

开设药理学非成瘾性镇痛药实验教学项目的探索

刘 芬,关凤英*,张大威,吕文伟

(吉林大学基础医学院, 长春 130021)

【摘要】 目的 探索适合课堂教学实验的非成瘾性镇痛药,延续药理学实验课经典镇痛药物药效学观察实验。**方法** 筛选 ICR 小鼠 100 只,随机分成五组:对照组 (Control)、美洛昔康组 (Meloxicam)、阿司匹林组 (Asipirin)、安痛定组 (Antodine)、哌替啶组 (Pethidine);分别采用热板法和扭体法制备小鼠疼痛模型,与对照组及成瘾性镇痛药哌替啶比较,检测各非成瘾性镇痛药的作用效果。**结果** 扭体法显示,与对照组比较,美洛昔康组、阿司匹林组、安痛定组、哌替啶组均有显著镇痛作用 ($P < 0.001$),且阿司匹林组、安痛定组、哌替啶组优于美洛昔康组 ($P < 0.001$),安痛定组优于阿司匹林与哌替啶组 ($P < 0.05$)。热板法显示:与对照组比较,阿司匹林组、安痛定组、哌替啶组具有显著镇痛作用 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),而安痛定组与哌替啶组效果优于阿司匹林组 ($P < 0.01$)。**结论** 综合以上结果表明美洛昔康、阿司匹林与安痛定作为非成瘾性镇痛剂,可以完全替代成瘾性镇痛剂进行教学实验。

【关键词】 药理学;教学实验;镇痛药

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 10-0085-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.10.014

The practice and exploration of non addictive analgesic teaching experiment in pharmacology

LIU Fen, GUAN Fengying*, ZHANG Dawei, LYU Wenwei

(School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China)

【Abstract】 Objective The possibility of using non addictive analgesics in a pharmacological teaching experiment was explored in order to continue the traditional analgesic experiment. **Methods** One hundred ICR mice were randomly divided into five groups: saline control group, meloxicam (5 mg/kg) group, aspirin (0.6 g/kg) group, antodine (1.2 mL/kg) group, and pethidine (5 mg/kg) group. Mouse pain models were established using hot plate and acetic acid torsional method. Each group was administered their respective substances by intraperitoneal injection. The analgesic effects were observed for the non addictive analgesics compared with those in the control group and the addictive analgesic group. **Results** The result showed that the analgesic effects of meloxicam, aspirin, antodine, and pethidine were significantly higher than in the control group, when tested with the acetic acid torsional method ($P < 0.001$); those in the aspirin, antodine, and pethidine groups were superior to that in the meloxicam group ($P < 0.01$); and that in the antodine group was superior to those in the aspirin and pethidine groups ($P < 0.05$). Moreover, when tested with the hot plate method, the analgesic effects of aspirin, antodine, and pethidine were significant compared with that in the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while those in the antodine and pethidine groups were better than for aspirin ($P < 0.01$). **Conclusions** As nonaddictive analgesics, meloxicam, aspirin, and antodine can take the place of addictive analgesics in teaching experiments.

【Keywords】 pharmacology; teaching experiment; analgesic

【基金项目】 吉林大学开放性创新实验项目资助(7060EP06);吉林大学实验技术项目(2017SYJS-B54)。

【作者简介】 刘芬(1966—),女,硕士研究生,研究方向:主要从事机能实验教学与心血管药理研究。E-mail:liufen@jlu.edu.cn

【通信作者】 关凤英(1975—),女,博士研究生,研究方向:心血管临床药理。E-mail:guanfy@jlu.edu.cn

实验项目“镇痛药的药效学观察”为吉林大学药理学有关中枢系统药物的唯一经典验证性实验,是医学“5+3”一体化、五年制及印尼留学生必做实验项目。内容包括镇痛药筛选的两种经典疼痛模型:热板法和扭体法^[1]。小鼠热板法实验是通过热刺激引起躯体体表疼痛,原教学实验用于对比阿片类镇痛药哌替啶(杜冷丁)及芬太尼的镇痛作用特点;小鼠醋酸扭体实验是通过化学刺激引起内脏痛,原教学实验内容为“氯丙嗪加强哌替啶镇痛作用观察”观察中枢抑制药对镇痛剂的协同作用。两个实验子项目使用的镇痛药物哌替啶和芬太尼均为阿片受体激动剂,镇痛效果明显,具有实验效果的直观性及实验学时的紧凑性,两者仅有作用强度及时程的差别,学生普遍反映良好。但最近几年由于镇痛、麻醉药物的严格管制,出现哌替啶和芬太尼购买困难、且库存药物难以维持教学使用的情况,故寻求临床常用的非管制类且适合课堂教学节奏的镇痛剂迫在眉睫。本项目拟摸索新的非管制类镇痛药物,进行实验课内容改良,以适应教学需求。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 ICR 雄性小鼠 25 只,7 周龄,体重 18 ~ 22 g,清洁级 ICR 雌性小鼠 75 只,7 周龄,体重 18 ~ 22 g,均购自吉林大学基础医学院实验动物中心[SCXK(吉)2013-0001][SYXK(吉)2013-0005]。实验动物饲养和处理严格遵循动物福利 3R 原则和吉林大学基础医学院伦理委员会相关条例要求。

