



中国科技论文统计源期刊 (中国科技核心期刊)

ZHONGGUO BIJIAO YIXUE ZAZHI

ISSN 1671-7856

CN 11-4822/R

原名《中国实验动物学杂志》

中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE



2016 **5**

邮发代号: 82-917

第26卷 (第5期) Vol.26 No.5

ISSN 1671-7856



9 771671 785145

主办 中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所

中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

月刊 1991 年 3 月创刊

第 26 卷 第 5 期 2016 年 5 月 30 日出版

主 管
中国科学技术协会

主 办
中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所

主 编
秦 川

编 辑
《中国比较医学杂志》编辑部

出 版
中国实验动物学会

发 行
《中国比较医学杂志》编辑部
100021, 北京市朝阳区潘家园南里 5 号
电话: (010) 67779337
传真: (010) 67770690
E-mail: bjlb@cnilas.org
http://zggydw.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 范永升
本期责任编辑 周文君

目 次

(本刊已入编“中文核心期刊要目总览”)

研究报告

壳聚糖导管复合辛伐他汀/泊洛沙姆 407 水凝胶

修复大鼠外周神经缺损的研究 郭琦, 刘灿, 海宝, 等(1)

树鼩 HGF 全长编码序列的克隆及分子特征分析

..... 李振宇, 陈玲霞, 尹博文, 等(10)

Slit2 在非酒精性脂肪肝中的作用 ... 曾翠玲, 郑凌云, 邢丽英, 等(19)

骆驼奶对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢

及 PPAR- γ 、TNF- α mRNA 的影响 ... 周琚, 张泉龙, 杨茜, 等(25)

杨梅苷对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用

..... 陈亚萍, 张彬, 刘桂艳, 等(31)

Fkbp51 基因敲除小鼠肝脏与大脑海马区 RNA 表达谱系的分析比较

..... 徐玉雪, 邱彬, 魏强, 等(40)

两种小型猪代谢综合征相关指标的比较

..... 那顺巴雅尔, 吉木斯, 牧仁, 等(49)

长爪沙鼠原位肝移植模型的建立 楼琦, 卢领群, 周冰璐, 等(53)

蜂巢结合针刺对变应性鼻炎模型大鼠的治疗作用研究

..... 秦良卿, 马玉奎, 薛云, 等(58)

糖尿病 ZDF 大鼠早期微血管并发症的

生化指标及病理组织学变化 陈小真, 戎亦骊, 马全鑫(63)

小鼠游泳耐力实验系统的建立与红景天抗疲劳作用的验证

..... 谢磊, 李由, 刘新民, 等(71)

除虫脲亚慢性染毒对大鼠血液系统的影响

..... 胡雄飞, 陆丹, 熊志军, 等(77)

乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂干预对慢性不可预知应激大鼠模型抗抑

郁作用及机制的研究 刘晓萌, 张荣, 董世芬, 等(81)

丹宁酸交联后续处理对牛颈静脉血管的影响

..... 孙嘉康, 周建业, 唐 跃, 等(87)

广 告 (封二, 封三, 封底)

期刊基本参数: CN11-4822/R * 1991 * m * 大 16 * 92 * zh * p * ¥20.00 * 2000 * 14 * 2016-5

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly Established in March 1991 Volume 26 Number 5 May 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/
zgbyxzz/ch/index.aspx](http://zgswdw.alljournal.ac.cn/zgbyxzz/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

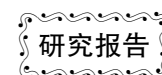
CSSN

ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

Copyright 2016 by the Chinese Association
for Laboratory Animal Sciences

CONTENTS IN BRIEF

- Bridging sciatic nerve defect with simvastatin delivered by injectable
thermosensitive pluronic F-127 hydrogel repairs peripheral nerve
defect in rats GUO Qi, LIU Can, HAI Bao, *et al.* (1)
- Cloning of full-length coding sequence of tree shrew HGF and prediction of
its molecular characteristics
..... LI Zhen-yu, CHEN Ling-xia, YIN Bo-wen, *et al.* (10)
- Effect of Slit2 on nonalcoholic fatty liver disease
..... ZENG Cui-ling, ZHENG Ling-yun, XING Li-ying, *et al.* (19)
- Effects of camel milk on glycolipid metabolism and PPAR γ /TNF α mRNA
expression in rats of type 2 diabetes mellitus
..... ZHOU Jun, ZHANG Quan-long, YANG Qian, *et al.* (25)
- Protective effects of myricitrin on ischemic/reperfusion injury in isolated rat
hearts CHEN Ya-ping, ZHANG Bin, LIU Gui-yan, *et al.* (31)
- The gene expression profiling difference of liver and brain hippocampus
between wild type and *Fkbp51* knockout mice
..... XUE Yu-xue, QIU Bin, WEI Qiang, *et al.* (40)
- Comparative studies on the metabolic syndrome-related parameters in two
kinds of minipigs
..... Na-shun-ba-ya-er, Ji-mu-si, Mu-ren, *et al.* (49)
- Modified orthotopic liver transplantation in gerbils
..... LOU Qi, LU Ling-qun, ZHOU Bing-luo, *et al.* (53)
- Effects of acupuncture combined with honeycomb on allergic rhinitis rat
model QIN Liang-qing, MA Yu-kui, XUE Yun, *et al.* (58)
- Biochemical indicators and pathological changes of early microvascular
complications in spontaneous type 2 diabetesmellitus (T2DM) ZDF
rats CHEN Xiao-zhen, RONG Yi-li, MA Quan-xin, *et al.* (63)
- Establishment of the swimming endurance system in mice and the
verification of the anti-fatigue effect in hongjingtian
..... XIE Lei, LI You, LIU Xin-min, *et al.* (71)
- Blood toxicity assessment of subchronic exposure to diflubenzuron in SD
rats HU Xiong-fei, LU Dan, XIONG Zhi-jun, *et al.* (77)
- Effects of mixture of Wuling powder and Hypericum perforatum *L.* on
depressed model rats induced by chronic unpredictable stress
... LIU Xiao-meng, ZHANG Rong, DONG Shi-fen, *et al.* (81)
- Effect of post-treatment on tannic acid fixed bovine jugular vein
..... SUN Jia-kang, ZHOU Jian-ye, TANG Yeu, *et al.* (87)



壳聚糖导管复合辛伐他汀/泊洛沙姆 407 水凝胶 修复大鼠外周神经缺损的研究

郭琦¹, 刘灿², 海宝², 马腾², 王红², 宋纯理², 徐迎胜¹

(1. 北京大学第三医院神经内科, 北京 100191; 2. 北京大学第三医院骨科, 北京 100191)

【摘要】 目的 探讨壳聚糖导管复合辛伐他汀/泊洛沙姆 407 水凝胶作为无细胞人工神经支架修复坐骨神经缺损的可行性。方法 制备壳聚糖导管和辛伐他汀/泊洛沙姆 407 水凝胶, 通过体视显微镜、扫描电镜、体外降解实验和流变学检测来观察复合材料的性能。选取 SPF 级 SD 大鼠 40 只, 分为单纯导管组、导管复合辛伐他汀 0 mg 组、导管复合辛伐他汀 0.5 mg 组, 和导管复合辛伐他汀 1 mg 组共 4 组其中前 2 组为对照组, 后 2 组为辛伐他汀治疗组, 每组 10 只, 造成左侧坐骨神经 10 mm 缺损模型, 用壳聚糖导管桥接缺损, 其内填充不同浓度的辛伐他汀水凝胶。移植后 10 周, 取再生神经的中间段进行 HE 染色、透射电镜观察再生神经的形态学改变, 并对再生神经的轴突数量、髓鞘厚度、G-ratio 等进行统计学分析; 免疫组化观察再生神经中 NF200 和 S100 蛋白的表达和神经营养因子 PTN、HGF、GDNF 和 VEGF 的表达。结果 壳聚糖导管和辛伐他汀/泊洛沙姆 407 水凝胶是适合神经缺损的无细胞修复材料。植入 10 周后四组均可见再生神经, 但 HE 染色显示辛伐他汀治疗组的神经干明显较对照组粗; 透射电镜显示辛伐他汀治疗组的再生轴突数量显著增多, 髓鞘显著增厚, G-ratio 显示髓鞘化程度亦明显好于对照组; 免疫组化显示辛伐他汀治疗组再生神经中标记轴突的 NF200 和标记雪旺细胞的 S100 的阳性表达明显增强, 且内源性神经营养因子 PTN、HGF、VEGF 和 GDNF 呈现高表达。结论 壳聚糖导管复合辛伐他汀/泊洛沙姆 407 水凝胶明显促进神经缺损组织学的重建, 可用于修复坐骨神经缺损。

【关键词】 外周神经损伤; 辛伐他汀; 壳聚糖导管; 泊洛沙姆 407 水凝胶; 外周神经再生

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 05-0001-09

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.005.001

Bridging sciatic nerve defect with simvastatin delivered by injectable thermosensitive pluronic F-127 hydrogel repairs peripheral nerve defect in rats

GUO Qi¹, LIU Can², HAI Bao², MA Teng², WANG Hong², SONG Chun-li², XU Ying-sheng¹

(1. Department of Neurology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China;

2. Department of Orthopedics, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China)

【Abstract】 Objective To explore the feasibility of combining chitosan conduit filled with simvastatin/ pluronic F-127 thermosensitive hydrogel to repair peripheral nerve defects in rats. **Methods** The chitosan conduits and simvastatin/ pluronic F-127 hydrogel were prepared and tested by stereomicroscope, SEM, vitro degradation testing and rheometer property. A total of 40 Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups ($n = 10$ per group): the chitosan conduit

【基金项目】 国家自然科学基金(81171693;81100895); 国家高技术研究发展计划“863 计划”(SS2015AA020304)。

【作者简介】 郭琦(1989 -), 女, 硕士生, 研究方向: 神经损伤、修复与重建。

【通讯作者】 徐迎胜(1971 -) 女, 主任医师, 副教授。E-mail: xys@bjmu.edu.cn。

alone (conduit group) or the conduit filled with pluronic F-127 hydrogel containing 0 (c + sim 0mg), 0.5 (c + sim 0.5mg), and 1 mg (c + sim 1mg) simvastatin. A 10mm nerve defect was created in the rat left sciatic nerve and bridged with the chitosan conduit filled with pluronic F-127 hydrogel containing different doses of simvastatin. At 10 weeks after surgery, the regenerated nerves were performed the H&E and TEM to observe the morphological change. The diameters of the myelinated axons, the thickness of the myelin sheath, and the G-ratios (the ratio of the axon diameter to the total fiber diameter) were calculated to make statistical analyses. And the immunohistochemical method was used to measure the expression of NF200 and S100 protein in the regenerated nerves and to detect the expression of neurotrophins including pleiotrophin (PTN), hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). **Results** The chitosan conduits filled with simvastatin/ pluronic F-127 promote nerve regeneration in rats. All groups showed the regenerated nerves, but H&E staining showed that the regenerated nerves in the simvastatin treated groups were much thicker than those without simvastatin; And the same trend was also found for the diameter of the myelinated axons, the thickness of the myelin sheath and G-ratio; In addition, the numbers of NF-positive cells indicating regenerated axons and S100-positive cells indicating Schwann cells were significantly larger in simvastatin treated groups than those without simvastatin. And immunohistochemical staining indicated that simvastatin induced an increased expression of PTN, HGF, VEGF and GDNF compared to those found in the control group. **Conclusions** Taken together, the simvastatin/ pluronic F-127 hydrogel filling in the chitosan conduits promoted the reconstruction of histological in peripheral nerve defects, which can be used for peripheral nerve regeneration.

【Key words】 Peripheral nerve injury; Simvastatin; Chitosan conduit; Pluronic F-127 hydrogel; Peripheral nerve regeneration

外周神经缺损一直以来对于基础和临床学者来说都是严格的挑战^[1]。短距离缺损通过端端吻合即可达到治愈的目的^[2]，而对于长距离神经缺损，自体神经移植虽然被认为是“金标准”，却也面临着一系列的困扰^[3]。现今，人工神经导管复合神经营养因子被认为是自体神经的理想替代物^[4-5]。然而，单纯应用一种外源性神经营养因子不足以支撑外周神经再生的全过程；而且，外源性神经营养因子大部分都是蛋白质，存在半衰期短和免疫排斥反应^[5]。因此，利用某种可以诱导内源性神经营养因子分泌的小分子化合物能够显著提高促进外周神经再生的效果。

他汀类药物作为降脂药，由于它的抗炎、抗氧化、调节免疫和神经保护作用而被应用在神经系统疾病^[6-8]。我们先前的实验结果表明辛伐他汀能够显著促进脊髓损伤大鼠神经功能的恢复，上调脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF)、神经胶质细胞源性的神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 表达^[9-10]。但辛伐他汀作为降脂药，其靶器官是肝脏，口服后由于肝脏的首过效应，口服他汀只有不足 5% 能够进入血液循环^[11]，因此我们期待利用一种缓释他汀，提高其生物利用度的载体可以显著提高受损神经再生的效果。

目前，关于局部应用辛伐他汀对于外周神经再

生的效果仍无报道。我们研究的目的是探索一种辛伐他汀/泊洛沙姆 407 温敏型水凝胶复合壳聚糖导管促进坐骨神经缺损 10 mm 大鼠的外周神经再生的效果。从形态学角度观察桥接后缺损神经的再生修复情况，为研究神经缺损的桥接材料提供形态学基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及饲养环境：SPF 级 SD 大鼠，40 只，雄性，6~7 周龄，体重 250~300 g。均购自于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】。饲养于北京大学医学部实验动物科学部【SYXK(京)2011-0039】。按照实验动物适用的“3R”原则给与人道关怀。实验前适应性饲养 1 周，自由摄取食水。

1.1.2 药品与试剂：辛伐他汀原料药(中国药品生物制品检定所)；壳聚糖(中国浙江金壳药业)；泊洛沙姆 407(德国 BASF 公司)；一抗 NF200 和 S100(英国 Abcam 公司)；一抗 PTN、HGF、VEGF 和 GDNF(北京博奥森生物技术有限公司)；一步法聚合物检测系统、DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.1.3 主要仪器：体视显微镜(德国 Leica 公司)；光学显微镜(日本 Nikon 公司)；扫描电子显微镜

(日本 JEOL 公司);透射电子显微镜(日本 JEOL 公司);流变仪(奥地利 Anton Paar 公司)。

1.2 方法

1.2.1 壳聚糖导管和辛伐他汀/泊洛沙姆 407 水凝胶的制备与特性检测

壳聚糖导管的制备参考文献^[12], 略微改良。壳聚糖粉末溶解在冰醋酸中达到 8% 的浓度。外径为 1.6 mm 的玻璃毛细管竖直插入壳聚糖溶液中, 竖直拔出, 再浸入 5% 的 NaOH 溶液中 30 min, 双蒸水反复冲洗直至 pH 值为中性。最后, 拔出玻璃毛细管留下壳聚糖导管, 切成 14 mm 长度的节段备用。

泊洛沙姆 407 粉末溶解在双蒸水中达到 25% 的浓度, 添加辛伐他汀至三种剂量, 分别为每 20 μ L 混悬液中含有 0 mg, 0.5 mg 和 1 mg 辛伐他汀。水凝胶的流变学检测利用流变仪, 设置参数为频率为 1 Hz, 幅度为 0.1%, 弹性模量(G')和黏性模量(G'')的温度范围为 4℃ ~ 45℃, 以 0.5℃/min 的速率加温。

壳聚糖导管填充辛伐他汀/泊洛沙姆 407 温敏型水凝胶使用体视显微镜观察宏观形态。另外, 取一片壳聚糖膜和水凝胶冻干、喷金、扫描电镜观察微观结构。

1.2.2 辛伐他汀/泊洛沙姆 407 水凝胶的体外降解实验

取 2 mL 辛伐他汀/泊洛沙姆 407 温敏型水凝胶置于 4.0 mL 离心管内并在 37℃ 恒温箱中孵育呈凝胶状。再向离心管内添加 2 mL PBS。每 24 h 换一次缓冲液。在第 0, 3, 5, 7, 10 和 14 天拍照观察水凝胶的降解情况。

1.2.3 外周神经损伤模型制作

大鼠麻醉后, 消毒备皮, 于左侧大腿外侧切开皮肤, 皮下, 沿肌间隙分离暴露坐骨神经, 于梨状肌下孔 5 mm 处完全横断坐骨神经, 造成 10 mm 缺口, 两端用 9-0 缝线缝合壳聚糖导管, 根据实验分组填充不同剂量的辛伐他汀水凝胶。伤口处洒青霉素粉末以防感染, 分层缝合肌肉与皮肤, 术后分笼饲养, 每笼 3 只, 术后观察大鼠精神状态、术侧肢体活动、饮食、伤口愈合情况等。手术操作过程见图 1。

1.2.4 动物分组及给药

标准分笼饲养的 SD 大鼠 40 只, SPF 级, 雄性, 6~7 周龄, 体重 250~300 g, 由北京大学医学部实

验动物科学部提供, 采用随机数字表法将 40 只 SD 大鼠随机分为 A、B、C、D 共 4 组, 每组 10 只: A 组: 壳聚糖导管组(conduit); B 组: 壳聚糖导管复合辛伐他汀水凝胶 0 mg(c + sim 0 mg); C 组: 壳聚糖导管复合辛伐他汀水凝胶 0.5 mg(c + sim 0.5 mg); D 组: 壳聚糖导管复合辛伐他汀水凝胶 1 mg(c + sim 1 mg)。

1.2.5 组织学观察

术后 10 周进行组织学观察。取再生坐骨神经置于 10% 福尔马林固定, 脱水, 石蜡包埋。取再生神经最中间段切片(5 μ m)行 HE 染色, 光镜下观察。

1.2.6 透射电镜观察

术后 10 周进行透射电镜观察。取再生坐骨神经置于 2.5% 戊二醛中固定, PBS 冲洗, 锇酸固定, 脱水, 树脂包埋。半薄切片(100 nm)行甲苯胺蓝染色, 超薄切片(50 nm)行铀酸-柠檬酸铅染色。透射电镜下观察, 计量髓鞘化轴突的直径、髓鞘的厚度和 G-ratio(轴突直径与神经纤维总直径的比值), 并进行统计分析。

1.2.7 免疫组织化学观察

术后 10 周进行免疫组织化学观察。取再生坐骨神经置于 10% 福尔马林固定, 脱水, 石蜡包埋, 切片(5 μ m)孵育一抗 NF200 和 S100, 分别标记轴突和雪旺细胞, 4℃ 过夜, PBS 水洗, 滴加山羊抗 IgG/HRP 聚合物, 室温 30 min, DAB 显色, 光镜下观察。以上一抗浓度均为 1:200。

1.2.8 神经营养因子的免疫组织化学观察

术后 10 周进行神经营养因子免疫组织化学观察。取再生坐骨神经置于 10% 福尔马林固定, 脱水, 石蜡包埋, 切片(5 μ m), 孵育一抗多效生长因子(pleiotrophin, PTN)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF), 4℃ 过夜, PBS 水洗, 滴加山羊抗 IgG/HRP 聚合物, 室温 30 min, DAB 显色, 光镜下观察。以上一抗浓度均为 1:200。

1.3 统计学分析

所有实验数据均以($\bar{x} \pm s$)表示, 使用 SPSS13.0 进行统计分析。计量资料组间使用 ANOVA-LSI 进行差异性分析。 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 实验动物数量分析

参加实验 40 只 SD 大鼠均进入结果分析。术后各组大鼠精神良好, 均成活, 进食及饮水正常, 营养状况良好, 切口愈合良好、无感染。

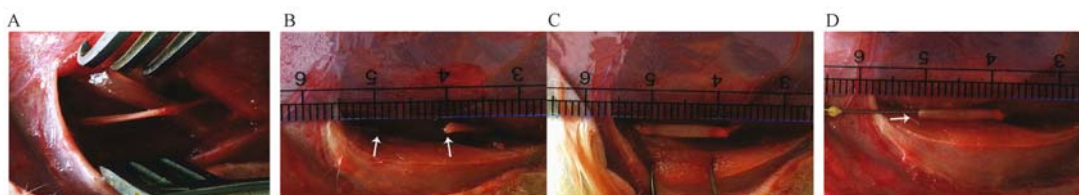
2.2 壳聚糖导管的特性观察

如图 2 所示, 壳聚糖导管呈现为半透明状, 直

径为 1.6 mm, 长度为 14 mm。通过扫描电子显微镜可以观察到良好的微观结构。

2.3 辛伐他汀/泊洛沙姆 407 水凝胶的特性观察

如图 3, 体外降解实验显示水凝胶在 14 d 内几乎降解完全。且通过扫描电子显微镜可观察到水凝胶的多孔状微观结构。图 4 可见辛伐他汀/泊洛沙姆 407 水凝胶呈现出温敏性, 即在 4℃ 呈现为液相, 37℃ 转为固相。

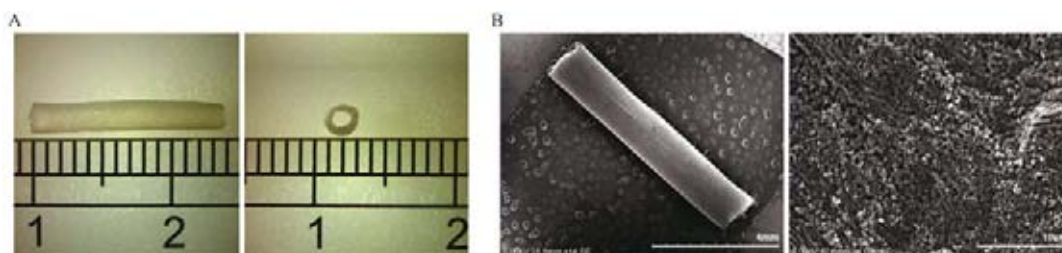


注: A: 暴露手术野; B: 横断坐骨神经; C: 桥接壳聚糖导管; D: 注射水凝胶。

图 1 手术操作图

Note: A: Exposure of surgical site; B: Transection of sciatic nerve; C: Grafting of chitosan conduit; D: Injection of hydrogel.

Fig. 1 Pictures of surgical procedure



注: A: 壳聚糖导管的大体结构观察; B: 壳聚糖导管的扫描电镜观察。

图 2 壳聚糖导管特性

Note: A: The gross structure of the chitosan conduits; B: The SEM of the chitosan conduits.

Fig. 2 Characteristics of the chitosan conduits



注: A: 水凝胶在体外不同时间的降解情况; B: 水凝胶在扫描电镜下观察到的多孔状结构。

图 3 辛伐他汀/泊洛沙姆水凝胶特性的观察

Note: A: Degradation of the simvastatin/pluronic F-127 hydrogel at 37°C on days 0, 3, 5, 7, 10, and 14 in vitro;

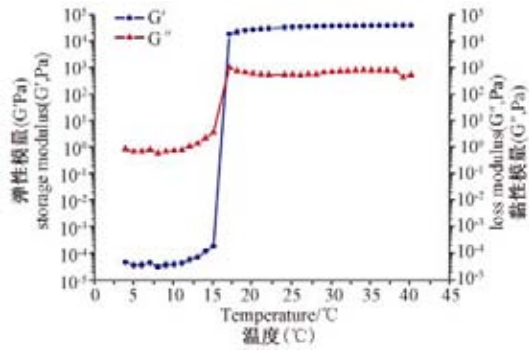
B: SEM of the simvastatin/pluronic F-127 hydrogel.

Fig. 3 Characteristics of the simvastatin/pluronic F-127 hydrogel

2.4 再生神经在体观察

如图 5 所示, 再生神经在体观察可发现填充辛

伐他汀/泊洛沙姆 407 水凝胶组的再生坐骨神经显著粗于对照组, 表明其再生情况明显优于对照组。



注:在弹性模量(G')和黏性模量(G'')
相交接的温度下,实现液相-固相的相转变。

图4 辛伐他汀/泊洛沙姆水凝胶流变学检测结果

Note: It underwent a phase transition from solution to gel at the temperature where the storage modulus (G') and loss modulus (G'') cross.

Fig.4 The rheological properties of the simvastatin/pluronic F-127 hydrogel

2.5 再生神经的组织学和免疫组化

如图6所示,HE染色表明辛伐他汀治疗组的再生神经明显粗于对照组,且镜下微观结构显示再

生神经纤维多且直径较粗大,排列更为规则,较接近正常坐骨神经。

2.6 再生神经的组织学和免疫组化

如图7所示,辛伐他汀治疗组中标记再生轴突的NF(神经丝)阳性细胞数和标记雪旺细胞的S100阳性细胞数显著多于对照组。

2.7 透射电镜观察

图8所示为再生神经中段的甲苯胺蓝和醋酸铀-柠檬酸铅双染色结果。如图9所示,经统计学分析,辛伐他汀1 mg组的髓鞘化轴突数目最多,而导管组数目最少。相同的趋势可在髓鞘化轴突的直径和髓鞘厚度中可见。并且,辛伐他汀治疗组中再生神经的G-ratio值(轴突直径与纤维总直径比值)显著低于对照组,表明其髓鞘化程度更好。

2.8 内源性营养因子的表达情况

如图10所示,免疫组化表明辛伐他汀诱导内源性神经营养因子包括PTN、HGF、VEGF和GDNF的高表达。



注:辛伐他汀组再生的坐骨神经较对照组明显增粗。

图5 每组于术后10周再生神经的大体情况

Note: The regenerated sciatic nerves in the rats whose defects were bridged by chitosan conduits filled with simvastatin/pluronic F-127 hydrogel were much thicker than that without simvastatin.

Fig.5 Gross views of the regenerated sciatic nerves 10 weeks after surgery

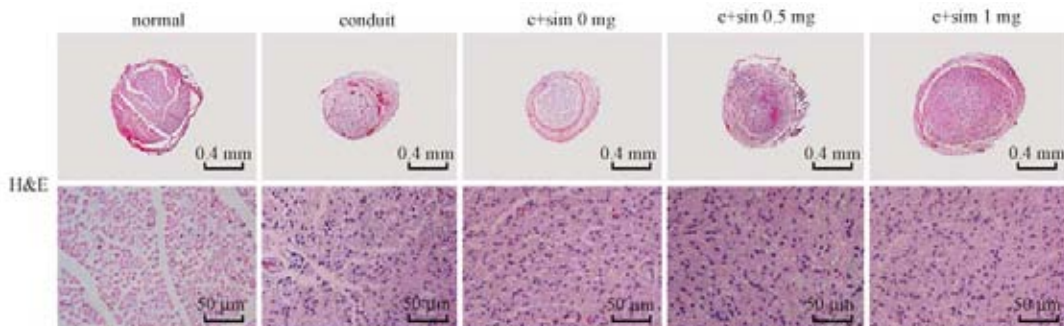
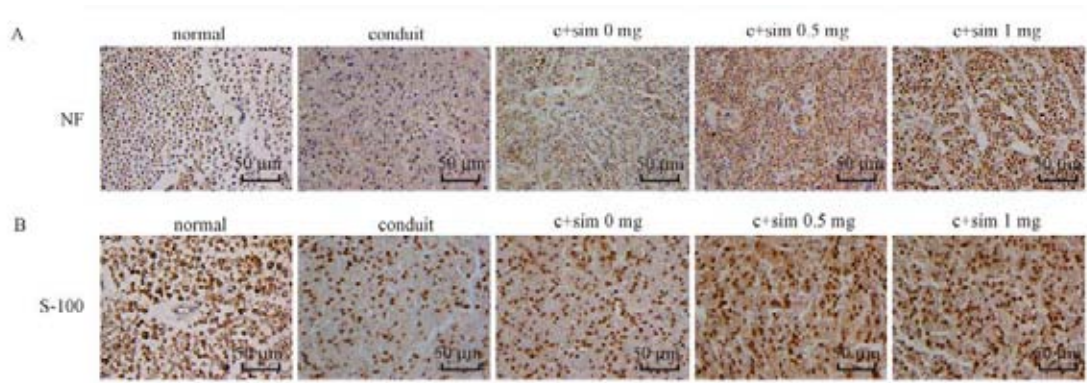


图6 再生坐骨神经中段HE染色观察

Fig.6 The HE staining of the regenerated sciatic nerve



注:A:NF 标记再生轴突;B:S100 标记雪旺细胞。

图 7 免疫组化染色

Note: A: NF to lable the regenerated axons; B: S-100 to lable the Schwann cells.

Fig. 7 The immunohistochemical staining of the regenerated nerves

表 1 术后 10 周大鼠再生神经中段透射电镜统计学结果 (n = 3, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The quantifications of TEM for axonal diameter, thickness of the myelin sheaths and the G-ratios of the regenerated nerves (n = 3, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	轴突直径(μm) Axonal diameter	髓鞘厚度(μm) Thickness of the myelin sheaths	髓鞘化程度 G-ratio
正常组 normal	3.72 ± 1.18	1.59 ± 0.68	0.55 ± 0.10
壳聚糖导管组 conduit	1.67 ± 0.50	0.39 ± 0.16	0.68 ± 0.10
辛伐他汀 0mg 组 c + sim 0mg	1.88 ± 0.66	0.48 ± 0.30	0.67 ± 0.11
辛伐他汀 0.5mg 组 c + sim 0.5mg	2.17 ± 0.68 **	0.64 ± 0.29 **	0.63 ± 0.11 */**
辛伐他汀 1mg 组 c + sim 1mg	2.70 ± 0.89 **	0.75 ± 0.25 **	0.64 ± 0.08 **

注:对于轴突直径,髓鞘厚度:与导管组和辛伐他汀 0mg 组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01;对于 G-ratio:与导管组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01。
Note: For the axonal diameter and thickness of the myelin sheaths : Compared with the groups of conduit and c + sim 0mg, * P < 0.05, ** P < 0.01; For G-ratio: Compared with the groups of conduit, * P < 0.05, ** P < 0.01.

3 讨论

寻找诱导性促进神经再生生物材料一直是神经修复领域研究的热点。有研究发现,壳聚糖降解产物可以促进雪旺细胞增殖和神经再生^[13],水凝胶作为可生物降解、良好生物相容性的高分子材料可作为缓释载体^[14-16],并可填充壳聚糖空导管,形成轴突再生的有效支架。

本研究中,我们观察到了壳聚糖导管中填充辛伐他汀/泊洛沙姆 407 水凝胶可以显著促进大鼠缺损 10 mm 的坐骨神经再生,在组织学上能够明显促进神经再生的结构的修复。并且,在辛伐他汀治疗组中与神经再生相关的内源性神经营养因子的分泌包括 PTN、HGF、VEGF 和 GDNF 也显著增加。

有研究发现,短期口服大剂量阿托伐他汀可以预防坐骨神经损伤,促进睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)高表达^[6];腹腔注射给予辛伐他汀(20 mg/kg/d)能够促进大鼠坐骨神经挫伤的恢复^[17]。相似的,也有报道称连续 14 d 腹腔注射阿托伐他汀(5 mg/kg/d)有助于大鼠坐骨神经

完全横断后的神经-肌肉再支配的重建^[18]。与此相对,另有报道称口服给予低剂量辛伐他汀(2 mg/kg/d)连续 14 d 会延缓神经纤维的再生,但对电生理检测并无影响^[19]。这相反的结果在某种程度上与他汀在肝脏的首过效应有关,口服给与的他汀只有少于 5% 能够到达系统循环中^[11],而高剂量的辛伐他汀又会引起一系列的副作用^[20]。因此,局部应用辛伐他汀既可以避免副作用,又可以提高局部辛伐他汀的生物利用度从而有效地促进神经再生。本实验的数据表明辛伐他汀对于神经再生是很有前景的生物小分子化合物。

大量的神经营养因子在中枢或外周神经损伤中均有促进神经再生的作用^[4-5]。人工神经通过缓释神经营养因子作为神经修复材料取得一定的效果,但外源性神经营养因子由于其价格昂贵、半衰期短、免疫源性、制备缓释载体困难及储备、存储不便等因素限制了临床的应用;并且单一的神经营养因子难以满足神经修复再生的全过程。国内罗卓荆课题组^[21]通过 c-Jun 基因修饰雪旺细胞,可以促进多种神经营养因子如 GDNF, BDNF, LIF 等分泌。

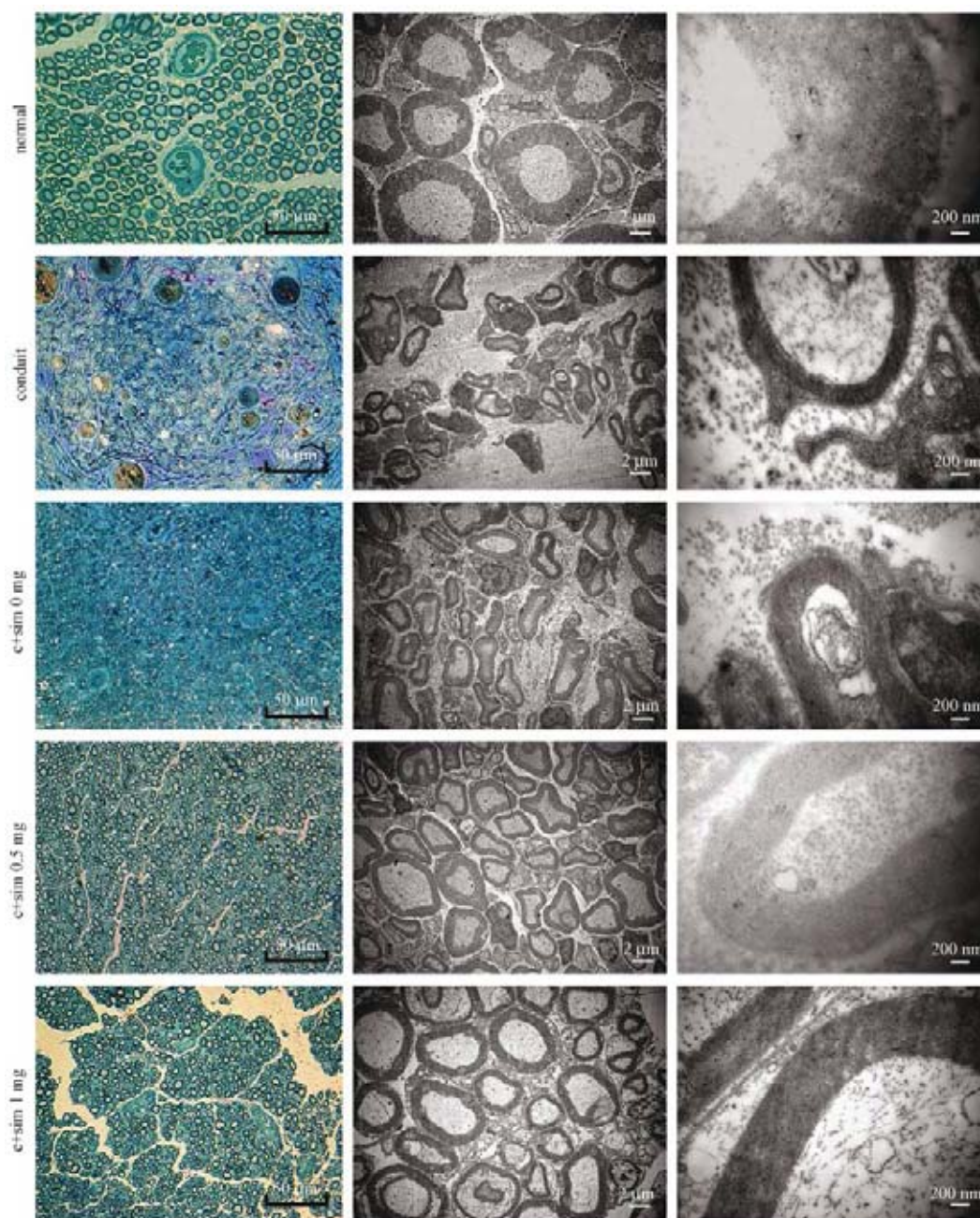


图8 再生神经轴突和髓鞘的透射电镜观察

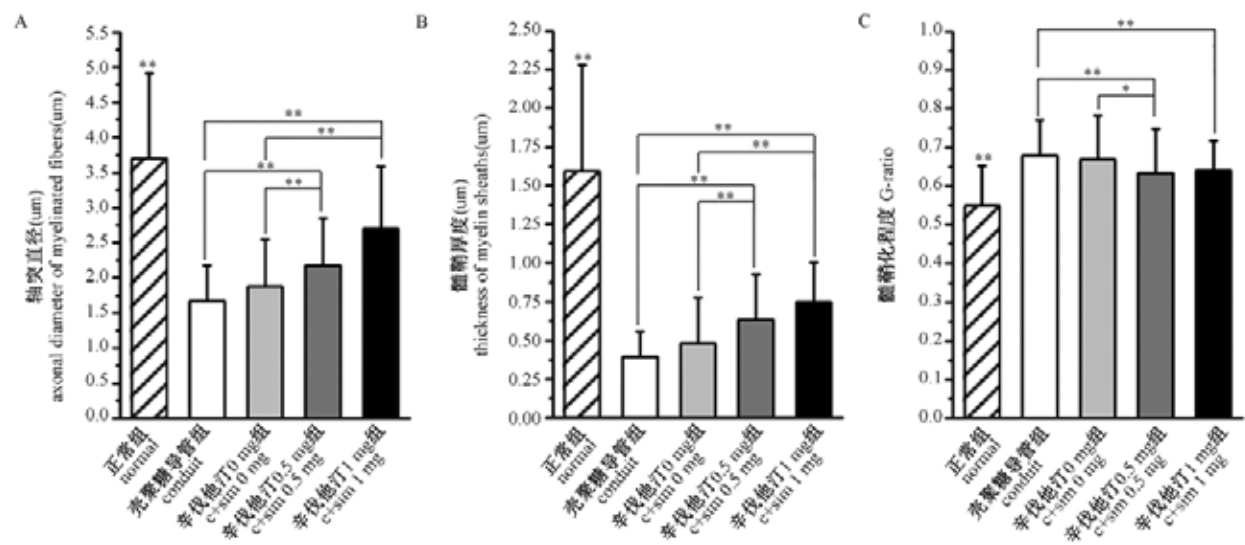
Fig.8 Observation of the regenerated axons and myelin sheaths by TEM

同基因修饰等遗传学方法及通过种子细胞和外源性神经营养因子等组织工程学方法相比,采用辛伐他汀这一小分子化合物的局部缓释促进内源性神经营养因子的表达,促进周围神经再生,无疑具有重要的研究价值。

本研究中,采用的辛伐他汀剂量为 0.5、1 mg,均显示可显著促进大鼠周围神经损伤修复,但两者(0.5 mg vs. 1 mg)之间没有显著性差异,结合泊洛沙姆水凝胶的体外降解实验结果,2 周内即基本完

全降解,提示更小剂量的辛伐他汀即能促进神经再生;同时延长缓释时间或将更好地发挥促进神经再生的作用。

本研究中,我们首次报道辛伐他汀显著增加大鼠外周神经中 PTN 的分泌,PTN 一直以来被认为在体内和体外实验中具有促进轴突再生的作用^[22]。HGF 被报道在大鼠坐骨神经损伤^[4]、面神经损伤^[23]和视神经损伤^[24]后均有促进神经再生和功能恢复的效果。最近,更多的研究表明 VEGF 也有神

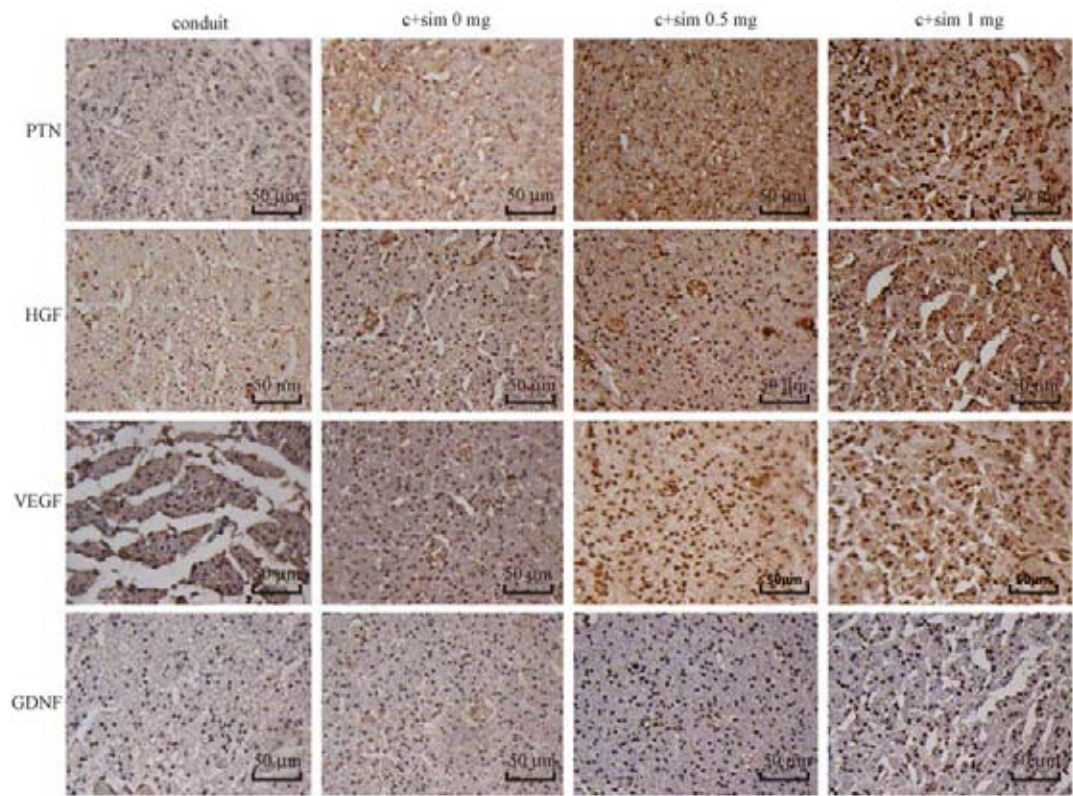


注:A:再生轴突直径的统计学分析;B:髓鞘厚度的统计学分析;C:髓鞘化程度(G-ratio)的统计学分析。

图9 再生坐骨神经中段的透射电镜观察

Note: A: Quantifications of axonal diameter; B: Quantifications of the thickness of the myelin sheaths; C: Quantifications of the G-ratios of the myelinated nerve fibers.

Fig.9 Observation of the regenerated nerves by TEM



注:辛伐他汀治疗组的局部神经营养因子表达明显增高。

图10 内源性营养因子 PTN、HGF、VEGF 和 GDNF 的免疫组化结果

Note: Simvastatin dramatically induces the secretion of PTN, HGF, VEGF and GDNF.

Fig.10 The immunohistochemical staining for PTN, HGF, VEGF and GDNF

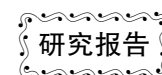
经营养和神经保护的作用^[25],加速神经再生和促进神经功能的恢复^[26-27]。以上这些发现均表明局部应用辛伐他汀通过促进内源性神经营养因子的分泌来促进缺损坐骨神经的再生。

综上, 我们的结果表明局部应用辛伐他汀通过增加内源性 PTN、HGF、VEGF 和 GDNF 的分泌, 从而促进坐骨神经缺损大鼠模型的神经再生。

参考文献:

- [1] Zhan X, Gao M, Jiang Y, *et al.* Nanofiber scaffolds facilitate functional regeneration of peripheral nerve injury [J]. *Nanomedicine*, 2013, 9(3): 305 – 315.
- [2] Zhu S, Ge J, Wang Y, *et al.* A synthetic oxygen carrier-olfactory ensheathing cell composition system for the promotion of sciatic nerve regeneration [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(5): 1450 – 1461.
- [3] Matsumoto K, Ohnishi K, Kiyotani T, *et al.* Peripheral nerve regeneration across an 80 – mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA) – collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves [J]. *Brain Res*, 2000, 868(2): 315 – 328.
- [4] Li Z, Peng P, Wang G, *et al.* Effects of local release of hepatocyte growth factor on peripheral nerve regeneration in acellular nerve grafts [J]. *Exp Neurol*, 2008, 214(1): 47 – 54.
- [5] Ma FK, Xiao ZF, Meng DQ, *et al.* Use of Natural Neural Scaffolds Consisting of Engineered Vascular Endothelial Growth Factor Immobilized on Ordered Collagen Fibers Filled in a Collagen Tube for Peripheral Nerve Regeneration in Rats [J]. *International Journal Of Molecular Sciences*, 2014, 15(10): 18593 – 18609.
- [6] Pan HC, Yang DY, Ou YC, *et al.* Neuroprotective effect of atorvastatin in an experimental model of nerve crush injury [J]. *Neurosurgery*, 2010, 67(2): 376 – 389.
- [7] Shi XQ, Lim TK, Lee S, *et al.* Statins alleviate experimental nerve injury-induced neuropathic pain [J]. *Pain*, 2011, 152(5): 1033 – 1043.
- [8] Morishita S, Oku H, Horie T, *et al.* Systemic Simvastatin Rescues Retinal Ganglion Cells from Optic Nerve Injury Possibly through Suppression of Astroglial NF-kappa B Activation [J]. *Plos One*, 2014, 9(1): e84387.
- [9] Han X, Yang N, Cui Y, *et al.* Simvastatin mobilizes bone marrow stromal cells migrating to injured areas and promotes functional recovery after spinal cord injury in the rat [J]. *Neurosci Lett*, 2012, 521(2): 136 – 141.
- [10] Han X, Yang N, Xu Y, *et al.* Simvastatin treatment improves functional recovery after experimental spinal cord injury by upregulating the expression of BDNF and GDNF [J]. *Neurosci Lett*, 2011, 487(3): 255 – 259.
- [11] Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2005, 19(1): 117 – 125.
- [12] Li X, Yang Z, Zhang A, *et al.* Repair of thoracic spinal cord injury by chitosan tube implantation in adult rats [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(6): 1121 – 1132.
- [13] Wang Y, Zhao Y, Sun C, *et al.* Chitosan Degradation Products Promote Nerve Regeneration by Stimulating Schwann Cell Proliferation via miR-27a/FOXO1 Axis [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(1): 28 – 39.
- [14] Carballo – Molina OA, Velasco I. Hydrogels as scaffolds and delivery systems to enhance axonal regeneration after injuries [J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 13.
- [15] Strappe PM, Hampton DW, Cachon-Gonzalez B, *et al.* Delivery of a lentiviral vector in a Pluronic F127 gel to cells of the central nervous system [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 61(3): 126 – 133.
- [16] Yang Y, Wang J, Zhang X, *et al.* A novel mixed micelle gel with thermo-sensitive property for the local delivery of docetaxel [J]. *J Control Release*, 2009, 135(2): 175 – 182.
- [17] Xavier AM, Serafim KG, Higashi DT, *et al.* Simvastatin improves morphological and functional recovery of sciatic nerve injury in Wistar rats [J]. *Injury*, 2012, 43(3): 284 – 289.
- [18] Cloutier FC, Rouleau DM, Hebert-Davies J, *et al.* Atorvastatin is beneficial for muscle reinnervation after complete sciatic nerve section in rats [J]. *Journal Of Plastic Surgery And Hand Surgery*, 2013, 47(6): 446 – 450.
- [19] Daglioglu E, Berker M, Demirci M, *et al.* Microscopic and electrophysiological changes on regenerating sciatic nerves of rats treated with simvastatin [J]. *Folia Neuropathol*, 2010, 48(1): 49 – 56.
- [20] England JD, Viles A, Walsh JC, *et al.* Muscle side effects associated with simvastatin therapy [J]. *Med J Aust*, 1990, 153(9): 562 – 563.
- [21] Huang L, Quan X, Liu Z, *et al.* c-Jun gene-modified Schwann cells: upregulating multiple neurotrophic factors and promoting neurite outgrowth [J]. *Tissue Eng Part A*, 2015, 21(7 – 8): 1409 – 1421.
- [22] Mi RF, Chen WR, Hoke A. Pleiotrophin is a neurotrophic factor for spinal motor neurons [J]. *Proceedings Of the National Academy Of Sciences Of the United States Of America*, 2007, 104(11): 4664 – 4669.
- [23] Esaki S, Kitoh CJ, Katsumi S, *et al.* Hepatocyte growth factor incorporated into herpes simplex virus vector accelerates facial nerve regeneration after crush injury [J]. *Gene Therapy*, 2011, 18(11): 1063 – 1069.
- [24] Wong WK, Cheung AW, Yu SW, *et al.* Hepatocyte growth factor promotes long-term survival and axonal regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve injury: comparison with CNTF and BDNF [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(10): 916 – 929.
- [25] Ruiz de Almodovar C, Lambrechts D, Mazzone M, *et al.* Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system [J]. *Physiol Rev*, 2009, 89(2): 607 – 648.
- [26] Pereira Lopes FR, Lisboa BC, Frattini F, *et al.* Enhancement of sciatic nerve regeneration after vascular endothelial growth factor (VEGF) gene therapy [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2011, 37(6): 600 – 612.
- [27] Jin K, Zhu Y, Sun Y, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(18): 11946 – 11950.

[修回日期] 2016 – 03 – 28



树鼩 HGF 全长编码序列的克隆及分子特征分析

李振宇¹, 陈玲霞¹, 尹博文¹, 苗雨润¹, 宋庆凯¹, 代解杰^{1,2}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心, 昆明 650118;
2. 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 昆明 650118)

【摘要】 目的 获取树鼩肝细胞生长因子的全长编码序列并进行分子特征分析。**方法** 以树鼩肝组织总 RNA 为材料, 通过 RT-PCR 扩增和序列拼接获得树鼩肝细胞生长因子全长编码序列, 进而通过 DNAMAN, Pymol 等生物信息学软件对其序列和分子特征进行分析。**结果** 树鼩 HGF 分子结构在进化中相对保守, 树鼩 HGF 整体结构与人相似。但树鼩 HGF α NK1 区域相比人 HGF 多出一个 α 螺旋, 并且有两个更长的 β 折叠片, 另外, 树鼩在该区域存在一个很强的表面正电荷区域。这些差异可能会对树鼩 HGF 与其受体的作用方式产生影响。**结论** 本实验为明确树鼩 HGF 与其受体的作用方式和树鼩 HGF 的合成与制备奠定了基础。

【关键词】 树鼩; 肝细胞生长因子; 分子克隆; 结构预测

【中图分类号】 Q518.3 Q959.832 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 05-0010-09

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.005.002

Cloning of full-length coding sequence of tree shrew HGF and prediction of its molecular characteristics

LI Zhen-yu, CHEN Ling-xia, YIN Bo-wen, MIAO Yu-run, SONG Qing-kai, DAI Jie-jie

(1. Center for Tree shrews Germplasm Resource, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, China; 2. Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infections Diseases, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Objective To get the full-length HGF, Hepatocyte growth factor, cDNA encoding sequence and predict its molecular characteristics. **Methods** Full-length HGF cDNA encoding sequence is cloned from total RNA in liver tissue of tree shrew by RT-PCR and its molecular characteristics is analyzed compared with other mammals by using biology software such as DNAMAN, Pymol and so forth. **Results** A 2193bp of the full-length HGF cDNA encoding sequence is cloned from total RNA in liver tissue of tree shrew. The analysis of molecular characteristics show that the molecular structure of HGF is relatively conservative in evolution, tree shrew HGF overall structure similar to Homo sapiens. However, compared with the structure and charge surface of NK1 domain of HGF α -chain of human, tree shrew has two longer β -sheet and one more α -helix. Additional, tree shrew had a strong positive charged site in this area, which may have a impact on the bind of HGF to its receptor. **Conclusion** This study provide a theoretical basis for preparation and receptor-binding mechanism studies of tree shrew HGF.

