



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 **1**

邮发代号: 82-917

第27卷 (第1期) Vol.27 No.1

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



9 771671 785145



# 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1期 2017年1月31日出版

**主管**  
中国科学技术协会

**主办**  
中国实验动物学会  
中国医学科学院医学实验动物研究所

**主编**  
秦川

**编辑**  
《中国比较医学杂志》编辑部

**出版**  
中国实验动物学会

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

**广告经营许可证**  
京朝工商广字第8131号

**照排**  
同方知网(北京)技术有限公司

**印刷**  
北京市百善印刷厂

**邮发代号**  
82-917

**定价**  
每期20.00元,全年240元

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

2017年版权归中国实验动物学会所有  
本刊已入万方数据网络和中国学术期刊(光盘版)电子杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国实验动物信息网、中国实验动物学会网站和世界卫生组织西太平洋地区医学索引等网络文献数据库,如不同意自己论文入网,请在来稿中声明。编辑部支付的稿酬已包含上述网站著作权使用费。  
本刊电子版出版发行合作伙伴:中邮阅读网:www.183read.com

**本期执行主编** 秦川  
**本期责任编辑** 金剑

## 目次

(本刊已入编“中文核心期刊要目总览”)

### 主编寄语

筚路蓝缕创佳绩 不忘初心再启航 ..... 秦川(1)

### 研究报告

高脂饮食喂养建立高脂血症模型的验证及规律探讨 ..... 王燕萍,彭丹虹,刘晓琪,等(5)

Smad3 对非小细胞肺癌 A549 细胞和宫颈癌 HeLa 细胞迁移的影响 ..... 韦荣飞,李梦媛,杨星九,等(11)

厄洛替尼引起皮肤不良反应的小鼠模型建立 ..... 宋亚中,徐央波,邓博,等(16)

不同时间点不同应激方法致大鼠焦虑样行为的研究 ..... 赵洪庆,韩远山,杜青,等(22)

比格犬蠕形螨病的诊疗与病理组织学观察 ..... 温福利,徐洪齐,熊爱兰,等(27)

抑制 IGFBP2、IGFBP3 在卵巢肿瘤中的表达对卵巢癌的迁移、侵袭的影响 ..... 李君,刘恩令,杨丽(32)

柯萨奇病毒 A16 型感染性模型的建立及其相关免疫学指标和应用的评价 ..... 张锋,高孟,高丽美,等(37)

广东小鼠腺病毒血清学调查及病毒和抗体在人工感染小鼠体内消长规律研究 ..... 罗银珠,张钰,潘金春,等(43)

补肾养血方对卵巢早衰大鼠中抗苗勒氏管激素的影响 ..... 姬霞,傅金英,王冰玉,等(49)

氧化槐果碱对小鼠炎症性疼痛的镇痛作用研究 ..... 吴璟,杨文,郑婕,等(54)

我国动物环境丰富研究论文的文献计量分析 ..... 刘帅,李军延(59)

羟乙基淀粉 40 氯化钠注射液过敏实验研究 ..... 宗卫峰,汪玉馨,刘洋,等(64)

TAK1 抑制剂对糖尿病大鼠 MAPK 与 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响及其对肾脏保护机制 ..... 欧阳春,张里克,卢远航,等(67)

淫羊藿苷对实验性 IgA 肾病大鼠的作用及相关机制 ..... 张红,刘念,李征(73)

### 技术方法

脂肪组织切片制备方法的改进 ..... 徐玉环,徐艳峰,刘颖,等(79)

巴斯德杆菌属 CODEHOP PCR 检测方法的建立与初步应用 ..... 邢进,冯育芳,岳秉飞,等(85)

综述与专论

人源肿瘤异种移植模型在精准肿瘤医学中的研究进展 ..... 李克娟,黄昊,高苒(91)

### 专家问答

不同类型的糖尿病动物模型血糖检测在何时进行合适? ..... (78)

检测血糖取血时,需要注意哪些事项? ..... (84)

---

# CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

---

Monthly    Established in March 1991    Volume 27    Number 1    January 31    2017

---

## Responsible Institution

China Association for Science and Technology

## Sponsor

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

## Editing

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

## Editor-in-Chief

QIN Chuan (秦川)

## Publishing

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

## Printing

The Baishan Printing House of Changping, Beijing

## Distributor

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

## Mail-order

Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine

## CSSN

ISSN 1671-7856  
CN 11-4822/R

Copyright 2017 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

## CONTENTS IN BRIEF

- Validation Research And Regulation Exploration Of High Fat-introduced Hyperlipidemia Model In Rat .....  
..... WANG Yan-ping, PENG Dan-hong, LIU Xiao-qi, et al. ( 5 )
- Effect of Smad3 on cell migration of A549 and HeLa cells .....  
..... WEI Rong-fei, LI Meng-yuan, YANG Xing-jiu, et al. (11)
- The establishment of mouse model of Erlotinib-induced skin adverse reactions .....  
..... SONG Ya-zhong, XU Yang-bo, DENG Bo, et al. (16)
- Research of different methods of stress-induced anxiety-like behavior in rats at different time points .....  
..... ZHAO Hong-qing, HAN Yuan-shan, DU Qing, et al. (22)
- Treatment and pathological observation of *demodex canis* in beagle dogs .....  
..... WEN Fu-li, XU Hong-qi, Xiong Ai-lan, et al. (27)
- Effects of IGFBP2 and IGFBP3 expression in ovarian tumors on migration, invasion of ovarian cancer .....  
..... Li Jun, Liu En-ling, Yang Li (32)
- Establishment of an animal model for coxsackievirus A16 infection related immunological evaluation .....  
..... ZHANG Feng, GAO Meng, GAO Li-mei, et al. (37)
- Serological Survey of Mad Infection Among Mice in Guangdong and Distribution and Serological Studies in Artificial Infection .....  
..... LUO Yin-zhu, ZHANG Yu, PAN Jin-chun, et al. (38)
- Effect of bushenyangxue prescription on the levels of anti-mullerian hormone in rat with premature ovarian failure .....  
..... JI Xia, FU Jin-ying, WANG Bing-yu, et al. (49)
- Oxysophocarpine ameliorates carrageenan-induced inflammatory pain via inhibiting expressions of prostaglandin E<sub>2</sub> and cytokines in mice ...  
..... WU Jing, YANG Wen, ZHENG Jie, et al. (54)
- Bibliometric study of the articles on environment enrichment in china ...  
..... LIU Shuai, LI Jun-yan (59)
- Experimental Study on Anaphylactoid Reactions of Hydroxyethyl Starch 40 Sodium Chloride Injection .....  
..... ZONG Wei-feng, WANG Yu-xin, Liu Yang, et al. (64)
- Regulatory effect of TAK1 inhibitors on MAPK and NF-κB signaling pathway in diabetic rats and its renal protection mechanism .....  
..... OU Yang-chun, ZHANG Li-ke, LU Yuan-hang, et al. (67)
- Effects of Icaritin of experimental IgA nephropathy in rats .....  
..... ZHANG Hong, LIU Nian, LI Zheng (73)
- A modification of adipose tissue preparation .....  
..... XU Yu-huan, XU Yan-feng, LIU Ying, et al. (79)
- Establishment and application of CODEHOP PCR assay for detection of *Pasteurella spp.* in laboratory animals .....  
..... XING Jin, FENG Yu-fang, YUE Bing-fei, et al. (85)
- Research progress of patient-derived xenografts in precision cancer medicine .....  
..... LI Ke-juan, HUANG Hao, GAO Ran (91)



# 筚路蓝缕创佳绩 不忘初心再启航

秦川

(《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》编辑部,北京 100021)

**【摘要】**《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》创刊近30年,两刊的成长经历了初创、起步和茁壮成长的过程。此成长过程,同时反映了本学科的发展过程,也是我国生命科学史中的重要一页。此成绩的取得是科技工作者戮力同心的成果,也是各级主管部门鼎力支持的成果。

**【关键词】** 中国实验动物学报;中国比较医学杂志;发展史

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0001-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.001

神猴辞岁,金凤迎春。

转瞬间《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》业已创刊20余载,悄然逼近“而立”之年。回首两刊逝去的峥嵘岁月,它的成长史忠实地记录了中国实验动物科学的发展史!尤其是刚刚挥别的2016年,是实验动物科学发展史上值得浓墨重彩描绘的一年。

在这一年里,我们组织召开了实验动物学科的香山会议。此次会议对实验动物学科进行了明确定位,确定了学科定义和分支领域,改变了过去学科定位不清晰的局面,为学科发展、获得资助和规划布局奠定了良好的开端。在这一年里,我们发起的中国工程院《实验动物科学技术与产业发展战略研究》报告和专家联名《关于加强我国实验动物科技创新的建议》得到中央领导肯定,批示要求加强实验动物科技创新,并要求相关部门给予落实。千淘万漉虽辛苦,吹尽狂沙始到金,实验动物学科的重要性终于得到了国家高度认可,这对于推动实验动物学科大力发展,进而保障生命科学、医学、药学、军事、环境、食品和生物安全等领域发展具有重大意义。相信学科在国家大力支持下,定会晴空一鹤排云上,得到跨越式提升。

在这一年里,《中国实验动物学报(英文版)》喜获“中国科技期刊国际影响力提升计划”资助创刊,

它的出版将打通与国际科技交流和传播的通道,进一步提升我国实验动物科学领域科技期刊的国际影响力,为我国科技成果和医药研发获得国际认可提供学术平台。

在这一年里,习近平主席在全国科技创新大会上,要求“广大科技工作者要把论文写在祖国的大地上,把科技成果应用在实现现代化的伟大事业中”,必将有越来越多的科研工作者将自己的优秀原创成果刊登在祖国的期刊上。凡此种种,都将为两刊的大发展的创造了契机,使我们有理由相信:两刊距离明天伫立于世界强刊之林,为时不远矣!

在享受今日成绩的同时,回顾过往,使我们由衷的钦佩前辈们从两刊创立之初到成绩斐然过程中所付出的心血和贡献。不禁回顾两刊20余年来的发展历史,感受其中发生的可圈可点的事件,从而不忘初心,再次起航。

## 一、筚路蓝缕初创

中国实验动物学始创于20世纪中叶,但真正的发展则开始于80年代。在科技部(原国家科委)等各部委的领导下,经过老一辈实验动物科技工作者长期默默无闻的努力,我国实验动物科学事业取得了长足的发展,特别是在医药卫生、兽医、农牧渔和国民经济等方面的应用,获得了较为丰硕的成果,

**【作者简介】**秦川,女,研究员,教授,博士生导师,中国医学科学院医学实验动物研究所所长,研究方向:病理学与病理生理学。

E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn

实验动物的科技队伍也日益壮大。在国家改革开放科学春天的大好形势下,实验动物学界以及有关学科的科技工作者迫切希望有一个交流学术与经验的学术园地,呼吁创办中国实验动物学的学术团体和学术期刊。创建于 1980 年的中国医学科学院实验动物研究所作为我国最早的唯一以实验动物研究、教学和生产为主要任务的科研机构,牵头筹建了中国实验动物学会,在此基础上中国实验动物学会承担起了创办学术刊物的任务。

1991 年 1 月,由中国实验动物学会主办、由时任中国医学科学院实验动物研究所所长卢耀增教授任主编的全国性专业期刊—《中国实验动物学杂志》(以下简称杂志)创刊号在北京东单三条 9 号诞生了。中国实验动物学会理事长钱信忠同志为封面刊头题字,并发表了创刊词。创刊时刊期为季刊,64 页。虽然当时杂志的印刷比较粗糙,但却如实地记录了我国实验动物科学发展的水平。时至今日,这本创刊号仍是中国实验动物科学领域的瑰宝。

1990 年,杂志由方喜业教授掌旗,担任主编。次年,研究所告别了东单 17 号楼,搬迁到潘家园南里 5 号院,有了自己的科研楼,开始了实验动物研究所的规模化、拓展时期。学会又筹谋创办《中国实验动物学报》(以下简称学报)作为对杂志学术层次的补充和提升。同年 3 月份,由卢耀增教授任主编的《中国实验动物学报》在潘家园南里 5 号又诞生了,创刊时刊期为半年刊,64 页。学报秉承理论与实践、提高与普及相结合的办刊方针,及时地向世界展示我国实验动物科学领域的重要研究成果,她是迄今为止我国实验动物科学领域唯一的学报级期刊。1999 年,由中国药品生物制品检定所(现中国食品药品检定研究院)的邢瑞昌研究员继任主编。

两刊的诞生,是老一辈实验动物科学工作者对中国实验动物学术界的又一重大贡献,是培养实验动物科技人才的又一园地,是展现中国实验动物科技成果和水平的重要舞台。她的诞生是老一辈实验动物科技工作者辛勤工作的碑石和足迹。其中,创刊过程的组织和准备工作,铭刻着初创人的艰辛和智慧,彰显着他们的无私和努力以及培养壮大实验动物科技人才的宏图伟略,更铭记着历代办刊人的远见卓识和润物无声的功德,也记录着历代贤哲甘为人梯默默奉献的高尚风格。

## 二、蹒跚学步启程

创刊近十年后,两刊迎来了新的历史发展阶段。

2001 年,两刊编辑部进行资源和人才配置,引进有经验的办刊人员,进行了制度化和规范化建设,严格执行稿件评议的三审制度和编辑发稿的“齐、清、定”制度。并聘请了资深的中、英文编辑对两刊严格把关。为加强质量控制,编辑部定期在期刊上刊登读者问卷,研究读者对所关注的问题,适时调整报道计划。对于一些学术概念问题,编辑部请教相关学科的博学鸿儒,并明确统一概念,在期刊上正本清源。对于关注本刊的专家学者,两刊在付印前,请他们阅读、挑错,建立了良好的互动关系。并进行一系列推陈出新:

### (一)形式与规范同步

2002 年开始,杂志由季刊改为双月刊,学报由半年刊改为季刊;版式上将字号从老五号改为新五号;版本均改为国际流行的大 16 开本,适当地扩大了版芯,增加了期刊的容量;印刷的纸张由原来的 60 克纸提高到 70 克合资胶纸;两刊页码均由 64 页增加至 80 页;封面用纸使用较高档的铜版纸并设计美观大方的封面;申请邮发代号,由免费赠阅改为邮发与自办相结合的方式;办理了广告经营许可证等等。

### (二)刊名与国际接轨

2003 年,鉴于实验动物科学发展处于新的发展阶段,一些发达国家为能准确地诠释实验动物科学在生命科学研究领域中的意义,将医学院中的实验动物系改为比较医学系,为与国际接轨,编辑部将原来的《中国实验动物学杂志》正式更名为《中国比较医学杂志》,率先填补了国内此学科刊物的空白。

### (三)专题与热点结合

2004 年,当我所置身于抗击非典的前列时,两刊也迎来了发展的契机,开启了系列的专题工作,以我们实验室关于非典的最新研究成果为先导,结合各时期研究热点,陆续推出了“A/H1N1 流感—世界关注的焦点”“心脏病模型”“小型猪模型”“斑马鱼模型”“新技术新材料在眼科模型方面应用”“实验动物在糖尿病方面的应用”等专题,极大的提高了论文的被引率和期刊的关注度。

凡此种种,都为两刊的茁壮成长奠定了坚实的基础。

### 三、沐浴阳光成长

近十年来,两刊的影响力不断提高,在生命科学领域吸引了大批的作者团队和读者群体,并不断获得主管单位的肯定和资助。

#### (一) 社会影响力不断提升

《中国实验动物学报》作为中国实验动物科学领域唯一的学报级期刊,在中国实验动物科学的发展中扮演着重要的角色。截止到 2016 年 12 月,共出版发行 102 期(24 卷)。报道范围涉及实验动物和动物实验的理论专著、科研成果、科学实验新方法、新材料、实验动物新资源开发及培育,以及与实验动物有关的学科综述,发行范围遍及国内 32 个省、直辖市、自治区。据来自 2016 版《中国科技期刊引证报告(核心版)》显示,《中国实验动物学报》2016 年的基金论文比为 94%。综合评价总分在 13 种动物类学术期刊中排名第 2 位。在 1985 种中国科技核心期刊中,综合评价总分排名 164 位。从 2010 年版的综合评价总分 1456 位到今天的 164 位,其中,浸透着所有办刊人心血。

《中国比较医学杂志》作为国内最早的以比较医学为研究对象的科技期刊,报道范围广泛,服务于科研一线,截止到 2016 年 12 月,共出版发行 192 期(26 卷)。它与《中国实验动物学报》互为补充,满足了国内科研工作者不同层次的需求。与学报同样,发行范围遍及国内 32 个省、直辖市、自治区。据来自 2016 版《中国科技期刊引证报告(核心版)》显示,《中国比较医学杂志》各指标继续稳中有升,综合评价总分在历史悠久的 27 种基础医学类期刊中,跻身前 10 位,并在 1985 种中国科技核心期刊群中,稳步前进,已置身于前 50%。

#### (二) 人才队伍建设不断完善

科技期刊发展的重要前提是高素质的人才队伍建设,它包括了编委会和编辑人才队伍建设,为此,两刊在近十年进行了两次组织有序、特色鲜明的编委会换届工作,并对编辑部的人员进行了调整重组。在编制紧张的情况下,优先保证编辑部的人员配置,先后引进了博士、博士后,在有着丰富办刊经验的负责人带领下,一步一个脚印的稳步前进。并在第 2 届、第 3 届编委会换届过程中,完成了编审队伍的建设,此两届编委会成员在提升两刊的品牌影响、扩大两刊影响力等方面发挥了重要的作用。

2008 年 2 月,为开创两刊工作的新局面,编委

会进行了创刊以来的首次改选,为不负杂志主编方喜业教授的信任,我接过他手中的大旗,组建了由 49 人组成的年富力强的编委会;学报继续由邢瑞昌先生担纲,组建了另一支由 49 人组成的生机勃勃的编委会。组建后的第 2 届编委会成员涵盖了国内本领域各学科的学术带头人。

2013 年 8 月,第 3 届编委会圆满召开。根据新闻出版署“报刊社社长总编辑(主编)任职条件的暂行规定”,学会“期刊与信息工作委员会”推荐我作为两刊总编主抓出版工作,此次换届整合了两刊分刊而治的编委会成员,组成了创刊以来专业特色最鲜明的新一届编委会:第一次有院士参与,为两刊迈向一个新的高度奠定了基础;编委的队伍不局限于国内,扩展到美国、英国、法国、德国、加拿大及日本的同行专家,研究方向涉及人类疾病模型、遗传学、免疫学等近 10 个专业,并且向相关临床方向延伸;主动性强,本次编委会委员采用自荐形式,编委们均热心两刊的发展,自愿履行入选的职责。

#### (三) “网络化”“数字化”建设趋于成熟

2012 年 6 月,两刊为促进网络化数字化建设,建立了门户网站,全面介绍两刊的各种信息,并开通了稿件远程处理系统。作者在平台网站上即可查询投稿进度,编辑在网站上处理稿件,达到了无纸化办公,大大节约了出版成本。随着系统的逐步完善,目前,两刊能在纸质版出版前,将电子版目次以邮件正文的形式一对一的发送给作者、编委及相关学科专家。邮件是有针对性发送的,专家可以直接点击感兴趣的文章即可登陆到本刊的网站中。这一举措不仅极大的提高了期刊的关注度,而且吸引了一大批专家学者和作者。

#### (四) 引领学科发展成绩显著

作为学科发展的晴雨表,两刊一直致力于与研究领域同步的报道。尤其近十年,推出的几十个专题在引领学科发展方面发挥了不可替代的作用。例如,2016 年,为临床精准医疗提供强有力的工具,弥补单一遗传背景的小鼠无法有效复制人类多基因、多因素的相互作用引起的复杂性疾病的不足,我牵头组织了“复杂性状遗传 CC 小鼠专题”,系统的介绍了 CC 小鼠和能够模拟人群多基因、多因素作用的复杂性状特点,为高血压和糖尿病等慢性病的治疗提供了很好的实验工具;为配合国家十三五和中长远科技发展计划,修订更科学、严谨、适用的实验动物国家标准,由两刊组织的“实验动物国家

标准论坛”,就修订中的各种问题,展开了广泛的讨论和建议。为了及时配合国内实验动物检测实验室多项能力验证计划,为科学实验结果提供有效的外部质量监控方式,由两刊组织的“实验动物质量检测能力验证”及“实验动物质量检测、标识标记、模型和评价”专题,为政府和社会了解实验室检测能力及真实水平提供了详实的基础数据。

#### (五) 项目资助喜报频传

“精品科技期刊工程项目”是由中国科协组织实施的项目,目的是提升中国科技期刊的学术影响力和核心竞争力,发挥示范引领作用,更好地服务科技创新和广大科技工作者,发挥科技期刊在创新驱动发展战略中的重要支撑作用。《中国实验动物学报》最初入围,是在第 3 期项目的第 2 年,我们倍加珍惜这宝贵的机会,用有限的经费组织了多次有效的活动。经过 2 年的不懈努力,用各项令人振奋的成绩获得了评审专家的认可,继续获得第 4 期项目的资助。进入这个精品期刊的行列不仅仅是为了有限的资助经费,更重要的是获得作为中文期刊第一梯队的地位和荣誉。

“中国科技期刊国际影响力提升计划”是中国科协的另一项资助计划,竞争激烈,几乎都是具有丰富办刊经验的同行,我们凭借着认真踏实的态度,严谨的工作作风,更感谢评审专家组的远见卓识,使得《中国实验动物学报(英文版)》在众多强刊中脱颖而出。这是我国实验动物行业里程碑式的事件。

#### (六) 社会效益优先是提高经济效益的前提

两刊在近 30 年的办刊实践中,积累了丰富的经验,逐渐摸索出:以质量求生存,靠质量谋发展;坚持社会效益优先是提高经济效益的前提。

通过提高期刊的质量,得到社会的认可,并陆续被“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”“中文核心期刊要目总览”“中国学术期刊综合评价统计源期刊”“中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)”“世界卫生组织(WHO)西太平洋地区医学索引(WPRIM)”“中国生物医学期刊数据库”“美国化学文摘”等网站收录。且《中国实验动物学报》2007 年被“中国科学引文数据库收录(CSCD)”收录。

社会影响的扩大,吸引了丰富的高质量稿源,使两刊进入良性循环轨道。同时也吸引了国内外广告客户慕名而来,增加了办刊经费。从创刊初期的等、靠、要,发展为现在的独立经营、健康发展、

自负盈亏的朝气蓬勃的杂志社。

## 四、戮力同心前行

2017 年,我们不仅要在以上基础上高质量地出版两刊,还要增加新的栏目:“专家问答”。在“专家问答”栏目中,还望各位积极参与,对工作中发现的有趣问题,解决的方案都一并发给我们,以便与同行交流共享。

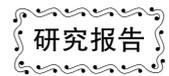
2017 年,按照国家关于期刊转企改制的要求,我们还要成立杂志社,为期刊的发展注入生命力:《中国比较医学杂志》杂志社完成登记,并开始企业化运作。在该杂志社旗下,出版《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》《中国实验动物学报(英文版)》共 3 本杂志,其中《中国实验动物学报(英文版)》为国际刊物,我们立志将该杂志社打造成为国内实验动物学科领域最高水平学术进展的出版机构。

2017 年,我们还要落实精品期刊项目的内容,召开专题研讨会,吸引优秀稿件,加强优秀选题组稿。计划于 2017 年中旬召开“影像学在实验动物研究中的应用”专题研讨会,吸引优秀稿件,引领学科发展。

2017 年两刊推出“实验动物资源培育及开发”“糖尿病相关动物模型”“影像学在实验动物科学研究中应用”“无菌动物与精准医学”等专题。2017 年,我们将进一步完善稿件采编系统,为方便作者和读者获取本刊信息,将推出手机版,并试行数字优先出版,以达到进一步提高期刊的影响力和所发表文章的关注度。等等。

在辞旧迎新之际,回首来路,雄关漫道真如铁,展望未来,而今迈步从头越。尽管目前国内期刊的办刊环境不尽如人意,但我们坚信“沉舟侧畔千帆过,病树前头万木春。”作为中国实验动物学研究期刊的领头羊,我们清醒地认识到使命所系、重任在肩,通过立鸿鹄之志,秉承“积跬步以至千里”的办刊方针。我坚信,置身于中国医学科学院的大家庭中,有各级领导的精心呵护,读者和作者的鼎力支持,加上全体实验动物科学工作者的携手同心,我们一定能不忘昨天、不愧今天、不负明天,在新的征程中不辱使命,通过和衷共济而再创辉煌。最后,借此万象更新之际,向长期以来默默支持两刊成长的朋友,以及为两刊注入新鲜血液的新人致以最衷心的感谢和最诚挚的节日祝福!

[收稿日期]2017-01-01



# 高脂饮食喂养建立高脂血症模型的验证及规律探讨

王燕萍, 彭丹虹, 刘晓琪, 谢蓉, 李先涛\*

(广州中医药大学基础医学院, 广东 510006)

**【摘要】** 目的 高脂饮食喂养SD大鼠8周建立高脂血症,验证该造模方法的可行性,并探究大鼠在不同时点的血脂变化规律。方法 正常雄性8周龄SD大鼠30只,适应性喂养1周后,根据体重随机分为对照组、模型1组、模型2组,每组10只。对照组给予普通饲料,模型组2组喂养高脂高胆固醇饲料,喂养时间为8周,每日计量各组饮食、饮水,4d更换垫料并称重。分别在第4周、6周、8周末,动物禁食过夜并眼眶静脉丛采血,测定各组血脂四项水平。8周末动物处死,收集各组大鼠肝脏、主动脉进行HE染色。**结果** 与对照组相比,模型1组的日平均进食量有所增加,但差异无统计学意义;模型2组的日平均进食量明显减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。日饮水量与对照组相比,模型组2组饮水量明显减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。肝脏/体重指数与对照组相比,模型组2组明显增重,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。终末体重与对照组相比,模型组2组的体重增加,但只有模型1组有统计学意义( $P < 0.05$ )。血脂方面,与对照组相比,4周末、6周末模型组2组TC水平明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ),8周末模型1组LDL-c水平明显升高,HDL-c水平降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。肝脏HE染色示对照组肝细胞排列正常,染色均匀,而模型组2组肝细胞大面积脂肪变,少数肝血窦内充血及炎症细胞浸润。主动脉HE染色示3组主动脉结构正常。**结论** 高脂饲料喂养SD大鼠建立高脂血症成立,所造模型为高胆固醇血症并伴有严重的脂肪肝。同时,高脂高胆固醇饲料喂养SD大鼠形成高脂血症实验过程中,血脂波动呈现一个升高-内适应-升高的状态。在造模过程中,如何克服动物厌食并胆固醇代谢内调节这个问题,是高脂饲料喂养成模的关键所在。

**【关键词】** 高脂血症;动物模型;高脂饮食

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0005-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.002

## Validation Research And Regulation Exploration Of High Fat-introduced Hyperlipidemia Model In Rat

WANG Yan-ping, PENG Dan-hong, LIU Xiao-qi, XIE Rong, LI Xian-tao\*

(School of Basic Medical Science of Guangzhou University of Chinese Medicine, GuangDong 510006, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the feasibility of high fat-introduced hyperlipidemia model in male SD rat and study the time rule of molding. **Methods** 30 Male adult rats of SD Strain bred in the animal house of the institute were divided into 3 groups after 1 week adaptation, group 1: control group, normal diet; group 2: model 1 group, high fat high cholesterol diet; group 3: model 2 group, high fat high cholesterol diet. The period of experiment was 8 weeks. Food and water intake were measured everyday and body weight were measured every four days. Blood were collected by orbital venous at the end of fourth, sixth, eighth week to test their serum lipid level. At the end of experiment, animals were killed to

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(2014CB542901)。

[作者简介] 王燕萍(1993-),女,硕士研究生,研究方向:临床流行病学应用研究。E-mail: 993880947@qq.com

[通讯作者] 李先涛(1966-),男,研究员,研究方向:临床流行病学应用研究、中医证候学。E-mail: lixiantao@gzucm.edu.cn

collect liver and aorta tissue for HE stain. **Results** Compared with control group, the food intake of model 1 was higher and model 2 was significant lower, water intake of model 2 was significant lower, the ratio of liver/weight of two model groups were significant heavier, and weight of model groups were higher. High fat diet significantly increased TC levels of model groups at the end of fourth, sixth week. The level of LDL-c in model 1 group were higher and the HDL-c were lower compared with control group. HE stain showed the livers of control group were regular, arrangements of the liver cells were trim, dyeing present uniformity. The two model groups showed a large range of hepatocyte fatty change, a few liver blood sinus were in congestion and infiltrated with inflammatory cells. Aorta HE stain showed no significant change among 3 groups. **Conclusions** The method of high fat-introduced hyperlipidemia model in male SD rat is feasible and the model turned out to present hypercholesterolemia with severe fatty liver. On the other hand, levels of serum lipid increased within an increase—inter-adjustment—decrease state. In the process of modeling, how to overcome the symptom of anorexia and the state of cholesterol inter-adjustment in animals is the key to successfully establish hyperlipidemia model.

**【Key words】** Hyperlipidemia; Animal models; High fat diet

高脂血症是临床常见疾病,也是导致脑卒中、冠心病、心脏猝死独立而重要的危险因素<sup>[1]</sup>。制作高脂血症的动物模型对于研究代谢性疾病及心脑血管疾病意义重大。

高脂血症动物模型制作有多种方法,常见的有高脂高胆固醇饲料喂养<sup>[2]</sup>、脂肪乳灌胃<sup>[3]</sup>、氯化可的松肌肉注射<sup>[4]</sup>、Triton WR-1339 腹腔注射<sup>[5]</sup>、Poloxamer 407 腹腔注射<sup>[6]</sup>、帕洛沙姆 407 腹腔注射<sup>[7]</sup>等,但后几种升高血脂作用多为急性的、短暂性的。现在最常用的造模方法就是高脂饲料喂养,模拟现代人类由于饮食失节形成的脂质代谢紊乱。但是阅读高脂血症造模相关文献可以知道,关于造模周期问题并未达成共识。有文献中提及 4 周成模,有的是 6 周,有的是 8 周,部分文献中提及高脂饲料喂养时间为 12 周。本实验采用高脂高胆固醇饲料喂养 SD 大鼠,试验周期共 8 周,分别在第 4 周、第 6 周、第 8 周禁食过夜采血进行血脂四项检测,分析各组血脂水平,旨在通过科学实验论证并总结高脂高胆固醇饲料喂养 SD 大鼠形成高脂血症的时间及变化规律。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只,8 周龄,重量 180 ~ 220 g,由广州中医药大学动物实验中心提供[SCXK(粤)2013-0020]。饲养于广州中医药大学动物实验中心屏障环境(SPF 级)中[SYXK(粤)2013-0085]。温度:21 ~ 25℃,日温差 ± 1℃;湿度:50%~70%,12 h 光照-阴暗交替。所有实验操作均按照该中心的操作指南执行,并得到动物伦理委员会的许可。

### 1.2 实验饲料

普通饲料由广州中医药大学实验动物中心提供。高脂饲料由广东省医学实验动物中心提供。(加工配方:蔗糖 20%、猪油 15%、胆固醇 1.2%、胆酸钠 0.2%、酪蛋白 10%、磷酸氢钙 0.6%、石粉 0.4%、预混料 0.4%、基础饲料 52.2%)。

### 1.3 试剂

血脂四项检测试剂盒(TC/TG/LDL-c/HDL-c)购买于南京建成试剂有限公司;试剂如水合氯醛、多聚甲醛等购买于广州亚优仪器有限公司;相关耗材如采血管、EP 管、手套等购买于广州杰特伟生物有限公司。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 高脂血症大鼠造模

大鼠适应性喂养 1 周后根据体重大小编号,运用随机数字表法随机分为 3 组。正常组 10 只,模型组 20 只。

造模方法:每组每 5 只大鼠为 1 笼,共 6 笼。正常组每笼每日给予普通饲料,模型 1、2 组每笼每日给予高脂饲料,各 150 g,饮水 500 mL。三组自由饮食、饮水,不限活动。每日称量剩余饲料量、饮水量,计算前一日饮食及饮水量。4 d 更换一次垫料并每组称重。造模周期为 8 周。

#### 1.4.2 血脂四项检测

动物乙醚麻醉后,眼眶后静脉丛采血约 1 mL,血样室温下静置 2 h,4℃、7000 rbp 离心 8 min。取干净的 1.5 mL EP 管,用移液枪将上层血清移至 EP 管中。血清 4℃ 保存。取血脂四项检测试剂盒,按操作说明书进行加液操作。用酶标仪测定 TC/TG/HDL/LDL 的 OR 值,公式计算得到各组的血脂水平。

#### 1.4.3 肝脏、主动脉 HE 染色

将各组大鼠标本放入标记好的包埋盒中,用切

刀切取 3~5 mm 边缘齐整的肝脏及主动脉组织,按从低浓度酒精到高浓度酒精的顺序进行组织脱水。然后进行组织透明及浸蜡。用镊子将经过浸蜡的组织块从脱水盒中取出,进行蜡块包埋。包埋后切取完整的 5  $\mu\text{m}$  左右的蜡片,置自来水中展开,然后再转放于 40 $^{\circ}\text{C}$  的温水中展平,用载玻片平整捞起,放在摊平机上摊平,放入烤箱烤片。将玻片进行脱蜡、HE 染色,并进行人工封片、烤片,置于显微镜下观察各组大鼠肝脏及主动脉的细胞形态。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件对各组大鼠的实验数据进行统计分析,结果以均数  $\pm$  标准差表示 ( $\bar{x} \pm s$ )。多组均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Bonferroni 法,不符合正态分布的选用非参数检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般情况比较

经过 8 周的高脂饲料喂养,我们得到了 3 组大鼠一般情况的数据,见表 1。表中显示:与对照组相比,模型 2 组饮水量、饮水量减少,肝脏指数增重,差异有明显的统计学意义 ( $P < 0.01$ );而模型 1 组饮水量减少,肝脏指数、终末体重增加,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ )。

同时,通过绘制 3 组每日饮食量、饮水量的曲线图(本文未显示)我们发现,3 组 28 d 前的日饮食量

稳定,模型 1 组的食量大于对照组及模型 2 组。从第 5 周开始,3 组的食量出现了下降的趋势,这可能与 4 周末禁食采血有关,但对照组经过一段时间的调整,饮水量逐渐恢复正常并趋于稳定;而模型 1、2 组却出现了饮水量减少并持续波动的情况,这可能表明模型组大鼠出现厌食。

3 组大鼠 4 周前饮水量相当。从 4 周末起,3 组饮水量出现了较大的起伏,这可能与采血相关,但相对于对照组来说,模型组 2 组的饮水量都下降。

### 2.2 血脂四项水平统计

分别在实验第 4、6、8 周末检测 3 组大鼠的血脂水平并统计,见表 2、3、4。表 2 可以看出:在 4 周末,与对照组相比,模型组 2 组 TC 升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );TG、LDL-c 的含量出现上升的趋势,但差异没有统计学意义 ( $P > 0.05$ );HDL-c 出现下降的趋势,但差异没有统计学意义。表明高脂血症大鼠模型建立成功。

表 3 可以看出:在 6 周末,与对照组相比,模型组 2 组 TC、LDL-c 升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与 4 周末相比,模型组 2 组 TC、TG、HDL-c 水平下降,LDL-c 水平上升。

表 4 可以看出,在 8 周末,与对照组相比,模型 1 组 HDL-c 水平降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );LDL-c 水平升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。同时与 6 周末相比,模型组 TC、HDL、LDL 水平升高,TG 水平降低。

表 1 3 组大鼠饮食量、饮水量、体重、肝脏指数  
Tab.1 Analysis of Food and water intake, weigh and liver index of 3 groups

| 组别<br>Group               | 日均饮食量(g)<br>Average food<br>intake per day | 日均饮水量(mL)<br>Average water<br>intake per day | 肝脏指数(g/kg)<br>Index of liver | 终末体重(kg)<br>Terminal weight |
|---------------------------|--|--|------------------------------|-----------------------------|
| 对照组 Control group         | 27.457 $\pm$ 2.365                         | 45.71 $\pm$ 8.829                            | 0.026 $\pm$ 0.002            | 451.54 $\pm$ 33.14          |
| 模型 1 组 First model group  | 27.836 $\pm$ 2.509                         | 38.04 $\pm$ 6.571 **                         | 0.046 $\pm$ 0.007 **         | 505.81 $\pm$ 40.39 *        |
| 模型 2 组 Second model group | 26.204 $\pm$ 2.180 **                      | 37.12 $\pm$ 5.739 **                         | 0.047 $\pm$ 0.008 **         | 492.74 $\pm$ 62.62          |

注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

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

表 2 4 周末各组大鼠血脂四项水平 (mmol/L)  
Tab.2 Analysis of TC, TG, LDL-c, HDL-c level at the end of forth week

| 组别 Group                  | TC                   | TG                | HDL-c             | LDL-c             |
|---------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 对照组 Control group         | 2.012 $\pm$ 0.457    | 0.641 $\pm$ 0.216 | 1.976 $\pm$ 0.294 | 0.732 $\pm$ 0.364 |
| 模型 1 组 First model group  | 3.723 $\pm$ 1.091 ** | 0.650 $\pm$ 0.187 | 1.756 $\pm$ 0.566 | 1.165 $\pm$ 0.583 |
| 模型 2 组 Second model group | 4.485 $\pm$ 2.028 ** | 0.737 $\pm$ 0.261 | 1.818 $\pm$ 0.359 | 0.988 $\pm$ 0.610 |

注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

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

对比大鼠第 4 周、第 6 周、第 8 周的数据可以看到:空白对照组在普通饲料喂养情况下,TC、LDL-c 随着喂养周期的延长,水平逐渐升高;3 组的 TG 水平随着喂养周期的延长逐渐降低;同时,模型组 2 组的 TC 水平在第 6 周时出现了下降,虽然持续高脂饲料喂养后升高,但是并未回到 4 周末水平。

## 2.3 肝脏、主动脉 HE 染色

### 2.3.1 肝脏 HE 染色结果

对照组肝脏 HE 染色可见肝细胞结构正常,排

列清楚,染色均匀,核深染,居于正中。模型组肝细胞增大,结构欠清或消失,细胞内大面积脂肪变,核居于一侧,部分肝血窦充血,肝脏细胞汇管区内可见淋巴细胞浸润,甚至肝脏细胞出现坏死。染色结果见图 1。

### 2.3.2 主动脉 HE 染色结果

3 组大鼠主动脉内膜光滑,各层结构清楚,无异常。染色结果见图 2。

表 3 6 周末各组大鼠血脂四项水平 (mmol/L)

Tab.3 Analysis of TC, TG, LDL-c, HDL-c level at the end of sixth week

| 组别 Group                  | TC              | TG            | HDL-c         | LDL-c            |
|---------------------------|-----------------|---------------|---------------|------------------|
| 对照组 Control group         | 2.241 ± 0.572   | 0.579 ± 0.217 | 0.429 ± 0.284 | 1.855 ± 1.119    |
| 模型 1 组 First model group  | 2.889 ± 0.586 * | 0.493 ± 0.145 | 0.419 ± 0.429 | 2.954 ± 1.356 *  |
| 模型 2 组 Second model group | 2.985 ± 0.681 * | 0.656 ± 0.231 | 0.378 ± 0.333 | 5.088 ± 2.937 ** |

注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

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

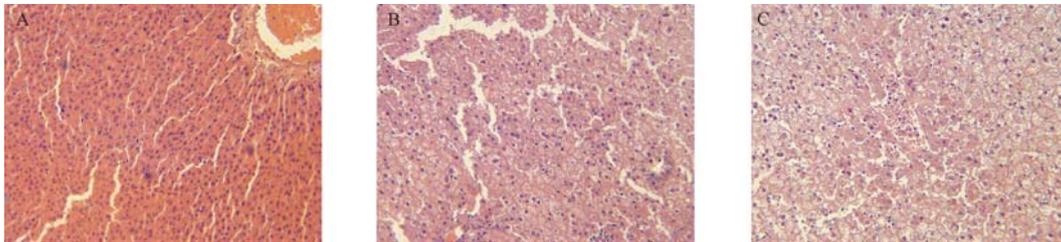
表 4 8 周末各组大鼠血脂四项水平 (mmol/L)

Tab.4 Analysis of TC, TG, LDL-c, HDL-c level at the end of eighth week

| 组别 Group                  | TC            | TG            | HDL-c           | LDL-c           |
|---------------------------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|
| 对照组 Control group         | 3.179 ± 0.575 | 0.427 ± 0.134 | 2.276 ± 0.960   | 2.259 ± 0.881   |
| 模型 1 组 First model group  | 3.327 ± 0.580 | 0.441 ± 0.142 | 1.322 ± 0.815 * | 3.501 ± 1.627 * |
| 模型 2 组 Second model group | 3.628 ± 0.861 | 0.486 ± 0.149 | 2.213 ± 0.510   | 2.581 ± 1.258   |

注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

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

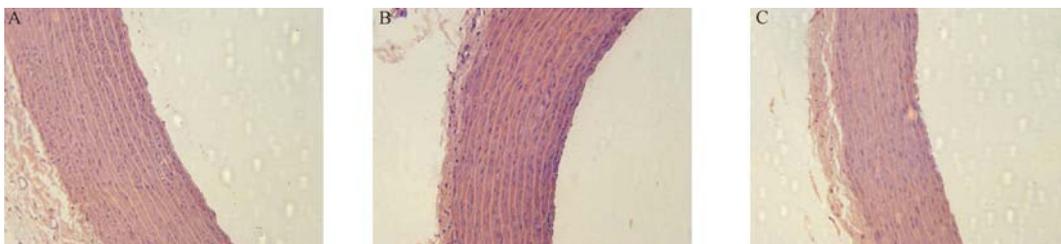


注:(A)对照组;(B)模型 1 组;(C)模型 2 组。

图 1 3 组大鼠肝脏病理切片结果 (×100)

Note. (A) control group; (B) first model group; (C) second model group.

Fig.1 The result of liver HE strain of 3 groups



注:(A)对照组;(B)模型 1 组;(C)模型 2 组。

图 2 3 组大鼠主动脉切片结果 (×100)

Note. (A) control group; (B) first model group; (C) second model group.

Fig.2 The result of Aorta HE strain of 3 groups

### 3 讨论

本次实验拟通过高脂饲料喂养 SD 大鼠造成高脂血症,并在不同的时间点内进行血脂检测,从而对大鼠的血脂水平进行纵向的追踪。实验数据表明,模型组的大鼠在 4 周时 TC 升高,与对照组相比,差异有显著统计学意义( $P < 0.01$ ),但 6 周末检测血脂水平时发现 TC 值出现了回落,第 8 周时检测血脂发现 TC 水平再次升高,但与 4 周末相比,水平还是降低的。这一结果表明 SD 大鼠在造模过程中,可能存在一个内适应的过程,能通过体内代谢调节血脂水平,使之达到一个比较平衡的状态。模型组 TG 水平由 4 周末的  $0.6 \sim 0.7 \text{ mmol/L}$  降至  $0.4 \text{ mmol/L}$  左右,也证明了这一点。

据以往文献表明,大鼠的高脂血症与人类高脂血症的发病机制差异较大,如大鼠内源性胆固醇合成量与人类差异较大,大鼠体内胆固醇转运依赖高密度脂蛋白,人类体内胆固醇转运则依赖低密度脂蛋白,且大鼠体内胆固醇血浆清除率明显高于人类。另外,大鼠对摄入的高胆固醇食物不敏感,而且还可以通过减少自身肝脏合成胆固醇、增加胆汁酸生成等途径而使血浆脂蛋白保持稳定,此外大鼠还具有对抗动脉粥样硬化形成的能力<sup>[8-11]</sup>。这可能解释了模型组大鼠 4 周后血脂降低的部分原因;其次,通过每日观察大鼠的剩余饮食量可知,模型组 2 组大鼠在第 5 周起出现了很明显的厌食,自由喂食导致模型组内饮食差异很明显,组间离散度很大。

本课题组建立大鼠高脂血症模型,原因是大鼠造模方法简单,成本适中,采血量较大,可以满足一次做多种指标,且模型建立的方法最多,更重要的是大鼠的食性与人类相似,所形成的病变与人类早期病理改变相似,且适应性较强,是目前国内研究脂质代谢最多的实验动物<sup>[12]</sup>,这些特性有助于课题组后期的药物开发及药理毒理实验的进行。目前国际上在血脂代谢的研究中多采用豚鼠或金黄地鼠,但金黄地鼠血量少,尾部采血困难,性情凶猛等给实验造成困难<sup>[13]</sup>。

本次试验设立了两个模型组,目的在于探究经过随机分组的大鼠在相同高脂饲料喂养的基础上,个体的差异性如何。每日饮食量、饮水量统计过程中发现,模型 2 组相对于模型 1 组而言,饮食量明显的降低,第 5 周后,2 组大鼠出现厌食,模型 2 组表

现更为明显,日均饮食量与对照组相比出现降低;同时,不同时期血脂四项水平检测也提示,模型组不同组间的血脂水平及波动情况迥异。这表明根据体重进行随机分组后的 2 组大鼠在相同饲养环境下个体差异性很大,提示在进行随机分组时应选择 TC 水平检测作为分组根据。

根据国标《保健食品检验与评价技术规范(2003 版)》中辅助降血脂功能评价,试验项目、实验原则及结果判定中的规定,“模型对照组和空白对照组比较,血清总胆固醇(TC)或低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c)升高,血清甘油三酯(TG)差异无显著性,判定高胆固醇血症动物模型成立”。此次实验得到了高脂饲料喂养形成高脂血症模型建立中的几点结论:1. 高脂饲料喂养 SD 大鼠建立高胆固醇血症模型是成功的。2. 高脂饲料喂养 SD 大鼠,大鼠表现出了中度甚至重度脂肪肝,表明脂质出现了异位沉积。3. 高脂饲料喂养 SD 大鼠,8 周无法形成动脉粥样硬化。4. 高脂饲料喂养 SD 大鼠的造模过程中,大鼠自身存在一个内调节过程,使血脂水平出现升高-内适应-升高的过程。5. 高脂饮食喂养 SD 大鼠造模过程中,模型组大鼠出现明显的厌食情况,且模型组内个体差异巨大。

针对大鼠厌食这一问题,我们课题组通过查看文献及组内讨论分析认为,可以在厌食出现的时期内增加高脂乳灌胃这一措施,从而保证模型组的外源性脂肪及胆固醇摄入<sup>[14]</sup>。同时,部分文献还提到,可以采用高脂-普通饮食交替饲养的方法,但具体结果如何,课题组并未进行验证。

该实验还存在 2 个不足之处。第一:通过数据可以看出,对照组的血脂水平如 TC、TG、LDL 从 4 周末到 8 周末也呈现着上升的趋势,且与以往其他人做的文献相比<sup>[15-17]</sup>,血脂水平也较高。肝脏 HE 染色也显示有极少数的对照组大鼠肝细胞出现脂质沉积、脂肪样变。课题组讨论认为,这可能与不限大鼠饮食、每日确保饮食供应量,大鼠笼内饲养,运动量少有关,其次,可能与动物本身的个体差异性有关。

第二:该实验只进行到第 8 周,并未继续造模观察大鼠 12 周的血脂水平。通过文献可以得知,部分研究者高脂饲料喂养大鼠 12 周造高脂血症<sup>[18-20]</sup>,且数据表明造模成功。此次实验中,8 周末模型组 TC、LDL 水平与第 6 周相比,都出现了升高,与对照组相比,有升高的趋势;HDL 水平与对照组相比,也

出现了降低的趋势。数据表明,随着高脂饲料的喂养,动物血脂水平可能继续升高。所以继续喂养 4 周,观察血脂的动态演变过程,其实是很有必要的。

针对实验中出现的这些不足,可采用实验前 TC 检测随机分组的方法,尽量消除组间的个体差异。同时实验过程中可考虑增加造模手段控制大鼠脂肪供应,防止大鼠因厌食而出现血脂降低。针对对照组血脂异常的情况,也可适度地限制大鼠的饮食来减少造模过程中的误差与偏倚,得到可靠的高脂血症动物模型。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 乔军华,盖国海,乔红曼,等. 高脂血症中医病机及治疗刍议 [J]. 中医临床研究,2015,7(14):145-147.
- [ 2 ] Hashimoto T, Ide T. Activity and mRNA Levels of Enzymes Involved in Hepatic Fatty Acid Synthesis in Rats Fed Naringenin [J]. J Agric Food Chem,2015,63(43):9536-9542.
- [ 3 ] 蒋锐,姜海斌,向秋玲,等. SD 大鼠高脂血症模型的建立 [J]. 湖南中医杂志,2014,30(5):135-137.
- [ 4 ] 徐安莉,周艳艳,赵敏,等. 两种高脂血症动物模型的比较 [J]. 时珍国医国药,2014,25(1):138-139.
- [ 5 ] Chaturvedi U, Shrivastava A, Bhadauria S, et al. A Mechanism-based Pharmacological Evaluation of Efficacy of Trigonella foenum graecum (Fenugreek) Seeds in Regulation of Dyslipidemia and Oxidative Stress in Hyperlipidemic Rats [J]. J Cardiovasc Pharmacol,2013,6(61):505-512.
- [ 6 ] 刘泉,刘率男,李林忆,等. Poloxamer 407 诱发金黄地鼠实验性高脂血症及其脂质代谢紊乱机制的初步研究 [C]. 中国药理学会第十次全国学术会议,2009,2,中国天津.
- [ 7 ] 王培琴,杨东升,孙静,等. 钨酸钠对泊洛沙姆 407 诱导高脂血症昆明小鼠模型血脂的影响 [J]. 武警后勤学院学报(医学版),2013,22(04):249-251.
- [ 8 ] 李大伟,张玲,夏作理. 建立高脂血症模型的动物选择与常用造模方法分析及改进 [J]. 中国临床康复,2006,10(48):145-147.
- [ 9 ] Harris WS. N-3 fatty acids and serum lipoproteins; animal studies [J]. Am J Clin Nutr,1997,65(5):1161-1166.
- [ 10 ] Spady DK, Cuthbert JA. Regulation of hepatic sterol metabolism in the rat, Parallel regulation of activity and mRNA for 7 alpha-hydroxylase but not 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase or low density lipoprotein receptor [J]. Biol Chem, 1992,267(8):5584-5591.
- [ 11 ] Shefer S, Nguyen LB, Salen G, et al. Differing effects of cholesterol and taurocholate on steady state hepatic HMG-CoA reductase and cholesterol 7alpha-hydroxylase activities and mRNA levels in the rat [J]. J Lipid Res,1992,33(8):1193-1200.
- [ 12 ] 高敏,倪凯,杨玉琪. 高脂血症动物模型的研究概况 [J]. 云南中医中药杂志,2010,31(10):79-81.
- [ 13 ] 朱竟赫,赵金明,秦文艳,等. 高脂血症实验动物模型研究概述 [J]. 实验动物科学,2012,29(2):48-52.
- [ 14 ] 谢予朋,王显,孙晓迪,等. 络衡方对高脂大鼠血液流变学的实验研究 [J]. 解放军药学报,2012,28(6):495-498.
- [ 15 ] 陈娟,邓军,张宇燕,等. 丹参素对高脂血症大鼠脂代谢调节机制研究 [J]. 中国中药杂志,2015,40(2):313-317.
- [ 16 ] 孙青,王淑娥,付舒倩,等. 大豆肽对实验性高脂血症大鼠血脂的影响及其机制 [J]. 中国老年学杂志,2014,34(8):2169-2171.
- [ 17 ] 高红莉,刘昭纯,陈强,等. 马黛茶对高脂血症大鼠血液流变学及心肌 ATP 酶活性的影响 [J]. 中国老年学杂志,2014,34(24):6991-6993.
- [ 18 ] Zhuang Y, Mao J, Yu M, et al. Hyperlipidemia induces vascular smooth muscle cell proliferation involving Wnt/ $\beta$ -catenin signaling [J]. Cell Biol Int,2016,40:121-130.
- [ 19 ] Zhou Y, Lin S, Zhang L, et al. Resveratrol prevents renal lipotoxicity in high-fat diet-treated mouse model through regulating PPAR- $\alpha$  pathway [J]. Mol Cell Biochem,2016,411:143-50.
- [ 20 ] 张泽生,康海轩,王婷婷,等. 迷迭香提取物对高脂血症小鼠血脂的影响 [J]. 食品科技,2013,38(3):197-200.

[ 收稿日期 ] 2016-06-23



# Smad3 对非小细胞肺癌 A549 细胞和 宫颈癌 HeLa 细胞迁移的影响

韦荣飞, 李梦媛, 杨星九, 朱瑞敏, 徐大模, 高 苒\*

(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, 北京 100021)

**【摘要】** 目的 过表达、敲低或抑制 Smad3 的活性, 探讨 Smad3 对非小细胞肺癌 A549 细胞和宫颈癌 HeLa 细胞迁移的影响。方法 设计扩增 Smad3 基因全长编码序列 cDNA 的引物, 通过分子克隆技术构建 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体, 同时设计并合成靶向 Smad3 的 siRNA 序列, 在 A549 和 HeLa 细胞中过表达或敲低 Smad3, 或者利用 Smad3 的抑制剂 SIS3 2  $\mu$ M 处理细胞, 采用细胞划痕的方法研究 Smad3 对 A549 和 HeLa 细胞迁移的影响。结果 利用分子克隆技术成功构建 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体。过表达 Smad3 促进 A549 和 HeLa 细胞的迁移。敲低 Smad3 抑制 A549 和 HeLa 细胞的迁移。SIS3 抑制 Smad3 的活性导致 A549 和 HeLa 细胞的迁移速率变慢。结论 Smad3 促进 A549 和 HeLa 细胞的迁移。

**【关键词】** Smad3; 过表达载体; RNA 干扰; SIS3; 细胞迁移

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0011-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.003

## Effect of Smad3 on cell migration of A549 and HeLa cells

WEI Rong-fei, LI Meng-yuan, YANG Xing-jiu, ZHU Rui-min, XU Da-mo, GAO Ran\*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Comparative Medical Center,  
Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of Smad3 on cell migration of A549 and HeLa cells. **Methods** Primers for pCMV-Myc-Smad3 plasmid construction and siRNA targeting Smad3 were designed and synthesized. pCMV-Myc-Smad3 plasmid was constructed with molecular cloning techniques. Overexpression of Smad3 with Myc-tag or silencing of endogenous Smad3, and then scratch assay was used to detect the migration ability of A549 and HeLa cells *in vitro*. **Results** pCMV-Myc-Smad3 plasmid was successfully constructed. Overexpression of Smad3 significantly up-regulated the migration rate of A549 and HeLa cells. Conversely, in the same cells, silencing of endogenous Smad3 or treatment with Smad3 inhibitor, SIS3, down-regulated the migration rate. **Conclusions** Smad3 promotes cell migration of A549 and HeLa cells.

