



中国科技论文统计源期刊

中文核心期刊要目总览

ISSN 1671-7856

CN 11-4822/R

ZHONGGUO BIJIAO YIXUE ZAZHI

中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

原名《中国实验动物学杂志》



2016 **6**

邮发代号: 82-917

第26卷 (第6期) Vol.26 No.6

ISSN 1671-7856

主办 中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所



主管
中国科学技术协会

主办
中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所

主编
秦 川

编辑
《中国比较医学杂志》编辑部

出版
中国实验动物学会

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

广告经营许可证
京朝工商广字第 8131 号

照排
同方知网(北京)技术有限公司

印刷
北京市百善印刷厂

邮发代号
82-917

定价
每期 20.00 元, 全年 240 元

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

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

本刊电子版出版发行合作伙伴: 中邮阅读网: www.183read.com

本期执行主编 秦 川

本期责任编辑 吴漪雨

目 次

(本刊已入编“中文核心期刊要目总览”)

研究报告

游离SIVmac239 病毒与 T 细胞介导两种方式

感染内皮细胞的效果比较 黄丹, 丛喆, 徐珮, 等(1)

大鼠自发性巨大肿瘤的病理分析 李婧, 许世清, 李鸿, 等(6)

两种不同的酒精摄入方式诱导的

小鼠酒精性肝损伤模型比较 肖娟, 张瑞芬, 黄菲, 等(11)

环孢素 A 对肝细胞中磷酸化 AKT 蛋白表达的影响 杨柳, 刘晓军, 王宏宇, 等(18)

多柔比星脂质体注射液与多柔比星注射液

大鼠重复给药毒性的比较 张颖, 马玉奎, 戴晓莉(23)

微生物源性抗氧化剂对小鼠睡眠及抗氧化性能的影响 余思佳, 徐建雄(28)

先天性白内障小鼠主要脏器重量和

血液生理生化指标的分析 袁江玲, 徐晓辉, 张燕, 等(32)

TALEN 构建 *fndc5* 基因敲除小鼠及初步分析 吴子环, 胡雄兵, 毛凤仪, 等(37)

辛伐他汀不同干预方案对骨质疏松大鼠

骨质量的影响 刘昊, 张岩, 张国彬, 等(42)

两种微创 Beagle 犬心肌梗死模型的比较 邓祖跃, 杨何, 刘璐, 等(48)

HBV 转基因小鼠尿液中乙肝病毒相关指标的分析 杨阳, 刘光泽, 李秀梅, 等(53)

新生儿缺氧缺血脑损伤大鼠模型的制备 庞炜, 曹帅帅, 李树祎, 等(61)

调查与观察

中国实验动物中鼠管状线虫的

分子鉴定和感染调查 高正琴, 李晓波, 冯育芳, 等(67)

技术方法

用压力-容积环评价大鼠心功能方法的改进及

注意事项 刘晓雨, 谭文(75)

综述与专论

兔 VX2 鼻咽移植瘤模型建立的研究现状 胡月, 文庆莲, 张莉(83)

肺纤维化动物模型及研究进展 陈孟毅, 孟爱民(88)

简 讯

一种实验兔膝关节滑膜组织提取新方法 王俊伟, 陈利锋, 王华松(94)

广 告 (封二, 封三, 封底)

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly Established in March 1991 Volume 26 Number 6 June 30 2016

Responsible Institution

China Association for Science and Technology

Sponsor

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

Editing

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

Editor-in-Chief

QIN Chuan (秦川)

Publishing

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

Printing

The Baishan Printing House of Changping, Beijing

Distributor

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

Mail-order

Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine

CSSN

ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

Copyright 2016 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

CONTENTS IN BRIEF

- Comparison of the SIV infection in endothelial cells by SIVmac239 directly or mediated by T cells *HUANG Dan, CONG Zhe, XU Pei, et al.* (1)
- Pathological observation of two huge spontaneous tumors in Wistar and a GK rats *LI Jing, XU Shi-qing, LI Hong, et al.* (6)
- Comparison of two mouse models of alcoholic liver disease induced by oral ethanol gavage or Lieber-DeCarli ethanol liquid diet *XIAO Juan, ZHANG Rui-fen, HUANG Fei, et al.* (11)
- Effects of cyclosporine A on the expression of phosphorylated AKT in human hepatocytes in vitro and rat hepatocytes in vivo *YANG Liu, LIU Xiao-jun, WANG Hong-yu, et al.* (18)
- Comparison of the repeated dose toxicity of doxorubicin liposome injection and doxorubicin injection in rats *ZHANG Ying, MA Yu-kui, DAI Xiao-li* (23)
- Effects of microbe-derived antioxidant on sleep and antioxidant ability in the rat *YU Si-jia, XU Jian-xiong* (28)
- Analysis of the main organs, hematological and biochemical indexes in congenital cataract mice *YUAN Jiang-ling, XU Xiao-hui, ZHANG Yan, et al.* (32)
- Construction of a *Fndc5* knockout mouse model by TALEN-mediated DNA targeting *WU Zi-huan, HU Xiong-bing, MAO Feng-yi, et al.* (37)
- Effects of simvastatin treatment with different intervention programs on the bone quality of osteoporotic rats *LIU Hao, ZHANG Yan, ZHANG Guo-bin, et al.* (42)
- Comparison of two types of myocardial infarction models in Beagle dogs *DENG Zu-yue, YANG He, LIU Lu, et al.* (48)
- Analysis of hepatitis B virus-related indexes in the urine of HBV transgenic mice *YANG Yang, LIU Guang-ze, LI Xiu-mei, et al.* (53)
- Preparation of a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy *PANG Wei, CAO Shuai-shuai, LI Shu-yi, et al.* (61)
- Prevalence and molecular identification of *Syphacia muris* in laboratory animals in China *GAO Zheng-qin, LI Xiao-bo, FENG Yu-fang, et al.* (67)
- Improvements and key points in the assessment of rat cardiac function using pressure-volume loop *LIU Xiao-yu, TAN Wen* (75)
- Current status of establishment ways of rabbit models of VX2 nasopharyngeal carcinoma *HU Yue, WEN Qing-lian, ZHANG Li* (83)
- Introduction and research progress of animal models of pulmonary fibrosis *CHEN Meng-yi, MENG Ai-min* (88)

游离 SIV_{mac239} 病毒与 T 细胞介导两种方式 感染内皮细胞的效果比较

黄 丹, 丛 喆, 徐 珮, 薛 婧, 魏 强

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

【摘要】 目的 比较游离病毒感染与 T 细胞介导的感染方式对 SIV 感染内皮细胞的影响, 探索 SIV_{mac239} 感染内皮细胞的主要途径, 从而为 SIV 入侵血脑屏障的机制提供理论基础。**方法** 采用游离 SIV 病毒直接感染内皮细胞和 SIV 感染的 CEMx174 细胞与内皮细胞共培养的两种方式, 通过巢式 PCR、间接免疫荧光法、Western blotting 以及 ELISA 检测内皮细胞的感染程度。**结果** 两种感染方式都能在内皮细胞内检测到前病毒 DNA, 感染细胞与内皮细胞共培养时, 内皮细胞内前病毒 DNA 含量, SIV P27 蛋白表达量和细胞培养上清液中 P27 含量远高于游离病毒直接感染的方式。**结论** 细胞介导的感染方式相较于游离病毒直接感染方式对内皮细胞的感染能力更强, 可能是 SIV 病毒入侵血脑屏障的主要途径。

【关键词】 SIV; 艾滋病脑病; 内皮细胞; P27

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)06-0001-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.06.001

Comparison of the SIV infection in endothelial cells by SIV_{mac239} directly or mediated by T cells

HUANG Dan, CONG Zhe, XU Pei, XUE Jing, WEI Qiang

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

【Abstract】 Objective To compare the effects of two approaches of SIV_{mac239} infection in endothelial cells, directly by cell-free virus or by T cell-mediated infection, to explore the predominant approach of SIV_{mac239} infection in endothelial cells, and finally lay a theoretical foundation of the molecular mechanism of SIV viral disruption of the blood-brain barrier. **Methods** We adopted two distinct ways to infect endothelial cells. One was to directly infect the endothelial cells by cell-free virus, another was by co-culture of infected CEMx174 cells with the endothelial cells. The degree of infection in the endothelial cells was evaluated by nested-PCR, indirect immunofluorescence assay, Western blotting and ELISA assays. **Results** The provirus DNA was found in the endothelial cells infected in either way. However, the endothelial cells infected by co-culture with CEMx174 cells had a significantly higher amount of provirus DNA and higher expression of SIV P27 in the cells and in the supernatant than those in the ECs directly infected by cell-free

【基金项目】 国家十二五科技重大专项课题 (2012ZX10004-501-001 和 2013ZX10004-608-003)。

【作者简介】 黄丹 (1991-), 女, 硕士研究生, 专业: 比较医学, 从事实验动物病毒学研究工作。

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

virus. **Conclusions** The way of T cell-mediated infection substantially enhances the capacity of SIV infection of endothelial cells than the direct infection by cell-free virus. It indicates that the T cell-mediated infection may serve as the principal route of SIV disruption of the blood-brain barrier.

[Key words] Simian immunodeficiency virus; AIDS encephalopathy; Endothelial cells; P27

艾滋病是由人类免疫缺陷病毒(HIV)感染引起的获得性免疫缺陷综合症。病毒进入人体后,除攻击 CD4⁺ T 细胞造成其耗竭外还伴随有严重的神经侵袭性。HIV 入侵中枢神经系统(CNS)导致的认知障碍、行为和运动缺陷称为艾滋病相关的神经认知紊乱(HAND)^[1-4]。HIV 在感染早期即可穿透血脑屏障(BBB),侵入 CNS,但具体的作用机制尚不明确。目前存在几个假说,其中比较公认的是病毒直接侵入假说、单核-巨噬细胞侵入假说、T 细胞诱导假说和液相入胞假说^[5]。简单来说,即病毒以游离病毒的形式或以感染病毒的细胞为载体,藉由内皮细胞或细胞间紧密连接处进入并感染中枢神经系统。迄今为止,还没有研究对各种假说进行比较,从而阐明 HIV/SIV 入侵 CNS 的主要途径。本研究通过比较游离病毒与 T 细胞介导的感染方式对 SIV 感染内皮细胞的影响,以期初步验证 SIV 入侵血脑屏障的主要途径。

1 材料和方法

1.1 材料

猴视网膜脉络丛内皮细胞 RF/6A 细胞株购自中国科学院上海生科院细胞;人急性淋巴细胞白血病 T、B 杂交细胞 CEMx174 细胞株由中国医学科学院医学实验动物研究所保藏;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;Western blotting 化学发光试剂盒购自 Santa Cruz 公司;BCATM Protein Assay Kit 购自美国 Pierce 公司;蛋白预染 marker 购自美国 NEB 公司;甲叉双丙烯酰胺和丙烯酰胺(acrylamide)购自美国 BioRad 公司; β -巯基乙醇购自美国 Biotech 公司;辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥公司;DNA Blood Mini Kit 购自 Qiangen 公司;小鼠抗 SIV P27 单克隆抗体由医科院动物所制备;山羊抗小鼠 FITC 购自中杉金桥公司;SIV P27 ELISA 试剂盒购自 Life Science 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:RF/6A 细胞系为贴壁细胞,生长速度较慢。在含 10% 胎牛血清的 1640 完全培养基中培养,当细胞长到 80% ~ 90% 时,用胰酶消化进行传代。1:3 分瓶置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。

CEMx174 细胞为悬浮细胞,生长速度较快。在含 10% 胎牛血清的 1640 完全培养基中培养,当细胞浓度较大时进行 1:5 传代培养置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。

1.2.2 不同方式感染 RF/6A 细胞:将 1 mL 含 5×10^4 TCID₅₀/mL SIVmac239 病毒加到 T25 瓶中感染 CEMx174 细胞,待 CEMx174 细胞出现细胞病变产生融合泡时,取细胞离心 5 min,将 1 mL 1×10^7 TCID₅₀/mL 病毒液和 1 mL 1×10^5 个/mL 感染细胞分别加入到含 RF/6A 细胞的 6 孔板,添加培养基使得终体积为 4 mL。2 d 后弃上清液和 CEMx174 细胞,并用无菌 PBS 漂洗两遍,再加入新鲜的 1640 维持培养基,培养至感染后 7 d,每天收集上清液,7 d 收细胞备用。

1.2.3 前病毒检测:

1.2.3.1 感染细胞 DNA 的提取:收取感染的内皮细胞 5×10^6 个,用 PBS 漂洗两次后用 200 μ L PBS 重悬。加入 20 μ L 蛋白酶 k。将 200 μ L 样品加入离心管中,适度混匀。参照 DNA Blood Mini Kit 操作步骤提取细胞中的 DNA^[6]。用 100 μ L 预热至 56℃ 的洗脱液洗脱样品。取 5 μ L 样品用紫外分光光度计检测提取核酸的质量。

1.2.3.2 巢氏 PCR 扩增病毒 gag 片段^[6]:使用巢式 PCR 的方法特异性扩增病毒 gag 基因,扩增片段大小为 477 bp。

1.2.3.3 PCR 扩增感染细胞的 β -actin 片段:提取感染细胞的 DNA 用于 PCR 反应,特异性扩增感染细胞的 β -actin 基因。引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。 β -actin 基因的上游引物 5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3',下游引物 5'-GCTGTACCTTCACCGTTCC-3',扩增片段长度 268 bp,退火温度 61℃,每个样品三次重复。

1.2.4 间接免疫荧光法检测内皮细胞内 SIVP27 的表达:CEMx174 感染 SIVmac239 发生细胞病变后离心,取 500 μ L 1×10^7 TCID₅₀/mL 毒液和 500 μ L 1×10^5 个/mL 的感染细胞加入含 RF/6A 细胞爬片的 24 孔板中。添加培养基使终体积为 2 mL,于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。感染 2 d 后,移除培养基并弃除 CEMx174 细胞。加入 2 mL 新鲜的 1640 培养基

培养,每两天换液 1 次。7 d 收细胞爬片,4% 多聚甲醛室温固定 20 min,吹干备用。

0.1% Triton X-100 通透爬片 5 min,5% FBS 室温封闭 30 min,加入小鼠抗 P27 单克隆抗体 100 μ L (1:20)37℃ 孵育 30 min。PBS 漂洗后,滴加山羊抗小鼠抗体-FITC(1:200),37℃ 孵育 30 min。漂洗后,DAPI 封片即可在荧光镜下观察结果^[7]。

1.2.5 Western blotting 检测 RF/6A 细胞中 P27 蛋白表达: RIPA 蛋白裂解液提取不同感染方式内皮细胞的总蛋白,BCA 法测蛋白浓度。取 30 μ g 总蛋白上样,10% SDS-PAGE 凝胶电泳,电转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭,选择一抗为小鼠抗 SIV P27 单克隆抗体(1:2 000),二抗为 HRP-羊抗小鼠抗体(1:15 000),内参选用 HRP- β -actin(1:15 000)进行 ECL 发光,凝胶成像分析系统扫描分析。

1.2.6 ELISA 试剂盒检测上清中 P27 蛋白表达: 将两种感染方式不同感染天数的上清 1:100 稀释后,200 μ L 稀释液加入 20 μ L 裂解液,与板子孵育具体步骤参照 ELISA 检测 SIV P27 盒子说明书^[8]。

2 结果

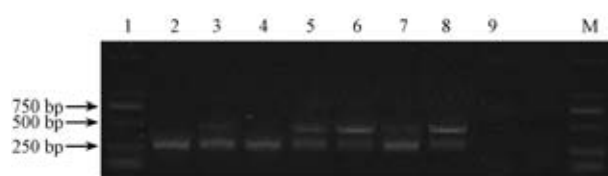
2.1 巢式 PCR 检测 SIV 感染内皮细胞前病毒 DNA 水平

SIV 感染的 CEMx174 细胞,做为阳性对照,PCR 级水作为阴性对照。PCR 产物电泳后,在 500 bp、250 bp 左右出现清晰条带,与内参 β -actin(268 bp)以及前病毒 DNA gag477 大小相符。在内参 β -actin 条带灰度大致相当时,SIV 直接感染内皮细胞的 3 个复孔中只有 2 号泳道出现较浅的大小正确的目的条带,1 号泳道和 3 号泳道均未检出。与 SIV 感染的 CEMx174 共培养的内皮细胞三个复孔均在 500 bp 左右出现目的条带,5 号泳道目的片段的亮度较 6、7 号泳道更强,均与阳性对照的条带位置相同(图 1)。

2.2 间接免疫荧光法检测 SIV 感染内皮细胞中 SIV P27 蛋白的表达

SIV 病毒直接感染内皮细胞,其细胞核内和胞浆内均无绿色荧光(图 2A-C),SIV 感染的 CEMx174 细胞与内皮细胞共培养,内皮细胞细胞核外、胞浆内有明显的点状绿色荧光,绿色荧光蛋白的位置为病毒蛋白 P27 所在位置(图 2D-I)。

2.3 Western blotting 检测内皮细胞内 SIV P27 分



注:M: DNA Marker DL2000;1-3:游离 SIV 病毒直接感染的内皮细胞;4-6:与 SIV 感染的 CEMx174 细胞共培养的内皮细胞;8-9:ddH₂O 作为阴性对照

图 1 巢式 PCR 检测 SIV 感染内皮细胞前病毒 DNA 水平
Note. M: DL 2000 DNA marker; 1-3: Endothelial cells infected with SIV; 4-6: Endothelial cells co-cultured with SIV-infected CEMx174 cells; 7: CEMx174 cells infected with SIV as positive control; 8-9: Sterile ddH₂O as negative control.

Fig. 1 The results of nested-PCR for detecting proviral DNA levels of SIV-infected endothelial cells

子的表达

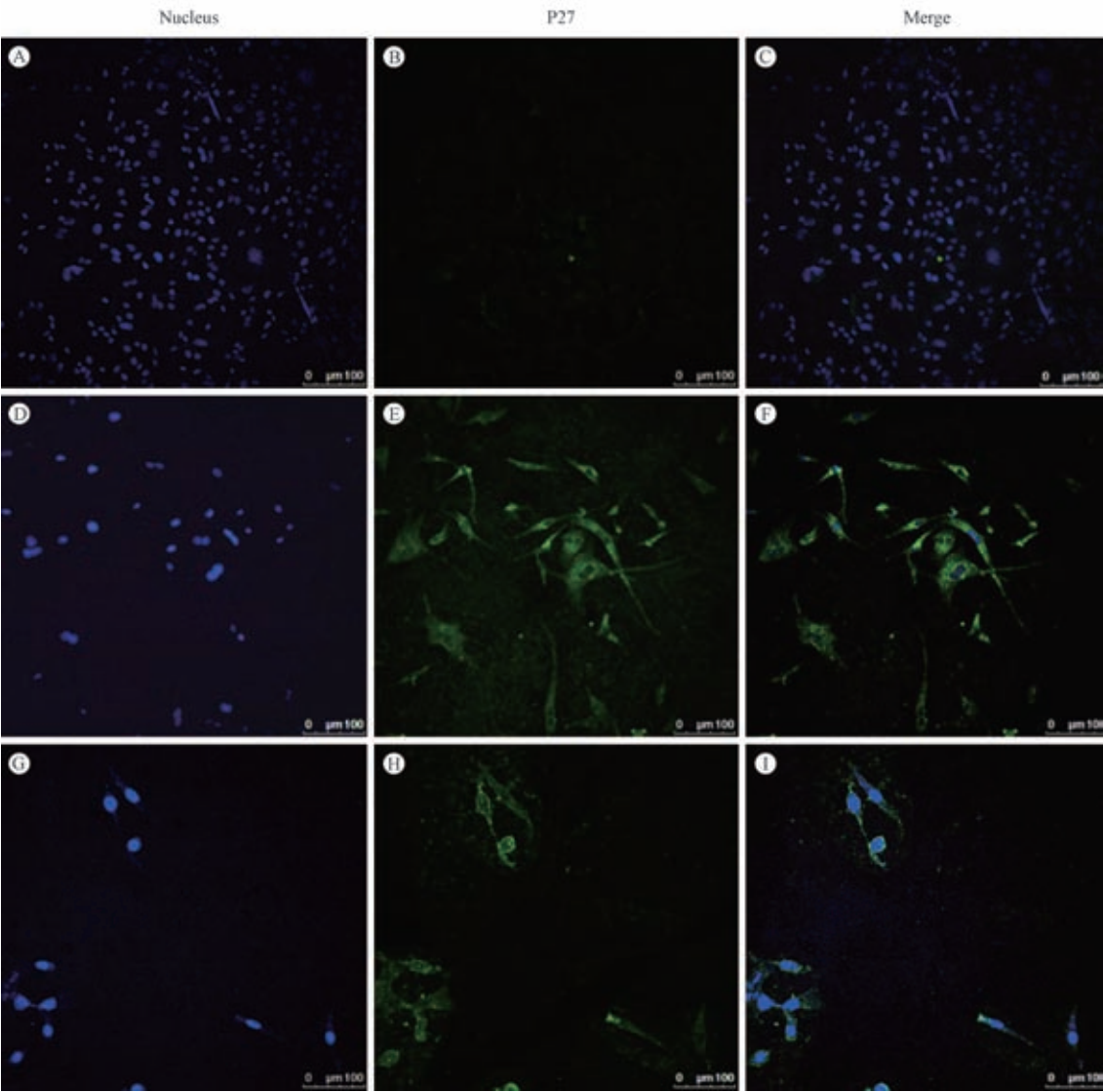
阳性对照为 SIV 感染的 CEMx174 细胞,阴性对照为未感染的 RF/6A 细胞。在 1-4 泳道内参 β -actin 蛋白条带灰度大致相同的情况下,与感染的 CEMx174 共培养的 RF/6A 中,WB 检测到与目的蛋白大小相同的特异性蛋白 P27 的条带,且与阳性对照条带位置相同。而在游离 SIV 直接感染的内皮细胞总蛋白中没有检出该目的条带(图 3)。

2.4 ELISA 方法检测不同感染方式上清中 SIV P27 含量变化情况

感染 2 d 时,无论是 SIV 直接感染还是与 SIV 感染的 CEMx174 细胞共培养的内皮细胞培养上清中 P27 含量基本相同,都达到 20 000 pg/mL 以上。2 d 弃上清液和感染细胞,用 PBS 漂洗后两种感染方式培养基残留的病毒含量相当,但随着感染天数的增加,与 CEMx174 共培养的内皮细胞培养上清液中 SIV P27 含量增加迅速,到感染 7 d 上清液中的 SIV P27 含量达到 4 240.9 pg/mL,约为漂洗后病毒含量(1 115.6 pg/mL)的 4 倍,而游离 SIV 直接感染内皮细胞的上清中 SIV P27 的含量变化不明显,仅由漂洗后的 1 064.7 pg/mL 增至 1 563.1 pg/mL(图 4)。

3 讨论

艾滋病脑病的形成与 HIV/SIV 病毒进入脑组织密切相关。病毒入侵 BBB 进入脑实质,使脑内细胞感染,继而产生大量病毒及病毒蛋白,以及多种细胞参与释放的细胞因子(如 TNF- α 等),引起神经毒效应,最终导致艾滋病脑病的发生^[9]。针对 HIV/SIV 入侵血脑屏障的分子机制的假说有 4 种,其中



注:A-C;游离 SIV 病毒直接感染的内皮细胞(×100);D-F;与 SIV 感染的 CEMx174 细胞共培养的内皮细胞(×100);
G-I;与 SIV 感染的 CEMx174 细胞共培养的内皮细胞(×200)

图 2 两种感染方式内皮细胞内病毒 SIV P27 的检测(标尺 = 100 μm)

Note. A-C: Endothelial cells infected with SIV (×100); D-F: Endothelial cells co-cultured with SIV infected CEMx174 cells (×100); G-I: Endothelial cells co-cultured with SIV infected CEMx174 cells (×200)

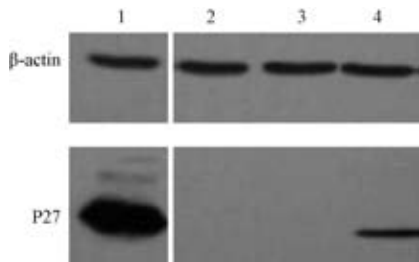
Fig.2 IFA showing expression of SIV P27 in SIV-infected endothelial cells

游离病毒直接感染和细胞介导的感染方式最为人接受,那么在这两者中哪个又为 HIV/SIV 感染内皮细胞的最主要方式呢?

巢式 PCR 的结果显示,游离病毒直接感染方式只有少量病毒能够吸附并进入内皮细胞内,同时进入细胞的病毒 RNA 可逆转录为 DNA 整合于内皮细胞的基因组内。而 IFA 和 Western blotting 均不能检出该感染方式的内皮细胞中 SIV P27 蛋白,说明少量病毒虽进入了内皮细胞但感染复制水平较低,没有产生足够多的病毒 P27 蛋白。这与培养上清中病毒 SIV P27 含量增长一直较低的结果一致。进一步

说明游离病毒对 RF/6A 细胞的感染水平较低,这种低水平的感染、复制产生的少量病毒蛋白用 WB 和 IFA 的实验方法检测不到。SIV 直接感染内皮细胞的感染水平较低,主要由于内皮细胞表面缺乏 CD4 受体。有一些研究显示 HIV 对 CD4⁺ 细胞的感染复制受限的原因是感染时进入细胞效率极低,初始感染的细胞不到 1%^[10,11]。这与我们发现的低水平感染结果一致。

既然游离 SIV 直接感染内皮细胞感染能力较低,那么 T 细胞介导的感染方式是否能造成高水平感染呢? 我们使用感染 SIV 的 CEMx174 细胞与



注:1: SIV 感染的 CEMx174 细胞,作为阳性对照;2: 未感染的内皮细胞,作为阴性对照;3: 游离 SIV 病毒直接感染的内皮细胞; 4: 与 SIV 感染的 CEMx174 细胞共培养的内皮细胞

图 3 两种感染方式内皮细胞胞浆内 SIV P27 蛋白的检测
Note: 1: CEMx174 cells infected with SIV as positive control; 2: Uninfected endothelial cells as negative control; 3: Endothelial cells infected with free SIV; 4: Endothelial cells co-cultured with SIV-infected CEMx174 cells.

Fig. 3 Western blot analysis showing expression of SIV P27 in the endothelial cells infected by both ways

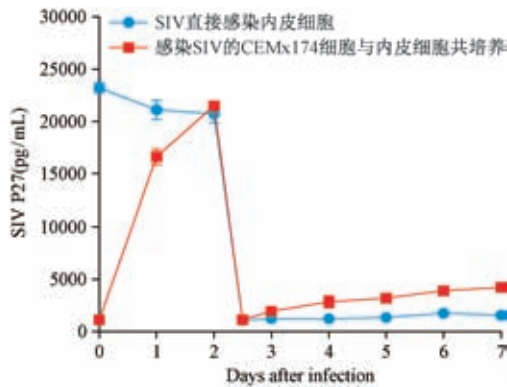


图 4 上清液中 SIV P27 蛋白含量的检测
Fig. 4 The protein expression of SIV P27 in the supernatant of SIV-infected endothelial cells, detected by ELISA.

RF/6A 共培养,利用巢式 PCR 的方法,三个复孔中均检出内皮细胞基因组 DNA 中的前病毒分子 gag477。WB 和 IFA 结果也均显示,内皮细胞内可以检测到 P27 蛋白,对比游离病毒直接感染的方式,T 细胞介导的感染方式可以明显促进病毒进入并整合于内皮细胞基因组的效率,产生病毒 SIV P27 蛋白,并大幅提高感染复制的水平。收集不同感染天数的细胞上清,ELISA 的结果提示,游离病毒直接感染方式 0 d 和 1 d 上清中的病毒含量都高于细胞共培养的感染方式,由于病毒在 CEMx174 细胞中的高效复制,感染 2 d 时两种感染方式的病毒含量基本相同,即总体上在游离病毒直接感染方式比 T 细胞介导的感染方式病毒含量高的情况下,T 细胞介导的感染方式培养上清中病毒 SIV P27 蛋白显著增加,约为初始病毒蛋白含量的四倍。然而,游离病

毒直接感染的方式上清中病毒蛋白含量并没有明显增加。Sato H^[12] 等人也发现,细胞与细胞之间的直接接触可以促进病毒在胞间的转移,这种转移导致的感染比游离病毒颗粒直接感染效率更高。

综上所述,游离病毒直接感染内皮细胞效率很低。这种低水平的感染,显然不能带来大面积的血脑屏障破坏,导致大量病毒和感染的淋巴细胞^[13]、巨噬细胞^[14] 进入脑中,引发严重的脑部神经病变。T 细胞介导的感染方式较之对内皮细胞的感染效率更高,感染能力更强。所以这两种感染方式的不同结果提示我们,在艾滋病脑病形成过程中,游离病毒通过直接感染构成血脑屏障的主要成分—内皮细胞进入脑实质,这一现象虽然存在,但是进入的效率极低,并不是主要的病毒入脑途径。血液中大量的感染细胞(单核巨噬细胞、T 细胞等)与内皮细胞接触,可能促进内皮细胞的感染,从而导致血脑屏障的破坏,使得大量病毒和感染细胞入脑。也就是说在艾滋病脑病的形成中,病毒入侵血脑屏障的主要方式并不是血液中游离病毒对内皮细胞的直接感染,而是血液中感染的细胞起到了关键作用。也有一些研究中发现,感染的单核细胞或 T 细胞与未感染的 T 细胞接触,可以通过病毒学突触这一结构,将病毒直接转移至未感染的 T 细胞内^[15-18]。但是感染 T 细胞与内皮细胞的接触,是否也能形成病毒学突触进而促进病毒在胞间高效转移,导致艾滋病脑病的高发病率,还没有确凿证据,需要进一步的研究探讨。

参考文献:

[1] Ances BM, Ellis RJ. Dementia and neurocognitive disorders due to HIV-1 infection [J]. Semin Neurol, 2007, 27(1): 86-92.
[2] Valcour V, Chalermchai T, Sailasuta N, et al. Central nervous system viral invasion and inflammation during acute HIV infection [J]. J Infect Dis, 2012, 206(2): 275-282.
[3] Mattson MP, Haughey NJ, Nath A, et al. Cell death in HIV dementia [J]. Cell Death Differ, 2005, 12(1): 893-904.
[4] Anders KH, Guerra WF, Tomiyasu U, et al. The neuropathology of AIDS [J]. Am J Pathol, 1986, 124(3): 537-558.
[5] 黄丹, 丛喆, 魏强, 等. HIV/SIV 入侵血脑屏障的分子机制探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(11): 84-88.
[6] 丛喆, 涂新明, 蒋虹, 等. PCR 技术在猴免疫缺陷病毒 SIV 感染模型中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2005, 13(2): 84-87.
[7] 孙敏, 涂新明, 魏强, 等. SIV P27 单克隆抗体的制备和鉴定 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(1): 27-33.

大鼠自发性巨大肿瘤的病理分析

李 婧¹, 许世清², 李 鸿², 娄晋宁², 徐宝华¹

(1. 中日友好医院口腔医学中心, 北京 100029; 2. 中日友好医院临床医学研究所, 北京 100029)

【摘要】 目的 研究 Wistar 及 GK 大鼠巨大自发性肿瘤的病理特征。**方法** 观察发生巨大自发性肿瘤的 Wistar 及 GK 大鼠的生长及生存状况, 手术切除肿瘤, 免疫组织化学染色研究其病理特征。**结果** 两例巨大自发性肿瘤瘤体重分别为 502 g 和 119 g, 分别为大鼠体重的 64% 和 24%, 肿瘤表面具有完整的包膜, 与正常组织边界清晰, 没有发现肿瘤含有血管的蒂状结构。病理检查结果显示: 确定为良性纤维瘤。**结论** 大鼠自发性巨大肿瘤为良性纤维瘤, 除瘤体过大对大鼠的活动产生影响外, 对生存状况无显著影响。

【关键词】 Wistar 大鼠; GK 大鼠; 自发性肿瘤; 纤维瘤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)06-0006-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671-7856. 2016. 06. 002

Pathological observation of two huge spontaneous tumors in a Wistar and a GK rats

LI Jing¹, XU Shi-qing², LI Hong², LOU Jin-ning², XU Bao-hua¹

(1. Dental Medical Center, 2. Institute of Clinical Medicine, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

【Abstract】 Objective To study the pathological features of two huge spontaneous tumors in Wistar and GK rats. **Methods** Forty Wistar rats and 40 GK rats were included in this study. Among those rats, two huge spontaneous tumors were observed in a Wistar rat at 14 months of age and in a GK rat at 22 months of age. The growth and survival status of the tumor-bearing rats were recorded. The tumors were surgically removed, and their pathological features were examined using HE and immunohistochemical staining (vimentin, CK19, α -SMA, CD31, CD34, S-100, NF 及 Ki-67). **Results** Both the two tumors were completely resected by surgery without much difficulties, and both host rats survived well after the operation. The weight of the two huge tumors was 502 g and 119 g, which corresponding to 64% and 24% of the body weight of their host rats, respectively. The tumors surface had a complete capsule, with a clear boundary separating from the normal surrounding tissues, and no vascular pedicle structure was found. According to the results of immunohistochemical staining, both the two tumors were diagnosed as benign fibroma. **Conclusion** This type of huge spontaneous tumors is benign fibroma. Besides the impact on the activities of the rats, the tumors have no significant impact on the living conditions in the hosts.

【Key words】 Wistar rats; GK rats; Spontaneous tumor; Fibroma; Pathology

实验动物模型是研究疾病的发病机制、治疗及预防是非常重要的工具。在实验动物的研究中,通

过诱导肿瘤的发生建立肿瘤动物模型已经成为一种较为成熟的实验技术,而对于实验动物的自发性

【基金项目】 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2012CB966402), 中日友好医院院级科研基金(2014-3-QN-23)。

【作者简介】 李婧(1980-), 女, 主治医师, e-mail: lijingbmu@sina.com。

【通讯作者】 许世清(1964-), 女, 副主任技师, e-mail: xushiqing@163.com。

肿瘤,特别是巨大肿瘤的发生及其病理特征研究甚少。我们对啮齿类动物的长期实验研究发现,老年动物常出现各种自发性肿瘤,并且在不同动物种属其肿瘤的发生率和病理类型均有差异^[1]。本研究对 1 例 Wistar 大鼠及 1 例 GK 大鼠发生的自发性肿瘤进行了饲养观察,并对动物的肿瘤生长、瘤体特征,以及病理类型进行了研究。结果显示,这种自发性肿瘤为一种缺乏血管蒂结构的良性纤维瘤,虽然体积巨大,除活动不便外,对动物的生存影响不大。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:SPF 级雄性 Wistar 大鼠,5 周龄,购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】。SPF 级雄性 GK 大鼠,8 周龄,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2012-0002】。两只大鼠均饲养于中日友好医院临床研究所 SPF 级动物实验室【SYXK(京)2010-0011】,饲养条件符合国标 GB14925-2001:室温 22~26℃,相对湿度 40%~60%,12 h 明暗交替,动物自由摄食及饮水。食用饲料为大鼠维持饲料,B 级,购于北京华阜生物科技股份有限公司【SCXK(京)2009-0008】。

1.1.2 主要试剂:10% 甲醛溶液购自北京中杉金桥生物技术有限公司;小鼠抗大鼠波形蛋白(vimentin)单克隆抗体;兔抗大鼠 CD31 单克隆抗体、兔抗大鼠 CD34 单克隆抗体、兔抗大鼠 CK19 单克隆抗体和兔抗大鼠 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)单克隆抗体均购自英国 Abcam 公司;羊抗大鼠 Ki-67 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;小鼠抗大鼠 S-100 单克隆抗体和小鼠抗大鼠神经微丝(NF)单克隆抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 肿瘤生长的观察:在本研究所观察的 40 只 Wistar 大鼠中,仅 1 只大鼠 14 月龄时在右后肢内侧出现一个直径约 1.4 cm 的单发性圆形肿物,肿瘤表面光滑,局部皮肤及毛发未见异常,精神状态良好,进食及生长状态未见明显异常。肿物生长迅速,至 17 月龄时,大鼠肿瘤已经扩展到右侧下腹部,行动开始受限。至 18 月龄时,肿物非常巨大,已导致右后肢完全抬起,不能接触地面行走(图 1),但肿瘤表

面毛发无异常,进食状况基本正常。

在本研究观察的 40 只 GK 大鼠中,仅有 1 只在 22 月龄时,右后肢外侧出现一个直径约 1.5 cm 的圆形肿物,肿物边界清晰,不影响行动和进食。肿瘤生长较为迅速,至 23 月龄时肿物表面部分毛发脱落,皮肤出现破损,局部有血痂形成,至 24 月龄时肿物进一步增大,大鼠进食量有所减少,行动稍显缓慢。

1.2.2 肿瘤大体特征及病理学检查:Wistar 大鼠 18 月龄时,采用 2.5% 戊巴比妥钠腹腔麻醉,肿瘤位于右下腹及右后肢内侧,瘤体位于皮下,未进入腹腔,术中发现肿瘤具有完整包膜,与周围组织无粘连,分界明显,分离非常容易,整个肿瘤未发现蒂状结构,肿瘤周围也未见丰富血管,手术采用手工完整剥离肿瘤,瘤体重 502 g。术后大鼠生存状况良好,行动自如。GK 大鼠 24 月龄时,2.5% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后,完整剥离整个肿瘤,手术过程所见与 Wistar 大鼠情况类似,整个肿瘤无蒂状结构,肿瘤周围也未见丰富的血管,瘤体重 119 g。

10% 甲醛溶液固定肿瘤组织(图 2:A、B 两部分,A 为中央的实性团块,质硬,B 为周围的软质组织),常规脱水、石蜡包埋,3 μ m 厚连续切片,HE 染色及相关肿瘤标记物免疫组织化学染色鉴定。

1.2.3 免疫组织化学染色:石蜡切片常规脱蜡、脱水,微波热修复,3% 过氧化氢溶液封闭内源性过氧化物酶。一抗分别使用:vimentin、CK19、 α -SMA、CD31、CD34、S-100、NF 及 Ki-67,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,4℃ 孵育过夜。二抗分别使用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体、羊抗小鼠 IgG 抗体和驴抗山羊 IgG 抗体,37℃ 孵育 30 min。二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素溶液复染、封片后镜检拍照。

2 结果

2.1 大体观察

Wistar 大鼠肿瘤包膜完整,无蒂,瘤体大小为 14 cm $\times$ 12 cm $\times$ 12 cm,瘤体重量为 502 g,切除瘤体后大鼠重为 780 g。肿瘤呈实性,浅粉色,质软,剖面灰白色,中央有一约 5 cm $\times$ 4 cm $\times$ 4 cm 大小的灰黄色实性团块,质硬,质地不均一。

GK 大鼠肿瘤位于右后肢外侧,瘤体位于皮下,未进入腹腔,包膜完整,无蒂,瘤体大小为 5 cm $\times$ 5 cm $\times$ 5 cm,瘤体重量为 119 g,切除瘤体后大鼠重

为 510 g。肿瘤呈实性,浅粉色,质稍韧,剖面肉粉色,质地尚均一,中央有部分不规则组织,颜色深红,质稍硬。

2.2 病理学观察

2.2.1 HE 染色结果:两例大鼠肿瘤染色结果一致,(图 3)。

中央的实性团块(质硬)HE 染色显示:肿瘤由大量密集的梭形细胞组成,细胞形态较一致,呈编织状、漩涡状或束状交错排列,细胞分界不清,核分裂像罕见,无明显异型性。

周围的软质组织(质软)HE 染色显示:肿瘤由大量梭形细胞组成,细胞分布不均,部分区域细胞密集,部分区域细胞分布稀疏,细胞形态较一致,可见个别巨型细胞,核分裂像罕见,无明显异型性,细胞间隔较大,可见胶原纤维,局部有毛玻璃样改变。

2.2.2 免疫组织化学染色结果:两例大鼠肿瘤染色结果一致(图 4~6)。

两例大鼠肿瘤免疫组织化学染色:Vimentin 均呈阳性, α -SMA 局部阳性,CK19、CD31、CD34、S-100、NF 均呈阴性,Ki-67 阳性指数 $<5\%$ 。

2.3 病理诊断

参考相关文献结合组织学形态及免疫组化染色结果,两例大鼠肿瘤病理诊断为皮下纤维瘤。

3 讨论

在本实验室以往所进行的动物实验中,也发现有大鼠自发性肿瘤的发生,但如此巨大的自发性肿瘤尚属比较少见。

徐艳峰等^[2]通过 104 周的观察得出 Wistar 雄性大鼠自发性肿瘤的发生率为 49.12%,以发生良性肿瘤者多见(38.60%)。雄性大鼠的良性肿瘤以垂体腺瘤最多见(19.30%),其次是睾丸间质细胞瘤(5.26%)和皮下纤维瘤(5.26%)。皮下纤维瘤出现在动物腹部或背部皮下,质地较硬,呈球形,肿瘤断面呈结节样或质地均匀、灰白或浅紫红色。本研究中两例肿瘤均位于大鼠的下腹部皮下,肿瘤可完整剥离,呈球形,浅红色,断面中央为团块样硬质组织,断面呈灰白色或浅粉色,符合纤维瘤的病理表现。后期由于肿瘤过度增长使身体过度消耗,GK 大鼠后期表现为精神状态差,进食减少,动物逐渐消瘦。本研究所观察的两例肿瘤生长如此之快,但肿瘤却没有血管样的蒂状结构,并且肿瘤周围及肿瘤组织内也未见丰富的毛细血管难以解释。肿瘤

具有完整的包膜,未浸润周围的邻近组织,生长并未影响大鼠的生命体征,Ki-67 阳性率较低,表明细胞的增殖活性较低,且组织学结果显示未见细胞核异型性及明显的核分裂像,所以肿瘤尚属良性。

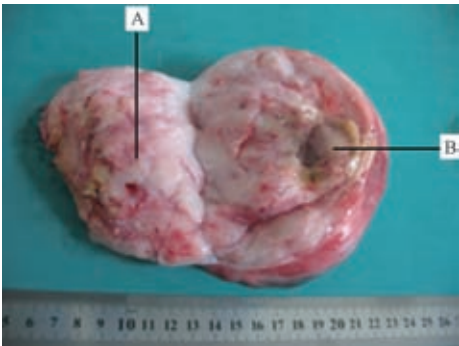
James Poteracki 等^[3]报道了 930 只对照组 Wistar 大鼠所发生的自发性肿瘤,雄性大鼠自发性肿瘤的发生率为 78%,其中良性肿瘤占 71%,平均存活时间为 104 周。本研究中 Wistar 雄性大鼠至术前已存活 70 余周,生命体征良好。James 等总结了 Wistar 大鼠所发生的自发性肿瘤,研究开始前雄性大鼠的平均体重为 214 g(162~253 g),研究结束时平均体重为 599 g(562~657 g)。本研究中 Wistar 雄性大鼠肿瘤重 510 g,切除肿瘤后大鼠重约 780 g,以往文献中尚未见如此巨大肿瘤的报道。肿瘤能生长至如此巨大而对动物的生存影响较小,与肿瘤细胞增殖活性低、未侵犯周围组织、未造成严重的脏器功能受损有关。Long Evans 大鼠自发性肿瘤 83% 发生于皮肤^[4],而 Wistar 大鼠自发性肿瘤绝大多数(68%)发生于内分泌系统(42%)和皮肤(26%)。角化棘皮瘤是雄性皮肤系统中最常见的肿瘤(11%),侵犯皮肤的非上皮源性肿瘤在雄性 Wistar 大鼠的发生率约为 2.4%^[5]。Tomoya Onozato 等^[6]报道了 1 例 50 周龄雄性 Wistar 大鼠自发性皮下肉瘤,该肿瘤诊断为低分化的间叶组织来源的肉瘤,因为缺乏特异性的特征来明确其具体的来源没有特殊分类。

Vimentin 是中间丝的其中一种蛋白质,负责维持细胞骨架的完整性,表达于正常间叶细胞及其来源的肿瘤。Vimentin 单克隆抗体主要用于间叶来源的恶性肿瘤如肌源性肿瘤、软组织肿瘤和骨肿瘤等肿瘤的诊断。细胞角蛋白(cytokeratin,CK)广泛存在于正常上皮细胞和上皮癌细胞中,其中 CK19 在正常上皮细胞和上皮性癌细胞的表达最为特异,本研究中两例肿瘤免疫组织化学染色显示肿瘤细胞表达 vimentin,不表达 CK19,表明肿瘤为间叶组织来源而非上皮来源。 α -SMA 是平滑肌肌动蛋白,广泛分布在平滑肌细胞中,在肌纤维母细胞及含有肌纤维母细胞的软组织肿瘤/病变都有阳性表达,在肌上皮细胞中染色阳性,在部分间叶组织来源的肿瘤呈阳性表达,本研究中免疫组织化学染色 α -SMA 呈局灶阳性,提示肿瘤非肌上皮细胞来源。S-100 蛋白是一种酸性钙结合蛋白,主要存在神经组织、垂体、肾上腺髓质以及少数间叶组织中,NF 是神经



图 1 荷瘤的 Wistar 大鼠

Fig. 1 The gross appearance of a tumor-bearing Wistar rat

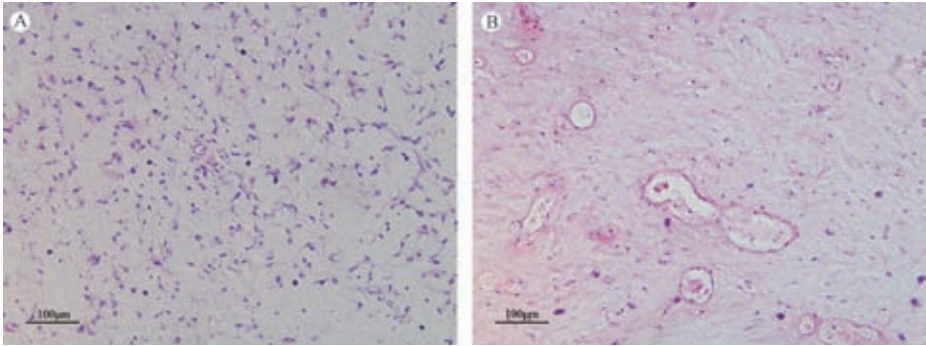


A 为中央的实性团块,质硬;B 为周围的软质组织

图 2 Wistar 大鼠肿瘤组织

A: The central solid mass, hard; B: The surrounding soft tissue

Fig. 2 The gross appearance of tumor of a Wistar rat



A: 实性团块的组织学, HE 染色 B: 软质组织的组织学, HE 染色

图 3 肿瘤 HE 染色(标尺 = 100 μm)

A: Histology of the solid mass. HE staining. B: Histology of the soft tissue. HE staining

Fig. 3 Histology of the tumor tissue. HE staining. (Bar = 100 μm)

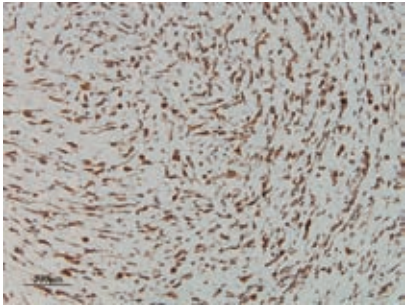


图 4 免疫组织化学染色 vimentin(+)(标尺 = 100 μm)

Fig. 4 Expression of vimentin in the tumor tissue. Immunohistochemical staining. (Bar = 100 μm)

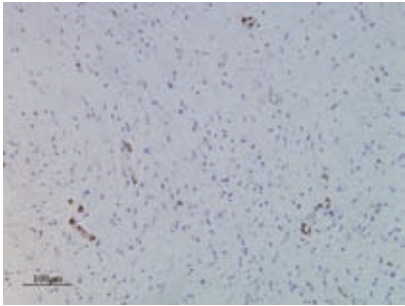


图 5 免疫组织化学染色 α - SMA (局灶阳性)(标尺 = 100 μm)

Fig. 5 Focally positive expression of α-SMA in the tumor tissue. Immunohistochemical staining. (Bar = 100 μm)

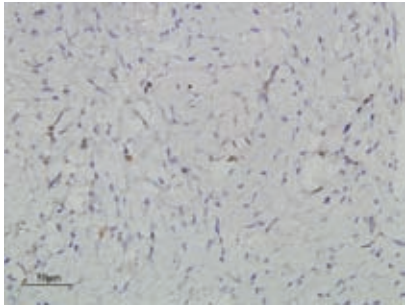


图 6 免疫组织化学染色 Ki-67 (标尺 = 50 μm)

Fig. 6 Expression of Ki-67 in the tumor tissue. Immunohistochemical staining. (Bar = 50 μm)

元特异性中间丝蛋白,正常表达于神经元及神经内分泌细胞中,本研究中 S-100 及 NF 均不表达,提示肿瘤非神经源性。CD31 在血管内皮细胞、单核细胞、部分浆细胞阳性表达,CD34 主要在骨髓基质细胞、血管内皮细胞、胚胎成纤维细胞表达,本研究中两者均呈阴性表达,提示肿瘤非血管来源。根据上述免疫组化染色结果,本实验的两例大鼠肿瘤诊断为皮下良性纤维瘤。

大鼠的自发性肿瘤的发生率比较高,尤其在老年动物比较常见。由于大多数实验室所饲养的动物比较年轻,并且饲养的时间较短,因此导致实际观察到的自发性肿瘤并不常见,特别是如本文所报道的如此巨大的肿瘤非常少见。本文的研究结果对认识大鼠自发性肿瘤的发生和病理特征会有所帮助。

参考文献:

[1] Aoyama H, Kikuta M, Shirasaka N, et al. Historical control data

on reproductive abilities and incidences of spontaneous fetal malformations in Wistar Hannover GALAS rats [J]. Cobqenit Anom (Kyoto), 2002, 42 (3) : 194 - 201.

[2] 徐艳峰, 侯粉霞, 杨慧芳, 等. Wistar 大鼠的自发肿瘤病变及其发生率 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22 (2) : 75 - 79.

[3] Poteracki J, Walsh KM. Spontaneous neoplasms in control Wistar rats: a comparison of reviews [J]. Toxicol Sci, 1998, 45 (1) : 1 - 8.

[4] Esfandiari A, Loya T, Lee JL. Skin tumors in aging Long Evans rats [J]. J Natl Med Assoc, 2002, 94 (6) : 506 - 510.

[5] Walsh KM, Poteracki J. Spontaneous neoplasms in control Wistar rats [J]. Fundam Appl Toxicol, 1994, 22 (1) : 65 - 72.

[6] Onozato T, Tamura T, Nagasawa T, et al. Spontaneous subcutaneous sarcoma in a 50-week-old male Wistar Hannover GALAS rat [J]. J Toxicol Pathol, 2011, 24 : 239 - 244.

[修回日期] 2016 - 03 - 30

(上接第 5 页)

[8] 金光, 王卫, 丛喆, 等. HIV-1 P24 和 SIV P27 两种 ELISA 试剂盒检测 SIV P27 抗原的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21 (2) : 26 - 30.

[9] Levy JA 著, 邵一鸣译. 艾滋病病毒与艾滋病的发病机制 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 183 - 196.

[10] Brack Werner R, Kleinschmidt A, Ludvigsen A. Infection of human brain cells by HIV-1: restricted virus production in chronically infected human glial cell lines [J]. AIDS, 1992, 6 (3) : 273 - 285.

[11] Mellert W, Kleinschmidt A, Schmidt J. Infection of human fibroblasts and osteoblast-like cells with HIV-1 [J]. AIDS, 1990, 4 (6) : 527 - 535.

[12] Sato H, Orenstein J, Dimitrov D, et al. Cell-to-cell spread of HIV-1 occurs within minutes and may not involve the participation of virus particles [J]. Virology, 1992, 186 (2) : 712 - 724.

[13] Weidenheim KM, Epshteyn I, Lyman WD. Immunocytochemical identification of T-cells in HIV-1 encephalitis: implications for pathogenesis of CNS disease [J]. Mod Pathogens, 1993, 6 (2) : 167 - 174.

[14] 刘克剑, 丛喆, 金光, 等. 表现神经症状的 SIVmac251 感染猴大脑基底节病毒 gp120 序列变异分析 [J]. 中国实验动物学报, 2006, 14 (4) : 271 - 275.

[15] Hübner W, McNerney GP, Chen P, et al. Quantitative 3D video microscopy of HIV transfer across T cell virological synapses [J]. Science, 2009, 323 (5922) : 1743 - 1747.

[16] Alvarez RA, Barria MI, Chen BK. Unique features of HIV-1 spread through T cell virological synapses [J]. PLoS Pathogens, 2014, 10 (12) : e1004513.

[17] Dale BM, McNerney GP, Thompson DL, et al. Cell-to-cell transfer of HIV-1 via virological synapses leads to endosomal virion maturation that activates viral membrane fusion [J]. Cell Host Microbe, 2011, 10 (6) : 551 - 562.

[18] Durham ND, Yewdall AW, Chen P, et al. Neutralization resistance of virological synapse-mediated HIV-1 infection is regulated by the gp41 cytoplasmic tail [J]. Virology, 2012, 86 (14) : 7484 - 7495.

[修回日期] 2016 - 03 - 28

两种不同的酒精摄入方式诱导的 小鼠酒精性肝损伤模型比较

肖娟^{1,2}, 张瑞芬², 黄菲², 刘磊², 邓媛元², 马永轩²,
刘冬³, 张名位², 孙远明¹

(1. 华南农业大学食品学院, 广州 510642; 2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所/农业部功能食品重点实验室/广东省农产品加工重点实验室, 广州 510610; 3. 深圳职业技术学院, 深圳 518055)

【摘要】 目的 筛选一种简便、稳定、可靠的酒精性肝损伤模型。方法 通过酒精灌胃或给予 Lieber-DeCarli 酒精液体饲料 8 周来建立酒精性肝损伤小鼠模型。实验期间记录小鼠精神状态、摄食量和体重变化, HE 染色进行病理学分析, 分析血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、 γ -谷氨酰转氨酶 (γ -GT)、碱性磷酸酶 (AKP) 活性, 血清和肝脏总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 含量等肝损伤指标。结果 造模 8 周后, 两种方式均导致小鼠肝脏脂质聚集等组织病理学变化, 血清 ALT、AST、AKP 活性、血清和肝脏 TG 含量均显著提高, 提示出现明显肝损伤。酒精灌胃导致小鼠精神状态差, 并显著减轻体重, 而酒精液体饲料对小鼠精神状态和体重影响小。酒精液体饲料模型肝脏指数和血清 TC 水平显著增加, 而且血清 ALT、AST 活性、血清和肝脏 TG 含量及肝脏脂质聚集等组织病理学变化幅度大于酒精灌胃模型, 提示前者的肝损伤程度比后者严重。结论 Lieber-DeCarli 酒精液体饲料模型优于酒精灌胃模型。Lieber-DeCarli 酒精液体饲料模型相对酒精灌胃模型更适合用于酒精性肝损伤分子机制的研究和防治药物的筛选。

【关键词】 酒精性肝损伤; Lieber-DeCarli 酒精液体饲料; 灌胃; 模型; 动物;

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)06-0011-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.06.003

Comparison of two mouse models of alcoholic liver disease induced by oral ethanol gavage or Lieber-DeCarli ethanol liquid diet

XIAO Juan^{1,2}, ZHANG Rui-fen², HUANG Fei², LIU Lei², DENG Yuan-yuan²,
MA Yong-xuan², LIU Dong³, ZHANG Ming-wei², SUN Yuan-ming¹

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Sericultural & Agri-Food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture/Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610; 3. Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055)

【Abstract】 Objective To select a simple, stable and reliable mouse model of alcoholic liver disease. **Methods** The mouse models of alcoholic liver disease were induced by oral gavage ethanol or Lieber-DeCarli ethanol liquid diet for 8 weeks. The food intake and body weight were recorded. Pathological changes were examined using HE staining. Liver

【基金项目】 国家自然科学基金-青年科学基金项目 (NSFC 31501478); 广东省自然科学基金博士启动项目 (2014A030310328); 深圳市科技计划基础研究项目 (JCYJ20140901162541286); 广东省省级科技计划项目 (2016B070701012)。

【作者简介】 肖娟 (1985 -), 女, 博士后, 研究方向: 植物活性物质与功能食品。

【通讯作者】 孙远明 (1958 -), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品安全检测。

injury was assessed by the activities of serum ALT, AST, AKP and γ -GT, and serum and hepatic TC and TG. **Results** After modeling, both models showed significantly increased activities of serum ALT, AST, AKP, and contents of serum and hepatic TG ($P < 0.05$), indicating the successful development of alcoholic steatohepatitis. However, oral ethanol gavage led to body weight loss and weak mental state. Ethanol liquid diet less affected the body weight and mental state. Ethanol liquid diet enhanced liver to-body weight ratio and serum TC, but oral gavage of ethanol did not. The changes of serum ALT, AST, serum and hepatic TG, and hepatic steatosis in the ethanol liquid diet models were more severe than those in the oral gavage ethanol models, suggesting that Lieber-DeCarli ethanol liquid diet led to more serious liver injury than oral gavage ethanol. **Conclusions** Lieber-DeCarli ethanol liquid diet model is better than oral gavage ethanol model, and is more suitable for studies on mechanisms and evaluation of hepato-protective drugs for alcoholic liver disease.