【Key words】 Tree shrew; Hepatocyte growth factor; Molecular cloning; Structural predicting

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2014BAI01B01)。

[作者简介] 李振宇(1990-), 男, 硕士, 从事干细胞研究, Email: 923203060@qq.com。

[通讯作者] 代解杰(1961-), 男, 研究员。Email: dj@imbcams.com.cn。

肝细胞生长因子(HGF),又名离散因子,隶属于纤溶酶原相关生长因子家族,是目前已知生物活性最广泛的细胞生长因子之一。最初的研究表明,其能刺激体外培养肝细胞的增值与DNA合成。而越来越多的研究表明,其在组织器官损伤修复、形态发生和肿瘤转移过程中发挥重要作用。在肝损伤的情况下,HGF通过与受损组织中上调的MET(由原癌基因*c-met*编码,为体内与HGF亲和力最高的受体)受体结合并激活下游信号转导分子如有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、哺乳动物类雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, MTR)通路和信号转导因子和转录激活因子(signals generated and activator of transcription, STAT)通路,并引起一系列的靶基因的转录上调或抑制,促进肝实质细胞和胆管上皮细胞的增生,从而加速肝脏再生^[1]。而在癌症发生过程中,癌细胞又可以通过长久的过量的表达MET受体和自分泌HGF,增强其增值与侵袭能力^[2]。同时,HGF还能通过促进血管再生作用^[3]及细胞离散效应进一步促进癌细胞的生长与扩散。

树鼯作为一种小型哺乳类动物,因其分类地位上相比小鼠和大鼠更接近于人,加之易于饲养与广泛分布的特性,目前已经广泛的用于包括自发性乳腺癌^[4]、肝癌^[5]等多种人类癌症模型的研究,具有很强的应用潜力。但到目前为止,尚未检索到关于树鼯HGF分子克隆的相关研究报道,这影响了树鼯HGF的表达制备与其在组织修复和癌症发生中作用的进一步研究与探讨。因此,本研究以获得树鼯HGF完整编码序列为目的,同时比较分析其分子特征与差异,为树鼯HGF后续的制备和功能研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 动物

本实验采用的滇缅树鼯来自中国医学科学院医学生物学研究所树鼯种质资源中心【SCXK(滇)K2013-0001】,无菌手术操作在中国医学科学院医学生物学研究所树鼯种质资源中心动物实验设施中进行【SYXK(滇)K2013-0001】。

1.2 树鼯全长编码序列的序列克隆

根据Genbank已经注册登记的人(NM_000601.5),小鼠(NM_001289458.1),大鼠(NM_017017.2)的HGF保守序列,设计表一中的六对引

物,该6对引物覆盖了树鼯HGF mRNA的整个编码区(表一)。

取成年树鼯麻醉后,打开腹腔剪下少量肝小叶组织,后压迫止血缝合。所得组织放入1.5 mL离心管,加入200 μ L Trizol(试剂盒购自大连宝生物)经过组织研磨器后按步骤提取组织总RNA,并采用PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser(试剂盒购自大连宝生物)一步法逆转录成cDNA,并去除基因组DNA污染。之后采用上述引物采用TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version(试剂盒购自大连宝生物)进行普通PCR,循环参数为:98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C ~ 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。用树鼯管家基因GAPDH作为阳性对照。PCR产物交由公司(北京奥科鼎盛生物科技有限公司)经TA克隆插入pMD-19T载体后,转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,提取质粒进行双酶切鉴定,最终进行双向测序。所得结果用DNAMAN5.0进行序列拼接得到全长编码序列,拼接时要求序列间碱基重合大于40 bp,一致性大于90%。

1.3 分子特征分析

本文所用于参考的核酸及蛋白质序列均来源于GenBank,以MEGA5.0, DNAMAN5.0, PyMOL分别进行核酸序列、氨基酸序列分析及蛋白质三维模型的构建。而蛋白质三级结构的预测,则采用在线程序进行同源构建(<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>)和分子表明电荷构建(<https://sourceforge.net/projects/apbs/>),全长cDNA的比对则采用GenBank的Blast进行,并根据已知人全长HGF mRNA的相关注释进行结构域分析。

2 结果

2.1 树鼯HGF全长编码序列扩增结果

利用树鼯肝组织总RNA,通过RT-PCR获得长度分别为267 bp(L1片段), 745 bp(L2片段), 759 bp(L3片段), 689 bp(L4片段), 622 bp(L5片段)的核酸片段。在第一次拼接过程中发现,由于测序数据读取原因, L1片段与L2片段未能重合,故又设计引物,通过RT-PCR获得长度为319 bp(L1-2片段)的核酸片段。之后通过DNAMAN6.0进行序列拼接(图1),得到总长为2357 bp的核酸片段,并通过MEGA5.0进行多序列比对,确定了树鼯HGF编码序列,树鼯HGF开放阅读框长度为2193 bp,共编码730个氨基酸(图2)。

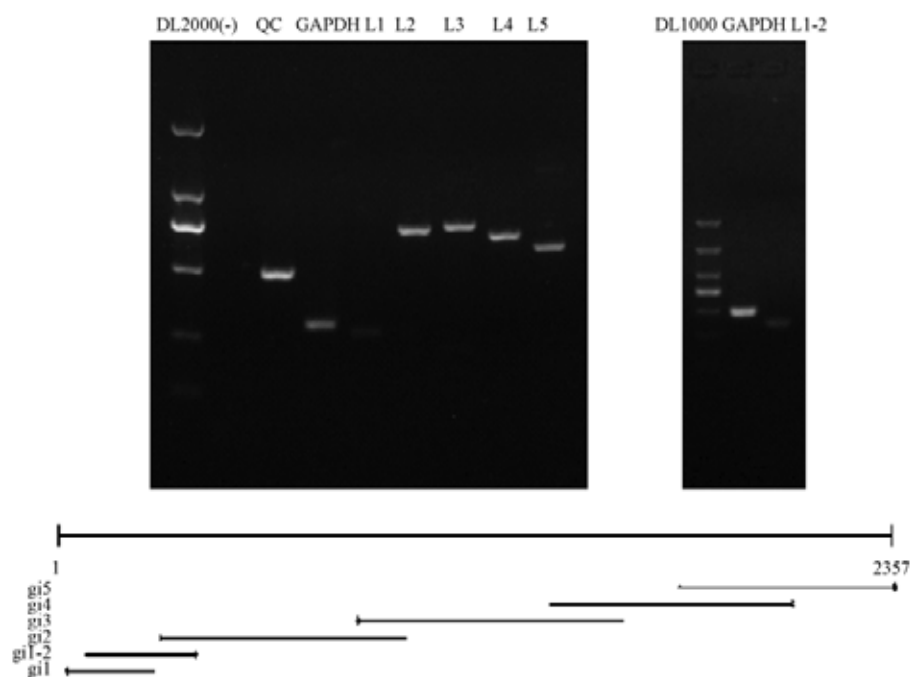
表 1 树鼩 HGF 分子 RT-PCR 引物设计

Tab.1 Primer design of tree shrew HGF

名称 Name	引物序列 Primer sequence	引物位置 Primer location
L1 - F	GCATCTATCTCCTCCAGTG	-42 ~ -23
L2 - F	AGACCAATGTGCCAATAGAT	200 ~ 219
L3 - F	AATTACTGCCGCAATCCTGAT	771 ~ 791
L4 - F	CGGAATCCTGATGATGATGCC	1320 ~ 1340
L5 - F	CGCAAGCAGGTTCTAAATGTG	1680 ~ 1700
L1 - 2 F	CTACGCAGAGGGACAGAA	80 ~ 98
L1 - R	CTATTGGCACATTGGTCTG	195 ~ 216
L2 - R	GTAACCTTCTCCTTGACCTT	919 ~ 939
L3 - R	AACTAACCATCCAGCCTACATT	1509 ~ 1531
L4 - R	TCACATGGTCCTGATCCAATCT	1987 ~ 2009
L5 - R	ACACTCAAGTAGTTGTCGTAGG	2281 ~ 2302
L1 - 2 R	TCCACTTGACATGCTATTGA	301 ~ 321

注:引物位置相对于引物在人 HGF 中的位置,参照起始位点为起始密码子。

Note:The location of primer is based on the location in human HGF,the initiation site is initiation codon.



注:QC 为 PCR 试剂盒质控,(-)为阴性对照。

图 1 树鼩 HGF cDNA 扩增和序列拼接结果

Note:QC is quality control of PCR kit,(-) is negative control.

Fig.1 PCR amplification of tree shrews HGF cDNA and result of sequence stitching

2.2 树鼩 HGF 三维分子模型的构建

我们通过 SWISS-MODEL 预测并结合 Pymol 构建得到了树鼩 HGF α 链 NK1 结构域和 β 链 sp 结构域的三维分子模型(图 3,图 4),并通过 APBS 软件得到了树鼩 HGF α 链 NK1 结构域的表明分子电荷模型(图 3)

3 讨论

3.1 树鼩 HGF 核苷酸序列的分析讨论

树鼩全长编码序列与人相似度为 91.97%,共存在 176 个碱基的差异,同时在树鼩 HGF 编码区域 1617 ~ 1622 位多出 6 个碱基,但上述差异并未导致

移码突变。本实验由于采用热启动版本的 Taq 聚合酶,并采用双向测序,有效排除了测序引起的误差。因此,测序所得的树鼩 HGF 分子全长编码序列应该是较为可信的。

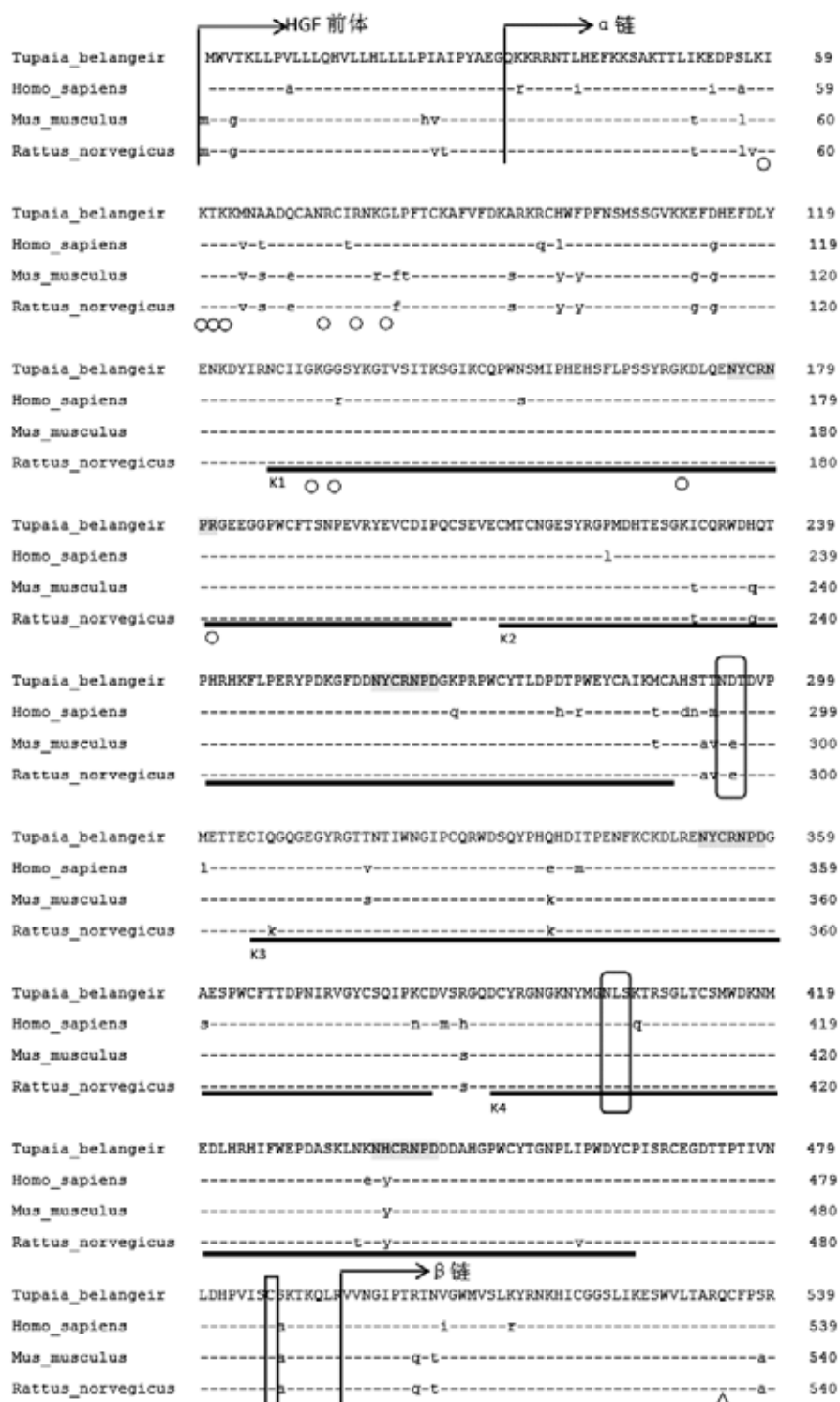
3.2 树鼩 HGF 氨基酸序列的分析讨论

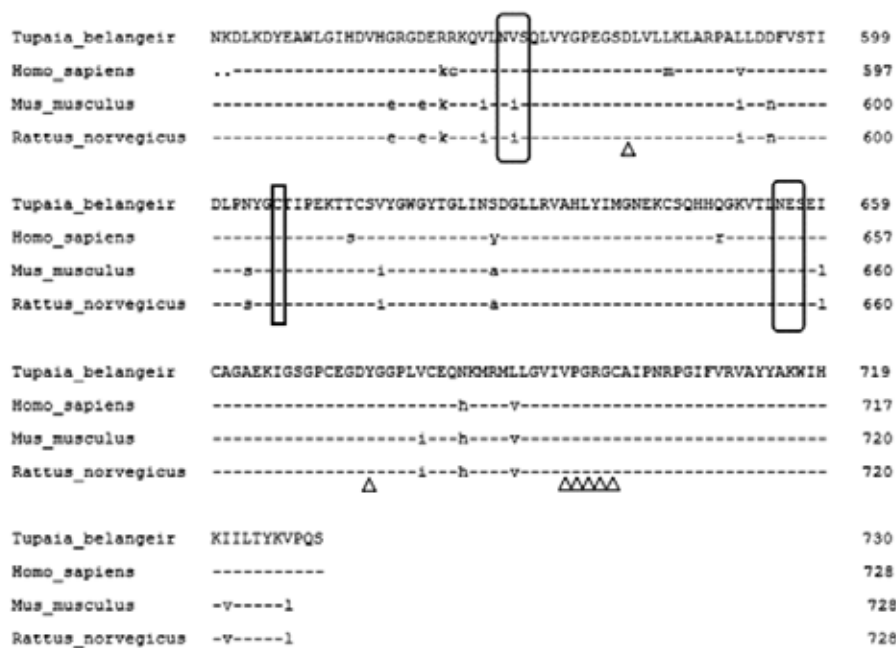
3.2.1 树鼩的 HGF 整体结构分析讨论

树鼩 HGF 分子前体由 730 个氨基酸组成,利用

mega5.0 和 DNAMAN6.0 软件将推导得到的树鼩 HGF 氨基酸序列与人(NP_000592.3),小鼠(NP_001276387.1)

大鼠(NP_058713.1)比对后,氨基酸序列相似度分别为 93.7%,93.16%,93.16%,树鼩 HGF 氨基酸序列与人类相似度更高,但与大小鼠相似度差别不大,这一结果提示 HGF 分子在进化过程中可能相





注:相同的氨基酸位点用-表示,序列缺失部分用.表示,kringle 结构域为下划线部分,其中共同基序用阴影画出,四个潜在的 N-糖基化位点用圆角矩形标出,连接 HGF α 与 β 链的半胱氨酸位点用矩形标出,与硫酸乙酰肝素和肝素结合的位点用○标出, β 链与 MET 受体结合的位点用△标出。

图 2 树鼯HGF 预测氨基酸序列与人,小鼠,大鼠的比对分析

Note: Identical amino acids are indicated by dashes (-), Dots (.) are introduced where the sequence fails. The kringle domains are shown by the underlines and the motifs in it are shadowed. Four putative N-glycosylation sites are circled. The cysteine residues that form a disulfide bond between the α - and β -chains are boxed. The sites in α -chain that bonded by heparan sulfate is marked by ○. The sites in β -chain that combine with MET receptor is marked by △.

Fig. 2 The Alignment and analysis of predicted tree shrews HGF amino acid sequences with their homologues from human, mouse and rat

对保守。如人一样,树鼯 HGF 在转录起始位点只有一个甲硫氨酸,而小鼠和大鼠有两个,另外,在树鼯 HGF 终止密码子与人处于相同位置,但相比大鼠和小鼠在翻译末端多出 3 个氨基酸残基,同时由于树鼯 HGF 在 540 和 541 处相比人多出两个氨基酸残基,导致树鼯 HGF 的总长为 730,这样的结构差异是否会导致 HGF 的功能差异,有待进一步研究和探讨。

同时通过与 GenBank 中人 HGF 的已经注明的结构域比对后发现,两者均由七个部分组成,包括 N 端一个约 32 个氨基酸残基长度的信号肽序列,N-端结构域(n),4 拷贝的 kringle 结构域(k1 - k4), 和一个 C-端结构域(又名 sp,因为该结构域与丝氨酸蛋白酶催化结构域结构相似),同时在 492 位和 493 位(Arg-Val)均存在一个推定的蛋白酶水解位点,裂解部位的结构与组织纤溶酶原激活物(TPA)活化纤溶酶原为纤溶酶的裂解部位的结构一致,提示树鼯成熟 HGF 异质二聚体也是经 TPA 裂解 pre-pro-HGF

后形成的 α 链与 β 链构成^[6]。同时连接 α 链与 β 链的半胱氨酸残基位置和推定的 4 个糖基化位点在四个物种中都处于同一位置。通过以上结果推断,树鼯 HGF 基本结构应与人 HGF 分子相似。

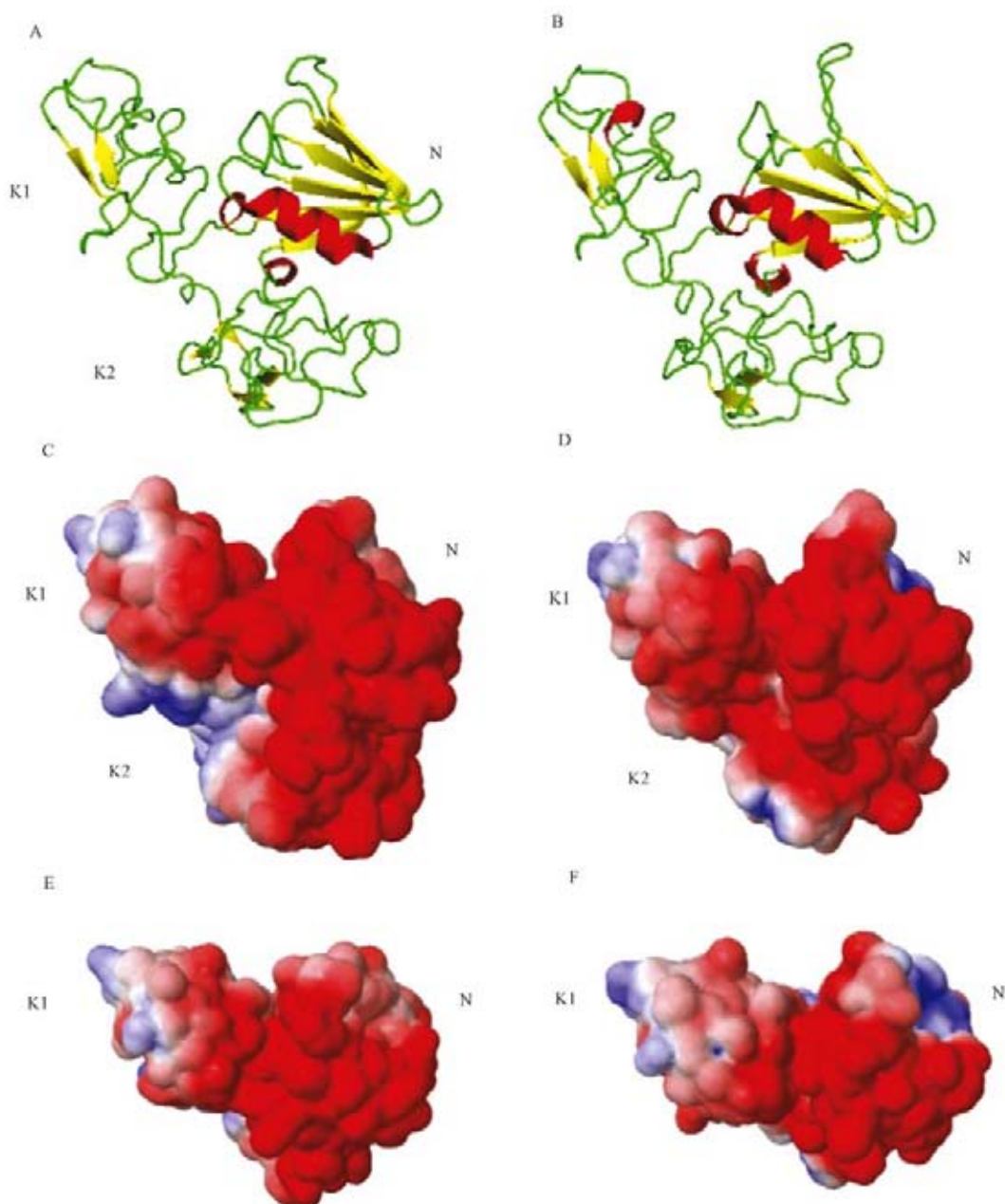
3.2.2 树鼯 HGF α 链的结构分析讨论

人的 HGF α 链主要有 5 个结构域,分子量大小为 69×10^3 ^[7] 分别是一个与纤溶酶原激活肽(plasminogen activation peptide)相关的 N 端结构域与 4 个相连的 kringle 结构域(K1 - 4),其中 kringle 域含有三个大的环区,环区内经由 3 组二硫键和大量的分子内氢键加以稳定,同时圈区间含有小的反向平行的 β 片,且结构域中特定位置含有 Asn-Tyr-Arg-Pro-Asp 特征结构。目前这一结构域已经在整个血液凝固和纤维蛋白溶解蛋白质中被发现,被认为在介导分子间相互作用和蛋白酶水解活性调节中起重要作用^[8]。在完整的人 HGF 中, α 链的 N 端发卡状结构域和 K1 结构域(NK1)与其受体 MET 紧密结合,已经能够激活 MET 受体的下游活性,因此

NK1 结构域被认为是 HGF 分子中最重要的与受体结合的活性区域之一^[9]。但在具体的活性位点上,虽然目前多数研究显示 HGF 主要通过 NK1 结构域与 MET 受体的 SEMA 结构域结合^[10],但也有研究表明其还可以与 MET 受体的 IPT 结构域结

合^[11],研究之间存在较大的争议,故 HGF α 链上与 MET 受体结合的活性位点尚不明确。

同时我们在通过 SWISS 在线预测软件对树鼩 HGF α 链进行同源构建的过程中发现,现有的晶体衍射模型只覆盖了 HGF α 链的 N 端结构域和 K1-2



注:左、右分别为人和树鼩的蛋白三维模型构建;A、B 和 C、D、E、F 分别为
飘带图和表明绝对电荷分布图(负电荷显示红色,正电荷为蓝色)。

图 3 人和树鼩 HGF α 链 NK2 结构域蛋白三维结构构建与表明电荷比较

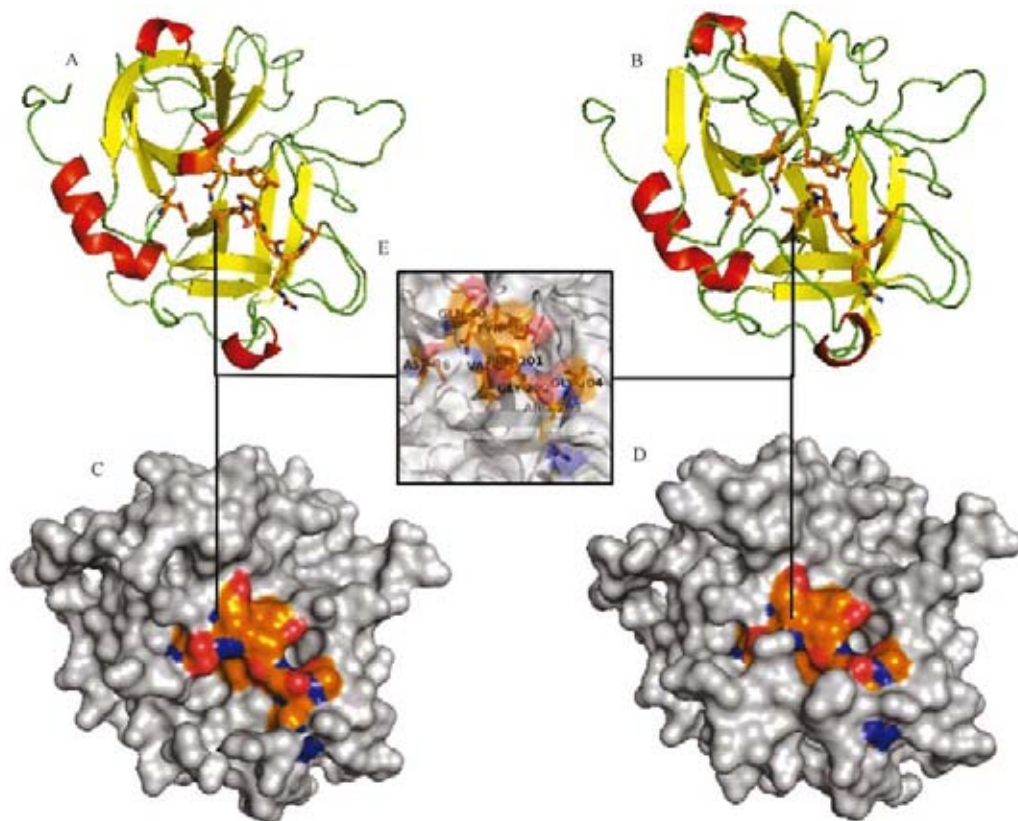
Note: Modeled structures and surface charge of human(left) and tree shrews(right) NK2 domain of HGF α -chain. Shown on A,B and C,D,E,F are surface views and surface charges, respectively. Show in red are negative charges and in blue are positive charges.

Fig.3 Modeling of three-dimensional structures and surface charge of the NK2 domain of human and tree shrews HGF α -chain

结构域(NK2),故我们基于同源构建的树鼩 HGF α 链也只显示了 NK2 结构域,而有研究表明 HGF α 链的 K3-4 区域与 MET 结合能力较差,可能更重要作用在于为 HGF β 链 sp 结构域与 MET 受体的结合提供合适的空间构像^[12],这可能是 K3-4 区域缺失的原因之一。因此我们通过 Pymol 和 APBS 在线预测分别对树鼩 HGF NK2 结构域三维空间结构和分子表面电荷进行了分析,结果显示(图3),树鼩 HGF K1 结构域氨基酸序列在人,大鼠,小鼠中高度一致,相似性分别达到 97.5%,100%,100%,且空间结构和分子表面电荷分布基本一致,同时 K1-K4 区均存在一个高度保守的 NYCRNPD 基序,该基序是否与受体的激活和结合有关,有待进一步研究。虽然 N 端结构域均由间隔分布的 3 个 α 螺旋和 5 个 β 折叠片以 α - β - β - α - β - β - α 的排序构成,但在第一个

和第五个 β 折叠片长度上不同,这导致了树鼩在到 52 位和 108 位到 116 位氨基酸残基的空间构象上存在差异。而在 K1 结构域,由于树鼩与小鼠和大鼠氨基酸残基序列完全一致,导致树鼩 247-251 位氨基酸残基在构象上存在与小鼠和大鼠相同的 α 螺旋,而这一结构在人 K1 结构域不存在。同时比较 N 端结构域的分子表面电荷后发现,树鼩 95 位和 97 位分别为精氨酸和组氨酸,带正电荷,而这两个残基恰好暴露于分子表面,导致该区域带上了较强的正电荷,而人 95 位和 97 位为谷氨酰胺和亮氨酸,带中性质电荷。因此,在以上位点的电荷和空间构象差异可能影响了树鼩 HGF 同其它分子的结合,例如,我们在实验中发现,人 HGF 分子对树鼩肝细胞的生长促进作用不明显。

同时,HGF α 链还能不依赖 β 链单独与 MET



注:左、右分别为人和树鼩 HGF β 链的三维结构模型构建,A、B 和 C、D 分别为
飘带图和溶剂可及表面图(橙色部分为活性位点区域),E 显示了活性位点与溶剂可及表面的相对位置。

图4 人和树鼩 HGF β 链 sp 结构域的三维模型构建和溶剂可及表面比较

Note: Modeled structures and solvent-accessible surface of human(left) and tree shrews(right)

HGF β chains. Shown on A, B and C, D are surface view and solvent-accessible surface
(the orange part is activation sites) respectively, Figure E show the relative location of activation
sites and solvent-accessible surface.

Fig. 4 Modeling of three-dimensional structures and solvent-accessible surface of sp domain of
human and tree shrews HGF β -chain

受体结合,因此除了完整的 HGF 异二聚体外,HGF 在体内还存在两中剪切异变体,分别是 NK1(仅包含 N 端结构域与 K1 结构域),NK2(仅包含 N 端结构域与 K1-2 结构域)^[13],在功能上,单独的 NK1 和 NK2 剪切体表现为 MET 受体拮抗剂^[14-15],而在受体细胞表面存在游离硫酸乙酰肝素,肝素存在的情况下,NK1 还能以二聚体或四聚体的形式同完整 HGF 分子一样起到 MET 受体激动剂的作用^[16]。因此我们比较了文献已经报道的硫酸乙酰肝素,肝素与 HGF N 端与 K1 结构域的结合位点后,发现树鼩除一个位点与人有差异之外,其余位点氨基酸序列完全一致,因此推测树鼩可能也存在相应的剪切异变体多聚形式,有研究表明,对 NK1 中 K1 结构域中的硫酸乙酰肝素结合位点进行突变后,NK1 与 MET 受体结合程度更高,因此推测树鼩 NK1 剪切体与 MET 受体的结合程度更高。

3.2.3 树鼩 HGF β 链的结构分析讨论

人 HGF 的 β 链为一个完整的结构域,分子量大小为 34×10^3 ,因与糜蛋白酶样丝氨酸蛋白酶(chymotrypsin-like serine proteases)家族蛋白酶的蛋白酶结构域高度相似,又被称为 sp 结构域(sp domain),因此同其它纤溶酶原(plasminogen)和丝氨酸蛋白酶原一样,树鼩的 β 链只有在单链的 HGF 前体分子经水解成双链并结合形成异二聚体后才具有活性,且其与 MET 受体的结合依赖于 α 链与 MET 受体的结合^[17]。虽然其与 MET 受体的结合能力差于 α 链的 NK1 区域,但如果 MET 受体缺失了 HGF β 链的结合,其下游信号通路的级联反应的强度会显著降低^[18],因此 HGF β 链与 MET 受体的结合是 HGF 发挥其完整生物学活性所必须的。而目前,人 HGF β 链与 MET 受体结合的具体位点已经通过 X 晶体衍射模型得到^[18]。

因此我们通过 Swiss-model 对树鼩 HGF β 链进行预测,并用 Pymol 对其三维结构和溶剂可及表面(solvent-accessible surface)进行建模比较,结果显示(图四):树鼩 HGF β 链类丝氨酸蛋白酶区域的相应活性位点与人一致,均为 Gln534, Asp578, Tyr673,因此树鼩 HGF β 链依然不具有丝氨酸蛋白酶活性。同时,树鼩 HGF β 链与 MET 受体结合位点与人完全一致,位点位置均为 Gln534, Asp578, Tyr673, Val692-Pro693-Gly694-Arg695-Gly696,在三维空间构型和溶剂可及表面基本一致,均存在一个凹槽。在人体内,HGF β 链通过该凹槽中的上述活性位点

与 MET 受体 SEMA 结构域结合,从而参与 MET 受体活性的激活^[19]。因此我们推测树鼩 β 链与 MET 受体的结合方式与人类似。

综上,我们通过 RT-PCR 扩增获得树鼩 HGF 全长编码序列,并对其分子结构进行比较分析。结果表明:HGF 分子结构在进化中相对保守,树鼩 HGF 整体结构与人相似。但树鼩 HGF α NK1 区域局部空间构型和分子表面电荷存在较大差异。而这些差异为进一步明确树鼩 HGF 与其受体的作用方式提供了参考,并有利于树鼩 HGF 的合成与制备。

参考文献:

- [1] Malgorzata B, Garratt AN, Torsten W, *et al.* Met provides essential signals for liver regeneration[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101(29):10608-13.
- [2] Renzo M F D, Olivero M, Katsaros D, *et al.* Overexpression of the Met/HGF receptor in ovarian cancer[J]. International Journal of Cancer, 1994, 58(5):658-62.
- [3] Jiang WG, Hiscox SE, Parr C, *et al.* Antagonistic effect of NK4, a novel hepatocyte growth factor variant, on in vitro angiogenesis of human vascular endothelial cells[J]. Clin Cancer Res. 1999 5(11):3695-703.
- [4] Xia H J, Wang C Y, Zhang H L, *et al.* Characterization of spontaneous breast tumor in tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*)[J]. Zoological Research, 2012, 33(1):55-59.
- [5] Park US, Su JJ, Ban KC, *et al.* Mutations in the p53 tumor suppressor gene in tree shrew hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus infection and intake of aflatoxin B1[J]. Gene, 2000, 251(1):73-80.
- [6] Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA[J]. American Journal of Pathology, 1993, 143(3):949-958.
- [7] Miyazawa K, Tsubouchi H, Naka D, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 1989, 163(2):967-973.
- [8] Patthy L, Trexler M, Váli Z, *et al.* Kringles: modules specialized for protein binding. Homology of the gelatin-binding region of fibronectin with the kringle structures of proteases[J]. Febs Letters, 1984, 171(1):131-136.
- [9] Lokker NA, Godowski PJ. Generation and characterization of a competitive antagonist of human hepatocyte growth factor, HGF/NK1[J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(268):17145-17150.
- [10] Ermanno G, Sara S, Petoukhov MV, *et al.* Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(11):4046-4051.

- [11] Cristina B, Addolorata A, Maria G, *et al.* A high affinity hepatocyte growth factor-binding site in the immunoglobulin-like region of Met[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(30):21267–21277.
- [12] Holmes O, Pillozzi S, Deakin JA, *et al.* Insights into the structure/function of hepatocyte growth factor/scatter factor from studies with individual domains [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 367(2):395–408.
- [13] W David T, Jennifer DH, Ermanno G, *et al.* Structural basis for agonism and antagonism of hepatocyte growth factor [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(30):13264–13269.
- [14] Youles M, Holmes OM, Nessen M, *et al.* Engineering the NK1 fragment of hepatocyte growth factor/scatter factor as a MET receptor antagonist[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 377(3):616–622.
- [15] Chan AM, Rubin JS, Bottaro DP, *et al.* Identification of a competitive HGF antagonist encoded by an alternative transcript [J]. *Science*, 1991, 254(5036):1382–1385.
- [16] Lietha D, Chirgadze DY, Mulloy B, *et al.* Crystal structures of NK1 – heparin complexes reveal the basis for NK1 activity and enable engineering of potent agonists of the MET receptor[J]. *Embo Journal*, 2001, 20(20):5543–5555.
- [17] Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, *et al.* Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor[J]. *Embo Journal*, 1992, 11(11):4825–4833.
- [18] Daniel K, Xiaoyi Y, Mark P, *et al.* Structural and functional basis of the serine protease-like hepatocyte growth factor beta-chain in Met binding and signaling [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(38):39915–39924.
- [19] Enrique DL, Srinivasan N, Sowdhamini R, *et al.* Molecular evolution and domain structure of plasminogen-related growth factors (HGF/SF and HGF1/MSP) [J]. *Protein Science*, 1994, 3(12):2378–2394.

[修回日期]2016-03-30

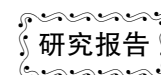
(下接第 80 页)

理检查结果显示其脾脏红髓髓窦高度扩张并充满大量红细胞,髓质内含铁血黄素沉积明显。本次研究可见,除虫脲对大鼠血液系统可造成明显损害。

参考文献:

- [1] 刘刚. 除虫脲原药产品登记企业达到 14 家. 农化市场十日讯, 2013, (19):38–38.
- [2] Cornell University. Pesticide Management Education Program PMEP [DB/OL]. <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/dienochlor-glyphosate/diflubenzuron-ext.html>, 1993–9.
- [3] 刘英华, 张静姝, 邸金茹, 等. 三聚氰胺对大鼠的亚慢性毒性研究[J]. *环境与健康杂志*, 2010, 27(5):422–425.
- [4] 李本长, 邓磊, 周宁, 等. 噻唑膦原药对大鼠的亚慢性毒性作用[J]. *中国比较医学杂志*, 2014, (6):49–53.
- [5] 张妍, 朱莎, 高宇, 等. 农药暴露与儿童急性白血病关系的病例-对照研究[J]. *中华预防医学杂志*, 2011, 45(1):41–46.
- [6] Gronowicz G, Swift H, Steck T L. Maturation of the reticulocyte in vitro[J]. *Journal of Cell Science*, 1984, 71(1):177–197.
- [7] 李津婴. 溶血性贫血的诊断与实验室检查[J]. *继续医学教育*, 2006, 20(4):66–71.
- [8] 卢焕兴, 余艳云. 血液细胞学参数在贫血诊断中的应用[J]. *现代预防医学*, 2005, 32(6):698–700.
- [9] Salama A. Drug-induced immune hemolytic anemia. [J]. *Expert opinion on drug safety*, 2009, 8:73–79.
- [10] Garratty, G. Immune hemolytic anemia caused by drugs [J]. *Expert opinion on drug safety*, 2012, 11(4):63–67.
- [11] 李晓晶, 陈旭岩, 汪波, 等. 药物导致溶血性贫血 18 例分析[J]. *中华内科杂志*, 2007, 46(2):146–147.
- [12] 付蓉. 后天获得性溶血性贫血[J]. *中国实用内科杂志*, 2009, (7):596–599.

[修回日期]2016-02-01



Slit2 在非酒精性脂肪肝中的作用

曾翠玲, 郑凌云, 邢丽英, 李香莉, 王丽京

(广东药学院, 血管生物医学研究所, 广州 510006)

【摘要】 目的 探讨 Slit2 蛋白在非酒精性脂肪肝中的作用。**方法** 选取 8 周龄雄性 LDLR^{-/-} 小鼠和 LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠, 各 6 只, 高脂喂养 12 周建立 NAFLD 模型后, 眼眶静脉丛取血测定血清 TC, TG, LDL-C, HDL-C 的水平, 取肝脏组织做切片染色观察病理改变并提取肝组织 RNA 用 QPCR 分析 LDLR^{-/-} 小鼠和 LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠脂代谢相关基因的表达水平。**结果** LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠血清中 LDL-C 水平明显低于 LDLR^{-/-} 小鼠;与 LDLR^{-/-} 小鼠相比, LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠肝脏脂肪变性及肝损伤明显减轻, 且肝脏组织脂代谢相关基因表达明显减少。**结论** Slit2 蛋白减轻了小鼠肝组织的病理损伤。

【关键词】 Slit2; 非酒精性脂肪肝; 脂代谢

【中图分类号】R-332 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2016) 05-0019-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.005.003

Effect of Slit2 on nonalcoholic fatty liver disease

ZENG Cui-ling, ZHENG Ling-yun, XING Li-ying, LI Xiang-li, WANG Li-jing

(Vascular Biology Research Institute, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Slit2 over-expression on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in mice. **Methods** Eight week male LDLR^{-/-} mouse and LDLR^{-/-};Slit2-Tg mouse were fed a high-fat diet for 12 weeks to induce NAFLD ($n=6$ per group). After 12 weeks, they were taken for blood samples and dissected. The concentration of TG (triglycerides), TC (total cholesterol), LDL-C (low density lipoprotein cholesterol) and HDL-C (high density lipoprotein cholesterol) in the serum were examined respectively. Liver tissue samples were taken for HE staining to observe the morphological and pathological changes. The mRNA expression levels of hepatic genes related to lipid metabolism such as LXR- α , LXR- β , FAS, SREBP-1c was measured by real-time RT-PCR. **Results** The serum LDL-C levels of LDLR^{-/-};Slit2-Tg mouse were significantly lower than that in LDLR^{-/-} mouse ($P < 0.01$). And the grade of lipid droplets and pathological injury of liver tissue decreased significantly in the LDLR^{-/-};Slit2-Tg mouse compared with LDLR^{-/-} mouse. Furthermore, The mRNA expression levels of hepatic genes related to lipid metabolism decreased significantly in the LDLR^{-/-};Slit2-Tg mouse. **Conclusions** The overexpression of Slit2 can reduce the pathological injury of liver tissue in mouse with NAFLD.

【Key words】 Slit2; NAFLD; Lipid metabolism

非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指除酒精和其他明确的损肝因

素所致的, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征^[1]。随着生活水平的改善、生

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (31271455; 31200861)。

[作者简介] 曾翠玲 (1991-), 女, 硕士生, 主要从事心血管病研究。Email: zengcuijing0929@163.com。

[通讯作者] 王丽京, 女, 博士, 教授, 研究方向: 肿瘤分子生物学。Email: wanglijing62@163.com。

活方式的改变、肥胖患者的增加,NAFLD 的发病率不断攀升,目前已成为全球慢性肝脏疾病的首要病因。其危害在于部分患者可进而发展为肝纤维化、肝硬化甚至肝癌,并易于并发心脑血管疾病而导致相关的致死致残率上升^[2-4]。因此,研究 NAFLD 脂肪变性的发病机制具有十分重要的临床意义。

Slit2 是一种最早从果蝇体内发现的分泌型细胞外基质蛋白,通过结合细胞膜上的 roundabout (Robo)受体家族发挥作用。Slit/Robo 信号作为神经导向因子在神经系统中的作用已经被阐述明确,研究表明 Slit/Robo 信号还参与多种生理病程,如抑制白细胞趋化,参与血管的发生及肿瘤新生血管的形成^[5-7]。我们实验室的前期研究也发现 Slit2/Robo1 信号在肝纤维化中具有重要作用,Slit2 蛋白过表达可以促进小鼠肝纤维化发生,而 slit2 阻断剂治疗后可明显减轻小鼠肝纤维化^[8],而 Slit2 蛋白在 NAFLD 中是否也有重要作用未见报道。本文选用 Slit2 蛋白过表达的 LDLR^{-/-}小鼠(即 LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠)为研究对象,以 LDLR^{-/-}小鼠为对照组,通过高脂喂养建立 NAFLD 模型,观察 Slit2 蛋白在 NAFLD 中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

LDLR^{-/-}小鼠(B6.129S7-Ldlr^{tm1Her}/J)12只(雄性4只,雌性8只)购自美国 Jackson 实验室,货号:002207。Slit2 过表达小鼠(Slit2-Tg 小鼠),由上海生命科学院构建赠送^[9],共6只,6~8周龄。LDLR^{-/-}小鼠与 Slit2-Tg 小鼠杂交后所得 LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠,通过6~8代回交且繁殖稳定后,用于本研究。所有小鼠均在广东药学院实验动物中心 SPF 级动物房饲养扩群【SYXK(粤)2012-0125】。

1.1.2 仪器及试剂

试剂:甲醇、乙醇、异丙醇和苏木素-伊红染色套装(康龙生物),琼脂糖(Biowest),PCR 引物(Invitrogen),PCR Mix(Thermo),酶法血脂四项测定试剂盒(北京中生北控),RNA 提取试剂盒(Takara),反转录试剂盒(Takara);2xRT SYBR Green Master Mix(Takara)。

仪器:组织包埋机(莱卡)、石蜡切片机(莱卡);PCR 仪(美国应用生物系统公司);荧光定量 PCR

仪(Bio-Rad);光学显微镜(Olympus);低温离心机(Thermo);超速离心机(Beckman);制冰机(北京长流科学仪器有限公司);凝胶成像仪(GE);电泳仪(Bio-Rad);旋转混合仪(宁波新芝生物科技有限公司);超纯水系统(Millipore)。

1.2 方法

1.2.1 LDLR^{-/-}小鼠的鉴定

剪取3周龄小鼠尾尖部约1cm,置于1mL离心管中,加入180μL 50mmol/L的NaOH,100℃水浴裂解30min后加入20μL 1mmol/L的Tri-HCL充分混匀,离心所得上清液即为提取的DNA。将提取的DNA按以下条件鉴定:LDLR^{-/-}基因引物P1:AATCCATCT TGTTCATGCGCCGATC;LDLR^{-/-}基因引物P2:CCATATGCATCCCCAGTCTT;LDLR^{-/-}基因引物P3:GCGATGGATACACTCACTGC。PCR反应条件为94℃预变性3min,94℃变性30s,65℃退火1min,72℃延伸1min,循环35次,72℃充分延伸2min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像系统观察电泳结果:LDLR^{-/-}基因的扩增产物片段长度约为350bp,野生型扩增产物片段长度约为167bp。

1.2.2 LDLR^{-/-};Slit2-Tg小鼠的鉴定

LDLR^{-/-};Slit2-Tg小鼠的鉴定分为两部分,第一部分鉴定LDLR^{-/-}基因,鉴定步骤见1.2.1;第二部分鉴定Slit2基因,Slit2基因的鉴定条件:Slit2基因引物P1:CCCTCCGGATCCTTTACCTGTCAAGGTCCT,Slit2基因引物P2:TGGAGAGAGCTCACAGAACAAAGCCACTGTA。PCR反应条件为94℃预变性4min,94℃变性45s,60℃退火45s,72℃延伸45s,循环35次,72℃充分延伸10min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像系统观察电泳结果。Slit2基因的扩增产物片段长度约为600bp。在350bp和600bp处均有扩增产物的为LDLR^{-/-};Slit2-Tg小鼠。

1.2.3 NAFLD动物模型构建

LDLR^{-/-}小鼠与LDLR^{-/-};Slit2-Tg小鼠每组各6只,8周龄左右,均为雄性,对照组给予普通饲料,模型组进行高脂饲料(普通饲料87.5%,猪油10%,胆酸盐0.5%,胆固醇2%)喂养12周建立NAFLD动物模型。高脂饲料喂养12周后取材,取材前一天禁食12h,对各组小鼠分别进行眼眶静脉丛取血并取肝脏组织用于下一步实验。

1.2.4 小鼠血脂分析

用北京中生北控血脂测定试剂盒,参照试剂盒说明书测定小鼠血脂,通过酶标仪测定相应的吸光值。TC、TG 和 HDL-C 的浓度分别根据吸光度直接计算得出, TG < 4.5 mmol/L 时, LDL-C 浓度由 Friedewald 公式法推算得到, $LDL-C = TC - (HDL-C + TG/2.2)$ 。

1.2.5 小鼠肝脏组织病理学观察

用颈椎脱臼法处死小鼠,分别取对照组和模型组 LDLR^{-/-}小鼠与 LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠肝脏组织进行固定,经脱水后石蜡包埋、切片,进行 HE 染色,镜下观察各组肝脏组织的病理改变。

1.2.6 小鼠肝组织脂代谢相关基因 mRNA 表达

分别取高脂饲料喂养 12 周后的 LDLR^{-/-}小鼠和 LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠肝组织,Trizol 裂解法抽提总 RNA。每个样品以 1 μ g RNA 按 Takara 的试剂盒说明书进行反转录得到 cDNA。采用 Takara 的 SYBR Green 试剂盒检测脂代谢相关基因 LXR- α , LXR- β , SREBP-1c 和 FAS 的表达水平。引物序列: Mouse GAPDH, 5'-GGTGAAGGTCGCTGTGAACG-3' (Forward), 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3' (Reverse), 产物大小 233 bp; Mouse LXR- α , 5'-CTCAATGCCTGATGTTTCTCCT-3' (Forward), 5'-TCCAACCCTATCCCTAAAGCAA-3' (Reverse), 产物大小 150 bp; Mouse LXR- β , 5'-ATGTCTTCCCCACAAGTTCT-3' (Forward), 5'-GACCACGATGTAGGCAGAGC-3' (Reverse), 产物大小 156 bp; Mouse SREBP-1c, 5'-GCAGCCACCATCTAGCCTG-3'

(Forward), 5'-CAGCAGTGAGTCTGCCTTGAT-3' (Reverse), 产物大小 199 bp; Mouse FAS, 5'-GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT-3' (Forward), 5'-TGGGTAATCCATAGAGCCCAG-3' (Reverse), 产物大小 140 bp。Realtime PCR 反应条件为:95℃ 预变性 10 min, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 循环 40 次。测得的阈循环 (threshold cycle, Ct 值), 根据公式 $\Delta Ct = [Ct(\text{目的基因})] - [Ct(\text{GAPDH})]$ 和 $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct(\text{实验组})] - [\Delta Ct(\text{对照组})]$, 计算出 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 反应目的基因表达水平。

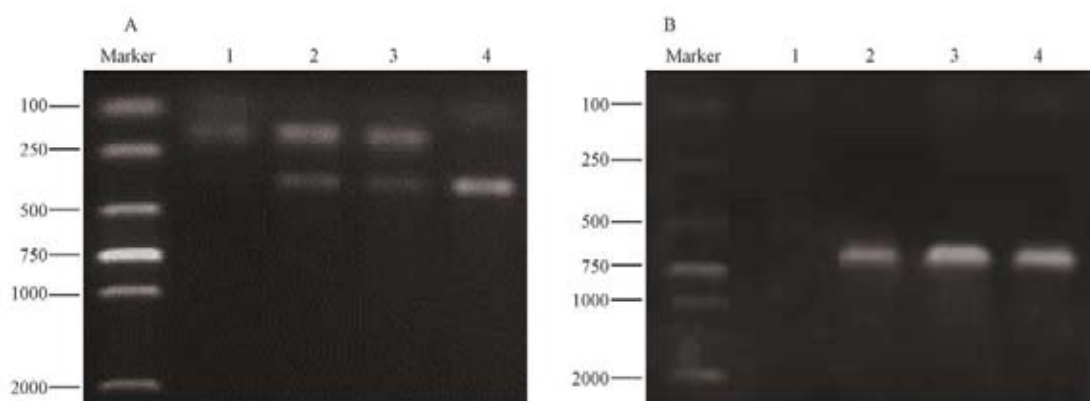
1.2.7 统计学处理

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Graph Pad Prism 5 统计软件进行统计分析。两组间比较采用配对 t 检验统计分析, 以 $P \leq 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 LDLR^{-/-}小鼠与 LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠的鉴定结果

将 LDLR^{-/-}小鼠和 Slit2-Tg 小鼠杂交。对其 F2 代进行 LDLR 基因和 Slit2 基因的鉴定, LDLR^{-/-}小鼠基因条带为 350 bp, LDLR^{+/+}小鼠基因条带为 167 bp; Slit2-Tg 小鼠基因的条带为 600 bp。图 1A 为 LDLR 基因的鉴定图, 4 号小鼠是 LDLR^{-/-}小鼠。图 1B 为 Slit2 基因的鉴定图, 2~4 号小鼠为 Slit2-Tg 小鼠。综上, 1 号小鼠为野生型小鼠, 2 和 3 号小鼠为 LDLR^{+/+};Slit2-Tg 小鼠, 4 号小鼠为 LDLR^{-/-};



注: Marker: DNA marker 2000; 1~4 号为子代小鼠 DNA 扩增结果, 其中 1 号为野生型小鼠; 2 和 3 号小鼠为 LDLR^{+/+}; Slit2-Tg 小鼠, 4 号小鼠为 LDLR^{-/-}; Slit2-Tg 小鼠。

图 1 LDLR^{-/-}小鼠与 LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠鉴定图

Note: Marker: DNA marker 2000; 1~4: Identification results of the offsprings by PCR, No. 1 is wild type mouse,

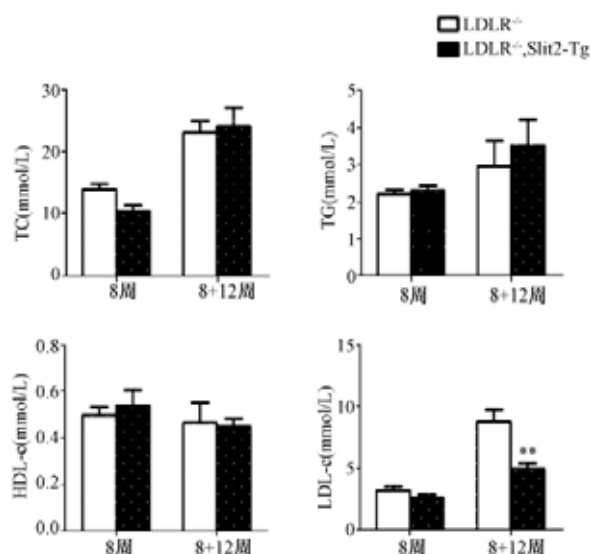
No. 2, 3 are LDLR^{+/+}; Slit2-Tg mice, No. 4 is LDLR^{-/-}; Slit2-Tg mouse.

Fig. 1 PCR results of LDLR gene and Slit2 gene for identification of LDLR^{-/-} mice and LDLR^{-/-}; Slit2-Tg mice

Slit2-Tg 小鼠。

2.2 Slit2 过表达对高脂诱导的小鼠血脂水平的影响

8 周龄左右的雄性 LDLR^{-/-} 小鼠 ($n=6$) 与 LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠 ($n=6$) 进行高脂饲料喂养 12 周后,小鼠血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL-C)浓度均比正常饮食情况下增高,而高密度脂蛋白(HDL-C)没有变化。其中 LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠血清中 LDL-C 浓度明显低于 LDLR^{-/-} 小鼠($P<0.01$)。



注:与 LDLR^{-/-} 组相比, ** $P<0.01$ 。

图 2 小鼠血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平 (mmol/L, $n=6$)

Note: Compared with the LDLR^{-/-} group, ** $P<0.01$.

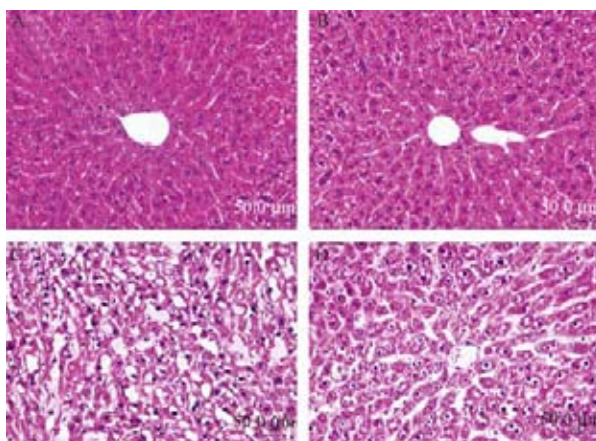
Fig. 2 The serum TC, TG, HDL-C, and LDL-C levels of the mice (mmol/L, $n=6$)

2.3 Slit2 过表达对小鼠肝脏组织的影响

HE 染色结果显示,普通饲料喂养 12 周(对照组)的 LDLR^{-/-} 和 LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠肝脏组织结构,肝小叶结构清晰,肝细胞索排列整齐,以中央静脉为中心呈放射状排列。肝细胞呈多边形,核大而圆,位于肝细胞中央。高脂饲料喂养 12 周(模型组)后,LDLR^{-/-} 小鼠肝脏组织结构不完整,肝细胞排列紊乱,有些肝细胞肿大变圆,内有脂肪滴,伴气球样变,炎性细胞浸润,部分出现肝细胞水肿,组织坏死。LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠也出现肝细胞脂肪变性,但相较于 LDLR^{-/-} 小鼠明显减轻,肝脏组织结构较完整。

2.4 Slit2 过表达对小鼠脂代谢相关基因表达的影响

实时定量 RT-PCR 的方法检测模型组 LDLR^{-/-}



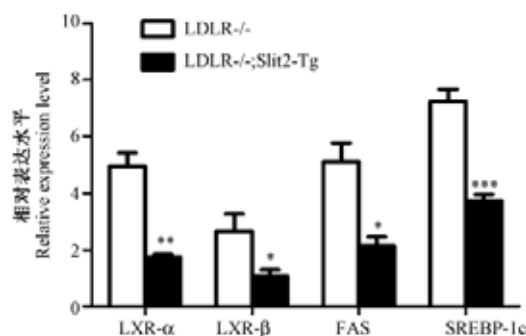
注:A:LDLR^{-/-} 小鼠(对照组);B:LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠(对照组);C:LDLR^{-/-} 小鼠(模型组);D:LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠(模型组)。

图 3 小鼠肝脏 HE 染色(标尺 = 50 μ m)

Note: A: LDLR^{-/-} mice (Control); B: LDLR^{-/-}; Slit2-Tg mice (Control); C: LDLR^{-/-} mice (Model); D: LDLR^{-/-}; Slit2-Tg mice (Model).