1.2 主要试剂与仪器

美洛昔康注射液勃林格殷格翰生产,批号:227355;精氨酸阿司匹林海南美康制药有限公司,批号:140703;盐酸哌替啶注射液青海制药厂股份有限公司生产,批号:20050407;安痛定注射液山东新华制药股份有限公司生产,批号:1305050;冰醋酸北京北化精细化学品责任有限公司生产,批号:20030419;氯化钠注射液辽宁民康制药有限公司生产,批号:A110608。

YLS-6 智能热板仪,山东省医学院设备厂。

1.3 实验方法

1.3.1 分组及给药剂量

两个实验均分成生理盐水对照组(Control,0.1 mL/10 g)、美洛昔康组(Meloxicam,5 mg/kg)、阿司匹林组(Asipirin,0.6 g/kg)、安痛定组(Antodine,2.5 mL/kg)、哌替啶组(Pethidine,5 mg/kg)。给药方式均为腹腔注射。

1.3.2 扭体法

每组小鼠进行随机分组,每组 10 只,雌雄各半。各组注射药物 20 min 后,给予 1% 冰醋酸,复制腹痛的病理模型,观察记录 15 min 内的扭体次数。汇总实验结果,算出各组扭体次数的均值、标准差,进行受试药组与对照组均数的比较,对结果进行统计分析。并按下列公式计算抑制率:抑制率=(给药组平均扭体次数-对照组平均扭体次数)/对照组平均扭体次数×100%。

1.3.3 热板法

将小鼠热板仪调至(55±0.5)℃,测定小鼠正常痛阈值(即痛阈反应时间)。筛选动物:以舔后足为验证方法,将跳跃以及反应时间<5 s 或>30 s 者剔除,同时记录痛阈值。每组取预选合格雌性小鼠 10 只,并分组、给药,给药后分别于第 15、30、45、60 分钟测定各个小鼠的痛阈值。如小鼠在 60 s 内均无疼痛反应,应立即取出,按 60 s 计算,同时记录痛阈值。汇总实验结果,算出各组用药前后各次的小鼠痛疼反应时间的均值、标准差,进行受试药组与对照组均数的比较,对结果进行统计分析。并按下列公式用所测得的痛阈平均值计算痛阈提高百分率:痛阈提高百分率=(用药后平均痛阈值-用药前平均痛阈值)/用药前平均痛阈值×100%,获得各组的痛阈提高百分率后,以时间为横坐标,痛阈提高百分率为纵坐标,绘出镇痛作用时程曲线,以分析药物的作用强度、作用开始时间和持续时间。

1.4 统计学方法

采用 GraphPadPrism5 进行数据统计,实验数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 扭体法实验结果

扭体法实验结果显示:美洛昔康、阿司匹林、安痛定及哌替啶各组的扭体次数均显著低于对照组($P < 0.001$),提示这对炎性致痛各药均有很好的镇痛效果;而阿司匹林、安痛定及哌替啶扭体次数显著低于美洛昔康组($P < 0.001$),说明阿司匹林、安痛定及哌替啶的镇痛效果优于美洛昔康;安痛定组的扭体次数远远低于阿司匹林及哌替啶组($P < 0.05$)提示安痛定组的镇痛效果最优,可以取代哌替啶,见表 1。

2.2 热板法实验结果

热板法实验结果显示:美洛昔康与对照组痛阈值比较差异无显著性,阿司匹林、安痛定及哌替啶各组的痛阈值均显著高于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),可持续 45 min,提示除美洛昔康外,阿司匹林、安痛定及哌替啶针对热板法的疼痛模型均有很好的镇痛效果;与阿司匹林组的痛阈值相比,安痛定及哌替啶组的痛阈值显著延长 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),说明安痛定及哌替啶的镇痛效果相近,优于阿司匹林组。提示热板法实验中安痛定及阿司匹林可取代哌替啶及芬太尼,表现为作用强度的差异,见表 2。

2.3 痛阈时程曲线:

经过计算得出各组小鼠痛阈提高百分率,并绘制时程曲线。从痛阈时程曲线观察得知,针对于热板法疼痛模型,美洛昔康无镇痛作用,阿司匹林、安

痛定及哌替啶各组维持时间相仿,但哌替啶组起效时间优于阿司匹林及安痛定组,镇痛效果哌替啶 > 安痛定 > 阿司匹林。见图 1。

3 讨论

疼痛是机体受到伤害性刺激后产生的一种保护性反应,目前,最常用的镇痛药是非甾体类抗炎药(如复方阿司匹林、布洛芬等)和阿片类镇痛药(如哌替啶、芬太尼、吗啡等),虽然两类药物均有不同程度的镇痛作用,但是作用机制和应用指证以及不良反应却不相同^[2-6]。如非甾体类抗炎药是通过抑制炎性介质前列腺素生物合成关键酶环氧酶(COX)而发挥解热镇痛及抗炎作用,适应于炎症引起的慢性钝痛,作用广泛,但可产生胃肠道不良反应;阿片类镇痛药则通过激动阿片受体阻断痛觉传导,适于严重外伤、尖锐的疼痛及癌症引起的疼痛,