[Key words] Alcoholic liver disease; Lieber-DeCarli ethanol liquid diet; Alcohol; Oral gavage; Mouse model

流行病学研究表明,全球酒精性肝病发病率逐年升高,该病已成为肝脏疾病中仅次于病毒性肝炎的第二大病因^[1],其致死率已经远超过乳腺癌、肠癌和前列腺癌等癌症疾病^[2,3]。为此,酒精性肝损伤成为近年来国内外学者研究的焦点之一^[4]。目前对酒精性肝损伤的研究主要集中于探讨其致病机理、预防措施以及防治药物的筛选等^[5,6]。稳定可靠的酒精性肝损伤动物模型是研究其致病机理和防治措施的基础和必备条件。国内外常用的酒精性肝损伤模型主要有 3 种,酒精灌胃模型、Lieber-DeCarli 酒精液体饲料模型和 Tsukamoto-French 模型^[7]。Tsukamoto-French 模型对实验技术和实验动物的要求严格、费用昂贵,故难以推广使用^[8]。酒精灌胃模型、Lieber-DeCarli 酒精液体饲料模型均能较好的复制出酒精性脂肪肝,但两种模型的动物精神状态、肝损伤程度等是否有差异尚不清楚^[7]。本文主要以小鼠的精神状态、体重和肝损伤程度等指标来比较酒精灌胃和 Lieber-DeCarli 酒精液体饲料诱导的酒精性肝损伤小鼠模型的差异,以筛选稳定、可靠的动物模型,为酒精性肝损伤的基础研究,特别是植物活性成分对其改善作用的评价提供稳定可靠的动物模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 60 只,体重 18 ~ 22 g (8 周龄)来源于中山大学(大学城)实验动物中心【SCXK(粤)2011-0029】。动物饲养于中山大学实验动物中心【SYXK(粤)2012-0081】屏障环境动物房(室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$,相对湿度为 55% ~ 60%,12 h 光照/12 h 黑暗)。动物组织取材中,按实验动物使用的 3Rs 原则给予人道的关怀。小鼠适应性喂养 1 周后,按体质量随机分为正常对照组(normal control)、

酒精灌胃组(oral ethanol gavage)、对照液体饲料组(control liquid diet)和酒精液体饲料组(ethanol liquid diet),每组 15 只。正常对照组和酒精灌胃组小鼠 5 只/笼,以全价营养颗粒饲料饲养,自由进食及饮水;对照液体饲料和酒精液体饲料组小鼠 3 只/笼,分别给予对照液体饲料和酒精液体饲料,饲料现配现用,每天记录摄食量,酒精液体饲料组小鼠自由进食,对照液体饲料组小鼠饲料给予量为前 1 d 酒精液体饲料组的平均摄食量。

1.2 试剂与仪器

Lieber-DeCarli 高脂肪型酒精液体饲料(含 4% (w/v)酒精;饲料热量组成为蛋白质热量 18%、酒精热量 28%、其他碳水化合物热量 19%、脂肪热量 35%)(代码:TP 4030B)及其对照液体饲料(不含酒精;饲料热量组成为蛋白质热量 18%、碳水化合物热量 47%,脂肪热量 35%)(代码:TP 4030BC)购于南通特洛菲饲料科技有限公司。ALT、AST、 γ -GT、AKP、TC 和 TG 试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。高速/冷冻离心机(Thermo,美国), -80°C 低温冰箱(Thermo,美国),低速离心机(Thermo,美国),酶标仪(Tecan,瑞士),差相荧光倒置显微镜(Leica,德国)。

1.3 实验方法

1.3.1 酒精肝损伤小鼠模型建立:酒精灌胃诱导酒精肝损伤小鼠模型建立:酒精灌胃组的酒精适应期为 1 周,酒精灌胃剂量由 $0.5 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{体重})$ 逐步增加到 $6 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{体重})$;其造模期为 8 周,1 ~ 4 周剂量为 $6 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{体重})$,5 ~ 8 周剂量为 $5 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{体重})$ ^[9-11]。正常对照组灌胃等量的蒸馏水。酒精或蒸馏水灌胃量为 $0.1 \text{ mL}/10(\text{g} \cdot \text{体重})$ 。

Lieber-DeCarli 酒精液体饲料酒精肝损伤小鼠模型建立:酒精液体饲料组先经过液体饲料适应期(3 d)后,再根据小鼠酒精性脂肪肝模型的建立方法

(经典法)说明书进行酒精适应期(4 d,第 1~4 d 酒精液体饲料与对照液体饲料混合的比例分别为 1:4、2:3、3:2 和 4:1),然后进入造模期,以酒精液体饲料喂养造模 8 周^[12-14]。

1.3.2 取材:小鼠禁食 12 h 后,乙醚麻醉小鼠,摘眼球取血,处死小鼠,肝脏用冰生理盐水漂洗、滤纸吸干水后,切取 1 cm³ 肝脏固定于 4% 多聚甲醛,用于 HE 染色;剩余肝脏迅速分装后 -80℃ 冻存。血液 4℃ 放置 1~1.5 h 后 4℃ 4 000 r/min 离心 15 min 后,取上清液立刻用于指标测定。

1.3.3 指标测定:

1.3.3.1 血清 ALT、AST、 γ -GT、AKP 活性,TC 和 TG 含量:血清 ALT、AST 采用赖氏法, γ -GT、AKP 采用比色法,TC 和 TG 采用甘油激酶-磷酸甘油氧化酶-过氧化物酶比色法,操作严格按试剂盒说明书进行。

1.3.3.2 肝脏 TC 和 TG 含量:取 200 mg 湿肝脏,加入 9 倍体积的氯仿-甲醇(2:1)溶液^[15],制备匀浆,离心后取 10 μ L 上清液检测,采用甘油激酶-磷酸甘油氧化酶-过氧化物酶比色法,按试剂盒说明书进行操作。

1.3.3.3 HE 染色观察肝组织病理学形态:按常规方法制作石蜡切片并进行 HE 染色,光镜下观察肝脏形态变化。

1.4 统计学方法

数据以平均值 $\pm$ 标准偏差表示,采用 SPSS 16.0 软件,进行 *t* 检验($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 精神状态及死亡率

实验过程中正常对照组及对照液体饲料组小鼠精神状态好,食欲佳,皮毛有光泽。酒精灌胃组小鼠酒醉现象严重、应激反应严重、精神萎靡、活动减少、反应迟钝、皮毛无光泽,在造模期第 4 周死亡 3 只。酒精液体饲料组小鼠也有酒醉现象,但比酒精灌胃组小鼠要轻微,无应激反应,精神状态和反应均较正常,动物未出现死亡。

2.2 体重

正常对照组小鼠体重持续增长图 1(A),酒精灌胃组小鼠体重缓慢增长,从造模期第 4 周开始,正常对照组小鼠体重显著高于酒精灌胃组小鼠($P < 0.05$)。对照液体饲料组和酒精液体饲料组体重缓慢增长后趋于平衡图 1(B),在造模期第 2 周至造模

期第 6 周,对照液体饲料组体重显著高于酒精液体饲料组($P < 0.05$),在造模期第 7 周至造模期第 8 周,对照液体饲料组小鼠与酒精液体饲料组小鼠体重差异无显著性($P > 0.05$)。结果表明,酒精灌胃显著减轻小鼠体重,而酒精液体饲料对小鼠体重影响小。

2.3 摄食量

整个饲养过程中,正常对照组与酒精灌胃组小鼠摄食量差异无显著性(图 2);对照液体饲料组和酒精液体饲料组小鼠摄食量差异无显著性,表明酒精灌胃和酒精液体饲料对小鼠摄食量无显著影响。

2.4 肝脏组织病理学形态变化

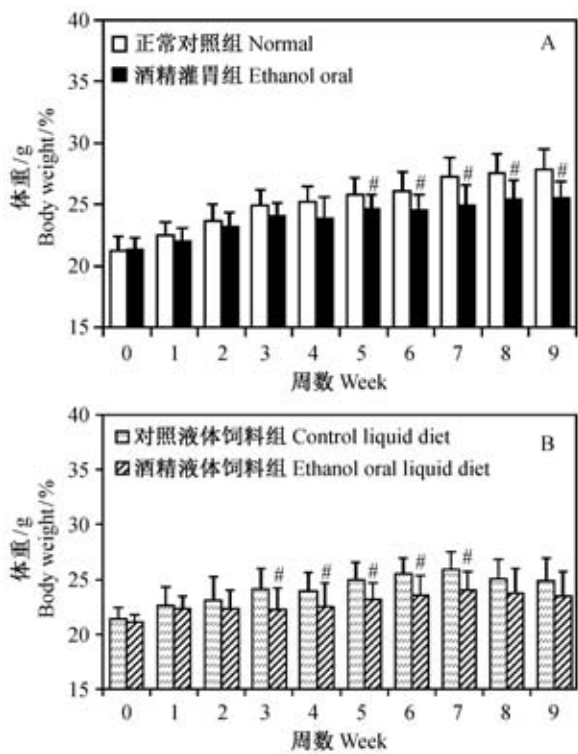
从图 3 中可见,正常对照组小鼠肝小叶结构清晰,肝细胞索由中央静脉向四周呈放射状排列;酒精灌胃组小鼠部分肝细胞出现脂肪变性,大部分脂肪空泡小,少数脂肪空泡大。对照液体饲料组小鼠肝小叶结构清晰,肝细胞索由中央静脉向四周呈放射状排列,少量肝细胞出现脂肪变性,脂肪空泡细小;而酒精液体饲料组小鼠大量肝细胞出现脂肪变性,脂肪空泡大,其余的大部分肝细胞变性、肿胀,胞浆内充满小的脂肪空泡,高倍镜下可观察到肝细胞细胞核浓缩和核溶解,以及炎性细胞浸润。与酒精灌胃组相比,酒精液体饲料组小鼠肝脏脂质聚集程度明显增加。

2.5 肝脏指数

与正常对照组相比,酒精灌胃组小鼠肝脏指数差异无显著性(表 1)。与对照液体饲料组相比,酒精液体饲料组小鼠肝脏指数显著提高 27.62% ($P < 0.05$)(表 2),提示酒精液体饲料组小鼠肝脏出现肿胀、脂质聚集等变化,该结果与肝脏组织病理学形态变化结果相互印证。

2.6 小鼠血清 ALT、AST、 γ -GT、AKP 活性

与正常对照组相比,酒精灌胃组小鼠血清 ALT、AST、AKP 活性均显著提高($P < 0.05$),提高幅度分别为 28.09%、110.32%、43.60%(表 1),提示肝脏出现损伤。与对照液体饲料组相比,酒精液体饲料组小鼠血清 ALT、AST 和 AKP 活力均显著提高($P < 0.05$),提高幅度分别为 86.41%、187.75%、34.78%(表 2),提示肝脏出现损伤。对比肝功能特征指标血清 ALT、AST 活性的变化程度,可发现酒精液体饲料组的变化幅度大于酒精灌胃组,提示酒精液体饲料诱导的肝脏损伤可能比酒精灌胃诱导的肝脏损伤更严重。



注: #表示差异有显著性($P < 0.05$)。

图1 酒精灌胃(A)和 Lieberber-DeCarli 酒精液体饲料(B)诱导的酒精性肝损伤小鼠模型体重变化

Note. #: Significantly reduced body weight ($P < 0.05$).

Fig.1 Changes of body weight of the oral ethanol gavage model (A) and Lieberber-DeCarli ethanol liquid diet model (B)

2.7 小鼠血清及肝脏 TG 和 TC 含量

与正常对照组相比,酒精灌胃组小鼠血清 TG 和肝脏 TG 含量均显著提高(表 1)($P < 0.05$),提高幅度分别为 23.80% 和 11.40%,但是,两组小鼠的血清 TC 和肝脏 TC 含量差异无显著性,提示灌胃酒精诱导的酒精肝损伤模型表现出一定的肝损伤。与对照液体饲料组相比,酒精液体饲料组小鼠血清 TG、TC 和肝脏 TG 含量均显著提高($P < 0.05$),提高幅度为 32.13%、21.90% 和 14.47%(表 2),提示酒精液体饲料能导致一定程度的肝损伤。

酒精液体饲料组小鼠血清 TC 显著增加,而酒精灌胃组该指标无显著变化。对比小鼠血清 TG 和肝脏 TG 含量变化程度,可发现酒精液体饲料组的变化幅度略大于酒精灌胃组。提示酒精液体饲料诱导的肝脏损伤可能比酒精灌胃诱导的肝脏损伤更严重。该结果与肝脏病理变化相互印证。

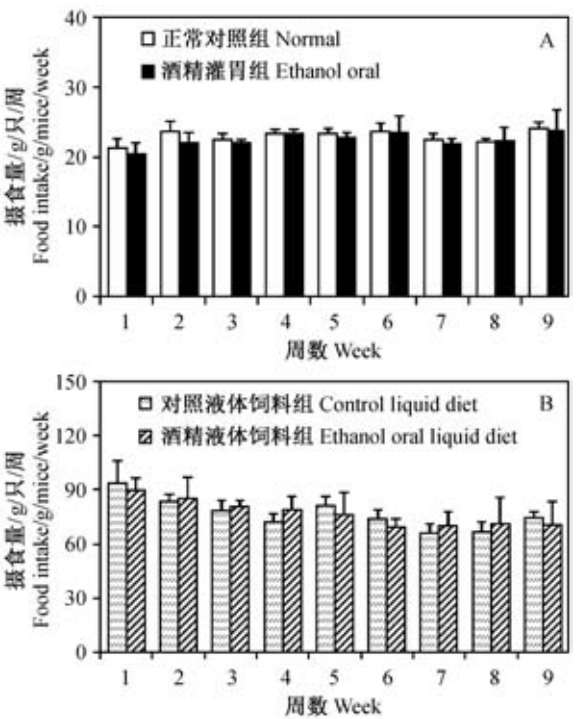


图2 酒精灌胃(A)和 Lieberber-DeCarli 酒精液体饲料(B)诱导的酒精性肝损伤小鼠模型摄食量变化

Fig.2 Changes of food intake of the oral ethanol gavage model (A) and Lieberber-DeCarli ethanol liquid diet model (B)

3 讨论

稳定可靠的动物模型是研究 ALD 的分子机制和防治措施的基础。酒精灌胃和 Lieber-DeCarli 酒精液体饲料诱导的 ALD 模型均为国内外公认的 ALD 模型^[7]。酒精灌胃模型操作简便,能够控制酒精摄入量,可维持血中有效酒精浓度,容易复制酒精性脂肪肝和肝炎,但动物易产生应激反应,死亡率高。Lieber-DeCarli 酒精液体饲料诱导的 ALD 模型是使动物能主动饮用酒精液体饲料,可复制出酒精性脂肪肝和肝炎,其优点是试验者能够通过配对喂养主动控制能量摄入,保持各组间的能量平衡,排除营养摄入即摄入能量不均对实验的结果的影响^[11,16]。

本实验利用酒精灌胃和 Lieber-DeCarli 酒精液体饲料诱导小鼠酒精性肝损伤,造模 8 周,肝脏出现明显脂质聚集,小鼠血清 ALT、AST、AKP 活性,血清 TG 和肝脏 TG 含量均显著提高,这些都符合早期酒精性肝损伤的变化特点^[2,3],表明酒精灌胃组和酒精液体饲料组小鼠均出现明显酒精性脂肪肝。但是,酒精灌胃组小鼠酒醉现象严重、精神状态差;酒

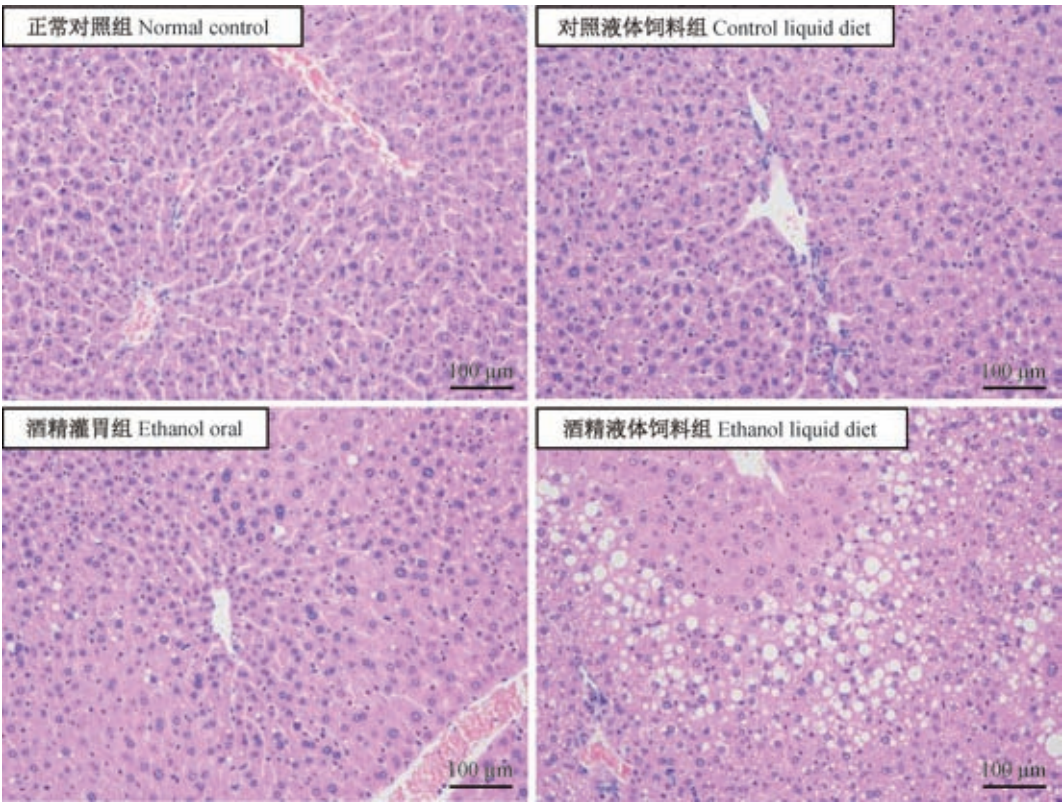


图3 酒精灌胃和 Lierber-DeCarli 酒精液体饲料诱导的酒精性肝损伤小鼠模型肝脏组织病理形态变化(HE 染色, ×200, 标尺 = 100 μm)

Fig.3 Histological changes of the liver tissues in the oral ethanol gavage and Lierber-DeCarli ethanol liquid diet mouse models. (HE staining, ×200, Bar = 100 μm)

表1 酒精灌胃诱导的酒精性肝损伤小鼠模型肝脏指数、血清 ALT、AST、γ-GT 和 AKP 活性,血清和肝脏中甘油三酯和总胆固醇水平的变化($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Changes of the liver-to-body weight ratio, serum ALT, AST, γ-GT and AKP activities, serum and hepatic TG and TC contents in the oral ethanol gavage models.

指标 Indexs	正常对照组 Normal control	酒精灌胃组 Oral ethanol	变化幅度/% Change /%
肝脏指数 Liver-to-body weight ratio/%	3. 34 ±0. 33	3. 59 ±0. 33	
谷丙转氨酶 ALT/U/L	29. 39 ±3. 82	37. 65 ±9. 66 *	+ 28. 09%
谷草转氨酶 AST/U/L	10. 72 ±2. 86	22. 55 ±3. 83 *	+ 110. 32%
γ-谷氨酰转移酶 γ-GT/U/L	3. 24 ±0. 74	3. 68 ±0. 89	
碱性磷酸酶 AKP/U/L	59. 79 ±10. 32	85. 85 ±14. 51 *	+ 43. 60%
血清甘油三酯 Serum TG/mmol/L	0. 94 ±0. 12	1. 16 ±0. 21 *	+ 23. 80%
血清总胆固醇 Serum TC/mmol/L	2. 58 ±0. 38	2. 75 ±0. 46	
肝甘油三酯 Hepatic TG/mg/g liver	11. 98 ±1. 26	13. 34 ±1. 47 *	11. 40%
肝总胆固醇 Hepatic TC/mg/g liver	4. 90 ±0. 75	5. 58 ±0. 88	

注* 表示在 0.05 水平上差异有显著性(P<0.05)。
Note. * means a significant difference(P<0.05).

精液体饲料组小鼠也有酒醉现象,但比酒精灌胃组小鼠要轻微,无应激反应,精神状态和反应均较正常,这有可能是因为酒精灌胃所用的酒精浓度高(50%酒精),对小鼠的刺激大,而酒精液体饲料中酒精的浓度仅为4%,对小鼠的刺激很微弱,因此从精神状态上来看酒精液体饲料模型优于酒精灌胃模型。本实验中酒精液体饲料诱导的ALD模型未出现死亡,而酒精灌胃的第4周小鼠死亡3只。研究表明酒精灌胃剂量低无法诱导酒精性脂肪肝形成,而剂量高易导致大量动物死亡^[7]。灌胃5 g/(kg·体重)或6 g/(kg·体重)酒精(酒精浓度40%~52%)8周成功诱导酒精性脂肪肝形成^[9, 10], Zeng等^[11]研究表明4 g/kg·体重酒精灌胃8周不能导致小鼠肝损伤(脂肪肝)的发生。因此,本实验中酒精灌胃剂量在1~4周为6 g/(kg·体重),在出现小鼠死亡后,酒精灌胃剂量调整为5 g/(kg·体重)。灌胃酒精显著减轻小鼠体重,由于灌胃酒精对摄食量无显著影响,那么体重的减少很可能是由于高浓度酒精刺激影响胃肠道的消化吸收功能造成的^[17, 18];而酒精液体饲料对小鼠体重影响小,很可能是因为进行了配对喂养,使得酒精液体饲料组与其对照组的能量摄入保持一致,这体现了Lieber-DeCarli酒精液体饲料模型的优点。

对照液体饲料组肝脏HE染色结果显示有少量

表2 Lieber-DeCarli酒精液体饲料诱导的酒精性肝损伤小鼠模型肝脏指数、血清ALT、AST、 γ -GT和AKP活性,血清和肝脏中甘油三酯和总胆固醇水平的变化($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Changes of the liver-to-body weight ratio, serum ALT, AST, γ -GT and AKP activities, serum and hepatic TG and TC contents in the Lieber-DeCarli ethanol liquid diet models

指标 Indexs	对照液体饲料组 Control liquid diet	酒精液体饲料组 Ethanol liquid diet	变化幅度/% Change/%
肝脏指数 Live-to-body weight ratio /%	3. 00 $\pm$ 0. 57	3. 82 $\pm$ 0. 51 *	+ 27. 62%
谷丙转氨酶 ALT/U/L	23. 35 $\pm$ 7. 40	43. 54 $\pm$ 14. 26 *	+ 86. 41%
谷草转氨酶 AST/U/L	10. 48 $\pm$ 1. 20	30. 16 $\pm$ 5. 10 *	+ 187. 75%
γ -谷氨酰转移酶 γ -GT/U/L	3. 14 $\pm$ 0. 68	3. 90 $\pm$ 0. 99	
碱性磷酸酶 AKP/U/L	67. 97 $\pm$ 12. 65	91. 61 $\pm$ 12. 21 *	+ 34. 78%
血清甘油三酯 Serum TG/mmol/L	0. 92 $\pm$ 0. 11	1. 22 $\pm$ 0. 23 *	+ 32. 13%
血清总胆固醇 Serum TC/mmol/L	2. 58 $\pm$ 0. 28	3. 14 $\pm$ 0. 30 *	+ 21. 90%
肝甘油三酯 Hepatic TG/mg/g liver	14. 02 $\pm$ 1. 26	16. 05 $\pm$ 2. 17 *	+ 14. 47%
肝总胆固醇 Hepatic TC/mg/g liver	8. 06 $\pm$ 1. 48	8. 46 $\pm$ 1. 67	

注*表示在0.05水平上差异有显著性($P < 0.05$)。

Note. * means a significant difference ($P < 0.05$).

脂质聚集,原因是对照液体饲料是高脂肪型饲料,食用时间较长的情况下小鼠肝脏会有少量脂质聚集,因此造模时间一般不超过8周^[7]。Ge *et al.* ^[13]和Wang *et al.* ^[14]的研究也发现造模8周后,HE染色和油红O染色显示对照液体饲料组小鼠肝脏有轻微脂质聚集。

比较酒精灌胃组和液体酒精饲料相对各自对照组的 变化程度发现:(1)液体酒精饲料模型肝脏指数显著增加,血清TC水平显著提高,而酒精灌胃模型这两个指标无显著变化。(2)两个模型的血清ALT、AST活性、血清和肝脏TG含量均显著变化,但液体酒精饲料模型的变化幅度大于酒精灌胃模型。(3)液体酒精饲料模型的肝脏脂质聚集等病理变化比酒精灌胃模型的严重。提示Lieber-DeCarli酒精液体饲料模型优于酒精灌胃模型。

因此,从精神状态、体重和肝损伤程度等方面来看,Lieber-DeCarli酒精液体饲料模型优于酒精灌胃模型。

4 结论

Lieber-DeCarli酒精液体饲料诱导的酒精肝损伤小鼠模型精神状态良好,肝脏指数显著增加,血清TC水平显著提高,血清ALT、AST活性、血清和肝脏TG含量及肝脏脂质聚集等组织病理学变化幅

度大于酒精灌胃诱导的酒精肝损伤小鼠模型。相对酒精灌胃, Lieber-DeCarli 酒精液体饲料对动物精神状态影响小、易于形成酒精脂肪肝, 因此更适合用于酒精性肝病分子机制的研究和防治药物的筛选。

参考文献:

- [1] Mann RE, Smart RQ, Govoni R. The epidemiology of alcoholic liver disease[J]. Alcohol Res Health, 2003, 27(3): 209 – 219.
- [2] Schwartz JM, Reinus JF. Prevalence and natural history of alcoholic liver disease [J]. Clin Liver Dis, 2012, 16 (4): 659 – 666.
- [3] Arteel G, Marsano L, Mendez BF, *et al.* Advances in alcoholic liver disease[J]. Best Pract Res Cl Ga, 2003, 17(4): 625 – 647.
- [4] Beier JI, Arteel GE, McClain CJ. Advances in alcoholic liver disease[J]. Curr Gastroenterol Rep, 2011, 13(1): 56 – 64.
- [5] 张彦芬, 秘尧, 何奇龙, 等. FH/Wjd 大鼠酒精性肝损伤模型探讨[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(5): 59 – 62.
- [6] Ding R-B, Tian K, Huang L-L, *et al.* Herbal medicines for the prevention of alcoholic liver disease: A review [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 144(3): 457 – 465.
- [7] Brandon-Warner E, Schrum LW, Schmidt CM, *et al.* Rodent models of alcoholic liver disease: Of mice and men[J]. Alcohol, 2012, 46(8): 715 – 725.
- [8] Nanji AA, French SW. Animal models of alcoholic liver disease focus on the intragastric feeding model[J]. Alcohol Res Health, 2003, 27(4): 325 – 330.
- [9] Park H-Y, Choi H-D, Eom H, *et al.* Enzymatic modification enhances the protective activity of citrus flavonoids against alcohol-induced liver disease [J]. Food Chem, 2013, 139 (1 – 4): 231 – 240.
- [10] Ren Y, Deng F, Zhu H, *et al.* Effect of epigallocatechin-3-gallate on iron overload in mice with alcoholic liver disease [J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(2): 879 – 886.
- [11] 曾涛, 姜璐璐, 张翠丽, 等. 两种 Lieber-DeCarli 液体饲料诱导的小鼠酒精性肝损伤模型的建立 [J]. 毒理学杂志, 2012, 26 (4): 258 – 261.
- [12] Bull-Otterson L, Feng W, Kirpich I, *et al.* Metagenomic analyses of alcohol induced athenogenic alterations in the intestinal microbiome and the effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53028.
- [13] Ge X, Lu Y, Leung T-M, *et al.* Milk osteopontin, a nutritional approach to prevent alcohol-induced liver Injury [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013, 304 (10): G929 – G939.
- [14] Wang Y, Kirpich I, Liu Y, *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment potentiates intestinal hypoxia-inducible factor, promotes intestinal integrity and ameliorates alcohol-induced liver injury [J]. Am J Pathol, 2011, 179(6): 2866 – 2875.
- [15] 曾涛, 谢克勤, 张翠丽, 等. 氯仿/甲醇匀浆测定肝脏甘油三酯含量 [J]. 卫生研究, 2008, 37(5): 550 – 552.
- [16] 方志红, 崔剑巍, 曹健美, 等. Lieber-DeCarli 酒精性肝损伤模型的复制 [J]. 中西医结合学报, 2006, 4(6): 596 – 600.
- [17] You M, Fischer M, Deeg MA, *et al.* Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP) [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (32): 29342 – 29347.
- [18] Zeng T, Xie KQ. Ethanol and liver: recent advances in the mechanisms of ethanol-induced hepatosteatosis [J]. Arch Toxicol, 2009, 83(12): 1075 – 1081.

[修回日期] 2016 – 03 – 22

环孢素 A 对肝细胞中磷酸化 AKT 蛋白表达的影响

杨 柳¹, 刘晓军², 王宏宇¹, 曹 永¹, 马永华¹, 徐 春¹

(武警总医院内分泌科, 北京 100039; 2. 武警总医院药剂科, 北京 100039)

【摘要】 目的 观察环孢素 A (cyclosporin A, CsA) 对肝细胞磷酸化 AKT (phosphorylated AKT, P-AKT) 表达的影响, 探讨 CsA 导致胰岛素抵抗的机制。**方法** 本研究分两部分: (1) 体外研究: 用不同浓度 CsA (0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$) 作用于人肝细胞 (HL7702 细胞) 48 h, 用 Western blot 方法检测 P-AKT 蛋白的表达水平。(2) 体内研究 (动物实验): 建立环孢素 A 诱发的大鼠糖尿病模型, 用免疫组化方法分析 P-AKT 蛋白在糖尿病大鼠肝细胞中的表达水平。**结果** (1) 各浓度 (0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$) CsA 组与对照组相比, HL7702 肝细胞中的 P-AKT 蛋白的表达呈现逐渐下降趋势, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$)。(2) 环孢素 A 引起大鼠血糖升高, 在服用环孢素 A 的第 5 个月, 大鼠平均血糖为 9.28 mmol/L, 说明环孢素 A 诱导的糖尿病大鼠模型建立成功, 糖尿病大鼠肝细胞中 P-AKT 蛋白的表达明显低于服药前和正常对照组 ($P < 0.05$)。**结论** 服用治疗剂量的环孢素 A 导致大鼠血糖升高, 环孢素 A 抑制大鼠肝细胞中 P-AKT 的表达, 环孢素 A 抑制人肝细胞 HL7702 中 P-AKT 的表达, 提示影响 PI3K/AKT 信号通路可能是环孢素 A 导致胰岛素抵抗的机制之一。

【关键词】 环孢素 A; 胰岛素抵抗; 移植后糖尿病; AKT; P-AKT

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2016) 06-0018-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.06.004

Effects of cyclosporine A on the expression of phosphorylated AKT in human hepatocytes in vitro and rat hepatocytes in vivo

YANG Liu¹, LIU Xiao-jun², WANG Hong-yu¹, CAO Yong¹, MA Yong-hua¹, XU Chun¹

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

【Abstract】 Objective To observe the effects of cyclosporin A on the expression of phosphorylated AKT in hepatocytes, and to investigate the mechanism of insulin resistance caused by cyclosporin A. **Methods** This study included two parts. 1. In vitro experiment: Human hepatocyte HL77022 cell line was cultured at different concentrations of cyclosporin A (0.1 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$) for 48 hours. The expressions of phosphorylated AKT (P-AKT) in HL77022 cells were measured by Western blot assay. 2. Rat in vivo experiment: SD rats were randomly divided into 2 groups. The rats in the control group were administrated with distilled water 1 mL/Kg/d. The rats in the cyclosporine group were administrated with cyclosporine 25 mg/Kg/d. The total experiment time was 5 months. The levels of fasting blood glucose and insulin were tested at the end of the experiment. The insulin resistance index and insulin sensitivity index were calculated. The expression of P-AKT in the rat hepatocytes was measured by immunohistochemistry. **Results** 1. Each group of the HL7702 cells treated by CsA (0.1 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$) showed a significantly decreased

【基金项目】 武警总医院科研项目 (编号: WZ20130403)。

【作者简介】 杨柳 (1986 -), 女, 硕士研究生, 专业: 内分泌代谢疾病。Email: y113949648250@163.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: wxjxuchun@sina.com。

expression of P-AKT ($P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.01$). 2. After 5 months of therapy, the fasting blood glucose level of rats in the cyclosporine group was 9.28 mmol/L, indicating that cyclosporine-induced diabetic rat models were established. The insulin sensitivity index in the cyclosporine group was lower than that in the control group ($P < 0.05$). The expression of P-AKT in liver in the cyclosporine group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Therapeutic dose of cyclosporine has hyperglycemic effects on rats. Cyclosporine can reduce the expression of phosphorylated AKT in hepatic tissue in rats and also decrease the expression of P-AKT in human hepatocyte HL77022 cells, which indicate that cyclosporine may cause insulin resistance by interfering PI3K/AKT signal transduction pathway.

【Key words】 Cyclosporin A; Insulin resistance; Post-transplantation diabetes mellitus; AKT; P-AKT

移植术后糖尿病 (post-transplantation diabetes mellitus, PTDM) 作为器官移植术后最为常见和最为严重的并发症之一,受到人们的广泛关注。PTDM 的高发病率 (2% ~ 53%) 以及带来的一些诸如术后反复感染、移植物失活、心脑血管疾病发生率增加等问题,显著影响移植后患者的愈合、生活质量和长期存活率。大量临床数据和研究表明年龄、性别、种族、家族史、术后急性排斥反应、免疫抑制剂、病毒感染等都是导致 PTDM 的危险因素,其中年龄、性别、种族和家族史等因素都是不可控的,而免疫抑制剂作为一个可调控的独立危险因素就显得尤为重要^[1,2]。器官移植患者术后使用的免疫抑制剂主要可分为糖皮质激素和钙调磷酸酶抑制剂 (calcineurin inhibitor, CNI) 两大类。目前认为糖皮质激素主要是通过促进肝糖原异生和加重外周胰岛素抵抗导致血糖升高,而 CNI 导致血糖升高的机制尚不清楚,目前的研究提示,CNI 导致胰岛 β 细胞损伤、凋亡,减少胰岛素 (insulin, Ins) 的合成和分泌,产生胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)^[3-8]。胰岛素受体后水平信号传导障碍是 IR 发生最常见和最重要的环节,胰岛素主要是通过磷酸酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 途径行使调控糖代谢的功能^[9,10]。因此,PI3K/Akt 信号通路的传导障碍应是 IR 发生的主要原因。AKT 是一种丝/苏氨酸激酶 (serine-threonine kinase),因与蛋白激酶 A 和蛋白激酶 C 有很高的同源性,故又称为蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB),其处于 PI3K/AKT 信号通路的中心环节,通过磷酸化和去磷酸化来控制反应进行,主要负责由 PI3K 始动的生物信息的传导,在细胞代谢、细胞周期、细胞生长、细胞凋亡、胰岛素分泌等多种生理过程中起着重要作用^[11-13]。我们曾经用临床剂量的环孢素 A (CNI 的代表药之一) 喂大鼠,在服药 3 个月后出现血糖的升高,环孢素 A

诱发的糖尿病大鼠表现出胰岛素 B 细胞的坏死和胰岛素的抵抗^[5]。为进一步研究环孢素 A 导致胰岛素抵抗的机制,本研究 1. 通过体外细胞培养,分析环孢素 A 对正常人肝细胞 (胰岛素主要靶细胞之一) 中磷酸化 AKT (phosphorylated AKT, P-AKT) 和 AKT 表达的影响,2. 通过动物实验,分析环孢素 A 诱发的糖尿病大鼠肝脏组织 P-AKT 的表达,获得环孢素 A 干扰胰岛素信号传导的证据,揭示钙调磷酸酶抑制剂升高血糖的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养部分:环孢素 A (cyclosporin A, CsA) 购自上海 Beyotime 公司,人正常肝细胞-HL7702 细胞系,购自于上海中科院细胞所。兔来源 phospho-AKT (Ser473) 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,兔来源 AKT 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.1.2 动物实验部分:

1.1.2.1 动物:SPF 级 SD 雄性 4 周大鼠 20 只,体重 (200.0 ± 10.0) g,来源于军事医学科学院实验动物中心【SCXK (军) 2014 - 005】。大鼠饲养在相同的鼠隔离系统内,居住环境经过无菌处理,温度 $22^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$; 12 h 白天,12 h 夜晚 (早 7:00 开灯)。标准的鼠粮:含钙 0.98%,含磷 0.75%,含维生素 D3 1500 IU/kg,含镁 0.3%;自来水。组织取材于武警总医院医学实验中心进行。

1.1.2.2 药物:环孢素 (CsA) 由诺华公司提供。将药品用蒸馏水溶解,稀释至 25 mg/mL,备喂养用。

1.2 方法

1.2.1 通过细胞培养观察不同浓度的环孢素 A 对人肝细胞 (HL7702 细胞) 表达磷酸化 AKT 和 AKT 的影响:

1.2.1.1 药物浓度及实验分组:实验分为对照组、

DMSO 组和实验组。对照组仅加细胞培养液。实验组加入不同浓度的 CsA (0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$)。因 CsA 粉剂不溶于水,根据 CsA 粉剂说明书,采用 DMSO 溶解,需增加 DMSO 组,DMSO 组只加细胞培养液和 DMSO,由于 CsA 各组 (0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$),分别含 DMSO 的浓度为 0.001‰、0.01‰、0.05‰,故 DMSO 组中 DMSO 的浓度最终稀释至 0.05‰。

1.2.1.2 细胞蛋白的提取和蛋白浓度的测定:将 HL7702 细胞接种于六孔培养板中,置入三气组织培养箱中培养 24 h。

吸取原培养液,每孔加入含不同浓度 CsA (0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$) 的培养液、单纯培养液或含 DMSO 的培养液 2 mL,继续培养 48 h。去除六孔板培养液,PBS 洗涤两遍。加入 80 μL 裂解液,充分裂解 10 min。10 000 ~ 14 000 r/min 离心 10 ~ 15 min,取上清液,得到 HL7702 细胞蛋白。将浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 BSA 按 0、1、2、4、8、12、16、20 μL 分别加入 EP 管中,补加高纯水到 20 μL 。将每蛋白样品取 5 μL 加入 BCA 工作液,在水浴箱 (60℃),30 min。在酶标仪上测定 562 nm 波长的吸光度值,计算蛋白浓度。

1.2.1.3 Western blotting 法检测 P-AKT 和 AKT 蛋白的表达:(1) SDS-PAGE 电泳:在加样孔内点入上样蛋白(取细胞蛋白 50 μg ,与等体积 2 $\times$ SDS 上样缓冲液混合,沸水中加热变性 5 min,1 000 r/min 离心 5 min)和标准蛋白 Marker 5 μL ,50 V 电压 30 min,待溴酚蓝到达分离胶与浓缩胶交界处时,更换电压至 90 V,继续电泳 90 min。(2)转膜。(3)封闭。(4)免疫反应:①取出已封闭的膜,浸于一抗(抗 P-AKT 抗体或抗 AKT 抗体)稀释液中,过夜,用 TBST 洗 3 次,每次 5 min。②将膜再浸于 1:5000 二抗稀释液中,室温孵育 1 h,然后用 TBST 洗 3 次,每次 5 min。(5)Odyssey 双色红外荧光成像系统扫描,并分析数据。

1.2.2 动物实验:

1.2.2.1 环孢素 A 诱发的糖尿病大鼠模型的建立:经过 1 周的适应生活,将大鼠随机分 2 组,每组 10 只,对照组:蒸馏水 1 mL/(kg·d),环孢素 A 组:环孢素 A 25 mg/(kg·d)。均经胃管灌注给药,根据我们以往实验的结果,设计本实验用药时间为 5 个月,在实验结束时环孢素 A 组大鼠因灌胃给药损伤死亡 2 只。测定两组给药前及给药第 5 个月的空腹

血糖,用放射免疫分析法测定血清胰岛素 (INS) 水平,根据以下公式计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 和胰岛素敏感指数 (HOMA- β): $\text{HOMA-IR} = \text{空腹胰岛素} \times \text{空腹血糖} / 22.5$, $\text{HOMA-}\beta = 20 \times \text{空腹胰岛素} / (\text{空腹血糖} - 3.5)$,其中空腹胰岛素单位为 mU/L,空腹血糖单位为 mmol/L。

1.2.2.2 用免疫组化方法测定大鼠肝细胞 P-AKT 的表达:制备肝脏组织石蜡切片,进行 P-AKT 的免疫组化染色。

1.2.3 统计学方法:采用 SPSS 19.0 进行统计学分析,计量资料采用均数士标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。给药前两组大鼠的血糖、胰岛素分泌指数、胰岛素抵抗指数的比较采用独立样本 t 检验;给药后两组大鼠的血糖、胰岛素分泌指数、胰岛素抵抗指数的比较采用协方差分析,以给药前水平作为协变量, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。大鼠 P-AKT 表达强度比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。人肝细胞 (HL7702 细胞) 磷酸化 AKT 的表达强度比较采用单因素方差进行分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。组间的两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的环孢素 A 对 HL7702 细胞中 AKT 和 P-AKT 蛋白表达的影响

不同浓度的环孢素 A 作用 48 h 后,通过 Western blot 方法检测 HL7702 肝细胞中 AKT 和 P-AKT 蛋白的表达结果,如表 1 所示:在 AKT 蛋白的表达中,各浓度 CsA 组分别与对照组相比,均无明显差异 ($P > 0.05$)。在 P-AKT 蛋白的表达中,0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 $\mu\text{mol/L}$ CsA 组分别与对照组相比,P-AKT 蛋白的表达呈现逐渐下降趋势,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$)。

2.2 环孢素 A 对大鼠血糖、胰岛素抵抗指数、胰岛素敏感指数的影响

给药前两组大鼠空腹血糖差异无显著性 ($P > 0.05$)。实验过程中环孢素 A 组大鼠因灌胃给药损伤死亡 2 只。给药 5 个月后环孢素 A 组剩余 8 只大鼠空腹血糖均大于 7.0 mmol/L,平均血糖为 9.28 mmol/L,糖尿病发生率为 100%,糖尿病模型建立。协方差分析结果显示:给药 5 个月后与对照组相比,环孢素组血糖显著增高 ($P < 0.05$),给药前的血糖对给药后血糖无显著影响;给药 5 个月后与对照组

相比,环孢素组胰岛素抵抗指数显著增高 ($P < 0.05$),给药前胰岛素抵抗指数对给药后胰岛素抵抗指数无显著影响;给药 5 个月与对照组相比,环孢素组胰岛素敏感指数显著降低 ($P < 0.05$),给药前胰岛素敏感指数对给药后胰岛素敏感指数无显著影响(表 2)。

2.3 环孢素 A 对大鼠肝脏 P-AKT 表达的影响

分别在 100 倍和 200 倍光学显微镜下观察两组大鼠肝脏组织中 P-AKT 的免疫组化表达,阳性细胞内可见褐黄色颗粒散在分布。通过 χ^2 检验,得出 $P < 0.001$,差异有统计学意义(表 3)。

3 讨论

环孢素 A(CsA)是一种由真菌代谢产生的含 11 个氨基酸的环形多肽类物质,通过抑制神经钙蛋白,作用于 T 细胞活化过程中的信号传导,抑制 T 细胞的增殖和分化,达到免疫抑制的效果,于 20 世纪 80 年代起开始广泛应用于器官移植术后。临床数据显示环孢素 A 可以增加器官移植术后糖尿病

的发生风险^[1],本研究给 SD 大鼠服用临床治疗剂量的环孢素 A,在服药 5 个月,大鼠血糖持续升高,达到糖尿病的诊断标准,成功建立了环孢素 A 诱发的糖尿病大鼠模型,糖尿病大鼠的胰岛素抵抗指数明显增加,说明环孢素 A 具有增加胰岛素抵抗的作用。

AKT 是 PI3K/Akt 信号通路的关键环节,当被激活后,可以活化多种底物,产生胰岛素的代谢效应,AKT 激活的主要机制是磷酸化,而它的磷酸化和去磷酸化,需要 Thr308 和 Ser473 两个磷酸化位点来调节。Thr308 位于 AKT 的催化域,该位点的激活只增加大约 10% 的 AKT 激酶活性;而 Ser473 位于 AKT 的调节域,是 AKT 完全磷酸化所必需的位点^[14]。当 Thr308 和 Ser473 两个位点的全都磷酸化时,AKT 达到最大激活状态。本研究分析的是 Ser473 磷酸化 AKT。当胰岛素通过血液循环到达肝脏、骨骼肌、脂肪等靶组织后,作用于细胞膜上的胰岛素受体,使胰岛素受体酪氨酸位点自磷酸化,磷酸化激活的胰岛素受体使胰岛素受体底物-1 (insulin receptor substrate 1, IRS-1) 发生磷酸化,

表 1 不同浓度的环孢素 A 作用肝细胞 HL7702 后,P-AKT、AKT 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	AKT/ACTIN	P-AKT/ACTIN	P-AKT/AKT
对照组 Control	1.407 ± 0.056	0.414 ± 0.047	0.294 ± 0.023
0.05% DMSO	1.412 ± 0.045 [△]	0.411 ± 0.043 [△]	0.291 ± 0.021 [△]
0.1 μmol/L CSA	1.414 ± 0.052 [△]	0.303 ± 0.060 [*]	0.214 ± 0.036 [#]
1 μmol/L CSA	1.391 ± 0.040 [△]	0.205 ± 0.045 [#]	0.147 ± 0.028 [#]
5 μmol/L CSA	1.403 ± 0.063 [△]	0.200 ± 0.063 [#]	0.142 ± 0.039 [#]

注:与对照组比较,△ $P > 0.05$, $^*P < 0.05$, $^{\#}P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group,△ $P > 0.05$, $^*P < 0.05$, $^{\#}P < 0.01$.

表 2 给药前后血糖、胰岛素抵抗指数、胰岛素敏感指数的比较

组别 Groups	空腹血糖 FBG		胰岛素抵抗指数 HOMA-IR		胰岛素敏感指数 HOMA-β	
	前 Before	后 After	前 Before	后 After	前 Before	后 After
环孢素组 CSA (n = 8)	5.29 ± 0.97	9.28 ± 2.11 ^{*△}	4.22 ± 0.93	8.28 ± 1.93 ^{*△}	8.87 ± 2.11	5.87 ± 1.01 ^{*△}
对照组 Control (n = 10)	4.97 ± 0.99	5.08 ± 1.05	3.97 ± 0.90	4.08 ± 0.95	8.18 ± 1.95	8.08 ± 1.87

注:与治疗前比较, $^*P < 0.05$;与对照组比较,△ $P < 0.05$ 。
Note. Compared with that before medication, $^*P < 0.05$. Compared with the control group,△ $P < 0.05$.

表 3 磷酸化 AKT 在大鼠肝脏组织中的免疫组化表达

组别 Groups	阴性 Negative	阳性 Positive	总计 Total
环孢素 A 组 CSA	16 (88.9%)	2 (11.1%)	18 (100.0%)
对照组 Control	1 (5%)	19 (95.0%)	20 (100.0%)
总计 Total	17 (44.7%)	21 (55.3%)	38 (100.0%)

注: $\chi^2 = 28.97$, $\nu = 1$, $P < 0.001$ (双侧)。
Note. $\chi^2 = 28.97$, $\nu = 1$, $P < 0.001$ (both sides).

IRS-1 上磷酸化的酪氨酸与磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K) 结合,活化的 PI3K 再使 4,5-二磷酸脂酰肌醇 (PIP2) 变为磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸 (PIP3),但 PIP3 并不能直接激活 AKT,它仅可以使 AKT 聚集到靶细胞膜上,发生构象的改变,进而可以被磷酸肌醇依赖性激酶 1 (phosphoinositide-dependent kinase, PDK1) 激活, PDK1 可使 AKT 的两个磷酸化位点磷酸化,使 AKT 完全激活,随后被磷酸化的 AKT (P-AKT) 从细胞膜上释放出来,转移到胞浆内,引起各底物的磷酸化反应,最后发挥胰岛素在靶组织的生理学效应。

在环孢素 A 诱发的糖尿病大鼠的肝细胞中,我们发现 P-AKT 的表达明显低于用药前和正常对照组。在体外培养的人肝细胞 HL7702 中加入 CsA,我们同样发现肝细胞中磷酸化 AKT (P-AKT) 蛋白的表达降低,且随着 CsA 浓度的增加,P-AKT 的脱磷酸化越来越明显。提示 CsA 是肝细胞 AKT 磷酸化的负调节因素,并且 AKT 的磷酸化水平和 CsA 的浓度成反比。

磷酸化的 AKT 主要通过以下五个底物途径参与发挥胰岛素的代谢调节作用^[15,16]:(1) 使葡萄糖转运体 (主要是葡萄糖转运体 4) 从细胞内转移到细胞膜,发挥转运葡萄糖的作用。(2) 使糖原合酶激酶 3 (GSK3) Ser 位点磷酸化,抑制 GSK3 活化,激活糖原合成酶 (glycogen synthetase, GS),活化的 GS 能够促进糖原合成、抑制糖异生。(3) 可使叉头转录因子 O1 (forkhead box protein O1, FoxO1) 磷酸化后出核失活,解除对糖异生基因 PEPCK 和 G6P 的转录调控,抑制肝脏的糖异生。(4) 使 PDE3B 激活,降低 cAMP 的水平,抑制 PKA 对脂肪酶的激活,抑制脂肪分解。(5) 使转录因子 PGC-1 磷酸化,抑制肝细胞糖异生以及脂肪酸氧化。

本研究通过细胞培养和动物实验观察到环孢素 A 抑制肝细胞 P-AKT 的表达,为揭示环孢素 A 引起胰岛素抵抗的机制提供了一条线索。

参考文献:

[1] Zbiti N, Souly K, Errami Z, et al. Post-transplantation diabetes

mellitus [J]. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2012, 23(5): 1104 - 1108.

[2] 徐春. 器官移植术后糖尿病的发病机制与防治措施 [J]. 武警医学, 2014, 25(2): 757 - 760.

[3] Xu C, Niu YJ, Tenq YQ, et al. Tacrolimus reversibly reduces insulin secretion, induces insulin resistance, and causes islet cell damage in rats [J]. Int J Clin Pharmacol, 2014, 52(7): 620 - 627.

[4] 闫赋琴, 牛玉坚, 徐春, 等. 环孢素 A 诱发的大鼠糖尿病模型的建立及其机制的探讨 [J]. 中华临床医师杂志 (电子版), 2013, 7(21): 9586 - 9589.

[5] 王文君, 徐春, 牛玉坚, 等. 肝移植术后胰岛素敏感性和胰岛 β 细胞功能的改变 [J]. 中国糖尿病杂志, 2012, 20(2): 133 - 135.

[6] 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 in liver transplant recipients [J]. Clin Lab, 2013, 59(7-8): 869 - 874.

[7] 藤稚芹, 牛玉坚, 徐春, 等. 他克莫司对大鼠血糖的影响及其作用机制 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(2): 74 - 77.

[8] Lopes P, Fuhrmann A, Sereno J, et al. Effects of cyclosporine and sirolimus on insulin-stimulated glucose transport and glucose tolerance in a rat model [J]. Transplant Proc, 2013, 45(3): 1142 - 1148.

[9] Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance [J]. J Clin Invest, 2000, 106(2): 165 - 169.

[10] 王笑, 王甄真, 陈雁. PI3K/AKT 信号通路在维持血糖平衡中的作用 [J]. 生命科学, 2013, 25(2): 133 - 139.

[11] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway [J]. Science, 2002, 296(5573): 1655 - 1657.

[12] Manning BD, Cantley LC. Akt/pkb signaling: Navigating downstream [J]. Cell, 2007, 129(7): 1261 - 1274.

[13] Du K, Tschlis PN. Regulation of the Akt kinase by interacting proteins [J]. Oncogene, 2005, 24(50): 7401 - 7409.

[14] Woodgett JR. Recent advances in the protein kinase B signaling pathway [J]. Curr Opin Cell Biol, 2005, 17(2): 150 - 157.

[15] Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT — a major therapeutic target [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1697(1-2): 3 - 16.

[16] 李晓瑾, 母义明. AKT 信号通路在胰岛 β 细胞功能中的研究进展 [J]. 医学综述, 2012, 18(8): 1121 - 1124.

[修回日期] 2016 - 02 - 23

多柔比星脂质体注射液与多柔比星注射液 大鼠重复给药毒性的比较

张颖¹, 马玉奎², 戴晓莉²

(1. 山东省临朐县人民医院, 山东 临朐 262600; 2. 山东省药学科学院, 济南 250100)

【摘要】 目的 研究大鼠连续静脉注射给予多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液后对大鼠产生的毒性作用及毒性异同比较。**方法** SD大鼠90只,随机分为溶剂对照组、多柔比星脂质体注射液(1 mg/kg)和多柔比星注射液(1 mg/kg)组。各组大鼠每3 d静脉注射1次,连续给药13次,检测其体重、血液生化学、血液学、脏器系数等指标,并进行组织病理学检查。**结果** 多柔比星脂质体注射液1 mg/kg可引起SD大鼠脱毛和溃疡,体重增长明显延缓,PLT、ALT、BUN升高,ALB降低,心脏和肾脏系数增大,胸腺和睾丸系数减小,组织病理学检查结果显示睾丸曲细精管生精上皮脱落,各级生精细胞消失,部分间质水肿;心脏心肌纤维断裂、溶解,横纹及部分细胞核消失;肾脏出现肾小管透明管型等病理组织学病变。与多柔比星脂质体注射液比较,相同剂量下多柔比星注射液亦可引起以上病变,但大鼠脱毛和皮肤溃疡率降低,肾脏毒性和心脏毒性明显增加。**结论** 多柔比星脂质体注射液与普通注射液比较,心脏和肾脏毒性明显减轻,但皮肤毒性明显增加。

【关键词】 多柔比星注射液;脂质体;SD大鼠;重复给药毒性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)06-0023-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.06.005

Comparison of the repeated dose toxicity of doxorubicin liposome injection and doxorubicin injection in rats

ZHANG Ying¹, MA Yu-kui², DAI Xiao-li²

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

2. Shandong Provincial Academy of Pharmaceutical Science, Jinan 250033)

【Abstract】 Objective To investigate the repeated dose toxicity of doxorubicin liposome injection and doxorubicin injection in rats. **Methods** Ninety SD rats (body weight 180–220 g, male:female = 1:1) were divided into 3 groups (30 rats in each group), and were administered intravenously with physiological saline, doxorubicin liposome injection (1 mg·kg⁻¹) and doxorubicin injection (1 mg·kg⁻¹), respectively, once every three days for thirteen times. The body weight, blood biochemistry, hematology, organ coefficient and histopathology were analyzed for the overall toxicity assessment. **Results** The rats administered with doxorubicin liposome injection (1 mg/kg) showed hair loss and skin ulcer, significantly reduced growth of body weight, increased levels of urea nitrogen (BUN), alanine aminotransferase (ALT), blood platelet (PLT), and kidney and heart coefficients, decreased thymus and testicular coefficients, myofibrillar rupture and lysis, and partial loss of cell nuclei, hyaline casts in the renal convoluted tubules, interstitial edema and loss of spermatogenic cells in the testicular tubules. Compared with the doxorubicin liposome injection group, similar abnormal changes were also observed in the doxorubicin injection group, but the hair loss and skin ulcer were milder

【基金项目】 山东省自主创新及成果转化专项(2014ZZCX02104)。

【作者简介】 张颖(1972–),女,主管药师,研究方向:药物不良反应检测。E-mail:449221076@qq.com。

【通讯作者】 马玉奎(1975–)男,副主任药师,博士,研究方向:药物临床前安全性评价。E-mail:yukuima@sina.com。

and the heart and kidney toxicities were severer. **Conclusions** Compared with doxorubicin injection, the doxorubicin liposome injection causes milder heart and kidney toxicity but more serious skin toxicity.