**【Key words】** Smad3; Overexpression vector; RNAi; SIS3; Cell migration

TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta, 转化生长因子  $\beta$ ) 信号通路是调节细胞生长的重要的信号通路, 机体对 TGF- $\beta$  信号通路响应的敏感性降低, 将会导致肿瘤的形成<sup>[1]</sup>。经典的 TGF- $\beta$  信号通路由

**【基金项目】** 协和青年基金资助, 中央高校基本科研业务费专项资金资助(3332016077); 中国医学科学院医学实验动物研究所基本科研业务费专项资金资助(2016ZX310033); 北京市优秀人才培养项目(2015000020124G073)。

**【作者简介】** 韦荣飞(1990-), 女, 助理研究员, 研究方向: 免疫与肿瘤。E-mail: weirongfei2010@163.com

**【通讯作者】** 高苒(1980-), 女, 副研究员, 研究方向: 肿瘤学、免疫学。E-mail: gaoran26@hotmail.com

TGF- $\beta$  I 型和 II 型受体 (TGFBR1, TGFBR2) 介导, TGFBR1 和 TGFBR2 与 TGF- $\beta$  结合后能够磷酸化下游 R-Smads (receptor-activated Smads) 蛋白, 包括 Smad2 和 Smad3<sup>[2,3]</sup>。激活的 R-Smads 蛋白随后与 Smad4 结合并转移至细胞核中调控基因的转录<sup>[4-6]</sup>。正常的生理条件下, 在多种组织器官中, 包括乳房组织, Smad3 能够抑制细胞的增殖并促进细胞凋亡, 而在乳腺癌晚期, Smad3 能够促进乳腺癌细胞的转移<sup>[7]</sup>。2015 年, Rodney B Luwor 等在 *Molecular Cancer* 杂志发表文章揭示, 与非迁移细胞相比, 迁移的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中, Smad3 具有更高的活性<sup>[8]</sup>。除了乳腺癌细胞, Smad3 是否也能影响其他类型的癌细胞的迁移呢? 为探讨该科学问题, 我们通过构建 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体, 检测过表达 Smad3 后对宫颈癌 HeLa 细胞和非小细胞肺癌 A549 细胞迁移的影响。同时, 通过 RNAi 干扰及 Smad3 抑制 SIS3 处理细胞敲低 Smad3 的蛋白水平或抑制 Smad3 的活性, 进一步验证 Smad3 对宫颈癌 HeLa 细胞和非小细胞肺癌 A549 细胞迁移的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞及主要试剂

载体构建 PCR 引物由上海维基生物科技有限公司合成; Taq polymerase、dNTP 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 限制性内切酶 Sal I、Not I 及 T4 DNA 连接酶购自美国 NEB 公司; 感受态细胞 DH5 $\alpha$  购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 质粒提取盒购自德国 Qiagen 公司; 胎牛血清、DMEM、胰酶购自美国 Gibco 公司; RIPA 裂解液购自 Sigma 公司; 蛋白 Marker 及发光底物购自 Thermo 公司; Lipofectamine 2000 及 RNAiMax 转染试剂购自 Life Technologies 公司。HEK-293T、HeLa 和 A549 细胞系为本实验室所冻存。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体的构建

##### 1.2.1.1 Smad3 DNA 目的片段的获得

提取 HeLa 细胞的总 RNA, 并进行 cDNA 扩增; 根据 CDS 序列 (NM\_005902.3) 设计含有 Sal I 和 Not I 限制性内切酶位点的引物序列; 以反转录的 Smad3 cDNA 作为模板, 扩增 Smad3 DNA 目的片段, 条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 20 s, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min。将 PCR 产物

进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 紫外灯下切割含有目的条带的凝胶块, 利用凝胶回收试剂盒回收目的片段。

##### 1.2.1.2 酶切

利用 Sal I 和 Not I 限制性内切酶对 PCR 获得的 Smad3 DNA 目的片段及 pCMV-Myc-vector 进行酶切, 酶切条件为 37 $^{\circ}$ C 过夜。将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 紫外灯下切割含有目的条带的凝胶块, 利用凝胶回收试剂盒回收目的片段。

##### 1.2.1.3 连接及转化

利用 T4 DNA 连接酶将酶切回收后的 Smad3 DNA 片段和线性 pCMV-Myc-vector 进行连接, 连接条件为 16 $^{\circ}$ C 过夜。连接产物转化感受态 DH5 $\alpha$  细胞, 在含有氨苄霉素的 LB 平板上筛选克隆。挑取阳性克隆, 过夜摇菌扩增。

##### 1.2.1.4 质粒提取、酶切鉴定及测序

利用质粒提取试剂盒提取阳性菌中的质粒。采用 Sal I 和 Not I 限制性内切酶对重组质粒 pCMV-Myc-Smad3 进行双酶切鉴定, 并以 1% 琼脂糖凝胶电泳验证片段大小, 同时对重组质粒进行基因测序鉴定。

##### 1.2.1.5 HeLa 细胞和 A549 细胞的培养

HEK-293T、HeLa 和 A549 细胞培养基为含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 高糖培养基。培养于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱。

##### 1.2.1.6 质粒的表达检测

用胰酶将 HEK-293T 细胞消化成单细胞悬液并对 24 孔板进行铺板, 24 h 后, 通过 Lipofectamine 2000 将 0.8  $\mu$ g 的 pCMV-Myc-vector 和重组质粒 pCMV-Myc-Smad3 分别转染。24 h 后, RIPA 裂解液裂解细胞, 加入等体积的 2  $\times$  loading buffer, 沸水煮 15 min, 得到蛋白样品。随后利用 Myc 标签抗体进行 Western blot 检测重组质粒 pCMV-Myc-Smad3 的表达情况。

##### 1.2.2 划痕实验

用胰酶将 HeLa 和 A549 细胞消化成单细胞悬液并对 6 孔板进行铺板, 24 h 后, 通过 Lipofectamine 2000 或 RNAiMax 转染试剂将 3  $\mu$ g 的重组质粒 pCMV-Myc-Smad3 或 Smad3 的 siRNA 分别进行转染。40 h 后, 用 20  $\mu$ L 枪头沿直线对 6 孔板中长满的细胞进行划痕, 0 h、24 h 及 48 h 时分别拍照记录细胞的迁移情况。Smad3 抑制剂 SIS3 (工作浓度 2  $\mu$ M) 加入细胞培养基中培养细胞, 划痕及记录方法同上。

1.3 统计学方法

细胞迁移划痕实验每个时间点随机选取 5 个视野拍照,并利用 ZEN 2 软件测量划痕间距,以时间点 0 h 划痕宽度作为标准即 100%,其他时间点划痕间距与 0 h 划痕间距的比值即为该时间点划痕两侧的相对距离(百分比),相对距离越小,则说明相对迁移速率越大。利用 Graphpad Prism 7 对结果进行 *t* 检验, $P < 0.05$  表示有统计学意义。

2 结果

2.1 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体的构建

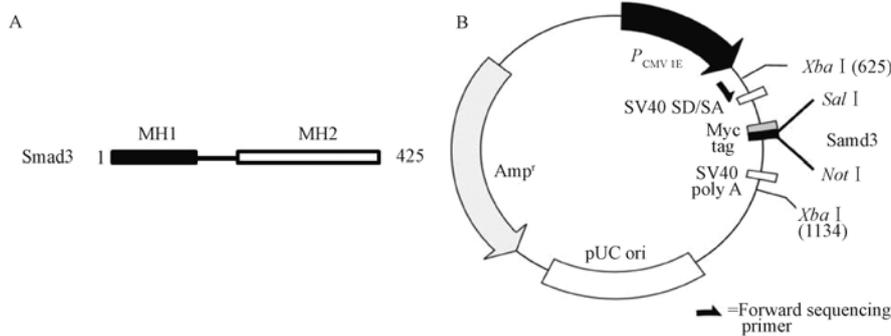
Smad3 蛋白由 425 个氨基酸组成,其主要包含两个结构域:MH1 和 MH2 结构域(图 1A)。MH1 和 MH2 对于 Smad3 正常生物学功能的发挥至关重要。我们以 cDNA 作为模板,用引物 Smad3-F/R(表 1)进行扩增,选择 Sal I 和 Not I 分别为上下游内切酶

切割位点(图 1B),得到与预期片段大小相符的特异性片段(图 2A)。利用 Sal I 和 Not I 对 PCR 产物进行酶切后,通过 T4 DNA 连接酶将酶切产物连接至 pCMV-Myc 载体上。经测序比对及图 2B 酶切鉴定结果显示,Smad3 DNA 全长片段已成功插入 pCMV-Myc 载体上。如图 2C,Western blot 结果显示,与 HEK-293T 细胞中只转染了 Myc-vector 的对照组相比,转染 Myc-Smad3 过表达质粒 24 h 后,在约 55 kDa 大小处检测到 Smad3 的过表达条带,表明 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体构建成功。

表 1 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体构建所需引物

Tab. 1 Primers for pCMV-Myc-Smad3 plasmid construction

| 基因名称<br>Name | 序列<br>Sequence                    | 酶切位点<br>Cleavage site |
|--------------|-----------------------------------|-----------------------|
| Smad3        | F 5'-atagtcgacaatgtctccatctg-3'   | Sal I                 |
|              | R 5'-tatgcggcgcctaagacacactgga-3' | Not I                 |

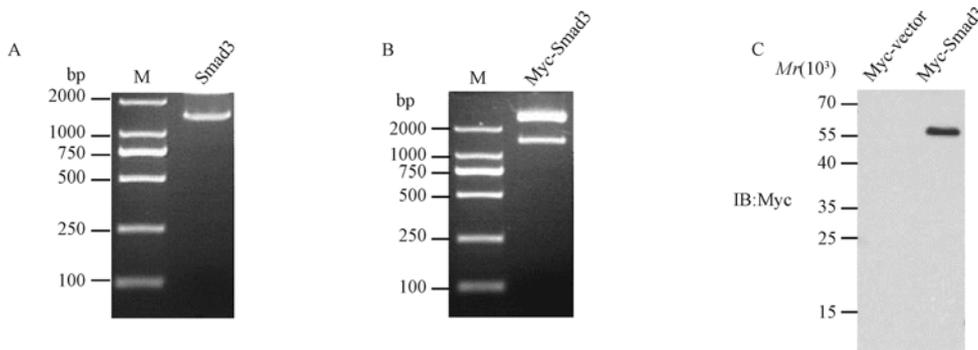


注:(A)为 Smad3 蛋白的结构示意图,主要包括 MH1 和 MH2 结构域;(B)为 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体构建示意图,其中,选取 Sal I 和 Not I 分别为上下游限制性内切酶切割位点。

图 1 Smad3 蛋白和 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体构建示意图

Note. (A) indicates the structure diagram of Smad3, including MH1 and MH2 domain; (B) indicates the plasmid profile of pCMV-Myc-Smad3.

Fig. 1 Structure diagram of Smad3 and pCMV-Myc-Smad3 plasmid construction.



注:(A)为利用引物 Smad3-F/R 扩增 Smad3 DNA 片段;(B)为 Sal I/Not I 酶切鉴定 pCMV-Myc-Smad3 质粒;(C)为 HEK-293T 细胞中转染 pCMV-Myc-Smad3 过表达质粒,MyC-vector 作为阴性对照,利用 Myc 标签抗体进行 Western blot 检测 Smad3 的过表达情况。

图 2 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体的构建及蛋白表达检测

Note. (A) indicates PCR for amplification of Smad3 DNA; (B) indicates the restriction enzyme digestion for pCMV-Myc-Smad3 by Sal I + Not I; (C) indicates the detection of protein expression level of pCMV-Myc-Smad3 in HEK-293T by Western blot.

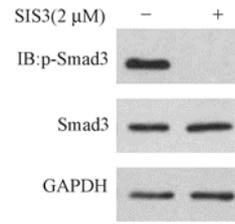
Fig. 2 Construction of pCMV-Myc-Smad3 plasmid

### 2.2 Smad3 抑制剂 SIS3 对非小细胞肺癌 A549 细胞和人宫颈癌 HeLa 细胞迁移的影响

SIS3 是 Smad3 的抑制剂,其能有效抑制 Smad3 的磷酸化,进而阻止 Smad3 进入细胞核参与基因的转录调控。为研究 SIS3 对细胞迁移的影响,首先在 A549 细胞中检测 SIS3 对 Smad3 的抑制作用,以证明 SIS3 的活性。如图 3 所示,SIS3 能够有效抑制 Smad3 的磷酸化。与 DMSO 处理组相比,含 2 μM SIS3 的 DMEM 培养基培养细胞,划痕后 0、24、48 h, A549(图 4A)和 HeLa(图 4B)细胞迁移结果显示, SIS3 能够有效抑制细胞的迁移。

### 2.3 敲低或过表达 Smad3 对 A549 和 HeLa 细胞迁移的影响

如图 5 所示,与对照组相比,通过 RNAi 干扰技术敲低 A549(图 5A)和 HeLa(图 5B)细胞中内源的 Smad3 后,划痕后 0、24、48 h 细胞迁移结果显示,敲低 Smad3 明显抑制细胞的迁移。相反,在 A549(图 5A)和 HeLa(图 5B)细胞中过表达 Smad3,划痕后 0、24、48 h 细胞迁移结果显示,过表达 Smad3 明显



注:上图 Western blot 检测 A549 细胞中 Smad3 抑制剂 SIS3 对 Smad3 活性(磷酸化)的抑制作用。

图 3 Smad3 抑制剂 SIS3 对 Smad3 活性的抑制效应

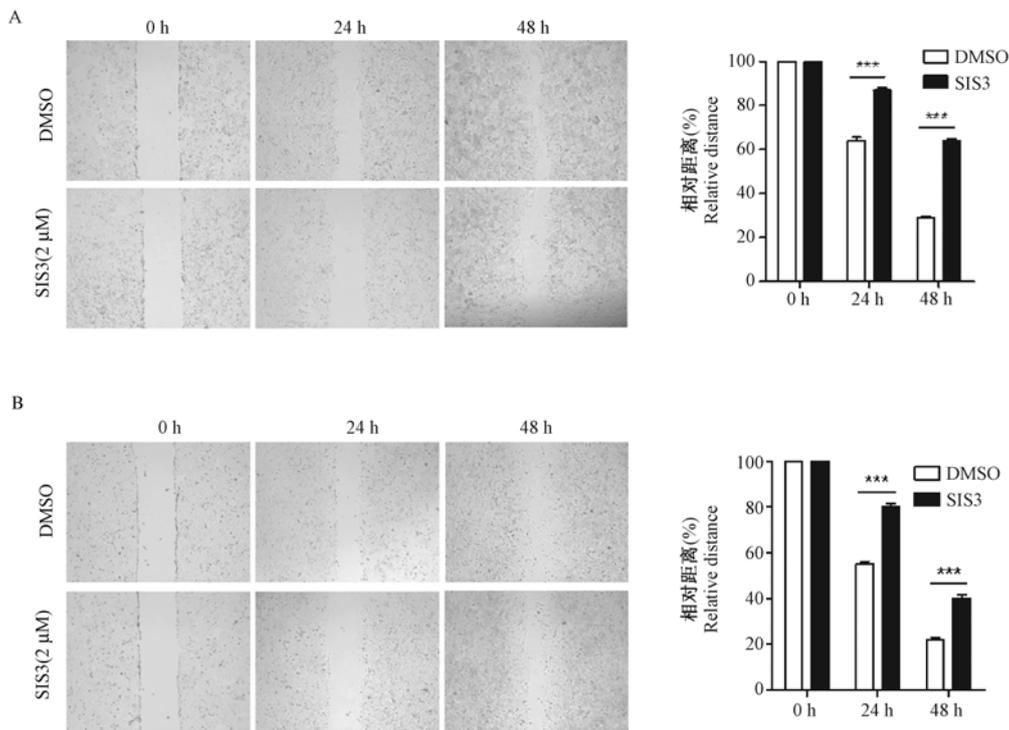
Note. The above result shows the inhibitor of Smad3, SIS3, has significant inhibitory effect on Smad3 activity.

Fig. 3 The inhibitory effect of SIS3 on Smad3

促进细胞迁移。以上结果表明,Smad3 促进 A549 和 HeLa 细胞的迁移。

### 3 讨论

癌症是导致人类死亡的主要疾病之一,其中,约 90% 以上的癌症患者死于癌细胞的转移。近年来,人们对肿瘤形成的分子机制展开了大量的研究,为人类治疗癌症提供了多个潜在的治疗靶点<sup>[9-11]</sup>。

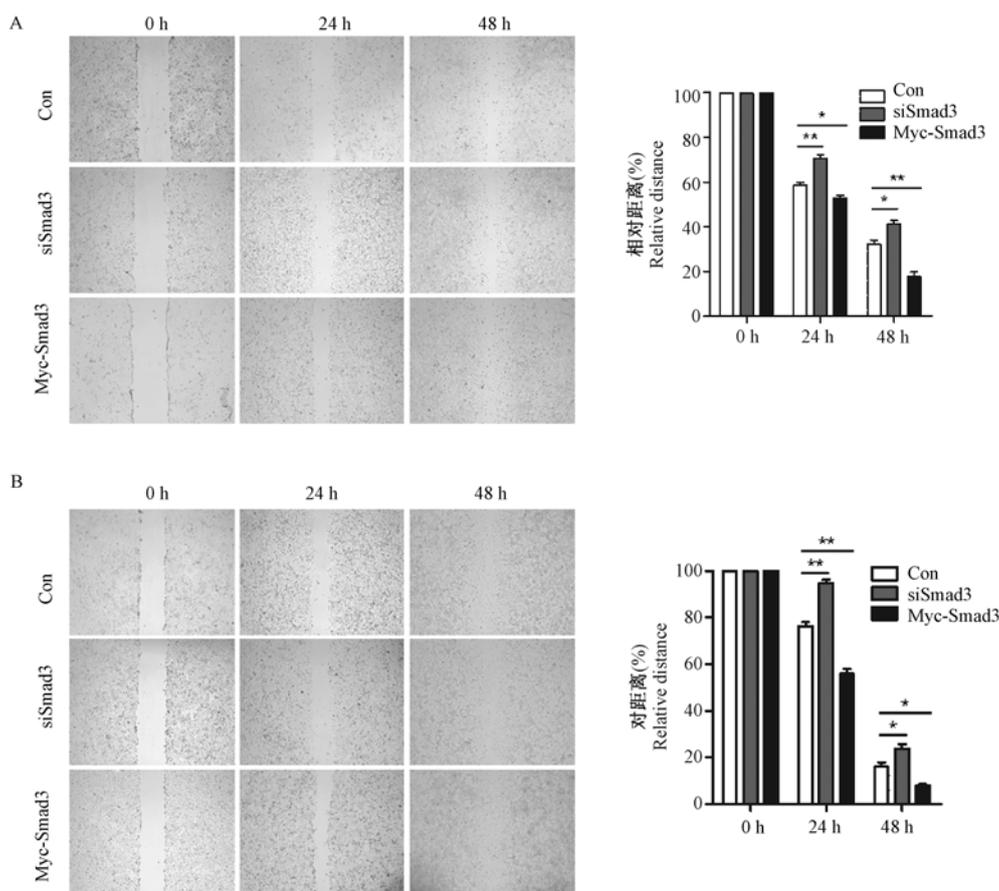


注:上图分别为 2 μM SIS3 处理 A549 细胞(A)和 HeLa 细胞(B)后进行划痕,0、24、48 h 时拍照观察细胞的迁移情况并进行统计学分析,DMSO 处理组作为对照组。与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。

图 4 Smad3 抑制剂 SIS3 能够有效抑制 A549 细胞和 HeLa 细胞的迁移

Note. The above results indicate the inhibitor of Smad3, SIS3, significantly inhibits cell migration of A549 (A) and HeLa (B) cells; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , compared with the normal group.

Fig. 4 The inhibitory effect of SIS3 on cell migration of A549 and HeLa cells



注:上图分别为 A549 细胞(A)和 HeLa 细胞(B)中敲低或过表达 Smad3 后进行划痕,0、24、48 h 时拍照观察细胞的迁移情况并进行统计学分析,Con 组作为对照组。与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。

**图 5** 敲低或过表达 Smad3 能够明显抑制或促进 A549 细胞和 HeLa 细胞的迁移

Note. The above results show silencing of endogenous Smad3 or overexpression of Smad3 in A549 (A) or HeLa (B) cells can effectively inhibits or promotes cell migration; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , compared with the normal group.

**Fig. 5** Knockdown or overexpression of Smad3 inhibits or promotes cell migration

前期报道揭示,TGF- $\beta$  与多种肿瘤的发展密切相关,包括神经胶质瘤、乳腺癌等<sup>[12-14]</sup>。在正常的生理条件下,TGF- $\beta$  信号能够抑制上皮细胞的增殖,然而,在肿瘤的发展进程中,TGF- $\beta$  则诱导肿瘤细胞的增殖、侵袭及血管生成<sup>[15,16]</sup>。Smad3 是 TGF- $\beta$  信号通路中的一个重要分子,前期报道揭示,在乳腺癌晚期,Smad3 异常活化,促进乳腺癌细胞的转移<sup>[7,8]</sup>。SIS3 作为 Smad3 的抑制剂,能够抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的 Smad3 的磷酸化及 Smad3-Smad4 的相互作用,进而抑制相关基因的转录<sup>[17]</sup>。本研究通过过表达、敲低 Smad3 或利用 SIS3 处理 A549 和 HeLa 细胞抑制内源 Smad3 的活性,然后检测细胞迁移能力的变化,从而阐明 Smad3 对非小细胞肺癌和宫颈癌细胞迁移的影响,结果显示,Smad3 促进 A549 和 HeLa 细胞的迁移。Smad3 调控细胞迁移的详细作用机制有待深入研究。

综上所述,结合前期相关报道,我们发现,Smad3 不仅能够促进乳腺癌细胞的迁移,也能促进非小细胞肺癌和宫颈癌细胞的迁移。这提示,在人类多种肿瘤类型中,Smad3 促进肿瘤细胞的迁移具有一定的普遍性。因此,后续靶向 Smad3 活性抑制药物的开发将具有很大的临床应用前景,也为肿瘤治疗提供新的途径。

**参考文献:**

[ 1 ] David CJ, Huang Y-H, Chen M, *et al.* TGF- $\beta$  Tumor Suppression through a Lethal EMT [J]. Cell, 2016, 164(5): 1015 - 1030.  
 [ 2 ] Abdollah S, Macías-Silva M, Tsukazaki T, *et al.* T $\beta$ RI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling [J]. J Biol Chem, 1997, 272(44): 27678 - 27685.

(下转第 21 页)



# 厄洛替尼引起皮肤不良反应的小鼠模型建立

宋亚中<sup>1</sup>, 徐央波<sup>1</sup>, 邓博<sup>2</sup>, 崔慧娟<sup>2\*</sup>, 彭艳梅<sup>1</sup>, 刘戴维<sup>1</sup>, 王垚涵<sup>1</sup>,  
刘凡<sup>1</sup>, 段桦<sup>1</sup>, 邱钰芹<sup>1</sup>, 李婧<sup>1</sup>

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 中日友好医院, 北京 100029)

**【摘要】目的** 厄洛替尼(商品名:特罗凯)是治疗非小细胞肺癌的一种新型靶向药物,近些年来临床应用甚广,但副作用较多,其中以皮疹最为多见,且最令患者难以接受。本研究旨在观察应用特罗凯前后小鼠在表皮、病理、免疫组化等方面的改变,复制特罗凯所致皮疹的动物模型,为临床外用药物治疗皮疹提供模型。**方法** 使用BALB/c 雌性小鼠 20 只,随机分成 4 组。实验组(Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组)用浓度为 10 g/L 的特罗凯溶液按 100 mg/kg 灌胃,对照组(Ⅰ组)以等体积去离子水灌胃,每天 1 次。于给药前 24 h 在小鼠头颈、背、腰处脱毛,实验结束后剪取颈部、背部、腰部皮肤并观察实验组、对照组小鼠在肉眼皮肤、病理切片、免疫组化等方面的改变。**结果** (1) 四组小鼠之间在毛发再生天数、毛发完全再生天数、脱屑时间、出现皮疹时间、毛孔扩张数等 5 方面的差异存在统计学意义( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ );(2) Ki67: 四组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** (1) 此次实验印证了许多研究者关于“EGFRs 导致的皮疹为一种炎症反应”的观点;(2) 该皮疹模型可靠实用,具有可重复性,适用于“EGFRs 所致皮疹动物模型”的大批建立,可推广以供临床、试验、研究所用。

**【关键词】** 厄洛替尼; 皮疹; 皮肤; 病理; 免疫组化

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0016-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.004

## The establishment of mouse model of Erlotinib-induced skin adverse reactions

SONG Ya-zhong<sup>1</sup>, XU Yang-bo<sup>1</sup>, DENG Bo<sup>2</sup>, CUI Hui-juan<sup>2\*</sup>, PENG Yan-mei<sup>1</sup>, LIU Dai-wei<sup>1</sup>,  
WANG Kai-han<sup>1</sup>, LIU Fan<sup>1</sup>, DUAN Hua<sup>1</sup>, QIU Yu-qin<sup>1</sup>, LI Qiang<sup>1</sup>

(1. Beijing University Of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

**【Abstract】Objective** Erlotinib (Trade Name: Tarceva) is a new targeted drug for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) that has a wide clinical application in recent years, but commonly carries many side effects, among which the most common and unbearable one is rash. The aim of this study is to observe the changes of epidermis, pathology, immunohistochemistry and other aspects before and after the application of Tarceva in mice and try to copy the rash animal models caused by Tarceva and thus to provide models for the clinical topical medications of rash. **Methods** 20 BALB/c female mice were randomly divided into four groups. The experimental group(Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ group) was given 100 mg/kg dosage with the concentration of 10 g/L erlotinib solution by gavage, and the control group (Ⅰ group) with an equal volume of deionized water by gavage once daily. The hairs from the head, neck and back of each mouse were removed 24 hours prior to the administration, and at the end of the experiment, clipping the skin in the neck, back and waist, then observed differences between the experimental group and the control group in mice skin, biopsy, immunohistochemistry and the like. **Results** (1) There were statistically significance ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ) in the four groups of mice in five

[基金项目] 中日友好医院院内课题(2013-MS-42); 北京市科技计划首都临床特色应用研究专项(Z151100004015168)。

[作者简介] 宋亚中(1989-), 男, 硕士研究生, 专业: 中西医结合肿瘤内科。E-mail: 18800100355@163.com

[通讯作者] 崔慧娟(1963-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合肿瘤内科及靶向药物所致皮疹等不良反应。E-mail: cuihj1963@163.com

aspects as hair regrowth days, days of the complete regrowth of hair, desquamation time, the time of appearance of rash and the number of pore expansion; (2) Ki67; There were no statistically significant differences among the four groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** (1) This experiment confirms many researchers' point of view that "the rash induced by EGFRs is an inflammatory response" (2) A mouse model of rash induced by EGFRs is successfully established, and this is a reliable, practical and reproducible model which applies to a large number of establishment of "EGFRs drug-induced rash in animal models", and can be popularized for clinical, experimental and institutional uses.

**【Key words】** Erlotinib; Rash; Skin; Pathology; Immunohistochemistry

肺癌的死亡率占全球肿瘤相关死亡的首位,而非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占肺癌总数的 80%~85%,目前的治疗主要包括手术、化疗、放疗、分子靶向治疗及生物免疫治疗等<sup>[1]</sup>。分子靶向药物主要为表皮生长因子受体抑制剂(epidermal growth factor receptor inhibitors, EGFRs),包括单克隆抗体和 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)等,其中 TKI 类药物使用范围甚广。厄洛替尼(商品名:特罗凯)、吉非替尼(商品名:易瑞沙)是较早在中国上市的 TKI 类药物,也是表皮生长因子受体抑制剂(Epidermal growth factor receptor inhibitors EGFRs)的代表药物。但其诸多不良反应不容忽视。50%以上接受治疗的患者会发生皮肤毒性<sup>[2]</sup>。其中,痤疮样皮疹是最常见的 EGFRs 皮肤毒性反应<sup>[3]</sup>。虽然 Perez-Soler R 等<sup>[4]</sup>认为:出现皮疹的患者(75%)的生存期显著优于未出现皮疹的患者,且一项 Meta 分析也显示:患者皮疹越严重,疗效会越好<sup>[5]</sup>。但皮疹会继发瘙痒、疼痛、皮肤受损等不适症状,严重影响患者生活质量,甚至有些患者因此而停药,影响靶向药物的继续治疗。所以如何减少或治疗靶向药所致的皮疹等皮肤不良反应,是临床亟待解决的问题。目前仍缺乏行之有效、机制明确的应对药物,因此本实验望有效复制 EGFRs 类药物所致的皮疹动物模型,为临床尽早研发治疗此类皮疹的药物提供动物模型基础。鉴于目前主要的 TKI 类药物为特罗凯、易瑞沙等,且二者的抗癌机制基本相同,主要通过抑制多种上皮细胞肿瘤中过度表达的 EGFR 受体来抑制肿瘤增殖、血管生成、转移来促进肿瘤细胞凋亡<sup>[6]</sup>,而特罗凯导致的皮疹等不良反应均高于易瑞沙<sup>[7]</sup>,所以本实验将特罗凯定为实验用药。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物实验基础

参考 David Surguladze 等<sup>[8]</sup>在 2009 年报道的方法进行了模型复制,2013 年 4 月至 2015 年 1 月进行了以下动物实验研究。

### 1.2 实验动物

SPF 级 BALB/c 雌性小鼠 20 只,5 周龄,体重 17~23 g,购自北京维通利华实验动物公司[SCXK(京)2012-0001]。饲养、无菌手术环境为中日友好医院 SPF 动物房[SYXK(京)2008-0019]。温度为 20~26℃,相对湿度为 50%~60%,并按照实验动物的 3R 原则给予人道关怀。

### 1.3 药物和试剂

厄洛替尼(erlotinib 商品名:特罗凯)购自上海罗氏制药有限公司;Ki67 抗体购自北京博奥森公司。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 动物分组

将 BALB/c 雌性小鼠按随机法分成 I、II、III、IV 4 组,每组 5 只。

#### 1.4.2 饲养

将特罗凯片用灭菌去离子水配置成 10 g/L 的溶液,按 100 mg/kg 对实验组(II、III、IV 组)进行灌胃,每天 1 次;对照组(I 组)用等体积去离子水按 100 mg/kg 每天灌胃。

#### 1.4.3 取材

于给药前 24 h 对每只小鼠头颈、背、腰等处进行脱毛。I 组、II 组、III 组、IV 组小鼠分别于连续灌胃 21 d、7 d、14 d、21 d 后取颈部、背部、腰部等处皮肤。

### 1.5 主要检测指标

#### 1.5.1 皮肤肉眼改变

实验开始后每日观测小鼠日常活动情况及皮毛改变。包括:背部剃毛部位红肿、皮疹和鼠毛重新生长、鼠毛质地等情况;未剃毛部位鼠毛卷曲、脱落等情况。

#### 1.5.2 皮肤病理改变

四组小鼠(共 20 只)分别取材后,苏木精-伊红(HE)染色及油红 O 染色观察颈、肩背、腰部皮肤组织。包括毛囊扩张、堵塞,嗜中性脓液簇等情况。

#### 1.5.3 免疫组化检测 Ki67

标本经 4% 甲醛溶液固定 > 6 h,脱水、石蜡包埋,采用免疫组化法检测 Ki67 的表达。参考

Olaussen KA 等<sup>[9]</sup>的方法,根据染色程度和染色细胞百分数进行评判。已知阳性的乳腺癌组织切片作为阳性对照,以磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照。Ki67 阳性染色定位于细胞核,随机计数 5 个高倍视野的阳性细胞百分比,以其平均值作为评定依据。

### 1.6 统计学方法

数据采用 SPSS 20.0 统计软件及 Excel 统计软件分析,实验数据以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。多组资料的均值比较和组间均值比较,如果各组均服从正态分布,采用单因素方差分析和多重比较,否则采用非参数检验。三个时间点之间的均值比较,采用重复测量资料的方差分析。检验水平  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 皮肤肉眼改变

观察发现:对照组(I组)小鼠剃毛后鼠毛生长较快,在 2 周时完全恢复,颈、肩部未出现皮疹。实验组(II、III、IV组)小鼠平均第 4 天见皮肤脱屑,第 8 天可见背部散在红色皮疹,第 13 天皮疹消失,毛发生长缓慢,3 周时仍未完全恢复(参见图 1)。与文献报道<sup>[8,10]</sup>相符。四组小鼠在毛发再生天数(其中 II 与 IV 差异显著( $P < 0.01$ ))、毛发完全再生天数(其中 II 与 IV、III 与 IV  $P < 0.05$ )、出现脱屑时间(其中: I 与 II、I 与 III  $P < 0.05$ )、出现皮疹时间(其中, I 与 III、I 与 IV  $P < 0.05$ )等四个方面有差异,总体上有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) (参见表 1)

### 2.2 皮肤病理改变结果

与对照组相比,实验组苏木精-伊红(HE)染色可见毛囊周围中性粒细胞增多伴堵塞、脓样嗜中性粒细胞在毛囊管外面集群所致的毛囊炎症(参见图 2D、d)。与文献报道<sup>[8,11,12]</sup>相符。

与对照组相比,实验组油红 O 染色可见扩张、膨胀的的卵泡明显增多(参见图 2E、e)。与文献报道<sup>[8,11,12]</sup>相符。毛孔扩张数:四组间有差异,总体上有统计学意义( $P < 0.01$ ) (其中: I 与 II、III、IV 差异显著  $P < 0.01$ ) (参见表 2)。

### 2.3 免疫组化检测 Ki67

Ki67:实验组 Ki67 稍高于对照组<sup>[13,14]</sup> (参见图 2 F、f)。四组间无明显差异,无统计学意义( $P > 0.05$ ) (参见表 2)。

## 3 讨论

EGFRIs 所致皮肤毒性反应众多,其中痤疮样皮疹最为常见、严重。其机制尚未明确,目前相关研究如下:Lacouture ME 等<sup>[15]</sup>认为厄洛替尼(特罗凯)所致皮疹病理表现可分成 4 个阶段:(1)皮红肿和皮肤敏感性增加;(2)炎性细胞因子分泌和局部浸润;(3)T 淋巴细胞增多的丘疹脓疱;(4)硬皮症。病理表现主要为:(1)表皮炎性细胞浸润并包绕过度角化和扩张的毛囊管;(2)表皮层化脓性毛囊炎伴上皮细胞层破裂。Lenz HJ 等<sup>[16]</sup>通过皮疹活检发现:病理多表现为毛囊周围炎和化脓性毛囊炎。钱军等<sup>[17]</sup>通过对患者皮肤组织活检发现,EGFRI 相关皮疹表现为真皮上层、卵泡破裂层和上皮棘层松解层的一种混合性炎性反应。Cunningham D 等<sup>[18]</sup>认为:EGFRI 引起基底角质细胞生长停滞和过早成熟分化,并伴有中性粒细胞的释放。Lacouture ME 等<sup>[19]</sup>认为中性粒细胞释放的某些酶导致角质细胞凋亡,凋亡的细胞积聚在真皮下导致皮肤进一步的损伤,最终形成触痛、丘疹脓疱和甲沟炎。Guttman-Yassky E 等<sup>[20]</sup>在 EGFRI 患者的皮肤组织中检测到单核细胞,树突状细胞,巨噬细胞,T 淋巴细胞的浸润,提示 EGFRI 相关的皮疹最终可能与炎症相关。

此次实验用鼠为 BALB/c 雌性小鼠,主要考虑雄性小鼠之间通常有打斗、抓挠,不易于饲养、管理,且易出现抓痕等难于与皮疹等皮肤不良反应相鉴别,而雌性小鼠则较少出现上述现象,故本次实验暂用雌性小鼠,但我们将在后续研究中进一步比较探究不同性别小鼠的实验结果。实验组用药后在表皮出现毛发生长缓慢甚至脱落、脱屑、红疹等,在病理上表现为毛囊周围中性粒细胞群集伴堵塞而形成的毛囊炎、毛囊扩张,且对照组、实验组之间在毛发再生天数、毛发完全再生天数、脱屑时间、出现皮疹时间、毛孔扩张数等 5 方面的差异存在统计学意义( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),结合上述研究,本实验用浓度为 10 g/L 的特罗凯溶液按 100 mg/kg 对小鼠灌胃致其出现皮疹等不良反应,此模型在表皮组织、病理切片上的表现与 David Surguladze 等的文献报道基本相符,且可靠实用、具有可重复性,提示“EGFRIs 所致皮疹”的动物模型建立基本成功,同时也印证了许多研究者关于“EGFRIs 导致的皮疹为一种炎症反应”的观点。但四组小鼠在 Ki67 测试方面无统计学意义( $P > 0.05$ )。结合既往研究:

**表 1** 四组小鼠用特罗凯( II、III、IV 组)、去离子水( I 组) 干预前后毛发、皮肤变化出现的时间( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

**Tab.1** The timepoints of 4 group mice's change in hairs and skins before and after the interventions with Tarceva (Group II, III, IV) and deionized water (Group I)

| 组别<br>Groups    | 毛发开始再生天数<br>Hair regrowth days | 毛发完全再生天数<br>Days of the complete regrowth of hair | 出现脱屑时间<br>Desquamation time | 出现皮疹时间<br>The time of appearance of rash |
|-----------------|--------------------------------|---|-----------------------------|--|
| I 组 I Group     | 4.20 ± 1.30                    | 14.40 ± 1.14                                      | 0                           | 0  |
| II 组 II Group   | 0*■                            | 0 <sup>△</sup>                                    | 4.40 ± 0.89*                | 4.00 ± 3.67                              |
| III 组 III Group | 10.80 ± 6.06*                  | 0 <sup>△</sup>                                    | 4.60 ± 1.14*                | 8.20 ± 1.30*                             |
| IV 组 IV Group   | 15.00 ± 1.22*■                 | 15.20 ± 8.53                                      | 4.40 ± 1.14                 | 8.20 ± 1.30*                             |

注:与对照组(I 组)相比,\* $P < 0.05$ ;与实验组(IV 组)相比;<sup>△</sup> $P < 0.05$ ,■ $P < 0.01$ 。

Note. Compared with control group(I 组),\* $P < 0.05$ . Compared with experimental group(IV 组),<sup>△</sup> $P < 0.05$ ,■ $P < 0.01$ .

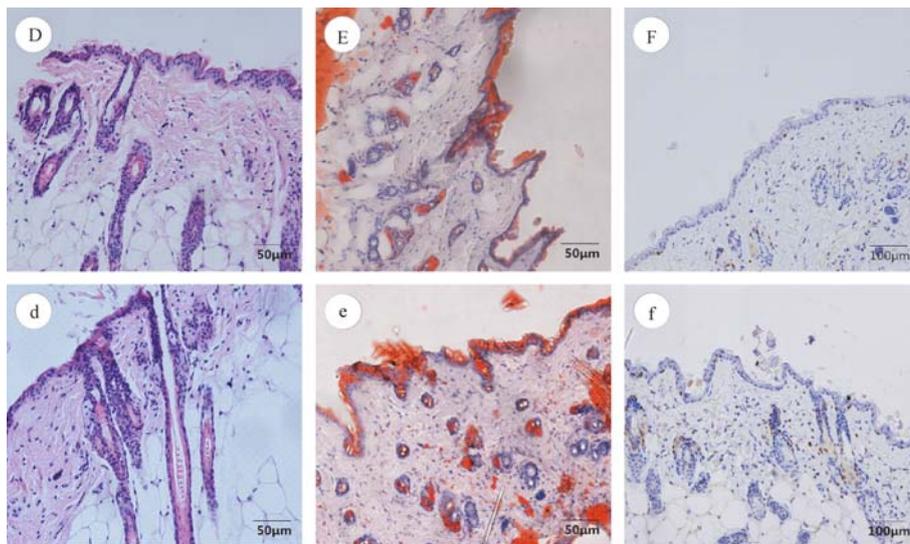


注:(A)对照 7 d 组;(B)对照 12 d 组;(C)对照 16 d 组;(a)实验 7 d 组;(b)实验 12 d 组;(c)实验 16 d 组

**图 1** 对照组和实验组小鼠在毛发和皮肤的变化

Note. (A) Control group at 7 days. (B) Control group at 12 days. (C) Control group at 16 days. (a) Experimental group at 7 days. (b) Experimental group at 12 days. (c) Experimental group at 16 days.

**Fig.1** Control group and experimental group mice's change in hairs and skins



注:(D)对照组;(d)实验组(HE 染色, ×100)。(E)对照组;(e)实验组(油红 O 染色, ×100)。(F)对照组;(f)实验组(免疫组化, ×40)。

**图 2** 对照组、实验组小鼠皮肤组织在病理切片和免疫组化等方面的变化

Note. (D) Control group. (d) Experimental group (HE staining, ×100). (E) Control group. (e) Experimental group (Oil Red O staining, ×100).

(F) Control group. (f) Experimental group (Immunohistochemical staining, ×40).

**Fig.3** Pathological and immunohistochemical changes of the skin tissue of mice in control group and experimental group

表 2 四组小鼠皮肤组织毛孔扩张、Ki67 的表达量 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab. 2 The expressions of the number of pore expansion and Ki67 in skin tissue of mice of four groups

| 组别<br>Groups    | 毛囊扩张<br>The number of pore expansion | Ki67        |
|-----------------|--------------------------------------|-------------|
| I 组 I Group     | 2.20 ± 0.84                          | 0.25 ± 0.14 |
| II 组 II Group   | 19.40 ± 1.52 <sup>#</sup>            | 0.25 ± 0.61 |
| III 组 III Group | 20.80 ± 1.48 <sup>#</sup>            | 0.26 ± 0.02 |
| IV 组 IV Group   | 22.80 ± 2.28 <sup>#</sup>            | 0.26 ± 0.06 |

注:与对照组(I组)相比<sup>#</sup> $P < 0.01$ 。

Note. Compared with control group(I组),<sup>#</sup> $P < 0.01$ .

Mario. E 在 2006 年阐明:基底层中角质形成细胞的 EGFR 受抑制会导致生长受限和过早分化,表现为细胞核相关抗原(Ki67)下调。吴萍等<sup>[13]</sup>的研究也表明:EGFR 和 Ki67 在肿瘤发生、发展过程中呈协同作用。正常表皮中 Ki67 仅在基底层有弱阳性表达<sup>[14]</sup>,该指标可以反应皮肤角质形成细胞的增殖是否受到影响。Ki67 表达于所有活跃的细胞周期阶段,并随细胞周期改变<sup>[21]</sup>。Ki67 单克隆抗体只标记 G1 后期、S 期和 G2 期、M 期细胞核抗原,且 Ki67 抗原半衰期短,这些特点使 Ki67 成为优质的细胞增殖标记物<sup>[22]</sup>。此次动物实验并未得出特罗凯用药前后 Ki67 有统计学上的差异,可能与样本量稍小、小鼠取材前剃毛等因素存在相关性,抑或二者之间本无联系,临床有待进一步研究及验证。

随着靶向药物在临床中的应用逐渐增多,其导致的皮疹等不良反应在临床中也越发常见。但目前我们对特罗凯等靶向药物所致皮疹的原因、发病机制尚未明确,故无有效的、针对性强的药物。本文参考国内外相关文献,复制 TKI 类药物所致的皮疹动物模型,并通过观察小鼠用特罗凯前后在肉眼皮肤、病理切片、免疫组化等方面的改变对其进行验证,同时,进一步探讨了特罗凯的发病机制,为评价外用药物、特别是中成药的有效性及其作用机理提供动物模型。

(致谢:本实验由中日友好医院提供实验室、资金及设备,在此向中日友好医院表示感谢。并向提供部分资金资助的北京市科学技术委员会表示感谢。感谢导师崔慧娟教授的悉心指导,感谢邓博、徐央波、彭艳梅师姐及其他同门在实验过程中的帮助)

#### 参考文献:

[1] Syrigos KN, Saif MW, Karapanagiotou EM, et al. The need for third-line treatment in non-small cell lung cancer: an overview of new options. [J]. Anticancer Res, 2011, 31(2):649-659.

- [2] Segaert S, Chiritescu G, Lemmens L, et al. Skin toxicities of targeted therapies. [J]. Eur J Cancer, 2009, 45(Sup 1):295-308.
- [3] Pérez-Soler R, Delord J P, Halpern A, et al. HER1/EGFR inhibitor-associated rash: future directions for management and investigation outcomes from the HER1/EGFR inhibitor rash management forum. [J]. Oncologist, 2005, 10(5):345-356.
- [4] Pérez-Soler R, Chachoua A, Hammond LA, et al. Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2004, 22(16):3238-3247.
- [5] Saltz LB, Kies MS, Abbruzzese JL, et al. The presence and intensity of the cetuximab-induced acne-like rash predicts increased survival in studies across multiple malignancies [J]. Proc Am Soc Clin Oncol, 2003, 22(abstr817):204.
- [6] 赵洪云, 张阳, 黄河, 等. 厄罗替尼治疗晚期非小细胞肺癌患者的临床疗效[J]. 癌症, 2008, 27(4):393-399.
- [7] Kim ST, Uhm JE, Lee J, et al. Randomized phase II study of gefitinib versus erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer who failed previous chemotherapy [J]. Lung Cancer, 2012, 75(1):82-88.
- [8] Surguladze D, Deevi D, Claros N, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 antagonists alleviate inflammatory skin changes associated with epidermal growth factor receptor antibody therapy in mice[J]. Cancer Res, 2009, 69(14):5643-5647.
- [9] Olausson K A, Dunant A, Fouret P, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy[J]. N Engl J Med, 2006, 355(10):983-991.
- [10] Mak KK, Chan SY. Epidermal growth factor as a biologic switch in hair growth cycle[J]. J Biol Chem, 2003, 278(28):26120-6.
- [11] Lacouture ME. Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(10):803-812.
- [12] Busam KJ, Capodiceci P, Motzer R, et al. Cutaneous side-effects in cancer patients treated with the anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 [J]. Br J Dermatol, 2001, 144(6):1169-1176.
- [13] 吴萍, 张锦, 李蓉, 等. 表皮生长因子受体 EGFR 和 Ki67 在非小细胞肺癌中的表达及其相关性研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2004, 11(9):913-918.
- [14] 张敏, 张谊之, 李俸媛. 银屑病皮损区 c-myc、c-jun、Ki-67、PCNA、VEGF 的表达[J]. 四川大学学报(医学版), 2002, 33(3):427-430.
- [15] Lacouture ME. Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(10):803-812.
- [16] Lenz HJ. Anti-EGFR mechanism of action: antitumor effect and underlying cause of adverse events [J]. Oncology (Williston Park), 2006, 20(5 Suppl2):5-13.
- [17] 钱军, 李慧, 秦叔逵. EGFR 皮肤毒性的发生机制和处理策略[J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(6):1186-1191.
- [18] Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2004, 351(4):337-345.

- [19] Lacouture ME, Lai SE. The PRIDE (Papulopustules and/or paronychia, Regulatory abnormalities of hair growth, Itching, and Dryness due to Epidermal growth factor receptor inhibitors) syndrome[J]. Br J Dermatol, 2006, 155(4):852-854.
- [20] Guttman-Yassky E, Mita A, De Jonge M, et al. Characterisation of the cutaneous pathology in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with the EGFR tyrosine kinase inhibitor erlotinib [J]. Eur J Cancer, 2010, 46(11):2010-2019.
- [21] Romero Q, Bendahl PO, Klintman M, et al. Ki67 proliferation in core biopsies versus surgical samples-a model for neo-adjuvant breast cancer studies[J]. BMC Cancer, 2011, 11(1):341.
- [22] Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, et al. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(2):174-183.

[收稿日期]2016-06-13

## (上接第 15 页)

- [3] Souchelnytskyi S, Tamaki K, Engström U, et al. Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor- $\beta$  signaling [J]. J Biol Chem, 1997, 272(44):28107-28115.
- [4] Shi Y, Hata A, Lo RS, et al. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4 [J]. Nature, 1997, 388(6637):87-93.
- [5] Chacko BM, Qin B, Correia JJ, et al. The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization [J]. Nat Struct Mol Biol, 2001, 8(3):248-253.
- [6] Chacko BM, Qin BY, Tiwari A, et al. Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF- $\beta$  signaling [J]. Mol Cell, 2004, 15(5):813-823.
- [7] Liu F, Xie W, Liu Z, et al. Role of Smad3 linker phosphorylation in breast cancer progression [J]. Cancer Res, 2015, 75(15 Supplement):4940-4940.
- [8] Luwor RB, Hakmana D, Iaria J, et al. Single live cell TGF- $\beta$  signalling imaging: breast cancer cell motility and migration is driven by sub-populations of cells with dynamic TGF- $\beta$ -Smad3 activity [J]. Mol Cancer, 2015, 14(1):1.
- [9] Holland EC. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models [J]. Nature Rev Genet, 2001, 2(2):120-129.
- [10] Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, et al. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research [J]. Cancer Treat Rev, 2010, 36(3):206-215.
- [11] Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment [J]. Trends Pharmacol Sci, 2003, 24(2):96-102.
- [12] Pasche B. Role of transforming growth factor beta in cancer [J]. J Cell Physiol, 2001, 186(2):153-168.
- [13] Rich J. The role of transforming growth factor-beta in primary brain tumors [J]. Front Biosci, 2003, 8:245-260.
- [14] Korpál M, Yan J, Lu X, et al. Imaging transforming growth factor- $\beta$  signaling dynamics and therapeutic response in breast cancer bone metastasis [J]. Nat Med, 2009, 15(8):960-966.
- [15] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling [J]. Nature, 2003, 425(6958):577-584.
- [16] Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- $\beta$  in homeostasis and cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(11):807-820.
- [17] Jimin M, Ihn H, Tamaki K. Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad3, and its effect on transforming growth factor- $\beta$ 1-induced extracellular matrix expression [J]. Mol Pharmacol, 2006, 69(2):597-607.

[收稿日期]2016-06-14



# 不同时间点不同应激方法致大鼠焦虑样行为的研究

赵洪庆<sup>1</sup>, 韩远山<sup>2</sup>, 杜青<sup>1</sup>, 杨琴<sup>2</sup>, 王宇红<sup>1\*</sup>, 杨蕙<sup>2</sup>, 孟盼<sup>1</sup>

(1. 湖南中医药大学, 湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地, 长沙 410208;  
2. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

**【摘要】目的** 从不同时间点比较几种不同的应激方法建立焦虑大鼠模型的生物学特点, 为寻找最合适的造模方法提供实验依据。**方法** 70只大鼠随机分为正常组、空瓶应激组、慢性情绪应激(chronic emotional stress, CES)组、束缚应激3 h组、束缚应激6 h组, 分别进行造模, 于实验第7 d、14 d、21 d分别采用高架十字迷宫和场景恐惧测试测定大鼠的焦虑样行为, 旷场测试考察大鼠的焦虑或抑郁样行为, 强迫游泳实验测定大鼠的抑郁样行为, 采用Elisa试剂盒检测大鼠海马组织中5-HT、DA含量。**结果** 焦虑样行为学测试结果表明, 第14天起, 空瓶应激组、CES组、束缚应激6 h组大鼠开始产生焦虑样行为, 此后焦虑样行为愈发明显, 强迫游泳实验结果表明, 束缚6 h组大鼠的不动时间于第7 d起即显著增加( $P < 0.05$ )。同时, 与正常大鼠比较, 空瓶应激组和CES组大鼠海马5-HT、DA含量于第14天开始显著上升( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。**结论** 在上述几种焦虑模型中, 束缚应激3 h焦虑样行为不明显; 束缚应激6 h可能由于应激时间过长, 表现出抑郁样行为。空瓶应激和CES能成功建立焦虑大鼠模型, 且其焦虑行为表征有一定差异, 可根据不同的实验目的选择对应的模型方法。

**【关键词】** 焦虑模型; 空瓶应激; 慢性情绪应激; 慢性束缚应激

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0022-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.005

## Research of different methods of stress-induced anxiety-like behavior in rats at different time points

ZHAO Hong-qing<sup>1</sup>, HAN Yuan-shan<sup>2</sup>, DU Qing<sup>1</sup>, YANG Qin<sup>2</sup>, WANG Yu-hong<sup>1\*</sup>, YANG Hui<sup>2</sup>, MENG Pan<sup>1</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Training Bases, Hunan Key Laboratory of Chinese Materia Medica Powder and Innovative Drugs Established by Provincial and Ministry, Changsha 410208, China;  
2. First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

**【Abstract】Objective** To compare the biological characteristics of several different anxiety rat models established by different methods of stress at different time points and provide experimental basis for the most appropriate modeling methods. **Methods** 60 rats were randomly divided into normal, empty bottle stress, chronic emotional stress (CES) group, restraint stress for 3h, 6h, and modeling respectively. In the experimental 7 d, 14 d, 21 d, elevated plus maze and fear condition system was used to test anxiety-like behavior in rats, open field test to study anxiety or depression-like behavior, forced swimming test was used to detect depression-like behavior in rats, and using the Elisa test kit to detect the contents of 5-HT, DA in the hippocampus in rats. **Results** Anxiety-like behavioral test results showed that rats in empty bottle stress, CES, 6 h restraint stress group started to have anxiety-like behavior since 14 d, then anxiety-like behavior

[基金项目] 湖南省科技厅重点项目(2015DK3003); 湖南省研究生创新课题(CX2016B371, 2016CX14)。

[作者简介] 赵洪庆(1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药神经药理。E-mail: 516005398@qq.com

[通讯作者] 王宇红(1965-), 女, 博士生导师, 研究方向: 中药神经药理。E-mail: wyh107@126.com

was becoming increasingly apparent. Forced swimming test results showed that immobility time in 6 h restraint rats was significantly increased in the first 7 d ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, compared with control group, hippocampal 5-HT, DA contents in empty bottle stress and CES rats increased significantly since 14 d. **Conclusions** Among several stress methods established anxiety model, anxiety-like behavior in 3 h restraint stress was not obvious; 6 h restraint stress exhibited a depression-like behavior in the forced swimming test might be due to prolonged stress. Empty bottle stress and CES can successfully establish the anxiety rat model, and the anxiety behavior of the rats have some differences. Corresponding model methods can be selected according to different experimental purposes.

**【Key words】** Anxiety model; Empty bottle stress; Chronic emotional stress; Chronic restraint stress

焦虑症是以焦虑为主要特征的神经症,临床表现为没有事实根据也无明确客观对象的紧张担心、恐惧不安等情绪。随着人们工作和生活节奏的加快,焦虑症的发病率呈明显上升趋势,已成为世界性的公共卫生问题。流行病学调查显示,焦虑症的终生患病率为 5%,而用于该病的费用约占精神类疾病支出总费用的 30%<sup>[1]</sup>。对焦虑症发病机制的研究已成为目前医学关注的热点,而寻找一种客观、规范、重复性好的动物模型,是研究疾病的重要基础。目前,建立焦虑动物模型多采用慢性心理应激的方法,主要包括不确定性空瓶饮水应激、慢性情绪应激(chronic emotional stress, CES)、慢性束缚应激三大类<sup>[2]</sup>。本研究旨在建立上述三类焦虑动物模型,并基于不同时间点,从动物行为学到脑内单胺递质含量进行比较研究,寻找最合适的焦虑动物应激模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 70 只,雄性,200~220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2013-0004],饲养于湖南中医药大学第一附属医院 SPF 级实验动物中心[SYXK(湘)2015-0003]。大鼠购入后先适应性饲养 5 d,实验期间大鼠均在室温( $24 \pm 2$ )℃、相对湿度( $50 \pm 5$ )% 环境下喂养。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

### 1.2 试剂与仪器

大鼠 5-HT、DA 酶联免疫分析(Elisa)试剂盒购自 Sigma 公司;DL-1 高架十字迷宫购自长沙肯基科技发展有限公司;5417R 低温高速离心机购自 Eppendorf 公司;MultiskanMK3 型酶标仪购自 Thermo 公司;斯金纳箱购自 Panlab 公司;大鼠束缚器购自安徽正华生物仪器公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物分组与造模

70 只 SD 大鼠共分为 5 个组,包括正常组、空瓶应激组、CES 组、束缚应激 3 h 组,束缚应激 6 h 组,每组 14 只。除正常组外,各模型组均按各自造模方法进行造模(具体造模方法如下),分别于实验第 7 d、14 d、21 d 进行行为学测试,并于行为学测试完成后麻醉部分大鼠,断头取脑,在冰盘上迅速剥离双侧海马,液氮中速冻保存,待测单胺类递质 5-HT、DA 含量。

空瓶应激组:采用不确定性空瓶饮水应激模型,进行定时喂水训练 7 d。定时喂水训练为每日 2 次,时间分别为 8:00~8:10 和 18:00~18:10,此两个时间段内给动物饮水,其他时间不再给水。7 d 后开始进行应激实验,在上述两个时间段内随机选取一个作为空瓶应激时间点,给动物以空水瓶诱发其情绪应激,另一个时间段给动物饮水<sup>[3]</sup>。

CES 组:采用慢性应激的方法,动物每笼 4 只,应激方法包括光照或黑暗 24 h,拥挤 24 h,孤养 24 h,每天下午 3:00~6:00 禁食或禁水 1 h,电击(20 次,持续 5 s,10 mA,间隔 30 s),45°倾笼 24 h,每天采用 1 种应激,同种应激不连续出现<sup>[4]</sup>。

慢性束缚应激 3 h 组:将动物束缚于特制的束缚器上,每日上午束缚 1 次,每次 3 h<sup>[5]</sup>。

慢性束缚应激 6 h 组:将动物束缚于特制的束缚器上,每天 9:00~15:00 进行束缚,共 6 h<sup>[6]</sup>。

#### 1.3.2 高架十字迷宫实验

将大鼠放入迷宫的中央平台处,使其头部正对封闭臂,释放后记录以下指标:① 进入开放臂次数(OE);② 进入封闭臂次数(CE)③ 进入开放臂时间(OT);④ 进入封闭臂时间(CT)。由上述指标计算出:① 进入开放臂的比例(OE%): $OE/(OE+CE) \times 100\%$ ;② 开放臂停留时间比例(OT%): $OT/(OT+CT) \times 100\%$ 。每只大鼠测试 5 min。

#### 1.3.3 旷场测试

将大鼠放入到一个长宽高为 80 cm×80 cm×40 cm 的黑色敞箱中,敞箱底面平均划分为 25 个小方

格。实验前 30 min 将待测大鼠放入测试房间,大鼠从敞箱中央放入,观察记录大鼠 4 min 内水平运动格数以及垂直竖立次数,计算水平和垂直得分的总和。

#### 1.3.4 场景恐惧测试

测试前 1 d 对大鼠进行训练,大鼠在斯金纳箱适应 2 min 后,给予 30 s 的噪音(5 kHz, 75 dB),在噪音结束最后 2 s 同时给予电击(50 V),大鼠继续呆在箱内 30 s,然后取出放回笼内,24 h 后进行测试,将大鼠放入斯金纳箱,2 min 后给予 60 s 的噪音,记录 60 s 内大鼠的不动(freezing)时间百分比<sup>[7]</sup>。

#### 1.3.5 强迫游泳实验

将大鼠放入高、直径为 50 cm × 20 cm 的圆柱形水缸中,水深约 40 cm,水温保持在(25 ± 2)℃。实验开始后 1 min 为适应时间,适应结束后记录 5 min 内大鼠的不动时间(大鼠两前爪停止游动,身体呈漂浮状态记为不动)。

#### 1.3.6 Elisa 检测

试剂盒采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验。往预先包被 5-HT、DA 抗体的微孔中,依次加入标本、标准品、HRP 标记的检测抗体,经过温育并彻底洗涤。用底物 TMB 显色,TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的

黄色。颜色的深浅与脑内单胺递质含量呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定光密度值。

#### 1.4 统计学方法

使用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计,实验数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间差异比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐时采用 LSD 检验法,方差不齐时采用 Dunnett's T3 进行两两比较, $P < 0.05$  表示有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高架十字迷宫实验结果

结果见表 1。从第 14 天开始,空瓶应激组、CES 组、束缚应激 6 h 组大鼠的 OE% 值、OT% 值均显著下降,差异都统计学意义( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。其中,CES 组大鼠在开臂中的次数及停留时间均明显比其他组少,大鼠爬到封闭臂后即进入不动状态。

### 2.2 旷场测试结果

结果见表 2。与正常组比较,空瓶应激组、CES 组、束缚应激 6 h 组大鼠的自主活动次数均在 14 d 开始显著下降,其中,CES 组下降的最为显著,其活动次数类似于抑郁模型大鼠。此外,束缚应激 3 h 组大鼠活动次数有所下降,但结果无统计学意义。

表 1 各组大鼠高架十字迷宫结果比较( $\bar{x} \pm s, n = 8, \%$ )  
Tab. 1 Comparison of the elevated plus maze results in each group

| 组别<br>Groups                    | 7 d        |            | 14 d         |             | 21 d        |             |
|---------------------------------|------------|------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
|                                 | OE         | OT         | OE           | OT          | OE          | OT          |
| 正常组<br>Control group            | 40.0 ± 7.6 | 17.5 ± 4.0 | 42.1 ± 11.7  | 16.7 ± 4.3  | 37.8 ± 6.5  | 17.7 ± 4.8  |
| 空瓶组<br>Empty bottle group       | 43.2 ± 9.4 | 17.9 ± 9.3 | 27.8 ± 7.6*  | 10.7 ± 3.5  | 22.5 ± 3.2* | 8.1 ± 3.8** |
| CES 组<br>CES group              | 32.5 ± 9.9 | 11.4 ± 5.3 | 4.5 ± 3.2**  | 4.8 ± 2.7** | 4.9 ± 2.8** | 3.3 ± 1.7** |
| 束缚 3 h 组<br>3 h restraint group | 39.6 ± 6.5 | 19.7 ± 4.6 | 34.6 ± 12.2  | 13.0 ± 4.2  | 26.7 ± 7.8  | 13.1 ± 5.4  |
| 束缚 6 h 组<br>6 h restraint group | 29.1 ± 9.1 | 10.4 ± 5.6 | 17.5 ± 8.3** | 6.3 ± 3.4** | 16.6 ± 7.5* | 9.9 ± 2.1*  |

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

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

表 2 各组大鼠自主活动情况( $\bar{x} \pm s, n = 8, \text{num}$ )  
Tab. 2 Comparison of the locomotor activity results in each group

| 组别 Groups                    | 7 d         | 14 d         | 21 d         |
|------------------------------|-------------|--------------|--------------|
| 正常组 Control group            | 81.7 ± 16.2 | 57.3 ± 26.7  | 52.0 ± 16.3  |
| 空瓶组 Empty bottle group       | 47.5 ± 15.6 | 26.5 ± 12.1* | 24.6 ± 9.3*  |
| CES 组 CES group              | 82.0 ± 21.8 | 3.4 ± 1.5**  | 3.1 ± 0.8**  |
| 束缚 3 h 组 3 h restraint group | 84.8 ± 18.0 | 44.7 ± 22.8  | 46.0 ± 15.7  |
| 束缚 6 h 组 6 h restraint group | 77.5 ± 23.8 | 37.8 ± 19.8* | 17.7 ± 10.8* |

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

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

**表 3** 各组大鼠场景恐惧 freezing 时间比( $\bar{x} \pm s, n = 8, \%$ )  
**Tab.3** Comparison of freezing time in fear condition test in each group

| 组别 Groups                    | 7 d        | 14 d          | 21 d         |
|------------------------------|------------|---------------|--------------|
| 正常组 Control group            | 11.7 ± 4.2 | 39.3 ± 20.0   | 38.1 ± 17.7  |
| 空瓶组 Empty bottle group       | 8.5 ± 3.6  | 79.9 ± 20.9** | 81.7 ± 9.3** |
| CES 组 CES group              | 12.1 ± 3.8 | 89.3 ± 20.1** | 84.0 ± 21.1* |
| 束缚 3 h 组 3 h restraint group | 9.5 ± 5.0  | 78.2 ± 14.9** | 76.6 ± 15.7* |
| 束缚 6 h 组 6 h restraint group | 19.5 ± 7.8 | 76.9 ± 11.7*  | 75.2 ± 21.3* |

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。  
Note. Compared with control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ .

**表 4** 各组大鼠强迫游泳不动时间比较( $\bar{x} \pm s, n = 8, s$ )  
**Tab.4** Comparison of immobile time in forced swimming testin each group

| 组别 Groups                   | 7 d         | 14 d          | 21 d          |
|-----------------------------|-------------|---------------|---------------|
| 正常组 Control group           | 5.3 ± 2.5   | 10.5 ± 2.1    | 18.5 ± 7.8    |
| 空瓶组 Empty bottle group      | 10.0 ± 2.1  | 8.5 ± 3.4     | 19.7 ± 13.4   |
| CES 组 CES group             | 9.5 ± 2.5   | 17.7 ± 6.6    | 21.6 ± 9.3    |
| 束缚 3h 组 3 h restraint group | 8.1 ± 3.0   | 18.3 ± 7.7    | 19.0 ± 13.5   |
| 束缚 6h 组 6 h restraint group | 14.7 ± 7.5* | 41.6 ± 11.9** | 62.0 ± 25.6** |

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。  
Note. Compared with control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ .

**表 5** 各组大鼠脑海马组织 5-HT、DA 含量( $\bar{x} \pm s, n = 6, \text{pg/mg}$ )  
**Tab.5** Comparison of the contents of 5-HT、DA in rats brainin each group

| 组别 Groups                       | 5-HT         |               |                | DAT          |              |               |
|---------------------------------|--------------|---------------|----------------|--------------|--------------|---------------|
|                                 | 7 d          | 14 d          | 21 d           | 7 d          | 14 d         | 21 d          |
| 正常组<br>Control group            | 288.4 ± 76.3 | 287.3 ± 41.4  | 292.1 ± 48.4   | 147.5 ± 31.3 | 150.7 ± 25.3 | 145.1 ± 18.7  |
| 空瓶组<br>Empty bottle group       | 290.1 ± 44.3 | 297.8 ± 89.5  | 317.0 ± 38.3*  | 149.3 ± 43.3 | 156.5 ± 22.8 | 157.7 ± 12.8* |
| CES 组<br>CES group              | 285.4 ± 62.1 | 337.8 ± 55.7* | 359.4 ± 57.9** | 151.3 ± 37.8 | 159.0 ± 21.5 | 165.0 ± 17.4* |
| 束缚 3 h 组<br>3 h restraint group | 291.2 ± 78.3 | 289.0 ± 31.2  | 282.5 ± 57.2   | 150.4 ± 12.2 | 152.5 ± 42.9 | 147.8 ± 27.3  |
| 束缚 6 h 组<br>6 h restraint group | 293.4 ± 32.2 | 284.5 ± 42.3  | 279.5 ± 31.5   | 142.4 ± 21.7 | 146.3 ± 61.0 | 142.4 ± 47.8  |

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。  
Note. Compared with control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ .

### 2.3 场景恐惧测试结果

结果见表 3。与正常组比较,各模型组大鼠从第 14 天开始 freezing 时间显著增加,并且趋于稳定。各模型组之间 freezing 时间差别不大,无统计意义。

### 2.4 强迫游泳实验结果

结果见表 4。与正常组比较,束缚应激 6 h 组大鼠从第 7 天开始不动时间显著增加,并随着造模时间的增加,不动时间增加。其余组与正常组比较均无统计学意义,表明该组大鼠无明显的抑郁样行为。

### 2.5 Elisa 检测结果

结果见表 5。与正常组比较,21 d 时空瓶应激组和 CES 组大鼠脑海马组织 5-HT、DA 含量明显上升,其中 CES 组上升最为显著。同时,与正常组比较,束缚应激 3 h 和 6 h 组大鼠脑内的 5-HT、DA 含量与正常组差别不大,其中束缚应激 6 h 组 5-HT、DA 含量均有逐渐下降趋势。

## 3 讨论

慢性应激是焦虑抑郁等情绪疾病的重要发病因素之一,也是建立情绪类疾病动物模型的常用方法。本实验通过对比分析三类不同的焦虑动物模型应激方法,通过不同时间点摸索各应激模型的特点,从动物行为学及脑内神经递质改变两方面,寻找一种模拟临床疾病特征的焦虑动物模型。

高架十字迷宫是以动物在新环境下的探究特性和对高悬空旷环境的恐惧特性之间形成的矛盾心理来模仿人类的焦虑状态,是经典的动物焦虑行为测试仪器。本实验研究发现,除束缚 3 h 组外,各模型组自 14 d 开始 OE%、OT% 值显著下降,显示各组动物均表现出明显的焦虑行为。场景恐惧测试是用于研究啮齿类动物环境相关条件性恐惧的实验。啮齿类动物在恐惧时会表现出特有的不动状态(freezing),保持静止不动的防御姿势,常用于研究

焦虑样行为<sup>[8]</sup>。本实验研究发现,与正常组比较,各焦虑模型组的 freezing 时间均显著上升。巧合的是,和高架十字迷宫测试结果类似,CES 组大鼠的 freezing 时间也是各模型组中最长的,说明此两种焦虑样行为测试结果可能具有一定的关联性。

旷场实验是评价实验动物在新异环境中自主行为、探究行为与紧张度的一种常用行为学方法,常用于检测实验动物的焦虑或抑郁样行为<sup>[9]</sup>。本实验研究发现,相比于正常组,空瓶应激组、CES 组、束缚应激 3 h 和 6 h 组大鼠的自主活动次数均下降,与文献报道相符合<sup>[10]</sup>。然而,令人惊奇的发现是 CES 组大鼠在第 14、21 天的测试中都是直接躲到敞箱角落不动,与以往课题组研究的抑郁大鼠表现相类似,而该组大鼠在笼内时十分活泼,强迫游泳实验结果也表明,在绝望状态下该组大鼠的不动时间很短,与正常组无差异,说明无明显抑郁样行为。为了探索大鼠的这一行为,将笼内其余大鼠放入敞箱,发现原来躲在角落的大鼠开始有探索行为,并最终四只大鼠各占据敞箱一角。经查阅书籍文献并联系其他行为学结果,本课题组确定该行为也属于焦虑障碍的一种,急性焦虑或者称之为惊恐障碍,表现出反复强烈的惊恐状态。

强迫游泳实验是使动物处于绝望状态,是最常用的研究动物抑郁样行为的测试方法,广泛用于抗抑郁药物的研究<sup>[11]</sup>。根据本实验结果,除慢性束缚应激 6 h 外,其余组与正常组比较,无统计学意义,说明其余模型组动物并不表现出抑郁样行为。综合行为学结果发现,束缚应激 6 h 能同时诱导出焦虑和抑郁样行为,而焦虑和抑郁是关联性很强的两种疾病,因此应激造模过程中可能由焦虑逐渐向抑郁行为过渡,两种疾病伴随着发生。然而,由于表现出抑郁行为,因此束缚应激 6 h 不能作为焦虑动物模型的最优选择。

单胺神经递质假说是关于焦虑症发病机制的一种经典假说,假说认为,单胺类神经递质的改变在焦虑症的发病过程中起着关键作用<sup>[12]</sup>。研究表明,焦虑症患者及焦虑模型大鼠都存在脑内单胺递质含量升高的现象<sup>[13-14]</sup>。本实验观察的单胺类神经递质 5-HT、DA 均是与焦虑发生有密切关系的神经递质。实验结果表明,与正常组比较,21 d 时空瓶应激组大鼠海马 5-HT、DA 含量显著升高,CES 组则从第 14 天起即显著上升,而慢性束缚 3 h 和 6 h 组并未有明显的改变,甚至还有下降的趋势。此外,

本实验发现在各模型组中,CES 组单胺递质含量上升最为显著,表明在惊恐状态下脑内单胺递质可能会有明显的上升,该结论需要进一步的研究验证。

综上所述,本实验研究发现,在几种常用的慢性应激焦虑模型方法中,空瓶应激和 CES 均能成功建立焦虑模型,其中空瓶应激建立焦虑模型时程以 21 d 最佳,CES 模型则以 14 d 为最佳。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Weisberg RB. Overview of generalized anxiety disorder: epidemiology, presentation, and course [J]. *J Clin Psychiatry*, 2009,70 (6) :4 - 10.
- [ 2 ] 杨超, 丰广魁. 焦虑动物模型造模方法述评 [J]. *广州中医药大学学报*, 2015, 32(11) :1135 - 1138.
- [ 3 ] 董宁, 唐启盛, 赵瑞珍, 等. 疏肝清热健脾法对广泛性焦虑大鼠脑内 bax、bcl-2 表达的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2015, 38(6) :383 - 387.
- [ 4 ] Golkar, Armital, Johansson, *et al.* The Influence of Work-Related Chronic Stress on the Regulation of Emotion and on Functional Connectivity in the Brain [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(9) :1 - 11.
- [ 5 ] 赵宏波, 白晓晖, 李晓娟. 逍遥散治疗慢性束缚应激焦虑模型大鼠行为学评价 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(5) :1669 - 1673.
- [ 6 ] 张俊芳, 张忠敏, 赵鑫, 等. 磷酸二酯酶 4 抑制剂利咯利普兰逆转慢性束缚应激诱导的大鼠抑郁和焦虑样行为 [J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(10) :1729 - 1739.
- [ 7 ] Catherine S John, Elizabeth I Sypek, William A, *et al.* Blockade of the GLT-1 Transporter in the Central Nucleus of the Amygdala Induces Both Anxiety and Depressive-Like Symptoms [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2015, 40(7) :1700 - 1708.
- [ 8 ] 陈伟海, 乔婧, 杨瑜. 情景变换诱发已消退恐惧记忆重现的神经环路 [J]. *心理科学进展*, 2014, 22(10) :1585 - 1596.
- [ 9 ] Valentina Gigliuccia, Shane Gormley, Sinead Gibney, *et al.* Characterisation of the antidepressant properties of nitric oxide synthase inhibitors in the olfactory bulbectomised rat model of depression [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2014, 24(8) :1349 - 1361.
- [ 10 ] 孙世光, 李子峰, 刘健, 等. 昆明小鼠焦虑与抑郁动物模型相关性研究:明暗箱实验与悬尾实验 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(2) :289 - 293.
- [ 11 ] 孙秀萍, 李腾飞, 石哲, 等. 人参总皂苷和远志总苷配伍对小鼠抗抑郁作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(6) :30 - 36.
- [ 12 ] 胡秦, 刘新民. 神经递质与焦虑动物模型 [J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(10) :635 - 638.
- [ 13 ] 和昱辰, 张波, 瞿玮, 等. 血清单胺类神经递质及其代谢产物在重度抑郁症及抑郁共病焦虑障碍诊断中的应用 [J]. *中药材*, 2014, 36(8) :806 - 810.
- [ 14 ] 闫智勇, 张天娥, 彭佳, 等. 蜘蛛香对焦虑模型大鼠行为学及脑组织神经递质含量的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2008, 24(3) :67 - 69.

[ 收稿日期 ] 2016 - 06 - 15



# 比格犬蠕形螨病的诊疗与病理组织学观察

温福利<sup>1</sup>, 徐洪齐<sup>2</sup>, 熊爱兰<sup>2</sup>, 马雷<sup>1</sup>, 张诗兰<sup>1</sup>, 郑和平<sup>1\*</sup>

(1. 南京军区福州总医院比较医学科, 福州 350025; 2. 福州动物缘宠物医院, 福州 35001)

**【摘要】** 目的 对感染蠕形螨的比格犬进行诊疗及病理组织学观察。方法 直接涂片法进行显微镜检查, 常规石蜡切片及 HE 染色后进行病理组织学观察。结果 (1) 临床观察: 患病犬四肢、眼周、下腹部等部位皮肤出现红点, 患部脱毛, 四肢皮肤变厚起皱褶; (2) 血液常规检查: 基本正常; (3) 显微镜观察: 发现大量犬蠕形螨小型虫体和虫卵; (4) 病理组织学观察: 毛囊内见大量犬蠕形螨虫体和虫卵, 皮脂腺和汗腺结构正常, 均未见螨体寄生。毛囊周围见大量嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞浸润, 同时可见多灶性肉芽肿形成, 肉芽肿呈椭圆形; (5) 治疗方案: 采用联合用药进行治疗, 加强环境控制, 疗效显著。结论 犬蠕形螨引起的肉芽肿可划分为免疫性肉芽肿; 小型虫体感染后可能不会破坏皮脂腺, 皮脂腺是否感染虫体可能与虫体种类或感染病程相关。

**【关键词】** 犬蠕形螨; 皮脂腺; 肉芽肿

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0027-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.006

## Treatment and pathological observation of *demodex canis* in beagle dogs

WEN Fu-li<sup>1</sup>, XU Hong-qi<sup>2</sup>, Xiong Ai-lan<sup>2</sup>, MA Lei<sup>1</sup>, ZHANG Shi-lan<sup>1</sup>, ZHENG He-ping<sup>1\*</sup>

(1. Department of Comparative Medicine, Fuzhou General Hospital of Nanjing Command, PLA, Fuzhou 350025, China;  
2. Fuzhou Animal Fate Pet Hospital, Fuzhou 350025, China)

**【Abstract】 Objective** Treatment and histopathological observation of *demodex canis* in beagle dogs. **Methods** Using the method of direct smear for microscopic examination of *demodex canis*. Histopathological observation on the skin of the parasitic parts after routine paraffin section and HE staining. **Results** (1) Clinical observation: The red spots and hair removal was appeared on limbs, eyes, lower abdomen and other parts of the skin of canine patients. The skin of the limbs becomes thicker and wrinkles. (2) Blood routine examination: Basically normal. (3) Microscope observation: The results showed that a large number of worms and eggs of small *demodex canis* could be found. (4) Histopathological observation: Hair follicles showed a large number of *demodex mites and eggs*. The sebaceous glands and sweat glands have normal morphology and no mites was found. A large number of eosinophils and neutrophil infiltration were seen around the hair follicles. It was also found that the formation of multifocal granuloma; the granuloma was oval shaped. (5) Treatment programme: The combination of medication and the strengthening of environmental control has been shown to be effective. **Conclusions** Granuloma caused by *demodex canis* can be divided into immune granuloma. It may not be possible to destroy the sebaceous glands after infection with small *demodex canis*. Whether the sebaceous gland is infected with the *demodex canis* may be associated with the worm species or course of disease.

**【Key words】** *Demodex canis*; Sebaceous glands; Granuloma

[基金项目] 福建省科技计划引导性项目(2015Y0075); 南京军区福州总医院临床应用研究专项(2015L01)。

[作者简介] 温福利(1987-), 男, 技师, 专业: 实验动物寄生虫研究。E-mail: wen\_fuli@163.com

[通讯作者] 郑和平(1962-), 男, 教授, 主任医师, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: zhpfz@163.com

犬蠕形螨病 (Demodicosis canis) 是由犬蠕形螨 (*Demodex canis*) 引起的一种常见寄生虫病<sup>[1]</sup>。该病寄生位置的描述通常是毛囊或皮脂腺,关于虫体种类与皮脂腺寄生位置的关系未有定论。目前,国外报道寄生于犬的蠕形螨有 3 种,在形态上和宿主的寄生位置上有所不同<sup>[2,3]</sup>。国内调查发现犬蠕形螨有大型虫体和小型虫体两种,大型虫体的报道较多,鲜有关于小型虫体的报道。本文对患病比格犬进行镜检后发现大量犬蠕形螨小型虫体,通过血常规和病理检查作进一步分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

比格犬 10 只,雄性,9~11 月龄,平均体重为 9.43 kg。外购于青岛某有资质的实验动物生产单位 [SCXK(鲁)2012-0003],出生后犬瘟和六联疫苗免疫,有 6 次体内驱虫记录,合格证编号为 0016658。饲养于南京军区福州总医院比较医学科普通环境 [SYXK(闽)2013-0005],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

辛硫磷浇泼溶液(商品名:除癞灵),规格:10 mL:4 g,生产批号:20150801,天津市保灵动物保健品有限公司生产;阿苯达唑伊维菌素预混剂,规格:100 g:阿苯达唑 6 g + 伊维菌素 0.25 g,生产批号:20150901,江西双实药业有限公司生产;伊维菌素注射液(商品名:癣螨净),规格:2 mL:0.02 g,生产批号:20150501,吉林省五星动物保健药厂生产;PE-6800vet 全自动动物血液细胞分析仪,深圳市普康电子有限公司;EG1150H 石蜡包埋机,德国徕卡公司;RM2245 半自动轮转式切片机,德国徕卡公司;GHP-9080 隔水式恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;ST5020 多功能染色机,德国徕卡公司;CV5030 自动化玻片盖片机,德国徕卡公司;DM2000 生物显微镜,德国徕卡公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 显微镜检查

采用直接涂片法进行检查。用小刀刮取患部皮肤结节或脓汁置于载玻片上,滴加 5% 甘油后盖上盖玻片,在显微镜下观察,拍照后测量虫体长度。

#### 1.3.2 血液常规检查和病理组织学观察

将 1 只具犬蠕形螨病典型临床症状的患病犬麻醉后置于手术台上,前肢静脉血管采集血液后接于

标记的 EDTA 抗凝管中,对患病犬进行血液常规检查。用灭菌手术刀在患部切取一小块皮肤(1 cm × 1 cm × 0.5 cm),置于 10% 福尔马林溶液固定 24 h。梯度脱水后二甲苯透明,常规石蜡包埋,切片后进行 HE 染色,中性树胶封片后,显微镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 临床观察

对 7 只患病犬进行观察发现,犬蠕形螨感染早期在四肢及下腹部皮肤出现红点,随后蔓延到颈部、眼周、鼻部、嘴唇等部位。患部均出现脱毛、脱屑症状,四肢皮肤变厚起皱褶,耳缘可见黑褐色结痂。雄性犬阴茎口可见黄绿色脓液,奶头发白。感染后期病犬的大腿根部、眼周及腹部两侧皮肤变成灰蓝色,患部见较厚结痂,出现精神沉郁、食欲废绝、呕吐清水症状。根据患病犬的临床症状,初步诊断为犬蠕形螨病。

### 2.2 血液常规检查

检查结果提示患病犬基本正常,RBC、HCT、RDW-SD 三项指标偏低,MCH、MCHC、PLT 三项指标偏高,WBC、GRAN%、GRAN# 三项指标处于参考临界值内的高位,其余检测指标均在参考值范围内(见表 1)。

### 2.3 实验室镜检结果

犬蠕形螨的虫体较小,借助于显微镜及其计算机辅助系统对虫体和虫卵形态特征进行观察鉴定(Leica DM2000, LAS V4.0)。镜下见大量的犬蠕形螨虫体和虫卵,成虫平均大小为 162.43 μm × 27.21 μm,鉴定为小型虫体。虫体和虫卵呈乳白色半透明,幼虫有 3 对足,若虫可见 4 对足,外形与成虫相似,体形较小。成虫外型上分为颚体、足体、末体 3 各部分,咽呈向后开口的马蹄铁状(见图 1)。

### 2.4 病理组织学观察

HE 染色切片中,毛囊内可见大量被切成纵、横等不同断面的犬蠕形螨虫体和虫卵。皮脂腺和汗腺结构正常,均未见螨体寄生。毛囊周围见大量嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞浸润。聚集的中性细胞核呈杆状或 2~5 分叶状,胞质粉红色,有颗粒。嗜酸性粒细胞核的形状与嗜中性粒细胞相似,有 2~3 叶,呈眼镜状,深紫色。切片镜下见多灶性肉芽肿,呈椭圆形,中央呈凝固性坏死,巨噬细胞及上皮样细胞聚集,大多在活虫入侵的毛囊周围形成(见图 2)。

表 1 患病犬血常规检测结果  
Tab. 1 The results of blood routine examination in dogs

| 检测项目<br>Test item | 结果<br>result | 单位<br>Unit          | 参考范围<br>Reference range | 检测项目<br>Test item    | 结果<br>result | 单位<br>Unit         | 参考范围<br>Reference range |
|-------------------|--------------|---------------------|-------------------------|----------------------|--------------|--------------------|-------------------------|
| 白细胞总数<br>WBC      | 15.8         | 10 <sup>9</sup> /L  | 6.0 ~ 17.0              | 红细胞平均体积<br>MCV       | 68.7         | fL                 | 62.0 ~ 72.0             |
| 淋巴细胞比率<br>LYM%    | 18.3         | %                   | 12.0 ~ 30.0             | 血红蛋白含量<br>MCH        | 26.3 ↑       | pg                 | 20.0 ~ 25.0             |
| 中间细胞比率<br>MID%    | 2.4          | %                   | 2.0 ~ 9.0               | 血红蛋白浓度<br>MCHC       | 383 ↑        | g/L                | 300—380                 |
| 粒细胞比率<br>GRAN%    | 81.3         | %                   | 60.0 ~ 83.0             | 红细胞分布宽度 SD<br>RDW-SD | 35.3 ↓       | fL                 | 37.0 ~ 54.0             |
| 淋巴细胞<br>LYM#      | 2.4          | 10 <sup>9</sup> /L  | 0.8 ~ 5.1               | 红细胞分布宽度 CV<br>RDW-CV | 15.3         | %                  | 11.0 ~ 15.5             |
| 中间细胞<br>MID#      | 0.4          | 10 <sup>9</sup> /L  | 0.1 ~ 1.8               | 血小板总数<br>PLT         | 474 ↑        | 10 <sup>9</sup> /L | 117 ~ 460               |
| 粒细胞<br>GRAN#      | 12.0         | 10 <sup>9</sup> /L  | 4.0 ~ 12.6              | 血小板平均体积<br>MPV       | 9.9          | fL                 | 7.0 ~ 12.9              |
| 红细胞总数<br>RBC      | 5.01 ↓       | 10 <sup>12</sup> /L | 5.50 ~ 8.50             | 血小板分布宽度<br>PDW       | 13.3         | %                  | 0.1 ~ 30.0              |
| 血红蛋白<br>HGB       | 132          | g/L                 | 110 ~ 190               | 血小板压积<br>PCT         | 0.46         | %                  | 0.01 ~ 9.99             |
| 红细胞压积<br>HCT      | 34.4 ↓       | %                   | 39.0 ~ 56.0             | 血小板大细胞比率<br>P-LCR    | 17.0         | %                  | 0.1 ~ 99.9              |

### 3 讨论

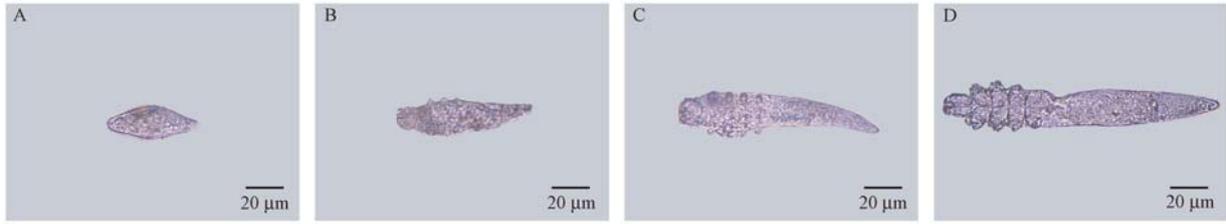
#### 3.1 犬蠕形螨种类与皮脂腺寄生虫体之间的关系

目前,国内调查发现犬蠕形螨有大型虫体和小型虫体两种,大型虫体的报道较多,鲜有关于小型虫体的报道。大型虫体平均大小为 222.75 μm × 44.55 μm,小型虫体平均大小为 168.17 μm × 39.60 μm<sup>[4]</sup>。李鼎等<sup>[5]</sup>对犬蠕形螨感染后的皮肤病理结构观察后发现,在毛囊中检查到虫体时,在皮脂腺中几乎都发现了虫体或虫卵,但未对虫体大小进行测量。李嘉荣等<sup>[6]</sup>用犬蠕形螨虫体接种于比格犬,90 d后毛囊可见犬蠕形螨明显增多,皮脂腺未见被破坏偶见有轻度增生,虫体大小也未说明。孙维平等<sup>[7]</sup>,犬蠕形螨主要寄生在发病皮肤毛囊的上部,不久后能够转入底部,很少寄生于皮脂腺内。本研究对患病犬镜检后发现,毛囊里的犬蠕形螨均为小型虫体,皮脂腺未见任何虫体和虫卵。国外报道寄生于犬的蠕形螨有 3 种 (De. cani, D. cornei, D. injai),

除了形态上的不同外,De. cani, D. cornei 和 D. injai 分别寄生于宿主的毛囊、表皮和皮脂腺<sup>[2]</sup>。综上所述,小型虫体感染后可能不会破坏皮脂腺,皮脂腺是否感染虫体可能与虫体种类或感染病程相关,有待进一步研究。

#### 3.2 嗜酸性粒细胞在抗犬蠕形螨感染中的作用

血常规结果可见,白细胞总数、粒细胞和粒细胞比率均在正常值范围内的偏高位,与病理组织切片中嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞增多相符合。嗜酸性粒细胞是寄生虫临床诊断的重要指标。寄生虫感染后常伴有嗜酸性粒细胞的增多,犬蠕形螨也不例外。患病犬机体内产生的各种趋化因子让嗜酸性粒细胞在感染部位聚集,并释放过氧酶等物质,从而对犬蠕形螨具有杀伤活性<sup>[8]</sup>。毛囊内大量的蠕形螨虫体和虫体碎片以及毛囊破坏后继发的细菌感染是导致嗜中性粒细胞增多的主要原因。嗜中性粒细胞在吞噬虫体碎片及杀死细菌过程中引起化脓反应,对犬蠕形螨虫体的破坏和宿主的保护具有重要作用。

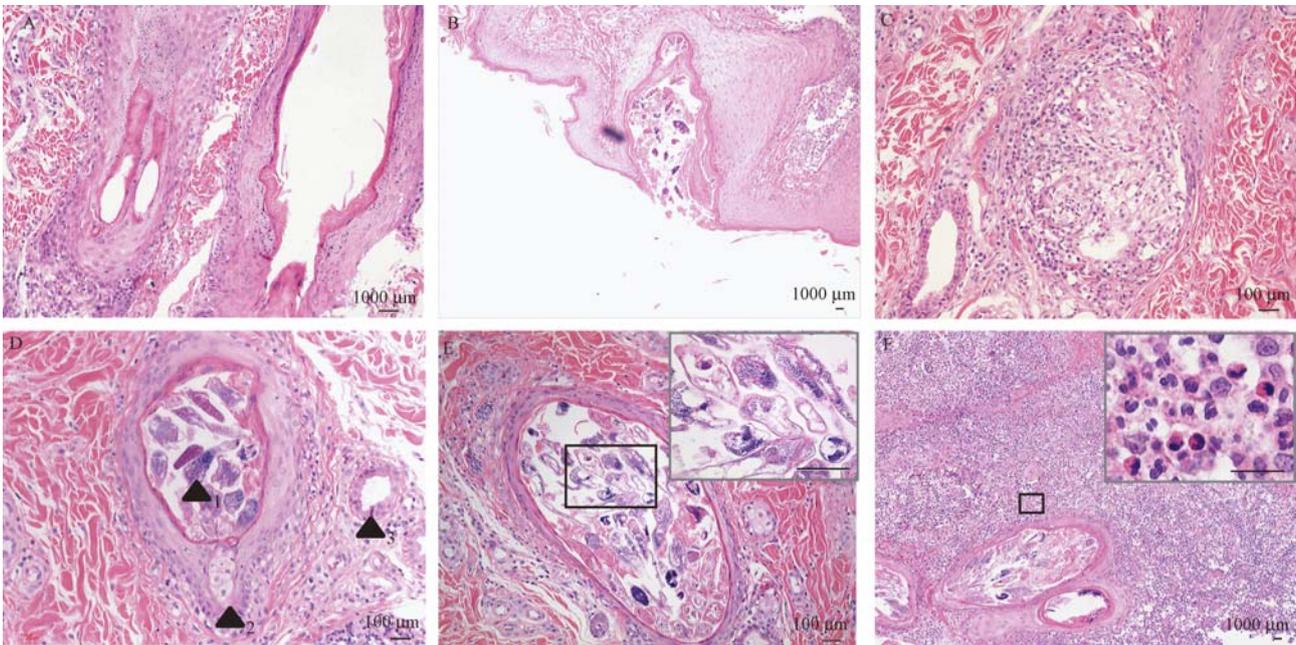


注:(A)虫卵 54.60 μm × 19.30 μm; (B)幼虫 70.08 μm × 19.37 μm; (C)若虫 118.13 μm × 26.42 μm; (D)成虫 160.19 μm × 25.11 μm。

图 1 显微镜检查结果(×400)

Note. (A)Egg 54.60 μm × 19.30 μm. (B)Larva 70.08 μm × 19.37 μm. (C)Nymph 118.13 μm × 26.42 μm. (D)Adult 160.19 μm × 25.11 μm.

Fig.1 The result of microscope observation



注:(A)正常毛囊结构(HE × 100); (B)犬蠕形螨侵入毛囊(HE × 40); (C)毛囊周围见多灶性肉芽肿形成(HE × 200); (D)毛囊内见大量犬蠕形螨虫体和虫卵,皮脂腺和汗腺未见螨体(HE × 200); (E)毛囊内见大量犬蠕形螨虫体和虫卵(HE × 200); (F)毛囊周围见大量嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞(HE × 40); ▲<sub>1</sub> 为犬蠕形螨; ▲<sub>2</sub> 为皮脂腺; ▲<sub>3</sub> 为汗腺; E 图和 F 图右上角为图中方框放大图(HE × 400)。

图 2 显微病理组织学检查结果

Note. (A)The structure of normal hair follicle (HE × 100). (B)The Demodex mites invades the hair follicle (HE × 40). (C) Multifocal granuloma formation was observed around the hair follicles (HE × 200). (D) A large number of Demodex mites and eggs was showed in Hair follicles, the sebaceous glands and sweat glands no mites was found (HE × 200). (E) Hair follicles showed a large number of dog Demodex mites and eggs (HE × 200). (F) A large number of eosinophils and neutrophils were seen around the hair follicles (HE × 40). (▲<sub>1</sub>) demodex canis. (▲<sub>2</sub>) the sebaceous glands. (▲<sub>3</sub>) the sweat gland. The diagram of the upper right corner of E and F figure are the enlargement in the box (HE × 400).

Fig.2 The result of histopathological observation

### 3.3 犬蠕形螨引起肉芽肿种类的划分

病理组织切片可见犬蠕形螨引起的多灶性肉芽肿。按照 warren(1976)对寄生虫性肉芽肿的分类,可分为免疫性肉芽肿、非特异炎症性肉芽肿及原因不明(包括未研究)的肉芽肿三类。嗜酸性粒细胞在螨虫

感染的早期可形成嗜酸性脓肿<sup>[8]</sup>,嗜酸性粒细胞趋化因子(ECF)在蠕虫的免疫反应中具有重要作用<sup>[9]</sup>,犬蠕形螨引起的肉芽肿可划分为免疫性肉芽肿。镜下观察病理切片可见毛囊周围的肉芽肿呈椭圆形,可能是患病犬抵抗蠕形螨或细菌而形成的慢性炎症。

### 3.4 联合用药对防治蠕形螨的意义

患病犬感染较为严重,个别犬出现细菌性继发感染,故采用联合用药进行治疗。辛硫磷浇泼溶液用于体表驱虫,对虫体具有强触杀和胃毒作用。伊维菌素可通过抑制神经递质  $\gamma$  氨基丁酸的释放来阻断神经信号传导,从而使虫体麻痹、死亡。阿苯达唑为高效低毒的广谱驱虫药,其与蠕虫体内的微管蛋白结合,从而影响蠕虫体内的有丝分裂、蛋白装配及能量代谢,导致虫体无法存活和繁殖<sup>[10]</sup>。伊维菌素和辛硫磷浇泼溶液对蠕形螨虫体虽然有良好的驱杀作用,但却不能杀灭虫卵,配合阿苯达唑和抗生素辅助治疗不仅对虫体和虫卵可以抑制细菌繁殖和控制局部炎症的发展<sup>[11]</sup>。

患病犬体表用温肥皂水擦洗,去除结痂和脱落的皮屑,然后用辛硫磷浇泼溶液(规格用量:每支 10 mL:4 g,加温水 3 Kg)进行体表驱虫和外环境虫体的杀灭,间隔 3~5 d 用一次,直到患病犬康复。饲料中添加阿苯达唑伊维菌素预混剂(规格用量:每包 100 g:阿苯达唑 6 g+伊维菌素 0.25 g,100 kg 犬粮添加 100 g),连用 7 d,间隔一星期后酌情重复给药;氨苄西林 7 mg/kg,地塞米松 10 mg/kg, vitC 20 mg/kg,肌肉注射,每天 1 次,连用 7 d。对个别患病严重的比格犬肌注伊维菌素注射液(规格用量:每支 2 mL:0.02 g,每 1 kg 体重 0.02 mL)。圈舍定期打开通风,保持地板干燥,空调设置除湿模式进行干燥除湿。通过采取上述治疗方法与防治策略,犬

蠕形螨病的临床症状逐渐消失,再次镜检未发现虫体和虫卵,驱虫效果非常明显。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 江斌,吴胜会,林琳,等. 畜禽寄生虫病诊治图谱[M]. 福州:福建科学技术出版社,2012.
- [ 2 ] Izdebska JN, Fryderyk S. Diversity of three species of the genus demodex ( Acari: Demodecidae ) parasitizing dogs in Poland [J]. Pol. J. Environ. Stud, 2011, 20(3):565-569.
- [ 3 ] 赵亚娥,De Rojas Manuel. 蠕形螨的系统学研究进展[J]. 国际医学寄生虫病杂志,2013,40(3):166-170.
- [ 4 ] 王祥生,于燕,王德昭,等. 犬常见皮肤病诊断及防治研究[J]. 动物医学进展,2001,22(2):92-94.
- [ 5 ] 李鼎,周生银,江海娟,等. 犬蠕形螨感染皮肤病理结构观察[J]. 中国畜牧兽,2009,36(4):172-174.
- [ 6 ] 李嘉荣,杨俊华,周光兴,等. 犬蠕形螨的致病性研究[J]. 上海医科大学学报,1995,22(1):37-40.
- [ 7 ] 孙维平,王传锋. 宠物寄生虫病[M]. 北京:中国农业出版社,2007.
- [ 8 ] 姜建强,额尔敦木图,包花尔,等. 嗜酸性粒细胞与寄生虫感染免疫的相关性[J]. 黑龙江畜牧兽医,2016,(02):63-67.
- [ 9 ] 郑霞,邓丹立,杨辉红. 嗜酸性粒细胞增多与临床[J]. 实用医技杂志,2008,15(5):654-656.
- [ 10 ] 温福利,郑和平,马雷,等. 巴马小型猪疥癣病的诊断与防治[J]. 畜牧与兽医,2015,47(7):110-112.
- [ 11 ] 左之才,欧阳俊,余杰. 犬蠕形螨病治疗失败的原因及对策浅析[J]. 中国工作犬业,2009,(2):16.

[收稿日期]2016-06-15



# 抑制 IGFBP2、IGFBP3 在卵巢肿瘤中的表达对 卵巢癌的迁移、侵袭的影响

李 君, 刘恩令\*, 杨 丽

(唐山市工人医院产科, 河北 唐山 063000)

**【摘要】** 目的 研究抑制 IGFBP2、IGFBP3 在卵巢肿瘤中的表达对卵巢癌的迁移侵袭的影响。方法 采用 siRNA 干扰 IGFBP2、IGFBP3 在卵巢癌细胞株 SKOV3 中的表达, CCK-8 试剂盒检测 SKOV3 的增殖情况, 流式细胞术检测 SKOV3 的凋亡情况, transwell 实验、细胞划痕愈合实验检测 SKOV3 的迁移与侵袭; CCK-8 法检测不同浓度顺铂(5、10、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 对 SKOV3 细胞生长的影响。结果 采用 siRNA 干扰 IGFBP2、IGFBP3 在卵巢癌 SKOV3 中表达后, 与对照组相比 SKOV3 细胞增殖能力下降, 凋亡增加, 迁移与侵袭功能下降。结论 抑制 IGFBP2、IGFBP3 在卵巢肿瘤中的表达对卵巢癌的迁移与侵袭起一定的抑制作用。

**【关键词】** IGFBP-2; IGFBP-3; 卵巢癌; 耐药

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0032-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.007

## Effects of IGFBP2 and IGFBP3 expression in ovarian tumors on migration, invasion of ovarian cancer

LI Jun, LIU En-ling\*, YANG Li

(Obstetrics Department, Tangshan City workers' Hospital, Tangshan 063000, China)

**【Abstract】** **Objective** To study the effect on ovarian tumor migration invasion after inhibition the expression of IGFBP2, IGFBP3. **Methods** siRNA interference IGFBP2, IGFBP3 expression in ovarian cancer cell lines SKOV3, SKOV3 proliferation detected by CCK-8 kits, SKOV3 apoptosis detected by flow cytometry, SKOV3 migration and invasion detected by transwell experiment and scratched cell healing detection; CCK-8 method detected survival after treated different concentrations of cisplatin (5, 10, 15, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). **Results** The proliferation ability of SKOV3 dropped and apoptosis increased after treated siRNA IGFBP2, IGFBP3 compared with the control group, migration and invasion function decline, resistance level to improve greatly. **Conclusions** The expression of IGFBP2, IGFBP3 in ovarian cancer affected migration and invasion.

**【Key words】** IGFBP-2; IGFBP-3; Ovarian; Cancer

卵巢癌在近几年发病率明显上升,对女性健康造成了极大的威胁。卵巢癌是妇科肿瘤中死亡率最高的恶性肿瘤,在女性中发病率占恶性肿瘤总数的

的4%。在女性生殖道肿瘤中卵巢恶性肿瘤发病率中占第2位,同时,卵巢恶性肿瘤占生殖道恶性肿瘤的22.90%。妇科的主要致死性疾病为卵巢上皮性

[基金项目] 2014年河北省医学科学研究重点课题(ZD20140384)。

[作者简介] 李君(1980-),女,硕士研究生,研究方向:产科基础及临床方面研究。E-mail: lijun135579@sina.com

[通讯作者] 刘恩令(1966-),男,博士,主任医师,研究方向:卵巢癌耐药的研究。E-mail: enling111@sina.com

癌,到目前为止,没有有效的早期诊断方法,70%的病例在就诊时已属晚期,5 年生存率低于 30%<sup>[1]</sup>。在卵巢癌患者中发现许多基因异常表达,其中 p53、胰岛素样生长因子 (insulin like growth factor, IGF) 已发现在卵巢癌中异常表达<sup>[2,3]</sup>。胰岛素样生长因子 (insulin like growth factor, IGF) 家族在肿瘤细胞的发生、发展及其转化过程中正日益受到重视。胰岛素样生长因子系统由 IGF 及其受体和胰岛素样生长因子结合蛋白 (insulin like growth factor binding protein, IGFBP) 及 IGFBP 蛋白酶组成,近来发现该家族与 p53 同样参与细胞凋亡的调控及恶性肿瘤的发生发展。本研究通过抑制 IGFBP2、IGFBP3 在卵巢肿瘤中的表达,探讨其对卵巢癌的迁移侵袭及耐药的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

SKOV3 细胞购自中科院上海生化细胞所;顺铂购自山东齐鲁制药有限公司;1640 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 Hyclone 公司;Si-RNA IGFBP-2、Si-RNA IGFBP-3 引物由广州锐博生物有限公司合成;流式细胞凋亡 Annexin V/PI 双染检测试剂盒购自上海生工有限公司;transwell 小室购自 NEST 公司;流式细胞仪购自 BD 生物有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 细胞培养

复苏 SKOV3 细胞于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中常规培养,并每天观察细胞状态,隔天换液传代。

#### 1.2.2 Si-RNA 干扰实验

(1) 在 6 孔板中每孔接种  $2 \times 10^5$  个细胞,每孔加入 2 mL 完全培养基,放在细胞培养箱中培养过夜。(2) 当细胞融合度达到 50%~80% 时,在超净台中用无菌离心管中按照说明书配制溶液 A 和溶液 B。将溶液 A 加入到溶液 B 中,轻轻吹打混匀,室温孵育 30 min。用 2 mL 左右 PBS 洗涤细胞,确保将血清全部洗去,每孔加入 0.8 mL 无血清培养基,将混合后的 AB 液滴加到孔中,轻轻摇晃混匀,放在细胞培养箱中孵育 8 h~12 h 后换液,加入新鲜的完全培养基,继续培养。(3) 36 h~72 h 后采用 RT-PCR 或 Western blot 检测干扰的效果。

#### 1.2.3 CCK-8 检测细胞增殖

复苏细胞进行培养,待细胞在大皿中呈指数期

增长时进行种板 (96 孔板),每孔接种细胞数 2000 个,待细胞贴壁后进行换液干扰实验,分别在 0 h 和 24 h 时每孔加入 10 uL CCK-8,设置对照组。细胞培养箱孵育 4 h 后,37℃ 摇床慢摇 10 分钟用酶标仪测 570 nm 的 OD 值。

#### 1.2.4 流式细胞术实验

用胰酶消化细胞,每个样本细胞数大约为  $5 \times 10^5$  个,离心 5 min 后弃去培养液,用 PBS 洗 2~3 次,1000 r/min 离心 5 min 弃去 PBS 后用 100 μL 的 Bangdingbuffer 重悬细胞,轻轻吹打均匀加入 5 μL 的 PI,室温下避光孵育 10~15 min 后(不要超过 30 min)流式细胞仪检测。

#### 1.2.5 细胞划痕实验

(1) 在 6 孔板背后,用 marker 笔均匀的划横线,横线要横穿过孔,可以用直尺比着,大约每隔 0.5~1 cm 一道。每个孔上面至少要划 5 条线。(2) 在每个孔中种下  $5 \times 10^5$  个干扰或未干扰的细胞,具体数量要根据细胞的增殖情况决定,细胞过夜后融合度能够达到 80%~90% 为宜。(3) 第二天用枪头划痕,划痕时枪头要垂直,使得划痕尽量垂至于背后的横线。(4) 用 PBS 洗细胞 3 次,加入无血清培养基放入细胞培养箱中培养。分别在 0 h,24 h 时进行取样,拍照。

#### 1.2.6 transwell 实验

提前一天用无血清无双抗的 1640 培养基将 transwell 小室水化过夜,第二天消化收集干扰及未干扰的细胞,将细胞浓度调整到  $1 \times 10^5$  /mL 备用。轻轻吸去 transwell 上室内液体,加入 600 uL 的完全培养基,同时在小室内加入 100 uL 细胞悬液。在细胞培养箱中孵育 48 h 后取出 transwell 小室,用 PBS 洗 3 次,用 4% 多聚甲醛固定 10 min 左右,用棉签小心擦去微孔膜上层的细胞,用 4 g/L 台盼蓝溶液染色,在倒置显微镜下计数迁移到微孔膜下层的细胞。

#### 1.2.7 顺铂耐药实验

将干扰或未干扰的细胞 96 孔板接种,每孔细胞数量为 2000 个,细胞贴壁后加入不同浓度的顺铂 (5、10、20 μg /mL),24 h 后换液加入 10 uL CCK-8,设置对照组。细胞培养箱孵育 4 h 后,37℃ 摇床慢摇 10 min 用酶标仪测 570 nm 的 OD 值。计算细胞存活率。

## 1.3 统计方法

数据采用 SPSS 16.0 进行统计分析,两组之间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ ,表示有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 转染 Si-IGFBP2, Si-IGFBP3 效果

干扰 SKOV3 细胞中 IGFBP2、IGFBP3 后可以发现细胞中 IGFBP2、IGFBP3 的蛋白表达水平与对照组相比明显降低。(见图 1)

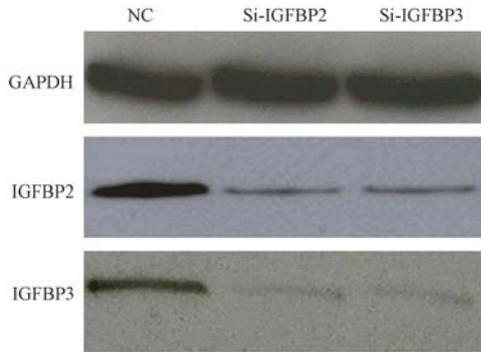


图 1 转染 SiRNA IGFBP2, SiRNA IGFBP3 效果

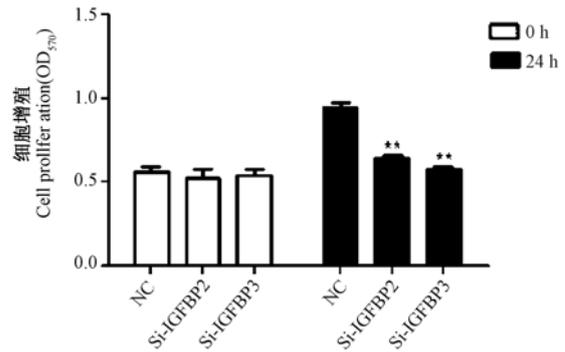
Fig.1 The transfection effect of SiRNA IGFBP2, SiRNA IGFBP3

### 2.2 转染 siRNA IGFBP2, siRNA IGFBP3 对 SKOV3 细胞增殖能力的影响

转染 siRNA IGFBP2, siRNA IGFBP3 后分别在 0 h、24 h 检测了细胞增殖情况, 结果发现, 在 0 h 时转染 siRNA IGFBP2, siRNA IGFBP3 组的细胞增殖能力与对照组相比, 差异无统计学意义, 在 24 h 时转染 siRNA IGFBP2, siRNA IGFBP3 组的细胞增殖能力与对照组相比, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。(见图 2)

### 2.3 转染 siRNA IGFBP-2, siRNA IGFBP-3 对 SKOV3 细胞凋亡的影响

转染 siRNA IGFBP-2, siRNA IGFBP-3 后分别在 24 h 检测了细胞凋亡情况, 结果发现, 在 24 h 时转染 siRNA IGFBP-2, siRNA IGFBP-3 组的细胞凋亡百



注: 与对照组相比较, \*\* $P < 0.01$ 。

图 2 转染 siRNA IGFBP2, siRNA IGFBP3 对 SKOV3 细胞增殖能力的影响 ( $n = 3$ )

Note. Compared with the NC group, \*\* $P < 0.01$ .

Fig.2 The effect on SKOV3 cell proliferation after transfection siRNA IGFBP2, siRNA IGFBP3

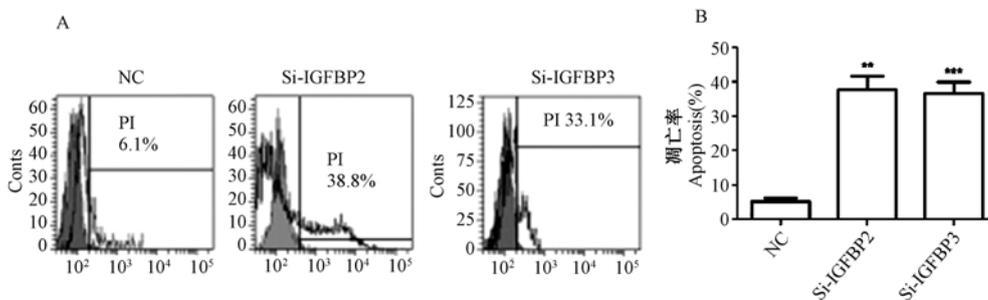
分比与对照组相比, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。(见图 3)

### 2.4 转染 siRNA IGFBP-2, siRNA IGFBP-3 对 SKOV3 细胞迁移能力的影响

为观察 IGFBP-2、IGFBP-3 对 SKOV3 细胞迁移能力的影响, SKOV3 细胞转染 siRNA IGFBP-2, siRNA IGFBP-3 后分别在 0 h、24 h 检测了细胞迁移能力, 结果发现, 转染 0 h 时, 3 组无明显差别, 转染 24 h 后, 与对照组相比, 转染 siRNA IGFBP-2, siRNA IGFBP-3 明显降低了 SKOV3 细胞的迁移能力, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。(见图 4)

### 2.5 转染 siRNA IGFBP-2, siRNA IGFBP-3 对 SKOV3 细胞侵袭能力的影响

为观察 IGFBP-2、IGFBP-3 对 SKOV3 细胞侵袭能力的影响, SKOV3 细胞转染 siRNA IGFBP-2,

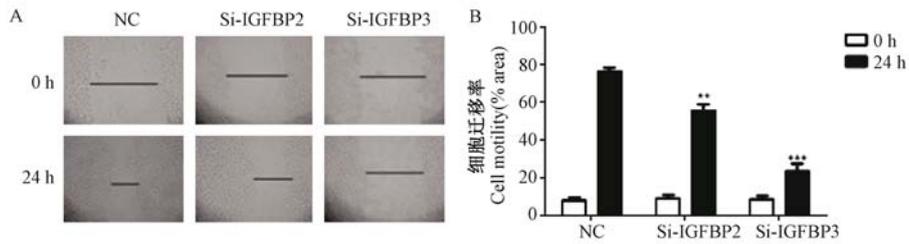


注: 与对照组相比较, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图 3 转染 siRNA IGFBP-2, siRNA IGFBP-3 对 SKOV3 细胞凋亡的影响 ( $n = 3$ )

Note. Compared with the NC group, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Fig.3 The apoptosis of SKOV3 cells after transfection siRNA IGFBP-2, siRNA IGFBP-3

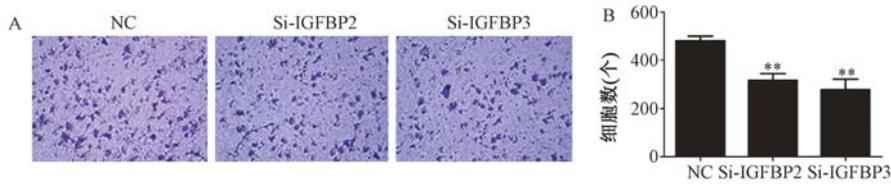


注:与对照组相比较, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图 4 转染 siRNA IGFBP-2, siRNA IGFBP-3 对 SKOV3 细胞迁移能力的影响 ( $n = 3$ )

Note. Compared with the NC group, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Fig. 4 The effect on migration of SKOV3 cells after transfection siRNA IGFBP -2, siRNA IGFBP-3



注:与对照组相比较, \*\* $P < 0.01$ 。

图 5 转染 siRNA IGFBP-2, siRNA IGFBP-3 对 SKOV3 细胞侵袭能力的影响 ( $n = 3$ )

Note. Compared with the NC group, \*\* $P < 0.01$ .

Fig. 5 The effect on invasion of SKOV3 cells after transfection siRNA IGFBP -2, siRNA IGFBP-3

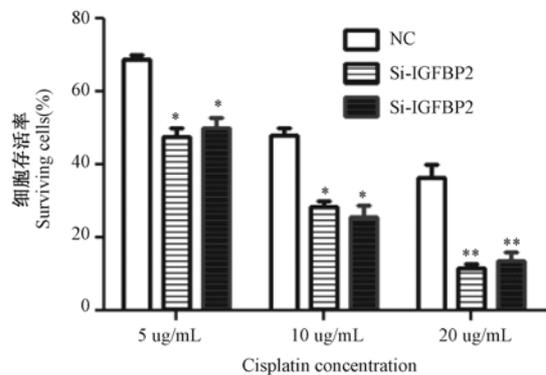
siRNA IGFBP-3 后在 24 h 检测了细胞侵袭能力, 结果发现转染 24 h 后, 与对照组相比, 转染 siRNA IGFBP-2, siRNA IGFBP-3 明显降低了 SKOV3 细胞的侵袭能力, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。 (见图 5)

### 2.6 转染 siRNA IGFBP-2, siRNA IGFBP-3 对 SKOV3 细胞顺铂耐药性的影响

为观察 IGFBP-2、IGFBP-3 对 SKOV3 细胞耐药性的影响, SKOV3 细胞转染 siRNA IGFBP-2, siRNA IGFBP-3 后加入不同浓度的顺铂 (5、10、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 在 24 h 后检测了细胞存活情况, 结果发现, 与对照组相比, 转染 siRNA IGFBP-2, siRNA IGFBP-3 明显降低了 SKOV3 细胞的耐药性, 加入顺铂浓度为 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时细胞存活数量减少, 与对照组相比差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 加入顺铂浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时细胞存活数量明显减少, 与对照组相比差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。 (见图 6)

### 3 讨论

卵巢癌主要的治疗方法为手术治疗、放化疗等, 但治疗后 3 ~ 5 年的复发率为 70% 左右, 复发后患者的治疗效果极差, 并且对多种化疗药物出现耐药性<sup>[4]</sup>, 因此, 分子靶向治疗将是卵巢癌治疗的重要



注:与对照组相比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图 6 转染 siRNA IGFBP-2, siRNA IGFBP-3 对 SKOV3 细胞顺铂耐药性的影响 ( $n = 3$ )

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

Fig. 6 The effect on drug resistance of SKOV3 cells after transfection siRNA IGFBP -2, siRNA IGFBP-3

方向。在大多数的恶性肿瘤中均有基因突变现象, 针对突变基因进行精准治疗, 对患者的治疗效果及化疗药的耐药性会有明显改善。

IGFBP2, IGFBP3 是胰岛素样生长因子家族的重要成员, 在人的生长发育过程中起着非常重要的作用<sup>[5,6]</sup>。目前发现在结肠癌、前列腺癌及卵巢癌等患者体内出现异常高表达<sup>[7-9]</sup>。有研究认为 IGFBP2 高表达可促进肿瘤细胞的增殖, 而 IGFBP3

的高表达可抑制肿瘤的增殖与迁移<sup>[10]</sup>, 并且 IGFBP2, IGFBP3 的表达与肿瘤分期及预后密切相关<sup>[11]</sup>。本研究通过干扰卵巢癌细胞中 IGFBP2, IGFBP3 的表达, 观察对卵巢癌细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡、耐药的影响。有研究表明, IGFBP-2 在卵巢癌中发挥重要的生物学作用是通过在卵巢恶性肿瘤组织、患者血清和囊液中过表达<sup>[12,13]</sup>。Lee EJ 等<sup>[14]</sup>通过侵袭实验已经证明了 IGFBP-2 能刺激 SKOV3 细胞侵袭, 通过 siRNA 来抑制它的表达而刺激作用减弱。Tornig PL 等<sup>[15]</sup>的研究表明 IGFBP-3 在人卵巢子宫内膜样癌 OVRW59-P4 细胞系中能抑制细胞迁移、侵袭和转移。本研究中干扰 IGFBP2, IGFBP3 在卵巢癌中的表达后发现卵巢癌细胞增殖受到明显抑制, 凋亡增加了 10 倍左右, 迁移与侵袭也受到了不同程度的抑制作用。与 Lee EJ 等人的研究结果一致, 而与 Tornig PL 等人的研究结果有一定的差异, 这可能与 IGFBP3 在肿瘤细胞中的双重作用有关。一方面, IGFBP3 可以与 IGF 形成三元络合物, 抑制 IGF 的促有丝分裂作用, 该过程是通过 ALS 进行的。另一方面, IGFBP3 也可通过与 IGF 的结合有效地延长 IGF 的半衰期而提高 IGF 在组织的生物利用率, 因为在络合物中 IGF 的半衰期为 15 h, 而游离的 IGF 半衰期为 20 ~ 30 min, 所以 IGFBP3 是 IGF 的循环库。IGFBP3 的这两种作用受许多因素调节, 所以这可能是造成 IGFBP3 在肿瘤中作用不一致的原因之一。IGFBP3 不仅可以通过 IGF 发挥作用, 有报道 IGFBP3 也可以通过其他途径发挥作用, 但具体机制还需进一步研究。因此, IGFBP 通过与 IGF 竞争性的与 IGF 结合, 以 IGF 依赖性和非依赖性等方式发挥作用, 在恶性肿瘤的侵袭、迁移发展过程中发挥重要作用。IGFBP2 有促进肿瘤细胞迁移、侵袭作用是因为 IGFBP2 能使基质金属蛋白酶表达增加, 而基质金属蛋白酶的作用是降解细胞外基质, 从而促进了肿瘤细胞向周围正常组织的迁移与侵袭。

顺铂是一种常用的化疗药, 其治疗恶性肿瘤效果显著, 但是副作用较多, 并且有些肿瘤已经对顺铂产生了耐药性, 有研究表明肿瘤的发生以及对药物的耐受与肿瘤的凋亡抑制密切相关<sup>[16]</sup>。有研究表明多数卵巢癌细胞系及所有卵巢上皮性癌组织均表达 IGF-1R<sup>[17-18]</sup>。并且 IGF-1R 可促进肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭和转移, 与卵巢癌的发生、发展和预后密切相关, IGF-1 受体的高表达与化疗耐药

及不良预后相关<sup>[19]</sup>。本研究中通过干扰 IGFBP2, IGFBP3, 观察其对卵巢癌耐药性的影响, 结果发现, 干扰 IGFBP2, IGFBP3 后, 卵巢癌细胞 SKOV3 对顺铂的敏感性明显增强。因此, 卵巢癌细胞的耐药性可能与 IGFBP2、IGFBP3 的异常表达有关。

在正常细胞向癌细胞转化的过程中, 胰岛素样生长因子家族各组成成分存在着性质和数量的变化表明胰岛素样生长因子家族在正常细胞增生和恶性转化过程中起着重要作用。而在胰岛素样生长因子结合蛋白家族中, IGFBP3 含量最高, 其次为 IGFBP2。因此, 通过研究 IGFBP2, IGFBP3 在卵巢肿瘤组织中的表达与肿瘤侵袭、迁移的相关性, 从而探讨 IGFBP2, IGFBP3 在卵巢癌发病及发展、耐药可能的作用机制, 进而为卵巢癌的预防、早期诊断及治疗提供理论依据。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Niels Eckstein, Kati Servan, Barbara Hildebrandt, *et al.* Hyperactivation of the Insulin-like Growth Factor Receptor 1 Signaling Pathway Is an Essential Event for Cisplatin Resistance of Ovarian Cancer Cells [J]. *Cancer Res*, 2009, 69 (7) : 2996 - 2300.
- [ 2 ] Ren YA, Mullany LK, Liu Z, *et al.* Mutant p53 promotes epithelial ovarian cancer by regulating tumor differentiation, metastasis, and responsiveness to steroid hormones [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(8) : 2206 - 2218.
- [ 3 ] Rohr I, Zeillinger R, Heinrich M, *et al.* Role of IGF-I in Primary Ovarian Cancer- A Study of the OVCAD European Consortium [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(3) : 1015 - 1022.
- [ 4 ] Derlatka P, Grabowska-Derlatka L, Jalini K, *et al.* Recurrent ovarian cancer-qualification and results of surgical treatment [J]. *Ginekol Pol*, 2015, 86(12) : 902 - 906.
- [ 5 ] Perri AF, Dallard BE, Baravalle C, *et al.* Cellular proliferation rate and insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-2 and IGFBP-3 and estradiol receptor alpha expression in the mammary gland of dairy heifers naturally infected with gastrointestinal nematodes during development [J]. *J Dairy Sci*, 2014, 97(8) : 4985 - 4996.
- [ 6 ] Smith T, Sloboda DM, Saffery R, *et al.* Maternal nutritional history modulates the hepatic IGF-IGFBP axis in adult male rat offspring [J]. *Endocrine*, 2014, 46(1) : 70 - 82.
- [ 7 ] Sztéfko K, Hodorowicz-Zaniewska D, Popiela T, *et al.* IGF-I, IGF-II, IGFBP2, IGFBP3 and acid-labile subunit (ALS) in colorectal cancer patients before surgery and during one year follow up in relation to age [J]. *Adv Med Sci*, 2009, 54(1) : 51 - 58.
- [ 8 ] Neuhaus ML, Platz EA, Till C, *et al.* Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins and prostate

(下转第 48 页)



# 柯萨奇病毒 A16 型感染性模型的建立及其相关免疫学指标和应用的评价

张 锋, 高 孟, 高丽美, 罗永能\*

(浙江省医学科学院病毒病研究所, 杭州 310013)

**【摘要】** **目的** 建立简便和可靠的对柯萨奇病毒 A16 型(coxsackievirus A16, CVA16)敏感的小型啮齿类实验动物模型。**方法** 选取不同日龄长爪沙鼠, 腹腔接种 CVA16 后连续观察 14 d, 筛选出对病毒敏感的最适接种日龄段; 然后比较接种剂量与效应关系, 测定其 50% 致死剂量(LD50); 并测定感染 3 d 后其血液和主要组织器官中 CVA16 病毒滴度; 最后用 CVA16 灭活疫苗在 1 日龄和 11 日龄免疫 2 针沙鼠后, 在 14 日龄时用 LD50 剂量病毒攻毒, 观察并记录沙鼠体重、症状及死亡率, 2 周后眼球采血, 应用微量中和试验和 ELISA 分别检测中和抗体效价和总抗体水平。**结果** 长爪沙鼠感染 CVA16 后出现活动减少、后肢无力、麻痹瘫痪、死亡等临床症状, 不同日龄沙鼠对 CVA16 感染的易感能力和感染后发病程度不同, 7 日龄和 14 日龄沙鼠易感, 28 日龄沙鼠不易感染, 最敏感和最合适接种日龄为 14 日龄, 其 LD50 为  $1 \times 10^{4.5}$  CCID50, 感染 3 d 后其血液和主要组织器官中均可检测到高滴度的 CVA16 病毒, 免疫两针灭活疫苗的 14 日龄沙鼠用 LD50 剂量攻毒, 存活率 87.5%, 疫苗免疫诱导沙鼠产生的 CVA16 中和抗体几何平均值(GMT)为 28.14, 抗体阳性率为 87.5%。**结论** 长爪沙鼠对 CVA16 敏感并且病毒能在其体内进行有效的复制和繁殖, 可作为 CVA16 致病机制研究、疫苗研发及药物评价的可靠小动物模型。

**【关键词】** 柯萨奇病毒 A16 型; 长爪沙鼠; 动物模型

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0037-06

doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2017.01.008

## Establishment of an animal model for coxsackievirus A16 infection related immunological evaluation

ZHANG Feng, GAO Meng, GAO Li-mei, LUO Yong-neng\*

(Institute of Viral Diseases, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

**【Abstract】** **Objective** To establish a simple and reliable experimental rodent model sensitive to coxsackievirus A16 (CVA16). **Methods** Mongolian gerbils with different age were selected and inoculated intraperitoneally with live CVA16, and the gerbils were observed daily until 14 days postinoculation to screen for the most optimal ages sensitive to the virus. The dose-dependent symptoms were evaluated and the 50% lethal dose (LD50) was determined. The virus titers were measured in blood and various tissues of CVA16-infected Mongolian gerbils 3 days post-infecton. Finally, the gerbils were immunized twice with inactivated CVA16 vaccine at day 1 and day 11, respectively, followed by challenge with the virus with a dose of LD50 at day 14. The gerbils were then observed for another 2 weeks to record their body weight, symptom and mortality rate. Their blood samples were collected from the eyes, and CVA16-specific neutralizing antibody

[基金项目] 浙江省科技计划项目(2014C37014, 2016C37102)。

[作者简介] 张锋(1974-), 男, 高级实验师, 研究方向: 从事医学病毒学研究。E-mail: 13957185700@163.com

[通讯作者] 罗永能(1966-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 从事医学病毒学研究。E-mail: ynl101@163.com

titers and total antibody titers was checked by microneutralization test and ELISA, respectively. **Results** Various clinical symptoms, such as inactivity, hind limb weakness, paralysis and even death occurred in gerbils following CVA16 infection. 7-day-old and 14-day-old gerbils are susceptible to CVA16 infection whereas 28-day-old gerbils are resistant. The most sensitive and appropriate age is 14-day-old. The 50% lethal dose was determined to be  $1 \times 104.5$  CCID<sub>50</sub>. High titers of the virus were confirmed in blood and various tissues of Mongolian gerbils contracted CVA16 3 days post-infection. The survival rate is 87.5% for 14-day-old gerbils preimmunized with two doses of inactivated CVA16 vaccine and challenged with the virus. The geometric mean titers (GMTs) of neutralizing antibody was 28.14, and the seroprevalence was 87.5%. **Conclusions** Mongolian gerbils is sensitive to CVA16 and the virus reproduces actively in Vivo. Thus, it can be used as a reliable small animal model for studies of CVA16 pathogenesis, vaccine development and drug evaluation.

