中国科技论文统计源期刊
中文核心期刊要目总览

ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

ZHONGGUO BIJIAO YIXUE ZAZHI

中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

原名《中国实验动物学杂志》

2017 10

邮发代号：82-917
第27卷（第10期）Vol.27 No.10
ISSN 1671-7856

主办 中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所

中 国 比 较 医 学 杂 志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

月刊　1991 年 3 月创刊　第 27 卷　第 10 期　2017 年 10 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
编辑部主任
李继平
编　辑
《中国比较医学杂志》编辑部
出　版
中国实验动物学会
发　行
《中国比较医学杂志》编辑部
100021,北京市朝阳区潘家园南里 5 号
电话:(010)67779337
传真:(010)67770690
E-mail: bjb@cnilas.org
http://zgsydw.alljournal.ac.cn/zgbjyxzz/ch/index.aspx
广告经营许可证
京朝工商广字第 8131 号
照　排
同方知网(北京)技术有限公司
印　刷
北京博海升彩色印刷有限公司
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

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　代解杰
本期责任编辑　金　剑　崔　韶

目　次

(本刊已入编“中文核心期刊要目总览”)

研究报告

骨内单次注射辛伐他汀促进小鼠乳腺癌肿瘤血管正常化的研究 …… 海宝,刘灿,张稳,等(1)
不同样本和方法对测定大鼠血液生化指标的影响 …… 李迎,崔晓霞,尚世臣,等(7)
流式细胞术分析 PMA 诱导 THP-1 分化为巨噬细胞的表型特征 …… 彭卓颖,李想,丛喆,等(10)
荧光双向电泳检测雌雄小鼠肝组织蛋白组学的差异 …… 戎卓娜,李慧玲,董鹏辉,等(16)
Mac-1 基因缺失对黑色素瘤生长的影响 … 陈坚,段有发,叶志金,等(23)
1α,25(OH)$_2$D$_3$ 对大鼠关节软骨细胞润滑素表达的影响 …… 牛国栋,李思维,刘忠军,等(28)
单染与复染在观察 *SIRT*1 基因敲除小鼠骨关节炎切片中的差异比较 …… 于红燕,杨占东,杨琪,等(34)
丹酚酸 A 改善 ZDF 大鼠视网膜病变及其作用机制 …… 马全鑫,陈小真,戎亦骊,等(40)
松花粉辅助紫杉醇联合铂类化疗的增效减毒作用 …… 赵学友,巩萍,孙铜,等(47)
高热大鼠不同程度寒颤模型的构建 …… 吴冬梅,郑翠红,吴冠虹,等(51)
钒暴露对大鼠小胶质细胞炎症反应和迁移的影响 …… 余晓巍,胡楚元,熊志军(55)
小鼠 CD4$^+$T 细胞外泌体分离及鉴定 …… 张伟鑫,曾仲(60)
广东省 2014～2016 年普通级兔和豚鼠病毒抗体监测与分析 …… 吴瑞可,王静,潘金春,等(65)
广东省实验用小型猪主要病原微生物学及寄生虫学调查 …… 黄树武,闵凡贵,吴瑞可,等(69)
miR-424 对非小细胞肺癌细胞株 A549 迁移及侵袭的影响 …… 王胜,熊飞,开金丹(74)
siRNA 沉默 MACC1 基因表达对宫颈癌细胞增殖及侵袭的影响 …… 杜珍,陈志美,周道秋,等(80)

研究进展

T 细胞亚群在心室重构中的作用研究进展 …… 顾文超,周晓慧,林芳,等(85)
肌萎缩侧索硬化症相关基因突变与疾病动物模型 …… 张丽,张连峰(89)
大鼠急性心肌梗死模型制备方法研究进展 …… 曹珏,李贻奎,陈孟倩,等(96)
替代方法在化妆品检测中的应用分析 …… 程树军,秦瑶,柯逸晖,等(101)
吗啡镇痛个体差异的遗传药理学进展 …… 杨银,孟爱民(107)
免疫系统人源化小鼠模型的研究进展 …… 连晶瑶,丁苗慧,秦国慧,等(113)

教学管理

医药院校实验动物生物安全危害及防控 … 韩志刚,张倩,韩文莉,等(120)
基因突变动物模型在《医学遗传学》实验教学中的应用 …… 唐佐青,霍学云,韩玉英,等(123)

专家问答

光声断层扫描系统介绍 …… (68)
活体成像的最新进展 …… (100)

简讯

《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》入选《中国学术期刊(网络版)》网络首发首批示范期刊 …… (6)

期刊基本参数:CN11－4822/R＊1991＊m＊大 16＊126＊zh＊p＊￥20.00＊2000＊24＊2017－10

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly **Established in March** 1991 **Volume** 27 **Number** 10 **October** 30 2017

Responsible Institution
China Associsation for Science and Technology

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

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

Editor-in-Chief
QIN Chuan (秦川)

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

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

CONTENTS IN BRIEF

Study on the effect of single dose intraosseous injection of simvastatin on tumor vascular normalization in murine breast cancer ····· *HAI Bao, LIU Can, ZHANG Wen, et al.* (1)
Effects of different samples and methods on the determination of blood biochemical indexes in rats ····· *LI Ying, CUI Xiao-xia, SHANG Shi-chen, et al.* (7)
Phenotypic characterization of PMA-induced THP-1 macrophages analyzed by flow cytometry ····· *PENG Zhuo-ying, LI Xiang, CONG Zhe, et al.* (10)
Differential proteomic analysis of liver tissues between male and female C57BL/6J mice by 2D-DIGE ····· *RONG Zhuo-na, LI Hui-ling, DONG Peng-hui, et al.* (16)
Effect of *Mac*-1 deficiency on the tumor growth of melanoma in mice ····· *CHEN Jian, DUAN You-fa, YE Zhi-jin, et al.* (23)
$1\alpha,25(OH)_2D_3$ regulates expression of lubricin of chondrocytes in rat articular cartilage ····· *NIU Guo-dong, LI Si-wei, LIU Zhong-jun, et al.* (28)
Observation of the articular cartilage of osteoarthritis in *SIRT1* gene knock-out mice through single staining and compound staining ····· *YU Hong-yan, YANG Zhan-dong, YANG Qi, et al.* (34)
Effect of salvianolic acid A on retinopathy and its mechanism in ZDF rats ····· *MA Quan-xin, CHEN Xiao-zhen, RONG Yi-li, et al.* (40)
Synergism and attenuation effects of Pini Pollen on paclitaxel and cisplatine chemotherapy ····· *ZHAO Xue-you, GONG Ping, SUN Tong, et al.* (47)
Establishment of rat models of fever and shivering in different degrees ····· *WU Dong-mei, ZHENG Cui-hong, WU Guan-hong, et al.* (51)
Exposure to vanadium promotes primary cultured rat microglial inflammation and migration ····· *YU Xiao-wei, HU Chu-yuan, XIONG Zhi-jun* (55)
Isolation and identification of exosomes of $CD4^+$ T cells in mice ····· *ZHANG Wei-xin, ZENG Zhong* (60)
Surveillance and analysis of virus antibodies in conventional rabbits and guinea pigs in Guangdong Province during 2014–2016 ····· *WU Rui-ke, WANG Jing, PAN Jin-chun, et al.* (65)
Microbiological and parasitological investigation of experimental minipigs in Guangdong province ····· *HUANG Shu-wu, MIN Fan-gui, WU Rui-ke, et al.* (69)
Effect of miR-424 on migration and invasion of non-small cell lung cancer cells A549 ····· *WANG Sheng, XIONG Fei, KAI Jin-dan* (74)
Effect of silencing MACC1 gene on proliferation and invasion of cervical cancer cells ····· *DU Zhen, CHEN Zhi-mei, ZHOU Dao-qiu, et al.* (80)
Advances in research on the role of T cell subsets in ventricular remodeling ····· *GU Wen-chao, ZHOU Xiao-hui, LIN Fang, et al.* (85)
Amyotrophic lateral sclerosis-associated gene mutations and ALS animal models ····· *ZHANG Li, ZHANG Lian-feng* (89)
Research progress on preparation of rat models of acute myocardial infarction ····· *CAO Jue, LI Yi-kui, CHEN Meng-qian, et al.* (96)
The application analysis of alternative method in cosmetics asssessment ····· *CHENG Shu-Jun, QIN Yao, KE YI-Hui, et al.* (101)
Genetic pharmacology of individual differences in morphine analgesia ····· *YANG Yin, MENG Ai-min* (107)
Research progress of humanized mouse models in immune system ····· *LIAN Jing-yao, DING Miao-hui, QIN Guo-hui, et al.* (113)
Biosafety hazard of laboratory animals in medical colleges and its prevention and control ····· *HAN Zhi-gang, ZHANG Qian, HAN Wen-li, et al.* (120)
Application of mutated inbred animal models in the experimental teaching of medical genetics ····· *TANG Zuo-qing, HUO Xue-yun, HAN-Yu-ying, et al.* (123)

研究报告

骨内单次注射辛伐他汀促进小鼠乳腺癌肿瘤血管正常化的研究

海　宝[1],刘　灿[1],张　稳[1],祝俊雄[1],曹宝山[3],宋纯理[1,2]*

(1.北京大学第三医院骨科,北京　100191;2.脊柱疾病研究北京市重点实验室,北京　100191;
3.北京大学第三医院肿瘤化疗与放射病科,北京　100191)

【摘要】 **目的**　研究骨内单次注射辛伐他汀对小鼠乳腺癌肿瘤血管结构和功能的影响。**方法**　构建小鼠乳腺癌原位模型,分别给予骨内单次注射辛伐他汀(50 μg)或空白载体。α-SMA/CD31 免疫荧光双染观察肿瘤血管的周细胞/血管内皮细胞覆盖率;尾静脉注射伊文氏蓝染料观察肿瘤血管渗透性;免疫组化检测肿瘤内部 HIF-1α 表达水平的变化。**结果**　免疫荧光双染发现与对照组相比辛伐他汀组肿瘤血管周细胞覆盖增多($P < 0.05$);肿瘤组织内伊文氏蓝含量显著降低($P < 0.05$),提示肿瘤血管渗透性减低,肿瘤血管趋于成熟;免疫组化显示肿瘤内部 HIF-1α 的表达水平降低,乳腺癌肿瘤组织缺氧改善。**结论**　骨内单次注射辛伐他汀能够提高新生血管的周细胞覆盖,促进乳腺癌肿瘤血管正常化。

【关键词】 辛伐他汀;骨内注射;血管正常化;乳腺癌;周细胞
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017)010-0001-06
doi: 10.3969. j. issn. 1671 -7856. 2017. 010. 001

Study on the effect of single dose intraosseous injection of simvastatin on tumor vascular normalization in murine breast cancer

HAI Bao[1], LIU Can[1], ZHANG Wen[1], ZHU Jun-xiong[1], CAO Bao-shan[3], SONG Chun-li[1,2]*
(1. Department of Orthopedics, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China; 2. Beijing Key Laboratory of Spinal Diseases, Beijing 100191; 3. Department of Cancer Chemotherapy and Radiology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191)

【**Abstract**】 **Objective**　To investigate the effect of single dose intraosseous injection of simvastatin on tumor vascular structure and function in murine breast cancer. **Methods**　BALB/c mice and 4T1 murine breast cancer cells were used to establish a subcutaneous xenograft model. The mouse model of orthotopic breast cancer received intraosseous injection of a single dose of simvastatin (50 μg) or vehicle only. Frozen tumor tissue sections were prepared for co-immunostained with CD31 and α-SMA. Evans blue dye was injected into the tail vein to observe the vascular permeability. The expression level of HIF-1α was detected by immunohistochemistry. **Results**　Immunofluorescence dual staining showed that intraosseous injection of simvastatin increased the number of perivascular pericytes in the tumor vessel($P < 0.05$), Evans blue dye content showed that in vivo vessel permeability in the tumor tissue was significantly decreased($P < 0.05$), and the immunohistochemistry results showed that local hypoxic area was significantly improved. **Conclusions**　Single dose

[基金项目]国家自然科学基金项目(81672133,81641079);国家高技术研究发展计划(2015AA020304)。
[作者简介]海宝(1989 -),男,硕士生,专业:外科学。E-mail: haibao@bjmu.edu.cn
[通讯作者]宋纯理(1971 -),男,研究员,研究方向:骨质疏松、骨折愈合。E-mail: schl@bjmu.edu.cn

intraosseous injection of simvastatin can promote the normalization of tumor vasculature by improving the coverage of pericytes.

【Key words】 Simvastatin; Intraosseous injection; Vasculature normalization; Breast cancer; Pericyte

肿瘤的生长和转移依赖新血管的形成[1],而新生的肿瘤血管往往结构异常并且杂乱无章,大约有50%的肿瘤血管都是无功能的,形成组织间隙压升高、局部低氧的肿瘤微环境[2]。有学者提出通过抗肿瘤血管新生以达到"饿死肿瘤"的目标,但目前此方面的研究并未取得应有的治疗效果,甚至因血管阻断药物造成局部缺氧,反而加速新血管生成和肿瘤生长[3]。近年来,肿瘤"血管正常化"作为一种新的治疗理念,被广泛研究[4,5],合理应用抗血管生成药物可以使异常的肿瘤新生血管趋于正常化,通过与化疗药物结合治疗能够增强药效,但其治疗时间窗口很窄,难以广泛应用[6]。

近年来研究发现他汀类药物具有除降脂以外的"多效性",如抗炎、抗氧化、抗肿瘤等[7]。本课题组前期实验发现骨内单次注射辛伐他汀/泊洛沙姆407水凝胶具有动员内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)促进局部成骨及成血管的作用[8]。新的观点认为,骨骼不仅是参与运动和支撑作用的惰性器官,而且是能够分泌多种活性物质的"内分泌器官"[9],骨重建过程中,释放大量的促血管生成因子如VEGF、bFGF等影响系统血管新生[10]。骨髓内还储存着丰富的EPCs和周细胞等[11],研究表明骨髓源性的造血干细胞能够分化为EPCs被动员至肿瘤参与血管的新生,而骨髓来源的周细胞也能够被募集至肿瘤促进血管的成熟[12]。

本实验通过骨内单次注射辛伐他汀水凝胶,观察其作用于骨髓内而产生的对远处肿瘤血管形态和功能的影响,为肿瘤的治疗提供新的策略。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF级雌性BALB/c小鼠40只,6周龄,体重18~20 g,购买于北京大学医学部实验动物科学部[SCXK(京)2016-0010],饲养于北京大学医学部实验动物科学部[SYXK(京)2016-0041],实验动物单笼饲养,自由饮食,并按照实验动物使用的"3R"原则给予人道关怀,适应性喂养一周后开始实验。

1.1.2 细胞株

4T1小鼠乳腺癌细胞株由德国伯托公司惠赠。

1.2 主要试剂与仪器

辛伐他汀原料药(中国药品生物制品检定所);泊洛沙姆(德国BASF公司);兔抗(hypoxia inducible factor-1, HIF-1α)多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司);抗CD31多克隆抗体(Abcam,美国);抗α-SMA单克隆抗体(Abcam,美国);DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);倒置荧光显微镜(Leica,德国)。

1.3 实验方法

1.3.1 建立4T1乳腺癌细胞株小鼠移植瘤模型

取对数生长期的4T1小鼠乳腺癌细胞接种于小鼠乳腺脂肪垫。监测小鼠的一般情况、体重、饮食及排便状况,使用游标卡尺隔日记录小鼠皮下肿块体积。以肿瘤最长直径(a)和垂直最短径(b)计算肿瘤体积分数:公式 $V(mm^3) = ab^2/2$(V为肿瘤近似体积)[13]。

1.3.2 泊洛沙姆水凝胶配制

泊洛沙姆407的配制按照本实验室既往方法[14],将辛伐他汀粉末加入配制好的泊洛沙姆溶液中,搅拌均匀,最终浓度为2.5 mg/mL。

1.3.3 药物干预及分组

待肿瘤达到100 mm^3时开始进行药物干预,将荷瘤小鼠按完全随机数表随机分为两组:空白对照组(control)、辛伐他汀组(SIM),每组20只。异氟烷麻醉,使用微量注射器在小鼠胫骨上端穿刺,注射50 μg辛伐他汀水凝胶,观察肿瘤组织缺氧的变化与肿瘤血管形态的改变。

1.3.4 伊文氏蓝(Evans blue)染色检测肿瘤血管渗透性

小鼠采用戊巴比妥钠麻醉后,尾静脉注射2%的伊文氏蓝染料100 μL,循环20 min。取材,瘤体置于60℃条件下烤干16 h。然后将瘤体放入含1 mL的甲酰胺溶液的EP管中,在室温下浸泡72 h以提取染料。采用酶标仪在630 nm波长下分别测定各瘤体染料含量。

1.3.5 免疫荧光双染观察血管周细胞

将小鼠组织标本取材后,分别放入4%多聚甲醛和液氮中保存,OCT包埋,使用冰冻切片机将肿瘤组织切片,7 μm厚,0.2%Triton-100冰上破膜,1%正常山羊血清封闭1 h,切片上同时滴加两种一抗:兔抗CD31多克隆抗体(1∶200)和Cy3标记的鼠抗α-SMA单克隆抗体(1∶200),4℃孵育过夜,加

DyLight-488 羊抗兔二抗(1∶500)室温避光孵育1 h,抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜下观察拍照,Image J 软件统计分析,计算 α-SMA$^+$/CD31$^+$ 周细胞覆盖率。

1.3.6　免疫组化检测 HIF-1α 的表达

将甲醛固定的标本石蜡包埋,切片,5 μm 厚,二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,封闭,加兔抗 HIF-1α 多克隆抗体(1∶100)4℃孵育过夜,次日加羊抗兔二抗在室温下孵育 30 min,加入 DAB 显色液,中性树胶封片,显微镜下观察拍照。

1.3.7　HE 染色观察肿瘤坏死面积

将石蜡切片,经过二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,使用苏木素染色,用含有 1% 盐酸的酒精进行分色,脱去残余的染料,加入 1% 的伊红染液,梯度酒精分色及脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察,Image J 软件统计分析,计算肿瘤的坏死面积。

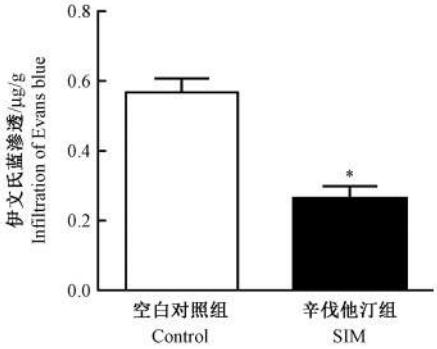
1.4　统计学方法

各组数据均采用 SPSS 21.0 软件进行统计学处理,以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异比较采用单因素方差分析及非配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示为差异有显著性。

2　结果

2.1　骨内单次注射辛伐他汀降低乳腺癌肿瘤组织血管渗透性

伊文氏蓝灌注法检测血管渗透性,结果显示空白对照组染料外渗至肿瘤间质的量为(0.58 ± 0.38) μg/g,而辛伐他汀组伊文氏蓝染料的外渗量为(0.26 ± 0.31) μg/g,肿瘤血管中染料的外渗量明显减少(图 1),差异有显著性($P < 0.05$),说明骨内注射辛伐他汀能够降低肿瘤血管的渗透性。



注:与 Control 组比较,$^*P < 0.05$。

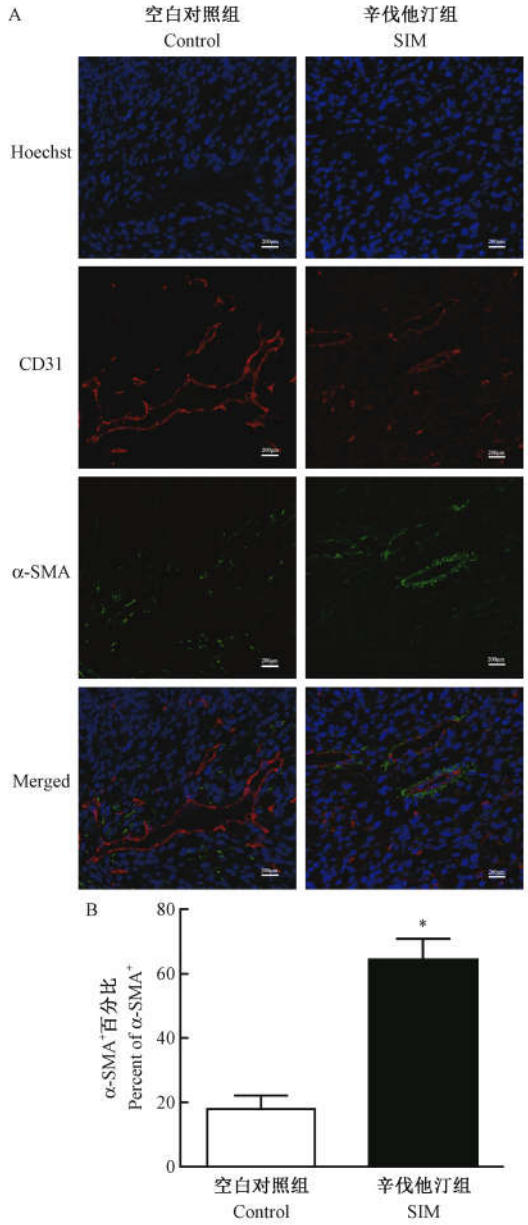
图 1　肿瘤间质的伊文氏蓝渗透量

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

Fig. 1　Interstitial infiltration of Evans blue

2.2　骨内注射单次辛伐他汀促进乳腺癌血管结构成熟

免疫荧光染色分别标记代表血管内皮细胞的 CD31 和代表血管壁周细胞的 α-SMA,观察骨内单次注射辛伐他汀后肿瘤血管周细胞的覆盖情况。血管周细胞覆盖率是指周细胞(α-SMA$^+$)表达的血管占所有血管(CD31$^+$)的百分比。观察发现 α-SMA$^+$ 在辛伐他汀组(SIM)与空白对照组(control)相比明显增多,使用 Image J 软件分析发现 α-SMA$^+$/CD31$^+$ 比率明显上升(图 2),表明肿瘤血管的周细胞覆盖明显增多。



注:A:免疫荧光图;B:统计学分析。与 Control 比较,$^*P < 0.05$。

图 2　肿瘤血管 α-SMA$^+$/CD31$^+$ 免疫荧光双染及统计结果

Note. A: Immunofluorescence staining; B: Quantifications of α-SMA$^+$. Compared with control group, $^*P < 0.05$.

Fig. 2　Co-immunofluorescence stain with CD31 and α-SMA of tumor vessels

2.3 骨内单次注射辛伐他汀改善乳腺癌肿瘤组织缺氧

采用免疫组化对小鼠乳腺癌组织切片进行HIF-1α染色,用来评价肿瘤组织内部的缺氧程度,结果显示HIF-1α阳性细胞数量在辛伐他汀组与对照组相比显著降低(图3)。说明肿瘤内部的缺氧情况经过骨内注射辛伐他汀的作用得到改善,其作用机制可能与肿瘤新生血管的正常化有关。

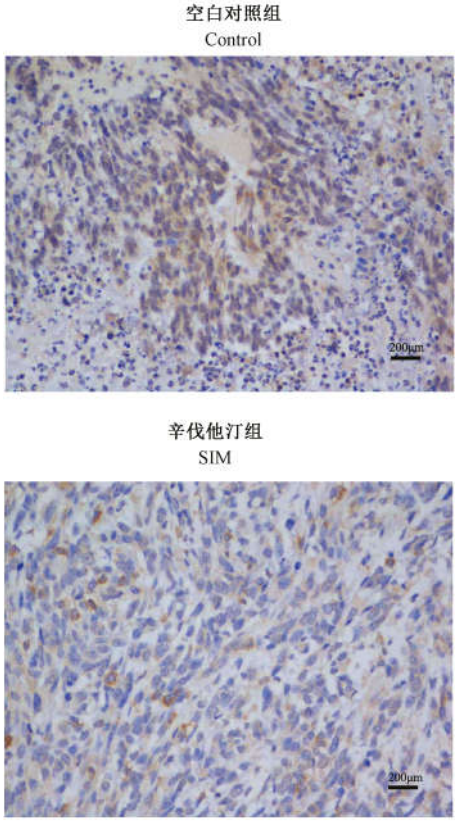
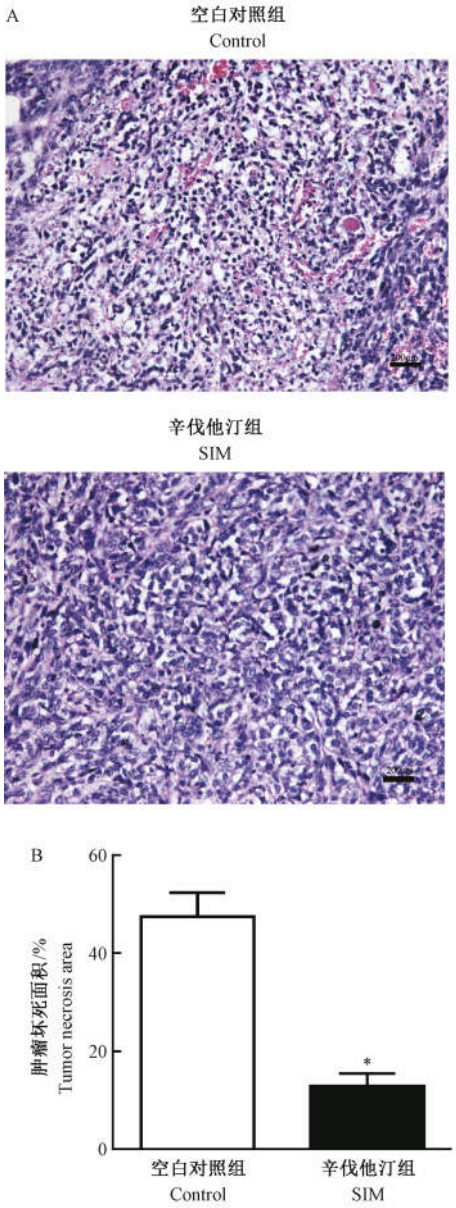


图3 肿瘤组织HIF-1α免疫组化染色

Fig. 3 Immunohistochemical staining of HIF-1α in the tumor tissue

2.4 骨内单次注射辛伐他汀减少乳腺癌肿瘤坏死面积

通过对肿瘤组织做HE染色观察发现,辛伐他汀组的肿瘤坏死面积与对照组相比明显减少,差异有显著性(图4)。



注:A:HE染色;B:统计学分析。与Control比较,$^*P < 0.05$。

图4 肿瘤组织坏死面积HE染色及分析

Note. A: HE staining; B: Quantifications of tumor necrosis area. Compared with the control group, $^*P < 0.05$.

Fig. 4 HE staining and analysis of tumor necrosis area

3 讨论

传统抗血管治疗方法旨在阻断肿瘤血管的生成,通过使用血管抑制剂破坏肿瘤血管的生长,期待能够减少肿瘤的血液供应,造成肿瘤组织的缺血缺氧从而"饿死"肿瘤细胞[15]。然而,血管抑制剂的过度应用使肿瘤血管严重退化,阻碍药物和氧份的输送而拮抗化疗和放疗的效果,并导致肿瘤细胞对缺氧环境的耐受,促使肿瘤细胞分泌血管生长因子进入肿瘤微环境,导致肿瘤进一步恶化[3]。近年来有研究发现,合理应用抗血管生成药物能够在短期内使肿瘤血管"正常化",并且能够促进化疗药物的敏感性[16]。Jain[17]提出抗血管生成药物的合理应用,能够在血管消退之前修复"不正常"的肿瘤血管,使更有效的运输氧和药物到达肿瘤内部,从而提高放化疗的敏感性。尽管如此,目前用于促进

“血管正常化”研究的药物大多是抗血管生成剂[18,19],而抗血管生成的药物很难精确控制其剂量,过多或过少都会影响其效果,并且伴随着许多副作用[20,21]。

辛伐他汀作为 HMG-CoA 还原酶抑制剂,是甲羟戊酸通路中的一种限速酶。甲羟戊酸通路影响着体内合成多种生化分子的过程,包括合成胆固醇和类异戊二烯等,因此他汀类药物的体内应用显示出其降脂以外的“多效性作用”[22]。

体外研究发现,辛伐他汀降低 MDA-MB231 和 BT-20 乳腺癌细胞的迁移能力[23]。可通过甲羟戊酸途径诱导 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 信号传导的失活,从而诱导乳腺癌细胞死亡[24]。不同剂量的他汀能够产生不同的疗效,低剂量促进血管生成,高剂量抑制血管生成[25]。有研究表明,低剂量辛伐他汀能够上调 eNOS 表达,促进周细胞的募集;高剂量辛伐他汀通过抑制 ROS 介导的 VEGF 的表达,达到抑制血管生成、降低肿瘤血管渗透性的作用[13]。但系统应用他汀类药物生物利用度低,口服后不到 5% 的药物能够进入血液循环[26],想要发挥作用需要服用过高的剂量。本课题组前期研究发现,骨内单次注射辛伐他汀,能够通过上调 VEGF 和 BMP2 的表达促进骨和血管生成[8]。作用机制主要是辛伐他汀能够动员骨髓内的 EPCs 进入外周血,达到组织缺血的部位参与血管的形成。

本课题组通过建立 4T1 小鼠乳腺癌模型,研究发现骨内单次注射辛伐他汀促进代表肿瘤血管周细胞的 α-SMA 表达增多,提示肿瘤血管的完整性增加。血管的稳定主要依赖内皮细胞和周细胞,而有研究表明周细胞来源于骨髓[11],因此我们推测骨内注射辛伐他汀是通过动员骨髓内的周细胞到达肿瘤血管,从而促进肿瘤血管正常化。

肿瘤血管正常化的另一项观察指标是血管的渗透性,成熟的血管渗透性降低[27],我们使用伊文氏蓝灌注发现,辛伐他汀组的肿瘤渗透性明显降低。血管渗透的减少能够使得输送更多的氧气和化疗药物到达肿瘤中心,减轻肿瘤的缺血缺氧状况。HIF-1α 在缺氧介导的细胞凋亡和肿瘤增殖中具有至关重要的作用,能够通过对多种肿瘤靶基因的调控促进侵袭和转移能力[28],它受细胞内部的氧分压精细调节,在缺氧条件下,HIF-1α 的诱导速度加快,而其降解过程受阻,表达水平迅速升高,是反应肿瘤缺氧状况的重要标志[29]。我们使用免疫组化对肿瘤组织染色发现,通过骨内注射辛伐他汀,肿瘤组织中 HIF-1α 的表达明显减少,差异有显著性($P < 0.05$),提示肿瘤内部缺氧得到改善。肿瘤血管正常化使得肿瘤间质液压降低,化疗药物更容易到达肿瘤组织发挥作用,从而与化疗药物产生协同作用。通过肿瘤内血流的改善,使更多的化疗药物进行有效的灌注[30],或将为肿瘤的化疗提供新的治疗策略,这也是未来重点研究的方向。

总之,本研究发现,通过骨内单次注射小剂量辛伐他汀,促进小鼠乳腺癌肿瘤血管正常化,改善肿瘤局部缺氧。

参考文献:

[1] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. Nature, 2000, 407(6801): 249-257.

[2] Jain RK. Determinants of tumor blood flow: a review [J]. Cancer Res, 1988, 48(10): 2641-2658.

[3] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease [J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890.

[4] Goel S, Duda DG, Xu L, et al. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases [J]. Physiol Rev, 2011, 91(3): 1071-1121.

[5] 汪思亮,盛晓波,韦忠红. 肿瘤血管正常化与肿瘤治疗[J]. 肿瘤, 2013, 33(7): 653-657.

[6] Jain RK. Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia [J]. Cancer Cell, 2014, 26(5): 605-622.

[7] Landmesser U, Bahlmann F, Mueller M, et al. Simvastatin versus ezetimibe: pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans [J]. Circulation, 2005, 111(18): 2356-2363.

[8] Tan J, Yang N, Fu X, et al. Single-dose local simvastatin injection improves implant fixation via increased angiogenesis and bone formation in an ovariectomized rat model [J]. Med Sci Monit, 2015, 21:1428-1439.

[9] Streeten EA. Bone as a classic endocrine organ: Interactions with non-bone tissues [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2015, 16(2): 77-78.

[10] Chim SM, Tickner J, Chow ST, et al. Angiogenic factors in bone local environment [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2013, 24(3): 297-310.

[11] Mangialardi G, Cordaro A, Madeddu P. The bone marrow pericyte: an orchestrator of vascular niche [J]. Regen Med, 2016, 11(8): 883-895.

[12] Bababeygy SR, Cheshier SH, Hou LC, et al. Hematopoietic stem cell-derived pericytic cells in brain tumor angio-architecture [J]. Stem Cells Dev, 2008, 17(1):11-18.

[13] Chen Y, Zhang S, Peng G, et al. Endothelial NO synthase and

reactive oxygen species mediated effect of simvastatin on vessel structure and function: pleiotropic and dose-dependent effect on tumor vascular stabilization[J]. Int J Oncol, 2013, 42(4): 1325-1336.

[14] 郭琦, 刘灿, 海宝, 等. 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[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(5):1-9.

[15] Teng LS, Jin KT, He KF, et al. Advances in combination of antiangiogenic agents targeting VEGF-binding and conventional chemotherapy and radiation for cancer treatment[J]. J Chin Med Assoc, 2010, 73(6):281-288.

[16] Lin MI, Sessa WC. Antiangiogenic therapy: creating a unique "window" of opportunity[J]. Cancer Cell, 2004, 6(6): 529-531.

[17] Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy[J]. Nat Med, 2001, 7(9): 987-989.

[18] Goel S, Wong AH, Jain RK. Vascular normalization as a therapeutic strategy for malignant and nonmalignant disease[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012, 2(3):a006486.

[19] Shang B, Cao Z, Zhou Q. Progress in tumor vascular normalization for anticancer therapy: challenges and perspectives[J]. Front Med, 2012, 6(1): 67-78.

[20] Otrock ZK, Hatoum HA, Awada AH, et al. Hypoxia-inducible factor in cancer angiogenesis: structure, regulation and clinical perspectives[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2009, 70(2): 93-102.

[21] Rebucci M, Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(9): 1219-1226.

[22] Bhandari S, Gupta P, Quinn P, et al. Pleiotropic effects of statins in hypercholesterolaemia: a prospective observational study using a lipoproteomic based approach[J]. Lancet, 2015, 385(Suppl 1):S21.

[23] Mandal CC, Ghosh-Choudhury N, Yoneda T, et al. Simvastatin prevents skeletal metastasis of breast cancer by an antagonistic interplay between p53 and CD44[J]. J Biol Chem, 2011, 286(13): 11314-11327.

[24] Wang T, Seah S, Loh X, et al. Simvastatin-induced breast cancer cell death and deactivation of PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling are reversed by metabolic products of the mevalonate pathway[J]. Oncotarget, 2016, 7(3): 2532-2544.

[25] Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, et al. Statins have biphasic effects on angiogenesis[J]. Circulation, 2002, 105(6): 739-745.

[26] Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2005, 19(1): 117-125.

[27] Kieda C, El Hafny-Rahbi B, Collet G, et al. Stable tumor vessel normalization with pO_2 increase and endothelial PTEN activation by inositol trispyrophosphate brings novel tumor treatment[J]. J Mol Med (Berl), 2013, 91(7): 883-899.

[28] Hanze J, Eul BG, Savai R, et al. RNA interference for HIF-1a inhibits its downstream signalling and affects cellular proliferation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 312(3): 571-577.

[29] Bae SH, Jeong JW, Park JA, et al. Sumoylation increases HIF-1a stability and its transcriptional activity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 324(1): 394-400.

[30] Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2011, 10(6): 417-427.

〔收稿日期〕2017-04-25

·简讯·

《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》入选《中国学术期刊(网络版)》网络首发首批示范期刊

为了更好地宣传学术期刊转型对促进国家"创新驱动发展"战略的重要意义,并积极推动学术评价机制改革,整体推进学术期刊数字化、网络化转型升级,根据国家新闻出版广电总局关于"首批连续型网络出版物规范化试点"与"国家数字复合出版系统工程试点"工作要求,基于前不久发布的《中国学术期刊(网络版)》(CAJ-N)的出版传播平台(CAJ-NP),本着试点先行、扎实推进的原则,《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社将启动"学术期刊网络版示范工程",组织、支持一批数字出版工作基础较好的重要期刊率先以录用定稿网络首发方式在CAJ-N正式出版期刊网络版。以网络首发方式发表单篇论文是出版学术期刊网络版的实质意义所在,其对作者研究成果首发权、学术竞争力和影响力,以及读者获取科研情报与知识的及时性具有无可争议的重要性。CAJ-N作为学术期刊网络版的正式出版平台,与以往没有正式刊号的优先数字出版不同,已经解决了论文网络首发的规范性问题,可以得到国家出版管理、科研与人事管理等相关部门的认可。

研究报告

不同样本和方法对测定大鼠血液生化指标的影响

李　迎[1,3],崔晓霞[1],尚世臣[1],赵　权[3],李桂军[1],王冬平[1*],陈振文[2*]

(1.军事医学科学院实验动物中心,北京　100071; 2.首都医科大学实验动物科学部,北京　100069;
3.吉林农业大学动物科学技术学院,长春　130118)

【摘要】 **目的**　比较血清和血浆两种不同样本和不同测试方法对大鼠血液生化指标测定值、血糖测定值的影响。**方法**　用血糖仪测定来源相同大鼠的全血血糖值,然后对其血清和血浆样本进行常规生化指标检测。**结果**　在血清与血浆样本进行 19 个常规生化项目检测中,ALB、TP、ALP、CHOL、URIC、GLU、Mg、LD、Ca 差异有显著性($P < 0.05$),在其余 10 项血清与血浆检测值比较中,差异无显著性($P > 0.05$)。不同样本和不同方法对血糖的检测结果分析差异有显著性($P < 0.05$)。**结论**　不同样本和方法对血清与血浆中部分生化项目检测时存在差异,不同方法和样本检测血糖结果也存在差异。

【关键词】 生化指标;血清;血浆;大鼠
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0007-03
doi: 10.3969. j. issn. 1671 -7856. 2017. 10. 002

Effects of different samples and methods on the determination of blood biochemical indexes in rats

LI Ying[1,3], CUI Xiao-xia[1], SHANG Shi-chen[1], ZHAO Quan[3], LI Gui-jun[1], WANG Dong-ping[1*], CHEN Zhen-wen[2*]
(1. Military Academy of Medical Sciences Laboratory Animal Center, Beijing 100071, China;
2. Capital University of Medical Sciences Laboratory Animal Department, Beijing 100069;
3. Jilin Agricultural University College of Animal Science and Technology, Changchun 130118)

【**Abstract**】 **Objective**　To compare the effects of two different samples and different test methods on blood biochemical indexes and blood glucose values in rats. **Methods**　Glucose levels in the serum and plasma samples were detected with a blood glucometer, and the biochemical parameters in the serum and plasma were determined by routine blood biochemistry. The data were statistically compared and analyzed to determine if there are some significant differences. **Results**　Among the 19 biochemical indexes of serum and plasma specimens, nine parameters, i. e., ALB, TP, ALP, CHOL, URIC, GLU, Mg, LD, Ca showed significant differences ($P < 0.05$), while the other 10 indexes showed no significant difference ($P > 0.05$). Different samples and different methods had significant differences in the detection of blood glucose ($P < 0.05$). **Conclusions**　Different method and samples impact on the detection of blood glucose and some other serum and plasma biochemical indexes.

【**Key words**】 Routine biochemical test; Serum; Plasma; Rat

实验动物血液生化参考值的建立是判断动物健康状况和选择合格动物的标准,是临床医疗和生

[基金项目]国家科技支撑计划课题(2015BA109B01 -04);国家自然科学基金项目(3137227)。
[作者简介]李迎(1993 -),女,硕士,研究方向:实验动物生物学特性研究。E-mail: 651998038@qq.com
[通讯作者]王冬平(1964 -),女,副研究员,研究方向:实验动物生物学特性研究。E-mail: Wangdp6493@126.com。
陈振文(1959 -),男,教授,研究方向:实验动物遗传学。E-mail: czwen@ccmu.edu.cn。 * 共同通讯

物医学研究中的重要基础数据[1]。随着科学技术不断发展,实验动物的血液生理生化指标的检测方法和仪器发生了很大的变化,检测数据与传统的方法有一定的差异。为确定检测数据的可比性,本实验采用全自动生化仪和血糖仪对同一来源成年大鼠的血清和血浆进行常规生化指标测定,探讨血清和血浆对常规生化指标检测结果的影响以及不同的检测方法和样本对血糖检测指标的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 Wistar 雌性大鼠 29 只,8 周龄,体重 180 ~220 g。军事医学科学院实验动物中心提供[SCXK(军)2012—0004],动物饲养于屏障环境内,日常饲喂以^{60}Co 照射消毒饲料及饮用消毒用水,实验于军事医学科学院实验动物中心实验室进行[SYXK(军)2012—0021]。本实验通过首都医科大学实验动物和动物实验伦理委员会批准(No. AEEI-2017-032)。

1.2 主要试剂与仪器

Beckman 公司提供的原装配套试剂;乙二胺四乙酸二甲(EDTA-K_2)作为抗凝剂;罗康全活力型血糖试纸、罗康全活力型血糖仪(型号:Accu-Chek Active、厂家:德国罗氏诊断有限公司);Beckman 全自动生化分析仪(型号:CX5PRO、厂家:美国贝克曼库尔特公司);低温离心机(型号:CF16RX、厂家:HITACHI)。

1.3 实验方法

1.3.1 血液标本的采集和处理

Wistar 大鼠空腹 12 ~24 h 后,眼眶静脉取血,静止 30 min,5000 r/min 离心 10 min 制备血清,同时在抗凝管加入血液颠倒混匀(抗凝剂枸橼酸钠和血液的比例为 1∶9),离心(离心条件同上)后所得的上清液即为血浆。

1.3.2 血糖仪的检测

采血即时应用血糖仪测定血糖值。

1.3.3 样品检测指标

应用 Beckman 全自动生化分析仪 CX5 的血清和血浆两种检测模式检测,检测项目包括:镁(Mg)、钙(Ca)、磷(PO_4)、葡萄糖(GLU)、总胆固醇(CHOL)、甘油三酯(TG-B)、高密度脂蛋白胆固醇(HDLD)、总胆红素(TBIL)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LD)、肌酸激酶(CK)、淀粉酶(AMY7)、尿素氮(BUN)、肌酐(CR-S)、尿酸(URIC)。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。实验数据以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用独立样本 t 检验;ANOVA 单因素方差分析,同时进行方差齐性检验,方差齐时使用 LSD 统计方法进行组间比较,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 检测结果及统计分析

19 项指标检测的结果:ALB、CHOL、URIC、GLU 差异有显著性($P < 0.05$),TP、ALP、Mg、LD、Ca 差异有显著性($P < 0.01$),其它指标差异无显著性。(见表 1)。

2.2 不同的检测方法和介质对血糖检测的影响

血糖仪直接测定的血糖值与生化仪测定的血清和血浆中葡萄糖值(见图 1)。不同介质对常规生化指标检测结果的比较使用 ANOVA 单因素方差分析,同时进行方差齐性检验,方差齐时使用 LSD 统计方法进行组间两两比较,$P < 0.05$ 为差异有显著性(见表 2)。

表 1 血清与血浆 19 项生化指标检测结果比较

Tab. 1 Comparison of 19 biochemical indicators detected in the results of serum and plasma

检测项目 Item	单位 Unit	血清 Serum	血浆 Plasma
ALB	g/L	25.31 ±2.22	35.55 ±3.40 *
TP	g/L	71.62 ±5.68	102.48 ±9.21 **
ALP	U/L	211.48 ±52.44	5.62 ±4.73 *
BUN	mmol/L	5.42 ±1.03	8.05 ±1.47
HDLD	mmol/L	1.38 ±0.18	1.89 ±0.26
CHOL	mmol/L	1.20 ±0.18	1.51 ±0.31 *
ALT	U/L	37.55 ±6.63	51.00 ±7.31
URIC	μmol/L	109.76 ±31.01	52.62 ±21.07 *
GLU	mmol/L	6.20 ±0.77	9.53 ±2.22 *
TG-B	mmol/L	0.58 ±0.26	0.71 ±0.28
AST	U/L	115.10 ±22.35	147.34 ±20.58
Mg	mmol/L	1.32 ±0.10	0.25 ±0.05 **
TBIL	μmol/L	9.80 ±1.95	9.52 ±1.76
LD	mmol/L	451.10 ±365.38	179.45 ±43.54 **
PO_4	mmol/L	3.54 ±0.62	4.63 ±0.90
CK	U/L	985.31 ±536.42	1054.42 ±451.59
CR-S	μmol/L	0.38 ±0.09	0.68 ±0.11
AMY7	U/L	1055.34 ±192.61	1351.62 ±206.08
Ca	mmol/L	2.94 ±0.15	0.33 ±0.09 **

注:与血清比,*$P < 0.05$,**$P < 0.01$。

Note. *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, *vs.* the serum.

表 2　不同的检测方法和介质对血糖检测的结果

Tab. 2　Effects of different detection and sampling methods on blood glucose determination

血糖仪 Glucometer	生化仪 Biochemical analyzer		*F* 值 *F* Value	*P* 值 *P* Value
	血清 Serum	血浆 Plasma		
4.85 ± 1.74(26)	6.20 ± 0.77* (29)	9.53 ± 2.22* (29)	58.734	0.000

注:括号内的数据为动物数。与血糖仪值比较,*$P < 0.05$。

Note. The data in parentheses are number of animals. Compared with the results detected with blood gluometer showing a significant difference ($P < 0.05$).

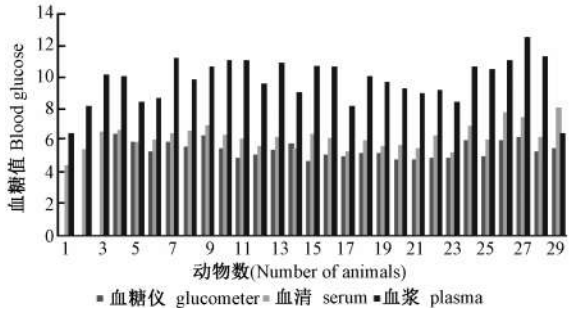


图 1　三者血糖值比较图

Fig. 1　Comparison of the serum and plasma glucose levels detected with a glucometer

3　讨论

国内外关于血浆与血清检测结果比较分析的报道较多,但说法各不相同[2]。血浆标本具有无需等待血液凝固,缩短检验时间和提高检验效率等优点,因此成为血常规生化检验的理想研究标本,但血浆和血清两者自身成分差异决定了检查结果存在必然差异[3]。我们通过对血清和血浆 19 项生化指标检测结果进行比较,在常规生化指标检测中 ALB、TP、ALP、CHOL、URIC、GLU、Mg、LD、Ca 差异均有显著性($P < 0.05$)。在血糖仪和生化仪中血清血浆三者的方差分析中,P 值为 0.000($P < 0.05$),差异有显著性。因此在动物实验研究中,血液生化指标检测有必要进行方法的一致性检测并加以标注,以确保实验的准确性和可重复性。

实验表明,不同介质对常规生化指标检测结果有影响,而且不同的检测方法和介质对血糖检测影响较大。在检查特定生化项目时,张正云等[4]报道血浆标本检测中 Ca、TP、ALT、AST 存在显著差异,本实验结果 ALT、AST 差异不显著。

罗氏血糖试纸说明书标明血糖仪测定值是应用血浆进行测试,但在本实验结果中,虽然血糖的不同介质和方法测试结果差异显著,但是血糖仪测定值却与血清测定的葡萄糖值相近。

综上所述,各实验室在采集标本的过程中应根据测定的项目来选择合适的标本和适当的方法,这样才不会影响检查结果的准确性和可重复性。本实验结果提示,不同的检测方法和检测标本所获得的生化和血糖指标存在较大差异。

参考文献:

[1] 王冬平,隋丽华,尚世臣,等. 清洁级 SD 大鼠血液生理生化指标的测定[J]. 中国比较医学杂志,2009,19(9):44-46.

[2] 梁吉平,孙振涛. 在生化项目检测中不同血液样本的检测结果比较[J]. 中国保健营养,2012,22(9):3538.

[3] 姚维菊. 不同血液样本在常规生化项目检测中的结果比较[J]. 检验医学与临床,2013,10(4):468-469.

[4] 张正云,何清. 急诊患者三种血液标本检测电解质的可比性[J]. 检验医学与临床,2013,10(6):734-735.

〔收稿日期〕2016-12-05

研究报告

流式细胞术分析 PMA 诱导 THP-1 分化为巨噬细胞的表型特征

彭卓颖,李　想,丛　喆*,薛　婧*

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

【摘要】 **目的**　用流式细胞术明确单独使用 PMA 诱导 THP-1 细胞分化而来的巨噬细胞的分化情况。**方法**　首先用 PMA 刺激 THP-1 细胞分化为巨噬细胞,再分别使用 LPS、IFN-γ 和 IL-6 将细胞诱导为 M1 型巨噬细胞,用 IL-4、IL-13 和 IL-6 将细胞诱导为 M2 型巨噬细胞。显微镜下观察三种细胞的形态学改变,并用流式细胞术检测各细胞主要 CD 分子表达的差异。**结果**　当 THP-1 分化为巨噬细胞后变为贴壁生长,细胞形态呈较规则的圆形或椭圆形;M1 和 M2 细胞形态不规则,细胞突起较明显,细胞颗粒度较大。巨噬细胞表面与抗原提呈功能相关的 CD 分子的表达均较低,大部分呈阴性;而 M1 和 M2 细胞表面这些 CD 分子的表达均较高。**结论**　单独使用 PMA 刺激 THP-1 细胞所分化而来的巨噬细胞抗原提呈能力较弱,基本处于静息状态。

【关键词】 THP-1;巨噬细胞;佛波酯;流式细胞术

【中图分类号】R-33　　【文献标识码】A　　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0010-06

doi: 10.3969. j. issn. 1671-7856. 2017. 10. 003

Phenotypic characterization of PMA-induced THP-1 macrophages analyzed by flow cytometry

PENG Zhuo-ying, LI Xiang, CONG Zhe*, XUE Jing*

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

【**Abstract**】 **Objective**　To identify the characteristics of the subtype of PMA-induced THP-1 macrophages by flow cytometry analysis. **Methods**　THP-1 monocytic cells differentiate into macrophages promoted by PMA, then induced into M1 and M2 by adding different cytokines, such as LPS, IL-6 and IFN-γ for THP-1-M1, IL-4, IL-13 and IL-6 for THP-1-M2. Morphology of cells were observed under a microscope and the expression of CD14, CD68, CD16, CD80, CD86, CD163, CD206, CD209, CD83, CD1a, CD11c, HLA-DR were detected by flow cytometry. **Results**　The macrophages stimulated by PMA became adherent; THP-1-M1 and THP-1-M2 lost their spherical morphology, appeared more irregular with many obvious projections. The expression of CD83, CD1a, CD11c, HLA-DR which had the function of antigen presenting on the surface of THP-1-Mφ were very low, and most of them were negative, but those of THP-1-M1 and THP-

[基金项目]国家自然科学基金 - 青年科学基金项目(81301437);科技部重大专项(2014ZX10001001-001-004,2014ZX10001001-002-006)。

[作者简介]彭卓颖(1992 -),女,硕士研究生,从事实验动物病毒学研究工作。E-mail: 18810963239@163.com

[通讯作者]薛婧(1983 -),女,副研究员,硕士生导师,研究方向:病原生物学和免疫学。E-mail: xuejing@cnilas.org。

丛喆(1972 -),女,副主任技师,从事实验动物病毒分子生物学和模型研究工作。E-mail: congz@cnilas.org。 * 共同通讯

1-M2 were very high. **Conclusions** The macrophages differentiated from THP-1 stimulated by PMA are weak in antigen presenting function.

【**Key words**】 THP-1; Macrophage; Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA; Flow cytometry

巨噬细胞(macrophage, Mφ)是一类由血液中单核细胞分化而来的固有免疫细胞,在机体免疫反应中发挥重要作用[1]。但是由于细胞数量少,分离过程较繁琐[2,3],因此多用佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)诱导 THP-1 单核细胞系分化而成的 THP-1-Mφ 作为研究巨噬细胞功能的体外细胞模型[4]。虽然目前 THP-1-Mφ 细胞是比较通用的巨噬细胞模型,但是此细胞的分化特征尚不明确,这将影响对巨噬细胞相关功能实验的分析。本文主要利用流式细胞术对分化所得巨噬细胞的特征进行分析,首先用不同细胞因子组合对 THP-1 细胞进行刺激,分别诱导出 Mφ、M1 和 M2 三种细胞,比较以上细胞的形态学变化,并用流式检测各细胞主要 CD 分子表达的差异,以期明确 THP-1-Mφ 细胞的分化情况。

1　材料和方法

1.1　细胞

THP-1 细胞,外周血的人单核细胞系,购自中国医学科学院基础所细胞中心,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基,置于 37℃、5% CO_2 孵箱中进行培养。

1.2　细胞因子

Recombinant Human IFN-γ(300-02)、Recombinant Human IL-13(200-13)和 Recombinant Human IL-4(200-04)购自 Peprotech 公司,Recombinant Human IL-6 Protein(206-IL)购自 R&D 公司,PMA(P1585)和 LPS(L4391)购自 Sigma 公司。

1.3　流式抗体

流式抗体 PE anti-human CD16 Antibody(3G8)、PE anti-human CD68 Antibody(Y1/82A)、FITC anti-human CD80 Antibody(2D10)、APC anti-human CD83 Antibody(HB15)、PE anti-human CD86 Antibody(IT2.2)、PE anti-human CD1a Antibody(HI149)、APC anti-human CD11c Antibody(3.9)均购自 Biolegend 公司;流式抗体 PE Mouse Anti-Human CD14(M5E2)、PerCP-Cy™5.5 Mouse Anti-Human CD209(DCN46)、APC Mouse Anti-Human HLA-DR(G46-6)、FITC Mouse Anti-Human CD163(GHI/61)、PE Mouse Anti-Human CD206(19.2)均购自 BD 公司。

1.4　实验方法

1.4.1　PMA 和细胞因子诱导 THP-1 细胞定向分化[4,5]

取 9×10^6 个正常 THP-1 于 T25 培养瓶内,加入终浓度为 50 ng/mL 的 PMA。2 d 后细胞进行换液处理,一部分细胞进行流式检测;一部分细胞中加入终浓度均为 20 ng/mL 的 LPS、IFN-γ 和 IL-6,使细胞向 THP-1-M1 方向分化;另一部分细胞中加入终浓度均为 20 ng/mL 的 IL-4、IL-13 和 IL-6,诱导细胞向 THP-1-M2 方向分化。THP-1-M1 和 THP-1-M2 细胞于第 5 天进行流式检测。

1.4.2　胞外流式染色

用胰酶将培养瓶内的贴壁细胞消化下来,PBS 缓冲液洗 2 次(4℃ 1500 r/min 离心 3 min),用 PBS 将细胞浓度调整为每毫升 1×10^7 个,混匀后在每个流式管中加入 100 μL 细胞悬液,向每管内加入相应流式抗体,轻轻混匀,4℃避光孵育 30 min,2 mL PBS 缓冲液洗 2 次,300 μL PBS 重悬细胞,过滤后上机。

1.4.3　胞内流式染色[6]

同上将细胞加入流式管内,向每管中加入 200 μL IC fixation buffer,4℃避光孵育 20 min,随后用 2 mL 破膜液洗 2 次,100 μL 破膜液重悬细胞,向每管中加入对应流式抗体,混匀后 4℃避光孵育 30 min,破膜液洗 2 次,PBS 缓冲液洗 1 次,将细胞悬液过滤后上机。

1.5　统计学方法

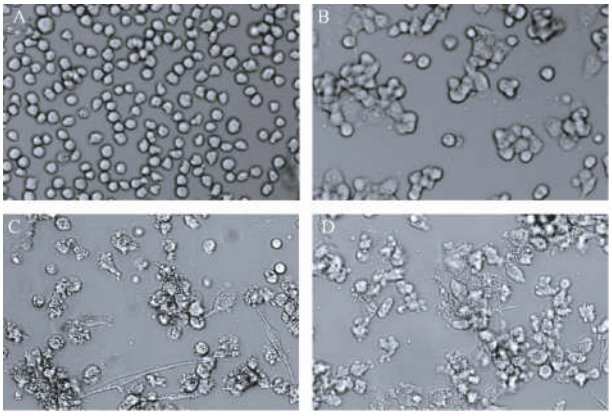
流式数据使用 FlowJo v10 进行分析。做图及统计分析在 Graphpad 5 软件中完成,实验结果以平均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间数据间进行 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2　结果

2.1　THP-1 分化为不同细胞后的形态学改变

THP-1 细胞形态饱满、大小均一、折光性较好,为悬浮生长单个细胞(图 1A);PMA 刺激 2 d 后,诱导分化的 THP-1-Mφ 细胞全部贴壁,大部分细胞仍呈圆形或椭圆形,聚团生长较明显(图 1B);继续向其中加入细胞因子 LPS、IFN-γ 和 IL-6,诱导细胞定向分化为 THP-1-M1 细胞后,形态更为多样,部分细胞呈长梭形,且细胞膜上的突起十分明显(图 1C);

而继续加入 IL-4、IL-13 和 IL-6 诱导分化出的 THP-1-M2 细胞,形态与 THP-1-M1 细胞较相似,但长梭形细胞相对较少(图1D)。



注:A:正常 THP-1 细胞; B:PMA 刺激 THP-1 细胞分化为THP-1-Mφ细胞;C:PMA 和 LPS、IFN-γ、IL-6 刺激 THP-1 细胞分化为 THP-1-M1 细胞;D:PMA 和 IL-4、IL-13、IL-6 刺激 THP-1 细胞分化为 THP-1-M2 细胞。

图1 不同巨噬细胞的形态学差异(×40)

Note: A: Normal THP-1 cells; B: THP-1-Mφ cells; C: THP-1-M1 cells; D: THP-1-M2 cells.

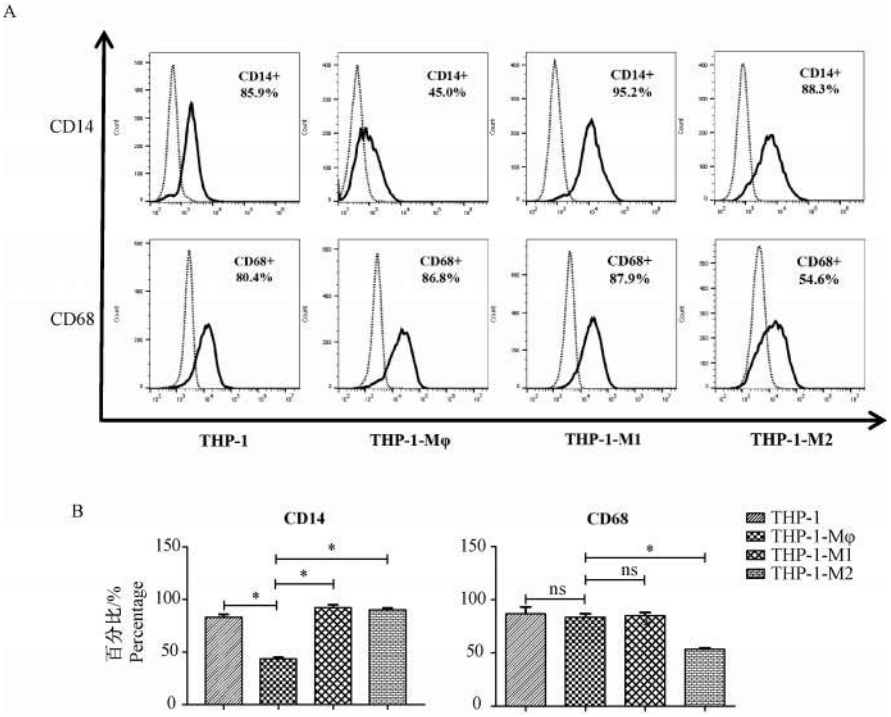
Fig. 1 Differences in the morphology of macrophage subsets

2.2 单核巨噬细胞特异性分子 CD14、CD68 在各细胞中的表达

THP-1、THP-1-M1 和 THP-1-M2 细胞表面均可高表达 CD14 分子,表达量分别为(85.8±6.93)%、(89.25±8.42)%和(82.20±8.62)%;而 PMA 刺激分化的 THP-1-Mφ 细胞表面 CD14 的表达仅为(43.1±2.95)%。与之相反,CD68 分子在 THP-1 与 THP-1-Mφ 细胞内均高表达,当继续分化为 THP-1-M1 后 CD68 的表达也并未发生明显变化(P=0.7709);而 THP-1-M2 细胞内 CD68 的表达则出现了较明显的降低(P=0.0129),表达量为(53.45±1.62)%(图2)。

2.3 M1 型巨噬细胞特异性分子 CD16、CD80 和 CD86 在各细胞中的表达

CD16、CD80 和 CD86 等分子的表达是判断 M1 型巨噬细胞分化情况的指标。如图3所示,THP-1 分化出的 THP-1-Mφ 细胞表面 CD16 和 CD80 的表达基本未发生变化,CD86 分子的表达量增加到(14.59±2.98)%(P=0.0270);当 THP-1-Mφ 继续分化为 THP-1-M1 后,CD16 分子的表达出现小幅度

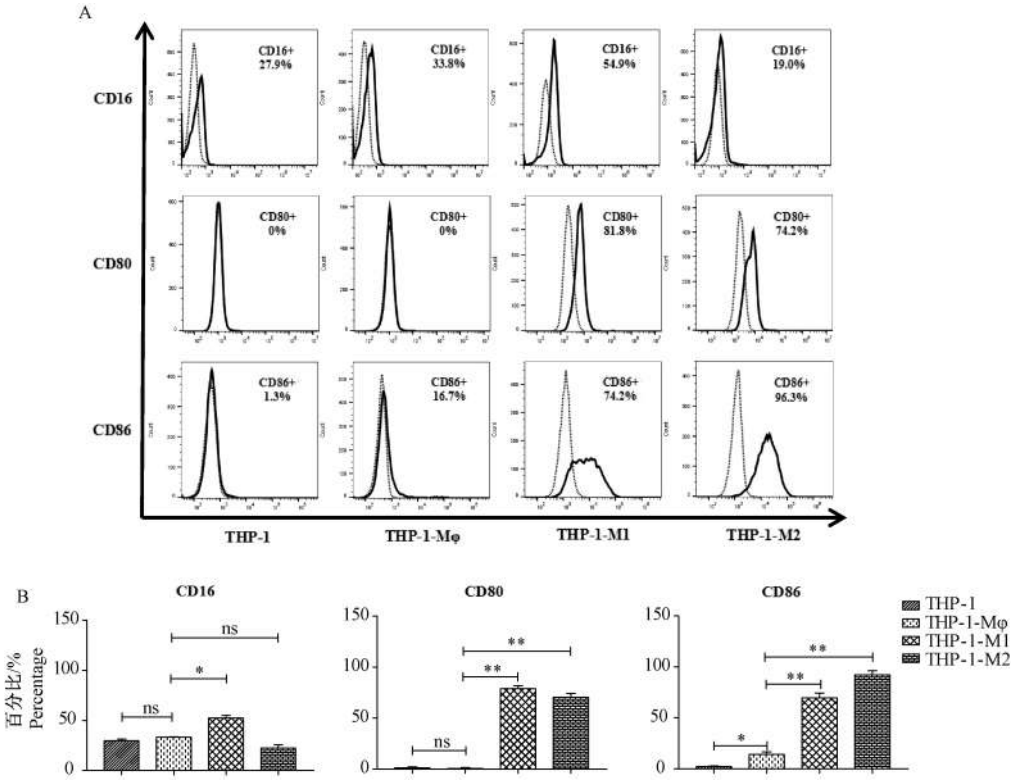


注:"……"同型对照;"–"CD14 和 CD68;A:使用流式细胞术检测 CD 分子的表达情况;B:利用统计图比较不同细胞上 CD 分子表达情况的差异。与 THP-1-Mφ 比较,*P<0.05。

图2 CD14 和 CD68 分子在不同巨噬细胞上表达的差异

Note: "……" Isotype control; "–" CD14 and CD68; A: The expression of CD molecules were detected by flow cytometry; B: The differences of CD molecules on different cells were analyzed by histogram. Compared with the THP-1-Mφ, *P< 0.05.

Fig. 2 Expression of CD14 and CD68 in different macrophage subsets



注："……"同型对照；"－"CD16，CD80 和 CD86；A：使用流式细胞术检测 CD 分子的表达情况；B：利用统计图比较不同细胞上 CD 分子表达情况的差异。与 THP-1-Mφ 比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

图 3　CD16，CD80 和 CD86 分子在不同巨噬细胞表面表达的差异

Note："……" Isotype control；"－" CD16，CD80 and CD86；A：The expression of CD molecules were detected by flow cytometry；B：The differences of CD molecules on different cells were analyzed by histogram. Compared with the THP-1-Mφ，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$.

Fig. 3　Differences in the expression of CD16，CD80 and CD86 in different macrophage subsets

升高，而 CD80 和 CD86 的表达却出现了非常明显的上升（P 值分别为 0.0063 和 0.0082），表达量分别达到（75.85 ± 8.41）% 和（69.65 ± 6.43）%；分化出的 THP-1-M2 细胞表面 CD16 分子的表达有所降低，但其变化并无显著性差异，CD80 和 CD86 的表达情况与 THP-1-M1 细胞基本相同。

2.4　M2 型巨噬细胞特异性分子 CD163、CD206 和 CD209 在各细胞中的表达

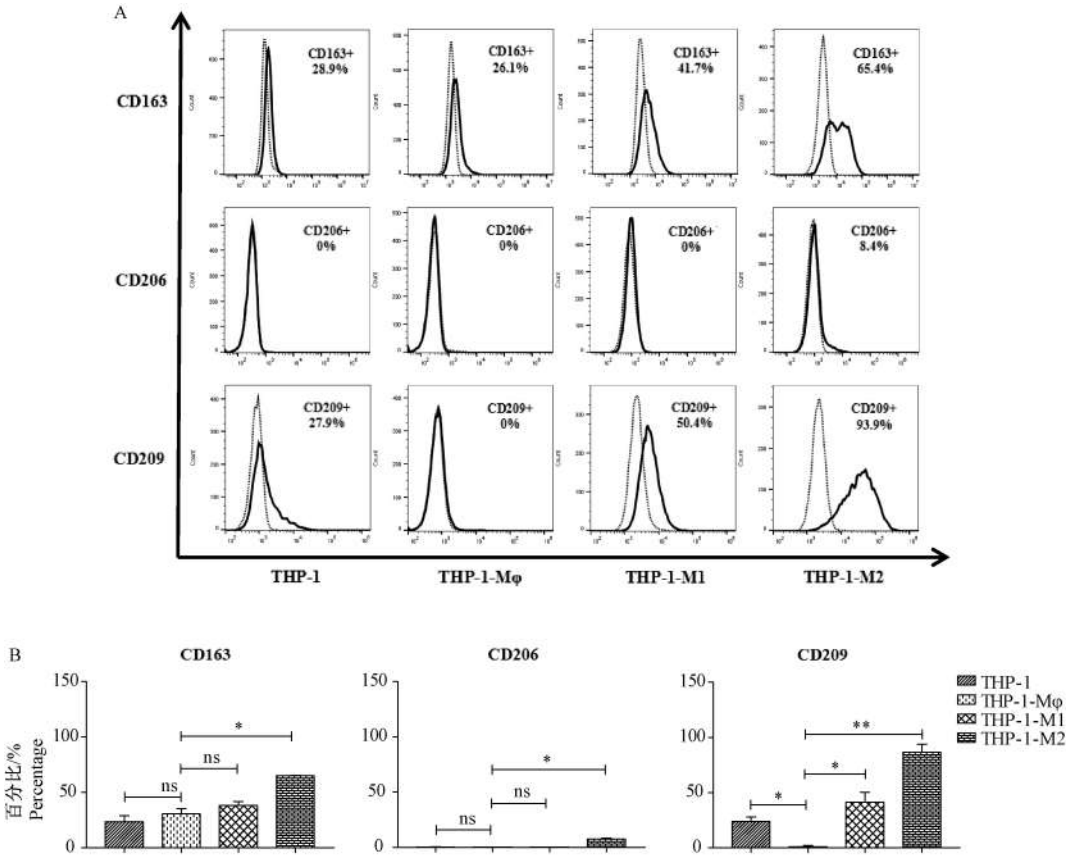
较常用于鉴定 THP-1-M2 细胞分化情况的 CD 分子为 CD163、CD206 和 CD209。正常 THP-1、THP-1-Mφ 和 THP-1-M1 细胞内 CD163 分子的表达量均较低；CD206 分子在以上三种细胞表面的表达基本为阴性；CD209 在 THP-1 和 THP-1-M1 细胞表面的表达量分别为（24.10 ± 5.37）% 和（44.75 ± 7.99）%，而在 THP-1-Mφ 细胞表面的表达基本呈阴性；分化成的 THP-1-M2 细胞可低表达 CD206 分子，而且 CD163 和 CD209 分子的表达均出现了明显的增加，表达量分别为（64.90 ± 0.71）% 和（89.20 ± 5.06）%（图 4）。

2.5　与抗原提呈功能相关的 CD 分子的表达情况

THP-1 细胞表面 CD83、CD11c 和 HLA-DR 的表达均较高，表达量分别达到（54.75 ± 7.84）%、（76.15 ± 9.12）% 和（94.25 ± 2.89）%，CD1a 分子的表达呈阴性。THP-1-M1 和 THP-1-M2 细胞则高表达这几个分子。与之相反，THP-1-Mφ 细胞 CD1a 的表达仍为阴性，CD83 分子的表达明显降低（P = 0.0498），CD11c 和 HLA-DR 的表达更是显著下降，P 值分别为 0.0073 和 0.0027（图 5）。

3　讨论

巨噬细胞是一种具有可塑性和多功能性的固有免疫细胞，当体内外微环境发生变化时，巨噬细胞可向不同亚型进行分化，其中研究较多的为 M1 和 M2 型巨噬细胞。M1 细胞可分泌促炎因子，在炎症早期发挥作用；M2 细胞可分泌抑制炎症因子，发挥组织修复作用[7,8]。而对巨噬细胞的功能性研究



注："……"同型对照；"－"CD163,CD206和CD209；A:使用流式细胞术检测CD分子的表达情况；B:利用统计图比较不同细胞上CD分子表达情况的差异。与THP-1-Mφ比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

图4 CD163,CD206和CD209分子在不同巨噬细胞上表达的差异

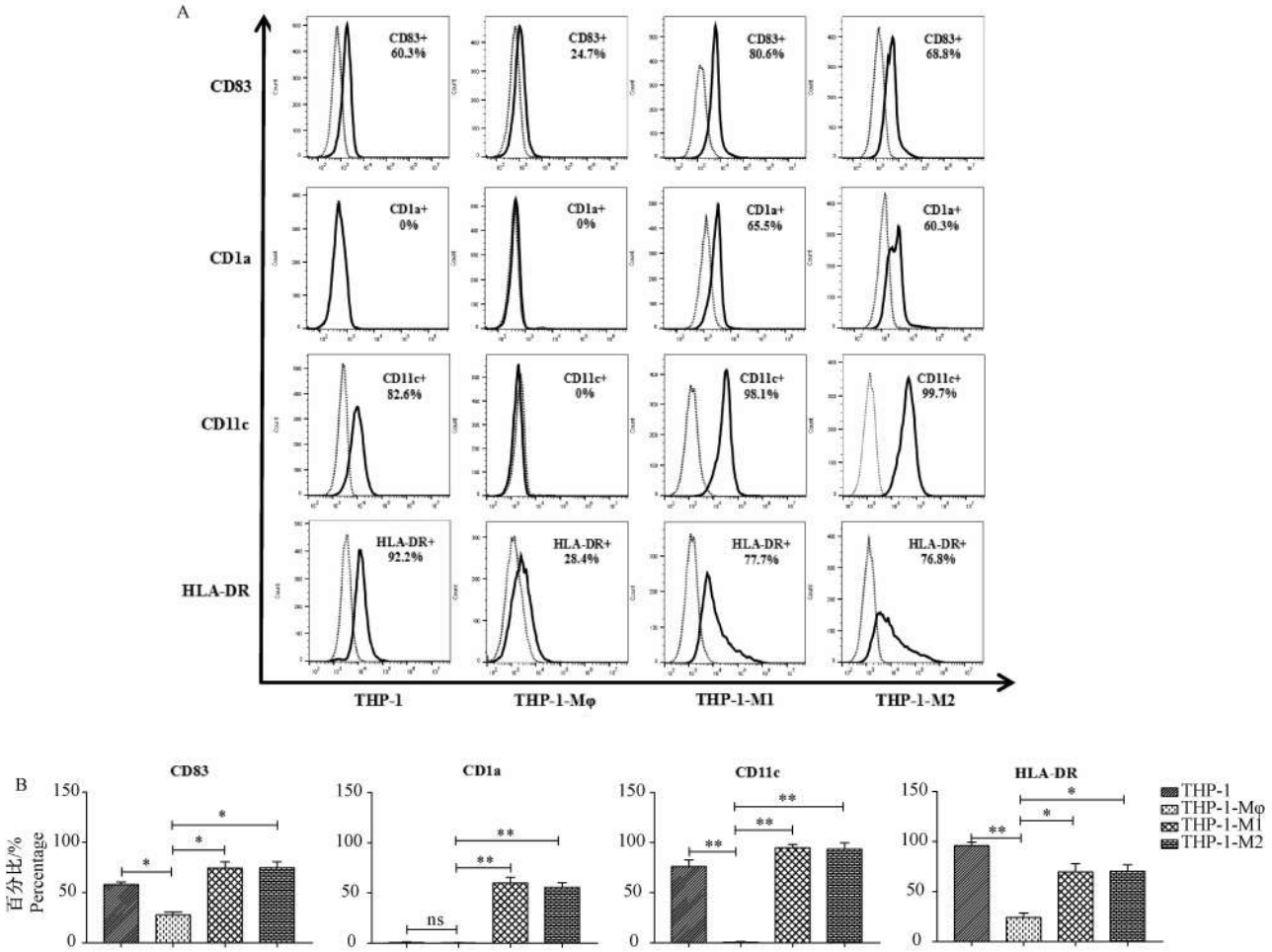
Note："……" Isotype control；"－" CD163,CD206 and CD209；A:The expression of CD molecules were detected by flow cytometry；B:The differences of CD molecules on different cells were analyzed by histogram. Compared with the THP-1-Mφ, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

Fig. 4 Differences in the expression of CD163,CD206 and CD209 in different macrophage subsets

主要通过体外实验进行,PMA诱导THP-1细胞分化成的THP-1-Mφ是最常用的细胞模型,但到目前为止并没有明确其分化情况。THP-1-Mφ可能为单一亚型的巨噬细胞,也可能是M1和M2型巨噬细胞共存的细胞群,因此本研究对此科学问题进行了深入探究。首先利用PMA刺激THP-1单核细胞分化为THP-1-Mφ,然后在此基础上继续添加不同细胞因子,分别诱导出THP-1-M1和THP-1-M2细胞,最后用显微镜观察细胞形态的变化,并用流式细胞术检测细胞主要CD分子的表达情况。

当THP-1细胞被PMA刺激两天后,细胞由之前的悬浮生长变为贴壁生长,而且THP-1-Mφ细胞可高表达单核巨噬细胞特有的CD14分子和CD68分子,说明单核细胞已经成功分化为巨噬细胞。但是此时细胞大部分呈圆形或椭圆形,并没有形成明显的突触,不具备吞噬病原体的功能,故THP-1-Mφ细胞摄取抗原的能力较弱,当继续分化为THP-1-M1和THP-1-M2后,细胞表面出现非常明显的突起,此时的巨噬细胞可对病原体进行有效的吞噬。由于Mφ与M1和M2型巨噬细胞之间的形态学差异较大,而且THP-1-Mφ并不能高表达M1型巨噬细胞的特异性分子CD80和CD86,也不能高表达M2型巨噬细胞的特异性分子CD163和CD209,因此可以认为THP-1-Mφ细胞并非THP-1-M1和THP-1-M2两种细胞的混合群,而是不同于M1和M2的一种巨噬细胞。

除各细胞的特异性分子之外,本研究还对与抗原提呈功能相关的CD分子进行了检测,其中共刺激分子CD80、CD83和CD86可使细胞有效摄取并加工提呈抗原,为T细胞的活化提供所需的共刺激信号[9];CD209的高表达同样可促进巨噬细胞更好的识别抗原,激活T细胞的免疫应答[10];CD1a则主



注："……"同型对照；"－"CD83，CD1a，CD11c 和 HLA-DR；A：使用流式细胞术检测 CD 分子的表达情况；B：利用统计图比较不同细胞上 CD 分子表达情况的差异。与 THP-1-Mφ 比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

图 5　CD83，CD1a，CD11c 和 HLA-DR 分子在不同巨噬细胞表面表达的差异

Note："……" Isotype control；"－" CD83，CD1a，CD11c and HLA-DR；A：The expression of CD molecules were detected by flow cytometry；B：The differences of CD molecules on different cells were analyzed by histogram. Compared with the THP-1-Mφ，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$.