【Key words】 Doxorubicin injection; Doxorubicin liposome; SD rat; Repeated dose toxicity

脂质体是近年来药剂领域研究非常活跃的一种新型制剂,是由脂质双分子层形成的粒径在纳米级别的囊泡,可将毒副作用大、在血液中稳定性差、降解快的药物包裹在脂质体内,携带药物到达特定的靶组织器官后再把装载的药物释放出来,达到靶向治疗的目的,从而可以提高疗效,降低毒副作用^[1]。目前脂质体制剂主要用于抗癌药物、疫苗以及核酸类药物。多柔比星脂质体注射液,是将一线治疗肿瘤药物多柔比星经包封制备成的纳米级长循环脂质体,制成后的脂质体大大降低了多柔比星普通制剂存在的心脏毒性问题,起到了减毒、增效的效果^[2]。本试验通过 SD 大鼠重复静脉给予多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液,通过检测血液学、血液生化学及病理学等指标,全面评价脂质体和普通制剂的毒性及毒性差异,为临床应用中的不良反应监测提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及实验环境:SPF 级 SD 大鼠 90 只,体重 180g~220 g,雌雄各半,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2007-0001】。饲养于 SPF 级环境,室温 20℃~26℃,湿度 40%~70%,日温差≤4℃。实验动物使用许可证号【SYXK(鲁)2010 0004】。

1.1.2 药品与试剂:多柔比星脂质体注射液(山东省药学院提供,批号 20110312);多柔比星注射液(先灵葆雅(中国)有限公司提供,批号 102369013);血液学检测试剂盒(济南荣辰医学科技有限公司提供);血凝检测试剂盒(上海太阳生物技术有限公司提供);血液生化学检测试剂盒(宁波瑞源生物科技有限公司提供)。

1.1.3 仪器:Sysmex XT-2000IV 型全自动血球计数仪(Sysmex Corporation 生产);日立 7180 全自动生化分析仪(日本株式会社日立高新技术生产);Sysmex CA1500 全自动血凝分析仪(Sysmex Corporation 生产);TB718 包埋机、TK-218 摊烤片机(湖北孝感医疗器械公司生产);RM2235 切片机、DMLS2 显微镜(Leica 公司生产)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与给药:健康 SD 大鼠 90 只,雌雄各半,随机分为 3 组,即溶剂对照组、多柔比星脂质体注射液(1 mg/kg)和多柔比星注射液(1 mg/kg)组,给药体积 10 mL/kg,溶剂对照组静脉给予等容积生理盐水,每 3 d 给药 1 次,连续给药 13 次,停药恢复 4 周。

1.2.2 剂量设计依据:根据预试验结果设计正式试验剂量。大鼠 30 只,随机分成 3 组,分别为多柔比星注射液 1.5、1.0、0.5 mg/kg 三个剂量组,静脉给药,每 3 d 给药 1 次,共给药 13 次。结果显示,0.5 mg/kg 剂量组 10 只动物全部存活,体重及摄食量下降;1.0 mg/kg 剂量组 10 只动物全部存活;1.5 mg/kg 剂量组于给药 8 次后死亡 2 只。根据预试验采用动物能够耐受的剂量 1 mg/kg 进行正式毒性比较试验研究。

1.2.3 指标检测和结果评价:每 3 天称量 1 次体重和摄食量,每天观察大鼠外观体征。末次给药后 72 h 每组取 20 只动物,恢复期结束取 10 只剩余动物腹主动脉采血进行血液学及血液生化学检测,戊巴比妥钠安乐处死后,剖检摘取心、肝、脾、肺、肾等主要脏器称重并计算脏器系数(脏器系数=脏器重量/体重×100,单位为 g/100 g 体重)。所有脏器福尔马林溶液固定,常规 HE 染色,进行病理组织学检查。

1.2.4 统计学方法:各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般体征观察

溶剂对照组动物未出现任何异常反应。多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液组分别约 58% 和 34% 的动物皮肤出现不可逆性脱毛。多柔比星脂质体注射液组 25% 动物出现皮肤可愈性溃疡,多柔比星注射液组动物亦出现皮肤可愈性溃疡,但比例明显减少,为 8%。除脱毛和溃疡外未见其它异常反应。

2.2 体重及摄食量影响

与溶剂对照组比较,多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液 1 mg/kg 剂量下均可使雄性 SD 大鼠体重增长明显减缓;对雌性大鼠体重影响较小,

与溶剂对照组比较体重增长略有缓慢。多柔比星脂质体注射液与多柔比星注射液比较,相同剂量下对大鼠体重影响基本一致,无明显差异。两者对动物摄食量无明显影响(图 1)。

2.3 血液学和血液生化学指标影响

给药结束时,与溶剂对照组比较,多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液两组大鼠血液学指标中 PLT 升高;血液生化学指标中 ALB 降低,BUN 和 ALT 升高。恢复期结束时两组动物血液生化学指标未见明显恢复,ALB 降低,BUN 和 ALT 升高,血液学异常指标恢复正常。其他指标给药结束和恢复期结束未见异常。多柔比星脂质体注射液与多柔比星注射液比较,相同剂量下对大鼠以上指标的影响基本一致,差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。

2.4 脏器系数的影响

与溶剂对照组比较,多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液两组大鼠给药结束和恢复期结束

心脏和肾脏系数增大,胸腺系数减小;恢复期结束时雄性大鼠睾丸和附睾系数减小。其它脏器系数未见异常。多柔比星脂质体注射液与多柔比星注射液比较,相同剂量下对大鼠脏器系数影响基本一致,无统计学差异($P > 0.05$)。见表 2。

2.5 组织病理学检查结果

病理学检查结果显示,多柔比星注射液组 40% 动物出现肾脏病变,主要表现为肾脏皮髓交界处肾小管内可见均质、无结构的嗜伊红染物质,为肾小管透明管型;30% 动物出现心脏病变,表现为心肌纤维断裂、溶解,横纹及部分细胞核消失;而多柔比星脂质体注射液组动物出现肾脏和心脏病变的比率分别为 20% 和 3%,病变表现相同,但病变比率明显低于多柔比星注射液组。两者出现睾丸毒性的比例均为 20% 左右,主要表现为睾丸曲细精管生精上皮脱落,各级生精细胞消失,部分间质水肿。心脏和肾脏病变给药结束和恢复期结束均出现,睾丸病变均出现在恢复期结束。病变组织病理组织切片见图 2。

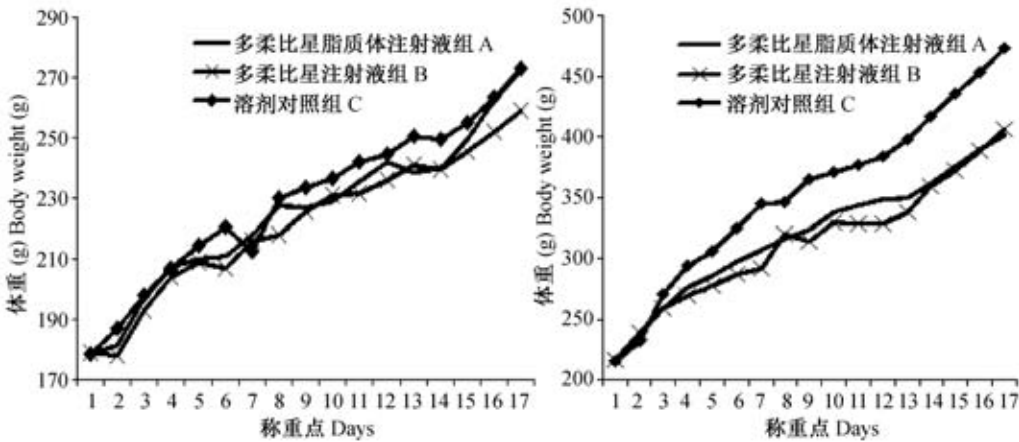


图 1 多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液对大鼠体重的影响

Fig. 1 Effects of doxorubicin liposome injection and doxorubicin injection on body weight of the rats

表 1 多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液对大鼠血液学和血液生化学指标的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effects of doxorubicin liposome injection and doxorubicin injection on blood biochemistry and hematology of the rats($\bar{x} \pm s$)

异常指标 Abnormal indexes	多柔比星脂质体 注射液组 Doxorubicin liposome injection	多柔比星 注射液组 Doxorubicin injection	溶剂 对照组 Solvent control
给药结束 End of dosing PLT ($10^9/L$)	1191 $\pm$ 163 *	1166 $\pm$ 108 **	986 $\pm$ 179
ALB (g/L)	34.22 $\pm$ 2.92 **	33.27 $\pm$ 2.79 *	37.09 $\pm$ 1.77
BUN (mmol/L)	8.76 $\pm$ 1.72 *	9.78 $\pm$ 2.44 **	6.62 $\pm$ 0.92
ALT (U/L)	72.81 $\pm$ 7.94	70.34 $\pm$ 7.58	39.49 $\pm$ 7.99
恢复期结束 End of recovery			
ALB (g/L)	35.54 $\pm$ 1.63 *	33.31 $\pm$ 1.72 *	37.36 $\pm$ 1.15
BUN (mmol/L)	8.49 $\pm$ 1.98 *	8.95 $\pm$ 2.73 *	6.06 $\pm$ 0.81
ALT (U/L)	60.75 $\pm$ 15.16	63.95 $\pm$ 12.60 *	46.51 $\pm$ 8.49

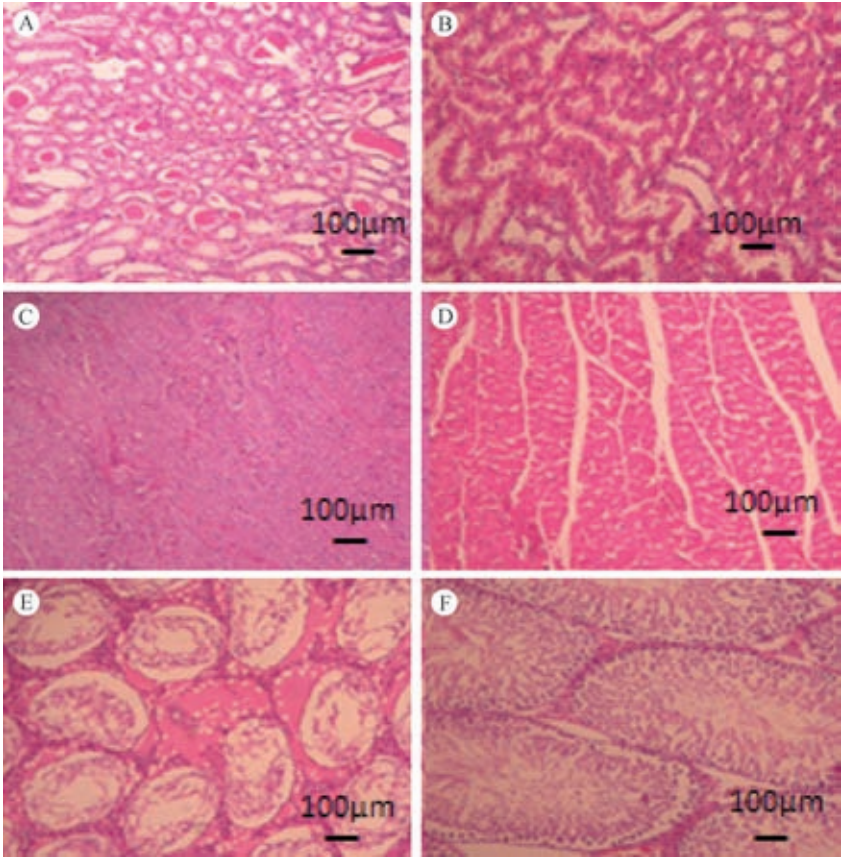
注: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. 溶剂对照组; $P > 0.05$, 多柔比星脂质体注射液组 vs. 多柔比星注射液组。
Note: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. the solvent control group; $P > 0.05$, doxorubicin liposome injection group vs. doxorubicin injection group.

表 2 多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液对大鼠脏器系数的影响($\bar{x} \pm s$, g/100g 体重)

Tab.2 Effects of doxorubicin liposome injection and doxorubicin injection on the organ coefficients of rats($\bar{x} \pm s$,g/100 g body weight)

异常指标 Abnormal indexes	多柔比星脂质体 注射液组 Doxorubicin liposome injection	多柔比星 注射液组 Doxorubicin injection	溶剂 对照组 Solvent control
给药结束 End of dosing			
心脏 Heart	0. 372 ±0. 037 *	0. 386 ±0. 055 *	0. 321 ±0. 032
肾脏 Kidney	1. 167 ±0. 126 *	1. 332 ±0. 180 **	0. 812 ±0. 072
胸腺 Thymus	0. 087 ±0. 053 *	0. 086 ±0. 031 **	0. 162 ±0. 027
恢复期结束 End of recovery			
心脏 Heart	0. 348 ±0. 042 *	0. 356 ±0. 024 *	0. 293 ±0. 040
肾脏 Kidney	1. 022 ±0. 082 *	1. 245 ±0. 389 *	0. 738 ±0. 022
胸腺 Thymus	0. 101 ±0. 016 *	0. 103 ±0. 018 *	0. 151 ±0. 032
睾丸 Testicle	0. 303 ±0. 035 **	0. 282 ±0. 019 **	0. 747 ±0. 059
附睾 Epididymis	0. 284 ±0. 069 *	0. 273 ±0. 087 *	0. 370 ±0. 046

注: ** $P < 0. 01$, * $P < 0. 05$ *vs* 溶剂对照组; $P > 0. 05$, 多柔比星脂质体注射液组 *vs* 多柔比星注射液组。
Note. ** $P < 0. 01$, * $P < 0. 05$ *vs*. solvent control group; $P > 0. 05$, doxorubicin liposome injection group *vs*. doxorubicin injection group.



注:A:病变肾脏;B:正常肾脏;C:病变心脏;D:正常心脏;E:病变睾丸;F:正常睾丸。(标尺 = 100 µm)

图 2 组织病理学 HE 染色结果

Note. A. Lesions in the kidney; B. Normal kidney; C. Lesions in the heart; D. Normal heart; E. Lesions in the testis; F. Normal testis. (Bar = 100 µm).

Fig.2 Histological changes of the rat kidney, heart and testicle. HE staining

3 讨论

肾脏是外源性化合物毒作用最常见的靶器官之一,主要因为肾脏是全身血流量最大的器官,血中有害物质可流进肾脏,特别肾皮质。肾脏的浓缩和蓄积能力可将血浆中浓度较低的毒物高度浓缩并沉积在肾小管细胞内。肾脏的内皮细胞网亦为毒物引起的免疫性内皮细胞损伤提供了结构基础^[3]。本研究中,多柔比星注射液和多柔比星脂质体注射液组大鼠血清中 BUN 明显升高,而 BUN 是肾脏损伤的特异性指标^[4],同时肾脏系数增大,病理学检查结果显示肾脏发生组织病理学改变,充分证明肾脏是两者共同的靶器官。

肝脏是人体主要的解毒器官,大部分药物需在肝脏代谢活化或灭活,故容易成为药物的毒作用靶点。ALB 是肝脏合成的水溶性蛋白质,是血中主要的运输蛋白,血清中含量最高,白蛋白只能够在肝脏合成,可用于判断肝脏损伤程度的指标。如果肾脏损伤,白蛋白将大量流失到体外,亦可引起含量降低。ALT 是肝细胞损伤释放到血液中的酶,肝、肾、心肌等几乎所有的脏器组织细胞中都有,特别在肝脏含量较高。与 AST 相比,在其它脏器中的分布量较少,可以用于肝损伤的特征指标^[4,5]。本研究结果显示,多柔比星注射液和多柔比星脂质体注射液组大鼠血清中 ALB 显著降低,ALT 明显升高,但病理学检查未见病变,说明两者可引起肝脏功能损伤,无器质性病变。

研究结果还显示,多柔比星注射液和多柔比星脂质体注射液还可引起大鼠不同程度的脱毛、皮肤溃疡、血液中 PLT 减少,心脏、胸腺和睾丸系数增加,心脏和睾丸发生病理组织学病变。睾丸系数增加和病理组织学病变均发生在恢复期结束,说明睾丸毒性损伤有一定的滞后效应。综合试验结果分析,多柔比星注射液和多柔比星脂质体注射液的毒性靶器官一致,均为皮肤、血液系统、肝脏、肾脏、心脏、胸腺和睾丸。

本研究的目的是研究多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液的毒性并加以比较。为充

分暴露药物的毒性,本研究采用动物能够耐受的剂量 1 mg/kg 长时间重复给药。试验结果显示,尽管两者的毒性靶器官一致,但毒性程度存在明显差异。皮肤毒性体现在脱毛和皮肤溃疡,多柔比星脂质体注射液发生率分别为 58% 和 25%,明显高于多柔比星注射液的 34% 和 8%。肾脏和心脏病理学检查结果显示,多柔比星脂质体注射液病变率分别为 20% 和 3%,明显低于多柔比星注射液的 40% 和 30%。两者对肝脏、血液系统、胸腺和睾丸的毒性基本一致,未存在明显差异。初步分析原因为多柔比星脂质体制剂同普通制剂相比,体内代谢行为可能会有较大的改变,比如可提高药物的皮肤靶向性、肿瘤组织的分布等。同时脂质体因具有低渗透性类脂基质与内部水性缓冲系统,两者协同可保持多柔比星在血液循环中处于包裹状态,只有渗入组织后,多柔比星才开始起效,因此可减少全身系统暴露,减少全身系统毒性^[6,7]。这种改变可能会带来有利的一面,如降低多柔比星注射液的心脏和肾脏毒性,但同时也可能带来不利的一面,如增加皮肤毒性等。

参考文献:

- [1] 李祥,杜俊,向小四,等. 脂质体在抗肿瘤药物中的应用研究进展[J]. 中南药学, 2014, 10(4): 290 - 294.
- [2] 贾晋斌,韦青燕. 阿霉素脂质体的研究进展[J]. 中国肿瘤, 2011, 2(5): 372 - 375.
- [3] 李波,袁伯俊,廖明阳. 药物毒理学(第一版)[M]. 北京:人民卫生出版社. 2015: 134 - 149.
- [4] 周宗灿. 毒理学教程(第3版)[M]. 北京:北京大学医学出版社. 2006: 409 - 427.
- [5] 贺蕾艳,郭瑶雪,李春,等. 药物性肝损伤生物标志物研究进展[J]. 药学报, 2015, 50(8): 959 - 965.
- [6] 文旭,范健. 脂质体多柔比星药物动力学研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2001, 20(3): 216 - 218.
- [7] 秦燕,徐智儒,王向伟,等. PEG 化脂质体多柔比星在动物体内的药动学及组织分布[J]. 中国医药工业杂志, 2009, 40(8): 596 - 599.

[修回日期]2016-02-23

微生物源性抗氧化剂对小鼠睡眠及抗氧化性能的影响

余思佳^{1,2}, 徐建雄^{1,2}

(1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240; 2. 上海市兽医生物技术重点实验室, 上海 200240)

【摘要】 目的 探究不同剂量微生物源性抗氧化剂对小鼠睡眠及其抗氧化性能的影响。**方法** 60 只雄性昆明小鼠随机分为 4 组, 低、中、高剂量组分别灌喂 0.5 g/kg 体重、1.0 g/kg 体重和 1.5 g/kg 体重微生物源性抗氧化剂, 对照组使用生理盐水进行灌胃, 试验期 30 d。在末次灌胃后, 各组动物腹腔注射戊巴比妥钠, 通过翻正反射实验观察小鼠睡眠状况, 并在结束后, 检测小鼠血清抗氧化性能。**结果** 与低、高剂量组相比, 中剂量组的微生物源性抗氧化剂可以显著延长戊巴比妥钠睡眠时间 ($P < 0.05$)。与对照组, 低、高剂量组相比, 中剂量组极显著提高 GSH-Px 活力 ($P < 0.01$)、显著提高 SOD 活力 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 中剂量组 MDA 和 8-ISO-PGF2 α 含量有显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** 提示微生物源性抗氧化剂有促进小鼠的睡眠、提高机体抗氧化能力的作用, 且在 1.0 g/kg 体重剂量下效果最显著。

【关键词】 微生物源性抗氧化剂; 翻正反射; 抗氧化性能; 睡眠小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)06-0028-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.06.006

Effects of microbe-derived antioxidant on sleep and antioxidant ability in the rat

YU Si-jia^{1,2}, XU Jian-xiong^{1,2}

(1. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

2. Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Shanghai 200240, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of different doses of microbe-derived antioxidant on sleep and antioxidant ability in mice. **Methods** Sixty male Kunming mice with similar body weight were randomly divided into 4 groups. The control group received normal saline, and the experimental groups received microbe-derived antioxidant in a dose of 0.5 g/kg bw, 1.0 g/kg bw or 1.5 g/kg bw once per day, respectively. The experiment period was 30 days. At the end of experiment, the mice of each group were intraperitoneally injected sodium pentobarbital to induce sleep. The mice fall sleep was judged by righting reflex. After the test of sleep, blood was taken for detection of serum antioxidant ability.

Results Compared with the low dose and high dose groups, the middle dose group showed a significantly prolonged sodium pentobarbital-induced sleeping time ($P < 0.05$). Compared with the control group, low and high dose groups, the middle dose group had highly significantly increased GSH-Px activity ($P < 0.01$) and significantly increased content of SOD. Under these conditions, the middle dose group reduced both the contents of MDA and 8-ISO-PGF2 α ($P < 0.05$) compared with the control group.

Conclusions Our results suggest that microbe-derived antioxidant exerts effect on sleep and antioxidant ability in rats. Supplement of 1.0 g/kg bw/d shows the most significant effects.

[作者简介] 余思佳(1992-), 女, 研究方向: 动物营养与饲料科学 E-mail: scarlettyu@yeah.net。

[通讯作者] 徐建雄(1962-), 男, 教授, 博士, 研究方向: 动物营养 Email: jxxu1962@sjtu.edu.cn。

[Key words] Microbe-derived antioxidant; Righting reflex; Antioxidant ability; Sleep; Rat

伴随着社会的发展和生活节奏的加快,失眠已成为困扰人们正常生活的重要问题之一。失眠是指无法入睡或无法保持睡眠状态,导致睡眠不足,又称入睡和维持睡眠障碍。失眠往往会给患者带来极大的痛苦和心理负担。目前治疗失眠的药物主要是化学合成类镇静催眠药,但长期使用会产生依赖和毒副作用,因此研发安全高效的保健品成为新的方向。睡眠与觉醒是中枢神经系统主要活动的结果,由于脑组织具有高密度膜不饱和脂肪酸、较高的脂肪代谢率、低含量抗氧化剂以及依赖完整神经元突触传递等特性,易受活性氧攻击导致损伤,引起细胞膜脂质过氧化及通透性增加;神经元发生细胞毒性水肿;线粒体遭到破坏,功能丧失等^[1]。抗氧化剂能够干扰自由基连锁反应的引发以及扩散,从而抑制脂质过氧化。而微生物源性抗氧化剂则是由一些具有抗氧化作用的菌体本身以及有抗氧化能力的微生物发酵产物组成。本试验通过灌喂小鼠不同剂量微生物源性抗氧化剂,探究其对小鼠抗氧化能力及睡眠的影响,为研究促进睡眠的新型保健食品提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 微生物源性抗氧化剂:由上海创博生态工程有限公司提供,该产品是刺梨、沙棘等果实,经枯草芽孢杆菌、乳酸杆菌、酪酸杆菌、啤酒酵母等有益微生物经固、液复合发酵后,再经提取、浓缩、灭活性、冻干等加工工艺制成。含有 VC、VE、异黄酮、SOD、谷胱甘肽、皂苷、牛磺酸和多种微量元素的金属衍生物。

1.1.2 实验动物:60 只清洁级雄性昆明小鼠,体重 15~18 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司(许可证号:SCXK(沪 2007-0005))。

1.1.3 实验试剂:血清中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)、超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)、8-异前列腺素 F2 α (8-ISO-PGF2 α) 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

戊巴比妥钠:购于默克化工技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理:小鼠随机分为 4 组,每组

15 只,分别为对照组、低(L-MA)、中(M-MA)、高剂量组(H-MA)。各组小鼠均饲喂基础日粮(购自上海斯莱克实验动物有限公司),实验组分别灌喂 0.5 g/kg 体重、1.0 g/kg 体重、1.5 g/kg 体重微生物源性抗氧化剂,对照组灌喂等体积的生理盐水,灌胃容量为 0.2 mL/10 g 体重,每天灌胃 1 次。实验小鼠饲养于上海交通大学农业与生物学院动物室内,自由进食与饮水,保持动物房温度为(22~25)℃,相对湿度为 50%~60%,光照明暗各 12 h。

1.2.2 测定指标和方法:

1.2.2.1 延长戊巴比妥钠睡眠时间实验:在末次灌胃 15 min 后,试验动物按 57 mg/kg 体重剂量腹腔注射戊巴比妥钠,注射量为 0.1 mg/10 g 体重,以小鼠翻正反射消失 1 min 以上作为入睡判断标准,翻正反射消失至恢复这段时间为动物睡眠时间,记录入睡动物数及睡眠时间。

1.2.2.2 抗氧化指标测定:(1)样品采集制备:翻正反射试验结束后,小鼠摘眼球采血,3 800 r/min 离心 10 min,制备血清。(2)测定指标与方法:按照南京建成检测试剂盒说明书对血清中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)、超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)、8-异前列腺素 F2(8-ISO-PGF2 α)这四个指标进行检测。

1.2.3 统计学方法:数据处理与分析采用 SPSS 17.0 的单因素方差分析,并用 LSD 法进行多重比较,分别以 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 为差异显著与极显著判断标准。结果以平均值果以标准差表示。

2 结果

2.1 戊巴比妥钠延长小鼠睡眠时间

从表 1 可以看出,在实验条件下,对照组的入睡动物数少,试验组入睡动物数皆高于空白对照组,其中低剂量组和中剂量组入睡动物数分别是是对照组的 2 和 1.8 倍。四组动物的睡眠潜伏期差异无显著性。中剂量组与低剂量组和高剂量组对比,小鼠的睡眠时间均高于后两者且呈现差异显著性($P < 0.05$)。中剂量组睡眠时间高于空白对照组($P > 0.05$),无统计学意义。表明中剂量微生物源性抗氧化剂对延长戊巴比妥钠小鼠的睡眠时间有促进作用。

表 1 受试物对戊巴比妥钠延长小鼠睡眠时间的影响

Tab. 1 The effect of microbe-derived antioxidant on duration of sleep induced by pentobarbital sodium

组别	动物数(只)	入睡动物数	睡眠潜伏期(min)	睡眠时间(min)
对照组	15	5	18.60 ± 0.55	29.00 ± 0.00ab
低剂量组	15	10	20.00 ± 4.03	26.90 ± 7.55b
中剂量组	15	9	20.00 ± 2.87	36.33 ± 2.00a
高剂量组	15	7	20.00 ± 2.83	28.14 ± 6.96b

注:在同一列中,值不同的小写上标表示差异显著($P < 0.05$),而相同上标表示无显著差异($P > 0.05$)。
Note. The different lowercase superscript means significant difference($P < 0.05$), the same superscript means no significant difference($P > 0.05$) in the same column.

表 2 小鼠血清抗氧化能力

Tab. 2 The antioxidant ability of the mouse serum

组别	GSH-px (U)	SOD (U/ml)	MDA (nmol/ml)	8-ISO-PGF2α (pg/ml)
对照组	492.84 ± 168.98B	115.86 ± 12.76B	13.35 ± 2.81aA	59.31 ± 8.52a
低剂量组	398.03 ± 117.11B	149.83 ± 24.59bA	8.63 ± 1.21cB	50.96 ± 8.57b
中剂量组	696.30 ± 202.94A	176.45 ± 21.65aA	10.93 ± 2.43b	52.07 ± 7.70b
高剂量组	483.62 ± 50.17B	150.08 ± 23.08bA	12.17 ± 3.64ab	53.99 ± 9.65ab

注:在同一列,值不同小写上标表示差异显著($P < 0.05$),不同的大写上标表示非常重大的不同($P < 0.01$),而相同或没有上标表示无显著差异($P > 0.05$)。
Note. The different lowercase superscript means significant difference($P < 0.05$), the different uppercase means very significant difference($P < 0.01$), the same superscript means no significant difference($P > 0.05$) in the same column.

2.2 血清抗氧化能力

从表 2 可以看出,中剂量组的 GSH-px 活力与其他各组相比有极显著的提高($P < 0.01$),低剂量组和高剂量组与对照组相比略有下降,但无统计学差异($P > 0.05$)。对于 SOD 含量,各剂量组与对照组相比,都有极显著提高($P < 0.01$),其中,中剂量组的 SOD 含量最高,且与低剂量组、高剂量组都有显著差异($P < 0.05$)。高剂量组较低剂量组 SOD 含量有提高,但无统计学意义($P > 0.05$)。对于 MDA 含量,各剂量组与对照组相比,皆有不同程度的降低。对照组与低剂量组差异极显著($P < 0.01$),与中剂量组差异显著($P < 0.05$),与高剂量组差异无显著性($P > 0.05$)。对于 8-ISO-PGF2α,各剂量组与对照组相比,皆有不同程度的降低。对照组与低剂量组和中剂量组差异显著($P < 0.05$),但与高剂量组差异无显著性($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 不同剂量的微生物源性抗氧化剂对小鼠睡眠的影响

研究表明,失眠与氧化应激存在着一定的关系^[1,2]。因为中枢神经系统富含不饱和脂肪酸,容易受到氧化应激及脂质过氧化的干扰,而睡眠与觉醒又是主要通过中枢神经系统进行调控。所以,睡眠时间的长短及质量在很大程度上受到氧化应激的影响。

Ikeda M 等^[3](2005)在给小鼠第三心室以 100 μL/10 h 的流速注射叔丁基过氧化氢(TBHP,一种强氧化剂)的实验中表明,0.1 μmol/L 的 TBHP 能够显著延长非快速眼动睡眠的时间(NREM)和快速眼动睡眠时间(REM),而 REM 的延长能够显著增加整个睡眠时间。但继续增加剂量(1 μmol/L),睡眠时间并没有增加。高剂量(10 μmol/L)TBHP 反而减少了 NREM,显示出了显著的睡眠抑制效应。产生的原因可能是因为高浓度的 TBHP 所产生的氧化应激效应使中视前区区域神经(睡眠及体温的控制中心)受到损伤。而注射低浓度 TBHP 时,并不能观察到注射区附近的氧化损伤,这一结论与本实验的结果有一定的一致性。实验数据表明,在氧化应激程度最低时,小鼠睡眠时间最长。从表 2 可以看出,各实验组的 MDA 以及 8-ISO-PGF2α 与对照组相比,皆有显著下降,说明在饲养过程中,小鼠受到了氧化损伤,而灌胃的微生物源性抗氧化剂在一定程度上缓解了氧化损伤的作用。同时,在中剂量组时,GSH-px 和 SOD 活力显著高于其他剂量组。说明在此剂量下微生物源性抗氧化剂的抗氧化效果最好,受到的氧化应激损伤最低。而从表 1 中可以看出,中剂量组小鼠的睡眠时间也显著高于低、高剂量组小鼠的睡眠时间。

根据本实验室之前的研究^[4,5],微生物源性抗氧化剂具有显著的抗氧化能力,其中含有 886 mg/100 g 含量的 GSH。GSH 是一种重要的抗氧化剂。

而氧化型谷胱甘肽(GSSG)可由 GSH 转化形成,是一种重要的睡眠促进物质,在谷氨酸受体的突触水平上能够抑制神经传递的兴奋性。在 10 ~ 100 nmol/L 范围注射氧化型谷胱甘肽(GSSG)和还原型谷胱甘肽的实验中发现,GSSH 及 GSH 对睡眠时间的作用呈现钟形趋势。在 25 nmol (GSSG)和 50 nmol (GSH)时分别呈现最显著的提高^[6]。这一结论也与本实验中,在受到氧化应激损伤程度最小的中剂量组时睡眠时间显著高于低、高剂量组小鼠的睡眠时间这一钟形曲线相吻合。

3.2 不同剂量的微生物源性抗氧化剂对小鼠抗氧化性能的影响

从表 2 中可以看出,灌注中剂量微生物源性抗氧化剂,小鼠的 GSH-px 和 SOD 活力显著高于其他剂量组,且低、中、高剂量组的 MDA 和 8-ISO-PGF2 α 的浓度皆低于对照组。综上数据表明,微生物源性抗氧化剂有一定抗氧化功效,但抗氧化效能并非随着抗氧化剂剂量的增加而增加,在 1.0 g/kg 体重/d 剂量下效果最好。说明超高剂量的抗氧化会导致过氧化作用,实践中盲目使用抗氧化剂不仅不能有效发挥机体抗氧化作用,反而可能使氧化应激更加严重^[7]。本实验数据在一定程度上也验证了这一点。虽然 ROS 可攻击不饱和脂肪酸,促使其发生氧化或过氧化,生成脂质过氧化物,并降解成为丙二醛;可引发细胞内蛋白氧化,线粒体损伤,诱发 DNA 结构破坏,促使端粒变短,激活细胞凋亡信号,最终影响细胞寿命^[8]。但在正常生理条件下生成的微量的 ROS 对维持细胞的正常功能(包括信号传导和转录调控)具有十分重要的意义^[7]。在高等动物的神经细胞内,正常生理功能的维持需要较高水平的 ROS,且神经细胞对 ROS 浓度的变化能够作出较为敏感的反应。同时,研究发现,ROS 可增强体内胰岛素信号的敏感性^[9],这表明,ROS 可能作为细胞内生命代谢的介导体,并作为一种信号分子从细胞外环境到细胞进行传递^[7]。

综上,正常生理条件下低剂量的 ROS 处于平衡状态,并对维持细胞稳态和生理功能起着十分重要

的作用。当在生理条件下添加抗氧化剂过度清除 ROS,而导致氧化还原失衡,也可诱发细胞信号紊乱,触发机体中自我代偿性的促氧化系统的启动^[7]。由上可知,大剂量补充抗氧化剂对机体是有害的,非氧化应激条件下抗氧化剂的大量补充也存在着促氧化的潜在可能。因而,确定适宜的剂量对抗氧化剂的抗氧化效应的发挥极为关键。

4 结论

1.0 g/kg·d 体重的微生物源性抗氧化剂可以显著延长小鼠的戊巴比妥钠睡眠时间,显著提高 GSH-Px 和 SOD 活力,著降低 MDA 和 8-ISO-PGF2 α 含量,说明微生物源性抗氧化剂有促进小鼠睡眠、提高机体抗氧化能力的作用,且在 1.0 g/kg 体重剂量下效果最显著。

参考文献:

- [1] 管莉萍,刘存志. 氧化损伤标志物与中枢神经系统疾病[J]. 国际老年医学杂志, 2011, 32(3): 107-112.
- [2] 范利锋,王平仁,兰培敏. 睡眠机制的研究概况[J]. 临床内科杂志, 2005, 10: 18-20.
- [3] Ikeda M, Ikeda-Sagara M, Okada T, et al. Brain oxidation is an initial process in sleep induction[J]. Neuroscience, 2005, 130(4): 1029-1040.
- [4] 陈小连,孙婷婷,徐建雄. 微生物源性抗氧化剂对大鼠抗氧化及损伤修复的作用[J]. 中国饲料, 2010, 22: 11-15.
- [5] 龚灵芝,陈小连,徐建雄. 微生物源性抗氧化剂对高不饱和脂肪酸饲料致大鼠自由基损伤模型的影响[J]. 饲料工业, 2008, 20: 32-34.
- [6] Inoue S, Honda K, Komoda Y. Sleep as neuronal detoxification and restitution[J]. Behav Brain Res, 1995, 69(1): 91-96.
- [7] 陈伟,林映才,马现永,等. 一些抗氧化剂的抗/促氧化作用及其机制[J]. 动物营养学报, 2012, 24(4): 595-605.
- [8] 皇甫冰,高继萍,杨霞,等. 氧化应激与肾脏细胞凋亡[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(2): 54-60.
- [9] Loh K, Deng H, Fukushima A, et al. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity[J]. Cell Metab, 2009, 10(4): 260-272.

[修回日期]2016-03-28

先天性白内障小鼠主要脏器重量和 血液生理生化指标的分析

袁江玲¹, 徐晓辉¹, 张 燕², 黄蕊芳¹, 熊 进¹, 陈欣如²

(1. 新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心, 乌鲁木齐, 新疆 830001;
2. 新疆维吾尔自治区实验动物研究中心, 乌鲁木齐, 新疆 830001)

【摘要】 目的 建立 SPF 级先天性白内障小鼠体重及主要脏器重量, 血液生理生化等指标的背景资料。**方法** 以 28 日龄及 56 日龄正常 KM 小鼠为对照组, 以同日龄先天白内障小鼠为实验组, 分别测定小鼠体重、主要脏器重量以及血液生理生化指标。**结果** 与 28 日龄 KM 小鼠相比较, 同日龄白内障小鼠各项指标均无统计学意义; 与 56 日龄 KM 小鼠相比较: (1) 小鼠体重、心、肝、脾、肺、肾、雄鼠睾丸重量差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 (2) 血液学检查数据显示: 雌鼠的平均血小板压积、血小板分布宽度以及雄鼠的白细胞、血小板、淋巴细胞比率差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。 (3) 血液生化学检查数据显示碱性磷酸酶、尿酸、葡萄糖、总蛋白、雄鼠谷丙转氨酶、白蛋白、雌鼠的尿素、甘油三酯差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 56 日龄白内障小鼠与同日龄 KM 小鼠相比, 体重及主要脏器重量以及部分生理生化指标有一定的差异。研究结果可以为科研人员提供参考数据。

【关键词】 先天性白内障小鼠; 脏器重量; 血液学指标; 生化指标

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)06-0032-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.06.007

Analysis of the main organs, hematological and biochemical indexes in congenital cataract mice

YUAN Jiang-ling¹, XU Xiao-hui¹, ZHANG Yan², HUANG Rui-fang¹, XIONG Jin¹, CHEN Xin-ru²

(1. Center for Disease Control and Prevention of Xinjiang Autonomous Region, Urumqi 830001, China;

2. Laboratory Animal Center of Xinjiang Autonomous Region, Urumqi 830001, China)

【Abstract】 Objective To establish the baseline data of body weight, main organ weights, hematological and biochemical indexes in SPF congenital cataract mice. **Methods** Body weight, main organs weights, hematological and biochemical indexes of the congenital cataract mice were determined at 28 days and 56 days of age, respectively. Normal KM mice in the same age were taken as control. **Results** There were no statistically significant differences in all indexes of the mice at 28 days of age. Compared with the 56-day old normal KM mice: (1) Statistically significant differences were found in the body weight, and weights of the heart, liver, spleen, lung, kidney and testis ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); (2) Statistically significant differences were found in hematological indexes WBC, PLT, MPV, LYMP, PDW for female mice and MPV, PDW for male mice ($P < 0.01$); (3) Among the biochemical indexes, there were also statistically significant

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31560614); 新疆维吾尔自治区疾控中心青年科学基金项目(201210)。

【作者简介】 袁江玲(1977-), 女, 助理研究员, 研究方向: 毒性病理, E-mail: xjzgyuan@126.com。

【通讯作者】 陈欣如(1962-), 男, 副研究员, 研究方向: 实验动物、动物模型, E-mail: xj3408@163.com。

differences in UREA, ALP, TP, UA, TG, GLU for female and ALT, ALP, TP, ALB, UA, GLU for male mice.

Conclusions There are statistical differences in the body weight, main organ weights, hematological indexes and biochemical indexes between the congenital cataract mice and normal KM mice at 56 days of age. These results may provide a useful reference for future research.

[Key words] Congenital cataract; Organ weight; Hematological indexes; Biochemical indexes; Mice

先天性白内障小鼠是由新疆实验动物研究中心培育并经过严格的生物净化,成功建立起来的 SPF 级隐性遗传白内障小鼠动物模型^[1],动物模型具有遗传背景清晰,生物学特性稳定等特点^[2]。为了给使用先天性白内障小鼠动物模型的科研人员提供明确的参考数据,我们进行了一系列的动物实验,以建立先天性白内障小鼠主要脏器重量、血液学及生化等生物学指标的数据档案。本研究中先天白内障小鼠来源于 KM 小鼠,为了达到实验同质性要求,因此研究选定与同日龄 KM 小鼠加以比较,初步探究 KM 小鼠眼部基因突变对其一般生物学特性的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物和生长环境

SPF 级先天性白内障小鼠及 KM 小鼠,饲养于屏障系统中。实验动物生产许可证号:【SCXK(新)2011-0001】,实验动物使用许可证号:【SYXK(新)2011-0002】。实验室温度变化范围为 20~23℃,湿度变化范围为 40%~50%,室内照明设置为 12 L:12 D(光照时间为 10:00~22:00,黑暗时间为 22:00~10:00)。动物饲料为新疆实验动物研究中心自产经⁶⁰Co 放射灭菌处理的全价小鼠饲料(生产许可证号 SCXK(新)2011-0003),饮水通过实验动物饮用水处理器(杭州永洁达净化科技有限公司)处理后加盐酸酸化,饮用水 pH 值为 3.0~3.5,按需更换水瓶和笼具。

1.2 检测仪器与材料

脏器称量用 BS323S 电子天平(精度为 0.001 g),体重称量用 671—983570 电子秤(精度为 0.01 g)血液学检查采用 Sysmex XT-2000i 型血细胞分析仪;Accute TBA-40FR 型全自动血液生化仪;电解质分析采用希莱恒 IMS-972 型电解质分析仪。检测所需试剂:血像、生化分析试剂及质控由迈瑞公司生产,电解质分析试剂及质控由希莱恒公司生产。

1.3 测定方法

1.3.1 体重和脏器系数的测定:随机抽取同日出生 SPF 级先天性白内障乳鼠及 KM 乳鼠 80 只,雌雄各

半,常规饲养,分别于 28 日龄、56 日龄时随机抽取 40 只,禁食 14 h 后,活体称重,颈椎脱臼处死,由经验丰富的病理技术人员进行解剖,依照 GB15193.24-2014 中病理学检查技术要求^[3],依次完整的取出心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胸腺、睾丸/子宫、附睾/卵巢等主要脏器,仔细将脏器周围的脂肪和结缔组织剔除干净,并用滤纸吸去组织器官表面的血液及体液,心脏组织称重前应除尽腔内的血块,而肾上腺、卵巢等较小组织器官,摘除后要立即称重,防止器官干燥失水而重量减轻。

脏器称重后计算脏器系数。脏器系数(%) = 脏器重量(g)/体重(g) × 100%。

1.3.2 血液学指标测定:随机抽取同日出生 SPF 级先天性白内障乳鼠及 KM 乳鼠各 40 只,雌雄各半,常规饲养,于 56 日龄(雌雄各半)进行处死前麻醉,然后拔取眼珠取血,检测白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞压积(HCT)、血小板(PLT)、平均血小板压积(MPV)、红细胞平均体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白容量(MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、中性粒细胞比率(MEUT%)、淋巴细胞比率(LYMP%)、单核细胞比率(MONO%)、嗜酸性粒细胞比率(E0%)、嗜碱性粒细胞比率(BASO%)、红细胞分布宽度(RDW)、血小板分布宽度(PDW)。

1.3.3 血液生化指标及电解质测定:随机抽取同日出生 SPF 级先天性白内障乳鼠及 KM 乳鼠各 40 只,雌雄各半,常规饲养,于 56 日龄(雌雄各半)禁食 14 h 后,进行处死前麻醉,然后拔取眼珠取血,采血后室温放置 30 min,经 3 000 r/min,测定于采血当日完成。测定小鼠的血液生化指标,包括肌酐(CREA)、γ-谷氨酰转肽酶(GGT)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、总胆汁酸(TBA)、胆碱酯酶(CHE)、尿酸(UA)、葡萄糖(GLU)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)。血液电解质指标测定:钾(K)、钠(Na)、氯(Cl)、钙(Ca)、pH 值。

1.4 统计学方法

用 IBM SPSS Statistics 19.0 统计软件对 SPF 级先天性白内障小鼠及 KM 小鼠各项指标数据进行分析,所有测定值均以平均数($\bar{x}$) $\pm$ 标准差(s)表示,采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 不同日龄 SPF 级先天性白内障小鼠及 KM 小鼠主要脏器重量(mg)、主要脏器系数(%)的测定

统计结果表明,与 28 日龄 KM 小鼠相比较,同日龄白内障小鼠体重、心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、肾上腺、胸腺、睾丸/卵巢的重量及脏器系数差异均不显著。与 56 日龄 KM 小鼠相比较,同日龄白内障小鼠雌鼠心、肝、肺、肾以及雄鼠心、肝、脾、肺均差异显著($P < 0.05$),雌鼠体重、脾脏以及雄鼠体重、肾、睾丸均差异极显著($P < 0.01$)(表 1)。

2.2 SPF 级先天性白内障小鼠及 KM 小鼠血液生理指标的测定

56 日龄白内障小鼠与 KM 小鼠血液学检查数

表 1 SPF 级白内障小鼠与 KM 小鼠主要脏器重量、脏器系数的比较

参数 Parameters	KM 小鼠 KM mice				白内障小鼠 Congenital cataract mice			
	28 日龄 28-day old		56 日龄 56-day old		28 日龄 28-day old		56 日龄 56-day old	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
体重(g) BW	21.3 $\pm$ 1.1	22.8 $\pm$ 1.1	33.5 $\pm$ 2.0	36.9 $\pm$ 2.1	21.2 $\pm$ 1.2	22.6 $\pm$ 1.4	31.3 $\pm$ 1.8 **	34.6 $\pm$ 1.9 **
心脏(mg)	124 $\pm$ 27.23	131 $\pm$ 26.42	183 $\pm$ 23.73	212 $\pm$ 18.74	122 $\pm$ 27.33	124 $\pm$ 25.38	168 $\pm$ 23.35 *	197 $\pm$ 25.23 *
脏体比(%) Heart coefficient	0.58 $\pm$ 0.10	0.57 $\pm$ 0.09	0.55 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.02	0.57 $\pm$ 0.10	0.54 $\pm$ 0.08	0.54 $\pm$ 0.04	0.57 $\pm$ 0.05
肝脏(mg)	1010 $\pm$ 195.68	1137 $\pm$ 205.31	1541 $\pm$ 125.82	1511 $\pm$ 128.99	1004 $\pm$ 210.57	1116 $\pm$ 219.24	1438 $\pm$ 144.51 *	1426 $\pm$ 114.46 *
脏体比(%) Liver coefficient	4.71 $\pm$ 0.70	4.96 $\pm$ 0.71	4.59 $\pm$ 0.21	4.09 $\pm$ 0.15	4.71 $\pm$ 0.72	4.90 $\pm$ 0.67	4.59 $\pm$ 0.19	4.11 $\pm$ 0.16
脾脏(mg)	77 $\pm$ 16.71	91 $\pm$ 16.38	87 $\pm$ 6.3	82 $\pm$ 9.01	76 $\pm$ 16.71	89 $\pm$ 17.45	81 $\pm$ 7.0 **	73 $\pm$ 16.18 *
脏体比(%) Spleen coefficient	0.36 $\pm$ 0.06	0.39 $\pm$ 0.06	0.26 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.02	0.36 $\pm$ 0.06	0.39 $\pm$ 0.05	0.26 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.04
肺(mg)	162 $\pm$ 32.31	178 $\pm$ 37.71	199 $\pm$ 18.88	217 $\pm$ 24.32	161 $\pm$ 32.74	176 $\pm$ 39.69	186 $\pm$ 19.50 *	200 $\pm$ 27.22 *
脏体比(%) Lung coefficient	0.75 $\pm$ 0.12	0.78 $\pm$ 0.13	0.59 $\pm$ 0.03	0.59 $\pm$ 0.03	0.75 $\pm$ 0.12	0.77 $\pm$ 0.13	0.60 $\pm$ 0.03	0.58 $\pm$ 0.05
肾脏(mg)	29 $\pm$ 47.66	328 $\pm$ 34.82	442 $\pm$ 32.35	634 $\pm$ 33.07	292 $\pm$ 50.50	322 $\pm$ 38.79	412 $\pm$ 36.75 *	598 $\pm$ 31.06 **
脏体比(%) Kidney coefficient	1.38 $\pm$ 0.16	1.43 $\pm$ 0.09	1.32 $\pm$ 0.05	1.72 $\pm$ 0.01	1.37 $\pm$ 0.16	1.42 $\pm$ 0.09	1.32 $\pm$ 0.04	1.73 $\pm$ 0.02
肾上腺(mg)	7 $\pm$ 1.4	7 $\pm$ 1.31	7 $\pm$ 1.23	8 $\pm$ 1.15	7 $\pm$ 1.4	7 $\pm$ 1.31	7 $\pm$ 1.46	7 $\pm$ 0.86
脏体比(%) Adrenal gland coefficient	0.03 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00
胸腺(mg)	118 $\pm$ 28.25	113 $\pm$ 25.69	124 $\pm$ 26.78	94 $\pm$ 16.24	117 $\pm$ 29.35	111 $\pm$ 26.99	116 $\pm$ 26.98	89 $\pm$ 14.95
脏体比(%) Thymus gland coefficient	0.55 $\pm$ 0.11	0.49 $\pm$ 0.09	0.37 $\pm$ 0.06	0.25 $\pm$ 0.03	0.55 $\pm$ 0.11	0.49 $\pm$ 0.09	0.37 $\pm$ 0.06	0.26 $\pm$ 0.03
卵巢/睾丸(mg)	14 $\pm$ 2.83	124 $\pm$ 13.61	28 $\pm$ 3.97	244 $\pm$ 13.27	12 $\pm$ 3.09	122 $\pm$ 15.04	26 $\pm$ 4.16	231 $\pm$ 12.34 **
脏体比(%) Testis/Ovary coefficient	0.06 $\pm$ 0.01	0.54 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.01	0.66 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01	0.54 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.01	0.67 $\pm$ 0.01

注:同日龄同性别白内障小鼠与 KM 小鼠间比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$
Note. Comparison between the congenital cataract mice and normal KM mice of the same age, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

据显示,雌鼠白细胞(WBC)、血小板(PLT)、平均血小板压积(MPV)、淋巴细胞比率(LYMP)、血小板分布宽度(PDW)差异极显著($P < 0.01$),雄鼠平均血小板压积(MPV)、血小板分布宽度(PDW)差异极显著($P < 0.01$);其它各项指标差异不显著($P > 0.05$)(表 2)。

2.3 SPF 级先天性白内障小鼠及 KM 小鼠血液生化指标的测定

56 日龄白内障小鼠与 KM 小鼠血液生化学检查数据显示雌鼠碱性磷酸酶(ALP)、尿酸(UA)、葡萄糖(GLU)以及雄鼠谷丙转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、尿酸(UA)、葡萄糖(GLU)差异极显著($P < 0.01$);雌鼠的尿素(UERA)、总蛋白(TP)、甘油三酯(TG)差异显著($P < 0.05$);其它指标差异不显著($P > 0.05$)(表 3)。

2.4 血液电解质指标测定

56 日龄白内障小鼠与 KM 小鼠血液电解质检测数据显示所有指标差异均不显著(表 4)。

表2 SPF级白内障小鼠与KM小鼠血液分类学指标的比较

指标 Indexes	KM 小鼠 KM mice		白内障小鼠 Congenital cataract mice	
	♀	♂	♀	♂
WBC (×10 ⁹ /L)	4.06 ± 1.00	4.91 ± 1.56	7.16 ± 1.06 **	6.69 ± 1.70
RBC (×10 ¹² /L)	9.94 ± 0.92	9.98 ± 0.35	10.25 ± 2.45	9.67 ± 1.82
HGB (g/L)	154.75 ± 6.80	154.86 ± 7.97	158.75 ± 28.51	142.8 ± 17.29
HCT (%)	51.03 ± 1.56	51.23 ± 2.22	54.79 ± 3.83	50.68 ± 3.03
PLT (×10 ⁹ /L)	1313 ± 133.71	1130.74 ± 159.06	903.85 ± 165.48 **	1089 ± 156.66
MPV (fL)	7.58 ± 0.51	7.09 ± 0.23	6.26 ± 0.15 **	6.13 ± 0.22 **
MCV (fL)	51.6 ± 3.28	51.37 ± 1.73	55.81 ± 13.60	53.9 ± 11.24
MCH (pg)	16.65 ± 0.80	15.54 ± 0.92	15.71 ± 1.21	14.93 ± 1.39
MCHC (g/L)	303.13 ± 8.04	302.69 ± 13.67	288.60 ± 39.09	281.8 ± 27.48
MEUT (%)	0.57 ± 0.23	0.74 ± 0.40	0.73 ± 0.13	0.90 ± 0.17
LYMP (%)	3.16 ± 0.79	3.66 ± 0.99	6.15 ± 0.86 **	5.12 ± 1.08
MONO (%)	0.19 ± 0.06	0.32 ± 0.14	0.19 ± 0.11	0.27 ± 0.11
EO (%)	0.14 ± 0.07	0.18 ± 0.12	0.09 ± 0.04	0.15 ± 0.03
BASO (%)	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.01
RDW (CV%)	32.56 ± 2.97	36.37 ± 6.72	36.46 ± 4.90	35.85 ± 3.28
PDW (CV%)	8.89 ± 0.77	8.23 ± 0.26	7.06 ± 0.46 **	6.58 ± 0.17 **

注:同日龄白内障小鼠与KM小鼠间比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$
Note. Comparison between the congenital cataract mice and normal KM mice of the same age, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表3 SPF级白内障小鼠与KM小鼠血液生化指标的比较

指标 Indexes	KM 小鼠 KM mice		白内障小鼠 Congenital cataract mice	
	♀	♂	♀	♂
CRE (μmol/L)	26.63 ± 10.38	26.88 ± 7.77	30.13 ± 4.73	29.63 ± 4.78
GGT (U/L)	200.50 ± 31.69	221.25 ± 42.94	214.00 ± 38.82	202.13 ± 77.60
UREA (mmol/L)	8.40 ± 0.71	9.83 ± 1.17	9.38 ± 0.98 *	11.14 ± 1.53
ALT (U/L)	45.88 ± 29.51	41.71 ± 9.21	28.50 ± 5.15	22.50 ± 10.82 **
AST (U/L)	151.50 ± 72.24	149.13 ± 32.00	150.00 ± 11.70	177.63 ± 44.63
ALP (U/L)	265.38 ± 35.07	280.38 ± 27.70	203.75 ± 31.93 **	164.63 ± 20.70 **
TP (g/L)	59.54 ± 4.43	60.56 ± 2.43	54.25 ± 4.28 *	53.76 ± 2.03 **
ALB (g/L)	37.26 ± 2.30	38.36 ± 1.02	36.33 ± 2.43	35.36 ± 0.99 **
TBIL (μmol/L)	2.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00	2.70 ± 1.34	2.69 ± 1.01
DBIL (μmol/L)	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.13 ± 0.35
TBA (μmol/L)	4.96 ± 0.76	4.98 ± 1.39	5.93 ± 1.55	5.08 ± 1.59
CHE (U/L)	5021.63 ± 595.50	5961.75 ± 957.40	5381.00 ± 623.33	6523.38 ± 425.85
UA (μmol/L)	81.88 ± 27.41	83.50 ± 21.35	153.00 ± 23.04 **	167.75 ± 40.18 **
GLU (mmol/L)	3.45 ± 0.67	2.61 ± 0.28	1.13 ± 0.20 **	1.33 ± 0.98 **
TG (mmol/L)	1.73 ± 0.37	1.54 ± 0.33	1.37 ± 0.21 *	1.33 ± 0.98
TC (mmol/L)	3.60 ± 0.30	2.78 ± 0.32	2.55 ± 0.21	2.47 ± 0.58

注:同日龄白内障小鼠与KM小鼠间比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$
Note. Comparison between the congenital cataract mice and normal KM mice of the same age, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表4 SPF级白内障小鼠与KM小鼠血液电解质指标的比较

指标 Indexes	KM 小鼠 KM mice		白内障小鼠 Congenital cataract mice	
	♀	♂	♀	♂
K (mmol/L)	7.33 ± 1.14	7.30 ± 0.57	7.44 ± 0.43	8.30 ± 0.59
Na (mmol/L)	157.46 ± 4.11	158.41 ± 9.18	160.58 ± 4.11	156.89 ± 9.79
Cl (mmol/L)	129.85 ± 4.71	130.48 ± 6.26	132.39 ± 4.11	134.40 ± 16.88
Ca (mmol/L)	1.36 ± 0.15	1.11 ± 0.13	1.47 ± 0.06	1.27 ± 0.19
pH	7.83 ± 0.05	7.86 ± 0.04	7.80 ± 0.05	7.81 ± 0.04

3 讨论

白内障是影响人类健康的常见病、多发病。国内外通过建立白内障动物模型,对白内障的病因及致病的分子机理做了大量研究。而对于白内障模型动物与正常动物的差异性研究较少,并且这方面的研究主要集中在大鼠动物模型上,小鼠动物模型差异性研究未见有报道。本研究将白内障小鼠与 KM 小鼠的体重、脏器重、血液生理生化指标进行了比较分析,28 日龄白内障小鼠体重及脏器重量均与正常 KM 小鼠没有统计学差异,56 日龄白内障小鼠体重及主要脏器重量与正常 KM 小鼠相比存在一定的差异,是否因其视力受限造成采食、饮水受到影响,还是因为基因变异从而影响体重的增长尚需进一步验证。28 日龄小鼠血液生理生化指标因采血量不能满足检测要求,未能比较。先天性白内障小鼠的眼部白内障通常于 35 日龄发育成熟^[4],所以本研究对 56 日龄白内障小鼠与正常 KM 小鼠的血液生理生化指标进行检测比较,发现血液指标中白细胞(WBC)、血小板(PLT)、平均血小板压积(MPV)、淋巴细胞比率(LYMP)、血小板分布宽度(PDW)存在统计学差异,这是否与基因变异导致的白内障以及其它疾病存在一定的关系尚不得而知。血清蛋白水平主要反映肝脏合成功能和肾脏病变造成蛋白丢失的情况。血清肌酐的浓度主要取决于肾小球的滤过功能,血清肌酐浓度、尿酸浓度可以在一定程度上反映肾小球滤过功能的损害程度^[5],这些指标的差异是否说明基因变异可能对小鼠肝脏及肾脏功能产生一定影响,目前也无法做出定论。此外,研究资料显示^[6-8],动物血液生理生化指标除受年龄和性别的影响,还与动物的生活环境、营养水平和生理状况等因素相关,这些因素中任何一种条件发生变化都可能会引起最终测定值的变化。在先天性白内障大鼠模型的同类研究中,也有部分指标如血红蛋白(Hb)、红细胞宽度(RDW)、白蛋白(ALB)、血小板计数(PLT)等指标与正常大鼠存在统计学差异^[9]。还有研究表明先天性白内障小鼠晶状体内多种元素与正常小鼠有统计学差异^[10]。因此,本研究中发现的各项差异,是否是由基因缺陷而导致了全身指标或其生物学

特性发生变化还有待进一步研究探讨。

实验动物生物学特性数据是实验动物研究与应用的基础,动物体重和脏器系数是种属标准化鉴定的依据,是衡量动物功能状态的重要指标;血液学、血液生化指标受遗传物质控制^[11],是反映动物健康与否的重要而敏感的指标,也是生物医学研究的基础指标,是临床医疗的基础数据。我们有必要在实际的工作中建立建全 SPF 级先天性白内障小鼠的生物学指标,为科研人员提供必要的参考。

参考文献:

- [1] 麦丽开·阿不力米提,徐艺玫,侯岩岩,等. KM 种白内障小鼠的剖腹净化研究[J]. 疾病预防控制通报, 2013, 28(2): 7-9.
- [2] 徐林. 人类疾病的动物模型[J]. 动物学研究, 2011, 32(1): 1-3.
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 15193. 24-2014. 食品安全国家标准食品安全性毒理学评价中病理学检查技术要求[S]. 北京:中国标准出版社, 2014.
- [4] 季樱红,卢奕,孔祥银,等. 先天性 γ S 基因突变小鼠晶状体的形态学和病理学改变[J]. 眼视光学杂志, 2007, 9(3): 145-148.
- [5] 巫向前主编. 临床检验结果的评价[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000: 256-360.
- [6] 赵安莎,孙于兰,周蓉,等. SD 大鼠 30 天喂养试验血液学指标和血清生化指标参考值探讨[J]. 中国比较医学杂志, 2003, 13(1): 13-15.
- [7] 胡建武,卢胜民,车路平,等. 10 种常见 SPF 级实验大、小鼠血液学及生化指标正常参考值的探讨[J]. 实验动物科学, 2007, 24(2): 5-10.
- [8] 胡雄飞,杨秀鸿,陈志莲. 不同周龄雌雄 SD 大鼠血液生理生化指标比较分析[J]. 实用预防医学, 2013, 20(10): 1173-1176.
- [9] 田小芸,尤金炜,董敏,等. 先天性白内障大鼠血液生化及血液流变学分析[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(3): 20-24.
- [10] 贾筱琴,范绍富,杨邦杰. BALB/c 小鼠先天性白内障晶体中多种元素含量的变化[J]. 江苏临床医学杂志, 2000, 4(4): 335-336.
- [11] Lee SM, Kim Y, Choi J, et al. Soy milk suppresses cholesterol-induced inflammatory gene expression and improves the fatty acid profile in the skin of SD rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430(1): 202-207.

