Inoue S, et al. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus[J]. Clin Microbiol, 2004, 42: 257-263.
- [13] Nie XZ. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of potato virus Y[J]. Plant Dis, 2005, 89: 605-610.
- [14] 李启明, 马学军, 高寒春, 等. 逆转录环介导等温核酸扩增技术(RT-LAMP)在 H5N1 禽流感病毒基因检测中的应用[J]. 病毒学报, 2008, 24: 178-184.

无特定病原体金定鸭微卫星 DNA 遗传多样性分析

赵丽丽[#], 陆涛峰[#], 张晓萍, 牛银杰, 陈洪岩^{*}

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001)

【摘要】 目的 利用微卫星标记对无特定病原体金定鸭群进行遗传多样性分析。**方法** 采用微卫星标记, 对 SPF 金定鸭种群中 71 个个体进行遗传多样性分析。**结果** SPF 金定鸭种群中 17 个位点上共检测到 119 个等位基因, 每个微卫星上等位基因数介于 3 ~ 13; 该 SPF 金定鸭群体中有 13 个位点 ($PIC > 0.5$) 呈现出高度多态, 平均杂合度为 (0.5816 ± 0.0142) , 其他位点均呈现出中度多态。仅有 5 个位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态, 其余 12 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 达到极显著水平 ($P < 0.01$)。**结论** 该 SPF 金定鸭群体内均存在丰富的遗传多样性, 满足建立封闭群的遗传特征, 可以利用该群体继续开展无特定病原体金定鸭封闭群的建立。

【关键词】 SPF 金定鸭; 遗传多样性; 微卫星标记

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0299-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.016

Analysis of the DNA genetic diversity in SPF Jinding duck population

ZHAO Li-li, LU Tao-feng, ZHANG Xiao-ping, NIU Yin-jie, CHEN Hong-yan^{*}

(State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Harbin 150001, China)

【Abstract】 Objective To analyze the DNA genetic diversity in SPF Jinding duck population using microsatellite markers. **Methods** The DNA genetic diversity in 71 SPF Jinding ducks were analyzed by microsatellite markers. **Results** A total of 152 alleles were detected at 17 microsatellite loci, and the numbers of alleles at each locus varied from 3 to 13. Thirteen microsatellite loci showed a high level of average PIC values ($PIC > 0.5$), the heterozygosity (H) was 0.5816 ± 0.0142 . Other loci showed a middle level of the average PIC values. Only 5 microsatellite loci were in Hardy-Weinberg equilibrium, although 12 microsatellite loci were not in ($P < 0.01$). **Conclusions** The results revealed that the genetic variabilities in the SPF Jinding duck population are rich, and this population meets to the genetic characteristics of the closed colony animals, so it can be used to establish the closed colony of SPF Jinding duck.

【Key words】 Jinding duck population; Genetic diversity; Microsatellite DNA

Corresponding author: CHEN Hong-yan, E-mail: chenhongyan@caas.cn.

金定鸭是我国著名的蛋鸭地方品种, 因其产蛋量高、体型小、饲料利用率高、杂交利用效果明显、适应性强等优点而驰名中外^[1-2]。哈尔滨兽医研究所实验动物中心从国家水禽种质资源基因库江苏省丰达水禽育种场引进祖代金定鸭种卵, 从孵化开始在屏障环境下进行病原微生物的净化。自 1 日龄起直至淘汰, 全部生命周期都饲养于隔离器中, 已经排除

了高致病性禽流感病毒、鸡新城疫病毒、禽腺病毒Ⅲ群、番鸭细小病毒、禽减蛋综合征、鹅细小病毒、鸭瘟病毒、I 型鸭肝炎病毒、鸭圆环病毒和鸭坦布苏病毒等十种病原体, 初步培育出无特定病原体金定鸭 FO 代核心群。为了了解该群的遗传多样性状况, 以便采取更有效的保种措施及更好地开发利用, 本研究采用微卫星 DNA 技术, 选用 17 个极其高度多态且

【基金项目】 中国农业科学院创新工程项目(2016350)。

【作者简介】 赵丽丽(1983-), 女, 博士, 助理研究员。研究方向: 兽医微生物和免疫学。E-mail: zhaolili213@163.com; 陆涛峰(1982-), 男, 博士, 助理研究员。研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: taofenglu@126.com。#为共同第一作者。

【通讯作者】 陈洪岩(1963-), 男, 研究员。研究方向: 实验动物学。E-mail: chenhongyan@caas.cn.

分布在不同连锁群上的微卫星标记,结合 PCR 和毛细管电泳技术,从分子水平对该群无特定病原体金定鸭的遗传多样性进行了研究,以期获得该群体的遗传学参数,为 SPF 金定鸭封闭群的培育提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本试验共采集了中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心保存的无特定病原体金定鸭 71 只,61 周龄【SCXK(黑)2011-007】,翅静脉采血。所有动物经过高致病性禽流感病毒、鸡新城疫病毒、禽淋巴白血病毒、番鸭细小病毒、禽减蛋综合征、

鹅细小病毒、鸭瘟病毒、I 型鸭肝炎病毒、鸭圆环病毒和鸭坦布苏病毒等十种病原体检测,均呈阴性,微生物检测内容在本文中没有涉及。

1.1.2 PCR 相关试剂

TaqDNA 聚合酶、dNTPs 及 100 bp DNA ladder 均购自大连宝生物有限公司。

1.1.3 微卫星引物

参照文献报道,选择了 17 对微卫星标记用于鸭的遗传多样性分析^[3,5,8]。为了实现微卫星多态性的荧光半自动检测,对引物进行了荧光修饰,本研究选择了适用于 ABI3130XL 下光栅 CCD 荧光检测系统的三种荧光集团,即 FAM(蓝色)、HEX(绿色)、和 LIZ(橙色),其中 LIZ 为分子量内标。所用引物和组合见表 1。

表 1 17 个鸭微卫星位点的相关信息

Tab.1 The information of 17 microsatellite loci in the ducks

微卫星标记名称 Name of microsatellite loci	引物序列(5'-3') Sequences of primers(5'-3')	片段范围/bp Fragment size	荧光标记 Fluorescence labeling	退火温度/℃ Annealing temperature
CAUD004	TCCACTTGGTAGACCTTGAG TGGGATTCACTGAGAAGCCT	202-222	HEX	62
CAUD011	TGCTATCCACCCAATAAGTG CAAAGTTAGCTGGTATCTGC	129-142	HEX	52
CAUD013	ACAATAGATTCCAGATGCTGAA ATGTCTGAGTCTCTCGGAGC	87-105	6FAM	58
CAUD023	CACATTAACTACATTTCGGTCT CAGCCAAAGAGTTCAACAGG	164-167	6FAM	52
CAUD026	ACGTCACATCACCCACAG CTTTGCCCTCTGGTGAGGTTT	142-152	6FAM	61
CAUD035	GTGCCTAACCCCTGATGGATG CTTATCAGATGGGGCTCGGA	221-239	6FAM	63
CAUD032	GAAACCAACTGAAAACGGGC CCTCCTGCGTCCCAATAAG	118-126	6FAM	58
CAUD027	AGAAGGCAGGCAAATCAGAG TCCACTCATAAAAAACCCACA	112-122	HEX	64
APH08	AAAGCCCTGTGAAGCGAGCTA TGTGTGTGCATCTGGGTGTGT	176-187	HEX	53
APH13	CAACGAGTGACAATGATAAAA CAATGATCTCACTCCCAATAG	243-255	HEX	56
APH18	TTCTGGCCTGATAGGTATGAG GAATTGGGTGGTTCATACTGT	149-153	6FAM	58
APH20	ACCAGCCTAGCAAGCACTGT GAGGCTTTAGGAGAGATTGAAAA	166-172	HEX	58
APH25	CCGTCAGACTGTAGGGAAGG AAAGCTCCACAGAGGCAAAG	102-114	6FAM	59
APH09	GGATGTTGCCCCACATATTT TTGCCTTGTTTATGAGCCATTA	104-130	6FAM	58
APH21	CTTAAAGCAAAGCGCACGTC AGATGCCCCAAAGTCTGTGGT	132-139	6FAM	59
APH22	GTTATCTCCCACTGCACACG CGACAGGAGCAAGCTGGAG	148-158	6FAM	58
APH15	CCGTCAGACTGTAGGGAAGG AAAGCTCCACAGAGGCAAAG	174-180	6FAM	60

1.2 方法

1.2.1 血液基因组 DNA 的提取采用常规的酚氯仿抽提法

1.2.2 PCR 扩增

PCR 总反应体积为 25 μL , 其中 10 $\times$ PCR buffer、dNTP、Taq 酶按照不同试剂盒的推荐量加入, 上下游引物 (100 pmol/ μL) 各 1 μL , 基因组 DNA:1 μL , 用纯水 (ddH₂O) 补足体系到 25 μL 。

PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性, 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性, 40 s; 退火温度 (各位点退火温度参见表 B), 40 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸, 40 s; 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 5 min; 扩增产物 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 PCR 产物的检测

PCR 产物, 经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳以及凝胶成像系统拍照检测扩增结果。

1.2.4 扩增产物的 STR 扫描

扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳检测确保扩增出目的片断后, 选择分别以 FAM、HEX、TAMRA 标记的三个位点的扩增产物, 以 1:1.5:1.5 体积比混合, 取 1 μL 上样进行 STR 扫描。荧光引物合成和 STR 扫描均由金唯智公司完成。

1.2.5 数据分析

本研究中采用 Excel Microsatellite Toolkit (version 3.1) 软件计算群体内各位点的等位基因数 (Na) 和多态信息含量 (PIC)、群体的期望杂合度 (He) 和观察杂合度 (Ho); 利用 GENEPOP version 3.4 软件进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。

2 结果与分析

2.1 等位基因及基因频率

该金定鸭群体在 17 个微卫星位点上的等位基因及等位基因频率情况如表 2 所示。结果表明, 金定鸭群体在 17 个位点上共检测到 119 个等位基因, 所有位点中等位基因数最多的为 13 个, 最少的为 3 个。大部分位点上检测到的等位基因数都接近于文献报道^[5,10]。每个位点上存在一个或极少数优势等位基因, 这些优势等位基因可能是品种间或种内较为保守的等位基因, 同时在部分位点也存在一些低频率的等位基因, 依据文献报道^[3,5,8]我们选取的微卫星全部为二核苷酸重复序列, 但在许多位点上检测到了单碱基的差异, 说明在这些位点的侧翼序列中可能存在着一定程度的单核苷酸多态性。

2.2 杂合度、多态信息含量及有效等位基因数

17 个微卫星位点在金定鸭群体中的多态信息含量 (PIC)、群体的期望杂合度 (He) 和观察杂合度 (Ho) 见表 3。结果表明, 该金定鸭群体中有 13 个位点 (PIC > 0.5) 呈现出高度多态, 平均杂合度为 (0.5816 $\pm$ 0.0142), 其他位点均呈现出中度多态。上述信息均表明群体内遗传多样性较高, 各位点多态性较好, 遗传多样性水平基本相当。依据 Botstein 等首先提出的衡量基因变异程度高低的多态信息含量 (PIC) 指标, 表明所选位点具有较高的多态性, 适于鸭的遗传学分析。

2.3 Hardy-Weinberg 平衡

使用 GENEPOP 软件对金定鸭群体中 17 个微卫星位点的 Hardy-Weinberg 平衡状态进行检验, 统计结果如表 4 所示。结果显示, 仅有 5 个位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态, 其余 12 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 达到极显著水平 ($P < 0.01$), 表明该群体在培育过程中受到明显的选择效应, 与该群体的遗传背景相符合。

综上所述, 该 SPF 金定鸭群体在所选的 17 个微卫星位点上表现出较高的多态性, 表明这些位点能用于封闭群金定鸭遗传质量评价。同时, 该群体在一些位点上表现出偏离哈代-温伯格平衡的现象, 表明该群体在培育过程中受到了人工选择的压力, 这也与该群体的遗传背景相一致。因此, 该群体经过基于微卫星标记的遗传质量检测, 表明该群体符合封闭群的遗传特征, 可以利用该群体继续开展无特定病原体金定鸭封闭群的建立。

3 讨论

微卫星 DNA (microsatellite) 是上世纪 80 年代末发展起来的一种新型遗传标记。由于其具有在基因组中分布广泛、多态性高、易于检测、共显性遗传等优点, 因此在评价遗传多样性、构建遗传连锁图谱、绘制系统发生树、疾病诊断和亲子鉴定方面显示出巨大优势, 并在动植物的遗传研究中得到了广泛应用^[7,8], 同时也被作为一种重要、成熟的遗传学检测工具广泛应用于各类实验动物遗传质量检测研究中^[9,10]。目前, 微卫星 DNA 扩增产物的电泳分型方法有琼脂糖电泳、聚丙烯酰胺电泳和毛细管电泳等。毛细管电泳技术是将荧光标记的 PCR 产物和标准分子量样品 (内参) 在同一毛细管中进行电泳, DNA 分析仪将结果自动记录在计算机上, 利用片段分析

软件进行图像收集和分析,精确计算出微卫星等位基因片段的大小。毛细管电泳检测 PCR 产物具有微量、高度自动化、结果更加准确等明显优势,是微卫星检测的发展方向。

表 2 17 个鸭微卫星位点等位基因数及等位基因频率

Tab.2 Allele size and corresponding frequencies at 17 microsatellite loci in the ducks								
基因座 Loci	等位基因数 Number of alleles	等位基 因频率 Allele frequency	基因座 Loci	等位基因数 Number of alleles	等位基 因频率 Allele frequency	基因座 Loci	等位基因数 Number of alleles	等位基 因频率 Allele frequency
APH08	100	1. 41	APH22	150	0. 70	CAUD026	167	1. 41
	105	20. 42		152	10. 56		168	33. 80
	106	0. 70		158	88. 73		169	12. 68
	107	24. 65		APH25	167	1. 41	170	0. 70
	109	0. 70			168	59. 15	171	0. 70
	110	2. 11			169	19. 72	172	0. 70
	111	42. 25			170	6. 34	195	2. 11
	113	7. 75			171	6. 34	203	14. 08
APH09	101	5. 63	CAUD004	172	3. 52	CAUD027	204	4. 93
	105	14. 08		173	3. 52		209	6. 34
	107	27. 46		195	3. 52		210	12. 68
	109	1. 41		203	25. 35		211	5. 63
	124	51. 41		204	9. 86		222	4. 23
APH13	176	7. 04	CAUD011	209	12. 68	CAUD032	145	7. 75
	178	69. 01		210	26. 06		150	22. 54
	179	14. 79		211	11. 27		151	18. 31
	187	9. 15		222	11. 27		152	1. 41
APH15	166	1. 41	CAUD013	132	2. 11	CAUD035	195	2. 11
	168	76. 06		133	0. 70		203	14. 08
	169	2. 82		135	40. 14		204	4. 93
	170	11. 97		138	4. 23		209	6. 34
	171	0. 70		143	1. 41		210	12. 68
	172	7. 04		145	7. 75		211	5. 63
APH18	243	4. 23	CAUD023	145	7. 75		222	4. 23
	244	1. 41		150	22. 54		222	14. 79
	250	13. 38		151	19. 72		230	47. 89
	251	36. 62		152	1. 41		231	9. 86
	252	44. 37		132	2. 11		232	2. 11
APH20	145	8. 45	CAUD023	133	0. 70		233	6. 34
	150	41. 55		135	40. 14		237	16. 20
	151	38. 73		138	4. 23		239	2. 82
	152	11. 27		143	1. 41			
APH21	132	2. 11		151	1. 41			
	133	0. 70		152	10. 56			
	135	59. 15		158	39. 44			
	138	18. 31		164	65. 49			
	143	4. 93		166	16. 20			
	150	0. 70		172	3. 52			
	151	14. 08		183	13. 38			
				184	0. 70			
				186	0. 70			

本研究利用毛细管电泳技术,建立了 SPF 金定鸭群体遗传质量研究的方法,该方法包含了 17 个鸭微卫星位点。通过对 SPF 金定鸭种群中 71 个个体的遗传多样性分析,共检测到 119 个等位基因,每个微卫星座位上等位基因数介于 3 ~ 13 个之间,大部分位点上检测到的等位基因数都接近于文献报道^[2, 11, 12]。该 SPF 金定鸭群体中有 13 个位点 (PIC > 0. 5) 呈现出高度多态,平均杂合度为 (0. 5816 ±

0.0142),其他位点均呈现出中度多态,仅有 5 个位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,其余 12 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡,达到极显著水平($P < 0.01$)。结果表明,该 SPF 金定鸭群体在所选的 17 个微卫星位点上表现出较高的多态性,说明这些位点能用于封闭群金定鸭遗传质量评价。同时,该群体在一些位点上表现出偏离哈代-温伯格平衡的现象,表明该群体在培育过程中受到了人工选择的压力,这也与该群体的遗传背景相一致。

表 3 17 个鸭微卫星位点遗传变异参数

Tab.3 Genetic variations at 17 microsatellite loci in the ducks

基因座 Loci	群体的期望 杂合度 Expected heterozygosity	观察杂合度 Observed heterozygosities	多态信息含量 Polymorphism information content
APH08	0.717311	0.647887	0.666807
APH09	0.641594	0.633803	0.581301
APH13	0.491959	0.323944	0.454286
APH15	0.404056	0.380282	0.377503
APH18	0.653781	0.507042	0.583151
APH20	0.662172	0.295775	0.592729
APH21	0.597942	0.619718	0.552652
APH22	0.202877	0.225352	0.183798
APH25	0.604735	0.366197	0.564855
CAUD004	0.821197	0.070423	0.790759
CAUD011	0.74578	0.985915	0.703294
CAUD013	0.674258	1	0.610565
CAUD023	0.529318	0.295775	0.485519
CAUD026	0.82739	1	0.803725
CAUD027	0.867845	1	0.847042
CAUD032	0.74578	0.985915	0.703294
CAUD035	0.712616	0.549296	0.675964

表 4 17 个鸭微卫星位点的 Hardy-Weinberg 平衡状态

Tab.4 Hardy-Weinberg equilibrium test of 17 microsatellites in the ducks

locus	P-val	S. E.	Fis estimates	
			W&C	R&H
APH08	0.2305	0.0176	0.0974	0.117
APH09	0.9673	0.0022	0.0122	-0.0169
APH13	0	0	0.3431	0.1008
APH15	0.0176	0.0031	0.0592	0.1034
APH18	0	0	0.2257	0.2018
APH20	0	0	0.5551	0.3677
APH21	0.9748	0.0039	-0.0367	-0.0094
APH22	1	0	-0.1117	-0.0568
APH25	0	0	0.3962	0.1462
CAUD004	0	0	0.9148	0.9156
CAUD011	0	0	-0.325	-0.1098
CAUD013	0	0	-0.4882	-0.1367
CAUD023	0	0	0.443	0.1483
CAUD026	0	0	-0.2104	-0.0768
CAUD027	0	0	-0.1535	-0.0936
CAUD032	0	0	-0.325	-0.1098
CAUD035	0	0	0.2304	0.1657

综上所述,本研究对利用微卫星 DNA 标记对培育的无特定病原体金定鸭种群的遗传多样性进行了遗传质量检测,表明该群体符合封闭群的遗传特征,可以利用该群体继续开展无特定病原体金定鸭封闭群的建立。从而可以为后期实验动物无特定病原体金定鸭的培育的标准化、规模化和种子库的建立提供重要的遗传学数据和理论依据。

参 考 文 献

[1] 左正宏,陈奕欣,吕良炬. 金定鸭遗传多样性及分子标记的研究 [J]. 厦门大学学报, 2004, 43(2): 256 - 259.

[2] 苏瑛,陈国宏,龙瑞军,等. 绿头鸭与我国主要地方鸭品种遗传多样性研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(9): 899 - 906.