**【Key words】** Coxsackievirus A16; Mongolian gerbils; Animal model

柯萨奇病毒 A16 型 (coxsackievirus A16, CVA16) 属于小 RNA 病毒科肠道病毒属, 是引起手足口病 (hand foot and mouth disease, HFMD) 的主要病原体之一<sup>[1]</sup>。手足口病是一种全球性的传染病, 世界各地均有不同程度的流行。尤其在亚太地区, 近年来疫情呈不断上升的趋势<sup>[2]</sup>。由于手足口病另一主要致病原肠道病毒 71 型 (enterovirus 71, EV71) 自 2008 年后在大陆及亚太地区多次大规模暴发流行已在易感人群中建立了一定程度的免疫屏障, 近几年 CVA16 等其它肠道病毒感染引发的病例已呈大幅上升趋势, 国内少数省份已有暴发流行并报告死亡病例<sup>[3]</sup>。国内外监测数据也表明 CVA16 引起的 HFMD 有逐年增加趋势, 每隔一定时间就出现一次高峰<sup>[3]</sup>。

手足口病至今尚无高效、特异的药物, 对症和支持治疗是主要的措施。研发疫苗对全面有效地预防控制手足口病的暴发流行有重大意义, 最近我国已完成 EV71 灭活疫苗的临床试验<sup>[4]</sup> 并批准上市。相关实验动物模型的建立和使用是上述疫苗研制过程中至关重要的环节之一, 目前国内外研究 CVA16 主要是使用小于 7 日龄的小鼠乳鼠, 我们先前的实验和他人报道均发现超过 7 日龄的小鼠乳鼠就不能感染<sup>[5,6]</sup>。然而这种小鼠乳鼠模型由于免疫系统发育尚未成熟等原因, 在实际使用上有很大限制。因此, 我们借鉴 Yao 等<sup>[7]</sup> 建立肠道病毒 71 型感染长爪沙鼠模型的成功经验, 使用 CVA16 YY157 株感染清洁级长爪沙鼠, 以期建立比小鼠乳鼠模型更加简便和可依赖的对 CVA16 敏感的小型啮齿类动物模型, 用于 CVA16 的发病机制、疫苗研发和抗 CVA16 药物评价。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞和病毒

Vero 细胞来源于美国标准生物物品收藏中心

(american type culture collection, ATCC); CVA16 病毒 YY157 株由本研究所保存<sup>[8-10]</sup>。用 Vero 细胞培养繁殖 CVA16 YY157 株, 并用微量细胞病变法测定病毒的感染性滴度。病毒上清反复冻融 3 次后, 低温离心 (5000 r/min, 离心力 3900 g, 20 min) 取上清, 0.2 μm 滤膜过滤后, -80℃ 冰箱中保存。

### 1.2 实验动物

清洁级 Z:ZCLA 长爪沙鼠, 由浙江省医学科学院实验动物中心 [SCXK(浙)2014-0001] 提供, 1 日龄, 8 只, 体重 3~3.5 g; 7 日龄, 16 只, 体重 6~7 g; 14 日龄, 68 只, 体重 10~11 g; 21 日龄, 16 只, 体重 15~17 g; 28 日龄, 16 只, 体重 20~22 g, 动物的饲养和实验在浙江省医学科学院实验动物中心进行 [SYXK(浙)2011-0166]。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物实验

选取 7、14、21 和 28 日龄清洁级长爪沙鼠 (各日龄 8 只), 各组腹腔内分接种病毒量  $1 \times 10^5$  细胞培养半数感染量 (CCID<sub>50</sub>)/只, 每日观察并记录沙鼠的临床症状和存活/死亡情况, 连续观察 14 d, 筛选出对 CVA16 病毒最敏感和最合适的沙鼠日龄段。取适龄的沙鼠 48 只, 随机分成 6 组 (每组 8 只), 各组腹腔内分别接种 CVA16 ( $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$  和  $1 \times 10^5$  CCID<sub>50</sub>/只) 和对照 MEM 液, 每日观察并记录沙鼠的症状和存活/死亡情况, 连续观察 14 d, 最后用 Reed-Muench 法计算出 CVA16 对沙鼠的 LD<sub>50</sub> 剂量, 并以此为基数确定后续实验所需接种的适宜剂量。

#### 1.3.2 临床症状判定标准

根据临床表现划分 5 个等级: 0. 正常; 1. 毛发竖起、体重下降和行动不便; 2. 后肢无力; 3. 单肢麻痹; 4. 双肢麻痹; 5. 死亡。

### 1.3.3 感染沙鼠的血液和主要组织器官中 CVA16 病毒滴度测定

选择 14 日龄长爪沙鼠 3 只,腹腔内注射接种 LD50 剂量(即  $1 \times 104.5$  CCID50)的 CVA16,感染 3 d 后分别取血液、后肢肌肉、心脏、肝脏、肺、脑和肠道等 7 个组织,称重(除血液外)后加入 10 倍(体积重量比)的 PBS,超声至匀浆后离心,取各上清液用 MEM 培养液作 10 倍梯度稀释至  $10^{-1} \sim 10^{-8}$ ,分别接种于 Vero 细胞长满单层 96 孔板中,置 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 35℃ 培养 7 d 后,用显微镜观察 CPE 产生与否,用 Reed-Muench 法计算血液和上述各组织提取上清液的 CVA16 滴度。

### 1.3.4 CVA16 灭活疫苗制备

病毒收获液经离心澄清,按 1:4000 的比例加入福尔马林,37℃ 灭活 3 d;超滤浓缩后,采用 Sephacryl S-400 HR 凝胶过滤层析和 Source 30Q 离子交换层析 2 步层析法纯化 CVA16,进行各项检定及分析合格后,再除菌过滤,2~8℃ 保存,用时加入铝佐剂,稀释成蛋白含量 10 μg/100 μL 的剂量。

### 1.3.5 CVA16 灭活疫苗对长爪沙鼠的免疫保护

新生 1 日龄的沙鼠腹腔内接种 CVA16 灭活疫苗(蛋白含量 10 μg/100 μL 只),10 d 后加强免疫一次。等沙鼠 14 日龄时,用 LD50 病毒剂量进行攻毒实验,观察并记录沙鼠体重、症状及死亡率,2 周后眼球采血,用 ELISA 检测血清中抗 CVA16 特异性抗体水平和体外微量中和试验检测其抗血清中和 CVA16 的能力,评价 CVA16 灭活疫苗的免疫原性。

### 1.3.6 体外微量中和试验检测中和抗体滴度

将沙鼠摘眼球采血,血清采用经典体外微量中和试验检测中和抗体效价。将免疫血清自 1:8 开始进行 2 倍系列稀释后,分别与 100 CCID50 CVA16 等体积混合,接种于 Vero 细胞长满单层 96 孔板中,置 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 35℃ 培养 7 d 后,用显微镜观察 CPE,以能抑制 50% 细胞病变的最高稀释度的倒数作为中和抗体效价,每次试验均设细胞、病毒对照,检测结果以中和效价  $\geq 1:8$  判为 CVA16 中和抗体阳性。

### 1.3.7 ELISA 检测血清中 CVA16 特异性抗体水平

将沙鼠血清用 1% BSA 液稀释 100 倍后加入包被 CVA16 抗原的反应孔,100 μL/孔,同时利用 BSA 和阴性血清设立空白对照和阴性对照,37℃ 孵育 1 h 后洗涤 5 次;将 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 进行 1:10000 稀释后加入反应孔,100 μL/孔,37℃ 孵育 30

min 后洗涤 5 次;每孔加入 100 μL OPD 显色液,37℃ 避光反应 15 min 后加入 50 μL 2 M 硫酸终止反应,用酶标仪测定 490 nm 的吸光度值。以阴性对照孔的平均吸光度值的 2.1 倍为阈值判定阳性。

### 1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism5 软件分析处理数据,组间比较采用独立样本 Bonferroni's Multiple Comparison Test, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CVA16 病毒感染长爪沙鼠的敏感性试验

长爪沙鼠感染 CVA16 后可出现活动减少、后肢无力、麻痹瘫痪、死亡等临床症状(图 1)。不同日龄长爪沙鼠对 CVA16 感染的敏感性不同并存在明显差异。7 日龄长爪沙鼠在攻毒后第 3 天出现症状,第 8 天全部死亡,存活率为 0;14 日龄长爪沙鼠在攻毒后第 4 天出现临床症状,第 9 天全部死亡,存活率为 0;21 日龄长爪沙鼠也在攻毒后第 4 天出现症状,但临床症状比 7 日龄和 14 日龄鼠轻,第 7 天有部分感染沙鼠死亡,第 8 天感染沙鼠症状开始减轻,存活率为 62.5%;28 日龄长爪沙鼠在攻毒后第 4 天出现轻微临床症状(毛发竖起,轻微肌无力),第 9 天起逐步恢复正常,存活率为 100%(图 2)。7 日龄和 14 日龄沙鼠对 CVA16 感染的敏感性有统计学意义( $P < 0.05$ ),21 日龄和 28 日龄沙鼠感染 CVA16 也会出现临床症状或死亡,但差异不具有统计学意义( $P > 0.05$ )。按照长爪沙鼠日龄、临床评分和存活率,确定 14 日龄长爪沙鼠为 CVA16 病毒感染最合适的对象,并用于后续试验。

### 2.2 CVA16 病毒感染长爪沙鼠的剂量与效应关系

14 日龄长爪沙鼠注射不同剂量病毒,表现的症状与剂量成正相关性( $P < 0.0001$ )。用  $1 \times 10^5$  CCID50 病毒量攻毒,第 3 天出现临床症状,在注射第 8~9 天全部死亡,存活率为 0。随着病毒量减少,出现症状减轻,存活率提高, $1 \times 10^4$  CCID50 病毒量,平均临床评分 2.54,存活率 62.5%; $1 \times 10^3$  CCID50 病毒量,平均临床评分 1.44,存活率 75%; $1 \times 10^2$  CCID50 病毒量,平均临床评分 0.88,存活率 87.5%。 $1 \times 10^5$  和  $1 \times 10^4$  CCID50 病毒量与对照 MEM 液组比较有明显差异( $P < 0.05$ )。最后用 Reed-Muench 法计算出 CVA16 对沙鼠的 LD50 剂量为  $1 \times 104.5$  CCID50 病毒量,结果见图 3。

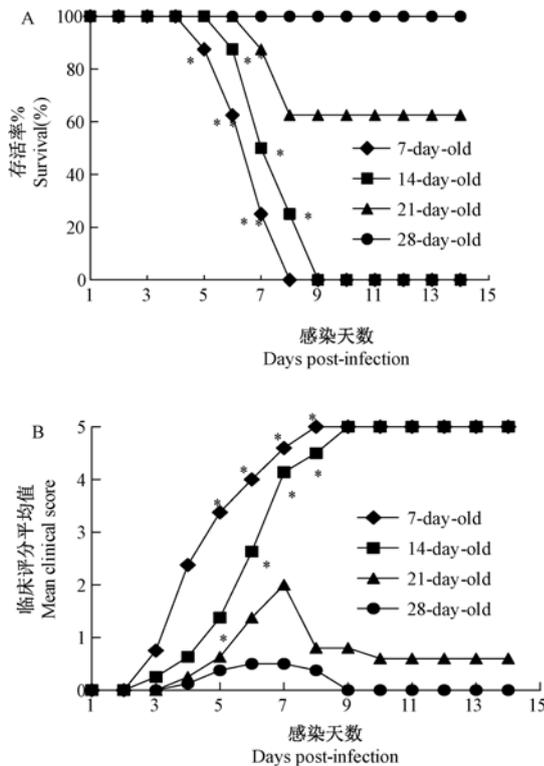


注:(A)正常;(B)病变。

图 1 14 日龄长爪沙鼠感染 CVA16 出现后肢麻痹

Note. (A) normal. (B) paralysis.

Fig.1 Hindlimb paralysis caused by CVA16 infection in 14-day-old Mongolian gerbils

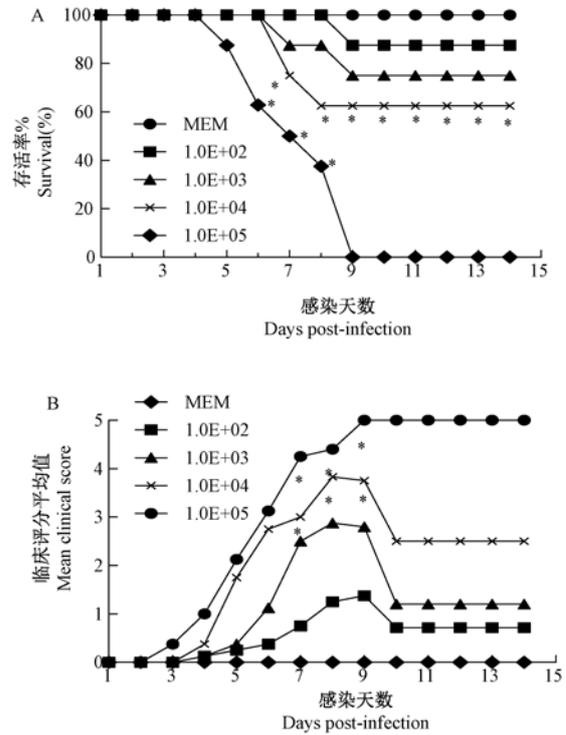


注:组间比较, \*  $P < 0.05$ 。

图 2 CVA16 感染长爪沙鼠的敏感性试验( $n = 8$ )

Note. Compared with multiple groups, \*  $P < 0.05$ .

Fig.2 Sensitivity test of CVA16 infection in Mongolian gerbils



注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ 。

图 3 CVA16 感染沙鼠的剂量与效应关系( $n = 8$ )

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

Fig.3 Dose-dependent consequence of CVA16 infection in Mongolian gerbils

### 2.3 感染沙鼠的血液和主要组织器官中 CVA16 病毒的复制繁殖

根据对 14 日龄长爪沙鼠感染 3 d 后的血液和所选择主要组织器官提取上清液中 CVA16 病毒滴度的测定结果(图 4), CVA16 病毒均有存在,在后肢肌肉和脑组织中滴度最高(达  $6 \times 10^5$  CCID<sub>50</sub>),表明 CVA16 确实感染了长爪沙鼠并在其体内进行了有效的复制和繁殖。

### 2.4 CVA16 灭活疫苗对长爪沙鼠的免疫保护作用

免疫两针 CVA16 灭活疫苗的 14 日龄沙鼠用 LD<sub>50</sub> 剂量攻毒,注射第 5 天有 2 只出现临床症状,一只症状较轻,另一只第 7 天死亡,存活率 87.5%。疫苗免疫诱导沙鼠产生的 CVA16 中和抗体几何平均滴度(GMT)为 28.14,特异性抗体阳性率为 87.5%,而且中和抗体效价高低与 ELISA 测定的总抗体 OD 值完全对应,呈现正相关性(表 1)。上述结果表明 CVA16 灭活疫苗对长爪沙鼠有显著的免疫保护效果。

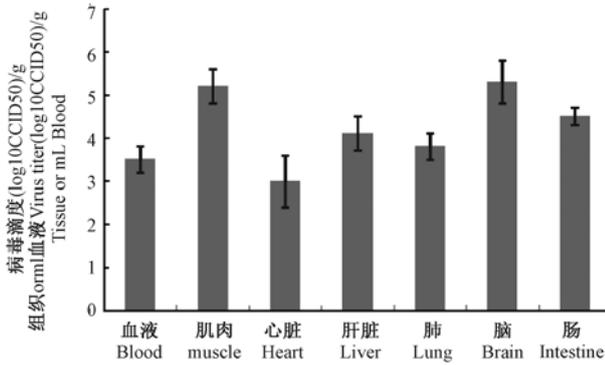


图 4 CAV16 感染 14 日龄长爪沙鼠 3 d 后血液和主要组织中的病毒滴度

Fig. 4 Virus titers in various tissues of CVA16-infected Mongolian gerbils 3 days post-infection

表 1 CVA16 灭活疫苗对长爪沙鼠的免疫原性

Tab.1 Immunogenicity of inactivated CVA16 vaccine in Mongolian gerbils

| 血清编号<br>Serum NO. | 中和抗体效价<br>Neutralizing antibody titers | 总抗体 A490 值<br>The total value of antibody A490 |
|-------------------|--|--|
| 1                 | 1:34.9                                 | 1.399  |
| 2                 | 1:42.4                                 | 1.647  |
| 3                 | 1:35.5                                 | 1.358  |
| 4                 | 1:28.2                                 | 1.217  |
| 5                 | 1:17.8                                 | 0.867  |
| 6                 | 1:24.1                                 | 1.138  |
| 7                 | 1:14.1                                 | 0.546  |

注: GMT 为 28.14; 中和抗体效价  $\geq 1:8$  判断为抗体阳性; 以阴性对照 2.1 倍为阈值判定阳性, cutoff 值 0.201。

Note: GMT to 28.14. Neutralizing antibody titer  $\geq 1:8$  judged to be antibody positive. To 2.1 times the negative control positive determination, cutoff values for 0.201.

### 3 讨论

柯萨奇病毒 A16 型是引起手足口病的主要病原体之一, 近年来越来越多报道显示 CVA16 除引起轻症外, 亦可导致心肌、心包、脑部和肺部等疾病, 甚至引发致死性心肌炎、脑干脑炎和肺炎等致死性症状<sup>[1]</sup>, 研发相应疫苗对全面有效地预防控制手足口病的暴发流行有重大意义。动物模型是疫苗临床前研究阶段评价保护效果等关键指标的重要工具, 直接影响疫苗评价的准确性。目前常用的动物模型主要是小鼠乳鼠模型和猴体模型, 小鼠乳鼠是相对敏感和常用的小动物感染模型, 但由于其感染年龄过低, 感染周期短, 限制了其在疫苗免疫效果评价和药物筛选中的应用; 而最为接近人类的猴体动物模型的研究虽然已经取得了一定的进展, 但由于存在动物来源困难、饲养环境要求高、运输条件苛

刻、试验费用高等客观原因, 极大地限制了该模型的应用和发展。因此, 开发建立新的手足口病小动物模型具有实际意义<sup>[7]</sup>。

长爪沙鼠属于啮齿目、沙鼠属动物, 1935 年由日本人开始驯化和实验动物化, 60 年代开始作为实验动物应用于医学研究。其对流行性出血热病毒、幽门螺旋杆菌、寄生虫等多种病原体易感, 相比于其他啮齿类实验动物, 长爪沙鼠受感染可表现出与人类更相似的病理学特征和临床症状, 因此长爪沙鼠作为具有独特生物学特性的“多功能”实验动物, 已广泛用于疫苗研制和病原感染等生物医学研究领域<sup>[11-13]</sup>。Yao 等<sup>[7]</sup>用一株临床分离的 EV71 病毒感染长爪沙鼠, 发现 7 到 28 日龄沙鼠感染后展现后肢麻痹、行动迟缓、运动失调和昏睡倦怠等症状并最终致死, 另伴有严重的中枢神经系统相关病变, 28 至 49 日龄沙鼠对 EV71 敏感度逐渐降低, 而 49 日龄以上沙鼠感染 EV71 后没有表现症状但多数产生相应的中和抗体。同时, 他们对新生沙鼠腹腔内接种 EV71 灭活疫苗 (20 mg/只) 并在一周后加强免疫一次, 再隔 2 周后即 21 日龄时, 用致死剂量 (100 倍 LD<sub>50</sub>) EV71 病毒进行攻毒实验, 发现接种 EV71 灭活疫苗对长爪沙鼠具有完全的免疫保护效果<sup>[7]</sup>。

CVA16 病毒 YY157 株临床分离后未经小鼠活体驯化传代, 前期工作中我们已测定了其基因组核酸全序列 (GenBank 序列号 KC507895)、探索了其在 Vero 等<sup>[8,9]</sup>细胞中培养与增殖特性并确定了衣壳蛋白 VP1 ~ VP3 的 B 淋巴细胞线性抗原表位<sup>[10]</sup>。我们将经过体外细胞培养繁殖并收获的 CVA16 YY157 株病毒通过腹腔注射感染长爪沙鼠, 后者出现活动减少、后肢无力、麻痹瘫痪、死亡等临床症状, 对 CAV16 感染的敏感性与沙鼠日龄相关即鼠龄越小越敏感; 在剂量与效应关系实验结果显示症状和死亡率与剂量成正相关性, 其 LD<sub>50</sub> 量与小鼠乳鼠模型接近<sup>[5]</sup>。先前在成功建立 EV71 H3-TY 株感染小鼠乳鼠模型基础上, 我们也曾尝试建立 CAV16 YY157 株感染小鼠乳鼠模型, 发现 5 日龄以下乳鼠才能被有效感染并展示类似的表型症状和剂量与效应关系。在本实验中感染 CVA16 使用的是 7 日龄以上长爪沙鼠, 并通过腹腔注射途径, 不同于小鼠乳鼠模型的颅内注射, 不会直接破坏神经系统, 更能客观反映病毒感染特征, 实验结果也显示应该比小鼠乳鼠模型具有更大实用价值。

在疫苗研发中, 疫苗免疫原性和保护效果评价

是疫苗质量的关键指标。与小鼠乳鼠模型(通过免疫怀孕母鼠,对其所产新生乳鼠攻毒)相比,长爪沙鼠模型避免了前者通过母传抗体间接评价疫苗模式带来的相关问题,同时也降低了由于小鼠乳鼠日龄过小给实验带来的不确定性,更能真实反映疫苗免疫保护效果。本文前述的 CVA16 灭活疫苗对的长爪沙鼠免疫保护实验中有 2 只在攻毒后第 5 天出现临床症状,其中 1 只在攻毒后第 7 天死亡,导致存活或免疫保护率不是 100%,很可能与免疫剂量低(10 mg/100 mL/只)和个体差异导致的中和抗体滴度不高有关。但 CVA16 感染长爪沙鼠引发的症状及其灭活疫苗的免疫保护作用均和 EV71 高度类似<sup>[7]</sup>。下一步我们将通过分子生物学方法检测相关细胞因子水平等状况。

总之,本实验利用浙江省实验动物中心驯养的 Z:ZCLA 长爪沙鼠建立了简便和可靠的对 CAV16 敏感的又一小型动物模型,其进一步优化、完善了 CVA16 的现有动物模型,可用于 CVA16 病毒致病机制、感染特点的研究和其相关疫苗及药物效果的评价。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 李兰娟.手足口病[M].浙江省科学技术出版社,2008.
- [ 2 ] 王一平,毛群颖,梁争论.柯萨奇 A 组 16 型研究进展[J].微生物学免疫学进展,2012,40(3): 62-66.
- [ 3 ] Mao Q, Wang Y, Yao X, *et al.* Coxsackievirus A16: Epidemiology, diagnosis, and vaccine [J]. Hum Vaccin Immunother, 2014, 10(2): 360-367.
- [ 4 ] Zhu FC, Meng FY, Li JX, *et al.* Efficacy, safety, and immunology of an inactivated alum-adjuvant enterovirus 71 vaccine in children in China: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. Lancet, 2013, 381(9882): 2024-2032.
- [ 5 ] Mao Q, Wang Y, Gao R, *et al.* A neonatal mouse model of coxsackievirus A16 for vaccine evaluation [J]. J Virol, 2012, 86(22): 11967-11976.
- [ 6 ] Liu Q, Yan K, Feng Y, *et al.* A virus-like particle vaccine for coxsackievirus A16 potently elicits neutralizing antibodies that protect mice against lethal challenge [J]. Vaccine, 2012, 30(47): 6642-6648.
- [ 7 ] Yao PP, Qian L, Xia Y, *et al.* Enterovirus 71-induced neurological disorders in young gerbils, *Meriones unguiculatus*: development and application of a neurological disease model [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51996.
- [ 8 ] 张锋,朱莲,陈军,等.柯萨奇病毒 A16 型 YY157 株在 Vero 细胞中培养与增殖特性的研究[J].中华实验和临床病毒学杂志,2014,28(6): 446-448.
- [ 9 ] 陈军,朱莲,张锋,等.柯萨奇病毒 YY157 株在不同细胞系中的增殖特性[J].国际流行病学传染病学杂志,2015,42(2): 103-106.
- [ 10 ] 高孟,倪红霞,朱莲,等.柯萨奇病毒 A16 型衣壳蛋白 VP1~VP3 的 B 淋巴细胞线性抗原表位预测与确定[J].中华临床感染病杂志,2015,80(6): 543-548.
- [ 11 ] 翁景清,朱智勇.双价流行性出血热灭活疫苗的研究和应用[J].医学研究通讯,2000,29(10): 21-22.
- [ 12 ] 肖丽,戴方伟,宋晓明,等.长爪沙鼠在病原感染研究中的应用[J].中国比较医学杂志,2013,23(7): 61-67.
- [ 13 ] 卢领群,宋晓明,戴方伟,等.长爪沙鼠的生物净化技术[J].中国比较医学杂志,2014,24(4): 62-65.

[收稿日期]2016-07-04



# 广东小鼠腺病毒血清学调查及病毒和抗体在人工感染小鼠体内消长规律研究

罗银珠<sup>1,2</sup>, 张 钰<sup>1,2</sup>, 潘金春<sup>1,2</sup>, 王 静<sup>1,2</sup>, 袁 文<sup>1,2</sup>, 何丽芳<sup>1,2</sup>,  
吴瑞可<sup>1,2</sup>, 黄碧洪<sup>1,2</sup>, 郭鹏举<sup>1,2</sup>, 黄 韧<sup>1,2\*</sup>

(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 了解我省小鼠腺病毒(Mad)自然感染情况及探究人工感染 Mad 小鼠体内各脏器组织中病毒分布规律及血清抗体变化。方法 采用 ELISA 方法对 2007 年和 2015 年饲养于普通环境小鼠血清及 2013 年~2015 年广东省 12 家监督单位和 32 家委托单位 SPF 级小鼠血清进行病毒抗体检测。利用腹腔注射方法感染 36 只 3 周龄 BALB/c 小鼠, 0.2 mL/只, 浓度为  $4.5 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L, 每天观察动物临床表现, 并于攻毒前第 0 天和攻毒后第 3、7、10、15、18、21、30、37、44、51、60 天剖检小鼠(各 3 只), 取组织标本(心、肝、脾、肺、肾、脑、胃、盲肠内容物)及血清, 应用实时荧光定量 PCR(QPCR)方法检测组织病毒核酸, ELISA 方法检测血清抗体水平。结果 普通饲养小鼠抗体阳性率为 24.44%~84.15%, 其中以 Mad-2 型 K87 株血清型为主。SPF 级小鼠 Mad 血清抗体阳性率均为 0%。所有攻毒小鼠均呈隐性感染, 无临床表现。攻毒后第 3 天及 7 天小鼠各组织病毒核酸检测阳性率均为 100%(3/3), 其中以脾脏 100% 阳性率维持时间最长(60 d)。除肝脏外, 小鼠各组织病毒含量均在攻毒后 7 d 达到高峰, 其中以脾脏病毒含量最高( $5.5 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L), 其次是心脏( $3.4 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L)、盲肠内容物( $2.6 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L)和胃( $2.6 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L), 脑为  $0.8 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L。攻毒后 15 d 可测出血清抗体, 在 37 d 达到峰值, 此后至 60 d 一直维持高水平。结论 SPF 级小鼠 Mad 感染率低, 普通环境饲养小鼠 Mad 感染率高。人工感染小鼠脾脏病毒含量最高, 阳性率维持时间最长, 说明病毒可以在脾脏内长期复制, 感染后第 7 天为组织病毒核酸最佳检测时间点。血清抗体在感染后 15~60 d 内均可以作为监测指标。

**【关键词】** 小鼠腺病毒; 血清学; 调查; 人工感染; 体内分布

**【中图分类号】** **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0043-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.009

## Serological Survey of Mad Infection Among Mice in Guangdong and Distribution and Serological Studies in Artificial Infection

LUO Yin-zhu<sup>1,2</sup>, ZHANG Yu<sup>1,2</sup>, PAN Jin-chun<sup>1,2</sup>, WANG Jing, YUAN Wen<sup>1,2</sup>, HE Li-fang<sup>1,2</sup>,  
WU Rui-ke<sup>1,2</sup>, HUANG Bi-hong<sup>1,2</sup>, Guo Peng-ju<sup>1,2</sup>, HUANG Ren<sup>1,2\*</sup>

(1. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the natural infection rate of Mouse Adenovirus(Mad) in Guangdong province and to estimate the tissue distribution and serology changes of Mad in infected mice. **Methods** Serums of mice from

[基金项目] 广东省科技计划项目(2014B070706006)。

[作者简介] 罗银珠(1983-), 女, 硕士, 兽医师, 研究方向: 实验动物病原学。E-mail: agluo122@sina.com

[通讯作者] 黄韧(1959-), 男, 博士, 研究员。E-mail: labking@sohu.com

general environment of Guangzhou in 2007 and 2015, and the SPF mice from 12 supervision and 32 entrusted units of Guangdong province among 2013 ~ 2015 were detected by ELISA. Thirty-six 3 weeks old BALB/c mice were each intraperitoneally inoculated with 0.2 mL of Mad in  $4.5 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L concentration. The tissue samples, including heart, liver, spleen, lung, kidney, brain, stomach, cecum contents and serum were taken at 0 d before inoculation, and 3, 7, 10, 15, 18, 21, 30, 37, 44, 51, 60 d after inoculation (3 animals each time). Real-time fluorescent quantitative PCR (Q-PCR) method was used to detect the virus nucleic acid of tissue. In addition, the antibody against Mad was detected by ELISA. **Results** Antibody positive rate was 24.44% ~ 84.15% and 0% among the general environment mice and the SPF mice, respectively, which is given priority to with Mad-2 K87 serotype strains. There were no clinical manifestations among all infected mice. The virus nucleic acid positive rate was 100% (3/3) in all tissue samples in 3 d and 7 d, which maintained a longest time to 60 d in spleen. Besides the liver, virus nucleic acid content were highest at 7 d in each tissue of infected mice, with spleen highest ( $5.5 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L), heart was second at  $3.4 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L, cecum contents and stomach ranked third ( $2.6 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L), followed by brain ( $0.8 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L). The antibody could be successfully detected at 15 d after inoculated, hit the peak at 37 d and maintained a high level until 60 d. **Conclusions** Mad infection rate is low in SPF mice, high in general environment mice. Mad nucleic acid content is the highest and positive rate maintain the longest in spleen, suggesting that Mad mainly replicate in spleen. And 7 d is the best pot for nucleic acid testing. Serum neutralizing antibody can be used as a monitoring index within 15 ~ 60 d after infection.

**【Key words】** Mouse adenovirus; Serology; Survey; Artificial infection; Distribution.

小鼠腺病毒 (mouse adenovirus, Mad) 属于腺病毒科, 哺乳动物腺病毒属, 核酸线性双股 DNA<sup>[1,2]</sup>。目前已报道有 Mad-1 型 FL 株 (1960 年 Hartley 等<sup>[3]</sup> 分离)、Mad-2 型 K87 株 (1966 年 Kazuo Hashimaoto 等<sup>[4,5]</sup> 分离) 和 Mad-3 型 (2009 年 Boris Klempa 等<sup>[6]</sup> 分离) 三个血清型。小鼠是 Mad 的自然宿主, Becker 等<sup>[9]</sup> 2007 年在英国地区捕获的野鼠血清流行病学调查中检测出有较高 Mad 阳性率 (68%), 但在实验鼠自然感染率不高<sup>[1,7,8]</sup>, 隐性感染居多, 被感染的小鼠可长期带毒和排毒并可增加感染其他病原微生物可能性, 从而影响小鼠健康, 干扰实验研究。国家实验动物微生物监测标准 (GB14922.2-2011) 将 Mad 列入需要排除的检测项目。为了解我省 SPF 级与普通级小鼠中 Mad 流行情况、病毒和抗体在人工感染小鼠体内消长规律, 本实验对我省 2013 ~ 2015 年 SPF 级小鼠及 2007 年和 2015 年广州地区普通环境饲养小鼠进行 Mad 抗体检测, 并利用 Mad-1 型 FL 株低浓度感染低日龄小鼠来模拟自然感染, 观察感染鼠临床症状及抗原抗体消长情况, 旨在为我省实验小鼠质量控制工作及 Mad 科学研究提供实验室参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 小鼠血清、病毒和细胞株

2007 年和 2015 年广州地区普通环境饲养小鼠血清及 2013 年 ~ 2015 年广东省 12 家监督单位和

32 家委托单位提供的 SPF 级小鼠。

小鼠腺病毒 FL 株购自美国典型菌种保藏中心 (ATCC VR-550), BHK-21 细胞由本实验室保存。

### 1.2 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠, 雄性, 36 只, 3 周龄, 体重 15 ~ 18 g, 购自于广东省医学实验动物中心 [SCXK (粤)2013 - 0002], 饲养于广东省实验动物监测所二级生物安全感染实验室内 [SYXK (粤)2012 - 0122], 实行光照/黑暗各 12 h 昼夜循环, 自由进食, 动物实验开展经广东省实验动物监测所动物使用和管理委员会审批 (I-IACUC2015003)。实验前, 随机抽取部分动物血清经酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测确定为 Mad 抗体阴性。

### 1.3 主要试剂和仪器

荧光定量 PCR 仪为 ABI 7500; 酶标仪为 Thermo M $\mu$ Ltiskan GO; DNA 抽提试剂盒购自 Omega 公司; ELISA 抗体检测试剂盒购于 EXPRESS BIO 公司; DMEM 培养液购自 Gibco 公司; DNA 聚合酶购自大连宝生物公司; 其余试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 QPCR 引物合成

所用 Mad 引物参照参考文献<sup>[10]</sup>。引物由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。

#### 1.4.2 病毒滴度测定

将小鼠腺病毒接种 BHK-21 细胞, 吸附作用 1 h 后加入含 2% 血清的维持液, 放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 细

胞培养箱中培养,倒置生物显微镜观察细胞形态,70% 细胞产生细胞病变(CPE)后收获病毒液,反复冻融 3 次,离心取上清液作为感染病毒,并用 QPCR 对病毒拷贝数进行定量。

1.4.3 人工感染试验

取浓度约为  $4.5 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L 的病毒液,腹腔注射病毒液每只 0.2 mL。动物接种病毒后,观察 60 d。每天观察动物的皮毛、外观、行为活动、饮食和精神状态。并在感染后第 3、7、10、15、18、21、30、37、44、51、60 天时,随机各取 3 只,麻醉后眼眶采血以制备血清置 -20℃ 待测,随后脱颈椎安乐死并快速采集小鼠心脏、肝、脾、肺、肾、脑、胃、盲肠内容物置 -20℃ 待测。

1.4.4 QPCR 检测各组织抗原

称量适量组织,加入 600  $\mu$ L 的 PBS 缓冲液于组织研磨机上研磨 3 ~ 5 min,将组织匀浆。研磨后,10000 r/min 离心 10 min,取 200  $\mu$ L 上清抽提核酸,具体步骤参照核酸提取试剂盒(TIANamp Genomic DNA Kit)说明书。最后应用 ABI 7500 Real-Time PCR System, Taqman RT-PCR 两步法试剂盒(Takara)即 95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 30 s,进行 40 个循环,荧光信号采集设于 60℃,溶解曲线设置为:95℃ 5 s,65℃ 1 min,50℃ 30 s,进行荧光定量 PCR 检测鉴定。

1.4.5 血清抗体检测(ELISA)

根据试剂盒说明进行操作:样本稀释及加样,将

血清样本从 1:50 稀释,再向 ELISA 微孔板各加 100  $\mu$ L 稀释好的样本;37℃ 孵育后洗板,每孔加 100  $\mu$ L 酶标二抗,37℃ 孵育后洗板,加显色液;反应完毕,立即用酶标仪读数,测试波长为 405 nm。

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

1.5 统计学方法

所有数据采用 GraphPad Prism 5.01 进行数据处理及分析。

2 结果

2.1 小鼠抗体阳性率

小鼠抗体检测结果,广州地区普通环境饲养小鼠 Mad 抗体检测阳性率较高(见表 2),2015 年比 2007 年高 4 倍,均以 Mad-2 K87 血清型流行为主。2013 年 ~ 2015 年广东省 SPF 级小鼠 Mad 阳性率为 0%(见表 3),说明 SPF 级小鼠 Mad 感染率低或无。

2.2 人工感染小鼠临床表现、血清及体内组织分布结果

2.2.1 临床观察结果

BALB/c 感染 Mad 后直至实验结束(60 d),除感染初期动物出现轻微立毛,在精神状态、运动及饮食方面等均无明显异常,总体呈现隐性感染状态。

表 1 Mad 引物序列

Tab.1 Primer sequences of Mad

| 引物 Primer           | 序列 Sequence                                  |
|---------------------|--|
| 正向引物 Forward primer | 5' - ACTCTGAGCGGTGTCCGC - 3'                 |
| 反向引物 Reverse primer | 5' -GATGTGCATGAAGGCCCACT - 3'                |
| 探针 Probe            | 5' -JOE -TGACGACGCCTTCAATGCAGCC- ECLIPS - 3' |

表 2 2007 和 2015 年广州地区普通环境饲养小鼠 Mad 抗体阳性率(%)

Tab.2 Mad antibody positive rate in mice raised in ordinary environment in 2007 and 2015 of Guangzhou region

| 项目(Items)                 | 抗体阳性率(Positive rate) |              |
|---------------------------|----------------------|--------------|
|                           | 2007                 | 2015         |
| FL 血清型(FLserotype)        | 0(0/45)              | 2.44(2/82)   |
| K87 血清型(K87serotype)      | 24.44(11/45)         | 81.71(67/82) |
| 总阳性率(Total positive rate) | 24.44(11/45)         | 84.15(69/82) |

表 3 2013 年 ~ 2015 年广东省检测 SPF 级动物感染率比较

Tab.3 Results of Mad antibody tests in SPF mice in 2013 ~ 2015 in Gongdong

| 项目(Items)            | 抗体阳性的动物数量(Number of antibody positive animals) |      |      |
|----------------------|--|------|------|
|                      | 2013   | 2014 | 2015 |
| 总数(Detection number) | 588  | 296  | 875  |
| 阳性数(Positive number) | 0  | 0    | 0    |
| 阳性率(Positive rate)   | 0%   | 0%   | 0%   |

注:动物来源于广东省 12 家监督单位和 32 家委托单位 SPF 级小鼠。

Note. SPF mice from the 12 supervision companys and 32 units entrusted of Guangdong province.

### 2.2.2 组织病毒含量变化

感染后第 3 天及 7 天小鼠各组织病毒核酸检测阳性率均为 100% (3/3), 其中以脾脏 100% 阳性检测率维持时间最长(图 1A)。感染后第 7 天病毒核酸在脾组织中含量最高, 其次是心脏、盲肠和胃, 最低是肺和肝(图 1B)。小鼠体内各组织病毒含量均在人工感染后第 7 天达到高峰(肝在第 3 天), 随后病毒核酸开始下降。(图 1C、图 1D)。

### 2.2.3 血清抗体滴度变化

感染小鼠体内抗体滴度随着感染时间迁移而升高, 接种后 15 d 可测出阳性抗体(阳性率为 100% (3/3)), 在 37 d 达到峰值, 此后至 60 d 可一直维持高水平, 为便于计算, 抗体滴度用 Log<sub>2</sub> 的指数表示(图 2)。

## 3 讨论

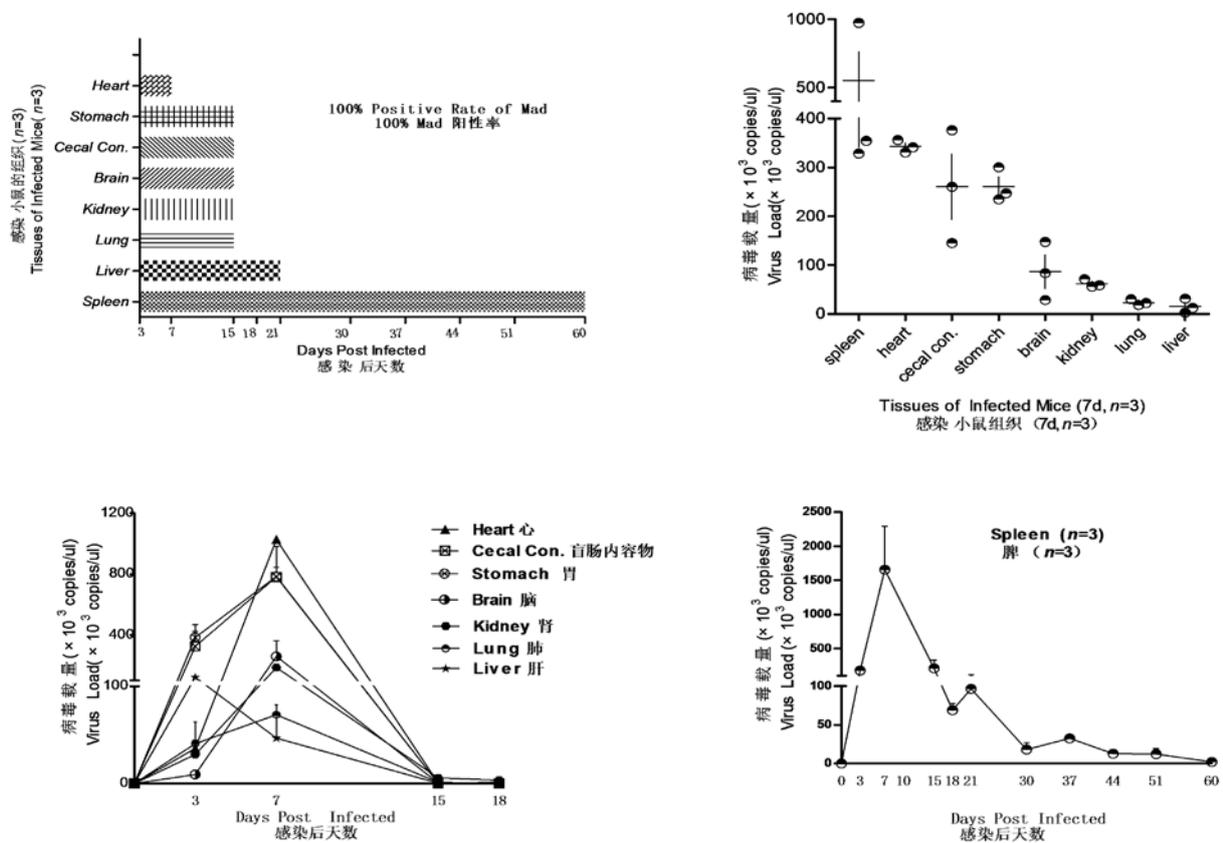
腺病毒科已知分有 5 类包括哺乳动物腺病毒属(Mastadenovirus)、禽腺病毒属(Aviadenovirus)、鱼类腺病毒属(Ichadenovirus)、唾液酸酶腺病毒属(Siadenovirus)、腺嘧啶富集性腺病毒属(Atadenovirus)等<sup>[11]</sup>。鼠腺病毒(Mad)属于哺乳腺病毒。中国 Mad 在啮齿类动物中血清流行病学情况, 20 世纪 90 年代中期 1985~1987 (14 个省市 38 个单位开放饲养和 SPF 小鼠), 开放养小鼠阳性率为 4% (24/623), 屏障小鼠阳性率为 0% (0/178)<sup>[12]</sup>, 21 世纪初 2003~2007 年(21 个省/市, 47 个单位送检 39 个品系小鼠)血清阳性率 0.24%<sup>[13]</sup>; 近年 2012~2013 (10 余个省市 36 家实验动物使用机构) Mad 血清阳性率 8.3% (27/325)<sup>[14]</sup>, 总体呈现高低高曲线。从我省小鼠血清流行性调查实验数据可以看出 2013 年~2015 年间 SPF 级小鼠 Mad 感染率为 0。说明 Mad 在实验用 SPF 鼠内流行率低, 而对比之下, 广州地区普通环境饲养的小鼠血清病毒抗体检测阳性率高, 2015 年达到 80% 以上, 显示着该病毒在该鼠群中携带率高, 并以 Mad-2 K87 血清型流行为主。以上结果反映了我省在实验鼠 Mad 病毒控制及质量控制方面达到较好的水平, 而开放饲养环境下因饲养过程中有与携带病原野鼠接触的可能性导致 Mad 在普通级小鼠内流行。

实验小鼠自然感染临床虽然不多见, 但可能会干扰实验研究, 特别是涉及中枢神经系统、肾脏和

肠胃系统<sup>[8,15]</sup>。本试验结果显示通过腹腔途径接种 BALB/c 小鼠后, 感染小鼠无呈现明显的临床症状, 感染后 3 d Mad 各组织呈现 100% 阳性检出率并以脾脏 100% 阳性检出率维持时间最长(60 d)。在血液系统, 神经系统, 消化系统等均检测出病毒核酸, 此结果与 1998 年报告<sup>[8]</sup>将此归类为多系统性感染疾病结论一致。脑内检出病毒核酸, 与研究<sup>[16,17]</sup>发现内皮细胞是其主要侵袭目标, 可破坏小鼠血脑屏障的结果相吻合。病毒载量结果显示各组织载毒量在 7 d 最高, 到 15 d 大部分组织病毒载量检测不到或没有, 暗示该病毒致病力有限。心脏在本次实验中其最高组织病毒载量为  $3.4 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L(7 d), 位同时段组织病毒载量第二(第一为脾脏), 这与 2015 年关于 Mad-1 与心肌炎关系研究<sup>[18]</sup>, 报道<sup>[19-21]</sup> Mad 感染成年 C57 小鼠内可引起脑脊髓炎出血性脑脊髓炎病症, 小鼠心肌炎结果形成互相佐证。小鼠脾脏引起本实验的关注, 其病毒含量明显高于其他组织, 且在脾脏持续复制, 核酸检测阳性维持时间最长, 说明脾脏是病毒长期复制的器官。

本试验所感染小鼠大部分组织载毒量在 7 d 达到高峰然后逐渐下降至检测不到, 相比之下 Mad 抗体水平在 15 d 即可以检测到抗体(阳性率为 100%,  $n=3$ ), 抗体滴度在 37 d 达到峰值, 此后至 60 d 一直维持高水平。提示感染早期(15 d 前)以病原核酸检测为宜, 15 d 后以抗体检测为主, 并建议对小鼠群的监测每 1~2 个月进行一次, 可及时了解小鼠群中 Mad 流行情况。在感染早期, 盲肠内容物及胃都出现了高载毒量, 证实该病毒可通过粪便途径传播和排毒, 粪便、垫料是 Mad 的重要传播途径之一, 必须严格执行动物房生物安全和卫生管理是预防与控制 Mad 的传播重要举措。

QPCR 核酸检测法近年来广泛被用于微生物核酸检测, 该检测方法具有快速、敏感、特异、通用、成本低及可定量等优点, 对腺病毒感染的早期诊断及预防具有重要意义<sup>[22]</sup>。本研究利用 QPCR 法, 从 Mad 感染小鼠不同时间的组织标本中检测到病毒并对病毒核酸含量进行准确定量检测, 可以用来判断感染小鼠病毒的复制与所致疾病的病程的关系, 为实验动物小鼠腺病毒的检测、流行病学监测、预防等提供重要的理论依据和技术支持。

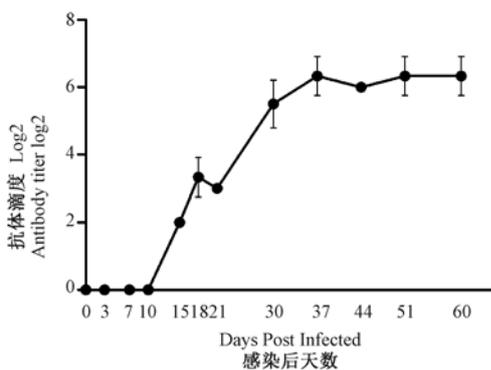


注: (A) 100% 核酸阳性率在各组织的维持时间; (B) 0 ~ 18 d 心、盲肠内容物、胃、脑、肾、肺、肝 Mad 病毒核酸含量变化图; (C) 各组织感染第 7 天核酸含量差异; (D) 0 ~ 60 d 脾脏 Mad 病毒核酸含量变化图。

图 1 Mad 病毒在感染小鼠各组织差异 (n = 3)

Note. (A) 100% antigen positive rate and difference tissues. (B) 0 ~ 18 d Mad contents of heart, cecum contents, stomach, brain, kidney, lung, and liver. (C) Contents of Mad in difference tissues (7 d). (D) Content of Mad in spleen (0 ~ 60 d).

Fig. 1 Mad nucleic acids in difference tissues of infected mice



注: 抗体滴度是能检出阳性结果的最大稀释倍数。

图 2 感染 BALB/c 小鼠抗 Mad 血清抗体的测定 (n = 3)

Note. Antibody titer is the biggest diluted multiples in checking out the positive sample.

Fig. 2 Determination of serum antibody against Mad of BALB/c mice infected

参考文献:

[ 1 ] 田克恭. 实验动物病毒性疾病 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1992, 41 - 45.

[ 2 ] Davison AJ, Benko M, Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses [J]. J Gen Virol, 2003, 84: 2895 - 2908.

[ 3 ] Hartley JW, Rowe WP. A new mouse virus apparently related to the ade-novirus group [J]. Virol, 1960, 11: 645 - 647.

[ 4 ] Hashimoto K, Sugiyama T, Sasaki S. An Adenovirus Isolated from the Feces of Mice I. Isolation and identification [J]. Jpn J Microbiol, 1966, 10 (2): 115 - 125.

[ 5 ] van der Veen J, Mes A. Serological classification of two mouse adenoviruses [J]. Arch Gesamte Virusforsch, 1974, 45 (4): 386 - 387.

[ 6 ] Klempa B, Kruger DH, Auste B, et al. A novel cardiotropic murine adenovirus representing a distinct species of mastadenoviruses [J]. J Virol, 2009, 83 (11): 5749 - 59.

[ 7 ] 贺争鸣, 范文平, 卫礼, 等. 小鼠腺病毒单克隆抗体的研制及初步应用 [J]. 中国实验动物学报, 1997, 5 (2): 15 - 18.

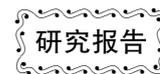
- [ 8 ] Baker DG. Natural Pathogens of Laboratory Mice, Rats, and Rabbits and Their Effects on Research [J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11(2), 231 - 266.
- [ 9 ] Becker SD, Bennett M, Stewart JP, *et al.* Serological survey of virus infection among wild house mice (*Mus domesticus*) in the UK [J]. Lab Anim, 2007, 41(2): 229 - 238.
- [ 10 ] Bootz F, Sieber I, Popovic D, *et al.* Comparison of the sensitivity of in vivo antibody production tests with in vitro PCR-based methods to detect infectious contamination of biological materials [J]. Lab Anim, 2003, 37(4): 341 - 51.
- [ 11 ] Adams MJ. Virus Taxonomy: Adenoviridae-Family [M]. Elsevier Inc, 2012, 125 - 141
- [ 12 ] 贺争鸣, 吴惠英, 卫礼, 等. 小鼠腺病毒在鼠群中心感染及血清学检测方法的比较 [J]. 北京实验动物学, 1988, 5(2): 16 - 20.
- [ 13 ] 王吉, 卫礼, 巩薇, 等. 2003 - 2007 年我国实验小鼠病毒抗体检测结果与分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(6): 394 - 396
- [ 14 ] 王翠娥, 陈立超, 周倩, 等. 实验大鼠和小鼠多种病毒的血清学检测结果分析 [J]. 实验动物科学, 2014, 31(2): 20 - 24.
- [ 15 ] Ginder DR. Increased susceptibility of mice infected with mouse adenoviruses to *Escherichia coli*-induced pyelonephritis [J]. J Exp Med, 1964, 120: 1117 - 1128.
- [ 16 ] Charles PC, Guida JD, Brosnan CF, *et al.* Mouse adenovirus type-1 replication is restricted to vascular endothelium in the CNS of susceptible strains of mice [J]. Virol, 1998, 245(2): 216 - 228.
- [ 17 ] Gralinski LE, Ashley SL, Dixon SD, *et al.* Mouse adenovirus type 1-induced breakdown of the blood-brain barrier [J]. J Virol, 2009, 83(18), 93 - 98.
- [ 18 ] McCarthy MK, Procario MC, Twisselmann N, *et al.* Proinflammatory effects of interferon gamma in mouse adenovirus 1 myocarditis [J]. J Virol, 2015, 89(1): 468 - 79.
- [ 19 ] Guida JD, Fejer G, Pirofski LA, *et al.* Mouse adenovirus type 1 causes a fatal hemorrhagic encephalomyelitis in adult C57BL/6 but not BALB/c mice [J]. J Virol, 1995, 69(12): 7674 - 7681.
- [ 20 ] Blailock ZR, Rabin ZR, Melnick JL. Adenovirus endocarditis in mice [J]. Science, 1967, 157(3784): 69 - 70.
- [ 21 ] Blailock ZR, Rabin ER, Melnick JL. Adenovirus myocarditis in mice. An electron microscopic study [J]. Exp Mol Pathol, 1968, 9(1): 84 - 96.
- [ 22 ] 姚新华, 郭英飞. 实时荧光定量 PCR 快速检测腺病毒方法的建立与评价 [J]. 解放军预防医学杂志, 2015, 33(2): 127 - 129.

[ 收稿日期 ] 2016 - 07 - 08

## ( 上接第 36 页 )

- cancer risk; results from the prostate cancer prevention trial [J]. Cancer Prev Res (Phila), 2013, 6(2): 91 - 99.
- [ 9 ] Yan XJ, Tian Y, Wang C, *et al.* The expressions and clinical significance of IGFBP-2, -3 in both serum and tumor tissues in patients with epithelial ovarian cancer. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2009, 40(4): 639 - 643.
- [ 10 ] D Katsaros, H Yu, M A Levesque, *et al.* IGFBP-3 in epithelial ovarian carcinoma and its association with clinicopathological features and patient survival [J]. Eur J Cancer, 2001, 37(4): 478 - 485.
- [ 11 ] PL Torng, YCG Lee, CYF Huang, *et al.* Insulin like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) acts as an invasion-metastasis suppressor in ovarian endometrioid carcinoma [J]. Oncogene, 2008, 27(15): 2137 - 2147.
- [ 12 ] A Karasik, J Menczer, C Pariente, *et al.* Insulin like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-2 are increased in cyst fluids of epithelial ovarian cancer [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1994, 78(2): 271 - 276.
- [ 13 ] H Kanety, M Kattan, I Goldberg, *et al.* Increased insulin like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) gene expression and protein production lead to high IGFBP-2 content in malignant ovarian cyst fluid [J]. Br J Cancer, 1996, 73(9): 1069 - 1073.
- [ 14 ] EJ Lee, C Mircean, I Shmulevich, *et al.* Insulin-like growth factor binding protein 2 promotes ovarian cancer cell invasion [J]. Mol Cancer, 2005, 4(1): article 7
- [ 15 ] JM Weiss, WY Huang, S Rinaldi, *et al.* IGF-I and IGFBP-3: risk of prostate cancer among men in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial [J]. Int J Cancer, 2007, 121(10): 2267 - 2273.
- [ 16 ] D Sachdev, D Yee. Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy [J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(1): 1 - 12
- [ 17 ] D Sachdev. Regulation of breast cancer metastasis by IGF signaling [J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2008, 13(4): 431 - 441.
- [ 18 ] Heidegger I, Pircher A, Klocker H, *et al.* Targeting the insulin-like growth factor network in cancer therapy [J]. Cancer Biol Ther, 2011, 11(8): 701 - 707.
- [ 19 ] Heidegger I, Massoner P, Sampson N, *et al.* The insulin-like growth factor (IGF) axis as an anticancer target in prostate cancer [J]. Cancer Lett, 2015, 367(2): 113 - 121.