[修回日期]2016-03-27

TALEN 构建 *Fndc5* 基因敲除小鼠及初步分析

吴子环^{1,2}, 胡雄兵³, 毛凤仪², 王超⁴, 张彬², 庄峰锋³, 胡克平², 孙晓波²,
刘 晓¹, 匡世焕^{2,4}, 金 文²

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315000; 2. 中国医学科学院药用植物研究所药理毒理中心中药(天然药物)创新药物研发北京市重点实验室、中国医学科学院-普渡大学脂肪代谢联合实验室, 北京 100193;
3. 北京唯尚立德生物科技有限公司, 北京 100085; 4. 普渡大学动物系, 美国)

【摘要】 目的 通过构建 *Fndc5* 基因敲除小鼠, 为后续的研究提供动物模型。**方法** 运用 TALEN 技术在 *Fndc5* 基因 FNIII domain 中造成缺失突变, 并通过测序进行基因型鉴定。通过配对建立稳定遗传系并在 mRNA 和 DNA 水平鉴定出生小鼠基因型; 对不同年龄段出生小鼠进行体重、血糖分析; 通过 qPCR 确定 *Fndc5* 在肾脏、肝脏、大脑、肌肉、心脏等组织中的表达情况。**结果** 成功构建并鉴定得到 4 种不同的 *Fndc5* 基因敲除小鼠品系; 不同年龄段出生小鼠体重、血糖未见显著性差异; 确定 *Fndc5* 在肌肉、心脏等组织中高表达。**结论** 本实验在国际上成功构建了 *Fndc5* 基因敲除小鼠, 并进行了初步分析, 为深入研究 *Fndc5* 基因在体内的功能提供了动物模型。

【关键词】 骨骼肌; *Fndc5* 基因; 纤维连接蛋白; TALEN

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)06-0037-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.06.008

Construction of a *Fndc5* knockout mouse model by TALEN-mediated DNA targeting

WU Zi-huan^{1,2}, HU Xiong-bing³, MAO Feng-yi², WANG Chao⁴, ZHANG Bin², ZHUANG Feng-feng³,
HU Ke-ping², SUN Xiao-bo², LIU Xiao¹, KUANG Shi-huan^{2,4}, JIN Wen²

(1. School of Ocean Biology, Ningbo University, Ningbo 315000, China; 2. Beijing Key Laboratory of Innovative Drug Development of Traditional Chinese Medicine (Natural Medicine) and Translational Medicine, CAMS-Purdue Associate Laboratory of Adipose Metabolism, Center of Pharmacology and Toxicology, Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193;
3. Beijing Viewsolid Biotech Company Ltd., Beijing 100085; 4. Department of Animal Science, Purdue University, USA)

【Abstract】 Objective To construct *Fndc5* knockout mouse models and provide animal models for related studies in the future. **Methods** Indels were introduced into FNIII domain of *Fndc5* gene by TALEN technology in mice, and genotypes were identified by sequencing. To set stable genetic system by pairing. Then at mRNA and DNA levels identified the genotype of born mice. At the same time the body weight and blood glucose of the mice at different ages were analyzed. Finally the *Fndc5* expression in the kidney, liver, brain, muscles, heart and other organs was determined by qPCR. **Results** Four different *Fndc5*-KO lines were generated. The body weight and blood glucose of the mice at different ages

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81471070); “重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09101、2012ZX09301002-001); 诺华诺德-协和和英才基金(肌信息素抵抗肥胖作用机理的研究); 药植所创新团队发展计划资助。

【作者简介】 吴子环(1990-), 男, 硕士研究生, 专业: 生物功能基因研究, E-mail: wuzihuan1122@163.com。

【通讯作者】 金文(1971-), 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 代谢性疾病药物药效学研究, E-mail: wjin@implad.ac.cn。

showed no significant differences. Finally high *Fndc5* expressions in the muscles, heart and other organs were determined.

Conclusions We Have for the first time successfully generated *Fndc5* knockout (KO) mouse model using TALEN mediated DNA targeting technique, and performed preliminary analysis. This *Fndc5* knockout (KO) mouse model provides a novel tool for further studies on the in vivo function of *FNDc5*.

[Key words] Skeletal muscle; *Fndc5*; Fibronectin; TALEN; Knockout mouse model

骨骼肌在调控系统能量稳态上扮演着重要的角色。而且骨骼作为一个分泌器官渐渐被认同,肌肉分泌和表达的细胞因子和其他多肽类,并且通过自分泌、内分泌、旁分泌的方式在不同组织发挥作用的物质叫“肌因子”^[1-3]。其中,肌因子 irisin 越来越受到关注,其前体 *Fndc5* (fibronectin type III domain containing protein 5) 是一个跨膜蛋白,它的胞外域裂解产生一个溶解的激素 irisin^[4]。*Fndc5* 最早是在对 fibronectin type III domains 的基因组搜索中发现的^[5]。最初,研究发现 *Fndc5* 在运动的刺激下作为 PGC1- α 依赖的产物,随后裂解产生 irisin 进入血液作用于白色脂肪,刺激 UCP1 表达提高产热;促使白色脂肪棕色化,从而提高和改善了肥胖和糖尿病患者的代谢状态,为治愈肥胖和糖尿病提供了可能^[2]。随着研究的深入,关于 *Fndc5* 的许多其他功能都被证实。

TALEN (transcription activator-like (TAL) effector nuclease) 靶向基因敲除基因修饰是第二代新型基因编辑分子生物学工具,首次发现于黄单胞杆菌 (*Xanthomonas*) 中^[6,7]。TALE 中的重复可变双残基 (repeat variable di-residue, RVD)^[6] 与 A、C、T、G 有恒定的对应关系^[8,9]。因此,为识别某一特定氨基酸序列,只需设计相应 TALE 单元串联克隆,然后在 N-端加上核定位信号,并在 C-端融合上 Fork I 核酸内切酶的切割区,就构建成了 TALEN^[10,11],利用其特异性内切酶活性切割特定的 DNA 序列,最后细胞可以通过 NHEJ (non-homologous end joining) 途径修复 DNA 损伤,在此修复过程中随机插入或删除了一定数目的碱基,造成移码突变,形成了目标基因敲除的突变体^[12,13]。目前,TALEN 技术已在非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)^[14,15]、青鳉 (*Oryzias latipes*)^[16]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[17]、大鼠 (*Rattus norvegicus*)^[18]、小鼠 (*Mus musculus*)^[19] 等模式动物的基因敲除研究中获得了成功。

Fndc5 作为新肌因子 irisin 的前体从研究初始其在体内外的功能就备受热议。它在小鼠、人体内的功能研究已经取得了初步进展,但是其在肌肉中的功能研究还未开展。我们通过 TALEN 技术在国

际上构建 *Fndc5* 基因敲除小鼠,并进行了初步分析,为后期研究 *Fndc5* 在体内尤其肌肉中的功能提供了敲除小鼠模型,对于 *Fndc5*/irisin 对肌肉本身的影响的认识,将填补这一认知领域的空白。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:SPF 级 C57BL/6 小鼠品系,购自北京维通利华有限公司,动物生产合格证号:SCXK(京)2014-0001。饲养于中国医学科学院药用植物研究所 SPF 级动物房,实验动物使用许可证:SYXK(京)2013-0023,动物房温度(20~26)℃,相对湿度 40%~70%。

1.1.2 TALEN 质粒:TALEN 质粒 pCS5-eTALEN-T 由北京唯尚立德生物科技有限公司合成。靶位点位置 T1:TTTCTAGAAGAAGGATGT gcggatgctccggtt CATTCAGGAGGTGAACA,其中左边 TALE 识别序列:TTCTAGAAGAAGGATGT 17 bp,右边 TALE 识别序列:GTTCACCTCCTGAATG 16bp,间隔 15 bp。靶位点位置 T3:TCCGGCACCTCAAGGCC aactetgccgtggtcag CTGGGATGTCCTGGAGGA,其中左边 TALE 识别序列:CCGGCACCTCAAGGCC 16 bp,右边 TALE 识别序列:CCTCCAGGACATCCCAG 17 bp,间隔 17 bp。

1.1.3 引物:对于靶点位置 1,设计基因型检测 PCR 引物:CATGTTTCCTTAGCTCTACTGTGG (正向),GGAGAAAGCATGCATGGCAGTCTC (反向)PCR 片段长度为 518 bp;对于靶点位置 3,设计基因型检测 PCR 引物:GGACCCTTGTTTGGCCAGTCTA (正向),CTCTACCATCATCCTCCATGCCTG (反向)PCR 片段长度为 479 bp。Real-Time 引物:*FNDc5*-F:ATGAA GGATGGGGAGGAA, *FNDc5*-R:GCGGCAGAAGAGAG CTATAACA, 18s-F:CATGCAGAACC CACGACAGTA, 18s-R:CCTCACGCAGCTTGTTG TCTA。

1.1.4 试剂:本实验的引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。Amp PCRmix (TAKARA, Ro74A) 试剂盒、TransZol Up Plus RNA Kit (Tran, ER501-01)、EasyScript First-Strand cDNA Synthesis

SuperMxi (Tran, AE301-03)、TransStrt Top Green qPCR SupreMix (Tran, AQ131-02)、Base (碱液)、Neutrization(中和液)等。

1.2 方法

1.2.1 *Fndc5* 基因敲除 TALEN 靶点位置的设计: 根据 *Fndc5* 的基因组结构, *Fndc5* protein domain 的分析, 破坏 the FNIII domain, 将 TALEN 的靶点位置设计在外显子 3 上或者外显子 3 前, 测定 SSA 活性, 选择活性比较高的靶点进行后续的 *Fndc5* 基因敲除小鼠的构建。

1.2.2 *Fndc5* 基因敲除鼠的构建流程: 将 *Fndc5*-T1 和 *Fndc5*-T3 的 TALEN 质粒对, 体外转录成 mRNA 后, 共显微注射 mRNA 到小鼠的受精卵中, 共注射 120 个受精卵, 出生 23 只小鼠。两周龄后, 剪取 4 周龄出生小鼠任一只耳朵大约 1/3, 放置在做好标记的 1.5 mL 的离心管中, 加入 75 μ L 碱液 (base) 95 $^{\circ}$ C 以上 40 min; 然后加入 75 μ L 中和液 (neutrization), 常温静置 5 min, 溶液即为提取的基因组 DNA。以此基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应, 产物测序并根据峰图进行基因型鉴定。

2 结果

2.1 四品系 *Fndc5* 基因敲除小鼠的建立

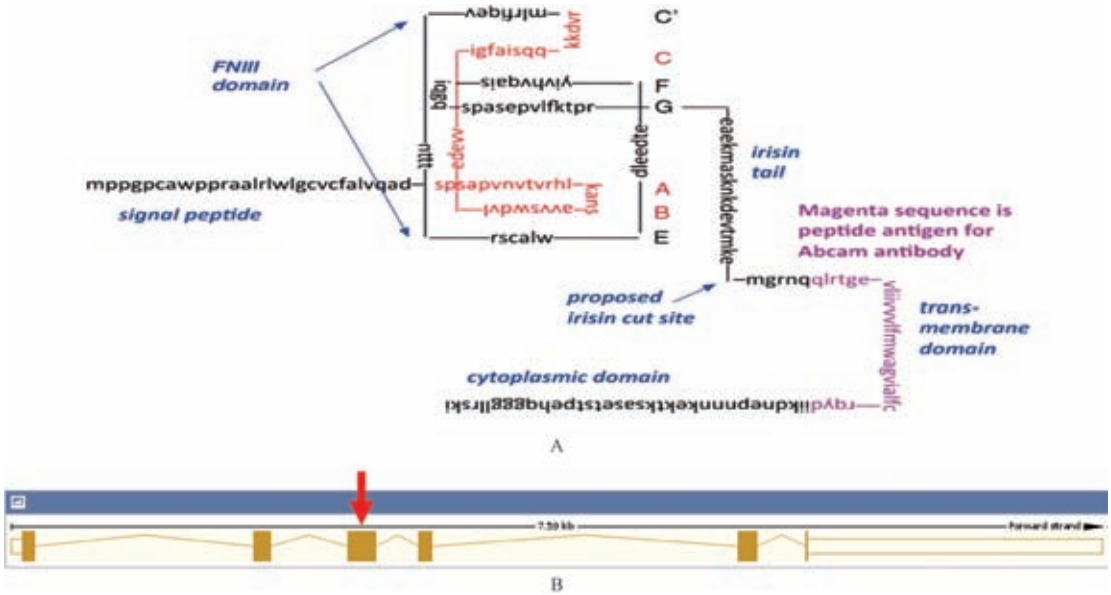
2.1.1 *Fndc5* 基因敲除 TALEN 靶点位置的设计: 根据 *Fndc5* 的基因组结构, *Fndc5* protein domain 的

分析, 决定破坏 the FNIII domain, 因此 TALEN 的靶点位置将设计在外显子 3 上或者外显子 3 前, 设计结果如图 1 箭头所示。

2.1.2 *Fndc5* TALEN 的 SSA 活性检测: 根据 SSA 活性结果, 我们选择活性比较高的靶点 *Fndc5*-T1 和 *Fndc5*-T3 进行后续的 *Fndc5* 基因敲除小鼠的构建, 结果见图 2。

2.1.3 *Fndc5* 基因敲除首建鼠的鉴定: 将受精卵注射后出生 23 只小鼠, 对出生两周的小鼠进行基因型分析和鉴定。结果如图 3 所示, 我们选取 Founder 7 (T1 一条缺失 2 bp, 一条缺失 4 bp) 进行测序图分析。测序峰形图在突变位点开始出现双峰, 表明为杂合子。通过峰形分析, 可以将突变型 1 的 DNA 序列 (下指箭头所指峰形) 和突变型 2 的 DNA 序列 (上指箭头所指峰形) 分析出来。结果为一条在 CCGGTCATTCAGGA 前缺失 2 个碱基 CT; 一条在 CCGGTCATTCAGG 前缺失 4 个碱基 GCTC, 均发生移码突变。

2.1.2 F1 代四品系 *Fndc5* 基因敲除鼠的鉴定: 根据发生移码突变情况, 选取的 Founder 7 小鼠、Founder 13 小鼠、和 Founder 18 小鼠分别与野生型 C57 小鼠交配, 出生的小鼠两周龄后按上述方法进行基因型鉴定。通过测序图可分析 F1 代小鼠的突变情况; 如果测序峰全是单峰说明该小鼠是 WT (野生型); 如果测序图出现双峰则该小鼠为杂合子; 如



注: A 为 FNDC5 蛋白质的一级结构, B 为 *Fndc5* 基因组结构(箭头为 TALEN 的靶点位置)。

图 1 FNDC5 蛋白质一级结构及 *Fndc5* 的基因组

Note. A is the primary structure of FNDC5 protein; B is the *Fndc5* genome structure (red arrow for TALEN target site).

Fig. 1 The primary structure of FNDC5 protein and the *Fndc5* genome.

果测序图也是单峰但是在预期位置出现缺失突变则该小鼠为纯合基因敲除小鼠,这在图 3 中已经进行了类似分析。我们从中选出 4 种突变类型#7-T1-1(T1 缺失 2 个碱基 CT)、#7-T1-2 (T1 缺失 4 个碱基 GCTC)、#13-T1-1 (T1 缺失 2 个碱基 TG)、#18-T1-1 (T1 缺失 2 个碱基 TC)建立稳定遗传 F1 小鼠品系。四品系 F1 小鼠的突变位点及突变后导致提前产生终止密码子的位置见表 1。基因型中黑体标记部分是 TALEN 设计敲除的靶位点序列,下划线部分为敲除的基因序列,这些缺失突变都会导致提前产生终止密码子。

2.2 Fndc5 敲除小鼠的初步分析

2.2.1 Fndc5 小鼠体重分析:通过成功建立和鉴定四品系 F1 小鼠后,将每个品系之间进行杂交配对,对出生的小鼠进行基因分型鉴定,分别在 1 月龄、2 月龄进行所有出生小鼠的体重测量,体重分析时将雌雄分开,进行纯合子与 WT 之间的体重差异分析,结果见图 4。结果表明小鼠生长正常,在 1 月龄、2 月龄纯合子和 WT 小鼠之间体重没有统计学差异。

2.2.2 Fndc5 在 小鼠不同组织的表达情况分析:检测 Fndc5 在不同组织内的表达情况有助于下一步的体内功能研究。提取小鼠不同组织 H(心脏)、K(肾脏)、B(大脑)、L(肝脏)、TA(肌肉)进行液氮研磨提取 mRNA,反转录成 cDNA 进行荧光定量 PCR,选取 18s 作为内参,结果发现 Fndc5 在 H、B、TA 中表达量较高,在 K、L 中表达很少,如图 5。

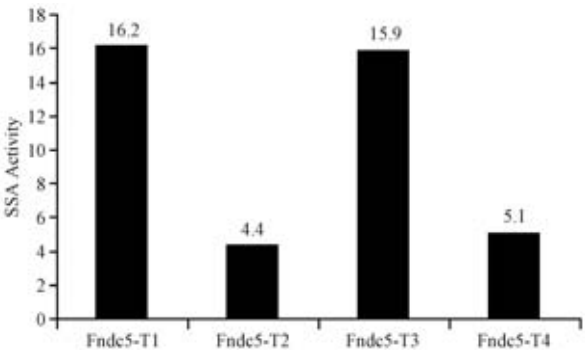
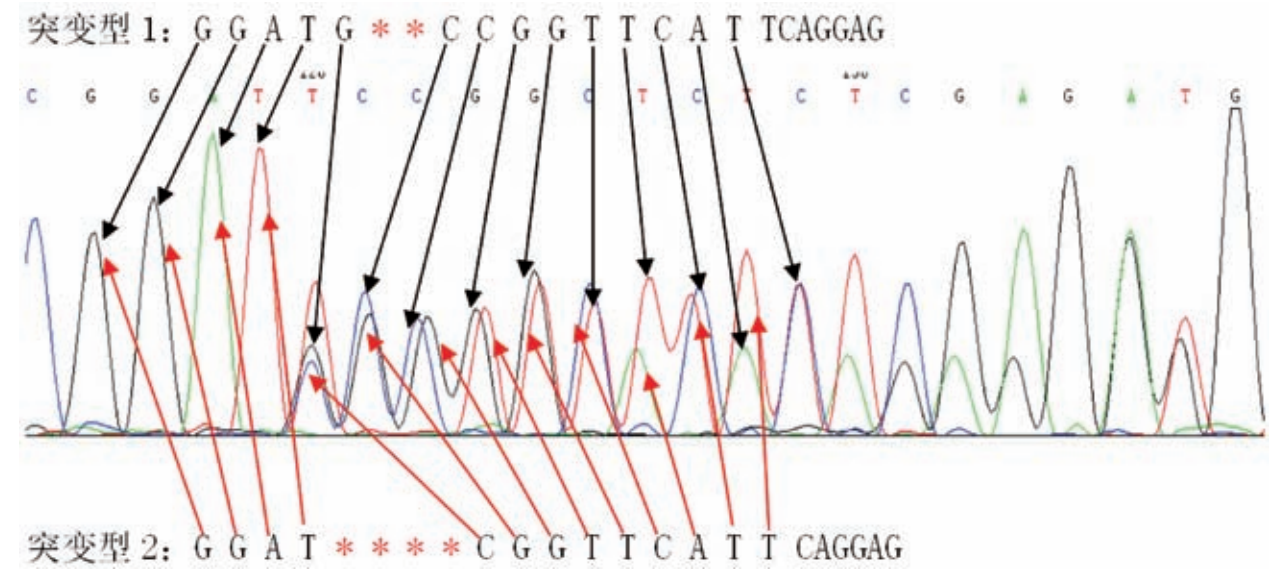


图 2 Fndc5 TALEN 的 SSA 活性检测

Fig. 2 Detection of the Fndc5 TALEN SSA activity



注:突变型 1 的 DNA 序列(下指箭头所指峰形)和突变型 2 的 DNA 序列(上指箭头所指峰形)。

图 3 Fndc5 基因敲除首建鼠的鉴定

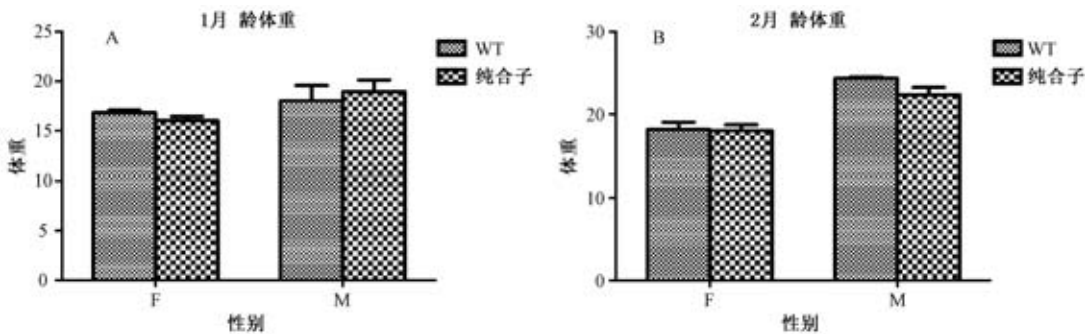
Note. The DNA sequence of mutant 1 peak shape (black arrows) and the DNA sequence of mutant 2 peak shape (red arrows).

Fig. 3 Identification of Fndc5 first built knockout mice

表 1 四品系 F1 小鼠的突变情况

Tab.1 The mutation of four different Fndc5-KO lines of mice

小鼠品系	基因型	蛋白发生移码突变的位置	终止密码子产生位置
WT(野生型)	AGGATGTGCGGATGCTCCGGTTCATTACAGG	无	第 209 个氨基酸
#7-T1-1	AGGATGTGCGGATG__CCGGTTCATTACAGG	氨基酸从第 73 位开始发生移码突变	第 114 个氨基酸
#7-T1-2	AGGATGTGCGGAT____CGGTTCATTACAGG	氨基酸从第 72 位开始发生移码突变	第 79 个氨基酸
#13-T1-1	AGGATGTGCGGA__CTCCGGTTCATTACAGG	氨基酸从第 72 位开始发生移码突变	第 114 个氨基酸
#18-T1-1	AGGATGTGCGGATGC__CGGTTCATTACAGG	氨基酸从第 73 位开始发生移码突变	第 114 个氨基酸

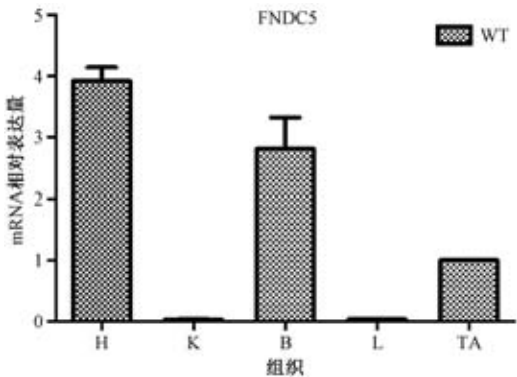


注:A 为 1 月龄体重分析结果,B 为 2 月龄体重分析结果。

图 4 *Fndc5* 小鼠不同年龄体重分析

Note. A: The Results of body weight analysis at one month of age. B: The Results of body weight analysis at two months of age.

Fig. 4 Analysis of body weight of the *Fndc5* mice at different ages.



注:H - 心脏,K - 肾脏,B - 大脑,L - 肝脏,TA - 肌肉

图 5 *Fndc5* 在小鼠不同组织的表达情况分析。

Note. H - heart. K - kidney. B - brain. L - liver. TA - muscle

Fig. 5 *Fndc5* expression in different tissues in the mice.

3 讨论

Fndc5 作为 Irisin (myokine) 的前体,作用于白色脂肪提高了全身的产热能力,促进了白色脂肪向棕色脂肪的转化,这一研究从发现伊始就被认为可作为治疗糖尿病的靶点。但是经过几年的研究,争议一直没有平息:*Fndc5* 裂解产生 irisin 的机制是什么? Irisin 在不同组织细胞发挥作用的受体? Irisin 在人体内是否发挥积极作用? 总而言之关于它在小鼠及人体内的研究还急需广泛开展。

目前关于它在脑、骨髓中的功能研究已经取得了一些进展,但是关于它在肌肉中的研究还未见报道,我们已经成功构建了 4 种品系 *Fndc5* 敲除小鼠,各自的突变类型在上文中也进行了分析,并建立了稳定遗传 F1 小鼠。我们发现每个品系出生小鼠符合正常的孟德尔比率,生长没有受到影响,在不同年龄段体重没有出现明显差异,我们也分析了 *Fndc5* 在不同组织内的表达分析,发现其在 H、B、TA

中表达量较高,这为我们下一步开展其在肌肉中的功能研究提供了基础。有趣的是,通过 *Fndc5* 抗体进行检测敲除小鼠时发现 WT 和纯合子都出现条带,我们认为本实验中利用 TALEN 技术构建敲除小鼠模型只是在 *Fndc5* 的 FNIII domain 缺失了几个碱基,导致终止密码子提前产生,从而是蛋白质的功能缺失。但是经过缺失突变的 *Fndc5* 还是会产生 70 - 110aa 长的蛋白质,关于这部分蛋白质是否能发挥一定的功能还不知道,所以后续可能还需要其他的手段去确切的证实 *Fndc5* 敲除小鼠是否成功。

参考文献:

[1] Baskin KK, Winders BR, Olson EN. Muscle as a “mediator” of systemic metabolism [J]. Cell Metab. 2015, 21 (2): 237 - 248.

[2] Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1-α-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis [J]. Nature 2012, 481: 463 - 468.

[3] Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ [J]. Nat Rev Endocrinol. 2012, 8(8): 457 - 465.

[4] Erickson HP. Irisin and *FNDC5* in retrospect: An exercise hormone or a transmembrane receptor? [J]. Adipocyte 2013, 2 (4): 289 - 293.

[5] Teufel A, Malik N, Mukhopadhyay M, et al. *Frcp1* and *Frcp2*, two novel fibronectin type III repeat containing genes [J]. Gene. 2002, 297(1 - 2): 79 - 83.

[6] Boch J, Bonas U. *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function [J]. Annu Rev Phytopathol, 2010, 48: 419 - 436.

[7] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors [J]. Science, 2009, 326 (5959): 1501 - 1501.

辛伐他汀不同干预方案对骨质疏松大鼠骨质量的影响

刘 昊¹, 张 岩¹, 张国彬², 邢 磊¹, 贾忠宝², 田发明³

(华北理工大学 1 附属医院; 2 研究生学院; 3 医学实验研究中心; 唐山 063000)

【摘要】 目的 探讨和比较不同干预方案下辛伐他汀对去卵巢大鼠骨丢失和骨质量下降的干预效果。**方法** 3月龄雌性SD大鼠32只,随机分为4组,每组8只:假手术(A)组、卵巢切除(B)组、卵巢切除加辛伐他汀前半程干预组(C)和后半程干预组(D)。除A组接受假手术外,其余各组大鼠行双侧卵巢切除术,C组于术后给予辛伐他汀(5 mg/kg/d)干预10周后停药,D组于术后10周开始接受辛伐他汀干预。术后20周处死所有大鼠,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清I型前胶原氨基端前肽(PINP)、I型胶原羧基端交联端肽(ICTP)水平,取第3、4、5腰椎,双能X线法检测大鼠第3腰椎骨密度,压缩试验检测第4腰椎侧最大载荷、弹性模量等生物力学指标,微计算机断层扫描技术(micro-CT)检测第5腰椎松质骨骨量和微观结构。**结果** (1)血清学检测结果:B、C、D组PINP和ICTP均显著高于A组;(2)骨密度:B组显著低于其余各组,C、D组显著低于A组($P < 0.05$);(3)生物力学:最大载荷、弹性模量B组显著低于其余3组($P < 0.05$)、C、D组显著低于A组($P < 0.05$);4、micro-CT:A组骨容积率(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)显著高于其余3组,骨小梁分离度(Tb.Sp)显著低于其余3组($P < 0.05$),C、D组Tb.Sp显著低于B组($P < 0.05$)。**结论** 大鼠去卵巢20周后发生明显骨量丢失和骨质量下降,选择前半程干预和后半程干预均能部分阻止该模型骨量丢失、微结构退变和力学性能下降,但骨密度均不能恢复到正常水平。

【关键词】 辛伐他汀;骨质疏松;骨密度;生物力学;Micro-CT

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

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.06.009

Effects of simvastatin treatment with different intervention programs on the bone quality of osteoporotic rats

LIU Hao¹, ZHANG Yan¹, ZHANG Guo-bin², XING Lei¹, JIA Zhong-bao², TIAN Fa-ming³.

(1. Affiliated Hospital, 2. Graduate School, 3. Medical Research Center,

North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of simvastatin on the bone loss and deterioration of bone quality with different intervention programs. **Methods** Thirty two 3-month-old female Sprague-Dawley (SD) rats were randomized into 4 groups of 8 animals in each: All rats but those in the sham group (A) received bilateral ovariectomy, and treated by vehicle (B), simvastatin (5 mg/kg/day) at first half period (C) or at latter half period (D). The rats in group C received simvastatin by a gavage after the OVX operation immediately, and stopped at 10 weeks after OVX. The rats in group D began to receive simvastatin treatment from 10 weeks after OVX and ended at 20 weeks after OVX. At week 20, all rats were sacrificed and the concentrations of serum PINP and ICTP were detected by ELISA, L3 vertebra was used

【基金项目】河北省自然科学基金(H2013209255)、河北省高等学校科学研究计划(QN20131007)、唐山市老年医学重点实验室资助项目(14140221B)。

【作者简介】刘昊,主治医师,主要从事骨与关节退行性疾病的研究。E-mail:15100526293@163.com。

【通讯作者】田发明,副教授,硕士研究生导师,E-mail:tfm9911316@163.com。

to detect the bone mineral density, L4 vertebra was used to analyze the maximum loading and elastic modulus by compression test, and the microstructure of the L5 vertebra was detected by micro-computed tomography. **Results** 1. ELISA analysis: the concentrations of serum PINP and ICTP in the groups A, B and C were significantly higher than that of group A ($P < 0.05$). 2. BMD test showed that the rats in group B had significantly lower BMD than the other 3 groups ($P < 0.05$), while the BMD of groups C and D were markedly lower than that of group A ($P < 0.05$). 3. Biomechanical test: the maximum load and elastic modulus of L4 vertebrae in the group B were significantly lower than the other 3 groups ($P < 0.05$), and those of the groups C and D were markedly lower than that in the group A ($P < 0.05$). 4. micro-CT: BV/TV and Tb. N in the sham operated rats were significantly higher than those of the other 3 groups, while the opposite trends was found in Tb. Sp ($P < 0.05$), and the Tb. Sp in the groups C and D were significantly lower than that of group B ($P < 0.05$). **Conclusions** Our data demonstrate that bone loss and deterioration of bone micro-structure and biomechanical properties occurred at 20 weeks after ovariectomy, both the first-half-period and latter-half-period treatment by simvastatin may partially prevent these changes, but can not restore the BMD to normal level.

【Key words】 Simvastatin; Osteoporosis; Bone mineral density; Biomechanics; Micro-CT; Rats

辛伐他汀是 3-羟基 3-甲基戊二酰辅酶 A (3-hydroxy-3-methylglutaryl- coenzyme A, HMG-CoA) 还原酶抑制剂家族成员之一,通过抑制胆固醇合成链中的限速酶 HMG-CoA 还原酶,减少胆固醇合成,目前临床上主要用于治疗高脂血症。1999 年 Mundy 等^[1]首次通过药物筛选报道了辛伐他汀具有促进骨形成的作用潜能,此后大量研究开始关注辛伐他汀的成骨作用,结果发现不同干预方式辛伐他汀促骨形成作用效果差异显著^[2-6]。其中以体内给药干预的实验中结果的争议较多。虽然有部分研究肯定了辛伐他汀系统性给药的作用潜能^[4],但也有临床和基础实验,未能发现辛伐他汀显著的促进成骨作用,则对此提出了质疑^[5,6]。本研究在同一实验中采用不同干预方案,观察两者对卵巢切除造成的大鼠骨质疏松模型干预效果及其差别,以期为后续相关研究乃至临床应用提供理论参考和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料及设备

本研究应用 3 月龄清洁级雌性 SD 大鼠 32 只, (购自北京维通利华实验动物中心,动物合格证号 SCXK(京)2013-0002 号)体重(250 ± 20)g,动物使用许可证号 SYXK(冀)2010-0038。辛伐他汀(西之达,浙江瑞邦药业有限公司生产),酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(上海史瑞可生物科技有限公司),骨密度分析仪(美国 Norland 公司),AG-IS 型生物力学分析系统(日本岛津公司)。

1.2 动物分组及处理

所有大鼠采用数字表法随机分为 4 组,每组 8 只:假手术组(Sham)只暴露卵巢,不予切除,直接缝

合;其余大鼠接收双侧卵巢切除术,方法参照以往研究^[7-12]。术后给予抗生素 3 d,卵巢切除(B)组、卵巢切除加辛伐他汀前半程干预组(C)和后半程干预组(D)。除 A 组接受假手术外,其余各组大鼠行双侧卵巢切除术, B 组为模型对照组, C 组于术后给予辛伐他汀(5 mg/kg·d)灌胃干预 10 周后停药, D 组于术后 10 周开始接受辛伐他汀干预。术后 20 周处死所有大鼠,采用 ELISA 法检测血清骨代谢标志物水平,取第 3、4、5 腰椎,双能 X 线法检测大鼠第 3 腰椎骨密度,压缩试验检测第 4 腰椎侧最大载荷、弹性模量等生物力学指标,微计算机断层扫描技术(microcomputed tomography, micro-CT)检测第 5 腰椎松质骨骨量和微观结构。

1.3 ELISA 检测血清骨代谢指标

参照试剂盒说明,采用 ELISA 法检测血 I 型前胶原氨基端前肽(procollagen type I N-terminal propeptide, PINP)、I 型胶原羧基端交联端肽(cross-linked C-telopeptides of type I collagen, ICTP)血清含量。

1.4 骨密度分析

应用 Norland-XR36 双能 X 线吸收测量(dual energy X-ray absorptiometre, DEXA)骨密度仪,采用小物体扫描模式,准确度 0.01%,扫描速度 60 mm/s,分辨率(resolution)1.0 mm × 1.0 mm,扫描宽度 5.0 cm 的参数值,检测第 3 腰椎,采用小动物扫描模式进行扫描。扫描结束后,用仪器自选工具选定兴趣区,读出每个标本的骨密度值。

1.5 生物力学分析

参照以往研究^[12],于实验开始前去除第 4 腰椎椎体所有附件,包括横突、上下关节突、椎弓根及椎板等附件,仅保留椎体组织。并将椎体上下面进行

打磨,制作成高度约为 5 mm 的标准件,椎体上下面应与椎体纵轴垂直。假设椎体为圆柱形,并根据每个椎体的前后径,计算出标准件的平均直径和体界面积。用胶水将椎体下端固定于测试平台上,以 5 mm/min 的速度进行椎体轴向压缩,直至椎体出现断裂,记录并分析最大压缩载荷及弹性模量。取所有大鼠的右侧股骨行三点弯曲试验,支点跨距(L)为 20 mm,中央垂直(股骨与载荷成 90°角)施加载荷,速率 10 mm/min,直至股骨断裂,记录并分析最大压缩载荷及弹性模量。

1.6 Micro-CT 检测

应用 Sky Scan 1076 Micro-CT (Sky Scan, Aartselaar, Belgium)对第 5 腰椎体进行扫描检测,在 40 k Vp 及 250 μA 的条件下对标本进行扫描,收集数据,并利用 Micro-CT 配套软件对扫描图像进行三维重建及结果分析。兴趣区为上端生长板下 1 mm 至 4 mm,直径为 1.5 mm 的圆柱体(皮质骨内侧的松质骨)。检测指标有:骨容积率(bone volume fraction, BV/TV)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb. Th)、骨小梁数量(trabecular number, Tb. N)、骨小梁分离度(trabecular separation, Tb. Sp)。

1.7 统计学方法

实验数据建立 Excel 数据库,资料用 SPSS 19.0 来处理。各组数据经过 Shapiro-Wilk 正态性检验和 Bartlett 方差齐次检验后,利用单因素方差分析比较各组之间的差异,LSD-t 检验比较两组间差异, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 动物死亡情况

A 组无大鼠死亡,B 组有 1 只大鼠因腹胀死亡、C 组有 2 只大鼠分别因为感染和不明原因死亡,D

组有 1 只大鼠因麻醉死亡,最终各组分别有 8、7、6、7 只动物纳入最终结果。

2.2 血清学检测结果

PINP 血清水平:A 组 PINP 血清水平均显著低于其余三组($P < 0.05$);C、D 高于 B 组,但差异无统计学意义($P > 0.05$);

ICTP 血清水平:A 组 ICTP 血清水平均显著低于其余三组($P < 0.05$);C、D 低于 B 组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。

2.3 骨密度

表 2 示各组第 3 腰椎骨密度检测结果比较:B 组显著低于其余各组($P < 0.05$),C、D 组显著低于 A 组($P < 0.05$),与 B 组比较,C、D 组骨密度分别提高 6.16% 和 4.94%;C 组高于 D 组,但差别无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 生物力学

表 3 示生物力学检测结果:各组间比较,第 4 腰椎最大载荷和弹性模量差异趋势相同:B 组显著低于其余 3 组($P < 0.05$),C、D 组显著低于 A 组($P < 0.05$),与 B 组相比,C 组最大载荷和弹性模量分别提高 45.1% 和 44.2%,D 组最大载荷和弹性模量分别提高了 38.4% 和 40.88%。

2.5 micro-CT 检测结果

表 4 示 micro-CT 分析结果:BV/TV:A 组显著高于其余各组($P < 0.05$),C、D 高于 B 组,但差异无统计学意义;Tb. Th:由高到低依次为 A、C、D、B 组,但各组间比较差别均无统计学意义($P > 0.05$);Tb. N:A 组显著高于 B 组($P < 0.05$),其余组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);Tb. Sp:A 组显著低于其余各组($P < 0.05$),C、D 组显著低于 B 组($P < 0.05$)。三维重建结果见图 1。

表 1 血清学检测结果($\bar{x} \pm s$)

项目 Items	Tab.1 Results of serum PINP and ICTP analysis($\bar{x} \pm s$)			
	假手术组(A) (n=8)	卵巢切除组(B) (n=7)	卵巢切除加辛伐他汀 前半程干预组(C)(n=6)	后半程干预组(D) (n=7)
I 型前胶原氨基端前肽 PINP (μg/L)	95.17 ± 13.81	170.83 ± 14.43 *	176.33 ± 19.78 *	175.50 ± 8.66 *
I 型胶原羧基端交联端肽 ICTP (μg/L)	3.13 ± 0.43	4.52 ± 0.31 *	4.35 ± 0.19 *	4.20 ± 0.43 *

* 与 A 组比较 $P < 0.05$

表 2 骨密度检测结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

项目 Items	Tab.2 Results of BMD test($\bar{x} \pm s, n=8$)			
	假手术组(A) (n=8)	卵巢切除组(B) (n=7)	卵巢切除加辛伐他汀前 半程干预组(C)(n=6)	后半程干预组(D) (n=7)
L3 (g/cm ²)	0.2743 ± 0.0085	0.2367 ± 0.0069 *	0.2513 ± 0.0079 *#	0.2484 ± 0.0076 *#

Note. * $P < 0.05$ vs. the group A; # $P < 0.05$ vs. the group B.

表 3 生物力学检测结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

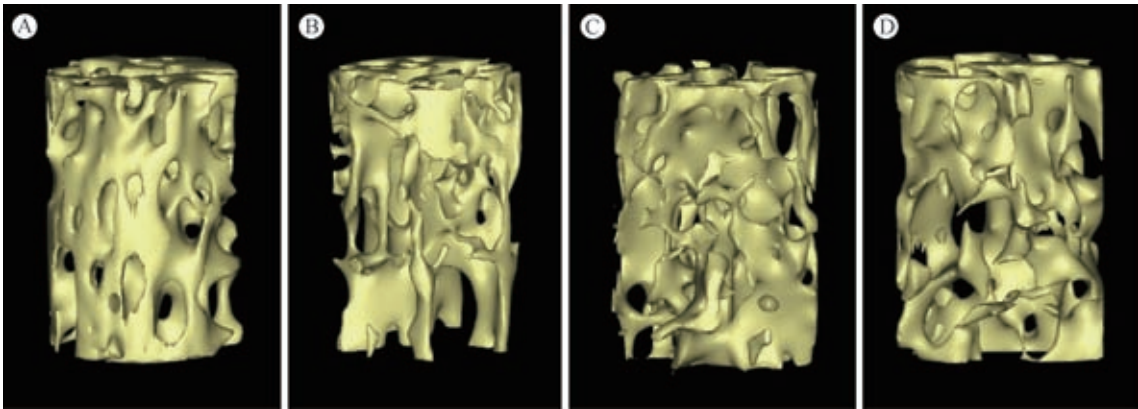
Tab.3 Results of biomechanical test. ($\bar{x} \pm s, n=8$)				
项目 Items	假手术组(A) (n=8)	卵巢切除组(B) (n=7)	卵巢切除加辛伐他汀 前半程干预组(C)(n=6)	后半程干预组(D) (n=7)
最大载荷(N)	197.2 ± 18.1	121.5 ± 16.4 *	176.3 ± 24.9 *#	168.2 ± 16.8 **
弹性模量(MPa)	815.0 ± 57.7	479.5 ± 76.0 *	691.2 ± 70.29 **	675.5 ± 32.6 **

Note. * P < 0.05 vs. the group A; # P < 0.05 vs. the group B.

表 4 micro-CT 检测结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab.4 Results of micro-CT measurement. ($\bar{x} \pm s, n=8$)				
项目 Items	假手术组(A) (n=8)	卵巢切除组(B) (n=7)	卵巢切除加辛伐他汀 前半程干预组(C)(n=6)	后半程干预组(D) (n=7)
骨容积率 BV/TV	26.13 ± 2.10	19.83 ± 2.24 *	22.35 ± 2.35 *	21.38 ± 2.26 *
骨小梁厚度 Tb.Th	105.26 ± 6.0	99.62 ± 5.52	102.79 ± 3.26	100.64 ± 4.51
骨小梁数量 Tb.N	2.36 ± 0.30	1.88 ± 0.38 *	2.12 ± 0.39	2.11 ± 0.34
骨小梁分离度 Tb.Sp	236.13 ± 28.80	358.08 ± 43.79 *	294.33 ± 26.30 **	305.83 ± 51.90 **

Note. * P < 0.05 vs. the group A; # P < 0.05 vs. the group B.



A, 假手术组; B, 卵巢切除组; C, 前半程干预组; D, 后半程干预组

图 1 L5 Micro-CT 三维重建图

A, Sham group; B, OVX group; C, first half period treated group; D, latter half period treated group

Fig.1 Reconstruction of micro-CT images of L5 vertebrae

3 讨论

双侧卵巢切除大鼠因雌激素衰退导致骨转换水平增高,且骨吸收活性更加活跃,导致骨量丢失,其表现与人类绝经后骨质疏松相似,也因此成为目前最为常用的绝经后骨质疏松动物模型^[7-12]。本研究在证实雌性大鼠卵巢切除后 20 周发生明显的骨量丢失、微观结构退变和生物力学性能下降的基础上,发现辛伐他汀两种干预方式,即前半程干预和后半程干预均可部分阻止该模型大鼠骨量丢失、微结构和生物力学性能退变,但骨密度均不能恢复至正常水平。

目前国内外针对辛伐他汀成骨潜能的研究大致分为系统性干预、局部用药以及体外刺激细胞三种,其中局部用药干预^[2, 3, 13]及体外刺激细胞^[14-17]

的研究结果大多证实了辛伐他汀促进骨形成的作用潜能,但在系统性干预相关研究中,一部分研究肯定了辛伐他汀的成骨潜能^[18-21],但也有研究结果未能证实其促进成骨作用^[5, 6, 22]。作者认为,这些结果的矛盾主要原因,一方面与辛伐他汀本身代谢特点有关-即灌胃给药经肝脏代谢后仅有少量药物进入外周循环,对骨组织干预效果较弱,另一方面,与实验设计的差异以及不同实验的动物和药物本身的差别有关,因此本研究通过同一药物同批动物采用不同干预方案验证辛伐他汀对该模型骨量丢失的干预效果的差异,我们分别选取前半程干预和后半程干预,虽然从数值高低的统计分析我们没有发现两者的显著差异,但是与模型组比较,前半程干预组对骨密度、生物力学性能提高的比例、骨小梁分离度降低的比例均高于后半程干预组,提示

该剂量下辛伐他汀预防性干预可能较治疗性干预对 OVX 大鼠骨丢失的干预效果更好,当然,这一推测需要进一步研究证实。

本研究中经 micro-CT 对松质骨的骨量和微结构的分析并未发现辛伐他汀能显著提高 OVX 大鼠骨密度,这与骨密度和生物力学检测结果并不一致。进一步对结果分析发现,虽然没有统计学差异,但辛伐他汀干预组骨量和微结构数据均优于模型组,作者认为,而 micro-CT 只反映松质骨的情况,而骨密度和生物力学指标反映的是整个椎体骨的骨量和力学性能,辛伐他汀对骨密度和力学性能的影响是其对皮质骨和松质骨共同作用的结果,可能辛伐他汀对两者任一的作用都不足够显著,但两者相加则达到显著水平。

PINP 即 I 型前胶原氨基端前肽,是成骨细胞合成并释放出 I 型前胶原的细胞外分解产物,PINP 在血液中的含量主要反映骨转换的情况和 I 型胶原的合成速率,升高提示骨转换活跃,I 型胶原合成速率加快。目前认为 PINP 是新骨形成及骨转换水平的特异性的敏感指标^[23-26]。ICTP 是骨吸收过程中骨基质中 I 型胶原分解产物,具有很强的特异性,是反映骨吸收活跃程度的主要生化标志物之一^[27]。本研究发现,大鼠卵巢切除后 20 周,两者血清水平明显高于对照组,提示其骨转换仍处于较高水平,与人类绝经后骨质疏松的骨代谢状态一致。以往多数研究认为辛伐他汀的作用主要是促进骨形成^[1-4],也有研究发现辛伐他汀干预卵巢切除大鼠既可以促进骨形成,又可以抑制骨吸收^[28]。本研究发现辛伐他汀干预组 PINP 较模型组有升高趋势,ICTP 有下降趋势,但两者均未能达到显著水平。考虑到本研究仅选取一个时间点检测了两个指标,不能完全反映骨代谢的动态变化,而以往研究也有骨代谢血清标志物水平与骨量变化不一致的结果^[28]。

综上,辛伐他汀预防性干预和治疗性干预均可部分阻止该模型骨量减少、力学性能退变、微结构改变,两者相比,虽然没有统计学差异,但预防性干预表现出较治疗性干预效果更好的趋势,但仍需后续研究提供更确实的证据。

参考文献:

- [1] Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins [J]. *Science*, 1999, 286(5446): 1946-1949.
- [2] Yang N, Cui Y, Tan J, et al. Local injection of a single dose of

- simvastatin augments osteoporotic bone mass in ovariectomized rats [J]. *J Bone Miner Metab*, 2014, 32(3): 252-260.
- [3] Tan J, Yang N, Fu X, et al. Single-dose local simvastatin injection improves implant fixation via increased angiogenesis and bone formation in an ovariectomized rat model [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 1428-1439.
- [4] Oxlund H, Andreassen TT. Simvastatin treatment partially prevents ovariectomy-induced bone loss while increasing cortical bone formation [J]. *Bone*, 2004, 34(4): 609-618.
- [5] Van Staa TP, Wegman S, de Vries F, et al. Use of statins and risk of fractures [J]. *JAMA*, 2001, 285(14): 1850-1855.
- [6] Von Stechow D, Fish S, Yahalom D, et al. Does simvastatin stimulate bone formation in vivo? [J]. *BMC Musculoskeletal Disord*, 2003; 4: 8.
- [7] Oliver RA, Yu Y, Yee G, et al. Poor histological healing of a femoral fracture following 12 months of oestrogen deficiency in rats [J]. *Osteoporos Int*, 2013, 24(10): 2581-2589.
- [8] Durão SF, Gomes PS, Colaço BJ, et al. The biomaterial-mediated healing of critical size bone defects in the ovariectomized rat [J]. *Osteoporos Int*, 2014, 25(5): 1535-1545.
- [9] Oliver RA, Yu Y, Yee G, et al. Poor histological healing of a femoral fracture following 12 months of oestrogen deficiency in rats [J]. *Osteoporos Int*, 2013, 24(10): 2581-2589.
- [10] Durão SF, Gomes PS, Colaço BJ, et al. The biomaterial-mediated healing of critical size bone defects in the ovariectomized rat [J]. *Osteoporos Int*. 2014, 25(5): 1535-1545.
- [11] Qiu C, Liu X, Wang J, Zhao Y, et al. Estrogen increases the transcription of human $\alpha 2$ -Heremans-Schmid-glycoprotein by an interplay of estrogen receptor α and activator protein-1 [J]. *Osteoporos Int*, 2014, 25(4): 1357-1367.
- [12] Luo Y, Zhang L, Wang WY, et al. Alendronate retards the progression of lumbar intervertebral disc degeneration in ovariectomized rats [J]. *Bone*, 2013, 55(2): 439-448.
- [13] Wang JW, Xu SW, Yang DS, et al. Locally applied simvastatin promotes fracture healing in ovariectomized rat [J]. *Osteoporos Int*, 2007, 18(12): 1641-1650.
- [14] Chen PY, Sun JS, Tsuang YH, et al. Simvastatin promotes osteoblast viability and differentiation via Ras/Smad/ERK/BMP-2 signaling pathway [J]. *Nutr Res*, 2010, 30(3): 191-199.
- [15] Kim IS, Jeong BC, Kim OS, et al. Lactone form 3-hydroxy-3-methylglutaryl- coenzyme A reductase inhibitors (statins) stimulate the osteoblastic differentiation of mouse periodontal ligament cells via the ERK pathway [J]. *J Periodontal Res*, 2011, 46(2): 204-213.
- [16] Qiao LJ, Kang KL, Heo JS. Simvastatin promotes osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells via canonical wnt/ β -catenin signaling [J]. *Mol Cells*, 2011, 32(5): 437-444.
- [17] Miyazawa A, Matsuno T, Asano K, et al. Controlled release of simvastatin from biodegradable hydrogels promotes odontoblastic differentiation [J]. *Dent Mater J*, 2015, 34(4): 466-474.

- [18] Ho ML, Chen YH, Liao HJ, et al. Simvastatin increases osteoblasts and osteogenic proteins in ovariectomized rats [J]. Eur J Clin Invest, 2009, 39(4): 296–303.
- [19] Seferos N, Pantopoulou A, Kotsiou A, et al. The influence of simvastatin in rats mandible and femur bone mass under Freund's adjuvant arthritis [J]. Stomatologija, 2012, 14(2): 46–52.
- [20] Chan MH, Mak TW, Chiu RW, et al. Simvastatin increases serum osteocalcin concentration in patients treated for hypercholesterolaemia[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86: 4556–4559.
- [21] Meier CR, Schlienger RG, Kraenzlin ME, et al. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of fractures [J]. JAMA, 2000, 283: 3205–3210.
- [22] Yao W, Farmer R, Cooper R, et al. Simvastatin did not prevent nor restore ovariectomy-induced bone loss in adult rats [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2006, 6(3): 277–283.
- [23] Chen C, Liang MK, Zhang H, et al. Relationships between age-related biochemical markers of bone turnover and OPG, TGF- β 1 and TGF- β 2 in native Chinese women [J]. Endocr Res, 2014, 39(3): 105–114.
- [24] Bauer DC, Garnero P, Harrison SL, et al. Biochemical markers of bone turnover, hip bone loss, and fracture in older men; the 18MROS study[J]. J Bone Miner Res, 2009, 24(12): 2032–2038.
- [25] Burshell AL, Möricke R, Correa-Rotter R, et al. Correlations between biochemical markers of bone turnover and bone density responses in patients with glucocorticoid-induced osteoporosis treated with teriparatide or alendronate [J]. Bone, 2010, 46(4): 935–939.
- [26] Boonyanurak P, Wilawan K. Levels of biochemical bone marker procollagen type I N-propeptide (PINP) in Thai women aged 40–70 years [J]. J Med Assoc Thai, 2009, 92(7): 873–877.
- [27] Naylor KE, Jacques RM, Paggiosi M, et al. Response of bone turnover markers to three oral bisphosphonate therapies in postmenopausal osteoporosis: the TRIO study [J]. Osteoporos Int, 2016, 27(1): 21–31.
- [28] Chen SH, Chou FF, Ko JY. The use of simvastatin with aromasin in an ovariectomized rat model: effects on the skeletal system [J]. Chang Gung Med J, 2010, 33(5): 509–51.