Fig. 5　Differences in the expression of CD83，CD1a，CD11c and HLA-DR in different macrophage subsets

要负责脂类抗原的提呈[11]；而 HLA-DR 的表达可促进巨噬细胞的激活，其表达程度也反映了细胞提呈抗原的能力[12]。统计结果发现，THP-1-Mφ 细胞表面以上分子的表达量均较低，大部分呈阴性，与体内静息状态下的巨噬细胞较相似，此时细胞摄取并提呈抗原的能力较弱，无法有效的刺激 T 细胞活化[13]；而当 THP-1-Mφ 被细胞因子诱导分化为 THP-1-M1 和 THP-1-M2 后，以上 CD 分子的表达均出现了明显的上升。因此可以认为 THP-1-Mφ 细胞为处于静息状态的巨噬细胞，而 THP-1-M1 和 THP-1-M2 则为被活化的具有功能性的巨噬细胞，但是以上结果并不能直接说明 THP-1-Mφ 即为 M0 细胞。

综上所述，静息状态的 Mφ 与活化状态的 M1、M2 在细胞形态和 CD 分子的表达方面差异较大，在实验过程中需要根据实验目的选择合适的细胞模型。本研究在体外诱导实验的基础上，采用了比较分析的方法，明确了 PMA 刺激 THP-1 细胞后所得 THP-1-Mφ 的类型，为巨噬细胞功能性实验的研究提供了理论依据，而且本实验重点研究了巨噬细胞 CD 分子的表达情况，也为巨噬细胞的表型鉴定方法提供了新思路。

参考文献：

[1] Van FR. The mononuclear phagocyte system [J]. Verh Dtsch Ges Pathol, 1980(64):1－11.

[2] 孙晓梅，曹春渝，高家红，等. 血细胞分离机大量采集实验猕猴外周血单核细胞方法探讨[J]. 中国实验动物学报，2008，16(6):424－427.

（下转第 23 页）

研究报告

荧光双向电泳检测雌雄小鼠肝组织蛋白组学的差异

戎卓娜,李慧玲*,董鹏辉,樊婷婷,李　娟,赵　毅,王福金,王爱国,王靖宇*

(大连医科大学实验动物中心,大连　116044)

【摘要】 **目的**　检测雌雄小鼠肝组织蛋白质组表达差异,探讨肝病发生的性别差异机制。**方法**　采用双向荧光差异凝胶电泳(two dimension difference gel electrophoresis, 2D-DIGE)和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术检测 C57BL/6J 雌雄小鼠肝组织的蛋白质组差异表达谱,分离并鉴定差异表达蛋白,应用 Western blot 进行验证,并对差异表达蛋白进行生物信息学分析,包括蛋白功能注释、分类分析、京都基因与基因组百科全书通路分析。**结果**　经双向荧光差异凝胶电泳-图像分析得到1767 个蛋白点,其中差异倍数≥1.5($P < 0.05$)的蛋白点 325 个。从中选择 78 个差异蛋白点进行 MALDI-TOF-MS 鉴定,得到 48 种差异性表达的蛋白质。其中,与雌鼠相比,雄鼠肝组织中高表达的蛋白有 14 种,低表达的蛋白有34 种。选取6 个差异蛋白点进行 Western blot 验证,证明了2D-DIGE 结果的可靠性。GO 分析结果显示,涉及雌雄鼠肝组织中的差异蛋白在细胞组分、分子功能、生物学过程中的分布广泛。KEGG 通路分析发现差异蛋白涉及6 条信号通路。**结论**　C57BL/6J 雌雄小鼠肝组织的差异性蛋白表达的检测结果为研究性别差异性肝病发生的分子机制提供了基础生物学信息和有益的线索。

【关键词】 肝;性别差异;蛋白质组学;生物信息学;双向荧光差异凝胶电泳

【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0016-07

doi: 10.3969. j. issn. 1671 -7856. 2017. 10. 004

Differential proteomic analysis of liver tissues between male and female C57BL/6J mice by 2D-DIGE

RONG Zhuo-na, LI Hui-ling*, DONG Peng-hui, FAN Ting-ting, LI Juan, ZHAO Yi, WANG Fu-jin, WANG Ai-guo, WANG Jing-yu*

(Laboratory Animal Center, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

【**Abstract**】 **Objective**　To identify the differential proteomic expressions between the liver tissues of male and female mice, and investigate the mechanisms underlying gender differences in liver diseases. **Methods**　Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2D-DIGE) and matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) were used to identify the differentially expressed proteins in the liver tissues of male and female C57BL/6J mice. The differentially expressed proteins were validated by Western blot and further analyzed by bioinformatics, including Gene Ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). **Results**　Among the auto-detected 1767 protein spots by 2D-DIGE, 325 protein spots were differentially expressed ($|ratio| \geq 1.5$, $P < 0.05$) between the liver tissues of male and female mice, in which 78 spots were randomly selected for MALDI-TOF-MS identification and finally 48 distinct proteins were obtained. Compared with females, 14 and 34 proteins were up- or down-regulated in males, respectively. Among them, 6 differentially expressed proteins were validated by Western blot which

[基金项目]辽宁省教育厅科学规划课题(L2014341);国家自然科学基金(30872950)。

[作者简介]戎卓娜,女,硕士,研究方向:肝肿瘤发生分子机制的研究。E-mail: rongzhuona@163. com

[通讯作者]李慧玲,女,硕士,讲师,研究方向:肝肿瘤发生分子机制的研究。E-mail: 5421992@ qq. com。

王靖宇,男,教授,博士生导师,研究方向:动物行为学和分子生物学。E-mail: wangjingyus@ 163. com。 * 共同通讯

confirmed the reliability of 2D-DIGE results. GO analysis showed that the differentially expressed proteins in the liver tissues of male and female mice are associated to various cellular component, molecular function and biological process. 6 pathways were significantly different between the liver tissues of males and females depending on KEGG analysis. **Conclusions** The proteomic data and related analysis of the liver tissues of C57BL/6J mice offer crucial clues for elucidating the underlying mechanisms of different gender effects on liver diseases.

【**Key words**】 Liver; Gender difference; Proteomic; Bioinformatics; Two dimension difference gel electrophoresis, 2D-DIGE

肝病的雄性倾向性是哺乳动物的显著特征[1-5],说明哺乳动物具有相似的性别差异性肝病发生机制,但其分子机制尚不清楚。近年,蛋白质组学技术和生物信息学分析的飞速发展,为从整体、动态、定量水平研究疾病发生发展的机制提供了关键性技术方法和重要信息[6]。本研究采用双向荧光差异凝胶电泳分析法,首次对 C57BL/6J 品系雌雄小鼠肝组织进行了差异蛋白质组学检测和相应的生物信息学分析,为以小鼠为动物模型的肝病的性别差异性发生机制研究提供基础生物学信息。

1　材料和方法

1.1　实验动物

SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 3 只,9 月龄,体重 24 ~ 27 g,雌性小鼠 3 只,15 月龄,体重 24 ~ 27 g,小鼠的繁育饲养和实验均在大连医科大学实验动物中心 SPF 区进行[SCXK(辽)2013 - 0003][SYXK(辽)2013 - 0006]。实验动物使用与管理委员会(ICUC)批准号:L20130326。

1.2　主要试剂与仪器

Cy2,Cy3,和 Cy5 购自英国 GE Healthcare Bio-Sciences 公司;二甲基甲酰胺购自美国 Aldrich 公司;尿素、琼脂糖、甘油、溴酚蓝、CHAPS、SDS、碘乙酰胺、过硫酸铵、TEMED、IPG 凝胶(24 cm,pH3 ~ 10)购自美国 Bio-Rad;蛋白酶抑制剂混合物购自瑞士 Roche Applied Science;胰蛋白酶(测序级)购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司;GelDocTMEZ 成像仪(美国 Bio-RAD);质谱仪(AutoFlex,德国 Bruker 公司);紫外分光光度计(Nanodrop 2000)、xMark 酶标仪等。

1.3　实验方法

1.3.1　组织样本的采集和蛋白质提取

宏观解剖分别采集 C57BL/6J 雄性和雌性小鼠的肝组织,剪成约 1 cm^3 大小的组织块,置于冷冻管中液氮冻存。组织块液氮研磨,加入 1 mL 裂解液(7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% CHAPS,30 mmol/L Tris-Cl pH 8.5,磷酸酶抑制剂),超声破碎 10 s,14 000 r/min 离心 30 min。用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒对蛋白浓度进行定量,并用 SDS-PAGE 确认。

1.3.2　DIGE 实验设计和荧光染料标记

在 3 只雌性或 3 只雄性小鼠的肝组织蛋白样本中各取 50 μg 进行等量混合,分别获得雄性(M)和雌性(F)肝组织混合蛋白样本。雌雄肝组织混合样本分别以 Cy3 和 Cy5 进行荧光标记,两者再进行等量混合为内标,以 Cy2 进行荧光标记。

1.3.3　双向电泳

IPG 胶条(24 cm,pH 3 ~ 10)置于 IPGphor 水平电泳仪(Bio-Rad)上进行水化和聚焦,取 1.3.2 中样本的等量混合液进行 2D-DIGE,电泳条件 280 kVh(30 min 内达到 250 V,1000 V 稳定 1 h,5 h 内达到 10000 V,10000 V 维持到 60 kVh)。等电聚焦结束后,IPG 胶条先后在十二烷基磺酸钠平衡液(0.5% DTT)和平衡液 Ⅱ(4.5% 碘乙酰胺)中各平衡 15 min;将平衡好的 IPG 胶条转移至 12% 的十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶上端,设置功率,避光条件下进行垂直电泳,直至溴酚蓝达胶底线,然后用 Typhoon 9410 激光共聚焦扫描仪对电泳结果进行成像,各个荧光染料激发/吸收特异波长设置分别为 Cy2(488/520 nm),Cy3(532/580 nm)和 Cy5(633/670 nm)。同时取未标记的蛋白内标样品 1 mg 进行双向电泳,具体操作同荧光染色样本。电泳结束后,先用超敏考马斯亮蓝染色液染色,再扫描成像,用于质谱分析。

1.3.4　图像分析

双向荧光差异凝胶电泳图谱用 SameSpots 软件分析,观察蛋白的变化趋势。同时,将一张分析过的图像用于切胶图像(SpotPicking),与 1 mg 内标样品的制备胶的染色点进行匹配。选择倍数≥1.5($P < 0.05$)的斑点为差异蛋白点。

1.3.5　差异蛋白的胶内酶切和质谱鉴定

采集差异蛋白点,经过清洗和脱色,脱水干燥,37℃酶解 15 h。收集上清,提取蛋白并冻干。将蛋

白样本复溶,点靶于MALDI金属盘上,4700 MALDI-TOF-MS串联飞行质谱仪进行鉴定。

1.3.6 数据库检索差异蛋白名称

应用MASCOT软件对上述质谱鉴定数据在NCBI非冗余数据库进行检索。检索参数:种类为Mus musculus;酶为胰蛋白酶,允许1个漏切位点;肽质量容忍差异为0.2;MS/MS容忍差异为0.3。

1.3.7 蛋白质印迹法验证2D-DIGE检测结果

RIPA裂解液提取C57BL/6J雌雄小鼠肝脏组织的总蛋白(4只/组),Bradford试剂盒测定样本蛋白浓度。将30 μg的蛋白样品在12%的SDS-PAGE上进行分离、转膜、封闭后,分别用EPHX2、CA3、FBP1、ARHGDIA(Abcam)和SCP2、Albumin(Bioworld)一抗以及HRP标记山羊抗兔(ABclonal)二抗孵育后,用ECL化学发光试剂盒(Advansta,USA)显影。实验重复3次,Bradford染色作为上样内参。

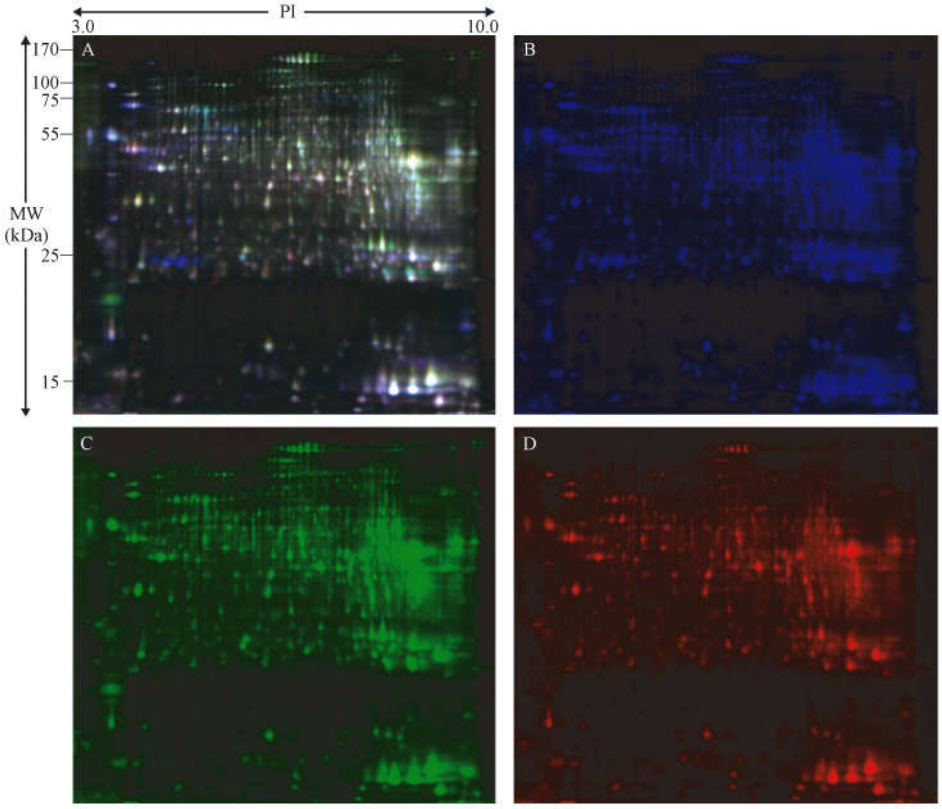
1.4 生物信息学分析

用DAVID软件(https://david.ncifcrf.gov/home.jsp)对鉴定的差异蛋白质进行Gene Ontology(GO)分析,对差异蛋白进行功能注释和分类,包括Cellular component(CC)、Molecular function(MF)和Biological Process(BP)分析;以及对差异蛋白进行Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)的通路富集分析。

2 结果

2.1 2D-DIGE图谱和分析结果

将雌鼠和雄鼠的肝组织蛋白样本进行荧光标记和电泳后,分别经488、532、633 nm波长的激光进行扫描,即获得内标图谱、雌鼠肝组织蛋白图谱、雄鼠肝组织蛋白图谱共3张,然后用SameSpots分析软件进行分析,并将图谱叠加(图1)。雌雄小鼠肝组织蛋白样本中共检测到蛋白质斑点1767个。



注:A:3个不同荧光标记样品的叠加图像;B:Cy2标记的混合蛋白样本内标;C:Cy3标记的雄鼠肝组织蛋白样本;D:Cy5标记的雌鼠肝组织蛋白样本。

图1 C57BL/6J雄鼠和雌鼠肝组织蛋白表达的双向荧光差异凝胶电泳图谱

Note. A: The merged images of different fluorescent labeled samples; B: Cy2 labeled mixed protein samples; C: Cy3 labeled liver tissue protein samples of male mice; D: Cy5 labeled liver tissue protein samples of female mice.

Fig. 1 Images of gender differentially expressed proteins in C57BL/6J mouse liver tissues detected by two dimensional fluorescence difference gel electrophoresis

表 1　雄鼠肝组织高表达差异蛋白的质谱鉴定结果

Tab. 1　Up-regulated proteins identified in the liver of male mice by LC MS/MS analysis

Uniprot 编号 Accession No.	相对分子量 MW	等电点 pI	蛋白质名称 Protein names
P07724	68647.7	5.75	血清白蛋白(serum albumin, Alb)
P11588	20763.3	4.96	主要尿蛋白 1(major urinary protein 1, MUP-1)
P16015	29347.6	6.89	碳酸酐酶 3(carbonic anhydrase 3, Ca3)
P24270	59757.6	7.72	过氧化氢酶(catalase, Cat)
P27773	56642.7	5.88	蛋白二硫键异构酶 A3(protein disulfide-isomerase A3, PDIA3)
P32020	59087.8	7.16	固醇载体蛋白 2(sterol carrier protein 2, SCP2)
P34914	62474.6	5.85	双功能环氧化物水解酶 2(bifunctional epoxidehydrolase 2, Ephx2)
P63017	70827.2	5.37	热休克蛋白 8(heat shock protein 8, Hsp 8)
Q03265	59715.6	9.22	ATP 合酶亚基 α(ATP synthase subunit alpha, ATP5A1)
Q63880	57821.5	5.43	羧酸酯酶 3A 羧酸酯酶 3A(carboxylesterase 3A, Ces3a)
Q8C196	164513.7	6.48	氨甲酰磷酸合酶(carbamoyl-phosphate synthase, CPS1)
Q8R0Y6	98646.5	5.64	醛脱氢酶家族 1 成员 L1(aldehyde dehydrogenase family1 member L1, ALDH1L1)
Q921I1	76673.7	6.94	血清铁蛋白(sero transferrin, Trf)
Q9R0N0	42268.4	5.17	半乳糖激酶(galactokinase, Galk1)

表 2　雄鼠肝组织低表达差异蛋白的质谱鉴定结果

Tab. 2　Down-regulated proteins identified in the liver of male mice by LC MS/MS analysis

Uniprot 编号 Accession No.	相对分子量 MW	等电点 pI	蛋白质名称 Protein names
E9PY03	14319	8.66	蛋白 TSTD1 (TSTD1 protein)
P02088	15738.2	7.14	血红蛋白亚基 β-1(hemoglobin subunit beta-1, Hbb-b1)
P05784	47509.2	5.22	细胞角蛋白 18(cytokeratin-18, CK-18)
P08113	92418.2	4.74	热休克蛋白 90b1(heat shock protein 90 kDa beta member 1, Hsp90-β1)
P11352	22268.3	6.74	谷胱甘肽过氧化物酶 1(glutathione peroxidase 1, GPX1)
P11725	39340.4	8.77	鸟氨酸氨甲酰转移酶(ornithine carbamoyl transferase, OTC)
P12710	14236.5	8.59	肝型脂肪酸结合蛋白(fatty acid-binding protein, liver, FABP1)
P12787	16091.3	6.08	细胞色素 c(cytochrome c, Cox5a)
P14206	32817.4	4.80	40S 核糖体蛋白 SA(40S ribosomal protein SA, Rpsa)
P14211	47964.9	4.33	钙网蛋白(calreticulin, Calr)
P19157	23594.1	7.68	谷胱甘肽 S-转移酶 P1(glutathione S-transferase P1, Gstp1)
P20029	72377.5	5.07	热休克蛋白 5(heat shock 70 kDa protein 5, Hsp5)
P22752	32193.5	6.36	组蛋白 H2A1 型(histone H2A type 1, Hist1h2ab)
P24369	23698.6	9.56	肽基脯氨酰顺反异构酶 B(peptidyl-prolylcis-transisomerase B, Ppib)
P56395	11135.5	5.13	细胞色素 b5(cytochrome b5, CYB5A)
P56480	56265.5	5.19	ATP 合酶亚基 β(ATP synthase subunit beta, ATP5b)
P58771	28679	4.75	原肌球蛋白 α-1 链(tropomyosin alpha-1 chain, Tpm1)
P62204	16826.8	4.09	钙调蛋白(calmodulin, CALM1)
P62806	11360.4	11.36	组蛋白 H4(histone H4, Hist1H4a)
P62962	14947.5	8.46	前纤维蛋白 1(profilin-1, Pfn1)
Q00623	30596.6	5.51	载脂蛋白 A1(apolipoprotein A-Ⅰ, ApoA1)
Q00915	15835.8	5.10	视黄醇结合蛋白 1(retinol-binding protein 1, RBP-1)
Q05816	15127.4	6.14	表皮型脂肪酸结合蛋白(fatty acid-binding protein, epidermal, FABP5)
Q64433	10955.9	7.93	10 kDa 伴侣蛋白(chaperonin10, Cpn 10/Hsp 10)
Q6P9P0	143880.7	9.34	SMC5-SMC6 复合物定位因子蛋白 2(SMC5-SMC6 complex localization factor protein2, SLF2)
Q8R317	58640.6	4.85	核小体表面蛋白 1(ubiquilin-1, UBQLN 1)
Q922R8	48658.6	5.05	蛋白二硫键异构酶 A6(protein disulfide-isomerase A6, PDIA6)
Q99PT1	23392.8	5.12	RhoGDP-解离抑制剂 1(Rho GDP-dissociation inhibitor 1, ARHGDIA)
Q9CPT4	17971.0	6.30	骨髓衍生生长因子(myeloid-derived growth factor, MYDGF)
Q9D3D9	17589.1	5.03	ATP 合酶亚基 δ(ATP synthase subunit delta, ATP5D)
Q9D819	32646.2	5.37	无机焦磷酸酶(inorganic pyrophosphatase 1, PPA1)
Q9DBB8	36277.7	6.03	反-1,2-二氢苯-1,2-二醇脱氢酶(trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehy drogenase, DHDH)
Q9QXD6	36888.8	6.15	果糖-1,6-二磷酸酶 1(fructose-1,6-bisphosphatase 1, FBP1)
O08709	24855	5.71	过氧化物酶-6(peroxiredoxin-6, Prdx6)

2.2 雌雄小鼠肝脏组织中差异表达蛋白的筛选和鉴定

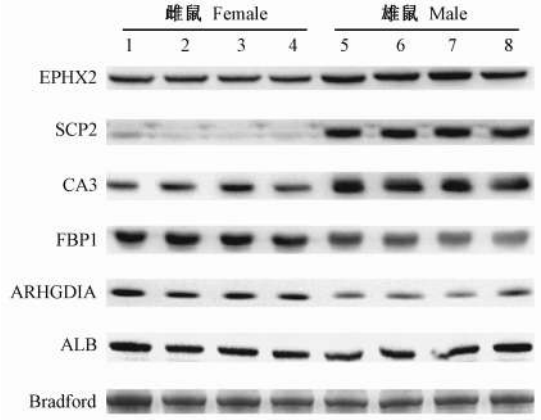
采用SameSpots软件对差异蛋白点进行分析和筛选。筛选条件:蛋白质差异在1.5倍以上($P<0.05$)。比较后共分析出325个差异点。其中,与雌鼠相比,雄鼠肝组织中高表达的蛋白点共计155个,低表达的蛋白点共计170个。对筛选出来的差异蛋白点,随机选取78个点进行MALDI-TOF-MS质谱鉴定。结果显示,这些鉴定的所有蛋白点均获得了较好的质谱图。将肽质量指纹图谱和MS/MS数据提交MASCOT进行在线检索,共成功检索出48种蛋白。其中,与雌鼠相比,雄鼠肝组织中高表达的蛋白14种(表1),低表达的蛋白34种(表2)。

2.3 鉴定结果的蛋白质印迹验证

在鉴定出的雌雄小鼠肝脏组织差异表达蛋白中选取EPHX2、SCP2、CA3、FBP1、ARHGDIA和Albumin 6个蛋白进行蛋白质印迹验证。结果如图2所示,与雌性小鼠的肝组织相比,EPHX2、SCP2和CA3在雄性小鼠肝组织中的表达明显升高,FBP1和ARHGDIA在雄性小鼠肝组织中的表达明显降低。这些结果与2D-DIGE的鉴定结果一致,说明了2D-DIGE结果的可靠性。但是,Albumin的蛋白表达在雌雄小鼠间未见明显差异,在2D-DIGE鉴定的78个蛋白点中,有9个点鉴定为Albumin。这表明Albumin在雌雄小鼠间可能存在转录剪切或翻译后修饰的显著差异。

2.4 差异蛋白的GO分析

将所有差异蛋白进行GO分析(表3),共涉及26条分子功能,其中包含蛋白数量最多的前10种分子功能为:poly(A)RNA结合、酶结合、脂质结合、受体结合、催化活性、解折叠蛋白结合、ATPase活性、钙粘蛋白结合参与细胞间粘附、泛素蛋白连接酶结合和蛋白复合物结合。共涉及28条细胞组分,其中包含蛋白数量最多的前十种细胞组分为:胞外体、细胞质、细胞核、胞质溶胶、线粒体、细胞外空间、内质网、蛋白复合物、胞外区和髓鞘。共涉及40条生物学功能,其中包含蛋白数量最多的前十种生物学功能为:运输、凋亡过程的负调控、代谢过程、蛋白质折叠、脂代谢过程、氧化还原过程、对药物的反应、响应活性氧、ATP代谢过程和受体介导的内吞作用。以上结果表明,雌雄小鼠肝脏差异蛋白在分子功能、细胞组分和生物学功能中都存在广泛而显著的差异。



注:1~8数字分别代表不同个体的C57BL/6J小鼠。

图2 蛋白质印迹法验证雌雄小鼠肝脏组织差异表达蛋白

Note. 1~8 numbers indicate the different individuals of C57BL/6J mice.

Fig. 2 Validation of the differentially expressed proteins between females and males by Western blot assay

表3 雌雄小鼠肝组织差异蛋白GO富集分析结果

Tab. 3 GO analysis for the gender differentially expressed proteins in mouse liver tissues

GO号 Go No.	GO注释 GO Term	基因数量/% Gene content	校正后P值 Corrected P value	基因 Gene
GO:0070062	Extracellular exosome	37/48(77.1)	5.0E-23	Krt18/Hsp90b1/Cyb5a/Hspa8/Mydgf等
GO:0005737	Cytoplasm	30/48(62.5)	4.5E-05	Krt18/Otc/Cyb5a/Tpm1/Hspa8等
GO:0005634	Nucleus	24/48(50.0)	4.6E-03	Mup1/Gstp1/Hspa5/Atp5b/Hspa8等
GO:0005829	Cytosol	19/48(39.58)	3.8E-08	Hsp90b1/Mup1/Gstp1/Ephx2/Hspa8等
GO:0005739	Mitochondria	17/48(35.42)	8.7E-07	Cox5a/Gstp1/Hspa5/Atp5b/Aldh1l1等
GO:0005615	Extracellular space	14/48(29.2)	2.7E-05	Mup1/Gstp1/Hspa8/Ces3a/Mydgf等
GO:0005783	Endoplasmic reticulum	12/48(25.0)	1.8E-04	Alb/Calr/Hspa5/Ppib/Pdia3等
GO:0006810	Transport	11/48(22.9)	1.3E-02	Alb/Scp2/Atp5b/Atp5a1/Trf等
GO:0043234	Protein complex	11/48(22.9)	1.5E-06	Alb/Calr/Gstp1/Cps1/Aldh1l1等
GO:0044822	Poly(A) RNA binding	10/48(20.8)	1.9E-03	Calr/Ppib/Pdia3/Pfn1/Atp5a1等

表 4　雌雄小鼠肝组织差异蛋白的 KEGG 通路数据库富集分析结果

Tab. 4　KEGG analysis for the gender differentially expressed proteins in the mouse liver tissues

KEGG 通路 KEGG pathway	基因数量/% Gene content	校正后 *P* 值 Corrected *P* value	基因 Gene
Protein processing in endoplasmic reticulum	7/48 (14.6)	1.1E-04	Hsp90b1/Calr/Hspa5/Pdia3/Hspa8/Ubqln1/Pdia6
Oxidative phosphorylation	5/48 (10.4)	3.8E-03	Cox5a/Atp5b/Atp5a1/Atp5d/Ppa1
Alzheimer's disease	5/48 (10.4)	8.9E-03	Cox5a/Atp5b/Calm1/Atp5a1/Atp5d
PPAR signaling pathway	4/48 (8.3)	6.0E-03	Fabp1/Scp2/Apoa1/Fabp5
Parkinson's disease	4/48 (8.3)	3.2E-02	Cox5a/Atp5b/Atp5a1/Atp5d
Thyroid hormone synthesis	3/48 (6.3)	4.2E-02	Hsp90b1/Gpx1/Hspa5

2.5　差异蛋白的 KEGG 分析

对所有差异蛋白进行 KEGG 通路分析，共发现了 6 个有统计学意义的代谢通路（表 4），包括内质网中的蛋白质加工、氧化磷酸化、阿尔茨海默病、PPAR 信号通路、帕金森病和甲状腺激素合成。

3　讨论

我们的前期研究结果表明，在 Ras 癌基因诱导的，以 C57BL/6J 为遗传背景的肝癌小鼠动物模型中[3]，肝肿瘤的发生主要集中在雄鼠的中年阶段和雌鼠的老年阶段，并存在显著的差异（肝肿瘤发生率：9 月龄雄鼠为 100%，15 月龄雌鼠为 34.62%）。由此，本研究选择 9 月龄雄鼠和 15 月龄雌鼠作为研究对象。通过 2D-DIGE 分析，与雌鼠相比，雄鼠肝组织中下调的蛋白 34 个，上调蛋白 14 个，涉及广泛的细胞生物学功能和代谢通路。

适当的 ROS 水平对正常细胞的生理过程具有重要的调节作用，但过量的 ROS 又是参与细胞病变过程的重要因素[7]。本研究发现，三种参与 ROS 代谢的关键酶（GPX1，Prdx6，CAT）在雌雄小鼠肝组织中的表达具有显著的差异。其中，GPX1 和 Prdx6 在雄性 C57BL/6J 小鼠肝组织内的表达较雌性小鼠显著降低（GPX1 下降 5.31 倍，Prdx6 下降 2.7 倍）。GPX1 是线粒体中重要的抗氧化酶，主要负责消除线粒体内 H_2O_2 的水平，从而抵抗或阻止 ROS 蓄积所导致的细胞损伤[8]。Prdx6 是抗氧化蛋白超家族成员之一，是具有 GPX 和 Ca^{2+} 非依赖性磷脂酶 A2 双重酶活性的蛋白。体外研究表明，小鼠表皮细胞过表达 Prdx6 具有抵抗氧化应激损伤的作用[9]。GPX1 和 Prdx6 的显著降低可能会导致雄性小鼠肝细胞中的 ROS 水平偏高，肝细胞易受损伤，进而有利于肝病的发生发展。另外，KEGG 富集分析结果显示，线粒体中氧化磷酸化通路发生了显著变化，其中的相关蛋白在雄性小鼠肝细胞中普遍降低，这可能会进一步提升雄性小鼠肝细胞中的 ROS 水平。有趣的是，CAT 在雄性 C57BL/6J 小鼠肝组织内的表达较雌性小鼠显著升高（1.6 倍）。CAT 主要功能是分解 H_2O_2 为 H_2O 和 O_2，与 SOD、POD 共同组成抗氧化酶系统，降低细胞内 ROS 水平[10]。CAT 的显著升高可能是低水平 GPX1 和 Prdx6 的代偿性补充，以维持雄性肝细胞的正常 ROS 水平和生理功能，但具体机制尚需进一步研究。

肝脏是生物体脂质代谢的中枢器官，而脂质代谢紊乱又是诱发或影响肝病发生发展的重要因素之一[11]。本研究的 KEGG 通路富集分析数据表明，调节脂质代谢的 PPAR 信号通路在雌雄小鼠的肝组织中具有显著的差异，其中检测到的差异蛋白为 Scp2、ApoA1、FABP1 和 FABP5，与雌性小鼠相比，Scp2 在雄性小鼠中上调，其他蛋白均下调。Scp2 是胆固醇代谢的重要调节因子，不仅参与胆固醇的生物合成和转化，还是胆固醇的重要转运蛋白。Liu 等研究表明，中草药当归可显著下调肝组织 Scp2 的表达进而抑制脂肪肝的发生[12]。因而，Scp2 在雄性小鼠肝组织中的显著升高可能会导致胆固醇在雄性肝细胞中的蓄积，进而影响肝病的进展。ApoA1 作为卵磷脂胆固醇酰基转移酶的载脂蛋白，主要参与胆固醇由外周组织向肝脏的逆向转运[13]。而 FABP1 和 FABP5 均为脂肪酸结合蛋白家族的成员，其中 FABP5 不仅可以转运脂肪酸为细胞生长提供能量及原材料，而且可以结合和转运各种配体，参与肿瘤生长相关的信号转导[14]。这些脂质代谢相关蛋白在脂肪肝及肝肿瘤中都具有重要的作用，然而，它们的显著下降对雄性倾向性肝病病变过程的影响尚有待进一步探究。

综上所述，本研究应用双向荧光差异凝胶电泳技术首次检测了 C57BL/6J 雌雄小鼠肝脏组织的差异性蛋白表达，为研究性别差异性肝病发生的分子机制提供了基础生物学信息和有益的线索。

参考文献:

[1] Bianco T, Gillo U, Amodio P, et al. Gender differences in the quality of life of patients with liver cirrhosis related to hepatitis C after liver transplantation[J]. Blood Purif, 2013, 36(3-4): 231-236.

[2] Pan JJ, Fallon MB. Gender and racial differences in nonalcoholic fatty liver disease[J]. World J Hepatol, 2014, 6(5): 274-283.

[3] Wang AG, Moon HB, Lee MR, et al. Gender-dependent hepatic alterations in H-ras12V transgenic mice[J]. J Hepatol, 2005, 43(5): 836-844.

[4] 定明, 何允刚, 张小飞, 等. 蛋白质组学技术筛选和鉴定白化黑线仓鼠皮肤白化相关差异蛋白质[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(1): 79-82.

[5] 李顺, 陈丽香, 彭秀华, 等. 小鼠肝癌模型研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(2): 213-216.

[6] Boguski MS, McIntosh MW. Biomedical informatics for proteomics[J]. Nature, 2003, 422(6928): 233-237.

[7] Holbrook NJ, Ikeyama S. Age-related decline in cellular response to oxidative stress: links to growth factor signaling pathways with common defects[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64(5-6): 999-1005.

[8] Thu VT, Kim HK, Ha SH, et al. Glutathione peroxidase 1 protects mitochondria against hypoxia/reoxygenation damage in mouse hearts[J]. Pflugers Arch, 2010, 460(1): 55-68.

[9] Shibata S, Shibata N, Shibata T, et al. The role of Prdx6 in the protection of cells of the crystalline lens from oxidative stress induced by UV exposure[J]. Jpn J Ophthalmol, 2016, 60(5): 408-418.

[10] Jadeja RN, Urrunaga NH, Ahmad D, et al. Data regarding M1 muscarinic receptor-mediated modulation of hepatic catalase activity in response to oxidative stress[J]. Data Brief, 2016, 6: 405-409.

[11] Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights[J]. Science, 2011, 332(6037): 1519-1523.

[12] Lu X, Yuan ZY, Yan XJ, et al. Effects of Angelica dahurica on obesity and fatty liver in mice[J]. Chin J Nat Med, 2016, 14(9): 641-652.

[13] Fernandez-Miranda C, Perez-Carreras M, Colina F, et al. A pilot trial of fenofibrate for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Dig Liver Dis, 2008, 40(3): 200-205.

[14] 周玲丽, 曹骥, 李薇, 等. RNA干扰FABP5基因对人肝癌HepG2细胞裸鼠移植瘤生长的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(4): 603-608.

〔收稿日期〕2017-02-19

(上接第15页)

[3] 桑明, 代明, 周立, 等. 恒河猴外周血单核巨噬细胞体外培养方法的建立[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(1): 18-24.

[4] Xue J, Fu C, Cong Z, et al. Galectin-3 promotes caspase-independent cell death of HIV-1-infected macrophages[J]. FEBS J, 2016, 284(1): 97-113.

[5] 彭卓颖, 丛喆, 李想, 等. 不同方法诱导THP-1细胞分化效果比较[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(9): 1-7.

[6] 吴芳新, 王卫, 丛喆, 等. 艾滋病猴特异性细胞免疫的胞内细胞因子检测方法优化与应用[J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(1): 18-23.

[7] Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment[J]. F1000Prime Rep, 2014, 6: 13.

[8] Mantovani A, Sica A, Sozzani S, et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization[J]. Trends Immunol, 2004, 25(12): 677-686.

[9] 张苗苗, 梁雪, 杨荣存. LPS刺激下miR-17和miR-20a对小鼠巨噬细胞CD80、CD86表达的影响[J]. 南开大学学报自然科学版, 2012(6): 12-16.

[10] 任建敏, 张彦洁, 王俊青, 等. DC-SIGN固有免疫调节及其表达调控机制研究进展[J]. 生命科学, 2012(10): 9-15.

[11] De Libero G, Mori L. How the immune system detects lipid antigens[J]. Prog Lipid Res, 2010, 49(2): 120-127.

[12] 徐魁, 周云. HLA-DR、CD40和CD1a在桥本甲状腺炎甲状腺滤泡上皮中的表达[J]. 湖北科技学报(医学版), 2011, 25(6): 480-482.

[13] Hornell TM1, Beresford GW, Bushey A, et al. Regulation of the class II MHC pathway in primary human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor[J]. J Immunol, 2003, 171(5): 2374-2383.

〔收稿日期〕2017-04-12

研究报告

Mac-1 基因缺失对黑色素瘤生长的影响

陈　坚,段有发,叶志金,王丽京,章倩倩*

(广东药科大学基础学院,血管生物学研究所,广州　510006)

【摘要】 **目的**　探讨 *Mac*-1 缺失对黑色素瘤肿瘤生长的影响。**方法**　*Mac*-1 基因敲除(*Mac*-1$^{-/-}$)小鼠扩群获得实验所需数量小鼠。设立对照组 C57BL/6J 小鼠和实验组 *Mac*-1$^{-/-}$小鼠,分别皮下注射 B16-F10 细胞,统计小鼠生存率、测量肿瘤体积和重量,通过免疫组化染色检测肿瘤细胞增殖及巨噬细胞浸润情况。**结果**　*Mac*-1 缺失后的黑色素瘤小鼠存活率较对照组 C57BL/6J 小鼠有显著性差异($P < 0.001$),肿瘤体积和重量较对照组 C57BL/6J 小鼠有显著性差异($P < 0.001$),肿瘤组织中增殖细胞数目与对照组相比较有显著性差异($P < 0.01$),并且肿瘤组织中巨噬细胞浸润显著减少。**结论**　*Mac*-1 基因缺失显著抑制黑色素瘤肿瘤生长。

【关键词】 *Mac*-1;黑色素瘤;肿瘤生长

【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0023-05

doi: 10.3969. j. issn. 1671 -7856. 2017. 10. 005

Effect of *Mac*-1 deficiency on the tumor growth of melanoma in mice

CHEN Jian, DUAN You-fa, YE Zhi-jin, WANG Li-jing, ZHANG Qian-qian*

(Institute of Vascular Biology, School of Basic Course, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

【**Abstract**】 **Objective**　To explore the influence of *Mac*-1 deficiency on tumor growth of melanoma. **Methods** The population of *Mac*-1 gene knock-out (*Mac*-1$^{-/-}$) mice was expanded. B16-F10 cells were subcutaneously injected into the C57BL/6J mice (control group) and *Mac*-1$^{-/-}$ mice (experiment group), respectively. Subsequently, the survival rate, tumor volume and body weight were recorded. The proliferation and infiltration of macrophages were detected by immunohistochemistry. **Results**　The survival rate of *Mac*-1$^{-/-}$ mice was significantly improved compared with the C57BL/6J mice ($P < 0.001$). The tumor volume and body weight were remarkably decreased in the *Mac*-1$^{-/-}$ mice compared with the control group ($P < 0.001$). Meanwhile, the tumor cell proliferation index was decreased in the *Mac*-1$^{-/-}$ mice compared with the control group ($P < 0.01$). Furthermore, the infiltration of macrophages in the tumor tissues was also decreased in Mac-1$^{-/-}$ tumor mice compared with control group. **Conclusions**　*Mac*-1 gene deletion can significantly suppress melanoma growth.

【**Key words**】 *Mac*-1; Melanoma; Tumor growth; Mice

表面受体整合素 CD11b/CD18,又称为巨噬细胞抗原-1(macrophage associated antigen-1, Mac-1)、补体受体 3(CR3)或 $\alpha_M\beta_2$,在髓系来源白细胞上表达丰富并介导其关键的黏附运动[1,2]。研究表明

[基金项目]国家自然科学基金(31712904);广东省科技计划(2015A030302083);广东省优秀青年教师培养计划(YQ2015100);广州市珠江科技新星(201610010045)。

[作者简介]陈坚(1993 -),男,硕士研究生,研究方向:肿瘤药理,模式动物疾病模型。E-mail: chenjian_ivory@163.com

[通讯作者]章倩倩(1981 -),女,副研究员,研究方向:肿瘤药理,模式动物疾病模型。E-mail: vinny223@126.com

Mac-1 的表达与肿瘤进程有密切关系[3]。我们前期研究发现,*Mac*-1 缺失会降低髓系细胞在肿瘤微环境的募集,进而减少肿瘤微环境中 TNFα(tumor necrosis factor-α)含量,抑制 Wnt/β-catenin 信号通路,最终抑制肠道肿瘤的生长[4]。说明 *Mac*-1 可能在肿瘤的发生、发展过程中发挥重要的调控作用。恶性黑色素瘤是一种由黑色素细胞发展而来的恶性肿瘤,多发生于皮肤组织,也可发生于眼、肺、消化系统、中枢神经系统、淋巴结等其他组织[5]。黑色素瘤的治疗存活率普遍较低,寻找新的分子治疗靶点将有望推动黑色素瘤治疗的进展。目前 *Mac*-1 缺失对黑色素瘤生长的影响研究尚不明确,我们运用 *Mac*-1 基因敲除小鼠建立皮下移植瘤模型,研究 *Mac*-1 基因缺失对黑色素瘤发生发展的影响。为探讨 *Mac*-1 作为研究黑色素瘤治疗新靶点提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 *Mac*-1 敲除小鼠纯合子(*Mac*-1$^{-/-}$),12 只,雌性和雄性各6只,体重20~22 g,7 周龄,购于美国 Jackson 实验室[B6.129S4-Itgamtm1Myd/J, stock No. 003991]。SPF 级 C57BL/6J 小鼠(C57,雌性,体重20~22 g),23 只,6~8 周龄,广东省医学实验动物中心购买[SCXK(粤)2013-0002]。无菌手术在广东药科大学实验动物中心屏障环境内进行[SYXK(粤)2012-0125]。所有实验动物相关的操作均经过广东药科大学实验动物使用与管理委员会(ICUC)批准[批准号为:gdpulac2016]。

1.2 细胞株

B16-F10 黑色素瘤细胞株购于中科院上海生物化学与细胞生物学研究所,37℃ 贴壁培养在含有10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 高糖培养基中,待细胞处于指数生长期时进行实验。

1.3 主要试剂与仪器

胎牛血清、胰蛋白酶和 DMEM 高糖培养基购自美国 Gibco 公司;Ki67 抗体购自基因科技有限公司;CD68 抗体购自 Abcam 公司;Omniscript® Reverse Transcription Kit 购自 Qiagen 公司;QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit 购自 Qiagen 公司;独立通气笼 IVC(苏杭科技器材有限公司);CO_2 培养箱(Thermo,美国)。

1.4 实验方法

1.4.1 异体移植黑色素瘤模型建立

Mac-1$^{-/-}$小鼠饲养于温度(25±3)℃,相对湿度40%~60%,自动光控时间12 h 明/12 h 暗的SPF级环境中。*Mac*-1$^{-/-}$小鼠(8~12 周龄)以雄:雌=1:3的比例配种,共配两笼,母鼠怀孕后单独饲养,记录产仔日期和产仔数,3 周龄时将仔鼠按照性别分笼饲养,并编号。

Mac-1$^{-/-}$小鼠为实验组,C57 小鼠为对照组,各22 只,雌性,6 周龄。取指数生长期 B16 细胞,胰酶消化后台盼蓝染色确定活细胞数 95%以上,用无菌生理盐水将细胞稀释后每只小鼠右上肢腋下皮下接种 1×10^5 个细胞(0.2 mL)。

1.4.2 肿瘤体积及重量的测定

从细胞注射后第 10 天开始每组取 10 只小鼠,每天用游标卡尺测量肿瘤的长径(L)和短径(W)直至第 17 天,并按照公式统计肿瘤的体积 $V=0.5236\times(L\times W^2)$。第 17 天测量完毕将小鼠处死,剥离肿瘤并称重。

1.4.3 小鼠生存率统计

剩余小鼠每天观察生长生活情况,记录自然死亡时间统计小鼠生存率。

1.4.4 免疫组化染色

小鼠断颈处死并分离肿瘤组织,10%中性福尔马林固定过夜,石蜡包埋切片。4 μm 厚切片脱蜡,脱水,并用 10% BSA 室温封闭 30 min。一抗 4℃孵育过夜,PBS 洗三次,二抗室温孵育 1 h,DAB 显色,苏木素复染。然后在显微镜下观察拍照。

1.4.5 实时荧光定量 PCR 检测 *Mac*-1 缺失对肿瘤组织中炎症因子表达的影响

剪取 50 mg 肿瘤组织,于研钵中加入液氮研磨至粉状,加 1 mL Trizol,收集至 1.5 mL 离心管,静置 5 min。加入0.2 mL 氯仿混匀,13 000 r/min 4℃离心 15 min,吸取上层水相,加0.5 mL 异丙醇混匀,沉淀10 min。13 000 r/min 4℃离心 10 min,弃上清,加1 mL 75%乙醇混匀,7500 r/min 4℃离心 5 min,弃上清,20 μL DEPC 水溶解,测定浓度。参考文献方法,用 Omniscript® Reverse Transcription Kit 反转录,QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit 进行扩增[6]。反转录反应条件为:37℃ 15 min,85℃ 5 s。荧光定量 PCR 扩增程序为 95℃ 3 min,95℃ 7 s、57℃ 10 s、72℃ 15 s 40 个循环。按照文献报道方法进行结果分析[7],并对炎症因子表达差异在 2 倍以上的进行统计分析。

1.5　统计学方法

采用SPSS 12.0 统计软件进行双尾 t 检验分析，实验数据以平均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2　结果

2.1　*Mac*-1$^{-/-}$小鼠繁育结果

Mac-1$^{-/-}$小鼠按照雄∶雌 = 1∶3比例配种，扩大种群，平均每只母鼠的窝产仔数为 8 只，共产仔 50 只。

2.2　*Mac*-1 基因敲除对黑色素瘤模型小鼠生存时间的影响

小鼠在接种 B16 肿瘤细胞后第 7 天观察到体表明显成瘤。成瘤后第 10 天开始，每天观察小鼠生活状态，并记录小鼠的死亡时间，绘制小鼠生存曲线图（见图 1）。注射 B16 细胞后 C57BL/6J 小鼠在 13 周开始出现死亡，在第 27 周时死亡率达 100%；而 *Mac*-1$^{-/-}$小鼠则在 15 周时出现死亡，36 周时死亡率达 100%。与对照组相比，实验组 *Mac*-1$^{-/-}$小鼠生存时间延长，差异有显著性（$P < 0.001$）。

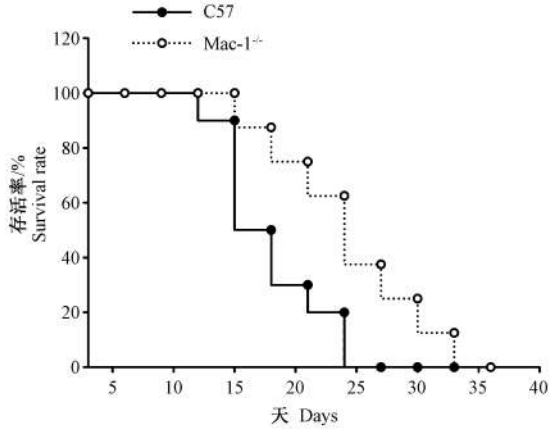
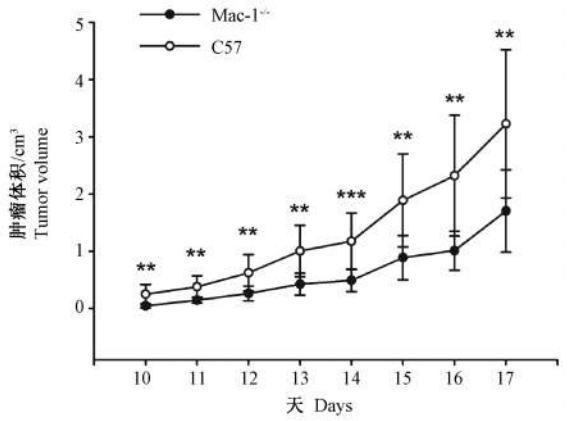


图 1　皮下注射 B16 细胞后 Mac-1$^{-/-}$小鼠和 C57BL/6J 小鼠生存率（$n = 10$）

Fig. 1　The survival rate of Mac-1$^{-/-}$ and C57BL/6J mice after subcutaneous injection of B16 cells

2.3　*Mac*-1 缺失对黑色素瘤生长的影响

分别在 *Mac*-1 敲除小鼠和 C57 小鼠右前肢皮下接种 B16 黑色素瘤细胞，10 天后均形成可见瘤结节。成瘤后，每天测量移植瘤长、短径，计算体积，并绘制出移植瘤生长曲线（图 2）。C57 小鼠移植瘤生长较快，肿瘤体积由 0.224 cm^3 增加到 3.023 cm^3；而 *Mac*-1 敲除小鼠移植瘤生长较缓慢，肿瘤体积由 0.062 cm^3 仅增加到 1.108 cm^3。与 C57 小鼠移植瘤相比，*Mac*-1 敲除小鼠移植瘤体积减小，差异有显著性（$P < 0.01$）。



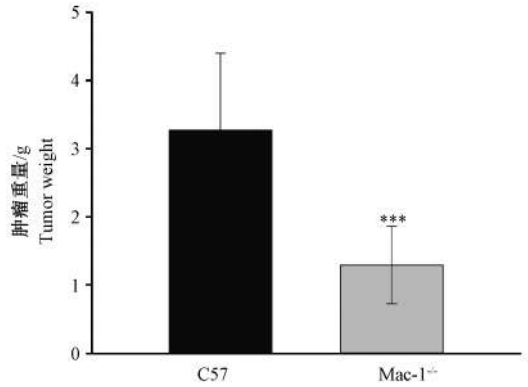
注：与 C57 组比较，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

图 2　*Mac*-1 敲除小鼠皮下移植黑色素瘤生长受到抑制（$n = 10$）

Note. Compared with the C57 group, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

Fig. 2　The tumor volume of *Mac*-1$^{-/-}$ mice was significantly inhibited compared with the C57BL/6J mice after subcutaneous injection of B16 cells

在接种肿瘤后第 17 天颈椎脱臼处死小鼠，剥取移植瘤称重。从图 3 可见，C57 小鼠移植瘤生长较快，平均肿瘤重量为 3.28 g，而 *Mac*-1 敲除小鼠移植瘤生长较慢，平均肿瘤重量仅为 1.32 g。*Mac*-1 敲除小鼠的肿瘤重量低于 C57 小鼠，差异有显著性（$P < 0.001$）。



注：与 C57 组比较，$^{***}P < 0.001$。

图 3　*Mac*-1 敲除小鼠皮下移植黑色瘤的重量受到抑制（$n = 9$）

Note. Compared with the C57 group, $^{***}P < 0.001$.

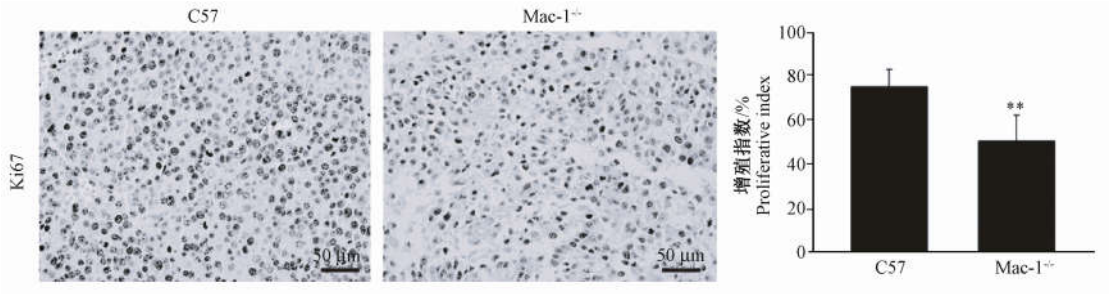
Fig. 3　The tumor weight of *Mac*-1$^{-/-}$ mice was the significantly inhibited compared with the C57BL/6J mice after subcutaneous injection of B16 cells

2.4 Mac-1 缺失对黑色素瘤肿瘤细胞增殖的影响

对肿瘤组织进行免疫组化染色,检测 *Mac*-1 缺失对肿瘤细胞增殖的影响。发现对照组小鼠肿瘤组织中,阳性染色的增殖细胞较多,而 *Mac*-1 缺失的小鼠肿瘤组织中,PCNA(proliferating cell nuclear antigen)阳性染色的增殖细胞较少。并且如图4统计结果显示,*Mac*-1 缺失抑制小鼠肿瘤组织中肿瘤细胞的增殖,且差异有显著性($P < 0.01$)。

2.5 *Mac*-1 缺失对肿瘤组织中巨噬细胞浸润的影响

肿瘤组织中通过对巨噬细胞标志物 CD68 进行免疫组化染色。如图5显示,*Mac*-1 缺失肿瘤组织中巨噬细胞的浸润数目较少,而 C57 对照组肿瘤组织中有大量巨噬细胞浸润。



注:与 C57 组比较,$^{**}P < 0.01$。

图4 Ki67 免疫组化染色

Note. Compared with the C57 group, $^{**}P < 0.01$.

Fig.4 Immunohistological staining for Ki67 in the tumor tissues

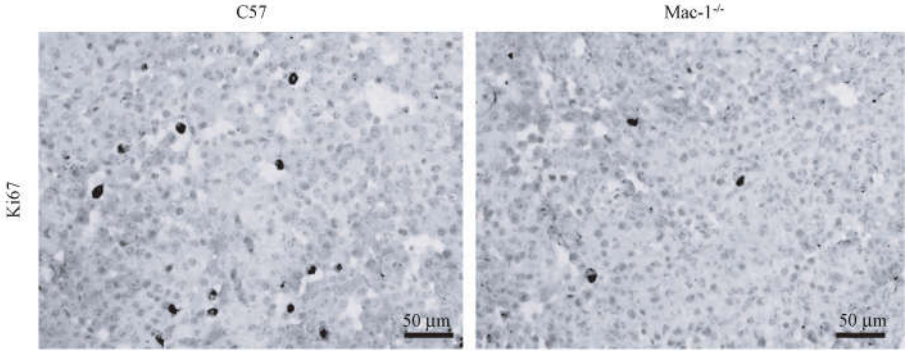


图5 CD68 免疫组化染色

Fig.5 Immunohistological staining for CD68

2.6 *Mac*-1 缺失对肿瘤组织中细胞因子的影响

通过对两种小鼠肿瘤组织进行总 RNA 提取,通过 real-time PCR 检测白细胞分泌的验证相关细胞因子进行筛选,对表达有2倍差异以上的基因进行统计,发现 *Mac*-1 缺失后,皮下移植黑色素瘤内细胞因子 CXCL9(Cxc chemokine ligand-9)表达上调18倍,IFN-γ(interferon-γ)表达上调8.5倍(图6)。

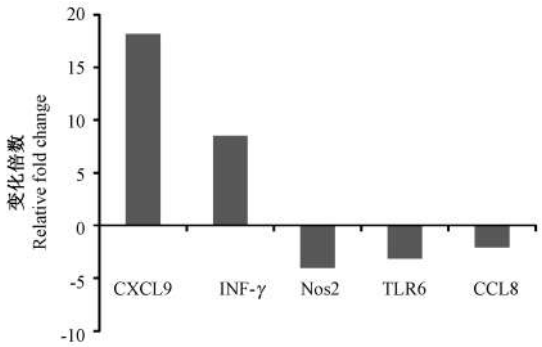


图6 细胞因子表达

Fig.6 Cytokine expression in the tumor tissues

3 讨论

Mac-1 是由 α(CD11b)和 β(CD18)两个亚基以非共价键的方式缔合而成的异二聚体,表达于白细胞表面参于机体防御及免疫反应的重要粘附分子,其主要影响白细胞粘附和迁移出内皮细胞或上皮细胞,到达炎症部位介导炎症反应[2]。Ahn 等[8]证实抑制 Mac-1 的表达能减少白细胞在肿瘤微环境中的募集,减弱肿瘤的抗辐射能力。并且,Mac-1 阳性白细胞大量分泌 MMP9(matrix metalloproteinase-9)

促进肿瘤血管新生[9]。Spicer 等[10]发现中性粒细胞通过 Mac-1/ICAM-1 与肿瘤细胞黏附,协助肿瘤转移。我们前期研究表明,Mac-1 阳性白细胞在结肠癌组织中大量浸润,缺失 *Mac*-1 能够抑制结肠癌肿瘤生长[4]。本研究应用 *Mac*-1 基因敲除小鼠建立移植瘤模型,探讨 *Mac*-1 缺失对恶性黑色素瘤肿瘤生长的影响。发现 *Mac*-1 缺失可以抑制黑色素瘤肿瘤生长及肿瘤细胞增殖,并且肿瘤微环境中巨噬细胞浸润数目减少。说明 *Mac*-1 缺失可能通过抑制肿瘤微环境中巨噬细胞浸润来抑制肿瘤的生长。

黑色素瘤是一种恶性程度较高的肿瘤,多发生于皮肤。其预后效果差,易转移的特点使得患者不能顺利地治愈。Li[11] 团队最近发现抑制髓样细胞在肿瘤微环境中的募集能有效提高黑色素瘤免疫治疗。肿瘤的发展与髓样细胞的激活密切相关,其中肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)为肿瘤生长提供了所需的因子[12]。TAM 是浸润在肿瘤组织中最多的白细胞,分泌多种炎症因子调节肿瘤的生长,因此我们主要检测肿瘤组织中巨噬细胞的浸润情况。根据巨噬细胞的活化类型及其在肿瘤微环境中的不同作用,TAM 主要分为 M1 型和 M2 型巨噬细胞。IFN-γ 刺激 M1 型巨噬细胞,诱导一氧化氮合酶和 CXCL9 等因子的表达,抑制肿瘤生长。而 M2 型巨噬细胞主要促进肿瘤生长。我们研究结果显示,*Mac*-1 缺失后 IFN-γ 和 CXCL9 表达升高。同时 Keane[13], Alshaker[14] 等研究表明 CXCL-9 及 IFN-γ 能减弱血管生成和肿瘤生长。提示虽然肿瘤微环境中巨噬细胞浸润数目减少,但是可能是浸润的 M2 型巨噬细胞减少,而 M1 型巨噬细胞增多,抑制了肿瘤生长。对肿瘤具有杀伤作用的 $CD8^+$ T 细胞和 NK 细胞可以分泌 IFN-γ,但是这两种白细胞在肿瘤组织中的浸润情况,以及 IFN-γ 升高是否由于这两种白细胞分泌尚不清楚,我们将进一步在今后的研究中深入探讨。

综上所述,*Mac*-1 基因的缺失能够抑制黑色素瘤的生长,可能是通过促进 IFN-γ 分泌增加 M1 型、减少 M2 型巨噬细胞在肿瘤组织中浸润,促进 CXCL9 分泌,进而抑制抑制肿瘤生长。本研究对 Mac-1 作为临床治疗肿瘤靶点的开发具有重要理论指导意义。

参考文献:

[1] Sriramarao P, Languino LR, Altieri DC. Fibrinogen mediates leukocyte-endothelium bridging in vivo at low shear forces[J]. Blood, 1996, 88(9): 3416-3423.

[2] Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, et al. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro[J]. J Clin Invest, 1989, 83(6): 2008-2017.

[3] Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, et al. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(8): 618-631.

[4] Zhang QQ, Hu XW, Liu YL, et al. CD11b deficiency suppresses intestinal tumor growth by reducing myeloid cell recruitment[J]. Sci Rep, 2015, 5: 15948.

[5] Ravdel L, Robinson WA, Lewis K, et al. Metastatic melanoma in the breast: a report of 27 cases[J]. J Surg Oncol, 2006, 94(2): 101-104.

[6] 田雨光,王玉珏,庞炜,等. 西藏小型猪 IGF-1 基因在不同生长发育阶段和不同组织器官中的差异表达[J]. 中国实验动物学报,2016, 24(6): 628-631.

[7] 马雨楠,游颖,沈欢欢,等. Noggin 基因沉默对 BMP 和 Wnt 信号通路表达的影响[J]. 中国实验动物学报,2016, 24(5): 475-480.

[8] Ahn GO, Tseng D, Liao CH, et al. Inhibition of Mac-1 (CD11b/CD18) enhances tumor response to radiation by reducing myeloid cell recruitment[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(18): 8363-8368.

[9] Yang L, DeBusk L, Fukuda K, et al. Expansion of myeloid immune suppressor Gr^+CD11b^+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis[J]. Cancer Cell, 2004, 6(4): 409-421.

[10] Spicer JD, McDonald B, Cools-Lartigue JJ, et al. Neutrophils promote liver metastasis via Mac-1-mediated interactions with circulating tumor cells[J]. Cancer Res, 2012, 72(16): 3919-3927.

[11] Shen L, Sundstedt A, Ciesielski M, et al. Tasquinimod modulates suppressive myeloid cells and enhances cancer immunotherapies in murine models[J]. Cancer Immunol Res, 2015, 3(2): 136-148.

[12] Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(1): 71-78.

[13] Keane MP, Belperio JA, Arenberg DA, et al. IFN-gamma-inducible protein-10 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of angiogenesis[J]. J Immunol, 1999, 163(10): 5686-5692.

[14] Alshaker HA, Matalka KZ. IFN-gamma, IL-17 and TGF-beta involvement in shaping the tumor microenvironment: The significance of modulating such cytokines in treating malignant solid tumors[J]. Cancer Cell Int, 2011, 11: 33.

〔收稿日期〕2016-12-16

研究报告

1α,25(OH)$_2$D$_3$ 对大鼠关节软骨细胞润滑素表达的影响

牛国栋,李思维,刘忠军,宋纯理,冷慧杰*

(北京大学第三医院骨科,北京　100191)

【摘要】 **目的**　在细胞水平,探讨1α,25(OH)$_2$D$_3$对软骨细胞润滑素合成和分泌的影响。**方法**　使用炎性因子 TNF-α 对大鼠关节软骨细胞进行炎症干预,分别添加不同剂量 1α,25(OH)$_2$D$_3$至正常及炎症状态下的软骨细胞,使用 ELISA 及 Western Blot 方法分别检测细胞上清中和细胞内润滑素分泌表达的变化,从而评估 1α,25(OH)$_2$D$_3$对大鼠关节软骨细胞润滑素的调节作用。**结果**　TNF-α 可以明显降低细胞活性,以及细胞内和细胞上清液中润滑素的表达分泌。1α,25(OH)$_2$D$_3$可以升高正常软骨细胞以及炎症状态下软骨细胞的活性,但是不能调节正常软骨细胞上清和胞内润滑素的分泌和表达。对于炎症状态的软骨细胞,1α,25(OH)$_2$D$_3$可以明显提高润滑素在细胞上清及细胞内的分泌表达,并有一定剂量依赖性。**结论**　1α,25(OH)$_2$D$_3$能够促进炎症状态下的软骨细胞润滑素的表达分泌,从而更好的保护软骨表面。

【关键词】 1α,25(OH)$_2$D$_3$;润滑素;软骨细胞;关节炎

【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017)010-0028-06

doi: 10.3969. j. issn. 1671 -7856. 2017. 010. 006

1α,25(OH)$_2$D$_3$ regulates expression of lubricin of chondrocytes in rat articular cartilage

NIU Guo-dong, LI Si-wei, LIU Zhong-jun, SONG Chun-li, LENG Hui-jie*

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

【**Abstract**】 **Objective**　To investigate the effects of vitamin D on synthesis and secretion of lubricin in chondrocytes at the cellular level. **Methods**　Rat articular chondrocytes were stimulated by TNF-α. Normal and inflammatory chondrocytes were treated by different doses of vitamin D respectively. ELISA and Western Blot were used to detect the secretion of lubricin in the supernatant and the synthesis level in the cells. **Results**　TNF-α significantly reduced the activity of both normal chondrocytes and chondrocytes in inflammatory state. TNF-α also significantly reduced the expression of lubricin in the cells and supernatant. 1α,25(OH)2D3 increased the activity of both normal chondrocytes and chondrocytes in inflammatory state. 1α,25(OH)2D3 significantly elevated the secretion and expression of supernatant and intracellular lubricin only in chondrocytes stimulated by TNF-α in a dose-dependent manner, but not in normal chondrocytes. **Conclusions**　Vitamin D can promote the secretion and expression of lubricin in inflammatory state chondrocytes, which may act as one of the mechanisms of vitamin D protecting the cartilage surface in osteoarthritis.

【**Key words**】 Vitamin D; Lubricin; Chondrocytes; Osteoarthritis

骨性关节炎是常见多发病,因其病程长,且致病因素复杂,包括遗传因素,年龄因素,创伤后力学因素等,从某种意义来说,也是疑难病[1-3]。其中关节损伤导致的关节不稳定从而造成关节软骨表面过度的摩擦负荷,是软骨损伤的重要原因。关节软骨作为一种非常复杂的摩擦学系统,可在关节的各

[基金项目]国家自然科学基金(编号:11472017)。

[作者简介]牛国栋(1985 -),男,硕士,主要从事骨性关节炎方面的研究。E-mail: tiankun23@163.com

[通讯作者]冷慧杰(1975 -),男,博士,副研究员,主要从事骨与关节力学生物学研究。E-mail: lenghj@bjmu.edu.cn

种运动情况下提供极低的摩擦,从而防止关节软骨的磨损[4]。关节的最佳功能状态与关节的低摩擦系数环境的维持是分不开的[5]。

关节腔中充填着软骨细胞和滑膜细胞分泌的关节滑液。在对关节软骨表层的保护中,关节腔中的滑液起着很重要的作用。关节滑液中的主要润滑成分包括透明质酸、润滑素以及表面活性磷脂。透明质酸作为滑液的主要成分(3.5mg/dL),早已引起广泛关注,而润滑素是近年才引起了学者们的关注。最近的研究表明,透明质酸、润滑素和表面活性磷脂三者必须协同起润滑作用、缺一不可[6]。润滑素作为关节软骨表面边界润滑的最重要蛋白,主要由关节软骨最表面的软骨细胞和关节囊内表面的滑膜细胞所分泌,作为关节软骨表面的边界润滑剂和细胞保护剂,在维持关节结构与功能上起着重要的作用[7]。润滑素不仅在边界润滑中发挥着重要的物理性保护作用,还具有抗炎症,抗滑膜组织增生等生物性保护作用[8]。已经有研究建议将润滑素作为治疗骨性关节炎的一个重要策略[9]。

维生素 D(VD)是一种类激素的营养物质,在人体中发挥的作用非常复杂,是目前的研究热点[10]。人们对于 VD 对于骨骼的重要生理作用已经非常明确,其缺乏会导致多种骨骼疾病,如佝偻病、骨质疏松、软骨病等[11, 12]。但 VD 水平与骨性关节炎的发生发展之间的关系尚存争议[13-16]。很多学者都在此领域进行探索。首先,已经有研究证实了软骨细胞中 VD 受体的表达[19]。并且,近来很多研究结果肯定了 VD 对关节软骨的保护作用[15, 17, 18]。VD 对于关节软骨的具体保护作用机制可能并不单一。目前文献中还没有研究探讨 VD 对润滑素的调节作用,而这对更全面认识 VD 在关节生理代谢中所起的作用有重要意义。我们的前期实验研究表明,VD 可以通过 TGF-β1 调节关节软骨Ⅱ型胶原的表达和降解[20]。而有实验证明,TGF-β 在润滑素表达分泌的过程中起着非常重要的作用[5, 21, 22]。因此我们假设维生素 D 可能可以通过调节关节软骨润滑素的分泌来保护软骨。本研究在细胞水平上探索维生素 D 是否可以促进关节软骨细胞润滑素的表达,进一步理解维生素 D 保护关节软骨的潜在机制。

1　材料和方法

1.1　实验材料

实验所用的软骨细胞取自 5 只出生后 24 h 内的 SPF 级 Sprague-Dawley 雄性大鼠,由北京大学医学部实验动物中心提供[SYXK(京)2016-0041]。

1.2　试剂

75% 乙醇(北京化工厂);1α,25(OH)$_2$D$_3$(Selleck,美国);双抗(Gibco,美国);PBS(Hyclone,中国);胎牛血清(Gibco,美国);DMEM 低糖培养基(Hyclone,中国);Ⅱ型胶原酶(Sigma,美国);甲苯胺蓝试剂(索莱宝公司,中国);4% 多聚甲醛(索莱宝公司,中国);TritonX-100 试剂(Sigma,美国);5% BSA 试剂(中杉金桥公司,中国);CCK-8 试剂盒(Dojindo,日本);Ⅱ型胶原抗体(Biosis,美国);Lubricin Elisa 试剂盒(HCB,加拿大);酶标仪(Thermo,美国);抗 Lubricin 抗体(Santa Cruz,美国);抗 GAPDH 抗体(谷歌生物,中国)。

1.3　实验分组

本研究将软骨细胞分为六组,进行组间比较。分组具体包括无任何干预的对照组,正常低 VD 组,正常高 VD 组,诱导组,诱导低 VD 组和诱导高 VD 组,诱导低 VD 组和诱导高 VD 组均为 TNF-α 和 VD 同时给药。每一组软骨细胞处理条件见表 1。

1.4　实验方法

1.4.1　软骨细胞分离、培养与鉴定

使用冰冻致死法处理新生的 SD 大鼠,并使用 75% 酒精浸泡 5 min 消毒。从新生大鼠关节中获取关节软骨组织块,对软骨组织块处理并分离软骨细胞,对软骨细胞进行培养,并利用甲苯胺蓝染色和Ⅱ型胶原染色对进行软骨细胞鉴定。具体方法细节请参考我们先前的研究[23]。因软骨细胞过度传代会发生细胞表型改变,本实验所用细胞均为2~3代软骨细胞。

1.4.2　关节软骨细胞活性测定

对各组将软骨细胞进行活性检测时,以 2.5×10^4 的密度接种于 96 孔细胞培养板中(每孔 100 μL),使细胞贴壁稳定。每组设置 6 个复孔,每孔加入 20 μL CCK-8 溶液,培养 3 h。用酶标仪在 490 nm 波长处测定各组细胞的吸光度值,来反映活细胞数量。

1.4.3　软骨细胞上清液中润滑素含量的检测

检测各组软骨细胞上清液中润滑素表达时,以每孔 5×10^4 的密度将软骨细胞接种于 24 孔板中,使细胞贴壁生长。每组设置 3 个复孔,细胞培养箱中培养。24 h 后收取 24 孔板中培养的软骨细胞上清液,4℃离心机 1000 r/min 离心 20 min,抽取上清,检测各组润滑素的表达。

1.4.5　软骨细胞内润滑素合成表达的检测

检测各组软骨细胞内润滑素合成时,将软骨细胞以 5×10^4 密度接种于 24 孔板,使用 RIPA 裂解液

提取细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,制备用于蛋白免疫印迹检测的蛋白样品。制作6%分离胶、5%浓缩胶,取30 μg样品蛋白上样,以90 V恒压电泳,样品进入分离胶后140 V恒压电泳,溴酚蓝抵达分离胶底部时停止电泳。以240 mA 4℃下电转膜120 min。取出硝酸纤维素膜,于5% BSA/TBST封闭液中室温封闭2 h,孵育Lubricin或GAPDH一抗,于摇床上4℃过夜。室温TBST洗膜10 min,重复3次,添加相应二抗,摇床上室温孵育1 h。室温TBST洗膜10 min,重复3次,双红外激光扫描成像系统进行荧光显色分析。

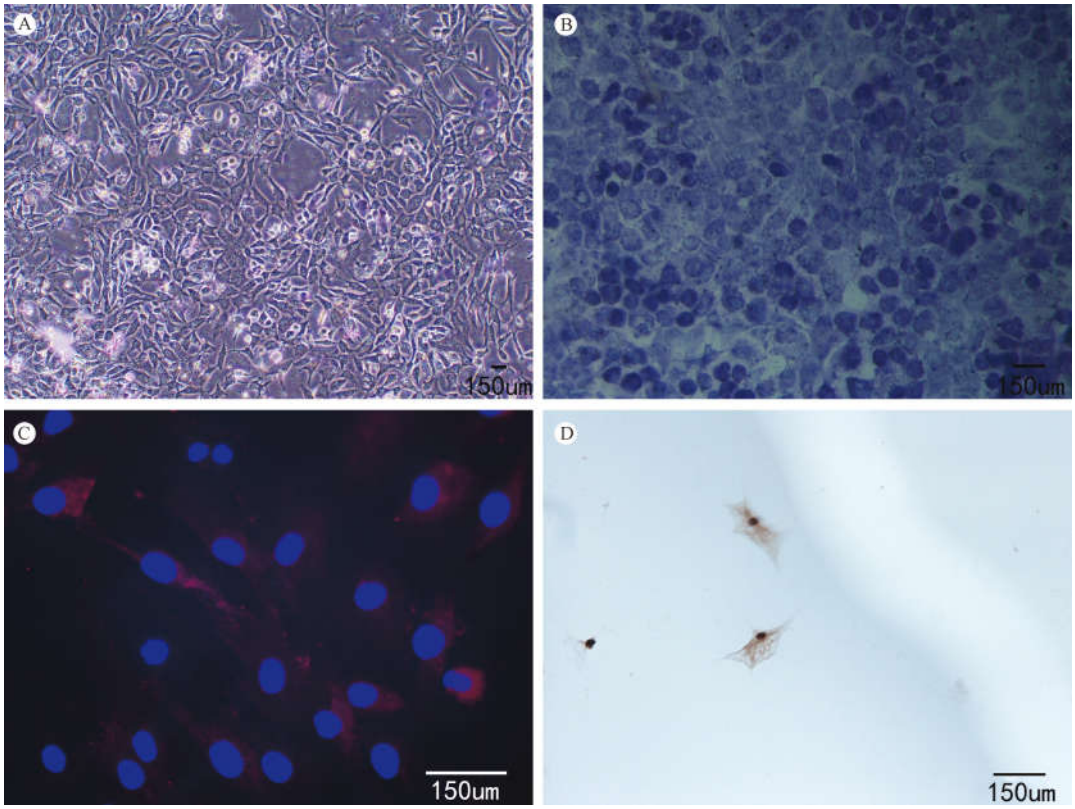
1.5 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件包进行数据处理,所有数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据的组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA followed by the LSD post hoc test),以$P < 0.05$为差异有显著性。

表1 软骨细胞研究分组一览表

Tab. 1 Groups of chondrocytes in the study

组名 Group names	TNF-α诱导/20 ng/mL TNF-α stimulation	1α,25(OH)$_2$D$_3$干预 1α,25(OH)$_2$D$_3$treatment	
		低剂量/10 nmol/L Low dose	高剂量/100 nmol/L High dose
对照组 Control group	−	−	−
正常低VD组 Normal low VD group	−	+	−
正常高VD组 Normal high VD group	−	−	+
诱导组 TNF-α stimulated group	+	−	−
诱导低VD组 Stimulated low VD group	+	+	−
诱导高VD组 Stimulated high VD group	+	−	+



注:A.光镜下软骨细胞;B.甲苯胺蓝染色;C.Ⅱ型胶原免疫荧光染色;D.软骨细胞维生素D受体。

图1 光镜下及染色后细胞形态观察

Note. A. Chondrocytes without staining (×10); B. Chondrocytes stained with toluidine blue (×20); C. Type Ⅱ collagen (×40); D. Vitamin D receptor in chondrocytes (×20).