Fig. 3 HE staining of the liver (Bar = 50 μ m)

小鼠与 LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠肝脏中与脂代谢通路相关因子 mRNA 的表达。高脂喂养 12 周后,与 LDLR^{-/-} 小鼠相比,LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠的 LXR- α , LXR- β , SREBP-1c 和 FAS 的 mRNA 水平都有显



注:与 LDLR^{-/-} 组相比, * 为 $P\leq 0.05$,

** 为 $P\leq 0.01$, *** 为 $P\leq 0.001$, ($n=6$)。

LXR- α , 肝脏 X 受体- α ; LXR- β , 肝脏 X 受体- β ; FAS, 脂肪酸合成酶; SREBP-1c, 固醇调节元件结合蛋白-1c。

图 4 高脂喂养 12 周后小鼠肝脏 LXR- α 、LXR- β 、FAS 和 SREBP-1c mRNA 的表达 ($n=6$)

Note: Compared with the LDLR^{-/-} group,

* $P\leq 0.05$, ** $P<0.01$, *** $P\leq 0.001$, ($n=6$)。

LXR- α , Liver X receptor- α ; LXR- β , Liver X receptor- β ; FAS, Fatty acid synthase; SREBP-1c, Sterol regulatory element binding protein-1c.

Fig. 4 The expression levels of LXR- α , LXR- β , FAS and SREBP-1c mRNA in the liver after 12 weeks of high-fat diet ($n=6$)

著下调。结果显示,LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠的 LXR- β 和 FAS 的表达明显下降($P < 0.05$),LXR- α mRNA 的差异更显著($P < 0.01$),SREBP-1c 在 LDLR^{-/-}小鼠与 LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠肝脏中表达差异最明显($P < 0.001$)。

3 讨论

NAFLD 的发生与遗传,环境,代谢密切相关,根据病因分原发性和继发性两大类,原发性 NAFLD 与肥胖、糖尿病及高脂血症等有关,继发性 NAFLD 则由某些特殊原因所致,如药物、毒物、减肥手术等^[10]。随着高脂血症发病率的逐年上升,大量研究证实高脂血症是诱发脂肪肝的主要因素^[11-12]。NAFLD 的发病机制至今尚未完全阐明,目前多认为其致病机制涉及胰岛素抵抗、氧化应激、细胞凋亡和脂肪因子等多重打击过程。目前较为公认的是 1998 年 Day 和 James 提出的二次打击学说,认为一次打击是多种原因导致的肝脂代谢紊乱,引起肝脂肪变性。二次打击则是由于肝脏脂肪变性,抗损伤能力下降,进而发展为脂肪性肝炎(NASH)、肝纤维化甚至肝癌。其中脂质代谢紊乱引起肝脂沉积是 NAFLD 发生的关键环节^[13-15]。脂代谢信号转导途径错综复杂,近年来研究发现,LXR- α 信号转导途径和 SREBP-1c 信号转导途径的紊乱在高脂血症和脂肪肝的形成中具有重要的作用^[16]。

本实验采用 LDLR^{-/-}小鼠,通过高脂喂养建立了一种 NAFLD 模型,结果显示高脂喂养 12 周后,血清 TG、TC、LDL-C 浓度均比正常饮食情况下增高,表现出高血脂的特征,肝脏病理形态表现出明显的脂肪肝。同时利用 LDLR^{-/-}小鼠和 Slit2 蛋白过表达小鼠杂交建立了稳定遗传的 LDLR^{-/-};Slit2-Tg 小鼠,观察 Slit2 对血脂,肝脏病理改变及脂代谢相关基因的影响。

Slit2 及其受体 Robo1 主要表达在中枢神经系统,现在研究发现 Slit2/Robo1 在非神经系统中也有表达,在很多肿瘤及血管性疾病中都有 Slit2/Robo1 的异常表达。研究发现 Slit2 在肝脏和肝癌细胞株的表达差异与肿瘤分期和分化程度相关,Slit2 在晚期肝癌及低分化肝癌中表达明显上调,在肝癌组织中表达明显高于癌旁组织^[17-18]。我们实验室前期研究也分别在临床和肝纤维化小鼠模型中证实 Slit2 在纤维化的肝脏组织表达明显高于正常肝组织,Slit2 蛋白过表达可以促进小鼠肝纤维化发

生^[8],但是 Slit2 在 NAFLD 中的作用尚未见报道。本研究结果发现,高脂喂养 12 周后,与 LDLR^{-/-}小鼠相比,Slit2 蛋白过表达的 LDLR^{-/-}小鼠血清 LDL-C 水平明显降低,肝脏脂肪变性明显减轻。LDLR 是一种细胞膜表面的糖蛋白,存在于哺乳动物和人体几乎所有的细胞表面上,但以肝细胞上最为丰富,其主要功能是通过摄取胆固醇进入细胞内来调节血浆胆固醇水平。LDLR 功能缺陷引起血脂尤其是 LDL 和 VLDL 的清除途径受阻,进而抑制了肝内脂类向肝外组织的转运,是高胆固醇血症和脂肪肝的主要原因之一^[19]。我们结果说明 Slit2 蛋白主要通过降低血清 LDL-C 水平,减轻肝脏的脂肪变性。研究表明 LXR- α 激活可以促进脂肪合成相关基因如脂肪酸合成酶(FAS),乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)和硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(SCD-1)的表达,促进脂肪酸的从头合成,进而导致肝脏脂肪变性和高胆固醇血症^[20-21]。同时 LXR- α 可激活 SREBP-1c,上调 FAS 的基因转录促进脂肪酸合成^[22-23]。我们研究结果显示,Slit2 蛋白过表达后脂代谢相关基因 LXR- α 和 SREBP-1c 基因表达均明显下降。研究初步表明 Slit2 过表达可能通过抑制 LXR- α —SREBP-1c—FAS 信号轴抑制脂肪酸的合成,降低肝脏脂质及血脂水平。

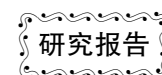
综上所述 Slit2 过表达可以减轻肝脏脂肪变性,降低血脂水平,其机制可能是抑制 LXR- α —SREBP-1c—FAS 信号轴,抑制脂肪酸的合成。因此本研究为预防或治疗脂肪肝提供新的线索,也为研究开发治疗脂肪肝药物提供了新的靶点。

参考文献:

- [1] Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease[J]. N Engl J Med, 2002,346(16):1221-1231.
- [2] Shen L, Fan JG, Shao Y, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver among administrative officers in Shanghai: an epidemiological survey[J]. World J Gastroenterol, 2003,9(5):1106-1110.
- [3] Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2011,34(3):274-285.
- [4] Caldwell S, Argo C. The natural history of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Dig Dis, 2010,28(1):162-168.
- [5] Li HS, Chen JH, Wu W, et al. Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons[J]. Cell, 1999,96(6):807-818.
- [6] Chedotal A. Slits and their receptors[J]. Adv Exp Med Biol,

- 2007,621:65–80.
- [7] Dickinson RE, Duncan WC. The SLIT-ROBO pathway: a regulator of cell function with implications for the reproductive system[J]. *Reproduction*,2010, 139(4):697–704.
- [8] Jianlan Chang, Tian Lan, Changzheng Li, *et al.* Activation of Slit2-Robo1 signaling promotes liver fibrosis [J]. *Journal of Hepatology*,2015,63(6): 1413–1420.
- [9] Han HX, Geng JG. Over-expression of Slit2 induces vessel formation and changes blood vessel permeability in mouse brain [J]. *Acta Pharmacol Sinica*,2011,32(11):1327–1336.
- [10] Inzucchi SE, Petersen KF, Shulman GI. Nonalcoholic fatty liver disease[J]. *N Engl J Med*,2002,347(10):768–769.
- [11] Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults[J]. *Aliment Pharmacol Ther*,2011,34(3):274–285.
- [12] Sharabi M, Eldad A. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with hyperlipidemia and obesity [J]. *Am J Med*, 2000,109(2):171.
- [13] Takahashi Y, Sugimoto K, Inui H, *et al.* Current pharmacological therapies for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis [J]. *World J Gastroenterol*,2015,21(13):3777–3785.
- [14] Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines[J]. *Curr Mol Med*,2009,9(3):299–314.
- [15] Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: a massive problem [J]. *Clin Med*, 2011,11(2):176–178.
- [16] Higuchi N, Kato M, Shundo Y, *et al.* Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatol Res*,2008,38(11): 1122–1129.
- [17] Mehmet Ender Avci, Ozlen Konu, Tamer Yagci, *et al.* Quantification of SLIT-ROBO transcripts in hepatocellular carcinoma reveals two groups of genes with coordinate expression [J]. *BMC Cancer*,2008,8(1):1–11.
- [18] Wang B, Xiao Y, Ding BB, *et al.* Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity[J]. *Cancer Cell*,2003,4(1): 19–29.
- [19] Barrett PH, Watts GF. Shifting the LDL-receptor paradigm in familial hypercholesterolemia: novel insights from recent kinetic studies of apolipoprotein B-100 metabolism [J]. *Atheroscler Suppl*,2002,2(3):1–4.
- [20] Chen G, Liang G, Ou J, *et al.* Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2004,101(31): 11245–11250.
- [21] Schultz JR, Tu H, Luk A, *et al.* Role of LXRs in control of lipogenesis[J]. *Genes Dev*,2000,14(22):2831–2838.
- [22] Ferre P, Foufelle F. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective [J]. *Horm Res*,2007,68(2): 72–82.
- [23] Repa JJ, Liang G, Ou J, *et al.* Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta [J]. *Genes Dev*, 2000,14(22):2819–2830.

[修回日期]2016–02–25



骆驼奶对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢及 PPAR- γ 、TNF- α mRNA 的影响

周 珺, 张泉龙, 杨 茜, 李茂星, 邱建国, 张汝学

(兰州军区总医院高原环境损伤防治重点实验室, 国家中医药管理局临床中药学重点学科, 兰州 730050)

【摘要】 目的 研究骆驼奶(CM)对 2 型糖尿病大鼠体重、血糖、血脂、胰岛素、PPAR γ 和 TNF- α 基因表达的影响。**方法** 采用高脂饲料加小剂量(30 mg/kg)链脲佐菌素(STZ)腹腔注射诱导 2 型糖尿病大鼠模型, 将其分为 4 组, 即正常对照(control)组、模型(model)组、骆驼奶低剂量(CM-L)组(3.5 mg/kg·d)、骆驼奶高剂量(CM-H)组(10 mg/kg·d), 每周测定体重和血糖, 第 4 周进行葡萄糖耐量实验, 给药 4 周后断头处死, 测定血脂(TC、TG、HDL-C、LDL-C)、胰岛素水平, 检测脂肪组织 PPAR γ 和肝脏组织 TNF- α mRNA 表达量。**结果** 与正常对照组相比, 模型组大鼠体重明显下降($P < 0.01$), 空腹血糖、糖耐量 0、30、60、120 min 血糖, 以及血清 TC、TG、LDL-C 含量均显著增高($P < 0.01$), HDL-C 含量下降, 胰岛素水平升高。CM 可缓解糖尿病大鼠体重下降, 降低高血糖, CM-H 组在给药第 4 周达到显著降糖效果, 并显著降低糖耐量 30 min 血糖($P < 0.05$)。CM 有降低糖尿病大鼠 TC、TG、LDL-C 含量, 升高 HDL-C 含量, 降低胰岛素趋势, 其中 CM-H 剂量组可显著降低 TG、LDL-C 含量($P < 0.05$)。与正常对照组比较, 模型组 PPAR γ mRNA 显著下调($P < 0.05$), TNF- α mRNA 显著上调($P < 0.01$), CM 使糖尿病大鼠的 PPAR γ mRNA 升高, 其中, CM-H 组差异显著($P < 0.05$), CM 可降低其 TNF- α mRNA 表达量。**结论** CM 可缓解 2 型糖尿病大鼠体重下降, 改善高血糖、糖耐量异常、血脂紊乱等症状, 其机制可能与调节 PPAR γ 、TNF- α 表达有关。

【关键词】 骆驼奶; 2 型糖尿病; 血糖; 血脂; PPAR γ ; TNF- α

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 05-0025-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.005.004

Effects of camel milk on glycolipid metabolism and PPAR γ 、TNF α mRNA expression in rats of type 2 diabetes mellitus

ZHOU Jun, ZHANG Quan-long, YANG Qian, LI Mao-xing, QIU Jian-guo, ZHANG Ruxue

(Key laboratory of the prevention and cure for the plateau environment damage, PLA; Clinical Pharmacy Key Discipline of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of camel milk on body weight, blood glucose, lipid, insulin and PPAR- γ 、TNF- α mRNA expressions in type 2 diabetes rats. **Methods** Type 2 diabetes was induced by high fat diet and small dose of STZ(i. g. 30 mg/kg), rats were divided into four groups, normal control(control) group, diabetes model(model) group, camel-low dose(CM-L) group(3.5 mg/kg·d), camel-high dose(CM-H) group(10 mg/kg·d). Body weight and fasting blood glucose were measured every week. Glucose tolerance test(OGTT) was conducted at 4th week. After 4 weeks administration, animals were decapitated, plasma lipid(TC、TG、HDL-C、LDL-C), insulin were assayed.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81173620;30772773)。

[作者简介] 周珺(1986-), 女, 药师, 硕士, 主要从事药理学研究工作。

[通讯作者] 张汝学(1963-), 男, 硕士生导师, 教授。E-mail: zhoujunh@163.com。

The expression of PPAR- γ and TNF- α mRNA were measured using RT-PCR method. **Results** Compared with control group, the weight of model group lowered significantly ($P < 0.01$), FBG and blood glucose at 0, 30, 60, 120 min of OGTT, as well as the TC, TG, LDL-C concentrations increased ($P < 0.01$), while HDL-C content reduced, and insulin level was higher than control rats. Compared with model group, body weight increased and blood glucose decreased in CM group, CM-H reduced the fasting glucose levels in 4th week and decreased the 30min glucose level significantly ($P < 0.05$). CM lowered the TC, TG, LDL-C, insulin and increased HDL-C concentration, and it is significantly in CM-H ($P < 0.05$). There is a marked decrease in PPAR γ mRNA expression ($P < 0.05$) and a significant increase in TNF- α mRNA expression ($P < 0.01$) in diabetes rats. Compared with model rats, PPAR γ mRNA expression was ascended by CM administration, and it is notably in CM-H group ($P < 0.05$), while the TNF- α mRNA expression of diabetes rats was lower, but there is no significant. **Conclusions** CM can improve the lowered body weight, hyperglycemia, abnormal glucose tolerance and dyslipidemia in type 2 diabetes. The mechanism of these maybe associated with the regulation of PPAR γ and TNF- α mRNA.

【Key words】 Camel milk; Type 2 diabetes mellitus; Blood glucose; Blood lipid; PPAR γ ; TNF- α

2 型糖尿病多表现为胰岛素分泌不足及胰岛素抵抗, 现有最有效的降糖药—胰岛素制剂均为注射剂, 使用极其不方便。研究发现, 骆驼奶 (camel milk, CM) 中的胰岛素含量较高, 1 mL 骆驼奶中含有 52 个微单位的胰岛素, 而等量牛奶的胰岛素含量仅为 16 个微单位^[1]。骆驼奶中还含有一种富含半胱氨酸的蛋白质, 其氨基酸序列与胰岛素蛋白家族极其相似, 这种蛋白质就是不被胃酸分解破坏的降糖活性物质—胰岛素/类胰岛素蛋白^[2], 因此这种成分被认为是治疗糖尿病的功效因子之一。骆驼奶对于糖尿病的防治具有较好的应用前景^[3], 临床试验证实, 患者每天饮用 0.5 L 骆驼奶, 将使胰岛素治疗用量平均减少 30%, 有饮用骆驼奶习惯的人群患糖尿病的比率比无饮用骆驼奶习惯的人群下降 0.15% ~ 0.3%^[4]。然而骆驼奶对糖脂代谢的具体效果不明, 其是否参与糖脂代谢关键基因的调节。本文采用高脂饲料加小剂量 STZ 联合诱导 2 型糖尿病大鼠模型, 通过 CM 干预, 研究 CM 对糖尿病大鼠糖脂代谢及关键基因的影响, 探索其对 2 型糖尿病大鼠脂代谢紊乱的影响并探讨其可能机制, 为 CM 应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

Wistar 大鼠, 清洁级, ♀, 体重 180 ~ 220 g, 由兰州大学医学院动物实验中心提供【SCXK(甘)2012-0200】, 饲养于兰州军区兰州总医院动物实验科【SYXK(军)2012-0029】, 普通饲料由该实验科自行配制, 自由摄食进水, 室温 19℃ ~ 24℃。

1.1.2 药品与试剂

链脲佐菌素 (STZ, 批号 S0130) 购自 Sigma 公司; 骆驼奶 (camel milk, CM, 批号 191531-740, 规格 328 g/罐) 购自新疆旺源驼奶实业有限; 血糖测试剂盒 (批号: 1210121)、总胆固醇 (TC) (批号: 1210141)、甘油三酯 (TG) (批号: 1210111)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) (批号: 1210081)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) (批号: 1210091) 检测试剂盒均购自四川省迈克科技有限责任公司; 胰岛素 (FINS) 放射免疫分析试剂盒 (批号: 20121120) 为天津九鼎生物技术有限公司产品; RNAiso Plus (TakaRa, BK4606); PrimeScript™ RT Master Mix (TakaRa, DRR036A); SYBR® Premix Ex Taq™ II (Ti RNaseH Plus) (TakaRa, RR820A)。其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3 实验器材

Vitalab ISP-21 半自动生化分析仪, 荷兰 Vital Scientific 公司; BP210S 电子天平, 赛多利斯有限公司; Biofuge Stratos 高速台式冷冻离心机, 德国 Heraeus 公司; Multiscan MK3 酶标仪, 美国 Thermo Electron 公司; Telstar Mini-V PCR 超净工作台, 西班牙 TERRASSA-SPAIN 医疗器械公司; SN-682 放射免疫 γ -计数器, 中国科学院上海原子核研究所日环仪器厂。ABI7300 定量 PCR 仪, 美国应用生物系统公司。

1.2 方法

1.2.1 高脂饲料加小剂量 STZ 联合诱导糖尿病大鼠模型的建立

高脂饲料饲养加小剂量 STZ 联合诱导建立 2 型糖尿病大鼠模型。购买的雌性 Wistar 大鼠在我实验科适应性饲养 1 周后, 根据体重平均分组, 一组为正常对照组 (10 只), 给与普通饲料, 其余均饲以高

脂饲料, 喂养 2 个月后大鼠禁食 16 h, 腹腔注射 STZ (30 mg/kg, i. p.) 诱发 2 型糖尿病模型, 选取空腹血糖值 ≥ 15 mmol/L 大鼠纳入试验。

造模成功后, 大鼠分为正常对照组、糖尿病组、CM-L 组 (3.5 mg/kg · d)、CM-H 组 (10 mg/kg · d)。正常对照组及模型组每日给予等量蒸馏水, 约 1 mL/100g 体重。以上各组均为灌胃 (i. g.) 给药, 连续给药 4 周, 在末次给药后大鼠禁食不禁水 6 h 后断头处死并收集躯干血, 4000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 将血浆分装于不同的离心管中 -20℃ 保存待用。

1.2.2 体重、血糖

每周测定一次空腹体重和空腹血糖, 测血糖前大鼠禁食不禁水 6~7 h, 眼眶静脉丛采血; 实验结束时收集血液。0.1 mol/L 肝素钠抗凝, 离心并分离血浆。用葡萄糖氧化酶法测定血浆葡萄糖含量。

1.2.3 葡萄糖耐量的测定

实验动物禁食 6 h (8:30 ~ 14:30) 后, 腹腔一次性注射 50% 葡萄糖 (2.5 g/kg), 测定注射 0、30、60、120 min 血糖值。

1.2.4 血脂、胰岛素含量的测定

血浆 TG 用 GPO-PAP 法测定, TC 用 COD-CE-PAP 法测定, HDL-C 用 PTA-Mg²⁺ 沉淀法测定, LDL-C 用聚乙烯硫酸沉淀法测定。采用放免法测定胰岛素含量。

1.2.5 RT-PCR 检测脂肪组织 PPAR- γ 和肝脏组织 TNF- α mRNA 表达

TRIzol 法提取总 RNA, 一步法逆转录合成 cDNA。进行实时荧光定量 PCR。PPAR- γ (153 bp) 上游引物 5' GGAGCCTAAGTTTGAGTTTGC-

TGTG3', 下游引物 5' TGCAGCAGGTTGTCTTGGATG3'; TNF- α (75 bp) 上游引物 5' ATACACTGGCCCGAGGCAAC 3', 下游引物 5' CCACATCTCGGATCATGCTTT-C3'; 以 β -actin (150 bp) 为内参照, 上游引物 5' GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA 3', 下游引物 5' GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG 3'。实验结果采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 进行相对定量。

1.2.6 统计学处理

使用 SPSS 11.5 统计软件, 各组实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异的显著性用 *t* 检验进行统计学处理, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠体重变化

表 1 所示, 正常组大鼠体重缓慢上升, 糖尿病大鼠体重明显下降 ($P < 0.01$), 随病程的延长糖尿病大鼠体重呈下降趋势, CM 组大鼠体重下降缓慢, 但与模型组相比, 无显著统计学意义。

2.2 骆驼奶对糖尿病大鼠血糖水平的影响

与正常对照组比较, 模型组和 CM 各组大鼠 0~4 周血糖值均明显高于正常对照组 ($P < 0.01$), 与模型组比较, CM 有降低 2 型糖尿病大鼠血糖趋势, 随实验进程模型组血糖逐渐升高, CM-H 组在给药第 4 周达到显著降糖效果 ($P < 0.05$)。

2.3 骆驼奶对糖尿病大鼠糖耐量的影响

与正常对照组相比, 糖尿病大鼠 0、30、60、120 min 血糖均显著增高 ($P < 0.01$); CM 可降低糖尿病大鼠 30、60、120 min 血糖, 其中 CM-H 组可显著降低 30 min 血糖值 ($P < 0.05$)。

表 1 骆驼奶对体重的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Effects of camel milk on body weight ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	只数 <i>n</i>	剂量 (g/kg · d) Dose (g/kg · d)	0 周 0 week	1 周 1 week	2 周 2 week	3 周 3 week	4 周 4 week
正常组 Control group	6	0	199.70 $\pm$ 18.68	203.10 $\pm$ 19.27	208.90 $\pm$ 18.14	211.40 $\pm$ 16.59	215.20 $\pm$ 18.39
模型组 Model group	6	0	181.86 $\pm$ 9.34 ^b	175.86 $\pm$ 10.33 ^b	168.71 $\pm$ 12.67 ^b	166.86 $\pm$ 7.17 ^b	164.60 $\pm$ 17.98 ^b
骆驼奶- 低剂量组 CM-L group	6	3.5	182.88 $\pm$ 12.82 ^b	177.00 $\pm$ 12.12 ^b	175.57 $\pm$ 17.46 ^b	174.57 $\pm$ 14.09 ^b	172.67 $\pm$ 18.79 ^b
骆驼奶- 高剂量组 CM-H group	6	10	182.13 $\pm$ 16.44 ^b	178.88 $\pm$ 15.68 ^b	176.75 $\pm$ 15.17 ^b	175.63 $\pm$ 14.11 ^b	176.00 $\pm$ 13.85 ^b

注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 与正常组比较。

Note: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs control group.

表 2 骆驼奶对空腹血糖的影响 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effects of camel milk on fasting glucose level (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	只数 <i>n</i>	剂量 (g/kg · d) Dose (g/kg · d)	空腹血糖 (mmol/L) FBG (mmol/L)				
			0 周 0 week	1 周 1 week	2 周 2 week	3 周 3 week	4 周 4 week
正常组 Control group	6	0	5.51 ± 0.59	6.21 ± 0.86	6.23 ± 1.12	6.30 ± 0.89	6.37 ± 0.98
模型组 Model group	6	0	19.76 ± 5.43 ^b	20.79 ± 4.45 ^b	23.64 ± 3.74 ^b	24.39 ± 6.51 ^b	25.30 ± 5.19 ^b
骆驼奶- 低剂量组 CM-L group	6	3.5	19.23 ± 4.91 ^b	20.41 ± 4.68 ^b	22.82 ± 5.06 ^b	22.09 ± 4.00 ^b	21.29 ± 5.90 ^b
骆驼奶- 高剂量组 CM-H group	6	10	18.33 ± 5.50 ^b	19.49 ± 5.02 ^b	18.66 ± 6.49 ^b	18.31 ± 6.40 ^b	18.45 ± 6.01 ^{bc}

注: ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 与正常组比较; ^c*P* < 0.05 与模型组比较。
Note: ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs control group; ^c*P* < 0.05 vs model group.

表 3 骆驼奶对糖耐量的影响 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effects of camel milk on glucose tolerance (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	只数 <i>n</i>	剂量 (g/kg · d) Dose (g/kg · d)	0 min 0 min	30 min 30 min	60 min 60 min	120 min 120 min
正常组 Control group	6	0	5.08 ± 0.36	13.82 ± 0.58	8.91 ± 0.96	7.27 ± 0.88
模型组 Model group	6	0	22.08 ± 2.24 ^b	29.57 ± 2.51 ^b	28.22 ± 4.82 ^b	24.21 ± 2.97 ^b
骆驼奶- 低剂量组 CM-L group	6	3.5	22.28 ± 0.73 ^b	27.00 ± 2.76 ^b	25.67 ± 5.19 ^b	22.78 ± 3.63 ^b
骆驼奶- 高剂量组 CM-H group	6	10	19.93 ± 1.06 ^b	26.43 ± 1.52 ^{bc}	24.50 ± 4.01 ^b	20.42 ± 3.53 ^b

注: ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 与正常组比较; ^c*P* < 0.05 与模型组比较。
Note: ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs control group; ^c*P* < 0.05 vs model group.

表 4 骆驼奶对血脂的影响 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Effects of camel milk on blood lipid (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	只数 <i>n</i>	剂量 (g/kg · d) Dose (g/kg · d)	总胆固醇 TC	甘油三酯 TG	高密度脂蛋白-胆固醇 HDL-C	低密度脂蛋白-胆固醇 LDL-C
正常组 Control group	6	0	1.74 ± 0.18	2.49 ± 1.01	2.16 ± 0.58	0.36 ± 0.15
模型组 Model group	6	0	4.68 ± 1.43 ^b	10.19 ± 3.27 ^b	1.71 ± 0.32	1.23 ± 0.45 ^b
骆驼奶- 低剂量组 CM-L group	6	3.5	4.26 ± 1.58 ^b	9.56 ± 3.66 ^b	1.82 ± 0.34	1.07 ± 0.39 ^b
骆驼奶- 高剂量组 CM-H group	6	10	4.02 ± 1.12 ^b	7.11 ± 2.97 ^{bc}	1.76 ± 0.37	0.75 ± 0.33 ^{bc}

注: ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 与正常组比较; ^c*P* < 0.05 与模型组比较。
Note: ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs control group; ^c*P* < 0.05 vs model group.

2.4 骆驼奶对糖尿病大鼠血脂水平的影响

表 4 结果可见:与正常组相比,模型组大鼠 TC、TG、LDL-C 含量显著增高 (*P* < 0.01), HDL-C 含量下降。CM-H 组可显著降低 TG、LDL-C 含量 (*P* < 0.05)。

2.5 骆驼奶对糖尿病大鼠胰岛素水平的影响

图 1 结果显示:与正常对照组相比,模型组胰岛素水平升高,CM 可降低糖尿病大鼠的胰岛素水平,但无显著统计学差异 (*P* > 0.05)。

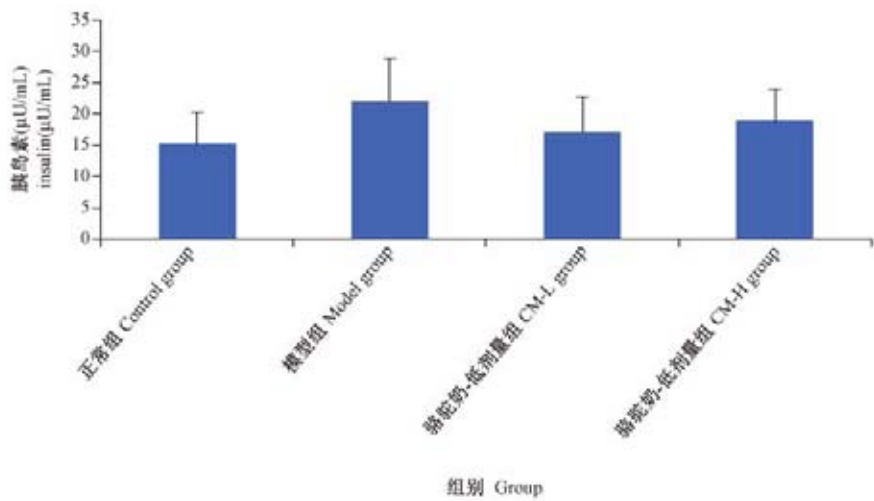


图 1 骆驼奶对胰岛素水平的影响 (μIU/mL, $\bar{x} \pm s$)

Fig. 1 Effects of camel milk on insulin levels (μIU/mL, $\bar{x} \pm s$)

表 5 骆驼奶对 PPARγ mRNA 和 TNF-α mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Effects of camel milk on expression of PPARγ mRNA and TNF-α mRNA in type 2 diabetes rats ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	只数 n	剂量 (g/kg · d) Dose (g/kg · d)	PPARγ mRNA	TNF-α mRNA
正常组 Control group	6	0	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
模型组 Model group	6	0	0.821 ± 0.158 ^a	1.893 ± 0.661 ^b
骆驼奶- 低剂量组 CM-L group	6	3.5	0.909 ± 0.192	1.675 ± 0.362 ^b
骆驼奶- 高剂量组 CM-H group	6	10	1.083 ± 0.137 ^c	1.618 ± 0.489 ^b

注:^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 与正常组比较; ^c $P < 0.05$ 与模型组比较。
Note: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs control group; ^c $P < 0.05$ vs model group.

2.6 RT-PCR 检测脂肪组织 PPAR-γmRNA 和肝脏组织 TNF-αmRNA 表达

由表 5 可见,与正常对照组相比较,糖尿病大鼠 PPARγ mRNA 显著下调 ($P < 0.05$),TNF-α mRNA 均显著上调 ($P < 0.01$)。CM-H 显著升高糖尿病大鼠的 PPARγ mRNA ($P < 0.05$),同时降低糖尿病大鼠的 TNF-α mRNA 表达量,但无统计学差异。

3 讨论

2 型糖尿病常伴随胰岛素抵抗的发生,胰岛素敏感性降低,导致胰岛素相对缺乏,机体内分泌代谢严重紊乱,导致体重的明显下降。脂肪正常代谢途径受阻,脂代谢紊乱。而机体内脂蛋白脂酶活力减弱,以及某些代谢关键基因的变化,导致游离 TC、TG、LDL-C 浓度增高,HDL-C 浓度减低,肝脏对游离脂肪酸的摄取超过肝细胞处置的能力,导致甘油三

酯的堆积^[5-8]。本实验结果证实,糖尿病大鼠血糖水平升高,糖耐量受损,TG、TC、LDL-C 水平升高,HDL-C 水平降低,胰岛素水平升高。这与相关研究报道一致^[8-9]。

研究认为,食物蛋白通过增强饱腹感帮助机体降低脂肪量,间接改善机体代谢健康,同时乳制品蛋白质派生的支链氨基酸 (BCAAs) 的合成代谢促进骨骼肌生长和功能发挥,而 BCAAs 又可促进肌肉蛋白合成,以及骨骼肌代谢的功能^[10]。研究发现,骆驼奶中的胰岛素含量较高,1 mL 骆驼乳中含有的胰岛素是等量牛奶的 3.25 倍^[1]。骆驼奶中还含有一种富含半胱氨酸的蛋白质,其氨基酸序列与胰岛素蛋白家族极其相似,这种蛋白质就是不被胃酸分解破坏的降糖活性物质—胰岛素/类胰岛素蛋白^[2],因此这种成分被认为是治疗糖尿病的功效因子之一。

本实验证实,CM 可有效改善 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢,缓解糖尿病大鼠体重的明显下降,使体重状况与正常组接近,不同程度的改善糖尿病大鼠的高血糖、高胰岛素和糖耐量异常状态,降低 TC、TG、LDL-C 含量,升高 HDL-C 水平。

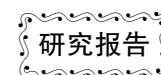
PPAR γ 在糖脂代谢中发挥着重要的作用。本研究发现糖尿病大鼠的 PPAR γ 表达在 mRNA 水平上明显低于正常大鼠。作为成脂过程的转录因子,糖尿病大鼠胰岛素效应组织 PPAR γ 的表达降低,可通过影响前脂细胞分化和成熟脂细胞功能参与胰岛素抵抗的形成^[11],而 CM 可通过升高 PPAR γ mRNA 表达量增加胰岛素敏感性。TNF- α 是一种主要由炎性细胞分泌的细胞因子,与细胞凋亡和免疫有关。近年来,TNF- α 在 IR 相关疾病中的作用越来越受到重视^[12]。有研究报道表明,TNF- α 可加速脂肪细胞的脂解,促使游离脂肪酸(FFA)从细胞溢出,参与肥胖及胰岛素抵抗的发生^[12]。本实验研究发现,糖尿病 TNF- α mRNA 均显著上调,说明其肝脏胰岛素抵抗和炎症损伤的程度较高。CM 具有降低 TNF- α mRNA 表达的趋势,提示 CM 可通过调节 TNF- α mRNA 表达作用改善糖脂代谢紊乱。

综上所述,CM 可改善糖尿病大鼠的糖脂代谢异常状态,其机制可能与调节糖脂代谢相关基因 PPAR γ ,TNF- α 的改变有关。

参考文献:

- [1] Zagorski O, Maman A, Yaffe A, *et al.* Insulin in milk a comparative study[J]. International Journal of Animal Science, 1998, 13(3): 241–244.
- [2] Beg OU, von Bahr-Lindström H, Zaidi ZH, *et al.* Characterization of a camel milk protein rich in proline identifies a new beta-casein fragment[J]. Regul Pept. 1986, 15(1):55–61.
- [3] 王瑞,周克夫,崔若辰,等. 骆驼奶防治糖尿病研究进展及应用前景[J].《新疆师范大学学报》(自然科学版),2014,33(4):17–20.
- [4] Agrawal RP, Swami S C, Beniwal R, *et al.* Effect of camel milk on glycemic control, lipid profile and diabetes quality of life in type 1 diabetes: A randomised prospective controlled cross over study[J]. Indian Journal of Animal Science, 2003, 73(10): 1105–1110.
- [5] Leite SA, Anderson RL, Kendall DM, *et al.* A1C predicts type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in a population at risk: the community diabetes prevention project [J]. Diabetol Metab Syndr. 2009, 1(1):5–9.
- [6] Chakravarthy MV, Semenkovich CF. The ABCs of beta-cell dysfunction in type 2 diabetes[J]. Nat Med. 2007, 13(3):241–242.
- [7] Klein S. Abdominal adiposity: An emerging marker. Introduction [J]. Clin Cornerstone. 2008, 9(1):8–10.
- [8] 周珺. 2 型糖尿病患者 HPA 轴功能的临床研究及药物治疗新途径的实验性探索[D]. 兰州大学,2011.
- [9] Taylor AI, Frizzell N, McKillop AM, *et al.* Effect of RU486 on hepatic and adipocyte gene expression improves diabetes control in obesity-type 2 diabetes [J]. Horm Metab Res. 2009, 41(12):899–904.
- [10] McGregor RA, Poppitt SD. Milk protein for improved metabolic health: a review of the evidence [J]. Nutr Metab (Lond). 2013, 10(1):46.
- [11] Janani C, Ranjitha Kumari BD. PPAR gamma gene—a review [J]. Diabetes Metab Syndr. 2015, 9(1):46–50.
- [12] Michaud M, Balardy L, Moulis G, *et al.* Proinflammatory Cytokines, Aging, and Age-Related Diseases[J]. J Am Med Dir Assoc. 2013, 14(12):877–82.

[修回日期]2016-02-23



杨梅苷对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用

陈亚萍¹, 张彬², 刘桂艳¹, 林文彬³, 王敏², 孙桂波², 孙晓波²

(1. 北京理工大学生命学院, 北京 100081; 2. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;
3. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心, 哈尔滨 150076)

【摘要】 目的 研究杨梅苷对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。**方法** 60只SD大鼠随机分为6组: 正常对照组、模型组、阳性给药组(维拉帕米 100 $\mu\text{g/L}$)和杨梅苷低中高剂量组(2.5, 5, 10 mg/L), 每组10只。采用Langendorff离体心脏灌流技术, 停灌30 min, 再灌45 min, 造成心肌缺血再灌注损伤模型。记录杨梅苷对心脏血流动力学指标的影响, 测定冠脉流出液中心肌三酶LDH、CK、AST的水平, 心肌组织中抗氧化酶SOD、CAT的活性及脂质过氧化物MDA的含量。HE染色观察心肌组织病理学变化。Western blot检测凋亡相关蛋白的表达。**结果** 杨梅苷低中高剂量组大鼠心脏血流动力学指标显著改善, 冠脉流出液中LDH、CK、AST的释放减少, 心肌组织中SOD、CAT的活性增加且MDA的产生减少, 不同程度地减轻缺血再灌注造成的心肌损伤。Western blot结果表明杨梅苷能上调Bcl-2的表达, 下调Bax和Caspase-3、Caspase-9的表达, 同时抑制ERK的磷酸化。**结论** 杨梅苷对心肌缺血再灌注损伤具有保护作用, 可以改善心肌收缩功能、增强抗氧化能力、抑制细胞凋亡等, 其机制可能是通过抑制ERK信号转导通路缓解缺血再灌注引起的心肌细胞凋亡。

【关键词】 杨梅苷; 心肌缺血再灌注; 心脏血流动力学; 心肌三酶; 细胞凋亡

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 05-0031-09

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.005.005

Protective effects of myricitrin on ischemic/reperfusion injury in isolated rat hearts

CHEN Ya-ping¹, ZHANG Bin², LIU Gui-yan¹, LIN Wen-bin³, WANG Min², SUN Gui-bo², SUN Xiao-bo²

(1. School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China;

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences,

Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 3. Center of Research and Development on

Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of myricitrin on myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts and its underlying mechanism. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into: (1) control group; (2) model group; (3) positive administration group (verapamil of 100 $\mu\text{g/L}$); (4) three dose groups with varying amount of myricitrin (2.5, 5, 10 mg/L). Each group included ten rats. The myocardial ischemia/reperfusion injury model was constructed using the Langendorff method. The isolated working hearts were ischemia for 30 min followed by reperfusion for 45 min after in equilibrium for 15 min. During the process, we determined myocardial hemodynamic parameters,

【基金项目】 国家科技部“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2012ZX09501001-004);

【作者简介】 陈亚萍(1992-), 女, 硕士, 研究方向: 心血管药理学。

【通讯作者】 孙晓波(1958-), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药及复方药效物质基础及分子机制, E-mail: sun-xiaobo@163.com; 孙桂波(1973-), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药及复方药效物质基础及分子机制, E-mail: sunguibo@126.com。

myocardial enzyme indicators (lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK) and aspartate aminotransferase (AST)) and antioxidative parameters (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA)). Furthermore, we performed histopathological examination of left ventricles and detected the expression of apoptosis related proteins (e.g., Bcl-2, Bax, Caspase-3 and Caspase-9) by western blot. **Results** Compared with the model group, myricitrin could significantly improve cardiac constriction and relaxation function, decrease the levels of LDH, CK and AST in perfusate, enhance the activities of SOD and CAT, and decrease the content of MDA in myocardial tissue. The cardiac protective effect of myricitrin was further confirmed by histopathological examination. Apparently, myricitrin pretreatment restrained myocardial apoptosis as evidenced by increasing the level of Bcl-2 expression, decreasing the levels of Bax, Caspase-3 and Caspase-9 expression, and inhibiting the phosphorylation of ERK. **Conclusions** Myricitrin had a protective effect on myocardial ischemia/reperfusion injury. It showed ability of improving myocardial contractile function, increasing anti-oxidation ability and inhibiting apoptosis. The possible mechanism of cardiac protection of myricitrin was that the agent attenuated myocardial cell apoptosis induced by ischemia reperfusion via inhibiting ERK signaling pathway.

【Key words】 Myricitrin; Myocardial ischemia/reperfusion; Cardiac hemodynamics; Myocardial enzymes; Cell apoptosis

缺血性心脏病 (ischemic heart diseases, IHDs) 是临床上最常见的心血管疾病,其发病率和死亡率正逐年上升。传统治疗方法一般采用药物溶栓、冠状动脉搭桥术、经皮腔内冠脉血管成形术等手段恢复心肌血液灌注^[1]。但缺血期处于可逆损伤的心肌细胞恢复血液供应后损伤反而加重,并转化为不可逆性,这种损伤被称为缺血再灌注损伤 (ischemia/reperfusion, I/R)^[2]。I/R 损伤造成了心脏血流动力学改变、心肌酶释放和心肌组织超微结构病变等影响,是导致心肌损害的重要因素。研究表明细胞内钙超载、线粒体功能紊乱、氧化应激、炎症反应、细胞凋亡、自噬等诸多因素均可能为缺血再灌注损伤的发生机制^[3-4]。

杨梅苷 (五羟基黄酮-3-鼠李糖, myricitrin) 为天然多酚羟基黄酮苷类化合物,大量存在于杨梅的果实、树皮、树叶及其他多种天然植物中。文献报道杨梅苷具有抗氧化、清除氧自由基、扩张血管、抗炎镇痛、抑菌等多种功效,可改善氧化应激诱导的各种疾病如局部缺血和老年痴呆等^[5-7]。本课题组研究表明杨梅苷对血管内皮细胞的氧化应激损伤具有保护作用,并对其作用机制做了初步研究^[8-9]。但是,杨梅苷对心肌缺血再灌注损伤是否具有保护作用目前尚不清楚。

本研究采用 Langendorff 离体心脏灌流技术,建立大鼠离体心脏缺血再灌注损伤模型,观察杨梅苷对缺血再灌注损伤心脏的血流动力学、心肌三酶、抗氧化酶等相关指标的影响,HE 染色观察心肌组织病理学变化,Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达,探讨杨梅苷对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制,为开发新的有效的治疗缺血性心脏病的

药物提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠,体重 200 ~ 220 g,购于北京维通利华实验动物公司【SCXK (京) 2012 - 0001】。动物分笼饲养于中国医学科学院药用植物研究所 SPF 级动物房内【SYXK (京) 2013 - 0023】(温度 22 ~ 25℃,湿度 50% ~ 70%,昼夜 12 h 交替),自由饮水及摄食。

1.2 主要试剂和仪器

杨梅苷为淡黄色粉末,能溶于水,纯度 98%,由中国医学科学院药用植物研究所化学室提供;盐酸维拉帕米注射液购于上海禾丰制药有限公司;肌酸激酶 (CK) 试剂盒、乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒、过氧化氢酶 (CAT) 试剂盒、丙二醛 (MDA) 试剂盒购于南京建成生物工程研究所;一抗 β -actin、Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9 和 ERK、p-ERK 均购于美国 Santa Cruz 公司;NaCl、KCl、CaCl₂、KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O、NaHCO₃、Glucose、EDTA-Na、浓 HCl 等均由北京化学试剂公司提供。其他试剂均为分析纯。

K-H 液配制:用电子天平精密称取 NaCl 20.67 g, NaHCO₃ 6.27 g, KCl 1.05 g, KH₂PO₄ 0.48 g, Glucose 5.99 g, MgSO₄·7H₂O 0.87 g, CaCl₂ 0.85 g 充分溶解于 1 L 蒸馏水,用酸度计调节 pH = 7.40,通过真空抽滤除去杂质。

美国 Radnoti 离体灌流系统;成都泰盟 BL-420/820 四道生理记录仪;天津奥特赛恩斯 AP-01P 型真

空泵;梅特勒 pH 计;DY89-II 型电动玻璃匀浆机;MQX200 型酶标仪;TGL-16 高速台式冷冻离心机;PYY-7C 型电泳仪;Chemi DOCTM 型凝胶成像系统。

1.3 分组与给药

雄性 SD 大鼠 60 只,随机分为 6 组:正常对照组 (Control)、模型组 (Model)、阳性给药组 (Verapamil 100 $\mu\text{g/L}$) 和杨梅苷低中高剂量组 (Myricitrin 2.5, 5, 10 mg/L), 每组 10 只。

1.4 Langendorff 离体心脏灌流技术检测血流动力学^[10-11]

将 SD 大鼠用 20% 乌拉坦腹腔麻醉后,舌下静脉给予肝素 (25 mg/kg)。迅速开胸,切断主动脉,取出心脏置于 K-H 营养液的玻璃器皿中,使心脏迅速停搏。分离主动脉,经主动脉逆行插管并结扎固定于灌流装置中的心脏套管上,采用 Langendorff 法逆灌含氧 K-H 液,切开左心耳,将带有测压导管的球囊插入左心室,测压导管另一端连接多道生理记录仪,向球囊内缓缓注入适量蒸馏水。全过程采用 K-H 液灌注,并连续通入体积分数 95% O_2 和 5% CO_2 的混合气体,灌流液温度维持在 37 $^{\circ}\text{C}$,灌流液流速恒定为 7 mL/min 。

正常对照组:待心脏功能处于稳定状态 15 min 后,恒定流速灌流 90 min。模型组:待心脏功能处于稳定状态 15 min 后,恒定流速继续灌流 15 min,然后停灌 30 min,再灌 45 min。阳性给药组:待心脏功能处于稳定状态 15 min 后,改用 100 $\mu\text{g/L}$ 盐酸维拉帕米注射液恒定流速继续灌流 15 min,然后停灌 30 min,再灌 45 min。杨梅苷低中高剂量组:待心脏功能处于稳定状态 15 min 后,恒定流速改用低中高 (2.5, 5, 10 mg/L) 浓度的杨梅苷继续灌流 15 min,然后停灌 30 min,再灌 45 min。分别记录各组血流动力学参数,即左室发展压 (left ventricular develop pressure, LVDP)、左室内压最大上升速率 (maximal positive velocity of left ventricular pressure, $+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$)、左室内压最大下降速率 (maximal negative velocity of left ventricular pressure, $-\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$)、心率 (heart rate, HR)。

1.5 测定冠脉流出液中 LDH、CK 及 AST 的活性

收集再灌注 45 min 时的灌流液冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 待测。按试剂盒说明书操作,测定灌流液中 LDH、CK 及 AST 的活性。

1.6 测定心肌组织匀浆中 LDH、CK、AST 的活性, SOD、CAT 的活性,MDA 的含量

取出心脏,冰水浴研磨,制备 10% 心肌组织匀浆。按试剂盒说明书操作,测定心肌组织匀浆中 LDH、CK、AST 的活性, SOD、CAT 的活性,MDA 的含量。

1.7 HE 染色观察心肌组织病理情况

灌注完毕,将心脏迅速放入 4% 多聚甲醛中固定,经脱水,浸蜡包埋,切片与贴片,脱蜡染色,脱水透明,封固,观察心肌组织病理情况。

1.8 Western blot 检测凋亡相关蛋白表达

灌注完毕,低温下将心脏组织剪碎,加入 RIPA 蛋白裂解液 (含蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂),快速匀浆、裂解、离心,提取总蛋白。采用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度,加入 loading buffer 煮沸 5 min,使蛋白充分变性。取等量样本上样于 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。电泳完毕后,将蛋白质转移至 NC 膜上,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 3 h。分别加入相应一抗 (β -actin、Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9、ERK、p-ERK), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日,用 TBST 洗涤 3 次,加入 HRP 标记的二抗,室温孵育 2 h。再用 TBST 洗涤 3 次,加入增强型 ECL 显色液避光孵育 5 min,用凝胶成像系统进行显影拍照。实验结果重复三次,用 Gel-Pro 灰度分析软件计算各组蛋白条带灰度值,以 β -actin 为内参蛋白,各组蛋白水平以对照的百分比表示。

1.9 统计方法

用 SPSS 19.0 软件,各组实验数据均采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组内比较采用 t 检验法,各组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

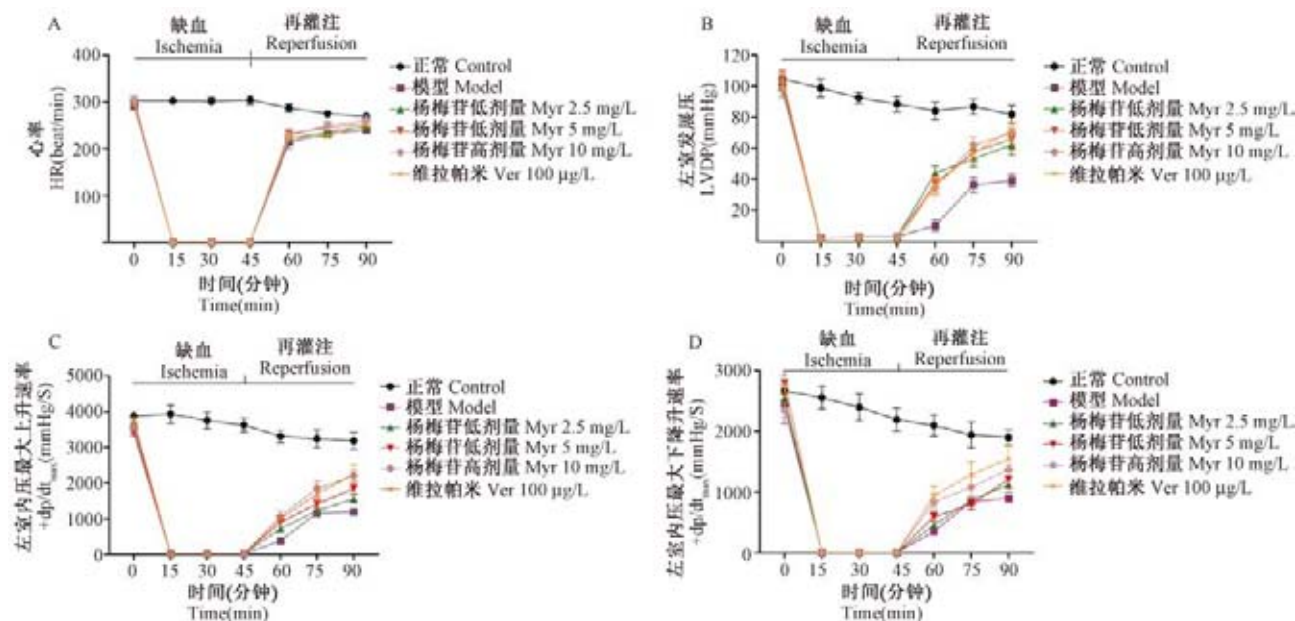
2 结果

2.1 杨梅苷对大鼠离体工作心脏血流动力学指标的影响

平衡时,各组间的血流动力学指标均无显著性差异。停灌 30 min,再灌 45 min 后,与正常对照组比较,模型组 HR、LVDP、 $\pm \text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 均明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较,阳性给药组和杨梅苷给药组 HR、LVDP、 $\pm \text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 均明显改善。且杨梅苷低中高剂量组对血流动力学指标的影响呈现出一定的剂量依赖关系,高剂量效果最好 (图 1)。

2.2 杨梅苷对大鼠离体工作心脏组织匀浆和冠脉流出液中 LDH、CK 及 AST 活性的影响

与正常对照组比较,模型组心肌组织匀浆中



注:A. 心率 HR; B. 左室发展压 LVDP; C. 左室内压最大上升速率 $+dp/dt_{\max}$; D. 左室内压最大下降速率 $-dp/dt_{\max}$ 。

图1 杨梅苷对大鼠离体工作心脏血流动力学指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Note: A. heart rate (HR); B. left ventricular develop pressure (LVDP); C. maximal positive velocity of left ventricular pressure ($+dp/dt_{\max}$); D. maximal negative velocity of left ventricular pressure ($-dp/dt_{\max}$).