[3] Maak S, Neumann K, Von Lengerken G, et al. First seven microsatellites developed for the Peking duck (*Anas platyrhynchos*) [J]. *Animal Genetics*, 2000, 31: 233

[4] Maak S, Wimmers K, Weigend S, et al. Isolation and characterization of 18 microsatellites in the Peking duck (*Anas platyrhynchos*) and their application in other waterfowl species [J]. *Mol Ecol Notes*, 2003, 3: 224 - 227.

[5] 柯柳玉. 利用微卫星标记分析 7 个鸭品种的遗传多样性 [D]. 福建农林大学, 2008.

[6] Huang YH, Haley CS, Wu F, et al. Genetic mapping of quantitative trait loci affecting carcass and meat quality traits in Beijing duck (*Anas platyrhynchos*) [J]. *Genetics*, 2001, 148: 349 - 360

[7] 张于光,李迪强,肖启明,等. 微卫星技术及在动物遗传多样性研究中的应用 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2001, 27(5): 410 - 414.

[8] 肖兵兵. 利用微卫星 DNA 技术对 SPF 种禽的分子遗传学研究 [D]. 中国农业科学院, 2008.

[9] 倪丽菊,赵丽亚,赵立虎,等. 利用多重荧光 STR 技术分析上海地区 7 品系常用近交系小鼠核心群的遗传特性 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(1): 72 - 79.

[10] 郑龙,李建辉,王俊霞,等. 微卫星 DNA 标记在近交系大鼠 HFJ 和 MJ 遗传监测中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(2): 32 - 36.

[11] 袁青妍,陶争荣,李国勤,等. 绍兴鸭微卫星 DNA 遗传多样性分析 [J]. 华北农学报, 2010, 25(3): 73 - 75.

[12] 段修军,王丽华,龚道清,等. 利用微卫星标记检测金定鸭小群保种效果 [J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(9): 1159 - 1164.

[收稿日期] 2016-02-23

肝螺旋杆菌感染对 BALB/c 小鼠免疫应答干扰的初步研究

冯洁^{1,2}, 张泉¹, 谢建云², 魏晓锋², 高诚²

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009; 2. 上海实验动物研究中心, 上海 201203)

【摘要】 目的 探讨肝螺旋杆菌(*Helicobacter hepaticus*, *H. hepaticus*)感染对小鼠骨髓源树突状细胞(DC)表面分子形态和机体免疫应答的干扰。**方法** 以 *H. hepaticus* (ATCC 51450)灌饲 SPF 级 BALB/c 雄性小鼠,于末次接种后5个月体外分离培养骨髓 DC,经粒细胞-单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素-4(IL-4),刺激 DC 增殖、分化,流式细胞仪分析 DC 细胞表面分子 CD11c、CD40、CD80、MHCII 的表达率。此基础上,用新城疫病毒(NDV) ZJ1 株人工接种实验组和对照组小鼠,每周测定 NDV 血清抗体效价,比较抗体产生的差异。**结果** 实验组 MHC II 和 CD40 分子的表达率高于对照组。NDV 抗体水平第1周实验组略低于对照组;第2~5周内实验组小鼠的抗体水平平均高于对照组,差异有显著性;第6周两组小鼠血清抗体均呈下降趋势,差异无显著性。**结论** *H. hepaticus* 感染对小鼠骨髓 DC 成熟有促进作用,能提高 MHC II 和 CD40 表达水平,可促进 BALB/c 小鼠产生抗 NDV 的抗体水平。

【关键词】 肝螺旋杆菌;树突状细胞;新城疫病毒;抗体

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0304-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.017

Preliminary observation on the interference effect of *Helicobacter hepaticus* infection on the immune response in BALB/c mice

FENG Jie^{1,2}, ZHANG Quan¹, XIE Jian-yun², WEI Xiao-feng², GAO Cheng²

(1. School of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203)

【Abstract】 Objective To determine the interference effect of *H. hepaticus* infection on the functional characteristics of dendritic cell (DC) surface molecules and immune response in mice. **Methods** Male BALB/c mice were inoculated with *H. hepaticus* (ATCC 51450). Murine bone marrow-derived dendritic cells (DC) were isolated and co-cultured which were stimulated by GM-CSF and IL-4 at the fifth month after the last inoculation. Then the DCs were subjected to FACS analysis for surface markers (CD11c, CD40, CD80 and MHCII) detection. On this basis, virus suspension of Newcastle disease virus(NDV) ZJ1 strain was inoculated into the mice. Serum was collected for detection of the NDV antibody titer in serum weekly to explore the difference of antibody titer between the two groups. **Results** The expression rates of CD40 and MHCII on the mouse DCs in experimental group were higher than that in the control group. The NDV antibody titer of experimental group was slightly lower than that in the control group in the first week. During the 2nd to 5th weeks, the titer was higher than that in the control group, with a very significant difference. In the 6th week, the titer of both the two groups tended to fall. **Conclusions** *H. hepaticus* infection can promote bone marrow DC maturation in mice, stimulate the expression rates of MHC II and CD40, and enhance the NDV antibody levels.

【Key words】 *Helicobacter hepaticus*; Dendritic cells; Newcastle disease virus, NDV; Antibody; Immune response; Mice

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

【基金项目】上海市科技创新行动计划(14140900600,11140901000);上海市科委研发平台专项(15DZ2292400)。

【作者简介】冯洁(1981-),女,副研究员,E-mail: moyifj@163.com

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

肝螺旋杆菌(*Helicobacter hepaticus*, *H. hepaticus*)属于革兰阴性菌,呈螺杆菌或弯曲状,生长要求苛刻,最早发现于发生肝细胞癌和慢性活动性肝炎的 A/J Cr 小鼠肝脏(Fox 等,1992)^[1]。*H. hepaticus* 可长期定植于啮齿类动物的肝脏和盲肠,引起慢性肝炎、肝癌、结肠炎和盲肠炎,病变的严重程度与动物的品系、年龄、性别等因素有关^[2-4],使用携带 *H. hepaticus* 的实验动物进行科学研究时,可能会干扰实验结果。

树突状细胞(dendritic cell, DC)是重要的抗原提呈细胞(APC),成熟 DC 具有强大的抗原呈递功能并刺激 T 细胞活化,介导机体免疫应答^[5]。本研究通过对 BALB/c 小鼠人工感染 *H. hepaticus*,分离骨髓源 DC 细胞,经诱导后以流式细胞术检测其表面分子的表达水平。在此基础上,用新城疫病毒(NDV)ZJ1 株接种小鼠,测定血清中 NDV 抗体效价水平,从而探讨 *H. hepaticus* 感染对于小鼠骨髓源 DC 表面分子形态的影响以及对小鼠免疫功能的干扰。

1 材料与方法

1.1 菌株

H. hepaticus 标准菌株(ATCC51450),购自美国国家标准菌种保藏中心。标准菌株接种于哥伦比亚选择性血琼脂培养基,立即置于放有微需氧产气袋的密闭厌氧罐中,37℃ 培养至第 7 天,收集细菌。

1.2 病毒

灭活禽新城疫病毒(NDV)ZJ1 株,由扬州大学畜禽传染病教研室惠赠。

1.3 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠 50 只,4~6 周龄,雄性,体重 22~24 g,由扬州大学比较医学中心提供【SCXK(苏)2012-0004】。所有动物均在扬州大学比较医学中心动物房进行饲养【SYXK(苏)2012-0029】。

1.4 仪器和试剂

哥伦比亚血琼脂基础培养基、脑心浸液、脱纤维裂解马血 SR48、选择性抗生素 SR147 和微需氧产气袋(英国 Oxoid 公司),RPMI 1640(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),青链霉素(山东鲁抗医药股份有限公司),小鼠重组 GM-CSF、IL-4(美国 Peprotech 公司),CD11c、CD40、CD80、MHCII 单抗(美国 eBiosciences 公司),其他相关试剂均为国产分析纯。

Mini Spin 离心机(德国 Eppendorf 公司),超净工作台(江苏苏州净化设备厂),细胞培养 6 孔板

(美国 Corning 公司),CO₂ 恒温培养箱(德国 Heraeus 公司),流式细胞仪 FACS Aria(美国 Becton-Dickinson 公司)。

1.5 方法

1.5.1 模型建立

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 50 只,经 *H. hepaticus* 特异性 16S rRNA 基因扩增证实无 *H. hepaticus* 感染。随机分为实验组和对照组,每组各 25 只,分别饲养于隔离器。禁食 12 h 后,实验组灌饲 *H. hepaticus* 菌液 0.2 mL (1×10^8 CFU/mL),对照组灌饲等量 PBS,连续三次,每次间隔 48 h。

1.5.2 小鼠骨髓 DC 的诱导培养

实验组小鼠感染 *H. hepaticus* 后第 5 个月,根据文献^[6-8],每组各取 8 只小鼠脱颈处死,无菌取股骨和胫骨,用 RPMI 1640 培养基冲出骨髓细胞,400 目滤网过滤两次后收集细胞悬液,离心弃上清,加入 0.8% Tris-NH₄Cl 破解红细胞,离心、洗涤,以每孔 2×10^6 个细胞接种于 6 孔板,每孔加入终浓度为 50 ng/mL 小鼠重组 IL-4 和 GM-CSF 置 37℃、5% CO₂ 培养箱诱导培养。48 h 后半量换液,加入新的含 20 ng/mL 小鼠重组 IL-4 和 50 ng/mL 小鼠重组 GM-CSF 的 10% FCS RPMI 1640,继续培养,每培养 48 h 半量换液,至第 10 天弃悬浮细胞,收集半贴壁的树突状细胞(所有溶液均用无热原水配置)。对照组作同等处理。

1.5.3 DC 表面分子的流式细胞术分析

收集的细胞 1000 r/min 离心 8 min 弃上清, PBS 洗一遍后将细胞悬浮于 100 μ L PBS 中,两组细胞分别加入大鼠抗小鼠 CD11c、CD40、CD80 和 MHCII 类分子荧光标记抗体,置 4℃ 避光标记 30 min, 1000 r/min 离心 8 min,弃上清,再用 PBS 洗两次将细胞悬浮于 100 μ L PBS 中,流式细胞仪检测 DC 细胞表面分子的表达率。

1.5.4 小鼠人工接种

感染 *H. hepaticus* 后第 5 个月每组选取 15 只小鼠进行腹腔注射,每只注射 0.2 mL 灭活 NDV。分别于接种 NDV 后第 1、2、3、4、5、6 周经颌下静脉丛采血分离血清,以血凝抑制法(HI)检测血清中抗 NDV 的抗体效价。

2 结果

2.1 DC 的诱导培养

培养基中加入小鼠重组 GM-CSF、IL-4,光学显

显微镜下观察,培养 24 h 内树突状细胞悬浮生长,24 h 后可见许多小而圆的半贴壁细胞,培养 2~3 d 后培养孔底部观察到细胞集落,且细胞集落随着培养时间的延长变多。培养至第 7 天,细胞呈悬浮生长且集落增多,高倍镜下可见细胞集落增多,细胞周围呈树突状突起(图 1)。

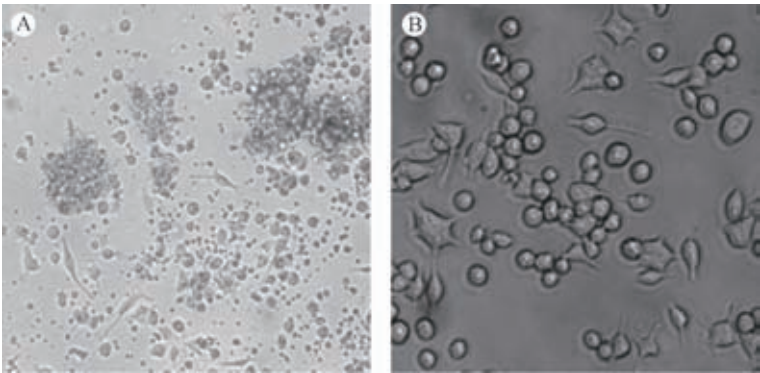
2.2 DC 表面分子表达分析

流式细胞仪检测细胞表面分子表达率如图 2 所示,实验组和对照组 CD11c 表面分子的表达率分别为:87.8%、85.6%;CD40 表面分子实验组和对照组表达率分别为 57.6%、38.8%;CD80 表面分子实验组和对照组表达率分别为 89.8%、88.7%;MHCII

表面分子实验组和对照组表达率分别为 3.6%、0.2%。可见肝螺杆菌感染能够促进 DC 表面分子 CD40 和 MHCII 类分子表达。

2.3 BALB/c 小鼠接种 NDV 后的抗体水平检测

由表 1 和图 3 可知,实验组接种 NDV 后第 1 到第 5 周内血清抗体效价均逐渐升高,第 6 周时呈下降趋势;对照组接种 NDV 后第 1、2 周血清抗体水平持平,未出现上升,2 到 5 周逐渐上升,第 6 周呈下降趋势。除第 1 周实验组小鼠抗体水平略低于对照组外,2 至 6 周内实验组抗体水平均高于对照组。可见肝螺杆菌感染能够提高 BALB/c 小鼠对 NDV 的抗体水平。



注:A. 分离培养 3 d(×200);B. 分离培养 5 d(×400)。

图 1 树突状细胞形态

Note. A. 3 days after isolation(×200); B. 5 days after isolation(×400).

Fig.1 Morphological observation of the murine dendritic cells

表 1 接种 NDV 后不同时间内小鼠的血清抗体效价(n=15)

Tab.1 Serum antibody titer of the mice after inoculation with NDV at different times

接种 NDV 时间 Inoculate times	血清平均效价 Average serum titer(log2)		P 值
	实验组 Experimental group	对照组 Control group	
第 1 周 1st week	5.40±0.63	5.53±0.52	0.53
第 2 周 2nd week	6.93±1.27	5.47±1.19	0.003
第 3 周 3rd week	7.08±1.04	6.47±0.52	0.049
第 4 周 4th week	7.65±0.42	6.87±0.52	0.02
第 5 周 5th week	8.62±0.65	8.00±0.53	0.01
第 6 周 6th week	6.54±0.52	6.33±0.49	0.29

3 讨论

啮齿动物螺杆菌在全球范围内普遍流行,已被公认为是啮齿类实验动物重要的致病菌,发达国家或国际知名实验动物供应商已将其纳入实验大小鼠病原体监测列表,而 *H. hepaticus* 尚未列入我国实验动物国家标准,国内实验室使用啮齿动物进行实验时通常不对该菌进行检测,使得感染难以被发现。对于机体免疫正常的小鼠 *H. hepaticus* 多为隐性感

染,通常无明显的病理变化,*H. hepaticus* 可引起机体细胞免疫和体液免疫,引起迅速而有力的 I 型免疫应答,产生 IgG 和 IgM 抗体,伴随抗 *H. hepaticus* 抗体产生、胆酸浓度改变、血清谷丙转氨酶水平升高,并引起多种细胞因子浓度升高^[9]。使用携带 *H. hepaticus* 的实验动物进行药理学、免疫学等科学研究时,可能会对实验产生干扰,从而混淆实验结果。

DC 是一种专职抗原提呈细胞,能够激活 T、B 细胞(特别是 T 细胞)的特异性免疫反应及免疫耐

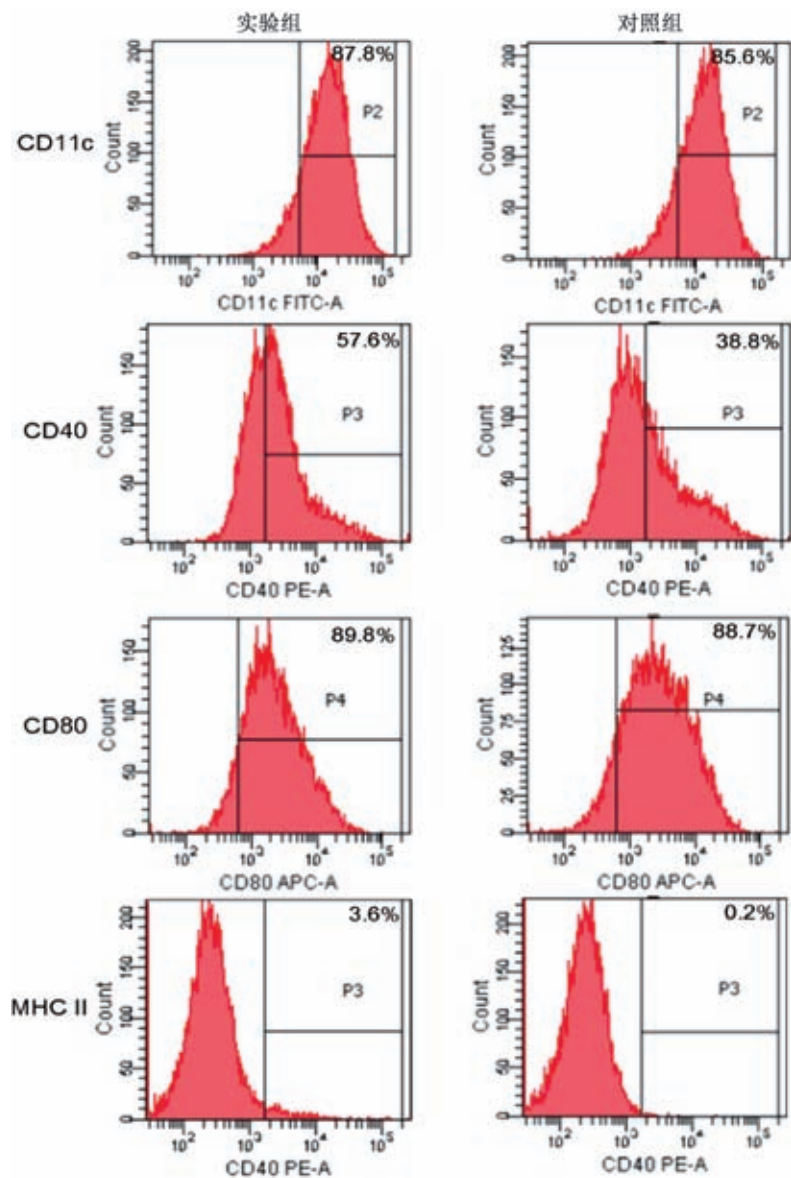


图 2 实验组与对照组小鼠 DC 表面分子表达率

Fig. 2 Expression rate of DC cell surface molecules in the experimental and control groups of mice

受。DC 的分化发育主要经历四个阶段:造血干细胞→DC 前体细胞→未成熟的 DC 细胞→成熟的 DC 细胞^[5]。在外来抗原的刺激下,成熟 DC 表面的 MHCII 分子与 T 细胞受体结合,传导抗原特异性刺激信号,同时,共刺激分子刺激 T 细胞活化,在机体特异性免疫应答调节中起着重要的作用^[10]。我们从感染 *H. hepaticus* 5 个月的 BALB/c 小鼠和未感染 *H. hepaticu* 的对照组小鼠骨髓中分出 DC 细胞进行体外诱导培养,可在 10 d 左右扩增出大量 DC 细胞。采用流式细胞术对两组细胞 DC 表面的共刺激分子 (CD11c、CD40、CD80 和 MHCII) 的表面分子的表达率进行检测,结果表明,MHCII 和 CD40 分子在实验组的表达率要高于对照组的表达率。由此推测,*H.*

hepaticus 感染可能会对小鼠骨髓中 DC 的成熟起促进作用,且能提高 MHC II 和 CD40 分子的表达水平,提示或许对抗体的产生水平有一定的促进作用。

有研究表明^[11],用单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-1) 分别接种感染 *H. hepaticus* 1 个月和未感染 *H. hepaticus* 的 C57BL/6 小鼠,1 周后感染 *H. hepaticus* 小鼠的 DC 表面分子 CD40、CD80、CD86 和 MHCII 分子水平较对照组显著降低,说明 *H. hepaticus* 感染抑制了 DC 表型成熟,这与本文结果有一定的差异。我们分析可能的原因在于本文仅单纯性研究感染 *H. hepaticus* 对 BALB/c 小鼠骨髓来源 DC 表面分子表达率的影响,而文献报道的结果则可能是 *H. hepaticus* 和 HSV-1 共同作用导致。另外也可能与动物品

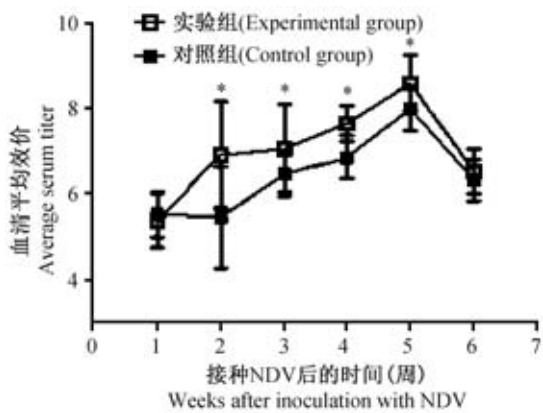


图 3 接种 NDV 抗原后不同时间小鼠的血清抗体水平的比较

Fig.3 Comparison of antibody titer of the mice after inoculation with NDV antigenat at different times

系、DC 细胞来源及感染的时间等因素有关,还有待进一步深入研究。

此外,本实验还用 NDV ZJ1 株分别接种已感染 *H. hepaticus* 和未感染 *H. hepaticus* 的 BALB/c 小鼠,结果显示,在不同时间段,*H. hepaticus* 感染可以促进 BALB/c 小鼠产生抗 NDV 的抗体水平,这可能与 *H. hepaticus* 感染可刺激 DC 细胞表面 CD40 和 MHC II 类分子表达水平有一定的关系。

综上所述,*H. hepaticus* 感染会对免疫学实验产生干扰而影响实验数据的准确性。因此在进行动物实验尤其是免疫学相关实验时,应尽量选择不携带 *H. hepaticus* 的动物,以排除其对实验的干扰。

参 考 文 献

[1] Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, et al. *Helicobacter hepaticus* sp. nov. , a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice [J]. Clin Microbiol, 1994, 32: 1238 – 1245.