Fig. 1 Microscopic images of chondrocytes observed using different staining

2　结果

2.1　关节软骨细胞及维生素 D 受体鉴定

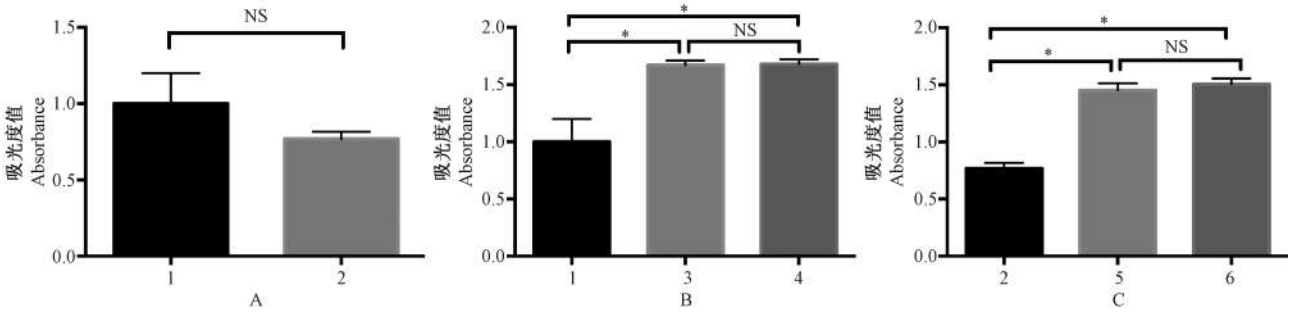
通过光学显微镜观察,所培养的细胞形态符合软骨细胞特点(图 1A)。通过甲苯胺蓝染色和免疫荧光染色,分别可观察到蛋白聚糖(图 1B)和Ⅱ型胶原表达(图 1C)。免疫细胞化学显示软骨细胞表面表达有维生素 D 受体(图 1D)。

2.2　$1\alpha,25(OH)_2D_3$ 对关节软骨细胞活性的调节作用

图 2 结果显示,TNF-α 诱导并不能降低软骨细胞活性($P > 0.05$)。相对于对照组软骨细胞,$1\alpha,25(OH)_2D_3$ 干预对正常软骨细胞活性有促进作用,但正常低 VD 组和正常高 VD 组差异无显著性。对于 TNF-α 诱导的软骨细胞,诱导低 VD 组和诱导高 VD 组均提高了诱导后软骨细胞活性,但两组之间差异无显著性($P > 0.05$)。

2.3　$1\alpha,25(OH)_2D_3$ 对关节软骨细胞上清中润滑素分泌的影响

图 3 结果显示,$1\alpha,25(OH)_2D_3$ 干预对正常软骨细胞(无诱导)润滑素表达差异无显著性($P > 0.05$)。TNF-α 诱导后,软骨细胞(诱导组)上清中润滑素表达明显降低(相对于对照组,$P < 0.05$)。$1\alpha,25(OH)_2D_3$ 进一步干预可显著提高软骨细胞润滑素的细胞外分泌($P < 0.05$)。并且诱导低 VD 组和诱导高 VD 组软骨细胞上清中润滑素表达差异有显著性($P < 0.05$)。

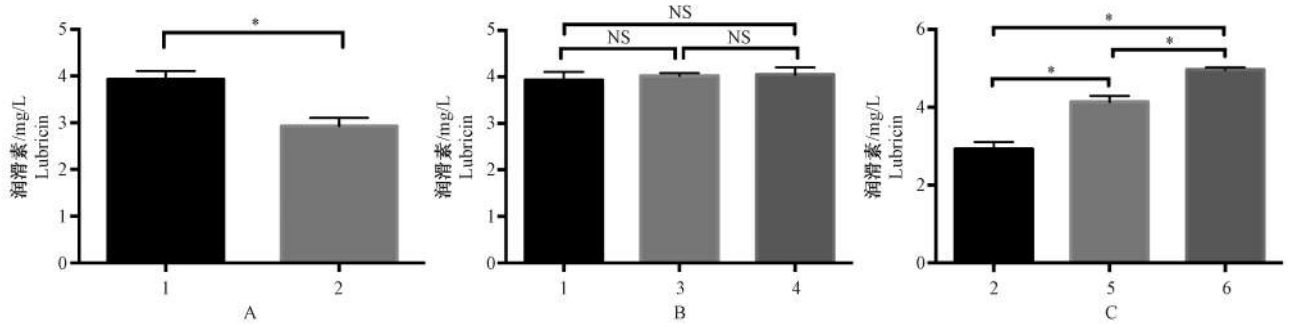


注:A. TNF-α 诱导对正常软骨细胞活性的影响;B. $1\alpha,25(OH)_2D_3$ 干预对正常软骨细胞活性的影响;C. $1\alpha,25(OH)_2D_3$ 干预对 TNF-α 诱导的软骨细胞活性的影响。1. 对照组;2. 诱导组;3. 正常低 VD 组;4. 正常高 VD 组;5. 诱导低 VD 组;6. 诱导高 VD 组。* 表示 $P < 0.05$,NS 表示 $P > 0.05$。

图 2　CCK-8 测定的各组软骨细胞活性比较

Note. A. Effects of TNF-α stimulation; B. Effects of different doses of $1\alpha,25(OH)_2D_3$ on the normal chondrocytes; C. Effects of different doses of $1\alpha,25(OH)_2D_3$ on the chondrocytes stimulated by TNF-α. 1. Control group; 2. TNF-α stimulated group; 3. Normal low VD group; 4. Normal high VD group; 5. Stimulated low VD group; 6. Stimulated high VD group. * indicates $P < 0.05$, NS indicates $P > 0.05$.

Fig. 2　Comparison of activities of chondrocytes from all the groups by CCK-8



注:A. TNF-α 诱导对正常软骨细胞润滑素分泌的影响;B. $1\alpha,25(OH)_2D_3$ 干预对正常软骨细胞润滑素分泌的影响;C. $1\alpha,25(OH)_2D_3$ 干预对 TNF-α 诱导的软骨细胞润滑素分泌的影响。1. 对照组;2. 诱导组;3. 正常低 VD 组;4. 正常高 VD 组;5. 诱导低 VD 组;6. 诱导高 VD 组。* 表示 $P < 0.05$,NS 表示 $P > 0.05$。

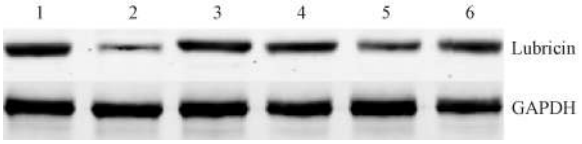
图 3　各组软骨细胞上清润滑素表达比较

Note. A. Effects of TNF-α stimulation; B. Effects of different doses of $1\alpha,25(OH)_2D_3$ on the normal chondrocytes; C. Effects of different doses of $1\alpha,25(OH)_2D_3$ on the chondrocytes stimulated by TNF-α. 1. Control group; 2. TNF-α stimulated group; 3. Normal low VD group; 4. Normal high VD group; 5. Stimulated low VD group; 6. Stimulated high VD group. * indicates $P < 0.05$, NS indicates $P > 0.05$.

Fig. 3　Expression of lubricin in the supernatant of cultured chondrocytes

2.4 1α,25(OH)$_2$D$_3$对关节软骨细胞胞内润滑素合成的影响

图4和图5结果表明,1α,25(OH)$_2$D$_3$干预对无诱导的软骨细胞润滑素表达差异无显著性($P > 0.05$)。TNF-α诱导后,软骨细胞(诱导组)中润滑素表达降低(相对于对照组,$P < 0.05$)。1α,25(OH)$_2$D$_3$进一步干预,诱导低VD组和诱导高VD组均显著上调了软骨细胞内润滑素的分泌($P < 0.05$),且诱导高VD组分泌的润滑素量显著高于诱导低VD组($P < 0.05$)。

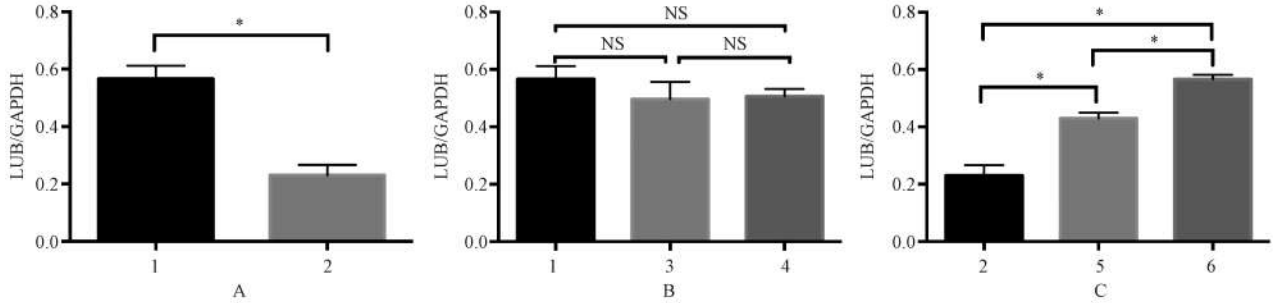


注:1.对照组;2.诱导组;3.正常低VD组;4.正常高VD组;5.诱导低VD组;6.诱导高VD组。

图4 软骨细胞中润滑素蛋白免疫印迹检测结果

Note. 1. Control group; 2. TNF-α stimulated group; 3. Normal low VD group; 4. Normal high VD group; 5. Stimulated low VD group; 6. Stimulated high VD group.

Fig. 4 Expression of lubricin in chondrocytes detected by Western blot



注:A. TNF-α诱导对正常软骨细胞润滑素表达的影响;B. 1α,25(OH)$_2$D$_3$干预对正常软骨细胞润滑素表达的影响;C. 1α,25(OH)$_2$D$_3$对TNF-α诱导的软骨细胞的影响。1.对照组;2.诱导组;3.正常低VD组;4.正常高VD组;5.诱导低VD组;6.诱导高VD组。* 表示 $P < 0.05$,NS表示 $P > 0.05$。

图5 各组软骨细胞内润滑素表达的比较

Note. A. Effects of TNF-α stimulation; B. Effects of different doses of 1α,25(OH)$_2$D$_3$ on the normal chondrocytes; C. Effects of different doses of 1α,25(OH)$_2$D$_3$ on the chondrocytes stimulated by TNF-α. 1. Control group; 2. TNF-α stimulated group; 3. Normal low VD group; 4. Normal high VD group; 5. Stimulated low VD group; 6. Stimulated high VD group. * indicates $P < 0.05$, NS indicates $P > 0.05$.

Fig. 5 Expression of lubricin in the chondrocytes

3 讨论

润滑素是关节软骨的一种保护性蛋白,在维持关节正常生理功能中发挥着重要作用。在骨性关节炎起始与发展的过程中,关节软骨表面的润滑素表达是降低的[24]。润滑素分泌的降低可能意味着关节软骨表面边界润滑能力的下降、关节软骨表面摩擦系数的增高和软骨磨损的增加。并且,关节软骨摩擦系数的增加引起的表面物理性改变可以导致关节软骨生物性改变,即逐渐引起软骨表面软骨细胞的凋亡,过度分泌MMP等基质金属蛋白酶和炎症因子,加速关节软骨的降解[25,26]。分泌的炎症因子会进一步导致关节软骨润滑素的降低,形成一种恶性循环[25]。因此,润滑素在OA的发生发展中所起的作用不可忽视。

我们使用了炎症因子TNF-α对软骨细胞进行干预,诱导关节软骨细胞炎症反应,模拟骨性关节炎发生时软骨细胞的改变。TNF-α是一种在骨性关节炎起始和发展中发挥重要作用的炎症因子,可以明显促进软骨细胞的分解代谢[27,28]。研究结果显示,相对于没有TNF-α干预的正常软骨细胞,TNF-α干预确实可导致软骨细胞上清中及胞质中润滑素表达降低,这与Jones有关生长因子和细胞因子对润滑素生物调节的研究结果相似,同时与临床观察到的骨性关节炎时润滑素表达下降的结果相呼应[5]。

在临床流行病学研究中,维生素D水平与骨性关节炎的发生发展关系尚不明确[29]。这可能与影响流行病学研究结果的因素错综复杂有关。近来越来越多的研究结果显示维生素D对关节软骨退变能起到重要的抑制作用[20,29]。本研究首先证实了大鼠软骨细胞中维生素D受体(VDR)的表达,Tetlow在人体软骨细胞研究中也发现了VDR的存在[19]。同时,实验结果显示无论是在正常状态下的

软骨细胞还是炎症状态下的软骨细胞,维生素 D 都能提高软骨细胞的活性,说明维生素 D 能够促进软骨细胞的生长和增殖。对于 TNF-α 诱导后的软骨细胞,酶联免疫吸附反应与蛋白免疫印迹的结果表明,无论是胞外润滑素分泌水平还是在胞质内合成水平,1α,25(OH)$_2$D$_3$干预可以显著抑制因 TNF-α 干预导致的润滑素表达下降。而且,随着剂量的增加,对润滑素表达的影响亦增加。这说明 1α,25(OH)$_2$D$_3$可以升高骨性关节炎的软骨细胞润滑素的表达,在骨性关节炎过程中,可能通过促进润滑素的表达来保护关节软骨。

然而对于未经 TNF-α 诱导的正常软骨细胞,1α,25(OH)$_2$D$_3$干预虽然可以提升软骨细胞活性,但并没有显著升高关节软骨细胞润滑素的表达水平。首先,结果说明维生素 D 发挥生物反应可能与细胞所处的状态相关,炎症状态下的软骨细胞和正常状态下的软骨细胞分泌润滑素对维生素 D 的敏感度有显著差异。Li 等[20]在关于 1α,25(OH)$_2$D$_3$对软骨细胞 CTXII 和 TGF-β 研究中也发现了类似的现象。在正常生理状态下的关节软骨,1α,25(OH)$_2$D$_3$干预不能增加其润滑素的表达,可能不能通过该途径来预防骨性关节炎的发生;而一旦处于骨性关节炎状态,1α,25(OH)$_2$D$_3$可促进炎症状态下的软骨细胞润滑素的表达,可能成为维生素 D 保护关节软骨的途径之一。另外,TNF-α 诱导可以降低软骨细胞润滑素的表达,但对细胞活性没有显著影响;1α,25(OH)$_2$D$_3$干预正常软骨细胞可以增加细胞活性,但对软骨细胞润滑素分泌没有显著影响;不同剂量的 1α,25(OH)$_2$D$_3$干预 TNF-α 诱导的软骨细胞,可以显著影响润滑素的表达,但对细胞活性没有显著影响。这些结果提示润滑素的分泌与软骨细胞活性没有必然联系,可能跟细胞炎症与否状态相关,这个问题尚待进一步研究。

骨性关节炎的多发性和复杂性长期困扰着患者和医疗工作者。尽管维生素 D 对关节作用的机制还不十分明确,但其对关节积极的保护使其成为一个极具前景的选择。并且,目前已有研究证明人重组润滑素可以改善关节炎症状,但距其应用于临床还有一段距离。维生素 D 可以促进炎症状态下的软骨细胞润滑素分泌表达这一作用,提供了一个新的思路,值得我们进一步探讨。

参考文献:

[1] Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, et al. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2015, 386(9991): 376-387.

[2] Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, et al. Osteoarthritis - an untreatable disease? [J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(4): 331-344.

[3] Olson SA, Horne P, Furman B, et al. The role of cytokines in posttraumatic arthritis[J]. J Am Acad Orthop Surg, 2014, 22(1): 29-37.

[4] Greene GW, Banquy X, Lee DW, et al. Adaptive mechanically controlled lubrication mechanism found in articular joints[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(13): 5255-5259.

[5] Jones AR, Flannery CR. Bioregulation of lubricin expression by growth factors and cytokines[J]. Eur Cell Mater, 2007, 13: 40-45.

[6] Seror J, Zhu L, Goldberg R, et al. Supramolecular synergy in the boundary lubrication of synovial joints[J]. Nat Commun, 2015, 6: 6497.

[7] Jones AR, Gleghorn JP, Hughes CE, et al. Binding and localization of recombinant lubricin to articular cartilage surfaces[J]. J Orthop Res, 2007, 25(3): 283-292.

[8] Iqbal SM, Leonard C, Regmi SC, et al. Lubricin/proteoglycan 4 binds to and regulates the activity of Toll-like receptors in vitro[J]. Sci Rep, 2016, 6: 18910.

[9] Flannery CR. Novel therapies in OA[J]. Curr Drug Targets, 2010, 11(5): 614-619.

[10] 付强,刘源. 钙、磷与维生素 D 对动物骨代谢的影响研究进展. 中国比较医学杂志, 2006, 16(8): 502-505

[11] Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice[J]. Endocr Rev, 2008, 29(6): 726-776.

[12] Prietl B, Treiber G, Pieber TR, et al. Vitamin D and immune function[J]. Nutrients, 2013, 5(7): 2502-2521.

[13] George J. Vitamin D supplementation and progression of knee osteoarthritis[J]. JAMA, 2016, 316(3): 347-348.

[14] Onuora S. Osteoarthritis: Vitamin D not effective for knee OA[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(5): 252.

[15] Mabey T, Honsawek S. Role of vitamin D in osteoarthritis: molecular, cellular, and clinical perspectives[J]. Int J Endocrinol, 2015, 2015: 383918.

[16] Zhang FF, Driban JB, Lo GH, et al. Vitamin D deficiency is associated with progression of knee osteoarthritis[J]. J Nutr, 2014, 144(12): 2002-2008.

[17] Muraki S, Dennison E, Jameson K, et al. Association of vitamin D status with knee pain and radiographic knee osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2011, 19(11): 1301-1306.

[18] Rizzoli R, Stevenson JC, Bauer JM, et al. The role of dietary protein and vitamin D in maintaining musculoskeletal health in postmenopausal women: a consensus statement from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO)[J]. Maturitas, 2014, 79(1): 122-132.

(下转第 39 页)

研究报告

单染与复染在观察 *SIRT*1 基因敲除小鼠骨关节炎切片中的差异比较

于红燕[1],杨占东[1],杨　琪[2],于　斐[3*]

(1.滨州市滨城区市立医院,山东 滨州　256600; 2.空军总医院,北京　100142; 3.北京大学深圳医院,广东 深圳　518036)

【摘要】 **目的**　通过 *SIRT*1 基因敲除建立相关小鼠膝关节骨关节炎模型,在此基础上观察各种不同单独染色或复合染色技术在观察软骨组织切片形态学中的差异。**方法**　将小鼠膝关节组织标本分为 2 组:*SIRT*1$^{-/-}$小鼠假手术组($n=6$,A 组),*SIRT*1$^{-/-}$小鼠骨关节炎模型组($n=6$,B 组)。通过前交叉韧带横断加内侧半月板切除术建立膝关节骨关节炎模型,行 HE 染色、番红 O-固绿染色、番红 O-阿利新蓝染色、番红 O 染色、固绿染色、阿利新蓝染色,6 种单独染色或复合染色方式观察膝关节软骨组织形态学变化。**结果**　番红 O-固绿染色、番红 O-阿利新蓝染色在观察软骨细胞的细胞形态、软骨分层结构的情况、II 型胶原纤维的显示、潮线及软骨下骨的改变中,效果更好;而番红 O 染色、阿利新蓝染色在观察软骨组织缺失方面有一定的优势。**结论**　在观察 *SIRT*1 基因敲除小鼠膝关节骨关节炎软骨组织切片中,与单独染色相比,复合染色在获得软骨结构的各种信息方面优势更加明显。

【关键词】 *SIRT*1 基因;基因敲除;小鼠动物模型;骨关节炎;单独染色;复合染色

【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0034-06

doi: 10.3969. j. issn. 1671 -7856. 2017. 10. 007

Observation of the articular cartilage of osteoarthritis in *SIRT*1 gene knock-out mice through single staining and compound staining

YU Hong-yan[1], YANG Zhan-dong[1], YANG Qi[2], YU Fei[3*]

(1. Binchengqu Shili Hospital, Binzhou 256600, China; 2. Air Force General Hospital, Beijing 100142; 3. Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036)

【**Abstract**】 **Objective**　To establish osteoarthritis model of the knee joint in mice on the basis of knocking out *SIRT*1 gene and to observe the differences in the morphology of the cartilage tissue using single staining and compound staining. **Methods**　The knee joint specimens were divided into two groups: *SIRT*1$^{-/-}$ control group (group A, $n=6$) and *SIRT*1$^{-/-}$ osteoarthritis model group (group B, $n=6$). The knee anterior cruciate ligament was traversed, and the ipsilateral medial meniscus was cut to establish an osteoarthritis model of knee joint. HE staining, safranin O-fast green staining, safranin O-alcian blue staining, safranin O staining, fast green staining, alcian blue staining were used to observe the morphological changes in the articular cartilage of the knee. **Results**　Safranin O-fast green staining and safranin O-alcian blue staining showed better results in observation of the morphology of chondrocytes, the structure of cartilage layers, the presence of type II collagen, tide line and the changes of subchondral bone. While the safranin O staining and alcian blue staining had certain advantages in the observation of the defects of cartilage tissue. **Conclusions** Compared with the

[基金项目]广东省自然科学基金 - 博士启动项目(2016A030310070);深圳市科创委资助项目(JCYJ20160428173412866)。

[作者简介]于红燕(1965 -),女,副高,研究生。E-mail: 434674348@qq.com

[通讯作者]于斐(1989 -),男,研究生。研究方向:骨关节炎、骨科生物材料。E-mail: oscarfyu@163.com

single staining, the compound staining used in this study have obvious advantages in obtaining useful information of the cartilage structure in the observation of morphology of cartilage tissues in *SIRT*1 gene knock-out mice.

【**Key words**】 *SIRT*1 gene; Gene knockout; Mouse model; Osteoarthritis; Single staining; Compound staining

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种以关节软骨的退变丢失为基础的多因素慢性疾病,在 50 岁以上人群中的发病率极高,仅次于心血管疾病居第二位[1],容易造成患者的生活质量降低,严重者可导致残疾,给国家和家庭带来了沉重的负担。沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, *SIRT*1),是一种与衰老密切相关的 III 型去乙酰化酶基因,在哺乳动物中研究深入,近年来研究证实,*SIRT*1 基因可以通过 PI3K/AKT[2]、NF-κB[3]等信号通路的作用与 OA 相关联,并在 OA 发生发展中起到重要的作用。我们前期研究证实,当 *SIRT*1 基因条件性敲除后,OA 发生更加明显[4],因此,在 *SIRT*1 基因条件性敲除的基础上进行 OA 的观察效果更加明显。在 OA 的相关研究中,病理学检查用处较大,而各种染色技术因其能够直观反应 OA 软骨组织的形态学变化而经常使用,不同染色技术在观察 OA 关节软骨切片中作用很大。

在以往 OA 相关的研究中,单独染色或者几种染料复合染色观察 OA 软骨组织的切片均有使用,但是观察效果各不相同,很少有对单独染色及复合染色的效果进行分析对比,研究单独染色与复合染色的区别以及各自的染色规律。为了探求不同的单独染色与复合染色在观察 OA 软骨组织切片中的相关作用,我们在软骨组织 *SIRT*1 基因条件性敲除的小鼠基础上,分析 OA 发生前后膝关节软骨组织中各种单独染色和复合染色对于膝关节软骨组织的观察效果,通过常规 HE 染色、番红 O-固绿染色、番红 O-阿利新蓝染色、番红 O 染色、固绿染色、阿利新蓝染色 6 种单独染色或复合染色方式探讨 OA 关节软骨组织形态学研究中的染色规律及应用中的优缺点。

1　材料和方法

1.1　实验动物

SPF 级 B6; 129-Sirt1 tm1 Ygu/J[5] ($SIRT1^{co/co}$)小鼠和 FVB-Tg (Col2a1-cre/ERT) KA3Smac/J[6] (Col2-CreERT2)小鼠,各 3 只雌性与 3 只雄性,12 ~ 13 周龄,购买自美国杰克逊实验室。实验用小鼠饲养于北京大学/香港科技大学医学中心深圳医院实验动物中心[SYXK(粤)2015 - 0106]SPF 级屏障区域的 PVC 鼠笼内,持续过滤通气,自由饮食,清洁饮水,每日保持 12 h 光照/黑暗循环。实验流程和小鼠处理均遵循实验动物管理规范,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2　主要试剂与仪器

Fast green solution、safranin O solution 购自 Scytek 公司;苏木素购自广州速聚生物有限公司;伊红 Y 购自行知生物科技有限公司;阿利新蓝购自北京雷根生物技术有限公司;中性树胶购自国药集团化学试剂有限公司。

光学显微镜、组织自动脱水机、组织自动包埋机、石蜡切片机(德国 Leica 公司);高压灭菌器(日本 Hirayama 公司);超净台(苏净集团安泰公司);鼠台(河南省原阳县振华教学仪器公司);显微器械(上海医疗器械有限公司手术器厂);4℃ 冰箱(中国海尔公司);体视显微镜(日本奥林巴斯公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　软骨特异性敲除 *SIRT*1 基因小鼠的繁育

将 $SIRT1^{co/co}$小鼠与 Col2-CreERT2 小鼠交配,获得 Col2-CreERT2;$SIRT1^{co/co}$小鼠,15 个月月龄 Col2-CreERT2;$SIRT1^{co/co}$小鼠,腹腔注射他莫昔芬(10 mg/mL,1 mg/(mL·g),每日 1 次,连续注射 5 d),即获得 *SIRT*1 *cKO* 小鼠($SIRT1^{-/-}$小鼠),从而更好的模拟 OA 在人群中的发病规律。基因敲除及鉴定方法参照本实验组前期研究[4]。

1.3.2　实验分组及膝关节 OA 模型的建立

他莫昔芬注射完毕 7 d 后,$SIRT1^{-/-}$小鼠行右侧膝关节前交叉韧带横断加内侧半月板切除术建立 OA 模型,左侧膝关节仅切开滑膜囊行假手术作为对照,手术后 3 个月建立膝关节 OA 模型。实验样本分为 2 组: $SIRT1^{-/-}$小鼠假手术组($n = 6$, A 组): *SIRT*1 基因敲除,膝关节进行假手术; $SIRT1^{-/-}$小鼠骨关节炎模型组($n = 6$, B 组): *SIRT*1 基因敲除,膝关节手术造成 OA 模型。具体方法参照本实验组前期研究[4]。

1.3.3　染色

HE 染色:取膝关节,固定,脱钙,包埋,切片,苏木素染核 15 min,流水冲洗 1 min,静水放置 5 min,0.5% 伊红染液 3 min,流水冲洗。

番红 O-固绿染色:取膝关节,固定,脱钙,包埋,

切片,番红O染液滴染20 min,自来水洗10 s,60℃预热固绿滴染30 s,蒸馏水急洗一次,番红O染液复合染色10 min,自来水冲洗10 s。

番红O-阿利新蓝染色:取膝关节,固定,脱钙,包埋,切片,番红O染液滴染20 min,流水冲洗,阿利新蓝染色液采用改良Lison法配制[7],阿利新蓝染液24 h,流水冲洗。

番红O染色:取膝关节,固定,脱钙,包埋,切片,番红O染液滴染20 min,流水冲洗。

固绿染色:取膝关节,固定,脱钙,包埋,切片,60℃预热固绿滴染30 s,流水冲洗。

阿利新蓝染色:取膝关节,固定,脱钙,包埋,切片,阿利新蓝染色液采用改良Lison法配制,阿利新蓝染液24 h,流水冲洗。

2 结果

2.1 软骨整体情况

A组小鼠软骨组织表面光滑平整,软骨各层结构清晰可以分辨,软骨细胞数量较多,形态均一,散在分布,部分细胞可以看到细胞核,II型胶原分布较均匀,潮线平整光滑,位置适中,软骨下骨形态清晰。B组小鼠软骨组织表面凹凸不平,部分位置出现糜烂、缺损,甚至出现钙化,软骨各层结构分辨不清,比较单一,软骨细胞数量减少,大小不等,成簇分布,II型胶原遭到破坏,潮线扭曲不规则,出现前移,甚至有部分潮线可以看到血管通过,软骨下骨形态分辨不清(图1、2)。

2.2 软骨细胞结构

A组小鼠软骨组织切片中,软骨细胞的数量较多,形状多为圆形或类圆形,大小均一,在软骨各层中分布均匀,细胞核清晰可见,着色均匀。B组小鼠软骨组织切片中,软骨细胞数量减少,在不同软骨层中数量有差异,细胞形状大小不一,分布紊乱甚至成簇分布,细胞核着色变浅。在软骨细胞结构的观察方面,复合染色分辨更加清晰,对于不同细胞结构着色有所差异,单独染色只能通过同一颜色的深浅分辨细胞不同结构。HE染色可以看到软骨细胞的细胞核为蓝紫色,细胞质为粉红色;番红O-固绿染色的细胞核为蓝绿色,细胞质淡红色;番红O-阿利新蓝染色中细胞核为淡蓝色,细胞质淡红色;而在单独番红O染色、固绿染色、阿利新蓝染色中,细胞核和细胞质均为单一的颜色,仅深浅不同(图1、2)。

2.3 软骨分层

A组小鼠的大部分切片中,能够分清软骨表层、移行层、辐射层和钙化层,其中几种复合染色更容易观察到软骨的四层结构,在观察效果上单独染色要劣于复合染色,在不同单独染色和复合染色中,各层面积有所不同。B组小鼠软骨组织四层结构分辨不清,由于表面的破坏使得部分软骨层缺失,但是在B组小鼠软骨组织的切片中,阿利新蓝染色、番红O染色这两种单独染色方式与其他单独染色方式相比,在观察软骨组织缺失上表现出一定的优势,缺少软骨组织的地方两种染料着色变浅,而在整体的观察效果上,复合染色方式仍然优于单独染色方式。HE染色、番红O-固绿染色、番红O-阿利新蓝染色这几种复合染色中,可以看到以辐射层为中心向两侧分别产生颜色变化,而番红O染色、固绿染色、阿利新蓝染色这几种单独染色中颜色比较单一(图1、2)。

2.4 II型胶原纤维

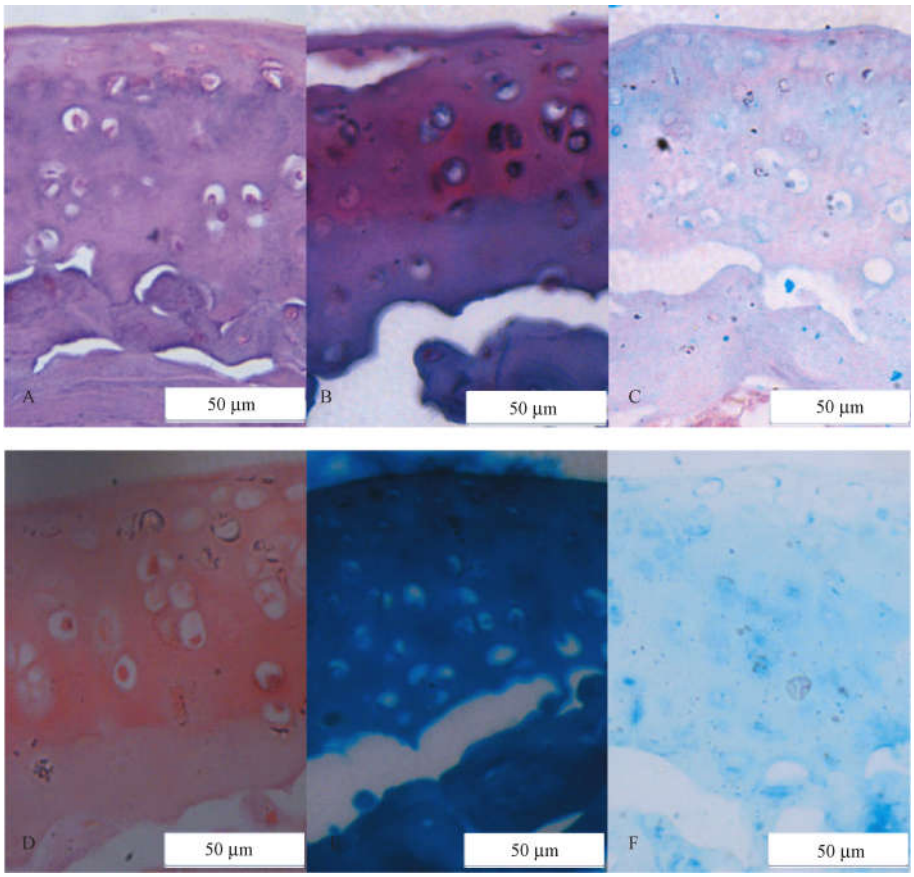
II型胶原纤维是软骨组织特异性的胶原纤维,能够对软骨进行定位,不同染色方式下II型胶原的着色不同。A组小鼠软骨组织切片中,II型胶原可能仅由于小鼠年龄较大导致表达减少,整体破坏较轻,单独染色中着色比较均匀,复合染色中可因颜色的差异进行分辨。B组小鼠软骨组织切片中,II型胶原则因为OA的发生而破坏严重,单独染色中着色变浅,复合染色中颜色单一。HE染色和番红O染色中,该区域呈粉红色;固绿染色、阿利新蓝染色、番红O-固绿染色和番红O-阿利新蓝染色中该区域呈蓝绿色或淡蓝色。但是由于染料数量的不同,与单独染色相比,复合染色在分辨II型胶原中,由于颜色丰富效果更好(图1、2)。

2.5 潮线

潮线可以区分软骨的深层和钙化层,呈波浪状。A组小鼠软骨组织切片中,潮线完整光滑,位置适中,没有血管通过。B组小鼠软骨组织切片中,潮线扭曲不规则,出现中断,发生前移,部分位置可以看到血管通过潮线。复合染色在观察潮线的过程中优势更加明显,能够明显看到潮线的形态以及周围的各种结构组织,单独染色仅能部分区分潮线形态,甚至无法分辨潮线(图1、2)。

2.6 软骨下骨

A组小鼠软骨组织切片中,软骨下骨较厚,染色均匀,结构比较规律。B组小鼠软骨组织切片中,软骨下骨变薄,染色单一,结构紊乱。在观察效果上仍然是复合染色优于单独染色(图1、2)。



注:A 为 HE 染色;B 为番红 O-固绿染色;C 为番红 O-阿利新蓝染色;D 为番红 O 染色;E 为固绿染色;F 为阿利新蓝染色。

图 1　*SIRT*1 $^{-/-}$ 小鼠假手术组膝关节软骨组织形态(×400)

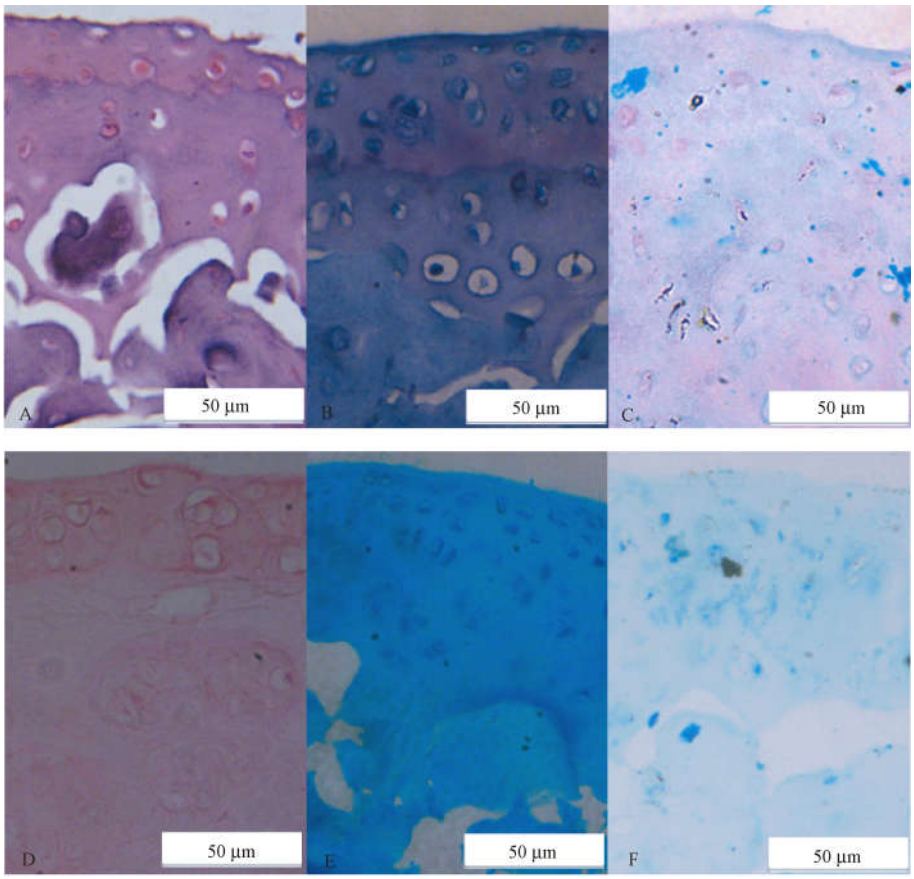
Note. A is HE staining; B is Safranin O-fast green staining; C is Safranin O-alcian blue staining; D is Safranin O staining; E is fast green staining; F is Alcian Blue staining.

Fig. 1　Morphology of knee joint cartilage in the *SIRT*1 $^{-/-}$ mice control group

3　讨论

OA 是一种与衰老、肥胖、遗传等因素密切相关的慢性退行性疾病,病理特点是严重的、局限性软骨破坏,深达骨质,临床上也出现相应的症状。*SIRT*1 基因因与衰老关系密切而参与到 OA 的发生发展过程中,并且可以通过 PI3K/AKT[2]、NF-κB[3]等信号通路的作用影响到 OA 的进程,当小鼠软骨组织中 *SIRT*1 基因条件性敲除之后,可以加重 OA 的发生发展,从而更加有利于观察 OA 软骨组织的切片情况。因此,我们利用软骨组织 *SIRT*1 基因特异性敲除的小鼠膝关节 OA 模型,观察不同单独染色及复合染色在观察 OA 软骨组织切片中的效果,为后续研究提供便利的条件。

苏木素是一种碱性染料,从洋苏木中提取,氧化后可生成苏木精,可将酸性成分染成蓝色。而伊红是一种酸性染料,可将细胞浆、结缔组织等染成红色或粉红色。苏木素常与伊红同时使用,作为病理学中常规的 HE 染色,用于与其他染色方式进行对照。阿利新蓝是一种大分子共轭染料,该染料带有阳离子,可与酸性基团相结合,从而形成不溶性复合物[8]。在软骨组织中,阿利新蓝可以与黏多糖结合,将软骨细胞及软骨基质染成浅蓝色,从而对软骨组织特异性着色。番红 O 是一种碱性染料,可与蛋白多糖结合,而软骨组织是一种嗜酸性的组织,与番红 O 结合后软骨基质及软骨细胞特异性的红染。固绿则为一种酸性染料,可与蛋白结合,并与嗜酸性的骨结合形成蓝绿色[9]。不同染色方法因染料的不同而具有一定的特异性,从而使物质显现出不同的效果,鉴于我们以往研究中发现,在软骨组织中观察比较多的几个结构分别为软骨细胞的细胞形态、软骨分层结构的情况、II 型胶原纤维的



注:A 为 HE 染色;B 为番红 O-固绿染色;C 为番红 O-阿利新蓝染色;D 为番红 O 染色;E 为固绿染色;F 为阿利新蓝染色。

图2 *SIRT*1 $^{-/-}$ 小鼠骨关节炎模型组膝关节软骨组织形态(×400)

Note. A is HE staining; B is Safranin O-fast green staining; C is Safranin O-alcian blue staining; D is Safranin O staining; E is fast green staining; F is Alcian Blue staining.

Fig. 2 Morphological changes of knee joint cartilage in the *SIRT*1 $^{-/-}$ mouse OA model group

显示、潮线及软骨下骨的分辨作为对比重点,用于研究几种单独染色及复合染色的效果。

我们在研究中发现,*SIRT*1 基因敲除后 OA 发生时,软骨组织破坏严重,软骨细胞数量减少,形态不一,分布紊乱,细胞结构难以观察,软骨层变薄,四层结构更难分辨,II 型胶原破坏,染色面积减少,潮线扭曲不规则,发生前移,部分位置有血管通过,软骨下骨变薄,结构不规律。复合染色在整体观察效果上优于单独染色,在软骨细胞结构、软骨分层、II 型胶原和软骨下骨的观察上,复合染色由于多种染料的存在,使不同结构或者部位着色不同,更容易区分辨别不同的结构及部位。例如在软骨细胞的观察中,HE 染色可以看到软骨细胞的细胞核为蓝紫色,细胞质为粉红色;番红 O-固绿染色的细胞核为蓝绿色,细胞质淡红色;番红 O-阿利新蓝染色中细胞核为淡蓝色,细胞质淡红色;而在单独番红 O 染色、固绿染色、阿利新蓝染色中,细胞核和细胞质均为单一的颜色。在软骨分层的观察中,复合染色可以看到以辐射层为中心向两侧分别产生颜色变化,单独染色中颜色则比较单一。在潮线的观察上,复合染色效果也优于单独染色,复合染色可在潮线处因颜色的交替呈现出明显的界线,从而更好的反应潮线情况,单独染色则没有这个优势。然而,单独染色也有其一定的好处,比如在观察软骨组织的缺失方面,阿利新蓝染色和番红 O 染色中,缺失软骨处颜色变浅甚至消失,比其他单独染色和复合染色更加明显。另外,单独染色所用试剂较少,与复合染色相比,价格低、操作简单,而且染色成功的几率更高。

综上所述,不同的单独染色及复合染色,在观察 *SIRT*1 基因敲除小鼠膝关节骨关节炎软骨组织切片时有不同特点,番红 O-固绿染色、番红 O-阿利新

蓝染色在观察软骨细胞的细胞形态、软骨分层结构的情况、II 型胶原纤维的显示、潮线及软骨下骨的改变中,效果更好;而番红 O 染色、固绿染色在观察软骨组织缺失方面有一定的优势;固绿染色单独使用效果不如前几种染色好。在研究中,应该结合实验室的研究条件、经费、实验周期长短等多种因素综合选择染色方法,以得到预期的效果。

参考文献:

[1] Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention[J]. Arthritis Rheum, 1998, 41: 1343 – 1355.

[2] Yu F, Zeng H, Lei M, et al. The effects of SIRT1 gene knockout through the activation of SREBP2 protein mediated PI3K/AKT signal pathway on osteoarthritis in mice[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2016, 36(5): 683 – 690.

[3] Lei M, Wang JG, Xiao DM, et al. Resveratrol inhibits interleukin 1β-mediated inducible nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes by activating SIRT1 and thereby suppressing nuclear factor-κB activity[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 674(2 – 3): 73 – 79.

[4] 于斐,雷鸣,曾晖,等. 高龄小鼠沉默信息调节因子 1 基因敲除后膝关节骨关节炎模型的建立[J]. 中国组织工程研究杂志, 2015, 19(49): 7895 – 7901.

[5] Bonzo, Brocker C, Jiang C, et al. Hepatic sirtuin 1 is dispensable for fibrate-induced peroxisome proliferator-activated receptor-α function in vivo[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014, 306(7): E824 – 837.

[6] Nakamura, Nguyen MT, Mackem S. Kinetics of tamoxifen-regulated Cre activity in mice using a cartilage-specific CreER(T) to assay temporal activity windows along the proximodistal limb skeleton[J]. Dev Dyn, 2006, 235(9): 2603 – 2612.

[7] 李彦会,刘永春,史敏. 三种阿利新蓝染色方法效果观察[J]. 河北医科大学学报, 2005, 26(6): 464.

[8] 张巧全,余年,林兴建,等. 阿利新蓝染色对脑膜癌的诊断价值[J]. 临床神经病学杂志, 2015, 28(1): 46 – 48.

[9] 姬瑞娟,孙爱军,施丽英,等. 番红 O-固绿染色在关节组织学应用的改进[J]. 解剖学杂志, 2011, 34(5): 716 – 718.

〔收稿日期〕2017 – 02 – 07

(上接第 33 页)

[19] Tetlow LC, Woolley DE. Expression of vitamin D receptors and matrix metalloproteinases in osteoarthritic cartilage and human articular chondrocytes in vitro[J]. Osteoarthr Cartil, 2001, 9(5): 423 – 431.

[20] Li S, Niu G, Wu Y, et al. Vitamin D prevents articular cartilage erosion by regulating collagen II turnover through TGF-beta1 in ovariectomized rats[J]. Osteoarthr Cartil, 2016, 24(2): 345 – 353.

[21] Neu CP, Khalafi A, Komvopoulos K, et al. Mechanotransduction of bovine articular cartilage superficial zone protein by transforming growth factor beta signaling[J]. Arthritis Rheumat, 2007, 56(11): 3706 – 3714.

[22] Miyatake K, Iwasa K, Mcnary S M, et al. Modulation of superficial zone protein/lubricin/PRG4 by kartogenin and transforming growth factor-beta1 in surface zone chondrocytes in bovine articular cartilage[J]. Cartilage, 2016, 7(4): 388 – 397.

[23] 李思维, 牛国栋, 刘忠军, 等. 1α,25(OH)2D3 调控关节软骨 II 型胶原降解的实验研究[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2015, 8(2): 161 – 166.

[24] Young AA, Mclennan S, Smith MM, et al. Proteoglycan 4 downregulation in a sheep meniscectomy model of early osteoarthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2006, 8(2): R41.

[25] Jay GD, Fleming BC, Watkins BA, et al. Prevention of cartilage degeneration and restoration of chondroprotection by lubricin tribosupplementation in the rat following anterior cruciate ligament transection[J]. Arthr Rheumat, 2010, 62(8): 2382 – 2391.

[26] Lee SY, Niikura T, Reddi AH. Superficial zone protein (lubricin) in the different tissue compartments of the knee joint: modulation by transforming growth factor beta 1 and interleukin-1 beta[J]. Tissue Eng Part A, 2008, 14(11): 1799 – 808.

[27] Oestergaard S, Sondergaard BC, Hoegh-Andersen P, et al. Effects of ovariectomy and estrogen therapy on type II collagen degradation and structural integrity of articular cartilage in rats: implications of the time of initiation[J]. Arthr Rheumat, 2006, 54(8): 2441 – 2451.

[28] Richette P, Dumontier MF, Francois M, et al. Dual effects of 17beta-oestradiol on interleukin 1beta-induced proteoglycan degradation in chondrocytes[J]. Ann Rheum Dis, 2004, 63(2): 191 – 199.

[29] Arden NK, Cro S, Sheard S, et al. The effect of vitamin D supplementation on knee osteoarthritis, the VIDEO study: a randomised controlled trial[J]. Osteoarthr Cartil, 2016, 24(11): 1858 – 1866.

〔收稿日期〕2017 – 04 – 20

研究报告

丹酚酸 A 改善 ZDF 大鼠视网膜病变及其作用机制

马全鑫[1],陈小真[1,2],戎亦骊[1],黄俊杰[1],朱科燕[1],陈　诚[1],施佳君[1],李园园[1],陈民利[1*]

(1. 浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究所,杭州　310053;
2. 温州医科大学附属第二医院,浙江 温州　325027)

【摘要】 **目的**　观察丹酚酸 A(SAA)对 Zucker 糖尿病肥胖(ZDF)大鼠视网膜病变的干预作用,探讨 SAA 可能的作用机制。**方法**　取 7~8 周龄雄性 ZDF 大鼠 32 只,Purina#5008 饲料饲喂 4 周后,按血糖平均分为模型对照组,SAA 高、低剂量组与二甲双胍(Met)组,每组 8 只。另取同龄雄性 ZL 大鼠 8 只作为正常对照。SAA 低、高剂量组每日尾静脉注射 SAA 0.5 mg/kg、1 mg/kg,Met 组每日经口灌胃 Met 200 mg/kg,连续给药 12 周,观察 ZDF 大鼠白内障发生率和视网膜病理学改变,并检测血糖血脂、糖化血红蛋白(HbA_{1c})和血清白介素 1(IL-1)、IL-6、氧化性低密度脂蛋白(ox-LDL)、丙二醛(MDA)含量和脂蛋白相关磷脂酶 A2(Lp-PLA2)的活性,以及尿液中转铁蛋白(TRF)、视黄醇结合蛋白(RBP)的含量。**结果**　模型对照组大鼠血糖、血脂及 HbA_{1c} 均上升,糖尿病性白内障发病率 68.75 %,视网膜基底增厚和微血管病变,血清 IL-1、IL-6、ox-LDL 和 MDA 含量和 Lp-PLA2 活性显著升高,尿液中 TRF 和 RBP 含量亦显著升高。给予 SAA 后,ZDF 大鼠白内障发病率降低,视网膜病理学形态有不同程度的改善,血清 IL-1、IL-6、ox-LDL、MDA 含量和 Lp-PLA2 活性下降,尿液中 TRF、RBP 含量亦下降。**结论**　SAA 能改善 ZDF 大鼠糖尿病视网膜病变,降低白内障发生率,其作用途径可能与抑制慢性炎症、防止脂质过氧化和降低 Lp-PLA2 活性有关。

【关键词】 2 型糖尿病;视网膜病变;Lp-PLA2;ZDF 大鼠
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0040-07
doi: 10.3969. j. issn. 1671 -7856. 2017. 10. 008

Effect of salvianolic acid A on retinopathy and its mechanism in ZDF rats

MA Quan-xin[1], CHEN Xiao-zhen[1,2], RONG Yi-li[1], HUANG Jun-jie[1], ZHU Ke-yan[1], CHEN Cheng[1], SHI Jia-jun[1], LI Yuan-yuan[1], CHEN Min-li[1*]

(1. Animal Experimental Research Center/Institute of Comparative Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. The Second Affiliated Hospital and Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027)

【**Abstract**】 **Objective**　To observe the intervention effect of salvianolic acid A (SAA) on retinopathy of Zucker diabetic fatty (ZDF) rats and explore the possible action mechanism of SAA to prevent and treat diabetic retinopathy (DR). **Methods**　Thirty-two 7-8-week old ZDF rats were taken and fed with Purina rat chow for 4 weeks. The ZDF rats were equally divided by the blood glucose into model group, 0.5 mg/kg SAA group, 1.0 mg/kg SAA group and metformin (Met) group. 8 Zucker lean (ZL) rats were taken as control group. After 12-week administration, incidence of cataracts

[基金项目]浙江省中医药管理局重点项目(2015ZZ009);浙江中医药大学比较医学创新团队(XTD201301)。
[作者简介]马全鑫(1988 -),男,硕士,研究方向:中药药理与比较医学。E-mail: mqx1025@hotmail.com
[通讯作者]陈民利(1963 -),女,教授,研究方向:实验动物与比较医学。E-mail: cmli991@aliyun.com

and retinal pathology was observed, and levels of GLU, TC and HbA_{1c} in blood, transferrin (TRF) and retinol binding protein (RBP) in urine and levels of interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), malondialdehyde (MDA) and lipoprotein related phospholipase A2 (Lp-PLA2) activity in serum were measured. **Results** In the model group, GLU, TC, HbA_{1c}, diabetic cataract incidence rate, retinal basement thickening and microangiopathy appeared in most of the rats. The levels of TRF and RBP in urine and levels of IL-1, IL-6, ox-LDL, MDA in serum were significantly increased, and Lp-PLA2 activity was also significantly increased. After SAA administration, the morbidity rate of cataract was reduced, and retinal pathological changes were improved in different degrees. The levels of TRF, RBP, IL-1, IL-6, ox-LDL, MDA and Lp-PLA2 activity was decreased. **Conclusions** SAA can slow down the process of diabetic retinopathy in ZDF rats and reduce the incidence of cataract. The mechanisms of action may be related to inhibition of chronic inflammation, prevention of lipid peroxidation and reduction of Lp-PLA2 activity.

【**Key words**】 Type 2 diabetes mellitus; Retinopathy; Lp-PLA2; ZDF rats

近年来,全球糖尿病发病率快速上升,其中 2 型糖尿病占 85%[1]。2 型糖尿病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。糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy,DR)是 2 型糖尿病的主要并发症之一。长期的高血糖、高胰岛素及慢性炎症反应会引起视网膜不可逆的病理变化,具体表现为微动脉瘤、微血管病变、视网膜出血、出现视网膜新生血管及黄斑水肿等[2,3],最终导致视网膜脱离而失明,严重影响患者的生活质量。因此改善或减缓糖尿病患者的视网膜病变至关重要。

丹酚酸 A(salvianolic acid A,SAA)是我国传统药用植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)中的活性最强的酚酸类物质。据报道,SAA 具有显著的抗炎、抗氧化、保护血管内皮细胞、抗纤维化和防治 1 型糖尿病并发症等药理活性[4-6],这些药理作用在一定程度上与 DR 的防治机制相一致。因此,本文使用 ZDF 大鼠作为 DR 动物模型,观察 SAA 对 DR 的防治作用,并探讨 SAA 可能的作用机制,为 SAA 的临床应用提供参考。

1　材料和方法

1.1　实验动物

32 只 SPF 级 7~8 周龄雄性 Zucker 糖尿病肥胖(Zucker diabetic fatty,ZDF)大鼠,体重(200±10)g 及 8 只同周龄的雄性 Zucker 瘦型(Zucker lean,ZL)大鼠,体重(170±10)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[SCXK(京)2012-001];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。经浙江中医药大学实验动物伦理审查委员会通过,决议编号:ZSLL-2015-72。

1.2　主要试剂与仪器

SAA 粉针剂,由正大青春宝药业有限公司提供;盐酸二甲双胍片(metformin,Met),国药准字:H20023370,由中美上海施贵宝制药有限公司生产;血糖(glucose,GLU),总胆固醇(total cholestrol,TC)检测试剂,购自上海德赛诊断系统有限公司;糖化血红蛋白(hemoglobin A1c,HbA1c)检测试剂,购自 Trinity Biotech 公司;酶联免疫吸附法检测(ELISA)试剂盒:转铁蛋白(transferrin,TRF),视黄醇结合蛋白(retinol-binding protein,RBP),白细胞介素-1(interleukin-1,IL-1),白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6),购自杭州诚维生物有限公司;丙二醛(malondialdehyde,MDA)测试盒购自南京建成生物工程研究所;脂蛋白相关磷脂酶 A2(lipoprotein-associated phospholipase A2,Lp-PLA2)活性检测试剂盒,购自 Abcam 公司;改良 FAA 固定液:70% 乙醇 90 mL,冰醋酸 5 mL,40% 甲醛 5 mL 混合配制而成;PAS 染色试剂盒,购自珠海贝索生物技术有限公司。

7020 全自动生化分析仪(日本日立公司);Hb9210 糖化血红蛋白分析仪(爱尔兰 Trinity Biotech 公司);Thermo 多功能酶标仪(美国 Thermo 公司);AL204-电子分析天平(瑞士 Mettler 公司);Nana Zoomer 2.0 RS 数字切片扫描设备(日本滨松公司);HM335E 半自动石蜡切片机(德国 Microm 公司);自动染色机(德国 Leica 公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　实验动物分组

取 32 只 7~8 周龄雄性 ZDF 大鼠,饲喂 Purina#5008 饲料,另取 8 只同周龄 ZL 大鼠饲喂基础饲料,作为正常对照组。饲喂 4 周后,将 ZDF 大鼠按血糖水平分层随机分为均匀 4 组,即模型对照组,SAA 高、低剂量组和 Met 组,每组 8 只。ZDF 大鼠 2 只一

笼,ZL大鼠4只一笼。SAA高、低剂量组ZDF大鼠每天经尾静脉注射SAA 1 mg/kg、0.5 mg/kg,Met组大鼠每天经口灌胃200 mg/kg,模型对照组和正常对照组每天尾静脉注射5 mL/kg生理盐水,连续给药12周。

1.3.2 一般情况观察

实验期间观察动物的饮食、饮水、粪便和排尿情况以及精神活动状态,并记录白内障发生数。

1.3.3 生化指标检测

在给药12周时,24 h代谢笼法收集的尿液,检测尿液中TRF、RBP含量,隔2 d后禁食不禁水12 h后,尾静脉取血约1 mL,一部分全血使用EDTA抗凝,用于检测HbA_{1c},另一部分分离血清,使用全自动生化检测仪检测GLU和TC,试剂盒检测IL-1、IL-6、ox-LDL、MDA含量和Lp-PLA2活性,具体方法按试剂盒说明书进行。

1.3.4 眼球病理组织学观察

取血后,对动物施行安死术,每组中随机选取4只大鼠,小心地取下眼球,置于4%中性甲醛固定24 h后,流水冲洗1 h,从睫状体后部经锯齿缘环形剪开虹膜,去除前眼部分,将眼杯以视乳头为中心,分切成3份均匀的橘瓣样片状,剥离视网膜层,PBS缓冲液中4℃浸泡过夜,用粗吸管轻吸出视网膜层,放入3%胰蛋白酶中消化2~3 h,10 mL消化1只眼视网膜,间隔20 min摇晃消化小瓶,终止消化,吸入蒸馏水中漂洗吹打,至仅剩下一层透明的视网膜血管网,用粗吸管将毛细血管网带水吸取置于洁净载玻片上,轻摇晃载玻片使水滴中血管网展开铺平,室温自然干燥后,按试剂盒说明书进行PAS染色。将另外4只大鼠眼球从眼眶中小心取出,直接置于改良FAA固定液,固定24 h后,以视乳头为中心,垂直于虹膜切开,固定、包埋、切片,进行HE染色并观察,随后在NDP. view2软件中,每只大鼠各选取黄斑区附近的5个点,测量从内界膜到视网膜色素上皮细胞层的厚度,并计算各组视网膜的平均厚度。

1.4 统计学方法

所有数据用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 22.0软件进行单因素方差分析,组间比较采用L-S-D分析,$P < 0.05$表示差异有显著性。

2 结果

2.1 对血液生化的影响

由表1可见,给药12周时,与正常对照组比较,模型对照组GLU、TC与HbA1c均升高($P < 0.01$),与模型对照组比较,1.0 mg/kg SAA组HbA1c降低($P < 0.05$),Met组GLU与HbA1c下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.2 对白内障发生率与视网膜病变的影响

给药12周时,正常对照组未出现白内障,模型对照组发病率68.75%,0.5 mg/kg SAA组发病率为31.25%,1 mg/kg SAA组发病率为12.50%,Met组发病率为31.25%,见表2。

由图1 HE染色结果可见,正常对照组视网膜各层细胞排列紧密,边界清晰;模型对照组视网膜神经纤维层结构疏松,有黄斑区水肿,各层细胞排列紊乱,可见毛细血管壁增厚;0.5 mg/kg SAA组与1.0 mg/kg SAA组视网膜组织结构有不同程度的改善,血管壁增厚程度减少;经NDP. view2软件测量,与正常对照组比较,模型对照组视网膜增厚($P < 0.01$),与模型对照组比较,SAA高、低剂量组与Met组视网膜厚度降低($P < 0.01$),见图2。

表1 SAA对ZDF大鼠血液生化指标的影响($n = 8$)

Tab. 1 Effects of SAA on blood biochemical indexes of the ZDF rats

组别 Groups	GLU/mmol/L	TC/mmol/L	HbA1c/%
正常对照组 Control group	6.81 ± 0.74	3.43 ± 0.14	4.83 ± 1.10
模型对照组 Model group	31.17 ± 2.22$^{\#\#}$	8.48 ± 0.84$^{\#\#}$	11.81 ± 0.42$^{\#\#}$
0.5 mg/kg SAA组 0.5 mg/kg SAA group	30.89 ± 2.28	8.34 ± 1.43	11.44 ± 0.39
1.0 mg/kg SAA组 1.0 mg/kg SAA group	28.70 ± 2.92	8.26 ± 0.98	11.24 ± 0.36*
Met组 Met group	25.38 ± 3.21*	8.30 ± 0.73	10.82 ± 0.37**

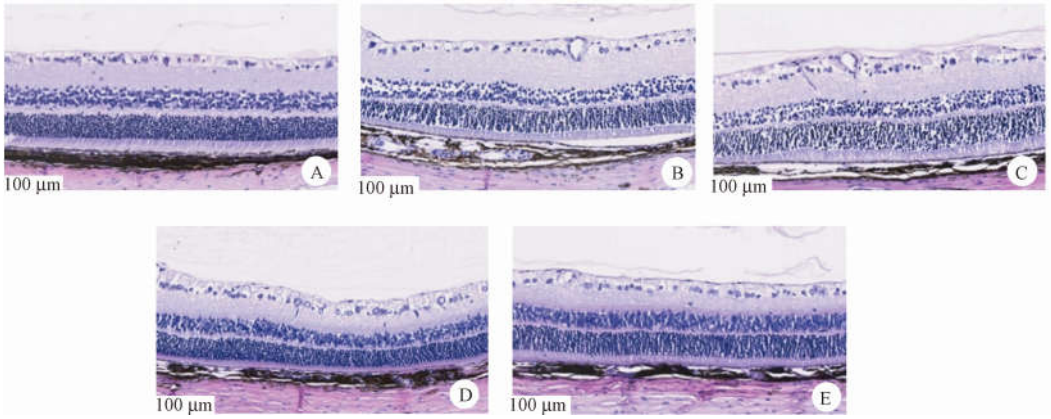
注:与正常对照组相比,$^{\#\#}P < 0.01$;与模型对照组相比,$^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$。

Note: Compared with the control group, $^{\#\#}P < 0.01$; Compared with the model group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

表 2　SAA 对 ZDF 大鼠白内障发生率的影响(n = 8)

Tab. 2　Effects of SAA on cataractin incidence rate of the ZDF rats

组别 Groups	左眼 Left eye	右眼 Right eye	合计 Total	发病率/% Morbidity
正常对照组 Control group	0	0	0	0
模型对照组 Model group	7	4	11	68.75
0.5 mg/kg SAA 组 0.5 mg/kg SAA group	3	2	5	31.25
1.0 mg/kg SAA 组 1.0 mg/kg SAA group	2	0	2	12.50
Met 组 Met group	3	2	5	31.25

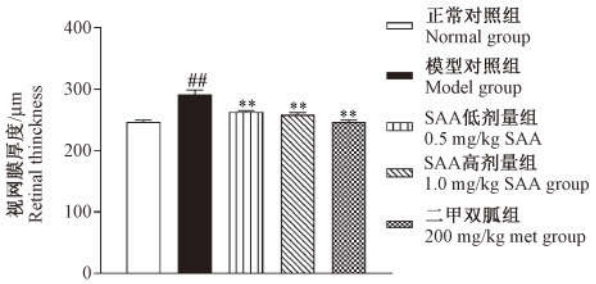


注:A:正常对照组;B:模型对照组;C:0.5 mg/kg SAA 组;D:1.0 mg/kg SAA 组;E:Met 组。

图 1　SAA 对 ZDF 大鼠视网膜的影响(HE 染色)

Note: A: Control group; B: Model group; C: 0.5 mg/kg SAA group; D: 1.0 mg/kg SAA group; E: Met group.

Fig. 1　Effect of SAA on the retina of the ZDF rats. HE stain



注:与正常对照组相比,$^{\#\#}P < 0.01$;与模型对照组相比,$^{**}P < 0.01$。

图 2　SAA 对 ZDF 大鼠视网膜厚度的影响

Note: Compared with the control group, $^{\#\#}P < 0.01$; Compared with the model group, $^{**}P < 0.01$.

Fig. 2　Effect of SAA on the thickness of retina of the ZDF rats

由图 3 视网膜血管消化铺片 PAS 染色结果可见,正常对照组视网膜血管形态完整,内皮细胞和周细胞分布规则;模型对照组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;各给药组视网膜微血管形态均有不同程度的改善,且 1.0 mg/kg SAA 组未发现明显的内皮细胞增生或周细胞减少现象。

2.2　对尿 TRF 和尿 RBP 含量的影响

由图 4 可见,与正常对照组比较,模型对照组 ZDF 大鼠尿液中 RBP 和 TRF 含量均升高($P < 0.01$);与模型对照组比较,SAA 高、低剂量组和 Met 组尿液 RBP 均下降($P < 0.05$);1 mg/kg SAA 组尿液 TRF 含量下降($P < 0.05$)。

2.3　对血清炎症因子水平的影响

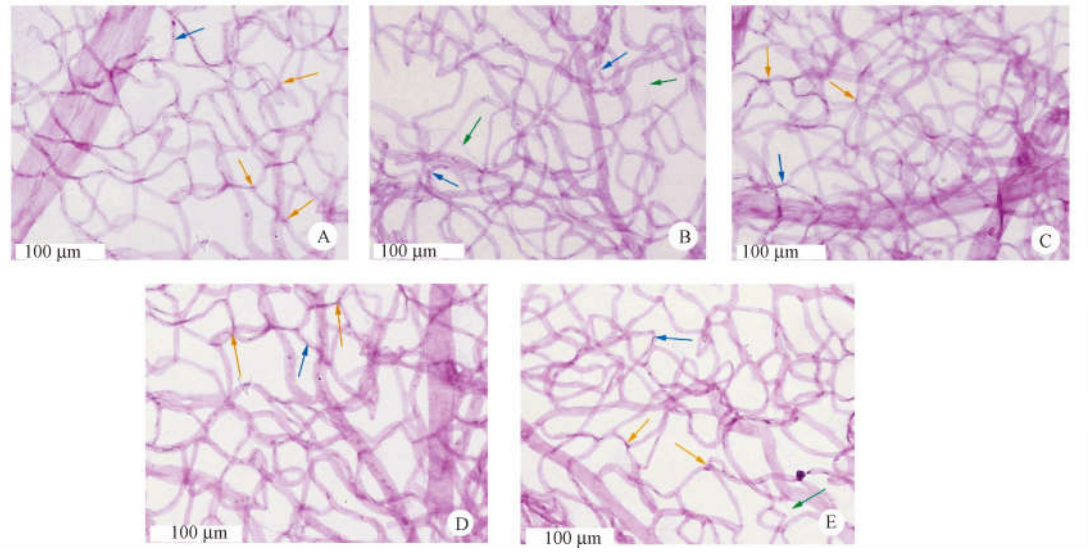
由图 5 可见,给药 12 周时,与正常对照组比较,模型对照组 ZDF 大鼠血清 IL-1 和 IL-6 含量上升($P < 0.01$);与模型对照组比较,1.0 mg/kg SAA 组 ZDF 大鼠血清 IL-1 和 IL-6 下降($P < 0.05$),而 200 mg/kg Met 血清 IL-1 和 IL-6 亦有下降趋势,但差异无显著性($P > 0.05$)。

2.4　对血清脂质过氧化的影响

由图 6 可见,给药 12 周时,与正常对照组比较,模型对照组 ZDF 大鼠血清 MDA 和 ox-LDL 含量上升($P < 0.01$);与模型对照组比较,SAA 高、低剂量组和 Met 组血清 MDA 含量均下降($P < 0.01$);1.0 mg/kg SAA 组 ox-LDL 含量下降($P < 0.01$),其余各给药组差异无显著性。

2.5　对血清 Lp-PLA2 活性的影响

由图 7 可见,给药 12 周时,与正常对照组比较,模型对照组 ZDF 大鼠血清 Lp-PLA2 活性上升($P < 0.01$);与模型对照组比较,SAA 高、低剂量

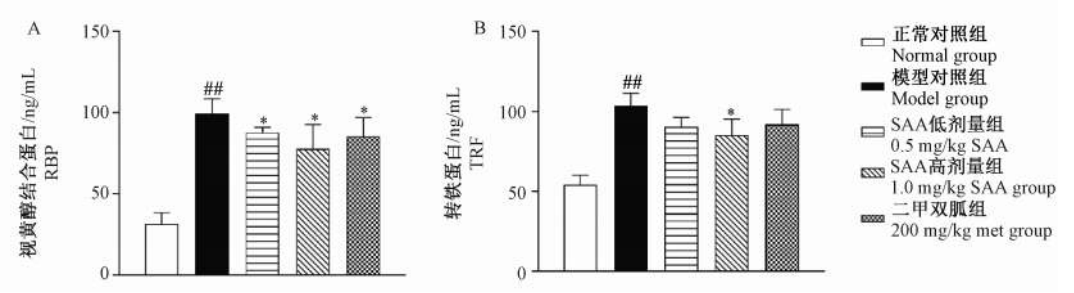


注:A:正常对照组;B:模型对照组;C:0.5 mg/kg SAA 组;D:1.0 mg/kg SAA 组;E:Met 组。
→: 周细胞;→:内皮细胞。→:无细胞毛细血管。

图3 SAA 对 ZDF 大鼠视网膜微血管形态的影响(PAS 染色)

Note:A:Control group; B:Model group; C:0.5 mg/kg SAA group; D:1.0 mg/kg SAA group; E: Met group. →: Pericytes; →:Endotheliocyte;→:Acellular capillaries.

Fig. 3 Effect of SAA on the retina microvessels of the ZDF rats. PAS stain

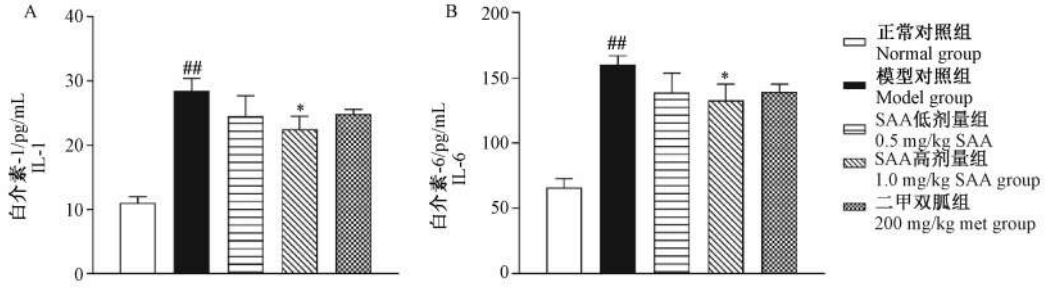


注:与正常对照组相比,$^{\#\#}P < 0.01$;与模型对照组相比,$^{*}P < 0.05$。

图4 SAA 对 ZDF 大鼠尿 RBP 和尿 TRF 的影响

Note: Compared with the control group, $^{\#\#}P < 0.01$; Compared with the model group, $^{*}P < 0.05$.

Fig. 4 Effect of SAA on RBP and TRF in urine of the ZDF rats



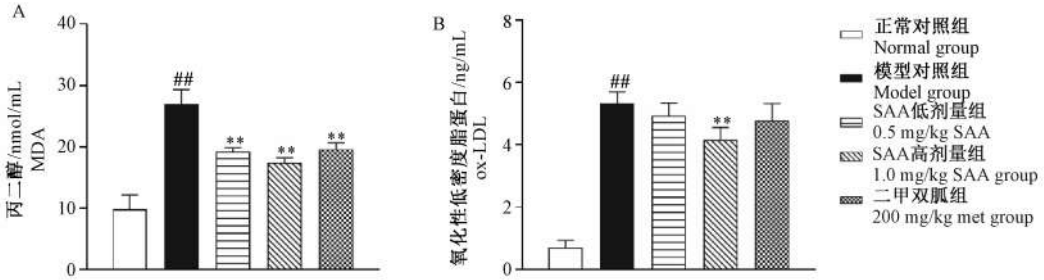
注:与正常对照组相比,$^{\#\#}P < 0.01$;与模型对照组相比,$^{*}P < 0.05$。

图5 SAA 对 ZDF 大鼠血清炎症因子的影响

Note: Compared with the control group, $^{\#\#}P < 0.01$; Compared with the model group, $^{*}P < 0.05$.