[ 收稿日期 ] 2016 - 06 - 30



# 补肾养血方对卵巢早衰大鼠中抗苗勒氏管激素的影响

姬霞, 傅金英\*, 王冰玉, 胡俊攀

(河南省中医院, 河南中医药大学第二附属医院妇产科, 郑州 450002)

**【摘要】** **目的** 建立雷公藤多苷致卵巢早衰大鼠的模型, 研究补肾养血方对卵巢早衰大鼠中抗苗勒管素 (anti-mullerian hormone, AMH) 的影响。**方法** 使用雷公藤多苷建立卵巢早衰大鼠模型, 造模成功后, 分别采用高、中、低剂量补肾养血方对大鼠灌胃, 每日一次, 共 30 d。给药完毕后于显微镜下观察各组大鼠卵巢组织形态。酶联免疫吸附法、免疫组化染色法和定量反转录聚合酶连锁反应 (qRT-PCR) 分别检测大鼠血清中 AMH 含量以及卵巢内 AMH 的蛋白和 mRNA 表达水平。**结果** 组织形态学显示高中低剂量组的卵泡和黄体的生长均比模型组好; 酶联免疫吸附法、免疫组化和 qRT-PCR 结果显示补肾养血方呈剂量依赖性逆转雷公藤多苷导致大鼠血清中 AMH 浓度以及卵巢中 AMH 表达水平的降低。**结论** 补肾养血方可逆转雷公藤多苷引起卵巢中 AMH 水平降低, 提示补肾养血方具有防止卵巢早衰的功效。

**【关键词】** 补肾养血方; 卵巢早衰; AMH

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0049-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.010

## Effect of bushenyangxue prescription on the levels of anti-mullerian hormone in rat with premature ovarian failure

Ji Xia, Fu Jin-ying\*, Wang Bing-yu, Hu Jun-pan

(Department of Obstetrics and Gynecology, Henan Province Hospital of TCM, the Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

**【Abstract】** **Objective** Establish premature ovarian failure (POF) model in female Sprague Dawley by tripterygium wilfordii, and investigate the effect of bushenyangxue prescription on the levels of anti-mullerian hormone (AMH). **Methods** After POF model was established, rats were gave by gavage of different dosage of Bushenyangxue prescription for 30 days. The changes of histomorphology on rat ovarian tissue were observed by hematoxylin-eosin staining. Serum AMH concentration, protein and mRNA expression of AMH were measure with ELISA, immunohistochemical staining and qRT-PCR, respectively. **Results** The follicle and corpus luteum were atrophied after tripterygium wilfordii challenge, which was improved after treatment with Bushenyangxue prescription. Serum AMH, protein and mRNA expression of AMH were decreased tripterygium wilfordii-treated rats; this decrease was inhibited after treatment with Bushenyangxue prescription. **Conclusions** Our study indicates that Bushenyangxue prescription could preserve the AMH levels of POF rats. These findings suggest that Bushenyangxue prescription may be a useful strategy to treat POF.

**【Key words】** Bushenyangxue prescription; Premature ovarian failure (POF); AMH

[基金项目] 河南省中医药管理局科研课题(2014ZY02013)。

[作者简介] 姬霞(1968-), 女, 副主任医师, 本科, 研究方向: 中西医结合治疗妇产科疾病的基础与临床研究。

E-mail: jx.1120@163.com

[通讯作者] 傅金英(1968-), 主任医师, 医学博士, 研究方向: 妇科生殖内分泌。E-mail: fujinying2003@163.com

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是一种多因素导致的卵巢功能提前减退的症状,指女性在 40 岁以前出现持续闭经,不育,伴随雌激素降低,卵泡雌激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 和黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 升高的一种疾病<sup>[1]</sup>。卵巢早衰是妇科分泌领域的常见病,常出现症状:脸色潮红,性欲低下,午后潮热多汗,皮肤暗黄长斑等。对女性的身心产生严重影响<sup>[2]</sup>。有学者认为肾阴不足、天葵亏耗、任冲二脉受损是卵巢早衰的主要病机<sup>[3]</sup>。通过补肾,阴阳调和,能够调节激素水平,改善卵巢早衰的临床症状<sup>[4]</sup>,且基于养血补肾为基础的补肾养血方对 POF 具有积极的治疗作用<sup>[5]</sup>。近年来,现代中医研究发现,基于当归、熟地黄加减的补肾养血方能够通过上调 POF 大鼠卵泡及卵巢间质 Bcl<sub>2</sub> 蛋白的表达,下调 Bax 蛋白的表达,抑制卵泡的过快凋亡<sup>[6]</sup>,另有研究证明<sup>[7]</sup>,养血补肾方能够促进 POF 大鼠卵泡生长,降低 POF 大鼠血清 FSH、LH 水平,促进 E2 水平上升,改善卵巢功能。近年来,临床上使用抗穆勒氏管 (anti-mullerian hormone, AMH) 做为卵巢功能的评估<sup>[8]</sup>,更有研究指出,AMH 在雌性动物体内由卵巢细胞分泌,在一定程度上可以反映卵巢的功能状态<sup>[9]</sup>。但,关于养血补肾方对于 POF 大鼠中 AMH 的影响报道较少,因此本实验采用雷公藤多苷建立大鼠卵巢早衰大鼠模型,研究补肾养血方对卵巢早衰大鼠体内 AMH 的影响,为补肾养血方可防治改善卵巢早衰提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

处于动情期的雌性 SD 大鼠 60 只,10~12 周龄,SPF 级,体重为 230~270 g,由北京大学医学部实验动物中心提供 [SCXK(京) 2012-0016],所有大鼠在河南省中医药大学动物实验中心完成 [SYXK(豫) 2012-009],采用颗粒型普通饲料喂养,饮自来水,保持室温,模拟正常昼夜生理节律光照。

### 1.2 实验药品与试剂

雷公藤多苷片,购于安徽新陇海药业有限公司,规格 10 mg/片;补肾养血方由本院药剂科提供,组方:淫羊藿 10 g,熟地黄 15 g,当归 10 g,丹参 15 g,菟丝子 10 g,枸杞子 10 g,山茱萸 10 g,白芍 8 g,杜仲 8 g,川芎 5 g,甘草 5 g,水煎并浓缩,制成相当于生药材 2.0 g/mL 的混悬液,放于 4℃ 冰箱储存备

用。戊酸雌二醇 (补佳乐),购于法国 Delpharm Lille S. A. S,规格 1 mg/片;大鼠抗苗勒氏管激素 (anti-mullerian hormone, AMH) ELISA 试剂盒购于美国 Diagnostic Systems Laboratories 公司;AMH 抗体购于美国 Abcam 公司;AMH 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;其余试剂均为国产分析纯。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 分组和造模

将 SD 大鼠随机分为 6 组,每组 10 只,称重,分别设空白组,模型组,高剂量组,中剂量组,低剂量组和阳性对照组。除空白组外,其余 SD 大鼠以雷公藤多苷片 50 mg/kg 灌胃,每日一次,连续 15 d。

#### 1.3.2 动物给药

造模成功 24 h 后进行给药,依据人鼠的剂量换算,折算为人的等效剂量的 10 倍;空白组,正常饮食;模型组,以生理盐水 2 mL/kg 给药,每日灌胃 1 次;高剂量给药组,以补肾养血方 20 g/kg 给药,每日灌胃一次;中剂量给药组,以补肾养血方 10 g/kg 给药,每日灌胃一次;低剂量给药组,以补肾养血方 5 g/kg 给药,每日灌胃一次。阳性对照组,以戊酸雌二醇 0.12 mg/kg 给药,每日灌胃一次。各组连续给药 30 d。

#### 1.3.3 酶联免疫吸附试验检测大鼠血清中 AMH 含量

将各组大鼠称重,尾静脉取血 3 mL,3000 r/min 离心 15 min,收集上清液待测。按 AMH ELISA 试剂盒说明书进行操作。将样品加入酶标包被板中,37℃ 孵育 30 min,洗板;加入生物素化抗体工作液,封板膜封板后 37℃ 孵育 1 h,洗板;加入 HRP,37℃ 孵育 30 min,洗板。加入显色剂,酶标仪 450 nm 波长处检测各孔吸光度 (10 min 内)。

#### 1.3.4 卵巢组织学观察

各组大鼠完成给药 24 h 后,处死大鼠,取双侧卵巢,一侧卵巢置于 -80℃ 中保存。另一侧卵巢用 10% 中性甲醛固定,洗涤,依次用梯度乙醇脱水,于二甲苯中透明 15 min,石蜡包埋后切片,烤干,二甲苯脱蜡后再依次用梯度乙醇脱水,苏木素染色,盐酸乙醇分化,进行 HE 染色。倒置显微镜下观察各组大鼠的卵巢形态学。

#### 1.3.5 免疫组化染色法检测 AMH 的蛋白表达水平

将卵巢组织切片置于二甲苯 (I) (II) (III) 中脱蜡,依次放入无水乙醇,90% 乙醇,80% 乙醇,70% 乙

醇中,洗涤,置于 3% 过氧化氢溶液 10 min,封闭,加入 AMH 抗体,4℃ 过夜,显色。苏木素复染,返蓝,乙醇脱水,置于二甲苯中浸泡,加入中性树胶,封片晾干。根据染色细胞所占面积和细胞染色强度两项指标进行综合评分判断。综合评分 = (染色细胞分数 + 细胞染色强度分数)/2;0 - 0.5 分为(-);0.5 - 1.5 分为(+);1.5 - 2.5 分为(++);>2.5 分为(+++)。

### 1.3.6 卵巢 AMH 的 mRNA 表达水平

将冷冻的卵巢组织在冰浴中用电动匀浆机充分搅拌,提取各组卵巢的总 RNA,逆转录合成 cDNA,进行 PCR 反应,AMH 引物:上游:5'-TCCTAGAGACCCTCACTCGC-3';下游:5'-CACGGGTCTGAAAGGTTGA-3';β-actin 引物:上游:5'-GTGGGGCGCCCAGGCACCA-3';下游:5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3';扩增条件:94℃ 30s,52℃ 1 min,72℃ 30 s,进行 25 个循环,于 73℃ 延伸 10 min。实验结果在荧光定量操作系统中进行分析对比,目标基因的相对定量用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算。

### 1.4 统计处理

试验数据运用 SPSS16.0 软件进行处理,实验结果以平均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),两组间比较采用 Bonferroni 校正的 *t* 检验,以  $P < 0.05$  表示有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血清中 AMH 浓度水平

酶联免疫吸附试验结果显示,模型组的大鼠卵巢中 AMH 的水平显著低于空白组;给予补肾养血方后,发现其呈剂量依赖性逆转雷公藤多苷诱导卵巢早衰 AMH 降低,与模型组相比具有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 卵巢组织学观察

空白组卵巢体积大,可见不同时期发育的卵泡,包括原始卵泡、初次卵泡、次级卵泡、成熟卵泡和闭锁卵泡,血管形态正常,可见大量黄体;模型组卵巢萎缩,卵泡和黄体数量少,闭锁卵泡增多;低剂量组各级卵泡生长情况略好于模型组;中剂量组各级卵泡与黄体数量比模型组明显增多;高剂量组各级卵泡生长情况与空白组相似,卵泡与黄体数量较多;阳性对照组各级卵泡和黄体数量显著高于空白组,卵泡细胞和黄体细胞生长良好。见图 1。

表 1 补肾养血方对卵巢早衰大鼠 AMH 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10, \text{pmol/L}$ )

Tab. 1 The effect of bushenyangxue prescription on the levels of AMH

| 组别<br>Group                     | AMH 水平<br>AMH levels |
|---------------------------------|----------------------|
| 空白组<br>Blank control group      | 2.47 ± 0.11          |
| 模型组<br>Model group              | 0.34 ± 0.01*         |
| 低剂量组<br>Low-dose group          | 1.07 ± 0.08#         |
| 中剂量组<br>Middle-dose group       | 1.78 ± 0.13#         |
| 高剂量组<br>High-dose group         | 2.45 ± 0.10#         |
| 阳性对照组<br>Positive control group | 4.12 ± 0.31#         |

注: \* $P < 0.05$ ,与空白组相比较; # $P < 0.05$ ,与模型组相比较。  
Note. \* $P < 0.05$  vs. blank control group. # $P < 0.05$  vs. model group.

### 2.3 免疫组化染色法检测 AMH 的蛋白表达水平

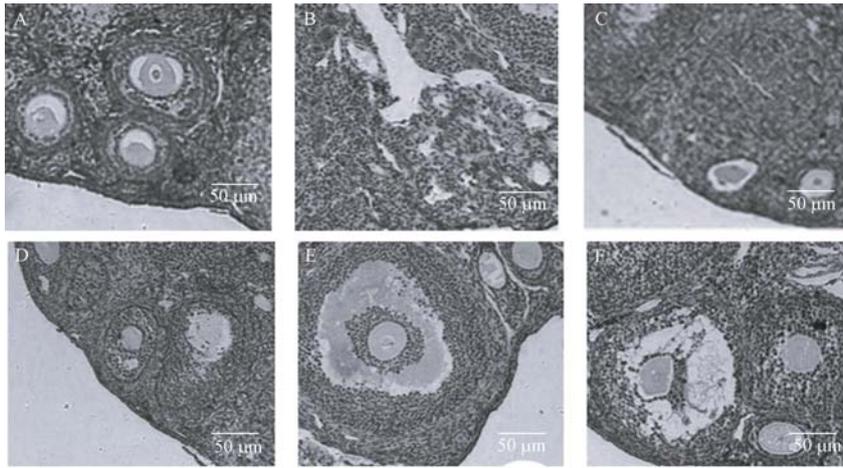
AMH 在卵巢中的主要表达窦前卵泡和小窦状卵泡的颗粒细胞,成熟卵泡和细胞间质表达也有表达。模型组中 AMH 的表达明显低于空白组;低剂量补肾养血方可逆转雷公藤多苷造成 AMH 表达的减少,并随着剂量增大而逆转效果更为显著;阳性对照组中 AMH 的表达水平显著高于空白组。见图 2,表 2。

### 2.4 qRT-PCR 检测卵巢中 AMH 的 mRNA 表达水平

qRT-PCR 检测结果表明,给予雷公藤多苷后大鼠卵巢中 AMH 的 mRNA 表达水平显著降低;而补肾养血方可明显逆转雷公藤多苷导致 AMH mRNA 表达的减少,并随给药剂量增大而逆转作用增强。见图 3。

## 3 讨论

卵巢早衰在中医可以归属为“血枯”、“血隔”、“月经后期”、“不孕”等范畴<sup>[10]</sup>。虽然,各医家对本病的病因认识有所区别,但总体认为本病的根本在于“天癸早枯”,肾中精气亏虚为主导。中医认为肾藏先天之精,主生殖,精血同源,相互助生,相互转化。因此肾气不足会导致精血亏虚,从而影响女子的生育功能。补肾养血方以补肾为主的淫羊藿,菟丝子,杜仲,山茱萸和补气养血的熟地黄,当归,党参,枸杞子,白芍,川芎组成,附以甘草调和诸药。

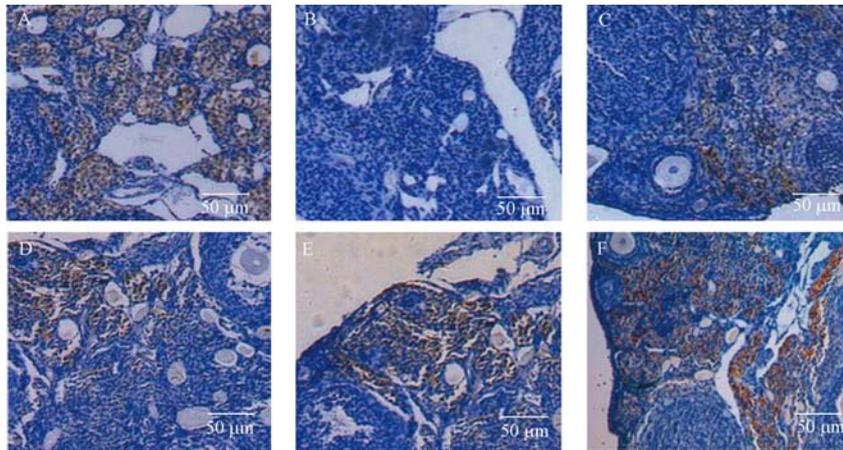


注: (A)空白组; (B)模型组; (C)低剂量组; (D)中剂量组; (E)高剂量组; (F)阳性对照组。

图 1 各组卵巢卵泡组织形态

Note. (A) blank control group. (B) model group. (C) low-dose group. (D) middle-dose group. (E) high-dose group. (F) positive control group.

Fig. 1 Representative images of ovarian tissue follicle morphology.



注: (A)空白组; (B)模型组; (C)低剂量组; (D)中剂量组; (E)高剂量组; (F)阳性对照组。

图 2 各组大鼠卵巢组织中 AMH 的表达

Note. (A) blank control group. (B) model group. (C) low-dose group. (D) middle-dose group. (E) high-dose group. (F) positive control group.

Fig. 2 Immunohistochemical results showing the expression of AMH.

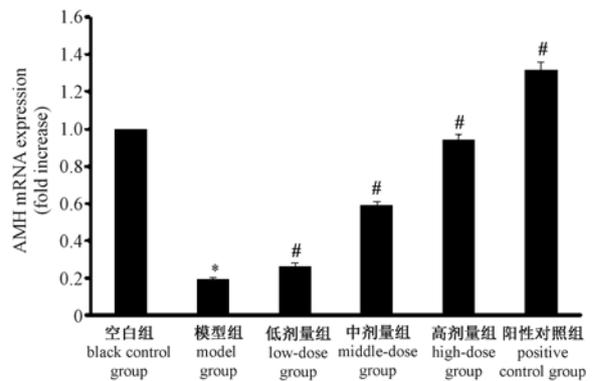
表 2 各组大鼠卵巢中的 AMH 表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab. 2 Immunohistochemical results showing the expression of AMH

| 组别                     | -  | + | ++ | +++ |
|------------------------|----|---|----|-----|
| Group                  | -  | + | ++ | +++ |
| 空白组                    | 0  | 2 | 5  | 3   |
| Blank control group    | 0  | 2 | 5  | 3   |
| 模型组                    | 8* | 2 | 0  | 0   |
| Model group            | 8* | 2 | 0  | 0   |
| 低剂量组                   | 3# | 5 | 2  | 0   |
| Low-dose group         | 3# | 5 | 2  | 0   |
| 中剂量组                   | 0# | 5 | 5  | 0   |
| Middle-dose group      | 0# | 5 | 5  | 0   |
| 高剂量组                   | 0# | 3 | 6  | 1   |
| High-dose group        | 0# | 3 | 6  | 1   |
| 阳性对照组                  | 0# | 1 | 4  | 5   |
| Positive control group | 0# | 1 | 4  | 5   |

注: \* $P < 0.05$ , 与空白组相比较; # $P < 0.05$ , 与模型组相比较。

Note. \* $P < 0.05$  vs. blank control group. # $P < 0.05$  vs. model group.



注: \* $P < 0.05$ , 与空白组相比较; # $P < 0.05$ , 与模型组相比较。

图 3 各组大鼠卵巢中 AMH 的 mRNA 表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Note. \* $P < 0.05$  vs. blank control group. # $P < 0.05$  vs. model group.

Fig. 3 Expression of AMH mRNA in different dosage group

补肾养血方具有滋补肝肾,补气活血敛阴,补而不滞,滋而不腻的特点,使得肾气盛而天癸至,对女子卵巢早衰之经闭具有治疗功效,调节生殖内分泌功能失调。

卵巢功能的评估指标主要包含:年龄、滤泡刺激激素(FSH)、黄体生成素(LH)、抑制素 B(Inhibin B)、卵巢大小(Ovarian volume)、窦卵泡数目(Antral follicle count)和雌激素(oestrogen-2, E2)等,但凭单一指标却无法真实反应卵巢状况。近来研究发现,卵巢功能开始衰退前期,在 FSH、E2、inhibin B 尚未产生变化,AMH 即可明确反应出衰退的征兆<sup>[11]</sup>。血清抗苗勒管素(AMH)是一种以二硫键连接的二聚体糖蛋白,是转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )家族的成员之一,雌性体内由卵巢颗粒细胞分泌<sup>[12]</sup>。AMH 抑制卵泡的生长过快,防止卵泡过早消耗。血清中 AMH 水平可以反映早期卵泡数量,预示着女性的生殖能力,因此,可以利用 AMH 水平来反映女性卵巢衰老的变化<sup>[11]</sup>。衰老是生命活动的普遍现象,其机制至今仍不完全清楚。而卵巢衰老主要表现为卵泡数量及卵泡质量的下降,卵巢生殖和内分泌功能减退,从而继发全身各器官功能改变<sup>[12]</sup>。本实验采用雷公藤多苷对大鼠灌胃,通过显微观察大鼠卵巢形态,结果发现雷公藤多苷可导致卵巢早衰的特征出现,如卵泡和黄体数量少,闭锁卵泡增多等;给予不同剂量的补肾养血方后,均在一定程度上逆转大鼠卵巢早衰的症状,卵泡和黄体数量明显增加;高剂量组的逆转作用更为显著,表明补肾养血方具有抑制卵巢早衰的功效。另一方面,雷公藤多苷给药后,大鼠血清中 AMH 水平显著降低,提示卵巢功能下降,衰竭;而给予补肾养血方的大鼠,其血清中 AMH 水平呈剂量依赖性上升,其中高剂量组血清中 AMH 水平接近空白组,提示补肾养血方可增加卵巢中 AMH 水平。免疫组化染色和 qRT-PCR 检测结果表明,雷公藤多

苷可导致卵巢中 AMH 蛋白和 mRNA 表达水平显著下降,补肾养血方呈剂量依赖性逆转雷公藤多苷导致 AMH 蛋白和 mRNA 表达水平下降。综上所述,补肾养血方能有效逆转雷公藤多苷导致大鼠卵巢早衰中 AMH 水平下降。

#### 参考文献:

- [1] 王松露,任锦锦,朱玲,等. 卵巢早衰的中西医治疗概况[J]. 中医药临床杂志,2016,28(1):134-137.
- [2] 牛聪,马堃,李敏. 40 例不孕症患者的中医临床特点分析及临床案例举隅[J]. 中国中药杂志,2016,41(5):960-964.
- [3] 张莉,施艳秋. 卵巢早衰的中医病因病机及治疗进展[J]. 山西医药杂志,2013,42(5):540-542.
- [4] 刘晓莉. 基于卵巢早衰中医证型与临床治疗方法研究[J]. 中医临床研究,2016,8(7):64-65.
- [5] 王方石,王晓男,闫秋. 补肾养血方剂联合人工激素疗法治疗卵巢早衰 54 例疗效研究[J]. 中国药业,2014,23(13):11-13.
- [6] 董晓英,柳顺玉,李冬华,等. 补肾养血方对卵巢早衰小鼠凋亡调控蛋白 Bcl-2/Bax 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,20(1):134-138.
- [7] 张丽娜,郑锦,刘特,等. 补肾活血方对卵巢早衰模型大鼠性激素水平及颗粒细胞凋亡调控相关因子的影响[J]. 上海中医药杂志,2015,49(7):72-76.
- [8] 刘建华. 血清抗苗勒管激素联合性激素检测在预测卵巢早衰中的临床意义[J]. 哈尔滨医药,2013,33(3):181-182.
- [9] 朱春兰,夏亦冬. 中药结合激素对卵巢早衰大鼠血清 AMH 及 VEGF 影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2014,16(2):88-90.
- [10] 黄宏丽,董莉. 浅述卵巢早衰证型分布特点[J]. 光明中医,2015,30(5):1146-1148.
- [11] 徐琳,任莉,韩雪松,等. AMH、FSH、E2 在卵巢早衰诊断中的价值[J]. 中国优生与遗传杂志,2011,19(3):96-99.
- [12] 田勇,赖志文,石良艳,等. AMH 蛋白在性成熟小鼠卵泡发育不同阶段及自然衰老过程卵巢组织中的表达变化[J]. 现代妇产科进展,2012,21(12):936-940.

[收稿日期]2016-04-02



# 氧化槐果碱对小鼠炎症性疼痛的镇痛作用研究

吴 璟<sup>1</sup>, 杨 文<sup>1</sup>, 郑 婕<sup>2</sup>, 杨 洋<sup>2</sup>, 黎伟华<sup>1</sup>, 赵玉萍<sup>2</sup>, 李凤梅<sup>2</sup>, 马鹏生<sup>2</sup>, 余建强<sup>2\*</sup>

(1. 宁夏医科大学实验动物中心, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学药学院, 银川 750004)

**【摘要】 目的** 研究氧化槐果碱对二甲苯和角叉菜胶诱导的小鼠炎症性疼痛的影响,以探索其可能的机制。**方法** ICR小鼠50只,随机分为模型组、ASP治疗组、氧化槐果碱高、中、低剂量组,各组分别给予对应药物1h后,采用二甲苯致小鼠耳肿胀实验和角叉菜胶诱导的小鼠足趾肿胀实验,研究氧化槐果碱对小鼠各种炎症性刺激的影响。**结果** 与生理盐水组相比,氧化槐果碱各剂量组能明显抑制二甲苯致小鼠耳肿胀程度和角叉菜胶致小鼠足趾肿胀程度;小鼠足组织的TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6和PGE<sub>2</sub>水平显著降低。**结论** OSC对角叉菜胶诱导的炎症性疼痛具有明显的镇痛作用,可能与其抑制炎症因子的分泌有关。

**【关键词】** 氧化槐果碱;炎症性疼痛;炎症细胞因子

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0054-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.011

## Oxysophocarpine ameliorates carrageenan-induced inflammatory pain via inhibiting expressions of prostaglandin E<sub>2</sub> and cytokines in mice

WU Jing<sup>1</sup>, YANG Wen<sup>1</sup>, ZHENG Jie<sup>2</sup>, YANG Yang<sup>2</sup>, LI Wei-hua<sup>1</sup>, ZHAO Yu-ping<sup>2</sup>,  
LI Feng-mei<sup>2</sup>, MA Peng-sheng<sup>2</sup>, YU Jian-qiang<sup>2\*</sup>

(1. Laboratory Animal Center, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

2. Department of Pharmacology, School of pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

**【Abstract】 Objective** In this study we investigated the analgesic effect of oxysophocarpine (OSC) on carrageenan-induced inflammatory pain in mice and to explore its possible mechanism. **Methods** Mouse ear swelling test and carrageenan-induced paw edema were used to investigate the effects of OSC (10, 40 and 80 mg/kg) on inflammatory pain in mice. The mechanical hyperalgesia and allodynia were measured by von Frey filaments. Paw edema was assessed by toe volumetric measuring instrument. text the content of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and PGE<sub>2</sub>. **Results** OSC showed a significant anti-inflammatory effect in the mouse ear swelling test. OSC (10, 40 and 80 mg/kg) also significantly reduced the paw edema volume and improved mechanical allodynia threshold value on carrageenan-induced inflammatory pain, as well as relieved paw tissues inflammatory damage and reduced the numbers of neutrophils in mice. OSC significantly suppressed over-expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and PGE<sub>2</sub>. **Conclusions** Based on these findings we propose that OSC attenuates inflammatory pain by suppressing the Pro-inflammatory cytokines.

**【Key words】** Oxysophocarpine; Inflammatory pain; Pro-inflammatory cytokines

炎症性疼痛是一种世界范围内日益增长的人类健康保健问题,它降低了患者的生活质量。与炎

症性疼痛相关的病症包括外伤、间质性膀胱炎、胰腺炎、类风湿性关节炎和骨关节炎<sup>[1]</sup>。炎症疼痛一

[基金项目]宁夏高等学校科学研究项目(NGY2014097)。

[作者简介]吴璟(1977-),女,硕士,副教授,研究方向:医学实验动物学及药理学研究。E-mail:wj.nxmc@qq.com

[通讯作者]余建强(1965-),男,硕士生导师,研究方向:药理学。E-mail:yujq910315@163.com

般用阿片类药物和非甾体类抗炎药治疗,但两种药物均受到(如成瘾、镇静和严重的心血管效应)副作用的限制。氧化槐果碱(OSC)是从豆科植物苦豆子中提取的生物碱。有关研究证明:OSC在乙酸诱导的扭体试验和在福尔马林诱导的炎性疼痛试验中具有显著镇痛作用<sup>[2]</sup>。本研究以 OSC 为研究对象,探讨其抗炎性疼痛的作用,为临床提供一定理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

6~8 周龄雌性 SPF 级 ICR 小鼠 180 只,由宁夏医科大学实验动物中心[SCXK(宁)2015-0001]提供,体重 18~24 g,饲养于宁夏医科大学实验动物中心屏障动物实验设施内[SYXK(宁)2015-0001],室温、昼夜明暗交替(12/12 h),自由进水摄食。每一只动物仅用于一个单一的实验并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

### 1.2 主要试剂与设备

爪肿胀体积测量仪(YLS-7A,山东省医学科学院设备站);氧化槐果碱(OSC 宁夏药物研究所,批号 20130001);阿司匹林(Sigma-Aldrich 公司,CAS:50-78-2);二甲苯(北京化工厂,批号 20130530);角叉菜胶(Shanghai Kai Yang Biotechnology Co. Ltd 20130104);小鼠 IL-1 $\beta$  ELISA 检测试剂盒(美国 RayBiotech 公司,ELM-IL1beta-001C)、小鼠 IL-6 ELISA 检测试剂盒(美国 RayBiotech 公司,ELM-IL6-001C);小鼠 TNF- $\alpha$  ELISA 检测试剂盒(美国 RayBiotech 公司,ELM-TNFalpha-001);小鼠 PGE<sub>2</sub> ELISA 检测试剂盒(美国 R&D 公司,KGE004B)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 小鼠的急性毒性实验

取 ICR 小鼠 50 只,随机均分成 5 组,将 OSC 按 1:0.8 等比计算配制成 5 个剂量组,腹腔注射给药后,观察 72 h。采用改良寇氏法计算 LD<sub>50</sub> = 240 mg/kg。给药最大剂量后,小鼠出现不安、阵挛、角弓反张、惊厥等症状,最后以呼吸抑制而死亡。

#### 1.3.2 小鼠耳肿胀试验

取 ICR 小鼠 50 只,随机分组,每组 10 只。分别为模型组(NS,腹腔注射 0.1 mL/10g),阿司匹林组(400 mg/kg 灌胃给药 0.1 mL/10g),OSC(80,40,10 mg/kg)药物组(腹腔注射 0.1 mL/10g)。给药 1 h 后,将各组小鼠分别于左耳正反两面均匀涂上二甲

苯 50  $\mu$ L 致炎,40 min 后脱颈椎处死小鼠,迅速剪下动物的双耳,并沿边缘打下 9 mm 耳片,于扭力天平上称重,同一只动物左右耳的重量差即为肿胀度<sup>[3]</sup>。

小鼠肿胀度 = 左耳耳片重量 - 右耳耳片重量。

小鼠耳肿胀抑制率(%) = (模型组肿胀度 - 给药组肿胀度)/模型组肿胀度  $\times$  100%

#### 1.3.3 角叉菜胶致小鼠炎性疼痛实验

取 ICR 小鼠 50 只,随机分组,每组 10 只。分别为模型组(NS,腹腔注射 0.1 mL/10g),阿司匹林组(400 mg/kg 灌胃给药 0.1 mL/10g),OSC(80,40,10 mg/kg)药物组(腹腔注射 0.1 mL/10g),分别于给药 0.5 h 后,在小鼠右后足底注射角叉菜胶溶液 30  $\mu$ L(300  $\mu$ g/paw)<sup>[4]</sup>。

##### 1.3.3.1 足趾容积的测定

于给药后 1、2、3、4、5 h,采用足趾容积测量仪测量右后踝关节以下容积。

##### 1.3.3.2 机械缩足反射阈值(paw withdrawal threshold, PWT)的测定<sup>[5]</sup>

在保证实验环境安静且光照适宜后,将待测小鼠置于 2 mm  $\times$  2 mm 孔隙的金属网格上。用固定大小的有机玻璃盒隔开各只小鼠(一次可放 6 只),待小鼠适应 0.5 h 后,测定小鼠的机械缩足反射阈值(PWT)。使用不同刺激强度的 Von Frey Filaments(vFFs)刺激小鼠的第 3、4 足趾的趾间皮肤,观察小鼠可能发生的缩足反应。刺激强度一般从 0.4 g 开始,若 vFFs 纤维丝弯曲超过 90 $^\circ$ 时,若小鼠仍不发生抬足,则视为无反应。此时应给予相邻的刺激强度大一级的纤维丝;如果有反应,则更换相邻的刺激强度小一级的纤维丝。每次刺激时间间隔必须大于 10 s,直到找到能引起 50% 抬足反应的纤维丝。本实验中最大刺激强度值为 4.0 g,记录所测小鼠的能引起 50% 抬足反应的纤维丝刺激强度值,即为机械缩足反射阈值(g)。分别测定给药前和给药后 1、2、3、4、5 h 的机械缩足反射阈值。

#### 1.3.4 氧化槐果碱对角叉菜胶致小鼠炎性痛损伤组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 PGE<sub>2</sub> 表达水平的检测

雄性 ICR 小鼠 30 只,随机分为:正常组、模型组、OSC(80 mg/kg)组,每组 10 只。各组小鼠分别于给药 0.5 h 后,在除正常组外所有小鼠的右后足底注射角叉菜胶溶液 30  $\mu$ L(300  $\mu$ g/paw),5 h 后,处死小鼠,剪下右后足底损伤组织,制成 10% 组织匀浆,4 $^\circ$ C,1.0  $\times$  10<sup>4</sup> r/min,离心 15 min,取上清,酶

标仪测定小鼠炎性痛损伤组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 PGE<sub>2</sub> 的蛋白表达水平(按试剂盒说明书操作)

#### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理分析,结果以均数  $\pm$  标准差表示( $\bar{x} \pm s$ )。两样本均数间比较采用 *t* 检验,多样本均数间比较采用 One-way ANOVA 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 氧化槐果碱对二甲苯致小鼠耳肿胀度的影响<sup>[4]</sup>

于小鼠左耳正反两面涂上 50  $\mu$ L 二甲苯 1 h 后,模型组的耳肿胀度达到 15.78  $\pm$  1.75 mg,说明模型制备成功。与模型组比较,阳性药阿司匹林组(400 mg/kg)的耳肿胀度显著降低( $P < 0.01$ )抑制率达 50.57%;氧化槐果碱(80 mg/kg)组的耳肿胀度显著降低( $P < 0.01$ ),抑制率达 52.79%,略高于阿司

匹林组;氧化槐果碱(40 mg/kg)组的耳肿胀度也显著降低( $P < 0.01$ );氧化槐果碱(10 mg/kg)组的耳肿胀度也明显降低,具有统计学差异( $P < 0.05$ )(见表 1)。

### 2.2 氧化槐果碱对角叉菜胶致小鼠足趾炎症反应肿胀度的影响

各组小鼠造模前的基础容积之间相互比较无显著性差( $P > 0.05$ )。与正常组比较,模型组 1~5 h 的足肿胀度显著增高( $P < 0.01$ ),说明角叉菜胶诱发了足肿胀,模型制备成功。与模型组比较,阳性药阿司匹林组(400 mg/kg)给药后 1~5 h 的足肿胀度显著性降低( $P < 0.05$ );氧化槐果碱(80 mg/kg)组给药后 1~5 h 的足肿胀度显著性降低( $P < 0.01$ );氧化槐果碱(40 mg/kg)组给药后 2~5 h 足肿胀度显著性降低( $P < 0.05$ );而氧化槐果碱(10 mg/kg)组给药后各时间点的足肿胀度差异无显著性( $P > 0.05$ )(见表 2)。

表 1 氧化槐果碱对二甲苯致小鼠耳肿胀度的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab.1 Effect of oxysophocarpine (OSC) on xylene-induced ear swelling in mice

| 组别<br>Group  | 剂量(mg/kg)<br>Dose | 肿胀度<br>Swelling degree | 抑制率<br>Inhibition rate |
|--------------|-------------------|------------------------|------------------------|
| NS 组 NS      | -                 | 15.78 $\pm$ 1.75       | -                      |
| 阿司匹林 Aspirin | 400               | 7.80 $\pm$ 2.63 **     | 50.57                  |
|              | 80                | 7.45 $\pm$ 2.39 **     | 52.79                  |
| 氧化槐果碱 OSC    | 40                | 10.08 $\pm$ 2.37 **    | 36.12                  |
|              | 10                | 12.55 $\pm$ 3.58 *     | 20.47                  |

注:与 NS 组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

Note. Comparison of the NS group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

表 2 氧化槐果碱对角叉菜胶致小鼠足趾炎症反应肿胀度的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab.2 Effect of oxysophocarpine (OSC) on carrageenan-induced the swelling degree of mice with toes inflammation

| 组别<br>Group     | 剂量<br>(mg/kg)<br>Dose | 肿胀度(mL)<br>Swelling degree |                        |                        |                        |                        |                        |
|-----------------|-----------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                 |                       | 基础容积<br>Base volume        | 1 h                    | 2 h                    | 3 h                    | 4 h                    | 5 h                    |
| 正常<br>Normal    | -                     | 0.1752 $\pm$               | 0.0098 $\pm$           | 0.0030 $\pm$           | 0.0003 $\pm$           | 0.0014 $\pm$           | 0.0002 $\pm$           |
|                 |                       | 0.0130                     | 0.0099                 | 0.0105                 | 0.0076                 | 0.0035                 | 0.0061                 |
| 模型组<br>Model    | -                     | 0.1729 $\pm$               | 0.0569 $\pm$           | 0.0545 $\pm$           | 0.0773 $\pm$           | 0.0957 $\pm$           | 0.0896 $\pm$           |
|                 |                       | 0.0146                     | 0.0294 <sup>##</sup>   | 0.0180 <sup>##</sup>   | 0.0149 <sup>##</sup>   | 0.0145 <sup>##</sup>   | 0.0166 <sup>##</sup>   |
| 阿司匹林<br>Aspirin | 400                   | 0.1773 $\pm$               | 0.0367 $\pm$           | 0.0330 $\pm$           | 0.0382 $\pm$           | 0.0406 $\pm$           | 0.0459 $\pm$           |
|                 |                       | 0.0167                     | 0.0159 <sup>##*</sup>  | 0.0175 <sup>##**</sup> | 0.0152 <sup>##**</sup> | 0.0112 <sup>##**</sup> | 0.0075 <sup>##**</sup> |
| 氧化槐果碱<br>OSC    | 80                    | 0.1740 $\pm$               | 0.0235 $\pm$           | 0.0311 $\pm$           | 0.0340 $\pm$           | 0.0354 $\pm$           | 0.0397 $\pm$           |
|                 |                       | 0.0145                     | 0.0150 <sup>##**</sup> | 0.0058 <sup>##**</sup> | 0.0085 <sup>##**</sup> | 0.0110 <sup>##**</sup> | 0.0093 <sup>##**</sup> |
| 氧化槐果碱<br>OSC    | 40                    | 0.1836 $\pm$               | 0.0449 $\pm$           | 0.0408 $\pm$           | 0.0519 $\pm$           | 0.0572 $\pm$           | 0.0525 $\pm$           |
|                 |                       | 0.0114                     | 0.0153 <sup>##</sup>   | 0.0158 <sup>##*</sup>  | 0.0193 <sup>##**</sup> | 0.0184 <sup>##**</sup> | 0.0221 <sup>##**</sup> |
| 氧化槐果碱<br>OSC    | 10                    | 0.1736 $\pm$               | 0.0456 $\pm$           | 0.0542 $\pm$           | 0.0697 $\pm$           | 0.0807 $\pm$           | 0.0832 $\pm$           |
|                 |                       | 0.0207                     | 0.0138 <sup>##</sup>   | 0.0162 <sup>##</sup>   | 0.0118 <sup>##</sup>   | 0.0148 <sup>##*</sup>  | 0.0185 <sup>##</sup>   |

注:与正常组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

Note. Comparison of the normal group,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ . Comparison of the model group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ .

表 3 氧化槐果碱对角叉菜胶致小鼠炎性痛痛阈值的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab. 3 Effect of oxysophocarpine (OSC) on carrageenan-induced inflammatory pain threshold of mice

| 组别<br>Group  | 剂量<br>(mg/kg)<br>Dose | 痛阈值(g) Pain threshold            |                             |                               |                               |                               |                              |
|--------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
|              |                       | 基础痛阈值<br>Baseline pain threshold | 1 h                         | 2 h                           | 3 h                           | 4 h                           | 5 h                          |
| NS 组 NS      | -                     | 1.50 ± 0.380                     | 1.260 ± 0.327               | 1.260 ± 0.378                 | 1.340 ± 0.299                 | 1.260 ± 0.327                 | 1.420 ± 0.437                |
| 阿司匹林 Aspirin | 400                   | 1.44 ± 0.337                     | 0.139 ± 0.102 <sup>##</sup> | 0.112 ± 0.051 <sup>##</sup>   | 0.091 ± 0.049 <sup>##</sup>   | 0.100 ± 0.053 <sup>##</sup>   | 0.112 ± 0.111 <sup>##</sup>  |
| 氧化槐果碱<br>OSC | 80                    | 1.40 ± 0.365                     | 0.142 ± 0.105 <sup>##</sup> | 0.336 ± 0.296 <sup>##*</sup>  | 0.308 ± 0.199 <sup>##**</sup> | 0.392 ± 0.147 <sup>##**</sup> | 0.184 ± 0.124 <sup>##</sup>  |
|              | 40                    | 1.38 ± 0.274                     | 0.186 ± 0.179 <sup>##</sup> | 0.331 ± 0.214 <sup>##**</sup> | 0.344 ± 0.176 <sup>##**</sup> | 0.459 ± 0.281 <sup>##**</sup> | 0.214 ± 0.165 <sup>##*</sup> |
|              | 10                    | 1.52 ± 0.483                     | 0.122 ± 0.110 <sup>##</sup> | 0.136 ± 0.105 <sup>##</sup>   | 0.154 ± 0.099 <sup>##*</sup>  | 0.271 ± 0.139 <sup>##**</sup> | 0.142 ± 0.105 <sup>##</sup>  |
|              | 10                    | 1.40 ± 0.365                     | 0.121 ± 0.110 <sup>##</sup> | 0.081 ± 0.051 <sup>##</sup>   | 0.068 ± 0.051 <sup>##</sup>   | 0.077 ± 0.047 <sup>##</sup>   | 0.089 ± 0.052 <sup>##</sup>  |

注:与正常组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note. Comparison of the normal group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ . Comparison of the model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

表 4 氧化槐果碱对角叉菜胶致小鼠炎性痛损伤组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、PGE<sub>2</sub> 蛋白表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab. 4 Effects of oxysopressin on carrageenan-induced the expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and PGE<sub>2</sub> proteins in inflammatory pain-injured mice

| 组别<br>Group   | 剂量(mg/kg)<br>Dose | TNF- $\alpha$<br>(pg/mg)     | IL-1 $\beta$<br>(pg/mg)      | IL-6<br>(pg/mg)              | PGE <sub>2</sub><br>(pg/mg)  |
|---------------|-------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 正常组<br>Normal | -                 | 82.90 ± 7.66                 | 159.60 ± 17.91               | 116.04 ± 22.87               | 63.08 ± 25.21                |
| 模型组<br>Model  | -                 | 381.96 ± 34.72 <sup>##</sup> | 343.25 ± 23.61 <sup>##</sup> | 811.49 ± 46.12 <sup>##</sup> | 214.72 ± 29.35 <sup>##</sup> |
| 氧化槐果碱<br>OSC  | 80                | 166.93 ± 13.49 <sup>**</sup> | 218.32 ± 19.63 <sup>**</sup> | 586.51 ± 58.68 <sup>**</sup> | 109.15 ± 18.97 <sup>**</sup> |

注:与正常组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note. Comparison of the normal group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ . Comparison of the model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

### 2.3 氧化槐果碱对角叉菜胶致小鼠炎性痛痛阈值的影响<sup>[5]</sup>

各组小鼠造模前的基础机械缩足反射阈值之间相互比较无显著性差异( $P > 0.05$ )。与正常组比较,角叉菜胶模型组小鼠 1~5 h 的机械缩足反射阈值显著降低( $P < 0.01$ ),说明角叉菜胶诱发了炎性疼痛,模型制备成功。与模型组比较,阳性药阿司匹林组(400 mg/kg)给药后 2~4 h 的机械缩足反射阈值显著性回升( $P < 0.05$ );氧化槐果碱(80 mg/kg)组给药后 2~5 h 的机械缩足反射阈值显著性回升( $P < 0.05$ );氧化槐果碱(40 mg/kg)组给药后 3~4 h 的机械缩足反射阈值显著性回升( $P < 0.05$ );而氧化槐果碱(10 mg/kg)组给药后各时间点的机械缩足反射阈值无显著性差异( $P > 0.05$ ) (见表 3)。

### 2.4 氧化槐果碱对角叉菜胶致小鼠炎性痛损伤组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、PGE<sub>2</sub> 蛋白表达水平的影响

Elisa 法检测结果显示:与正常组比较,角叉菜胶致小鼠炎性痛模型组小鼠损伤组织中促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 PGE<sub>2</sub> 的蛋白表达水平显著上

升( $P < 0.01$ );与模型组相比,氧化槐果碱组小鼠损伤组织中的促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 PGE<sub>2</sub> 蛋白表达水平显著下降( $P < 0.01$ ) (见表 4)。

### 3 讨论

疼痛通常与炎症有关,这是由组织损伤,化学刺激,或自身免疫过程引起,这些能够引起组织损伤的致炎因子参与伤害感受器的外周敏化,并为抗炎剂提供治疗范围,治疗其与炎症反应相关的疾病<sup>[6-9]</sup>。二甲苯诱导的小鼠耳肿胀试验是一种成本低,时间短和分级客观的对药物抗炎活性进行评价的方法<sup>[10]</sup>。角叉菜胶作为致炎剂,可引起皮肤局部毛细血管通透性增高,炎症细胞浸润,组织肿胀,造成耳廓及足趾急性渗出性炎症水肿<sup>[11]</sup>。局部应用二甲苯和足底注射角叉菜胶都产生炎症反应<sup>[12]</sup>。角叉菜胶诱导的足趾肿胀试验已常被用于评估天然产物的抗炎作用。角叉菜胶诱导的足趾肿胀试验通常被划分成两个阶段。第一阶段,或是急性期,持续 1~2 h,由组胺和 5-羟色胺介导形成水肿。第二阶段,或是引发炎症期,持续 2~5 h,缓激肽和 PEG<sub>2</sub> 保持了较高的血管通透性并诱导促炎细胞因

子的释放。这些介质参与炎性反应,刺激感受器,从而诱发和加剧疼痛<sup>[13]</sup>。本研究通过角叉菜胶诱导小鼠的足趾肿胀模型评估 OSC 的改善炎症性疼痛的效果<sup>[14]</sup>。

目前,临床常用的抗炎药虽抗炎作用显著,但长期和大量的应用可产生非常严重的不良反应<sup>[15-16]</sup>。开发天然药物的抗炎作用成为了研究者关注的焦点。OSC 是由天然豆科植物苦豆子中提取一类生物碱,研究表明,对二甲苯致小鼠耳肿胀性炎症有明显的抑制作用,对角叉菜胶致小鼠足肿胀有一定的抑制作用,OSC 改善了小鼠爪的机械异常性疼痛阈值。OSC 能明显降低炎症模型中 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 和 PEG2 的含量。抗炎作用可能与细胞因子的水平有关。这些发现可能对了解 OSC 治疗炎症性疼痛的分子基础有重要意义。

因此,我们的研究表明,OSC 将在治疗炎症性疼痛方面可能作为抗炎药物使用,为临床进一步的开发利用提供了理论基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Reinold H, Ahmadi S, Depner UB, *et al.* Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype[J]. *Clin Invest*, 2005, 115:673 - 679.
- [ 2 ] Xu T, Li Y, Wang H, *et al.* Oxysphocarpine induces antinociception and increases the expression of GABA $\alpha$ 1 receptors in mice[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7:1819 - 1825.
- [ 3 ] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学(第三版)[M]. 人民卫生出版社, 1991, 728:1171 - 1173.
- [ 4 ] 骆新,孙艳,永雪薇,等. 复方薰衣草油膏治疗实验性豚鼠烫伤、抗炎及镇痛的效果观察[J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(9):28 - 31.
- [ 5 ] 周顺长,杜佐华,叶明霞,等. 复方亚甲蓝注射液浸润麻醉对小鼠痛阈的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(3):151 - 152.
- [ 6 ] Ristoiu V. Contribution of macrophages to peripheral neuropathic pain pathogenesis[J]. *Life Sci*, 2013, 93: 870 - 881.
- [ 7 ] Guillot X, Semerano L, Decker P, *et al.* Pain and immunity [J]. *Joint Bone Spine*, 2012, 79: 228 - 236.
- [ 8 ] Yosipovich G, Mills KC, Nattkemper LA, *et al.* Association of pain and itch with depth of invasion and inflammatory cell constitution in skin cancer: results of a large clinicopathologic Study[J]. *JAMA Dermatol*, 2014, 150: 1160 - 1166.
- [ 9 ] Ren K, Dubner R. Interactions between the immune and nervous systems in pain[J]. *Nat Med*, 2010, 16:1160 - 1166.
- [ 10 ] Aquino AB, Cavalcante-Silva LH, Matta CB, *et al.* The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae) [J]. *ScientificWorldJournal*, 2013, 2013:218627.
- [ 11 ] 陈建双,张玉玲,赵波,等. 赤菴根总皂苷抗炎作用研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(8):163 - 166.
- [ 12 ] Choi JI, Koehn FJ, Sorkin LS. Carrageenan induced phosphorylation of Ark is dependent on neurokinin-1 expressing neurons in the superficial dorsal horn[J]. *Mol Pain*, 2012, 8:4.
- [ 13 ] Chou TC. Anti-inflammatory and analgesic effects of paeonol in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia [J]. *Br J Pharmacol*, 2003, 139: 1146 - 1152.
- [ 14 ] Khan S, Shehzad O, Chun J, *et al.* Mechanism underlying anti-hyperalgesic and anti-allodynic properties of anomalin in both acute and chronic inflammatory pain models in mice through inhibition of NF $\kappa$ B, MAPKs and CREB signaling cascade[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 718:448 - 458.
- [ 15 ] 杨世杰,王怀良. 药理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2001: 421 - 428.
- [ 16 ] 洪靖,许卫娜. 非甾体抗炎药长时间应用的危害及预防[J]. *中国伤残医学*, 2014, 22(18):152 - 153.

[收稿日期]2016 - 06 - 27



# 我国动物环境丰富研究论文的文献计量分析

刘 帅,李军延\*

(中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所,北京 100050)

**【摘要】 目的** 对我国动物环境丰富研究文献进行计量分析,以期为我国环境丰富研究和应用提供一定参考。**方法** 基于中国知网和万方数据库,检索环境丰富相关文献,分别对论文发表年代、期刊、作者、机构及学科分布和应用环境丰富的动物等进行统计分析。**结果** 2016年之前共检索出环境丰富相关文献422篇,其中期刊273篇,分布于126种期刊。总体发文量稳步上升,特别是在2006年之后呈快速增长。载文量前3的期刊为《野生动物学报》、《中国康复医学杂志》、《中华行为医学与脑科学杂志》。发文量最多的机构是第三军医大学新桥医院(18篇)和福建医科大学附属协和医院(14篇),而来自此2家单位的陈燕惠、赵聪敏是此方向的高产作者。涉及17个学科,其中神经病学、精神病学、生物学和儿科学是主要学科。应用环境丰富的动物可分3类,最多的是实验动物(占69.6%),其次是动物园动物(22.9%),最后是农场经济动物(7.5%)。**结论** 目前环境丰富的研究相对集中于神经学、精神病学等方面,对于改善动物福利的研究主要在动物园动物上,实验动物此方向的研究还较少,需要加强这方面的工作。

**【关键词】** 环境丰富;文献计量分析;动物福利

**【中图分类号】** **【文献标识码】** A **【文章编号】**1671-7856(2017) 01-0059-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.012

## Bibliometric study of the articles on environment enrichment in china

LIU Shuai, LI Jun-yan\*

(National Institute of Occupational Health and Poison Control, China CDC, Beijing 100050, China)

**【Abstract】 Objective** To analyze the literature characteristics on environmental enrichment published in China, and provide reference for researchers. **Methods** The papers relevant to environmental enrichment published in CNKI database and Wanfang database were statistically analyzed from the aspects of publishing year, journal of publication, author, institution and subjects covered by the article with bibliometrics method. **Results** There were 422 papers published before Dec 31, 2015, in which 273 papers published in 126 kinds of journals. The number of papers increased gradually, especially after 2006. The top 3 journals with the most articles published were Chinese Journal of Wildlife(28), Chinese Journal of Rehabilitation Medicine(15) and Chinese Journal of Behavioral Medicine and Brain Science(12). Xinqiao Hospital of TMMU and Fujian Medical University Union Hospital accounted for the top 2 total number of the papers, from which Yan-hui Chen and Cong-min Zhao published the more articles. Those papers covered 17 subjects, neurology, pathergasiology, biology and pediatrics were the main subjects. There were 3 kinds of animal that got enriched, the first was laboratory animals(69.6%), then zoo animals(22.9%), and farm animals(7.5%). **Conclusions** The research of environmental enrichment was relatively concentrated in terms of neurology and psychiatry. To improve animal welfare was mainly in the zoo animals; laboratory animal research in this direction was less. It is necessary to strengthen the work in this regard.