[2] Ward JM, Fox JG, Anver MR, et al. Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species[J]. J Natl Cancer Inst. 1994, 86(16):1222 – 1227.

[3] Cahill RJ, Foltz CJ, Fox JG, et al. Inflammatory bowel disease: an immunity-mediated condition triggered by bacterial infection with *Helicobacter hepaticus*[J]. Infect Immun. 1997, 65: 3126 – 3131.

[4] Hailey JR, Haseman JK, Bucher JR, et al. Impact of *Helicobacter hepaticus* infection in B6C3F1 mice from 12 National Toxicology Program 2-year carcinogenesis studies [J]. Toxicol Pathol. 1998, 26: 602 – 611.

[5] Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, et al. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cell with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells[J]. J Exp Med, 2000, 192 (9): 1213 – 1222.

[6] Inba K, Inaba M, Romanin N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone-marrow culture supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor [J]. J Exp Med, 1992, 176: 1693 – 1702.

[7] Cao X, Zhang W, He L, et al. Lymphotactin gene-modified bone marrow dendritic cells act as more potent adjuvants for peptide delivery to induce specific antitumor immunity[J]. J Immunol, 1998, 161: 6238 – 6244.

[8] Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow [J]. Immunol Methods, 1999, 223(1): 77 – 92.

[9] Chahnavi A, Rabkin S, Todo T, et al. Effect of prior exposure to herpes simplex virus 1 on viral vector mediated tumor therapy in immunocompetent mice [J]. Gene Ther, 1999, 6:1751 – 1758.

[10] Smaroula D, Julius MC, Robert L. Function of CD80 and CD86 on monocyte and stem cell derived dendritic cells [J]. Exp Mol Pathol, 2003, 75: 217.

[11] Gulani J, Norbury CC, Bonneau RH, et al. The effect of *Helicobacter hepaticus* infection on immune responses specific to herpes simplex virus type 1 and characteristics of dendritic cells[J]. Comp Med. 2009, 59 (6): 534 – 544.

[收稿日期] 2016-02-22

上海地区实验动物病原体感染指数分析

冯丽萍,陶凌云,周洁,谢建云,林金杏,冯洁,王胜昌,魏晓锋,高诚*

(上海实验动物研究中心,上海 201203)

【摘要】 目的 探索测算感染指数的最佳方法,以便更加科学的反映实验动物的感染状况。**方法** 感染指数,也称感染度,它是对实验动物质量监测的定性指标。通过加工汇总实验动物的病原体感染率,综合反映某一特定实验动物群体的病原体感染状态或趋势的一种指标。**结果** 总体上,小鼠病原体感染指数略有下降,而大鼠的病原体感染指数则逐年上升。分别比较各类病原体感染指数发现,小鼠中寄生虫感染指数较高,而大鼠中细菌感染指数最高。**结论** 感染指数分析揭示了实验动物质量的基本状况,需要加强对小鼠寄生虫的监测,而大鼠的细菌检测需要投入更多关注。小鼠病原体感染情况得到控制,大鼠各类病原体的控制情况均逐年趋于严重。

【关键词】 实验动物;感染指数;质量监控

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0309-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.018

Analysis of laboratory animal pathogen infection indexes in Shanghai area

FENG Li-ping, TAO Ling-yun, ZHOU Jie, XIE Jian-yun, LIN Jin-xing,
FENG Jie, WANG Sheng-chang, WEI Xiao-feng, GAO Cheng*

(Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China)

【Abstract】 Objective To more intuitively understand the quality control for laboratory animals and further achieving a more scientific and reasonable management of laboratory animals, the infection index as evaluation criteria was introduced. Then the best way to calculate infection index was explored in order to more scientifically reflect the infection status of laboratory animals. **Methods** Infection index, also called the degree of infection, is a qualitative indicator of monitoring laboratory animal quality. After arranging, analyzing, processing and gathering the data from laboratory animal quality monitoring, the index reflects synthetically the pathogen infection status or trend of a particularly investigated experimental animal population or the development of certain experimental animals. **Results** In general, the pathogen infection index of mice was slightly decreased, while the pathogen infection index of rats roughly increased year by year. In comparing infection index by different pathogens, the parasite infection index of mice was found to be higher than bacteria and virus infection indexes, while the bacteria infection index of rats was higher than parasite infection index and virus ones. **Conclusions**

The infection index model intuitively reflects the quality control status of laboratory animals. The analysis also reveals that the parasite monitoring of the mice and the bacteria detection of rat needs to be reinforcement. In addition, the index of infection reveals that the pathogen infection of mice is well under control, while that of rats tends to be more serious year by year.

【Key words】 Laboratory animal; Infection index; Quality monitoring

Corresponding author: GAO Cheng, Email: gaochengdgb@126.com

【基金项目】上海市科学技术委员会科研计划项目(No: 13DZ1512104, 15DZ2292400)。

【作者简介】冯丽萍(1985-),女,硕士,预防兽医学,E-mail: flp2013@foxmail.com

【通讯作者】高诚(1961-),男,研究员,实验动物质量控制,E-mail: gaochengdgb@126.com

实验动物质量监测是确保实验动物质量的必要手段,确保实验动物质量,不仅对保证动物实验结果准确性、规律性、重复性而且对保证工作人员健康都有重要意义。动物的质量易受气候、饲养环境、饲料、饲养及繁育方式、人员、运输等多种因素的影响。如果出现监测的缺失,将直接导致管理和生产中的质控盲区,可能导致实验动物发生病原体感染。

有文献使用病原体阳性率来研究实验动物质量控制情况^[1],这种方法能够观察特定病原体的感染情况,却无法直接获知整体的质量控制情况。本文探索一个综合性指标来评估实验动物质量,通过权重分值的校正,得到更加科学的感染指数。

1 材料与方法

1.1 样本来源

所有样本来源于上海市实验动物质量监督检验站的委托检测样品和年检抽查样品,所有统计病原体项目均为国标规定必检项目在 2010 ~ 2014 年五年间检测数据。

1.2 动物种类和级别

清洁级、SPF 级的大鼠和小鼠。

1.3 感染指数设定方法

实验动物感染指数是能够反映实验动物质量的综合性的定性指标,以病原体的阳性率为基础,以病原体致病性为依据,设定不同的分值来控制其在实验动物感染指数中所占的权重,如此可以更加科学直观的体现所统计的实验动物质量控制情况。实验动物感染指数并未有过研究,作者根据常见的指数计算方法,设计了感染指数的计算公式。

感染指数公式为感染指数 = $\sum$ (各类病原体阳性率百分数 × 检测项目权重分值) / 累计各类病原体检测类别数目/1%

1.4 主要试剂和仪器

检测所需要的仪器和试剂均参照国家标准要求配备。

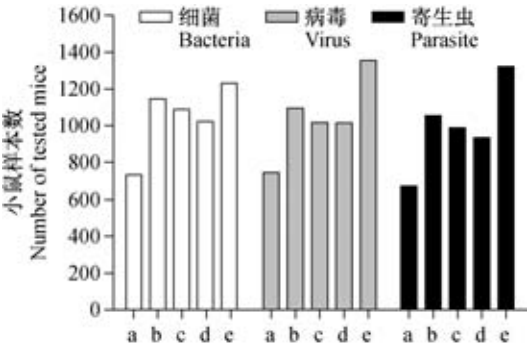
2 结果

2.1 大鼠和小鼠样本数

经详实统计和汇总,在 2010 ~ 2014 年各类病原体检测中,小鼠每年检测量在 600 ~ 1400 之间,大鼠的检测量在 150 ~ 300 之间,统计所用小鼠和大鼠样本数如图 1、2 所示。

由于小鼠和大鼠在实验动物检测总量中超过

75% (如图 3),是最有代表性的实验动物。为了使数据模型简单化,我们对小鼠和大鼠(包括年检抽查和委托检测两类动物)的感染指数进行整理分析。

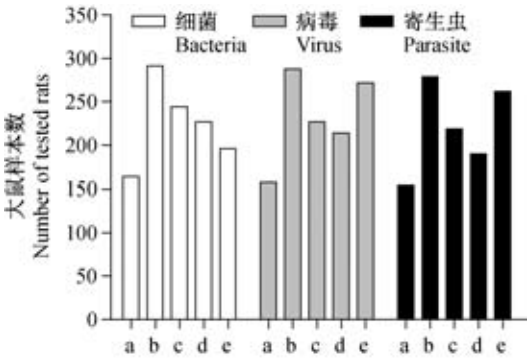


注:a. 2010 年;b. 2011 年;c. 2012 年;d. 2013 年;e. 2014 年。

图 1 2010 ~ 2014 年小鼠检测样本数

Note. a. 2010; b. 2011; c. 2012; d. 2013; e. 2014.

Fig. 1 The number of tested mice during 2010 - 2014



注:a. 2010 年;b. 2011 年;c. 2012 年;d. 2013 年;e. 2014 年。

图 2 2010 ~ 2014 年大鼠检测样本数

Note. a. 2010; b. 2011; c. 2012; d. 2013; e. 2014.

Fig. 2 The number of tested rats during 2010 - 2014

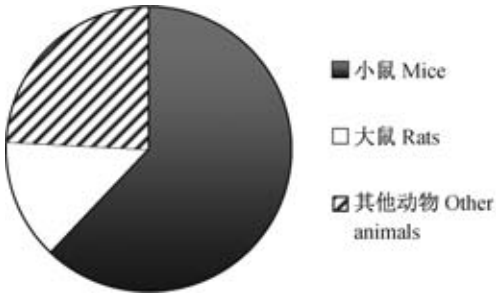


图 3 2010 ~ 2014 年大鼠和小鼠检测总量占比图

Fig. 3 The number of rats, mice and other laboratory animals tested during 2010 - 2014

2.2 按照病原体致病性控制权重

根据微生物和寄生虫对实验动物的致病性和对动物实验的影响与干扰,通常可分为以下三类:I 类为可引起人畜共患病的微生物,如沙门菌^[2],汉坦病毒^[3]等。II 类为可引起实验动物烈性传染病的微生物,影响动物生长、发育、繁殖,如鼠痘病毒^[4]等。III 类为动物条件性致病病原体,多是实验动物体内的正常微生物,甚至参与体内营养代谢。但当外界环境发生变化或出于应激状态时,可能会变成条件致病菌,影响动物健康状况和动物实验结果。

以病原体致病性为依据,设定不同的分值来控制其在实验动物感染指数中所占的权重。如检测中大鼠和小鼠细菌类病原体有 9 类,其中人畜共患病病原体沙门菌的权重分值设置为 10;实验动物主要致病性病原体支气管鲍特杆菌^[5,6]、支原体^[7]和嗜肺巴斯德杆菌权重分值为 6;条件致病性病原体金黄色葡萄球菌^[8]、鼠棒状杆菌^[9]、泰泽病原体^[10]、绿脓杆菌及肺炎克雷伯杆菌的权重分值为 3。所有大鼠和小鼠国标必检项目权重分值详见表 1。

表 1 病原体权重分值表
Tab.1 The weight value of each pathogen

病原体类别 Pathogen types	病原体 Pathogens	分值 score
细菌 Bacteria	沙门菌 <i>Salmonella spp.</i>	10
	嗜肺巴氏德杆菌 ^[11] <i>Pasteurella pneumotropica</i>	6
	支气管鲍特杆菌 <i>Bordetella bronchiseptica</i>	6
	支原体 <i>Mycoplasma spp.</i>	6
	鼠棒状杆菌 <i>Corynebacterium kutscher (C. kutscheri)</i>	3
	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	3
	泰泽病原体 <i>Tyzzer's organism</i>	3
	肺炎克雷伯杆菌 ^[12] <i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
	绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
	汉坦病毒 <i>Hantavirus (HANT)</i>	10
	鼠痘病毒 <i>Ectromelia virus (Ect.)</i>	10
	仙台病毒 ^[13] <i>Sendai virus (SV)</i>	6
	小鼠肺炎病毒 <i>Pneumonia virus of mouse (PVM)</i>	6
	大鼠冠状病毒/大鼠涎腺炎病毒 <i>Sialodacryoadenitis virus/rat coronavirus (SDAV/RCV)</i>	6
病毒 Viruses	小鼠肝炎病毒 ^[14] <i>Mouse hepatitis virus (MHV)</i>	6
	小鼠细小病毒 <i>Minute virus of mouse (MVM)</i>	3
	呼肠孤病毒Ⅲ型 <i>Reovirus-3 (REO-3)</i>	3
	大鼠细小病毒 RV 株 <i>Kiham rat virus (KRV)</i>	3
	大鼠细小病毒 H-1 株 <i>Rat parvovirus (H-1)</i>	3
	弓形虫 ^[15] <i>Toxoplasma gondii</i>	10
	全部蠕虫 <i>All helminths</i>	6
	体外寄生虫(节肢动物) <i>Ectoparasites (arthropods)</i>	3
	鞭毛虫 <i>Flagellate</i>	3
	纤毛虫 <i>Ciliates</i>	3
寄生虫 Parasites		

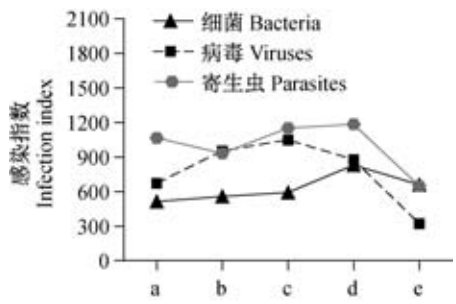
2.3 大鼠和小鼠各类病原体感染指数

将各类病原体的阳性百分数(各类病原体阳性率 × 100)与相应的权重分值取乘积后再分类求和即得“Σ(各类病原体阳性率 × 100 × 检测项目权重分值)”,之后再将该和值除以累计检测的病原体数目,最后以各检出率的 1% 为指数基数,计算得出各病原体的感染指数。病原体感染指数是将细菌、病毒和寄生虫合并计算的结果,反映了实验动物整体感染情况。

年感染指数达到峰值,之后迅速下降;小鼠寄生虫感染指数呈波浪形。总体上,小鼠病原体感染指数较稳定,2014 年略低于其他年份(图 6)。

就大鼠的感染指数而言(图 5),2010 年~2014 年大鼠的细菌感染指数呈 U 型反转,2011 年感染指数达到谷底,之后持续攀升;大鼠的病毒感染指数形态类似生长曲线式,呈现典型的对数前期中期和后期;大鼠寄生虫感染指数呈阶梯式上升。总体上,大鼠病原体感染指数逐年上升的趋势(图 6),其中大鼠的细菌感染指数最高(图 5)。

经过统计(图 4),2010~2014 年小鼠细菌感染指数略有上升;小鼠病毒感染指数呈抛物线形,2012

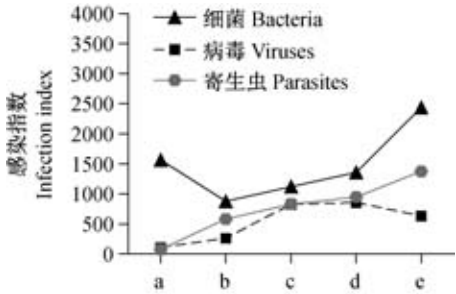


注: a. 2010 年; b. 2011 年; c. 2012 年; d. 2013 年; e. 2014 年。

图 4 小鼠各类病原体感染指数

Note. a. 2010; b. 2011; c. 2012; d. 2013; e. 2014.

Fig. 4 Pathogen infection indexes in the mice

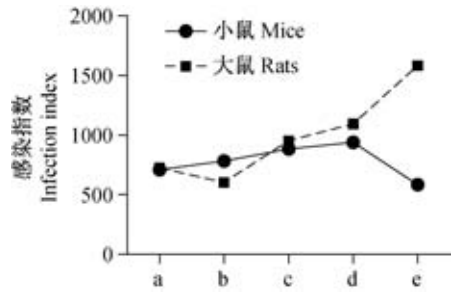


注: a. 2010 年; b. 2011 年; c. 2012 年; d. 2013 年; e. 2014 年。

图 5 大鼠各类病原体感染指数

Note. a. 2010; b. 2011; c. 2012; d. 2013; e. 2014.

Fig. 5 Pathogen infection indexes in the rats



注: a. 2010 年; b. 2011 年; c. 2012 年; d. 2013 年; e. 2014 年。

图 6 大鼠和小鼠全部病原体感染指数的比较

Note. a. 2010; b. 2011; c. 2012; d. 2013; e. 2014.

Fig. 6 Comparison of the pathogen infection indexes in rats and mice

3 讨论

利用感染指数来比较和分析 2010 ~ 2015 年上海地区大鼠和小鼠的病原体感染情况,可知小鼠质量控制情况得到一定改善,而大鼠感染情况却越发严重。病原体感染指数不仅能表现出大鼠和小鼠的病原体感染情况,而且能够灵活的表现更多的实验动物感染情况,也可以将所有的实验动物感染情况表现在同一条曲线中。然而感染指数的获得需要大量的检测数据为基础,无法从一种或者几种病原体

的感染情况获取。所以前期的数据采集工作必须细致而全面,才能算出准确的感染指数。在大数据时代背景下,实验动物病原体感染指数能为实验动物质量评估提供更大的帮助。

(致谢:本文所利用的检测数据凝结着本中心质监站每一名检测人员的辛勤工作。在此感谢接收样品、档案工作、采样和对外服务的陈懿斐、倪丽菊、田立立、刘雄伟、沈志敏,感谢他们为检测数据的统计和本文的编写提供的帮助和指导。)

参 考 文 献

[1] 冯丽萍,陶凌云,冯洁,等. 2010 ~ 2013 年上海地区实验大鼠小鼠病原体感染情况分析[J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(5): 398 - 402.