Fig.1 Effect of myricitrin on myocardial hemodynamic parameters in isolated rat hearts ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

LDH、CK 及 AST 活性明显降低 ($P < 0.01$), 灌流液中 LDH、CK 及 AST 活性明显升高 ($P < 0.01$), 说明缺血再灌注引起心肌组织受损, 心肌三酶漏出量增加。与模型组相比, 杨梅苷给药组心肌组织匀浆内 LDH、CK 及 AST 活性增高 ($P < 0.05$), 而灌流液中 LDH、CK 及 AST 活性明显降低 ($P < 0.05$), 并呈一定量效关系, 提示杨梅苷可能通过增强心肌细胞膜稳定性, 减少心肌三酶的漏出量, 发挥心肌保护作用 (图 2)。

2.3 杨梅苷对大鼠离体工作心脏组织匀浆 SOD、CAT 活力及 MDA 含量的影响

与正常对照组比较, 模型组大鼠心肌组织中 SOD、CAT 活性明显降低 ($P < 0.05$), 而 MDA 含量明显增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 杨梅苷给药组大鼠心肌组织中 SOD、CAT 活性明显升高, 而 MDA 含量明显减少, 并呈一定量效关系, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.4 杨梅苷对大鼠离体工作心脏组织病理学变化的影响

心肌缺血再灌注过程中会涉及到心肌细胞的水肿、组织坏死等病理学变化。我们通过心脏病理切片检测心脏的病理学变化情况。本实验结果显示, 正常对照组无明显病理学变化; 模型组大部分

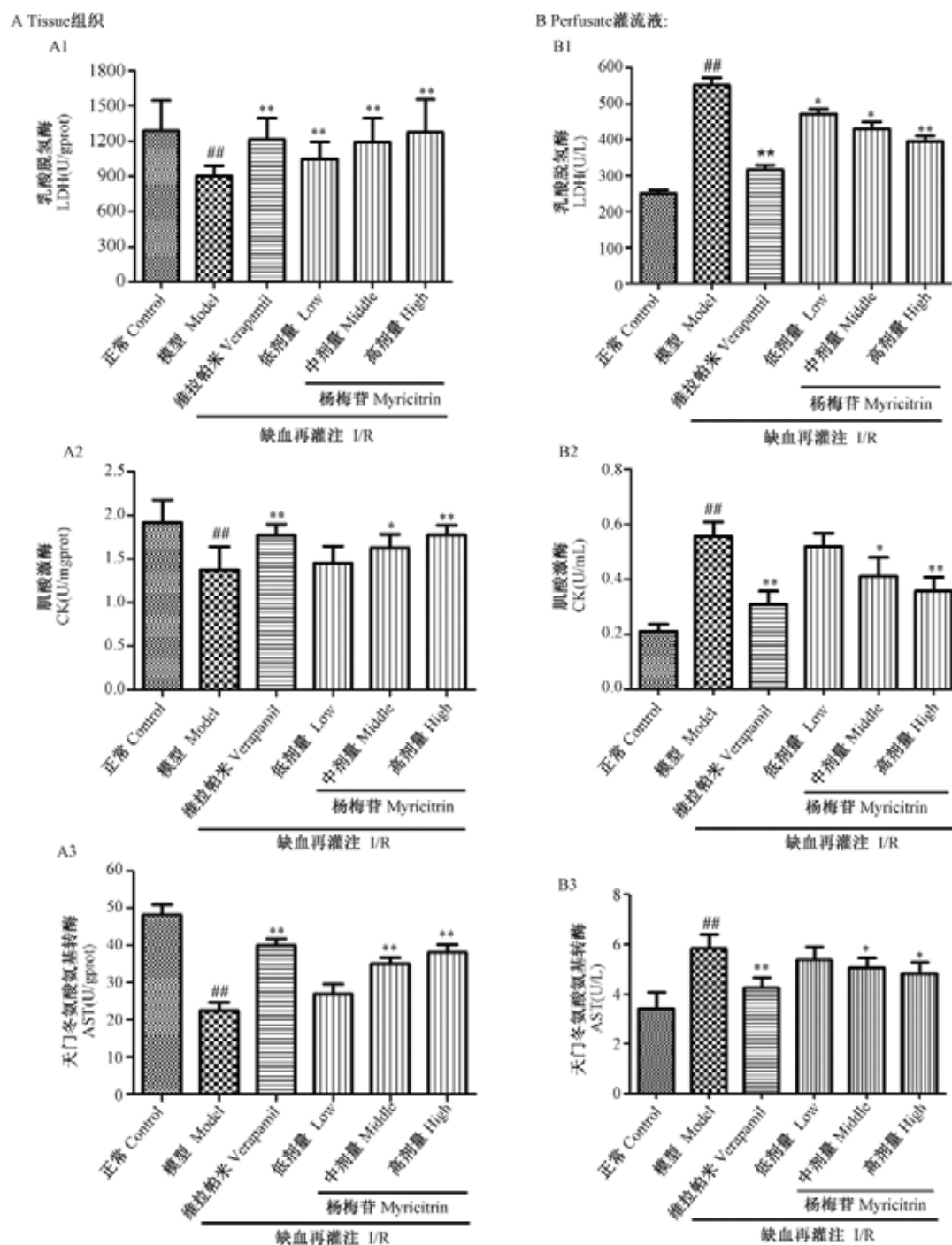
心肌呈灶性坏死, 纤维组织肿胀、断裂; 杨梅苷低中高剂量组对心肌损伤有不同程度的改善, 心肌纤维断裂和坏死区域减少, 剂量依赖性的减轻心肌组织病变程度 (图 4)。

2.5 杨梅苷对大鼠离体工作心脏凋亡相关蛋白表达的影响

与正常对照组相比, 模型组心肌组织中凋亡蛋白 Caspase-3、Caspase-9 及促凋亡蛋白 Bax 显著增加, 而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 杨梅苷高剂量组能够显著抑制凋亡蛋白的表达, 促进抗蛋白 Bcl-2 表达 ($P < 0.05$, 图 5 C)。此外, 模型组 p-ERK 的表达较正常组显著增加, 杨梅苷预给药可以抑制 ERK 的磷酸化 ($P < 0.05$, 图 5 E)。

3 讨论

缺血心肌恢复血液灌流, 常导致缺血心肌损伤加重, 出现再灌注损伤。心肌收缩和舒张功能下降是 I/R 损伤的主要表现。HR、LVDP、 $\pm dp/dt_{\max}$ 是衡量心肌舒缩功能的常用指标。其中, LVDP 反映等容收缩期左室内压变化, 体现心肌顺应性; $+dp/dt_{\max}$ 可间接反映心肌收缩的缩短程度, 是评价心肌收缩性能的敏感指标; $-dp/dt_{\max}$ 是用于反映心脏舒



注:A. 心肌组织中心肌酶水平(A1. LDH(U/gprot);A2. CK(U/mgprot);A3. AST(U/gprot));B. 冠脉流出液中心肌酶水平(A1. LDH(U/L);B2. CK(U/mL);B3. AST(U/L))。与正常组相比,^{##} $P < 0.01$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

图2 杨梅苷对大鼠离体工作心脏组织匀浆和冠脉流出液中心肌酶水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Note: A. The levels of cardiac enzymes in myocardial tissue (A1. LDH (U/gprot); A2. CK (U/mgprot);

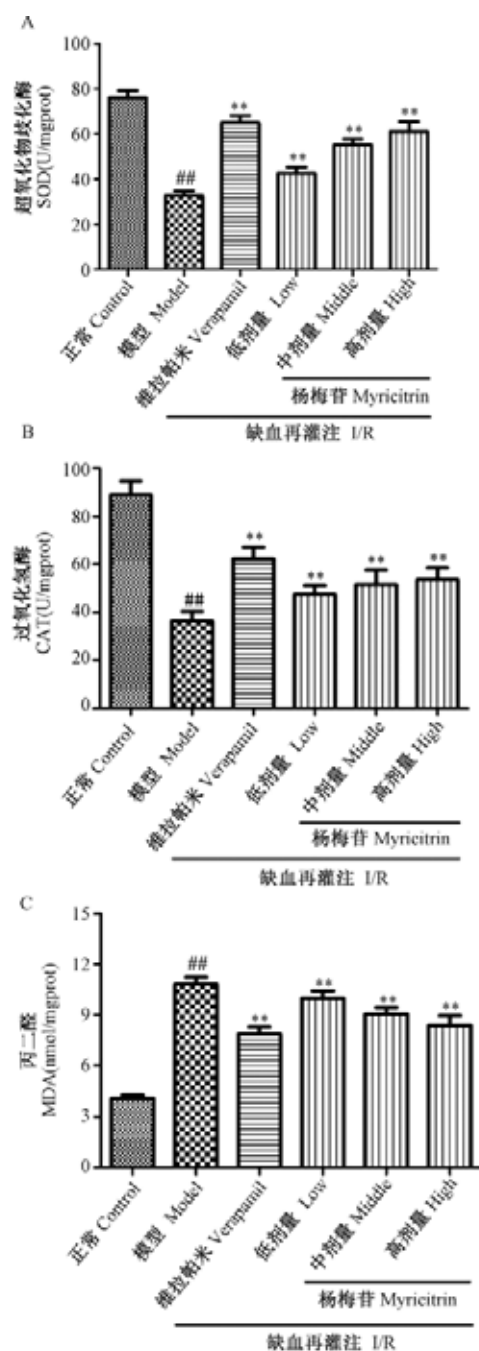
A3. AST (U/gprot)). B. The levels of cardiac enzymes release in perfusate (B1. LDH (U/L); B2. CK (U/mL);

B3. AST (U/L)). ^{##} $P < 0.01$, vs. the control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, vs. the model group.

Fig.2 Effect of myricitrin on the levels of cardiac enzymes in myocardial tissue and perfusate after I/R ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

张功能的敏感指标。本研究采用 Langendorff 离体心脏灌注技术,模拟心肌缺血再灌注损伤模型,测定 HR、LVDP、 $\pm dp/dt_{\max}$ 等血流动力学指标。实验

结果表明,模型组心脏的 HR、LVDP、 $\pm dp/dt_{\max}$ 均明显降低,提示缺血再灌注后心脏功能受损。相对于模型组,杨梅苷低中高剂量组在再灌注期左室



注: A. SOD (U/mgprot); B. CAT (U/mgprot); C. MDA (nmol/mgprot)。与正常组相比, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组相比, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

图 3 杨梅苷对大鼠离体工作心脏 SOD、CAT 活力及 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
 Note: A. SOD (U/mgprot); B. CAT (U/mgprot); C. MDA (nmol/mgprot). ^{##} $P < 0.01$, vs. the control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, vs. the model group.

Fig. 3 Effect of myricitrin on the activities of SOD, CAT and the content of MDA in myocardial tissue after

I/R ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

HR、LVDP、 $\pm dp/dt_{\max}$ 显著升高,表明杨梅苷预处理

可改善缺血再灌注心脏收缩及舒张功能,其中高剂量作用最明显。

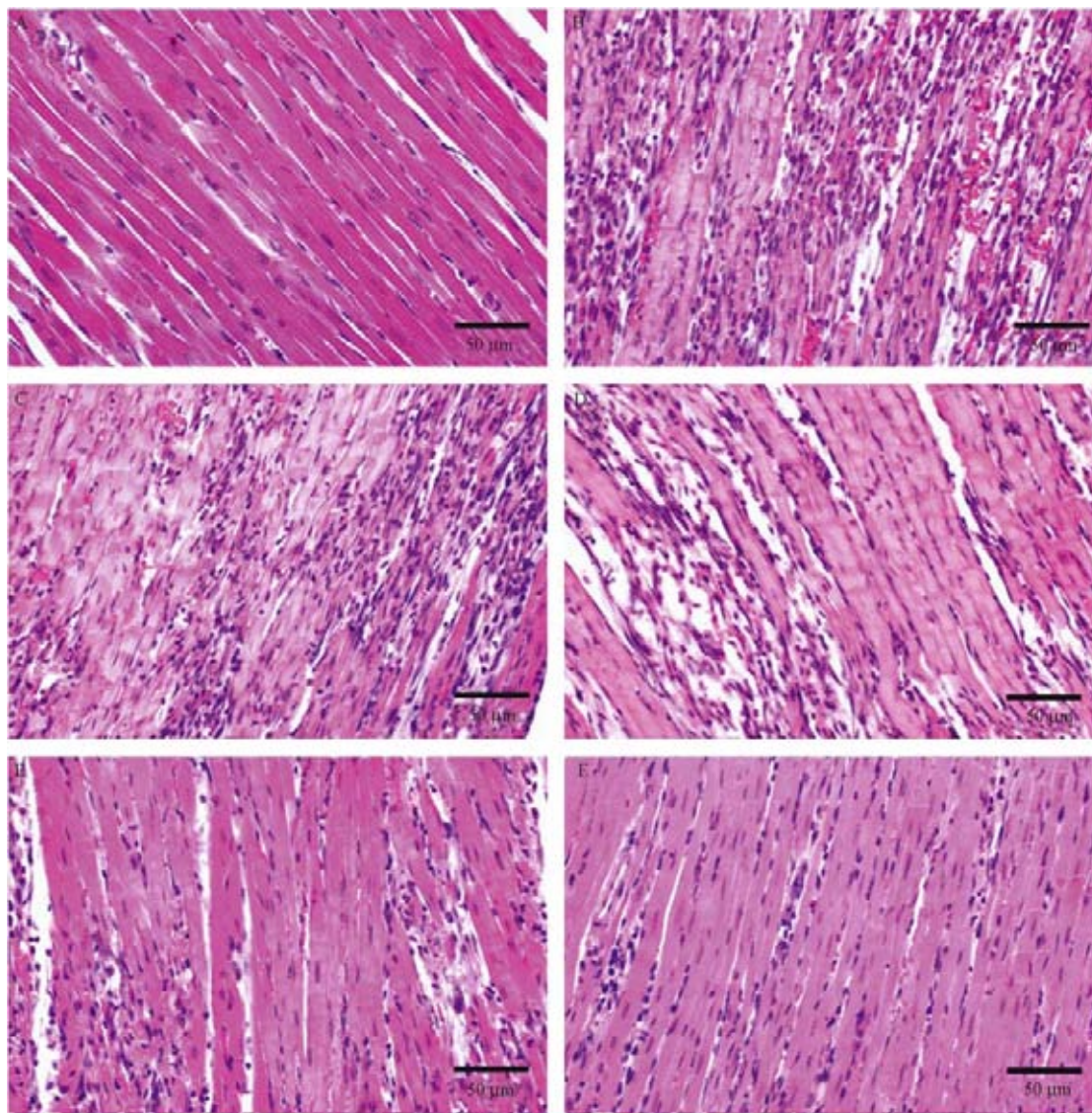
MDA 是脂质过氧化反应产生的活性物质,具有生物毒性;SOD、CAT 是能够清除自由基的酶,维持机体内氧化和抗氧化的动态平衡。因此,心肌组织中 MDA、SOD、CAT 水平可间接反应心肌损伤的程度和清除自由基的能力^[12]。心肌细胞内含有大量的心肌三酶 CK、LDH 和 AST,正常情况下,心肌三酶存在于细胞内,但当心肌受损时,心肌细胞膜被破坏,其通透性改变,心肌三酶和自由基释放到血液中,通过脂质过氧化反应对心肌造成进一步的损害^[13],因此心肌三酶含量也可以反映心肌组织受损情况。为进一步研究杨梅苷对心肌缺血再灌注损伤的保护作用,我们测定了心肌组织中心肌三酶和抗氧化酶的活力,实验结果表明,与模型组相比,杨梅苷能减少 LDH、CK 及 AST 的外漏,提高 SOD、CAT 的活性,降低 MDA 的含量。由此可见,杨梅苷可以保护心肌细胞,提高细胞膜的稳定性,增强细胞的抗氧化应激能力。HE 染色后发现 I/R 模型组心肌损伤严重,杨梅苷可改善 I/R 的心肌损伤,减少心肌纤维断裂和坏死区域。上述结果证明杨梅苷对 I/R 诱导的心肌损伤具有显著的保护作用。

1994 年 Gottlieb 等^[14] 利用家兔离体心脏灌注模型发现再灌注损伤促进了细胞凋亡。此后,许多研究证实,心肌缺血再灌注损伤能够引起心肌细胞凋亡^[15]。凋亡是细胞在基因调控下的程序性死亡。凋亡信号通路主要包括外源性途径(死亡受体凋亡途径)和内源性途径(线粒体凋亡途径)。在生理条件下,心肌细胞有序而协调地激活凋亡诱导基因(Bax、Fas 和 p53 等)和凋亡抑制基因(Bcl-2 等),共同调控细胞代谢而维持细胞内环境的稳定,但在缺血再灌注过程中,凋亡相关基因及其表达产物发生了变化,从而导致心肌细胞凋亡的发生^[16-17]。本研究结果表明,杨梅苷可显著抑制促凋亡蛋白 Bax 的表达,下调 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达,并促进抗蛋白 Bcl-2 表达。提示杨梅苷可调节抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 之间平衡,抑制 Caspase 家族蛋白的激活,从而发挥抗凋亡作用。同时杨梅苷可以降低 ERK1/2 的磷酸化水平,提示杨梅苷可能通过抑制 ERK 信号转导通路来缓解缺血再灌注引起的心肌细胞凋亡。

综上所述,杨梅苷对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤具有一定的保护作用,其保护作用可能与杨梅

苷的清除氧自由基、增强抗氧化酶活性、抑制细胞凋亡等作用有关,进一步的作用机制可能是通过抑制 ERK 信号转导通路缓解缺血再灌注引起的心肌细胞凋亡。由于心肌缺血再灌注过程中细胞凋亡

的发生是多因素和多途径的^[18],所以阻断细胞凋亡级联反应中的关键环节和抑制参与多信号途径的介质可能是防治缺血再灌注引起的细胞凋亡的有效方法。

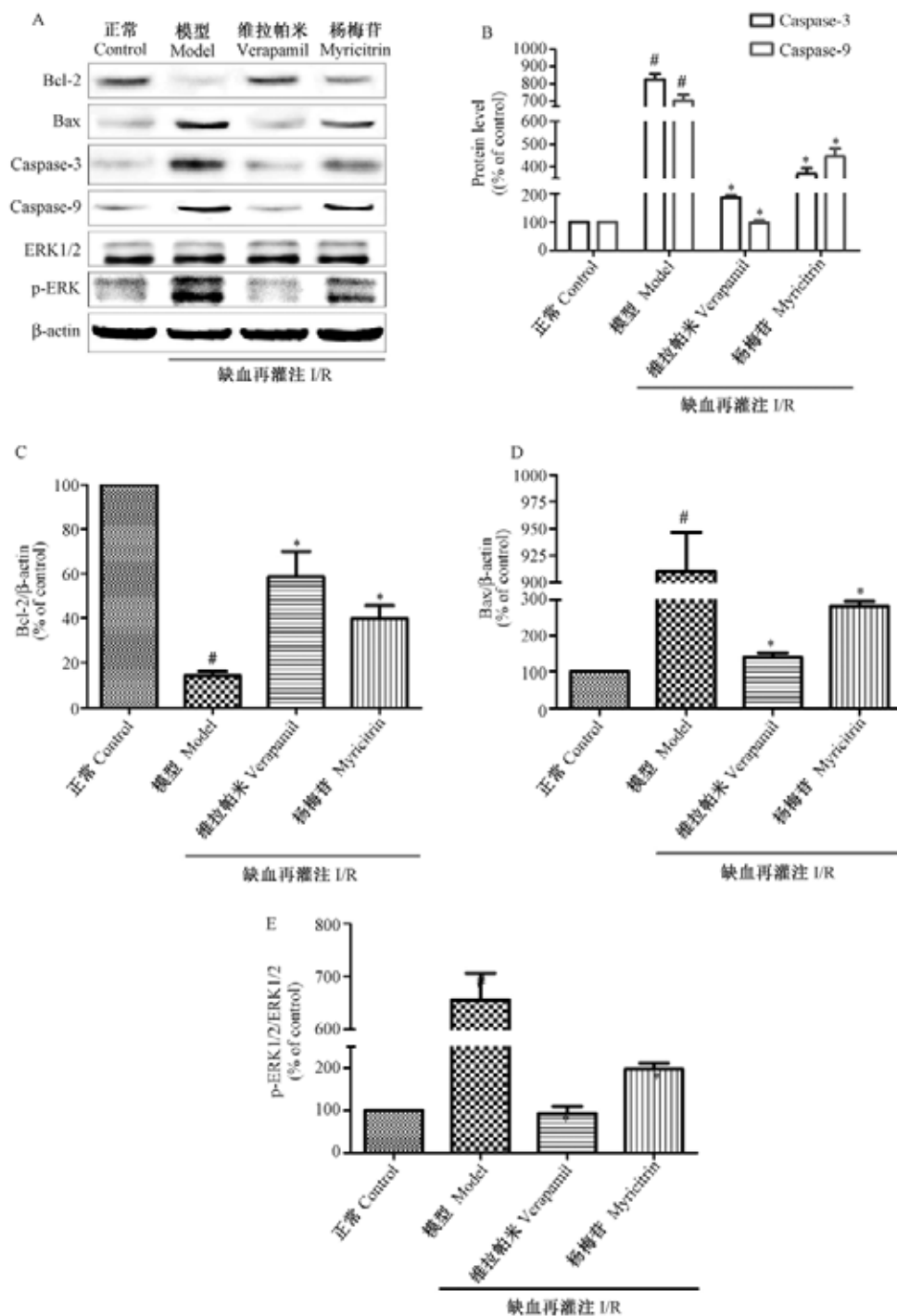


注:A. 正常对照组;B. 模型组;C. 杨梅苷低剂量组(Myricitrin 2.5 mg/L);
D. 杨梅苷中剂量组(Myricitrin 5 mg/L);E. 杨梅苷高剂量组(Myricitrin 10 mg/L);F. 阳性给药组(维拉帕米 100 µg/L)。

图 4 杨梅苷对大鼠离体工作心脏组织病理学变化的影响

Note: A. control group; B. model group; C. myricitrin low dose group (Myr 2.5 mg/L);
D. myricitrin middle dose group (Myr 5 mg/L); E. myricitrin high dose group (Myr 10 mg/L);
F. positive administration group (Ver 100 µg/L).

Fig. 4 Effect of myricitrin on the pathological changes of isolated rat hearts



注:A. Western blot 检测凋亡相关蛋白和 ERK1/2 及 p-ERK1/2 蛋白表达情况;B. Caspase-3 和 Caspase-9 相对表达水平 C. Bcl-2 相对表达水平;D. Bax 相对表达水平;E. p-ERK1/2 相对 ERK1/2 表达水平;与对照组比较, [#] $P < 0.01$,与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$ ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)。

图5 杨梅苷对大鼠离体工作心脏凋亡相关蛋白表达的影响

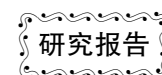
Note: A. The expression of proteins related to apoptosis and ERK1/2 determined by Western blot analysis; B. Statistical results of Caspase-3, Caspase-9 expression levels relative to the control group; C. Statistical results of Bcl-2 expression level relative to the control group; D. Statistical results of Bax expression level relative to the control group; E. Statistical results of p-ERK1/2/ ERK1/2 expression level relative to the control group. ^{##} $P < 0.01$, vs. the control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, vs. the model group. ($\bar{x} \pm s$, $n=3$).

Fig. 5 Effect of myricitrin on the expression of apoptosis related proteins in isolated rat hearts

参考文献:

- [1] Minamino T. Cardioprotection from ischemia/reperfusion injury: basic and translational research [J]. Circ J, 2012, 76(5): 1074–1082.
- [2] Braunwald E, Kloner R A. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? [J]. J Clin Invest, 1985, 76(5): 1713–1719.
- [3] Ibanez B, Heusch G, Ovize M, *et al.* Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. J Am Coll Cardiol, 2015, 65(14): 1454–1471.
- [4] Hausenloy D J, Yellon D M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target [J]. J Clin Invest, 2013, 123(1): 92–100.
- [5] Domitrovic R, Rashed K, Cvijanovic O, *et al.* Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice [J]. Chem Biol Interact, 2015, 230: 21–29.
- [6] Winekenstadde D, Angelis A, Waltenberger B, *et al.* Phytochemical profile of the aerial parts of *Sedum sediforme* and anti-inflammatory activity of myricitrin [J]. Nat Prod Commun, 2015, 10(1): 83–88.
- [7] Huang Q, Gao B, Wang L, *et al.* Protective effects of myricitrin against osteoporosis via reducing reactive oxygen species and bone-resorbing cytokines [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2014, 280(3): 550–560.
- [8] Qin M, Luo Y, Meng X B, *et al.* Myricitrin attenuates endothelial cell apoptosis to prevent atherosclerosis: An insight into PI3K/Akt activation and STAT3 signaling pathways [J]. Vascu Pharmacol, 2015, 70: 23–34.
- [9] 孙桂波, 秦蒙, 罗云, 等. 杨梅苷对氧化应激诱导血管内皮细胞凋亡的保护作用及其机制探讨 [J]. 药学报, 2013, 48(04): 615–620.
- [10] 周文武, 林玲, 陈军, 等. 冠脉结扎法制做大鼠心肌缺血模型 [J]. 中国实验动物学报, 2004, 12(04): 36–40.
- [11] 徐明亮, 王丽丽, 李琳, 等. 白鲜皮水提物对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(01): 47–52.
- [12] Kaminski K, Bonda T, Wojtkowska I, *et al.* Oxidative stress and antioxidative defense parameters early after reperfusion therapy for acute myocardial infarction [J]. Acute Card Care, 2008, 10(2): 121–126.
- [13] Jaeschke H, Woolbright B L. Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species [J]. Transplant Rev (Orlando), 2012, 26(2): 103–114.
- [14] Gottlieb R A, Bureson K O, Kloner R A, *et al.* Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes [J]. J Clin Invest, 1994, 94(4): 1621–1628.
- [15] Lin M, Li L, Li L, *et al.* The protective effect of baicalin against renal ischemia-reperfusion injury through inhibition of inflammation and apoptosis [J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14(19): 1–9.
- [16] Huttemann M, Helling S, Sanderson T H, *et al.* Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1817(4): 598–609.
- [17] Gottlieb R A. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011, 16(3–4): 233–238.
- [18] Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. Physiol Rev, 2008, 88(2): 581–609.

[修回日期]2016–03–23



Fkbp51 基因敲除小鼠肝脏与大脑海马区 RNA 表达谱系的分析比较

徐玉雪, 邱 彬, 魏 强, 雍伟东

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 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 通过分析野生型小鼠(WT)与 *Fkbp51* 基因敲除(KO)小鼠肝脏、海马 RNA 表达谱系之间的差异, 研究 *Fkbp51* 基因在代谢通路和神经通路中的作用。方法 利用第二代测序技术对 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠的肝脏与海马 mRNA 进行表达谱测序, 将测序结果用 BRB-ArrayTools 进行分析, 筛选出小鼠肝脏与海马的差异基因, 然后分别利用在线工具 DAVID 对差异基因进行 GO 本体分析, STRING 数据库对其进行蛋白质的相互作用网络分析, 并利用 Genecard 对基因进行注释。结果 (1) *Fkbp51* 的缺失, 在肝脏中造成类固醇生物合成及代谢、脂类物质代谢以及氧化还原反应等相关基因表达水平的变化; (2) 在海马中造成机械刺激探测、学习或记忆、突触传递的调节、PPAR 信号通路、肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)等相关基因表达水平的变化; (3) 在肝脏与海马中, *Fkbp51* 的缺失同时造成了 11 个基因的共差异表达, 这 11 个基因的蛋白网络互作图显示: HMGCS2 与 INSIG1 及相关蛋白形成网络, 而 USP2 与 PER、CRY、DBP 等相关蛋白形成另一个网络。这两个网络既参与代谢也参与神经调节。结论 *Fkbp51* 在代谢与神经中的作用既是相互独立又是相互联系的。

【关键词】 *Fkbp51* 基因敲除小鼠; 肝脏; 神经系统; RNA-seq

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 05-0040-09

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2016. 005. 006

The gene expression profiling difference of liver and brain hippocampus between wild type and *Fkbp51* knockout mice

XU Yu-xue, QIU Bin, WEI Qiang, YONG Wei-dong

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

【Abstract】 Objective The purpose of this study is to understand the function of *Fkbp51* in metabolic pathways and neural pathways by profiling gene expression of liver and hippocampus tissues of both *Fkbp51*KO and WT mice. **Methods** mRNAs of liver and hippocampus of *Fkbp51*KO and WT mice were isolated and expression profiling was performed using RNA-seq. Differentially expressed gene between KO and WT were analyzed using BRB-Array Tools. DAVID, STRING,

【基金项目】 国家自然科学基金(81272273); 协和青年基金和中央高校基本科研业务费专项资金资助(33320140151、3332015054、3320140086); 中国医学科学院医学实验动物研究所基本科研业务费专项资助(DWS201508)。

【作者简介】 徐玉雪(1988-), 女, 硕士, 研究方向: 基因与发育生物学。E-mail: 978268201@qq.com。

【通讯作者】 雍伟东(1967-), 男, 研究方向: 生殖与发育生物学。Email: wyong@cnilas.org; 魏强(1964-), 男, 研究方向: 实验动物病毒学。Email: weiqiang0430@sohu.com。

Genecard programs, the Gene Ontology, the Protein-protein Interaction Network and the Gene Annotation were applied to identify significant functional-relevant pathways. **Results** When compared differentially expressed genes between *Fkbp51*KO and WT in liver, we found that the loss of *Fkbp51* in liver has large effect on the genes related to steroid biosynthetic and metabolic process, lipid biosynthetic process and oxidation reduction. When differentially expressed gene in hippocampus was studied between genotypes, we found that elimination of *Fkbp51* has much effect on genes related to detection of mechanical stimulus, learning or memory, regulation of synaptic transmission and the pathway of PPAR and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) e. g. When intersection of gene lists between liver and hippocampus tissues, we identified 11 common differentially expression genes. In these genes, HMGCS2 and INSIG1 are grouped in one protein-protein interaction network, and USP2, PER, CRY and DBP are grouped in another network. **Conclusions** The role of *Fkbp51* in metabolism and nervous system is not only independent but also interactive.

【Key words】 *Fkbp51* knockout mice; Liver; Nervous system; RNA-seq

Fkbp51 是一种具有肽酰脯氨酰顺-反异构酶活性的免疫亲和蛋白,含有肽重复序列结构域,可介导蛋白与蛋白之间的相互作用。其作为一种共伴侣蛋白,能够直接与伴侣蛋白(热休克蛋白 HSP90/70 等)结合并参与激素-受体复合物的形成及调控^[1]。已有研究表明,*Fkbp51* 在代谢与神经方面发挥着重要作用。

研究发现,*Fkbp51* 可通过调节糖代谢和脂代谢在动物体代谢过程中发挥作用。在肝脏中,糖皮质激素(GC)的重要作用是促进糖异生,但 GC 的过度刺激往往会引发糖尿病和某些代谢综合征,如向心性肥胖、脂肪病变和胰岛素抵抗等^[2-3]。GC 激活糖皮质激素受体(GR)后可直接促进 *Fkbp51* 的表达,进而负反馈作用于 GR,使其对 GC 的敏感性降低^[4-6],促进机体稳态的平衡。此外,近些年 *Fkbp51* 在脂肪细胞分化中的作用也引起了研究者的关注,Toneatto J 等^[7]人发现 *Fkbp51* 可抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的分化,而 Stechschulte 等^[8]人的研究则发现脂肪的生成需要 *Fkbp51* 的参与,这些矛盾的体外实验结果,可能是由于培养和诱导体系不同所导致的。我们前期利用 *Fkbp51* 基因敲除小鼠(*Fkbp51*KO),通过高脂喂养模型,发现敲除 *Fkbp51* 基因可对抗高脂诱导的肥胖^[9],并且其体内脂肪含量明显减少。进一步的研究发现,*Fkbp51*KO 肝脏、肌肉和脂肪组织中 GR 的活性明显大于野生型小鼠(WT),提示 *Fkbp51* 可能通过调节 GR 活性及其下游基因在代谢中发挥作用^[10]。

此外,*Fkbp51* 在神经方面也发挥着重要作用。海马是应激反应的整合部位,在海马中存在糖皮质激素受体(GR)和盐皮质激素受体(MR),下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)的负反馈调节就是通过 GR 和 MR 调节实现的。HPA 轴通过释放皮质类固醇激素

来应对外界的各种压力,这类激素的释放可激活神经元中 GR 活性和一些与应激反应相关的基因^[11],但这些调控机制的紊乱则会导致与压力相关脑疾病的产生。Binder 和他的同事发现 *Fkbp51* 基因的单核苷酸多态性(SNPs)与抑郁症及其治疗密切相关,这一发现为抗抑郁药物的研究提供了新的方向^[12]。研究还发现,这些存在于 *Fkbp51* 基因组中的 SNPs 能够使 *Fkbp51* 蛋白表达量增加,进而导致 GR 活性下降,引起 HPA 轴调节的紊乱。持续的 GR 抵抗使个体极易发生与压力相关的精神疾病。近年的研究还发现 *Fkbp51* 基因的 SNPs 变异与多种精神疾病的发病具有高度相关性,包括重度抑郁、双相情感障碍以及创伤后应激障碍(PTSD)等^[13-14]。

本实验通过分析 *Fkbp51* 基因敲除小鼠肝脏、海马 RNA 表达谱系与野生型小鼠之间的差异,研究 *Fkbp51* 基因在代谢通路与神经通路以及共同通路中的差异基因,进而进一步研究 *Fkbp51* 在生物体中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

2 月龄清洁级 *Fkbp51*KO 与同窝野生型雄鼠,由中国医学科学院医学实验动物研究所提供【SYXK(京)2014-0029】【SCXK(京)2014-0004】,体重 20g~24g。动物实验方案经过中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会(IACUC)批准。在使用实验动物的过程中充分考虑到动物的福利原则,尊重动物生命,善待动物,减少动物的应激、痛苦和伤害,采取脱颈的方法处置动物。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及测序

脱颈处死同窝 *Fkbp51*KO 与 WT 雄鼠各 3 只,取肝脏和海马,利用 Trizol 法提取组织的 RNA,样品交由华大基因测序。

1.2.2 差异表达基因的筛选

利用 BRB-ArrayTools 软件对数据进行统计学分析。该软件基本功能包括数据可视化、标准化处理、差异基因筛选、聚类分析等。BRB-ArrayTools 以 Excel 加载宏的形式呈现,计算由 Excel 外部的分析工具完成,用来比较两个组间的基因表达差异,集中关注一组显著上调或下调的基因,以此来阐述不同处理对样本产生的影响或揭示其中的生物学意义。

1.2.3 差异基因的 GO 本体分析以及 KEGG 通路分析

通过在线工具 DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) 对差异基因进行分析。基因本体数据库 GO (Gene Ontology) 具有 3 个结构化的网络,从生物学过程、细胞成分和分子功能三个方面分别对肝脏与海马的差异基因进行注释。

1.2.4 差异表达基因的相互作用网络分析

STRING (<http://string-db.org/>) 数据库是一个

有关已知或预测蛋白质间相互作用的数据库,这些相互作用包括物理上的直接作用和功能上的间接关系。它们主要来自高通量实验、共表达分析、基因组内容、已有的知识这四个资源数据子库。本文主要利用此数据库进行肝脏与海马共差异基因的相互作用网络分析,来进一步研究蛋白之间的直接与间接相互作用。

1.2.5 Genecard 注释及分析

通过在线工具 Genecard (<http://www.genecards.org/>) 对基因进行注释。Genecard 是一个全面的,综合的收集了所有已知的或者预测的基因。它整合了跟基因相关的基因组、转录组、蛋白质组、临床等相关信息,收集整理了超过 100 个网站的数据。

2 结果

2.1 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠肝脏差异表达基因的分析

2.1.1 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠肝脏差异表达基因的 GO 本体分析

利用 BRB-ArrayTools 软件对 *Fkbp51*KO 和 WT

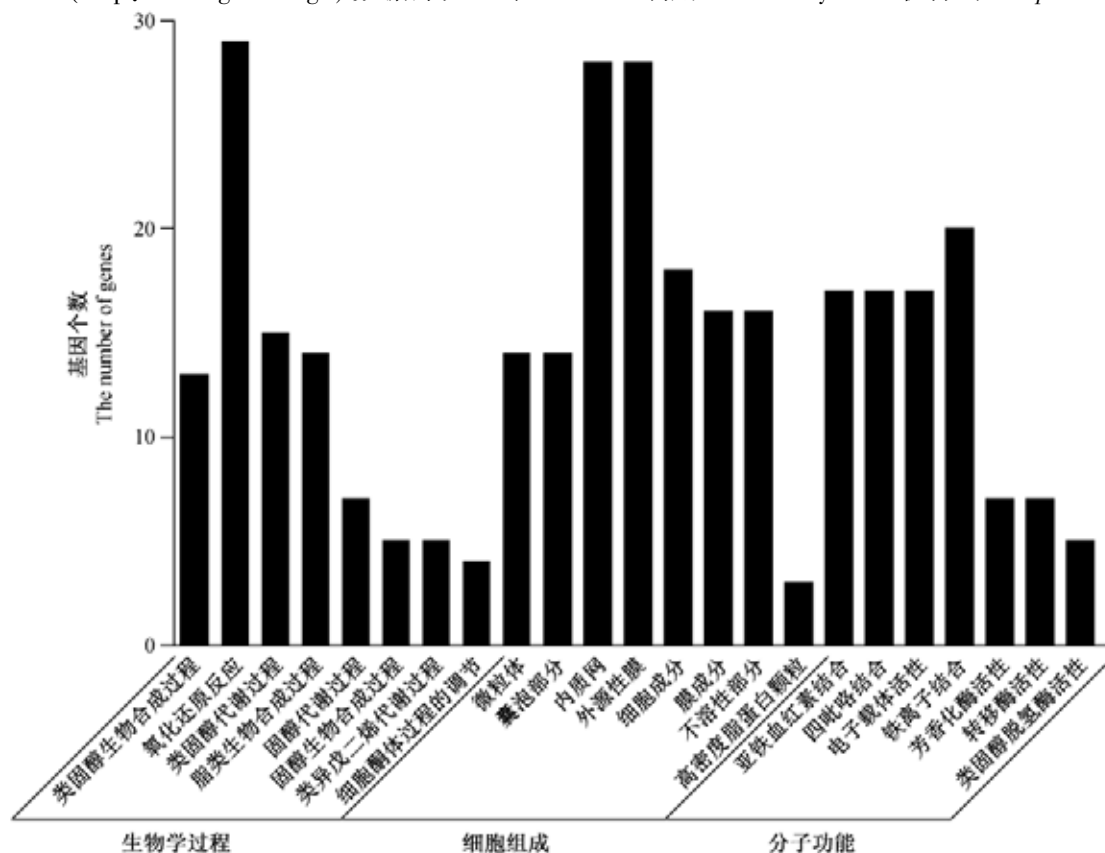


图 1 KO 与 WT 小鼠肝脏差异基因 GO 本体分析

Fig. 1 GO analysis of the liver differentially expressed genes in KO and WT mice

小鼠的肝脏基因进行差异筛选,共筛选出 206 个差异基因,其中 154 个基因呈现上调趋势,52 个基因呈现下调趋势。通过在线工具 DAVID 对肝脏的差异基因进行 GO 本体分析,分别从生物学过程、细胞组成和分子功能对基因进行注释(图 1),并统计每个注释中的上调基因和下调基因个数(表 1)。从图中可以看出,肝脏中的差异基因主要涉及与脂类物质代谢相关的生物学过程,在细胞组成中涉及到高

密度脂蛋白颗粒,在分子功能中涉及到芳香化酶活性、转移酶活性以及类固醇脱氢酶活性。这一分析也进一步验证了这些差异基因在肝脏中的重要性。对这些差异表达基因进行生物学过程分析发现:主要涉及类固醇生物合成过程、氧化还原反应、类固醇代谢过程、脂类生物合成过程等生物学过程(表 2)。

表 1 KO 与 WT 小鼠肝脏差异基因的变化趋势
Tab. 1 Variation tendency of the liver differentially expressed genes in KO and WT

名称 Name	GO 本体分析 GO analysis	基因上调个数 Number of increasing genes	基因下调个数 Number of decreasing genes
生物学过程 Biological process	类固醇生物合成过程	8	5
	氧化还原反应	22	7
	类固醇代谢过程	9	5
	脂类生物合成过程	8	6
	固醇代谢过程	5	2
	固醇生物合成过程	3	2
	类异戊二烯代谢过程	3	2
	细胞酮体过程的调节	2	2
细胞组成 cellular component	微粒体	8	6
	囊泡部分	9	5
	内质网	19	9
	外源性膜	10	8
	细胞成分	11	7
	膜成分	10	6
	不溶性部分	8	8
	高密度脂蛋白颗粒	2	1
分子功能 molecular function	亚铁血红素结合	10	7
	四吡咯结合	9	8
	电子载体活性	11	6
	铁离子结合	12	8
	芳香化酶活性	4	4
	转移酶活性	4	3
	类固醇脱氢酶活性	4	3

表 2 KO 与 WT 小鼠肝脏差异基因的生物学过程
Tab. 2 Biological process of the liver differentially expressed genes in KO and WT

生物进程 Biological process	基因数目 Number of genes	基因名称 Name of genes	P-值 P-value	Benjamini 值 Benjamini-value
类固醇生物合成过程 Steroid biosynthesis	13	<i>Hmgcs2</i> . <i>Akr1c20</i> . <i>Akr1c6</i> . <i>Cyp17a1</i> . <i>Cyp39a1</i> . <i>Cyp21a1</i> . <i>Hsd3b2</i> . <i>Hsd3b3</i> . <i>Hsd3b5</i> . <i>Insig1</i> . <i>Fdps</i> . <i>Sc5d</i> . <i>Sc4molL</i> . <i>Gm3571</i>	5.7E-12	6.1E-9
氧化还原反应 oxidation-reduction reaction	29	<i>adh1</i> . <i>adh4</i> . <i>Aox3</i> . <i>Akr1c</i> 族. <i>Cyp2a</i> 族. <i>Hsd3b</i> 族. <i>Retsat</i> . <i>Cyp4a</i> 族. <i>Gm</i> . <i>Sc4molL</i>	1.3E-10	7.0E-8
类固醇代谢过程 Steroid metabolism process	15	<i>Hmgcs2</i> . <i>Akr1c6/20</i> . <i>Cyp17a1</i> . <i>Cyp21a1</i> . <i>Cyp39a1</i> . <i>Hsd3b2/3/5</i> . <i>Insig1</i> . <i>Serpian6</i> . <i>Fdps</i> . <i>Gm</i> . <i>Sreb1</i> . <i>Sc4mol</i> . <i>Sc5d</i>	9.0E-10	3.2E-7
脂类生物合成过程 Lipid biosynthesis	14	<i>Hmgcs2</i> . <i>Elov15</i> . <i>Akr1c6/20</i> . <i>Cyp17a1</i> . <i>Cyp21a1</i> . <i>Hsd3b2/3/5</i> . <i>Cyp39a1</i> . <i>Fdps</i> . <i>Gm</i> . <i>Sc4mol</i> . <i>Sc5d</i> .	6.6E-6	1.8E-3

注: Fisher 检验, $P < 0.001$; Benjamini-Hochberg 校正, $P < 0.01$ 。
Note: Fisher's exact test, $P < 0.001$; Benjamini-Hochberg corrected, $P < 0.01$.

2.2.2 *Fkbp*51KO 与 WT 小鼠肝脏差异表达基因的 KEGG 通路分析

同时 DAVID 在线工具对上述差异基因进行 KEGG 通路分析发现,这些差异基因主要参与药物代谢、视黄醇代谢、细胞色素 P450 外源性代谢、花生四烯酸代谢、亚油酸代谢等信号通路(表 3)。

2.2 *Fkbp*51KO 与 WT 小鼠海马差异表达基因的分析

2.2.1 *Fkbp*51KO 与 WT 小鼠海马差异表达基因的 GO 本体分析

利用 BRB-ArrayTools 软件对 *Fkbp*51KO 和 WT 小鼠的海马基因进行差异筛选,共筛选出 364 个差异基因,其中 172 个上调基因,192 个下调基因。通

过在线工具 DAVID 对海马的差异基因进行 GO 本体分析,分别从生物学过程、细胞组成和分子功能对基因进行注释(图 2),并统计每个注释中的上调基因和下调基因个数(表 4)。从图中可以看出,海马中的差异基因主要涉及与神经调节相关的生物学过程,在细胞组成方面涉及到与神经调节相关的纤维以及微管,在分子功能上涉及顺-反异构酶等的活性。这一统计也正进一步验证了这些差异基因在海马中的重要性。

通过对这些差异表达基因进行生物学过程分析发现:主要涉及机械刺激探测、学习或记忆、多糖分解过程、突触传递的调节等生物学过程(表 5)。

表 3 KO 与 WT 小鼠肝脏差异基因的 KEGG 通路

Tab. 3 KEGG pathway of the liver differentially expressed genes in KO and WT

KEGG 通路 KEGG pathway	基因数目 Number of genes	P-值 P-value	Benjamini 值 Benjamini-value
药物代谢 Drug metabolism	14	1.0E-11	1.0E-9
视黄醇代谢 Retinoids metabolism	13	5.6E-11	2.7E-9
细胞色素 P450 外源性代谢 Cytochrome P450 exogenous metabolism	12	7.3E-10	2.3E-8
花生四烯酸代谢 Arachidonic acid metabolism	8	1.1E-4	2.6E-3
亚油酸代谢 Linoleic acid metabolism	6	3.4E-4	6.6E-3

注: Fisher 检验, $P < 0.001$; Benjamini-Hochberg 校正, $P < 0.01$ 。

Note: Fisher's exact test, $P < 0.001$; Benjamini-Hochberg corrected, $P < 0.01$.

表 4 KO 与 WT 小鼠海马差异基因的变化趋势

Tab. 4 Variation tendency of the Hippocampus differentially expressed genes in KO and WT

名称 Name	GO 本体分析 GO analysis	基因上调个数 Number of decreasing genes	基因下调个数 Number of increasing genes
生物学过程 Biological process	机械刺激探测	1	3
	学习或记忆	4	3
	多糖分解过程	3	1
	突触传递的调节	5	2
	神经冲动传送的调节	4	3
	细胞蛋白复合体装配	4	3
	几丁质分解代谢过程	2	1
细胞组成 cellular component	行为	8	7
	细胞投射	9	14
	内质网	13	14
	肌原纤维	3	4
	收缩性纤维	2	5
	外源性膜	10	9
	Z 椎间盘	3	2
分子功能 molecular function	质膜	28	42
	微管相关的复合物	3	3
	离子束缚作用	50	49
	ATPase 活性	8	6
	金属肽酶活性	6	5
	阳离子结合作用	45	50
	顺-反异构酶活性	2	3
	金属离子结合活性	43	48
	几丁质酶活性	2	1

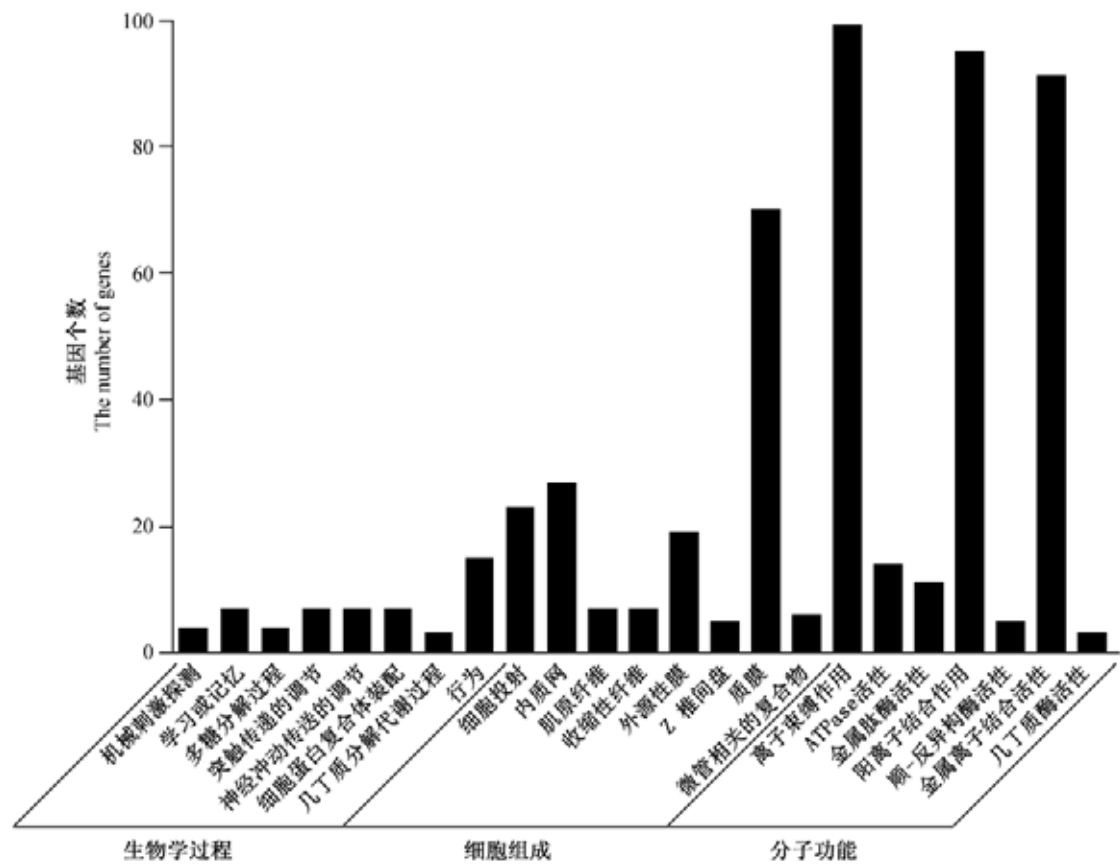


图 2 KO 与 WT 小鼠海马差异基因 GO 本体分析

Fig. 2 GO analysis of the Hippocampus differentially expressed genes in KO and WT

表 5 WT 与 *Fkbp51*KO 小鼠海马差异基因的生物学过程

生物进程 Biological process	基因数目 Number of genes	基因名称 Name of genes	P-值 P-value	Benjamini 值 Benjamini-value
机械刺激探测 Mechanical stimulation to detect	4	<i>Atp2b2</i> 、 <i>Sox2</i> 、 <i>Grin2b</i> 、 <i>Phk1</i>	3. 2E-3	9. 9E-1
学习或记忆 Learning and memory	7	<i>Hmger</i> 、 <i>Drd5</i> 、 <i>Bdnf</i> 、 <i>park2</i> 、 <i>Slc11a2</i> 、 <i>Grm4</i> 、 <i>Slc11a2</i>	5. 2E-3	9. 8E-1
多糖分解过程 Polysaccharide decomposition	4	<i>Chi3l1</i> 、 <i>Chia</i> 、 <i>Pygm</i> 、 <i>Ovgp1</i>	5. 9E-3	9. 5E-1
突触传递的调节 The regulation of synaptic transmission	7	<i>Atp2b2</i> 、 <i>park2</i> 、 <i>Bdnf</i> 、 <i>Drd5</i> 、 <i>Gria2</i> 、 <i>Gria2b</i> 、 <i>ppp3ca</i>	9. 1E-3	9. 7E-1

注:Fisher 检验, $P < 0. 001$ 。
Note:Fisher's exact test, $P < 0. 001$.

表 6 WT 与 *Fkbp51*KO 小鼠海马差异基因的 KEGG 通路

KEGG 通路 KEGG pathway	基因数目 Number of genes	P-值 P-value	Benjamini 值 Benjamini-value
PPAR 信号通路	7	2. 4E-3	2. 2E-1
肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (ALS)	4	7. 7E-2	9. 8E-1
轴突导向通路	6	7. 8E-2	9. 4E-1
神经配体-受体相互作用通路	9	8. 3E-2	8. 9E-1

注:Fisher 检验, $P < 0. 001$ 。
Note:Fisher's exact test, $P < 0. 001$.