**【Key words】** Environmental enrichment; Bibliometrics; Animal welfare

[基金项目] 职业卫生与中毒控制所青年科技基金项目(DW201502)。

[作者简介] 刘帅(1985-),男,助理研究员,硕士生,研究方向:实验动物学研究。E-mail: cauvet@126.com

[通讯作者] 李军延(1963-),女,研究员,本科生,研究方向:实验动物及管理研究。E-mail: lijy1@chinacdc.cn

环境丰富 (environmental enrichment) 又被称为丰富环境或环境丰富,是指提供选择满足动物物种特定需要以改善动物的机体和心理福利的所有环境改善措施<sup>[1]</sup>。环境丰富对动物的影响已受到人们的广泛关注。我国的科技工作者也对此展开了积极的研究。本文以中国知网 (CNKI) 和万方数据为平台,采用文献计量学的方法对环境丰富研究领域的期刊、作者、机构分布、涉及学科等状况进行分析,展示我国在环境丰富方面已有的成就和需要进一步努力的方向,进而为我国环境丰富科研和应用提供有益的参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 数据来源

以中国知网 (CNKI) 文献数据库和万方数据服务平台为数据源。进入高级检索页面,以“环境丰富”或“丰富环境”或“环境丰富”为主题词,并包含于“基础科学”、“农业科技”、“医药卫生科技”科技领域,发表日期截止到 2015 年 12 月 31 日进行检索。通过阅读论文标题和摘要,删除和环境丰富无关论文以及以人为研究对象的论文,保留动物环境丰富相关论文。

### 1.2 统计学方法

利用 Excel 软件建立数据库,使用文献计量学方法,对检出的文献从发表时间、出版物、作者、机构、涉及学科及丰富的动物等角度进行统计分析。

## 2 结果

经检索,中国知网 (CNKI) 数据库获得动物环境

丰富相关论文 316 篇,万方数据库获得 338 篇,其中 232 篇为两家重复,合并之后共获得 422 篇,其中期刊论文 273 篇,学位论文 95 篇,会议论文 54 篇,涉及 126 份刊物,727 位作者。

### 2.1 论文的时间分布及其发展趋势

我国关于环境丰富的研究文章可以追溯到 1984 年,但是 2000 年以前相关研究比较少,只有 4 篇文献。2000 年至 2005 年每年也只有零星几篇文献,从 2006 年开始论文数量开始快速增长,年发文量稳步上升,说明环境丰富的相关研究正处于稳步发展阶段。其中期刊论文占比最大,是主要论文类型,其次为学位论文,最后是会议论文。具体论文类型及发文量见图 1。

### 2.2 论文的期刊分布

期刊载文量是描述期刊刊载某类论文能力的基本指标之一。273 篇论文发表在 126 种期刊上,表 1 列出环境丰富研究领域载文量前 10 的期刊。通过布拉德福定律的区域分析法确定环境丰富领域的 7 种核心期刊(见表 1 排序前 7 位),核心期刊占总期刊数(126)的 5.5%,共载相关论文 92 篇,占期刊论文总数(273)的 33.7%。核心期刊的测定可以用于指导投稿,在 7 中核心期刊中有 3 家为康复医学杂志,动物学、神经学、儿科学杂志各 1 家以及 1 家医学学报。研究者可选择收录相关论文量大、侧重于收录与相关研究内容相一致的期刊,提高文献命中率,有利于扩大研究成果在本领域的影响范围<sup>[2]</sup>。表 1 中《野生动物学报》载文最多,为 28 篇,其次为《中国康复医学杂志》与《中华行为医学与脑科学杂志》,可作为相关研究者阅读和投稿的关注对象。

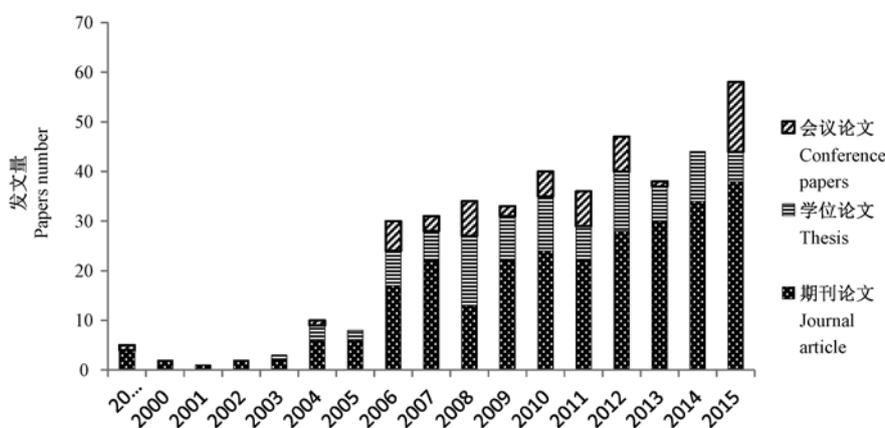


图 1 论文类型及年代分布

Fig. 1 The type and time distribution of papers

表 1 论文的期刊分布

Tab. 1 Distribution of papers source on environment enrichment

| 排名<br>Ranking | 期刊名称<br>Journal  | 发文数量<br>Papers | 出版周期<br>Publication Frequency |
|---------------|--|----------------|-------------------------------|
| 1             | 野生动物学报<br>Chinese Journal of Wildlife                                      | 28             | 季刊<br>Quarterly               |
| 2             | 中国康复医学杂志<br>Chinese Journal of Rehabilitation Medicine                     | 15             | 月刊<br>Monthly                 |
| 3             | 中华行为医学与脑科学杂志<br>Chinese Journal of Behavioral Medicine and Brain Science   | 12             | 月刊<br>Monthly                 |
| 4             | 中华实用儿科临床杂志<br>Journal of Applied Clinical Pediatrics                       | 11             | 半月刊<br>Semimonthly            |
| 5             | 第三军医大学学报<br>Journal of third military medical university                   | 10             | 半月刊<br>Semimonthly            |
| 6             | 中华物理医学与康复杂志<br>Chinese Journal of Physical Medicine and Rehabilitation     | 9              | 月刊<br>Monthly                 |
| 7             | 中国康复理论与实践<br>Chinese Journal of Rehabilitation Theory and Practice         | 7              | 月刊<br>Monthly                 |
| 8             | 中国比较医学杂志<br>Chinese Journal of Comparative Medicine                        | 6              | 月刊<br>Monthly                 |
| 8             | 中国组织工程研究<br>Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research | 6              | 周刊<br>Weekly                  |
| 10            | 四川动物<br>Sichuan Journal of Zoology   | 5              | 双月刊<br>Bimonthly              |

### 2.3 论文作者的合作情况

273 篇期刊论文共涉及 727 位作者,由 1 名作者单独撰写的论文有 14 篇,占 5.1%,4 人合作撰写论文最多 59 篇,占 21.6%,论文合作率 94.9%,合作度为 4.4。详见表 2。

表 2 论文作者合作情况

Tab. 2 The cooperation of authors

| 作者人数<br>Author number | 发文量<br>papers | 占比(%)<br>percent |
|-----------------------|---------------|------------------|
| 1                     | 14            | 5.10             |
| 2                     | 35            | 12.80            |
| 3                     | 44            | 16.10            |
| 4                     | 59            | 21.60            |
| 5                     | 44            | 16.10            |
| 6                     | 37            | 13.60            |
| 7                     | 23            | 8.40             |
| 8                     | 10            | 3.70             |
| 9                     | 3             | 1.10             |
| 10                    | 4             | 1.50             |
| 合计                    | 273           | 100.00           |

### 2.4 高产作者

以每篇文献的每位作者计一个频次统计,273 篇文献的作者总数有 1202 人次,表 3 列出了发文量最多的 10 位高产作者,共发文 101 篇,占总发文量的 37%。其中 7 位来自 2 家医院的儿科,分别是第三军医大学新桥医院儿科(4 位)和福建医科大学附属协和医院儿科(3 位),剩余 3 位分别来自医院康复

科、神经内科和上海动物园。

### 2.5 论文机构分布

273 篇期刊文献中,第一作者的所在机构共有 121 家,发文量居前 10 的机构如表 4 所示,共发文 92 篇,占 33.7%,说明环境丰富的研究是相对集中的。10 家机构包括 6 所医院,4 家动物园,其中医院当中的儿科和康复科是主要发文单位。发文量最多的第三军医大学新桥医院儿科(18 篇),其次是福建医科大学附属协和医院儿科(14 篇)。

### 2.6 论文涉及学科类别

273 篇期刊论文共涉及到 17 个学科类别,前 7 位学科类别的研究人员共发文 240 篇,占全部发文量的 88%。其中发文最多的是神经病学,占 24%,其次为精神病学,占 19%,随后是生物学 14% 和儿科学 11%,而基础医学、野生动物保护、畜牧和动物医学发文量分别占 9%、6%、5%。

### 2.7 应用环境丰富的动物种类

273 篇期刊论文中 227 篇说明了环境丰富应用的动物,这些动物可分为 3 类,实验动物、动物园动物和农场经济动物。其中实验动物最多,占 69.6%,其中大鼠 125 篇,小鼠 33 篇;动物园动物 52 篇,占 22.9%;农场经济动物 17 篇,占 7.5%,其中猪 9 篇,牛 5 篇,鸡 3 篇。

表 3 高产作者  
Tab. 3 Prolific authors

| 名次<br>Ranking | 作者<br>Author         | 发文量<br>papers | 所在机构<br>Institution  |
|---------------|----------------------|---------------|--|
| 1             | 陈燕惠<br>CHEN Yan-hui  | 16            | 福建医科大学附属协和医院儿科<br>Fujian medical university union hospital |
| 1             | 赵聪敏<br>ZHAO Cong-min | 16            | 第三军医大学新桥医院儿科<br>Xinqiao hospital of TMMU                   |
| 3             | 陈达光<br>CHEN Da-guang | 11            | 福建医科大学附属协和医院儿科<br>Fujian medical university union hospital |
| 4             | 蒲昭霞<br>PU Zhao-xia   | 10            | 第三军医大学新桥医院儿科<br>Xinqiao hospital of TMMU                   |
| 5             | 鲁利群<br>LU Li-qun     | 9             | 第三军医大学新桥医院儿科<br>Xinqiao hospital of TMMU                   |
| 5             | 贾子善<br>JIA Zi-shan   | 9             | 河北省人民医院康复科<br>Herbei general hospital                      |
| 7             | 张雨平<br>ZHANG Yu-ping | 8             | 第三军医大学新桥医院儿科<br>Xinqiao hospital of TMMU                   |
| 7             | 刘群秀<br>LIU Qun-xiu   | 8             | 上海动物园<br>Shanghai zoo                                      |
| 9             | 王铭维<br>WANG Ming-wei | 7             | 河北医科大学第一医院神经内科<br>The first hospital of HMU                |
| 9             | 陈敏<br>CHEN Min       | 7             | 福建医科大学附属协和医院儿科<br>Fujian Medical University Union Hospital |

表 4 发文机构  
Tab. 4 Distribution of institutions for environment enrichment

| 排名<br>Ranking | 机构<br>Institution  | 发文量<br>Papers | 占比(%)<br>percent |
|---------------|--|---------------|------------------|
| 1             | 第三军医大学新桥医院儿科<br>Xinqiao hospital of TMMU                   | 18            | 6.6              |
| 2             | 福建医科大学附属协和医院儿科<br>Fujian medical university union hospital | 14            | 5.1              |
| 3             | 河北省人民医院<br>Herbei general hospital                         | 11            | 4.0              |
| 4             | 上海动物园<br>Shanghai zoo                                      | 9             | 3.3              |
| 5             | 成都动物园<br>Chengdu zoo                                       | 9             | 3.3              |
| 6             | 武汉大学中南医院<br>Zhongnan hospital of Wuhan university          | 7             | 2.6              |
| 7             | 上海交通大学医学院附属新华医院<br>XinHua hospital                         | 6             | 2.2              |
| 8             | 南京市红山森林动物园<br>Hongshan zoo                                 | 6             | 2.2              |
| 9             | 佳木斯大学康复医学院<br>Rehabilitation medicine hospital of JMSU     | 6             | 2.2              |
| 10            | 北京动物园<br>Beijing zoo                                       | 6             | 2.2              |

### 3 讨论

环境丰富化的概念最早于上世纪四十年代被提出,起初主要应用于神经学的研究中。经过长期的研究和发展,环境丰富在脑神经发育、脑损伤修复

上的促进作用被广泛证实<sup>[3]</sup>。八十年代后,随着动物福利逐渐被大众认知和认同,以改善动物福利为目的的环境丰富相关研究才逐渐兴起<sup>[4]</sup>。随着研究的深入,环境丰富对提高动物福利,减少应激和抑郁行为<sup>[5]</sup>,改善生长发育以及繁殖性能等方面的

有益影响也被广泛关注<sup>[6]</sup>。

文献计量理论认为,科学文献数量和结构的变化规律可以反映该科技领域的科研现状和发展特征,帮助发现该领域研究的薄弱之处<sup>[7]</sup>。本文通过分析我国环境丰富文献的发表、分布特征,反映和预测我国环境丰富研究的历史和趋势,为研究人员选题和制定研究方向提供指导和帮助<sup>[8]</sup>。

我国环境丰富的最早文献为 1984 年,但直到 2005 年之前也只是零星报道。2006 年之后发文量显著增加,近几年年发文量都在 40 篇左右,且在逐渐增加。显示此领域正处于稳步发展阶段。

本次统计共收录期刊文献 273 篇,发表在 126 种期刊上,在 7 种核心期刊中有 4 种是神经医学和康复医学类期刊。前 10 位高产作者中有 9 位来自医院的儿科、康复科和神经内科,共发文 93 篇,占 34%。发文量前 10 的机构中有 6 家医院。涉及的学科类别中神经病学占 24%,精神病学占 19%,儿科学占 11%。说明我国环境丰富的研究主要集中在神经学方面,此领域中第三军医大学新桥医院和福建医科大学附属协和医院是主要研究机构,不仅发文量最多,而且前 10 为高产作者中有 7 为来自这 2 家机构。他们对环境丰富对诸多神经、精神疾病带来的各种脑损伤的辅助治疗、促进康复的作用进行了广泛的研究和开发<sup>[9]</sup>。

而在提升动物福利这方面,在动物园动物上的研究最为突出。本次文献计量统计发现,载文量最大的期刊为《野生动物学报》,发文量最多的 10 家机构中,有 4 家动物园,分别是上海动物园、成都动物园、南京红山森林动物园、北京动物园。动物园丰容文献中,主要通过动物行为的变化和动物对笼舍空间的利用率来评价丰容效果<sup>[10]</sup>。而环境丰富对实验动物福利影响的研究在我国刚刚起步<sup>[11]</sup>,发表的文献较少(< 20),且主要通过实验动物的生长繁殖性能和体内激素变化来评价丰容效果<sup>[12, 13]</sup>。而对于经济动物,环境丰富的文献共 17 篇,主要集中在环境丰富对动物的经济性能的提升上<sup>[14]</sup>。我国环境丰富对动物福利影响的研究从发文趋势上来看还处于初步阶段,从研究手段上来看还比较单

一,有效的环境丰富方式或材料还需要进一步开发。

综上所述,我国在环境丰富的研究方面已经取得了一定的进展,但是研究相对比较集中,主要是神经学方向。环境丰富对提升动物福利的研究还处于初步阶段,此方面的基础研究和应用研究都还大有作为。

#### 参考文献:

- [1] de Azevedo CS, Cipreste CF, Young RJ. Environmental enrichment: A GAP analysis [J]. *Applied Animal Behaviour Science*, 2007, 102(3-4): 329-343.
- [2] 李娟, 罗勇, 胥虹贝, 等. 基于 Web of Science 数据库的跨文化护理文献计量学分析 [J]. *中国护理管理*, 2015, (9): 1058-1062.
- [3] 季力, 崔晓. 丰富环境对脑神经可塑性的影响 [J]. *神经病学与神经康复学杂志*, 2013, (2): 99-101.
- [4] Young RJ. *Environmental enrichment for captive animals* [M]. Oxford: Blackwell Publishing, 2003. 5-10.
- [5] 鄢平, 李洪文, 杨佳璐, 等. 环境丰容对圈养非洲狮行为的影响 [J]. *野生动物学报*, 2015, 36(1): 43-47.
- [6] 李军延, 刘帅. 实验动物环境丰富化 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, (3): 327-330.
- [7] 王济, 程金莲, 张妍, 等. 基于 CNKI 的中医治疗肥胖文献计量学分析 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2013, 20(6): 20-22.
- [8] 袁玉花, 方祥. 基于 Web of Science 的肠道菌群文献计量学分析 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(1): 569-572.
- [9] 左天香, 朱生根. 丰富环境与脑可塑性及康复训练的启示 [J]. *牡丹江医学院学报*, 2012, 33(6): 66-70.
- [10] 张铁卓. 中国动物园环境丰容的科研现状和发展前景 [J]. *现代农业科技*, 2014, (22): 243-246.
- [11] 梁磊, 恽时锋. 丰富环境在啮齿类实验动物中的应用及研究现状 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(2): 71-78.
- [12] 梁磊, 许龙祥, 陈小晚, 等. 社居福利因素对小鼠生长发育及繁殖性能的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(1): 18-22.
- [13] 刘帅, 李军延, 陈巍, 等. 环境丰富对 SD 大鼠生长和血液学指标的影响 [J]. *实验动物与比较医学*, 2016, 36(1): 41-47.
- [14] 赵阳, 赵亚军, 李保明, 等. 饲养密度和鸡笼局部遮光对肉种鸡产蛋期行为与福利的影响 [J]. *动物学研究*, 2006, 27(4): 433-440.

[收稿日期] 2016-06-24



# 羟乙基淀粉 40 氯化钠注射液过敏实验研究

宗卫峰,汪玉馨,刘洋,王瑶,张微峰,陆益红\*

(江苏省食品药品监督检验研究院,南京 210008)

**【摘要】** 目的 评价羟乙基淀粉 40 氯化钠注射液过敏安全性。方法 进行了主动全身过敏反应试验、体内过敏指标测定与筛查及被动皮肤过敏反应试验的方法,考察样品的过敏安全性。结果 我们对 3 个企业 45 批羟乙基淀粉 40 氯化钠注射液进行了豚鼠全身过敏反应和被动皮肤过敏试验,均未发生过敏反应。通过对血浆中过敏性指标,组胺(HIS)、IgG、IgM 和 IgE 进行测定和比较,发现 IgM 和 IgE 在各组间均无明显变化;组胺及 IgG 阳性组与阴性组及样品组间均有差异。结论 建议羟乙基淀粉 40 氯化钠注射液安全性评价应包括过敏反应,还可在羟乙基淀粉临床应用时进行组胺及 IgG 这两项过敏指标的监测。

**【关键词】** 羟乙基淀粉 40 氯化钠注射液;过敏反应;组胺;IgG

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0064-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.013

## Experimental Study on Anaphylactoid Reactions of Hydroxyethyl Starch 40 Sodium Chloride Injection

ZONG Wei-feng, WANG Yu-xin, LIU Yang, WANG Yao, ZHANG Wei-feng, LU Yi-hong\*

(Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, china)

**【Abstract】 Objective** To evaluate the sensitizations of Hydroxyethyl Starch 40 Sodium Chloride Injection. **Methods** Active systemic anaphylaxis (ASA) test, internal sensitive index's determination and screening and Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) test are carried out. Observe the allergy safety of the samples. **Results** We use guinea pigs to carry on ASA test and PCA test with Hydroxyethyl Starch 40 Sodium Chloride Injection from 45 batches of 3 companies and no changes have occurred. Measuring and comparing the sensitive index of HIS, IgG, IgM and IgE in plasma, IgM and IgE are not obvious variation; HIS and IgG positive group and negative group and sample groups are different. **Conclusions** It is suggestion that Hydroxyethyl Starch 40 Sodium Chloride Injection safety evaluation should include allergic reactions, HIS and IgG sensitive index monitoring in clinical application of hydroxyethyl starch.

**【Key words】** Hydroxyethyl starch 40 sodium chloride injection; Anaphylactoid reactions; HIS; IgG

羟乙基淀粉为羟乙基化支链淀粉的水解产物,其制剂是一种良好的血浆代用品,具有降低血液黏度、改善血流动力学、扩充血容量、提高组织供氧、进而改变微循环、抑制炎症等作用<sup>[1]</sup>。羟乙基淀粉 40 氯化钠注射液作为血容量补充药,有抑制血管内红细胞聚集作用,用于改善微循环障碍,临床用于低血容量性

休克,如失血性、烧伤性及手术中休克等;少数患者使用本品可出现过敏现象,表现为眼睑水肿、荨麻疹及哮喘等。为进一步弄清羟乙基淀粉 40 氯化钠注射液过敏反应情况,我们进行了主动全身过敏和被动皮肤过敏试验研究,以期进一步明确羟乙基淀粉 40 氯化钠注射液不良反应的真正原因,为确保安全用药提供

[作者简介]宗卫峰(1978-),男,副主任药师,研究方向:药品药理毒理研究、实验动物检测。E-mail:wfzong@sina.com

[通讯作者]陆益红,主任药师,研究方向:药品药理毒理研究、实验动物检测。E-mail:yihonglu@163.com

依据。同时,优选过敏方法指标,为羟乙基淀粉 40 氯化钠注射液安全性研究提出合理化建议。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

普通级豚鼠,体重 280~310 g,来源于无锡市惠山江南实验动物场[SCXK(苏)2015-0004]。实验环境温度 20~24℃,相对湿度为 45%~60%,实验于江苏省食品药品监督检验研究院设施内进行[SYXK(苏)2012-0043]。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

### 1.2 试剂与仪器

41 批羟乙基淀粉 40 氯化钠注射液(企业 A、B)、4 批高渗氯化钠羟乙基淀粉 40 注射液(企业 C)、2 批羟乙基淀粉 130/0.5 氯化钠注射液(企业 D)。氯化钠注射液(江苏四环生物制药有限公司,批号:15070410,规格:100 mL:0.9 g);新生牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,批号:141011)。

豚鼠组胺 ELISA 试剂盒(96T 批号:BPE40015);豚鼠 IgE ELISA 试剂盒(96T 批号:BPE40020);豚鼠 IgG ELISA 试剂盒(96T 批号:BPE40003);豚鼠 IgM 试剂盒(96T 批号 BPE40022),均购自朗顿生物公司。

L-550 离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);全自动酶标仪(Synergy H1, BIOTEK 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 豚鼠全身主动过敏试验

将豚鼠按体重随机分组(每组 6 只),分别为:氯化钠注射液组、10%小牛血清组、羟乙基淀粉 40 注射液组、羟乙基淀粉 130 注射液组。取豚鼠 6 只,隔日给药一次,给予每只动物 0.5 mL 相应的供试药液,连续 3 次,然后分别于末次给药后的 14 d 和 21 d,给予每只动物前肢静脉注射各组 1.0 mL 相应的供试药液激发注射。观察各组动物在激发注射后 15 min 内是否出现过敏反应(有无竖毛、发抖、干呕、连续喷嚏 3 声、连咳 3 声、紫癜、呼吸困难、二便失禁、步态不稳或倒地、抽搐、休克、死亡等过敏反应症状)。21 d 给药后 15 min 取血浆检测组胺、总 IgE、IgG、IgM 水平<sup>[2]</sup>。

#### 1.3.2 被动皮肤过敏试验<sup>[3]</sup>

##### 1.3.2.1 剂量组别

设阴性、阳性对照组、受试药组。阴性对照组用氯化钠注射液,阳性对照组用新生牛血清 10 倍稀释液。

##### 1.3.2.2 每组动物数

普通级豚鼠,雌雄各半。致敏每组 6 只,激发每组 6 只,均为雌雄各半。

##### 1.3.2.3 致敏方法及抗血清的制备

取上述豚鼠,随机分组,每组 6 只,雌雄各半,分别为受试药组、小牛血清组和氯化钠注射液组,按无菌操作方法,隔日腹腔注射上述三种药品致敏,0.5 mL/只,共计注射 3 次,然后于最后一次致敏注射后第 10 日,股动脉采血,分离血清,将各组 6 只豚鼠的血清分别混合,-20℃保存,2 周内备用。

##### 1.3.2.4 PCA 反应的激发

取上述各组抗血清用生理盐水稀释成 1:2、1:8、1:32。然后取上述豚鼠,随机分组,每组 6 只,雌雄各半,在豚鼠两侧背部预先剪毛,再取受试物组、新生牛血清组和氯化钠注射液组的稀释抗血清,于剪毛处皮内注射各 0.1 mL。经 48 h 后,各组静脉注射与致敏剂量相同的激发抗原加等量的 1% 依文思兰染料溶液,1 mL/只。30 min 后麻醉处死各组动物,剪取背部皮肤,测量皮肤内层的斑点大小,直径大于 5 mm 者判定为阳性。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件处理组间差异,实验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用双侧  $t$  检验进行统计学计算, $P < 0.05$  表示有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 豚鼠全身主动过敏试验

取 3 个企业 45 批羟乙基淀粉 40 氯化钠注射液原液,致敏并激发豚鼠,结果均未发生豚鼠主动全身过敏反应。羟乙基淀粉 130/0.5 氯化钠注射液(企业 D)1412042 批号的其中一只豚鼠出现连续咳嗽现象,小牛血清组攻击 3 min 后即出现步态不稳,咳嗽,抽搐,倒伏等强阳性反应。

通过对血浆中过敏性指标组胺(HIS)、IgG、IgM 和 IgE 进行测定和比较发现 IgM 和 IgE 在各组间均无明显变化,而组胺及 IgG 在小牛血清阳性组内有比较明显的升高,见图 1、2 及表 1。用双侧  $t$  检验进行统计学计算发现,阳性组与阴性组及样品组间均有差异,阳性结果成立。组胺及 IgG 在羟乙基淀粉 40 各组间无显著差异,与阴性对照组无显著区别。

### 2.2 豚鼠被动皮肤过敏试验

我们对 3 个企业 45 批羟乙基淀粉 40 氯化钠注射液,取原液,致敏并攻击豚鼠,考察豚鼠被动皮肤过敏反应,结果均未发生豚鼠被动皮肤过敏反应。

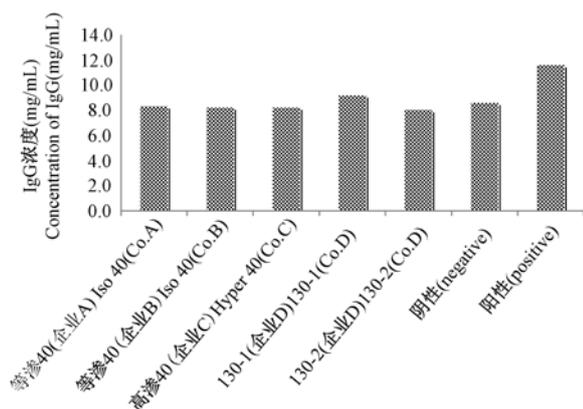


图1 各组间 IgG 均值比较

Fig. 1 Comparison on average of IgG in each group.

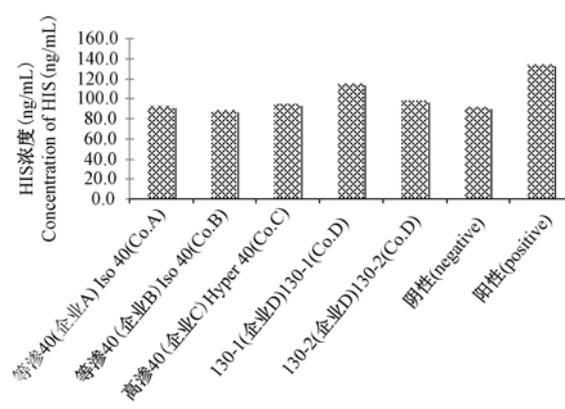


图2 各组间 HIS 均值比较

Fig. 2 Comparison on average of HIS in each group.

表1 豚鼠全身主动过敏反应实验结果(n=3)

Tab. 1 The result of Active systemic anaphylaxis induced by Hydroxyethyl Starch 40 Sodium Chloride Injection in guinea pigs.

| 组别            | 批号          | 激发后出现过敏反应及组胺和 IgG 的含量(第 21 天激发) |                |                |      |
|---------------|-------------|---------------------------------|----------------|----------------|------|
|               |             | 症状发生数(只)<br>主要症状                | 组胺<br>(ng/mL)  | IgG<br>(mg/mL) | 结果判断 |
| 阴性            | 阴性          | 0                               | 92.2 ± 21.62   | 8.6 ± 1.23     | -    |
| 等渗 40 (企业 A)  | 2A15042305  | 0                               | 100.3 ± 12.13  | 8.8 ± 1.09     | -    |
|               | 2A15052705  | 0                               | 75.0 ± 27.92   | 6.9 ± 2.67     | -    |
|               | 2A15061405  | 0                               | 103.0 ± 15.97  | 8.1 ± 0.98     | -    |
|               | 1411283203  | 0                               | 96.3 ± 15.72   | 8.9 ± 0.96     | -    |
| 等渗 40 (企业 B)  | 1507243201  | 0                               | 89.5 ± 15.61   | 8.5 ± 1.33     | -    |
|               | 1507043203  | 0                               | 80.4 ± 15.94   | 7.2 ± 2.24     | -    |
|               | 141230 0102 | 0                               | 89.7 ± 23.75   | 8.8 ± 1.80     | -    |
| 高渗 40 (企业 C)  | 150603 0101 | 0                               | 97.9 ± 28.42   | 7.1 ± 1.44     | -    |
|               | 141017 0101 | 0                               | 95.9 ± 11.36   | 8.8 ± 4.09     | -    |
| 等渗 130 (企业 D) | 1412042     | 1                               | 115.6 ± 6.52   | 9.1 ± 1.28     | -    |
|               | 1503161     | 0                               | 98.0 ± 15.51   | 8.0 ± 1.13     | -    |
| 阳性            | 阳性          | 3                               | 134.2 ± 4.95** | 11.6 ± 0.91**  | +    |

注:与阴性相比较,\*\* $P < 0.05$ 。Note. Compared with the negative control, \*\* $P < 0.05$ .

### 3 讨论

本研究对企业 A 和 B 的 41 批羟乙基淀粉 40 氯化钠注射液、企业 C 的 4 批高渗羟乙基淀粉氯化钠注射液、企业 D 的羟乙基淀粉 130/0.5 氯化钠注射液,用豚鼠进行了全身主动过敏和被动皮肤过敏实验,结果显示,羟乙基淀粉 40 氯化钠注射液等渗和高渗溶液均无明显过敏反应。目前羟乙基淀粉 40 氯化钠注射液质量标准中未制定过敏反应检查项,但因药物在临床不良反应中有过敏反应现象,故建议企业增加过敏反应发生的质量监控。另外因《中国药典》中过敏反应检查是用豚鼠全身主动过敏检查法,仅是对动物行为学指标进行观察,也受试验者主观因素影响,存在误差。而在临床上出现的一些超过敏反应症状在此检查法中也不能体现出,故可对过敏实验敏感动物模型方面作进一步研究。

本次研究中羟乙基淀粉 130 组中有 1 只豚鼠出现咳嗽症状,该组组胺及 IgG 水平比阴性及羟乙基

淀粉 40 组也略有升高,虽统计学分析无显著性差异,但结合前期不良反应检索结果提示我们分子量大小与过敏反应存在一定的正相关,中、高分子量的羟乙基淀粉存在过敏反应的风险,其作为代血浆使用时,为急救用药且用量大,所以安全性尤为重要。故有必要对羟乙基淀粉 130、羟乙基淀粉 200 进行进一步过敏研究,同时在其临床应用时收集组胺及 IgG 这两项过敏指标与不良反应相关性的数据,对易过敏病人提高警惕,以减少不良反应的发生,保障用药的安全。

#### 参考文献:

- [1] 陈燕,骆喜宝,潘云. 羟乙基淀粉的药理作用和临床应用研究进展[J]. 医学综述,2012,18(4):593-595.
- [2] 张美玉,李贻奎,张嘉,等. 鱼腥草注射液过敏及类过敏实验研究[J]. 中国现代应用药学杂志,2009,26(8):610-614.
- [3] 国家食品药品监督管理总局. 药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则(2014年版)[OL]. <http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL1616/101018.html>

[收稿日期]2016-06-14



# TAK1 抑制剂对糖尿病大鼠 MAPK 与 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响及其对肾脏保护机制

欧阳春, 张里克\*, 卢远航, 李先林

(湖北省中山医院, 武汉 430030)

**【摘要】 目的** 探讨 TAK1 抑制剂对糖尿病大鼠 MAPK 及 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响及其对肾脏的保护机制。**方法** 将 48 只大鼠按照随机数字表法分为 DN 组、TAK1 组和对照组, 每组 16 只。对照组大鼠正常喂养, 不做任何处理; DN 组、TAK1 组通过向大鼠腹腔注射 1% 50 mg/kg STZ 建立 DN 大鼠模型。每组分别于 4 周、8 周时处死 8 只大鼠, 观察各组大鼠肾脏组织病理变化, 检测血清 TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$  表达, 肾脏组织 p38MAPK、NF- $\kappa$ Bp63 蛋白表达及 p38MAPK、NF- $\kappa$ Bp63 mRNA 表达。**结果** 4 周、8 周时, DN 组、TAK1 组大鼠体质量、血糖、UAER 均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), DN 组大鼠体质量、UAER 显著高于 TAK1 组 ( $P < 0.05$ )。DN 组、TAK1 组血清 TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$  水平显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), DN 组大鼠上述指标高于 TAK1 组 ( $P < 0.05$ ); DN 组、TAK1 组 p38MAPK、NF- $\kappa$ Bp63 蛋白及 mRNA 表达水平显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 其中 DN 组上述指标高于 TAK1 组 ( $P < 0.05$ )。**结论** TAK1 通过激活 MAPK 及 NF- $\kappa$ B 信号通路来诱导炎症反应, 并参与糖尿病肾脏损伤; TAK1 抑制剂能够下调炎症因子的表达和释放而发挥抗炎作用。

**【关键词】** 糖尿病肾病; 转化生长因子  $\beta$  激活激酶-1; 炎症反应; 信号通路

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0067-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.014

## Regulatory effect of TAK1 inhibitors on MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathway in diabetic rats and its renal protection mechanism

OU Yang-chun, ZHANG Li-ke\*, LU Yuan-hang, LI Xian-lin  
(Zhongshan Hospital of Hubei Province, Wuhan 430030, China)

**【Abstract】 Objective** To explore the regulatory effect of TAK1 inhibitors on MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathway in diabetic rats and its renal protection mechanism. **Methods** A total of 48 rats accorded to the random number table method were divided into DN group, TAK1 group and control group, each group with 16 rats, control group with normal fed, DN group and TAK1 group by the intraperitoneal injection of 1% 50 mg/kg STZ DN model rat. 8 rats were killed in each group at 4 weeks and 8 weeks respectively, the pathological changes of renal tissue were observed, serum TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\beta$  levels were detected by enzyme linked immunosorbent assay, p38MAPK, NF- $\kappa$ Bp63 protein expression were detected by Western blotting, p38MAPK, NF- $\kappa$ Bp63 mRNA levels in renal tissue were detected by real time fluorescence quantitative PCR. **Results** At 4 weeks and 8 weeks, the body weight, blood glucose and UAER of DN group and TAK1 group were significantly higher than those in control group ( $P < 0.05$ ). The body weight and UAER of DN group were significantly higher than those of TAK1 group ( $P < 0.05$ ). The serum TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\beta$  levels in DN group and TAK1 group were significantly higher than those in control group ( $P < 0.05$ ), and DN group serum TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\beta$  levels were

[作者简介] 欧阳春(1970-), 男, 副主任技师, 研究方向: 临床输血研究。E-mail: 68471104@qq.com

[通讯作者] 张里克(1969-), 男, 副主任技师, 研究方向: 临床输血研究。E-mail: 3257550384@qq.com

significantly higher than those in TAK1 group ( $P < 0.05$ ). The expression levels of p38MAPK, NF- $\kappa$ Bp63 protein and mRNA in DN group, TAK1 group were significantly higher than those in control group ( $P < 0.05$ ), and p38MAPK, NF- $\kappa$ Bp63 protein and mRNA in DN group was significantly higher than that in TAK1 group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** TAK1 induces inflammation by activating MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways, and participates in diabetic renal injury. TAK1 inhibitors with anti-inflammatory effect by down regulate the expression of inflammatory factors.

**【Key words】** Diabetic nephropathy; Transforming growth factor  $\beta$  activated kinase-1; Inflammatory reaction; Signal pathway

糖尿病肾病<sup>[1]</sup> (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病常见的微血管并发症, DN 的发病机制复杂, 包括肾血流动力学异常、糖代谢紊乱、遗传因素、炎症反应等。国外研究证实<sup>[2]</sup>, 糖尿病高血糖环境下, 单核细胞趋化因子-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 等炎症因子释放增加, 导致肾脏炎症反应加重, 最终发生肾脏病变。Ellina 等<sup>[3]</sup> 对糖尿病大鼠进行持续观察, 结果发现随着糖尿病病情的加重, 肾脏周围大量浸润巨噬细胞, 提示巨噬细胞浸润于 DN 的发病密切相关。MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路是参与激活巨噬细胞的细胞内转导通路, 而转化生长因子  $\beta$  激活激酶-1 (transforming growth factor  $\beta$  activated kinase-1, TAK1) 是 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路共同的上游调节因子<sup>[4,5]</sup>。Corporeau 等<sup>[6]</sup> 将输尿管梗阻小鼠 TAK1 基因敲除后, 小鼠肾脏组织 JNK、NF- $\kappa$ B 信号通路受到抑制, 炎症因子也显著降低, 肾脏组织损害显著减轻, 提示 TAK1 能够调节肾脏炎症反应。本研究旨在探讨 TAK1 对 DN 大鼠 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路的调节作用及其机制, 为 DN 的防治提供新的治疗思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

48 只 SPF 级 SD 大鼠 6~8 周龄, 体重 180~240 g, 均为雄性, 购自武汉大学医学院实验动物中心 [SCXK(鄂)2014-0005] [SYXK(鄂)2014-0022]; 所有大鼠均于动物房检疫合格, 标准化饲养房饲养, 室温 20~22 $^{\circ}$ C, 相对湿度 50%, 每天交替进行 12 h 光照、12 h 黑暗处理, 喂养 1 周后进行实验。48 只大鼠按照随机数字表法分为 DN 组、TAK1 组和对照组, 各 16 只。3 组大鼠周龄、体质量比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 具有可比性。本实验大鼠处置方法经过动物伦理学批准。

### 1.2 主要仪器与试剂

TAK1 抑制剂 5Z-7-oxozeaenol 购自美国 MCE 公

司 (纯度 > 99.99%); 免疫组化试剂盒购自上海拜力生物科技有限公司; 糖原染色液 (PAS) 购自上海研域生物科技有限公司; TNF- $\alpha$ 、MCP-1、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 试剂盒购自上海基免生物技术有限公司; 小鼠抗人 p38MAPK 多克隆抗体、兔抗小鼠 NF- $\kappa$ Bp63 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗、 $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 抗体、链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ) 均购自美国购自 Sigma 公司; PVDF 膜、磷酸缓冲盐溶液 (PBS)、RPMI 1640 培养基购自美国 Santa Cruz 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

7600-020 全自动生化分析仪购自日本日立公司; 9700 型 PCR 仪购自美国 ABI 公司; TS100-F 倒置显微镜购自尼康公司; Odyssey 成像系统及图像分析软件购自美国 LI-COR 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物模型制备

对照组大鼠正常喂养, 不做任何处理; DN 组、TAK1 组建立 DN 大鼠模型<sup>[7]</sup>: 向大鼠腹腔注射 1% STZ, 注射剂量 50 mg/kg, 注射 72 h 后连续 3 d 尾静脉采血测定血糖, 每日采血 1 次; 造模成功标准: 连续 3 次血糖  $\geq 16.6$  mmol/L、24 h 尿蛋白排泄率 (urinary albumin excretion rates, UAER)  $> 30$  mg、尿量  $\geq 150\%$  原尿量。DN 大鼠模型建立后, 对照组大鼠、DN 组大鼠正常喂养, TAK1 组腹腔注射 5Z-7-oxozeaenol 2 mg/kg, 每隔 1 d 注射 1 次; 检测 5Z-7-oxozeaenol 注射 4 周、8 周大鼠体质量、血糖、UAER。上述两个时段每组分别处死 8 只大鼠, 处死后从心脏取血, 置于肝素抗凝管中, -20 $^{\circ}$ C 保存待检; 另取大鼠双肾组织, 将肾包膜完全剥离, 矢状纵行将肾脏剖开, 其中一部分用丙酮固定, 做冰冻切片, 置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存; 另外一部分用 5% 多聚甲醛固定, 液氮保存。

#### 1.3.2 肾脏组织病理学检查

取石蜡切片, 脱蜡至水, 蒸馏水冲洗后, 70% 乙

醇洗脱;再将切片置于高碘酸乙醇溶液浸泡 10 min, 70% 乙醇洗脱,置入还原液中 1 min,再用 70% 乙醇洗脱,置于品红溶液中 60 min,自来水下冲洗 10 min,苏木素复染 3 min,1% 盐酸酒精分化,再次自来水冲洗,甩干后透明、封固;显微镜下观察染色情况。

### 1.3.3 血清 TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$ 检测

分别取各时段全血 1 mL,5000 r/min 离心 10 min(离心半径 8 cm),吸取上清液,置于无菌 EP 管中,-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。采用酶联免疫吸附试验检测血清 TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$  表达水平,所有检测操作均严格按照试剂盒说明书要求。

### 1.3.4 肾脏组织 p38MAPK、NF- $\kappa$ Bp63 蛋白检测 (Westernblot)

将肾脏组织取出,剪碎后充分研磨,加入 RIPA 裂解液,冰水浴上静置 30 min,充分裂解后于冷冻离心机上以 4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 10 min,提取总蛋白;BCA 法检测总蛋白浓度。取 50  $\mu$ g 总蛋白,100 $^{\circ}$ C 水浴上变性 5 min,采用 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳分离蛋白,湿转法将电泳带电转移至 PVDF 膜上,37 $^{\circ}$ C 条件下加入 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 ~ 2 h,再分别加入 1:1000 稀释的 p38MAPK 多克隆抗体、1:500 稀释的 NF- $\kappa$ Bp63 多克隆抗体、1:5000 稀释的  $\beta$ -actin 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 冲洗 3 次,待洗膜后再加入 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗,37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 1 h,PBS 冲洗 3 次;采用 ECL 化学发光试剂显影、曝光,凝胶成像系统对条带进行分析,半定量分析灰度条带,目的条带与  $\beta$ -actin 条带积分吸光度值之比为目的蛋白相对表达量。

### 1.3.5 肾脏组织 p38MAPK、NF- $\kappa$ Bp63 mRNA (Quantitative Real-time PCR)

采用 Trizol 试剂盒提取肾脏组织总 RNA,提取方法按照试剂盒说明书;标准步骤将总 RNA 逆转录成 cDNA,再将 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 实验,引物委托南京金斯瑞生物科技有限公司设计合成,p38MAPK: Forward: 5'-GGGTCAAAGATCACGTGACAG-3',Reverse: 5'-TTGTCAAAGCAGACGGAGGTC-3' 扩增片段长度 226 bp; NF- $\kappa$ Bp63: Forward: 5'-TTGACCGGTAAATGTCAACGTAAT-3',Reverse: 5'-TGAGACTGGCACTGAGAGTGGTTC-3',扩增片段长度 304 bp; GAPDH: Forward: 5'-GGTGAACGTGC GTCTCAAGC-3',Reverse: 5'-GTCCGGTGGTGAAGA TCGTC-3',扩增片段长度 117 bp; PCR 反应体系:

ddH<sub>2</sub>O 13  $\mu$ L、缓冲液 2.5  $\mu$ L、dNTP1  $\mu$ L、上下游引物各 0.5  $\mu$ L,cDNA3  $\mu$ L、Taq 酶 0.5  $\mu$ L,总反应体系 21  $\mu$ L;反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,40 个循环后 72 $^{\circ}$ C 5 min;以 GAPDH 为内参照进行校正,测量目的基因 CT 值,2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>法分析目的基因相对表达量。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据处理,计量资料采用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用 ANOVA 单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异(LSD)检验,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠一般情况比较

4 周、8 周时,对照组大鼠毛发有光泽,行动自如,进食、饮食正常;DN 组大鼠出现明显多尿、多饮、多食、偏瘦,毛发杂乱且无光泽,大鼠行动偏少;TAK1 组亦有 DN 组大鼠表现,但症状较 DN 组明显减轻。4 周、8 周时,DN 组、TAK1 组大鼠体质量、血糖、UAER 均显著高于对照组( $P < 0.05$ ),DN 组大鼠体质量、UAER 显著高于 TAK1 组( $P < 0.05$ ),见表 1。

### 2.2 各组大鼠肾脏组织病理学变化

对照组大鼠肾脏组织上皮细胞连接紧密、形态规则、排列整齐、边缘完整,细胞间隙未见水肿和炎性浸润;DN 组肾脏组织可见大面积上皮细胞坏死,部分上皮细胞发生脱落,基底膜部分裸露,管腔内存在大量脱落细胞及碎片;TAK1 组肾脏组织上皮细胞坏死面积缩小,管腔内脱落细胞数量减少;上皮细胞坏面积较 DN 组显著缩小,见图 1。

### 2.3 各组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$ 含量比较

4 周、8 周时,DN 组、TAK1 组血清 TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$  显著高于对照组( $P < 0.05$ ),DN 组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$  显著高于 TAK1 组( $P < 0.05$ ),见表 2。

### 2.4 各组大鼠肾脏组织 p38MAPK、NF- $\kappa$ Bp63 蛋白表达

免疫印迹结果显示,4 周、8 周时,DN 组、TAK1 组 p38MAPK、NF- $\kappa$ Bp63 蛋白表达水平显著高于对照组( $P < 0.05$ ),其中 DN 组 p38MAPK、NF- $\kappa$ Bp63 蛋白表达显著高于 TAK1 组( $P < 0.05$ ),见图 2-3。

**2.5 各组大鼠肾脏组织 p38MAPK、NF-κBp63 mRNA 表达**

实时荧光定量 PCR 结果显示,4 周、8 周时, DN 组、

TAK1 组 p38MAPK、NF-κBp63 mRNA 表达水平显著高于对照组( $P < 0.05$ ),其中 DN 组 p38MAPK、NF-κBp63 mRNA 表达显著高于 TAK1 组( $P < 0.05$ ),见图 4。

**表 1** 各组大鼠一般情况( $n = 8$ )

**Tab. 1** Comparison of general situation in each group

| 组别<br>Groups         | 体质量<br>Body weight(g)      |                            | 血糖<br>Blood sugar(mmol/L) |                           | 24 h 尿蛋白排泄率<br>Urinary albumin excretion rates( $\mu\text{g}/24\text{ h}$ ) |                              |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---|------------------------------|
|                      | 4 周<br>4 week              | 8 周<br>8 week              | 4 周<br>4 week             | 8 周<br>8 week             | 4 周<br>4 week   | 8 周<br>8 week                |
| 对照组<br>Control group | 204.6 ± 10.4               | 211.1 ± 10.8               | 7.21 ± 0.43               | 7.14 ± 0.38               | 16.87 ± 2.04  | 17.03 ± 2.31                 |
| DN 组<br>DN group     | 307.3 ± 13.1 <sup>a</sup>  | 311.6 ± 13.9 <sup>a</sup>  | 34.31 ± 6.32 <sup>a</sup> | 35.08 ± 6.03 <sup>a</sup> | 973.48 ± 83.28 <sup>a</sup>   | 997.31 ± 87.37 <sup>a</sup>  |
| TAK1 组<br>TAK1 group | 274.6 ± 11.4 <sup>ab</sup> | 276.1 ± 12.5 <sup>ab</sup> | 35.17 ± 6.78 <sup>a</sup> | 35.04 ± 6.32 <sup>a</sup> | 479.31 ± 37.06 <sup>ab</sup>  | 483.48 ± 39.41 <sup>ab</sup> |

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 DN 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

Note. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs. the control group. <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs. the DN group.

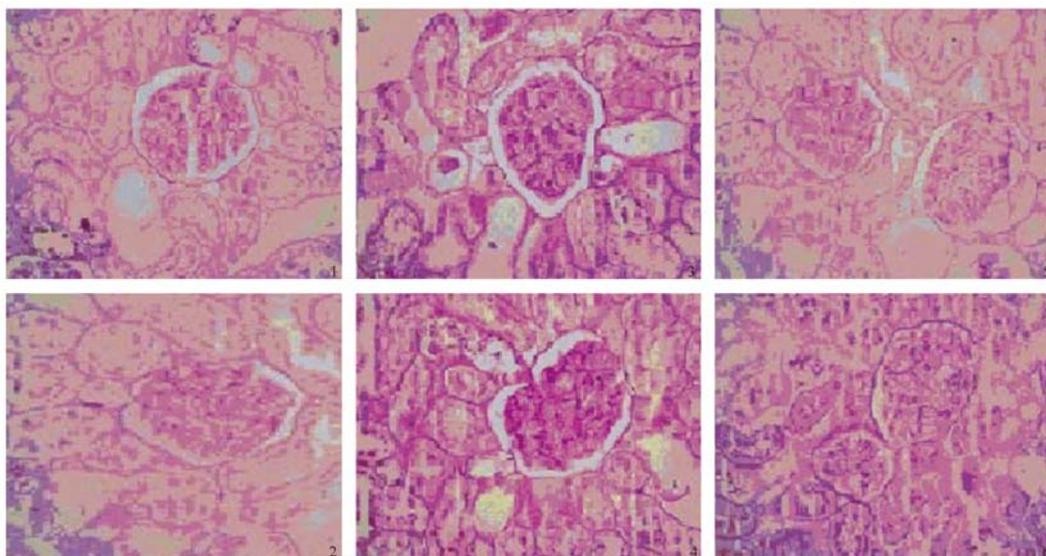
**表 2** 各组大鼠血清 TNF-α、MCP-1、IL-1β 含量比较( $n = 8, \text{ng/L}$ )

**Tab. 2** Comparison of TNF-α, MCP-1 and IL-1β in each group

| 组别<br>Groups         | 肿瘤坏死因子-α<br>TNF-α         |                          | 单核细胞趋化因子-1<br>MCP-1        |                            | 白细胞介素-1<br>βIL-1β          |                            |
|----------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                      | 4 周<br>4weeks             | 8 周<br>8weeks            | 4 周<br>4weeks              | 8 周<br>8weeks              | 4 周<br>4weeks              | 8 周<br>8weeks              |
| 对照组<br>Control group | 13.1 ± 1.7                | 12.9 ± 1.4               | 169.5 ± 12.7               | 171.4 ± 13.4               | 51.7 ± 6.1                 | 49.5 ± 5.7                 |
| DN 组<br>DN Group     | 104.2 ± 11.5 <sup>a</sup> | 85.4 ± 7.6 <sup>a</sup>  | 636.4 ± 43.1 <sup>a</sup>  | 645.9 ± 44.5 <sup>a</sup>  | 714.3 ± 41.3 <sup>a</sup>  | 729.4 ± 31.6 <sup>a</sup>  |
| TAK1 组<br>TAK1 Group | 87.4 ± 8.4 <sup>ab</sup>  | 85.5 ± 4.7 <sup>ab</sup> | 437.1 ± 23.6 <sup>ab</sup> | 447.6 ± 24.5 <sup>ab</sup> | 974.6 ± 81.7 <sup>ab</sup> | 816.5 ± 64.8 <sup>ab</sup> |

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 DN 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

Note. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs. the control group. <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs. the DN group.



注:(1)对照组 4 周;(2)对照组 8 周;(3)DN 组 4 周;(4)DN 组 8 周;(5)TAK1 组 4 周;(6)TAK1 组 8 周。

**图 1** 各组大鼠肾脏组织病理学变化(PAS 染色, ×100)

Note. (1)Control group in 4 weeks. (2) Control group in 8 weeks. (3)DN group in 4 weeks.

(4)DN group in 8 weeks. (5) TAK1 group in 4 weeks. (6)TAK1 group in 8 weeks.

**Fig. 1** Pathological changes of the rat kidney tissue in each group

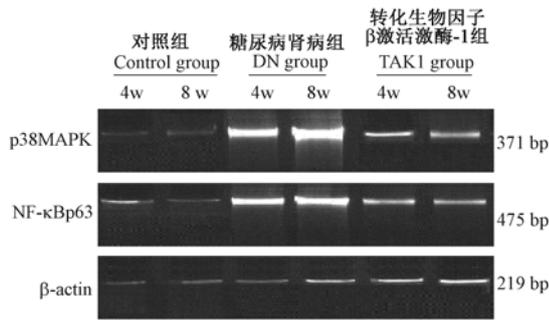
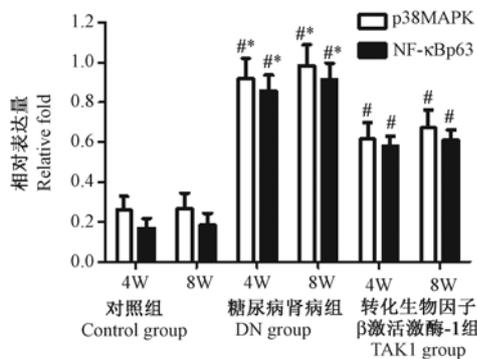


图 2 三组大鼠肾脏组织 p38MAPK、NF-κBp63 蛋白表达水平

Fig. 2 Protein expression of p38MAPK, NF-κBp63 of the rats kidney tissue in three groups



注:与对照组比较, # $P < 0.05$ ;与 TAK1 组比较, \* $P < 0.05$ 。

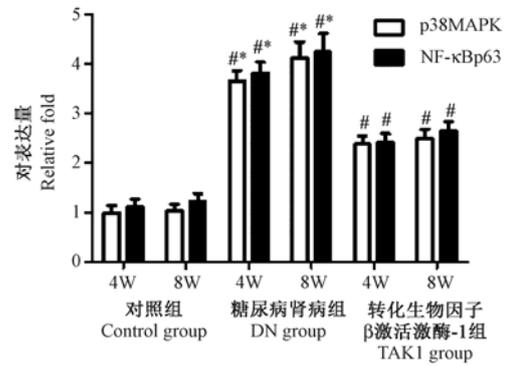
图 3 三组大鼠肾脏组织 p38MAPK、NF-κBp63 蛋白表达水平

Note. # $P < 0.05$  vs. the control group.  
\* $P < 0.05$  vs. the DTAKI group.

Fig. 3 Protein expression of p38MAPK, NF-κBp63 of the rats kidney tissue in three groups

### 3 讨论

局部炎症反应对 DN 的发病起关键作用。国外研究证实<sup>[8,9]</sup>糖尿病的高血糖环境会导致肾脏组织处于微炎症反应中,炎症反应释放的炎症因子会加速肾小球硬化,并导致肾小管萎缩、间质纤维化,加速 DN 的病情进展。本研究显示 4 周时 DN 大鼠即开始出现体重增加、贪食等症状,同时伴有微量白蛋白尿。给予 TAK1 抑制剂后, DN 大鼠体质量、UAER 均明显降低,而 TAK1 组、DN 组大鼠血糖比较差异无统计学意义。说明 TAK1 抑制剂对 DN 肾脏具有保护作用,而这种保护作用并不依赖于血糖的降低。李媛媛等<sup>[10]</sup>证实 TAK1 是调节多条炎症反应信号通路的关键因子, TAK1 可以下调丝裂原活化蛋白激酶的活性,诱导下游靶基因释放 TNF- $\alpha$ 、



注:与对照组比较, # $P < 0.05$ ,与 TAK1 组比较, \* $P < 0.05$ 。

图 4 三组大鼠肾脏组织 p38MAPK、NF-κBp63 mRNA 表达水平

Note. # $P < 0.05$  vs. the control group.

\* $P < 0.05$  vs. the DTAKI group.

Fig. 4 Expression of p38MAPK, NF-κBp63 mRNA of the rats kidney tissue in three groups

MCP-1 等炎症因子,并促进炎症因子在肾小球外基质聚集,最终诱导肾脏发生病变。Medici 等<sup>[11]</sup>报道称 TAK1 是 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路上游共同的调节因子,其主要参与调节相应下游信号分子的表达来介导炎症反应。

p38MAPK 是 MAPK 家族成员之一,亦是细胞信号转导的交汇点<sup>[12]</sup>。当 p38MAPK 与 TAB 结合后,发生自身磷酸化反应而被激活。陈子等<sup>[13]</sup>报道称与正常人群比较,慢性肾炎肾组织 p38MAPK 磷酸化水平显著升高,并介导一系列肾脏局部炎症反应。王晓天等<sup>[14]</sup>对 DN 大鼠肾脏组织进行观察,结果显示在肾脏损伤的开始阶段 p38MAPK 即出现明显磷酸化,且随着时间的延长,磷酸化水平不断增加。本研究显示,4 周、8 周时 DN 组大鼠 p38MAPK 蛋白和 mRNA 表达显著增强,提示 p38MAPK 参与了糖尿病肾脏损伤。给予 TAK1 抑制剂后, p38MAPK 蛋白和 mRNA 显著降低,提示 TAK1 可能通过促进 p38MAPK 表达介导的肾脏损伤。

Huvet 等<sup>[15]</sup>报道称 TAK1 能够激活 I $\kappa$ B 激酶,降解 I $\kappa$ B 蛋白,使 NF- $\kappa$ B 从 IKK 复合物中解离并转移至细胞内,与 DNA 相应位点结合后诱导 NF- $\kappa$ B 级联反应。Ka 等<sup>[16]</sup>对 DN 患者 NF- $\kappa$ B 表达进行检测,结果显示与正常人群比较, DN 患者外周血 NF- $\kappa$ B 蛋白和 mRNA 表达水平显著增加,且病情越重、UAER 越高,外周血 NF- $\kappa$ B 表达越高。Bhattacharya 等<sup>[17]</sup>通过 STZ 诱导糖尿病小鼠模型,结果显示 STZ 诱导 2 周后肾脏组织 NF- $\kappa$ Bp63 表达即开始显著增加,至 3 周时 TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$  等细胞因子也开

始逐渐增加,4 周时小鼠肾脏组织开始出现肾小球硬化、胶原合成增加等;给予 NF- $\kappa$ B 抑制剂 PDTC 后,相关指标均明显降低,说明 NF- $\kappa$ B 是诱导 DN 肾脏炎症反应的主要机制,而 TAK1 参与了 NF- $\kappa$ B 的激活。本研究显示,4 周、8 周时 DN 组大鼠 NF- $\kappa$ Bp63 蛋白和 mRNA 表达显著增强,经 TAK1 抑制剂后,NF- $\kappa$ Bp63 蛋白和 mRNA 显著降低,说明 TAK1 抑制剂亦可以减弱 NF- $\kappa$ Bp63 介导的炎症反应而发挥肾脏的保护作用。

Tone 等<sup>[18]</sup>研究显示,血糖升高会刺激肾脏系膜细胞释放 MCP-1,并促进单核细胞在炎症反应部位聚集,导致肾脏损伤加重。IL-1 $\beta$  是体内炎症反应的关键因子,在慢性炎症的起始阶段,IL-1 $\beta$  释放逐渐增加,并调节下游炎症因子的级联反应<sup>[19]</sup>,导致体内炎症因子大量释放。Elsherbiny 等<sup>[20]</sup>报道称 IL-1 $\beta$  能够刺激肾小球上皮细胞、系膜细胞和内皮细胞释放 TNF- $\alpha$ ,进而介导肾脏的炎性反应和组织损伤。本研究显示 DN 组血清 TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$  显著高于 TAK1 组,TAK1 组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$  显著低于于 TAK1 组,说明 TAK1 抑制剂可能通过下调炎症因子的表达和释放而发挥抗炎作用。

综上所述,TAK1 通过激活 MAPK 及 NF- $\kappa$ B 信号通路来诱导炎症反应,并参与糖尿病肾脏损伤;TAK1 抑制剂能够下调炎症因子的表达和释放而发挥抗炎作用。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Somania R, Singhai AK, Shivgunde P, *et al.* Asparagus racemosus Willd ( Liliaceae ) ameliorates early diabetic nephropathy in STZ induced diabetic rats[J]. Indian J Exp Biol, 2012,50(7):469-475.
- [ 2 ] Verhave JC, Bouchard J, Goupil R, *et al.* Clinical value of inflammatory urinary biomarkers in overt diabetic nephropathy: A prospective study[J]. Diabetes Res Clin Pract,2013,101(3):333-340.
- [ 3 ] Ellina O, Chatzigeorgiou A, Kouyanou S, *et al.* Extracellular matrix-associated (GAGs, CTGF), angiogenic (VEGF) and inflammatory factors (MCP-1, CD40, IFN- $\gamma$ ) in type 1 diabetes mellitus nephropathy[J]. Clin Chem Lab Med,2012,50(1):167-174.
- [ 4 ] Singh V, Barbosa FL, Torricelli AA, *et al.* Transforming growth factor  $\beta$  and platelet-derived growth factor modulation of myofibroblast development from corneal fibroblasts invitro [J]. Exp Eye Res,2014,120:152-160.
- [ 5 ] Michalska M, Kozakiewicz M, Bodek KH. Polymer angiogenic factor carrier. Part I. Chitosan-alginate membrane as carrier PDGF-AB and TGF-beta[J]. Polim Med,2008,38(4):19-28.
- [ 6 ] Corporeau C, Groisillier A, Jeudy A, *et al.* A Functional Study of Transforming Growth Factor-Beta from the Gonad of Pacific Oyster *Crassostrea gigas*[J]. Mar Biotechnol (NY),2011,13(5):971-980.
- [ 7 ] Omran OM. Effects of thymoquinone on STZ-induced diabetic nephropathy: An immunohistochemical study[J]. Ultrastruct Pathol, 2014,38(1):26-33.
- [ 8 ] Celec P, Hodosy J, Gardlík R, *et al.* The effects of anti-inflammatory and anti-angiogenic DNA vaccination on diabetic nephropathy in rats [J]. Hum Gene Ther,2012,23(2):158-166.
- [ 9 ] Alipour MR, Khamaneh AM, Yousefzadeh N, *et al.* Upregulation of microRNA - 146a was not accompanied by downregulation of pro-inflammatory markers in diabetic kidney [J]. Mol Biol Rep, 2013,40(11):6477-6483.
- [ 10 ] 李媛媛,徐兴欣,邵云侠,等. 转化生长因子  $\beta$  激活激酶 1 抑制剂对糖尿病小鼠肾脏的保护作用及机制[J]. 中华肾脏病杂志,2015,31(11):848-854.
- [ 11 ] Medici D, Potenta S, Kalluri R. Transforming growth factor-beta 2 promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling[J]. Biochem J, 2011,437(3):515-520.
- [ 12 ] Tran P, Ho SM, Kim BG, *et al.* TGF- $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1) and apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) interact with the myogenic receptor Cdo to promote myogenic differentiation via activation of p38MAPK pathway [J]. J Biol Chem,2012,287(15):11602-11615.
- [ 13 ] 陈子摇,黄胜华,连希艳. p38MAPK 与肾脏疾病关系的研究进展[J]. 海南医学,2015,26(22):3344-3346.
- [ 14 ] 王晓天,李向阳,秦苏萍,等. p38MAPK 介导的 Fas/FasL 凋亡信号通路在大鼠抗 GBM 肾炎中的作用[J]. 中国免疫学杂志,2012,28(11):979-985.
- [ 15 ] Huvet A, Fleury E, Corporeau C, *et al.* In Vivo RNA Interference of a Gonad-Specific Transforming Growth Factor-beta in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* [J]. Mar Biotechnol (NY), 2012,14(4):402-410.
- [ 16 ] Ka SM, Yeh YC, Huang XR, *et al.* Kidney-targeting Smad7 gene transfer inhibits renal TGF- $\beta$ /MAD homologue (SMAD) and nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signalling pathways, and improves diabetic nephropathy in mice[J]. Diabetologia,2012,55(2):509-519.
- [ 17 ] Bhattacharya S, Manna P, Gachhui R, *et al.* D-Saccharic acid 1, 4-lactone protects diabetic rat kidney by ameliorating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via NF- $\kappa$ B and PKC signaling [J]. Toxicol Appl Pharmacol,2013,267(1):16-29.
- [ 18 ] Tone A, Shikata K, Nakagawa K, *et al.* Renoprotective effects of clarithromycin via reduction of urinary MCP-1 levels in type 2 diabetic patients[J]. Clin Exp Nephrol,2011,15(1):79-85.
- [ 19 ] Dabhi B, Mistry KN. Oxidative stress and its association with TNF-alpha-308 G/C and IL-1 alpha-889 C/T gene polymorphisms in patients with diabetes and diabetic nephropathy [J]. Gene,2015,562(2):197-202.
- [ 20 ] Elsherbiny NM, Abd El Galil KH, Gabr MM, *et al.* Reno-protective effect of NECA in diabetic nephropathy: Implication of IL-18 and ICAM-1[J]. Eur Cytokine Netw,2012,23(3):78-86.