[2] 周永明,张顺先,古文鹏,等. 鼠伤寒沙门菌致幼儿腹泻的病例检测与调查分析[J]. 中华预防医学杂志, 2015, 49(11): 1020 - 1022.

[3] Zhang YZ, Dong X, Li X, 等. Seoul virus and hantavirus disease, Shenyang, People's Republic of China [J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(2): 200 - 206.

[4] 安学芳,刘峰松,方明刚,等. 鼠痘病毒的分离鉴定及感染性研究 [J]. 中国病毒学, 2003, 18(6): 563 - 565.

[5] 郭效东,高国栋,赵振伟,等. 支气管败血鲍特氏菌致肾脓肿 1 例 [J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(2): 145 - 145.

[6] 朱农,朱礼尧,陈震. 支气管败血鲍特氏菌败血症误诊为肾综合征出血热 1 例分析 [J]. 中国误诊学杂志, 2011, 11(6): 1411.

[7] 龚妮,段德令,何宗忠,等. 19530 例泌尿生殖道感染患者支原体感染及药敏结果分析 [J]. 重庆医学, 2015, (25): 3539 - 3541.

[8] 吴文伟,郑世翔,翁钦永,等. 柚皮素缓解小鼠金黄色葡萄球菌肺炎的损伤作用及其机制 [J]. 中国老年学杂志, 2015, (14): 3849 - 3850.

[9] 高正琴,张强,邢进,等. 鼠棒状杆菌的分离与鉴定 [J]. 实验动物科学, 2008, 25(1): 18 - 20.

[10] 陈园生,李红. 泰泽病原体研究现状 [J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(1): 45 - 49.

[11] 刘星,李红,石朝辉,等. 嗜肺巴氏杆菌在实验大鼠和小鼠中的传染性研究 [J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(4): 246 - 248.

[12] Keynan Y, Rubinstein E. The changing face of Klebsiella pneumoniae infections in the community [J]. Int J Antimicrob Agents, 2007, 30(5): 385 - 389.

[13] 袁立军,李晓眠,李梅. 仙台病毒基因结构与功能的研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2006, 1(6): 462 - 464.

[14] 高骏,王英,孙凤萍,等. 小鼠肝炎病毒研究进展 [J]. 上海农业学报, 2004, 20(2): 114 - 116.

[15] 李淑梅,赵慧. 弓形虫简介 [J]. 生物学教学, 2012, 37(11): 60 - 62.

裸鼹鼠在生物医学研究中的应用前景

崔淑芳

(第二军医大学实验动物中心, 上海 200433)

【摘要】 裸鼹鼠是一种奇特的动物, 具有寿命长、抗肿瘤、耐缺氧、新陈代谢率低、痛觉缺失、触觉灵敏、视觉功能低下、骨骼再生能力强等诸多特点。本文在概述裸鼹鼠上述生物学特点的基础上, 结合当前肿瘤、衰老、低氧适应以及疼痛等领域研究趋势, 对裸鼹鼠在生物医学研究中的应用前景进行分析与展望。

【关键词】 裸鼹鼠; 抗肿瘤; 抗衰老; 耐缺氧; 痛觉缺失; 应用前景

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0313-08

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.019

Application prospects of naked mole rats in biomedical research

CUI Shu-fang

(Laboratory Animal Centre, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 Naked mole rats are unique animals with long lifetime, anti-tumor properties, hypoxia tolerance, low metabolic rate, analgesia, tactile sensitiveness, poor eyesight and strong bone regeneration ability. Based on the basic biological characteristics of naked mole rats, and the current research trends in the field of cancer, aging, hypoxia tolerance, as well as algesia, this review focuses on the application prospects of naked mole rats in biomedical research.

【Key words】 *Heterocephalus glaber*; Anti-tumor; Anti-aging; Hypoxia tolerance; Analgesia; Application prospects

Corresponding author: CUI Shu-fang, Email: youngstar_sf@163.com

2013 年, 裸鼹鼠成为《Nature》封面故事的主角^[1], 其独特的外形与终生不罹患癌症的特性一时吸引全球众多读者的眼球。其实, 裸鼹鼠除了拥有天然抗肿瘤的特性以外, 还集中了很多其他令人瞩目的生物学特性, 如抗衰老、低氧适应性强、疼痛耐受性强等, 每一种特性都与我们人类战胜重大疾病, 实现健康、长寿的梦想息息相关, 早已引起生命科学界的高度关注。笔者所在单位从非洲引进该物种, 并围绕其实验动物化和生物学特性开展研究, 至今已对其生活习性以及基本生物学特性有了更加直观与深入的认识, 而且随着合作机构的不断拓展与研究的不断深入, 更加坚信裸鼹鼠将在生物医学研究领域拥有越来越广阔而深远的应用前景。

1 生活习性及其基本生物学特性

裸鼹鼠(*Heterocephalus glaber*)是一种分布于非

洲索马里、肯尼亚、埃塞俄比亚等地的野生动物, 在动物学分类位置上属于哺乳纲、啮齿目、滨鼠科、裸鼹鼠属、裸鼹鼠种^[2]。其外观全身几乎无毛, 皮肤褶皱呈暗粉色, 2 对门齿明显突出, 成年动物体重约 30 ~ 50 g^[3]。野生环境中, 裸鼹鼠终生在地下 2 m 左右的黑暗洞穴中生活, 以植物地下球根块茎为食。它们是哺乳类动物中、迄今为止发现的唯一一种与蜜蜂、蚂蚁等昆虫类似、营社会性生活的群居性动物, 群居数量可达 300 只。由于身处恶劣的生存环境以及社会化结构的特殊性, 裸鼹鼠形成了有别于其他哺乳动物的独特生理学特点。

1.1 寿命长

裸鼹鼠是啮齿目动物中寿命最长的保持者, 最老的个体年龄超过 28 岁^[4], 是同属啮齿目动物小鼠寿命的 7 ~ 9 倍。笔者单位已经培育裸鼹鼠 7 年, 现有的种群当中, 年龄最大的已经超过 18 年。

1.2 对癌症具有超级免疫力

裸鼹鼠对癌症具有天生的抗性。不论是从野生环境捕获的还是动物园饲养的裸鼹鼠,至今都没有发现自发癌症的例子^[5]。

1.3 缺氧耐受性强

裸鼹鼠长期生活在地下 2 m 左右的环境中,由于穴居密度高,与外界气体交换不顺畅,洞穴中空气的二氧化碳含量很高,而氧含量极低(10% ~ 15%)。这样的空气环境对于其他任何一种哺乳动物来说都可能是致命的,会导致大脑损伤以及其他各器官系统的病理性改变,甚至危及生命^[6]。而裸鼹鼠却未见任何缺氧性疾病发生,说明裸鼹鼠具有极强的耐低氧能力。笔者单位研究发现裸鼹鼠心脏每搏输出量较大,泵血能力较强;肺脏导气部非常发达,各级气管扩张程度远远高于 C57BL/6J 小鼠;骨骼肌中肌红蛋白含量约为小鼠的 1.5 倍,骨骼肌中微血管密度显著高于 C57BL/6J 小鼠,从而提高骨骼肌在低氧条件下的功能,这些特点使裸鼹鼠更适合低氧环境。

1.4 新陈代谢率低,体温调节能力差

裸鼹鼠的新陈代谢率比其他体型接近的哺乳动物低,体温调节能力非常差,其正常体温大约 30 ~ 33℃,当环境温度低于 28℃ 时,便失去了维持恒定体温的能力,需要互相拥挤着取暖,以保证体温不至于丧失太多^[7,8]。

1.5 痛觉缺失

裸鼹鼠的痛觉感受器以及连接方式非常独特,具有奇特的耐疼痛生物特性^[9],它对酸性物质和辣椒素刺激无疼痛相关的行为反应。此外,当受到炎症损伤或者已知物质的刺激时,裸鼹鼠也无痛觉过敏反应。

1.6 触觉异常灵敏,视觉功能低下

裸鼹鼠终生在黑暗的地下洞穴生活,眼睛高度退化,几乎完全丧失了视觉,仅依靠身体两侧的触须来辨认方向,大脑皮层中负责视觉的区域大大减小,改用于感受触觉^[10]。

1.7 骨骼维稳与再生能力强

裸鼹鼠在 1 ~ 24 岁之间,骨密度随年龄增长没有发生明显的变化,骨骼保持了良好的结构和强度。此外,雌性裸鼹鼠怀孕时腰椎长度能够增加 32% 以上,具有独特的延长骨骼的能力^[11]。

目前,国内外学者陆续揭示了裸鼹鼠心脏^[12]、消化道^[13]、血管^[14]、皮肤^[15]、触须^[16]、骨骼肌^[17]、睾丸^[18]、肾脏^[19]、松果体^[20]、毛囊^[21]、牙齿^[22]等组织器官的结构特点。第二军医大学实验动物中心从非洲引进裸鼹鼠,初步探索了其人工饲养繁育方

法^[23],并在国内率先开展裸鼹鼠生物学特性的研究工作^[24]。现已初步研究了裸鼹鼠的生长发育规律,绘制了生长曲线及部分脏器指数^[25];明确了 3、6、9 月龄裸鼹鼠的血液生理生化、尿常规等正常值范围^[26];开展了成年裸鼹鼠心脏^[27]、肝脏^[28]、肺脏^[29]、肾脏^[30]、胸腺、淋巴结、脾脏^[31]、骨骼^[32]、骨骼肌^[33]等组织的解剖显微结构以及超微结构的研究;并检测了其遗传生化标记位点^[34],在裸鼹鼠的生物学特性研究方面做了大量的探索性工作,并取得良好进展,为标准化裸鼹鼠的开发和推广应用奠定了重要的研究基础。

2 裸鼹鼠在生物医学研究中的应用前景

2.1 抗肿瘤研究

肿瘤已经成为人类目前死亡的一大病因,严重威胁人类健康与寿命,人类实现攻克肿瘤的梦想至今没有见到曙光。经历漫长的肿瘤防治研究与实践,科学家普遍坚信彻底阐明肿瘤发生、发展的分子机制、肿瘤细胞的信号转导网络,在此基础上设计具有多靶点抑制作用的药物,是当前与将来预防与攻克肿瘤的主流方向^[35]。有关肿瘤产生的分子机制与调控信号通路的研究也已经取得许多发现,但由于受到肿瘤疾病的多样性、复杂性,研究手段的局限性,包括动物模型资源的局限性等诸多因素的限制,还远不够系统、深入与准确,这在很大程度上制约了肿瘤分子靶向治疗的研究进展,也是当前人类找不到对抗肿瘤有效策略的关键原因之一。

裸鼹鼠是至今为止在啮齿类动物中唯一被证实对肿瘤有超级免疫力的动物,因此有望作为一种少有的肿瘤抗性动物模型,在肿瘤分子调控机制、筛选药物靶点以及肿瘤免疫学等转化医学研究领域发挥独特而重要的作用。

有关裸鼹鼠抗肿瘤机制的现有研究结果不仅印证了裸鼹鼠抗肿瘤的特性,而且还为将来的研究指出了一定思路与方向。如 Seluanov 领导的研究团队发现^[36],与小鼠相比,裸鼹鼠成纤维细胞具有更为敏感的“早期接触抑制”能力,该动物可以通过 p16Ink4a 和 p27Kip1 介导的 ECI 以及 p53 和 pRb 两条信号通路严格控制细胞过量增殖,能有效防止细胞癌变。但是裸鼹鼠细胞“早期接触抑制”的产生由哪种基因表达诱导及其具体的信号转导调控机制尚不明确。2009 年, Xiao 等^[1]研究发现,裸鼹鼠细胞大量表达高分子量透明质酸 (high-molecular-mass hyaluronic acid, HMM-HA) 的能力在“早期接触抑

制”中起到重要作用,一旦敲除透明质酸合成酶基因(HAS2)或者使透明质酸-降解酶过度表达而清除HMM-HA,裸鼹鼠细胞变得容易癌变。但是裸鼹鼠HMM-HA的合成与降解机制及其参与细胞“早期接触抑制”调节的机制都不得而知。因此,结合当前抗肿瘤研究方向,运用现代分子生物学知识与技术,在现有研究基础上,系统深入筛选与验证裸鼹鼠抑癌基因、癌基因、损伤修复相关基因、细胞周期调控基因等相关关键基因,探明其在各种细胞转导通路中的调控机制与功能,将为深入揭示肿瘤发生分子调控机制、筛选抗肿瘤药物靶点提供强有力佐证。

另一个有趣的现象是,大量的研究证实恶性肿瘤组织中,端粒酶活性高表达往往与肿瘤发生率呈正相关。但裸鼹鼠例外:该动物正常细胞可以在长期保持端粒酶较高活性的同时,依然拥有超强的肿瘤抗性。这提示裸鼹鼠体内很可能存在某种特别的机制或途径,能够抵消端粒酶的高度活性,使得其整个生命历程中能够有效避免癌症的发展。因此,裸鼹鼠的这一发现为端粒酶功能研究提供了新的视角、增加了新的维度。对裸鼹鼠端粒酶活性与肿瘤发生这种特殊关系的深入研究,将有可能促使我们挖掘出新的肿瘤发生机制,为肿瘤的预防、诊断和治疗提供新思路。

其次,肿瘤的发生、侵蚀与转移无不与机体抵抗外界不利因素的刺激、诱导能力密切关系。Liang等^[37]尝试使用致癌物质RasG12和SV40大T抗原(TAg)诱导裸鼹鼠细胞癌变,没有成功。而这种诱导细胞癌变的方法用于其他多个物种都是有效的^[38-41]。这提示裸鼹鼠具有较强的对抗外界不利因素刺激的能力。因此,深入研究裸鼹鼠的抗肿瘤免疫机制,尤其是抗肿瘤细胞免疫机制,探明T细胞、NK细胞、巨噬细胞、嗜酸性细胞、中性粒细胞的数量、功能以及在裸鼹鼠抵抗肿瘤过程中所起的作用,也将为肿瘤免疫学的发展提供重要参考依据。

再有,裸鼹鼠在抵抗肿瘤过程中某些关键性生物活性物质,将为筛选肿瘤药物提供新思路。如自从Nature报道高分子量透明质酸被认为是裸鼹鼠抵抗肿瘤细胞增殖的有效成分之后,Vera教授带领的课题组在深度挖掘高分子量透明质酸代谢机制与参与抗癌的调控机制,试图寻求到抗癌药物的治疗靶点的同时,还运用从裸鼹鼠体内提取的高分子量透明质酸分别注射到小鼠和人类细胞内,测试其抗癌的有效性。

2.2 抗衰老研究

不伴随老年性疾病的“健康长寿”是自古以来

全人类共同的梦想。抗衰老以及预防与治疗老年性疾病的药物的开发始终吸引着众多科学家与医药企业的关注,但收效不甚理想。究其因是人们对于衰老这一复杂生物学过程的机制,至今没有较为系统与深入的认识。尽管有关衰老的假说与学说已有近300个之多,但都因研究角度的单一,或研究方法与手段的局限性而难免以偏概全^[42]。从系统论出发,深入完善与整合各种学说,从分子、细胞、组织、整体水平探寻机体衰老、抗衰老的因子及其相互作用机制,进而筛选到系列关键性靶点,是衰老与抗衰老机制学说研究的大趋势,也是提高抗衰老药物研发效率与效果的重要前提条件。裸鼹鼠作为啮齿类动物中的既长寿,又健康的典型,加之93%的基因与人类有同源性,提示其在抗衰老研究领域拥有重要价值与应用前景。

现有研究已经发现裸鼹鼠与抗衰老密切相关的部分特殊生物学现象,这些特殊的生物学现象将为当前抗衰老机制、抗衰老药物研发提供新的视角。

过量自由基、尤其是活性氧(ROS)导致的氧化损伤与细胞衰老、凋亡关系密切^[43]。但是研究表明,裸鼹鼠有大量活性氧与很高的氧化损伤。另一方面,Karl等发现,裸鼹鼠肝脏中多种蛋白酶、蛋白酶样物质活性显著高于小鼠,表明裸鼹鼠蛋白质循环体系非常活跃,细胞异常蛋白的表达量极低,具有更稳定的蛋白质组^[44];而且裸鼹鼠蛋白质很少出现不可逆的氧化损伤、蛋白质变性等现象,因此可以肯定,裸鼹鼠体内至少蛋白质代谢能有效补偿自由基、ROS氧化损伤的副作用。这种补偿机制尚待进一步探明。Azpurua^[45]研究发现裸鼹鼠成纤维细胞的翻译速度与小鼠相仿,而翻译的错配率却比小鼠低四倍,提示裸鼹鼠蛋白质高效准确的翻译调控机制在维持蛋白质的稳定性方面起到一定作用。而裸鼹鼠是如何补偿细胞脂质、细胞膜、线粒体、DNA、染色体等的氧化损伤作用的,目前尚不得而知。DNA与线粒体DNA(mtDNA)损伤修复能力都与抗衰老能力密切相关。因此,沿着裸鼹鼠是如何补偿氧化损伤这条思路,逐一探明裸鼹鼠蛋白质翻译调控过程、DNA损伤修复能力、线粒体结构与功能及mtDNA损伤修复能力等,将为系统揭示裸鼹鼠抗衰老的关键因素,丰富与完善衰老的相关学说提供新的佐证,并为寻求补偿氧化损伤的措施新思路。

其次,端粒酶、端粒与衰老及肿瘤也密切相关,开发端粒酶制剂,维持或适当延长人体正常细胞端粒长度,进而达到延缓寿命目标,也是当前与将来开发抗衰老药物的热点之一^[46]。不过,广泛应用端粒

酶制剂还有一个实践和研究的过程,而且还有一个因素值得注意,即正常细胞的端粒得以人为延长,是否有罹患癌症的风险?裸鼹鼠是目前唯一被发现正常细胞既保持端粒酶高活性,又能有效抵御肿瘤的啮齿类动物^[47]。深入探明裸鼹鼠既保持端粒酶活性的长期稳定表达,同时又能有效抵抗癌症的平衡机理,将使我们对端粒酶在抗衰老以及肿瘤发生过程中的作用有更准确、更深入的认识,同时为合理制备与使用端粒酶制剂提供理论依据。

另外,从免疫学角度寻求抗衰老的方法也吸引着不少研究机构。免疫系统的衰老主要表现在与衰老相关的疾病发生率增高,如感染、中枢系统退行性疾病、自身免疫性疾病以及肿瘤等^[48]。裸鼹鼠具有较强的耐化学应激、DNA 损伤物质(如化疗药物)和毒素的能力,笔者单位研究已经证实自噬裸鼹鼠在抵抗病毒时发挥了重要作用^[49-50],而自噬是天然免疫的重要部分;另外,尚未见裸鼹鼠发生退行性疾病、自身免疫性疾病及肿瘤的报道,可见裸鼹鼠免疫功能,尤其是功能的稳定性很好。因此深度挖掘裸鼹鼠免疫系统结构、功能,尤其探明其抗外界不利刺激因素时的调节机制以及维持免疫功能长期稳定性的内在原因,对于阐释免疫与肿瘤、免疫与衰老的关系具有重要参考价值。

从分子生物学角度深度挖掘衰老、抗衰老的机制是众多衰老学说相互交融、整合与发展的必经之路。裸鼹鼠寿命长达 28 年以上,其衰老基因、长寿基因的激活与阻抑及其调控机制中,隐藏着其赖以维持稳定的端粒酶高活性、DNA(mtDNA)损伤修复能力、活跃的蛋白质循环体系等一系列有助于延缓衰老、抵抗退行性疾病的“遗传密码”与转录调控“秘密”。现有的研究已经证实 α -2-巨球蛋白基因(A2m)^[51]等与衰老相关的基因以及与抗衰老相关的端粒酶逆转录酶基因(TERT)在裸鼹鼠都有较高表达^[37]。裸鼹鼠基因组测序工作的完成,为我们在现有基础上,运用基因组学、蛋白组学、表观遗传学等技术,进一步筛选与验证裸鼹鼠抗衰老的相关关键基因,探明其信号传导网络与调控机制,筛选相关药物靶点奠定了基础。