Fig. 5 Effect of SAA on inflammatory factor in serum of the ZDF rats

组和 Met 组 Lp-PLA2 活性均下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

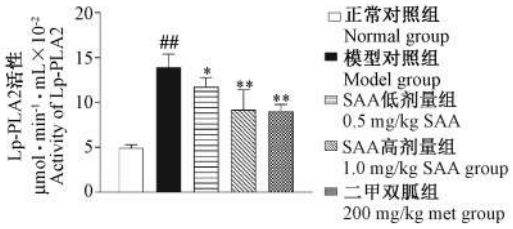


注:与正常对照组相比,$^{\#\#}P < 0.01$;与模型对照组相比,$^{**}P < 0.01$。

图 6　SAA 对 ZDF 大鼠脂质过氧化的影响

Note: Compared with the control group, $^{\#\#}P < 0.01$; Compared with the model group, $^{**}P < 0.01$.

Fig. 6　Effect of SAA on lipid peroxidation of the ZDF rats



注:与正常对照组相比,$^{\#\#}P < 0.01$;与模型对照组相比,$^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$。

图 7　SAA 对 ZDF 大鼠血清 Lp-PLA2 活性的影响

Note: Compared with the control group, $^{\#\#}P < 0.01$; Compared with the model group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

Fig. 7　Effect of SAA on the activity of Lp-PLA2 in serum of the ZDF rats

3　讨论

DR 是糖尿病常见的微血管并发症。国内常用的 2 型糖尿病 DR 动物模型多为链脲佐菌素诱导模型[7],而 ZDF 大鼠作为一种新引进的自发型 2 型糖尿病动物模型,具有微血管病变发病周期短,个体差异小,与人类临床症状相似等特点[8]。本实验研究发现,ZDF 大鼠在 20 周龄时,出现血糖血脂升高、出现糖尿病性白内障、视网膜厚度增加、视网膜血管周细胞数目明显减少等特征性病变,给予 SAA 能有效降低白内障发病率、改善糖尿病视网膜微血管病变、抑制视网膜水肿,提示 SAA 具有抗 DR 的作用。

尿 RBP、TRF 与 DR 的发生和发展的严重程度密切相关,DR 的程度可随尿 RBP 和 TRF 的增高而加重[9,10]。有学者认为,如果存在持续性的微量白蛋白尿,视网膜会出现旁中央区光敏度下降,甚至出现视野缺损[11]。因此,尿 RBP、TRF 可做为 DR 早期诊断的独立预测因子。本实验中,模型对照组 ZDF 大鼠尿 RBP 和 TRF 含量显著升高,SAA 组均有不同程度的下降,且呈一定的剂量关系,进一步证实了 SAA 对糖尿病视网膜微血管的保护作用。本实验还发现,SAA 具有一定的降糖作用但不显著,因此我们推测 SAA 并非通过调节血糖血脂抑制 DR 的形成,而是通过其他作用途径来实现的。

慢性炎症在 DR 的发生发展中扮演着重要而又复杂的角色。一方面,视网膜炎症反应可通过影响内皮型一氧化氮合酶导致眼内血压升高,并能通过产生血管内皮生长因子诱导新生血管形成,而这些血管渗透性高,易发生出血[12,13];另一方面,病变的视网膜中炎症介质和粘附因子表达升高,可导致白细胞粘附,加剧了局部的炎症反应,进一步诱发血管损伤[14]。因此,降低机体炎症反应是防治 DR 的重要策略之一。多项研究已证实 SAA 具有显著的抗炎活性[15,16],本研究同样发现,SAA 能明显降低 ZDF 大鼠 IL-1 和 IL-6 等炎症标记物,而 Met 组并未显示出明显的抗炎作用,提示 SAA 能通过减轻机体炎症反应减缓 DR 的发展,而在抗炎方面的作用 SAA 优于 Met。

氧化应激是指机体在遭受各种有害刺激时,自由基的产生和抗氧化防御系统之间的失衡,从而导致组织损伤的过程。在高糖状态下,氧化应激增强,产生过氧化产物,激活与糖尿病微血管并发症发生发展有关的信号传导通道[17]。本实验结果显示 SAA 能显著降低血清 ox-LDL 和 MDA 含量,而这两者是典型的脂质过氧化产物,说明 SAA 具有较强的抗氧化活性。Met 也有降低 MDA 的作用,但在降低 ox-LDL 方面没有 SAA 作用明显,提示 SAA 具有显著的抗氧化活性,能通过减少脂质过氧化来降低

对视网膜微血管的损伤作用。

Lp-PLA2是一种炎症性疾病的新型标记物,其活性的增加意味着血管功能出现障碍[18]。Lp-PLA2能水解ox-LDL产生溶血卵磷脂和氧化游离脂肪酸,二者是强烈的过氧化物质和促炎因子,对血管内皮细胞造成损伤,使血管通透性增加。近来有研究发现,降低Lp-PLA2活性能有效抑制糖尿病所致的血-视网膜屏障功能障碍,其作用机制为Lp-PLA2抑制剂能减少溶血卵磷脂的产生,减少血管内皮生长因子受体2信号通路的激活,从而降低血管通透性[19]。因此,Lp-PLA2可能成为治疗糖尿病患者黄斑水肿的新的治疗靶点。本实验研究发现,SAA能显著降低血清中Lp-PLA2活性,并呈一定的剂量关系,推测降低Lp-PLA2活性可能也是SAA改善ZDF大鼠视网膜病变的作用途径之一。然而其具体作用机制尚不明确,需更多实验加以阐释。

综上所述,SAA有减缓和改善糖尿病视网膜微血管病变的作用,其作用机制可能和抗炎、抗氧化以及降低Lp-PLA2活性有关。因此,SAA可以作为DR的一种有效辅助治疗药物,对于改善DR的预后有重要意义。

参考文献:

[1] Forouhi NG, Wareham NJ. Epidemiology of diabetes[J]. Medicine (Abingdon), 2014, 42(12):698-702.

[2] Hammes HP, Feng Y, Pfister F, et al. Diabetic retinopathy: targeting vasoregression[J]. Diabetes, 2011, 60(1): 9-16.

[3] Ferris FL, Nathan DM. Preventing diabetic retinopathy progression[J]. Ophthalmology, 2016, 123(9): 1840-1842.

[4] 张莉, 张维库, 赵莹, 等. 丹酚酸A的研究与进展[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(19): 2603-2609.

[5] 鲁珽, 陈方明, 朱科燕, 等. 注射用丹酚酸A防治肝纤维化的实验研究[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(7): 57-62.

[6] Chien MY, Chuang CH, Chem CM, et al. Salvianolic acid A alleviates ischemic brain injury through the inhibition of inflammation and apoptosis and the promotion of neurogenesis in mice[J]. Free Radical Bio Med, 2016, 99: 508-519.

[7] 段惠惠, 黄建梅, 于素云, 等. STZ糖尿病大鼠视网膜病变模型的再评价[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(5): 12-18.

[8] 陈小真, 戎亦骊, 马全鑫, 等. 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[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(5): 63-70.

[9] 杨洪亮. 脂蛋白(a), 尿视黄醇结合蛋白与糖尿病视网膜病变的相关性研究[J]. 微量元素与健康研究, 2015, 32(1): 13-14.

[10] 王芳, 徐莉. 内皮细胞损伤及尿微量蛋白与糖尿病视网膜病变的相关性研究[J]. 现代预防医学, 2008, 35(17): 3435-3436.

[11] Chen YH, Chen HS, Tarng DC. More impact of microalbuminuria on retinopathy than moderately reduced GFR among type 2 diabetic patients[J]. Diabetes Care, 2012, 35(4): 803-808.

[12] Van Hecke MV, Dekker JM, Nijpels G, et al. Inflammation and endothelial dysfunction are associated with retinopathy: the Hoorn Study[J]. Diabetologia, 2005, 48(7): 1300-1306.

[13] Spijkerman AMW, Gall MA, Tarnow L, et al. Endothelial dysfunction and low-grade inflammation and the progression of retinopathy in type 2 diabetes[J]. Diabetic Med, 2007, 24(9): 969-976.

[14] Stitt AW, Curtis TM, Chen M, et al. The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy[J]. Prog Retin Eye Res, 2016, 51: 156-186.

[15] Li L, Xu T, Du Y, et al. Salvianolic acid a attenuates cell apoptosis, oxidative stress, Akt and NF-κB activation in angiotensin-Ⅱ induced murine peritoneal macrophages[J]. Curr Pharm Biot Echno, 2016, 17(3): 283-290.

[16] Huang J, Qin Y, Liu B, et al. In silico analysis and experimental validation of molecular mechanisms of salvianolic acid A-inhibited LPS-stimulated inflammation, in RAW264.7 macrophages[J]. Cell Proliferat, 2013, 46(5): 595-605.

[17] Madsen-Bouterse SA, Kowluru RA. Oxidative stress and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives[J]. Rev Endocr Met Ab Dis, 2008, 9(4): 315-327.

[18] Wilensky RL, Macphee CH. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and atherosclerosis[J]. Curr Opin Lipidol, 2009, 20(5): 415-420.

[19] Canning P, Kenny BA, Prise V, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) as a therapeutic target to prevent retinal vasopermeability during diabetes[J]. P Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(26): 7213-7218.

〔收稿日期〕2017-04-12

研究报告

松花粉辅助紫杉醇联合铂类化疗的增效减毒作用

赵学友[1],巩　萍[1],孙　铜[2],马玉奎[3*]

(1. 山东省临朐县人民医院,山东 临朐　262600; 2. 山东省食品药品检验研究院,济南　250101;
3. 山东省药学科学院,济南　250100)

【摘要】 **目的**　研究松花粉对紫杉醇联合铂类(paclitaxel and cisplatin, TP)方案化疗有无减毒和增效作用。**方法**　取人肺癌 H460 细胞株制备的移植瘤裸鼠 48 只,按瘤体积均衡原则分为模型组、松花粉 600、300、150 mg/kg 三个剂量 +TP 方案化疗组、单用 TP 方案化疗组、单用松花粉 600、300、150 mg/kg 三个单剂量组,每组 6 只。各组给予相应的药物后以裸鼠的体重、进食量、抑瘤率、血液学和肝肾功能等为评价指标,全面评价松花粉对 TP 化疗方案有无增效和减毒作用。**结果**　模型动物给予 TP 方案化疗的同时灌胃给予松花粉(150、300、600 mg/kg)可明显提高单用 TP 化疗方案的抑瘤率,抑制化疗药物引起的体重减轻和摄食量的减少、抑制化疗引起的白细胞降低和肝肾功能的损伤。**结论**　TP 方案化疗的同时给予松花粉具有明显的增效减毒作用。

【关键词】 松花粉;增效;减毒;肺癌
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0047-04
doi: 10.3969. j. issn. 1671 -7856. 2017. 10. 009

Synergism and attenuation effects of Pini Pollen on paclitaxel and cisplatine chemotherapy

ZHAO Xue-you[1], GONG Ping[1], SUN Tong[2], MA Yu-kui[3*]
(1. People's Hospital of Linqu County, Linqu 262600, China; 2. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101;
3. Shandong Pharmaceutical Academy, Jinan 250100)

【**Abstract**】 **Objective**　To investigate the synergism and attenuation effects of Pini Pollen on paclitaxel and cisplatin (TP) chemotherapy in model mice. **Methods**　Forty-eight model nude mice with H456 cell line xenograft were divided into 8 groups: model group, TP chemotherapy group, Pini Pollen (150, 300 and 600 mg/kg) group and TP chemotherapy plus Pini Pollen (150, 300 and 600 mg/kg) group. The tumor inhibition rates, body weight, food intake, hematology and blood biochemistry indexes were selected to evaluate the synergism and attenuation effects of intragastric administration of Pini Pollen (150, 300, 600 mg/kg) on TP chemotherapy. **Results**　Compared with the TP chemotherapy group, the tumor inhibition rates, body weight, food intake, white blood cell count were increased and liver and kidney function damage were alleviated significantly in the TP chemotherapy plus Pini Pollen groups. **Conclusions**　Pini Pollen has a significant synergism and attenuation effects on TP chemotherapy.

【**Key words**】 Pini Pollen; Synergism; Attenuation; Lung Cancer

松花粉(Pini Pollen)药名松花、松黄,最早记载于唐代的《新修本草》。松花粉是我国传统药材,可

[基金项目]山东省自主创新及成果转化专项(2014ZZCX02104)。
[作者简介]赵学友(1975 -),男,主管药师,本科, 研究方向:临床药学。E-mail: yaoliduli@ 163. com
[通讯作者]马玉奎 (1975 -),男,主任药师,博士,研究方向:新药药理毒理评价。E-mail: yukuima@sina. com

药食兼用的花粉品种,在我国具有悠久的药用历史。《神农本草经》和《本草纲目》中均记载其“气味甘平无毒”,具有润心肺、益气、利小便、消瘀血等功效,亦可用于酿酒。松花粉富含蛋白质、磷脂、矿物质和多种维生素和微量元素等营养物质[1]。现代药理研究证明,松花粉具有降脂、延缓衰老、美容养颜、保肝、降糖、提高机体免疫力等众多功效[2]。尽管研究证明众多中药均具有抗肿瘤作用,但单味中药用于抗肿瘤临床上几乎没有确切疗效,临床一般多辅助化疗药物应用[3]。故本文采用人肺癌 H460 裸鼠移植瘤模型初步考察了松花粉对 TP 方案化疗的增效和减毒作用,为松花粉进一步研究和开发利用提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物及瘤珠

BALB/c 裸鼠,雄性,SPF 级,4 周龄,15 ~ 17 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2014 - 0004]提供。饲养于山东省药学科学院独立送风 IVC 笼具中[SYXK(鲁) 2010 - 0005]。室温20℃~23℃,相对湿度 40%~60%。本实验经过山东省药学科学院新药评价中心实验动物使用与管理委员会审查,编号为 IACUC - 2015068。人肺癌 H460 细胞系,济南天长商贸有限公司提供。

1.2 主要试剂与仪器

松花粉(批号:14010412,烟台新时代健康产业有限公司);紫杉醇注射液(TAX,批号:E1400520,江苏奥赛康药业股份有限公司);注射用顺铂(CDDP,批号:140728,上海新百合药业股份有限公司)。

Hemavet 950 型全自动血球计数仪(Drew Scientific 公司);日立 7180 全自动生化分析仪(日本株式会社日立高新技术);BPN-50CH(UV)二氧化碳培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);XSP-18C 型倒置生物显微镜(上海巴拓仪器有限公司);电子数显卡尺(深圳市格雷创科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 裸鼠移植瘤模型建立及动物分组

常规传代培养人肺癌 H460 细胞,收集细胞悬液后调整细胞数为每毫升 $1.0 \times 10^8 \sim 2.0 \times 10^8$ 个细胞。在无菌条件下将肿瘤细胞接种于裸鼠右腋皮下,每只 0.1 mL。接种后定期测量肿瘤长径、宽径和高,计算瘤体积(V = 3. 14 × 宽径 × 长径 × 高/6)[4],当肿瘤体积为 150 ~ 300 mm^3 时,按瘤体积均衡原则分为模型组、松花粉 600、300、150 mg/kg 三个剂量 + TP 方案化疗组、单用 TP 方案化疗组、单用松花粉 600、300、150 mg/kg 三个单剂量组,每组 6 只。

1.3.2 分组后给药

松花粉各剂量组裸鼠每天灌胃 1 次,给予相应剂量的药物溶液,连续给药 21 d;TP 方案化疗组于分组后第 8 天和 16 天按照 16 mg/kg 剂量各腹腔注射 1 次 TAX,第 10、12 和 14 天按照 6.7 mg/kg 剂量各腹腔注射 1 次 CDDP。松花粉 + TP 方案化疗组在给予 TP 方案化疗的基础上给予松花粉;模型组灌胃给予等体积的纯水和腹腔注射等体积的 0.9% 氯化钠注射液。

1.3.3 结果检测和评价

体重和饲料消耗量每 3 d 称量 1 次,21 d 药后 3 h戊巴比妥钠麻醉后腹主动脉采血,检测主要血液学指标:红细胞(RBC)、白细胞(WBC)、血红蛋白(HB)和肝肾功能指标:谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、尿素氮(BUN)、肌酐(CR)。采血后取每只动物的瘤块并称瘤重,按下面公式计算出抑瘤率和 q 值[5,6]。

肿瘤抑制率 = (A-B)/A × 100% ,B 为药物组平均瘤重,A 为模型组平均瘤重。

q 值 = E(ab)/[Ea + (1 - Ea) × Eb],E(ab)为两种药物合用的肿瘤抑制率,Ea、Eb 为两种药物单用的肿瘤抑制率,q 大于 0.85 提示两种药物合用有协同作用。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,实验数据以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 松花粉对化疗裸鼠摄食量的影响

裸鼠给予化疗药物后摄食量减少,而同时给予松花粉后,裸鼠摄食量随着给药时间延长逐渐恢复,其中给药 21 d 后化疗和松花粉 300、600 mg/kg 合用组裸鼠的摄食量与模型组基本一致。见表1。

2.2 松花粉对化疗裸鼠体重的影响

TP 方案化疗后裸鼠体重逐渐减轻,自 12 d 开始体重明显低于模型组($P < 0.05$),而同时给予松花粉后,裸鼠体重随给药时间延长逐渐恢复,给药 21 d 后体重明显高于 TP 化疗组($P < 0.05$),而与

模型组体重基本一致。结果见表2。

2.3　松花粉对化疗药物的增效作用

与模型组比较,松花粉和 TP 方案化疗合用后瘤重明显减轻,抑瘤率明显高于化疗或松花粉单用组,其中松花粉 300、600 mg/kg 和化疗合用后 q 值大于 0.85,说明松花粉在 300 mg/kg 以上剂量时可明显增强 TP 方案化疗的抗肿瘤作用。结果见表 3。

表 1　松花粉对裸鼠摄食量的影响($n=6$)

Tab. 1　Effects of Pini Pollen on food intake of the model nude mice

组　别 Groups	剂量/mg/kg Doses	摄食量/g/只/d Food intake			
		6 d	12 d	18 d	21 d
模型 Model	—	4.7	4.8	5.1	5.4
紫杉醇+顺铂 Paclitaxel+Cisplatin	16+6.7	4.9	2.9	2.3	2.0
松花粉+紫杉醇+顺铂 Pini Pollen+Paclitaxel+Cisplatin	600+16+6.7	4.8	3.8	4.6	4.9
	300+16+6.7	4.6	3.3	3.9	4.7
	150+16+6.7	4.8	3.0	2.7	3.6

表 2　松花粉对裸鼠体重的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab. 2　Effects of Pini Pollen on body weight of the model nude mice

组　别 Groups	剂量/mg/kg Doses	体重/g　Body weight				
		0 d	6 d	12 d	18 d	21 d
模型 Model	—	23.2±1.7	24.6±2.0	24.8±1.7	25.9±1.9	26.3±1.7
紫杉醇+顺铂 Paclitaxel+Cisplatin	16+6.7	23.1±1.9	23.2±1.8	21.8±1.9*	21.2±1.8*	21.0±2.1*
松花粉+紫杉醇+顺铂 Pini Pollen+Paclitaxel+Cisplatin	600+16+6.7	23.5±1.6	23.3±1.6	22.4±1.2	23.7±2.1#	24.2±2.1#
	300+16+6.7	23.0±2.2	22.9±1.9	22.2±1.6	23.4±2.0#	23.9±1.9#
	150+16+6.7	23.6±2.0	23.0±1.8	21.9±1.6	22.3±1.5	23.4±1.4#

注:与模型组比较,*$P<0.05$;与 TP 组比较,#$P<0.05$。

Note. *$P<0.05$, vs the model group; #$P<0.05$, vs the TP group.

表 3　松花粉对化疗药物的增效作用($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab. 3　Synergistic effects of Pini Pollen on chemotherapy in the model nude mice

组　别 Groups	剂量/mg/kg Doses	瘤重/g Tumor weight	抑瘤率/% Tumor inhibition rate	q 值 q value
模型 Model	—	1.52±0.43	—	—
紫杉醇+顺铂 Paclitaxel+Cisplatin	16+6.7	0.70±0.16*	53.9	—
松花粉 Pini Pollen	600	0.98±0.16*##	35.5	—
	300	1.08±0.26#	28.9	—
	150	1.12±0.32#	26.3	—
松花粉+紫杉醇+顺铂 Pini Pollen+Paclitaxel+Cisplatin	600+16+6.7	0.38±0.17**	75.0	1.07
	300+16+6.7	0.56±0.26**	63.2	0.94
	150+16+6.7	0.68±0.15*	55.3	0.84

注:与模型组比较,*$P<0.05$,**$P<0.01$;与松花粉+TP 组比较,#$P<0.05$,##$P<0.01$。

Note. *$P<0.05$, **$P<0.01$, vs the model group; #$P<0.05$, ##$P<0.01$ vs the Pini Pollen plus TP group.

表 4　松花粉对化疗引起的血液学和血液生化学减毒作用($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab. 4　Attenuation effects of Pini Pollen on hematological and blood biochemical toxicity caused by chemotherapy in the model nude mice

组　别 Groups	剂量/mg/kg Doses	WBC /10^9/L	RBC /10^{12}/L	HB /g/L	ALT /U/L	AST /U/L	CR /μmol/L	BUN /mmol/L
模型 Model	—	7.31±0.99	10.1±1.5	13.6±2.1	69.1±17.8	148.7±19.4	30.0±3.5	6.9±1.2
紫杉醇+顺铂 Paclitaxel+Cisplatin	16+6.7	4.51±0.67**	9.1±0.9	12.0±2.2	125.0±29.9*	221.1±32.4**	54.2±4.0**	10.7±2.0*
松花粉+紫杉醇+顺铂 Pini Pollen+Paclitaxel+Cisplatin	600+16+6.7	6.88±1.95#	10.4±2.0	12.6±2.1	79.1±21.1#	162.3±21.5#	35.1±7.6#	7.9±1.1#
	300+16+6.7	6.31±0.99#	9.8±1.6	11.3±1.9	85.5±17.8#	180.2±24.3#	41.9±6.8#	8.3±1.2#
	150+16+6.7	5.60±1.22*	10.0±2.0	12.2±1.0	98.2±25.4*	197.2±31.0*	46.1±6.4**	8.7±2.1

注:与模型组比较,*$P<0.05$, **$P<0.01$;与 TP 化疗药物组比较,#$P<0.05$。

Note. *$P<0.05$, **$P<0.01$, vs the model group; #$P<0.05$, vs the TP group.

2.4 松花粉对化疗引起的血液学和血液生化学毒性减毒作用

与模型组比较,裸鼠 WBC 数量化疗后明显减少,血清中 ALT、AST、CR 和 BUN 含量明显升高,与单用化疗药物组比较,同时给予松花粉 300、600 mg/kg 后裸鼠 WBC 数量明显增多,血清中 ALT、AST、CR 和 BUN 含量明显降低($P < 0.05$),说明松花粉在 300 mg/kg 以上剂量可明显抑制 TP 方案化疗药物引起的白细胞减少和肝肾功能损伤。各个剂量对 RBC 和 HB 无明显影响。结果见表4。

3 讨论

我国恶性肿瘤的发病率和死亡率逐年上升,我国每年新发肿瘤病例 300 多万,肿瘤病人死亡人数占全球的四分之一左右,已成人类死亡的主要原因[7]。临床上根据肿瘤的不同生长部位、不同病理类型、不同分期、患者的具体情况等会选择化疗、放疗、手术治疗以及中医药治疗等不同的治疗方式。其中,化疗时最常用的治疗方式,但多数化疗药物存在选择性差,毒副作用大,容易耐药等缺陷,严重制约着化疗的效果。而中医药治疗具有多靶点和多环节效应以及副作用小等化药不具有的优势,但也存在诸如治疗的肿瘤和疗效有限、作用机制不明确等众多缺陷,故临床上中药多与化疗药物合用,通过增强机体免疫力、活血化瘀、扶正驱邪、补气养血、清热解毒、调理脏腑等多个方面增强化疗药物疗效的同时降低毒副反应,改善肿瘤患者的生活状态,提高肿瘤患者化疗的耐受性等[8,9]。

选择合适的实验动物模型是新药药效评价的重要一环,目前抗肿瘤药物的增效减毒作用研究多采用 S180 腹水癌小鼠模型,研究对于环磷酰胺等单个化疗药物的辅助作用,但此模型与临床实际应用存在较大差异,例如肿瘤细胞来源为鼠源性而非人源性瘤株,临床化疗一般不会单个药物而多采用多种化疗药物联合应用等。因此本文采用了人源性的 H460 非小细胞肺癌瘤珠制备裸鼠移植瘤模型,给予非小细胞肺癌国际治疗指南中推荐的 TP 标准化疗方案,选择抑瘤率作为增效指标,化疗最常见的食欲不振、体重减轻、白细胞减少和肝肾功能损伤作为减毒指标,初步模拟临床治疗现状来研究松花粉的增效减毒作用。

本实验研究结果证明,裸鼠给予 *TP* 方案化疗后出现了体重减轻、进食量减少、*WBC* 减少、肝肾功能受损等临床肿瘤病人化疗后最容易出现的不良反应,说明此模型复制成功,能够较好地模拟临床实际。化疗的同时灌胃给予松花粉后,不良反应明显减轻,体重和进食量随着给药次数增多逐渐恢复正常。与 *TP* 方案化疗组小鼠比较,合用松花粉 21 *d* 时检测 *WBC* 数量明显增多,血清中 *AST*、*ALT*、*CR*、*BUN* 含量明显降低,说明松花粉对血液系统和肝肾功能具有明显保护作用。抑瘤效果显示,*TP* 方案化疗和松花粉合用后,与单纯 *TP* 方案化疗相比,对 H460 裸鼠移植瘤的抑瘤效果显著增强。本实验结果初步证明,松花粉对化疗药物具有明显的增效和减毒作用,其作用可能与松花粉具有抗氧化、保肝、提高免疫力、抗肿瘤作用有关[2,10],其确切的作用机制仍有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 何晓燕,孙雪园,于智洋. 松花粉的营养成分及药理作用[J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(9): 78-80.
[2] 谢娇,王华,任廷远,等. 松花粉的功效及应用展望[J]. 食品与药品, 2011, 12(3): 139-141.
[3] 木拉提·扎依别克,哈木拉提·吾普尔. 抗肿瘤中药的分类及作用机理[J]. 新疆医科大学学报, 2006, 29(11): 1102-1104.
[4] 何志军,陈先祥,蔡庆和,等. 移植瘤体积不同计算方法的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(9): 47-50.
[5] 王作军,马玉奎,贾玉萍,等. 毛蚶提取物辅助 NP 化疗的增效减毒作用[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(5): 37-40.
[6] 陈颖,茅蕾蕾,胡碧原,等. 银杏外种皮提取物联合顺铂对 S180 荷瘤小鼠抗肿瘤增效减毒作用[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(13): 1569-1572.
[7] 吴菲,林国帧,张晋昕. 我国恶性肿瘤发病现状及趋势[J]. 中国肿瘤, 2012, 21(2): 81-85.
[8] 孙菲. 中药抗肿瘤作用及机制研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(17): 48-54.
[9] 张顺辰,要晓静. 中药抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国处方药, 2015, 13(5): 19-20.
[10] 李雯雯, 陈才法, 李悦, 等. 松花粉醇提物抗肿瘤作用的初步研究[J]. 解放军药学学报, 2011, 27(3): 199-201.

〔收稿日期〕2017-02-06

研究报告

高热大鼠不同程度寒颤模型的构建

吴冬梅[1],郑翠红[2*],吴冠虹[1],李华萍[3]

(1. 福建医科大学护理学院,福州　350108; 2. 福建卫生职业技术学院,福州　350101; 3. 福建省级机关医院,福州　350003)

【摘要】 **目的**　探索高热大鼠降温处理过程中发生寒颤的体温阈值,构建不同程度寒颤大鼠模型。**方法**　使用 20% 干酵母混悬液将体重为(200 ± 20)g、基础体温为 36.8℃ ~ 38.3℃的雄性 SD 大鼠致热,选取致热成功的大鼠 40 只,随机分为 4 组,每组 10 只,分别使用 10、20、40 mL 冰袋对高热大鼠施行颈部和腋下探索性降温处理 30 min,对照组不进行降温。观察大鼠寒颤的表现、监测大鼠发生寒颤的肛温阈值。**结果**　高热大鼠在降温处理 30 min 内,对照组和 10 mL 冰袋组大鼠身体任一部位均未发生寒颤;20 mL 冰袋组大鼠发生轻度寒颤,表现为竖毛,头、颈部颤抖,伴或不伴上肢颤抖,发生轻度寒颤的平均肛温阈值为 37.25℃,轻度寒颤发生率为 100%;40 mL 冰袋组大鼠发生重度寒颤,表现为竖毛,头、颈部、四肢和躯干均剧烈颤抖,尾巴肌张力增强,发生重度寒颤的平均肛温阈值为 37.07℃,重度寒颤发生率为 90%。**结论**　对高热大鼠进行冰袋降温干预可以构建出较为理想的无寒颤、轻度寒颤、重度寒颤模型。

【关键词】 寒颤;模型;不同程度;高热大鼠

【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0051-04

doi: 10.3969. j. issn. 1671 -7856. 2017. 10. 010

Establishment of rat models of fever and shivering in different degrees

WU Dong-mei[1], ZHENG Cui-hong[2*], WU Guan-hong[1], LI Hua-ping[3]

(1. Nursing Collage of Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China; 2. Fujian Health College, Fuzhou 350101; 3. Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350003)

【**Abstract**】 **Objective**　To explore the body temperature thresholds of shivering in febrile rats during therapeutic hypothermia, and establish rat models of shivering in different degrees. **Methods**　A randomized controlled trial was adopted. Rats weighted 200 ± 20 g and basal body temperature of 36.8 – 38.3℃ were induced with fever using 20% dry yeast solution through dorsal subcutaneous injection. 40 rats were randomly divided into 4 groups: 10 mL ice pack group, 20 mL ice pack group, 40 mL ice pack group and control group, 10 rats in each group. Physical cooling was implemented for 30 minutes in the neck and armpits. No cooling measures was given to the control group. The shivering of rats were observed, and the threshold of anal temperature was monitored. **Results**　In the rats with hyperthermia, shivering was not observed in any part of the rats in the control group and in the therapeutic hypothermia group of 10 mL ice pack. The rats in the therapeutic hypothermia group of 20 mL ice pack developed mild shivering, which manifested as piloerection, head and neck trembling, with or without upper limbs trembling. The threshold of the average rectal temperature of mild shivering was 37.25℃, The incidence of mild shivering was 100%. The rats in the therapeutic hypothermia group of 40 mL ice pack developed severe shivering, which manifested as piloercetion, head, neck, limbs and trunk were trembling,

[基金项目]福建省科学技术厅 2014 年福建省科技重点项目(2014I0002)。

[作者简介]吴冬梅(1991 –),女,硕士研究生,研究方向:老年护理。E-mail: 384293477@qq.com

[通讯作者]郑翠红(1963 –),女,教授,研究方向:老年护理。E-mail: fjcuihong@126.com

and tail muscle tension increased. The threshold of the average rectal temperature of severe shivering was 37.07℃, severe shivering occurred in 90% of the rats. **Conclusions** No shivering, mild shivering, and severe shivering models can be established by intervention with ice pack in rats with high fever during therapeutic hypothermia.

【**Key words**】 Shivering; Model; Varying degrees; Febrile rats

寒颤为机体骨骼肌的快速节律性收缩,是机体对中枢低体温的代偿反应,以增加热能来抵抗温度过低的保护性应激反应,常表现为战栗、肌强直或躁动不安。研究表明,寒颤是冷疗过程中一项常见的并发症,发生寒颤会增强机体的新陈代谢、影响冷疗效果并容易引起机体生理及心理的不适[1]。寒颤发生的部位主要有咀嚼肌、颈部、胸前区、四肢和躯干。床边寒颤评估表是 Badjatia 等[2]学者根据寒颤发生部位的不同将寒颤分为轻度、中度和重度三个等级,用于寒颤评估。但目前尚缺乏不同程度寒颤的动物模型,为此,本研究欲对高热大鼠采用冰袋降温的方法构建出不同程度寒颤动物模型,为研究寒颤对机体的影响提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,10 周龄,体重(200±20)g,由上海斯莱克动物实验中心购入[SCXK(沪)2012-0002]。饲养于福建卫生职业技术学院动物实验中心[SYXK(闽)2012-0006]。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

0.9%氯化钠注射液,批号:H31021690,上海信谊金朱药业有限公司;高活性干酵母粉,批号:CF20150728,安琪酵母股份有限公司;戊巴比妥钠,批号:WS40140220,德国 Merck 公司;3%~5%苦味酸溶液,批号:20020701,广东台山粤侨化工厂;液体石蜡,批号:031202,江西德诚制药有限公司。

AEG-220 电子分析天平(日本 SHIMADZU 公司);TD-116075 体重计(余姚市金诺天平仪器有限公司);BCD-186KB 冰箱(青岛海尔股份有限公司);CR·W12 水银肛温计(上海医用仪表厂);3.2 cm×4 cm 及 4.0 cm×6.0 cm PE 自封袋(京东商城斯图旗舰店,1481050517);大鼠固定器、烧杯、量筒、注射器(福建卫生职业技术学院动物实验室提供)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验准备

冰袋制作:选择不透水、温度通透性好的 3.2 cm×4.0 cm 和 4.0 cm×6.0 cm 的 PE 材质冰袋,分别注入清水约 10 mL 和 20 mL。将冰袋做好标记,放入冰箱 24 h 冷冻备用,冰箱温度为 -18℃,使用时用三层无纺纱布包裹。

20%干酵母混悬液的制备:称取干酵母 2 g,置于烧杯中,加入 0.9%氯化钠 10 mL,搅拌均匀,最后定容为 10 mL(20%)。

实验动物:正式试验前,先用 3%~5%的苦味酸溶液标记大鼠,随后将大鼠置于温度(23.0±2.0)℃,相对湿度(50.0±2.0)%中适应性喂养 3 d,实验前 1 d 早上 08:00、下午 14:00、晚上 20:00 三次测量大鼠肛温,实验日晨 08:00 再次测量大鼠肛温,每次测量前用凡士林润滑肛温计,插入大鼠直肠约 3 cm,2~3 min 后待读数稳定后读取并记录,最后计算四次的平均值,作为基础体温。

1.3.2 大鼠致热

纳入实验当天体温及基础体温在 36.8℃~38.3℃,体重在 180~220 g 的大鼠,排除单次体温>38.3℃,或者相邻两次体温差值>0.8℃的大鼠。实验前 6 h 禁食不禁水,测定肛温前让大鼠自然排空粪便并称重。用固定器将符合标准的大鼠固定,在其背部皮下注射 20%干酵母混悬液 10 mL/kg 体质量。观察体温变化,与基础体温相比较,若干酵母注射后 6~7 h 体温升高≥0.8℃,则认为大鼠致热成功[3]。体温升高<0.8℃的大鼠,予以剔除;

1.3.3 不同寒颤程度大鼠模型的建立

随机分组:筛选符合致热成功的大鼠 40 只。根据简单随机化分组的方法将大鼠随机分配到对照组(不进行降温处理组);10 mL 冰袋组(使用一个 3.2 cm×4.0 cm 冰袋对大鼠进行颈部降温处理);20 mL 冰袋组(使用两个 3.2 cm×4.0 cm 冰袋对大鼠双侧腋下降温处理组);40 mL 冰袋组(使用两个 4.0 cm×6.0 cm 冰袋对大鼠双侧腋下降温处理组);每组各 10 只大鼠。

麻醉大鼠:用 2%戊巴比妥钠按 40 mg/kg 剂量对高热大鼠进行腹腔注射。

降温处理:当麻醉致大鼠翻背反射消失时,取俯卧位,针对各组高热状态的大鼠相对应地采取冰袋降温措施,降温时间为 30 min。

寒颤观察:记录降温过程中大鼠发生寒颤的情况,包括寒颤开始的时间、发生寒颤时体温阈值、寒颤发生部位、寒颤表现、寒颤结束时间等。

1.4　统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件录入数据和分析,采用描述性统计方法对一般资料进行描述,符合正态分布的数据使用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析进行多个样本均数比较。以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2　实验结果

2.1　一般资料

四组大鼠体重、基础体温、致热体温差异无显著性($P > 0.05$)。(见表 1)

2.2　寒颤观察

本研究中对照组和 10 mL 冰袋组大鼠均未发生寒颤,10 mL 冰袋组大鼠降温处理 30 min 内均未发生寒颤,即躯体任一部位均未发生颤抖;20 mL 冰袋组和 40 mL 冰袋组的大鼠均发生寒颤。其中 20 mL 冰袋组大鼠平均降温 10.4 min 时 10 只大鼠均出现竖毛、头、颈部颤抖,伴或不伴上肢颤抖,平均为降温处理结束后 11.7 min 寒颤停止;40 mL 冰袋组的大鼠平均降温 7.78 min 10 只大鼠均出现竖毛、头、颈部和上肢颤抖,平均降温 17.33 min 9 只大鼠均出现四肢及躯干颤抖,伴或不伴翘尾巴,平均为降温处理结束后 13.33 min 寒颤停止。大鼠发生寒颤有一个过程,一般先出现竖毛,从头、颈部颤抖开始、头部可触到震颤波,然后上肢颤抖,接着下肢、躯干颤抖,寒颤剧烈时还会出现翘尾巴及机体对抗冷刺激出现躯体侧翻的表现。但寒颤发生的次数以及每次寒颤持续的时间存在较大的变化,无法进行准确的监测。

2.3　不同寒颤程度大鼠模型

根据高热大鼠降温处理过程中寒颤表现可建立出理想的不同程度寒颤模型。其中 40 mL 冰袋组有 1 只大鼠与其余 9 只大鼠表现差异大,降温过程中仅出现竖毛、头、颈部及上肢颤抖,未出现四肢及躯体的颤抖,因此将其剔除后构建出不同程度寒颤大鼠模型。(见表 2)

2.4　寒颤阈值

根据构建出的不同寒颤程度大鼠模型及实验中的监测,发生轻度寒颤的平均肛温阈值为 37.25℃;发生重度寒颤的平均肛温阈值为 37.07℃。

表 1　大鼠基础状况($n = 10$)
Tab.1　Basic conditions of the rats

组别 Groups	体重/g Body weight	基础体温/℃ Basal body temperature	致热体温/℃ Heating temperature
对照组 Control group	215.50 ± 16.70	37.31 ± 0.36	39.07 ± 0.25
10 mL 冰袋组 10 mL ice pack group	213.50 ± 21.05	37.44 ± 0.30	38.95 ± 0.42
20 mL 冰袋组 20 mL ice pack group	212.10 ± 18.50	37.43 ± 0.29	38.91 ± 0.37
40 mL 冰袋组 40 mL ice pack group	214.50 ± 18.18	37.47 ± 0.32	39.02 ± 0.43
F	0.582	0.406	1.265
P	0.630	0.708	0.301

表 2　不同程度寒颤大鼠模型
Tab.2　Rat models with different degrees of shivering

模型 Models	表现 Manifestations
无寒颤 No shivering	降温 30 min 内身体任一部位均未发生颤抖 No tremble in any part of the body during therapeutic hypothermia within 30 minutes
轻度寒颤 Mild shivering	降温 30 min 内头、颈部颤抖,伴或不伴上肢颤抖 Head and neck tremble, with or without upper limbs tremble during therapeutic hypothermia within 30 minutes
重度寒颤 Severe shivering	降温 30 min 内头、颈部、四肢及躯干均发生颤抖,伴或不伴翘尾巴 Head, neck, limbs and trunk tremble, with or without tail up during therapeutic hypothermia within 30 minutes

3 讨论

3.1 高热大鼠对于冷刺激的耐受能力有限

对于高热机体,冰袋降温通过传导散热可达到较好的降温效果,降温处理会引起皮肤和内脏器官血管收缩,可降低新陈代谢,洪利芬等[4]研究表明降温可减少脑耗氧量。然而,低温治疗容易引起寒颤[5,6]。本研究中,冰袋降温对于高热大鼠来说是一个刺激,不同个体对冷刺激的适应水平不同。当寒冷刺激达到一定程度时,中心体温低于体温调定点,冷敏神经元受到刺激并使得产热装置兴奋,引起血管收缩和寒颤发生。

Otte等[7]研究表明,由于皮下脂肪厚度的差异,降温部位不同会影响到降温效果。浅层皮肤因冷觉感受器较温觉感受器多,对冷刺激也较敏感,因此,实验过程中选用大鼠皮肤较薄的颈部及腋下为冰袋降温部位。本研究中对照组和使用10 mL冰袋降温处理30 min组大鼠躯体任一部位均未发生寒颤表现,与吴冠虹等[8]的研究结果相一致:使用10 mL冰袋为高热大鼠降温合理,是其可以耐受的范围,不会引起寒颤发生。使用20ml冰袋即超出了大鼠的耐受范围,本研究中20 mL冰袋降温30 min组大鼠均发生了轻度寒颤,表现为头、颈部颤抖,伴或不伴上肢颤抖,轻度寒颤发生率为100%;40 mL冰袋降温30 min组大鼠发生重度寒颤,表现为头、颈部、四肢及躯干均颤抖,伴或不伴翘尾巴,重度寒颤发生率为90%。

3.2 大鼠寒颤程度与冰袋含量呈现正相关

国外学者[1]研究表明物理降温时降温期易发生寒颤,发生寒颤可使机体的耗氧量增加100%~300%,并且肌束颤动会引起机体极大的不适。近年来,在为患者进行物理降温的过程中,临床工作者也越来越关注到寒颤对机体的危害。Logan等[9]提出应对寒颤患者进行有效管理,但临床工作中可变因素较多,比较难以监测到患者发生不同程度寒颤时的状况,因此,本研究通过对高热大鼠降温处理时冰袋大小的控制,监测大鼠寒颤状况,构建出不同程度寒颤动物模型。结果表明,大鼠寒颤程度与冰袋含量呈现正相关,使用冰袋量越大,大鼠发生寒颤的可能性就越大,且程度越深,即出现震颤的部位越多,震颤的幅度越大。此外,大鼠发生重度寒颤的体温阈值稍低于发生轻度寒颤的体温阈值,这与重度寒颤大鼠在相同时间内使用较大量的冰袋有关。

3.3 不同程度寒颤大鼠模型划分依据

本研究通过使用不同含量冰袋对高热大鼠进行降温,根据降温处理过程中大鼠的表现,并结合床边寒颤评估表[2]构建出较理想的不同程度寒颤大鼠模型。由于个体差异,将40 mL冰袋组中与其余9只大鼠表现差异大的1只大鼠剔除后构建出无寒颤、轻度寒颤、重度寒颤大鼠模型,具体见表2。大鼠发生寒颤表现为头、颈部、四肢、躯干等部位的颤抖,尾部肌张力增强。寒颤程度不同,发生颤抖的部位有所差异。通常发生四肢颤抖时,躯体颤抖也会发生,比较难以区分,因此本研究没有构建中度寒颤模型。通过本研究构建出不同程度寒颤动物模型,旨在能够为研究降温处理过程中寒颤的发生对机体的影响提供一定依据,但本研究存在样本量较少,冰袋含量划分不够细等不足之处,有待进一步开展更为细致的研究。

参考文献:

[1] Kupchik NL. Development and implementation of a therapeutic hypothermia protocol [J]. Crit Care Med, 2009, 37(7):279-284.

[2] Badjatia N, Strongilis E, Gordon E, et al. Metabolic impact of shivering during therapeutic temperature modulation: the bedside shivering assessment scale[J]. Stroke, 2008, 39(12):3242-3247.

[3] 左泽平,王志斌,郭玉东,等. 常用大鼠发热模型研究[J]. 中国比较医学杂志,2012,22(2):52-57.

[4] 洪利芬,吴育平,李芳芹. 手足口病高热患儿采用不同降温方法疗效比较[J]. 实用医学杂志,2011,27(5):896-897.

[5] 方文华,刘运生,姜交德. 一种硬膜外局部低温方法的降温效能和安全性研究[J]. 中国比较医学杂志,2009,19(3):35-38.

[6] Jordan JD, Carhuapoma JR. Hypothermia: comparing technology[J]. J Neurol Sci,2007,261(1-2):35-38.

[7] Otte JW, Merrick MA, Ingersoll CD, et al. Subcutaneous adipose tissue thickness alters cooling time during cryotherapy[J]. Arch Phys Med Rehabil,2002,83(11):1501-1505.

[8] 吴冠虹,郑翠红,邓元荣,等. 冰袋用冷时间对干酵母致热大鼠体温影响的实验研究[J]. 护理学杂志,2016,31(14):51-54.

[9] Logan A, Sangkachand P, Funk M. Optimal management of shivering during therapeutic hypothermia after cardiac arrest[J]. Crit Care Nurse,2011,31(6):18-30.

〔收稿日期〕2017-02-17

研究报告

钒暴露对大鼠小胶质细胞炎症反应和迁移的影响

余晓巍,胡楚元,熊志军

(湖南省职业病防治院,长沙　410003)

【摘要】 **目的**　观察偏钒酸钠($NaVO_3 \cdot 2H_2O$)暴露对小胶质细胞炎症反应和迁移的影响,探讨钒神经毒性的相关机制。**方法**　偏钒酸钠孵育原代培养的 SD 大鼠小胶质细胞,免疫荧光技术显示小胶质细胞形态的变化及其特异性标志物 Iba1 的表达,免疫印迹技术检测 iNOS、COX-2、ERK 和 p-ERK 蛋白表达,酶联免疫吸附实验检测炎症因子 TNF-α,IL-1β 的释放水平;构建划痕迁移模型,免疫荧光技术记录偏钒酸钠对小胶质细胞迁移的影响。**结果**　偏钒酸钠孵育小胶质细胞后,神经小胶质细胞形态由静息态的分支状向吞噬细胞样形态转变,其特异性标志物 Iba1 表达显著增加;iNOS 和 COX-2 的蛋白表达和 TNF-α,IL-1β 释放水平与对照组相比较均显著升高;偏钒酸钠促进小胶质细胞的迁移。**结论**　偏钒酸钠显著促进了小胶质细胞的炎症反应和迁移。

【关键词】 偏钒酸钠;小胶质细胞;炎性反应;迁移

【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0055-05

doi: 10.3969. j. issn. 1671 -7856. 2017. 10. 011

Exposure to vanadium promotes primary cultured rat microglial inflammation and migration

YU Xiao-wei, HU Chu-yuan, XIONG Zhi-jun

(Hunan Prevention and Treatment Institute for Occupational Diseases, Changsha 410003, China)

【**Abstract**】 **Objective**　To observe the changes of rat microglial inflammation and migration after exposure to sodium metavanadate ($NaVO_3 \cdot 2H_2O$), and to analyze the possible mechanisms of vanadium neurotoxicity. **Methods** Primary cultured rat microglial cells were incubated with $NaVO_3 \cdot 2H_2O$. Morphological changes and the Iba1 expression of microglia were tested by immunofluorescence assay. iNOS, Cox-2, ERK and p-ERK protein expressions were determined by western blotting. The levels of TNF-α and IL-1β in the culture medium were tested by enzyme-linked immunosorbent assay. The migration of microglia was tested by immunofluorescence staining using wound-healing assay. **Results** Microglia changed from resting state with ramous shape to round shape in activated state after $NaVO_3 \cdot 2H_2O$ exposure, and the expression of Iba1 increased obviously. The protein expressions of iNOS and COX-2 increased significantly compared with the control. The levels of TNF-α and IL-1β were also increased significantly. $NaVO_3 \cdot 2H_2O$ promotes the migration of microglia through ERK pathway. **Conclusions**　Exposure to $NaVO_3 \cdot 2H_2O$ promotes primary cultured rat microglial inflammation and migration. These results suggest that the inflammatory reaction of microglia may be one of the possible mechanisms of neurotoxicity caused by vanadium exposure.

【**Key words**】 Sodium metavanadate; Microglia; Inflammatory reaction; Migration

---

[基金项目]湖南省卫生与计划生育委员会科研基金(B2015 - 318)。

[作者简介]余晓巍(1984 -),男,医学博士,主管药师,研究方向:毒理学研究。E-mail: yuxw0714@ 163. com

钒是地球上广泛分布的微量元素。钒的大量开发与应用引发的环境问题日益严重,生产过程中产生的废气成为大气中钒的重要来源[1,2],厂区及附近的土壤、水源大都受到污染,尤以钒、锰、铜、铅为主[3,4],存在严重职业危害与环境污染。国内外研究显示,钒具有神经毒性[5],有研究发现钒甚至可以直接进入中枢神经系统,导致明显的神经毒性[6]。小胶质细胞是中枢免疫细胞,在正常生理状态下处"静息"状态,它们通过持续监控微环境的变化维持内环境的稳态[7]。而当中枢神经系统受损时,小胶质细胞被迅速"激活"并对外界刺激做出反应,如迁移、增殖、形态改变(从分枝状转变为阿米巴状)、释放免疫因子和炎性介质,并参与细胞碎片吞噬[8,9],这些作用对神经元的损伤和修复具有双重影响[10,11]。因此本研究拟通过观察钒暴露对原代培养大鼠小胶质细胞炎性反应和迁移的影响,探讨钒神经毒性的相关机制,以期为钒暴露导致的神经元损伤提供应对策略。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雌性SD乳鼠(出生24 h内),体重6.5~9.0 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2016-0002],在湖南省职业病防治院毒理学实验室[SYXK(湘)2014-0003]进行实验。经实验动物使用与管理委员会(IACUC)批准[湘职防(2014)伦研批第006号]。

1.2 主要试剂

偏钒酸钠($NaVO_3 \cdot 2H_2O$):分析纯,购自天津市光复精细化工研究所;iNOS和COX-2抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology公司,OX-42、Iba1、Hoechst 33258、ERK和p-ERK购自英国Abcam公司;荧光标记二抗、FITC和罗丹明购自美国Thermo Fisher公司;DMEM培养基和胰蛋白酶购自美国Hylone公司;ELISA试剂盒(TNF-α、IL-1β)购自北京中杉金桥公司。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠皮层原代小胶质细胞的制备

将新生SD乳鼠在无菌条件下断头、开颅取脑后,置于冷PBS溶液中。分离大脑皮层、剪碎,0.125%的胰酶溶液于37℃消化20 min,2层纱布过滤后接种于多聚赖氨酸预先包被的75 mL培养瓶中,置于37℃,5% CO_2培养箱中培养24 h后全量换液。之后每3 d换液一次,第14天将培养瓶旋紧密封,固定于37℃恒温水平摇床内,以220 r/min振荡3 h,收集脱落细胞悬液,接种于培养皿中,贴壁1 h后去除未贴壁细胞,加入含10%胎牛血清的DMEM继续培养。

1.3.2 小胶质细胞的鉴定

细胞爬片后,按免疫荧光法,用OX-42抗体标记细胞,荧光显微镜下观察。

1.3.3 免疫荧光检测小胶质细胞形态学的变化

细胞爬片后,25 μmol/L的偏钒酸钠孵育小胶质细胞12 h,用4%的多聚甲醛固定30 min,PBS浸洗3次,每次10 min,0.3% Triton X-100室温处理30 min后,加3% BSA室温封闭30 min;加入Iba1抗体(1∶200),4℃过夜;次日,PBS浸洗3次,每次10 min,加FITC标记荧光二抗或罗丹明,室温孵育1 h;PBS浸洗3次,每次10 min,甘油封片后,置于奥林巴斯FV1000荧光显微镜下观察、拍照。采用奥林巴斯FV10-ASW显微摄影图像分析系统摄取免疫荧光图像,随机测定5个视野细胞荧光强度,实验均重复5次($n=5$)。

1.3.4 划痕迁移实验

在24孔板中按照5×10^5/孔进行细胞爬片后,用1 mL吸管尖端在玻片上进行划痕,用DMEM培养基浸洗3次后,25 μM的偏钒酸钠孵育小胶质细胞12 h,按免疫荧光法,用OX-42抗体标记细胞,置于奥林巴斯FV1000荧光显微镜下观察、拍照,并计算进入划痕区域的细胞数量。每次随机选取5个视野,取平均值作为1个样本。每次实验均重复5次;按免疫印迹法,检测ERK和p-ERK蛋白表达,每次实验均重复3次($n=3$)。

1.3.5 免疫印迹实验检测iNOS、COX-2蛋白表达

将小胶质细胞接种于6孔培养板,培养24 h,加入25 μM的偏钒酸钠处理,分别于6、12和24 h后,经胰酶消化收集细胞,提取总蛋白。根据BCA蛋白定量试剂盒的说明蛋白定量后,进行10% SDS-PAGE电泳,然后100 mA 3.5 h电转至PVDF膜上,用浓度为5%的脱脂奶粉封闭1 h后,用PBST洗膜3次,每次10 min;将PVDF膜放入稀释好的iNOS抗体(1∶1000)、COX-2抗体(1∶500)中,4℃过夜;次日用PBST洗膜3次,每次10 min,将PVDF膜放入辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶5000稀释)中,室温孵育2 h;PBST洗膜3次,每次20 min;加ECL发光剂孵育,在3~15 min内显影、定影,分析。每次实验均重复3次($n=3$)。

1.3.6　酶联免疫吸附试验

将小胶质细胞接种于 6 孔培养板，培养 24 h，加入 25 μM 的偏钒酸钠处理，分别于 6、12 和 24 h 后收集细胞培养液，根据 ELISA 试剂盒说明书的相关步骤检测细胞培养液中炎性因子 TNF-α、IL-1β 含量的变化。

1.4　统计学方法

采用 SigmaPlot 10.0 进行作图，采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。结果以平均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，两组间比较采用 t 检验，以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2　结果

2.1　原代小胶质细胞的鉴定

小胶质细胞所占总体细胞比例达到 99% 以上，表明 SD 大鼠皮层原代小胶质细胞分离纯化成功（图 1）。

2.2　偏钒酸钠暴露对小胶质细胞形态的影响

未经处理的小胶质细胞形态呈现为细长分枝状，25 μM 的偏钒酸钠孵育小胶质细胞 12 h 后，小胶质细胞形态由细长分枝状转变为阿米巴状，表现为突起回缩和形态变圆 25 μM 的偏钒酸钠孵育小胶质细胞 12 h，Iba1 的相对荧光强度与对照组比较显著增加，差异有显著性（$P < 0.01$），表明小胶质细胞被显著激活（图 1）。

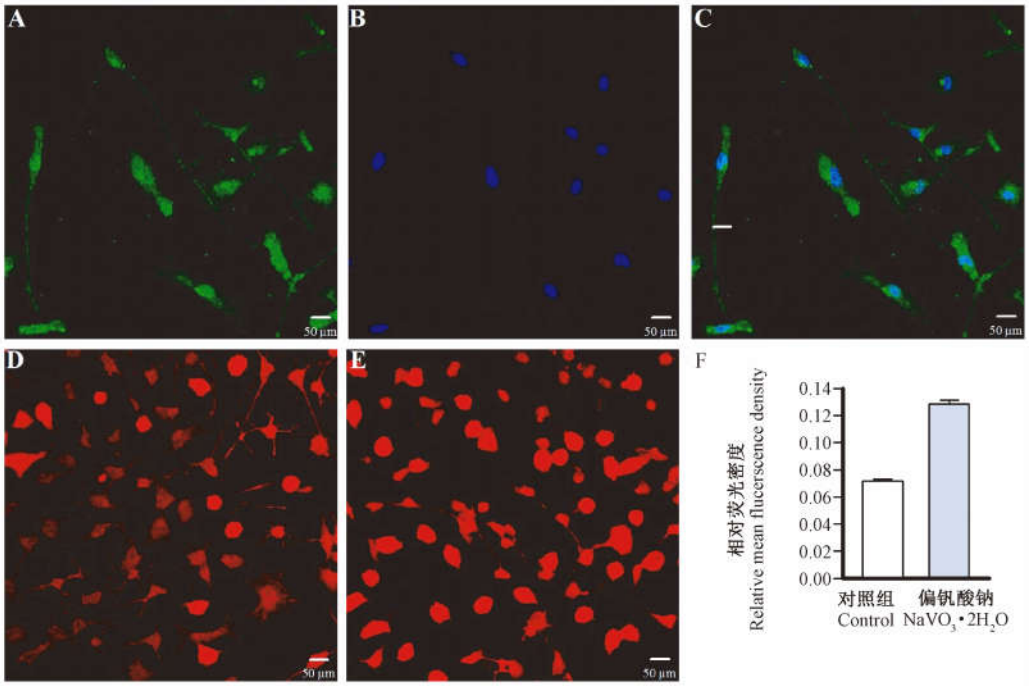
2.3　偏钒酸钠暴露对小胶质细胞迁移的影响

与对照组比较，25 μM 的偏钒酸钠处理小胶质细胞 12 h 显著上调了 ERK 磷酸化水平，并增强了小胶质细胞的迁移能力，差异有显著性（$P < 0.01$）（图 2）。

2.4　偏钒酸钠暴露对小胶质细胞释放炎症因子的影响

小胶质细胞在静息状态时几乎不表达 iNOS 和 COX-2，25 μM 偏钒酸钠处理的小胶质细胞炎症因子 iNOS 和 COX-2 的蛋白表达水平随时间的延长增加（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）（图 3）。

小胶质细胞在静息状态时分泌少量 TNF-α 和 IL-1β，在被偏钒酸钠激活后，小胶质细胞大量分泌 TNF-α 和 IL-1β，且随时间的延长显著增加，与对照组比较，差异有显著性（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）（表 1）。

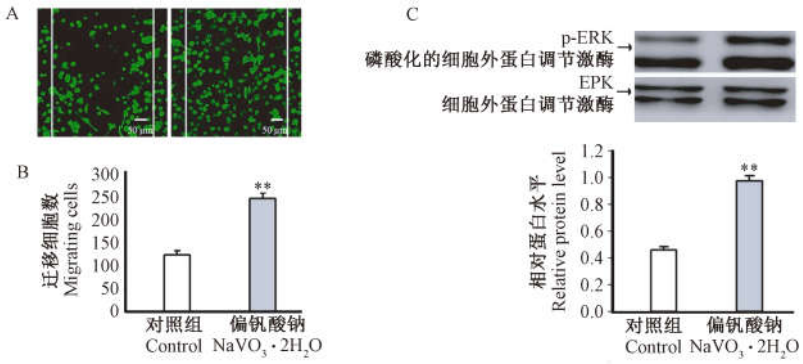


注：（A）OX-42 标记的小胶质细胞；（B）Hoechst 33258 标记的细胞核；（C）A + B 组合；（D）小胶质细胞对照组；（E）偏钒酸钠处理组（25 μmol/L）；与对照组比较，$^{**}P < 0.01$。

图 1　小胶质细胞鉴定以及偏钒酸钠对小胶质细胞形态学的影响

Note. (A) Microglia labeled with OX-42; (B) Cell nuclei labeled with Hoechst 33258; (C) Merged A and B; (D) Control group; (E) $NaVO_3 \cdot 2H_2O$ exposure group (25 μmol/L); Compared with the control group, $^{**}P < 0.01$.

Fig. 1　Microglia identification and the effect of $NaVO_3 \cdot 2H_2O$ on the morphology of microglia

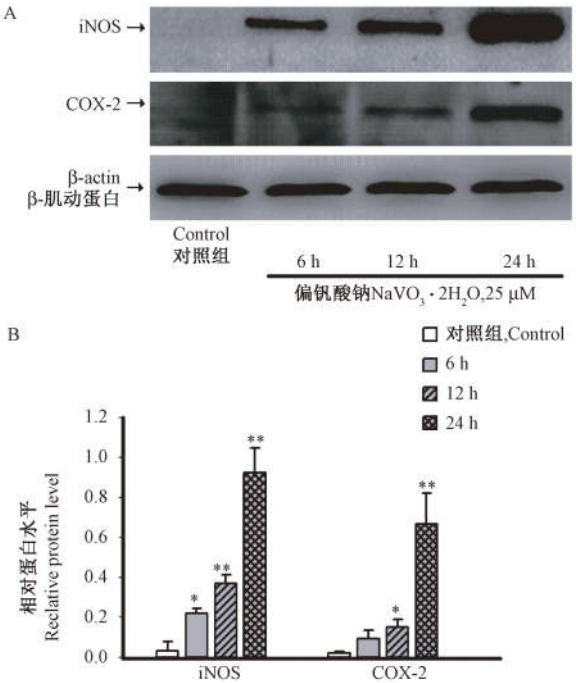


注:(A)免疫荧光检测小胶质细胞迁移情况;(B)小胶质细胞迁移数目统计分析;(C)免疫印迹实验检测p-ERK蛋白表达情况;与对照组比较,$^{**}P < 0.01$。

图2 偏钒酸钠对小胶质细胞迁移以及ERK磷酸化水平的影响

Note: (A) Representative photomicrographs of the migrating cells before and after treatment with a $NaVO_3 \cdot 2H_2O$ (25 μM); (B) Statistical analysis of the number of microglia migration; (C) The expression of p-ERK determined by Western blotting analysis; Compared with the control group, $^{**}P < 0.01$.

Fig. 2 Effect of $NaVO_3 \cdot 2H_2O$ on microglial migration and the expression of p-ERK



注:(A)免疫印迹实验检测小胶质细胞iNOS和COX-2蛋白表达;(B)灰度值统计分析;与对照组比较,$^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$。

图3 各组间小胶质细胞iNOS和COX-2的蛋白表达情况

Note: (A) The expression of iNOS and COX-2 by Western blotting analysis; (B) Statistical analysis of the gray value; Compared with control grouo, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

Fig. 3 The expression of iNOS and COX-2 in different groups

表1 比较各组小胶质细胞上清液中TNF-α、IL-1β含量的变化($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

Tab. 1 Comparison of TNF-α and IL-1β levels in the supernatant of microglial cultures in different groups

分组 Groups	TNF-α	IL-1β
对照组 Control group	44.49 ± 10.73	49.63 ± 14.58
偏钒酸钠6 h处理组 $NaVO_3 \cdot 2H_2O$ for 6 h	95.49 ± 10.73*	83.63 ± 14.58*
偏钒酸钠12 h处理组 $NaVO_3 \cdot 2H_2O$ for 12 h	159.49 ± 10.73**	257.63 ± 14.58**
偏钒酸钠24 h处理组 $NaVO_3 \cdot 2H_2O$ for 24 h	245.74 ± 6.69**	279.63 ± 14.58**

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

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

3 讨论

钒的毒性研究较多地集中在致畸,致癌,致突变作用方面。相比之下,对钒的神经毒性研究开展得相对有限和缺乏。越来越多的研究表明,钒具有神经毒性效应[12,13],钒甚至可以直接进入中枢神经系统,导致明显的神经毒性,例如神经衰弱、不安、震颤、狂躁症、抑郁症等[6]。近来,研究还发现受到钒刺激的少突胶质细胞和星形胶质细胞会产生大量的ROS而受损[14],少突胶质细胞是神经元髓鞘的重要组成部分,星形胶质细胞对于神经元发挥生理功能也是不可或缺。小胶质细胞是中枢神经系统内的固有免疫细胞,它在神经元的生存和整个生命活动中起着十分重要的作用[7]。而关于钒对小胶质细胞的相关作用目前尚未见任何报道。

迁移是小胶质细胞应对炎症刺激的一个重要的功能,ERK磷酸化在小胶质细胞的迁移中发挥关键性的调节作用[15]。本研究发现,偏钒酸钠诱导的小胶质细

胞形态发生明显改变,细胞突起长度缩短、变圆,伴随着迁移能力的增强,其特异性标志物 Iba1 蛋白表达也明显增加。而 Iba1 蛋白属 EF 手性蛋白,是小胶质细胞和巨噬细胞的特异性表面标记物,因脑组织巨噬细胞含量极少,检测 Iba1 可视为特异性检测小胶质细胞。随着小胶质细胞的激活,Iba1 的表达显著增加。这些指标表明偏钒酸钠诱导小胶质细胞活化,而激活的小胶质细胞是介导中枢炎症反应主要的细胞。小胶质细胞介导的神经炎症是一把双刃剑:精密调控下的神经炎症反应启动后可以发挥吞噬和修复的作用,最终恢复组织内环境的平衡[16,17];而过度的炎症反应使得小胶质细胞上调多种细胞表面受体,释放多种细胞因子,如炎症因子 TNF-α、IL-1β、NO 和活性氧类物质等,这些炎症介质不但对神经元产生毒性,还通过级联放大效应使得小胶质细胞产生更多的毒性因子,从而加剧神经毒性作用。而本研究发现,在偏钒酸钠作用下,小胶质细胞表达大量的炎性因子如 iNOS、COX-2、TNF-α 和 IL-1β,并随着作用时间的延长而显著增加。

中枢神经系统中,iNOS 主要存在于小胶质细胞和星形胶质细胞,过度激活的小胶质细胞生成大量的 iNOS,进而导致高浓度的 NO 的生成,高浓度的 NO 能够抑制线粒体呼吸功能和糖酵解、抑制 DNA 合成、损害 DNA 结构、与超氧阴离子自由基反应生成过氧亚硝基,产生神经毒性作用[18]。COX-2 为诱导型酶,正常生理状态下不表达,在受到炎症刺激时诱发性的高表达。COX-2 除了本身具有一定的促炎作用之外,与 iNOS 之间存在“交互感应”。COX-2 是 NO 合成的上游关键酶分子,而在炎性状态下,NO 能够通过 NO/cGMP 通路上调 COX-2 的表达。TNF-α 是小胶质细胞炎症反应释放的主要的炎性细胞因子,在神经毒性中发挥重要作用。已有研究表明,TNF-α 可激活小胶质细胞上的 TNF-α 受体从而启动级联反应,导致其它促炎因子如 iNOS、COX-2 等的合成,最终导致神经元的损伤、变性甚至死亡[19]。此外 TNF-α 可促进星形胶质细胞产生趋化因子和黏附分子,促进炎症因子如 IL-1β、IL-6 的产生,导致炎症的恶性循环[20]。IL-1β 是中枢炎症级联反应中的关键因子,其不仅可以通过 NF-κB 途径进一步促进小胶质细胞的激活,还具有自分泌作用,进而通过炎症因子的级联放大反应,加重炎症损伤,促进神经毒性作用。这些炎性因子存在着一定程度的相互作用机制,共同促进炎症的发展。本研究显示小胶质细胞能够被偏钒酸钠激活,表达及高分泌 iNOS、COX-2、TNF-α 和 IL-1β。

综上所述,钒暴露可在体外激活原代培养的小胶质细胞,导致炎症因子的大量表达,并显著促进小胶质细胞的迁移,为进一步深入研究偏钒酸钠的神经毒性机制奠定基础。

参考文献:

[1] 钟敏. 攀枝花地区钒的环境效应[J]. 广州化工, 2012, 40(2):24-25,46.

[2] 王秋霞, 马化龙. 我国钒资源和 V_2O_5 研究、生产的现状及前景[J]. 矿产保护与利用, 2009, (5):47-50.

[3] Nadal M, Schuhmacher M, Domingo JL. Metal pollution of soils and vegetation in an area with petrochemical industry[J]. Sci Total Environ, 2004, 321(1-3):59-69.

[4] Liu Y, Woodin MA, Smith TJ, et al. Exposure to fuel-oil ash and welding emissions during the overhaul of an oil-fired boiler[J]. J Occup Environ Hyg, 2005, 2(9):435-443.

[5] 崔鹏, 张勤, 兰亚佳. 钒及其化合物的神经行为毒性研究进展[J]. 毒理学杂志, 2013, 27(01): 64-67.

[6] Maciejczyk P, Chen LC. Effects of subchronic exposures to concentrated ambient particles (CAPs) in mice. VIII. Source-related daily variations in in vitro responses to CAPs[J]. Inhal Toxicol, 2005, 17(4-5):243-253.

[7] Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo[J]. Science, 2005, 308(5726):1314-1318.

[8] Prinz M, Mildner A. Microglia in the CNS: immigrants from another world[J]. Glia, 2011, 59(2): 177-187.

[9] Graeber MB. Changing face of microglia[J]. Science, 2010, 330(6005):783-788.

[10] Orre M, Kamphuis W, Osborn LM, et al. Isolation of glia from Alzheimer´s mice reveals inflammation and dysfunction[J]. Neurobiol Aging, 2014, 35(12): 2746-2760.

[11] Prokop S, Miller KR, Heppner FL. Microglia actions in Alzheimer's disease[J]. Acta Neuropathol, 2013, 126(4):461-477.

[12] Luo J, Sun Y, Lin H, et al. Activation of JNK by vanadate induces a Fas-associated death domain (FADD)-dependent death of cerebellar granule progenitors in vitro[J]. J Biol Chem, 2003, 278(7): 4542-4551.

[13] Afeseh Ngwa H, Kanthasamy A, Anantharam V, et al. Vanadium induces dopaminergic neurotoxicity via protein kinase Cdelta dependent oxidative signaling mechanisms: relevance to etiopathogenesis of Parkinson's disease[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 240(2):273-285.

[14] Todorich B, Olopade JO, Surguladze N, et al. The mechanism of vanadium-mediated developmental hypomyelination is related to destruction of oligodendrocyte progenitors through a relationship with ferritin and iron[J]. Neurotox Res, 2011, 19(3):361-373.

[15] Cudaback E, Li X, Montine KS, et al. Apolipoprotein E isoform-dependent microglia migration[J]. FASEB J, 2011, 25(6):2082-2091.

[16] Glass CK, Saijo K, Winner B, et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration[J]. Cell, 2010, 140(6):918-934.

[17] Innamorato NG, Lastres-Becker I, Cuadrado A. Role of microglial redox balance in modulation of neuroinflammation[J]. Curr Opin Neurol, 2009, 22(3):308-314.

[18] Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation[J]. Nat Med, 2011, 17(7):796-808.

[19] Harms AS, Barnum CJ, Ruhn KA, et al. Delayed dominant-negative TNF gene therapy halts progressive loss of nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease[J]. Mol Ther, 2011, 19(1):46-52.

[20] Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J. Functions of microglia in the central nervous system—beyond the immune response[J]. Neuron Glia Biol, 2011, 7(1):47-53.

〔收稿日期〕2017-02-18

研究报告

小鼠 CD4$^+$ T 细胞外泌体分离及鉴定

张伟鑫,曾　仲*

(昆明医科大学第一附属医院器官移植中心,昆明　650000)

【摘要】 **目的**　探讨 CD4$^+$T 细胞是否具有分泌外泌体的能力,以及 CD4$^+$T 细胞外泌体参与炎症及肿瘤免疫过程的可能。**方法**　应用断颈处死的方法取出小鼠的脾脏,用磁珠分选的方法从小鼠脾脏细胞中分选出 CD4$^+$T 细胞,并尝试从培养基上清液中提取 CD4$^+$T 细胞的外泌体,在透射电镜下观察,后用 PCR 技术分析 miR-23a、miR-214 的表达情况。**结果**　在透射电镜下能够观察到提取出的 CD4$^+$T 细胞外泌体,且用 PCR 技术能检测到小鼠 CD4$^+$T 细胞外泌体中 miR-23a、miR-214 这两个炎症及肿瘤相关的 miRNA 的表达。**结论**　小鼠 CD4$^+$T 细胞有分泌外泌体的能力,且为 CD4$^+$T 细胞外泌体参与炎症及肿瘤相关过程提供了可能。

【关键词】 CD4$^+$T 细胞;外泌体;分离;鉴定;miRNA

【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0060-05

doi: 10.3969. j. issn. 1671 -7856. 2017. 10. 012

Isolation and identification of exosomes of CD4$^+$T cells in mice

ZHANG Wei-xin, ZENG Zhong*

(Organ Transplantation Center, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650000, China)

【**Abstract**】 **Objective**　To explore whether CD4$^+$T cells in mice can secrete exosomes and the possibility of exosomes to participate in the inflammation and immune response process. **Methods**　Spleen samples were taken from mice, and CD4$^+$T cells were isolated from the spleen tissue using magnetic bead separation method. Exosomes of CD4$^+$T cells were extracted from the supernatant and observed under transmission electron microscope. PCR assay was used to detect the expression of miR-23a and miR-214. **Results**　Exosomes were observed under elecron microscope, and the expression of miR-23a and miR-214 were detected by PCR assay. **Conclusions**　CD4$^+$T cells in mice can secrete exosomes, which offer possibility to participate in the inflammation and immune response.