〔修回日期〕2016–03–23

(上接第 41 页)

- [8] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors [J]. Science, 2009, 326(5959): 1509–1512.
- [9] 靳玉珠, 王世山, 向华, 等. TALEN 靶向基因修饰新技术研究进展 [J]. 广东农业科学, 2013, (19): 149–152.
- [10] Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [J]. Nat Biotechnol, 2010, 29(2): 143–148.
- [11] Smith J, Bibikova M, Whitby FG, et al. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains [J]. Nucleic Acids Res 2000, 28(17): 3361–3369.
- [12] 汪加兴, 张淑君. TALEN 和 CRISPR/Cas 两个基因编辑新技术 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2015, (2): 22–26.
- [13] 倪培凌, 刘畅, 陈凌懿. DNA 剪刀—TALEN 和 CRISPR/Cas [J]. 中国细胞生物学学报, 2014, 36(1): 1–7.
- [14] Mussolino C, Morbitzer R, Lütge F, et al. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity [J]. Nucl Acids Res, 2011, 39(21): 9283–9293.
- [15] Lei Y, Guo X, Liu Y, et al. Efficient targeted gene disruption in *Xenopus* embryos using engineered transcription activator-like effector nucleases (TALENs) [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(43): 17484–17489.
- [16] Ansai S, Sakuma T, Yamamoto T, et al. Efficient targeted mutagenesis in medaka using custom-designed transcription activator-like effector nucleases [J]. Genetics, 2013, 193(3): 739–749.
- [17] Sander JD, Cade L, Khayter C, et al. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs [J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(8): 697–698.
- [18] Tesson L, Usal C, Ménoret S, et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs [J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(8): 695–696.
- [19] Sung YH, Baek IJ, Kim DH, et al. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(1): 23–24.

〔修回日期〕2016-02-25

两种微创 Beagle 犬心肌梗死模型的比较

邓祖跃¹, 杨 何², 刘 璐¹, 陈永祥²

(1. 浙江省食品药品检验研究院, 杭州 浙江 310015; 2. 浙江省医学科学院, 杭州 浙江 310012)

【摘要】 目的 采用两种方法建立 beagle 犬心肌梗死动物模型并比较其效果。**方法** 将 30 条 Beagle 犬随机分成三组, 每组 10 条。①假手术组, 开胸后剪开心包腔, 不结扎冠状动脉。另外两组在电视胸腔镜辅助下用钛夹夹闭犬左冠状动脉前降支血管, ②微创直视组, 在胸骨左缘第 3 肋间开 3.0 cm 小切口, 光源和操作器械均由此孔进入胸腔。③胸腔镜组, 采用左侧第 3 肋间锁中线开孔 1.0 cm, 作为探测孔, 电视胸腔镜由此进入胸腔, 在第 3 肋间胸骨旁线及第 4 肋间锁中线处各开 0.5 cm 小孔作为操作孔, 手术器械由此进入胸腔。造模后, 测定心电图和血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)和肌钙蛋白 I(cTnI)含量变化, 采用 HE 染色了解各组的心肌病变情况。记录手术成功率、从皮肤切开开始到关胸所需要的时间和伤口愈合时间。**结果** 与假手术组比较, 两组动物出现明显的心肌梗塞改变(心电图 ST 段抬高, 血清 CK-MB 和 cTnI 水平增加, 心肌缺血坏死纤维化, 心肌细胞减少)。两种造模方法的犬存活率达 90%, 微创直视法所需时间明显较少, 胸腔镜法切口愈合时间较短。**结论** 微创手术建立的心肌梗塞模型, 动物创伤小, 死亡率低, 是一种研究心肌梗塞病理生理机制的理想模型。

【关键词】 心肌梗塞; 左冠状动脉前降支; 犬; 电视胸腔镜

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)06-0048-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.06.010

Comparison of two types of myocardial infarction models in Beagle dogs

DENG Zu-yue¹, YANG He², LIU Lu¹, CHEN Yong-Xiang²

(1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310015, China;

2. Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 320007, China)

【Abstract】 Objective The purpose of this study was to compare two types of myocardial infarction (MI) models in Beagle dogs. **Methods** 30 dogs were divided randomly into three groups (n = 10). ① The sham-operated group underwent pericardiotomy but without coronary artery ligation. The other two model groups were made under video-assisted thoracoscopy (VATS), where the left anterior descending coronary artery was closed by titanium clips: ② The direct vision group: the minimally invasive closure of the artery was performed under direct vision. In this group, the thoracoscopic operation was performed through a 3.0 cm small incision opened at the margin of the left third rib. ③ The thoracoscopic group: the video-assisted thoracoscope was inserted into the chest through a 1.0 cm exploratory hole in the midline of the third rib, and the surgical instruments were inserted through two 0.5 cm operating holes at the para-sternum line of the third rib and midclavicular line of the fourth rib. Electrocardiogram (ECG) was recorded and the levels of serum creatine kinase-MB (CK-MB) and troponin I (cTnI) were measured after modeling. The heart tissue samples were examined by histology using HE staining. The success rate of model establishment, durations from skin incision to chest closing and the wound healing were recorded. **Results** Compared with the sham-operated group, changes of myocardial infarction were observed

【基金项目】 浙江省省级公益性技术应用研究计划项目(编号: Y206355)。

【作者简介】 邓祖跃(1973-), 男, 研究方向: 实验动物学。E-mail: dzy7317@sina.com。

【通讯作者】 陈永祥(1975-), 男, 副研究员, 研究方向: 实验动物学。E-mail: cyx75001@163.com。

in the two model groups (ECG S-T segment elevation, increased serum CK-MB and cTnI levels, myocardial ischemia and fibrosis, and reduced amount of cardiomyocytes). The survival rate was 90% in both of the two model groups. The operating time was shorter in the minimally invasive surgery under direct vision group, and the wound healing time was shorter in the thoracoscopic group. **Conclusions** The myocardial infarction models generated by minimally invasive surgery have less trauma and low mortality in the dogs. This model is suitable for investigation of pathophysiological mechanism associated with myocardial infarction.

【Key words】 Myocardial infarction; Left anterior descending coronary artery; Beagle dogs; Video-assisted thoracoscopy

近年来,微创手术作为一种成熟技术在腹部和胸部外科领域应用越来越广,已有研究者将微创技术引入动物模型的制造,在心肌梗塞模型制备中,出现了电视胸腔镜辅助下制作猪和犬的心肌梗死模型^[1,2]。我们在分析了这些方法的基础上,结合自身实验的体会,比较了两种微创 Beagle 犬心肌梗塞模型,为心肌梗塞研究的模型制造提供参考方法。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

RM-6000 型多导生理记录仪(日本 Kohden 公司);全自动生化分析仪,日本日立公司产品;Aeon7200A 呼吸麻醉机(上海寰熙医疗器械有限公司)。胸腔镜一套,杭州桐庐医疗光学仪器有限公司。Amersham Imager 600 多功能成像仪(美国 GE 公司),RM2235 切片机(德国徕卡(莱卡)公司),DM4000 B 显微镜(德国徕卡(莱卡)公司)。

氯化硝基四氮唑蓝染色液(N-BT,批号:201506)(南京建成生物工程研究所);肌酸激酶 MB 同工酶(CK-MB,批号:171036/50003007)试剂盒(德赛诊断系统(上海)有限公司);肌钙蛋白测定试剂盒(合肥博美生物科技责任有限公司,批号:201507)。

1.2 实验动物及实验环境

健康雄性纯种比格犬 30 只,体重 10~20 kg,购于福建振和实验动物技术开发有限公司提供,生产许可证:【SCXK(闽)2012-0002】,质量合格证号:35002100000059。动物实验在浙江省医学科学院实验动物部完成 SYXK(浙)2012-0176。室温 20℃~25℃,相对湿度 40%~70%。单笼饲养,给予自由进食和饮水,平衡饮食 1 周后随机分组进行实验

1.3 动物实验

1.3.1 分组:30 只比格犬随机分为 3 组,每组 10 只。(1)假手术组,胸骨左缘第 3 肋间开胸后剪开

心包腔,不结扎冠状动脉。(2)微创直视法组,在胸骨左缘第 3 肋间切口长约 3.0 cm,电视胸腔镜和操作器械均由此孔进入胸腔,在直视下用钛夹夹闭犬左冠状动脉前降支血管。(3)胸腔镜法组,采用左侧第 3 肋间锁中线开孔 1.0 cm,电视胸腔镜由此进入胸腔,在第 3 肋间胸骨旁线及第 4 肋间锁中线处各开 0.5 cm 小孔作为操作孔,操作器械分别由此进入胸腔,在电视胸腔镜辅助下用钛夹夹闭犬左冠状动脉前降支血管。

1.3.2 动物模型的建立:参考相关文献造模^[2],称重比格犬后,在前肢皮下静脉注射 3% 戊巴比妥钠(给药剂量 1 /mL·kg),麻醉后置于手术台上,以左侧卧位固定。在犬后肢建立静脉给药通路,连接肢导 II 导联,监测心电图,将单腔气管插管插入犬气管,连接呼吸机,建立无创气道通路。根据分组情况在相应位置开孔,进行手术操作。在左心耳搏动明显处心剪开心包,找到冠脉前降支,在中上部分钳夹一钛夹,接着逐层缝合肌肉皮肤,据犬心电图 ST 段抬高和结扎部位以下心肌变白判断心肌梗死模型制作成功。手术完成后观察 30 min,无异常后,鼓肺,逐层缝合切口,关胸、吸痰,待动物苏醒后拔除气管,观察 30 min 各项生命指标无异常后常规检测各项生理指标及采集标本,检测完毕后送返动物观察室。术后前 3 d,每日肌注青霉素 240 万 U,以后常规饮水进食,饲养 4 周后处死取材。手术后 3 h 和处死前取血,制备血清,-20℃ 保存备用;处死动物取心脏,取结扎部位以下的部分组织切片,用 0.5% 氯化硝基四氮唑蓝(N-BT)染色液染色,取心肌梗死周边部位心肌保存于 10% 甲醛溶液中,进行病理组织学检测。

1.3.3 监测 ECG:术后在 4 个时间点(结扎前、结扎后 10 h、3 h、28 d)监测 ECG,测量各点 ST 段值。ST 段 ≥ 0.1 mV 以上为 ST 段抬高,表明心肌有缺血,实验根据此指标的变化可以动态了解心肌梗死发生的大致位置、程度以及恢复情况。

1.3.4 血液各项生化指标检测：用全自动生化仪和试剂盒测定血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)，肌钙蛋白 IcTnI)。

1.4 统计学方法

实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。双侧 t 检验进行组间显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况及手术存活情况

犬术后 2~3 h 苏醒,6 h 仍精神萎靡,半卧位,不能自主进食,多数有呼吸急促、紫绀及呕吐表现,12 h 即能行走,能舔食流质饮食,基本没有异常表现。术后存活情况,假手术组 10 只均存活,微创直观法组 9 条存活,1 条死亡,死亡原因为术中室颤;胸腔镜法组 9 条存活,1 条因术后复苏时氧气不足而死亡,三组手术的犬术后存活率差异没有显著性 ($P > 0.05$)。:

2.2 从皮肤切开始到关胸所需要的时间及术后伤口愈合情况

假手术组、微创直视组和胸腔镜法组三组手术时间分别为 (40.7 ± 3.5) min、(15.5 ± 2.6) min、(30.8 ± 4.2) min,微创直视组所需时间明显较少 ($P < 0.01$)。术后伤口愈合情况,假手术组 (10.5 ± 2.5) d 后愈合,微创直视组 (5.3 ± 1.4) d 愈合,胸腔镜法组 (3.2 ± 1.5) d 愈合。两种微创手术的恢复明显比开胸手术快 ($P < 0.01$),二者之间的差异不显著。

2.3 心电图变化

三组动物在术前 ECG 基本一致,ST 段变化在正常范围,术后,假手术组没有阻断 LAD, ECG 在各时间没有明显变化,而微创创造模组均阻断了 LAD,心肌缺血,结扎术后各时间问段查心电图,以 II 导联为标准,进行对照,可以看到早期典型的梗死心电图改变(图 1)。结扎后 10 min 心电图可见 ST 段抬高,部分导联达 0.5 mV;21.5 倍,19,8 倍,3 h ST 段明显回落,T 波高尖与主波方向一致 8 倍,8,5 倍;术后 28 d 下降更明显,偶有 T 波倒置 4.7 倍和 5.1 倍。但 ST 段均比假手术组高 ($P < 0.01$),说明缺血仍然存在, ($P < 0.01$) (表 1)。

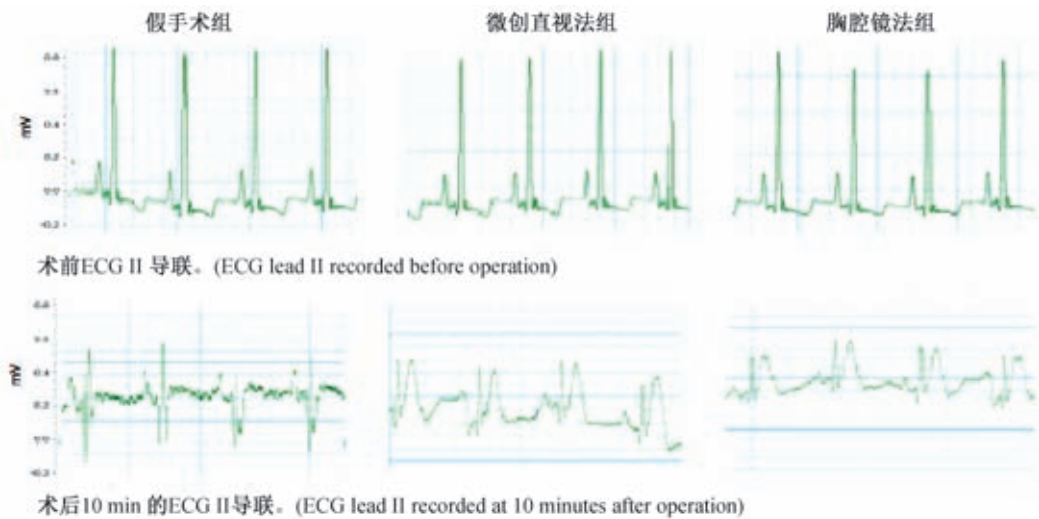


图 1 犬手术前后心电图变化情况

Fig.1 ECG changes before and after operation in the dogs

表 1 犬心电图 ST 段抬高的情况

Tab.1 ECG ST segment elevation levels in the dogs ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别 Groups	ST (mV)			
	术前 Before operation	0 h	3 h	28 d
假手术组 Sham-operated group	0.025 ± 0.006	0.029 ± 0.008	0.031 ± 0.009	0.027 ± 0.006
微创直视法组 Minimally invasive surgery under direct vision group	0.026 ± 0.008	0.558 ± 0.032 **	0.247 ± 0.023 **	0.126 ± 0.013 **
胸腔镜法组 Thoracoscopic group	0.024 ± 0.007	0.573 ± 0.029 **	0.265 ± 0.025 **	0.138 ± 0.015 **

注:与假手术比较, ** $P < 0.01$ 。
Note. ** $P < 0.01$, compared with the sham group.

表 2 血清 CK-MB 和 cTnI 的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Tab.2 Changes of the serum CK-MB and cTnI levels ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	CK-MB (U//mL)		cTnI (nmol/mL)	
	3 h	28 d	3 h	28 d
假手术组 Sham-operated group	254.76 ± 23.63	136.37 ± 27.52	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.02
微创直视法组 Minimally invasive Surgery under direct vision group	918.53 ± 81.36 **	145.68 ± 21.32	5.26 ± 2.54 **	0.03 ± 0.01
胸腔镜法组 Thoracoscopic group	956.88 ± 78.83 **	139.42 ± 31.56	5.05 ± 3.12 **	0.04 ± 0.02

注:与假手术比较, ** $P < 0.01$ 。
Note. ** $P < 0.01$, compared with the sham group.

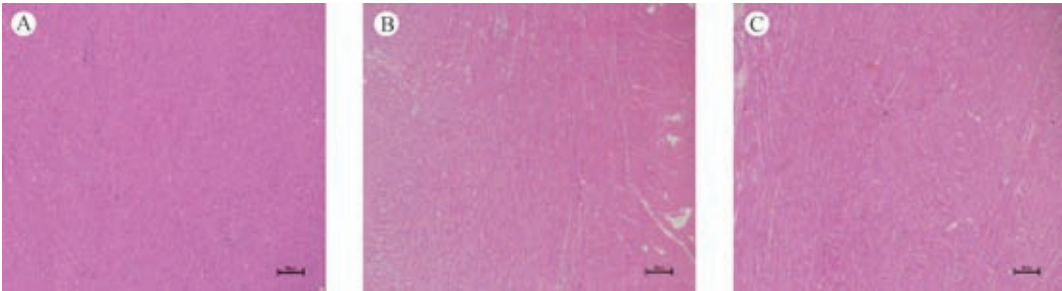


注:A 是假手术组;B 是 微创直视组;C 是 胸腔镜组。

图 2 心脏 N- BT 染色病理结果

Note. A: Sham operated group; B: Minimally invasive surgery under direct vision group; C: Thoracoscopic group.

Fig.2 Pathological changes of the myocardium in the dogs. N-BT staining

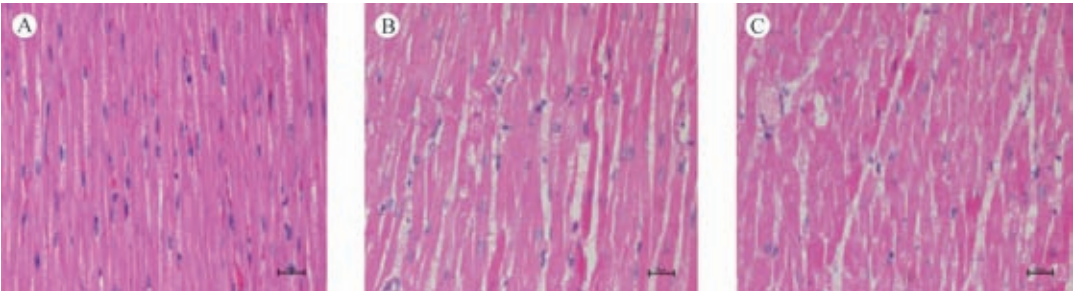


注:A 是假手术组;B 是 微创直视组;C 是 胸腔镜组(标尺 = 100 μm)。

图 3 心脏 HE 染色的病理改变

Note. A: Sham operated group; B: Minimally invasive surgery under direct vision group; C: Thoracoscopic group(Bar = 100 μm).

Fig.3 Pathological changes of the heart in the dogs. HE staining.



注:A 是假手术组;B 是 微创直视组;C 是 胸腔镜组;标尺 = 10 μm。

图 4 心脏 HE 染色的病理改变

Note. A: Sham group; B: Minimally invasive surgery under direct vision group; C: Thoracoscopic group; Bar = 10 μm.

Fig.4 Pathological changes of the myocardium. HE staining

2.4 比格犬血清 CK-MB 和 cTnI 的变化

假手术组在术后 6 h, CK-MB 值比术后 21 d 高近 1 倍, 说明手术对 CK-MB 有影响, 而 cTnI 没有变化。与假手术组相比, 心肌梗死组血清 CK-MB 和 cTnI 含量在术后 6 h 均显著增加, 分别为 3.6 和 3.8 倍和 131.5 和 126.2 倍, ($P < 0.01$), 术后 21 d, 三组结果基本一致(表 2)。

2.5 大体形态和组织病理结果

由图 2 可以观察到心脏的大体病理表现: 对照组肉眼, 观察心脏大体情况和 N-BT 染色结果, 假手术组心脏表面光滑, 各区域颜色一致, 没有发现心肌梗塞病变; 而两种手术组在夹闭血管周围有点状出血灶, 梗死区心脏颜色变白, 表面有白色纤维增生, N-BT 染色相应区域染色变淡, 有明显的纤维化区域, 提示发生了较大面积的心肌梗死 ($P < 0.01$) (图 2)。

HE 染色结果显示: 假手术组心肌细胞包膜完整、排列规则、细胞间隙均匀, 肌纤维完整、走向一致。两种手术组均可见前降支血管旁心肌细胞排列紊乱、纤维浊肿断裂、空泡变性, 心肌纤维变性坏死、纵纹及横纹消失, 细胞核数量明显减少(图 3, 4)。

3 讨论

犬的心脏解剖特点决定了其适合用于制作心脏疾病模型, 但由于成本的原因, 很多研究常常采用杂种犬^[3], 但杂种犬的来源和遗传背景复杂, 获得的实验数据偏差大, 有时会影响结果判断。而 Beagle 犬由于品种固定, 遗传稳定, 实验结果稳定, 被国际公认为是经典的实验动物^[4]。因此, 我们拟用 Beagle 犬作为实验对象进行心肌梗塞研究。

经典的心肌梗塞模型主要开胸结扎冠脉左前降支, 随着外科领域的发展, 传统的大切口手术模式正逐步减少, 新兴的微创手术应用越来越广泛^[5]。现代电视胸腔镜就是这样一门全新的微创胸外科技术, 借助高精度光学和影像技术以及精良的外科工具只需在胸壁打 1~3 个小孔或附加 1 个 2~3 cm 的小切口, 与常规开胸手术相比, 手术创伤小, 失血少, 疼痛轻, 不破坏胸壁的完整性, 对心肺功能尤其是肺功能损害小, 减少了术后并发症的发生。江佩蓉等^[6]比较了解常规开胸手术和胸腔镜手术行肺叶切除术患者影响, 结果发现, 胸腔镜组术后肺功能的影响小于常规组, 认为主要原因是

胸腔镜手术减少了开胸手术引起的胸壁创伤、降低了心肺功能损伤、从而保护了肺功能。

本次实验应用了这些技术和设备建立了两种微创心肌梗塞模型, 用钛夹夹闭左前降支制作了急性心肌梗死模型, 结果均获得满意的效果: 心电图 ST 明显抬高, 心肌梗塞血清标志物 CM-KM 和 cIN 增加, 两种手术组心脏梗塞区出现心肌坏死, 纤维变性、细胞减少。两种手术的成功率均很高, 达到 90% 以上。在术后伤口愈合方面, 我们发现了明显差异, 假手术组 10 d 后愈合, 微创直视组 5 d 愈合, 胸腔镜法组 3 d 愈合。这些结果说明了这两种技术造模都是成功的, 但在创伤对模型的影响方面, 微创能尽快恢复, 而传统手术(假手术组)创口恢复明显晚很多, 动物的自身活动明显受限, 这对实验的后期影响较大。我们比较这两种微创手术, 没有看到二者在手术效果上有明显差异, 但在手术操作时间中发现了一些差异。微创直视法, 所有的设备在同一孔进行, 操作过程的手术器械比较容易定位, 虽然空间局促, 但钛夹钳操作能够顺利完成, 这个手术操作时间比较短, 操作技术容易掌握, 在熟练的情况下, 可以不需要连接呼吸机, 就可以完成手术, 只是开口相对较大, 伤口愈合慢一些, 这个手术和传统的开胸不同, 它需要专业的冷光源照明胸腔内环境, 外部直射光是不能完成这个任务的, 另外手术器械需要专门微创手术器械, 才能达到在小的手术视野完成手术。胸腔镜法, 胸腔镜和手术器械分别由不同的孔进入胸腔, 每个孔开的比较小, 一般不超过 1 cm, 所以术后愈合很快, 甚至有些孔不需缝合, 但这个手术的技术要求比较高, 对专用手术器械操作要求熟练, 另外, 电视图像与胸腔操作同步性需要较长的适应期, 所有的这些造成手术时间比较长, 因此, 气管插管又是比较关键的技术, 必须保证在呼吸机通气的前提下才能维持手术过程, 而肺泡的舒张影响手术视野, 那么只有进行右侧单肺通气, 这要求更高的气管插管技术, 但这个手术的优点是除了创伤小, 由于手术器械腾拉空间大, 还有可进行长时间的精细手术。

总之, 我们用两种微创手术成功制作了心肌梗塞模型, 为心肌梗塞的研究提供了两种参考方法, 两种方法各有其优点, 但均是对动物机体影响较小的方法, 甚至均可多次进行胸腔手术。至于用哪一种模型造模更好, 主要根据各实验的要求和实验室设备情况, 选择合适的方法。(下转第 60 页)

HBV 转基因小鼠尿液中乙肝病毒相关指标的分析

杨 阳^{1,2}, 刘光泽², 李秀梅², 孔祥平², 顾为望¹

(1. 南方医科大学比较医学研究所暨实验动物中心, 广州 510515; 2. 解放军第458医院全军肝病中心, 广州 510602)

【摘要】 目的 检测分析 HBV 转基因小鼠尿液中 HBV 相关指标表达情况, 进一步认识转基因小鼠的生物学特性; 并通过多种实验方法确定尿液中 HBV 相关指标的组织来源。**方法** 使用酶联免疫吸附法 (ELISA) 和荧光定量 PCR (real-time PCR) 检测转基因小鼠尿液中 HBV 相关指标; 并通过水动力转染的小鼠实验、RNA 干扰方法抑制 HBV 表达转基因鼠实验、乙肝患者 HBV 阳性血清感染正常小鼠实验等多种实验方法确定其复制表达组织来源。**结果** HBV 转基因小鼠尿液中存在 HBsAg、HBeAg、及 HBV-DNA 表达, 其中 HBsAg 的表达水平较高 (6674 ± 619.8 IU/mL), 但低于血清中 HBsAg 的表达水平 (16470 ± 2704 IU/mL), 尿液 HBsAg 雄性小鼠的表达水平高于雌性小鼠; 而尿液 HBeAg 表达水平较低, 且尿液中 HBeAg 的阳性率高于血液, HBeAg 的表达水平个体间和性别间有明显差异; 尿液中存在 HBV-DNA 含量达到 $10^3 \sim 10^5$ copy/mL; 未检测到相关抗体表达。通过水动力转染等实验表明转基因鼠尿液中的 HBV 相关指标来源于肾脏的复制表达, 而不是由肝脏分泌进入血液循环以尿液排出, 肾脏是 HBV 独立的表达场所。**结论** 转基因小鼠尿液中存在 HBV 相关指标的表达, 并随月龄长期表达, 其中 HBsAg 及 HBV-DNA 表达水平较高且比较稳定, 雄性小鼠尿液 HBsAg 的滴度高于雌性小鼠; HBeAg 雄性鼠表达水平相对雌性鼠较高且比较稳定; 尿液中无各类抗体表达; 肾脏也是 HBV 独立的复制表达场所。

【关键词】 肝炎病毒, 乙型; 转基因小鼠; 模型, 动物; 尿液; 生物学特性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2016) 06-0053-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.06.011

Analysis of hepatitis B virus-related indexes in the urine of HBV transgenic mice

YANG Yang^{1,2}, LIU Guang-ze¹, LI Xiu-mei², KONG Xiang-ping², GU Wei-wang¹

(1. Institute of Comparative Medicine & Center of Experimental Animals, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Liver Disease Center of PLA, No. 458 Hospital of PLA, Guangzhou 510602)

【Abstract】 Objective To detect and analyze the HBV-related indexes in the urine of HBV transgenic mice and further understand the biological characteristics of transgenic mice, and to clarify the tissue sources of HBV-related indexes. **Methods** HBV-related indexes in the urine of transgenic mice were tested using enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) and fluorescence quantitative PCR (real-time PCR). The tissue sources were confirmed by several experiments, i. e. hydrodynamic transfection of mice, RNA interference to inhibit HBV-expression in the transgenic mice, and to infect normal mice with HBV-positive serum from patients. **Results** Expression of HBsAg, HBeAg and HBV-DNA was present in the urine of transgenic mice, of which the HBsAg expression level was high (6674 ± 619.8 IU/mL), but

【基金项目】 国家科技重大专项课题—艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治—HBV 细胞和动物模型的建立和应用 (课题编号: 2012ZX10004503010)。

【作者简介】 杨阳 (1987 -), 女, 硕士, 实验动物技术研究。E-mail: yangya726@qq.com。

【通讯作者】 顾为望 (1965 -), 男, 教授, 研究方向: 从事比较医学研究。E-mail: guww@163.com; 刘光泽 (1962 -), 男, 主任技师, 研究方向: 疾病基因工程动物模型的制备和应用研究, E-mail: lgze68@163.com。

lower than that in the serum (16470 ± 2704 IU/mL). The level of HBsAg expression in the urine of male mice was higher than that in female mice. The level of HBeAg expression in the urine was lower and the HBeAg positive rate of urine was higher than that of blood, and the levels of HBeAg expression showed significant inter-individual and inter-sexual differences. HBV-DNA level reached $10^3 - 10^5$ copy/mL in the urine, but no related antibody expression was detected. The experiments such as hydrodynamic infection test indicated that the HBV-related indexes in the urine are derived from replication in the kidneys rather than secreted from the liver, entered into the blood circulation, and discharged from the urine. The kidneys are an independent expression site of HBV. **Conclusions** The expression of HBV-related indexes is present in the urine of transgenic mice and it is a long-term expression along with the age in months, of which the expression levels of HBsAg and HBV-DNA are rather high and stable. HBsAg titer in the urine of the male mice is higher than that of female mice. HBeAg expression level in the male mice is more stable compared with that in female mice. No expressions of various kinds of antibodies have been found in the urine. The kidneys are an independent expression site of HBV.

【Key words】 Hepatitis B virus; Transgenic mice; Model, animal; Urine; Biological indexes

目前转基因小鼠在乙型肝炎的研究中得到了广泛地应用,综合国内外相关文献表明^[1-5],HBV 转基因小鼠体内表达的组织特异性及与病毒元件和细胞内转录活性子的相互作用有关。此外,其它还有许多因素影响转录,包括激素、组织特异性转录子及各种修饰细胞在转录及转录后水平相互作用均影响转基因表达。转基因小鼠出生前就能在内源性 HBV 启动子的控制下,主要在肝脏内持续转基因表达。康爱君等^[6]观察血清 HBsAg 为阳性的 15 只小鼠,肝组织有 HBsAg 的存在,且 HBsAg 的分布呈胞质型,但不存在于脾、肺、心等组织中。Burk RD 也有报道只有在肝和肾有 HBV 基因表达^[7]。Chisari 实验室^[8]和我们实验室建立 1.3 拷贝全基因 HBV 转基因鼠模型^[9],只有在肝和肾组织有 HBsAg/HBcAg 表达,免疫组化阳性,但对肾组织进行 HBV 基因表达特性及与肝、外周血乙肝病毒指标关系等缺少相关研究报道。本实验室的 HBV 转基因小鼠,已广泛应用于 HBV 的复制、表达及小型实验动物中的免疫发病机制研究,同时也是筛选和评价抗 HBV 药物理想工具^[9,10]。对该转基因小鼠进行更深入生物学特性研究时,我们发现转基因小鼠的尿液也有 HBV 相关指标的表达复制,为此展开了对转基因小鼠泌尿系统的研究。本研究对进一步深入了解 HBV 转基因小鼠的生物学特性有重要意义,丰富了转基因小鼠生物学特性研究的内容,为 1.3copyD 基因型 HBV 转基因小鼠实际应用于临床前药物评价时提供更多的理论依据,而且目前国内未见相关方面的研究报道。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级血清 HBsAg 检测阳性的 1.3copyD 基因

型 HBV 转基因小鼠【SCXK(军)2012-0018】,由本科研究室提供。

SPF 级 C57BL/6 小鼠 12 只(18~20)g,均为雌性鼠【SCXK(粤)2013-0002】,BAL B/c 小鼠 6 只(18~20)g,雌雄各半【SCXK(粤)2013-0002】购于广东省实验动物中心,分别用于 1.3.2 水动力感染的小鼠实验和 1.3.4 乙肝患者 HBV 阳性血清感染正常小鼠实验。

SPF 级 1.3copyD 基因型 HBV 转基因小鼠(HBsAg 测定值吸光度相近)10 只(18~20)g,均为雄性,用于 1.3.3 RNA 干扰方法抑制 HBV 表达转基因鼠实验。

以上实验动物均饲养于解放军 458 医院实验动物中心 SPF 饲养设施【SYXK(军)2012-0059】。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 黑暗的昼夜节奏。购买的实验小鼠适应环境 1 周进行实验。

1.2 实验试剂

HBsAg、HBeAg、抗 HBeAg、抗 HBsAg、抗 HBcAgELISA 检测试剂盒购自上海科华生物公司,HBsAg、HBcAg 免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司,Omega 组织 DNA 抽提试剂盒购自广州飞扬生物工程有限公司。

目的质粒 PCDNA3.1(+)-1.3 HBVC,由 302 医院徐东平教授惠赠。目的质粒 pU6-siHBV7(HBV 特异性的 shRNA 表达载体),由本科研究室提供。乙肝患者 HBV 阳性血清,于本院采集。

1.3 动物实验

1.3.1 转基因小鼠尿液、血清 ELISA 酶联检测及 HBV-DNA 定量检测:用玻璃采血管通过眼眶后静脉丛采血,5 000 r/min 离心 10 min。将分离血清收集于 0.5 mL 无菌 EP 管内,置于 -20℃ 冻存。行按

压膀胱法采集尿液, 5 000 r/min 离心 5 min, 置于 4℃ 保存(尿液 4℃ 存放时间不超过 48 h)。按 ELISA 试剂盒说明分别进行 HBsAg、HBeAg、抗 HBeAg、抗 HBsAg、抗 HBcAg 检测(其中 HBsAg 血清和尿液样本取原液和 1/5 000 稀释两种), 并进行结果判定。

取保存的尿液和血清样本进行 real-time PCR 检测 HBV-DNA 的表达。

1.3.2 水动力转染的小鼠实验: 取实验 C57BL/6 小鼠随机分为实验组(10 只)和对照组(2 只), 将目的质粒 pCDNA3.1(+)-1.3HBVC 溶于生理盐水中, 生理盐水的体积为小鼠体重的 10%, 通过水动力转染方法初步建立 HBV 转染 C57BL/6 小鼠模型^[11-17]。在注射结束后 7 d 采集实验小鼠血清和尿液进行 HBsAg、HBeAg、HBV-DNA 检测, 方法同前。

1.3.3 RNA 干扰方法^[18-22]抑制 HBV 表达转基因鼠实验: 取实验 1.3copyD 基因型 HBV 转基因小鼠随机分为实验组和对照组(各 5 只), 将目的质粒 pU6-siHBV7 溶于生理盐水中, 生理盐水的体积为小鼠体重的 10%, 采用水动力转染方法进行质粒注射^[11-17]。在注射结束后 5 d 采集实验小鼠血清和尿液进行 HBsAg 检测(样本进行 1/1 600 稀释), 方法同前。

1.3.4 乙肝患者 HBV 阳性血清感染正常小鼠实验: 取实验 BAL B/c 小鼠经尾静脉注射人 HBV 阳性血清^[11-17]。在注射结束后 2 d 采集实验小鼠血清和尿液进行 HBsAg、HBeAg、HBV-DNA 定量检测, 由本院检验中心完成。

1.3.5 转基因小鼠肾脏、膀胱免疫组化特性及病理观察: 断颈处死血清 HBsAg 阳性的转基因小鼠 8 只(雌性 4 只, 雄性 4 只)和正常小鼠 2 只(雌性 1 只, 雄性 1 只)取肾脏、膀胱。以 10% 中性甲醛固定 48 h, 石蜡包埋, 常规切片, 脱蜡, HE 染色, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光镜下观察。按免疫组化试剂盒操作说明检测转基因小鼠肾脏、膀胱中 HBsAg、HBcAg 的表达情况。

1.3.6 转基因小鼠肾脏、肝脏 HBV-DNA 定量检测: 断颈处死血清 HBsAg 阳性的转基因小鼠 26 只取肾脏、肝脏。按组织 DNA 抽提试剂盒操作说明进行肝脏、肾脏组织 DNA 提取, 并进行 real-time PCR 检测 HBV-DNA, 分析肾脏和肝脏 HBV-DNA 的阳性率及复制水平。

1.4 统计学方法

定量资料均采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)方式表示。当进行两组数据间的比较时采用 *t* 检验。当进行多组间比较时: 组间方差齐时采用单因素多水平设计定量资料方差分析(ANOVA); 组间方差不齐时采用非参数检验。数据资料采用 SPSS 15.0 进行统计学分析, 并以 $P < 0.05$ 表示组间数据的差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HBV 相关指标检测结果

ELISA 检测结果显示转基因小鼠尿液中可检测到 HBsAg、HBeAg, 以血清 HBsAg 阳性为基数尿液 HBsAg 阳性率达 100%、HBeAg 达 66.99%, 未检测到相关抗体(HBsAb、HBeAb、HBcAb); 血液中可检测到 HBcAb, 且阳性率达 100%。Real-time PCR 结果显示尿液和血液中存在 HBV-DNA 的复制, 拷贝数可达 $10^3 \sim 10^5$ (表 1)。

2.2 转基因小鼠尿液中 HBsAg 滴度特点

对血清 HBsAg 阳性的转基因小鼠 120 只(雌性 60 只, 雄性 60 只)尿样进行 ELISA 分析, 样本做 1/5 000 稀释, 检测尿液和血清中 HBsAg 的阳性率的关系及表达水平的高低。结果发现, 尿液和血清中 HBsAg 的阳性率均为 100%, 但血清比尿液滴度高(表 1), 具有统计学意义($P < 0.001$), 且主要由于雌鼠尿液 HBsAg 滴度过低导致(图 1)。雌性转基因鼠尿液 HBsAg 滴度低于血液, 具有统计学意义($P < 0.0001$), 雄性转基因鼠尿液与血液滴度相当(图 1), 不具有统计学意义($P > 0.05$)。尿液雄性小鼠比雌性小鼠滴度高(图 1), 具有统计学意义($P < 0.0001$), 血清雄性小鼠比雌性小鼠滴度略高(图 1), 但不具有统计学意义($P > 0.05$)。这表明, 转基因小鼠尿液中 HBsAg 的含量与性别有关, 雄性高于雌性。

2.3 转基因小鼠尿液中 HBeAg 表达特点

2.3.1 转基因小鼠尿液中 HBeAg 阳性率及与性别关系: 对血清 HBsAg 阳性的转基因小鼠 541 只(雌性 291 只, 雄性 250 只)进行 ELISA 分析检测尿液和血清中 HBeAg 的阳性率及与性别关系。结果发现, 尿液 HBeAg 阳性率为 66.99%, 血清为 9.17%。雌鼠尿液和血清阳性率分别为 48.17%、8.66%, 雄鼠尿液和血清阳性率分别为 87.84%、9.8%。(表 2)统计学分析表明, 尿液和血液阳性率

的差别具有统计学意义($P < 0.001$);雌性小鼠和雄性小鼠血清 HBeAg 阳性率的差别不具有统计学意义($P > 0.05$);但雌性小鼠和雄性小鼠尿液 HBeAg 阳性率的差别具有统计学意义($P < 0.0001$)。

2.3.2 转基因小鼠尿液中 HBeAg 表达滴度水平及性别的影响:对尿液 HBeAg 阳性的转基因小鼠 209 只(雌性 79 只,雄性 130 只)进行 A 值比较分析,结果发现雄性小鼠比雌性小鼠滴度高(图 2),具有统计学意义($P < 0.0001$)。这表明,转基因小鼠血清中 HBeAg 的含量与性别有关,雄性鼠 HBeAg 滴度高于雌性鼠,且可长期稳定表达,随月龄变化滴度水平变化不显著。

2.4 转基因小鼠尿液中 HBV-DNA 的复制水平

对血清 HBsAg 阳性的转基因小鼠 30 只进行 real-time PCR 检测分析尿液和血清中 HBV-DNA 的阳性率及复制水平。结果发现,HBV-DNA 阳性率尿液和血清阳均为 100%,拷贝数达 $10^3 \sim 10^5$ 。统计学分析表明,转基因小鼠尿液和血清 HBV-DNA 复制水平的差别不具有统计学意义($P > 0.05$)。

为确定 HBV 转基因鼠尿液中乙肝病毒指标组织来源,我们又进一步进行了下面项目的实验研究。

2.5 水动力转染 HBV 的小鼠实验结果

对所有实验小鼠进行 ELISA 分析和 real-time PCR 检测,结果发现对照组小鼠血清、尿液未检测到 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA。实验组的小鼠尿液中未检测到 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA,而血清中则有检测到,且处于高水平。表明 HBV 质粒经水

动力可以转染到正常鼠肝细胞内进行复制表达,并且相关蛋白可以释放进入血液,但血液中的 HBV 相关指标正常情况下不能通过肾小球滤过进入尿液中。

2.6 RNA 干扰方法抑制 HBV 表达转基因鼠实验结果

对所有实验转基因小鼠于实验前和试验后 5 d 进行 ELISA 分析检测血清和尿液 HBsAg 的表达情况,结果发现,RNAi 组血清 HBsAg 的表达水平变化明显,HBsAg 平均 A 值同对照组相比大幅降低(图 3),具有统计学意义($P < 0.0001$);但尿液中 RNAi 组和对对照组 HBsAg 的滴度没有明显改变,差别不具有统计学意义($P > 0.05$)(图 3)。表明 RNAi 在 hydrodynamic 肝脏靶向性的作用下能够抑制转基因小鼠肝细胞内 HBV 的表达,进而影响血液中 HBV 相关指标的滴度,但影响不了转基因鼠尿液中 HBV 相关指标的滴度。这表明 HBV 转基因鼠血液中 HBV 相关指标的显著变化并没有影响其尿液中 HBV 相关指标。

2.7 乙肝患者 HBV 阳性血清感染正常小鼠实验结果

对所有实验小鼠进行 ELISA 分析和 real-time PCR 检测,结果发现尾静脉注射人 HBV 阳性血清的小鼠尿液中未检测到 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA,而血清中则有检测到,且处于较高水平。表明血液中的 HBV 相关指标不能通过肾小球滤过进入尿液中,进一步表明 HBV 转基因鼠血液和尿液中 HBV

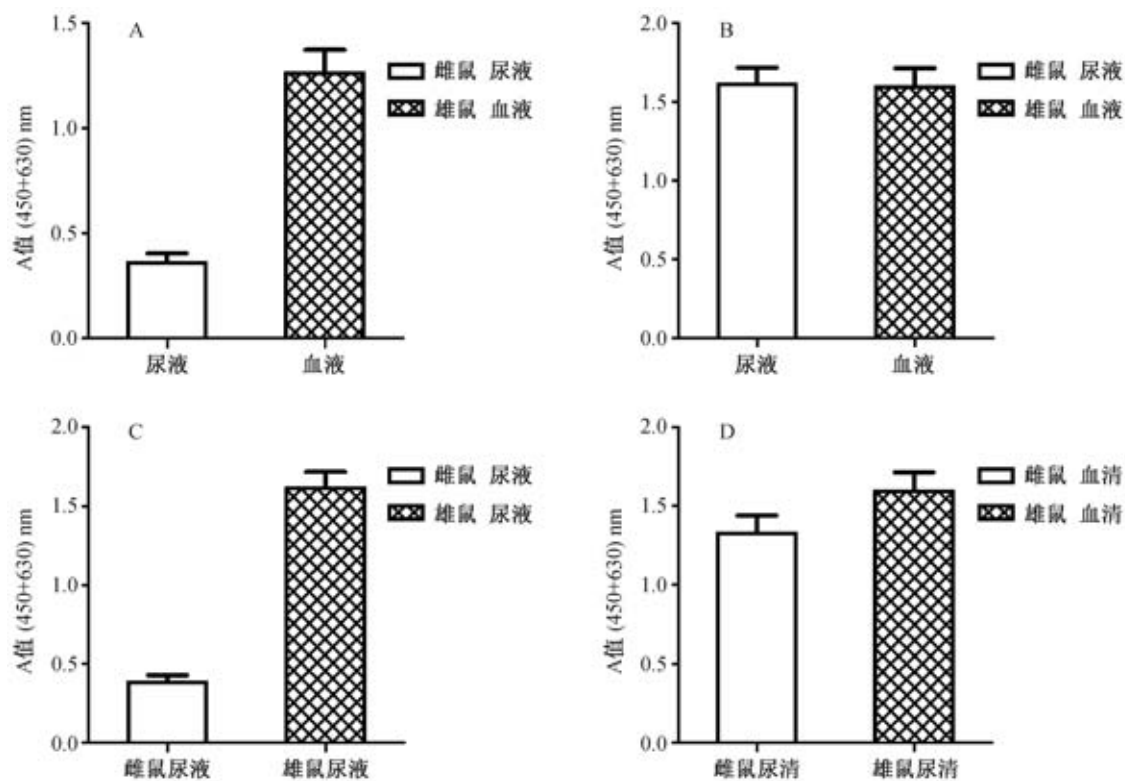
表 1 HBV 相关指标检测结果
Tab.1 Detection of HBV-related indexes in the blood and urine

项目 Itmes	尿液 Urine			血液 Blood		
	动物数	结果/含量	阳性率(%) *	动物数 n	结果/含量	阳性率(%)
	n	Content	Positive rate		Content	Positive rate(%)
HBsAg(IU/mL)	60	6674 ± 619.8	100	60	16470 ± 2704	100
HBeAg(A 值)	312	0.127 ± 0.007	66.99	229	0.104 ± 0.072	9.17
HBsAb(A 值)	32	阴性	—	28	阴性	—
HBeAb(A 值)	30	阴性	—	30	阴性	—
HBcAb(A 值)	35	阴性	—	35	0.214 ± 0.057	100
HBV-DNA(copy/mL)	30	$10^3 \sim 10^5$	100	30	$10^3 \sim 10^5$	100

注:以血清 HBsAg 为阳性 Notes. Serum HBsAg is considered as positive

表 2 转基因小鼠血液和尿样中 HBeAg 阳性率比较
Tab.2 Comparison of HBeAg positive rates in the blood and urine of transgenic mice

动物 Animal	尿液 Urine		血液 Blood	
	动物数 n	阳性率	动物数 n	阳性率 Positive rate
	Number of mice	Positive rate	Number of mice	
转基因小鼠 Transg. mice	312	66.99%	229	9.17%
雌鼠 Female	164	48.17%	127	8.66%
雄鼠 Male	148	87.84%	102	9.8%

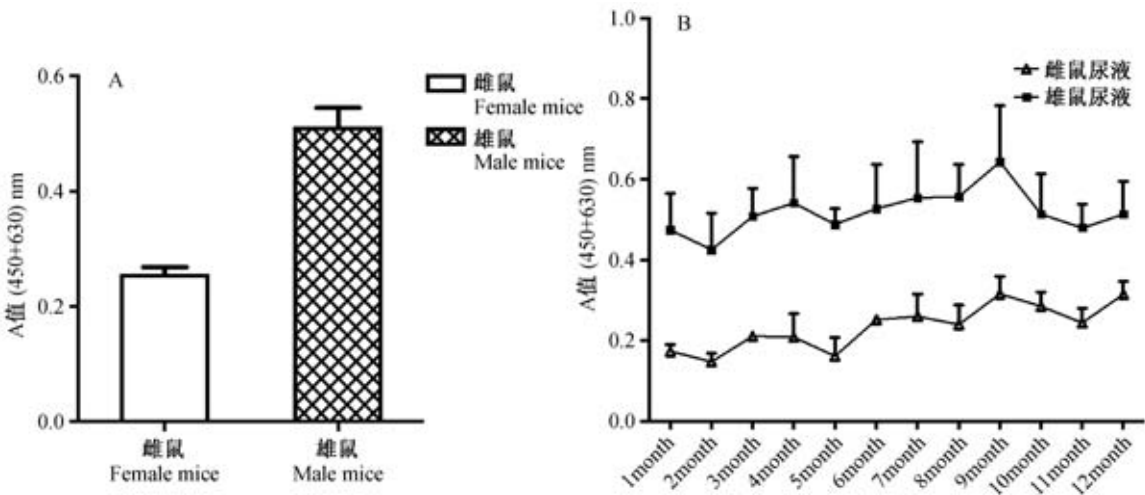


A: 雌性鼠尿液和血清中 HBsAg 滴度, B: 雄性鼠尿液和血清中 HBsAg 滴度, C: 雌雄性转基因小鼠尿液 HBsAg 表达水平, D: 雌雄性转基因小鼠血清 HBsAg 表达水平

图 1 转基因小鼠尿液和血清中 HBsAg 的阳性率和滴度水平比较 (均以 1/5 000 稀释样本)

Figure A shows HBsAg titer in urine and serum of female mice; Figure B shows HBsAg titer in urine and serum of male mice; Fig. C shows HBsAg expression level in the urine of female transgenic mice; Fig. D shows HBsAg expression level in the serum of female transgenic mice.

Fig. 1 Comparison of HBsAg positive rate and titer level in the urine and serum of transgenic mice (1/5 000 diluted samples)

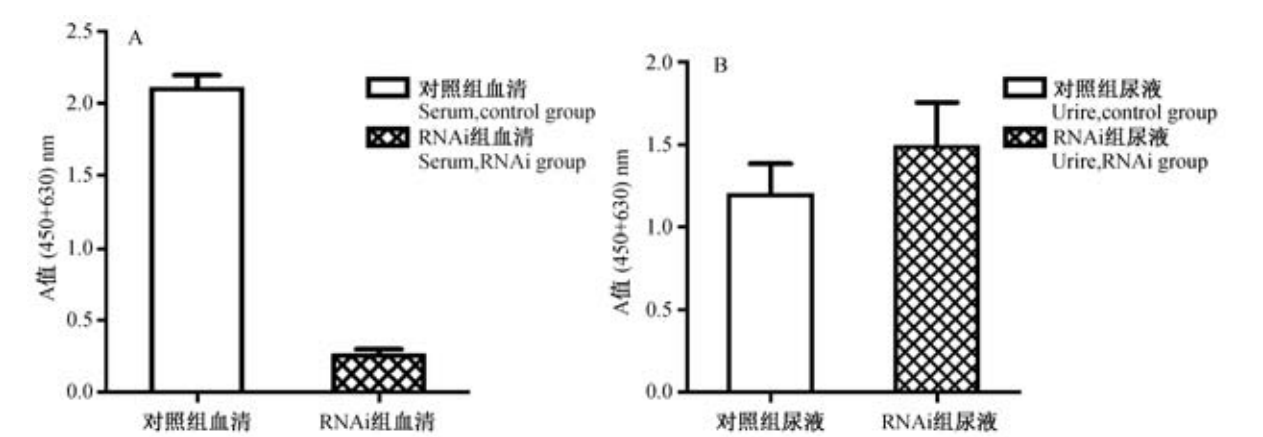


A: 不同性别转基因小鼠尿液 HBeAg, B: 不同性别转基因小鼠尿液 HBeAg 滴度随月龄的变化。

图 2 转基因小鼠尿液中 HBeAg 阳性 A 值与各月龄 HBeAg 阳性结果 A 值

Figure A shows the urine HBeAg in the male and female transgenic mice; Figure B shows changes along with age in month of urine HBeAg titer in the male and female transgenic mice.

Fig. 2 HBeAg positive A value in the urine of transgenic mice at each age in months.

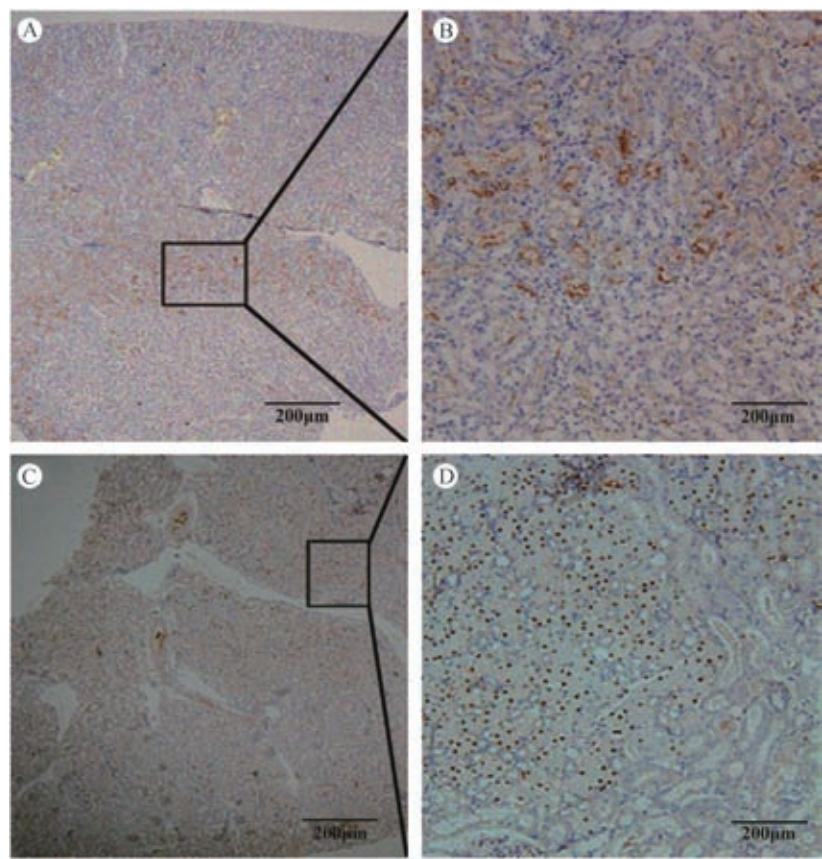


(A:对照组和 RNAi 组血清 HBsAg 的 A 值,B:对照组和 RNAi 组尿液 HBsAg 的 A 值)

图3 对照组和 RNAi 组血清和尿液 HBsAg 中的 A 值比较(均以 1/1 600 稀释样本)

Figure A shows HBsAg A values in the urine of control and RNAi groups. Figure B shows HBsAg A values in the urine of control and RNAi groups.

Fig. 3 Comparison of A values of HBsAg in the serum and urine between control group and RNAi group (1/5 000 diluted samples).



A、B;肾脏 HBsAg 免疫组化,C、D;肾脏 HBcAg 免疫组化

图4 转基因小鼠肾脏 HBsAg、HBcAg 免疫组化

A,B; Kidney, HBsAg staining. C,D; Kidney, HBcAg staining.

Fig. 4 The expression of HBsAg and HBcAg in kidney tissues of the transgenic mice. Immunohistochemical staining.

相关指标来源于两个独立的复制表达体系。

2.8 转基因小鼠肾脏、膀胱组织 HE 染色及免疫组化结果

血清 HBsAg 阳性的转基因小鼠和正常小鼠进

行肾脏、膀胱组织经 HE 染色后,在显微镜下观察,发现其肾脏和膀胱组织的形态、结构无明显的病理改变。转基因小鼠肾脏、膀胱组织 HBsAg、HBcAg 免疫组化检测结果显示肾脏有 HBsAg、HBcAg 的表

达(图4),其中 HBsAg 的以胞浆型为主分布于靠近肾髓质区的肾皮质区;HBcAg 多呈核型分布于肾脏髓质区。膀胱中均未检测到 HBsAg、HBcAg 的表达。

2.9 转基因小鼠肾脏中 HBV-DNA 的复制表达水平

血清 HBsAg 阳性的转基因小鼠肾脏、肝脏组织 HBV-DNA 定量 PCR 检测结果发现,HBV-DNA 阳性率尿液和血清阳均为 100%,拷贝数达 $10^5 \sim 10^7$ 。统计学分析表明,转基因小鼠肾脏和肝脏组织 HBV-DNA 复制水平的差别不具有统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

本研究对该转基因小鼠尿液中 HBV 相关指标进行了检测分析,发现转基因小鼠尿液中存在 HBsAg、HBeAg、及 HBV-DNA,未检测到 HBsAb、HBeAb、HBcAb 的存在。其中 HBsAg 的表达水平较高,血清中 HBsAg 的表达水平高于尿液中 HBsAg 的表达水平,尿液 HBsAg 雄性小鼠的表达水平高于雌性小鼠;而血液 HBeAg 表达水平低与尿液且尿液中 HBeAg 的阳性率高于血液,HBeAg 的表达水平个体间和性别间有明显差异,雄性小鼠 HBeAg 的表达水平高于雌性小鼠;尿液中存在 HBV-DNA 含量达到 $10^3 \sim 10^5$ copy/mL。转基因小鼠年尿液中 HBsAg、HBeAg 的含量与性别有关,雄性高于雌性,主要是由于 HBV 基因的表达受到雌激素和雄激素的共同作用,雌激素能抑制 HBV 转录和 HBV-DNA 复制^[23]。Alomg 等^[24]发现,雌激素能抑制雄性鼠 HBV-DNA 的表达,还能抑制 HBsAg 的合成,补充雌激素可抑制雄性鼠 HBeAg 的产生,对雌性鼠 HBV-DNA 表达的作用甚微。

肾小球滤过膜具有一定的“有选择性”的通透性,分子半径小于 14 nm 通过滤过膜不受限制;半径大于 20 nm 滤过则受到一定限制,半径大 42 nm 则不能通过。而且滤过膜所带电荷对其通透性有很大影响,带负电荷的分子不易通过。HBsAg 的分子大于 42 nm 且带负电荷,因此不能通过肾小球滤出;HBeAg 及其所形成的复合物分子小于 14 nm 但因其是带负电荷,所以也不能够通过肾小球滤出^[25]。本研究通过不同实验方法表明血液中 HBV 相关指标不能通过肾小球的滤过进入尿液,尿液中 HBV 相关指标的表达情况不受血液变化的影响,肾脏是

HBV 的独立的表达复制场所。

本研究使用正常小鼠通过水动力转染方法建立 HBV 急性转染模型,使目的质粒在肝脏获得高水平的复制表达,分泌 HBV 相关指标入血,在造模小鼠尿液中未检测到 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA,而血清中能检测到,且处于高水平表达,表明血液中的 HBV 相关指标正常情况下不能通过肾小球滤过进入尿液中。接着,选取 HBV 转基因小鼠采用水动力转染方法将肝脏作为靶器官,使 shRNA 表达质粒被肝细胞摄取从而对 HBV 转基因小鼠 HBV 产生抑制作用,导致血清中 HBsAg 减少,而不影响尿液中 HBsAg,反过来表明血液中 HBV 相关指标的表达对尿液中的没有影响。最后,我们进行了乙肝患者 HBV 阳性血清感染正常小鼠实验,也进一步表明血液中的 HBV 相关指标不能通过肾小球滤过进入尿液中。上述实验结果表明,血液和尿液中 HBV 相关指标来源于两个独立的复制表达体系。

而且 HBV 并非严格的嗜肝病毒,目前已有研究证实 HBV 可以在包括肾脏在内的多种肝外组织复制^[26]。在对本研究 HBV 转基因小鼠前期的生物学特性研究中也表明乙肝病毒基因在 HBV 转基因小鼠肾脏具有较高水平转录^[9]。同时,HBV 转基因小鼠的肾组织形态、结构无明显的病理改变,表明转基因小鼠尿液中的出现 HBV 相关指标并非由于肾脏病变所致;肾组织检测到 HBsAg、HBcAg (HBsAg 的以胞浆型为主分布于靠近肾髓质区的肾皮质区,HBcAg 多呈核型分布于肾脏髓质区)表明肾脏本身存在 HBV 相关指标的复制表达,这进一步加深我们对乙型肝炎病毒的认识。

参考文献:

- [1] Schweizer J, Valenza-Schaerly P, Goret F, et al. Control of expression and methylation of a hepatitis B virus transgene by strain-specific modifiers [J]. DNA Cell Biol. 1998, 17(5): 427-435.
- [2] Farza H, Salmon AM, Hadchouel M, et al. Hepatitis B surface antigen gene expression is regulated by sex steroids and glucocorticoids in transgenic mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987, 84(5): 1187-1191.
- [3] Aragona E, Burk RD, Ott M, et al. Cell type-specific mechanisms regulate hepatitis B virus transgene expression in liver and other organs [J]. J Pathol. 1996, 180(4): 441-449.
- [4] Davis HL, Brazolot Millan CL. DNA-based immunization against hepatitis B virus [J]. Springer Semin Immunopathol. 1997, 19(2): 195-209.