表 1 扭体法实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Experimental results of torsional body method		
组别 Groups	扭体次数(15 min) Times of twistbody	抑制率(%) Inhibition ration
对照组 Control	44.5 ± 7.05	—
美洛昔康组 Meloxicam	25.3 ± 8.09 ***	43.14
阿司匹林组 Asipirin	9.7 ± 3.95 *** ### △	78.2
安痛定组 Antodine	0.9 ± 2.34 *** ###	97.98
哌替啶组 Pethidine	4.87 ± 2.46 *** ### △	89.06

注:与对照组相比,*** $P < 0.001$;与美洛昔康组相比,### $P < 0.001$;与安痛定组相比,△ $P < 0.05$ 。
Note. Compared with control group, *** $P < 0.001$. Compared with meloxicam group, ### $P < 0.001$. Compared with antodine group, △ $P < 0.05$.

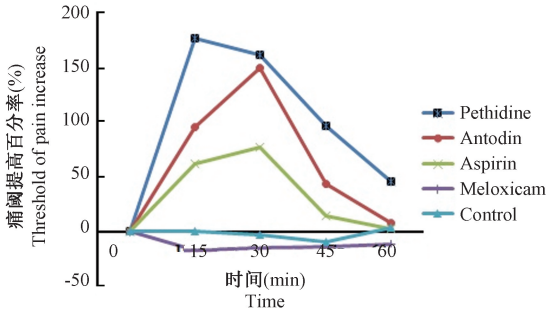


图 1 美洛昔康、阿司匹林、安痛定及哌替啶镇痛治疗后的痛阈时程曲线

Figure 1 Time course curves of pain threshold after analgesia with meloxicam, aspirin, antodine, and pethidine

表 2 热板法实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 2 Experimental results of hot plate method

组别 Groups	痛阈值(s) Threshold of Pain				
	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min
对照组 Control	18.2 ± 5.50	18.2 ± 6.25	17.6 ± 6.39	16.5 ± 6.02	18.7 ± 5.81
美洛昔康组 Meloxicam	19.7 ± 4.47	16.3 ± 5.77	16.8 ± 6.18	16.9 ± 5.37	17.4 ± 4.77
阿司匹林组 Aspirin	20.0 ± 5.74	32.3 ± 9.63 *	35.2 ± 10.27 **	22.8 ± 8.41	20.5 ± 8.33
安痛定组 Antodine	19.2 ± 3.14	37.2 ± 8.89 **	47.5 ± 5.63 ***	27.4 ± 11.16 **	20.6 ± 9.75
哌替啶组 Pethidine	19.0 ± 3.48	52.2 ± 6.76 ***	49.3 ± 9.00 ***	37.1 ± 10.97 ***	27.5 ± 6.61 *

注:与对照组相比,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与阿司匹林组相比,# $P < 0.05$ 。
Note. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with aspirin group, # $P < 0.05$.

镇痛效果好,但阿片类药物则有不同程度的成瘾性,这使得它们在临床上的应用受到了很大的限制。镇痛药的筛选一般通过小鼠热板实验和小鼠醋酸扭体实验两种经典的疼痛模型。小鼠热板实验主要用于筛选中枢性镇痛药,小鼠醋酸扭体实验主要用于筛选外周镇痛药物,这两种经典模型也一直被本科生教学实验所采用。此实验效果稳定,课堂节奏比较适合教学实验,很受学生们的好评。为了该经典实验的可持续性,本研究着手寻求可替代药物。阿司匹林、安痛定(复方氨林巴比妥注射液)是临床和生活中常用的解热镇痛药,阿司匹林以往是口服制剂,不适合实验教学节奏,注射用精氨酸阿司匹林剂型为课堂实验教学提供了保障。安痛定是氨基比林、安替比林和巴比妥组成的复方制剂,对发热时的头痛、神经痛、肌肉痛有较强的镇痛作用。美洛昔康是一种新型非甾体抗炎镇痛药,主要用于类风湿性关节炎的疼痛、创伤性疼痛、手术后疼痛的对症治疗。美洛昔康为 COX2 选择性抑制剂,消化系统等不良反应少,安全性提高,所以广泛应用于临床^[7-9]。研究结果证实:综合热板法和扭体法两种疼痛模型实验,阿司匹林和美洛昔康虽同属于非甾体解热镇痛抗炎药,但是阿司匹林镇痛效果优于美洛昔康,可能因为美洛昔康为 COX2 选择性抑制剂,安全性提高但是效果较温和;在扭体法镇痛实验中,安痛定的镇痛效果与哌替啶类似,高于其他两种非甾体抗炎药物,原因为其复方制剂中含有苯巴比妥,此为中枢镇静剂,能够与氨基比林等镇痛药物合用发挥协同作用,因而可以提高其镇痛效果,其可以替换氯丙嗪加强哌替啶镇痛作用实验;原热板实验采用的哌替啶与芬太尼的药理作用与吗啡基本相同,镇痛作用弱于吗啡,哌替啶效价强度为吗啡的 1/10 ~ 1/7,而芬太尼镇痛效力为吗啡的 100 倍^[10],故二者的实验效果体现为镇痛效果有所差别,阿司匹林与安痛定实质上同为非甾体抗