【**Key words**】 CD4$^+$T cells; Exosome; Isolation; Identication; MiRNA

外泌体(exosomes)是可由各种细胞脱落释放的大小均一的直径约为 30 ~ 150 nm 的脂质双分子层结构的囊泡,其外面的脂质双分子层膜可保护它内含物不受降解。其囊泡内含有脂质、蛋白质、mRNA、miRNA、siRNA 等多种遗传物质[1]。自 1985 年 Pan 等[2]人首次在成熟哺乳动物的网织红细胞中观察到后,众多学者研究发现几乎所有细胞都可产生外泌体,其广泛存在于血液、尿液、腹水

等体液中[3]。外泌体参与着人体许多重要的生理及病理过程,它在细胞的通讯及迁移、血管新生、炎

症及免疫反应和肿瘤细胞的生长及迁徙浸润等方面有着极为重要的作用[4],因此外泌体的研究引起了众多的关注。本文就小鼠 CD4$^+$T 细胞是否

[基金项目]云南省卫生科技计划基金资助项目(2014NS155)。

[作者简介]张伟鑫(1990 -),男,硕士研究生,主要从事肝胆外科疾病的临床研究。E-mail: 815564969@qq.com

[通讯作者]曾仲(1967 -),男,博士,主任医师,主要从事肝胆外科疾病的临床研究。E-mail: zzong@medmail.com.cn

能够分泌外泌体进行验证从而探寻 CD4$^+$T 细胞外泌体参与炎症及肿瘤相关过程提供可能。

1　材料和方法

1.1　实验动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠,体重 20 ~22 g,6 ~8 周龄,购自昆明医学院(实验动物中心)[SCXK(滇)2015 -0008],小鼠的组织取材于中国科学院昆明动物研究所动物实验设施内进行[SYXK(滇)2013 -0004]。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2　主要试剂

小鼠淋巴细胞分离液(达科为公司)免疫磁珠分选仪(Miltenyi Biotec 公司);流式细胞仪(BD Biosciences 公司);小鼠 CD4$^+$T 细胞磁珠分选试剂盒(Miltenyi Biotec 公司);培养细胞 Exosome 提取试剂盒(唯辉公司);Exosome 透射电镜分析试剂盒(唯辉公司);RPMI1640 培养液和青霉素、链霉素双抗(Hyclone 公司);PBS 磷酸盐缓冲液(Hyclone 公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　小鼠脾脏淋巴细胞悬液的制备

将小鼠断颈处死后浸泡于75% 的乙醇中,于超净台取出小鼠脾脏置于细胞筛网(70 μm)中,将细胞筛网置于 60 mm 细胞培养皿中,加入 5 mL 小鼠淋巴细胞分离液,仔细研磨后将悬有脾脏细胞的分离液转移到 15 mL 的离心管中,并小心覆盖上 500 μL 的 RPMI1640 培养基,室温下 2600 r/min 离心 30 min(需设置较慢的加速度和减速度)。后小心吸出中间的淋巴细胞层,加入 10 mL 的 RMPI1640 培养基,颠倒洗涤,于室温下 1600 r/min 离心 10 min,弃去上清液,收集细胞并计数。

1.3.2　CD4$^+$T 细胞悬液的制备

将得到的小鼠脾脏淋巴细胞悬浮于 PBS 磷酸盐缓冲液中并调整细胞浓度为 10^7 个/90 μL。添加美天旎 CD4(L3T4)磁性微珠并混匀 4℃ 放置 15 min,后加入 PBS 磷酸盐缓冲液冲洗并 1600 r/min 离心 10 min,弃去上清液,加入 PBS 磷酸盐缓冲液重新悬浮细胞并调整浓度为 10^8 个/500 μL,将细胞加入已经冲洗好的美天旎 MS 型号分选柱中,待柱内细胞悬液流干后再加入 500 μL PBS 缓冲液冲洗 3 次,取下分选柱,放置在 15 mL 离心管上并加入 1 mL 缓冲液用柱塞冲洗出磁性标记细胞。

1.3.3　CD4$^+$T 细胞纯度检测

取上述经磁珠分选后的细胞于室温下 1600 r/min 离心 10 min 后,弃去上清液,加入 PBS 磷酸盐缓冲液调节细胞浓度为 10^6/mL 吹打混匀,取 80 μL 的细胞悬液,置于 200 μL 的离心管中,加入 FITC anti-mouse CD3e 和 PE anti-mouse CD4 各 10 μL 混匀后室温避光放置 30 min,之后上流式细胞仪进行检测分析。

1.3.4　CD4$^+$T 细胞外泌体的提取

将细胞室温下 1600 r/min 离心 8 min 后弃去上清液,用无血清的 RMPI1640 培养基调整 CD4$^+$T 淋巴细胞浓度为 2×10^7 个/mL,在 24 孔细胞培养板中每孔加入 1 mL 悬浮好的 CD4$^+$T 淋巴细胞,置于细胞培养箱中饥饿处理细胞 48 h 后收集 2 mL 细胞培养基,于 4℃ 下 4200 r/min 离心 10 min 去除细胞和细胞碎片,转移 2 mL 上清液到玻璃管中并加入现配好的 exosome 提取液,涡旋混匀并于 4℃ 中静置 30 min,可见玻璃管中出现明显分层,吸出管中的 exosome 层置于 1.5 mL 微量离心管中 9000 r/min 离心 3 min 后弃去管中上层和底层再将中间的 exosome 层转移到 0.5 mL 微量离心管中 9000 r/min 离心 3 min 后弃去管中上层和底层只留下中间的 exosome 层,将管盖打开晾干 5 min 后加入 80 μL PBS 缓冲液到微量离心管中并用移液枪剧烈吹打后在水平摇床上高速摇动管子 10 min 使 exosome 层再次悬浮,将管子 9000 r/min 离心 5 min,转移上清液到试剂盒提供的过滤柱中,将柱子 4200 r/min 离心 5 min,收集到的液体即为 exosome 悬液。

1.3.5　CD4$^+$T 细胞外泌体的电镜观察

在干净的 Parafilm 膜上滴 10 μL exosome 悬液,取一张 exosome 透射电镜分析试剂盒中提供的 EM 网,将其涂层面朝下贴在 exosome 悬液表面让其在干燥环境中吸收 10 min。用镊子将 EM 网(涂层面朝下)转移到清洗缓冲液中清洗 30 s 后再重复清洗一次。于干净的封口膜上,滴 10 μL 的 EM 溶液,转移 EM 网(涂层面朝下)到 EM 溶液中静置 10 min 后,转移 EM 网到清洗缓冲液中清洗 30 s 后再重复清洗一次。转移 EM 网到滤纸上(涂层面朝上),室温下风干过夜。将 EM 网置于透射电镜下观察。

1.3.6　PCR 技术检测相关的 miRNA 的表达

利用 PCR 技术检测 miR-23a、miR-214 这两个炎症及肿瘤相关的 miRNA 其在小鼠 CD4$^+$T 细胞外泌体中的表达。(见表 1)

表 1 引物列表

Tab. 1 List of primers

引物 Primers	序列 Sequences
mmu-miR-R	ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG
mmu-miR-23a-3p F	CGG CGA TCA CAT TGC CAG GG
mmu-miR-23a-3p RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGAAAT
mmu-miR-23a-5p F	GCA TGG GGT TCC TGG GGA TG
mmu-miR-23a-5p RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAATCC
mmu-miR-214-5p F	CGA TAC GTG CCT GTC TAC ACT TG
mmu-miR-214-5p RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCACAG
mmu-miR-214-3p F	CGG CAC AGC AGG CAC AGA CA
mmu-miR-214-3p RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACTGCC

2 结果

2.1 CD4⁺T 纯度检测

从小鼠脾脏细胞中利用磁珠分选的方法分离获得的 CD4⁺T 细胞纯度为(90.1 ± 5.8)% 可以用于后续实验(见图 1)。

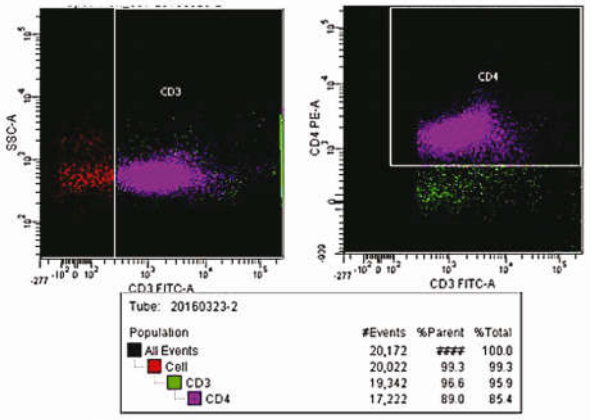


图 1 CD4⁺T 细胞纯度检测结果

Fig. 1 CD4⁺T cells purity test results

2.2 CD4⁺T 细胞外泌体的电镜观察

将 CD4⁺T 细胞经饥饿处理后通过分离与纯化其上清液中的外泌体,在透射电镜下观察到小鼠 CD4⁺T 细胞外泌体呈圆形或椭圆形,其大小不一,直径约在 80 nm 左右,可见有明显的膜性结构,其腔内为低电子密度成分(见图 2)。

2.3 利用 PCR 技术检测特定 miRNA 的表达

利用 PCR 技术能检测到外泌体中 miR-23a、miR-214 这 2 个 miRNA 的表达。在普通 PCR 电泳中在约 100 bp 处,5 个样品都出现条带,由于产物大小和引物二聚体大小比较接近,因此从电泳图上看起来是一条单一的条带(见图 3)。而在 Real Time PCR 中溶解曲线上出现不单一峰,说明除了目标 miRNA 外可能存在其他产物。但是本实验采用的

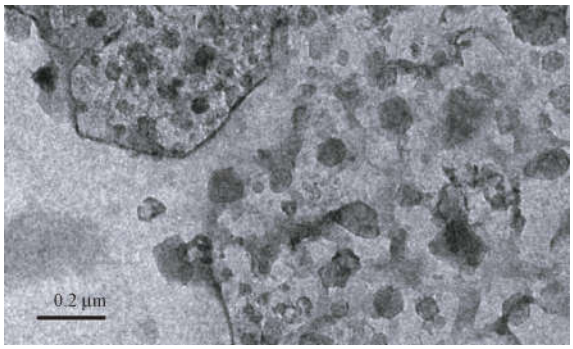
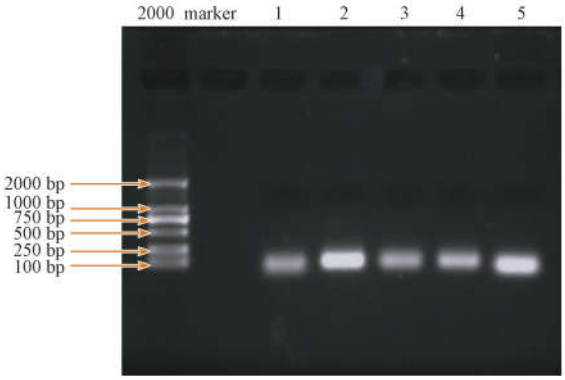


图 2 透射电镜下观察到的 CD4⁺T 细胞外泌体

Fig. 2 CD4⁺T cell exosomes observed under TEM

方法为茎环法,其特异性相对较高。产物不单一,存在的可能引物二聚体,因此,胶图和曲线二者结果基本吻合。(见图 4)



注:(1)为引物 mmu-miR-23-3p-F/mmu-miR-R 组;(2)为引物 mmu-miR-23-5p-F/mmu-miR-R 组;(3)为引物 mmu-miR-214-5p-F/mmu-miR-R 组;(4)为引物 mmu-miR-214-3p-F/mmu-miR-R 组;(5)为内参 U6-F/U6-R 组。

图 3 普通 PCR 结果

Note. (1) Primer mmu-miR-23-3p-F/mmu-miR-R group; (2) Primer mmu-miR-23-5p-F/mmu-miR-R group; (3) Primer mmu-miR-214-5p-F/mmu-miR-R group; (4) Primer mmu-miR-214-3p-F/mmu-miR-R group; (5) Internal reference U6-F/U6-R group.

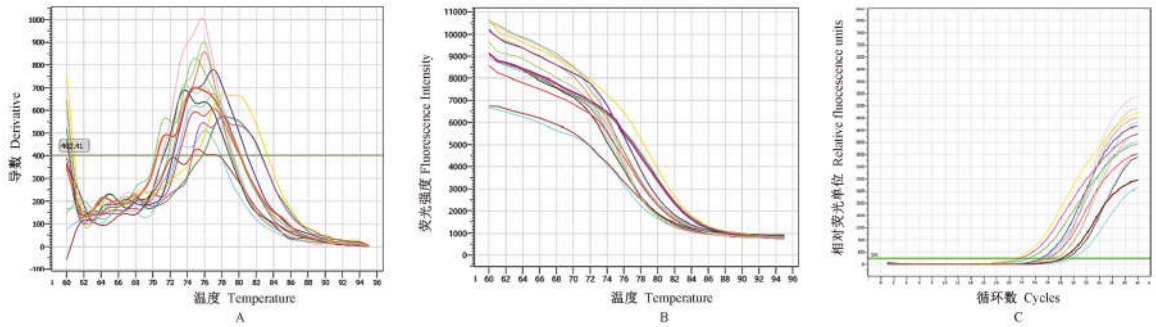
Fig. 3 Ordinary PCR electrophoresis results

3　讨论

外泌体是由细胞内的多泡体与胞浆膜融合然后释放到胞外的一种脂质双分子层结构的囊泡，直径约 30 ~ 150 nm，其广泛存在于各种体液中如血液、尿液、唾液等，其囊泡内含有脂质、蛋白质、mRNA、miRNA、siRNA 等多种遗传物质[5,6]。外泌体被细胞释放入外环境后，可以通过受体介导、直接弥散、内吞作用等方式来进入靶细胞，由于其内含有生物活性脂质、蛋白、核酸等，故其可以向受体细胞传递各种遗传信息进而发挥各种生物学功能，从而影响靶细胞细胞的生长状况，进而介导疾病的发生和发展[7]。这些外泌体所携带的 RNA 被统称为外泌体来源 RNA（exosome shuttle RNA，esRNA）。已经有研究发现 EsRNA 拥有相对稳定的特性，能在一定程度上代表其母细胞的 miRNA 水平。因此，esRNA 拥有作为分子诊断标记和靶向治疗的潜力[8]。在肿瘤相关方面 esRNA 有着诱导肿瘤细胞的侵袭性以及保持肿瘤细胞的致瘤性的能力[9]。

本实验已经证实了小鼠 $CD4^+T$ 细胞分泌的外泌体中能够检测到 miR-23a、miR-214 这 2 个 miRNA 的表达。对于 miRNA-23a，已有研究证明其参与着炎症反应以及肿瘤相关的过程。研究学者 Li 等[10]研究了临床肝炎患者血清中的 miRNA 表达谱后发现，乙型肝炎患者血清中 miR-23a 的表达明显升高。还有研究学者研究发现，在牙周炎患者其牙龈组织中的 miR-23a 的表达高于健康者[11,12]，提示了 miR-23a 极有可能与炎症反应的发生以及发展有关。miRNA-23a 在肿瘤相关方面，已有研究显示其与肿瘤的发生、发展具有着非常密切的关系，其一般扮演致癌基因的作用，参与着多种癌症的发生、发展过程。如：有研究学者发现，miR-23a 能够直接地靶向抑制转移抑制因子 1 蛋白的表达，进而能够促进结肠癌细胞的生长以及侵袭转移的能力。其临床研究还说明 miR-23a 在结肠癌中的表达上调，并且随着临床分期的演进以及浸润深度的增加而增加，其有可能成为肠黏膜恶性转变以及结肠癌发生浸润转移的重要的生物学标志[13,14]。而对于 miR-214，近几年的研究发现发现，miR-214 在多种恶性肿瘤中均有异常表达，但其在不同肿瘤中的表达情况却不尽相同，具有一定的肿瘤特异性。有研究学者 Zhang 等[15]人研究发现，miR-214 在胰腺癌中呈现高表达，其能够促进胰腺癌细胞的生存并能降低肿瘤细胞对吉西他滨的敏感性。还有 Yang 等[16]人研究发现：miR-214 可以促进卵巢癌细胞的存活，并能够降低对化疗药物顺铂的敏感性。而另外有一些学者报道：miR-214 在肿瘤中则呈低表达，如研究显示，在宫颈癌细胞系 Hela 以及 Caski 细胞中，TFAM 蛋白的表达量明显升高，但 miR-214 的表达量却呈现明显的下降。而当在这两种细胞中上调 miR-214 的表达，能够明显的抑制宫颈癌细胞的增殖及细胞周期进展，进一步的研究显示：TFAM 是 miR-214 的靶基因之一，而且 miR-214 可以通过降低 TFAM 的表达来达到延缓肿瘤发展，并增加宫颈癌细胞对化疗药物的敏感性的目的[17]。

$CD4^+T$ 细胞不是功能单一的一类细胞，它是一群功能复杂的细胞群。其各亚群在细胞免疫反应都有着极为重要的作用。其不仅能辅助细胞毒性 T 细胞，还可以协助 NK 细胞清除和杀灭肿瘤，甚至还有着不依赖于 $CD8^+T$ 细胞的肿瘤杀伤作用，它在机体抗肿瘤免疫中有着重大的意义[18,19]。在现阶段在临床研究中，已经有学者研究得出输注 $CD4^+T$ 细胞，可以有效防止接种了血液或实体肿瘤细胞的动物发病[20]。



注：（A）熔解曲线；（B）荧光曲线；（C）扩增曲线。

图 4　Real Time PCR 结果

Note. (A) Melting curve; (B) Fluorescence curve; (C) Amplification curve.

Fig. 4　Real-time PCR results

本实验已经证实了 CD4⁺T 细胞具有着分泌外泌体的能力,且在其分泌的外泌体中检测到 miR-23a、miR-214,这两个免疫及肿瘤相关的 miRNA 的表达,而恰恰 CD4⁺T 细胞的功能也与炎症及肿瘤相关,是否 CD4⁺T 细胞在执行其免疫及肿瘤相关的功能时有着 miR-23a、miR-214 的参与? 值得我们去深入研究。本实验为 CD4⁺T 细胞外泌体参与 CD4⁺T 细胞执行其炎症及肿瘤过程提供了可能,并且 CD4⁺T 细胞是一群功能较为复杂的细胞群,其分泌的外泌体必定是多种多样的,其中所含的 miRNA 必定更为复杂,这些 miRNA 是否能发挥作用? 怎样去发挥作用? 我们依旧不甚清楚,这值得广大学者们深入探索。

总之,对外泌体的研究国内依旧处于初级阶段,对外泌体的研究还有着诸多的困难,对于外泌体发挥作用的具体机制,也需进一步的探究。相信随着科技的发展以及人们对外泌体认识的日益加深,外泌体中蕴含的丰富信息将会被人们所了解并运用到对疾病的治疗中去。

参考文献:

[1] 刘长红, 武明花, 李桂源. 肿瘤细胞来源的外泌体与恶性肿瘤的进展及化疗[J].中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(06):526-532.

[2] Pan BT, Teng K, Wu C, et al. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes [J]. J Cell Biol, 1985, 101(3):942-948.

[3] Bang C, Thum T. Exosomes: new players in cell-cell communication [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012 Nov; 44(11): 2060-2064.

[4] 卢婉, 杨人强, 王伶. 外泌体的研究进展[J].生命的化学, 2013, 33:438-442

[5] Rodriguez M, Silva J, López-Alfonso A, et al. Different exosome cargo from plasma / bronchoalveolar lavage in non-small-cell lung cancer [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2014, 53(9): 713-724.

[6] 张敏, 张晨光, 丁卫. 外泌体及其在肿瘤诊疗中的意义[J]. 生理科学进展, 2014, 45:372-378.

[7] Record M, Carayon K, Poirot M, et al. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologies [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, Jan; 1841(1):108-120.

[8] Südhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins [J]. Science. 2009 Jan 23; 323(5913):474-477.

[9] Pollard JW. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer [J]. J Leukoc Biol. 2008 Sep; 84(3):623-630.

[10] Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma [J]. Cancer Res. 2010 Dec 1; 70(23): 9798-9807.

[11] Lee YH1, Na HS, Jeong SY, et al. Comparison of inflammatory microRNA expression in healthy and periodontitis tissues [J]. Biocell. 2011 Aug; 35(2):43-49.

[12] Xie YF, Shu R, Jiang SY, et al. Comparison of microRNA profiles of human periodontal diseased and healthy gingival tissues [J]. Int J Oral Sci. 2011 Jul; 3(3):125-134.

[13] 周雪鹏. miR-23a 通过靶向 MTSS1 促进结肠癌侵袭转移及临床意义 [D]. 衡阳:南华大学, 2011.

[14] 周雪鹏, 刘彦宇, 刘德勇. miR-23a 对人结肠癌 SW480 细胞生长增殖的影响 [J]. 医学信息, 2011, 24(9):6088.

[15] Zhang XJ, Ye H, Zeng CW, et al. Dysregulation of miR-15a and miR-214 in human pancreatic cancer [J]. J Hematol Oncol. 2010 Nov 24; 3:46. doi: 10.1186/1756-8722-3-46.

[16] Yang H, Kong W, He L, Zhao JJ, MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN [J]. Cancer Res. 2008 Jan 15; 68(2):425-433.

[17] Wen Z, Lei Z, Jin-An M, et al. The inhibitory role of miR-214 in cervical cancer cells through directly targeting mitochondrial transcription factor A (TFAM) [J]. Eur J Gynaecol Oncol. 2014; 35(6):676-682.

[18] 孙君重, 肖文华, 于力. CD4⁺T 淋巴细胞功能研究新进展 [J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(2):544-548.

[19] Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, et al. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells [J]. Blood, 2007, Jun 15; 109(12):5346-5354

[20] Greenberg PD, Kern DE, Cheever MA. Therapy of disseminated murine leukemia with cyclophosphamide and immune Lyt-1⁺,2-T cells. Tumor eradication does not require participation of cytotoxic T cells [J]. J Exp Med, 1985, May 1; 161(5): 1122-1134.

〔收稿日期〕2017-02-28

研究报告

广东省 2014 ~ 2016 年普通级兔和豚鼠病毒抗体监测与分析

吴瑞可,王　静,潘金春,李秀珍,陈梅玲,黄树武,闵凡贵*

(广东省实验动物监测所,广东省实验动物重点实验室,广州　510663)

【摘要】 **目的**　依据 GB 14922.2 标准中 SPF 级动物质量要求,对 2014 ~ 2016 年广东省生产许可单位的普通级兔和豚鼠进行病毒抗体监测,分析从普通级动物中筛查 SPF 级动物的可行性。**方法**　累计收集到来自 6 家单位 9 批次的 167 只普通级兔和 155 只普通级豚鼠血清样本,采用 ELISA 方法检测 GB 14922.2 标准中规定的 SPF 级动物排除的病毒抗体。**结果**　兔出血症病毒(RHDV)免疫阳性率 85.4%(134/157),10 只非免动物抗体均为阴性,兔轮状病毒(RRV)阳性率 42.5%(71/167),兔仙台病毒(SV)结果均为阴性。豚鼠呼肠孤病毒Ⅲ型(REO-3)阳性率 52.9%(82/155),豚鼠小鼠肺炎病毒(PVM)阳性率 20%(31/155),仙台病毒(SV)和淋巴细胞脉络丛脑炎病毒(LCMV)均为阴性。**结论**　普通级兔和豚鼠虽然满足国家标准要求,但 SPF 级动物质量要求排除的病原污染率较高,表明不适宜通过群体筛查获得满足 SPF 级质量要求的动物。

【关键词】 普通级;兔;豚鼠;病毒;抗体检测

【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0065-04

doi: 10.3969. j. issn. 1671 -7856. 2017. 10. 013

Surveillance and analysis of virus antibodies in conventional rabbits and guinea pigs in Guangdong Province during 2014-2016

WU Rui-ke, WANG Jing, PAN Jin-chun, LI Xiu-zhen, Chen Mei-ling, HUANG Shu-wu, MIN Fan-gui*

(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

【**Abstract**】 **Objective**　To analyze the possibilities of screening SPF rabbits and guinea pigs from conventional animals, viral antibodies of the conventional rabbits and guinea pigs bred by licensed companies in Guangdong province during 2014 -2016 were determined according to the standard of SPF animals in GB14922. 2. **Methods**　Nine batches of 167 rabbit sera and 155 guinea pig sera were sampled from 6 companies. Serum antibodies to virus were determined by ELISA according to GB14922. 2. **Results**　Positivity of antibody to rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) was 82.2% (129/157) for the vaccinated rabbits, and negative result were obtained for unvaccinated rabbits. Positive rate of rabbit rotavirus (RRV) was 42.5% (71/167). No positive antibody responses to Sendai virus were detected out in all rabbits. The positive rates of guinea pig reovirus type III (REO-3) and pneumonia virus of mice (PVM) were 52.9% (82/155) and 20% (31/155) respectively. Antibody responses to Sendai virus (SV) and lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) were negative in all guinea pigs. **Conclusions**　Although the conventional rabbits and guinea pigs could meet the national

[基金项目]国家科技支撑计划项目(2015BAI07B01); 广东省科技计划项目(2015A030302028)。

[作者简介]吴瑞可(1984 -),女,本科,研究方向:实验动物微生物学。E-mail: 359295772@qq.com

[通讯作者]闵凡贵(1980.2 -),男,硕士,副研究员,研究方向:实验动物与比较医学研究。E-mail: minfangui@aliyun.com

standard, higher infection rates of virus excluded that SPF animals emerged in conventional animals, indicating that selection of SPF animals from conventional colonies is impracticable.

【Key words】 Conventional animals; Rabbits; Guinea pigs; Virus; Antibody detection

兔和豚鼠是目前国内使用量较大、标准化程度较高的实验动物,广泛应用于生物科学研究和医药检验等领域。随着科学研究和医药检验要求的提高,清洁级和SPF级兔和豚鼠的用量逐步增加,但因受制于较高的生产和使用成本,清洁级及SPF级兔和豚鼠尚未获得广泛应用,目前,仍以普通级兔和豚鼠为主。从家兔流行病学调查结果来看,兔轮状病毒(rabbit rotavirus, RRV)和兔出血症病毒(rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV)感染率较高[1,2],并且对动物健康危害较大。国内关于豚鼠病毒的流行病调查较少,相关报道显示淋巴细胞脉络丛脑炎病毒(lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV)是对豚鼠健康威胁较大的病毒[3,4]。

由于普通级兔和豚鼠生产设施的环境质量控制措施有限,导致动物病原暴露机会增加,加之普通级动物需排除的病原较少,部分条件性致病微生物可能直接影响动物的质量及动物实验结果的准确性和重复性。本研究依照国家标准GB 14922.2规定的SPF级动物质量要求[5],对2014~2016年本机构监督抽查的普通级兔和豚鼠的样本进行检测,分析病原携带情况,探讨在普通级动物群体中筛查SPF级动物的可行性,以期为实验动物生产、管理、使用和实验动物标准的制(修)订提供参考。

1 材料和方法

1.1 血清样品

2014~2016年,累计收集到来自广东省内6家实验动物生产单位(分别定义为A、B、C、D、E、F单位)的9批次167份普通级兔和155份普通级豚鼠血清,每批次抽样数量为5~25个。兔均为新西兰系,豚鼠主要以FMMU、Hartley等白化品系为主,并有少量三色豚鼠。兔经耳缘静脉或耳中央动脉采血,豚鼠经心脏采血,分离血清,-80℃保存。

1.2 主要试剂和仪器

ELISA试剂盒均源于美国XpressBio公司,购自苏州西山生物科技有限公司。本次检测两种动物共计七种病毒的ELISA试剂分别为:兔出血症病毒(RHDV)ELISA试剂(批号:K7057)、兔轮状病毒(RRV)ELISA试剂(批号:K6951)、兔仙台病毒(SV)ELISA试剂(批号:K6970),豚鼠淋巴细胞脉络丛脑炎病毒(LCMV)ELISA试剂(批号:K6948)、豚鼠小鼠肺炎病毒(PVM)ELISA试剂(批号:K6947)、豚鼠呼肠孤病毒III(REO-3)ELISA试剂(批号:K6617)、豚鼠仙台病毒(SV)ELISA试剂(批号:K7008)。

酶标仪为Thermo Multiskan Fc;洗板机为伯乐BIO-RAD1575酶标洗板机;恒温培养箱为上海跃进PYX-DHS隔水式电热恒温箱。

1.3 实验方法

1.3.1 检测项目

兔病毒检测项目包RRV、RHDV和仙台病毒(Sendai virus, SV)。豚鼠病毒检测项目包括呼肠孤病毒III(Reovirus type III, REO-3)、小鼠肺炎病毒(Pneumonia virus of mice, PVM)、SV和LCMV。

1.3.2 检测方法

根据ELISA试剂盒说明书进行抗体检测。兔、豚鼠各病毒均按以下步骤进行检测:将血清样本1:50稀释,再向ELISA微孔板对应的样品孔各加100 μL稀释好的样本和阴性、阳性对照(阴性、阳性对照不稀释),37℃孵育45 min后洗板5次,拍干微孔板;每孔加100 μL酶标二抗,37℃孵育45 min后洗板5次,拍干微孔板;加显色液室温孵育30 min;反应完毕,立即用酶标仪读板,测试波长为405 nm。

结果判定方法:样本(或对照)OD值=特异孔OD值-非特异孔OD值;阳性对照OD值≥0.600,阴性对照OD值≤0.250,则试验成立;样本OD值≥0.300判为阳性,样本OD值<0.300判为阴性。

1.4 统计学方法

根据病原的免疫和感染情况,分别计算抗体阳性率,评价免疫保护率和感染率。抗体阳性率为抗体阳性的个体数量占采样总量的百分比;免疫保护率为免疫群体中抗体检测结果为阳性的个体数量占采样总量的百分比;某病毒感染率是指该病的阳性个体数占总采样数量的百分比,而已知群体并未曾针对该病毒进行过免疫。

2 结果

2.1 普通级兔检测结果

本次检测结果见表1。对于普通级兔,国家标准只对RHDV做出规定,可以免疫,也可不免疫。除E单位2016年未进行免疫外,其他单位各抽样时

间段均进行了免疫,免疫后群体抗体阳性率均在70%以上,3 年的总体阳性率为 85.4% (134/157),未免疫的动物抗体均为阴性。

SPF 级兔另需排除的 2 种病毒 RRV 和 SV。除 E 单位未检出 RRV 外,其他 5 家受检单位均检出 RRV,3 年的总体检出率为 42.5% (71/167);对于 SV,3 年来,所有单位均未检出。

表 1　2014 ~2016 年普通级兔检测结果

Tab. 1　Test results of conventional rabbits in 2014 –2016

单位 Companies	检测项目 Items	抗体阳性率(阳性数/样本总数) Positive rates(positive number/total number)			
		2014	2015	2016	合计 Total
A	RHDV *	85% (17/20)	85% (17/20)	81.8% (18/22)	83.9% (52/62)
	RRV	55% (11/20)	5% (1/20)	40.9% (9/22)	33.9% (21/62)
	SV	0% (0/20)	0% (0/20)	0% (0/22)	0% (0/62)
B	RHDV *	85% (17/20)		100% (25/25)	93.3% (42/45)
	RRV	65% (13/20)		92% (23/25)	80% (36/45)
	SV	0% (0/20)		0% (0/25)	0% (0/45)
C	RHDV *	85% (17/20)			85% (17/20)
	RRV	20% (4/20)			20% (4/20)
	SV	0% (0/20)			0% (0/20)
D	RHDV *	72% (18/25)			72% (18/25)
	RRV	20% (5/25)			20% (5/25)
	SV	0% (0/25)			0% (0/25)
E	RHDV#			0% (0/10)	0% (0/10)
	RRV			0% (0/10)	0% (0/10)
	SV			0% (0/10)	0% (0/10)
F	RHDV *			100% (5/5)	100% (5/5)
	RRV			100% (5/5)	100% (5/5)
	SV			0% (0/5)	0% (0/5)

注:* 表示动物已免疫;#表示动物未免疫。

Note. *, indicates that animals have been vaccinated; #, indicates that animals are not vaccinated.

表 2　2014 ~2016 年普通级豚鼠检测结果

Tab. 2　Test results of conventional guinea pigs in 2014 –2016

单位 Companies	检测项目 Items	抗体阳性率(阳性数/样本总数) Positive rates(positive number / total number)			
		2014	2015	2016	合计 Total
A	PVM	0% (0/20)	53.3% (8/15)	4.6% (1/22)	15.8% (9/57)
	REO-3	75% (15/20)	80% (12/15)	59.1% (13/22)	70.2% (40/57)
	SV	0% (0/20)	0% (0/15)	0% (0/22)	0% (0/57)
	LCMV	0% (0/20)	0% (0/15)	0% (0/22)	0% (0/57)
B	PVM	80% (16/20)		0% (0/25)	35.6% (16/45)
	REO-3	85% (17/20)		4% (1/25)	40% (18/45)
	SV	0% (0/20)		0% (0/25)	0% (0/45)
	LCMV	0% (0/20)		0% (0/25)	0% (0/45)
C	PVM	0% (0/20)			0% (0/20)
	REO-3	45% (9/20)			45% (9/20)
	SV	0% (0/20)			0% (0/20)
	LCMV	0% (0/20)			0% (0/20)
D	PVM	0% (0/13)			0% (0/13)
	REO-3	0% (0/13)			0% (0/13)
	SV	0% (0/13)			0% (0/13)
	LCMV	0% (0/13)			0% (0/13)
E	PVM			33.3% (5/15)	33.3% (5/15)
	REO-3			66.7% (10/15)	66.7% (10/15)
	SV			0% (0/15)	0% (0/15)
	LCMV			0% (0/15)	0% (0/15)
F	PVM			20% (1/5)	20% (1/5)
	REO-3			100% (5/5)	100% (5/5)
	SV			0% (0/5)	0% (0/5)
	LCMV			0% (0/5)	0% (0/5)

2.2 普通级豚鼠检测结果

普通级豚鼠检测结果见表2。对于普通级豚鼠,国家标准只对LCMV做出规定,要求阴性,3年来所有抽检的样本检测结果均为阴性。

清洁级豚鼠要求进一步排除SV,SPF级豚鼠在清洁级基础上排除REO-3和PVM。3年来,所有抽检的动物均未检测到SV,但PVM和Reo-3抗体阳性率均较高,PVM的总体检出率为20%(31/155),Reo-3的总体检出率为52.9%(82/155)。

3 讨论

随着生物医药行业的快速发展,普通级兔和豚鼠已经不能完全满足科研和检验需求,而清洁级和SPF级兔和豚鼠的产能有限,从普通级动物群体中筛选满足清洁级和SPF级动物质量要求的兔和豚鼠成为解决当前供求矛盾的捷径。本研究对2014~2016年监督抽查的样本进行了复测,涵盖SPF级动物质量要求排除的病毒项目,旨在了解目前普通级动物病毒的感染情况,为动物实验应用和动物筛查提供参考。

从本次调查结果来看,普通级兔RHDV群体免疫合格率均达到70%,未免疫的动物抗体检测结果均为阴性,符合国家标准的要求。RRV是SPF级兔要求排除的病毒,调查结果显示该病毒感染率较高,9次抽检结果仅1次未检出,表明该病毒污染严重。SV已被证实可影响家兔的热原试验,存在交叉感染[6,7],也是SPF级兔要求排除的病原,此次调查未发现普通级兔携带SV。

普通级豚鼠均未检出LCMV,满足普通级动物质量要求。同时,所有动物均未检出SV,表明SV感染率极低,可以通过日常管理控制该病原。然而,SPF级豚鼠要求排除的2种病毒Reo-3和PVM的感染率均较高,表明基于现有的普通级豚鼠群体筛查满足SPF级质量要求的动物可行性低,批量获得满足SPF级质量要求豚鼠需要严格依照SPF级动物生产繁育的要求进行生产繁育。

综上调查结果,广东地区现有的普通级兔和豚鼠符合国家标准规定的普通级动物质量要求,但SPF级动物规定的病毒污染率高,基于普通级动物群体筛选高质量动物的可行性不高,需要建立SPF种群进行生产繁育。

参考文献:

[1] 徐春厚,崔思列. 兔轮状病毒的流行病学调查[J]. 中国兽医杂志,1994,21(8):6-8.
[2] 王孝友,杨睿,沈克飞,等. 三峡库区兔病毒性出血症流行情况调查[J]. 黑龙江畜牧兽医,2014,04:43-44.
[3] 李雨函,魏强. 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒感染实验动物的情况概述[J]. 中国比较医学杂志,2013,23(1):46-49.
[4] 周娉,董伟,刘建高,等. 湖南省实验动物中几种常见的人兽共患病监测[J]. 中国比较医学杂志,2009,19(3):74-75.
[5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 实验动物 微生物等级及监测[S]. GB/T 14922. 2-2011.
[6] 胡春萍. 仙台病毒对家兔体温的影响[J]. 中国养兔杂志 2000.1:13-14
[7] 田克恭,贺争鸣,刘群,等. 实验动物疫病学[M]. 北京:中国农业出版社. 2015:360-366.

〔收稿日期〕2017-03-16

专家问答

问:光声断层扫描系统介绍

答:多光谱光声断层扫描系统(multispectral optoacoustic tomography, MSOT)主要是利用了光声成像原理。光声成像是近年来发展起来的一种无创医学成像方法,是根据生物组织对光的吸收分布反映组织结构的一种新兴的成像模式。该技术检测的是超声信号,因而能够克服纯光学成像技术在成像深度与分辨率上不可兼得的缺陷,并解决单纯超声成像技术在对比度和功能性方面的不足。结合光学和超声这两种成像技术各自的优点,MSOT能实现对组织体较大深度、高分辨率、高对比度三维功能成像。我们认为,MSOT和MR搭配是目前搭建实验室最完美的方式。

(感谢第四军医大学 **师长宏** 教授和冷泉港生物科技股份有限公司分子影像部门副总经理 **王志宇** 先生的解答)

研究报告

广东省实验用小型猪主要病原微生物学及寄生虫学调查

黄树武[1,2],闵凡贵[1,2],吴瑞可[1,2],陈梅玲[1,2],王希龙[1,2*],潘金春[1,2*]

(1. 广东省实验动物监测所,广州　510663; 2. 广东省实验动物重点实验室,广州　510663)

【摘要】 **目的**　调查广东省实验用小型猪主要病原微生物和寄生虫的感染情况。**方法**　从广东省 4 家生产单位随机抽取小型猪 154 头,包括巴马小型猪、蕨麻小型猪、西藏小型猪和五指山小型猪 4 种品系,采集皮毛、鳞屑、血清、肛拭子、粪便等样品检测 20 种病原,对结果进行生产单位和品系间的差异性分析。**结果**　所检 4 家单位的所有品系小型猪均存在多种病原复合感染,猪链球菌 2 型(50.7%)、胸膜肺炎放线杆菌(40.3%)、肺炎支原体(100.0%)、乙型脑炎病毒(41.3%)、猪圆环病毒 2 型(74.8%)、猪传染性胃肠炎病毒(73.8%)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(44.7%)7 种病原的检出率相对较高,猪细小病毒(26.0%)、猪伪狂犬病病毒(15.6%)、肠道中蠕虫(3.2%)有一定检出率;要求强免的猪瘟病毒(62.8%)、口蹄疫病毒(35.8%)免疫合格率较低,猪伪狂犬病病毒免疫合格率高达 98.4%。本次调查未检出沙门氏菌、布鲁氏菌、猪痢疾蛇样螺旋体、皮肤病原真菌、甲型流感病毒、弓形虫、体外寄生虫和粪便球虫。**结论**　广东地区存栏实验用小型猪存在多种病原复合感染,需加强免疫和质量控制,逐步建立高等级群体;同时也为实验用小型猪地方标准乃至国家标准的制/修订提供了依据。

【关键词】 实验用小型猪;病原菌;病毒;寄生虫;调查

【中图分类号】R-33　　【文献标识码】A　　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0069-05

doi: 10.3969. j. issn. 1671 -7856. 2017. 10. 014

Microbiological and parasitological investigation of experimental minipigs in Guangdong province

HUANG Shu-wu[1,2], MIN Fan-gui[1,2], WU Rui-ke[1,2], CHEN Mei-ling[1,2], WANG Xi-long[1,2*], PAN Jin-chun[1,2*]

(1. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663)

【**Abstract**】 **Objective**　To conduct a microbiological and parasitological investigation of experimental minipigs in Guangdong province. **Methods**　Four major experimental minipig production units in Guangdong province were included in this investigation. Samples were taken from a total of 154 pigs of 4 breeds, i. e., Bama minipigs, Juema minipigs, Tibet minipigs and Wuzhishan minipigs. Pig fur, scales, serum, rectal swabs and feces samples were collected for detection of 20 pathogens. The data were analyzed and compared among the production units and breeds. **Results**　Mixed infections were detected in all the four institutions. The infection rates of 7 pathogens were rather high: *Streptococcus suis* type 2 (50.7%), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (40.3%), *Mycoplasma hyopneumoniae* (100%), Japanese encephalitis virus

[基金项目]广东省科技计划项目(2015A030302028,2015A030303004)。

[作者简介]黄树武(1990 -),男,学士,研究方向:实验动物质量监测和病原菌研究。E-mail: hsw2015@gdlami.com

[通讯作者]王希龙(1963 -),男,研究员,研究方向:小型猪实验动物标准化和比较医学研究。E-mail: wangxilonggd@163.com。
潘金春(1979 -),男,副研究员,研究方向:实验动物质量监测和比较医学研究。E-mail: jcpan@sina.com。 *共同通讯

(41.3%), porcine circovirus type 2 (74.8%), porcine transmissible gastroenteritis virus (73.8%), gastroenteritis virus (44.7%). Porcine parvovirus (26.0%), pseudorabies virus (15.6%) and intestinal worms (3.2%) were also detected in some animals. The immune qualified rates of classical swine fever virus (62.8%) and foot-and-mouth disease virus (35.8%) were rather low. The immune qualified rate of pseudorabies virus was as high as 98.4%. Besides, *Salmonella*, *Brucella*, swine dysentery snake like spirochetes, dermatophytes, influenza virus. Toxoplasma gondii, ectoparasites, and coccidia were not detected. **Conclusions** The results of this investigation indicate that epidemiological quality control of pathogens in experimental minipigs and efforts to establish high grade minipig population in Guangdong province remain to be strengthened. Our study also provides a basis for revision of local and even national standards for experimental minipigs.

【**Key words**】 Experimental minipigs; Pathogenic bacteria; Virus; Parasite; Investigation

研究证明,猪在药代动力学、生理学、生物化学和解剖学等多个方面与人类非常相似[1],是一种理想的实验动物,可替代犬、猴用于器官移植、外科模型、教学和药物临床前评价等生物医学研究[2]。小型猪由于具有体小、操作方便等优点,已经在生命科学研究的各个领域得到广泛应用,日益成为一种理想的实验动物,然而我国尚未有实验用小型猪相应的国家标准,仅北京、上海、广西、江苏等地方提出了地方标准,且各地标准存在较大差异[3-6],在一定程度上阻碍了小型猪的实验动物标准化研究和推广应用。由于广东省缺乏实验用小型猪的地方标准,并且制标、立标的周期长,目前广东省实验动物行政许可需要对外来地方标准进行确认,鉴于各地已有地方标准规定的技术指标差异很大,对广东地区的适用性需要进行科学探讨。

此前,国内有研究人员对部分地区的实验用小型猪病原携带情况进行了调查,显示病原携带情况除与品系相关外,还具有区域性特点[7-10]。目前,尚无关于广东地区实验用小型猪流行病调查的相关报道。本研究通过对广东地区小型猪繁殖基地生产的小型猪进行人兽共患病和高发病原的流行病学调查,旨在了解实验用小型猪感染性疾病的病原携带状况及其分布特点,为小型猪的质量检测、广东省地方标准乃至国家标准的制定提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本研究抽样调查的实验动物来自广东省4家实验用小型猪生产单位(用代号A、B、C、D单位表示),共抽取154头小型猪,品系包括巴马小型猪(bama minipig, BMP)、蕨麻小型猪(Juema minipig, JMP)、西藏小型猪(Tibet minipig, XZP)和五指山小型猪(Wuzhishan minipig, WZSP)。具体抽样信息见表1。

1.2 主要试剂与仪器

DHL平板、沙氏琼脂平板购自广东环凯微生物科技有限公司;肛拭子运送培养基购自广州阳普医疗科技股份有限公司;ID 32E鉴定条、氧化酶试剂购自法国生物梅里埃股份有限公司;三糖铁、半固体琼脂购自北京陆桥技术股份有限公司;糖发酵培养基、氨基酸脱羧酶试验培养基、氰化钾培养基、蛋白胨水、靛基质试剂购自杭州滨和微生物试剂有限公司;鼠伤害沙门菌(CMCC50115)购自广东省微生物菌种保藏中心;沙门多价诊断血清购自宁波天和微生物试剂有限公司;布氏杆菌试管凝集抗原购自中国疾病预防控制中心传染病预防控制所;猪ELISA试剂盒购自TSZ公司和武汉科前生物股份有限公司;弓形虫间接血凝试验检测试剂购自中国农业科学院兰州兽医研究所;DNA抽提试剂,猪痢疾蛇样螺旋体荧光PCR检测试剂盒购自广州旭牧生

表1 不同生产单位抽样调查的实验用小型猪品系及数量

Tab.1 The number and quantity of experimental minipigs for different production units

品系 Strains	A单位 Unit A	B单位 Unit B	C单位 Unit C	D单位 Unit D	合计 Total
BMP	10	20	20		50
JMP		24			24
XZP	20		20		40
WZSP		20		20	40
合计 Total	30	64	40	20	154

物科技有限公司;无水乙醇购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

生化培养箱(宁波江南仪器厂,SPX-288 型);生物安全柜(德国,Biometra 型);ATB 梅里埃鉴定仪(法国,ATB NEW 型);离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,TG16-W 型);恒温摇床(宁波江南仪器厂,KYC100 型);生物显微镜(德国,Leica DM500 型);酶标仪(美国,Bio-rad 680 型);酶标洗板机(北京拓普分析仪器公司,DEM-Ⅲ型);恒温培养箱(英国,SPX-250B 型);恒温孵育器(杭州奥盛仪器有限公司,K-20 型);漩涡振荡器(天津津立仪器设备科技发展有限公司,TM60-4 型);PCR 工作台(上海市金鹏科技有限公司,BHC-1300II A/B3 型);AB-7500 荧光定量 PCR 仪(北京新阳创业科技发展有限公司,7500 型);冰箱(容声,BCD-295WYL 型);可见光分光光度计(上海上分计量检测有限公司,722S 型)。

1.3　实验方法

1.3.1　样本采集

血清取样:从小型猪前腔静脉丛无菌采血 5 mL,加入肝素抗凝管中,轻轻混匀,离心后分离血浆用于 ELISA 检测,剩下血细胞用于 DNA 抽提。粪便:取猪新鲜粪便(含粘液)或肛拭子用于肠道病原菌和肠道寄生虫检测。体表拔毛取样:用镊子在耳根、颈后、眼周、背部、臀部和腹股沟等易感部位分别拔取少许被毛,散放于载玻片上,用透明胶带压住用于检体外寄生虫。取皮毛、鳞屑:用刮刀刮取动物皮毛、鳞屑接种于沙氏平板培养,用于皮肤病原真菌检测。

1.3.2　检测指标及方法

检测指标共 20 项,包括病原菌指标 7 项,病毒指标 9 项和寄生虫指标 4 项,具体检测指标和方法见表 2。ELISA、PCR 方法直接参照试剂盒说明书进行检测,病原菌培养严格执行无菌操作。

1.4　统计学方法

对检测结果进行统计分析,非免疫群体以检出率(阳性数量/样本总量 ×100%)表示,免疫群体以免疫合格率(抗体阳性数量/样本总量 ×100%)表示。

2　结果

2.1　不同生产单位实验用小型猪的病原检测结果

本次调查结果见表 2,不同生产单位实验用小型猪的病原检测结果存在差异。

在病原菌方面,4 个生产单位都检出猪链球菌 2 型和胸膜肺炎放线杆菌,感染率均较高,总体感染率达到 50.7% 和 40.3%。猪肺炎支原体方面,A 和 C 单位未检测,B 和 D 单位的检出率为 100%。4 个生产单位均未检出沙门氏菌、布鲁氏菌、猪痢疾蛇样螺旋体和皮肤病原真菌。

在病毒方面,年度国家动物疫病强制免疫计划要求对猪瘟、口蹄疫、猪繁殖与呼吸综合征病毒进行免疫[11]。4 家单位均未免疫猪繁殖与呼吸综合征病毒疫苗,但均能检测到病毒感染,平均感染率达 44.7%。A 和 B 单位免疫了猪瘟病毒疫苗,A、B 和 C 单位免疫了口蹄疫病毒疫苗,但免疫合格率低,未免疫的单位均未检测到相应病毒抗体。B 单位免疫了伪狂犬病毒疫苗,免疫率为 98.4%,其他 3 家单位未免疫该病毒疫苗,但是均能检测到不同比例的抗体。乙型脑炎病毒和猪圆环病毒 2 型 4 个生产单位皆有不同程度的感染,C 单位猪圆环病毒 2 型感染率达 100%。4 家单位中,B 和 C 单位检测到猪细小病毒感染。4 家单位中,只有 B 和 D 单位进行了猪传染性胃肠炎的检测,均有很高的检出率。

在寄生虫方面,所有 4 家单位均未检出弓形虫、体外寄生虫和粪便球虫,A、B、D 单位检出少量肠道蠕虫。

2.2　不同品系小型猪的病原免疫与感染情况

将检测结果按小型猪品系进行分类统计(表 3),不同品系的小型猪病原免疫和感染情况总体差异不大。

疫苗免疫方面,只对猪瘟病毒、口蹄疫病毒和猪伪狂犬病病毒进行了免疫,猪伪狂犬病病毒免疫合格率最高,超过 95%;口蹄疫病毒免疫合格率最低,均未超过 60%;对于猪瘟病毒,只有巴马小型猪免疫合格率达标。未免疫猪瘟病毒、口蹄疫病毒群体检测结果为阴性,而未免疫猪伪狂犬病病毒群体有一定的检出率。

群体病原感染方面,所有小型猪均未检出沙门氏菌、布鲁氏菌、猪痢疾蛇样螺旋体、皮肤病原真菌、猪流感、弓形虫、体外寄生虫和粪便球虫;所有受检小型猪均检测到猪链球菌 2 型、胸膜肺炎放线杆菌、猪肺炎支原体、乙型脑炎病毒、猪圆环病毒 2 型、猪细小病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒感染。在肠道蠕虫感染方面,有三个品系小型猪检测到虫体。

表2 不同生产单位的实验用小型猪病原感染情况

Tab. 2 Pathogenic infections of experimental minipigs in four production units

病原 Pathogens	检测方法 Methods	阳性率/%(阳性数量/样本总量) Positive rate (Positive numbers / total sample)				
		A单位 Unit A	B单位 Unit B	C单位 Unit C	D单位 Unit D	总计 Total
沙门氏菌 *Salmonella* spp.	培养法 Culture method	0.0(0/30)	0.0(0/64)	0.0(0/40)	0.0(0/20)	0.0(0/154)
布鲁氏菌 *Brucella*	试管凝集试验 Tube agglutination test	0.0(0/30)	0.0(0/64)	0.0(0/40)	0.0(0/20)	0.0(0/154)
猪链球菌2型 *Streptococcus suis* type 2	ELISA	26.9(7/26)	57.8(37/64)	57.5(23/40)	45.0(9/20)	50.7(76/150)
胸膜肺炎放线杆菌 APP	ELISA	16.0(4/25)	23.4(15/64)	87.5(35/40)	30.0(6/20)	40.3(60/149)
猪肺炎支原体 *Mycoplasma* spp.	ELISA		100.0(56/56)		100.0(20/20)	100.0(76/76)
猪痢疾蛇样螺旋体 *Serpulina hyodysenteriae*	镜检 Microscopy、PCR	0.0(0/30)	0.0(0/64)	0.0(0/40)	0.0(0/20)	0.0(0/154)
皮肤病原真菌 Pathogenic dermal fungi	培养法 Culture method	0.0(0/30)	0.0(0/64)	0.0(0/40)	0.0(0/20)	0.0(0/154)
猪瘟病毒 * CSFV	ELISA	50.0(15/30)	68.8(44/64)			62.8(59/94)
猪瘟病毒 CSFV	ELISA			0.0(0/40)	0.0(0/20)	0.0(0/60)
口蹄疫病毒 * FMDV	ELISA	6.7(2/30)	46.9(30/64)	40.0(16/40)		35.8(48/134)
口蹄疫病毒 FMDV	ELISA				0.0(0/20)	0.0(0/20)
乙型脑炎病毒 JEV	ELISA	34.6(9/26)	37.5(24/64)	60.0(24/40)	25.0(5/20)	41.3(62/150)
猪圆环病毒2型 PCV2	ELISA	44.4(12/27)	68.8(44/64)	100.0(40/40)	85.0(17/20)	74.8(113/151)
猪细小病毒 PPV	ELISA	0.0(0/26)	45.3(29/64)	25.0(10/40)	0.0(0/20)	26.0(39/150)
猪伪狂犬病病毒 * PRV	ELISA		98.4(63/64)			98.4(63/64)
猪伪狂犬病病毒 PRV	ELISA	10.0(3/30)		7.5(3/40)	40.0(8/20)	15.6(14/90)
猪传染性胃肠炎病毒 TGEV	ELISA		67.2(43/64)		95.0(19/20)	73.8(62/84)
猪繁殖与呼吸综合征病毒 PRRSV	ELISA	23.3(7/30)	68.3(41/60)	5.0(2/40)	85.0(17/20)	44.7(67/150)
猪流感病毒(H1型) SIV	ELISA	0.0(0/30)	0.0(0/64)	0.0(0/40)	0.0(0/20)	0.0(0/154)
弓形虫 *Toxoplasma*	IHA	0.0(0/30)	0.0(0/64)	0.0(0/40)	0.0(0/20)	0.0(0/154)
体外寄生虫 External parasites	镜检 Microscopy	0.0(0/30)	0.0(0/64)	0.0(0/40)	0.0(0/20)	0.0(0/154)
粪便球虫 Fecal coccidia	镜检 Microscopy	0.0(0/30)	0.0(0/64)	0.0(0/40)	0.0(0/20)	0.0(0/154)
肠道蠕虫 Intestinal helminth	镜检 Microscopy	3.3(1/30)	4.7(3/64)	0.0(0/40)	5.0(1/20)	3.2(5/154)

注：*，为免疫群体的免疫合格率。

Note. *, indicats qualified rate of an immunized population.

表 3　不同品系的实验用小型猪的病原感染情况

Tab. 3　Pathogenic infection in different strains of experimental minipigs

病原 Pathogens	阳性率/%(阳性数量/样本总量)Positive rate(Positive numbers / total sample)			
	BMP	JMP	WZSP	XZP
沙门氏菌 *Salmonella* spp.	0.0(0/50)	0.0(0/24)	0.0(0/40)	0.0(0/40)
布鲁氏菌 *Brucella*	0.0(0/50)	0.0(0/24)	0.0(0/40)	0.0(0/40)
猪链球菌 2 型 *Streptococcus suis* type 2	50.0(23/46)	66.7(16/24)	52.5(21/40)	40.0(16/40)
胸膜肺炎放线杆菌 APP	48.9(22/45)	37.5(9/24)	22.5(9/40)	50.0(20/40)
猪肺炎支原体 *Mycoplasma* spp.	100.0(12/12)	100.0(24/24)	100.0(40/40)	
猪痢疾蛇样螺旋体 *Serpulina hyodysenteriae*	0.0(0/50)	0.0(0/24)	0.0(0/40)	0.0(0/40)
皮肤病原真菌 Pathogenic dermal fungi	0.0(0/50)	0.0(0/24)	0.0(0/40)	0.0(0/40)
猪瘟病毒* CSFV	90.0(27/30)	54.2(13/24)	55.0(11/20)	40.0(8/20)
猪瘟病毒 CSFV	0.0(0/20)		0.0(0/20)	0.0(0/20)
口蹄疫病毒* FMDV	30.0(15/50)	58.3(14/24)	55.0(11/20)	20.0(8/40)
口蹄疫病毒 FMDV			0.0(0/20)	
乙型脑炎病毒 JEV	36.0(18/50)	40.0(8/20)	32.5(13/40)	57.5(23/40)
猪圆环病毒 2 型 PCV2	64.0(32/50)	100.0(21/21)	87.5(35/40)	65.0(26/40)
猪细小病毒 PPV	20.0(10/50)	70.0(14/20)	27.5(11/40)	10.0(4/40)
猪伪狂犬病病毒* PRV	100.0(20/20)	95.8(23/24)	100.0(20/20)	
猪伪狂犬病病毒 PRV	10.0(3/30)		40.0(8/20)	7.5(3/40)
猪传染性胃肠炎病毒 TGEV	12.5(3/24)	100.0(20/20)	97.5(39/40)	
猪繁殖与呼吸综合征病毒 PRRSV	39.1(18/46)	66.7(16/24)	75.0(30/40)	7.5(3/40)
猪流感病毒(H1 型)SIV	0.0(0/50)	0.0(0/24)	0.0(0/40)	0.0(0/40)
弓形虫 *Toxoplasma*	0.0(0/50)	0.0(0/24)	0.0(0/40)	0.0(0/40)
体外寄生虫 External parasites	0.0(0/50)	0.0(0/24)	0.0(0/40)	0.0(0/40)
粪便球虫 Fecal coccidia	0.0(0/50)	0.0(0/24)	0.0(0/40)	0.0(0/40)
肠道蠕虫 Intestinal helminth	2.0(1/50)	8.3(2/24)	5.0(2/40)	0.0(0/40)

注:*,为免疫群体的免疫合格率。

Note. *, indicates qualified rate in immunized population.

3　讨论

微生物和寄生虫感染实验动物不仅会干扰试验结果,影响动物生产,甚至还会威胁人类健康,因此需要定期开展病原监测[12]。本研究对广东省保种繁育的实验用小型猪开展了 7 种病原菌、9 种病毒和 4 种寄生虫的流行病学调查研究,结果发现各 4 种品系的小型猪均存在多种病原复合感染,不同品系的小型猪对病原的易感性总体差异不大。

现有关于实验用小型猪流行病学调查研究结果显示,不同地理区域、不同品系小型猪病原携带情况存在一定差异[7-10]。由于尚无关于广东地区实验用小型猪的流行病学调查报道,本研究可以弥补这方面的不足。本次调查结果显示,猪链球菌 2 型、胸膜肺炎放线杆菌、猪肺炎支原体、猪圆环病毒 2 型、乙型脑炎病毒、猪细小病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒等主要病原流行特征与已有报道相似,只是存在感染率的差异;但广东地区猪传染性胃肠炎病毒检出率高,甚至达到 100% 的感染率;广东地区未检出猪流感病毒(H1 型)。本研究结果中实验用小型猪肺炎支原体的检出率与广东地区商品猪肺炎支原体的调查结果相似[13],表明猪种间病原的易感性差异不大,与地域性病原流行相关性高。

根据《2016 年国家动物疫病强制免疫计划》的要求,对高致病性禽流感、口蹄疫、高致病性猪蓝耳病、猪瘟,群体免疫密度应常年保持在 90% 以上,其中应免畜禽免疫密度应达到 100%,免疫抗体合格率全年保持在 70% 以上[11]。而本调查结果,口蹄疫病毒(35.8%),猪瘟病毒(62.8%)的免疫合格率都相对比较低,达不到免疫要求,部分生产单位未免疫或未及时免疫高危病原,存在较大风险。所有生产单位均未免疫猪繁殖与呼吸综合征病毒,但所有品系均检测到感染,表明小型猪对该病毒的易感性较高或感染后可检测到抗体,与潘金春等[14]研究结果吻合。

本次调查结果显示,广东地区现有普通级实验用小型猪存在多种病原复合感染并趋于复杂化,表明在普通级小型猪群体通过病原筛选高质量小型猪乃至 SPF 级小型猪的可行性不高,需要建立屏障环境生产繁育高等级小型猪。本研究结果对指导实验用小型猪的生产、管理和使用有着重要的意义,同时可为小型猪质量控制标准的制/修订提供基础数据。

(下转第 79 页)

研究报告

miR-424 对非小细胞肺癌细胞株 A549 迁移及侵袭的影响

王　胜,熊　飞,开金丹*

(湖北省肿瘤医院胸外科,武汉　430079)

【摘要】 **目的**　探讨 miR-424 对非小细胞肺癌细胞株 A549 迁移及侵袭的影响。**方法**　RT-PCR 法检测肺癌细胞 NCI-H460、NCI-H1975、NCI-H446、A549、NCI-H1299、NCI-H157 及人胚肺成纤维细胞 MRC-5 中 miR-424 表达,脂质体 Lipofectamine™2000 将 miR-424 inhibitor 和 miR-424 NC 转入 A549 细胞中,48 h 后,RT-PCR 法检测 miR-424 表达,CCK-8 法检测细胞活力,划痕实验检测细胞迁移能力,Transwell 实验检测细胞侵袭能力,western blot 检测基质金属蛋白酶 2(MMP2)、MMP9、转化生长因子-β1(TGF-β1)及 p-Smad3 的表达。**结果**　miR-424 在肺癌细胞 NCI-H460、NCI-H1975、NCI-H446、A549、NCI-H1299、NCI-H157 中的[(1.78 ± 0.13),(1.69 ± 0.10),(1.89 ± 0.18),(2.88 ± 0.27),(2.52 ± 0.20),(2.49 ± 0.23)]表达量显著高于 miR-424 在人胚肺成纤维细胞 MRC-5 中的(0.58 ± 0.05)表达量($P < 0.01$)。与 miR-424 NC 组比较,miR-424 inhibitor 组 miR-424 表达量显著降低($P < 0.01$),细胞活力下降($P < 0.01$),细胞迁移及侵袭能力降低($P < 0.01$),MMP2,MMP9,TGF-β1 及 p-Smad3 表达量均显著下调($P < 0.01$)。**结论**　miR-424 表达量下调后能通过抑制 TGF-β1/Smad3 信号通路进而抑制 A549 细胞的迁移及侵袭。

【关键词】 miR-424;非小细胞肺癌;A549;迁移;侵袭
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0074-06
doi: 10.3969. j. issn. 1671 -7856. 2017. 10. 015

Effect of miR-424 on migration and invasion of non-small cell lung cancer cells A549

WANG Sheng, XIONG Fei, KAI Jin-dan*
(Department of Thoracic Surgery, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China)

【**Abstract**】 **Obejectives**　To explore the effect of miR-424 on migration and invasion of non-small cell lung cancer A549 cells. **Methods**　Expression of miR-424 in NCI-H460, NCI-H1975, NCI-H446, A549, NCI-H1299, NCI-H157 lung cancer cells and embryonic lung fibroblasts MRC-5 cells was examined by RT-PCR. miR-424 inhibitor and miR-424 NC were transfected into A549 cells with liposome Lipofectamine™2000. Cell viability was measured by MTT assay. Cell migration and invasion was measured by wound scratch assay and transwell migration assay, respectively. The expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP2), MMP9, transforming growth factor-β (TGF-β1), p-Smad3 was measured by western blot. **Results**　The expression of miR-424 in NCI-H460, NCI-H1975, NCI-H446, A549, NCI-H1299, NCI-H157 cells (1.78 ± 0.13, 1.69 ± 0.10, 1.89 ± 0.18, 2.88 ± 0.27, 2.52 ± 0.20, 2.49 ± 0.23) was significantly higher than that in

[作者简介]王胜(1980 -),男,硕士生,主治医师,研究方向:胸部肿瘤的外科及综合治疗。E-mail: 13643651@qq.com
[通讯作者]开金丹,E-mail: glucosecn@hotmail.com

MRC-5 cell 0.58 ±0.05 ($P < 0.01$). Compared with the miR-424 NC group, the cell viability was reduced ($P < 0.01$), cell migration and invasion ability was decreased ($P < 0.01$), and the expression of MMP2, MMP9, TGF-β1, p-Smad3 protein was down-regulated in miR-424 inhibitor group ($P < 0.01$). **Conclusions** miR-424 inhibitor can inhibit the migration and invasion in lung cancer A549 cells via inhibition of TGF-β1/Smad3 signal pathway.

【**Key words**】 miR-424; Non-small cell lung cancer; A549; Migration; Invasion

肺癌是一种常见的呼吸道恶性肿瘤,在全世界范围内发病率及死亡率均居首位,且逐年成上升趋势。肺癌包括非小细胞肺癌及(non-small cell lung cancer,NSCLC)小细胞肺癌(SCLC),前者占了将近85%的比例。近些年来虽然随着外科手术、化疗、放疗等医学技术手段不断提高,肺癌患者术后5年生存率仍不足5%,预后极差。造成这一结果的主要原因是肺癌的侵袭转移,因此探讨肺癌细胞的侵袭转移机制对于肺癌的治疗将具有重要意义[1-3]。miRNA是一种长度约为21~23 nt的高度保守的非编码小RNA分子,通过靶向调控靶基因mRNA表达,参与细胞的增殖、分化、凋亡、迁移及侵袭转移等生命过程[4,5]。众多研究已经表明miRNA在包括肺癌在内的众多肿瘤组织中异常表达,miR-424是其中一种[5,6]。miR-424是miR-16家族的一员,研究显示miR-424在不同的肿瘤组织中表达趋势不同,在NSCLC、乳腺癌、肾癌等组织中表达量上调,在宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌中表达量下调[7,8],但在肿瘤的发生过程中的具体作用机制尚未见报道,因此本研究将探讨miR-424在肺癌细胞株中的表达,及其对肺癌细胞迁移及侵袭的影响及相关机制。

1　材料和方法

1.1　细胞株

人大细胞肺癌细胞NCI-H460,人肺腺癌细胞NCI-H1975,人小细胞肺癌细胞NCI-H446,人非小细胞肺癌细胞A549,H1299,NCI-157,人胚肺成纤维细胞MRC-5购于中国科学院上海细胞库。

1.2　主要试剂和仪器

miR-424 inhibitor和miR-424 NC均购自广州锐博技术有限公司。兔抗人MMP2、MMP9、TGF-β1、Smad3和p-Smad3多克隆抗体均购自美国Abcam公司。胎牛血清和DMEM培养基均购自美国Hyclone公司。辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)、BCA试剂盒和CCK-8试剂盒均购自南京凯基生物技术有限公司。Trizol法试剂盒、Lipofectamine™2000脂质体和一步法RT-PCR试剂盒均购自大连宝生生物技术有限公司。Transwell小室购自美国Corning公司。DYCZ-425D型双垂直电泳仪和DYCZ-40D型转印电泳仪均购自北京六一仪器厂。GelDoc XR System凝胶成像系统购自美国伯乐公司。FACSCalibur型流式细胞仪和168-1000XC型酶标仪均购自美国BD公司。AF6000型荧光显微镜购自德国莱卡公司。

1.3　实验方法

1.3.1　RT-PCR法检测miR-424在细胞中的表达

使用Trizol试剂盒提取细胞总RNA,并检测纯度;接着采用一步法RT-PCR将RNA逆转录为cDNA并进行扩增;最后利用琼脂糖凝胶电泳检测cDNA扩增产物。miR-424上游引物:5'-CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGAA-3',下游引物:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3';GAPDH上游引物:5'-AGCCACATCGCTCAGACA-3',下游引物:5'-TGGACTCCACGACGTACT-3'。上游引物和下游引物由上海生工合成。

1.3.2　细胞转染

当A549细胞生长至50%左右时,利用Lipofectamine™2000脂质体将miR-424 inhibitor和miR-424 NC转染到A549细胞中,6 h后弃去培养液,换成含10%血清的DMEM培养基并继续培养48 h。使用RT-PCR法检测细胞中miR-424表达。

1.3.3　CCK-8法检测A549细胞活力

将5×10^3个A549细胞接种至96孔板,培养24 h,按"1.3.2"进行转染,48 h时每孔中均加入CCK-8试剂,继续孵育4 h,然后利用酶标仪检测波长570 nm处的OD值,所测OD值即为细胞活力。

1.3.4　划痕实验检测细胞迁移能力

取按"1.3.2"进行转染的A549细胞接种到6孔板,继续培养24 h后,用200 μL的枪头对6孔板内的细胞进行划痕,接着用PBS洗去脱落下来的细胞,继续培养24 h,于倒置显微镜下进行拍照并每孔选取4个视野进行划痕距离的记录。

1.3.5　Transwell法检测细胞侵袭能力

实验前将Matrigel胶均匀的平铺于Transwell小室微膜上,备用。将1×10^4个A549细胞接种于6孔板后,按"1.3.2"进行转染,继续培养48 h后,用

胰蛋白酶将细胞消化下来并制成单悬液,用含有10%胎牛血清的DMEM培养基重悬,并接种至Transwell上室,下室仅加入含10%胎牛血清的DMEM培养基,48 h后,将Transwell小室取出,用多聚甲醛固定细胞,接着结晶紫染色,并在倒置显微镜下进行观察,对Transwell下室5个视野中的细胞计数取平均值,即为细胞的侵袭数目。

1.3.6 Western blot检测细胞MMP2、MMP9、TGF-β1、Smad3、p-Smad3中表达

将1×10^5个细胞接种至6孔板,按"1.3.2"操作步骤进行转染,培养48 h,在冰浴条件下将6孔板中的细胞刮取并离心收集,向其中加入细胞裂解液,30 min后离心收取上清液即为总蛋白,总蛋白浓度测定及定量根据BCA试剂盒说明书进行,接着将蛋白煮沸变性,取大约30 ng左右蛋白样品上样,进行十二烷基苯磺酸钠凝胶电泳2 h;接着湿法转膜30~50 min。2%BSA室温下孵育1 h,一抗溶液(兔MMP2,MMP9,TGF-β1,Smad3,p-Smad3多克隆抗体,稀释度为1∶100) 4℃过夜孵育。第二天在室温条件下,在二抗溶液(辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG (H+L))中孵育1~2 h,凝胶成像系统中曝光。

1.4 统计学方法

所有数据均用SPSS 17.0软件进行统计分析,用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用t检验分析两组之间数据差异性,以$P<0.05$表示差异有显著性。

2 结果

2.1 miR-424在肺癌细胞及胚肺成纤维细胞中的表达

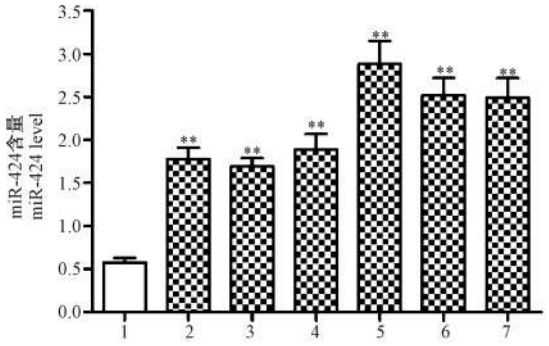
如图1所示,miR-424在肺癌细胞NCI-H460、NCI-H1975、NCI-H446、A549、NCI-H1299、NCI-H157中[(1.78±0.13)、(1.69±0.10)、(1.89±0.18)、(2.88±0.27)、(2.52±0.20)、(2.49±0.23)]的表达量显著高于miR-424在人胚肺成纤维细胞MRC-5(0.58±0.05)中的表达量,差异有显著性($P<0.01$)。

2.2 miR-424 inhibitor转染效果的检测

如图2所示,与miR-424 NC组(2.89±0.28)比较,miR-424 inhibitor组(0.74±0.07)中miR-424表达量下降($P<0.01$)。

2.3 miR-424 inhibitor对A549细胞活力的影响

与miR-424 NC组(0.72±0.07)比较,miR-424 inhibitor组(0.35±0.03)细胞活力均降低($P<0.01$)。

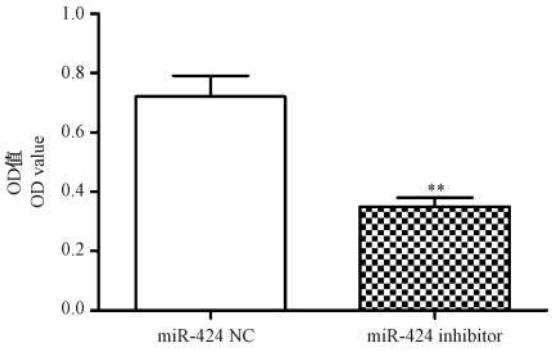


注:1:MRC-5;2:NCI-H460;3:NCI-H1975;4:NCI-H446;5:A549;6:NCI-H1299;7:NCI-H157;与MRC-5比较,$^{**}P<0.01$;miR-214表达量即是miR-214的拷贝数。

图1 miR-424在肺癌细胞及胚肺成纤维细胞中的表达

Note. 1:MRC-5 cells;2:NCI-H460 cells;3:NCI-H1975 cells;4:NCI-H446 cells;5:A549 cells;6:NCI-H1299 cells;7:NCI-H157 cells; Compared with MRC-5, $^{**}P<0.01$; The expression of miR-214 is miR-214 copy number.

Fig. 1 Expression of miR-424 in the lung cancer cells and embryonic lung fibroblasts



注:与miR-424 NC比较,$^{**}P<0.01$。

图2 miR-424 inhibitor转染效果的检测

Note. Compared with the miR-424 NC, $^{**}P<0.01$.