[5] 康爱君, 董宇红, 田枫, 等. 乙型肝炎病毒转基因小鼠病理学观察 [J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(1): 8-10.

[6] Burk RD, DeLoia JA, Elawady MK, et al. Tissue preferential expression of the hepatitis B virus (HBV) surface antigen gene in two lines of HBV transgenic mice [J]. J Virol. 1988, 62(2): 649-654.

[7] Guidotti LG, Matzke B, Schaller H, et al. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice [J]. J Virol. 1995, 69: 6158-6169.

[8] 刘光泽, 熊一力, 王洪敏, 等. 近交系高表达 HBV 转基因小鼠建立及表达传代稳定性 [J]. 中国兽医学报, 2003, 23(6): 580-582.

[9] 刘光泽. 复制型 HBV 转基因小鼠的建立、生物学特性、应用及无免疫耐受研究 [D]. 第一军医大学, 2007, 5.

[10] 孔祥平, 刘光泽, 易雪瑞. 复制型 HBV 转基因小鼠的建立与应用 [J]. 解放军医学杂志, 2011, 36(9): 954-957.

[11] Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA [J]. Gene Ther, 1999, 6: 1258-1266.

[12] 刘恩岐, 尹海林, 顾为望. 医学实验动物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2008: 201-201.

[13] Chisari FV, Pinkert CA, Milich DR, et al. A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state [J]. Science, 1985, 230: 1157-11601.

[14] Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA [J]. Hum Gene Ther, 1999, 10: 735-1737.

[15] 田粉梅, 付秋霞, 詹林盛. 水动力转染技术及其在肝炎病毒实验动物模型研究中的应用 [J]. 军事医学科学院院刊, 2008, 29(1): 91-93.

[16] Sawyer GJ, Rela M, Davenport M, et al. Hydrodynamic gene delivery to the liver; theoretical and practical issues for clinical application [J]. Curr Gene Ther, 2009, 9: 128-135.

[17] Bonamassa B, Hai L, Liu D. Hydrodynamic gene delivery and its applications in pharmaceutical research [J]. Pharm Res, 2011, 28: 694-701.

[18] 周勇. 水动力转染在 IFN β -Luc 小鼠模型与 HBV 树鼯模型研究中的应用 [D]. 解放军军事医学科学院, 2011, 5.

[19] Kemphues KJ, Guo S. par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed [J]. Cell, 1995, 81(4): 611-620.

[20] Uprichard SL. The therapeutic potential of RNA interference [J]. FEBS Letters, 2005, 579(26): 5996-6007.

[21] 张学智, 山长亮, 叶虹虹, 等. RNA 干扰在抗乙肝治疗中的应用及其研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(6): 631-636.

[22] 吕娜, 武芳, 刘素霞. RNA 干扰抗乙肝病毒的研究进展 [J]. 河北化工, 2013, 36(2): 35-38.

[23] 朱明明. 雌激素代谢相关基因 CYP17, COMT 多态性与乙型肝炎病毒感染后肝硬化、肝细胞癌的关系 [D]. 山东大学, 2008, 5.

[24] Jilma B, EichlerHG, Koppl C, et al. Effects of testosterone on serum levels of hepatitis B surface antigen and HBV-DNA in men [J]. Liver, 1998, 18(3): 162-165.

[25] 陈立章. 乙型肝炎病毒在肾脏、腮腺、卵巢组织中的存在及其意义 [D]. 中南大学, 2004, 5.

[26] Chen LB, Chen PL, Wang GL, et al. Ultrastructural study on extrahepatic infection of duck hepatitis B virus in ducks [J]. Chin Med J, 1992, 105(3): 212-216.

[修回日期] 2016-03-28

(上接第 52 页)

参考文献:

[1] 童继春, 翟光地, 黄晓燕, 等. 电视胸腔镜辅助下建立猪心肌梗死模型 [J]. 江苏大学学报(医学版), 2010, 20(6): 485-487.

[2] 李连达, 周晓辉, 吴理茂. 应用电视辅助胸腔镜制作慢性微创心肌梗死模型的研究 [J]. 中华中医药学, 2008, 26(3): 453-457.

[3] 刘洁, 曲极冰, 曲绍春. 复方红景天对犬实验性心肌梗塞的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 1997, 3(5): 29-32.

[4] 陈心培, 张瑜, 梁卓, 等. 比格犬与杂种犬右心室快速起搏至房颤模型比较 [J]. 解放军医学院学报, 2014, 35(6): 605-607.

[5] 王永光. 微创、微创外科与微创医学 [J]. 中国医刊, 2004, 39(1): 53-54.

[6] 江佩蓉, 张宁, 吴旭辉. 电视胸腔镜与传统开胸手术患者肺功能对比 [J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(5): 583-584.

[修回日期] 2016-03-04

新生儿缺氧缺血脑损伤大鼠模型的制备

庞 炜¹, 曹帅帅², 李树祎², 田雨光¹, 顾为望¹

(1. 南方医科大学实验动物中心, 广州 510515; 2. 广州医科大学口腔教研室, 广州 510182)

【摘要】 目的 在高原低压环境模拟仓内,模拟新生儿在高原环境下缺氧缺血脑损伤的过程,制备不同海拔高度下高原脑损伤大鼠模型。**方法** 10日龄的SD新生大鼠32只,随机分为4组,即A组(对照组)和3个实验组:B组(2 000 m组)、C组(4 000 m组)、D组(6 000 m组)。对照组大鼠在屏障环境中饲养,实验组大鼠置于高原低压环境模拟仓结合运动的方法制作新生儿高原脑缺氧缺血模型,运动方式为在舱内游泳槽进行60 min/d的游泳运动,且在高原低压环境模拟仓内生活时间每天不得少于20 h。每组大鼠分别在第3、7、11、15天用Zea Longa 5分制评分标准进行行为学评分并且于第15天采集静脉血,在扫描电镜下观察红细胞形态。每组处死后取脑组织进行HE染色和TTC染色。**结果** (1)神经病学评分:实验组B组、C组、D组行为学评分与对照组大鼠相比,行为学评分差异显著($P < 0.05$),D组与对照组相比差异非常显著($P < 0.01$)。(2)HE染色结果显示:与对照组大鼠相比,实验组大鼠均有炎症细胞浸润,且炎症细胞浸润程度与海拔高度成正相关。(3)TTC染色表明:在高原环境下大鼠的大脑皮质缺血明显。(4)电镜下观察红细胞形态显示:实验组B组呈帽状结构;C组呈不规则形;D组呈锯齿状。**结论** 本研究采用高原低压环境模拟仓结合运动模拟高原环境制作新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)的模型,该模型稳定、可靠,比其他方法更符合缺血缺氧脑损伤的发病机理,与临床贴近,可用于相关研究。

【关键词】 新生儿脑缺氧缺血性脑病;TTC染色;扫描电镜;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)06-0061-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.06.012

Preparation of a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy

PANG Wei¹, CAO Shuai-shuai², LI Shu-yi², TIAN Yu-guang¹, GU Wei-wang¹

(1. Experimental Animal Center, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. Department of Stomatology, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China)

【Abstract】 Objective To simulate the process of hypoxic-ischemic brain injury at high altitude in a simulated cabin with plateau low pressure environment, and to prepare a rat model of cerebral injuries at different high altitudes. **Method** Thirty-two 0-day-old neonatal SD rats were divided into four groups, namely group A (control group) and three test groups: group B (2000 m group), group C (4000 m group), and group D (6000 m group). The rats of control group were reared in a barrier environment. The rats of test groups were placed in a simulated cabin with plateau low pressure environment, and to prepare neonatal cerebral ischemia-hypoxia model by sport activities. The sport movements were carried out in the cabin in a swimming groove 60 min/d, and not less than 20 hours a day at high altitude low pressure

【基金项目】 高新区发展引导专项(2012B011000004);广东省科技基础条件建设项目(2012B060300003);高新区发展引导专项(2010A011200003);广东省科技基础条件建设项目(2013B030300004);广东省科技基础条件建设项目(2013B060300001);广东省科技基础条件建设项目(2010B060500001);国家国际科技合作专项项目(2011DFA33290)。

【作者简介】 庞炜(1989-),女,硕士,南方医科大学,主要从事实验动物的研究。E-mail: 1583281060@qq.com。

【通讯作者】 田雨光(1987-),男,博士,南方医科大学,主要从事实验动物的研究。邮箱 471977663@qq.com;顾为望(1956-),男,教授,博士研究生导师,南方医科大学,主要从事实验动物与比较医学的研究。E-mail: guww100@163.com。

environment. Zea Longa 5 point scale standard was used to determine the behavioral scores at the 3th 7th 11th 15th days, and samples were collected on the 15th day to observe red blood cell morphology using HE and 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining and ultrastructure by scanning electron microscopy. **Result** (1) The neurological scores of the test groups A, B, C were significantly different from that of the control group ($P < 0.05$), and the scores of test group D and control group were very significantly different ($P < 0.01$). (2) The histopathological examination using HE staining showed inflammatory cell infiltration in all rats of the test groups, and the extent of inflammatory cell infiltration was positively correlated with the increase of altitude. (3) The histopathology with TTC staining revealed prominent ischemia in the cerebral cortex of rats in the plateau hypoxic environment. (4) Scanning electron microscopy showed that the rat erythrocytes were cap-like in the group B, irregular in the group C, and zigzag shape in the group D. **Conclusions** In this study, a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) is successfully established by hypoxic cabin combined with sport activity. This model is stable, reliable, more closely mimicking the pathogenesis and clinical manifestation of neonatal HIE than models prepared with other methods, therefore, may be used in related research.

【Key words】 Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy, Hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE; 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride, TTC; Histopathology; Scanning electron microscopy; Rats

缺氧缺血性脑损伤 (hypoxic-ischemic brain damage, HIBD) 是因脑组织部分或完全缺氧、脑血流量减少或暂停导致的脑损伤,最终可造成神经细胞的凋亡和坏死。其中一种高发人群为新生儿,称为新生儿缺氧缺血性脑病 (hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)^[1-3]。是指围产期窒息缺氧所引起的脑损伤,严重者可造成永久性神经功能损害,是儿童神经系统损伤的常见原因之一。重度 HIE 患儿即使存活下来,也常患有脑瘫、智力障碍、癫痫等严重的中枢神经系统后遗症^[4,5]。目前临床上对于 HIE 的治疗主要局限于护理及支持疗法。长期以来,研究和开发有效的治疗 HIE 药物,是新生儿科医学研究的重要任务。近年来,神经干细胞在胚胎和成年个体神经系统中的发现以及体外培养成功为缺氧缺血性脑病的细胞移植治疗和基因治疗,提供了新的方法^[6,7]。在了解这些治疗方案疗效及其作用机制的研究中,HIE 动物模型起到了非常重要的作用。在高原地区,大气氧分压较低,由于高原低氧的影响,新生儿缺氧缺血性脑病 (HIE) 在高原地区发病率比较高^[8]。本实验采用高原低压环境模拟仓结合大鼠游泳运动的方法建立在高原地区新生儿缺氧缺血性脑病模型,观察其行为学、脑组织病理变化、脑 TTC 染色和红细胞,为 HIE 在高原地区的临床研究做基础实验准备。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:10 日龄的 SPF 级 SD 新生大鼠 32 只,体重为 30 ~ 50 g,雄性,购自南方医科大学实

验动物中心【SCXK(粤)2011-0015】,使用许可证号:【SYXK(粤)2011-0074】,饲养条件为屏障环境,室温(20 ~ 26)℃,光照控制 12 h (7:00 a. m. ~ 7:00 p. m.),自由采食饮水。

1.1.2 试剂与设备:高原低压环境模拟仓 LT/ACR-2002(北京易盛泰和科技有限公司);扫描电镜 Hitachi 型号 S-3400N(日本日立公司);TTC 染料(南京奥多福尼生物科技有限公司)

1.2 方法

1.2.1 动物分组:32 只 10 日龄 SD 大鼠,编号后,随机分成 4 组,即:对照组(A组)、2 000 m 海拔高原组(B组)、4 000 m 海拔高原组(C组)和 6 000 m 海拔高原组(D组),每组 8 只。对照组(A组)大鼠在屏障环境正常饲养,实验组大鼠在高原低压环境模拟仓生活和运动 15 d(温度:(26 ± 2)℃;湿度:45% ± 5% RH;正常昼夜节律)运动方式为在舱内游泳槽进行 60 min/d 的游泳运动,大鼠不能以尾部支持底部得到休息,水温为 30℃,水深为鼠尾长 1.5 倍。实验组大鼠在高原低压环境模拟仓内生活时间每天不得少于 20 h(其余时间为换水、加饲料、清洁)^[9-11]。

1.2.2 神经病学评分:依次在第 3、7、11、15 天取出对照组和实验组大鼠,进行 Zea Longa 5 分制行为学评分,具体评分标准如下:0 分,无神经损伤症状;1 分,对侧前爪不能完全伸展;2 分,行走时向瘫痪侧转圈;3 分,走路不稳,向对侧倾倒;4 分,不能自发行走,意识丧失^[12]。

1.2.3 HE 染色:在第 15 天从对照组和实验组分别取出 4 只新生鼠,以 3% 戊巴比妥钠(1.5 mL/kg)

腹腔注射麻醉,仰卧位固定于鼠板上,剪开胸腔,暴露出心脏,先用手术剪剪开右心耳,再用 1 mL 注射器进入左心室插进主动脉,先灌注生理盐水 150 mL 左右,再灌注 10% 多聚甲醛 400 mL 左右,断头取出全脑。置于 40 g/L 多聚甲醛固定,脱水、透明、浸蜡、包埋、冠状切片,厚 4 μm ,制作常规病理切片,进行苏木精-伊红染色后用光学显微镜观察。HE 染色切片制作流程如下:(1)切片入二甲苯 2 次,每次 20 min,以脱去石蜡;(2)入 100%、95%、85% 的酒精,每次 10~15 min;(3)入苏木精染液染色 5 min;(4)用自来水洗去多余的染液;(5)入盐酸酒精约 10 s 分色,至细胞核着色较深,其它结构无色时为宜;(6)自来水缓洗 10 min,使苏木精“蓝化”,胞核呈蓝色;(7)入 1% 伊红染液染色约 2 min;(8)用蒸馏水洗去多余的伊红;(9)经浓度递增的酒精脱水;(10)入 100% 酒精脱水 2 次,每次约 10 min;(11)入二甲苯透明 2 次,每次约 15 min;(12)擦去载玻片上多余的二甲苯,在切片上滴中性树胶 1~2 滴,加盖玻片封片,干燥环境保存,镜下观察、拍照^[13]。

1.2.4 TTC 染色: 在第 15 天从 A、B、C、D 4 组中各取出剩余 4 只新生大鼠,采用颈椎脱臼处死,小心快速取出全脑,置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻 20 min,取出用刀片切片,第 1 刀在脑前极与视交叉连线中点处;第 2 刀在视交叉部位;第 3 刀在漏斗柄部位;第 4 刀在漏斗柄与后叶尾极之间,切成五六片,每隔 2 mm 切一片。将切片置于 1% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)用锡箔纸盖住后,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中避光染色 10~30 min,不时翻动脑片,使均匀接触到染色液,染色后进行拍照,观察脑组织^[14];未缺血坏死区颜色呈淡红色,已缺血坏死组织呈白色。

1.2.5 扫描电镜: 在第 15 天取对照组和模拟组共 32 只大鼠,采静脉血 1~2 滴直接滴 5 mL 新鲜配制的质量分数 2.5% 戊二醛固定液中,轻轻振荡后静置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中半小时以上,取适量已固定好血样于 1.5 mL 离心管,低速离心(1 500 r/min)去上清液,0.1 mol/L PBS 缓冲液漂洗 3 次,每次 5 min;体积分数 50%、70%、80%、90%、100% 酒精(2 次)脱水,每次都需低速离心(1 500 r/min),最后滴于预先覆有 Formvar 膜的洁净盖玻片上,室温自然干燥^[15]。3 d 后用双面胶带将干燥后的盖玻片粘贴在样品台上,SUPER CT-2000 离子溅射仪喷金,Hitachi S-3400N 扫描电镜下观察并拍照。

1.2.6 数据分析: 所有数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,SPSS 13.0 软件进行统计分析,采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异非常显著。

2 结果

2.1 神经病学评分

对照组行为学均正常,在行为学评分中为 0 分,而实验组大鼠行为学异常,主要表现为一侧肢体感觉和运动功能障碍和平衡功能的异常。实验组大鼠评分随海拔升高而升高,行为异常程度与海拔高度呈正相关。并且实验组大鼠在第 3、7、11、15 天行为学评分逐渐升高(表 1),这一数据表明在高原环境下缺氧时间越长脑损害越严重,实验表明对照组与各实验组差异有显著性意义($P < 0.05$)海拔 6000 m 组与对照组比较差异非常显著($P < 0.01$)(图 1)。

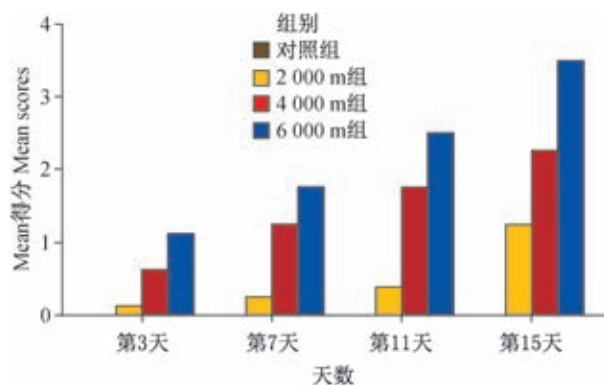


图 1 不同海拔高度下新生大鼠神经病学评分

Fig.1 Neurological scores of the neonatal rats treated by different altitude hypoxia

2.2 脑组织病理学改变

对照组脑组织神经细胞、神经胶质细胞大小、外形正常,未出现脑水肿;在海拔 2 000 m 大脑皮质轻度萎缩,神经元细胞轻度水肿,胶质细胞轻度增生;在海拔 4 000 m 大脑皮质中度萎缩,神经元细胞中度水肿,胶质细胞中度增生;在海拔 6 000 m 室管膜细胞重度水肿(图 2)。

2.3 TTC 染色结果

TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)是脂溶性光敏感复合物,它是呼吸链中吡啶—核苷结构酶系统的质子受体,与正常组织中的脱氢酶反应而呈红色,而缺血组织内脱氢酶活性下降,不能反应,故不会产生变化呈苍白^[16]。对照组 TTC 染色结果为红色,未出现缺血缺氧表现;海拔 2 000 m 出现轻度改变,

大脑皮质出现小片苍白;海拔 4 000 m 大脑皮质区可明显看见苍白区域;海拔 6000 m 接近一半出现苍白区(图 3)。利用 Image-Pro Plus 做出海拔 2 000 m 组脑缺氧面积为 26.6%,海拔 4 000 m 组脑缺氧面积为 34.3%,海拔 6 000 m 组脑缺氧面积为 56.6%,而对照组则为正常。

2.4 电镜下红细胞

在扫描电镜下可以看见对照组红细胞呈双凹圆盘状,在海拔 2 000 m 下电镜表现为轻度改变呈

帽状结构;在海拔 4 000 m 下表现为不规则形;在海拔 6 000 m 下表现为锯齿状,部分红细胞会出现空洞,崩解(图 4)。

3 讨论

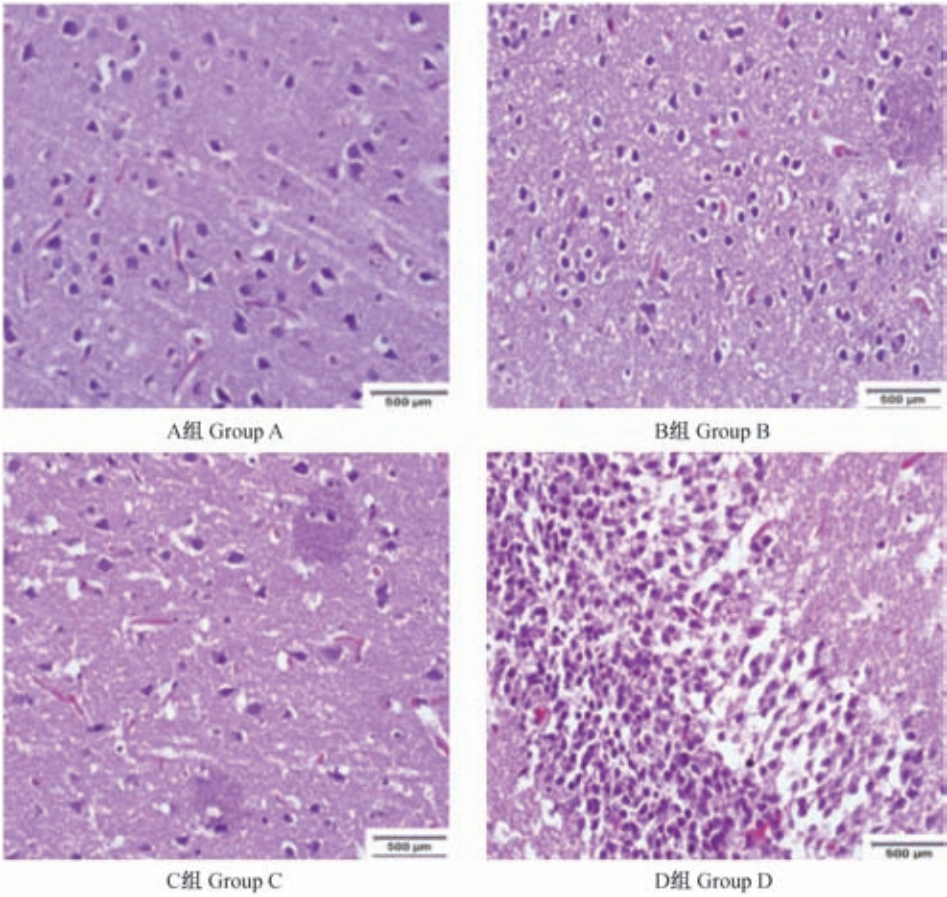
新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)是指围产期窒息缺氧所引起的脑损伤,严重者可造成永久性神经功能损害,是儿童神经系统损伤的常见原因之一。重度 HIE 患儿即使存活下来,也常患有脑瘫、智力障

表 1 不同海拔高度下新生大鼠神经病学评分

Tab.1 Neurological scores of the neonatal rats treated by different altitude hypoxia

组别 Groups	第 3 天	第 7 天	第 11 天	第 15 天
对照组(A)	0	0	0	0
2000 m 组(B)	0.125 ± 0.35	0.25 ± 0.46	0.375 ± 0.52	1.25 ± 0.46 *
4000 m 组(C)	0.625 ± 0.52	1.25 ± 0.71	1.75 ± 0.46	2.25 ± 0.46 *
6000 m 组(D)	1.125 ± 0.35	1.75 ± 0.71	2.5 ± 0.53	3.5 ± 0.53 **

* P < 0.05 2 000 m 组、4 000 m 组和对对照组相比;6 000 m 组与对对照组相比 ** P < 0.01.
* P < 0.05, Control group compared with the 2 000 m and 4 000 m groups; ** P < 0.01, Control group compared with the 6 000 m group.

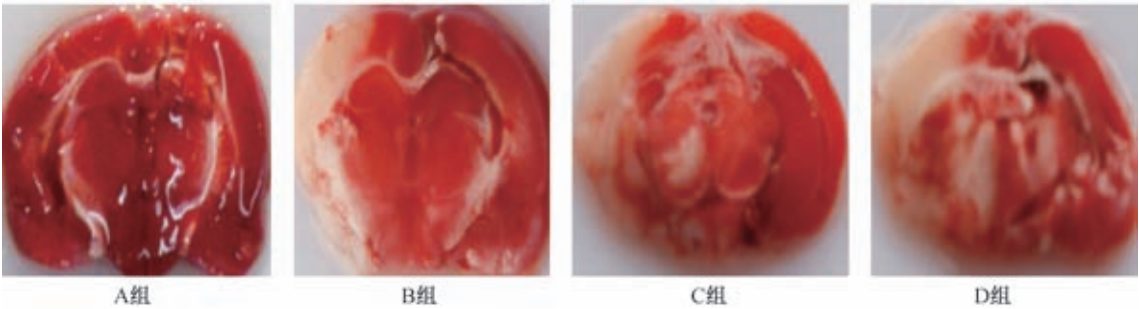


A 组为对照组;B 组为 2 000 m 组,胶质细胞轻度增生;C 组为 4 000 m 组,胶质细胞中度增生;
D 组为 6 000 m 组,室管膜细胞重度水肿

图 2 不同海拔下新生大鼠脑病理 HE 染色切片(×400)

Note. A is the control group. B is the 2 000 m group, showing mild hyperplasia of glial cells. C is the 4 000 m group, showing moderate hyperplasia of glial cells. D is the 6 000 m group, showing severe edema of ependymal cells.

Fig.2 Histological changes of the neonatal rat brain tissues treated by different altitude hypoxia. HE staining. ×400

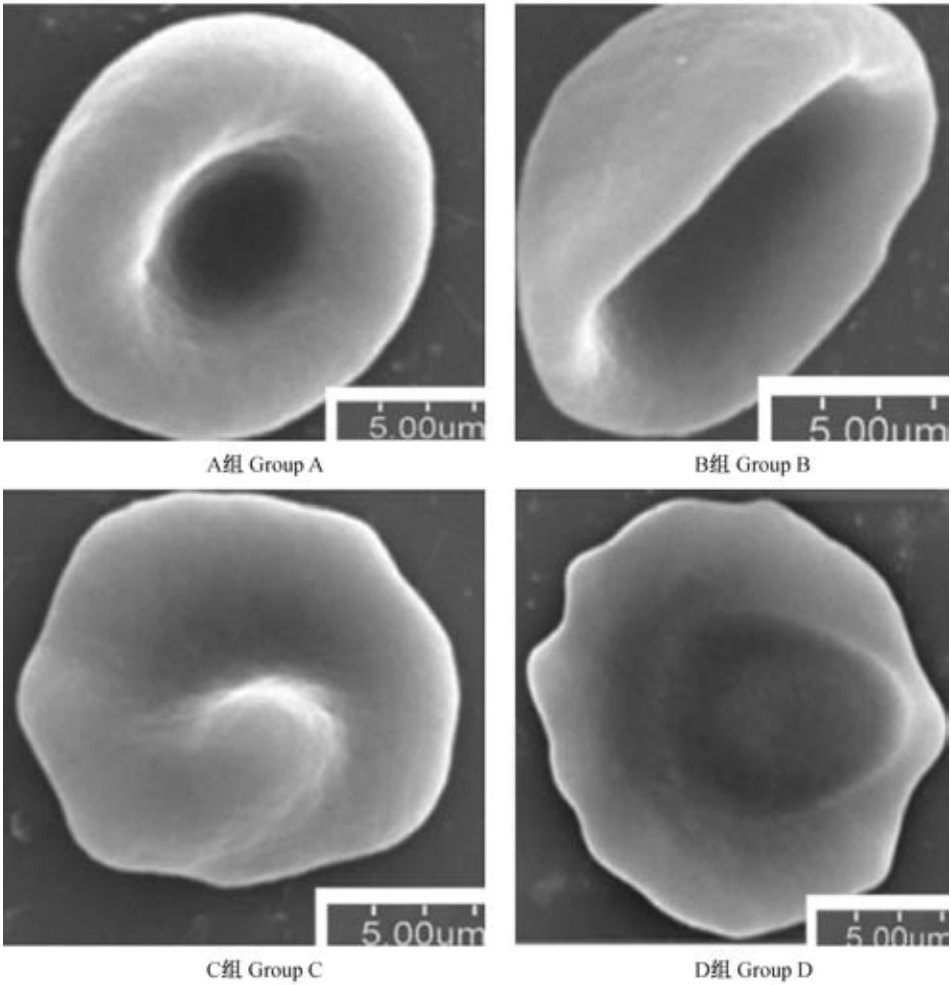


A 组为对照组;B 组为 2 000 m 组,大脑皮质出现小片苍白;C 组为 4 000 m 组,大脑皮质苍白区明显;
D 组为 6 000 m 组,大脑皮质近一半出现苍白

图 3 不同海拔下新生大鼠脑切片 TTC 染色

Note. A is the control group. B is the 2 000 m group, showing small pale areas of cerebral cortex. C is the 4 000 m group, showing more distinct pale area of cerebral cortex. D is the 6 000 m group, showing nearly half of the cerebral cortex became pale.

Fig.3 Gross appearance of the brains of neonatal rats, treated by different altitude hypoxia. TTC staining



A 组为对照组;B 组为 2 000 m 组呈帽状结构;C 组为 4 000 m 组呈不规则形;D 组为 6 000 m 组呈锯齿状

图 4 不同海拔下新生大鼠电镜下红细胞(×10 000)

Note. A is the control group. B is the 2 000 m group, showing cap-like shape. C is the 4 000 m group, showing irregular shape. D is the 6 000 m group showing zigzag shape.

Fig.4 Scanning electron microscopic appearance of erythrocytes of the neonatal rats treated by different altitude hypoxia. ×10 000

碍、癫痫等严重的中枢神经系统后遗症在临床多见,死亡率高。而在高原地区,大气氧分压较低,由于高原低氧的影响,新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)在高原地区发病率比平原地区更高。所以建立高原环境下的缺氧缺血动物模型是了解 HIE 在高原环境下的发病机制,评估各治疗方法疗效的重要研究基础。本实验在模型制备上不同于近年来常见的缺氧缺血模型制作方法:比如孕鼠腹腔感染、大脑中动脉阻塞、结扎双侧颈动脉等,孕鼠腹腔感染的致死率比较高;大脑中动脉阻塞的方法制作模型虽然更贴近新生儿缺氧缺血临床病因,但是线栓法结扎大脑中动脉操作复杂有难度,不易成功;结扎双侧颈动脉的方法虽然比大脑中动脉阻塞操作简单,但是手术后温度要保证在 $36^{\circ}\text{C} \sim 37^{\circ}\text{C}$,不然术后动物死亡率高。^[17] 上述三种造模方法会造成损伤,难以量化。本实验采取的是模拟高原情况下缺氧缺血合并运动的模型制作方法,因为这种方法容易操作,可以量化,并且结合游泳运动的方法,模拟人在高原环境中运动下的脑缺氧缺血,更加接近高原环境临床疾病的发生的条件,故选取此方法。

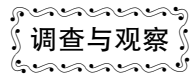
行为学测试结果表明,实验组大鼠评分为明显高于对照组,差异有显著性意义($P < 0.05$),实验组大鼠评分随海拔升高而升高,行为异常程度与海拔高度呈正相关,并且通过实验组大鼠在第 3、7、11、15 d 行为学评分可以看出高原环境下缺氧时间越长脑损害越严重。病理结果表明,随着海拔高度从 2 000 m、4 000 m 到 6 000 m 上升,脑组织的病理变化逐渐加重,在海拔 2 000 m、4 000 m 以胶质细胞增生为主,而在 6 000 m 以室管膜细胞重度水肿为明显改变。TTC 染色结果表明在模拟高原环境下新生大鼠在不同海拔高度显示出不同程度的缺血表现,并且随着海拔高度的增高,脑缺血逐渐加重,主要以大脑皮质的缺血为主。扫描电镜的结果表明对照组红细胞的形态为正常双凹圆盘状,实验组在不同海拔高度下缺氧时红细胞的形态有不同程度的改变。以上实验结果均可说明由于在高原环境的缺氧可导致新生大鼠的脑缺氧缺血的形成^[18],则造模成功。

在模型制作中,由于在高原环境下海拔 2 000 m 的高原居民多见,所以 2 000 m 做为实验组的最低海拔组,在此海拔高度上做出的模型更贴近实际情况。为了让实验有比较与对比,更符合高原环境,实验组还加入了 4 000 m 组和 6 000 m 组。而海拔

6 000 m 以上几乎无人居住,为模型分组的最高极限值,所以以海拔 6 000 m 组为实验组的海拔最高组,未选入 8 000 m 组。标准大气压为: 1.013×10^5 Pa,等于 760 mmHg 且每升高 12 m,大气压约下降 133 Pa。由于在不同海拔高度的高原地区,大气压在低于平原地区的情况下新生儿的健康就成为一个迫切的问题。目前应该对高原地区有神经系统异常表现的新生儿进行头颅超声或者头颅 CT 的检查,确诊后及时治疗,而非当地居民的孕妇最好在平原地区待产,以确保新生儿的健康。综上所述,本实验建立了比较理想的高原新生儿缺氧缺血脑损伤模型。

参考文献:

- [1] 才仁卓玛. 高原地区新生儿缺血缺氧性脑病的病历分析[J]. 中国保健营养, 2014, (5): 2776.
- [2] 吴世政. 高原神经医学研究新进展[J]. 中华医学信息导报, 2014, 29(17): 19.
- [3] 韩玉昆. 新生儿缺血缺氧性脑病诊断依据和临床表现[J]. 中华儿科杂志, 1997, 35(2): 99-100.
- [4] Vannucci RC. Hypoxic-ischemic encephalopathy [M]. Am J Perinatol. 2000, 17(3): 113-120.
- [5] 周丛丛, 姜毅, 冯琪, 等. 围产期缺氧性脑损伤患儿神经系统后遗症的早期预测探讨[J]. 中华儿科杂志, 2000, 38: 302-305.
- [6] 余勤, 王艳, 连俊兰, 等. 大鼠骨髓间质干细胞修复缺氧/缺血性脑损伤的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16(1): 34-37.
- [7] 余勤, 李佩佩, 周丽萍, 等. 黄芩联合鞘内移植间充质干细胞对大鼠缺氧缺血性脑损伤修复作用的研究[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(7): 1455-1458.
- [8] 刘彩霞, 舒爱兰. 神经生长因子联合高压氧治疗高原地区新生儿缺血缺氧性脑病的疗效观察[J]. 中国卫生产业, 2011, 8(7): 74-75.
- [9] 杨涛, 黄庆愿. 低压舱内大鼠游泳运动模型的建立[J]. 高原医学杂志, 2012, 22(1): 1-4.
- [10] Kramer K, Dijkstra H, Bast A, et al. Control of physical exercise of rats in a swimming basin [J]. Physiol Behav, 1993, 53(2): 271-276.
- [11] 刘晔, 刘桂华, 陈琰. 模拟海拔 2000 m 和 3000 m 高原训练的不同时期对大鼠骨骼肌蛋白质代谢的影响[J]. 北京体育大学学报, 2002, 25(2): 191-193.
- [12] Carter RJ, Morton J, Dunnett SB. Motor coordination and balance in rodents [M]. Curr Protoc Neurosci, 2001, Chapter 8: Unit 8.12.
- [13] 王年丑, 余香梅. 苏木精-伊红染色法的改进[J]. 山西医药杂志, 2001, 30(2): 106-107.



中国实验动物中鼠管状线虫的分子鉴定和感染调查

高正琴, 李晓波, 冯育芳, 王 吉, 付 瑞, 邢 进, 王淑菁,
魏 杰, 王 洪, 巩 薇, 李冠民, 贺争鸣, 岳秉飞

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

【摘要】 目的 对鼠管状线虫进行分子鉴定和感染调查, 为国家标准的修订提供参考依据。**方法** 923 批 5199 只 SPF 动物(包括: 1 批 5 只猴, 3 批 25 只小型猪, 28 批 55 只兔, 13 批 248 只地鼠, 37 批 198 只豚鼠, 93 批 459 只大鼠, 742 批 4179 只小鼠, 5 批 25 只鸡和 1 批 5 只鸭)和 145 批 1389 只清洁动物(包括: 1 批 3 只兔, 4 批 31 只地鼠, 16 批 157 只豚鼠, 32 批 268 只大鼠和 92 批 930 只小鼠)来自全国 50 个不同的厂家。应用直接镜检实时动态显微视屏摄录技术结合形态学鉴定方法, 进行鼠管状线虫感染筛查。应用多重 PCR 和测序技术, 鉴定分离的鼠管状线虫 ITS(内转录间隔区)、28S rRNA(28S 核糖体 RNA)、nad1(NADH 脱氢酶亚单位 1)和 cox1(细胞色素 C 过氧化物酶亚基 1)基因, 从分子水平上确证鼠管状线虫感染。**结果** 应用直接镜检实时动态显微视屏摄录技术, 从动物中检出鼠管状线虫的虫卵、幼虫和成虫。根据鼠管状线虫的卵细胞、幼虫、雌雄成虫的大小和形态来鉴定虫种。应用多重 PCR 测序技术, 能从分离的单个鼠管状线虫的虫卵、幼虫和成虫中鉴定出 ITS、28S rRNA、nad1 和 cox1 基因, 与其他不同种属的寄生虫无交叉反应。应用直接镜检实时动态显微视屏摄录技术, 从 5199 份 SPF 和 1389 份清洁动物样本中分别检出鼠管状线虫阳性样本 285 份和 135 份。应用多重 PCR 和测序技术, 鉴定证明这些阳性样本中确实含有鼠管状线虫特异性的 DNA。测序结果显示, 不同动物分离的鼠管状线虫的 ITS、28S rRNA、nad1 和 cox1 部分基因序列核苷酸相似性达 100%。SPF 和清洁动物的鼠管状线虫感染率分别为 5.5%(285/5199)和 9.7%(135/1389)。**结论** 应用直接镜检实时动态显微视屏摄录技术联合多重 PCR 测序技术能够快速精准检测鉴定出鼠管状线虫。鼠管状线虫的人兽共患本质可以视为公共卫生的一个预警。良好的动物质量控制对保护人类身体健康和保障人民用药安全具有重要作用。本研究对中国 SPF 和清洁动物的鼠管状线虫进行了分子鉴定和感染调查。

【关键词】 实验动物; 鼠管状线虫; 分子鉴定; 感染调查

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)06-0067-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.06.013

Prevalence and molecular identification of *Syphacia muris* in laboratory animals in China

GAO Zheng-qin, LI Xiao-bo, FENG Yu-fang, WANG Ji, FU Rui, XING Jin, WANG Shu-jing,

WEI Jie, WANG Hong, GONG Wei, LI Guan-min, HE Zheng-ming, YUE Bing-fei

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

【Abstract】 Objective To acquire the prevalence and molecular identification data on *Syphacia muris* and provide reference for the revision of national standard. **Methods** 923 batches of 5199 SPF animals (including one batch of 5

【基金项目】 国家科技支撑计划(No. 2013BAK11B03)。

【作者简介】 高正琴, 副研究员, 研究方向: 病原生物学和快检新技术研究。

【通讯作者】 岳秉飞, 研究员, 研究方向: 实验动物学。

monkeys, 3 batches of 25 mini-pigs, 28 batches of 55 rabbits, 13 batches of 248 hamsters, 37 batches of 198 guinea pigs, 93 batches of 459 rats, 742 batches of 4179 mice, 5 batches of 25 chickens and one batch of 5 ducks) and 145 batches of 1389 clean animals (including one batch of 3 rabbits, 4 batches of 31 hamsters, 16 batches of 157 guinea pigs, 32 batches of 268 rats and 92 batches of 930 mice) came from 50 different manufactures in China. Direct microscopy real-time dynamic video recording techniques in combination with morphological identification method were applied to screen the *Syphacia muris* infestation. A multiple polymerase chain reaction (multiple-PCR) testing of the isolate based on amplification of the conserved portions of the *Syphacia muris* internal transcribed spacer (ITS), 28S ribosomal RNA (28S rRNA), NADH dehydrogenase subunits 1 (nad1) and cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) genes, and the molecular sequencing of the multiple-PCR amplicons was used to confirm the *Syphacia muris* infection. **Results** *Syphacia muris* eggs, larvae and adults were detected by using direct microscopy real-time dynamic video recording technique. *Syphacia muris* were detected based on the morphology and size of ovum, larvae, and female and male adult worms. Multiple-PCR and sequencing were performed to identify ITS, 28S rRNA, nad1 and cox1 genes of DNA extracted from the single egg, larva and adult parasite *Syphacia muris*. This approach allowed the specific identification with no amplicon being amplified from heterogeneous DNA samples, and sequencing confirmed the identity of the amplified sequences. Molecular characterization by multiple-PCR amplification and sequencing of the ITS, 28S rRNA, nad1 and cox1 genes demonstrated the presence of *Syphacia muris*. Multiple-PCR followed by sequencing confirmed 285 of 5199 SPF and 135 of 1389 clean animal samples classified as positive by using direct microscopy real-time dynamic video recording technique in the study as containing *Syphacia muris*-specific DNA. Comparison of the partial sequences of the ITS, 28S rRNA, nad1 and cox1 genes revealed 100% similarity amongst *Syphacia muris* from different animals. The prevalence of *Syphacia muris* infection in SPF and clean animals were 5.5% (285/5199) and 9.7% (135/1389), respectively. **Conclusions** Direct microscopy real-time dynamic video recording technique, multiple-PCR and sequencing can be used to rapidly detect and accurately identify *Syphacia muris*. The zoonotic nature of *Syphacia muris* can be regard as a public health alter, hence the good quality control of animal has an important role in protecting human health and safeguarding people safety. This is the first molecular identification and infection investigation of *Syphacia muris* in SPF and clean animals in China.

【Key words】 laboratory animal, *Syphacia muris*, Molecular identification, Infection investigation

鼠管状线虫隶属于线虫纲(Nematoda)、尖尾目(Oxyurida)、管状科(Syphaciidae)、管状属(*Syphacia*),也称蛲虫(Pinworm),寄居于肠道,轻度感染时无明显临床症状,重度感染时引起神经精神症状、生长发育障碍、腹痛腹泻、肠炎等^[1,2]。鼠管状线虫感染一方面损坏宿主的神经系统、血液循环系统、呼吸系统、消化系统、泌尿生殖系统、皮肤黏膜功能,另一方面影响宿主的肠道生理学、血液学指标,干扰免疫学、营养学、传染病学、自生免疫性疾病等的研究,感染还可传播扩散,增加宿主感染其他病原体的机会^[3-6]。国家标准规定了清洁及以上动物中不得检出全部蠕虫^[7,8],但未见鼠管状线虫(*Syphacia muris*)检测方法,至今尚无精准快速检测鉴定方法,更缺乏全面监测感染数据。本研究应用直接镜检实时动态显微视屏摄录技术检测和形态学鉴定方法联合多重 PCR (multiple polymerase chain reaction, multiple-PCR) 和测序技术,对我国无特定病原体(specific pathogen-free, SPF)和清洁动物的鼠管状线虫进行快速检测和分子鉴定并开展感染调查,对丰富完善国家标准、防控实验动物疫病

暴发、维护社会公共安全具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 仪器设备

生物安全柜(Thermo Fisher Scientific, 美国); LEICA DM2500 生物显微镜(Leica Microsystems, 德国);倒置显微镜及成像系统(Nikon, 日本);二氧化碳培养箱(北京五洲东方科技发展有限公司);基因扩增仪(Applied Biosystem, 美国);凝胶成像分析系统(东乐自然基因生命科学公司)。

1.2 样品来源

923 批 5199 只 SPF 动物(包括:1 批 5 只猴,3 批 25 只小型猪,28 批 55 只兔,13 批 248 只地鼠,37 批 198 只豚鼠,93 批 459 只大鼠,742 批 4179 只小鼠,5 批 25 只鸡和 1 批 5 只鸭)和 145 批 1389 只清洁动物(包括:1 批 3 只兔,4 批 31 只地鼠,16 批 157 只豚鼠,32 批 268 只大鼠和 92 批 930 只小鼠)来自全国 50 个不同的厂家。对于猴、小型猪、兔等活体采集其直肠内容物或新鲜粪便样本,对于地鼠、豚鼠、大鼠、小鼠等则安乐死后采集其回盲部内容物

样本。

1.3 直接镜检实时动态显微视屏摄录技术检测和形态学鉴定鼠管状线虫

在负压生物安全柜内,分别将采集的直肠内容物、回盲部内容物和新鲜粪便样本,置洁净离心管中,加生理盐水充分混匀,弃上清液,沉淀置于新的洁净离心管中,洗涤数次后重新悬浮,迅速连续滴片,应用直接镜检实时动态显微视频摄录技术和形态学鉴定方法进行蠕虫检定。根据蠕虫的虫卵、幼虫、成虫的形态和大小等进行虫种鉴定。

1.4 鼠管状线虫离体生存能力试验

在负压生物安全柜内,无菌移取新分离的鼠管状线虫,置培养瓶中,加入新鲜配制的含 10% 胎牛血清和 1% 青/链霉素的 DMEM 培养液,置 37℃ 5% CO₂ 实验条件下培养,倒置显微镜观察,实时拍摄记录结果。

1.5 多重 PCR 和测序技术鉴定鼠管状线虫

为了后续鼠管状线虫 DNA 条形码分子鉴定体系的建立,本研究选定的靶标基因是鼠管状线虫内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS)、28S 核糖体 RNA (28 S ribosomal RNA, 28 S rRNA)、NADH 脱氢酶亚单位 1 (NADH dehydrogenase subunits 1, nad1) 和细胞色素 C 过氧化物酶亚基 1 (cytochrome c oxidase subunit 1, cox1) 基因,设计合成四对引物 (表 1)。建立优化多重 PCR 检测体系和反应条件,进行特异性、灵敏性、稳定性试验和方法评价验证,应用于 SPF 和清洁动物鼠管状线虫检测。将直接镜检实时动态显微视屏摄录技术检出,经形态学鉴定为鼠管状线虫的单个虫卵、幼虫、雌性成虫和雄性成虫,提取 DNA。分别以抽提的虫卵、幼虫和成虫 DNA 为模板,同时用已知鼠管状线虫、四翼无翅线虫 (*Aspiculuris tetraptera*)、隐匿管状线虫 (*Syphacia*

obvelata) 基因组 DNA 作阳性和阴性对照。鼠管状线虫 PCR 检测总反应体系为 50 μL,包括 5.0 μL 10 × buffer (Mg²⁺ Plus)、4.0 μL dNTP mixture、各 0.5 μL 正反向引物、0.25 μL EX Taq、2.0 μL 模板 DNA、37.75 μL nuclease-free water。循环参数:95℃ 1 min 1 cycle;95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 1 min,40 cycles;72℃ 10 min 1 cycle。琼脂糖凝胶电泳检测多重 PCR 扩增产物。提取 SPF 和清洁动物样本 DNA,作为模板 DNA 同上进行多重 PCR 检测。阳性样本进一步作多基因测序鉴定。

2 结果

2.1 直接镜检实时动态显微视屏摄录技术检测和形态学鉴定鼠管状线虫结果

镜下可见:许多细小、乳白色虫体游走蠕动,雌虫较活泼且个体比雄虫大,同时可见处于不同发育阶段的幼虫和虫卵。雌虫长 2.8 ~ 4.0 mm,口孔在虫体头部顶端,有 3 片唇瓣环绕,头端的角皮向周围膨起形成头翼,食管下部膨大成球状 (图 1A),阴门开口于虫体前 1/4 处的腹侧,阴门上方为一较长的阴道,阴道与前后排列的 2 根子宫相接,交配后有雄虫射精管腺体分泌的棕黄色物质栓塞雌虫阴门,子宫与输卵管、卵巢相接,内部充满卵 (图 1B),虫体中部膨大,尾端直而尖细,肛门开口于虫体后 1/6 处 (图 1C)。雄虫长 1.2 ~ 1.3 mm,射精管与直肠末端共同构成泄殖腔,经肛门通向外界,尾端明显向腹侧弯曲,尾端有引带、交合刺,尾端角皮上有乳突 (图 1D)。虫卵大小为 (72 ~ 82) μm × (25 ~ 36) μm,无色透明,壳薄,两侧稍不对称,一侧扁平,一侧隆起,呈肾形,内含物为发育中的幼虫,在卵一端的凹面有一粗糙小区,是幼虫孵化出口或称卵盖 (图 1E)。依据雌雄成虫、幼虫的形态、大小、构造和虫

表 1 鼠管状线虫多重 PCR 引物
Tab. 1 Multiplex-PCR primers of *Syphacia muris*

名称 Names	序列 5'→3' Sequence 5'→3'	产物 Products
GZQSMITSF	ATGTTTGTGATAGGGTTCTGCTACTAGTTGAACCTTTGT	702 bp
GZQSMITSR	TCAGCGATTGACGATACGGCAATGCTAGCGCTTCAGC	
GZQSM28SrF	ATGAGTGGTTGCCAGTTGTCGATACTGGTTATTGCTGTAG	507 bp
GZQSM28SrR	TCAC TGACAAGCACCGATGCAGTCATAGCTGTGCTGATGC	
GZQSMnad1F	ATGGTTTAAAGTTGGTTAAGAAGGAACAGTTGATGTCGAT	396 bp
GZQSMnad1R	CTAAATAACAGAAAATAAAGGTAATAAACATCAAAAAAAA	
GZQSMcox1F	ATGTTTGGGCATTTAGGTATGCTGTATGCTGTTTCTA	296 bp
GZQSMcox1R	TTATCCAAAACAGGATTAGCCACTATAATACCAGTCAAAC	

卵的大小、形状、颜色、卵壳、内含物特征,鉴定为鼠管状线虫。应用实时动态显微视屏摄录直接镜检技术检测和形态学鉴定鼠管状线虫,结果从 5199 份 SPF 动物样本中分离鉴定获得 285 份鼠管状线虫活体阳性样本,阳性率 5.5% (285/5199);从 1389 份清洁动物样本中分离鉴定获得 135 份鼠管状线虫活体阳性样本,阳性率 9.7% (135/1389)。自 SPF 和清洁动物中分离获得,经形态学鉴定为鼠管状线虫的活体阳性样本中,精心挑选出形态完整、特征典型的新鲜的鼠管状线虫单个虫卵、幼虫、雌性成虫和雄性成虫,特殊方法固定,保存备用。在研究中,笔者发现了一些动物个体同时自然感染鼠管状线虫与其他种属寄生虫(如:隐匿管状线虫、四翼无刺线虫、鞭毛虫、纤毛虫、体外寄生虫)的现象(另文报道)。形态学鉴定经验不足者极易将鼠管状线虫误判为隐匿管状线虫,笔者鉴别二虫要点有五:第一,虫卵:两者均呈肾形,但前者较小且两端钝圆,后者较大且两端尖锐;第二,成虫:前者雌雄成虫个体均小于后者,前者雌虫阴门在虫体前 1/4 处,交配后阴

门有栓塞,而后者在虫体前 1/6 处,阴门前后缘均有唇状隆起;第三,虫体头端:前者角皮向周围膨起形成头翼,后者颈翼膜窄小而平缓;第四:食道:两者食道前部皆为棒状,但前者食管下部膨大如容量瓶样球形,而后者恰似烧瓶样球状;第五,虫体:前者中部膨大而尾部直且尖细,后者中部匀称而尾部长且细尖。

2.2 鼠管状线虫离体生存能力试验结果

对鼠管状线虫培养观察发现:37℃ 5% CO₂ 实验条件下,鼠管状线虫离体至少能存活 10 d。第 2 天时,鼠管状线虫的幼虫可见包络鞘,说明蜕皮发生。第 3 天,雌雄特征已清晰可辨。第 4 天,雌性成虫阴门有深色阴道栓塞封闭,表明已发生交配。第 5 天,雄性成虫行动迟缓出现死亡,雌性成虫子宫中可见少量虫卵。第 6 天,雌性成虫子宫中可见大量虫卵。第 7 天,雌性成虫子宫中充满成熟的卵。第 8 天,妊娠的雌性成虫在暴露的空气中产卵。第 9 天,产卵后的雌虫形体萎缩死亡,虫卵中含有发育完全的、活动的、有感染性的幼虫。

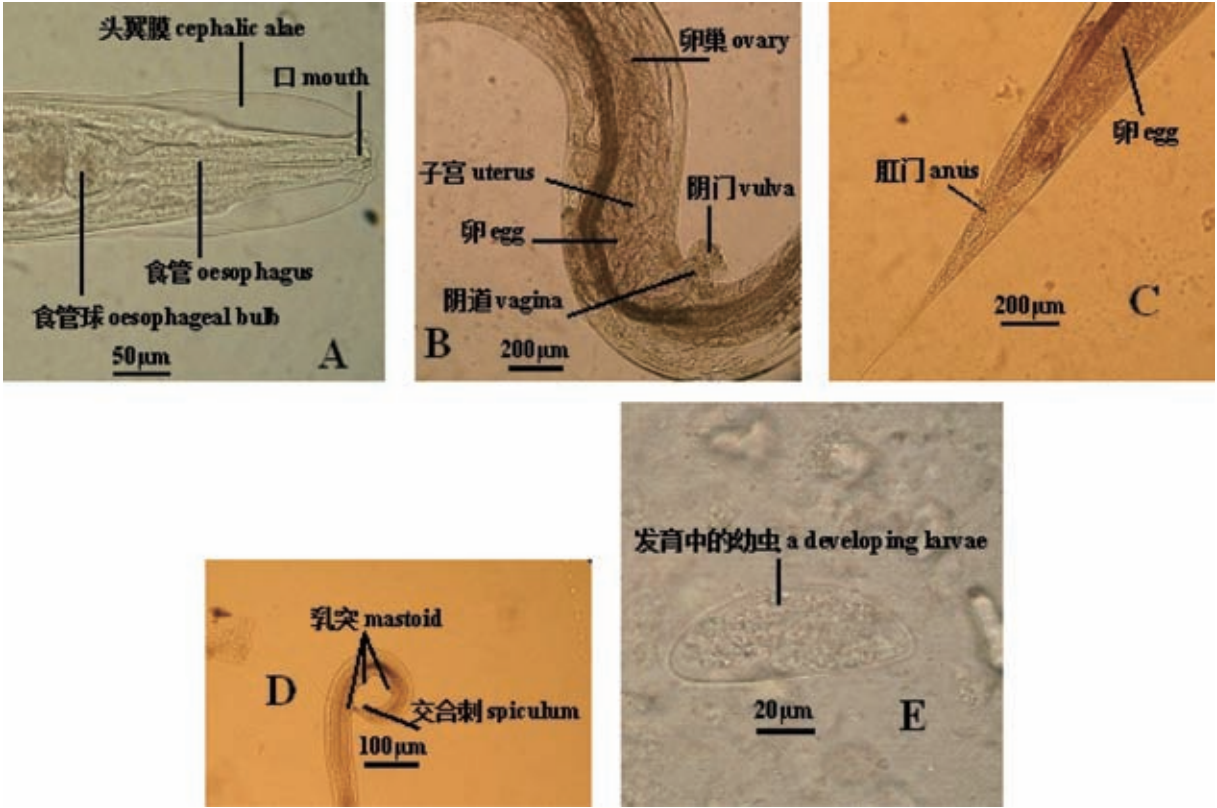


图1 中国 SPF 和清洁动物鼠管状线虫镜检形态(A:雌性成虫前部;B:雌性成虫腹部;C: 雌性成虫尾部;D:雄性成虫尾部;E:虫卵)

Fig.1 Microscopic morphology of *Syphacia muris* isolated from SPF and clean animals in China.