2.2.2 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠海马差异表达基因的 KEGG 通路分析

同时 DAVID 在线工具对上述差异基因进行 KEGG 通路分析发现,这些差异基因主要参与 PPAR 信号通路、肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)、轴突导向通路、神经配体-受体相互作用通路等信号通路(表 6)。

2.3 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠肝脏与海马共差异表达基因的分析

2.3.1 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠肝脏与海马共差异表达基因的筛选

通过 BRB-ArrayTools 工具对两样本分类比较后一共找出 11 个共差异表达基因(图 3),其中 *Abca3*、*Cela1*、*Fkbp5*、*Glo1*、*Hmgcs2*、*Insig1*、*Per3*、*Usp2* 在肝脏与海马中的变化趋势相同,而 *Cml1*、*Dbp*、*Gstm6* 变化趋势相反,具体见表 7。

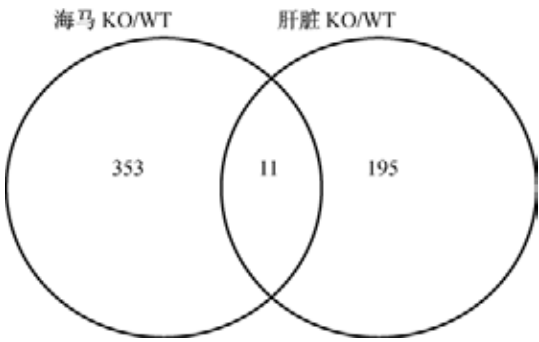


图 3 海马与肝脏共差异表达基因
Fig.3 Coexpression analysis of liver and hippocampus differentially expressed genes

表 7 KO 与 WT 小鼠肝脏与海马差异基因
Tab.7 Liver and hippocampus differentially expressed genes differentially expressed genes in KO and WT

序号 Number	基因名称 Name of genes	KO/WT 倍数 (肝脏) KO/WTmultiple (liver)	KO/WT 倍数 (海马) KO/WTmultiple (hippocampus)
1	<i>Abca3</i>	4.4964 ↑	1.1996 ↑
2	<i>Cela1</i>	4.3763 ↑	2.0984 ↑
3	<i>Cml1</i>	3.4376 ↑	0.6860 ↓
4	<i>Dbp</i>	31.4498 ↑	0.9561 ↓
5	<i>Fkbp5</i>	0.0180 ↓	0.1159 ↓
6	<i>Glo1</i>	2.5599 ↑	2.0965 ↑
7	<i>Gstm6</i>	2.5472 ↑	0.6540 ↓
8	<i>Hmgcs2</i>	0.4022 ↓	0.4807 ↓
9	<i>Insig1</i>	3.2643 ↑	1.3971 ↑
10	<i>Per3</i>	10.4440 ↑	1.2905 ↑
11	<i>Usp2</i>	4.9330 ↑	1.2301 ↑

2.3.2 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠肝脏与海马共差异表达基因的蛋白网络互作分析

通过 STRING 在线工具对 11 个差异表达基因编码的蛋白进行蛋白-蛋白相互作用网络分析(图 4-左),发现 PER3、DBP 与 USP2 之间存在相互作用关系,HMGCS2 与 INSIG1 之间存在互作关系,而其他蛋白之间无网络关系。进一步的网络互作分析发现, *Fkbp51* 通过 HSP90AA1、CSNKLE 与 PER3、USP2、DBP、PER1、PER2、CLOCK、CRY1、CRY2、ARNT1 形成相互作用的网络,而 HMGCS2、INSIG1 与 SREBF2、SCAP 形成网络关系(图 4-右、表 8)。HSP90AA1、CSNK1E、PER1、PER2、CLOCK、CRY1、CRY2、ARNT1、SREBF2 以及 SCAP 虽然未出现在我们的测序数据里,但是为我们研究这些共差异蛋白在脂类代谢与神经调节中的作用提供了一个明确的思路,具有非常重要的意义。

表 8 肝脏与海马共差异表达基因的可能作用基因
Tab.8 The probably interaction genes of liver and hippocampus differentially coexpressed genes

序号 Number	基因名称 Name of genes	基因注释 Gene annotation
1	<i>Cry1</i>	隐色素生物钟蛋白 1;黄素腺嘌呤二核苷酸结合蛋白
2	<i>Cry2</i>	隐色素生物钟蛋白 2;黄素腺嘌呤二核苷酸结合蛋白
3	<i>Clock</i>	生理运动输出周期;ARNTL / 2-CLOCK 异质二聚体激活 E-box 元素
4	<i>Arntl</i>	芳基碳氢化合物受体核转运蛋白;ARNTL-CLOCK 异质二聚体激活 E-box
5	<i>Per1</i>	生物钟蛋白 1;生物钟的组成部分
6	<i>Per2</i>	生物钟蛋白 2;生物钟的组成部分
7	<i>Scap</i>	SREBP 伴侣蛋白;调节胆固醇以及脂质体内平衡
8	<i>Srebf2</i>	甾体调节元件结合因子 2;脂类代谢所需的转录因子
9	<i>Csnk1e</i>	酪蛋白激酶 1e
10	<i>Hsp90aa1</i>	热休克蛋白 90aa1

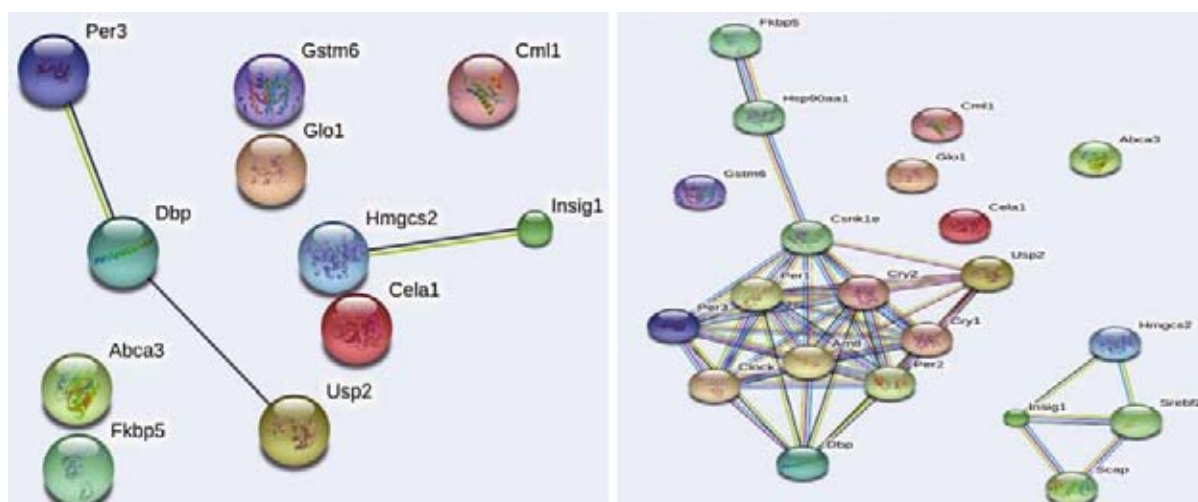


图 4 肝脏与海马共差异表达基因蛋白互作网络图

Fig. 4 Protein-protein interaction network of the differentially expressed genes

3 讨论

Fkbp51 在代谢与神经中的具体作用机制目前仍不清楚,其作用机制可能涉及多个方面,这是一个多基因、多途径、多步骤、多信号通路相互作用和相互影响的过程。因此,研究 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠的肝脏与海马 RNA-seq,对于从分子水平揭示 *Fkbp51* 在生物体内的作用是一个重要的突破口。

首先,对 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠的肝脏数据进行挖掘,共筛选出 206 个差异表达基因。通过进一步的 GO 本体和 KEGG 通路分析,我们发现这些差异表达基因主要参与类固醇生物合成与代谢、脂类代谢、药物代谢通路、视黄醇代谢通路、细胞色素 P450 外源性代谢通路、花生四烯酸以及亚油酸代谢通路等分子生物过程及信号通路。而 *Akr1c*、*Hsd3b*、*Sc4molL* 和 *Fdps* 几乎参与上述所有过程。研究报告:*Akr1c* 编码酮类还原酶家族,此家族包含 40 种已知的酶。这些酶利用 NADH/NADPH 催化醛与酮之间的转换;*Hsd3b* 编码的蛋白为一种双功能酶,在类固醇的所有生物合成阶段发挥重要作用;*Sc4molL* 编码甲基固醇单加氧酶,位于内质网膜,在内源性胆固醇合成中扮演重要角色;而 *Fdps* 编码法尼基焦磷酸合酶,可以催化合成香叶基焦磷酸酯和法尼基焦磷酸酯,而法尼基焦磷酸酯是胆固醇和甾醇生物合成过程中重要的中间物质。因此深入研究 *Fkbp51* 与这些基因之间的关系,对于探究 *Fkbp51* 在脂代谢中的作用具有重要意义。

然后,对 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠的海马数据进行挖掘,共筛选出 364 个差异表达基因。这些差异基因主要参与机械刺激探测、学习或记忆、多糖分

解过程、突触传递的调节等生物学过程以及 PPAR 信号通路、肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (ALS)、轴突导向通路、神经配体-受体相互作用通路等信号通路。同时我们对这些差异表达基因进行蛋白-蛋白相互作用网络分析发现泛素蛋白 C (Ubiquitin C, UBC) 居于网络中心,我们通过文献检索发现 UBC 与蛋白降解、DNA 修复、细胞周期调控、激酶修饰以及细胞内吞作用均有关,且该蛋白参与 PI-3K 级联反应。

最后,在肝脏与海马的共差异表达分析中,我们发现 HMGCS2 与 INSIG1 存在互作关系。*Hmgcs2* 编码 3-羟基-3 甲基戊二酰辅酶 A 合酶 2,是一种线粒体酶,催化生酮反应的第一步反应,主要在碳水化合物缺失 (比如禁食) 时发挥作用,研究显示野生型小鼠体重减轻时,此蛋白表达量也随之降低。*Insig1* 是胰岛素诱发基因 1,编码内质网膜蛋白,研究发现此蛋白具有促进胆固醇合成和抑制脂类生成的作用。进一步分析发现,SCAP 和 SREBF2 也参与此互作关系。*Srebf2* 是固醇调节元件结合因子 2,调节低密度脂蛋白、胆固醇和脂肪酸的转录,维持脂类稳态。SCAP 是 SREBP 的伴侣蛋白,在高胆固醇和氧甾醇密集时,SREBP-SCAP 复合物通过内质网保留蛋白 INSIG1 的作用滞留在内质网上;而在低胆固醇时,SREBP-SCAP 复合物离开内质网进入细胞核激活靶基因的转录,进而促进固醇、脂肪酸以及甘油三酯等物质的合成^[15]。在 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠的测序数据中,我们发现 KO 与 WT 小鼠相比,其 HMGCS2 表达量下降,而 INSIG1 表达量升高,这些均提示敲除 *Fkbp51* 基因可能通过这些基因调节脂类合成和代谢^[16]。

从共差异表达蛋白网络互作图中,我们还发现

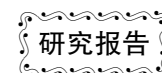
USP2 与 PER、CRY、DBP 等蛋白存在相互作用。*Usp2* 基因编码泛素特异性肽酶 2, 具有去泛素化作用, 主要靶蛋白为脂肪酸合成酶、小鼠双微粒 2 (MDM2) 以及细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1), 并且在肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路中发挥重要作用。其中 *Mdm2* 是肿瘤抑制基因 *P53* 的负性调节因子, 而细胞周期蛋白 D1 在细胞周期 G1/S 转换中发挥重要作用。*Dbp* 基因编码白蛋白启动子 D 位点结合蛋白, 可结合白蛋白、*Cyp2a4* 和 *Cyp2a5* 等基因的启动子区, 此外还能够调节与生物节律相关的基因的表达。而 *Per3* 基因编码的蛋白属于生物钟节律蛋白, 是自发活动、代谢、行为的生物周期节律的蛋白组件, 主要参与生物节律通路。CLOCK/ARNTL 异二聚体可以上调该蛋白, 而 PER/CRY 异二聚体可以通过结合 CLOCK/ARNTL 进而抑制其上调作用。在代谢方面有研究报道, 小鼠肝脏中的 USP2A 可以通过促进 CRY1 去泛素化来增加其稳定性, 以此来对抗炎症反应, 而这一稳定性的维持则是通过抑制 *Per2* 启动子活性实现的。有趣的是, 促炎症因子、TNF- α 可以使 CRY1 蛋白表达水平增加并抑制与生物钟相关的基因表达^[17]。在神经方面研究报道称, USP2 的去泛素化作用与生物节律蛋白密切相关, 在低光照强度下 *Usp2*^{-/-} 小鼠比 WT 小鼠的相位延迟明显提高。最近的流行病学研究显示: 生物节律的混乱会造成代谢上的紊乱^[17-18]。在我们的测序数据中, USP2、PER 与 DBP 蛋白在肝脏与海马中的变化正是说明代谢调节与神经调节是紧密联系的。

本研究通过对 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠的肝脏与海马 RNA-Seq 数据分析后, 发现 *Fkbp51* 在脂类代谢和神经调节中的作用既是相互独立又是相互联系的, 也为下一步深入研究 *Fkbp51* 基因在脂类代谢和神经调节中作用的分子机制提供了理论基础。未来我们将继续展开工作, 对这些数据分析进行后续分子生物学实验, 以期进一步验证这些分析的可靠性。

参考文献:

- [1] Zannas A S, Wiechmann T, Gassen N C, et al. Gene-Stress-Epigenetic Regulation of FKBP5: Clinical and Translational Implications[J]. Neuropsychopharmacology, 2015, 16(2): 33-42.
- [2] Vegiopoulos A, Herzig S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases[J]. Mol Cell Endocrinol, 2007, 275(1-2): 43-61.
- [3] Sapolsky R M, Romero L M, Munck A U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions[J]. Endocr Rev, 2000, 21(1): 55-89.
- [4] Hubler T R, Scammell J G. Intronic hormone response elements mediate regulation of FKBP5 by progestins and glucocorticoids[J]. Cell Stress Chaperones, 2004, 9(3): 243-252.
- [5] U M, Shen L, Oshida T, et al. Identification of novel direct transcriptional targets of glucocorticoid receptor[J]. Leukemia, 2004, 18(11): 1850-1856.
- [6] Paakinaho V, Makkonen H, Jaaskelainen T, et al. Glucocorticoid receptor activates poised FKBP51 locus through long-distance interactions[J]. Mol Endocrinol, 2010, 24(3): 511-525.
- [7] Toneatto J, Guber S, Charo N L, et al. Dynamic mitochondrial-nuclear redistribution of the immunophilin FKBP51 is regulated by the PKA signaling pathway to control gene expression during adipocyte differentiation[J]. J Cell Sci, 2013, 126(Pt 23): 5357-5368.
- [8] Stechschulte L A, Hinds T J, Khuder S S, et al. FKBP51 controls cellular adipogenesis through p38 kinase-mediated phosphorylation of GR α and PPAR γ [J]. Mol Endocrinol, 2014, 28(8): 1265-1275.
- [9] 张曼, 邱彬, 曹勇, 等. 伴侣蛋白 FKBP51 在高脂诱导肥胖中的作用[J]. 中国比较医学杂志, 2015(07): 53-58.
- [10] Ratajczak T, Cluning C, Ward B K. Steroid Receptor-Associated Immunophilins: A Gateway to Steroid Signalling[J]. Clin Biochem Rev, 2015, 36(2): 31-52.
- [11] de Kloet E R, Joels M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease[J]. Nat Rev Neurosci, 2005, 6(6): 463-475.
- [12] Binder E B, Salyakina D, Lichtner P, et al. Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment[J]. Nat Genet, 2004, 36(12): 1319-1325.
- [13] Binder E B. The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders[J]. Psychoneuroendocrinology, 2009, 34 Suppl 1: S186-S195.
- [14] Ratajczak T, Cluning C, Ward B K. Steroid Receptor-Associated Immunophilins: A Gateway to Steroid Signalling[J]. Clin Biochem Rev, 2015, 36(2): 31-52.
- [15] Zheng W, Reem R E, Omarova S, et al. Spatial distribution of the pathways of cholesterol homeostasis in human retina[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37926.
- [16] Gao J, He J, Zhai Y, et al. The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity[J]. J Biol Chem, 2009, 284(38): 25984-25992.
- [17] Tong X, Buelow K, Guha A, et al. USP2a protein deubiquitinates and stabilizes the circadian protein CRY1 in response to inflammatory signals[J]. J Biol Chem, 2012, 287(30): 25280-25291.
- [18] Shimba S. The roles of clock genes in obesity[J]. Nihon Rinsho, 2013, 71(2): 244-248.

[修回日期]2016-01-10



两种小型猪代谢综合征相关指标的比较

那顺巴雅尔¹, 吉木斯², 牧仁³, 苏小华¹, 刘吉贞¹, 顾为望⁴

(1. 广东医学院, 广东 东莞 523808; 2. 东莞市寮步医院, 广东 东莞 523400; 3. 阿巴嘎旗动物疫病预防控制中心, 内蒙古 阿巴嘎旗 011400; 4. 南方医科大学实验动物中心, 广州 510515)

【摘要】 目的 探讨两种小型猪作为代谢综合征模型动物的可行性。**方法** 选择巴马小型猪和西藏小型猪, 测量体重、体尺以及与代谢综合征有关指标-血脂、血糖、自由基水平, 在不同种和性别之间进行比较分析。**结果** 与西藏小型猪比较, 巴马小型猪体重大, 体长度短, 颈围大, 腹围大, 肥胖指数高, 而且差异在雌性巴马小型猪中更加显著。TC、HDL-C、LDL-C、TC 水平在雌性小型猪高于雄性小型猪。GLU 水平在巴马小型猪高于西藏小型猪, 并与雌性西藏小型猪的差异显著, 而 FRA 和 HbA1c 水平在西藏小型猪高于巴马小型猪, Insulin 水平在雌性巴马小型猪和雄性西藏小型猪中分别高于雄性巴马小型猪和雌性西藏小型猪。MDA 水平在雌性巴马小型猪中显著高于雄性巴马小型猪和西藏小型猪, SOD 和 GSH-Px 水平在巴马小型猪中高于西藏小型猪。**结论** 通过体重、体尺、血脂、血糖和自由基水平等正常生理指标的分析, 巴马小型猪倾向于肥胖; 两种小型猪血脂雌性高于雄性; 巴马小型猪空腹血糖高于西藏小型猪, 但巴马小型猪的血糖控制能力优于西藏小型猪; 巴马小型猪抗氧化能力优于西藏小型猪。总之, 在代谢综合征相关研究中根据具体需求进行选择不同种、不同性别的小型猪并以具体造模实践来加以验证。

【关键词】 小型猪; 代谢综合征; 体重; 体尺; 血脂; 血糖; 自由基

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 05-0049-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 005. 007

Comparative studies on the metabolic syndrome-related parameters in two kinds of minipigs

Na-shun-ba-ya-er¹, Ji-mu-si², Mu-ren³, SU Xiao-hua¹, LIU Ji-zhen¹, GU Wei-wang⁴

(1. Guangdong Medical University, Guangdong Dongguan 523808, China; 2. Liaobu Hospital, Guangdong Dongguan 523400, China; 3. Animal Epidemic Prevention and Control Center, Neimenggu Abaga Qi 011400, China; 4. Laboratory Animal Center, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

【Abstract】 Objective To explore the possibility of two kind of minipigs as the animal model for metabolic syndrome. **Methods** Bama minipigs and Tibet minipigs were selected to measure their body weight, body size and metabolic syndrome-related parameters including blood lipid, blood sugar and free radical. **Results** Compared with Tibet minipigs, Bama minipigs was heavier in weight, shorter in length, larger in neck circumference and abdominal circumference, higher in obesity index, and what's more, the difference in female Bama minipigs was more significant. The levels of TC, LDL-C, HDL-C and TC were higher in female than in male. GLU levels in Bama minipigs was higher than that of Tibet minipigs, and with differences in female Tibet minipigs significantly, while the level of FRA and HbA1c in the Tibet minipig was higher than that of Bama minipigs, Insulin level in female Bama minipigs and male Tibet minipigs

[基金项目] 广东医学院博士启动基金(2XB14003); 广东省科技计划项目(2013B030300040; 2015A030302076)。

[作者简介] 那顺巴雅尔(1979-), 男, 博士, 兽医师, 研究方向: 人类疾病动物模型研究。E-mail: nashunbayaer@163.com。

[通讯作者] 顾为望(1956-), 男, 教授, 博士生导师。E-mail: guww100@163.com。

was respectively higher than the male Bama minipigs and female Tibet minipigs. MDA levels in female Bama minipigs was significantly higher than that of male Bama minipigs and Tibet minipigs, the level of SOD and GSH-Px in Bama minipigs was higher than that of Tibet minipigs. **Conclusions** Through the analysis of normal physiological parameters, such as body weight, body measurement, blood lipid, blood sugar and free radical, Bama minipigs tend to be obese; the level of blood fat of female is higher than that of male in two kind of minipigs; the level of blood sugar of Bama minipigs is higher than that of Tibet minipigs, but the ability of Bama minipigs to control blood sugar is better than Tibet minipigs; the ability of Bama minipigs to antioxidant is better than Tibet minipigs. In short, according to the specific needs different kinds of minipigs are selected to use in the metabolic syndrome-related research and verified in actual modeling practices.

【Key words】 Minipigs; Metabolic syndrome; Body weight; Body size; Blood lipid; Blood sugar; Free radical

代谢综合征 (metabolic syndrome, MS) 是以中心性肥胖、2 型糖尿病、高血压、脂代谢异常和胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 等一组疾病危险因素为病理生理基础的临床症候群^[1-3]。小型猪与人在解剖、生理上具有更多的相似性, 利用它建立代谢综合征模型用于人类代谢综合征机制和临床前研究具有重要意义。巴马小型猪和西藏小型猪是我国主要小型猪品种, 随着实验动物化和标准化的进一步深入, 有成功建立巴马小型猪和西藏小型猪糖尿病模型^[4-5]。本文对巴马小型猪和西藏小型猪的与代谢综合征有关的生理指标进行比较研究, 探讨该两种猪作为代谢综合征模型动物的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

巴马小型猪和西藏小型猪各 50 只, 雌雄各半, 210~240 日龄, 普通级; 实验动物由东莞松山湖明珠实验动物科技有限公司提供【SCXK (粤) 2012-0030】, 并在其设施内完成【SYXK (粤) 2012-0123】。两种小型猪饲养环境和日常管理模式相同, 每日饲喂 2 次, 按体重的 4% 的量提供饲料, 自由饮水。饲料蛋白质、脂肪、碳水化合物能量比分别是 54.78%、16.06%、29.16%, 消化能含量为 12.0 MJ/kg。

1.2 主要仪器与试剂

仪器: 离心机 (Eppendorf 5810R)、酶标仪 (POLARstar OPTIMA)、分光光度计 (Thermo Fisher Nanodrop 2000)、生化仪 (Roche Modular)。

试剂: 胰岛素 (insulin)、糖化血红蛋白 (glycosylated hemoglobin, HbA1c) ELISA 检测试剂盒, 均由上海心语生物科技有限公司提供; 总胆固醇 (total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、血糖 (glucose,

GLU)、果糖胺 (fructosamine, FRA)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 检测试剂盒, 均由南京建成生物工程研究所提供。

1.3 实验方法

实验动物分为 4 组, 分别是巴马小型猪雄性组 (B+组)、巴马小型猪雌性组 (B-组)、西藏小型猪雄性组 (T+组) 和西藏小型猪雌性组 (T-组)。所有实验动物实验前 8h 禁食。实验时先称量体重 (body weight, BW), 之后测量体长 (从鼻端到尾根部, body size, BS)、颈围 (neck circumference, NC)、腹围 (abdominal circumference, AC), 接着通过前腔静脉采集血液分离血清供相关指标检测。根据体长、颈围、腹围数据计算猪肥胖指数 (porcine obesity index, POI)。猪肥胖指数以每厘米体积来定义 (L/cm), 体积 (L) 和猪肥胖指数 POI (L/cm) 的具体计算公式如下^[6]:

$$\text{体积 (L)} = \left\{ \pi (BS/3) (\text{cm}) \times \left[(A)^2 (\text{cm}) + (N)^2 (\text{cm}) + (A) (\text{cm}) \times (N) (\text{cm}) \right] \right\} \times 10^{-3}$$

BS 代表体长, A 代表腹围处半径, N 代表颈围处半径。

猪肥胖指数 (POI) (L/cm) = 体积 (L) / BS (cm)。

1.4 数据处理

所有检测指标用 $\bar{x} \pm \text{SEM}$ 表示, 并以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, 采用双侧检验方法对不同组别之间进行 ONE-WAY ANOVA 方差检验, 方差检验结果显著者进一步进行 Duncan 多重比较。数据统计过程均用 SPSS13.0 软件来完成。

2 结果

2.1 体重、体尺测量结果

实验小型猪进行体重、体长、颈围和腹围检测

的基础上计算了肥胖指数(表 1)。

2.2 血脂检测结果

实验小型猪进行了总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯检测(表 2)。

2.3 糖代谢相关指标检测结果

实验小型猪进行了血糖、果糖胺、胰岛素和糖化血红蛋白检测(表 3)。

2.4 自由基检测结果

实验小型猪进行了 MDA、SOD 和 GSH-Px 等自由基检测(表 4)。

3 讨论

代谢综合征及其引发的相关疾病日益威胁着

人类的健康,已成为世界性公共健康问题^[7]。选择适宜实验动物,建立代谢综合征相关动物模型是代谢综合征发病机制研究和防治临床前研究的前提。

西藏小型猪胸较窄,背腰平直或微弓,四肢结实紧凑,心肺功能发达;巴马小型猪体型矮、小、短、圆,背腰微凹,腹大圆而下垂,四脚短细^[8]。我们通过实际测量发现,与西藏小型猪比较,巴马小型猪体重偏大,体长偏短,腹围偏大,肥胖指数偏高,其中雌性巴马小型猪表现更加显著,对两种小型猪的外观特征差异提供了客观数据的支持。代谢综合征的发生以中心性肥胖为基础,从外观、体重、体尺测量结果推测巴马小型猪,尤其是雌性巴马小型猪更容易发生中心性肥胖。

表 1 体重、体尺测量和肥胖指数计算结果
Tab.1 Results of body weight, body size and obesity index

	B +	B -	T +	T -	F	P
BW(kg)	20.87 ± 0.74	22.35 ± 0.76	18.99 ± 0.90#	20.12 ± 1.00	2.720	0.049
BS(cm)	80.76 ± 1.00	79.08 ± 0.89	80.36 ± 1.11	84.20 ± 1.32**§	4.023	0.010
NC(cm)	51.08 ± 0.88	51.00 ± 0.92	48.16 ± 1.22	49.84 ± 1.04	1.784	0.155
AC(cm)	68.00 ± 1.09	72.60 ± 0.94*	66.64 ± 1.17#	70.04 ± 1.31§	5.212	0.002
POI(L/cm)	0.29 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.27 ± 0.01#	0.29 ± 0.01	3.168	0.028

注: * 表示与 B + 组比较差异显著($P < 0.05$); # 表示与 B - 组比较差异显著($P < 0.05$); § 表示与 T + 组比较差异显著($P < 0.05$)。
Note: * Compared with B + group $P < 0.05$; # compared with B- group $P < 0.05$; § compared with T + group $P < 0.05$.

表 2 血脂检测结果(mmol/L)
Tab.2 Results of blood lipid (mmol/L)

	B +	B -	T +	T -	F	P
TC	1.52 ± 0.07	2.10 ± 0.11*	1.82 ± 0.06**	2.08 ± 0.07*§	11.982	0.000
HDL-C	0.68 ± 0.04	0.83 ± 0.05*	0.74 ± 0.03	0.82 ± 0.03*	2.979	0.035
LDL-C	0.84 ± 0.04	1.24 ± 0.08*	1.04 ± 0.05**	1.25 ± 0.07*§	10.569	0.000
TG	0.33 ± 0.02	0.44 ± 0.03*	0.37 ± 0.02	0.43 ± 0.03*	3.937	0.011

注: * 表示与 B + 组比较差异显著($P < 0.05$); # 表示与 B - 组比较差异显著($P < 0.05$); § 表示与 T + 组比较差异显著($P < 0.05$)。
Note: * Compared with B + group $P < 0.05$; # compared with B- group $P < 0.05$; § compared with T + group $P < 0.05$.

表 3 血糖、果糖胺、胰岛素和糖化血红蛋白检测结果
Tab.3 Results of GLU, FRA, Insulin and HbA1c

	B +	B -	T +	T -	F	P
GLU (mmol/L)	5.02 ± 0.26	5.26 ± 0.23	4.56 ± 0.46	4.10 ± 0.17**	2.900	0.039
FRA (μmol/ml)	263.00 ± 3.82	264.80 ± 7.47	269.64 ± 5.57	265.92 ± 5.05	0.248	0.863
Insulin (mIU/L)	68.35 ± 2.23	72.73 ± 2.66	69.88 ± 2.96	67.45 ± 3.14	0.698	0.555
HbA1c (nmol/L)	2080.70 ± 134.66	1852.20 ± 148.29	2267.70 ± 149.48	2130.80 ± 163.38	1.340	0.266

注: * 表示与 B + 组比较差异显著($P < 0.05$); # 表示与 B - 组比较差异显著($P < 0.05$)。
Note: * Compared with B + group $P < 0.05$; # compared with B- group $P < 0.05$.

表 4 实验小型猪自由基检测结果
Tab.4 Results of free radical

	B +	B -	T +	T -	F	P
MDA (nmol/ml)	9.21 ± 0.31	11.49 ± 0.62*	9.88 ± 0.33#	9.93 ± 0.60#	3.919	0.011
SOD (U/ml)	4.34 ± 0.33	4.68 ± 0.31	4.07 ± 0.31	3.82 ± 0.43	1.133	0.340
GSH-Px (U)	1100.70 ± 98.73	1273.00 ± 315.24	814.27 ± 60.95	951.49 ± 81.67	1.302	0.278

注: * 表示与 B + 组比较差异显著($P < 0.05$); # 表示与 B - 组比较差异显著($P < 0.05$)。
Note: * Compared with B + group $P < 0.05$; # compared with B- group $P < 0.05$.

血清 TC、HDL-C、LDL-C 和 TG 水平在巴马小型猪和西藏小型猪的雌性当中普遍高于雄性。曾报道哥廷根小型猪 TG、HDL-C 和 TC 水平在雌性中高于雄性^[9]。而人类男性的 TG 水平高于女性, HDL-C 水平低于女性, TC 水平无性别差异。

糖代谢方面研究显示, GLU 水平在巴马小型猪高于西藏小型猪, 并与雌性西藏小型猪的差异显著, 而 FRA 和 HbA1c 水平在西藏小型猪高于巴马小型猪, insulin 水平在雌性巴马小型猪和雄性西藏小型猪中分别高于雄性巴马小型猪和雌性西藏小型猪。GLU 一般表示机体即刻血糖水平, 而 FRA 和 HbA1c 分别表示近 3 周和 3 个月的血糖控制水平。因此, 巴马小型猪的空腹血糖高于西藏小型猪, 但其控制血糖能力优于西藏小型猪。

自由基方面研究显示, MDA 水平在雌性小型猪中高于雄性小型猪, 而且雌性巴马小型猪中显著高于雄性巴马小型猪和西藏小型猪, 而 SOD 和 GSH-Px 水平在巴马小型猪中高于西藏小型猪, 但差异不显著。结合小型猪体重、体尺分析, 可能由于雌性巴马小型猪相对肥胖而脂质过氧化产物多导致 MDA 水平相对高, 但通过 SOD 和 GSH-Px 水平分析巴马小型猪抗氧化能力优于西藏小型猪。

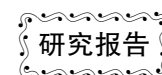
代谢综合征是一种临床症候群, 其中以中心性肥胖为基础^[3]。猪杂食性, 懒惰而不愿意运动, 易于肥胖, 与现代人类生活方式有诸多相似之处^[7]。小型猪作为新型实验动物, 在人类代谢综合征等疾病的研究领域具有重要潜在应用前景^[10]。本文通过对巴马小型猪和西藏小型猪体重、体尺、血脂、血糖和自由基水平等正常生理指标的综合分析, 巴马小型猪倾向于肥胖; 两种小型猪血脂雌性高于雄性; 巴马小型猪空腹血糖高于西藏小型猪, 但巴马小型猪的血糖控制能力优于西藏小型猪; 巴马小型猪抗氧化能力优于西藏小型猪。在代谢综合征相关研究中根据具体需求进行选择不同种、不

同性别的小型猪。本文所选动物均为正常动物, 其相关指标均在正常范围之内, 但各项指标在不同种和不同性别猪之间存在差异, 而且部分指标差异显著, 这对于代谢综合征相关研究中动物的选择具有重要参考意义。此外, 还需要加大样本量和选择不同年龄段动物, 制备代谢综合征相关小型猪模型来进一步选择, 并培育最适合作为代谢综合征模型的小型猪。

参考文献:

- [1] 龚凌霄. 青稞全谷物及其防治代谢综合征的作用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [2] 宋秀霞, 纪立农. 国际糖尿病联盟代谢综合征全球共识定义[J]. 中华糖尿病杂志, 2005, 13(3): 178-180.
- [3] Jaspinder Kaur. A comprehensive review on metabolic syndrome[J]. Cardiology Research and Practice, 2014; 1-21.
- [4] 于健, 叶瑶, 黄漓莉, 等. 高脂高糖饮食联合链脲佐菌素构建巴马小型猪 2 型糖尿病模型稳定性研究[J]. 山西医药杂志, 2014, 43(21): 2499-2501.
- [5] 戚文军. 西藏小型猪糖尿病模型的建立及胰岛细胞分离纯化的研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2013.
- [6] Sebert SP, Lecannu G, Kozlowski F, et al. Childhood obesity and insulin resistance in a Yucatan mini-piglet model: putative roles of IGF-1 and muscle PPARs in adipose tissue activity and development[J]. International journal of obesity, 2005, 29: 324-333.
- [7] 中华人民共和国国务院办公厅. 《中国居民营养与慢性病状况报告(2015)》发布. www.scio.gov.cn.
- [8] 任丽华. 西藏小型猪实验动物化的初步研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2006.
- [9] Berit Oestergaard C, Nanna G, Valeria G, et al. Gender-associated differences in metabolic syndrome-related parameters in Gottingen minipigs[J]. Comparative medicine, 2007, 57(5): 493-504.
- [10] 张杰. 猪是研究肥胖及代谢综合征的理想模型[J]. 养猪, 2014, (3): 65-69.

[修回日期]2016-02-23



长爪沙鼠原位肝移植模型的建立

楼琦¹, 卢领群¹, 周冰珞², 郭红刚¹, 李巍¹, 石巧娟¹, 杜江涛¹, 萨晓婴¹

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

2. 浙江大学医学院, 杭州 310053)

【摘要】 目的 建立长爪沙鼠原位肝移植模型的方法与技术。**方法** 用改良的双套管法行100对长爪沙鼠原位肝移植手术, 门静脉、肝下下腔静脉行套管吻合, 而肝上上腔静脉采用缝合法, 胆管内支架法完成胆道重建。**结果** 在手术成熟后, 供体手术时间为 34.56 ± 5.12 min, 修肝及安置套管时间为 15.43 ± 2.75 min, 受体手术时间为 58.37 ± 8.54 min, 其中无肝期为 23.66 ± 4.47 min。手术成功率为86.67% (术后存活6 h以上)。**结论** 改良的双套管法成功建立了长爪沙鼠肝移植模型, 通过手术技巧训练可提高手术成功率, 延长爪沙鼠存活时间。

【关键词】 长爪沙鼠; 肝移植; 模型; 动物

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 05-0053-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.005.008

Modified orthotopic liver transplantation in gerbils

LOU Qi¹, LU Ling-qun¹, ZHOU Bing-luo², GUO Hong-gang¹, LI Wei¹, SHI Qiao-juan¹, DU Jiang-tao¹, SA Xiao-ying¹

(1. Experimental Animal Center, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Zhejiang experimental animal and safety research key laboratory, Hangzhou 310013, China; 2. School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

【Abstract】 Objective To establish the orthotopic liver transplantation model in gerbils. **Methods** Orthotopic liver transplantation was performed in 200 gerbils with modified two-cuff techniques. The suprahepatic vena cave was anastomosed end to end using nylon suture thread, the portal vein and the infrahepatic vena were inosculated by cuff method, respectively. Biliary tract reconstruction was completed in bile duct stent law. **Result** After paratise, donor surgery time was 34.56 ± 5.12 min, liver repaired time was 15.43 ± 2.75 min, surgery receptor time was 58.37 ± 8.54 min, no liver time was the success rate (survived more than 6 hours after operation) was 23.66 ± 4.47 min. **Conclusion** Orthotopic liver transplantation with modified two-cuff techniques in gerbils is a certain feasible. Improving operative techniques is of great importance in increasing successful rate and prolonging the survival time of gerbils after surgery.

【Key words】 Gerbils; Liver transplantation; Models, animal

稳定、可靠的肝移植动物模型是临床肝移植和免疫耐受研究的基础。只有成熟稳定的动物模型作为技术平台, 器官移植和免疫耐受研究才能有质的飞跃^[1]。虽然大鼠肝移植模型是目前较为常用的动物模型, 但封闭群大鼠用于该模型的稳定性和重现性有待进一步提高, 虽然应用近交系大鼠造模

的稳定性有所提高, 但由于资源相对匮乏, 不易获取, 而且较为昂贵^[2-4]。因此, 进一步寻求稳定、易得的实验动物肝移植模型具有重要价值。

长爪沙鼠又称蒙古沙鼠 (Meriones Unguiculatus, Mongolian gerbil), 分类学上属于啮齿目、仓鼠科、沙鼠亚科、沙鼠属。近年来, 作为重

【基金项目】 国家自然科学基金(31301933); 浙江省科技计划项目(2013C37012, 2013C37013, 2014C27011)。

【作者简介】 楼琦(1982-), 男, 本科, 实验师, 专业: 实验动物, E-mail: liuqi@126.com。

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

要的实验动物资源,长爪沙鼠在国内的使用越来越多,其应用领域也不断扩大,我国已将长爪沙鼠的标准化及其动物模型开发纳入实验动物领域重点支持范畴^[5-6]。目前,国内外尚无有关长爪沙鼠应用于器官移植的报道,本文首次以长爪沙鼠作为供、受体,采用经典的 Kamada “双套管法”^[7]建立长爪沙鼠原位肝移植模型,探讨长爪沙鼠在器官移植中的应用前景,为长爪沙鼠的进一步开发应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

长爪沙鼠,雄性,体重 40 ~ 50 g,由浙江省实验动物中心提供【SCXK(浙) 2014-0001】,实验过程在屏障系统实验室中完成(空气洁净度 7 级,换气次数 15 ~ 20 次/h,温度 20 ~ 26℃,日温差 ≤ 3℃,相对湿度 40 ~ 70%)。动物使用许可证号【SYXK(浙) 2014-0008】。长爪沙鼠饲喂⁶⁰Co 辐射灭菌的营养配合饲料,饮用超滤无菌水,笼器具、垫料等均经 121℃ 高压灭菌。

1.2 实验器材

乙醚(杭州市化学试剂厂)、氯胺酮针(100 mg/2 mL,杭州市第一制药厂),肝素注射液(5000 U/2 mL,杭州市第一制药厂),显微手术器械(上海医药器械厂),缝合线(杭州华威医疗器械有限公司)均购自华东医药股份有限公司。超净工作台(苏州苏净化设备有限公司)。

1.3 原位肝移植方法与步骤

1.3.1 术前准备

供体和受体动物术前均禁食 24 h,自由饮水。供体鼠体重接近或略小于受体鼠。供体鼠采用 120 mg/kg 氯胺酮腹腔注射麻醉,受体采用小剂量氯胺酮(50 mg/kg)腹腔注射加乙醚吸入联合用药麻醉^[8]。手术在屏障系统实验室超净工作台内进行无菌操作。

1.3.2 血管套管和胆管支架的制备

胆管支架长 4.0 mm,外径 1.0 mm,由硬膜外导管制成,两端修成斜面。

门静脉、肝下下腔静脉套管由聚乙烯塑料管制成,包含 2.0 mm 的套管柄和套管体。套管体上刻有横纹,以方便结扎固定。门静脉套管内径为 1.5 mm,外径为 2.0 mm。肝下下腔静脉套管内径为 1.8 mm,外径为 2.0 mm。

1.3.3 供肝切取^[8-9]

肝脏暴露 长爪沙鼠备皮麻醉后仰卧位固定,消毒,腹部行大十字切口。止血钳夹住剑突向头侧牵引固定,充分暴露肝脏,以生理盐水纱布覆盖供肝。切断镰状韧带,以 8-0 缝合线结扎紧贴着肝上下腔静脉的左膈下静脉。

处理胆管与肝门 将肝脏翻向头侧,用棉签游离胃小弯背腹侧的乳头叶和尾状叶,暴露胆总管,在左右肝管汇合处下 1.5 mm 处剪一“V”形切口,插入胆管支架,5-0 缝合线结扎固定,远端离断胆总管。

肝周血管的处理 将肠管推向左侧,切断后腹膜与右下叶间的联系,从右肾静脉以上水平游离肝下下腔静脉,右肾动脉,以 8-0 缝合线结扎右肾静脉及右肾上腺静脉。

全血肝素化及肝灌注 如图 1 所示,暴露腹主动脉及其分支,从髂静脉处穿刺,注射含 100U 肝素的生理盐水 2 mL,使全血肝素化。以头皮针穿刺肾下端的腹主动脉,并快速剪破左侧膈肌进胸,阻断胸主动脉,同时剪开胸段下腔静脉,让灌注液流出。供体鼠经腹主动脉用 0 ~ 4℃ 20 mL 生理盐水(含 25 U/mL 肝素)灌注,速度为 2.5 mL/min,肝脏呈土黄色时即表示灌注良好。钝性分离肝动脉,门静脉及其分支,用 8-0 缝合线结扎幽门静脉,远端离断,在幽门静脉结扎线以下 1.0 mm 处切断门静脉,切断左肾静脉水平的肝下下腔静脉、右肾上腺静脉及右肾静脉。紧贴膈肌离断肝上下腔静脉,取出供肝,并置于 0 ~ 4℃ 的生理盐水中。



图 1 供体肝脏灌注

Fig. 1 The donor liver perfusion

1.3.4 修肝及套管的安置

修肝及套管的安置均在 0 ~ 4℃ 的生理盐水冰浴中进行(图 2)。去除门静脉及肝下下腔静脉周围

的脂肪组织,将自制套管管柄朝下,用显微直镊将肝下腔静脉从套管中拉出(图 3),并将血管壁外翻套于套管上,用 5-0 的缝合线结扎固定。同法安装门静脉套管。在肝上下腔静脉两角用 8-0 带针缝合线各吊一针,作为两点式缝合的支持线,完毕后置于 4℃ 冰箱保存。



图 2 供体肝脏修整
Fig. 2 The donor liver adjustment



图 3 供体肝脏套管插入与固定
Fig. 3 The placement of cuffs and bile duct stent

1.3.5 受体肝切除^[8-9]

与供肝同法暴露并游离肝脏,区别在于开腹切口略小,游离肝门内结构时应尽量靠近肝脏,受体内留有足够长度的胆道与血管,分离肝下腔静脉时则在右肾静脉上缘水平。具体如下:如图 4 所示,腹部正中切口,用自制拉钩暴露肝脏,向左侧外移肠道并用生理盐水纱布覆盖。离断镰状韧带,缝扎左膈下静脉,游离左三角韧带,结扎离断食管与左肝之间的交通支。同供肝方法暴露胆总管并结扎离断,以 8-0 缝合线结扎肝动脉。游离右肾静脉平面之上的肝下腔静脉,远离下腔静脉结扎右肾上腺静脉丛。离断右三角韧带,游离肝上下腔静脉,并在其后方放置一细橡皮条以备牵引。用动脉夹

先后阻断右肾静脉水平以上的肝下腔静脉以及幽门静脉以上的门静脉。于门静脉分叉处注入 1 mL 生理盐水将肝内血液驱入长爪沙鼠体内。牵引肝上预留的橡皮条,用动脉夹阻断肝上下腔静脉,切断近肝的肝上下腔静脉、门静脉和肝下腔静脉,移出原肝(图 5),密切注意后腹膜有无出血点。



图 4 受体肝脏切除
Fig. 4 The hepatectomy of receptor



图 5 受体进入无肝期
Fig. 5 Receptor in no liver time

1.3.6 供肝的植入

从冰水浴中取出供肝,置入上腹部,调整供肝和受体,使肝上下腔静脉处于最佳吻合位置。利用供肝肝上下腔静脉的 2 根预埋缝合线,从左到右连续缝合血管后壁再到前壁,结束吻合前用生理盐水冲洗管腔以排出气泡。肝上下腔静脉吻合完成后,将肝向头侧翻起,将门静脉动脉夹下移至脾静脉水平处,用生理盐水冲净血管腔内的血块和气泡,夹住供肝门静脉套管柄,将门静脉套管套入受体门静脉内,以 5-0 缝合线结扎固定。同法连接肝下腔静脉。开放受体门静脉及肝上下腔静脉,结束无肝期(图 6)。轻拉受体胆总管,在近结扎处前剪一 V 形切口,将供肝胆总管支架插入受体胆总管

内,5-0 缝合线结扎固定。将肠道放回原位,逐层关腹。术后保温,单笼饲养,待恢复正常饮食方可合群。



图 6 受体植入供肝

Fig. 6 The implantation of donor liver

2 结果

预实验期共行长爪沙鼠原位肝移植 40 例,术后存活 10 例,存活时间最长 13 h,最短 45 min,无 1 例超过 24 h。随着操作技术的成熟,在此基础上正式实验,共行长爪沙鼠原位肝移植 60 例。手术成功 52 例。供体手术时间为 34.56 ± 5.12 min,修肝及安置套管时间为 15.43 ± 2.75 min,受体手术时间为 58.37 ± 8.54 min,其中无肝期为 23.66 ± 4.47 min。术后存活时间 6 h ~ 12 h 为 4 例,12 h ~ 24 h 为 5 例,24 h ~ 2 d 为 8 例,2 d ~ 3 d 为 20 例,4 d 以上为 15 例,最长存活时间为 3 个月。

手术中死亡原因主要为术中出血,血管吻合失败,无肝期过长等操作技术原因。术后死亡原因主要是血栓形成,术后出血,移植肝功能不良或失功,胆漏或胆道梗阻,术后感染。

3 讨论

3.1 长爪沙鼠原位肝移植模型的意义

长爪沙鼠由于其独特的生理、解剖学和行为学特征,成为一种正在进行开发并具有广阔应用前景的多功能实验动物^[5]。本课题组前期研究表明长爪沙鼠脂质代谢与人类相似,连续 16 周高脂饲料喂养,长爪沙鼠可发生脂肪肝系列病变最终导致肝纤维化的发生,提示长爪沙鼠在肝硬化研究具有潜在价值^[10-13],该结果亦得到国内外多篇文献的证实^[14-16]。本课题组近期通过外科手术联合高脂饮食的方法,初步建立了符合终末期肝硬化特征(肝

硬化,门静脉高压,腹水等)的长爪沙鼠肝硬化模型,而肝移植是临床上治疗终末期肝硬化的根本解决办法,因此,长爪沙鼠原位肝移植模型的建立将为终末期肝硬化疾病的肝移植治疗与观察提供动物模型及技术支持。本课题组前期研究发现长爪沙鼠的天然免疫细胞功能和获得性免疫系统活化程度均显著低于大、小鼠^[17],而本文所建立的长爪沙鼠原位肝移植模型将有利于观察长爪沙鼠肝移植后的免疫反应,为长爪沙鼠在器官移植中免疫学研究奠定基础。

3.2 长爪沙鼠原位肝移植术式的选择及改进

小动物肝移植模型目前最常用的手术方式有单套管法(即门静脉行套管吻合),双套管法(门静脉、肝下下腔静脉行套管吻合和肝上上腔静脉采用缝合法),三套管法(门静脉、肝下下腔静脉、肝上上腔静脉均用套管吻合法)^[2,18-19]。单套管法主要缺点是无肝期及受体总体手术时间相对较长,目前公认这两个时间的长短是术后存活情况的关键,缩短手术期及无肝期可减轻受体血流动力学、生化等方面的病理生理改变,减轻供肝的缺血再灌注损伤。因此,目前已经较少采用该术式。而三套管法虽然能有效减少无肝期(较双套管法平均缩短 5 ~ 6 min),但在该法中,肝上上腔静脉较容易发生套管扭曲、脱落及血管通而不畅的并发症,上述结论在我课题组针对日常工作中近 200 例大鼠原位肝移植模型中亦得到证实^[8]。本研究在参考 Kamada 等“双套管”吻合血管的基础上进行了改良,施行长爪沙鼠原位肝移植手术。改进如下:

(1)为减少长爪沙鼠在手术中的死亡率,麻醉深度(尤其是受体)的掌握是关键。常用的乙醚开放麻醉具有简单易操作的优点,但具有诱导期长,动物反抗激烈,不易固定的缺点^[20]。本文中受体采用氯胺酮(50 mg/kg,腹腔注射)与乙醚(吸入)联合用药的方法,可有效避免上述缺点。术中偶尔会出现麻醉过深可导致呼吸抑制,或阻断肝上下腔静脉时,钳夹膈肌过多或下拉膈肌过猛,可造成呼吸骤停,此时采用 10 mL 注射筒联合胸腔按压进行类似人工呼吸的紧急抢救,效果理想。

(2)套管/支架的选择应视动物大小、血管/胆管粗细而异。总体原则是套管/支架在有一定硬度的条件下越薄越好,套管的内径与血管外径接近,过细或过粗都会发生回流不畅,静脉腔张开不全,甚至发生套管扭转、脱落。为方便结扎固定,需要

加刻横槽。我们选用硬膜外导管和聚乙烯管分别作为套管和支架的材料,在加热后拉伸出不同的直径。

(3)在血管的吻合/缝合过程中,必须要用生理盐水冲洗管腔,可以防止血管壁粘连引起的血管狭窄,并用以排出气泡,避免由于空气栓塞导致的肝叶坏死,肝脓肿。在吻合胆管时亦应冲洗管腔,可减少术后胆道梗阻的发生。在缝合/吻合过程中,生理盐水的冲洗,还可使术野清晰,提高缝合/吻合的速度与质量。

(4)在肝移植术中,由于感染引起的肾功能、呼吸功能衰竭亦是术后死亡的主要原因。因此我们在术中十分注重无菌操作。首先,手术器械、棉签、纱布、手术衣等均经过高压灭菌。不可高压的物品如套管、胆管支架等均用戊二醛浸泡消毒;冰块亦用无菌手术巾包裹。其次手术在屏障系统实验室的超净工作台中完成。超净工作台按细胞无菌培养的有关规范进行环境控制。整个手术实验室亦定期用万洁进行喷雾消毒并擦拭天花板与墙面,术前用紫外灯照射。以上措施可有效减少感染的发生。

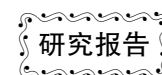
(5)长爪沙鼠的肝脏极为娇嫩,在供肝的获取过程中的任何接触均可造成局部微循环障碍,激活 Kuffer 细胞,释放大量的 ROS 及炎症因子,最终加重肝脏的缺血再灌注损伤^[21-22]。因此笔者在手术时动作轻柔,对供肝的保护始终放在重要位置。

总之,本文初步建立了长爪沙鼠原位肝移植模型。长爪沙鼠相对于大鼠要小的多,因而操作更为困难,该模型要求术者具有良好的显微外科操作技术,难度较大,初试者不易成功。本模型虽然术后长期存活问题还需进一步研究,操作方法有待进一步改进,但实验结果表明以长爪沙鼠作为实验动物,建立原位肝移植模型是具有可行性的。

参考文献:

- [1] Jacob M, Lewsey JD, Sharpin C, *et al.* Systematic review and validation of prognostic models in liver transplantation. *Liver Transpl* [J]. 2005, 11(7):814-25.
- [2] Ishii E, Shimizu A, Takahashi M, *et al.* Surgical technique of orthotopic liver transplantation in rats: the Kamada technique and a new splint technique for hepatic artery reconstruction [J]. *J Nippon Med Sch.* 2013;80(1):4-15.
- [3] Lu J, Wang S, Wen P, *et al.* A novel model for orthotopic liver transplantation in rats using hepatic rearterialization and biliary extradrainage system [J]. *J Surg Res.* 2014, 187(2):690-8.
- [4] 周天保,陈规划,杨扬,等. 大鼠原位肝移植急性排斥反应模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(2):120-124
- [5] 李长龙,杜小燕,陈振文,等. 长爪沙鼠资源开发利用进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(6):106-109, 113.
- [6] 卢领群,宋晓明,戴方伟,等. 长爪沙鼠的生物净化技术 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(4):62-66.
- [7] Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage [J]. *Transplantation.* 1979, 28(1):47-50.
- [8] 金晓音,楼琦,萨晓婴,等. 大鼠原位肝移植模型建立方法的若干问题探讨 [J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(12):760-762.
- [9] 陈细桃,马毅,何晓顺,等. 大鼠原位肝移植的围手术期处理 [J]. *中国比较医学杂志*, 2003, 13(5):307-309.
- [10] 李巍,石巧娟,郭红刚,等. 动态分析沙鼠非酒精性脂肪肝病形成及生化影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(8):44-48, 52.
- [11] 李巍,石巧娟,郭红刚,等. 三种啮齿类动物非酒精性脂肪肝病形成及机制探讨 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, 22(1):76-80.
- [12] Ying HZ, Liu YH, Yu B, *et al.* Dietary quercetin ameliorates nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fat diet in gerbils [J]. *Food Chem Toxicol.* 2013, 52:53-60.
- [13] 刘月环,毛栋森,吴旧生,等. 高脂血症长爪沙鼠模型的转录组检测和代谢性炎症通路的初步研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(4):51-56.
- [14] 钟民涛,黄敏,王钜,等. 长爪沙鼠脂代谢的研究进展 [J]. *实验动物科学与管理*, 2006, 23(1):42-46.
- [15] 俞建顺,严茂祥,王德军,等. 高脂饮食对长爪沙鼠生化及主要脏器组织病理学的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, (4):38-43, 47.
- [16] 钟民涛,黄敏,卢静,等. 长爪沙鼠速发型高脂血症模型的初步建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2006, 14(3):217-221.
- [17] 肖丽,戴方伟,宋晓明,等. 长爪沙鼠在病原感染研究中的应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(7):61-67.
- [18] Nagai K, Yagi S, Uemoto S, *et al.* Surgical procedures for a rat model of partial orthotopic liver transplantation with hepatic arterial reconstruction [J]. *J Vis Exp.* 2013, 7(73):e4376.
- [19] 康俊升,王霞. 三种大鼠原位肝移植术式的比较研究 [J]. *中国实验动物学杂志*, 2000, 10(3):163-166.
- [20] 陈辉,姜骊,王雁,等. 三种不同麻醉药对 SD 大鼠肝移植手术麻醉效果的比较和应用 [J]. *实验动物科学*, 2009, 26(4):57-59, 62.
- [21] Liu C, Tsai HL, Chin T, *et al.* Clamping the supra-celiac aorta can effectively increase the success rate of orthotopic rat liver transplantation by increasing the tolerable time of the anhepatic phase [J]. *J Surg Res.* 2006, 136(1):116-9.
- [22] Oldani G, Maestri M, Gaspari A, *et al.* A novel technique for rat liver transplantation using Quick Linker system; a preliminary result [J]. *J Surg Res.* 2008, 149(2):303-9.