炎药,本热板实验观察到,二者亦表现出镇痛效果的差别,故可替代哌替啶与芬太尼。综上所述,鉴于哌替啶及芬太尼为管制性药品,今后的学生实验可以选择美洛昔康、精氨酸阿司匹林及安痛定进行药效强弱的对比及二药合用的协同作用观察的替代药物。在扭体法中可选用美洛昔康与阿司匹林、安痛定进行药效强弱的对比;在热板法可以选用阿司匹林及安痛定分别观察药物的作用强度、作用开始时间和持续时间。并同时在两种模型中观察安痛定组中枢抑制药苯巴比妥对镇痛剂的协同加强作用。

参考文献:

- [1] 李才. 人类疾病动物模型的复制[M]. 人民卫生出版社, 2008:418-422.
- [2] 刘学文. 非甾体类抗炎镇痛药的研究进展与应用评价[J]. 齐鲁药事, 2009, 28(10):614-615.
- [3] 王晓辉, 朱浩静, 王恒, 等. 两种非甾体类抗炎药对清醒状态血管源性头痛模型大鼠颅内 Fos 表达的影响[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3):40-43.
- [4] 郎茜, 叶婧. 抗炎镇痛药的研究进展[J]. 健康之路, 2015, 14(12):23.
- [5] 林小茹. 中枢镇痛药的研究进展[C]. 第六届海南省科技论坛“医药科技创新与药品质量安全”专题论坛, 海南省药学会 2012 年学术年会论文集, 371-375.
- [6] 杨银, 孟爱民. 吗啡镇痛个体差异的遗传药理学进展[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(10):108-110.
- [7] 刘洪英, 王梓凌, 宋津晓, 等. 精氨酸阿司匹林辅助治疗急性百草枯中毒 25 例[J]. 医药导报, 2012, 31(11):1441-1442.
- [8] 吴倪, 黄娟, 许邓令等. 复方氨林巴比妥注射液致不良反应的文献分析[J]. 基层医学论坛, 2016, 20(3):393-394.
- [9] 薄存菊, 卢振和. 痛点注射美洛昔康治疗跟痛症的临床观察[J]. 中国实用医药, 2012, 7(18):11-12.
- [10] 杨宝峰. 药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 161-162.

[收稿日期]2018-04-27

实验大鼠和小鼠多种细菌 PCR 检测与分析

冯洁^{1,2}, 谢建云², 魏晓锋², 冯丽萍², 张泉^{1*}, 高诚^{2*}

(1. 扬州大学兽医学院, 扬州 225009; 2. 上海实验动物研究中心, 上海市实验动物质量监督检验站, 上海 201203)

【摘要】 目的 调查上海市实验动物生产设施大鼠、小鼠细菌携带状况。**方法** 比较国内外实验动物细菌监测方案, 选取螺杆菌、啮齿柠檬酸杆菌、牛棒状杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和肺炎克雷伯杆菌作为检测项目, 分别于2014年和2016年收集样品共计848份, 采用PCR方法对上述6种病原体进行检测。**结果** SPF级设施均无金黄色葡萄球菌污染, 清洁级设施2014年无肺炎克雷伯杆菌污染, 其它病原体在不同级别设施内均有不同程度的污染, 所有清洁级设施均存在螺杆菌和牛棒状杆菌污染。螺杆菌、啮齿柠檬酸杆菌和牛棒状杆菌在不同级别动物上均检出阳性。螺杆菌、绿脓杆菌阳性率呈下降趋势, 而啮齿柠檬酸杆菌、牛棒状杆菌、肺炎克雷伯杆菌阳性率则呈上升趋势。**结论** 本研究全面、系统地分析了上海地区实验大鼠、小鼠细菌携带状况, 为提高实验动物质量和饲养管理水平起促进作用, 为我国实验动物国家标准的修订和完善提供依据和参考。

【关键词】 大鼠; 小鼠; 细菌; PCR

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 10-0089-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.10.015

Investigation of various bacteria in laboratory rats and mice by PCR assay

FENG Jie^{1,2}, XIE Jianyun², WEI Xiaofeng², FENG Liping², ZHANG Quan^{1*}, GAO Cheng^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai Quality Monitoring Center of Laboratory Animals, Shanghai 201203)