2.3 低氧适应研究

低氧适应机制研究与军事行动、高原作业、登山活动、医疗急救等行业及相关学科密切相关。当前,国内外对于低氧适应机制的研究多选择高原人群(如安第斯人,我国的藏族等人)及高原动物作为实验样本,在探寻其低氧适应的生理学、生物化学以及组织形态学特征基础上,着重开展低氧适应相关候

选基因的筛选以及低氧感知与信号通路的研究^[52]。尽管目前低氧适应的分子调节机制取得一定研究进展,但还未获得对适应过程中相关基因的全面认识,而且这些基因表达调控的机制和相互关系也尚未被发现^[53]。裸鼹鼠低氧环境的高度适应能力,为低氧适应研究领域提供了一种宝贵的研究资源。

首先,裸鼹鼠将在低氧生理学研究领域扮演重要角色。前期研究已经发现裸鼹鼠低氧适应的部分结构特征与生理机制,如肺毛细血管呈肺泡囊双侧分布,基础代谢率底、血红蛋白氧亲和力高等^[54],但是,裸鼹鼠组织与细胞对氧的高效摄取、输送与利用机制,包括裸鼹鼠在低氧环境下其心、脑、骨骼肌等组织毛细血管密度的改变状况及线粒体结构、功能和数目对机体能量供给的影响等不明确,探明这些机制,将为研究如何提高机体氧摄取、转运能力与效率提供参考依据。尤其值得关注的是,裸鼹鼠脑部神经系统拥有很强的低氧适应保护机制^[6]。这种保护机制,对于人类及其他哺乳动物,包括已经应用于低氧适应研究的鼯鼠、鼠兔等高原动物^[55-56],只存在于初生阶段的神经系统,随着出生之后脑细胞发育成熟,这种保护机制也就随之消失,而裸鼹鼠神经细胞却终身拥有^[6]。因此,对裸鼹鼠低氧环境下大脑调控和组织的抵抗机制进行研究,有望为治疗因突发心脏病、中风或意外事故而造成的脑部缺氧提供一种新型临床治疗思路与方法,为开展缺血性脑损伤的药物靶点研究奠定基础。

另外,开展裸鼹鼠低氧适应的分子机制研究,有望挖掘出裸鼹鼠特异的耐受低氧环境的关键调控基因或新的细胞外信号传导通路。基因组测序结果表明,与其他哺乳类相比,裸鼹鼠 HIF-1 α 基因可能通过特异地改变 VHL 结合位点的氨基酸种类而延缓其泛素依赖的降解过程^[57]。本中心前期的研究也发现,耐受低氧环境的成年裸鼹鼠组织中 HIF-1 α 的累积水平显著高于对缺氧敏感的成年小鼠,因此,裸鼹鼠组织中保持着高水平的 HIF-1 α 和 VEGFA 蛋白的表达或累积。同时,裸鼹鼠组织(脑、肝、肾)在急性低氧刺激后(5% O₂),HIF-1 α 或 VEGF 的表达同样发生不同程度的上调。而且,低氧诱导裸鼹鼠成纤维细胞中 HIF-1 α 或 VEGF 的表达。这些结果说明,裸鼹鼠可能通过上调 HIF-1 α 或 VEGF 的表达来阻止细胞程序性死亡从而抵抗组织缺氧。然而,在低氧刺激不同时间后,裸鼹鼠脑组织(4 h)和肝脏组织(15 h)中 HIF-1 α 蛋白的表达呈现下调,这可能与低氧情况下裸鼹鼠降低其基础代谢率有关。因而上述结果也提示,低氧条件下,尽管 HIF-1 参与

激活 VEGF 的转录,但对维持 VEGF 的活化并不是必须的。这提示裸鼹鼠低氧适应的基因群及其调控机制具有特异性。因此,系统筛选与验证裸鼹鼠低氧适应的关键基因及相关基因,全面系统探明其对红细胞生成、血管生长与舒缩、糖代谢与应激反应的调节机制,将有助于开展低氧适应分子机制的比较医学研究,准确筛选抗衰老与退行性疾病的药物靶点以及制定有效的低氧损伤医学预防措施。

2.4 疼痛研究

疼痛生物学机制的阐明将对战事创伤,急性外伤或一些疾病所致的慢性病痛的治疗带来无限希望。虽然急性的疼痛可以预防或者适应,但是慢性的疼痛却是一种非常令人痛苦的疾病,终生患病率达 20% ~ 60%^[58]。世界卫生组织已将疼痛确定为继血压、呼吸、脉搏、体温之后的“第五大生命体征”。以慢性疼痛中的神经源性疼痛为例,它是一种病灶累及感觉神经系统导致的疼痛^[59]。对大多数病人来说,神经源性疼痛多是外周神经源性的,如周围神经损伤所致或者代谢性疾病,如糖尿病所致,会从多方面影响患者健康和生活质量,包括睡眠和认知过程^[60-61]。与情感有关的疾病例如抑郁症和焦虑症,在遭受慢性痛的患者中常常见到,流行病学研究表明大约 50% 的患者经历慢性痛时表现出抑郁样症状^[62-63]。目前研究人员已经从神经内分泌^[64-66],神经免疫^[67-68],神经营养因子^[69-70],以及胶质细胞^[71]等方面开展了系统的研究工作,在此基础上,从分子到整体水平深入阐明参与疼痛的信号传导机制并筛选到关键的调控靶标,将为临床上攻克疼痛提供重要的治疗策略。

疼痛感觉信号传导系统几乎在所有脊椎动物上是高度保守的,而只有一种哺乳动物——裸鼹鼠例外。如果能够在这种先天性痛觉缺失的动物上挖掘出其独特之处,并加以利用,将为疼痛的治愈带来巨大希望。Carstens 等^[72]已经发现裸鼹鼠体内分布于皮肤的触觉感受器天生就缺少 P 物质和降血钙素源性肽。这些感觉神经肽通常与初级伤害感受传入神经纤维密切相关,当这些肽类物质缺失时,疼痛相关的行为会被削弱^[73-74]。Park 等^[75]进一步研究发现,作为机体内、外环境与脊髓联结纽带的背根神经节(Dorsal root ganglion, DRG)也不表达 P 物质,因此接受辣椒酸或者酸性物质处理时,裸鼹鼠也不会表现出伤害防御反应^[76]。除此之外,也有研究发现裸鼹鼠体内伤害感受器本身在分子水平就发生了特异性的改变,从而影响了其正常功能及其与中枢神经系统之间的关联,从此实现了化学感受器功能削

减以及丧失^[77-80]。究竟什么样的选择压力使得裸鼹鼠进化获得如此非同寻常的伤害感受系统呢?一种可能的解释源于这种地下生活的哺乳动物所具有特殊的生活习性,狭窄且通风能力差的洞穴里具有较高的 CO₂ 浓度^[81],后者作为一种有害的刺激可以通过引起组织酸中毒刺激 C 纤维^[82]。高浓度 CO₂ 可能产生了一种选择压力剥夺了伤害感受器被酸性物质活化的能力,从而抑制了周围神经系统和中枢神经系统释放神经肽类物质。裸鼹鼠对炎性疼痛不敏感可能也是这一物种长期适应的一种重要的副产物。由此看来,进一步在裸鼹鼠的分子和细胞水平研究伤害感受系统可以为在人类及其他哺乳动物中进行疼痛刺激的转变提供重要的思路。除了上述已经发现的独特之处,裸鼹鼠 DRG 神经元自身的信号转导系统,以及感觉中枢对于痛觉信号的处理、整合和反馈过程在这一群体进化中获得了怎样的改变,裸鼹鼠在进化过程中是否选择性的关闭或者开启了某些基因的表达而从此获得了疼痛耐受,都值得我们 从基因,细胞,以及整体水平加以深入研究。

除了经典观点认为的疼痛及疼痛的调节只受神经元调节之外,近年来的研究表明,脊髓胶质细胞,主要是小胶质细胞和星型胶质细胞特异性的参与了病理性疼痛过程^[83]。特异性表达于小胶质细胞的嘌呤能受体 P2X4Rs,以及主要表达于小胶质细胞的 P2X7Rs 被激活之后,可以刺激小胶质细胞通过释放促进细胞因子^[84-85],趋化因子^[86-87],神经营养因子^[88-89],肿瘤坏死因子^[90]等参与疼痛过程的级联放大反应^[71]。目前关于胶质细胞在裸鼹鼠疼痛耐受中发挥了怎样的作用,尚未得到深入的研究,这也为我们进一步利用裸鼹鼠观察胶质细胞在疼痛耐受中的研究提供了契机。

疼痛这一疾病过程是由神经系统,免疫系统等多系统共同参与的一个复杂的事件,可以发生于身体的任何组织或者器官。若能充分利用裸鼹鼠这一痛觉缺失的动物模型,从分子和细胞水平差异性筛选其参与痛觉缺失的特异之处,在裸鼹鼠体内特异性表达其本身缺失的与疼痛相关的基因,利用疼痛动物模型中普遍认可的观察指标,在整体动物水平加以验证,将为我们系统性的阐明疼痛的生物学机制,并为治疗疼痛提供重大的理论基础。

3 结语

除了在抗肿瘤、抗衰老、低氧适应以及疼痛等特定研究领域具有深远应用前景外,裸鼹鼠在生物学

其他众多领域也具有潜在的应用价值。如裸鼹鼠骨骼能在长达 20 余年的生命历程中维持稳定的骨密度^[11],提示其拥有良好的防止骨成分流失及骨骼损伤修复能力,有望成为人类临床骨质疏松症防治研究的新型工具;又如其较强的肌肉损伤修复能力^[33]提示其可能在肌萎缩症防治研究领域发挥作用;肾小管上皮细胞的快速适应与修复能力^[30]提示其在肾脏损伤修复研究领域具有重要价值,等等。因此,裸鼹鼠可以称之为一种“多能”性的新型研究工具或载体。随着标准裸鼹鼠化种群的建立及应用的不断推广,裸鼹鼠将在生命科学与生物医药研究各领域中发挥出越来越突出的支撑作用。

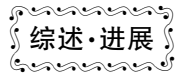
参 考 文 献

- [1] Tian X, Azpurua J, Hine C, et al. High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat [J]. *Nature*, 2013, 499(7458): 346–349.
- [2] Wilson DE, Reeder DM. *Mammal Species of the World* (3rd ed.) [M]. Johns Hopkins University Press, 2005: 1542–1543.
- [3] Sherman PW, Jennifer J, Richard A. *The Biology of the Naked Mole-rat* [M]. Princeton University Press, 1992: 433–434.
- [4] Buffenstein R. Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat; insights from a successful aging species [J]. *J Comp Physiol B*, 2008, 178(4): 439–445.
- [5] Buffenstein R. The naked mole-rat: a new long-living model for human aging research [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2005, 60(11): 1369–1377.
- [6] Nathaniel TI, Saras A, Umesiri FE, et al. Tolerance to oxygen nutrient deprivation in the hippocampal slices of the naked mole rats [J]. *J Integr Neurosci*, 2009, 8(2): 123–136.
- [7] Goldman BD, Goldman SL, Lanz T, et al. Factors influencing metabolic rate in naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*) [J]. *Physiol Behav*, 1999, 66: 447–459.
- [8] Riccio AP, Goldman BD. Circadian rhythms of body temperature and metabolic rate in naked mole-rats [J]. *Physiol Behav*, 2000, 71(1–2): 15–22.
- [9] Park TJ, Lu Y, Juttner R, et al. Selective inflammatory pain insensitivity in the African naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*) [J]. *PLoS Biol*, 2008, 6(1): e13.
- [10] Hetling JR, Balg-Silva MS, Comer CM, et al. Features of visual function in the naked mole-rat *Heterocephalus glaber* [J]. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 2005, 191(4): 317–330.
- [11] Henry EC, Dengler-Crish CM, Catania KC. Growing out of a caste-reproduction and the making of the queen mole-rat [J]. *J Exp Biol*, 2007, 210(Pt 2): 261–268.
- [12] Grimes KM, Lindsey ML, Gelfond JA, et al. Getting to the heart of the matter: age-related changes in diastolic heart function in the longest-lived rodent, the naked mole rat [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2012, 67(4): 384–394.
- [13] Kotze SH, Van Der Merwe EL, Bennett NC, et al. The comparative anatomy of the abdominal gastrointestinal tract of six species of African mole-rats (Rodentia, Bathyergidae) [J]. *J Morphol*, 2010, 271(1): 50–60.
- [14] Csizsar A, Labinskyy N, Orosz Z, et al. Vascular aging in the longest-living rodent, the naked mole rat [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(2): H919–927.
- [15] St John Smith E, Purfurst B, Grigoryan T, et al. Specific paucity of unmyelinated C-fibers in cutaneous peripheral nerves of the African naked-mole rat: comparative analysis using six species of Bathyergidae [J]. *J Comp Neurol*, 2012, 520(12): 2785–2803.
- [16] Park TJ, Comer C, Carol A, et al. Somatosensory organization and behavior in naked mole-rats: II. Peripheral structures, innervation, and selective lack of neuropeptides associated with thermoregulation and pain [J]. *J Comp Neurol*, 2003, 465(1): 104–120.
- [17] Mc Mullen CA, Andrade FH, Crish SD. Underdeveloped extraocular muscles in the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*) [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2010, 293(5): 918–923.
- [18] Endo H, Okanoya K, Park TJ, et al. Localization of the cytochrome p450 side-chain cleavage enzyme in the inactive testis of the naked mole-rat [J]. *Zoolog Sci*, 2002, 19(6): 673–678.
- [19] Onyango DW, Oduor-Okello D, Otiang a-Owiti GE. Ultrastructural study of the testis of non-breeding naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*, Ruppell) [J]. *Ann Anat*, 1993, 175(5): 447–452.
- [20] Quay WB. Pineal atrophy and other neuroendocrine and circumventricular features of the naked mole-rat, *Heterocephalus glaber* (Ruppell), a fossorial, equatorial rodent [J]. *J Neural Transm*, 1981, 52(1–2): 107–115.
- [21] Crish SD, Rice FL, Park TJ, et al. Somatosensory organization and behavior in naked mole-rats I: Vibrissa-like body hairs comprise a sensory array that mediates orientation to tactile stimuli [J]. *Brain Behav Evol*, 2003, 62(3): 141–151.
- [22] Catania KC, Remple MS. Somatosensory cortex dominated by the representation of teeth in the naked mole-rat brain [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(8): 5692–5697.
- [23] 孙伟, 汤球, 赵善民, 等. 裸鼹鼠人工饲养繁殖初步研究 [J]. *实验动物与比较医学*, 2013, 33(4): 296–300.
- [24] 赵善民, 崔淑芳. 裸鼹鼠生物学特性的研究进展 [J]. *实验动物与比较医学*, 2013, 33(5): 400–405.
- [25] 张璐, 袁子彦, 赵善民, 等. 裸鼹鼠生长发育指标及主要脏器系数正常参考值测定 [J]. *实验动物与比较医学*, 2013, 33(6): 473–476.
- [26] 赵善民, 孙伟, 汤球, 等. 裸鼹鼠血液生理生化及尿常规值的测定 [J]. *实验动物与比较医学*, 2013, 33(6): 469–472.
- [27] 袁子彦, 赵懿宁, 张璐, 等. 裸鼹鼠心脏显微结构与超微结构观察 [J]. *实验动物与比较医学*, 2013, 33(5): 383–387.
- [28] 袁子彦, 赵懿宁, 张璐, 等. 裸鼹鼠肝脏显微结构与超微结构观察 [J]. *实验动物与比较医学*, 2013, 33(5): 373–

- 377.
- [29] 袁子彦, 赵懿宁, 张璐, 等. 裸鼹鼠肺脏显微结构与超微结构观察 [J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33(5): 378–382.
 - [30] 张璐, 赵懿宁, 袁子彦, 等. 裸鼹鼠与 C57BL/6J 小鼠肾脏结构及超微结构比较 [J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33(5): 388–394.
 - [31] 赵善民, 赵懿宁, 汤球, 等. 裸鼹鼠胸腺、脾脏及淋巴结解剖学、组织学与超微结构研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33(5): 395–399.
 - [32] 赵善民, 肖邦, 余琛琳, 等. 裸鼹鼠骨骼标本的制作及其形态学观察 [J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33(6): 493–498.
 - [33] 袁子彦, 汤球, 孙伟, 等. 裸鼹鼠与 C57BL/6J 小鼠骨骼肌结构与摄氧能力比较 [J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33(6): 487–492.
 - [34] 林丽芳, 王洪, 赵善民, 等. 裸鼹鼠生化位点的初步研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33(6): 477–480.
 - [35] 齐平, 靳颖华, 张为革, 等. 分子靶向抗肿瘤药物研究进展 [J]. 中国医药, 2014, 16(2): 302–303.
 - [36] Seluanov A, Hine C, Azpurua J, et al. Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(46): 19352–19357.
 - [37] Liang ST, Mele J, Wu YH, et al. Resistance to experimental tumorigenesis in cells of a long-lived mammal, the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*) [J]. Aging Cell, 2010, 9(4): 626–635.
 - [38] Livingston DM, Bradley MK. The simian virus 40 large T antigen: A lot packed into a little [J]. Mol Biol Med, 1987, 4(2): 63–80.
 - [39] Sun B, Huang Q, Liu S, et al. Progressive loss of malignant behavior in telomerase-negative tumorigenic adrenocortical cells and restoration of tumorigenicity by human telomerase reverse transcriptase [J]. Cancer Res, 2004, 64(17): 6144–6151.
 - [40] Sun B, Chen M, Hawks CL, et al. The minimal set of genetic alterations required for conversion of primary human fibroblasts to cancer cells in the subrenal capsule assay [J]. Neoplasia, 2005, 7(6): 585–593.
 - [41] Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular basis for multistep carcinogenesis [J]. Cancer Res, 1989, 49(14): 3713–3721.
 - [42] 张赛君, 张先凡. 衰老理论与学说 [J]. 中国医药科学, 2011, 1(20): 39–41.
 - [43] 李崧, 王秀娟, 康学, 等. 抗衰老机制及中药复方抗衰老研究进展 [J]. 北京中医药, 2011, 30(10): 794–795.
 - [44] Rodriguez KA, Edrey YH, Osmulski P, et al. Altered composition of liver proteasome assemblies contributes to enhanced proteasome activity in the exceptionally long lived naked mole rat [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e35890.
 - [45] Azpurua J, Ke Z, Chen IX, et al. Naked mole-rat has increased translational fidelity compared with the mouse, as well as a unique 28S ribosomal RNA cleavage [J]. PNAS, 2013, 110(43): 17350–17355.
 - [46] 吕欣桐. 端粒、端粒酶与抗衰老的研究进展 [J]. 医学信息, 2011, 24(5): 33–34.
 - [47] Liang S, Mele J, Wu Y, et al. Resistance to experimental tumorigenesis in cells of a long-lived mammal, the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*) [J]. Aging Cell, 2010, 9(4): 626–635.
 - [48] 张娜, 李电东, 邓洪斌. 免疫系统的衰老及其机制 [J]. 国际老年医学杂志, 2014, 35(1): 27–30.
 - [49] Zhao S, Luo H, Kan G, et al. The protective role of autophagy in *Heterocephalus glaber* hepatic stellate cells exposed to H₂O₂ or nutritional stress [J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 34(2): –473.
 - [50] Zhao S, Lin L, Kan G, et al. High autophagy in the naked mole rat may play a significant role in maintaining good health [J]. Cell Physiol Biochem. 2014, 33(2): 321–332.
 - [51] Yu C, Lj Y, Holmes A, et al. RNA sequencing reveals differential expression of mitochondrial and oxidation reduction genes in the long lived naked mole rat when compared to mice [J]. PLoS ONE, 2011, 6(11): e26729.
 - [52] 李文玲, 李继中, 杨舒黎, 等. HIF-2a 在高原动物低氧适应中的研究进展 [J]. 安徽农学科学, 2012, 40(7): 4036–4038.
 - [53] 包鹏甲, 裴杰, 阎萍, 等. 藏羊 EPO 基因遗传多样性与高原低氧适应性 [J]. 江苏农业学报, 2014, 30(3): 581–585.
 - [54] Larson J, Park TJ. Extreme hypoxia tolerance of naked mole-rat brain [J]. Neuroreport, 2009, 20(18): 1634–1637.
 - [55] 于红妍. 高原鼯鼠对低氧环境适应的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(31): 19239–19240.
 - [56] 马兰, 格日力. 高原鼠兔低氧适应分子机制的研究进展 [J]. 生理科学进展, 2007, 38(2): 143–146.
 - [57] Kim EB, Fang X, Fushan AA, et al. Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat [J]. Nature, 2011, 479(7372): 223–227.
 - [58] Breivik H, Collett B, Ventafridda V, et al. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment [J]. Eur J Pain, 2006, 10: 287–333.
 - [59] Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, et al. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes [J]. Neurology, 2008, 70: 1630–1635.
 - [60] Attal N, Lanteri-Minet M, Laurent B, et al. The specific disease burden of neuropathic pain: results of a French nationwide survey [J]. Pain, 2011, 152: 2836–2843.
 - [61] Haanpää M, Attal N, Backonja M, et al. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment [J]. Pain, 2011, 152: 14–27.
 - [62] Bair MJ, Robinson RL, Katon W, et al. Depression and pain comorbidity: a literature review [J]. Arch Intern Med, 2003, 163: 2433–2445.
 - [63] Maletic V, Raison CL. Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain [J]. Front Biosci, 2009, 14: 5291–5338.
 - [64] Heim C, Ehler U, Hellhammer DH. The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders [J]. Psychoneuroendocrinology, 2000, 25: 1–35.
 - [65] Raison CL, Miller AH. When not enough is too much: the role of

- insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders [J]. *Am J Psychiatry*, 2003, 160: 1554 – 1565.
- [66] Lang UE, Borgwardt S. Molecular mechanisms of depression; perspectives on new treatment strategies [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 31: 761 – 777.
- [67] Clark AK, Old EA, Malcangio M. Neuropathic pain and cytokines; current perspectives [J]. *J Pain Res*, 2013, 6: 803 – 814.
- [68] Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents; the role of cytokines in the pathophysiology of major depression [J]. *Biol Psychiatry*, 2009, 65, 732 – 741.
- [69] Coull JA, Beggs S, Boudreau D, et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain [J]. *Nature*, 2005, 438, 1017 – 1021.
- [70] Ferrini, F., De Koninck, Y. Microglia control neuronal network excitability via BDNF signaling[J]. *Neural Plast* 2013 (2013), Article ID 429815, 11 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/429815>
- [71] Watkins LR, Maier SF. The pain of being sick: implications of immune-to-brain communication for understanding pain [J]. *Annu Rev*, 2000, *Psychol* 51: 29 – 57.
- [72] Carstens EE, Carstens MI, Simons CT, et al. Dorsal horn neurons expressing NK-1 receptors mediate scratching in rats [J]. *Neuroreport*, 2010, 21: 303 – 308.
- [73] Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K, et al. Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesiogenic agents in mice [J]. *Eur J pharmacol*, 1995, 275: 229 – 233.
- [74] Thomsen JS, Petersen MB, Benfeldt E, et al. Scratch induction in the rat by intradermal serotonin; a model for pruritus [J]. *Acta Derm Venereol*, 2001, 81: 250 – 254.
- [75] Park TJ, Comer C, Carol A, et al. Somatosensory organization and behavior in naked mole-rats; II. Peripheral structures, innervation, and selective lack of neuropeptides associated with thermoregulation and pain [J]. *J Comp Neurol*, 2003, 465: 104 – 120.
- [76] Park TJ, Lu Y, Jüttner R, et al. Selective inflammatory pain insensitivity in the African naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*) [J]. *PLoS Biol*, 2008, 6: e13. doi: 10.1371/journal.pbio.0060013.
- [77] Sneddon LU, Braithwaite VA, Gentle MJ. Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270: 1115 – 1121.
- [78] Sandercock DA. Putative nociceptor responses to mechanical and chemical stimulation in skeletal muscles of the chicken leg [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2004, 46: 155 – 162.
- [79] McKeegan DE. Mechano-chemical nociceptors in the avian trigeminal mucosa [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2004, 46: 146 – 154.
- [80] Koltzenburg M, Lewin GR. Receptive properties of embryonic chick sensory neurons innervating skin [J]. *J Neurophysiol*, 1997, 78: 2560 – 2568.
- [81] Chris G. Faulkesa, Nigel C. Bennett. Family values: group dynamics and social control of reproduction in African mole-rats [J]. *Trends Ecol Evol*, 2001, 16: 184 – 190.
- [82] Steen KH, Reeh PW, Anton F, et al. Protons selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptors in rat skin, in vitro [J]. *J Neurosci*, 1992, 12: 86 – 95.
- [83] Milligan ED, Mehmert KK, Hinde JL, et al. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120 [J]. *Brain Res*, 2000, 861: 105 – 116.
- [84] Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, et al. Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin [J]. *J Exp Med*, 1997, 185: 579 – 582.
- [85] Hide I, Tanaka M, Inoue A, et al. Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor- α release from rat microglia [J]. *J Neurochem*, 2000, 75: 965 – 972.
- [86] Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Koga Y, et al. Activation of P2X7 receptors induces CCL3 production in microglial cells through transcription factor NFAT [J]. *J Neurochem*, 2009, 108: 115 – 125.
- [87] Shiratori M, Tozaki-Saitoh H, Yoshitake M, et al. P2X7 receptor activation induces CXCL2 production in microglia through NFAT and PKC/MAPK pathways [J]. *J Neurochem*, 2000, 114: 810 – 819.
- [88] Trang T, Beggs S, Wan X, et al. P2X4-receptor-mediated synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38-mitogen-activated protein kinase activation [J]. *J Neurosci*, 2009, 29: 3518 – 3528.
- [89] Beggs S, Trang T, Salter MW. P2X4R⁺ microglia drive neuropathic pain [J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15: 1068 – 1073.
- [90] Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Tsuda M, et al. Mechanisms underlying extracellular ATP-evoked interleukin-6 release in mouse microglial cell line, MG-5 [J]. *J Neurochem*, 2001, 78: 1339 – 1349.

[收稿日期] 2015-11-16



抑郁症动物模型与其发病机制研究的进展

罕园园,代解杰*

(中国医学科学院 北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心,
云南省重大传染病疫苗研发重点实验室,昆明 650118)

【摘要】 抑郁症在全球范围内高发,目前尚无有效的治疗手段,使其成为全球性卫生问题之一。抑郁症动物模型作为疾病机理研究以及药物筛选的主要手段,一直以来备受关注,现有的抑郁模型创新性地融合了比较行为学以及最新的分子生物学等相关技术。本文将结合模型的表面效度、结构效度及预测效度对现有的抑郁症动物模型及发病机制研究的最新进展进行综述,主要包括应激模型、损伤模型、化学诱导模型及转基因模型,这些模型均能不同程度的模拟人抑郁症的特征,在抗抑郁药物开发及发病机理研究中发挥重要作用。

【关键词】 抑郁症;动物模型;发病机制

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0321-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.020

Research progress in animal models and mechanism of depression

HAN Yuan-yuan, DAI Jie-jie*

(Center for Tree Shrews Germplasm Resource, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Diseases, Kunming 650118, China)

【Abstract】 The incidence of depressive illness is high worldwide, and the inadequacy of currently available drug treatments contributes to the significant health burden associated with depression. Animal models of depression used as the main methods to study the pathogenesis mechanism and select effective drugs receive increasing concerns. Current popular models of depression creatively merge ethologically valid behavioral assays with the latest technological advances in molecular biology. In this context, this study aims to review the animal models of depression and pathogenesis related with face validity, construct validity, and predictive validity of these models. These models include stress-induced models, injury-induced models, drug-induced models and transgenic models which all mimic the depression symptoms of human to some degree and are of great value for developing new antidepressant drugs and studying the pathogenesis of this disease.

【Key words】 Depression; Animal model; Pathogenesis.

Corresponding author: DAI Jie-jie, Email: dj@imbcams.com.cn

抑郁症是一种精神疾病,随着生活压力增大呈现出高发的态势,全球疾病负担研究显示,2010年精神疾病导致全球23.2万人死亡,是导致非致命性疾病的首要原因,其中抑郁症导致的伤残占精神疾病的40.5%^[1],现有治疗药物大多基于抑郁症发病的“单胺假说”机制研制,即通过急性升高单胺类递质的浓度发挥作用,主要包括经典的抑制递质再摄

取的选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitors,SSRIs)、三环类(tri-cyclic antidepressants,TCAs)及抑制递质降解的如单胺氧化酶抑制剂(monoaminoxidase inhibitor,MAOIs),但这些药物对20%~30%的患者无效或效果不佳,称作难治性抑郁症(treatment-resistant depression,TRD)^[2],亟需建立有效的动物模型,阐明抑郁发病

【基金项目】 国家科技支撑计划项目(编号:2014BAI01B01)。

【作者简介】 罕园园(1983-),女,硕士,从事人类疾病动物模型研究,Email: Hyy@imbcams.com.cn

【通讯作者】 代解杰(1961-),男,研究员。Email: dj@imbcams.com.cn

机制及探索新的治疗措施。衡量动物模型的三个标准为表面效度(具有人抑郁症相似行为表现)、结构效度(具有人抑郁症的病理生理学改变)和预测效度(模型的行为学改变能够被有效的治疗药物逆转)^[3], 本文将从以上三个方面结合疾病发病机制研究进展对现有的抑郁症动物模型进行综述。

1 疾病发病机制

目前对抑郁神经生物学机制了解非常有限, 目前倾向于认为抑郁发病与一个复杂的信号网络改变有关, 这个信号网络涵盖单胺类神经递质系统、神经内分泌系统、神经营养因子与成年神经再生、神经免疫系统和表观遗传修饰。机体对应激适应性地产生产前炎症细胞因子, 诱导氧化应激性脑损伤, 导致 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT) 系统损伤及糖皮质激素抵抗, 而单胺类等神经递质的改变可通过调控基因转录翻译引发缓慢的“神经可塑性”改变, 从而导致抑郁发生^[4]。其次, 疾病病因不明, 目前明确的仅是抑郁的一些诱因, 例如生活压力、内分泌异常等, 也尚未发现绝对相关的抑郁基因, 目前倾向于认为遗传易感性与环境危险因素交互作用引发抑郁^[5]。基于以上观点, 抑郁模型建立主要有应激模型、损伤模型、化学诱导模型及转基因模型, 影响不同模型成立的主要因素(即易感性)主要包括性别、品系、年龄、饲养条件、处理条件及抑郁行为的判断。

2 应激模型

2.1 环境应激模型

2.1.1 慢性不可预知轻度应激(unpredictable chronic mild stress, UCMS)

方法是动物长期(3 周~3 月)置于温和的不可预知的应激刺激环境, 引起主要由动物的奖励反射活动受损引起的快感缺失症状: 糖水消耗减少、颅内自身刺激(intracranial self-stimulation, ICSS) 阈值增加, 以及体重减轻、食/性欲减弱及睡眠紊乱, 如快相睡眠(rapid eyes movement, REM) 增加等。应激引起大脑前额皮质和海马区域的神经细胞萎缩与凋亡, 与谷氨酸兴奋性神经递质的过度表达有关; 并导致腺垂体轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA 轴) 兴奋, 促使糖皮质激素(主要为皮质酮) 过度释放, 糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR) 表达降低及功能失敏, 不能正常进行其负反馈抑制, 损伤海马组织等引起学习记忆功能改变^[6]。应激还

导致决定星形细胞功能的缝隙连接通道出现扩散减慢, 超微结构改变, 其主要蛋白亚单位 Cx43 表达降低^[7], 近期研究表明星形胶质细胞 ATP 释放异常是抑郁症发生的重要环节, 为筛选快速起效的药物提供了新靶点^[8]; 同时触发前炎症因子反应激活, 如产生 IL-1、IL-6 等, 抗炎症细胞因子 TGF β 、IL-10 水平降低, 且炎症因子的变化与抑郁核心症状快感缺失有相关性, IL-1 I 型受体敲除小鼠及 IL-6(-/-) 小鼠未检测到以上改变, 提示免疫系统和大脑之间存在相互关系^[6]。

啮齿类尤其大鼠是 UCMS 建立的常用动物。大鼠出现不易感的“应激弹性(stress-resilient)”现象, 在刺激停止后 4~5 周, 动物可适应性自然恢复, 因此这种刺激对动物行为的影响会再次重复; 在刺激同时给予抗抑郁药物可逆转抑郁症状, 部分大鼠(50%) 出现类似患者的 TRD 现象。对比发现弹性大鼠对刺激反应迅速, 且在 2 周内皮质酮恢复基线水平, 右腹侧海马发生轻微形态学改变^[6], 其 CA 区中氧化磷酸化增加与应激处理相关^[9], 与海马信号传导相关的基因表达增加^[10], 且前额 BDNF 及 NTRK3 不对称性表达^[11]; 而应激易感与突触囊泡释放缺陷及电压门控钠离子通道表达增加相关, 同时在应激易感及药物抵抗动物中, γ 氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA) A 介导的自发性抑制性突触后电流频率(spontaneous inhibitory postsynaptic currents, sIPSCs) 大大降低, 并与受损的 GABA 释放相互促进导致快感缺失^[12], 同时凋亡通路基因表达显著上调, 推测易感性与海马神经再生受损有关^[10]。

UCMS 模型特征与患者病因相似, 具有很好的模型效度, 在其他种类实验动物中(如斑马鱼) 也有延伸应用。但此模型主要缺陷是建立耗时费力, 对实验条件变化反应敏感, 各个实验室造模的条件难以统一实验室间的结果缺乏可靠性。

2.1.2 获得性无助(learned helpless, LH)

获得性无助即是通过让大鼠接受无法控制或逃避的厌恶性刺激后, 将其放在可以逃避电击环境中时, 呈现出的由动机缺陷引发(而非 UCMS 中的由奖励反射活动受损) 的逃避行为欠缺及运动活性降低的“无助”行为, 实验常设置对照组、可控及不可控刺激对照组。动物在“无助”同时可伴有食欲减退、体重减轻及攻击性降低。刺激导致单胺类递质系统发生显著改变, 激活并致敏 5-HT 神经元, 去甲肾上腺素(noradrenaline, NE) 释放减少, 多巴胺(do-

pamine, DA) 信号传导降低表明出现应对缺陷。模型症状可通过慢性(而非急性)给予单胺能抗抑郁药物逆转,符合疾病临床特征,此延迟效应可能由于抗抑郁药物均通过“共同的最终通路”——神经营养因子类物质的改变——而发挥作用。在海马齿状回注射脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)或制造增加 BDNF 的环境抑制“无助”的发生,注射糖皮质激素受体拮抗剂使动物无助易感性增强,证实 BDNF 和 HPA 在 LH 发病中的重要作用。应激还可导致海马某些神经元长效增强,且这一增强与谷氨酸受体 N-甲基-D-天门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR)的激活相关,谷氨酸系统代表了抑郁症治疗的新靶标,着眼于 NMDAR 的药物(如氯胺酮)可以抑制神经递质释放,或对突触后反应进行调控^[13]。先天性 LH 品系大鼠(congenital LH, cLH)出现先天性药物抵抗,其外侧缰核神经元中钙依赖蛋白激酶(Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase II, CaMKII) β CaMKII 表达上调,从而引起更多谷氨酸受体进入突触等变化,最终导致外侧缰核整体活性上调,并加强对下游单胺能中心的抑制,产生抑郁行为,因此外侧缰核的高度活跃性已成为新的治疗靶标,深度脑刺激抑制外侧缰核活性成功改善患者抑郁症状^[14]。

此模型常用于研究基因与表型的关系, Ridder^[15]等利用此模型发现了 GR 基因的功能,基因表达升高导致动物表现出抑郁弹性,同时发现 GR 表达改变与 BDNF 改变相关,提示 HPA 轴假说与神经递质假说的紧密联系。但此模型一个缺陷在于停止刺激后抑郁样症状持续时间不超过 1 周,因此,不适用于周期较长的抗抑郁药物筛选^[13]。

2.1.3 生命早期应激

母婴分离(maternal separation, MS)通过扰乱啮齿类动物出生后存在的独特的 HPA 轴快速衰退的应激低反应期(stress hyporesponsive period, SHRP),打破亲子间相互作用对 HPA 轴活性的抑制,导致 GC 含量升高及其受体激活,皮质酮升高导致谷氨酸升高及 GABA 释放降低^[16],从而引发动物成年后出现焦虑样行为、惊反射的前脉冲抑制(prepulse inhibition, PPI)缺失等行为改变^[17];并通过增强中脑伏隔核多巴胺系统的功能影响潜伏抑制和逆反学习;5-HT 能增强;前额叶、海马内 BDNF 水平显著降低,海马齿状回神经元再生数目的减少^[18]。检测即刻早期基因 c-Fos 表达发现动物的许多脑区被激

活,且表达模式随着发育而改变。基因区域(如 Avp 基因增强子区域、GR 基因上游的序列模体 Nr3c1 等)甲基化改变,可对 HPA 轴有调控作用^[16]。海马 miRNAs 表达发生改变,多种抗抑郁药物能够逆转这些包括 miR-451 的改变,提示药物作用的共同通路,miRNAs 的表达可能是应激诱导病理的重要组成部分及新的药物靶点^[19]。

miR-16、miRNA 对 MS 抑郁发病有重要作用,并可能与 UCMS 涉及不同的机制。灵长类动物研究中同样表明 MS 导致长久的动物稳态及情感行为的改变,动物海马盐皮质激素受体(mineralocorticoid receptor, MR)及 GR 的 mRNA 有所下降^[20];同时 MS 可影响动物节律系统对药物的反应性,产生长久的生物节律系统可塑性的改变,推测 ELS 的靶标可能为褪黑素系统^[21];MS 可以增加动物成年后对其他刺激(如 UCMS)的易感性,其很好地模拟了人类的早期应激情景,尤其可研究儿童母爱缺失、儿童期忽略等相关抑郁行为和神经生物学机制,在现在的抑郁研究中也占有重要的地位。

2.2 社会应激模型

通过与侵略性强的动物双养或群养的方式,弱勢动物应激并产生长期的行为和精神社会学的改变,其中包括焦虑、防御行为、物质滥用、社会性及性行为的改变,其大脑神经元结构及形态、神经递质发生紊乱。树鼯是一种新型实验动物,通过将雄性树鼯合笼饲养也成功建立了树鼯社会挫败模型,斗败的从属性树鼯出现抑郁样行为改变、内分泌改变、及时间依赖性的单胺类受体改变,新奇事物探索试验中探索行为抑制,并且这种改变可持续至少 2 周以上,同时这些抑郁样症状可以通过给予氯米帕明得以缓解和恢复^[22]。食蟹猴社会挫败模型中同样发现社会地位与抑郁样症状间的联系,抑郁猴脑海马 CA1 和 DG 区中神经纤维和细胞层体积减少,胶质细胞数下降了 30%,颗粒神经元数目在 DG 区趋于减少,整个海马区的椎体神经元和神经胶质细胞密度趋于减少^[23]。抑郁症是一种社会性心理疾病,社会应激模型以社会回避作为主要的评价指标,很好的模拟了人类抑郁症中的“社会退缩”现象,非人灵长类动物有着与人类相似的社会环境和丰富的行为模式,能够更加真实的模拟人类环境,对抑郁症行为与中枢神经系统机制的研究可能更有参考价值。