Fig. 2 Detection of transfection efficiency of miR-424 inhibitor

2.4 miR-424 inhibitor对A549细胞迁移及侵袭能力的影响

如图3所示,与miR-424 NC组(25.34±2.35)比较,miR-424 inhibitor组(4.78±0.45)细胞迁移距离降低($P<0.01$)。如图4所示,与miR-424 NC组(156.49±14.55)比较,miR-424 inhibitor组(39.76±3.28)细胞侵袭数目降低($P<0.01$)。

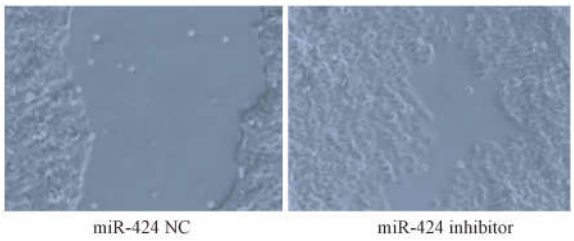


图 3　miR-424 inhibitor 对 A549 细胞迁移能力的影响(×200)

Fig. 3　Effect of miR-424 inhibitor on A549 cell migration ability

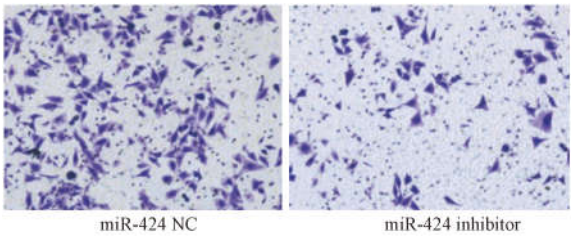


图 4　miR-424 inhibitor 对 A549 细胞侵袭能力的影响(×200)

Fig. 4　Effect of miR-424 inhibitor on A549 cell invasion ability

2.5　miR-424 inhibitor 对 A549 细胞中 MMPs 表达量的影响

如图 5 所示,与 miR-424 NC 组比较,miR-424 inhibitor 组中 MMP2、MMP9 表达量显著下调,差异有显著性($P < 0.01$)。

2.6　miR-424 inhibitor 对 A549 细胞中 TGF-β 信号通路的影响

如图 6 所示,与 miR-424 NC 组比较,miR-424 inhibitor 组中 TGF-β1、p-Smad3 表达量显著下调,差异有显著性($P < 0.01$)。

3　讨论

相关学者于 1993 年在秀丽隐杆线虫中首次发现了 miRNA 的存在,即 lin-4;于 2000 年在秀丽隐杆线虫中又发现了第二个 miRNA,即 let-7。后续的十几年来在脊椎动物、植物及病毒中发现了近千种的 miRNA,并发现了 miRNA 不仅与生长发育,免疫调控有关,还发现 miRNA 所定位的基因组处于肿瘤相关的脆性区,提示了 miRNA 与肿瘤的发生可能密切相关[4,5]。相关学者于 2002 年证实了 miRNA 和肿瘤的关系,慢性淋巴细胞白血病患者中 miR-15 和 miR-16 表达量下调,并且这两个 miRNA 与白血病

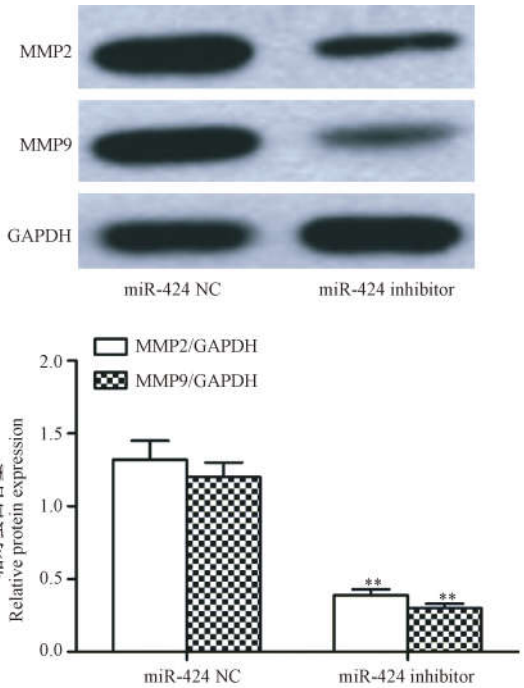


图 5　miR-424 inhibitor 对 A549 细胞中 MMPs 表达量的影响

Fig. 5　Effect of miR-424 inhibitor on the expression of MMPs in A549 cells

的发生发展密切相关,引发了探讨 miRNA 在肿瘤发生过程中的作用的相关研究[5,6]。miR-15/16 家族包括了 miR-15a/b, miR-16, miR-195, miR-424 和 miR-497。其中 miR-424 定位于人类染色体 Xq26.3 上,但在鼠类中的同源物为 miR-322。研究显示 miR-424 在不同的生理和病理条件下其作用效果不一样。如 miR-424 在 NSCLC、乳腺癌、肾癌等组织中表达量上调,在宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌中表达量下调,但具体的作用机制尚未见报道[7,8]。因此本研究将探讨 miR-424 在肺癌中的作用机制。首先 Chen 等[9]研究发现 miR-424 在肺癌患者病灶组织及肺癌细胞系中的表达量均显著提高。Donnem 等[10]研究发现生存时间短的 NSCLC 患者中 miR-424 表达量显著的高于生存时间长的 NSCLC 患者,且这一过程可能与 miR-424 促血管生成有关。所以本研究首先利用 RT-PCR 法检测肺癌细胞 NCI-H460, NCI-H1975, NCI-H446, A549, NCI-H1299, NCI-H157 及人胚肺成纤维细胞 MRC-5 中 miR-424 的表达量,结果与 Chen 等[9], Donnem 等[10]研究一致,肺癌细胞中 miR-424 的表达量显著高于 MRC-5 细胞中的表达量,提示 miR-424 在肺癌的发生发展中起促进作用。同时 miR-424 在 A549 中的表达量

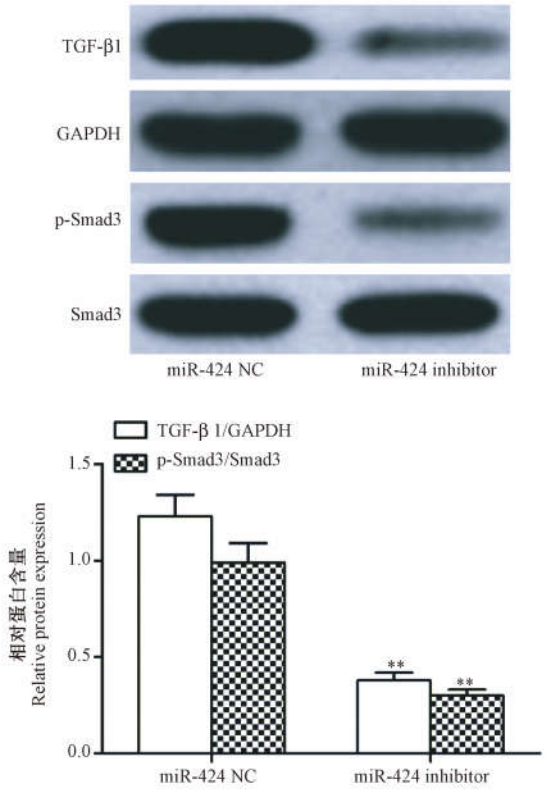


图6 miR-424 inhibitor对A549细胞中TGF-β信号通路的影响

Fig. 6 Effect of miR-424 inhibitor on TGF-β signal pathway in A549 cells

最高,所以本研究选取此细胞株作为后续研究对象。接着利用脂质体转染miR-424 inhibitor和miR-424 NC,RT-PCR法证明转染成功。进一步CCK-8法检测miR-424 inhibitor对A549细胞活力的影响,结果表明miR-424 inhibitor能显著的降低A549活力,与miR-424在胃癌细胞中的作用一致[11]。

研究已经显示肺癌细胞的侵袭转移是导致肺癌患者预后不良,5年生存率低的主要原因[1-3]。因此本研究进一步的探讨miR-424 inhibitor对A549细胞迁移及侵袭能力的影响,结果表明miR-424 inhibitor能显著的抑制A549的迁移及侵袭能力。weel,Chk1,CYLD,Wnt3a,BCL-2,E2F6蛋白是目前已报道的miR-424的靶基因,但上述蛋白主要与细胞增殖、凋亡、细胞周期有关的,而与细胞的迁移及侵袭关系不大[7,8]。另外细胞外基质的降解是细胞迁移,侵袭及转移等过程中的必经过程,MMPs是降解细胞外基质最为主要的蛋白水解酶。同时MMPs也是一组Zn^{2+}-Ca^{2+}依赖性蛋白酶,可以降解几乎所有的ECM成分。其中MMP2可以通过降解细胞外基质成分和诱导血管新生进而促进肿瘤细胞浸润[12]。MMP9是MMPs中分子量最大的蛋白水解酶,几乎也能降解所有的细胞外基质成分,提高肿瘤细胞的运动能力[13]。所以本研究进一步的探讨miR-424 inhibitor对A549细胞迁移及侵袭的影响,结果表明miR-424 inhibitor能显著的下调MMP2及MMP9表达量,提示miR-155 inhibitor能通过下调MMPs进而抑制A549细胞的迁移及转移。

肿瘤细胞的迁移、侵袭等生物学过程受多种信号通路调控,TGF-β就是其中一种[14,15]。TGF-β包括TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3,其中TGF-β1研究最为广泛。而TGF-β1/Smad信号通路也是TGF-β1介导的最为主要的信号通路,TGF-β1与其下游受体Smad2/3结合后,将信号传递到细胞核,进而调控靶基因的转录。且有研究表明miR-424能通过抑制TGF-β1/Smad3信号通路进而抑制胃癌细胞的增殖,迁移等生物学行为[11],提示miR-424可能也可以通过调控TGF-β1/Smad3信号通路进而抑制A549细胞的迁移及侵袭。所以本研究继续探讨miR-424 inhibitor对A549细胞中TGF-β1/Smad3信号通路的影响,结果表明miR-424 inhibitor能显著的下调TGF-β1、p-Smad3表达,进而抑制A549细胞的迁移及侵袭。

综上所述,miR-424在肺癌细胞中的表达量高于人胚肺成纤维细胞中的表达量,miR-424 inhibitor能显著的抑制A549细胞的迁移及侵袭,并下调MMP2及MMP9表达,与抑制TGF-β1/Smad3信号通路有关。

参考文献:

[1] Baker S, Dahele M, Lagerwaard FJ, et al. A critical review of recent developments in radiotherapy for non-small cell lung cancer[J]. Radiat Oncol, 2016,11(1):115.

[2] Paleiron N, Bylicki O, Andre M, et al. Targeted therapy for localized non-small-cell lung cancer: a review[J]. Onco Targets Ther, 2016,9:4099-4104.

[3] Counago F, Rodriguez A, Calvo P, et al. Targeted therapy combined with radiotherapy in non-small-cell lung cancer: a review of the Oncologic Group for the Study of Lung Cancer (Spanish Radiation Oncology Society)[J]. Clin Transl Oncol, 2017,19(1):31-43.

[4] Cai Y, Yu X, Hu S, et al. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation[J]. Genom Proteom Bioinform, 2009,7(4):147-154.

[5] Gambari R, Brognara E, Spandidos D A, et al. Targeting oncomiRNAs and mimicking tumor suppressor miRNAs: New trends in the development of miRNA therapeutic strategies in

oncology (Review)[J]. Int J Oncol, 2016,49(1):5 -32.
[6] 许文剑, 苏秀兰, 刘明. miRNA 与肿瘤关系的研究进展[J]. 医学综述, 2013,19(17):3120 -3123.
[7] 刘萍, 赵海苹, 罗玉敏. MicroRNA-424 在肿瘤发生中的作用和机制研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2016,24(5):529 -534.
[8] 赵海苹, 刘萍, 罗玉敏. MicroRNA-424 参与多种疾病发生发展的分子机制研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2016,26(9):76 -82.
[9] Chen B, Duan L, Yin G, et al. Simultaneously expressed miR-424 and miR-381 synergistically suppress the proliferation and survival of renal cancer cells——Cdc2 activity is up-regulated by targeting WEE1[J]. Clinics (Sao Paulo), 2013,68(6):825 -833.
[10] Donnem T, Fenton CG, Lonvik K, et al. MicroRNA signatures in tumor tissue related to angiogenesis in non-small cell lung cancer[J]. PLoS One, 2012,7(1):e29671.
[11] Wei S, Li Q, Li Z, et al. miR-424-5p promotes proliferation of gastric cancer by targeting Smad3 through TGF-beta signaling pathway[J]. Oncotarget, 2016.
[12] Ekbote A V, Danda S, Zankl A, et al. Patient with mutation in the matrix metalloproteinase 2 (MMP2) gene - a case report and review of the literature[J]. J Clin Res Pediatr Endocrinol, 2014,6(1):40 -46.
[13] Gong L, Wu D, Zou J, et al. Prognostic impact of serum and tissue MMP-9 in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Oncotarget, 2016,7(14):18458 -18468.
[14] Sun N, Taguchi A, Hanash S. Switching roles of TGF-beta in cancer development: implications for therapeutic target and biomarker studies[J]. J Clin Med, 2016,5(12).
[15] Barrett CS, Millena AC, Khan SA. TGF-beta effects on prostate cancer cell migration and invasion require FosB[J]. Prostate, 2017,77(1):72 -81.

〔收稿日期〕2017 -02 -14

(上接第 73 页)

参考文献:

[1] Wakeman DR, Crain AM, Snyder EY. Large animal models are critical for rationally advancing regenerative therapies[J]. Regen Med,2006, 1:405 -413.
[2] Pan J, Min F, Wang X, et al. Establishment of a special pathogen free Chinese Wuzhishan minipigs colony[J]. J AnimSci Technol,2015, 57:7.
[3] DB11/T 828.1 -2011, 实验用小型猪第 1 部分:微生物学等级及监测[S].
[4] DB11/T 828.2 -2011, 实验用小型猪第 2 部分:寄生虫学等级及监测[S].
[5] DB31/T 240 -2001, 实验动物实验用小型猪[S].
[6] DB45/T546 -2008, 实验动物小型猪[S].
[7] 胡燕, 杨欣艳, 王传彬, 等. 我国实验用小型猪三个种群微生物感染状况调查[J]. 中国比较医学杂志, 2006,16(10): 599 -602.
[8] 田维毅, 钱宁, 王平, 等. 贵州小型猪病原生物携带和感染状况的调查[J]. 实验动物科学,2007,24(6):86 -88.
[9] 杨欣艳, 胡燕, 王传彬,等. 国内不同地区实验用小型猪种群微生物感染状况调查[J]. 实验动物科学, 2007,24(1):21 -24.
[10] 王峰, 孙瑞萍, 刘涛, 等. 海南封闭群五指山小型猪病原微生物携带状况调查[J]. 江苏农业科学,2012,40(7): 200 -201.
[11] 2016 年国家动物疫病强制免疫计划[E]. 农医发[2016]10 号.
[12] 孙倩. 实验动物学基础[M]. 北京:北京科学技术出版社. 2005:97 -129.
[13] 万庆文, 谢王韵, 温贤诚, 等. 广东东莞地区猪肺炎支原体感染的血清学调查[J]. 广东畜牧兽医科技. 2014,39(3):22 -23.
[14] 潘金春, 任柏桦, 闵凡贵, 等. 不同品系小型猪对高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的敏感性筛选[J]. 中国比较医学杂志,2015,25(6):14 -17.

〔收稿日期〕2017 -03 -21

研究报告

siRNA 沉默 MACC1 基因表达对宫颈癌细胞增殖及侵袭的影响

杜　珍,陈志美,周道秋,黄洁萍

(海南省第二人民医院妇产科,海南 五指山　572299)

【摘要】 **目的**　探讨 siRNA 沉默结肠癌转移相关基因 1(MACC1)表达对 Hela 宫颈癌细胞增殖及侵袭的影响。**方法**　通过脂质体将 siRNA MACC1 及 siRNA NC 转入 Hela 细胞中,RT-PCR 及 western blot 检测转染效果,MTT 法检测细胞活力,流式细胞术检测细胞周期,Transwell 法检测细胞侵袭能力,western blot 检测细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)、cyclin E,基质金属蛋白酶 2(MMP2)、MMP9 蛋白表达及细胞外调节蛋白激酶(ERK)磷酸化水平。**结果** 与 siRNA NC 组比较,siRNA MACC1 组中 MACC1 蛋白及 mRNA 表达量降低($P < 0.01$),细胞活力及侵袭能力下降($P < 0.01$),细胞周期阻滞在 G1 期,cyclin D1、cyclin E、MMP2、MMP9 及 p-ERK 表达量下调($P < 0.01$)。**结论** siRNA MACC1能显著的抑制宫颈癌 Hela 细胞增殖与侵袭,可能与下调 ERK 磷酸化水平有关。

【关键词】 结肠癌转移相关基因 1(MACC1);宫颈癌;增殖;侵袭

【中图分类号】R－33　　【文献标识码】A　　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0080-05

doi: 10.3969. j. issn. 1671－7856. 2017. 10. 016

Effect of silencing MACC1 gene on proliferation and invasion of cervical cancer cells

DU Zhen, CHEN Zhi-mei, ZHOU Dao-qiu, HUANG Jie-ping

(Department of Obstetrics and Gynecology; the Second People's Hospital of Hainan province, Wuzhishan 72299, China)

【**Abstract**】 **Objective**　To explore the effect of silencing metastasis-associated in colon cancer 1 (MACC1) gene on proliferation and invasion of cervical cancer Hela cells. **Methods**　siRNA MACC1 and siRNA NC were transfected into cervical cancer Hela cells with liposomes. The expression of MACC1 protein and mRNA was detected by western blot and RT-PCR. Cell viability and invasion ability were measured by MTT and transwell assay, respectively. The expression of cyclin D1, cyclin E matrix metalloproteinase 2 (MMP2), MMP9 and the level of extracellular regulated protein kinases (ERK) phosphorylation was detected by western blot. **Results**　Compared with siRNA NC, the expression of MACC1 protein and mRNA was down-regulated, cell viability and invasion ability were reduced ($P < 0.01$), cell cycle was arrested at G1 phase ($P < 0.01$), the expression of cyclin D1, cyclin E, MMP2, MMP9 and p-ERK1/2 was down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusions**　siRNA MACC1 can inhibit proliferation and invasion of cervical cancer Hela cells, which migiht be related to down-regulation of p-ERK.

【**Key words**】 Metastasis-associated in colon cancer 1(MACC1); Cervical cancer; Proliferation; Invasion

[作者简介]杜珍(1966－),女,本科,副主任医师,研究方向:妇科宫腔镜。E-mail: 1137232558@qq.com

宫颈癌是一种常见的女性恶性肿瘤,仅次于乳腺癌,近些年来由于宫颈癌细胞筛查技术的推广使得宫颈癌的发病率及死亡率均有所下降,但是随着高危型人乳头状病毒(HPV)持续感染的增加,导致了目前宫颈癌的发病年龄呈现了年轻化[1,2]。同时宫颈癌的发病机制到目前为止还未详细阐述,因此从分子水平上进一步的探讨宫颈癌的发病机制对于宫颈癌的诊断,基因治疗及预后将具有重大意义。Stein 等学者在 2009 年结肠癌研究中发现了结肠癌转移相关基因 1(metastasis-associated in colon cancer 1,MACC1),且后续研究表明 MACC1 在众多的肿瘤组织中高表达,并与肿瘤的侵袭转移密切相关[3-6]。也有众多学者研究发现 MACC1 在正常宫颈组织,中-重度宫颈上皮内瘤变组织,宫颈癌组织中逐渐高表达,且发现 MACC1 在宫颈癌细胞的侵袭转移中发挥重要作用[7,8]。但 MACC1 在宫颈癌细胞的增殖及侵袭中的作用还未见报道,因此本研究将较为详细的阐述此作用机制。

1　材料和方法

1.1　细胞株

宫颈癌细胞 Hela 购自中国科学院细胞库,目录号 TCHu187。

1.2　主要试剂和仪器

兔抗人 MACC1、cyclin D1、cyclin E、MMP2、MMP9、ERK1/2、p-ERK1/2 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司;兔抗人 GAPDH 单克隆抗体,BCA 蛋白测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;胎牛血清,DMEM 培养基购自 Hyclone 公司;transwell 小室购自美国 Corning 公司;siRNA MACC1 及 siRNA NC 购自上海吉玛生物制药公司;一步法 RT-PCR 扩增试剂盒,trizol RNA 提取试剂盒购自大连宝生生物技术有限公司。DYCZ-25D 型双垂直电泳仪,DYCZ-25D 型转印电泳仪购自北京六一仪器厂;GelDoc 2000 凝胶成像系统购自美国伯乐公司;Biosciences FACSAria 流式细胞仪购自美国 BD 公司;MK3 酶标仪购自美国 Thermo 公司。

1.3　实验方法

1.3.1　siRNA 的转染

当 Hela 细胞生长达到 50% 左右的时候,利用脂质体将 siRNA MACC1 及 siRNA NC 转染到 Hela 细胞中,6 h 后换液,继续培养 48 h,利用 RT-PCR 法及 western blot 法检测转染效果。

1.3.2　MTT 法检测细胞活力

将 Hela 细胞接种到 96 孔板,培养 24 h 后,按“1.3.1”进行转染,继续培养 48 h 后,加入 MTT 20 μL,培养 4 h,将 96 孔板翻过来弃去上清液,再往 96 孔板中每个孔加入 150 μL 的二甲基亚砜,96 孔板在微量振荡器中震荡约 10 min,最后在酶标仪中检测 OD 值,波长选择为 560 nm,OD 值即是细胞活力。

1.3.3　流式细胞术检测细胞周期

将 Hela 细胞接种到 6 孔板,培养 24 h 后,按“1.3.1”进行转染,继续培养 48 h 后,每组分别收集 1×10^5/mL 个细胞,加入 Rnase(终浓度为 10 mg/mL)5 μL,小心吹打吹打混匀后,室温下孵育 1 h,再加入 PI 染液,继续吹打混匀,并在室温下避光孵育 30 min,于 1 h 内在流式细胞仪进行细胞周期检测分析。

1.3.4　Transwell 法检测细胞侵袭能力

将 matrigel 胶平铺于 Transwell 小室微膜上以被使用。利用 0.25% 胰蛋白酶将按“1.3.1”进行转染并培养了 48 h 的 Hela 细胞消化下来,离心收集细胞后,将细胞接种到 Transwell 的上室,下室不接种细胞,仅加入 DMEM 培养基,48 h 后,将 Transwell 小室取出来,用 4% 的多聚甲醛固定 5 min,PBS 洗涤后,结晶紫再染色 5 min,在倒置显微镜下观察,并取 5 个视野中的细胞数目进行计数,取平均值,即为细胞的侵袭数目。

1.3.5　RT-PCR 检测 MACC1 mRNA 的表达

采用 trizol RNA 提取试剂盒提取细胞总的 RNA,并用检测总 RNA 的纯度,当检测结果 OD260/OD280 在 1.8 ~2.1 之间,说明 RNA 纯度的良好,可以接着采用一步法 RT-PCR 试剂盒逆转录 RNA,而逆转录产物 cDNA 进行扩增,最后将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。引物如下。MACC1 上游引物:5'-AACCCCAAACCTAAAAAGACTC-3',下游引物:5'-ACCCAGGACATCAGCTAAAACT-3',GAPDH 上游引物:5'-AGCCACATCGCTCAGACA-3',下游引物:5'-TGGACTCCACGACGTACT-3'。

1.3.6　Western blot 检测 cyclin D1、cyclin E、MMP2、MMP9 及 p-ERK 的表达

在冰浴条件下把细胞刮下来,离心加入细胞裂解液进行裂解,大约 30 min,并在 4℃ 条件下离心,收集到的上清液即是总蛋白。接着采用 BCA 试剂盒对蛋白浓度进行测定。蛋白定容后,在微波炉上

煮沸变性。制作浓缩胶和分离胶,并蒸馏水封闭。然后蛋白样品上样,进行十二烷基苯磺酸钠凝胶电泳,湿法转膜。5%脱脂奶粉封闭1 h,一抗溶液(兔抗人 cyclin D1、cyclin E、MMP2、MMP9、ERK1/2,p-ERK1/2 及 GAPDH 多克隆抗体,稀释度为1∶100)孵育,4℃过夜;第二天在二抗溶液中室温条件下孵育1~2 h。最后在凝胶成像系统中曝光。

1.4 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验分析组间差异性,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性,。

2 结果

2.1 siRNA MACC1 对 Hela 细胞中 MACC1 表达的影响

如图1所示,与 siRNA NC 组中 MACC1 蛋白(1.07±0.10)及 mRNA(0.69±0.07)表达比较,siRNA MACC1 组 MACC1 蛋白(0.29±0.03)及 mRNA(0.12±0.01)表达下调,差异有显著性($P < 0.01$)。

2.2 siRNA MACC1 对 Hela 细胞活力的影响

Hela 细胞转染 siRNA NC 及 siRNA MACC1,48 h后经 MTT 实验发现,二者细胞活力分别为(0.73±0.07)、(0.38±0.03),差异有显著性($P < 0.01$)。

2.3 siRNA MACC1 对 Hela 细胞周期的影响

如表1所示,Hela 细胞转染 siRNA NC 及 siRNA MACC1,48 h 后经流式细胞周期实验发现,siRNA MACC1 能使细胞周期阻滞在 G1 期。

2.4 siRNA MACC1 对 Hela 细胞侵袭能力的影响

如图2所示,Hela 细胞转染 siRNA NC 及 siRNA MACC1,48 h 后经 transwell 侵袭实验发现,二者细胞侵袭数目分别为(159.65±15.94)、(38.59±3.86),差异有显著性($P < 0.01$)。

2.5 siRNA MACC1 对 Hela 细胞中 cyclin D1 及 cyclin E 表达的影响

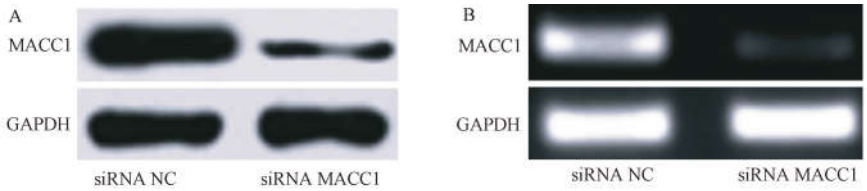
如图3所示,Hela 细胞转染 siRNA NC 及 siRNA MACC1,48 h 后经 western blot 实验发现,与 siRNA NC 组中 cyclin D1(0.54±0.05)及 cyclin E(0.60±0.06)表达比较,siRNA MACC1 组 cyclin D1(0.15±0.01)及 cyclin E(0.20±0.02)表达下调,差异有显著性($P < 0.01$)。

2.6 siRNA MACC1 对 Hela 细胞中 MMP2 及 MMP9 表达的影响

如图4所示,Hela 细胞转染 siRNA NC 及 siRNA MACC1,48 h 后经 western blot 实验发现,与 siRNA NC 组中 MMP2 (1.19±0.12)及 MMP9 (1.03±0.10)表达比较,siRNA MACC1 组 MMP2 (0.30±0.03)及 MMP9 (0.24±0.02)表达下调,差异有显著性($P < 0.01$)。

2.7 siRNA MACC1 对 Hela 细胞中 EKR 磷酸化水平的影响

如图5所示,Hela 细胞转染 siRNA NC 及 siRNA MACC1,48 h 后经 western blot 实验发现,与 siRNA NC 组(1.38±0.12)比较,siRNA MACC1 组(0.46±0.04)p-ERK1/2 表达下调 ($P < 0.01$)。



A:蛋白表达;B:mRNA 表达。

图1 siRNA MACC1 对 Hela 细胞中 MACC1 表达的影响($n=6$)

Note. A:Protein expression;B:mRNA expression.

Fig. 1 Effect of siRNA MACC1 on the expression of MACC1 in Hela cells

表1 siRNA MACC1 对 Hela 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$, %)

Tab. 1 Effect of siRNA MACC1 on Hela cell cycle

组别 Groups	G1 期 G1 phage	S 期 S phage	G2 期 G2 phage
siRNA NC	48.37±4.90	16.43±1.64	35.20±3.52
siRNA MACC1	62.54±6.29**	11.48±1.20**	25.98±2.60**

注:与 siRNA NC 比较,**$P < 0.01$。

Note. Compared with the siRNA NC group, **$P < 0.01$.

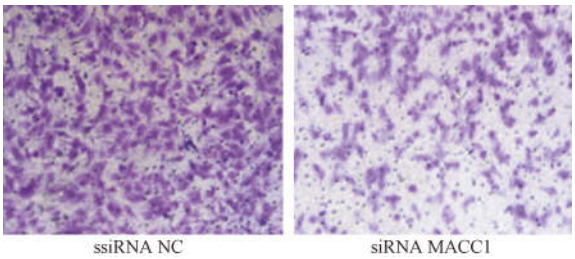


图 2　siRNA MACC1 对 Hela 细胞侵袭能力的影响(×200)

Fig. 2　Effect of siRNA MACC1 on the invasion ability of Hela cells

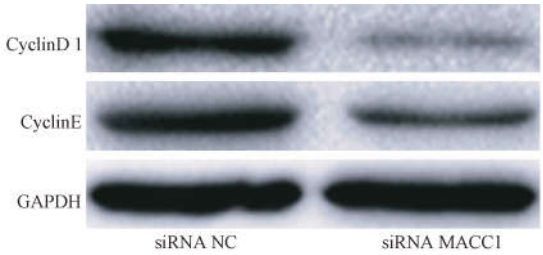


图 3　siRNA MACC1 对 Hela 细胞中 CyclinD1 及 CyclinE 表达的影响

Fig. 3　Effect of siRNA MACC1 on the expression of cyclin D1 and cyclin E in Hela cells

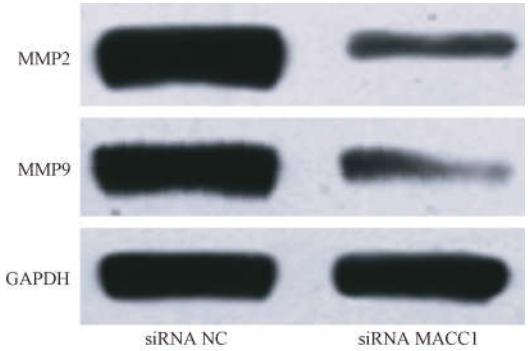


图 4　siRNA MACC1 对 Hela 细胞中 MMP2 及 MMP9 表达的影响

Fig. 4　Effect of siRNA MACC1 on the expression of MMP2 and MMP9 in Hela cells

3　讨论

2009 年 Stein 等学者通过基因比对技术在结肠癌的研究中发现了一种与结肠癌转移密切相关的基因,并命名为 MACC1。MACC1 位于人第 7 号染色体上,所编码的蛋白质由 852 个氨基酸组成。此蛋白质结构域包括 ZU5,SH3 及死亡结构域等,能够介导蛋白质之间相互作用,信号传导,也能够参与细胞凋亡,迁移,炎症反应及免疫调节[5,6]。MACC1

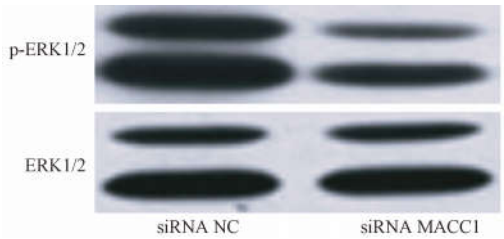


图 5　siRNA MACC1 对 Hela 细胞中 p-ERK1/2 表达的影响

Fig. 5　Effect of siRNA MACC1 on the expression of p-ERK1/2 in Hela cells

是 HGF/c-Met 信号通路中关键调节因子,能够结合于 c-Met 启动子,激活此信号通路,进而调控下游靶基因的转录表达,也能够促使 c-Met 自身发生磷酸化,进而介导多种生物学反应[5]。众多研究已经表明 MACC1 在宫颈癌、乳腺癌、卵巢癌等多种妇科肿瘤中高表达,并与肿瘤细胞的侵袭转移密切相关[5,7,8]。另外研究还表明 siRNA MACC1 能够显著的抑制宫颈癌细胞的侵袭转移,与下调 MMP2 及 MMP9 表达有关[9]。但是目前 MACC1 在宫颈癌细胞的增殖及侵袭中的作用报道较少,并且相应作用机制不清楚,因此本课题组将对此展开研究。本研究首先利用脂质体将 siRNA MACC1 及 siRNA NC 转染到宫颈癌细胞 Hela 中,并利用 western blot 及 RT-PCR 证实转染成功。接着采用 MTT 法检测 siRNA MACC1 对 Hela 细胞活力的影响,结果表明 siRNA MACC1 能显著的降低 Hela 细胞活力,与 Zhou 等[9]研究一致。

肿瘤细胞增殖旺盛源于细胞周期的紊乱,细胞周期相关蛋白异常表达,使细胞周期调控系统失去控制,导致细胞中蛋白质合成远大于分解,细胞有丝分裂加快,细胞不断增值。其中 G1 期,G2 期是细胞周期主要调控点,是众多抗肿瘤药物作用靶点[10,11]。cyclin D1 是与 G1 期密切相关的细胞周期蛋白,在 G1 期合成并达到顶峰,能与 CDK4/6 结合形成复合物,促使下游核转录因子进入细胞核与细胞增殖相关基因结合,并促使其转录,最终使得 G1 期向 S 期迅速转换。cyclin E 亦是与 G1 期相关的细胞周期蛋白,能在 cyclin D1 降解后,与 CDK2 结合,促进 DNA 继续复制。另外肿瘤细胞的侵袭转移是导致外科手术失败的重要因素之一。其中细胞外基质的降解能够促使肿瘤细胞的快速迁移,介导这一个过程的是蛋白水解酶,其中最为主要的是 MMPs。MMP2 在降解细胞外基质成分的同时还能

够诱导新生血管的发生,进而促进肿瘤细胞的迁移、扩散及转移。MMP9是分子量最大的MMPs,几乎能够降解所有的细胞外基质成分,包括Ⅳ胶原。而且有研究表明siRNA MACC1能够通过下调cyclin D1,cyclin E表达,并使细胞周期阻滞在G1期,进而遏制胶质瘤细胞U251的增殖[12]。另外也有研究表明siRNA MACC1能够抑制大肠癌细胞的迁移侵袭与下调MMP2,MMP9的表达有关[13]。因此探讨siRNA MACC1对Hela细胞周期、细胞侵袭、细胞周期相关蛋白及MMPs表达的影响将具有重要意义。所以本研究进一步检测了siRNA MACC1对Hela细胞周期,细胞侵袭能力,细胞周期蛋白及MMPs表达的影响,结果表明siRNA MACC1能使细胞周期阻滞在G1期,降低细胞侵袭能力,下调cyclin D1,cyclin E,MMP2及MMP9表达,最终抑制Hela细胞的增殖与侵袭。

细胞的凋亡,增殖,分化,细胞周期,细胞迁移及侵袭等等生物学过程受多种信号通路的调控,MAPK信号通路就是其中的一种[14]。MAPK家族包括ERK,JNK及p38 MAPK三个主要亚族。其中EKR是此信号通路的关节调控点,包括5个亚族(ERK1-5),其中EKR1和ERK2研究得最为彻底,能通过自身磷酸化并将信号传递给下游基因进而调控细胞的生命过程。且有研究表明MACC1能够通过MAPK信号通路级联反应参与乳腺癌的发生发展[15]。提示MACC1可能也可以通过此信号通路影响宫颈癌的发生发展。所以本研究接着利用western blot检测siRNA MACC1对Hela细胞中ERK1/2磷酸化水平的影响,结果表明siRNA MACC1能显著的下调p-ERK1/2表达,进而遏制Hela细胞的增殖与侵袭。

综上所述,siRNA MACC1能显著降低Hela细胞活力,使细胞周期阻滞在G期,并降低细胞侵袭能力,是通过下调cyclin D1、cyclin E、MMP2及MMP9表达实现的,可能与抑制ERK信号通路激活有关。

参考文献:

[1] Abboud S, De Penning E, Brawner BM, et al. Cervical cancer screening among arab women in the United States: an integrative review[J]. Oncol Nurs Forum, 2017,44(1):E20-E33.

[2] Perkins AC, Skinner EN. A review of the current cervical cancer screening guidelines[J]. N C Med J, 2016,77(6):420-422.

[3] Zhen T, Dai S, Li H, et al. MACC1 promotes carcinogenesis of colorectal cancer via beta-catenin signaling pathway[J]. Oncotarget, 2014,5(11):3756-3769.

[4] Sheng XJ, Li Z, Sun M, et al. MACC1 induces metastasis in ovarian carcinoma by upregulating hepatocyte growth factor receptor c-MET[J]. Oncol Lett, 2014,8(2):891-897.

[5] 柴红霞, 杨永秀. MACC1与妇科肿瘤的研究进展[J]. 中国肿瘤, 2015,24(12):1022-1025.

[6] Wu Z, Zhou R, Su Y, et al. Prognostic value of MACC1 in digestive system neoplasms: a systematic review and meta-analysis[J]. Biomed Res Int, 2015,2015:252043.

[7] Guo L, Lu W, Zhang X, et al. Metastasis-associated colon cancer-1 is a novel prognostic marker for cervical cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014,7(7):4150-4155.

[8] 石琳, 李丽. 宫颈癌组织中MACC1、c-Met蛋白表达相关性及与盆腔淋巴结转移的关系[J]. 中国老年学杂志, 2015,35(20):5819-5820.

[9] Zhou X, Xu C J, Wang J X, et al. Metastasis-associated in colon cancer-1 associates with poor prognosis and promotes cell invasion and angiogenesis in human cervical cancer[J]. Int J Gynecol Cancer, 2015,25(8):1353-1363.

[10] 张百红, 岳红云. 肿瘤检查点相关研究进展[J]. 癌症进展, 2015,13(3):260-264.

[11] Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2017,17(2):93-115.

[12] Sun L, Li G, Dai B, et al. Silence of MACC1 expression by RNA interference inhibits proliferation, invasion and metastasis, and promotes apoptosis in U251 human malignant glioma cells[J]. Mol Med Rep, 2015,12(3):3423-3431.

[13] Gao J, Ding F, Liu Q, et al. Knockdown of MACC1 expression suppressed hepatocellular carcinoma cell migration and invasion and inhibited expression of MMP2 and MMP9[J]. Mol Cell Biochem, 2013,376(1-2):21-32.

[14] 周璇, 阳学风. 神经酰胺诱导肿瘤细胞凋亡的机制研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015(1):174-177.

[15] Kim GE, Lee JS, Park MH, et al. Metastasis associated in colon cancer 1 predicts poor outcomes in patients with breast cancer[J]. Anal Quant Cytopathol Histpathol, 2015, 37(2): 96-104.

〔收稿日期〕2017-04-14

研究进展

T 细胞亚群在心室重构中的作用研究进展

顾文超[1],周晓慧[2,3],林　芳[2,3],范慧敏[1,2,3*]

(1. 同济大学附属东方医院心外科,上海　200120; 2. 同济东方转化医学中心,上海　200120;
3. 上海市心力衰竭研究中心,上海　200120)

【摘要】 心室重构是多种心脏疾病最终进展为心力衰竭的主要原因。大量研究表明炎症反应在心室重构的发生和发展中发挥重要作用。最近的研究发现 T 细胞介导的慢性炎症反应与心室重构的发生密切相关。本文主要对 T 淋巴细胞亚群在心室重构中作用研究进展进行综述。

【关键词】 炎症反应;T 淋巴细胞;心室重构
【中图分类号】R－33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0085-04
doi: 10.3969. j. issn. 1671－7856. 2017. 10. 017

Advances in research on the role of T cell subsets in ventricular remodeling

GU Wen-chao[1], ZHOU Xiao-hui[2,3], LIN Fang[2,3], FAN Hui-min[1,2,3*]
(1. Department of Cardiac Surgery, Shanghai East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200120, China; 2. Research Center for Translational Medicine, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200120; 3. Shanghai Heart Failure Institute, Shanghai 200120)

【Abstract】 Ventricular remodeling is one of the main causes of heart failure. A large number of studies have shown that inflammation plays an important role in the occurrence and development of ventricular remodeling. Recent studies found that chronic inflammation mediated by T cells is closely related to the progression of ventricular remodeling. This review summarized the recent research progress of T lymphocyte subsets in ventricular remodeling.

【Key words】 Inflammation; T lymphocytes; Ventricular remodeling

心血管疾病是全球范围内疾病造成死亡的最主要原因之一,据世界卫生组织的报告,2015 年大约有 2 000 万人死于心血管疾病,未来也将继续成为全球疾病死亡的一个主要原因。心室重构是多种心脏疾病最终进展为心力衰竭的主要原因。在高血压,心肌病,瓣膜功能障碍和心肌梗死等疾病中,各种病理刺激,如压力和体积过载,肌节基因突变和神经体液活化等,导致长期和不受控制的肥厚性重构,以致心脏功能障碍,最终出现心力衰竭或心脏骤停。

近年研究发现,在不同病因导致的心肌肥大和重构过程中,均存在多种炎症信号通路的改变以及炎症细胞的激活,后者释放的炎症信号分子可诱导肥厚和纤维化反应。最近的研究认为,心脏原本驻留和募集而来的免疫细胞介导的炎症反应先于心肌细胞肥大和重塑,并持续存在于心室重构的整个过程中。早期的炎症反应有助于清除死亡细胞和促进瘢痕形成,防止心脏破裂,但是,过度的炎症反

[基金项目]国家自然科学基金(81370434,81670458,81470393,81400363);上海市领军人才(2012053);浦东新区卫计委重点学科群建设(PWZxq2014－01);上海市卫计委(ZY3－LCPT－2－1003);浦东新区科委(Pkj2013－z03);浦东新区卫计委(PW2013E－1)。
[作者简介]顾文超(1991. 06－),男,硕士研究生,研究方向:心室重构。E-mail: 149558643@qq.com
[通讯作者]周晓慧,E-mail: zxh100@tongji.edu.cn

应将引起细胞外基质的降解和细胞凋亡,导致心室重构和心力衰竭。以往认为,心脏损伤后的炎症反应主要涉及到中性粒细胞,巨噬细胞,树突状细胞等介导的固有免疫反应。近年研究发现,适应性免疫反应在心室重构中发挥重要作用,其中不同T细胞亚群参与的慢性炎症反应与心室重构的发生密切相关。

幼稚的T淋巴细胞在不同微环境中可以诱导分化为不同的T效应细胞亚群,并显示不同的功能。T细胞主要分为辅助性T细胞(T helper cells, Th cells),调节T细胞(regulatory T cells,Tregs),细胞毒性T细胞等。Th细胞根据其表达的转录因子和功能不同又可以分为Th1、Th2、Th17、Th22、Th9等亚型。不同T细胞亚群表达多种趋化因子受体,后者介导不同T细胞亚群的迁移和招募,迁移到炎症区域的T细胞发挥其特定的效应功能。有研究表明,T淋巴细胞在心室重构和心衰的发生发展中作用显著[1]。最近的研究发现,在多种心脏疾病中T细胞被招募到心脏局部,并且参与了心室重构的病理生理过程,敲除小鼠体内的T淋巴细胞可以明显改善多种原因所致的心室重构。在心脏TNF-α过表达的小鼠模型中,抗CD3抗体中和T细胞,能减少炎症细胞募集到心脏,并阻止心肌肥大[2]。在压力过载诱导的心肌肥大模型中,T细胞缺陷的Rag2小鼠的心肌纤维化程度减轻,而且巨噬细胞浸润减少[3]。另有研究报道,Rag1$^-$缺陷小鼠可以减轻血管紧张素Ⅱ诱导的高血压和血管功能障碍[4],提示T细胞可能参与了高血压导致的心脏肥大和重塑。最新的研究表明,敲除CD3$^+$T细胞可以改善糖尿病心肌病小鼠模型的心脏功能,并减轻心肌纤维化的程度[5]。

进一步的研究证实,T细胞亚群,包括Th1、Th2、Th17细胞、Tregs、杀伤性T细胞都在心肌的损伤修复和心室重构中扮演了重要的角色。

1 Th1和Th2与心室重构的发生密切相关

Th1主要是促炎症的细胞,而Th2主要是促纤维化的细胞。Th1和Th2可以潜在地调节巨噬细胞表型。Th1产生的细胞因子能影响巨噬细胞的激活,调节M1型巨噬细胞的极化和功能,进而促进心室重构的发生。因此,这两种细胞可能在心肌肥大和心室重构的不同阶段中发挥重要作用。在临床研究中发现,心梗患者体内的Th1明显上升而Th2明显下降[6]。另有临床试验表明,体内Th2的数量越多,血管壁的厚度越薄,患心梗的风险越小[7]。这些研究表明调节Th1和Th2细胞的分化可能是一种有效的方法抑制过度的炎症反应和不利的心室重构。

2 Th17促进不利的心室重构

Th17和Th1一样也是一类促炎性细胞。Th17分泌的炎症因子IL-17能促进心梗后的炎症反应,引起心肌肥大和心室重构。心梗患者体内Th1和Th17的水平明显升高[8],而且,心梗患者外周血中Th1和Th17细胞的比例与NYHA分数呈正相关[9],说明Th1和Th17作为两类促炎细胞亚群可导致不利的心室重构。在小鼠心梗模型中,敲除IL-17的心梗小鼠心腔扩张下降,心脏功能明显上升[10,11]。

Th17在高血压引起的心脏肥大和心室重构中也具有重要作用。已有研究证明,高血压患者中IL-17浓度增加[12]。在动物模型中,敲除IL-17显著降低血管紧张素Ⅱ诱导的高血压以及减弱血管功能障碍[12]。IL-17敲除也被证明有利于减轻扩张型心肌病模型导致的心脏肥大和心室重构[13]。

3 其它辅助T细胞与心室重构

TH9和Th22是最近发现的辅助T细胞亚群,前者主要分泌IL-9和IL-10,后者主要分泌IL-22。已有研究发现,Th9在对抗寄生虫感染和诱导变应性疾病,Th22在感染性疾病和许多自身免疫性疾病中发挥着重要的作用。有研究发现在急性冠脉综合征患者体内的Th9和Th22数量都上升[14]。另有研究发现在柯萨奇病毒B3诱导的小鼠病毒性心肌炎模型中,Th9细胞没有明显作用[15]。但是这两种细胞在心室重构的作用目前仍然不清楚。

4 调节T细胞通过抑制多种效应细胞的功能减轻心室重构

过度的炎症反应是引起细胞外基质的降解和细胞凋亡,导致心室重构的主要原因。因此,抑制过度的炎症反应是减弱心室重构和增强心脏功能的关键。调节T细胞是控制过度的炎症反应并维持机体免疫稳态的重要细胞,越来越多的研究表明Tregs在心脏修复中发挥着重要作用。

临床研究发现,心梗患者外周血中的Tregs数量减少,而心脏梗死区域的Tregs增加[16],提示心梗发生后外周血中的Tregs可能往心梗区域募集。通

过临床随访研究发现,循环系统中的 Tregs 水平越低,发生心梗的风险越高[17]。心衰患者外周血中 Tregs 的数量与心功能成正相关。这些都可以说明 Tregs 与心梗的发生和发展有重要关系。

在动物模型中,几项研究显示 FoxP3$^+$ Tregs 能改善心脏损伤。过继转移 Tregs 能抑制心脏中的巨噬细胞和 T 细胞群,减少血管紧张素 II 和压力超负荷诱导的心脏肥大和心室重构[18]。在心脏 TNF-α 过表达小鼠模型中,Tregs 能通过 IL-10 依赖性的途径抑制炎症反应和减轻心脏肥大[2]。Tregs 已被证明能改善心梗后的心肌肥大和心室重构。进一步对动物心梗模型的研究发现,减少心脏浸润的 Tregs 数量会引起 M1 型巨噬细胞,辅助 T 细胞,杀伤性 T 细胞等促炎细胞的增加,从而导致心梗面积扩大,左室功能障碍和室腔扩张,加重心室重构[19]。在小鼠心梗模型中,过继输入体外的 Tregs 或者注射 JJ316 抗体促进体内 Tregs 的产生都能抑制炎症反应,减少心肌纤维化,抑制 MMP 的活化以及减少心肌细胞的凋亡,从而减少梗死面积和减轻心梗后心室重构[20]。这些实验都说明浸润的 Tregs 能抑制心梗后的炎症反应,减轻不利的心室重构。在不同条件下,巨噬细胞可以分化为促炎的 M1 型巨噬细胞,或者抑炎的 M2 型巨噬细胞。Weirather 等人[22]的研究发现敲除 Tregs 能促进 M1 型巨噬细胞的极化,而扩增 Tregs 能促进 M2 型巨噬细胞的极化,表明 Tregs 可能通过促进 M2 型巨噬细胞的分化促进心梗后的愈合。胶原蛋白是细胞外基质的主要成分,肌成纤维细胞主要通过分泌胶原蛋白修复受损的心肌组织,而持续的成纤维细胞的活化会导致不利的心室重构。Amit 等[22]的研究发现,在体外实验中,Tregs 能抑制 α-平滑肌肌动蛋白和 MMP-3 的表达,从而抑制心肌纤维化,表明了 Tregs 可能通过调节成纤维细胞的表型和功能抑制心室重构。唐婷婷等[23]的研究发现 Tregs 在体内能抑制 CD8$^+$ T 细胞的功能而减轻心梗后心室重构。这些研究提示 Tregs 可能通过作为于多种效应细胞来维护心脏的结构和功能。

5　杀伤性 T 细胞在心室重构中的作用

心梗的发生引起杀伤性 T 细胞往梗死区域浸润。有研究发现,心梗患者的死亡率跟体内 CD8$^+$ CD57$^+$ T 细胞的数量成正比[24]。大鼠的体外实验证明,杀伤性 T 细胞在心梗后激活并且能识别和杀死正常的心肌细胞[25]。分离心梗小鼠脾脏中具有抗原识别性的杀伤性 T 细胞,通过颈内静脉过继输入同型正常小鼠体内能引起自身免疫心肌炎的发生[26]。这些实验都表明了杀伤性 T 细胞确实在心梗后被激活并引起心脏损伤,导致心室重构的发生。

6　总结与展望

T 细胞亚群在多种病理原因导致的心室重构中发挥重要作用。除了不同 T 细胞亚群介导的炎症反应在疾病中的作用之外,最近的研究显示,T 细胞还通过与非免疫细胞相互作用并直接调节组织细胞的功能[27]。在心脏组织的局部,T 细胞是否与心肌细胞直接作用仍需进一步的探索。而且,如何在心脏疾病的不同时期调控不同亚群细胞的迁移,表型和功能对于控制心室重构的发生和转归具有重要的意义。

参考文献:

[1] 张辉,周晓慧,刘中民,等.生物学标志物在心力衰竭早期诊断中作用的研究进展[J].中国实验动物学报,2016,(01):102-106.

[2] Huber SA, Feldman AM, Sartini D. Coxsackievirus B3 induces T regulatory cells, which inhibit cardiomyopathy in tumor necrosis factor-alpha transgenic mice [J]. Circ Res, 2006, 99(10): 1109-1116.

[3] Laroumanie F, Douin-Echinard V, Pozzo J, et al. CD4$^+$ T cells promote the transition from hypertrophy to heart failure during chronic pressure overload [J]. Circulation, 2014, 129(21): 2111-2124.

[4] Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction [J]. J Exp Med, 2007, 204(10): 2449-2460.

[5] Abdullah CS, Li Z, Wang X, et al. Depletion of T lymphocytes ameliorates cardiac fibrosis in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 39: 251-264.

[6] Pasqui AL, Di Renzo M, Auteri A, et al. Cytokines in acute coronary syndromes [J]. Int J Cardiol, 2005, 105(3): 355-356.

[7] Engelbertsen D, Andersson L, Ljungcrantz I, et al. T-helper 2 immunity is associated with reduced risk of myocardial infarction and stroke [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33(3): 637-644.

[8] Yan X, Anzai A, Katsumata Y, et al. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction [J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 62: 24-35.

[9] Tapp LD, Shantsila E, Wrigley BJ, et al. The CD14^{++}CD16$^+$ monocyte subset and monocyte-platelet interactions in patients

with ST-elevation myocardial infarction [J]. J Thromb Haemost, 2012, 10(7): 1231 -1241.

[10] Liao YH, Xia N, Zhou SF, et al. Interleukin-17A contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration [J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 59(4): 420 -429.

[11] Liu W, Wang X, Feng W, et al. Lentivirus mediated IL-17R blockade improves diastolic cardiac function in spontaneously hypertensive rats [J]. Exp Mol Pathol, 2011, 91(1): 362 -367.

[12] Madhur MS, Lob HE, McCann LA, et al. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction [J]. Hypertension, 2010, 55(2): 500 -507.

[13] Baldeviano GC, Barin JG, Talor MV, et al. Interleukin-17A is dispensable for myocarditis but essential for the progression to dilated cardiomyopathy [J]. Circ Res, 2010, 106(10): 1646 -1655.

[14] Lin YZ, Wu BW, Lu ZD, et al. Circulating Th22 and Th9 levels in patients with acute coronary syndrome [J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013: 635672.

[15] Qing K, Weifeng W, Fan Y, et al. Distinct different expression of Th17 and Th9 cells in coxsackie virus B3-induced mice viral myocarditis [J]. Virol J, 2011, 8: 267.

[16] Ghourbani Gazar S, Andalib A, Hashemi M, et al. CD4$^+$ Foxp3$^+$ Treg and its ICOS$^+$ subsets in patients with myocardial infarction [J]. Iran J Immunol, 2012, 9(1): 53 -60.

[17] Wigren M, Bjorkbacka H, Andersson L, et al. Low levels of circulating CD4$^+$ FoxP3$^+$ T cells are associated with an increased risk for development of myocardial infarction but not for stroke [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(8): 2000 -2004.

[18] Kanellakis P, Dinh TN, Agrotis A, et al. CD4$^+$ CD25$^+$ Foxp3$^+$ regulatory T cells suppress cardiac fibrosis in the hypertensive heart [J]. J Hypertens, 2011, 29(9): 1820 -1828.

[19] Dobaczewski M, Xia Y, Bujak M, et al. CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells [J]. Am J Pathol, 2010, 176(5): 2177 -2187.

[20] Sharir R, Semo J, Shimoni S, et al. Experimental myocardial infarction induces altered regulatory T cell hemostasis, and adoptive transfer attenuates subsequent remodeling [J]. PLoS One, 2014, 9(12): e113653.

[21] Saxena A, Dobaczewski M, Rai V, et al. Regulatory T cells are recruited in the infarcted mouse myocardium and may modulate fibroblast phenotype and function [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014, 307(8): H1233 -1242.

[22] Weirather J, Hofmann UD, Beyersdorf N, et al. CD4$^+$ Foxp3$^+$ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation [J]. Circ Res, 2014, 115(1): 55 -67.

[23] Tang TT, Yuan J, Zhu ZF, et al. Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction [J]. Basic Res Cardiol, 2012, 107(1): 232.

[24] Tae Yu H, Youn JC, Lee J, et al. Characterization of CD8$^+$ CD57$^+$ T cells in patients with acute myocardial infarction [J]. Cell Mol Immunol, 2015;12(4):466 -473.

[25] Varda-Bloom N, Leor J, Ohad DG, et al. Cytotoxic T lymphocytes are activated following myocardial infarction and can recognize and kill healthy myocytes in vitro [J]. J Mol Cell Cardiol, 2000;32(12):2141 -2149.

[26] Maisel A, Cesario D, Baird S, et al. Experimental autoimmune myocarditis produced by adoptive transfer of splenocytes after myocardial infarction [J]. Circ Res, 1998;82(4):458 -463.

[27] Zhou X, Tang J, Cao H, et al. Tissue resident regulatory T cells: novel therapeutic targets for human disease [J]. Cell Mol Immunol, 2015, 12(5): 543 -552.

〔收稿日期〕2017 -02 -16

研究进展

肌萎缩侧索硬化症相关基因突变与疾病动物模型

张　丽[1],张连峰[1,2*]

(1. 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,卫计委人类疾病比较医学重点实验室,北京　100021;
2. 中国医学科学院神经科学中心,北京　100730)

【摘要】 肌萎缩侧索硬化症是一种累进性神经退行疾病,以上、下运动神经元选择性退化和凋亡为特征,引发瘫痪、最终导致死亡。大量引发 ALS 的基因突变被鉴定出,包括 *FUS/TLS*、*EPHA*4、*SS*18 *L*1、*ATXN*2 和 *C*9*ORF*72 等基因,这些基因突变的发现拓宽了 RNA 调节参与 ALS 病理生成的理解。本文对家族性 ALS 相关的基因突变及现有的 ALS 啮齿类动物模型进行总结概括。

【关键词】 肌萎缩侧索硬化症;基因突变;动物模型
【中图分类号】R－33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0089-07
doi: 10.3969. j. issn. 1671－7856. 2017. 10. 018

Amyotrophic lateral sclerosis-associated gene mutations and ALS animal models

ZHANG Li[1], ZHANG Lian-feng[1,2*]

(1. Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College, Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health and Family Planning Commission of P. R. C, Beijing 100021, China; 2. Neuroscience Center, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

【Abstract】 Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease characterized by a selective loss of upper and lower motor neurons that lead to paralysis and even death. Mutations in a large number of genes, including *FUS/TLS*, *EPHA*4, *SS*18 *L*1, *ATXN*2 and *C*9*ORF*72, are identified to the casual genes of ALS, which broadens our understanding of the role of RNA modulation in ALS pathogenesis. This review summarized ALS-associated genes and the related ALS rodent models.

【Key words】 Amyotrophic lateral sclerosis; Gene mutation; Animal model

肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)也称为“葛雷克氏症”,是一种累进性神经退行疾病,以控制肌肉收缩的一种神经元即上、下运动神经元选择性退化和凋亡为特征,引发瘫痪、最终导致死亡。ALS 分为家族型和分散性两类,家族型 ALS(fALS)约占 10%,散发性 ALS (sALS) 占 90%。目前已找到多种引发 ALS 的基因突变,仅占这些病例的 20% ~30% 左右。但大部分家族型和是绝大部分分散病例的病因仍是未知,可能与神经突触内谷氨酸的兴奋毒性、氧化应激、神经营养因子、自身

[基金项目]国家自然科学基金(81571222);中央级公益科研院所基本科研业务费(2016ZX310039)。
[作者简介]张丽(1981 －),女,博士,研究方向:比较医学。E-mail: zhangl@ cnilas. org
[通讯作者]张连峰,男,研究员,博士,研究方向:比较医学。E-mail: zhanglf@ cnilas. org

免疫反应、重金属中毒、慢病毒感染等有关。

ALS 目前缺少有效的治疗方法。发现新的致病基因、易感基因,寻找不同致病基因导致 ALS 的共同机制和治疗靶点等仍然是目前研究的热点。本文就目前发现的 ALS 相关基因突变和动物模型情况作如下总结。

1 参与 ALS 病理发生的基因

从 1995 年发现 SOD1 基因突变是家族型 ALS 的致病基因以来[1],ALS 致病基因的发现越来越多,包括近 5 年发现的 *EPHA*4、*SS*18 *L*1 和 *ATXN*2 等。表 1 列举了 ALS 相关基因,共计 27 种,其中,*SOD*1、*C*9*ORF*72、*FUS* 和 *TARDBP* 与 ALS 关系最为密切,*SOD*1 在家族型 ALS 中占了 15%,*C*9*ORF*72 重复核酸扩增在家族型 ALS 中占了 45%,在散发性 ALS 中占了 10%,*FUS* 和 *TARDBP* 在家族型 ALS 中比例均可达 4%;*SETX*、*VAPB*、*ANG*、*OPTN*、*SQSTM*1 等比较罕见,仅与少数 ALS 相关,见图 1。仍有一些分子流行病研究发现的 ALS 相关基因可作为尚未确定基因。

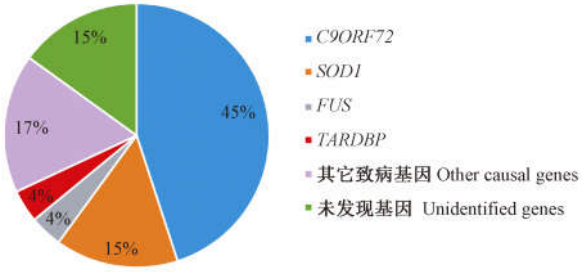


图 1 家族型 ALS 致病基因比例

Fig. 1 The percentage of four familial ALS disease-causing genes and other genes

表 1 参与 ALS 病理发生的基因

Tab. 1 A list of genes implicated in ALS pathogenesis

基因 Genes	基因功能 Gene function	染色体 Chromosomes	突变 Mutations	家族性/% fALS	散发性/% sALS	参考文献 References
*SOD*1	该基因突变是家族性 ALS 的病因。Mutations in this gene have been implicated as a cause of fALS.	21q22.11	166	15	1 ~3	[1]
*Hsp*27	*Hsp*27 突变可致 2f 腓骨肌萎缩(CMT2F)和远端遗传性运动神经病变(dHMN)。上调表达可以保护突变 *SOD*1 蛋白引起的神经元损伤。*Hsp*27 mutations cause both CMT2F and dHMN. Upregulated expression of *Hsp*27 protect against neuronal damage induced by mutant SOD1 protein.	7q11.23	–	–	–	[2,3]
*GluA*2	*GluA*2 是谷氨酸受体家族中的一员,对 AMPA 敏感,形成配体激活的离子通道;*GluA*2 RNA 编辑缺陷与 ALS 病因相关。This gene product belongs to a family of glutamate receptors that are sensitive to alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA), and function as ligand-activated cation channels. Defective *GRIA*2 RNA editing may be relevant to ALS etiology.	4q32.1	–	–	–	[4]
*Epha*4	*EPHA*4 属于受体酪氨酸激酶家族蝶素受体亚家族,基因表达与 ALS 疾病发生、存活负相关,基因突变可增加存活。*EPHA*4 belongs to the ephrin receptor subfamily of the protein-tyrosine kinase family. In humans with ALS, EPHA4 expression inversely correlates with disease onset and survival, and loss-of-function mutations in EPHA4 are associated with long survival.	2q36.1	–	–	–	[5]
FUS	该基因编码多功能的 DNA 和 RNA 结合蛋白,参与前体 mRNA 选择性剪接及 mRNA 胞浆运输等过程。This gene encodes a multifunctional DNA/RNA binding protein. It is involved in pre-mRNA splicing and the export of fully processed mRNA to the cytoplasm.	16p11.2	27	4	0.2 ~0.4	[6]

续表 1

基因 Genes	基因功能 Gene function	染色体 Chromosome	突变 Mutations	家族性/% fALS	散发性/% sALS	参考文献 References
TARDBP/TDP-43	DNA/RNA 结合蛋白,证据明确显示 TDP-43 蛋白异常沉积与 ALS 病理相关。 DNA/RNA binding proteins, the pathologic accumulation of TDP-43 is now well recognized to contribute to the pathology of ALS.	1p36.22	39	4	0.2~0.4	[7]
*ARHGEF*28	该蛋白可结合神经丝蛋白 mRNA,可能参与了 ALS 神经丝蛋白聚集体的形成。 The encoded protein interacts with neurofilament mRNA and may be involved in the formation of ALS neurofilament aggregates.	5q13.2	-	-	-	[8]
SETX	该蛋白具有 DNA/RNA 解旋酶功能域,参与 RNA 剪切过程。基因突变和一个常染色体显性遗传的青少年 ALS 相关。 This protein contains a DNA/RNA helicase domain which suggests that it may be involved in both DNA and RNA processing. Mutations in this gene have been associated with an autosomal dominant form of juvenile ALS.	9q34.13	7	罕见 Rare		[9]
*ATXN*2	*ATXN*2 蛋白 N 端包含一个 14~31 残基多谷氨酰胺区域,病理条件扩增至 32~200 个。多谷氨酰胺长度增加的个体对 ALS 易感。 The N-terminal region of the protein contains a polyglutamine tract of 14-31 residues that can be expanded in the pathogenic state to 32-200 residues. Intermediate length expansions of this tract increase susceptibility to ALS.	12q24.12	CAG 重复扩增 CAG repeat expansion	4.7	-	[10,11]
*PFN*1	参与肌动蛋白的聚合-解聚动态平衡调节。该基因的缺失与 Miller-Dieker 综合症相关,所编码的蛋白质也可能在亨廷顿病中发挥作用。 The encoded protein plays an important role in actin dynamics by regulating actin polymerization. Deletion of this gene is associated with Miller-Dieker syndrome, and the encoded protein may also play a role in Huntington disease.	17p13.2	4	-	-	[12]
SS18 L1	SS18L1 钙敏感的反式激活因子,参与表观遗传控制和染色质重塑。SS18L1 突变与 ALS 相关。 This gene encodes a calcium-responsive transactivator which is an essential subunit of a neuron-specific chromatin-remodeling complex. Mutations in this gene are involved in ALS.	20q13.33	-	-	-	[13,14]
*C9ORF*72	与 RAB 蛋白相互作用参与自噬和内吞,具有 2~22 个或 700~1600 个拷贝的 GGGGCC 六核苷酸重复扩增突变与 ALS 或额颞痴呆(FTD)相关。 *C9ORF*72 has been shown to interact with Rab proteins that are involved in autophagy and endocytic transport. Expansion of a GGGGCC repeat from 2-22 copies to 700-1600 copies in transcripts from this gene is associated with ALS and FTD (frontotemporal dementia).	9p21.2	GGGGCC 重复扩增 GGGGCC repeat expansion	45	10	[15]
OPTN	*OPTN* 可与 huntingtin 蛋白、转录因子 3A 以及 RAB8 蛋白相互作用,具有激活 TNFa 和 Fas 配体通路介导凋亡和炎症,基因突变导致家族型青光眼和 ALS。 *OPTN* interactions with huntingtin, RAB8 and transcription factor IIIA proteins. It may utilize tumor necrosis factor-alpha or Fas-ligand pathways to mediate apoptosis and inflammation. *OPTN* mutations are associated with familial glaucoma and ALS.	10p13	3	罕见 Rare	-	[16]

续表 1

基因 Genes	基因功能 Gene function	染色体 Chromosomes	突变 Mutations	家族性/% fALS	散发性/% sALS	参考文献 References
*UBQLN*2	蛋白质泛素化与降解。 This protein is thought to functionally link the ubiquitination machinery to the proteasome to affect *in vivo* protein degradation.	Xp11.21	5	–	–	[17]
*SQSTM*1	可与泛素结合并调节 NF-KB 信号通路。 *SQSTM*1 binds ubiquitin and regulates activation of the nuclear factor kappa-B (NF-kB) signaling pathway.	5q35.3		罕见 Rare		[18]
VCP	参与高尔基体分选和蛋白质泛素化与降解。 The encoded protein plays a role in Golgi sorting, protein ubiquitination and degradation.	9p13.3	4	–	–	[19]
ALS2/ALSIN	参与膜泡运输，调节内吞。 This protein is involved in vesicular transport and functions as a modulator for endosomal dynamics.	2q33.1	19	–	–	[20]
*HNRNPA2B*1	核糖核蛋白类，与 mRNA 加工、代谢和运输有关。 This gene encodes heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) and influences pre-mRNA processing, as well as other aspects of mRNA metabolism and transport.	7p15.2	–	–	–	[21,22]
*HNRNPA*1	核糖核蛋白类，与 mRNA 加工、代谢和运输有关。 This gene encodes heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) that associate with pre-mRNAs in the nucleus and influences pre-mRNA processing, as well as other aspects of mRNA metabolism and transport.	12q13.13	–	–	–	[22]
CHMP2B	参与膜泡运输。 *CHMP2B* is involved in vesicular transport.	3p11.2	–	–	–	[23]
*ELP*3	ELP3 是组蛋白乙酰转移酶复合物的催化亚基，和 RNA 合成延长，投射神经元成熟有关。 *ELP*3 is the catalytic subunit of the histone acetyltransferase elongator complex, which contributes to transcript elongation and also regulates the maturation of projection neurons.	8p21.1	–	–	–	[24]
ANG	RNA 酶家族成员，促进 tRNA 水解进而导致蛋白合成下降，可调节新生血管形成和运动神经元轴突生长。 This gene encodes ribonuclease, RNase A family. It hydrolyzes cellular tRNAs resulting in decreased protein synthesis. It is an exceedingly potent mediator of new blood vessel formation and motor neuron axon outgrowth.	14q11.2	18	罕见 Rare		[20]
*SPG*11	参与细胞间物质转运，与神经元轴突生长有关。 The protein is involved in intercellular transport and is related to axon outgrowth.	15q21.1	–	–	–	[20]
*DCTN*1	可与细胞内微管结合驱动轴突运输。 Dynactin binds to microtubules to drive axonal transport.	2p13.1	–	–	–	[25]
NEFH	参与神经元细胞骨架的形成。 The protein is involved in the formation of neuronal cytoskeleton.	22q12.2	–	–	–	[20]
VAPB	参与细胞间物质转运，与神经元轴突生长有关。 The protein is involved in intercellular transport and is related to axon outgrowth.	20q13.32	2	罕见 Rare		[20]

注：–，不明确；fALS，家族性脊髓侧索硬化症；ALS，脊髓侧索硬化症。

Note. –, unclear; fALS, familial amyotrophic lateral sclerosis; ALS, amyotrophic lateral sclerosis.

2　RNA 代谢异常是 ALS 主要机制?

研究表明,ALS 是通过异常的蛋白脂代谢如 ER 应激和自噬以及 RNA 剪切加工过程介导的。而在所有的非 *SOD*1 介导的 ALS 疾病均有 RNA 剪切过程参与。目前发现的参与 ALS 病理发生的基因有 30 种左右,涉及细胞表面受体、RNA 剪切、蛋白质合成到轴突转运等多个方面。但是,涉及 RNA 剪切、延伸和代谢的基因占了主要部分,其中 *C9ORF*72 突变导致的 ALS 疾病在家族性 ALS 病例的中的比例最高,与 RNA 代谢的关系也最为密切。由于 *C9ORF*72 剪切体 1 的第一外显子 E1a 和剪切体 3 的第一外显子 E1b 之间有 GGGGCC 六个碱基的重复序列(hexanucleotide repeat expansion,HRE),HER 长短在人群中具有多态性,正常人群中 GGGGCC 重复数一般在 30 个以下,高于 30 个重复会有发生额颞叶痴呆(FTD)或 ALS 的可能,ALS 患者中拷贝数可高达 1 600 个。尽管 *C9ORF*72 的致病机制仍然处于初始阶段,但是目前可推测 HER 有二种可能机制参与 FTD 或 ALS。其一是 HRE 结构导致 *C9ORF*72 转录子在细胞内的积累,并可能与 DNA 形成 RNA/DNA 杂交环(R-loop)引起 RNA 毒性。第二种可能是 HRE 结构可能导致一种叫做不需要 ATG 的翻译(repeat-associated non-ATG (RAN) translation)GGGGCC 重复可以编码甘胺酸/精氨酸或脯氨酸/精氨酸的多肽,这两种多肽都有细胞毒性。*C9ORF*72 第一外显子后的 GGGGCC 多拷贝重复,造成 RNA 的异常积累和定位。

此外,*FUS*、*TARDB*、*SETX*、*ATXN*2、*ARHGEF*28、*ELP*3、*HNRPA*2*B*1 和 *HNRPA*1 等 8 个基因在 ALS 所占比例次于 *C9ORF*72,也与 RNA 代谢相关。*FUS* 和 *TARDBP* 是一个多功能的 DNA 和 RNA 结合蛋白,参与 RNA 转录、选择性剪接及 mRNA 稳定性调节。*SETX* 有 DNA/RNA 解旋酶功能域,参与 tRNA 和核内小 RNA 的剪切。ANG 属于 RNA 酶,*ATXN*2 突变可以增加 *TARDBP* 毒性。*ARHGEF*28 是 Rho 信号激活单白,但可以结合神经丝蛋白 mRNA 并引起其降解,*ELP*3 参与 RNA 合成延长。*HNRPA*2*B*1 和 *HNRPA*1 编码不均一型核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein,hnRNP)是多功能 RNA 结合蛋白,可调节前体 mRNA(pre-mRNA)分子的选择性剪接以及 mRNA 转运、翻译和稳定性。因此 RNA 代谢异常可能是 ALS 的核心机制之一。

3　ALS 动物模型

ALS 动物模型是研究 ALS 的病因、病理、发病机制和治疗的重要工具。目前建立 ALS 的啮齿类动物模型主要是 *SOD*1、*TDP*-43、*VCP*、*FUS*、*ALSIN* 等基因的不同突变体和采用不同启动子的转基因大小鼠或基因敲除小鼠,还包括 Wobbler 小鼠自发突变 ALS 易感品系,以及免疫原诱发的豚鼠 ALS 模型(表 2)。自发突变 ALS 易感品系 Wobbler 小鼠是 50 年前建立的 ALS 模型,现在仍然广泛使用。hm*SOD*1-G93A 突变基因转基因小鼠是目前应用最广泛的 ALS 模型[27],比较客观的反映氧化应激对运动神经元的损伤机制。

4　ALS 疾病动物模型展望

ALS 病因多样,机制复杂,目前所建立的基因修饰模型和诱导模型尚不能全方位的反映 ALS 的病理机制,这也成为 ALS 治疗研究的限制之一。一方面现有的模型品系仅涉及有限的基因,大多致病基因包括新发现的 ALS 致病基因比如 *C9ORF*72、*ARHGEF*28 尚未建立模型,这些基因可能反映不同致病机制。另一方面,已经建立的 *SOD*1、*TDP*-43、*FUS* 等基因在野生型基因高表达时也会引起神经毒性[28,31,32],所以转基因模型不能完全反映基因突变的特点。相对于转基因随机插入,基因敲入是实现基因稳定过表达的一种有效工具。利用 CRISPR/Cas9 技术可以实现外源基因的定点敲入,使遗传背景更为简单,实验操作更加精准、高效。此外,很多致病基因表达的蛋白具备多个功能域,可以和其他多种因子相互作用,而且基因敲除和点突变对细胞作用也是不同的,基因敲除 ALS 模型不能完全反映基因突变的致病机制,因此在未来的研究中,需要以突变的基因敲入为主,制作更能反映致病机制的 ALS 模型。

表2 ALS 啮齿类模型

Tab. 2 Rodent models of ALS

编号 No.	靶基因 Target genes	表型 Phenotypes	参考文献 References
1	*SOD*1	*SOD*1 基因不同突位点、神经元特异或星型细胞特异启动子的转基因大鼠和小鼠超过20个品系,主要病理特征包括线粒体损伤、蛋白折叠错误和沉积、兴奋性中毒、氧化应激等。转基因动物表现生存期短,肢体的瘫痪。低拷贝转基因病情缓慢发展过程与人类 ALS 更相似。 Over twenty transgenic rat or mouse lines with different mutations utilizing neuronal-specific or astrocytic promoters have been created. Mutant *SOD*1 transgenic rodents recapitulate many features of ALS, including mitochondrial dysfunction, protein misfolding and aggregation, excitotoxicity, and oxidative stress. Transgenic animals have shortened survival and limb paralysis. Mice with a low transgene copy number, in which the onset of disease-like symptoms is delayed and shows slower progression, may more accurately recapitulate human ALS.	[28]
2	*TDP*-43	*TDP*-43 突变基因不同启动子的转基因大鼠和小鼠,主要表型轴突和突触缺损,有运动神经元发生退行性改变。运动表现步态异常及抓力降低。 Both transgenic rats and mice with mutant *TDP*-43 gene were generated using different promoters, transgenic rodents displayed axonopathy, synaptic defect and motor neuron degeneration. Mutant TDP-43 caused the development of an abnormal gait and reduced grip strength.	[28]
3	*FUS*	野生和突变 *FUS* 转基因大小鼠都有报道,其中突变的转基因大鼠可发展成进行性麻痹和运动神经元丢失,同时人野生基因转基因大鼠皮层和海马有明显的神经元丢失,并发生空间学习记忆损伤。 Both transgenic rat and mouse with overexpression of wild type or mutant FUS gene have been generated. Mutant FUS transgenic rats developed progressive paralysis secondary to loss of motor neurons. Transgenic rats that overexpressed the wild-type human FUS display a substantial loss of neurons in the cortex and hippocampus and deficit in spatial learning and memory.	[28]
4	*VCP*	携带 R155H 突变 VCP 基因敲入纯合子小鼠出现突出的肌肉、心脏、脑和脊髓病理表型,包括线粒体异常和自噬紊乱,21日龄之前死亡,表现虚弱和肌电图异常改变。 The VCPR155H/R155H mice manifest prominent muscle, heart, brain and spinal cord pathology. including striking mitochondrial abnormalities, in addition to disrupted autophagy. Homozygote mice typically survive less than 21 days, exhibit weakness and myopathic changes on electromyography(EMG).	[28]
5	ALSIN	敲除小鼠具有正常的生命周期,存在轻度运动功能缺陷,脊髓颈段的皮质脊髓束的运动神经元有变性病变。 *ALSIN* knockout mouse models displayed normal life expectancy with minor motor coordination impairment, and potential corticospinal motor neuron (CSMN) defects in the cervical region of the spinal cord.	[29]
6	*Vps*54	wobbler 小鼠是与 *Vps*54 基因自发突变品系。小鼠表现体重减轻,精子发育异常,雄性不育,肌肉无力、步态不稳、头部振颤等 ALS 病理表现和渐进式上下行运动神经元变性,。 Wobbler mice are homozygous for *Vps*54 spontaneous mutation. The mice exhibited body weight loss, defective spermatogenesis, male infertility and ALS pathological changes including muscle weakness, gait instability, head tremor, progressive ascending and descending motor neuron degeneration.	[30]

参考文献:

[1] Andersen PM, Nilsson P, Ala-Hurula V, et al. Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZn-superoxide dismutase [J]. Nat Genet, 1995, 10(1): 61-66.