【Abstract】 Objective To investigate bacterial infection in laboratory rats and mice from production facilities in Shanghai. **Methods** Programs for monitoring bacteria in laboratory animals were compared between China and elsewhere. A total of 848 samples were collected from the laboratory animal production facilities of Shanghai from 2014 to 2016. *Helicobacter* spp., *C. rodentium*, *C. bovis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *K. pneumoniae* were tested by PCR for the monitoring project. **Results** *S. aureus* contamination was not identified in SPF facilities in 2014 and 2016. *K. pneumoniae* contamination was not identified in clean level facilities in 2014. There were different degrees of contamination by other pathogens in facilities of different levels. *Helicobacter* spp. and *C. bovis* could be detected in all clean level facilities. *Helicobacter* spp., *C. rodentium*, and *C. bovis* were detected in animals at all levels. The rates of positivity for *Helicobacter* spp. and *P. aeruginosa* declined over time, but those of *C. rodentium*, *C. bovis*, and *K. pneumoniae* rose. **Conclusions** This study investigated the prevalence of bacteria in rats and mice in Shanghai from 2014 to 2016. This work should promote the quality of laboratory animals and the levels of feeding and management, and also provide an important reference for the optimization of standards for laboratory animals.

【Keywords】 rat; mouse; bacterium; PCR

[基金项目] 上海市科技创新行动计划(17140900600)。

[作者简介] 冯洁(1981—), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 实验动物质量控制, E-mail: moyifj@163.com

[通信作者] 张泉(1979—), 男, 教授, 研究方向: E-mail: zquan@yzu.edu.cn。高诚(1961—), 男, 研究员, E-mail: gaocheng@slarc.org.cn。

* 共同通信作者

实验动物微生物学质量是评价实验动物质量的重要指标之一,定期对实验动物进行微生物质量监测是确保动物质量的重要手段。欧洲实验动物联合会(FELASA)定期发布和更新详细全面的实验动物健康监控指南和人员培训计划,详细阐述了监测病原体的种类、采样要求和检测方法等^[1]。国际知名的实验动物企业(如 CRL、Taconic)均制定一系列企业标准和检测制度,对于病原体项目、动物年龄、检测方法和频率均有明确指示。我国于 1994 年颁布了国家标准《实验动物微生物学等级及监测标准》并陆续进行了修改和完善,按照微生物学和寄生虫学规定了不同等级实验动物应排除的病原体及对应的检测方法。2017 年以来中国实验动物学会制定并发布两批团体标准,新增了部分病原体项目及检测方法,对于我国实验动物质量保证和提升起到了促进作用。本研究在详细比较国内外实验动物细菌监测方案并结合实际的基础

表 1 不同年份实验动物生产设施、动物数量统计表

Table 1 Numbers of laboratory animals and production facilities tested in different years							
年份 Year	检测设施数量/个 Number of facilities		大鼠/只 Rats		小鼠/只 Mice		动物总数/只 Total number
	屏障环境(清洁级) Barrier system (CL)	屏障环境(SPF 级) Barrier system (SPF)	清洁级 CL	无特定病原体动物 SPF	清洁级 CL	无特定病原体动物 SPF	
2014	4	9	30	78	64	191	363
2016	4	13	18	60	91	316	485
累计 Total	/	/	48	138	155	507	848

表 2 动物品系分布表

Table 2 Animal strain distribution		
品系 Strain	样本总数 Total number	
	2014 年	2016 年
SD	58	57
Wistar	44	17
ZDF	6	4
C57	40	73
BALB/c	44	63
ICR	46	54
Scid	18	36
KM	46	66
Nude	30	75
GEM	31	6
db/db db/db	/	6
ob/ob	/	6
F1	/	22
合计	363	485

上,选取国外普遍要求检测而我国国标暂未纳入(螺杆菌、啮齿柠檬酸杆菌、牛棒状杆菌)以及国标规定检测(金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和肺炎克雷伯杆菌)的细菌指标作为调查项目,采用 PCR 方法对 2014 年和 2016 年上海市实验动物生产许可证单位实验大鼠、小鼠的部分细菌携带状况进行调查。调查结果可为上海乃至全国实验动物微生物质量控制提供参考,也可为国家标准的修订和完善提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本次调查的实验动物包括小鼠和大鼠,来源于 2014 年和 2016 年上海市具有实验大鼠、小鼠生产许可证的单位。清洁级和 SPF 级动物均饲养于屏障环境。各年度检测设施数量、动物数量及品系分布详见表 1 和表 2。

1.2 主要试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,Taq DNA 聚合酶、2 × Taq Plus Master Mix (Dye Plus)、DL2000 plus DNA Marker 购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品处理

无菌采集动物回盲部内容物,取 0.2 g 悬浮于 1 mL 的 PBS(pH7.4),850 r/min 离心 5 min 后取上清液,按照细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书进行 DNA 模板抽提。获得的 DNA 样品于 -20℃ 保存备用。

1.3.2 PCR 引物序列

参考文献^[2-5],根据 GenBank 登录的牛棒状杆菌 16S rRNA 序列(NR_118465.1),利用 Primer 5.0 设计 1 对特异性引物。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物信息见表 3。