3 损伤模型

嗅球与边缘系统功能有关,对嗅觉、情绪、内分泌

泌和记忆产生深远影响,大鼠嗅球切除 (olfactory bulbectomy, OB) 作为抗抑郁药物研发的抑郁模型已有很长历史。UCMS 中发现嗅球损伤,临床患者中也发现嗅球功能下降,均提示嗅球系统功能障碍与抑郁发生有关。OB 导致大鼠中央嗅觉系统多个区域包括前额、嗅前核、杏仁核等区域顺/逆行性跨神经元变性及血管变性,旷场试验中的自发活动下降是 OB 行为学变化的主要衡量指标。在神经递质及受体方面,OB 大鼠纹状体 NE 基础值降低而多巴胺基础值增加;杏仁核皮质、额叶及中脑的 5-HT 浓度降低,5-HT_{2A} 受体数目代偿性增加;NMDA 受体在前额叶、侧杏仁核等脑区密度降低,皮层乙酰胆碱 N 型受体 $\alpha 4\beta 2$ 密度增加,纹状体 N 型受体 $\alpha 4$ 密度降低,可能诱发血迹记忆损伤;GABA 浓度降低;下丘脑前神经肽 P 的 mRNA 表达增加诱发摄食行为改变;生长激素降低;HPA 轴功能亢进,皮质酮浓度增加;氧化/亚硝化损伤增加,相应出现免疫方面的肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF- α)、IL-1 β 、凋亡因子增加等^[24],同时海马可塑性受损伴随记忆能力缺陷^[25]。然而模型较为耗时,对试验中手术操作要求高,可能导致造模过程中动物死亡,且在动物模型与临床之间仍有差异,因此常用于抗抑郁药的次筛以及作用机制的研究。此外,成年动物 (包括啮齿类和非人灵长类动物等) 卵巢切除还有行为学、生物化学及神经化学的抑郁样改变,这些症状可以通过补充雌激素或给予抗抑郁药物逆转。卵巢切除模型特异性应用于 17 β 雌二醇等雌性激素对抑郁样症状的治疗效果评价及产后抑郁的机制研究^[26]。

4 化学药物诱导

4.1 免疫刺激模型

抑郁的免疫假说认为,机体对应激适应性地诱导产生前炎症细胞因子,产生氧化/亚硝化应激性脑损伤,打乱外周循环的 GC 对 HPA 轴的负反馈抑制,也能导致 HPA 轴过度激活;通过激活色氨酸-犬尿氨酸途径中的限速酶-吡哆胺 2,3-二氧化酶 (indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO),将色氨酸代谢从 5-HT 合成转换成为犬尿氨酸合成,犬尿氨酸通过凋亡、神经毒性及前氧化效应导致神经变性,同时还通过降低血脑屏障摄取色氨酸降低 5-HT 的合成,在此过程中,细胞因子成为与包括神经递质代谢、神经元可塑性、神经营养因子及内分泌功能多条抑郁通

路相互作用的炎症介质^[2]。抑郁症患者中炎症前介质如 IL-1、2、6 及 TNF- α 水平升高,事实上 IL-6 在许多抑郁模型中显著升高,伴随内源性抗氧化物质下降及抑郁、焦虑样症状、认知缺陷的增加,同时这些症状并不能被氟西汀所逆转,提示 IL-6 可能在抗药性中起到关键作用,已成为研究热点^[27]。

越来越多的证据表明神经、内分泌和免疫系统存在交互作用,精神疾病也有免疫系统的参与,致炎细胞因子包括 IL、TNF、内毒素类脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和干扰素 (interferon, IFN) 等充当了神经调节功能的作用,通过给予这些物质能够导致类似人的快感缺失、睡眠紊乱等症状,也出现神经营养因子的变化,可被抗抑郁药物逆转^[28]。在恒河猴中的研究也表明 IFN- α 可以诱导恒河猴产生与人抑郁症相似的行为学、神经内分泌及免疫反应,此外,HPA 轴的反应性改变及多巴胺代谢产物可能对 IFN- α 诱导产生的抑郁样蜷缩行为有促进作用^[29]。本模型反应了免疫系统在抑郁发生中的重要作用,是当前研究的热点,但各细胞因子对中枢神经系统的影响不尽相同,有各自特点,因此此模型有一定局限性。

4.2 药物诱导模型

早期在临床上发现耗竭单胺类递质的抗高血压药物—利血平可以导致患者产生抑郁症状,进一步研究发现利血平诱导大鼠 5-羟色胺能系统中相关的储藏蛋白、受体和转运体的表达皆发生改变,也有研究发现急性/慢性给予利血平的大鼠中在 5-HT 诱导下产生的第二信使磷酸肌醇 1P1 增加,5-HT₂ 受体的结合位点也发生单胺类物质降低后的补偿性增加^[30]。利血平还可导致免疫学方面的改变,利血平通过消耗 5-HT 和诱导迟发型超敏反应而抑制细胞免疫反应,导致 IFN- γ 的分泌,而 IFN- γ 被认为可以降低抗体的产生,并导致特异性的肠道体液免疫反应 (IgA 和 IgG 亚群) 降低^[31]。经典药物 TCAS、MAOIs 以及重复小剂量苯甲酰胺均可逆转利血平导致的症状。利血平可导致动物中伤害性感受阈降低,脑内单胺递质降低及氧化/氮应激增加诱导炎症级联反应从而导致疼痛及抑郁“二联体”的发生,这符合最新的疼痛抑郁共病机制假说。因而此模型现除用于抗抑郁新药的初筛外,已大量用于具有抗疼痛/抑郁功能的抗炎症药物 (姜黄色素)、镇痛药物 (龙胆苦甙) 等的药理机制研究当中^[32]。

人类精神兴奋剂戒断综合征和抑郁症状极为相

似,精神兴奋剂戒断的大鼠产生快感的阈值升高,奖赏功能缺陷,在强迫游泳试验(forced swimming test, FST)时游泳时间减少、游泳距离减短及不动时间增加,悬尾试验(tail suspension test, TST)中不动时间延长;5-HT 系统、HPA 轴活性及海马神经可塑性均发生相应变化,随后的工作中,研究人员也利用乙醇、尼古丁、吗啡、可卡因、安非他命、摇头丸(methylene dioxy methamphetamine, MDMA)、海洛因等急性或亚慢性给药的方式建立了相应药物的戒断模型,并对动物病理生理学及行为学试验为指标的应激反应等做了深入的研究。此外,一些治疗精神兴奋剂戒断综合征的药物是直接或间接通过单胺类系统来发挥疗效的,这说明它和抑郁症有相似的药理学特性。但此模型持续时间较短,发病机制不同于应激抑郁,但并不影响其在抑郁研究中的作用^[33]。

5 基因型改变

在 5-HT 能系统的所有分子中,转录因子 Lmx1b 在发育中发挥着广泛的调控作用,而转录因子 Pet1 仅在 5-HT 神经元中特异表达并直接激活血清能系统中的相关基因,包括色氨酸羧化酶(tryptophan hydroxylase, Tph2)、5-HT 转运蛋白(serotonin transporter 5, Sert)及囊泡单胺转运蛋白(vesicular monoamine transporter, Vmat2)。基于这些基因建立了相应的基因敲除小鼠、转基因小鼠及条件性基因剔除小鼠,包括影响中缝 5-HT 神经元的发育、5-HT 生物合成、5-HT 储存和释放、5-HT 转运蛋白 5-HT 受体表达的模型^[34]。

抑郁症患者中 HPA 轴持续亢进,使分布于下丘脑神经细胞的促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH)生成增多,CRH 经垂体门脉系统到达垂体前叶,促使垂体前叶的促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)产生增加,ACTH 再随血液到达肾上腺皮质,从而使肾上腺皮质合成糖皮质激素(皮质酮等)增多。基于各激素及受体、转运蛋白也建立了相应的基因敲除小鼠、转基因小鼠及条件性基因剔除小鼠^[35],包括 CRH 过表达、CRHR1/CRHR2 双基因敲除、条件性 GR 敲除、条件性 GR 过表达等模型。

通过近交繁殖的方法,人们筛选得到了许多先天具有抑郁表型的动物品系,这些动物为基因突变动物,在行为学、神经内分泌、神经生化及免疫等方面均不同程度模拟了人类抑郁症状,同时还兼有嗜

酒、痴呆等表型,最为常用的如 Wista-Kyoto 大鼠、cLH 和 HAB (high anxiety behavior, HAB) 大鼠等^[36]。尽管这类动物可以提供研究人类疾病、精神疾病如抑郁等,但精神疾病是很难复制的,因为这些疾病与人特异性的一些基因相关。

6 讨论

综上所述,现有的模型使用尽管还存在一些限制,如动物不能观察悲伤、内疚、自杀的念头等仅限于人中的症状,模型建立的急性应激本质,以及大多以雄性动物造模等与人类不符的情况。但现有的抑郁模型在一定程度上允许对分子、基因、表观遗传、环境等致病因素进行研究,从而弄清潜在基因与环境改变的因果关系,最终阐明其发病机理并用于相应治疗药物的研发。且患者中的临床研究也进一步推动着动物模型的改进,多种临床技术和指标 MRI、PSG、ERPs 等在模型评价中的应用将为建立更有效的动物模型提供指导。

参 考 文 献

- [1] Whiteford HA, Degenhardt L, Rehm J, et al. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010[J]. Lancet, 2013, 382(9904): 1575–1586.
- [2] 邓佳慧,李素霞,董问天,等. 难治性抑郁症治疗的研究进展[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2014, 40(3): 189–192.
- [3] Abelaira HM, Reus GZ, Quevedo J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression[J]. Revista Brasil Psiquiatria, 2013, 35(Suppl 2): 112–120.
- [4] Stepanichev M, Dygalo NN, Grigoryan G, et al. Rodent models of depression: neurotrophic and neuroinflammatory biomarkers[J]. BioMed Res Int, 2014, 9: 2757.
- [5] Nabeshima T, Kim HC. Involvement of genetic and environmental factors in the onset of depression[J]. Exp Neurol, 2013, 22(4): 235–243.
- [6] Wiborg O. Chronic mild stress for modeling anhedonia[J]. Cell Tissue Res, 2013, 354(1): 155–169.
- [7] Sun JD, Liu Y, Yuan YH, et al. Gap junction dysfunction in the prefrontal cortex induces depressive-like behaviors in rats[J]. Neuropsychopharmacology, 2012, 37(5): 1305–1320.
- [8] Cao X, Li LP, Wang Q, et al. Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviors[J]. Nature Med, 2013, 19(6): 773–777.
- [9] Henningsen K, Palmfeldt J, Christiansen S, et al. Candidate hippocampal biomarkers of susceptibility and resilience to stress in a rat model of depression[J]. Mol Cellul Proteomics, 2012, 11(70): 1–35.
- [10] Bergstrom A, Jayatissa MN, Thykjaer T, et al. Molecular pathways associated with stress resilience and drug resistance in the

- chronic mild stress rat model of depression: a gene expression study[J]. *J Mol Neurosci*, 2007, 33(2): 201–215.
- [11] Farhang S, Barar J, Fakhari A, et al. Asymmetrical expression of BDNF and NTRK3 genes in frontoparietal cortex of stress-resilient rats in an animal model of depression[J]. *Synapse*, 2014, 68(9): 387–393.
 - [12] Fortune ES, Rose GJ. Short-term synaptic plasticity as a temporal filter[J]. *Trends Neurosci*, 2001, 24(7): 381–385.
 - [13] Vollmayr B, Gass P. Learned helplessness: unique features and translational value of a cognitive depression model[J]. *Cell Tissue Res*, 2013, 354(1): 171–178.
 - [14] Li K, Zhou T, Liao L, et al. betaCaMKII in lateral habenula mediates core symptoms of depression[J]. *Science*, 2013, 341(6149): 1016–1020.
 - [15] Ridder S, Chourbaji S, Hellweg R, et al. Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(26): 6243–6250.
 - [16] Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T. Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents[J]. *Fronti Neurosci*, 2014, 17(8): ecollection2014.00166.
 - [17] Ellenbroek BA, Cools AR. The long-term effects of maternal deprivation depend on the genetic background[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2000, 23(1): 99–106.
 - [18] 薛晓芳, 李曼, 王玮文, 等. 母婴分离的动物模型及其神经生物学机制[J]. *心理科学进展*, 2013, 21(6): 990–998.
 - [19] O'Connor RM, Grenham S, Dinan TG, et al. microRNAs as novel antidepressant targets: converging effects of ketamine and electroconvulsive shock therapy in the rat hippocampus[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2013, 16(8): 1885–1892.
 - [20] Patel PD, Lopez JF, Lyons DM, et al. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain[J]. *J Psychiatr Res*, 2000, 34(6): 383–392.
 - [21] Rawashdeh O, Dubocovich ML. Long-term effects of maternal separation on the responsiveness of the circadian system to melatonin in the diurnal nonhuman primate (*Macaca mulatta*) [J]. *J Pineal Res*, 2014, 56(3): 254–263.
 - [22] 祁可可, 冯敏, 孟肖路, 等. 树鼩的社会挫败抑郁模型[J]. *心理科学进展* 2012, 20(11): 1787–1793.
 - [23] Willard SL, Riddle DR, Forbes ME, et al. Cell number and neuropil alterations in subregions of the anterior hippocampus in a female monkey model of depression[J]. *Biol Psychiatr*, 2013, 74(12): 890–897.
 - [24] Song C, Leonard BE. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005, 29(4–5): 627–647.
 - [25] Morales-Medina JC, Juarez I, Venancio-Garcia E, et al. Impaired structural hippocampal plasticity is associated with emotional and memory deficits in the olfactory bulbectomized rat[J]. *Neuroscience*, 2013, 236(16): 233–243.
 - [26] El-Bakly WM, Hasanin AH. Hypericum perforatum decreased hippocampus TNF-alpha and corticosterone levels with no effect on kynurenine/tryptophan ratio in bilateral ovariectomized rats[J]. *Korean J Physiol pharmacol*, 2014, 18(3): 233–239.
 - [27] Sukoff Rizzo SJ, Neal SJ, Hughes ZA, et al. Evidence for sustained elevation of IL-6 in the CNS as a key contributor of depressive-like phenotypes[J]. *Translat Psychiatr*, 2012, 2: e199.
 - [28] Kubera M, Curzytek K, Duda W, et al. A new animal model of (chronic) depression induced by repeated and intermittent lipopolysaccharide administration for 4 months[J]. *Brain Behav Immunity*, 2013, 31: 96–104.
 - [29] Felger JC, Mun J, Kimmel HL, et al. Chronic interferon-alpha decreases dopamine 2 receptor binding and striatal dopamine release in association with anhedonia-like behavior in nonhuman primates[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38(11): 2179–2187.
 - [30] Lee MJ, Wei JW. The influences of reserpine and imipramine on the 5-HT2 receptor binding site and its coupled second messenger in rat cerebral cortex[J]. *Chin J Physiol*, 2013, 56(4): 199–208.
 - [31] Bao S, Fei J, Shen J, et al. Reserpine-induced model of stress suppresses mucosal immunity[J]. *Immunol Cell Biol*, 2006, 84(6): 537–542.
 - [32] Arora V, Chopra K. Possible involvement of oxido-nitrosative stress induced neuro-inflammatory cascade and monoaminergic pathway: underpinning the correlation between nociceptive and depressive behaviour in a rodent model[J]. *J Affect Disorders* [J]. 2013, 151(3): 1041–1052.
 - [33] Renoir T, Pang TY, Lanfumey L. Drug withdrawal-induced depression: serotonergic and plasticity changes in animal models[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2012, 36(1): 696–726.
 - [34] Fernandez SP, Gaspar P. Investigating anxiety and depressive-like phenotypes in genetic mouse models of serotonin depletion[J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62(1): 144–154.
 - [35] Gass P, Reichardt HM, Strekalova T, et al. Mice with targeted mutations of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: models for depression and anxiety? [J]. *Physiol Behav*, 2001, 73(5): 811–825.
 - [36] Willner P, Belzung C. Treatment-resistant depression: are animal models of depression fit for purpose? [J]. *Psychopharmacology*, 2015, 232(19): 3473–3495.

严重的糖尿病血管病变的发生机制 及其动物模型制作进展

冯丽帅,马旭,王建波*

(上海交通大学附属第六人民医院介入放射科,上海 200233)

【摘要】 2型糖尿病(DM)并发的动脉粥样硬化(AS)由于具有斑块不稳定、供血区缺血严重及治疗后再狭窄率高等特点成为导致2型DM患者死亡及截肢最常见病因。对2型DM血管并发症制定并实施针对性强的治疗方案对降低此类疾病对人类健康的危害有重要意义。而2型DM背景下严重的血管病变动物模型的建立,则为研究并进一步实施2型DM血管并发症治疗方案提供了实验基础。本文首先对2型DM并发的严重的血管病变发生机制进行探讨,进一步对现阶段国内外建立此类血管病变动物模型的实验方法进行综述。

【关键词】 糖尿病;血管病变;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0327-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.021

Mechanism and research progress of severe diabetic vasculopathy and related experimental animal studies

FENG Li-shuai, Ma Xu, WANG Jian-bo*

(Department of Interventional Radiology, Shanghai Jiaotong University
Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

【Abstract】 Diabetes mellitus (DM) complicated with atherosclerosis (AS) is the most common cause of amputation and death in patients with type 2 DM due to the instability of plaque, severe ischemia and the high rate of restenosis after treatment. It is important to reduce the diabetic vascular complications in those patients. Establishment of animal models of severe diabetic vasculopathy will provide an experimental basis for further studies on those complications. In this paper, we will firstly discuss the mechanism of the development of severe diabetic vasculopathy and then review the methods referring to the establishment of this kind of animal models worldwide.