[修回日期]2016-02-02



蜂巢结合针刺对变应性鼻炎模型大鼠的治疗作用研究

秦良卿¹, 马玉奎², 薛云², 刘兆华³

(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; 3. 山东大学药学院, 济南 250012)

【摘要】 目的 探讨蜂巢结合针刺对 AR 大鼠的治疗作用及其机制。**方法** 采用卵白蛋白制备变应性鼻炎 (AR) 大鼠模型, 给予蜂巢结合针刺治疗 10d 后, 以行为学观察评分、血清中组胺、IgE、IFN- γ 、IL-4 含量、鼻腔分泌物量、鼻粘膜中嗜酸细胞和肥大细胞数以及胸腺和脾脏系数为考察指标, 同时采用丙酸氟替卡松鼻喷雾剂为阳性对照, 全面考察蜂巢结合针刺对 AR 大鼠的治疗作用及其机制。**结果** 与模型组比较, 蜂巢结合针刺治疗后大鼠行为学评分降低; 血清中组胺、IgE、IL-4 含量、鼻腔分泌物量、鼻粘膜中嗜酸细胞和肥大细胞数量显著减少; 血清中 IFN- γ 含量增多; 胸腺系数升高, 脾脏系数明显降低。**结论** 蜂巢结合针刺对 AR 模型大鼠具有明显的治疗作用。

【关键词】 针刺; 蜂巢; 变应性鼻炎; 大鼠

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 05-0058-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 005. 009

Effects of acupuncture combined with honeycomb on allergic rhinitis rat model

QIN Liang-qing¹, MA Yu-kui², XUE Yun², LIU Zhao-hua³

(1. People's Hospital of Linqu County, Shandong Linqu 262600, China; 2. Shandong Pharmaceutical Academy, Jinan 250100, China; 3. School of pharmaceutical sciences Shandong university, Jinan 250012, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects and mechanism of acupuncture combined with honeycomb on allergic rhinitis (AR) rat model. **Methods** AR rat model was induced by ovalbumin (OVA). AR rats were treated with acupuncture combined with honeycomb for ten days. Fluticasone propionate nasal spray was selected as positive control in the text. Behavior analysis were observed and the content of histamine, IgE, IFN- γ and IL-4 in serum, the weight of nasal drainage and the number of eosinophils and mast cells, the index of spleen and thymus were detected to evaluate the effects of acupuncture combined with honeycomb on AR rats. **Results** Compared with model group, acupuncture combined with honeycomb treatment groups displayed markedly lower behavior scores, histamine, IgE and IFN- γ in serum, the weight of nasal drainage and the number of eosinophils and mast cells, the index of spleen as well as higher IL-4 in serum and index of thymus. **Conclusion** Acupuncture combined with honeycomb displayed significant effects on AR rat model.

【Key words】 Acupuncture; Honeycomb; Allergic rhinitis; Rat

变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 即过敏性鼻炎, 是耳鼻喉科常见病和多发病, 属于 IgE 介导的 I 型变态反应性疾病, 临床的主要表现为阵发性喷

嚏、鼻塞、鼻痒、分泌大量清水样鼻涕等^[1]。长期以来, 医学界对变应性鼻炎的临床治疗一直停留在快速解除症状上, 使用 H₁ 受体拮抗剂或糖皮质激素

【基金项目】 山东省自然科学基金项目 (2012HM056)。

【作者简介】 秦良卿 (1973 -), 男, 主治医师, 本科, 研究方向: 耳鼻喉疾病研究。

【通讯作者】 马玉奎 (1975 -), 男, 副主任药师, 博士, 研究方向: 新药药理毒理评价。E-mail: yukuima@sina.com。

等抗过敏药物,但这些治疗措施一方面只能暂时性缓解鼻炎症状,另一方面也存在诸多不良反应。蜂巢即蜜蜂房或蜜蜂巢脾,具有抗炎、免疫调节、抑制细菌、镇痛和抗肿瘤等作用。我国民间积累了蜂巢治疗鼻炎的丰富经验,可以有效地预防和缓解变应性鼻炎的症状^[2]。同样针灸作为一种中医治疗方法已经在变应性鼻炎中得到应用,并取得了一定的疗效^[3]。但蜂巢或针灸单用疗效均有限,且以往的研究多为临床的总结,缺乏实验观察及机制研究。本文采用变应性大鼠鼻炎模型,研究了蜂巢结合针刺的治疗作用,并初步探讨了其作用机制,为临床推广应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物及饲养环境 SPF 级 SD 大鼠 40 只,雌雄各半,体重 180 ~ 220 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2012-0001】。饲养于 SPF 级动物房,相对湿度 40% ~ 70%,室温 20 ~ 26℃。实验动物使用许可证号【SYXK(鲁)2014-0008】。

1.1.2 药品与试剂 蜂巢(济南养蜂堂蜂产品有限公司提供, -18℃ 冷冻后粉碎,过 20 目筛,加入 6 倍体积水后 98℃ 水浴三次,每次 1 h,过滤除蜡,浓缩备用);丙酸氟替卡松鼻喷雾剂(葛兰素史克制药集团提供,批号: H20140117);大鼠组胺、IgE、IL-4、IFN- γ 试剂盒(上海森雄科技实业有限公司提供);卵白蛋白(北京索莱宝有限公司提供,批号: 326A052);氢氧化铝(国药集团化学试剂有限公司提供,批号: 20120907)。

1.1.3 仪器 HC-3018R 型高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司制造);Spectra Max I3 多功能读板机(美国 MD 公司制造);ST-96W 全自动洗板机(北京誉朗诺科技有限公司制造);微量加样器(美国艾本德公司制造);一次性针灸针(环球牌, 0.18 mm $\times$ 13 mm)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠变应性鼻炎模型的建立^[4]

每只大鼠腹腔注射抗原佐剂混悬液 1 mL(含卵白蛋白 0.3 mg, 氢氧化铝 30 mg)进行致敏,隔日 1 次,共 7 次。末次致敏后第 2 天进行激发,每只大鼠给予 5% 卵白蛋白生理盐水溶液滴鼻(50 μ L/侧),同时超声雾化吸入 1% 卵白蛋白溶液 5 min,每天 1

次,连续 7 d。正常组大鼠以相同的操作方法于相同的时间给予等容积的生理盐水。

1.2.2 行为学观察评分^[5]

末次激发后采用症状评分判断大鼠是否造模成功,给药结束评分判断干预效果。记分方法为喷嚏:1 ~ 3 个为 1 分,4 ~ 10 个为 2 分, $\geq$ 11 个为 3 分;鼻痒:轻度瘙痒 1 ~ 2 次为 1 分,剧烈瘙痒抓鼻四周为 2 分;流涕:流至鼻孔为 1 分,超出前鼻孔为 2 分,涕流满面为 3 分。叠加总分 5 分以上为造模成功。

1.2.3 动物分组及给药

选取造模成功大鼠 30 只,按行为学观察评分均衡地分为 3 组,分别为模型组、丙酸氟替卡松鼻喷雾剂阳性对照组和蜂巢结合针刺组。阳性对照组给予丙酸氟替卡松鼻喷雾剂,每只鼻孔每次喷入约 50 μ g,每日 1 次,连续 10 d;蜂巢结合针刺组每日灌胃给予蜂巢水提溶液 1 mL/100g,每次灌胃后针刺迎香、肺俞、合谷和足三里,针刺深度约为 1 cm,针柄接脉冲电疗仪,采用疏密波,频率 2 ~ 100 Hz,电流强度 1 ~ 2 mA,每次 10 min,每日 1 次,连续 10 d^[6]。另取 10 只正常大鼠为正常组,正常组和模型组不进行任何干预。

1.2.4 大鼠血清中组胺、IgE、IFN- γ 、IL-4 含量测定

实验结束后腹主动脉采血,分离血清,按照试剂盒说明应用双抗体夹心法(ELISA 法)测定标本中组胺、IgE、IFN- γ 、IL-4 含量。用纯化的大鼠相应抗体包被微孔板,制成固相抗体,向包被单抗的微孔中依次加组胺、IgE、IFN- γ 、IL-4,再与 HRP 标记的相应抗体结合,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,洗涤后加底物 TMB 显色。HRP 酶可催化 TMB 转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色,样品中的待测成分含量决定了颜色的深浅。用酶标仪在 450 nm 波长下测定样本的 OD 值,通过标准曲线计算组胺、IgE、IFN- γ 、IL-4 的浓度。

1.2.5 大鼠鼻腔分泌物、嗜酸细胞及肥大细胞数测定

将滤纸剪成 2 cm $\times$ 0.2 cm 的形状,末次给药后反复吸取鼻腔内液体,采用减重法记录鼻腔分泌物重量。将大鼠 1% 戊巴比妥钠麻醉后采血测试 1.2.4 项下指标,处死后沿鼻中线剪开鼻腔,暴露鼻中隔及两侧鼻腔,将鼻中隔中段剪下,剥离双侧粘膜固定于甲醛溶液中。一侧 HE 染色后在高倍光学显微镜下计算任意 10 个视野中嗜酸细胞(EOS)数;另一侧甲苯胺蓝染色,同法计数肥大细胞数。

1.2.6 大鼠胸腺和脾脏系数测定

实验结束后取大鼠胸腺和脾脏称重,计算脏器系数(脏器系数 = 脏器重量/体重 $\times 100$,单位为 g/100 g 体重)。

1.2.7 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件,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 蜂巢结合针刺对 AR 大鼠行为学影响

末次激发后,30 只造模大鼠症状评分均大于 5 分,说明造模成功。与模型组比较,给予蜂巢结合针刺后大鼠的行为学评分明显减轻,与模型组比较有显著性差异($P < 0.01$),丙酸氟替卡松鼻喷雾剂组大鼠行为学评分亦有明显减轻,与蜂巢结合针刺组比较无显著性差异($P > 0.05$),说明蜂巢结合针刺疗效与丙酸氟替卡松鼻喷雾剂相当(图 1)。

2.2 蜂巢结合针刺对 AR 大鼠血清中组胺、IgE、IFN- γ 、IL-4 含量的影响

与模型组比较,给予蜂巢结合针刺或丙酸氟替卡松鼻喷雾剂后大鼠血清中组胺、IgE 和 IL-4 含量明显减少,IFN- γ 含量明显增多,与模型组比较均有显著性差异($P < 0.01$);蜂巢结合针刺组与丙酸氟

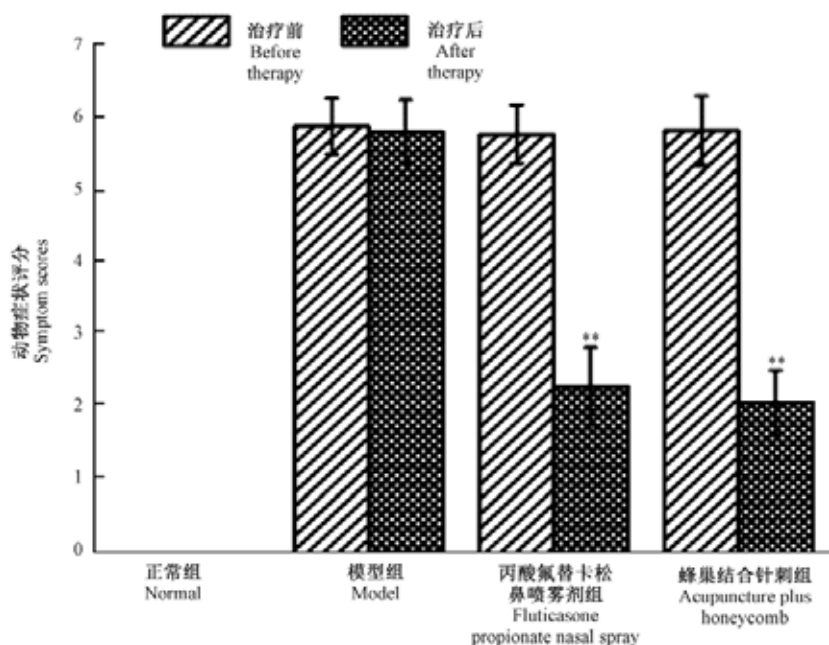
替卡松鼻喷雾剂组比较,以上指标无显著性差异($P > 0.05$)。以上结果说明蜂巢结合针刺和丙酸氟替卡松鼻喷雾剂对变应性鼻炎均有较好的治疗效果,两者效果相当(表 2)。

2.3 蜂巢结合针刺对 AR 大鼠鼻腔分泌物、嗜酸细胞及肥大细胞数的影响

与正常组比较,模型组大鼠鼻腔分泌物和鼻粘膜中嗜酸细胞及肥大细胞数显著增多($P < 0.01$)。与模型组比较,给予蜂巢结合针刺后大鼠鼻腔分泌物和鼻粘膜中嗜酸细胞及肥大细胞数均明显减少($P < 0.01$);丙酸氟替卡松鼻喷雾剂组大鼠以上指标亦显著减少($P < 0.01$),但与蜂巢结合针刺组比较无显著性差异($P > 0.05$),说明蜂巢结合针刺疗效与丙酸氟替卡松鼻喷雾剂相当(图 3)。

2.4 蜂巢结合针刺对 AR 大鼠胸腺和脾脏系数的影响

与正常组比较,模型组大鼠胸腺系数明显降低,而脾脏系数明显升高($P < 0.05$),提示卵白蛋白致敏可降低大鼠胸腺系数和升高脾脏系数;与模型组比较,给予蜂巢结合针刺后大鼠胸腺系数明显升高,脾脏系数明显降低($P < 0.05$);其升高胸腺系数和降低脾脏系数程度与丙酸氟替卡松鼻喷雾剂组基本一致,无统计学差异($P > 0.05$)(图 4)。

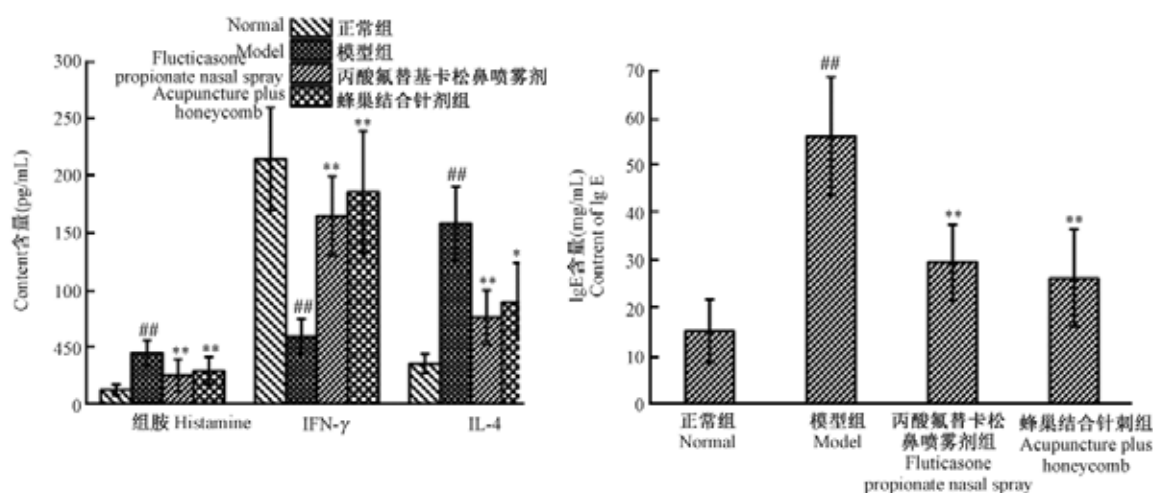


注: ** $P < 0.01$, vs 模型组。

图 1 蜂巢结合针刺对 AR 大鼠行为学的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note: ** $P < 0.01$, vs model group.

Fig. 1 The effects of acupuncture combined with honeycomb on behavior of AR rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

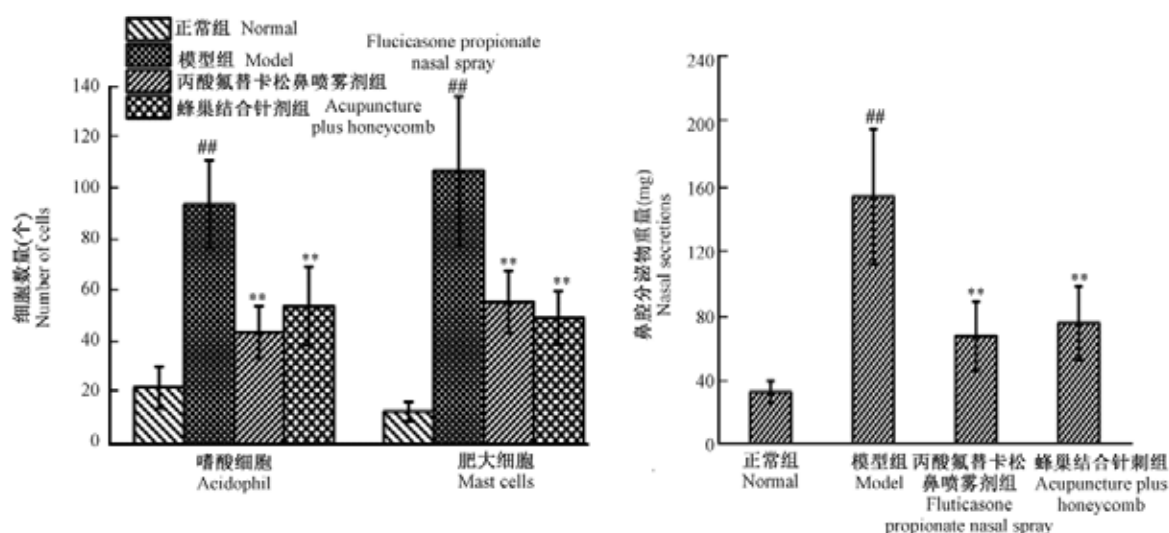


注: ** $P < 0.01$, vs 模型组; ## $P < 0.01$, vs 正常组。

图2 蜂巢结合针刺对 AR 大鼠血清中组胺、IgE、IFN- γ 、IL-4 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note: ** $P < 0.01$, vs model group; ## $P < 0.01$, vs normal group.

Fig.2 The effects of acupuncture combined with honeycomb on the content of histamine, IgE, IFN- γ and IL-4 in serum of AR rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)



注: ** $P < 0.01$, vs 模型组; ## $P < 0.01$, vs 正常组。

图3 蜂巢结合针刺对 AR 大鼠鼻腔分泌物、嗜酸细胞及肥大细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

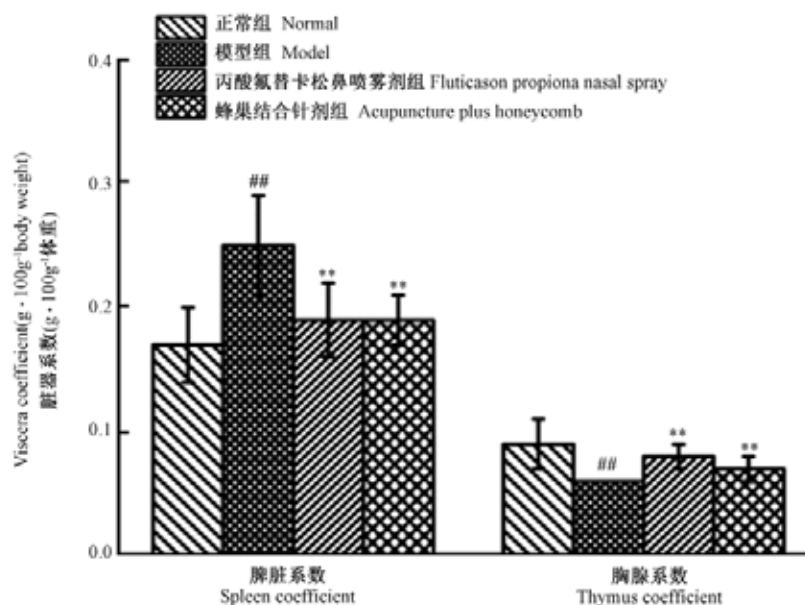
Note: ** $P < 0.01$, vs model group; ## $P < 0.01$, vs normal group.

Fig.3 The effects of acupuncture combined with honeycomb on the weight of nasal secretions and the number of acidophils and mast cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3 讨论

变应性鼻炎是以鼻粘膜变应性验证为主要特征,是由多种免疫活性细胞和多种细胞因子共同参与的 IgE 介导的 I 型超敏反应性疾病。在其发病过程中, T 淋巴细胞、嗜酸性粒细胞和肥大细胞作用最为明显。从免疫学的角度看,体内外环境因素作用于机体导致 Th1 和 Th2 细胞因子免疫反应失衡是引起变应性鼻炎发病的关键因素。Th1 细胞主要分泌

IFN- γ , IFN- γ 通过抑制嗜酸性细胞在气道上的浸润在 AR 中起到负性调节作用^[7]。Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13 和 IL-15 等细胞因子。其中 IL-4 是最重要的特征性细胞因子,可以刺激 B 细胞转化为浆细胞并合成 IgE 抗体, IgE 抗体可特异性与肥大细胞交联,引起肥大细胞脱颗粒,释放组胺等炎性介质,同时大量的嗜酸性粒细胞浸润鼻粘膜,从而引起阵发性喷嚏、鼻塞、鼻痒、分泌大量清水样鼻涕等临床症状^[8]。



注: * $P < 0.05$, vs 模型组; # $P < 0.05$, vs 正常组。

图4 蜂巢结合针刺对 AR 大鼠胸腺和脾脏系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note: * $P < 0.05$, vs model group; # $P < 0.05$, vs normal group.

Fig. 4 The effects of acupuncture combined with honeycomb on the index of spleen and thymus of AR rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

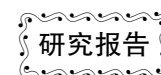
对于过敏性鼻炎的治疗主要以抗组胺药、糖皮质激素、过敏反应介质阻断剂、白三烯受体拮抗剂和免疫调节剂为主,这些药物能够快速缓解 AR 症状,但这些药物尤其是糖皮质激素类具有严重的不良反应,对于化药有禁忌症的患者或慢性期需要长久性治疗的患者,化药并不合适。而传统医学和中医药却可以弥补化药的不足,对于改善过敏体质防止复发具有重要意义。已有研究表明^[2,6],针刺和蜂巢治疗 AR 均具有一定的效果,但两者单用疗效有限,短时间内改善 AR 的疗效不如化学药物,但两者均没有任何不良反应。本文尝试将蜂巢和针刺结合起来,用于治疗 AR,观察是否能起到更好的疗效,是否能够替代化药用于 AR。本实验采用了卵白蛋白制备 AR 大鼠模型,给予蜂巢结合针刺治疗 10 d 后,以行为学观察评分、血清中组胺、IgE、IFN- γ 、IL-4 含量、鼻腔分泌物量、鼻粘膜中嗜酸细胞和肥大细胞数以及胸腺和脾脏系数为考察指标,同时采用丙酸氟替卡松鼻喷雾剂为阳性对照,全面考察蜂巢结合针刺对 AR 大鼠的治疗作用及其机制。实验结果表明,与模型组比较,蜂巢结合针刺治疗后大鼠行为学评分降低;血清中组胺、IgE、IL-4 含量、鼻腔分泌物量、鼻粘膜中嗜酸细胞和肥大细胞数量显著减少;血清中 IFN- γ 含量增多;胸腺系数升高,脾脏系数明显降低。本实验结果充分证明,蜂巢结

合针刺对 AR 具有明显的疗效,其改善程度与丙酸氟替卡松鼻喷雾剂基本一致,临床上完全可以替代糖皮质激素类药物用于 AR 的治疗。

参考文献:

- [1] Zheng T, Yu J, Oh MH, *et al.* The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma[J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2011, 3 (2): 67 - 73.
- [2] 罗岳雄, 赵红霞, 张学锋, 等. 蜂巢提取物改善过敏性鼻炎患者生活质量的研究[J]. *中国蜂业*, 2014, 65(7): 49 - 51.
- [3] 陈益丹, 金肖青, 俞迈红, 等. 针刺治疗中重度变应性鼻炎疗效观察[J]. *中国针灸*, 2015, 35(4): 339 - 341.
- [4] 吴春晓, 陈莹, 陈静, 等. 针刺对变应性鼻炎模型大鼠的治疗作用及其机理研究[J]. *江苏中医药*, 2013, 45 (12): 69 - 71.
- [5] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会, 中华医学会耳鼻咽喉科分会. 变应性鼻炎的诊疗原则和推荐方案(2004 年兰州). *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*[J]. 2005, 40(3): 166.
- [6] 赵义造, 黄益灯, 黄加云, 等. 电针对变应性鼻炎大鼠模型 IL-4 及 IFN- γ 表达的影响[J]. *浙江中医杂志*, 2010, 45 (12): 916 - 918.
- [7] 潘刚强, 袁岳沙, 陈杰, 等. Th1/Th2 细胞因子在过敏性鼻炎患者表达水平研究[J]. *检验医学与临床*, 2010, 7(22): 2472 - 2473.
- [8] Diamant Z, Boot JD, Mantzouranis E, *et al.* Biomarkers in asthma and allergic rhinitis[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2011, 23 (60): 468 - 481.

[修回日期]2016-02-01



糖尿病 ZDF 大鼠早期微血管并发症的 生化指标及病理组织学变化

陈小真,戎亦骊,马全鑫,黄俊杰,朱科燕,陈 诚,施佳君,李园园,陈民利

(浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究中心,杭州 310053)

【摘要】 目的 观察自发性 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM) ZDF 大鼠早期微血管并发症的生化指标及病理变化。**方法** 取 6 只 7~8 周龄的雄性 ZDF 大鼠适应性饲养 3 d 后,开始饲喂 Purina#5008 饲料,另取 8 只同周龄的雄性 ZL 大鼠为正常对照组,饲喂普通饲料。在 12、14、16 周龄时检测血糖 (GLU)、血清胆固醇 (CHOL)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL-C)、低密度脂蛋白 (LDL-C)、超敏 C 反应蛋白 (hsCRP)、糖化血红蛋白 (HbA1c),16 周龄时处死,并对眼球、肾、心、脑组织进行病理学检查。**结果** ZDF 大鼠 GLU、CHOL、TG、HDL-C、LDL-C、hsCRP 水平逐渐升高。16 周龄时,ZDF 大鼠 RBP、mALB、TRF 含量显著高于 ZL 大鼠 ($P < 0.01$)。肾小球、视网膜、心肌、脑部出现不同程度的微血管病变,肾小球部分血管基膜增厚,视网膜内皮细胞增多,血管壁增厚,心脏出现少量心肌纤维化,海马区神经元异常。**结论** ZDF 大鼠在 16 周龄时出现 T2DM 早期微血管并发症,其中 T2DM 早期肾病、视网膜病变、心肌病变较为突出,脑神经元轻微病变。

【关键词】 微血管;2 型糖尿病;病理;ZDF 大鼠

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 05-0063-08

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 005. 010

Biochemical indicators and pathological changes of early microvascular complications in spontaneous type 2 diabetes mellitus (T2DM) ZDF rats

CHEN Xiao-zhen, RONG Yi-li, MA Quan-xin, HUANG Jun-jie,

ZHU Ke-yan, CHEN cheng, SHI Jia-jun, LI Yuan-yuan, CHEN Min-li

(Laboratory Animal Research Center Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Objective To investigate the biochemical indicators and pathological changes of early microvascular complications in spontaneous type 2 diabetes (T2DM) ZDF rats. **Methods** Six male ZDF rats aged around 7-8 weeks were allowed to acclimate for 3 days after feeding Purina#5008, eight male ZL rats at the same age were assigned to control group, fed with regular diets. At 12, 14, 16 week, blood glucose (GLU), serum cholesterol (CHOL), triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP), glyated hemoglobin (HbA1c) were detected. All rats were sacrificed at 16 week and pathological examinations were applied to eye, kidney, heart, brain tissues. **Results** GLU, CHOL, TG, HDL-C, LDL-C, hsCRP levels in ZDF rats were increased gradually ($P < 0.01$). At 16 week, RBP, mALB, TRF contents in ZDF rats were

[基金项目]浙江省中医药管理局重点项目(2015ZZ009);比较医学创新团队(XTD201301)。

[作者简介]陈小真(1991-),女,硕士生,研究方向:中药药理与比较医学,E-mail:sochenxiaozhen@126.com。

[通讯作者]陈民利(1963-),女,教授、硕士,研究方向:实验动物与比较医学,E-mail:cmli991@aliyun.com。

significantly higher than ZL rats ($P < 0.01$). Glomeruli, retina, myocardium, brain tissue showed varying degrees of microvascular disease, vascular basement membrane of the glomerular part appeared thicken, retinal endothelial cells were increased, vascular wall was thicken, and the heart showed a small amount of myocardial fibrosis, hippocampal neurons appeared abnormal. **Conclusions** ZDF rats showed early microvascular complications of T2DM at 16 week, among which T2DM early nephropathy, retinopathy, cardiomyopathy become more prominent, cerebral neuron appeared slight lesion.

【Key words】 Microvessel; Type 2 diabetes mellitus; Pathology; ZDF rats

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是一种代谢紊乱性疾病,可引发多种微血管和大血管并发症,并伴有冠心病、高血压、脑血管病、肾病、眼部并发症、神经病变、脂血症、脂肪肝等并发症,其中微血管并发症包括糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR)、糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN)、糖尿病神经病变及糖尿病心肌病等^[1]。目前关于 1 型糖尿病微血管病变的研究较多,对 T2DM 微血管病变的研究较少。Zucker 糖尿病肥胖大鼠 (zucker diabetes fatty, ZDF) 是从出现糖尿病表型的 Zucker 大鼠中筛选出来的,是一种新型的自发性 T2DM 模型^[2]。在高脂饲喂后出现高血糖与高胰岛素血症,并伴有肥胖、脂质紊乱及糖耐量异常等代谢综合征^[3],与人类 T2DM 发病进程相似,因此本文选取 ZDF 大鼠为研究对象,以 Zucker 瘦型大鼠 (zucker lean, ZL) 作为对照,观察 ZDF 大鼠糖尿病早期微血管并发症的生化指标及相关组织的病理改变,并探讨其发病特点。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

SPF 级 7~8 周龄雄性 ZDF 大鼠 6 只及同周龄的雄性 ZL 大鼠 8 只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2012-X001】;饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心屏障实验室【SYXK(浙)2013-184】,环境温度:(22 ± 2)℃,相对湿度:50%~60%,光照:12 h/12 h 明暗交替,噪声 < 50 dB;在 IVC 笼内饲养,自由饮食,并在实验过程中按实验动物使用的“3R”原则给予人道主义关怀。

Purina#5008 营养组分:蛋白质 23.75%、总脂肪 7.55%、粗纤维 4.00%、消化能 14.6 KJ/kg。

1.2 试剂与仪器

Advantage 血糖仪 (德国罗氏公司), Bouin 氏固定液 (苦味酸饱和溶液,冰醋酸,甲醛), Premier Hb9210 型糖化血红蛋白分析仪 (爱尔兰 Trinity Biotech 公司), 7020 型全自动生化分析仪 (日本日

立公司), 大鼠转铁蛋白 (TRF) ELISA 试剂盒, 大鼠视黄醇结合蛋白 (RBP) ELISA 试剂盒, 大鼠尿微量白蛋白 (mALB) 试剂盒, 超敏 C 反应蛋白 (hsCRP) ELISA 试剂盒, 购自杭州诚维生物科技有限公司, Thermo 光谱扫描多功能酶标仪 (美国 Thermo 公司), ST5010 染色机 (德国 Leica 公司), 80I 相差显微镜 (日本 Nikon 公司)。Masson 试剂盒, PAS 试剂盒, 购自珠海贝索生物技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组:

ZDF 大鼠适应性饲养观察 3 d 后开始饲喂 Purina#5008 饲料,作为模型组 (Model group)。ZL 大鼠饲喂普通饲料,作为正常对照组 (Control group),并在 8 周时处死动物。

1.3.2 血液生化指标测定

动物在禁食 12 h 后,分别在 8、10 周龄时,尾尖取血,血糖仪测定 GLU;在 12、14、16 周龄时,尾静脉取血 0.5 mL, 3000 r/min 离心 10 min,分离血清,用全自动生化分析仪检测 GLU、CHOL、TG、HDL-C、LDL-C。取全血 200 μ L,用糖化血红蛋白分析仪测定 HbA1c。

16 周龄时,收集大鼠 24 h 尿液,利用 ELISA 试剂盒检测尿液中 TRF、mALB 的含量;同时用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清中 hsCRP、RBP 的含量。

1.3.3 病理组织学观察

大鼠 16 周龄时,解剖取心、肾、脑、眼球,分别进行组织固定及染色。取心脏组织进行马松 (Masson) 染色,脑组织切片进行苏木素-伊红 (HE) 染色,肾脏组织切片进行糖原 (PAS) 染色,光学显微镜下观察病理变化。

取各组实验动物的左眼球,在 Bouin 氏固定液固定 24 h 后,以视乳头为中心,垂直于虹膜切开,固定、脱水、石蜡包埋、切片,进行 HE 染色,观察视网膜厚度。参照潘琳^[4]的方法,取各组实验动物的右眼球,通过视网膜毛细血管消化铺片,进行 PAS 染色。

1.4 统计学方法

所有数据用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS22.0 软件进行统计分析,两两比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 一般情况与体重变化

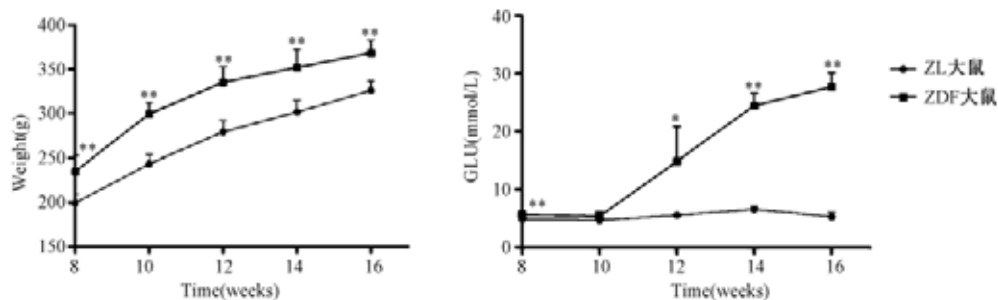
正常对照组 ZL 大鼠生长良好,活动灵活,毛色健康,无其他症状;ZDF 大鼠采食量、饮水量增加,毛色无光泽、枯黄,尿量及排泄物增多。ZDF 大鼠

体重显著高于 ZL 大鼠($P < 0.01$),实验期间,ZL 大鼠体重持续增加,ZDF 大鼠在 8~10 周龄快速增长,而从 12 周龄起开始缓慢增长。

2.2 空腹血糖的变化及 HbA1c 水平

ZDF 大鼠在 12 周龄时空腹血糖显著上升,显著高于 ZL 大鼠($P < 0.05$, $P < 0.01$),14 周龄起血糖增长缓慢(图 1)。

在 16 周龄时,ZDF 大鼠 HbA1c 水平显著高于 ZL 大鼠($P < 0.01$)(图 2)。

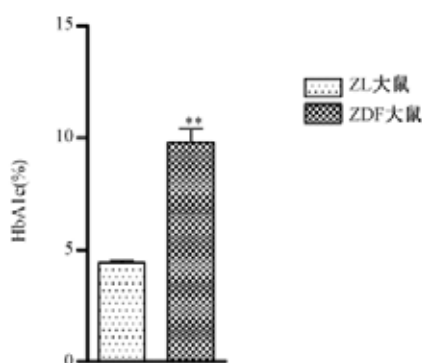


注:与正常对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 1 ZDF 大鼠体重和空腹血糖的变化

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

Fig. 1 Changes of weight and GLU in ZDF rats



注:与正常对照组相比,** $P < 0.01$ 。

图 2 ZDF 大鼠 HbA1c 水平

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

Fig. 2 Level of HbA1c in ZDF rats

2.3 血脂和血清 hsCRP 变化

12、14、16 周龄时,ZDF 大鼠血清 CHOL、TG、HDL-C 均显著高于 ZL 大鼠($P < 0.01$),LDL-C 在 14、16 周龄时显著高于 ZL 大鼠($P < 0.01$)(图 3)。

16 周龄时,ZDF 大鼠血清 hsCRP 显著高于 ZL 大鼠($P < 0.01$)(图 4)。

2.4 血清 RBP 和尿液 mALB、TRF 的含量变化

16 周龄时,ZDF 大鼠血清 RBP 和尿液中 mALB、TRF 含量显著高于 ZL 大鼠($P < 0.01$)(图 5)。

2.5 病理组织学变化

2.5.1 视网膜病变

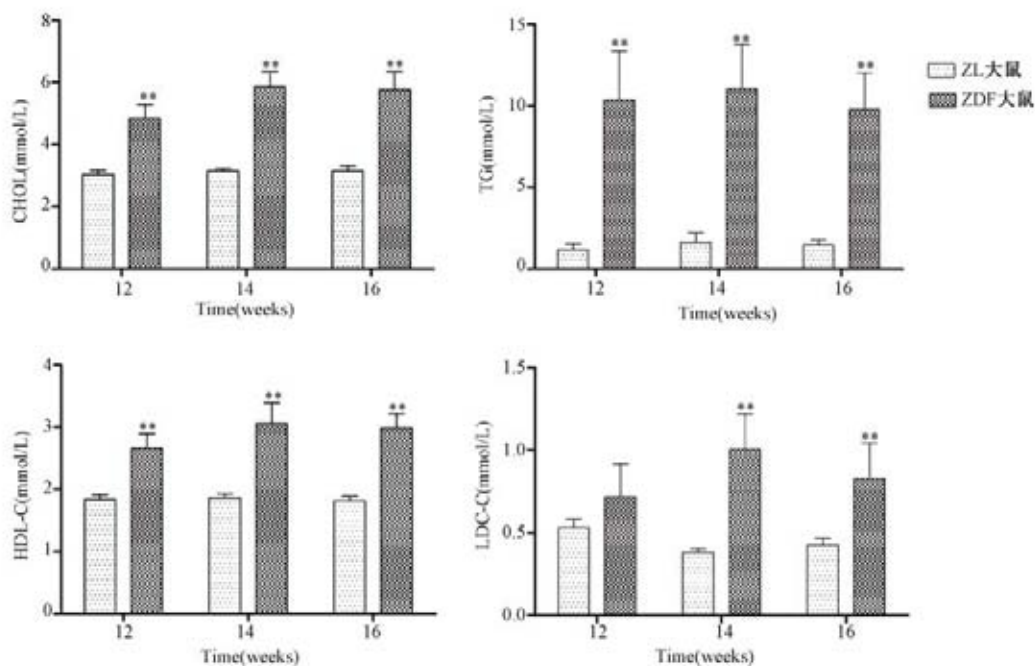
眼球石蜡切片 HE 染色显示 ZL 大鼠视网膜内、外界膜排列整齐,神经纤维层排列紧密,血管壁未见增厚;ZDF 大鼠视网膜神经纤维层局部疏松,血管壁增厚,各层细胞排列紊乱,同时,可见部分脉络膜层血管壁轻度增厚(图 6)。在 NDP.view2 软件中,每只大鼠各选取 5 个点,测量从内界膜到视网膜色素上皮细胞层的厚度,计算各组视网膜平均厚度,发现 ZDF 大鼠视网膜厚度较 ZL 大鼠增厚,存在显著性差异($P < 0.01$)(图 7)。

视网膜毛细血管消化铺片后,进行 PAS 染色,结果显示 ZL 大鼠视网膜血管内皮细胞和周细胞分布规则,未发现增生或凋亡;ZDF 大鼠视网膜内皮细胞增多且部分增生,细胞核大小不一,周细胞减少(图 6)。

2.5.2 肾脏病变

肾脏石蜡切片经 HE 染色显示,ZL 大鼠肾小球、肾小管结构完整,无炎性细胞浸润和纤维变化;ZDF 大鼠肾小球肥大,肾小球基膜增厚,系膜细胞增生,分布弥散,挤压毛细血管。

PAS 染色显示 ZL 大鼠肾小球无明显病理改

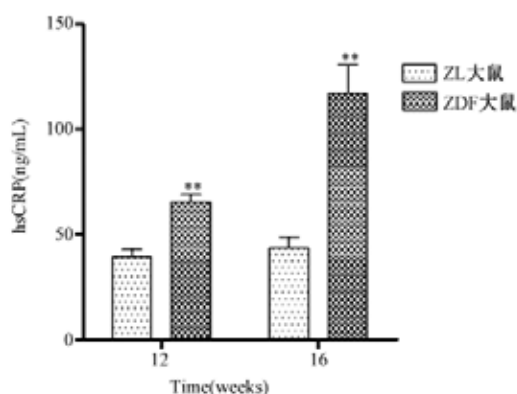


注:与正常对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 ZDF 大鼠血脂变化

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

Fig. 3 Changes of lipid in ZDF rats



注:与正常对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 ZDF 大鼠血清 hsCRP 变化

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

Fig. 4 Changes of serum hsCRP in ZDF rats

变,结构完整,系膜区未见异常;ZDF 大鼠肾小球体积略有增大,系膜轻度增生,系膜区增宽,部分毛细血管基膜增厚,肾小球血浆蛋白出现部分玻璃样变性(图 8)。

2.5.3 心肌病变

由 HE 染色可见 ZL 大鼠心肌细胞排列整齐,结构清晰,心肌纤维形态结构无明显异常;ZDF 大鼠心肌细胞肥大,排列紊乱,细胞核大小不规则,成纤

维细胞增多,可见少量炎性细胞浸润。

Masson 染色显示 ZL 大鼠心肌间质和血管周围存在少量胶原纤维,排列整齐,细胞间隙均匀;ZDF 大鼠心肌间质出现少量心肌纤维化,胶原纤维沉积,排列紊乱,细胞间隙扩大(图 9)。

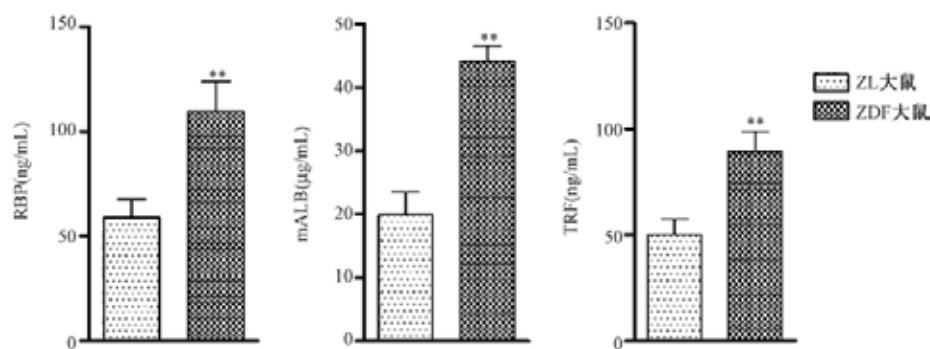
2.5.4 脑部病变

脑组织切片,HE 染色显示 ZL 大鼠海马 CA₃ 区神经元分布整齐,排列规则,海马齿状回颗粒层细胞排列整齐,未见核固缩等明显变化;ZDF 大鼠海马 CA₃ 区神经元排列出现紊乱,海马齿状回颗粒层部分神经元异常,排列紊乱,细胞核变小(图 10)。

3 讨论

DM 发病率逐年上升,DM 并发症的不断恶化是其致残和致死的主要原因,已成为人类健康的重大威胁,预计到 2030 年,糖尿病患者将增至 3.8 亿,其中 T2DM 占总数的 90% 以上^[5]。近来 Gupta^[6] 等研究发现在无症状的 T2DM 患者中,微血管病变的发生率亦高达为 32.55%。微血管并发症主要表现在视网膜、肾、心肌、神经组织及足趾等部位,使患者深受病痛折磨。

目前,ZDF 大鼠多用于 T2DM 及其并发症的研

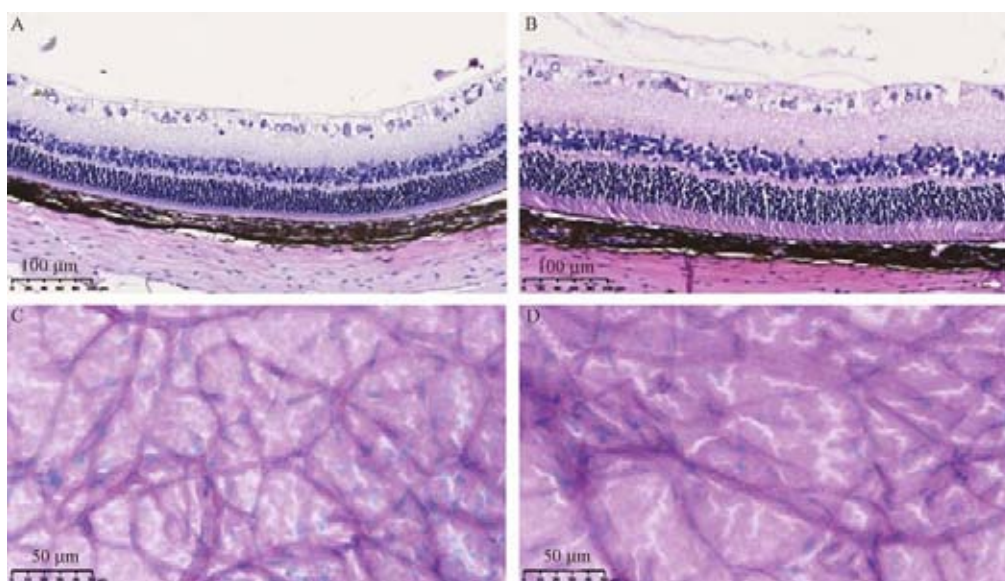


注:与正常对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

图5 ZDF大鼠血清RBP和尿液mALB、TRF的变化

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

Fig.5 Changes of serum RBP, urine mALB and TRF in ZDF rats



注:A:正常对照组,HE染色;B:模型组,HE染色;标尺=100 μm;C:正常对照组,消化铺片PAS染色;D:模型组,消化铺片PAS染色;标尺=50 μm。

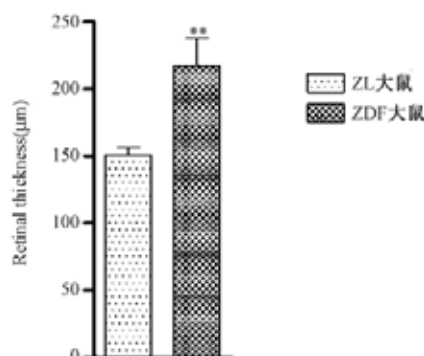
图6 ZDF大鼠视网膜病理组织学变化

Note: A: Control group, HE staining; B: Model group, HE staining; Bar = 100 μm; C: Control group, PAS staining; D: Model group, PAS staining. Bar = 50 μm.

Fig.6 Histopathological of retinal staining in ZDF rats

究^[7-8]。本实验结果显示:ZDF大鼠在16周龄时,体重、采食量、饮水量、尿量、血脂血糖、视黄醇结合蛋白(RBP)、微量白蛋白(mALB)、转铁蛋白(TRF)均显著上升,且出现肾、视网膜、心脏、脑的病理组织学异常,具体表现为肾小球部分血管基膜增厚,系膜增生;视网膜内皮细胞有所增多,血管壁增厚;心脏出现少量心肌纤维化,海马区神经元异常,说明此时已出现T2DM早期微血管并发症。

微血管并发症形成的过程大致为:微循环功能性改变,内皮损伤,基膜增厚,红细胞聚集,血小板粘附和聚集,最后是微血栓形成和微血管闭塞。微血管基底膜增厚是T2DM微血管病变的一种较早表现。实验表明,ZDF大鼠在饲喂4周后,空腹血糖显

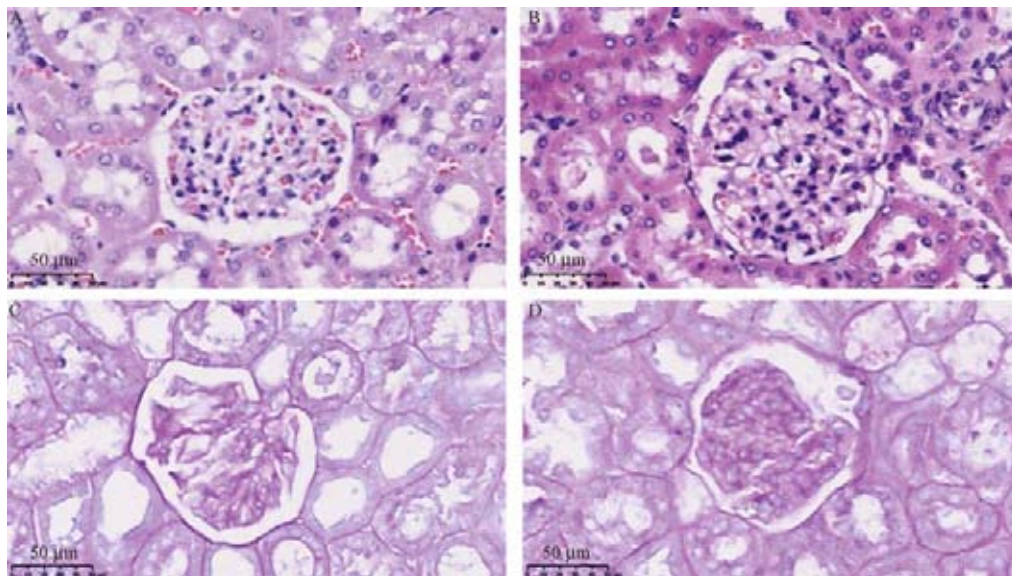


注:与正常对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

图7 ZDF大鼠视网膜厚度变化

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

Fig.7 Measurement of Retinal thickness in ZDF rats

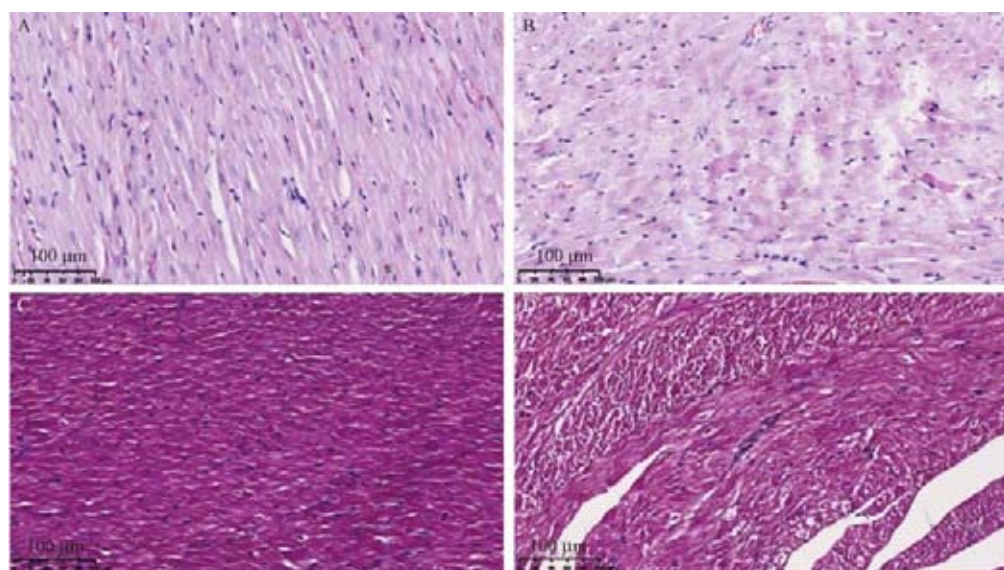


注:A:正常对照组,HE 染色;B:模型组,HE 染色;标尺 = 50 μm ;C:正常对照组,PAS 染色;D:模型组,PAS 染色;标尺 = 50 μm 。

图 8 ZDF 大鼠肾脏 PAS 和 HE 染色

Note: A: Control group, HE staining; B: Model group, HE staining; Bar = 50 μm ; C: Control group, PAS staining; D: Model group, PAS staining; Bar = 50 μm .

Fig. 8 Histopathological of kidney in ZDF rats by PAS staining and HE staining



注:A:正常对照组,HE 染色;B:模型组,HE 染色;标尺 = 100 μm ;C:正常对照组,Masson 染色;D:模型组,Masson 染色;标尺 = 100 μm 。

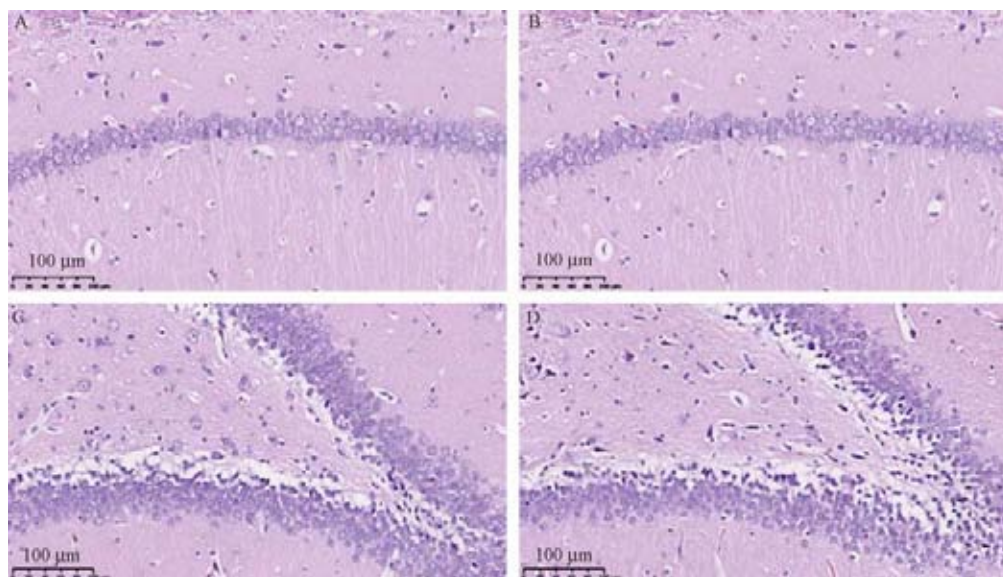
图 9 ZDF 大鼠心脏 HE 和 Masson 染色

Note: A: Control group, HE staining; B: Model group, Masson staining; Bar = 100 μm ; C: Control group, HE staining; D: Model group, Masson staining; Bar = 100 μm .