表 3 PCR 引物列表
Table 3 Sequences of PCR primers

细菌名称 Bacteria	引物序列 Primer name	退火温度(°C) Annealing temperature	产物长度(bp) Fragment length
螺杆菌 <i>Helicobacter. spp</i>	P7: CTATGACGGGTATCCGGC P8: ATTCCACCTACCTCTCCCA	53	374
啮齿柠檬酸杆菌 <i>C. rodentium</i>	CR1: TGCTGGTGCTATCTCATCTGTC CR2: GCAAGGCTGCTAACACAACAA	61	420
牛棒状杆菌 <i>C. bovis</i>	CB1: GTGGCGAACGGGTGAGTAA CB2: ACACACTAAAGCACGGTCTAT	61	100
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	SA1: CTTTAGCCAAGCCTTGACGAAC SA2: AAAGGGCAATACGCAAAAGAGGT	56	484
绿脓杆菌 <i>P. aeruginosa</i>	PA1: GCACCCGCAACGCATCAA PA2: CCTGGAAGGCTCCGAATAGTG	56	278
肺炎克雷伯杆菌 <i>K. pneumoniae</i>	KP1: TGGCCCCGCCCGAGGGTTCGAAA KP2: GATGTCGTCATCGTTGATGCCAG	56	368

1. 3. 3 PCR 反应程序

PCR 反应体系 50 μL,包括 2 × Taq Plus Master Mix(Dye Plus)25 μL,上下游引物(10 μM)各 1 μL, DNA 模板 2 μL。

PCR 反应程序:95℃ 预变性 5 min 后,按 95℃ 变性 30 s,退火 30 s,72℃ 延伸 30 s 的程序循环 34 次,最后 72℃ 延伸 10 min。

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测分析。将不同来源的阳性 PCR 产物进行归类,随机挑选阳性产物经凝胶电泳纯化回收后送至至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序结果与 GenBank 中已知核酸序列进行 BLAST 比对、验证。

2 结果

2.1 设施分析

如图 1 所示,在 SPF 级设施未检出金黄色葡萄球菌污染,清洁级设施 2014 年未检出肺炎克雷伯杆菌污染,其它病原体在不同级别设施内均有不同程度的污染。所有清洁级设施均存在螺杆菌和牛棒状杆菌污染,SPF 级设施的螺杆菌和牛棒状杆菌污染率分别为 77.78% (2014 年)、61.54% (2016 年)和 66.67% (2014 年)、92.31% (2016 年)。

2.2 病原检测结果分析

如图 2 所示,大鼠螺杆菌阳性率为 34.26% (2014 年)和 25.64% (2016 年),啮齿柠檬酸杆菌阳性率为 4.63% (2014 年)和 17.95% (2016 年),牛棒状杆菌阳性率为 23.15% (2014 年)和 33.33% (2016 年),金黄色葡萄球菌阳性率为 5.56% (2014

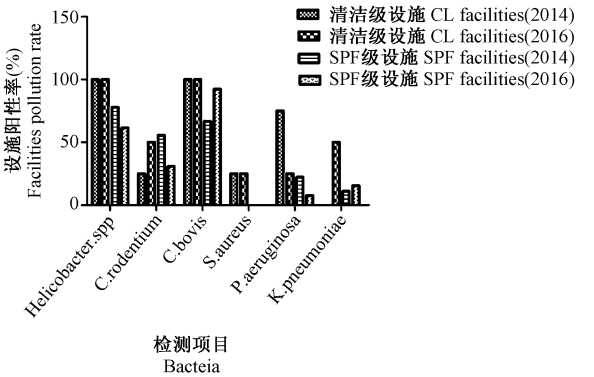


图 1 不同细菌检测项目的设施污染率比较

Figure 1 Comparison of rates of contamination of facilities with different bacteria

年)和 7.69% (2016 年),绿脓杆菌和肺炎克雷伯杆菌均未检出阳性。小鼠螺杆菌阳性率为 40.39% (2014 年)和 29.73% (2016 年),啮齿柠檬酸杆菌阳性率为 5.88% (2014 年)和 15.48% (2016 年),牛棒状杆菌阳性率为 19.22% (2014 年)和 38.33% (2016 年),金黄色葡萄球菌阳性率为 1.57% (2014 年)和 0% (2016 年),绿脓杆菌阳性率为 9.80% (2014 年)和 0.74% (2016 年),肺炎克雷伯杆菌阳性率(2014 年 0.78%,2016 年 3.69%)。

分别对不同级别动物不同年份的阳性率进行分析。如表 4 所示,螺杆菌仅清洁级大鼠阳性率呈上升趋势,其他级别均下降。啮齿柠檬酸杆菌和牛棒状杆菌在不同级别动物上的阳性率均呈上升趋势。国标要求排除的 3 种细菌,金黄色葡萄球菌仅清洁级有阳性检出,SPF 级均为阴性,符合国标要求。大鼠绿脓杆菌无阳性检出,不同年份、不同级