[2] Ackerley S, James PA, Kalli A, et al. A mutation in the small heat-shock protein HSPB1 leading to distal hereditary motor neuronopathy disrupts neurofilament assembly and the axonal transport of specific cellular cargoes [J]. Hum Molec Genet, 2006, 15(2): 347-354.

[3] Krishnan J, Lemmens R, Robberecht W, et al. Role of heat shock response and Hsp27 in mutant SOD1-dependent cell death [J]. Exp Neurol, 2006, 200(2): 301-310.

[4] Hideyama T, Kwak S. When does ALS start? ADAR2-GluA2 hypothesis for the etiology of sporadic ALS [J]. Front Mol Neurosci, 2011, 4: 33.

[5] Van Hoecke A, Schoonaert L, Lemmens R, et al. EPHA4 is a disease modifier of amyotrophic lateral sclerosis in animal models and in humans [J]. Nat Med, 2012, 18(9): 1418-1422.

[6] Deng H, Gao K, Jankovic J. The role of FUS gene variants in neurodegenerative diseases [J]. Nat Rev Neurol, 2014, 10(6): 337-348.

[7] Bennion Callister J, Pickering-Brown SM. Pathogenesis/genetics of frontotemporal dementia and how it relates to ALS [J]. Exp Neurol, 2014, 262 Pt B: 84-90.

[8] Cañete-Soler R, Wu J, Zhai J, et al. p190RhoGEF binds to a destabilizing element in the 3′-untranslated region of light

neurofilament subunit mRNA and alters the stability of the transcript. [J]. J Biol Chem, 2001, 276(34): 32046 – 32050.

[9] Chen YZ, Bennett CL, Huynh HM, et al. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4) [J]. Am J Hum Genet, 2004, 74(6): 1128 – 1135.

[10] Liu X, Lu M, Tang L, et al. ATXN2 CAG repeat expansions increase the risk for Chinese patients with amyotrophic lateral sclerosis [J]. Neurobiol Aging, 2013, 34(9): 2236. e5 – 8.

[11] Elden AC, Kim HJ, Hart MP, at al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS [J]. Nature, 2010, 466(7310): 1069 – 1075.

[12] Wu CH, Fallini C, Ticozzi N, et al. Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis [J]. Nature. 2012, 488(7412): 499 – 503.

[13] Teyssou E, Vandenberghe N, Moigneu C, et al. Genetic analysis of SS18L1 in French amyotrophic lateral sclerosis [J]. Neurobiol. Aging, 2014, 35(5): e9 – e12.

[14] Renton AE, Traynor BJ. CRESTing the ALS mountain [J]. Nat Neurosci, 2013, 16(7): 774 – 775.

[15] Haeusler AR, Donnelly CJ, Periz G, et al. C9 or f72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease [J]. Nature. 2014, 507(7491): 195 – 200.

[16] Maruyama H, Morino H, Ito H. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis [J]. Nature, 2010, 465(7295): 223 – 226.

[17] Renton AE, Chiò A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics [J]. Nat Neurosci, 2014, 17(1): 17 – 23.

[18] Gal J, Ström AL, Kwinter DM, et al. Sequestosome 1/p62 links familial ALS mutant SOD1 to LC3 via an ubiquitin-independent mechanism [J]. J Neurochem, 2009, 111(4): 1062 – 1073.

[19] Zou ZY, Liu MS, Li XG, et al. Screening of VCP mutations in Chinese amyotrophic lateral sclerosis patients [J]. Neurobiol Aging, 2013, 34(5): 1519. e3 – 4.

[20] Su XW, Broach JR, Connor JR, et al. Genetic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: implications for clinical practice and research [J]. Muscle Nerve, 2014, 49(6): 786 – 803.

[21] Martinez FJ, Pratt GA, Van Nostrand EL, et al. Protein-RNA networks regulated by normal and ALS-associated mutant HNRNPA2B1 in the nervous system [J]. Neuron, 2016, 92(4): 780 – 795.

[22] Kim HJ, Kim NC, Wang YD, et al. Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS [J]. Nature, 2013, 495(7442): 467 – 473.

[23] Cox LE, Ferraiuolo L, Goodall EF, et al. Mutations in CHMP2B in lower motor neuron predominant amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [J]. PLoS One, 2010, 5(3): e9872.

[24] Simpson CL, Lemmens R, Miskiewicz K, et al. Variants of the elongator protein 3 (ELP3) gene are associated with motor neuron degeneration [J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(3): 472 – 481.

[25] Münch C, Sedlmeier R, Meyer T, et al. Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS [J]. Neurology, 2004, 63(4): 724 – 726.

[26] Hirano M, Quinzii CM, Mitsumoto H, et al. Senataxin mutations and amyotrophic lateral sclerosis [J]. Amyotroph Lateral Scler, 2011, 12(3): 223 – 227.

[27] 范昌发,岳秉飞,王军志. 转基因动物模型在 ALS 发病机制研究及药物疗效观察中的应用[J].实验动物科学, 2008, 25(4): 45 – 48.

[28] McGoldrick P, Joyce PI, Fisher EM, et al. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1832(9): 1421 – 1436.

[29] Lai C, Xie C, McCormack SG, et al. Amyotrophic lateral sclerosis 2-deficiency leads to neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis through altered AMPA receptor trafficking [J]. J Neurosci, 2006, 26(45): 11798 – 11806.

[30] Moser JM, Bigini P, Schmitt-John T. The Wobbler mouse, an ALS animal model [J]. Mol Genet Genomics, 2013, 288(5 – 6): 207 – 229.

[31] Mitchell JC, McGoldrick P, Vance C, et al. Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion [J]. Acta Neuropathol, 2012, 125(2): 273 – 288.

[32] Xu G, Ayers JI, Roberts BL, et al. Direct and indirect mechanisms for wild-type SOD1 to enhance the toxicity of mutant SOD1 in bigenic transgenic mice [J]. Hum Mol Genet, 2014, 24(4): 1019 – 1035.

〔收稿日期〕2017 – 03 – 01

研究进展

大鼠急性心肌梗死模型制备方法研究进展

曹　珏[1,3],李贻奎[2],陈孟倩[1],姚魁武[1*]

(1. 中国中医科学院广安门医院,北京　100053; 2. 中国中医科学院西苑医院,北京　100091;
3. 北京中医药大学,北京　100029)

【摘要】 急性心肌梗死是危害人类生命的重大疾病之一。心肌梗死动物模型对研究人类心肌梗死的病理生理变化、诊断和治疗有着重要意义。目前心肌梗死动物模型的制备主要存在动物存活率低、繁琐复杂等问题。近年来,针对心肌梗死动物模型制备方法研究取得一些进展,在模型动物存活率、模型动物合格率、制备模型速度等方面具有一定的提高。该文就急性心肌梗死模型的制备方法及相关研究现状进行分析,结合实际因素以期简化模型制备过程,提高科研人员的造模水平,从而为医学研究提供稳定可靠的急性心肌梗死模型来源。

【关键词】 大鼠;急性心肌梗死模型;自主呼吸;冠脉结扎;麻醉;检测指标
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0096-05
doi: 10.3969. j. issn. 1671 -7856. 2017. 10. 019

Research progress on preparation of rat models of acute myocardial infarction

CAO Jue[1,3], LI Yi-kui[2], CHEN Meng-qian[1], YAO Kui-wu[1*]
(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China; 2. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091; 3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029))

【Abstract】 Acute myocardial infarction is one of the major causes of death in the world. Research on animal models of myocardial infarction has a great significance in improving the pathophysiology, diagnosis and treatment of human myocardial infarction. At present, problems such as low survival rate and complicated preparation still exist. In recent years, some progress has been made in the preparation of animal myocardial infarction models, which can improve the survival rate, qualified rate and speed. This paper analyzes the preparation of rat models of acute myocardial infarction and related research, combined with actual factors to simplify the process of preparation and improve the skills of scientific researchers, so as to provide a source of stable and reliable acute myocardial infarction models for medical research.

【Key words】 Rat; Acute myocardial infarction model; Spontaneous breathing; Coronary artery ligation; Anaesthesia; Detection indicator

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是全世界病死率较高的疾病之一。诱导受损的心肌细胞再生成为治疗急性心肌梗死的重要临床目标,而标准化的动物模型是心肌细胞再生医学研究的基础[1,2]。因为大鼠急性心肌梗死模型与临床 AMI 病理生理过程有一定的相似性,模型的存活时间较长、变异性低、可重复性高、相对稳定性好以及价格适宜、易于饲养等优点突出,是模型制备及研究的良好动物模型来源[3]。虽然大鼠造模有上述诸多优点,加之众多科研工作者对造模方法做了

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(81173449)。
[作者简介]曹珏(1992 -),男,研究生,专业:中医心血管病。
[通讯作者]姚魁武,E-mail: yaokuiwu@126. com

大量的研究与探讨,但在实际制作过程中依然存在如下问题:大鼠本身的个体差异明显,存在手术过程中不耐受的现象;手术者的水平参差不齐,对大鼠的处理流程存在差异,相应地导致制备时间增加,造成手术者精力及体能的消耗随之增加,难以保证造模操作的连贯完整。以上因素都会导致大鼠的存活率及造模成功率下降。所以将其用于心血管事件及心肌细胞再生医学的机制的研究依旧有很大的挑战和难度。该文通过近年来对大鼠 AMI 模型建立的总结和制备过程重点环节的研究探讨,为标准化 AMI 大鼠模型的制备方法提供切实可信的改进方案,提高模型的生存率和造模成功率,降低制备过程的难度提供参考。

1　关于是否建立人工气道的选择

过去认为呼吸支持可以提高实验模型的生存率,经典的 Jones[4] 法造模是在大鼠自主呼吸条件下为其佩戴呼吸面罩,连通动物呼吸机持续正压通气为大鼠提供呼吸支持。之后国内外众多的科研学者也在对 Jones 法进行改良,很多造模方法中也经常把动物呼吸机作为实验必备的仪器之一;王学文等[2]、杨文慧等[5]选用经口直视插管接通动物呼吸机为 AMI 大鼠模型支持呼吸,在确定大鼠呼吸频率与呼吸机一致后,对呼吸机进行设定:容量控制模式,呼吸频率为每分钟 50 ~75 次,吸呼比为 1∶1,潮气量为 10 ~ 15 mL/250 g 体重;刘宇等[6],赵传艳等[7]采用在气管第 2、3 或 4、5 软骨环处切开,进行深度 1.0 cm 插管并接通动物呼吸机的方式支持呼吸;Ilayaraja 等[8] 采用两种插管方案:第一种为在大鼠颈部提供光源,在光源下经口插管;第二种为在颈部正中做出 5 mm 的切口,并在立体显微镜注视下将管针插入气管内,两种方案均需接通呼吸机,设定潮气量为小鼠体重(g)的 3 倍 +155 μL,设定频率每分钟 120 次。但在实际制备过程中对呼吸机的参数设定需要消耗时间,如选用无创的呼吸面罩通气,死腔样通气效应[7] 明显,可能导致大鼠体内 CO_2 蓄积,而且操作过程中无法监测气道内压力,为调节气道内压力以防止气道压过高造成的肺损伤带来困难;而在改良的方法中如对大鼠进行有创气管插管,不论是经口直视插管还是气管切开插管,即便是熟练的操作者,成功建立有创通气所需时间仍在 10 min 以上,难度很大。同时在大鼠颈部周围进行有创操作的创伤很大,1 次插管失败后反复插管易造成喉头水肿,难度的提升增加了实验过程所需时间,同样延长了麻醉时间,这很大程度上是增加了大鼠模型的死亡率。而且购置呼吸机和相关器械也增加了科研成本。从而有部分学者将目光转向非人工通气条件下[9,10] 制备大鼠 AMI 模型。在摒弃动物呼吸机、大鼠完全自主呼吸的条件下,模型的生存率依然没有下降。李贻奎等[10],闫奎坡等[11]按照是否在动物呼吸机条件下制备的 AMI 模型进行分组比较,发现实验动物生存率及造模成功率未见明显差异。而在非人工通气条件下最突出的优势在于简化实验过程,缩短手术过程所需时间,加快模型制作速度,显著提高造模效率;同时相比于气管插管这一有创操作,降低了大鼠呼吸道的损伤程度,保护其机体生理结构以利于其术后呼吸功能恢复和生存;且降低了大鼠的应激反应,也免去在拔管后清除呼吸道分泌物及进行缝合气道的操作。

2　冠状动脉结扎手术方式的选择

结扎冠状动脉是制备 AMI 动物模型最主要的方法,Jones 法中对大鼠心脏左冠状动脉(left coronray artary, LCA)有详细的描述。结扎 LCA 使其闭塞,造成心肌缺血,与临床上心肌缺血及心梗时实际发病过程有相似之处。此方法能保证结扎位置和深度固定,控制心肌缺血的程度以增加造模成功率,以便日后进行心电图检测和组织染色检查等指标的测定。目前制备大鼠 AMI 模型存在死亡率高,操作难度大,模型质量难以保证,制备方法掌握起来比较困难等实际问题。手术操作失败的原因主要是手术过程长,结扎位置过高导致恶性心律失常[12] 发生。参照国内学者的方法[2,10],在非人工通气条件下于胸骨左缘第 4、5 肋间隙皮肤处剪开切口,用止血钳沿胸骨左缘第 4 肋间穿入胸腔,钝性分离胸大肌和前锯肌,剥离心包,充分暴露术野,并轻压胸廓挤出心脏;于左心耳下缘 2 mm 处用 0 号手术线结扎冠状动脉左前降支(left anterior descending coronary artery, LAD),结扎成功标志为左心室前壁及心尖周围心肌组织颜色苍白、晦暗或青紫和运动减弱[13],结扎后立即将心脏放回,迅速排出胸腔内气体,对合、捏紧并缝合皮肤。该方法使得心脏挤出时心尖上翘,肺自然被推到一边,减少因手术操作对肺造成的损伤[14]。手术过程的创口较小,对大鼠胸部的解剖结构影响较小,可使其结构功能迅速

恢复,便于开胸取材。Gao 等[15]对大鼠在非人工通气条件下的冠脉结扎及传统呼吸机模式下开胸结扎进行对比,结果发现操作时间上前者平均(1.22 ±0.05)min,后者则平均(23.2 ±0.6)min,操作过程的时间因为未建立人工气道而缩短,使大鼠的组织器官暴露于外界的时间缩短;术中大鼠死亡率前者为3%,后者为15.9%;心律失常的发生率在前者中明显低于后者;前者在炎症指标的检测中依然占有优势,在术后24 h及7 d的两次检测下,肿瘤坏死因子(TNF-α)及髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)在前者血液中含量显著低于后者;在造模后28 d前者的生存率也较后者高近20%;同时LAD结扎的位置可以满足AMI模型标准。手术过程的简化及较小的切口可以减轻手术对大鼠机体的损伤,提高其生存率及造模成功率。手术者掌握此方法的关键的是熟悉大鼠心脏的解剖和冠脉的走行,快速准确定位并结扎LAD,相信经过不断对解剖基础的夯实和实际操作的重复,熟练掌握操作技术并不困难。

3 麻醉方式的选择

动物实验中对实验动物麻醉是很重要的环节,科研人员对麻醉是否了解对于制备动物模型具有非常大的影响。模型制作过程当中经常可以遇到麻醉过浅而使手术过程中断,或者整个手术过程较长,麻醉过深造成模型的死亡的情况。理想的麻醉既要保证动物在可耐受的条件下完成手术操作,又要使其在手术后尽快苏醒以降低死亡率。目前国内的麻醉剂研究中,汪新亮等[16]把水合氯醛、氯胺酮、丙泊酚进行对比研究,发现麻醉起效时间由快到慢依次为氯胺酮、丙泊酚、水合氯醛,麻醉维持时间由短到长依次为水合氯醛、丙泊酚、氯胺酮;麻醉致死量由高到低依次为氯胺酮、丙泊酚、水合氯醛;麻醉剂量安全线比较中水合氯醛较丙泊酚和氯胺酮高将近10倍。李少春等[17]对不同浓度水合氯醛对老年及青年大鼠的麻醉效果进行比较,结果发现不同年龄的大鼠对水合氯醛敏感程度不同:老年大鼠较正常剂量低的剂量才能既能保证理想的麻醉效果,又可降低死亡率;在不同浓度的水合氯醛对大鼠麻醉效果比较中,达到深度麻醉所需时间低浓度组短于高浓度组,大鼠苏醒或出现反应低浓度组快于高浓度组。在大鼠AMI造模过程中,对麻醉剂选用要求尽量安全、有效、廉价,通常把水合氯醛作为造模的麻醉剂,但依然要注意的是大鼠的年龄、体重在麻醉剂用量上的区分,并且要与科研人员的自身情况结合考虑。国外研究证实[18,19],水合氯醛即便是以极低的浓度(36 mg/mL)用于大鼠麻醉也会导致大鼠出现多发性肝坏死、腹膜炎及全身毒性,从而引起模型质量下降。在手术操作时间过长的情况下,达到良好的麻醉效果增加麻醉剂用量,势必会增加动物死亡的风险。所以对科研人员和手术者来说,优化手术设计、简化手术操作也很重要。前文提到的手术方法的优化可以保证手术过程时间缩短,从而减少麻醉剂用量,降低对动物的影响和死亡率。而关于哪种麻醉药物和哪种剂量最适合的问题还存有争议,需结合具体的实验因素来决定,关于这方面的问题还有待进一步研究考证。

4 检测指标的探讨

关于大鼠AMI模型制作完成后选取何种检测方法及选用何种检测指标来判定模型制备成功与否是一个值得探讨的问题。在实验中经常被用于检测的方法包括心电图、血清生物标志物及超声心动图,每一种方法都有其重要的诊断意义,但又有其不足的方面。心电图作为一种判定AMI形成的方法,因其操作简便易行,记录方便而被被广泛应用于实验中。将大鼠LAD结扎后主要造成左心室前壁缺血,何涛等[20]通过观察记录结扎后大鼠肢、胸导联心电图发现J点偏移在I、aVL、V2、V5导联抬高,T波振幅的幅值在I、aVL导联增大,基本可以明确AMI大鼠的梗死部位是左心室,且梗死程度并未因观察时间的不同而有所变化。心电图是判断AMI的重要方法,但是问题局限在普通心电图很难对AMI的位置及范围进行精确的定位与评价,如心肌梗死区域较小导联的连接部位出现偏移时易出现假阴性结果,Bonilha 等[21]在研究中指出,坏死性Q波形成大于1 mm在大面积AMI大鼠和小面积AMI大鼠中存在率相当(92%,96%),Q波的深度与小面积AMI相关性无从体现,同时心电图波形的记录易受外界因素干扰导致信息不准确。血清生物标志物在诊断AMI时有愈发重要的参考价值,灵敏度高、特异性强的标志物是研究者最希望发现并使用的。目前常用来检测的AMI相关性的标志物包括心型脂肪酸结合蛋白(heart-type fatty acid binding protein, H-FABP)、血清同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)与心肌肌钙蛋白T(cardiac

tropoin T, cTn-T),标志物的检测同样存在时间窗的问题,国内学者[22-24]的研究表明,对大鼠结扎 LAD 后,H-FABP 在血清中的含量 1 h 已经升高,3 h 达到高峰,9 h 依然可以维持;而血清 HCY 的含量 1 h 有升高趋势,3 h 达到高峰,且一直维持到术后 12 h;cTn-T 在血清中的含量 3 h 开始升高,6 h 达到高峰,且一直到术后 7 d 持续存在。以上三种标志物均能对 AMI 进行早期判断,其中对 H-FABP 的研究中还发现,其在血清中的含量与 AMI 程度呈正相关性;cTn-T 为心肌细胞所特有,心肌特异性强,为临床最新诊断 AMI 阳性的最重要指标之一;还有研究[25]认为 HCY 可以用于评估 AMI 的预后。但问题在于这些高敏感性和高特异性的研究指标对 AMI 的梗死程度进行准确的定量分析十分有限,对时间窗的把握也有一定的要求,通常将多种标志物进行结合分析更有价值。随着影像学技术的发展,超声心动图(ultrasound cardiogram, UCG)在动态观察心脏结构、心脏顺应性及心功能等方面发挥了许多不可替代的作用,同时在监测模型的时效性方面有着不可比拟的优势,也利于纵向观察心梗后心室重塑的动态变化,为当前临床分析和动物实验研究提供了可靠的参考价值。Benavides-Vallve 等[26]在研究中得到左室收缩和舒张状态下的面积变化分数(fractional area change, FAC)可用于 AMI 的评价,变化分数下降即可证明 AMI,并且在 7 d 后 FAC 基本保持稳定。黄颖等[27],胡珍等[28],林蔚等[29]研究表明 AMI 主要影响的心功能指标为收缩末期左室内径(left ventricular end systolic diameter, LVESD)、收缩末期左室容积(left ventricular end systolic volume, LVESV)、射血分数(ejection fraction, EF)、短轴缩短率(fractional shortening, FS)及每搏输出量(stroke volume, SV)明显下降,因而判定 AMI 急性期对心脏的收缩功能影响较大,对舒张功能无显著影响;同时通过能良好反映心肌做功的 Tei 指数的变化幅度也可进行对左室功能的判断与评价。目前在基础研究中 UCG 评价心功能的最佳指标存疑,关于其标准的制定所进行的相关研究不多;此外技术本身也存在着一定的限制性,仍存在进一步探讨和研究的空间。因此对大鼠 AMI 模型从诸如电生理、酶学、形态及功能等多角度、多方面的考察仍然十分必要,通过技术的更新及科学工作者相关认知水平的提升,更多有价值的信息会被发现和研究。

5　总结与展望

标准化的 AMI 动物模型是研究心血管事件和心肌细胞再生医学机制的基础,当前的研究进展中可以看到,模型的制备过程有简单化的趋势。非人工通气条件下手术者摆脱了呼吸机的限制,节省了制备模型的时间,节约物力和财力成本,同样降低了手术者制作水平的门槛。缩短手术操作时间对于保证手术者状态和动物状态的稳定较为有利。麻醉剂用量也因整体手术过程时间缩短而减少,对动物的影响和死亡率降低有显著的作用。在检测方面,B 超检测方法的使用,极大的推进了对心梗模型的评价方式,尤其在无创、定量、动态等方面有显著的优势。该模型的制备在近年来取得明显进展,有诸多方面的提高,但是现有的制备方法、麻醉药物的选择、检测指标等方面仍有待进一步探索,这也是一代代科研工作者所不断追求的动力源泉。

参考文献:

[1] Kim JH, Hong SJ, Park CY, et al. Intramyocardial adipose-derived stem cell transplantation increases pericardial fat with recovery of myocardial function after acute myocardial infarction[J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0158067.

[2] 王学文,徐善慧,张宁坤,等. 改良冠脉结扎法提高大鼠心梗模型存活率方法探讨[J]. 山西医科大学学报, 2011, 42(11): 931-934.

[3] 张伟,许静,汤小江,等. 大鼠急性心肌梗死模型建立的影响因素[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2016, 37(2): 209-214.

[4] Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction: A method of coronary occlusion in small animals[J]. Ann Surg, 1954, 140(5): 675-682.

[5] 杨文慧,郭涛,杨莉,等. 大鼠急性心肌梗死模型的建立[J]. 中国老年学杂志, 2015, 11(21): 6019-6021.

[6] 刘宇,杨娟,韦婷,等. 改良冠脉结扎法大鼠心肌缺血模型的制备[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(6): 202-205.

[7] 赵传艳,王 昕. 制备心肌梗死大鼠模型方法的改进[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(18): 2886-2891.

[8] Muthuramu I, Lox M, Jacobs F, et al. Permanent ligation of the left anterior descending coronary artery in mice: a model of post-myocardial infarction remodelling and heart failure[J]. J Vis Exp, 2014, (94): e52206.

[9] 魏峰,张静,韩克,等. 非人工通气下大鼠急性心肌梗死模型的建立[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2010, 31(6): 699-702.

[10] 李贻奎,赵乐,何萍,等. 提高结扎冠状动脉在体大鼠心肌梗死模型制作速度和质量的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(7): 948-950.

[11] 闫奎坡,朱翠玲,孙彦琴,等. 两种冠状动脉结扎法制作大鼠急性心肌梗死模型的比较[J]. 国际心血管病杂志,2016,43(2):107-109.
[12] 王勇,高大中,殷跃辉,等. 大鼠心肌梗死模型建立方法选择及心电图表现[J]. 中国实验动物学报,2011,19:525-529.
[13] 侯予龙,郭伟,杨志健,等. 建立大鼠心肌梗死模型时如何选择结扎位点和控制心肌梗死面积[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2015,35(10):1469-1473.
[14] 陈学娟,范金茹,廖建萍,等. 冠脉结扎法大鼠心肌梗死模型的改进[J]. 中国中医急症,2014,23(10):1806-1807.
[15] Gao E, Lei YH, Shang X, et al. A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial in farction in the mouse [J]. Circ Res,2010,107:1445-1453.
[16] 汪新亮,刘彤云. 三种常用动物实验麻醉药对小白鼠麻醉效果比较分析[J]. 医学信息,2015,28(19):56-57.
[17] 李少春,马丽娜,李峰杰,等. 不同浓度水合氯醛对大鼠的麻醉作用比较[J]. 中国药业,2014,23(19):22-23.
[18] Hüske C, Sander SE, Hamann M, et al. Towards optimized anesthesia protocols for stereotactic surgery in rats: Analgesic, stress and general health effects of injectable anesthetics. A comparison of a recommended complete reversal anesthesia with traditional chloral hydrate monoanesthesia[J]. Brain Res,2016,1642:364-375.
[19] Zhang J, Grindstaff RD, Thai SF, et al. Chloral hydrate decreases gap junction communication in rat liver epithelial cells [J]. Cell Biol Toxicol, 2011,27(3):207-216.
[20] 何涛,张小华,罗园柳. 开胸制备大鼠心肌梗死模型操作过程中同步肢胸导联心电图变化[J]. 临床和实验医学杂志,2015,14(15):1235-1238.
[21] Bonilha AM, Saraiva RM, Kanashiro RM, et al. A routine electrocardiogram cannot be used to determine the size of myocardial infarction in the rat[J]. Braz J Med Biol Res. 2005,38(4):615-619.
[22] 李峰杰,段昌令,张金艳,等. 心型脂肪酸结合蛋白与大鼠心肌损伤的相关性及其动态变化规律[J]. 中国药业,2013,22(19):14-16.
[23] 李峰杰,张金艳,李贻奎. HCY与大鼠心肌损伤相关性及其动态变化规律[J]. 世界中西医结合杂志,2013,8(8):775-777.
[24] 李贻奎,李峰杰,张萍,等. 大鼠心肌梗死模型心肌肌钙蛋白T动态变化规律研究[J]. 中国药理学通报,2012,28(10):1356-1359.
[25] 黄永存,于玲,王艳萍,等. 急性心梗溶栓治疗后同型半胱氨酸水平及预后的观察[J]. 临床药物经济学,2013,11(2):112-114.
[26] Benavides-Vallve C, Corbacho D, Iglesias-Garcia O, et al. New strategies for echocardiographic evaluation of left ventricular function in a mouse model of long-term myocardial infarction[J]. PLoS One. 2012,7(7): e41691.
[27] 黄颖,李贻奎,崔海峰,等. 高频率超声影像在急性心肌梗死大鼠心功能评价中的应用[J]. 中国超声医学杂志,2012,28(8):676-679.
[28] 胡珍,陈景瑞,魏静,等. 冠状动脉结扎制备大鼠心肌梗死模型及评价实验研究[J]. 天津中医药,2016,33(2):90-95.
[29] 林蔚,孟凡玲,赵静,等. 超声心动图对大鼠急性心肌梗死的评价作用[J]. 中国超声医学杂志,2012,28(1):9-12.

〔收稿日期〕2017-02-27

专家问答

问:活体成像的最新进展

答:最新的活体成像技术是可以获得实时定量的影像,比如进行实时的药物动力学分析。目前随着CCD等级的提升,采集足够信号所需的时间越来越短,几乎已经可以做到实时动态。这样的新技术可以促使人们从以往做得较多的肿瘤学实验转向神经学研究,比如,今年全国要开启的"脑科学计划";另外就是可以进行清醒动物实验,比如阿茨海默症、帕金森综合症这些动物模型,以往都是在大鼠被麻醉的状态下进行信号采集,但其实麻醉因素会造成很大的实验差异,如果能够在大鼠清醒状态下开展实验,效果和意义都会好很多,这类实验需求也会越来越多。

(感谢第四军医大学 **师长宏** 教授和冷泉港生物科技股份有限公司分子影像部门副总经理 **王志宇** 先生的解答)

研究进展

替代方法在化妆品检测中的应用分析

程树军[1],秦　瑶[2],柯逸晖[1,2],陈志杰[2],黄健聪[2]

(1.广东检验检疫技术中心,广州　510642; 2.广州市华代生物科技有限公司,广州　510535)

【摘要】 体外方法是不可缺少的生物学检测与研究工具,已普遍用于化妆品法规性测试、生物学机制研究和功效性原料的筛查。体外方法包括法规认可和列入标准测试指南的替代方法,用于风险评估和毒性预测的非生物测试方法,以及大量多元和个性化的方法。这些方法可用于产品监管、原料筛查、配方优化、组合测试和定制化评估,覆盖化妆品质量和安全评价的整个过程。随着全行业共识的形成和应用经验的积累,建立在检测标准基础上的方法创新和优化将不断涌现,这些技术将支撑行业的健康发展,有助于提高竞争力和开发适应消费者需求的产品。

【关键词】 替代方法;化妆品;体外;应用

【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0101-06

doi: 10.3969. j. issn. 1671-7856. 2017. 10. 020

The application analysis of alternative method in cosmetics asssessment

CHENG Shu-Jun[1], QIN Yao[2], KE YI-Hui[1,2], CHEN Zhi-Jie[2], HUANG Jian-cong[2]

(1. Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510642, China;
2. Chn-Alt Biotech Co., Ltd, Guangzhou 510535)

【Abstract】 In vitro method as indispensable biological research and testing tools, has been widely used in cosmetics compliance test, biological mechanism research and functional materials screening. These methods include alternative methods which have been accepted by reguations and standardized test guide, non-testing method used for risk assessment and prediction, and a lot more diversification and individualization of in vitro methods. With the consensus formation of the whole industry and increase of application experience, innovation and optimization in vitro method will be constantly emerge. These technologies will be beneficial to improve competitiveness and to develop products to meet the needs of consumers.

【Key words】 Alternative methods; Cosmetics; In vitro assessment; Application

生物医学研究和应用中动物实验的减少(reduction)、优化(refinement)和代替(replacement)的 3R 原则提出 60 多年来已逐渐得到普及并成为共识,技术人员也愿意关注实验动物的福利伦理并主动实践减少和优化的 2R 原则。但以不使用动物为核心的 1R 原则由于投入和研发时间长难度大一直以来进展缓慢。进入 21 世纪后,现代生物技术的飞速发展推动毒理学测试走向现代化,代替动物实验的 1R 原则进入快速轨道。欧盟关于化妆品动物实验禁令的实施和化学品 REACH 法规的影响,以及之后越来越多的国家将替代动物实验列为化妆品法规,推动了替代技术的监管认可[1]。近年来,以美国为首推行的“21 世纪毒性测试观念与远景”,使得大量体外新技术从基础研究转化为体外方法

[基金项目]广东省科技计划项目(2015A030402005);国家认监委认证认可科技支撑计划项目(2017RJWKJ10)。

[作者简介]程树军(1971-),博士,研究员,研究方向:化妆品测试替代方法研发和标准化。E-mail: chengsj@126.com

应用于皮肤生物学和化妆品领域[2]。

1 非动物检测方法分类

凡是利用无知觉材料(如计算机模型、体外细胞、重建组织、离体器官、低等生物等)替代活体哺乳动物的安全性与功效性的测试都可称为体外方法(*in vitro* methods),经过严格验证并被法规接受,用于取代毒理学动物实验的体外方法可称为绝对“替代方法”。根据实验系统和适用范围的不同,体外方法可分为三类。

1.1 非测试方法

非测试方法(non-testing methods)又称为“硅片方法”(in silico methods),广义是指任何基于计算机开发的预测方法。基于计算机的强大功能,很多毒性测试与功效评估的计算机方法被开发出来,用于预测化合物对人体健康和环境的影响,例如定量构效关系(structure-activity relationship),分类法(grouping approaches),交叉参照(read-across)、毒理学阈值(threshold of toxicological concern,TTC)和专家系统(expert systems)等。这些方法在经济合作与发展组织(OECD),欧盟、美国和日本等国家和地区发展较快,例如已经有不少QSAR模型和工具应用到化妆品毒理学安全性评估中,例如,OECD QSAR Toolbox、Toxtree、CAESAR、TEST及HESS等,毒性终点涉及经皮吸收、皮肤刺激、眼刺激、皮肤致敏、急性毒性、重复剂量染毒、生殖发育、遗传和致癌等。欧盟消费者委员会(SCCS)认为针对化妆品杂质以及含量极小的化妆品原料安全性评估,可以使用TTC方法。在工业化学品领域,交叉参照已经被多个国家的管理机构所接受[3],也被我国新化学物质申报登记指南所认可。我国国家食品药品监督管理总局(CFDA)发布的《化妆品新原料申报与审评指南》中也提到:可以根据该原料理化特性、定量构效关系、毒理学资料、临床研究、人群流行病学调查以及类似化合物的毒性等资料情况,增加或减免试验项目。总的来说,中国化妆品非测试方法的认识刚起步,开发和应用与国外都还存在一定的差距,还需要更多的经验积累和借鉴。

1.2 替代方法

狭义的替代方法或称之为“绝对替代”方法,是指经过科学验证程序证明其相关性和可靠性,用于替代传统动物实验并被监管机构所认可的体外方法。因此,替代方法的结果应当与预期回答的毒性终点之间建立预测关系,即体外实验获得的数据与体内有害效应之间建立预测模型。如体外细胞毒性预测啮齿类动物的急性经口毒性,在细胞活性的半数抑制浓度(IC_{50})与动物半数致死剂量(LD_{50})间建立线性关系;基于3D表皮模型的皮肤刺激方法把细胞活性与体内刺激评分建立判定关系;皮肤致敏的细胞实验把免疫细胞表面标志物(CD86和CD54)的表达与致敏评分建立相关关系等[1,2]。替代方法验证工作始于上世纪90年代,官方的验证机构如欧洲替代方法参考实验室(EURL -ECVAM)、美国替代方法多部门协调验证中心(ICCVAM)和日本替代方法验证中心(JaCVAM),完成验证的毒性测试替代方法已超过50项。

1.3 体外方法

广义的体外方法既包括符合法规要求的替代方法,还包括大量应用于化妆品原料和产品安全性或功效性测试的非动物和非临床测试方法。体外方法由体外实验系统、实验过程、指标及检测方法、结果和统计方法(预测模型)等4个基本要素组成,还包括实验原理、适用范围等界定方法应用领域的因素。如美白剂的组合测试方案包括了酪氨酸酶抑制、B16或人黑色素细胞生成抑制、角质细胞摄取试验、斑马鱼测试等多个体外方法,抗光老化功效的体外测试组合包括酯酶抑制方法,成纤维细胞光老化测试和三维重建皮肤模型的方法等[2]。这类方法紧跟皮肤生物学的发展,且与检测技术与装备的进步密切相关,因而新技术不断涌现、个性化方案很多,为产品的宣称提供数据支持。

2 替代方法在化妆品检测中的应用情况

首个法规认可的替代方法是OECD 2004年发布的指南432,即3T3中性红摄取光毒性试验(in vitro 3T3 neutral red uptake phototoxicity test, 3T3 NRU PT),目前列入指南的替代方法已经超过20项。我国接受替代方法成为国家标准和检验检疫行业标准(SN)始于2006年,累计发布标准约30项,国家CFDA在2016年10月吸收列入《化妆品安全技术规范》的首个替代方法是3T3 NRUPT。截止目前,OECD先后发布的替代方法已覆盖皮肤吸收、光毒性、眼刺激、皮肤刺激、皮肤致敏、遗传毒性、内分泌干扰等毒性终点。目前国内常用的化妆品评测的体外方法见表1[2]。

表 1　目前可用的体外方法

Tab. 1　The currently available in vitro testing methods

法规认可和有效的替代方法 Regulation accepted and valided alternative methods	法规/标准编号 No. of guides and standards
牛角膜浑浊和渗透性试验 Bovine corneal opacity and permeability test, BCOP	OECD 437, SN/T 4153
重建表皮模型腐蚀试验 In vitro skin corrosion: Human skin model test	OECD 431, GB/T 27830, SN/T 2245
重建表皮模型刺激试验 In vitro skin irritation reconstructed human epidermis test	OECD 439, SN/T 3948, SN/T 4577
大鼠经皮肤电阻试验 Rat skin transcutaneous electrical resistance test, TER	OECD 430, GB/T 27828
皮肤腐蚀的膜屏障试验 In vitro membrane barrier test for skin corrosion, CORRTOX	OECD 435, GB/T 27829
直接多肽结合试验 Direct peptide reactivity assay, DPRA	OECD 442C
人细胞系活化试验 Human cell line activation test, h-CLAT	OECD 442E
3T3 中性红摄取光毒性试验 In vitro 3T3 NRU phototocicity test, 3T3-NRU-PT	OECD432, GB/T21769
荧光素漏出试验 Fluorescein leakage test, FL	OECD460
兔角膜细胞短期暴露试验 Short time exposure in vitro test, STE	OECD491
3D 角膜模型试验 Epiocular test, HCE	OECD492
体外皮肤吸收试验 Skin absorption: in vitro test	OECD428, GB/T 27818
雌激素受体拮抗剂和激动剂体外转染细胞试验 The stably transfected human estrogen receptor-α transcriptional activation assay	OECD 455
鸡胚绒毛膜尿囊膜试验 Hen's egg test chorio-allantoic-membran assay, HET-CAM	SN/T2329
急性经口毒性的细胞毒性预测 Cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral acute toxicity tests	OECD DG129, SN/T 2328
胚胎和发育毒性的小鼠胚胎干细胞试验 Cosmetics embryotoxicity and developmental toxicity of mice embryonic stem cell test	SN/T2330
胚胎毒性测试的植入后大鼠全胚胎试验 Chemicals embryotoxicity test-post-implantation embryo culture method	SN/T 3527
眼刺激的红细胞溶血试验 Red blood cell test for eye irritation	SN/T 3084. 2
眼刺激的中性红吸收法 Neutral red uptake assays for eye irritation	SN/T 3084. 1

注: OECD: 经济合作和发展组织; GB: 国家标准; SN: 检验检疫行业标准。
Note. OECD: Organization for Economic Cooperation and Development; GB: National Standard; SN: Industry standard.

近年来,替代方法的发展呈现以下几个趋势。一是研发重点转向更复杂的毒理学领域,如皮肤致敏、肝脏毒性、生殖发育毒性和内分泌干扰等,如 2016 年发布的 DPRA、h-CLAT。二是整合评估策略(integrated assessment testing approach, IATA)的开发,尝试把单一的方法合理科学地组合使用,如眼刺激、皮肤刺激和皮肤致敏的 IATA 处于指南形成的不同阶段。整合策略不仅考虑了现行有效的方法,还加入了 QSAR、理化信息、人群暴露等[4]。三是替代方法开发与毒理学新理论紧密结合,研发效率和导向性显著提高,如有害结局通路(adverse outcome pathway, AOP)原则的运用,出现了大量新发现和新方法[5];四是与风险评估结合,基于大数据的分析,建立从体外数据直接预测人体风险的模型。

3　替代方法在化妆品体外测试中的具体应用分析

3.1　原料和成品安全性测试

法规认可的替代方法主要以代替动物实验为目的,替代方法的预测模型、验证指标和判定依据多以动物实验数据为金标准,因此替代方法用于预测人类健康风险的准确性等于或优于动物实验。这些标准化的测试指南可用于化学品的分类/标识、产品安全性测试和上市监管。而且体外方法使

传统以形态学观察为主的半定量动物实验走向以量化参数为主的生物学测试,不仅提高了测试通量,而且测试结果更为客观和具有可比性[6]。如秦瑶等分别用 CAMVA 方法和 BCOP 方法检测了 60 种化妆品的眼刺激性,结果显示 CAMVA 方法的特异性(阴性结果的预测率)为 97.6%,敏感性(阳性结果的预测率)为 100%,准确性达到 98.3%。BCOP 方法的敏感性为 100%,特异性为 83.3%,准确性达到 85%[7]。表明替代方法可用于产品上市的监管,但不同方法的原理和适用范围存在差异,例如与 CAMVA 方法相比,BCOP 方法对于轻度到严重刺激性之间的预测不够精确[6-8]。

3.2 产品制造过程测试

利用替代方法比较精确和可以定量的优点,可将其用于化妆品原料筛查。如对于同一原料的不同供应商或不同批次可能由于杂质、工艺或其它未知因素的影响造成某些毒性作用程度的不一致,利用替代方法的测试结果可为优先选择原料提供帮助,如可用短期暴露细胞实验筛选刺激性温和的表面活性剂[9],用 BCOP 方法可筛选不同批次的原料供应商[10]。同样,替代方法提供的多个检测参数为产品改进提供了线索,例如 BCOP 方法中,获得不同配方的浊度值、OD 值和体外评分,对于数据比较高的配方,可通过降低某种物质的含量、去除某个成份或改变配合比例对配方进行优化,确定最温和的产品。对于刺激-剂量效应关系的原料,还可以通过反复测试确定原料或成份在终产品中的安全浓度[10]。

3.3 用于特殊人群和温和产品的测试

基于不同原理开发的替代方法提供了量化的数据和多种方法的组合,通过对测试数据的挖掘可满足企业个性化的需求。例如 BCOP 方法对于体外评分小于 3 的产品判定为无刺激性[8],CAMVA 方法对于 EC50 少于3%的产品判定为无刺激性,重建三维表皮模型实验对于无刺激性的判定标准为组织活性大于 50%[2]。通常认为优于临界值的数据其产品越温和,温和产品符合特殊人群产品的需求,如婴童、女性、老人等,这些产品以低刺激性或温和为追求目标。具体测试时可选标准方法,也可用改进方案或组合方案。例如可以把温和产品刺激性的建议简单设定为 BCOP 体外评分在 1 以下,CAMVA 的 EC50 大于70%,皮肤模型的组织活性大于 80%等。

3.4 整合策略的使用

鉴于单一替代方法的不足,应当采用整合策略组合不同方法获得毒理学全面评估,组合方法的选择不仅要考虑方法的科学性和局限性,还要综合考虑方法的可用性、成本、技术难度等。组合模式也有多种方案,使用时可参考 OECD 发布的 IATA 指南[4]。常用的替代方法组合见表 2。例如眼刺激的自下而上和自下而上方案均以 BCOP 为重要方法[11],研究表明采用 CAMVA-BCOP 的组合方法预测产品的眼刺激性敏感性为 100%,特异性为 97.6%,准确性达到 98.3%,优于单一方法[7]。另外,对于复杂的毒性终点,也建议采用组合模型,以避免单一方法覆盖机制不全的局限,例如,可把导致皮肤致敏发生的 AOP 不同阶段开发的替代方法组合起来,提高预测的准确性[12,13]。把检测胚胎发育不同阶段的胚胎干细胞试验、全胚胎试验和斑马鱼实验组合起来,预测化合物的胚胎毒性。组合方案也多用于化妆品功效原料的筛查,如美白剂的整合测试策略组合了酪氨酸酶抑制、B16 或人黑色素细胞生成抑制、角质细胞摄取试验、斑马鱼测试等多个体外方法,抗光老化功效的体外测试组合包括酯酶抑制方法,成纤维细胞光老化测试和三维重建皮肤模型的方法等。

3.5 产品个性化宣称

企业内部使用的替代方法可以在标准方法的水平上提高要求,或满足消费者述求,或追求更高的安全水平。优化方法主要用于适应产品差异化竞争、更精确获得实验数据、温和宣称及特殊人群需要[1]。如利用皮肤模型对产品的皮肤刺激性进行评估时,可在标准方法检测细胞活性的基础上,增加刺激引进的白介素 1α 的表达情况[14],或测定皮肤模型表皮屏障电阻值的变化,也可改变暴露方式,如暴露和后孵育的时间和次数,如 BCOP 的改良[10,15]。常见的替代方法优化方案见表 3。随着检测数据的积累和研究的深入,许多改进方案将被行业内提出并使用。

3.6 拓展应用领域

替代方法开发的初衷是满足大量化学品毒性测试的需要,目前成熟的方法主要用于皮肤接触化学品的毒性预测。但对于粘膜接触类物质的毒性测试尚无完整的替代方法解决方案,可在现有方法基础上建立合理化的应用模型,例如牛角膜具有上皮组织共有的多层角质细胞的屏障结构和功能,可

将其用于粘膜(口腔、阴道)刺激和皮肤刺激性的测试,为检测口腔护理品(牙膏、漱口水等)和卫生护理产品(纸尿裤、卫生巾等)的安全性提供数据[10]。也有人将体外方法用于药品、消毒产品、医疗器械的评价[16]。

表 2　替代方法的组合应用情况

Tab. 1　The integrated application of alternative methods

毒性终点 Toxic endpoint	组合方案 Integrated strategy	主要应用 Main applications
眼刺激 Eye irritation	BCOP + CAMVA + HCE BCOP + STE BCOP + (Cytosensor) + HCE	提高预测的精确性,减少单一方法的不足 Increase accuracy of prediction, decrease the shortcoming of single method 扩大方法的应用范围 Extend the test method application field
皮肤致敏 Skin sensitization	DPRA + LuSens + U-SENS DPRA + Keratinosens™ + U-SENS DPRA + h-CLAT DPRA + LuSens Keratinosens™ + h-CLAT LuSens + U-SENS LuSens + h-CLAT	基于 AOP 的多通路组合皮肤致敏测试方案,提高预测的精确度 Test strategy based on AOP of multi-pathway integrated skin sensitization, to increase the accuracy of prediction
光毒性 Phototoxicity	3T3 NRU PT + 皮肤模型(skin model)	减少单一方法的不足;提高适用性 Decrease the shortcoming of single method, increase the applicability
多毒性终点 Multiple toxic endpoint	皮肤模型(Episkin) + h-CLAT	同时检测皮肤刺激、皮肤致敏及相互影响 Testing and study the interaction of skin irritation and skin sensitization at the same time

表 3　目前替代方法的优化应用情况

Tab. 3　current conditions of optimizing application in alternative methods

标准方法 Standard methods	优化方案 Optimizing approaches	优点和主要应用 Advantages and typical application
BCOP	增加参数:角膜厚度检测、组织学观察、炎性因子测试;延长暴露时间;多重暴露;延长暴露后孵育时间 Add parameters: corneal thickness test, histological observation, inflammatory factor assay; prolong exposure time; multiple exposure; prolong time of post-incubation	更精确区分刺激性和了解作用机制;测试长时间接触的产品;多次反复接触产品或化妆品套装;刺激后的恢复作用 Distinguish irritation more accuracy and understand the mechanism; testing the safety for a long time expose products; multiple and replicating exposing to products and cosmetics suit; recovery after irritation
皮肤模型方法 Skin model methods	增加参数:炎性因子;延长暴露时间和后孵育时间 Add parameters: IL-1a inflammatory factor IL-1a; prolong exposure time and post-incubation time	更精确区分刺激性和了解作用机制;提高检测敏感性 Distinguish irritation more accurately and understand the mechanism; Increase the detection sensitivity
CAMVA	简化方法,不计算 EC50,只描述现象 Simplified method, no calculated EC50, only describe the phenomenon	用于配方比较和优化,刺激性预测,缩短检测时间 For comparing and optimizing the formula, predicting the irritation and shortening the test time
STE	增加中性红毒性测试 Add neutral red toxicity test	用于含活性成分和聚合物眼药水的刺激 For testing the irritation of the eyedrops containing active ingredients and polymers
DPRA	氨基酸衍生物反应试验 Amino acid derivative reactivity assay, ADRA	降低受试物浓度,提高精确度 Decrease the concentration of the products, increase the accuracy
h-CLAT	与 3D 皮肤模型共培养 Co-culture with 3D skin model	增加皮肤吸收,用于难溶解物质、终产品和可能代谢活化物质的测试 Increase the skin absorption, for testing the dissolvable products, final products and the substances which can be metabolized and activated

4 化妆品替代方法应用趋势

随着替代技术的日益成熟,在全球化妆品毒性测试标准一体化和法规相互影响的背景下,我国化妆品全安性的测试会逐渐与国际标准趋同和接近,替代方法的应用范围和水平也会相应提高,并实现自主创新和形成特色。今后将会有越来越多的体外测试数据,回答原料和产品安全性的问题。替代技术的投入研发和使用也会带动相关学科和行业的发展,如细胞技术和模型、三维组织构建和产业化、替代方法专用设备、计算机模型、生物信息学和检测技术的进步。替代技术在化妆品行业的率先应用不仅惠及本产业,也有利于其它健康相关产业,同时对保护消费者权益也有促进作用。

参考文献:

[1] 程树军,焦红.实验动物替代方法原理与应用[M].北京:科学出版社,2010:285-304.

[2] 程树军.化妆品评价替代方法标准实施指南[M].北京:中国质检出版社,2017.

[3] Patlewicz G, Ball N, Booth ED, et al. 2013. Use of category approaches, read-across and (Q)SAR: general considerations [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2013, 67(1):1-12.

[4] OECD. OECD new guidance document on an integrated approach on testing and assessment(IATA) for skin corrosion and irritation [S]. Series on Testing and Assessment No. 203. 2013

[5] 瞿小婷,程树军,秦瑶,等.有害结局通路指南及毒性测试应用分析[J].中国日用化学工业,2016,46(8):473-478

[6] 黄健聪,秦瑶,程树军,等.牛角膜浑浊渗透试验方法预测眼刺激性的研究[J].中国卫生检验杂志,2014,24(14):1980-1983.

[7] 秦瑶,程树军,黄健聪,等.整合CAMVA和BCOP方法检测化妆品的眼刺激[J].中国比较医学杂志,2014,24(6):78-82.

[8] OECD. OECD guideline for testing of chemicals No.437: Bovine corneal opacity and permeability test method for identifying i) Chemicals inducing serious eye damage and ii) Chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage [S]. Paris: OECD, 2013:1-27.

[9] Inácio AS, Mesquita KA, Baptista M, et al. In vitro surfactant structure-toxicity relationships: implications for surfactant use in sexually transmitted infection prophylaxis and contraception[J]. PLoS ONE, 2011 6(5): e19850

[10] 秦瑶,柯逸晖,程树军,等.牛角膜浑浊和渗透性实验应用于个人护理产品评价的案例分析[J].日用化学品科学,2017,(3):13-18.

[11] Scott L, Eskes C, Hoffmann S, et al. A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using bottom-up and top-down approaches[J]. Toxicol in Vitro, 2010, 24(1):1-9.

[12] 柯逸晖,陈彧,程树军,等.直接多肽结合试验组合人细胞系活化试验预测皮肤致敏物的探讨[J].中国实验动物学报,2016,24(6):611-617.

[13] Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, et al. Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy[J]. Arch Toxicol, 2015, 89(12):2355-83.

[14] Walters RM, Gandolfi L, Mack CM, et al. In vitro assessment of skin irritation potential of surfactant-based formulations by using a 3-D skin reconstructed tissue model and cytokine response[J]. Altern Lab Anim, 2016, 44(6):523-532.

[15] 陈彧,喻欢,程树军,等.结合组织学评分的牛角膜浑浊和渗透性方法研究[J].日用化学工业,2016,46(2):107-110.

[16] Coleman KP, McNamara LR, Grailer TP, et al. Evaluation of an in vitro human dermal sensitization test for use with medical device extracts[J], Applied In Vitro Toxicol, 2015, 1(2):118-130.

〔收稿日期〕2017-02-09

研究进展

吗啡镇痛个体差异的遗传药理学进展

杨　银,孟爱民*

(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,卫计委人类疾病比较医学重点实验室,北京　100021)

【摘要】 吗啡是广泛使用的一种阿片类镇痛药,不同个体间对吗啡镇痛的敏感性有较大差异,长期使用吗啡会导致镇痛效果降低而产生耐受,耐受的易感性在个体间也有较大差异,这些都给吗啡在临床的优化应用带来很多困扰。遗传因素通过控制蛋白质编码从药代动力学和药效动力学两方面影响个体对吗啡镇痛的反应。P－糖蛋白编码基因 *ABCB*1 的多样性影响吗啡的转运和分布,编码 UDP－葡糖醛酸转移酶的基因 *UGT*2*B*7 的多样性则控制吗啡代谢转化。吗啡的主要作用靶点 μ 阿片受体的编码基因 *OPRM*1 和儿茶酚-*O*-甲基转移酶的编码基因 *COMT* 的多样性引起的下游信号通路反应性差异影响吗啡镇痛药效学。未来对吗啡镇痛个体差异的遗传学研究需要使用遗传多样性更复杂的个体,采用更系统全面的分析方法从更广的范围筛选关键基因。阐明遗传多样性与个体间对吗啡镇痛反应差异的关系,将有助于理解吗啡镇痛的遗传药理学调控机制,为临床吗啡镇痛使用实现个人化、精确化甚至联合基因治疗改善吗啡镇痛提供依据。

【关键词】 吗啡镇痛;个体差异;遗传药理学;药代动力学;药效动力学

【中图分类号】R－33　　【文献标识码】A　　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0107-06

doi: 10.3969. j. issn. 1671－7856. 2017. 10. 021

Genetic pharmacology of individual differences in morphine analgesia

YANG Yin, MENG Ai-min*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College(PUMC), Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health and Family Planning Commission of P. R. C, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Morphine is a widely used opioid analgesic, but great individual differences in response to morphine such as sensitivity to analgesia and susceptibility to tolerance, which due to chronic morphine treatment, are great challenges for clinicians to optimize treatment strategy. Genetic factors play an important role in individual variability to morphine treatment. Individual responses to morphine are influenced by various gene-encoded-proteins implied in pharmacokinetics and pharmacodynamics. Variants of P-glycoprotein encoding gene *ABCB*1 regulate transportation and distribution of morphine and affect analgesic effect. Diversity in UDP-glucuronosyl transferase encoding gene *UGT*2*B*7, whose encoding product catalyzing morphine to glycosylated metabolites contribute to different response to morphine in a pharmacokinetic way. Nevertheless, variants in μ-opioid receptor encoding gene *OPRM*1 and catechol-*O*-methyltransferase encoding gene *COMT* regulate morphine-induced downstream signaling and influence morphine analgesia in a pharmacodynamic way. It is necessary to employ individuals with more complex genetic diversity and screen in a larger scope through a more comprehensive system to find the key genes involved in individual differences of morphine analgesia in future research. Elucidating the association between genetic variability and individual differences will help to figure out the

[基金项目]中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费(2016ZX310044)。

[作者简介]杨银(1988－),男,博士,研究方向:神经生物学。E-mail: yangyin987654@163.com

[通讯作者]孟爱民(1963－),女,研究员,研究方向:组织干细胞损伤。E-mail: ai_min_meng@126.com

mechanism of pharmacogenetic regulation in morphine analgesia. It will provide basis for personalized and accurate utility of morphine or even combining with gene therapy to improve the analgesic effect.

【Key words】 Morphine analgesia; Individual differences; Pharmacogenetics; Pharmacokinetics; Pharmacodynamics

吗啡是目前治疗中重度疼痛使用最广泛的镇痛药,但其镇痛效果在不同个体之间具有很大差异。上世纪九十年代就有文献报道不同患者个体术后镇痛时对吗啡的需求量明显不同[1],有的患者使用吗啡甚至没有镇痛效果,一项122例口服吗啡治疗癌痛的临床实验发现对吗啡镇痛不敏感的患者比例高达11.5%[2]。吗啡长期使用会导致镇痛效果降低,即产生耐受,个体间对吗啡镇痛产生耐受的几率和程度也存在较大差异,一些患者使用吗啡镇痛时,随着病程迁延和疼痛的增加吗啡用量也快速增加,而另一些患者在稳定的吗啡用量下持续数月还能得到充分的疼痛缓解[3]。此外,种族差异对吗啡镇痛效果也有较大影响[4]。这些研究结果都提示遗传因素在吗啡镇痛的个体差异产生中起到重要影响,因此,理清基因变异性与吗啡镇痛效果的关系将对改善吗啡使用和推进疼痛个体化治疗起到关键的作用。

遗传基因通过控制蛋白质编码从药代动力学和药效动力学两方面对吗啡镇痛产生影响,影响吗啡药代动力学的蛋白包括参与吗啡吸收、分布、催化代谢和排泄的酶和转运体等,而影响吗啡药效动力学的蛋白包括吗啡的靶点受体和受体激活后下游的信号转导元件等。本文对这些遗传因素在调控吗啡镇痛敏感性和耐受易感性个体差异中的作用进行了总结和讨论。

1 遗传因素对吗啡的药代动力学影响

1.1 吗啡镇痛敏感性差异

吗啡镇痛的量效关系个体间差异非常大,背后机制目前尚未完全阐明。大量研究表明在吗啡进入机体后对其进行吸收转运的蛋白及进一步催化代谢的酶共同作用,从药代动力学方面对吗啡镇痛产生影响。负责多种药物转运的主动外排泵P-糖蛋白(P-glycoprotein)位于构成血脑屏障的毛细血管内皮细胞腔表面和肠上皮细胞表面,可阻止药物进入脑或抑制口服药物的肠吸收过程,降低其生物利用率[5,6]。皮下注射给予吗啡30 min后,P-糖蛋白缺失小鼠脑内吗啡浓度较野生型小鼠显著升高,同时吗啡镇痛效果也有所增高,此外,使用P-糖蛋白的抑制剂环孢霉素(cyclosporine)对动物进行预处理发现可显著提高野生型小鼠的吗啡镇痛效果,而在P-糖蛋白缺失的小鼠中则无影响[7]。另一项在受试者中使用P-糖蛋白的另一种抑制剂奎尼丁(quinidine)的研究结果表明口服吗啡的肠吸收得到了提高,血药浓度显著增加,药效相应增强,但血药浓度和药效的比例关系并未受到影响,提示P-糖蛋白可能在控制吗啡进入人脑方面没有明显作用[8]。P-糖蛋白的编码基因*ABCB1*具有C3435T单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphism, SNP),该位点碱基为T的患者对吗啡的需求量有增高的趋势[9],可能也与吗啡敏感性差异的产生相关。

吗啡-6-葡糖苷酸(morphine-6-*O*-glucuronide, M6G)和吗啡-3-葡糖苷酸(morphine-3-*O*-glucuronide, M3G)是人体内吗啡的主要代谢产物,由肝脏、脑和肾脏中的UDP-葡糖醛酸转移酶(UDP-glucuronosyltransferase, UGTs)的一种亚型UGT2B7催化形成,其中M6G具有较强的镇痛效果,可能是吗啡给药后镇痛效果的主要贡献者,而M3G不具镇痛效果[10]。有报道表明美洲原住民使用吗啡后M6G代谢产物要低于高加索白种人,提示吗啡的葡糖苷酸化代谢存在种族差异[11],可能作为吗啡镇痛个体差异的一种机制。*UGT2B7*基因的多样性已经有研究阐明,有*UGT2B7**1和*2两种基因型由C802T的SNP所引起,两种基因型频率分别为51.1%和48.9%,所编码的UGT2B7在第268位组氨酸(His)位点上替换为了酪氨酸(Tyr),但分别由*UGT2B7**1和*2两种基因型编码的UGT2B7介导的对吗啡的葡糖醛酸化作用并无差别,患者使用吗啡后血液中吗啡-葡糖苷酸与吗啡的比例也没有改变[12],其他UGT2B7的多样性也对其催化吗啡葡糖苷酸化并无影响[13-15]。有临床病例报告通过对两位吗啡镇痛效果差异巨大的癌症患者进行研究发现,这两位患者的UGT2B7蛋白即存在His268Tyr的突变,同时对吗啡镇痛不敏感的患者其μ阿片受体(μ-opioid receptor, MOR)的编码基因*OPRM1*第118位也较吗啡镇痛效果较好的患者不同,由纯合的A/A变为A/G,此变异导致μ阿片受体第40位天冬酰胺(Asn)变为天冬氨酸(Asp)[16],对UGT2B7多样性对其功能影响的研究提示此病例中两位患者对吗啡反应的差异性可能由μ阿片受体的Asn40Asp变

异介导。采用病人自控给药镇痛(patient-controlled analgesia)的研究显示,UGT2B7 编码基因 802 位点为 C 的患者子宫切除术后对吗啡镇痛的敏感性较该位点为 T 的患者显著增强[17]。

1.2　吗啡耐受易感性差异

药代动力学范围内吗啡耐受主要表现为长期使用吗啡时其进入体内后一系列的代谢过程发生了改变,吗啡成为一些代谢酶或转运蛋白系统的活化剂或抑制剂,阻止了吗啡镇痛活性代谢物的产生和向神经系统转运,导致到达受体的吗啡及其镇痛活性代谢物随时间逐渐降低。

长期给予吗啡可引起大鼠脑中 P-糖蛋白表达增高约两倍,可能会增强血脑屏障对吗啡的外排作用,阻止吗啡入脑,是潜在的产生吗啡耐受的机制[18]。此结果与前述 P-糖蛋白只参与到胃肠对口服吗啡的吸收而在吗啡进入脑中无明显作用的研究结果有差别,还有待更深的研究证实。个体间因遗传差异导致吗啡药代动力学差异从而表现出不同吗啡耐受易感性的研究还比较少,未来此方面研究将有助于推动从基因层面调控改善吗啡药代、提高生物利用率。

2　遗传因素对吗啡的药效动力学影响

2.1　吗啡镇痛敏感性差异

对吗啡镇痛药效动力学影响的分子机制研究主要集中在阿片受体及其下游信号通路激活的调控方面。阿片受体分为 μ 阿片受体(μ-opioid receptor, MOR)、δ 阿片受体(δ-opioid receptor, DOR)、κ 阿片受体(κ-opioid receptor, KOR)和孤啡肽受体(orphanin FQ receptor, OFQR/ORL-1R)四种。μ 阿片受体是吗啡镇痛的主要作用靶点,因此 μ 阿片受体基因 *OPRM*1 的遗传变异性是通过影响吗啡的药效动力学从而参与介导吗啡镇痛个体间差异的主要因素。T802C 的 SNP 使 μ 阿片受体第 268 位氨基酸存在丝氨酸(Ser)或脯氨酸(Pro)两种类型,该变异位于受体的第三胞内环,对吗啡与受体的亲和力无影响,但脯氨酸型的受体被激动剂激活后与 G 蛋白偶联的下游信号有所降低,导致吗啡的效力降低,由于 T802C 变异的发生频率远小于 1%,因而临床研究也较为缺乏[19,20]。*OPRM*1 基因 A118G 的突变使其编码的 μ 阿片受体在位于 N 端胞外第 40 位氨基酸位点处出现由天冬酰胺(Asn)向天冬氨酸(Asp)的变异,导致受体丧失一个潜在的 N-糖基化位点。在癌症病人中,*OPRM*1 基因 118 位点为 G 的纯合子变异较为 A 的野生型对吗啡镇痛的药物需求量有明显提高[21],手术后使用吗啡进行急性疼痛的治疗研究也表明,*OPRM*1 基因 118 位为 G 的个体对吗啡的需求量较大[22,23]。国内的一项研究通过对 112 例使用包括吗啡在内的阿片类镇痛药镇痛的癌症患者进行研究,也发现 A118G 多态性位点为 G 时对阿片类物质的需求量显著增加,患者对阿片镇痛表现出较差的敏感性[9]。另一项样本量更大的研究结果显示,973 例子宫切除术术后吗啡镇痛的患者中 *OPRM*1 基因 118 位为 G 的患者疼痛评分更高且吗啡需求量更大,且 A118G 多态性在华裔患者和亚裔印度族患者中的影响无差异[24]。也有研究对 88 个扁桃腺切除术后使用吗啡镇痛的儿童进行分析发现,*ORPM*1 基因 118 位点的 G 使个体对吗啡镇痛敏感性较差,痛评分较高,而该位点为 A 则对吗啡镇痛敏感性较高[25]。

儿茶酚-*O*-甲基转移酶(catechol-*O*-methyltransferase, COMT)编码基因多样性在吗啡镇痛个体间差异中也起到重要作用。COMT 在体内负责介导多巴胺、肾上腺素和去甲肾上腺素的失活,其编码基因 *COMT* 在群体中存在多样性导致存在第 158 位氨基酸由缬氨酸(Val)变异为甲硫氨酸(Met)的 Val158Met 多态性。通过对 207 名使用吗啡镇痛的高加索癌症病人进行基因型鉴定,进而与其吗啡需求量进行关联研究表明,COMT 第 158 位氨基酸为 Val 的个体较该位点为 Met 的个体对吗啡的需求量显著增多[26]。对 117 名使用吗啡进行心脏术后镇痛的患者 *COMT* 基因型和吗啡镇痛效果关系研究发现,使用相同吗啡剂量,COMT 第 158 位氨基酸为 Val 的患者疼痛评分显著增高[27],提示 Val158Met 变异使对吗啡镇痛敏感性增强。

2.2　吗啡耐受易感性差异

药效动力学范围内吗啡耐受主要表现为随吗啡给药时间的延长 μ 阿片受体系统本身对药物的反应逐渐降低。利用自发高血压(spontaneously hypertensive, SHR)、Wistar 和 Sprague-Dawley (SD)三种大鼠连续给予吗啡镇痛进行研究发现,Wistar 大鼠吗啡耐受的发展比率较 SD 和 SHR 大鼠有显著增高[28];同样,使用 11 个品系的小鼠(129P3, A, AKR, BALB/C, C3H/HE, C57BL/6, CBA, DBA/2, LP, SJL, SWR)进行吗啡耐受的对比研究发现,品系间对吗啡耐受的程度有显著差异,其中 129P3

和 LP 两种小鼠不表现出对吗啡的耐受[29],这些结果提示遗传因素在吗啡耐受发展中具有重要作用。使用不同性别的小鼠对吗啡耐受的发展情况进行研究发现,随着长时间地给予吗啡,雌雄小鼠吗啡镇痛量效曲线均发生明显右移,ED_{50}值均显著增高,提示发生药物耐受,但雌性小鼠较雄性小鼠耐受程度更强[30],说明性别的遗传差异对耐受易感性也会产生影响。

另一项使用SD大鼠和 Wistar 大鼠进行吗啡耐受的研究也表明,吗啡连续给药后,Wistar 大鼠产生较强的耐受,而 SD 大鼠的吗啡抗伤害效果长时间给药没有改变,并且给药后两种大鼠的血药浓度没有差异,代谢产物吗啡-3-葡糖苷酸及其与吗啡的比例也没有差异[31],与前述使用三种大鼠进行研究的结果一致,提示吗啡耐受易感性在两种大鼠间的差异更倾向于通过药效动力学而非药代动力学途径产生。

分别将吗啡注射到大鼠脑中可介导吗啡镇痛的两个区域——中脑导水管灰质(periaqueductal gray, PAG)和延髓头端腹内侧区(rostral ventromedial medulla, RVM)进行吗啡镇痛,长时间给药后发现通过 PAG 给予吗啡镇痛更易发生耐受,说明 PAG 和 RVM 两个脑区不同神经元对吗啡耐受的抗性不同[32],这种直接将吗啡注射到脑区进行镇痛的研究可排除皮下注射等给药方式药物经过复杂代谢过程的影响,进一步证实药效动力学差异可影响吗啡耐受。

行为学结合遗传学的研究结果提示小鼠第10号染色体 *Mop*2 基因座位点在吗啡镇痛中具有重要作用,该位点内含有 μ 阿片受体的编码基因 *OPRM*1。使用 C57BL/6J (B6)和 DBA/2J (D2)培育的同类系小鼠 B6cD2 和 D2cB6,在上述基因座位点分别引入另一种品系的遗传信息,对两种同类系小鼠进行吗啡耐受研究结果表明,B6 小鼠的 *Mop*2 基因座所含的遗传信息使小鼠更快产生吗啡耐受[33]。

3 其他基因的影响

很多研究报道筛选出一些其他基因也可能参与到吗啡镇痛个体差异中,但其参与机制尚不明确,无法区分是通过影响吗啡的药代或是药效动力学产生作用,此部分将进行简要总结。编码5-羟色胺-1B 受体(5-hydroxytryptamine-1B, $5\text{-}HT_{1B}$)的 *Htr*1*b* 基因参与介导对吗啡镇痛的个体敏感性差异,DBA/2 小鼠和 C57BL/6 小鼠的 *Htr*1*b* 基因存在多样性差异,使用5-羟色胺-1B 受体拮抗剂进行研究发现抑制5-羟色胺-1B 的功能 DBA 小鼠吗啡镇痛效果显著降低,但对 C57BL/6 小鼠无影响,间接证明了 *Htr*1*b* 基因在其中的作用[34]。使用全基因组关联分析(genome-wide association studies, GWAS)进行更广泛无偏地筛选与吗啡镇痛个体差异相关基因的研究提示,在 *TAOK*3 数量性状位点(quantitative trait locus, QTL)中有影响吗啡镇痛敏感性的单核苷酸多态性位点,该区域含有编码丝/苏氨酸蛋白激酶 TAO3 的基因,在儿童术后吗啡急性镇痛敏感性个体差异中有重要作用[35]。近期有研究表明 Yin Yang 1 蛋白在吗啡镇痛敏感性个体差异中也有作用,Yin Yang 1 蛋白为一种广泛表达的核蛋白,参与到髓鞘形成、神经退行性病变、肿瘤发生和线粒体功能调控中,其编码基因为 *Yy*1。MOLF/EiJ 小鼠 *Yy*1 等位基因较 C57BL/6J 不同,对吗啡镇痛敏感性较 C57BL/6J 小鼠显著降低[36]。

有研究利用23个品系的近交系小鼠,采用基因组水平的计算机辅助遗传作图(genome-wide computational genetic mapping)结合错误发现概率纠错(correct for the false discovery rate)的方法对吗啡耐受背后的分子机制进行了探索,筛选出编码多个 PDZ 结构域包含蛋白 MUPP1 (multiple-PDZ containing protein)的基因 *Mpdz*,可能参与调控吗啡耐受,进一步分别对耐受易感的 C57/6J 和不易感的 129S1 小鼠研究,发现 C57/6J 小鼠脊髓中 *Mpdz* 基因表达较高[37]。

4 基因之间协同作用参与调控吗啡镇痛个体差异

除单个基因对吗啡镇痛个体差异的影响外,多个基因间也可能通过相互作用影响吗啡的镇痛效果。最新的研究将 *OPRM*1 和 *ABCB*1 两种基因的基因型与患者年龄、体重和经历的手术时长结合在一起综合分析,探讨与术后吗啡镇痛的关联,有助于更准确研究吗啡镇痛个体差异的机制[38]。对 *ABCB*1 基因 C3435T 和 *OPRM*1 基因 A80G 的多态性与吗啡镇痛效果的关系进行研究,发现将两种基因型情况结合后与吗啡的镇痛效果的关联性显著增强,从基因分析层面对吗啡镇痛的强敏感、敏感和不敏感三组的预测可达到100%正确率[39]。在吗啡镇痛敏感性方面,有研究对术后吗啡镇痛的吗

啡消耗量与 *OPRM*1、*COMT*、*UGT*2*B*7 和 *ESR*1 基因中的单核苷酸多态位点(SNPs)的关系进行了研究,对 201 个经历腹部手术采用病人自控吗啡镇痛的高加索病人的 20 个 SNPs 进行了研究,*OPRM*1 基因的 7 个 SNPs 对吗啡消耗起到加性效应,联合包括年龄和 *ESR*1、*OPRM*1、*COMT* 三个基因中共 9 个 SNPs 在内的线性回归模型可对 10.7% 的吗啡消耗量差异进行解释,为最高比例[40]。

有研究表明 μ 阿片受体和 δ 阿片受体(δ-opioid receptor, DOR)可相互作用参与到对吗啡镇痛敏感性的调节,SD 大鼠对吗啡镇痛的敏感性较 Wistar 大鼠高,在 SD 大鼠的突触蛋白中,μ 阿片受体和 δ 阿片受体相互作用形成的聚合体也较 Wistar 大鼠具有更高比例[41]。

5　总结与展望

现有研究结果提示,P-糖蛋白编码基因 *ABCB*1 的变异性影响吗啡进入小鼠和大鼠脑内的过程,长时间给予吗啡后大鼠脑内 P-糖蛋白表达升高,可能与耐受产生相关,与此相反,使用抑制剂进行研究的结果表明在人体中 *ABCB*1 差异在控制吗啡入脑过程中无明显作用。吗啡糖基化代谢相关基因 *UGT*2*B*7 存在 C802T 单核苷酸多态性,该位点为 C 的个体对吗啡镇痛敏感性较高。μ 阿片受体编码基因 *OPRM*1 的 T802C 变异使个体对吗啡敏感性降低,A118G 变异也会导致对吗啡敏感性降低。此外,在人体中儿茶酚-*O*-甲基转移酶(COMT)编码基因多态性使 COMT 也存在 Val158Met 的变异,但该变异使个体对吗啡镇痛敏感性增强。

尽管现在已有一些候选基因可为临床吗啡镇痛药物用量优化提供参考,但多数都只考虑了单基因的作用,且只能解释总差异中很小比例,因此基于药物遗传学对个体吗啡镇痛敏感性和耐受易感性的预测仍非常复杂。未来需要使用更多品系的动物进行研究以扩大潜在靶基因的筛选范围,更好模拟临床情况下不同人之间遗传的多样性,筛选出更多影响吗啡镇痛个体差异的基因。此外,注重基因之间的相互作用和调节有助于更好地揭示吗啡镇痛个体差异背后复杂的遗传因素,为临床改善和提高吗啡镇痛效果提供科学依据。

参考文献:

[1] Tyler DC, Pomietto M, Womack W. Variation in opioid use during PCA in adolescents [J]. Paediatr Anaesth, 1996, 6(1):33-38.

[2] Corli O, Floriani I, Roberto A, et al. Are strong opioids equally effective and safe in the treatment of chronic cancer pain? A multicenter randomized phase IV 'real life' trial on the variability of response to opioids [J]. Ann Oncol, 2016, 27(6):1107-1115.

[3] Foley K. Changing concepts of tolerance to opioids: what the cancer patient taught us [A]. IASP Refresher Course Syllabus, Seventh World Congress on Pain in Paris [C]. 1993, 331-350.