Fig. 9 Histopathological of myocardium in ZDF rats by HE staining and Masson staining

著上升,HbA1c 高于 ZL 大鼠。hsCRP 是肝脏分泌的炎症反应蛋白,在 T2DM 发生、发展中起着非常重要的作用,在 16 周龄时,ZDF 大鼠血清 hsCRP 含量显著高于 ZL 大鼠,出现倍数增长,说明炎症反应加剧,提示 hsCRP 水平可以作为 T2DM 早期微血管并发症的评估指标,同时,ZDF 大鼠血清 CHOL、TG、

HDL-C 含量均显著高于 ZL 大鼠,LDL-C 含量较 ZL 大鼠有所升高,有可能是肝、肾功能异常所致,其结果有待进一步研究。RBP、mALB、TRF 是糖尿病早期肾损伤的敏感指标,可灵敏地反映肾脏损害的程度,被认为是 T2DM 早期微血管并发症的重要指标。RBP 主要从肾脏排泄,当肾小球滤过率降低,血中



注:A:正常对照组,CA₃区;B:模型组,CA₃区;标尺=100 μm;C:正常对照组,齿状回;D:模型组,齿状回;标尺=100 μm。

图 10 ZDF 大鼠脑部切片 HE 染色

Note: A: Control group, CA₃; B: Model group, CA₃; Bar = 100 μm; C: Control group, dentate gyrus;

D: Model group, dentate gyrus; Bar = 100 μm.

Fig. 10 Histopathological of brain in ZDF rats by HE staining

的 RBP 贮存,说明肾功能受损;mALB 是 DN 最早出现变化的生化指标之一,是肾脏和心血管系统改变的早期标志;TRF 则是作为早期肾小管受损的标志性微量蛋白。实验显示 ZDF 大鼠在 16 周龄时 RBP、mALB、TRF 含量升高,推测肾脏细胞已处于增殖和肥大状态、肾小球滤过障碍,肾功能已减退。

糖尿病视网膜病变(DR)是 T2DM 常见微血管并发症,已经成为全球致盲的重要原因,研究表明,DR 也是其他血管并发症的早期常见表现^[9]。早期病变首先引起微血管功能改变,使视网膜血管扩张,引起周细胞变性、基底膜增厚和内皮细胞增生^[10]。本实验研究发现,ZDF 大鼠视网膜神经纤维层局部出现疏松,血管壁增厚,各层细胞排列紊乱,部分脉络膜层血管壁轻度增厚;视网膜 PAS 染色显示,内皮细胞增多,部分增生,细胞核大小不一,周细胞减少,提示在机体炎症反应的促进下,ZDF 大鼠 16 周龄时已出现 T2DM 早期视网膜病变。

糖尿病肾病(DN)是由肾小球微血管病变而引起的蛋白排泄和滤过异常,已经严重影响患者的生活质量,发病率已上升至 56%^[11],其主要病理变化为肾小球肥大、肾小球基底膜增厚、肾小管间质纤维化,研究发现,SD 大鼠 DM 造模 4 周后,动物出现早期 DN 症状^[12]。ZDF 大鼠肾脏 HE 和 PAS 染色,发现部分肾小球部分血管基膜增厚,系膜增生,提

示已经有一定程度的肾功能障碍,出现 T2DM 早期 DN 微血管病变。

目前认为 T2DM 大血管并发症是导致 DM 心脏病的主要原因,但越来越多的研究表明 T2DM 微血管并发症也能够影响心脏的结构与功能^[13-14]。心肌病变与 T2DM 微血管病变密切相关,微循环功能障碍会引起心肌纤维化及心肌缺血^[15]。心脏切片 Masson 染色显示,ZDF 大鼠出现少量心肌纤维化以及胶原沉积,提示可能在高糖刺激下,内皮细胞紊乱,血管通透性增强,毛细血管增生、变厚,导致 T2DM 早期微血管并发症出现心肌病变。

T2DM 出现的认知功能障碍是由多种因素参与的复杂病理过程,其中糖代谢紊乱会使氧化应激增强,导致神经退行性病变^[16],慢性持续的高血糖引起大脑神经元损伤及凋亡,损伤微血管,进一步诱发 T2DM 神经病变。ZDF 大鼠脑部 HE 染色显示海马区部分神经元异常,推测大鼠的学习与记忆能力可能已经降低,出现早期的认知功能障碍。

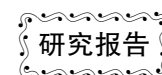
综上所述,ZDF 大鼠饲喂 Purina#5008 饲料后,在 16 周龄时出现 T2DM 微血管并发症早期病变;在 T2DM 早期,肾脏、视网膜、心肌、大脑已经出现不同程度的微血管损伤,与高糖以及高糖引起的炎症反应密切相关。对 ZDF 大鼠 T2DM 早期微血管并发症的生化与病理组织学变化的研究有助于 T2DM 微

血管并发症的防治,对 T2DM 微血管并发症的早期诊断具有重要意义。

参考文献:

- [1] Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus-present and future perspectives [J]. *NatRevEndocrinol*, 2012, 8(4): 228-236.
- [2] Davidson EP, Coppey LJ, Holmes A, *et al.* Characterization of Diabetic Neuropathy in the Zucker Diabetic Sprague-Dawley Rat: A New Animal Model for Type 2 Diabetes [J]. *Journal of diabetes research*, 2014, DOI: 10.1155/2014/714273.
- [3] 奚赛飞, 斯徐伟, 朱科燕, 等. ZDF(fa/fa)大鼠的糖脂代谢特点与胰岛素抵抗特性[J]. *实验动物与比较医学*, 2014, 34(2): 102-106.
- [4] 潘林. 实验病理学技术图鉴 [M]. 王太龄. 北京: 科学出版社, 2012: 506-510
- [5] Forouhi NG, Wareham NJ. Epidemiology of diabetes [J]. *Medicine (Abingdon)* 2014, 42(12): 698-702.
- [6] Gupta A, Gupta A, Singh T. Occurrence of complications in newly diagnosed type 2 diabetes patients: a hospital based study [J]. *Journal of the Indian Medical Association*, 2013, 111(4): 245-247.
- [7] Topp BG, Atkinson LL, Finegood DT. Dynamics of insulin sensitivity, β -cell function, and β -cell mass during the development of diabetes in fa/fa rats [J]. *Am JEndocrinolMetab*, 2007, 293(6): E1730-E1735.
- [8] Futamura M, Yao J, Li X, *et al.* Chronic treatment with a glucokinase activator delays the onset of hyperglycaemia and preserves beta cell mass in the Zucker diabetic fatty rat [J]. *Diabetologia*, 2012, 55(4): 1071-1080.
- [9] Cheung N, Wong TY. Diabetic retinopathy and systemic vascular complications [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2008, 27(2): 161-176.
- [10] 陈雨, 朱晓华. 糖尿病视网膜病变发病机制的研究进展 [J]. *国际眼科杂志*, 2006, 6(2): 433-435.
- [11] Naqshbandi M, Harris SB, Esler JG, *et al.* Global complication rates of type 2 diabetes in Indigenous peoples: A comprehensive review [J]. *Diabetes research and clinical practice*, 2008, 82(1): 1-17.
- [12] 唐丽琴, 刘圣, 陈礼明, 等. 复方黄连胶囊对糖尿病大鼠血脂及血液流变学的影响 [J]. *中国药房*, 2007, 18(15): 1129-1131.
- [13] 符丽娟, 庞东渤. 糖基化终产物在糖尿病大鼠心肌病变中的作用 [J]. *中国微循环*, 2009, 13(4): 277-279.
- [14] 简春燕, 吴铿. 糖尿病性心脏病发病机制和治疗的研究现状 [J]. *中华临床医师杂志*, 2012, 6(1): 164-167
- [15] Boussageon R, Bejan-Angoulvant T, Saadatian-Elahi M, *et al.* Effect of intensive glucose lowering treatment on all-cause mortality, cardiovascular death, and microvascular events in type 2 diabetes: Meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *BMJ*, 2011, 343.
- [16] McCrimmon RJ, Ryan CM, Frier BM. Diabetes and cognitive dysfunction [J]. *Lancet*, 2012, 379(9833): 2291-2299.

[修回日期]2016-02-01



小鼠游泳耐力实验系统的建立与 红景天抗疲劳作用的验证

谢磊^{1,2}, 李由³, 刘新民², 陈善广³, 王克柱², 陈怡西¹, 王琼¹

(1. 四川医科大学, 四川 泸州 646000; 2. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;
3. 中国航天员科研训练中心人因工程重点实验室, 北京 100094)

【摘要】 目的 建立小鼠游泳耐力实验系统, 挖掘评价小鼠游泳耐力的新指标, 并用此系统验证红景天对小鼠耐力的影响。**方法** 将计算机视频采集技术和图像分析技术应用于小鼠游泳耐力实验中, 实时获取小鼠游泳信息, 提取包括力竭时间、首次下沉时间、下沉总时间、首次连续下沉时间在内的多个耐力评价指标, 客观精确地在线分析小鼠耐力数据; 利用正常小鼠、红景天给药小鼠对系统的稳定性、可靠性进行实验研究。**结果** 计算机记录数据与人工记录数据具有高度相关性, $r > 0.95$, 系统稳定可靠。首次连续下沉时间与力竭时间的相关性系数 $r = 0.974$, 其他新指标与力竭时间的相关性系数 $r < 0.9$ 。红景天给药组较空白组, 首次下沉时间和首次连续下沉时间显著性增加。**结论** 该系统用于评价小鼠游泳耐力的指标客观、精确、灵敏, 实现了视频采集、信息整合、数据分析、统计输出一体化, 寻找到了与力竭时间高度相关的新指标-首次连续下沉时间。全套系统自动化、智能化程度高, 为抗疲劳药物的筛选提供了一套可靠的实验系统。

【关键词】 小鼠; 力竭游泳; 计算机; 红景天

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 05-0071-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.005.011

Establishment of the swimming endurance system in mice and the verification of the anti-fatigue effect in hongjingtian

XIE Lei^{1,2}, LI You³, LIU Xin-min², CHEN Shan-guang³,
WANG Ke-zhu², CHEN Yi-xi¹, WANG Qiong¹

(1. Sichuan Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development,
Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;
3. National Key Laboratory of Human Factors Engineering, China Astronaut Research and
Training Center, Beijing 100094, China)

【Abstract】 Objective To establish a swimming endurance system, excavating new indexes evaluating the swim capacity in mice and detecting the effects of HONGJINGTIAN (HJT) capsule on the swimming capacity in mice. **Methods** Combining video capture technology with image analysis technology into the Exhaustive swimming test, this system would automatically collect and objectively analyze the data when the swimming behavior perform synchronously in mice. A series of indexes would be calculated, such as Exhaustive time, First sink time, Total sink time, Sink frequency, Continuous sink

【基金项目】 人因工程重点实验室开放基金资助项目 (HF2012-K-01, HF2012-K-06); 国家科技重大专项 (2012ZX09J12201); 四川省科技厅-泸州市人民政府-泸州医学院联合科研资金项目 (14JC01323-LH50)。

【作者简介】 谢磊 (1990-), 男, 硕士生, 研究方向: 中药神经精神药理, E-mail: 296303836@qq.com。

【通讯作者】 王琼, 女, 博士生导师, E-mail: wqimplad@126.com; 刘新民, 男, 博士生导师, E-mail: liuxinmin@hotmail.com。

time. Furthermore, the classical anti-fatigue herb named HJT will use to detect the stability and reliability of this swimming endurance system. **Results** The data showed high correlation between the computer and manual record ($r > 0.95$), indicating high stability and reliability of the swimming endurance system. The continuous sink time (CST) have been proved out high correlation with Exhaustive time(ET) ($r = 0.974$), while the correlation of others indexes less than 0.9. The mice treated with HJT by intragastric administration had showed significantly increase in the First sink time (FST) and the Continuous sink time (CST) compared with the control group. **Conclusions** The results showed that the system could assess swimming capacity objectively, precisely and sensitively in mice. In addition, this system realized integrating video capture, data analysis and data output together automatically. Besides, a new index-CST was found to be high correlation with ET. This system turn out to be high automatically and intelligently, and provide a reliable system to screen the potential anti-fatigue drugs.

【Key words】 Mice; Exhaustive swimming; Computer; Hongjingtian

随着社会竞争压力的增加,各类急性疲劳、慢性疲劳综合症已成为严重影响人类工作、生活的社会性问题。近年来有关西药抗疲劳药物研究报道较少且副作用大^[1],因此,从中药中寻找有效的抗疲劳成分已成为抗疲劳药物研究的热点。目前国内用于抗疲劳药物研究的行为学方法主要包括负重游泳实验、强迫游泳实验、跑台实验、转棒实验等^[2-4],其中最为经典的是负重游泳实验^[5],该实验方法对动物心理应激小、生理伤害少,从而被广泛使用。

然而现阶段大量的负重游泳实验方法多为人工记录,自动化程度低、结果可靠性差,测试中获得的信息量少、检测环境不稳定(水温需人工调节)、动物之间相互干扰(多只动物同时检测,出现身体碰撞、相互蹬踏等不可避免的干扰因素),导致实验重复性差^[6]。研究自动化程度高、更为科学客观的负重游泳实验系统,挖掘能更好评价小鼠游泳耐力的新指标是现在科研工作者急需解决的问题。因此,本研究结合计算机视频采集技术和图像分析技术,旨在构建一套小鼠游泳耐力实验系统并评价疲劳相关的行为学指标,为抗疲劳药物的研究提供科学、客观的实验方法。

1 材料和方法

1.1 仪器

计算机主机(Pentium 3.2 GHz,内存 2.00 GB,硬盘 500 G)、摄像机(VS-250DH,分辨率 752 * 582,)、镜头(AFT-VS0410ZM),图像采集卡(维视 MV-E8800,总线数据传输速率 250MByte/S, 10bit AD 转换芯片)、显示器(Dell 17 寸显示器,分辨率 1280 * 1024)、负重游泳测试缸及附属配件、恒温装置(亨庭 X-218 加热棒,功率 1000w)、负重游泳测

试桶。

1.2 实验动物与材料

1.2.1 实验动物

雄性 ICR 小鼠,SPF 级,购自北京维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2012-0001】。给药期间饲养于实验室动物房,实验室温度恒定保持 25℃, 12h 照明/12h 黑暗环境(8:00 am 开灯,20:00 pm 关灯),动物自由饮食饮水。动物实验在协和药用植物研究所动物房进行【SYXK(京)2013-0023】,并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2.2 材料

央科藏域红景天胶囊:购自西藏央科生物科技有限公司,生产日期:20140410,生产批号:140401

羧甲基纤维素钠 300 ~ 800 mPa·s:购自国药集团化学试剂有限公司。

铅皮:渔具店购买。

1.3 小鼠游泳耐力实验系统的建立

1.3.1 硬件的研制

硬件包括测试缸,及测试缸内的测试桶(2 个)、加热装置、LED 灯和测试缸外的主支架、相机支架、亚格力透光板、摄像机(2 个)、LED 背景灯控制器、视频采集卡和计算机。采用全开放式缸体设计,单一测试缸尺寸 750 * 350 * 400 mm (长 * 宽 * 高)的组合式长方体超白玻璃缸,内含两个平行放置的有机玻璃桶。实验桶尺寸为 250 * 300 mm (直径 * 高),右侧壁板上安置加热装置一套。缸外顶部和前部安置有摄像装置,摄像装置分别通过各自相机支架固定于主支架的顶部和前部。缸外底部和后部有与摄像装置相对应的红色 LED 背景灯,LED 背景灯与缸体之间间隔一层亚格力透光板,LED 背景灯外侧有主支架,主支架对测试缸及其他结构起支撑作用。硬件结构如图 1。

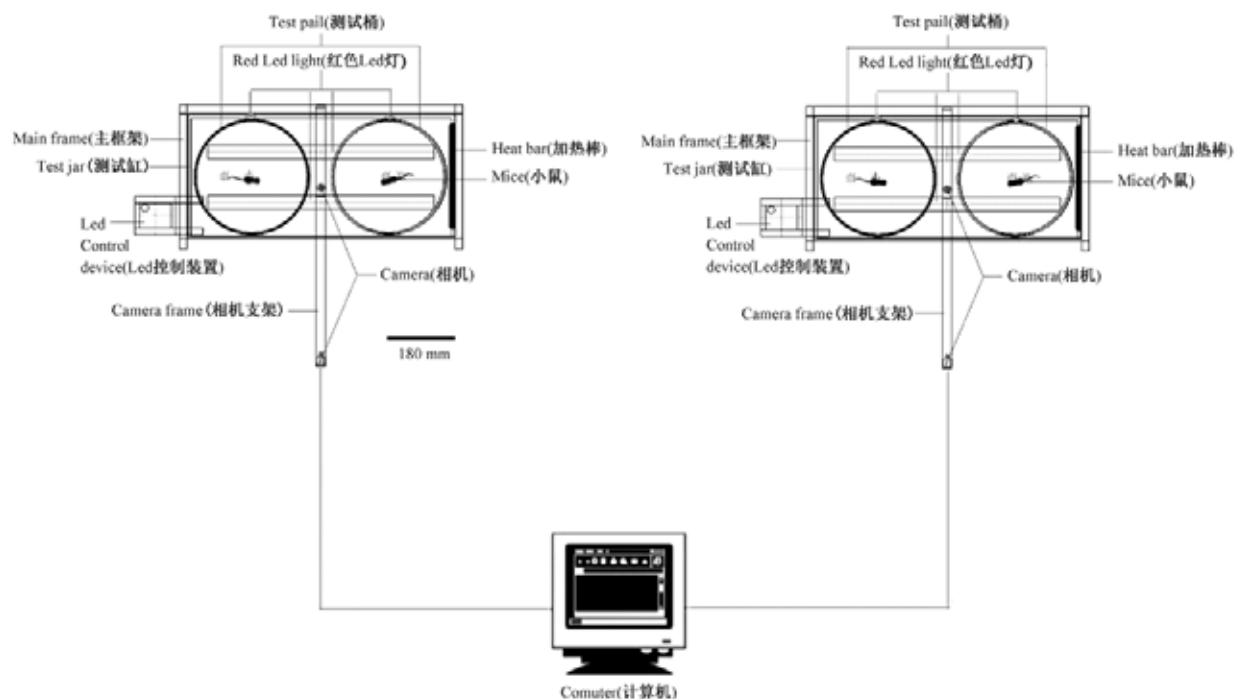


图1 小鼠游泳耐力实验系统结构图

Fig. 1 Diagram of swimming endurance system in mice

1.3.2 软件的研制

软件系统采用 Microsoft Visual C++ 6.0 语言开发环境,运行于 XP 操作系统,设置实验项目、实验参数、实验操控、数据输出 4 大功能模块。设定包括力竭模式、下沉次数模式和下沉总时间模式等 3 种不同的实验模式。软件可提取的耐力指标包括: 1) 力竭时间 (exhaustive time, ET), 动物从开始检测至全部躯干浸入水下超过 7 s 计算机所记录的游泳时间; 2) 首次下沉时间 (first sink time, FST), 动物从开始检测至首次全部躯干浸入水下计算机所记录的游泳时间; 3) 下沉总时间 (total sink time, TST), 动物从开始检测至力竭期间或指定时间点下沉时间的总和; 4) 下沉次数 (sink frequency, SF), 动物从开始检测至力竭期间或指定时间点下沉次数的总和; 5) 首次连续下沉时间 (continuous sink time, CST): 动物从开始检测至 7 s 内连续出现 2 次或以上的下沉行为计算机所记录的游泳时间。软件界面图见图 2。

1.4 系统验证

1.4.1 指标可靠性验证

ICR 小鼠 20 只, 雄性, 36 ~ 42 g, SPF 级, 来源于北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号【SCXK(京)2012-0001】, 实验室使用许可证号【SYXK(京)2013-0023】。调用“力竭模式”, 将 20



图2 小鼠游泳耐力实验系统软件界面图

Fig. 2 software interface of swimming endurance system in mice

只 Icr 雄性小鼠称重后尾根部捆绑 6% * m (m 代表小鼠体重) 的铅皮^[5], 进行负重游泳测试, 水深 $\geq 25\text{cm}$ ^[7-8]。实验过程中, 记录人工观察到的动物 ET、FST、TST、SF、CST, 并与计算机记录的 ET、FST、TST、SF、CST 进行相关性分析^[9]。再将计算机记录的 ET 与计算机记录的 FST、TST、SF、CST 进行相关性分析, 以寻找与经典指标 ET 高度相关的新指标。考虑到动物之间存在个体差异, 游泳时间不同, 利用软件数据分段提取的功能, 分别将动物 150 s、200 s、250 s 游泳时刻的下沉次数、下沉总时间单独提取, 与力竭时间进行相关性分析。采用 SPSS18.0 统

计分析软件中的相关性分析对人工记录数值和计算机记录数值做相关性分析,所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.4.2 小鼠游泳耐力实验系统的应用

ICR 小鼠 20 只,雄性,19~21 g,SPF 级,来源于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号【SCXK(京)2012-0001】,实验室使用许可证号【SYXK(京)2013-0023】。于动物房进行环境适应性饲养 1 周,于购入第 8 天随机分为 2 组:对照组和红景天组。5% CMC-Na 红景天悬液灌胃 14 d 后进行负重游泳检测,给药体积为 0.2 mL/10 g 体重,给药剂量为 120 mg/kg^[10],对照组给予等体积的 5% CMC-Na 悬液。末次给药 30 min 后选择力竭模式进行尾根部捆绑 6% * m 的铅皮进行负重游泳检测,水深 >=25cm。采用 SPSS18.0 统计分析软件中的两样本 t 检验进行统计分析,所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

2 结果

2.1 指标相关性验证

结果显示,ET、FST、TST、SF、CST 计算机记录值与人工记录值均高度相关,除 TST 的人机相关系数 $r=0.96$,其余 4 个指标的人机相关系数均 >0.99,也进一步验证了下沉阈值(=0.5 s)的可靠性(表 1)。

2.2 新指标与经典指标(ET)相关性分析

结果显示,TST 与 ET 间相关性最低($r=0.043$),CST 与 ET 间的相关性最高($r=0.974$),SF 与 ET 间相关性较低($r=0.16$),FST 与 ET 间相关性较高($r=0.771$)。分段后各时刻得到的下沉次数、下沉总时间分别与力竭时间进行相关性分析所得到的相关性系数均较力竭时刻的下沉次数、下沉总时间的相关性系数高,且所取时刻越大,相关性越高。提示下沉次数和下沉总时间两个指标在实验数据分析时应在固定游泳时间下进行分析。结果如表 2、表 3、表 4。

表 1 小鼠游泳耐力实验系统指标相关性验证($\bar{x} \pm s, n=20$)
Tab.1 Correlation of basic indexes in swimming endurance system in mice($\bar{x} \pm s, n=20$)

方法 (Methods)	力竭时间 (Exhaustive time,ET)(s)	首次下沉时间 (First sink time,FST)(s)	下沉次数 (Sink frequency, SF)(次)	下沉总时间 (Total sink time,TST)(s)	首次连续下沉时间 (Continuous sink time,CST)(s)
人工记录(Manual record)	490.1±199.8	317.6±169.4	12.1±6.8	33.7±14.6	426.7±212.6
计算机记录(Computer record)	490.6±200.0	317.0±170.0	12.4±7.2	34.4±14.7	426.7±212.5
相关性系数(Pearson value)	>0.99	>0.99	>0.99	=0.96	>0.99

表 2 小鼠游泳耐力实验系统新指标与力竭时间相关性分析($\bar{x} \pm s, n=20$)
Tab.2 Correlation between new indexes and exhaustive time in swimming endurance system in mice($\bar{x} \pm s, n=20$)

新指标 (New indexes)	首次下沉时间 (First sink time,FST)(s)	下沉次数 (Sink frequency, SF)(次)	下沉总时间 (Total sink time,TST)(s)	首次连续下沉时间 (Continuous sink time,CST)(s)
新指标值 (Value of New indexes)	317.6±169.4	12.1±6.8	33.7±14.6	426.7±212.6
力竭时间 (Exhaustive time,ET)(s)	490.1±199.8	490.1±199.8	490.1±199.8	490.1±199.8
相关性系数 (Pearson value)	0.771	0.16	0.043	0.974

表 3 小鼠游泳耐力实验系统分段下沉次数(次)与力竭时间(s)相关性分析($\bar{x} \pm s, n=20$)

Tab.3 Correlation between different period of sink frequency and exhaustive time in swimming endurance system in mice($\bar{x} \pm s, n=20$)

分段下沉次数 (Paragraph of sink frequency)	150 s 下沉次数 (Sink frequency of 150 s)	200 s 下沉次数 (Sink frequency of 200 s)	250 s 下沉次数 (Sink frequency of 250 s)
分段值 (Value of the Paragraphs)	0.6±1.57	1.0±2.43	1.95±3.36
力竭时间(Exhaustive time,ET)	490.1±199.8	490.1±199.8	490.1±199.8
相关性系数(Pearson value)	0.42	0.442	0.596

表 4 小鼠游泳耐力实验系统分时段下沉总时间(s)与力竭时间(s)相关性分析($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Tab.4 Correlation between different period of total sink time and exhaustive time in swimming endurance system in mice($\bar{x} \pm s, n = 20$)

分段下沉总时间 (Paragraph of total sink time)	150 s 下沉总时间 (Total sink time of 150 s)	200s 下沉总时间 (Total sink time of 200s)	250s 下沉总时间 (Total sink time of 250s)
分段值 (Value of the Paragraphs)	1. 06 ± 2. 97	2. 34 ± 7. 4	4. 03 ± 8. 89
力竭时间(Exhaustive time,ET)	490. 1 ± 199. 8	490. 1 ± 199. 8	490. 1 ± 199. 8
相关性系数(Pearson value)	0. 411	0. 393	0. 525

2.3 红景天对小鼠耐力的研究

结果显示,红景天能明显增加 ICR 小鼠游泳耐力,ICR 雄性小鼠经 14 d 灌胃后,体重与空白组比较无显著性差异,表现出首次下沉时间、首次连续下沉时间两项指标显著性($P < 0. 05$)增加,力竭时间也有很大增加($P = 0. 057$)。

表 5 红景天对 Icr 小鼠体重(g)的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.5 Effect of HJT capsule on weight in mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

时间 Date(d)	空白组 (Control group)	红景天组 (Integripetal rhodiola herb group)
1	26. 58 ± 1. 52	28. 22 ± 1. 51
4	29. 54 ± 1. 22	29. 35 ± 1. 34
7	30. 20 ± 1. 45	30. 35 ± 1. 51
10	31. 18 ± 1. 29	31. 22 ± 1. 65
14	31. 45 ± 1. 28	31. 80 ± 1. 65

3 讨论

力竭游泳实验是临床前实验中评价小动物耐力的经典实验方法^[11]。王艳杰等^[12]采用透光材质将动物分区实验,解决了动物在实验过程中相互干扰的问题,但仍采用人工记录数据的实验方法;张卫华等^[13]研制的动物游泳实验视频观察仪器,解决了力竭实验过程中出现的图像失真,动物位置偏好等问题,可获得漂浮时间、游泳时间、力竭时间三个指标;庄成乐等^[14]研制的大小鼠力竭游泳装置采用在大小鼠口鼻尖放置传感器来判定动物下沉行为,

获得动物下沉总时间 10 s 的时刻。本课题采用同一软件系统下,同时捕获 4 只动物在不同游泳桶内的二维活动,既避免了动物的相互干扰,又更准确提取了动物下沉行为信息,测试样本量也增加四倍。该系统设计的“小鼠力竭游泳实时监测软件”在现有指标下,增加了首次下沉时间、下沉次数、下沉总时间、首次连续下沉时间,还可提取分时段的下沉次数及分时段的下沉总时间。经过数百次实验验证,这些指标稳定可靠,与经典的力竭时间指标有很好的相关性。

研究表明,力竭时间是经典的负重游泳耐力评价指标,但动物力竭后生理及心理应激反应强烈,与动物伦理及福利相违背^[15]。龚梦娟等^[5]研制出一套小鼠游泳计算机自动控制与图像分析处理系统,首次提出了首次下沉时间的概念。因此,本课题致力于挖掘与力竭时间高度相关的耐力评价新指标,以多角度、小应激、低死亡、高精度为目的评价小鼠游泳耐力强弱。结果显示,首次连续下沉时间与力竭时间相关性最高,且出现时间更早,提示在实验动物较少或者负重游泳测试后需进行生化指标测定等的实验,可用首次连续下沉时间代替力竭时间来对实验进行评价。此外,刘静波等人研究指出,影响负重游泳的最大因素为游泳水温^[16],利用本系统的恒温装置可将水温恒定在 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$,大大减少了实验的变量,保证了实验环境的稳定。经

表 6 红景天对 Icr 小鼠游泳耐力指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.6 Effect of HJT capsule on swimming capacity indexes in mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

指标 (Indexes)	力竭时间 (Exhaustive time,ET)(s)	首次下沉时间 (First sink time,FST)(s)	下沉次数 (Sink frequency, SF)(次)	下沉总时间 (Total sink time,TST)(s)	首次连续下沉时间 (Continuous sink time,CST)(s)
空白对照组 (Control group)	717. 9 ± 277. 4	439. 9 ± 190. 2	20. 1 ± 17. 7	51. 9 ± 33. 7	612. 3 ± 238. 1
红景天组 (Integripetal rhodiola herb group)	1179. 4 ± 601. 3	798. 0 ± 310. 1	35. 6 ± 32. 5	70. 1 ± 66. 1	984. 5 ± 455. 9
两样本 t 检验值 (Values of Independent-Samples T tests)	0. 057	0. 006	0. 202	0. 447	0. 034

前期研究证明,体重对负重游泳实验影响较大,相对较重的体重在进行力竭游泳测试时,各指标的数据分布更集中,标准差更小。因此,推荐力竭游泳实验测试时尽量选用大周龄小鼠($w > 7$),但购入动物不能超过 4 周龄,以免动物发生同笼厮打行为。

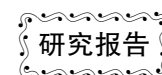
《四部医典》曾著红景天,其性平、味涩、善润肺、能补肾、理气养血。主治周身乏力、胸闷、恶心、体虚等症。耿欣等^[17]报道,红景天具有显著的抗疲劳、抗辐射功能,韩雪娇,郭娜等^[18]进一步证实了红景天中红景天苷的抗疲劳作用。本课题利用红景天的抗疲劳作用,再次验证了小鼠游泳耐力实验系统的可靠性。

本研究采用更完整的硬件设计,建立的小鼠游泳耐力实验系统,不仅有效避免了动物间的相互干扰,还能准确判断动物的下沉相关指标,同时温度自动控制,且检测样本量增加。开发的小鼠游泳耐力实验软件系统,不仅稳定可靠,还提取了与经典指标相关性高的新指标。全套系统自动化、智能化程度高,为抗疲劳药物的筛选提供了一套可靠的实验系统。

参考文献:

- [1] 徐志刚. 抗疲劳药物的研究进展[J]. 海峡药学, 2012, 01: 21-23.
- [2] Matsumoto K, Ishihara K, Tanaka K, *et al.* An adjustable-current swimming pool for the evaluation of endurance capacity of mice[J]. *Journal of Applied Physiology*, 1996, 81(4): 1843-1849.
- [3] Billat V L, Mouisel E, Roblot N, *et al.* Inter-and intrastrain variation in mouse critical running speed[J]. *Journal of Applied Physiology*, 2005, 98(4): 1258-1263.
- [4] 马挺军, 徐艺青. 西伯利亚白刺籽油的抗疲劳活性[J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(5): 77-79.
- [5] 龚梦鹃, 张煜. 基于小鼠游泳计算机自动控制系统的抗疲劳指标评价体系的建立[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12: 59-61.
- [6] 钟雨, 闫明珠, 张泽生, 等. 黄秋葵水提物抗运动疲劳作用研究[J]. 食品科技, 2015, 01: 171-175.
- [7] Zhang H, Liu Y, Zhou J, *et al.* Amylopectin is the anti-fatigue ingredient in glutinous rice[J]. *International journal of biological macromolecules*, 2014, 63: 240-243.
- [8] Wang L, Zhang H L, Lu R, *et al.* The decapeptide CMS001 enhances swimming endurance in mice[J]. *Peptides*, 2008, 29(7): 1176-1182.
- [9] 王琼, 买文丽, 李翊华, 等. 自主活动实时测试分析处理系统的建立与开心散安神镇静作用验证[J]. 中草药, 2009, 11: 1773-1779.
- [10] 马莉. 红景天苷抗疲劳作用及其机制的实验研究[D]. 第二军医大学, 2006.
- [11] 何来英, 严卫星, 楼密密, 等. 保健食品抗疲劳作用试验方法研究[J]. 中国食品卫生杂志, 1997, 04: 3-8+26+48.
- [12] 王艳杰, 刘慧慧, 冯晓帆, 等. 一种强迫小动物游泳实验装置[P]. 辽宁: CN203399599U, 2014-01-22.
- [13] 张卫华, 徐国标, 黄坤, 等. 动物游泳实验视频观察仪器[P]. 四川: CN202026685U, 2011-11-09.
- [14] 庄成乐, 陈帆风, 黄冬冬, 等. 一种专用于大小鼠力竭游泳实验的设备[P]. 浙江: CN204520726U, 2015-08-05.
- [15] 金玫蕾. 我国实验动物科学带来的动物伦理及福利问题[J]. 生命科学, 2012, 11: 1325-1329.
- [16] 刘静波, 林松毅. 以负重游泳动物试验评价抗疲劳作用的影响因素分析[J]. 食品科学, 2005, 08: 399-403.
- [17] 耿欣. 红景天抗疲劳作用研究进展[J]. 中医药学报, 2011, 03: 95-97.
- [18] 韩雪娇, 郭娜, 朱美宣, 等. 红景天苷药理作用及其作用机理研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 01: 171-175.

[修回日期]2016-02-24



除虫脲亚慢性染毒对大鼠血液系统的影响

胡雄飞, 陆 丹, 熊志军, 张丽娜

(湖南省职业病防治院毒理室, 长沙 410007)

【摘要】 目的 在研究除虫脲对大鼠的亚慢性经口毒性基础上, 初步探讨染毒后对大鼠血液系统的影响。**方法** 将 80 只 SPF 级 SD 大鼠按体重随机分成 4 组, 每组 20 只, 雌雄各半。分别用含 0、25、500、10000 mg/kg 除虫脲的饲料连续喂饲染毒 3 个月, 观察各组大鼠的临床表现、摄食量、体重, 实验结束时测定相关血液学指标、血液生化学指标、脏器重量、脏器系数及病理组织学改变。**结果** 实验期间, 各剂量组雌、雄鼠进食、活动、饮水基本正常, 未见明显中毒表现。中、高剂量组大鼠血液红细胞计数(RBC)、血红蛋白浓度(HGB)和红细胞压积(HCT)降低, 高剂量组大鼠血液平均红细胞体积(MCV)和红细胞分布宽度(RDW)升高, 并且雄鼠血清总胆红素(TBIL)升高, 与对照组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 0.05)。高剂量组大鼠脾脏重量和脏器系数均增高, 雌鼠肝脏重量和脏器系数均增高, 与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。高剂量组全部动物及中剂量组部分动物脾脏明显肿大, 质地较硬, 颜色较深。病理检查结果显示其脾脏红髓髓窦高度扩张并充满大量红细胞, 髓质内含铁血黄素沉积明显。**结论** 除虫脲对大鼠血液系统有明显损害, 长期接触可能会导致脾脏肿大、机体出现慢性溶血性贫血表现。

【关键词】 除虫脲; 亚慢性毒性; 血液系统; 慢性溶血性贫血

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 05-0077-04

doi: 10. 3969/j. issn. 1671 - 7856. 2016. 005. 012

Blood toxicity assessment of subchronic exposure to diflubenzuron in SD rats

HU Xiong-fei, LU Dan, XIONG Zhi-jun, ZHANG Li-na

(Hunan Prevention and Treatment Institute of Occupational Diseases, Changsha, 410007, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of diflubenzuron on the blood system in rats. **Methods** A total of 80 rats were randomly divided into three diflubenzuron treated groups and one negative control group. Different doses of diflubenzuron at 0, 25, 500 and 10000 mg/kg were administered continuously for 90 days to the rats by the way of feeding. Animals were observed for clinical signs of toxicity, food consumption and body weight. Haematological parameters, clinical chemistry parameters, absolute and relative organ weights and histopathological changes were examined at the end of the study. **Result** During the period of the study, the food and water consumption were all normal at all dose groups and no obvious toxicity symptoms appeared. For haematological parameters, the main changes were the decrease of red blood cell count (RBC), haemoglobin (HGB) and haematocrit (HCT) in the medium and high dose groups and the increase of mean corpuscular volume (MCV) and erythrocyte hemoglobin distribution width (RDW) in the high dose group ($P < 0.05$ or 0.01). For clinical chemistry parameters, the main change was the increase of total bilirubin (TBIL) in the high dose

group of male rats ($P < 0.05$). The absolute and relative spleen weights increased obviously in the female and male rats of the high dose group ($P < 0.01$). The absolute and relative liver weights increased obviously in the female rats of the high dose group ($P < 0.01$). The spleens were larger, harder and darker than normal in all of the rats of high dose group and part of the rats of medium dose group. For the result of histopathology examination of spleen, the main changes were a lot of red cells in the medullary sinus and hemosiderin in the medulla. **Conclusion** Diflubenzuron had toxic effect on the blood system of the rats. The spleen was intumesce and chronic hemolytic anemia may be occurred for long-term exposure.

【Key words】 Diflubenzuron; Subchronic toxicity; Blood system; Chronic hemolytic anemia

除虫脲是 20 世纪 70 年代发现的苯甲酸基苯基脲类除虫剂,是一类能抑制靶标害虫的几丁质合成而导致其死亡或不育的昆虫生长调节剂(IGRs),被誉为第三代杀虫剂或新型昆虫控制剂。由于缺乏几丁质,幼虫不能形成新表皮、化蛹受阻,成虫难以羽化、产卵以及虫卵不能正常发育,所以除虫脲的杀虫优势在于影响害虫的整个世代。因其独特的作用机制、较高的环境安全性以及广谱高效的杀虫活性而被广泛使用,国内外已有 14 家企业对其进行产品登记^[1]。但目前对其毒理学研究的报道甚少,特别是亚慢性毒性研究,国内未见相关报道。本研究对除虫脲原药进行了亚慢性经口毒性试验,探讨其对大鼠血液系统的影响,为全面评价其毒性及作用机制提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

除虫脲(98%),类白色粉末,由国内某农用激素研究中心提供。

1.2 动物与分组

选用湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供的 SPF 级健康 SD 大鼠【SCXK(湘)2011-0003】,4~6 周龄,体重 90~108 g。将 80 只动物按体重随机分成 4 组,每组雌雄各 10 只。设低、中、高三个剂量组和一个对照组。动物单笼喂养,自由进食和饮用纯净水。实验动物使用许可证号为【SYXK(湘)2014-0003】。

1.3 染毒方法与剂量

根据除虫脲对 SD 大鼠相关毒性资料^[2],本次实验雌、雄鼠各组设计剂量均为 2.5、50、1000 mg/kg bw·d。按大鼠进食量为其体重的 10% 比例将受试物直接混入饲料,分别用含 25、500、10000 mg/kg 除虫脲的饲料连续喂饲染毒 3 个月。对照组给予不加药的清洁级基础饲料。

1.4 观察及检测指标

(1)动物的一般状况、每周体重及摄食量变化。

(2)染毒结束时取静脉血,BC-5300Vet 全自动血液细胞分析仪和 BACKMAN COULTER 全自动生化分析仪分别测定血液学指标和血液生化学指标。(3)试验结束时处死动物,小心分离肝、脾、肾,对其称重并计算脏器系数。(4)将分离出的所有器官和组织用福尔马林固定,进行石蜡包埋、切片、HE 染色,光镜下病理组织学检查。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 统计软件(V11.5)对各项检测数据作单因素方差分析或 t 检验。以评定各剂量组与对照组之间是否有明显差异。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 动物的一般状况

各剂量组雌、雄鼠在整个染毒期间摄食、活动、饮水基本正常,未见明显中毒表现。染毒期间各剂量组雌、雄鼠体重及摄食量较对照组无明显变化(表 1)。

2.2 染毒剂量

根据各组雌、雄大鼠试验期间摄食量计算得出各组实际染毒剂量:雌性大鼠分别为 0、1.7、36.0 和 736.0 mg/kg,雄性大鼠分别为 0、1.6、32.6 和 658.0 mg/kg。

2.3 血液学及血生化指标

中、高剂量组大鼠血液红细胞计数(RBC)、血红蛋白浓度(HGB)和红细胞压积(HCT)降低,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$ 和 0.01),并且随着染毒剂量的增加而不断下降;高剂量组大鼠血液平均红细胞体积(MCV)和红细胞分布宽度(RDW)升高,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。高剂量组雄鼠血清总胆红素(TBIL)明显升高,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),且随着染毒剂量的增加而不断升高。各剂量组血小板计数(PLT)与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 2)。

2.4 白细胞及分类

各剂量组雌、雄鼠白细胞计数(WBC)与对照组比较无显著变化。中剂量组雄鼠中性粒细胞比例(Neu)明显高于对照组、淋巴细胞比例(Lym)明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$ 和 0.01),但均无剂量反应关系。各剂量组单核细胞(MON)和嗜酸性粒细胞比例与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)(表3)。

2.5 脏器重量及脏器系数

高剂量组雌、雄鼠脾脏重量和脏器系数均增高,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),且随着染毒剂量的增加而不断升高。高剂量组雌

鼠肝脏重量和脏器系数均增高,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01)。各剂量组大鼠其余脏器重量及脏器系数均无明显异常(表4)。

2.6 病理组织学检查

大体解剖发现,高剂量组全部雌、雄鼠及中剂量组6只雌鼠、4只雄鼠脾脏明显肿大,质地较硬,颜色较深。普通光学显微镜下可见脾脏红髓髓窦高度扩张并充满大量红细胞,髓质内含铁血黄素沉积明显。其它主要脏器未见明显病理学改变(图1)。

表1 除虫脲对大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 The effect on body weight of rats caused by diflubenzuron($\bar{x} \pm s, n = 10$)

剂量组 (Group)		染毒前(g) (Before administration)	第1个月(g) (The first month)	第2个月(g) (The second month)	第3个月(g) (The third month)
对照组 (Control group)	♀	95.7 ± 4.3	210.5 ± 9.7	262.1 ± 19.9	288.1 ± 25.7
	♂	100.1 ± 4.1	313.3 ± 22.6	415.0 ± 38.6	444.8 ± 54.6
低剂量组 (Low-dose group)	♀	95.4 ± 3.3	208.8 ± 14.8	260.6 ± 21.7	280.1 ± 32.8
	♂	100.0 ± 3.4	301.2 ± 21.8	422.9 ± 33.5	454.9 ± 27.3
中剂量组 (Moderate-dose group)	♀	95.5 ± 4.0	206.8 ± 22.3	264.2 ± 16.7	284.6 ± 27.2
	♂	100.2 ± 4.3	293.7 ± 24.6	416.5 ± 31.6	471.9 ± 55.2
高剂量组 (High-dose group)	♀	94.9 ± 3.2	207.6 ± 29.5	274.7 ± 21.5	310.1 ± 14.4
	♂	99.7 ± 3.4	299.4 ± 16.7	415.8 ± 44.4	441.0 ± 91.8

表2 除虫脲对大鼠部分血液学及生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 2 The effect of diflubenzuron on the haematological and serum biochemical parameters in the rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

剂量组 (Group)		RBC ($\times 10^{12}/L$)	HGB (g/L)	HCT (%)	MCV (fL)	RDW (%)	PLT ($\times 10^9/L$)	TBIL ($\mu\text{mol/L}$)
对照组 (Control group)	♀	8.08 ± 0.22	167 ± 4	46.2 ± 1.3	57.1 ± 1.1	12.3 ± 0.8	455 ± 411	5.86 ± 1.91
	♂	9.32 ± 0.60	177 ± 10	49.1 ± 2.9	52.7 ± 1.4	13.2 ± 0.4	395 ± 242	6.15 ± 2.09
低剂量组 (Low-dose group)	♀	7.95 ± 0.51	163 ± 7	45.2 ± 2.6	57.0 ± 1.3	12.6 ± 0.5	393 ± 345	5.80 ± 2.34
	♂	9.08 ± 0.51	176 ± 4	48.6 ± 1.8	53.6 ± 1.9	13.0 ± 0.9	368 ± 254	7.24 ± 3.08
中剂量组 (Moderate-dose group)	♀	7.06 ± 0.54 **	152 ± 6 **	42.2 ± 2.0 **	59.9 ± 3.4	12.9 ± 1.8	511 ± 295	6.49 ± 4.60
	♂	8.68 ± 0.27 *	169 ± 7 *	46.9 ± 2.2 *	54.0 ± 2.0	13.6 ± 0.6	329 ± 226	7.96 ± 5.13
高剂量组 (High-dose group)	♀	6.54 ± 0.40 **	148 ± 6 **	42.1 ± 2.1 **	64.5 ± 4.8 **	13.8 ± 0.8 **	404 ± 367	5.76 ± 1.20
	♂	7.53 ± 0.29 **	157 ± 4 **	45.0 ± 1.6 **	59.9 ± 3.0 **	14.7 ± 1.1 **	272 ± 263	12.28 ± 10.17 *

注:与对照组比较,*与对照组比较 $P < 0.05$,**与对照组比较 $P < 0.01$ 。

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

表3 除虫脲对大鼠血液白细胞及分类的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 3 The effect of diflubenzuron on the WBC and its classification in the rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

剂量组 (Group)		WBC ($\times 10^9/L$)	白细胞分类(%) Leukocyte differential count			
			NEU	LYM	MON	EOS
对照组 (Control group)	♀	7.08 ± 1.42	21.5 ± 5.9	66.3 ± 9.9	4.0 ± 1.9	8.1 ± 5.6
	♂	13.41 ± 3.22	16.2 ± 5.9	73.9 ± 8.2	4.2 ± 2.0	5.1 ± 2.4
低剂量组 (Low-dose group)	♀	8.13 ± 1.78	22.5 ± 7.7	66.3 ± 9.2	3.6 ± 1.4	7.3 ± 3.3
	♂	14.90 ± 4.34	22.6 ± 7.9	66.2 ± 9.3	3.8 ± 1.8	6.6 ± 3.7
中剂量组 (Moderate-dose group)	♀	8.27 ± 1.76	23.8 ± 6.4	63.9 ± 10.2	3.8 ± 1.5	8.1 ± 4.6
	♂	13.46 ± 3.14	24.7 ± 5.5 *	62.2 ± 9.0 **	4.3 ± 1.3	8.2 ± 3.9
高剂量组 (High-dose group)	♀	10.09 ± 6.16	18.0 ± 8.4	65.9 ± 7.8	6.1 ± 5.4	9.6 ± 5.2
	♂	15.67 ± 6.26	19.4 ± 3.3	69.4 ± 4.9	3.8 ± 2.9	6.4 ± 4.1

注:与对照组比较,*与对照组比较 $P < 0.05$,**与对照组比较 $P < 0.01$ 。

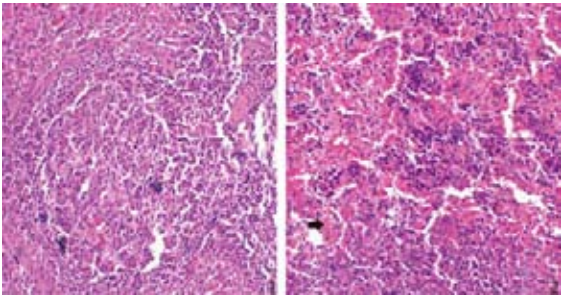
Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 4 除虫脲对大鼠部分脏器重量和脏器系数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.4 The effect of diflubenzuron on the organ weight and coefficient in the rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

剂量组 (Group)		肝(g) Liver(g)	脾(g) Spleen(g)	肾(g) Kidney(g)	肝/体(%) Liver coefficient	脾/体(%) Spleen coefficient	肾/体(%) Kidney coefficient
对照组 (Control group)	♀	6.47 ± 0.50	0.46 ± 0.08	1.74 ± 0.14	2.40 ± 0.14	0.17 ± 0.02	0.65 ± 0.05
	♂	9.35 ± 1.21	0.64 ± 0.13	2.77 ± 0.36	2.19 ± 0.12	0.15 ± 0.02	0.65 ± 0.07
低剂量组 (Low-dose group)	♀	6.53 ± 0.54	0.44 ± 0.05	1.69 ± 0.21	2.53 ± 0.21	0.17 ± 0.03	0.65 ± 0.07
	♂	10.07 ± 1.78	0.63 ± 0.11	2.86 ± 0.26	2.37 ± 0.35	0.15 ± 0.03	0.67 ± 0.04
中剂量组 (Moderate-dose group)	♀	6.75 ± 0.72	0.59 ± 0.11	1.69 ± 0.12	2.55 ± 0.26	0.22 ± 0.05 *	0.64 ± 0.05
	♂	10.58 ± 1.27	0.75 ± 0.15	2.97 ± 0.39	2.40 ± 0.11	0.17 ± 0.02	0.67 ± 0.06
高剂量组 (High-dose group)	♀	7.81 ± 0.82 **	0.88 ± 0.22 **	1.84 ± 0.06	2.68 ± 0.20 **	0.30 ± 0.06 **	0.63 ± 0.04
	♂	10.76 ± 0.89	1.14 ± 0.26 **	2.84 ± 0.49	2.44 ± 0.16	0.26 ± 0.06 **	0.65 ± 0.12

注:与对照组比较, * 与对照组比较 $P < 0.05$, ** 与对照组比较 $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.



注:1. 对照组大鼠脾脏组织切片;2. 高剂量组大鼠脾脏组织切片;箭头所指为含铁血黄素。

图 1 病理组织学检查(HE × 40)

Note:1. The histological section of spleen from the rat of the control group;2. The histological section of spleen from the rat of the high dose group.
The arrow point out haemosiderin.

Fig.1 Pathology pictures(HE × 40)

3 讨论

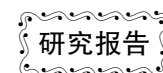
体重是动物实验中一个重要的非特异性指标,可综合反映动物机体中毒效应,也可反映外来化合物对机体的综合影响^[3-4]。本次研究结果显示,各剂量组大鼠体重差异无统计学意义,表明在本实验条件下,除虫脲对大鼠体重增长、发育均未发生明显影响。

流行病学调查研究显示^[5],多种农药(包括有机磷农药、有机氯农药、合成除虫菊酯、氨基甲酸酯等)暴露的易感性和高暴露水平等,会使儿童患血液病的发病风险增大。我们在实验中发现,除虫脲作为苯甲酸苯基脲类除虫剂,中、高剂量组大鼠血液 RBC、HGB 和 HCT 均降低,表明大鼠已出现贫血。红细胞形成过程中,晚幼红细胞脱核释放入外周血后,变成含有 RNA 和少量 DNA 碎片的网织红细胞(reticulocytes, Ret),这种细胞在血管内进一步

成熟,24 ~ 36 h 后变成成熟红细胞^[6]。溶血性贫血(hemolytic anemia, HA)是指红细胞破坏速率增加(寿命缩短),并且超过骨髓造血的代偿能力而发生的一类贫血。根据 HA 诊断依据^[7],HA 不仅出现血液 RBC、HGB 和 HCT 降低,一般还会伴有 Ret 和 TBIL 的升高。本次研究中高剂量组雄鼠血清 TBIL 明显升高,血液 WBC 及其分类无明显变化,符合 HA 特征。国外曾有报道,13 周持续染毒除虫脲后大鼠外周血红细胞计数下降、网织红细胞明显上升,可以作为佐证。血液 MCV 和 RDW 对不同贫血的鉴别诊断有重要参考价值。有报道显示^[8],溶血性贫血(HA)患者 MCV 与 RDW 均升高,属大细胞性贫血。本次实验结果显示高剂量组大鼠血液 MCV 与 RDW 均明显高于对照组,考虑该贫血可能为 HA。

造成红细胞破坏过多的因素分为内在和外在两部分,内在因素主要为红细胞先天性缺陷,外在因素中很多种类,其中很重要一种就是接触药物^[9-11]及化学品所致的溶血性贫血。可引起溶血性贫血的化学物质主要有氧化剂类,如芳香族有机物、氧原子以及有氧化作用的铜、砷、铅等^[12]。除虫脲从结构上看属于芳香族有机物,为外来化学物致 HA 的敏感物质。慢性 HA 临床表现一般为贫血、黄疸和脾大。我们也在试验中发现,高剂量组雌、雄鼠脾脏重量和脾脏脏器系数均明显增高,其脾脏重量均接近于对照组 2 倍。可以推测大鼠由于长期一定剂量摄入除虫脲,导致机体血液红细胞被快速破坏,当红细胞破坏的速度超过了骨髓造血的代偿能力,致使脾脏恢复造血功能,进一步导致增生性脾大。大体解剖发现,高剂量组全部大鼠及中剂量组部分大鼠脾脏明显肿大,质地较硬,颜色较深。病

(上转第 18 页)



乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂干预对慢性不可预知应激大鼠模型抗抑郁作用及机制的研究

刘晓萌^{1,2}, 张 荣¹, 董世芬¹, 程工倪¹, 畅洪昇¹, 孙建宁¹

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 中国食品药品检定研究院 国家药物安全评价监测中心, 北京 100176)

【摘要】 目的 观察乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂对慢性不可预知应激大鼠行为学、下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴功能以及海马组织单胺类神经递质含量的影响。**方法** 选取 SD 大鼠 72 只, 随机分为正常对照组、应激模型组、氟西汀组、乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂 (高、中、低剂量) 组, 给药 28 d, 实验结束时对各组大鼠进行糖水消耗实验、Morris 水迷宫实验监测, 采用放免法检测血清皮质酮 (CORT)、促肾上腺皮质激素 (ACTH)、促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 的浓度, 高效液相-电化学法检测海马中 5-羟色胺 (5-HT)、去甲肾上腺素 (NE) 以及多巴胺 (DA) 的含量。**结果** 与正常对照组相比, 模型组大鼠造模 4 周后, 糖水偏嗜度明显降低, Morris 水迷宫实验中大鼠逃避潜伏期延长、在目标象限的时间及总路程减少 ($P < 0.05$); 血液指标显示, 模型组大鼠血清中的 ACTH、CORT、CRH 含量明显升高, 海马组织单胺神经递质 5-HT、NE 和 DA 的含量明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂 490 mg/kg, 245 mg/kg 剂量组可显著升高模型组大鼠糖水偏嗜度, 缩短大鼠逃避潜伏期, 增加大鼠在目标象限的时间及总路程 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。还可显著降低模型大鼠血清中 ACTH、CORT、CRH 含量, 升高海马组织 5-HT、NE 和 DA 的含量 ($P < 0.05$)。**结论** 乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂具有一定的抗抑郁作用, 其机制可能与增加海马组织中 5-HT、DA、NE 的含量, 改善应激刺激导致的 HPA 轴功能紊乱状态有关。

【关键词】 乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂; 慢性不可预知应激; 抗抑郁; 下丘脑-垂体-肾上腺轴; 单胺类神经递质

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 05-0081-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.005.013

Effects of mixture of Wuling powder and *Hypericum perforatum* L. on depressed model rats induced by chronic unpredictable stress

LIU Xiao-meng^{1,2}, ZHANG Rong¹, DONG Shi-fen¹, CHENG Gong-ni, CHANG Hong-sheng¹, SUN Jian-ning¹

(1. School of Chinese Material Medical, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China)

【Abstract】 Objective To observe the effects of Wuling powder and *Hypericum perforatum* L. on changes of behavior, the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis function, and monoamine neurotransmitters concentration of hippocampus on chronic unpredictable stress model in rats. **Methods** Depression model was induced by chronic unpredictable stress combining with solitary method. The stimulus lasted for 4 weeks. During the stress, the rats were

【作者简介】 刘晓萌 (1981 -), 女, 助理研究员, 学士, 主要从事药物安全性评价工作, 研究方向: 中药药理。E-mail: liuxm@nifdc.org.cn; 张荣 (1990 -), 女, 硕士生, 研究方向: 中药神经精神药理研究。

【通讯作者】 孙建宁 (1954 -), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药防治重大疾病创新药物研究, E-mail: jn_sun@sina.com。

intragastric given with the decoction of Wuling powder and *Hypericum perforatum* L. (490 mg/kg, 245 mg/kg, 123 mg/kg) and Fluoxetine hydrochloride (2.4 mg/kg) for 4 weeks. At the end of the experiment, sucrose consumption and Morris Water Maze experiment monitor the behavior of rats, such as sucrose consumption, escape latency. Moreover, the levels of the monoamine neurotransmitters in the hippocampus were analyzed by high performance liquid chromatography-electrochemistry and the content of CORT, ACTH, CRH in plasma were detected by Radioimmunoassay. **Results** In Morris Water Maze test, the escape latency of rats which were consecutively administrated with Wuling powder and *Hypericum perforatum* L. for 4 weeks decreased obviously; the total time and distance in target quadrant remarkably increased ($P < 0.05$). In sucrose consumption experiment, the percentage in sugar water consumption with treatment of Wuling powder and *Hypericum perforatum* L. increased significantly ($P < 0.01$). Meanwhile, the content of norepinephrine (NE), dopamine (DA), and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the hippocampus were significantly increased in rats of Wuling powder and *Hypericum perforatum* L. and the concentrations of CORT, ACTH, CRH in plasma of Wuling powder and *Hypericum perforatum* L. group rats were decreased obviously ($P < 0.05$). **Conclusions** The disturbances of cognition, learning and memory function of rats induced by chronic unpredictable stress combining with solitary could alleviated by Wuling powder and *Hypericum perforatum* L., and the pharmacological effects may related to modulation of monoaminergic neurotransmitters in the hippocampus and the content of CORT, ACTH, CRH in plasma.