别的小鼠均有阳性检出,但均呈下降趋势。大鼠肺炎克雷伯杆菌无阳性检出,小鼠仅 2014 年清洁级为阴性,其他均有阳性检出。

对阳性动物品系进行分析,螺杆菌阳性率相对较高的品系有 BALB/c、ICR、KM 等,仅 KM 阳性率升高,其它品系阳性率均下降。来自同一设施的 22 只清洁级 F1 小鼠螺杆菌全部为阳性。所有品系动物均检出牛棒状杆菌阳性。大多数品系的啮齿柠檬酸杆菌和牛棒状杆菌阳性率均呈升高趋势。金黄色葡萄球菌仅 SD 大鼠和 BALB/c 小鼠检出阳性。绿脓杆菌和肺炎克雷伯杆菌阳性样品均集中在小鼠。在动物饲养管理和使用过程中应加以关注(表 5,表 6)。

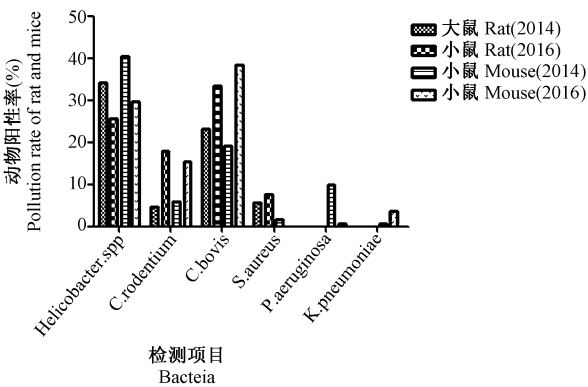


图 2 PCR 检测不同动物阳性率统计

Figure 2 Contamination rates of rats and mice determined by PCR

表 4 PCR 检测不同级别动物阳性率统计(%)

Table 4 Contamination rates of different level animals determined by PCR

检测项目 Bacteria	清洁级大鼠 CL rats		SPF 级大鼠 SPF rats		清洁级小鼠 CL mice		SPF 级小鼠 SPF mice	
	2014	2016	2014	2016	2014	2016	2014	2016
螺杆菌 <i>Helicobacter. spp</i>	20.00	38.89	39.74	21.67	87.50	75.82	24.61	16.46
啮齿柠檬酸杆菌 <i>C. rodentium</i>	6.67	33.33	3.85	13.33	6.25	8.79	5.76	17.41
牛棒状杆菌 <i>C. bovis</i>	43.33	66.67	15.38	23.33	12.50	21.98	21.47	43.04
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	20.00	33.33	0	0	6.25	0	0	0
绿脓杆菌 <i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	23.44	2.20	5.24	0.32
肺炎克雷伯杆菌 <i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	8.79	1.05	2.22

表 5 PCR 检测不同品系动物阳性率统计(%,2014 年)

Table 5 Contamination rates of different strains determined by PCR (2014)

品系 Strain	螺杆菌 <i>Helicobacter. spp</i>	啮齿柠檬酸杆菌 <i>C. rodentium</i>	牛棒状杆菌 <i>C. bovis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	绿脓杆菌 <i>P. aeruginosa</i>	肺炎克雷伯杆菌 <i>K. pneumoniae</i>
SD	32.76	8.62	34.43	10.34	0	0
Wistar	36.36	0	11.36	0	0	0
ZDF	33.33	0	0	0	0	0
C57	35	2.5	22.5	0	15	0
BALB/c	52.27	4.55	27.27	9.09	13.64	4.55
ICR	56.52	0	21.74	0	8.70	0
scid	16.67	22.22	22.22	0	22.22	0
KM	50	8.70	15.22	0	4.35	0
裸鼠	40	6.67	16.67	0	13.33	0
转基因	6.45	6.45	6.45	0	0	0
合计	38.57	5.51	20.39	2.75	6.89	0.55

表 6 PCR 检测不同品系动物阳性率统计(%,2016 年)

Table 6 Contamination rates of different strains determined by PCR (2016)

品系 Strain	螺杆菌 <i>Helicobacter. spp</i>	啮齿柠檬酸杆菌 <i>C. rodentium</i>	牛棒状杆菌 <i>C. bovis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	绿脓杆菌 <i>P. aeruginosa</i>	肺炎克雷伯杆菌 <i>K. pneumoniae</i>
SD	22.81	19.30	33.33	10.53	0	0
Wistar	35.29	17.65	35.29	0	0	0
ZDF	25	0	25	0	0	0
C57	8.22	12.39	34.25	0	1.37	8.22
BALB/c	11.11	12.70	47.62	0	1.59	4.76
ICR	37.04	0	37.04	0	0	0
Scid	0	58.33	41.67	0	2.78	0
KM	60.66	25.76	36.37	0	0	3.03
裸鼠	32	10.67	40	0	0	0
转基因	33.33	0	0	0	0	0
db/db	0	0	66.67	0	0	50
ob/ob	0	0	83.33	0	0	16.67
F1	100	0	13.63	0	0	0
合计	29.07	15.88	37.53	1.24	0.62	3.09