【Key words】 Diabetes mellitus; Vasculopathy; Animal model

Corresponding author: WANG Jian-bo, Email: 253823319@qq.com

全球现约有3亿人患有2型DM。18岁以上成年人中2型糖尿病(DM)的发病率约为9%^[1]。2型DM引发的以动脉粥样硬化(AS)为代表的心血管并发症发病率在全球范围内不断上升,成为2型DM患者最常见的死因,给人类健康造成极大危害^[2,3]。为2型DM背景下的血管病变设计有效的治疗方案是当今医学研究热点。众所周知,高脂血

症与AS发生关系密切,但前期临床实验表明,纠正高脂血症可以减少DM微小血管并发症(如视网膜病变及肾脏病变),却不能阻止AS的发生,且血管病变在形态学上与非DM背景下的血管病变相比,具有血管弹性差,管腔狭窄严重且动脉斑块不稳定的特点,提示DM血管并发症发生可能与DM背景下的其他机制相关^[4-7]。因此,首先探明2型DM与

【作者简介】冯丽帅(1991-),女,硕士研究生,专业:介入放射学。Email: fenglishuai1991@163.com

【通讯作者】王建波(1969-),男,副教授,研究方向:糖尿病足及外周血管病变。Email: 253823319@qq.com

此背景下严重的血管病变发生所涉及的相关机制,对成功构建理想严重的血管病变动物模型,并随后研制有效的预防和治疗手段有重要价值。

1 2 型 DM 背景下严重的血管病变发生的相关机制

对 2 型 DM 背景下严重的血管病变的发生机制进行探讨,有利于为 2 型 DM 背景下严重血管病变治疗方案提供新思路。多名学者通过实验研究发现,相比于不伴 DM 的 AS 患者,DM 背景下的 AS 具有血管狭窄严重且斑块不稳定的特点^[5,6];国内外学者就 2 型 DM 主要发病特点与此背景下严重的血管病变的关系做了大量相关研究。下文主要就 2 型 DM 导致体内发生的两方面变化与严重的血管病变发生的相关性研究进行综述。

1.1 DM 背景下巨噬细胞功能异常与 AS 的关系

近年来多名学者研究显示,处于 DM 背景下的巨噬细胞功能将发生改变,此种改变将促进 AS 发展并导致动脉斑块不稳定性的增加。Bornfeldt 等^[7]认为,DM 可导致患者体内出现巨噬细胞的异常分化,从而产生更多细胞因子和趋化因子,促进了 AS 的发生;Nishizawa 和 Bornfeldt^[8]则认为高糖环境是诱发巨噬细胞介导炎症反应增加的原因。在上述理论的基础上,Sun 等^[9]通过动物实验发现,巨噬细胞迁移抑制因子的使用可起到延缓 DM 动物血管病变发展进程的作用,这进一步有力的证明了 DM 患者体内巨噬细胞的异常活动的确在诱发糖尿病血管并发症方面发挥了重要作用。此外,多项研究发现,与非 DM 人群相比,DM 患者体内巨噬细胞易发生凋亡,而这将导致动脉斑块的不稳定性及栓塞几率的增加,成为危害人类健康的重大安全隐患^[10-14]。上述相关研究均证明了 DM 背景下巨噬细胞功能异常与 AS 发生的密切相关性,这提示我们在造模过程中可将对 DM 动物巨噬细胞功能及其状态的监测,作为参考血管模型成功建立与否的重要指标之一;此外,相关研究还提示我们,在预防或治疗 DM 所致的严重的血管病变时,创新性地干预消除促进巨噬细胞功能变化的因素,或在治疗方案中有针对性的加入适量巨噬细胞的靶向抑制剂,将有可能突破性地起到延缓 DM 血管病变的疗效。

1.2 胰岛素抵抗与 AS 的关系

2 型 DM 以胰岛素抵抗为主要发病机制,近年来,多名学者通过实验研究证实了胰岛素抵抗与 AS 发生的相关性。Al-Mashhadi 等^[15]通过相关实验得

出结论:以单纯高血糖为主要发病特征的 1 型 DM 并非促进 AS 发生的独立危险因素,这说明 DM 背景下 AS 的发生在很大程度上仍受其他机制的调节。Hamilton 等^[16]认为胰岛素抵抗所致胰岛素底物受体功能减低可造成对 AS 有预防作用的一氧化氮(NO)的减少及与 AS 的发生关系密切的晚期糖基化终产物(AGEs)及氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)生成增加;另外,胰岛素抵抗还可通过多种途径造成动脉中层钙化及血管弹性的降低,进一步促进严重的血管病变形^[17-19]。在此理论基础上,诸多学者通过设计不同的实验证实了上述假设:胰岛素抵抗导致的体内应激反应及副产物的增加,与 AS 的发展变化密切相关,即:在其他因素相同的情况下,胰岛素敏感性越低,血管病变加重程度越深^[20,21]。

2 建立 2 型 DM 血管病变动物模型的常用方法介绍

综合 2 型 DM 发病特点后我们得出结论:想要成功建立符合上述血管病变特点的动物模型,造模的关键是在血管病变出现之前首先诱发动物产生胰岛素抵抗。众所周知,以胰岛素抵抗为发病机制的 2 型 DM 的发生发展与人类长期摄入过剩能量关系密切,据此科学家们推断出:高热量饲料饲喂实验动物便可诱发其产生类似于人类胰岛素抵抗的理论假设。随后,Kajimoto 等^[22]即通过设计动物实验证实了这一理论假设的科学性;此外,多名学者在研究实践中发现,小剂量胰岛 β 细胞毒性药物的使用,同样可使动物体内的胰岛素敏感性下降,达到类似于人类胰岛素抵抗这一症状的效果^[23,24]。综合上述理论和长期实践经验我们得出:长期高脂饮食或小剂量破坏胰岛功能的药物诱导形成的 2 型 DM 动物与人类 2 型 DM 发展进程类似,故这些动物模型发生的血管病变亦可成为研究治疗 2 型 DM 背景下严重的血管病变的理想素材。

3 造模动物的选择及相应实验案例

由于不同物种生理差异性的存在,国际上目前尚无 2 型 DM 造模动物选择的统一标准。近年来学者们根据各自的研究目的分别选择了不同动物作为造模对象。

3.1 兔应用于研究 DM 背景下血管病变相关案例

兔因其脂代谢和心血管系统与人类相似度高且造模过程中死亡率低等特点被研究人员看作是模拟

人类 2 型 DM 及其并发症的理想动物模型^[25, 26]。Ning 等^[27]通过相关实验证明了高糖高脂饲料喂饲确实可使家族性高脂血症兔发生胰岛素抵抗,而这一症状同样影响着实验组兔 AS 的进程;Zheng 等^[28]在对两组周龄相同日本白兔做了相似处理后,经研究得出结论:高脂高胆固醇饲料喂饲的确可使实验兔胰岛素敏感性降低,出现类似于人类 2 型 DM 的症状。随后,研究人员通过对两组动物血管壁标本进行分析比较后,进一步发现:与无血管壁异常的对照组相比,实验组日本白兔血管壁出现了斑块;高玲等^[29]在建立非 DM 与 DM 兔模型后发现,DM 背景下兔 AS 腹主动脉壁特别是近血管腔处巨噬细胞浸润明显多于非 DM 背景下 AS 兔,而且发现了更加活跃的炎症细胞浸润,提示相比较于非 DM 背景下 AS,DM 背景下 AS 的病变性质不稳定的特性,与上文分析过的 DM 背景下 AS 斑块具备的特点相符。以上列举的种种相关实验案例提示我们:兔能够在高脂饲料条件下产生类似于人类 2 型 DM 症状,而这种生理状态则与其血管病变的产生密切相关。这进一步证明兔能够并适合成为 2 型 DM 背景下严重的血管病变的造模及实验研究对象。但 Zhou 等^[30]在对 DM 兔模型实施经皮腔内血管成形术(PTA)后发现,高血糖刺激对兔血管再狭窄进程并无显著影响,这提示我们 DM 兔并不适合作为针对血管再狭窄所研制的新型药物或治疗方案的疗效评估模型;另外,由于兔本身对 STZ 不敏感,故寻找出有效破坏兔部分胰岛功能的药物或操作方法成为成功建立符合要求的动物模型和进一步进行科学研究前提。

3.2 大鼠应用于研究 DM 背景下血管病变的实验案例

大鼠被认为是啮齿目动物中较为适合制造 2 型 DM 所致动脉粥样硬化模型的动物。Wajima 等^[31]将周龄及体重均相同的自发性肥胖型大鼠(OLETF)和非 DM 大鼠(LETO)设为实验组和对照组并用标准大鼠饲料喂饲,一段时间后分别对其实施血压、糖耐量及颈动脉血流超声检查,随后猝死大鼠并对其颈动脉病理及颈动脉厚度等研究分析。结果显示:出现胰岛素抵抗的实验组大鼠颈动脉斑块明显大于对照组,血管厚度也明显超过了对照组。而此类型的血管病变与我们之前讨论过的 2 型 DM 背景下严重的血管病变特点类似,据此我们得出:OLETF 也可作为理想的动物模型应用于研究和治疗 2 型 DM 背景下严重的血管病变这一领域。

但由于大鼠体内存在天生的抗动脉粥样硬化及血管炎症等相关机制,其在建立胰岛素抵抗所致动脉粥样硬化模型应用中的普适性仍待通过更多相关研究证实;另一方面,Carroll 等^[32]认为饮食诱发或自发性大鼠胰岛素抵抗模型因与人类胰岛素抵抗机制并不完全相同,故选择大鼠作为实验动物进行造模的科学严谨性尚待探讨。

3.3 小鼠应用于研究 DM 背景下血管病变的实验案例

小鼠因体积小,成本低,妊娠周期短,繁殖力强,易于操作且与其他种属动物相比,具有与人类基因组同源性高等特点现已成为应用极为广泛 DM 及其并发症的造模动物^[33]。DM 小鼠模型主要分为三类:自发性 DM 小鼠、实验性 DM 小鼠和基因工程 DM 小鼠模型^[34]。下面对近来研究较热的以基因敲除为基础的相关血管病变实验造模方法进行简单罗列。Sun 等^[4]对 *ApoE* 基因敲除后的小鼠实施部分腹腔内注射 STZ 的方法得到实验组 DM 小鼠和对照组非 DM 小鼠,一段时间后检测发现实验组小鼠血浆胆固醇含量明显高于对照组且 AS 病变亦明显严重于对照组,与人类 2 型 DM 背景下严重血管病变特点相符;Zhu 等^[21]在对 *ApoE* 及 *LDLR* 基因敲除后的 C57BL/6 雌性小鼠进行腹腔内 STZ 注射并辅以高胆固醇饲料喂饲处理后,成功建立了类似于人类 2 型 DM 的小鼠模型,并在此基础上进一步对此生理状态下的小鼠所发生的血管病变进行了相关机制的分析及研究,发现处于 2 型 DM 生理状态下小鼠体内所出现的变化与严重的血管病变的发生密切相关。虽然一些学者对选择小鼠作为造模动物持肯定态度,但当今学术界仍不乏对利用基因敲除小鼠来建立 2 型 DM 背景下严重的血管病变动物模型的做法的质疑之声。Avramoglu 等^[35]认为基因敲除将可能影响 AS 进程;C57BL/6 小鼠对控制条件要求苛刻,饲料或环境的轻微变化就会引起实验小鼠发出现不同表型;种种原因将影响实验结果的说服力;Huang 等^[36]甚至通过实验证明,选择性抑制脂肪组织 *ApoE* 的表达,可以提高胰岛素敏感性并削弱巨噬细胞的致炎能力。Zheng 等^[28]对选择小鼠作为理想血管病变造模动物持有异议,他认为一方面由于小鼠因天生具有对抗动脉粥样硬化及血管炎症的机制,另外由于体型等因素的制约,故在对单个小鼠进行多次血样采集、血压测量及其他 2 型 DM 胰岛素抵抗重要相关指标测量时存在困难,故其认为

小鼠并不是最适合建立胰岛素抵抗模型的动物。

3.4 猪应用于 DM 背景下血管病变治疗模型的研究进展

Hamamdziec 和 Wilensky^[37]认为,在新型药物及治疗方案真正应用于临床前的疗效评估阶段,与小型动物相比,大型实验动物(如猪)的使用可以达到更好的评估效果。Ludvigsen 等^[38]在使用少量 STZ 诱发小型猪患 DM 后发现:轻微 DM 并不能加重 AS,但是为了评估心血管药物对 DM 的附加疗效,DM 动物模型的构建仍具有其必要性。这提示我们在 DM 背景下 AS 的新型治疗方案真正应用于临床前,可选择小型猪来进行临床前期疗效的评估,以此确保新型治疗方案真正应用于人类时的安全有效性。

4 结语

动物疾病模型的建立是对人类疾病研究并设计出有效治疗方案的基础,而至今仍没有一种公认的理想动物模型与人类 2 型 DM 特征完全吻合,不同类型的动物模型各有其特征和局限性^[39]。对实验动物的选择应在参照前人研究经验的基础上,根据具体实验研究目的等情况而酌情考量。建立表现为以胰岛素抵抗为发病特点的 2 型 DM 所致血管病变的动物模型,为有针对性的研制 DM 背景下严重的血管病变的治疗方案提供前提。为更有针对性的治疗 2 型 DM 背景下严重的血管并发症,我们应首先投入更多精力来深入研究 2 型 DM 背景下严重的血管病变的具体发病机制,并将严重的血管病变的具体特点与导致此种血管变化所涉及的相关机制充分联系起来。另外,在新型治疗方案应用于临床之前,我们可选择大型实验动物(如猪)来做为疗效评估的模型,以此来充分确保新治疗方案应用于人类时的安全性和有效性。

参 考 文 献

- [1] Tang YZ, Wang G, Jiang ZH, et al. Efficacy and safety of vildagliptin, sitagliptin, and linagliptin as add-on therapy in Chinese patients with T2DM inadequately controlled with dual combination of insulin and traditional oral hypoglycemic agent [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2015, 7: 91.
- [2] Rhee SY, Kim YS. Peripheral arterial disease in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Diabet metab J*, 2015, 39(4): 283–290.
- [3] Kohen Avramoglu R, Laplante MA, Le Quang K, et al. Cardiovascular complications (CVC) are the most common causes of death in patients with type 2 diabetes (T2D) [J]. *Can J Diabetes*, 2013, (5): 351–358.
- [4] (UKPDS) GROUP. UPDS. Intensive blood glucose control with sulphonyl ureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes [J]. *Lancet*, 1998, 352: 837–853.
- [5] Gleibner CA. The vulnerable vascular disease in diabetes mellitus [J]. *Hamostaseologie*, 2015, 35(3): 267–271.
- [6] Ritsinger V, Saleh N, Lagerqvist B, et al. High event rate after a first percutaneous coronary intervention in patients with diabetes mellitus: results from the Swedish coronary angiography and angioplasty registry [J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2015, 8(6): e002328.
- [7] Karin E. Bornfeldt. 2013 Russell Ross Memorial Lecture in Vascular Biology: Cellular and molecular mechanisms of diabetes-accelerated atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(4): 705–714.
- [8] Nishizawa T, Bornfeldt KE. Diabetic vascular disease and the potential role of macrophage glucose metabolism [J]. *Ann Med*, 2012, 44(6): 555–563.
- [9] Sun H, Zhang X, Zhao L, et al. Attenuation of atherosclerotic lesions in diabetic apolipoprotein E-deficient mice using gene silencing of macrophage migration inhibitory factor [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(4): 836–849.
- [10] 李丹, 李玉洁, 杨庆, 等. 血管内皮功能障碍与动脉粥样硬化研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(8): 272–276.
- [11] 阎雨, 何阳阳, 方莲花, 等. 巨噬细胞在动脉粥样硬化中的研究进展 [J]. *Chin Pharm J*, 2014, 49(1): 7–10.
- [12] 张艳, 林玉壁, 孙雷. 巨噬细胞凋亡与动脉粥样硬化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(5): 406–408.
- [13] 严士敏, 陈凤玲. 糖尿病动脉粥样硬化中巨噬细胞凋亡的研究进展 [J]. *医学综述*, 2013, 19(13): 2315–2317.
- [14] 朱晔斌, 吴双, 孔麟麟, 等. 氧化型低密度脂蛋白的形成及其致动脉粥样硬化的机制 [J]. *武警医学院学报*, 2009, 18(1): 62–71.
- [15] Al-Mashhadi RH, Björklund MM, Mortensen MB, et al. Diabetes with poor glycaemic control does not promote atherosclerosis in genetically modified hypercholesterolaemic minipigs [J]. *Diabetologia*, 2015, 58: 1926–1936.
- [16] Hamilton SJ, Watts GF. Endothelial dysfunction in diabetes: pathogenesis, significance, and treatment [J]. *Rev Diabetic Studies*, 2013, 10(2–3): 133–156.
- [17] Li H, Li XX, Ma Q, et al. The variability of oxLDL-induced cytotoxicity on different types of cell lines [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 67(2): 635–644.
- [18] Lu H. Insulin enhances dendritic cell maturation and scavenger receptor-mediated uptake of oxidised low-density lipoprotein [J]. *J Diabetes Complic*, 2015, 29(4): 465–471.
- [19] Sozer V, Himmetoglu S, Korkmaz GG, et al. Paraoxonase, oxidized low density lipoprotein, monocyte chemoattractant protein-1 and adhesion molecules are associated with macrovascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Minerva Med*, 2014, 105(3): 237–244.

- [20] Gray SP, Di Marco E, Okabe J, et al. NADPH oxidase 1 plays a key role in diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2013, 127(18): 1888 – 1902.
- [21] Zhu L, He Z, Wu F, et al. Immunization with advanced glycation end products modified low density lipoprotein inhibits atherosclerosis progression in diabetic apoE and LDLR null mice [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2014, 13: 151.
- [22] Kajimoto Y, Kaneto H. Role of oxidative stress in pancreatic β -cell dysfunction [J]. *Ann New York Acad Sci*, 2004, 1011(1): 168 – 176.
- [23] Bhonagiri P, Pattar GR, Habegger KM, et al. Evidence coupling increased hexosamine biosynthesis pathway activity to membrane cholesterol toxicity and cortical filamentous actin derangement contributing to cellular insulin resistance [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(9): 3373 – 3384.
- [24] Gilbert ER, Fu Z, Liu D. Development of a nongenetic mouse model of type 2 diabetes [J]. *Exp Diabetes Res*, 2011: 416254.
- [25] Fan J, Watanabe T. Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models [J]. *Pharmacol Ther*, 2003, 99(3): 261 – 282.
- [26] Duranthon V, Beaujean N, Brunner M, et al. On the emerging role of rabbit as human disease model and the instrumental role of novel transgenic tools [J]. *Transgenic Res*, 2012, 21(4): 699 – 713.
- [27] Ning B, Wang X, Yu Y, et al. High-fructose and high-fat diet-induced insulin resistance enhances atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2015, 12:.
- [28] Zheng H, Zhang C, Yang W, et al. Fat and cholesterol diet induced lipid metabolic disorders and insulin resistance in rabbit [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2009, 117(8): 400 – 405.
- [29] 高玲, 陈琴, 康丽娜, 等. DM 和非 DM 动脉粥样硬化兔模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(3): 179 – 183.
- [30] Zhou X, Dong J, Zhang L, et al. Hyperglycemia has no effect on development of restenosis after percutaneous transluminal angioplasty (PTA) in a diabetic rabbit model [J]. *J Endocrinol*, 2015, 224(2): 119 – 125.
- [31] Wajima D, Nakagawa I, Takamura Y, et al. Carotid artery stenosis is exacerbated in spontaneously obese model rats with diabetes [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2014, 21(12): 1253 – 1259.
- [32] Carroll JF, Dwyer TM, Grady AW, et al. Hypertension, cardiac hypertrophy, and neurohumoral activity in a new animal model of obesity [J]. *Am J Physiol*, 1996, 271(1–2): H373 – H8.
- [33] 刘倩, 李霞辉, 张学梅, 等. 2 型糖尿病小鼠模型的研究进展 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2013, 18(10): 1196 – 1200.
- [34] Islam MS, Loots du T. Experimental rodent models of type 2 diabetes: A review [J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2009, 31(4): 249 – 261.
- [35] Kohen Avramoglu R, Laplante MA, Le Quang K, et al. The genetic and metabolic determinants of cardiovascular complications in type 2 diabetes: recent insights from animal models and clinical investigations [J]. *Can J Diabetes*, 2013, 37(5): 351 – 358.
- [36] Huang ZH, Reardon CA, Getz GS, et al. Selective suppression of adipose tissue apoE expression impacts systemic metabolic phenotype and adipose tissue inflammation [J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(2): 215 – 226.
- [37] Hamamdzić D, Wilensky RL. Porcine models of accelerated coronary atherosclerosis: role of diabetes mellitus and hypercholesterolemia [J]. *J Diabetes Res*, 2013: 761415.
- [38] Ludvigsen TP, Kirk RK, Christoffersen BØ, et al. Göttingen minipig model of diet-induced atherosclerosis: influence of mild streptozotocin-induced diabetes on lesion severity and markers of inflammation evaluated in obese, obese and diabetic, and lean control animals [J]. *J Transl Med*, 2015, 13(1): 312.
- [39] 刘芳, 杨华, 周文江, 等. 诱发性 2 型糖尿病小鼠模型与自发性 db/db 小鼠特性的比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(6): 54 – 74.

[收稿日期] 2015-12-27