【Key words】 Wuling powder and *Hypericum perforatum* L.; Chronic unpredictable stress; Antidepressant; Hypothalamus-pituitary-adrenal axis; Neurotransmitter

抑郁症是一种情感性精神疾病,其发病机制与神经递质失调、内分泌功能紊乱以及大脑功能异常等有着密切的关系。临床上首选抗抑郁药物多以增加突触单胺类神经递质 5-HT、NE、DA 的含量为主,但是这些药物的起效时间缓慢,副作用多^[1]。因此开发新型、高效、低毒副作用的抗抑郁中药制剂是近年来研究的热点。乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂是由乌灵菌粉和贯叶连翘提取物组成,乌灵参菌粉具有明显调节中枢神经系统功能的作用,临床常用于改善失眠、衰弱、焦虑、社交障碍等,其主要含有蛋白质、多糖、无机元素、维生素及腺苷类等化学成分;贯叶连翘又称之为圣约翰草,是英国皇家药典委员会郑重推荐治疗抑郁症的首选植物药,被世界卫生组织评定为“植物药之星”,主要含有:贯叶金丝桃素类化合物,黄酮类化合物及苯并二萜酮类化合物等。本课题采用慢性不可预知应激与孤养相结合的方法建立抑郁模型,观察乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂对该模型大鼠海马组织单胺类神经递质以及下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响,探讨其抗抑郁作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠,72 只,雄性,体重 250 ~ 300 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2012 - 0001】,实验室使用许可证号【SYXK(京)2011 ~ 0024】,室温为 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对

湿度为 $(65 \pm 5)\%$,实验前动物适应性饲养 1 周,自由摄取食水。

1.2 药品与试剂

受试药物:乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂,褐色粉末,浙江佐力公司提供,临床人用量为 2.1 g/60 kg,大鼠受试剂量根据临床人用量分别设为 490 mg/kg,245 mg/kg,123 mg/kg,其中 245 mg/kg 为临床等效剂量;阳性对照药:盐酸氟西汀,PATHEONF RANCE 有限公司,批号 A078877,大鼠给药剂量为 2.4 mg/kg。上述药物临用时以去离子水配成所需浓度的溶液,均灌胃(i. g.)给药。

血清皮质酮(CORT)放免试剂盒,美国 Los Angeles CA 试剂公司;促肾上腺皮质激素(ACTH)放免药盒,促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)放免药盒,北京华英生物技术研究产品。5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT),去甲肾上腺素(norepinephrine, NE),多巴胺(dopamine, DA),以上试剂为标品,仅供含量测定用;均购自 SIGMA 公司。甲醇为色谱纯(Thermo Fisher Scientific, USA),其他试剂为分析纯。

1.3 主要仪器

R-911 全自动放射免疫计数器,中国科技大学实业总公司;ESA 高效液相色谱仪,Model coulochem III 电化学检测器,Model 582 Pump (solvent delivery system), C18 色谱柱($5\ \mu\text{m}$, $3.2\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$)。循环水式多用真空泵, Heraeus Fresco 21 高速冷冻离心机, pH S-3B 精密 pH 计, JA1103N 分析天平,小动

物行为分析系统 (Ethovision XT 9), Morris 水迷宫 (Morris water maze)。

1.4 动物分组及给药

大鼠置于自然昼夜节律光照条件下,适应性饲养 1 周,6 只/笼。1 周后根据体重随机分为正常对照组、应激模型组,模型 + 盐酸氟西汀组 (2.4 mg/kg),模型 + 乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂高、中、低剂量组 (490 mg/kg、245 mg/kg、123 mg/kg),实验期间正常对照组大鼠 6 只/笼,模型组及各给药组大鼠均单笼饲养。造模同时给药,给药体积 10 mL/kg,每日一次,连续给药 28 d。

1.5 动物模型的建立

根据 Willner 的应激方法稍作改动。应激方法如下:电击足底 (36 V, 频率 0.1 Hz, 每次持续 10 s, 共 20 次)、禁食 (24 h)、禁水 (24 h)、噪音刺激 (2 h)、夹尾 (1 min)、热应激 (45 °C, 5 min)、制动 (8 h)、昼夜颠倒 (24 h)、冰水游泳 (4 °C, 5 min)。除对照组外,应激组大鼠每天被迫接受应激,每日 1 种应激,连续处理 28 d。于实验前随机抽取每日刺激方式,避免同一种应激方式连续使用。

1.6 行为学检测

1.6.1 糖水消耗实验

开始造模前 1 周对大鼠进行 1% 糖水偏好训练。于造模开始前进行第 1 次糖水偏好度测试。糖水偏好训练和测试均于大鼠禁水 22 h 后,测定 2 h 内饮用量 (中途 1 h 时交换瓶子位置)。计算糖水偏嗜度,计算公式如下:

糖水偏嗜度 (%) = 糖水消耗/总液体消耗 × 100%。

1.6.2 水迷宫实验

各组动物模型及灌胃结束后,次日进行 Morris 水迷宫。(1) 定位航行实验 (place navigation test) 将水迷宫分为均等的 4 个象限,逃逸平台置于象限 IV 的中央,水深 50 cm (平台没于水下 2 cm),以其他 3 个象限迷宫壁中点为大鼠落水点,实验期间迷宫周围环境始终不变。大鼠入水时面对迷宫壁,观察并记录 90 s 内大鼠找到平台 (要求大鼠找到平台并在平台上停留 5 s 以上) 的时间,即逃避潜伏期 (escape latency),若 90 s 内未找到平台,则以 90 s 计。每次实验结束后让大鼠在平台上停留 15 s (若大鼠在 90 s 内未能找到平台,则引导其爬上平台) 以产生并加强记忆。依次从不同象限的入水点入水,每天训练 1 次,连续训练 7 d。(2) 空间探索实验 (spatial

probe test) 第 8 天撤除水中平台,将大鼠自距原平台最远的象限 (象限 II) 放入水中,观察并记录在第 IV 象限 (目标象限) 运动的总路程和时间 (时限 90 s)。

1.7 下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴的检测

行为学结束后,断头的同时收集血样,室温下凝固,3000 r/min 离心 15 min,取上清,采用放免法,按照试剂盒说明进行血清 CRH、ACTH、CORT 浓度的检测。样本存放于 -20 °C 冰箱中待测。

1.8 单胺类神经递质的检测

大鼠断头后,于冰上分离大鼠脑组织,取出海马,按 100 mg 组织加入 500 μL 裂解液,匀浆,14000 r/min 离心 15 min,取上清,过膜 (0.45 μm),取 20 μL 进样,采用高效液相-电化学方法检测单胺类神经递质的含量。流动相:500 mL 中含醋酸钠 3.402 g,柠檬酸 5.25 g,正辛基黄酸钠 0.05 g,三乙胺 660 μL,Na₂EDTA 0.1 g,色谱甲醇 25 mL。流速:0.4 mL/min,电压:0.3 V。主要检测海马去甲肾上腺素 (NE),多巴胺 (DA),5-羟色胺 (5-HT) 的浓度。样本保存于 -70 °C 待测。

1.9 统计学处理

所有结果均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计分析,数据采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 统计,用 LSD 检验比较两组间的差异。

2 结果

2.1 乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂对慢性不可预知温和应激大鼠行为学的影响

2.1.1 乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂对慢性不可预知温和应激大鼠糖水偏嗜度的影响

实验结果显示:与正常对照组相比,模型组大鼠糖水的偏嗜度明显降低 ($P < 0.01$),而乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂各剂量组均能显著增加模型大鼠糖水偏嗜度 ($P < 0.01$) (表 1)。

2.1.2 乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂对慢性不可预知温和应激大鼠 Morris 水迷宫试验的影响

2.1.2.1 各组大鼠定位航行实验逃避潜伏期比较

实验结果显示:与正常对照组相比,从定位导航的第 5 次开始,模型组大鼠逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.05$),与模型组相比,乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂 490 mg/kg、245 mg/kg 剂量组可明显缩短模型大鼠逃避潜伏期 ($P < 0.05$) (图 1)。定位航行实验结果表明慢性应激可引起大鼠空间学习能力下

降,导致空间学习障碍;乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂高、中剂量组可提高慢性应激大鼠的空间学习能力。

2.1.2.2 各组大鼠空间搜索实验结果比较

实验结果显示:与正常对照组相比,模型组大鼠在目标象限的时间及总路程明显减少 ($P < 0.05$),与模型组相比,乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂 490 mg/kg 剂量组可增加模型大鼠在目标象限的时间及总路程 ($P < 0.05$) (表 2)。空间探索实验结果

表明,慢性应激可导致大鼠的空间记忆力减退,乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂高剂量可改善应激大鼠空间记忆能力。

2.2 乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂对慢性不可预知温和应激大鼠 HPA 轴的作用

实验结果表明:与正常对照组相比,模型组大鼠血清中的 ACTH、CORT、CRH 含量明显升高,而乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂 490 mg/kg 剂量组可显著降低 ACTH、CORT、CRH 含量 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 1 乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂对慢性应激模型大鼠糖水偏嗜度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 The effect of Wuling powder and *Hypericum perforatum* L. on sugar water percentage in CUS rats ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	例数 n	糖水偏嗜度 (%) Sucrose percentage (%)
对照组 Control	—	11	82.92 ± 3.11 **
模型组 Model	—	12	65.60 ± 8.56
氟西汀 Fluoxetine	2.4	12	80.75 ± 5.81 **
乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂	490	11	75.92 ± 4.97 **
Wuling powder and	245	11	72.97 ± 4.13 **
<i>Hypericum perforatum</i> L.	123	12	72.89 ± 3.12 **

注:与模型组比较, ** $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the model group, ** $P < 0.01$.

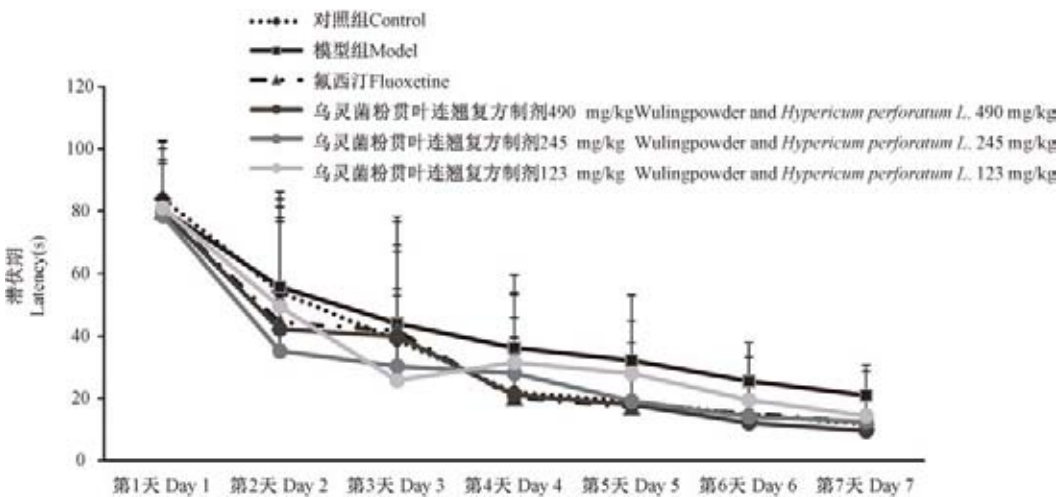


图 1 乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂对慢性应激模型大鼠定位导航持续时间的影响

Fig.1 The effect of Wuling powder and *Hypericum perforatum* L. on place navigation test in CUS rats

表 2 乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂对慢性应激模型大鼠空间探索能力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 The effect of Wuling powder and *Hypericum perforatum* L. on spatial probe test in CUS rats ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	例数 n	目标象限总路程 Route of target quadrant (cm)	目标象限总时间 Time of target quadrant (s)
对照 Control	—	11	1274.95 ± 395.07 *	22.34 ± 3.88 *
模型 Model	—	12	1010.77 ± 379.20	18.21 ± 5.31
氟西汀 Fluoxetine	2.4	12	1279.21 ± 189.61 *	23.05 ± 3.20 *
乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂	490	11	1335.71 ± 331.39 *	24.49 ± 7.96 *
Wuling powder and	245	9	1029.69 ± 207.70	19.18 ± 2.38
<i>Hypericum perforatum</i> L.	123	11	1101.11 ± 306.44	21.69 ± 4.59

注:与模型组比较, * $P < 0.05$ 。
Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$.

表 3 乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂对慢性应激模型大鼠血浆相关物质的影响 ($\bar{x} \pm s$)**Tab.3** The effect of Wuling powder and *Hypericum perforatum* L. on plasma in CUS rats ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	例数 n	促肾上腺皮质激素 ACTH (pg/mL)	皮质酮 CORT (ng/mL)	促肾上腺皮质激素释放 激素 CRH (pg/mL)
对照组 Control	—	10	28.58 ± 7.39 *	340.94 ± 39.00 *	5.35 ± 1.26 *
模型组 Model	—	10	33.97 ± 6.65	393.38 ± 59.46	7.13 ± 1.96
氟西汀 Fluoxetine	2.4	10	28.76 ± 5.74 *	344.36 ± 48.36 *	5.87 ± 0.99
乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂	490	10	26.83 ± 4.86 *	299.77 ± 44.33 *	5.51 ± 1.62 *
Wuling powder and <i>Hypericum</i>	245	10	27.19 ± 3.96 *	382.25 ± 55.51	6.32 ± 2.24
<i>perforatum</i> L.	123	10	28.83 ± 5.40	365.15 ± 55.88	6.69 ± 1.17

注:与模型组比较, * $P < 0.05$ 。Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$.

2.3 乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂对慢性不可预知温和应激大鼠海马单胺类神经递质的作用

实验结果表明:与正常对照组相比,模型组大鼠海马组织单胺神经递质 5-HT, NE 和 DA 明显降

低($P < 0.05$);与模型组相比,乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂 490 mg/kg 剂量组可明显升高海马组织 5-HT, NE 和 DA 的含量($P < 0.05$)(表 4)。

表 4 乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂对慢性应激模型海马组织单胺类神经递质的影响 ($\bar{x} \pm s$)**Tab.4** Effects of Wuling powder and *Hypericum perforatum*L. on monoamine neurotransmitters concentration in hippocampus in CUS rats ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	例数 n	5-羟色胺 5-HT (ng/mL)	去甲肾上腺素 NE (ng/mL)	多巴胺 DA (ng/mL)
对照组 Control	—	10	585.05 ± 227.59 *	150.08 ± 28.40 *	89.42 ± 22.44 *
模型组 Model	—	10	418.22 ± 101.05	129.60 ± 29.31	75.91 ± 13.05
氟西汀 Fluoxetine	2.4	10	624.24 ± 109.05 *	175.50 ± 36.06 *	101.77 ± 28.37 *
乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂	490	10	639.78 ± 147.43 *	173.65 ± 32.04 *	84.37 ± 17.69 *
Wuling powder and <i>Hypericum</i>	245	10	378.73 ± 100.03	140.43 ± 38.78	65.48 ± 15.36
<i>perforatum</i> L.	123	10	354.57 ± 62.15	119.61 ± 41.43	75.97 ± 29.27

注:与模型组比较, * $P < 0.05$ 。Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$.

3 讨论

目前抑郁症的发病率呈逐年上升的趋势,成为研究热点。研究过程中,合理的抑郁动物模型是关键,主要包括环境应激模型、社会刺激模型、手术制备模型、转基因动物模型以及产后抑郁模型。其中,慢性不可预知应激致抑郁模型,因与实际生活中长期遭受低水平应激导致的抑郁症行为特征相似,如自主活动减少、兴趣缺失、探索能力以及学习能力低下等^[2],并且可伴与临床抑郁症患者相似的生理化和激素水平等的改变,是公认的抑郁症模型。此外,该模型还具有成模率高、可持续性长等特点,广泛应用于药物筛选、机制的探究、心理行为变化等^[3-5]方面研究。

本实验选用慢性不可预知应激加孤养模型,连续给药 28 d,行为学结果显示,模型组大鼠糖水偏嗜度明显降低,与抑郁患者兴趣缺失的症状相似,给予乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂治疗后可显著增加慢性应激大鼠糖水偏嗜度。Morris 水迷宫是常用于

评价学习记忆能力的方法,用于检测空间学习能力和空间记忆能力,动物成功找到逃避潜伏期时间越长,空间学习能力越差,乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂可缩短模型动物逃避潜伏期,改善模型动物学习记忆能力。上述行为学研究结果显示,乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂对慢性应激抑郁模型大鼠具有一定的治疗作用。

应激反应会引起单胺递质含量不足、脑源性神经营养因子减少以及 HPA 轴功能失调^[6-8],其中最主要的特征是 HPA 轴活化,有研究表明抑郁症患者血清 COR、ACTH 的含量显著升高,且出现 COR、ACTH 分泌昼夜节律紊乱^[9]。国外研究显示,海马是 HPA 轴负反馈的高级中枢,也是应激损伤的敏感部位,持续的应激刺激会导致抑郁患者或动物脑内奖赏环路如前额皮层、杏仁核以及海马等脑区神经元萎缩,海马作为调控学习记忆功能的重要脑区,对于获取信息、巩固、储存记忆起着关键作用,慢性应激可降低模型大鼠海马组织中 5-HT、NE、DA 蛋白含量^[10-13]。而中枢神经系统 5-HT、NE 等含量

降低,则发生抑郁,本实验结果显示,模型组大鼠海马组织中 5-HT、DA、NE 的含量明显降低,血浆 CORT、ACTH、CRH 含量升高,乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂可显著降低血浆 CORT、ACTH、CRH 的含量,升高海马组织单胺类神经递质。综上所述,乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂具有抗抑郁作用,其机制与提高海马单胺类神经递质含量,调节 HPA 轴功能有关。

参考文献:

- [1] Lavergne F, Jay TM. A new strategy for antidepressant prescription[J]. *Front Neurosci*,2010,4;192.
- [2] Aung SK, Fay H, Hobbs RF. Traditional Chinese medicine as a basis for treating psychiatric disorders: a review of theory with illustrative cases[J]. *Med Acupunct*,2013,25(6):398-406.
- [3] Yilmaz N, Demirdas A, Yilmaz M, *et al.* Effects of venlafaxine and escitalopram treatments on NMDA receptors in the rat depression model[J]. *J Membr Biol*,2011,242(3):145-151.
- [4] Zhang L, Hu L, Chen M, *et al.* Exogenous interleukin - 6 facilitated the contraction of the colon in a depression rat model [J]. *Dig Dis Sci*,2013,58(8):2187-2196.
- [5] Zhang Z, Fei P, Mu J, *et al.* Hippocampal expression of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 and neuronal PAS domain protein 4 in a rat model of depression[J]. *Neurol Sci*, 2014,35(2):277-282.
- [6] Brunoni AR, Lopes M, Fregni F. A systematic review and meta-

analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*,2008,11(8):1169-1180.

- [7] Rohleder N, Wolf JM, Wolf OT. Glucocorticoid sensitivity of cognitive and inflammatory processes in depression and posttraumatic stress disorder[J]. *Neurosci Biobehav Rev*,2010,35(1):104-114.
- [8] Strekalova T, Couch Y, Kholod N, *et al.* Update in the methodology of the chronic stress paradigm: internal control matters[J]. *Behav brain funct*,2011,7;9.
- [9] 周晓莉,饶一武. 应激状态下患者下丘脑-垂体-肾上腺轴功能的变化[J]. *医学综述*,2014,20(13):2439-2440.
- [10] Lin LC, Sibille E. Reduced brain somatostatin in mood disorders: a common pathophysiological substrate and drug target? [J]. *Front Pharmacol*,2013,4;110.
- [11] Sandi C, Haller J. Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2015,16(5):290-304.
- [12] Foy MR. Ovarian hormones, aging and stress on hippocampal synaptic plasticity[J]. *Neurobiol Learn Mem*,2011,95(2):134-144.
- [13] 童妍,金钊,赵焕瑛. 大黄素甲醚对慢性轻度不可预见应激大鼠海马单胺类神经递质的影响[J]. *中药药理与临床*,2015,31(1):54-57.

[修回日期]2016-02-01

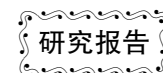
(下接第 92 页)

- [6] Zhai W, Zhang H, Wu C, *et al.* Crosslinking of saphenous vein ECM by procyanidins for small diameter blood vessel replacement [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2014 Aug,102(6):1190-1198.
- [7] 徐朝军,宋岚,杨进,等. 原花青素交联去细胞牛颈静脉带瓣管道的实验研究[J]. *现代生物医学进展*,2012,30:5831-5835.
- [8] 林曦,张卫达,王晓武,等. Triton X-100、环氧氯丙烷联合改性处理牛颈静脉带瓣管道的体内外生物相容性研究[J]. *中国现代医学杂志*,2011,35:4405-4408+4413.
- [9] Isenburg JC, Simionescu DT, Vyavahare NR. Elastin stabilization in cardiovascular implants: improved resistance to enzymatic degradation by treatment with tannic acid [J]. *Biomaterials*,2004 Jul,25(16):3293-302.
- [10] Isenburg JC, Simionescu DT, Vyavahare NR. Tannic acid treatment enhances biostability and reduces calcification of glutaraldehyde fixed aortic wall [J]. *Bimaterials*,2005,26(11):1237-1245.
- [11] D. M. Basalyga, D. T. Simionescu, W. Xiong, *et al.* Elastin

degradation and calcification in an abdominal aorta injury model [J]. *Circulation*, 2004,110: 3480-3487.

- [12] Lee JS, Basalyga DM, Simionescu A, *et al.* Elastin calcification in the rat subdermal model is accompanied by up-regulation of degradative and osteogenic cellular responses [J]. *American Journal of Pathology*,2006 Feb,168(2):490-498.
- [13] 刘小为. 丹宁酸与给水处理过程相关的若干化学行为研究 [D]. 哈尔滨工业大学,2007.
- [14] Jastrzebska M, Zalewska-Rejaki, Wrazlik R, *et al.* Tannic acid-stabilized pericardium tissue: IR spectroscopy, atomic force microscopy, and dielectric spectroscopy investigations [J]. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Jul,78(1):148-156.
- [15] Isenburg JC, Karamchandani NV, Simionescu DT, *et al.* Structural requirements for stabilization of vascular elastin by polyphenolic tannins[J]. *Biomaterials*,2006 Jul,27(19):3645-3651.

[修回日期]2016-04-26



丹宁酸交联后续处理对牛颈静脉血管的影响

孙嘉康¹, 周建业¹, 唐跃¹, 罗富良¹, 汪胜¹, 周庆亮², 霍美俊²

(1. 北京协和医学院 中国医学科学院 阜外医院 国家心血管病中心 心血管疾病国家重点实验室, 北京 100037;

2. 北京迈迪顶峰医疗科技有限公司, 北京 101312)

【摘要】 目的 观察丹宁酸固定后续处理对改善丹宁酸交联牛颈静脉贮存液稳定性, 和对血管热稳定性、抗钙化能力、生物力学性能及纤维结构的影响。**方法** 新鲜牛颈静脉分别经戊二醛固定(戊二醛组)、丹宁酸交联(丹宁酸组)及丹宁酸交联后续处理(实验组), 采用大鼠皮下植入模型测定钙含量、热皱缩温度、断裂强度和断裂伸长率, 以及组织病理学检查等指标进行评价。**结果** 研究组所有指标均优于戊二醛组($P < 0.05$); 与丹宁酸组比较, 实验组的贮存液颜色不再变化, 热皱缩温度有所降低, 21 d 钙含量略升, 60 d 钙含量略低($P < 0.01$), 两组材料力学强度结果无统计学差异($P > 0.05$), 且两组的胶原纤维和弹力纤维均保持较好的完整性。**结论** 丹宁酸交联后处理可提高贮存液的稳定性, 使牛颈静脉血管的柔软性有所恢复, 同时保持了血管抗钙化能力、组织强度和纤维结构的完整性。

【关键词】 牛颈静脉; 丹宁酸; 钙化; 生物力学

【中图分类号】 R318.0 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 06-0087-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.005.014

Effect of post-treatment on tannic acid fixed bovine jugular vein

SUN Jia-kang¹, ZHOU Jian-ye¹, TANG Yue¹, LUO Fu-liang¹, WANG Sheng¹,

ZHOU Qing-liang², HUO Mei-jun²

(1. State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037, China;

2. Beijing Med Zenith Medical Scientific Co., Ltd, Beijing 101312, China)

【Abstract】 Objective To investigate effects of post-treatment on stability of storage solution/ thermostability, anti-calcification, the biomechanics and fibred structures of tannic acid fixed bovine jugular vein (BJV). **Methods** Fresh bovine jugular vein were treated with glutaraldehyde (Glut group), tannic acid (TA group), and post-treatment on TA-fixed (Study group). Calcium level was measured by implanting BJVs subcutaneously into the rats. The shrinkage temperature, tensile strength, elongation at break and histological changes were evaluated as well. **Results** Compared with Glut group, all results were better in Study group ($P < 0.05$). Compared with TA group, in the Study group, color of storage solution did not change, shrinkage temperature and 60-days' calcium level decreased, 21-days' calcium level increased ($P < 0.01$); biomechanical properties were not statistics difference between TA group and Study group ($P > 0.05$), and collagen fibers and elastic fibers were maintained well in TA group and Study group. **Conclusion** Post-treatment on TA-fixed Bovine Jugular Vein can improve stability of storage solution and BJVs elasticity, and do not change anti-calcification, biomechanical properties and fibred structures of TA-fixed BJVs.

【Key words】 Bovine jugular vein; Tannic acid; Calcification; Biomechanics

牛颈静脉带瓣血管因其具有天然瓣膜结构、规格齐全、来源易得等优点, 是良好的心血管外科修

[作者简介] 孙嘉康(1983-), 男, 硕士生, 助理研究员, 主要从事生物材料研究。

[通讯作者] 周建业(1966-), 男, 硕士, 研究员, 硕士生导师, 主要从事生物材料和人工器官研究, E-mail: zhoujy@263.net。

补材料^[1],但由于血管壁易发生严重钙化而制约了牛颈静脉血管的广泛应用。本课题组前期的研究发现,在传统戊二醛固定的基础上增加丹宁酸序贯交联可显著提高牛颈静脉血管的抗钙化能力和其他理化性能^[2]。但在随后的研究中也发现,丹宁酸既能交联弹力纤维,也能交联胶原纤维,在增加组织强度的同时也带来了血管变硬、顺应性变差、手术操作性能下降的问题。此外,丹宁酸溶液是多元醇和多元酚的混合物,组成成分和化学反应复杂,容易发生自聚合反应,放置在丹宁酸溶液里的牛颈静脉会持续变硬,溶液颜色也持续变深。因此,如何解决血管的血管顺应性下降,和改善贮存液稳定性的问题,是本文的研究目标。本研究在丹宁酸序贯交联的基础上再增加漂洗及更换贮存液的后继处理,并评价了该处理对牛颈静脉血管抗钙化性能、生物力学性能和纤维结构的影响。

1 材料和方法

1.1 样品采集及分组处理

取新鲜牛颈静脉,去除血管表面脂肪,分为 3 组。戊二醛固定为对照组(戊二醛组):用 0.6% 戊二醛于 4℃ 固定 2 d,再于 0.3% 戊二醛溶液中处理 7 d 以上,长期保存备用;丹宁酸交联组(丹宁酸组),在戊二醛固定组基础上,用 0.3% 丹宁酸于 4℃ 避光处理 4 d 以上,长期保存备用;丹宁酸后处理组(实验组):丹宁酸交联基础上,用 0.3% 戊二醛溶液 4℃ 振荡漂洗 10 次,每次 8 h,最后于 0.3% 戊二醛中保存备用。

1.2 贮存液稳定性观察

分别取丹宁酸组交联完成后最小包装一瓶(含一根牛颈静脉血管和 50 mL 溶液)、实验组处理完成后最小包装一瓶,4℃ 避光保存 30 d,取出静脉血管,比较颜色改变情况。

1.3 热皱缩温度测定

将 5×40 mm 长方形血管片挂于皮革温度收缩测定仪测试架(MSW-YD4,陕西科技大学)的上、下挂钩之间,以纯化水作为加热介质,测量待测样品的热皱缩温度。

1.4 周向断裂拉伸力

在牛颈静脉血管上避开瓣膜窦部分,取长度为 30 mm±0.5 mm 的血管为样品,保持血管完整形态横向固定于电子万能材料试验机(WDW-1,上海松顿机械设备有限公司),设定拉伸速度 100 mm/min,记录血管断裂时拉力及断裂拉伸率。

1.5 轴向拉伸断裂力

取长度为 50 mm±0.5 mm 的血管为样品,保持血管完整形态纵向固定于电子万能材料试验机(WDW-1,上海松顿机械设备有限公司),夹具间距 50 mm,拉伸速度 100 mm/min,记录血管断裂时拉力及断裂拉伸率。

1.6 大鼠皮下植入模型的钙含量测定

1.6.1 大鼠皮下埋植模型

30 只 SPF 级 SD 雄性大鼠,21 d(70~80 g),由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2015-0001】。无菌手术在中国医学科学院阜外医院屏障动物实验设施进行【SYXK(京)2013-0025】。实验动物使用经中国医学科学院阜外医院“实验动物福利与伦理审查委员会”讨论同意使用。

1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉,SD 大鼠俯卧位固定,背部正中切口,在皮下植入分别经过戊二醛组、丹宁酸组和实验组的牛颈静脉血管片各 1 片,随后缝合皮肤切口,并消毒。每个植入片为 1 cm×1 cm,植入前用无菌生理盐水清洗 3 次,每次 2 min,每次生理盐水用量为 500 mL。

术后大鼠随机分为 2 组,分别于术后 21 d 和 60 d 采用吸入 CO₂ 的方法处死大鼠,取出植入血管片,去除表面的宿主组织,生理盐水冲洗备用。

1.6.2 钙含量测定

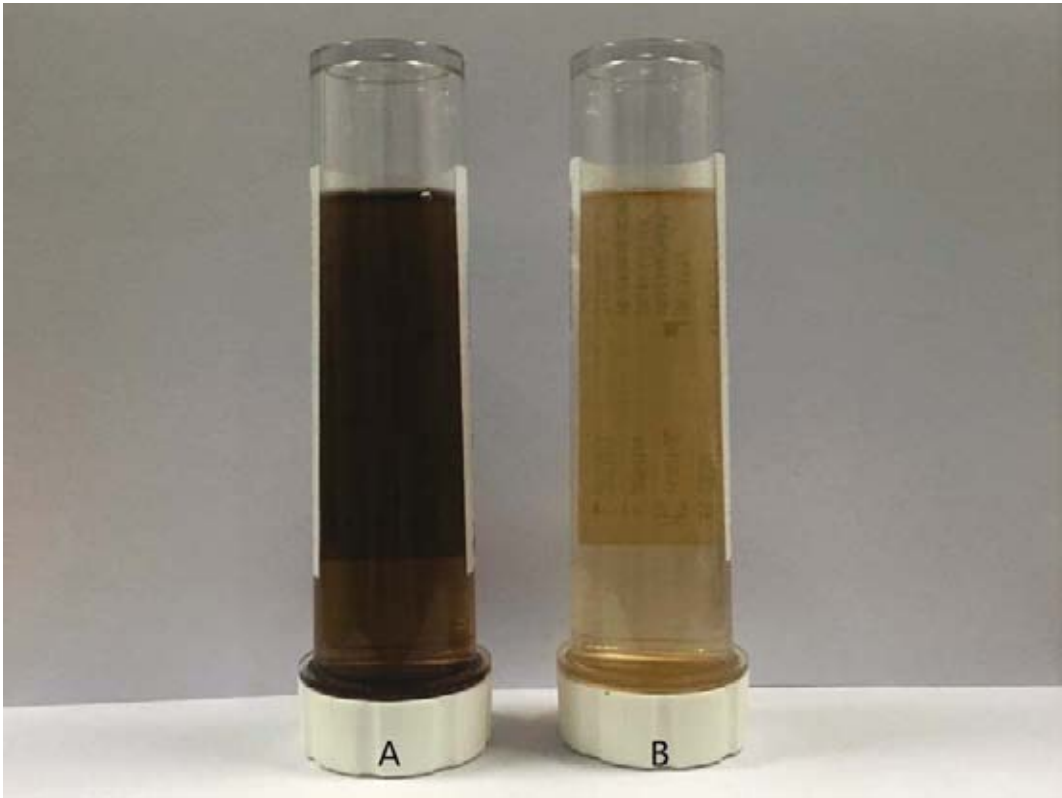
将样品经恒温烘箱 80℃ 干燥 48 h 至恒重,称重并记录,随后用优级纯 HNO₃ 1 mL,低温加热至样品溶解,并继续加热至溶液近干,用去离子水定容至 20 mL 容量瓶中待测。检测使用仪器为电感耦合等离子体光谱仪(icap 6300,Thermo)。用钙标准储备液(1000 μg,购于国家标准物质研究中心)绘制标准曲线。随后将样品注入检测仪器,计算钙含量。计算公式 元素含量(μg/g)=(A-A₀)*V/m,其中 A 为样品溶液中待测元素浓度值,单位 μg/mL;A₀ 为样品空白溶液中待测元素浓度值,单位 μg/mL;V 为样品定容体积,单位 mL;m 为样品质量,单位 g。

1.7 组织病理学观察

皮下植入后血管片标本石蜡包埋、切片、酒精梯度脱水后分别做 Masson 染色和 ET+VG 染色,蔡司光学显微镜下观察照相。

1.8 统计学分析

所有数据使用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$),采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,采用方差分析。检验结果以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



注:(A)为丹宁酸处理组;(B)为实验组。

图 1 贮存液颜色

Note:(A) TA group;(B) Study group.

Fig.1 Color of storage solution

2 结果

2.1 贮存液变色情况

由图 1 可见实验组颜色保持不变,表明贮存液已趋于稳定。

2.2 热皱缩温度

表 1 所示,实验组热皱缩温度低于丹宁酸组,戊二醛组热皱缩温度最低,3 组间差异具有显著性($P < 0.01$)。说明后续处理会影响牛颈静脉血管的热稳定性,但仍优于戊二醛组。

表 1 热皱缩温度

Tab.1 Shrinkage temperature

组别 Group	热皱缩温度 Shrinkage temperature(℃)
戊二醛组(Glut group)	89.52 ± 1.12
丹宁酸组(TA group)	96.52 ± 0.93
实验组(Study group)	94.16 ± 0.97

2.3 周向/轴向拉伸断裂力

根据表 2 所示结果,实验组与戊二醛组比较,实验组周向/轴向拉伸断裂力均优于戊二醛组($P <$

0.05);实验组与丹宁酸组比较,周向/轴向拉伸断裂力无差异($P > 0.05$)。

2.4 大鼠皮下埋植血管片钙含量

表 3 所示,实验组、丹宁酸组钙含量各时间点均优于戊二醛组($P < 0.01$);与丹宁酸组比较,实验组 21d 钙含量略升、60d 钙含量略低($P < 0.01$)。

2.5 组织病理学观察

由图 2 可见,实验组与丹宁酸组比较,弹力纤维结构基本保持完整,未见明显变化。图中箭头指处蓝紫色为弹力纤维,戊二醛组的弹力纤维断裂、排列杂乱,60 d 组尤其明显(B);丹宁酸组和实验组两个时间点的弹力纤维的基本保存完好,明显好于戊二醛组。提示后续的处理手段并未削弱丹宁酸对牛颈静脉管壁胶原纤维与弹力纤维结构的稳定作用。

图 3 中箭头指处红色为胶原纤维,3 组在植入 21 d 时,胶原纤维基本保持原有结构;植入 60 d 时,戊二醛组胶原纤维断裂(B),而其他两组胶原纤维仍保持较好的完整性。

表 2 周向/轴向拉伸断裂力
Tab. 2 Circumferential/Axial tensile biomechanical properties

组别 Group	周向拉伸断裂力 (Circumferential)		轴向拉伸断裂力 (Axial)	
	最大荷重 Tensile strength (N)	断裂伸长率 Elongation at break (%)	最大荷重 Tensile strength (N)	断裂伸长率 Elongation at break (%)
戊二醛组 (Glut group)	260. 93 ± 46. 06	305. 47 ± 30. 34	145. 7 ± 44. 57	867. 24 ± 130. 62
丹宁酸组 (TA group)	354. 48 ± 67. 55	308. 79 ± 53. 34	176. 63 ± 49. 05	832. 03 ± 182. 51
实验组 (Study group)	360. 71 ± 52. 64	347. 73 ± 40. 46	199. 81 ± 40. 55	765. 35 ± 114. 35

表 3 大鼠皮下埋植血管片钙含量
Tab. 3 Calcium level of implanting BJVs
subcutaneously into the rats

组别 Group	植入 21d 21-days' (mg/g)	植入 60d 60-days' (mg/g)
戊二醛组 (Glut group)	50. 07 ± 17. 87	158. 83 ± 14. 7
丹宁酸组 (TA group)	1. 06 ± 0. 24	2. 57 ± 0. 70
实验组 (Study group)	1. 47 ± 0. 25	1. 56 ± 0. 50

3 讨论

人工带瓣血管是肺动脉闭锁、永存动脉干、大动脉转位等外科矫治手术中重建右室流出道不可缺少的修补材料^[3]。目前临床中广泛使用戊二醛固定的异种生物材料,虽然生物力学性能达到要求^[4],但远期钙化问题始终无法解决,这是以 Contegra 为代表的商业化牛颈静脉带瓣管道不能回避的待解问题^[5]。因此,近年来学者们聚焦于新型交联方法的探索,例如使用原花青素等改性方法,得到了比较满意的结果^[6-8]。

本课题组前期的研究证明,在戊二醛固定的牛颈静脉带瓣血管的基础上再经过丹宁酸交联处理,牛颈静脉的生物力学强度及抗钙化能力得到显著改善^[2]。这是由于戊二醛仅能交联固定胶原纤维,而丹宁酸不仅能交联胶原纤维,还能交联弹力纤维^[9-10]。在血管类富含弹力纤维的生物材料中,弹力纤维断裂、衰败引起的炎性反应和成骨过程,诱发了钙结晶的形成^[11-12],是容易发生严重钙化的主要原因,丹宁酸对弹力纤维的交联作用,减少了弹力纤维断裂的发生,从而减轻了牛颈静脉的钙化程度。

虽然丹宁酸序贯交联使牛颈静脉血管抗钙化

能力和力学强度得到显著提高,但在进行大动物植入实验时,发现经丹宁酸交联后的血管较硬、顺应性变差,手术操作性能下降;另外发现,丹宁酸交联后,随着保存时间延长血管材料持续变硬,同时贮存液颜色持续变深。虽然具体原因不明,但我们推测可能有两个原因:一是交联处理完成时组织中残留有未反应的丹宁酸,二是丹宁酸成分复杂,在酸性环境下会持续发生自体聚合反应^[13],而且丹宁酸主要通过氢键与弹力纤维等结合^[14-15],键能较低,不够稳定。因此,我们计划采用多次漂洗的方法去除多余的丹宁酸,再将血管贮存到偏碱性的 0.3% 戊二醛溶液中,希望能遏制多余的聚合反应,保持贮存液的稳定性。

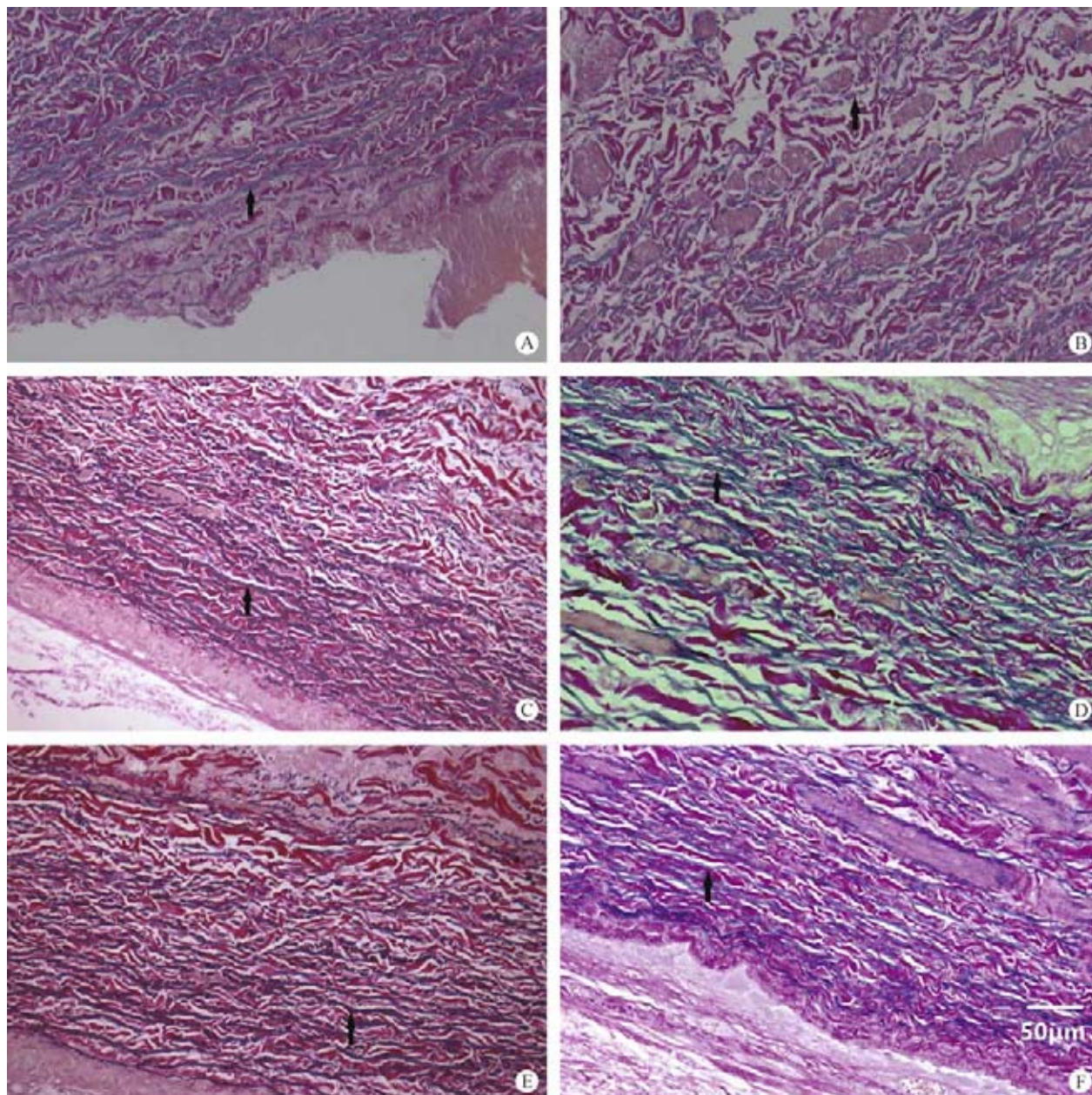
经过上述的后处理措施,可以直观地观察到贮存液颜色不再变深,表明贮存液趋于稳定。同时发现后处理组的血管变软,血管顺应性和大动物植入手术的操作性能提升明显,虽然没有合适的方法进行量化的测定,但血管材料变软确实是客观存在。这一现象也可以从热皱缩温度的降低得到证实,热皱缩温度反映组织材料中的键合程度,后处理步骤使热皱缩温度降低了 2℃,表明血管组织中的键合程度有所降低,材料变软有合理的解释。

后续处理在改善了血管材料的柔顺性的同时,保持了组织强度不减弱,无论是轴向还是周向的断裂拉力和断裂伸长率都没有显著变化。而对于丹宁酸处理带来的优异的抗钙化性能也得到了很好的保持,虽然丹宁酸组和实验组钙含量在统计学上表现为有差异,但相对于戊二醛 50 mg/g 和 150 mg/g 的量级而言,相差 1 mg/g 是没有实际意义的,因此我们认为后处理步骤维持了丹宁酸的抗钙化性能。病理学观察也表明后处理并未破坏血管的弹力纤维和胶原纤维结构的完整性。

综上所述,本研究通过对丹宁酸处理的牛颈静

脉带瓣血管进行多次漂洗和更换贮存液的后处理,改善了贮存液稳定性,提高了血管顺应性和手术操作性能,同时保持了血管材料的抗钙化性能、

力学强度和纤维结构的完整性。而丹宁酸交联反应和自体聚合的具体机制有待进一步深入研究。



注:(A)和(B)为戊二醛组,分别埋植 21 d 和 60 d;(C)和(D)为丹宁酸组,分别埋植 21 d 和 60 d;

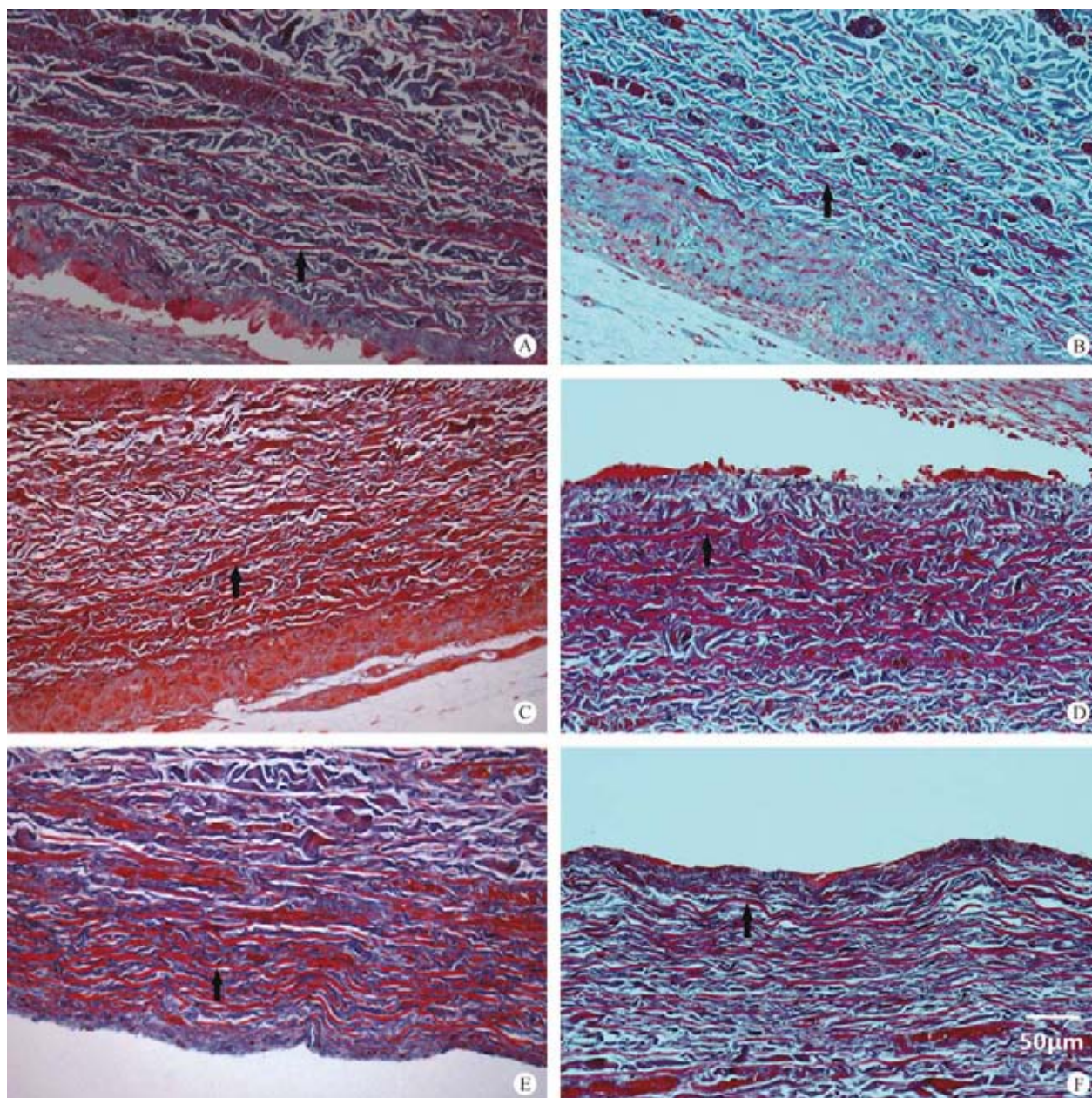
(E)和(F)为实验组,分别埋植 21 d 和 60 d。

图 2 牛颈静脉植入大鼠皮下后血管片的弹性纤维情况(ET + VG 染色, $\times 20$)

Note:(A) 21-days' Glut group (B) 60-days' Glut group; (C) 21-days' TA group (D) 60-days' TA group;

(E) 21-days' Study group (F) 60-days' Study group.

Fig. 2 Vascular elastic fiber after implanting BJVs subcutaneously into the rat (ET + VG, $\times 20$)



注:(A)和(B)为戊二醛组,分别埋植 21 d 和 60 d;(C)和(D)为丹宁酸组,分别埋植 21 d 和 60 d;
(E)和(F)为实验组,分别埋植 21 d 和 60 d。

图 3 牛颈静脉植入大鼠皮下后血管片的胶原纤维情况 (Masson 染色, $\times 20$)

Note: (A) 21-days' Glut group (B) 60-days' Glut group; (C) 21-days' TA group (D) 60-days' TA group;
(E) 21-days' Study group (F) 60-days' Study group.

Fig. 3 Vascular collagenous fiber after implanting BJVs subcutaneously into the rat (Masson, $\times 20$)

参考文献:

- [1] 金晶,陶凉,吴忠仕,等.牛颈静脉带瓣补片在复杂先天性心脏病患者右心室流出道重建中的应用[J].中国胸心血管外科临床杂志,2012,05:534-537.
- [2] 王德,周建业,胡盛寿,等.丹宁酸改性处理对戊二醛固定牛颈静脉管道理化特性的影响[J].中国医学科学院学报,2009,01:65-67.
- [3] Yong MS, Yim D, d'Udekem Y, *et al.* Medium-term outcomes of bovine jugular vein graft and homograft conduits in children [J]. ANZ Journal of Surgery, 2015 May, 85(5):381-385.
- [4] 笪琳萃,龚梅,王旻,等.新型交联方法在生物衍生材料中的应用进展[J].中国修复重建外科杂志,2014,06:777-783.
- [5] Krishna S Iyer. The Contegra bovine jugular valved conduit: Living up to expectations [J]? Ann Pediatr Cardiol, 2012 Jan-Jun, 5(1): 34-35.

(上转第 86 页)