[收稿日期]2016-06-21



# 淫羊藿苷对实验性 IgA 肾病大鼠的作用及相关机制

张红<sup>1\*</sup>, 刘念<sup>2</sup>, 李征<sup>3</sup>

(郑州大学附属南阳市中心医院 1. 肾病风湿免疫科; 2. 骨二科; 3. 泌尿外科, 河南 南阳 473400)

**【摘要】目的** 探究不同剂量的淫羊藿苷对实验性 IgA 肾病大鼠的影响, 并研究其相关作用机制。**方法** 建立实验性 IgA 肾病大鼠模型, 实验共分为 5 组, 正常对照组 (con), 造模组 (IgA), 淫羊藿苷低剂量组 (ICA-L), 淫羊藿苷中剂量组 (ICA-M) 和淫羊藿苷高剂量组 (ICA-H); 各组经相应处理后, 测定各组大鼠尿红细胞、尿蛋白和尿 NAG 水平; 免疫荧光染色检测 IgA 沉淀情况; 免疫组化染色法与实时荧光定量 PCR 分别检测 NF- $\kappa$ Bp65 与 MCP-1 的蛋白表达水平和 IL-4, IL-10 与 IL-13 的 mRNA 表达变化。**结果** 给予淫羊藿苷处理后, 降低实验性 IgA 肾病大鼠的尿红细胞、尿蛋白和尿 NAG 水平与减少 IgA 沉淀, 并降低 NF- $\kappa$ Bp65 与 MCP-1 的蛋白表达水平和 IL-4, IL-10 与 IL-13 的 mRNA 表达。**结论** 淫羊藿苷对实验性 IgA 肾病有一定的疗效, 可能与调控 NF- $\kappa$ Bp65, MCP-1 因子的表达以及机体免疫调节有关。

**【关键词】** 淫羊藿苷; IgA 肾病; NF- $\kappa$ Bp65; MCP-1; IL-4; IL-10; IL-13

**【中图分类号】** 【文献标识码】A **【文章编号】**1671-7856(2017) 01-0073-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.015

## Effects of Icaritin of experimental IgA nephropathy in rats

ZHANG Hong<sup>1</sup>, LIU Nian<sup>2</sup>, LI Zheng<sup>3</sup>

(1. Department of Nephropathy Rheumatology, 2. Department of Orthopaedics, 3. Department of Urology, Nanyang Central Hospital of Zhengzhou University, Nanyang 473400, China)

**【Abstract】Objective** To investigate the effect of Icaritin (ICA) experimental IgA nephropathy in rats and to explore related mechanisms. **Methods** Experimental IgA nephropathy rat model was established and then model rat were treated with or without different doses of ICA. Then, urine RBC, Urine protein and urine NAG were analyzed; IgA precipitation was detected with immunofluorescence staining; the protein level of NF- $\kappa$ Bp65 and MCP-1 were examined by immunohistochemical staining; the mRNA level of IL-4, IL-10 and IL-13 were determined by quantitative PCR. **Results** The concentrations of urine RBC, Urine protein and urine NAG were reduced after ICA treatment, as accompanied by a decrease of IgA precipitation. Moreover, ICA treatment also decreased the protein level of NF- $\kappa$ Bp65 and MCP-1, and the mRNA level of IL-4, IL-10 and IL-13. **Conclusions** ICA exerts a certain degree of efficacy on the treatment of experimental IgA nephropathy through regulating NF- $\kappa$ Bp65 and MCP-1 expression and the immunoregulation mechanism.

**【Key words】** Icaritin; IgA nephropathy; NF- $\kappa$ Bp65; MCP-1; IL-4; IL-10; IL-13

IgA 肾病 (IgA nephropathy, IgAN) 是最常见的原发性肾小球疾病之一, 主要表现为肾小球系膜区 IgA 沉积, 伴随膜细胞增生和系膜基质扩张<sup>[1]</sup>。临

床病状表现多样, 主要有肾病综合征、高血压、急性肾炎与肾功能不全等, 既往认为 IgA 肾病患者的预后良好, 但仍有 25%~30% 的患者最终发展为终末

期肾病<sup>[2]</sup>。IgA 肾病及导致得肾衰竭给患者造成严重的健康困扰及沉重的经济负担。因此,有效地预防及治疗 IgA 肾病是临床迫切需要解决的难题。

淫羊藿苷(Icariin, ICA)是小檗科淫羊藿属淫羊藿茎叶的主要活性成分之一。主要具有免疫调节,抗肿瘤,促进骨细胞发育和心血管系统等药理作用。吴东方等<sup>[3]</sup>研究发现淫羊藿苷通过抑制肾皮脂质过氧化物的产生与减轻谷胱甘肽的消耗,从而降低肾损伤大鼠的血肌酐和尿素氮水平。另外,陈香美等<sup>[4]</sup>研究发现淫羊藿苷能够增加  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶活性,减轻庆大霉素对肾小管与肾间质的损伤。此外,研究表明淫羊藿苷还可增强血凝素,从而诱生 IL-2、IL-3 和 IL-6 的作用,与剂量呈正相关,通过促进 IL-2 的含量提高淋巴因子激活的杀伤细胞、自然杀伤细胞和 B 细胞的功能<sup>[5]</sup>。随着淫羊藿苷的药理作用研究的不断深入,临床上疗效也显示出巨大的优势。我们通过建立 IgA 肾病大鼠模型,探讨不同剂量的淫羊藿苷对 IgA 肾病的作用,并研究其可能的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 50 只,体重 180 ~ 200 g,雌雄各半,购自北京华阜康生物科技股份有限公司, [SCXK(京)2014-0009]。饲养于南阳理工学院中医学实验中心 SPF 级动物房,实验动物使用许可证号[SYXK(豫)2014-0006],相对湿度 45%~75%。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

淫羊藿苷(Icariin)购自西安小草植物科技有限公司,纯度 >98%;牛血清白蛋白购自北京希凯创新科技有限公司;脂多糖购自 Sigma 公司, NF- $\kappa$ Bp65 与 MCP-1 抗体购自博士德生物工程有限公司;IL-4, IL-10, IL-13 引物购自广州迈博生物科技有限公司;其他试剂购自国产分析纯。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物造模与分组

将健康 SD 大鼠进行 1 周的适应性喂养,造模方法按照汤颖等<sup>[6]</sup>实验性 IgA 肾病模型进行,除正常对照组(control group)外,其余各组大鼠用 400 mg/kg 10% 牛血清白蛋白灌胃,每日一次,直至实验结

束,共 21 周;于第 6 周和第 8 周末尾静脉注射 0.05 mg 脂多糖,每只每次;每周末皮下注射蓖麻油 0.5 mL 与四氯化碳 0.1 mL,共给药 9 周;正常对照组在相应时间等体积给予蒸馏水灌胃,生理盐水皮下注射和尾静脉注射。于第 9 周末,心脏取血处死 4 只模型组大鼠,取肾脏组织做免疫荧光检查,其余大鼠随机分为造模组(IgA group),淫羊藿苷低剂量组(ICA-L group),淫羊藿苷中剂量组(ICA-M group)和淫羊藿苷高剂量组(ICA-H group),在第 9 周末开始,淫羊藿苷低剂量组,淫羊藿苷中剂量组和淫羊藿苷高剂量组分别灌胃 60 mg/kg, 90 mg/kg 和 120 mg/kg,每日一次,直至实验结束,共 12 周,试验中并无大鼠死亡。

#### 1.3.2 尿红细胞、尿蛋白和尿 NAG 水平的测定

于 21 周末,将大鼠置于代谢笼中,饮食正常,收集 24 h 尿液,测量尿液中尿红细胞、尿蛋白和尿 NAG 的水平。

#### 1.3.3 免疫荧光染色

处死大鼠后,摘除肾脏,用组织包埋剂 OCT 包埋后,置于 -80℃ 液氮中冷冻,切片,晾干, PBS 洗涤 3 次,滴入加 FITC 标记的 IgA 抗体(1:50),置于 37℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤,滴入甘油封片,置于荧光显微镜观察 IgA 的沉淀情况与绿色荧光的强度。

#### 1.3.4 免疫组化染色

将大鼠肾组织制成石蜡切片,置于 80℃ 烘箱 60 min,分别浸泡于二甲苯 I、II 各 10 min,再置于梯度酒精(100%、95%、85%、75%)浸泡 5 min, PBS 冲洗,置于 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  浸泡 8 min, PBS 冲洗,加入 8% 山羊血清封闭,孵育 10 min,滴入一抗,4℃ 孵育过夜, PBS 冲洗,加入相应带生物素标记的二抗,37℃ 孵育 20 min,加入 DAB 显色剂,自来水冲洗,苏木素复染,1% 盐酸分化,碳酸锂溶液蓝化,梯度酒精脱水(75%、85%、95%、100%),二甲苯 I、II 透明,中性树脂封片,置于光学显微镜下观察。

#### 1.3.5 实时荧光定量 PCR(qPCR)

取各组大鼠肾脏组织,依据 Trizol 说明书要求,提取总 RNA,反转录合成 cDNA,采用 PCR 仪进行扩增,所用引物序列如表 1 所示。扩增条件:94℃ 30 s, 63℃ 30 s, 73℃ 45 s, 共 34 个循环, 74℃ 延伸 5 min。实验结果在荧光定量操作系统中进行分析对比,目标基因的相对定量用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  计算。

**表 1** 引物序列  
**Tab.1** Primer sequence

| 引物名称<br>Primer name | 引物序列<br>Primer sequence  |
|---------------------|--|
| 白细胞介素-4<br>IL-4     | forward primer 5' - GCTAT-TGATGGGTCTCACCC-3'<br>reverse primer 5' - CAGGACGTC AAGGTA-CAGGA-3'  |
| 白细胞介素-10<br>IL-10   | forward primer 5' - AGGGCACCCAGTCTGAGAACA-3'<br>reverse primer 5' - CGGCCTTGCTCTTGTTCAC-3'     |
| 白细胞介素-13<br>IL-13   | forward primer 5' -CTCGCTTGCCCTGGTG-3'<br>reverse primer 5' -TGATGTTGCTCAGCTCCTC-3'            |
| β-肌动蛋白<br>β-actin   | forward primer 5' - GTGGGGCGCCCAAGGACCA -3'<br>reverse primer 5' - CTCCTTAATGTCACGCAGGATTTC-3' |

**表 2** 尿红细胞、尿蛋白和尿 NAG 水平变化( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
**Tab.2** The change of urine erythrocyte, urinary protein and urinary NAG content

| 组别<br>Group             | 尿红细胞(per/ $\mu$ L)<br>Urine erythrocyte | 尿蛋白(mg/L)<br>Urinary protein   | 尿 NAG(U/L)<br>Urinary NAG     |
|-------------------------|---|--------------------------------|-------------------------------|
| 正常对照组<br>Control group  | 7.12 $\pm$ 3.57                         | 8.53 $\pm$ 4.38                | 0.97 $\pm$ 0.47               |
| 造模组<br>IgA group        | 391.86 $\pm$ 13.94 <sup>a</sup>         | 62.18 $\pm$ 11.73 <sup>a</sup> | 6.12 $\pm$ 1.64 <sup>a</sup>  |
| 淫羊藿苷低剂量组<br>ICA-L group | 264.28 $\pm$ 18.57 <sup>ab</sup>        | 48.67 $\pm$ 8.34 <sup>ab</sup> | 4.53 $\pm$ 1.57 <sup>ab</sup> |
| 淫羊藿苷中剂量组<br>ICA-M group | 173.62 $\pm$ 15.82 <sup>ab</sup>        | 32.46 $\pm$ 4.57 <sup>ab</sup> | 2.83 $\pm$ 0.83 <sup>ab</sup> |
| 淫羊藿苷高剂量组<br>ICA-H group | 86.34 $\pm$ 9.34 <sup>ab</sup>          | 18.34 $\pm$ 2.37 <sup>ab</sup> | 1.76 $\pm$ 0.37 <sup>ab</sup> |

注:与正常对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 IgA 组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。  
Note. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs control group. <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs IgA group.

**1.4 统计学方法**

采用 SPSS16.0 软件进行统计分析,实验数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示;组间采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 尿红细胞、尿蛋白和尿 NAG 水平**

与 control 组相比,IgA 组大鼠的尿红细胞、尿蛋白和尿 NAG 水平均显著升高( $P < 0.05$ ),给予淫羊藿苷干预后,随剂量增大尿红细胞、尿蛋白和尿 NAG 水平逐渐下降,如表 2 所示。

**2.2 肾组织 IgA 免疫荧光检测结果**

如图 1 所示,control 组不出现 IgA 沉淀;IgA 组大鼠肾小球系膜区出现弥漫性颗粒状沉淀,强阳性绿色荧光,呈弥漫性团块状;给予淫羊藿苷干预的大鼠肾组织沉淀较少,呈弱绿色荧光,并随剂量升高荧光强度减弱。

**2.3 肾组织的 NF- $\kappa$ Bp65 与 MCP-1 的蛋白表达水平**

如图 2,3 所示,control 组肾组织中 NF- $\kappa$ Bp65 与 MCP-1 蛋白少量表达;与 control 组相比,IgA 组中

NF- $\kappa$ Bp65 与 MCP-1 的蛋白表达显著升高,呈强阳性表达;与 IgA 组相比,给予淫羊藿苷干预后,随剂量增大,NF- $\kappa$ Bp65 与 MCP-1 的蛋白表达逐渐减弱。

**2.4 肾组织中 IL-4, IL-10 与 IL-13 的 mRNA 表达变化**

如图 4 所示,与 control 组相比,IgA 组中 IL-4, IL-10 和 IL-13 的 mRNA 表达显著升高( $P < 0.05$ );与 IgA 组相比,给予淫羊藿苷干预后,随剂量增大,IL-4,IL-10 和 IL-13 的 mRNA 表达逐渐减弱。

**3 讨论**

本试验采用联合牛血清白蛋白 + 脂多糖 + 蓖麻油 + 四氯化碳方法进行造模,通过免疫荧光结果显示造模组大鼠肾小球系膜区出现弥漫性颗粒状沉淀,符合 IgA 肾病的病理变化,提示本试验 IgA 肾病大鼠造模成功。蛋白尿是 IgA 肾病患者最常出现的临床症状,蛋白尿是引起肾小管间质损害的因素之一,使肾小管细胞缺氧导致肾小管上皮细胞萎缩<sup>[7]</sup>。本试验显示淫羊藿苷明显减轻 IgA 肾病大鼠的尿红细胞、尿蛋白和尿 NAG 水平,从而减少对肾小管间质的损害。

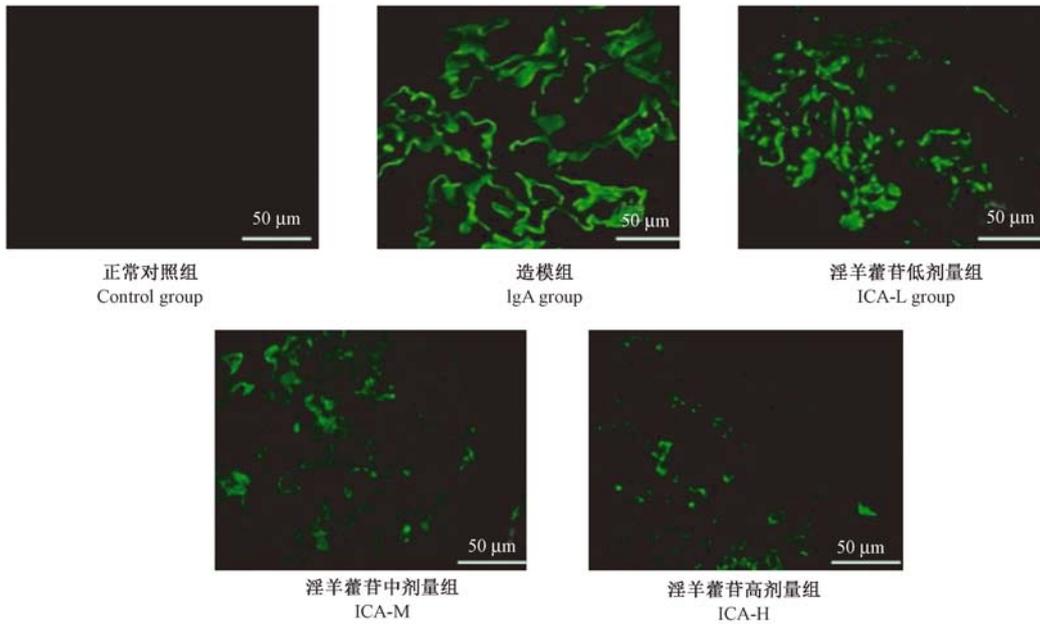


图 1 肾组织 IgA 免疫荧光检测结果

Fig. 1 The immunofluorescence result of IgA

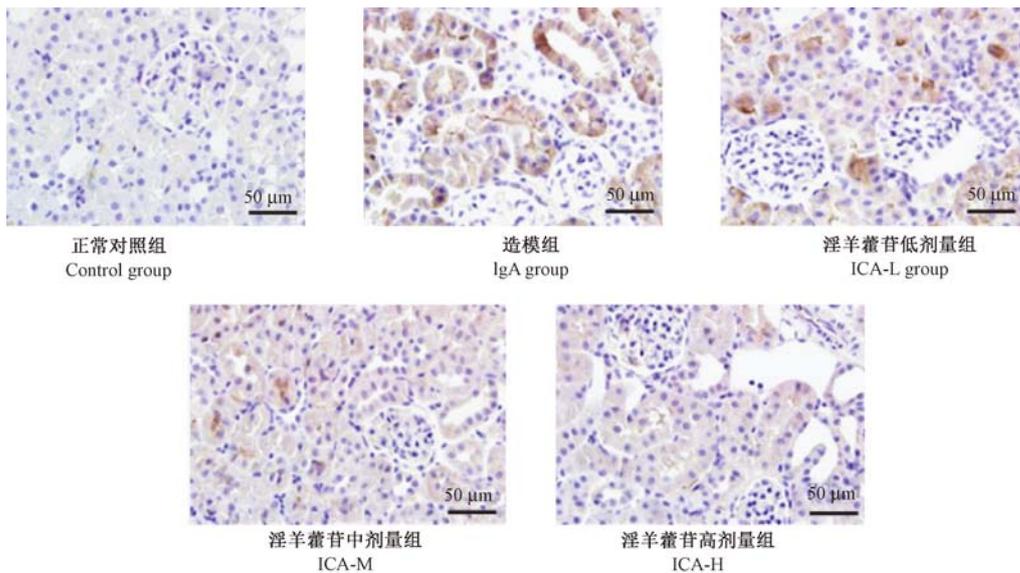


图 2 免疫组化染色检测 NF-κBp65 蛋白的表达变化

Fig. 2 The protein expression of NF-κBp65

核转录因子  $\kappa\text{B}$  是转录因子家族的重要成员, 主要参与免疫反应、淋巴细胞分化、细胞内信号传导, 参与多种调控多种炎症细胞因子和趋化因子的合成<sup>[8]</sup>。NF- $\kappa\text{B}$  参与调控 IL-2、IL-6、IL-8、MCP-1 等参与多种肾脏疾病发生发展过程<sup>[9]</sup>。通常 NF- $\kappa\text{B}$  与多肽 p65 和 p50 蛋白亚基组成二聚体, 但只有 p65 在蛋白 c 末端含有转录激活区域<sup>[10]</sup>。MCP-1 是单核巨噬细胞最重要的趋化和活化因子。研究表明 NF- $\kappa\text{B}$  在肾小球肾炎模型中活性显

著增强, 且 MCP-1 的表达上调, 抑制 NF- $\kappa\text{B}$  后 MCP-1 的表达下调, 提示 MCP-1 的表达与 NF- $\kappa\text{B}$  密切相关<sup>[11,12]</sup>。在 IgA 肾病中蛋白尿可引起 NF- $\kappa\text{B}$  的活化, 从而增强 MCP-1 的表达, 引起单核细胞趋化浸润激活<sup>[13]</sup>。本试验研究发现淫羊藿苷抑制 IgA 肾病中 NF- $\kappa\text{B}$  与 MCP-1 的表达, 并与剂量呈正相关, 提示淫羊藿苷可能通过抑制 NF- $\kappa\text{B}$  与 MCP-1 的表达, 从而抑制单核细胞的趋化浸润, 从而减轻对肾间质的损伤。

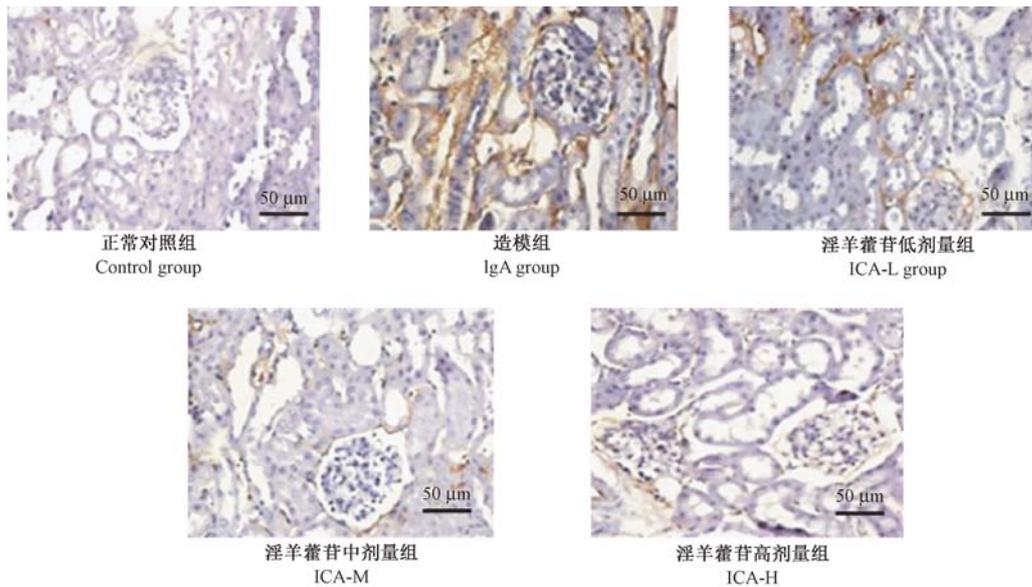
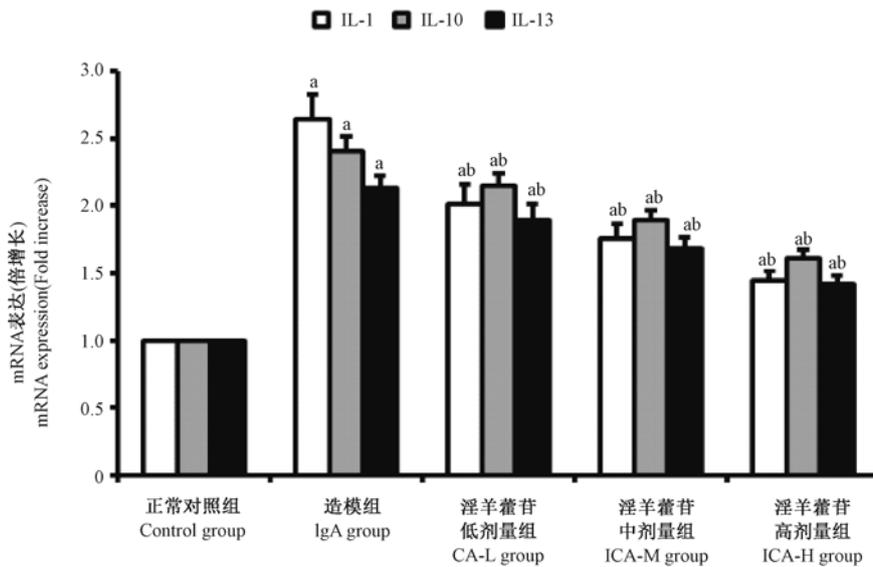


图 3 免疫组化染色检测 MCP-1 蛋白的表达变化

Fig. 3 The protein expression of MCP-1



注:<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs con 组; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs IgA 组。

图 4 淫羊藿苷对 IL-4, IL-10 与 IL-13 mRNA 表达变化的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Note. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs control group. <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs IgA group.

Fig. 4 The effect on the mRNA expression of IL-4, IL-10 and IL-13 by icariin

IL-4, IL-10 与 IL-13 主要是由 Th2 细胞产生,具有普遍抑制炎症细胞因子的作用,促进抗体的生成,介导体液免疫应答。其中 IL-4 与 IL-13 是可直接影响 IgA 源性 B 细胞的增殖和活化,影响抗体的分泌,对肾小管上皮细胞造成一定的损伤。已有研究发现 IL-4 与 IL-13 对肾小管上皮细胞的形态和功能有所影响,进而对肾小管上皮细胞造成损伤<sup>[14]</sup>。徐勇等<sup>[15]</sup>研究发现联合应用 IL-4 与 IL-10 可抑制

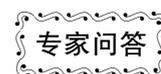
中性白细胞浸润,对肾缺血在灌注损伤的大鼠有肾保护的作用。本研究发现,淫羊藿苷通过抑制 IgA 肾病大鼠肾组织中 IL-4, IL-10 与 IL-13 的表达,从而对肾具有保护作用。

综上所述,淫羊藿苷对 Ig 肾病具有一定的疗效,可能与淫羊藿苷对 NF- $\kappa$ B 与 MCP-1 因子的表达的影响,以及机体免疫调节有关。

## 参考文献:

- [ 1 ] 史伟,王文健,刘双信,等. IgA 肾病[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:1-29.
- [ 2 ] Barratt J, Feehally J. Ig A Nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2005,16(7):2088-2097.
- [ 3 ] 吴东方,马俊玲,周健,等. 淫羊藿提取液对庆大霉素急性肾损伤的影响[J]. 中国医院药学杂志,2002,22(5):270-271.
- [ 4 ] 陈香美,田劲,于力方,等. 淫羊藿、虫草菌丝、黄芪防治庆大霉素所致急性肾损伤的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 1993,9(6):758-760.
- [ 5 ] 赵勇,崔正言,张玲,等. 淫羊藿苷协同诱导 IL-2、IL-3、IL-6 作用的研究[J]. 中国免疫学杂志,1996,12(1):43-45.
- [ 6 ] 汤颖,姜探奇,成彩联,等. 实验性 IgA 肾病模型的改进[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2006,27(2):184-187.
- [ 7 ] Paolo C, Giuseppe R. Pathophysiology of proteinuria and its value as an outcome measure in chronic kidney disease[J]. Br J Clin Pharmacol, 2013,76(4):516-523.
- [ 8 ] Jutz S, Leitner J, Schmetterer K, et al. Assessment of costimulation and coinhibition in a triple parameter T cell reporter line: Simultaneous measurement of NF- $\kappa$ B, NFAT and AP-1 [J]. J Immunol Methods, 2016,430:10-20
- [ 9 ] Sakurai H, Hisada Y, Ueno M, et al. Activation of transcription factor NF- $\kappa$ B in experimental glomerulonephritis in rats [J]. Biochim Biophys Acta, 1996,1316(2):132-138.
- [ 10 ] Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B protein: new discoveries and insights[J]. Annu Rev Immunol, 1996,14:649-683.
- [ 11 ] Silva GE, Costa RS, Ravinal RC, et al. NF- $\kappa$ B expression in IgA nephropathy[J]. Dis Markers,2011,31(1):9-15.

[ 收稿日期 ] 2016-04-06



**问:不同类型的糖尿病动物模型血糖检测在何时进行合适?**

**答:**DM 动物模型分为 1 型糖尿病(T1DM)模型和 2 型糖尿病(T2DM)模型,T1DM 动物模型主要检测空腹血糖,而 T2DM 动物模型除检测空腹血糖外,同时还检测餐后血糖和随机血糖,因此,不同类型的 DM 模型的血糖检测时间和要求也是不同的。

### 1、空腹血糖检测的合适时间

(1) T1DM 动物模型空腹血糖检测的合适时间,一般在早上 8:00~9:00,大动物要求提前禁食不禁水 12 h 以上,啮齿类动物 T1DM 模型提前禁食不禁水要求 10~12 h。

(2) T2DM 动物模型空腹血糖检测的合适时间:大鼠、小鼠等啮齿类动物 T2DM 模型空腹血糖的合适检测时间是在下午 4:00~5:00,大鼠提前禁食不禁水 6~8 h,小鼠提前禁食不禁水 5~6 h。其它动物 T2DM 模型空腹血糖的合适检测时间在早上 8:00~9:00,要求提前禁食不禁水 12 h 以上。

### 2、餐后血糖检测的合适时间

餐后血糖通常是口服葡萄糖耐量试验(OGTT)2 h 血糖,也有研究者采用动物进食后 2 h 或 3 h 血糖。餐后血糖检测的合适时间,一般在早上 8:00~9:00,大动物要求提前禁食不禁水 12 h 以上,啮齿类动物 DM 模型禁食不禁水要求 10~12 h。

### 3、随机血糖检测的合适时间

大鼠、小鼠等啮齿类动物 T2DM 模型的合适检测时间是在上午未加喂饲料前或在加喂饲料后 3 h 至下午加喂饲料前。其它一日三餐定时饲喂的动物,T2DM 模型随机血糖的合适检测时间是在上午饲喂后 3 h 至下午饲喂前。

(感谢浙江中医药大学动物实验研究中心 陈民利 教授的解答)



## 脂肪组织切片制备方法的改进

徐玉环,徐艳峰,刘颖,黄澜,于品,韩云林,李彦红,  
赵文杰,邓巍,秦川,朱华\*

(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 探讨脂肪组织石蜡切片及冰冻切片方法的改进。方法 取脂肪组织迅速固定于10%中性福尔马林中,设置不同的脱水程序制备石蜡切片,HE染色。免疫组化法观察PPAR $\gamma$ 和ITLN1的表达。取脂肪组织迅速固定于甲醛钙或10%中性福尔马林固定液中24h以上,OCT包埋,置于-80℃冰箱至少30min,设置冰冻切片箱体温度-20℃,样品头温度-30℃,切片后HE染色。结果 用改进方法制备的脂肪组织石蜡切片,切面平整,无皱褶,无裂隙,脂肪细胞结构完整,染色清晰,且对免疫组化结果无影响;冰冻切片的改进提高了切片质量,结构完整,形态好,染色清晰。结论 改进的脂肪组织石蜡切片和冰冻切片均可成功应用于不同实验动物,为脂肪组织的研究提供了有力的支撑条件。

**【关键词】** 脂肪组织;石蜡切片;冰冻切片

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0079-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.016

### A modification of adipose tissue preparation

XU Yu-huan, XU Yan-feng, LIU Ying, HUANG Lan, YU Pin, HAN Yun-lin, LI Yan-hong,  
ZHAO Wen-jie, DENG Wei, QIN Chuan, ZHU Hua\*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences. Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging Infectious Diseases, Beijing 100021, China)

**【Abstract】 Objective** To improve the method of paraffin section and frozen section of adipose tissues. **Methods**

The adipose tissues were collected and quickly placed in 10% neutral formaldehyde. Sections were prepared by setting different dehydration procedures. The slices were observed under microscope after Hematoxylin-Eosin staining. The expression of PPAR $\gamma$  and ITLN1 in adipose tissues was detected by immunohistochemistry. For frozen sectioning, the adipose tissues were collected and quickly placed in 10% neutral formaldehyde or Calcium formaldehyde. After embedded by OCT, put in -80℃ refrigerator for at least 30 minutes. Setting the temperature of frozen section cabinet to -20℃ and the temperature of sample to -30℃. **Results** Following the improved methods, the slices of adipose tissues were better than before. The structural integrity and consistency of adipose tissues were preserved well, the staining was distinct, and the improved methods had no effect on immunohistochemistry results. The improvement of the frozen sectioning had greatly

[基金项目]国家自然科学基金面上项目(81371546)。

[作者简介]徐玉环(1980-),女,主管技师。E-mail: yuhuanxu1109@163.com

[通讯作者]朱华(1971-),女,主任技师,研究方向:病理与病理生理学。E-mail: zhuh@cnilas.org

improved the slice quality, the adipose tissues showed complete structure and good morphology. **Conclusions** The improved methods can be successfully applied to different experimental animals, which provide a powerful condition for the study of adipose tissues.

**【Key words】** Adipose tissues; Paraffin sections; Frozen sections

脂肪组织包括白色脂肪组织 (white adipose tissue, WAT) 和棕色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT)。白色脂肪组织和棕色脂肪组织在能量代谢中发挥着截然相反的作用。白色脂肪组织主要通过甘油三酯储存能量, 而棕色脂肪组织则通过产热消耗能量。近年来科学家们越来越重视对脂肪组织的研究。脂肪组织结构特殊, 含有较多的油脂成分, 无论是冰冻切片还是石蜡包埋制片都较其它组织困难。传统的处理方法往往不能制备出完整的切片, 影响对其组织结构的观察, 对后续研究造成困难。为了解决这一问题, 我们不断摸索, 对脂肪组织石蜡切片和冰冻切片进行了改进, 提高了脂肪组织的制片质量。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

清洁级雄性金黄地鼠, 4 只, 4 月龄, 体重 85 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2012 - 0001]。SPF 级雄性 BALB/c 小鼠, 8 周龄, 4 只, 体重 20 ~ 25 g, 来源于军事医学科学院实验动物中心 [SCXK (军) 2012 - 0004]。SPF 级雄性 SD 大鼠, 8 周龄, 4 只, 体重 220 ~ 250 g, 购自中国食品药品检定研究院 [SCXK (京) 2014 - 0013]。普通级雄性日本大耳白家兔, 4 月龄, 2 只, 体重 2.5 ~ 3.0 kg, 购自北京富龙腾飞养殖中心 [SCXK (京) 2013 - 0004]。普通级雄性 Beagle 犬, 6 月龄, 1 只, 体重 6.0 kg, 购自北京日新科技有限公司 [SCXK (京) 2011 - 0007]。普通级雄性恒河猴, 2 岁龄, 1 只, 体重 3.0 kg, 购自北京协尔鑫生物资源研究所有限责任公司 [SCXK (京) 2015 - 0011]。动物在中国医学科学院医学实验动物研究所 [SYXK (京) 2010 - 0030] 饲养及管理。金黄地鼠、BALB/c 小鼠脱颈椎安乐死, 其余动物戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉后股动脉放血安乐死。按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

### 1.2 仪器及试剂

Leica ASP300S 型真空组织脱水机; Leica EG1150H + C 型智能石蜡包埋机, 樱花 IVS410 型推拉式切片机; Leica Stainer XL 型全自动染色机;

Leica CV5030 型全自动封片机; 10% 中性福尔马林固定液、无水乙醇、二甲苯、苏木素及伊红 Y 染色液购自北京益利精细化学品有限公司; Anti-PPAR $\gamma$  antibody, SIGMA-ALDRICH, 货号 SAB4502262; Anti-ITLN1 antibody, ABCAM, 货号 ab118232; 兔超敏二步法免疫组化检测试剂, 中杉金桥, 货号 PV-9001; 正常羊血清工作液, 中杉金桥, 货号 ZLI-9056。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 金黄地鼠脂肪组织石蜡标本的制备

脱颈椎处死金黄地鼠, 取附睾脂肪, 迅速固定于 10% 中性福尔马林固定液中, 固定液体积约为脂肪组织体积的 50 倍, 并用纱布盖住以防止脂肪组织漂浮。经彻底固定后, 常规取材 (取材厚度为 2 ~ 3 mm), 10% 中性福尔马林固定液再固定 12 h 以上。入真空组织脱水机进行脱水、透明、浸蜡。一般而言, 不同种属的实验动物有其不同的脱水条件, 同一种属的实验动物因个别脏器的不同性质, 其脱水条件也要改变。脂肪组织结构特殊, 脂肪细胞内含有较多的脂肪滴, 若按常规程序脱水, 则脱水不完全, 影响后续的制片。因此, 本实验中, 我们将金黄地鼠脂肪组织进行单独处理, 对其脱水条件也进行了改进, 改进前后的脱水条件如表 1 所示。

#### 1.3.2 脂肪组织石蜡切片及 HE 染色

脱水后的脂肪组织, 经智能石蜡包埋机包埋制成蜡块, 推拉式切片机常规切片 (切片厚度 4  $\mu$ m), 恒温石蜡烤箱烤干后入全自动染色机染色, 全自动封片机封片。

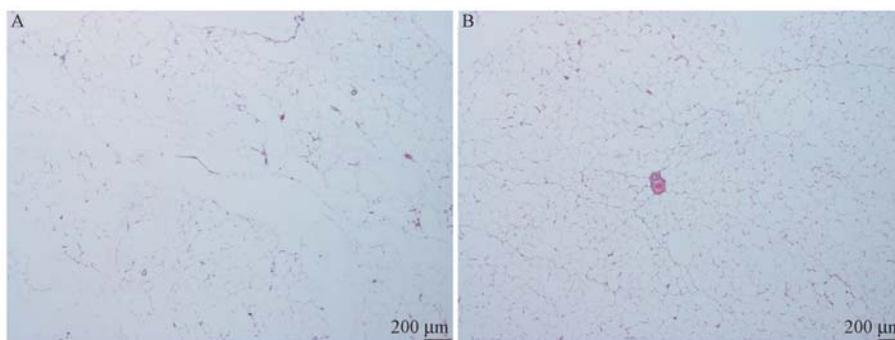
#### 1.3.3 脂肪组织石蜡切片免疫组化染色

脂肪组织免疫组化染色方法参照文献<sup>[1]</sup>, 略有改变: (1) 石蜡切片脱蜡至水; (2) 微波修复; (3) 3% 双氧水封闭 15 min; (4) 正常羊血清工作液封闭 20 min; (5) 滴加用抗体稀释液稀释的一抗 (PPAR $\gamma$  稀释度为 1:50; ITLN1 稀释度为 1:200), 冰箱 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; (6) 滴加二抗试剂 1, 室温孵育 10 min; (7) 滴加二抗试剂 2, 室温孵育 10 min; (8) DAB 显色, 镜下观察显色程度; (9) 苏木素复染, 镜下观察细胞核染色; (10) 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封片。

**表 1** 改进前后脱水程序设定的比较  
**Tab. 1** Comparison of the dehydration process before and after optimization

| 步骤<br>Step | 浸入试剂<br>Reagents           | 时间设置范围 Duration |           |
|------------|----------------------------|-----------------|-----------|
|            |                            | 改进前 Before      | 改进后 After |
| 1          | 4% 甲醛(10% formalin)        | 01:20           | 01:20     |
| 2          | 50% 乙醇(50% alcohol)        | 01:20           | 03:30     |
| 3          | 70% 乙醇(70% alcohol)        | 01:20           | 03:30     |
| 4          | 80% 乙醇(80% alcohol)        | 01:20           | 03:30     |
| 5          | 95% 乙醇 I(95% alcohol I)    | 01:20           | 03:30     |
| 6          | 95% 乙醇 II(95% alcohol II)  | 01:20           | 03:30     |
| 7          | 100% 乙醇 I(100% alcohol I)  | 01:10           | 03:30     |
| 8          | 100% 乙醇 II(100% alcohol I) | 01:10           | 03:30     |
| 9          | 二甲苯 I(xylol I)             | 01:00           | 01:00     |
| 10         | 二甲苯 II(xylol II)           | 01:10           | 01:10     |
| 11         | 蜡 I(paraffin I)            | 01:00           | 01:00     |
| 12         | 蜡 II(paraffin II)          | 01:10           | 01:10     |
| 13         | 蜡 III(paraffin II)         | 01:20           | 01:20     |

注:改进前程序为金黄地鼠其他脏器常规脱水程序;改进后程序为本实验设定的脂肪组织脱水程序。  
Note. The dehydration process of other organs before optimization. The optimized process of this experiment.



注:(A)改进前;(B)改进后。

**图 1** 改进前后金黄地鼠脂肪组织石蜡切片 HE 染色比较 (Bar = 200 μm)

Note. (A) Before optimization. (B) After optimization.

**Fig. 1** Comparison of the hamster adipose tissue paraffin sections before and after optimization by Haematoxylin and Eosin staining

### 1.3.4 脂肪组织冰冻切片的制备

动物安乐死后,取脂肪组织迅速固定于甲醛钙或 10% 中性福尔马林固定液中,且固定液体积约为脂肪组织体积的 50 倍,并用纱布盖住以防止脂肪组织漂浮。经彻底固定且用卫生纸吸水后, OCT 包埋,冻于冰箱 -80℃ 至少 30 min。设置冰冻切片机箱体温度为 -20℃,样品头温度为 -30℃,切片厚度为 10 μm。切片后不需要再固定即可入全自动染色机染色,若需要长期保存需根据实验要求在丙酮或甲醛钙中固定 15 min,再放入冰箱 -20℃ 保存。

## 2 结果

### 2.1 金黄地鼠脂肪组织在脱水程序改进前后 HE 染色比较

脂肪组织因其特殊的结构,按常规程序脱水,包

埋后进行切片,则切片困难且有空洞,展片时蜡片向四周扩散,染色后切片不完整。将脱水程序改进后,脂肪组织能与石蜡很好地融合在一起,切片时手感柔润,且无空洞,展片时蜡片完整,染色后切片完整,结构清晰。(见图 1)

### 2.2 改进后的脱水程序在其他动物脂肪组织石蜡切片中的应用

脂肪组织主要由大量群集的脂肪细胞构成,聚集成团的脂肪细胞由薄层疏松结缔组织分割成小叶。经过酒精及二甲苯的溶解成为空泡状。本研究中,我们将改进后的程序应用于小鼠,大鼠,兔,狗,猴及人脂肪组织中,制成的蜡块能顺利地切出完整的切片,经染色后可见切面平整,层次清晰,无皱褶,无裂隙,脂肪细胞结构完整,染色清晰。(见图 2)

### 2.3 经改进后的脱水程序制备的石蜡切片在免疫组化中的应用

经改进后的脱水程序制备的石蜡切片对免疫组化染色未见明显影响:细胞膜完整,细胞核清晰。免疫组化结果显示:PPAR $\gamma$  和 ITLN1 在正常金黄地

鼠脂肪组织中均有表达。PPAR $\gamma$  呈弱阳性表达,ITLN1 呈阳性表达。(见图 3)

### 2.4 脂肪组织冰冻切片与石蜡切片 HE 染色的比较

脂肪组织几乎不含水,在冰冻切片中难象其它

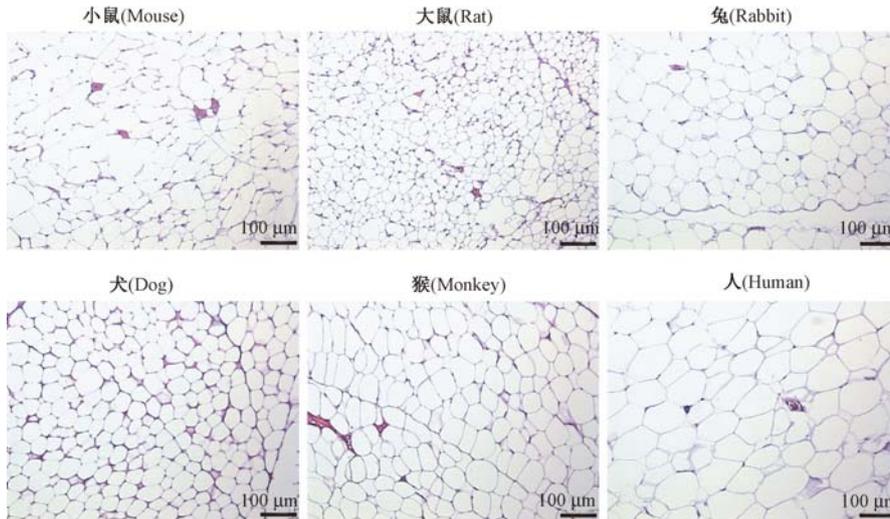


图 2 小鼠,大鼠,兔,犬,猴及人脂肪组织石蜡切片 HE 染色结果 (Bar = 100  $\mu$ m)  
Fig. 2 The results of mouse, rat, rabbit, dog, monkey and human hamster adipose tissue paraffin sections by Haematoxylin and Eosin staining

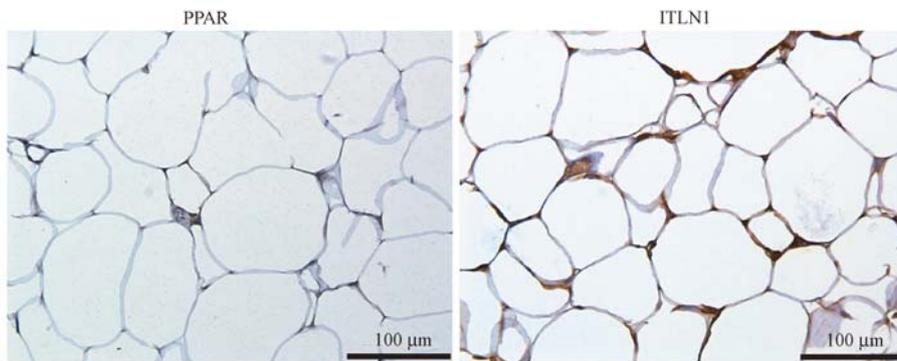
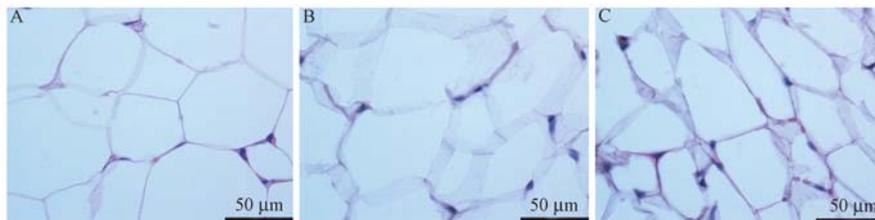


图 3 PPAR $\gamma$  和 ITLN1 在金黄地鼠脂肪组织石蜡切片中的表达 (Bar = 100  $\mu$ m)  
Fig. 3 The expressions of PPAR $\gamma$  and ITLN1 in hamster epididymal fat paraffin sections



注:(A)金黄地鼠脂肪组织蜡切片;(B)金黄地鼠脂肪组织冰冻切片;(C)BALB/c 小鼠脂肪组织冰冻切片。

图 4 脂肪组织冰冻切片与石蜡切片 HE 染色比较 (Bar = 50  $\mu$ m)

Note. (A) Paraffin sections of hamster adipose tissue. (B) Frozen sections of hamster adipose tissue. (C) Frozen sections of BALB/c mice adipose tissue.

Fig. 4 The comparison of frozen section and paraffin section by Haematoxylin and Eosin staining

组织一样被冻硬。经过不断摸索,我们成功制备了脂肪组织的冰冻切片。从图 4B 和图 4C 中可以看到切片结构完整,细胞间质清晰,细胞膜略厚。与冰冻切片相比,石蜡切片(图 4A)染色颜色更鲜艳,脂肪空泡更为圆润。从固定液选择上看,甲醛钙固定液处理的脂肪组织(图 4C)比 10% 中性福尔马林处理的脂肪组织(图 4B)细胞形态更好一些,细胞膜更为清晰。

### 3 讨论

在相当长的一段时间内,脂肪组织被单纯的认为是能量储备和调节的组织器官,直到 1994 年瘦素<sup>[2]</sup>的发现。随着人们对脂肪组织在生命中的作用有了更深入的了解和全面的认识,脂肪生物学<sup>[3]</sup>诞生。日益增加的肥胖症、糖尿病、动脉粥样硬化及其他相关疾病,使脂肪组织备受关注,对其功能的认识也发生了根本的转变。研究表明,脂肪细胞的分化对脂肪细胞的结构和功能变化具有重大影响<sup>[4]</sup>。白色脂肪细胞的结构和功能紊乱可引发肥胖、胰岛素抵抗、炎症,并与多种疾病如糖尿病、肿瘤、心脑血管疾病等的发生、发展有关<sup>[5-6]</sup>。而棕色脂肪组织不仅能御寒而且有助于改善葡萄糖的平衡,增强机体能量的消耗,从而阻止肥胖症、糖尿病等疾病的发生<sup>[7]</sup>。

脂肪组织主要由大量群集的脂肪细胞构成,脂滴占据了整个脂肪细胞的大部分。细胞内脂滴的多少是判定脂肪细胞分化程度的重要指标。脂肪细胞内脂滴的染色方法主要有油红 O 染色和尼罗红荧光染色法<sup>[8]</sup>,这两种方法都需要冰冻切片。脂肪细胞几乎不含水,在冰冻切片中很难象其它组织一样被冻硬。本研究中,我们除了将温度调低,对脂肪组织本身也做了处理,提高了切片质量。因此在制备脂肪组织的冰冻切片时,先用甲醛钙或 10% 中性福尔马林固定液固定脂肪组织。若研究脂滴,切片前需要将脂肪组织在甲醛钙固定液中彻底固定,且先在  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷冻至少 30 min,冰冻切片机体温度调到  $-20^{\circ}\text{C}$ ,样品头温度调到  $-30^{\circ}\text{C}$ ,切片再用冷甲醛钙固定 15 min 后放  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用;若不研究脂滴,仅需要在 10% 中性福尔马林固定液即可,切片再用冷丙酮固定 15 min 后放  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

而观察细胞的基本形态和抗体的表达,可借助于石蜡切片,虽然脂质会脱去,但细胞的基本形态

不变,且能很好的保存抗原。金黄地鼠(Golden Hamster)对食源性的脂肪、胆固醇摄入较为敏感,是一种较好的脂代谢研究模型<sup>[9]</sup>,又由于附睾处脂肪体积大且形态完整,因此本研究中我们选取金黄地鼠的附睾脂肪作为实验的基本条件。脂肪组织中含有较多的油脂成分,按常规脱水程序处理,切出的片子空洞,破碎。本研究通过实验,不断摸索,利用真空组织脱水机成功制备了完整的脂肪组织石蜡切片。

过氧化物酶体增殖子激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ , PPAR $\gamma$ ) 具有脂肪组织特异性,是白色与棕色脂肪细胞的产生和分化所必需的一种专性转录因子<sup>[10]</sup>。肠凝集素 1 (intelectin 1, ITLN1) 是网膜脂肪组织特异性表达的脂肪细胞因子<sup>[11]</sup>。因此本研究中,我们选取 PPAR $\gamma$  和 ITLN1 两个基因在金黄地鼠脂肪组织中的表达来验证我们的脱水条件对免疫组化染色无影响。

制备脂肪组织石蜡切片需要注意以下几点:(1)固定:固定一定要彻底,这是制备任何病理切片都至为关键的一步,脂肪组织含有较多的油脂,有机溶剂不易渗透。固定液体积为脂肪组织体积的 50 倍,且用纱布盖住以防止脂肪组织漂浮于液体表面而固定不全。(2)取材:改进的方法对于取材厚度和组织部位没有特别的要求,无论是白色脂肪还是棕色脂肪只要常规取材 2~3 mm 即可。取材大小也无特殊要求。(3)脱水:脂肪易被酒精、二甲苯溶解,本实验中,我们只调整了梯度酒精的脱水程序,组织在无水乙醇和二甲苯中时间过长,组织硬脆,不易切片。

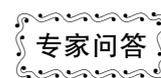
切片制片方法的选择上需要注意的几点:(1)免疫组化,若所检测抗原不稳定,只能做冰冻切片。若所检测抗原稳定,原则上来讲,冰冻、石蜡切片均可,但用石蜡切片检测的染色效果要比冰冻切片好一些。(2)研究目的,石蜡切片对组织细胞的定位准确。冰冻切片可能会因为冰晶的形成而破坏组织细胞的形态结构。(3)标本保存,石蜡切片可长期保存且细胞形态结构保持良好。冰冻切片适合对新鲜组织制片且可以相对避免石蜡自发荧光的干扰。

用改进的方法制备的脂肪组织石蜡切片,结构完整,一致性好,且对免疫组化结果无影响;冰冻切片的改进提高了切片质量,结构完整,形态好,为脂肪组织的研究提供了有力的支撑条件。

## 参考文献:

- [ 1 ] 徐玉环,徐艳峰,刘颖等. 视网膜血管铺片技术的改进[J]. 中国比较医学杂志,2015,25(5):51-53,50.
- [ 2 ] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [J]. Nature, 1994, 372(6505): 425-432.
- [ 3 ] Chaldakov GN, Stankulov IS, Hristova M, et al. Adipobiology of disease: adipokines and adipokine-targeted pharmacology [J]. Curr Pharm Des, 2003, 9(12): 1023-1031
- [ 4 ] Mueller E. Understanding the variegation of fat: novel regulators of adipocyte differentiation and fat tissue biology [J]. BiochimBiophysActa, 2014, 1842(3): 352-357.
- [ 5 ] Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, et al. Adipose tissue: the new endocrine organ [J]. Science, 2009, 54(9): 1847-1856.
- [ 6 ] Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health [J]. Nat Rev Endocrinol, 2014, 10(1): 24-36.
- [ 7 ] Castillo-Quan JI. From white to brown fat through the PGC-1 $\alpha$ -dependent myokineirisin: implications for diabetes and obesity [J]. Dis Model Mech, 2012, 5(3): 293-295.
- [ 8 ] Xing Y, Yan F, Liu Y, et al. Matrine inhibits 3T3-L1 preadipocyte differentiation associated with suppression of ERK1/2 phosphorylation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396(3): 691-695.
- [ 9 ] Wang PR, Giu Q, Ippolito M, et al. High fat fed hamster, a unique animal model for treatment of diabetic dyslipidemia with peroxisome proliferator activated receptor alpha selective agonists [J]. Eur J Pharmacol, 2001, 427(3): 285-293.
- [ 10 ] EL-Jack AK, Hamm JK, Pilch PF, et al. Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  [J]. J Biol Chem, 1999, 274(12): 7946-7951
- [ 11 ] Yang RZ, Lee MJ, Hu H, et al. Identification of omentin as a novel depot specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action [J]. Am J Physiol Endocrinol MeTab, 2006, 290(6): E1253-E1261.

[ 收稿日期 ] 2016-06-17



**问: 检测血糖取血时, 需要注意哪些事项?**

**答: 1、避免噪音**

DM 模型动物很容易受惊, 在取血时要保持安静, 抓取、固定等操作动作要轻柔, 尽量不要产生噪音, 避免噪音引起应激引起血糖升高。

**2、提前作适应性操作**

首次操作易使 DM 模型出现紧张、恐惧, 在取血前 2 d 要进行抓取等模拟操作, 使动物提前适应, 减少取血的操作应激。

**3、禁止眼眶取血**

由于 DM 模型血液较粘, 且大部分动物机体存在炎症或低度炎症, 组织受损后不易愈合或恢复较慢, 大鼠、小鼠等啮齿类动物 DM 模型不宜进行眼眶动静脉取血, 否则会引起眼部血管受损而加速 DM 视网膜病变和白内障的发生。

**4、禁食前的采食时间相对一致化**

大鼠、小鼠等啮齿类动物 DM 模型是属于自由采食, DM 模型动物的采食时间、采食的频率和每次采食的量均不一致, 在采取禁食时, DM 模型采食情况个体差异很大, 最好在采取禁食前 1~2 h 加喂一次饲料, 促使动物采食, 使动物在禁食前的采食时间相对一致化。

**5、禁食时间不宜过长**

T2DM 模型因自身能分泌胰岛素或有高胰岛素血症, 禁食时间过长会引起低血糖反应, 尤其是大鼠、小鼠等啮齿类动物 T2DM 模型。

(感谢浙江中医药大学动物实验研究中心 陈民利 教授的解答)



# 巴斯德杆菌属 CODEHOP PCR 检测方法的 建立与初步应用

邢进<sup>1</sup>, 冯育芳<sup>1</sup>, 岳秉飞<sup>1</sup>, 贺争鸣<sup>1\*</sup>, 孙晓梅<sup>2</sup>, 代解杰<sup>2</sup>

(1. 中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 北京 100050; 2. 中国医学科学院/北京协和医学院医学  
生物研究所树鼩种质资源中心, 昆明 650118)

**【摘要】** 目的 建立巴斯德杆菌的 CODEHOP PCR 快速检测方法, 为实验动物的呼吸道细菌的控制提供参考。方法 应用 CODEHOP 在线简并引物设计工具, 比对 Genbank 中 13 株巴斯德杆菌的 RNA 聚合酶  $\beta$  亚基 (*rpoB*) 氨基酸序列设计简并引物。对建立 CODEHOP PCR 方法用 21 株参考菌株进行特异性和敏感性评价, 并应用于实验动物中的巴斯德杆菌检测。结果 简并引物 PastF6/PastR5 扩增标准菌株的目的片段为 200 bp 左右。能够区分受试的巴斯德杆菌和主要的实验动物呼吸道病原菌。敏感性为 0.2 pg/ $\mu$ L ~ 2 pg/ $\mu$ L。在受试的 609 只实验动物中呼吸道样品中检测出巴斯德杆菌阳性率为 19.1%。样品阳性片段经测序验证, 准确率为 100%。结论 所建立的方法具有良好的特异性和敏感性, 可用于动物样品中巴斯德杆菌的检测。

**【关键词】** 巴斯德杆菌; 共有序列简并杂合寡核苷酸引物; PCR 检测; 实验动物

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0085-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.017

## Establishment and application of CODEHOP PCR assay for detection of *Pasteurella* spp. in laboratory animals

XING Jin<sup>1</sup>, FENG Yu-fang<sup>1</sup>, YUE Bing-fei<sup>1</sup>, HE Zheng-ming<sup>1\*</sup>, SUN Xiao-mei<sup>2</sup>, DAI Jie-jie<sup>2</sup>

(1. National Institute of Food and Drug Control, Institute of Laboratory Animal Resources, Beijing 100050, China;  
2. Center of Tree Shrews Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, CAMS and PUMC, Kunming 650118, China)

**【Abstract】** **Objective** We established a rapid detection method of *Pasteurella* spp. and provided a reference for microbiological quality control of laboratory animal. **Methods** According to the  $\beta$  subunit of bacterial RNA polymerase (*rpoB*) protein multiple alignments of 13 different *Pasteurella* spp. published in NCBI. The degenerate primers were designed by CODEHOP designer online. CODEHOP PCR method was applied to detecting *Pasteurella* spp. after the specificity and sensitivity of the method had been evaluated by 21 reference strains. **Results** Standard strain amplified fragment were about 200 bp by degenerate primers PastF6/PastR5. The primers are able to distinguish between *Pasteurella* spp. and the other pathogenic organisms of laboratory animal respiratory tracts. Sensitivity of this method were 0.2 pg/ $\mu$ L ~ 2 pg/ $\mu$ L to different *Pasteurella*. The *Pasteurella* positive rate was 19.1% in 609 animal's respiratory samples. The accuracy of positive results was 100% through verifying by sequenced and blast. **Conclusions** The established method has good specificity and sensitivity. It can be used to detect *Pasteurella* spp. in animal samples.