[4] Sibille KT, Kindler LL, Glover TL, et al. Individual differences in morphine and butorphanol analgesia: a laboratory pain study [J]. Pain Med, 2011, 12(7):1076-1085.

[5] Fricker G, Miller DS. Relevance of multidrug resistance proteins for intestinal drug absorption in vitro and in vivo [J]. Pharmacol Toxicol, 2002, 90(1):5-13.

[6] Fromm MF. P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs [J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 2000, 38(2):69-74.

[7] Thompson SJ, Koszdin K, Bernards CM. Opiate-induced analgesia is increased and prolonged in mice lacking P-glycoprotein [J]. Anesthesiology, 2000, 92(5):1392-1399.

[8] Kharasch ED, Hoffer C, Whittington D, et al. Role of P-glycoprotein in the intestinal absorption and clinical effects of morphine [J]. Clin Pharmacol Ther, 2003, 74(6):543-554.

[9] Gong XD, Wang JY, Liu F, et al. Gene polymorphisms of OPRM1 A118G and ABCB1 C3435T may influence opioid requirements in Chinese patients with cancer pain [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(5):2937-2943.

[10] Christrup LL. Morphine metabolites [J]. Acta Anaesthesiol Scand, 1997, 41(1 Pt 2):116-122.

[11] Cepeda MS, Farrar JT, Roa JH, et al. Ethnicity influences morphine pharmacokinetics and pharmacodynamics [J]. Clin Pharmacol Ther, 2001, 70(4):351-361.

[12] Holthe M, Klepstad P, Zahlsen K, et al. Morphine glucuronide-to-morphine plasma ratios are unaffected by the *UGT2B7 H268Y* and *UGT1A1**28 polymorphisms in cancer patients on chronic morphine therapy [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2002, 58(5):353-356.

[13] Holthe M, Rakvag TN, Klepstad P, et al. Sequence variations in the UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) gene: identification of 10 novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) and analysis of their relevance to morphine glucuronidation in cancer patients [J]. Pharmacogenomics J, 2003, 3(1):17-26.

[14] Bhasker CR, McKinnon W, Stone A, et al. Genetic polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) at amino acid 268: ethnic diversity of alleles and potential clinical significance [J]. Pharmacogenetics, 2000, 10(8):679-685.

[15] Jin C, Miners JO, Lillywhite KJ, et al. Complementary deoxyribonucleic acid cloning and expression of a human liver uridine diphosphate-glucuronosyltransferase glucuronidating carboxylic acid-containing drugs [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1993, 264(1):475-479.

[16] Hirota T, Ieiri I, Takane H, et al. Sequence variability and candidate gene analysis in two cancer patients with complex clinical outcomes during morphine therapy [J]. Drug Metab Dispos, 2003, 31(5):677-680.

[17] Bastami S, Gupta A, Zackrisson AL, et al. Influence of UGT2B7, OPRM1 and ABCB1 gene polymorphisms on postoperative morphine consumption [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2014, 115(5):423-431.

[18] Aquilante CL, Letrent SP, Pollack GM, et al. Increased brain P-glycoprotein in morphine tolerant rats [J]. Life Sci, 2000, 66(4):L47-L51.

[19] Befort K, Filliol D, Decaillot FM, et al. A single nucleotide polymorphic mutation in the human μ-opioid receptor severely impairs receptor signaling [J]. J Biol Chem, 2001, 276(5):3130-3137.

[20] Koch T, Kroslak T, Averbeck M, et al. Allelic variation S268P of the human μ-opioid receptor affects both desensitization and G protein coupling [J]. Mol Pharmacol, 2000, 58(2):328-334.

[21] Klepstad P, Rakvag TT, Kaasa S, et al. The 118 A > G polymorphism in the human μ-opioid receptor gene may increase morphine requirements in patients with pain caused by malignant disease [J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2004, 48(10):1232-1239.

[22] Chou WY, Wang CH, Liu PH, et al. Human opioid receptor A118G polymorphism affects intravenous patient-controlled analgesia morphine consumption after total abdominal hysterectomy [J]. Anesthesiology, 2006, 105(2):334-337.

[23] Sia AT, Lim Y, Lim EC, et al. A118G single nucleotide polymorphism of human μ-opioid receptor gene influences pain perception and patient-controlled intravenous morphine consumption after intrathecal morphine for postcesarean analgesia [J]. Anesthesiology, 2008, 109(3):520-526.

[24] Sia AT, Lim Y, Lim EC, et al. Influence of u-opioid receptor variant on morphine use and self-rated pain following abdominal hysterectomy [J]. J Pain, 2013, 14(10):1045-1052.

[25] Lee MG, Kim HJ, Lee KH, et al. The influence of genotype polymorphism on morphine analgesic effect for postoperative pain in children [J]. Korean J Pain, 2016, 29(1):34-39.

[26] Rakvag TT, Klepstad P, Baar C, et al. The Val158Met polymorphism of the human catechol-O-methyltransferase (COMT) gene may influence morphine requirements in cancer pain patients [J]. Pain, 2005, 116(1-2):73-78.

[27] Ahlers SJ, Elens LL, van Gulik L, et al. The Val158Met polymorphism of the COMT gene is associated with increased pain sensitivity in morphine-treated patients undergoing a painful procedure after cardiac surgery [J]. Br J Clin Pharmacol, 2013, 75(6):1506-1515.

[28] Hoffmann O, Plesan A, Wiesenfeld-Hallin Z. Genetic differences in morphine sensitivity, tolerance and withdrawal in rats [J]. Brain Res, 1998, 806(2):232-237.

[29] Kest B, Hopkins E, Palmese CA, et al. Genetic variation in morphine analgesic tolerance: a survey of 11 inbred mouse strains [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2002, 73(4):821-828.

[30] Kest B, Palmese C, Hopkins E. A comparison of morphine analgesic tolerance in male and female mice [J]. Brain Res, 2000, 879(1-2):17-22.

[31] Mas M, Sabater E, Olaso MJ, et al. Genetic variability in morphine sensitivity and tolerance between different strains of rats [J]. Brain Res, 2000, 866(1-2):109-115.

[32] Morgan MM, Clayton CC, Boyer-Quick JS. Differential susceptibility of the PAG and RVM to tolerance to the antinociceptive effect of morphine in the rat [J]. Pain, 2005, 113(1-2):91-98.

[33] Tapocik JD, Letwin N, Mayo CL, et al. Identification of candidate genes and gene networks specifically associated with analgesic tolerance to morphine [J]. J Neurosci, 2009, 29(16):5295-5307.

[34] Hain HS, Belknap JK, Mogil JS. Pharmacogenetic evidence for the involvement of 5-hydroxytryptamine (serotonin)-1B receptors in the mediation of morphine antinociceptive sensitivity [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 291(2):444-449.

[35] Cook-Sather SD, Li J, Goebel TK, et al. TAOK3, a novel genome-wide association study locus associated with morphine requirement and postoperative pain in a retrospective pediatric day surgery population [J]. Pain, 2014, 155(9):1773-1783.

[36] Sorge RE, LaCroix-Fralish ML, Tuttle AH, et al. The Yin and Yang of pain: variability in formalin test nociception and morphine analgesia produced by the Yin Yang 1 transcription factor gene [J]. Genes Brain Behav, 2013, 12(4):405-413.

[37] Donaldson R, Sun Y, Liang DY, et al. The multiple PDZ domain protein Mpdz/MUPP1 regulates opioid tolerance and opioid-induced hyperalgesia [J]. BMC Genomics, 2016, 17(1):313.

[38] Hajj A, Peoc HK, Laplanche JL, et al. Genotyping test with clinical factors: better management of acute postoperative pain? [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(3):6298-6311.

[39] Campa D, Gioia A, Tomei A, et al. Association of ABCB1/MDR1 and OPRM1 gene polymorphisms with morphine pain relief [J]. Clin Pharmacol Ther, 2008, 83(4):559-566.

[40] De Gregori M, Diatchenko L, Ingelmo PM, et al. Human genetic variability contributes to postoperative morphine consumption [J]. J Pain, 2016, 17(5):628-636.

[41] Ballesta JJ, Cremades J, Rodriguez-Munoz M, et al. Sensitivity to μ-opioid receptor-mediated anti-nociception is determined by cross-regulation between μ-o and δ-opioid receptors at supraspinal level [J]. Br J Pharmacol, 2012, 166(1):309-326.

〔收稿日期〕2017-02-13

研究进展

免疫系统人源化小鼠模型的研究进展

连晶瑶[1,3],丁苗慧[2],秦国慧[1],张　毅[1],王纯耀[1,3*]

(1.郑州大学第一附属医院,郑州　450052; 2.郑州大学临床医学系,郑州　450052; 3.郑州大学,郑州　450052)

【摘要】 动物模型是生物医学科学研究中所建立的具有人类模拟性表现的动物材料,作为实验假说和临床假说的实验基础,可以缩短研究时间,观察疾病的发生、发展或预防与治疗的全过程,并可在人为控制条件下进行各种实验研究,对各种疾病的相关机制研究有着重要意义。人类的生物医学研究主要受限于生物体复杂性,为了克服这个限制,基于可接受异种移植物的严重联合免疫缺陷(SCID)或重组激活基因(Rag^{null})无效小鼠的免疫缺陷特征开发人源化小鼠模型,这些具有人体免疫力的小鼠模型已被广泛用于研究人类免疫生物学的基本原理以及人类疾病的复杂病理的潜在机制。这种方法是促进医学科学发展的重要途径之一,具有实用性和前瞻性。本文将对人源化小鼠模型的应用及研究进展进行综述。

【关键词】 动物模型;人源化小鼠;治疗;进展

【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0113-07

doi: 10.3969. j. issn. 1671-7856. 2017. 10. 022

Research progress of humanized mouse models in immune system

LIAN Jing-yao[1,3], DING Miao-hui[2], QIN Guo-hui[1], ZHANG yi[1], WANG Chun-yao[1,3*]

(1. The First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Department of Clinical Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052; 3. College of Life Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052))

【Abstract】 Animal model is an animal material with human mimic performance established in biomedical scientific research. It can be used as experimental basis for studies of experimental hypothesis and clinical hypothesis. It can shorten the research time and observe the whole process of disease occurrence, development or prevention and treatment. Human biomedical research is largely limited by the biological complexity. In order to overcome this limitation, based on the immunosuppressive characteristics of a severely immunodeficient (SCID) or recombinant activated gene (Rag^{null}) in mice, humanized mouse models of human diseases can be established and have been widely used to study the underlying principles of human immunobiology and complex pathological mechanisms of human diseases. This approach has become one of the important ways to promote the development of medical sciences, with practicality and foresight. In this paper, the application and research progress of humanized mouse models are reviewed.

【Key words】 Humanized mouse models; Human diseases

[作者简介]连晶瑶(1990-)女,硕士生,研究方向:肿瘤免疫。E-mail: jingyao725@163.com

[通讯作者]王纯耀(1962-)男,研究方向:实验动物相关研究。E-mail: chunyao@zzu.edu.cn

人源化小鼠应用于研究人类免疫细胞、人类自身免疫性疾病、病毒感染、移植生物学和肿瘤生物学的发展和应用。通过移植成熟的人类免疫细胞、胎儿人类胸腺、骨髓、肝组织等,构建具有人体免疫力的小鼠模型。具有人源化免疫系统的动物模型将显著促进我们对人类免疫生物学和免疫相关疾病如自身免疫性疾病、病毒感染以及肿瘤和移植排斥的认识。这些动物模型是研究人淋巴细胞生物学和免疫应答的重要研究工具[1,2]。现已经有探究人源化小鼠人源细胞的检测方法[3]。人源化小鼠由人类细胞、组织、器官甚至人类基因构成的小鼠[4],包括用人的肺、肾、胰腺、胃、肝、卵巢、子宫内膜、神经和皮肤组织移植的模型[5-8]。严重联合免疫缺陷(SCID)或重组激活基因(*Rag*)小鼠缺乏T和B细胞,最初被用作重建人体免疫的接受者[9]。最近,越来越多的基因修饰的SCID或*Rag*小鼠模型被使用,包括SCID[10],NOD/SCID[11],Rag^{null}[12]和NOD/LtSz-$Rag1^{null}Pfp^{null}$[13]等,这些小鼠是先天免疫缺陷的。人源化小鼠模型作为研究人类疾病的活体模型,在阐明发病机制、药物筛选等方面具有巨大的优势和广泛的应用前景[14]。本综述主要介绍免疫系统人源化小鼠模型的现状及研究进展。

1 人源化小鼠模型的建立

1.1 接种小鼠选择用于移植异种人造血和免疫细胞

为了提高人类免疫细胞或组织的移植效率,要求不同的条件治疗方案和移植手段,包括宿主先天免疫细胞的清除以及植入成熟的人类免疫细胞、胎儿胸腺、肝组织、骨髓和$CD34^+$血液干细胞(HSC)[15]等的小鼠模型的构建。SCID小鼠缺乏T细胞受体和免疫球蛋白基因的重排,导致T细胞和B细胞的缺失[16],SCID小鼠中功能性T和B细胞的缺失有助于同种异体移植物或异种移植物的接受,没有严重的排斥反应[17]。Rag1或Rag2通过产生DNA双链断裂引发TCR和免疫球蛋白基因的VDJ重排,因此小鼠中的纯合突变体导致不能产生成熟的T和B细胞,导致SCID样表型[18]。具有Rag1和穿孔素基因的靶向突变的NOD小鼠,命名为NOD/LtSz-$Rag1^{null}Pfp^{null}$小鼠,其缺乏成熟的T、B和NK细胞[19]。现在越来越多的科学家来开发具有更多缺陷先天免疫修饰的SCID小鼠或其他人源化小鼠模型。NOD/Shi-SCID小鼠也具有类似于NOD/LtSz-SCID小鼠的严重免疫功能障碍[20]。NOD/LtSz-SCID或NOD/Shi-SCID小鼠的先天免疫缺陷可能很好地解释了体内人异种移植物存活增加的问题[21]。CD47可以通过与巨噬细胞上表达的信号调节蛋白(SIRP)反应,有效地保护靶细胞免受巨噬细胞吞噬作用[22]。

1.2 敲除受体小鼠中的先天免疫细胞

SCID或Rag^{null}小鼠的先天免疫力成为限制人免疫细胞重建的主要因素。在受体小鼠中敲除NK细胞、单核细胞和巨噬细胞等某些亚群的方法可以改善人类HSCs或免疫细胞移植[23,24]。CD122抗体或IL-2R抗体等用于敲除NK细胞,脂质体包封的二氯亚甲基双膦酸盐敲除巨噬细胞[25],这会严重影响小鼠嗜中性粒细胞[26]和粒细胞[27],这可能控制SCID或Rag^{null}小鼠对人类移植物的天然免疫应答,并与人类移植物的增加显著相关。

1.3 人类生长因子的影响

人类免疫细胞在异种免疫缺陷型受体小鼠中的低移植效率可能通过提供人类生长因子而有所改善。在小鼠中,CD4和CD8单阳性胸腺细胞的成熟需要TNF-α的诱导[28]。T细胞的发育、增殖和存活对上皮衍生的IL-7具有重要的依赖性[29],人Fc-IL7融合蛋白的使用大大提高了NOD/SCID小鼠的脾脏和外周血中人T细胞的存活[30]。IL-15对造血功能有促进作用,包括T细胞的增殖,B细胞的成熟和NK细胞的发育[31,32]。rhIL-15可以改善转染人类PBL后NOD/SCID小鼠人T细胞的移植和重建[33]。此外,IL-12或IL-18的使用增强了小鼠中人$CD4^+$和$CD8^+$T细胞的移植[34]。在用人PBL或骨髓细胞(BMC)接种的SCID小鼠中,注射重组人生长激素(rhGH)或重组人催乳素(rhPRL)强烈促进胸腺和脾脏中的人T细胞移植,IgG/M血清水平增强[35]。

1.4 通过辐射或化学药剂为供体细胞制造“空间”

尽管通过NK细胞或巨噬细胞的抗体进行预处理可以清除NOD/SCID小鼠的残留免疫力,但是可能需要亚致死辐射或化学试剂的制备方案来制造用于接种异种人类HSCs或免疫细胞的“空间”。这些预处理可能导致生长因子和化学引诱物浓度的增加,并为受体小鼠中人HSC和免疫细胞的发育和再辐射保留一定量的空间,一些免疫抑制剂和烷化剂已经显示出与辐射相似的效果。例如,与3.5 Gy照射相比,单次剂量(35 mg/kg)的Busilvex能够进

行人类细胞的等同移植[36]。通常,人类 HSC 移植在 NOD/SCID 小鼠中需要 2 ~3 Gy 预辐射,并且人类免疫细胞可以在受照射的受体中很好的生存[37]。

1.5　直接植入成熟的人免疫细胞获得人源化小鼠

通过用针对受体小鼠 NK 细胞、巨噬细胞或粒细胞的抗体处理,人免疫细胞的移植显著改善[38]。与 SCID 小鼠相比,用人 PBLs 腹膜内移植的 *Rag2*^{null} 小鼠显示有限的人类移植率和较低水平的人免疫球蛋白[39]。600Gy 照射可以提高 *Rag2*^{null} 小鼠人类植入的效率[40]。为了提供适当的微环境,移植到 SCID 小鼠中,包含必需的细胞组分有 T 细胞、B 细胞和抗原呈递细胞(APC)。在这些小鼠中,人免疫缺陷病毒(HIV)可以正常复制[41],分化成产生人 IgM 或 IgG。分析抗原特异性细胞免疫应答是非常困难的,人 T 和 B 细胞介导的这种异种反应不仅引起了致命的移植物抗宿主病(GVHD)[42],而且严重限制了人类 PBL 对外源性抗原的反应能力[43]。因此,这种方法在生物医学研究中的应用很有限。当人类脐带血 CD34$^+$ 细胞注射到 NOD/SCID 胎儿中时,人类免疫细胞在胎儿小鼠环境中不能有效地自我更新和分化[44]。

1.6　移植人类胸腺和 HSC 获得人源化小鼠

建立人源化小鼠模型的另一个重要方法是在 SCID 小鼠的肾胶囊下移植胎儿人胸腺和肝组织,导致良好的血管胸腺样器官[45]。观察到来自胎儿人肝组织移植物的人类 HSCs 迁移到胸腺移植物中[46]。这些人源化小鼠为体内研究人体免疫功能提供了强大的模型。NOD/SCID 或 *Rag2*^{null} 小鼠没有 T 和 B 细胞,没有 NK 活性,并且缺失 DC 功能[47],因此是比较好的小鼠模型。由于人类抗小鼠异种免疫反应引起的 GVHD 的高发生率或可能性,直接移植高剂量的成熟人类 T 细胞和其他免疫细胞可能不是理想的选择。因此,在免疫缺陷小鼠中植入胎儿人胸腺组织和 HSC 以重建人类免疫可能是一种最佳方法。胎儿人胸腺或肝组织和 CD34$^+$ HSCs 的共移植策略可以维持人类免疫细胞多谱系的发育,包括 T 细胞,B 细胞和 DC,提供更强大的适应性和先天免疫力。

2　人源化小鼠模型在生物医学研究中的应用

人源化小鼠广泛应用于人类 HSCs 的自我更新和多能分化能力的研究,以及人类对病毒感染,肿瘤和移植的免疫力。人脐带血(UCB)、骨髓和外周血被用作移植人 HSCs 的来源。从人 UCB 移植 CD34$^+$ 细胞与来自骨髓或外周血的 CD34$^+$ 细胞相比,NOD/SCID 小鼠的移植水平更高[48]。人类 CD34$^+$ 群体可以分为两个独特特征的亚群(CD34$^+$ CD38$^+$ 和 CD34$^+$ CD38$^-$)。CD34$^+$ CD38$^+$ 细胞早期重新产生,而 CD34$^+$ CD38$^-$ 细胞的增殖在晚期代表了更原始的群体和更高的 T 细胞前体[49]。人类 CD34$^+$ Lin$^-$ Thy-1$^+$ 祖细胞的群体可以重新填充胸腺移植物。此外,人类 CD34$^+$ 细胞或 CD34$^+$ Lin$^-$ Thy-1$^+$ CD10$^+$ 群体在 SCID 小鼠中产生 T、B、NK 和 DC 群体。当将人 CD34$^+$ 细胞移植到 NOD/SCID/IL2R 无效小鼠中时,重构免疫细胞的重组,包括人 T 细胞、B 细胞、单核细胞、巨噬细胞和 DC[50,51]。人源化小鼠中的人 DC 在发育,表现和功能上类似于人类发现的 DC 亚群[52]。自身免疫性疾病从具有器官特异性和多系统自身免疫疾病的患者获得的人 PBL 在 SCID 小鼠中存活数月,并产生具有与供体相同特异性的 IgG 和自身抗体[53]。因此,这提供了一种可能的方法来研究人体自身免疫性疾病在体内模型中的发病机制和效应阶段。这些结果表明人源化小鼠可以作为抗体介导的人自身免疫性皮肤病的模型。

2.1　病毒感染

人造模型被用于研究病毒与人类免疫系统之间的相互作用,并评估疫苗和治疗剂对人类病毒等的作用。艾滋病毒感染主要限于体外或临床研究,人源化小鼠已广泛用于研究 HIV 发病机制和体内治疗[54,55]。在接种人类 PBL 的 SCID 小鼠中,HIV 感染被限制在短时间内,因为 CD4$^+$ T 细胞迅速耗尽,缺乏补充来源[56]。在将未经治疗的 HIV 感染患者的 PBLs 诱导转移到 NOD/SCID 小鼠后,观察到强烈的 HIV 特异性抗体反应[57]。在接种人胸腺和肝组织的人源化小鼠中,艾滋病毒感染对于一些胸腺 CD3$^-$ CD4$^+$ CD8$^-$ T 细胞的细胞呈现出先天性趋向[58]。在移植人类 CD34$^+$ 细胞后,在 NOD/SCID/IL-2 小鼠的脾脏、骨髓或胸腺中检测到感染 CCR5 和 CXCR4$^-$ 嗜性 HIV-1 分离物后的长期病毒血症。CXCR4$^-$ 嗜性 HIV 病毒感染所有淋巴器官,而 CCR5$^-$ 嗜性 HIV 病毒感染主要限于胸外组织。两种病毒株都导致人类长期淋巴器官传播感染与 HIV 感染密切相似。已经开发了人源化小鼠模型,用于对 HIV 抗病毒化合物进行临床前评估,包括叠氮胸苷[59],双脱氧肌苷,双脱氧胞嘧啶,奈韦拉平,蛋白

酶抑制剂[60]。SARS 病毒导致了亚洲的致命疫情[61]。人 PBLs 构建的人源化小鼠被用于研究针对 SARS-CoV 的新型候选疫苗。SARS DNA 疫苗诱导特异于 SARS 抗原的人细胞毒性 T 淋巴细胞和针对 SARS-CoV 的人中和抗体[62],证明血管紧张素转换酶 2 是 SARS-CoV 的功能受体[63]。对登革热病毒发病机理和免疫力的理解的一个主要限制是缺乏理想的人源化动物模型。用人脐带血造血祖细胞或胎儿肝衍生的 $CD34^+$ 细胞移植的照射的 NOD/SCID 小鼠在生理环境中实现登革热病毒感染的复制。发现这些模型易感染登革病毒感染,发现典型的发烧和血小板减少症状,并用于评估登革病毒的发病机制[64]。此外,人源化小鼠也已经用于研究 EBV[65],巨细胞病毒(CMV)[66]和流感感染[67]的病理和治疗等。

2.2 对同种异体移植物或异种移植物的免疫应答或耐受性

在接种人胸腺和肝组织或 PBL 的 SCID 小鼠中移植同种异体 HLA 错配的胎儿胰腺导致人单核细胞浸润胰腺和随后的排斥反应[68]。人类 T 细胞对 SCID 小鼠中同种异体供体的皮肤移植物的排斥负责[69,70]。像人类皮肤移植一样,皮肤微血管被破坏,皮肤坏死[71]。人类 PBL 移植的 SCID 小鼠被建立为延迟型超敏反应(DTH)的模型[72]。从供体受体的肾移植受者分离出的适应性 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞介导人源化 SCID 小鼠中供体特异性 DTH 的抑制[73]。从供体 A 和来自供体 B 的胎儿胸腺移植人胎肝的 SCID 小鼠开发了混合嵌合人胸腺[74]。在该模型中,与供体 A 反应的人 T 细胞通过在胸腺中的选择被克隆缺失,而与供体 B 的同种异体胸腺上皮细胞相互作用的 T 细胞可能对供体 B 有潜在的响应[75]。人体小鼠模型用于研究体内异种猪移植物的免疫应答[76]。用胎儿猪胸腺和人肝组织移植的 SCID 小鼠中的猪胸腺移植物支持由人类胎儿肝细胞提供的造血前体的多克隆功能性人 T 细胞的正常发育[77]。这些人类 T 细胞对供体猪抗原具有特异性的耐受性,但对非供体猪异种抗原和同种异体抗原反应正常。外源 IL-2 没有消除耐受性,表明中枢克隆缺失而不是无反应是可能的耐受机制[77]。最近,研究结果表明,人类功能性 $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ Treg 细胞可以在 NOD/SCID 小鼠的异种猪胸腺移植物中发育。嵌合体由人胸腺肝组织和猪 HSC 在 SCID 小鼠中构建[78]。在这种嵌合体中发育的人类 T 细胞显示出对猪供体的特异性无反应性,因为它缺乏猪血液细胞和抗供体猪反应的排斥,以及供体猪白细胞抗原(SLA)匹配皮肤的接受移植物,而混合嵌合小鼠中的人 T 细胞拒绝了第三方猪皮肤移植物,并测定对第三方猪和同种异体人类抗原作出反应[78]。造血嵌合体诱导供体细胞 T 细胞耐受性的能力主要是由成熟供体反应性胸腺细胞的胸腺内克隆缺失引起的[79]。

2.3 抗肿瘤免疫反应

恶性肿瘤可以无限制地生长,逃避人类免疫监视。SCID 或 Rag 小鼠可以成功地植入异种人类肿瘤,包括各种各样的实体人类肿瘤和血液肿瘤[80],其中人类肿瘤生物学、生长、血管发生和转移已被评估。在免疫缺陷小鼠中成功移植人类肿瘤和人类免疫细胞的能力已经促成了人源化小鼠模型的开发和使用,以评估抗肿瘤治疗。事实上,理想的模型是具有完整人类免疫系统的人源化小鼠,这将允许在完整的人免疫微环境的背景下评估肿瘤免疫生物学的机制。人源化小鼠可用于评估抗制人肿瘤生长的治疗方法,包括使用血管生成抑制剂[81]、基于细胞的疗法[82]、人源化抗体[83]、传统的免疫抑制和免疫治疗方案[84]和肿瘤生长抑制剂[85]。人源化小鼠提供了评估人细胞因子和趋化因子的机会,其增强人白细胞的先天和适应性抗肿瘤免疫应答,从而提供临床相关的模型。

3 展望

人源化小鼠模型的建立为疾病的病因学、发展过程和治疗研究提供了极大的帮助,尤其是近来分子生物学技术的提高及在人源化小鼠模型中的应用,为各种疾病有关基因研究提供了依据,为进一步研究疾病发生机制及靶向治疗提供了广阔的前景。随着研究的深入以及各种技术的进步,人们将建立更为完善的人源化小鼠模型,在疾病研究及治疗方面取得更大的突破。

参考文献:

[1] Kenney LL, Shultz LD, Greiner DL, et al. Humanized mouse models for transplant immunology[J]. Am J Transplant, 2016, 16(2):389-397.

[2] Safinia N, Becker PD, Vaikunthanathan T, et al. Humanized mice as preclinical models in transplantation[J]. Springer New York, 2016, 1371:177-179.

[3] 陈炜, 冯娟, 施海霞, 等. 人源化小鼠人源细胞检测方法[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(7):63-66.

[4] Aubard Y. Ovarian tissue xenografting[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2003, 108(1): 14-18.

[5] Maltaris T, Koelbl H, Fischl F, et al. Xenotransplantation of human ovarian tissue pieces in gonadotropin-stimulated SCID mice: the effect of ovariectomy[J]. Anticancer Res, 2006, 26(6B): 4171-4176.

[6] Matsuura-Sawada R, Murakami T, Ozawa Y, et al. Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue in immunodeficient mice[J]. Hum Reprod, 2005, 20(6): 1477-1484.

[7] Masuda H, Maruyama T, Hiratsu E, et al. Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/gamma c(null) immunodeficient mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(6): 1925-1930.

[8] McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, et al. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function[J]. Science, 1988, 241(4873): 1632-1639.

[9] Mosier DE, Stell KL, Gulizia RJ, et al. Homozygous SCID/SCID; beige/beige mice have low levels of spontaneous or neonatal T cell-induced B cell generation[J]. J Exp Med, 1993, 177(1): 191-194.

[10] Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells[J]. Blood, 2002, 100(9): 3175-3182.

[11] Chen J, Shinkai Y, Young F, et al. Probing immune functions in RAG-deficient mice[J]. Curr Opin Immunol, 1994, 6(2): 313-319.

[12] Shultz LD, Banuelos S, Lyons B, et al. NOD/LtSz-Rag1^{null} Pfp^{null} mice: a new model system with increased levels of human peripheral leukocyte and hematopoietic stem-cell engraftment[J]. Transplantation, 2003, 76(7): 1036-1042.

[13] Ito R, Takahashi T, Katano I, et al. Current advances in humanized mouse models.[J]. Immunol, 2012, 9(3): 208-214.

[14] Lan P, Tonomura N, Shimizu A, et al. Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34$^+$ cell transplantation[J]. Blood, 2006, 108(2): 487-492

[15] Kirchgessner CU, Patil CK, Evans JW, et al. DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect[J]. Science, 1995, 267(5201): 1178-1183.

[16] Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, et al. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency[J]. Nature, 1988, 335(6187): 256-259.

[17] Chen J, Shinkai Y, Young F, et al. Probing immune functions in RAG-deficient mice[J]. Curr Opin Immunol, 1994, 6(2): 313-319.

[18] Shultz LD, Banuelos S, Lyons B, et al. NOD/LtSz-Rag1^{null} Pfp^{null} mice: a new model system with increased levels of human peripheral leukocyte and hematopoietic stem-cell engraftment[J]. Transplantation, 2003, 76(7): 1036-1042.

[19] Koyanagi Y, Tanaka Y, Tanaka R, et al. High levels of viremia in hu-PBL-NOD-scid mice with HIV-1 infection[J]. Leukemia, 1997, 3: 109-112.

[20] Greiner DL, Shultz LD, Yates J, et al. Improved engraftment of human spleen cells in NOD/LtSz-SCID/SCID mice as compared with C.B-17-SCID/SCID mice[J]. Am J Pathol, 1995, 146(4): 888-902.

[21] Wang H, Madariaga ML, Wang S, et al. Lack of CD47 on non-hematopoietic cells induces split macrophage tolerance to CD47^{null} cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(34): 13744-13749.

[22] Kerre TC, De Smet G, De Smedt M, et al. Adapted NOD/SCID model supports development of phenotypically and functionally mature T cells from human umbilical cord blood CD34$^+$ cells[J]. Blood, 2002, 99(5): 1620-1626.

[23] Yoshino H, Ueda T, Kawahata M, et al. Natural killer cell depletion by anti-asialo GM1 antiserum treatment enhances human hematopoietic stem cell engraftment in NOD/Shi-*scid* mice[J]. Bone Marrow Transplant, 2000, 26(11): 1211-1216.

[24] Legrand N, Weijer K, Spits H. Experimental models to study development and function of the human immune system in vivo[J]. J Immunol, 2006, 176(4): 2053-2058.

[25] Santini SM, Rizza P, Logozzi MA, et al. The SCID mouse reaction to human peripheral blood mononuclear leukocyte engraftment. Neutrophil recruitment induced expression of a wide spectrum of murine cytokines and mouse leukopoiesis, including thymic differentiation[J]. Transplantation, 1995, 60(11): 1306-1314.

[26] Santini SM, Spada M, Parlato S, et al. Treatment of severe combined immunodeficiency mice with anti-murine granulocyte monoclonal antibody improves human leukocyte xenotransplantation[J]. Transplantation, 1998, 65(3): 416-420.

[27] Zuniga-Pflucker JC, Di J, Lenardo MJ. Requirement for TNF-α and IL-1 alpha in fetal thymocyte commitment and differentiation[J]. Science, 1995, 268(5219): 1906-1909.

[28] El Kassar N, Lucas PJ, Klug DB, et al. A dose effect of IL-7 on thymocyte development[J]. Blood, 2004, 104(5): 1419-1427.

[29] Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-*scidIL2Rγ*^{null} mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells[J]. J Immunol, 2005, 174(10): 6477-6489.

[30] Bykovskaia SN, Buffo M, Zhang H, et al. The generation of human dendritic and NK cells from hemopoietic progenitors induced by interleukin-15[J]. J Leukoc Biol, 1999, 66(4): 659-666.

[31] Lodolce JP, Boone DL, Chai S, et al. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation[J]. Immunity, 1998, 9(5): 669-676.

[32] Sun A, Wei H, Sun R, et al. Human interleukin-15 improves engraftment of human T cells in NOD-SCID mice[J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13(2): 227-234.

[33] Senpuku H, Asano T, Matin K, et al. Effects of human interleu-

kin-18 and inter-leukin-12 treatment on human lymphocyte engraftment in NOD-scid mouse[J]. Immunology, 2002, 107(2): 232-242.

[34] Sun R, Zhang J, Zhang C, et al. Human prolactin improves engraftment and reconstitution of human peripheral blood lymphocytes in SCID mice[J]. Cell Mol Immunol, 2004, 1(2): 129-136.

[35] Robert-Richard E, Ged C, Ortet J, et al. Human cell engraftment after busulfan or irradiation conditioning of NOD/SCID mice [J]. Haematologica, 2006, 91(10): 1384.

[36] Nervi B, Rettig MP, Ritchey JK, et al. Factors affecting human T cell engraftment, trafficking, and associated xenogeneic graft-vs-host disease in NOD/SCID beta2m^{null} mice[J]. Exp Hematol, 2007, 35(12): 1823-1838.

[37] Tournoy KG, Depraetere S, Pauwels RA, et al. Mouse strain and conditioning regimen determine survival and function of human leucocytes in immunodeficient mice[J]. Clin Exp Immunol, 2000, 119(1): 231-239.

[38] Steinsvik TE, Gaarder PI, Aaberge IS, et al. Engraftment and humoral immunity in SCID and RAG-2-deficient mice transplanted with human peripheral blood lymphocytes[J]. Scand J Immunol, 1995, 42(6): 607-616.

[39] Friedman T, Shimizu A, Smith RN, et al. Human CD4$^+$ T cells mediate rejection of porcine xenografts[J]. J Immunol, 1999, 162(9): 5256-5262.

[40] Kaneshima H, Shih CC, Namikawa R, et al. Human immunodeficiency virus infection of human lymph nodes in the SCID-hu mouse[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, 88(10): 4523-4527.

[41] Sandhu J, Shpitz B, Gallinger S, et al. Human primary immune response in SCID mice engrafted with human peripheral blood lymphocytes[J]. J Immunol, 1994, 152(8): 3806-3813.

[42] Bankert RB, Umemoto T, Sugiyama Y, et al. Human lung tumors, patients' peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes propagated in SCID mice[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1989, 152: 201-210.

[43] Schoeberlein A, Schatt S, Troeger C, et al. Engraftment kinetics of human cord blood and murine fetal liver stem cells following in utero transplantation into immunodeficient mice[J]. Stem Cells Dev, 2004, 13(6): 677-684.

[44] Namikawa R, Weilbaecher KN, Kaneshima H, et al. Long-term human hematopoiesis in the SCID-hu mouse[J]. J Exp Med, 1990, 172(4): 1055-1063.

[45] Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995, 11: 35-71.

[46] Colucci F, Soudais C, Rosmaraki E, et al. Dissecting NK cell development using a novel a lymphoid mouse model: investigating the role of the c-abl proto-oncogene in murine NK cell differentiation[J]. J Immunol, 1999, 162(5): 2761-2765.

[47] Noort WA, Wilpshaar J, Hertogh CD, et al. Similar myeloid recovery despite superior overall engraftment in NOD/SCID mice after transplantation of human CD34$^+$ cells from umbilical cord blood as compared to adult sources[J]. Bone Marrow Transplant, 2001, 28(2): 163-171.

[48] Hogan CJ, Shpall EJ, Keller G. Differential long-term and multilineage engraftment potential from subfractions of human CD34$^+$ cord blood cells transplanted into NOD/SCID mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(1): 413-418.

[49] Melkus MW, Estes JD, Padgett-Thomas A, et al. Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1[J]. Nat Med, 2006, 12(11): 1316-1322.

[50] Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor γ chain^{null} mice[J]. Blood, 2005, 106(5): 1565-1573.

[51] Cravens PD, Melkus MW, Padgett-Thomas A, et al. Development and activation of human dendritic cells in vivo in a xenograft model of human hematopoiesis[J]. Stem Cells, 2005, 23(2): 264-278.

[52] Elkon KB, Ashany D. Autoimmunity versus allo- and xeno-reactivity in SCID mice[J]. Int Rev Immunol, 1994, 11(4): 283-293.

[53] Kollmann TR, Pettoello-Mantovani M, Katopodis NF, et al. Inhibition of acute in vivo human immunodeficiency virus infection by human interleukin 10 treatment of SCID mice implanted with human fetal thymus and liver[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(7): 3126-3131.

[54] Withers-Ward ES, Amado RG, Koka PS, et al. Transient renewal of thymopoiesis in HIV-infected human thymic implants following antiviral therapy[J]. Nat Med, 1997, 3(10): 1102-1109.

[55] Mosier DE, Gulizia RJ, MacIsaac PD, et al. Rapid loss of CD4$^+$ T cells in human-PBL-SCID mice by noncytopathic HIV isolates[J]. Science, 1993, 260(5108): 689-692.

[56] Steyaert S, Verhoye L, Beirnaert E, et al. The intraspleen huPBL NOD/SCID model to study the human HIV-specific antibody response selected in the course of natural infection[J]. J Immunol Methods, 2007, 320(1-2): 49-57.

[57] Su L, Kaneshima H, Bonyhadi M, et al. HIV-1-induced thymocyte depletion is associated with indirect cytopathogenicity and infection of progenitor cells in vivo[J]. Immunity, 1995, 2(1): 25-36.

[58] McCune JM, Namikawa R, Shih CC, et al. Suppression of HIV infection in AZT-treated SCID-hu mice[J]. Science, 1990, 247(4942): 564-566.

[59] Rabin L, Hincenbergs M, Moreno MB, et al. Use of standardized SCID-hu Thy/Liv mouse model for preclinical efficacy testing of anti-human immunodeficiency virus type 1 compounds [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(3): 755-762.

[60] Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome [J]. N Engl J Med, 2003, 348(20): 1967-1976.

[61] Okada M, Okuno Y, Hashimoto S, et al. Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models[J]. Vaccine, 2007, 25(16):

3038 – 3040.

[62] Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus[J]. Nature, 2003, 426(6965): 450 – 454.

[63] Bente DA, Melkus MW, Garcia JV, et al. Dengue fever in humanized NOD/SCID mice[J]. J Virol, 2005, 79(21): 13797 – 13799.

[64] Lim WH, Kireta S, Russ GR, et al. Human plasmacytoid dendritic cells regulate immune responses to Epstein-Barr virus (EBV) infection and delay EBV-related mortality in humanized NOD-SCID mice[J]. Blood, 2007, 109(3): 1043 – 1050.

[65] Moffat JF, Stein MD, Kaneshima H, et al. Tropism of varicella-zoster virus for human CD4$^+$ and CD8$^+$ T lymphocytes and epidermal cells in SCID-hu mice[J]. J Virol, 1995, 69(69): 5236 – 5242.

[66] Palucka AK, Gatlin J, Blanck JP, et al. Human dendritic cell subsets in NOD/SCID mice engrafted with CD34$^+$ hematopoietic progenitors[J]. Blood, 2003, 102(9): 3302 – 3310.

[67] Banuelos SJ, Shultz LD, Greiner DL, et al. Rejection of human islets and human HLA-A2.1 transgenic mouse islets by alloreactive human lymphocytes in immunodeficient NOD-*scid* and NOD-*Rag1*^{null}*Prf1*^{null} mice[J]. Clin Immunol, 2004, 112(3): 273 – 283.

[68] Pober JS, Bothwell AL, Lorber MI, et al. Immunopathology of human T cell responses to skin, artery and endothelial cell grafts in the human peripheral blood lymphocyte/severe combined immunodeficient mouse[J]. Springer Semin Immunopathol, 2003, 25(2): 167 – 180.

[69] Rayner D, Nelson R, Murray AG. Noncytolytic human lymphocytes injure dermal microvessels in the huPBL-SCID skin graft model[J]. Hum Immunol, 2001, 62(6): 598 – 606.

[70] Murray AG, Petzelbauer P, Hughes CC, et al. Human T-cell-mediated destruction of allogeneic dermal microvessels in a severe combined immunodeficient mouse[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(19): 9146 – 9150.

[71] Petzelbauer P, Groger M, Kunstfeld R, et al. Human delayed-type hypersensitivity reaction in a SCID mouse engrafted with human T cells and autologous skin[J]. J Invest Dermatol, 1996, 107(4): 576 – 581.

[72] Xu Q, Lee J, Jankowska-Gan E, Schultz J, et al. Human CD4$^+$ CD25^{low} adaptive T regulatory cells suppress delayed-type hypersensitivity during transplant tolerance[J]. J Immunol, 2007, 178(6): 3983 – 3995.

[73] Vandekerckhove BA, Namikawa R, Bacchetta R, et al. Human hematopoietic cells and thymic epithelial cells induce tolerance via different mechanisms in the SCID-hu mouse thymus[J]. J Exp Med, 1992, 175(4): 1033 – 1043.

[74] Schols D, Vandekerckhove B, Jones D, et al. IL-2 reverses human T cell unresponsiveness induced by thymic epithelium in SCID-hu mice[J]. J Immunol, 1994, 152(5): 2198 – 2206.

[75] Tereb DA, Kirkiles-Smith NC, Kim RW, et al. Human T cells infiltrate and injure pig coronary artery grafts with activated but not quiescent endothelium in immunodeficient mouse hosts[J]. Transplantation, 2001, 71(11): 1622 – 1630.

[76] Nikolic B, Gardner JP, Scadden DT, et al. Normal development in porcine thymus grafts and specific tolerance of human T cells to porcine donor MHC[J]. J Immunol, 1999, 162(6): 3402 – 3407.

[77] Lan P, Wang L, Diouf B, et al. Induction of human T-cell tolerance to porcine xenoantigens through mixed hematopoietic chimerism[J]. Blood, 2004, 103(10): 3964 – 3969.

[78] Lechler RI, Garden OA, Turka LA. The complementary roles of deletion and regulation in transplantation tolerance[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(2): 147 – 158.

[79] Hudson WA, Li Q, Le C, et al. Xenotransplantation of human lymphoid malignancies is optimized in mice with multiple immunologic defects[J]. Leukemia, 1998, 12(12): 2029 – 2033.

[80] O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, et al. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice[J]. Nat Med, 1996, 2(6): 689 – 692.

[81] Siegler U, Kalberer CP, Nowbakht P, et al. Activated natural killer cells from patients with acute myeloid leukemia are cytotoxic against autologous leukemic blasts in NOD/SCID mice[J]. Leukemia, 2005, 19(12): 2215 – 2222.

[82] Flavell DJ, Warnes SL, Bryson CJ, et al. The anti-CD20 antibody rituximab augments the immunospecific therapeutic effectiveness of an anti-CD19 immunotoxin directed against human B-cell lymphoma[J]. Br J Haematol, 2006, 134(2): 157 – 170.

[83] Trieu Y, Wen XY, Skinnider BF, et al. Soluble interleukin-13 Rα2 decoy receptor inhibits Hodgkin's lymphoma growth in vitro and in vivo[J]. Cancer Res, 2004, 64(9): 3271 – 3275.

[84] Watanabe M, Dewan MZ, Okamura T, et al. A novel NF-κB inhibitor DHMEQ selectively targets constitutive NF-κB activity and induces apoptosis of multiple myeloma cells in vitro and in vivo[J]. Int J Cancer, 2005, 114(1): 32 – 38.

〔收稿日期〕2017 – 04 – 16

教学管理

医药院校实验动物生物安全危害及防控

韩志刚,张　倩,韩文莉,谭冬梅*

(重庆医科大学实验动物中心,重庆　400016)

【摘要】 医药院校在科研、教学中使用的动物种类、数量越来越多,随之带来的生物安全问题也越来越值得重视。本文从医药院校的生物安全环境特点、实验活动、人兽共患病、实验动物管理等方面分析了其潜在的生物安全风险,并就防控生物安全危害提出了建议。

【关键词】 实验动物;动物实验;教学;生物安全

【中图分类号】R－33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0120-03

doi: 10.3969. j. issn. 1671－7856. 2017. 10. 023

Biosafety hazard of laboratory animals in medical colleges and its prevention and control

HAN Zhi-gang, ZHANG Qian, HAN Wen-li, TAN Dong-mei*

(Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

【Abstract】 Biosafety hazard has been paid high attention with increasing use of animal species and quantities in medical colleges. In the present paper, we analyze potential biosafety risks in medical colleges from characteristics of biosafety environment, experiment activity, zoonosis, laboratory animal management, etc., then give some advices on prevention and control of biosafety hazards.

【Key words】 Laboratory animal; Animal experiment; Teaching; Biosafety hazards

实验动物是医药院校进行生物医药研究和教学的重要基础与支撑条件。随着科学技术的飞速发展,除常规实验动物外,在科研、教学中还经常使用各种转基因模型动物以及家畜、家禽甚至野生动物。这些实验用动物在生产、使用和运输过程中,存在携带感染性病原体并向周边扩散、对人和环境造成生物安全威胁的可能。如何防控实验动物可能带来的生物安全危害,已成为科研和教学工作中越来越值得重视的问题。

1　生物安全与实验动物生物安全

生物安全(biosafety)是指防范由现代生物技术的开发和应用以及生物医药的研究与实验所产生的负面影响,即对生物多样性、生态环境及人体健康可能构成的危险或潜在风险[1]。实验动物生物安全是对实验动物可能产生的潜在风险或现实危害的防范和控制。这些风险和危害来源于生产和使用实验动物的各个环节,涉及实验动物之间的相互感染,以及实验动物对人和环境的危害[2]。因此,预防和控制实验动物生物安全危害的意义重

[基金项目]重庆市科委项目(cstc2016zyydzx1002)。

[作者简介]韩志刚(1977－),男,高级实验师,研究方向:实验动物教学、管理与研究。E-mail: hanzhigang@sina.com

[通讯作者]谭冬梅(1976－),女,副研究员,研究方向:实验动物教学、科研及管理工作。E-mail: dongmei_tan@126.com

大,不仅关系到实验动物本身的健康,保证动物实验结果的准确性与可靠性,更重要的是对人和环境的保护。

2　医药院校实验动物生物安全风险

2.1　医药院校生物安全环境特点

在我国,多数医药院校都设立了实验动物中心(或学部),具备实验动物生产设施和实验设施,包括屏障设施、隔离器、IVC 以及普通环境设施。工作人员、实验人员众多,层次不一。实验项目涵盖生物医药各学科,其中不乏感染性实验。教学实验一般在教学实验楼公共开放的实验室进行,缺乏相应的生物安全防护设施,且教学对象多数为未经实验动物专业课程学习或培训的本科生,他们对生物安全防护知识的认知水平普遍较低[3]。

科研、教学所使用的动物种类、品系繁多,来源复杂,既有国内外实验动物生产、使用单位提供的常规实验动物和转基因动物,也有市场购买的家畜、家禽,甚至野外捕捉的动物(如蟾蜍),生物安全风险控制较难。近年来,我国高校发生过多起实验动物生物安全突发事件[4,5],严重影响了在校师生的身体健康。因此,医药院校承担生物安全危害的风险较大。

2.2　科研、教学实验活动中的生物安全隐患

动物实验室里不同种类、品系的动物虽相对分区饲养,但实验操作室基本采用共用模式,各种实验交织在一起,加上频繁的人流、物流、动物流,大大增加了动物之间、人与动物间相互感染的机率。

教学实验室未配置超净工作台、生物安全柜等设备,学生自我防护意识也较差,甚至连最基本的口罩、手套都不佩戴。实验结束后,学生只对实验台面、地面以及实验器械简单清洁,并不做消毒处理,下一批学生紧接着会在此进行其它动物实验,这样容易发生交叉感染。学生还可能将病原带到其它教室、寝室、食堂等公共场所,危害公共安全。转基因动物在医药院校的科研项目中使用得越来越多。以重组 DNA 为基础的转基因技术,由于技术手段本身的问题和生物体复杂性的原因,本身存在不稳定性,有一定的生态风险[6],可能对自然环境和人类健康造成潜在的威胁。

2.3　人兽共患病

常见的人兽共患病病原体有狂犬病毒、汉坦病毒、猴 B 病毒、禽流感病毒、沙门菌、布鲁氏杆菌、真菌、弓形虫等,实验动物本身可能携带有这些病原。饲养人员、实验人员在长时间接触实验动物的过程中,可能被动物咬伤、抓伤,或者被操作过动物的器械刺伤、割伤,还有沾染带病动物的血液、组织或分泌物以及吸入感染性气溶胶等风险[7]。

据了解,个别学生违规在自己院系的普通实验室饲养动物并进行实验,动物尸体随意丢弃、动物逃逸的情况时有发生。实验室里经常有蚊蝇、蟑螂甚至野鼠出没,这些动物恰恰是多种疾病包括人兽共患病的传播媒介。另外,教学实验所使用的土犬、猫、鸡等动物来源于市场购买,动物的防疫状况、健康状况无法保证,潜在危害较大[8]。

2.4　实验动物管理问题所带来的风险

医药院校虽有实验动物管理委员会或伦理委员会,但对动物实验项目涉及生物安全内容的审查要求不高,甚至忽略这方面的审查;对实验操作过程的监管不到位;对违规饲养动物及随意丢弃动物尸体等现象缺乏有效的整治措施;对教学动物的使用要求不严。这些管理上的缺失或不足,无疑会增加学校的生物安全风险。

实验动物中心对从国内外引入的实验动物的管理也存在客观的不足之处。受检测条件、检测成本等因素所限,目前做不到对每批外来动物进行抽样检测,而只能隔离观察一段时间便用于繁殖或实验。所以,不能排除处于隐性感染或潜伏期的动物,在观察期后发病的可能。

3　医药院校实验动物生物安全的防控措施

3.1　加强制度建设,防范生物安全隐患

医药院校应依据国家相关法律、法规如《实验动物管理条例》、《实验动物许可证管理办法》、《实验室生物安全通用要求》,制定本校实验动物相关管理制度、操作规程,以制度来规范实验动物的生产和使用,防范生物安全隐患。

实验动物中心要以国家标准、团体标准为技术规范,制定本单位的实验动物环境设施和动物质量监测制度。对实验动物的质量检测,应以最新版的国家标准为依据,同时结合本单位、本地区病原微生物的流行特征,确定检测项目及检测频率,及时掌握流行变化趋势,并调整应对措施。

3.2　加强内部管理,预防生物安全危害的发生

加强实验动物在引种、繁育、运输、设备维护、消毒灭菌、环境监测、动物尸体及废弃物处理等环

节的管理。引入动物,尤其是转基因动物,必须附带实验动物质量合格证及背景资料,必要时抽样检测。教学实验应从正规渠道购买经检疫合格的动物(附带动物检疫合格证明),使用之前还应饲养观察一段时间。

加大高校实验动物管理机构的监督、检查力度,杜绝违规饲养动物的现象。严格按照标准操作规程进行各项操作,正确使用个人防护用品,最大程度地保护自己。实验结束,做好实验室及个人清洁、消毒工作,避免感染性物质被带出实验室。

伦理委员会对动物实验的审查内容,应兼顾动物福利、伦理、科学需要、生物安全等几方面内容,对生物安全风险要进行评估[9,10]。实验动物中心应建立兽医管理团队,充分发挥其在监测、预防和控制实验动物传染病,尤其是人兽共患病中的作用以及对实验操作过程的监管作用[11]。

3.3 加大宣传教育力度,普及生物安全思想

针对本科生,应普遍开设《医学实验动物学》和《动物实验技术》等实验动物相关课程。在理论教学中,加大实验动物生物安全内容的比例,提高学生自我防护的意识;在实验课中,尽量让学生掌握实验操作技术,减少由于操作失误导致的风险。对于研究生,还要进行动物实验入室资质培训,使其掌握良好的生物安全防护能力。要让实验者清楚实验过程中可能发生的生物安全危害并深刻意识到各种潜在的生物危害因子对健康的影响,主动遵守操作规程并采取有效的防护措施[9,12]。

3.4 制定应急预案,应对生物安全事件的突发

教育部下发的《关于加强高等学校动物实验安全管理工作的通知》中,提出要健全动物实验安全管理制度与应急预案。团体标准《实验动物 动物实验生物安全通用要求》中对建立风险评估和控制制度、制定动物实验事故预案和处置措施也作了相应规定。

医药院校的实验动物管理机构应承担起生物安全的管理责任,并根据本单位的实际情况,对实验动物突发的人兽共患病,具有高度传染性和较强致死性的传染病,不明原因引起的实验动物大批发病或死亡及新传入本地的实验动物疫病,建立相应应急处理机制[13],最大限度地减轻突发事故对实验动物生产和使用以及公众健康等造成的损害,维护公共安全及社会稳定。

4 小结

实验动物作为人类生命科学发展的先驱和基石,在科研、教学中起着不可替代的作用。如何有效防控医药院校在实验动物生产、使用中的生物安全危害,一方面需要建立医药院校实验动物生物安全防控体系,进一步完善和落实相关法规、标准,科学管理,规范操作。另一方面,要加强宣传教育,提高实验动物从业者以及广大师生的安全意识,做好自我防护,主动参与防控实验动物生物安全危害,共同为医药院校实验动物的生产和使用创造健康的环境。

参考文献:

[1] 曲连东,张永江. 动物实验的生物安全与防护[M]. 北京,中国农业科学技术出版社,2007:5.
[2] 钱军,孙玉成. 实验动物与生物安全[J]. 中国比较医学杂志,2011,21(10,11):15-19.
[3] 郝智慧,赵厚德. 动物实验的生物安全防护初探[J]. 实验动物科学,2010,27(4):62-64.
[4] 董智强,罗雷,王玉林,等. 广州市某高校动物实验室生物安全事件的调查与分析[J]. 医学动物防制,2010,26(1):14-15.
[5] 张慧俭,张娜. 中医院校实验动物生物安全教育现状及对策[J]. 中国科教创新导刊,2013(32):82.
[6] 薛达元. 转基因生物安全与管理[M]. 北京:科学出版社,2013:85.
[7] 汪晖,沈智,庞万勇. 浅论与实验动物相关的职业健康安全与人畜共患病[J]. 中国比较医学杂志,2010,20(4):1-4,18.
[8] 韩庆功,崔艳红,陈金山. 教学实验动物人畜共患病的防控措施[J]. 贵州农业科学,2012,40(2):112-114.
[9] 魏强. 动物实验中的生物安全问题[J]. 中国比较医学杂志,2015,25(6):75-78.
[10] 刘艳,王珑. 动物实验活动中病原微生物生物危害风险评估体系的建立[J]. 实验动物科学,2015,32(1):37-40.
[11] 杜小燕,王超,陈振文. 兽医在实验动物工作中的主要作用[J]. 实验动物科学,2012,29(6):48-51.
[12] 张娜,刘学芳,赵君政,等. 谈生物安全教育在中医院校实验动物学教学工作的重要性[J]. 中国科教创新导刊,2012(28):24-25.
[13] 巩薇,贺争鸣,李根平. 北京市实验动物突发重大事件应急预案的制定[J]. 实验动物科学,2008,25(1):29-33.

〔收稿日期〕2017-04-06

教学管理

基因突变动物模型在《医学遗传学》实验教学中的应用

唐佐青,霍学云,韩玉英,王　晶,叶海虹,赵　天,李振坤,陈振文*

(首都医科大学,基础医学院医学遗传学与发育生物学学系,北京　100069)

【摘要】 **目的**　在《医学遗传学》实验教学中引入基因突变动物模型,并调查其在分子遗传诊断课程中的应用价值,以期促进医学生对基因突变检测原理与技术的理解,并有效提高医学生解决实际遗传诊断问题的能力。**方法**　对首都医科大学 2011 级和 2012 级基础医学专业 80 名本科生开设分子遗传诊断实验,以无毛突变小鼠为实验对象,通过动物组织提取基因组 DNA,并以提取的 DNA 作为模板,采用 PCR 方法对目的片段进行扩增,电泳鉴定 PCR 产物及应用凝胶成像系统对结果进行分析,观察基因突变动物模型—无毛小鼠表型特征与其基因型的内在联系。针对实验效果,设计调查问卷,分析学生反馈。**结果**　问卷调查各项指标满意率均达到 90% 以上,98.7% 的学生认为新的实验教学模式有助于对专业实验技能的掌握,96% 的学生认为该实验课程有效提高了他们解决问题的能力。**结论**　应用基因突变动物模型开展分子遗传诊断实验能够切实提高学生的学习效果,培养学生的综合素质。同时也为医学院校在教学中如何充分利用实验动物模型拓展教学内容和教学手段提供了借鉴。

【关键词】 基因突变动物模型;实验课教学;分子遗传诊断

【中图分类号】R－33　　【文献标识码】A　　【文章编号】1671-7856(2017) 10-0123-04

doi: 10.3969. j. issn. 1671－7856. 2017. 10. 024

Application of mutated inbred animal models in the experimental teaching of medical genetics

TANG Zuo-qing, HUO Xue-yun, HAN Yu-ying, WANG Jing, YE Hai-hong, ZHAO Tian, LI Zhen-kun, CHEN Zhen-wen*

(Department of Medical Genetics and Developmental Biology, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

【**Abstract**】 **Objective**　Mutated inbred animal model is introduced to the practical course of genetic diagnosis in the hope that medical students are able to apply what they have learned to clinical cases, based on a deep understanding of principle and technology on gene mutation detection. **Methods**　We integrated DNA extraction, polymerase chain reaction, agarose gel electrophoresis, and gel imaging analysis into a comprehensive experiment and arranged 4-year-programme undergraduates majoring in preclinical medical sciences to conduct it with the purpose of investigating the internal relations between phenotype and genotype in a hairless Uncv mouse model. Subsequently, the questionnaire aimed at evaluating learning effect on the part of students was handed out and their feedbacks were analyzed. **Results**　More than

[基金项目]2016 年度首都医科大学校长基金(2016JYY01)。

[作者简介]唐佐青(1975－),女,讲师,研究方向:表观遗传学。E-mail: tangzq@ccmu.edu.cn

[通讯作者]陈振文(1959－),男,教授,博士生导师,研究方向:分子遗传学。E-mail: czwen@ccmu.edu.cn

90% of respondents are satisfied with the general learning effect. Especially, 98.7% of students support the enhancing effect of the new teaching mode on their research skills and 96% consider the practical course helpful to their problem-solving ability. **Conclusions** The introduction of mutated inbred animal model to the practical system of molecular diagnostics proves beneficial to boost students' learning effect and scientific research quality. Our practice also provokes thoughts on the further utilization of animal models in teaching system of medical sciences.

【**Key words**】 Mutated animal model; Experimental teaching; Molecular genetic diagnostics

医学遗传学是遗传学与临床医学相互渗透的一门学科,主要研究疾病产生的遗传机制、遗传方式及其诊治和预防的策略与措施。基因突变检测是目前遗传病诊断的最可靠的手段,也是目前和今后一定时期的研究热点。因此,医学生学习和掌握遗传病基因检测的原理和方法就成了培养创新型人才的实验课教学内容之一。但可用于医学生实验的人类遗传病病料的来源十分有限,加之受到相关伦理学的制约,使该实验课程一直没有开设起来。自然突变的实验动物模型具有基因突变明确、表型特征显著、来源充裕,以及与人的基因突变在发生原理和检测方法等方面相同的诸多优点。因此,在恪守动物福利原则的前提下,可以作为替代人类遗传病病料的生物材料[1]。除此之外,学生还可以亲自观察基因突变动物的表型特征,比较不同基因型动物性状的差异,这有利于学生透彻理解遗传病中,单一基因座上的基因突变与可见表型改变的内在联系。所以,我们在医学遗传学实验课程体系中,引入基因突变动物模型,新增分子遗传诊断的综合实验内容。通过2个基础医学专业班次的教学实践,以及学生调查问卷的反馈分析,该课程收到满意的教学效果。希望本文为医学、药学和生物学教学中应用模型动物材料提供有益参考。

1 分子遗传诊断实验课内容设计

1.1 设计原则

综合性实验是将具有紧密联系的几个实验综合成一个大实验,每一个具体实验之间既独立又相互连贯,前一个实验的结果是下一个实验的材料[2]。通过此类实验的设置,让学生找出相关实验之间的内在联系,从而让单个的独立实验变成系统性、连贯性的综合技能训练,既方便了学生的理解和掌握,又提高了学生的实验兴趣,激发了学生在实验中的主观能动性。

1.2 基因突变动物模型材料

无毛小鼠是一种全身无毛的裸小鼠,由于基因自发突变从而引起皮肤和毛囊结构发生异常。无毛小鼠的皮肤更接近于人的皮肤,适合于皮肤和毛发发育异常等方面的研究,是一种非常珍贵的实验材料。无毛小鼠是军事医学科学院在BALB/c小鼠繁殖群中偶然发现并培育的突变品系,命名为Uncovered(简称Uncv)[3]。研究表明,Uncv小鼠是由单基因突变引起的,该突变基因为*iRhom*2(C57BL/6J; chromosome 11; 28854 bp),其蛋白产物N端167个氨基酸缺失。当*iRhom*2基因突变后,影响毛基质细胞的增殖、毛囊内根鞘和毛干分化,最终导致小鼠无毛性状的出现[4]。

1.3 分子遗传诊断实验内容

1.3.1 无毛鼠,杂合鼠和野生鼠基因组DNA提取纯化

在决定小鼠毛囊分化中发挥关键作用的*iRhom*2基因如果发生片段缺失,会导致小鼠无毛性状的出现[3,4]。我们采用无毛鼠、杂合鼠和野生鼠为实验材料,分别研磨肝组织,应用DNA提取试剂盒提取全基因组DNA。

1.3.2 *iRhom*2基因片段的聚合酶链反应(PCR)

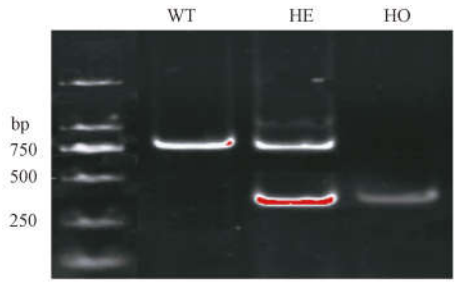
通过课前讨论和师生互动,明确实验试剂的用途、PCR技术原理、电泳结果分析等。同时,向学生演示如何从美国国立生物技术信息中心(NCBI)的基因库中检索基因序列,讲解PCR引物的设计原则,利用引物设计软件设计并优化突变基因片段的特异性引物,预测扩增产物。

1.3.3 PCR产物的电泳检测

PCR产物经琼脂糖凝胶电泳,通过凝胶成像系统观察是否获得清晰特异的电泳条带,并比较无毛鼠、杂合鼠和野生鼠三者电泳图带(见图1)。

1.3.4 实验结果讨论分析

在教师的组织引导下,学生根据实验结果进行讨论,明确每一条带分别代表的是哪一个基因类型和形成该图带的原理。同时,将3种基因型小鼠的表型特征(无毛-基因突变纯合子,稀毛-杂合子,全毛-野生型纯合子)与图带对应分析,加深对单一基因座上的基因突变导致可见表型改变的理性认识。



注:取用 BALB/c 小鼠肝脏组织,提取全基因组 DNA,*iRhom*2 基因片段的聚合酶链反应(PCR)之后,琼脂糖电泳鉴定小鼠基因型。WT:野生纯合子;HE:杂合子;HO:突变纯合子。

图 1　BALB/c 小鼠 *iRhom*2 基因 PCR 产物电泳结果

Note. Genome DNA was extracted from liver tissue and then was subject to PCR. Amplified *iRhom*2 fragments were isolated and identified by agarose gel electrophoresis. WT: wild-type homozygote; HE: heterozygote; HO: mutated homozygote.

Fig. 1　Electrophoresis analysis of *iRhom*2 fragments after PCR

2　教学效果调查分析

2.1　调查方法

经过实验课教学实践后,我们对首都医科大学 2011 级和 2012 级基础医学专业 80 名本科生,进行问卷调查。问卷选取了"教学方法"、"教学条件"、"学生收获情况"等 3 个一级指标。每个指标包含若干个二级指标,全卷共计 11 个二级指标。问卷要求调查对象就每一个项目指标给出程度级别的选择,程度分为 4 档,1 为很满意;2 为满意;3 为一般;4 为不满意。在每个调查指标后设原因项目,即选择该等级的原因,为开放性问题,由调查对象自由填写。

2.2　调查结果

调查共发放问卷 80 份,回收 76 份,有效问卷 76 份,回收率占 95%,有效问卷占 100%。调查结果应用 Excel 软件统计处理。问卷调查各项指标满意率均达到 90% 以上,多数学生认为实验课教学内容和教学方法的全面更新,给了大家新的学习视角和对实验课的重新认识,学习实验的动力大幅提高。学生特别对"掌握专业实验技能"这一指标满意率高达 98.7%(结果见表 1)。

学生反映通过核酸系列实验(包括动物组织基因组 DNA 的提取,以提取的基因组 DNA 作为模板,采用 PCR 技术对目的片段进行扩增,电泳鉴定 PCR 产物及应用凝胶成像系统对结果进行分析),不但掌握了核酸制备分析的基本实验技术、实验设计思路,学会了 PCR 仪、电泳仪及电泳槽、凝胶成像系统等仪器设备的使用方法,而且对遗传病的基因诊断技术和原理有了更加深入的理解。

表 1　对分子遗传诊断综合实验的调查结果

Tab. 1　Questionnaire analysis

调查项目 Investigation areas	学生评价 Feedback			
	很满意/% Excellent	满意/% Satisfactory	一般/% Fair	不满意 Not good
教学方法总体印象 General impression	32(42.1)	37(48.7)	7 (9.2)	0
培养学生实验动手能力 Operation skills	35(46.1)	35(46.1)	6(7.8)	0
教学时间安排 Schedule arrangement	31(40.8)	38(50.0)	7(9.2)	0
教师能及时解决学生问题 Teachers' assistance	42(55.3)	33(43.4)	1(1.3)	0
培养学生在实验中的团结协作能力 Team spirit	34(44.7)	37(48.7)	5(6.6)	0
实验设备情况 Equipment conditions	31(40.8)	38(50.0)	7(9.2)	0
实验条件能满足教学需求 Lab hardware	35(46.1)	37(48.7)	4(5.2)	0
学生通过该课能很好地掌握专业实验技能 Research skills	39(51.3)	35(46.1)	2(2.6)	0
学生通过该课能有效提高解决问题的能力 Problem-solving ability	41(53.9)	32(42.1)	3(3.9)	0
实验能培养学生创新思维 Creative thinking	37(48.7)	35(46.1)	5(6.6)	0
对指导教师教学效果是否满意 Teaching effect	52(68.4)	24(31.6)	0	0
学生评价之平均值 Average value	37.2(48.9)	34.6(45.5)	4.3(5.6)	0

3　讨论

3.1　动物模型更适于用作遗传实验课的教学材料

动物模型基因突变明确,而且在尊重动物生命,遵守动物福利伦理原则的基础上,可以确保实验材料的来源。目前人类遗传病病料收集受到了严格限定,1998 年由中国科学技术部和卫生部联合下发的《人类遗传资源管理暂行办法》要求所有遗传资源提供者及其亲属必须知情同意,而且不能随意将遗传资源及信息提供给与基因诊断无关的实验室。同时,《暂行办法》建议开展基因诊断的机构在使用这些标本或信息时应接受遗传资源管理办

公室的指导，并对遗传资源的安全性负责，违者必究。因此，动物模型材料应用在《医学遗传学－分子诊断综合实验》的优势十分突显。

在人类遗传病的研究中，适当的动物模型对研究基因突变在遗传病发病中的作用必不可少。由于小鼠与人类基因同源性高，小鼠的许多遗传病模型与人类相应的疾病具有可比性；加之目前实验用小鼠具有明确的遗传背景，易于饲养与繁殖，使基因突变小鼠被广泛应用于医学研究中[5]。*ob* 基因突变所致的肥胖小鼠（C57BL/6J *ob* 小鼠）就是学生理解点突变的理想材料。由于肥胖小鼠模型中 *ob* 基因第105密码子处的单碱基突变（C→T），使编码精氨酸的密码子变为终止密码子，这一突变改变了限制性内切酶 DdeⅠ对该片段的识别位点，因而用 PCR 及限制性片段长度多态技术可以准确分析 C57BL/6J *ob* 小鼠3种 *ob* 基因型[6]。

3.2 引入无毛基因突变小鼠模型，激发学生的学习兴趣

无毛小鼠是一种皮肤和毛囊发育异常的基因突变小鼠，其突变基因 *iRhom2* 在小鼠第11号染色体上纯合缺失一段核酸序列[3,4]。该序列的杂合缺失发生在杂合子鼠体内，而野生型鼠中 *iRhom2* 基因未发生变化。利用这3种小鼠，可以同时检测出有害基因纯合个体、有害基因携带者，以及家系中正常个体。因而该综合性实验体现出基因诊断方法与传统疾病诊断方法相比更准确，更可靠的特点。为培养学生对动物的关爱[1]，实验前一周的每一个工作日（周一至周五），学生分组轮流进入动物饲养间，为动物加水加料及更换垫料，保证动物受到良好的照料。在实验开始后组织取材的过程中，合理使用麻醉剂，保证动物无痛苦死亡，使学生一方面受到实验动物福利伦理方面的教育，另一方面也使学生近距离观察无毛鼠、杂合鼠和野生型鼠的表型特点，有利于学生深入理解单基因遗传病中，单一基因座上的基因突变即可引起生物体可见表型的显著改变。通过引入基因突变动物模型，学生不仅领悟到了基因的突变是遗传病的基础，而且还对实验动物有了进一步认识，学生的学习兴趣和参与精神得以充分调动。

3.3 充分利用课前讨论，提高学生解决实际问题能力

传统的实验教学模式是在实验课前，教师将所有的试剂、器材和设备都准备好，课堂上详细讲解实验原理、方法和操作步骤，学生“照方抓药”式地完成相关操作，这样造成学生对实验目的和实验设计毫不关心，更欠缺对实验的整体把握。基于以上弊端，我们采用“问题情境式”教学，即创设一个问题情境，提出一个待解决的问题，并让同学自行设计实验方案。

多数学生在实验前对实验动物的观察中已然提出了问题：这3种小鼠毛发的差异是由什么因素导致的？如何检测该因素从而尽早预测生物的性状？辅导老师根据学生的问题，给出参考资料出处，让学生查阅文献，了解小鼠无毛性状致病基因 *iRhom2* 的突变类型和相关检测手段。之后，开展课前讨论，让同学成为实验的设计者，提出相应实验方案。讨论中教师除了引导以外，对学生提出的新问题和疑虑进行解答，通过“讨论—思考—再讨论”，确定最终实验方法。通过上述教学方法的实施，有效地调动了学生的潜在学习需求，激发了学生的学习主动性，同时也很好地锻炼了学生的思维，培养了学生发现问题、分析问题和解决问题的能力。

4 展望

动物模型是生命科学研究不可或缺的实验材料，目前人类重要疾病的动物模型已超过1万余种，为医学研究和药物开发做出了巨大贡献。这些模型动物也是十分珍贵的遗传资源，它们具有明确的基因改变和显著的表型特征，是医学、药学和生物学教学的良好材料。本文只是将基因突变动物模型引入到分子遗传诊断实验教学中进行尝试，但足以凸显模型动物在医学教学中的优势和巨大潜力。相信随着人们对模型动物认识的提高和普遍应用，将会有越来越多的模型动物应用于医学、药学和生物学的教学实践中，从而促进教学水平的提高。

参考文献：

[1] 梅志强，王琼，邓莉. 动物福利在研究生实验动物学教学中的应用初探[J]. 中国比较医学杂志，2012，22(3)：76－78.

[2] 齐志广，周春江，赵宝华，等. 生物学实验教学的改革与实践[J]. 实验室科学，2010，13(3)：8－11.

[3] 仇志华，王冬平，李瑞生，等. BALB/c 突变无毛小鼠研究概况[J]. 实验动物科学与管理，2004，21(3)：42－46.

[4] 游颖，马雨楠，曾林，等. iRhom2 及其突变基因重组慢病毒的包装和稳定表达细胞系的建立[J]. 中国实验动物学报，2015，23(6)：597－601.

[5] 庞荣清，李自安，阮光萍，等. Duchenne 型肌营养不良小鼠模型鉴定及干细胞移植后 dystrophin 的变化[J]. 中国实验动物学报，2014，22(6)：81－85.

[6] Hirasawa T, Ohara T, Makino S. Genetic typing of the mouse ob mutation by PCR and restriction enzyme analysis[J]. Exp Anim, 1997, 46:75－77.

〔收稿日期〕2016－12－16

未名集团
SINOBIOWAY

为新药高效研发体系
提供临床前动物实验完善服务

实景图（2016年11月5日航拍图）

合肥半汤生物经济实验区是未名集团投资建设的生物药研发和制造基地，位于安徽省合肥市，占地31平方公里；整个建筑群工程浩大，带状绵延犹如一条巨龙，每栋单个建筑都是一个字母，组合起来看，从左到右8栋建筑组成英文“抗体”即ANTIBODY，将成为世界一流水平的抗体药生产基地；右侧ATCG为基因的四个碱基，作为国家大基因中心；未名实验动物中心位于实验区内（龙尾处），也是中国实验动物联盟的核心基地，占地100亩，中心建筑面积6万平方米，为新药高效研发体系提供临床前动物实验完善服务，建立新药研发临床期前实验的“巴拿马运河”。

北大未名生物工程集团有限公司
SINOBIOWAY GROUP CO., LTD.

地址：中国北京市海淀区上地西路39号北大生物城　邮编 100085
Add: PKU Biocity, 39 Shangdi West Rd., Haidian, Beijing, 100085, China
电话 / Tel: (8610)82890905　传真 / Fax: (8610)82890908
网址 / Web：http://www.sinobioway.com.cn