A, Anterior portion of a female adult; B, Ventral side of a female adult; C, Posterior portion of a female adult; D, Posterior portion of a male adult; E, egg)

2.3 多重 PCR 和测序技术鉴定鼠管状线虫结果

对鼠管状线虫虫卵、幼虫、成虫 DNA 分别进行多重 PCR 检测,结果在单个虫卵、幼虫、雌性成虫和雄性成虫 DNA 样本中,均可检出鼠管状线虫靶标基因 ITS(702 bp)、28S rRNA(507 bp)、nad1(396 bp)和 cox1(296 bp)特异性目的片段,而作为阴性对照的四翼无翅线虫、隐匿管状线虫却未见特异性片段。将目的条带回收纯化后进行测序鉴定。将所获得的鼠管状线虫多基因测序数据,在线提交 NCBI,通过 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)进行比对分析,结果显示本研究分离获得的鼠管状线虫靶标基因 ITS、28 S rRNA、nad1 和 cox1 序列,与国际上已公布的不同国家不同来源的鼠管状线虫 ITS、28 S rRNA、nad1 和 cox1 基因核苷酸同源性达 99% ~ 100% (GenBank 登录号为 EU263106.2、AB500174.1、HM204802.1 和 HM204808.1)。多重 PCR 和测序技术从基因角度证明了实验动物鼠管状线虫感染。多重 PCR 和测序技术检测鼠管状线虫结果与直接镜检实时动态显微视屏摄录技术检测鼠管状线虫结果相一致。研究结果说明应用直接镜检实时动态显微视屏摄录技术联合多重 PCR 和测序技术,能够快速检测精准鉴定鼠管状线虫。

本研究应用该技术对我国 SPF 和清洁动物的鼠管状线虫自然感染进行了监测,检测 5199 只 SPF 动物(包括:5 只猴,25 只小型猪,55 只兔,248 只地鼠,198 只豚鼠,459 只大鼠,4139 只小鼠,25 只鸡,5 只鸭),检测结果显示,SPF 动物的鼠管状线虫阳性检出率为 5.5% (285/5199),其中:SPF 豚鼠、大鼠

和小鼠的鼠管状线虫感染率分别为 2% (4/198)、12.4% (57/459)和 5.4% (224/4179),而 SPF 猴、小型猪、兔、地鼠、鸡和鸭未检出鼠管状线虫;检测 1389 只清洁级动物(包括:3 只兔,31 只地鼠,157 只豚鼠,268 只大鼠,930 只小鼠),检测结果显示,清洁动物鼠管状线虫阳性检出率为 9.7% (135/1389),其中:清洁豚鼠、大鼠和小鼠的鼠管状线虫感染率分别为 5.1% (8/157)、10.8% (29/268)和 10.5% (98/930),而清洁兔、地鼠未检出鼠管状线虫(表 2)。

3 讨论

鼠管状线虫生活史属直接型,感染期虫卵被宿主摄食后,在十二指肠内经消化液的作用,幼虫孵出,沿小肠下行,经几次蜕皮发育为成虫。成虫寄生在盲肠、结肠及回肠下部,重度感染时可达胃和食管等处。雌、雄虫交配后,雄虫很快死亡并排出体外,故宿主肠道内雌虫数比雄虫多。雌虫在肠道内低氧、温度及 pH 等影响下不排卵或仅排少量卵。而在宿主睡眠时肛门括约肌处于松弛状态下,妊娠雌虫便乘机移行至肛门外,受肛周温湿度及氧气的刺激,虫体头尾交替收缩蠕动,子宫发生强有力的收缩,瞬间排出大量虫卵。粘附在肛周的虫卵 6 h 后发育成熟,蜕皮 1 次后成为感染期虫卵,卵细胞内是发育完全的、活动的、有感染性的幼虫。排卵后的雌虫或孵化出的幼虫可经肛门逆行进入肠内或钻入阴道、尿道内引起新的感染^[9-12]。虫卵轻得可以漂浮在空气中,造成大面积的环境污染^[13]。虫卵

表 2 中国 SPF 和清洁动物鼠管状线虫感染监测结果
Tab.2 Prevalance of *Syphacia muris* infestation in SPF and clean animals in China

动物种类和等级 Animal species and levels	动物数量 Number of animals	检出率 Detection rate (%)
SPF 猴 SPF monkeys	5	0
SPF 小型猪 SPF mini-pigs	25	0
SPF 兔 SPF rabbits	55	0
SPF 地鼠 SPF hamsters	248	0
SPF 豚鼠 SPF guinea pigs	198	2% (4/198)
SPF 大鼠 SPF rats	459	12.4% (57/459)
SPF 小鼠 SPF mice	4179	5.4% (224/4179)
SPF 鸡 SPF chicken	25	0
SPF 鸭 SPF duck	5	0
清洁兔 Clean rabbits	3	0
清洁地鼠 Clean hamsters	31	0
清洁豚鼠 Clean guinea pigs	157	5.5% (8/157)
清洁大鼠 Clean rats	268	10.8% (29/268)
清洁小鼠 Clean mice	930	10.5% (98/930)

可经空气中的粉尘、污染的设备、动物和人进行传播。Stone^[14]报道美国研究人员在儿童和猴子的粪便中检出鼠管状线虫卵。Lytvynets^[15]报道捷克实验动物繁育设施中的灰尘、空调、饲养笼和技术人员手的鼠管状线虫卵检出率分别为 7.6%、28.7%、50.8% 和 37.9%。鼠管状线虫卵高度耐受各种环境因素如低温、干燥和消毒剂^[16],一旦污染不易去除。Meade^[17]报道鼠管状线虫卵在外界环境中暴露 7 个月依然具有活力。本文作者在 37℃ 5% CO₂ 实验条件下研究发现,鼠管状线虫可在体外存活近十天。本研究获得的鼠管状线虫可作为模式生物,用于抗寄生虫药物筛选研究,也可作为人类寄生虫病动物模型制备材料,进一步开展该虫的致病机理研究。

鼠管状线虫的自然感染在世界各地流行。Tung 等^[18]报道台湾野生大鼠的鼠管状线虫感染率为 28.6%。Paramasvaran 等^[19]报道马来西亚野生大鼠的鼠管状线虫感染率为 17.6%。Kataranovski 等^[20]报道南斯拉夫野生大鼠的鼠管状线虫感染率为 7.4%。Sharma 等^[21]报道印度野生大鼠和小鼠的鼠管状线虫感染率分别为 6.97% 和 8.57%。Kamranrashani 等^[22]报道伊朗野生小鼠的鼠管状线虫感染率为 2.89%。Hayashimoto 等^[23,24]报道日本实验小鼠和宠物小鼠鼠管状线虫感染率分别为 6.2% 和 46.4%。Hussey 等^[25]报道美国实验鼠鼠管状线虫感染率为 100%。Beyhan 等^[26]报道土耳其实验大鼠和小鼠的鼠管状线虫感染率均为 100%。我们的研究调查结果显示:我国 SPF 和清洁动物鼠管状线虫感染率分别为 5.5% 和 9.7%,其中:SPF 豚鼠、大鼠和小鼠的鼠管状线虫感染率分别为 2%、12.4% 和 5.4%;清洁豚鼠、大鼠和小鼠的鼠管状线虫感染率分别为 5.1%、10.8% 和 10.5%。实验动物寄生虫感染对人类寄生虫感染起一定的储存和传播作用,在流行病学上具有重要意义。即使当下进行的胚胎干细胞移植也并不能消除所有的感染性的病原体^[27]。人兽共患病名录中人兽共患寄生虫病 69 种,我国存在 60 种^[28-30]。最近我国时有 SPF 或清洁动物因人兽共患寄生虫感染致病或致死的报道^[31-33]。当前,我国实验动物感染人兽共患寄生虫的现状不容乐观。实验动物携带的人兽共患寄生虫,不仅会污染环境、饮水、食品、空气,同时也会对人类健康造成危害,已污染的实验动物用于食品药品生物制品医疗器械检定或动物种质

资源收集保存分发后果不堪设想。因此,各实验动物种子中心承担单位和动物繁育生产单位一定要高度重视人兽共患寄生虫病原体的生物安全性问题,切实落实自查抽查工作,及时发现并处理被污染的动物、粪便、垫料、饲料、饮水、笼器具、通风排气系统,彻底杀灭病原体并作无害化处理,避免污染公共水源和周边环境,要认真查找、严格控制并切断污染源,强化公共卫生安全防控意识,保证动物质量,保障人员安全,保护生态环境。

目前,直接检查肠道内容物仍是蠕虫检测的“金标准”,其局限性是安乐死动物^[34]。肛周胶带法可检测宿主肛周粘附的蛲虫卵,但漏检率较高^[35]。粪便漂浮法常用于检测产粪量较大的动物粪便中虫卵,不太适合实验动物^[36]。Parel 等^[37]曾用 ITS2 区 PCR-RFLP 鉴定鼠管状线虫,PCR 扩增后再进行酶切和电泳,操作繁琐且易污染。Leblanc 等^[38]曾在蛲虫通用引物 PCR 中得到了假阳性结果。Dole 等^[39]曾认为 PCR 检虫卵比粪检法灵敏,但后来在 PCR 检测阴性样本中竟然发现了活的虫体,提示单纯 PCR 方法不适合感染性的寄生虫病原体检测。本研究中,我们将直接镜检实时动态显微视屏摄录技术和形态学鉴定方法联合多重 PCR 和测序技术应用于鼠管状线虫的快速检测和分子鉴定,进行了方法学研究和验证,并对动物鼠管状线虫感染情况进行了监测,对鼠管状线虫筛查和确认的有效性进行了评价。应用多重 PCR 能够检测出单个鼠管状线虫卵、幼虫、雌性成虫和雄性成虫 DNA,经多基因测序技术鉴定出鼠管状线虫靶标基因 ITS、28S rRNA、nad1 和 cox1,与其他不同种属的寄生虫无交叉反应,尤其是形态学鉴定上与鼠管状线虫容易混淆的隐匿管状线虫和四翼无刺线虫,表明:多重 PCR 结合测序技术检测鉴定鼠管状线虫具有较高的灵敏度和特异性。对直接镜检实时动态显微视屏摄录技术检出,经形态学鉴定为活体鼠管状线虫的 285 份 SPF 和 135 份清洁动物阳性样本,分别提取 DNA 后,用多重 PCR 检测,均能获得预期目的条带,阳性样本测序证实获得的是鼠管状线虫靶标基因 ITS、28S rRNA、nad1 和 cox1。测序结果显示,不同 SPF 和清洁动物分离获得的鼠管状线虫的 ITS、28S rRNA、nad1 和 cox1 基因核苷酸相似性达 100%。应用多重 PCR 和测序技术检测 SPF 和清洁动物样本中的鼠管状线虫,结果分别检出 285 份和 135 份阳性,SPF 和清洁动物鼠管状线虫阳性率分

别为 5.5% (285/5199) 和 9.7% (135/1389)。诊断灵敏度二者无差异。直接镜检实时动态显微视屏摄录技术通过形态学鉴定鼠管状线虫联合多重 PCR 和测序技术通过基因分析方法鉴定鼠管状线虫的分子验证结果相吻合,显示多重 PCR 和测序技术检测鉴定鼠管状线虫的特异性,提示今后可将 ITS、28 S rRNA、nad1 和 cox1 基因作为鼠管状线虫快速检测精准识别的分子靶标,有效扩展目前检疫检测方法和常规健康监测途径,为国家标准修订提供技参考依据和技术支撑,获得的多基因位点数据可用于鼠管状线虫遗传多样性研究,为进一步开展分子流行病学调查奠定基础。

欧洲实验动物学会联合会制定了统一的欧洲标准,规定肠道蠕虫是实验动物要求检测的病原体^[40]。日本中央实验动物研究所实验动物质量控制标准规定必检蛲虫。随着中国社会经济的发展 and 国内外交流合作的增加,实验动物在诸多领域中的作用日益重要,因此,适应全球经济一体化,研究国外标准,以我国实验动物寄生虫监测调研基础数据作为科学依据,修订完善国家标准显得非常必要,这需要我们今后继续开展更多确定的研究予以支持。

综上所述,直接镜检实时动态显微视屏摄录技术和形态学鉴定联合多重 PCR 及测序技术可有效应用于鼠管状线虫感染的快速检定和感染监测中。本研究首次对中国 SPF 和清洁动物的鼠管状线虫进行了分子鉴定和感染调查,整体而言调查的面还不够宽广,还需要扩大样本的容量和丰度,以获得更全面的监测数据。鼠管状线虫作为一种重要的人兽共患病病原,其对动物质量和人类健康造成的危害不容忽视,今后一定要加强人兽共患病的防控工作,联合使用多种技术精准科学做好监测工作,切实保护人民生命健康,保障人民用药安全。

参考文献:

- [1] Sotillo J, Trelis M, Cortés A, et al. Proteomic analysis of the pinworm *Syphacia muris* (Nematoda: Oxyuridae), a parasite of laboratory rats [J]. Parasitol Int, 2012, 61(4): 561–564.
- [2] Roman E, Kientruong T. Behavior of the rat in relation to oxyurid *Syphacia muris* infestations at different stages of life [J]. Bull Soc Pathol Exot Filiales, 1973, 66(1): 178–183.
- [3] Wagner M. The effect of infection with the pinworm (*Syphacia muris*) on rat growth [J]. Lab Anim Sci, 1988, 38(4): 476–478.
- [4] Gonçalves L, Noronha D, Gomes DC. Worm burdens in outbred

and inbred laboratory rats with morphometric data on *Syphacia muris* (Yamaguti, 1935) Yamaguti, 1941 (Nematoda, Oxyuroidea) [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2001, 96(1): 133–136.

- [5] Trelis M, Cortés A, Fried B, et al. Protective immunity against *Echinostoma caproni* in rats is induced by *Syphacia muris* infection [J]. Int J Parasitol, 2013, 43(6): 453–463.
- [6] Plachý V, Litvinec A, Langrová I, et al. The effect of *Syphacia muris* on nutrient digestibility in laboratory rats [J]. Lab Anim, 2015, 16. pii: 0023677215577038.
- [7] 中华人民共和国国家标准[S]. GB/T 14922. 1–2001. 2001, 1–2.
- [8] 中华人民共和国国家标准[S]. GB/T 18448. 10–2001. 2001, 17–19.
- [9] Ross CR, Wagner JE, Wightman SR, et al. Experimental transmission of *Syphacia muris* among rats, mice, hamsters and gerbils [J]. Lab Anim Sci, 1980, 30(1): 35–37.
- [10] Lübcke R, Hutcheson FA, Barbezat GO. Impaired intestinal electrolyte transport in rats infested with the common parasite *Syphacia muris* [J]. Dig Dis Sci, 1992, 37(1): 60–64.
- [11] Stahl W. Studies on the life cycle of *Syphacia muris*, the rat pinworm [J]. Keio J Med, 1963, 12: 55–60.
- [12] Lewis JW, D’Silva J. The life-cycle of *Syphacia muris* Yamaguti (Nematoda: Oxyuroidea) in the laboratory rat [J]. J Helminthol, 1986, 60(1): 39–46.
- [13] Baker DG. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research [J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11(2): 231–266.
- [14] Stone WB, Manwell RD. Potential helminth infections in humans from pet or laboratory mice and hamsters [J]. Public Health Rep, 1966, 81(7): 647–653.
- [15] Lytvynets A, Langrova I, Lachout J, et al. Detection of pinworm eggs in the dust of laboratory animals breeding facility, in the cages and on the hands of the technicians [J]. Lab Anim, 2013, 47(1): 71–73.
- [16] Dix J, Astill J, Whelan G. Assessment of methods of destruction of *Syphacia muris* eggs [J]. Lab Anim, 2004, 38(1): 11–16.
- [17] Meade TM, Watson J. Characterization of rat pinworm (*Syphacia muris*) epidemiology as a means to increase detection and elimination [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2014, 53(6): 661–667.
- [18] Tung KC, Hsiao FC, Yang CH, et al. Surveillance of endoparasitic infections and the first report of *Physaloptera* sp. and *Sarcocystis* spp. in farm rodents and shrews in central Taiwan [J]. J Vet Med Sci, 2009, 71(1): 43–47.
- [19] Paramasvaran S, Sani RA, Hassan L, et al. Endo-parasite fauna of rodents caught in five wet markets in Kuala Lumpur and its potential zoonotic implications [J]. Trop Biomed, 2009, 26(1): 67–72.
- [20] Kataranovski M, Mirkov I, Belij S, et al. Intestinal helminths infection of rats (*Ratus norvegicus*) in the Belgrade area (Serbia): the effect of sex, age and habitat [J]. Parasite,

- 2011, 18(2): 189–196.
- [21] Sharma D, Joshi S, Vatsya S, et al. Prevalence of gastrointestinal helminth infections in rodents of Tarai region of Uttarakhand [J]. J Parasit Dis, 2013, 37(2): 181–184.
- [22] Kamranrashani B, Kia E, Mobedi I, et al. Helminth parasites of *Rhombomys opimus* from Golestan Province, Northeast Iran [J]. Iran J Parasitol, 2013, 8(1): 78–84.
- [23] Hayashimoto N, Morita H, Ishida T, et al. Current microbiological status of laboratory mice and rats in experimental facilities in Japan [J]. Exp Anim, 2013, 62(1): 41–48.
- [24] Hayashimoto N, Morita H, Ishida T, et al. Microbiological survey of mice (*Mus musculus*) purchased from commercial pet shops in Kanagawa and Tokyo, Japacommercial pet shops in Kanagawa and Tokyo, Japan [J]. Exp Anim, 2015, 64(2): 155–160.
- [25] Hussey KL. *Syphaia muris* vs. *S. obvelata* in laboratory rats and mice [J]. J Parasit, 1957, 43(5): 555–559.
- [26] Beyhan YE, Gürler AT, Bölükbaş CS, et al. Helminths of some laboratory animals detected by necropsy and fecal examination [J]. Türkiye Parazit Derg, 2010, 34(2): 98–101.
- [27] Mook D, Taylor DK, Huerkamp MJ. The rodent quarantine quagmire [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2009, 48(5): 472–474.
- [28] Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2001, 356(1411): 983–989.
- [29] Woolhouse ME, Gowtage-Sequeria S. Host range and emerging and reemerging pathogens [J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11(12): 1842–1847.
- [30] 于恩庶, 黄丰, 潘亮, 等. 当今人兽共患病病原体分类[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(6): 485–491.
- [31] 高正琴, 贺争鸣, 关伟鸿. 肿瘤移植裸鼠粪类圆线虫感染病原和分子诊断[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(7): 51–53.
- [32] 高正琴, 贺争鸣, 岳秉飞. 蓝氏贾第鞭毛虫诊断[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(1): 76–79.
- [33] 高正琴, 岳秉飞. 四翼无刺线虫形态和分子鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(7): 635–639.
- [34] Sousa JE, Carvalho EF, Levenhagen MA, et al. Diagnosis of the pinworm *Syphacia muris* in the Wistar rat *Rattus norvegicus* [J]. J Helminthol, 2014, 90(1): 117–120.
- [35] Hill WA, Randolph MM, Mandrell TD. Sensitivity of perianal tape impressions to diagnose pinworm (*Syphacia* spp.) infections in rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*) [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2009, 48(4): 378–380.
- [36] Beyhan YE, Gürler AT, Bölükbaş CS, et al. Helminths of some laboratory animals detected by necropsy and fecal examination [J]. Türkiye Parazit Derg, 2010, 34(2): 98–101.
- [37] Parel JD, Galula JU, Ooi HK. Characterization of rDNA sequences from *Syphacia muris*, *Syphacia muris*, and *Aspiculuris tetraptera* and development of a PCR-based method for identification [J]. Vet Parasitol, 2008, 153(3–4): 379–383.
- [38] Leblanc M, Berry K, Graciano S, et al. False-positive results after environmental pinworm PCR testing due to *Rhabditid* nematodes in Corncob bedding [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2014, 53(6): 717–724.
- [39] Dole VS, Zaias J, Kyricopoulos-Cleasby DM, et al. Comparison of traditional and PCR methods during screening for and confirmation of *Aspiculuris tetraptera* in a mouse facility [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2011, 50(6): 904–909.
- [40] Mähler Convenor M, Berard M, Feinstein R, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units [J]. Lab Anim. 2014, 48(3): 178–192.

[修回日期]2016-02-19

(上接第 66 页)

- [14] 张振强, 宋军营, 贾亚泉, 等. 脑缺血合并高脂血症模型大鼠脑组织的病理改变 [J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(33): 5981–5987.
- [15] 樊小军, 陈明霞, 刘衍晟, 等. 红细胞扫描电镜样品的快速制作法 [J]. 电子显微学报, 2005, 24(4): 438.
- [16] 王燕, 胡慧媛, 赵美咪, 等. TTC 染色评价豚鼠离体心脏缺血/再灌注损伤梗死面积的适宜观察时间及计算方法 [J]. 中国医科大学学报, 2013, 42(2): 160–164.
- [17] 马杰, 杨敏, 杨建华, 等. 新生小鼠脑缺氧缺血性脑病模型的制作 [J]. 中华神经外科杂志, 2007, 23(9): 713–715.
- [18] 段涛, 陈超. 新生儿缺血缺氧性脑病(II) [J]. 中华医学杂志, 2005, 85(18): 1292–1294.

[修回日期]2016–02–22

用压力-容积环评价大鼠心功能方法的改进及注意事项

刘晓雨, 谭文

(华南理工大学生物科学与工程学院/生物医药前孵化器研究中心/广东省发酵与酶工程重点实验室, 广州 510006)

【摘要】目的 探讨应用压力-容积环 (pressure-volume loop, PV Loop) 评价大鼠心功能过程中的影响因素及方法改进原则, 分析主动脉弓缩窄 (transverse aortic constriction, TAC) 诱导的压力负荷对大鼠心脏功能的影响, 从而为大鼠健康或疾病状态下的心功能分析提供更为科学全面的方法。**方法** 采用压力容积传感器从大鼠的颈动脉插入左心室, 调整传感器到合适位置来改善压力-容积环的形状, 结合配套软件对心功能进行多方面的评价, 分别从压力及容积的定标、导管在左心室腔内的位置、呼吸机对测定的影响等方面分析应用压力-容积环测定大鼠心功能时的操作要点。**结果** (1) 通过颈静脉注射适量的高渗盐水定标, 扣除心室壁平行电导率引起的容积, 可以获得准确的左心室容积。(2) 适度调节压力-容积导管, 使传感器的位置完全进入心室但又不接触心室壁, 可以得到更好的压力-容积信号。(3) 停止呼吸机适当时间, 消除非自主呼吸对测定的影响, 有助于获得更稳定的数据。采用这一方法对主动脉缩窄手术 (诱导心肌梗大) 后 1 个月的大鼠进行分析, 可以更好地评价大鼠在正常和疾病状态下的心功能。**结论** 本研究从容积定标、导管位置和呼吸机等方面对大鼠心脏的压力-容积环测定方法进行了改进和完善, 并通过分析正常和心肌梗大的大鼠心功能验证了该方法的可靠性。

【关键词】 压力-容积环; 主动脉弓缩窄; 心功能; 方法改进

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)06-0075-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.006.014

Improvements and key points in the assessment of rat cardiac function using pressure-volume loop

LIU Xiao-yu, TAN Wen

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Pre-Incubator for Innovative Drugs and Medicine Center, South China University of Technology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Objective To investigate the key factors for PV Loop evaluation in rats and to improve this method. To provide examples of cardiac function measurements obtained from normal rats and from rats with cardiac hypertrophy induced by transverse aortic constriction (TAC). To establish a more reliable method for rats heart measurements. **Methods** Rats underwent left ventricular catheterization through the right carotid artery. Through adjustments of the position of the pressure-volume conductance catheter, the optimal PV Loops and a number of cardiac functional parameters were acquired. The key influencing factors, calibration of volume, position of the catheter in the left ventricle (LV) and suspension of ventilator were assessed. **Results** 1. The real volume of left ventricle were acquired by injecting appropriate volume of hypertonic saline through jugular vein, which deducted the parallel conductivities of ventricular wall. 2. To get

【基金项目】 广州市重大专项科技项目 (201300000051)。

【作者简介】 刘晓雨 (1990 -), 男, 硕士生, 主要研究方向: 心肌梗大与心衰相关疾病, Email: 513688273@qq.com。

【通讯作者】 谭文, 男, 教授, 主要从事医药生物学研究, Email: went@scut.edu.cn。

better PV loops, it's important to adjust the position of the catheter in the left ventricle until all of the pressure and volume sensors were located in the ventricle as well as out of touch with the ventricular wall. 3. Suspension the ventilator during the test is conducive to stable and reasonable data acquisition. We further assessed the cardiac functions of healthy rats and rats with cardiac hypertrophy with this improved method, which showed better performances. **Conclusions** This study we have evaluated the influences of calibration of volume, position of the catheter in the left ventricle (LV) and ventilator on measurements of rats PV loops, and further improved this method. Moreover, we have validated this method with measurements of cardiac functions of normal rats and cardiac hypertrophic rats.

【Key words】 Pressure-volume loop; Transverse aortic constriction; Cardiac function; Method improvement

左心室压力-容积环分析^[1]在啮齿类动物生理、病理状态下的心功能评价中应用广泛,已经成为基础研究中公认的评价动物心功能变化的“金标准”之一。采用压力-容积关系比较负荷和变力性对心室收缩的影响,表明负荷变化对心脏各项指数的影响与其对变力刺激敏感性接近,并且压力-容积关系参数理论分析的结果与试验数据一致^[2]。通过这一方法对心肌梗塞引起的心衰进行功能评价,表明心肌缺血后,随着时间推移,从代偿性重构逐步发展为失代偿的心衰,心脏收缩和舒张功能均发生一系列显著变化^[3],在衰老相关的晚期心衰大鼠中也可以观察到心脏各项参数的变化^[4]。目前,基于清醒小鼠的压力-容积环分析检测也被建立起来^[5],从而可以连续观察清醒状态下心脏收缩的变化情况。

压力-容积环分析也广泛用于大型动物或临床人体心功能的评价^[6-12]。采用这一方法,结合超声心动图等技术,对具有正常射血分数的心衰病人(HFNEF)进行分析,表明不同病人之间具有不同的生理病理学机制^[6-7]。近期一项研究将这一技术测定各种心血管疾病病人的心功能,表明压力-容积关系能更好地区分不同的临床症状的病人^[8]。细胞移植是一种治疗心衰的新方法,采用压力-容积检测可以长期观察这种治疗对心衰病人的恢复效果^[9]。对诸如狗等相对较为大型的动物,选择合适型号的压力-容积导管,也可以测定各种疾病状态下的心脏功能^[10-11]。

尽管压力-容积关系已经广泛用于心脏功能评价,相关的操作流程已经较为完善^[13],然而,对这项技术是否能科学、客观地反映心功能的状态尚有争议,相关方法学也需要进一步完善^[14],与左心室功能检测相关的各种实验技术也需要不断提升^[15]。为此,本研究分别从压力和容积的定标、压力容积导管在左心室腔的位置、呼吸机对评价的影响等方面改进这一心功能评价方法,探讨应用导管测定心功能过程中的操作原则和注意事项,并应用这一改

进的方法测定主动脉弓缩窄手术(TAC)诱导的大鼠心肌肥大模型的心功能参数变化,为小鼠健康或疾病状态下的心功能分析提供更为科学全面的方法。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物:Wistar 大鼠,雄性,8~10 周龄,体重 200 ± 20 g,购买于广东省中山大学动物实验中心【SCXK(粤)2011-0029】,在中山大学动物实验中心进行实验【SYXK(粤)2011-0112】。

1.1.2 主要仪器:外科手术设备及器械(广州器化医疗设备有限公司)、小动物呼吸机(Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)、恒温加热垫(广州飞迪生物科技有限公司,型号:PLS-20A)、PowerLab 数据采集分析系统(AD Instruments Inc.)、Millar 压力容积导管 SPR-838(Millar Instruments Inc.)、光纤冷光源(F-150S)、小动物电子秤(永康市华鹰衡器有限公司,型号:ASC-30)、恒温加热垫(广州飞迪生物科技有限公司,型号:PLS-20A)。

1.2 实验方法

1.2.1 主动脉弓缩窄手术建立大鼠心肌肥大模型:对大鼠实施主动脉缩窄手术,制造压力负荷诱导的大鼠心肌肥大模型^[16]。其过程如下:大鼠称重后腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后,让其仰卧于手术台上(恒温垫控温 37℃),固定大鼠四肢,头部。行经口气管插管,连接上小动物呼吸机,设置潮气量为 4~6 mL/200 g,频率为 65~70 次/min。手术区域备皮,碘伏消毒,铺无菌纱布,用眼科弯镊和剪刀从左胸部位斜向把皮剪开,用眼科弯镊钝性分离两边的皮,暴露更多的肌肉。然后用弯头止血钳钝性分离胸大肌和胸小肌,暴露出肋骨。用眼科弯镊在第二和第三肋骨间无菌操作下开胸,并小心拨开左右两片胸腺,暴露主动脉弓。把 4-0 号的医用真丝编织线从右无名动脉和左颈总动脉之间穿

过胸主动脉(结扎部位如图 1 所示)^[17],将主动脉结扎于 21 G(外径为 0.8 mm)的针头上,随后把针头抽出。结扎牢固后,将胸腺轻轻回位盖住结扎部位。由胸腔引出一根消毒的塑料管,逐层关胸,缝好肌肉后,用注射器经塑料管吸出胸腔内的气体,使肺部能较好地扩张,然后拔掉塑料管并缝合伤口。继续通呼吸机 15 min,待大鼠自主呼吸恢复后,拔出气管插管,放回笼子饲养。假手术组(SHAM)实施完全相同的操作,只是编织线穿过血管后不行结扎。

1.2.2 大鼠心功能的测定:左心室压力和容量测定的原理:Millar 压力容积导管是一根末端带有一个微型压力感受传感器(PS)和四个感受容积的环状电极(E1-E4)的导管(图 2)。其中导管两端的电极是兴奋性电极,中间的一对电极是干预记录电极。导管插进心脏后,四个电极可以跨距整个心室的长轴。通过微型压力感受器可以检测心室压力的变化。兴奋性电极之间经过高频低振幅的恒定电流,产生局部的电场。干预电极之间的电势与血液的电阻成正比,与血液的电导率成反比。干预电极可以记录心室内血液的电导率。一个心动周期内不同的时相中心室的血容量不同导致干预电极记录的电导率也不同。根据检测心室内的电导,转换为心室容积,转化公式: $\text{Volume} = (1/\alpha) \times \rho \times L^2 \times G$,其中 Volume 表示心室容积,α 表示容积校正系数,ρ 表示血液的电阻,L 表示干预电极之间的距离,G 表示检测的总电导。由于导管检测心室内血液的电导率是以电势值信号输出的,因此需要进行单位转换。将相对容积电导信

号(以电势 V 表示)转化为绝对容积(μL)。此外,由于检测的总电导其实包含了血液、心室壁和周围的组织产生的电导,所以为了准确地得到心室容积,需要进行高渗盐水定标,以扣除心室壁和周围组织产生的电导^[13]。

1.2.2.1 压力容积导管电导信号单位(ms)向容积单位(μL)转换:使用由厂家提供的绝缘体容积校准容器(见图 3),置于 37℃ 恒温加热垫上,往 5 个深 1 cm、直径在 5~9 mm 范围内的孔中加入 1% 的肝素(生理盐水配制)进行润洗,然后抽出肝素,迅速往里面加入用 1% 的肝素抗凝的新鲜大鼠血液,将导管插入到孔中,保证导管的 4 个电极均浸没在血液中,保持 10~20 s,此时,屏幕上可看见容积信号上升并维持一段时间。然后插入到下一个孔中,由于这五个孔的体积不一样,会产生不同的电导信号,直到采集完 5 个梯度的电导信号,然后重复 2 次。根据每个孔测得的实际容积信号 V) 与标示的容积(μL)数据(表 1),拟合出校正标准曲线,由此得到线性方程的斜率和截距(图 4),将斜率和截距代入方程即可将电导信号单位(ms)向绝对体积单位(μL)转换^[13]。

1.2.2.2 左心室内插入导管:将 TAC 手术后饲养 4 周的大鼠麻醉后,固定于 37℃ 的恒温手术台上。经口插入气管导管,通上呼吸机,具体步骤参考模型制备的步骤(1.2.1 部分)。对大鼠颈部周围进行备皮,行颈正中切口约 3 cm,钝性分离皮下组织和颈前正中肌肉,找到呈“T”型的三块肌肉,在肌肉下找到右侧颈总动脉,用玻璃分针小心将动脉周围的神经分离,避免分离右侧颈动脉时牵拉迷走神经。然后在动脉下穿线,结扎右侧颈动脉远心端,并在近心端置小动脉夹,并穿线备用。在靠近近心端结扎处用眼科剪朝向心端呈 45° 剪一

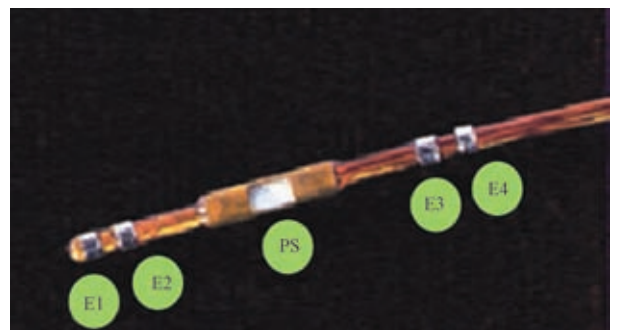


图 2 SPR-838 Millar 导管

Fig. 2 A picture of SPR-838 Millar catheter

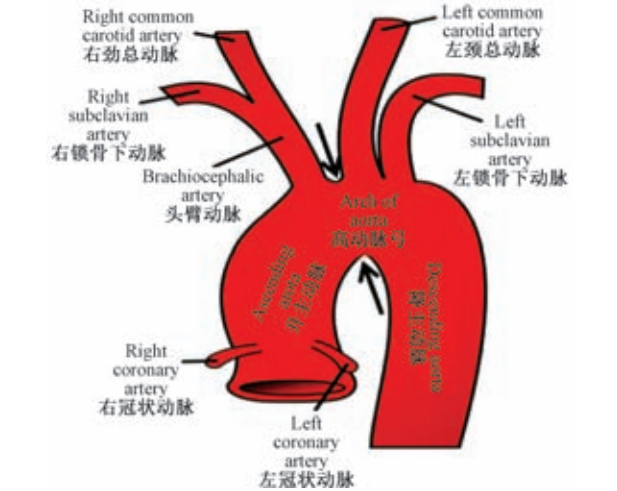


图 1 实施 TAC 手术的主动脉弓狭窄部位^[17]

Fig. 1 The site of transverse aortic constriction^[17]



图 3 绝缘体校准容器

Fig.3 Insulated calibrating container

表 1 使用绝缘体校准容器平衡 3 次测得的实际容积

Tab.1 The real volume measured by the insulated calibrating container

	孔 1 Hole 1	孔 2 Hole 2	孔 3 Hole 3	孔 4 Hole 4	孔 5 Hole 5
直径 (mm) Diameter	5	6	7	8	9
标示的容积 (μL) Nominal capacity	176. 71	254. 47	346. 36	452. 39	572. 56
实际容积 (V) Real capacity	- 9. 063	- 8. 855	- 8. 627	- 8. 452	- 8. 278
实际容积 (V) Real capacity	- 9. 086	- 8. 817	- 8. 587	- 8. 419	- 8. 263
实际容积 (V) Real capacity	- 9. 086	- 8. 822	- 8. 622	- 8. 433	- 8. 295

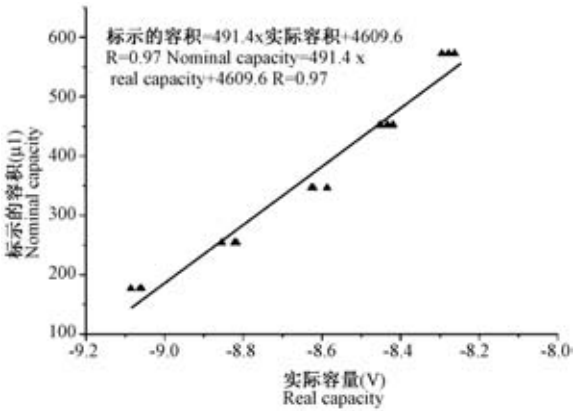


图 4 校正标准曲线

Fig. 4 Calibrated standard curve (Volume)

松结,松开动脉夹,并观察电脑屏幕上波形的变化。当导管往心脏方向前进时遇到助力,可以适度地将其往回退,然后再继续前进,直到屏幕上出现典型的心室内压波形,即可停止前进,为把近心端的松结扎紧,避免导管脱落,此时要适度地调整导管在左心室内的位置,直到出现稳定且漂亮的压力-容量环^[18]。

1.2.2.3 采用平行电导对容积进行校正:用玻璃

分针钝性分离大鼠右颈静脉,小心牵拉迷走神经。然后在颈静脉下穿线,结扎颈静脉远心端,并在近心端置小动脉夹,并穿线备用。在靠近近心端结扎处用眼科剪朝向心端呈 45° 剪一“V”型小口,插入 PE50 导管后,用靠近心端的线扎紧,松开动脉夹,用注射器往 PE50 导管里推进约 40μL 30% 的高渗盐水,此时可见左心室容量迅速增大,压力-容积环往右移动(电导发生明显改变)且不伴随压力信号幅度的降低。等左心室容量恢复到给高渗盐水前的水平,再次重复推进高渗盐水,如此进行 2~3 次高渗盐水定标。选取左心室容量增大的一段数据,可得出给高渗盐水后左心室的舒张末容积-收缩末容积的线性关系,此直线与当左心室舒张末容积与收缩末容积相等时的直线(此直线表示心室没有血液)相交于一点,此点对应的体积为平行体积(V_p),即心室壁和周围组织产生的电导所引起的心室容量误差。所以最终表示左心室的容积要扣除这容量误差。相关研究表明^[4, 18],注射 20~40 μL 的 30% 高渗盐水, V_p 一般为 130~280 μL。

2 结果

2.1 高渗盐水定标对平行电导校正的影响

采用高渗盐水注射来确定心室壁的平行电导引起的容积是获得心室真实容积的有效方法。由图 5A 可知,大鼠静脉注射高渗盐水后,心室容量增加的同时会引起心室压力的降低。在此区域里,推算出的 V_p 值超出文献公认的规定值。选取容量增加同时心室压力没有明显变化的区域(压力容积曲

线只发生左右平移,无上下移动,图 5B 中),推算出的 V_p 值在文献公认的范围。由此可知,注射高渗盐水对平行电导进行校正时需要选取容量增加的同时心室压力没有明显变化的数据,如图 5B 上所示。

2.2 压力容积导管在左心室腔内的位置对压力-容积环测定的影响

研究发现,导管的位置对于容积的测定影响较大,如图 6 所示。调整前,左心室等容舒张期和等容

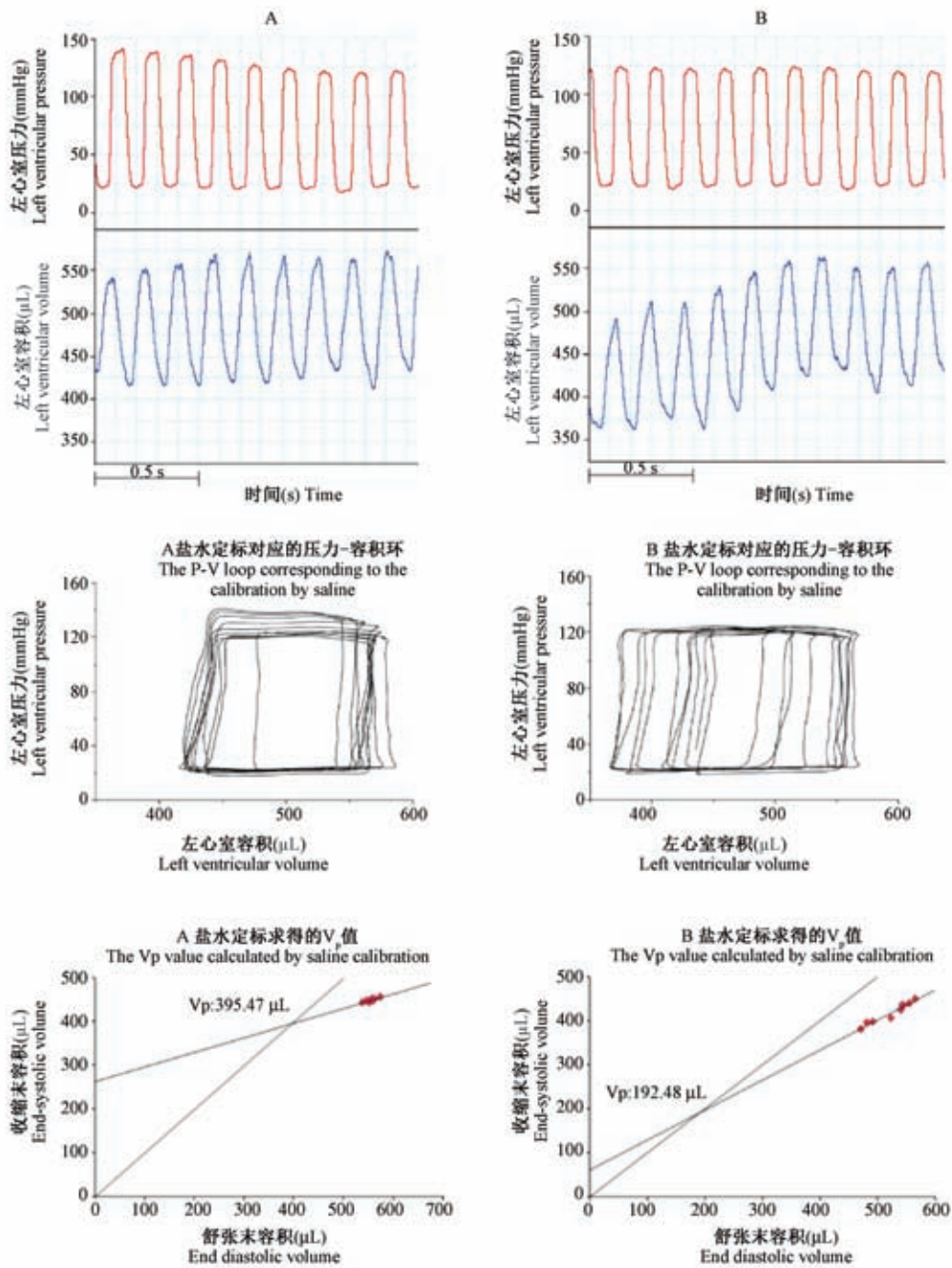


图 5 注射高渗盐水进行平行电导校正

Fig.5 Parallel conductance corrected by hypertonic saline

收缩期中的容积发生明显变化,呈现不等容现象。经适度调整后,压力-容积环的等容舒张期和等容收缩期偏移减少,并且心室收缩末容积与调整前发生明显改变。此时压力容积导管前端的传感器器应该位于左心室内,并且不应该与心室壁有接触。导管末端进入心室长度随大鼠体重变化而稍有不同,例如体重约 300 g 的大鼠,导管进入长度约为 6.3 mm,体重约 400 g 的大鼠,导管进入长度约 6.8 mm。

2.3 呼吸机对压力-容积环测定的影响

研究发现,呼吸机会显著引起左心室压力和容积的波动,从而导致每个心动周期测定的压力-容积环发生偏移(图 7)。而暂停呼吸机后,压力-容积环的位置变得相对稳定,并且心室压没有明显变化,因此为获得稳定的压力-容积环,可采集停呼吸机 5~10 s 的数据,然后再继续通上呼吸机。

2.4 主动脉缩窄手术诱发大鼠心肌肥大的压力-容积环测定

主动脉弓缩窄手术(TAC)可通过压力负荷诱

导心肌肥大,由图 8 可知,正常组(图 8 左)具有正常的心功能,而实施 TAC 手术一个月的肥大组(图 8 右)心功能下降,舒张功能恶化,收缩有关的 dp/dt_{max} 、EF 等参数与对照组没有明显差异,说明 TAC 手术后一个月大鼠心室明显扩张,但尚处于代偿期,心脏功能总体处于良好状态,压力-容积环右移。而大鼠实施 TAC 手术两个月后, dp/dt_{max} 和 EF 均显著降低,Ped 和 Tau 均明显增加,表明心脏收缩功能和舒张功能均受损,此时心脏进入失代偿阶段,压力-容积环右移且环的上下边沿均朝中心移动(数据未显示)。

3 讨论

3.1 使用绝缘体校准容器进行校正

目前,使用 Millar 压力容积导管进行压力-容积环测定评价心功能时,多采用绝缘体校准容器将电导率信号转换为容积信号,以避免容器本身所具有的电导对信号的影响。绝缘体校准容器

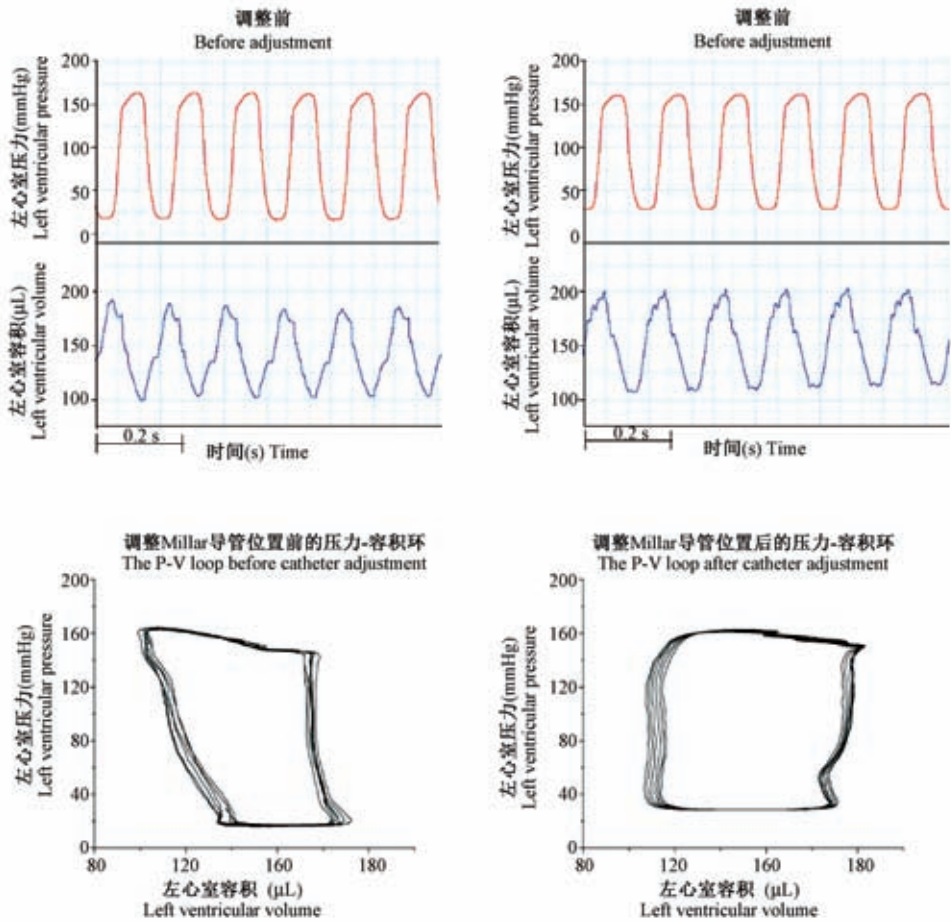


图 6 压力容积导管位置对压力-容积环测定的影响
Fig.6 The infection of catheters position to PV-loop assessing

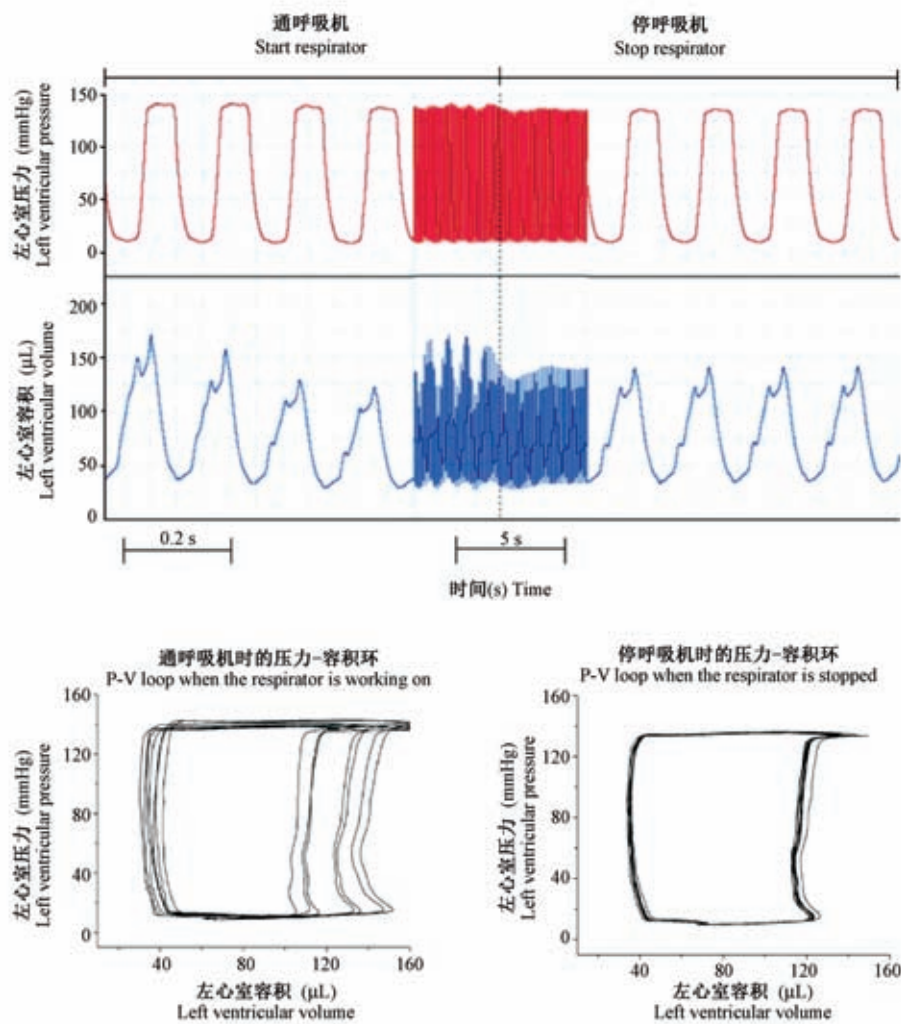


图 7 呼吸机对压力-容积环测定的影响

Fig. 7 The infection of respirator on the PV-loop assessment

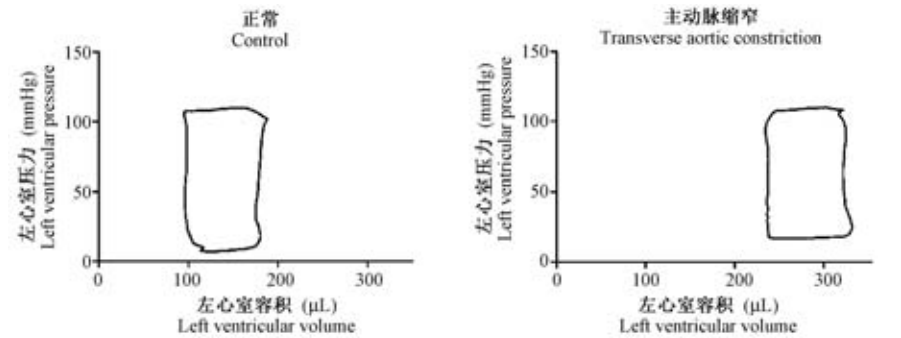


图 8 正常生理状态及代偿性心肌肥大状态下的压力-容积曲线

Fig. 8 PV-loop curves in normal status and compensatory cardiac hypertrophy status

具有多个不同容积的孔,当往这些孔内注射满大鼠血液后,将 Millar 管依次插入其中,通过不同孔的容积与电导率信号读数,绘制出两者的关系曲线。根据这一曲线,可以方便地见所测得的电

导率数据转换为真实的容积。由于不同大鼠的血液理论上具有不同的电导率,因此每检测一只动物,均应该用该动物的血液进行电导率-容积的转换,即每只动物应该有自己的电导率-真实

容积曲线。

3.2 高渗盐水定标对平行电导校正的影响

平行电导是心室壁和周围组织产生的电导率。干预电极测定心室容积时实际上包含了这部分电导率,因此需要静脉注射高渗生理盐水改变心室血液的电导率进行平行电导校正^[13]。动物注射高渗盐水会增加容量负荷或引起收缩性改变,此时使容积信号发生改变。在收缩末容积-舒张末容积关系图上,收缩末容积与舒张末容积相等时的直线代表心室没有血液(容积信号仅由心室壁及周围组织的平行电导率产生),注射高渗盐水时的容积曲线与此曲线的交点即代表平行电导率引起的容积 V_p 。

3.3 Millar 导管在左心室腔内的位置对压力-容积环测定的影响

压力-容积环的建立关键在于心室容积的测定。由于心室腔本身的形状是不规则的,Millar 导管在心室腔内不同的位置,干预电极检测的电导率信号也随之变化。因此对 Millar 导管在心室腔内的位置进行调整,对于压力-容积环的测定非常重要。测定过程中导管末端的传感器如果与心室壁有接触,将会对信号产生极大干扰,使压力-容积环形状不规则,心功能参数不准确,因此测定时含传感器的导管应完全进入左心室,但又不能接触心室壁。

3.4 呼吸机对压力-容积环测定的影响

Millar 导管进入左心室的方式有两种,分别是经右颈总动脉插管(关胸)以及经心尖顶端插管(开胸)。其中经心尖顶端插管必须通上呼吸机,而右颈总动脉插管可选择自由呼吸。但由于此过程必须使用麻醉药,稍微过量的麻醉药会显著抑制心率和心功能而导致测定的数据不准确,例如,动物实验常用的麻醉药戊巴比妥钠还会显著增加呼吸道粘液的分泌导致呼吸暂停甚至窒息死亡。因此,一般建议 Millar 导管经右颈总动脉插入左心室的过程也通上呼吸机。本研究发现,呼吸机对于左心室压力-容积环的测定会产生显著影响,特别是对左心室容积的测定。因此,为保证心功能测定的顺利进行,可记录停呼吸机几秒的数据,然后继续通上呼吸机。

本研究分别从压力和容积的定标、压力容积导管在左心室腔的位置、呼吸机对评价的影响等方面对大鼠压力容积环测定心功能的方法进行了完善和改进,并以心肌肥大模型进行验证,从而为小鼠健康或疾病状态下的心功能分析提供更为科学全

面的分析手段。

参考文献:

- [1] Kass DA. Clinical ventricular pathophysiology: a pressure-volume view [M]. In: Ventricular Function, edited by Warltier DC. Baltimore, MD: Williams & Wilkins. 1995; 131-51.
- [2] Pacher P, Nagayama, Takahiro, *et al.* Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats[J]. Nature Protocols. 2008. 3(9): 1422-1434.
- [3] Shioura KM, Geenen DL, Goldspink PH. Assessment of cardiac function with the pressure-volume conductance system following myocardial infarction in mice [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007; 293(5): H2870-7.
- [4] Kaludercic, NinaTakimoto, EikiNagayama, *et al.* Monoamine Oxidase A-mediated enhanced catabolism of norepinephrine contributes to Adverse Remodeling and pump failure in hearts with Pressure overload [J]. Circ Res, 2010, 106(1): 193-U401.
- [5] Joho S, Ishizaka S, Sievers R, *et al.* Left ventricular pressure-volume relationship in conscious mice [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007; 292(1): H369-H377.
- [6] Maurer MS, King DL, El-Khoury Rumbarger L, *et al.* Left heart failure with a normal ejection fraction: identification of different pathophysiologic mechanisms [J]. J Card Fail. 2005; 11(3): 177-87.
- [7] Maurer MS, Kronzon I, Burkhoff D. Ventricular pump function in heart failure with normal ejection fraction: insights from pressure-volume measurements [J]. Prog Cardiovasc Dis. 2006; 49(3): 182-95.
- [8] Shoucri RM. End-systolic pressure-volume relation, ejection fraction, and Heart failure: Theoretical aspect and clinical applications [J]. Clin Med Insights Cardiol. 2015; 9(Suppl 1):111-20.
- [9] Steendijk P, Smits PC, Valgimigli M, *et al.* Intramyocardial injection of skeletal myoblasts: long-term follow-up with pressure-volume loops [J]. Nat ClinPract Card. 2006; 3 Suppl 1: S94-100.
- [10] Little WC. The left ventricular dP/dtmax-end-diastolic volume relation in closed-chest dogs [J]. Circ Res. 1985; 56: 808-15.
- [11] Diakos NA, Pozios I, Katsaros L, *et al.* Afterload-induced left ventricular diastolic dysfunction during myocardial ischaemia and reperfusion [J]. Exp Physiol. 2015;100(3):288-301.
- [12] Sagawa K, Maughan L, Suga H, *et al.* Cardiac Contraction and Pressure-Volume Relationship [M]. New York: Oxford University Press. 1988.
- [13] Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, *et al.* Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats [J]. Nat Protoc. 2008; 3(9): 1422-34.