**【Key words】** *Pasteurella* spp.; CODEHOP; PCR detection; Laboratory animals

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2014BAI01B01)。

[作者简介] 邢进(1979-), 男, 副研究员。研究方向: 实验动物微生物检测。E-mail: xjvet@nifdc.org.cn

[通讯作者] 贺争鸣(1957-), 男, 研究员。研究方向: 实验动物微生物学。E-mail: zhengminghe57@163.com

巴斯德杆菌属 (*Pasteurella spp.*) 是一群革兰氏阴性, 不抗酸、不运动、无芽孢的短杆菌或球杆菌, 绝大部分存在于动物呼吸道粘膜, 特别是在啮齿类实验动物呼吸道中普遍存在。本属菌株表型特征相近<sup>[1]</sup>, 大部分菌株为条件致病菌, 以嗜肺巴斯德杆菌和多杀巴斯德杆菌较为常见, 为实验动物微生物国家标准中 SPF 级动物需排除的病原菌<sup>[2]</sup>。感染发病时, 以呼吸系统症状为主, 根据具体感染部位的不同可引起各种炎症, 如肺炎、皮炎、眼炎、结膜炎、乳腺炎、关节炎等<sup>[3]</sup>。与仙台病毒、腺病毒、支原体、支气管鲍特杆菌等合并感染, 更会加重感染症状, 对动物实验造成不可忽视的影响<sup>[4-5]</sup>。

与我国标准不同, 欧盟实验动物联合会 (FELASA) 的检测标准中需要检测巴斯德菌科 (*Pasteurellaceae*) 中的所有菌株。在巴斯德菌科中, 除巴斯德杆菌属外, 放线杆菌属 (*Actinobacillus*)、嗜血杆菌属 (*Haemophilus*)、曼海姆菌属 (*Mannheimia*) 等菌属的菌株在实验动物中也比较常见, 其形态和基因组序列相似度高, 不易区分。根据我国的实验动物微生物控制现状, 短期内排除所有巴斯德菌科菌株并不现实, 因此首先从排除影响大、感染率最

高的巴斯德杆菌属着手, 建立有效的菌属检测方法。本研究旨在采用共有序列简并杂合寡核苷酸引物 (consensus degenerate hybrid oligonucleotide primers, CODEHOP) PCR 方法<sup>[6,7]</sup>, 建立针对巴斯德杆菌属的快速检测方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌株

本研究共采用 21 株参考菌株, 依据伯杰氏系统细菌学手册<sup>[8]</sup>和美国标准生物品收藏中心 (ATCC) 的分类, 其中巴斯德菌科菌株 16 株, 5 株巴斯德杆菌 (表 1)。

#### 1.1.2 实验动物呼吸道样本

小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠呼吸道样品取自 2015 年北京市会检, 沙鼠呼吸道样品采自普通环境生长的长爪沙鼠, 由浙江省实验动物中心 [SCXK (浙) 2014-0034] 和首都医科大学 [SCXK (京) 2015-0009] 提供。树鼩呼吸道样品采自昆明滇西亚种野生驯化树鼩咽拭子及气管, 由中国医学科学院医学生物学研究所提供 [SCXK (滇) K2013-0001]。

表 1 参考菌株

Tab. 1 Reference strains in this study

| 参考菌株<br>Reference Strains                               | 菌株编号<br>Number |
|---|----------------|
| 嗜肺巴斯德杆菌 <i>Pasteurella pneumotropica</i> biotype Heyl   | ATCC 12555     |
| 嗜肺巴斯德杆菌 <i>Pasteurella pneumotropica</i> biotype Jawetz | ATCC 35149     |
| 多杀巴斯德杆菌 <i>Pasteurella multocida</i>                    | ATCC 43137     |
| 产气巴斯德杆菌 <i>Pasteurella aerogenes</i>                    | ATCC 27883     |
| 达科马巴斯德杆菌 <i>Pasteurella dagmatis</i>                    | ATCC 43325     |
| 鸡禽杆菌 <i>Avibacterium gallinarum</i>                     | ATCC 13361     |
| 豚放线杆菌 <i>Actinobacillus ureae</i>                       | ATCC 25976     |
| 副鸡禽杆菌 <i>Avibacterium paragallinarum</i>                | ATCC 29545     |
| 鸟禽杆菌 <i>Avibacterium avium</i>                          | ATCC 29546     |
| 溶血曼海姆杆菌 <i>Mannheimia haemolytica</i>                   | ATCC 33369     |
| 溶血嗜血杆菌 <i>Haemophilus haemolyticus</i>                  | ATCC 33390     |
| 流感嗜血杆菌 <i>Haemophilus influenzae</i>                    | ATCC 33391     |
| 副流感嗜血杆菌 <i>Haemophilus parainfluenzae</i>               | ATCC 33392     |
| 杜克雷嗜血杆菌 <i>Haemophilus ducreyi</i>                      | ATCC 33940     |
| 肉芽肿巴曼海姆菌 <i>Mannheimia granulomatis</i>                 | ATCC 49244     |
| 小鼠放线杆菌 <i>Actinobacillus muris</i>                      | ATCC 49577     |
| 支气管鲍特杆菌 <i>Bordetella bronchiseptica</i>                | ATCC 19395     |
| 肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>                   | CMCC 36001     |
| 乙型溶血性链球菌 <i>Streptococcus pyogenes</i>                  | CMCC 32210     |
| 鼠棒状杆菌 <i>Corynebacterium Kutscheri</i>                  | CMCC 65013     |
| 肺炎支原体 <i>Mycoplasma pneumoniae</i>                      | ATCC 15531     |

注: (ATCC) 美国标准物质保藏中心; (CMCC) 中国医学细菌保藏管理中心。

Note. (ATCC) American Type Culture Collection. (CMCC) National Center for Medical Culture Collection.

1.2 主要试剂与仪器

哥伦比亚血琼脂(OXIOD);无菌脱纤维羊血(北京路桥生物技术有限公司);GC 琼脂(BD),肺炎支原体肉汤(北京三药科技开发有限公司);DNA 提取试剂盒(Qiagen);PCR 试剂(TAKARA);,琼脂糖(TAKARA)。

恒温培养箱(美国 Thermo IGS180);冷冻离心机(美国 Thermo X1R);超微量分光光度计(德国 NanoPhotometer);PCR 仪(美国 ABI veriti96);电泳仪(美国伯乐 Powerpac HC);紫外凝胶成像系统(美国 Kodak GL212pro)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种复苏与 DNA 提取

巴斯德杆菌及其他参考菌种接种于哥伦比亚血琼脂平皿,至 36℃ 培养 24 h;嗜血杆菌接种于 GC 培养基,36℃ 微需氧培养 48 h;肺炎支原体接种于肺炎支原体肉汤培养基 36℃ 厌氧培养 5 d;根据试剂盒说明提取各参考菌株的基因组 DNA,冻存与 -20℃ 备用。

1.3.2 引物的设计与合成

将 13 株 Genbank 中获得的巴斯德杆菌 *ropB* 氨基酸序列(表 2)通过 CODEHOP 在线引物设计工具(<http://blocks.fhrc.org/codehop.html>)<sup>[10]</sup>设计简并引物。巴斯德杆菌 *ropB* 氨基酸序列经分析后,被分为了三个保守的区域,从中选择高分、低简并度的引物,最终筛选出上游引物 PastF6: 5'-GGTGAACGCCAGGTGacngargarat-3' 和下游引物 PastR5: 5'-CTGGGTGGACACGTCCatrtartgdat-3' (图 1)。由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

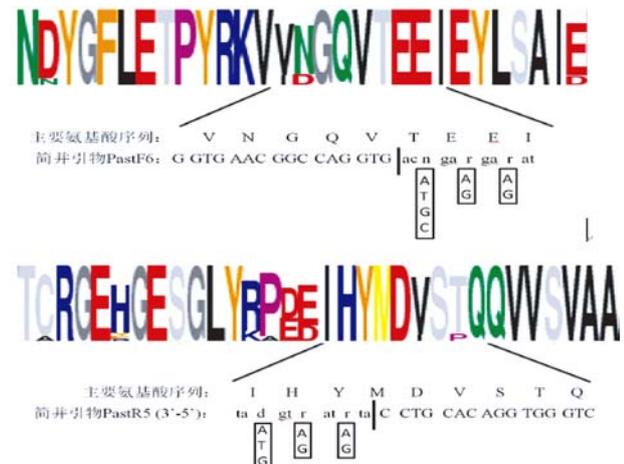


图 1 P-选简并引物 PastF6 和 PastR5

Fig.1 CODEHOP primer pair PastF6 and PastR5

表 2 13 株巴斯德杆菌 *ropB* 氨基酸序列信息

Tab.2 *ropB* amino acid sequence information of 13 *Pasteurella* spp.

| 菌名<br>Strains                               | Genbank 登录号<br>Genbank sequence No. |
|---|-------------------------------------|
| <i>P. pneumotropica</i>                     | AAR19033.1                          |
| <i>P. multocida</i> subsp. <i>gallicida</i> | AAR19034.1                          |
| <i>P. multocida</i> subsp. <i>Septica</i>   | AAQ83545.1                          |
| <i>P. aerogenes</i>                         | AAQ83551.1                          |
| <i>P. bettyae</i>                           | AAQ83553.1                          |
| <i>P. caballi</i>                           | AAQ83547.1                          |
| <i>P. canis</i>                             | AAQ83549.1                          |
| <i>P. dagmatis</i>                          | AAR19030.1                          |
| <i>P. langaaensis</i>                       | AAR19031.1                          |
| <i>P. mairii</i>                            | AAQ19032.1                          |
| <i>P. oralis</i>                            | ADQ26769.1                          |
| <i>P. stomatis</i>                          | AAR19035.1                          |
| <i>P. testudinis</i>                        | AAR19036.1                          |

1.3.3 PCR 体系及条件

PCR 体系为 20 μL: 10 × PCR Buffer(含 Mg<sup>2+</sup>)2 μL, dNTP(10 μM)1.6 μL, 1 U 的 Taq HS DNA 聚合酶(5 U/μL), PastF6/R5(10 μM)各 0.5 μL, 模板 DNA 1 μL, 灭菌水 14.2 μL。反应条件经优化后确定: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 45 s, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min。产物经 1.5% 琼脂糖在 0.5% TBE 中 120 V 电泳 40 min, 并将阳性片段送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.3.4 特异性检测

对 5 株巴斯德杆菌及 16 株它属菌株基因组 DNA 进行扩增, 检测非巴斯德菌有无目的片段产生, 特异性条带进行测序和 Blast 比对验证。

1.3.5 敏感性检测

提取 5 株巴斯德杆菌的 DNA, 核酸浓度均调整至 20 ng/μL, 分别做 10 倍系列稀释至 10<sup>-6</sup>, 共 7 个稀释度(20 ng/μL ~ 20 fg/μL), 对本 PCR 方法进行敏感性检测。

1.3.6 方法应用检测

用 DNA 提取试剂盒提取呼吸道样品的 DNA, 进行 PCR 扩增。部分 PCR 阳性产物进行测序和 Blast 比对, 验证结果的准确性。同时对相同样品进行血琼脂分离培养, 将结果进行比较。树鼩取样操作在中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种属资源中心进行[SYXK(滇)K2013-0001], 其他实验动物操作在中国食品药品检定研究院进行[SYXK(京)2011-0008]。

2 结果

2.1 方法的建立与特异性结果

根据引物的配对组合结果, PastF6/R5 引物对能



注:(1,23)100 bp DNA Marker;(2)嗜肺巴斯德杆菌 ATCC12555;(3)嗜肺巴斯德杆菌 ATCC35149;(4)多杀巴斯德杆菌 ATCC43137;(5)产气巴斯德杆菌 ATCC27883;(6)达科马巴斯德杆菌 ATCC43325;(7)鸡禽杆菌 ATCC13361;(8)豚放线杆菌 ATCC25976;(9)副鸡禽杆菌 ATCC29545;(10)P. avium ATCC29546;(11)溶血曼海姆杆菌 ATCC33369;(12)溶血嗜血杆菌 ATCC33390;(13)流感嗜血杆菌 ATCC33391;(14)副流感嗜血杆菌 ATCC33392;(15)杜克雷嗜血杆菌 ATCC33940;(16)肉芽肿曼海姆菌 ATCC49244;(17)小鼠放线杆菌 ATCC49577;(18)支气管鲍特杆菌 ATCC19395;(19)肺炎链球菌 CMCC36001;(20)乙型溶血性链球菌 CMCC32210;(21)鼠棒状杆菌 CMCC65013;(22)肺炎支原体 ATCC15531。

图 2 P-选引物 PastF6/R5 特异性试验结果

Note. (1,23)100 bp DNA Marker. (2) *P. neotropica* ATCC12555. (3) *P. neotropica* ATCC35149. (4) *P. multocida* ATCC43137. (5) *P. aerogenes* ATCC27883. (6) *P. dagmatis* ATCC43325. (7) *A. gallinarum* ATCC13361. (8) *A. ureae* ATCC25976. (9) *A. paragallinarum* ATCC29545. (10) *P. avium* ATCC29546. (11) *M. haemolytica* ATCC33369. (12) *H. haemolyticus* ATCC33390. (13) *H. influenza* ATCC33391. (14) *H. parainfluenzae* ATCC33392. (15) *H. ducreyi*. (16) *M. granulomatis* ATCC49244. (17) *A. muris* ATCC49577. (18) *B. bronchiseptica* ATCC19395. (19) *S. pneumoniae* CMCC36001. (20) *S. hemolyticus* CMCC32210. *A. faecalis* ATCC8750, *S. pullorum* CMCC50047, *P. mirabilis* DJ150030, *B. cereus* CMCC63301. (21) *C. kutscheri* CMCC65013. (22) *M. pneumoniae* ATCC15531.

Fig. 2 Specific result of primers PastF6/R5 amplified reference strains

表 3 巴斯德杆菌阳性片段测序比对结果  
Tab. 3 Blast results of the positive fragment

| 标准菌株<br>Standard strains                                | 片段长度(bp)<br>Fragment length | 登录号<br>Accession | 相似度(%)<br>Ident |
|---|-----------------------------|------------------|-----------------|
| 嗜肺巴斯德杆菌 Jawetz 型<br><i>P. neotropica</i> biotype Jawetz | 199                         | AB461843.1       | 98              |
| 嗜肺巴斯德杆菌 Heyl 型<br><i>P. neotropica</i> biotype Heyl     | 198                         | GU809196.1       | 99              |
| 多杀巴斯德杆菌<br><i>P. multocida</i>                          | 201                         | CP008918.1       | 97              |
| 产气巴斯德杆菌<br><i>P. aerogenes</i>                          | 199                         | AY314040.1       | 96              |
| 达科马巴斯德杆菌<br><i>P. dagmatis</i>                          | 200                         | AY362966.1       | 96              |
| 鸡禽杆菌<br><i>A. gallinarum</i>                            | 198                         | JN592558.1       | 96              |
| 鸟禽杆菌<br><i>P. avium</i>                                 | 202                         | AY362965.1       | 96              |

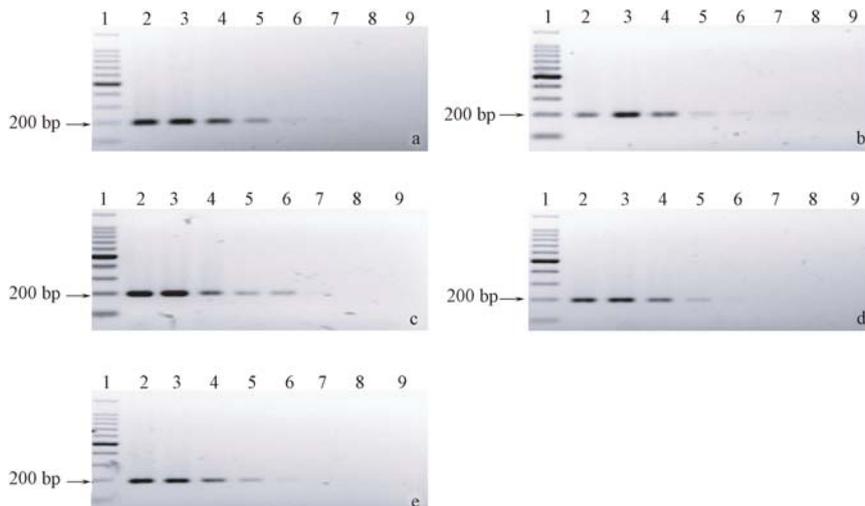
够较特异性的扩增出 5 株巴斯德杆菌标准菌株。而且均扩增出单一的 200 bp 左右目的条带(图 2)。目的片段经测序和 Blast 比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 结果相符(表 3)。

## 2.2 敏感性结果

用引物 PastF6/R5 分别扩增 5 株巴斯德杆菌参考菌株 DNA, 不同菌株的敏感性结果有所不同(图 3)。检测嗜肺巴斯德杆菌和产气巴斯德杆菌的检测限可达 0.2 pg/μL; 多杀巴斯德杆菌和达科马巴斯德杆菌的检测限为 2 pg/μL。

## 2.3 应用检测

用本方法检测 609 只动物呼吸道样品, 共有 116 份产生目的片段, 巴斯德杆菌属阳性率为 19%, 分离培养法鉴定出 77 份存在巴斯德杆菌, 阳性率为 12.6%(表 4)。用统计分析软件 SPSS19.0 对结果进行 McNemar 检验,  $P < 0.001$ , 两种方法差异显著; 一致性检验 Kappa 值 = 0.725, 结果比较一致。对树鼩的 58 份阳性片段(图 4)进行测序和序列比对, 结果中多杀巴斯德杆菌感染率为 32/58, 嗜肺巴斯德杆菌、达科马巴斯德杆菌和产气巴斯德杆菌各为 1/58, 其他未知巴斯德菌科菌株为 23/58。除 25 份样本为未知的巴斯德菌科菌株外, 阳性结果准确率 100%。

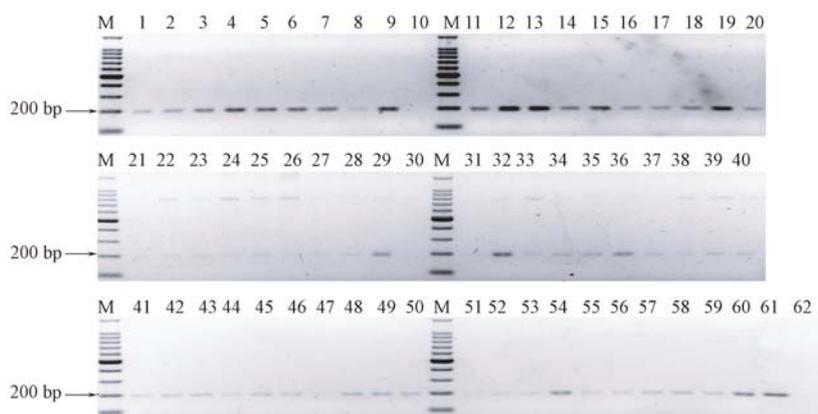


注：(a) 菌株 ATCC12555；(b) 菌株 ATCC27883；(c) 菌株 ATCC25149；(d) 菌株 ATCC43137；  
(e) 菌株 ATCC43325；(1) 100bp DNA Marker；(2~8) 模板浓度分别为 20 ng/μL~20 fg/μL；(9) 空白对照。

图 3 引物 PastF6/R5 敏感性检测结果

Note. (a) Strain ATCC12555. (b) Strain ATCC27883. (c) Strain ATCC25149. (d) Strain ATCC43137. (e) Strain ATCC43325. (1) 100bp DNA Marker. (2~8) Template concentration of 20 ng/μL~20 fg/μL respectively. (9) Blank control.

Fig. 3 Sensibility results of primers PastF6/R5 amplified *Pasteurella* spp.



注：(M) 100bp DNA Marker；(1~60) 树鼩呼吸道样本；(61) 多杀巴斯德杆菌阳性对照；(62) 空白对照。

图 4 树鼩呼吸道样品巴斯德杆菌检测结果

Note. (M) 100bp DNA Marker. (1~60) *Tree shrew* respiratory tract samples. (61) *P. multocida* positive control. (62) Blank control.

Fig. 4 The results of Tree shrews *Pasteurella* test

表 4 CODEHOP PCR 方法检测 6 种实验动物呼吸道样品的结果

Tab. 4 Results of six kinds of animals respiratory samples by CODEHOP PCR detection methods

| 动物种类<br>Species     | 等级<br>Level  |              |                | 总计<br>Total                 |
|---------------------|--------------|--------------|----------------|-----------------------------|
|                     | 普通级<br>CV    | 清洁级<br>CL    | 无特定病原体级<br>SPF |                             |
| 小鼠 Mice             | /            | 9/100(7/100) | 5/150(3/150)   | 14/250(10/250)              |
| 大鼠 Rats             | /            | 2/60(0/60)   | 0/50(0/50)     | 2/110(0/110)                |
| 豚鼠 Guinea pigs      | 0/80(0/80)   | 0/15(0/15)   | 0/10(0/10)     | 0/105(0/105)                |
| 地鼠 Hamster          | /            | 0/20(0/20)   | /              | 0/20(0/20)                  |
| 沙鼠 Mongolian gerbil | 42/64(37/64) | /            | /              | 42/64(37/64)                |
| 树鼩 Tree shrew       | 58/60(30/60) | /            | /              | 58/60(30/60) <sup>[9]</sup> |

注：括号中为分离培养法阳性率。

Note. The content in round brackets is the positive rate of culture method.

### 3 讨论

本研究利用 CODEHOP 方法设计了巴斯德杆菌属的简并引物,在巴斯德菌科内能够排除绝大部分非巴斯德杆菌属菌株。巴斯德杆菌属、放线杆菌属和嗜血杆菌属仅通过 16SrRNA 很难进行区分,根据此前的报道,*rpoB* 蛋白能够识别 16SrRNA 不能区分的巴斯德菌科菌株<sup>[10]</sup>,因此我们将 RNA 聚合酶的  $\beta$  亚基(*rpoB*)作为了目标基因。所建立的 PCR 方法与传统分离培养法相比较,具有更高的敏感性,被检样品的阳性率从 12.6% 提高到 19.1%,不同种类动物的检出率均有提高。通过对目的片段的测序和序列比对,能够快速获取目标菌的种类,相比培养后进行生化鉴定具有更高的效率和可靠性。

虽然本方法能够比较好的区分出巴斯德杆菌属的菌株,但与禽杆菌属菌株仍存在交叉反应,与 Christensen 等<sup>[10]</sup>所报道的结果一致。伯杰氏系统细菌学手册(2004 年第二版)中将狭义的巴斯德杆菌限制为多杀巴斯德杆菌、达科马巴斯德杆菌、犬巴斯德杆菌和口腔巴斯德杆菌。禽类菌株曾经归属于巴斯德杆菌属,但在系统进化上分属于不同的分支<sup>[8]</sup>。在随后的基因型和表型研究进一步证实了禽类菌株的不同,对禽巴斯德杆菌 *P. gallinarum* 和鸡巴斯德杆菌 *P. avium* 等 4 株菌重新进行了分类,均归属于禽杆菌属(*Avibacterium spp.*),并更名为 *A. gallinarum* 和鸟禽杆菌 *A. avium*<sup>[11]</sup>。因此寻找巴斯德杆菌属与禽杆菌菌株的之间的特异性差异片段仍需进一步研究。

#### 参考文献:

[1] 邢进,冯育芳,岳秉飞,等. 北京地区实验动物中嗜肺巴斯德杆菌的表型分析[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(6): 54 -

57.

- [2] GB/T 14922.2 - 2010, 实验动物微生物学等级及监测[S]. 2011.
- [3] Bootz F, Kirschnek S, Nicklas W, et al. Detection of *Pasteurellaceae* in rodents by polymerase chain reaction analysis [J]. Lab Anim Sci, 1998, 48(5): 542 - 546.
- [4] Waggie K, Kagiyama N, Allen AM, et al. Manual of microbiologic monitoring of laboratory animals, Second Edition [M]. 1994, 145 - 150.
- [5] Pintore MD, Corbellini D, Chieppa MN, et al. Canine adenovirus type 1 and *Pasteurella pneumotropica* co-infection in a puppy [J]. Vet Ital, 2016, 52(1): 57 - 62.
- [6] Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, et al. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences [J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(7): 1628 - 1635.
- [7] Rose TM, Henikoff JG, Henikoff S. CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(13): 3763 - 3766.
- [8] Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Volume Two, The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria [M]. 2005.
- [9] 邢进,冯育芳,付瑞等. 野生树鼩可培养细菌和真菌携带情况的调查 [J]. 实验动物科学, 2012, 29(3): 34 - 38.
- [10] Christensen H, Kuhnert P, Olsen JE, et al. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae* [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2004, 54(Pt 5): 1601 - 1609.
- [11] Blackall PJ, Christensen H, Beckenham T, et al. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55(Pt 1): 353 - 362.

[收稿日期] 2016 - 06 - 28



# 人源肿瘤异种移植模型在精准 肿瘤医学中的研究进展

李克娟, 黄 昊, 高 苒\*

(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, 北京 100021)

**【摘要】** 癌症是由于物理、化学、病毒等致癌因子导致的原癌基因和抑癌基因突变从而引发的一系列异质性疾病的统称。尽管近年来高通量测序技术与靶向治疗取得了突破性的进展,但是临床转化研究的高失败率使得抗肿瘤药物的创新发展十分有限。人源肿瘤异种移植模型(patient-derived xenograft model, PDX 模型)是指直接将病人的新鲜肿瘤组织移植到免疫缺陷小鼠上,依靠小鼠提供的环境生长的一种异种移植模型。这种模型保留了原代肿瘤的基质异质性、组织学特性、分子多样性以及微环境,为临床前药效的个性化筛选评估以及生物标志物的鉴定提供了有效的研发资源。PDX 模型结合临床数据,基因组图谱以及药效数据可以增加药物特异性,应用于肿瘤患者个体化治疗,提高临床治疗成功率。本文就 PDX 模型研究进展进行综述,包括其在肿瘤新疗法中的应用、挑战性与局限性、以及在精准肿瘤医学中的应用前景。

**【关键词】** 人源性肿瘤异种移植; PDX 模型; 个性化治疗; 精准医学

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0091-08

doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2017.01.018

## Research progress of patient-derived xenografts in precision cancer medicine

LI Ke-juan, HUANG Hao, GAO Ran\*

(Institute of laboratory animal sciences, CAMS & PUMC, Beijing 100021, China)

**【Abstract】** Cancer is a group of heterogeneous disease caused by diverse genomic alterations in oncogenes and tumor suppressor genes. Despite recent advances in high-throughput sequencing technologies and development of targeted therapies, novel cancer drug development is limited due to the high attrition rate from clinical studies. Patient-derived xenografts (PDX) models are generated by implanting sectioned patient tumor fragments into immunodeficient mice. PDX models retain many of the key characteristics of patients' tumors including histology, genomic signature, cellular heterogeneity, and drug responsiveness. These models cannot only serve as a platform for co-clinical trials by enabling the integration of clinical data, genomic profiles, and drug responsiveness data to determine precisely targeted therapies, but also be applied to the development of biomarkers for drug responsiveness and personalized drug selection. This review summarizes our current knowledge of this field, including methodologic aspects, applications in drug development, challenges and limitations, and utilization for precision cancer medicine.

**【Key words】** Patient-derived xenografts; PDX models; Individual treatment; Precision medicine

[基金项目]北京市优秀人才培养资助项目(2015000020124G073)。

[作者简介]李克娟(1987-),女,博士,研究方向:肿瘤模型建立。E-mail:likejuan@cnilas.org

[通讯作者]高苒(1980-),女,副研究员,研究方向:肿瘤模型建立。E-mail:gaoran26@hotmail.com

癌症是由于多种致癌因素激活原癌基因或(和)灭活肿瘤抑制因子,使细胞发生转化并无限增殖,且与肿瘤基因信号通路相关的一类基因组疾病的统称<sup>[1]</sup>。高通量测序技术的最新进展已经阐明了多种癌症的突变过程并提供了一个全面的癌症基因目录<sup>[2-6]</sup>。此外,癌症基因组分析也表明癌症通常是一种高度异质性的疾病,即使是基因突变水平以及肿瘤组织病理结果一致的同种类型的癌症也存在异质性。这种普遍存在的异质性可以在某种程度上解释为什么同一种癌症类型的患者对某种特定的治疗表现出不同的疗效。随着基因组测序技术以及生物信息与大数据科学的交叉应用,新型医学概念与医疗模式逐渐发展。美国医学界在 2011 年首次提出精准医学的概念,2015 年美国奥巴马又在国情咨文中提出“精准医学计划”,希望精准医学可以引领一个医学新时代。精准医学的本质是通过精确基因组分析,将患者分为小亚群,通过个体或亚群的精确分类来实现个体化精准治疗。

大量的基因组分析已经鉴定出了多种肿瘤相关基因,同时也发现了许多潜在的靶向治疗位点,目前有很多临床药物就是根据这些潜在的靶向位点而设计的,其中包括伊马替尼(imatinib),该药物通过靶向 BCR-ABL1 融合蛋白治疗慢性粒细胞白血病<sup>[7]</sup>;曲妥珠单抗(trastuzumab)是通过靶向 HER2 治疗乳腺癌与胃癌<sup>[8]</sup>;吉非替尼(gefitinib)和厄洛替尼(erlotinib)是通过靶向 EGFR 突变治疗肺癌<sup>[9]</sup>;克唑替尼(crizotinib)则是通过靶向 EML4-ALK 融合蛋白治疗肺癌<sup>[10]</sup>。除了将这些药物转化到临床,靶向治疗的快速发展也促进了人们对根据个体化肿瘤分子分型而制定的个体化治疗方案理念的认同<sup>[11]</sup>。目前基因组分析和靶向治疗的结合已经应用到几乎所有类型的肿瘤治疗。

抗肿瘤药物的创新发展常因为临床试验的高失败率而受到制约。目前抗肿瘤药物的临床试验成功率低于 15%,针对实体瘤的成功率则更低<sup>[12]</sup>。尽管靶向治疗具有巨大的潜力,但是在实际操作过程中有相当多的肿瘤都难以被靶向药物识别。这是因为在一个特定的肿瘤中,基因组的不稳定性导致了多种肿瘤相关的原癌基因或抑癌基因发生改变进而增加了肿瘤细胞表型的复杂性。此外,肿瘤本身就是一个异质细胞的集合体,其中包括肿瘤细胞,成纤维细胞,血管内皮细胞以及免疫细胞,甚至

来自同一患者的肿瘤细胞在基因组和转录组中均可表现出多样化的特征,这些都可以体现肿瘤的异质性。因此,在多数情况下,药物疗效预测并不能通过简单的基因组分析来进行全面的预期评估。

为了克服这些局限性,针对肿瘤的基因组改变,医学研究者们迫切需求更加精准更加全面的分析以及药物疗效预测评估的方法。人源肿瘤移植模型(patient derived xenograft model, PDX 模型)是指将病人的新鲜肿瘤组织移植到免疫缺陷小鼠上,依靠小鼠提供的环境生长的一种异种移植模型。这种模型为临床前药效筛选及评估提供了有效的研发资源。本文就 PDX 模型研究进展以及在精准肿瘤医学中的应用进行综述。

## 1 人源肿瘤移植模型(PDX 模型)

传统的的体内药敏测试方法是将鼠源或人源细胞在体外筛选,经过传代培养,建立稳定细胞株,然后移植到小鼠体内建立肿瘤模型,这种模型的建立在肿瘤研究中的应用已有半个世纪<sup>[13]</sup>,但是这种模型存在一定的缺陷,因为连续传代的肿瘤细胞株适应了外界培养皿的环境,丢失了肿瘤异质性,因此不能客观反应原代肿瘤的情况。PDX 模型是一种直接将病人的新鲜肿瘤细胞或组织通过原位或者是异位(多为皮下或肾包膜)等方式移植到免疫缺陷小鼠上,依靠小鼠提供的环境生长的一种动物模型。其最重要的优势就是可以高度保留患者肿瘤的组织学特性,遗传学特征以及肿瘤特异性,同时也包含了原代肿瘤的微环境,包括细胞外基质,免疫细胞以及肿瘤微环境因子<sup>[14]</sup>。PDX 模型是目前为止最接近临床研究的相关肿瘤模型,这种模拟人肿瘤特异性的模型对肿瘤临床前期评估、治疗和预后具有重要的转化意义,有望为肿瘤患者个体化治疗带来新突破。

PDX 模型的建立方法是将新鲜外科手术肿瘤组织或活检组织通过皮下<sup>[15]</sup>或原位种植到免疫缺陷小鼠身上,也有将肿瘤种植到血供更为丰富的肾包膜下<sup>[16]</sup>。接种到小鼠身上的肿瘤需要被剪切成 2~4 mm 大的碎片然后重新种植到新的小鼠身上进行传代。用于建立 PDX 模型的小鼠根据免疫缺陷程度可以分为 BALB/c Nude, SCID, NOD SCID, NSG 小鼠以及 NOG 小鼠。其中 NSG 小鼠(NOG 小鼠)不但缺乏 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞,而且细胞因子信号传递能力缺失,对人源细胞和组织几乎没有排

斥反应,是目前国际公认的免疫缺陷程度最高、最适合人源细胞或组织移植的工具小鼠。

一般来说,PDX 移植瘤的成瘤时间在 2~4 个月<sup>[15]</sup>,在药物敏感性测试实验中,移植瘤小鼠应在早期世代进行传代扩增。PDX 建模的成功率(以获得可以传代的 PDX 肿瘤为标准)在 23%~75% 之间<sup>[17]</sup>,与肿瘤类型密切相关(表 1)。据报道,结直肠癌(64~89%)与胰腺癌(62%)具有较高的移植率,但是乳腺癌(13%~27%)的成功率则较低<sup>[18,19]</sup>。此外,肿瘤标本的恶性程度以及分化程度对移植的成功率影响也较大,恶性程度高、分化程度低的肿瘤移植成功率较高<sup>[20]</sup>。移植位点也是影响移植瘤生长的一个重要影响因素。皮下移植因其操作简单、容易观察、方便定期测量和适合传代等优点被广泛使用,但成功率相对较低,约为 40%~60%<sup>[21]</sup>。在皮下异种移植模型中,其肿瘤一般局限于皮下成

团生长,很少出现转移扩散和转移瘤。肾包膜下移植因其血供比较丰富,成功率能达到 95% 以上<sup>[22]</sup>。但是肾包膜下移植也有它的局限性,包括肾包膜脆弱操作困难、对受体小鼠的损伤较大、且易导致感染等。与其他两种移植位点相比,原位移植更加贴近肿瘤微环境,尤其是在研究癌症转移方面,原位移植模型最为理想<sup>[25]</sup>。但是由于原位移植对移植者的技术要求较高,建模比较困难,也阻止了其广泛应用。此外,移植成功率还被报道与激素补充剂有关,在乳腺癌中,给雌鼠补充雌二醇颗粒可以将成功率从 2.6% 提高到 21.4%<sup>[26]</sup>,而在前列腺癌中,给 NOD SCID 雄鼠补充睾丸素可将成功率提高至 38.9%<sup>[23]</sup>。因此,肿瘤类型、肿瘤恶性程度、移植方式以及激素补充剂等是影响肿瘤异种移植成功率的重要因素。

表 1 PDX 模型成瘤率总结

Tab. 1 Summary of engraftment rates of PDX tumors

| 肿瘤类型<br>Tumor type   | 小鼠种类<br>Mice strain | 移植位点<br>Implantation site | 成瘤率(%)<br>Engraftment rate | 参考文献<br>References |
|--|---------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------|
|  | Nude                | 皮下                        | 13                         | [27]               |
| 乳腺癌<br>Breast cancer   | NOD SCID            | 乳腺脂肪垫                     | 27                         | [30]               |
|  | SCID Beige, NSG     | 乳腺脂肪垫                     | 19~21                      | [26]               |
|  | NOD SCID            | 人源性乳腺脂肪垫                  | 13                         | [34]               |
| 结直肠癌<br>Colorectal cancer  | NOD SCID            | 皮下                        | 87                         | [36]               |
|  | Nude                | 皮下                        | 64                         | [31]               |
| 头颈部癌(鳞状细胞癌)<br>Head and neck cancer<br>(Squamous cell carcinoma) | Nude                | 原位                        | 89                         | [37]               |
|  | NSG                 | 皮下                        | 85                         | [38]               |
| 髓母细胞瘤<br>Medulloblastoma   | Nude                | 皮下                        | 54                         | [39]               |
|  | Rag2 SCID           | 原位                        | 52                         | [40]               |
| 非小细胞性肺癌<br>Non-small cell lung cancer                            | NOD SCID            | 皮下                        | 25                         | [41]               |
|  | SCID                | 皮下                        | 45                         | [42]               |
|  | NOD SCID            | 肾包膜                       | 90                         | [43]               |
| 胰腺癌<br>(导管腺癌)<br>Pancreatic cancer<br>(Ductal adenocarcinoma)    | Nude                | 皮下                        | 61                         | [44]               |
|  | Nude                | 原位                        | 62                         | [45]               |
| 葡萄膜黑色素瘤<br>Uveal melanoma  | ICR SCID            | 皮下                        | 67                         | [32]               |
|  | NOD SCID            | 肾包膜                       | 90                         | [46]               |
| 胃食管交界癌<br>Gastroesophageal junction carcinoma                    | NOD SCID            | 皮下                        | 28                         | [47]               |
|  | NOD SCID            | 皮下                        | 36.8                       | [48]               |
| 卵巢癌<br>Ovarian cancer  | SCID                | 肾包膜                       | >95                        | [22]               |
| 肝癌<br>Liver cancer   | SCID                | 原位                        | 100                        | [49]               |
| 前列腺癌<br>Prostate cancer  | NOD SCID            | 肾包膜                       | >95                        | [23]               |

大量的研究表明, PDX 模型高度保真并保留了原代肿瘤的组织病理学、遗传学特征以及肿瘤异质性<sup>[27]</sup>。此外,全面的基因表达谱数据分析表明 PDX 肿瘤在很大程度上保留了原代肿瘤中大多数的关键基因与信号通路活性<sup>[28,29]</sup>。在乳腺癌 PDX 模型中也会在临床相关位点发生自发性转移,包括胸腺、肺、骨及腹膜<sup>[30]</sup>。在一些传代实验中,反复种植同一个肿瘤可以相对高度地保留基因组偏差,这在结直肠癌、乳腺癌以及胰腺癌中均有报道<sup>[28,31,32]</sup>。但是也有些报道发现了 PDX 特有的核苷酸突变,这有可能是由肿瘤对新环境的适应性或在原代肿瘤中低于可检测极限的亚克隆过度生长所导致的<sup>[33,34]</sup>。

## 2 PDX 模型应用

PDX 模型已被证实是一个很有意义的在多种肿瘤类型临床前药物测试的研究工具。研究发现结直肠癌、胰腺癌患者与相应的 PDX 模型对西妥昔单抗和吉西他滨均表现出相同的反应性<sup>[31,36,44]</sup>。贝伐单抗在胶质母细胞瘤(GBM)患者与 PDX 模型中均没有改善生存期,且使肿瘤变得更具侵袭性和侵袭性<sup>[49]</sup>。白蛋白结合型紫杉醇和吉西他滨的联合疗法通过 PDX 实验证实对胰腺癌具有效果<sup>[51]</sup>,该疗法随后被报道在一个随机 III 期临床研究中成功地晚期胰腺癌患者提供了生存获益<sup>[52]</sup>。PDX 模型在临床前的靶向药物研究中具有独特的优势,这是因为在评估了 PDX 模型的基因组特性之后,一个具有相同基因组特征的 PDX 模型子集可以被用来评估靶向治疗的效果。例如,pan-RAF 和 SRC 家族激酶双重抑制剂的作用就是先前已知的 BRAF 抑制剂敏感和耐受的黑素瘤 PDX 模型中评估的<sup>[53]</sup>。此外,靶向药物和细胞毒性药物组合治疗,也可以在之前特定的 PDX 模型中得到测试,如 Park 团队<sup>[54]</sup>最近利用胃癌 PDX 模型验证了 BCL2L1 抑制剂和伊立替康联合治疗的功效。

将 PDX 模型更加系统地应用到肿瘤药物研发资源开发上面,需要建立生物库或 PDX 肿瘤生物样本库,尤其是基因组高度特异性的 PDX 库是发展高级诊断和癌症治疗的宝贵资源<sup>[55]</sup>。最近国际上已经有一些研究团队建立了 PDX 资源库,并且现在已经开始尝试建立合作网络化 PDX 生物银行。比如, EurO PDX 就是由 16 个欧洲机构联合组成的 PDX

模型库,旨在发展建立临床相关和标注的 PDX 网络库,据称已经拥有 1500 个 PDX 模型<sup>[35]</sup>;美国国家癌症研究所(NCI)的初期目标是建立 1000 个 PDX 模型,目前数量已经完成约三分之一;美国的杰克逊实验室已经拥有超过 450 个 PDX 模型;以诺华公司为代表的制药公司于 2015 年发布的药物筛选工具便使用了 1000 多个 PDX 模型。这些模型将帮助医学研究者们更好的研究癌症的遗传复杂性。

随着基因组高度明确的 PDX 模型收集以及药物敏感性和耐药性相关的生物标志物逐渐被识别,癌症的精准医疗将变成可能。科学家们已经利用 PDX 模型重现了多种已知的癌症敏感性生物标志物,如野生型 KRAS 的结直肠癌对西妥昔单抗敏感<sup>[31,36]</sup>和野生型 KRAS 的肺癌对厄洛替尼敏感<sup>[56]</sup>。通过分别对药物敏感和药物耐受的大肠癌 PDX 模型进行比较,HER2 的扩增被确定为西妥昔单抗治疗的耐药标志物<sup>[36]</sup>。同时,通过对 PDX 模型反复给予某种特定药物可以建立新型耐药肿瘤模型。与体外肿瘤细胞培养系统相比,这些耐药肿瘤更具有临床相关性,可以用于耐药机制的研究和耐药标志物的鉴定。例如,对 BRAF 阳性的黑色素瘤 PDX 模型使用 BRAF 抑制剂 vemurafenib 的连续给药,可以诱导伴有 BRAF 突变并且对 vemurafenib 耐受的黑色素瘤模型的产生,BRAF 突变蛋白水平升高已经被报道为连续 vemurafenib 药物治疗中的判断耐药性的一个关键因素<sup>[57]</sup>。

PDX 模型的预测能力已被应用到新型抗癌药物开发的联合临床试验中。一般来讲, I、II 期临床试验至少需要 5 年才可以完成,在这些试验中,实时分析、数据整合、及对药物呈现不同反应的人群进行分层十分有限。为了克服这一障碍,小鼠肿瘤模型的药物试验与临床试验共同进行的联合临床试验可以被实施,这样临床前数据和临床数据可以同时得到整合<sup>[58]</sup>。联合临床试验的概念最初是为转基因小鼠模型提出的,现在这一观念也可以应用于基因组明确的 PDX 模型<sup>[35]</sup>。使用 PDX 模型的联合临床试验方法将有利于将患者快速分层、药物组合优化、耐药机制的研究及生物标志物的鉴定<sup>[58]</sup>。

PDX 模型还可以作为“替身”模型用于个体化抗癌药物筛选。“替身”模型是将小鼠作为特定的人类患者的替代品来测试与筛选抗癌药物。在一

项前瞻性研究中,14 名患者的替身小鼠模型被用来研究筛选含 63 种药物的 232 个治疗方案中的有效的治疗方案,然后将针对移植瘤模型的最有效的治疗方案中的 17 个方案对 11 名患者进行了治疗,其中的 15 个治疗方案对患者成功地起到了持久性的部分缓解疗效<sup>[18]</sup>。在另一项研究中,PDX 临床试验 (PCT) 被证实可通过靶向药物在 PDX 模型上的反应评估靶向药物对患者的反应,研究发现 67% 的 BRAF 突变黑色素瘤 PDX 模型对 encorafenib 敏感,这与 II 期临床试验中选择性的 BRAF 抑制剂对患者的反应率是一致的;而对 encorafenib 不敏感的 BRAF 突变黑色素瘤 PDX 模型对 BRAF 抑制剂与 MEK 抑制剂联合治疗显示反应,这也与 I/II 期临床试验中联合治疗 BRAF 突变的黑色素瘤患者的结果相符<sup>[59]</sup>。因此,临床医生可以根据个体化的 PDX 模型对药物的反应,指导并确定最佳治疗方案,并根据疗效反应及时对治疗方案进行优化。

PDX 模型也可以用于研究肿瘤免疫治疗的效果。例如,同时移植了患者来源的胃癌组织以及外周血单核细胞的小鼠对 anti-hcd137 和 anti-hpd1 抗体的联合疗法表现出肿瘤生长抑制<sup>[60]</sup>。然而,目前构建 PDX 模型使用的小鼠皆为免疫缺陷小鼠,仍不能完全模拟人类体内肿瘤及免疫环境,因此具有患者来源的肿瘤及包含所有人类免疫细胞的人源化的 PDX 模型则是适合研究肿瘤免疫最佳的临床前模型。

### 3 PDX 模型研究面临的挑战

虽然 PDX 模型保留了原代肿瘤的组织病理学、基因组结构以及药敏反应,但在肿瘤移植到免疫缺陷小鼠身上的同时,PDX 肿瘤的克隆型分布与患者原始肿瘤相比依然不同。在 PDX 肿瘤中的连续传代过程中,全基因组等位基因变异频率表明克隆选择在初期的移植步骤中比在传代扩增步骤中发生的更加频繁,而具体的克隆选择在同一类型肿瘤不同肿瘤样本中表现不同<sup>[61]</sup>。PDX 模型的克隆动力学可能是由预先存在的克隆而非新生成的克隆选择行为而产生的<sup>[62]</sup>。作为克隆选择的结果,PDX 肿瘤中更具侵略性的肿瘤克隆很可能成为主导,并且在某些情况下,根据基因组和转录组分析结果表明 PDX 模型的确显示了更具转移性和复发性的迹象<sup>[63]</sup>。这些更具侵略性的克隆就很可能成为肿瘤

治疗极为重要的目标。

在使用 PDX 模型进行临床前药物筛选过程中,植入失败以及 PDX 建立花费的时间(约 4~8 个月)也是肿瘤治疗所面临的限制因素。此外,人体基质和免疫细胞在移植肿瘤传代过程中的损耗对后期世代肿瘤微环境和转移的研究是 PDX 模型的一个主要限制。肿瘤相关细胞,如血管内皮细胞、成纤维细胞、炎症细胞及肿瘤细胞之间的的相互作用在肿瘤生物学中起到一个重要的作用。近期研究表明,肿瘤微环境也与药物反应有关<sup>[64]</sup>。此外,免疫调节剂如 anti-PD1 抗体应用到 PDX 模型具有局限性,因为用于建立 PDX 模型的免疫缺陷小鼠缺乏免疫系统的重要组成部分<sup>[35]</sup>。将免疫功能低下小鼠体内移植人类造血干细胞和祖细胞,即建立人源化的小鼠,则有望克服这一障碍。一些研究表明,通过输入人类造血干细胞可以在移植瘤中分化出不同谱系的人源功能性免疫细胞,包括人类的免疫细胞和间质细胞<sup>[65,66]</sup>。

PDX 模型的另一个主要问题是小鼠体内的人源肿瘤淋巴瘤,这种现象已在多种组织来源的 PDX 模型中被报道,其中包括非小细胞肺癌、肝癌、前列腺癌和胃癌<sup>[67-70]</sup>。这些淋巴瘤大多数是表达 CD45 标记的人源淋巴瘤,与 B 细胞淋巴瘤相一致<sup>[67,70]</sup>。患者肿瘤组织的炎症增加了罹患人源性淋巴瘤 PDX 模型的风险,与结直肠癌相比,胃癌 PDX 模型具有更高比例的淋巴瘤,部分可能是由于基线炎症率较高导致的<sup>[70]</sup>。关于淋巴瘤的形成机理有一种说法是,免疫缺陷小鼠体内缺乏免疫监视,EBV 感染使 B 淋巴细胞转换成增殖状态,导致 B 细胞淋巴瘤的产生<sup>[70]</sup>。因此,在 PDX 模型构建过程中需要运用组织病理学及 CD34 等标记物排除淋巴瘤的形成<sup>[70]</sup>。

### 4 结论

癌症治疗的精准医学需要来自基因组分析和药物反应的大数据整合,高通量测序技术的最新进展使患者个人的癌症基因组分析变成可能。PDX 模型保留了原代肿瘤的组织病理、基因组特性、及药物敏感性,并且可以作为患者“替身”来研究药物反应。这些 PDX 模型为多样化的药物开发、生物标记物的发现、临床前的药物测试、联合临床实验以及个体化药物筛选提供了一个较为理想的平台,此

外,结合基因组序列及 PDX 模型药物筛选,可以指导临床用药及提高疗效,为精准癌症医学提供新的机会。最后,结合测序数据以及替身实验的定向突变 PDX 模型将会给优化治疗,提高临床疗效,以及精准癌症医学提供新的机会。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Garraway LA, Verweij J, Ballman KV. Precision oncology: an overview [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(15):1803-1805.
- [ 2 ] Bell D, Berchuck A, Birrer M, *et al.* Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma [J]. *Nature*, 2011, 474(7353):609-615.
- [ 3 ] Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, *et al.* Comprehensive molecular portraits of human breast tumours [J]. *Nature*, 2012, 490:61-70.
- [ 4 ] Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, *et al.* Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer [J]. *Nature*, 2012, 487(7407):330-337.
- [ 5 ] Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1 [J]. *Cancer Cell*, 2010, 17(1):98-110.
- [ 6 ] Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, *et al.* The cancer genome atlas pan-cancer analysis project [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(10):1113-1120.
- [ 7 ] Quintas-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2009, 113(8):1619-1630.
- [ 8 ] Slamon D, Eiermann W, Robert N, *et al.* Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365:1273-1283.
- [ 9 ] Pao W, Miller V, Zakowski M, *et al.* EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(36):13306-13311.
- [ 10 ] Shaw AT, Yeap BY, Solomon BJ, *et al.* Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis [J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(11):1004-1012.
- [ 11 ] Macconnaill LE, Garraway LA. Clinical implications of the cancer genome [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28, 28(35):5219-5228.
- [ 12 ] DiMasi JA, Reichert JM, Feldman L, *et al.* Clinical approval success rates for investigational cancer drugs [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2013, 94(3):329-335.
- [ 13 ] Dulbecco R. Production of Plaques in Monolayer Tissue Cultures by Single Particles of an Animal Virus [J]. *Proc Natl Acad USA*, 1952, 38(8):747-752.
- [ 14 ] Kopetz S, Lemos R, Powis G. The promise of patient-derived xenografts; the best laid plans of mice and men [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(19):5160-5162.
- [ 15 ] Morton CL, Houghton PJ. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(2):247-250.
- [ 16 ] Wang Y, Sudilovsky D, Zhang B, *et al.* A human prostatic prostatic epithelial model of hormonal carcinogenesis [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(16):6064-6072.
- [ 17 ] Siolas D, Hannon, GJ. Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(17):5315-5319.
- [ 18 ] Hidalgo M, Bruckheimer E, Rajeshkumar NV, *et al.* A pilot clinical study of treatment guided by personalized tumorgrafts in patients with advanced cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(8):1311-1316.
- [ 19 ] Williams SA, Anderson WC, Santaguida MT, *et al.* Patient-derived xenografts, the cancer stem cell paradigm, and cancer pathobiology in the 21st century [J]. *Lab Invest*, 2013, 93(3):970-982.
- [ 20 ] van Kempen LC, Ruiter DJ, van Muijen GN, *et al.* The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution [J]. *Eur J Cell Bio*, 2003, 82(11):539-548.
- [ 21 ] Jin K, Teng L, Shen Y, *et al.* Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: asystematic review [J]. *Clin Transl Oncol*, 2010, 12(7):473-480.
- [ 22 ] Lee CH, Xue H, Sutcliffe M, *et al.* Establishment of subrenal capsule xenografts of primary human ovarian tumors in SCID mice: potential models [J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 96(1):48-55.
- [ 23 ] Lin D, Wyatt AW, Xue H, *et al.* High Fidelity Patient-Derived Xenografts for Accelerating Prostate Cancer Discovery and Drug Development [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(4):1272-83.
- [ 24 ] Scott CL, Becker MA, Haluska P, *et al.* Patient-derived xenograft models to improve targeted therapy in epithelial ovarian cancer treatment [J]. *Front Oncol*, 2013, 3:295.
- [ 25 ] Hoffman RM. Patient-derived orthotopic xenografts: better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(8):451-452.
- [ 26 ] Zhang XM, Claerhout S, Prat A, *et al.* A Renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(15):4885-4897.
- [ 27 ] Marangoni E, Vincent-Salomon A, Auger N, *et al.* A new model of patient tumor derived breast cancer xenografts for preclinical assays [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(13):3989-3998.
- [ 28 ] Reyat F, Guyader C, Decraene C, *et al.* Molecular profiling of patient-derived breast cancer xenografts [J]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14(1):R11.
- [ 29 ] Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, *et al.* Patient-derived tumour

- xenografts as models for oncology drug development [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2012, 9(6):338–350.
- [30] DeRose YS, Wang GY, Lin YC, *et al.* Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes [J]. *Nat Med*, 2011, 17(11):1514–1520.
- [31] Julien S, Merino-Trigo A, Lacroix L, *et al.* Characterization of a large panel of patient-derived tumor xenografts representing the clinical heterogeneity of human colorectal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(19):5314–5328.
- [32] Mattie M, Christensen A, Chang MS, *et al.* Molecular characterization of patient-derived human pancreatic tumor xenograft models for preclinical and translational development of cancer therapeutics [J]. *Neoplasia*, 2013, 15(10):1124–1136.
- [33] Ding L, Ellis MJ, Li SQ, *et al.* Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft [J]. *Nature*, 2010, 464(7291):999–1005.
- [34] Li S, Shen D, Shao JY, *et al.* Endocrine-therapy resistant ESRI variants revealed by genomic characterization of breast-cancer-derived xenografts [J]. *Cell Rep*, 2013, 4(1):1116–1130.
- [35] Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, *et al.* Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research [J]. *Cancer Discov*, 2014, 4(9):998–1013.
- [36] Bertotti A, Migliardi G, Galimi F, *et al.* A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts (“xenopatiens”) identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer [J]. *Cancer Discov*, 2011, 1(6):508–523.
- [37] Aytes A, Molleví DG, Martínez-Iniesta M, *et al.* Stromal interaction molecule 2 (STIM2) is frequently overexpressed in colorectal tumors and confers a tumor cell growth suppressor phenotype [J]. *Mol Carcinog*, 2012, 51(9):746–753.
- [38] Kimple RJ, Harari PM, Torres AD, *et al.* Development and characterization of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma tumorgrafts [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(4):855–864.
- [39] Keysar SB, Astling DP, Anderson RT, *et al.* A patient tumor transplant model of squamous cell cancer identifies PI3K inhibitors as candidate therapeutics in defined molecular bins [J]. *Mol Oncol*, 2013, 7(4):776–790.
- [40] Zhao XM, Liu ZG, Yu LT, *et al.* Global gene expression profiling confirms the molecular fidelity of primary tumor-based orthotopic xenograft mouse models of medulloblastoma [J]. *Neuro Oncol*, 2012, 14(5):574–583.
- [41] Fichtner I, Rolff J, Soong R, *et al.* Establishment of patient derived non-small cell lung cancer xenografts as models for the identification of predictive biomarkers [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(20):6456–6468.
- [42] Zhang XC, Zhang J, Li M, *et al.* Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenograft models with genetic aberrations within EGFR, KRAS and FGFR1: useful tools for preclinical studies of targeted therapies [J]. *J Transl Med*, 2013, 11:168.
- [43] Dong X, Guan J, English JC, *et al.* Patient derived first generation xenografts of non-small cell lung cancers: promising tools for predicting drug responses for personalized chemotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(5):1442–1451.
- [44] Garrido-Laguna I, Uson M, Rajeshkumar NV, *et al.* Tumor engraftment in nude mice and enrichment in stroma-related gene pathways predict poor survival and resistance to gemcitabine in patients with pancreatic cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(17):5793–5800.
- [45] Reyes G, Villanueva A, García C, *et al.* Orthotopic xenografts of human pancreatic carcinomas acquire genetic aberrations during dissemination in nude mice [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(24):5713–5719.
- [46] Xue A, Julovi SM, Hugh TJ, *et al.* A patient-derived subrenal capsule xenograft model can predict response to adjuvant therapy for cancers in the head of the pancreas [J]. *Pancreatol*, 2015, 15(4):397–404.
- [47] Némati F, Sastre-Garau X, Laurent C, *et al.* Establishment and characterization of a panel of human uveal melanoma xenografts derived from primary and/or metastatic tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(8):2352–2362.
- [48] Dodbiba L, Teichman J, Fleet A, *et al.* Primary esophageal and gastro-esophageal junction cancer xenograft models: clinicopathological features and engraftment [J]. *Lab Invest*, 2013, 93(4):397–407.
- [49] Huynh H, Ong R, Soo KC. Foretinib demonstrates anti-tumor activity and improves overall survival in preclinical models of hepatocellular carcinoma [J]. *Angiogenesis*, 2012, 15(1):59–70.
- [50] Joo KM, Kim J, Jin J, *et al.* Patient-specific orthotopic glioblastoma xenograft models recapitulate the histopathology and biology of human glioblastomas in situ [J]. *Cell Rep*, 2013, 3(1):260–273.
- [51] Von Hoff DD, Ramanathan RK, Borad MJ, *et al.* Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(34):4548–4554.
- [52] Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, *et al.* Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(18):1691–1703.
- [53] Girotti MR, Lopes F, Preece N, *et al.* Paradox-breaking RAF inhibitors that also target SRC are effective in drug-resistant BRAF mutant melanoma [J]. *Cancer Cell*, 2015, 27(1):85–96.
- [54] Park H, Cho SY, Kim H, *et al.* Genomic alterations in BCL2L1 and DLC1 contribute to drug sensitivity in gastric cancer [J].

- Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(40):12492–12497.
- [55] Dowst H, Pew B, Watkins C, *et al.* Acquire: an open-source comprehensive cancer biobanking system [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(10):1655–1662.
- [56] Fichtner I, Rolff J, Soong R, *et al.* Establishment of patient derived non-small cell lung cancer xenografts as models for the identification of predictive biomarkers [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(20):6456–6468.
- [57] Das Thakur M, Salangsang F, Landman AS, *et al.* Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance [J]. *Nature*, 2013, 494(7436):251–255.
- [58] Nardella C, Lunardi A, Patnaik A, *et al.* The APL paradigm and the "co-clinical trial" project [J]. *Cancer Discov*, 2011, 1(2):108–116.
- [59] Gao H, Korn JM, Ferretti S, *et al.* High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response [J]. *Nat Med*, 2015, 21(11):1318–1325.
- [60] Fernandez de Sanmamed M, Lopez Rodriguez I, Schalper KA, *et al.* Nivolumab and urelumab enhance antitumor activity of human T lymphocytes engrafted in Rag2<sup>-/-</sup> IL2R<sup>γ</sup>null immunodeficient mice [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(17):3466–3478.
- [61] Eirew P, Steif A, Khattra J, Ha G, *et al.* Dynamics of genomic clones in breast cancer patient xenografts at single-cell resolution [J]. *Nature*, 2015, 518(7539):422–426.
- [62] Aparicio S, Hidalgo M, Kung AL. Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(5):311–316.
- [63] Rosfjord E, Lucas J, Li G, *et al.* Advances in patient-derived tumor xenografts: From target identification to predicting clinical response rates in oncology [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 91(2):135–143.
- [64] Ostman A. The tumor microenvironment controls drug sensitivity [J]. *Nat Med*, 2012, 18(9):1332–1334.
- [65] Morton JJ, Bird G, Keysar SB, *et al.* Xact Mice: humanizing mouse bone marrow enables microenvironment reconstitution in a patient-derived xenograft model of head and neck cancer [J]. *Oncogene*, 2016, 35(3):290–300.
- [66] Rongvaux A, Willinger T, Martinek J, *et al.* Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(4):364–372.
- [67] Chen K, Ahmed S, Adeyi O, *et al.* Human solid tumor xenografts in immunodeficient mice are vulnerable to lymphomagenesis associated with Epstein-Barr virus [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6):e39294.
- [68] John T, Yanagawa N, Kohler D, *et al.* Characterization of lymphomas developing in immunodeficient mice implanted with primary human non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(7):1101–1108.
- [69] Wetterauer C, Vlajnic T, Schuler J, *et al.* Early development of human lymphomas in a prostate cancer xenograft program using triple knock-out immunocompromised mice [J]. *Prostate*, 2015, 75(6):585–592.
- [70] Zhang LH, Liu YQ, Wang XH, *et al.* The extent of inflammatory infiltration in primary cancer tissues is associated with lymphomagenesis in immunodeficient mice [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:9447.

[收稿日期]2016-06-29