3 讨论

细菌病原学检测方法可分为传统的分离培养以及 PCR 等分子生物学方法。当前国际先进标准已广泛使用 PCR 方法对实验动物病原体进行监测,中国实验动物学会制定的团体标准中亦发布了部分病原体(如螺杆菌、牛棒状杆菌)的 PCR 检测规程。但我国国标目前主要采用分离培养法进行检测,尚未采用分子生物学方法。培养法需要培养基配制、采样、分离培养、染色镜检和生化鉴定等多个环节,存在检测周期长、操作流程繁琐、检测试剂的供应及标准化不足、对检测人员的专业技术要求较高等诸多不足,严重制约了我国实验动物质量标准以及检测体系的完善与发展。PCR 方法相较于传统分离培养法特异性强,敏感性高。在规范试验试剂、设备以及人员操作流程的前提下,可用于病原体的快速检测,尤其适用于大规模筛查。

国外先进标准中普遍要求实验大鼠、小鼠须排除的病原体,如螺杆菌、牛棒状杆菌、柠檬酸杆菌等均未出现在我国标准中。螺杆菌主要以隐性感染形式存在于动物消化道,可致小鼠肝炎、肝细胞瘤、盲肠结肠炎、胆肝炎等多种疾病,严重影响实验动物质量,已被公认为是啮齿类实验动物的重要致病菌。啮齿柠檬酸杆菌为肠杆菌科柠檬酸杆菌属成员之一,为条件性致病菌,可引起小鼠传染性结肠增生、腹泻、结肠炎甚至直肠脱垂等症状。对于免疫功能健全的成年小鼠,一般无明显症状。牛棒状杆菌可导致裸鼠表皮角化过度,俗称“鳞皮病”。无毛鼠和免疫缺陷鼠一旦感染,几乎终身携带。动物感染通常伴随体重减轻、摄水量增加、结膜充血、异种植物生长缓慢等现象,设施一旦污染很难清除^[6]。金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯杆菌是我国实验动物微生物学等级及监测标准(14922.2-2011)中明确规定 SPF 级实验大鼠、小鼠必须检测和排除的病原菌^[7],均属于条件性致病菌,正常存在于动物体内和环境中,当动物免疫功能低下时可感染动物。国外多数将其作为环境监测的参考指标,当评估认为该病原体可能会对正在进行的实验存在干扰时则要求监测。

本研究参照文献所述 PCR 检测程序,对上海地区实验鼠群进行大规模质量监测,并从设施、动物级别、动物品系等多角度全面系统地分析了当前实验大鼠、小鼠细菌的携带状况。数据显示,螺杆菌、

啮齿柠檬酸杆菌和牛棒状杆菌在不同级别动物上均有阳性检出。尤其是清洁级小鼠螺杆菌、所有级别动物的牛棒状杆菌和柠檬酸杆菌污染率高、污染范围广,应引起重视。啮齿柠檬酸杆菌、牛棒状杆菌、肺炎克雷伯杆菌阳性率呈明显上升趋势,但螺杆菌、绿脓杆菌阳性率均呈下降趋势。文献数据显示,螺杆菌呈全球性分布,Charles River 对北美和欧洲实验鼠群螺杆菌进行调查发现,螺杆菌是实验鼠群主要流行的病原体。金黄色葡萄球菌是日本实验大鼠和小鼠流行最普遍的病原体,小鼠设施阳性率达 18.8%,大鼠设施阳性率达 58.62%,欧美小鼠金黄色葡萄球菌的携带率为 6%~11%,啮齿柠檬酸杆菌感染率极低^[8-10]。我国北京、广东等地区也有螺杆菌、牛棒状杆菌、金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌阳性报道^[11-14]。由此可见,国内外实验鼠群病原体污染的流行趋势基本一致。

虽然 PCR 方法具备精准、高效、便捷的优势,仍需结合经典方法进行验证。笔者认为后续应进一步溯源至阳性的设施和品系,开展细菌的分离培养及鉴定等病原学方面的工作,以全面细致了解本市实验动物生产设施内上述细菌的分布情况。本研究的调查结果对于提高实验动物质量和饲养管理水平起促进作用,为我国实验动物国家标准的修订和完善提供依据和参考。鉴于上述病原体对于动物本身及从业人员和环境的影响,生产单位作为国内实验动物的源头,应结合行业发展趋势,加强饲养管理,制定并优化监测方案,从而提高动物品质和企业竞争力。

参考文献:

- [1] Mahler Convenor M, Berard M, Feinstein R, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental unit [J]. Lab Anim, 2014, 48(3): 178-192.
- [2] Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene [J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(7): 1654-1660.
- [3] 谭燕玲,朱瑞良,王慧,等.鸡胚胎性病原菌多重 PCR 检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2011,33(5):374-377.
- [4] Riley LK, Franklin CL, Hook RR Jr, et al. Identification of murine helicobacters by PCR and restriction enzyme analyses [J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(4): 942-946.
- [5] 冯洁,谢建云,张泉,等.啮齿柠檬酸杆菌 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2017,39(5):393-397.

(下转第 116 页)