兔 VX2 鼻咽移植瘤模型建立的研究现状

胡月¹, 文庆莲¹, 张莉²

(1. 西南医科大学附属医院, 肿瘤科, 四川 泸州 646000; 2. 西南医科大学附属医院, 核医学科, 四川 泸州 646000)

【摘要】 总结和介绍了兔 VX2 鼻咽移植瘤模型的制作方法, 并对模型制备的各个环节进行了分析和方法改进的探讨, 以期为医学实验研究提供良好的动物模型。

【关键词】 兔; VX2; 鼻咽肿瘤; 模型; 动物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)06-0083-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671-7856. 2016. 06. 015

Current status of establishment ways of rabbit models of VX2 nasopharyngeal carcinoma

HU Yue¹, WEN Qing-lian¹, ZHANG Li²

(1. Department of Oncology, 2. Department of Nuclear Medicine, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou Sichuan 646000, China)

【Abstract】 To summarize and introduce the available methods of establishing rabbit models of VX2 nasopharyngeal carcinoma (NPC), and to explore the improvements at each stage in the preparation of the rabbit models, in order to provide a favorable animal model for future experimental research.

【Key words】 Rabbit; VX2 tumor; Nasopharyngeal neoplasms; Model, animal

鼻咽癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 发病率居耳鼻喉科恶性肿瘤之首, 而鼻咽肿瘤由于其解剖位置深在, 周围毗邻结构复杂而重要, 不易进行直观的在体观察或活体取样研究, 此时体内实验就显得尤为重要。体内实验之中的动物实验, 即利用动物对人类疾病进行复制, 既可以缩短疾病的自然病程, 便于观察疾病发生发展的全过程, 又能进行活体解剖, 从病理层面对鼻咽癌加以研究, 使得结果更具有科学依据与说服力。VX2 肿瘤是一种来源于 Shop 病毒于皮肤诱发的兔乳头状瘤衍生的鳞癌, 于 1940 年正式建立株^[1], 现已被广泛用于肿瘤领域的基础研究, 国内外一些学者将 VX2 肿瘤种植于耳

廓、脑部、肝脏、肺部、肾脏等^[2-8]部位, 进行肿瘤各方面的研究。但由于鼻咽原位移植瘤的动物模型不多, 且在鼻咽移植瘤动物模型的建立上, 没有统一的标准, 故本文对兔 VX2 鼻咽移植瘤模型制作方法的现状作如下综述, 为后续鼻咽癌的体内研究提供合适的实验动物模型。

1 鼻咽移植瘤模型建立和应用概况

鼻咽癌发病率逐年递增, 对鼻咽癌的相关基础及临床研究也成为肿瘤领域的热点。国内外许多学者都曾建立过不同的鼻咽癌动物模型, 以进行鼻咽肿瘤不同特性的深入研究。黄小鹏等^[9]将鼻咽

【基金项目】 PET-CT 在鼻咽癌放疗中的基础和临床研究(泸州医学院附属医院[2013]60 号)。

【作者简介】 胡月(1991-), 女, 主要研究方向: 肿瘤综合治疗, E-mail: hy_meilin@163.com。

【通讯作者】 文庆莲, 女(1973-), 教授, 主要研究方向: 肿瘤综合治疗。E-mail: wql7315@163.com。

癌细胞株 CNE-2 于 BALB/c-nu 裸鼠四肢皮下建立了移植瘤模型,并采用绿色荧光蛋白(GFP)标记,进行放射抗拒性的研究。而宁喜等^[10]将 CNE-2 鼻咽癌裸鼠模型给予生理盐水、EGCG、放疗、EGCG 联合放疗等不同处理,发现联合放疗组能够显著抑制肿瘤生长,得出 EGCG 能够增强模型对放疗的敏感性,其机制可能与抑制 survivin 和 VEGF 的表达水平有关。张心丽等^[11]实验研究发现,紫杉醇、顺铂都能显著的阻遏裸鼠人鼻咽癌 CNE-1 的生长,对于鼻咽癌,这两者都是可应用于化疗中的药物。但以上鼻咽癌模型都是在小鼠四肢皮下建立,与临床患者鼻咽癌生长部位差异显著,其侵袭转移性,生理学、生物学特性也会较之有明显不同,从而影响实验观测结果。李萍等^[12]采用了鸡胚材料,利用 5-8F 鼻咽癌细胞株建立了鼻咽癌鸡胚绒毛尿囊膜模型,并在此模型基础上进行了鼻咽癌细胞侵袭行为研究等。鸡胚材料目前已在医学研究中广泛应用,但其作为一胚胎性结构,还未形成成熟的周围组织,这就极大限制了鼻咽癌鸡胚绒毛尿囊膜模型的研究范围,适用性较窄。蓝柯等^[13]人应用 DNA 重组以及显微注射等技术,构建出 *N-M1P1* 转基因鼻咽癌小鼠模型,研究结果显示 *N-M1P1* 能够于小鼠的鼻咽部诱导发生癌前病变。转基因技术实现了外源基因的引入与流动,从基因层面研究疾病的发生发展,但转基因动物模型的构建难度大,技术支持要求高,资金耗费大,不适宜进行大规模的动物模型研究。以上学者都是在小鼠身上建立动物模型,但小动物鼻咽部结构太小,在建立鼻咽癌移植瘤模型时,难以辨认鼻咽部的结构,不能正确判断肿瘤是否种植在鼻咽部,降低了实验结果的可信度。同时,郑文宏等^[14]学者也发现,人与小鼠胚胎在鼻咽的解剖学和组织学方面都存在着明显差异,并不是建立鼻咽移植瘤模型的最佳实验动物。兔体型较大,生物学及转移特性等都与人类相似,便于复制人类鼻咽癌模型并进行后续的研究。

2 兔 VX2 鼻咽移植瘤模型制作方法

2.1 动物的选择

新西兰兔对 VX2 肿瘤天然缺乏免疫机制,因而 VX2 瘤株移植成功率^[15]且 VX2 的头颈部肿瘤模型在生物学特性、淋巴结转移及远处转移、侵袭方式上都与人类头颈部肿瘤极为相似^[16-18]。人类鼻咽肿瘤大多为鳞癌,其中低分化的鳞状细胞癌可占 85%

以上,而 VX2 瘤株作为一种低分化的鳞状细胞癌,在病理学上与其共通,有利于鼻咽肿瘤的病因学、血清学等方面的研究^[19]。而随着 VX2 肿瘤细胞在体内的迅速生长,逐渐向周围组织浸润,尤以咽旁间隙、鼻腔、口咽居多,斜坡、海绵窦、颅底等也有侵犯,这与人鼻咽肿瘤的生长特性十分相似^[20],可以此进行鼻咽肿瘤诊断、治疗等方面的探讨。在远处转移方面,种植于头颈部的 VX2 肿瘤同人类鼻咽肿瘤一样,都会进一步进展,侵犯淋巴结,首先波及同侧颈深淋巴结,肿瘤种植成功一定时间后,其同侧颈深淋巴结的转移率可达到 100%^[21],并逐渐转移至同侧颈浅淋巴结,进而扩散至对侧颈部淋巴结,晚期甚至发生肺转移、骨转移。因此利用 VX2 鼻咽移植瘤模拟人类鼻咽肿瘤的在体生长,具有较强的实验可行性。同时,兔的鼻咽部接近于人的解剖学形态,鼻咽部结构易进行影像学观察,进行影像学引导下的穿刺接种。因此选择新西兰白兔(Ⅱ级动物)建立模型,雌雄不限,月龄多选择 3~4 月龄的新西兰兔,此时兔的生理机能稳定,生长发育良好,易于进行长时间的饲养及观察^[22,23],体重在 2.5 kg~2.6 kg 左右。

2.2 动物的麻醉

家兔体型中等,且此次操作持续时间短,需选择安全系数高,麻醉效果好,不良反应少的麻醉方式及药物。复合麻醉能够减少单种药物在动物体内的蓄积量,减低麻醉风险,是合适的麻醉方式。速眠新在麻醉诱导阶段具有诱导快、安全性好、效果稳定等优势,是良好的麻醉诱导剂^[24]。高堂成、许达、颜克松等^[25-27]先后发表的文章中阐述了氯胺酮与速眠新复合麻醉在动物实验中的应用,曹春艳、王小铭、张立永等^[28-30]也探讨了速眠新联合水合氯醛、速眠新联合地西洋的麻醉方法,其麻醉效果较好、麻醉深度易于控制、手术需要及动物安全都能得到有效保证,都可作为此次实验的麻醉药物。参照有关文献^[31,32],氯胺酮与速眠新联合方案采用速眠新 II 注射液 0.1 mL/kg 及盐酸氯胺酮注射液 0.3 mL/kg~0.5 mL/kg,混匀后在兔大腿外侧肌肉注射,必要时在首次给药 0.5 h 后追加首次用量的 1/3~1/2。速眠新联合水合氯醛方案采用速眠新 II 注射液 0.1 mL/kg~0.2 mL/kg 肌肉注射麻醉,当兔对刺激反应迟钝时,再沿耳缘静脉缓慢推注 10% 水合氯醛 1 mL/kg~1.5 mL/kg。速眠新联合地西洋方案采用速眠新 II 注射液 0.2 mL/kg~

0.3 mL/kg,地西洋 0.2 mL/kg 分别臀部肌肉注射。

2.3 接种液的选择

细胞接种法和组织块接种法是目前构建移植瘤动物模型的两种主要方法。其中细胞接种法分为细胞悬液接种法和细胞匀浆接种法,组织块接种法分为新鲜组织块接种法、冻存组织块接种法以及组织块包埋法。组织块包埋法一般适用于皮下移植瘤的构建,由于鼻咽部位于头颅中央,无法活体解剖出鼻咽部进行瘤块的包埋,因此以下主要介绍其余几种方法在构建兔 VX2 鼻咽移植瘤中的应用。

蔡丰等^[33]采用细胞悬液接种法建立了模型,将对数生长期的肿瘤细胞进行消化,加入适量生理盐水后,制成所需浓度的细胞悬液。此接种法形成的瘤块大小形状较均匀,减小了肿瘤外观体积差异带来的实验误差。但其瘤块生长时间较长,对有较短时间限制的实验不宜选用。

王晓东等^[34]采用细胞匀浆接种法构建模型,从传代新西兰兔身上取出并选用有活力的肿瘤组织,将其尽量剪碎呈匀浆状,置于 200 目无菌不锈钢滤网上研磨,在过滤后的底层细胞匀浆内加入适量生理盐水,制成所需浓度的细胞匀浆。细胞匀浆的制备需要反复在滤网上研磨,以确保过滤成单细胞悬液,但研磨时间过长、研磨力度过大,都极易造成肿瘤细胞的失活坏死,因此模型制作的成功率较低。

而吴媛等^[35]采用新鲜组织块接种法建立模型,选用出适宜的肿瘤组织后,将其尽量剪碎,使得肿瘤组织碎块小于 1 mm³,再用生理盐水调整为所需浓度的组织悬液。

冻存组织块接种法则需先将冻存于 -70℃ 液氮中的组织利用组织块复苏法复苏,再采用新鲜组织块接种法的步骤制作组织悬液。文庆莲等^[36]研究者认为,造模成功率最高的是新鲜组织块种植法,但其与冻存组织块种植法都存在所形成肿瘤体积差异大的问题,且这两种悬液注射过程中容易造成针头的堵塞,影响模型的制作。

在实际操作的过程中,需要充分综合考虑肿瘤组织及实验兔状态、操作用具规格以及实验人员技术水平等具体情况,选择适宜的接种液类型。

2.4 种植部位

兔鼻咽部解剖学形态与人相似又略有不同,根据其硬腭及鼻中隔短,而软腭较长的特点,界定其鼻咽部范围为:前界为上颌结节与垂体窝后缘的连线,顶部为基蝶骨(蝶骨体)与基枕骨(枕骨底部),

底部为软腭,两侧壁为粘膜和软组织,沿软腭作一延线迄咽后壁为后界^[37]。

2.5 肿瘤接种

悬液的穿刺接种目前可采用经软腭穿刺接种法与经舌骨中点穿刺接种法。

经软腭穿刺接种法:实验兔麻醉后,将四肢与头部固定,呈仰卧位,嘴部呈张口固定,一只手固定舌与下颚,暴露软腭,另一只手由牙齿向悬雍垂方向轻按硬腭,当感觉到与硬腭明显不一样的柔软感,即到达软腭,持 19 G 穿刺针穿过软腭达鼻咽部,直至穿刺针遇到阻力,提示针尖已达鼻咽顶后壁,停止进针。用注射器抽取约 0.5 mL 配置好的肿瘤细胞悬液或组织悬液,连接注射器与穿刺针,向接种部位缓慢注入悬液,完成穿刺。

经舌骨中点穿刺接种法:实验兔麻醉后,将四肢与头部固定,呈仰卧位,对拟穿刺区域进行剪毛及常规消毒。首先对兔进行鼻咽部多层螺旋 CT 平扫,以正中矢状位作为拟穿刺平面,以舌骨中点后缘作为最佳穿刺点,利用 MPR 后处理技术进行观察和测量,以确定穿刺的角度及距离。持 19 G 穿刺针按照测量确定的角度和距离,从穿刺点进针,直至穿刺针遇到阻力,提示针尖已达鼻咽顶后壁,停止进针,再次进行多层螺旋 CT 平扫,观察此时针尖所在位置,若穿刺位置不满意,再根据扫描结果做适度的调整甚至重新穿刺,以至针尖位于紧邻斜坡的鼻咽顶后壁。达满意位置后,用注射器抽取约 0.5 mL 配置好的肿瘤细胞悬液或组织悬液,连接注射器与穿刺针,向接种部位缓慢注入悬液,完成穿刺。

金观桥^[38]、张俊^[15]以及孟汉卿等^[39]研究者选用的穿刺点为舌骨中点,VX2 移植瘤成功率分别为 80% (20/25,1 只意外死亡,4 只未见肿瘤生长)、66.7% (8/12,8 只未见肿瘤生长)和 80% (20/25,2 只穿刺死亡,3 只未见肿瘤生长)。黄江琼等^[20]研究者则选择软腭作为穿刺点,VX2 移植瘤成功率为 90.2% (37/41,4 只腹泻死亡,3 只未见肿瘤生长)。

两种穿刺方法亦各有其优劣,经舌骨中点穿刺接种法由于是在 CT 引导下穿刺接种,接种部位得到可靠验证,提高了接种成功率。但反复的 CT 扫描延长了操作时间,实验兔易在中途苏醒,影响接种过程。同时,以舌骨中点后缘作为穿刺点,在进针过程中易误穿大血管,造成实验兔失血死亡。经软腭穿刺接种法仅凭实验人员经验确定穿刺针到达部位,对实验人员的操作经验及操作能力要求较

高,且不能保证穿刺部位的准确性,但显著缩短了实验时间,减少了实验的人力与财力,降低了意外死亡率。在实际穿刺过程中,需根据具体的操作条件与操作水平,来选择最佳的接种方式。

2.6 观察和评价方法

观察方法:从接种完成后的第 1 周开始,每一周对实验兔行 CT 扫描,扫描范围包括整个头颅至环甲膜,层厚 $< 3.0\text{ mm}$ 。

评价依据:(1)鼻咽部有软组织肿块,或于局部发现小的软组织隆起;(2)鼻咽腔不对称;(3)颅底骨质有破坏;(4)颈动脉鞘周围有一个或多个肿大淋巴结。于 CT 图像上见到以上一个或多个表现,即表明兔 VX2 移植瘤模型制作成功。

3 方法改进

本文总结介绍了兔 VX2 鼻咽移植瘤模型的构建方法,并比较了其优劣及适用条件。在具体操作中,为了提高模型建立的成功率及模型质量,某些过程可根据情况进行适当改进:(1)在麻醉操作中,为防止兔子挣扎、头部摆动,造成麻醉针头刺破耳缘静脉,可利用固定器将兔头固定后再行静脉注射。注射过程中可先推注麻醉药物总量的 $1/2$,观察兔子状态的同时,缓慢推入剩下的麻醉药物,一旦发现兔进入麻醉状态,立即停止麻醉,以防麻醉过深。(2)在制作接种液时,最好选择体积约为 2 cm^3 的肿瘤,体积过大的肿瘤中心常常出现坏死,影响所得接种液活性。(3)若采用细胞匀浆接种法,操作过程中研磨力度不宜过大,研磨时间不宜过长。(4)为保持细胞活性选择在冰上或其他低温容器中进行接种液制作,并保持操作环境的无菌条件。(5)在行穿刺接种时,用固定器将实验兔头部固定,确保穿刺位置的准确性。

兔 VX2 鼻咽移植瘤模型能较大程度还原人类鼻咽肿瘤的在体生长,且模型制作成功率高、适用性广、可重复性好,对于人类鼻咽肿瘤的诊断、治疗、监控等各方面研究都有着重要意义。

参考文献:

[1] Kidd JG, Rous P. Cancers deriving from the virus papillomas of wild rabbits under natural conditions [J]. J Exp Med, 1940, 71 (4): 469–494.

[2] Adriane K, Huang J, Ding G, et al. Self assembled magnetic PVP/PVA hydrogel microspheres; magnetic drug targeting of VX2 auricular tumours using pingyangmycin [J]. J Drug Target,

2006, 14(4): 243–253.

[3] Anayama T, Nakajima Dunne TM, et al. A novel minimally invasive technique to create a rabbit VX2 lung tumor model for nano-sized image contrast and interventional studies [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e67355.

[4] Park HS, Han JK, Lee JM, et al. Dynamic contrast-enhanced MRI using a macromolecular MR contrast agent (p792): evaluation of antivascular drug effect in a rabbit VX2 liver tumor model [J]. Korean J Radiol, 2015, 16(5): 1029–1037.

[5] Rossmann A, Mandic R, Heinis J, et al. Intraperitoneal oxidative stress in rabbits with papillomavirus-associated head and neck cancer induces tumoricidal immune response that is adoptively transferable [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(16): 4289–4301.

[6] Wang F, Fang W, Zhang MR, et al. Evaluation of chemotherapy response in VX2 rabbit lung cancer with ^{18}F -labeled C2A domain of synaptotagmin I [J]. J Nucl Med, 2011, 52(4): 592–599.

[7] Wang Y, Kan HL, Sun H, et al. Magnetic resonance imaging-navigated argon-helium cryoablation therapy against a rabbit VX2 brain tumor [J]. Exp Ther Med, 2015, 9(6): 2229–2234.

[8] Zhao S, Yu H, Du N. Experimental study of doxorubicin interventional chemotherapy in the treatment of rabbit VX2 renal transplantation carcinoma [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8 (7): 10739–10745.

[9] 黄小鹏, 马慧, 朱小东, 等. 绿色荧光蛋白标记的鼻咽癌放射抗拒性裸鼠移植瘤模型的建立及其活体成像观察 [J]. 中国癌症防治杂志, 2013, (04): 291–295.

[10] 宁喜, 倪菊芳, 易世江. EGCG 联合放疗治疗鼻咽癌裸鼠移植瘤模型 [J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2011, (04): 200–203.

[11] 张心丽. 鼻咽癌 CNE-1 及 CNE-1/taxol 裸鼠移植瘤模型的建立及生物学特性差异的研究 [D]. 中南大学, 2011.

[12] 李萍, 张哲, 韦祝新, 等. 鼻咽癌细胞鸡胚绒毛尿囊膜移植瘤模型的建立 [J]. 微创医学, 2010, (05): 435–437.

[13] 蓝轲, 乔贵林, 沈新民, 等. 鼻咽癌来源潜伏膜蛋白 1 的表达诱发转基因小鼠鼻咽不典型增生 [J]. 动物医学进展, 2002, (05): 46–48, 54.

[14] 郑文宏. 小鼠和人鼻咽发育形态学与免疫组织化学研究 [D]. 南方医科大学, 2013.

[15] 张俊, 骆宾, 高峥嵘. 兔鼻咽部 VX2 肿瘤模型的建立及 CT 灌注特征 [J]. 山西医药杂志, 2008, 37(5): 434–435.

[16] van Es RJ, Dullens HF, van der Bilt A, et al. Evaluation of the VX2 rabbit auricle carcinoma as a model for head and neck cancer in humans [J]. J Craniomaxillofac Surg, 2000, 28(5): 300–307.

[17] Sapundzhiev N, Dunne AA, Ramaswamy A, et al. The auricular VX2 carcinoma: feasibility of complete tumor resection [J]. Anticancer Res, 2005, 25(6b): 4209–4214.

[18] 沈毅, 孙坚, 周晓健, 等. 兔舌不同部位 VX-2 鳞癌与颈淋巴结转移模型的生物学特性 [J]. 上海口腔医学, 2007, 16 (5): 497–501.

[19] 韩秀丽. 清瘤亮喉方对喉咽癌移植瘤生物学行为的影响及其

- 机理研究 [D]. 山东中医药大学, 2011.
- [20] 黄江琼, 王安宇, 朱小东, 等. 兔鼻咽 VX2 移植瘤模型的建立及其生长转移特性 [J]. 中国肿瘤临床, 2009, 36(4): 222 - 226.
- [21] 沈纳, 吴海涛. 兔 VX2 梨状窝癌颈淋巴结转移模型建立 [C]. 中华医学会第十次全国耳鼻咽喉-头颈外科学术会议论文汇编, 2007: 2.
- [22] 赵国成. 不同营养水平对 3 ~ 5 月龄新西兰兔生长的影响 [J]. 毛皮动物饲养, 1996, (04): 4 - 6.
- [23] 王刚, 刘科, 赵伟健, 等. 我国 SPF 新西兰兔培育和生物学特性研究进展 [C]. 北京: 2008: 1.
- [24] 周立才, 张秀兰, 石晶, 等. 实验动物麻醉的应用研究 (附 1000 例报告) [J]. 腹腔镜外科杂志, 2013, (08): 634 - 637.
- [25] 高堂成, 张春才, 康庆林, 等. 硫喷妥钠、氯胺酮与安定在实验兔麻醉中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(3): 170 - 172.
- [26] 许达, 郑长生, 邢超, 等. 氯胺酮与速眠新 II 复合麻醉对 SPF 兔麻醉效果的观察 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, (10): 82.
- [27] 颜克松, 牛春, 王英召, 等. 氯胺酮与速眠新 II 复合应用对小型猪麻醉的观察 [J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(5): 206 - 208.
- [28] 曹春艳, 康宁, 严笠, 等. 速眠新 II 复合水合氯醛对实验兔全麻效果的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(5): 15 - 18.
- [29] 王小铭, 赵建农, 黄显龙. 速眠新 II、戊巴比妥钠联合地西洋对新西兰大白兔麻醉效果的比较 [J]. 黑龙江医药, 2013, 26(4): 603 - 605.
- [30] 张立永, 尹秀玲, 蒋禄峰. 水合氯醛、速眠新 II、二甲苯胺噻唑对家兔心电图、呼吸率和血压的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(4): 70 - 73.
- [31] 李尧清, 杨小玲, 秦建琼, 等. 氯胺酮在实验动物麻醉中的应用分析 [J]. 上海实验动物科学, 2001, 21(3): 169 - 170.
- [32] 吴曙光, 钱宁. 速眠新在实验动物麻醉中的应用 [J]. 贵阳中医学院学报, 2007, 29(1): 58 - 60.
- [33] 蔡丰. 人鼻咽癌细胞裸鼠肺转移模型的建立 [D]. 蚌埠医学院, 2014: 1 - 43.
- [34] 王晓东, 任军, 杨仁杰, 等. VX2 活细胞数与兔肝癌模型成功率及成瘤时间的关系 [J]. 现代肿瘤医学, 2005, 13(05): 589 - 591.
- [35] 吴媛, 周训钊, 钟昌桃, 等. 裸鼠腋下皮肤切开缝合和穿刺套针注射接种人鼻咽癌细胞成瘤效果比较 [J]. 山东医药, 2015, 55(19): 5 - 7.
- [36] 文庆莲, 吴敬波, 范娟, 等. 建立人鼻咽癌裸鼠皮下移植瘤模型不同方法的比较 [J]. 肿瘤防治研究, 2007, 34(3): 229 - 230.
- [37] 罗文, 邓宝和, 王惠华, 等. 兔鼻咽部解剖学的初步研究 [J]. 癌症, 1982, 1(1): 28 - 32.
- [38] 金观桥. 兔 VX2 鼻咽癌颅底侵犯模型建立及其放射治疗疗效的 CT、MR 评价 [D]. 广西医科大学, 2011.
- [39] 孟汉卿. 磁共振成像对实验兔鼻咽颅底结构及其 VX2 癌侵犯的研究 [D]. 广西医科大学, 2012: 1 - 67.

[修回日期]2016 - 03 - 28

(上接第 82 页)

- [14] Clark JE, Marber MS. Advancements in pressure-volume catheter technology - stress remodelling after infarction [J]. Exp Physiol. 2013; 98(3): 614 - 21.
- [15] 王艳飞, 曹雪滨, 崔英凯, 等. 改良大鼠左心室插管术及心衰大鼠左心功能指标的测定 [J]. 中国比较医学杂志 [J]. 2008; 18(12): 34 - 36.
- [16] Rockman HA, Ross RS, Harris AN, *et al.* Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991; 88: 8277 - 81.
- [17] Henry Gray. Anatomy of the Human Body [M]. Philadelphia and New York: Lea and Febiger. 1918; plate 506.
- [18] Connolly KA, Prior DL, Kelly DJ, *et al.* Load-sensitive measures may overestimate global systolic function in the presence of left ventricular hypertrophy: a comparison with load-insensitive measures [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006; 290(4): H1699 - 705.

[修回日期]2016 - 03 - 09

肺纤维化动物模型及研究进展

陈孟毅, 孟爱民

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021)

【摘要】 近年来,肺纤维化的发病率呈上升趋势,其病因和发病机制尚不清楚。肺纤维化动物模型在研究肺纤维化发病机制中起重要作用。本文对一些常用和新建立的肺纤维化模型的使用和特点进行了总结,为肺纤维化疾病的基础研究和药物筛选及有效性评价提供参考。

【关键词】 肺纤维化;动物模型;博来霉素;肺

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)06-0088-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2016.006.016

Introduction and research progress of animal models of pulmonary fibrosis

CHEN Meng-yi, MENG Ai-min

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

【Abstract】 Pulmonary fibrosis can severely disrupt lung functions, but its etiology and pathogenesis remain unclear. Animal models of lung fibrosis play an important role in investigation of the mechanism by which pulmonary fibrosis develops. This review summarizes the characteristics, advantages, and disadvantages of widely used and newly established animal models of lung fibrosis.

【Key words】 Pulmonary fibrosis; Animal models; Bleomycin; Lung

肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是以炎症和细胞外基质沉积为特征,呈进展性和致死性的弥漫性肺间质疾病。在弥漫性间质性肺疾病中,特发性肺间质纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)发病率最高,且预后极差^[1]。特发性肺纤维化是一种原因不明、以弥漫性肺泡炎和肺泡结构紊乱最终导致肺间质纤维化为特征的疾病,病理组织学特点是普通型间质性肺炎(usual interstitial pneumonia, UIP)^[2],表现为上皮细胞增生、基底膜裸露、肺泡实变、出现成纤维细胞灶等。

根据2013年美国胸科学会/欧洲呼吸学会的标

准^[3],将特发性间质性肺炎分为以下几类:(1)常见的间质性肺炎:特发性肺纤维化、特发性非特异性间质性肺炎、呼吸性支气管间质性肺炎、脱屑性间质性肺炎、隐源性机化性肺炎、急性间质性肺炎;(2)罕见的特发性间质性肺炎:特发性淋巴性间质性肺炎、特发性胸膜肺实质弹力纤维增生症;(3)无法分类的间质性肺炎。

肺纤维化发病机制尚不明确,缺乏有效的治疗手段。以往认为肺纤维化是由慢性炎症引起,试图通过抑制炎症反应阻止肺纤维化的发展进程,没有取得预期效果。近年来的研究发现上皮细胞及上

【基金项目】 国家自然科学基金(81372928, 81129020, 81573094)。

【作者简介】 陈孟毅(1992-),女,硕士生,专业:放射医学。E-mail: huchenmengyi@126.com。

【通讯作者】 孟爱民(1963-),女,研究员,研究方向:放化疗损伤造血系统机制。E-mail: ai_min_meng@126.com。

皮-间质细胞的反应异常激活导致的肺泡上皮细胞慢性损伤在肺纤维化发生过程中起重要作用^[4]。也可能炎症反应和上皮细胞改变这两种机制共同作用导致肺纤维化产生。

由于临床上缺乏治疗肺纤维化疾病有效的药物,迫切需要探讨其发病机制,建立合适的实验型肺纤维化动物模型具有重要的作用。目前常用诱导肺纤维化的方法有博来霉素、二氧化硅、异硫氰酸荧光素、辐射或通过病毒载体或转基因系统表达特定的基因等等。本文总结了一些常用的及新建的肺纤维化模型,并分析这些动物模型的应用及优缺点,为肺纤维化疾病的基础研究和药物筛选及有效性评价提供参考。

1 利用物理化学手段诱导肺纤维化模型

1.1 博来霉素

在临床应用中发现博来霉素(bleomycin, BLM)可以诱导患者的肺纤维化。因此 BLM 是目前最常用的诱导特发性肺纤维化动物模型的药物。

BLM 是由轮枝链霉菌产生的碱性糖肽类物质的多组分复合抗生素^[5],具有抗肿瘤作用。多常用小鼠、大鼠、仓鼠、兔、豚鼠等啮齿类动物,也用于狗和灵长类动物等动物模型。BLM 可通过气管内、腹膜内、皮下、静脉内以及吸入等多种方式给药,最常用的是通过气管插管单次给药,剂量通常是 3~5 mg/kg。在 BLM 单次给药后,急性炎症反应会持续 8 d,第 9 天炎症会向肺纤维化转换,28 d 或 35 d 之后出现组织基质沉积,呈现纤维化的改变^[6]。

有关 BLM 诱导小鼠肺纤维化的机制,有学者认为是 BLM 诱导 DNA 的断裂,产生自由基诱导氧化应激反应^[6],引起细胞凋亡或坏死,诱导炎症反应和纤维化^[7]。而 K. Aoshiba 的研究^[8]认为 BLM 早起引起肺泡 I 型细胞死亡,具有干细胞特性的肺泡 II 型细胞试图增殖分化进行修复,但 BLM 造成的 II 型细胞损伤导致其增殖能力受到严重影响,致使上皮细胞不能修复,纤维母细胞激活后向上皮细胞间的缺陷处迁移,从而导致肺纤维化。肺泡 II 型细胞的损伤及过度增殖导致细胞衰老,可能是肺纤维化发生的一种新的机制。

BLM 肺纤维化模型易于操作、可重复性强,在阐明肺纤维化与细胞因子、生长因子和信号通路的关系上具有重要作用,还广泛应用于潜在抗纤维化药物的筛选。但该模型并没有复制出人 IPF 进展

慢、不可逆这两个特点^[9],利用此模型筛选出的 240 多种治疗手段,在临床转化后没有取得预期后果,该模型需要进一步优化。

1.2 石棉

石棉肺在暴露人群中是一种严重的肺纤维化疾病。利用石棉气管滴注和雾化吸入两种方式可以诱导小鼠肺纤维化。气管滴注模型在第 7 天出现纤维化,第 14 天纤维化成熟,吸入模型在 1 个月左右才出现纤维化^[10]。气管内单次滴注石棉纤维模型的特点是:石棉纤维在两肺叶间分布不均,纤维化常出现在肺中央而不是在胸膜下^[10],建模所需时间短;吸入模型需要专门的设备并且建模时间较长。该模型的机制是:石棉纤维的特异性沉积可以诱导氧化应激,损伤肺泡上皮细胞^[11],巨噬细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞和嗜中性粒也参与肺损伤的过程。

小鼠石棉肺模型是少数能建立肺纤维化病灶的模型之一,因此有助于了解肺纤维化的病理发展。但石棉能够引起人罕见的间皮瘤发生,操作人员在应用时应该加强防护。

1.3 二氧化硅

二氧化硅滴注到小鼠肺部可以产生纤维结节,与一些职业暴露人群中的矽肺结节性纤维化疾病类似^[12]。

二氧化硅可以通过雾化吸入、气管滴注或者是口喉抽吸等方式诱导动物肺纤维化,雾化吸入模型常用 C3H/HeN、MRL/MpJ 和 NZB 小鼠^[13],气管滴注则常用 C57BL/6 小鼠。二氧化硅在肺中沉积,形成持续的毒性刺激炎症反应,使纤维化结节在二氧化硅周围形成。两种模型相比,气管滴注模型更易操作更高效,吸入模型与人类矽肺的病因更接近,但吸入模型建模需要 40~120 d^[14],而气管内给药建模需 14~28 d^[15],故常用气管滴注模型。

二氧化硅模型的一个重要特征就是巨噬细胞的炎症复合体(NALP3)被激活^[16],在研究肺纤维化的先天免疫调节方面具有重要作用。

二氧化硅模型的优点是肺部的二氧化硅粒子难以清除,能形成一个持久性刺激。该模型也有一定的局限性:1、该模型建模时间长,并且缺乏 UIP 的一些特征:纤维化无纤维细胞灶、时间异质性不明显、无上皮细胞增生;2、雾化吸入二氧化硅需要专门的雾化吸入设备;3、具有种属依赖性。

1.4 异硫氰酸荧光素

异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 也可用于诱导肺纤维化。FITC 可以直接作用与气道,作为半抗原与其他的肺组织蛋白结合,通过趋化因子受体 2 (CCR2) 与 CCL12 配体的相互作用使纤维细胞进入肺,成为一个长时间的刺激因素,诱导肺纤维化^[17]。FITC 经气管内给药至肺部,约 14~21 d 可以形成肺纤维化^[18]。FITC 的发病机制:FITC 引起急性肺损伤,引发肺水肿和炎症反应,随后发生纤维化^[17]。常用 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠。

该模型独特的优势:FITC 是带荧光的荧光素荧光分子,能确定周围纤维化的沉积区域,可以用免疫荧光的方法来定位肺受损伤部位^[19]。FITC 模型仍然存在一些缺点:每次给药时 FITC 都必须使用新鲜溶液,由于超声处理的 FITC 颗粒的大小不同,其每次作用效果不同,使纤维化的标准化和重复性有很大的困难。并且,若超声处理的时间较长,FITC 的颗粒较小,会增加急性毒性,引起早期肺损伤^[7]。

1.5 辐射

目前,肿瘤的发病率持续上升,临床上常用的治疗方法有手术治疗、化学治疗(化疗)、放射治疗(放疗)和靶向治疗。放射性肺损伤成为胸部肿瘤放疗后常见的严重并发症之一。因此建立放射性诱导肺纤维化模型具有重要的意义。

放射性肺纤维化模型的作用机制是辐射通过使 DNA 损伤直接诱导 I 和 II 型肺泡上皮细胞死亡,肺泡巨噬细胞涌入到这些受损的区域,随后激活单核细胞,产生炎症因子、促纤维化细胞因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和生长转化因子- β (TGF- β) 等,参与肺纤维化的发展过程^[4]。放射性纤维化模型具有剂量依赖性,当辐射小于 5 Gy 时,几乎不会发生纤维化;小鼠全身照射 12~15 Gy 在第 20 周出现肺纤维化^[20]。若辐射剂量较大,纤维化将会持续 6 个月。

小鼠在照射后,晚期作为放射性肺纤维化模型,早期可作为放射性肺炎的模型^[7]。放射性肺纤维化模型是验证骨髓间充质干细胞修复作用的模型之一^[21]。

2 利用基因工程手段诱导肺纤维化模型

2.1 转基因小鼠

过去的研究发现,家族间质性肺炎 (FIP) 与表面活性蛋白 C (SFTPC)、表面活性蛋白-A2 (SFTPA2)、

端粒酶逆转录酶 (TERT) 和端粒酶 RNA (TERC) 这四个基因位点突变有关。有调查发现这四个基因突变大概占到 FIP 病例的 15~20%^[22]。SFTPC 突变与儿童和成人间质性肺疾病均有关,SFTPC 在肺泡上皮细胞中表达,引起肺泡 II 型细胞的内质网应激反应,从而容易引起肺纤维化^[23];SFTPA2 突变在体外模型中也能引起内质网应激反应^[24];TERT 和 TERC 突变与成人的间质性肺炎和肺纤维化有关^[25],

常用 SFTPC、SFTPA2、TERT 和 TERC 等几个基因来构建转基因小鼠,利用四环素或多西环素操纵子诱导系统打开或关闭这些特定细胞类型的特定基因的表达,观察该基因与肺纤维化的关系。

2.2 细胞因子的过量表达模型

肺纤维化发生过程中,不仅肺组织病变部位细胞成分发生改变,生长转化因子- β (TGF- β)、结缔组织生长因子、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等多种细胞活性因子也参与纤维化形成过程。

在 IPF 的患者体内发现 TGF- β 、TNF- α 、白细胞介素-13 (IL-13) 和白细胞介素-1b (IL-1b) 等细胞因子过量表达。TGF- β 是最重要的致纤维化因子^[26],能诱导细胞外基质产生和成纤维细胞生成,过量表达时会导致胶原纤维沉积而产生瘢痕组织及纤维化。TGF- β 在肺纤维化中的主要作用是^[27]:促进成纤维细胞分裂增殖及成熟分化并合成大量胶原蛋白;趋化炎症细胞及单核巨噬细胞,合成释放 IL-1、IL-6 等细胞因子,提高其生物活性。TNF- α 是一种炎症细胞因子,在肺纤维化发生机制中的作用有:聚集炎症细胞;与 IL-1 协同激活嗜中性粒细胞,介导肺炎炎症反应;刺激肺成纤维细胞增殖,对胶原合成有一定促进作用;通过细胞外信号调节激酶 (ERK) 信号通路诱导 TGF- β_1 的生成^[28]。

在基础研究中,常利用转基因方法,通过腺病毒作为载体,在肺上皮细胞调节某种基因的表达,调节下游的细胞信号传导通路,产生过量的细胞因子,从而来观察该细胞因子在纤维化过程中的作用。这些模型的缺点是小鼠的免疫系统会识别并攻击这些载体,使遗传转化不太成功。其中 TGF- β 过量表达模型的特点:(1) 具有种属依赖性,常用 C57BL/6 小鼠;(2) 能模拟人类疾病的上皮细胞凋亡和介质变化的特点^[29]。

3 肺纤维化模型的研究进展

3.1 BLM 多次给药模型

之前利用 BLM 诱导肺纤维化时常采用单次给药的方法,虽然单次给药模型有助于理解肺纤维化的重构,但也有一定的局限:(1)该疾病模型在时间和空间发展和人类疾病的发展是不同的。人类疾病可能随着时间的发展反复对肺泡上皮细胞产生周期性的损伤,使肺不能完全修复,最终导致 IPF。BLM 单次给药不能对肺造成反复性损伤,并且在 BLM 给药 6 周之后,小鼠肺损伤部位有可逆性修复^[30]; (2)两者的显微病理学不同:人类发生肺纤维化的肺部损伤区细胞外基质的沉积增多,成纤维细胞灶周围的肺泡上皮细胞增生^[31],中性粒细胞的炎症反应不明显;而 BLM 单次给药诱导的小鼠肺纤维化中常有明显的嗜中性粒细胞细胞的炎症反应,极少出现 II 型上皮细胞增生。

与单剂量博莱霉素模型和本文描述的其他模型相比,通过 BLM 多次给药的模型可以造成小鼠肺重复性损伤,这种重复剂量模型在肺泡上皮细胞(AEC)增生、减轻肺部炎症反应方面有重要的优势,且更类似于人类肺纤维化疾病的发展过程。这是肺纤维化模型一个重要进展。但是该模型也有一些缺点:(1)虽然建模时间长,但与临床 IPF 的病理过程相比,时间仍是较短;(2)该模型有肺泡上皮细胞增生、出现成纤维细胞灶等 UIP 的特点,但仍不能完全复制 UIP 的病理表现^[32]。

该模型可用于研究支气管肺泡干细胞的作用和上皮-间质转化肺重塑和修复 2 个领域的评估^[32]。

3.2 老年鼠纤维化模型

调查发现肺纤维化的发病率随着年龄增加而增加^[33]。

一些研究表明,老年小鼠比年轻小鼠更容易受到 BLM 的损伤,并且早衰的小鼠比具有衰老抵抗力的小鼠在 BLM 诱导肺损伤后能发生更严重的纤维化。原因是在 BLM 诱导的肺损伤后,老年鼠比年轻鼠能聚集和保留更多的成纤维细胞^[33]。

Elizabeth F 等^[34]用 52~54 周龄的 C57BL/6J 作为老年鼠,Viranuj Sueblinong 等^[35]用 24 月龄的小鼠作为老年鼠,BLM 给药后诱导小鼠肺纤维化。老年鼠肺纤维化模型主要有两个缺点:(1)老年小鼠饲养花费巨大且使用困难;(2)诱导肺纤维化合适的年龄尚不清楚,需要进一步的研究。

3.3 人源化小鼠肺纤维化模型

由于目前尚没有一个肺纤维化动物模型能完全复制肺纤维化的病理特征,因此最近在尝试人源化

小鼠肺纤维化模型。人源化小鼠肺纤维化模型是将人成纤维细胞注射到非肥胖型糖尿病/重症联合免疫缺陷小鼠(NOD/SCID)体内^[36]。这些小鼠缺乏先天免疫和适应性免疫反应,允许人成纤维细胞在小鼠肺中的生长。由于小鼠在人成纤维细胞灌注之前的肺部没有出现纤维化,可以证明人成纤维细胞在肺纤维化发病中的作用。

在人源化肺纤维化模型中,人成纤维细胞不但直接参与小鼠肺的病理性重塑,同时也激活小鼠上皮细胞和成纤维细胞进行病理性重塑和增生。在人成纤维细胞注射后的 30~35 d 发生纤维化,并可以持续数月^[10]。

该模型的优势是被注射的成纤维细胞可以被具有细胞渗透性的染料标记。但同时它也有一定的缺陷:(1)该模型是在小鼠没有免疫细胞的情况下发生纤维化的,这种情况不可能在人类发生;(2)免疫缺陷小鼠价格昂贵,并需要专门的饲养环境。

4 总结

临床上肺纤维化的主要致病因素有:吸入无机或有机粉尘、放射型损伤、家族性肺纤维化等,动物模型常用的诱发因素与之类似,但目前尚没有一个单一的肺纤维化模型能在时间、空间动态发展上复制人类肺纤维化的发病过程,主要有以下几方面的限制:(1)时间持续性,人类疾病的发生需要 10~20 年的时间,BLM 动物模型成模只需 21~28 d,动物模型缺乏人类发病持续性的特点;(2)肺纤维化确诊标准不同,啮齿类动物肺纤维化模型主要是通过基质沉积的病理特点确认为纤维化,而临床上是通过肺功能评估、CT 扫描、病理观察这三个方面才能确诊为肺纤维化;(3)动物模型不能完全复制出临床上肺纤维化的病理特点。

动物模型是研究肺纤维化的一个重要工具,它为探索特发性肺纤维化和其他肺纤维化疾病发病机制及寻找治疗这些破坏性疾病方法提供重要线索。虽然目前肺纤维化模型都有一定的局限性,动物肺纤维化模型仍具有重要作用。一方面我们可以利用现有不同类型的肺纤维化模型其各自的优点来了解肺纤维化的不同特点。例如 BLM 重复给药模型与其他模型相比,最重要的特点是出现肺泡 II 型细胞增生。由于之前的模型中没有 II 型细胞增生这个特征,我们不清楚它对 IPF 有怎样的影响,

对促纤维信号是有益的还是有害的,重复给药模型成为研究肺泡 II 型细胞作用的重要模型。又比如 FITC 模型用免疫荧光的方法确定肺损伤部位、利用二氧化硅模型研究人矽肺的结节性肺纤维化等。另一方面我们需要筛选出对肺纤维化更敏感的小鼠品系、寻找新的与临床类似的肺纤维化动物模型的确诊方法如显微成像技术和动物特异性肺功能的评估等,建立更符合人类肺纤维化病理过程的肺纤维化模型,用此模型研究肺纤维化的致病机制和发展过程,根据实验和临床研究中的新发现不断反馈和修正模型的制备方法,并筛选出更多的抗纤维化药物,为临床上治疗肺纤维化提供更多的参考。总之,我们有必要并十分迫切的需要对肺纤维化动物模型进行更深入的研究。

参考文献:

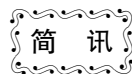
- [1] Molina-Molina M, Pereda J, Xaubet A. [Experimental models for the study of pulmonary fibrosis: current usefulness and future promise] [J]. Arch Bronconeumol, 2007, 43(9): 501–507.
- [2] Demedts M, Costabel U. ATS/ERS international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias [J]. Eur Resp J, 2002, 19(5): 794–796.
- [3] Travis W D, Costabel U, Hansell D M, *et al.* An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias [J]. Am J Resp Crit Care Med, 2013, 188(6): 733–748.
- [4] Morgan G W, Breit S N. Radiation and the lung: a reevaluation of the mechanisms mediating pulmonary injury [J]. Int J of radiation Oncol, Biol, phys, 1995, 31(2): 361–369.
- [5] Adamson IY. Pulmonary toxicity of bleomycin [J]. Environ health persp, 1976, 16:119–126.
- [6] Moeller A, Ask K, Warburton D, *et al.* The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? [M]. Int J Biochem cell biol. 2008: 362–382.
- [7] Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis [J]. Am J physiol Lung Cell Mol Physio, 2008, 294(2): L152–160.
- [8] Aoshiha K, Tsuji T, Nagai A. Bleomycin induces cellular senescence in alveolar epithelial cells [J]. Eur Resp J, 2003, 22(3): 436–443.
- [9] Chua F, Gaudie J, Laurent GJ. Pulmonary fibrosis: searching for model answers [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 33(1): 9–13.
- [10] B. Moore B, Lawson WE, Oury TD, *et al.* Animal models of fibrotic lung disease [J]. Am J Resp Cell Mol, 2013, 49(2): 167–179.
- [11] Sanchez VC, Pietruska JR, Miselis NR, *et al.* Biopersistence and potential adverse health impacts of fibrous nanomaterials: what have we learned from asbestos? [J]. Wiley Interdiscipl Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2009, 1(5): 511–529.
- [12] Oberdorster G. Significance of particle parameters in the evaluation of exposure – dose – response relationships of inhaled particles [J]. Inhalation Toxicology, 1996, 8 Suppl:73–89.
- [13] Davis GS, Leslie KO, Hemenway DR. Silicosis in mice: effects of dose, time, and genetic strain [J]. J Environ Pathol, Toxicol Oncol, 1998, 17(2): 81–97.
- [14] Barbarin V, Nihoul A, Misson P, *et al.* The role of pro – and anti – inflammatory responses in silica – induced lung fibrosis [J]. Resp Res, 2005, 6:112.
- [15] Lakatos HF, Burgess HA, Thatcher TH, *et al.* Oropharyngeal aspiration of a silica suspension produces a superior model of silicosis in the mouse when compared to intratracheal instillation [J]. Exp Lung Res, 2006, 32(5): 181–199.
- [16] Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, *et al.* The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(26): 9035–9040.
- [17] Moore BB, Murray L, Das A, *et al.* The role of CCL12 in the recruitment of fibrocytes and lung fibrosis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006, 35(2): 175–181.
- [18] Moore BB, Paine R, 3rd, Christensen PJ, *et al.* Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling [J]. J Immunol, 2001, 167(8): 4368–4377.
- [19] Christensen PJ, Goodman RE, Pastoriza L, *et al.* Induction of lung fibrosis in the mouse by intratracheal instillation of fluorescein isothiocyanate is not T – cell – dependent [J]. Am J Pathol, 1999, 155(5): 1773–1779.
- [20] McDonald S, Rubin P, Chang AY, *et al.* Pulmonary changes induced by combined mouse beta – interferon (rMuIFN – beta) and irradiation in normal mice – – toxic versus protective effects [J]. Radiother Oncol, 1993, 26(3): 212–218.
- [21] Epperly MW, Guo H, Gretton JE, *et al.* Bone marrow origin of myofibroblasts in irradiation pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 29(2): 213–224.
- [22] Lawson WE, Loyd JE, Degryse AL. Genetics in pulmonary fibrosis – – familial cases provide clues to the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Am J Med Sci, 2011, 341(6): 439–443.
- [23] Lawson WE, Cheng DS, Degryse AL, *et al.* Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(26): 10562–10567.
- [24] Wang Y, Kuan PJ, Xing C, *et al.* Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer [J]. Am J human Genet, 2009, 84(1): 52–59.
- [25] Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, *et al.* Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. New Engl J of Med, 2007, 356(13): 1317–1326.
- [26] Fernandez IE, Eickelberg O. The impact of TGF – beta on lung fibrosis: from targeting to biomarkers [J]. Proc Am Thorac Soc,

- 2012, 9(3): 111 – 116.
- [27] Morimoto Y, Kim H, Oyabu T, *et al.* Effect of long – term inhalation of toner on extracellular matrix in the lungs of rats in vivo [J]. *Inhalation Toxicol*, 2005, 17(3): 153 – 159.
- [28] Sullivan DE, Ferris M, Pociask D, *et al.* Tumor necrosis factor – alpha induces transforming growth factor-beta1 expression in lung fibroblasts through the extracellular signal – regulated kinase pathway [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 32(4): 342 – 349.
- [29] Lee CG, Cho SJ, Kang MJ, *et al.* Early growth response gene 1 – mediated apoptosis is essential for transforming growth factor beta1 – induced pulmonary fibrosis [J]. *J Exp Med*, 2004, 200(3): 377 – 389.
- [30] Chung MP, Monick MM, Hamzeh NY, *et al.* Role of repeated lung injury and genetic background in bleomycin – induced fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 29(3 Pt 1): 375 – 380.
- [31] Katzenstein AL, Mukhopadhyay S, Myers JL. Diagnosis of usual interstitial pneumonia and distinction from other fibrosing interstitial lung diseases [J]. *Human pathol*, 2008, 39(9): 1275 – 1294.
- [32] Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, *et al.* Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol physiol*, 2010, 299(4): I442 – 452.
- [33] Sueblinvong V, Neveu WA, Neujahr DC, *et al.* Aging promotes pro – fibrotic matrix production and increases fibrocyte recruitment during acute lung injury [J]. *Adv Biosci Biotechnol*, 2014, 5(1): 19 – 30.
- [34] Redente EF, Jacobsen KM, Solomon JJ, *et al.* Age and sex dimorphisms contribute to the severity of bleomycin – induced lung injury and fibrosis [J]. *Am J physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 301(4): L510 – 518.
- [35] Sueblinvong V, Neujahr DC, Mills ST, *et al.* Predisposition for disrepair in the aged lung [J]. *Am J Med Sci*, 2012, 344(1): 41 – 51.
- [36] Pierce EM, Carpenter K, Jakubzick C, *et al.* Therapeutic targeting of CC ligand 21 or CC chemokine receptor 7 abrogates pulmonary fibrosis induced by the adoptive transfer of human pulmonary fibroblasts to immunodeficient mice [J]. *Am J pathol*, 2007, 170(4): 1152 – 1164.

[修回日期]2015 – 12 – 10

更 正

本刊第 26 卷第 4 期第 62 页【基金项目】应为【国家自然科学基金(编号:31300946,31260250),泸州市人民政府 – 泸州医学院科技战略合作科技项目(2013LZLY – J22)】。特此更正。



一种实验兔膝关节滑膜组织提取新方法

王俊伟¹, 陈利锋², 王华松², 陈芳², 王丽平², 刘琴²

(1. 湖北中医药大学针灸骨伤学院, 武汉 430065; 2. 广州军区武汉总医院, 武汉 430060)

【中图分类号】 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856(2016)06-0094-01

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 06. 017

类风湿性关节炎(RA)典型病理表现之一为滑膜组织增生。成纤维样滑膜细胞(FLSs)在RA的发生、发展中发挥着重要作用。在原代FLSs体外培养过程中,滑膜组织提取成功与否是实验顺利进行的关键。以往兔膝关节滑膜组织提取大都是提起髌骨上下进行分离,在实验中我们发现将髌骨提起分离两侧及胫骨时需要将髌骨翻转,此时难以辨认关节囊内外层组织的解剖关系,致使分离困难,可能将纤维层混杂导致培养细胞纯度不高。本研究在此基础上进行改良,建立一种简单易行的提取方法并附图做详尽说明。

方法:取新西兰兔一只,耳缘静脉空气栓塞处死,75%酒精浸润双大腿皮肤5 min。沿踝关节切开皮肤至大腿根部,充分剥离皮肤,显露膝关节。将膝关节周围筋膜层剥离,扪及髌骨骨性标志。采取髌骨下极上缘0.5 cm处切开长约1 cm横行切口,离断髌腱,保留髌下脂肪垫作为识别滑膜组织标志。沿切口向内外侧髌游离,提夹关节囊层,必要时离断内外侧副韧带。仔细辨认关节囊内壁一层

薄薄的组织,即为滑膜。助手辅助下仔细分离小心钳夹,剔出滑膜组织上的血液及脂肪组织。将取出滑膜组织置于EP管中(内含100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素的PBS液)。

提取前明确滑膜组织解剖关系将大大减少术中辨认时间(图1)。本研究中,取髌骨下极上缘0.5 cm处切口,考虑此处为关节间隙水平,其下方为髌下脂肪垫。髌下脂肪垫与滑膜组织毗邻,可作为滑膜层辨认的标志,术中需离断外侧副韧带(图2)。横行切开髌韧带,从一侧打开即可肉眼见到关节囊的内外分层,内层即为实验所需的滑膜层(图3)。研究组以该法提取兔膝关节滑膜组织,操作简单,实验时间约1 h,组织纯度高,经传代培养,细胞呈典型纤维样改变(图4),是一种切实可行且简单的实验方法。

术中注意:(1)提取时需避免滑膜组织混杂血液及脂肪;(2)正常滑膜组织透亮,有一定黏性,但韧度不足,操作需动作轻柔,切勿粗暴。关节炎诱导模型兔滑膜组织则因充血、炎性增生而变厚、质韧,形态学发生一定改变,需注意辨清层次关系。

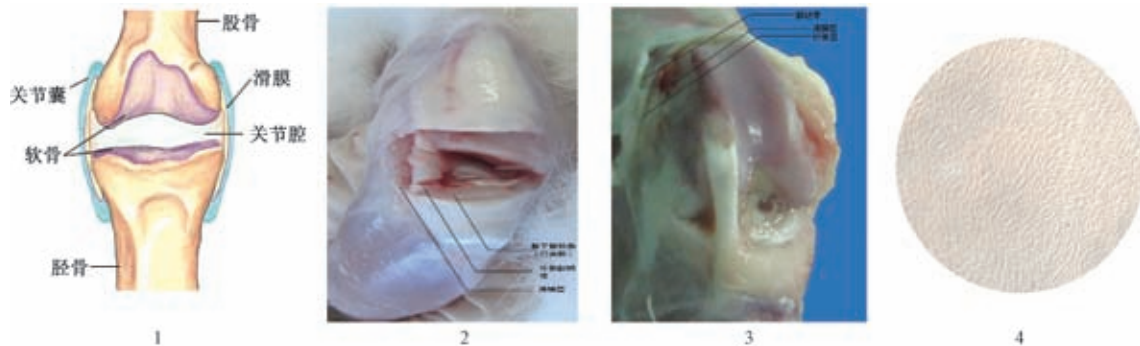


图1 正常膝关节解剖 图2 实验兔膝关节组织层次关系 图3 实验兔膝关节组织层次关系 图4 所提取滑膜培养的细胞

[基金项目]湖北省卫生厅中医药科研课题(2013Z-Y37);广州军区武汉总医院课题(YZ201422)。

[作者简介]王俊伟,湖北中医药大学研究生院,2014级硕士研究生在读。

[通讯作者]陈利锋,广州军区武汉总医院中西医结合科,副主任医师。